

## Calcium Channel Blocker가 사염화탄소에 의한 간손상에 미치는 영향 및 조직학적 검경

전명애 · 정춘식 · 정기화\*  
덕성여자대학교 약학대학

### Effect and Histopathologic Examination of Calcium Channel Blocker on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats

Myoung Ae CHUN, Choon Sik JEONG and Ki Hwa JUNG\*  
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received July 14, 1998; accepted August 1, 1998)

**Abstract** – Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induces the hepatotoxicity due to the reactive free radicals generated by cytochrome P-450 (CYP-450) enzyme, which result in destabilization of cellular membrane. Diltiazem, a calcium channel blocking agent, has been known to suppress the CYP-450 enzyme activities. To study the effect of diltiazem in CCl<sub>4</sub>-treated rats, we measured the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and glutathione S-transferase (GST), contents of bilirubin, albumin, total protein, cholesterol, triglyceride, blood urea nitrogen, creatinine malondialdehyde and calcium. Also we conducted liver histopathologic examinations. Diltiazem, when administered 1 hour prior to CCl<sub>4</sub> treatment, significantly reduced the activities of ALT and AST, the contents of microsomal malondialdehyde and calcium in liver and microsome as compared with those of CCl<sub>4</sub>-treated rats. In addition, histopathologic examination showed that diltiazem prevented the development of centrilobular necrosis induced by CCl<sub>4</sub> in liver tissue. Our results suggested that diltiazem could inhibit the formation of free radicals and the influx of calcium. Therefore diltiazem may be applied to suppress the liver damage caused by CCl<sub>4</sub>.

**Keywords** □ CCl<sub>4</sub>, Diltiazem, ALT, AST, GST, Malondialdehyde, Calcium content

인체는 간장에 독작용을 일으키는 활성대사 중간체로 전환될 수 있는 수 많은 환경오염물질들과 화학물질, 식품첨가제 및 의약품 등에 노출되어 있다. 용제로 많이 쓰이는 CCl<sub>4</sub>는 O<sub>2</sub>와 반응하여 trichloromethyl peroxy radicals을 만드는 것으로 알려져 있다(Pohl 등, 1983). 이 radicals은 polyunsaturated fatty acid와 반응하여 간세포에 lipid peroxidation을 일으키거나 세포내의 단백질, 지질 등과 같은 macromolecule들과 결합하여 간세포 괴사를 야기시켜 약물 대사 효소의 활성 소실, glucose 6-phosphatase 활성 소실, 단백질 합성능 소실 및 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 LDL의 생성·유리를 차단해서 급속한 지방 축적을 야기한다고 보고되어 있다(Pecknagel 등, 1973). 또한 이 free radicals은 endoplasmic reticulum(ER)의 calcium pump를 불활성화시킨다. 이로 인해 세포질의 calcium 함량이 증가하고,

원형질막의 이온투과성이 변해서 고농도의 외부 calcium이 세포질 내로 들어오고, 세포 내에 있는 과량의 calcium이 mitochondria로 이동한다. Mitochondria의 calcium 함량이 높아지면 산화적 인산화반응이 저해되어 간세포 괴사에 이르게 된다(Moore 등, 1976).

현재 임상적으로 널리 쓰이는 간질환 치료제로는 biphenyldimethyl dicarboxylate, silymarin, ursodesoxycholic acid 및 vitamin B complex 등이 있으며(Martindale, 1989; Relando 등, 1989; Alfred 등, 1992) 그 질환의 심각성에 비해 치료제의 종류가 많지 않아 간손상 치료제의 개발은 그 의의가 매우 크다.

Diltiazem은 협심증, 부정맥 등을 비롯한 다양한 심혈관 계질환의 치료에 사용되는 benzothiazepine계 calcium channel blocker(CCB)의 일종이다(McAuley 등, 1982; Nayler 등, 1983). Diltiazem은 간에서 CYP-450 의존성 mixed function oxidase (MFO) system에 의해 대사되며 CYP-

\* To whom correspondence should be addressed.

450에 의해 산화받을 수 있는 많은 potential site를 갖기 때문에 간의 MFO system에 의한 다른 약물의 대사를 경쟁적으로 저해한다.

저자 등은 diltiazem의 약물대사효소 저해작용이 CCl<sub>4</sub>의 독성을 저해함으로써 간세포괴사에 억제효과가 있을 것으로 기대하고 CCl<sub>4</sub>로 간손상을 일으킨 흰쥐에 diltiazem을 시간별로 투여하여 calcium 함량과 간세포 괴사에 미치는 diltiazem의 효과와 작용 기전 및 임상적 적용의 가능성을 규명하고자 한다. 이를 위하여 CCl<sub>4</sub>투여 1시간 전과 7시간 후, 1시간 후, 7시간 후에 diltiazem을 복강투여한 후 혈청 ALT와 AST, alkaline phosphatase(ALP) 활성도를 측정하고 bilirubin, albumin, total protein(TP), cholesterol, triglyceride (TG), blood urea nitrogen(BUN) 및 creatinine 등의 함량을 관찰하였다. 또한 간 조직 중의 cholesterol, TG, calcium, 지질 과산화물의 함량 및 GST 활성도를 측정하고 광학현미경을 통해 간조직의 손상정도를 검정한 결과를 보고하고자 한다.

### 실험재료 및 방법

#### 시약과 기기

실험에 사용한 ALT, AST, protein, albumin, cholesterol, TG, bilirubin, BUN, ALP 및 creatinine kit는 Yeongdong Pharmaceutical Co.(Korea)의 제품을, diltiazem은 Hanil Pharmaceutical Co.(Korea)의 제품을 사용하였다. Bovine serum albumin, glycine, 4-chloro-1-naphthol, Tris base, Tris acetate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, sodium citrate, Tris hydrochloride, osmium tetroxide, propylene oxide, toluidine blue, guanidine thiocyanate 및 sodium acetate는 Sigma Chemical Co.(USA)의 제품을 thiobarbituric acid(TBA, BDH Laboratory, England) 및 기타 시약은 Duksan Pharmaceutical Co.(Korea)로부터 시판 특급시약을 구입하여 사용하였다.

기기는 high speed centrifuge(DuPont Sorvall Instrument, Model RC-5C), ultra centrifuge(Beckman Co., Ltd. L-80), microscope(Hitachi H-600), UV spectrophotometer(Hewlett Packard HP 8452A Diode-Array), osterizer blender(Oster Co., Listed 564A household type) 및 tissue tearor(Biospec Products Inc., Model 985-370)를 사용하였다.

#### 실험 동물

Sprague-Dawley계 음성 흰쥐(180~220 g)를 삼육실험동물 연구소(주)에서 공급받아 실내 온도 22±1℃에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 간장손상 유발과 diltiazem 투여

CCl<sub>4</sub>는 corn oil을 vehicle로 하여 0.5 ml/kg의 용량으로 16시간 절식시킨 흰쥐에 복강주사하여 간장손상을 유발시

켰고 이를 4군으로 나누었다. CCl<sub>4</sub> 단독 투여군은 CCl<sub>4</sub>만을 단독으로 투여하였다(이하 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군이라 함). Diltiazem 24 mg/kg을 CCl<sub>4</sub> 투여 1시간 전에 1회 복강투여한 군(이하 D-C 투여군이라 함), diltiazem 12 mg/kg을 CCl<sub>4</sub> 투여 1시간 전과 7시간 후에 총 2회 복강투여한 군(이하 D-C-D 투여군이라 함) 및 CCl<sub>4</sub> 투여 7시간 후에 diltiazem 24 mg/kg을 1회 복강투여한 군(이하 C-D 투여군이라 함)으로 나누어 실험을 시행하였다. CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후 흰쥐를 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하였다. 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리시켜서 얻은 혈청을 검체로 사용하였다. 대조군은 corn oil 0.5 ml/kg을 1회 복강투여하였다.

#### 간장, 신장, 비장 및 흉선의 무게 측정

CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후 체중 및 간장, 신장, 비장 및 흉선의 무게를 측정하여 체중 100 g에 대한 각 장기의 무게로 환산하였다.

#### 혈청 생화학적 분석

혈청 ALT, AST, ALP 활성도, bilirubin, albumin, TP, cholesterol, TG, BUN, creatinine 함량을 분석하였다.

#### 간장의 생화학적 분석

CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후 적출한 간장조직을 phosphate buffer saline(PBS)(pH 7)에 넣고 약 1분간 분쇄한 후 10% liver homogenate를 만들어 cholesterol과 TG 함량을 분석하였다.

#### Microsome과 cytosol 분리

흰쥐 간장을 적출하여 PBS로 혈액 등을 제거한 후 간장의 3배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer(0.1 M Tris Ac, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)를 가하고, 가위로 잘게 세절한 다음, osterizer blender를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 원심분리기로 8,000 g에서 30분, 10,000 g에서 30분간 원심분리한 후 그 상징액만을 취하여 105,000 g에서 90분간 초원심분리시켰다.

여기에서 그 상징액인 cytosol을 분리하였다. 분리한 cytosol은 분주하여 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다. 침전물을 동량의 0.1 M sodium pyrophosphate buffer(0.1 M sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4)로 현탁시켜 144,000 g에서 60분간 초원심분리한 후 얻은 microsome을 50 mM Tris acetate buffer(50 mM Tris acetate, 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기 직전까지 -70℃에서 보관하였다.

모든 조작은 4℃이하에서 실시하였다.

#### 단백정량

단백정량은 Lowry 등(Lowry 등, 1951)의 방법에 따라 실시하였다.

회석된 microsome 및 cytosol 0.6 ml에 0.5 ml Lowry complex(0.2 ml 4% sodium potassium tartrate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate/0.2 N

sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼합하였다.

15분 후 0.1 ml의 Folin Ciocalteu's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질의 농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 산출하였다.

#### 지질과산화물 함량 측정

Microsome의 지질과산화물 함량 측정은 Uchiyama 등 (Uchiyama 등, 1978)의 방법에 따라 시행하였다.

Microsome 0.5 ml에 1%  $H_2PO_4$ , 0.67% TBA 시약을 가하고 95°C water bath에서 45분 교반 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 ml를 가해서 진탕 추출한 후 원심분리하여 butanol층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하여 그 차를 계산하였다.

표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 malondialdehyde(MDA) 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.

#### GST 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 GST 활성도는 Habig 등(Habig 등, 1974)의 방법에 따라 시행하였으며 CDNB가 GST에 의하여 glutathione(GSH)와 포합되었을 때의 고유의 노란색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 산출하였다.

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)와 cytosol 단백질 25  $\mu$ g에 넣고 25°C에서 2분간 방치 후 기질로써 1.0 mM의 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)와 1.0 mM의 GSH를 가하여 총량을 1.0 ml로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100초 동안 흡광도를 측정하였다.

Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol 단백질을 사용하였으며 분자흡광계수 9.6  $\mu$ M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 환산하여 계산하였다.

#### Calcium 함량 측정

간장균질액과 microsome을 원심분리하여 o-cresolphth-

alein complexone과 반응시킨 다음 25°C, 546 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료에서의 calcium 함량을 계산하고 이를  $\mu$ g/mg protein으로 나타내었다.

#### 조직학적 검경

흰쥐의 간장을 2 mm의 두께로 절제하여 10% formalin에 4°C에서 10시간 동안 고정한 후 ethanol로 탈수시켜 xylene으로 처리하였다.

처리 후 paraffin에 포매하여 고체화한 후 microtome을 이용하여 4  $\mu$ m의 두께로 박절한 조직을 유리 슬라이드에 59°C의 열로 부착시킨 다음 xylene으로 처리하고 100% ethanol로 부터 단계적인 농도로 세척하여 절편된 조직을 재수화시켰다. 그 후 통상의 방법으로 hematoxylin-eosin으로 염색하고 광학현미경으로 검경하였다.

#### 통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하였고, 각 군간의 차이는 student t-test를 사용하여 p값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결 과

### 간장, 신장, 비장 및 흉선의 무게

체중에 대한 간장, 신장, 비장 및 흉선의 무게를 Table I에 나타내었다.

간장의 무게는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(4.18 g)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서 각각 3.99, 4.07 및 4.26 g으로 D-C 투여군에서 감소하는 경향을 보였다.

신장, 비장 및 흉선의 무게는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군과 비교하여 차이를 보이지 않았다.

### 혈청생화학적 분석

ALT, AST 활성도를 Table II에 나타내었다. ALT 활성도는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(1002.4 KA unit/l)에 비해 D-C와 C-D

**Table I.** Effects of diltiazem on organ weight in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Liver	Kidney	Spleen (g/100 g Body Weights)	Thymus
Control	-	3.25±0.17	0.43±0.02	0.62±0.06	0.10±0.01
CCl <sub>4</sub>	-	4.18±0.22	0.42±0.02	0.53±0.04	0.11±0.01
D-C	24	3.99±0.13	0.43±0.01	0.51±0.06	0.11±0.01
D-C-D	24	4.07±0.14	0.41±0.02	0.53±0.04	0.10±0.01
C-D	24	4.26±0.09	0.41±0.004	0.47±0.04	0.11±0.01

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

**Table II.** Effects of diltiazem on ALT and AST activities in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	ALT (KA unit/l)	AST (KA unit/l)
Control	-	29.6±4.65	119.1±5.0
CCl <sub>4</sub>	-	1002.4±137.7 <sup>†</sup>	1521.5±86.0 <sup>†</sup>
D-C	24	257.6±60.1**	1021.5±139.2*
D-C-D	24	896.0±173.6	1423.1±52.2
C-D	24	633.3±87.2*	1218.4±88.3*

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

<sup>†</sup>P<0.05 compared to the control group.

\*P<0.05 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

\*\*P<0.001 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1 hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

투여군에서 각각 74.3과 36.8%의 유의성있는 감소를 보였다. AST 활성도는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(1521.5 KA unit/l)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군은 각각 1021.5, 1423.1 및 1218.4 KA unit/l로 D-C와 C-D 투여군에서 유의성있는 감소를 보였다.

ALP활성도와 bilirubin 함량을 Table III에 나타내었다. ALP활성도는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(1.43 KA unit/l)에 비해 D-C 투여군에서 유의성있는 감소를 보였다. Bilirubin 함량은 CCl<sub>4</sub>

**Table III.** Effects of diltiazem on ALP and bilirubin levels in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	ALP (KA unit/l)	Bilirubin (mg/dl)
Control	-	1.11±0.20	8.32±0.78
CCl <sub>4</sub>	-	1.43±0.20	5.35±0.78
D-C	24	0.65±0.09*	2.42±0.34*
D-C-D	24	1.46±0.23	4.84±0.64
C-D	24	1.05±0.05	3.59±0.51*

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

\*P<0.05 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1 hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

**Table IV.** Effects of diltiazem on albumin and TP levels in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Albumin (g/dl)	TP (g/dl)
Control	-	2.94±0.16	5.83±0.58
CCl <sub>4</sub>	-	3.23±0.50	7.92±1.06
D-C	24	4.98±0.54*	4.37±0.78*
D-C-D	24	4.84±1.02	5.28±0.39
C-D	24	4.63±0.54	8.64±0.73

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

\*P<0.05 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1 hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

단독 투여군(5.35 mg/dl)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서 2.42, 4.84 및 3.59 mg/dl로 D-C 투여군에서 유의성있는 감소를 보였으며, C-D 투여군에서도 다소 감소하였다.

Albumin과 TP 함량을 Table IV에 나타내었다. Albumin 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군에 비하여 D-C 투여군에서 유의성있는 증가를 보였으며, D-C-D와 C-D 투여군에서도 증가하는 경향을 보였다. TP 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(7.92 g/dl)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군은 각각 4.37, 5.28 및 8.64 g/dl로 D-C 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

**Table V.** Effects of diltiazem on cholesterol and TG levels in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)
Control	-	61.2±6.8	57.9±18.0
CCl <sub>4</sub>	-	92.0±11.4	89.8±19.1
D-C	24	100.6±18.9	53.5±5.9
D-C-D	24	100.4±7.5	68.3±14.3
C-D	24	96.9±12.1	45.5±11.3

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1 hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

**Table VI.** Effects of diltiazem on BUN and creatinine levels in CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Control	-	17.4±0.6	0.66±0.22
CCl <sub>4</sub>	-	19.4±2.1	0.62±0.30
D-C	24	20.8±1.9	0.61±0.09
D-C-D	24	18.9±0.4	0.35±0.16
C-D	24	23.4±0.5	0.59±0.23

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

**Table VII.** Effects of diltiazem on cholesterol and TG levels in the liver of CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Cholesterol (mg/g liver)	TG (mg/g liver)
Control	-	6.76±0.04	13.4±2.3
CCl <sub>4</sub>	-	11.39±1.11	19.5±2.6
D-C	24	8.57±0.76	18.8±1.9
D-C-D	24	12.46±0.77	24.7±2.5
C-D	24	11.97±0.69	25.7±2.2

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

Cholesterol과 TG 함량을 Table V에 나타내었다. Cholesterol 함량은 정상군에서 61.2 mg/dl이었고 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(92.0 mg/dl)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서 각각 100.6, 100.4 및 96.9 mg/dl로 차이를 보이지 않았다. TG 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(89.8 mg/dl)에 비해 모든 투여군에서 감소하는 경향을 보였다.

BUN과 creatinine 함량을 Table VI에 나타내었다. BUN 함량은 정상군에서는 17.4 mg/dl이었고 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(19.4 mg/dl)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서 각각 20.8, 18.9 및 23.4 mg/dl로 차이를 보이지 않았다. Creatinine 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(0.62 mg/dl)에 비해 D-C-D 투

**Table VIII.** Effects of diltiazem on MDA level in the liver microsome of CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	MDA (nmol/mg protein)
Control	-	0.17±0.01
CCl <sub>4</sub>	-	0.20±0.01
D-C	24	0.16±0.01*
D-C-D	24	0.17±0.01
C-D	24	0.13±0.01*

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

\*P<0.05 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

여군에서 감소하는 경향을 보였다.

#### 간장조직 중 Cholesterol과 TG 함량

간장조직액에서의 cholesterol과 TG 함량을 Table VII에 나타내었다.

Cholesterol 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(11.39 mg/g)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서 각각 8.57, 12.46 및 11.97 mg/g로 차이를 보이지 않았다. TG 함량에 있어서도 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군의 19.5 mg/g과 비교하여 모든 투여군에서 차이를 보이지 않았다.

#### 지질과산화물 함량

Microsome에 존재하는 지질과산화물 함량을 Table VIII에 나타내었다.

MDA 함량은 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(0.20 nmol/mg protein)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군에서는 각각 0.16, 0.17 및 0.13 nmol/mg protein으로 D-C와 C-D 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

#### GST 활성도

Cytosol에 존재하는 GST의 활성도를 Table IX에 나타내었다.

각 실험군의 간장에서 분리한 cytosol을 CDNB를 기질로 하여 GST활성도를 측정한 결과 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(0.41 μmol/min/mg protein)에 비해 D-C, D-C-D 및 C-D 투여군은 각각 0.44, 1.00 및 0.95 μmol/min/mg protein으로 D-C-D와 C-D 투여군에서 유의성 있는 증가를 보였다.

#### Calcium 함량

간장조직과 microsome에서의 calcium 함량을 Table X에 나타내었다.

**Table IX.** Effects of diltiazem on GST activity in the liver cytosol of CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
Control	-	1.01 $\pm$ 0.03
CCl <sub>4</sub>	-	0.41 $\pm$ 0.08
D-C	24	0.44 $\pm$ 0.02
D-C-D	24	1.00 $\pm$ 0.05*
C-D	24	0.95 $\pm$ 0.03*

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

\*P<0.01 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1 hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

**Table X.** Effects of diltiazem on calcium contents in the liver and microsome of CCl<sub>4</sub> treated rats

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Liver ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Microsome ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Control	-	1.28 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.09
CCl <sub>4</sub>	-	3.21 $\pm$ 0.12	2.18 $\pm$ 0.17
D-C	24	1.67 $\pm$ 0.07**	0.53 $\pm$ 0.09**
D-C-D	24	3.51 $\pm$ 0.57	2.27 $\pm$ 0.08
C-D	24	2.18 $\pm$ 0.16*	0.52 $\pm$ 0.09*

The values are expressed as mean S.E. (n=6).

\*P<0.01 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

\*\*P<0.001 compared to the CCl<sub>4</sub> group.

Control: Corn oil, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, 0.5 ml/kg, was given as intraperitoneal injections.

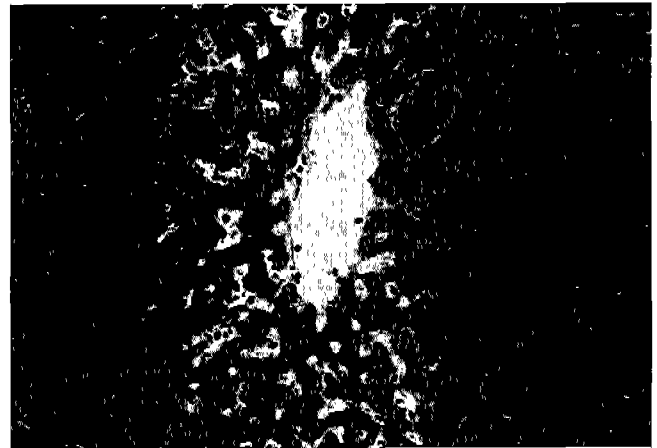
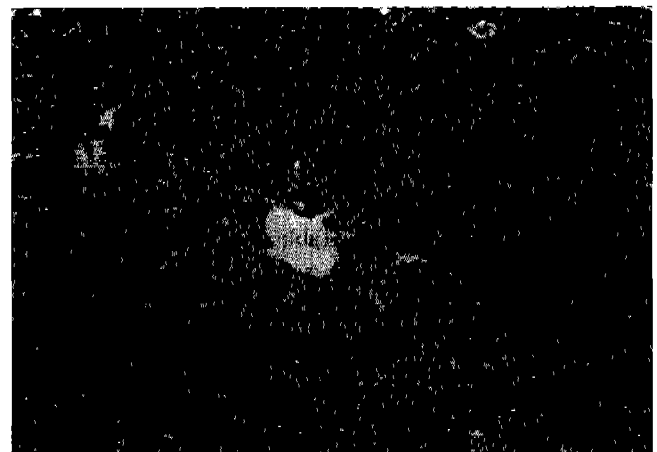
D-C: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 1hr prior to CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

D-C-D: Diltiazem, 12 mg/kg, was administered 1 hr prior to and 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

C-D: Diltiazem, 24 mg/kg, was administered 7 hr post CCl<sub>4</sub> as intraperitoneal injections.

간장조직에서의 calcium 함량은 정상군에서 1.28  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein이었고 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군은 3.21 $\pm$ 0.12  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein으로 정상군에 비하여 150%의 증가를 보였다. D-C, D-C-D 및 C-D 투여군은 각각 1.67, 3.51 및 2.18  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein으로 D-C와 C-D 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

Microsome에서의 calcium 함량은 정상군에서 0.44  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein이었고 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(2.18  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein)에 비해 D-C와 C-D 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다.

**Fig. 1.** Histological findings in normal rat (H&E,  $\times$ 100) Note well-preserved lobular architecture.**Fig. 2.** Histological findings in CCl<sub>4</sub> group (H&E,  $\times$ 100) Note congestion and necrosis (upper two-thirds of figure).**Fig. 3.** Histological findings in the D-C group (H&E,  $\times$ 100) Note recovery of hepatocyte.

### 조직학적 검경

광학현미경( $\times$ 100)으로 관찰한 결과를 Fig. 1에서 Fig. 5

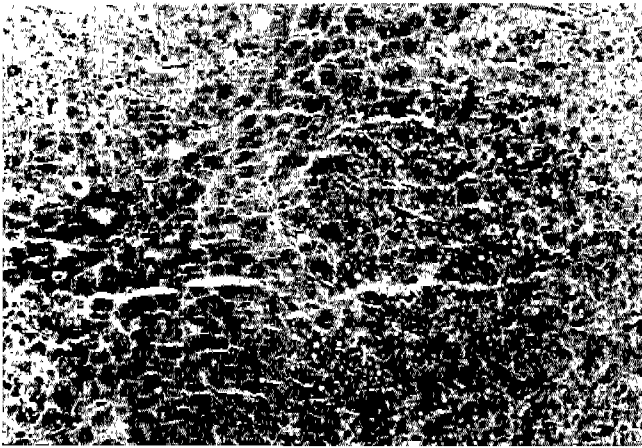


Fig. 4. Histological findings in the D-C-D group (H&E, ×100) Note massive necrosis and vacuolar degeneration.

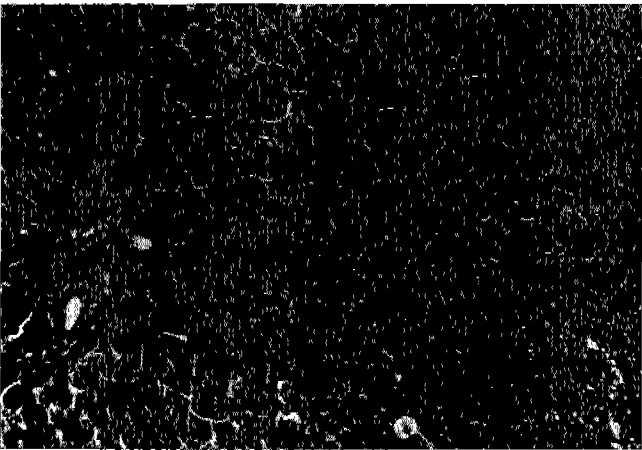


Fig. 5. Histological findings in C-D group (H&E, ×100) Note recovery of hepatocyte but, focal congestion.

까지 나타내었다.

Fig. 1은 정상군으로 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있었다. Fig. 2는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군으로서 중심소엽주위의 간세포 괴사와 광범위한 울혈이 보여진다. Fig. 3은 D-C 투여군으로 간세포의 손상정도가 거의 정상군과 같이 회복된 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4는 D-C-D 투여군으로 광범위한 괴사와 vacuolar degeneration이 보여지며 Fig. 5는 C-D 투여군으로 세포손상이 약간 회복되었으나 부분적인 울혈을 관찰할 수 있었다.

### 결론 및 고찰

CCl<sub>4</sub>의 독성은 CYP-450에 의해 생성되는 매우 반응성이 큰 toxic free radical인 CCl<sub>3</sub>·에 기인한다. CCl<sub>3</sub>·는 막의 인지질에 있는 이중불포화지방산의 methylene carbon을 공격하여 지질과산화물을 일으킨다. 이 반응은 peroxide rad-

icals로부터 새로운 radical이 계속 생성되는 자기촉매반응이므로 ER의 막의 구조와 기능이 급속도로 파괴된다. CCl<sub>4</sub>에 의한 세포손상은 정도가 매우 심하고 발현이 극히 빠르다. 즉 30분 이내에 간장의 단백 합성능이 떨어지고, 2시간 이내에 smooth ER의 팽윤과 rough ER으로부터 ribosomes의 해리가 보여진다. 또한 triglyceride와 lipid acceptor protein으로부터 lipoprotein을 형성할 수 없기 때문에 지방의 축적이 일어난다. 즉 CCl<sub>4</sub>에 의한 지방간의 형성이 초래된다. 또한 mitochondria 및 원형질막의 손상으로 인해 세포내로 과도한 calcium의 유입이 일어나고 결국 세포괴사에 이르게 된다(Cotran 등, 1994).

본 연구에서는 CCl<sub>4</sub>로 간장손상을 일으킨 흰쥐에 시간별로 diltiazem 24 mg/kg을 복강투여(Koubach 등, 1990)한 후 각 장기의 무게와 간장손상의 지표가 되는 여러 효소들을 혈청 및 간장조직을 사용하여 분석하였으며 조직학적 병변의 여부를 광학현미경으로 검경하였다.

CCl<sub>4</sub>를 투여한 흰쥐의 각 장기의 무게에 미치는 diltiazem의 영향을 살펴본 결과 D-C 투여군에서 간장의 무게가 감소하는 경향을 보여 간손상의 억제효과를 확인하였다(Yamada 등, 1993). 본 실험에서 ALT활성도는 D-C와 C-D 투여군에서 각각 74.3과 36.8% 감소하였으며 AST활성도 또한 D-C와 C-D 투여군에서 유의성있는 감소를 보였다. CCl<sub>4</sub> 투여 후 AST활성도 증가에 비해 ALT활성도 증가가 높은 것은 ALT가 AST보다 간장의 실질세포파괴에 직접적인 관련이 있다는 견해(Plaa 등, 1982)와 일치되는 결과이며 diltiazem을 투여한 모든 군에서 bilirubin함량이 다소 감소한 결과는 간장에서의 glucuronic acid 포함 반응에 의한 것으로 생각된다.

간장질환과 영양장애의 지표로 사용되는 TP 함량은 D-C 투여군에서 감소를 보였는데 이는 새로운 단백질합성을 위한 amino acid로 이용되기 위해 총단백이 분해된 것으로 생각된다.

본 실험에서 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군에서 고cholesterol혈증이 나타났는데 이는 간장손상으로 인한 배설장애에 기인한 것으로 생각된다. D-C 투여군에서 증가된 cholesterol과 TG 함량이 다소 저하됨을 볼 수 있었다.

지질과산화물을 TBA법에 의해 측정된 결과 D-C와 C-D 투여군에서 유의성있는 감소를 보였으므로 diltiazem이 free radical 과다 생성으로 인한 조직 손상에 방어 효과가 있는 것으로 판단되며 이는 diltiazem이 CYP-450을 경쟁적으로 저해하기 때문으로 생각된다(Renton, 1984).

GST는 호기성 세포의 세포질에 주로 존재하는 phase II 대사효소로 세포내로 유입된 약물들의 대사로 인해 생성되는 oxygen free radical이나 친전자성 독성물질에 GSH의 thiol기를 포함시킴으로써 독성화합물의 해독화 작용을 한다(Vos 등, 1990). 본실험에서 D-C-D와 C-D 투여군에서

CCl<sub>4</sub> 단독 투여군에 비해 유의성있는 증가를 보임으로써 해독화과정에 관여하는 GST활성도 증가가 간세포보호작용에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

간장조직과 microsome에서의 calcium 함량을 측정할 결과 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군에서 증가된 calcium 함량이 D-C와 C-D 투여군에서 감소함을 확인할 수 있었는데 이를 통해 diltiazem이 세포내로의 calcium 유입을 억제하여 간세포보호작용을 하였음을 추정할 수 있다. 그러나 CCl<sub>4</sub> 투여 12시간 후에 CCB를 투여한 경우 간세포로의 calcium의 유입 및 괴사의 발현을 억제할 수 없었는데 이를 통해 membrane microviscosity가 너무 낮아진 후의 CCB의 투여는 효과가 없을 수 있다.

CCl<sub>4</sub>를 투여한 흰쥐의 간세포를 염색하여 전자현미경을 통해 calcium의 증가가 중심소엽부위에서 집중적으로 나타나며(Reynolds 등, 1968) 산소공급이 적은 부위일수록 calcium의 증가에 있어서 감수성이 더 크다(Landon 등, 1984). 광학현미경을 이용한 점경 결과 D-C 투여군에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 간장손상이 대부분 회복됨을 관찰할 수 있었고 C-D 투여군에서 부분적인 회복을 볼 수 있었는데 이는 ALT 및 AST 등을 포함한 간장기능의 지표가 되는 여러 분석자료와 D-C와 C-D 투여군에서 개선효과가 보인 것은 상관성이 있다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때 diltiazem을 CCl<sub>4</sub> 투여 1시간 전에 전처치하였던 D-C 투여군에서 효소의 활성도 및 MDA함량의 저하와 간세포 괴사의 개선이 가장 뚜렷하였는데 이는 diltiazem의 전처치로 인한 간세포내로의 calcium 유입의 차단과 CCl<sub>4</sub>로부터의 free radicals 생성 저해작용에 기인하는 것으로 추정된다.

간세포에 대한 CCB의 보호작용이 심허혈에서도 매우 유사하게 일어나는데 심허혈 후의 reperfusion은 매우 급속한 calcium의 유입으로 인해 심장 세포 괴사에 이르게 되는데 초기의 CCB의 투여는 calcium의 증가와 이에 따른 세포 손상을 감소시킨다. 이와 유사한 보호작용들이 신장 허혈에서도 보여진다. CCB의 이와 같은 세포 손상의 억제 효과는 CCl<sub>4</sub>와 같은 화학물질에 의한 독성 뿐만 아니라 심장 수술 및 이식을 위한 신장의 보관과 같은 허혈 상황에서도 활용될 수 있으리라 생각된다(Landon 등, 1984).

### 감사의 말씀

본 연구는 98년도 덕성여자대학교와 98년도 과기처 선도 기술개발과제 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

### 참고문헌

Alfred, G. G., Theodore, W. R., Alan, S. N. and Palmer, T.

- (1992). The pharmacological basis of therapeutics, Maxwell Macmillan International Editions, 1523-1552.
- Castro, J. A., Cignoll, E. V., Castro, C. R. DE, and Fenos, O. M. (1972). Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by carbon tetrachloride, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 49-57.
- Castro, J. A., Ferreyra, E. C. DE, Castro, C. R. DE, and Fenos, O. M. DE. (1973). Studies on the mechanism of cystamine prevention of several liver structural and biochemical alterations caused by carbon tetrachloride, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **24**, 1-19.
- Cotran, R. S., Kumar, V. and Robbins, S. L. (1994). Pathologic basis of disease, 4-17.
- Ferreyra, E. C. DE, Fenos, O. M. DE, Bernacchi, A. S., Castro, C. R. DE, and Castro, J. A. (1977). Treatment of carbon tetrachloride induced liver necrosis with chemical compounds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **42**, 513-521.
- Gordis, E. (1969). Lipid metabolites of carbon tetrachloride, *J. Clin. Invest.*, **48**, 203-209.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Koubach, A. B. and Souich, P. (1990). Effect of diltiazem on acetaminophen and phalloidine hepatotoxicity. *Research Communication in Chemical Pathology*, **68**, 143-157.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Rasndall, R. R. (1951). Protein measurement with the foline phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Marchand, C., Mclean, S. and Plaa, G. L. (1970). The effect of SKF 525A on the distribution of carbon tetrachloride in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **174**, 232-238.
- Marchand, C., Mclean, S., Plaa, G. L. and Traiger, G. (1971). Protection by 2-diethylaminoethyl-2-2-diphenyl valerate hydrochloride against carbon tetrachloride hepatotoxicity. A possible mechanism of action, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 869-875.
- Martindale. (1989). The Extra Pharmacopoeia, The pharmaceutical Press, 1613.
- Marzi, A., Toranzo, E. D. G. DE, and Castro, J. A. (1980). Mechanism of chlorpromazine prevention of carbon tetrachloride-induced liver necrosis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **52**, 82-88.
- Moore, L., Davenport, G. R. and Landon, E. J. (1976). Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to in vivo administration of carbon tetrachloride, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1197-1201.
- Nayler, W. G. and Horowitz, J. D. (1983). *Pharmac. Ther.*, **20**, 203.
- Pecknagel, R. D. and Glende, E. A. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **2**, 263-297.
- Pohl, L., Schulick, R., Hight, R. and George, J. (1983). Identification of dichloromethyl carbene as a metabolite of carbon tetrachloride, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 367-372.
- Pohl, L., Schulick, R. and George, J. (1986). Reductive oxygenation mechanism of metabolism of carbon tetra-



- chloride to phosgene by cytochrome p. 450, *Mol. Pharmacol.*, **25**, 318-324.
- Rees, K. R. (1962). Cellular injury by drugs. In *Enzyme and Drug Action*, 344-358.
- Relando, C., Garrido, A., Guerra, R. and Valenzuela, A. (1989) Silybin Dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver, *Planta Medica.*, **55**, 417-419.
- Reynolds, E. S. and Yee, A. G. (1968). *Lab. Invest.*, **19**, 273.
- Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978). *Anal. Biochem. Biochem.*, **86**, 271-278.
- Vos, R. E. M. and Van Bladem, P. J. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics, *Chem. Biol. Interact.*, **41**, 241-265.