

단백질메칠화 반응과 간독성간의 상관관계

김재현* · 박창원 · 이주한 · 백윤기 · 문화희 · 홍성렬¹ · 이향우²

국립보건안전연구원 독성부, ¹성균관대학교 유전공학과, ²성균관대학교 약학과

Correlation between Protein Methylation and Hepatotoxicity

Jae Hyun KIM*, Chang Won PARK, Joo Han LEE, Yun Gi BAEK,
Hwa Hwey MOON, Sungyoul HONG¹ and Hyang Woo LEE²

National Institute of Safety Research, 5 Nokbun-Dong, EunPyung-Ku, Seoul 122-020, Korea

¹Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

²Department of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University Suwon, 440-746, Korea

(Received January 26, 1994; accepted March 23, 1994)

Abstract—The methylation response as well as the level of methyl donor substance, S-adenosyl-L-methionine (SAM) has been suggested to be related to hepatotoxicity including hepatocarcinogenesis. But direct correlation between protein methylation and hepatotoxicity has not been established to the present. To observe relationship between protein methylation and short-term hepatotoxicity induced by chemical substances, the activities of protein methylase I and II (PM I, PM II) were examined in cytosolic fraction of SD rat treated orally with acetaminophen(AA), α -naphthyl-isothiocyanate (ANIT) and tetracycline (TC) that was known to produce necrosis, cholestasis and steatosis respectively. To evaluate the degree of hepatotoxicity induced by each chemicals, we observed the serum levels of indicative parameters and histopathological alteration. In AA treated group, the activities of PM I were increased at 6, 12 hours after administration, prior to the appearance of the hepatotoxicity by clinical parameters. It was suggested that the levels of PM I were related with the initial stage of hepatotoxic mechanism induced by AA. In ANIT treated group, though most of clinical parameters were significantly increased at 24, 48 hours after administration, the activity of PM I was not changed, indicating that ANIT induced hepatotoxicity was not coupled to protein methylation.

Keywords □ hepatotoxicity, protein methylases, acetaminophen, α -naphthylisothiocyanate, tetracycline, nitric oxide synthase.

단백질은 리보솜에서 polypeptide chain의 생합성 후 여러 형태의 공유결합성 변형을 받으며, 이러한 단백질 변형의 종류에는 methylation, acetylation, hydroxylation, phosphorylation, carboxylation 및 glycosylation 등이 있다. 그중 단백질메칠화반응은 Ambler와 Rees (1959)가 *Salmonella typhimurium*의 편모단백질에서 methyllysine을 발견한 아래, 메칠화와 관련된 효소 및 그 생화학적 의미에 대한 많은 연구가 진행되었다.

단백질에 메칠기를 전이시키는 효소 중, protein methylase I (S-adenosyl-L-methionine: protein arginine N-methyltransferase: EC 2.1.1.23; PM I)은 단백질의 arginine 잔기의 guanidino기에 메칠기를 전이시키는 효소

이며, protein methylase II (S-adenosyl-L-methionine: protein carboxyl-O-methyltransferase: EC 2.1.1.24; PM II)는 dicarboxylic 아미노산의 carboxyl기에 메칠기를 전이 시키는 효소이다.

이들 효소를 뿐만 아니라 여러가지 메칠전이효소는 메칠공여체인 S-adenosylmethionine이라는 생체물질을 사용하여 단백질 뿐만 아니라 DNA, RNA, polysaccharide, lipid 등 고분자화합물에 메칠기를 전이시킨다. 그밖에 SAM은 polyamine 생합성(Tabor와 Tabor, 1976), methionine이나 cystein과 같은 sulfur가 함유된 아미노산의 대사조절(Mudd와 Levy, 1983)에도 관여한다.

최근 특정단백질의 아미노산 측쇄에 일시적이거나 지속적인 변형은 단백질에 구조적인 변화를 일으켜 종양 발생 과정 중 유발인자(inducer)로 제공될 가능성이 있

* To whom correspondence should be addressed.

음을 보고한 후, 단백질 메칠화와 발암성을 포함한 독성간의 관계를 규명하기 위한 연구가 진행 중이다. 단백질메칠화, 특히 histone methylation은 유전자발현과 복제에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정하여 조절의 소실 혹은 amplification에 의한 종양을 유도할 수 있음을 보고하였다(Duerre 등, 1991).

또한 Paik 등(1975)은 성장속도가 다른 여러 hepatoma에서 PM I의 활성도를 측정한 결과 hepatoma의 성장속도와 비례하여 활성도가 증가함을 보고하였으며, Shinkai 등(1989)은 메칠기를 전이시키는 반응을 저해하는 5'-methylthioadenosine(MTA), 2'-deoxyadenosine 및 sinefungin이 랫드 복강간암세포에 대한 invasion을 *in vitro*에서 저해함을 관찰하였으며 이러한 현상은 단백질, 지방 및 혼산의 메칠화저해 작용에 의한 것이라고 보고하였다. 상기 서술한 단백질 메칠화 반응 외에 메칠기의 세포내 공급이나 대사의 결핍을 유발시키는 메칠결핍사료(methyl-deficient diet)를 먹인 랫드에서 지방간과 발암과정의 촉진현상이 관찰되었다. 이는 세포내 SAM의 고갈로 인한 메칠화의 저하로 중식을 조절하는데 중요한 역할을 하는 gene(C-myc, C-fos, Ha-ras)들의 발현상승을 유도함에 기인된다고 추정하여 DNA 메칠화와 간독성간의 관련성을 시사하였다(Wainfan과 Poirier, 1992). 또한 diethylnitrosamine으로 유발시킨 간암 모델(resistant hepatocyte model)에서 GGT positive foci를 형성하는 과정 중에 SAM의 농도, SAM/SAH (S-adenosyl-L-homocysteine)의 비율 및 DNA 메칠화의 감소가 관찰되었다. 또한 외부에서 투여한 SAM에 의해 간세포내의 SAM의 농도와 DNA 메칠화의 회복이 용량의존적으로 관찰됨으로써 SAM의 항발암촉진효과에 DNA 메칠화가 관련됨을 보고하였다(Pascale 등, 1991; Pascale 등, 1991).

실험동물 모델에서 α -naphthylisothiocyanate(ANIT)와 같은 독성물질에 의해 유도되는 병리학적 간질환은 메칠기 전이시 메칠공여체로 사용되는 SAM의 투여로 호전됨이 관찰되었다. 이는 간독성 유발물질에 의해 야기되는 인지질 메칠화의 감소를 회복시킴으로써 간세포막 유동성과 Na^+ , K^+ -ATPase 활성도를 정상적으로 만들뿐만 아니라 trans-sulphuration 경로를 촉진시킴으로써 간의 해독작용을 개선시킬 수 있다고 보고하였다(Padova 등, 1985; Shinkai 등, 1989; Cacciatore 등, 1989). 또한 Cabrero 등(1988)은 SAM합성효소의 활성도가 간경변환자에서 현저히 감소됨을 관찰하였으나 SAM의 세포내 농도는 정상인과 유사한 수치를 나타냄을 보고하였다. 이는 간경변증에서 메칠화 반응시 SAM의 이용률 저하와 관련성이 있을 것으로 추정하여 SAM을 간질환 치료제로의 개발 가능성을 시사하였다. 또한 galactosamine(Stromentinoli 등, 1978)이나 ethanol(Pascale 등, 1984)에 의해 발생하는 실험실적 간상해의 경우에서도 간세포내 SAM의 농도가 현저히 감소됨을 보고하여 여러가지 화

학물질에 의해 유도되는 간독성에 메칠전이반응이 관련하는 것으로 추정하였다.

이상과 같이 생체고분자물질의 메칠화반응과 SAM의 세포내 농도가 간암을 포함한 간독성과 상관성이 있음을 시사하는 사례가 많이 보고되었지만 단백질메칠화 반응과 간독성간의 관계는 명확하게 규명되지 않았다. 따라서 본실험에서는 서로다른 간독성기전을 가진 시험물질을 선택한 후, 간독성 기전별에 따른 단백질 메칠화효소의 활성도를 측정함으로써 단백질메칠화반응과 간독성간의 상관관계를 규명하여 간독성기전에 대한 생화학적 의미를 고찰코자 본 실험을 수행하였다. 또한 단백질메칠화 반응과 관련된 새로운 간독성 지표물질을 폭넓게 탐색하여 이들 결과를 종합한 후 조기 간독성 지표로 응용가능성 여부를 타진해 보고자 하다.

한편 nitric oxide(NO)는 free radical구조를 갖는 무색기체로 생체내에서의 cytotoxic 작용, 내피세포에서의 혈관이완작용 및 신경전달물질로서의 작용 등에 관여한다. Nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성된 NO는 간에 존재하고 있는 Kupffer cell에서 cytotoxic효과가 있어 간독성과의 관련성이 시사되고 있다. 특히 NO는 모든 생체조직내에서 L-arginine으로부터 citrulline을 형성하는 과정에서 형성되는데 메칠화된 단백질의 대사 산물인 N^G -monomethyl-L-arginine 등 메칠화된 arginine이 NOS의 저해제로 밝혀짐(Olken 등, 1991)에 따라 화학물질에 의해 유도되는 간독성과 단백질메칠화반응과 연관된 NOS의 활성도 변화에 대한 연구도 병용하고자 한다.

실험방법

실험동물

생후 5주령의 건강상태가 양호한 SD계 웅성 랫드(250 ± 20 g)를 실험에 사용하였으며 동물에 검체를 투여하기 전 24시간 동안 절식시키고 물은 자유롭게 섭취시켰다. 동물사육조건은 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 명암 교대 12시간(조명시간 06:00~18:00)을 유지했다.

검체 및 시약

간독성을 유발시키기 위해 사용된 acetaminophen (AA), tetracycline(TC), α -naphthylisothiocyanate(ANIT)는 모두 Sigma Co.에서 구입하였으며, *S*-adenosyl-L-[m -methyl- 14 C]methionine(specific activity; 56 mCi/mmole)은 Amersham에서, protein assay kit는 Bio-Rad사에서 구입하여 protein methylases 활성도 측정과 단백질 정량에 각각 사용하였다.

또한 혈액생화학적 지표인 ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin 및 cholesterol 측정시약은 Technicon사에서 구입하였다. 기타 시약은 모두 특급(GR)을 사용하였다.

약물의 제조와 투여

Acetaminophen은 1% CMC용액에 혼탁하여 2400

mg/kg tetracycline은 3000 mg/kg, ANIT는 200 mg/kg의 용량으로 하루 동안 절식시킨 SD계 랫드에 경구투여한 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 및 48시간 후에 diethyl ether로 마취하여 부검하였다. 투여 후 48시간에 이르기까지 사료는 공급하지 않았으며, 물은 자유로이 섭취하게 하였다.

혈청분리 및 혈액생화학적 검사

부검시 간장적출에 앞서 최대한 채혈 후 방혈시켜서 간장내 혈액을 제거한 후 채혈한 혈액은 실온에서 약 1시간 방치 후 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈액생화학적 검사는 자동혈액 생화학 분석기(RA-XT; Technicon)를 이용하여 ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin 및 cholesterol의 양을 측정하였다.

조직병리학적 검사

간장 적출 즉시 조직병리학적 검사를 위해 일정부위를 잘라 10% formalin 용액에 고정시키고 나머지는 효소의 활성도를 측정하기 위해 액체질소에 동결하여 저장하였다. 고정한 간엽은 embedding, 염색을 거쳐 슬라이드로 제작하여 혈미경 하에서 조직병리학적 검사를 실시하였다.

세포질 분획 분리

액체질소에 동결한 간엽은 사용시 0°C에서 녹여 1g을 취한 후 0.25 M sucrose를 9 ml(9 column, w/v) 가하여 teflon glass homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 double layered cheese cloth를 통과시킨 다음 105,000 ×g로 1시간 원심분리 후 상등액을 취하여 세포질 분획(cytosolic fraction)을 얻어 효소(PM I, PM II 및 NOS)의 활성도를 측정하는데 사용하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bio-Rad 표준용액과 단백질 정량시약을 사용하여 Bredford 방법으로 측정하였다. 먼저 표준용액을 정량시약의 microassay 표준범위인 25 µg 이하의 농도로 만들기 위해 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.125 µg/ml 단계로 희석하고, 적당한 비율로 희석시킨 세포질분획 800 µl에 200 µl의 reagent를 넣어 발색시킨 후 595 nm에서 spectrophotometer(GILFORD사)로 측정하여 단백질의 양을 측정하였다.

Protein Methylase I의 활성도 측정

세포질 분획을 효소원으로 하여 Kim의 방법(Kim과 Paik, 1980)에 따라 다음과 같이 실시하였다. Eppendorf tube에 0.5 M sodium phosphate buffer(pH 7.2) 20 µl을 가하고, 기질로 histone type II-As(30 mg/ml), 효소원으로 세포질분획 20 µl을 가한 후 37°C에서 5분간 preincubation한 후 S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine(specific activity: 56 mCi/m mole) 20 µl을 가한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 100 µl의 30% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시키고 90°C로 15분간 가온하여 crude enzyme내에 존재하는 혼산과 인지질을 제거한 후 15% TCA로 2회 세척하여 과량의 미반응 방사성 물질을

제거하였다. 0.5 M sodium phosphate 완충액(pH 8.0) 0.2 ml을 넣고 5분간 60°C에서 incubation시키고 15% TCA로 세척하여 PM II에 의한 methylester compound를 제거하여 ethanol로 세척한 후 남아있는 단백질을 Bray's solution용액 5 ml에 혼탁시켜 histone에 결합된 메칠기의 방사선동위원소량을 scintillation counter(PACKARD사)로 측정하였으며 이결과를 이용하여 1 mg의 시료단백에 의하여 1분 동안 기질인 histone type II-As로 전이된 방사선동위원소로 표지된 methyl기의 양을 SAM의 pmole수로 나타내었다.

Protein Methylase II의 활성도 측정

Eppendorf tube에 citrate-phosphate 완충액(pH 6.0) 40 µl, 20 µl의 histone 혼탁액(histone type II-As), 30 µl의 세포질분획을 넣은 후 37°C에서 5분간 preincubation한 후 10 µl의 [methyl-¹⁴C]SAM을 가한 다음 37°C에서 10 분간 incubation하였다. 100 µl의 15% TCA를 가하여 반응을 정지시키고 ethanol과 15% TCA로 2회 세척한 후 chloroform : ether : ethanol 혼합액(1 : 2 : 2, v/v)과 ethanol로 세척한 후 방사선동위원소량을 측정함으로써 이 효소의 활성도를 계산하였다.

NOS의 활성도 측정

효소원으로 세포질분획 50 µl와 50 mM Tris 완충액(0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 M leupeptin, 1 M pepstatin A 포함; pH 7.4) 50 µl를 첨가하고 2 mM CaCl₂, 1 mM NADPH, 1 µg calmodulin, 33 µM[2.3.4.5-³H]-arginine를 가하고 37°C에서 10분간 incubation한 후 Dowex suspension II (Dowex-50W, Na⁺ form, 200~400 mesh: 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 1 mM citrullin, 2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA 포함=2 : 1) 1 ml을 가해 반응을 종결시켰다. 11,000 ×g에서 5분간 원심분리 후 그 상등액 400 µl를 취해 scintillation vial에 넣고 Bray's solution 10 ml을 가한 후 liquid scintillation counter로 방사선동위원소량을 측정하였다. Blank는 incubation 혼합물에서 효소원 대신 50 mM Tris 완충액(pH 7.4)를 사용하였다. NO syntase의 specific activity는 1 mg protein에서 1분당 생성되는 citrulline의 pmole로 나타내었다.

실험결과

Acetaminophen(AA)유발 간독성시 단백질메칠화반응의 변화

간의 괴사를 일으키는 것으로 알려진 AA를 2400 mg/kg의 농도로 단일경구투여한 후 3, 6, 12, 24 및 48시간에서 혈액생화학적 검사, 조직병리학적 검사 및 protein methylase I, II의 활성도를 측정한 결과, 혈액생화학적 지표 중 간괴사의 독성지표로 이용되는 ALT, AST의 경우 투여 후 24시간에서 최대의 수치를 보인 후 48시간에서는 수치가 감소하는 경향을 관찰하였다(Fig. 1a, b).

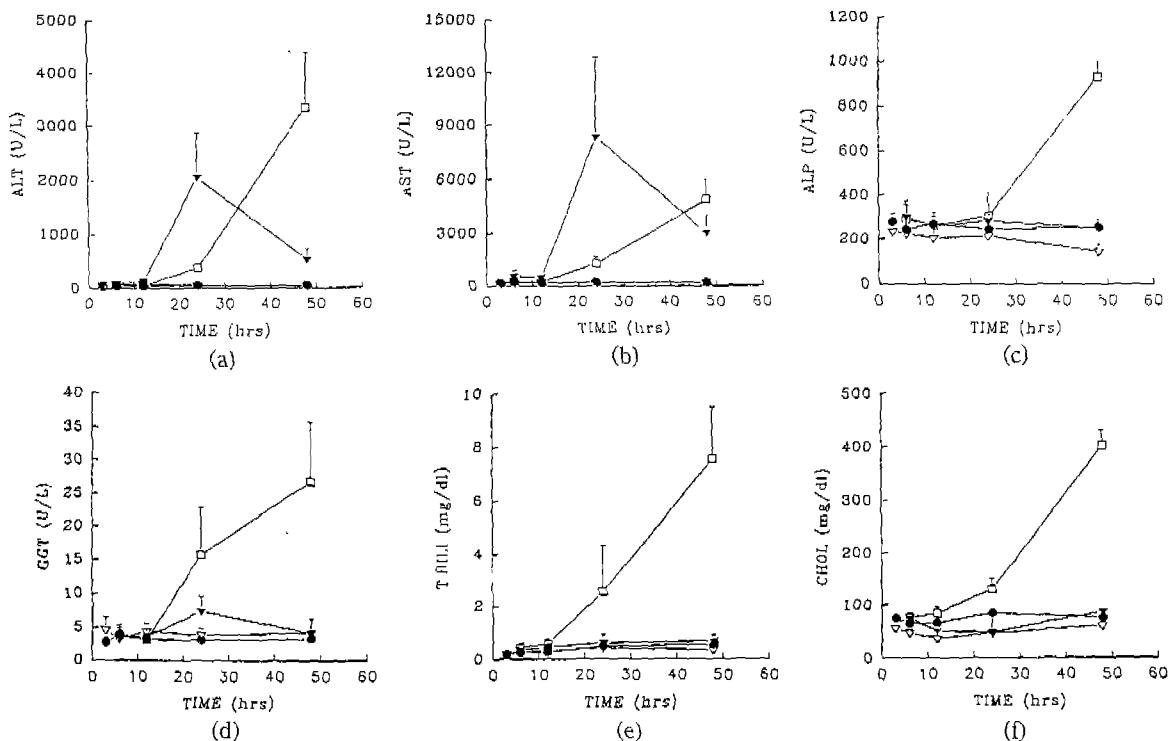


Fig. 1. Change of Clinical Parameters after Hepatotoxic Substances Treatment. Each value represents the mean \pm standard deviation of result with eight animals (●: Control, ▼: Acetaminophen, □: α -naphthylisothiocyanate, ▽: Tetracycline).

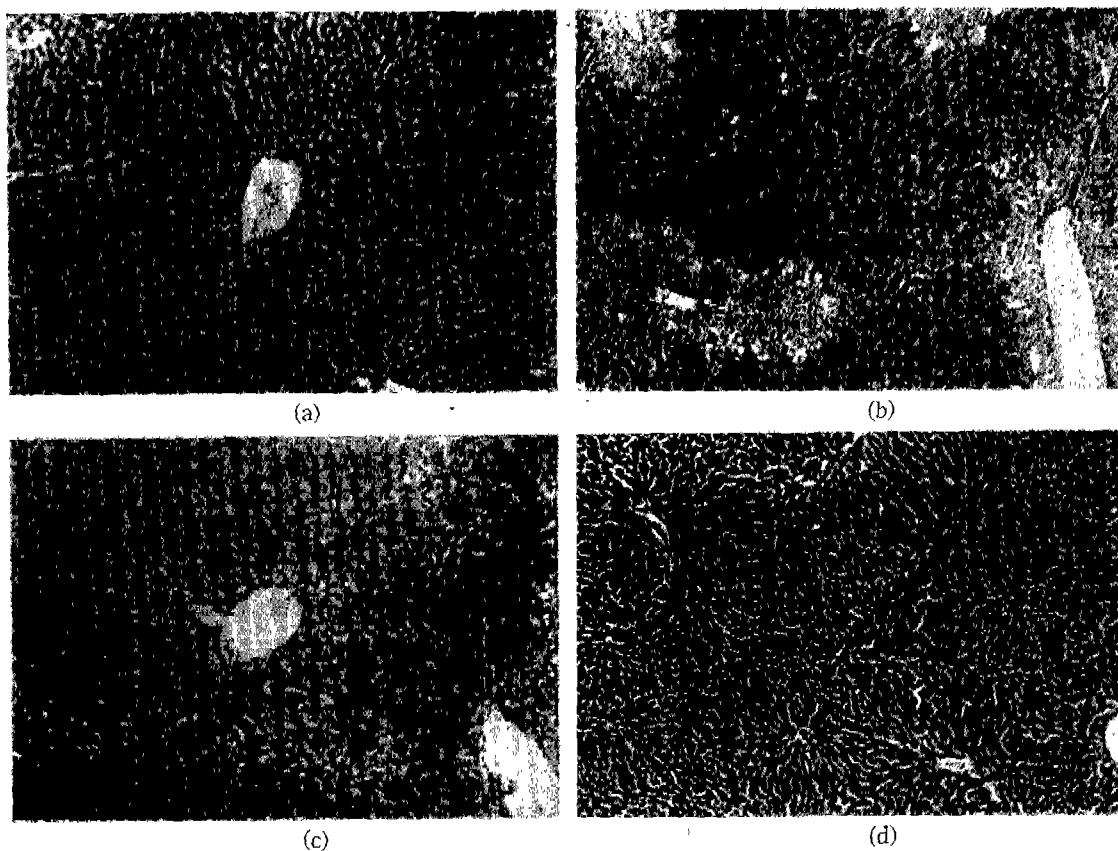


Fig. 2. Histopathological Alteration after Hepatotoxic Substances Treatment. H & E stain. X100 ((a: Control, b: Acetaminophen, c: α -naphthylisothiocyanate d: Tetracycline).

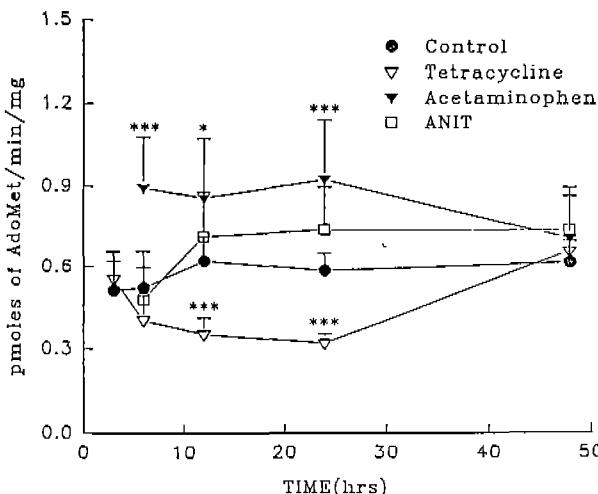


Fig. 3. Change of Protein Methylase I Activity after Hepatotoxic Substances Treatment. Each value represents the mean + standard deviation of result with eight animals. Significantly different from the control: * p<0.05, *** p<0.001 (●: Control, ▼: Acetaminophen, □: α -naphthylisothiocyanate, ▽: Tetracycline).

조직병리학적 검사에서도 역시 AA에 의한 간피사를 확인할 수 있었다(Fig. 2b). 이러한 간피사상태에서 protein methylases의 활성도를 측정한 결과 PM I 활성도는 검체투여 후 3, 6, 12 hr에서 유의성있는 증가가 관찰되었으며 PM II의 활성도는 별 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3, 4).

α -naphthylisothiocyanate(ANIT)유발 간독성시 단백질메칠화반응의 변화

담즙을체(cholestasis)를 일으키는 물질로 알려져 있는 ANIT를 200 mg/kg의 농도로 단일경구투여한 후 AA와 동일한 시간에 혈액생화학적 검사, 조직병리학적검사 및 PM I, II의 활성도를 관찰한 결과, 혈액생화학적 검사의 모든 항목에서 시간이 경과할수록 간독성이 증가되어 투여 후 48시간대에 간독성이 최대로 증가됨을 관찰하였다(Fig. 1) 조직병리학적 검사에서는 간의 피사 등 별다른 간독성을 확인할 수 없었다(Fig. 2c). 또한 PM I, II의 활성도를 측정한 결과 전 시간대에서 모두 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3, 4).

Tetracycline(TC)유발 간독성시 단백질메칠화반응의 변화

지방간을 형성한다고 알려져 있는 TC를 3000 mg/kg의 농도로 단일투여한 후 3, 6, 12, 24 및 48시간에서 혈액생화학적 검사, 조직병리학적 검사 및 PM I, II의 활성도를 측정한 결과, 혈액생화학적 검사에서 투여 후 3, 6시간에 ALT가 약간 증가경향이 관찰되었을 뿐 다른 항목에서는 별다른 변화가 관찰되지 않았으며(Fig. 1) 조직병리학적 소견 역시 별다른 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2d). 또한 PM I의 활성도 측정결과 TC 투여 후 12, 24시간에서 대조군에 비해 활성도의 감소경향을 관

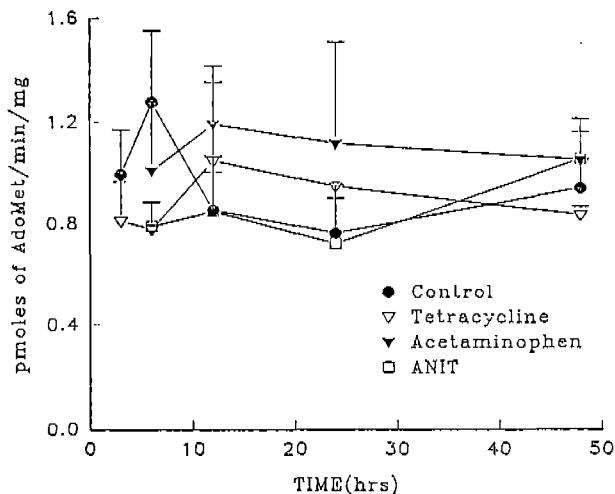


Fig. 4. Change of Protein Methylase II Activity after Hepatotoxic Substances Treatment. Each value represents the mean + standard deviation of result with eight animals (●: Control, ▼: Acetaminophen, □: α -naphthylisothiocyanate, ▽: Tetracycline).

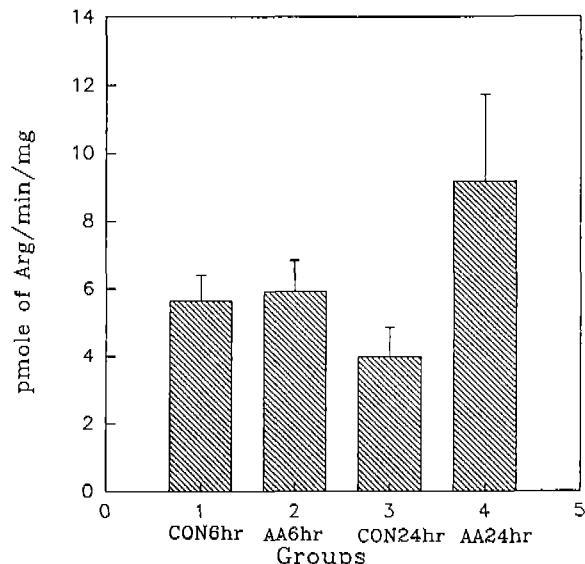


Fig. 5. Change of Nitric Oxide Synthase Activity after Hepatotoxic Substances Treatment. Each value represents the mean + standard deviation of result with three animals.

찰하였으나(Fig. 3), PM II의 활성도에서는 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

Acetaminophen유발 간독성시 nitric oxide 합성효소의 활성도 변화

AA 투여 후 PM I 활성도의 증가, 즉 단백질의 arginine 잔기의 methyl 전이량의 증가가 간독성의 초기단계에 관계됨이 본실험에서 관찰되었으며, nitric oxide(NO)의 cytotoxic 작용과 관련된 nitric oxide synthase의 활성도가 이 효소의 활성도 저해작용을 갖고있는 methylated

arginine과의 관련성을 관찰하여 본 결과 AA 투여 후 24시간, 즉 PM I의 활성도 및 혈청생화학적 지표가 최대로 나타나는 시간에 NOS의 활성도의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

Acetaminophen(AA)은 널리 임상적으로 사용되고 있는 해열진통제로써 과량복용시 사람과 실험동물에서 간독성이 발생하며(Black, 1984), 그 독성기전은 AA가 간에서 cytochrome P-450에 의해 대사되어 전자친화성이 있는 물질인 *N*-acetyl-*P*-benzo quinoneimine을 생성하여 세포내 고분자물질에 결합함으로써 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(Dahlin 등, 1984). 그러나 glutathione(GSH)이 충분한 경우 glutathione 포합체를 형성하여 담즙을 통해 배설되거나 효소반응을 거쳐 AA-cysteinylglycine, AA-cysteine 및 AA-mercaptopurate가 되어 뇨로 배설됨으로써 무독화 한다고 알려져 있다(Gregus 등, 1988). 또한 AA의 과량투여로 심한 centrilobal 간괴사를 일으키며(Proudfoot와 Weight, 1970), 이 부위의 괴사는 AA를 전자친화성이 있는 물질로 전환시키는 mixed function oxidase(MFO)가 이 부위에 위치하기 때문이라는 보고가 있다(Schiff와 Schiff, 1982).

Ponsoda 등(1991)은 사람의 간세포를 이용한 실험에서 외부로부터 처치한 SAM이 cystathionine 경로를 거쳐 GSH의 세포내 농도를 증가시켜 acetaminophen, opiates 및 ethanol에 의한 GSH 고갈을 회복시킴으로써 독성물질에 의한 해독과정에 관여하며, 또한 외부에서 처치된 SAM은 생체내에서 생성되는 SAM의 대사경로와 동일하기 때문에 transmethylation, trans-sulphuration 및 decarboxylation에 관여를 보고하여 AA에 의한 독성에 메칠전이화의 관련가능성을 시사하였다.

본 실험결과 AA에 의해 유도된 간독성을 평가하기 위한 혈액생화학적지표를 보면 ALT, AST가 투여 후 24시간에 수치가 최대로 증가되었으나 48시간에 감소 경향을 확인하였다. 또한 조직병리학적 검사 역시 전반적인 간괴사를 확인할 수 있었다.

그러나 protein methylase I(PM I)의 활성도 측정결과, 혈액생화학적지표에 의한 간독성 발현이 확인되기 전인, 투여 후 6, 12시간부터 PM I의 활성도는 대조군에 비해 유의성있는 증가가 나타났으며 투여 후 48시간에서의 감소경향은 혈액생화학적 검사결과와 유사하였다. 이러한 PM I의 활성도 변화는 AA투여에 의한 간독성에 기인한 PM I의 활성도 변화인지, 혹은 PM I의 활성도 변화에 기인한 간독성의 발현인지는 확인할 수 없었으나, 이 시험물질에 의한 간독성시 단백질 메칠화반응, 특히 PM I의 간독성의 조기단계에 관련되어 있음을 확인할 수 있었다. 세부적인 관련성여부는 AA에 의한 정확한 간독성기전의 규명을 통하여 확인 하는 것이 바람직하

다고 사료되며, 이를 위해서 화학물질에 의해 유도되는 간독성시 활성도 변화가 관찰된 PM I을 분리 정제하여 어떠한 단백질에 주로 메칠화가 진행되는지를 관찰하고, 메칠화된 단백질의 활성도를 측정함으로써 단백질메칠화반응의 상관관계에 대해 정확히 규명하는 것이 필수적이라고 사료된다.

한편, 담즙울체(cholestasis)는 biliary tree의 폐색과 흡사한 급성 혹은 만성질환으로써 랫드에 *α*-naphthylisothiocyanate(ANIT)의 단일투여에 의해 담즙울체, 간세포와 담관내피세포의 괴사 및 담관폐색을 일으킨다(Plass와 Priestley, 1977).

Hirata 등(1980)은 ANIT와 같은 독성물질에 의해 유도되는 병리학적 간질환을 SAM의 투여로 호전시킬수 있으며, 이는 세포막의 인지질에 대한 메칠화활성이 관계될 것으로 보고하였다. 왜냐하면 주요 세포막 구성성분 중 인지질인 phosphatidylcholine의 합성은 phospholipid methyltransferase에 의해 촉매된 phosphatidylethanolamine의 효소적 메칠화에 메칠공여체로써 SAM을 이용하기 때문이다.

상기 내용과 같이 ANIT 투여에 의한 간독성 발현시 인지질메칠화와 관계가 어느정도 밝혀져 있으나 본 실험에서 단백질메칠화와 ANIT에 의해 유도되는 담즙울체의 관련성여부를 측정한 결과는 별다른 관련성이 관찰되지 않았다. 즉, 혈액생화학적 지표를 통해 ANIT에 의한 간독성을 측정하여 본 결과 검사한 모든 항목에서 투여후 48시간이 경과할수록 혈액생화학적지표가 최대로 상승함을 관찰하였으나, PM I 및 PM II의 활성도 측정결과 검사한 모든 시간대에서 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다.

따라서 ANIT에 의해 유도되는 담즙울체에는 AA에 의한 간독성과는 반대로 단백질 메칠화가 관련이 없을 것으로 사료되었다.

또한 항생제로 사용되는 tetracycline(TC)은 특징적인 microvesicular 형태의 지방간을 생성하며 간의 괴사나 담즙울체의 증상이 거의 관찰되지 않는다. 또한 TC에 의해 유도되는 지방간에서 혈액생화학적 지표로의 관찰은 bilirubin, GOT, ALP의 상승과 혈청cholesterol 수치 저하에 의해 평가되어지며, 독성발현기전은 단백질합성의 저해를 초래해 lipoprotein(VLDL)으로 지방산의 간외 배설에 대한 상해로 추측되어지고 있다(Schiff와 Schiff, 1982). 본 실험에서 TC를 과량 경구투여하여 PM I의 활성도를 측정한 결과 대조군에 비해 유의성있는 감소가 투여 후 12시간과 24시간에서 관찰되었으나 혈액생화학적 검사 및 조직 병리학적 검사 모두에서 간독성을 야기시켰다고 할만한 자료를 얻지 못하여 단백질 메칠화와의 관계를 규명하고자 하는데는 새로운 간독성지표에 의한 실험이 요구되며, 지방간 발현을 유도하기 위한 반복투여 시험 등이 필수적인 것으로 사료된다.

Nitric oxide(NO)는 hepatic kupffer cell 등에서도 생

성되며(Billiar 등, 1989) 이러한 세포와 관련된 NO의 cytotoxic 효과로는 mitochondrial 호흡의 억제, aconitase 활성도의 저하 및 DNA합성억제가 보고되었다(Hibbs 등, 1988). 이러한 NO의 cytotoxic 효과와 화학물질에 의해 유도되는 간독성 발현시 NO합성효소(NOS)의 변화를 AA 투여군에서 관찰하여 본 결과 AA 투여 후 24시간에서 NOS의 활성도가 상승되었으며 이 시간에서는 혈액생화학적 검사수치가 가장 높은 시간대에서 관찰됨으로 AA에 의한 간독성시 NOS의 활성도와 어느정도 관련성이 추정되었다. 따라서 보다 세부적인 간독성에 따른 NOS 활성도와의 관계를 확립하기 위해 methylated-arginines의 정량등 계속적인 연구를 수행함으로써 최종적으로 생체내에서 NO형성에 저해작용을 갖는 methylated-arginines과 단백질의 arginine잔기에 메칠기를 전이시키는 PM I의 관련성에 따른 새로운 간독성기전의 규명을 밝히는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ambler, R. P. and Rees, W. M. (1959). *e-N-methyl-lysine in bacterial flagella protein*. *Nature* **184**, 56-61.
- Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., West, M. A., Bentz, B. G. and Simmons, R. L. (1989). An *L*-arginine-dependent mechanism mediates kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*. *J. Exp. Med.* **169**, 1467-1485.
- Black, M. (1984). Acetaminophen hepatotoxicity. *Annu. Rev. Med.* **35**, 577-593.
- Cabrero, C., Duce, A. M., Ortiz, P., Alemany, S. and Mato, J. M. (1988). Specific loss of the high-molecular-weight form of *S*-adenosyl-*L*-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* **8**, 1530-1534.
- Cacciatore, L., Varriale, A., Cozzdino, G. and Dionisio, M. (1989). *S*-adenosyl-methionine (SAM) in the treatment of pruritus in chronic liver disease. *Acta Therapeutica* **15**, 363-371.
- Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y. H. and Nelson, S. D. (1984). *N*-acetyl-*P*-benzoquinone imine: A cytochrome *P*-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1327-1331.
- Duerre, J. A., DiMaria, Kim, S. and Paik, W. (1991). Current status of protein methylation in Carcinogenesis. *Oncogenesis* **2**, 97-108.
- Gregus, Z., Madhu, C. and Klaassen, C. D. (1988). Species variation in toxication and detoxication of acetaminophen *in vivo*: Comparative study of biliary and urinary excretion of acetaminophen metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 91-99.
- Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87-93.
- Hirata, F. and Axelrod, J. (1980). Phospholipid methylation and biochemical signal transmission. *Science* **209**, 1082-1090.
- Kim, S. and Paik, W. K. (1980). *Protein methylation*, pp. 112-141. John wiley & sons, New York.
- Mudd, S. H. and Levy, H. L. (1983). Disorders of transsulfuration., In *The metabolic basis of inherited disease*, pp. 522-559.
- Olken, N. M., Rusche, K. M., Richard, M. K. and Marletta, M. A. (1991). Inactivation of macrophage nitric oxide synthase activity by *N*^G-methyl-*L*-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 828-832.
- Padova, C. P., Padova, F. D., Tritapepe, R. and Stramentinoli, G. (1985). *S*-adenosyl-*L*-methionine protection against *α*-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in the rat. *Toxicology Letters* **29**, 131-136.
- Paik, W., Kim, S., Ezirike, J. and Morris, H. P. (1975). *S*-adenosylmethionine: Protein transmethylase in hepatomas. *Cancer Research* **35**, 1159-1163.
- Pascale, R., Garcea, R. and Daino, L. (1984). The role of *S*-adenosyl-*L*-methionine in regulation of glutathione pool and acetaldehyde production in acute ethanol intoxication. *Resesrch Communication in Substance Abuse* **5**, 321-324.
- Pascale, R. M., Simile, M. M., Satta, G., Seddaiu, M. A., Daino, L., Pinna, G., Vinci, M. A., Gaspa, L. and Fer, F. (1991). Comparative effect of *L*-methionine, *S*-adenosyl-*L*-methionine and 5'-methylthioadenosine on the growth of preneoplastic lesions and DNA methylation in rat liver during the early stages of hepatocarcinogenesis. *Anticancer Research* **11**, 1617-1624.
- Pascale, R., Smile, M. M., Ruggiu, M. E., Seddaiu, M. A., Satta, G., Sequenza, M. J., Daino, L., Vannini, M. G., Lai, P. and Feo, F. (1991). Reversal by 5'-azacytidine of *S*-adenosyl-*L*-methionine-induced inhibition of the development of putative preneoplastic foci in rat liver carcinogenesis. *Cancer letters* **56**, 259-265.
- Plass, G. L. and Priestly, B. G. (1977). Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharm. Rev.* **28**, 207-273.
- Ponsoda, X., Jover, R., Gomez-Lechon, M. J., Fabra, R., Trullenque, R. and Castell, J. V. (1991). Intracellular glutathione in human hepatocytes incubated with *S*-adenosyl-*L*-methionine and GSH-depleting drugs. *Toxicology* **70**, 293-302.
- Proudfoot, A. T. and Weight, N. (1970). Acute paracetamol poisoning. *Br. Med. J.* **3**, 577-585.
- Schiff, L. and Schiff, E. R. (1982). *Disease of the liver*, pp. 652-654. J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Shinkai, K., Mukai, M., Horai, T., Ohigashi, H., Nishikawa, S., Inoue, H., Takeda, Y. and Akedo, H. (1989). Inhibition of *in vitro* tumor cell invasion by transmethylation inhibitors. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 716-719.
- Stramentinoli, G., Gualano, M. and Ideo, G., (1978). Protective role of *S*-Adenosyl-*L*-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biochemical Pharmacology* **27**, 1431-1433.
- Tabor, C. W. and Tabor, H. (1976). 1,4-Diaminobutane (Putrescine), spermidine and spermine. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 285-306.
- Wainfan, E. and Poirier, L. A. (1992). Methyl groups in carcinogenesis: Effect on DNA methylation and gene expression. *Cancer Research* **52**, 2071s-2077s.