

2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향 2. 혈청 효소 활성치

강정부¹ · 김철호* · 손호상
경상대학교 수의과대학(동물의학연구소)
*경상남도 축산진흥연구소

Effects of Administration of 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride(AAPH) on Liver Function in Rats 2. Serum Enzyme Activities

Chung-Boo Kang¹, Cheoul-Ho Kim* and Ho-Sang Son
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 determine the changes of serum enzyme activities in rats with hepatic injury induced by the administration of AAPH. Minor behavioral change, brittleness of skin hair and decreased water and feed intake were observed in rats administered intraperitoneally with AAPH. Serum AST and ALT activities pre-treatment were 65 ± 13.8 and 32 ± 12.6 IU/L, respectively and increased sharply from 2 hours of administration and reached 1248 ± 77.6 and 946 ± 45.6 IU/L, respectively at 48 hours of administration. Serum ALP and γ -GTP activities pretreatment were 221 ± 75.6 and 2.2 ± 0.35 IU/L, respectively and increased sharply from 8 hours of administration and reached 767 ± 44.9 IU/L and 8.0 ± 1.23 IU/L, respectively at 48 hours of administration.

Key word : 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, serum enzyme activity, rat

서 론

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(peroxyl radical)를 생성하여 여러형태의 생물학적 분자와 결합 반응을 일으켜 생체막의 구조를 허물게 하는 것으로 생각되고 있다¹⁷⁻¹⁸. 순환혈액에서 AAPH로부터 생성된 자유기는 순환 혈액과의 직접적인 접촉에 의해 혈액에 있는 고분자물질 도는 세포의 원형질막과 반응할 수 있어 CCl₄, halothane 등의 경우는 주로 간 손상

에 국한되나¹⁻³, AAPH는 모든 장기에 손상을 줄 가능성이 커 이와 같이 서로 다른 기전에 의해 자유기를 유발하는 유발인자(radical sourcer)를 사용하여 간 기능에 미치는 영향을 추구코져 CCl₄를 투여하여 간 기능과 관련이 깊을 것으로 예측된 임상증상 및 혈액화학치⁵, 혈청효소 활성치에 대한 보고⁶, AAPH에 의한 영향과의 비교 검색을 실시코져 임상증상 및 혈액화학치에 대한 보고에 이어 Sprague Dawley (SD) strain rat를 공시동물로 하여 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.

¹Corresponding author.

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 활성치

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

혈청 효소 활성치 측정에는 예비실험 결과에 근거하여 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 Reitman-Frankel방법으로, alkaline phosphate (ALP)는 Kind-King방법⁶으로, γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)는 Orłowski방법⁷으로 각각 측정하였다.

실험군 설정 및 시료 채취

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

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

AAPH를 투여한 군에서의 정량적인 분석은 어려웠으나 다소의 행동 둔화와 음수량 및 사료 섭취량의 감소가 투여 직후부터 뚜렷이 나타났다.

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

예비실험과정에서의 분석을 통해 본 실험과 관련이 깊었던 혈청효소 활성치의 변동은 아래와 같았다.

AST (GOT)활성치의 변화

대조군에서는 평균 65 \pm 13.8 IU/L이었다. AAPH의 50 ml/100 g B.W.의 복강내 투여 2시간 이후에서는 243 \pm 25.5 IU/L로 급격히 증가하기 시작하여 투여 후 4시간째에서는 341 \pm 21.3 IU/L로 상승함을 알 수 있었다. 4시간 이후부터 8시간, 12시간, 24시간 및 48시간째에는 376 \pm 104.8, 482 \pm 108.0, 908 \pm 51.2, 1248 \pm 77.6 IU/L로 지속적인 증가를 나타내었다. 투여 2시간 이후에서 부터는 대조군과의 유의성 인정은 물론이고 이와 같은 현상은 투여 후 48시간 째에 있어서도 같았으며 시간별 그룹간에 있어서의 유의성도 분명하였다 (Table 1 참조).

ALT (GPT)활성치의 변화

ALT의 활성치는 대조군에서는 평균 32 \pm 12.6 IU/L이었다. AAPH 투여 후 2시간째의 ALT활성치는 91 \pm 26.0 IU/L로 급격히 상승함을 알 수 있었다. 투여 후 4시간째에는 111 \pm 15.1 IU/L로 더욱더 상승하여 투여 후 8시간째에는 199 \pm 40.4 IU/L이었으며 투여 후 12시간, 24시간, 48시간째에는 각각 276 \pm 40.9, 301 \pm 12.3, 446 \pm 45.6 IU/L로 나타나 앞서의 AST활성치의 변화와 같이 지속적인 증가를 나타내었다 (Table 2. 참조).

ALT활성치 역시 투여 후 2시간째에는 대조군과의 뚜렷한 차이를 인정할 수 있었으며 ($P < 0.05$) 이는 투여

Table 1. Serum AST activity after injection of AAPH into rats

Group	Hours	Number	AST (IU/L)
Control	0	5	65 \pm 13.8 ^a
	2	5	243 \pm 25.5 ^b
	4	5	341 \pm 21.3 ^c
	8	5	376 \pm 104.8 ^c
	12	5	482 \pm 108.0 ^d
	24	5	908 \pm 51.2 ^e
AAPH	48	5	1248 \pm 77.6 ^f

Table 2. Serum ALT activity after injection of AAPH into rats

Group	Hours	Number	ALT (IU/L)
Control	0	5	32±12.6 ^a
	2	5	91±26.0 ^b
	4	5	111±15.1 ^b
	8	5	199±40.4 ^c
	12	5	276±40.9 ^d
AAPH	24	5	301±12.3 ^d
	48	5	946±45.6 ^e

후 8시간째에는 더욱더 명료하였다. 투여후 12시간 이후 부터 48시간까지에서의 ALT 효소 활성치의 소견에서의 변화는 역시 지속적인 증가를 보여 각 그룹간에서의 유의성 인정은 물론 활성치에서도 뚜렷한 변화를 나타내었다.

ALP 활성치의 변화

대조군에서의 ALP 활성치는 평균 221±75.6 IU/L 이었다. 투여후 2시간째에는 240±27.5 IU/L, 4시간째에는 268±32.5 IU/L로 나타났으나 다소 증가하는 경향은 있었으나 8시간째에는 355±35.5 IU/L로 나타나 대조군과의 뚜렷한 유의성을 인정할 수 있었다(P<0.05). 12시간째에는 399±35.6 IU/L로 다소 증가하는 경향은 있었으나 투여후 8시간째와 12시간째에 있어서의 유의성은 인정되지 않았다. 투여후 24시간째에는 668±85.2 IU/L로 나타나나 대조군과의 차이는 물론 투여후 12시간과도 차이를 볼 수 있었으며 이와 같은 유의성은 48시간째까지도 지속됨을 알 수 있었다 (Table 3. 참조).

γ-GTP 활성치의 변화

대조군에서의 γ-GTP의 효소 활성치는 평균 2.2±0.35 IU/L이었다. 투여후 2시간, 4시간까지는 각각 2.2±1.09

Table 3. Serum ALP activity after injection of AAPH into rats

Group	Hours	Number	ALP (IU/L)
Control	0	5	221±75.6 ^a
	2	5	243±27.0 ^a
	4	5	262±39.3 ^a
	8	5	352±60.6 ^b
	12	5	393±23.7 ^b
AAPH	24	5	663±61.7 ^c
	48	5	767±44.9 ^d

Table 4. Serum γ-GTP activity after injection of AAPH into rats

Group	Hours	Number	γ-GTP (IU/L)
Control	0	5	2.2±0.35 ^a
	2	5	2.0±0.71 ^{ab}
	4	5	2.2±0.45 ^a
	8	5	3.2±1.30 ^{ab}
	12	5	4.0±1.00 ^b
CCl ₄	24	5	7.0±1.00 ^c
	48	5	8.0±1.23 ^c

IU/L, 2.0±0.71 IU/L로 나타나 변화를 볼 수 있었다 (Fig 4. 참조). 투여후 8시간째에는 3.4±0.5 IU/L로 대조군 및 투여후 2시간, 4시간째와의 차이 즉 유의성을 인정할 수 있었다(P<0.05). 투여후 12시간, 24시간, 48시간째에는 4.2±0.84, 7.2±1.09, 9.0±1.58 IU/L로 나타나 지속적인 상승(증가)을 나타내었고 대조군과의 차이는 물론 각 그룹간에서의 차이도 충분히 인정할 수 있었다(Table 4 참조).

고 찰

본 실험에서는 지금까지 보고된 용량과는 달리 예비 실험결과, 임상소견 및 효소 활성치의 변화를 유발하는 AAPH를 체중 100 g당 50 mg의 최저 용량으로 하여 투여한 결과, 다른 보고 내용과 일치하지는 않았으나¹⁵⁻¹⁶ 간 특이성이 있는 효소에서의 뚜렷한 변화는 알 수 있었다.

용량과는 별도로 투여 방법에서는 경구 투여를 실시하고 있는 경우도 많으나¹⁵⁻¹⁶ 본 연구 결과에서는 복강내 투여가 안전하면서도 투여가 용이하였는데 이와 같은 사실은 복강내 macrophage 등의 활성 등과도 관련이 깊은 것으로 생각된다^{5,6}.

투여 용량은 대개의 경우가 본 실험군에서의 마우스에서의 투여량 보다 높게 투여한 결과¹⁶라 정확히 비교하기에는 어려움이 많으나 혈중 AST와 ALT의 활성치는 간 손상을 나타내는 지표로서 가장 널리 활용되고 있는데 설치류에서도 이와 같은 경향은 뚜렷하였다⁶. ALT 활성치는 간 특이성이 높지만 AST는 간에는 물론 심장, 골격근, 신장 및 뇌에도 분포하고 있어 특이성에서는 고려해 볼 필요가 있겠으나 이들의 동시 분석은 의미가 큰 것으로 생각된다⁶. ALT 활성치는 AAPH 투여에서만이 아니고 chloroform, acetaminophen을 포함한 다른 화학제에 의한 간세포의 괴사에서도 상승하는 것으로 알려져 있어 진단 지표상 신중을 요

하나 권장될 AST활성치는 투여후 2시간 이후부터, ALT활성치 역시 투여후 2시간 이후부터 지속적인 증가를, 48시간째에는 검출한계에 이르러 여기에 대한 보다 더 정확한 검증을 위해서는 병리조직학적인 검색이 수행되어야 할 것으로 판단된다¹²⁻¹⁴.

ALP활성치는 골질환, 간 및 담도질환 중 특히 폐쇄성 황달 즉 담즙정체를 알려주는 민감한 검사법으로 알려져 있고⁶ 본 실험에서도 투여후 4시간까지에서는 큰 변화를 나타내지 않아 담즙정체와는 무관한 것으로 생각된다. 투여후 8시간 이후부터는 지속적인 증가를 나타내어 간세포의 이물 처리능력이 크게 저해되고 있음을 알 수 있었다.

ALP역시 isozyme에 따라 임상적 의의가 달라 肝毒性 폐쇄성 황달 등의 중요한 지표로 되어 있는 ALP₁ isozyme을 포함한 분석이 있어야 될 것으로 생각된다⁶.

γ -GTP활성치는 보고자에 따라 차이가 있으나 ALP활성치와 마찬가지로 급성간염에서는 물론 만성 간염에서의 진단가치도 높은 것으로 생각되며 본 연구결과에서도 지속적인 상승을 나타내어 진단적 가치가 매우 높은 것으로 판단되어 앞으로는 free radical의 정량과 동시에 이들에 대한 체계적인 분석으로 AAPH가 생체에 미치는 영향을 구체적으로 규명해야 될 것으로 판단된다.

결 론

8주령의 Sprague Dawley rat (♂)를 공시동물로 하여 AAPH를 50 mg/100 g B.W.로 하여 복강내 투여 1회를 실시하여 투여후 48시간까지에서의 혈청효소 활성치의 변화에서 AST (GOT)활성치는 대조군에서는 평균 65 ± 13.8 IU/L로 정상범위이었으나 투여후 2시간 이후부터 증가하기 시작하여 8시간 이후부터는 상승이 최대치에 도달함을 알 수 있었다.

ALT (GPT)활성치 역시 AST활성치와 비슷하였으나 ALT활성치는 투여후 8시간까지에서의 변동은 AST활성치 변동보다 뚜렷하였다.

ALP활성치는 투여후 4시간까지에서는 뚜렷한 증가를 인정할 수 없었으나 투여후 8시간 이후부터는 지속적인 증가를 나타내었으며 γ -GTP활성치 역시 사염화탄소 투여후 4시간까지에서는 뚜렷한 차이를 볼 수 없었으나 투여 8시간 이후부터는 지속적인 증가를 보여 급성 및 만성 간기능장애에서의 혈청효소활성치의 분석은 간기능장애의 진행정도, 예후판정 등에도 크게 활용가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Brattin WJ, Glende EAJR, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radic Biol Med* 1985; 1(1): 27-33.
2. 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.
3. Dawkies MJR. Carbon tetrachloride poisoning in liver of the newborn rat. *J Path Bacteriol* 1963; 85: 189-196.
4. 강정부, 이은석, 허주형. 사염화탄소(CCl₄)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향 I: 임상증상 및 혈액화학치. *Korean J Vet Clin Med* 1997; 14(2): 268-272
5. 강정부, 이은석, 허주형. 사염화탄소(CCl₄)의 투여가 쥐의 간기능에 미치는 영향 II. 혈액효소활성치. *Korean J Vet Clin Med* 1997; 14(2): 273-278
6. Kind PRN, King EJ. Estimation of plasma alkaline phosphate by oleteramination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *J clin pathol* 1954; 7: 322-326.
7. Naftalin L, Sexton M, Tracey D. A routine procedure for estimating serum gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Clin Chem Acta* 1963; 26: 293-304.
8. Poli G, Albano E and Dianzani MU. The role of lipid reoxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 117-142.
9. Poli G, Cheseman KH, Slater TF and Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in CCl₄-induced damage to liver microsomal enzymes : Comparative studies *in vitro* usiry microsomes and isolated liver cells. *Chem Biol Interac* 1981; 37: 13-24.
10. Rao KS, Recknagel RO. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 271-278.
11. Rechnagel RO. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life sciences* 1983; 33(5): 401-408.
12. Reynolds ES, Ree HJ. Liver parenchymal cell injury VII: membrane denaturation following carbon tetrachloride. *Lab Invest* 1971; 25: 269-278.
13. Sherer E. Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophysica* 1984; 738: 219-236.
14. Solt DB, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 702-703.
15. 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.
16. Terao K. Liver injuries induced by free radical. *J Toxicol pathol* 1989; 2: 11-18.