

## 간장 허혈 및 재관류시 Vitamin C가 간장 기능에 미치는 영향

김순애\* · 서민영 · 염동호 · 조태순 · 이선미

성균관대학교 약학대학

### Effect of Vitamin C on Hepatic Biliary and Microsomal Function in Hepatic Ischemia/reperfusion

Soon-Ae KIM\*, Min-Young SEO, Dong-Ho YEOM, Tai-Soon CHO and Sun-Mee LEE

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

(Received November 21, 1995; accepted December 8, 1995)

**Abstract**—This study was done to investigate the effect of vitamin C on hepatic biliary and microsomal function during ischemia and reperfusion. Rats were treated with vitamin C(20, 100, 400, 1600 mg/kg) or with vehicle(saline) and then subjected to 60 min no-flow hepatic ischemia *in vivo*. Control animals were time-matched sham ischemic animals. After 1 or 5 hr of reperfusion, bile was collected, blood was obtained from the abdominal aorta, and liver microsomes were isolated. In vehicle-treated ischemic rats, serum ALT and AST levels peaked at 5 hr and were significantly attenuated by vitamin C 20 mg/kg and 100 mg/kg treatment. Similarly, hepatic wet weight-to-dry weight ratio was decreased in the vehicle-treated ischemic group. Vitamin C 20 mg/kg and 100 mg/kg treatment minimized the increase in this ratio. Lipid peroxidation was elevated in vehicle-treated ischemic group, but this elevation was also inhibited by vitamin C 20 mg/kg and 100 mg/kg treatment. Bile flow and cholate output, but not bilirubin output, were markedly decreased by ischemia/reperfusion. Vitamin C 20 mg/kg and 100mg/kg treatment restored the secretion but vitamin C 1600 mg/kg reduced the cholate output. Cytochrome P-450 content was decreased by ischemia/reperfusion and restored by vitamin C 20 mg/kg and 100 mg/kg treatment to the level of sham operated group but decreased by vitamin C 1600 mg/kg. Aminopyrine N-demethylase activity was decreased and aniline p-hydroxylase activity was increased by ischemia/reperfusion. The changes in the activities of aminopyrine were prevented by vitamin C 20 mg/kg and 100 mg/kg treatment, but not by 400 mg/kg and 1600 mg/kg treatment. Our findings suggest that ischemia/reperfusion diminishes hepatic secretory functions as well as microsomal drug metabolizing systems, small doses(20, 100 mg/kg) of vitamin C significantly ameliorates and large doses(400, 1600 mg/kg) of vitamin C aggravated these ischemia/reperfusion-induced changes.

**Keywords** □ vitamin C, hepatic secretion, drug metabolism, ischemia/reperfusion

최근 허혈과 관련있는 관상동맥 질환이나 뇌졸중 등을 위한 새로운 치료법이 증가하면서 허혈 및 재관류시 나타나는 세포독성에 관심이 모아지고 있다. 여러 연구에 따르면 활성산소가 허혈 및 재관류시 일어나는 세포조직 손상이나 모세혈관의 손상의 주요 원인이며(Granger 등 1986), 이런 활성산소의 원천은 xanthine-oxidase 반응에 의한다고 한다(Mayami 등 1993). 즉 허혈시 고에너지 물질인 ATP가 분해되어 purine 대사물이 되고, 동시에

xanthine dehydrogenase가 xanthine oxidase로 전환된다. 재관류시 산소가 도입되면 purine 물질은 xanthine oxidase에 의해 더 빨리 산화되며 부산물로 활성산소가 생성되는데 이 생성된 활성산소가 생체막을 공격하여 지질과산화물을 일으켜 세포막을 구성하는 불포화 지방산의 산화적 파괴를 유발한다고 한다(Saibo 등, 1990).

간은 체내에서 가장 대사율이 높은 장기로서 몸전체 산소 소모율의 20%를 차지하며 수많은 생화학적 반응이 일어난다. 또 간장은 담즙을 생성하고 호르몬 및 약물을 대사시키는 주된 장소이다. 최근 간기능 부전 환자에

\* To whom correspondence should be addressed.

대한 새로운 치료법으로 간장이식술이 도입되면서 적출된 공여 장기의 허혈 및 재관류 손상을 최소화하기 위한 연구가 진행되고 있다.

Vitamin은 생명유지와 체내 대사 활성을 조절하는데 없어서는 안되는 것으로 전에는 비타민 결핍시 보충하는 소극적 의미로 사용하였으나 근래에는 성인병 예방이나 질병 치료의 보조제로서의 역할이 발표되고 있다. Vitamin E의 경우 천연항산화제로 활성산소의 공격으로 인한 과산화 지질의 생성을 억제하여 세포막 보호에 뛰어난 효과를 나타낸다고 하며 지용성 비타민중에서 가장 독성이 적다고 하나 지용성이므로 응급시에는 적용될 수 없다(Ingold 등, 1987; Di Mascio 등, 1991). Vitamin C는 널리 알려진 수용성 항산화제로 작용발현도 빠르고 체내에 축적되지 않으나,  $Fe^{2+}$ 이나  $Cu^{2+}$ 와 같은 전이원소 존재하에서나(Borg와 Schaich, 1989), 만성으로 vitamin C를 과량으로 투여하였을 경우, 만성으로 vitamin C를 저용량으로 투여하였을 경우(Holloway와 Kivers, 1991), 생체의 실험에서 vitamin C 투여시 허혈시 ferritin으로부터 유리된 철이 과산화수소를 hydroxyl radical이나 hydroxyl like radical로 변화시켜 세포막을 공격하여 전산화제(pro-oxidant)로 작용한다고 한다(Wu 등, 1991).

따라서 본 실험에서는 vitamin C의 용량을 달리하여 활성산소가 관여하는 허혈 및 재관류시 간세포 손상정도, 지질과산화측정, 담즙분비 변동, 간장 약물대사효소계의 변동에 대한 vitamin C의 효과를 관찰하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 실험 동물

실험동물로는 체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 제일상사로 부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 연구실 동물 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후, 일반상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 실험 동물은 실험 24시간 전에 절식시켰으며 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 약물 투여 및 실험군

Vitamin C는 생리적 식염수에 녹여 20, 100, 400, 1600 mg/kg b.wt.을 각각 허혈 5분전에 경정맥으로 주사하였고, sham operation군과 허혈 및 재관류 대조군도 위와 동일한 방법으로 생리적 식염수를 처치하였다.

### 간장 허혈 유발

실험 동물을 pentobarbital sodium(50 mg/kg b.wt.)로 마취시키고, 복부 정중선을 따라 개복하여 문맥의 왼쪽 분지와 간장내 산소공급에 주된 역할을 하는 간동맥을 clamp하여 허혈을 유발시키고, 일정 시간 경과 후 (60분) clamp를 제거하여 재관류시켰다. 재관류 1시간 및 5시간 후에 PE-50 tubing을 총담관에 삽입하여 담즙을 채취한 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽

및 중앙엽을 적출하여 실험에 사용하였다. Sham operation동물은 문맥의 왼쪽 분지와 간동맥을 clamp하지 않고 모든 시험법을 위와 동일하게 시행하였다.

### 간장 소포체 분리

적출한 간장을 잘게 썰어 teflon pestle homogenizer를 이용하여 간 무게 1 g당 4 ml의 0.25 M sucrose용액으로 균질화시킨 다음 9,000 g에서 60분간 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 상등액을 다시 105,000 g에서 60분간 원심분리하여 상등액은 버리고 하층의 침전물인 소포체 분획을 얻었으며 간소포체 1 g당 최종 소포체 용액이 4 ml이 되도록 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4를 첨가하고 이를 재현탁시켜  $-70^{\circ}C$ 에 보관하여 실험에 사용하였다. 간장 균질화부터 소포체 재현탁까지의 모든 과정은  $2^{\circ}C$ 에서 수행하였다.

### 분석방법

Serum aminotransferases(ALT 및 AST)는 Sigma kit # 59-UV 및 # 58-UV(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 사용하여 표준 흡광법으로 측정하였다. 간장 wet weight-to-dry weight ratio는 좌엽의 일부를 잘라 무게를 측정하고(wet wt.)  $80^{\circ}C$ 에서 48시간 건조시킨 후 무게를 달아(dry wt.) wet 대 dry wt.비를 측정하였다. 간장내 지질 과산화는 Masugi와 Nagamura(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. 담즙량은 eppendorf tube 자체의 무게를 미리 측정한 후, 총담관에서 받은 tube무게와의 차이값을 담즙량으로 하여 ml/hr/100 g b.wt로 표시하였다. Total bilirubin량은 AM 301-K(Nipponshaji, Tokyo, Japan) kit를 사용하여 표준 흡광법으로 측정하였고, 담즙내 cholate양은 Irvin 등(1944)의 방법에 따라 측정하였다. 간장 소포체내 약물 대사효소계 측정에 있어서 cytochrome P-450함량은 Omura와 Sato(1964)의 방법에 준하여 differential spectrophotometer로 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하고 그 차이와 molar extinction coefficient를  $104 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 으로 하여 계산하였다. Aminopyrine N-demethylase 활성은 생성되는 formaldehyde를 Schenkman 등(1967)의 방법에 따라 412 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였고, aniline p-hydroxylase 활성은 생성되는 para-aminophenol(PAP)을 Mieyal과 Blumer(1976)의 방법에 따라 630 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다. Protein 함량은 Lowry등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

### 통계처리

모든 실험결과는 평균± 표준오차로 나타내었으며 자료 분석은 two-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여  $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험 결과

혈청내 ALT 및 AST 활성도

그림 1에서 보는 바와같이 sham군에 있어 ALT치는 허혈후, 재관류 1시간에 각각  $55 \pm 5$  U/L,  $67 \pm 11$  U/L로 정상수위에서와 차이가 없었으나 재관류 5시간에  $333 \pm 32$  U/L로 약간 증가하였다. 허혈 및 재관류 대조군에서 ALT치는 허혈후부터 증가하기 시작하여 재관류 5시간에는 ALT치가  $4105 \pm 816$  U/L까지 증가하였으나, vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여군에서는 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. Sham군에 있어 AST치는 허혈 및 재관류 5시간동안  $78 \pm 9$  U/L로 일정하였으며 허혈 및 재관류 대조군에서는 ALT치와 마찬가지로 허혈후부터 증가하기 시작하여 재관류 5시간에  $6135 \pm 212$  U/L로 최고치를 나타내었고, vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여군에서 이의 증가를 유의성있게 감소하였

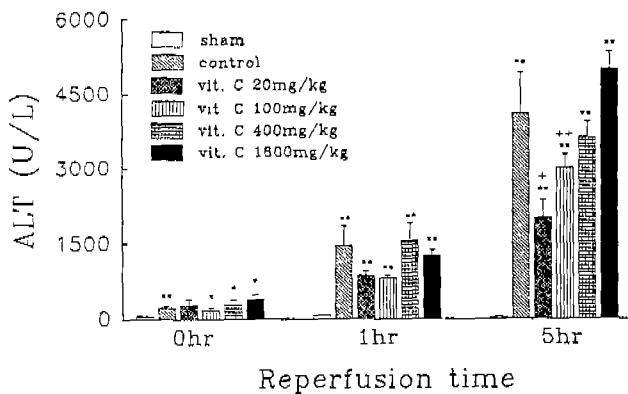


Fig. 1. Effect of vitamin C on serum ALT activities in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means  $\pm$  S.E.M. for 7 rats per group. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  vs sham-operated rats. += $p < 0.05$ , ++= $p < 0.01$  vs vehicle-treated ischemic rats.

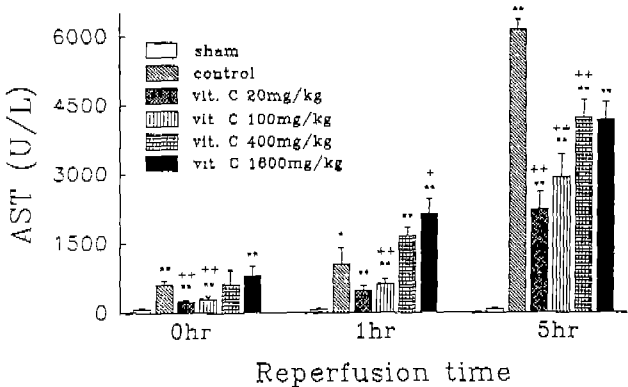


Fig. 2. Effect of vitamin C on serum AST activities in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means  $\pm$  S.E.M. for 7 rats per group. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  vs sham-operated rats. += $p < 0.05$ , ++= $p < 0.01$  vs vehicle-treated ischemic rats.

다. 더욱이 재관류 1시간에 대조군은 sham군에 비해 AST치가  $1043 \pm 351$  U/L까지 상승하였으나, vitamin C 20 mg/kg투여군에서는 대조군보다 유의성있게 감소하였고, 1600 mg/kg투여군에서는 오히려 대조군보다 증가하였다(그림 2).

Liver wet weight-to-dry weight ratio

그림 3에서 보듯이 허혈후 및 1시간에 대조군의 간장 wet wt.-to-dry wt. ratio는 sham군(3.3과 3.46)에 비해 3.78과 3.86을 나타내어 부종으로 인한 세포손상을 뚜렷이 나타내었으나, vitamin C 100 mg/kg투여군에서 허혈 및 재관류 대조군보다 유의성있게 그 수치가 감소하였다. 재관류 5시간에서 대조군이 sham군에 비해 wet wt. to dry wt. ratio치를 현저히 증가시켰으나 20 mg/kg투여군에서 이의 증가를 유의성있게 감소하였다.

간장내 지질 과산화

그림 4에서 보는 바와 같이 sham군에 있어 간장내 지질과산화산물인 malondialdehyde(MDA)치는 실험전기 간동안 대략  $0.51 \pm 0.03$  nmole/MDA formed/mg protein으로 일정하였다. 그러나 허혈후 허혈 및 재관류 대조군이 sham에 비해 MDA양이 현저히 증가하였으며, vitamin C 100 mg/kg투여군에서 대조군의 증가를 유의성있게 감소하였다. 재관류 1시간에 sham군에 비해 대조군의 MDA양이 약 4배정도 증가하나 vitamin C 20 mg/kg, 100 mg/kg투여로 그 수치가 유의성있게 감소하였으며 400 mg/kg투여로는 오히려 증가하였다. 재관류 5시간에는 허혈 및 재관류 대조군이  $2.70 \pm 0.56$  nmole/MDA formed/mg protein으로 sham군에 비해 현저히 증가하였으나 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다.

담즙 분석

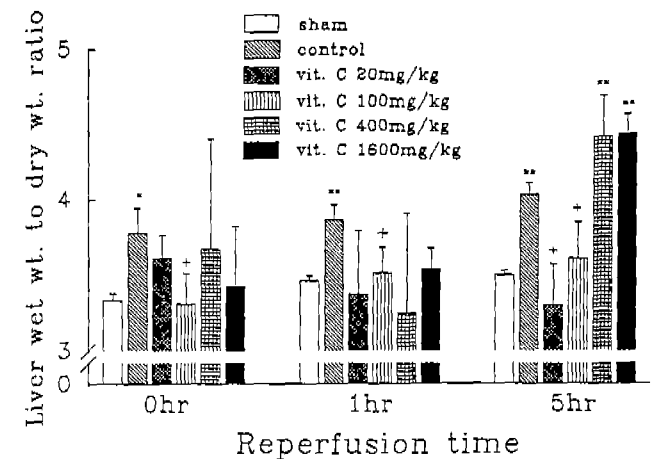


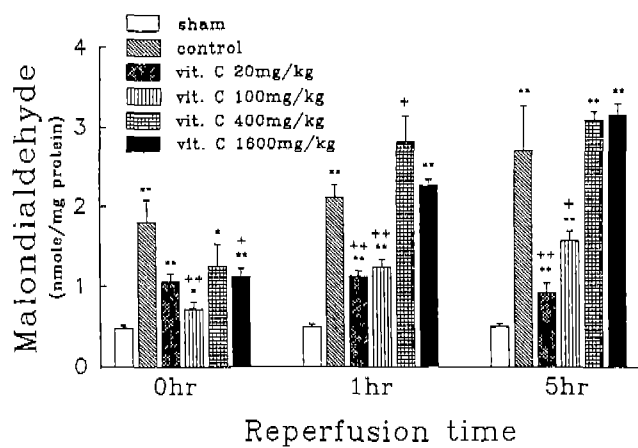
Fig. 3. Effect of vitamin C on liver wet weight-to-dry weight ratio in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means  $\pm$  S.E.M. for 7 rats per group. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$  vs sham-operated rats. += $p < 0.05$  vs vehicle-treated ischemic rats.

담즙량은 재관류 1시간에 대조군(0.11±0.02 ml/hr/100 g b.wt)에서 sham군에 비해 50%정도 감소하였으나 vit. C 100 mg/kg투여군에서는 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 재관류 5시간에서는 대조군은 0.15±0.03 ml/hr/100 g b.wt로 sham군에 비해 감소하였으나 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여로 유의성있게 증가하였다. Cholate양은 재관류 1시간에 대조군은 0.61±0.07 mg/hr/100g b.wt.로 sham군(1.23±0.07 mg/hr/100g b.wt)에 비해 cholate양이 감소되었으나, vitamin C 20 mg/kg투여군에서는 대조군에 비해 유의성있게 증가하였고 vitamin C 1600 mg/kg투여군에서는 오히려 감소하였다. 재관류 5시간에 대조군의 cholate양은 sham군에 비해 더욱 현저한 감소를 보였으나 vitamin C 100 mg/kg 및 400 mg/kg투여군에서 유의성있는 증가를 보였고,

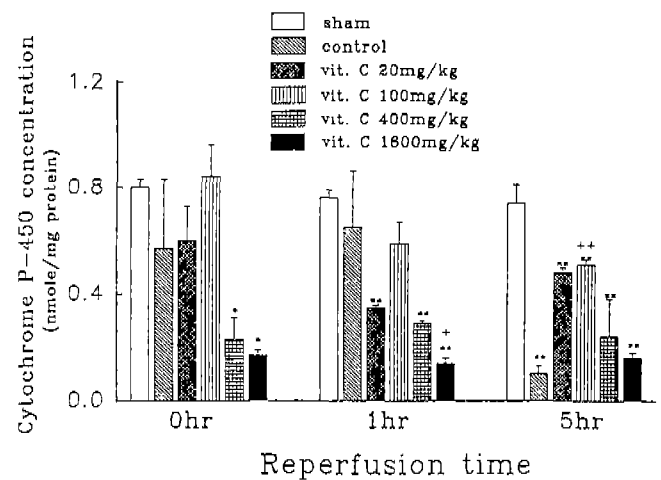
1600 mg/kg투여군에서는 오히려 유의성있는 감소를 나타내었다. Bilirubin은 모든 실험군에서 큰 차이를 나타내지 않았다(표 D).

**간장 소포체내 약물대사 효소계**

허혈 및 재관류 대조군의 간장소포체내 총 cytochrome P-450양은 재관류 1시간에 sham군(0.76±0.03 nmole/mg protein)과 비슷하였으나 재관류 5시간에 sham군에 비해 13%로 현저히 감소하였다. vitamin C 100 mg/kg투여군에서 재관류 5시간에 대조군보다 유의성있게 증가하였으나 vitamin C 1600 mg/kg투여군에서는 재관류 1시간에 오히려 그 효소활성이 감소하였다(그림 5). 그림 6에 의하면 aminopyrine N-demethylase 활성은 재관류 1시간에 허혈 및 재관류 대조군(28±3 nmole HCHO/mg protein/10 min)은 sham군에 비해 효소활성이 45%정도



**Fig. 4.** Effect of vitamin C on lipid peroxidation in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*=*p*<0.05, \*\*=*p*<0.01 vs sham-operated rats. +=*p*<0.05, ++=*p*<0.01 vs vehicle-treated ischemic rats.

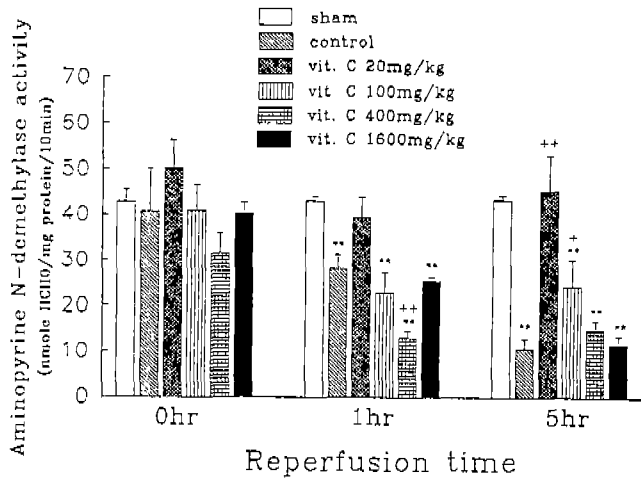


**Fig. 5.** Effect of vitamin C on microsomal cytochrome P-450 concentration in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*\*=*p*<0.01 vs sham-operated rats. +=*p*<0.05, ++=*p*<0.01 vs vehicle-treated ischemic rats.

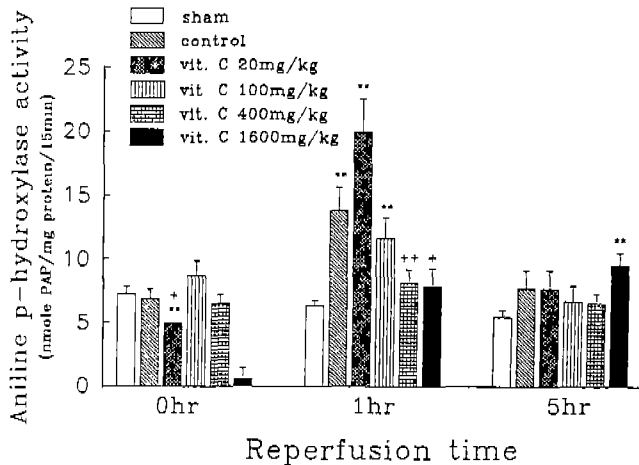
**Table I.** Effect of vitamin C on biliary secretion in ischemia/reperfusion of rat liver

Group	Reperfusion	Bile flow <sup>1</sup>	Cholate output <sup>2</sup>	Total bilirubin <sup>2</sup>
Sham operation	1 hr	0.23±0.03	1.23±0.07	1.49±0.18
	5 hr	0.20±0.03	1.00±0.07	1.39±0.19
Ischemia/Reperfusion control	1 hr	0.11±0.02**	0.61±0.07**	1.25±0.36
	5 hr	0.15±0.03*	0.23±0.09**	1.27±0.35
vit. C 20 mg/kg	1 hr	0.11±0.01**	0.92±0.02***+	1.84±0.27
	5 hr	0.24±0.05	0.23±0.02**	2.66±1.47
vit. C 100 mg/kg	1 hr	0.18±0.02+	0.60±0.07**	1.27±0.50
	5 hr	0.23±0.03**+	0.54±0.04***+	1.47±0.50
vit. C 400 mg/kg	1 hr	0.07±0.01**	0.76±0.02**	1.00±0.22+
	5 hr	0.06±0.02**	0.61±0.03**+	1.18±0.34
vit. C 1600 mg/kg	1 hr	0.13±0.02*	0.20±0.05***+	0.89±0.08*
	5 hr	0.16±0.01	0.15±0.01***+	1.51±0.30

Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*=*p*<0.05, \*\*=*p*<0.01 vs sham-operated rats. +=*p*<0.05, ++=*p*<0.01 vs vehicle-treated ischemic rats. <sup>1</sup> ml/hr/100 g body weight; <sup>2</sup> mg/hr/100 g body weight.



**Fig. 6.** Effect of vitamin C on microsomal aminopyrine N-demethylase activity in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*\*= $p < 0.01$  vs sham-operated rats. += $p < 0.05$ , ++= $p < 0.01$  vs vehicle-treated ischemic rats.



**Fig. 7.** Effect of vitamin C on microsomal aniline p-hydroxylase activity in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*\*= $p < 0.01$  vs sham-operated rats. += $p < 0.05$ , ++= $p < 0.01$  vs vehicle-treated ischemic rats.

감소하였고 vitamin C 400 mg/kg투여군에서 대조군보다 유의성있게 감소하였다. 재관류 5시간에 대조군의 aminopyrine N-demethylase활성은 sham군에 비해 더욱 감소하여 25%정도를 나타내었으나 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여군에서 대조군보다 유의성있게 증가하였다. 허혈 및 재관류 대조군에서 aniline p-hydroxylase활성은 허혈후 sham군과 효소활성이 거의 비슷하였으나 vit. C 20 mg/kg투여군에서는 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다. 재관류 1시간에 대조군(13.9±1.8 nmole PAP/mg protein/15 min)은 sham군에 비해 효소활성이 2배정도 증가하나 vitamin C 400 mg/kg 및 1600 mg/

kg투여군에서는 이의 증가를 유의성있게 감소하였다(그림 7).

**고 찰**

허혈은 조직에 혈액이 공급되지 않아 산소요구량에 비해 산소의 공급량이 부족해 에너지 생산이 감소되어 생체내 장기의 조직과 기능을 손상시킨다. 이러한 상태에서 산소를 공급시키면 장기의 기능이 호전되리라 여겨지지만 실제로 기능이 오히려 악화되는 현상을 볼 수 있는데, 이는 산소로 인해 생성된 활성산소등에 기인한다고 한다(Granger등, 1986).

허혈이 일어나는 동안에 고에너지물질인 ATP의 이화(catabolism)가 촉진되어 hypoxanthine과 xanthine같은 purine물질로 되며 동시에 95%의 xanthine dehydrogenase와 5%의 xanthine oxidase의 형태로 존재하던 효소가 20%의 xanthine dehydrogenase와 80%의 xanthine oxidase의 형태로 변화한다. 더우기 이때 재관류되어 과량으로 산소가 재도입되면 purine물질은 더 빨리 산화되어 urate로 되며 그 부산물로 xanthine oxidase에 의해 산소가 superoxide radical로 된다. 이렇게 생성된 superoxide radical은 그 자체가 조직손상을 일으키기도 하나 철이나 구리이온 존재하에서는 더 독성이 강한 hydroxyl radical로 전환되어 조직 손상을 가중시키기도 하며 그 자체가 화학주성물질(chemoattractant)이 되어 호중구에 부착, 축적되어 호중구를 활성화시켜 superoxide radical이나 protease를 생성한다(Mayumi 등, 1993). 따라서 이런 조직손상을 일으키는 각각의 cascade 단계에서 효소를 억제하는 allopurinol이나 superoxide dismutase, dimethylsulfoxide와 같은 활성산소 제거제를 투여하면 조직손상이 완화된다(Dalsing 등, 1983).

Vitamin C는 세포간의 결합조직인 collagen생성과 melanin대사에 관여하며 부족하면 피하출혈, 잇몸출혈, 관절염, 부종 등을 초래한다. 또 면역작용에도 영향을 미쳐 결핍시 항체생산량이 감소되어 면역성이 감소된다는 사실도 입증되었다. Vitamin C의 일일권장량은 확실히 정해져 있지는 않으나 최근 메가비타민 요법으로 권장량의 폭이 더욱 넓어지고 있으나 대략 60 kg성인당 400 mg이며 주사시에는 250~1000 mg이다. Vitamin C는 세포질에서 세가지 형태(reduced ascorbic acid, ascorbate radical, dehydroascorbic acid)로 존재하면서 산화 환원반응을 일으키며 vitamin E와는 달리 활성산소를 생성하기도 하고 제거하기도 한다(Takayama 등, 1993; Holloway 등, 1981; Dillard 등, 1982; Wu 등, 1991). 즉 Vitamin C는 세포손상을 주는 hydroxyl radical, superoxide radical, hypochlorous acid, carbon center radical에 대하여 세포막 보호효과를 나타내며 친수성이므로 생체막 지질과산화물을 직접 억제하지는 못하지만 친지성인 vitamin E와 협동작용을 하여 radical을 빠르고 효과적으로

제거한다. 그러나 이와는 달리 vitamin C는 철이나 구리같은 전이원소 존재하에서 산소분자를 환원시켜 hydrogen peroxide를 생성하기도 하고 만성으로 vitamin C를 과량 투여했을 경우, 또 만성으로 vitamin C를 저용량 투여했을 경우에는 cytochrome P-450양의 저하, cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 활성의 저하, bile turnover rate의 저하 등을 볼 수 있으며(Holloway 등, 1981), 생체의 실험에서 vitamin C 0.5 mmol/L를 투여했을 경우 허혈시 고분자 철함유물로부터 유리된  $Fe^{3+}$ 을 vitamin C가  $Fe^{2+}$ 로 변화시키며, 이 변화된  $Fe^{2+}$ 은 hydrogen peroxide를 hydroxyl radical이나 hydroxyl like radical로 변화시켜 전산화작용을 나타낸다고 하며 이러한 전산화작용은 vitamin C의 원래의 항산화작용을 감춰버린다(Wu 등, 1991). 이와 같이 vitamin C는 상황이나 용량에 따라 항산화제 또는 전산화제로 작용하기도 한다.

본 연구에서 허혈 및 재관류시 간장내 지질과산화산물인 malondialdehyde양이 정상에 비해 5배까지 증가하는데 이러한 증가는 vitamin C 20 mg/kg와 100 mg/kg투여로 억제된다. 더우기 재관류 1시간에는 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여는 재관류 5시간에 서와 같이 재관류로 인한 지질과산화를 억제하나 vitamin C 400 mg/kg 투여는 오히려 지질과산화생성을 증가시켰다. 또한 간장의 일반적인 손상지표인 혈액내 ALT 및 AST 활성도와 간장세포막의 투과성 변화를 나타내는 wet weight to dry weight ratio를 관찰한 결과에서도 허혈 및 재관류시 대조군의 혈청내 ALT 및 AST활성도가 허혈상태부터 증가하기 시작하여 재관류 5시간에 최고치를 나타내었고, 허혈 및 재관류시 세포부종의 지표로 여겨지는 wet weight to dry weight ratio도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 이러한 증가는 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여로 그 증가정도가 유의성있게 억제되었으나 vitamin C 400 mg/kg 및 1600 mg/kg투여에서는 대조군과 차이가 없었다. 이를 간장내 지질과산화에서의 결과와 연관시켜 보면 허혈 및 재관류시 간장의 세포막 파괴는 지질과산화와 밀접한 관계가 있고 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여는 간장손상을 억제함을 추측할 수 있다.

간장의 일반적인 기능으로 약물대사와 담즙분비기능이 있다. Kamiike 등(1985)에 따르면 담즙분비는 세포내 ATP변동과 밀접한 관계가 있으므로 단순한 담즙분비율 측정을 통하여 간장손상 정도를 쉽게 평가할수 있다고 한다. 또한 담즙이 분비되는 기전은 담즙산의 능동적 수송에 따른 담즙산 의존성(bile acid-dependent)과 sodium, bicarbonate와 같은 전해질의 이동, glutathione이나 bilirubin과 같은 유기이온에 의한 담즙산 비의존성 펌프(bile-acid independent pump)로 나뉘어 진다. 허혈 및 재관류시 간장의 담즙 분비량은 정상상태에 비해 50%정도 감소하며 cholate양 역시 정상에 비해 유의성있게 감소하였으나 bilirubin양은 변화가 없었다. 이로써 허혈

및 재관류시 담즙분비 저하는 담즙산 의존성 기전에 더욱 민감한 것으로 여겨진다. 또한 이러한 담즙분비량 및 cholate양의 감소는 vitamin C 20 mg/kg와 100 mg/kg 투여에 의해 증가하나, vitamin C 1600 mg/kg투여에 의해서 cholate양이 오히려 감소됨을 볼 수 있었다.

약물대사기능은 주로 간장내의 세포체에서 이루어지며 그 대표적인 효소로는 cytochrome P-450가 있다. 세포막은 세포막, 미토콘드리아막과 같이 활성산소의 공격을 쉽게 받아 지질과산화를 통해 세포막 불포화 지방산의 산화적 파괴가 유도된다. Lee와 Clemens(1992)의 연구에 따르면 간장허혈 및 재관류는 세포막의 지질과산화뿐 아니라 cytochrome P-450의 양적인 감소와 비정상적인 기능변화를 일으킨다고 한다. 허혈 및 재관류시 간장세포내 cytochrome P-450양과 aminopyrine N-demethylase 및 aniline p-hydroxylase활성을 비교한 본 연구에서도 간장허혈 및 재관류시 총 cytochrome P-450양의 감소와 더불어 aminopyrine N-demethylase활성이 감소되었으나 이와는 달리 aniline p-hydroxylase 활성은 증가되었다. Cytochrome P-450양의 감소는 재관류 5시간에 vitamin C 100 mg/kg투여로 증가되었으나 vitamin C 1600 mg/kg투여에서는 재관류 1시간에 오히려 감소됨을 보여주었다. 허혈 및 재관류시 aminopyrine N-demethylase의 활성감소는 vitamin C 20 mg/kg 및 100 mg/kg투여에 의하여 증가되었으나 vitamin C 400 mg/kg투여에 의해서는 더욱 현저한 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 간장 허혈 및 재관류는 담즙분비저하와 약물대사 효소계의 기능이상을 초래하며 저용량의 vitamin C는 간장허혈 및 재관류시 야기되는 간장손상을 방지하나 고용량의 vitamin C는 오히려 간장기능을 악화시키는 것 같다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한국과학재단 핵심전문 연구과제 연구비(과제번호 951-0710-084-2)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Atalla, S. L., Toledo-Pereyra, L. H. and Mackenzie, G. H. (1985). The influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* **40**, 584-590.
- Borg, D. C. and Schaich, K. M. (1989). Pro-oxidant of antioxidants. In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*(Jaime Miquel, Ed.), pp.63-77. Boca Ranton, Florida.
- Dalsing, M. C., Grosfeld, J. L., Shiffler, M. A., Vane, D. W., Hull, M., Beher, R. L. and Weber, T. R. (1983). Superoxide dismutase: A cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J. Surg. Res.* **34**, 589-596.
- Dillarrd, C. J., Kunert, K. J. and Tappel, A. L. (1982). Effects

- of vit E. Ascorbic acid and mannitol on alloxan-induced lipid peroxidation in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 204-212.
- Doba, T. and Burton, G.W. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vit C. *Biochem. Biophys. Acta* **835**, 298-303.
- Drugas, G. T., Paidas, C. N., Yahanda, A. M., Ferguson, D. and Clemens, M. G. (1991). Conjugated desferoxamine attenuates hepatic microvascular injury following ischemia/reperfusion. *Circ. Shock* **34**, 278-283.
- Granger D. N., Hollwarth, M. E. and Parks, D. A. (1986). Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta. Physiol. Scand.* **548**, 47-63.
- Harris, W. S., Kottke, B. A. and Ravi Subbiah, M. T. (1979). Bile acid metabolism in ascorbic acid-deficient guinea pigs. *Am. J. clin. Nutr.* **32**, 1837-1841.
- Holloway, D. E. and Rivers, J. M. (1981). Influence of chronic ascorbic acid deficiency and excessive ascorbic acid intake on bile acid metabolism and bile composition in the guinea pig. *J. Nutr.* **111**, 412-424.
- Irvin, J. L., Johoston, C. G. and Kopalz, J. (1944). A photometric method for the determination of cholates in blood and bile. *J. Biol. Chem.* **153**, 439-444.
- Kamiike, W., Nakahara, M., Koseke, M., Nishida, T., Kawashima, Y., Watanabe, F. and Tagawa, K. (1985). Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver. *Transplantation* **39**, 50-55.
- Leung, H. W., Vang, M. J. and Mavis, R. D. (1981). The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta* **664**, 266-272.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marubayashi, S., Dohi, K. and Ochi, K. (1986). Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury. *Surgery* **99**, 184-191.
- Masugi, F. and Nakamura T. (1976). Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**, 187-191.
- Mayumi, T., Schiller, H. J. and Bukley, G. B. (1993). Pharmaceutical intervention for the prevention of post-ischemic reperfusion injury. In *Free radicals: from basic science to medicine* (G. Poli, Ed), pp.438-447.
- Mieyal, J. and Blumer, J. (1976). Acceleration of autooxidation of human oxyhemoglobin by aniline: its relation to hemoglobin-catalyzed aniline hydroxylation. (1976). *J. Biol. Chem.* **251**, 3442-3445.
- Omura, T. and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment liver microsome. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- Packer, J. E., Slater, T. F. and Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**, 737-738.
- Saito, M., OH-Hashi, A., Kubota, M., Nishide, E. and Yamaguchi, M. (1990). Mixed function oxidases in response to different types of dietary lipids in rats. *B. J. Nutr.* **63**, 249-257.
- Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estrabook, R. W. (1967). Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* **3**, 113-123.
- Takayama, F., Egashira, T., Kudo, Y. and Yamanaka, Y. (1993). Effects of anti-free radical intervention on phosphatidyl choline hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 1749-1757.
- Wayner, D. D. M. and Burton, G.W. (1986). The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochem. Biophys. Acta* **884**, 119-123.
- Wu, T. W., Hashimoto, N., Au, J. X., Wu, J. and Carry, D. (1991). Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* **3**, 575-580.
- Younes, M., Kayser, E. and Strubelt, O. (1992). Effect of antioxidants on hypoxia/reoxygenation-induced injury in isolated perfused rat liver. *Pharmacol. toxicol.* **71**, 278-283.
- Zang, L. H., Wu, J., Carry D. and Wu, T. W. (1991). Trolox and ascorbate: are they synergistic in protecting liver cells *in vitro* and *in vivo*? *Biochem. Cell Biol.* **69**, 98-201.