

Streptozotocin 유도 당뇨병 흰쥐에서 methotrexate의 신독성 생성기전에 관한 연구

김석환¹ · 김여정 · 이주연 · 강혜옥 · 이항우² · 최종원*

경성대학교 약학대학, ¹동아대학교 식품영양학과, ²대구전통생물소재산업화센터

Received January 6, 2006 / Accepted March 20, 2006

The Mechanism of Nephrotoxicity Formation of Methotrexate in STZ-Induced Hyperglycemic Rats.
Seok-Hwan Kim¹, Yeo-Jeong Kim, Joo-Yeon Lee, Hye-Ok Kang, Hang-Woo Lee² and Jongwon Choi*.
College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea, ¹Department of Food Science and Nutrition, Dong-a University, Busan 604-714 Korea, ²Traditional Bio-materials industry center, Daegu 704-230 Korea – This study is investigated the effect on mechanism of nephrotoxicity formation of methotrexate(MTX) by examining the induction of hyperglycemic by streptozotocin(STZ). MTX was injected daily at two doses of 3, 6 mg/kg for 1 week in STZ-induced hyperglycemic rats. Activities of BUN, creatinine and LDH were significantly increased by treatment with MTX in STZ-induced diabetic group when compared to MTX treatment group in normal rats. Renal lipid peroxide content and activities of cytosolic enzyme were significantly increased in the treatment of MTX in diabetic group. The concentration of glutathione and glutathione biosynthesis enzymes were decreased by treatment with MTX in STZ-induced diabetic group. These results suggest that nephrotoxicity of MTX in STZ-induced hyperglycemic rat was caused by activation of renal metabolizing enzymes in cytosol and decrease of glutathione concentration.

Key words – Methotrexate, streptozotocin, nephrotoxicity, cytosolic enzyme, glutathione

2001년도 우리나라 국민의 사망원인통계에 의하면 당뇨병에 의한 사망이 질병에 의한 사망 중 4번째로 10만 명당 23.8명인 것으로 보고되었으며 이는 지난 10년 사이에 124.5% 증가한 것으로 암 다음으로 크게 증가한 것이다. 이러한 당뇨병의 확대와 심화는 식생활의 서구화와 생활패턴의 변화에 의하여 과식, 운동부족, 음주, 흡연과 같은 잘못된 생활습관이 형성되어 영양적 불균형과 운동부족 상태를 야기하기 때문일 것으로 생각된다. 당뇨병 환자에서는 거의 대부분 눈, 신경, 신장 등의 triopathy를 동반하고 그 외에도 여러 가지 대사성 질환을 초래한다. 따라서 당뇨병 환자에서는 망막증, 신증과 같은 미세혈관증과 고혈압, 심근경색, 협심증과 같은 심질환 및 뇌졸중, 뇌혈관 장애 등의 동맥경화성 혈관장애와 신경장애 등의 전신의 혈관 장애 합병증을 발생시킨다[9,12]. 또한 당뇨병 환자에게는 다양한 종류의 뼈와 관절 질환이 잘 생긴다. 높은 혈당과 그로 인한 신경이나 혈관의 합병증이 복잡하게 얽혀서 뼈와 관절의 이상을 유도하는 것이다[17].

이러한 당뇨병 환자에게 나타나는 관절등의 염증치료에 여러 가지 약물을 사용하고 있으나 이들 약물 중에서도 methotrexate (MTX)가 효율 측면에서 다른 약제에 비해 가장 빠르고 뛰어난 효과를 가지고 있다고 알려져 있다[24,31,36]. MTX는 엽산과 유사한 화학적 구조를 가져 dihydrofolate가 tetrahydrofolate로 전환되는데 필요한 dihydrofolate reduc-

tase와 가역적 결합을 하여 tetrahydrofolate의 합성을 억제한다. 결과로 dUMP가 dTMP로 전환되지 못하여 thymidyate와 purine의 합성장애를 초래하여 세포의 분열 및 증식의 장애를 유발한다[4,13,33]. MTX의 부작용으로는 골수독성, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증등이 나타나며 특히 고용량을 투여하며는 신독성이 나타나 MTX가 신장으로의 배설이 늦어져 사망에 이르게 되는 심각한 증상이 초래된다. 이에 본 실험에서는 streptozotocin (STZ) 으로 유도한 당뇨병 실험동물에서 MTX의 투여로 인한 신독성의 생성기전을 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험설계

MTX는 유한양행으로부터 구입하였으며, 실험 동물은 대한 BioLink(충북 음성)로부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도 : 22±0.5℃, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 200±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 당뇨의 유도는 STZ (50 mg/kg)을 0.01 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해하여 꼬리정맥에 주사하여 유발하였다. STZ 주사 48시간 후 공복 상태에서 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 공복시 혈당 수준이 300 mg/dL 이상일때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였고 당뇨 유발 3일째부터 1주일 동안 MTX 3 mg/kg, 6 mg/kg을 복강 주사하였고 마지막 주사로부터 24 시간후에 처치하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4888, Fax : +82-51-620-4804

E-mail : jwchoi@ks.ac.kr

혈액 성분의 측정

혈청생화학적 검사는 실험동물을 CO₂로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 혈청으로 aspartate/alanine aminotransferase (AST/ALT)의 활성 측정은 Reitman과 Frankel의 방법 [30], alkaline phosphatase (ALP)의 활성 측정은 Lowry등의 방법[14], blood urea nitrogen (BUN)의 함량 측정은 Chabner 등의 방법[5], creatinine의 함량 측정은 Slot의 방법[32], lactate dehydrogenase (LDH)의 활성 측정은Cabaud와 Wroblewski의 방법[3] 및 superoxide dismutase의 활성 측정은 Oyanagui의 방법[27]에 준하였다.

신조직에서의 변동

채혈을 마친 실험동물에서 신장을 적출하여 신조직을 관류하여 혈액을 제거하고 얻은 신조직에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 병냉하에서 glass-teflon homogenizer로 마쇄하여 10% 마쇄액을 얻었다. 이를 이용하여 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)의 함량측정은 Ohkawa의 방법[26], glutathione(GSH)의 함량측정은 Ellman의 방법[7]에 준하여 측정하였다. 이 마쇄액을 고속 및 초고속 원심분리(105,000×g, 1hr) 하여 mitochondria, cytosol 및 microsomal 분획을 얻어 이를 효소액으로 하여 xanthine oxidase/dehydrogenase (XO/XD) 활성 측정은 Stirpe과 Della의 방법[34], aldehyde oxidase (AO)의 활성 측정은 Rajagopalan의 방법[30], aminopyrine N-demethylase (AD)의 측정은 Nash의 방법[25], aniline hydroxylase(AH)의 활성 측정은 Bidlack 등의 방법[2], glutathione S-transferase (GST)의 활성 측정은 Habig 등의 방법[10], superoxide dismutase (SOD) 활성의 측정은 Marklund와 Marklund의 방법[20], catalase 활성의 측정은 Aebi의 방법[1], glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성의 측정은 Paglia와 Balentine의 방법[28], γ

-glutamylcystein synthetase (γ -GCS)의 측정은 Meister와 Richmandml 방법[22], glutathione reductase (GR)와 활성 측정은 Charles와 Robert의 방법[6]에 준하여 측정하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질 정량은 bovine serum albumin (Sigma Fr. IV)을 표준품으로 하여 Lowry 등의 방법[19]에 따라서 측정하였으며, 실험결과는 평균치±표준편차로 표시하였고 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하였다. P값이 5% 미만일때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

혈중 생화학적 변동

정상군과 STZ를 투여하여 당뇨를 유발시킨 군에 MTX를 용량별로 투여하고서 혈중에 미치는 생화학적변동을 관찰한 결과는 Tabel 1에 나타난 바와 같았다.

MTX 투여시 ALT와 AST, ALP의 활성을 관찰한 결과 정상군에 MTX 3, 6 mg/kg을 투여한 군에 비하여 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서 활성이 다소 증가하기는 했지만 통계적 유의성은 관찰할 수 없었다. BUN 및 creatinine의 함량과 LDH의 활성은 정상군에 MTX 3 mg/kg을 투여하였을 때는 별 영향이 없고 6 mg/kg의 MTX를 투여하였을 때는 다소 증가하던 것에 비하여 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서는 BUN 및 creatinine의 함량과 LDH의 활성이 현저히 증가하였다. Transaminase는 amino기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상적으로 가장 많이 이용되고 있는 AST와 ALT가 있는데 이들 효소들은 amino산과 α -keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있다. 이들은 간손상의 지표로 널리 이용되는 것으로 간세포가 손상이 되면 세포 밖으로 유출되는 유출효소로서 이 과정

Table1. Effect of MTX on biochemical parameter of STZ-induced hyperglycemic rats in serum

Treatment	Dose (mg/kg)	AST [*]	ALT ^{**}	ALP ^{***}	BUN ^{****}	Creatinine	LDH ^{*****}
		u/L		KA unit	mg/dl		wrobleski unit
Normal		60.4±10.3 ^a	28.9±7.63 ^a	10.8±3.43 ^a	12.8±3.6 ^b	4.5±0.97 ^c	25.5±2.11 ^c
+MTX	3	62.8±7.36 ^a	30.2±6.55 ^a	13.2±4.62 ^a	13.5±2.9 ^b	5.0±0.83 ^c	31.8±3.16 ^c
+MTX	6	68.3±9.25 ^a	29.7±8.25 ^a	14.0±3.52 ^a	20.3±8.7 ^b	7.4±2.63 ^{bc}	50.2±15.70 ^b
STZ		69.8±11.3 ^a	31.6±9.43 ^a	13.9±5.11 ^a	16.5±4.3 ^b	5.8±0.90 ^c	37.8±3.46 ^{bc}
+MTX	3	73.2±14.6 ^a	33.2±8.52 ^a	15.2±6.25 ^a	32.8±5.9 ^a	10.6±2.3 ^{ab}	72.4±10.51 ^a
+MTX	6	75.8±12.9 ^a	35.7±9.93 ^a	16.8±4.23 ^a	40.2±6.3 ^a	13.8±3.27 ^a	80.9±13.72 ^a

Rats were treated with methotrexate(MTX, 3, 6 mg/kg i.p.) daily for 1 week in STZ-induced hyperglycemic rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. for five experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test from normal (p<0.05).

* : alanine aminotransferase, ** : aspartate aminotransferase, *** : alkaline phosphatase, **** : blood urea nitrogen, ***** : lactate dehydrogenase

은 세포내의 energy 공급이 감소된 결과로 세포내의 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 혈액 중으로 빠르게 유출되어 간 손상시 정상치 보다는 현저히 증가되므로서 간기능 검사에 이용되고 있다. Alkaline phosphatase[35]는 monoesterified phosphoric acid를 가수분해 하는 효소로서 담즙울체 및 간 질환에서 증가되는 효소로서 간기능 검사의 지표로 사용된다. 요소는 주로 간에서 urea cycle 종말 대사물로 간, 신장 이외의 조직에서 생성된 ammonia를 glutamine으로 합성되어 간으로 운송된다. 간에서는 glutaminase의 작용으로 ammonia가 유리되고 이 ammonia와 이산화탄소로 carbamyl-phosphate가 합성된다. carbamyl phosphate는 요소 회로로 들어가서 arginase의 작용에 의해 arginine으로부터 요소가 생성된다. 생성된 요소는 혈류로 들어가 사구체를 거쳐 요로 배설된다. 이 요소는 혈액이나 뇨 이외에 뇌척수액, 심이지장액에도 함유되며 간에서 합성된 무해한 요소는 체액으로 방출되고 세포 내외로 쉽게 확산된다. 혈중 요소 질소의 변동은 단백 섭취량, 요소의 합성 및 배설 등 세 가지 인자로 좌우되며 주로 요소 질소가 체내에서 증가하는 경우는 ammonia 생성이 증가하여 요소 합성이 증가하는 예로서 주로 대수술, 체내 출혈, 악성 종양, 기아, 고열, 화상, 갑상선 기능 항진증, 체장 괴사, 중증 감염증 등에서 조직 단백질의 이화 항진이 일어나 증가되며 신장 기능 장애의 경우 현저히 증가되는 것으로 알려져 있다. Creatinine은 신장 실질 장애가 진행되면 내인성 삼투압 이뇨가 생겨 요소의 세뇨관 재흡수를 저해하여 creatinine, creatine, 요산 등에 비하여 상대적으로 뇨중 배설이 증가된다. 또한 생체내에서 해당계의 최종 단계에 작용하는 효소로 L-lactate를 pyruvate로 전환하는 가역반응을 촉매하고 뇨중 근위 및 원위 세뇨관의 손상을 반영하는 LDH 역시 신장기능 장애의 경우 현저히 증가된다. 본 실험의 결과로 보아 당뇨병 쥐에 MTX를 투여하면 간보다는 신장에서의 장애를 감지하는 효소의 활성이 현저히 증가되는 것으로 사료되었다.

지질과산화물의 함량에 미치는 영향

신독성이 유도된 실험동물에 대한 신장조직 중의 지질과산화 함량변화를 실험한 결과가 Fig. 1과 같았다. 정상군에 MTX 3 mg/kg을 투여한 군에서는 별 영향이 없고, 6 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서는 다소 증가하던 것이 당뇨를 유발시킨 당뇨쥐에서는 MTX를 3, 6 mg/kg을 1주간 복강 투여하였을 때 지질과산화 함량이 유의성있게 증가하였다. 일반적으로 생체조직 세포막의 손상은 세포막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 그 한가지 요인으로 지적되고 있는데, 지질과산화의 생체 외적인 요인뿐만 아니라 내

적인 요인에 의하여 생성된 oxygen free radical들 때문에 야기된다. 이러한 oxygen free radical은 세포막의 구성성분인 불포화 지방산을 과산화시켜 세포의 성분이나 기질 특히 세포막의 연쇄적인 과산화를 일으켜 세포 괴사 등을 일으킨다 [8,15]. 이러한 세포막 지질과산화 산물중 하나가 malondialdehyde (MDA)이다. 일반적으로 과산화지질을 유도하는 물질은 그 물질이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 또는 대사부산물로서 oxygen radical을 생성시켜서 이들이 세포내 recycling 반응에 관여하여 계속적으로 radical을 생성하여 지질과산화의 생성을 증가시켜 결국은 조직의 괴사를 초래한다. 본 실험의 결과, 당뇨쥐에 MTX를 투여하면 지질과산화물의 생성을 증가시켜 지질과산화 반응에 의한 신 손상을 증가시키는 것으로 사료된다.

활성 산소 생성계에 미치는 영향

체내에 투여되어진 약물 및 독성물질의 대사과정은 phase I 반응과 phase II 반응으로 나눌 수 있으며, 신장조직의 지질과산화 함량의 증가가 어떠한 기전에 의하여 나타나는가를 검토할 목적으로 신장에서 일어나는 활성산소의 생성체인 phase I 반응 중 cytosol 효소계 및 microsomal 효소계에 미치는 MTX의 영향을 관찰한 결과가 Table 2이다. Microsomal 효소계인 AD및 AH의 효소계를 측정하여 본 결과 정상군에 비하여 STZ의 전치리로 당뇨를 유발시킨 당뇨쥐에서 다소 증가하였지만 MTX를 3, 6 mg/kg을 1주간 복강 투여하였을 때는 별 다른 영향을 나타내지 않았다. Cytosol 효소인 XD및 XO의 활성을 측정해 보았다. 정상군에 MTX 3 mg/kg을 투여하고 24시간 후 관찰한 XD 활성에는 별 영향이 없고 6 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서 다소 감소하던 것이 당뇨쥐에서는 MTX를 3, 6 mg/kg 투여하였을 때 XD활성이 현저히 감소하였다. XO 활성은 정상쥐에 MTX 3 mg/kg을 투여할 때는 별 영향이 없고 6 mg/kg의 MTX를 투여 하였을 때는 다소 증가하던 것에 비하여 당뇨쥐에 MTX를 투여 하였을 때는 현저히 증가함을 관찰할 수 있었

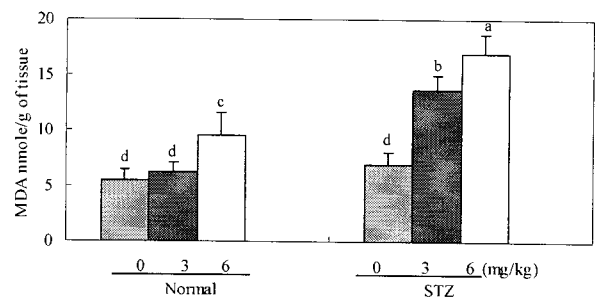


Fig. 1. Effect of MTX on renal lipid peroxide content (mean±S.D.) in STZ-induced hyperglycemic rats. The means sharing a common letter are not significantly different (p<0.05) between groups.

다. 이들 결과는 MTX를 투여하였을 때 유도되는 radical이 xanthine 관련 효소들의 효소 활성에 영향을 미쳤다는 증거로, 당뇨쥐에 MTX를 투여하였을 때 XD에서 XO로의 변환이 현저히 증가되었다는 것을 보여주고 있다. 또다른 신장조직에서의 radical 생성 효소인 AO 활성 역시 정상군에 MTX를 투여한 군에 비하여 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서 유의성 있게 증가하였다. 생체내의 정상적인 상태에서는 XD 활성만을 가지고 있는데, radical 또는 외부 독성 물질 유입은 이들을 XO로 변환시켜[11] NAD⁺를 필요로 하지 않는 효소 형태로 바꾸어 버린다. 이들 XO는 각종 aldehyde, purine 등을 분해할 수 있는데, 이들 분해 과정에서 많은 radical이 형성[21]되어 생체내 산화적 손상을 더욱 악화시키게 된다. AO도 XO와 물리화학적인 구조나 성질이 유사하며, XO와 마찬가지로 oxygen free radical을 생성시키는 효소이다. 이에 본 실험의 결과 당뇨쥐에 MTX를 투여하면 cytosol계 효소의 활성을 촉진시켜 free radical 생성을 증가시킴으로 신독성을

악화시키는 것으로 사료된다.

활성산소의 해독계에 미치는 영향

당뇨쥐에 MTX를 투여하면 신독성이 증가하는 과정에 활성산소의 해독계에 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Table 3이다. 정상군과 STZ를 투여하여 당뇨를 유발시킨 군에 MTX를 용량별로 3, 6 mg/kg을 1주일간 복강 투여하고 SOD,GSH-Px의 활성을 관찰해 본 결과 정상군에 MTX를 투여한 군에 비해 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서 다소 감소하긴 했지만 통계적 유의성은 관찰 할 수 없었고, GST의 활성을 관찰해 본 바, 정상군에 MTX 3 mg/kg을 투여한 군에서는 별 영향이 없고, 6 mg/kg을 투여하였을 때는 다소 감소하던 것이 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서는 활성이 현저히 감소하였다. Phase II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이 나 내인성 및 외인성 물질을 포함시키고 무독화 시키는 단계이다. 그 중 SOD는 xenobiotics로 인하여 생성된 supero-

Table 2. Effect of MTX on phase I enzyme activities in STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity				
		XD [*]	XO ^{**}	AO ^{***}	AH ^{****}	AD ^{*****}
Normal		0.214 ± 0.041 ^a	0.092 ± 0.018 ^c	0.39 ± 0.010 ^d	3.62 ± 0.23 ^b	2.53 ± 0.17 ^b
+MTX	3	0.194 ± 0.038 ^{ab}	0.096 ± 0.016 ^c	0.40 ± 0.036 ^d	3.92 ± 0.17 ^b	2.62 ± 0.25 ^b
+MTX	6	0.090 ± 0.025 ^c	0.141 ± 0.019 ^b	0.55 ± 0.020 ^c	4.06 ± 0.43 ^b	2.58 ± 0.19 ^b
STZ		0.156 ± 0.039 ^b	0.109 ± 0.013 ^c	0.41 ± 0.038 ^d	5.23 ± 0.73 ^a	3.16 ± 0.27 ^a
+MTX	3	0.048 ± 0.026 ^{cd}	0.193 ± 0.017 ^a	0.80 ± 0.013 ^b	5.48 ± 0.63 ^a	3.36 ± 0.40 ^a
+MTX	6	0.018 ± 0.012 ^d	0.208 ± 0.015 ^a	1.03 ± .027 ^a	6.21 ± 0.80 ^a	3.41 ± 0.33 ^a

- 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 dehydrogenase ; uric acid nmole/mg protein/min
- ** : Xanthine oxidase ; uric acid nmole/mg protein/min
- ***: Aldehyde oxidase ; 2-pyridone nmole/mg protein/min
- ****: Aniline hydroxylase ; P-aminophenol nmole/mg protein/min
- *****: Aminopyrine N-demethylase; HCHO nmole/mg protein/min

Table 3. Effect of MTX on phase II enzyme activities on STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity			
		SOD [*]	Catalase ^{**}	GSH-Px ^{***}	GST ^{****}
Normal		25.4 ± 3.36 ^a	124.6 ± 24.9 ^a	193.6 ± 30.7 ^a	145 ± 15.7 ^a
+MTX	3	23.8 ± 2.28 ^a	120.8 ± 18.3 ^a	187.3 ± 29.7 ^a	141 ± 17.9 ^a
+MTX	6	23.1 ± 3.25 ^a	118.6 ± 17.5 ^a	175.21 ± 31.3 ^a	111 ± 19.3 ^b
STZ		23.7 ± 3.13 ^a	120.2 ± 13.2 ^a	182.7 ± 30.9 ^a	139 ± 15.3 ^{ab}
+MTX	3	20.8 ± 6.14 ^a	103.9 ± 25.3 ^a	161.7 ± 31.3 ^a	61.8 ± 13.9 ^c
+MTX	6	19.9 ± 7.90 ^a	100.8 ± 24.8 ^a	157.5 ± 29.8 ^a	42.9 ± 11.7 ^c

- 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)
- *: Superoxide dismutase ; unit/mg protein/min ; one unit SOD is defined as the amount of enzyme that causes 50% inhibition of cytochrome C reduction.
- ** : Catalase; H₂O₂ nmole/mg protein/min
- ***: Glutathione peroxidase ; oxidized NADPH nmole/mg protein/min
- ****: Glutathione S-transferase ; nmole DNCB conjugated formed/mg protein/min

xide anion을 H₂O₂로 전환시키는 효소로 생체 내 해독 과정에 관여하는 효소 중 하나이다. 또 catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하여 무독화 시키는 radical scavenging enzyme [16,18]로 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다. glutathione peroxidase 역시 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유기물을 물로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시킨다.

또 다른 해독계로서, 체내에서 일차적으로 산화대사된 후 제2단계인 conjugation 단계를 거쳐서 무독화 되는 최종 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이를 이용하여 체내 독성 물질을 전이 분해시키는 GST의 역할을 생각할 수 있다[24,37].

Glutathione 생성계 활성화에 미치는 영향

GSH 농도와 glutathione 생성계인 GR, γ -GCS활성을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 정상군에 3 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서 별다른 영향이 없고, 6 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서 다소 감소하던 것에 비해 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서는 GSH의 함량이 현저히 감소하였다. 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 -glutamyl cysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해 합성된다. MTX에 의한 glutathione의 함량 감소 기전을 알아볼 목적으로 glutathione 합성에 관여하는 γ -glutamylcystein synthetase (γ -GCS)의 활성과 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 glutathione reductase의 활성을 관찰하였다. 그 결과 정상군에 3 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서 별다른 영향이 없고, 6 mg/kg의 MTX를 투여한 군에서 다소 감소하던 것에 비해 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서는 glutathione reductase의 활성이 현저히 감소하였다. 합성에 관여하는 γ -glutamylcystein synthetase의 활성에서도 정상군

에 MTX를 투여한 군에 비해 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서는 γ -glutamylcystein synthetase의 활성이 현저히 감소하였다.

이로 보아 당뇨쥐에서 MTX에 의하여 신 조직 중의 지질 과산화의 함량이 증가하는 것은 glutathione의 함량 감소에 의하여 나타나는 결과로 사료된다.

요 약

엽산과 유사한 구조를 가져 관절염 치료제로 쓰이는 methotrexate (MTX)의 당뇨병 쥐에서의 신독성 기전을 구명할 목적으로 실험동물 정상군과 STZ로 당뇨를 유발한군에 MTX를 투여하여 신장 독성을 유발하여 혈중 생화학적 변화를 관찰하고 free radical의 생성계와 해독계의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 혈중 신장기능 지표 효소 및 신장조직의 지질과산화 함량이 정상군에 MTX를 투여한 군에 비해 당뇨쥐에 MTX를 투여한 군에서 현저히 증가하였다. 당뇨쥐에 MTX를 투여함으로써 활성산소 생성계인 phase I 단계 중 cytosol 효소계 활성이 정상쥐에 MTX를 투여한 군에 비하여 현저히 증가하였고, phase II 단계 중 glutathione S-transferase의 활성이 정상쥐에 MTX를 투여하였을때에 비하여 당뇨쥐에 MTX를 투여하였을때 현저히 감소하였다. 신조직 중 glutathione의 함량 또한 당뇨쥐에 MTX를 투여했을때 현저히 감소하였고 이러한 결과는 γ -glutamylcystein synthetase와 glutathione reductase의 활성을 감소시킨 결과로 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼때 당뇨쥐에 MTX를 투여하면 신독성이 증가함을 확인할 수 있었고, 그 기전은 cytosol계 효소 활성을 증가시켜 MTX의 대사계를 촉진시킴으로 독성물질의 생성을 증가시키고, 이로 인한 신조직중의 지질 과산화 함량의 증가는 glutathione의 함량 감소에 의해 나타나는 결과로 사료되어진다.

참 고 문 헌

1. Aebi, H. 1974. Catalase. In "Methods of enzymetic analy-

Table 4. Effect of MTX on the glutathione synthesis in STZ-induced hyperglycemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	GSH [*]	GR ^{**}	γ -GCS ^{***}
		μ mole/g of tissue	μ mole/g of tissue	Pi nmole/mg protein/min
Normal		0.69 \pm 0.05 ^a	22.97 \pm 2.4 ^a	14.15 \pm 0.7 ^a
+MTX	3	0.63 \pm 0.07 ^a	20.76 \pm 3.7 ^a	14.07 \pm 0.9 ^a
+MTX	6	0.49 \pm 0.09 ^b	17.92 \pm 3.5 ^a	11.01 \pm 0.9 ^b
STZ		0.61 \pm 0.08 ^a	20.23 \pm 3.6 ^a	14.03 \pm 0.6 ^a
+MTX	3	0.31 \pm 0.04 ^c	10.17 \pm 2.7 ^b	7.13 \pm 0.5 ^c
+MTX	6	0.23 \pm 0.02 ^c	7.90 \pm 1.8 ^b	5.97 \pm 0.6 ^c

1) Values are mean \pm SD of eight experiments.

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

* : Glutathione ** : Glutathione reductase *** : γ -glutamylcysteinsynthetase

- sis" Bergmeyer, H.U., Academic Press, New York., 2, 673-684.
2. Bidlack, W. R. and G. L. Lowry, 1982. Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochemical Pharmacology* **31**, 311-317.
 3. Cabaud, P. G. and F. Wroblewski. 1958. The determination of serum lactate dehydrogenase. *American Journal Clinical Pathology* **30**, 234-236.
 4. Chabner, B. A., F. Mayers and C. N. Coleman. 1975. Antineoplastic agents. *New England Journal Medicine* **292**, 1107-1113.
 5. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinica Chimica Acta* **8**, 130-132.
 6. Charles, E. M. and G. L. Robert. 1962. Hepatic glutathione reductase. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 1589-1595.
 7. Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **80**, 70-77.
 8. Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zuller. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehyde. *Free Radical Biology of Medicine* **11**, 81-128.
 9. Garcia, M. J., P. M. Mcnamara, T. Gordon and W. B. Kannel. 1974. Morbidity in mortality in diabetes in the Framingham population. *Diabetes* **23**, 105-108.
 10. Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry* **249**, 7130-7139.
 11. Ji, S., Lemaster, J. J., V. Christenson. and R. Thurman, 1990. Periportal and pericentral pyrimidine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver. Evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **79**, 5415-5419.
 12. Kannel, W. B. and D. L. McGee. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. *J.A. H.A.* **241**, 2053-2038.
 13. Kinney, C. S. and L. M. Morse. 1964. Effect of a folic acid antagonist in rat. *Journal of Nutrition* **84**, 288-294.
 14. Lowry, O. H., R. R. Nitra, M. L. Wu, W. S. Hixon and E. J. Crawford. 1954. The quantitative histochemistry of brain, enzyme measurements. *Journal Biological Chemistry* **207**, 19-37.
 15. Lane, R. H., R. J. Ramirez, A. E. Tsirka, J. L. Kloesz, M. K. Maloughlin, E. M. Gruetzmacher and S. U. Devaskar. 2001. Uteroplacental insufficiency lowers the threshold towards hypoxia-induced cerebral apoptosis in growth-related fetal rats. *Brain Research* **895**, 186-193.
 16. Lawrence, R. A. and R. F. Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **71**, 952-958.
 17. Lee, S. I. 2004. Diabetes and the secondary complication. *Korea Visuals*, pp. 141-148.
 18. Little, C. and P. J. O'Brine. 1968. An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**, 145-150.
 19. Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. L. Farr and Rendall, R. J. 1951. Protein Measurement with folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* **193**, 265-275.
 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. *European Journal Biochemistry* **47**, 469-474.
 21. McCord, J. M. 1985. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal Medicine* **312**, 159-163.
 22. Meister, A. and P. G. Richman. 1975. Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1422-1426.
 23. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **52**, 711-760.
 24. Mielants, H., E. M., Veys, C. Straeten C. Ackerman and S. Goemaere. 1991. The efficacy and toxicity of constant low dose of methotrexate as a treatment for intractable rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology* **18**, 978-983.
 25. Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Journal of Biological Chemistry* **55**, 416-421.
 26. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yaki. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.
 27. Oyanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical Biochemistry* **142**, 290-296.
 28. Paglia, E. D. and W. N. Valentine. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **70**, 158-169.
 29. Rajagopalan, K. V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 922-928.
 30. Reitman, S. and S. K. Frankel. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology* **28**, 58-63.
 31. Salaffi, F., M. Carotti, A. Sartini and C. Cervini. 1995. A prospective study of the long-term efficacy and toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* **13**, 23-38.
 32. Slot, C. 1973. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* **43**, 305-310.
 33. Stephen, B. and K. Rita. 1980. Influence on methotrexate pharmacokinetics. *European Journal of Cancer* **16**, 1427-1432.
 34. 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). *Journal of Biological Chemistry* **244**, 3855-3863.
 35. Szasa, F. 1969. A Kinetic photometric method for serum

- glutamyltransferase. *Clinical Chemistry* **15**, 124-136.
36. Weinblatt, M. E., B. N. Weissman D. E., Holdsworth, P. A. Fraser, A. L. Maier, K. R. Falchuk. and J. S. Coblyn. 1992. Long-term prospective study of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* **35**, 129-137.
37. Wendel, A. and S. Feuerstein. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochemical Pharmacology* **30**, 2513-2520.