

만성 신부전 환자의 혈청과산화 지질에 관한 연구

박 란 숙

승의여자전문대학 식품영양과

Serum Lipid Peroxide Levels in Chronic Renal Failure

Ran-Sook Park

Department of Food and Nutrition, Soong Eui Woman's College

= Abstract =

Serum lipid peroxide levels in 25 chronic renal failure patients undergoing hemodialysis were examined by determining TBA reaction with spectrofluorometry.

The lipid peroxide levels, 208.9 ± 88.4 nmol/ml, in the patient group was significantly higher than 152.4 ± 43.9 nmol/ml of 48 control healthy subjects.

It is likely that the elevated serum lipid peroxide levels can play a role in increasing tendency of hemorrhage and incidence of atherosclerosis in chronic renal failure patients.

서 론

생체내 지질과산화(lipid peroxidation)는 프로스타글란딘 합성, 노화 등의 정상 생리과정에서 관찰할 수도 있지만, CCl_4 중독에 의한 세포손상과 동맥경화증, 혈관질환 등을 위시한 만성 질환 발생의 병리기전의 하나로 생각되고 있다¹⁾²⁾.

지질과산화는 (1) 세포막 기능손실과 막내 효소의 장애, (2) 지질과산화 과정에서 발생한 고도의 반응성을 지닌 free radical이 효소를 불활성화 시키고 세포내 소기관의 손상을 일으키거나 (3) 세포막 지질이 지질과산화 과정을 거치는 도중에 생기는 aldehyde등에 의하여 세포 손상을 유발한다³⁾.

Lipid peroxide의 최종산물인 malondialdehyde (MDA)를 측정하기 위한 Yagi⁴⁾의 TBA를 이용한

spectrofluorometry가 개발된 이래 과산화지질 측정이 활발해지고 노화 및 동맥경화증, 혈관질환등 여러가지 만성질환과 지질과산화의 상관관계가 연구되어 왔다.

국내에서는 백등⁵⁾이 Yagi방법으로 질환자에서의 혈청 과산화지질을 보고하였으며, 이등⁶⁾은 Yagi방법을 보완한 측정법을 발표한 바 있으며, 박⁷⁾은 이들의 방법을 이용하여 지질과산화에 대한 riboflavin의 효과를 보고하였다.

만성신부전증은 주로 만성 사구체신염이나 만성 신우신염등이 진행되어 신장의 기능저하를 일으키는 질환으로 혈액투석(hemodialysis) 및 신장이식으로 치료하고 있다. 만성 신부전 환자들에서는 동맥경화증이 흔히 발생하고 반복하여 혈액투석법에 의한 치료를 받는 경우에는 빈혈 및 비출혈, 위장관계 출혈 등 출혈성 합병증이 보고되었으나 그 원인에 대해

서는 아직까지 밝혀진 바 없다⁸⁾.

만성신부전 환자에서 지질대사의 이상이 보고되고⁹⁾, 혈액투석으로 치료받는 만성신부전 환자의 적혈구막의 과산화 지질이 정상인보다 높다는 연구가 있었으므로¹⁰⁾ 본 실험에서는 혈액투석으로 치료받고 있는 만성신부전 환자들에서 혈청내 과산화지질의 증가여부를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 만성신부전 환자군

가톨릭의과대학 부속 강남성모병원 인공신장실에서 정기적으로 혈액투석으로 치료받고 있는 만성신부전 환자 25명의 혈액을 5ml씩 채취하여 실온에 방치한 후 섬유소를 제거한 뒤 3000rpm(Beckman TJ 6R)으로 원심분리하여 얻은 혈청을 사용하였다. 환자들의 연령분포는 19세~60세로 평균은 38.7세였다.

2. 대조군

가톨릭의과대학 부속 강남성모병원 건강진단센터에 내원한 사람들중에서 동맥경화증이나 고혈압, 간염 등의 만성질환이 없는 48명을 대상으로 하였으며 연령은 19~56세(평균 39.9세)였다(표 1).

3. 과산화지질 측정

이등⁶⁾의 방법을 사용하였으나 혐기성 상태를 유지하기 위한 질소 주입은 시험관 내에 질소를 3분간 유입시킨후 밀봉하여 중탕시켰다. 표준용액은 1, 1,

3, 3-tetraethoxypropane(TEP, Sigma Co.)을 5ml methanol로 만든 후 갈색병에 넣어 냉장 보관하고 working solution은 5nmol/ml 수용액을 사용하였다. 혈청내 과산화지질의 최종산물인 malondialdehyde(MDA)와 반응시킬 정색물질은 2-thiobarbituric acid를(TBA, Sigma Co.)사용하였다.

1) 1/12N H₂SO₄ 4ml를 담은 cap tube에 검사혈청 20μl로 주입한 다음 10% phosphotungstic acid 0.5ml 첨가한 후 vortex mixer로 혼합한 뒤 5분간 실온에 방치하고 나서 3000rpm에서 5분간 원침시킨다.

2) 침전물을 증류수 3ml에 재부유시키고 TBA용액 1ml와 1ml glacial acetic acid, 0.1ml FeCl₃ 용액을 넣고 혼합한다. 검량곡선을 위해 TEP 용액 0.5, 1, 2, 3, 4, 5nmol을 만들어 동일한 방법으로 처리하였다.

3) Cap tube에 질소가스를 충전시켜 혐기성 상태로 수조내에서 50분간 중탕하고 냉각시켜서 butanol 5ml를 첨가한 후 vortex mixer로 혼합한다. 포화 황산 암모늄염 0.5ml를 가한 후 3000rpm에서 5분간 원침시킨다.

4) 상등액을 얻어 spectrofluorometer(Barid-Atomic Co.)를 사용하여 extinction 515nm, emission 546nm에서 형광도를 측정하였다. 혈청과산화 지질량은 아래의 수식으로 MDA치로 나타내었다.

$$\text{Serum Lipid Peroxide} = 0.5 \times \frac{f}{F} \times \frac{1}{0.02} = \frac{f}{F} \times 25 \text{ (nmol/ml)}$$

F : TEP 0.5nmol 형광 강도

f : 혈청의 형광 강도

성적의 통계처리는 Student's t test로 하였다.

Table 1. Age distribution in control and patient groups

Age	Sex	Control group		Patient group	
		male	female	male	female
10~20		1	1	1	-
21~30		2	1	4	2
31~40		10	8	5	4
41~50		13	8	3	1
51~60		3	1	2	3

성적 및 고찰

1. Tetraethoxypropane(TEP) 검량곡선

TEP 0.5, 1, 2, 3, 4, 5nmol을 표준용액으로 하여 1% TBA 1ml와, glacial acetic acid 1ml, FeCl₃ 0.1ml를 넣어 혈청과 동일한 방법으로 각각의 표준용액 농도에서의 TEP 형광 강도를 측정하였던바 0.5nmol에서 5nmol까지에서 형광강도의 농도사이에 직선의 비례관계를 나타내었다(Fig. 1).

2. 혈청과산화 지질량

대조군의 혈청 과산화 지질은 161.7±58.3nmol/ml이고 만성신부전 환자군의 혈청 과산화 지질은

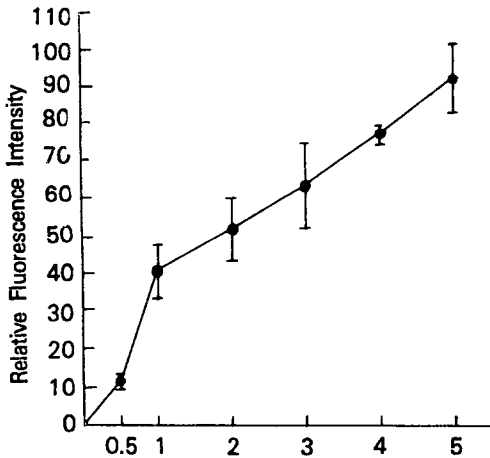


Fig. 1. Calibration curve of tetraethoxypropane(TEP) relative fluorescence intensity was measured at 515nm excitation and 546 nm emission.

Table 2. Serum lipid peroxide levels

Group	N	Mean± S.D.
Controls	48	152.4± 43.9
Chronic renal failure Patients	25	208.9± 88.4
		P<0.01

Lipid peroxide level was expressed in terms of malondialdehyde(nmol/ml) of serum.

P value was calculated by student's t-test.

208.9±88.4nmol/ml였으며 두군의 평균의 차이는 통계적으로 유의하였다(P<0.01)(표 2).

만성 신부전 환자군에서 혈청과산화 지질량이 의의있게 증가된 것은 Giardini등¹⁰⁾이 혈액투석 환자의 적혈구막의 지질과산화가 정상적혈구의 경우에 비해 증가되었다고 보고한 결과와 일치한다. 또한 이들은 혈액투석 전후의 적혈구막의 지질과산화는 차이가 없었다고 하였다.

만성 신부전 환자에서 혈청 과산화 지질이 증가된 것이 적혈구막의 지질과산화에 의한 직접적인 것인지 또는 신부전시 발생한 free hydroxyl radical 또는 hydrogen peroxide에 의한 세포손상으로 혈청과산화 지질이 증가됐으며 이로 인하여 적혈구막의 지질과산화도 증가된 것인지는 확실치 않다.

혈청내 지질과산화물 측정이 개발된 이후로 병적 현상때 조직이나 장기에서 발생한 지질과산화물과 각 질환의 상관관계가 많이 연구되어 왔다. 특히 화상이나 동맥경화증을 포함한 혈관 질환의 경우 밀접한 관계가 있으며 토끼에 linoleic acid hydroperoxide를 정맥주사한 후 24시간에 대동맥 내피세포의 손상이 관찰되었다고 하였다¹¹⁾.

혈액투석으로 치료받고 있는 만성 신부전 환자에서 보는 동맥경화증이나 출혈성 소인(素因)의 원인은 아직까지 밝혀지지 않았지만 만성 신부전으로 인해 증가된 혈청 과산화 지질이 혈관 내피세포의 손상을 일으켜 동맥경화나 출혈성 소인이 증가 또는 활성화 될 수 있다고 추정한다.

TBA반응을 이용한 과산화 지질 측정법은 lipid hydroperoxide의 분해물인 aldehyde를 측정하지만 cholesterol hydroperoxide등이 제외되고, 어떤 지질이 산화되는지 알수 없는 단점들이 지적되었다¹¹⁾. 그러나 TBA법, diene conjugation법이나, microsome의막 내 phospholipid에서 불포화지방산 소실을 측정하는 방법 그리고 막내 phospholipid의 carbonyl function을 측정하는 방법들을 비교한 결과 이들 네 가지 방법은 서로 높은 상관관계를 나타내었다고 하였다¹²⁾.

각종 질환에서의 지질과산화물 측정은 진단적 방법으로 사용하기에는 어렵다 하여도 과산화지질이 세포손상을 유발하므로 환자의 예후를 측정하거나

여러 질환에서 과산화 지질을 측정 비교 검토하므로써 질병의 발생기전이나 병태 생리에 미치는 영향을 연구할 수 있을 것이다.

맺 음 말

혈액투석(인공신장)으로 치료받고 있는 만성 신부전 환자 25명과 정상 대조군 48명의 혈청 과산화 지질을 TBA반응을 이용하여 측정하였다.

만성 신부전 환자군에서는 208.9 ± 88.4 nmol/ml로 정상 대조군 152.4 ± 43.9 nmol/ml에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었으며 이와같은 혈청 과산화 지질의 증가가 출혈성 소인이나 동맥경화증의 증가와 관계있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Yagi K . *Lipid peroxides and human disease. Chem Phys Lipids* 45 : 337-351, 1987
- 2) Freeman BA, Crapo JD . *Biology of disease, free radicals and tissue injury. Lab Invest* 412-426, 1982
- 3) Esterbauer H . *Aldehydic products of lipid peroxidation, In : Free radicals, lipid peroxidation and cancer, ed McBrien DCH & Slater TF 101-128, Academic Press, New York 1982*
- 4) Yagi K . *A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med* 15 : 212-216, 1976

- 5) 백태홍, 천현자, 전세열, 김제국 . *질환자에서의 혈청 과산화 지질. 한국 생화학회지* 16 : 260-265, 1983
- 6) 이정원, 모수미, 이태녕 . *무산소 상태에서 $FeCl_3$ 로 촉진된 thiobarbituric acid반응을 이용한 혈청중 TBA반응물의 새로운 정량법. 한국영양학회지* 17 : 31-40, 1984
- 7) 박란속 . *지질과산화에 대한 riboflavin-2', 3', 4', 5',-tetrabutylate의 억제효과. 승의논총* 10 : 347-356, 1987
- 8) 방병기 : *혈액투석의 문제점. 대한 의학협회지* 31 : 483-487, 1988
- 9) 김법완, 조준승 . *만성 신부전증 환자의 혈청 high density lipoprotein중 각종 지질과 apoprotein의 변동. 대한 의학협회지* 31 : 987-996, 1988
- 10) Giardini O, Lubrano TR, Bandino GR, Silvi I, Ruberto V, Casciani CV . *Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in hemodialysis patients. nephron* 36 : 235-247, 1984
- 11) Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN . *Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem* 160 : 7-13, 1987
- 12) Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M . *measurement of lipid peroxidation in vivo : A comparison of different procedures, Lipids* 22 : 206-211, 1987