

사염화탄소(CCl₄)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향

1. 임상증상 및 혈액화학치

강정부¹ · 이은석* · 허주형**

경상대학교 수의과대학(동물의학 연구소)

*마산 창생동물병원

** 부평 고려동물병원

Effects of Administration of CCl₄ on Liver Function in Rats

1. Clinical Signs and Blood Chemical Values

Chung-boo Kang¹, Eun-seok Lee* and Ju-hyeong Hur**

College of Veterinary Medicine(Institute of Animal Medicine),

Gyeongsang National University, Chinju 660-701

*Changsaeng Animal Hospital, Masan 631-470

**Koryo Animal Hospital, Pupeong 403-010

ABSTRACT : This study was performed to estimate the clinical signs and biochemical parameters of indicator on acute hepatic injury induced by the administration of CCl₄ in rats. Minor behavioral change, brittleness of skin hair and decreased volume of water and food intake were observed in rats after 2 hours of CCl₄ administration compared to control group. Concentration of serum albumin has shown lower than that of control group. However, concentration of total bilirubin has shown higher than that of control group. As times go on, serum LDH activity was significantly increased compared to control group. Serum CPK activity hasn't shown change compared to control group. Passive hemagglutination that of α -fetoprotein was shown negative reaction in all the treatment groups and control group.

Key words : carbon tetrachloride, liver function, blood chemical values, α -fetoprotein, rat

서 론

사염화탄소 즉, CCl₄는 간 손상을 일으키는 대표적인 화학물질의 하나로 생체내의 smooth endoplasmic reticulum(SER)의 nicotinamide adenine phosphate(NADPH)-oxygenase에 의해 대사되어 CCl₃와 같은 자유기(free radical)를 생성하는^{1,4-6,10,19-20,24-25} 외인성 생체이물질(xenobiotic compounds)로 알려진 이후 많은 외인성 물질이 밝혀지고 있다^{1,4-6,10,19-20,24-25}. 예를 들면, 생체 내에서 과산화 자유기(peroxyl radical)가 적혈구 영상 세포막(erythrocyte ghost membrane)을 공격하여 세포막면의 지질 과산화(lipid peroxidation)와 용혈의 유발 역시 여기에 해당된다. 이러한 자유기는 하나 이상의 짝을 이루지 않는 전자를 가지는 불안정한 분자로서 정상적인 세포의 대사에서 생긴 대사산물로 이러한 자유

기의 주요 공급원은 분자산소이고 이외 외인성 생체이물질에서 자유기가 생성될 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 생체 내에서 외인성 생체이물질에서 생긴 자유기가 조직 손상에 관여한다는 직접적인 증거는 아직까지 규명되지는 않고 있다²⁶. 이것은 자유기에 의한 손상의 결과를 예측하기 어려운 점도 있지만 장기마다 다르게 나타나고 또 같은 장기내의 세포내에서도 다르게 나타날뿐 더러 자유기 생성 및 소멸에 관여하는 여러 인자, 생성 및 소멸의 장소 그리고 free radical oxidation products(FROPs)의 배출경로, 그리고 여기에 관여하는 대식세포 및 면역기관의 영향, 세포막 인지질 구성성분의 차이 등에 따라 다르기 때문이고, 자유기가 생성되는 장소 근처에서 세포 구성물(cell components)과 자유기 사이의 상호작용이 극단적으로 빠르게 반응하기 때문에 이러한 손상이 자유기에 의한 것인지 실험적으로 명백히 증명하기 어려운 점에 기인된 것으로 생각된다.

¹Corresponding author.

그러나 일반적으로 자유기는 원형질막(plasma membrane), 소포체(endoplasmic reticulum), 사립체(mitochondria), 골지체(golgi apparatus), 그리고 리소솜(lysosome) 같은 다양한 생체막(biomembrane)을 공격한다. 자유기를 분자수준에서 보면, 생체막을 유사한 방법으로 공격할지라도 생체이물질에 의한 자유기(free radical mediated xenobiotic)의 독성에 의해 병리형태학적으로는 다양한 양상으로 나타날 수 밖에 없다. 이는 생체이물질에 따라 우리 몸에서 대사되는 장기(organ)가 다르고 그 장기 안에서도 서로 다른 부위 또는 서로 다른 소기관(organelle)에서 대사되기 때문이다²¹⁻²².

CCl₄는 활면소포체(smooth-surfaced endoplasmic reticulum)에 있는 NADPH-cytochrome P-450 electron transport chain에서 대사되어 trichloromethyl radical (CCl₃·)과 이것이 이어서 산소분자와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical(OOCCl₃·)이 생성되어, 소포체내 막단백과 지질에 결합하여 막 인지질의 다중 불포화 지방산의 과산화 변성을 야기시키는 것으로 알려져 있어^{2,4,5,8} 이들이 간 기능에 미치는 영향을 검증코져 일차적으로 간기능과 관련이 깊을 것으로 생각되는 임상증상 및 혈액화학치 소견에 대한 연구를 Sprague Dawley(SD) strain rat를 공시동물로 하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

6주령 전후의 Sprague-Dawley계통 수컷 랫드를 전문 생산업체에서 분양 받아 2주간 휴식을 위해 순화시켜 순화기간 후 건강한 동물만을 실험에 사용하였다. 순화된 8주령의 평균 체중은 120~150 g 전후이었고 12시간씩의 명암주기와 20°C 내의 실내온도에서 사육시켰다. 사료는 실험동물 전용 고품사료로, 음수와 급이는 자유 섭식토록 하였다.

실험군 및 약물의 투여

실험군은 CCl₄(Sigma Co. USA, 99.9%, 비중 1.585)를 corn oil과 1:4의 비율로 완전 혼합시켜 복강내 투여를 실시하였다. 투여량은 체중 100 g당 0.01 ml로 하였다. 실험군은 각 시간별 그룹당 5마리씩으로 하여 사용하였다.

혈청 albumin, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN) 및 α -fetoprotein의 농도 측정

임상증상에 있어서는 전반적인 외관, 행동, 식욕, 음

수량 및 배뇨량에 초점을 두어 매시 관찰하였다.

혈액화학치 분석에서는 Albumin 농도는 BCG법⁷으로, total bilirubin의 농도는 alkaline phosphatase bilirubin blue법¹¹으로, blood urea nitrogen(BUN)의 농도는 urease-indolphenol법³으로, creatine kinase(CPK)의 측정은 Kuby-Noda-Lardy의 변법인 creatine인산기질법¹⁴으로, lactic dehydrogenase(LDH)의 측정은 LDH-LQ kit(acetic acid matrix method)법으로, α -fetoprotein(AFP)은 hemogenized enzyme immunoassay법^{23,24}을 이용하여 측정하였다.

α -fetoprotein의 측정의 기본 개요는 hemogenized enzyme immunoassay(HEIA)를 기본원리로 한 측정법으로 효소표지항체인 AFP항체를 검체에 가하면 검체 중의 AFP는 항원 항체반응을 일으켜 응집표지항체를 형성하는데 여기에 과잉의 과산화수소를 가하면, 반응효소의 작용으로 4-aminoantipyrine과 phenol을 축합하여 키노이드색소를 생성하며, 미반응의 효소표지 항체 중의 peroxidase는 과잉의 과산화수소 존재하에서는 기질의 저해를 받아 효소활성이 억제되는 원리로 생성된 색소량은 검체중의 항원량과 비례관계가 있으므로 그 흡광도로 부터 항원량을 정량하였다.

실험군 설정 및 시료 채취

실험군 설정은 사염화탄소 투여군에서는 투여 후 2시간, 4시간, 48시간 그룹별을 원칙으로 하여 실시하였고 대조군은 사염화탄소 투여 대신 멸균 생리식염수를 동일 용량 투여한 그룹으로 하였다. 시료채취 즉 채혈은 각 시간별 그룹당 5마리씩을 사용하였다. 채혈에 있어서는 가벼운 ether마취 하에 안와정맥을 heparinized capillary tube로 채혈한 다음 즉시 원심 분리하여 분석을 실시하도록 하였다. 즉시 분석 못한 경우의 샘플은 분석 전까지 -4°C에 냉동 보관하였다.

통계 처리 방법

대조군과 각 시간별에 따라 나는 군들 사이의 결과치는 평균치와 표준 오차로 표기(mean \pm SE)하고 이들의 차이에 대한 통계 처리는 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 이용한 분산 분석(ANOVA)을 시행하여 통계적 차이를 검증하였다($\alpha=0.05$).

결 과

임상증상

CCl₄를 투여한 군에서의 정량적인 분석은 어려웠으

나 다소의 행동 둔화와 음수량 및 사료 섭취량의 감소가 투여 직후부터 뚜렷이 나타났다.

장기부검을 통한 육안적 간 소견에서는 뚜렷한 변화(괴사등)는 알 수 없었고 간 비대(hepatomegaly)현상도 나타나지 않았다.

혈중 albumin, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN) 및 α -fetoprotein의 혈청 농도의 변화

혈청 albumin농도는 대조군에서 3.4 ± 0.2 g/dl, 사염화탄소 투여 2시간 이후에는 2.1 ± 1.0 g/dl, 8시간 후에는 2.7 ± 0 g/dl로 낮게 나타났다. BUN의 경우 대조군에서 23.2 mg/dl이었고 투여후 2시간, 4시간, 8시간까지에서는 크게 변화하지 않았고 이들 상호간에서의 유의성 역시 인정되지 않았다(Table 1).

혈청 bilirubin농도는 대조군에서는 0.2 ± 0.01 mg/dl

Table 1. Changes of serum albumin, blood urea nitrogen and AFP concentrations after injection of carbon tetrachloride into rats

Hours	Concentrations		
	Albumin (g/dl)	BUN (mg/dl)	AFP (ng/dl)
Control	3.4 ± 0.2	23.2 ± 1.5	-*
2	2.1 ± 1.0	35.2 ± 1.3	-
4	2.5 ± 0.6	25.9 ± 2.7	-
8	2.5 ± 0	22.7 ± 4.3	-

*Not detected

Table 2. Changes of bilirubin concentration after injection of CCl_4 into rats

Group	Hours	Number	Bilirubin (mg/dl)
Control	0	5	0.2 ± 0
	2	5	0.7 ± 0.1^b
	4	5	1.9 ± 0.1^c
	8	5	1.4 ± 0.1^d
	12	5	1.5 ± 0.1^d
CCl_4	24	5	1.8 ± 0.2^e
	48	5	2.8 ± 0.2^f

Table 3. Enzyme activities of LDH and CPK after injection of carbon tetrachloride into rats

Hours	Enzyme activities	
	LDH (IU/L)	CPK (IU/L)
Control	885 ± 43^a	0.6 ± 0.1
2	718 ± 7^b	0.8 ± 0.2
4	1221 ± 1^c	0.6 ± 0.9
8	2193 ± 2^d	0.7 ± 0.3

이었다. 투여후 2시간 이후부터 0.7 mg/dl로 증가하기 시작하여 이후 48시간까지 증가됨을 알 수 있었다(Table 2). 투여후의 경과별 변동에서는 8시간에서 12시간까지에서의 유의성은 인정되지 않았으나 대조군과의 차이는 뚜렷하였고($P < 0.05$), 이후에는 지속적인 증가를 나타내었다. 그리고 Table 1에서와 같이 대조군을 포함한 실험동물에서 α -fetoprotein의 passive hemagglutination반응은 모두 음성으로 나타났다.

혈청효소(LDH 및 CPK) 활성치의 변화

LDH활성치는 대조군에서 885 ± 43 IU/L이었으나 사염화탄소 투여후 2시간부터 증가함을 알 수 있었다. 투여후 2시간, 4시간, 8시간에서의 유의성 인정($P < 0.05$)은 물론 대조군과의 뚜렷한 차이를 볼 수 있었다.

CPK활성치는 대조군에서 0.6 ± 0.1 U/L이었으며 투여후의 시간별 경과에 있어서도 대조군과의 차이는 물론 경과별에 있어서도 대조군과의 차이는 물론 경과별에 따른 변동도 인정되지 않았다(Table 3).

고 찰

간은 생체내 최대의 장기일뿐만이 아니고 다양한 생리기능을 갖고 있음은 다 아는 사실이나 아직까지도 규명되지 못한 부분이 많은 것으로 알려져 있다.

간을 기본적으로 구성하고 있는 실질세포인 간세포(hepatocyte)외에도 간소엽의 膽管의 관벽을 구성하고 있는 소형의 上皮세포 즉 膽管세포, 肝細胞索間의 공간(洞樣血管)을 메우고 있는 內皮세포, 洞樣血管內腔에 존재하면서 식작용을 갖고 있는 Kupffer세포, 洞樣혈관과 肝細胞索사이의 좁은 틈새에 존재하는 섬유아세포 및 지방섭취세포 일명 Itoh세포가 있어 이들의 상호작용에 의해 생리기능을 유지하고 있음은 당연하나^{19,24} 이들의 주된 기능은 역시 간의 총 세포수의 약 65%, 용적의 약 85%를 점유하고 있는 간세포에서 행해지고 있음이 알려져 있어 이들에 대한 기능평가를 위한 기초자료의 일환으로 투여한 결과 최저용량으로 하여 투여한 2시간 이후부터 육안적인 관찰에서도 변화가 있음을 알 수 있어 간 기능장애가 진행되고 있음을 예측할 수 있었다.

간장은 생체내 단백질 합성의 중요기관으로 albumin합성은 물론 다른 혈청단백질의 異化작용에도 관여하는 것으로 알려져 있어 본 연구에서의 혈중 albumin농도의 감소는 투여후 2시간에서 나타났는데 이것은 사염화탄소의 대사산물인 CCl_3 (trichloromethyl free radical)가 endoplasmic reticulum에서의 과산화반응을

일으켜 결과적으로 비가역적인 단백질합성 억제에 의한 것으로 생각된다¹⁵⁻¹⁸. 2시간 이후에서의 변화는 뚜렷하지 않았는데 이것은 투여용량이 매우 낮아 간세포의 재생능력과 연관시켜 볼 필요가 큰 것으로 판단된다.

BUN은 합질소물질의 대사산물로 대개의 경우는 생성속도도 일정하고 주로 신장을 통해 체외로 배설되기 때문에 이들의 농도는 신장 기능장애(뇨붕증등 포함)가 없는 경우는 일정한 것으로 알려져 있어 본 연구결과와 일치하여 사염화탄소의 매우 낮은 농도의 투여에서는 예상과는 달리 타장기에서의 영향은 거의 없는 것으로 예측된다⁹.

α -fetoprotein은 사람을 포함, 가축의 정상 성숙에서는 볼 수 없고 태아 혈청에는 정상적으로 나타나나 신생아(신생축)시기에서 급속히 감소하여 소실되는 태아성 특이 단백질로 알려져 있으나 1963년 러시아의 Abelev가 마우스에 간암 세포주를 이식시켰을때 이 단백질이 혈중에 방출(검출)된 보고에 근거해 특히 원발성 간세포암 진단에 크게 유용한 것으로 알려져 있어 발암 관련과의 검색에서는 실험군 모두에서 대조군과 같이 검출되지 않아 본실험에서도 hepatocarcinogenesis와는 관련이 없는 것으로 밝혀졌다^{22,23}.

Bilirubin농도는 대조군과는 뚜렷한 증가를 지속적으로 나타내어 간세포에서의 bilirubin의 처리능력에 문제가 있음을 시사해 주는 좋은 지표로 생각되었고 대조군에서의 성적과 비교하여 볼 때 간세포성 기능장애로 판단되나 본 실험에서의 총 bilirubin농도 측정만이 아니고 직접형과 간접형 각각에 대한 분석이 있어야 할 것으로 생각된다.

LDH 활성치는 악성 종양에서 증가하는 사실이 알려져 있으나 병태의 원인 분석, 예후판정에도 유용한 지표로 활용되고 있어 본 연구에서의 성적은 대조군에서는 885±43 IU/L 이었으나 투여 후 2시간 이후부터는 지속적인 증가를 나타내어 간 손상과도 관련이 깊음을 알 수 있었다¹²⁻¹³. 최근에는 LDH isozyme의 성상은 장기에 따라서, 연령에 따라서 다름이 밝혀져 이들 isozyme에 대한 분석이 뒤따라야 할 것으로 판단되나 LDH활성치의 증가는 주로 골격근 및 간에서 많이 분포하고 있는 LDH5의 상승에 인한 것으로 생각되어 진단가치가 높은 것으로 생각된다.

CPK활성치는 대조군과 비교하여 실험군에서의 변동을 전혀 볼 수 없었는데 이것은 골격근, 심근 및 중추신경계의 변화시 나타나는 것으로 알려져 있는 바와 같이^{19,26} 간세포를 포함한 간에서의 손상과는 관련이 없는 것으로 추측된다.

결 론

생후 8주령의 Sprague Dawley strain rat(♂)를 사용, 실험적으로 간 기능장애를 유발시키기 위해 최저 용량의 CCl₄를 복강내 투여, 검색한 결과 투여후 2시간 부터는 행동의 둔화, 식욕 및 음수량의 점진적인 감소를 나타내었다. 혈중 albumin농도는 투여후 2시간 이후 부터는 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었으나 이후에서는 경과별에 따른 변동은 나타나지 않았으나 bilirubin농도는 투여후 시간 경과에 따라 유의성 있는 증가를 나타내었다.

LDH활성치는 시간 경과에 따른 지속적인 상승을 나타내었으나 CPK활성치는 시간 경과에 따른 변동은 물론 대조군과도 차이를 나타내지 않았다.

α -fetoprotein은 실험군, 대조군에서 다 같이 검출되지 않았다.

참고문헌

1. Brattin WJ, Glende EAJR, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. J Free Radic Biol Med 1985; 1(1): 27-33.
2. Butler TC. Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1961; 134: 311-319.
3. Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin Chem 1962; 8: 130-136.
4. Comporti M. Biology of disease. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab Invest 1985; 53(6): 599-623.
5. Connor HD, Thurman RG, Galizi MD and Mason RP. The formation of novel free radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and in vivo. J Biol chem 1986; 261: 4542-4548.
6. Cornelius CE. A review of new approaches to assessing hepatic function in animals. Vet Res Commun 1987; 11(5): 423-441.
7. Dumas BJ, Biggs HG. Determination of serum albumins, standard methods of clinical chemistry. Washington D. C.: American Association for clinical chemistry 1972; 7: 175-188.
8. Dawkies MJR. Carbon tetrachloride poisoning in liver of the newborn rat. J Path Bacteriol 1963; 85: 189-196.
9. Feingold KR, Siperstein MD. Abnormalities of glucose metabolism in liver disease. In Hepatology: a textbook of liver disease. (Zakim, D., Boyer, T. W. D.) Philadelphia, WB Saunders, 1982; 499.
10. Formi LG, Packer JE, Slater TF and Wilson RL.

- Reaction of trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids: a pulse radiolysis study. *Chem Biol Interac* 1983; 45: 171-177.
11. Hogg CH, Meites SA. A modification of assay procedure for the micro-determination of total bilirubin. *Am J Tech* 1959; 25: 281-286.
 12. 김길수, 박준형. 사염화 탄소에 의한 랫드의 간손상에 대한 인진호메타놀 추출물의 억제 효과, *Korean J Vet Res* 1994; 34(3): 619-626.
 13. 이창우. 사염화탄소를 투여한 한국 흑염소에 있어서 임상병리학적 검사결과의 변동. *한국임상수의학회지* 1986; 3(2): 99-107.
 14. Okinaka S. *et al.*: Serum creatine phosphokinase activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular disease. *J Lab Clin Med* 1964; 64: 299-305.
 15. Poli G, Albano E and Dianzani MU. The role of lipid reoxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 117-142.
 16. Poli G, Cheseman KH, Slater TF and Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes: Comparative studies *in vitro* usiry microsomes and isolated liver cells. *Chem Biol Interac* 1981; 37: 13-24.
 17. Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 271-278.
 18. Recknagel RO. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life sciences* 1983; 33(5): 401-408.
 19. Recknagel RD, Glende EAJr, Waller RL and Lowrey K. Lipid peroxidation: biochemistry, measurement and significance in liver cell injury, In *Toxicology of the liver*. (Plaa, G. L. and Hewitt, W. R.) New York. Raven Press. 1982
 20. Reynolds ES, Moslen MT. Free-radical damage in liver. In *Free Radical in Biology*. (W. A. Pryor ed) Academic Press, New York 1980; 4: 49-94.
 21. Reynolds ES, Ree HJ. Liver parenchymal cell injury VII: membrane denaturation following carbon tetrachloride. *Lab Invest* 1971; 25: 269-278.
 22. Sherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophysica* 1984; 738: 219-236.
 23. Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 702-703.
 24. Tatsuya K, Shuji K, Motoaki Y, Takeshi I, Yoshio K and Kazuhiko K. Effect of 5,6,7,8,-tetrahydro-neopterin on the Bovine Endothelial cell injury induced by Cumene Hydroperoxide. *Jpn J Pharmacol* 1995; 68: 263-269.
 25. Terao K. Liver injuries induced by free radical. *J Toxicol pathol* 1989; 2: 11-18.
 26. Tomasi A, Albano E, Banni S, Botti B, Corowgin F, Dessi MA, Iannone A, Vanmm V, and Dianzani MU. Free radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of mechanism of activation. *Biochem J* 1987; 246: 313-317.