

흰쥐에서 DWP-04가 D-galactosamine에 의해 유도된 간독성의 보호효과

이정희¹ · 지상철¹ · 김석현² · 신영호³ · 최종원*

경성대학교 약학대학, ¹성균관대학교 약학대학, ²동아대학교 식품영양학과, ³(주)대우약품

Received January 31, 2005 / Accepted June 7, 2005

Protective Effect of DWP-04 Against Hepatotoxicity Induced by D-galactosamine. Jung-Hee Lee, Sang-Cheol Chi¹, Seok-Hwan Kim², Young-Ho Shin³ and Jongwon Choi*. *College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan, 608-736, ¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, ²Department of Food and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, ³Dae Woo Pharmaceutical Ind. Co. Busan 604-031, Korea* – This study was conducted to investigate the biological activity and hepatoprotective effect of DWP-04 [DDB : selenium yeast : glutathione (31.1 : 6.8 : 62.1(w/w/w))] in D-galactosamine (GalN) intoxicated rats. The DWP-04 (50, 100 or 200 mg/kg) or its vehicle was orally administered everyday before the start of GalN injection (400 mg/kg, ip) for two weeks and animal decapitated for 24 hrs after GalN-injected. The activities of serum enzymes, markers of liver function, were increased in the GalN group compared to normal group and significantly lowered in the DWP-04 pretreated group than in the GalN group. Hepatic lipid peroxide level and activities of phase I enzymes were significantly higher than those of GalN group compared to normal group and lower in the DWP-04 pretreated group than in the GalN group, and phase II enzyme activities in liver were lower in the GalN group than in the normal group and were increased in the DWP-04 pretreated group than in the GalN group. Total hepatic glutathione content and glutathione biosynthesis enzymes were lower in the GalN group than in the normal group and were increased in the DWP-04 pretreated group than in the GalN group. Therefore, the current results indicated that DWP-04 administration alleviated the GalN-induced adverse effect through enhancing the antioxidant enzyme activities.

Key words – DWP-04, biphenyldimethyl dicarboxylate, selenium yeast, glutathione, hepatotoxicity, D-galactosamine

간질환은 여러가지 원인에 의하여 빈번히 일어나며 특히 과도한 스트레스, 음주, 흡연 및 약물에 의하여 빈번히 일어나고 있으며 인체에 치명적인 위험을 가하므로써 사회적으로 지대한 관심의 대상이 되고 있다. Aminosulfate의 한 종류인 galactosamine(GalN)은 간세포에 독성을 나타내며, 실험동물에 투여시 간세포의 지방변화, 염증세포 침윤 및 간세포의 괴사 등의 간염과 유사한 병변을 유도한다. GalN은 galactose 대사장애를 통한 UTP, UDP 및 UMP등의 농도감소로 RNA의 합성이 저해되어 지질의 축적을 유도하고 또한 세포막 성분 중 탄수화물의 조성과 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 변화시켜 간조직의 손상을 유발한다[1-3]. GalN의 급성중독시에는 간괴사, 만성 중독의 경우는 간경변과 세포성 종양이 일어나게 된다. GalN의 대사계를 살펴보면 체내에 섭취된 GalN은 간 microsomal 산화계에 의하여 산화되어 무독성인 D-glucuronic acid로 대사되어 소변으로 배설되며 일부는 glutathione과 포함되어 배설되는 것으로 알려져 있다[4-6]. Glutathione은 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 사용하여 γ -glutamylcysteine synthetase에 의해서 합성된 황 함유 분자단을 가진 대표적인 생체 항산화물질로서 단백질의

분해나 합성, DNA의 합성 및 thiol기의 저장 등에 직접 관여하며[7,8], 생리적으로 중요한 여러 가지 해독반응에 직,간접적으로 작용하는데, glutathione peroxidase에 의한 반응이나, 비효소적으로 직접 유리기 소거 반응에 관여하기 때문에 유리기에 의한 세포손상의 방에 glutathione의 역할은 대단히 중요한 것으로 알려져 있다. 셀레늄[9,10]은 glutathione peroxidase의 구성성분으로 생체내 효소의 구성성분으로 작용하고 있으며, DDB(biphenyldimethyl dicarboxylate)는 북미 미자(Schizandrae chinesis)의 열매에서 분리된 활성 성분인 Schizandrin C의 합성동족체의 하나로서 간질환에 효과가 있다고하여 임상에 널리 사용되고 있다[11,12]. 이에 본 연구에서는 DDB와 glutathione, selenium yeast를 혼합한 혼합제(DWP-04)의 간기능 보호효과의 기전을 연구할 목적으로 실험동물에 DWP-04를 전처리하고 GalN의 투여로 간장해를 유발한 후 간독성 보호효과를 검색한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료제조 - DWP-04의 조제는 DDB : Selenium yeast : Glutathione을 31.1 : 6.8 : 62.1 (w/w/w) 비율로 혼합하였으며 각각의 시료는 (주)대우약품에서 공급받아 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4883, Fax : +82-51-628-6540
E-mail : jwchoi@ks.ac.kr

실험동물 및 실험설계 - 실험 동물은 대한 BioLink(충북 음성)로부터 분양 받은 체중 200±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 SPF 흰쥐를 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도 : 22±1℃, 습도 : 55±3%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨후 사용하였다. DWP-04는 2% Tween 80에 현탁(50, 100, 200 mg/kg)하여 2주간 rat용 zode를 사용하여 경구로 투여하고 투여 마지막날 D-galactosamine 400 mg/kg을 복강내로 주사하고 24시간 후에 동물을 처치하였으며 실험동물은 처치 전 12시간동안 사료를 제거하고 물만 섭취케하였다.

혈액 성분의 측정 - 혈청생화학적 검사는 실험동물을 CO₂ gas로 마취하여 개복하고 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였으며, 이를 -20℃에 즉시 보관하여 분석에 사용하였다. Aspartate/alaline aminotransferase (AST/ALT), sorbitol dehydrogenase (SDH), γ-glutamyltranspeptidase (γ-GTP), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH)의 분석은 clinical spectrophotometer (Shimadzu, CL-770, Japan)을 사용하였다.

간조직에서의 변동 - 체혈을 마친 실험동물에서 간을 적출하여 간조직을 관류하여 간조직에서 혈액을 제거한 간조직에서 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)의 함량측정은 Buege와 Aust의 방법[13], Glutathione (GSH)의 함량측정은 Griffith의 방법[14]에 준하였다. 간조직 일정량에 potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하고 glass-tefron homogenizer로 마쇄하고, 고속 및 초고속 원심분리(105,000×g, 1hr) 하여 mitochondria, cytosol 및 microsomal분획을 얻어 이를 효소액으로써 xanthine oxidase (XO)의 활성측정은 Stirpe와 Della 방법[15], aldehyde oxidase (AO)의 활성측정은 Rajagopalan등의 방법[16], aninopyrine N-demethylase (AD)의 측정은 Nash의 방법[17], aniline hydroxylase (AH)의 활성 측정은 Bidlack등의 방법[18], glutathione S-transferase

(GST)의 활성 측정은 Habig 등의 방법[19], superoxide dismutase (SOD) 활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법[20], catalase 활성의 측정은 Aebi의 방법[21], glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성의 측정은 Paglia와 Valentine의 방법[22], γ-glutamylcystein synthetase (γ-GCS)의 측정은 Meister와 Richman의 방법[23], glutathione reductase (GR)의 활성 측정은 Mize와 Langdon의 방법[24]에 준하여 측정하였다.

단백질 정량 및 통계처리 - 단백질 정량은 bovine serum albumin (Sigma Fr.IV)을 표준품으로 하여 Lowry등의 방법[25]에 따라서 측정하였으며, 실험결과는 평균치±표준편차로 표시하였고 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하였다. P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

혈중 생화학적 변동

DDB혼합제제인 DWP-04 (50, 100, 200 mg/kg)을 2주간 전처리하고 GaIN을 투여하여 간독성을 유발시킨 다음 혈중 간지표에 미치는 생화학적 변동을 관찰한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 정상군의 aminotransferase, SDH, γ-GTP, ALP, 및 LDH의 활성은 GaIN 중독에 따라 현저히 증가되었으나 DWP-04를 투여함으로써 용량의존적으로 억제되었으며 특히 100, 200 mg/kg의 투여에서 유의성 있게 감소하였다. Transaminase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상적으로 가장 많이 이용되고 있는 aspartate aminotransferase (AST)와 alinine aminotransferase (ALT)[26]가 있는데 이들 효소들은 아미노산과 α-keto acid와의 사이에 아미노기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있다. 이들이 간손상의 지표로 널리 이용되는 것은 간세포가 손상 되면 세포 밖으로 유출되는 효소이기 때문이다. 이러한 유출과정은 세포내의 energy공급이 감소되어 세포내의 K⁺이

Table 1. Effect of pretreated of DWP-04 on the serum enzyme activities in D-galactosamine-induced hepatitis rats

Group	Dose (mg/kg)	ALT	AST	SDH	γ-GTP	ALP	LDH
		IU/L		mU/ml		K-A unit	Wroblewski unit
Normal		30.9±3.5 ^a	61.4±9.91 ^a	19.4±5.32 ^a	28.6±3.54 ^a	39.4±3.17 ^a	30.7±5.01 ^a
GaIN		793.2±54.3 ^c	957.9±30.2 ^d	198.1±32.2 ^d	116.7±4.27 ^d	147.6±10.3 ^d	97.6±6.77 ^d
GaIN+DWP-04	50	860.3±36.6 ^c	639.4±23.2 ^c	102.2±20.1 ^c	76.3±10.90 ^c	89.6±6.57 ^c	56.5±6.63 ^c
	100	396.7±47.9 ^b	497.6±33.4 ^b	79.3±19.3 ^{b,c}	65.3±9.43 ^c	70.2±16.54 ^b	41.9±5.42 ^b
	200	351.9±33.2 ^b	510.2±20.5 ^b	52.9±18.5 ^{a,b}	41.6±3.56 ^b	58.7±4.63 ^b	35.7±3.26 ^{a,b}

Rats were orally peradministered DWP-04 daily for unsecutive two weeks and then D-galactosamine (GaIN 400 mg/kg) was intraperitoneally injected at a time. Rats were decapitated 24hr after the injection of GaIN. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (p<0.05).

ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, SDH: sorbitol dehydrogenase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactate dehydrogenase

온이 세포외로 유출되고 Na^+ , Ca^{++} 및 수분이 세포내로 유입이 되면서 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST 및 ALT는 순환 혈액 중으로 빠르게 유입되어 간 손상시 정상치보다 현저히 증가됨으로써 간기능 검사에 이용되고 있다. Sorbitol dehydrogenase (SDH)[27] 또한 간장에 존재하는 효소로서 fructose와 sorbitol의 상호전환과 가역적인 산화환원 반응의 촉매로서 작용하는 효소로 간 질환이 있을 때 현저히 증가되므로 간기능 검사의 지표로 널리 사용되고 있다. γ -Glutamyltransferase (γ -GTP)[28]는 γ -glutamyl기를 다른 peptide나 1-amino acid에 전이하는 전이 효소로서 간 특효소로 알려져 있다. 이 효소 또한 간조직 손상시 혈중으로 유출이 증가되므로 간기능의 지표 검사에 많이 이용되고 있다. Alkaline phosphatase (ALP)[29]는 monoesterified phosphoric acid를 가수분해 하는 효소로서 담즙 울체 및 간 질환에서 증가되는 효소이며, lactate dehydrogenase (LDH)[30]는 생체내에서 해당계의 최종 단계에서 작용하는 효소로 L-lactate를 pyruvate로 전환하는 가역반응을 촉매하는 효소로서 이 효소 또한 간 질환시 증가되는 것으로 알려져 있다. 혈청 aminotransferase, SDH, γ -GTP, ALP, 및 LDH는 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 잠재성 간장애의 분류 및 급성간염 발병의 조기진단에 필수적인 요소로서 간조직 손상시 다량 혈중으로 유출되어 그 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다[31]. 본 실험에서 DWP-04의 전처리로 GaIN에 의하여 유도된 여러효소의 활성이 억제되는 것은 이들이 GaIN에 의한 간조직의 손상을 억제하거나 간 세포막을 안정시킴으로써 나타나는 결과로 사료되어진다.

지질과산화물의 함량에 미치는 영향

DWP-04를 50, 100, 200 mg/kg을 2주간 경구 투여한 후 GaIN 처리로 의해 간독성이 유도된 실험동물에 대한 간조직 중의 지질과산화 함량변화를 실험한 결과가 Fig. 1과 같다. 정상쥐에 GaIN을 투여함으로써 과산화물이 현저히 증가되던 것이 DWP-04의 투여에 의해 현저히 감소하였다.

일반적으로 생체조직 세포막의 손상은 세포막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 그 한가지 요인으로 지적되고 있는데, 지질과산화의 생체 외적인 요인뿐만 아니라 내적인 요인에 의하여 생성된 oxygen free radical들 때문에 야기되며, 세포의 성분이나 기질, 특히 불포화지방산이 다량 존재하는 세포막에 연쇄적인 과산화적 손상을 입힌다. 또한 생체는 free radical의 독작용을 저지시켜주는 free radical scavenging system이 존재하고 있고 여러가지 손상으로부터 보호받고 있다. 그러나 어떠한 원인에 의해 free radical generating system과 scavenging system 사이의 불균형이 초래되어 질때에는 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등과 같이 여러가지 독작용을 유발한다고 한다[32]. 지질과

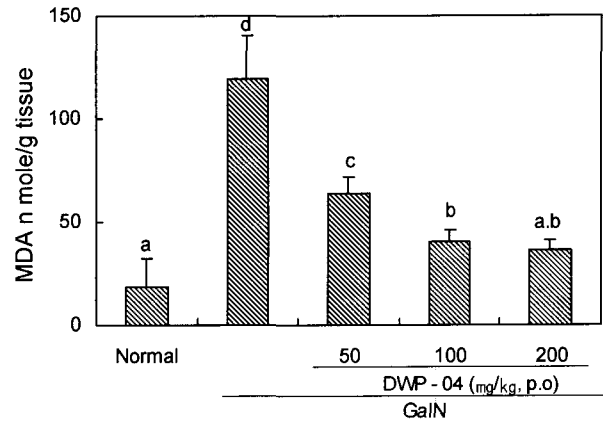


Fig. 1. Effect of DWP-04 on the hepatic lipid peroxide (mean \pm S.D.) in D-galactosamine-intoxicated rats. The means sharing a common letter are not significantly different ($p < 0.05$) between groups.

산화는 자동산화 반응에 의한 다가 불포화지방산에 산소가 부가된 생산물의 총칭이다. 이것은 병태 생리 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표이다. 지질과산화는 불포화 지방산 구성성분이 많고 인지질의 함량이 풍부한 mitochondria, microsome, erythrocyte 및 platelet 등의 막에서 쉽게 일어날 수 있다[33]. 지질과산화는 세포막의 투과성을 향진시키고 전반적인 세포독성을 초래하여 세포기능을 저하시켜 괴사에 관여하여 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유발하여 발암의 과정에도 관여할것이라고 Ahokas 등은 보고하였다[34]. 본 실험의 결과 DWP-04의 투여가 GaIN에 의해 생성되는 지질과산화물을 감소시킴으로서 지질과산화반응에 의한 간 손상을 억제시키는 것으로 사료된다.

활성 산소 생성계에 미치는 영향

체내에 투여되어진 약물 및 독성물질의 대사과정은 phase I 반응과 phase II 반응으로 나눌 수 있으며, Table 1에서 DWP-04가 GaIN에 의하여 유도된 지질과산화의 억제효과가 어떠한 기전에 의하여 나타나는가를 검토할 목적으로 간장에서 일어나는 활성산소의 생성계인 phase I 반응 중 cytosol 효소계 및 microsomal 효소계에 미치는 DWP-04의 효과를 관찰한 성적이 Table 2이다. DWP-04를 2주간 전처리하고 마지막 GaIN을 투여하였을 때 cytosolic 효소인 xanthine oxidase (XO)와 aldehyde oxidase (AO)의 활성이 GaIN의 투여로서 현저히 증가되던 것이 DWP-04를 전처리 (100, 200 mg/kg) 하므로써 용량의존적으로 유의성 있게 억제되었다. 한편 microsomal 효소계인 aminopyrine N-demethylase (AD) 및 aniline hydroxylase (AH)의 활성도 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. XO는 모든 생물 종에 분포하며, 동물조직에서는 간과 소장외의 세포질에 주로 존재하는것으로 purine과 pyrimidine을 산화시키고, hypoxanthine을 산화시켜 xanthine

Table 2. Effect of DWP-04 on phase I enzyme activities in D-galactosamine-intoxicated rats

Group	Dose (mg/kg)	Activity			
		XO [*]	AO ^{**}	AH ^{***}	AD ^{****}
Normal		2.98±0.67 ^{a1,2)}	30.41±1.74 ^a	1.58±0.17 ^a	3.86±0.33 ^a
GalN		13.30±3.41 ^b	56.78±7.03 ^c	3.87±0.13 ^d	9.26±0.58 ^d
GalN+DWP-04	50	5.72±1.18 ^a	46.01±7.23 ^b	2.19±0.11 ^c	6.97±0.29 ^c
	100	3.77±0.49 ^a	37.30±2.11 ^{a,b}	1.82±0.13 ^b	5.63±0.42 ^b
	200	3.41±0.32 ^a	35.47±3.69 ^a	1.70±0.09 ^{a,b}	4.85±0.50 ^b

1) Values are mean±SD of eight experiments.

2) Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p<0.05)

^{*} : Xanthine oxidase; uric acid nmole /mg protein / min

^{**} : Aldehyde oxidase; 2-pyridone nmole /mg protein / min

^{***} : Aminopyrine N-demethylase; HCHO nmole/mg protein/min

^{****} : Aniline hydroxylase; P-aminophenol nmole/mg protein/min

을 만들며 xanthine로부터 uric acid 생성에 관여한다[35,36]. 이때 생성된 oxygen free radical은 과산화지질을 유도하는 것으로 알려져 있다. AO도 XO와 물리화학적인 구조나 성질이 유사하며, XO와 마찬가지로 oxygen free radical을 생성시키는 효소이다[37]. 또한microsomal 효소계에서 phase 1단계에 관여하는 cytochrome P450은 mixed function oxidase로서 독성물질의 결합하는 형태 및 존재조직에 따라 서로 다른 spectrum을 나타내는데 aninopyrine을 기질로하여 formaldehyde를 생성하는 type I과 aniline을 기질로하여 p-aminophenol을 생성하는 type II로 분류하고 있으며 이는 microsomal계의 활성산소 생성에 관여하고 있다[38]. 이에 본 실험의 결과 GalN투여로 인해 cytosol 및 microsomal 효소계의 활성이 증가되어 superoxide anion, hydroxyl radical 및 H₂O₂와 같은 oxygen free radical이 생성이 증가되는 것을 DWP-04의 투여로서 이러한 과정을 저지시켜 지질과산화반응을 억제시키는 것으로 생각된다.

활성산소의 해독계에 미치는 영향

DWP-04의 전처리가 GalN에 의하여 유도된 간독성이 경감되는 과정에 활성산소의 해독계에 어떠한 영향을 주는가

를 관찰한 성적이 Table 3이다. DWP-04를 2주간 전처리하고 마지막날 GalN을 투여하였을 때 해독계인 효소의 활성이 GalN의 투여로서 정상군에 비하여 현저히 억제되던 것이 DWP-04를 전처리(100, 200 mg/kg) 하므로써 용량의존적으로 유의성 있게 증가되었다. Phasea II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이나 내인성 및 외인성 물질에 glucuronic acid, sulfate, glutathione의 결합에 의한 작용과 superoxide dismutase를 통하여 대사되어진다. 그 중 superoxide dismutase (SOD)는 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키는 효소로 생체내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다. 또한 catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하여 무독화 시키는 radical scavenging enzyme로 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다. Glutathione peroxidase 역시 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유리기를 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다. 이러한 radical scavenging enzyme의 활성 [39]은 GalN의 간독성 유발에 의해 감소하는 경향을 보였으며 DWP-04의 전처리 군에서 개선되었다. 또 다른 해독계로서, 체내에서 일차적으로 산화대사된 후 제2단계인 conjugation

Table 3. Effect of DWP-04 on phase II enzyme activities in D-galactosamine-intoxicated rats

Group	Dose (mg/kg)	Activity			
		GST	SOD	Catalase	GSH-Px
Normal		293.8±30.5 ^{a1,2)}	5.53±1.06 ^a	36.95±1.43 ^a	8.97±0.40 ^a
GalN		157.7±21.8 ^c	2.23±0.77 ^c	18.40±3.17 ^c	5.28±0.24
GalN+DWP-04	50	194.5±19.6 ^c	3.99±0.28 ^b	22.19±0.87 ^c	6.41±0.38 ^c
	100	240.5±27.5 ^b	4.25±0.56 ^{a,b}	27.77±2.10 ^b	8.06±0.29 ^b
	200	259.3±24.8 ^b	4.75±0.63 ^{a,b}	30.56±1.18 ^b	8.31±0.56 ^{a,b}

1) Values are mean±SD of eight experiments.

2) Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p<0.05)

GST: 1,2-dichloro-4-nitrobenzene nmole/mg protein/min, SOD: Unit/mg protein: One unit of SOD was defined as the which inhibited the reduce of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%, Catalase: Decreased H₂O₂ nmole/mg protein/min, GSH-Px: oxidized NADPH nmole/mg protein/min

Table 4. Effect of DWP-04 on the glutathione synthesis in D-galactosamine-intoxiated rat

Group	Dose (mg/kg)	GSH		
		µmole/g tissue	γ-GCS*	GR**
Normal		23.67±2.38 ^{a, 1,2)}	131.4±13.8 ^a	31.2±2.40 ^a
GaIN		11.26±1.43 ^d	85.6±1.18 ^c	11.6±0.88 ^b
GaIN+DWP-04	50	15.85±2.00 ^c	90.70±2.36 ^c	12.8±0.96 ^b
	100	18.49±1.56 ^{b,c}	110.4±2.41 ^b	11.5±1.24 ^b
	200	20.63±2.26 ^{a,b}	118.9±3.10 ^b	13.2±0.73 ^b

1) Values are mean±SD of eight experiments.

2) Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p<0.05),

*: Pi nmole/mg protein/min, **: µmole/g of tissue

단계를 거쳐서 무독화되는 최종 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이를 이용하여 체내 독성물질을 전이 분해시키는 GST의 역할을 생각할 수 있다[40,41]. 이상의 결과로 볼 때 DWP-04의 투여가 GST, SOD와 catalase 활성을 증가시켜 oxygen free radical의 생성을 억제시키므로서 GaIN에 의하여 나타나는 지질과산화물을 억제함으로써 간 손상을 완화시켜 간을 보호하는 것으로 사료된다.

Glutathione 생성계 활성화에 미치는 영향

Glutathione (GSH) 농도와 glutathione 생성계를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. GaIN 단독투여군의 GSH 농도가 유의적으로 감소하였는데, 이는 GaIN 투여시 간조직의 GSH 함량이 감소된다는 Rikans와 Kosanke[42]의 보고와 유사하였다. 이에 DWP-04를 전처리하고 GaIN을 투여하므로서 GaIN 단독투여군보다 유의성 있게 개선되었다.

친전자성 물질들과 활성 산소 및 과산화물의 최종적 무독화 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이 물질의 함량에 따라 독성 발현의 유무를 판단할 수 있다. glutathione은 간과 신장에서 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS)와 glutathione synthetase에 의해 합성된다[43,44]. 본 논문에서는 GaIN으로 유발된 간독성에 대한 DWP-04의 독성억제를 알아보기 위해 GSH 농도를 측정된 결과 간독성의 유발로 인해 정상군에 비하여 현저히 감소되었다. GSH의 세포내 함량 유지에는 GSH 활성 효소인 γ-GCS와 해독 반응후 생성되는 산화형 GSH의 재환원 효소인 glutathione reductase (GR)[45]이 관여한다. 간독성 유발에 의한 GSH의 함량 감소를 경감시키는 기전을 알아볼 목적으로 γ-GCS의 활성과 GR의 활성을 관찰한 결과 GaIN의 간독성에 의해 GR의 활성은 별다른 유의성을 나타내지 못하였다. 그러나 합성에 관여하는 γ-GCS의 활성은 증가되었다. 이로 보아 GaIN에 의한 간독성을 DWP-04의 전처리로 억제되는 것은 γ-GCS의 활성을 증가시켜 GSH 농도를 증가시키므로서 phase II과정의 해독계에 영향을 주어 GaIN 투여로 인한 지질과산화 반응을 억제시키는 것으로 사료된다.

요 약

간기능 보호 작용이 있는 것으로 알려진 DDB, selenium과 glutathione의 혼합제제인 DWP-04의 간보호 작용을 검토할 목적으로 DWP-04를 실험동물에 경구로 투여하고서 D-galactosamine으로 간독성을 유발하여 혈액의 변동 및 간조직에서의 활성산소 생성계 및 해독계의 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 GaIN의 단독투여는 대조군에 비하여 혈중 간기능 지표효소 및 간조직에서의 지질과산화의 함량이 현저히 증가하였으나, DWP-04의 전처리로 현저히 감소되었다. GaIN의 단독 투여로 활성산소의 생성계인 phase 1계의 효소가 현저히 증가하던 것이 DWP-04의 처리로 억제되었으며 해독계인 phase II계의 효소는 GaIN의 투여로 대조군에 비하여 억제되던 것이 DWP-04의 전처리로 정상군에는 미치지 않으나 유의성 있게 증가되었다. 간조직중 glutathine의 함량은 GaIN의 투여로 현저히 억제되었으며 DWP-04의 투여로 증가하였는데 이러한 결과는 DWP-04의 투여로 glutathione peroxidase의 활성보다는 γ-glutamylcysteine synthetase의 활성을 조절한 결과로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 DWP-04의 투여는 활성산소의 생성 및 해독계를 조절하므로서 GaIN으로 인한 간손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 대우약품주식회사의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Decker, K. and D. Keppler, 1974. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **71**, 77-106.
2. Wang, J. and A. Wendel. 1990. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the

- perfused mouse liver. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 267-270.
3. El-Mofty, S. K., M. C. Scrutton, A. Serroni, C. Nicolini and J. L. Farber. 1975. Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am. J. Pathol.* **79**, 579-595.
 4. Keppler, D., R. Lesch, W. Reutter and K. Decker. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279-290.
 5. Farber, J. L., G. Gill and Y. Konishi. 1973. Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am. J. Pathol.* **72**, 53-62.
 6. Lesch, R., W. Reutter, D. Kippler and K. Decker. 1969. Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: Autoradiographic and biochemical studies in rats. *Exp. Mol. Pathol.* **12**, 58-69.
 7. Pereira, B., L. F. Rosa, D. A. Sato, E. J. Bechara and R. Curi. 1995. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. *Bio. Chem. Pharmacol.* **50**, 2093-2098.
 8. Imura, T., S. Ameshima and S. Miyabo. 1995. Glutathione peroxidase. *Nippon Rinsho.*, **53**, 428-431.
 9. Sakurai, H. and K. Tsuchiya. 1975. A tentative recommendation for the maximum daily intake of selenium. *Environm. Phys. Biochem.* **5**, 107-118.
 10. Harrison, I., D. L. John and G. S. Fell. 1996. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Anal. Chem.* **121**, 189-194.
 11. Wang, X. L. 1894. Clinical effect of DDB pilules on 56 cases of chronic viral hepatitis B. *New Drugs Clinic.* **3**, 13-15.
 12. Liu, Z., G. Liu and S. Zhang. 1996. Reversing effect of DDB on the phenotypes of human hepatocarcinoma cell line. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* **75**, 696-678.
 13. Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology* Vol. **52**, 302-310.
 14. Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
 15. Stirpe, F. and C. E. Della. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
 16. Rajagopalan, K. V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **237**, 922-928.
 17. Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Fehling reaction. *J. Biol. Chem.* **55**, 416-423.
 18. Bidlack, W. R. and G. L. Lowry. 1982. Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311-317.
 19. Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
 20. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-473.
 21. Aebi, H. 1973. Catalase. *Method of Enzymatic Analysis*. pp. 673-698, Vol. **2**, Bergmeyer MU, ed, Academic Press, New York.
 22. Pagila, E. D. and W. N. Valentine. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158-169.
 23. Meister, A. and P. G. Richman. 1975. Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**, 1422-1429.
 24. Mize, C. E. and R. G. Langdon. 1962. Hepatic glutathione reductase: I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **237**, 1589-1595.
 25. Lowry, O. H., N. J. Rodebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 26. Yi, K.N. and J. Q. Kim. 1988. *Clinical Chemistry*. pp. 301-309, Euigakmunawhasa, Seoul.
 27. Gary, P. C. 2002. Effect of the inhibition of the metabolism of 4-vinylphenol on its hepatotoxicity and pneumotoxicity in rats and mice. *Toxicology* **179**, 129-136.
 28. Szasa, F. 1969. Kinetic photometric method for serum glutamyltransferase. *Clin. Chem.* **15**, 124-136.
 29. Zieve, L., W. R. Anderson, and R. Dozeman. 1988. Hepatic regenerative enzyme activity after diffuse injury with galactosamine, relationship to histologic alterations. *J. Lab. Clin. Med.* **115**, 575-582.
 30. Hong, S. S., G. T. Gibney, M. Esquilin, J. Yu and Y. Xia. 2004. Effect of protein kinases on lactate dehydrogenase activity in cortical neurons during hypoxia. *Brain Research.* **1009**, 195-202.
 31. Lim, H. K., H. S. Kim and J. W. Choi. 2000. Therapeutic effects of berginin and actylberginin on galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Kor. J. Pharmacol.* **31**, 351-356.
 32. Halliwell, B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep.* **2**, 113-128.
 33. Awasthi, Y. C., E. Beutler and S. K. Srivastava. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **250**, 5144-5149.
 34. Ahokas, J. T., C. Davies, P. J. Ravenscroft and B. T. Emmerxon. 1984. Inhibition of soluble glutathione S-transferase by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1929-1932.
 35. Battelli, M. G., C. E. Della and F. Stirpe. 1972. Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem. J.* **126**, 747-749.
 36. Mccord, J. M. and I. Fridovich. 1968. The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **243**, 5753-5760.
 37. Wolpert, M. K., J. R. Althaus and D. G. Johns. 1973. Nitroreductase activity of mammalian liver aldehyde oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **185**, 202-213.
 38. Sato, I. Y. 1966. Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethyl isocyanide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 80-86.
 39. Halliwell, B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key

- role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep.* **2**, 113-128.
40. Wendel, A. and S. Feuerstein. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 2513-2520.
41. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
42. Rikans, L. E. and S. D. Kosanke. 1981. Effect of aging on liver glutathione levels and hepatocellular injury from carbon tetrachloride, allyl alcohol or galactosamine. *Drug. Chem. Toxicol.* **7**, 595-604.
43. William, R. M. and A. Meister. 1987. Enzymatic synthesis of novel glutathione analogs. *Analytical Biochemistry* **2**, 487-493.
44. Susana M. H., M. Baptista and E. P. Ruy. 1997. Glutathione metabolism in hepatomas liver of rats treated with diethylnitrosamine. *Biochim. Biophys. Acta.* **12**, 157-168.
45. Dodds, M. G. and R. D. Foord. 1970. Enhancement by potent diuretics of renal tubular necrosis induced by cephaloridine. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 227-236.