

오미자 Schizandrin C 유도체 DDB 복합물 DWP-04가 Acetaminophen 해독계에 미치는 영향

박희준¹ · 이명선¹ · 지상철² · 이경태³ · 신영호⁴ · 최종원*
경성대학교 약학대학, ¹상지대학교 자원식물학과, ²성균관대학교 약학대학
³경희대학교 약학대학, ⁴(주)대우약품

Evaluation of a Schzandrin C Derivative DDB-mixed Preparation (DWP-04) on Acetaminophen Detoxification Enzyme System in the Animal Model

Hee-Juhn Park¹, Sang-Cheol Chi², Kyung-Tae Lee³, Young-Ho Shin⁴, and Jongwon Choi*

College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
¹*Division of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea*
²*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea*
³*College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 120-749, Korea*
⁴*Dae Woo Pharmaceutical Ind. Co., Busan 604-031, Korea*

Abstract – The effects of the DWP-04 [DDB:selenium yeast:glutathione (31.1 : 6.8 : 62.1(w/w%))] on acetaminophen detoxification enzyme system were studied in rats. Treatment with DWP-04 was prevented against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat as evidenced by the decreased formation of lipid peroxide. Effect of DWP-04 on the activities of free radical-generating enzymes, free radical scavenging enzymes and glutathione-related enzymes as well as detoxification mechanism of DWP-04 against acetaminophen-treated was investigated in rat. Activities of cytochrome p450, cytochrome b5, aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase as free radical-generating enzymes activities were decreased by the treatment with DWP-04 against acetaminophen treated. Although acetaminophen-induced hepatotoxicity results in the significantly decrease in the level of hepatic glutathione and activities of glutathione S-transferase, quinone reductase, glutathione reductase and γ -glutamyl-cysteine synthetase, these decreasing effects were markedly lowered in the DWP-04-treated rat. Therefore, it was concluded that the mechanism for the observed preventive effect of DWP-04 against the acetaminophen-induced hepatotoxicity was associated with the decreased activities in the free radical-generating enzyme system.

Key words – DWP-04, DDB, selenium yeast, glutathione, acetaminophen, hepatotoxicity, microsomal enzyme, glutathione S-transferase

Acetaminophen(N-acetyl-p-aminophenol, AAP)은 acetanilid 및 phenacetin의 활성대사 물질로 알려 지면서부터 phenacetin을 대체하여 최근에 와서는 비처방하에 널리 사용되는 해열 진통작용을 갖는 약물로 경구투여시 간에서 대사받아 신장으로 배설되는 과정을 갖는 약물이다. AAP는 다른 해열진통제에 비하여 위장 출혈을 일으키지 않는 이점이 있으나 과량 투여시 사람과 동물에서 치명적인 간장과 신장의 괴사를 유발하는 것으로 보고되고 있다.^{1,2)} 이러한 독성

의 생성은 간 microsomal 분획의 cytochrome p450과 관련되어 일어나는 산화과정에서 조직의 macromolecule과 공유 결합하는 화학적으로 반응성이 큰 aryl기를 지닌 중간대사물을 형성하여 이 화합물에 의하여 hepatic glutathione의 농도가 적어도 50% 정도 결핍되었을때 간조직의 괴사를 유발하므로서 독성을 발현하는 것으로 시사되고있다. 그리고, AAP의 반응성 물질이 glutathione과 포합반응하여 무독화되는 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 최근까지 보고된 AAP의 대사 과정을 살펴보면 상용량에서 체내로 투여된 AAP는 sulfate와 glucuronic acid포합체를 형성하여 정상적인 대사계를 거

*교신저자(E-mail) : jwchoi@ks.ac.kr
(FAX) : 051-628-6540

쳐서 배설되지만 고용량의 투여시 hepatic glutathione과 포함하여 AAP와 AAP으로 뇨중으로 배설되나, 이때 hepatic glutathione이 결여되므로 해독능이 감소되어 반응성이 강한 물질이 생성되며 이 반응성 물질이 nucleophile cell macromolecule과 공유결합하여 cellular death를 유발하여 hepatic necrosis를 나타낸다.^{6,7)}

Glutathione은 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 사용하여 γ -glutamylcysteine synthetase에 의해서 합성된 황 함유 분자를 가진 대표적인 생체 항산화물질로서 간해독반응에 직·간접적으로 관여하며, 또한 유리기 소거 반응에 관여하기 때문에 유리기에 의한 세포손상의 방어에 glutathione의 역할은 대단히 중요한 것으로 알려져 있다. 한편 셀레늄은 과산화물을 제거하는 과정을 촉매하는 glutathione peroxidase의 필수적 구성성분으로 지질과산화물 방어를 하는데 중요한 역할을 한다. 이와 같은 관점에서 서로 작용기전이 다른 제제를 복합하여 기존의 단일제제보다 효과가 우수한 약물의 개발은 현시점에서 중요한 과제로 생각된다.

이에 본 실험에서는 전보⁸⁾에서 DDB 복합제제인 DWP-04의 투여로서 사염화탄소에 의한 간독성 경감작용이 있음을 관찰하고서 실험동물을 이용하여 임상에서 약물의 투여의 기초자료를 제공하기 위하여 OTC로서 널리 해열진통제로 사용되고 있는 AAP의 해독계에 DWP-04가 미치는 영향을 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - Bovine serum albumin, NADPH, GSH (reduced & oxydized form of glutathione), TCA(trichloroacetic acid), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), GR(glutathione reductase) 등은 Sigma 사, malondialdehyde, sodium thiosulfide는 Aldrich사로부터 구입하였으며, 그외 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 UV spectrophotometer (Shimadzu UV-120), refrigerated centrifuge (Hanil supro 22K), ultracentrifuge(Hitachi 70P-72) 등을 사용하였다.

시료제조 - DWP-04는 DDB, Glutathione, Selenium을 31.1:62.1:6.8% 비율로 혼합하여 사용하였으며 각각의 시료는 대우약품에서 공급받아 사용하였다.

실험동물 및 실험설계 - 실험 동물은 대한 BioLink(충북 음성)로부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도: $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도: $55 \pm 3\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 $200 \pm 10\text{g}$ 의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. Acetaminophen(AAP)의 투여는 400 mg/kg을 하루에 한번씩 1주간 경구투여하고 나머지 2주 동안은 DWP-04는 2% Tween 80에

현탁(50, 100, 200 mg/kg)시켜 동시에 투여하였다. 즉 AAP의 투여는 3주간 하였다. 대조군은 동일량의 1% tween 80을 투여하였다. 실험동물은 실험전 24시간 물만 주고 절식시켰다.

혈액 및 간조직에서의 변동 - 혈청생화학적 검사는 실험동물을 CO_2 gas로 마취하여 개복하고 복부대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하였으며, 이를 -20°C 에 즉시 보관하여 분석에 사용하였다. Aspartate/alanine aminotransferase (AST/ALT)의 분석은 Clinical Spectrophotometer(Shimadzu, CL-770, Japan)을 사용하였다. 체혈을 마친 실험동물에서 간을 적출하여 간조직을 관류하여 간조직에서 혈액을 제거한 간조직에서 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 함량측정은 Buege와 Aust의 방법,⁹⁾ Glutathione(GSH)의 함량측정은 Griffith의 방법¹⁰⁾에 준하였다.

효소활성의 측정 - 간조직 일정량을 미세하여 초고속 원심분리후 cytosol 및 microsomal분획을 얻어 이를 효소액으로하여 Quinone reductase(QR)의 활성 측정은 Prochaska와 Santamaria의 방법,¹¹⁾ cytochrome p450 및 cytochrome b5 함량측정은 Imai와 Sato등의 방법,¹²⁾ Aminopyrine N-demethylase의 측정은 Nash의 방법,¹³⁾ Aniline hydroxylase의 활성 측정은 Bidlack과 Lowry의 방법,¹⁴⁾ Glutathione S-transferase(GST)의 활성 측정은 Habig 등의 방법,¹⁵⁾ γ -glutamylcystein synthetase(γ -GCS)의 측정은 Meister와 Richman의 방법,¹⁶⁾ glutathione reductase(GR)의 활성측정은 Mize와 Langdon의 방법¹⁷⁾에 준하여 측정하였다.

단백질 정량 및 통계처리 - 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법¹⁸⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 실험결과 평균치 \pm 표준 편차로 표시하였으며 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다. P 값이 5%미만($p < 0.05$)일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

혈중 생화학적 변동 - AAP를 1주간 전처리하고 나머지 2주간은 DDB혼합 제제인 DWP-04(50, 100, 200 mg/kg)를 동시에 실험동물에 경구투여한 후 AAP의 간독성에 미치는 영향을 관찰한 혈중 간지표에 미치는 생화학적 변동을 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 정상군의 alanine amino transferase(ALT)의 활성이 69.3 IU이던 것이 AAP를 투여하므로써 397.3 IU로 현저히증가 되었다. 이에 DWP-04를 동시에 투여에서 50 mg/kg의 투여에서는 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 100, 200 mg/kg 투여에서는 용량의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 한편 aspartate amino transaminase(AST)의 활성도 ALP의 결과와

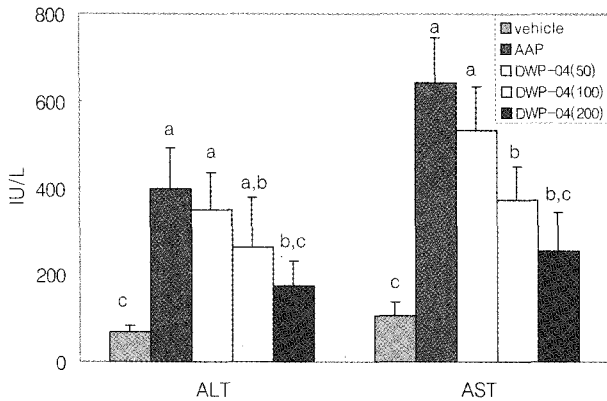


Fig. 1. Effect of DWP-04 on serum ALT and AST levels in rats treated with acetaminophen. Acetaminophen (AAP, 400 mg/kg, *p.o.*) was administered for 3 weeks, and DWP-04 were orally administered for 2 weeks. Data shown are mean values with bars indicating the S.D. of eight experiments. The units of the value in parenthesis are mg/kg. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from vehicle group ($p < 0.05$).

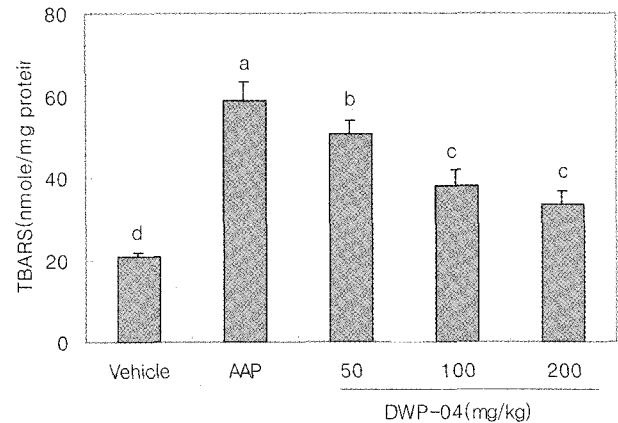


Fig. 2. Effect of DWP-04 on the hepatic lipid peroxide content in acetaminophen-induced rat. Value represent means \pm S.D.(n = 8). Values followed by the same superscript letter are not significantly different from the control ($p < 0.05$).

유사하였다. 혈중 transaminase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상적으로 가장 많이 이용되고 있는 AST와 ALT가 있는데 이들 효소들은 아미노산과 a-keto acid와의 사이에 아미노기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있다. 이들은 간손상의 지표로 널리 이용되는 것은 간세포가 손상이 되면 세포 밖으로 유출되는 유출효소로서 이과정은 세포내의 energy공급이 감소된 결과로 세포 내의 K^+ 이온이 세포외로 유출되고 Na^+ , Ca^{++} 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST 및 ALT는 순환 혈액중으로 빠르게 유출되어 간 손상시 정상치보다는 현저히 증가되므로 간기능 검사에 이용되고 있다.^{19,20)} 혈청 aminotransferase는 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 잠재성 간장애의 분류 및 급성간염 발병의 조기진단에 필수적인 요소로서 간조직 손상이 다량 혈중으로 유출되어 그 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 본 실험에서 DWP-04의 투여로 AAP에 의해 유도된 본효소의 활성이 억제되는 것은 이들이 AAP에 의한 간조직의 손상이나 간 세포막을 안정시켜서 나타나는 결과로 사료되어진다.

지질과산화물의 함량에 미치는 영향 - AAP 및 DDB혼합제제인 DWP-04를 동시에 실험동물에 경구투여하고서 AAP 처리로 의해 실험동물에 대한 간조직 중의 지질과산화 함량변화를 실험한 결과가 Fig. 2와 같다. 정상쥐에 AAP를 투여함으로써 과산화물이 현저히 증가되던 것이 DWP-04의 투여에 의해 현저히 감소하였다. 일반적으로 생체조직 세포

막의 손상은 세포막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 그 한 가지 요인으로 지적되고 있는데, 지질과산화는 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 질 때에는 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화등과 같이 여러가지 독작용을 유발한다고 한다.^{22,23)} 지질과산화는 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.²⁴⁻²⁶⁾ 지질과산화는 세포막의 투과성을 항진시키고 전반적인 세포독성을 초래하여 세포기능을 저하시켜 괴사에 관여하여 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유발하여 발암의 과정에도 관여할 것이라고 Ahokas 등은 보고하였다.²⁷⁾ 본 실험의 결과 DWP-04의 투여가 AAP에 의해 생성되는 지질과산화물을 감소시킴으로써 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, Fig. 1에서 DDB 혼합제(DWP-04)가 AAP에 의하여 유도된 지질과산화의 억제효과가 어떠한 기전에 의하여 나타나는가를 검토할 목적으로 간장에서 일어

Table I. Effect of DWP-04 on the hepatic microsomal enzyme system in acetaminophen-induced rats

Treatment (mg/kg)	Dose (mg/kg)	Activity			
		Cyto p450*	Cyto b5**	AH***	AD****
vehicle		0.79±0.08 ^c	0.30±0.023 ^c	0.93±0.086 ^d	3.96±0.27 ^c
AAP		1.58±0.17 ^a	0.85±0.051 ^a	1.86±0.23 ^a	6.33±0.48 ^a
+DWP-04	50	1.36±0.20 ^a	0.79±0.043 ^a	1.79±0.30 ^{ab}	5.53±0.50 ^b
+DWP-04	100	1.07±0.09 ^b	0.55±0.055 ^b	1.43±0.19 ^{bc}	4.27±0.37 ^c
+DWP-04	200	0.93±0.10 ^{bc}	0.51±0.023 ^b	1.33±0.21 ^c	3.89±0.31 ^c

The assay procedure was described in the experimental methods.

Data are presented as Mean±S.D. (n = 8). Values followed by the same letter are not significantly different than control ($p < 0.05$).

*: nmole/mg protein

***: aniline hydroxylase: *p*-aminophenol nmole/mg protein/min

****: aminopyrine N-demethylase: HCHO nmole/mg protein/min

나는 활성산소의 생성체인 phase I 반응 중 microsomal 효소계(cytochrome p450, cytochrome b₅, aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase)에 미치는 DWP-04의 효과를 관찰한 성적이 Table I이다. AAP를 1주일간 투여하고 DWP-04를 2주간 AAP와 동시에 투여하고서 microsomal 효소계에서 phase I 단계에 관여하는 cytochrome p450 및 cytochrome b₅의 효소 활성이 AAP의 투여로 현저히 증가되던 것이 DWP-04의 투여로 억제되었다. Cytochrome p450은 mixed function oxidase로서 독성물질의 결합하는 형태 및 존재조직에 따라서 서로 다른 spectrum을 나타내는데 aminopyrine을 기질로 하여 formaldehyde를 생성하는 type I과 aniline을 기질로하여 *p*-aminophenol을 생성하는 type II로 분류하고 있으며 이는 microsomal계의 활성산소 생성에 관여하고 있다.²⁸⁻³⁰ 이에 본 실험에서 cytochrome 2E1의 활성과 관계가 있는 간 microsomal aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성이 AAP의 투여로 현저히 증가되던 것이 DWP-04의 동시투여로 현저히 억제되었으며 특히 100 mg/kg의 2주 투여에서 뚜렷한 결과를 관찰할 수 있었다. 이로써 DWP-04의 투여는 AAP의 투여로

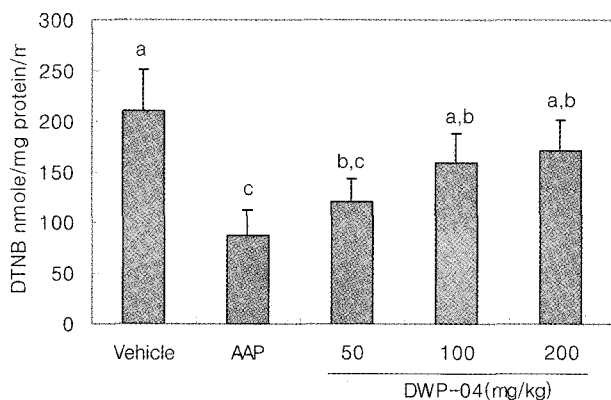


Fig. 3. Effect of DWP-04 on the hepatic glutathione S-transferase activity in acetaminophen-induced rat.

서 지질과산화의 반응을 증가시켜 간독성이 야기되는 것을 cytochrome 2E1의 활성을 억제하므로 AAP의 투여로 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 해독기에 미치는 영향 - AAP와 DWP-04의 동시처리가 AAP의 간독성이 경감되는 과정에 활성산소의 해독기에 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Fig. 3과 Fig. 4이다. AAP의 독성은 활성 대사체인 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone(NAPQI)와 GSH 양의 비율에 의존하며 연령, 식이 습관, 영양상태, 음주, 약물 복용상태나 병력등에 의하여 독성의 정도가 다르기는 하지만 사람에게서 간손상은 AAP 250 mg/kg 이상 복용하였을 때 약 50% 정도에서 나타난다. AAP는 제 1상 반응인 cytochrome p450의 대사계를 거치면서 친전자성 물질인 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone (NAPQI)를 생성하며 이의 해독계로서 glutathione을 포함하는 GST와 non-

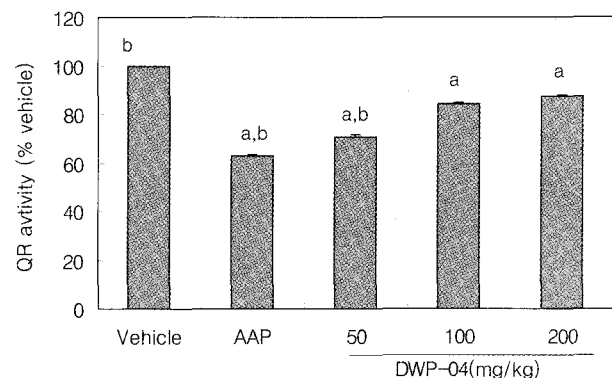


Fig. 4. Effect of DWP-04 administration on acetaminophen-induced hepatic quinone reductase (QR) activity in rats. All data are presented as Mean±S.D.(n = 8). Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal ($p < 0.05$).

toxic hydroquinones을 형성하는 QR의 두가지 효소를 들수 있다.^{33,34)} 이에 본 실험에서는 AAP를 1주간 전처리하고 DWP-04를 2주간 동시투여하므로써 GST 및 QR의 활성이 정상군에 비하여 현저히 억제되던 것이 DWP-04를 동시투여하므로써 용량의존적으로 유의성 있게 증가되었다. AAP의 대사에서 phase II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이거나 내인성 및 외인성 물질에의하여 glucuronic acid, sulfate, glutathione의 결합이 주로 이루어지며 특히 고용량의 AAP를 투여하므로써 glutathione의 포합반응이 주를 이루는 것으로 알려져있다. AAP는 체내에서 일차적으로 산화대사된 후 제2단계인 conjugation단계를 거쳐서 무독화되는 최종 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이를 이용하여 체내 독성물질을 전이 분해시키는 GST의 역할을 생각할 수 있다.^{35,36)} 이상의 결과로 볼 때 DWP-04의 투여가 GST 및 QR의 활성을 증가시켜 oxygen free radical의 생성을 억제시키므로써 AAP에 의하여 나타나는 지질과산화물을 억제함으로 간 손상을 완화시켜 간을 보호하는 것으로 사료된다.

Glutathione 생성계 활성화에 미치는 영향 - AAP와 DWP-04의 동시처리가 AAP의 간독성이 경감되는 과정에 필연적으로 필요한 glutathione과 glutathione 생성계에 관여하는 효소계를 관찰한 성적이 Table II이다. AAP의 단독투여군은 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의적으로 감소하였으며 이에 DWP-04를 동시에 투여함으로써 AAP를 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 -GCS와 glutathione synthetase에 의해 합성된다.³⁷⁻³⁹⁾ 본 연구에서는 AAP 단독투여군에서의 간독성에 대한 DWP-04의 독성억제를 알아보기 위해 GSH 농도를 측정된 결과 간독성의 유발로 인해 정상군에 비하여 현저히 감소되었다. GSH의 세포내 함량 유

지에는 GSH 활성 효소인 γ -GCS와 해독반응 후 생성되는 산화형 GSH의 재환원 효소인 GR⁴⁰⁻⁴²⁾이 관여한다. 간독성 유발에 의한 glutathione의 함량 감소를 경감시키는 기전을 알아볼 목적으로 γ -GCS의 활성과 GR의 활성을 관찰한 결과 AAP의 단독투여에 의하여 현저히 억제되던 GR 및 γ -GCS의 활성이 DWP-04를 동시에 투여함으로써 AAP 단독투여군보다 현저히 증가되었다. 이로 보아 AAP에 의한 간독성을 DWP-04의 동시투여로서 GR 및 γ -GCS의 활성에 영향을 주어 간조직중 GSH 농도를 증가시키므로써 phase II과정의 해독계에 영향을 주어 AAP 투여로 인한 지질과산화 반응을 억제시키는 것으로 사료된다.

결론

간기능 보호 작용이 있는 것으로 알려진 DDB, selenium과 glutathione의 혼합제제인 DWP-04와 acetaminophen(AAP)를 실험동물에 동시에 투여하고서 혈액에서의 생화학적 변동과 간조직에서의 활성산소 생성계 및 해독계의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 AAP의 단독투여는 대조군에 비하여 혈중 간기능 지표효소 및 간조직에서의 지질과산화의 함량이 현저히 증가하였으나, DWP-04의 동시투여로서 현저히 감소되었다. AAP의 단독 투여로 활성산소의 생성계인 phase I 계의 효소가 현저히 증가하던 것이 DWP-04의 처리로 억제되었으며 해독계인 phase II 계의 효소는 AAP의 투여로 대조군에 비하여 억제되던 것이 DWP-04의 전치리로 정상군에는 미치지 않으나 유의성 있게 증가되었다. 간조직중 glutathione의 함량은 AAP의 투여로 현저히 억제되었으며 DWP-04의 투여로 증가하였는데 이러한 결과는 DWP-04의 투여로 glutathione reductase(GR) 및 γ -glutamylcysteine synthetase(γ -GCS)의 활성을 조절하므로써 나타나는 결과로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여볼 때 DWP-04의 동시 투여는 활성산소의 생성 및 해독계를 조절하므로

Table II. Effect of DWP-04 on the hepatic glutathione concentration glutathione biosynthesis enzyme system in acetaminophen-induced rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Concentration		
		Glutathione *	GR**	γ -GCS***
Vehicle		5.37±0.59 ^a	28.5±1.43 ^a	18.5±1.40 ^a
AAP		2.06±0.16 ^c	17.2±1.09 ^d	9.6±0.93 ^c
+DWP-04	50	2.86±0.43 ^c	20.3±2.46 ^c	11.5±1.86 ^c
+DWP-04	100	3.87±0.50 ^b	23.5±1.17 ^b	15.3±1.77 ^b
+DWP-04	200	4.33±0.61 ^b	25.5±0.98 ^b	16.2±1.42 ^{a,b}

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are presented as Mean±S.D.(n = 8). Values followed by the same letter are not significantly different from control (p < 0.05).

* : μ mole/g tissue

** : glutathione reductase: glutathione nmole/mg protein/min

*** : γ -glutamylcystein synthetase: Pi nmole/mg protein/min

서 AAP로 인한 간손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

인용문헌

- Meredith, T. J. and Vale, J. A. (1984) Epidemiology of analgesic overdose in England and Wales. *Human Toxicol.* **3**: 61S-74S.
- Meredith, T. J. and Vale, J. A. (1986) Non-narcotic analgesics problems of overdosage. *Drugs.* **32**: 177-205.
- Michaell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**: 211-217.
- Prescott, L. F. and Wright, N. (1973) The effects of hepatic and renal damage on paracetamol metabolism and excretion following overdosage. A pharmacokinetic study. *British J. Pharmacol.* **49**: 602-613.
- Slattery, J. and Levy, G. (1979) Acetaminophen kinetics in acutely poisoned patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **25**: 184-185.
- Ray, S. D., Mumaw, V. R., Raje, R. R., and Fariss, M. W. (1996) Protection of AAP-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**: 1470-1483.
- Webster, P. A., Roberts, D. W., Benson, R. W., and Kearns, G. L. (1996) Acetaminophen toxicity in children: diagnostic confirmation using specific antigen biomarker. *J. Clin. Pharmacol.* **36**: 397-402.
- Lee, J. H., Chi, S. C., Kim, S. H., Shin, Y. H., Park, H. J., and Choi, J. W. (2005) Preventive effect of a Schzandrin C derivative DDB-mixed preparation against hepatotoxicity induced by Carbon Tetrachloride. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: in press.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302-310.
- Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- Prochaska, H. J. and Santamaria, A. B. (1988) Direct measurement of NAD(P)H:puinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**: 328-336.
- Imai, Y., Ito, A., and Sato, R. (1966) Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J. Biochem.* **60**: 417-441.
- Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentsch reaction. *J. Biol. Chem.* **55**: 416-423.
- Bidlack, W. R. and Lowry, G. L. (1982) Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal off acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 311-317.
- Habig, W. H., Pabist, M. J., and Jakoby, W. B. (1974) Glutathion S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139.
- Meister, A. and Richman, P. G. (1975) Regulation of -glutamyl-cysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* **250**: 1422-1429.
- Mize, C. E. and Langdon, R. G. (1962) Hepatic glutathione reductase: I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **237**: 1589-1595.
- Lowry, O. H., Rodebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Bergmeyer, H. U., Scheibe, P., and Wahlfeld, A. W. (1978) Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* **24**: 58-73.
- Pumford, N. R., Halmes, N. C., Martin, B. M., Cook, R. J., Wagner, C., and Hinson, J. A. (1997) Covalent binding of acetaminophen to N-10-formyltetrahydrofolate hydrogenase in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**: 501-505.
- Lim, H. K., Kim, H. S., and Choi, J. W. (2000) Therapeutic effects of bergenin and actylbergenin on galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 351-356.
- 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.
- Salvi, A., Carrupt, P. A., Tillement, J. P., and Bernard Testa, B. (2001) Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochem. Pharmacol.* **61**: 1237-1243.
- Awasthi, Y. C., Beutler, E., and Srivastava, S. K. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **250**: 5144-5149.
- Mark, A. B., Anatoly, I. D., and Leonid, F. L. (1988) Lipid peroxidation as a possible cause of cataract. *Mechanisms of Ageing and Development*, **44**: 69-89.
- Paul, H. (1988) Perspectives on hydrogen peroxide and drug-induced hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Free Radical Biol. Med.* **5**: 387-392.
- Ahokas, J. T., Davies, C., Ravenscroft, P. J., and Emmerxon, B. T. (1984) Inhibition of soluble glutathione S-transferase by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **33**: 1929-1932.
- Sato, I. Y. (1966) Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethyl isocyanide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**: 80-86.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Davis, D. C.,

- Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **187**: 185-194.
30. Herod, I. A. and Gangolli, S. D. (1980) The effect of treatment with some phase II substrates on hepatic xenobiotic metabolism and the urinary excretion of metabolites of the -glucuronic acid pathway in the rat. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **52**: 371-378.
31. Thompson, T. N., Watkins, J. B., Gregus, Z., and Klaassen, C. D. (1982) Effect of microsomal enzyme inducers on the soluble enzymes of hepatic phase II biotransformation. *Toxicol. Applied Pharmacol.* **66**: 400-408.
32. Iyer, K. R. and Sinz, M. W. (1999) Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chemico-Biological Interactions.* **118**: 151-169.
33. Hajos, A. K. D. and Winston, G. W. (1992) Role of cytosolic NAD(P)H-quinone oxidoreductase and alcohol dehydrogenase in the reduction of p-nitrosophenol following chronic ethanol ingestion. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 223-229.
34. Cohen, S. D. and Khairallah, E. A. (1997) Selective protein covalent binding and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism Review.* **29**: 59-77.
35. Wendel, A. and Feuerstein, S. (1981) Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 2513-2520.
36. Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
37. Marinho, H. S., Marco, B., and Pinto, R. E. (1997) Glutathione metabolism in hepatoma liver of rats treated with diethylnitrosamine. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1360**: 157-168.
38. Sangeeta, R., Neil, L. A., Misso, J. C., Lenzo, C. R., and Philip, J. T. (1999) Gamma γ -glutamylcysteine synthetase activity in human lung epithelial (A549) cells: Factors influencing its measurement. *Free Radical Biol. Med.* **27**: 1346-1356.
39. Serviddio, G., Vendemiale, G., Altomare, E., Poli, G., Pallardo, F., Vina, J., and Sastre, J. (2003) Ursodeoxycholic acid protects liver mitochondria against oxidative stress in secondary biliary cirrhosis via up-regulation of gamma γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Hepatol.* **38**: 84.
40. Dodds, M. G. and Foord, R. D. (1970) Enhancement by potent diuretics of renal tubular necrosis induced by cephaloridine. *Br. J. Pharmacol.* **40**: 227-236.
41. Dincer, Y., Alademir, Z., Ikova, H., and Akcay, T. (2002) Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clin. Biochem.* **35**: 297-301.
42. Nicolas, G., Marcos, M., Juan, A., Carlos, S., Antonio, P., and Jose, R. (2004) Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, **82**: 1059-1066.

(2005년 2월 26일 접수)