

# 원위 간장에서 허혈/재관류로 인한 분비 기능 및 약물대사 변동

아주대학교 의과대학 응급의학교실

조준필 · 정윤석

=Abstract=

## *Effects of Ischemia/Reperfusion on Hepatic Secretion and Microsomal Drug-Metabolism in Rat*

Joon Pil Cho, M.D., Yoon Seok Jung, M.D.

*Department of Emergency Medicine  
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

Ischemia causes tissue necrosis in a wide variety of pathologic conditions. Permanent deprivation of blood flow is lethal to any tissue and the prudent therapy for ischemia unquestionably is reperfusion. While reperfusion is necessary to reverse the progression towards ischemic death, reperfusion is also thought to be accompanied by its own component of injury. Oxygen free radicals, formed during ischemia/reperfusion, have been proposed as one of the main causes of reperfusion injury. Free radical attacks on biological membrane, such as mitochondria and endoplasmic reticulum, and can lead to the oxidative destruction of the polyunsaturated fatty acids of the membranes through lipid peroxidation. However, direct association between microsomal lipid peroxidation in vivo after ischemia/reperfusion and changes in secretory function and drug metabolism on the liver have not been established.

Therefore, present study was performed to evaluate the hepatic secretory function and the hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activity after ischemia/reperfusion preparation in rat liver. Further, the effect of oxygen free radical scavengers was investigated.

The animals were divided into sham operation group and ischemia/reperfusion group. The ischemia/reperfusion group was subdivided into non-treated control and treated (with superoxide dismutase, allopurinol,  $\alpha$ -tocopherol, deferoxamine) groups. Hepatic ischemia was produced by clamping the left branches of portal vein and hepatic artery, resulting in complete ischemia to the median and left lobes while the right lobes remained perfused to prevent intestinal congestion. Reperfusion was permitted by declamping after 1 hour. After 1 or 5 hours of reperfusion, bile was collected, blood was obtained from abdominal aorta, and liver microsomes were isolated.

The results are as follows. Serum aminotransferase was increased 15~20 times by ischemia/reperfusion. However, this increase was attenuated by free radical scavengers, especially 5 hours of reperfusion. The wet weight-to-dry weight ratio of the liver was significantly increased by ischemia/reperfusion.  $\alpha$ -tocopherol pretreatment minimized the increase

of ratio. Malondialdehyde level in the liver microsomal fraction was significantly increased after ischemia/reperfusion, but this increase was attenuated by scavenger pretreatment, especially  $\alpha$ -tocopherol. Bile flow and cholate output, but not the bilirubin output, were decreased after ischemia/reperfusion. The free radical scavenger pretreatment restored the secretion significantly. Cytochrome P-450 content was significantly decreased after ischemia/reperfusion and ameliorated by free radical scavenger pretreatment. NADPH cytochrome P-450 reductase activity and aminopyrine N-demethylase activity were also decreased and improved by free radical scavengers pretreatment.

These results indicate that ischemia/reperfusion deteriorates the hepatic secretory function as well as hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activity, and the oxygen free radical scavengers attenuate the functional changes of the liver induced by ischemia/reperfusion.

**Key Words :** Ischemia/reperfusion, oxygen free radical, drug metabolizing enzyme

저자연락처 : 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5번지 아주대학교병원 응급의학과 조 준 필 Tel:(0331)219-6007, 5725

## I. 서론

허혈/재관류는 심근 경색<sup>1)</sup>, 뇌졸중<sup>2)</sup> 및 속 후 다발성 장기부전증<sup>3)</sup> 등과 같은 다양한 병리 상태에서 장기의 손상과 관련되어 있다고 알려져 있다. 특히 간이식을 비롯한 장기이식(organ transplantation) 및 심장 재관류(cardiac reperfusion)와 같은 새로운 치료법이 증가하면서 허혈 상태 또는 저산소 상태의 조직에 산소가 재도입 되거나, 재관류된 후 일어나는 여러 세포 독성에 밀받침이 되고 있는 기전 연구에 관심이 모아지고 있다<sup>4)</sup>.

허혈 혹은 저산소 상태에서는 에너지원인 ATP가 많이 소모되어 hypoxanthine이 조직 내에 축적되고 동시에 NAD 의존성 xanthine dehydrogenase가 산소 의존성 xanthine oxidase로 전환된다. 재관류로 산소가 도입되면 축적된 purine 대사물은 더욱 쉽게 산화되어, 산소 분자는 xanthine oxidase에 의해 독성이 강한 활성 산소로 전환된다<sup>5)</sup>. 세포막에는 다중 불포화 지방산이 풍부하고 산소분자는 소수성(hydrophobic)인 막에 용해도가 크기 때문에<sup>6)</sup> free radical을 소실

시켜 부종을 일으키고 나아가서 세포붕해(cytolysis)를 초래한다.

활성 산소 생성 억제 및 제거물질로는 allopurinol, superoxide dismutase, catalase, deferoxamine,  $\alpha$ -tocopherol 등이 있다. Allopurinol은 superoxide anion 생성에 관여하는 xanthine oxidase의 억제제이며, superoxide dismutase는 xanthine 및 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 의해 산화되면서 생성되는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키고 생성된 과산화수소는 catalase에 의해 물과 산소 분자로 변화된다. 또한 ion chelator 중의 하나인 deferoxamine<sup>7)</sup>은 철에 의하여 매개되는 활성 산소 생성을 억제하며, 지용성 활성산소 제거물질로는 지질과산화 반응을 억제하는  $\alpha$ -tocopherol<sup>8)</sup> 등이 알려져 있다.

간은 체내에서 가장 대사율이 높은 장기의 하나로서 안정 상태에서 몸 전체 산소 소모율의 20%를 차지한다. 간조직은 세포 내에서 일어나는 수많은 생화학적 반응을 통하여 여러 가지 물질을 만들어 이들을 다른 기관에 공급한다. 또한 간장은 담즙을 생성하고 호르몬 및 약물을 대사시키는 주된 장소이다. 최근 장기 이식술이 널리

적용되면서 적응된 공여 장기의 허혈 및 재관류 손상을 최소화하기 위하여 allopurinol 등의 활성 산소 생성 억제 및 제거 물질이 포함된 장기 저장액의 개발을 위한 노력이 계속되고 있다<sup>9)</sup>. 그러나 과거의 몇몇 연구는 주로 허혈 자체 또는 재관류 직후의 여러 생화학적 및 형태학적 변화에만 관심을 두었을 뿐 수술 경과 후의 기능 변화에는 역점을 두지 않았다. 그러나 임상적으로는 혈류가 차단된 상태의 공여 장기가 이식 수술 후 재관류되면서 야기되는 간기능의 변화가 환자의 예후에 매우 중요하다.

현재까지 허혈 및 재관류로 인한 장기 손상에 관한 연구들이 많이 보고되었지만, 간에 대한 연구는 매우 한정되어 있고 더욱이 생체내에서 허혈 및 재관류 후 일어나는 약물대사 효소들의 기능 변동과 그의 기전적인 연구로 지질과산화와의 직접 관련성에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 간장의 허혈 및 재관류에 따른 일반 손상 지표의 변동과 담즙 분비 변동 및 약물대사 효소계의 활성 변동을 관찰하고, free radical의 생성 억제 및 제거 약물을 사용하여 허혈/재관류 손상 방지 효과를 알아보기 위하여 이번 실험을 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 몸무게 200~250g의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 이용하였으며 실험 전 24시간 동안 절식시키고 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 sham operation군, 허혈/재관류군으로 구분하였으며 허혈/재관류군은 다시 대조군,  $\alpha$ -tocopherol 투여군, deferoxamine 투여군, allopurinol 투여군, superoxide dismutase 투여군으로 나누었다.

### 2. 간장 허혈 유발

실험 동물을 pentobarbital sodium(50mg/kg)으로 마취시키고, 약물 투여를 위해 경정맥에 catheter를 cannulation한 후 복부 정중선을 따라 개복하여 문맥의 왼쪽 분지와 간장내 산소 공급에 주된 역할을 하는 간동맥을 clamp하여 허혈을 유발시키고, 일정 시간 경과 후(60분) clamp를 제거하여 재관류시켰다. 재관류 1시간 및 5시간 후에 PE-50 tubing을 담관내 삽관하여 담즙을 채취한 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간의 좌엽 및 중앙엽을 적출하여 실험에 사용하였다. 이때 좌엽의 일부를 잘라 무게를 측정하고(wet wt.) 80°C에서 48시간 건조시킨 후 무게를 달아(dry wt.) wet/dry liver wt. 비를 측정하였다. Sham-operated 동물은 문맥의 왼쪽 분지와 간 동맥을 clamp하지 않고 모든 시험법을 위와 동일하게 시행하였다.

### 3. 약물저지

활성 산소 생성 억제 및 제거 물질로는  $\alpha$ -tocopherol, allopurinol, deferoxamine, 및 superoxide dismutase를 사용하였다.  $\alpha$ -tocopherol은 실험 3일 전부터 하루에 20 mg/kg body weight 씩 복강내 주사하였으며 용매로는 soybean oil을 사용하였다. Allopurinol은 실험전 2일부터 하루에 50 mg/kg body weight 씩 경구 투여하였으며 실험 개시 2시간 전에 50 mg/kg body weight를 경구 투여하였다. Deferoxamine은 허혈 조작 5분전 및 재관류 조작 5분전에 150,000 units/kg body weight를 정맥 주사 하였으며 superoxide dismutase는 역시 허혈 조작 5분전 및 재관류 조작 5분전에 60mg/kg body weight를 정맥 주사하였다. Allopurinol, deferoxamine, 및 superoxide dismutase의 용매는 모두 생리적 식염수로 하였다.

### 4. 간장 소포체 분획의 분리

적출한 간장을 잘게 썰어 teflon pestle homogenizer를 이용하여 간 무게 1g당 4ml의 0.15

M KCl 용액으로 균질화시킨 다음 9,000g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 다시 105,000g에서 60분간 원심분리하여 상등액은 버리고 하층의 침전물인 소포체 분획을 얻었으며 간소포체 1g당 최종 소포체 용액이 4ml 되도록 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4를 첨가하여 재현탁시켜 -70°C deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다. 간장 균질화부터 소포체 재현탁까지의 모든 과정은 2°C에서 수행하였다.

### 5. 분석 방법

혈청 aminotransferase는 Sigma kit # 59-UV(Sigma hemical Co., St. Louis, MO, U.S.A)를 사용하여 표준흡광법으로 측정하였으며, 담즙cholate는 표준용액으로 sodium taurocholate를 써서 630nm에서 표준흡광법으로 측정하였으며, bilirubin은 AM 301-K(Nipponshaji, Tokyo, Japan) kit를 사용하여 표준흡광법으로 측정하였다. 간장 소포체 분획내 지질 과산화물은 Masugi와 Nagamura(1976)의 방법<sup>10)</sup>에 따라 thiobarbituric acid(TBA) assay를 사용하여 535nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane(malondialdehyde [MDA] tetraethyl acetal)을 사용하였다. NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성 측정은 Masters 등(1967)의 방법<sup>11)</sup> 및 Mazel(1972)의 방법<sup>12)</sup>에 따라 조작후 반응 속도가 일정하게 되는 3~4분 사이에 550nm에서 1분간의 흡광도 차를 측정하고 molar extinction difference를 19.1nM/L/cm으로 하여 측정하였다. Cytochrome P-450 함량은 Omura와 Sato(1964)의 방법<sup>13)</sup>에 따라 differential spectrophotometer로 450nm와 500nm에서 흡광도를 측정하고 그 차이를 molar extinction coefficient를 104mM/L/cm로 계산하였다. Aminopyrine N-demethylase활성은 생성되는 formaldehyde를 Schenkman등(1967)의 방법<sup>14)</sup>에 따라 412nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다. Aniline p-hydroxylase활성은 생성되는 para-aminophenol(PAP)을 Mieyal과 Blumer(1976)의 방

법<sup>15)</sup>에 따라 630nm에서 흡광도를 측정하여 산정하였다. Protein함량은 Lowry 등(1951)의 방법<sup>16)</sup>에 따라 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

### 6. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료 분석은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 결정하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 혈청 aminotransferase(ALT) 활성

혈청 ALT 활성은 sham operation 직후 55.0±5.0 U/L이었으나 수술후 5시간에는 330.0±32.1 U/L로 증가하였다. 1시간 동안 허혈을 유발시켰을 때 혈청 ALT활성은 105.3±27.0 U/L로 sham

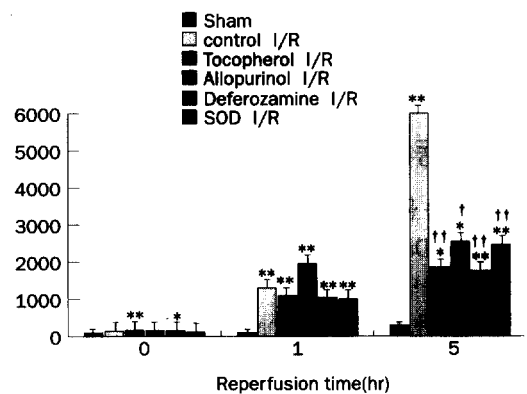


그림 1. 허혈/재관류 후 혈청 aminotransferase의 변동 및 항산화 약물의 영향

값은 각각 7마리의 흰쥐에서 평균±표준오차임  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01 sham operation 군과의 비교  
 †p<0.05, ††p<0.01 허혈/재관류 대조군과의 비교

operation에 비해 약간 증가하였으나, 재관류 후에는 현저히 증가하였다. 즉 재관류 1시간에는  $1425.6 \pm 170.7$  U/L로 증가하였으며 5시간 후에는  $5269.4 \pm 575.2$  U/L로 재관류 전에 비하여 50배 이상 증가하였다. 그러나 활성 산소 생성 억제 및 제거물질 투여는 5시간 재관류로 인한 혈청 ALT 활성 증가를  $\frac{1}{2} \sim \frac{1}{3}$ 수준까지 억제하였다. 즉  $\alpha$ -tocopherol과 deferoxamine 처치군의 5시간 재관류시 혈청 ALT치는 각각  $1812.6 \pm 513.9$  U/L와  $1611.1 \pm 296.6$  U/L이었으며, allopurinol 투여군과 superoxide dismutase 투여군은  $2565.4 \pm 876.2$  U/L와  $2432.8 \pm 432.1$  U/L이었다. 그러나 재관류 1시간에는 허혈/재관류 대조군이나 약물처치군 사이에 별 차이가 없었다(그림 1).

## 2. 간장의 wet weight-to-dry weight 비

Sham operation군에서 간장의 wet weight-to-dry weight 비는  $3.33 \pm 0.05$ 에서 수술 5시간 후에도  $3.50 \pm 0.03$ 으로 별 차이가 없었다. 그러나 1시

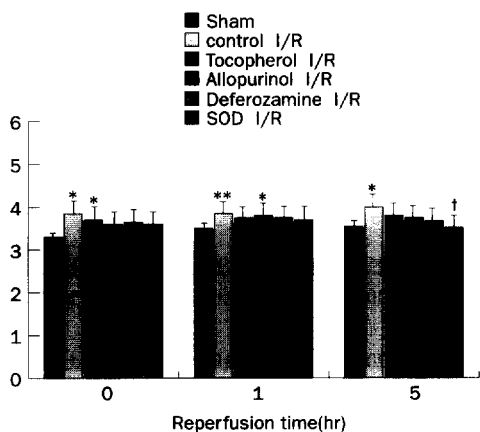


그림 2. 허혈/재관류 후 wet weight-to-dry weight ratio 변동 및 항산화 약물의 영향

값은 각각 7마리의 흰쥐에서 평균±표준오차임  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  sham operation 군과의 비교  
 † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  허혈/재관류 대조군과의 비교

간 허혈로 이 비는  $3.78 \pm 0.16$ 으로 증가하였으며, 재관류 1시간에  $3.86 \pm 0.10$ , 5시간에  $4.03 \pm 0.08$ 로 부종이 의의있게 증가하였다. 그러나 활성 산소 제거물질 투여는 재관류로 인한 부종에 대해 별 영향이 없었으나, superoxide dismutase는 재관류 5시간에서 그 비가  $3.51 \pm 0.09$ 로 간장 부종을 의의있게 억제하였다(그림 2).

## 3. 간세포내 지질 과산화

간장 세포내 지질과산화산물인 malondialdehyde치는 sham operation군에서 수술 직후  $0.44 \pm 0.05$  nmole/mg protein에서 1시간, 5시간 후 모두  $0.50 \pm 0.03$  nmole/mg protein으로 별 차이가 없었다. 그러나 허혈/재관류 대조군에서 재관류 직전  $1.80 \pm 0.28$  nmole/mg protein이었으며, 1시간에  $2.11 \pm 0.15$  nmole/mg protein, 5시간에  $2.58 \pm 0.31$  nmole/mg protein으로 지속적으로 현저히 증가하였다. 활성 산소 생성 억제 및 제거물질 투여군에서는 sham operation군에 비하여 모두 증가하

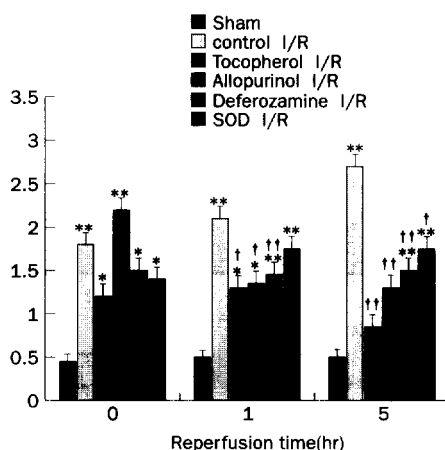


그림 3. 허혈/재관류 후 malondialdehyde 변동 및 항산화 약물의 영향

값은 각각 7마리의 흰쥐에서 평균±표준오차임  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  sham operation 군과의 비교  
 † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  허혈/재관류 대조군과의 비교

였으나 전반적으로 허혈/재관류 대조군에 비하여 그 증가 정도는 의의있게 약화되었다. 특히 α-tocopherol 처치군에서 재관류 5시간에 malondialdehyde치는 0.95±0.21 nmole/mg protein으로 허혈/재관류 대조군에 비하여 의의있게 감소하였으며 sham operation군과 별 차이가 없었다(그림 3).

#### 4. 담즙 분비

담즙 분비량은 sham operation군이 1시간 및 5시간 후에 각각 0.23±0.03, 0.20±0.01 ml/hr/100g body weight로 대체로 일정하였으나 허혈 기간 중에는 전혀 담즙분비를 관찰할 수 없었으며 재관류 후에도 허혈/재관류 대조군에서 1시간에 0.12±0.02 ml/hr/100g body weight, 5시간에 0.08±0.03 ml/hr/100g body weight으로 감소하였다. 활성 산소 생성 억제 제거물질 투여로는 담즙 분비량 감소에 별 영향이 없었다. 총 bilirubin치는 sham operation군이나 허혈/재관류군 사이에 의의있는 차이가 없었다. cholate의 분비량은 허혈/재관류 대조군에서 재관류 1시간 및 5시간 후에 각각 0.62±0.14, 0.23±0.09 ml/hr/100g body weight로 sham operation군의 1.23±0.07, 1.00±0.06 ml/hr/100g body weight보다 감소되었다. 허혈/재관류 후 1시간에 α-tocopherol 투여군이 1.74

±0.26 ml/hr/100g body weight, deferoxamine 투여군이 1.64±0.15 ml/hr/100g body weight, superoxide dismutase 투여군이 1.53±0.08 ml/hr/100g body weight로 허혈/재관류 대조군에 비하여 의의있게 증가되었다(표 1).

#### 5. Cytochrome P-450 농도 및 NADPH cytochrome P-450 reductase 활성도

간장 소포체내 cytochrome P-450 양은 sham operation군이 수술 직후, 1시간, 및 5시간에 각각 0.80±0.03, 0.76±0.03, 0.74±0.07 nmole/mg protein으로 일정하였다. 허혈/재관류 대조군에서는 재관류 후 1시간에는 별 변동이 없었으나, 5시간에 0.33±0.08 nmole/mg protein으로 유의하게 감소하였다. 활성 산소 생성 억제 및 제거 물질 투여군 모두에서 sham operation군에 비하여 통계적으로 큰 차이는 없었으나 deferoxamine 및 superoxide dismutase 투여군에서 재관류 후 5시간에 각각 0.92±0.13, 0.87±0.15 nmole/mg protein으로 증가하여 sham operation군과 비슷하였다. NADPH-cytochrome P-450 reductase의 양은 sham operation군에서는 수술 직후, 1시간, 5시간에 각각 128.4±10.4, 128.6±10.4, 137.0±10.2 nmole/mg protein으로 일정하였다. 허혈/재관류 대조군에서는 58.4±17.0, 57.1±9.72, 67.6±11.1

표 1. 허혈/재관류 후 담즙 분비 기능의 변동 및 항산화 약물의 영향

Sham operation	0.23±0.03	0.20±0.01	1.23±0.07	1.00±0.06	1.49±0.18	1.39±0.19
Ischemia/Reperfusion						
Control	0.12±0.02**	0.08±0.03**	0.62±0.14**	0.23±0.09**	1.25±0.36	1.27±0.35
α-tocopherol	0.13±0.02**	0.13±0.03*†	1.74±0.26†	0.32±0.07**	2.07±0.51	1.70±0.25
Allopurinol	0.11±0.02**	0.12±0.03*	0.66±0.13**	0.51±0.11**	1.38±0.41	1.79±0.44
Deferoxamine	0.16±0.02*	0.10±0.01**	1.64±0.15*††	0.49±0.18*	1.52±0.11	1.31±0.35
SOD	0.08±0.01**	0.06±0.01**	1.53±0.08*††	1.28±0.58	1.30±0.46	1.54±0.13

값은 각각 7마리 흰쥐에서 평균±표준오차임.

\* p < 0.05,

\*\* p < 0.01 sham operation군과의 비교

† p < 0.05,

†† p < 0.01 허혈/재관류 대조군과의 비교

1: ml/hr/100g body weight

2: mg/hr/100g body weight



그러나 허혈/재관류 대조군에서는 허혈 기간 중에는 별 차이가 없었으나 재관류 1시간 및 5시간 후에는  $6.61 \pm 1.27$  및  $5.36 \pm 1.03$  nmole HCHO/mg protein/10min으로 sham operation군에 비하여 유의있게 감소하였다.

$\alpha$ -tocopherol 및 superoxide dismutase 투여군에서는 재관류 1시간 후에 각각  $16.16 \pm 2.76$ ,  $15.80 \pm 1.90$  nmole HCHO/mg protein/10min로 허혈/재관류 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다. Aniline p-hydroxylase 활성도는 sham operation군이 수술후 1시간에  $6.40 \pm 0.42$  nmole PAP/mg protein/15min인데 비하여 허혈/재관류 대조군에서는 재관류 1시간에  $13.87 \pm 1.82$  nmole PAP/mg protein/15min로 유의하게 증가되었으며 활성 산소 억제 및 제거 약물을 투여하였을 경우 증가가 관찰되지 않았다(표 3).

#### IV. 고찰

허혈은 생체 장기의 기능적 변동과 조직학적 손상을 초래하며, 이때 비가역적 조직 손상이 일어나기 전에 산소를 재공급하는 것이 손상 장기의 생존에 필수적이다. 그러나 산소를 재공급 할 경우 허혈시보다 심한 조직 손상이 초래되며 이 같은 재관류 손상은 재관류시 반응성이 높은 활성 산소가 생성되기 때문일 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

활성 산소 생성 기전으로는 mitochondrial cytochrome oxidase complex, xanthine oxidoreductase, arachidonic acid cascade 등이나 iron-catalyzed reaction, NADPH-dependent oxidase(respiratory burst) 등에 의하여 생성될 수 있다. 특히 허혈/재관류 손상에서의 xanthine oxidoreductase에 의한 활성 산소 생성 기전을 살펴보면, 생체 조직 내에 허혈 상태가 유발되면 에너지원인 ATP가 많이 소모되어 조직내에 hypoxanthine이 축적되고 동시에 허혈에 의한 세포내 칼슘의 증가로 단백분해 효소(calpain)가 활성화되면 xanthine dehydrogenase가 xanthine oxidase로 전환된다<sup>17)</sup>.

Xanthine dehydrogenase는 기질로부터 NAD+

로 전자를 전달시켜 산화반응을 촉진시키나 xanthine oxidase는 NAD<sup>+</sup> 대신에 산소로 전자를 전달하므로 재관류에 의하여 산소가 재도입되면 위의 purine 대사물은 더욱 쉽게 산화되어, 산소 분자는 xanthine oxidase에 의해 독성이 강한 활성 산소의 하나인 superoxide radical로 전환된다. 이렇게 생성된 superoxide radical은 생체내의 방어 기전 중의 하나로 존재하는 superoxide dismutase에 의하여 hydrogen peroxide로 되고, 이는 다시 catalase에 의하여 물과 산소 분자로 변화되거나 glutathione peroxidase에 의하여 glutathione disulphide로 변화되는 해독과정을 거치게 된다. 또한 superoxide radical과 hydrogen peroxide는 철, 구리와 같은 전위 원소 매개하에 반응하여 hydrogen radical이 생성되며 이는 반응성이 매우 높아 lipid peroxidation에 의한 세포막 손상, protein denaturation, nucleic acid denaturation 등의 조직 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 아울러 이러한 활성 산소는 위와 같은 허혈/재관류 손상의 주된 기전일 뿐만 아니라 염증, 관절염, 노화 및 암에서도 주요한 병리 생태적 역할을 한다<sup>18)</sup>.

약물 대사에는 효소에 의하여 산화, 환원, 및 가수분해시키는 방법과 세포질내의 여러 가지 물질에 조합시키는 방법이 있다. 약물을 비활성화 시키는데 필요한 oxidative metabolizing enzyme은 microsome막에 붙어 있는 복합적인 electron transport system으로서 이들 효소의 산화작용에는 NADPH와 산소가 필수적이다. 특히 간장내 microsome은 cytochrome P-450 isoenzymes을 함유하고 있고 기질(약물) 특이성을 가지고 있으므로 각 약물에 따른 대사적 다양성을 나타낸다<sup>19)</sup>. 따라서 허혈 및 재관류를 포함한 간 질환 상태에서의 cytochrome P-450 isozymes의 활성 변화는 일률적이지 아니라 약물에 따라 변화 정도가 다를 것으로 생각된다.

이번 실험에서 일반적 간장 손상의 지표로 간장 세포의 붕해(cytolysis)정도를 알아보기 위하여 혈청 aminotransferase(ALT)를 측정하고, 간장 세포의 투과성(permeability)변화를 알기 위하여 wet weight-to-dry weight ratio를 측정된 결과



이들은 허혈에 의하여 증가하기 시작했으며 재관류에 의하여 그 정도가 더욱 심하여져서 재관류 5시간까지 점차로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 활성 산소에 의한 세포막 손상의 지표로 간장 소포체의 지질과 산화 대사 산물인 malondialdehyde도 허혈/재관류로 인하여 증가하였으며, 이는 허혈/재관류로 인하여 증가하였으며, 이는 허혈/재관류에 의한 간세포 손상과 지질과산화 사이에 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각된다. 더욱이 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 투여시 모든 허혈/재관류 군에서 혈청 ALT증가 정도가 감소하고 지질과산화 대사 산물의 증가가 현저하게 억제됨을 관찰하였는데, 이는 활성 산소에 의한 세포막 지질과산화가 허혈/재관류 손상의 주요한 손상 기전임을 뒷받침해 주고 있다.

허혈/재관류 조작 후 간장의 담즙 분비량은 재관류직후부터 5시간까지 점차로 감소되었으며 특히 bile acid dependent한 분비에 관여하는 cholate 양의 감소가 주된 요인임을 알 수 있었다. 또한 superoxide dismutase나  $\alpha$ -tocopherol 전처치시 담즙 분비량의 증가를 볼 수 있었는데 이는 간장 기능 중의 하나인 담즙 분비도 허혈/재관류로 생성된 활성 산소에 의하여 그 기능이 저하된다고 볼 수 있다. 간장 재관류시 초기에 생성되는 활성 산소는 간장 세포 외에서 생성되며 이는 주로 Kupffer cell에 의해 매개되고 간세포의 손상은 그 뒤 호중구의 침윤과 관계된다고 한다<sup>20)</sup>.

간장내 허혈/재관류시 약물대사 효소계인 cytochrome P-450 system의 이상이 간장 소포체 지질 과산화와 밀접한 관계가 있으며  $\alpha$ -tocopherol 전처치로 lipid peroxidation을 감소시킨다고 한다<sup>21)</sup>. 실제로 간장 세포의 약물대사계의 기능적 손상을 야기시키는 이번 실험의 결과도 간장 세포의 산화적 스트레스의 지표로 여겨질 수 있다고 생각된다. 간장내 약물대사 효소계의 총 cytochrome P-450 양은 허혈 직후 및 재관류 1시간에는 별 변동이 없으나 재관류 5시간에는 현저히 감소하였다. 이와 같은 총 cytochrome P-450 양의 감소는 간장내 cytochrome P-450

dependent oxidase의 전반적 활성 저하를 의미하며, 이번 실험에서 전처치로 사용된 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 모두에서 오히려 증가되는 것으로 보아 활성 산소에 의한 약물 대사 효소의 활성 변동에 의한 것으로 생각된다. 생체의 실험이긴 하지만 간장 소포체 현탁액에 가해진 지질 과산화물이 간장내 약물의 산화를 억제하고 cytochrome P-450을 파괴시킨다고 한다<sup>22)</sup>.

실제 생체 내에서는 허혈/재관류로 인한 지질과산화가 간장 소포체뿐만 아니라 미토콘드리아와 같은 세포내 여러 소기관에도 영향을 주므로 또 다른 가능성을 배제할 수는 없다. 간경화 환자의 경우 활성 산소 공격에 대해 간을 보호하는 천연물질로 잘 알려진 carotenoids와 tocopherol의 혈장내 및 간장에서의 치가 매우 낮다고 하며<sup>23)</sup>, 이 두 천연 간보호물질 결핍시 약물대사 효소계의 활성 저하로 이들은 화학적 발암물질을 무독화시키지 못하여 암발생에도 영향을 준다고 한다<sup>24)</sup>.

생체의 실험에서 지질 과산화 증가시 cytochrome P-450은 cytochrome P-420으로 전환되어 감소되고 aminopyrine demethylation과 3, 4-benzopyrene hydroxylation도 cytochrome P-450의 감소와 평행하게 감소하지만 glucuronyl transferase활성은 초기 지질과산화 생성시 오히려 증가하고 지질과산화가 더욱 진행되면 다시 정상화된다고 한다<sup>25)</sup>. 이번 실험에서도 간장 허혈/재관류시 총 cytochrome P-450 양의 감소와 더불어 aminopyrine N-demethylase 활성은 감소되었으며 aniline p-hydroxylase 활성은 오히려 증가하였다. 이 두 비정상적인 양상은 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 전처치로 그 감소 혹은 증가의 정도가 완화되었다. 이같이 약물 대사의 변동이 일관되지 못함에 대한 기전은 아직 확실치 않지만 cytochrome P-450 동종 효소의 작용 양상이 허혈 및 재관류 손상으로 각기 다르게 영향을 받는 것으로 여겨진다. 이를 임상적으로 연관지어 볼 때 간질환 환자의 경우 약물에 따른 간장내 대사 및 제거가 정상에 비하여 예기치 못하게 나타날 수 있으므로 약물을 투여함에 있어

더욱 주의하여야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 간장의 허혈/재관류는 간장 분비 기능의 장애를 초래하며 이에 는 활성 산소에 의한 지질과산화가 관여함을 알 수 있었다. 특히 간장 소포체내의 cytochrome P-450 isoenzyme의 활성 변동은 여러 약물의 대사 변동을 유발할 것으로 추측된다. 또한 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물은 허혈/재관류에 의한 간 손상을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

## V. 결 론

허혈/재관류 후 일어나는 간장 분비 기능 변동 및 약물대사 효소들의 활성 변동과 지질과산화와의 관련성을 규명하고자, 간장에 허혈/재관류 조작을 한 후 간장의 담즙 분비 변동 및 약물 대사 효소계의 활성 변동을 관찰하고, 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈청 aminotransferase 활성은 간장의 허혈/재관류로 현저히 증가하였으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 투여로 그 증가가 억제되었다.
2. 간장 부종은 허혈/재관류로 증가되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물은 간장 부종을 억제하여 허혈/재관류를 시행하지 않은 sham operation군과 비슷하였다.
3. 간소포체내 지질과산화는 허혈/재관류로 증가되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 투여로 그 증가가 억제되었다.
4. 담즙 분비 기능은 허혈/재관류시에 유의하게 저하되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물 투여로 cholate 분비 감소는 억제되었으나 담즙 분비량은 별 변동이 없었다.
5. 간장 cytochrome P-450양과 NADPH-cytochrome P-450 reductase 활성도는 재관류 5시간 후에 감소되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물은 허혈/재관류로 인한 감소를 억제하였다.
6. minopyrine N-demethylase 활성도는 허혈/재관류로 감소되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제

거 약물 투여로 그 감소가 억제되었다. Aniline-p-hydroxylase 활성도는 재관류 1시간 후에 증가되었으며 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물을 투여하였을 경우 증가가 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 간장의 허혈/재관류는 간장 소포체내의 cytochrome P-450의 활성도를 변동시키고 간기능 장애를 초래하며, 이에 는 활성 산소에 의한 지질과 산화가 관여하고 활성 산소 생성 억제 및 제거 약물은 허혈/재관류로 의한 간 손상 정도를 감소시킴을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Braunwald E, Kloner RA: Myocardial reperfusion: a double edged sword? *J Clin Invest* 76: 1713-1719, 1985
2. Davis RJ, Bilkley GB, Traystman RJ: Role of oxygen free radicals in focal brain ischemia. *Fed Proc* 46: 799-807, 1987
3. Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE: Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 85: 205-211, 1979
4. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA : Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radical. *Acta Physiol Scand* 548: 47-63, 1986
5. McCord JM: Mechanisms of disease: oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 312: 159-163, 1985
6. Lawrence JH, Loomis WF, Tobias CA: Preliminary observations on the narcotic effect of xenon with a review of values for solubilities of gases in water and oils. *J Physiol* 105: 197-207, 1946
7. Omar R, Nomilos I, Piccorelli G: Prevention of postischemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 30: 510-514, 1989
8. Kawase T, Kato S, Lichber CS: Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10: 815-821, 1989

9. Shaw BW, Gordon RD, Iwatsuki S: Retransplantation of the liver. *Semin Liver Dis* 5: 394-401, 1985
10. Masugi F, Nagamura T: Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxide in the rat liver. *Int J Vit Nut Res* 46: 187-191, 1976
11. Master BSS, Willism Jr CH, Kamin H: The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome C reductase from pig liver. In Estrabrook RW, Pullman ME eds. *Emzymology*. New York, Academic Press, 1967, pp567-573
12. Mazel P: Comparison of microsome from control and phenobarbital treated rats as to NADPH-cytochrome C reductase activity. In La Du EN, Mandel HG, Way EL eds. *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition* New York, Academic Press, 1972, pp575-577
13. Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome. *J Biol Chem* 239: 2370-2378, 1964
14. Schenkman JB, Remmer H, Estrabrook RW: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* 3: 113-123, 1967
15. Mieyal J, Blumer J: Acceleration of the auto-oxidation of human oxyhemoglobin by aniline: its relation to hemoglobin catalyzed aniline hydroxylation. *J Biol Chem* 251: 3442-3445, 1976
16. Lowry OH, Rose brough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
17. Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology* 81: 22-29, 1981
18. Cross E, Halliwell B, Boresh ET, Pryor WW, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545, 1987
19. Guengerich FP: Cytochrome P-450 enzymes and drug metabolism, *Prog Drug Metab* 10: 3-84, 1987
20. Jaeschke H, Harhood A: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver, *Am J Physiol* 260:G355-G362, 1991
21. Lee SM, Clemes MG: Effect of  $\alpha$ -tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia/reperfusion, *Hepatology* 15: 276-281, 1992
22. Hrycay Eg, O' brien P: The peroxidase nature of cytochrome P-420 utilizing a lipid peroxide substrate. *Arch Biochem Biophys* 147: 28-35, 1971
23. Rocci E, Borghi A, Paolillo F, Pradell M, Casalgrandi G: Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. *J Lab Clin Med* 118: 176-185, 1991
24. Loe MA, Lowe N, Lieber CS: Interaction of drugs and retinol, *Biochem Pharmacol* 35: 3949-3953, 1986
25. Hogberg J, Bergstrand A, Jakobsson SV: Lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Eur J Biochem* 37: 51-59, 1973