

YH439의 알콜성 지방간생성 억제작용

강경애 · 김영철*

서울대학교 약학대학, 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1

Decreased Induction of Alcoholic Fatty Liver by YH439 in Rats

Kyoung Ae Kang and Young Chul Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University,
San 56-1 Shinrim-Dong Kwanak-Ku, Seoul 151-742, Korea

(Received November 22, 1995)

(Accepted December 1, 1995)

ABSTRACT : A single large dose of ethanol as well as chronic ethanol consumption produces alcoholic fatty liver in human and experimental animals. We examined the effects of YH439, a potential hepatoprotective agent, on alcoholic fatty liver generation in adult female rats. In rats treated with YH439 (250 mg/kg, po) 4 hr prior to a single dose of ethanol (6 g/kg, po), a significant decrease in hepatic triglyceride accumulation was observed. YH439 also has an inhibitory effect on hepatic triglyceride and cholesterol accumulation induced by repeated ethanol treatments for one week. Because it has been known that induction of alcoholic fatty liver is associated with lipid peroxidation and/or hepatic glutathione depression, the effect of YH439 on these parameters was determined in the livers of rats treated with ethanol. Coadministration with YH439 inhibited MDA formation and glutathione depression induced by acute or repeated ethanol administration. In order to determine the effect of YH439 on ethanol metabolism in vivo, disappearance of ethanol from blood was measured. In rats treated with a single dose of ethanol (6 g/kg, po), the ethanol concentration in blood reached a peak approximately 120 min following the treatment which declined linearly for 18 hrs. YH439 had no effect on the decline of blood ethanol concentration regardless of the dose of ethanol given to rats. These results in this study suggest that YH439 has an inhibitory effect on fatty liver generation induced by acute or repeated ethanol consumption through a mechanism not directly related to the rate of ethanol metabolism in vivo.

Key Words : Alcoholic fatty liver, Ethanol, YH439, Lipid peroxidation, Glutathione, Triglyceride, Cholesterol

I. 서 론

현재 우리나라에서 간질환의 발생률은 외국에 비해 상당히 높은 편이며 그 이유는 식생활 및 음주양식 때문인 것으로 인정되고 있다. 특히 만성적인 알콜섭취에 의해서 나타나는 지방간은 가장 흔히 발생하는 간질환의 예이다. 알콜에 의해 유도되는 지방간은 간세포내에 지방이 증가하는 현상으로 fat infiltration에 의해서 야기되며(Dianzani, 1991) 간에서의 지방산의 합성과 분비의 균형이 알콜에 의해 저해됨으로써 나타나는 것으로 알려져 있다(Baraona and Charles, 1979). 지방간이 진행되면서 간비대화가 나타나며 간괴사, 간경

화 등으로 진전된다(Baraona and Charles, 1979). 만성적인 알콜섭취에 의해서 뿐만아니라 고용량의 일회 섭취에 의해서도 알콜성 지방간은 유도될 수 있다(Mallov and Bloch, 1956). 최근 알콜에 의한 간질환에 cytochrome P-450 2E1이 밀접히 관련되어 있으며 또 lipid peroxidation이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Ekström and Ingelman-Sundberg, 1989). YH 439(isopropyl 2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate)는 (주) 유한양행에서 간장질환치료제로 개발중인 물질로서 실험동물에서 수종의 화학물질로 유도된 급성 및 만성적인 간장해에 탁월한 보호효과가 있음이 관찰되었다. 본 연구에서는 YH 439가 ethanol에 의한 알콜성 지방간 생성에 미치는 영향을 확인하고 그 기전을 규명하고자 하였다.

본 연구는 과기처 '94년도 특정연구개발사업에 의해 지원되었음.

*To whom all correspondence should be addressed.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

자성 Sprague-Dawley 랫트를 (주)유한양행으로부터 공급받아 실험동물로 사용하였다. 분양받은 동물은 3주 이상 본 대학 사육실에서 적응시킨 후 체중이 약 150 g에 도달했을 때 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하였으며 오전 8시와 오후 8시를 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 고품사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

2. 시약

본 연구실험에 사용된 시약은 NADPH, heparin, ethylenediaminetetraacetic acid, glutathione reductase, glutathione, thiobarbituric acid, zeolite, sodium-m-periodate, sodium-m-arsenite, 4,5-dihydroxy-naphthalene-2,7-disulfonic acid, *o*-phthalaldehyde, cholesterol, tris (hydroxymethyl)aminomethane, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(이상 Sigma Chemical Co., U.S.A.), ethyl ether, perchloric acid, acetic acid(이상 덕산시약), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, sodium lauryl sulfate, n-butanol, chloroform, sodium chloride(이상 Junsei Chemical Co., Japan), $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ (Avondale Laboratories, England), ethanol(Merck, U.S.A.), 1-propanol(Tedia Co., Japan), methanol(Carlo Erba Regenti, S.R.L.), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pyrazine, potassium hydroxide(이상 Aldrich Chemical Co., U.S.A.), potassium chloride, glacial acetic acid(이상 Yacuri Pure Chemicals Co., Japan), c- H_2SO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (이상 Shinyo Chemical Co., Japan), sodium carboxy methyl cellulose(Shimakyu's Pure Chemicals, Japan), YH439(유한양행 중앙 연구소) 등이며 실험에 사용된 모든 시약과 용매는 reagent grade 또는 그 이상의 품질을 사용하였다.

3. 약물 투여방법

랫트에 YH439를 0.5% sodium carboxy methyl cellulose(CMC-Na)에 현탁시켜 10 ml/kg을 경구투여하였으며 용량은 체중 kg당 250 mg이 되도록 하였다. YH439 투여 4시간 후에 ethanol 6 g/kg을 20 ml/kg으로 경구투여하였다. 대조군은 CMC만을 투여한 후 ethanol을 투여하였다. Ethanol을 투여한 후에는 실험

이 끝날 때까지 절식시켰다.

4. Assays

혈중 Ethanol 농도는 측정은 Naresh 등의(1972) 방법을 변형하여 측정하였다. Flame ionization detector (FID)가 장착된 Varian 3300 Gas Chromatograph (Varian Instruments Division, Palo Alto, Calif., U.S.A.)를 이용하였으며 컬럼 온도는 110°C , 인젝터 온도 130°C , 디텍터 온도 150°C 로 설정하였다. Carrier gas인 N_2 는 30 ml/min, H_2 는 30 ml/min, compressed air는 300 ml/min로 유지하였다.

간 triglyceride 함량은 Van Handel과 Zilversmit의 방법(1957)을 Butler 등이 변형시킨 방법(1961)으로 측정하였다. 간을 적출하여 chloroform으로 추출한 후 saponification에 의해 생긴 glycerol를 산화시킨 다음 chromotropic acid(4,5-dihydroxy-naphthalene-2,7-disulfonic acid)를 가해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cholesterol 함량 측정은 Zlatits와 Zak의 방법(1969)을 변형하여 측정하였다. 간을 적출하여 chloroform과 methanol(2:1)로 추출한 후 *o*-phthalaldehyde를 가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Glutathione은 enzymatic recycling method를 이용하여 측정하였다(Griffith, 1980). 간을 적출하여 homogenate를 만든 후 원심분리하여 NADPH 용액과 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) 용액을 가하고 상온에서 4분간 방치한 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

Lipid peroxidation은 thiobarbituric acid법(Ohkawa, 1979)을 이용하여 측정하였다. 간을 적출하여 homogenate를 만든 후 SDS 용액, thiobarbituric acid, acetic acid, 증류수를 취해 둔 시험관에 homogenate를 가해 마개를 막고 95°C 의 수조에서 60분간 가열하였다. 가열이 끝난 후 n-butanol을 가하여 TBA 반응물을 추출한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 유기층을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결 과

Ethanol은 1회 경구로 투여되었을 때 간조직의 triglyceride나 cholesterol level을 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켜 지방간생성을 유발하는 것으로 관찰되었다(Table 1). 그러나 4시간 전에 YH439가 투여된 동물군에서는 ethanol에 의한 triglyceride의 상승이 완전히 억제되었다. 급성적인 ethanol 투여에 의해 상승된

Table 1. Effect of YH439 on hepatic triglyceride and cholesterol level in rats treated with a single dose of ethanol¹

	Triglyceride level (mg/g liver)	Cholesterol level (mg/g liver)
Control (5)	10.70±0.50	5.80±0.38
EtOH (10)	22.68±1.86*	7.54±0.72*
YH439+EtOH (10)	11.52±1.29**	7.48±0.29

¹YH439 (250 mg/kg, po) was given to rats 4 hr prior to ethanol (6 g/kg, po). Rats were sacrificed for the assay 18 hr following the ethanol treatment. Results represent the mean±SE for the number of rats indicated in the parenthesis.

*Significantly different from the control rats (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

**Significantly different from the rats treated with ethanol only (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

Table 2. Effect of YH439 on hepatic triglyceride and cholesterol level in rats treated with ethanol repeatedly for a week¹

	Triglyceride level (mg/g liver)	Cholesterol level (mg/g liver)
Control (5)	15.40±0.65	6.20±0.25
EtOH (5)	24.90±1.09*	9.48±0.35*
YH439+EtOH (7)	17.27±0.47**	6.79±0.17**

¹YH439 (250 mg/kg, po) was given to rats 4 hr prior to ethanol (6 g/kg, po) every day for 6 days. Rats were sacrificed for the assay 18 hr following the last ethanol treatment. Results represent the mean±SE for the number of rats indicated in the parenthesis.

*Significantly different from the control rats (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

**Significantly different from the rats treated with ethanol only (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

간 cholesterol 함량에 YH439는 영향을 주지 못했다. 반복적인 일주일간의 ethanol 투여는 triglyceride와 cholesterol의 간조직내 함량을 더욱 현저하게 증가시키는 추세를 보였다(Table 2). Ethanol과 같이 일주일간 전처리된 YH439는 triglyceride와 cholesterol level 모두를 정상범위로 유지시켜 ethanol에 의한 지방간 생성에 억제작용을 갖고 있음을 보였다.

한편 알콜성 지방간의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 lipid peroxidation의 유발에 급성적인 ethanol 투여 및 YH439가 주는 영향은 Table 3과 같다. Ethanol은 급성적인 1회 투여에 의해서도 lipid peroxidation의 지표인 간 homogenate에서 측정된 MDA 생성을 현저하게 증가시켰으며 환원형 glutathione의 함량은 반대로 저하되었다. YH439는 ethanol에 의해 유발되는 이 지표의 변화를 저해하여 lipid peroxidation의 발생을 억제 할 수 있는 것으로 관찰되었다. 반복적으로 투여된 ethanol에 의해 증가된 간 homogenate에서의 MDA 생성증가와 glutathione 함량저하도 YH439는 유효하게 억제시키는 효과를 보였다(Table 4).

YH439 투여가 급성적인 ethanol 투여 후 혈중 ethanol의 소실속도에 주는 영향은 Fig. 1과 같다. Ethanol(6 g/

Table 3. Effect of YH439 on hepatic lipid peroxidation and glutathione level in rats treated with a single dose of ethanol¹

	MDA (μmol/g liver)	Glutathione level (μmol/g liver)
Control (5)	213.13±28.41	4.87±0.36
EtOH (6)	633.73±58.87*	3.55±0.22*
YH439+EtOH (8)	305.04±21.70**	3.81±0.11

¹YH439 (250 mg/kg, po) was given to rats 4 hr prior to ethanol (6 g/kg, po). Rats were sacrificed for the assay 5 hr following the last ethanol treatment. Results represent the mean±SE for the number of rats indicated in the parenthesis.

*Significantly different from the control rats (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

**Significantly different from the rats treated with ethanol only (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

Table 4. Effect of YH439 on hepatic lipid peroxidation and glutathione level in rats treated with ethanol repeatedly for a week¹

	MDA (μmol/g liver)	Glutathione level (μmol/g liver)
Control (5)	263.74± 23.29	3.80±0.45
EtOH (6)	493.14±115.34*	2.36±0.26*
YH439+EtOH (8)	194.73± 25.77**	3.31±0.06**

¹YH439 (250 mg/kg, po) was given to rats 4 hr prior to ethanol (6 g/kg, po) every day for 6 days. Rats were sacrificed for the assay 5 hr following the last ethanol treatment. Results represent the mean±SE for the number of rats indicated in the parenthesis.

*Significantly different from the control rats (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

**Significantly different from the rats treated with ethanol only (Student's *t*-test, *p* < 0.01).

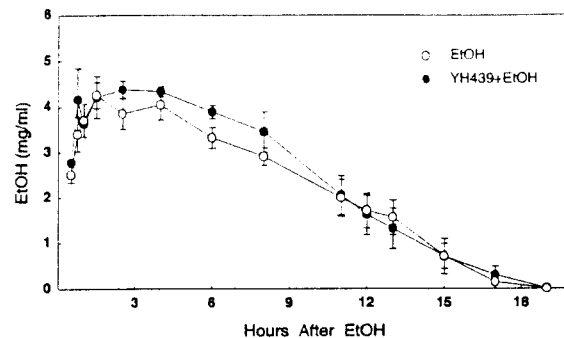


Fig. 1. Disappearance of ethanol from blood in rats (I). Rats were treated with YH439 (250 mg/kg, po) 4 hr prior to EtOH (6 g/kg, po). Each point represents the mean±SE for 5 rats. The effect of YH439 pretreatment on ethanol blood concentration was not significant throughout the whole time points (Student's *t*-test, *P* > 0.05).

kg)을 경구투여하였을 때 혈중 최대농도는 약 2시간대에 도달하였다. 이 후 혈중 ethanol 농도는 Fig.상에서 거의 직선적으로 감소하여 ethanol 투여 후 최대 19시간까지 검출되었다. 한편 4시간 전에 투여된 YH439(250 mg/kg, po)는 혈액중 ethanol 농도 변화에 아무런 영향도 주지 않았으며 ethanol만을 투여한 동물군과 비교시 AUC(Area Under the Curve)에도 차이를 보이지 않았다(data not shown). Ethanol의 투여량을 감소

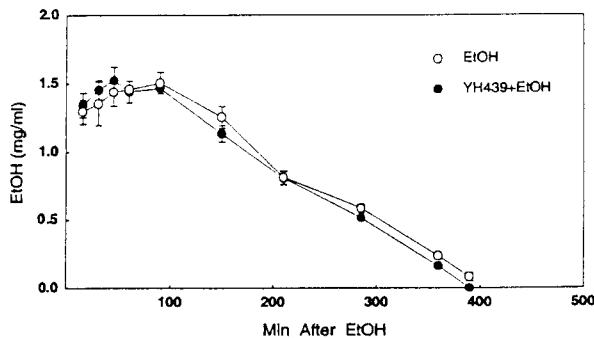


Fig. 2. Disappearance of ethanol from blood in rats (II). Rats were treated with YH439 (250 mg/kg, po) 4 hr prior to EtOH (2 g/kg, po). Each point represents the mean \pm SE for 5 rats. The effect of YH439 pretreatment on ethanol blood concentration was not significant throughout the whole time points (Student's *t*-test, $P > 0.05$).

시켰을 때에도 유사한 결과가 관찰되었다(Fig. 2). 경구 투여된 2 g/kg의 ethanol에 의해 최대 혈중농도는 약 1/3로 감소되고 최대농도 도달시간은 1시간대 내외로 관측되었으며 이때 YH439 투여는 ethanol만을 투여한 동물군과 비교시 전시간대에 걸쳐 ethanol의 혈중농도에 차이를 보이지 못하였다.

IV. 고 찰

지방간은 간질환의 초기현상으로 가장 흔히 나타나는 병변 중의 하나이다. 많은 화학성 간독성물질이 지방간을 유발하며 그 중 대표적인 화학물질의 하나로 ethanol을 들 수 있다. Ethanol은 만성적인 섭취에 의해서 뿐만아니라 일시적인 고용량의 투여에 의해서도 알콜성 지방간을 유발하는 것으로 알려져 있다(Mallov and Bloch, 1956). 고용량의 급성적인 ethanol이 지방간을 생성시키는 기전은 ethanol에 의한 stress 유발과 유관한 것으로 추정되고 있다. 즉, 혈중 ethanol 농도 상승에 의해 아드레날린성 신경계의 흥분이 일어나며 각 말초조직에서의 지방산 분해가 촉진된 결과 급성적으로 지방간이 유발되는 것으로 추정되고 있다(Kalant *et al.*, 1975). 한편 만성적인 ethanol 섭취에 의한 지방간의 생성은, 첫째 ethanol의 대사에 의한 지방산의 지속적인 공급과다가 원인이 되거나, 둘째로 지방산의 합성을 매개하는 효소의 활성증가로 인하여 acyl-CoA로부터 지방산의 합성증가, 또는 세째로 간세포막의 손상으로 인한 triglyceride의 분비장애에 의하여 진행되는 것으로 알려져 있다(Baraona and Lieber, 1979).

본 연구실험에서 시험된 YH439는 급성적인 ethanol 투여나 반복적인 투여에 의해 유발되는 지방간 생성을 현저하게 억제하는 결과를 보였다. 그러나 ethanol 투

여 후 측정된 혈중 ethanol 농도와 AUC에는 YH439 전처리가 아무런 영향을 주지 못하였다. 따라서 YH439의 알콜성 지방간 억제작용은 ethanol의 체내 흡수나 대사분해속도의 저하에 의한 효과는 아닌 것으로 볼 수 있다. 최근에 ethanol에 의한 hepatotoxicity는 reactive oxygen species generation과 유관하며 여기에 aldehyde oxidase(AO)가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Albano *et al.*, 1994; Mira *et al.*, 1995). AO는 acetaldehyde oxidation을 통해서 oxiradicals을 생성할 뿐만 아니라 ethanol에 의해 증가된 NADH를 oxidation시키면서 superoxide anion radical을 생성하고 oxygen free radicals이 lipid peroxidation을 매개하여 alcohol-induced liver injury를 일으키는 것으로 추정된다(Mira *et al.*, 1995). 실제로 ethanol은 급성적 또는 만성적으로 투여시 간에서 lipid peroxidation 각각 3.5배와 2배 정도로 증가시킴이 보고된 바 있으며(Videla *et al.*, 1983; Gutierréz-Ruiz *et al.*, 1995)이 결과는 본 연구 실험에서의 관찰과 일치하고 있다.

한편 ethanol에 의한 peroxidative effect의 유발에 2E1 활성이 연관되어 있음을 시사하는 실험결과도 보고되고 있다. 2E1 활성의 inhibitor인 metyrapone이나 2E1 antibody를 투여하는 실험에서 ethanol에 의해 유도되는 lipid peroxidation은 현저히 감소하였다(Montoliu *et al.*, 1994).

본 연구실험에서 관찰된 간의 환원형 glutathione (GSH) 함량의 감소는 ethanol의 peroxidative effect에 의해 이 endogeneous tripeptide가 소모되어 나타난 결과로 볼 수 있다. 이 관찰은 알콜성 지방간의 생성이 항산화제 투여에 의해 감소됨을 관찰한 보고와(Ryle, 1984) 더불어 lipid peroxidative damage가 ethanol에 의한 간질환의 유발에 중요한 역할을 하고 있음을 강력하게 시사하고 있다.

YH439가 ethanol에 의한 지방간 생성을 억제하는 기전은 아직도 분명하지 않다. 이 약물은 강력한 2E1 활성억제작용을 가지고 있음이 보고되고 있다(Choi, 1994; Kang and Kim, 1995). 그러나 알콜성 지방간의 유발에 2E1 활성의 역할에 관해서는 아직도 논란이 계속되고 있으며 따라서 YH439의 ethanol에 의한 생성 억제작용에 이 약물이 가진 2E1 억제효과의 기여도는 추후 계속 연구되어야 할 과제이다.

참고문헌

Albano, E., Clot, P., Comoglio, A., Mario, U.D. and Tomasi, A. (1994): Free radical activation of acetal-

- dehyde and its role in protein alkylation, *FEBS J.*, **348**, 65-69.
- Baraona, E. and Lieber, C.S. (1979): Effects of ethanol on lipid metabolism, *J. Lip. Res.*, **20**, 289-315.
- Butler, W.M., Maling, H.M., Horning, M.G. and Bordie, B.B. (1961): The direct determination of liver triglycerides, *J. Lipid. Res.*, **2**, 95-96.
- Choi, E.Y. (1994): Effects of YH439 on the expression of rat hepatic CYP 2E1, microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase, M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Dianzani, M.U. (1991): Biochemical aspects of fatty liver in Hepatotoxicology (Meeks, R.G., Harrison, S.D. and Bull, R.J. Eds.), (CRC press, Boca Raton), 327-399.
- Ekström, G. and Ingelman-Sundberg M. (1989): Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P450 (P1IE1), *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1313-1319.
- Griffith, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine, *Anal. Biochem.*, **106**, 207-212.
- Gutierr z-Ruiz, MC., Bucio, L. Souza, V. and Carabez, A. (1995): The effect of chronic and acute ethanol treatment on morphology, lipid peroxidation, enzyme activities and Na⁺ transport systems on WRL-68 cells, *Human Exp. Toxicol.*, **14**, 324-334.
- Kang, K.A. and Kim, Y.C. (1995): Alterations in dichloromethane-induced carboxyhemoglobin elevation by several metabolic modulators, *Korean J. Toxicol.* (Submitted)
- Kalant, H., Khanna, J.M., Seymour, F. and Loth, J. (1975): Acute alcoholic fatty liver-Metabolism or stress, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 431-434.
- Mallov, S. and Bloch, J.L. (1956): Role of hypophysis and adrenals on fatty infiltration of liver resulting from acute ethanol intoxication, *Am. J. Physiol.*, **184**, 29-34.
- Mira, L. Maia, L. Barreira, L. and Manso, C.F. (1995): Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 53-58.
- Montoliu, C., Valles, S. and Guerri, C. (1994): Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: Effect of chronic alcohol consumption, *J. Neurochem.*, **63**, 1855-1862.
- Naresh, C. and Robert, H. (1972): Analysis of alcohol 2. A review of gas chromatographic method, *J. Chromatograph. Sci.*, **10**, 263-267.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Ryle, P.R. (1984): Free radicals, lipid peroxidation, and ethanol hepatotoxicity, *The Lancet*, **25**, 461.
- Van Handel, E. and Zilversmit, D.B. (1957): Micromethod for the direct determination of serum triglycerides, *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 152-157.
- Videla, L.A., Fraga, C.G., Koch, O.R. and Boveris, A. (1983): Chemiluminescence of the *in situ* rat liver after acute ethanol intoxication-effect of (+)-cyanidanol-3, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2822-2825.
- Zlatis A. and Zak B. (1969): Study of a new cholesterol reagent, *Anal. Biochem.*, **29**, 143-148.