

만성 알코올과 철분의 과잉 섭취가 흰쥐의 간 세포 미토콘드리아 DNA 손상에 미치는 영향*

박정은 · 이정란 · 정자용†

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of chronic alcohol and excessive iron intake on mitochondrial DNA damage in the rat liver*

Park, Jung-Eun · Lee, Jeong-Ran · Chung, Jayong†

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

ABSTRACT

Purpose: In this study, we investigated the effects of chronic alcohol and excessive iron intake on mitochondrial DNA (mtDNA) damage and the progression of alcoholic liver injury in rats. **Methods:** Twenty-four Sprague-Dawley male rats were divided into four groups (Control, EtOH, Fe, and EtOH + Fe), and fed either control or ethanol (36% of total calories) liquid diet with or without 0.6% carbonyl iron for eight weeks. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, liver malondialdehyde concentrations were measured by colorimetric assays. Liver histopathology was examined by Hematoxylin-eosin staining of the fixed liver tissues. The integrity of the hepatic mtDNA and nuclear DNA was measured by long-range PCR. The gene expression levels of cytochrome c oxidase subunit 1 (Cox1) and NADH dehydrogenase subunit 4 (Nd4) were examined by real-time PCR. **Results:** Serum ALT and AST activities were significantly higher in the EtOH+Fe group, as compared to the Control group. Similarly, among four groups, liver histology showed the most severe lipid accumulation, inflammation, and necrosis in the EtOH + Fe group. PCR amplification of near-full-length (15.9 kb) mtDNA showed more than 50% loss of full-length product in the liver of the EtOH + Fe group, whereas amounts of PCR products of a nuclear DNA were unaffected. In addition, the changes in the mtDNA integrity showed correlation with reductions in the mRNA levels of mitochondrial gene Cox1 and Nd4. **Conclusion:** Our data suggested that the liver injury associated with excessive iron and alcohol intake involved mtDNA damage and corresponding mitochondrial dysfunction.

KEY WORDS: alcoholic liver injury, iron, mitochondrial DNA

서 론

알코올은 전세계적으로 많이 남용되고 있는 약물로, 우리나라 성인의 음주 비율은 평균 60.1% (남자 75.3%, 여자 45.7%)로 매우 높으며,¹ 고위험음주율 (1회 음주 시 남성은 7잔 이상, 여성은 5잔 이상을 주 2회 이상) 또한 계속해서 증가하는 추세에 있다.² 국내 알코올 관련 질환에 의한 사망자 수는 한 해 4,500여명으로 알코올이 국민 건강에 미치는 영향이 매우 높아 이에 대한 관심이 필요하다.³ 알코올성 간질환 (alcoholic liver disease, ALD)은 지방간

(steatosis), 지방간염 (steatohepatitis), 간염 (hepatitis), 간 섬유증 (hepatic fibrosis), 그리고 간경변증 (liver cirrhosis)의 진행 단계를 거친다. 한 가지 주목할 점은 개인마다 알코올성 간 손상에 대한 감수성이 다르며, 알코올 남용자의 일부만이 간경변증과 같은 심한 간질환으로 진행된다는 점이다.⁴ 즉, 습관적인 음주자의 대부분인 90~100%에서 알코올성 지방간이 발생하는 반면, 알코올성 간염은 10~35%에서, 알코올성 간경변증은 8~20%에서만 발생하는 것으로 보고되고 있다.⁵ 이는 알코올성 간질환의 진행 속도 및 중증도는 알코올 이외의 다른 환경적·영양적 요인들이 중

Received: August 18, 2015 / Revised: September 24, 2015 / Accepted: October 8, 2015

*This work was supported by grants from the Basic Science Research Program of the National Research Foundation (NRF-2010-0011226).

†To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-2-961-0977, e-mail: jchung@khu.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

요하게 관여함을 제시한다.

철분은 펜톤 반응에 의해 하이드록실 라디칼 등의 활성 산소종 생성을 촉매하여 산화스트레스를 유발하고, 그 결과 지질 과산화, 단백질 및 DNA 산화 반응을 증가시켜 조직의 손상을 초래한다. 기존의 선행 연구에 따르면, 8주간 알코올을 만성 투여한 랫트 (rat) 모델에서 간 조직의 철분 농도와 간 손상 정도에 유의적인 상관관계가 있는 것으로 나타났으며⁶ 위내 삽관 (intragastric infusion) 법으로 알코올을 연속적으로 투여한 쥐 모델에서 철분을 같이 공급해 주었을 때, 산화스트레스가 증가되고 일부 쥐의 경우 간섬유증에서 간경변증으로 이행이 관찰되었다.⁷ 또한 알코올성 간경변증 환자들을 대상으로 한 연구에서, 간의 철분 농도가 높을수록 간경변증으로 인한 사망률이 높아지는 것으로 나타났다.⁸ 이와 같이 만성적인 알코올 섭취와 과잉의 철분은 간 손상의 진행 단계를 가속화시켜 심각한 간 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있어 그 작용 기전에 대한 이해가 필요하다.

특히 만성 알코올 섭취와 과량의 철분 섭취는 서로 밀접한 관계가 있는데, 국민건강영양조사를 기반으로 성인 음주자의 영양소 섭취 실태를 분석한 최근의 연구에 따르면,⁹ 비음주자에 비해 문제음주자와 알코올 의존자는 유의적으로 철분을 많이 섭취하는 것으로 나타났다. 또한, Kwak 등¹⁰의 연구에서도 음주군은 비음주군에 비해 하루 평균 철 섭취량이 유의적으로 높았으며, 이는 음주 시 안주 섭취로 인해 육류와 같은 동물성 식품의 섭취가 증가되기 때문으로 보인다. 또한 알코올 섭취가 증가할수록 혈청 철 농도와 체내 철 저장 상태를 나타내는 페리틴 농도가 비례하여 증가됨이 보고된 바 있다.¹¹

미토콘드리아는 세포 내에서 에너지 생산에 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아의 손상은 지방간을 비롯하여, 당뇨,¹² 치매,¹³ 일부 암^{14,15} 등 매우 다양한 질병의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 미토콘드리아는 세포 내 소기관 중 유일하게 자체 내에 미토콘드리아 DNA (mtDNA)를 가지고 있는데, 이들 mtDNA는 전자 수송계의 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 발생지와 인접해 있는 반면, 보호 단백질인 histone이 없어 ROS에 의한 산화적 손상에 매우 민감하게 노출되어 있다. 따라서 본 연구에서는 만성적인 알코올 섭취와 과잉의 철분이 mtDNA 손상에 미치는 영향을 살펴보고 간 조직 손상 정도와의 관계를 알아보고자 하였다.

연구방법

실험동물 및 식이구성

Sprague Dawley 종 수컷 쥐 24마리 (4주령)를 2일간 고

형 사료로 적응시킨 후, 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 6마리씩 총 4군 [대조군 (control), 알코올군 (EtOH), 철분군 (Fe), 알코올 + 철분군 (EtOH + Fe)]으로 분류하였다. 액상 사료인 Lieber-DeCarli liquid diet (Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA)를 공급하였으며, EtOH군과 EtOH + Fe군의 알코올 함량은 전체 열량의 36%가 되도록 첨가하였고, 대조군과 Fe군의 경우 알코올을 같은 열량의 maltose dextrin으로 대체하였다. Fe군과 EtOH + Fe군은 carbonyl iron을 최종 농도 0.6%가 되도록 첨가하였다.^{16,17} 각 군의 식이 공급량은 EtOH + Fe군을 기준으로 pair-feeding하였다. 동물 사육실은 온도 22~24°C, 습도 45 ± 5%, 조명 12시간 dark-light cycle로 조절하였으며 본 연구는 경희대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다 (KHUASP(SE)-09-002).

철분 수준 및 생화학 지표 측정

간 조직의 철분 함량은 조직을 동결건조한 후, 65% 질산 (Suprapur[®] grade, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)으로 ash화하여 inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (ICP-AES)로 측정하였다. 실험에 사용한 비커는 금속이온의 오염을 최소화 하기 위하여 10% HCl에 24시간 침지시킨 후 건조하여 0.4% EDTA 용액과 3차 증류수로 세척하였다. 혈액의 헤마토크리트 수치는 모세유리관에 채혈 후 원심분리하여 측정하였으며, 헤모글로빈 농도는 헤모글로빈 측정용 시약 (Yeongdong Pharmaceutical, Seoul, Korea)을 이용하여 540 nm에서 비색정량하였다.

간 조직에서 지질 과산화정도를 정량하기 위하여 malondialdehyde (MDA) 농도를 thiobarbituric acid와의 반응법으로 측정하는 Ohkawa 등¹⁸의 방법으로 532 nm에서 비색정량하였다. 또한, aspartate aminotransferase (AST) 측정용 시약과 alanine aminotransferase (ALT) 측정용 시약 (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 이들 효소의 혈청 내 활성을 측정하였다.

간 조직의 병리학적 검사

적출한 간 조직을 10% formalin에 48시간 고정 후 파라핀 블록을 제작하였고 5 µm 두께의 절편으로 슬라이드를 만들어 Hematoxylin-eosin과 Perls' Prussian blue 용액으로 염색을 실시하고 광학현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 400배의 배율로 관찰하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

각 군의 mtDNA 손상 정도를 비교하기 위해, mtDNA의

Table 1. Nucleotide sequence for PCR primers

Gene		Sequence	Size
15.9 kb fragment of mtDNA	forward	CCT CCC ATT CAT TAT CGC CGC CCT TGC	15.9 kb
	reverse	GAT GGG GCC GGT AGG TCG ATA AAG GAG	
200 bp fragment of mtDNA	forward	CCT CCC ATT CAT TAT CGC CGC CCT TGC	200 bp
	reverse	GTC TGG GTC TCC TAG TAG GTC TGG GAA	
Transferrin receptor	forward	GCA TAT TGG AAC ACT TGT GAG GGT GG	16.1 kb
	reverse	AGA AGA CAT GCG ATT AGA TGC CAG AA	
β -globin	forward	CCA ATC TGC TCA CAC AGG	265 bp
	reverse	CAC CTT TCC CCA CAG G	

전체 길이에 가까운 15.9 kb 영역을 긴 영역 PCR (long-range PCR)을 이용하여 증폭하였다. 이를 위해, 간 조직에서 DNeasy Blood & TissueTM 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출한 후, TaKaRa LA TaqTM 키트 (Takara Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 사용된 mtDNA 양을 보정하기 위한 loading control로는 mtDNA에 특이적인 200 bp 영역을 증폭하였다. mtDNA 15.9 kb 영역과 200 bp 영역의 증폭을 위해 사용된 primer의 염기 서열은 Table 1에 나타내었다. 또한, 각 군별 PCR product의 생성 변화가 mtDNA에 특이적인지, 아니면 핵 DNA (nuclear DNA)에서도 나타나는지를 알아보기 위해 비슷하게 긴 길이의 핵 DNA 영역에 대한 PCR을 수행하였다. 이 때 사용된 핵 유전자는 transferrin receptor 유전자 16.1 kb 영역과 β -globin 유전자 265 bp 영역이며 사용된 primer 염기 서열은 Table 1에 나타내었다. 15.9 kb mtDNA와 16.1 kb 핵 DNA는 93°C에서 3분간 초기 denaturation 시킨 후 93°C 15초, 64°C 30초, 68°C 15분의 cycle을 28회 반복하였으며 매 cycle마다 annealing 시간을 20초씩 증가하여 수행하였다. 200 bp mtDNA와 265 bp 핵 DNA는 초기 denaturation을 95°C에서 2분간 수행 후 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 cycle을 25회 반복하였다.

Real-time RT-PCR

mtDNA에 위치하고 있는 유전자의 발현 정도를 살펴보기 위하여 cytochrome c oxidase subunit 1 (*Cox1*)과 NADH dehydrogenase subunit 4 (*Nd4*) mRNA 수준을 real-time RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 우선, TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 간 조직의 total RNA를 추출하고 Nano 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량하였다. 정량한 RNA 1 μ g을 Prime ScriptTM RT reagent 키트 (Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용해 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 SYBR Premix Ex Taq

(Takara Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 MJ miniTM thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 수행하였으며, 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 총 40회 수행하였다.

통계분석

모든 값은 평균 (Mean)과 표준오차 (Standard error, S.E)로 표시하였고, 각 군 간 평균값의 차이는 One-way analysis of variance (ANOVA)로 분석 후 Duncan's multiple range test로 사후검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였으며, 모든 통계분석은 Statistical Analysis Systems (SAS) ver.9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA)을 사용하였다.

결 과

체중과 간 무게 변화 및 철분 영양상태

실험 식이를 8주간 공급한 후, 각 군의 최종 체중에는 유의적인 차이가 없었고, 알코올을 공급한 경우 (EtOH군, EtOH + Fe군) 간 조직의 무게와 체중 대비 간 조직의 무게가 유의적으로 높게 나타났다. 식이에 철을 보충한 경우 (Fe군), 간 조직의 철분 농도가 대조군에 비해 10배 이상 유의적으로 증가하였으며, 알코올과 함께 철을 보충한 그룹 (EtOH + Fe군) 역시 에탄올 단독 공급군 (EtOH군)에 비해 간 조직의 철분 농도가 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 한편, 혈중 헤마토크릿 수치와 헤모글로빈 농도는 각 군별로 유의적인 차이가 없었다 (Table 2).

알코올 및 철분이 간 조직 손상에 미치는 영향

지질의 과산화 정도를 나타내는 MDA 수준을 간 조직에서 관찰한 결과, 대조군에 비해 EtOH + Fe군이 유의적으로 증가함을 볼 수 있었으며, 혈청의 ALT와 AST 활성 수준 역시 대조군에 비해 EtOH + Fe군이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 1). 반면, 알코올을 단독 공급하거나 철분만을

Table 2. Body and liver weights, liver iron concentrations, and blood iron parameters after 8-week feeding of ethanol and iron in rats

	Control	EtOH	Fe	EtOH + Fe
Initial body weight (g)	191.7 ± 2.1	195.6 ± 5.8	194.2 ± 4.0	194.4 ± 6.1
Final body weight (g)	378.7 ± 8.4	373.6 ± 12.5	374.7 ± 10.4	354.0 ± 13.7
Liver weight (g)	8.9 ± 0.3 ^a	12.9 ± 0.5 ^b	9.6 ± 0.3 ^a	11.8 ± 0.5 ^b
Liver index (g/100 g bw)	2.4 ± 0.0 ^a	3.4 ± 0.1 ^c	2.6 ± 0.1 ^b	3.3 ± 0.0 ^c
Hematocrit (%)	44.9 ± 1.3	46.5 ± 0.3	50.0 ± 0.8	45.4 ± 2.4
Hemoglobin (g/dL)	14.7 ± 0.2	15.0 ± 0.3	14.7 ± 0.3	15.5 ± 0.3
Liver iron (μg/g dry wt)	310.0 ± 43.7 ^a	213.2 ± 40.6 ^a	3685.4 ± 526.4 ^c	1884.0 ± 231.8 ^b

Values are expressed as mean ± SE (n = 6 for each group). Means with different superscripts are significantly different at p < 0.05.

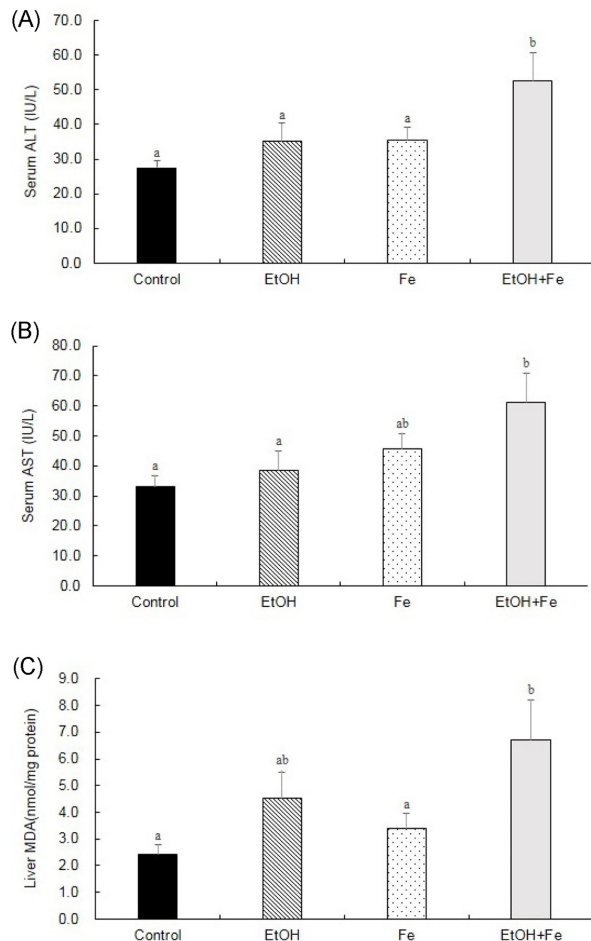


Fig. 1. Effects of ethanol and iron on serum ALT and AST activities and liver MDA concentrations. (A) Serum ALT activity, (B) Serum AST activity, (C) Liver MDA concentration. Values are expressed as mean ± SE (n = 6 for each group). Different superscripts show statistical significance (p < 0.05).

공급한 군에서는 간 조직 MDA, 혈청 AST와 ALT 활성 등 모든 지표에서 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

간의 병리학적 조직 변화를 관찰한 결과, EtOH군에서는 대조군에 비해 다수의 지방구가 확인되었다. Fe군에서는

지방구는 거의 없지만 염증을 확인할 수 있었으며, EtOH + Fe군에서는 다수의 지방구와 함께 염증성 세포의 침입 정도가 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 2).

알코올 및 철분이 간 조직의 mtDNA 손상에 미치는 영향

각 군별 간 조직 mtDNA의 보전 상태 (integrity) 혹은 손상 정도를 알아보기 위하여, 긴 영역 PCR을 이용하여 mtDNA의 전체 길이에 가까운 15.9 kb 길이의 mtDNA PCR product의 생성량을 비교하였다. 이 방법은 DNA 손상이 대부분 단일 혹은 이중 사슬 끊김 (single or double strand breaks)이나 광범위한 영역의 염기 변화 (bulky base modification)의 형태로 나타나며 이 경우 DNA 중합효소 (DNA polymerase)에 의한 반응을 방해하여 PCR 생성물의 양이 감소함을 이용한 방법이다.^{19,20}

15.9 kb mtDNA PCR 생성물의 양은 대조군에 비해, EtOH군, Fe군, EtOH + Fe군에서 모두 감소하였으며, 특히 EtOH + Fe군은 대조군의 절반 미만의 수준으로 가장 크게 감소하였다 (Fig. 3A). 이와는 대조적으로 비슷한 길이 (16.1 kb)의 핵 DNA에 대한 PCR 생성물의 양에는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타나 알코올 및 철분에 의한 DNA 손상이 mtDNA에서 특이적으로 발생함을 알 수 있었다 (Fig. 3B). 한편, 이들 실험에서 mtDNA 혹은 핵 DNA loading control로 사용한 200~265 bp 길이의 PCR 생성물의 양은 각 군 별 차이가 없었다.

알코올 및 철분이 미토콘드리아 호흡사슬효소 (respiratory chain enzymes) 유전자 발현 정도에 미치는 영향

*Cox1*과 *Nd4*는 mtDNA에 위치하며 미토콘드리아의 호흡사슬효소 (respiratory chain enzyme)를 구성하는 cytochrome c oxidase subunit 1과 NADH dehydrogenase subunit 4를 부호화 (coding)하는 유전자이다. 앞에서 관찰된 mtDNA의 손상이 이들 유전자 발현에 영향을 미치는지

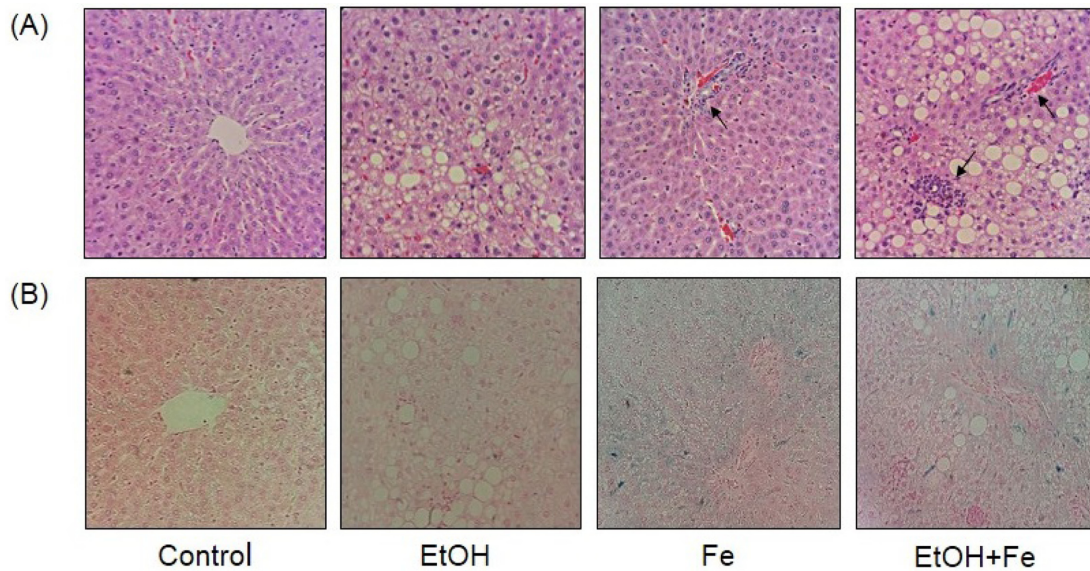


Fig. 2. Liver histology in ethanol and/or iron fed rats (x400). (A) Hematoxylin and eosin (H&E) staining, (B) Perls' Prussian blue staining (iron staining). Arrows show inflammatory cell infiltrations.

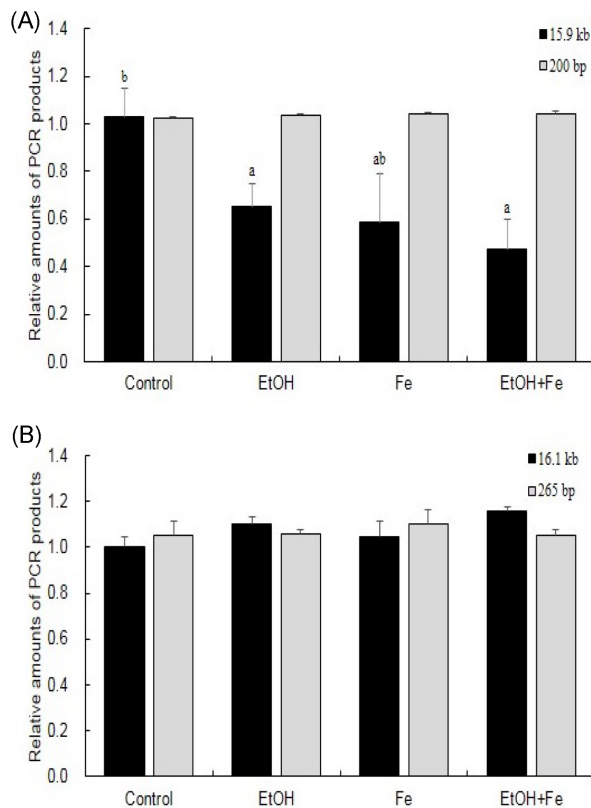


Fig. 3. Effects of ethanol and iron on the integrity of mitochondria DNA (mtDNA) and nuclear DNA. (A) Full-length (15.9 kb) mtDNA PCR products, (B) 16.1 kb nuclear transferrin receptor DNA PCR products. Values are expressed as mean \pm S.E (n = 6 for each group). Different superscripts show statistical significance (p < 0.05).

살펴보기 위하여, *Cox1* mRNA와 *Nd4* mRNA 수준을 real-time PCR로 측정하였다. 그 결과, 음성 대조군으로 사용한 핵 DNA 유전자인 *Gapdh* mRNA 수준은 EtOH군, Fe군 및 EtOH + Fe군의 세 군에서 모두 대조군과 비슷한 수준으로 나타났으나, EtOH군의 *Cox1* mRNA와 *Nd4* mRNA는 각각 대조군의 69.5%와 50.2% 수준으로 낮았으며, Fe군의 경우 *Cox1* mRNA는 대조군의 72.9%, *Nd4* mRNA는 대조군의 60.6% 수준으로 감소하는 것으로 나타났다. EtOH + Fe군의 경우, *Cox1* mRNA와 *Nd4* mRNA 모두 대조군에 비해 유의적으로 낮았으나, EtOH군 또는 Fe군에 비해 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 4).

고 찰

간은 알코올 대사의 주요 기관으로, 알코올로 인한 독성의 가장 대표적인 표적기관이 된다. 알코올성 간 질환은 간 세포에 중성지방이 축적되는 지방간을 초기 증상으로 하여 지방간염, 간염, 간섬유증, 간경변증 등의 좀 더 심각한 손상으로의 진행되는데, 이 때 활성산소로 인한 산화스트레스는 간 손상 진행의 가속화에 중요하게 관여한다. 미토콘드리아는 ROS를 생성하는 주된 장소이자 동시에 ROS에 의한 손상에 매우 민감한 세포 내 소 기관으로, 본 연구에서는 만성적인 알코올과 철분의 노출이 간 조직의 미토콘드리아에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

8주간의 만성적인 알코올 섭취와 과잉 철은 간 손상 지표인 혈청 ALT와 혈청 AST 활성도를 대조군에 비해 유의

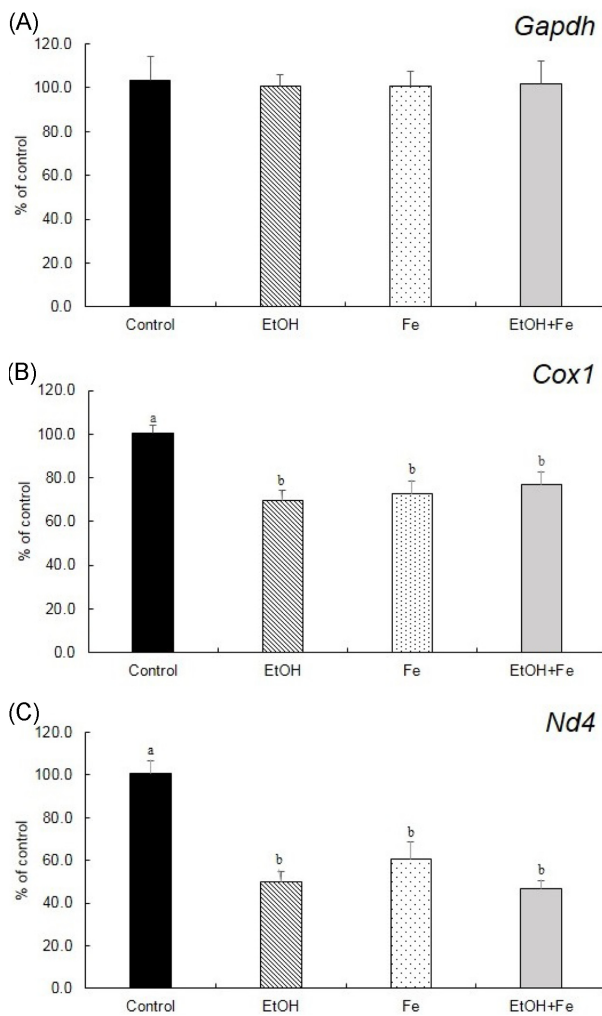


Fig. 4. Effects of ethanol and iron on the mRNA levels of *Cox1* and *Nd4* in the rat liver. (A) *Gapdh*, (B) *Cox1*, (C) *Nd4*. Values are expressed as mean \pm S.E (n = 6 for each group). Different superscripts show statistical significance (p < 0.05).

적으로 증가시켰다. 특히, AST는 세포질 뿐만 아니라 미토콘드리아의 내막에 위치하고 있음을 고려할 때,²¹ 혈청 AST 활성도 증가는 전반적인 간 손상과 함께 미토콘드리아의 심각한 손상이 있었음을 제시한다. 알코올을 단독 공급한 EtOH군의 경우 혈청 ALT와 혈청 AST 활성도 모두 대조군에 비해 유의적인 차이가 없게 나타나 선행 연구들과 비슷한 결과를 보였다.^{7,22} 또한, 과잉 철만을 공급한 Fe군의 경우 EtOH군에 비해 혈청 AST 활성도가 높은 경향을 나타냈으나, 대조군에 비해 유의적인 증가는 아니었으며, 알코올과 철을 모두 공급한 EtOH + Fe군에서만 대조군에 비해 유의적인 증가를 보였다. 이와 같은 변화는 간 조직의 형태적 변화와 일치하는 것으로 나타났는데, EtOH군의 경우 지방구의 축적이 관찰되는 단순 지방간의 상태인 반면

EtOH + Fe군의 경우 지방구 축적과 함께 다수의 염증성 세포의 침입과 조직의 괴사가 관찰되는 등 지방간염의 상태로 진행되었음을 알 수 있었다. 이는 알코올성 간 손상에 있어 알코올은 초기 지방간 상태를 유도하는 첫 번째 자극이 되고, 이후 추가적인 자극에 의해서 더욱 심각한 상태로 진행되는 소위 “two-hit” 가설을 뒷받침하는 것으로,²³⁻²⁵ 본 연구의 결과 과잉의 철분은 알코올에 의한 간 손상을 가속화하는 하는 주요한 자극 요인이 될 수 있음을 제시한다. 철분이 알코올에 의한 간 손상을 악화시키는 작용 기전 중의 하나로 산화스트레스 증가에 대한 연구가 주로 보고된 바 있다.²⁶ 또한, 철분은 간의 대식세포인 Kupffer 세포에서 NF- κ B를 활성화하고, pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 나 IL-6 등의 생성을 유도하는 등 염증 반응을 증가시킨다.²⁷ 뿐만 아니라, 철분은 지질대사 조절에 관여하는 유전자 발현수준을 변화시켜 간 조직²⁸과 혈청²⁹의 지질 농도를 높이는 것으로 나타나, 본 연구의 결과를 뒷받침한다.

만성적인 알코올과 철 공급이 간 조직의 DNA 손상에 미치는 영향을 살펴본 결과, 알코올과 철분 모두 mtDNA의 손상 정도를 유의적으로 높이는 것으로 나타났다. mtDNA는 전체 16,569 bp로 이루어진 비교적 작은 크기의 원형 DNA 분자로 histone 단백질에 의해 보호되지 않아 알코올 혹은 철분에 의한 자극에 취약함을 알 수 있다. 실제로 본 연구에서 histone 단백질과 결합하고 있는 핵 DNA의 경우 알코올 혹은 철분에 의한 변화는 나타나지 않았다. 또한 핵 DNA의 경우 핵막 내에 위치하고 있는 반면, mtDNA는 ROS 생성의 주요 장소인 미토콘드리아 내막에 가까이 위치하기 때문에³⁰ 알코올 또는 철분에 의한 산화스트레스의 증가가 mtDNA의 손상을 유발할 수 있을 것으로 사료된다. 철분 2가 이온은 과산화수소와 만나 하이드록실 라디칼을 형성하는 대표적인 산화촉진제 (pro-oxidant)이다. 마찬가지로 알코올은 cytochrome P450, NAD(P)H oxidase, inducible nitric oxide synthase 등의 효소 활성 증가를 비롯한 다양한 경로를 통해 산화스트레스를 유발하는 것으로 잘 알려져 있다.³¹⁻³³ 기존의 선행 연구에서 Larosch 등³⁴은 급성 (2시간)으로 알코올을 노출시켰을 때 일반 마우스에서는 간의 mtDNA 양이 감소되나 항산화 효소인 Mn-SOD (superoxide dismutase)에 대한 유전자를 결손시킨 knock-out 마우스에서는 나타나지 않음을 보고하여 알코올에 의한 mtDNA 손상에 ROS가 관여함을 제시한 바 있다. 또한, Tang 등³⁵은 항산화 물질인 퀘르세틴 (quercetin)을 보충 투여했을 때 알코올에 의한 미토콘드리아 형태적 (morphological) 손상이 억제됨을 관찰하였다. 하지만 Tang 등³⁵의 연구에서는 mtDNA의 변화 여부에 대해서는 연구되지 않은 제한점을 가진다. 따라서 본 연구 결과 나타

난 알코올 및 철분에 의한 mtDNA의 손상이 항산화 영양소의 보충에 의해 억제될 수 있는지 여부에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 대조군과 비해 알코올 및 철분에 노출된 군에서 mtDNA에 의해 부호화되는 유전자인 *Cox1*과 *Nd4*의 발현 수준이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 특히, EtOH + Fe군에서 *Nd4* mRNA의 감소 정도는 EtOH군 혹은 Fe군의 감소 정도에 비해 더욱 크게 나타났으나 유의적인 차이는 아니었다. mtDNA는 호흡사슬효소 복합체를 구성하는 필수단백 소단위 (subunit)들에 대한 다수의 유전자를 포함하고 있는데, *Cox1*과 *Nd4*는 복합체 I (NADH 탈수소효소)와 복합체 IV (사이토크롬 c 산화효소)의 소단위로서 미토콘드리아의 내막에 위치하여 산화적 인산화에 의한 ATP 합성에 관여한다. 따라서, 알코올과 철분에 의한 mtDNA 손상은 호흡사슬효소 구성 단백질에 대한 mtDNA 유전자의 발현을 억제하여 미토콘드리아 기능 저하를 유발할 수 있음을 제시한다. Lakshmi와 Anuradha³⁶은 에탄올과 함께 철을 공급한 랫트 (rat)의 간 조직에서 호흡사슬효소 복합체의 활성 변화를 측정 한 결과, 복합체 I과 복합체 IV의 활성도가 대조군의 약 50~60% 수준으로 감소함을 보고한 바 있다. 또한, 심근세포주인 H9c2 세포에 고농도의 철을 처리하였을 때,³⁷ mtDNA 손상에 비례하여 미토콘드리아에 의한 산소 소모량이 유의적으로 감소한 것으로 나타나 본 연구의 결과를 뒷받침한다.

요 약

본 연구에서는 Sprague-Dawley 종 랫트 수컷을 대조군, EtOH군, Fe군, EtOH + Fe군으로 나누어, 알코올과 철분을 액상 사료로 8주간 공급한 후, 간 조직과 간 세포 mtDNA의 손상 정도를 알아보았다. EtOH + Fe군은 대조군, EtOH군, Fe군의 다른 세 군에 비해 혈청 ALT와 혈청 AST 수치가 가장 유의적으로 높았으며, 간 조직 검사의 결과에서도 다수의 지방구, 염증성 세포 침입 및 조직의 괴사가 관찰되는 등 가장 심한 간 손상이 확인되었다. DNA 손상 여부를 긴 영역 PCR을 사용하여 분석한 결과, 만성적인 알코올과 철분에 의한 노출은 간 세포의 mtDNA 손상을 유발하는 것으로 나타났으며, 핵 DNA에는 영향을 미치지 않았다. 또한 미토콘드리아의 호흡에 관여하는 *Cox1*과 *Nd4* 유전자 발현 정도를 real-time PCR으로 분석한 결과, 알코올 또는 철분은 간 세포의 *Cox1* mRNA와 *Nd4* mRNA 수준을 유의적으로 낮추는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 만성 알코올 또는 과잉의 철분에 의한 간 손상에 mtDNA 손상 및 미토콘드리아 기능 저하가 관여함을 제시한다.

References

1. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2013: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-1). Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2014.
2. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Community health survey 2014. Cheongju; Korea Centers for Disease Control and Prevention: 2015.
3. Statistice Korea. Cause of death statistics 2013 [Internet]. Daejeon: Statistice Korea; 2014 [cited 2015 Aug 1]. Available form: <http://kostat.go.kr>.
4. Stewart S, Jones D, Day CP. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. Trends Mol Med 2001; 7(9): 408-413.
5. Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. Hepatology 1996; 23(5): 1025-1029.
6. Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR. Alcohol mediates increases in hepatic and serum nonheme iron stores in a rat model for alcohol-induced liver injury. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20(8): 1352-1361.
7. Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S, Brittenham GM. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. J Clin Invest 1995; 96(1): 620-630.
8. Ganne-Carrié N, Christidis C, Chastang C, Ziol M, Chapel F, Imbert-Bismut F, Trinchet JC, Guettier C, Beaugrand M. Liver iron is predictive of death in alcoholic cirrhosis: a multivariate study of 229 consecutive patients with alcoholic and/or hepatitis C virus cirrhosis: a prospective follow up study. Gut 2000; 46(2): 277-282.
9. Kim HT, Chun SS, Joung SH, Yun ME. Nutrient intake status of Korean drinkers: analysis of data from Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES), 2011. J Korean Diet Assoc 2013; 19(4): 343-355.
10. Kwak CS, Lee JW, Hyun WJ. The effects of smoking and alcohol drinking on nutritional status and eating habits in adult males. Korean J Community Nutr 2000; 5(2): 161-171.
11. Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. Alcohol Clin Exp Res 2001; 25(7): 1037-1045.
12. Blake R, Trounce IA. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. Biochim Biophys Acta 2014; 1840(4): 1404-1412.
13. Aliev G, Priyadarshini M, Reddy VP, Grieg NH, Kaminsky Y, Cacabelos R, Ashraf GM, Jabir NR, Kamal MA, Nikolenko VN, Zamyatnin AA Jr, Benberin VV, Bachurin SO. Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease. Curr Med Chem 2014; 21(19): 2208-2217.
14. Wallace DC. Mitochondria and cancer. Nat Rev Cancer 2012; 12(10): 685-698.
15. Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. Front Oncol 2013; 3: 292.

16. Olynyk J, Hall P, Reed W, Williams P, Kerr R, Mackinnon M. A long-term study of the interaction between iron and alcohol in an animal model of iron overload. *J Hepatol* 1995; 22(6): 671-676.
17. Takeyama Y, Kamimura S, Kuroiwa A, Sohda T, Irie M, Shijo H, Okumura M. Role of Kupffer cell-derived reactive oxygen intermediates in alcoholic liver disease in rats in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20(9 Suppl): 335A-339A.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
19. Ayala-Torres S, Chen Y, Svoboda T, Rosenblatt J, Van Houten B. Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* 2000; 22(2): 135-147.
20. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(2): 514-519.
21. Masola B, Devlin TM. Intramitochondrial localization of alanine aminotransferase in rat-liver mitochondria: comparison with glutaminase and aspartate aminotransferase. *Amino Acids* 1995; 9(4): 363-374.
22. Demori I, Voci A, Fugassa E, Burlando B. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. *Alcohol* 2006; 40(3): 185-191.
23. Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, McKillop IH. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol* 2012; 46(8): 715-725.
24. Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. *Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306(10): G819-G823.
25. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114(4): 842-845.
26. Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(2 Suppl): 70-76.
27. Xiong S, She H, Sung CK, Tsukamoto H. Iron-dependent activation of NF- κ B in Kupffer cells: a priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alcohol* 2003; 30(2): 107-113.
28. Choi JS, Koh IU, Lee HJ, Kim WH, Song J. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2013; 24(9): 1634-1644.
29. Silva M, da Costa Guerra JF, Sampaio AF, de Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Iron dextran increases hepatic oxidative stress and alters expression of genes related to lipid metabolism contributing to hyperlipidaemia in murine model. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 272617.
30. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(17): 6465-6467.
31. Cederbaum A. Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(10): 1223-1244.
32. Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(1): 1-10.
33. Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 potentiation of LPS and TNF α -induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress, activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction. *Genes Nutr* 2010; 5(2): 149-167.
34. Larosche I, Choumar A, Fromenty B, Lett  ron P, Abbey-Toby A, Van Remmen H, Epstein CJ, Richardson A, Feldmann G, Pessayre D, Mansouri A. Prolonged ethanol administration depletes mitochondrial DNA in MnSOD-overexpressing transgenic mice, but not in their wild type littermates. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 234(3): 326-338.
35. Tang Y, Gao C, Xing M, Li Y, Zhu L, Wang D, Yang X, Liu L, Yao P. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(5): 1194-1200.
36. Lakshmi Devi S, Anuradha CV. Mitochondrial damage, cytotoxicity and apoptosis in iron-potentiated alcoholic liver fibrosis: amelioration by taurine. *Amino Acids* 2010; 38(3): 869-879.
37. Gao X, Campian JL, Qian M, Sun XF, Eaton JW. Mitochondrial DNA damage in iron overload. *J Biol Chem* 2009; 284(8): 4767-4775.