

Guinea pig에서 alcohol과 paraquat에 의한 간독성에 미치는 selenium의 방어 효과

박상철 · 강형섭 · 이호일 · 김진상

전북대학교 수의과대학
(1996년 1월 19일 접수)

Protective effects of selenium on alcohol and/or paraquat-induced hepatotoxicity in guinea pigs

Sang-chul Park, Hyung-sub Kang, Ho-il Lee, Jin-sang Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
(Received Jan 19, 1996)

Abstract : Experiments were undertaken to examine the ability of selenium to protect against alcohol and/or paraquat-induced hepatotoxicity and to examine the additive effect between alcohol and paraquat. Protective effect against hepatotoxic functions was measured in serum from alcohol(15% v/v), paraquat(200ppm), alcohol and paraquat, and combination of sodium selenite(4ppm) in drinking water-fed guinea pigs *ad libitum* for 4 weeks.

A total of 68 healthy 7-weeks-old male animals were assigned at random to 8 treatment groups(9~13 animals/group). Body and liver weight losses, and high serum concentrations in aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT, in only paraquat group), γ -glutamyltranspeptidase(γ -GTP), cholesterol(Cho), creatinine, blood urea nitrogen(BUN), total bilirubin(TB), direct bilirubin(DB), total protein(TP), albumin and globulin as well as low values in alkaline phosphatase(ALP) and glucose were produced in a groups of alcohol or paraquat-fed. These values were not potentiated in a group given the combination of alcohol plus paraquat. Morphological changes in the liver were also observed in the alcohol or paraquat-fed group. Lipid droplet and cell swelling in the hepatocytes were observed in alcohol-fed guinea pig, especially Mallory's hyaline arounded hepatic vein. In the paraquat-fed guinea pig, lipid droplet, pyknosis and karyolysis were observed. When alcohol or paraquat was combined with selenium-fed, hyperplasia of Kupffer cell in liver were observed. However, the mean ALT, γ -GTP, Cho, BUN, TB, TP, albumin and globulin values were lower in groups given the combination of alcohol and/or paraquat plus selenium, compared with

groups given alcohol and/or paraquat. Also, the ratio of liver weight to body weight and ALP values(exception of paraquat plus selenium group) were increased by selenium. These results suggest that an adequate selenium confers marked protection against alcohol and paraquat-induced hepatotoxicity.

Key words : Hepatotoxicity, alcohol, paraquat, selenium.

서 론

Selenium은 1957년 Schwarz와 Foltz'가 흰쥐의 간에서 피사성 변성을 억제하는 생물학적 효과가 있음을 보고한 이래 selenium은 사람과 동물에서 필수 미량원소임이 밝혀졌다^{2,3}. 그러나 지난 40여년간 selenium은 주로 독성물질로 인식되어 왔으며 이전에는 selenium의 생화학적 기능에 대해서 잘 알려져 있지 않았으나 최근 많은 연구자들에 의해 그 중요성이 밝혀지고 있다. 특히 생체내 여러 효소의 필수 구성성분으로 selenium은 vitamin E와 함께 대표적인 항산화제로써 산화성 이물질로부터 생체막의 지질 과산화를 억제하는데 이 항산화 효과는 selenium 의존성 glutathione peroxidase(Se-GSH-Px)인 selenoprotein의 활성화에 의한다고 알려져 있다^{4,5}. 생체내 대사물, 약물 또는 독성물질은 생체내에서 peroxide를 생성시키는데 세포막이나 세포 구성분이 과다한 peroxide에 의해 손상될 수 있다. 이러한 손상이 일어나기 전에 GSH-Px에 의해 peroxide가 제거되며⁶ selenium이 GSH-Px의 구성성분으로 체내 GSH-Px의 지표가 될만큼 GSH-Px 활성화도에 중요한 원소이다^{5,7,8}. Selenium의 결핍은 간세포내 GSH-Px의 감소를 일으킬 뿐아니라 간의 여러 효소계 및 면역계의 변동을 초래하여⁹⁻¹¹ 질병을 일으키는데 최근 연구보고에 의하면 selenium이나 vitamin E의 결핍으로 인한 지질 과산화가 간조직의 손상을 일으킨다고 알려져 있다^{12,13}. Oxidative stress를 일으켜 세포독성을 나타내는 alcohol과 폐에서 진행성 interstitial fibrosis를 일으키는 paraquat^{14,15}는 대표적인 지질 과산화를 촉진시키는 물질로 체내 selenium이나 vitamin E의 농도를 감소시켜 GSH-Px의 활성을 억제함은 물론 다른 항산화제인 superoxide dismutase와 ascorbate를 억제한다⁹ 사실은 지질 과산화의 촉진에 의하여 간독성 및 간기능 저하를 일으킬 수 있을 것으로 추론된다. 이와같이 alcohol이나 paraquat가 지질 과산화를 일으켜 독성효과를 나타내는데¹⁵ 이중 alkaline phosphatase를 비롯한 몇몇 효

소와 몇가지 임상적 검사치를 제시하여 독성작용에 대해 언급했을 뿐^{9,11,16-18} 그 독성효과에 대한 직접적인 방어효과가 생체내에서 평가되지 못했다. 그리고 selenium은 간 microsome이나 간세포 mitochondria의 기능(GSH-Px 활성화, ATP 생성)에 중요한 역할을 담당하고 있음은 잘 알려져 있으나¹⁵ 단지 selenium이 결핍된 상태에서 지질 과산화 촉진에 의한 독성효과를 보고하였고^{5,12,19} selenium이 적절히 공급되는 조건에서 독성이나 selenium의 방어적 효과에 대해서 보고된 바 없다.

본 실험에서는 alcohol과 paraquat를 단독 또는 혼합 급여시 guinea pig 간기능의 변동과 두 물질의 상승 독작용을 평가하고 이들의 독성에 대한 selenium의 방어적 효과를 관찰하기 위하여 간기능 평가의 지표인 효소 및 생화학적 임상검사를 실시하였고 아울러 간조직의 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 체중 250g 내외의 숫컷 guinea pig (7주령) 68수를 대조군, 4ppm selenium군, 15% alcohol군, 200ppm paraquat군, 15% alcohol+200ppm paraquat 혼합군, 4ppm selenium+15% alcohol 혼합군, 4ppm selenium+200ppm paraquat 혼합군 및 4ppm selenium+15% alcohol+200ppm paraquat 복합군 모두 8군(Table 1 참고)으로 분류하여 각각의 약물을 각 군의 음수에 혼합하여 4주간 자유롭게 섭취하도록 하였다. Selenium(sodium selenite, Fluka)은 증류수에 녹인 4,000ppm의 원액을, paraquat(dipyridyl herbicides, 1-1-dimethyl-4, 4-bipyridium ion dichloride salts, 한정화학)은 증류수에 희석한 200,000ppm의 원액을 음수에 희석하였고, alcohol(99.9%, Hayman Limited)은 음수에 희석(15% v/v)하여 급여시켰다. 실험기간동안 사료(삼양사)는 모든 군에 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험방법 : 4주후 ether로 마취하여 고정된 후

복부 정중선을 절개하여 복대동맥으로부터 채혈하였다. 혈액은 상온에서 응고시킨 다음 원심분리(1,500rpm)하여 혈청을 얻은 즉시 automatic analyzer (Hitachi 7150)를 이용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), γ glutamyltranspeptidase(γ GTP), cholesterol, triglyceride, glucose, creatinine, blood urea nitrogen(BUN), total bilirubin, direct bilirubin, total protein 및 albumin 함량을 측정하였으며 각각의 항목 측정을 위해 3-10 μ l의 혈청이 사용되었다.

조직병리학적 관찰 : 채혈후 간장을 전체 적출하여 무게를 측정한 다음 즉시 10% 중성 완충 포르말린 용액에 넣어 고정하였다. 고정된 조직의 일부를 취하여 일반조직 처리과정을 거친 다음 paraffin 절편(5 μ m)을 만들어 H & E 염색하여 조직 병리학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다. 각군에서 얻어진 실험성적은 nonpaired Student's *t*-test로 유의성을 검정하였다.

결 과

체중 및 간 중량 : 4주간 각각의 약물을 단독 또는 혼합급여한 결과 대조군과 selenium 급여군의 중체량은 245 \pm 19.5g으로 양군의 차이가 없었으나 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군은 대조군보다 체중증가가 없거나 현저히 낮았다(자료 미제시). 상기 3개군에 selenium을 혼합급여한 결과 alcohol 급여군보다 selenium 혼합급여군에서 경미하게 증가되는 경향이었고 alcohol-paraquat에 selenium의 혼합급여는 alcohol-paraquat 급여군보다 유의하게 높아졌다. 역시 간 중량도 각군에서 체중과 비슷한 양상이 관찰되었다. 특히 alcohol에 selenium을, alcohol-paraquat에 selenium을 혼합급여한 경우 유의하게 증가되었다. 체중 kg당 간 중량비를 역시 두 독성물질의 단독 또는 혼합급여로 감소되는 경향이었고 이 중량 비율에 대하여 selenium 혼합급여는 뚜렷한 증가효과가 있었다. 그러나 체중, 간 중량 및 그 비율에 있어서 paraquat 작용에 대해서는 selenium의 방어효과가 관찰되지 않았고, 지질 과산화 촉진에 의한 간독성을 나타내는 alcohol과 paraquat를 혼합급여할 경우 단독

급여군보다 체중 및 간 중량은 유의하게 감소되었으나 그 비율은 단독급여군과 비슷한 경향을 보였다(Table 1).

혈중효소활성도 : 간 독성시 간 기능을 알아보기 위해 주로 측정되는 효소활성도를 혈청내에서 측정하여 각 군별로 비교 검토하였다. Selenium 급여군에서는 AST와 ALT가 대조군과 차이가 없었으나 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군은 대조군보다 유의성 있게 감소되거나 증가되었다. 그러나 이들 물질에 selenium을 혼합급여군에서 alcohol에 의한 AST와 ALT의 검사치에 대해서 alcohol 단독급여군에 비하여 selenium의 방어효과를 나타내지 않았으나 paraquat 또는 alcohol-paraquat 급여군에서 두 효소의 검사치에 비하여 selenium 급여로 방어효과가 있었다. Selenium 급여군 자체는 ALP 활성도를 감소시켰고, 역시 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 ALP가 현저히 감소되었으나 selenium 혼합급여군에서는 alcohol 단독 및 alcohol-paraquat 급여군에서 보다 ALP가 증가되어 방어효과가 있었다. 그러나 paraquat 단독급여에 의한 ALP 감소치에 비하여 selenium 혼합급여에서 더욱 감소되어 selenium에 의해 방어효과가 없었다. Selenium 급여군의 γ -GTP는 대조군보다 증가되었고, 역시 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군의 γ -GTP가 현저히 증가되었다. 또한 이들 물질에 의한 γ -GTP가 증가 되었으나 selenium의 추가 급여한 군에서는 γ -GTP가 감소되어 대조군과 비슷한 결과치를 보였다. Alcohol-paraquat 급여군에서 모든 효소활성도가 증가되거나 감소되었는데 이는 단독급여군 보다 더욱 강화되지는 않았다(Table 2).

혈중 일반 생화학적 검사 : Selenium만의 급여군에서 대조군에 비하여 혈청내 triglyceride와 glucose가 감소되었고 cholesterol, creatinine 및 BUN은 변동되지 않았다. Alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 cholesterol, creatinine 및 BUN이 유의성 또는 고도의 유의성 있게 증가 또는 감소되었고 이러한 모든 검사치에 비하여 selenium 혼합급여군에서는 유의성 또는 경미하게 억제되는 경향이였다. 그러나 alcohol-paraquat 급여군에 selenium의 혼합급여를 제외한 alcohol이나

Table 1. Effect of alcohol, paraquat and/or selenium on body weights and liver weights in experimental animals

Groups	Liver wt.g	Body wt.g	Liver wt/body wt.mg/kg	No.of animals
Control	16.56±0.91	454.4±23.5	36.55±1.78	11
4 ppm Selenium	15.96±1.17	450.4±24.7	35.44±1.61	9
15% Alcohol	9.19±0.65**	320.8±25.7**	28.65±0.72**	13
200 ppm Paraquat	12.56±1.28*	383.4±22.0*	32.77±1.35	12
15% 200ppm Alcohol + Paraquat	8.2±0.37**	252.8±10.2***	33.12±0.58	12
4ppm 15% Selenium + Alcohol	12.69±0.83 ^u	396.1±27.6	32.04±0.80 ^v	10
4ppm 200ppm Selenium + Paraquat	12.93±1.02	357.6±21.2	36.14±1.88	9
4ppm 15% 200ppm Selenium + Alcohol + Paraquat	14.67±1.39 ^v	376.2±24.5**	36.00±1.91 ^v	12

Values are means ±SE.

All comparisons between group and group were made with group *t* test.

p*<0.05, *p*<0.001 compared with the control group.

^u*p*<0.01, ^v*P*<0.005 compared with the 15% alcohol group.

p*<0.01, *p*<0.001 compared with the 15% alcohol + 200 ppm paraquat group.

Table 2. Effect of alcohol, paraquat and/or selenium on serum enzyme activity in guinea pigs

Groups	AST(U/I)	ALT(U/I)	ALP(U/I)	GGT(U/I)
Control	83.63±4.72	68.00±2.72	431.88±18.84	15.75±0.73
4 ppm Selenium	88.83±7.79	68.33±6.81	347.00±35.93	18.83±0.79*
15% Alcohol	106.44±7.91*	59.89±2.65**	229.44±17.51***	20.44±0.53
200 ppm Paraquat	122.50±10.69*	131.67±9.22***	293.67±21.42***	21.83±1.17**
15% 200ppm Alcohol + Paraquat	109.00±9.34*	95.14±9.67	248.43±16.34***	21.71±1.49**
4ppm 15% Selenium + Alcohol	103.88±8.44 ^u	63.38±3.71	351.88±20.99 ^u	16.12±1.12 ^v
4ppm 200ppm Selenium + Paraquat	100.67±10.41	78.67±12.17 ^v	250.17±28.06	16.67±0.33 ^v
4ppm 15% 200ppm Selenium + Alcohol + Paraquat	82.137±7.09 ^v	62.75±3.22 ^v	347.50±24.01**	15.00±1.18**

Values are means ±SE.

All comparisons between group and group were made with group *t* test.

p*<0.05, ^u*p*<0.01, **p*<0.001 compared with the control group.

^v*p*<0.01, ^v*p*<0.001 compared with the 15% alcohol group.

^v*p*<0.01 compared with the 200ppm paraquat group.

P*<0.05, *p*<0.01 compared with the 15% alcohol + 200ppm paraquat group.

Table 3. Effect of alcohol, paraquat and/or selenium on specific biochemical function in guinea pig serum

Groups	Tch(mg/dl)	TG(mg/dl)	Glucose(mg/dl)	Creatinine(mg/dl)	BUN(mg/dl)
Control	39.88±2.32	46.75±2.94	179.12±8.24	0.46±0.03	22.38±1.22
4 ppm Selenium	37.50±2.26	36.00±2.29**	120.00±4.21***	0.43±0.02	23.75±0.83
15% Alcohol	94.00±8.48***	50.44±4.05	119.83±5.83***	0.57±0.02**	29.46±1.88**
200 ppm Paraquat	52.33±1.54***	40.00±1.75*	128.20±5.65***	0.55±0.02	27.4±1.60*
15% 200ppm Alcohol + Paraquat	88.00±4.87***	56.86±3.73*	109.29±12.42***	0.53±0.02	35.23±1.58***
4ppm 15% Selenium + Alcohol	46.88±3.40***	47.75±3.93	108.62±9.75	0.44±0.02 ^{ns}	24.43±1.02 ^{ns}
4ppm 200ppm Selenium + Paraquat	48.67±4.20	52.50±1.98 ^{ns}	125.67±9.28	0.45±0.02 ^{ns}	30.27±2.66
4ppm 15% 200ppm Selenium + Alcohol + Paraquat	46.25±3.79 ^{ns}	61.25±3.22	132.88±7.16	0.41±0.01*	23.41±0.35 ^{ns}

Values are means±SE.

All comparisons between group and group were made with group *t* test.

p*<0.05, *p*<0.01, ****p*<0.001 compared with the control group.

¹*p*<0.01, ¹¹*p*<0.001 compared with the 15% alcohol group.

¹*p*<0.01, ¹¹*p*<0.001 compared with the 200 ppm paraquat group.

¹*p*<0.001 compared with the alcohol + 200 ppm paraquat group.

Table 3. Continued

Groups	T.Bil(mg/dl)	D.Bil(mg/dl)	T.P(g/dl)	Albumin(g/dl)	Globulin(g/dl)	Albu/Glo Ratio
Control	0.71±0.10	0.21±0.05	5.14±0.17	3.20±0.08	1.94±0.15	1.73±0.15
4 ppm Selenium	1.37±0.23*	0.43±0.07*	5.62±0.14	3.17±0.03	2.45±0.12*	1.31±0.06*
15% Alcohol	2.39±0.30***	0.77±0.04	6.91±0.22***	3.84±0.07***	3.07±0.25	1.31±0.09*
200 ppm Paraquat	2.05±0.21*	0.50±0.07***	6.40±0.10***	3.17±0.06	3.23±0.11***	0.99±0.05**
15% 200ppm Alcohol + Paraquat	2.54±0.48**	0.81±0.16**	6.81±0.28***	3.70±0.10**	3.11±0.33*	1.28±0.14*
4ppm 15% Selenium + Alcohol	1.51±0.09 ¹	0.49±0.04 ¹¹	5.73±0.09 ¹¹	3.38±0.03 ¹¹	2.35±0.08 ¹	1.45±0.05
4ppm 200ppm Selenium + Paraquat	1.60±0.15	0.52±0.09	5.90±0.06 ¹¹	3.05±0.04	2.85±0.07 ¹	1.07±0.03
4ppm 15% 200ppm Selenium + Alcohol + Paraquat	0.71±0.12 ^{ns}	0.21±0.04 ^{ns}	5.19±0.12 ^{ns}	3.05±0.06***	2.15±0.13*	1.46±0.11

Values are means±SE.

All comparisons between group and group were made with group *t* test.

p*<0.05, *p*<0.001, ****p*<0.001 compared with the control group.

¹*p*<0.05, ¹¹*p*<0.001, compared with the 15% alcohol group.

¹*p*<0.05<¹¹*p*<0.01 compared with the 200 ppm paraquat group.

¹*p*<0.05, ¹¹*p*<0.01, ¹¹¹*p*<0.001 compared with the 15% alcohol + 200 ppm paraquat group.

paraquat 급여군에서 glucose가 감소되었고 여기에 selenium의 혼합급여군 역시 glucose가 감소되었다. 대부분 alcohol-paraquat 급여군에서는 이들 단독급여군보다 생화학적 검사치의 증가 및 감소효과가 강화되지는 않았다. Selenium 급여군에서 대조군에 비하여 total bilirubin, direct bilirubin 및 globulin이 증가되었고 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서는 paraquat 급여군의 albumin을 제외한 모든군에서 total bilirubin, direct bilirubin, total protein 및 globulin이 현저히 증가되었으나, 이들 물질과 selenium을 혼합급여한 군에서는 이들 단독급여군보다 현저히 감소되어 selenium의 방어효과가 관찰되었다. 간 실질장해 여부를 알아보기 위하여 albumin/globulin의 비율을 비교해본 결과 대조군보다 selenium, alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 감소되었고, 이들에 selenium을 혼합군에서는 단독급여군보다 다소 증가되어 alcohol 및 paraquat는 간 실질에 영향을 주며 이에 대한 selenium의 방어효과가 있음을 알 수 있었다(Table 3).

간장의 조직병리학적 결과 : Selenium군에서는 대조군과 비교하여 간 세포의 일반형태가 큰 변화가 없었으나 핵의 변화와 세포질의 변화가 비슷한 반면 alcohol군에서는 간 세포내 지방소적을 갖고 있는 종창된 세포들이 보였으며, 소수의 다양한 수포가 알콜성 간 질환시 발견되는 조직변화상과 같이 간 소엽내에 산재되어 나타났다(Figs 1,2,3). 특히 alcohol군에서 종창된 간소엽 문맥 주변부의 간세포에 많은 초자양 물질(Mallory's hyaline)을 나타냈다(Fig 3). Paraquat 급여군은 간소엽의 문맥 주변부에 종창된 간세포는 많지 않았으나 수포를 다수 관찰할 수 있었다(Fig 4). 이들 군에 selenium을 혼합급여한 군들에서는 간세포에서 세포 분열상을 보이는 회복상 증거 즉, 이핵성 및 다핵성 간세포가 나타나고 색소침착을 한 Kupffer 세포가 과증식되는 현상이 나타났다(Figs 6~8).

고 찰

간은 화학물질, 생물학적으로 유래된 독성물질 및 중금속 등의 1차성 간독성물질에 의해 직접적으로 손

상받는다²⁰. 이들 독성물질에 의한 간독성 작용기전은 두가지로 분류되는데 첫째, 간 지질의 과산화에 의한 생체막 손상²¹ 둘째, 독성물질의 대사산물이 세포막 지질이나 단백질과의 공유결합에 의한 세포손상을 입는 것으로 알려져 있다¹⁵. 이중 지질 과산화는 병리학적으로 mitochondria와 lysosome의 종창과 분해를 일으키며²² 생화학적으로 microsome의 지질 과산화물은 glucose-6-phosphatase, cytochrome P-450 및 UDP-glucuronyltransferase의 감소를 일으킨다^{23,24}. 그리고 생체내 간 mitochondria와 endoplasmic reticulum에서 지질 과산화는 간세포 구성분의 기능이상, 손상된 mitochondria 산화성 대사와 microsome의 cytochrome P-450의 양적 감소와 관련된다¹⁵. 이와같은 지질 과산화에 의한 간세포의 손상을 억제하는 효소의 작용기전으로 GSH-Px가 중요하다. 즉, 간 microsome의 지질 과산화가 GSH-Px에 의해 억제되는데 이 GSH-Px 작용은 vitamin E와 같은 항산화제에 의함을 의미하며²⁵ 이 GSH-Px는 GSSG(glutathione disulfide)로 산화되어 다시 GSH-Px로 환원되기 위해서는 NADPH-의존성 GSH-Px가 필요하다¹⁵. 역시 간세포에서 cytoplasm은 selenium 의존성 GSH-Px를 함유하여 free fatty acid hydroperoxide를 환원시킨다¹⁵. 그래서 지질 과산화에 의한 간 손상을 억제하기 위해서는 GSH-Px의 활성을 증가시키는 일이 보다 중요하다. 항산화제인 selenium은 GSH-Px의 보조인자 즉, 보결분자의 필수성분으로 selenium-GSH-Px인 selenoprotein을 활성화시켜 지질 과산화물 분해를 촉매하는 catalase로 작용한다⁴⁻⁶. 만약 selenium이나 vitamin E 등 미량 원소가 식이적으로 체내에 결핍되거나 어떤 물질에 의해서 체내농도가 감소된다면 지질 과산화 반응이 촉진되어 세포손상이 일어날 것이다.

Alcohol과 paraquat는 간장에서 지질 과산화를 촉진시키는 대표적인 물질로 알려져 있다. 영양학적으로 습관성 alcohol 섭취자^{12,26} alcohol성 간경화증 환자¹³에서 혈청내 selenium과 vitamin E의 감소 또는 GSH-Px 활성도 감소 등의 보고는 지질 과산화 촉진을 의미하며, 실험적으로 selenium이나 vitamin E를 결핍시킨 동물에서 alcohol이나 paraquat를 투여한 경우 그 독성효과와 강화^{27,28}, 지질 과산화의 촉진²⁹을 보고하였다. 또한 흰쥐에 ethanol 급여는 간에서 vitamin E의 대사를 변동시키고 낮은 농도의 vitamin E를 급여할 경우 γ -tocopherol량을 감소시켜 간은 free radical에 민감하게 반

용하여 손상되거나²⁹ low-molecular-weight non-heme iron complexes의 농도를 증가시켜 지질 과산화를 촉진시킨다고 한다³⁰. 그러나 만성 alcohol 급여시 급성 중독량을 투여하면 지질 과산화가 강화되는데 이 강화작용은 alcohol 자체에 의한 것이지 GSH-Px 억제에 의한 것은 아니라고 하였다³¹. 그리고 paraquat에 의한 지질 과산화는 NADPH-cytochrome P-450 reductase에 따라 그 정도가 달라진다³². 그런데 alcohol이나 paraquat에 의한 지질 과산화, GSH-Px 활성 감소와 독성효과가 selenium에 의해서 억제되므로^{33,34} 그 방어기전이 항산화에 의함을 추측할 수 있다. Selenium이나 vitamin E 뿐만 아니라 몇몇 약물이 alcohol이나 paraquat의 지질 과산화에 의한 독성에 억제적 효과를 보고하였다. 간과 소뇌에서 alcohol에 의한 oxidative stress가 allopurinol이나¹⁶ clausenamide에 의한 GSH-Px 활성 증가에 의해서³⁵ 억제되므로 allopurinol은 alcohol에 의한 간장 손상 치료에 이용 가능성이 있음을 주장한 바 있다¹⁶. 또한 간장에서 paraquat에 의한 지질 과산화가 melatonin³⁶이나 phenobarbital³⁷에 의해 억제되며 thiosulfate와 sulfite에 의해서도 억제되는데 이는 아마 glutathione 의존성 해독효과로 추정하였다³⁸.

상기 내용을 종합해볼 때 alcohol이나 paraquat는 주로 지질 과산화를 촉진시켜 간 실질세포나 간 기능에 손상을 일으키므로 본 실험에서는 직접실험동물에 이를 급여시켜 alcohol성 간염과 같은 간 질환시 변동되는 혈청내 AST, ALT, ALP 및 γ -GTP와 일반 생화학적 검사를 실시하여 그 독성효과를 확인하고 이에 대한 selenium의 방어효과를 검토하였다. 본 실험에서 alcohol, paraquat 및 alcohol과 paraquat의 혼합투여한 결과 AST, ALT 및 γ -GTP의 증가와 ALP의 감소가 관찰되어 간기능에 뚜렷한 영향이 있음을 확인하였다. 단지 alcohol 투여군에서 ALT의 유의한 감소를 보여 간괴사를 의심하였으나, 역시 조직학적 소견에서 간 정맥 주위의 종창된 세포속에 분홍색 초자양 물질(Mallory's hyaline)이 있고 간세포 부위에 다형핵 백혈구가 보여 괴사되었음을 알 수 있었다. 그러나 selenium의 추가 급여에 의해서 alcohol군의 AST, paraquat군에서 ALT와 ALP를 제외한 모든 효소의 활성도 변동이 현저히 억제되었다. 이와같은 결과는 alcohol과 paraquat의 급여가 간 기능의 지표가 되는 혈청내 효소활성도에 영향을 미치는데 이에 대한 selenium의 방

어효과가 뚜렷함을 관찰하였다. 이전 연구자들에 의하면 만성 alcohol 섭취자나³⁹ ethanol를 급여한 흰쥐에서 혈청내¹⁷ 또는 간 세포막의 γ -GTP가 증가되었고, paraquat를 급여한 토끼¹¹, selenium이 결핍된 송아지에서⁴² ALP가 감소되었으며 개⁴³와 흰쥐에서^{44,45} AST와 ALT가 증가되었다는 결과는 본 실험결과와 일치하였다. 반면 alcohol를 급여한 흰쥐에서 ALP가 증가하였다고 하였다^{44,45}. 그러나 이들은 독성물질에 의한 효소활성도 변화와 아울러 selenium의 억제작용을 추구하지 않았으며 본 실험결과와 같이 alcohol 중독이나 간기능의 지표가 되는 효소활성도³⁹와 일반적인 생화학적 검사를 동시에 실시하지 않았다. Alcohol과 paraquat는 간독성을 일으키는 물질이기 때문에 이 두 약물을 혼합급여하면 독성 작용이 상승되어 효소활성도 변동이 더욱 클 것으로 예측하였으나 그렇지 않았고, 이 두 약물을 혼합 급여할 때 selenium에 의해서 더욱 독작용이 강하게 억제되었다(Table 2). 이는 흰쥐에서 ethanol이 paraquat의 독성을 감소시켰다는 보고⁴⁰와 일치하였다. 본 실험에서 혈청내 효소활성도 이외에 일반 생화학적 검사를 실시하였다. Paraquat에 의한 triglyceride와 albumin을 제외한 모든 군에서 cholesterol, triglyceride, creatinine, BUN, direct bilirubin, total protein, albumin 및 globulin이 모두 증가되어 개에서 paraquat에 의해서 creatinine, cholesterol 및 total bilirubin이 증가되었다는 일부 보고치^{43,44}와 일치하였다. 본 실험에서 단지 glucose만이 alcohol이나 paraquat에 의해서 감소되었는데 토끼에서 paraquat에 의해 glucose가 증가되었다¹¹는 결과와는 일치하지 않았다. 그리고 간 실질장해 여부를 추정하기 위해 albumin/globulin 비율을 비교해본 결과 대조군보다 selenium, alcohol, paraquat 및 alcohol과 paraquat의 혼합투여군에서 감소되었고, 여기에 selenium의 혼합투여는 단독투여군보다 다소 회복되는 경향을 보여 alcohol 및 paraquat는 간 실질에 손상을 줄 수 있으며 이는 조직소견에서도 alcohol 및 paraquat군에서 심한 지방변화를 말초부위 간 실질에서 보였다.

본 실험은 *in vivo* 실험이기 때문에 투여한 약물이 간 뿐만 아니라 다른 실질기관이나 system에 영향을 주고 더구나 혈청내의 생화학적 검사와 조직소견의 결과로 간독성에 대한 실험이라고 단정하기는 어렵다. 그러나 간독성의 결과로 해석한 이유는 다음과 같다. 첫째, 간장은 외부 독성물질에 대해서 1차적으로 노출되는 기

관이고 둘째, alcohol과 paraquat은 간장에서 지질 과산화물을 일으켜 간독성을 일으키는 대표적인 물질이며 셋째, 간기능의 지표가 되는 효소 및 임상생화학적 검사치가 현저히 변동되었고 끝으로 병리조직학적으로도 간세포의 손상이 관찰되었다. 결국 간증량, 체중, 혈청내 효소활성도 및 생화학적 검사치에 대한 alcohol과 paraquat의 독작용이 상기와 같이 selenium의 첨가로 뚜렷하게 억제되었다. 즉, selenium이 지질 과산화를 일으켜 간독성을 일으키는 물질에 대해 현저한 방어효과가 있음을 지적한다. 그러므로 alcohol성 또는 기타 지질 과산화성 물질에 의한 간질환에 selenium을 치료학적으로 이용될 수 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

기니피에서 alcohol과 paraquat에 의한 간독성에 미치는 selenium의 방어효과를 알아 보기 위하여 7주령 수컷 guinea pig를 9~13수 씩 대조군, alcohol군, paraquat군, alcohol과 paraquat군 및 상기 약물과 selenium 복합 급여군, 모두 8군으로 구분하여 4주간 상기 약물을 음수에 섞어 급여시켰다. 4주후 체중과 간증량 그리고 혈중 효소활성도와 혈중 일반생화학적 검사치인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), γ glutamyltranspeptidase(γ GTP), cholesterol(Cho), creatinine, blood urea nitrogen(BUN), total bilirubin(TB), direct bilirubin(DB), total protein(TP), albumin, globulin, alkaline phosphatase(ALP)와 glucose를 측정하였고 간의 조직병리학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 체중 및 간 증량 변동에 있어서 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군은 대조군보다 증체량이 없거나 현저히 낮았고 상기 3개군에 selenium을 혼합급여한 결과 alcohol 급여군보다 alcohol과 selenium 혼합급여군에서 경미하게 증가되는 경향이었으나 alcohol-paraquat-selenium 혼합급여군은 alcohol-paraquat 급여군보다 유의하게 높아졌다.

2. 혈중 효소활성도에 있어서 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군은 AST와 ALT가 대조군보다 유

의성 있게 높거나 낮았다. 이들 물질에 selenium을 혼합급여한 결과 paraquat 또는 alcohol-paraquat에 의한 두 효소의 측정치에 대해서 selenium급여로 방어효과가 있었다. 또한 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 ALP가 현저히 감소되었으나 selenium 혼합급여군은 alcohol 단독 및 alcohol-paraquat 급여군에서 보다 ALP치가 증가되었다. γ GTP에 있어서도 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat급여군은 현저히 증가되었고 이들 물질에 selenium의 급여군에서는 γ GTP치가 감소되어 대조군과 비슷한 결과치를 보였다.

3. 혈중 일반생화학적 검사치에 있어서 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 cholesterol, creatinine 및 BUN이 유의성 있게 증가되었거나 감소되었고, 이러한 모든 변동에 비하여 selenium 급여군에서 다소 억제되는 경향이였다. Selenium 급여군에서 대조군에 비하여 total bilirubin, direct bilirubin 및 globulin이 증가되었고 역시 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서는 paraquat 급여군의 albumin을 제외한 모든군에서 현저히 증가되었으나, 이들 물질과 selenium을 혼합급여한 군에서는 이들 단독급여군 보다 현저히 억제되어 selenium의 방어효과가 관찰되었다.

4. albumin/globulin의 비율을 비교해 본 결과 alcohol, paraquat 및 alcohol-paraquat 급여군에서 감소되었고 이들에 selenium을 혼합군에서는 단독급여군보다 다소 증가되어 alcohol 및 paraquat은 간실질에 영향을 주며 이에 대한 selenium의 방어효과가 있음이 관찰되었다.

5. 조직병리학적 소견에서도 alcohol군에서 간조직내 지방 소적을 갖고 있는 종창된 세포들이 간정맥 주위에 많이 발견되었고 분홍색의 초자양 물질(Mallory's hyaline)을 갖고 있다. Paraquat군은 종창된 세포는 보이지 않으나 지방 소적이 나타났으며 핵농축과 용해가 나타났다. 이들 약물에 selenium을 혼합급여한 군들에서는 이핵성 및 다행성 간세포가 나타나고 색소침착을 한 Kupffer 세포가 과증식되는 현상이 나타났다.

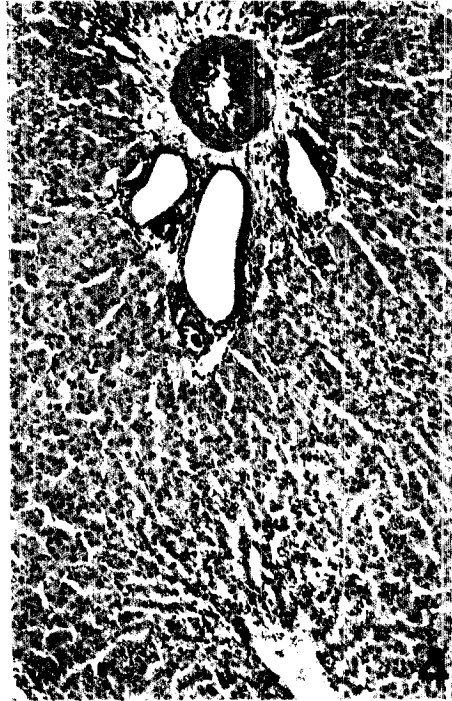
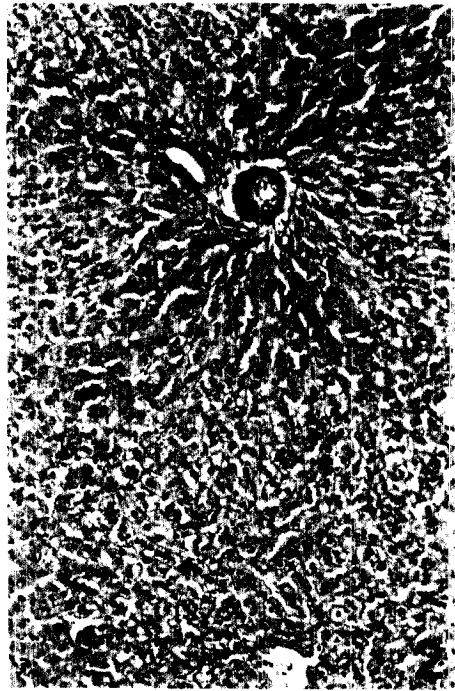
상기 결과를 종합할 때 alcohol 및 paraquat은 간 기능에 영향을 미치며 이때 적절한 selenium의 급여는 간 독성에 현저한 방어효과가 있음을 알 수 있었다.

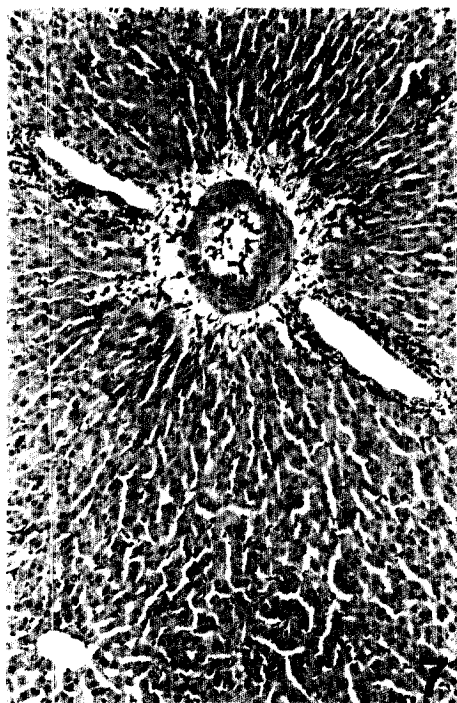
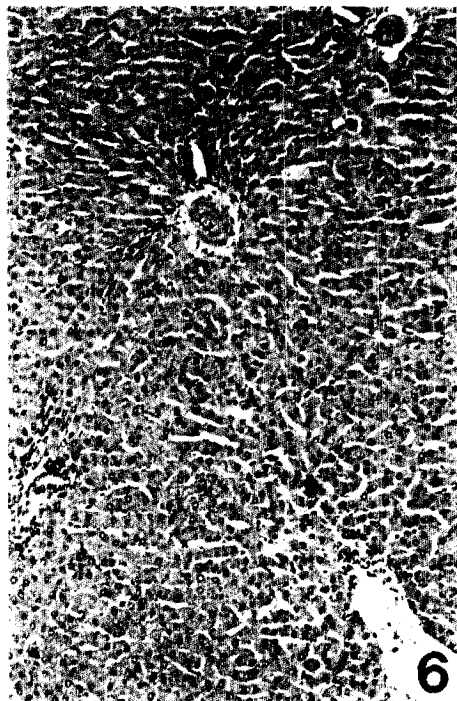
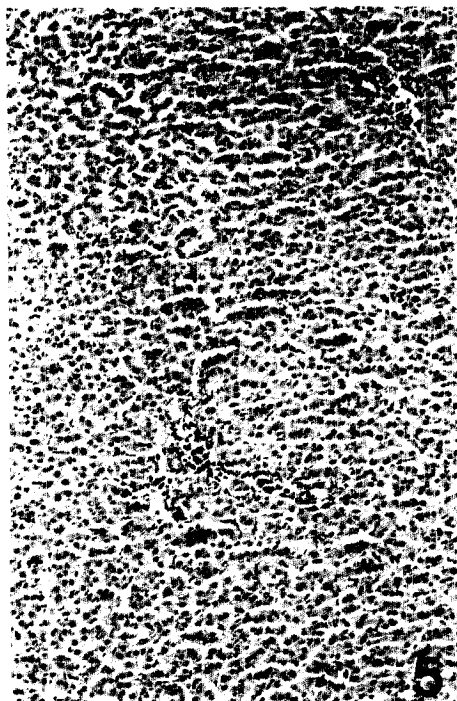
Legends for figures

- Fig 1. Liver of normal guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 2. Liver of 4ppm selenium-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 3. Liver of 15% alcohol-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 4. Liver of 200ppm paraquat-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 5. Liver of 15% alcohol plus 200ppm paraquat-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 6. Liver of 15% alcohol plus 4ppm selenium-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 7. Liver of 200ppm paraquat plus 4ppm selenium-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).
Fig 8. Liver of 15% alcohol plus 200ppm paraquat and combination of 4ppm selenium-fed guinea-pig ($\times 100$, H-E stain).

참 고 문 헌

- Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem*, 79 : 3292~3293, 1957.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179 : 588~590, 1973.
- Young VR. Selenium: A case for its essentiality in man. *NEJM*, 304 : 1228~1230, 1981.
- Hoekstra WG. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc*, 34 : 2083~2089, 1975.
- Combs GF Jr, Combs SB. The nutritional biochemistry of selenium. *Ann Rev Nutr*, 4 : 257~290, 1984.
- Naguchi T, Cantor AH, Scott ML. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. *J Nutr*, 103 : 1502~1511, 1973.
- Hoffman C, Rivinus B, Swanson L. Effect of intramuscular administration of selenium and vitamin E in dairy heifers on erythrocyte glutathione peroxidase activity and blood selenium levels. *J Anim Sci*, 47 : 192~197, 1978.
- Sane HW, Drudrick S, Warren DC. Blood selenium levels and glutathione peroxidase activities in university and chronic intravenous hyperalimentation subjects. *Proc Soc Exp Biol Med*, 167 : 383~390, 1981.
- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol*, 25 : 231~237, 1990.
- Roy M, Kiremidjian—Schumacker L, Wishe HI, et al. Selenium and immune cell functions. II. Effect on lymphocyte-mediated cytotoxicity. *PSEBM*, 193 : 143~148, 1990.
- Raja M, al-Fatah A, Ali M, et al. Modification of liver and serum enzymes by paraquat treatment in rabbits. *Drug Metabol Drug Interactions*, 10 : 279~291, 1992.
- Ringstad J, Knutsen SF, Nilssen OR, et al. A comparative study of serum selenium and vitamin E levels in a population of male risk drinkers and abstainers. A population-based matched-pair study. *Biol Trace Elem Res*, 36 : 65~71, 1993.
- Bell H, Bjorneboe A, Eidsvoll B, et al. Reduced concentration of hepatic alpha-tocopherol in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol*, 27 : 39~46, 1992.
- Murray RE, Gibson JE. A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys. *Exp Mol Pathol*, 17 : 317~325, 1972.
- Recknagel RO, Glunde EA, Britton RS. Free radical damage and lipid peroxidation. In : Meeks RG, ed. *Hepatotoxicology*, Boca Raton, Florida: CRC, 401~436, 1991.
- Kato S, Kawase T, Alderman J, et al. Role of xan-





- thine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology*, 98 : 203~210, 1990.
17. Yamada S, Wilson JS, Lieber CS. The effects of ethanol and diet on hepatic and serum γ -glutamyltranspeptidase activities in rats. *J Nutr*, 115 : 1285~1290, 1985.
 18. Antonenkov VD, Panchenko LF. Effect of chronic ethanol treatment under partial catalase inhibition on the activity of enzymes related to peroxide metabolism in rat liver and heart. *Int J Biochem*, 20 : 823~828, 1988.
 19. Combs GF Jr, Scott ML. Nutritional interrelationships of vitamin E and selenium. *Bio Sci*, 27 : 467~473, 1977.
 20. Zimmerman H. *Hepatotoxicity*, 1st ed. New York, 1978.
 21. Kappus H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 45 : 105~115, 1987.
 22. Hoffsten PE, Hunter FE Jr, Gebicki JM, et al. Formation of lipid peroxide under conditions with lead to swelling and lysis of rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 7 : 276~280, 1962.
 23. Recknagel RO, Glende EA Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal damage. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2 : 263~297, 1973.
 24. de Groot H, Noll T, Tolle T. Loss of latent activity of liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. Studies of nucleoside diphosphatase, glucose-6-phosphatase, and UDP glucuronyl-transferase. *Biochem Biophys Acta*, 815 : 91~96, 1985.
 25. Reddy CC, Scholz RW, Thomas CE, et al. Vitamin E dependent reduced-glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci*, 31 : 571~576, 1982.
 26. Snook JT. Effect of ethanol use and the lifestyle variables on measures of selenium status. *Alcohol*, 8 : 13~16, 1991.
 27. Bus JS, Aust SD, Gibson JE. Lipid peroxidation : a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 11 : 31~38, 1975.
 28. Omaye ST, Reddy KA, Cross CE. Enhanced lung toxicity of paraquat in selenium-deficient rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 43 : 237~247, 1978.
 29. Kawase T, Kato S, Lieber CS. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology*, 10 : 815~821, 1989.
 30. Houze P, Rouch H, Gentil M, et al. Effect of allopurinol on the hepatic and cerebellar iron, selenium, zinc and copper status following acute ethanol administration to rats. *Free Radic Res Commun*, 2 : 663~668, 1991.
 31. Shaw S, Jayatilke E, Ross WA, et al. Ethanol-induced lipid peroxidation : potentiation by long-term alcohol feeding and attenuation by methionine. *J Lab Clin Med*, 98 : 417~422, 1981.
 32. Hara S, Endo T, Kawai F, et al. Different effects of paraquat on microsomal lipid peroxidation in mouse brain, lung and liver. *Pharmacol Toxicol*, 68 : 260~265, 1991.
 33. Hoffman DJ, Heinz GH, Krynitsky AJ. Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings. *J Toxicol Environ Health*, 27 : 263~271, 1989.
 34. Combs GF Jr, Peterson FJ. Protection against acute paraquat toxicity by dietary selenium in the chick. *J Nutr*, 113 : 538~545, 1983.
 35. Liu Y, Shi CZ, Zhang JT. Anti-lipid peroxidation and cerebral protective effects of clausenamide. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 26 : 166~179, 1991.
 36. Melchiorri D, Reter RJ, Attia AM, et al. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci*, 56 : 83~89, 1994.
 37. Hirai K, Ikeda K, Wane GY. Paraquat damage of rat liver mitochondria by superoxide production depends on extramitochondrial NADH. *Toxicology*, 72 : 1~16, 1992.
 38. Yamamoto H. Protection against paraquat-induced

- toxicity with sulfite or thiosulfate in mice. *Toxicology*, 79 : 37~43,1993.
39. Horner F, Kellen JA, Kingtone E, et al. Dynamic changes of serum gammaglutamyltransferase in chronic alcoholism. *Enzyme*, 24 : 217~223, 1979.
40. Puapairoj P, Cui L, Ogawa K, et al. Effect of ethanol on paraquat toxicity in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 32 : 379~386, 1994.
41. Lahrichi M, Ratanasavanh D, Galteau MM, et al. Effect of chronic ethanol administration on gamma-glutamyltransferase activity in plasma and in hepatic plasma membranes of male and female rats. *Enzyme*, 28 : 251~257, 1982.
42. Arther JR, Morrice PC, Beckett GJ. Thyroid hormone concentrations in serum deficient and selenium sufficient cattle. *Res Vet Sci*, 45 : 122~123, 1988.
43. Nagata T, Kono I, Masaoka T, et al. Acute toxicological studies on paraquat : pathological findings in beagle dogs following single subcutaneous injections. *Vet Human Toxicol*, 34 : 105~112, 1992.
44. Mendenhall CL, Rouster SD, Grossman CJ, et al. The impact of acute alcohol toxicity in the rat. *Alcohol Alcohol*, 28 : 675~685, 1993.
45. Jaya DS, Augustine J, Menon VP. Role of lipid peroxides, glutathione and antiperoxidative enzymes in alcohol and drug toxicity. *Indian J Exp Biol*, 31 : 453~459, 1993.
-