

Caffeine과 Acetaminophen으로 인한 간독성과 항산화성 비타민의 효과

옥현이 · 노숙령[†] · 이재관*

중앙대학교 식품영양학과

*중앙대학교 생물공학과

The Hepatotoxicity and the Effect of Antioxidative Vitamins by the Simultaneous Administration of Caffeine and Acetaminophen *in vitro*

Hyun-Ee Ok, Sook-Nyung Rho^{*} and Jae-Gwan Lee*

Dept. of Food and Nutrition, Chung-ang University, Ansan 457-756, Korea

*Dept. of Biotechnology, Chung-ang University, Ansan 457-756, Korea

Abstract

Hepatotoxicity of caffeine and acetaminophen was investigated in this study. Special attention was paid to the effect of vitamins on the reduction of hepatotoxicity caused by the chemicals. Rat hepatocytes isolated by two-step perfusion method were cultured in two different methods—suspension, monolayer cultures—and exposed to caffeine and/or acetaminophen for 24hrs. Caffeine or acetaminophen exhibited no significant hepatotoxicity in terms of intracellular glutathione(GSH) level and lipid peroxidation(MDA), but GSH level was significantly decreased after administrated acetaminophen, and the toxicity caused by the chemicals showed a dose-dependent manner. The synergistic effect of caffeine and acetaminophen was observed when both caffeine and acetaminophen were supplemented to culture medium. At the concentration 1mM, caffeine enhanced the intracellular GSH depletion and MDA formation by 63% and 64%, respectively, compared to single supplementation of 10mM acetaminophen in culture medium. This hepatotoxicity induced membrane integrity loss was observed by lightmicroscope on the simultaneous administration of caffeine and acetaminophen in monolayer cultured hepatocytes. Co-supplementation of vitamins with caffeine/acetaminophen to culture medium results in the protection of hepatocytes from hepatotoxic attack by caffeine/acetaminophen. Especially, vitamin E was superior to vitamin C and β-carotene from the standpoints of GSH depletion and MDA formation. From this results, it has been speculated that vitamin E may play a role of antioxidant scavenging radicals produced from acetaminophen. Taken all together, *in vitro* culture system like monolayer culture of hepatocytes may be a useful tool for the evaluation of hepatotoxicity or protection ability of food ingredients.

Key words: caffeine, acetaminophen, hepatotoxicity, *in vitro* culture, antioxidant

서 론

식생활 산업의 다양화와 식품 사용의 간편화로 우리의 식생활은 서구화되어 가고 있고 특히 카페인을 함유한 기호 음료의 소비가 증가하고 있다(1,2). 카페인은 음료에서 뿐만 아니라 여러 의약제에도 꼭넓게 사용되고 있는데(3) 진통·해열제로 널리 이용되는 acetaminophen(APAP)과 약 1:10(caffeine: APAP)의 비율로

섞여 이용되기도 한다. 그러나 APAP를 과량 복용하게 되면 잠재적이고 치명적인 간 괴사와 심각한 중독 현상을 일으키게 되는데(4-6) caffeine을 APAP와 같이 복용할 경우 APAP로 인한 간 독성 유발이 상승된다는 보고가 있었다(7-10). 간에서 caffeine과 APAP는 cytochrome P450에 의해 대사되어지고 여러가지 대사산물을 형성하게 되는데 특히 APAP는 친전자성 화합물인 N-acetyl-p-benzoquinone-imine(NAPQI)로 산화되

[†]To whom all correspondence should be addressed

고 이것은 glutathione(GSH)과 결합하여 신장으로 배설되나 지나친 생성은 glutathione을 고갈시킨다(11-14). GSH는 tripeptide로 과산화수소, 유리기와 결합하여 간세포 내에서 해독작용을 한다. 이 작용에 있어서 중요한 요소는 대사산물 형성 속도와 GSH 합성 속도간의 균형이며(15) 이러한 균형이 깨어지고 GSH 함량이 감소하게 되면 과산화수소가 축적되고 생체막의 구성 성분인 고도불포화지방산의 과산화반응이 시작된다(16-19).

생성된 과산화물은 극히 불안정하여 산화·중합·분해되어 2차 산물을 만들며 이들은 1차 산물보다 세포방어 능력을 더 감소시킨다고 한다(20). 특히 그중에서 malondialdehyde(MDA)는 지질 과산화반응으로 가장 많이 발생하는 aldehyde이고 반응성도 가장 높으며 *in vitro*에서 proteins, DNA, RNA 그리고 많은 다른 생체분자들을 변형시킬 수 있다(21,22).

이러한 연쇄적인 과산화반응은 항산화성 비타민인 α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid 등에 의해 차단되어 정상적인 세포막 구조의 유지를 지속시킨다고 한다. 이들은 지방질 생성물들과 다양하게 반응하고 환원제, 유리기 제거제(radical scavenger), 미량금속과 금속이온의 제거제(metal scavenger) 및 산소제거제(oxygen scavenger)로서 작용한다(20,23,24).

이와같은 약물의 독성반응에 있어서 caffeine과 acetaminophen으로 인한 영향은 *in vitro*에서 많은 연구가 이루어지지 않았고 간독성 유발에 항산화제의 방어작용에 관한 연구도 찾아보기 어려웠다.

따라서 본 연구에서는 rat으로부터 분리된 간세포를 체외배양방법을 이용하여 caffeine과 APAP의 동시 투여로 인한 독성발현의 정도를 알아보았고 간손상에 대한 항산화성 비타민들의 독성 방어능력을 알아보고자 하였다.

Caffeine과 APAP 이외의 여러 독성효과가 있는 약물이나 성분 또는 식품에 대해서도 체외에서 다른 장기의 영향을 배제하고 직접적으로 간세포에서의 독성 여부와 방어 기능을 관찰할 수 있으며, 건강 교육을 위한 하나의 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

간세포의 분리

Hepatocyte는 2~3개월 된 male Sprague-Dawley rat으로부터 두단계의 관유(perfusion)를 거치는 Seglen(25)의 방법에 의해 분리해 낸다. 이렇게 분리된 간세포는 Kreamer(26)의 방법에 의해 정제되고 hepat-

ocyte의 생육력은 trypan blue exclusion에 의해 결정된다.

간세포의 배양

간세포는 60mm tissue culture dish(falcon)에 2×10^6 cells/4ml media로 seeding된다. 이때 이용되는 배양액은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium, Cat D-3656)에 hormone mixture(0.05unit/ml insulin, 7ng/ml glucagon, 20ng/ml EGF(epidermal growth factor), 7.5 μ g/ml hydrocortison, 100unit/ml penicillin/streptomycin, 60 μ g/ml L-proline)을 추가하여 준비한다.

Suspension culture는 hepatocyte를 95% O₂/5% CO₂ incubator에서 2시간(37°C) 동안 배양시킨 다음 caffeine과 acetaminophen을 각각 또는 동시에 투여하고 배양액의 전체 부피는 4ml가 되게 한다.

Monolayer culture는 tissue culture dish에 collagen(1mg/ml)과 10×DMEM을 10:1로 혼합한 용액 1ml로 gel matrix를 만든 다음 hepatocyte를 seeding하고 24시간 동안 배양시킨 후 suspension culture와 같은 방법으로 시료를 투여한다.

시료의 처리

Suspension culture system은 배양 2시간 후에 caffeine과 APAP를 투여하는데 CA 1mM은 하루 평균 섭취량의 4배에 해당되는 양이며 APAP 5mM은 APAP를 하루에 3~4g정도 섭취하였을 때의 혈장 농도에 해당된다. Caffeine과 APAP를 같이 투여한 후 배양액의 전체 부피는 4ml가 되게 하였고 대조군은 배양액 4ml를 넣어준다.

Monolayer culture는 배양 24시간, 48시간 후 미리 대워 둔 PBS로 plate를 한번 세척한 다음 caffeine과 APAP를 넣어준다. 또, 항산화제로서는 α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid를 사용하였고 α -tocopherol과 ascorbic acid의 투여량은 권장량수준에 해당하는 양이며 β -carotene은 흡연자들에게 치료 목적으로 투여하는 함량으로 정하였다. 이렇게 각 시료를 처리한 후 0시간, 24시간에 배양액을 회수하고 회수된 배양액은 -20°C에 보관되어 분석에 사용되었다.

간세포의 회수

각 시료를 투여한 후 24시간에 배양액을 회수하여 -20°C에 보관하고 suspension culture인 경우는 scraper를 이용하여 cell을 회수하고 monolayer culture인 경우는 tissue culture dish를 미리 데워둔 PBS 2ml로 세척

한 후 0.05% collagenase buffer 5ml를 넣고 약 10분 동안 incubator에서 방치시킨 후 hepatocyte를 회수한다. 회수된 pellet에 7.5% trichloroacetic acid(TCA) 1ml를 첨가하여 2분 동안 vortex한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 얻는다. 이 상층액으로 malondialdehyde와 glutathione 함량을 분석한다.

Glutathione(GSH) 정량

Acetaminophen의 대사산물인 NAPQI로 인한 세포내 glutathione의 고갈 정도를 알아보기 위해 MDA assay와 같은 방법으로 상층액을 얻은 후 Griffith의 방법(27)으로 GSH를 측정한다. 상층액 25μl를 0.3mM NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form) 700μl와 6mM DTNB(5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, Ellman's Reagent) 100μl의 혼합액에 넣고 물로 총 부피를 1ml가 되게 맞춘다. 이것을 30°C에서 10~15분간 방치시킨 다음 50U/ml glutathione reductase(G.R, type III)를 10μl 첨가하여 반응을 일으킨다.

412nm에서 time zero, 10min, 20min에 흡광도를 측정하여 standard curve에서 관찰된 기울기와 비교하여 glutathione 함량을 알아낸다.

Malondialdehyde(MDA) 정량

간세포내 지질의 과산화로 인한 최종 생성물 중의 하나인 malondialdehyde(MDA)의 함량은 Yokoyama 등의 방법(28)으로 측정한다.

측정 방법은 앞서 설명한 간세포의 회수 방법에 따라 상층액을 얻은 다음 상층액 500μl를 thiobarbituric acid reagent solution(15%(W/C) TCA, 0.375%(W/C) TBA, 0.25 N HCl) 1ml에 넣는다. 15분 동안 끓인 후 냉각시킨 다음 3000rpm에서 15분 동안 원심 분리한다. Spectrophotometer(Beckman DU-600)를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve는 1,1,3,3-tetraethoxypropane(melondialdehyde-bis-diethylacetal)을 이용해서 calibration을 만든다. 10mM stock solution은 1%(v/v) sulfuric acid 100ml에 acetal 1mmol을 첨가하여 실온에서 2시간 동안 방치하여 만든다.

통계처리

모든 실험은 배양 방법별로 하나의 간에서 얻은 hepatocyte를 이용하여 2번 반복하였고 이것을 세 개체에서 실행하였다. 결과는 유의차가 적은 한 개체에서 얻은 결과를 평균±S.E.M으로 표시하였으며 각 실험군간의 유의성은 unpaired student's *t*-test로 알아보았다.

결과 및 고찰

분리한 간세포를 24시간 동안 culture dish에서 배양한 후 caffeine과 APAP를 각각 또는 동시에 투여하여 세포내 glutathione(GSH) 함량을 알아본 결과는 Table 1과 같다. Caffeine만을 투여한 군은 대조군과 유의적인 차이가 없었고 APAP는 1mM, 5mM, 10mM을 투여한 군이 대조군보다 각각 19%, 57%, 75%씩 유의적인 감소를 보였다($p<0.01$). 또 caffeine과 acetaminophen을 함께 투여하였을 때 CA 1mM+APAP 5mM군은 APAP 10mM군보다 약 46% 감소하였고 CA 1mM+APAP 10mM군은 APAP 10mM군보다 약 63% 감소하여 caffeine과 APAP를 같이 투여하게 되면 APAP만 투여하였을 때보다 세포내 GSH 함량이 크게 감소함을 알 수 있었다. 그리고 APAP 10mM군에 caffeine 농도를 증가시킬 경우에도 caffeine 농도에 따라서 GSH 함량이 감소함을 알 수 있었다. Caffeine은 단기간 투여할 경우 부작용을 일으킬 수 있는 함량은 5~10g이나 caffeine으로 인한 치명적인 독성을 드물며(29) 2.5×10^6 cell의 밀도로 human hepatocyte와 rat hepatocyte를 24시간 동안 배양시킬 때 0.1~1mM 범위는 독성을 일으키지 않는다고 한다(30). 그리고 APAP는 간세포에서 glucuronide, sulfate, glutathione, cysteine conjugate와 같은 4가지의 대사산물을 형성하게 되는데 glucuronide와 sulfate의 저장량은 한정적이므로 이들이 모두 소모되고 나면 NAPQI가 생성되고 이것은 glutathione과 결합하게 되어 glutathione의 고갈이 더 촉진되는 것으로 여겨진다(10,12,13).

한편 간손상으로 인해 생성될 수 있는 malondialdehyde(MDA)를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 대조군과 caffeine 투여군, APAP 투여군은 유의적인 차이가 없었으나 CA 1mM+APAP 5mM군과 CA 1mM+APAP 10mM군, CA 5mM+APAP 10mM군은 대조군에 비

Table 1. Effects of caffeine and acetaminophen on intracellular GSH content in suspension cultured hepatocytes

		APAP(mM)			
		0	1	5	10
CA(mM)	0	100	81±15*	43±0.4**	25±2**
	1	101±2.1		23±1.4**	9±0.2**
	5	94±2.1			5±0.2**

Isolated rat hepatocytes were preincubated for 2hr and treated with caffeine and/or acetaminophen for 24hr. Intracellular GSH in controls was 74.02nmol/ 10^6 cells which is expressed as 100%. Values are mean±S.E.M(n=2) * $p<0.01$, ** $p<0.001$ compared to control (with caffeine and acetaminophen)

Table 2. Effects of caffeine and/or acetaminophen on MDA formation in suspension cultured hepatocytes

		APAP(mM)		
		0	1	5
CA(mM)	0	100	50±3.8*	73±3.8
	1	100±15.4		104±11.3†
	5	54±15.2		169= 7‡

Intracellular MDA in controls was 0.13nmol/10⁶cells which is expressed as 100%

*p<0.05 compared control, †p<0.01(APAP 5mM) ‡(APAP 10mM)

해 각각 4%, 27%, 69%씩 증가하였고 APAP만 투여한 군에 비해서도 caffeine농도가 증가할수록 MDA생성이 유의적으로 증가하였다(p<0.05). APAP만을 투여하였을 때의 결과는 3-methylcholanthrene으로 cytochrome P-450을 유도한 isolated rat hepatocyte에서 APAP가 세포내 GSH함량을 매우 감소시킬 뿐만 아니라 지질 과산화반응을 촉진시킨다(9,10,31,32)는 결과와 다른 경향을 보이는 것이나 APAP 1mM을 투여한 경우는 대조군보다 HDA 생성이 낮은 결과를 보였는데 이는 Albano 등(31)의 결과와 유사하며 지질과산화의 전파단계에서 APAP의 항산화제로서 작용한 것으로 여겨진다. 그러나 caffeine과 APAP를 함께 투여한 경우는 생체실험에서 나온 결과(9,10) 뿐만 아니라 생체외에서 3시간 동안 배양한 후 얻은 결과(7)와도 유사한 결과이다.

그러므로 체외배양된 hepatocyte에서 caffeine과 APAP를 각각 투여하였을 때 한편 APAP는 GSH함량이 대조군과 큰 차이가 없음에도 불구하고 MDA함량이 크게 줄었는데 이것은 APAP가 지질 과산화반응의 전파단계에서 항산화제로서 작용할 수도 있다는 Albano(31)의 결과를 뒷받침하는 것이며 caffeine은 정상적인 대사과정에서 발생하는 유리기와 반응하는 Free Radical Scavenger로서 작용하여 지질 과산화반응을 차단하는 것을 알 수 있다(33). Caffeine만으로는 MDA생성과 GSH 고갈이 대조군과 비슷하고 APAP는 농도에 따라 세포내 GSH함량을 감소시키나 MDA생성에 있어서는 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 caffeine과 APAP를 함께 투여하면 caffeine과 APAP의 농도가 증가할수록 GSH함량은 유의적으로 감소하고 MDA생성은 상당히 증가하여 동시 투여가 단독 투여보다 간세포에 더 큰 손상을 끼치는 것으로 생각된다.

간독성에 대한 항산화제의 첨가 효과

앞서 살펴본 CA와 APAP의 동시 복용으로 유발되는 간손상에 항산화성 비타민이 어떠한 영향을 미치는

지 알아보기 위해 monolayer culture에서 위의 두가지 성분과 함께 α-tocopherol, β-carotene, ascorbic acid를 각각 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

그 결과 GSH함량의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 α-tocopherol을 투여한 군은 GSH함량이 대조군보다 약 40%가 더 높았고 CA 1mM+APAP 10mM군에 비해서는 약 82%가 높았다(p<0.01). 그리고 β-carotene과 ascorbic acid를 투여한 군은 GSH함량이 대조군의 수준으로 유지되고 있었다 α-Tocopherol은 다른 지용성 비타민들에 비해서 상대적으로 독성이 낮아서 하루에 100~800mg의 α-tocopherol보충제를 섭취하여도 별로 독성효과가 나타나지 않는다고 하며(34) β-carotenesinglet oxygen의 억제자이고 lipid peroxidation을 일으키는 peroxyyl radicals와 직접 반응할 수 있으므로 항산화제로서 항암성을 지니고 있다고 한다(35,36). Ascorbate는 세포막과 결합되어 있는 vit E의 활성형을 재생산함으로써 막지질을 간접적으로 보호하는 작용을 한다(37).

위의 세가지 비타민 중 α-tocopherol이 β-carotene과 ascorbic acid보다 더 효과적으로 GSH함량을 유지시켰는데 α-tocopherol은 ascorbic acid가 모두 소모된 다음에 비로소 감소하기 시작하며 β-carotene은 항암효과와 함께 α-tocopherol의 절약효과를 지니고 있으므로 α-tocopherol을 투여하였을 때 GSH함량이 더 높았던 것으로 생각된다(20,38).

또, MDA 생성의 변화를 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. α-Tocopherol과 β-carotene을 투여한 군은 대조군과 유의적인 차이가 없었고 ascorbic acid도 대조군과 거의 비슷한 수준이었으나 CA 1mM+APAP 10mM군과 비교해 보면 위의 세가지 비타민이 각각 31%, 31%, 62%씩 감소하여 MDA생성에 있어서는 ascorbic acid가 효과적인 것으로 생각된다.

α-tocopherol은 산화적 손상으로부터 세포막을 보호하는 생물학적 항산화제로서 기능을 하고 세포막에서 유리기 제거제(free radical scavenger)로서 기능을 하며(39) α-tocopherol 1분자는 220분자의 polyunsaturated fatty acid를 보호할 수 있다고 한다(40). 그리고 쥐에게 α-tocopherol을 35~65mg/kg diet로 먹인 결과 bromobenzene과 같은 간독성 유발을 일으킬 수 있는 물질을 먹였을 때보다 MDA생성이 억제되었고 GSH 함량이 유지되어 간을 보호하였다는 보고도 있으나(41) 체외배양에서 α-tocopherol을 투여한 후 간독성 정도를 알아본 연구는 찾아보기 어려웠다. β-Carotene은 흡연자에게 하루에 20mg을 복용시킨 결과 지질 과산화반응이 현격히 감소하였다고 한다(42). 또, ascorbic acid

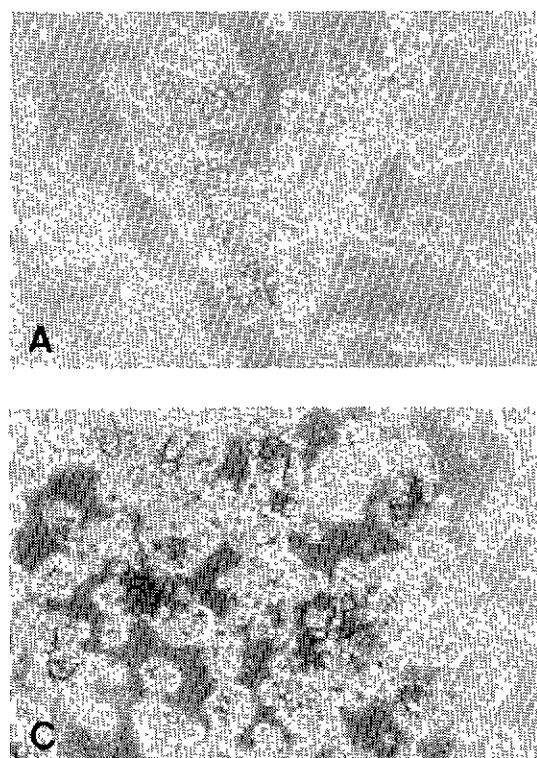


Fig. 1. The profiles of hepatotoxicity by lightmicroscope on the simultaneous administration of caffeine and acetaminophen in monolayer cultured hepatocytes.

The photographs were pictured with Olympus CK2 at two hundred magnification.

A: control ($\times 200$), B: CA 1mM + APAP 5mM, C: CA 1mM + APAP 10mM, D: CA 1mM + APAP 10mM + Vit E 5 μ M

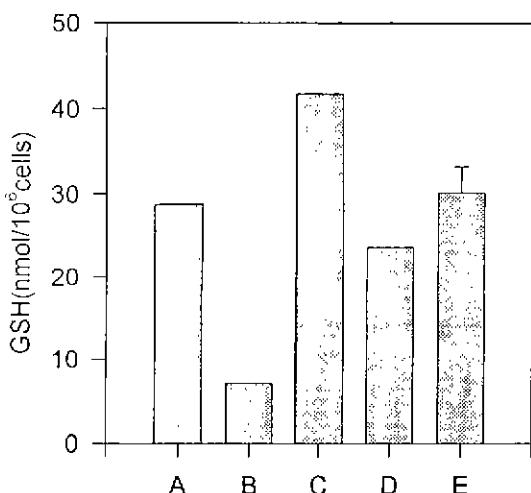
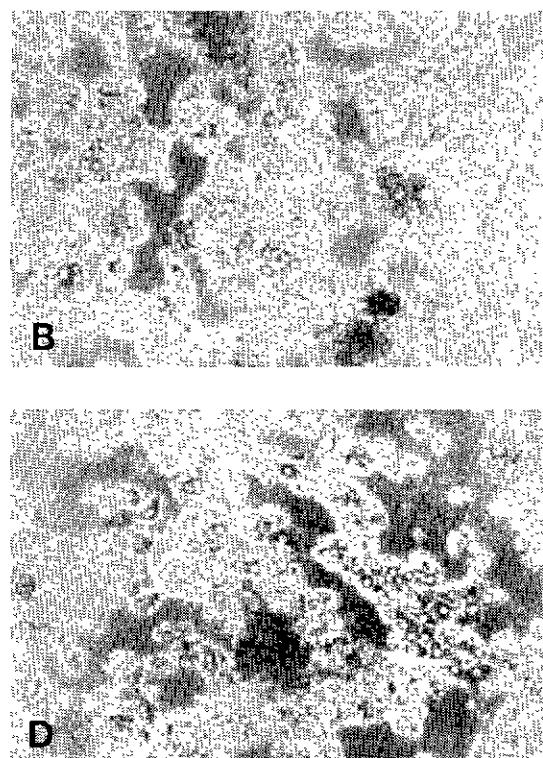


Fig. 2. Effect of three vitamins on GSH content in monolayer cultured hepatocyte administrated with caffeine and acetaminophen.

A: control, B: CA 1mM + APAP 10mM, C: CA 1mM + APAP 10mM + Vit E 5 μ M, D: CA 1mM + APAP 10mM + β -carotene 9 μ M, E: CA 1mM + APAP 10mM + Vit C 70 μ M

는 과산화적 손상으로부터 혈장 지질을 완전히 보호하고 더욱이 지질 과산화반응은 혈장의 모든 ascorbic acid가 소비된 후에만 발생한다고 하며(20) NAPQI와 acetaminophen으로 환원시킴으로써 NAPQI와 단백질의 공유결합을 저해하여 APAP로 인한 간독성을 저해하는데 효과적이라고 한다(43).

이상으로 α -tocopherol, β -carotene, ascorbate는 항산화제로서 간독성을 유발할 수 있는 물질로부터 간을 보호하고 특히 α -tocopherol은 다른 두 비타민에 비해 낮은 농도로도 효과적으로 GSH함량을 유지시켰다.

Hepatocyte morphology 관찰

Caffeine과 acetaminophen을 간세포에 투여하여 24시간 동안 배양하였을 때 세포막의 통합성(cell membrane integrity)을 알아보기 위해 isolated hepatocyte를 collagen-coated dish에 seeding하는 monolayer culture에서 caffeine과 APAP를 같이 첨가하였을 경우와 여기에 vit E 5 μ M을 더 첨가하였을 때 간세포의 morphology를 광학현미경(Olympus CK2, Japan)으로 관

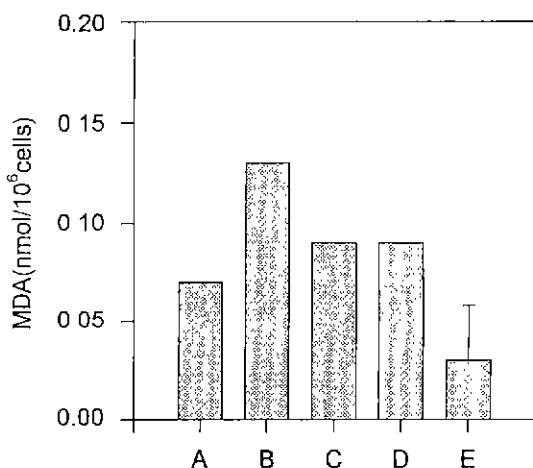


Fig. 3 Effect of three vitamins on MDA formation in monolayer cultured hepatocyte administrated with caffeine and acetaminophen.

A: control, B: CA 1mM + APAP 10mM, C: CA 1mM + APAP 10mM + Vit E 5μM, D: CA 1mM + APAP 10mM + β-carotene 9μM, E: CA 1mM + APAP 10mM + Vit C 70μM

찰해 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 CA 1mM + APAP 5mM을 첨가하였을 때 세포내에 미립(微粒)이 형성되면서 membrane integrity가 감소한 것을 볼 수 있었고 CA 1mM + APAP 10mM인 경우는 그 정도가 더 심해져서 collagen matrix에서 세포가 떨어져 나오는 것을 볼 수 있었다. 그러나 vit E 5μM을 첨가하였을 때는 이러한 반응이 지연되어 세포 손상정도가 대조군과 유사하였다.

Hepatocyte에서 미립 형성은 toxic injury의 초기 가역반응의 신호이며 세포 손상의 다른 지표보다 먼저 일어나고(16) membrane integrity손실은 GSH의 고갈로 세포내에 H₂O₂가 축적되어 지질 과산화반응이 일어나 세포막 손상이 유발됨을 입증하는 것이다(44). 또 원형질 내의 GSH보다 미토콘드리아내의 GSH고갈이 지질 과산화반응과 더 상관성이 높다고 한다(45). Membrane integrity손실은 GSH 이외에 칼슘의 항상성과도 연관이 있는데, 칼슘은 원형질골격과 membrane integrity의 유지와 같은 수많은 세포기능의 조건에 있어서 중요한 역할을 한다고 한다. 그런데 NAPQI는 세포내 지질 과산화반응을 일으키고 원형질내의 Ca²⁺수준을 상승시켜 칼슘의 항상성을 깨뜨리게 되어 membrane integrity를 감소시킨다(46). 그러나 caffeine은 칼슘의 채외배설을 증가시키나 single rat hepatocyte에서 10mM농도로는 free Ca에 있어서 어떤 중요한 변화를 유도하지 않는다고 한다(47).

그러므로 membrane integrity 감소의 원인은 caffeine이 세포내 단백질과 결합함으로써 APAP의 산화를 촉진시켜 NAPQI의 생성을 증가시키고 NAPQI는 칼슘의 항상성을 변화시켰기 때문인 것으로 생각된다.

요 약

간세포에서 caffeine과 APAP의 독성 효과를 알아보기 위해 *in vitro*에서 suspension culture 방법을 이용하였고 간독성의 지표로 glutathione, malondialdehyde를 측정하였다. 또 monolayer culture에서 hepatocyte morphology를 관찰하였으며 위의 두 가지 성분과 함께 항산화성 비타민인 α-tocopherol, β-carotene, ascorbic acid를 투여해 본 결과는 다음과 같았다. 채외배양된 hepatocyte에서 caffeine과 APAP를 각각 투여하였을 때 caffeine만으로는 MDA생성과 GSH고갈이 대조군과 비슷하고 APAP는 농도에 따라 세포내 GSH함량을 감소시키나 MDA생성에 있어서는 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 caffeine과 APAP를 함께 투여하면 caffeine과 APAP의 농도가 증가할수록 GSH 함량은 유의적으로 감소하고 MDA생성은 상당히 증가하여 동시 투여가 단독 투여보다 간세포에 더 큰 손상을 끼치는 것으로 여겨진다. Caffeine과 acetaminophen으로 인한 간세포의 손상정도를 광학현미경으로 관찰해 본 결과 acetaminophen의 농도가 증가할수록 미립이 많이 형성되어 세포막의 통합성이 떨어지는 것으로 볼 수 있었고 vit E 5μM을 첨가하였을 때는 이러한 현상이 감소함을 알 수 있었다. 그리고 caffeine과 APAP의 동시 투여로 간독성을 유발할 수 있는 상황에 비타민인 α-tocopherol, β-carotene, ascorbic acid를 첨가하였을 때 이들 모두 항산화제로서 간세포를 보호하였고 α-tocopherol이 더 효율적으로 GSH의 고갈을 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국과학재단 핵심 전문 연구과제(과제번호 961-1105-029-1) 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 현

1. 경제기획원 조사통계국 : 산업 생산 연보(1983)
2. 경제기획원 조사통계국 : 도시 가계 연보(1984)
3. Roe, D. A. : Intolerance to intentional additives. In "Diet and drug interactions" New York, Van Nostrand Reinhold, p.76(1988)

4. Ameer, B. and Greenblatt, D. J. : Acetaminophen *Ann Intern. Med.*, **87**, 202(1977)
5. Roe, D. A. : Diet nutrition and drug reaction. In "Modern nutrition in health and disease" 7th ed., Philadelphia Publishing, p.630(1988)
6. Clark, R., Thompson, R. P. H., Borirakchanyavat, V., Widdop, B., Davidson, A. R., Goulding, R and Williams, R. : Hepatic damage and death from overdosage of paracetamol. *Lancet*, **1**, 66(1973)
7. Sato, C. and Izumi, N. : Mechanism of increased hepatotoxicity of acetaminophen by the simultaneous administration on caffeine in the rat. *J. Pharm. Exp. Therapeu.*, **248**, 1243(1989)
8. Sato, C., Izumi, N., Nouchi, J., Hasumura, Y. and Takeuchi, J. : Increased hepatotoxicity of acetaminophen by concomitant administration of caffeine in the rat. *J. Toxicol.*, **34**, 95(1985)
9. Kalhorn, T. F., Lee, C. A., Slattery, J. T. and Nelson, S. D. : Effect of methylxanthines on acetaminophen hepatotoxicity in various induction states. *J. Pharm. Exp. Therapeu.*, **252**, 112(1990)
10. Jaw, S. and Jeffery, E. H. : Interaction of caffeine with acetaminophen. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 493(1993)
11. Lee, W. M. : Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl. J. Med.*, **333**, 1118(1995)
12. Albano, E., Rundgren, M., Harvison, P. J., Nelson, S. D. and Moldéus, P. : Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, **28**, 306(1985)
13. Moldéus, P. : Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2859(1978)
14. Snawder, J. E., Roe, A. L., Benson, R. W. and Roberts, D. W. : Loss of CYP2E1 and CYP1A2 as a function of acetaminophen dose : Relation to toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 532(1994)
15. Cohen, G. M. and Freedman, R. B. : Roles and functions of glutathione. *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 78(1982)
16. Reed, D. J. and Fariss, M. W. : Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.*, **36**, 25S(1984)
17. Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Davis, D. C., Gillette, J. R. and Brodie, B. B. : Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Roles of drug metabolism. *J. Pharm. Exp. Therapeu.*, **189**, 185(1973)
18. Black, M. : Acetaminophen hepatotoxicity. *Annu. Rev. Med.*, **35**, 577(1984)
19. Dahlin, D. C., Miwa, G. T. and LU, A. T. H. : N-acetyl-p-benzoquinone imine, a cytochrome P₄₅₀-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1327(1987)
20. Cheigh, H. S. : Lipid peroxidation and its nutritional significance. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 867(1994)
21. Davis, M. and Labadarios, D. : Metabolism of paracetamol after therapeutic and hepatotoxic doses in man. *J. Int. Med. Res.*, **4**, 40(1976)
22. Song, Y. O., Cheigh, H. S. and Pyeon, J. H. : Changes in free amino acids by lipid deterioration in the biological system of rice bran. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **80**, 214(1991)
23. Halliwell, B. and Sasanna, C. : Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, **57**(suppl), 715S(1993)
24. Aruoma, O. I. : Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.*, **32**, 671(1994)
25. Seglen, P. O. : Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Biol.*, **13**, 29(1976)
26. Kreamer, B. L. : Use of low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase viability of isolated rat hepatocytes preparations. *In Vitro Cell Biol.*, **22**, 201(1982)
27. Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-venylpyridine. *Anal. Biochem.*, **106**, 207(1980)
28. Yokoyama, H., Horie, T. and Awazu, S. : Oxidative stress in isolated rat hepatocytes during naproxen mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 991(1995)
29. Sawynok, J. : Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs*, **49**, 37(1995)
30. Berthou, F., Ratanasavach, D., Alix, D., Carlhant, D., Riche, C., Guillouzo, A. : Caffeine and theophylline metabolism in newborn and adult human hepatocytes: comparison with adult rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 3691(1988)
31. Albano, E., Poli, G., Chiarpotto, E., Baiasi, F. and Diazianzi, M. U. : Paracetamol-stimulated lipid peroxidation in isolated rat and mouse hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **47**, 249(1983)
32. Farber, I. L., Leonard, T. B., Kyle, M. E., Nakae, D., Serroni, A. and Roberts, S. A. : Peroxidation-dependent and peroxidation-independent mechanisms by which acetaminophen kills cultured rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, 640(1988)
33. Goodman, B. A., Ghidewell, S. N., Deighton, N. and Morrice, A. E. : Free radical reactions involving coffee. *Food Chem.*, **51**, 399(1994)
34. Farrell, P. M., Roberts, R. J. : Vitamin E. In "Modern nutrition in health & disease" Shils, M. E., Olson, J. A. and Shike, M.(eds.), 8th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, p.326(1994)
35. Krinsky, N. I. : Antioxidant functions of carotenoids. *Free. Radical Biol. Med.*, **7**, 617(1989)
36. Ziegler, R. G. : A review of epidemiology evidence that carotenoide reduce the risk of cancer. *J. Nutr.*, **119**, 116(1989)
37. Meister, A. : Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*, **43**, 1332(1995)
38. Olson, J. A. : Vitamin A, retinoids, and carotenoids. In "Modern nutrition in health and disease" Shils, M. E., Olson, J. A. and Shike, M.(eds.), 8th ed., Lea & Fehiger, p.287(1994)
39. Macay, P. B., King, M. : Biochemical function. In "Vitamin E, A comprehensive treatise" Machlin, L. J.(ed.), Marcel Dekker, New York, p.288(1980)
40. Haenen, G. R. M. M. and Bast, A. : Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Letters*, **159**, 24(1983)
41. Maellaro, E., Casini, A. F., Bello, B. P. and Comporti, M. : Lipid peroxidation and antioxidant system in the

- liver injury produced by glutathione depleting agents. *Biochem Pharmacol.*, **39**, 1513(1990)
42. Allard, J. P., Royall, D., Kurian, R. and Nuggli, R. : Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *Am J. Clin Nutr.*, **59**, 884(1994)
43. Miller, M. G., Jollow, D. J. : Effect of L-ascorbic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity and covalent binding in hamsters : evidence that *in vitro* covalent binding differs from that *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.*, **12**, 271(1984)
44. Lachance, M. P. : The pharmacology and toxicology of caffeine. *J. Food Safety*, **4**, 71(1982)
45. Kyle, M. E., Nakae, D., Sakaida, I., Farber, J. L. : Protein-thiol depletion and killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 3979 (1989)
46. Whiting, S. J., Whitney, H. L. : Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium excretion in the adult rat. *J. Nutr.*, **3**, 1224(1987)
47. Sanchez-bueno, A., Marreno, I., Cobbold, D. H. : Caffeine inhibits agonists-induced cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in single rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 728(1994)

(1997년 7월 2일 접수)