

CCl₄와 Lipopolysaccharide로 유도한 흰쥐 간 독성에 대한 YH439의 방어작용 : cytokines 및 nitric oxide 생성의 억제

김연숙 · 이종욱* · 김낙두[#]

서울대학교 약학대학, *유한양행 중앙연구소

(Received February 18, 1999)

YH439, a Hepatoprotective Agent, Suppresses Cytokines and Nitric Oxide Production in LPS-primed Rats Administered with CCl₄

Youn Sook Kim, Jong Wook Lee* and Nak Doo Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Central Research Institute, YuHan Co. LTD., Gunpo-Si, Kyonggi-Do 435-030, Korea

Abstract—The aim of the present investigation was to examine whether YH439, a hepatoprotective agent, exerts protective effect against hepatotoxicity and reduces the production of cytokines and NO in lipopolysaccharide (LPS)-primed rats with carbon tetrachloride (CCl₄). Administration of LPS following a single dose of CCl₄ injection resulted in remarkable elevations of the serum TNF α , IL-1 β and IL-6 level. The serum NO level was moderately elevated and severe liver damage was evidenced by increases in serum alanine aminotransferase (ALT) and sorbitol dehydrogenase (SDH) activities. YH439 decreased the levels of TNF, IL-1 β , IL-6, ALT, SDH as well as NO in the serum elevated by CCl₄+LPS in a dose-dependent manner. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) level was decreased in the liver of rats treated with YH439. The increased iNOS activity induced by LPS and interferon- γ was significantly decreased in RAW 264.7 cells by YH439 treatment. YH439 increased the GSH level decreased by CCl₄+LPS and suppressed the ratio of GSSG/GSH. The reduction of hepatotoxicity by YH439 may be associated with the decrease in the production of cytokines as well as suppression of iNOS protein in conjunction with an increase in the GSH level.

Keywords □ Tumor necrosis factor 2, interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide, hepatoprotective agent, glutathione, inducible nitric oxide synthase.

CCl₄는 간세포에서 CYP2E1에 의해 CCl₃· (trichloromethyl free radical)과 CCl₃O₂· (peroxy radical)로 환원 대사 되어 쿠퍼세포를 활성화시켜서 각종 cytokines유리를 촉진시킨다.¹⁻³⁾ Lipopolysaccharide (LPS)에 의한 간독성의 기전은 쿠퍼세포와 호중구성 과립구가 관여하여 생성되는 TNF- α 등의 cytokines, eicosanoids, reactive oxygen species(ROS)와 같은

매개체들이 원인이 되는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}

LPS는 흰쥐의 간조직과 간세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 전사단계에서 유도하며,^{6,7)} iNOS에 의해 대량 생성된 NO는 자가면역 조직 독성의 병리에서 중요한 역할을 하며 심한 혈관 이완에 의한 septic shock 및 간 조직이나 간세포의 독성에 관여한다.⁸⁾ Glutathione(GSH)은 thiol기를 가진 분자로 세포를 산화제의 공격으로부터 보호하는데 매우 중요하다.⁹⁾ Edmund등에 의하면 CCl₄를 투여한 토끼를 LPS에 노출시켰을 때 생존율이 급격하게 감소되었으

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7840 (팩스) 02-871-1795

며¹⁰⁾ 또한 CCl₄를 투여하고 LPS로 priming시킨 흰쥐에서 ALT, AST, SDH 및 LDH활성이 상승적으로 증가했다는 보고가 있다.^{11,12)}

Isopropyl-2-(1,3-dithioetane-2-ylidene)-2[N-(4-methyl-2-thiazol-2-yl)carbamoyl]acetate(YH439)는 합성 간장보호제로 개발되어 여러 화학적 물질로 유발된 간독성 모델에서 효과가 있으며,¹³⁾ 현재는 임상시험 제2단계가 진행중이다. YH439는 CYP2E1억제제이며^{13,14)} phase II 대사효소인 mEH단백 발현과 GST 활성을 증가 시킴이 보고되었다. 이 실험에서는 CCl₄와 LPS를 병용 투여한 간염 모델을 이용하여 간 독성 매개체로 알려져 있는 cytokines인 혈청TNF- α , IL-1, IL-6 및 NO에 미치는 YH439의 효과를 시험하였다. 또한 간 조직에서 GSH 함량 변화에 미치는 효과에 대해서도 검토하였다.

실험방법

실험동물 - 5주령의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐를 대한실험동물센터에서 구입하여 서울대학교 약학대학 실험동물 사육장에서 사육한 후 200~250 g이 되었을 때 실험에 사용하였다.

투여 및 시료채취 - YH439를 10, 25, 50, 100 mg/kg의 용량으로 1일 1회, 3일간 투여후 마지막 투여2시간째에 1.3 g/kg 용량의 CCl₄를 0.25 ml/100 g씩 복강 투여 하였다. CCl₄ 투여 후 20시간째에 300 μ g/kg 용량의 LPS를 0.1 ml/100 g씩 꼬리정맥에 정맥 주사하였다. LPS 투여 후 4시간째에 채혈하여 3,500 rpm, 4°C에서 13분간 원심 분리하여 혈청을 얻었다.^{11,12)}

간 무게 4배 용량의 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 가하여 분쇄한 조직을 9,000 rpm에서 30분, 105,000 g에서 1시간동안 초 원심 분리한 상등액인 cytosol을 분주하여 실험 시 까지 -70°C에 보관하였다.¹⁵⁾ 단백질 양은 Bradford방법으로 정량하였다.¹⁶⁾

혈청 ALT 및 SDH활성 측정 - 혈청중의 ALT활성은 영동제약의 측정kit를 이용하여 측정하였다.¹⁷⁾ 혈청 SDH활성은 Gerlach 및 Makoto의 방법에 따라, 4M fructose를 기질로 하여 366 nm에서 2분간 흡광도 감소를 측정하였다.^{18,19)}

혈청 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 정량 - L 929 cell을 96-well microplate에 4 \times 10⁴/well이 되도록 가하고 37°C에서 24시간 배양하여 well에 부착되도록 하였다.

배지를 제거하고 혈청이 없는 DMEM으로 용해한 1 μ g/ml actinomycin D를 90 μ 씩 가하고, 혈청 시료를 10 μ 씩 가하여 37°C에서 18시간 방치하였다. MTT assay로 L 929 cell의 세포독성을 측정하여 TNF- α 수준을 정량 하였다.^{20,21)} 혈청 IL-1 β 는 IL-1 β 항체가 미리 부착되어 있는 ELISA kit를 사용하였다.²²⁾ B 9.114 cell을 96-well microplate에 2~3 \times 10³/well이 되도록 가하고, IL-6가 첨가되지 않은 RPMI 1640으로 희석한 혈청 시료를 100 μ 씩 가하여 37°C에서 68시간동안 방치하였다. MTT assay로 세포증식을 측정하여 혈청 IL-6 수준을 정량 하였다.²³⁻²⁵⁾

혈청 nitrite/nitrate 정량 - 혈청 시료 4 μ 를 NO analyzer(ANTEK model 745)에 주입하여 nitrite 및 nitrate 양을 sodium nitrite로부터 얻은 표준곡선으로부터 농도를 환산하였다.²⁶⁾

iNOS 활성 측정 - RAW 264.7 cell에 0.5 μ g/ml LPS와 100 U/ml IFN- γ 를 가하여 37°C, 5% CO₂ humidified incubator에서 6시간동안 배양하여 활성화시켰다. Cytosol(단백질 100 μ g에 해당)과 50 mM Tris buffer(pH 7.5), 100 μ M L-arginine(200,000 dpm L-[¹⁴C]-arginine포함), 1 mM NADPH, 5 μ M tetrahydrobiopterin 및 DMSO에 희석한 YH439(10, 50 및 100 μ M)을 혼화하여 100 μ 가 되도록 섞어서 37°C에서 25분간 shaking하여 반응시켰다. 이 반응액에 Dowex 50W Na⁺ form column을 통과시켜 얻은 상등액 300 μ 에 Bray solution을 3 ml씩 넣어서 액체섬광계수로 방사능을 측정하여 L-[¹⁴C]-citrulline 생성량을 계산하였다.^{27,28)}

iNOS의 면역화학적 분석 - 간 cytosol을 Laemmli 방법²⁹⁾에 따라 Bio-Rad Mini Protean II를 이용하여 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)하였다. 전기 영동이 끝난 후 Davis의 방법(1986)에 따라 Western blot을 시행하였다. 전이가 끝난 nitrocellulose지는 3% 탈지유 PBS용액에 담가 4°C에서 하룻밤 방치하여 비특이성 결합을 방지하고, iNOS의 일차항체인 rabbit anti-macrophage iNOS와 이차항체인 AP conjugated goat anti-rabbit IgG, 기질인 BCIP/NBP액으로 면역화학적 분석을 행하였다.^{15,30)}

간조직내 GSH 및 GSSG 정량 - 0.6 M perchloric acid로 분쇄하여 얻은 상등액을 6.3 mM EDTA가 함유된 0.125 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)로

Table 1— Effects of YH 439 on serum alanine aminotransferase (ALT) and sorbitol dehydrogenase (SDH) activities in rats treated with CCl₄, LPS, and CCl₄+LPS

Treatment	ALT (SF U/L)	% Change	SDH (U/L)	% Change
Control	23.8±2.2		10.2±1.4	
CCl ₄ (1.3 g/kg)	252.8±45.9 ^{a)}		471.4±122.9 ^{a)}	
LPS (300 µg/kg)	21.5±2.9		9.0±2.7	
CCl ₄ +LPS	1678.6±93.9 ^{a),b),c)}	100%	1713.4±123.5 ^{a),b),c)}	100%
+YH 439 (10 mg/kg)	214.1±21.0 ^{d)}	13%	255.1±49.7 ^{d)}	15%
+YH 439 (25 mg/kg)	180.8±27.7 ^{d)}	11%	203.6±46.5 ^{d)}	12%
+YH 439 (50 mg/kg)	102.9±18.3 ^{d)}	6%	108.0±29.7 ^{d)}	6%
+YH 439 (100 mg/kg)	39.4±3.0 ^{d)}	2%	35.1±3.5 ^{d)}	2%

Rats were pretreated with YH439 orally once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl₄ and intravenous treatment of LPS. Blood samples were obtained 4 h after LPS injection. Values are represented as mean±S.E. and percentage of decrease from CCl₄+LPS. (n=8/group)

^{a)} p<0.01, ^{a')} p<0.001 vs. control; ^{b)} p<0.001 vs. CCl₄; ^{c)} p<0.001 vs. LPS; ^{d)} p<0.001 vs. CCl₄+LPS.

희석한 시료 100 µl에 0.3 mM NADPH, 6 mM DTNB를 가하여 총부피가 1 ml이 되도록 하여 30°C에서 4분간 방치하였다. Glutathione reductase(26 U/ml) 30 µl를 가하고 섞어 즉시 412 nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정하였다. GSSG는 2-vinyl pyridine으로 환원형 GSH를 masking한 시료를 사용하였다.^{31,32)}

간조직내 glutathione reductase 활성 측정 - 간절편을 50 mM Tris-0.154 M KCl homogenizing buffer (pH 7.4)로 분쇄하여 얻은 상등액을 사용하였다. 1 mM EDTA가 함유된 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 3 mM DTNB, 2 mM NADPH를 넣고 적당히 희석한 상등액(단백질 100 µg에 해당)을 가하여 총부피가 1.9 ml이 되도록 하여 2~3분간 실온에서 방치하였다. 20 mM GSSG 0.1 ml을 가하여 412 nm에서 1분간 흡광도 변화를 측정했다. 상술한 medium에 Glutathione reductase를 가하여 얻은 standard curve로부터 농도를 환산하였다.⁴⁹⁾

통계 처리 - 실험 결과는 mean±S.E.로 표시하였으며 각 군간의 평균치는 unpaired Student's t-test로 비교하였다.

실험결과

혈청 ALT 및 SDH활성에 대한 효과 - 흰쥐의 혈청 ALT활성이 CCl₄를 투여하였을 때 대조군(23.8±2.2 SF U/L)의 10배 이상(252.8±46.0 SF U/L) 증가하였으나 LPS에 의해서는 증가하지 않았다(21.5±2.9 SF U/L). 그러나 CCl₄를 전투여하고 LPS를 처치하였을 때는 70배(1678.6±93.9 SF U/L) 증가하였다. 이러한 활성 증가는 10, 25, 50 및 100 mg/kg의 YH439

전투여에 의해서 각각 87, 89, 94 및 98% 억제되었다 (Table I).

SDH활성 역시 CCl₄만 투여한 경우 대조군(10.2±1.4 U/L)의 46배(471.4±122.9 U/L) 증가하였으나 LPS투여 군은 대조 군과 같은 수준(9.0±2.7 U/L)이었다. CCl₄와 LPS를 병용 처리하였을 때는 대조군의 169배(1713.4±123.5 U/L) 증가하였다. YH439 10, 25, 50 및 100 mg/kg에서 각각 85, 88, 94 및 98% 억제되었다(Table I).

혈청 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 수준에 대한 효과 - LPS투여 30분에 TNF-α의 수준은 755.6±214.4 pg/ml 이었고 2시간 후에는 2436.6±73.7 pg/ml로 최고

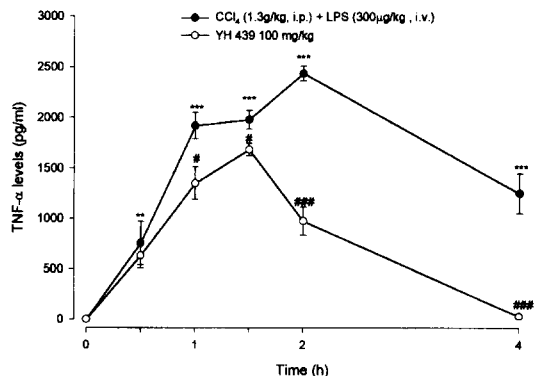


Fig. 1— Time course of serum TNF-α concentrations in rats treated with CCl₄+LPS. Rats were treated with CCl₄ intraperitoneally and LPS intravenously 20 h later. Blood samples were obtained 0.5, 1, 1.5, 2 and 4 hours after the LPS injection. TNF-α concentrations were measured in L-929 fibroblast cells by the lytic assay. Values are represented as mean±S.E.(n=8). ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control.

Table II— Effect of YH 439 on serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in rats treated with CCl₄, LPS and CCl₄+LPS

Treatment	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (ng/ml)
Control	ND	2.9 \pm 2.9	ND
CCl ₄ (1.3 g/kg)	153 \pm 73 ^{a1}	ND	51 \pm 24 ^{a1}
LPS (300 μ g/kg)	759 \pm 189 ^{a1}	80 \pm 17 ^{a1}	870 \pm 82 ^{a1}
CCl ₄ +LPS	2437 \pm 74 ^{A1}	2930 \pm 411 ^{A1}	1743 \pm 58 ^{A1}
+ 10 mg/kg YH 439	1922 \pm 107 ^{d1}	—	1412 \pm 47 ^{d1}
+ 25 mg/kg YH 439	1909 \pm 65 ^{d1}	483 \pm 53 ^{d1}	1255 \pm 55 ^{d1}
+ 50 mg/kg YH 439	1544 \pm 119 ^{d1}	422 \pm 83 ^{d1}	763 \pm 99 ^{d1}
+ 100 mg/kg YH 439	975 \pm 139 ^{d1}	109 \pm 19 ^{d1}	576 \pm 81 ^{d1}

Rats were pretreated with YH439 orally once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl₄ and intravenous treatment of LPS. Blood samples were obtained 4h after LPS injection. Values are represented as mean \pm S.E. (n=8/group)

^{a1} p<0.05, ^{a1} p<0.01, ^{a1} p<0.001 vs. control; ^{A1} p<0.001 vs. CCl₄ and vs. LPS; ^{d1} p<0.001 vs. CCl₄+LPS.

치에 도달하였다. 그 이후 감소하여 4시간 후에는 1249.2 \pm 197.6 pg/ml로 감소하였다(Fig. 1). CCl₄/LPS 투여 시 혈청TNF- α 가 가장 높았던 2시간에서 YH439의 효과를 측정하였을 때 YH439 전투여에 의해 농도 의존적으로 TNF- α 수준이 억제되었으며 10, 25, 50 및 100 mg/kg에서 각각 21, 22, 37 및 60%가 억제되었다(Table II).

LPS 투여 4시간후의 혈청 IL-1 β 수준은 CCl₄ 단독 투여에 의해서는 생성되지 않았고, CCl₄/LPS병용투여에 의해서는 LPS단독 투여군(79.9 \pm 16.7 pg/ml)에 비해 37배 증가(2930.0 \pm 411.2 pg/ml)하였다. CCl₄/LPS 병용 투여군은 4시간에서 YH439의 전투여는 농도 의존적으로 IL-1 β 생성 억제효과가 있었다. 25, 50 및 100 mg/kg 투여군에서 CCl₄/LPS투여 군에 비해 각각 84, 86 및 96% 억제하였다(Table II).

CCl₄만 단독투여 하였을 때 IL-6가 191.0 ng/ml까지 생성된 개체가 있었으나, LPS 단독 투여 군은 CCl₄ 단독 투여 군(51.1 \pm 23.5 ng/ml)보다 평균 17배 더 많이 생성(870.2 \pm 81.7 ng/ml)되었다. CCl₄/LPS투여 군에서의 혈청IL-6수준(1743.3 \pm 57.9 ng/ml)은 CCl₄군의 34배, LPS군의 2배이었다. CCl₄/LPS투여 군에서 YH 439를 전투여 하였을 때 10, 25, 50 및 100 mg/kg투여 시 각각 19, 28, 56 및 67%를 억제하였다(Table II).

혈청 nitrite/nitrate 수준에 대한 효과 - CCl₄ 단독 투여군에서는 대조 군(48.3 \pm 8.1 μ M)에 비해 혈청 nitrite(NO₂⁻) + nitrate(NO₃⁻) 수준에 변화가 없었으나(39.8 \pm 1.7 μ M) LPS 투여 군은 대조군의 4.4배(211.2 \pm 15.4 μ M)이었다. CCl₄/LPS투여 군은 LPS 단독 투여군의 2배(409.2 \pm 14.9 μ M, p<0.001)가 생성되었다. CCl₄/LPS투여 군에서 YH439를 전투여 하였

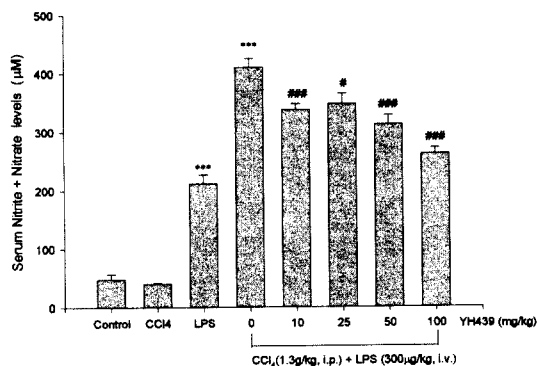


Fig. 2— Effects of YH439 on serum nitrite/nitrate concentrations in rats treated with CCl₄, LPS, or CCl₄+LPS. Rats were orally pretreated with YH 439 once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl₄ and intravenous treatment of LPS. Blood samples were obtained 4h after LPS injection. Values are represented as mean \pm S.E. (n=8). ***p<0.001 vs control; [†]p<0.05, [‡]p<0.001 vs. CCl₄+LPS.

을 때 10, 25, 50 및 100 mg/kg 투여시 각각 17, 15, 24 및 36% 억제하였다(Fig. 2).

iNOS 활성화에 대한 효과 - LPS와 IFN- γ 로 활성화시킨 RAW 264.7 세포의 cytosol에서의 iNOS활성은 3.2 [¹⁴C]-L-citrulline pmol/min/mg protein이었다. DMSO에 용해한 YH439를 첨가하여 측정하였을 때는 10, 50 및 100 μ M에서 대조 군(3.2 pmol/min/mg protein)에 비하여 각각 25, 41 및 40% 감소하였다. N^G-nitro-L-arginine 100 μ M을 첨가하였을 때는 86% 감소(0.45 \pm 0.04 pmol/min/mg protein)하였다(Fig. 3).

iNOS단백 발현에 대한 효과 - 대조 군과 CCl₄단독 투여 군에서는 iNOS가 발현되지 않았고, LPS단독 투

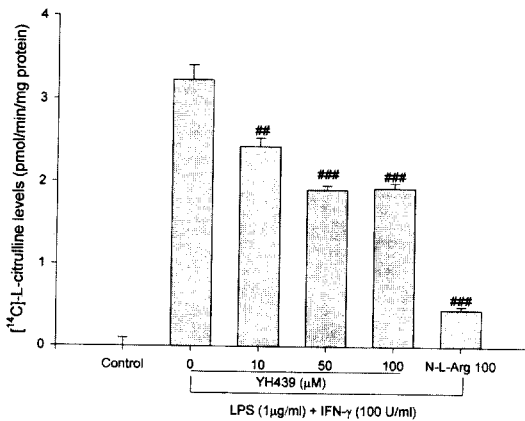


Fig. 3—Effects of YH439 on inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities in RAW264.7 cell cytosol. RAW264.7 cells were activated with combination of LPS and IFN- γ for 6 hours. iNOS activities were measured as described in Materials and Methods. Values are represented as mean \pm S.E. (n=6). ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 vs. LPS+IFN- γ .

여군의 간 세포에서는 단백질의 발현이 관찰되었다. 단백질 발현 정도를 densitometry scanning 하였을 때 CCl₄/LPS 투여군의 간에서는 LPS단독 투여군(100%)의 1.5배 이상 진하게 iNOS단백질 수준이 유도 발현되었다. CCl₄/LPS투여군에서YH439를 전투여한 간 세포에서는 10 mg/kg 투여시에는 감소효과가 없었으나, 25 mg/kg 투여군은 CCl₄/LPS 투여군에 비해 14%, 50 mg/kg 투여군에서는 32%(p<0.05) 단백질 발현이 감소되었다. 100 mg/kg을 투여하였을 때는 44%(p<0.01) 억제되었다(Fig. 4).

GSH 및 GSSG수준에 대한 효과 - CCl₄/LPS투여군(4.1 \pm 0.3 μ mole/g liver)에 비해서 YH439 100 mg/kg을3일간 전투여한 후 CCl₄/LPS를 투여한 군의 GSH함량은(5.3 \pm 0.2 μ mole/g liver)는 1.3배 증가(p<0.005)하였다. GSSG수준은 YH439의 투여에 의해 감소하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다. 그러나 총 GSH에 대한 GSSG의 비율은 YH439 100 mg/kg의 투여로 32% 감소하였다(Fig. 5).

간조직내 Glutathione reductase 활성에 대한 효과 - 대조군의 간세포의 glutathione reductase 활성은 평균 247.6 \pm 7.5 mU/mg protein이었는데 YH439 100 mg/kg을 3회 투여하고 24시간 후에 얻은 조직에서는 389.9 \pm 3.8 mU/mg protein으로 증가(p<0.001)하였다. YH439 100 mg/kg을 3일간 전투여한 후 CCl₄/LPS를 투여

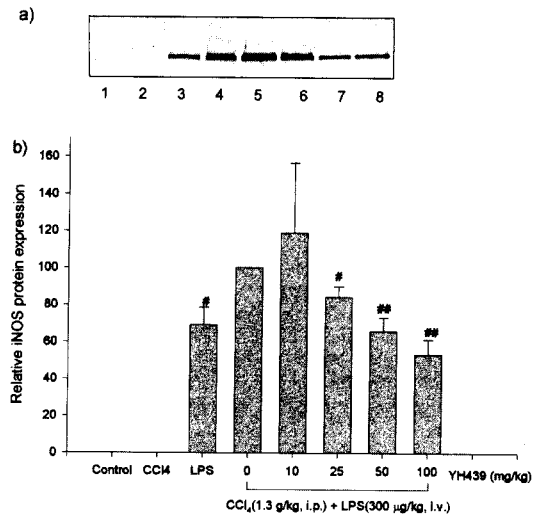


Fig. 4—A) Immunoblot analysis: Effect of YH439 on the expression of iNOS protein in rats treated with CCl₄, LPS or CCl₄+LPS. Rats were pretreated with YH439 orally once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl₄ and intravenous treatment of LPS. Liver samples were obtained 4h after LPS injection. Lane 1, Control; 2, CCl₄ (1.3 g/kg, i.p.); 3, LPS (300 μ g/kg, i.v.); 4, CCl₄+LPS; 5, YH439 10 mg/kg+CCl₄+LPS; 6, YH439 25 mg/kg+CCl₄+LPS; 7, YH439 50 mg/kg+CCl₄+LPS; 8, YH439 100 mg/kg+CCl₄+LPS. B) Cumulative data obtained from 8 different experiments. The level of iNOS protein was quantified by densitometry, and expressed relative to the levels in CCl₄+LPS treated group. Each bar represents as mean \pm S.E. (n=8). [#], ^{##}: Significantly different from CCl₄+LPS-treated rats, p<0.05, p<0.01.

하였을 때 Glutathione reductase의 활성(376.0 \pm 27.7 mU/mg protein)은 YH439 비투여군(222.1 \pm 22.3 mU/mg protein)에 비해서 glutathione reductase 활성을 69.3% 증가시켰다(Fig. 6).

고찰

본 연구에서는 간 독성 물질인 CCl₄와 과다한 염증반응을 야기시키는 LPS를 병용투여한 간염 모델에서 YH439의 간 보호 효과에 대하여 연구하였다. CCl₄를 투여하고 20시간 뒤에 LPS를 투여하였을 때 CCl₄단독 처리에 비해 ALT는 6.6배, SDH는 3.6배 정도 증가하였으며, LPS단독 처리에 비해서는 TNF- α 는 3배, IL-1 β 는 37배 및 IL-6는 2배, nitrite/nitrate는 2배,

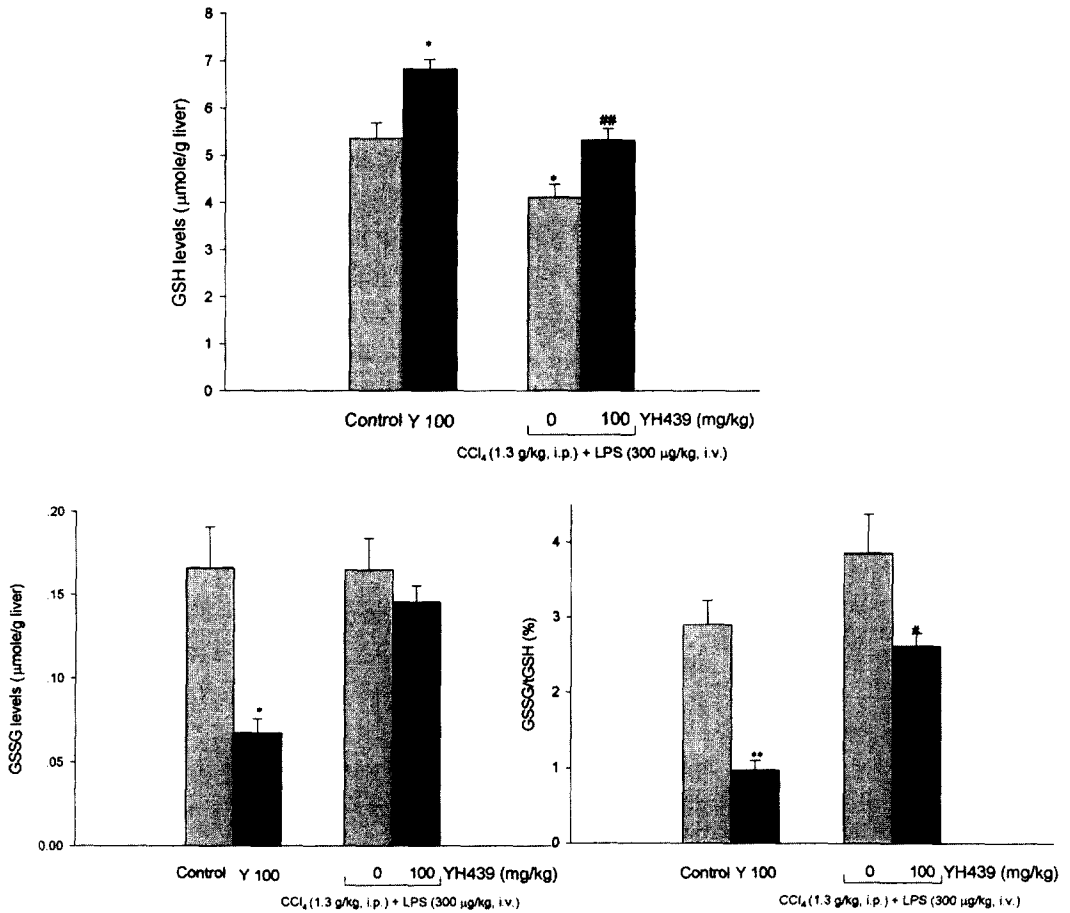


Fig. 5— Effect of YH439 on the liver reduced glutathione (GSH) levels (a), oxidized glutathione (GSSG) levels (b) and oxidized glutathione (GSSG)/total glutathione (tGSH) (c) in rats treated with 40% PEG and CCl₄+LPS. Rats were treated with YH439 (100 mg/kg) orally once a day for 3 consecutive days. Liver samples were obtained 24 h after administration. Rats were pretreated with YH439 orally once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl₄ and intravenous treatment of LPS. Liver samples were obtained 4 h after LPS injection. Values are represented as mean±S.E. (n=8). *p<0.05 vs. control †p<0.05, ‡p<0.01 vs. CCl₄+LPS.

iNOS발현은 1.5배 정도 증가하였다. 환원형 GSH도 단독 투여 시보다 더욱 감소하였다.

CCl₄ 또는 LPS를 단독 투여 시보다 CCl₄ 및 LPS를 병용 투여시, 간 독성 뿐만 아니라 염증 반응을 증폭시키는 이유는 LPS로 활성화되는 쿠퍼세포가 ROS를 유리하여 CCl₄로 인한 간 독성을 증가 시키기 때문이다.^{33,34} 따라서 CCl₄/LPS 간염 모델은 간독성을 특이적으로 유발할 수 있는 좋은 실험 모델로 사용되어질 수 있을 것이다. YH439를 3일간 전처리 하였을 때 용량 의존적으로 CCl₄/LPS로 증폭된 ALT와 SDH의 활성을 억제하였다. IL-1β, TNF-α 및 IL-6등 cytokine은 염증 반응과 간 독성을 유발 하는 것으로 알

려져 있다.³⁵⁻³⁹ YH439는 혈청 TNF-α가 최대가 되는 LPS투여 후 2시간 후에 용량 의존적으로 억제하였으며 따라서 LPS로 인한 TNF-α 유리를 면역 반응 초기 단계부터 억제 효과가 있는 것으로 사료된다. IL-1β는 LPS 투여 4시간 후에 증폭되었으며 YH439는 용량 의존적으로 IL-1β 생성을 억제하였고 IL-6또한 용량 의존적으로 억제 되었다.

흰쥐 간 세포의 iNOS 발현을 면역 화학적으로 분석한 결과 iNOS 단백 발현이 YH439투여로 완만하나 용량 의존적으로 감소되었으며 또한LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 세포에서 iNOS의 활성을 억제하는 효과가 있었다. 따라서 YH439는 효소활성을 직접 억제하는

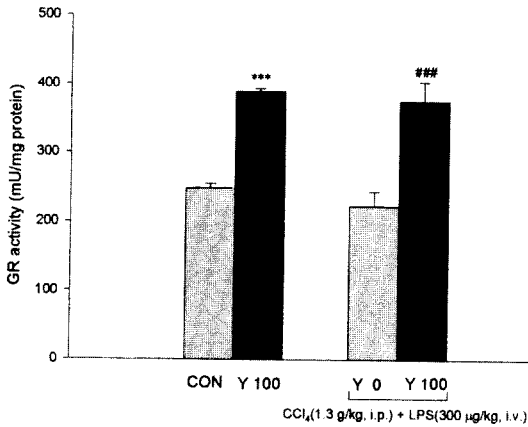


Fig. 6 — Effect of YH439 on liver glutathione reductase activities in rats treated with 40% PEG and CCl_4 +LPS. Rats were pretreated with YH439 orally once a day for 3 consecutive days before intraperitoneal treatment of CCl_4 and intravenous treatment of LPS. Liver samples were obtained 4 h after LPS injection. Values are represented as mean \pm S.E. (n=6~8). ***p<0.001 vs. control ###p<0.001 vs. CCl_4 +LPS.

작용뿐 아니라 전사단계에서 iNOS 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 보여지며 YH439에 의해 혈청 nitrite 및 nitrate 수준이 감소된 것과 일치하는 결과이었다. Endotoxin이나 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β 및 IFN- γ 등의 염증 cytokine들은 간세포의 NOS를 증폭적으로 유도시킨다.^{8,40,41} 또한 과량의 NO는 저혈압을 유발하며 host cell인 간세포 자체의 독성을 유발하여 간독성 정도와 상관관계가 있다.⁴² 선택적인 iNOS 억제제인 aminomethyl-isothiourea(AE-ITU)는 LPS를 투여한 랫드에서 간 기능 저하를 유의성 있게 억제하였으나 비선택성 NOS활성 억제제인 N^G -methyl-L-arginine(L-NMMA)은 혈청 ALT와 AST의 증가를 회복시키지 못했다. 따라서 YH439는 ALT 및 AST활성을 억제 할뿐만 아니라 iNOS유도를 증폭시키는 작용을 갖는 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β 및 IL-6의 생성을 억제하는 선택적인 iNOS 억제제로 작용하여 간질환에 개선효과가 있을 것으로 사료된다.^{43,44} LPS는 체내의 monocyte, macrophage에서 superoxide 등 free radical의 생성을 증가 시켜서 lipid peroxidation과 세포독성을 유발하는데 이때 체내에서는 GSH, glutathione peroxidase(GPX), superoxide dismutase(SOD) 및 catalase등이 독성에 대해 보호 작용을 한다.^{45,46} $\text{TNF-}\alpha$ 와 IFN- γ 으로 NOS를 활성화시킨 간세포에서

GSH고갈과 GSSG증가가 관찰되고,⁴⁷ GSH투여가 흰 쥐의 간 손상과 사망률을 억제한다는 보고가 있다.⁴⁸ YH439를 단독 투여한 후 24시간 뒤에 간 조직의 총 GSH양이 유의성 있게 증가하였으며 CCl_4 와 LPS로 독성을 유발하였을 때 YH439 전투여는 환원형GSH를 증가시키고 GSSG는 감소시켰다. Glutathione reductase(GR)활성도 YH439단독 투여 시나 또는 YH439를 전처리하고 CCl_4 와 LPS를 처리하였을 때 모두 유의성 있게 증가시키는 것으로 보아 YH439는 항산화효과가 있는 것으로 추정된다. Glutathione peroxidase활성은 각 군별로 별차이를 보이지 않았으며, CCl_4 /LPS투여 군에서만 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 YH439는 염증 매개체인 $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β 및 IL-6와 같은 cytokines의 생성을 억제하고 따라서 iNOS의 활성 및 유도를 억제하여 간 독성에 대한 보호효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 glutathione reductase활성을 증가하여 free radical의 독성을 방어하는 간 조직의 GSH함량을 증가시켜 각종 화학 독성 물질로 인한 간 독성에 보호효과를 나타낼 것으로 추정된다. GSH 증가 기전으로 γ -glutamyl-cystein synthetase(GCS)와 GSH synthase의 활성이 기여하는지에 대해 더 연구가 필요하다.

감사의 말씀

본 연구는 유한 양행 중앙연구소 연구지원금으로 수행되었으며 이에 감사를 표합니다.

문헌

- 1) Meeks, R., Harrison, R. J. and Bull, S. D. : Hepatotoxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, 360 (1991).
- 2) Icho, T., Kojima, S., Shinohara, N., Kajiwara, Y., Kitabatake, K. and Kubota, K. : Protective effects of tetrahydroneopterin against free radical-induced injury. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 139 (1989).
- 3) Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L., Karck, U., Peters, T. and Decker, K. : Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J. Leukocyte Biol.*

- 45, 139 (1989).
- 4) Decker, K. : Signal paths and regulation of superoxide, eicosanoid and cytokine formation in macrophages of rat liver. *Biological Reactive Intermediates*, vol. IV, New York, Plenum, 507 (1990).
 - 5) Tiegs, G. and Wendel, A. : Leukotriene-mediated liver injury. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2569 (1988).
 - 6) Mitchell, J. A., Kohlhaas, K. L. and Sorrentino, R. : Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery : lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 265 (1993).
 - 7) Knowles, R. G., Merrett, M., Salter, M. and Moncada, S. : Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem. J.* **270**, 833 (1990).
 - 8) Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., Ferreri, F. K. and Simmons, R. L. : Evidence that the activation of Kupffer cells results in the production of L-arginine metabolites that release cell-associated iron and inhibit hepatocyte protein synthesis. *Surgery* **106**, 364 (1989).
 - 9) Hotherhall, J. S., Cunha, F. Q., Neild, G. H. and Norohna-Dutra, A. A. : Induction of nitric oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione : effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthase induction. *Biochem. J.* **322**, 477 (1997).
 - 10) Farrar, W. E., Jr., Eidson, M. and Kent, T. H. : Susceptibility of rabbits to pyrogenic and lethal effects of endotoxin after acute liver injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**, 711 (1968).
 - 11) Chamulitrat, W., Jordan, S. J. and Mason, R. P. : Nitric oxide production during endotoxin shock in carbon tetrachloride-treated rats. *Mol. Pharm.* **46**, 391 (1994).
 - 12) Chamulitrat, W., Blazka, M. E., Jordan, S. J., Luster, M. I. and Mason, R. P. : Tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sciences* **57**, 2273 (1995).
 - 13) Choi, E. Y., Kim, S. G., Lee, J. W. : Suppression of rat hepatic cytochrome P450 2E1 expression by isopropyl 2-(1,3-dithioetane-2-ylidene)-2-[N-(4-methyl-thiavol-2-yl)carbamoyl]-acetate (YH 439), and experimental hepato protection : Protective role against hepatic injury. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1219 (1996).
 - 14) Jeong, K. S. and Lee, I. J. : Transcriptional inhibition of cytochrome P450 2E1 by a synthetic compound, YH 439. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 137 (1996).
 - 15) Oguchi, S., Iida, S., Adachi, H., Ohshima, H. and Esumi, H. : Induction of Ca²⁺/calmodulin-dependent NO synthase in various organs of rats by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide treatment. *FEBS Letters* **308**, 22 (1992).
 - 16) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantification of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
 - 17) Reitman, S. and Frankel, S. K. : A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
 - 18) Gerlach, U. : Sorbitol Dehydrogenase. *Method of Enzymatic Analysis(III)* 112 (1983).
 - 19) Asada, M. : Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury : an experimental and clinical study. *Gastroenterology* **44**, 578 (1963).
 - 20) Aggarwal, B. B., Kohr, W. J. and Hass, P. E. : Human tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **260**, 2345 (1985).
 - 21) Fisch, H. and Gifford, G. E. : A photometric and plaque assay for macrophage mediated tumor cell cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **57**, 311 (1983).
 - 22) Sekiyama, K. D., Yoshida, M. and Thomson, A. W. : Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **98**, 71 (1994).
 - 23) Walley, K. R., Lukacs, N. W., Standiford, T. J., Strieter, R. M. and Kunkel, S. L. : Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect. Immun.* **64**, 4733 (1996).
 - 24) Aarden, L. A., Groot, E. R., Schaap, O. L., and Lansdorp, P. M. : Production of hybridoma growth

- th factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1411 (1987).
- 25) Carrick, J. B., Martins, Jr., O. : The effect of LPS on cytokine synthesis and jung neutrophil influx after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J. Surg. Res.* **68**, 16 (1997).
 - 26) Kitade, H., Sakitani, K., Inoue, K., Masu, Y. and N. Kawada : Interleukin-1 β markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysacchride in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells. *Hepatology.* **23**, 797 (1995).
 - 27) Salter, M., Knowles, R. G. and Moncada, S. : Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Letters* **391**, 145 (1991).
 - 28) Evans, T. J., Strivens, E., Carpenter, A. and Cohen, J. : Differeces in cytokine response and induction of nitric oxide synthase in endotoxin-resistant and endotoxin-sensitive mice after intravenous gram-negative infection., *J. Immunol.* **150**, 5033 (1993).
 - 29) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
 - 30) Hom, G. J., Grant, S. K., Wolfe, G., Bach, T. J., Macintyre, D. E. and Hutchinson, N. I. : Lipopolysaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat : Tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, N^G-monomethyl-L-arginine ofr indomethacin. *J. Pharm. Exp. Ther.* **272**, 452 (1995).
 - 31) Griffith, O. W. : Determination of glutathione disulfide using glatathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
 - 32) Alcerboom, T. P. M. and Sies, H. : Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* **77**, 373 (1982).
 - 33) Laskin, D. L. : Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* **10**, 293 (1990).
 - 34) Mayer, A. M. S. and Spitzer, J. A. : Continous infusion of Escherichia coli endotoxin *in vivo* primes *in vitro* superoxide anion release in rat polymorphonuclear leukocytes and Kupffer cells in a time-dependent manner. *Infect. Immun.* **59**, 4590 (1991).
 - 35) Kang, H. S., Kim, Y. H., Lee, C. S., Lee, J. J., Choi, I. and Pyun, K. H. : Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11), 15-dien-19-oic acid, and its antifibrotic effects *in vivo*. *Cellular. Immunol.* **170**, 212 (1996).
 - 36) Armendariz-Borunda, A., Seyer, J. M., Postlethwaite, A. E. and Kang, A. H. : Kupffer cells from carbon tetrachloride-injured rat livers produce chemotactic factors for fibroblasts and monocytes: the role of tumor necrosis factor- α . *Hepatology* **14**, 895 (1991).
 - 37) Beutler, B., Milsark, I. W. and Cerami, A. C. : Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* **229**, 869 (1985).
 - 38) Exley, A. R., Cohen, J. and Buurman, W. : Monoclonal antibody to TNF in severe septic shock. *Lancet* **335**, 1275 (1990).
 - 39) Whiting, J., Rosenbluth, A., Narcisso, J. and Gollan, J. : Tumor necrosis factor- α inhibits tau-rocolate uptake by hepatocytes: implications for the pathogenesis of endotoxin-induced cholestasis. *Gastroenterology* **100**, A811 (1991).
 - 40) David A. G. and Andreas K. N. : Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**, 522 (1993).
 - 41) Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Hofmann, K. and Simmons, R. L. : Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.* **170**, 1769 (1989).
 - 42) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
 - 43) Moncada, S. : The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta. Physiol. Scand.* **145**, 205 (1992).
 - 44) Thiernermann, C., Ruetten, H., Wu, C. and Vane, J. R. : The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of ni-

- tric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 2845 (1995).
- 45) Pinkus, R., Weiner, L. M. and Daniel, V. : Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 13422 (1996).
- 46) De Groot H. : Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology*. **41**, 328 (1994).
- 47) Adamson, G. M. and Billings, R. E. : Cytokine toxicity and induction of NO synthase activity in cultured mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**, 100 (1993).
- 48) Falsini, S. and Cellai, M. P. : Reduced glutathione and L-cysteine in endotoxic shock in the rat. *Minerva Anesthesiol.* **60**, 413 (1994).
- 49) Ivan, K. S., Rhomas L. V. and Carol A. T. : Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithio bis (2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **175**, 408 (1988).