

# Diethylnitrosamine 및 Thioacetamide 유발 간손상 생쥐에서의 $^{99m}\text{Tc}$ -Lactosylated Serum Albumin의 체내 분포상

경북대학교 의과대학 핵의학교실, 서울대학교 의과대학 핵의학교실<sup>1</sup>  
황재석 · 안병철 · 성영옥 · 서지형 · 배진호 · 정신영 · 유정수 · 정재민<sup>1</sup> · 이재태 · 이규보

## Biodistribution of $^{99m}\text{Tc}$ -Lactosylated Serum Albumin in Mice with Diethylnitrosamine or Thioacetamide Induced Liver Injury

Jae Seok Whang, M.D., Byeong-Cheol Ahn, M.D., Young-Ok Sung, M.D., Ji-Hyoung Seo, M.D., Jin-Ho Bae, M.D., Shin-Young Jeong, M.D., Jung-Soo Yoo, M.D., Jae Min Jeong, M.D., Jaetae Lee, M.D., Kyu Bo Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University Medical School, Daegu, Korea, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Tc-99m labeled diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)-coupled galactosylated human serum albumin (GSA) is a currently used imaging agent for asialoglycoprotein receptor (ASGPR) of the liver, but, it has several shortcomings. Recently a new ASGPR imaging agent,  $^{99m}\text{Tc}$ -lactosylated human serum albumin (LSA), with simple labeling procedure, high labeling efficiency, high stability was developed. In order to assess the feasibility of the  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA as a ASGPR imaging radiopharmaceuticals, we performed biodistribution study of the tracer in liver injured mice model and the results were compared with histologic data. **Materials and Methods:** To induce hepatic damage in ICR mice, diethylnitrosamine (DEN) (60 mg/kg/week X 5 time, low dose or 180 mg/kg/week X 2 times, high dose) and thioacetamide (TAA) (50 mg/kg X 1 time) were administrated intraperitoneally. Degree of liver damage was evaluated by tissue hematoxylin-eosin stain, and expression of asialoglycoprotein receptor (ASGPR) was assessed by immunohistochemistry using ASGPR antibody.  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA was intravenously administrated via tail vein in DEN or TAA treated mice, and biodistribution study of the tracer was also performed. **Results:** DEN treated mice showed ballooning of hepatocyte and inflammatory cell infiltration in low dose group and severe hepatocyte necrosis in high dose group, and low dose group showed higher ASGPR staining than control mice in immunohistochemical staining. TAA treated mice showed severe hepatic necrosis.  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA Biodistribution study showed that mice with hepatic necrosis induced by high dose DEN or TAA revealed higher blood activity and lower liver activity than control mice, due to slow clearance of the tracer by the liver. The degree of liver uptake was inversely correlated with the degree of histologic liver damage. But low dose DEN treated mice with mild hepatic injury showed normal blood clearance and hepatic activity, partly due to overexpression of ASGPR in mice with mild degree hepatic injury. **Conclusion:** Liver uptake of  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA was inversely correlated with degree of histologic hepatic injury in DEN and TAA treated mice. These results support that  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA can be used to evaluate the liver status in liver disease patients. (Korean J Nucl Med 39(3):200-208, 2005)

**Key Word:** Asialoglycoprotein receptor, Lactosylated human serum albumin, liver scan, Diethylnitrosamine, Thioacetamide.

## 서론

현재까지 핵의학적 영상을 이용한 간기능 평가는 주로 방사능 표지 콜로이드의 간내 분포를 이용하였으나, 콜로이드는 간기능의 주된 역할을 하는 간세포에 섭취되는 것이 아니라 간조직에 존재하는 망세내피계 세포에 섭취되어 영상화 되므로 실제 간기능 반영한다고 할 수 없다.

• Received: 2005. 3. 3. • Accepted: 2005. 6. 1.  
• Address for reprints: Kyu Bo Lee, M.D., Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University Hospital, #50 Samduck 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea  
Tel: 82-53-420-5585, Fax: 82-53-422-0864  
E-mail: kyubo@mail.knu.ac.kr  
\* 본 연구는 한국산업기술평가원 지원-경북대학교 생체분자공학실험화면구센터의 지원에 의한 것입니다.

간세포의 혈청단백 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 asialoglycoprotein 수용체(ASGP receptor: ASGPR)가 간세포의 표면에 발현됨이 알려진 후 이의 정량적인 평가를 이용하면, 현재까지 널리 이용되고 있는 방사능표지 콜로이드보다 간세포 기능을 평가는 데 더 유용할 것으로 예측되었다.<sup>1,2)</sup>

현재 ASGP 수용체(ASGP receptor: ASGPR)에 특이적으로 결합할 수 있는 제제인 galactosylated serum albumin (GSA)에 방사능을 표지하고 이의 간내 분포 및 혈액내 제거 정도를 이용하여 간세포 기능을 평가하는 방법들이 상용화되고 있다.<sup>1-3)</sup> 그러나 <sup>99m</sup>Tc-GSA가 가지는 몇 가지 단점들로 인하여, 이를 극복한 새로운 ASGPR 영상용 방사성의약품인 락토즈 인혈청 알부민(lactosylated serum albumin: LSA)이 최근 개발되었다. 본 연구는 인위적으로 간손상을 발생시킨 생쥐에서 <sup>99m</sup>Tc 표지 LSA (<sup>99m</sup>Tc-LSA)의 체내분포를 알아보고, <sup>99m</sup>Tc-LSA가 간세포의 ASGPR 발현 정도의 평가에 이용될 수 있는지와 조직학적 간손상 정도를 비침습적 평가 하는데 이용될 수 있는 방사성의약품인지를 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 간손상 유발제

무균실에서 사육한 생후 4주, 체중 20 gm의 ICR (Institute of Cancer Research, USA)계 숫컷 생쥐(mouse)를 효창 사이언스로부터 구입하여 사용하였다. 미약한 간손상을 일으키기 위하여, diethylnitrosamine (DEN) (Sigma, USA)을 생쥐 체중 kg당 60 mg의 용량으로 주당 1회씩 5주간 복강 내 주사하였고 실험은 6주째 시행하였다. 심한 간손상을 일으키기 위해서 DEN을 생쥐 체중 kg 당 180 mg의 용량으로 주당 1회씩 2주간 복강 내로 주사하였고 2회 주사 다음날 실험을 시행하였다. 또한 급성 간손상을 일으키기 위하여 thioacetamide (TAA) (Sigma, USA)를 생쥐체중 kg당 50 mg의 용량으로 주사한 다음, 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후 실험을 시작하였다. 실험을 시행하기 전까지 실험동물들은 23±2 °C, 습도 55±5 %로 유지되는 항온항습 사육실에서 충분한 양의 먹이와 물을 공급받으면서 사육되었다. 실험에서 사용된 생쥐 수는 총 48마리로 대조군과 두가지 용량의 DEN 투여군, TAA 투여군으로 분류하였다.

### 2. <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin (LSA) 준비

앞서 발표된 논문<sup>4)</sup>에서와 동일한 방법으로 제작된 LSA cold 바이알에, <sup>99m</sup>Tc 을 생리적 식염수로 희석하여 3.7 X

10<sup>7</sup> Bq/ml로 되도록 만들어 혼합하였고, 15분간 상온에서 반응시켜 표지하였다. <sup>99m</sup>Tc 은 Dupont사에서 구입한 발생기에서 얻었으며, 비방사능을 높이기 위하여, 방사능 표지 30분 이내에 착유를 시행하여 얻은 <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate를 사용하였다. 각 생쥐에서 투여되는 방사성의약품은 용액량이 0.2 ml가 되고 방사능 양이 8 μCi, LSA는 25μg이 되도록 생리적 식염수로 희석하였으며, 희석 후 vortex를 이용하여 2분간 충분히 혼합하여 각 생쥐에게 투여할 방사성의약품 0.2 ml를 27 게이지 바늘이 장착된 1 ml 주사기에 준비하였고, 각 생쥐에게 투여되는 방사능량을 구하기 위하여 표준화 주사기도 함께 준비하였다.

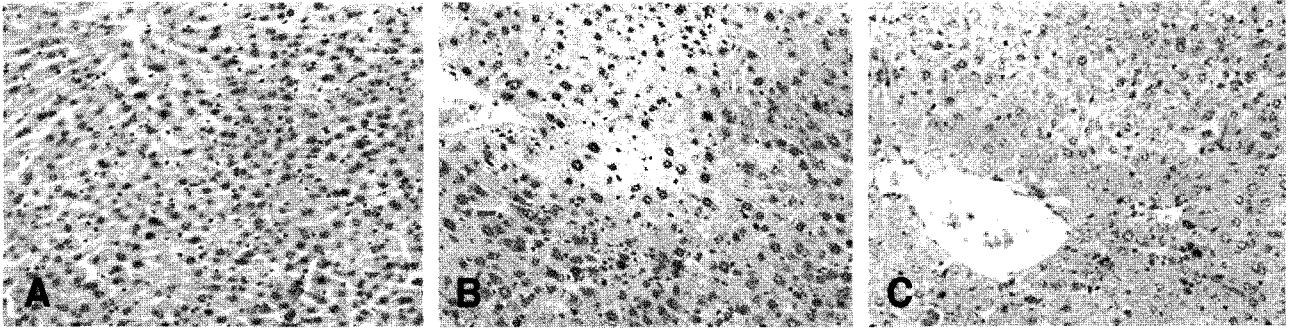
### 3. 장기의 방사능 계수측정

방사능 계수측정은 5 ml용 그린튜브에 검사재료를 넣은 후 Cobra II Auto- Gamma Counting System (Model 5005, Packard, USA)을 이용하여 2분간 계수를 시행하여 측정하였다. 이때 에너지 준위는 140±20 keV로 하였고, <sup>99m</sup>Tc의 반감기를 6.02시간으로 하여 측정된 계수를 보정하였다.

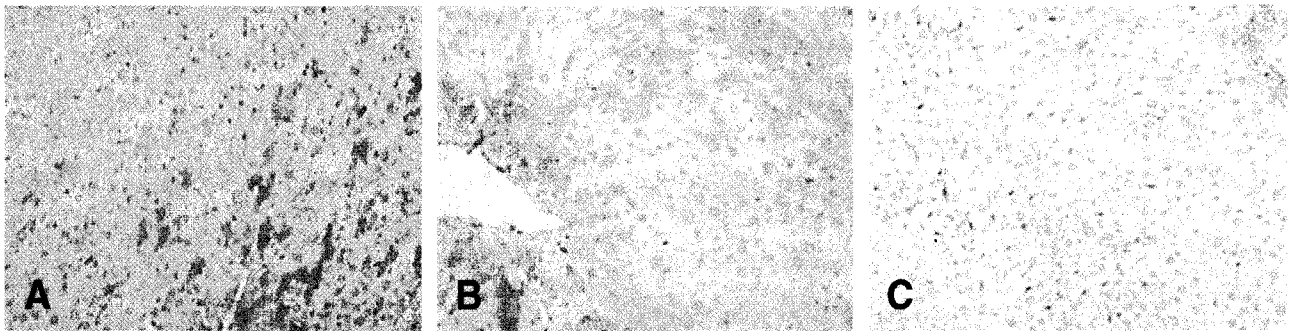
### 4. 실험 방법

대조군 생쥐 및 간손상이 발생한 생쥐들을 실험대로 옮긴 후 정맥이 확장될 수 있도록 백열전구를 이용하여 15초 정도 동안 꼬리를 가열하였다. 그 동안 주사할 방사성의약품이 들어 있는 주사기의 무게를 먼저 측정하였고, 꼬리정맥이 확장된 것을 확인한 후, 미리 준비한 방사성의약품 0.2 ml를 27 게이지 바늘이 장착된 1 ml 주사기를 이용하여 주입하였다. 주입이 끝난 후 빈 주사기의 무게를 다시 측정하여, 각 생쥐에게 투여된 방사성의약품의 무게를 구하였다. 방사성의약품 투여한 후 10분, 30분, 2시간, 6시간에 생쥐를 희생시켜 혈액, 간, 비장, 창자, 위장, 갑상선, 신장, 폐장, 뼈 및 골수를 분리시켜 그린튜브에 넣고, 동시에 표준화 주사기의 방사능을 50배로 희석하여 그중 1 ml를 채취하여 그린튜브에 넣어, 장기가 들어 있는 그린튜브와 함께 Cobra II 계수기를 이용하여 방사능 계수를 구하였다. 표준화 주사기에서 얻어진 방사능량을 기준으로 하여 각 생쥐에 투여된 전체 방사능량을 추정하고, 추정한 전체 방사능량에 대한 각각 장기들의 상대적인 방사능 분포정도를 알아보았다. 분석 자료로는 투여된 전체 방사능량에 대한 해당 장기에 모인 방사능량을 백분율로 구하여, 이를 장기의 무게와 생쥐의 무게로 보정하여 사용하였다.

실험동물의 혈액을 이용하여 간효소치(AST, ALT)의 상승여부를 알아보았고, 조직학적 간손상 정도를 평가하기 위해 동물을 희생시킨 후 즉시 간을 적출하여 10% formalin용



**Fig. 1.** Light microscopy of liver tissue with hematoxylin-eosin stain was presented. (A) Control mouse. (B) Mouse treated with DEN 60 mg/kg/week × 5 times showed mildly swollen hepatocyte and minimal inflammatory cell infiltration. (C) Mouse treated with DEN 180 mg/kg/week × 2 times showed massive necrosis and inflammatory cell infiltration around central vein.



**Figure 2.** Immunohistochemistry of liver specimen with asialoglycoprotein receptor antibody was presented. (A) Control mouse. (B) Mouse treated with DEN 60 mg/kg/week × 5 times showed stronger positive reactivity than control mouse. (C) Mouse treated with DEN 180 mg/kg/week × 2 times showed weak reactivity.

액에 고정하였고, 파라핀을 이용하여 조직절편을 만든 후, hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 시행하였다. 이렇게 만들어진 조직으로 DEN 투여 용량에 따른 간손상 형태를 알아 보았으며, 간손상에 따른 ASGPR의 발현 변화를 알아보기 위하여 anti-asialoglycoprotein receptor antibody (Calbiochem, Germany)를 이용하여 면역조직화학 검사를 시행하였다. 조직검사상 나타난 간손상 정도 및 면역조직화학 검사 결과와 방사성의약품의 체내분포 변화를 비교하여 보았다.

### 5. 통계학적 분석

통계학적 처리는 SPSS program (version 10)을 이용하였다. 사용한 통계 기법으로는 비모수 검정법인 Kruskal-Wallis H 검사를 이용하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. DEN 및 TAA에 의한 생쥐의 간조직 변화조건

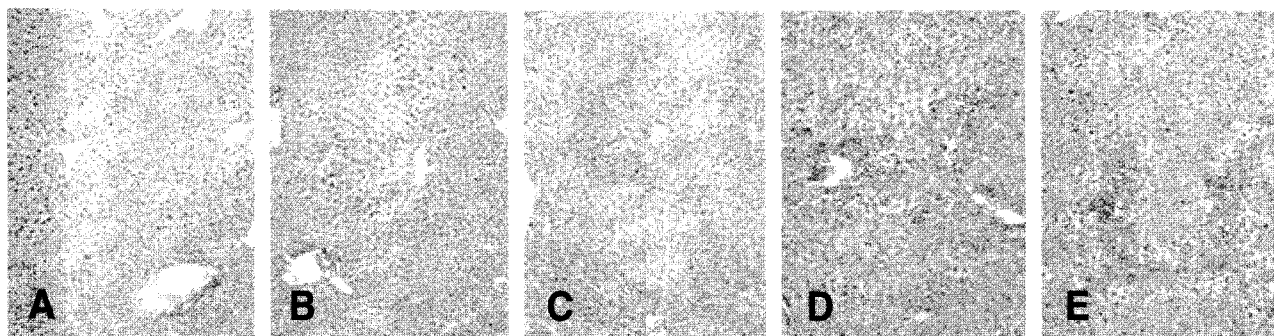
#### 1) DEN에 의한 간조직 변화

DEN 60 mg을 주 1회씩 5번 투여하고 6주째 실험 생쥐의 경우 H-E 염색상 약간의 간세포 크기 증가와 미약한 염증세포의 침윤외 간세포 괴사 및 섬유화 등의 뚜렷한 간손상 소견이 없었다. 그러나 180 mg을 주1회로 2번 투여한 다음날 실험한 생쥐는 심한 간조직 괴사가 관찰되었다(Fig. 1).

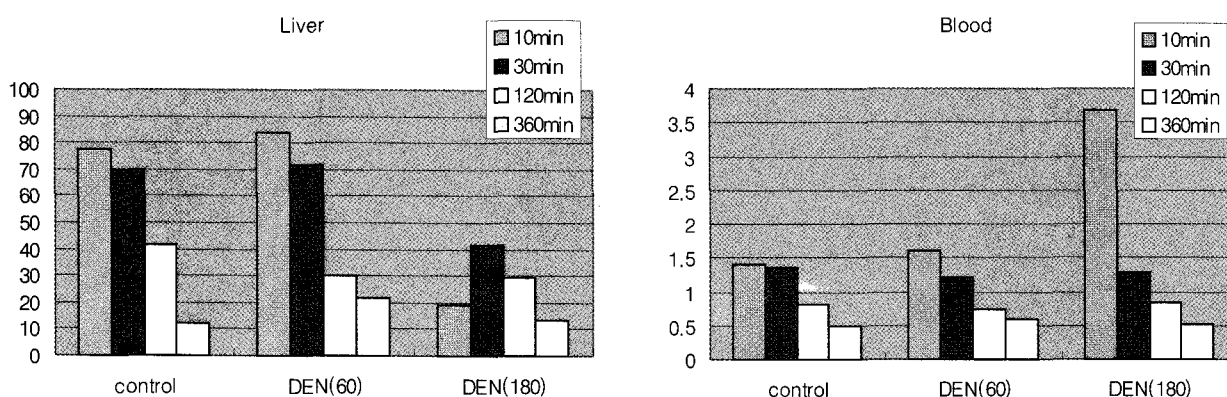
ASGPR 항체를 이용한 면역조직화학검사에서는 정상에서는 염색이 되고, 60 mg으로 간손상을 일으킨 생쥐에서는 염색이 짙게 되어 ASGPR의 발현이 증가된 것으로 나타났으며, 180 mg으로 손상시킨 생쥐에서는 염색상이 낮아져, ASGPR의 발현이 감소된 소견을 나타내었다(Fig. 2).

#### 2) TAA 투여에 의한 간조직 변화

TAA 투여 후 6 시간까지는 조직학적으로 뚜렷한 간손상 소견은 발견되지 않았으나, 24시간에는 중심정맥 주위로 미약한 정도의 초점성 간세포 괴사 및 염증세포 침윤소견이 관찰되었다. 48시간에는 중심정맥 주위로 심한 간세포 괴사 소견 및 염증세포의 침윤이 관찰되어 24시간에 비해 심해진 간



**Fig. 3.** Light microscopy of liver tissue with hematoxylin-eosin stain was presented. (A) Control mouse. (B) 6 hours after treatment with TAA 50 mg/kg showed only mild hepatocyte ballooning. (C) 24 hours after treatment showed spotty necrosis around central vein and mild inflammatory cell infiltration. (D) 48 hours after treatment showed hepatocyte necrosis around central vein and severe inflammatory cell infiltration. (E) 72 hours after treatment also showed but necrosis around central vein and severe inflammatory cell infiltration, but, improved findings compared to (D).



**Fig. 4.** Mouse treated with DEN 60 mg/kg showed similar blood and liver activities compared to control mouse, but mouse treated with DEN 180 mg/kg showed higher blood and lower liver activities compared to control mouse at 10 minutes after <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin injection.

**Table 1.** Changes of Transaminases Over 72 Hours by Intraperitoneal Injection (ip) of TAA (50 mg/kg) in ICR Mice

Hours after TAA ip	AST (IU/ml)	ALT (IU/ml)
Control	136.5±22.8	42.4±11.7
6 hr	186.3±37.8*	79.4±13.2*
24 hour	555.8±338.2*	1063.6±384.7*
48 hour	277.3±173.1*	535.7±336.8*
72 hour	135.6±38.3	58.7±19.6*

\*: p<0.05 and statistical difference between before

**Table 2.** Changes of Liver and Blood ID/gm(N) at 10 and 30 Minutes after <sup>99m</sup>Tc-lactosylated Serum Albumin Injection in ICR Mice Treated with and without Intraperitoneal Injection (ip) of DEN (60, 180 mg/kg)

Organs	Groups	Groups		p value*	Groups		p value†
		Control	DEN 60mg/kg		DEN 180 mg/kg	p value†	
liver	10 min	77.8±15.7	84.1±13.0	NS	19.1±13.6	<0.01	
	30 min	69.8±10.2	72.1±8.0	NS	41.8±18.2	NS	
blood	10 min	1.42±0.06	1.61±0.04	NS	3.67±1.28	<0.01	
	30 min	1.37±0.03	1.21±0.19	NS	1.27±0.29	NS	

Data are mean±SD. \*means statistical difference between control and DEN 60 mg/kg group, † means statistical difference between control and DEN 180 mg/kg group. NS : not significant.

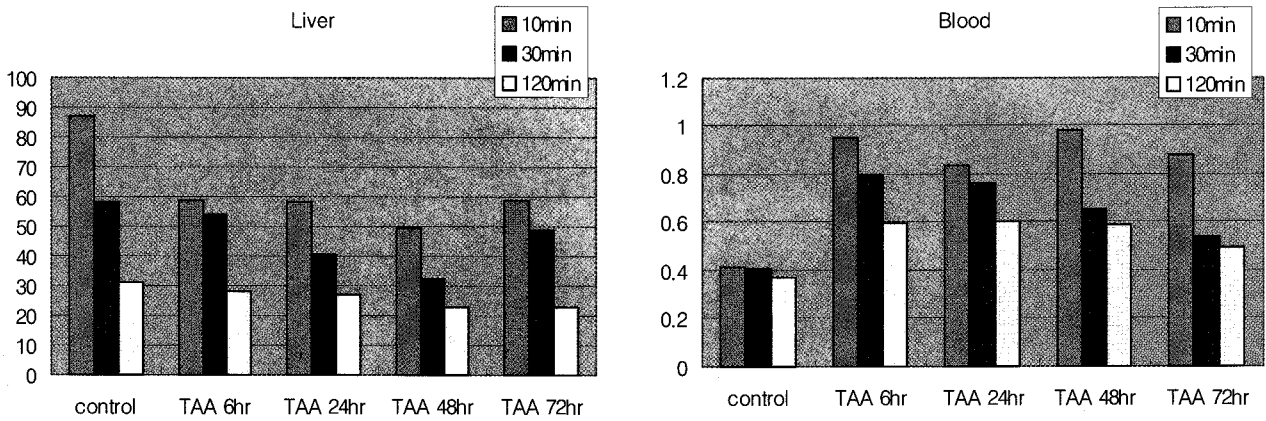


Fig. 5. Mouse treated with TAA 50 mg/kg showed higher blood and lower liver activities compared to control mouse, especially at 48 hours after TAA injection.

Table 3. Changes of Liver and Blood ID/gm(N) at 10 and 30 Minutes after <sup>99m</sup>Tc-lactosylated Serum Albumin Injection in ICR Mice Treated with Intraperitoneal Injection (ip) of TAA 50 mg/kg

Organs	Groups	Groups				
		Control	6 hours after TAA ip	24 hours after TAA ip	48 hours after TAA ip	72 hours after TAA ip
Liver	10 min	87.34±4.39	59.11±3.38*	58.04±3.69*	49.34±6.17*	59.09±10.19*
	30 min	58.19±4.03	54.37±8.63	40.45±4.41*	32.63±3.48*	48.15±7.63*
Blood	10 min	0.41±0.03	0.95±0.10*	0.83±0.17*	0.97±0.17*	0.87±0.12*
	30 min	0.50±0.09	0.80±0.34*	0.77±0.16*	0.65±0.08*	0.54±0.10

data are mean±SD. \* means p<0.05 compared to control mouse.

조직 손상소견을 보였고, 72시간 영상에서는 48시간에 비해 간세포 괴사 및 염증세포 침윤정도가 감소하여 간손상이 회복되는 소견을 보였다(Fig. 3).

### 2. 간손상 억제에 의한 간효소치의 변화

간독성 약제가 투여되지 않은 대조군 생쥐에서는 AST가 177.7±83.5 IU/ml, ALT가 29.3±2.5 IU/ml 였으나, 생쥐 체중 Kg 당 DEN 180 mg을 2번 투여한 경우 AST는 499.8±313.4 IU/ml로, ALT는 555.8±299.1 IU/ml로 통계적으로 유의하게 증가하였다(Kruskal-Wallis H, p<0.05).

TAA를 투여한 경우 간효소치는 투여 후 24시간 후 가장 상승된 값을 보였으며, 그 후 시간 경과에 따라 호전되는 경향을 보여, 72시간 후 얻은 결과상 대조군과 비슷한 값을 가지는 것으로 나타났다(Table 1).

### 3. <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin의 체내 분포

1) Diethylnitrosamine 유발 간손상 생쥐에서 <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin의 체내 분포

생쥐 체중 kg당 DEN 60 mg을 투여한 생쥐는 대조군 생쥐와 비슷한 정도의 간섭취 정도와 혈액내 잔류를 보였으나, 생쥐 체중 kg당 DEN 180 mg을 투여한 생쥐는 대조군 및 DEN이 60 mg 투여된 생쥐에 비하여 낮은 간섭취와 높은 혈액내 방사능을 보여, 간에서의 LSA 제거가 감소되어 있는 소견을 보였다(Fig. 4, Table 2).

2) TAA 유발 간손상 생쥐에서 <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin의 체내 분포

TAA를 투여하지 않은 생쥐에 비해 TAA를 투여한 생쥐는 실험이 시행된 모든 시간대(6시간, 24시간, 48시간, 72시간)에서 간섭취가 감소되었으며, 혈액내 방사능의 잔류가 높았다. 그중 조직학적으로 간손상정도가 가장 심하였던 TAA 투여 48시간 후에 시행된 실험에서 간장내 섭취정도가 가장 감소되었으며, 혈액내 방사능제거도 낮았다(Fig. 5, Table 3).

## 고 찰

위장관계에서 흡수된 약제를 포함한 음식물들은 간문맥

을 통하여 간으로 전달되어 필요한 대사를 거친 후 전신에 분포하게 된다.<sup>5)</sup> 이러한 간 문맥계의 특성으로 인하여 간은 다양한 특성을 지닌 많은 종류의 물질에 노출되게 되며, 이들 물질이나 그 대사물 가운데 일부는 간에 손상을 일으킬 수 있다. 치료용 약제 뿐만 아니라 인간이 접하는 많은 물질들이 간손상을 일으킬 수 있으며,<sup>6,7)</sup> 간손상의 원인물질에 지속적으로 노출이 되면 심각한 간손상으로 생명에 위협을 초래할 수 있다.<sup>8,9)</sup> 그러므로 독성물질에 의한 간손상이 발생한 경우, 가능한 빨리 그 원인을 찾아내어 제거함으로써 더 이상의 간손상을 막는 것이 중요하며, 또한 간손상이 지속적으로 진행되는지 혹은 회복되고 있는지를 파악하는 것 역시 임상적으로 중요한 의미를 가진다. 만성 간질환도 간독성 물질의 지속적인 섭취, 간염 바이러스, 면역질환 등 다양한 원인에 의해 발생될 수 있으며, 간질환의 중증도를 평가하기 위하여 다양한 검사법들이 사용되고 있다.

간기능 평가에는 간조직 검사, 간조직내의 화학적 성분검사, 간세포 합성물질의 검사, 간의 배설능 검사, 간의 약제대사능 검사 및 간효소치 검사 등이 이용될 수 있으나,<sup>10)</sup> 현재 임상적으로는 알부민 같은 혈액내 간세포 합성물질 검사, AST 및 ALT와 같은 간효소치 검사, 간에서 제거하여야 하는 빌리루빈 검사 및 방사성교질을 이용한 간 신티그라피와 간조직 검사가 주로 이용되고 있다. 간손상 정도를 평가하는 방법 중 간조직 검사가 가장 정확한 방법으로 받아들여지고 있으나,<sup>10)</sup> 반복시행이 어려울 뿐 아니라 조직검사를 시행한 환자의 10%에서 조직검사 침습성으로 인한 합병증이 발생하고, 빈도는 낮지만 조직검사로 인한 사망도 보고되고 있다.<sup>12,13)</sup> 그 외에도 간손상 환자에서 간혹 발생하는 출혈성 경향이 동반되면, 조직학적 검사의 적용이 더욱 위험할 수 있으며, 드물게는 심한 복수나 환자의 거부로 인하여 간조직 검사가 불가능한 경우도 있을 수 있다. 비침습적으로 간상태를 평가하기 위한 방법으로 AST, ALT 등의 간효소치의 검사가 널리 이용되고 있으나, 혈액내 간효소치 만으로는 간손상 정도 및 잔여 간기능을 예측하기 어렵다.<sup>11)</sup> 또한 이러한 혈청검사는 예민도에 문제점이 있어 중증 간질환인 간경변증에서도 정상 혹은 미약한 이상만을 보이기도 하며, 심장이나 근육질환에서도 이상소견을 보일 수 있어 특이도에도 제약이 있다.<sup>11)</sup>

간 신티그라피는 비교적 간편하게 시행할 수 있으며, 조직검사와 달리 검사로 인한 위험성이 거의 없으며, 임신부를 제외하면 검사대상에 제한이 거의 없다. 또한 빠른 시간내에 간편하게 결과를 얻을 수 있으며, 비침습적이어서 필요한 경우, 한 환자에서 반복적으로 검사를 시행하여 간상태의 변화 여부를 관찰 할 수 있다. 방사선 치료 후에 간 신티그라피를

시행하여 방사선 치료에 의한 간의 손상을 간 신티그라피로 평가 할 수 있음이 발표된 후<sup>14,15)</sup> 약물에 의한 간손상 환자에서 간 신티그라피 유용성도 발표되었으며,<sup>16)</sup> 또한 간 인식 후 간기능의 평가에도 간 신티그라피가 사용될 수 있다는 연구가 진행되고 있고,<sup>17)</sup> 일부에서는 임상적 적용도 시도하고 있다.<sup>18,19)</sup>

$^{99m}\text{Tc}$  표지 콜로이드 및  $^{99m}\text{Tc}$  표지 imminodiacetic acid (IDA)가 간 신티그라피에 사용되는 주된 방사성의약품이었으나, 방사성교질은 간기능의 주된 역할을 하는 간세포에 섭취되는 것이 아니라 간조직에 존재하는 망세내피계 세포에 섭취됨으로써 간기능을 정확히 표현하기 어렵다는 단점이 있고, IDA 제제는 간에 집적된 후 빠르게 담도로 배설됨으로 인하여 담도 및 담낭질환의 평가에는 적절하나 간세포 기능의 평가에는 한계가 있다는 단점이 있다.

최근에는 간세포 표면에 발견되어 간세포의 혈청단백 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 ASGPR에 특이적으로 결합 할 수 있는 제제인 galactosylated serum albumin (GSA)에 방사능을 표지하고 이의 간내 분포 및 혈액내 제거 정도를 이용하여 간기능을 평가하는 방법들이 소개되고 있다.<sup>1-3,20,21)</sup> ASGPR은 포유류의 간세포에만 특이하게 존재하는 수용체로서 체내에서 생성되거나 외부에서 유입된 당단백의 대사와 연관이 있다고 알려져 있는데, 갈락토오스가 노출된 당단백이 수용체와 결합하고 세포내로 유입되어 (endocytosis) 간세포내의 라이소좀으로 이동되어 최종 대사가 일어나는 것으로 알려져 있다.<sup>2,22,23)</sup> 이 ASGPR은 간세포의 숫자와 비례하는 것으로 밝혀져, ASGP와 ASGPR의 결합 정도를 평가함으로써 기능을 발휘하는 간세포의 용적을 정량적으로 평가할 수 있으며, 간의 기능 예비능을 예측할 수 있는 근거가 되고 있다.<sup>2)</sup> ASGPR 영상용 방사성의약품으로는 Krohn 등<sup>9)</sup>이 1980년에 처음으로  $^{99m}\text{Tc}$ 을 표지할 수 있도록 개발하였으며, 이 방사성의약품이 시험관 내 및 생체 내에서 간세포에 부착함을 밝혔다. 그러나 그들이 개발한 제제는 전기분해를 통해  $^{99m}\text{Tc}$ 을 표지하게 됨으로써 임상적으로 사용되기에 매우 불편하였다. 그 후 Kubota 등<sup>24)</sup>이 GSA로 명명된 DTPA가 부착된 neogalactosylalbumin을 새로이 개발함으로써 ASGPR 영상용 방사성의약품에  $^{99m}\text{Tc}$  표지가 대부분의 핵의학시설에서 가능하게 되었고, 이로 인하여 GSA를 이용한 간기능 평가법이 상용검사법으로 시행될 수 있게 되었다. 특히 일본은 간담도 핵의학 영상법이 지속적으로 감소되던 중  $^{99m}\text{Tc}$ -GSA의 임상이용 승인과 함께 간 신티그라피의 촬영 건수가 급격히 증가된 바 있다.<sup>25)</sup>

그러나 현재 사용되고 있는  $^{99m}\text{Tc}$ -GSA는 DTPA를 매개로 사용하도록 개발되어 있는데,<sup>24)</sup> DTPA와  $^{99m}\text{Tc}$  결합이

안정적이지 못하여, 일부의 <sup>99m</sup>Tc은 단백질 자체에 결합하는 것으로 알려져 있고,<sup>25)</sup> 또한 DTPA와 갈락토오스 모두가 단백질의 아미노기에 결합되기 때문에 인혈청 알부민에 부착 시 경쟁적인 결합 반응이라는 단점이 있다. 그 외에도 DTPA가 거대분자인 알부민에 부착하게 되면 합텐(hapten)으로 면역반응을 일으킬 수도 있으며,<sup>26)</sup> 현재 상용화된 키트는 <sup>99m</sup>Tc 표지시 50°C에서 30분간의 반응시간이 필요하다는 단점 등이 있다.<sup>24)</sup>

본 연구에서는 <sup>99m</sup>Tc-GSA의 이러한 단점을 개선시킨 새로운 ASGPR 영상용 방사성의약품인 환원형 LSA<sup>27,28)</sup>를 이용하여, 인위적으로 간손상을 일으킨 생쥐를 대상으로 하여, 체내분포를 알아보고, 이를 통하여 <sup>99m</sup>Tc-LSA가 간세포의 ASGPR 발현 정도의 평가에 이용될 수 있는지와 조직학적 간손상 정도를 비침습적 평가 하는데 이용될 수 있지를 알아보려고 하였다.

#### 1) Diethylnitrosamine 및 thioacetamide에 의한 간손상

본 연구에서 사용된 간손상 화합물인 DEN은 간섬유화를 거쳐 간경변으로 진행하게 하여, 알코올성 간질환에서 발견되는 조직소견과 유사한 변화를 일으키는 것으로 알려져 있으며,<sup>29-31)</sup> 간손상의 발생 재현성이 높고, 실험동물의 치사율이 낮아 간독성 동물 모델에서 자주 이용되고 있다. 본 연구에서는 생쥐 체중 kg 당 60 mg 정도의 낮은 용량으로 주당 1회 5차례 투여한 예와 180 mg의 높은 용량을 주당 1회 2차례 투여한 예가 있는데, 낮은 용량을 투여한 경우 간세포의 미약한 풍선화 변성과 소량의 염증세포의 침윤 등이 소견의 전부였다. 그러나 높은 용량을 투여한 생쥐는 광범위한 간세포 괴사와 염증세포 침윤을 동반한 급성 간손상 상태를 보였다. 그러나 DEN 투여시 발생하는 것으로 알려진 간의 섬유화 및 재생결절 등의 소견은 관찰되지 않았다. ASGPR에 대한 면역조직화학 검사에서는 저용량의 DEN을 투여한 생쥐는 정상생쥐에 비해 높은 염색상이 보여 간세포의 ASGPR의 발현이 증가된 양상을 보였는데, 고용량의 DEN을 투여한 생쥐는 염색상이 낮아 ASGPR의 발현이 감소된 것으로 나타났다. ASGPR은 간세포의 분화된 정도를 나타내며, 간세포의 분열시에는 간세포의 분화도가 낮아져 그 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> 본 연구에서 간세포의 괴사가 없는 미약한 손상을 일으킨 간조직은 간세포의 분열은 없으면서 원래의 간세포 기능으로 회복하기 위하여 ASGPR의 발현이 증가된 것으로 생각되며, 괴사가 심했던 간조직은 간세포의 ASGPR 발현이 감소되어 있었는데, 이는 간손상 후 분열과정으로 진행하게 됨으로서 ASGPR의 발현이 감소된 것으로 생각된다.

두 번째로 간손상을 발생시키기 위해 사용된 화합물인 TAA는 주로 중심정맥 주위의 간세포에 괴사성 병변을 일으키며, 그 손상기전에는 TAA 자체 보다는 hepatic mixed-function oxidase에 의해 발생하는 독성 대사물질에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>32,33)</sup> TAA에 의한 간손상이 간조직에 균일하게 발생하지 않고 주로 중심정맥 주위에 심하게 발생하는 것은 중심정맥 주위에 있는 간세포에 독성대사물의 형성에 관여하는 효소인 cytochrome P-450의 농도가 가장 높고,<sup>34)</sup> 중심정맥 (central vein) 부위가 혈류를 공급하는 문맥부위(portal triad)에서 가장 멀리 떨어져 있어 영양의 공급이 낮고 간손상 물질에 대한 저항력이 가장 낮은 부위이기 때문이다.<sup>35)</sup> 생쥐에게 TAA를 복강 내로 투여한 후 6시간까지는 괴사조직이 관찰되지 않았으나, 24시간에는 중심정맥 주위로 미약한 정도의 초점성 간세포 괴사 및 염증세포 침윤소견이 관찰되었고, 48시간에는 중심정맥 주위로 심한 간세포 괴사 소견 및 염증세포의 침윤이 관찰되어 24시간에 비해 심해진 간조직 손상소견을 보였고, 72시간 영상에서는 48시간에 비해 간세포 괴사 및 염증세포 침윤 정도가 감소하여 간손상이 회복되는 소견을 보였다. DEN과 TAA에 의한 간조직손상 소견은 인간에서의 급성 독성간손상에서 흔히 볼 수 있는 소견이어서, DEN과 TAA 유발 간손상 생쥐는 급성간손상 연구를 위한 실험동물 모델로 적절하다고 생각된다.

#### 2) 간손상에 따른 <sup>99m</sup>Tc-lactosylated serum albumin의 체내 분포 변화

투여된 <sup>99m</sup>Tc-LSA의 간내 분포정도는 전체 간세포의 양과 간조직에 발현된 ASGPR의 양에 비례한다고 알려져 있다.<sup>20,21)</sup> 본 연구에서 미약한 간세포 손상이 발생한, 체중 kg 당 60 mg의 DEN을 5차례 투여 받은 생쥐는 <sup>99m</sup>Tc-LSA의 혈액내 제거 및 간 섭취 정도가 정상생쥐와 유의한 차이가 없었으며, 통계적 유의성은 없었지만 간 섭취 정도가 오히려 높은 경향을 보여 주었다. 이는 간의 조직학적 검사에서 확인된 것처럼 간괴사의 발생이 없어 간세포 절대수의 감소가 없으면서, 면역조직화학 검사에서 보여진 것처럼 간세포의 ASGPR의 염색상이 높아져 있어, ASGPR의 발현이 증가되어 <sup>99m</sup>Tc-LSA가 미약한 간손상에서 오히려 섭취가 증가하는 결과를 발생되게 한 것으로 생각된다. 그러나 넓은 범위에 간세포의 괴사가 발생할 정도의 심한 정도의 간손상이 유도된 생쥐(DEN 180 mg, 2회, TAA 5 mg)는, <sup>99m</sup>Tc-LSA의 혈액내 제거 및 간 섭취 정도가 정상생쥐에 비해 유의하게 감소된 결과를 나타내었다. 이는 괴사로 인한 간세포의 절대수가 감소와, 간세포의 손상 후 재생과정에서 ASGPR의 발



현 감소가  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA 섭취감소 원인이라고 생각된다. 조직학적으로 미약한 간손상이 발생된 소량의 DEN 투여 생쥐와 조직학적 간괴사가 발생한 생쥐에서  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 섭취가 대조군에 비해 서로 반대의 소견을 보이므로,  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 분포변화를 이용하면, 간손상 정도가 미약하여 괴사 없이 간 상태가 회복 될 것인지, 간세포괴사로 진행 될 것인지를 구분 할 수 있을 것으로 생각된다.

TAA 투여로 간손상을 발생시킨 생쥐에서는 모든 시간대에 간섭취가 감소하는 소견을 보였으며, 조직학적으로 간손상의 회복시기인 72시간에는  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 섭취도 향상되는 소견을 보며,  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA 혈액 제거 및 간내 섭취 평가는 급성 간손상 후 회복과정도 잘 반영해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합적으로 볼 때,  $^{99m}\text{Tc}$ -GSA의 단점을 개선시킨 ASGPR 영상용 방사성의약품인  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA는 DEN 및 TAA 투여에 의해 급성 및 만성 간손상 생쥐 모델에서 조직학적 간손상 여부와 정도 예측할 수 있었으며, 또한 간손상 후 그 회복과정을 비침습적으로 보여 줄 수 있는 방사성의약품인 것으로 나타났다.  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA 간 신티그라피가 급성 혹은 만성 간손상이 의심되는 환자에서 간손상 정도를 예측하고 간 손상의 호전 혹은 진행 여부를 판단하는 영상기법으로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

## 요 약

**목적:** 비침습적으로 간의 상태를 예측하기 위하여 여러 검사법들이 시도되고 있으나 각각의 제한점이 있다. 간 신티그라피는 방사성교질과 방사능 표지 iminodiacetic acid (IDA) 화합물이 가장 널리 사용되고 있으나, 실제 간세포의 상태를 나타내는데는 부족한 점이 있다. 최근에는 간세포 표면에 발현되는 asialoglycoprotein (ASGP) 수용체 (ASGP receptor: ASGPR)에 특이적으로 결합 할 수 있는 제제인 galactosylated serum albumin (GSA)이 간 신티그라피에 유용한 방사성의약품으로 성장하고 있으나 제한점을 가지고 있다. 본 연구는 현재 상용화 된 GSA보다 유용한 ASGPR 영상용 방사성의약품인 lactosylated serum albumin (LSA)이 간세포의 ASGPR 발현 정도의 평가에 이용될 수 있는지와 조직학적 간손상정도 비침습적 평가 하는데 이용될 수 있는 방사성의약품인지를 알아보고자 시행하였다. **대상 및 방법:**  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 간기능 평가 성능을 알아보기 위하여 diethylnitrosamine (DEN)과 thioacetamide (TAA) 투여로 간손상을 일으킨 생쥐에서 생체내 분포변화를 알아보았

며, DEN 투여로 간손상을 일으킨 흰쥐에서 영상을 통하여 간 및 혈액내 방사능 분포 변화 양상을 알아보았다. 방사성의약품의 체내 분포 변화 및 간 및 혈액내 분포 변화가 간손상 여부를 잘 반영하는 지를 알아보기 위하여 간조직 검사를 시행하여 비교하였다. **결과:** 체중 kg 당 DEN 60 mg이 주당 1회 5번 투여된 생쥐는 광학현미경상 간손상 정도가 미약하였으며, 면역조직화학검사상 ASGPR의 발현이 높았으며,  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 체내 분포는 정상생쥐와 유의한 차이가 없었다. 체중 kg당 DEN 180 mg이 주당 1회 2번 투여된 생쥐는 조직검사상 간조직의 괴사가 광범위하였으며, 면역조직화학 검사상 ASGPR의 발현이 감소되어 있었고,  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 체내 분포는 정상생쥐에 비해 간섭취가 감소되어 있었으며, 혈액에서의 제거나 늦었다. TAA를 투여하여 간조직의 괴사가 발생한 생쥐에서도  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA의 체내 분포는 정상생쥐에 비해 간섭취가 감소되어 있었으며, 혈액에서의 제거가 늦었다. **결론:** 새로이 개발된  $^{99m}\text{Tc}$ -LSA는 정상 간조직에 섭취정도가 높으며, ASGPR 발현정도에 비례하여 간섭취를 나타내며, 간손상 정도에 따라 섭취가 감소하여, 간손상 정도를 비침습적으로 잘 반영해 주는 것으로 나타나 향후 간기능 평가용 방사성의약품으로 임상에 손쉽게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

## References

1. Krohn KA, Vera DR, Steffen SM.  $^{99m}\text{Tc}$ -Neogalactosylalbumin: a general model for some bifunctional carbohydrates. *J Label Comp Radiopharm* 1980;18:91-3.
2. Lee J. Quantitative evaluation of liver function with hepatic receptor scintigraphy using Tc-99m galactosylated serum albumin. *Korean J Nucl Med* 1998;32:305-13.
3. Miki K, Kubota K, Inoue Y, Vera DR, Makuuchi M. Receptor measurements via Tc-99m GSA kinetic modeling are proportional to functional hepatocellular mass. *J Nucl Med* 2001;42:733-7.
4. Jeong SY, Lee JT, Seo MR, Yoo JA, Bae JH, Ahn BC, et al. Evaluation of Liver Function Using  $^{99m}\text{Tc}$ -Lactosylated Serum Albumin Liver Scintigraphy in Rat with Acute Hepatic Injury Induced by Dimethylnitrosamine. *Korean J Nucl Med* 2003;37: 418-27.
5. Zakim D, Boyer TD. *Hepatology; A textbook of liver disease*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1996. p. 720.
6. MacSween RN, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann BC. *Pathology of the liver*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 563-8.
7. Larrey D. Drug-induced hepatitis: epidemiologic, clinical, diagnostic and physiopathologic aspects in 1995. *Rev Med Intern* 1995;16: 752-8.
8. Acharya SK, Dasarathy S, Kumer TL, Sushma S, Prasanna KS, Tandon A, et al. Fulminant hepatitis in a tropical population: clinical course, cause, and early predictors of outcome. *Hepatology* 1996;23:1448-55.
9. Ambuhl PM, Ballmer PE, Krahenbuhl S. Fulminant hepatitis:



- pathogenesis, clinical aspects and management. *Schweiz Med Wochenschr* 1994;124:368-80.
10. Batt AM, Ferrari L. Manifestation of chemically induced liver damage. *Clin Chem* 1995;41:1882-7.
  11. Zakim D, Boyer TD. *Hepatology; A textbook of liver disease*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1996. p. 789-871.
  12. Creswell SN, Burrows D. Liver biopsies in psoriatics-complications and evaluation. *Int J Dermatol* 1980;19:217-9.
  13. Hegarty JE, Williams R. Liver biopsies: techniques, clinical applications, and complications. *Br Med J(Clin Res Ed)* 1984;288:1254-6.
  14. Concannon JP, Edelmann A, Frich JC, Kunkel G. Localized "radiation hepatitis" as demonstrated by scintillation scanning. *Radiol* 1967;89:136-9.
  15. Gelfand MJ, Saha S, Aron BS. Imaging of irradiated liver with Tc-99m-sulfur colloid and Tc-99m-IDA. *Clin Nucl Med* 1981;6:399-402.
  16. Singh A, Thakur R. Scintigraphic study of prophylthiouracil induced submassive hepatic necrosis. *Clin Nucl Med* 1995;20:132-5.
  17. Svensson G, Friman S, Jacobsson L, Holmberg SB. Hepatocyte and Kupffer cell function after liver transplantation in the rat-in vivo evaluation with dynamic scintigraphy. *Liver* 1995;15:189-95.
  18. Ekman M, Fjalling M, Friman S, Carlsson S, Volkmann R. Liver uptake function measured by IODIDA clearance rate in liver transplant patients and healthy volunteers. *Nucl Med Commun* 1996;17:235-42.
  19. Brunot B, Petras S, Germain P, Vince P, Constantinesco A. Biopsy and quantitative hepatobiliary scintigraphy in the evaluation of liver transplantation. *J Nucl Med* 1994;35:1321-7.
  20. Hirose S, Ise H, Uchiyama M, Cho CS, Akaike T. Regulation of asialoglycoprotein expression in the proliferative state of hepatocytes. *Bioch Biophys Res Commun* 2001;287:675-81.
  21. Kouda K, Ha-Kawa SK, Tanaka Y. Increased technetium-99m-GSA uptake per hepatocyte in rats with administration of dimethylnitrosamine or hepatocyte growth factor. *J Nucl Med* 1998;39:1463-7.
  22. Stockert RJ, Morell AG. Hepatic binding protein: the galactose specific receptor of mammalian hepatocytes. *Hepatology* 1983;3:750-7.
  23. Chang TM, Chang CL. Hepatic uptake of asialoglycoprotein is different among mammalian species due to different receptor distribution. *Biochem Biophys Acta* 1988;942:57-64.
  24. Kubota Y, Kojima M, Hazama H, Kawa S, Nakazawa M, Nishiyama Y, et al. A new liver function test using the asialoglycoprotein-receptor on the liver cell membrane: I. Evaluation of liver imaging using the Tc-99m-neoglycoprotein. *Kaku Igaku* 1986;23:899-905.
  25. Yamamoto K. Nuclear medicine for evaluation of liver functions. *Kaku Igaku* 1994;31:521-6.
  26. Rearden DT, Meares CF, Goodwin DA, McTigue M, David GS, Stone MR, et al. Antibodies against metal chelates. *Nature* 1985;316:265-7.
  27. Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee J, Kang JH, Lee DS, et al. Development of <sup>99m</sup>Tc-neomannosyl human serum albumin (<sup>99m</sup>Tc-MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. *Nucl Med Commun* 2004;25:1211-7.
  28. Jeong JM, Hong MK, Lee J, Son M, So Y, Lee DS, et al. <sup>99m</sup>Tc-neolactosylated human serum albumin for imaging the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Bioconjug Chem* 2004;15:850-5.
  29. Craddock VM. Nitrosamines and human cancer: proof of an association? *Nature* 1983;306:638.
  30. Montesano R, Bartsch H. Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards. *Mutat Res* 1976;32:179-228.
  31. Mayer MJ, Schook LB. Immunotoxicity of nitrosamines. In: Smialowicz RJ, Holsapple MP, editors. *Experimental Immunotoxicology*. Boca Raton: CRC Press; 1996. p. 351-66.
  32. Dyroff MC, Neal RA. Studies of the mechanism of metabolism of thioacetamide S-oxidase by rat liver-microsomes. *Mol Pharmacol* 1983;23:219-27.
  33. Chieli E, Mavalidi G. Role of microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxidase. *Toxicol* 1984;31:41-52.
  34. Jungermann K. Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes. *Enzyme* 1986;35:161-80.
  35. Zakim D, Boyer TD. *Hepatology; A textbook of liver disease*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1996. p. 9.