

## 디메틸니트로자민에 의한 흰쥐의 간독성에 미치는 유기황화합물의 효과

신혜순\*, 강주연

덕성여자대학교 약학대학

## Effect of Organic Sulfur-Containing Compounds on Hepatotoxicity in Rats Induced by N, N-Dimethylnitrosamine

Hea Soon Shin\* and Joo Yeon Kang

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

### ABSTRACT

This study is focused on the hepatoprotective effect in cirrhotic rats induced by N, N-dimethylnitrosamine treatment when organic sulfur-containing compounds were orally injected. Biochemical parameters (aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) alkaline phosphatase (ALP), t-protein and t-bilirubin) were measured in serum injured liver tissue. The increased AST and ALT values were significantly reduced by organic sulfur-containing compounds at the oral doses of 50 mg/kg. The result of morphological changes have illustrated the accumulation of liver damages, such as inflammatory cell accumulation and cirrhosis, caused by N, N-dimethylnitrosamine. Also, it was found that liver damages were prevented by the treatment of organic sulfur-containing compounds.

**Key words :** N, N-dimethylnitrosamine, organic sulfur-containing compounds

### 서 론

만성 간질환을 일으키는 심한 간손상의 대표격인 간경변증과 간섬유화는 다양한 원인에 의한 간세포의 괴사성 염증, kupffer 세포의 활성화, 사이토카인의 유리, 간성상세포의 활성화, 세포외기질의 합성 촉진 및 기질분해의 장애 등 일련의 과정이 총체적으로 발생하여 간내 총 세포외기질 (extracellular matrix) 구성단백이 축적된 상태이다 (Anthony

*et al.*, 1978; Sanchez *et al.*, 1996; Gressner and Bachem, 1994). 간섬유화 과정에서 중추적 역할을 하는 활성화된 간성상세포 (hepatic stellate cell, HSC)는 간내에 침착되는 다양한 세포외기질 물질인 collagen, fibronectin, laminin 등을 합성하고 분비한다. 또한 성장조절인자를 생산하여 세포증식을 증가시키기도 한다 (Scott *et al.*, 1985; Parola *et al.*, 1993; French *et al.*, 1993). 한편 HSC 이외에도 간손상시 침윤하는 염증세포들도 섬유화에 기여하는 interleukin, tumor necrosis factor 등의 사이토카인을 분비할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Fabris *et al.*, 1993). 간섬유화의 치료를 위해서는 간조직 자체의 염증반응 억제, HSC의 활성화 억제 및 세포외기질

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-02-901-8398, Fax: +82-02-901-8386

E-mail: hsshin@duksung.ac.kr

의 합성을 억제시킬 수 있는 약물의 발견에 많은 노력이 집중되고 있다. 현재까지 corticosteroid, prostaglandin, colchicine, retinoid, vitamin E 등이 실험적이거나 임상적으로 시도되었지만, 대부분의 경우에서 간기능 개선에는 부분적으로 효과가 있지만 조직학적으로 간섬유화에 대한 억제효과가 미미하였거나, 간독성의 문제를 야기할 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Sonne, 1996; Kose *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2001).

실험적 간섬유화 독성실험은 N, N-dimethylnitrosamine (DMN) 투여에 의한 방법이 사람의 알코올과 관련된 만성 간질환과 임상적, 형태학적 소견에 있어서 부분적으로 유사하다고 알려져 있다 (Jenkins *et al.*, 1985; Mancini *et al.*, 1991). 이 실험 모델의 장점은 동물의 치사율이 낮으며 DMN 투여 3주 후에 급격하게 섬유성 격막을 형성하여 소결절형 간경변증이 발생하게 되는 재현성이 우수한 방법이다 (Ala-Kokko *et al.*, 1989). 유허를 함유하는 유기황화합물은 마늘의 주성분인 디알릴설파이드 (diallylsulfide) 구조를 가지고 있으며 최근 들어 pyridazine 모핵에 allylthio 기를 도입시킨 유도체가 종양세포의 증식억제, 화학물질에 의한 발암 억제 작용 및 간보호 활성 등의 효과를 가지고 있음이 보고되었다 (Shin and Kwon, 2003; Wu *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서는 유기황화합물이 DMN에 의해 유발된 흰쥐의 간섬유화 독성실험에서 억제작용을 가지는가를 알아보기 위해 생화학적 효과 및 조직학적 변화를 확인하고 보고하고자 하였다.

## 실험 방법

### 1. 시험동물

6주령의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 (200~230 g)를 (주)대한바이오링크에서 공급받아 군당 10마리 이하로 수용하였다. 실온에서 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 뒤 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 실험에 사용하였다. 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다. 사료는 실험동물용 고형사료를 자유롭게 섭취시켰으며 물은 충분히 공급하였다.

### 2. DMN에 의한 간장해 유발 및 약물투여

DMN (Sigma, St Louis, MO)에 의한 간장해 유발 실험모델로 Mancini 등(1991)의 방법에 따라 시험동물 체중당 DMN 0.1 mL/100 g를 4주간 주 3회씩 복강 주사하였다. 약물투여군은 DMN 투여기간 동안 합성한 유기황화합물 5종을 예비실험 결과에서 최적용량으로 산출된 50 mg/kg 용량으로 경구투여하였다. 유기황화합물은 암예방효과 및 항암효과가 보고된 6-allylthiopyridazine의 파라위치에 알콕시기를 도입한 유도체 5종을 사용하였다. 대조군은 실험군에 대한 DMN 주입시 생리식염수만을 0.1 mL/100 g씩 복강내 주사하였다.

### 3. 간 중량/체중측정 및 일반증상 관찰

DMN 투여기간동안 일반적인 증상을 관찰하였으며 희생시킨 후 적출한 전체 간의 무게를 측정하였다. 간경화 유도기간 중 각 실험군의 흰쥐는 1주간격으로 체중을 측정하였으며 부검시 측정된 간습중량의 체중에 대한 비율로 계산하여 간중량을 산출하였다.

### 4. 혈청 생화학적 활성 측정

실험동물을 치사시킨 후 복부 정중선을 약간 오른쪽으로 절개하여 심장에서 채혈한 뒤, 4°C에서 30분 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청의 생화학적 활성 측정은 Reitman과 Frankel (1957)의 방법에 따라 실험군에서 채취한 혈청 중 aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT)을 측정하여 간세포의 사멸과 파괴정도를 검사하였다. 간장 담관과 담도계의 장애유무를 알아볼 수 있는 alkaline phosphatase (ALP), total protein, total bilirubin 값을 kit (Youngdong Co)를 사용하여 clinical chemical analyzer (Hitachi 7600-110, Japan)로 측정하였다. 혈청 단백질량의 측정은 Bradford (1976)의 방법을 사용하였다. 같은 검체에 대하여 두 번이상 검사를 실시하여 평균치를 산출하였다.

### 5. 조직학적 검사

동물들을 희생시킨 즉시 간을 적출하여 무게를 기록한 후 적출한 간조직은 1 cm<sup>3</sup> 크기로 잘라서

시험 종료 후, 모든 시험 동물군의 간장을 10% 중성 완충 포르말린액에 고정하였다. 고정된 간조직을 파라핀 포매과정을 거쳐 microtome을 이용하여 4  $\mu$ m 두께의 조직절편으로 제작한 다음 Masson's Trichrome 염색과 Hematoxylin과 Eosin 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 6. 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 각 군간의 비교는 Student's *t*-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 *p*값이 5% 미만일 때를 통계학적 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

DMN에 의한 간경화 독성실험으로 유도된 간섬유화는 재현성이 우수하고, 투여 3주 후에 급속히 섬유성 격막을 형성하며 소결절성 간경변증이 생긴다. 소량으로 비교적 짧은 기간인 3주 만에 사람의 알콜성 간경화와 유사한 병리적 소견을 보이고 투여를 중단하여도 간경화 상태가 그대로 유지된다는 장점이 있다 (Ala-Kokko *et al.*, 1989). DMN에 의해 유발된 섬유화의 주된 기전은 Kupffer 세포 및 침습적인 단핵세포와 같은 염증세포들의 TGF- $\beta$ 나 platelet-derived growth factor (PDGF)와 같은 사이토카인의 분비에 의한 것으로 알려져 있다 (Herrea *et al.*, 2001)

간은 완충능력이 큰 기관으로 초기단계의 질환에서는 통증이나 자각증상이 잘 나타나지 않고 상당히 악화되어서야 발견되는 경우가 종종 있다. 간경변이나 간경화와 같은 만성적인 간손상을 당하면 간세포괴사, 염증, 간세포의 재생이 반복되면서 조직 중 결합단백의 과다침착 및 nodule 형성 등 간소엽의 정상적인 구조가 파괴된다. 또한 간혈류량 저하, 대사효소의 기능 저하, 혈중 단백질의 질적 변화 및 담즙량의 변화 등으로 인해 전반적인 간기능이 저하된다 (Ono *et al.*, 1991). 만성 간질환의 치료약물로 선정된 유기황화합물의 항암작용이나 간보호 효과를 나타내는 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나 마늘에 들어있는 갈릭 오일 (gallic oil)인 알리신 (allicin) 등은 암세포의 증식을 억제

**Table 1.** The effects of sulfur-containing compounds on DMN-induced hepatic injury for the body and liver weight changes in rats

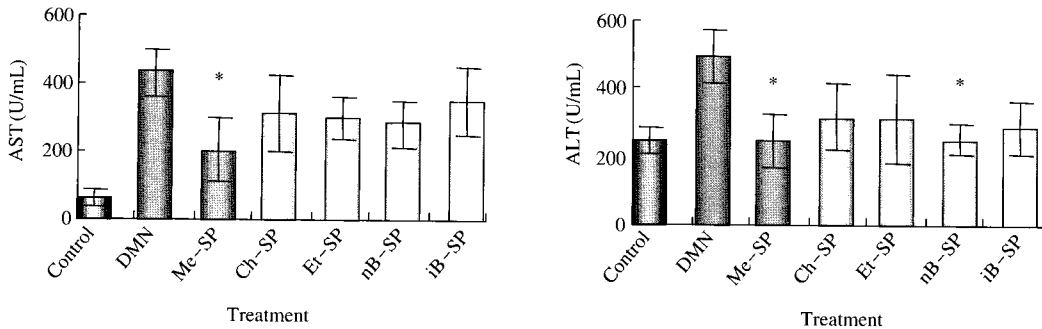
Treatment	Number of animal	Liver weight (g)	Ratio of liver weight/body weight (%)
Control	10	7.39 $\pm$ 1.34 <sup>#</sup>	2.89 $\pm$ 2.98
DMN	10	5.63 $\pm$ 5.22	2.65 $\pm$ 2.03
Me-SP <sup>1</sup>	10	6.77 $\pm$ 3.56*	2.52 $\pm$ 3.87*
Et-SP <sup>2</sup>	10	6.22 $\pm$ 6.53	2.38 $\pm$ 4.69*
nB-SP <sup>3</sup>	10	6.32 $\pm$ 5.49	2.57 $\pm$ 3.47
iB-SP <sup>4</sup>	10	6.58 $\pm$ 7.61*	2.44 $\pm$ 4.63*
Ch-SP <sup>5</sup>	10	6.52 $\pm$ 5.68*	2.64 $\pm$ 4.73

<sup>#</sup>The results presented are mean  $\pm$  S.E. (n = 10). \*Significantly different from the DMN-treated group (p < 0.01). 1. 3-Methoxy-6-allylthiopyridazine, 2. 3-Ethoxy-6-allylthiopyridazine, 3. 3-n-Buthoxy-6-allylthiopyridazine, 4. 3-i-Buthoxy-6-allylthiopyridazine, 5. 3-Chloro-6-allylthiopyridazine.

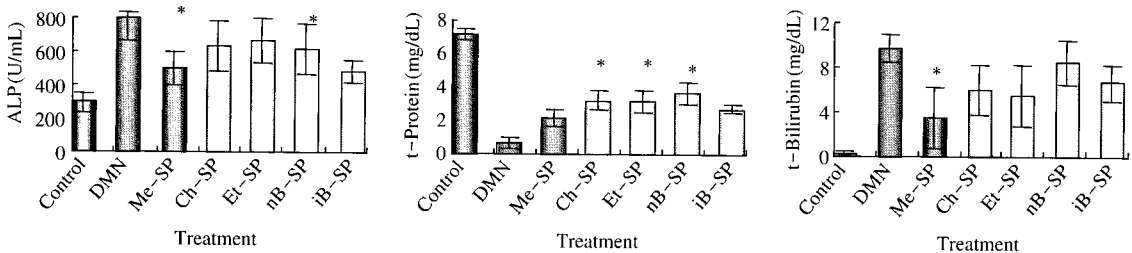
하고 세포사멸기전을 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (Jung *et al.*, 2001; Dorai and Aggarwal, 2004). 이러한 allicin의 디알릴설파이드 구조를 가지고 있는 6-allylthiopyridazine을 선정하여 이 모핵의 파라 위치에 알록시기를 도입한 유기황화합물이 DMN에 의해 유발된 흰쥐의 간섬유화 독성실험에서 미치는 영향을 조사하기 위하여 생화학적 효과 및 조직학적 변화를 확인하였다.

DMN 투여로 간장애가 유발되어 Table 1과 같이 정상군의 63%로 유의성있게 감소하여 간의 위축을 보였다. 간섬유화가 유발된 흰쥐의 체중은 유의성있게 감소되었으며 (246.8  $\pm$  8.6 g) (p < 0.05) 간 무게도 마찬가지로 5.63  $\pm$  5.22 g으로써 유의한 감소를 나타냈다 (p < 0.05). 그러나 유기황화합물을 투여한 약물투여군에서는 DMN에 의한 체중 감소를 현저히 둔화시켰다 (265  $\pm$  6.7 g) (p < 0.05). 같은 맥락의 효과로 간중량의 감소를 둔화시키는 결과를 보여서 (Me-SP군: 6.77  $\pm$  3.56 g) (p < 0.05) Shimizu 등 (1999)이 보고한 간섬유화 보호효과를 갖는 약물연구에서 위축된 간개선효과를 나타내어 간중량이 증가한다는 결과와 일치하였다. 각 유기황화합물 5종의 각 군별 체중은 체중의 평균치에 있어서 군간에 두드러진 차이를 보이지 않았지만, DMN 투여군에 비해서는 각각 유의한 증가를 보였다 (p < 0.05).

혈청 생화학적 변화측정 실험에서는 Fig. 1에 나



**Fig. 1.** The value of clinical biochemistry in serum of DMN-induced hepatic injury in rats. The results presented are means  $\pm$  S.D. (n = 10). \*Significantly different from the DMN-treated group ( $p < 0.01$ ). (a) AST: Aspartate transaminase, (b) ALT: Alanine transaminase.

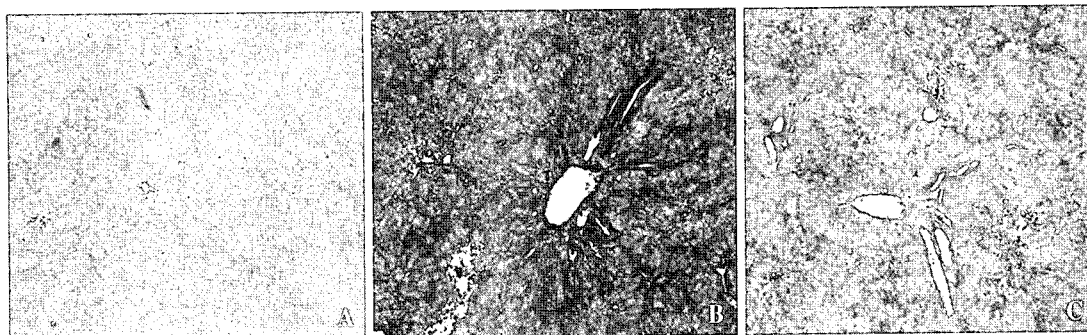


**Fig. 2.** The value of clinical biochemistry in serum of DMN-induced hepatic injury in rats. The results presented are means  $\pm$  S.D. (n = 10). \*Significantly different from the DMN-treated group ( $p < 0.01$ ). (a) ALP: Alkaline phosphatase, (b) t-protein: total protein, (c) t-bilirubin: total bilirubin.

타넨 바와 같이 DMN 투여로 혈청 AST는 약 7배, ALT는 약 2배 효소 활성이 증가되어 간의 손상 정도가 현저한 상태로 나타났다. 즉, AST 활성도 측정결과는 정상군이  $68.4 \pm 2.63$  U/mL인 것에 비하여, 간장해가 유발된 DMN 투여군은  $465.12 \pm 9.25$  U/mL로써 약 6.8배가 증가하였다. 어떠한 처치도 하지 않은 정상군에 비하여 유의성있게 증가하여 간장해가 유발되었음을 확인하였다. ALT 활성도 측정결과에서도 정상군이  $287.8 \pm 12.81$  U/mL인 것에 비해 DMN의 투여군은  $661.9 \pm 8.71$  U/mL로써 약 2.3배 증가하였다. 유기황화합물 약물투여군의 혈청 AST와 ALT의 평균값은 Me-SP군과 nB-SP군이 DMN군에 비하여 유의하게 감소되었으며 ( $p < 0.05$ ), Ch-SP군, Et-SP군 및 iB-SP군에서는 AST의 경우 nB-SP군에서 유의하게 감소되었지만 ( $p < 0.01$ ), ALT의 경우는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 일반적으로 간기능상태를 나타내는 파라미터인 간기능 담도계 장애의 지표인 ALP, total bilirubin 등이 DMN 투여군에서 현저히 증가하였다. ALP 레벨은 DMN 투여군에서 대조군보다 약 300% 증가하였으나 유의성은 없었고, total protein 농도는 일주일 경과시까지 큰 차이를 보이지 않았으나 3주 후에는 약물투여군 모두에서 급격히 감소하는 결과를 보였다 ( $P < 0.05$ ). Total bilirubin 수치는 증가하는 경향을 보였으나 개체차가 커서 유의성은 없었다.

Fig. 3의 조직학적 검사결과의 사진에서 보이는 바와 같이 DMN을 투여한 모든 흰쥐에서 섬유성 격막이 형성되고 문맥계 섬유화가 보였으며, 간내 염증세포 침윤 및 간내 콜라겐 함량의 증가를 보였다. 콜라겐에 대한 Masson's trichrome 염색에서 정상 간조직은 문맥역에 매우 소량의 콜라겐의 침착만 관찰되었으나 (A), DMN 투여군에서는 문맥역



**Fig. 3.** Photomicrographs of liver tissue with treatment of DMN and sulfur-containing compounds A: Control, B: DMN, C: Me-SP (Hematoxylin & Eosin Stained; original magnification  $\times 400$ ).

과 문맥 주위역에 현저한 콜라겐의 침착이 관찰되었다(B). 그러나 약물 투여군에서는 6-allylthiopyridazine 모핵의 파라위치에 methyl기를 도입한 Me-SP 화합물에서 두드러지게 콜라겐의 침착이 감소하였다(C). 이와 같은 결과는 DMN에 의해 유도된 간장해가 유기황화합물 투여에 의해 상당히 호전된 것을 의미한다. 위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 마늘에 들어있는 알리신 성분과 유사한 구조의 합성 유기황화합물 5종 중 특히 Me-SP 화합물이 DMN군에 비교하여 AST와 ALT의 수치결과와 간기능 담도계 장애의 지표인 ALP 및 total bilirubin의 수치결과 및 조직학적 검사결과 등에서 두드러진 개선효과를 보임으로써 DMN 투여에 의해 유발된 간섬유화 독성실험에서 간보호효과를 나타냄을 확인하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2004년도 덕성여자대학교 연구비지원에 의해 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

Anthony PP, Ishack KG and Nayak NC. The morphology of cirrhosis, *J Clin Pathol* 1978; 31: 395-414.  
Ala-Kokko L, Stenback F and Ryhanen L. Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat, *J Lab Clin Med* 1989; 113: 177-

183.  
Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.  
Dorai T and Aggarwal B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy, *Cancer Lett* 2004; 215: 129-134.  
Fabris C, Pirisi M, Panozzo M, Soardo G, Roniutto P, Hocza V and Bartoli E. Intensity of inflammatory damage and serum lipid peroxide concentrations in liver disease, *J Clin Pathol* 1993; 46: 346-367.  
French K, Wong L, Jui E, Albano AL and Ingelman-Sundberg HM. Effect of ethanol on cytochrome P4502E1 (CyP2E1), lipid peroxidation and serum protein adduct formation in relation to liver pathology pathogenesis, *Exp Mol pathol* 1993; 58: 61-75.  
Gressner AM and Bachem MG. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm, *Ann Biol Clin* 1994; 52: 205-226.  
Herrea B, Fernandez M, Alvarez AM, Roncero C, Benito M, Gil J and Fabregat I. Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-x<sub>L</sub> down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  in rat fetal hepatocytes, *Hepatology* 2001; 34: 548-556.  
Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I and Shields RA. Dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat, *J Hepatol* 1985; 1: 489-499.  
Jung MY, Kwon SK and Moon A. Chemopreventive allylthiopyridazinederivatives induce apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells through a mechanism, *European*

- Journal of Cancer 2001; 37: 2104–2110.
- Kose K, Yazici C and Assioglu O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behcet's disease, *Clin Biochem* 2001; 34(2): 125.
- Mancini R, Paolucci F, Svegliati-Baroni G, Jezequel AM and Orlandi F. Phenotypic analysis of inflammatory infiltrate in rats with dimethylnitrosamine induced cirrhosis, *Int J Exp Pathol* 1991; 72: 119–128.
- Ono M, Sekiya C and Ohhira M. Elevated level of serum Mn-superoxide dismutase in patients with primary biliary cirrhosis: Possible involvement of free radicals in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis, *J Lab Clin Med* 1991; 118(5): 476–483.
- Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P and Dianzani MU. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells, *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 194(3): 1044–1050.
- Reitman S and Frankel SA. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 56–63.
- Sanchez A, Alvarez A, Benito M and Fabregat I. Apoptosis induced by transforming growth factor- $\beta$  in fetal hepatocyte primary cultures, *J Biol Chem* 1996; 271: 7416–7422.
- Scott L, Friedman F, Roll J, Boyles DJ and Bissell M. Hepatic lipocytes: The principal collagen producing cells of normal rat liver, *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 8681–8685.
- Shimizu I, Ma Y-R, Mizubuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T and Amagaya S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats, *Hepatology* 1999; 29(1): 149–160.
- Shin HS. and Kwon SK. Allylthiopyridazine derivatives of inhibition of aflatoxin B1-Induced hepatotoxicity in rat, *Arch Pharm Res* 2003; 26: 351–357.
- Sonne J. Drug metabolism in liver disease: Implications for therapeutic drug monitoring, *Therapeutic Drug Monitoring* 1996; 18: 397–401.
- Wu X, Kassie F and Mersch-Sundermann V. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds, *Mutat Res* 2005; 589: 81–86.