

## 간장내 허혈 및 재관류시 Vitamin E와 C의 간세포 보호작용

이선미\* · 김순애 · 조태순

성균관대학교 약학대학

### Vitamins E and C: Are They Synergistic in Protecting Liver Cells against Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury?

Sun-Mee LEE\*, Soon-Ae KIM and Tai-Soon CHO

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

(Received December 11, 1996; accepted March 4, 1997)

**Abstract** - This study was done to determine that vitamins E and C are synergistic in protecting liver cells during hepatic ischemia and reperfusion. Rats treated with vitamins E and C were subjected to 60 min of hepatic ischemia and to 1 and 5 hr of reperfusion thereafter. Serum aminotransferase level and microsomal lipid peroxidation were markedly increased by ischemia/reperfusion. These increases were significantly attenuated by vitamins E, C or its combination. Hepatic wet weight-to-dry weight ratio was increased in ischemic group, but this increase was prevented by combination of vitamin E and C. Bile flow and cholate output were markedly decreased by ischemia/reperfusion and vitamin C alone and combination of vitamin E and C restored their secretion. Cytochrome P-450 content and aminopyrine N-demethylase activity were decreased by ischemia/reperfusion and restored by vitamin C and combination of vitamin E and C to the level of sham-operated rat. Aniline p-hydroxylase activity was increased by ischemia/reperfusion and this increase was prevented by vitamin E. Our findings suggest that ischemia/reperfusion diminishes hepatic secretory and microsomal functions by increasing lipid peroxidation and vitamins E and C synergistically ameliorates these changes.

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

최근 허혈 및 재관류로 인한 조직손상이 심근경색, 뇌졸중 및 장기이식과 같은 인간의 생존문제와 직결되는 질환의 중요 인자라는 것이 알려진 이래 허혈 및 재관류시에 나타나는 장기독성과 그 기전 연구에 관심이 모아지고 있다 (Younes 등, 1992).

여러 연구에 따르면 허혈 및 재관류시 나타나는 세포독성은 활성산소에 기인하며 이러한 활성산소의 원천은 호중구의 NADPH oxidase와 xanthine oxidase 등이라 한다 (Granger 등, 1986). 즉 허혈 시에는 ATP의 분해가 촉진되어 hypoxanthine으로 이화되며 이 때 재관류되어 산소가 도입되면 산소분자가 전자 하나를 받아 들임으로서 독성이 강한 superoxide radical을 생성하고 이는 철, 구리와 같은 전이원소 존재 하에서는 반응성이 더욱 강한 hydroxyl radical을 생성하여 세포막, 미토콘드리아 및 소포체 등과 같은 생체막을 공격하여 지질과산화물을 통해 세포막 불포화지방산의 산화적 파괴를 유도한다고 한다(Parks 등, 1981).

Vitamin이란 생체 내에서 합성되지 않지만 소량으로서 생명 유지에 필수 불가결한 유기물질이다. Vitamin E( $\alpha$ -tocopherol)가 쥐의 항불임 인자로 발견된 이래 최근 들어 세포막을 안정시키고 지질과산화를 억제하는 항산화작용이 있다는 점에서 혈액 순환 개선 및 노화 방지 비타민으로 사용되고 있으며(Leo 등, 1993; Mascio 등, 1991), Lee와 Clemens(1992)에 의하면 간장 허혈 및 재관류시 vitamin E의 처리로 지질과산화가 억제되어 허혈 및 재관류로 인한 세포막 손상방지와 간장내 효소의 비활성화를 정상화시켜 준다고 한다. 이렇듯 vitamin E는 소량으로도 생체막에서 radical을 제거하는데 높은 효과를 가지고 있으며 지용성 vitamin중 가장 독성이 적다고 하지만 세포내에서 작용을 나타내기까지는 시간이 걸려 응급시 사용하기에는 부적절하다(Ingoted 등, 1987; Mascio 등, 1991).

Vitamin C(ascorbic acid)는 세포간의 결합 조직인 collagen의 생성과 melanin대사에 관여하고 이의 결핍시 피하출혈, 잇몸 출혈, 괴혈병, 관절염, 부종 등을 초래한다(Packer 등, 1979). 또한 수용성 항산화제로 알려진 vitamin

\* To whom correspondence should be addressed.

C는 vitamin E와는 달리 일부 상황에 따라 활성산소를 제거하기도 하고 이와는 반대로 오히려 생성하기도 하는 전산화제(pro-oxidant)로도 작용한다(Wu 등, 1991).

더욱 흥미있는 일은 지용성 항산화제인 vitamin E와 수용성 항산화제인 vitamin C의 상호작용으로, Packer 등(1979)은 vitamin E와 C가 항산화작용을 나타냄에 있어 상승적으로 작용한다고 하였으며 이는 vitamin E가 생체막에서 일차적으로 항산화작용을 일으키고 그 이후에 생성된 vitamin E radical이 vitamin C와 반응하여 vitamin E를 원래 형태로 재생시킴으로써 조직내 vitamin E의 양을 유지시켜 vitamin E의 항산화 효과를 높인다고 한다. 그러나 이와는 달리 Ginter (1984)에 따르면 vitamin E와 C가 반드시 상승적으로 작용하는 것이 아니라 vitamin E와 C 병용시 일부 효소는 vitamin E와 C의 용량증가에 비례하지 않고 오히려 억제된다고 한다.

이와 같이 vitamin E와 C의 상호작용에 관한 연구는 그 결과가 실험모델에 따라 일정치 않으며 더구나 간장허혈 및 재관류시 이들의 병용효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인체의 임상응용에 도움을 주는 생체내 실험(in vivo)을 통해 활성 산소가 관여하는 허혈 및 재관류시 나타나는 간세포 손상 양상과 그의 기전을 살펴보고, 이때 간세포 손상을 방지할 것으로 생각되어지는 vitamin E와 C의 병용 효과도 알아보고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물로는 체중 250 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 제일상사로 부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 연구실 동물 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후, 일반 상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 실험 동물은 실험 18시간 전에 절식시켰으며 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 약물 투여 및 실험군

Vitamin E는 soybean oil에 녹여 허혈 및 재관류 전 3일간 25 mg/kg b.wt.씩 복강내 주사하였고, vitamin C는 생리적 식염수에 녹여 100 mg/kg b.wt.을 허혈 5분전에 각각 경정맥으로 주사하였고, sham군과 허혈 및 재관류 대조군도 위와 동일한 방법으로 생리적 식염수를 처치하였다.

### 간장 허혈 유발

실험 동물을 pentobarbital sodium(50 mg/kg b.wt.)으로 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 대

동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 실험에 사용하였다. Sham군은 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 g 당 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 소포체를 얻었으며 간소포체 1 g당 최종 소포체 용액이 4 ml이 되도록 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4를 첨가하고 이를 재현탁시켜 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다. 간장 균질화부터 소포체 재현탁까지의 모든 과정은 2℃에서 수행하였다.

### 간조직 검사

간장 허혈 및 재관류군과 vitamin E와 C 단독 및 병용투여군에서 얻은 간조직은 10% formaldehyde 용액에 고정시킨 다음 탈수과정을 거쳐 파라핀포매를 하였으며 4-6 μm 두께의 조직절편을 만들어 hematoxylin 및 eosin 염색후 광학현미경하에서 검정하였다.

### 분석방법

Serum aminotransferases(ALT 및 AST)는 Sigma kit # 59-UV 및 # 58-UV(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A)를 사용하여 표준 흡광법으로 측정하였다. 간장 wet weight-to-dry weight ratio는 좌엽의 일부를 잘라 무게를 측정하고 (wet wt.) 80℃에서 48시간 건조시킨 후 무게를 달아(dry wt.), wet 대 dry liver 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 eppendorff tube 자체의 무게를 미리 측정할 후, 총담관에서 받은 tube무게와의 차이값을 담즙량으로 하여 ml/hr/100 g b.wt로 표시하였다. Total bilirubin량은 AM 301-K (Nipponshaji, Japan) kit를 사용하여 표준 흡광법으로 측정하였고, 담즙내 cholate양은 Irvin 등(1944)의 방법에 따라 측정하였다. 간장 소포체내 약물 대사효소계 측정에 있어 cytochrome P-450함량은 Omura와 Sato(1964)의 방법에 준하여 differential spectrophotometer로 450 nm와 500 nm에서 흡광도를 측정하였고 그 차이와 molar extinction coefficient를 104 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>으로 하여 계산하였다. Aminopyrine N-demethylase 활성은 생성되는 formaldehyde를 Schenkman 등(1967)의 방법에 따라 412 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였고, aniline p-hydroxylase활성은 생성되는 para-aminophenol(PAP)을 Miecyl과 Blumer(1976)의 방

법에 따라 630 nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다. Protein 함량은 Lowry 등(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.

### 실험결과

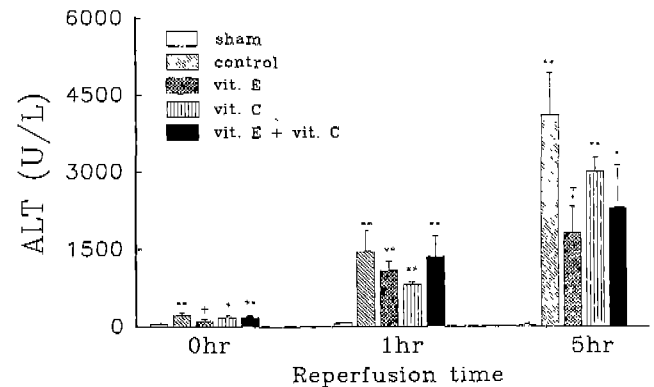
#### 간조직 검사

Fig. 1에 의하면 허혈 및 재관류가 일어난 간세포는 간의 약물대사효소계가 분포된 중심정맥주위와 문맥주위에 세포괴사가 일어났으며, 호중구 침윤, 세포질 붓입, 세포질 공포 및 출혈경향이 나타났다. Vitamin E를 투여한 군은 문맥주위세포와 중심정맥주위의 세포괴사는 관찰되지 않았으나 호중구의 침윤은 심하였고 심한 세포질 공포와 세포질 붓입 및 출혈경향이 관찰되었다. Vitamin C를 투여한 군은 중심정맥 주위세포괴사가 있었으나 심한 정도는 아니었고 세포괴사는 관찰되지 않았으며 세포질 붓입 및 출혈경향이 관찰되었다. Vitamin E와 C의 병용투여군은 중심정맥

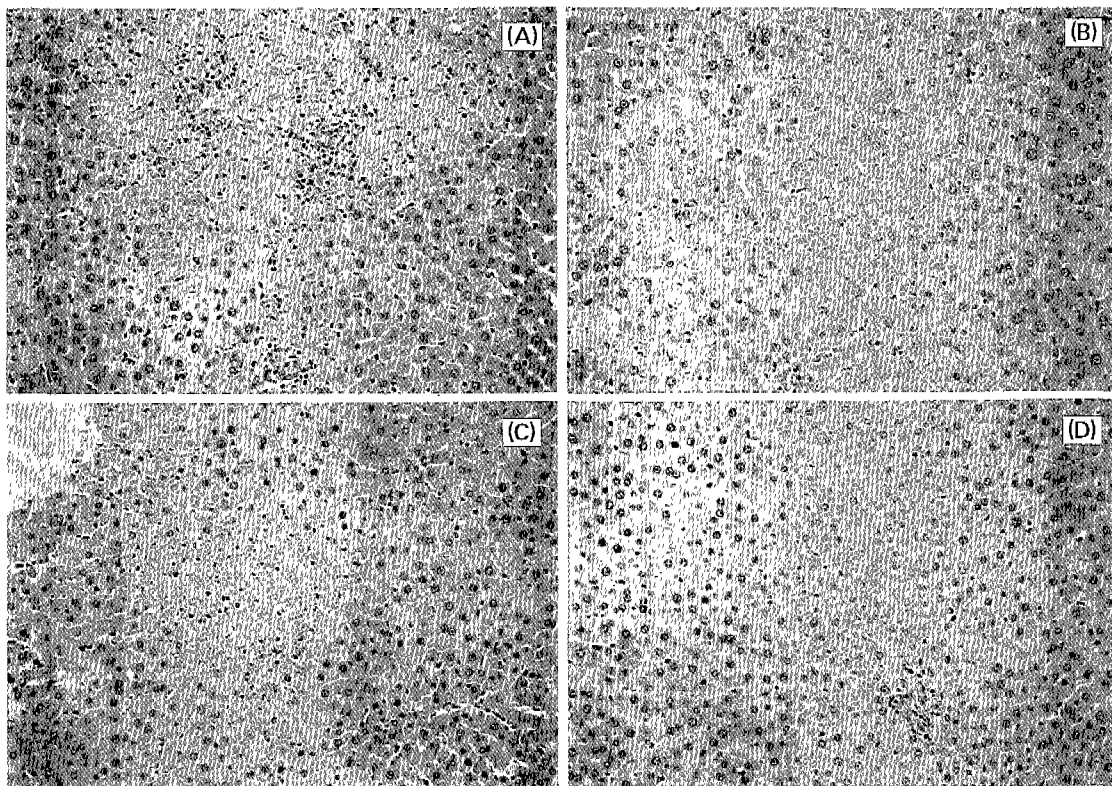
주위와 문맥주위의 세포질괴사가 거의 없었으며, 호중구 침윤도 없었고, 약한 세포질 공포와 세포막 함윤등만이 관찰되었다.

#### 혈청내 ALT 및 AST 활성도

Fig. 2에서 보는 바와 같이 sham군에 있어 혈청 ALT치는 허혈후, 재관류 1시간에 각각  $55 \pm 5$  U/L로 거의 일정하



**Fig. 2.** Effect of vitamin E and C on serum ALT activities 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. += $p < 0.05$  vs vehicle-treated ischemic rats.



**Fig. 1.** Photomicrograph of paraffin sections from livers of rats killed 5 hr after hepatic ischemia and reperfusion. Sections were stained with hematoxylin and eosin.  $\times 200$ . A) Hepatic ischemia/reperfusion control, B) vitamin E treatment, C) vitamin C treatment, D) vitamin E and C treatment.

였고 재관류 5시간에 330±32 U/L 로 약간 증가 하였다.

허혈 및 재관류 대조군에서는 간세포손상으로 인해 허혈 후 227±34 U/L, 재관류 1시간에 1451±397 U/L로 그 수치가 증가하기 시작하여 재관류 5시간에 4105±816 U/L 로 최고치를 나타내었다. 대조군에서 증가된 수치는 재관류 1시간에 vitamin E 단독투여군에서 유의성있게 감소하였고 재관류 5시간에는 vitamin C 단독투여군과 vitamin E와 C 병용투여군에 의해서도 유의성있게 감소하였다.

AST치도 ALT와 마찬가지로 sham 군에서는 78±9 U/L 로 실험 전기간동안 일정하였으며 대조군에서는 허혈후 598±80 U/L, 재관류 1시간 1043±351 U/L로 점차 증가하여 재관류 5시간에는 sham군보다 그 수치가 78배 증가한 6135±212 U/L이었다. 대조군에서 증가된 수치는 재관류 5시간에 vitamin E와 C 각각의 단독투여군에 의해 유의성 있게 감소하였고, vitamin E와 C 병용투여군에서는 대조군에 비해서 뿐 아니라, vitamin C, vitamin E 단독투여군보다 유의성있는 감소를 나타내었다(Fig. 3).

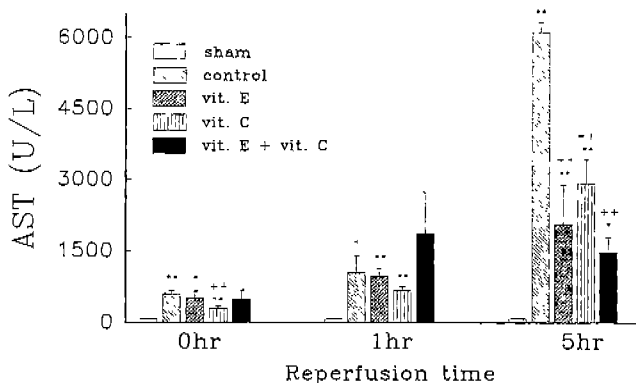
**간장부종**

Fig. 4에서 보는 바와 같이 허혈 및 재관류 대조군은 sham군에 비해 간조직의 습중량 대 건중량의 비율이 허혈 후 3.75±0.16, 재관류 1시간에는 3.86±0.10 및 재관류 5시간에는 4.03±0.08로 간세포손상으로 인한 세포부종을 시간이 지남에 따라 뚜렷히 알 수 있었다.

Vitamin E 및 C 단독투여군에서는 허혈 및 재관류 전기 간에 대조군과 거의 차이가 없었으나 vitamin E와 C의 병용투여군에서는 재관류 1시간과 5시간에 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

**간장내 지질과산화**

간장내 지질과산화 산물인 malondialdehyde (MDA)치는 실험전 기간동안 대략 0.54±0.03 nmole MDA/mg protein 으로 일정하였으나 간장 허혈 및 재관류 대조군에서 허혈

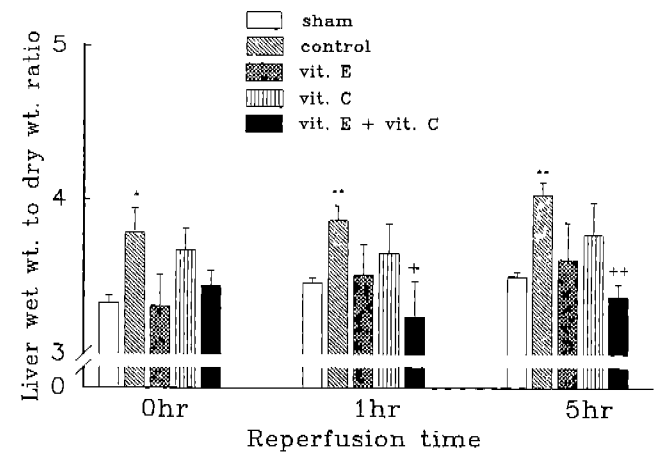


**Fig. 3.** Effect of vitamin E and C on serum AST activities in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*=*p*<0.05, \*\*=*p*<0.01 vs sham-operated rats. +=*p*<0.01 vs vehicle-treated ischemic rats.

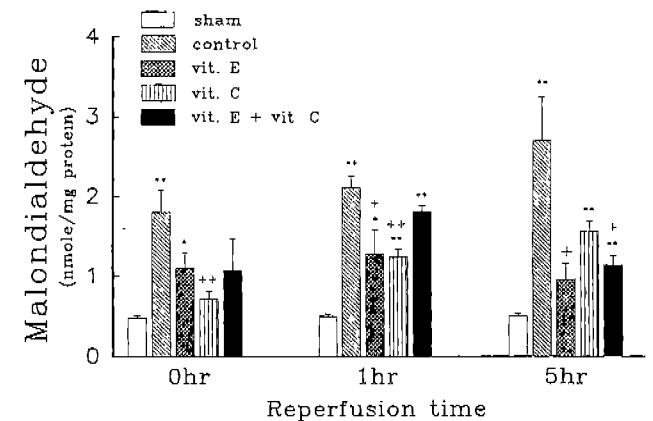
후부터 증가하여 재관류 5시간에는 sham군의 5배까지 되었다. 이 증가된 수치는 vitamin E 투여군에서는 재관류 1시간과 5시간에, vitamin C 단독투여군에서는 허혈후와 재관류 1시간에, vitamin E와 vitamin C의 병용투여군에서는 재관류 5시간에 대조군에 비해 각각 유의성있게 감소하였다(Fig. 5).

**담즙분비**

담즙분비량은 sham 군은 재관류 1시간과 5시간에 각각 0.23±0.03, 0.20 ±0.03 ml/hr/100 g b.wt.이었으며 허혈 및 재관류 대조군에서는 0.11±0.02, 0.15±0.03 ml/hr/100g b.wt로 감소 하였으나 재관류 1시간에 대조군에서 감소된 담즙량이 vitamin C 단독투여군에서 유의성 있게 증가하였다. 또한 vitamin E와 C 병용투여군에서도 특히 재관류 5시



**Fig. 4.** Effect of vitamin E and C on liver wet weight-to-dry weight ratio 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.

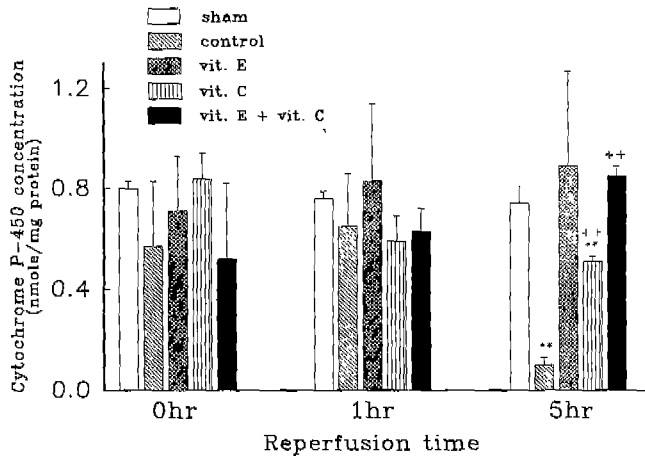


**Fig. 5.** Effect of vitamin E and C on lipid peroxidation in ischemia/reperfusion of rat liver. Values are means±S.E.M. for 7 rats per group. \*=*p*<0.05, \*\*=*p*<0.01 vs sham-operated rats. +=*p*<0.05, +=*p*<0.01 vs vehicle-treated ischemic rats.

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

Group	Reperfusion	Bile flow (ml/hr/100 g b.wt.)	Cholate output (mg/hr/100 g b.wt.)	Total bilirubin (mg/hr/100 g b.wt.)
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			
	5 hr	0.11±0.02**	0.61±0.07**	1.25±0.36
vit. E	1 hr	0.15±0.03*	0.23±0.09**	1.27±0.35
	5 hr	0.13±0.02**	1.74±0.26*	2.07±0.51
vit. C	1 hr	0.13±0.03	0.32±0.07**	1.70±0.25
	5 hr	0.18±0.02 <sup>+</sup>	0.60±0.10**	1.27±0.48
vit. E+vit. C	1 hr	0.23±0.03	0.54±0.04***	1.47±0.47
	5 hr	0.16±0.01*	0.51±0.15**	1.03±0.27
		0.30±0.02** <sup>+</sup>	0.47±0.04***	1.70±0.23

Values are means±S.E.M. for 7 to 10 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. 6.** Effect of vitamin E and 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. ++= $p<0.01$  vs vehicle-treated ischemic rats.

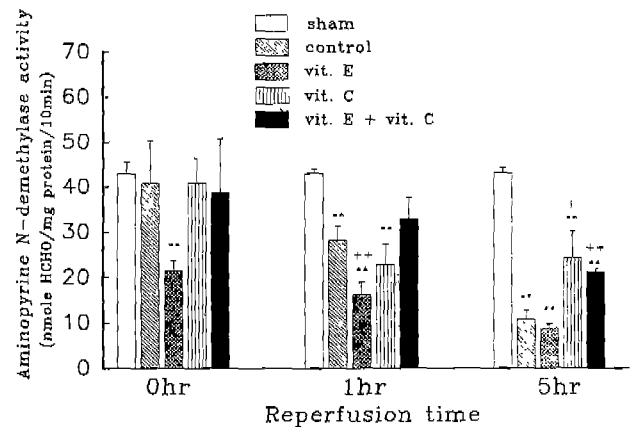
간에 대조군에서 감소된 담즙량의 증가가 sham 군에 비해 오히려 증가하였다.

담즙중 cholate의 양은 sham군에서는 재관류 1시간과 5시간에 각각  $1.23\pm 0.07$ ,  $1.00\pm 0.07$  mg/hr/100 g b.wt.이었으며, 허혈 및 재관류 대조군에서 재관류 1시간 및 5시간에 각각  $0.61\pm 0.07$ ,  $0.23\pm 0.09$  mg/hr/100g b.wt.로 감소되었다.

허혈 및 재관류로 감소된 담즙산양은 재관류 5시간에 vitamin C 단독투여군과 vitamin E와 C 병용투여군에서 유의성있게 증가하였고 재관류 1시간에 vitamin E 단독투여군에서도 유의성있게 증가하였다(Table I).

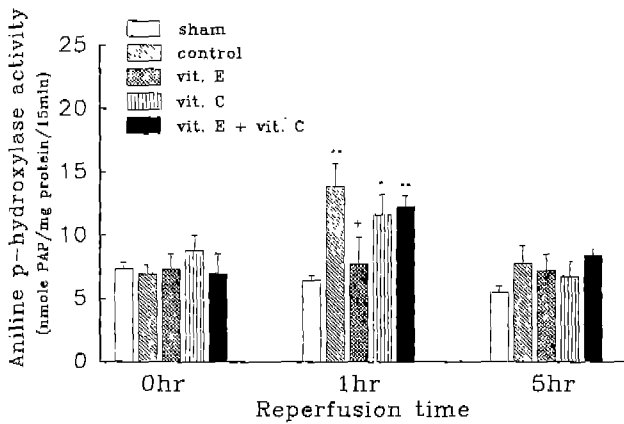
#### 간장 소포체내 약물대사 효소계

Fig 6에서 보는 바와 같이 간장 소포체내 cytochrome P-450양은 sham군이 허혈후와 재관류 1시간 및 5시간에 각각  $0.80\pm 0.03$ ,  $0.76\pm 0.03$ ,  $0.74\pm 0.07$  nmole/mg protein이었으며 허혈 및 재관류 대조군에서 재관류 1시간에는 별



**Fig. 7.** Effect of vitamin E and 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.

변동이 없었으나, 5시간에  $0.33\pm 0.08$  nmole/mg protein로 sham군에 비해 유의있게 감소하였다. 재관류 5시간에 vitamin C 단독투여군과 vitamin E와 C 병용투여군에서 대조군에서 감소된 수치를 유의성있게 증가하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 aminopyrine N-demethylase활성은 sham군에서 실험 전기간동안 일정하였으나 허혈 및 재관류 대조군에서 재관류 1시간 및 5시간에 각각  $28.2\pm 3.1$ ,  $10.7\pm 2.1$  nmole HCHO/mg protein/10 min로 sham군에 비하여 유의있게 감소하였다. 이런 감소는 재관류 5시간에 vitamin C 단독투여군과 vitamin E와 C 병용투여군에 의해 유의성있게 증가되었으며, 재관류 1시간에는 vitamin E 단독투여군에서 오히려 대조군에 비해 감소하였다. Aniline p-hydroxylase활성도는 허혈 및 재관류 대조군에서 재관류 1시간에 sham군에 비해 비정상적인 활성증가를 나타내었으나, 이는 vitamin E 단독투여군에 의해 유의성있게 활성이



**Fig. 8.** Effect of vitamin E and C on microsomal aniline p-hydroxylase activity 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.

억제되었다(Fig. 8).

## 고 찰

허혈 및 재관류로 인한 조직손상과 관련된 질환은 심근 경색(Braunwald 등, 1985), 뇌졸중(Bulkley 등, 1983) 및 장기이식(Trauman 등, 1988) 등 인체의 생명과 직결되는 중요 질환들이며 정확한 손상기전은 아직 알 수 없으나 여러 보고에 의하면 활성산소가 주된 역할을 한다고 한다(Atalla 등, 1985; Fridovich 등, 1978).

Vitamin은 생명유지와 체내 대사활성을 조절하는데 없어서는 안되는 것으로 전에는 비타민 결핍시에 이를 보충하는 소극적 의미로 사용하였으나 근래에는 성인병 예방이나 질병치료의 보조제로서의 적극적 역할이 발표되고 있다. Vitamin E의 경우 천연 항산화제로 활성산소의 공격으로 인한 과산화지질의 생성을 억제하여 세포막 보호에 뛰어난 효과를 나타낸다고 한다(Ingold 등 1987; Di Mascio 등 1971). Lee와 Clemens(1992)에 의하면 허혈 및 재관류는 조직손상, 지질과산화 및 간장세포내 효소활성변동을 초래한다고 하며 이때 vitamin E의 투여로 조직손상과 지질과산화가 억제되고 효소의 비정상적인 기능변화가 정상으로 회복된다고 한다. 그외 여러 연구논문에서도 vitamin E의 우수한 항산화효과가 관찰되었는데  $\alpha$ -tocopherol의 투여는 생체내 실험에서 ATP재합성촉진과 과산화지질의 생성을 억제한다고 하며(Marubayashi 등, 1986), 개를 사용하여 좌측관상동맥을 폐색시켜 허혈을 유발시킨 실험에서 vitamin E의 수용성 유도체인 trolox의 관류액내 주입은 간세포손상을 완화시켜 준다고 한다. 그러나 vitamin E는 지용성이므로 수일간의 전처치를 통해서만이 세포내에 유입이 되어 항산화작용을 나타낸다(Wu 등, 1991).

Vitamin C는 세포간의 결합조직인 collagen생성과 melanin대사에 관여하며 부족하면 피하출혈, 잇몸출혈, 관절염, 부종등을 초래한다. 흥미있는 일은 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 나타낸다. 그러나 이와는 달리 vitamin C는 철이나 구리같은 전이원소 존재하에서 산소분자를 환원시켜 hydrogen peroxide를 생성하기도 하고 만성으로 vitamin C를 과량 또는 저용량 투여했을 경우에는 cytochrome P-450양의 저하, cholesterol  $\alpha$ -hydroxylase 활성의 저하, bile turnover rate의 저하등을 볼 수 있으며(Holloway 등, 1981), 생체의 실험에서 vitamin C 0.5 mmol/L를 관류액에 첨가하였을 경우 허혈시 고분자 철함유물로 부터 유리된  $Fe^{3+}$ 을 vitamin C가  $Fe^{2+}$ 로 변화시켜, 이 변화된  $Fe^{2+}$ 은 차례로 hydrogen peroxide를 hydroxyl radical이나 hydroxyl like radical로 변화시켜 전산화작용을 나타낸다고 하며 이러한 전산화작용은 vitamin C의 원래의 항산화작용까지 감춰버린다고한다(Wu 등, 1991). 이와 같이 vitamin C는 상황이나 용량에 따라 항산화제 또는 전산화제로 작용하기도 한다. 실제로 본 연구실에서도 저용량의 vitamin C는 간장 허혈 및 재관류시 야기되는 간장손상을 방지하나 고용량의 vitamin C는 오히려 간장기능을 약화시킴을 보고한바 있다(Kim, 1995).

이렇듯 vitamin E와 C는 각각 뚜렷한 항산화작용을 나타내지만 각각 단점 즉 vitamin E의 경우 작용발현이 느린점, vitamin C의 경우 수용성이므로 세포막에 존재하는 활성산소를 직접 제거하기 힘든점, 또 전산화제로도 작용할 수 있다는 점이 있으므로 두가지 vitamin을 병용하여 각기 단점을 보완시켜주면 훌륭한 항산화제로 작용할 수 있다는 점에 착안하여 여러 실험에서 두 항산화제를 병용하여 투여시 협동작용이 관찰되었는데 Leung 등(1981)은 liposomal system에 있어서 vitamin E와 C가 각각 독립적으로 우수한 항산화효과를 나타낼뿐 아니라, vitamin C가 vitamin E radical을 환원시켜 원래형태로 되돌려 주어 서로 협동적인 작용을 나타낸다고 한다. 즉, vitamin E는 주로 생체막에 존재하며 생체막에서 생성되는 활성산소를 제거시키고, 자신은  $\alpha$ -phenoxyl radical형태가 되며, 이는 세포질에 존재하는 vitamin C에 의해 다시 vitamin E로 전환되어 또 다시 활성산소를 제거할 수 있는 능력을 갖게 되어 상승된 효과를 나타낸다고 한다. 즉 세포막중 vitamin E의 농도와 교체율은 예상보다 그리 높지 않아 vitamin E가 수많은 free radical을 제거하기 위해서는 vitamin C와 같은 항산화제에 의해 to-

copheryl radical 이 다시 vitamin E로 환원 되어져야 한다고 한다. 그러나 이와는 달리 Ginter 등(1984)에 따르면 이처럼 vitamin E와 vitamin C가 반드시 상승적으로 작용하는 것이 아니라 vitamin E와 vitamin C의 병용시 일부효소는 vitamin E와 C의 용량증가에 대해 비례하지 않고 오히려 억제된다고 한다. 즉, 두가지 비타민의 결핍시에는 간장내 약물대사 효소활성이 낮아지고 vitamin E와 C의 섭취를 증가시키면 효소활성도 증가되지만, 매우 높은 용량의 비타민 E와 C의 투여시에는 효소의 활성이 오히려 억제된다고 하며 Zeng 등 (1990)은 Vitamin E의 수용성 유도체인 Trolox 와 vitamin C를 사용한 생체의 실험에서 각각의 vitamin 처리는 항산화효과가 있지만 이들의 병용투여시에 비해 의의 있는 효과를 나타내지 않는다고 한다. 또 본 교실 서 등 (1996)도 비교적 저용량의 vitamin C(20 mg/kg)와 vitamin E의 병용투여시에 흰쥐 간의 허혈 및 재관류로 인한 간장 손상을 각각 단독으로 사용할 때보다 상승적으로 억제하지는 못함을 관찰하였다.

이렇듯 vitamin E와 vitamin C의 병용투여시에 단독투여 시보다도 의의있는 효과를 나타내기 위해서는 항산화효과를 나타내는 용량결정이 매우 중요하리라 여겨진다. 위의 본 교실에서 용량별 vitamin C반응을 관찰한 결과 비교적 상용량인 vitamin C 100 mg/kg에서 흰쥐 간의 허혈 및 재관류로 인한 손상을 막아주는 항산화효과가 나타나는 것을 관찰하였기 때문에 본 실험에서는 vitamin C 100 mg/kg와 vitamin E 25 mg/kg을 병용투여하여 보았다. Vitamin E와 C 병용투여를 한 본 실험에서 허혈 및 재관류 대조군에 있어서 혈청내 ALT 및 AST치가 허혈후 및 재관류 1시간에 증가되었고, 5시간의 재관류 후에는 더욱 큰 증가를 보였는데 이는 허혈 및 재관류가 간장손상을 야기시키고, 이는 재관류 5시간에 극대화됨을 암시한다. 이에 대해 vitamin E 및 C 단독투여시 및 병용투여시 ALT 및 AST치의 감소양상으로 보아 vitamin E와 C 각각이 간세포 손상을 억제시키고, vitamin E와 C의 병용시가 단독투여시보다 더욱 현저히 간세포 손상을 억제시킴을 알수 있었다. 간세포 부종 지표인 간조직 습중량 대 건중량 비율에서도 허혈 및 재관류 대조군에서 시간이 지남에 따라 증가하였으나 vitamin E와 C의 병용투여로 재관류 1시간과 5시간에 유의성있게 감소하였다. 이는 또한 병리조직검사 결과에서도 더욱 뚜렷이 나타나는데 간장허혈 및 재관류는 간장중심정맥 및 문맥주위 세포의 괴사, 호중구의 극심한 침윤 등을 나타내었고 이때 vitamin E와 C 각각투여는 이러한 손상을 일부 완화시켰으나 vitamin E와 C 병용투여시 더욱 완하시켜 것으로 보아 이는 ALT, AST치 및 간장부종의 결과와 종합하여 볼 때 vitamin E와 C는 각각이 좋은 항산화제이지만 이들의 병용투여시 항산화작용에 있어 협동작용을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 간세포 손상의 원인으로 생각되

는 지질과산화도 허혈 및 재관류 대조군에서 5시간에 최고치를 이루었으며 이는 vitamin E와 C 각각 투여군과 병용 투여군에서 모두 억제되는 것으로 보아 지질과산화 억제와 간장손상 방지가 밀접한 관계가 있는 것 같다.

간장의 주요기능 중의 하나인 담즙분비 기능과 담즙의 주성분이며 담즙분비기능 중 담즙산 의존성이며 ATP와 관련된 cholate총량과 담즙산 비의존성인 bilirubin치를 비교해본 결과 허혈 및 재관류로 인해 감소된 담즙량과 담즙산량은 vitamin C의 투여에 의해 유의성있게 증가하였으며 vitamin E와 C의 병용투여에 의해 vitamin C 단독투여군보다 더욱 유의성있게 증가하였다. 그러나, 예상과는 달리 vitamin E투여군에서는 뚜렷한 변화를 보여주지 않았다. Bilirubin치는 실험 전반에 걸쳐 별다른 변화가 없는 것으로 보아, 허혈 및 재관류로 인한 ATP의 감소는 담즙량과 담즙산량에만 영향을 미치는 것으로 생각된다.

허혈 및 재관류는 간세포내 약물대사효소계중 cytochrome P-450양의 감소와 동종효소인 aminopyrine N-demethylase활성의 감소를 나타내었으며 이러한 활성의 억제는 vitamin C 단독투여와 vitamin E와 C 병용투여에 의해 유의성있게 증가되었다. 또 aniline p-hydroxylase의 비정상적인 활성이 관찰되었는데 이는 재관류 1시간에 vitamin E 투여에 의해 비정상적인 활성이 억제되었다.

이상의 결과로 보아 허혈 및 재관류로 인한 간세포손상과 이와 직접 관련된 지질과산화의 억제 측면에서 vitamin E와 C의 병용투여는 vitamin E와 C의 단독투여시의 효과보다도 더욱 협동적인 항산화효과를 나타내었고, 특히 간장기능중 담즙분비기능과 간장세포내 효소활성 측면에서 vitamin E와 C의 병용투여군은 허혈 및 재관류로 인한 비정상적인 측면을 정상적으로 회복시켜 주는 것으로 보아 vitamin E와 C의 병용투여는 각각 단독투여군보다 협동적 항산화작용을 나타내는 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.
- Barclay, L. R. C., Locke, S. J. and MacNeil, J. M. (1985). Autooxidation in micelles. *Can. J. Chem.* **63**, 366.
- Bjorkhem, I. and Kallner, A. (1976). Hepatic 7 $\alpha$ -hydroxylation of cholesterol in ascorbate-deficient and ascorbate-sup-

- plemented guinea pigs. *J. Lipid Res.* **17**, 360-365.
- Borg, D. C. and Schaich, K. M. (1989). Pro-oxidant of antioxidants. In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine* (Jaime Miquel, Ed.) Boca Ranton, Florida, I, 63-77.
- Brehe, J. E. and Burch, H. B. (1978). Enzymatic assay for glutathione. *Anal. Biochem.* **74**, 189-197.
- Chen, L. H. (1891). An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation of vitamin C in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1036-1042.
- Dillard, 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., Burton, G. W. and Ingold, K. W. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *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.
- Ginter, E. (1984). Ascorbic acid in cholesterol and bile acid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* **258**, 410-421.
- 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.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
- 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.
- Ingold, K. U., Burton G. W., Foster D. O., Hughes L., Lindsay D. A. and Webb A. (1987). Biokinetics of and discrimination between dietary RRR- and SPR- $\alpha$ -tocopherols in the male rat. *Lipids* **22**, 163-168.
- 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.
- Kim, S. A., Seo, M. Y., Yeom, D. H., Cho, T. S. and Lee, S. M. (1995). Effect of vitamin C on hepatic biliary and microsomal function in hepatic ischemia/reperfusion. *J. Appl. Pharmacol.* **3**, 304-310.
- Lee, S. M. and Clemens, M. G. (1992). Effect of  $\alpha$ -tocopherol on hepatic mixed function oxidase in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* **15**, 276-281.
- 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.
- Marubayash, S., Dohi, K., Ochi, K. and Kawasaki, T. (1988). Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury. Prevention of damage by  $\alpha$ -tocopherol administration. *Surgery* **99**, 184-191.
- Masugi, F. and Nakamura, T. (1978). 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 Buckley, G. B. (1993) Pharmacological intervention for the prevention of post-ischemic reperfusion injury. In *Free radicals: from basic science to medicine* (G. Poli, Ed) 438-447.
- Omura, T. and Sato, R. (1984). 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.
- Samokyszyn, V. M., Thomas, C. E., Rrif, D. W., Sato. M. and Aust, S. D. (1988). Release of iron from ferritin and its role in oxygen radical toxicities. *Drug Metab. Rev.* **19**, 283-303.
- 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. (1988). 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. and Strubelt, O. (1988). The involvement of reactive oxygen species in hypoxic injury to rat liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **59**, 369-381.
- 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.