

## 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride(AAPH)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향

### 1. 임상증상 및 혈액 화학치 소견

강정부<sup>1</sup> · 손호상 · 김철호\*  
경상대학교 수의과대학(동물의학 연구소)  
\*경상남도 축산진흥연구소

## Effects of Administration of 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride(AAPH) on Liver Function in Rats

### 1. Clinical Signs and Blood Chemical Values

Chung-Boo Kang<sup>1</sup>, Ho-Sang Son and Cheol-ho Kim\*  
College of Veterinary Medicine(Institute of Animal Medicine),  
Gyeongsang National University, Chinju 660-701  
\*Gyeongsangnamdo Livestock Promotion Institute 660-360

**ABSTRACT :** This study was performed to estimate the clinical signs and changes of biochemical parameters in rats with hepatic injury induced by the administration of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH). Minor behavioral change, brittleness of skin hair and decreased volume of water and feed intake were observed in rats 2 hours after AAPH administration compared to control group. Concentration of serum albumin showed lower than that of control group. However, concentration of total bilirubin has shown higher than that of control group. As time goes on, serum LDH activity increased significantly compared to control group, but serum CPK activity did not change compared to control group. Passive hemagglutination of  $\alpha$ -fetoprotein was negative in all the treatment groups and control group.

**Key words :** 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH), liver function, blood chemical values,  $\alpha$ -fetoprotein, rat

## 서 론

사염화탄소 즉,  $CCl_4$ 는 간 손상을 일으키는 대표적인 화학물질의 하나로 생체내의 smooth endoplasmic reticulum (SER)의 nicotinamide adenine phosphate (NADPH)-oxygenase에 의해 대사되어  $\cdot CCl_3$ 와 같은 자유기 (free radical)를 생성하는 외인성 생체이물질(xenobiotic compounds) 즉, 자유기 손상에 의한 가능성을 처음 Butler (1961)<sup>1</sup>가 제시한 이후 많은 외인성 물질이 밝혀져 있다<sup>13,17-18</sup>.

$CCl_4$ 는 활면소포체(smooth-surfaced endoplasmic reticulum)에 있는 NADPH-cytochrome P-450 electron transport chain에서 대사되어 trichloromethyl radical ( $CCl_3\cdot$ )

과 이것이 이어서 산소분자와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical ( $OOCCl_3\cdot$ )이 생성되어, 소포체내 막 단백질과 지질에 결합하여 막 인지질의 다중 불포화 지방산의 과산화 변성을 야기시키는 것으로 알려져 있다<sup>1,7-8,11,13-14</sup>. 최근 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, 일명 AAPH는 수용성의 azo화합물의 일종으로서 열분해에 의해서 자유기를 생성시키는 것으로 알려져 있고 복강내로 투여된 AAPH는 수분내에 혈류를 타고 전신 순환되며 AAPH는 산소분자와 반응하여 생성된 탄소 자유기(carbon radical)는 이어서 과산화자유기(peroxy radical)를 생성하여 여러형태의 생물학적 분자와 결합반응을 일으켜 생체막의 구조를 허물게 하는 것으로 생각되고 있다<sup>17-18</sup>. 순환혈액에서 AAPH로부터 생성된 자유기는 순환 혈액과의 직접적인 접촉에 의해 혈액에 있는 고분자물질 또는 세포의

<sup>1</sup>Corresponding author.

원형질막과 반응할 수 있어  $CCl_4$ , halothane 등의 경우는 주로 간 손상에 국한되나, AAPH는 모든 장기에 손상을 줄 가능성이 커 이와 같이 서로 다른 기전에 의해 자유기를 유발하는 유발인자(radical sourcer)를 사용하여 간 기능에 미치는 영향을 추구하고자  $CCl_4$ 를 투여한 연구에서의 결과 간기능과 관련이 깊을 것으로 예측된 임상증상 및 혈액화학치<sup>7</sup>, 혈청효소 활성치에 대한 보고<sup>8</sup>에 이어 AAPH에 의한 영향과의 비교 검사를 실시코져 Sprague Dawley (SD) strain rat를 공시동물로 사용하여 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

6주령 전후의 Sprague-Dawley계통 수컷 랫드를 전문 생산업체에서 분양 받아 2주간 휴식을 위해 순화시켜 순화기간 후 건강한 동물만을 실험에 사용하였다. 순화된 8주령의 평균 체중은 120~150 g 전후이었고 12시간씩의 명암주기와 20°C내의 실내온도에서 사육시켰다. 사료는 실험동물 전용 고품사료로, 음수와 급이는 자유 섭식토록 하였다.

### 실험군 및 약물의 투여

실험군에 있어서는 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Wako pure chemical Co. (Japan) 제품을 사용하여 복강내 투여를 실시하였다. AAPH는 생리식염수 1 ml당 40 mg의 농도로 하여 체중 100 gm 당 50 mg (50 mg/100 g B.W.)의 용량으로 하여 투여하였다.

### 임상증상 및 혈청효소 활성치와 혈청 albumin, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), $\alpha$ -fetoprotein의 농도 측정

임상증상에 있어서는 전반적인 외관, 행동, 식욕, 음수량 및 배뇨량에 초점을 두어 배시 관찰하였다.

혈액화학치 분석에서는 Albumin 농도는 BCG법<sup>1</sup>으로, total bilirubin의 농도는 alkaline phosphatase bilirubin blue법<sup>6</sup>으로, blood urea nitrogen (BUN)의 농도는 urease-indolphenol법<sup>2</sup>으로, creatine-kinase (CPK)의 측정은 Kuby-Noda-Lardy의 변법인 creatine 인산기질법<sup>14</sup>으로, lactic dehydrogenase (LDH)의 측정은 LDH-LQ kit (acetic acid matrix method)법으로,  $\alpha$ -fetoprotein (AFP)은 앞서 저자등이 보고한 방법<sup>7</sup>과 같이 homogenized enzyme immunoassay법<sup>16</sup>을 이용하여 측정하였다.

### 실험군 설정 및 시료 채취

실험군 설정은 AAPH 투여군에서는 투여 후 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 그룹별을 원칙으로 하여 실시하였다. 대조군은 AAPH투여 대신 멸균 생리식염수를 동일 용량 투여한 그룹으로 하였다. 시료채취 즉 채혈은 각 시간경과별 그룹당 5마리씩을 사용하였다. 채혈에 있어서는 가벼운 ether마취 하에 안와정맥을 heparinized capillary tube로 채혈한 다음 즉시 원심분리 하여 분석을 실시하도록 하였다. 즉시 분석 못한 경우의 샘플은 분석 전까지 -4°C에 냉동 보관하여 사용하였다.

### 통계 처리 방법

대조군과 각 시간별에 따라 나눈 군들 사이의 결과치는 평균치와 표준 오차로 표기(mean  $\pm$  SE)하고 이들의 차이에 대한 통계 처리는 Duncan의 다중 범위 검정(Duncan's multiple range test)을 이용한 분산 분석(ANOVA)을 시행하여 통계적 차이를 검증하였다( $\alpha=0.05$ ).

## 결 과

### 임상증상

실제적인 정량분석에는 어려움이 있었으나 다소의 행동둔화와 음수량 및 사료섭취량의 감소가 투여 직후부터 나타났으나 그 정도는 이미 보고한  $CCl_4$ 투여군에서 보다는 명확하지 않았다.

장기부검을 통한 육안적 간 조건에서는 뚜렷한 변화(피사등)는 알 수 없었고 간 비대(hepatomegaly)현상도 나타나지 않았다.

### 혈청 albumin, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN) 및 $\alpha$ -fetoprotein의 혈청 농도의 변화

혈청 albumin농도는 대조군에서  $3.4 \pm 0.24$  g/dl, AAPH 투여 2시간 이후에는  $2.3 \pm 0.53$  g/dl, 4시간 후에는  $2.3 \pm 0.41$  g/dl로 낮게 나타났으나 2시간에서부터 8시간까지에서의 변화는 볼 수 없었다. BUN의 경우 대조군에서 23.2 g/dl이었고 투여후 2시간, 4시간, 8시간까지에서는 일정한 변화는 나타나지 않았고 이들 상호간에서의 유의성 역시 인정되지 않았다(Table 1).

Table 1에서와 같이 대조군을 포함한 모든 실험군에서  $\alpha$ -fetoprotein의 passive hemagglutination반응은 모두 음성이었다.

혈청 bilirubin농도는 대조군에서는  $0.2 \pm 0.01$  mg/dl

**Table 1.** Changes of serum albumin, blood urea nitrogen and AFP concentrations after injection of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride into rat

Hours	Concentrations		
	Albumin (g/dl)	BUN (mg/dl)	AFP (ng/dl)
Control	3.4±0.24	23.2±1.48	-*
2	2.3±0.53	23.0±0.92	-
4	2.3±0.41	27.5±0.60	-
8	2.3±0.57	19.5±0.97	-

\*Not detected

**Table 2.** Changes of bilirubin concentration after injection of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride into rats

Group	Hours	Number	Bilirubin
Control	0	5	0.2±0.01 <sup>a</sup>
	2	5	0.7±0.11 <sup>b</sup>
AAPH	4	5	0.9±0.06 <sup>c</sup>
	8	5	1.3±0.22 <sup>d</sup>
	12	5	1.5±0.11 <sup>e</sup>
	24	5	1.8±0.13 <sup>f</sup>
	48	5	2.6±0.12 <sup>g</sup>

이었다. 투여후 2시간 이후 부터 0.7 mg/dl로 증가, 48시간 까지 지속적인 증가를 나타내었다(Table 2). 투여후의 경과별 변동에서 투여 후 2시간 이후부터 48시간까지에서의 각 시간 경과별에 따른 유의성은 물론 대조군과의 차이도 뚜렷하였다(P<0.05).

### 혈청효소 LDH 및 CPK 활성치의 변화

LDH활성치는 대조군에서 885±42.5 IU/L이었으나 AAPH 투여후 2시간 부터 증가함을 알 수 있었으나 (P<0.05) 투여후 4시간, 8시간에서의 유의성은 인정할 수 없었다.

CPK활성치는 대조군에서 0.6±0.12 IU/L이었으며 투여후의 시간별 경과에 있어서 투여후 2시간째에는

**Table 3.** Enzyme Activities of LDH and CPK after injection of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride into rats

Hours	Enzyme activities	
	LDH (IU/L)	CPK (IU/L)
Control	884±42.5	0.60±0.12
2	989±54.9	1.30±0.25
4	1294±66.8	0.04±0.02
8	1095±87.5	0.90±0.17

급격히 상승하였으나 이후에서의 대조군과의 차이는 물론 경과별에 있어서도 대조군과의 차이는 물론 경과별에 따른 변동도 인정되지 않았다(Table 3).

## 고 찰

간의 주된 기능은 역시 간의 총 세포수의 약 65%, 용적의 약 85%를 점유하고 있는 간세포에서 행해지고 있음이 알려져 있어 이들에 대한 기능평가를 위한 기초자료의 일환으로 AAPH를 50 mg/100 g.B.W.의 최저 용량으로 하여 투여한 결과 투여 2시간 이후부터 육안적인 관찰에서도 미세한 변화가 있음을 알 수 있어 간 기능장애가 진행되고 있음을 예측할 수 있었다<sup>7</sup>.

본 연구에서의 혈중 albumin농도의 감소는 투여후 2시간에서 나타났는데 이것은 AAPH로부터 생성된 탄소자유기(carbon radical)는 과산화자유기(peroxyl radical)를 생성하여 CCl<sub>4</sub>과 같이 endoplasmic reticulum에서의 과산화반응을 일으켜 결과적으로 비가역적인 단백질합성 억제에 의한 것으로 생각된다<sup>18-21</sup>. 이와 같은 현상은 췌 등<sup>7</sup>이 앞서 보고한 CCl<sub>4</sub> 투여에서의 결과치와 거의 일치함을 알 수 있었으나 2시간 이후에서의 변화는 뚜렷하지 않아 CCl<sub>4</sub>투여군과는 차이를 나타내었다. Rat를 공시동물로 하여 AAPH를 투여한 보고는 아직까지도 없어<sup>17-18</sup> 어려움이 있으나 투여용량이 매우 낮아 간세포의 재생능력과 연관시켜 볼 필요가 큰 것으로 판단된다.

BUN은 합질소물질의 대사산물로 대개의 경우는 생성속도도 일정하고 주로 신장을 통해 체외로 배설되기 때문에 이들의 농도는 신장 기능장애가 없는 경우는 일정한 것으로 알려져 있어 본 연구결과와 연관시켜 생각해 볼 때 AAPH의 매우 낮은 농도의 투여에서는 예상과는 달리 타장기에의 영향이 명확하지 않아 앞으로 간은 물론 타 장기에 대한 조직학적 검색등이 실시되어야 할 것으로 판단된다<sup>5</sup>.

α-fetoprotein은 실험군 모두에서 대조군에서와 같이 검출되지 않아 rat에서 저자 등이 실시한 CCl<sub>4</sub>의 투여에서와 같이 AAPH의 투여에서도 hepatocarcinogenesis와는 전혀 관련이 없는 것으로 밝혀졌다<sup>4,15-16</sup>.

Bilirubin농도는 대조군과는 뚜렷한 증가를 지속적으로 나타내어 간세포에서의 bilirubin의 처리능력에 문제가 있음을 시사해 주는 좋은 지표로 생각되었고 대조군에서의 성적과 비교하여 볼 때 간세포성 기능장애의 가능성도 크나 AAPH의 특성상 타장기에의 영향도 있을 것으로 판단되어 본 실험에서의 총 bilirubin농도 측정만이 아니고 직접형과 간접형 각각에

대한 분석과 동시에 체계적인 검토가 수반되어야 할 것으로 생각된다<sup>17-18</sup>.

LDH 활성치는 대조군에서는  $88.4 \pm 42.5$  IU/L 이었으나 투여 후 2시간 이후부터는 증가를 나타내어 LDH 함유 기관에서의 영향이 있음을 알 수 있었으나 최근 LDH isozyme의 분획은 장기또는 연령에 따라서 차이가 밝혀져 이들 isozyme에 대한 분석이 뒤따라야 할 것으로 판단되나 LDH 활성치의 증가는 주로 골격근 및 간에서 많이 분포하고 있는 LDH<sub>5</sub>의 상승에 인한 것으로 생각되어 이들 LDH isozyme에 대한 분석이 필요함을 알 수 있었다<sup>7-8</sup>.

CPK 활성치는 대조군과 비교하여 실험군에서 2시간 이후에서는 변동을 볼 수 있었으나 이후에서의 변화는 볼 수 없어서 이것은 골격근, 심근 및 중추신경계의 변화시 나타나는 것으로 알려져 있는 바와 같이<sup>15</sup> 간세포를 포함한 간 손상과는 관련이 없을 것으로 판단된다.

## 결 론

생후 8주령의 Sprague Dawley strain rat (♂)를 사용, 실험적으로 간 기능장애를 유발시키기 위해 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride, AAPH를 체중 100 g당 50 mg의 용량으로 하여 복강내 투여, 검색한 결과 투여 후 2시간부터는 행동의 둔화, 식욕 및 음수량의 점진적인 감소를 나타내었다. 혈중 albumin 농도는 투여 후 2시간 이후 부터는 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었으나 이후에서는 경과별에 따른 변동은 나타나지 않았다. Bilirubin 농도는 투여 후 시간 경과별에 따른 유의성 있는 증가를 나타내었다.

LDH 활성치는 시간 경과에 따른 지속적인 상승을 나타내었으나 CPK 활성치는 시간 경과에 따른 변동은 물론 대조군과도 차이를 나타내지 않았다.

$\alpha$ -fetoprotein은 실험군, 대조군에서 다 같이 검출되지 않았다.

## 참 고 문 헌

- Butler TC. Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissues and tissue constituents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1961; 134: 311-319.
- Chaney AL, Marbach EP. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin Chem 1962; 8: 130-136.
- Daumas BJ, Biggs HG. Determination of serum albumins, standard methods of clinical chemistry. Washington D. C.: American Association for clinical chemistry 1972; 7: 175-188.
- Dawkins MJR. Carbon tetrachloride poisoning in liver of the newborn rat. J Path Bacteriol 1963; 85: 189-196.
- Feingold KR, Siperstein MD. Abnormalities of glucose metabolism in liver disease. In Hepatology: a textbook of liver disease. (Zakim, D., Boyer, T. W. D.) Philadelphia, WB Saunders, 1982; 499.
- Hogg CH, Meites SA. A modification of assay procedure for the micro-determination of total bilirubin. Am J Tech 1959; 25: 281-286.
- 강정부, 이은석, 허주형. 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향 I. 임상증상 및 혈액화학치. Korean J Vet Clin Med 1997; 14(2): 268-272.
- 강정부, 이은석, 허주형. 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)의 투여가 쥐의 간 기능에 미치는 영향 II. 혈청효소 활성치. Korean J Vet Clin Med 1997; 14(2): 273-278.
- Okinaka S. et al.: Serum creatine phosphokinase activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular disease. J Lab Clin Med 1964; 64: 299-305.
- Poli G, Albano E and Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. Chem Phys Lipids 1987; 45: 117-142.
- Poli G, Cheseman KH, Slater TF and Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in CCl<sub>4</sub>-induced damage to liver microsomal enzymes: Comparative studies *in vitro* using microsomes and isolated liver cells. Chem Biol Interac 1981; 37: 13-24.
- Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. Exp Mol Pathol 1968; 9: 271-278.
- Recknagel RO. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. Life sciences 1983; 33(5): 401-408.
- Reynolds ES, Ree HJ. Liver parenchymal cell injury VII: membrane denaturation following carbon tetrachloride. Lab Invest 1971; 25: 269-278.
- Sherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. Biochem Biophysica 1984; 738: 219-236.
- Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature 1976; 263: 702-703.
- Terao K, Niki E. Damage to biological tissue induced by radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. J Free Radicals in Biol Med 1986; 2: 193-201.
- Terao K. Liver injuries induced by free radical. J Toxicol Pathol 1989; 2: 11-18.