

간장내 허혈 및 재관류시 약물대사 효소계의 지질 과산화에 관한 연구

이선미* · 박미정 · 이상호 · 박두순 · 조태순
성균관대학교 약학대학

Lipid Peroxidation of Hepatic Microsomal Drug-Metabolizing System in Hepatic Ischemia and Reperfusion

Sun-Mee LEE*, Mee-Jung PARK, Sang-Ho LEE, Doo-Soon PARK and Tai-Soon CHO
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received June 7, 1994; accepted June 24, 1994)

Abstract—This study was done to determine whether specific alterations exist in hepatic microsomal function after varying periods of ischemia (IS) and reperfusion (RP) during microsomal lipid peroxidation occurs. Rats were pretreated with α -tocopherol to inhibit lipid peroxidation or with vehicle (soybean oil). Control animals were time-matched sham-ischemic animals. Four groups of animals were studied: Group 1 (sham), group 2 (30 mins IS), group 3 (60 mins IS) and group 4 (90 mins IS). After 1, 5 or 24 hr of reperfusion, liver microsomes were isolated and cytochrome P-450s were studied. In all vehicle-treated ischemic rats, serum ALT levels peaked at 5 hr and were significantly reduced by α -tocopherol pretreatment. Similarly, microsomal lipid peroxidation was elevated in all vehicle-treated ischemic animal groups, but this elevation was prevented by α -tocopherol pretreatment. Cytochrome P-450 content was significantly decreased in both group 3 and group 4. In all vehicle-treated ischemic animal groups, aminopyrine N-demethylase activity was significantly decreased for the entire reperfusion period. α -Tocopherol inhibited reductions of cytochrome P-450 content and aminopyrine N-demethylase activity at both 1 hr and 5 hr of reperfusion but did not affect the reduced levels of cytochrome P-450 content and aminopyrine N-demethylase activity at 24 hr of reperfusion. Aniline p-hydroxylase activity was significantly decreased in group 4, whereas it was increased in group 3. These decreases and increases were prevented by α -tocopherol pretreatment. Our finding suggests that abnormalities in microsomal drug metabolizing function occur during hepatic ischemia and reperfusion *in vivo* and this is attributed to microsomal lipid peroxidation.

Keywords □ lipid peroxidation, hepatic ischemia and reperfusion, microsomal drug metabolizing function.

허혈이란 장기가 미관류(underperfusion)된 상태를 말하며 결과적으로 조직에 산소 공급이 불충분하게 되어 해당장기의 기능손상을 초래하게 된다. 이 중 간장 허혈은 간절제(Delva 등, 1984), 속 (Cello와 Sleisenger, 1982), 외상 및 패혈증(Chaudry 등, 1979) 등과 같은 상태에서 일어나며 특히 간이식시 간 허혈 기간은 임상에서 매우 중요하다. 이같은 허혈 상태에서 이론적으로 산소를 공급해 주어 재관류시키면 장기의 기능이나 장

태가 호전되리라 여겨지지만 실제로는 작용이 오히려 악화되는 양상을 볼 수 있으며 이를 '산소 역설(oxygen paradox)'이라 한다. 허혈 및 재관류로 인한 조직 손상은 심근경색, 뇌졸중 및 장기이식과 같은 다양한 병리상태에서의 장기(organ)손상과 관련된다(Braunwald와 Kloner, 1985; Thurman 등, 1988). 최근 들어 허혈 및 재관류에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 오고 있지만, 이같은 상태에서의 장기손상에 관한 기전은 확실치 않고, 더우기 간과 같이 다양한 기능을 수행하는 기관에서 일어나는 허혈 및 재관류 후 기능변화에 대해서는 아직도

* To whom correspondence should be addressed.

많은 부분이 이해되어 있지 않은 상태이다.

간질환 환자에서 일반적으로 볼 수 있는 것은 약물 대사 및 배설의 비정상적 상태이다(Huet와 Villeneuve, 1983). 이에에는 여러가지 요소가 관여되겠지만 그 중 주된 것은 간장 소포체내 약물 대사 효소(drug-metabolizing enzymes)의 손상으로 여겨진다(Reichen 등, 1987). 간장 약물 대사에는 cytochrome P-450이 중요한 역할을 하며, 이에에는 여러 동종 효소(isozymes)가 존재하고 있으므로, 이들은 각기 다른 기질(약물) 특이성을 가질 뿐 아니라 조절기전 역시 다양하다(Guengerich, 1987).

허혈조직의 재관류와 관련된 소혈관(microvasculature) 및 실질(parenchyma)손상에 활성산소가 주된 역할을 한다는 여러 실험적인 증거들이 있다(Granger 등, 1986; Drugas 등, 1991). 즉 허혈시 xanthine dehydrogenase가 xanthine oxidase로 전환됨과 동시에 세포내 ATP는 hypoxanthine으로 이화되어 세포내 에너지 감소와 구조 및 대사 변화를 일으키며, 재관류시 도입되는 산소 분자는 hypoxanthine과 반응하여 xanthine과 활성산소를 생성하고, 이는 특히 세포막, 미토콘드리아 및 소포체 등과 같은 생체막을 공격하여 지질 과산화화를 통해 세포막 불포화 지방산의 산화적 파괴를 유도한다고 한다. 현재까지 허혈 및 재관류로 인한 장기 손상에 관한 연구들이 많이 보고되었지만, 간에 관한 연구는 매우 한정되어 있고 더우기 생체내에서 허혈 및 재관류 후 일어나는 약물 대사 효소들의 기능 변동과 그의 기전적 연구로 지질 과산화와의 직접 관련성에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 먼저 단기간의 허혈 기간(30분)으로 부터 60분, 90분으로 허혈 기간을 늘림으로써 허혈 기간에 따른 세포 손상과 약물 대사 효소계의 변화를 관찰하고 이와 마찬가지로 속발되는 재관류 기간(1시간, 5시간 및 24시간)에도 이들 변동을 알아보려고 하였다. 다음으로 지용성 항산화제로 널리 알려진 α -tocopherol을 전처치하여 위의 결과와 비교 분석함으로써 위의 변화 기전을 더욱 확실하게 알아보려고 하였다.

실험방법

간장 허혈 유발

체중 200~250 g, 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 실험전 24시간 동안 절식시킨 후(단 물은 자유로이 섭취하게 하였음) pentobarbital sodium(50 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 복부 정중선을 따라 개복하였다. 문맥의 왼쪽 분지와 간장내 산소공급에 주된 역할을 하는 간동맥을 clamp하여 허혈을 유발시키고 일정시간 경과 후(30분, 60분 및 90분) clamp를 제거하여 재관류시켰다. 재관류 1시간, 5시간 및 24시간 후에 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 간장내 단백질 함량, 지질 과산화 및 약물 대사 효소 측정

사용하였다. Sham-operated 동물은 문맥의 왼쪽 분지와 간동맥에 clip만을 놓지 않고 모든 실험법을 위와 동일하게 시행하였다.

약물투여 및 실험군

α -Tocopherol은 soybean oil(vehicle, 20 mg/ml)에 녹여 실험전 3일간 20 mg/kg b.wt.씩 복강내 투여하였다. 실험군은 α -tocopherol를 전처치한 허혈 및 재관류 실험군, 기초제(vehicle)를 처치한 허혈 및 재관류 실험군, α -tocopherol을 전처치한 sham 허혈 및 재관류 실험군 및 기초제를 처치한 sham 허혈 및 재관류 실험군 등 크게 4군으로 나누었으며, 특히 기초제를 처치하거나 α -tocopherol을 처치한 sham 실험군에서의 모든 실험 결과가 두군에서 비슷하였으므로 이들의 실험 결과를 합쳐서 이를 하나의 sham 실험군으로 하였다. 각 약물 처치군은 다시 허혈 30분, 60분 및 90분군으로 나누었고, 더 나아가 각각의 허혈군에서는 허혈 직후(0 hr), 재관류(1시간, 5시간 및 24시간 등)의 실험군으로 나누었다.

간장 소포체 분획의 분리

적출한 간장을 세공하여 motor-driven teflon pestle를 사용하여 간 무게 1 g당 4 ml의 150 mmol/L KCl용액으로 균질화시킨 다음 9,000 g에서 20분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 상등액을 다시 105,000 g에서 60분간 원심분리하여 상등액은 버리고 하층의 침전물인 소포체 분획을 간소포체 1 g당 최종 소포체 용액이 4 ml이 되도록 100 mmol/L phosphate buffer, pH 7.4를 첨가하여 재현탁시켜 -70°C deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 2°C 에서 수행하였다.

분석 방법

간장 소포체 분획내 지질 과산화는 Masugi와 Nakamura(1976)의 방법에 준하여 thiobarbituric acid(TBA) assay를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane(malondialdehyde [MDA] tetraethyl acetal)을 사용하였다. 간장소포체내 cytochrome P-450함량은 Omura와 Sato(1964)의 방법에 준하여 differential spectrophotometer로 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하여 그 차이를 molar extinction coefficient를 $104 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 로 하여 계산하였다. 간소포체 분획 중 aminopyrine N-demethylase의 활성 측정은 Schenkman 등(1967)의 방법에 준하여 생성되는 formaldehyde를 412 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였고 aniline p-hydroxylase의 활성 측정은 Mieyal와 Blumer(1976)의 방법에 준하여 생성되는 p-aminophenol(PAP)를 630 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다. 단백질 함량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다. 간장내 glucose-6-phosphatase(G-6-Pase)활성은 적출한 간장을 냉각된 0.1 M pH 6.2 Tris-maleate 완충액으로 균질화시킨 다음 Triawger와 Plaa(1971)의 방법에 준하여 반응한 후 반응 결과로서 유리되어 나온

무기인(Pi)의 함량을 Fiske와 Subbarow(1925) 방법에 따라 측정하였다. 혈액내 aminotransferase(ALT)는 kit #59-UV(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 사용하여 표준 흡광법으로 측정하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적인 분석은 two-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였고 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었다.

실험결과

Serum ALT

대조군(sham-operated rats)에 있어 일반적 간장 손상의 지표인 혈액내 ALT치는 정상쥐(normal rats)에서와 비슷한 값인 55 ± 5 U/L을 나타내었으나 재관류 5시간 및 24시간에서는 330 ± 32 U/L 및 485 ± 45 U/L로 각각 증가하였다. 허혈 30분, 60분 및 90분 실험군에서의 허혈 직후의 혈액내 ALT치는 모두 대조군과 별차이를 나타내지 않았다. 이는 본 실험에서 간장의 허혈이 모든 허혈 실험군에서 완전했고(complete ischemia), 이 기간에 있어서 간장 효소의 혈액내 유출이 억제됨을 의미하는 것 같다. 그러나 이와는 달리 허혈된 간장으로 혈액이 재도입(재관류) 되었을 때 허혈 30분군을 비롯한 60분, 90분군 모두에서 재관류 1시간부터 ALT치가 유의성있게 증가하였고, 재관류 5시간에서는 모든 실험군에서 최고치를 나타내었다(각각 3579 ± 401 , 4593 ± 675 및 6348 ± 808 U/L). 또한 이러한 증가는 허혈 기간에 비례하여 즉, 허혈 기간이 긴 실험군일수록 더욱 높은치를 나타내었다(Fig. 1). Fig. 2에서 보는 바와 같이 α -tocopherol 전처치는 모든 허혈 실험군에서 재관류 1시간에서의 완전한 ALT치의 증가를 억제하지 못하였으나 재관류 5시간에

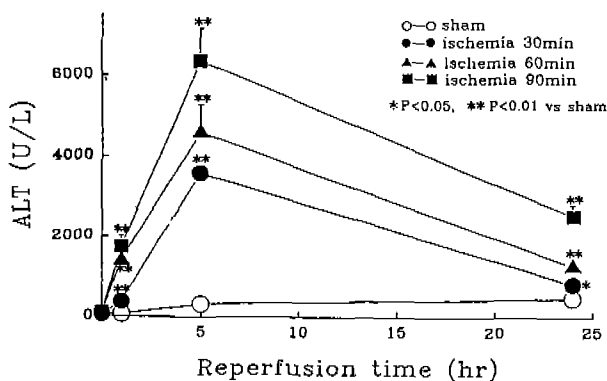


Fig. 1. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on serum ALT activities. Values are means±S.E.M. for 7 to 11 rats per group. *, **=Significantly different ($p < 0.05$, $p < 0.01$) from sham-operated rats. ○-○ sham, ●-● ischemia 30 min, ▲-▲ ischemia 60 min, ■-■ ischemia 90 min.

서의 현저한 ALT치의 증가 및 재관류 24시간에서의 ALT의 증가를 모두 유의성있게 억제하였다.

간세포내 지질 과산화

Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군에 있어 간장 세포내 지질 과산화 산물인 MDA치는 실험 전 기간동안 대략 0.51 ± 0.03 nmole MDA formed/mg protein으로 일정하였다. 그러나 이와는 달리 30분, 60분 및 90분 허혈군에서의 간장 세포내 MDA치는 모두 허혈 직후부터 급격히 증가하기 시작하여 재관류 1시간 및 5시간에서 대조군에 비해 각각 4배 및 6배로 현저히 증가하였고, 이러한 증가는 허혈 90분 후 재관류 5시간에서 가장 뚜렷하였다(3.08 ± 0.21 nmole MDA formed/mg protein). 재관류 24시간의 MDA치는 ALT경우와 마찬가지로 모든 허혈군에서 1시간 및 5시간에 비해서는

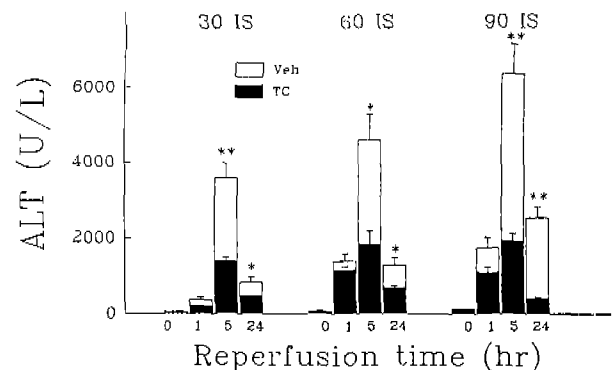


Fig. 2. Effect of α -tocopherol on serum ALT activities after ischemia and subsequent reperfusion. Values are means±S.E.M. for 7 to 11 rats per group. *, **=Significantly different ($p < 0.05$, $p < 0.01$) from vehicle-treated ischemic rats. □, vehicle-treated ischemic rats; ■, α -tocopherol-treated ischemic rats; 30 IS, ischemia 30 min; 60 IS, ischemia 60 min; 90 IS, ischemia 90 min.

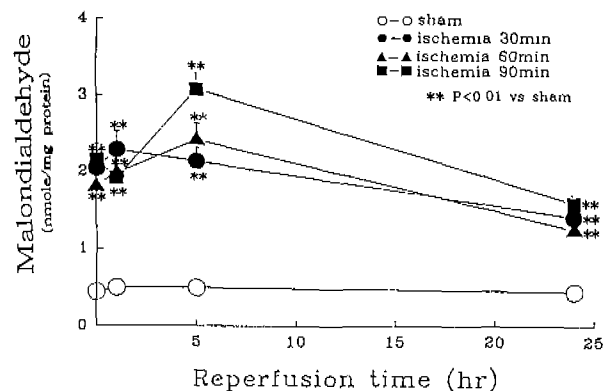


Fig. 3. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on microsomal lipid peroxidation. Values are means±S.E.M. for 7 to 11 rats per group. **=Significantly different ($p < 0.01$) from sham-operated rats. ○-○ sham, ●-● ischemia 30 min, ▲-▲ ischemia 60 min, ■-■ ischemia 90 min.

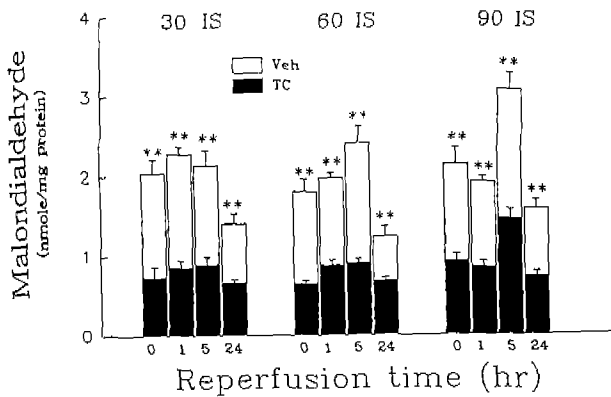


Fig. 4. Effect of α -tocopherol on hepatic microsomal lipid peroxidation after ischemia and subsequent reperfusion. Values are means \pm S.E.M. for 7 to 11 rats per group. **= Significantly different ($p < 0.01$) from vehicle-treated ischemic rats. \square , vehicle-treated ischemic rats; \blacksquare , α -tocopherol-treated ischemic rats; 30 IS, ischemia 30 min; 60 IS, ischemia 60 min; 90 IS, ischemia 90 min.

감소하였으나 대조군에 비해서는 여전히 높은치를 나타내었다. 그러나 α -tocopherol 전처치로 모든 실험군에서의 허혈 직후 및 재관류시 지질 과산화가 모두 유의성있게 억제되었다(Fig. 4).

Glucose-6-phosphatase activity

간장내 G-6-Pase활성은 대조군에서 대략 $2.4 \pm 0.1 \mu\text{mole pi formed/mg protein/20 min}$ 으로 실험 전 기간 동안 일정하였다. 허혈 30분 및 60분군에서 G-6-Pase활성은 재관류 24시간에서만 유의성있게 감소하였다. 그러나 이와는 달리 허혈 90분군은 허혈 직후에는 대조군에 비해 별 변동이 없었으나, 재관류 1시간, 5시간 및 24시간 모두에서 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

Cytochrome P-450 content

Fig. 6에서 보는 바와 같이 간장 소포체내 cytochrome P-450양은 모든 허혈군에서 허혈시에는 대조군과 차이를 나타내지 않았으나, 재관류시에는 허혈 기간에 비례하여 감소하였다. 즉, 허혈 30분군에서는 재관류 24시간에만 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으나, 허혈 60분군에서는 재관류 5시간 및 24시간에 각각 대조군에 비해 유의성있게 감소하였고, 허혈 90분군에서는 이보다 앞서 재관류 1시간, 5시간 및 24시간에 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. α -Tocopherol 전처치로 허혈 60분 후 재관류 5시간, 허혈 90분 후 재관류 1시간 및 5시간의 cytochrome P-450양의 감소는 억제되었으나 모든 허혈 실험군에서의 재관류 24시간의 감소는 억제하지 못하였다(Table I).

Mixed function oxidase(MFO) activities

Fig. 7에서 보는 바와 같이 대조군에서 aminopyrine N-demethylase활성은 대략 $21.5 \pm 0.5 \text{ nmole HCHO/mg protein/10 min}$ 으로 실험 전 기간 동안 일정하였으나,

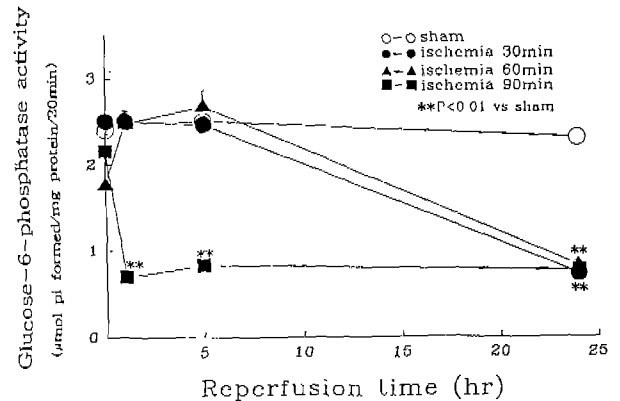


Fig. 5. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on glucose-6-phosphatase activities of liver microsomes. Values are means \pm S.E.M. for 7 to 11 rats per group. **= Significantly different ($p < 0.01$) from sham-operated rats. \circ - \circ sham, \bullet - \bullet ischemia 30 min, \blacktriangle - \blacktriangle ischemia 60 min, \blacksquare - \blacksquare ischemia 90 min.

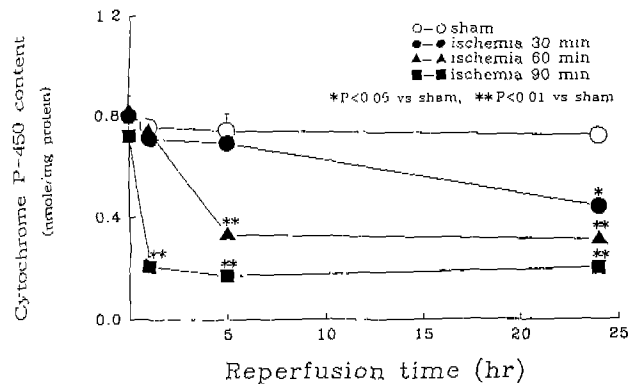


Fig. 6. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on microsomal cytochrome P-450. Values are means \pm S.E.M. for 7 to 11 rats per group. *, **= Significantly different ($p < 0.05$, $p < 0.01$) from sham-operated rats. \circ - \circ sham, \bullet - \bullet ischemia 30 min, \blacktriangle - \blacktriangle ischemia 60 min, \blacksquare - \blacksquare ischemia 90 min.

모든 허혈군에서는 허혈 기간만을 제외한 재관류 1시간, 5시간 및 24시간에 대조군에 비해 유의성있게 감소하였으며, 이같은 감소는 허혈 기간이 길수록 더욱 두드러졌다. Aniline p-hydroxylase 활성은 대조군에서 대략 $6.4 \pm 0.4 \text{ nmole PAP/mg protein/15 min}$ 으로 일정하였으나 허혈 30분 및 90분군에서는 재관류시 cytochrome P-450양의 감소 양상과 평행하게 감소하였다. 그러나 예상과는 달리 허혈 60분군에서 재관류 1시간 및 5시간에 오히려 대조군에 비해 유의성있게 증가하였고, 재관류 24시간에는 다른 허혈군과 마찬가지로 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다(Fig. 8). Table I에서 보는 바와 같이 aminopyrine N-demethylation은 α -tocopherol 전처치로 허혈 60분 및 90분 실험군에서 재관류 1시간과 5시간에 나타나는 효소의 활성 감소만을 유의성있게 억제하였으

Table I. Effect of α -tocopherol on cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase and aniline p-hydroxylase activities after ischemia and subsequent reperfusion

Group		cytochrome P-450 (nmole/mg protein)		aminopyrine N-demethylase (nmole HCHO/mg protein/10 min)		aniline p-hydroxylase (nmole PAP/mg protein/15 min)		
		Veh	α -TC	Veh	α -TC	Veh	α -TC	
30 mins	0 hr	0.80±0.01	0.78±0.01	22.9±2.2	21.4±2.1	5.6±0.6	6.4±0.5	
	1 hr	0.71±0.01	0.74±0.03	12.7±0.6	15.2±0.7	7.1±0.4	7.0±0.4	
	IS	5 hr	0.69±0.03	0.76±0.02	11.9±0.6	14.6±0.9	7.0±0.5	6.8±0.3
	24 hr	0.44±0.02	0.38±0.01	15.0±0.7	14.5±1.0	3.4±0.3	6.5±0.6**	
60 mins	0 hr	0.82±0.01	0.74±0.03	20.2±1.0	21.2±1.9	7.5±0.5	7.4±0.7	
	1 hr	0.74±0.01	0.76±0.02	6.7±0.5	17.8±1.8**	15.9±1.0	8.2±0.7**	
	IS	5 hr	0.33±0.03	0.62±0.04**	5.7±0.3	9.1±0.5*	10.5±0.7	5.9±0.5**
	24 hr	0.31±0.02	0.32±0.03	5.5±0.2	7.5±1.9	3.0±0.2	5.7±0.4**	
90 mins	0 hr	0.72±0.07	0.79±0.07	21.1±1.9	20.6±1.8	6.2±0.8	7.0±0.7	
	1 hr	0.21±0.03	0.58±0.05**	5.9±0.5	10.4±0.8**	2.2±0.1	5.4±0.6**	
	IS	5 hr	0.17±0.01	0.47±0.05**	4.0±0.3	7.0±0.8*	1.4±0.1	4.4±0.3**
	24 hr	0.20±0.01	0.21±0.03	5.0±0.4	6.5±0.9	2.6±0.1	4.8±0.5*	

Values are means±S.E.M. for 7 to 10 rats per group.

*, **=significantly different ($p<0.05$, $p<0.01$) from vehicle-treated ischemic rats.

IS, ischemia; Veh, vehicle; α -TC, α -tocopherol.

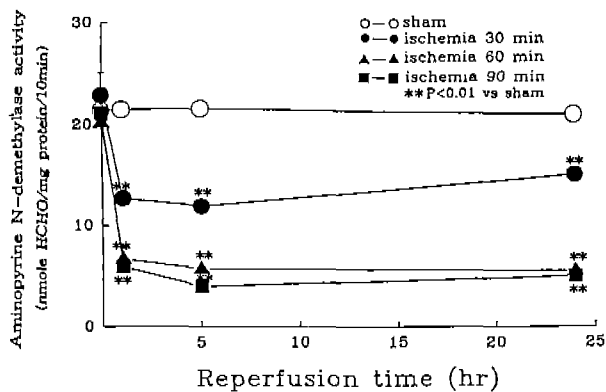


Fig. 7. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on microsomal aminopyrine N-demethylase. Values are means±S.E.M. for 7 to 11 rats per group. ***=Significantly different ($p<0.01$) from sham-operated rats. ○—○ sham, ●—● ischemia 30 min, ▲—▲ ischemia 60 min, ■—■ ischemia 90 min.

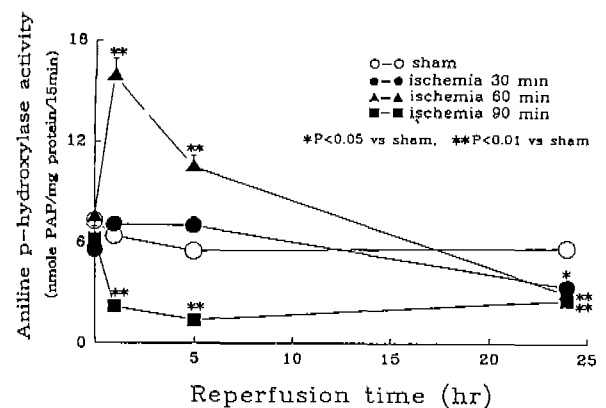


Fig. 8. Effect of hepatic ischemia and reperfusion on microsomal aniline p-hydroxylation. Values are means±S.E.M. for 7 to 11 rats per group. *, **=Significantly different ($p<0.05$, $p<0.01$) from sham-operated rats. ○—○ sham, ●—● ischemia 30 min, ▲—▲ ischemia 60 min, ■—■ ischemia 90 min.

나 이와는 달리 aniline p-hydroxylation은 α -tocopherol 전처리로 허혈 30분군에서 재관류 24시간, 허혈 90분군에서 재관류 1시간, 5시간 및 24시간에의 효소 활성의 감소를 현저히 억제시킨 반면, 허혈 60분군에서의 재관류 1시간 및 5시간의 효소 활성의 증가를 현저히 억제하여 모두 정상화시켰다.

고 찰

지난 10년간 허혈 및 재관류로 인한 간세포 기능 손상에 관한 연구들이 많이 보고되었지만 최근들어 간이식

증가와 더불어 이를 시행함에 있어 간을 공여자로부터 떼어내어(허혈 상태) 이식한 후(재관류)에 일어나는 여러 문제점을 해결하기 위해 더욱 이에 관심이 모여지고 있다. 어떠한 치료로도 치유 불가능한 각종 말기 부전증 환자들을 치료하는데 유효한 정규 수단으로 인정 받고 있는 이식술에 있어 장기의 저장과 장기의 생존력(viability) 및 허혈 손상 정도를 측정하는 것은 매우 중요하다. 특히 간이식에 있어 신장 이식시와는 달리 제한된 시간 내에 이식을 시행하여(즉, 허혈 지속이 8시간으로 제한) 혈액이 재관류되어야 하므로 이와 관련된 허혈 손상이 임상적으로 큰 문제로 남아 있다(Shaw 등, 1985). 이는

장기 저장액의 개발(최근 UW solution) 및 수술법의 발달과 더불어 장기 허혈 손상을 최소화시키면서 문제점이 차츰 해결 되어가고 있으나 허혈 기간에 따른 간장 기능 변화에 관해서는 연구가 없는 실정이다. 또한 과거의 몇몇 연구는 주로 허혈 자체 또는 허혈 직후의 여러 생화학적 및 형태학적 변화에만 관심을 두었을 뿐 수술 경과 후의 기능 변화에는 역점을 두지 않았으나 실제로 이식 수술 후 산소가 재도입되고 회복되는 과정에서의 간기능 변화, 다시 이야기하면 재관류 시간 경과에 따른 기능 변화 측정 또한 매우 중요하다(Metzger와 Lauterburg, 1988). 이와 같이 아직도 허혈 및 재관류 동안의 세포 손상 기전에 관한 많은 부분이 이해되지 않는 채로 남아있다.

생체내 과산화 지질의 생성은 간괴사, 허혈성 뇌손상(Bromont 등, 1989), 허혈성 간손상(Omar 등, 1989) 및 허혈성 심질환(Petty 등, 1990)과 같은 병리 상태와 관련되며, 이는 세포 소기관막의 구조적, 기능적 손상을 야기시킨다고 한다. 활성산소는 허혈 및 재관류와 관련된 간손상에 있어 지질 과산화 생성에 주요한 역할을 하며 (Atalla 등, 1985), 더 나아가 약물로 인한 간세포 손상의 과산화 과정에도 관여한다고 한다(Tappel, 1980). 예를 들면 사염화 탄소와 같은 물질은 CCl_3 을 형성하여 간세포의 지질 과산화를 일으키고 만성 알콜 중독자의 경우도 지질 과산화치가 상승되어 있으며, 이들은 각각 promethazine 및 α -tocopherol과 같은 항산화제에 의해 억제된다(Kawase 등, 1989)고 한다. 이는 간장내 허혈 및 재관류 동안의 지질 과산화 증가가 α -tocopherol 전처치로 억제되는 본 연구 결과와도 일치한다.

본 연구에서도 모든 허혈 실험군에서 허혈 직후부터 지질 과산화가 증가하기 시작하여 재관류 1시간에는 이보다 더욱 증가하고 재관류 5시간에서 이의 증가가 더욱 현저하였다. 일반적 간기능 손상의 지표인 ALT치도 이와 비슷하게 모든 허혈 실험군에서 재관류 1시간부터 증가하여 재관류 5시간에 최고치를 나타내었으며 이 같은 증가는 허혈 기간에 비례하여 더욱 높은치를 나타내었다. 이는 허혈 후 재관류 1시간과 5시간 사이에 glutamate pyruvate transaminase(GPT), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), lactate dehydrogenase(LDH) 등과 같은 세포질내 존재하는 효소의 혈액내 유출이 가장 심하고(가역적 세포 손상), 특히 재관류 5시간에는 세포의 비가역적 손상, 즉 세포 괴사와 관계되는 미토콘드리아 내에 존재하는 효소인 glutamate dehydrogenase의 세포내 활성이 현저히 저하된다는 Frederiks와 Marx 등(1987)의 연구 보고와도 일치한다. 이와 같은 사실로 미루어 이는 아마도 허혈 및 재관류 기간에 따른 간세포 손상과 지질 과산화 사이에 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각되며 더우기 α -tocopherol 전처치로 모든 허혈군에서 재관류 5시간 및 24시간에 ALT치 증가가 억제되고 허혈 직후부터 재관류 기간 전반에 나타나는 지질 과산화 증

가가 현저하게 억제됨은 위의 사실을 더욱 뒷받침해 주고 있다. 간장 내형질 세망(endoplasmic reticulum)에 존재하며 이의 감소가 지질 과산화 증가와 밀접한 관계가 있고, 더 나아가 이 효소의 활성저하가 특이적으로 세포 내형질 세망의 손상을 반영한다(Recknagel와 Glende, 1973)고 알려져 있는 G-6-Pase활성은 허혈 30분 및 60분군에서는 재관류 24시간에서만 대조군에 비해 유의있게 감소하였으나 허혈 90분군에서는 재관류 1시간, 5시간 및 24시간 모두에서 대조군에 비해 유의있게 감소하는 것으로 보아 다시금 허혈 및 재관류로 인한 간세포 손상에 지질 과산화가 관여됨을 알 수 있었다.

Jaeschke 등(1990)과 Jaeschke와 Farhood (1991)의 연구에 따르면 간장 재관류시 초기에 생성되는 활성산소는 간장 세포외에서 생성되며 이는 주로 Kupffer cell에 의해 매개되고 간세포의 손상은 그 뒤 호중구 침윤과 관련된다고 한다. 실제로 이하의 결과로 볼때 간장 약물 대사계의 기능적 손상을 야기시키는 본 연구 결과도 간장 세포의 산화적 스트레스 지표로 여겨질 수 있다고 생각된다. 간장내 약물 대사 효소계의 총 cytochrome P-450 양은 허혈 30분군에서 허혈 직후에는 별 변동이 없었으나 재관류 24시간에 감소하였고 허혈 60분군에서는 그보다 앞서 재관류 5시간과 24시간에, 더 나아가 허혈 90분군에서는 재관류 1시간, 5시간 및 24시간에 현저히 감소하였다. 이와 같은 총 cytochrome P-450 양의 감소는 간장내 cytochrome P-450 dependent oxidases의 전반적 활성 저하를 의미하며 α -tocopherol 전처치로 이의 감소가 억제되는 것으로 보아 간장 소포체내 지질 과산화로 인한 것 같다. 이같은 가설은 생체의 실험이긴 하지만 간장 소포체 현탁액에 가해진 지질 과산화물이 간장내 약물의 산화를 억제하고 cytochrome P-450을 파괴시킨다고 한 Hrycay와 O'Brien(1971)의 연구에 의해 사실로 더욱 뒷받침되어 지지만 실제 생체내에서는 허혈 및 재관류로 인한 지질 과산화가 간장 소포체 뿐만 아니라 미토콘드리아와 같은 세포내 여러 소기관에도 영향을 주므로 또 다른 가능성을 배제할 수 없다. Rocchi 등(1991)도 간경화 환자의 경우 활성 산소의 공격에 대해 간을 보호하는 천연물질로 잘 알려진 carotenoids와 tocopherol의 혈장 및 간장에서의 치가 매우 낮다고 하며 Loe 등(1986)도 이 두 천연 간 보호물질 결핍시 약물 대사 효소계의 활성 저하로 이들은 화학적 발암물질을 무독화시키지 못하여 암발생에도 영향을 준다고 하였다.

간장 소포체내 cytochrome P-450 동종효소와 그와 관련된 약물 대사 기능 이상 및 생체내에서 그와 관련된 지질 과산화에 관한 연구보고는 거의 없다. Högborg 등(1973)은 생체의 실험에서 지질 과산화 증가시 cytochrome P-450은 cytochrome P-420으로 전환되어 감소되고 aminopyrine demethylation과 3,4-benzopyrene hydroxylation도 cytochrome P-450의 감소와 평행하게 감소하지만 glucuronyl transferase 활성은 초기 지질 과산화

생성시 오히려 증가하고 지질 과산화가 더욱 진행되면 다시 정상화된다고 하였다. 예상대로 본 연구에서도 간장 허혈 및 재관류시 총 cytochrome P-450양의 감소와 더불어 aminopyrine N-demethylase 활성은 감소되었다. 그러나 흥미있게도 aniline p-hydroxylase 활성은 허혈 기간이 비교적 완만한 60분 실험군에서는 증가된 반면 90분 허혈군에서는 억제되었다. 이 두 비정상적 양상은 α -tocopherol 전처치로 모두 거의 정상화되었다. 이 같이 약물 대사의 변동이 일관되지 못함에 대한 기전은 확실치 않지만 cytochrome P-450 동종 효소의 작용 양상이 허혈 및 재관류 손상으로 각기 다르게 영향을 받는 것으로 여겨지며 이를 임상적으로 연관지어 볼 때 약물에 따른 간장내 대사 및 제거가 간질환 환자의 경우 정상시 보다 예기치 못하게 다르게 나타날 것이므로 환자에게 약물을 투여함에 있어 더욱 주의해야 한다고 생각한다. 실제 정상 흰쥐의 경우 그치는 매우 낮지만 6~9개의 cytochrome P-450 동종효소가 존재한다(Guengerich 등, 1982)고 하며 몇몇 연구자는 간소엽내 이들의 분포 자체도 조금씩 다른 부위에 국한되어 있다(Baron 등, 1978)고 한다.

허혈 및 재관류시 이 같은 변동에 관한 또 다른 견해는 간장 인지질의 변동과의 관련성이다. Laitinen 등(1975)은 지방산 조성을 변화시킨 식이성 지질은 간장 소포체의 유동성(fluidity)뿐 아니라 간장 약물대사 효소계 막의 활성도 변화시킨다고 한다. 본 연구에서도 α -tocopherol이 aminopyrine N-demethylase 활성 감소에는 일부만을 억제시키나 aniline p-hydroxylase의 비정상적 활성 증가 및 감소는 모두 억제하였다. 이는 아마도 분자구조 중 질소 원자를 함유하고, cytochrome내 철(iron)과 직접 반응하는 type II 기질인 aniline이 기질의 반응부위가 cytochrome내 철과 인접한 단백질이고, 대부분 화학 물질이 이와 유사한 방법으로 cytochrome P-450과 반응하는 type I 기질인 aminopyrine보다 지질 과산화 동안 생성되는 전자에 더욱 민감하며 cytochrome P-450과 aminopyrine N-demethylase 활성 저하에는 α -tocopherol과 관련된 지질 과산화외에 다른 요소도 관여되리라 생각된다.

이상의 결과로 보아 간장 허혈 및 재관류는 약물 대사 효소계의 기능 이상을 초래하며 이는 아마도 지질 과산화와 밀접한 관계가 있으리라 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Atalla, S. L., Toledo-Pereyra, L. H., Mackenzie, G. H. and Ce-

- derna, J. P. (1985). Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* **40**, 584-590.
- Baron, J., Redick, J. A. and Guengerich F. P. (1978). Immunohistochemical localization of cytochromes P-450 in the rat liver. *Life Sci.* **23**, 2627-2632.
- Braunwald, E. and Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: a double edged sword? *J. Clin. Invest.* **76**, 1713-1719.
- Bromont, C., Marie, C. and Bralet, J. (1989). Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* **20**, 918-924.
- Cello, J. P. and Sleisenger, M. H. (1982). The liver in systemic conditions. In *A Text Book of Liver Disease* (D. Zakim and T. D. Boyer, Ed.), pp. 1221-1249. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Chaudry, I. H., Wichterman, K. A. and Baue, A. E. (1979). Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* **85**, 205-211.
- Delva, E., Barberousse, J. P., Nordlinger, B., Ollivier, J. M., Vacher, B., Guilmet, C. and Huguet, C. (1984). Hemodynamic and biochemical monitoring during major liver resection with use of hepatic vascular exclusion. *Surgery* **95**, 309-318.
- Drugas, G. T., Paidas, C. N., Yahanda, A. M., Ferguson, D. and Clemens, M. G. (1991). Conjugated desferrioxamine attenuates hepatic microvascular injury following ischemia/reperfusion. *Circ. Shock* **34**, 278-283.
- Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
- Frederiks, W. M. and Marx, F. (1987). Changes in cytoplasmic and mitochondrial enzymes in rat liver after ischemia followed by reperfusion. *Exp. Mol. Pathol.* **47**, 291-299.
- Granger, D. N., Hollwarth, M. E. and Parks, D. A. (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-driven free radicals. *Acta. Physiol. Scand.* **548**, 47-63.
- Guengerich, F. P. (1987). Cytochrome P-450 enzymes and drug metabolism. *Prog. Drug Metab.* **10**, 3-84.
- Guengerich, F. P., Dannan, G. A., Wright, S. T., Martin, M. V. and Kaminsky, L. S. (1982). Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450s. *Xenobiotica* **12**, 701-716.
- Högberg, J., Bergstrand, A. and Jakobsson, S. V. (1973). Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* **37**, 51-59.
- Hrycay, E. G. and O'Brien, P. (1971). The peroxidase nature of cytochrome P-420 utilizing a lipid peroxide substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 28-35.
- Huet, P. M. and Villeneuve, J. P. (1983). Determinations of drug disposition in patients with cirrhosis. *Hepatology* **3**, 913-918.
- Jaeschke, H. and Farhood, A. (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.* **260**, G355-G362.
- Jaeschke, H., Farhood, A. and Smith, C. W. (1990). Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver *in vivo*. *FASEB J.* **4**, 3355-3359.
- Kawase, T., Kato, S. and Lieber, C. S. (1989). Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* **10**, 815-821.

- Laitinen, M., Hietanen, E., Vainio, H. and Hanninen, O. (1975). Dietary fats and properties of endoplasmic reticulum. I. Dietary lipid induced changes in composition of microsomal membranes in liver and gastroduodenal mucosa of rat. *Lipids* **10**, 461-466.
- Leo, M. A., Lowe, N. and Lieber, C. S. (1986). Interaction of drugs and retinol. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3949-3953.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Masugi, F. and Nakamura, T. (1976). Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxide in rat liver. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**, 187-191.
- Metzger, J. and Lauterburg, B. H. (1988). Postischemic ATP levels predict hepatic function 24 hours following ischemia in the rat. *Experientia.* **44**, 455-457.
- Mieyal, J. and Blumer, J. (1976). Acceleration of the autooxidation of human oxyhemoglobin by aniline: its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **251**, 3442-3445.
- Omar, R., Nomikos, I., Piccorelli, G., Savino, J. and Agarwal, N. (1989). Prevention of post ischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* **30**, 510-514.
- Omura, T. and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- Petty, M., Grisar, J. M., Dow, J. and Jong, W. D. (1990). Effects of an α -tocopherol analogue on myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **179**, 241-242.
- Recknagel, R. O. and Glende, E. A. Jr. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *C.R.C. Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263-297.
- Reichen, J., Arts, B., Schafroth, U., Zimmermann, A., Zeltner, T. B. and Zysset, T. (1987). Aminopyrine N-demethylation by rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* **93**, 719-726.
- Rocci, E., Borghi, A., Paolillo, F., Pradell, M. and Casalgrandi, G. (1991). Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. *J. Lab. Clin. Med.* **118**, 176-185.
- Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estrabook, R. W. (1967). Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* **3**, 113-123.
- Shaw, B. W., Gordon, R. D. and Iwatsuki, S. (1985). Retransplantation of the liver. *Semin. Liver. Dis.* **5**, 394-401.
- Tappel, A. L. (1980). Measurement of and protection from *in vivo* lipid peroxidation. In *Free radicals in biology* (W. A. Pryor, Ed.), pp. 1-47. Academic Press Inc., New York.
- Thurman, R. G., Marzi, I., Seitz, G., Thies, J., Lemaster, J. J. and Zimmerman, F. (1988). Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* **46**, 502-506.
- Triawger, G. J. and Plaa, G. L. (1971). Differences in the potentiation of carbon tetrachloride in rats by ethanol and isopropanol pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 105-112.