

Hep G2 세포와 rat 간세포에서 Metronidazole에 의한 암모니아 독성 감소

¹김 보애 · ²김 현정 · † ¹김 유영

¹경북대학교 자연과학대학 생화학과, ²건양대학교 안경광학과
(접수 : 2008. 7. 17., 게재승인 : 2008. 10. 7.)

Metronidazole Reduced Ammonia Toxicity in Human Hep G2 cell and Rat Hepatocytes

Bo Ae Kim¹, Hyun Jung Kim², and You Young Kim^{1†}

¹Department of Biochemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of Optometry, Konyang University, Daejeon 320-718, Korea

(Received : 2008. 7. 17., Accepted : 2008. 10. 7.)

Lipophilic ammonia is toxic gas and can easily diffuse across cell membranes. Excess ammonia is implicated in the pathogenesis of several metabolic disorders including hepatic encephalopathy and may result in the death. The purpose of this study was to clarify the inhibition effect of metronidazole on liver cell damage due to ammonia in human Hep G2 cell and rat hepatocytes. The effects of metronidazole were studied in ammonium chloride treated human Hep G2 cell (75 mM) and rat hepatocyte (100 mM) following 0.1 μ M metronidazole treatment. In MTZ+AC group, cell viabilities increased prominently and LDH activities decreased over 25% than AC group. Furthermore, ammonia level according to ammonium chloride treatment reduced over 30% and lipid peroxidation as an index of cell membrane damage decreased more than twice. By comparison with control, catalase activity showed more than 30% reduction in AC group while less than 10% reduction in MTZ+AC group, respectively. In addition, MTZ+AC group showed the similar cell structure as control in cell morphology study by using light microscope, and represented fluorescent intensity decrement compared with AC group in fluorescent microscopic study with avidin-TRITC fluorescent dye. And cleaved PARP expression due to ammonia reduced twofold or more in MTZ+AC group. As the results suggest, metronidazole may protect the liver cell by inhibiting cell damages due to ammonia and be used for an effective antagonist of ammonia in hyperammonemia.

Key Words : Ammonia, Metronidazole, Hep G2 cell, Hepatocyte, Hyperammonemia

서 론

간은 사람의 신체에서 복합적인 역할을 수행한다. 세포질의 물질대사에서 간의 주요기능은 글루코오스, 지질, 단백질 합성 및 비타민 A, D, B와 철분 등을 저장하고, 해독기관으로서 암모니아, 약품, 그 외의 화학물질을 해독 한다(1-3). 그 중에서 포유동물은 소화관에서 단백질 가수분해효소에 의해

섭취한 단백질을 유리아미노산으로 전환시킨 후 혈관을 통해 아미노산분해가 주로 일어나는 간으로 운반 된다. 간질환 중의 하나인 과암모니아혈증 (hyperammonemia)은 간의 유전적 결함 또는 간경변증에 의해 일어나는데 선천적인 경우는 1개 또는 그 이상의 요소회로효소가 결함이 있는 것으로 나타나며, 인체의 혈액 속 NH_4^+ 농도가 60 μM 이상인 상태로 암모니아 중독 (ammonia intoxication), 즉 무기력, 멀립, 언어 장애, 시각 장애, 구토, 혼수 심지어 사망을 야기한다. 과암모니아혈증은 최종적으로 뇌에서 증세가 나타나기 때문에 암모니아는 신경독 물질로 분류되며, 침투성이 강하여 세포질을 자유로이 통과할 뿐만 아니라 혈액-뇌 장벽 (blood-brain barrier)을 쉽게 침투한다. 또한 뇌척수액 (cerebral spinal fluid)에도 들어가 신경독 작용을 나타내며 말초신경의 기능을 마비시켜 사망에 이르게 하는

† Corresponding Author : Department of Biochemistry, Kyungpook National University, 1370 Sangyeok-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

Tel : +82-53-950-6354, Fax : +82-53-943-2762

E-mail : yykim@knu.ac.kr

위험한 물질이다(4-6).

간에 독성물질인 암모니아가 다량 존재하게 되면 요소회로의 엄격한 지배를 받게 된다. 이러한 간이 선천적 또는 후천적으로 기능을 상실하게 되면 간부전 (liver failure) 상태에 놓이게 되며, 이는 암모니아를 해독할 수 없다는 것을 의미한다. 신체에서 암모니아는 창자 및 신장에서 생성되며 간이 정상상태 일 때 혈액 내 암모니아는 간의 요소합성 또는 근육의 글루타민 합성 (glutamine synthesis)에 의해 해독될 수 있다. 그러나 간부전 동안에는 글루타민과 요소합성이 급격히 감소되어 암모니아 해독 능력이 저하하게 된다. 이때 골격근육은 평소보다 글루타민 생산이 증가하여 어느 정도 적응할 수 있으나, 이도 한계에 다다르면 결국 신체 내의 극심한 암모니아 증가가 뇌에 영향을 주어 심하면 사망에 이르게 된다(7).

과암모니아혈증의 치료 목표는 과다한 암모니아 생성 촉진 인자를 제거하는 것이다. 즉 단백질과 질소성 산물의 흡수를 감소시킴으로써 혈중 암모니아의 수치를 낮추는 방법이 있는데, 식이로서는 단백질 섭취를 제한하며 약물치료로는 합성이당류인 락투로스 (lactulose)의 장기 투여 및 네오마이신 (neomycin), 메트로니다졸 (metronidazole), 테트라사이클린 (tetracycline)과 같은 항생제가 이용되는데, 이들은 혈장 암모니아 수치를 감소시키는 데 효과적이다. 이들은 단백질을 대사시키는 박테리아를 감소시킴으로써 그 작용을 나타내며, neomycin이나 metronidazole과 같은 경구용 항생제는 요소분해생성 세균의 수를 줄여서 암모니아 생성을 억제하는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(8-11).

Metronidazole은 일반적으로 질편모충 감염증 (trichomonas vaginalis-related diseases)에 효과적인 치료제의 한가지로 알려져 있으며(12), metronidazole과 암모니아는 신경독으로서 장기 침투에 대한 성질이 매우 유사하여 서로 길항 (antagonist) 작용할 가능성이 있으며 장내 박테리아의 번식을 억제하는 효과가 우수하여 소량의 metronidazole이 간성뇌증에 의한 혼수억제에 좋은 약으로서 그 가능성성이 여전히 높다고 할 수 있다. 또한 metronidazole은 피부감염증, 여드름, 별진 및 안면혈관확장증세인 피부주사 (rosacea)에 연고제형으로 도포하여 치료제로 사용된다. 즉, 염증을 치료하는 항생제 역할 외에 혈관수축 효과로도 알려져 있다(13).

따라서 본 연구는 암모니아에 의해 손상된 사람의 간세포 Hep G2 cell과 rat의 간세포 (hepatocyte)를 대상으로 metronidazole이 세포 생존율과 암모니아 수준 및 간 기능에 작용하는 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다(14).

재료 및 방법

세포주 및 재료

세포실험에 사용한 Hep G2 cell (human hepatocellular liver carcinoma cell line)은 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin, trypsin-EDTA, fungizone 등은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Rat hepatocyte primary culture에 사용된 실험동물은 효창 사이언스 (Daejeon, Korea)의 건강한 Sprague-Dawley (SD)종 수컷 흰쥐 (8주령, 평균 230~250 g)를

사용하였다. Western blot에 사용된 anti-poly clonal ADP-ribose polymerase (PARP)는 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)에서, ammonia kit와 LDH (lactate dehydrogenase) kit는 ASAN (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 배양접시는 Corning (Rochester, NY, USA)사에서 구입하였으며, ammonium chloride (AC), metronidazole (MTZ), thiobarbituric acid (TBA) 및 기타 실험에 필요한 시약은 Sigma chemical (St. Louis, USA) 특급 시약을 사용하였다.

Hep G2 cell 배양

Human hepatocellular liver carcinoma Hep G2 cell line은 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 MEM (minimum essential medium) 배지에서 60 mm 배양접시에 0.8×10^6 cells/ml로 접종하여 48시간 배양 후에 배지를 제거하고, MEM 배지에 75 mM ammonium chloride와 0.1 μ M metronidazole을 각 그룹별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다.

Rat hepatocyte 적출 및 배양

분양 받은 8주령 된 rat 수컷 Sprague-Dawley (SD)를 효창 사이언스 (Daejeon, Korea)로부터 분양 받아 약 1주일 동안 안정화 하였다. 실험 시작 전 일반 고형사료 (SamYang Co. Wonjoo, Korea)와 물로 자유식이 하였고, 적정 사육 조건 하 [온도 ($18 \pm 4^\circ\text{C}$), 습도 ($70 \pm 10\%$), 명암 (일일 12시간 주기)]에서 예비 사육을 통해 적응 기간을 두었다. 몸무게가 220~250 g 정도가 되었을 때 간 (liver) 적출을 수행하였다. 마취를 위해 Ketamine (1 ml당 Ketamine HCL 57.68 mg-Ketamine 염기로서 50 mg, Bayer Animal Health Co. Suwon, Korea)을 약 2~3 ml 주사하여 개복한 뒤 간의 문맥 (portal vein)을 통해 1 mM EDTA (pH 7.4)가 포함된 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, 137 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 0.5 mM Na₂HPO₄, 0.58 mM Na₂HPO₄, 4.16 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, pH 7.4)를 순환 (circulation)하여 혈액을 완전히 제거하였다. 그리고 KRB (Krebs ringer bicarbonate)-collagenase (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 5.5 mM Glucose, 0.25 mM NaHCO₃, 0.2 mM HEPES, pH 7.4) 용액을 처리한 후 완전한 단일세포 (single cell)가 되도록 하고 PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)로 여러 번 수세 후 60 mm 배양접시에 MEM 배지 4 ml를 분주하여 3×10^6 cells/ml의 밀도로 접종하였다. 계속하여 24시간 배양 후 배지를 제거하고, 100 mM ammonium chloride와 0.1 μ M metronidazole을 각 그룹별로 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Sanyo, MCO-15AC, Tokyo, Japan)에서 6시간 동안 배양하였다.

세포 생존율 측정

Hep G2 cell 배양 후 0.25% trypsin-EDTA를 5분 동안 처리하고 배양접시로부터 분리된 세포를 모아 trypan blue로 염색하여 혈마토사이토메터 (hematocytometer)를 이용해 세포수를 계산하였다.

암모니아에 의한 Hep G2 세포치사 농도 LD₅₀ (lethal dose)를 확인하기 위해 96-well plate에 세포를 6.4×10^3 cells/well로 접종 후 48시간 동안 배양하여 ammonium chloride를 농도별로 처리하였다. 다양한 시간별로 반응 시킨 후 MTT (methylthiazol tetrazolium) 20 μ l (5 mg/ml)를 처리하여 4시간 반응시키고,

DMSO (dimethyl sulfoxide)-EtOH (50:50)를 처리하여 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hep G2 세포 생존율은 ammonium chloride와 metronidazole 둘 중 아무것도 처리하지 않은 정상세포를 기준으로 상대적인 백분율 (%)로 나타내었다.

다음 실험을 위해 배양 후의 배지는 -70°C에 보관하였으며, 세포는 따로 모아 sonication buffer (20 mM HEPES, pH 7.0/ 1 mM EDTA/ 2 mM PMSF)를 2:1 비율로 하여 ultrasonic generator sonication (US-50, Nissui, Tokyo, Japan)을 이용하여 ice-cold water bath에서 10초 간격으로 micro homogenation을 1분간 시행하고 4°C에서 14,000×g로 15분 동안 원심분리한 파쇄 된 세포를 단백질 정량 후 실험에 사용하였다.

젖산탈수소 효소 (lactate dehydrogenase, LDH) 활성측정

LDH kit (LDH-LQ kit AM159, Asan pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 기질액과 정색시액을 동일한 양으로 혼합한 뒤 37°C에서 5분간 방치하고, 확인하고자 하는 배지를 넣고 다시 37°C에서 정확히 10분 동안 방치한다. 이때 1 mL 희석반응 정지액을 넣고 혼합하여 570 nm에서 시약 블랭크를 대조로 흡광도를 측정했다. 이러한 방법으로 농도별 처리 후에 유출된 LDH를 정량하여 배지 내에 세포독성 유발여부를 확인하였다.

암모니아 수준 (ammonia level) 측정

세포배양 후 -70°C에 보관 해놓은 배지에 ammonia kit (Ammonia kit, Asan pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 암모니아 함량을 측정하였다. 우선 배지 내에 있는 단백질을 제거하기 위해 1 mL 제단백 시약을 넣고 2,500×g에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액에 ammonia kit에서 제공된 발색시약을 차례로 넣었다. 그리고 37°C에서 20분간 방치 후 시약 블랭크를 대조로 630 nm에서 흡광도를 측정하여 배지 내에 암모니아성 질소 함량을 계산하였다.

과산화지질 함량측정

과산화지질은 thiobarbituric acid reaction substance (TBARS) assay를 이용하여 측정하였다. 세포 추출물에 TBA 용액 (0.375% thiobarbituric acid/ 15% trichloroacetic acid in 0.25 N HCl)을 가하여 15분 동안 끓는 물에 중탕 후 12,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액에 유리된 malondialdehyde와 thiobarbituric acid (TBA)의 반응에서 생성된 발색생성물을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Catalase 활성측정

Catalase 활성은 세포 파쇄 후 세포액에 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)와 0.015 M H₂O₂를 넣고 240 nm에서 흡광도 감소를 1분간 측정하였다(15).

형광현미경 관찰

8-OH-dG와 특이하게 반응하는 avidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate (avidin-TRITC, Sigma, A7169, Louis, USA)를 이용하여 세포 내 DNA 손상정도를 측정하였다. 세포배양 후 trypsin-EDTA로 세포를 분리하고 PBS로 여러 번 수세한 다음 70% (v/v) ice-cold ethanol로 10분 동안 고정시켰다. PBS로 5분

동안 원심분리하여 수세한 후 PBS에 1:200으로 희석한 avidin-TRITC를 세포에 처리하여 37°C 암소에 1시간 동안 방치 후 cover glass를 이용하여 Zeiss Axiovert 200 역상 현미경으로 측정하였다 (excitation, 488 nm; emission, 580 nm, Zeiss, Jena, Germany)(16).

절단된 poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 발현 양 측정

세포나 조직 추출물의 상등액 (50 µg 단백질)을 12% SDS-PAGE로 분리한 후 단백질을 nitrocellulose membrane에 electrotransfer 하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (0.1% Tween 20을 함유한 TBS용액에 5% non-fat milk를 넣은 buffer) 용액으로 12시간 동안 blocking 시킨 후에 1차 항체 anti-cleaved PARP를 4시간 동안 4°C에서 반응시킨다. 반응이 끝난 nitrocellulose membrane은 여러 번 TBS에 수세하고 2차 항체와 반응시킨다. 그 후 ECL western blot detection kit로 반응시킨 후 X-ray film에 감광시켜서 단백질을 동정하였다(17).

결 과

세포 생존율 변화

Hep G2 cell에 ammonium chloride를 처리한 농도가 높고, 처리 시간이 길수록 세포의 흡광도 수치가 점차 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1, A). 이것은 세포가 암모니아에 의해 손상을 받아 세포의 생존율이 감소한 것을 나타낸다.

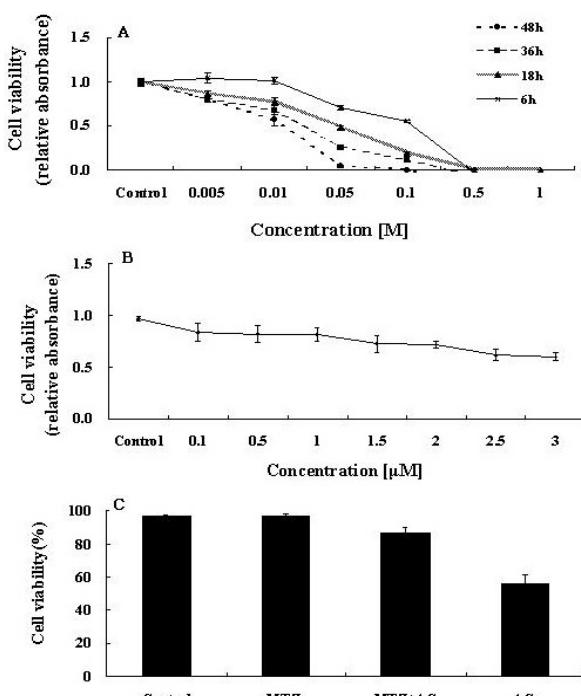


Figure 1. Determination of LD₅₀ values of ammonium chloride: A and metronidazole: B. Viability of Hep G2 cell: C. In C, MTZ, metronidazole, (0.1 µM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 µM), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). LD₅₀ and cell viabilities were calculated by MTT assay and trypan blue-stained cell counting methods respectively. Results represents the mean ± SD of four separate experiments.

60 mm 배양접시에서 ammonium chloride LD₅₀을 측정한 결과 Hep G2 cell에서는 75 mM로 확인되었으므로, 이후 암모니아에 의한 세포손상 유발을 위한 ammonium chloride 처리 농도는 75 mM로 결정하였다. 그리고 다양한 농도의 metronidazole을 48시간 동안 처리하여 세포독성 실험을 한 결과, 저농도의 metronidazole 처리는 세포 생존율에 큰 변화를 주지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, B). 따라서 이후 실험을 위한 metronidazole의 처리 농도는 0.1 μM로 결정하였다. 음성 대조군 (control), metronidazole 단독 처리군 (MTZ), metronidazole과 ammonium chloride 혼합 처리군 (MTZ+AC), ammonium chloride 단독 처리군 (AC) 등으로 나누어 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1, C). 그 결과 단독으로 75 mM ammonium chloride를 처리한 AC 군 보다 0.1 μM metronidazole을 함께 처리한 MTZ+AC 군에서 높은 세포 생존율을 보였으며 세포수 또한 적게 감소하였다. 이로써 metronidazole이 암모니아에 의한 간세포 손상을 억제하는 것으로 사료된다.

LDH 변화

Ammonium chloride LD₅₀ 농도를 60 mm 배양접시를 기준으로 Hep G2 cell에는 75 mM, rat의 hepatocyte에는 100 mM로 처리하여 실험하였다. 이때 음성 대조군, MTZ, MTZ+AC, AC 군으로 나누어 농도별 처리 후에 LDH 효소를 정량하여 배지 내에 세포독성 유발여부를 확인하였다. 그 결과 Hep G2 cell과 rat의 hepatocyte에서 AC 군보다 MTZ+AC 군의 LDH 활성이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 세포독성 저해에 대한 metronidazole의 효과를 의미한다.

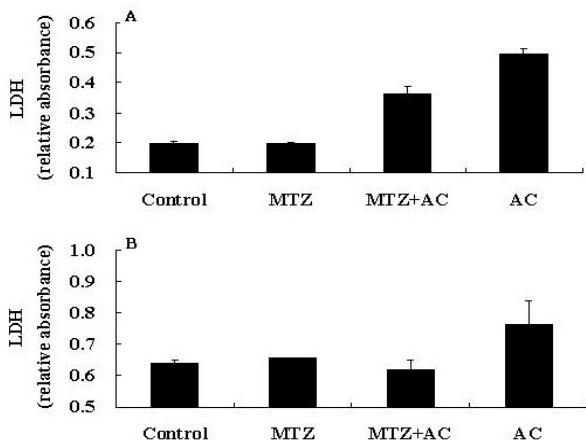


Figure 2. Relative absorbance of LDH expression in Hep G2 cell: A and rat hepatocyte: B. In A, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). In B, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (100 mM); AC, ammonium chloride, (100 mM). Results represents the mean ± SD of four separate experiments.

암모니아 수준변화

세포배양 후 배지 내에 암모니아 함량을 측정하기 위해 음성 대조군을 대조로 630 nm에서 흡광도를 측정하여 암모니아 성질소의 함량을 관찰하였다. 이때 음성 대조군, MTZ, MTZ+AC, AC 군으로 처리 후 배지 내에 암모니아 수준을 확인하였다. 그 결과 Hep G2 cell과 rat의 hepatocyte에서 AC 군 보다

MTZ+AC 군의 암모니아 흡광도 값이 감소하였다(Fig. 3). 이는 metronidazole이 간세포 손상과 관련된 암모니아 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

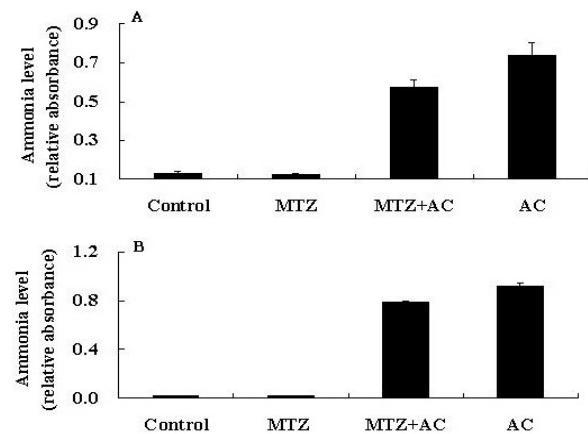


Figure 3. Relative absorbance of ammonia levels in Hep G2 cell: A and rat hepatocyte: B. In A, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). In B, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (100 mM); AC, ammonium chloride, (100 mM). Results represents the mean ± SD of four separate experiments.

과산화지질 함량변화

지질과산화의 정도를 음성 대조군, MTZ, MTZ+AC, AC 군으로 나누어 측정했을 때, MTZ+AC 군은 AC 군에 비해 낮은 TBARS 증가를 보였다(Fig. 4). 이 결과는 metronidazole이 암모니아에 의한 세포 내의 산화적인 손상을 감소시키는 것으로 생각된다.

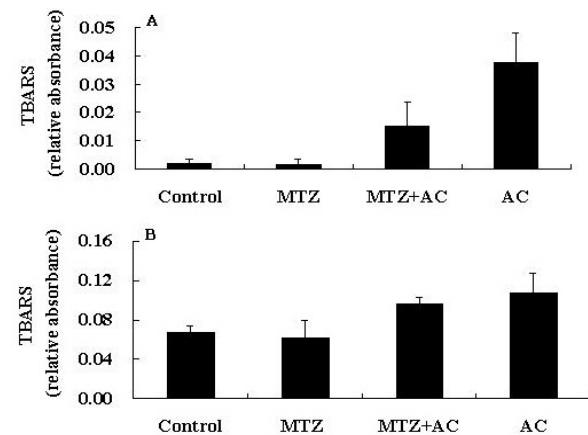


Figure 4. Relative absorbance of lipid peroxidation in Hep G2 cell: A and rat hepatocyte: B. In A, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). In B, MTZ, metronidazole, (0.1 μM); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μM), ammonium chloride, (100 mM); AC, ammonium chloride, (100 mM). Results represents the mean ± SD of four separate experiments.

Catalase 활성변화

세포 내에 catalase 함량이 높을수록 H₂O₂가 산소와 물로 분해되는 확률이 높아지며, 음성 대조군과 MTZ 군에서는 같은 정도의 높은 catalase 값을 나타내었고, AC 군은 음성 대조군

보다 약 30% 이상 catalase 활성이 감소되었으나 MTZ+AC 군은 음성 대조군에 비해 약 10% 이하의 감소를 보였다. 이것은 metronidazole[○] ammonium chloride에 의한 간세포의 항산화 활성 감소를 저해시킨 것으로 사료된다(Fig. 5).

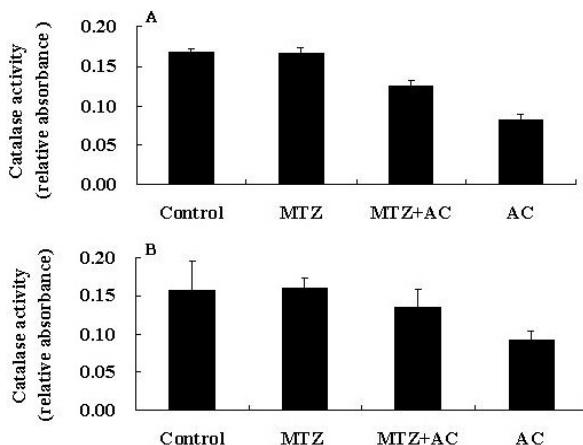


Figure 5. Relative absorbance of catalase activity changes in Hep G2 cell: A and rat hepatocyte: B. In A, MTZ, metronidazole, (0.1 μ M); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μ M), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). In B, MTZ, metronidazole, (0.1 μ M); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μ M), ammonium chloride, (100 mM); AC, ammonium chloride, (100 mM). Results represents the mean \pm SD of four separate experiments.

세포형태 변화

Ammonium chloride에 의해 손상된 Hep G2 cell에 대한 metronidazole의 처리에 따른 세포형태 변화를 광학현미경으로 관찰하였다. MTZ 군의 세포형태는 음성 대조군과 같은 양상을 보여주며 세포의 형태에 영향을 주지 않는 것이 확인되었다. AC 군에서는 세포수 감소 및 심각한 세포형태 변화가 관찰되었으며, AC+MTZ 군의 경우 AC 군에 비해 ammonium chloride로 인한 세포손상의 감소가 관찰되었다(Fig. 6 A, B, C, D).

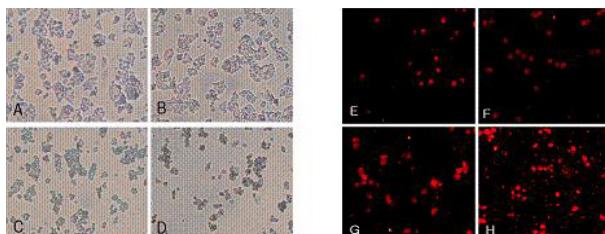


Figure 6. Morphology of Hep G2 cells, A and E: intact, B and F: MTZ treated, C and G: MTZ+AC treated, D and H: AC treated. MTZ, metronidazole, (0.1 μ M); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μ M), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). Left(A, B, C and D): light microscopic images, right(E, F, G and H): fluorescent microscopic images.

DNA 손상변화

세포 내의 핵산이 산화적 손상을 받으면 8-하이드록시구아노신(8-hydroxy-guanosine, 8-OH-dG)을 비롯한 여러 가지 DNA 부가 생성물이 형성된다. 따라서 DNA 손상의 지표로서 8-OH-dG와 선택적으로 결합하는 형광물질인 avidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)를 반응시켜서 형광현미경으로 관찰하

였다. 그 결과 AC 군에서는 음성 대조군과 MTZ 군 보다 많은 형광이 관찰되었고, MTZ+AC 군에서는 AC 군에 비해 현저한 형광 감소를 볼 수 있었다(Fig. 6 E, F, G, H). 이는 metronidazole이 암모니아로부터 유도된 간세포의 DNA 손상을 감소시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.

절단된 poly-ADP-ribose polymerase 발현 양 변화

Ammonium chloride로 인한 Hep G2 cell의 세포사멸 (cell death)에 대한 metronidazole의 세포사멸 억제효과를 관찰하기 위하여 절단된 poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 발현 양을 western blot으로 확인하였다. 그 결과 음성 대조군과 MTZ 군에서는 비슷한 크기의 절단된 PARP 밴드가 관찰되었으며, AC 군에서는 음성 대조군이나 MTZ 군에 비해 절단된 PARP의 발현이 6배 이상 증가됨이 관찰되었다. 그러나 MTZ+AC 군의 경우 AC 군에 비해 절단된 PARP의 발현이 50% 이하로 감소하였으며, 이는 metronidazole[○] ammonium chloride에 의한 세포사멸을 억제시킨 것으로 보여진다(Fig. 7).

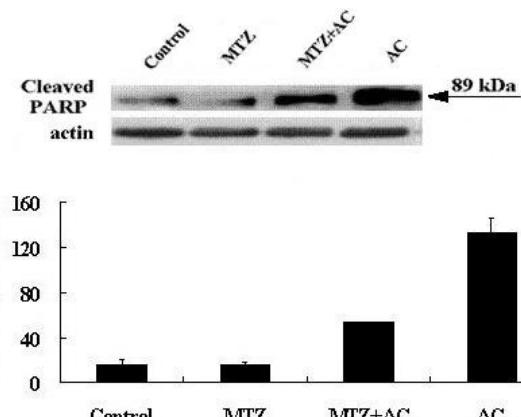


Figure 7. Western blot of cleaved poly-ADP-ribose polymerase (PARP) in Hep G2 cell. MTZ, metronidazole, (0.1 μ M); MTZ+AC, metronidazole, (0.1 μ M), ammonium chloride, (75 mM); AC, ammonium chloride, (75 mM). Results represents the mean \pm SD of four separate experiments.

고 칠

Metronidazole의 일반적인 처방으로서의 과량의 metronidazole은 암모니아 감소효과가 미미하였으며 오히려 부작용이 부각되어 현재 거의 쓰이지 않고 있다.

본 연구에서는 대표적인 간세포주인 사람의 Hep G2 cell과 rat의 hepatocyte를 대상으로 암모니아에 의한 세포손상을 유도하고, 손상된 간세포에 대하여 저농도의 metronidazole을 처리함으로써 암모니아에 의한 세포손상에 대한 metronidazole의 억제효과를 밝히고자 하였다.

Metronidazole의 농도는 먼저 *in vivo* 실험에서 사람을 대상으로 2주 동안 500 mg을 투여하고, rat을 대상으로 위관영양법을 통해 6일 동안 매일 30 mg/kg을 주입한 참고문헌을 근거로 하여 세포주를 이용한 본 *in vitro* 실험에서의 metronidazole 처리 농도의 범위를 선택한 후, 다양한 처리 농도에 따른 예비실험 결과로부터 세포 생존율에 영향을 주지 않으면서 ammonium chloride LD₅₀에 효과

적인 반응을 나타냈던 0.1 μM을 적정 농도를 결정하였다(18, 19).

Hep G2 cell과 rat의 hepatocyte에 각각 75 mM과 100 mM의 ammonium chloride 처리에 따른 암모니아의 영향으로 세포 독성이 유발되어 세포 생존율이 현저히 감소되었고, 젖산탈수소 효소(LDH)와 암모니아 수준 및 과산화지질의 양이 증가하였으며, 항산화 효소의 일종인 catalase의 활성 감소가 나타났다. 또한 세포형태의 심각한 변화와 함께 세포 내 DNA 손상이 일어났으며, apoptosis 유발에 따른 절단된 PARP 발현 증가를 동반하였다. 그러나 0.1 μM의 metronidazole을 함께 처리한 경우 (MTZ+AC 군)에는 ammonium chloride 단독 처리군 (AC 군)에 비해 세포 생존율이 현저히 증가되었고, ammonium chloride에 의해 증가된 LDH의 양은 50% 이하로 감소되었다. 그리고 20~30% 정도의 세포 내 암모니아 수준 감소와 함께 세포막 손상의 지표인 과산화지질의 양도 20~60% 정도 감소되었다. 또한 ammonium chloride에 의해 45~50%로 감소되었던 catalase 활성이 약 30% 정도 증가하였다. 광학현미경 관찰 결과 metronidazole은 ammonium chloride에 의한 세포손상을 음성 대조군에 가까운 형태로 유지시켜줌을 확인하였으며, 세포 내 DNA 손상의 지표로서 이용되는 8-OH-dG에 대한 특이적 결합을 하는 avidin-TRITC 형광염료를 사용한 형광현미경 관찰 결과 metronidazole을 처리한 세포에서는 형광 세기 감소가 관찰되어 ammonium chloride에 의한 8-OH-dG의 생성억제를 확인하였다. PARP는 DNA 복구 과정에서 활성화되는 단백질로서 세포의 핵에 존재하고 있다. 세포가 손상을 받으면 apoptosis가 유발되고 우선 중요 신호전달 경로인 caspase-3 (cysteine aspartyl protease-3)가 활성화되어 핵막의 구성 성분인 lamin B를 절단하고, PARP를 절단하게 되어 apoptosis 과정 동안 세포 치유 기능이 없어지게 된다. 따라서 PARP의 발현 양은 apoptosis의 지표로서 사용되며 본 실험에서 ammonium chloride에 의해 증가되었던 절단된 PARP 발현이 metronidazole 처리에 의해 현저히 감소되었다.

이상의 실험결과에서 metronidazole은 암모니아로부터 기인하는 세포손상을 감소시킴을 확인하였고, 간세포 기능을 보호함으로써 간 기능의 저하로 발생한 과암모니아혈증에 효과적인 치료제로서의 가능성을 시사한다. Metronidazole은 세포에 미치는 독성이 적고 특히 낮은 농도에서도 그 효과가 유효하다는 임상 실험의 병행과 함께 간성뇌증 환자의 혼수억제제로서의 가능성을 규명하기 위하여 metronidazole의 암모니아에 의한 간세포 손상 억제 신호전달 메커니즘에 대하여 더욱 구체적인 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

본 연구에서는 암모니아에 의해 손상된 사람의 간세포주 Hep G2 cell과 rat의 hepatocyte에 대하여 metronidazole이 간 세포 손상을 억제하는 효과가 있음을 밝혔다. Metronidazole은 암모니아에 의한 세포 생존율 감소, 배지내의 암모니아 수준 및 지질과산화 증가 및 항산화 효소 발현 감소 그리고 세포 내 DNA 손상과 세포사멸을 억제하였다. 따라서 metronidazole은 암모니아로부터 기인하는 세포손상을 감소시켜 간세포 기능을 보호함으로써 간 기능의 저하로 발생한 과암모니아혈증에 효과적인 치료제로서의 가능성을 시사한다.

REFERENCES

- Sweeney, G. D., K. G. Jones, and F. Krestynski (1978), Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatment on size, sedimentation velocity, and mixed function oxygenase activity of rat hepatocytes, *J. Lab. Clin. Med.* **91**(3), 444-454.
- Gaub, J., L. Fauerholdt, S. Keiding, J. Kondrup, P. Petersen, and G. L. Wantzin (1981), Cytophotometry of liver cells from ethanol fed rats: ethanol causes increased polyploidization and protein accumulation, *Eur. J. Clin. Invest.* **11**(3), 235-237.
- Endemann, G., P. G. Goetz, J. Edmond, and H. Brunengraber (1982), Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate, *J. Biol. Chem.* **257**(7), 3434-3440.
- Butterworth, R. F. (2002), Glutamate transporters in hyperammonemia, *Neurochem. Int.* **41**(2-3), 81-85.
- Bachmann, C., O. Braissant, A. M. Villard, O. Boulat, and H. Henry (2004), Ammonia toxicity to the brain and creatine, *Mol. Genet. Metab.* **81**, S52-S57.
- Ott, P. and F. S. Larsen (2004), Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal, *Neurochem. Int.* **44**(4), 185-198.
- Haussinger, D., F. Schliess, and G. Kircheis (2002), Pathogenesis of hepatic encephalopathy, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**(3), S256-S259.
- Morgan, M. Y. and K. E. Hawley (1987), Lactitol vs. lactulose in the treatment of acute hepatic encephalopathy in cirrhotic patients: a double-blind, randomized trial, *Hepatology* **7**(6), 1278-1284.
- Gill, M. A. and W. R. Kirchain (1996), Alcoholic liver disease in Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach, 3rd ed., p785-800, Appleton & Lange Press, New York.
- Watanabe, A., T. Sakai, S. Sato, F. Imai, M. Ohto, Y. Arakawa, and G. Toda (1997), Clinical Efficacy of Lactulose in Cirrhotic Patients With and Without Subclinical Hepatic Encephalopathy, *Hepatology* **26**(6), 1410-1414.
- Blei, A. T. and J. Córdoba (2001), Hepatic encephalopathy, *Am. J. Gastroenterol.* **96**(7), 1968-1976.
- Wood, S., C. M. Kennedy, and R. P. Galask (2007), Prolonged vaginalis: a case report, *J. Reprod. Med.* **52**(11), 1057-1058.
- Gupta, A. K. and M. Chaudhry (2002), Topical Metronidazole for Rosacea, *Skin Therapy Lett.* **7**(1), 1-3.
- Choi, Y. S., D. Y. Lee, I. Y. Kim, S. Kang, K. Ahn, H. J. Kim, Y. H. Jeong, G. T. Chun, J. K. Park, and I. H. Kim (2000), Ammonia removal using hepatoma cells in mammalian cell cultures, *Biotechnol. Prog.* **16**(5), 760-768.
- Beers, R. F. Jr. and I. W. Sizer (1952), A spectrophotometric methods for measuring the breakdown of hydrogen peroxides by catalase, *J. Biol. Chem.* **195**(1), 133-135.
- Struthers, L., R. Patel, J. Clark, and S. Thomas (1998), Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues, *Anal. Biochem.* **255**(1), 20-31.
- Kim, K. M., J. J. Song, J. Y. An, Y. T. Kwon, and Y. J. Lee (2005), Pretreatment of Acetylsalicylic Acid Promotes Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by Down-regulating BCL-2 Gene Expression, *J. Biol. Chem.* **280**(49), 41047-41056.
- Yurdaydin, C., T. J. Walsh, H. D. Engler, J. H. Ha, Y. Li, E. A. Jones, and A. S. Basile (1995), Gut bacteria provide precursors of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy, *Brain Res.* **679**(1), 42-48.
- Miyaji, H., S. Ito, T. Azuma, Y. Ito, Y. Yamazaki, Y. Ohtaki, F. Sato, M. Hirai, M. Kuriyama, and Y. Kohli (1997), Effects of *Helicobacter pylori* eradication therapy on hyperammonaemia in patients with liver cirrhosis, *Gut* **40**(6), 726-730.