

## 사염화탄소 및 에탄올에 의해 유도된 만성간 손상에 미치는 말로틸레이트의 항산화 작용

김형춘 · 허인회\*

강원대학교 약학대학, \*중앙대학교 약학대학

(Received June 22, 1990)

### Antioxidant Action of Malotilate on Prolonged Hepatic Injury Induced by Carbon Tetrachloride Alone or in Combination with Ethanol in Rat.

Hyoung-Chun Kim and In-Hoi Hur\*

College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-710

\*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract**—To achieve a better understanding of antioxidant action manifested by malotilate, the dithiol malonates, we monitored the oxy radical-scavenging system against the chronic hepatic damage induced by  $\text{CCl}_4$  alone or in combination with ethanol. Malotilate was given orally at a dose of 100 mg/kg/day and  $\text{CCl}_4$  1.5 ml/kg was injected subcutaneously twice a week for 4 weeks. In each group receiving ethanol, drinking water was replaced by 20% aqueous solution or glucose, isocaloric amounts of ethanol, as a control of ethanol was diluted in its drinking water. Each rat was killed as a starved state at 18 hours after the period of the experiment, four weeks.

The results were summarized as follows:

- 1) Malotilate inhibited the rate of generation of superoxide radicals, the accumulation of lipoperoxides, and promoted the synthesis of glutathione in the liver.
- 2) Malotilate stimulated the enhancement of activity of superoxide dismutase in hepatic mitochondria.
- 3) Malotilate had no effects on the hepatic  $\text{H}_2\text{O}_2$  contents.
- 4) Malotilate showed the increase of catalase activity in the liver poisoned with  $\text{CCl}_4$ , and also gave a tendency to increase it in the liver intoxicated with ethanol. Thus, our data suggested that the activation of hepatic antioxidant system in the presence of malotilate would play a role in protecting liver against the toxic effects of oxy radical and/or lipid peroxides under the hepatotoxic conditions induced by  $\text{CCl}_4$  with or without ethanol. However, the effects of malotilate against the ethanol-induced hepatotoxicity appear to be insignificant.

**Keywords** □ dithiol malonates, malotilate, oxy radical-scavenging system.

Dithiol malonate 유도체는 항균제인 isoprothiolane의 안전성 연구과정에서 간세포 재생작용을 나타낸 것이 동기가 되어 개발되었으며,<sup>1)</sup> 우리나라에서도 보다 안전성이 확보된 dithiol malonate 유도체를 개발하기 위한 연구가 계속되고 있다.<sup>2-4)</sup> 그 주요작용 기전에는 단백질합성촉진,<sup>5)</sup> 마이크로솜전자 전달계의 유도<sup>2,6,7)</sup> 과산화지질의 억제,<sup>2,7-9)</sup> 간혈류량 증가,<sup>10)</sup> 지방간<sup>11,12)</sup> 및 섬유화 억제<sup>9,12-14)</sup> 등이 알려지고 있다.

최근에 보고된 몇몇 간독성 모델에 있어서 간독성 발현 병소가 산소분압이 높은 문정맥 부위라고 제시되고 있다.<sup>15-17)</sup> 대표적인 간독소인  $\text{CCl}_4$ 도 산소분압이 낮은 중심정맥 부위에서는 주로 지방변성을 유도하나, 산소분압이 높은 문정맥 부위에서는 cytochrome P 450에 의해 대사된  $\dot{\text{C}}\text{Cl}_3$  유리기가 즉시, 보다 반응성이 강한  $\text{Cl}_3\text{CO}\dot{\text{O}}$  유리기로 대사되어 직접세포막을 공격하는 것으로 확인되고 있다.<sup>18-20)</sup> 특히 최근의 ESR(electron spin reso-

nance spectroscopy) 연구에서  $\text{CCl}_4$ 의 최종대사물이  $\text{CO}_2$ 와 superoxide 유리기( $\dot{\text{O}}_2^-$ )임이 시사되고 있어 주목되고 있다.<sup>21)</sup> 에탄올인 경우, 그 독성발현으로 유도된 마이크로솜 에탄올산화계(MEOS)가  $\dot{\text{O}}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , xanthine oxidase, 아세트알데히드의 대사와 2차적으로 세포질의 효소가 연관되며, xanthine-xanthine oxidase 계에 의해 에탄올이 아세트알데히드로 산화되는 반응도 superoxide dismutase(SOD)에 의해 억제되므로 그 반응이  $\dot{\text{O}}_2^-$ 에 의해 비롯됨을 유추할 수 있고,<sup>22)</sup> 특정 알콜성 간질환 및 알콜성 간경변에서도 철이 침착됨으로서 Fenton 형의 반응이 가속화되어 산소유리기와 과산화지질 형성을 촉진한다고 한다.<sup>23,24)</sup>

이제까지 사염화탄소를 대상으로한 연구가 가장 많았고, 그 독성 발현이 중간대사물들과 직접 관련되는 점에 착안한 dithiol malonate 유도체의 기전 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이며, 더욱이 임상적으로 가장 중요한 의미를 갖는 에탄올에 대한 연구는 몇 보문<sup>14,25-28)</sup>을 제외하면 거의 알려지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 dithiol malonate 유도체 중 말로틸레이트(diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene malonate)를 선택하여 항산화계에 미치는 새로운 작용을 밝히는 한편, 새로 개발되는 dithiol malonate 유도체의 기전검색에 기여하기 위하여 흰쥐에 사염화탄소 및 에탄올 중독간을 제작하여 실험에 착수하게 되었다.

### 실험방법

**시약 및 기기**—말로틸레이트(MLT)는 삼성제약에서 제공받아 5%의 CMC 용액으로 사용하였으며 사염화탄소와 올리브유는 Wako 사(Japan)에서, cytochrome C, xanthine, xanthine oxidase, bovine serum albumin, glutathione, sodium dodecylsulfate, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetramethoxy propane은 Sigma 사(U.S.A)에서 구입하였고, 일반시약들은 일급 및 특급을 사용하였다. 기기로는 cell disruptor(sonifier-Bronson sonic power Co.), 분광광도계(Beckman M-35), 형광광도계(Perkin Elmer) 및 저온 고속 원심분리기(Beckman J2-21) 등이 사용되었다.

**실험동물의 처리**—일정조건에서 2주 이상 적응시

킨 Sprague-Dawley 계의 200g 내외의 응성 흰쥐를 실험에 사용했으며, 투약기간은 4주로 사용하였다. 실험군은 아래와 같이 9군으로 나누었다. 즉, 1) 매일 말로틸레이트(MLT) 100 mg/kg을 경구 투여시킨 MLT 군, 2) 음료수 대용으로 20% 에탄올용액을 섭취시킨 EtOH 군, 3) 에탄올의 대조군으로 에탄올과 동일열량의 포도당용액을 음료수 대용으로 섭취시킨 Glucose 군, 4) 주 2회 사염화탄소 1.5 ml/kg와 올리브유(1.5 ml/kg)의 혼액을 피하주사한  $\text{CCl}_4$ 군, 5) 주 2회 올리브유(1.5 ml/kg)를 피하주사한 대조군(Control), 6) 말로틸레이트와 사염화탄소를 병용투여한  $\text{CCl}_4$ +MLT 군, 7) 말로틸레이트와 에탄올을 병용시킨 EtOH+MLT 군, 8) 사염화탄소와 에탄올을 병용시킨  $\text{CCl}_4$ +EtOH 군, 9) 사염화탄소와 에탄올에 추가로 말로틸레이트를 병용시킨  $\text{CCl}_4$ +MLT+EtOH 군으로 나누어졌다. 또한 각군은 4주 투여 후 18시간 절식시켰다가 희생시켰으며, 이 때 취한 간의 체중비율(간 g/흰쥐 100g)은 각각 MLT 군  $3.37 \pm 0.15$ , EtOH 군  $3.63 \pm 0.10$ , Glucose 군  $3.83 \pm 0.11$ ,  $\text{CCl}_4$  군  $6.63 \pm 0.29$ , Control 군  $3.89 \pm 0.12$ ,  $\text{CCl}_4$ +MLT 군  $4.77 \pm 0.23$ , EtOH+MLT 군  $3.68 \pm 0.19$ ,  $\text{CCl}_4$ +EtOH 군  $5.42 \pm 0.56$  및  $\text{CCl}_4$ +MLT+EtOH 군  $4.39 \pm 0.20$  이었으며, 본 실험실에는 효소유도에 가장 민감한 중엽<sup>29)</sup>을 취하여 검정에 임하였다. 흰쥐 1마리당 1일 에탄올 섭취량은  $7.2 \pm 1.8$ g/kg이며, 1일 포도당 섭취량은  $12.5 \pm 1.1$ g/kg 이었다.

**Superoxide 생성의 측정**—superoxide 유리기 생성은 superoxide dismutase(SOD)로 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원되는 속도로 측정했다.<sup>30)</sup> 0.1 mM EDTA를 함유한 인산염완충액(pH 7.8) 420  $\mu$ l에 cyanide의 농도가 50  $\mu$ M이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 37°C에서 10분간 보온하였다. 이 용액에 간균질액 10  $\mu$ l과 0.1 mM cytochrome C 50  $\mu$ l을 넣어 온도조절기가 장치된 분광광도계(Gilford 260)로 cuvette를 37°C로 유지시키면서 550 nm에서 흡광도 변화를 2분간 관찰하였다. 이 때 환원되는 cytochrome C의 양은 분자흡광계수  $E_{1\text{cm}}^{1\text{M}} = 19,500$ 으로 계산하였다.

**세포질 SOD의 분리**—간조직의 세포질에 함유된 superoxide dismutase의 추출은 Lee<sup>31)</sup> 및

Weisiger와 Fridovich<sup>32)</sup> 등의 방법에 의했다. 혈액이 제거된 간조직 일정량을 취하여 미리 냉각시킨 0.1 mM-EDTA 가 함유된 5 mM-인산염완충액 (pH 7.8)를 4배 용량으로 첨가한 후 균질화하여 0°C에서 700×g로 5분간 원심분리하여 핵을 제거하고, 상층액은 다시 14,000×g로 15분간 원심분리하여 세포질과 사립체를 분리하였다. 이렇게 얻은 상층액은 구리와 아연을 함유한 SOD의 효소원으로 사용하였다. 모든 추출조작을 0~4°C에서 실시하였다.

**사립체 SOD의 분리**—사립체에 함유되어 있는 SOD는 Weisiger와 Fridovich의 방법<sup>32)</sup>에 의해 추출하였다. 즉, 앞에서 분리한 조사립체 (crude mitochondria)를 0.25 M-sucrose 가 함유된 10 mM-인산염완충액에 부유시킨 후 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이와 같이 2회 반복세척하여 사립체를 정제한 후 0.1 mM-EDTA 함유 50 mM-인산염완충액 (pH 7.8) 5배 용량에 부유시켰다. 이 사립체 분획을 얼리고 녹이는 과정을 2회 반복 후 cell disruptor를 사용해 50 watt로 15분간 sonication하고, 20,000×g에서 60분간 원심분리한 상층액을 망간을 함유한 SOD의 효소원으로 하였다. 이상의 모든 추출조작은 0~4°C에서 실시하였다.

**SOD 활성도 측정**—xanthine과 xanthine oxidase의 존재하에서 생성되는 superoxide에 의하여 ferricytochrome C의 환원을 억제시킨다는 반응원리를 이용하여 SOD 활성도를 측정하였다.<sup>30)</sup> 즉, 3 ml 용량의 cuvette에 0.1 mM-EDTA 함유 50 mM-인산염완충액 (pH 7.8) 2.3 ml, 0.5 mM-xanthine 0.3 ml, 0.1 mM-ferricytochrome C 0.3 ml 씩을 넣어 잘 혼합하고, 25°C 물증탕에서 내용물이 평형을 이루게 하였다. 이 혼합액에 xanthine oxidase를 첨가한 후 파장 550 nm에서 흡광도가 증가되는 속도를 측정하였다. 이 때 흡광도 증가가 매분당 0.020 되게 xanthine oxidase의 농도를 조정하였다. 또한 다른 cuvette에는 앞의 조건으로 세포질 및 사립체에서 추출한 SOD를 각각 0.1 ml 씩 가하고, 파장 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 효소의 활성도는 위와 같은 반응조건에서 ferricytochrome C의 환원속도를 50% 억제시키는 때의 효소의 양을 1 unit로 하였다.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 측정**—간조직에 유리되어 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 측정은 Thruman 등의 ferrithiocyanate 법<sup>33)</sup>에 의했다. 0.15 M-KCl 및 1 mM-EDTA 함유 20 mM-인산염완충액 (pH 7.5)의 균질액에 같은 부피의 10%-trichloroacetic acid를 넣어 단백질을 침전시키고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액의 2 ml에 0.4 ml의 0.01 M-ferrous ammonium sulfate와 0.2 ml의 2.5 M-potassium thiocyanate를 넣어 480 nm에서 생성되는 ferrithiocyanate를 측정하였다.

**Catalase 생성의 측정**—Aebi의 방법<sup>34)</sup>에 따라 측정하였다. 즉, 혈액이 제거된 간조직 일정량을 50 mM-인산염완충액 (pH 7.0) 5배 용량에 부유시킨 균질화시켰다. 그 후 4°C, 600×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 여과한 여액을 이용하여 catalase의 활성도를 측정하였다. 즉, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM/l)의 O.D가 1.2되도록 조적하고 50 mM-인산염완충액 (pH 7.0) 2.0 ml, 균질액 10 μl 혼액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 ml를 첨가하고 그로부터 1분간 240 nm에서 분해되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 측정하였다. 이 때의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 molar extinction coefficient는 43.6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>로 계산했다. 이 모든 추출조작은 0~4°C에서 실시하였다.

**환원형 Glutathion(GSH)정량**—GSH는 Cohn과 Lyle의 방법<sup>35)</sup>을 일부 수정한 Chung 등의 방법<sup>36)</sup>에 따라 실시했다. 간조직 일정량을 10%-trichloroacetic acid, 1 mM-EDTA, 0.01 N-HCl의 1:1:1 혼합물과 함께 균질화시킨 후 4°C, 5,000×g에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 회석하여 0.5 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 ml 및 0.1% o-phthalaldehyde 0.1 ml을 가해 실온에서 정확히 15분 방치 후 형광광도계에서 정량했다 (excitation 328 mμ, emission 430 mμ).

**과산화지질의 정량**—Masugi와 Nakamura (1977)의 방법<sup>37)</sup>에 따라 측정하였다. 혈액이 제거된 간의 5배 용량에 해당하는 50 mM-인산염완충액 (pH 7.4)를 가해서 3분간 균질화한 균질액에 7% sodiumdodecylsulfate (SDS), 0.1 N-HCl, 10%-phosphotungstic acid, 0.5%-TBA 용액을 각각 일정량을 95°C의 수욕상에서 45분간 가열, 냉각 후 n-butanol을 가해서 3000 rpm에서 10분간 원심분리 후 n-butanol층의 색을 532 nm에서 비색

Superoxide mediated cytochrome C reduction (u mol/min/liver g)

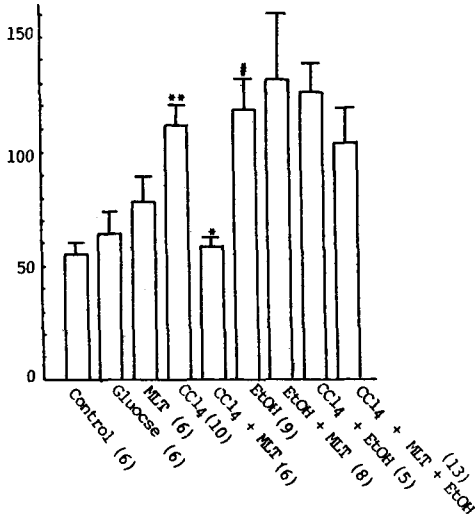


Fig. 1—The effects of MLT against the rate of generation of superoxide radical.

\*, P < 0.02, VS. the CCl<sub>4</sub> group.

\*\* , P < 0.01, VS. the Control group.

#, P < 0.05, VS. the Glucose group.

Male Sprague-Dawley rats fed with commercial chow and libitum were used.

CCl<sub>4</sub> (1.5 ml/kg) as 1:1 (V/V) mixture of olive oil (or olive oil alone as control) administered subcutaneously to the rats twice a week.

A suspension of malotilate in 5% solution of carboxy methyl cellulose was prepared.

And daily oral administration of malotilate 100 mg/kg was performed.

EtOH groups were given drinking water containing either 20% alcohol or isocaloric amount of glucose as control.

After 4 weeks of experimental periods, rats were fasted for 18 hr prior to sacrifice.

Values represent means ± S.E with the number of animals in parentheses.

정량하였다. 별도로 검량선은 malondialdehyde (MDA)로서 1,1,3,3-tetramethoxypropane 1 mmole을 1%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 녹여서 작성하였다.

**단백질 정량**—각 조직의 균질액 및 세포질 분획, 사립체 분획의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법<sup>30)</sup>으로 측정하였다.

**통계분석**—모든 data의 유의성 검정은 student's t-test로 행하였다.

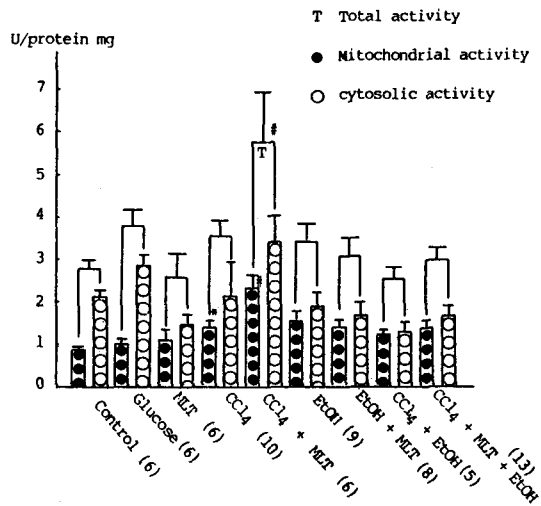


Fig. 2—The effects of MLT against the activity of superoxide dismutase.

A unit was defined as the quantity of SOD required to 50% inhibition of the reduction of cytochrome C under the specified conditions.

#, P < 0.05, VS. the CCl<sub>4</sub> group.

\*, P < 0.05, VS. the Control group.

For details, see the legend to Fig. 1.

실험결과

**말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간의 Superoxide 유리기(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 생성율에 미치는 영향**—superoxide 유리기 생성율은 superoxide 의존성 cytochrome C의 분당 환원속도로 측정하였는데 그 결과는 Fig.1과 같다. 대조군보다 현저히 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성율을 증가(p < 0.01)시킨 사염화탄소군(111.74 ± 8.31 μmole/min/liver g)은 말로틸레이트가 병용투여됨으로 현저히 그 생성율이 감소(p < 0.02)되어 대조군의 수준(58.12 ± 4.73 μmole/min/liver g)으로 되었다. 그러나 포도당군에 비하여 유의성있게 그 생성율이 증가(p < 0.05)된 에탄올군(118.99 ± 13.18 μmole/min/liver g)에 말로틸레이트가 병용되어도 그 생성율은 감소되지 않았다. 또한 사염화탄소와 에탄올을 병용시에도 에탄올군이나 사염화탄소군과 유사한 양상으로 그 생성율의 증가 추세를 나타내었으며 말로틸레이트를 병용하여 유의한 감소를 나타내지 못하였다.

**말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간의 Superox-**

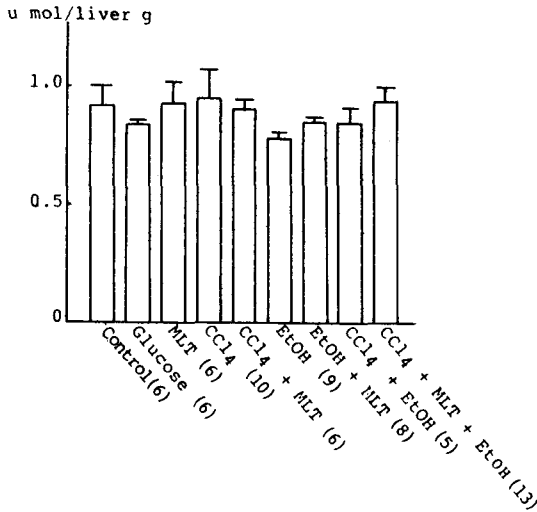


Fig. 3—The effects of MLT on the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
For details, see the legend to Fig. 1.

ide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향—O<sub>2</sub><sup>-</sup> 유리의 제거제(scavenger)인 세포질 분획의 Cu, Zn-SOD와 사립체 분획의 Mn-SOD의 활성도를 측정된 결과는 Fig.2와 같다. 사염화탄소와 말로틸레이트가 병용된 군을 제외한 모든 군에서 총 SOD 활성의 변화가 유의하게 나타나지 않았다. 사염화탄소군의 총 SOD 활성은 (3.53±0.53 U/protein mg) 말로틸레이트를 병용시에 그 활성이 현저히 (p<0.05) 유도(5.74±1.03 U/protein mg)되었다. 사립체 SOD의 경우, 대조군, 포도당군 및 말로틸레이트군은 0.77±0.10 U/protein mg, 1.03±0.15 U/protein mg 및 1.01±0.24 U/protein mg 으로서 서로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 그 활성이 대조군에 비하여 유의하게 증가(p<0.05)된 사염화탄소군의 활성(1.40±0.14 U/protein mg)은 말로틸레이트가 병용됨으로서 그 활성은 현저히 유도(2.34±0.25 U/protefin mg)되었다(p<0.05). 포도당군에 비하여 활성증가 경향을 보인 에탄올군(1.55±0.21 U/protein mg)은 말로틸레이트가 병용되어도 유의한 변화가 나타나지 않았고, 사염화탄소 및 에탄올 투여군에도 말로틸레이트의 병용효과는 인정되지 않았다.

세포질 분획의 Cu, Zn-SOD에 있어서 대조군과 같은 수준의 활성이 유도된 사염화탄소군(2.13±0.76 U/protein mg)은 말로틸레이트가 병용됨으로

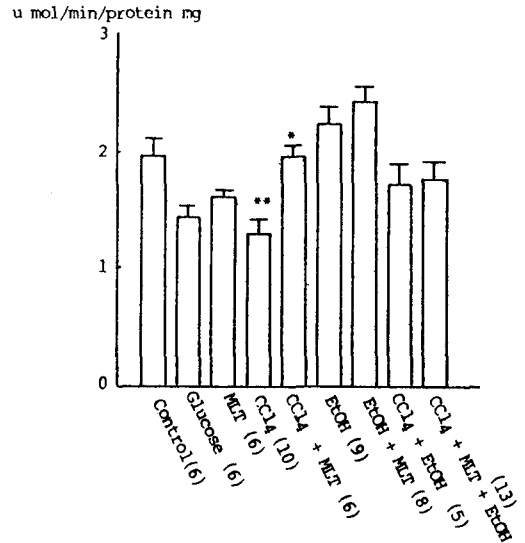


Fig. 4—The effects of MLT against the activity of catalase. Catalase was expressed as the rate of the reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm.  
\*, P<0.02, VS. the CCl<sub>4</sub> group  
\*\*, P<0.05, VS. the Control group  
For details, see the legend to Fig. 1.

서 그 활성은 증가 경향(3.40±0.61 U/protein mg)을 보였으며, 포도당군(2.73±0.47 U/protein mg)에 비하여 억제경향을 보인 에탄올군(1.88±0.30 U/protein mg)에 대하여는 말로틸레이트의 병용효과가 관찰되지 않았다. 최저의 활성도(1.29±0.20 U/protein mg)를 보인 사염화탄소 및 에탄올 병용군에 malotilate를 병용시킬 때 경미하게 활성이 증가(1.66±0.24 U/protein mg)되는 경향을 보였다.

말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향—간균질액에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성량을 검정한 결과는 Fig.3과 같다. 전반적으로 말로틸레이트 병용투여군을 포함한 모든 군에서 간조직 g당 0.9 μmole 내외의 치를 나타내어 말로틸레이트의 병용효과는 관찰되지 않았다.

말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간의 catalase 활성에 미치는 영향—간균질액에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 제거제인 catalase 활성을 측정된 결과는 Fig.4와 같다. 대조군(1.97±0.14 μmole/min/protein mg)보다 그 활성이 현저히 억제(p<0.05)된 사염화탄소군(1.28±0.14 μmole/min/protein mg)에 말로틸레이트가 병용되면 그 활성이 현저히 유도(p<0.02)되어 대

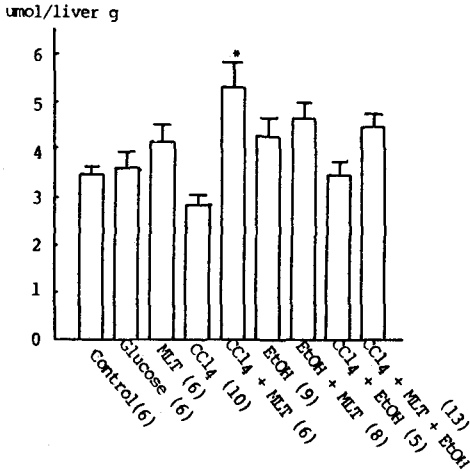


Fig. 5—The effects of MLT against the level of glutathione.

\*, P<0.02, VS, the CCl<sub>4</sub> group.

For details, see the legend to Fig. 1.

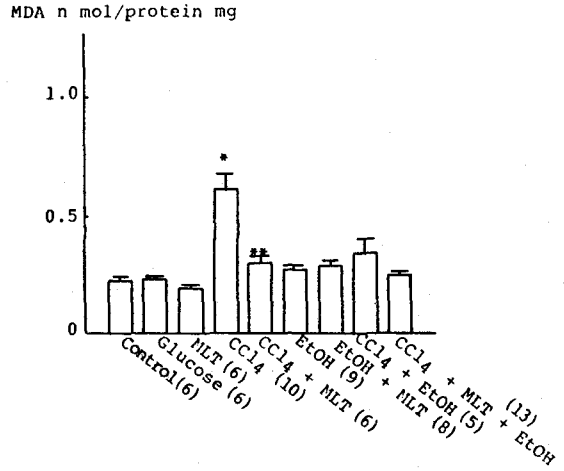


Fig. 6—The effects of MLT against the accumulation of malondialdehyde (MDA) as parameter of lipid peroxide.

\*, P<0.01, VS. the Control group.

\*\* , P<0.02, VS. the CCl<sub>4</sub> group.

For details, see the legend to Fig. 1.

조군 수준으로 되었다. 포도당군(1.43±0.10 μmole/min/protein mg)보다 그 활성이 현저히 유도(p<0.01)된 에탄올군(2.24±0.15 μmole/min/protein mg)에 말로틸레이트가 병용되면 유의한 변화는 나타나지 않았으나 경미하게 그 활성이 증가하는 양상이었다. 또한 사염화탄소 및 에탄올 병용군은 대조군에 근접한 수준의 활성이었으나 그에 대한 말로틸레이트의 병용효과는 관찰되지 않았다.

말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간에 glutathione(GSH)함량에 미치는 영향—간조직의 GSH 함량을 측정할 결과는 Fig.5와 같다. 그림에서처럼 각각 동일 수준인 대조군, 포도당군보다도 말로틸레이트군은 경미하게 GSH 유도를 증가시키는 경향을 보였다. 대조군(3.45 μmole/liver g)에 비하여 감소추세를 보인 사염화탄소군(2.81±0.23 μmole/liver g)에 malotilate를 병용시키면 GSH가 현저히 유도(p<0.02)되어 모든 군 중 가장 높은 함량(5.28±0.55 μmole/liver g)을 나타내었다. 포도당군(3.59±0.33 μmole/liver g)에 비하여 증가 추세를 보인 에탄올군(4.26±0.39 μmole/liver g)에서는 말로틸레이트로 인하여 경미하게 증가 경향을 보였으며, 에탄올군에 비하여 GSH 유도가 억제된 사염화탄소 및 에탄올 병용군(3.44±0.30 μmole/liver g)에 말로틸레이트를 병용시킬 때 GSH 함량

(4.47±0.27 μmole/liver g)이 증가되는 경향이 있었다.

말로틸레이트의 병용투여가 흰쥐간의 malondialdehyde(MDA) 생성에 미치는 영향—간조직액에서 MDA의 함량을 측정할 결과는 Fig.6과 같다. 대조군, 포도당군, 및 말로틸레이트군은 각각 0.22±0.02 nmole/protein mg, 0.23±0.01 nmole/protein mg 및 0.19±0.01 nmole/protein mg 으로서 동일 수준이었으나, 대조군보다 MDA 생성이 현저히 증가(p<0.01)된 사염화탄소군(0.61±0.07 nmole/protein mg)에 첫째로, 말로틸레이트가 병용되면 현저히 그 생성이 억제(0.30±0.03 nmole/protein mg)되었고(p<0.02), 둘째로 에탄올이 병용되어도 MDA 생성이 오히려 억제되는 경향을 나타내었으며, 이 상태에서 추가로 말로틸레이트가 병용되면 그 치가 대조군 수준으로 되었다. 한편, 에탄올군에도 MDA의 생성이 촉진되지 않았으며, 또한 말로틸레이트의 병용효과도 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서 에탄올 중독간의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성물은 Boveris 등<sup>29)</sup>이 12주간 32% 에탄올을 음료수 대용

으로 섭취시킨 흰쥐에서의 경향과 유사하였으며, 그 생성율은 사염화탄소 증독간이나 사염화탄소 및 에탄올 증독간과 유사한 수준으로 나타났는데, 이와 같은 산소유리기의 생성축진은 각각 분획별 SOD가 유도된 것과의 관련 가능성을 고려해 볼 수 있다. 즉, 대조군 및 포도당군에서의 사립체 SOD와 세포질 SOD의 활성비는 각각 1:2.9 및 1:2.6이었으나, 에탄올군, 사염화탄소군 및 사염화탄소와 에탄올의 병용군에서는 1:1.5, 1:1.3 및 1:1.05로서 세포질 SOD의 활성은 감소하고, 사립체 SOD의 활성은 증가하게 된다. 더욱이, 사염화탄소군의 사립체 SOD 활성이 대조군보다 유의성 있게 증가하는 것을 볼 때 사립체막이 공격대상이 된 상태에서의 보상성의 활성유도로 추측되어진다. 특히 사염화탄소에 말로틸레이트가 병용된 군은 현저히 사립체 SOD 활성이 유도시키고 세포질 SOD 활성을 증가시켜 사염화탄소 유발  $\dot{O}_2^-$  생성물을 현저히 억제하는 것으로 해석된다. 또한 최근의 연구결과에서와 같이 사염화탄소를 4일간 처리한 증독간에 말로틸레이트를 후처리한 급성실험의 경우<sup>12)</sup>와 첫 4주 동안 에탄올을 투여하고 두번째 4주 동안은 사염화탄소를 투여하여 사염화탄소의 독성을 증가시키는 과정에 말로틸레이트를 동시에 8주간 병용시킨 만성실험의 경우<sup>14)</sup>에도 현저히 사립체의 MnSOD가 유도되었는데, Nakayama<sup>40)</sup>도 말로틸레이트는 마이크로솜 분획보다는 사립체 분획에서보다 현저히 과산화지질을 억제한다 하여 저자 등의 결과와 상관된 것으로 생각되며, 더욱이 간독소의 만성적인 공격으로 사립체 항상성이 현저히 저하되는 것을 볼 때<sup>41)</sup> 이 점이 말로틸레이트의 중요보호기전이라고 생각된다. 또한, 급성시험에서 gas chromatography head space 법으로 혈중 에탄올과 아세트알데히드 함량에 미치는 말로틸레이트의 작용을 검색한 바,<sup>27)</sup> 말로틸레이트는 에탄올만 투여된 흰쥐보다는 오히려 사염화탄소 처리 후 에탄올이 투여 되었을 때 더욱 유의성있게 혈중 에탄올 및 아세트알데히드를 감소시켰다.

본 연구에서 73마리의 흰쥐에 각각 사염화탄소와 에탄올을 병용투여시킨 후 4주째에는 현저한 체중감소와 함께 5마리만 생존(6.8%)하였는데, 이 때 생존 흰쥐는 오히려 생화학적 및 병리조직학적 소견이 사염화탄소 투여 흰쥐보다도 양호한 편이었고,<sup>14)</sup> 동

시에 추가로 병용투여된 말로틸레이트가 처리된 경우에는 30마리 중 14마리(46.7%)가 생존하여 유의하게 생존율을 증가시켰는데( $X^2$  value에 의함), 이 때 생존 흰쥐는  $\dot{O}_2^-$  유리기의 생성률을 감소시키는 추세였다.

본 실험에 나타난  $H_2O_2$ 의 함량은 dismutation에 의한 것과 내인성의 Fenton-Haber Weiss 형의 반응과정<sup>42)</sup>이 혼재된 것으로 사료된다. 이제까지의 에탄올에 대한 말로틸레이트 효과는 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 청소율 증가,<sup>27)</sup> 에탄올 유발 뇌파변화의 억제화<sup>25)</sup> 및 에탄올 유발 저콜레스테롤 혈증과 저 HDL-콜레스테롤 혈증의 현저한 개선 등이 보고되고 있다.<sup>14,28,43)</sup>

본 연구결과 에탄올 투여로 인한 총 SOD, catalase 및 GSH와 같은 유리기 제거제(free radical scavenger)의 유도율은 Harat 등의 연구결과<sup>44)</sup>와 유사한 양상을 보였는데, 에탄올 유발 간 손상에 대한 말로틸레이트의 보호기전이 인정되는 것은 catalase 활성증가 및 GSH 유도현상으로 생각되어진다. 한편, 급성 사염화탄소 증독간에서 말로틸레이트는  $\dot{O}_2^-$  생성물, catalase 활성 및 GSH 유도에 유의한 작용을 나타내지 못하였고<sup>12)</sup> MDA 생성에 대하여도 유의한 억제효과를 발현하지 못하였다.<sup>8,12)</sup> 그러나, 본 연구결과 4주간의 사염화탄소 증독간에 말로틸레이트가 병용됨으로서 산소독성 방어체계를 현저히 유도하고 지질과 산화를 억제하여 유의성 있는 간보호작용을 나타내었는데, 본 실험결과에서 나타난 바와 같이  $\dot{O}_2^-$  생성물 증가, GSH 결핍 및 지질과산화 축진은 서로의 관련성을 나타내고 있음을 제시하고 있으며, 4주 동안 사염화탄소와 에탄올을 동시에 노출시킨 증독간에 대하여도 경미한 보호기전의 경향을 검색하였으며, 에탄올이 포함된 군에 대하여는  $\dot{O}_2^-$ 의 생성물과 그에 따른 SOD 유도의 불균형이 곧 과산화 손상(peroxidative stress)의 원인이 될 수 있다는 Boveris 등의 결과<sup>39)</sup>와 일부 연관되는 것으로 생각된다. 최근에 저자 등이 유사한 실험조건으로 행한 조직학적 연구<sup>14,45)</sup>에서, 사염화탄소 증독간의 경우는 4주간의 노출로도 경변을 유도할 정도의 섬유화가 관찰되었으나, 말로틸레이트가 병용됨으로서 섬유화는 억제되고 경미한 지방변성만이 관찰되었으며 전자현미경상에도 간세포의 공포변성이 유의하게 감소되고 현저한 평활내 형질

내세망(SER)의 확장이 관찰되었다. 사염화탄소와 에탄올을 4주간 병용시에는 에탄올 투여시보다 지방변성, 산재성괴사 및 섬유화가 증가되었으며, 전자현미경상에서도 사립체의 종창이 관찰되었으나, 추가로 말로틸레이트가 병용시에는 섬유화 및 Kupffer 세포의 증식은 억제하였다. 그러나 오히려 지방변성은 사염화탄소와 에탄올만을 병용할 때보다 증가되었으므로<sup>14)</sup> 그 기전에 관한 현상은 규명되어야 할 연구과제이다. 말로틸레이트의 중요한 생화학적 기전으로 제시된 사립체 SOD에 초점을 맞추고 전자현미경상에서 사립체 변화를 검색한 바, 특히 사염화탄소 및 에탄올 중독간의 사립체 종창이 말로틸레이트가 투여되므로써 개선되었다<sup>45)</sup> 또한 8주간 말로틸레이트 100 mg/kg/day을 병용시키면서 4주간은 사염화탄소를, 다음 4주간은 20% 에탄올을 섭취시킨 결과, 교원섬유 증식을 억제하여 섬유화를 차단함으로써 간경변으로의 전개를 억제할 수 있었는데<sup>45)</sup> 이 때  $\dot{O}_2$ 의 생성률이 현저히 억제되어 Lewis의 이론<sup>46)</sup>을 지지하는 결과를 얻었다. 그러나, 에탄올 관련 중독간에 대한 말로틸레이트의 기전을 보완하기 위하여는 조직학적 고찰을 위한 사료의 고려, 투여용량의 조절, 투여기간의 연장, peroxidase 계의 정사 및 면역조직화학적 검색이 더욱 요망된다. 말로틸레이트는 에탄올 단독처리시 보다는 사염화탄소와 병용되거나, 사염화탄소 단독처리시에 더욱 보호작용을 나타내는데, 이들 간독소의 독성발현에는 필연적으로 중간대사과정에서 생성되는 유리기들의 반응성과 연관되므로, ESR (electron spin resonance spectroscopy)을 이용하여 여러 유리기들의 동태에 미치는 기전을 추적하는 연구가 보완되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

사염화탄소 및 에탄올을 4주간 투여하여 유도된 중독간에 미치는 dithiol malonate 유도체인 말로틸레이트의 항산화기전을 검색하기 위하여 Sprague-Dawley 계 웅성 흰쥐를 대상으로 실험에 임하였다. 사염화탄소는 1.5 ml/kg 씩 주 2회 피하주사하였고, 에탄올을 20% 용액으로 하여 음료수 대용으로 섭취시켰고, 에탄올의 대조군인 포도당군은 에탄올과 동일열량을 내도록 포도당 용액을 음료수 대

으로 섭취시켰으며, 말로틸레이트는 100 mg/kg 씩 매일 1회 경구투여하였으며, 최종투여 후 18시간 절식시켜 얻은 간에서 superoxide 유리기( $\dot{O}_2$ )의 생성율, 사립체 및 세포질의 superoxide dismutase (SOD)의 활성도,  $H_2O_2$  농도, catalase 활성도, glutathione(GSH) 함량 및 malonedialdehyde (MDA) 함량을 검정하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 대조군에 비하여 각각  $\dot{O}_2$ 의 생성율, 사립체 SOD 활성도 및 MDA 생성이 현저히 증가되고, catalase 활성은 감소된 사염화탄소 중독간에 말로틸레이트가 병용투여되면  $\dot{O}_2$  생성율 및 MDA 생성은 현저히 저하되고, 특히 사립체 SOD 활성도를 비롯한 catalase 활성도 및 GSH 생성은 더욱 유의있게 증가되었다.

2) 포도당 투여간에 비하여  $\dot{O}_2$  생성율 및 catalase 활성도가 현저히 증가한 에탄올 중독간에 말로틸레이트를 병용투여하여도 유의한 변화는 나타나지 않았다.

3) 사염화탄소 중독간에 비하여 MDA 생성억제 경향을 보인 사염화탄소 및 에탄올의 중독간에 말로틸레이트를 투여시에 유의한 변화는 나타나지 않았으나, 전반적으로 경미한 항산화 체계가 유도되었다.

## 감사의 말씀

말로틸레이트를 제공해주셨던 어경남 선생님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Ito, R., Toida, S., Matsuura, S., Hidano, T., Uchida, H., Miyazaki, T., Sugimoto, T. and Kasai, T.: Acute toxicity of diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene malonate, a new drug for liver disease. *J. Med. Soc. Toho, Japan*, 25(2), 387-391 (1978).
- 2) Park, K.H. and Lee, J.W.: Effects of novel dithiol malonates derivatives on the liver lipid peroxidation and on microsomal electron transport system. *Kor. J. Toxicol.*, 2(2), 97-110 (1987).
- 3) 박재길, 이정원, 이종성, 문병석, 이 완, 김종수, 유중근, 이종욱: 새로운 간장보호약물 YH439의



- 일반약리작용 및 안정성 평가 연구. 대한약학회 강연요지집 p.117(1989).
- 4) 박근희, 김병채, 이종성, 박재길, 유중근, 이종욱 : 새로운 간장보호약물 YH493의 약리작용연구. 대한약학회 강연요지집 p.118(1989).
  - 5) Imaizumi, Y., Katoh, M. and Sugimoto, T.: Effect of molotilate on the synthesis and movement of RNA in rat liver. *Folia. Pharmacol. Japan.*, **79**, 285-291 (1982).
  - 6) Kawata, S., Sugiyama, T., Seki, K., Okamoto, M. and Yamán, T.: Stimulatory effect of cytochrome b<sub>5</sub>-nitroanisole and diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene-malonate on rat liver microsomal drug hydroxylations. *J. Biochem.*, **92**, 305-313 (1982).
  - 7) Matoh, M., Kitada, M., Satoh, T., Kitagawa, H., Sugimoto, T. and Kasai, T.; Further studies on the *in vivo* effect of NKK-105 on the liver microsomal drug Oxidation system in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **30**(2), 2759-2765 (1981).
  - 7) Egashira, T., Yamamoto, T. and Kuroiwa, Y.; Protective effects of diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) on live injury by CCl<sub>4</sub>. *The JI. Toxicol. Sci.*, **7**, 13-18 (1982).
  - 9) Matoh, M. and Sugimoto, T.: Effect of malotilate on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Folia Pharmacol. Japan.*, **80**, 83-91 (1982).
  - 10) 中山 貞男, 栗本 忠, 初鹿 野誠彦, 狩野 元成, 坂本 浩仁 : Diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene malonate(NKK-105) 藥理學的研究(第 II報), 膽汁分泌るらひに 膽汁成分に及ぼす影響. 昭和醫學會誌, **38** (5), 513-523(1978).
  - 11) 中山 貞男, 岡崎 雅子, 酒井 節代, 中村 幸雄, 坂本 浩二 : Diisopropyl -1, 3 -dithiol- 2 -ylidene malonate の藥理學的研究(第 IV報) - CCl<sub>4</sub> 脂肪肝に及ぼす影響について. 昭和醫學會雜誌, **39**(1), 19-29(1979).
  - 12) Kim, H.C.: Mechanism of NKK-105 on acute hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. *Jl. Sci and Technol. Kang Weon National Univ.*, **28**, 113-121 (1989).
  - 13) Igarashi, S., Hatahara, T., Nagai, Y., Hori, H., Sakaibara, K., Katoh, M., Sakai, A. and Sugimoto, T.: Anti-fibrotic effect of malotilate on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Jap. J. Exp. Med.*, **56**(5), 235-245 (1986).
  - 14) Kim, H.C., Park, E.S., Yoo, J.H. and Song, K.Y.: Serochemical and histochemical observations on the effect of malotilate in chronic liver injury induced by CCl<sub>4</sub> with or without ethanol. *Kor. J. Pathol.*, **23**(2), 223-234 (1989).
  - 15) Badr, M.Z., Belinsky, S.A., Kauffman, F.C. and Thurman, R.G.: Mechanism of hepatotoxicity to peirportal rigions of the liver lobule due to ally alcohol; Role of oxygen and lipid peroxidation. *Jl. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**(3), 1138-1142 (1986).
  - 16) Ganey, P.E., Kauffman, F.C. and Thurman, R.G.: Oxygen dependent hepatotoxicity due to doxorubicin. *Mol. Pharmacol.*, **134**, 695-701 (1988).
  - 17) Badr, M.Z, Ganey, P.E., Yoshihara, H., Kauffman, F.C. and Thurman, R.G.: Hepatotoxicity of menadione predominates in oxygen-rich zone of liver lobule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**(3), 1317-1322 (1989).
  - 18) Recknagel, R.O.: A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sceince*, **33**(5), 401-408 (1983).
  - 19) Burk, R.F., Lane, J.M. and Patel, K.: Relationship of oxygen and glutathione in protection against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic microsomal lipid peroxidation and covalent binding in the rat. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1996-2001 (1984).
  - 20) Forni, L.G., Packer, J.E., Salter, T.F. and Wilson, R.L.: Reaction of the trichloromethyl and halothane-derived peroxy radicals with unsaturated fatty acids. *Chem. Biol. Interact.*, **45**, 171-177 (1983).
  - 21) Connor, H.D., Thurman, R.G., Galizi, M.D. and Mason, R.P.: The formation of a novel free radical metabolite from CCl<sub>4</sub> in the perfused rat liver and *in vivo* *Jl. Biol. Chem.*, **26**(10), 4542-4548 (1986).
  - 22) Videla, L.A. and Valenzuela, A.: Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation metabolic interrelations and pathological implications. *Life Science*, **31**, 2395-2407 (1982).
  - 23) Jakobovitis, A.W., Morgan, M.Y. and Sherlock, S.: Hepatic siderosis in alcoholics, *Digest. Dis. Sci.*, **24**, 305-310 (1979).
  - 24) Chapman, R.W., Morgan, M.Y., Bell, R., Sherlock, S.: Hepatic uptake in alcoholic liver disease.

- Gastroenterol.*, **84**, 143-147 (1983).
- 25) Shiraiishi, T. and Matsumiya, T.: Anti-alcohol action of hepatoactivator (NKK-105) on motoricity and EEG in experimental animals and man. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.*, **6**(1), 103-112 (1981).
  - 26) 허인회, 김형춘, 송계용 ; NKK-105 가 CCl<sub>4</sub> 유발 간독성 쥐의 alcohol 효과에 미치는 영향 ; 대한약학회 강연요지집 p.89(1984).
  - 27) Hur, I.H., Lee, S.J., Jhoo, W.K., Heo, M.Y. and Kim, H.C.: Effects of malotilate on levels of ethanol and acetoldehyde in blood. *Yakhak Hoeji*, **31**(6), 399-401 (1987).
  - 28) 허인회, 이상준, 주왕기, 김형춘 : Ethanol 만성노출 흰쥐에 미치는 malotilate(NKK-105)의 영향 : 대한약학회 강연요지집 p.99(1985).
  - 29) Sipes, I.G. and Gandolfi, A.J.: Biotransformation of toxicants. Casarett and Doull's toxicol 3 ed. Macmillan publishing Co., New York, pp. 84-87 (1986).
  - 30) McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. Enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969).
  - 31) Lee, Y.M., Ayala, F.J. and Misra, H.P.: Purification and properties of SOD from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8506-8509 (1981).
  - 32) Weisiger, R.A. and Fridovich, I.: SOD, Organelle specificity. *J. Biol. chem.*, **248**, 3852-3592 (1973).
  - 33) Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R.: Hepatic microsomal ethanol oxidation-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 420-430 (1972).
  - 34) Aebi, H.: Colorimetric Assay. In methods of enzymatic analysis 2nd Ed., pp.673-678, Bergmeyer, H.U., New York Academic Press (1974).
  - 35) Cohn, V.H. and Lyle, J.: A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.*, **14**, 434-440 (1966).
  - 36) Chung, A.S., Maines, M.D. and Reynolds, W.A.: Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by HgCl<sub>2</sub> in the rat kidney. *Biochem. Pharmacol.*, **31**(9), 3093-3100 (1982).
  - 37) Masugi, F. and Nakamura, T.: Measurement of thio-barbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulfate and variation of the values affected by vitamine E and drugs. *Vitamine*, **51**, 21-29 (1977).
  - 38) Lowry, C.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.S.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
  - 39) Boveris, A., Fraga, C.G., Vansavsky, A.I. and Koch, O.R.: Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**(2), 534-541 (1983).
  - 40) Nakayama, S.: Effects of diisopropyl-1,3-dithiol-2-ylidene malonate (NKK-105) on the drug metabolizing enzymes and fine structure of rat liver. *Folia. Pharmacol. Japan*, **75**, 571-584 (1979).
  - 41) Krahenbuhl, S., Stucki, J., and Reichen, J.: Mitochondrial function in carbon tetrachloride-induced cirrhosis in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **38**(10), 1583-1588 (1989).
  - 42) Gutteridge, J.M.C.: Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. *FEBS*, **185**, 19-23 (1985).
  - 43) Wakasugi, J., Tawara, K., Katami, K., Ikeda, T. and Tomikawa, M.: Action of malotilate on serum cholesterol level in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Jap. J. Pharmacol.*, **38**, 391-401 (1985).
  - 44) Harata, J., Nagata, M., Sasaki, E., Ishiguro, I., Ohta, Y. and Murakami, Y.: Effect of prolonged alcohol administration on activities of various enzymes scavenging activated oxygen radicals and lipid peroxide level in the liver of rats. *Biochem. Pharmacol.*, **32**(11), 1795-1798 (1983).
  - 45) Kim, D.H., Kim, H.C. and Song, K.Y.: An electron microscopic study on the protective effects of malotilate in the liver with CCl<sub>4</sub> and ethanol intoxication. *The Chung-Ang J. Med.*, **12**(3), 437-446 (1987).
  - 46) Lewis, K.O., Paton, A.: Could superoxide cause cirrhosis?. *The Lancet*. July, **24**, 188-189 (1982).