

타우로우루소데옥시콜린산이 흰쥐의 적출심장에서 허혈 및 재관류 손상에 미치는 영향

한석희 · 이우용 · 박진혁 · 이선미*
성균관대학교 약학대학

Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart

Suk-Hee HAN, Woo-Yong LEE, Jin Hyuk PARK and Sun-Mee LEE*
College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received November 10, 1999; accepted December 1, 1999)

Abstract – In this study, the effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on ischemia/ reperfusion injury were investigated on isolated heart perfusion models. Hearts were perfused with oxygenated Krebs-Henseleit solution (pH 7.4, 37°C) on a Langendorff apparatus. After equilibration, isolated hearts were treated with TUDCA 100 and 200 µM or vehicle (0.02% DMSO) for 10 min before the onset of ischemia in single treatment group. In 7 day pretreatment group, TUDCA 50, 100 and 200 mg/kg body weight were given orally for 7 days before operation. After global ischemia (30 min), ischemic hearts were reperfused for 30 min. The physiological (i.e. heart rate, left ventricular developed pressure, coronary flow, double product, time to contracture formation) and biochemical (lactate dehydrogenase; LDH) parameters were evaluated. In vehicle-treated group, time to contracture formation was 810 sec during ischemia, LVDP was 34.0 mmHg at the endpoint of reperfusion and LDH activity in total reperfusion effluent was 34.3 U/L. Single treatment with TUDCA did not change the postischemic recovery of cardiac function, LDH and time to contracture compared with ischemic control group. TUDCA pretreatment showed the tendency to decrease LDH release and to increase time to contracture and coronary flow. Our findings suggest that TUDCA does not ameliorate ischemia/reperfusion-induced myocardial damage.

Key words □ Tauroursodeoxycholic acid, Heart ischemia/reperfusion injury, Cardioprotective effect

울혈성 심부전, 관상동맥 질환, 심근 경색, 뇌졸중, 고혈압 등으로 대표되는 심혈관계 질환은 대표적인 성인 질환으로 이중 특히 허혈성 심장질환인 심근경색, 협심증은 현대 도시 생활자의 경우 그 예방과 치료에 대한 관심이 증대되고 있음에도 불구하고 발병률이 계속 증가하고 있다.

허혈이란 장기가 미관류(underperfusion)된 상태를 말하며 결과적으로 조직에 산소 공급이 불충분하게 되어 해당 장기에 손상을 주게 된다. 이러한 허혈 상태에서 이론적으로 산소를 공급해 주면 장기의 기능이나 상태가 호전될 것이라 예측되지만 실제로는 더욱 악화되는 양상을 보이며 이를 '산소 역설(oxygen paradox)'이라 한다. 최근 들어 이러한 허혈 및 재관류 손상기전에 관한 연구가 활발히 진행되어 오고 있으며 이중 산소유리기와 칼슘이 병인으로 주목되고 있다(Simon 과 Gregory, 1997).

산소 유리기는 재관류 시 도입된 산소가 xanthine oxidase에 의해 superoxide anion이 되고 이는 Fenton 반응과 Haber-Weiss 반응을 통해 더욱 독성이 강한 hydroxyl radical로 되어 이것이 세포막의 지질과산화 등을 일으켜 재관류 시 세포 손상을 야기한다고 한다(Halliwell, 1978; McCord 와 Day, 1978). 또한 허혈 및 재관류 시에는 세포 외로부터 칼슘이 이동되어 세포 내 칼슘의 과부하가 일어나고 이 같은 과량의 칼슘은 phospholipase 활성화(Lubbe 등, 1992), 여러 단백질의 손상, 미토콘드리아의 손상 등을 야기하여 결국 세포가 손상을 일으킨다. 이는 허혈 기간에 비례하여 세포질 내 칼슘농도가 증가되고(Marban 등, 1990) 재관류 시 가속화되며(Naylor 등, 1980) 이러한 장기손상에 있어 칼슘의 과부하와 산소유리기의 상호작용이 나타나기도 한다(Halliwell, 1978; Opie, 1991).

UDCA는 오래 전부터 주로 담즙분비 증진에 사용되는 약물로 최근 들어 간장에 있어 허혈 및 재관류 손상 시

*To whom correspondence should be addressed.

세포막을 안정화시켜 간세포를 보호한다고 하며(Hertl 등, 1997) 본 연구실에서 선행한 실험에서도 UDCA는 심장허혈 및 재관류시 심수축기능을 회복시키고, 생화학적 손상을 감소시키며, 심근 경색시간을 연장시키는 등 뚜렷한 항허혈 효과를 나타내었다(Lee 등, 1999). TUDCA는 UDCA의 타우린 포함체로서 구조적으로 UDCA와 유사하여 이담제로 사용되고 일부 간장손상에 있어 UDCA보다 더 나은 보호효과를 나타낸다. 즉 TUDCA는 소수성 담즙산이나 cyclosporin투여로 유발된 세포내 Ca^{++} 과부하를 낮추는 Ca^{++} 조절작용이 있으며(Nicchitta 등, 1985; Queneau 등, 1993; Anwer 등, 1988), ethanol로 유발된산화적 손상에 대해서도 보호효과가 있고(Vendemiale 등, 1998), 간세포막을 안정화시킨다고 한다(Guldutuna 등, 1993).

따라서 본 실험에서는 TUDCA가 Ca^{++} 조절능력, 항산화작용 및 일부 세포보호 작용이 있으며 또한 그 구조적 유사체인 UDCA가 뚜렷한 항허혈 작용을 보였으므로 TUDCA도 항허혈 작용이 있을 것으로 기대되어 흰쥐의 적출심장에서 허혈 및 재관류 손상에 대한 TUDCA의 항허혈 효과를 알아보고자 하였다.

실험방법

시약

Tauroursodeoxycholic acid(TUDCA)는 Sigma Chemical CO.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Sodium pentobarbital, sodium pyruvate 및 LDH kit는 Sigma Chemical CO.의 시약을 사용하였고 heparin sodium은 (주)중외제약의 제품을 사용하였으며, 기타 KHBB solution의 조제에 사용된 sodium bicarbonate, potassium chloride, magnesium sulfate, potassium phosphate, calcium chloride 및 glucose는 국내에서 시판되는 특급 시약을 사용하였다.

실험 동물

체중 350-400 g의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 제 일상사로부터 공급받아 사육실에서 일주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 5^\circ C$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고형 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

흰쥐의 심장적출 및 관류

흰쥐를 sodium pentobarbital(50 mg/kg i.p.)로 마취시킨 후 대퇴정맥에 cannulation하여 sodium heparin(1000 U/kg i.v.)을 투여하고 Grover 등(1995)의 방법에 따라 심장을 적출 하였다. 즉, 기관에 cannula를 삽입하고 rodent ventilator(Ugo basile, Italy)를 이용해 인공호흡을 시키며 in situ 상태에서 대동맥 cannula를 대동맥에 삽입하고 역행성 관류 하에 심장을 적출해 Langendorff apparatus에

재빨리 매달고 심장에 붙어 있는 불필요한 조직을 제거한 후 정압 관류(55 mmHg)하에서 산소로 포화된 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer(KHBB) 용액($37^\circ C$, pH 7.4)으로 관류하였다. 증류수로 채운 고무 풍선(latex balloon)을 매달은 stainless steel cannula를 폐정맥을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 isovolumetric하게 측정하기 위해 pressure transducer(Statham, U.S.A.)에 연결하였다. 심장을 안정화시킨 후 LVEDP(left ventricular end diastolic pressure)를 5 mmHg로 하고 이 풍선 부피를 전 실험기간 동안 유지시켰다. 생리액은 KHBB 용액(조성 $\langle mM \rangle$: 112.0 NaCl, 5.0 KCl, 1.2 $MgSO_4$, 1.0 KH_2PO_4 , 25.0 $NaHCO_3$, 1.25 $CaCl_2$, 11.5 Glucose, 2.0 Pyruvate)을 사용하였으며 온도는 $37^\circ C$ 를 유지시켜 주고 실험을 진행하는 동안 계속 95% O_2 와 5% CO_2 의 혼합 가스를 통해 주어 pH를 7.4로 유지하였다.

단회처치군 및 7일간 전처치군

TUDCA 단회처치군의 경우 우선 산소로 포화된 생리액으로 적출심장을 15분간 안정화시키고 10분간 TUDCA (100, 200 μM) 및 vehicle(DMSO, 0.02%)을 관류하였다. 곧이어 30분간 KHBB 용액의 공급을 차단하여 30분간 허혈을 유발하였으며 30분 후에 정상적인 재관류를 시도하면서 허혈 전과 허혈 후에 각각 심장기능을 나타내는 left ventricular developed pressure(LVDP), heart rate(HR), double product(DP), coronary flow(CF) 그리고 $+dP/dt$ 를 측정하였고 허혈 기간에 심근경색시간(time to contracture), 재관류액 내 lactate dehydrogenase(LDH) 활성을 측정하였다. TUDCA 7일간 전처치군의 경우 약물을 carboxymethylcellulose-Na(CMC-Na)에 현탁하여 50, 100 및 200 mg/kg로 하여 1일 1회 경구투여 하였으며, 대조군의 경우 CMC-Na를 같은 기간동안 같은 방법으로 경구투여 하였다. 생리액을 20분간 관류하여 적출심장을 안정화시키고 이를 차단 30분간 허혈을 일으킨 후 30분간 재관류 하였다. 측정항목은 단회처치군과 동일하였다.

측정 및 분석 항목

심장 수축 기능과 심박동수(HR) 및 관상혈류(CF)를 측정하여 심장기능 및 관상 혈관 기능을 평가하였다(Grover 등, 1995; 1990). 심장 수축 기능 지표인 좌심실발생압(LVDP)은 좌심실 최대 수축기압(LVP; left ventricular peak systolic pressure)과 이완기말 좌심실압(LVEDP; left ventricular end diastolic pressure)의 차이로부터 산출하였고 이의 미분치인 dP/dt 도 산출하였다. Double product (ratepressure product)는 Watts의 방법(1987)에 따라 심박동수에 좌심실발생압을 곱하여 계산하였다. 총 관상 혈류량은 isolated heart chamber 내의 튜브를 통해 유출되는 관류량을 1분간 측정하였으며 심근경색시간(TTC)은 확장기 말압력이 허혈이 시작될 때로부터 5 mmHg 상승되는데 걸

리는 시간으로 측정하였고, 생화학적 지표인 LDH 함량은 kit를 이용하여 분석하였다(Sweidan 등, 1996).

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준오차로 표시하였으며 유의성의 검정은 the unpaired Student's *t*-test와 Dunnet's multiple comparison of ANOVA를 사용하여 P값이 0.05미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

실험결과

TUDCA단회 처치군의 적출심장에 대한 효과

좌심실 발생압은 대조군의 경우 허혈 전 안정화 시

Table I. Effect of single treatment with TUDCA on cardiac function before and after 30 min of global ischemia

Parameter	Before ischemiare		reperfusion
	Predrug	Postdrug	
LVDP(mmHg)			
Vehicle	96.5±4.1	101.0±4.9	34.0±6.8**
TUDCA(μM)			
100	99.5±5.5	97.0±9.4	27.8±3.9**
200	97.0±10.4	95.0±7.3	33.0±5.1**
HR(beats/min)			
Vehicle	243.0±4.8	240.0±12.0	204.0±4.8**
TUDCA(μM)			
100	245.0±6.7	237.0±4.9	203.0±5.3**
200	259.0±13.9	260.0±14.6	215.0±15.4*
DP(LVDP×HR/1000)			
Vehicle	23.4±1.1	24.3±1.2	6.8±1.3**
TUDCA(μM)			
100	24.2±1.0	22.8±2.0	5.6±0.8**
200	25.2±3.4	24.5±1.6	6.9±0.8**
+dP/dt_{max}(mmHg/sec)			
Vehicle	1604±170	1624±164	434±97**
TUDCA(μM)			
100	1564±138	1626±183	407±53**
200	1458±261	1619±161	474±77**
CF(Coronary flow)			
Vehicle	8.3±0.3	8.4±0.3	5.1±0.5**
TUDCA(μM)			
100	8.0±0.5	9.6±0.4	5.4±0.5**
200	10.1±0.8	9.9±0.5	6.1±0.3**

Values are means ± S.E.M. for 6 hearts per group.

*,**Significantly different ($p < 0.05$, $p < 0.01$) from predrug values. LVDP, left ventricular developed pressure; HR, heart rate; DP, double product; +dP/dt_{max}, maximum rate of pressure increase; CF, coronary flow.

96.5 mmHg에 비해 허혈 및 재관류 후 34.0±6.8 mmHg로 급격히 감소 하였다. TUDCA 처치군에서는 100 μM 처치 시 재관류 후 27.8±3.9 mmHg로 감소하는 경향을 보였으나 200 μM 처치군에서는 33.0±5.1 mmHg로서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 심박동수의 경우에 있어서도 허혈 및 재관류 후 대조군의 204.0±4.8 beats/min에 비해 100 및 200 μM 처치군에서 각각 203.0±5.3 및 215.0±15.4 beats/min으로 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 좌심실 수축기압의 미분치인 dP/dt의 경우 TUDCA 100 μM에서 대조군에 비해 약간 감소하였고 200 μM 전처치군에서 약간 증가하였으나 이들 모두에서 대조군과 통계적 유의성은 없었다. 관상혈류량은 대조군과 약물처치군 모두에서 별다른 차이를 보이지 않았다(Table I). 심근경색시간은 대조군의 경우 810±72 sec 이었으나 TUDCA 100 μM 처치군은 852±57 sec 로 약간 증가하였고 200 μM 처치군에서는 오히려 635±123 sec로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 재관류액 내의 LDH 치는 대조군에서 34.3±2.4(U/L)이었고 TUDCA 100 및 200 μM 처치군은 각각 33.8±3.4 및 32.9±3.7(U/L)로서 별다른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

TUDCA 7일간 전처치군의 적출심장에 대한 효과

좌심실발생압에 있어서 대조군의 경우 허혈 및 재관류 후 35.0±4.7 mmHg이었고 TUDCA 50 mg/kg 처치군에서 29.2±5.1 mmHg로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 심박동수는 대조군의 경우 허혈 및 재관류 후 194.0±9.3

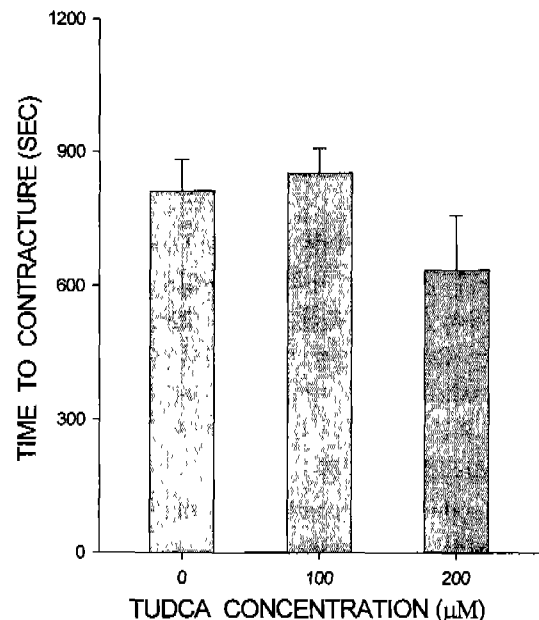


Fig. 1. Effect of single treatment with TUDCA on time to contracture during global ischemia. Isolated rat heart was subjected to 30 min of global ischemia subsequent 30 min reperfusion. Values are means ± S.E.M. from 6 hearts per group

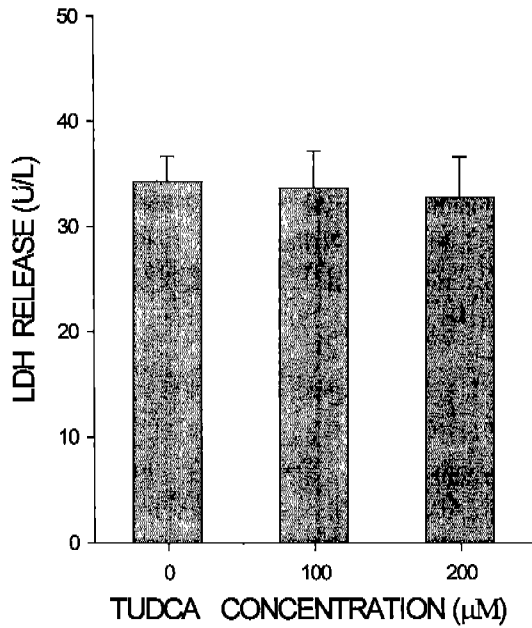


Fig. 2. Effect of single treatment with TUDCA on lactate dehydrogenase (LDH) release during reperfusion in isolated rat heart subjected to 30 min of global ischemia subsequent 30 min reperfusion. Values are means \pm S.E.M. from 6 hearts per group.

beats/min으로 약물 50, 100 및 200 mg/kg 처치군의 값인 189.0 \pm 9.9, 199.0 \pm 8.6 및 202.0 \pm 8.4 beats/min와 차이를 나타내지 않았다. DP 및 dP/dt 값은 TUDCA 100 mg/kg 처치군에서 허혈 및 재관류 대조군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 관상혈류량은 100 및 200 mg/kg 처치군에서 대조군의 4.8 ml/min에 비해 각각 5.4 및 5.6 ml/min으로 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다(Table II). 대조군의 경우 심근경색시간은 640 \pm 86 sec이고 TUDCA 50, 100 및 200 mg/kg 처치군의 경우 각각 673 \pm 94, 720 \pm 96 및 776 \pm 103 sec로서 증가하는 경향만을 나타내었다(Fig. 3). Fig. 4에 나타난 바와 같이 재관류액 내의 LDH 치는 TUDCA 50, 100 및 200 mg/kg 처치군에서 각각 33.8 \pm 2.3, 34.9 \pm 1.9 및 33.2 \pm 3.5(U/L)로서 대조군 37.0 \pm 2.8(U/L)에 비해 감소하는 경향을 보였다.

고 찰

허혈이란 산소의 요구량보다 공급량이 부족한 상태를 말한다. 엄격히 말하면, 심장에서의 허혈이란 심근세포의 기계적 또는 물리적 활성에 의해 결정되는 미토콘드리아의 산화 속도(rate of mitochondrial oxidation)에 비해 산소의 분할적 소비(fractional uptake of oxygen)가 불충분할 경우를 말한다(Ferrari 등, 1996). 심근 허혈과 관련된 대사

Table II. Effect of 7 day pretreatment (p.o.) with TUDCA on cardiac function before and after 30 min of global ischemia

Parameter	Before ischemia	reperfusion
LVDP(mmHg)		
Vehicle	86.0 \pm 6.1	35.0 \pm 4.7**
TUDCA(mg/kg)		
50	81.8 \pm 4.0	29.2 \pm 5.1**
100	85.5 \pm 6.2	33.7 \pm 6.5**
200	82.0 \pm 4.3	35.3 \pm 4.0**
HR(beats/min)		
Vehicle	240.0 \pm 15.2	194.0 \pm 9.3*
TUDCA(mg/kg)		
50	229.0 \pm 10.1	189.0 \pm 9.9**
100	237.0 \pm 13.1	199.0 \pm 8.6*
200	236.0 \pm 8.7	202.0 \pm 8.4**
DP(LVDP\timesHR/1000)		
Vehicle	20.4 \pm 0.6	6.8 \pm 0.7**
TUDCA(mg/kg)		
50	18.7 \pm 1.2	5.8 \pm 1.3**
100	19.9 \pm 0.9	7.3 \pm 1.1**
200	19.5 \pm 1.6	7.0 \pm 0.7**
+dP/dt_{max}(mmHg/sec)		
Vehicle	1115 \pm 152	407 \pm 42**
TUDCA(mg/kg)		
50	1082 \pm 102	378 \pm 70**
100	1194 \pm 81	543 \pm 101**
200	1286 \pm 136	476 \pm 92**
CF(Coronary flow)		
Vehicle	8.7 \pm 1.4	4.8 \pm 0.9*
TUDCA(mg/kg)		
50	7.2 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4**
100	8.7 \pm 0.7	5.4 \pm 0.6**
200	9.5 \pm 0.8	5.6 \pm 0.6**

Values are means \pm S.E.M. for 6 hearts per group. *,**Significantly different (p<0.05, p<0.01) from predrug values. LVDP, left ventricular developed pressure; HR, heart rate; DP, double product; +dP/dt_{max}, maximum rate of pressure increase; CF, coronary flow.

적·구조적 변화로는 ATP 및 creatine phosphate의 손실, 세포 외로의 K⁺ 이온 유출, 이온 항상성 파괴, 산증(acidosis), glutathione의 고갈(Simon 등, 1997; Patterson 과 Rhoades, 1988), 심근세포의 비후, 구조적 붕괴(structural disorganization) 등이 있다(Simon, 1997). 이러한 허혈 자체와 관련된 변화들은 허혈 초기에 외과적 처치 및 약물 요법으로 어느 정도 회복될 수 있어 경색

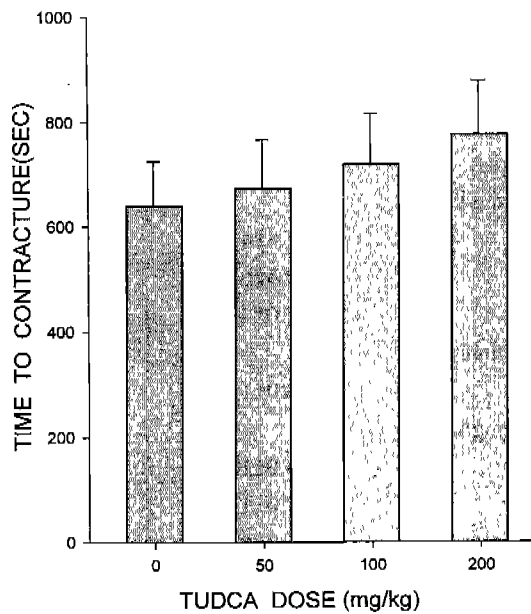


Fig. 3. Effect of 7 day pretreatment (p.o.) with TUDCA on time to oncontracture during global ischemia. Isolated rat heart was subjected to 30 min of global ischemia subsequent 30 min reperfusion. Values are means \pm S.E.M. from 6 hearts per group.

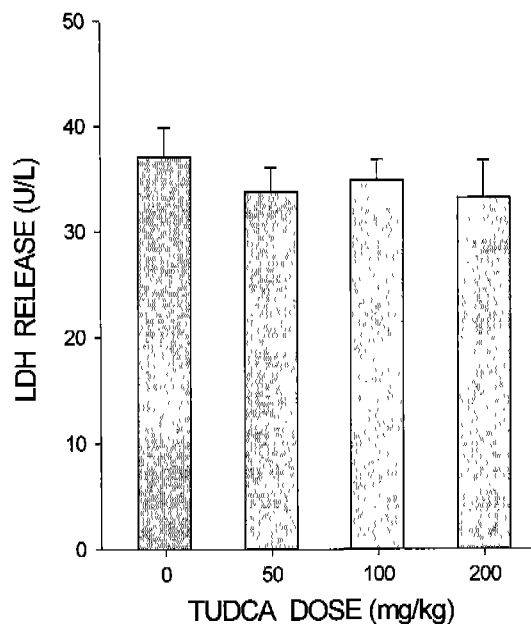


Fig. 4. Effect of 7 day pretreatment (p.o.) with TUDCA on lactate dehydrogenase (LDH) release during reperfusion in isolated rat heart subjected to 30 min of global ischemia subsequent 30 min reperfusion. Values are means \pm S.E.M. from 6 hearts per group.

(infarction)과 세포 괴사 등을 궁극적으로 억제할 수 있으나 허혈 지역의 재관류로 인한 산소의 재 도입은 이들보다 더욱 심각한 조직 손상을 초래할 수도 있다. 이러한 재관

류 손상(reperfusion injury)의 병리학적 특징은 혈관 및 모세혈관의 손상(Forman 등, 1989; Maxwell 과 Gavin, 1991), 내피세포의 기능장애(Sobey 등, 1992; McFalls 등, 1991), 세포 괴사의 촉진(Hearse 등, 1975; 1986) 및 과립구의 활성화등(Ceriana, 1992)이 있으며, 생화학적 특징으로는 glutathione의 고갈 및 미토콘드리아 기능 손상이 허혈 시보다 더 심해지며(Ferrari 등, 1989), 칼슘의 과부하(calcium overload), 활성산소로 인한 지질과산화가 발생하는 것(Dart와 Sanders, 1988; Guamieri 등, 1980) 등을 들 수 있다.

현재까지 알려진 재관류 손상에 대한 기전은 크게 둘로 나눌 수 있는데, 그 첫째는 산소 유리기 가설(oxygen free radical hypothesis)이고, 둘째는 칼슘 가설(calcium hypothesis)이다. 산소 유리기 가설이란 재관류시 도입된 산소가 xanthine oxidase에 의해 superoxide radical을 형성하게 되고(Chambers 등, 1985), 이 유리기가 Fenton 반응과 Haber-Weiss 반응 등의 과정을 통해 극히 유독하다고 알려진 hydroxyl radical 등의 유리기들이 생성되어 이들에 의해 재관류 손상이 유발된다는 것이고, 칼슘 가설이란 허혈 및 재관류 시에 H^+ , Na^+ 및 Ca^{++} 등의 이온 항상성이 유지되지 못해 세포 내로의 과도한 칼슘의 유입으로 인해 세포가 손상된다는 것으로, 이 과량의 칼슘이 phospholipase 활성화를 통한 세포막의 손상, 수축관련 단백질 손상에 의한 수축기전의 이상 그리고 미토콘드리아의 손상 등을 야기 시킨다고 한다(Ferrari 등, 1989). 또한 유리기와 칼슘의 과부하는 서로 영향을 미치며 유리기는 근질세망에서 Ca^{++} 재도입을 막고, Na^+ pump를 억제하며, Na^+/Ca^{++} pump를 활성화하여 세포내의 Ca^{++} 농도를 증가시키고 또한 직접 인지질을 손상시켜 세포질내의 Ca^{++} 과부하를 야기시켜 증가된 Ca^{++} 으로 야기된 근질세망의 Ca^{++} 방출 채널의 활성화 등을 통해 허혈 및 재관류 손상을 악화시킨다고 한다(Opie, 1991).

이를 바탕으로 허혈 및 재관류로 인한 손상을 방지하기 위해 항산화제를 이용하여 활성 산소를 제거하여 지질 과산화 등을 억제하거나(Maarten, 1993), Ca^{++} 이온의 항상성을 유지시키거나, 재관류 방법을 조작하여 급작스런 재관류로 인한 손상을 예방하는 등의 방법들이 제시되고 있다(Simon 등, 1997).

담즙산은 인간과 동물의 담즙에 함유되어 있으며, 이담 작용, 간 혈류 증가작용, 지방의 흡수 촉진작용 및 미세담도를 통한 노폐물 배설작용 등의 약리 작용을 가지고 있다. 담질환 치료시 초기에는 케노데옥시콜린산(CDCA)이 담석 용해제로 사용되어 왔으나(Iser 등, 1975), 만성투여 시 심한 간독성이 유발되어 그 후 UDCA가 대표적인 약물로 현재까지 널리 담즙용해제로 사용되고 있다(Makino 등, 1975). 또한 UDCA는 수침구속 스트레스에 의해 유발된

폐양과 위점막의 지질과산화물을 억제시킨다고 하며 (Kawamura 등, 1989; Cho 등, 1995), 이러한 항스트레스 작용은 UDCA의 이담작용에 기인된다고 한다(Park 등, 1996).

최근 연구에 따르면 UDCA는 간장 허혈 및 재판류 손상에 대해 간장 세포막을 안정화시켜(Guldutuna 등, 1993) 간장 뿐 아니라 허혈과 관련된 다른 기관의 손상에 UDCA가 적용될 수 있음을 시사하였다. 본 연구실에서 실행한 실험에서도 흰쥐의 적출심장에서 허혈 및 재판류 손상에 대해 UDCA 전처치군에서 LVDP 및 DP를 현저히 증가시켜 심장수축기능을 회복시켰고, 판류액 내로의 LDH 유출량을 감소시켜 생화학적 손상을 감소시켰으며, 허혈기간 내에 발생하는 심근의 경축 시간을 유의적으로 연장시키는 등 뚜렷한 항 허혈효과가 있음을 밝혔다(Lee 등, 1999).

TUDCA는 UDCA에 타우린이 붙은 복합체로서 구조적으로 UDCA와 비슷하며 그 효과도 유사하여 주로 담즙분비 이상에 사용되는 약물이며 소수성 담즙으로 유발된 세포 내의 증가된 칼슘에 의한 담즙분비 이상에 대해서도 효과가 있음이 보고되었다. 최근 연구에 의하면 TUDCA는 적출된 쥐 간에서 정상적인 생리적 상태에서는 세포질 내 칼슘치를 증가시키고 세포내 칼슘 신호 전달에도 관여한다고 한다(Beuers 등, 1993). 또한 장기이식 시에 면역억제제로 사용되는 cyclosporin은 세포 내에 칼슘치를 증가시켜 신장 및 간장의 손상을 유발하나 이 증가된 칼슘치는 TUDCA의 정맥주사로 낮아지고 결국 담즙분비 이상이 개선된다고 한다(Queneau 등, 1993).

앞서 언급한 바와 같이 허혈 및 재판류 손상의 주된 원인 중 하나인 유리기와 관련 하여 TUDCA는 ethanol로 유발된 지질과산화와 같은 산화적 손상에 대해 보호작용이 있다고 하며(Vendemiale 등, 1998), 더 나아가 TUDCA의 스테로이드 핵의 일부가 세포막의 비극성 부분과 결합하여 세포막을 안정화시킨다고 한다(Guldutuna 등, 1993).

TUDCA와 구조적으로 유사한 UDCA가 뚜렷한 항허혈 효과를 나타내었고 또한 TUDCA는 허혈 및 재판류 손상의 주요원인이 되는 세포내의 Ca^{++} 조절에 관여하고, 항산화 능력 및 세포막 보호기능도 보고된 바 있으므로 이의 항허혈 효과가 있을 것으로 기대되어 본 실험에서는 흰쥐의 적출심장에서 허혈 및 재판류 손상에 대한 TUDCA의 약리 효과를 알아보았다.

본 실험에서 TUDCA의 항허혈 작용을 알아보기 위해 먼저 TUDCA를 생리액을 통해 판류하여 단회치치 실험을 시행 하였다. TUDCA를 생리액을 통해 판류한 실험에서 100 μ M 처치시 심수축력을 나타내는 좌심실 발생압 및 간접적으로 심박출량을 나타내는 DP에서 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었고

관상혈관 기능을 나타내는 관상혈류량의 경우에도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 세포손상을 나타내는 가장 일반적인 지표인 판류액 내의 LDH 치는 대조군과 약물처치군 모두에서 유사한 값을 나타내어 이 역시 TUDCA가 허혈 및 재판류에 대한 심장세포 보호작용은 없는 것으로 생각되었다.

TUDCA가 UDCA에 비해 포합형이므로 세포막 내로의 흡수기간이 다소 걸릴 것으로 예상되어 1주일간 TUDCA를 용량별로 경구투여하여 다음 실험을 실시하였다. TUDCA를 7일간 전처치한 실험에서 50 mg/kg 전처치군에서 대조군에 비해 좌심실발생압과 DP를 감소시키는 경향을 나타내었으나 이와는 반대로 100 mg/kg 전처치군에서 DP 및 dP/dt 가 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 심장보호에 대한 지표인 관상혈류량의 경우 100 및 200 mg/kg 전처치군 모두에서 대조군에 비해 약간 증가하는 경향을 나타낼 뿐 통계적 유의성은 없었다. 재판류액 내의 LDH 치도 대조군에 비해 50, 100 및 200 mg/kg 전처치군 모두에서 감소하는 경향을 나타내어 TUDCA의 세포보호작용의 가능성을 보여주었으며 심근경축시간도 통계적 유의성은 없었으나 대조군에 비해 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

본 실험 결과에 의하면 허혈 및 재판류 손상에 대해 TUDCA가 단회치치 및 7일간 전처치 모두에서 대조군에 비해 손상을 감소시키지 못하였으나 7일간 전처치군에서는 일부 허혈 및 재판류로 인한 손상을 개선하는 경향을 보였다. 이는 TUDCA를 장기간 투여할 경우 그 효과가 나타날 수 있다는 가능성을 제시한다. 따라서 TUDCA의 만성적 처치 실험과 더불어 세포내의 칼슘수준 조절 기전에 대한 연구가 좀더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

TUDCA를 제공해주신 대응 제약, 그리고 본 실험을 수행하는데 기술적 도움을 주신 조선무약에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- Anwer, M. S., Engelking, L. R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P. and Lester, R. (1998). Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca^{++} activity of isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 8, 887-891.
- Beuers, U., Nathanson, M. H. and Boyer, J. L. (1993). Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca^{++} signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104, 604-612.
- Ceriana, P. (1992). Effects of myocardial ischaemia-reperfusion on granulocyte elastase release. *Anaesth. Int. Care.* 20, 187-190.

- Chambers, D. E., Parks, D. A. and Patterson, G. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischaemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* **17**, 145-152.
- Cho, T. S., Lee, S. M., Yeom, J. H., Yu, E. J., Lim, S. W., Jang, B. S., Kim, Y. H., Yu, Y. M. and Park, M. H. (1995). Anti-stress effects of ursodeoxycholic acid on the restraint stress in rats. *Yakhak Hoeji* **39**, 548-553.
- Dart, R. C. and Sanders, A. B. (1988). Oxygen free radicals and myocardial reperfusion injury. *Ann. Emerg. Med.* **17**, 53-58.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Benigno, M., La, Canna. G. and Visioli, O. (1996). Left Ventricular dysfunction due to the new ischemic outcomes: stunning and hibernation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **18**(Suppl. 1), S18-S26.
- Ferrari, R., Curello, S., Boffa, G.M., Condorelli, E., Pasini, E., Guanieri, G. and Albertini, A. (1989). Oxygen free radical-mediated heart injury in animal models and during bypass surgery in humans. Effects of alpha-tocopherol. *Ann. NY Acad. Sci.* **570**, 237-253.
- Forman, M. B., Puett, D. W. and Virmani, R. (1989). Endothelial and myocardial injury during ischaemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* **13**, 450-459.
- Grover, G. J., McCullough, J. R., D'Alonzo, A. J., Sargent, C. A. and Atwal, K. S. (1995). Cardioprotective profile of the cardiac-selective ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **25**, 40-50.
- Grover, G. J., Sleph, P. G. and Dzwonczyk, S. (1990). Pharmacological profile of cromakalim in the treatment of myocardial ischemia in isolated rat hearts and anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**, 853-864.
- Guamieri, C., Flamigini, F. and Caldara, C. M. (1980). Role of oxygen in cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **12**, 797-808.
- Guldutuna, S., Zimmer, G., Imhof, M., Bhatti, S., You, T. and Leuschner, U. (1993). Molecular aspect of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* **104**(6), 1736-1744.
- Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biological systems. *FEBS Lett.* **92**, 321-326.
- Hearse, D. J., Humphrey, S. M., Nayler, W. G., Sale, A. and Border, Z. (1975). Ultrastructural damage associated with reoxygenation of anoxic myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* **7**, 315-324.
- Hearse, D. J., Manning, A. S., Downey, J. M. and Yellen, D. M. (1986). Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischaemia and reperfusion?. *Acta Physiol. Scand.* **548**, 65-74.
- Hertl, M., Engelhard O., Vollmers B., Rogiers X., Jung R. and Broelsch, C. E. (1997). Donor Pretreatment with Hydrophilic Bile Salts Protects the liver From Preservation and reperfusion injury in the Rat. *Transplantation Proceedings* **29**, 388-389.
- Iser, J. H., Dowling, R. H., Mok, H. Y. I. and Bell, G. D. (1975). Chenodeoxycholic acid treatment of gallstones: a follow up report and analysis of factors influencing response to therapy. *N. Eng. J. Med.* **293**, 378-383.
- Kawamura, T., Koiaumi, F. and Ishimori, A. (1989). Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats. *Nippon-Shokakibyō-Gakkai-Zasshi* **24**, 2373-2378.
- Lee, W. Y., Han, S. H., Cho, T. S., Yoo, Y. H. and Lee, S. M. (1999). Effect of ursodeoxycholic acid on ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Arch. Pharm. Res.* **22**(5), 479-484.
- Lubbe W. H., Podzuweit T. and Opie L. H. (1992). Potential arrhythmogenic role of cyclic adenosine monophosphate (AMP) and cytosolic calcium overload. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 1622-1633.
- Maarten, J. (1993). Antioxidant defences in rat, pig, guinea pig, and human hearts: comparison with xanthine oxidoreductase activity. *Cardiovascular research* **27**, 2052-2057.
- Makino, J., Shinazaki, K. and Yoshino, K. (1975). Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Jap. J. Gastroenterol.* **72**, 690-691.
- Marban, E., Kitakaze, M., Koretzune, Y., Yue, D. T., Chako, V. P. and Pike M. M. (1990). Quantification of $[Ca^{2+}]_i$ in perfused hearts: critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischaemia and reperfusion. *Circ. Res.* **66**, 1255-1267.
- Maxwell, L. and Gavin, J. B. (1991). The role of post-ischaemic reperfusion in the development of microvascular incompetence and ultrastructural damage in the myocardium. *Basic Res. Cardiol.* **86**, 544-553.
- McCord, J. M. and Day, E. D. (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron EDTA complex. *FEBS Lett.* **86**, 139-142.
- McFalls, E.O., Duncker, D. J., Krams, R., Ward, H., Gomick, C. and Verdouw, P. D. (1991). Endothelium dependent vasodilatation following brief ischaemia and reperfusion in anaesthetised swine. *Cardiovasc. Res.* **25**, 659-665.
- Nayler, W. G., Ferrari, R. and Williams, A. (1980). Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischaemic reperfused myocardium. *Am. J. Cardiol.* **46**, 242-248.
- Nicchitta, C. V., Kamoun, M. and Williamson, J. R. (1985). Cyclosporine augments receptor-mediated cellular Ca^{++} fluxes in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 13616-13618.
- Opie L. H. (1991). Postischemic stunning -the case for calcium as the ultimate culprit. *Cardiovasc. Drug Ther.* **5**, 895-900.
- Park, I., Kim, Y. I., Lee, S. M. and Cho, T. S. (1996). Anti-stress effect of cholic acid derivatives in restraint stress induced rats. *J. Appl. Pharmacol.* **4**(2), 162-166.
- Patterson, C. E. and Rhoades, R. A. (1988). Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. *Exp. Lung Res.* **14**, 1005-1019.
- Queneau, P. E., Bertault-Peres, P., Mesdjian, E., Durand, A.

- and Montet, J. C. (1993). Diminution of an acute cyclosporine-induced cholestasis by tauroursodeoxycholic acid in the rat. *Transplantation* **56**, 530-534.
- Simon, R. J. and Gregory, Y. H. (1997). Reperfusion injury: a review of the pathophysiology clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol.* **58**, 95-117.
- Sobey, C. G., Dalipram, R. A., Dusing, G. J. and Woodman, O. L. (1992). Impaired endothelium-dependent relaxation of dog coronary arteries after myocardial ischaemia and reperfusion: prevention by amlodipine, propranolol and allopurinol. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 557-562.
- Sweidan, H., M llner, S. and Jacob, R. (1996). An assessment by means of the release of lactate dehydrogenase by the ischemic and reperfused Langendorff heart. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* **46**(1), 25-27.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Signorile, A. and Altomare, E. (1998). Ethanol-induced changes of intracellular thiol compartmentation and protein redox status in the rat liver: effect of tauroursodeoxycholate. *J. Hepatology* **28**(1), 46-53.
- Watts, J. and Maiorano, L. (1987). Effects of diltiazem upon globally ischemic rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.* **138**, 335-342.