



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

에탄올 급성 투여가 랫트의  
간과 신장에서 시스테인으로부터  
글루타치온과 타우린의 생성에  
미치는 영향

2013년 2월

서울대학교 대학원  
약학과 예방약학 전공  
이 유 민

에탄올 급성 투여가 랫트의 간과  
신장에서 시스테인으로부터 글루타치온과  
타우린의 생성에 미치는 영향

The effects of an acute ethanol administration  
on the hepatic and renal metabolic conversion  
of cysteine to glutathione and taurine in rats

지도교수 김 영 철

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2012년 11월

서울대학교 대학원

약학과 예방약학 전공

이 유 민

이유민의 석사학위논문을 인준함

2012년 12월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 정 진 호 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ 이 병 훈 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 김 영 철 \_\_\_\_\_ (인)

## 요약(국문초록)

글루타치온은 많은 친전자성, 산화성 화합물을 무독화하여 산화적 스트레스를 억제하는 역할을 하는 주요 생체 물질이며, 따라서 글루타치온의 조직 내 함량은 세포가 처한 산화적 환경에 따라 역동적으로 변화한다.

본 실험에서는 수컷 랫트에 에탄올을 급성 (3 g/kg bw, ip, 단회) 투여한 뒤 6 시간과 24 시간 경과 후의 간, 신장 및 혈액에서의 변화를 측정하여, 급성적인 에탄올 투여가 글루타치온 합성에 주는 영향을 연구하였다. 특히 시스테인의 글루타치온과 타우린으로의 경쟁적 대사 전환에 대한 변화에 주목하였다.

에탄올을 투여한 지 6 시간 경과 후, 글루타치온은 간과 신장 조직 모두에서 감소하였지만, 간에서는 글루타치온의 감소가 24 시간 동안 지속된 반면 신장에서는 24 시간 이내에 회복되었다. 특히 간에서 산화된 형태로 존재하는 글루타치온 (GSSG) 이 빠르게 증가하여, 에탄올에 의해 발생한 산화적 스트레스가 글루타치온 농도의 변화를 유발하였음을 알 수 있다.

이러한 글루타치온의 감소 기전을 밝히기 위해, 글루타치온 생합성을 위해 요구되는 시스테인의 양을 측정하였다. 에탄올 투여 6 시간 후, 간과 신장 내 시스테인은 감소하였다. 하지만 24 시간 이후, 간에서는 이러한 감소 상태 및 정도가 유지되었지만 신장과 혈액 중 시스테인은 증가하였다. 따라서 글루타치온 생성 반응의 기질인 시스테인의 감소가 간과 신장에서 글루타치온의 감소를 유발하였으며, 간과 달리 신장에서 글루타치온이 더 빠르게 복구된 것은 시스테인의 증가에 기인한 것으로 해석 될 수 있다.

시스테인은 글루타치온 뿐만 아니라 하이포타우린과 타우린을 생성하는데 필요한 전구체이기도 하므로 하이포타우린과 타우린의 양의 변화를 측정해 보았다. 에탄올 투여 6 시간 경과 시, 간과 신장에서 하이포타우린이 증가하였으며 간과 혈액에서 타우린이 증가하였다. 하지만 24 시간 경과 시, 간과 신장에서 하이포타우린이 감소하였고 간과 혈중 타우린도 회복되었다.

또한 이 대사의 속도 결정 효소인 cysteine dioxygenase (CDO) 는 6 시간 경과 후 간 내 mRNA, 단백질의 양, 그리고 효소 활성이 모두 증가하였으나 24 시간 후 모두 감소하는, 유동적인 양상을 보였다. 이것은 에탄올은 CDO 의 조절을 통해 시스테인으로부터 하이포타우린과 타우린으로의 대사를 빠르게 항진시키나 24시간 이내에 역전되어 오히려 CDO 는 억제된다는 점을 알 수 있다.

이러한 결과들은 기존에 보고된 글루타치온의 소모 또는 간으로부터 혈중으로의 유출 증가라는 요소들 이외에 랫트의 간에서 CDO의 유도를 통한 시스테인으로부터 하이포타우린과 타우린으로의 대사의 증진, 그로부터 시스테인 이용의 제한이 에탄올의 급성 투여에 의한 글루타치온 고갈의 중요한 원인임을 시사한다.

**주요어 : 에탄올, 글루타치온, 시스테인, (하이포)타우린,  
Cysteine dioxygenase (CDO),  
Glutamate cysteine ligase (GCL)**

**학 번 : 2011-21755**

# 목 차

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 국문초록 .....                  | 1  |
| 목 차 .....                   | 3  |
| List of Figures .....       | 5  |
| 서 론 .....                   | 8  |
| 실험 재료 및 방법 .....            | 12 |
| 1. 시약 및 화학물질 .....          | 12 |
| 2. 동물 실험 모델 .....           | 14 |
| 3. 혈액 및 조직의 분획 분리 .....     | 14 |
| 4. 글루타치온의 함량 측정 .....       | 15 |
| 5. 시스테인의 함량 측정 .....        | 16 |
| 6. 하이포타우린과 타우린의 함량 측정 ..... | 17 |
| 7. 단백질 함량 측정 .....          | 18 |
| 8. 효소 활성 측정 .....           | 18 |
| 9. 단백질 발현 측정 .....          | 20 |
| 10. 유전자 발현 측정 .....         | 20 |
| 11. 통계 처리 .....             | 21 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 결 과 .....                             | 23 |
| 1. 글루타치온 함량에 대한 에탄올의 영향 .....         | 23 |
| 2. 시스테인 함량에 대한 에탄올의 영향 .....          | 30 |
| 3. 하이포타우린 또는 타우린 함량에 대한 에탄올의 영향 ..... | 35 |
| 4. GCL-c 발현에 대한 에탄올의 영향 .....         | 40 |
| 5. CDO 효소 활성 및 발현에 대한 에탄올의 영향 .....   | 46 |
| 고 찰 .....                             | 56 |
| 참고문헌 .....                            | 63 |
| Abstract .....                        | 69 |

## List of Figures

|   |    |
|---|----|
| Scheme 1. Metabolism of ethanol .....   | 8  |
| Scheme 2. Simplified metabolic pathway for biosynthesis of<br>glutathione and hypotaurine/taurine ..... | 10 |
| Figure 1. The effects of EtOH on the hepatic concentration of<br>total glutathione .....                | 25 |
| Figure 2. The effects of EtOH on the hepatic concentration of<br>oxidized glutathione .....             | 26 |
| Figure 3. The effects of EtOH on the oxidized / reduced<br>glutathione .....                            | 27 |
| Figure 4. The effects of EtOH on the renal concentration of<br>total glutathione .....                  | 29 |
| Figure 5. The effects of EtOH on cysteine availability<br>for GSH synthesis in the liver .....          | 31 |
| Figure 6. The effects of EtOH on cysteine availability<br>for GSH synthesis in the kidney .....         | 33 |



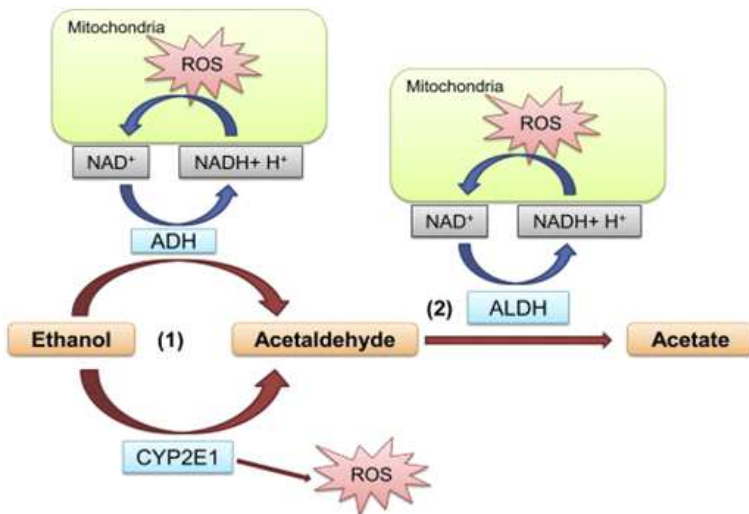
|  |    |
|--|----|
| Figure 7. The effects of EtOH on cysteine levels in blood .....  | 34 |
| Figure 8. The effects of EtOH on hepatic hypotaurine and<br>taurine levels .....                           | 36 |
| Figure 9. The effects of EtOH on renal hypotaurine and<br>taurine levels .....                             | 38 |
| Figure 10. The effects of EtOH on plasma taurine levels .....  | 39 |
| Figure 11. The effects of EtOH on hepatic expression of<br>glutamate cysteine ligase (GCL-c) protein ..... | 41 |
| Figure 12. The effects of EtOH on renal expression of<br>glutamate cysteine ligase (GCL-c) protein .....   | 42 |
| Figure 13. The effects of EtOH on gene expression of<br>glutamate cysteine ligase (GCL-c) in liver .....   | 44 |
| Figure 14. The effects of EtOH on gene expression of<br>glutamate cysteine ligase (GCL-c) in kidney .....  | 45 |
| Figure 15. The effects of EtOH on hepatic<br>cysteine dioxygenase (CDO) enzymatic activity .....           | 47 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 16. The effects of EtOH on hepatic<br>cysteine dioxygenase (CDO)protein expression<br>at t=6 hr .....   | 49 |
| Figure 17. The effects of EtOH on hepatic<br>cysteine dioxygenase (CDO) protein expression<br>at t=24 hr ..... | 50 |
| Figure 18. The effects of EtOH on renal cysteine dioxygenase<br>(CDO) protein expression at t=6 hr .....       | 51 |
| Figure 19. The effects of EtOH on renal cysteine dioxygenase<br>(CDO) protein expression at t=24 hr .....      | 52 |
| Figure 20. The effects of EtOH on hepatic gene expression of<br>cysteine dioxygenase (CDO) .....               | 54 |
| Figure 21. The effects of EtOH on renal gene expression of<br>cysteine dioxygenase (CDO) .....                 | 55 |

# 서론

단독 또는 반복적인 에탄올 (ethanol) 투여에 의해 간 내 글루타치온 (glutathione) 의 감소가 발생함이 동물실험과 임상시험을 통해 오래 전부터 보고되어왔다 (Macdonald et al., 1977; Guerri and Grisolia, 1980; Feo et al., 1986; Vendemiale et al., 1989). 이러한 현상을 보고한 논문들은 에탄올에 의한 간 내 글루타치온의 고갈 현상을 설명하기 위한 다양한 기전들을 제시해왔다.

에탄올은 체내 대사 과정에서 아세트알데히드 (acetaldehyde) 와 ROS (reactive oxygen species) 를 생성하여, 산화적 스트레스를 일으키고 독성을 유발한다 (Scheme 1). 따라서, 글루타치온과 과산화된 지질과의 반응 및 아세트알데히드와의 결합이 증가하여 글루타치온의 소모가 증대되므로, 간 내 글루타치온은 감소한다 (Videla et al., 1980; Vina et al., 1980; Kera et al., 1985b).



Scheme 1. Metabolism of ethanol

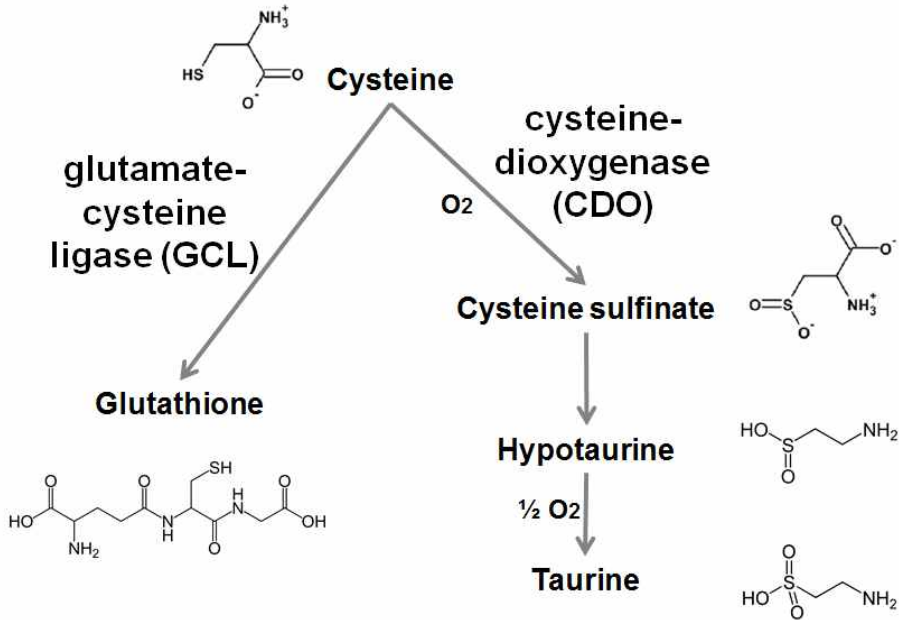
또한 에탄올에 노출된 간세포에서 배지 (medium) 내 글루타치온의 농도가 증가하였으며, 에탄올 단회 투여에 의해 랫트의 간정맥 내 글루타치온 농도가 상승한 결과들은 에탄올이 간으로부터 혈중으로의 글루타치온 유출을 증가시킨다는 기전을 입증한다 (Fernandez-Checa et al., 1987; Choi et al., 2000).

마지막으로, 글루타치온의 생합성을 억제함으로써 간 내 글루타치온을 감소시킨다는 주장이 제기되어왔다 (Speisky et al., 1985; Lu et al., 1999; Kim YC et al., 2003). 이들 보고에서는 연령이 높은 랫트나 고지방 식이의 섭취를 동반한 랫트에서 단기 또는 장기적인 에탄올 투여가 시스테인으로부터 글루타치온을 생성하는 대사의 속도 결정 효소인 glutamate cysteine ligase (GCL) 의 발현의 감소 또는 활성의 억제를 유발하는 것을 확인한 바 있다.

본 연구는 위에서 언급한, 에탄올 투여에 의해 유도되는 글루타치온의 농도 감소에 기여하는 여러 요인들 중, 글루타치온의 생성에 영향을 주는 요소들의 변화를 더욱 체계적으로 규명하고자 하였다.

글루타치온의 합성 과정은 (Scheme 2) 에서 간략히 제시하였다. 시스테인 (cysteine) 을 필수기질로 이용하여, GCL 효소의 작용에 의해 최종 생성물로 글루타치온이 생성된다. 또한 시스테인은 타우린 (taurine) 의 대사 전구체이다. cysteine dioxygenase (CDO) 효소는 시스테인을 cysteine sulfinic acid (CSA) 로 산화시키고, CSA 는 하이포타우린 (hypotaurine) 을 경유해 타우린으로 전환된다. 즉, 시스테인은 글루타치온과 타우린의 생합성 과정에서 공통적으로 필요로 하는 기질이며, 시스테인의 이용은 서로 경쟁적이므로, 세포 내 시스테인의 농도는 양쪽 대사 과정의 활성화에 따라 결정된다

(Dominy Jr JE et al., 2007).



Scheme 2. Simplified metabolic pathway for biosynthesis of glutathione and hypotaurine / taurine

역으로, 시스테인의 농도가 두 대사 경로를 변동시키는 조절 요소로 작용한다. GCL 과 CDO 의 활성이 시스테인의 농도에 의해 조절되며, 이러한 조절의 원리 및 생리적 의의는 생체내의 글루타치온에 대한 요구를 충족하고, 시스테인 농도의 항상성을 유지하기 위한 필요성이 존재하기 때문일 것이라고 해석되고 있다 (Stipanuk et al., 1992; Kwon and Stipanuk, 2001).

이와 같이, 시스테인 농도의 변화를 매개하여 상호 연관된, GCL 과 CDO 가 관여하는 두 대사 경로는 함께 고려되어야 할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 급성의 에탄올 투여에 의해 유도된 글루타치온 감소의 기전을 확인하기 위해, 글루타치온의 생성을 제한하는 두 가지 요소인 시스테인의 공급과 속도 결정 효소인 GCL 의 활성뿐만 아니라, 특히 시스테인으로부터 타우린으로의 대사에 대한 에탄올의 영향에 주목하여 글루타치온의 합성에 영향을 주는 요소들의 변화를 측정하였다.

# 실험 재료 및 방법

## 1. 실험재료

### 1.1. 시약 및 화학물질

$\beta$ -NADPH, adenosine triphosphate (ATP), GSH reductase, glutamate, ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA), folin-cioalteau's phenol reagent, 4-nitrophenol, ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, cysteine sulfinat, hypotaurine, taurine, boric acid, sodium acetate, GSH, tetramethylethylenediamine (TEMED), bromophenol blue, naphthol blue black, *O*-phthalaldehyde (OPA), 5-sulfosalicilic acid (SSA), nynhydrin, acetonitrile, tetrahydrofuran, trichloroacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic dianhydride (DTPA), 3-morpholinosydnonimine hydrochloride (SIN-1), 그리고  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methiolbutyric acid (KMBA) 는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다.

2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) 는 Wako Chemicals USA (Richmond, VA, USA) 에서,  $\gamma$ -Glutamylcysteine 는 Kohjin Co. (Tokyo, Japan) , Dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, Tris-acid 는 Amresco Inc. (Cochran Road Solon, OH, USA) , Diethyl ether, hydrogen chloride (HCl) 는 Daejung Chemicals & Metals Co. (경기도 시흥시) 에서 구입하였다.

Ethanol, sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl),

Propylene glycol, sodium hydroxide, perchloric acid, formaldehyde, acetic acid 는 Duksan Pure Chemical Co. (경기도 안산시) 에서 구입하였다.

Skim milk, Bis/Acryl amide solution, amido black, ECL reagent, bovine serum albumin (BSA) 은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석에 사용한 methanol 은 Burdick and Jackson 사 (Muskegon, MI, USA) 에서 구입하였다. 그 외, 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

## 1.2. 항체

GAPDH polyclonal 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다. Anti-CDO polyclonal 항체는 Yu Hosokawa 교수님 (Jissen Women's University, Tokyo, Japan) 으로부터 공여 받았다. Anti-GCL polyclonal 항체는 Abcam, Inc. (Cambridge, MA, USA) 에서 구입하였다.

모든 1 차 항체는 5 % 의 BSA 에 적절한 비율로 희석하여 사용하였으며, 사용 후 4 °C 에 보관하였다. 각 항체의 희석 비율은 각각의 data sheet 에 따랐다.

2 차 항체인 HRP conjugated goat anti-rabbit 은 Jackson Immuno Research (West Grove, PA, USA) 에서, donkey anti-mouse 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다.



## 2. 동물 실험 모델

실험 동물로 수컷 SD (Sprague-Dawley) 랫트 (8 주령, 300 - 350 g) 를 (주) 중앙 실험동물 에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전 1 주 이상  $55 \pm 5$  % 의 습도,  $22 \pm 2$  °C 의 온도 및 환기가 조절된 서울대학교 약학대학 141 동 동물 실험 연구동에서 동물을 적응시켰으며, 오전 7 시와 오후 7 시를 기준으로 12 시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 에탄올은 생리식염수에 40 % v/v 이 되도록 희석하여 사용하였으며, 대조군으로는 투여하지 않았거나, vehicle 만 투여한 동물을 사용하였다.

랫트에 에탄올을 3 g/kg bw 의 용량으로 일회, 복강 투여한 후, 투여 6 시간과 24 시간 뒤에 diethyl ether 로 마취한 상태에서 개복하여, 복대 동맥 채혈한 후 간과 신장을 적출하였다.

## 3. 혈액 및 조직의 분획 분리

### 3.1. 혈장의 분리

헤파린 처리된 syringe 를 사용하여 채혈한 후, 15,000 rpm 에서 약 40 초간 원심 분리한 상등액 (혈장) 을  $-70$  °C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 에 보관하였다.

### 3.2. 간과 신장의 S9 분획 분리

랫트를 diethyl ether 로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 간과 신장에 4 배 용량의 1.15 % KCl 완충 용액을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후 4 °C , 10500 rpm 에서 high speed centrifuge (Model J2,-MC, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) 로 약 20 분간 원심분리하고 상등액 (S9 fraction) 을 취하였으며, 이 분획을 효소 활성, 단백질 함량과 발현 및 TOSC 측정에 사용하였다. S9 분획은 실험 시까지 -70 °C 이하로 유지되는 deep freezer (Model ULT-1490, REVCO, Asheville, NC, USA) 에 보관하였다.

## 4. 글루타치온의 함량 측정

간과 신장 내 GSH 는 enzymatic recycling method 를 이용하여 측정하였다 (Griffith, 1980). 간과 신장에 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA-TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 로 분쇄한 후, 분쇄액에 2mM EDTA 가 함유된 1 M HClO<sub>4</sub> 를 1:1 의 비율로 가해 혼합한 후, 시료를 약 15,000 rpm 에서 10 분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 분석시까지 -70 °C 이하의 deep freezer 에 보관하였다.

상등액에 phosphate 완충액 (phosphate 0.125 M, EDTA 6.3 mM, pH 7.5) 을 사용하여 GSH 농도가 표준 검량선 농도 범위 내에 들

도록 희석한 후 total GSH 정량을 위한 검체로 사용하였다. 1.5 ml tube 에 0.3 mM NADPH 용액 700  $\mu$ l, 6 mM DTNB (5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) 용액 100  $\mu$ l, 검체 또는 GSH 표준액 200  $\mu$ l을 가하여 잘 섞은 후 35  $^{\circ}$ C 에서 4 분간 방치하였다. 여기에 GSH 측정을 위해 12.5 units/ml 농도의 GSH reductase 를 60  $\mu$ l 가하였다. 잘 섞은 후 UV/VIS spectrophotometer (model V-530, Jasco, Tokyo, Japan) 을 이용하여 412 nm 에서 약 40 초간 흡광도의 변화를 측정하여 linear 한 30 초간의 기울기 변화를 구하고 표준 검량선 으로부터 GSH 의 농도를 환산하였다.

한편, GSSG 측정은 GSH 측정 시와 동일한 시료에 GSH 를 제거 하기 위해 2-vinyl pyridine 을 가하고 상온에서 10 분간 잘 섞어주었다. 40 units/ml 농도의 GSH reductase 를 사용하여 GSH 측정과 동일한 방법으로 정량하였다. GSSG 는 두 분자의 GSH 로 환산하였다.

## 5. 시스테인의 함량 측정

간과 신장의 시스테인 함량은 GSH 의 함량을 측정하기 위해 분리한 시료를 사용하였다. 혈중 시스테인 농도 측정을 위해서는 혈장과 10 % 의 sulfosalicylic acid 를 2:1 의 비율로 혼합한 후, 약 15,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C 에서 10 분간 원심 분리한 상등액을 사용하였다.

Cysteine 함량은 Gaitonde (1967) 의 방법을 이용하여 측정하였다. 10 분간 100  $^{\circ}$ C 에서 100  $\mu$ l 의 산성 ninhydrin 용액, 100  $\mu$ l 의

acetic acid 와 100 ul 의 시료를 반응시킨 후 즉시 얼음물로 식혔다. 95 % 에탄올 670  $\mu$ l 를 가하여 안정화시키고 20 - 30 분 후 560 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 농도의 계산은 표준 검량선 으로부터 계산하였다.

## 6. 하이포타우린과 타우린의 함량 측정

적출한 간과 신장에 각 4 배 용량의 1.15 % KCl 을 가하여 약 1 분 정도 polytron (ULTRA- TURRAX T-25, IKA-Labortechnik, Germany) 으로 분쇄한 후, 분쇄액과 methanol 을 1:3 의 비율로 잘 혼합하여, 15000 rpm 에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액을 증류수와 1:2 의 비율로 잘 혼합하고, 이 시료를 분석 시까지 -70 °C 이하의 deep freezer 에 보관하였다.

정량을 위해 *O*-phthaldialdehyde (OPA) 을 이용하여 유도체화 하였는데, 시료 40 ul 와 OPA 200 ul 를 1.5 ml tube 에서 2 분간 반응시킨 후, fluorometric 검출기 (FS-980 fluorescence detector, Applied Biosystem, Foster, CA, USA) 와 역상 column 을 장착한 HPLC 로 측정하였다. 0.1M sodium acetic acid (Solvent A; pH = 7.2) 와 methanol + tetrahydrofuran = 97 + 3 (v/v) (Solvent B) 을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기 위해 2개의 pump (Jasco Model PU-980, Jasco Co., Tokyo, Japan) 를 이용하였다. 농도 구배는 Rajendra의 방법 (1987) 을 약간 변화시켜 Solvent A 를 0 분에 90 % 로, 0 - 4 분에 84 % 로, 4 - 12 분에 84 % 로, 12 - 18

분에 78 % 로, 18 - 22 분에 78 % 로, 22 - 26 분에 70 % 로, 26 - 30 분에 70 % 로, 30 - 47 분에 53 % 로, 47 - 51 분에 53 % 로, 51 - 56 분에 30 % 로, 56 - 58 분에 0 % 로, 58 - 62 분에 0 % 로, 62 - 63 분에 90 % 로 변화시켰으며 온도 40 °C 에 유속은 1.0 ml/min 이었다. taurine, hypotaurine의 표준 검량선 으로부터 시료에 포함된 각각의 물질을 정량하였으며, 각각의 retention time 은 32, 21 분이였다.

## 7. 단백질 함량 측정

단백질 총량은 Lowry 등 (1951) 의 방법으로 측정하였다. 시험관에 150  $\mu$ l 의 단백질 희석액을 넣고 Lowry complex (2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : 1 % (w/v) copper sulphate : 2 % (w/v) potassium sodium tartrate = 100 : 1 : 1) 750  $\mu$ l 를 가하고 즉시 혼합했다. 10 분 후 75  $\mu$ l 의 0.1 N folin-ciocalteau's phenol 시약을 가하고 즉시 혼합한 다음 30 분 후에 750 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 bovine serum albumin (BSA) 을 이용하였으며 작성된 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 계산하였다. 이를 이용해 효소 활성 측정 및 단백질 발현 측정에 적용하였다.

## 8. 효소 활성 측정

### 8.1. Cysteine dioxygenase (CDO) 활성 측정

CDO의 활성은 Stipanuk 등의 방법 (2008) 에 따라 측정하였다. 반응액은 0.5 mM ferrous ammonium sulfate, 5 mM hydroxylamine HCl, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 5 mM cysteine 과 1 mg protein으로 구성되었으며 총 반응액의 부피는 1 ml 이었다. 37 °C 에서 17 분간 반응시키고 cold methanol 2.5 ml 을 가하여 반응을 종결시켰다. 생성된 cysteine sulfinate 을 *O*-phthalaldehyde / 2-mercapto-ethanol 으로 유도체화 하였고, fluorescence detector 와 3.5  $\mu$ m Kromasil C18 column (4.6  $\times$  100 mm, EkaChemicals, Bohus, Sweden) 이 장착된 HPLC system 으로 정량하였다.

### 8.2. $\gamma$ -Glutamyl cysteine lygase (GCL) 활성 측정

GCL 활성은 Sekura 와 Meister 의 방법 (1977) 을 사용하였다. 반응액은 0.1 M tris-HCl / 0.15 M KCl (pH 8.2), 10 mM ATP, 10 mM L-glutamate, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 5 mM cysteine 과 250 ug protein 으로 구성되었다. 3 분 동안 preincubation 한 후 cysteine 을 가하고 37 °C 에서 15 분 동안 반응시킨 후 생성된  $\gamma$ -glutamylcysteine 을 *O*-phthalaldehyde 으로 유도체화 하였다. Yan과 Huxtable (1995) 의 HPLC separation/fluorometric detection 방법을 사용하였다. HPLC system 은 PU-980 pump, FP-920 fluorescence detector (Jasco Co., Tokyo, Japan), 3.5 $\mu$ m Symmetry C18 column (4.6  $\times$  75 mm, Waters Co., Milford, MA, USA) 으로 구성되었다.

## 9. 단백질 발현 측정 (Western blot)

Laemmli 의 방법 (1970) 에 따라 각 분획의 단백질을 sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하였다. 7.5 % separating gel 을 제조하기 위해 3.95 ml 의 증류수와 2.5 ml 의 1.5 M Tris 완충액 (pH 8.8) 및 3 ml 의 30 % acrylamide/bis 용액을 섞었다. 위의 용액에 즉시 조제한 10 % ammonium persulfate 60 ul 와 TEMED 5 ul 를 가하여 미리 준비된 gel 굳힘용 유리판 사이에 붓고 그 위에 증류수를 가하여 gel 표면을 고르게 한 후 약 1 시간 가량 방치하여 굳혔다. 12 % separating gel 은 7.5 % gel 의 조성 중 증류수는 2.85 ml, 30 % acrylamide/bis 용액은 4 ml 로 변화시켜 만들었다. Separating gel 이 굳은 후 gel 표면의 증류수를 조심스럽게 제거하였으며, 다음의 조성에 따라 stacking gel 을 가한후 comb 을 꽂아 sample loading 준비를 하였다. Stacking gel 은 3.36 ml 의 증류수, 0.5 M Tris (pH 6.8) 1.5 ml, 30 % acrylamide/bis 용액 780 ul, 10 % ammonium persulfate 45 ul 와 TEMED 6 ul 를 가해 제조하였다. 전기 영동할 시료는 sample dilution buffer (1 M Tris (pH 6.8) 2.5 ml, 80 % glycerol 5 ml, 20 % SDS 5 ml, 1 % bromophenol blue 0.2 ml, b-mercaptoethanol 2 ml 과 증류수 5.3 ml 포함) 를 가해 적절한 농도로 희석하고, 95 °C 에서 5 분간 가열하여 준비하였다. 준비된 gel 에 시료를 loading 한 후 running buffer (1 L 의 용액 중에 Trizma base 3.04 g, glycine 14.42 g, 20 % SDS 5 ml 포함) 내에서 전기영동 하였다. 전압은 stacking gel 에서 100 volts 가 되

도록 하고, separating gel 에서는 160 volts 를 유지하였다. 전기영동이 끝난 후 80 volts 에서 2 시간 동안 gel 을 nitrocellulose (NC) 지에 전이하였다. 이 때 사용한 transfer buffer 는 1 L 용액 중에 tris base 3.04 g, glycine 14.42 g 및 200 ml 의 methanol 이 포함되었다. 전이가 끝난 NC 지는 단백질을 염색시키는 amido black 용액을 이용해 전이과정이 정상적으로 이루어졌는지 확인하였으며, 5 % non-fat milk 용액에 담가 상온에서 1 시간 방치하여 비특이성 결합을 방지하고, 0.05 % Tween 20 을 함유한 Tris buffer (TBST) 로 3 회 이상 세척한 후 1 차 항체를 사용하여 4 °C 에서 하룻밤 방치하였다. 1 차 항체는 5 % bovine serum albumin 용액에 희석하였다. 다음날 5 % non-fat milk 용액으로 희석한 2 차 항체로 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescence system (Amersham, Gaithersburg, MA, USA) 을 사용하여 발색하였다.

## 10. 유전자 발현 측정

간과 신장 조직 내 CDO 와 GCL 의 유전자 발현을 quantitative-real time PCR 을 이용해 측정하였다.

먼저, 간과 신장 조직으로부터 AGPC ( Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform ) 방법을 이용해 RNA 를 추출한 후, Nano drop spectrophotometer 를 이용해 정량하고 순도를 확인하였다. 1 ug/ ul 로 희석한 RNA 를 주형으로 역전사하여 cDNA 를 얻고, Nano drop spectrophotometer 를 이용해 정량하고 순도를 평가하였다.



cDNA를 150 ng/ ul 로 희석한 후, 각 유전자에 특이적인 primer (Table 1.) 를 사용해 cDNA 를 증폭시키면서, 그 과정에서 SYBR GREEN I<sup>®</sup> 과의 결합 방식을 이용한 실시간 형광 측정을 통해 증폭곡선을 얻고, 일정한 증폭에 도달하는데 걸리는 시간을 비교하여 유전자 발현을 정량하였다.

| gene  | Forward sequence (5' → 3') | Reverse sequence (5' → 3') |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| gapdh | GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG     | ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA      |
| cdo   | GCTGGAAGCCTACGAGAGCAA      | AGCAGTGGGAGTCCGTGTGA       |
| gcl-c | CTGCACATCTACCACGCAGTCA     | ATCGCCGCCATTCAGTAACAA      |

**Table 1. Primer sequences for target genes (cdo, gcl-c) or endogenous control (gapdh)**

## 11. 통계 처리

모든 실험 결과는 mean ± SEM 으로 표시하였으며, two-tailed Student's *t*-test 로 유의성 여부를 판정하였다. 통계적인 유의성은 *P* 값이 0.05 미만인 경우를 기준으로 판정하였으며 0.05 이상이지만 유의성이 있다고 판단되는 경우 *P* 값을 표시하였다.

## 결 과

### 1. 간과 신장의 글루타치온 함량에 대한 에탄올의 영향

#### 1.1 에탄올 투여가 간의 총 글루타치온 (total glutathione; tGlutathione) , 산화형 글루타치온 (GSSG; oxidized glutathione) , 및 환원형 글루타치온 (GSH; reduced glutathione) 에 대한 산화형 글루타치온의 비율 (GSSG/GSH) 에 미치는 영향

급성 투여된 에탄올이 랫트의 간 내에 존재하는 글루타치온의 함량에 주는 영향을 밝히기 위하여, 먼저 간 내 글루타치온 총량을 측정하였다 (Fig. 1). 에탄올을 투여한 지 6 시간이 경과한 후 측정하였을 때, 총 글루타치온의 함량은 투여를 하지 않은 정상 대조군 (normal control; n.c)에 대하여 약 66 %, 동시간대에 생리식염수를 투여한 대조군 (saline + 6 hr; s6) 의 약 88 % 수준으로서, 각각 유의적으로 감소하였다.

에탄올 투여 24 시간 경과 후 측정 시에는, n.c 대비 약 74 %, 생리식염수를 투여한 뒤 24 시간 경과 후에 얻은 대조군 (saline + 24 hr; s24) 의 측정값에 대비하여 약 84 % 수준으로, 간 내 글루타치온 총 함량이 각각 유의적으로 감소한 상태를 보였다.

이러한 결과는 에탄올 투여 후 6 시간 이내에 감소한 간 내 글루타치온의 함량이 24 시간 이내에는 회복되지 않고, 따라서 이러한

감소 상태가 적어도 24 시간 동안 유지되었음을 보여준다.

반면, 간 내에서 산화된 형태로 존재하는 글루타치온의 함량은, 총 글루타치온 함량의 감소에도 불구하고, 에탄올 투여 후 6 시간이 경과하는 동안 s6 과 대비하여 약 1.3 배 이상 유의적으로 증가하였다. 증가한 산화형의 글루타치온 함량은 24 시간 이내에 감소하여 24 시간 이후, 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않는 수준으로 회복되었다 (Fig. 2).

특히, 산화된 형태로 존재하는 글루타치온의, 환원형의 글루타치온에 대한 비율을 통하여 산화형이 차지하는 함량 비를 계산한 결과를 나타낸 Fig. 3 을 보면, 정상적인 비율의 범위는 2.7 ~ 2.8 % 임을 확인할 수 있다. 하지만, 에탄올 투여 6 시간 경과 후 이 비율은 약 3.7 % 로서, 1.4 배 정도 유의적으로 상승하였다가, 이후에는 감소하는 양상을 보여, 24 시간 경과 후 정상 수준에 도달하였다 (Fig. 3).

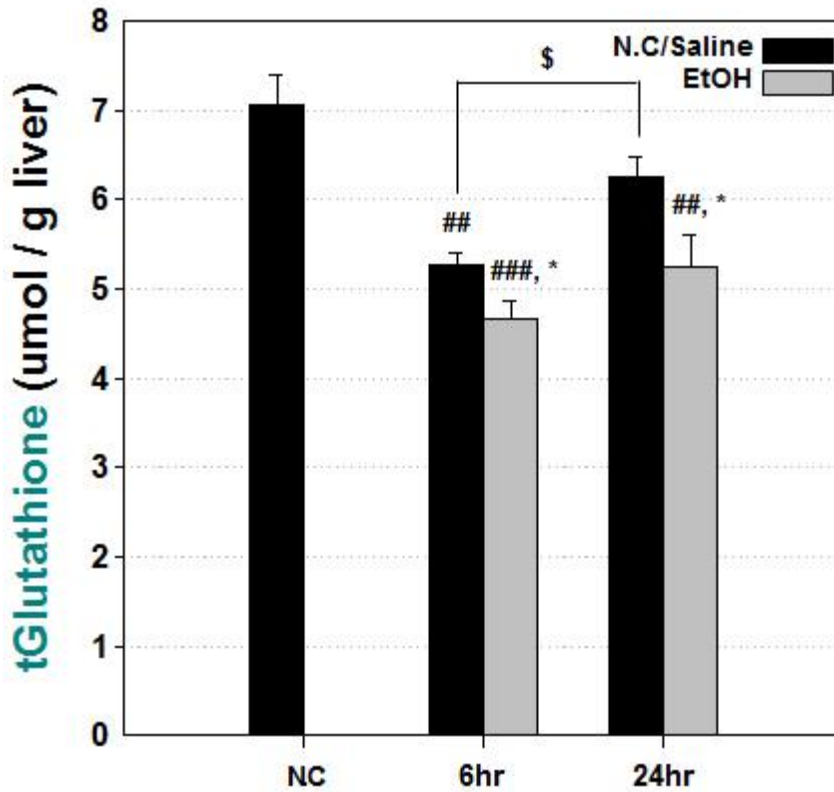


Fig. 1 The effects of EtOH on the hepatic concentration of total glutathione

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 4 rats

<sup>##</sup>,  $P < 0.01$  / <sup>###</sup>,  $P < 0.001$  vs. N.C

<sup>\*</sup>,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time

<sup>\$</sup>,  $P < 0.05$  : saline + 6 hr vs. saline + 24 hr

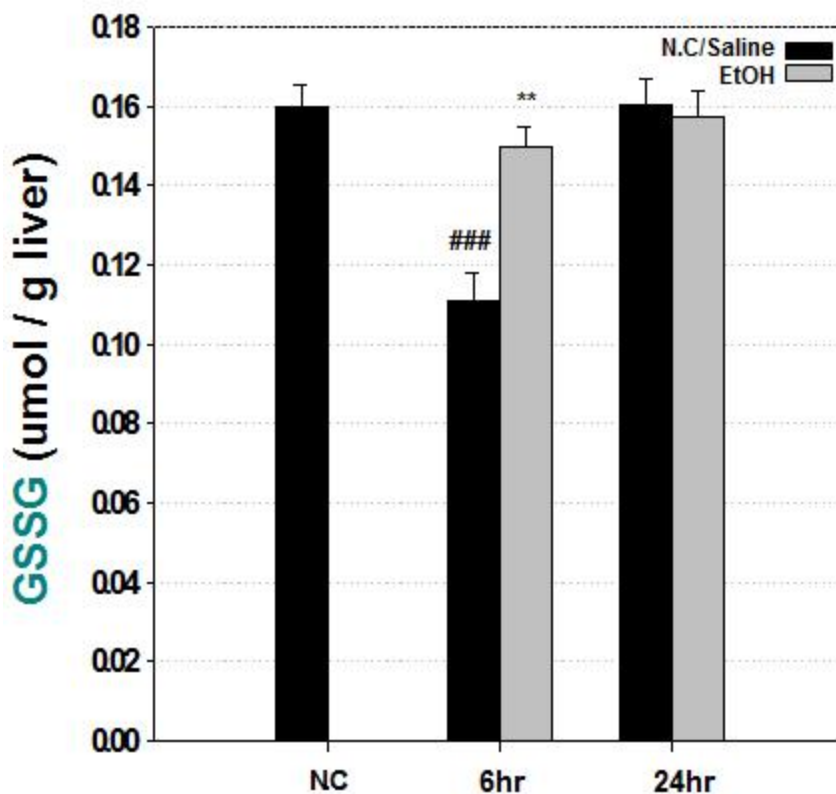


Fig. 2 The effects of EtOH on the hepatic concentration of oxidized glutathione

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 5 rats

###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*\* ,  $P < 0.01$  vs. saline group administrated at the same time

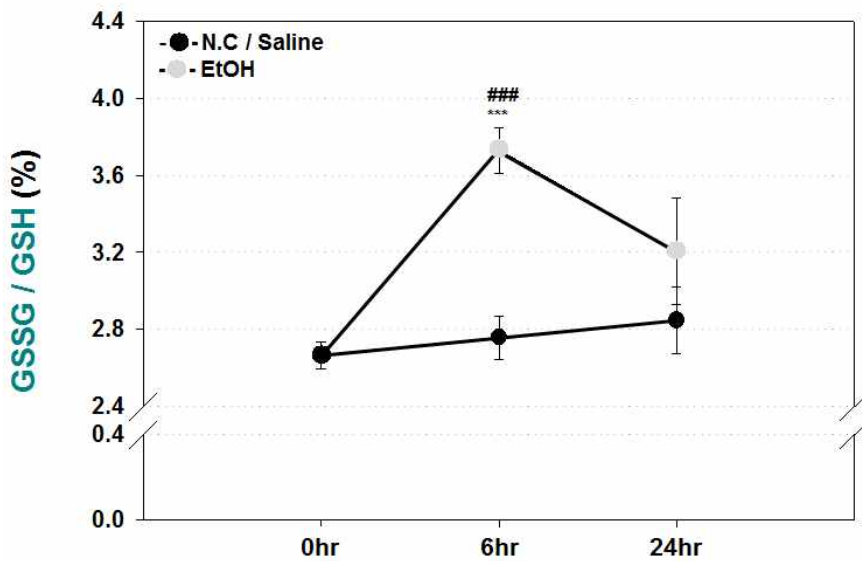


Fig. 3 The effects of EtOH on the oxidized / reduced glutathione ratio in the liver

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 5 rats

###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*\*\*,  $P < 0.001$  vs. saline group administrated at the same time

## 1.2 에탄올이 신장의 총 글루타치온 (total glutathione ; tGlutathione) 함량에 미치는 영향

다음은 신장에서 에탄올 투여에 의한 글루타치온 함량의 변화를 살펴보고자, 신장 내 글루타치온의 총량을 측정하였다 (Fig. 4).

에탄올을 투여한 지 6 시간이 경과한 후, 총 글루타치온의 함량은 s6 대비 약 80 % 수준을 보여, 간에서 나타난 현상과 동일하게 유의적인 감소를 나타내었다. 에탄올 투여 24 시간 경과 후에는 대조군과 비교하여 통계적인 차이를 보이지 않아, 간 내 유발된 변화와 일치하지 않는 경향을 보였다.

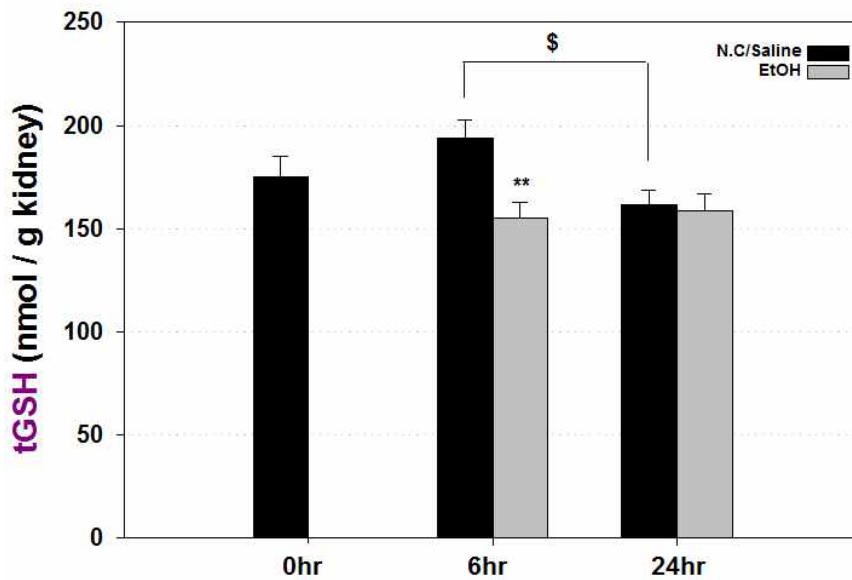


Fig. 4 The effects of EtOH on the renal concentration of total glutathione

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

\*\* $, P < 0.01$  vs. saline group administrated at the same time

\$ $, P < 0.05$  ; saline + 6hr vs. saline + 24hr



## 2. 간과 신장 및 혈중의 시스테인 함량에 대한 에탄올의 영향

본 실험에서 에탄올에 의한 간과 신장 내 글루타치온 함량 변화와 관련하여 글루타치온의 합성에 필요한 기질인 시스테인의 함량이 에탄올에 의해 어떠한 영향을 받는지 보았다.

### 2.1 에탄올이 간의 시스테인 (cysteine) 함량에 미치는 영향

먼저, 간에서의 시스테인 함량을 측정하였다 (Fig. 5). 간의 시스테인 함량은, 에탄올을 투여한 지 6 시간이 경과한 후, n.c 에 대하여 약 80 %, s6 에 대하여 약 86 % 수준으로, 각각 유의적으로 감소하였다. 에탄올 투여 24 시간 경과 후, n,c 대비 약 84 %, s24 대비하여 약 87 % 수준으로서, 간의 시스테인 함량이 각각 유의적으로, 또한 지속적으로 감소한 상태를 보였다.

이러한 변화는, 에탄올 투여 후 간 내 글루타치온 함량이 6 시간 이내에 감소하였고 24 시간 동안 감소 상태를 지속한 양상과 유사하며, 글루타치온 함량과 시스테인 함량 사이의 연관성을 제시한다.

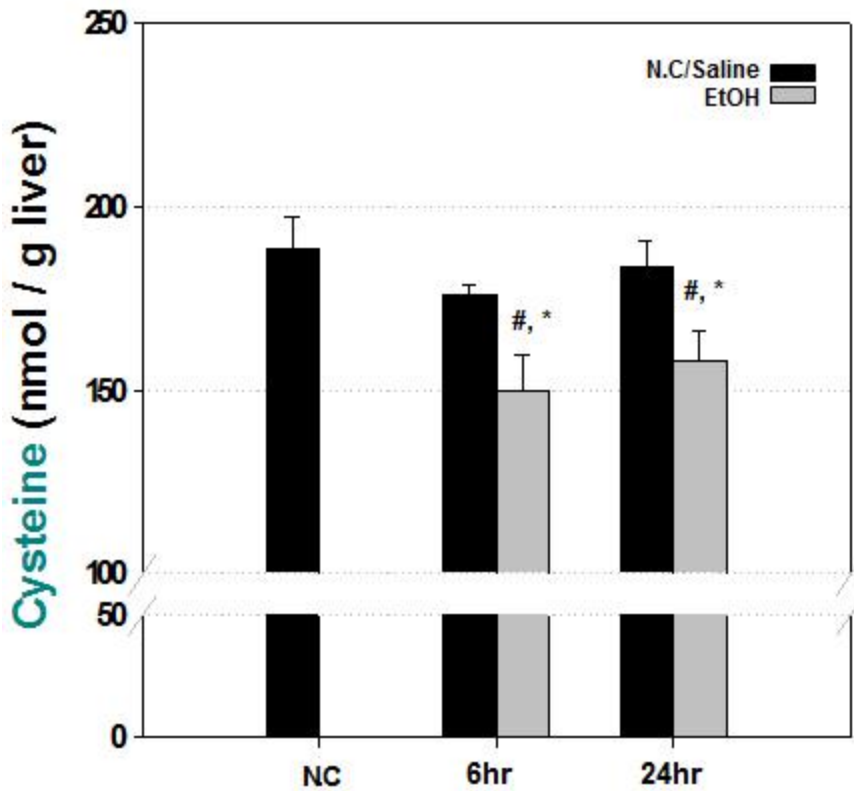


Fig. 5 The effects of EtOH on cysteine availability for GSH synthesis in the liver

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 5 rats

#,  $P < 0.05$  vs. N.C

\*,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time

## 2.2 에탄올이 신장의 시스테인 (cysteine) 함량에 미치는 영향

에탄올 투여 6 시간이 경과한 후 신장의 시스테인 함량은 n.c 에 대하여 약 57 %, s6 에 대하여 약 65 % 수준으로서, 각각 유의적인 감소를 나타냈다 (Fig. 6). 하지만 24 시간이 경과한 후, n.c 의 약 1.33 배, s24 와 비교해 1.5 배 이상 높은 함량을 나타내, 신장의 시스테인 함량이 각각 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다.

## 2.3. 에탄올이 혈액 중의 시스테인 (cysteine) 함량에 미치는 영향

혈중 시스테인 농도는 6 시간 동안 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 에탄올 투여한 후 24 시간 경과 후, s24 에 비하여 1.3 배 이상 그 농도가 증가하였다.

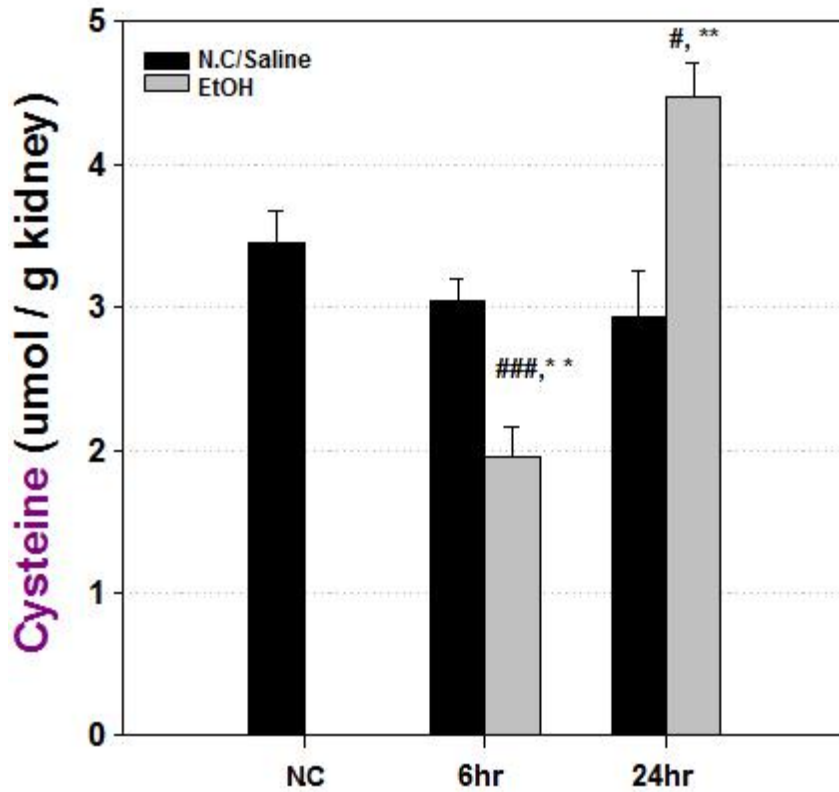


Fig. 6 The effects of EtOH on cysteine availability for GSH synthesis in the kidney

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

#,  $P < 0.05$ / ###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*\* ,  $P < 0.01$  vs. saline group administrated at the same time

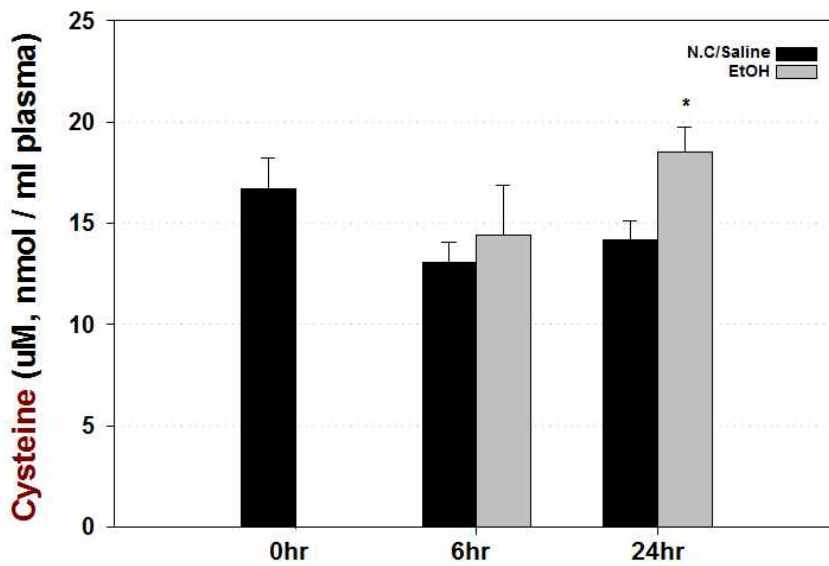


Fig. 7 The effects of EtOH on cysteine levels in blood

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 4 rats

\*,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time

### 3. 간과 신장 내, 혈액 중의 하이포타우린 또는 타우린 함량에 대한 에탄올의 영향

시스테인의 변화가 글루타치온 뿐 아니라 시스테인의 또 다른 대사체인 타우린과 하이포타우린의 변화와 연계되어있는지 알아보고자, 하이포타우린과 타우린 양의 시간에 따른 변화를 측정하였다.

#### 3.1 에탄올 투여가 간 내 하이포타우린 (hypotaurine) 과 타우린 (taurine) 함량에 미치는 영향

에탄올 투여 6 시간 후, 간에서 하이포타우린의 양은 5 배 이상, 타우린의 양은 약 3 배, 모두 유의적으로 증가하였다. 그러나 24 시간 이내에 하이포타우린 양의 급격한 상승이 기기의 검출 수준 이하를 보이며 역전되었고, 타우린도 대조군의 수준으로 복구되었다 (Fig. 8).

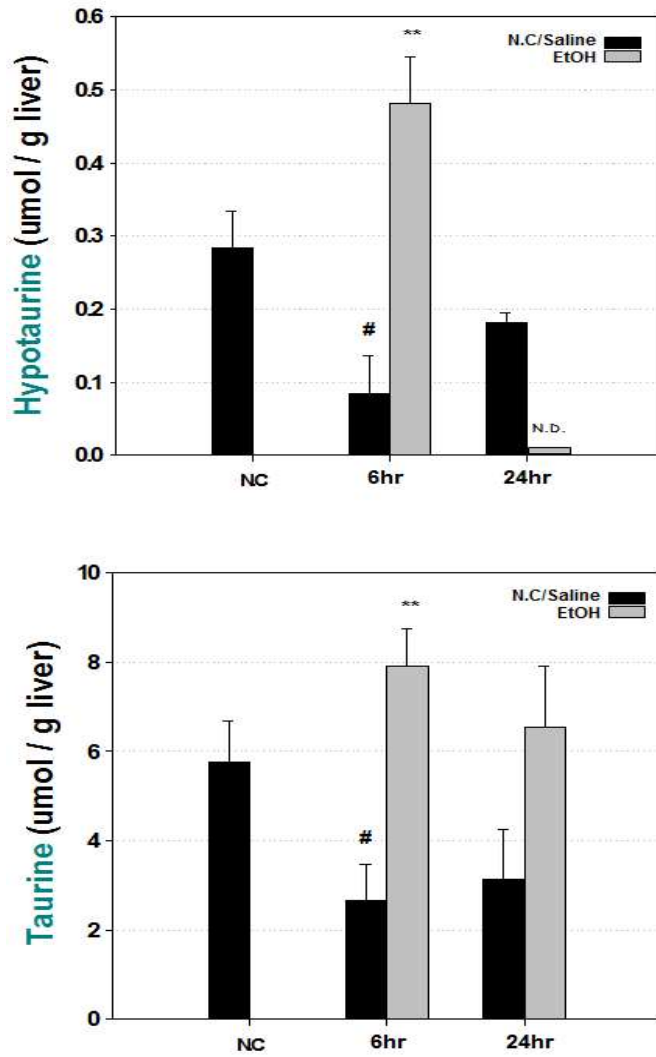


Fig. 8 The effects of EtOH on hepatic hypotaurine and taurine level

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 4 rats

#,  $P < 0.05$  vs. N.C

\*\*,  $P < 0.01$  vs. saline group administrated at the same time

N.D. ; not detected

### 3.2 에탄올 투여가 신장 내 하이포타우린(hypotaurine)과 타우린(taurine) 함량에 미치는 영향

신장 내 에탄올 투여에 따른 하이포타우린 양의 변화는 간에서와 유사한 양상을 보였다. 6 시간 때, 약 44 % 증가 하였다가, 24 시간 후 대략 44 % 감소하였다 (Fig. 9).

타우린은 6 시간 이내에 유의적인 차이를 보이지 않았고, 24 시간 때 약 28 % 증가하였다.

### 3.3 에탄올 투여가 혈액 내 타우린(taurine) 농도에 미치는 영향

혈액 중의 타우린 농도는 에탄올 투여에 의해 6 시간 후 약 2.5 배 증가하였다가 24 시간 이내에 대조군의 수준으로 회복되는 양상을 보였다 (Fig. 10).



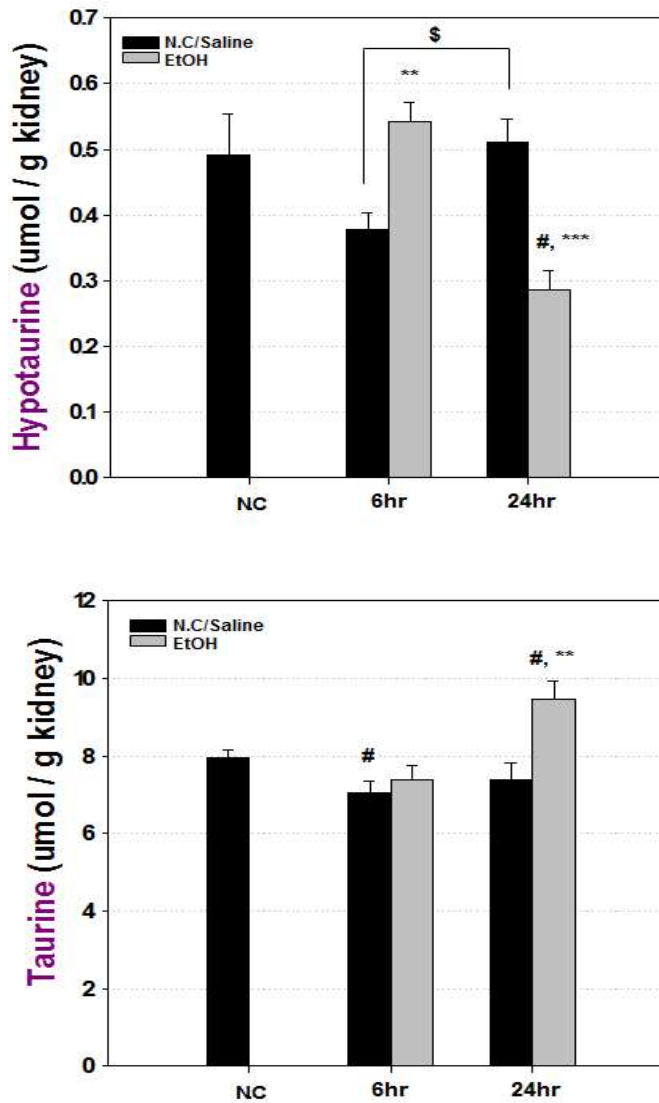


Fig. 9 The effects of EtOH on renal hypotaurine and taurine levels

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 4 rats

#,  $P < 0.05$  vs. N.C ; \$,  $P < 0.05$  ; saline + 6hr vs. saline + 24hr

\*\*,  $P < 0.01$  / \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. saline group administrated at the same time

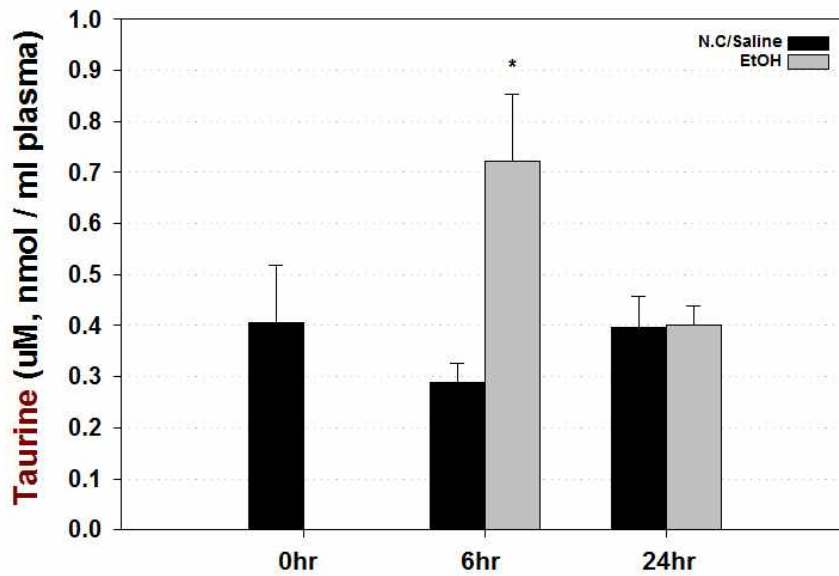


Fig. 10 The effects of EtOH on plasma taurine levels

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 5 rats

\*,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time

#### 4. 간과 신장에서 GCL-c (glutamate cysteine ligase catalytic subunit) 발현에 대한 에탄올의 영향

글루타치온 합성 과정의 속도를 결정하는 효소인 GCL (glutamate cysteine ligase) 의 단백질 발현과 유전자 발현을 간과 신장에서 측정하였다.

##### 4.1 에탄올 투여가 간과 신장 내 GCL-c의 단백질 발현에 대하여 미치는 영향

에탄올 투여 6 시간과 24 시간 그룹 모두에서, 각각 정상대조군 또는 생리식염수를 투여한 그룹과 비교했을 때, 간 (Fig. 11) 과 신장 (Fig. 12) 내 GCL 단백질의 농도는 유의적인 변화를 보이지 않았다.

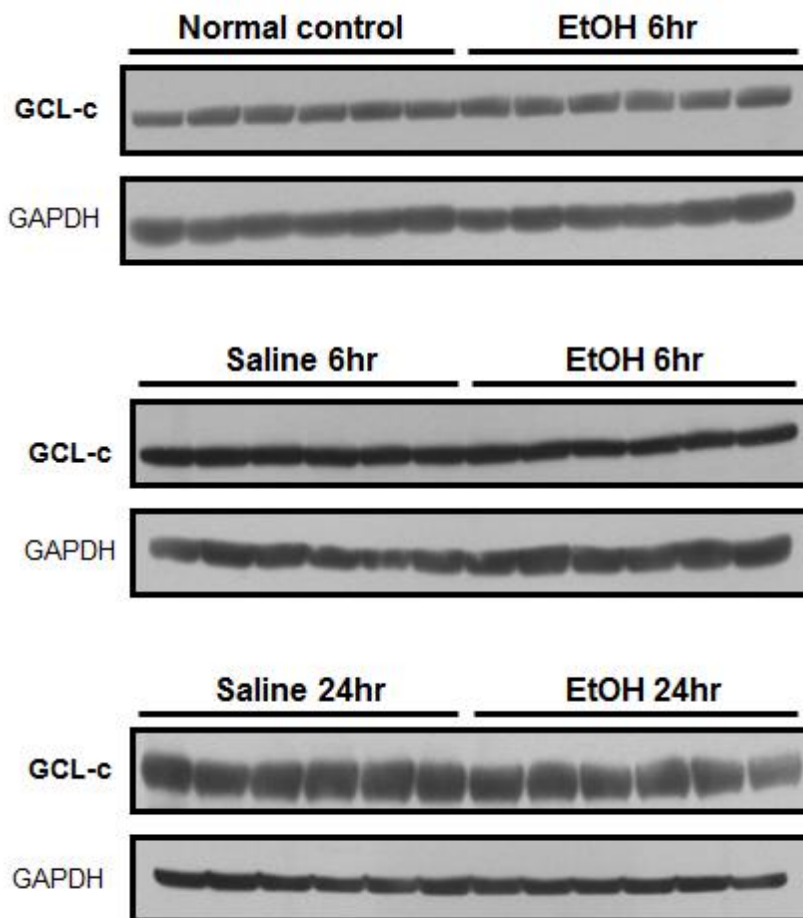


Fig. 11 The effects of EtOH on hepatic expression of glutamate cysteine ligase (GCL-c) protein

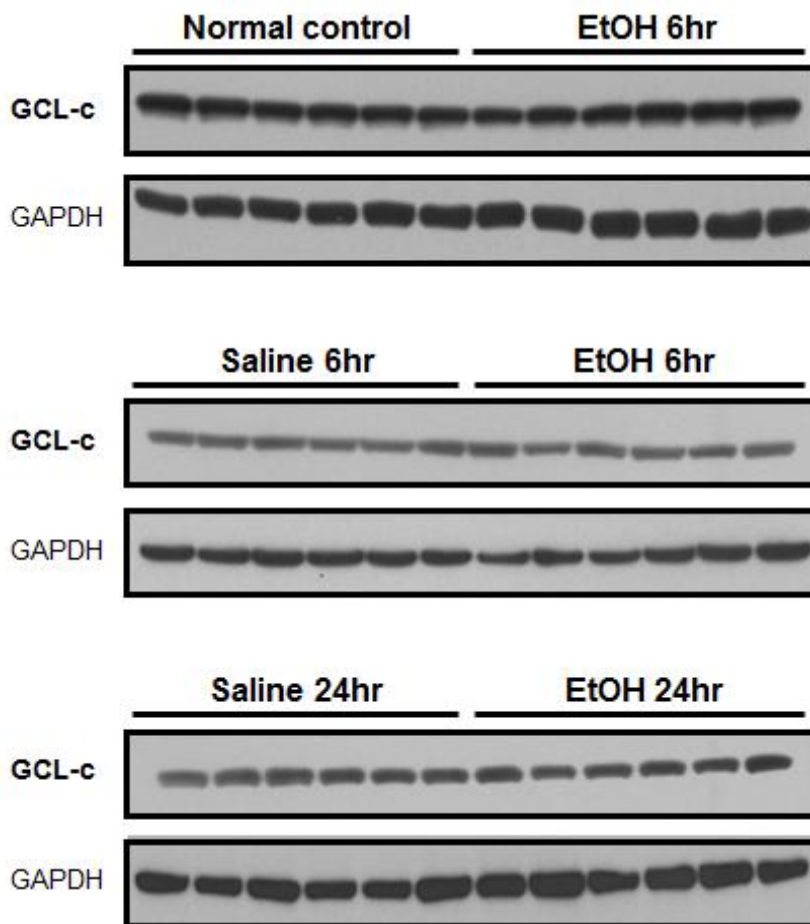


Fig. 12 The effects of EtOH on renal expression of glutamate cysteine ligase protein (GCL-c)

## 4.2 에탄올 투여가 간과 신장의 GCL-c 유전자 발현에 대하여 미치는 영향

에탄올이 GCL 유전자 발현을 조절하는지 검증하기 위해, 간과 신장에서 GCL mRNA 양을 측정하였다.

에탄올 투여 후 6 시간 동안 간 내 GCL mRNA 양은 감소하는 경향을 보였다가, 24 시간 후 증가하였다 (Fig. 13). 신장의 GCL 유전자의 발현은 6 시간까지 에탄올에 의해 변화되지 않았으나, 24 시간 후 2 배 가까이 증가하였다 (Fig. 14).

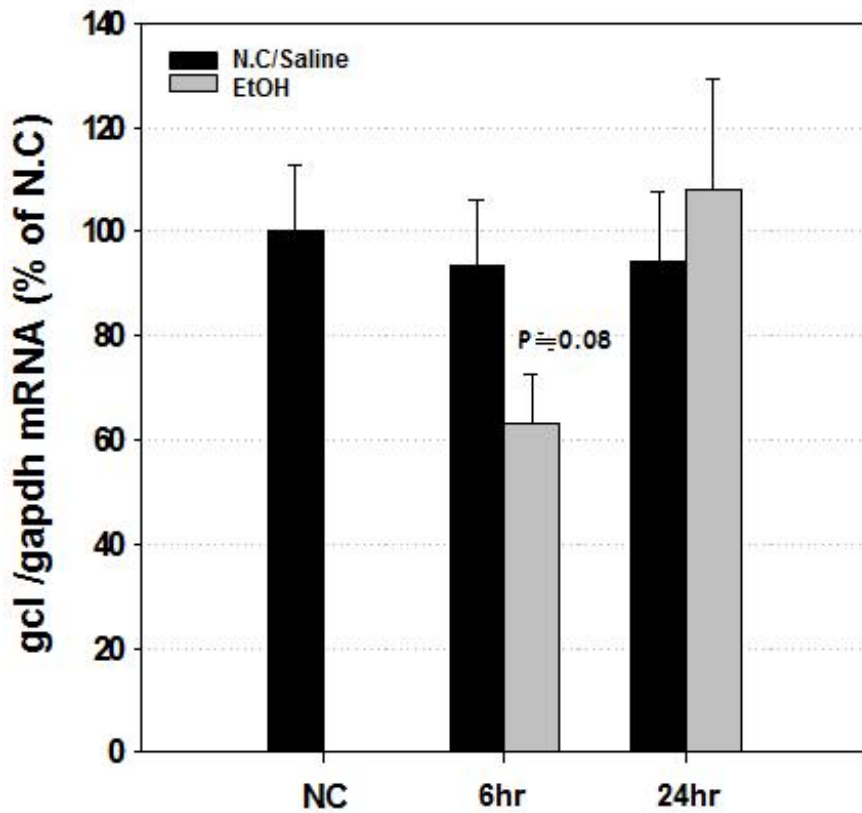


Fig. 13 The effects of EtOH on gene expression of glutamate cysteine ligase (GCL-c) in liver

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats  
 $P=0.08$  vs. saline group administrated at the same time

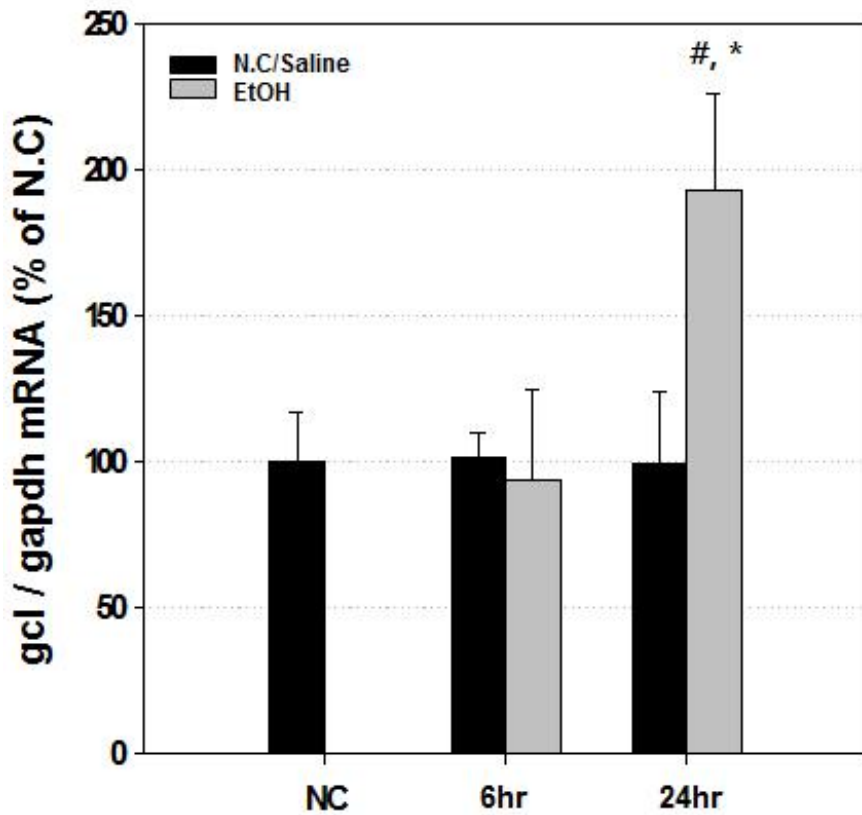


Fig.14 The effects of EtOH on gene expression of glutamate cysteine ligase (GCL-c) in kidney

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 5 rats

#,  $P < 0.05$  vs. N.C

\*,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time



## 5. 간과 신장에서 CDO (cysteine dioxygenase) 의 효소 활성 및 발현에 대한 에탄올의 영향

에탄올에 의해 글루타치온과 그 기질인 시스테인 함량 뿐 아니라, 시스테인의 또 다른 대사 생성물인 하이포타우린과 타우린의 양이 변화하였으므로, 시스테인을 하이포타우린과 타우린으로 전환하는 대사의 속도 제한 효소인 CDO (cysteine dioxygenase) 의 효소 활성, 단백질 발현, 유전자 발현의 변화를 간과 신장에서 측정하였다.

### 5.1 에탄올 투여가 간에서 CDO 효소 활성에 대하여 미치는 영향

에탄올 투여 6 시간 후 간의 CDO 활성은 n.c 의 약 1.8 배, s6 과 비교해 약 2 배 상승한 상태를 나타냈다. 하지만, 24 시간 이내에 대략 n.c 의 63 %, s24 의 67% 수준으로 저하된 활성을 보였다 (Fig. 15).

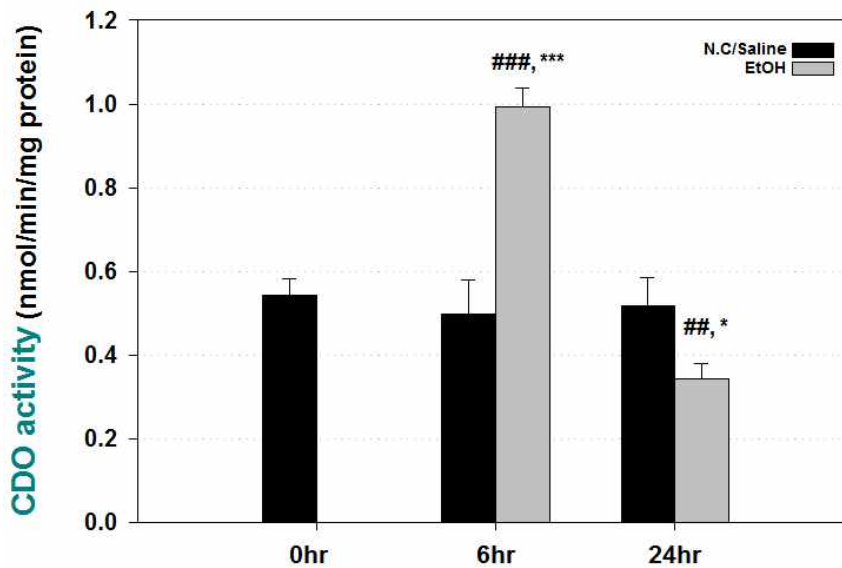


Fig. 15 The effects of EtOH on hepatic cysteine dioxygenase (CDO) enzymatic activity

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

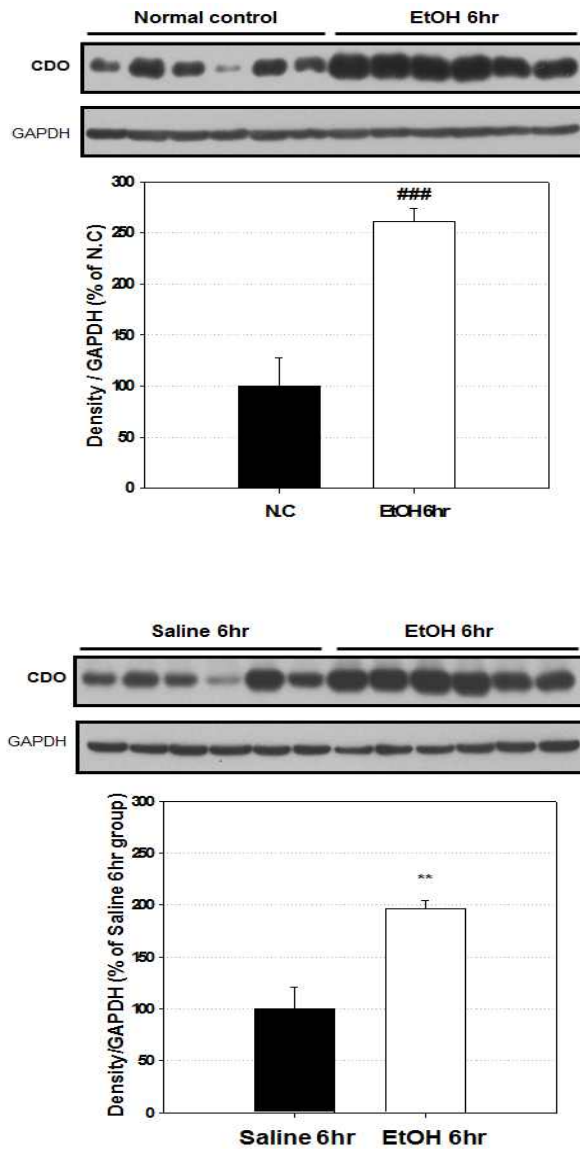
##,  $P < 0.01$  / ###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*,  $P < 0.05$  / \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. saline group administrated at the same time

## 5.2 에탄올 투여가 간과 신장 내 CDO 의 단백질 발현에 대하여 미치는 영향

에탄올 투여 6 시간 후, 간의 CDO 단백질 농도는 n.c 의 약 2.5 배, s6 의 약 2 배로 증가하였다 (Fig. 16). 반면, 24 시간 후, CDO 단백질은 s24 대비 60 % 수준으로 유의적으로 낮았다 (Fig. 17).

간에서와 달리, 6 시간 전 투여된 에탄올은 신장의 CDO 단백질 양에 유의적인 변화를 유발하지 않았다 (Fig. 18). 하지만 24 시간 후에는 간에서와 같이, CDO 단백질 양이 대조군과 비교하여 약 60 % 정도로 감소하였다 (Fig. 19).



**Fig. 16** The effects of EtOH on hepatic cysteine dioxygenase (CDO) protein expression at t=6 hr

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*\* ,  $P < 0.01$  vs. saline group administrated at the same time

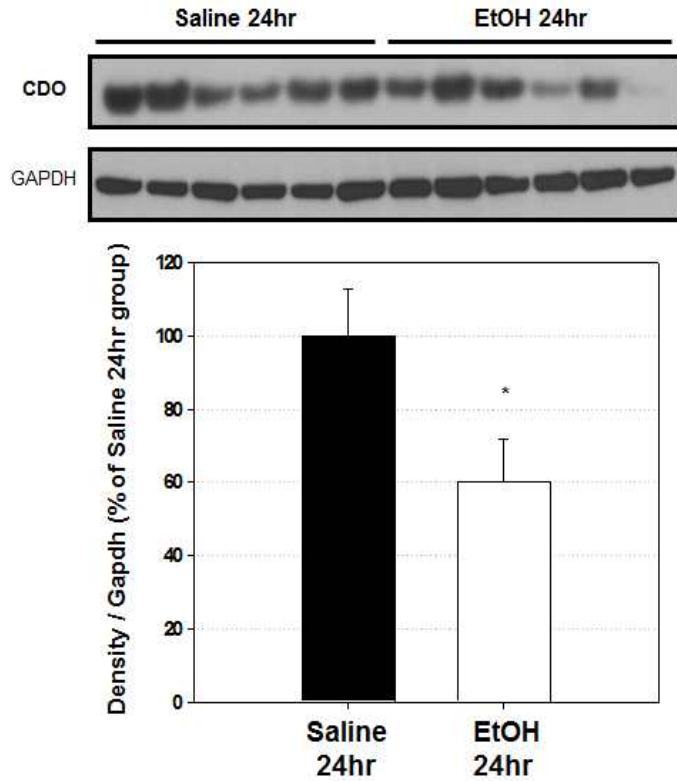


Fig. 17 The effects of EtOH on hepatic cysteine dioxygenase (CDO) protein expression at t=24 hr

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

\*,  $P < 0.05$  vs. saline group administrated at the same time

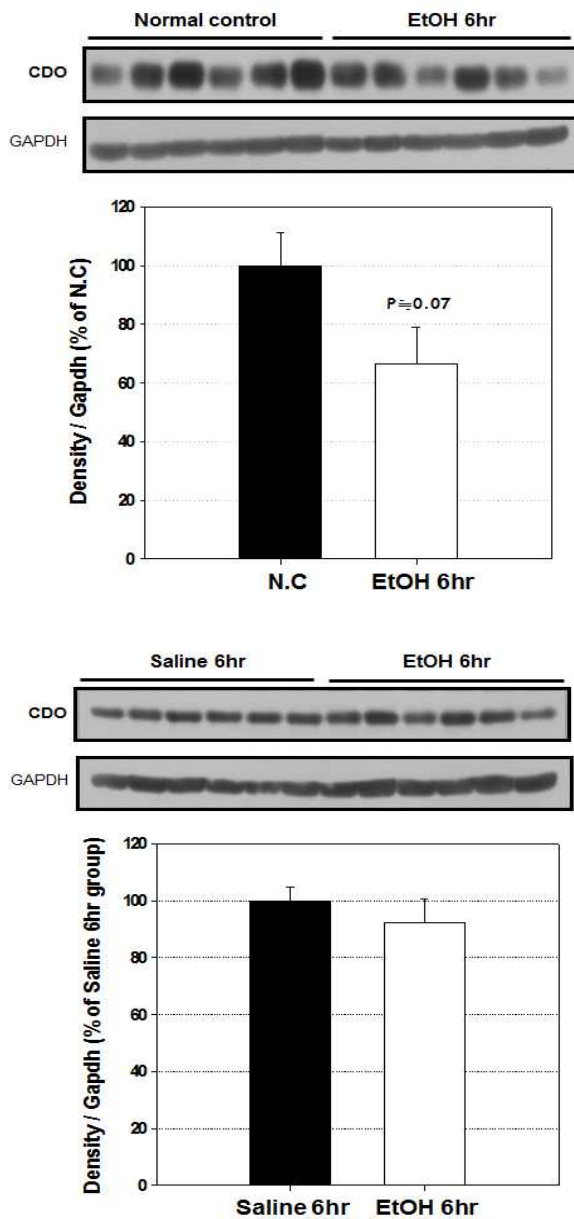


Fig. 18 The effects of EtOH on renal cysteine dioxygenase (CDO) protein expression at t=6 hr

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

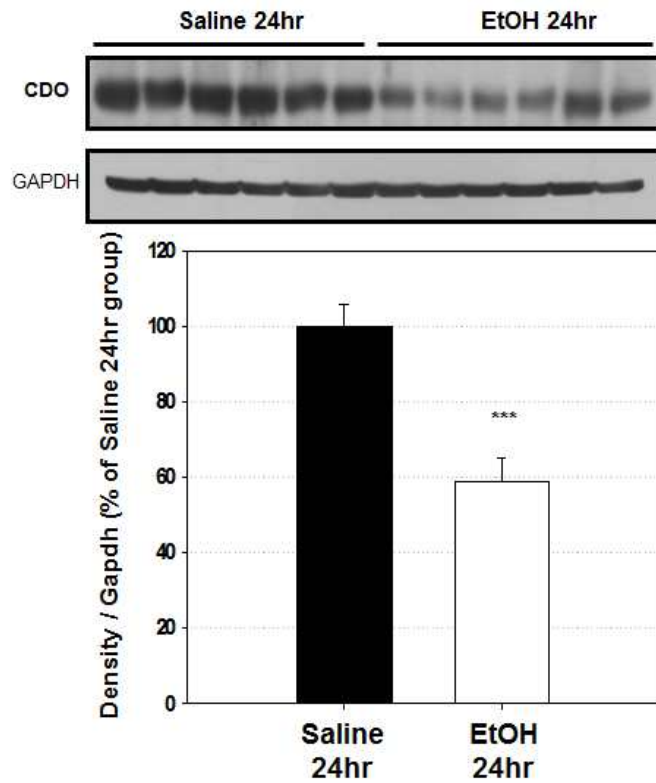


Fig. 19 The effects of EtOH on renal cysteine dioxygenase (CDO) protein expression at t=24 hr

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats  
 \*\*\*,  $P < 0.001$  vs. saline group administrated at the same time

### 5.3 에탄올 투여가 간과 신장의 CDO 유전자 발현에 대하여 미치는 영향

간의 CDO mRNA 양은 에탄올 투여 6 시간 이내에 n.c 에 대하여 약 1.7 배, s6 에 대해 약 1.6 배 증가하였다가, 24 시간 이내에 n.c 대비 약 66 %, s24 대비 약 60 % 수준으로 감소하였다 (Fig. 20).

신장의 CDO mRNA 농도는 에탄올 투여 후 24 시간 동안 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 21).



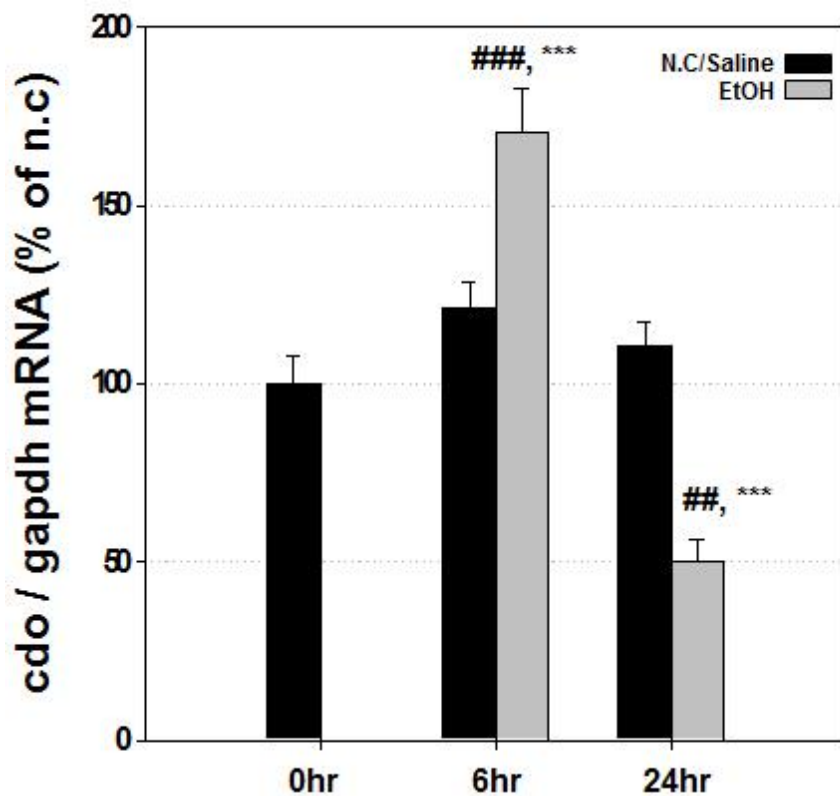


Fig. 20 The effects of EtOH on hepatic gene expression of cysteine dioxygenase (CDO)

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

##,  $P < 0.01$  / ###,  $P < 0.001$  vs. N.C

\*\*\*,  $P < 0.001$  vs. saline group administrated at the same time

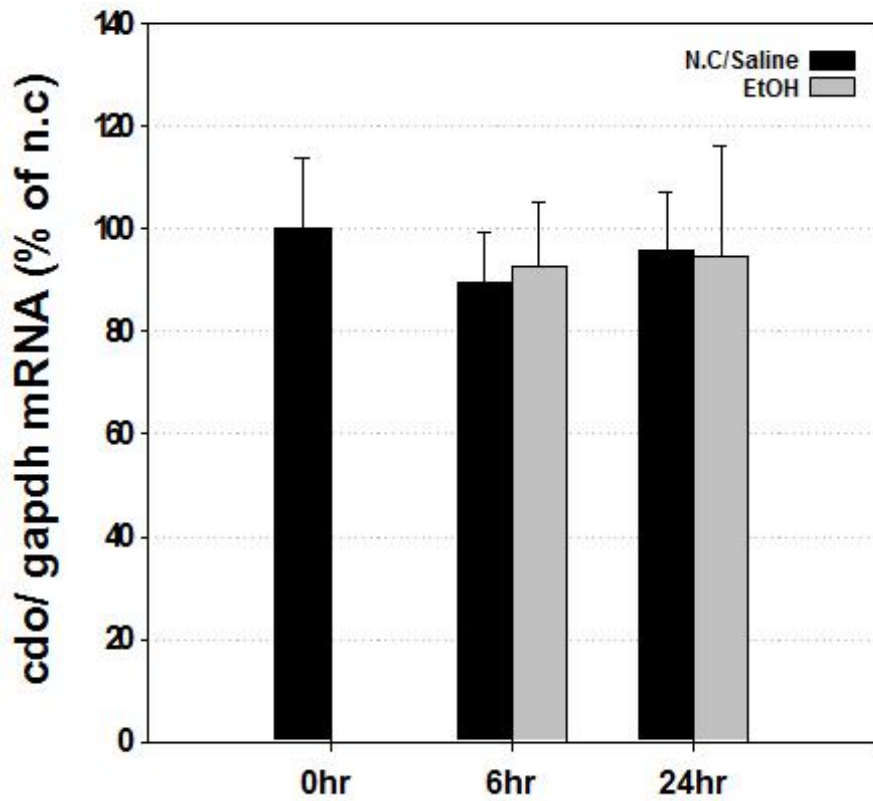


Fig. 21 The effects of EtOH on renal gene expression of cysteine dioxygenase (CDO)

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for more than 6 rats

## 고 찰

본 실험에서 에탄올은 간과 신장 내에 존재하는 글루타치온을 빠르게 감소시켰다. 또한, 급성 에탄올 투여의 간 내 시스테인 농도에 대한 영향은 변동이 없거나 (Lauterburg et al., 1984; Choi et al., 2000) 또는 약간 감소하여 글루타치온의 감소를 동반하는 것으로 보고된 바 있는데 (Speisky et al., 1985), 본 연구에서는 에탄올에 의해 간과 신장 내에서 시스테인이 빠르게 감소하였지만, 혈액 중 시스테인 농도의 변화를 동반하지는 않았다. 이 결과는 두 장기의 시스테인 감소의 원인은 혈중 유입이나 유출로부터 기인하지 않고, 각각의 조직 내에서 시스테인의 양적 변화와 연관이 있음을 암시한다. 따라서 각 장기 내에서 에탄올에 의한 시스테인으로부터 글루타치온으로의 대사 변화에 중점을 두고 초기 시간대의 글루타치온 감소의 원인을 파악하고자 하였다.

이 실험에서 에탄올 투여에 의한 글루타치온의 감소 상태는 간에서는 24 시간 동안 지속한 반면, 신장은 24 시간 이내에 회복하였다. 즉, 간과 신장에서의 초기 감소 여부 및 정도는 유사하였지만, 24 시간 후 서로 다른 회복 양상을 보였다. 이것은 간보다 신장이 더 빠르게 에탄올에 의한 글루타치온의 감소로부터 회복될 수 있음을 시사한다.

에탄올 투여 뒤 6 시간 이후부터 24 시간까지 간에서는 시스테인이 증가하였지만 대조군과 유의적인 차이가 없었던데 반해, 신장과 혈액에서의 시스테인 농도는 이전의 감소 상태를 역전하는, 유의적인 상승을 보여 글루타치온과 마찬가지로 간보다 혈액과 신장에서

시스테인이 더 빠르게 회복되는, 두 장기간 차이를 나타냈다.

에탄올에 의해 간세포로부터 혈중으로의 글루타치온 배출은 증가된다고 밝혀져 있으며 (Choi et al., 2000), 또한 신장 내의 시스테인 함량이 간세포 내 글루타치온의 혈액 유출량에 대한 간접적인 지표로 추정된다 (McIntyre and Curthoys, 1980). 간으로부터 혈중으로 유리된 글루타치온의 대부분은 결국 신장에서  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) 에 의하여 글루타메이트 (glutamate) 로 분해되고, 이어서 dipeptidase 에 의해 최종적으로 시스테인을 유리하기 때문에, 신장 내 시스테인 함량은 간으로부터 혈중으로의 글루타치온 유출량과 상관 관계를 갖게 된다. 이러한 근거들 및 본 실험의 결과를 종합해 볼 때, 에탄올에 의해 증가된 글루타치온의 혈중 유출이 신장 내 시스테인의 증가를 야기하며, 또한 동일한 일련의 효소 반응에 의해 혈중 시스테인의 증가가 초래했을 것으로 판단된다. 역으로, 혈액과 신장 내 높은 시스테인 함량은, 글루타치온의 간 밖으로의 유출 증가가 에탄올에 의한 간 내의 글루타치온 감소에 대한 원인으로 작용하였음을 입증하는 결과이기도 하다.

특히, 신장에서의 에탄올에 의한 시스테인 변화를 주목해보면, 에탄올 투여 후 6 시간 동안 감소, 24 시간 이내 감소 상태를 회복했다는 측면에서 신장 내 글루타치온 함량과 유사성을 보이며, 글루타치온 함량의 변화가 시스테인 함량의 변화에서 기인했을 가능성을 암시한다. 또한, 간과 신장 내 글루타치온 함량 변화의 상이성 역시 시스테인 함량 변동의 상이성에 의존했을 것이다. 이러한 연계성은 간과 신장 모두에서 시스테인의 이용가능성이 글루타치온의 함량에 영향을 주며, 에탄올은 시스테인 이용률을 두 장기 모두에서 감소시킴으로써 글루타치온의 합성을 저해하여 글루타치온을 감소시킨다

는 결론을 도출할 수 있게 한다.

글루타치온의 생성은 기질인 시스테인의 공급과 속도 결정 효소인 GCL 의 활성이라는, 두 가지 요소에 의해 제한된다고 밝혀져 있다 (Meister and Anderson, 1983). 본 연구에서, GCL 발현은 에탄올에 의해 저해되지 않았다. 따라서 글루타치온의 합성에 관여하는 GCL 단백질 발현의 조절과 그 대사의 변화만으로 본 연구에서 관찰된 에탄올에 의한 간과 신장 내 글루타치온의 빠른 감소를 설명할 수 없다. 에탄올은 비록 GCL 의 단백질 양은 변화를 일으키지 않았지만, 유전자 발현의 이상을 초래하는 것으로 보인다. 6 시간 동안은 유전자 발현이 간 내에선 억제되었고, 신장에서는 유지되다가, 24 시간 이내 유전자 발현이 간 내에선 회복, 신장에서는 증가하여 전반적으로 에탄올 투여 초기에 GCL 유전자 발현은 저하되었다가 이후에 증가하였다.

GCL 은 여러 전사 조절 인자를 매개로 하는 유전자 발현의 조절을 통해 단백 발현과 효소 활성이 조절된다고 알려져 있다. 하지만 본 연구에서 유전자 발현과 단백질 발현은 상관성이 뚜렷하지 않았는데, mRNA 증감의 변동 크기가 단백질 양을 조절할 수준에 도달하지 않았거나, 전사 후 (post-transcriptional) 또는 번역 후 (post-translational) 단백질의 분해를 비롯한 조정 (modification) 등의 요인이 개입했을 가능성도 있다.

또한 24 시간 동안 에탄올에 의해 유발된 산화적 스트레스 상황에 놓인 세포는 GCL 의 발현을 유도하여 글루타치온의 합성을 유도하는 체내 방어 기전을 확인할 수 있었다. 하지만, 에탄올 투여 후 초기 시간에 오히려 GCL 의 유전자 발현이 억제되거나 유도가 지연

되는 현상에 대한 기전은 분명하지 않다. 즉, 글루타치온을 고갈시키는 병태기전으로 설명할지, 글루타치온의 감소를 담보로 다른 생리적 역할을 하기 위한 현상인지 후속 연구를 통해 밝힐 부분이라고 생각된다.

시스테인은 글루타치온을 합성하기 위해 필요한 기질일 뿐 아니라, 하이포타우린과 타우린의 생성에도 이용되는 기질이며, 여러 세포 실험과 동물 실험계를 통해 글루타치온과 (하이포)타우린으로의 양쪽 대사 경로를 유기적으로 조절하는 공통의 인자로 밝혀져 있다 (Cresenzi CL et al., 2003; Lee JI et al., 2004). 즉, 세포 내 시스테인의 농도가 낮을 경우, GCL 활성이 증가하여 글루타치온을 합성하는 경로가 유도되고 (Lee JI et al., 2006), CDO의 활성은 저하되어 하이포타우린과 타우린을 생성하는 대사는 억제된다. 이러한 현상은 글루타치온의, 산화적 스트레스에 대한 방어 기능이 유지될 수 있도록 하며, 글루타치온으로 전환되는 시스테인의 양을 증가시키는 생리적 의미를 갖는다. 반면, 시스테인의 농도가 높은 경우, GCL의 활성은 감소시키고 CDO 활성을 증가시켜 하이포타우린과 타우린으로의 전환을 증대하여 시스테인을 제거함으로써, 고농도의 시스테인에 의하여 발생하는 독성을 억제하고 세포는 항상성을 유지한다.

에탄올은 하이포타우린의 농도를 간과 신장 모두에서 빠르게 상승시켰다가 24 시간 이내에 급격히 낮추는, 유동적인 변동을 야기했고, 간 내 CDO의 유전자, 단백질 발현과 효소 활성 각각도 같은 변화를 보였다. 하지만, 에탄올이 시스테인의 양에 대한 조절을 매개로 CDO 발현 및 효소 활성에 변화를 야기했는지는 분명하지 않다. 에탄올 투여 6 시간 후, 간과 신장 내 시스테인이 낮은 농도 상

태에서 하이포타우린 농도가 증가한 결과는, 시스테인의 이화 과정 (catabolism) 을 억제하여 글루타치온의 합성을 위한 시스테인의 이용률을 높이고 글루타치온 농도를 유지할 것이라는 기존의 개념과 상충한다. 오히려 에탄올은 시스테인의 감소에도 불구하고 CDO 가 관여하는, 하이포타우린으로의 대사 경로를 빠르게 활성화시켰거나, CDO 유도 및 하이포타우린이 급격히 증가하며 이차적으로 시스테인의 감소가 유발되었다고 볼 수 있다.

즉, 시스테인 이외의 아직 밝혀지지 않은 대사 조절 인자가 존재할 가능성이 있으며, 단순히 시스테인의 농도를 낮추기 위한 이유 외에 하이포타우린 합성의 생리적인 의미를 조사할 필요성이 있는 것으로 보인다.

위와 같은 6 시간대의 하이포타우린 농도의 급격한 상승은 에탄올 투여 후 24 시간 이내에 감소로 전환함에 따라 증감의 방향이 역전되는 양상을 나타냈다. 간과 신장 내의 CDO 도 24 시간 후 단백 발현이 낮아진 상태를 보였기 때문에, 하이포타우린은 CDO 의 활성 변화에 민감하게 반응하여 신속하게 생성이 조절, 농도가 변동됨을 알 수 있다.

하이포타우린의 대사체인 타우린의 양은 간과 혈중에서 빠른 증가를 보였지만 하이포타우린에 비해 서서히 감소하여 24 시간 후 정상 농도를 회복했다. 조직 내 타우린의 농도는 하이포타우린 농도의 15 ~ 20 배 정도로 높고, 반감기도 길기 때문에 생성이 저하되더라도 농도가 급격하게 하강하지 않았을 것이다. 따라서 타우린은 에탄올에 의한 CDO 와 하이포타우린 농도의 변화보다 덜 민감하게 조정된다. 농도 변화의 즉각성은 감소하고 지속성과 지연성은 증가하는 것이다. 또한 이런 차이가 두 대사체의 변화에 있어 시간적 간격

을 존재하게 만든 것으로 생각되며, 타우린 보다 CDO 의 변화와 상관관계가 큰 하이포타우린이 CDO 의 조절을 이해하는 데 더욱 합당한 지표로 판단된다. 또한, 간과 혈중의 타우린 변화가 일치하는 결과를 통해 혈중 타우린의 증가는 간으로부터 증가한 타우린의 혈중 유출이 증가된 결과로 볼 수 있다. 반면 신장 내 타우린 양은 서서히 증가하여 24 시간 후 높아져 있었다. 이는 혈중 증가한 타우린의 신장 내로의 유입이 증가한 결과로 해석 될 수 있으며, 에탄올에 의한 글루타치온과 시스테인의 변화와 유사하게 24 시간 후, 각 조직 내 대사 이외의 수송체의 변화가 수반된 것으로 보인다.

급성 에탄올 투여에 의해 간 내 CDO 효소 활성은 초기에 유도되었다가, 이후에 오히려 억제되었는데, 간에서의 CDO 단백질 발현 또한 빠른 상승을 보인 후 감소하여, 효소 활성과 일치하는 변화를 보였고, 증감의 변화 폭도 거의 비슷한 수준을 나타냈다. 뿐만 아니라, CDO 유전자 발현 역시 동일한 경향성을 보였다. 시스테인이 CDO 단백질의 분해 과정에 영향을 주어, CDO 의 활성을 조절하는 기전이 밝혀져 있는데 (Stipanuk MH et al., 2004; Dominy JE. et al., 2006), 에탄올도 또한 CDO 의 발현을 조절하여, 효소 활성의 변화를 유발하는 기전을 가지는 것으로 볼 수 있다. 하지만 앞서 살펴본 바와 같이 에탄올에 의한 CDO 의 조절 기전이 시스테인 농도의 변화를 유발함에 기인하는지 여부는 분명하지 않다. 반면, 에탄올 투여는 신장의 CDO 유전자 발현에 유의적인 변화를 야기하지 않았다. 일정한 수준의 유전자 발현에도 불구하고 에탄올 투여가 24 시간 경과 후 단백질 수준의 발현에 감소를 초래한 것은 24 시간 동안 단백질의 분해가 지속적으로 유도된 것으로 보인다.



결론적으로, 본 연구의 결과들은 랫트의 간과 신장에서 CDO 의 유도를 통한 시스테인으로부터 하이포타우린, 타우린으로의 전환의 증가가 시스테인의 공급을 억제하여 글루타치온의 합성의 감소를 유발하였고, 궁극적으로 에탄올의 급성 투여에 의한 글루타치온 고갈의 중요한 원인임을 밝혔다.

하지만 급성의 에탄올 투여가 글루타치온의 합성은 억제하는 반면, 하이포타우린과 타우린의 합성은 항진시키는 본질적인 이유에 대하여는 명확한 답을 도출하지 못했다. 다만, 이러한 대사 활성화가 에탄올에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대응하기 위한 역할을 할 잠재성이 있다. 특히, 타우린은 항산화 효과를 기반으로 세포 보호 기능을 가진 물질로 인식되어왔지만 (Huxtable, 1992), ROS 을 제거하는 직접적인 활성화는 미미한 것으로 밝혀져 있는 반면 (Aruoma et al., 1988), 타우린 합성의 중간 대사체인 하이포타우린과 CSA (cysteine sulfinic acid) 는 여러 종의 ROS 를 직접적으로 제거할 수 있다 (Shi et al., 1997; Pecci et al., 1999). 그러므로 타우린 자체보다는 시스테인으로부터 타우린으로의 합성의 증진이 에탄올에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 방어적 역할을 할 수 있을 것이라는 추정이 더 설득력 있다. 이러한 발견의 생리적 의미와 관련해서는 추가적인 연구를 진행할 필요가 있다고 사료된다.

## 참고문헌

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256: 251-255

Choi DW, Kim SY, Kim SK, Kim YC (2000) Factors involved in hepatic glutathione depletion induced by acute ethanol administration. *J Toxicol Environ Health A* 60: 459 - 469

Cresenzi CL, Lee JI, Stipanuk MH (2003) Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J Nutr* 133: 2697-2702

Dominy Jr JE, Hirschberger LL, Coloso RM, Stipanuk MH (2006) Regulation of cysteine dioxygenase degradation is mediated by intracellular cysteine levels and the ubiquitin-26S proteasome system in the living rat. *Biochem J* 394: 267-273

Dominy Jr JE, Hwang J, Stipanuk MH (2007) Overexpression of cysteine dioxygenase reduces intracellular cysteine and glutathione pools in HepG2/C3A cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E62-69

Feo F, Pascale R, Garcea R, Daino L, Pirisi L, Frassetto S, Ruggiu ME, Di Padova C, Stramentinoli G (1986) Effect of the variations of S-adenosyl-L-methionine liver content on fat accumulation and ethanol metabolism in ethanol-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 83: 331

Fernandez-Checa JC, Ookhtens M, Kaplowitz N (1987) Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol. *J Clin Invest* 80: 57 - 62

Gaitonde MK (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *The Biochem journal* 104: 627-633

Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212

Guerra C, Grisolia S (1980) Changes in glutathione in acute and chronic alcohol intoxication. *Pharmacol Biochem Behav* 13[Suppl 1]: 53 - 61

Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72: 101-163

Kera Y, Kiriya T, Komura S (1985a) Conjugation of acetaldehyde with cysteinylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by gamma-glutamyltranspeptidase. *Agents Actions* 17: 48 - 52

Kera Y, Komura S, Ohbora Y, Kiriya T, Inoue K (1985b) Ethanol induced changes in lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl content. Different sensitivities in rat liver and kidney. *Res Commun Chem Pathol*

Pharmacol 47: 203 - 209

Kim YC, Kim SY, Sohn YR (2003) Effect of age increase on metabolism and toxicity of ethanol in female rats. *Life Sciences* 74: 509-519

Kwon YH, Stipanuk MH (2001) Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E804 - 815

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lauterburg BH, Davies S, Mitchell JR (1984) Ethanol suppresses hepatic glutathione synthesis in rats in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 7 - 11

Lee JI, Londono M, Hirschberger LL, Stipanuk MH (2004) Regulation of cysteine dioxygenase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J Nutr Biochem* 15: 112-122

Lee JI, Kang J, Stipanuk MH (2006) Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem J* 393: 181-190

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Lu SC, Huang ZZ, Yang JM, Tsukamoto H (1999) Effect of ethanol and

high-fat feeding on hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase subunit expression in the rat. *Hepatology* 30: 209 - 214

Macdonald CM, Dow J, Moore MR (1977) A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury. *Biochem Pharmacol* 26: 1529 - 1531

McIntyre TM, Curthoys NP (1980) The interorgan metabolism of glutathione. *Int J Biochem* 12: 545-551

Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711 - 760

Pecci L, Costa M, Montefoschi G, Antonucci A, Cavallini D (1999) Oxidation of hypotaurine to taurine with photochemically generated singlet oxygen: the effect of azide. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 661-665

Rajendra W (1987) High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with O-phthaldehyde. *J Liq Chromatogr* 10: 941-955

Sekura R and Meister A (1977) gamma-Glutamylcysteine synthetase. Further purification, "half of the sites" reactivity, subunit, and specificity. *J Biol Chem* 252: 2599-2605

Shi X, Flynn DC, Porter DW, Leonard SS, Vallyathan V, Castranova V

(1997) Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation. *Ann Clin Lab Sci* 27: 365-374

Speisky H, MacDonald A, Giles G, Orrego H, Israel Y (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. *Biochem J* 225: 565 - 572

Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RA, Banks MF (1992) Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr* 122: 420.427

Stipanuk MH, Monica P, Londono, Carrie L, Cresenzi, Yu AF (2004) The ubiquitin-proteasome system is responsible for cysteine-responsive regulation of cysteine dioxygenase concentration in liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E439-448

Stipanuk MH, Dominy Jr JE, Ueki I, Hirschberger LL (2008) Measurement of cysteine dioxygenase activity and protein abundance. *Curr Protoc Toxicol* 38: 6.15.1-25

Vendemiale G, Altomare E, Trizio T, Le Grazie C, Di Padova C, Salerno MT, Carrieri V, Albano O (1989) Effects of oral Sadenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 24: 407 - 415

Videla LA, Fernandez V, Ugarte G, Valenzuela A (1980) Effect of acute ethanol intoxication on the content of reduced glutathione of the liver in

relation to its lipoperoxidative capacity in the rat. FEBS Lett 111: 6 - 10

Vina J, Estrela JM, Guerri C, Romero FJ (1980) Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. Biochem J 188: 549 - 552

## Abstract

# The effects of an acute ethanol administration on the hepatic and renal metabolic conversion of cysteine to glutathione and taurine in rats

Lee Yoo Min

Preventive Pharmacy, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Glutathione (GSH) plays an important role in the detoxification of many electrophilic xenobiotics and reactive oxygen species (ROS) and also it has been well established that either acute or chronic treatment of ethanol decreases the hepatic GSH concentrations both in experimental animals and in humans.

In the present study, we systematically examined the effects of an acute EtOH treatment on GSH synthesis in rats' liver and kidney, with special emphasis on the alteration in the metabolic



conversion of cysteine to taurine.

Adult male rats were sacrificed 6 or 24 hr after treatment with a single dose of ethanol (3g/kg bw, ip.). The acute dose of ethanol induced time-dependent changes in GSH synthesis both in liver and kidney.

Ethanol led to a rapid decrease in the hepatic and renal GSH levels at t=6 hr, which persisted in liver but recovered in kidney in 24 hr. Both hepatic and renal concentrations of cysteine, a common substrate for synthesis of GSH and (hypo)taurine, was also lowered rapidly following the ethanol treatment. These results revealed that the reduction of cysteine availability played a significant role in the ethanol-induced depletion of the GSH level in liver and kidney.

However, the production of hypotaurine and taurine was greatly increased through the up-regulation of cysteine dioxygenase (CDO), mediating the generation of these two metabolites from cysteine, at the level of its gene and protein expression as well as enzymatic activity in liver. Therefore, these occurrences would contribute to the decline of cysteine availability for GSH generation. In contrast, the expression of GCL (glutamate cysteine ligase), the rate-limiting enzyme in the metabolic pathway from cysteine to GSH, was not affected by ethanol, which could not account for the changes in the level GSH.

In conclusion, the results in this study indicate that acute administration of ethanol reduced GSH synthesis by causing the

elevation of the hypotaurine and taurine synthesis through the regulation of CDO, rather than GCL and also suggest that the physiological significance of these phenomena at the expense of the reduced GSH synthesis need to be studied.

**Keywords :** ethanol, glutathione, cysteine, (hypo)taurine  
cysteine dioxygenase (CDO),  
glutamate cysteine ligase (GCL).

**Student Number :** 2011-21755