

간장독성에서 니트릭 옥시드의 양면적 효과

박창원 · 조대현 · 홍성렬** · 한정환* · 이항우**

식품의약품안전청, *성균관대학교 약학대학, **성균관대학교 유전공학과

(Received October 23, 1998)

Biphasic Effects of Nitric Oxide in Liver Toxicity

Chang Won Park, Dae Hyun Cho, Sung Youl Hong**,
Jeung Whan Han* and Hyang Woo Lee**

Korea Food & Drug Administration, *College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,

**Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University

Abstract—The liver expresses a considerable amount of nitric oxide (NO) upon induction with cytokines or/and endotoxin. The NO synthesized by inducible NO synthase (NOS) of the liver seems to play a role in various hepatic physiological processes. Here we investigate the effects of NO on acetaminophen (AA)-induced liver injury. The treatment of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP, exogenous NO donor) at the dose of 0.1 mM decreased AA-induced hepatotoxicity suggesting the possibility of NO to play a role in protection from the hepatotoxicity induced by AA. On the other hand, the excessive NO produced by NO donor (SNAP: 0.5, 2.5, 6.25 mM) has been shown to cause a concentration dependent hepatotoxicity, and such damage was decreased by superoxide and increased by superoxide dismutase, indicating that the hepatotoxicity induced by excessive NO depends on balancing between NO and superoxide. Taken together, the results indicate that NO has biphasic effects on hepatotoxicity.

Keywords □ Nitric oxide, superoxide, hepatotoxicity, acetaminophen.

최근 Nitric oxide(NO)는 생물학적 활성을 지닌 것 중 가장 작은 분자량을 갖고 있는 물질로서 생체 내에서 확산을 통하여 세포나 조직에 작용하며, 매우 불안정하여 안정화된 최종 산물인 nitrate(NO_3^-)와 nitrite(NO_2^-)로 신속히 변환된다.¹⁾ 또한 NO는 불안정성으로 인하여 좀더 안정화된 물질로 활성을 나타내기 위해서 혈장 내의 알부민과 결합하여 S-nitroso-adduct를 형성함으로써 체내에서 생물학적 활성을 갖기도 한다.²⁾

NO는 간장에서 여러 가지 작용을 갖고 있으며, 그 중 발암성 nitrosamine의 형성,^{3,4)} mitochondrial aconitase활성도의 감소,^{5,6)} cytochrome P-450 활성도의 저해,⁷⁾ cyclic GMP 합성과 분비 증가⁸⁾ 및 단백질 합성 감

소^{9,10)} 등이 보고되어 있다.

간장이외에서의 NO의 독성학적 측면에서 보면, NO는 대기오염물질로서 혹은 담배연기의 구성 성분으로 폐장에서 폐부종, 폐출혈 등을 유발시킨다.^{11,12)} 또한 감염 세포에서 NO는 장기적으로 높은 농도가 생성될 경우 DNA 손상,¹³⁾ 유전자변이 및 염색체 이상을 유발하며,^{14,15)} 그밖에 NO는 superoxide와 결합하여 더 반응성이 있는 peroxynitrite 음이온을 생성한다.¹⁶⁾

상기 서술한 NO의 독성학적인 작용과는 반대로 NO는 허혈조직상해를 차단하고,¹⁷⁾ 위궤양 치료에 도움을 주며,¹⁸⁾ 방사선에 대한 독성과,¹⁹⁾ 심근 괴사를 감소시키며 또한 내피세포 기능저하도 차단하는 유익작용을 나타내기도 한다.²⁰⁾ 또한 최근의 시험관^{21,22)} 및 생체내 실험^{23,24)}을 이용한 연구에 의하면 간장에서의 NO는 간독성을 경감시키는 작용을 갖고 있는 것으로 여겨지고

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7702 (팩스) 0331-290-7722

있다.

한편 NO는 P450 heme 성분에 결합이 용이하기 때문에 간장에서 약물 대사에 중요한 역할을 하고 있는 cytochrome P-450 효소 활성도를 감소시킨다.^{7,25)} 이러한 효과 때문에 이 효소에 의해 대사되어 독성을 나타내는 물질의 경우 독성이 있는 대사물질의 감소로 간에서 보호 효과를 나타낼 수 있다.

또한 이러한 NO의 유해성 및 유익성은 superoxide, hydroxyl radical 및 peroxynitrite 등 free radical과 밀접한 관련성이 있는 것으로 여겨지고 있다. NO는 superoxide와 결합하여 superoxide의 독성을 차단하는 chemical barrier로서의 역할을 수행할 수 있으며, chinese 햄스터 폐장 섬유아세포(V79 cell)를 이용한 모델에서는 NO가 superoxide나 hydrogen peroxide에 의한 세포독성효과를 현저히 감소시켜 NO가 hydrogen peroxide를 매개로 하는 세포 손상이나 사망에 대해 보호 역할을 수행한다고 보고하였다.²⁶⁾ 이와는 반대로 외래물질(xenobiotic)대사에 의해 세포 상해를 유발하는 superoxide는 NO와 빠르게 반응하므로 포유동물세포에서 또 다른 가능성 있는 독성물질이며 반응성 높은 peroxynitrite 음이온을 생성하기도 한다. 이 radical은 생리적인 pH에서 nitrate로 빠르게 전환되지만 상피 세포에서 단백질의 sulfhydryl기를 산화시켜 상해를 유발시킴으로써 NO의 독성 작용을 강하게 하는 역할을 할 것으로 사료된다.^{27,28)} 더욱이 peroxynitrite는 다시 분해되어 좀 더 반응성이 있는 hydroxyl radical 이나 lipid peroxidation의 활성물질인 nitrogen dioxide radical로 분해되어 독성을 나타낼 수도 있다.^{29,30)} 또한 내피세포에서 hydroxyl radical 이나 superoxide에 의해 NO의 독성이 증가 되었으며,³¹⁾ 농약인 paraquat에 의한 폐독성에서 NO합성 저해제들에 의해 독성감소가 용량 의존적으로 감소되었다.³²⁾ 이와같이 여러 가지 NO의 역할 중에서 간장에서의 NO의 유익성 및 유해성과 관련된 대부분의 연구는 superoxide 등 free radical과 관련되어 있을 수 있다.

따라서 본 실험에서는 acetaminophen(AA)을 간독성 유발물질로 사용하여 이에 대한 간독성에 미치는 NO의 간보호 영향을 관찰하였으며, 또한 NO의 독성학적 역할을 조사하기 위해 NO donor를 이용한 과량의 NO생성이 독성에 미치는 영향을 관찰하였다. 그리고 이러한 NO의 독성이 superoxide와 어떠한 관련성이 있는지 관찰하기 위해 superoxide를 시험관내에

서 생성시키거나 superoxide scavenger인 superoxide dismutase(SOD)를 생체내에서 직접 투여하였을 때의 상관관계를 규명코자 하였다.

실험방법

실험동물 및 시약

식품의약품안전청 독성연구소에서 사육한 생후 5~6 주령의 건강 상태가 양호한 특정 병원체 부재(specific pathogen free, SPF) SD계 수컷 흰쥐(250±20 g)를 실험에 사용하였으며, 간세포 분리에 사용된 배지 및 완충액은 모두 세포분리용(cell culture) 시약을 사용하였고, 기타 시약은 모두 특급을 구입하여 실험에 사용하였다. 또한 생체내 실험에서 NO의 양을 최대도 증가시키기 위해 사용된 heat-killed *Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)의 제조는 ATCC No. 6919를 구입하여 혐기 상태에서 배양하여 중탕으로 heat-killed 하고 건조하여 사용하였다.

간세포의 분리

간세포는 SD계 수컷 흰쥐를 사용하여 분리하였으며, 마취 개복 후 간문맥에 카테터를 삽입, 전관류 완충액(HBSS 9.52 g/l, HEPES 2.4 g/l, EGTA 0.19 g/l, NaHCO₃ 0.35 g/l pH 7.4)을 2 ml/min 속도로 관류하였으며, 관류 즉시 대동맥, 대정맥을 동시에 절단하여 혈액을 충분히 제거하고 혈액의 방류가 끝나면 collagenase buffer base 200 ml당(HBSS 9.52 g/l, HEPES 2.4 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0.74 g/l, NaHCO₃ 0.35 g/l pH 7.4) collagenase 50 mg을 첨가한 용액을 관류하였다. 관류가 완료되면 조심스럽게 절개하여 washing buffer 용액에 넣고 분산시킨 다음 mesh에 여과하였으며, 여과액을 50 g에서 1분 동안 원심분리(3회 반복)하여 세포 현탁액을 얻었다. 분리된 간세포는 collagen-coated well에 골고루 분산시켰으며, 배지는 William's medium E를 사용하였다. 일정량의 간세포를 cell well에 접종한 후 4시간 후에 새 배지로 교환해 주었으며, 24시간 후 다른 배지로 다시 교환해 주었고 교환 배지에는 검체가 포함되게 하였다. 간세포는 48 well에 5×10⁵ cell/well이 포함되게 하였다.

LDH 활성도 측정

분리한 간세포에서 검체를 포함한 배지로 교환하고

LDH 측정 시간대에 cell well를 천천히 교반 후 배지의 일정량을 취하고 원심분리하여 부유간세포를 제거하고 lactate dehydrogenase(LDH) kit(Sigma DG-1340K, St. Louis, USA)를 이용하여 340 nm에서 NADH의 소실량을 1분간 spectrophotometer로 측정함으로써 그 효소의 활성도를 측정하였다.

간세포 생존율 측정(MTT assay)

Boeringer Mannheim(Cat. No. : 1465 007, Mannheim, Germany) MTT assay kit를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 실험방법은 MTT labelling 시액을 최종농도 0.5 mM로 하고 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 동량의 solubilization 용액을 가하고 배양기에서 하루 방치하여 595 nm의 ELISA reader로 간세포의 생존율을 측정하였다.

NO의 측정

시험관내 실험에서 NO정량은 nitrite의 양을 Griess시액을 사용하여 비색 정량함으로써 NO 생성량으로 같음하였다. 시험관내 시험에서의 NO측정은 검체를 처리한 후 측정 시간대에 배지의 일정량을 취하여 동량의 Griess시액(2% phosphoric acid에 1% sulfanilamide와 0.1% naphthylethylenediamine 함유)을 가하고 540 nm의 ELISA reader를 이용하여 NO₂⁻의 양을 M의 단위로 계산하였다. 생체내 실험에서의 NO측정은 NO₃⁻를 nitrate reductase를 사용하여 NO₂⁻로 전환시켜서 NO의 생성량을 측정하면 보다 정확한 NO의 생성량을 관찰할 수 있다. 따라서 흰쥐를 이용한 혈액 및 간조직의 세포질 분획에서의 NO함량 측정방법은 다음과 같이 개선하여 실시하였다.

반응 혼합물(0.14 M KH₂PO₄(pH 7.5) 400 µl, 12.5 mM NADPH 8 µl, distilled water 325 µl, sample 250 µl)를 37°C에서 5분간 preincubation 후 3.5 U/ml nitrate reductase 17 µl를 가하고 20분간 incubation 한 후 0.5 M NaOH에 있는 0.42 M zinc sulfate 250 µl를 가하여 반응을 종결시키고 11,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 단백질을 제거시킨 후 상등액을 일정량 취하여 동량의 Griess 시액을 가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청분리 및 간조직의 분획화

부검시 ether마취 후 신속히 개복하여 복대동맥에서

혈액을 최대한으로 채혈하였으며, 채취된 혈액은 응고할 때까지 방치하고 즉시 4000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 사용할 때까지 냉동고에 보관하였다. 방혈된 간조직은 적출 즉시 액체질소에 보관하였으며, 사용할 때에 0°C에서 녹여 분획화 하였다. 세포질 분획은 NOS 활성도를 측정하는데 사용하였다.

NOS 활성도 측정

액체 질소에 보관한 간조직을 사용시 0°C에서 녹여 일정량을 취한 후 50 mM Tris 완충액(0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 M leupeptin, 1 M pepstatin : pH 7.4) 4 volume을 가한 후 균질화하고, 간조직 내에 존재하고 있는 arginine을 제거하기 위해 Dowex suspension I (Dowex-50W, Na⁺ form : 50 mM Tris buffer, pH 7.4=1 : 1(v/v)) 1/4 volume을 가하였다. 세포질 분획을 분리하기 위해 Contron T-2000 ultracentrifuge를 사용하여 105,000×g로 1시간동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 NOS의 활성도를 측정하는데 사용하였다.

세포질 분획은 Bio-Rad 단백질 정량 kit를 사용하여 단백질의 양을 측정하고 그 농도를 10 mg/ml로 균일하게 하여 이를 효소원으로하여 2 mM CaCl₂, 1 mM NADPH, 1 µg calmodulin, 33 M [2,3,4,5-³H]-L-arginine을 가하고 전체반응 혼합물의 양은 150 µl로 하였다. 이 혼합물을 37°C에서 10분간 incubation한 후 Dowex suspension II(Dowex-50W, Na⁺ form : 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 1 mM citrulline, 2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA 포함=2 : 1(v/v)) 1 ml을 가해 반응을 종결시켰다. 11,000×g에서 5분간 원심분리한 후 그 상등액 300 µl를 취해 scintillation vial에 넣고 Bray's 용액 5 ml를 가한 후 liquid scintillation counter로 방사선 동위원소량을 측정하였으며, blank는 반응 혼합물에서 효소원 대신 50 mM Tris buffer(pH 7.4)를 사용하였다. NOS의 활성도는 1 mg protein에서 1분당 생성되는 citrulline의 pmole로 나타내었다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 자동혈액 생화학분석기(RA-XT : Technicon, New York, USA)를 이용하여 ALT 및 AST의 활성을 측정하였다.

통계 처리

통계학적 처리는 student's t-test를 사용하여 유의성을 검정하였으며 모든 수치는 평균 표준편차로 표시하였다. 또한 유의 수준은 P<0.05에서 대조군과 비교하였다.

실험결과

Acetaminophen에 의한 간독성에 미치는 NO의 영향

NO donor인 S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP)를 이용하여 시험관내에서 NO를 생성시키고 NO scavenger인 Carboxy-PTIO를 이용하여 NO의 작용을 차단하였을 때 acetaminophen(AA)의 간세포 독성에 미치는 영향을 관찰하였다. NO의 생성이 SNAP+AA 병용 처치군의 경우, AA 단독 처치군에 비해 약 6배 정도(22.0 M)로 증가되었으며, 이러한 조건하에 독성지표인 배지내로 방출된 LDH의 활성도는 오히려 AA 단독 처치군에 비해 약 23% 감소하였다. 이와는 반대로 NO scavenger인 Carboxy-PTIO를 추가 처치하였을 때 다시 배지내로 방출된 LDH의 활성도가 증가되었다.

또다른 간세포독성의 지표인 생존율을 측정된 결과, 대조군의 생존율을 100으로 환산하고 각 처치군을 비교하였을 때, AA 단독 처치군은 59.3%, AA와 SNAP 병용 처치군은 71.4%, AA, SNAP와 Carboxy-PTIO 병용 처치군은 65.3%의 생존율을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 배지내로 방출된 LDH 활성도와 세포 생존율 측정 결과와 같이 NO donor를 첨가한 AA 처치군이 AA 단독 처치군에 비해 독성이 낮았다(Table I).

또한 과량의 NO가 독성이 있는 지를 관찰하기 위하여 SNAP를 6.25, 2.5, 0.5, 0.1 mM의 농도로 간세포를 분리 배양한 plate에 가한 후, 방출된 NO의 양을 Griess 시액으로 측정하였을 때, NO의 발생이 농도 의존적이었으며(data not shown), 동시에 SNAP 처치에 의한 간세포의 생존율을 측정하기 위해 실시한 MTT assay는 0.1 mM SNAP를 처치한 군에서는 대조군과 유사한 생존율이 확인되었으나, 0.5, 2.5, 및 6.25 mM SNAP를 처치한 군에서는 처치 후 1시간부터 생존율이 급격히 저하되었다(Table II).

SNAP의 농도를 독성용량인 0.5 mM로 증가시켜 AA에 의한 독성을 감소시킬 수 있을 지를 관찰하여 본

Table I— Effects of NO produced from 0.1 mM SNAP on AA-induced hepatotoxicity

Group	Hepatocyte		
	NO production (Nitrite, μ M)	LDH (U/L)	Cell viability (% of control)
Control	5.39 \pm 0.82	90.5 \pm 17.8	100.0 \pm 15.5
AA	3.85 \pm 0.81	133.4 \pm 22.9*	59.3 \pm 13.7*
AA+SNAP	22.0 \pm 1.80*	102.8 \pm 15.5	71.4 \pm 20.9
AA+SNAP+Carboxy PTIO	22.9 \pm 1.65*	152.8 \pm 30.5*	65.3 \pm 17.0

Isolated rat hepatocytes were co-treated with acetaminophen (AA, 4 mM), S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP, 0.1 mM), Carboxy-PTIO (5 μ M) for 24 hr at 37°C in 95% O₂/5% CO₂. NO₂⁻ and LDH released into medium were assayed in conditioned medium (see Methods). Values represent means \pm SD. Significantly different from control group (*p<0.05).

Table II— The change of hepatocyte viability by the treatment with various concentration of SNAP

Time (hr)	Cell viability (% of control)			
	6.25	2.5	0.5	0.1
1	28.7 \pm 5.01*	42.6 \pm 17.6*	29.7 \pm 3.94*	89.6 \pm 14.33
7	30.6 \pm 2.00*	74.7 \pm 31.3	44.0 \pm 7.33*	127.3 \pm 30.66
23	35.1 \pm 0.39*	47.9 \pm 10.8*	50.0 \pm 17.6*	105.4 \pm 16.89
28	35.3 \pm 0.02*	40.0 \pm 6.84*	73.2 \pm 28.4	102.1 \pm 23.68
30	43.8 \pm 1.17*	45.6 \pm 7.02*	57.9 \pm 16.37*	101.8 \pm 10.00

Isolated rat hepatocytes in primary culture were incubated with SNAP (0.1, 0.5, 2.5 and 6.25 mM) for indicated time at 37°C in 95% O₂/5% CO₂. MTT dye solution (BM 1465007) was added to the each plate with the final concentration 5 mg/ml and cultured further 4 hr. Solubilization solution was added to each plate and left overnight in the incubator to dissolve insoluble purple crystal. The optical density was read plate on ELISA reader using a test wavelength of 595 nm. Values represent means \pm SD. Significantly different from control group (*p<0.05).

Table III—Effects of NO produced from 0.5 mM SNAP on AA-induced hepatotoxicity

Group	LDH (U/L)	Cell viability (% of control)
Control	147.7±18.0	100.0±23.0
2 mM AA	185.7±41.0	68.2±7.3*
2 mM AA+0.5 mM SNAP	324.7±48.2*	22.9±4.2*
4 mM AA	212.2±23.0*	53.7±6.8*
4 mM AA+0.5 mM SNAP	433.3±50.0*	20.3±0.5*

Isolated rat hepatocytes in primary culture were incubated with increasing concentration of acetaminophen (AA, 2 and 4 mM), SNAP (0.5 mM) for 24 hr for LDH assay or for 7 hours for MTT assay. LDH was assayed in conditioned medium. MTT dye was added to the each plate with the final concentration 5 mg/ml and cultured further 4 hr. Acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) was added to each plate and mixed thoroughly to dissolve insoluble blue formazan crystal. The optical density was read plate on ELISA reader using a test wavelength of 570 nm. Values represent means±SD. Significantly different from control group (*p<0.05).

결과, AA의 농도에 상관없이 AA 단독 처치군보다 SNAP 병용 처치군 모두에서 간세포의 생존율이 낮았으며, 0.1 mM의 SNAP에서 처럼 AA에 의한 간독성에 독성경감효과는 없었다(Table III).

이상의 결과로 0.1 mM의 SNAP에 의해 생성되는 NO가 AA의 독성을 감소시켰으나, 0.5 mM SNAP의 농도, 즉 독성 용량으로 처치하고 AA의 농도를 2 mM 과 4 mM로 처치한 군에서는 NO가 AA에 의해 유도되는 독성을 감소시키지 못하고 오히려 AA의 단독 처치군의 독성을 증가시켰다. 그러므로 NO의 농도가 AA의 독성에 보호 역할을 수행하는 지는 NO의 농도에 의존할 것으로 여겨진다.

NO의 간독성에 미치는 Oxygen Radical 관련성

NO가 superoxide와 결합하여 간독성에 어떠한 영향

Table IV—Effects of oxygen radical scavenger on NO-induced hepatotoxicity (SNAP 0.5 mM)

Group	LDH (U/L)
Control	170.9±23.0
SNAP	203.3±25.0
SNAP+SGS	153.8±20.0
SNAP+SGS+SOD	175.9±22.0

Isolated rat hepatocytes in primary culture were incubated with SNAP (0.5 mM), superoxide dismutase (SOD 5 U/ml media) and superoxide generating system (SGS: hypoxanthine 0.5 mM+xanthine oxidase 0.08 U/ml media) at 37°C in 95% O₂/5% CO₂. LDH was measured as described in Table I. Values represent means±SD.

Significantly different from control group (*p<0.05).

을 미치는 지를 관찰하기 위해 NO donor로서 SNAP를 사용하였다. 또한 superoxide를 생성시키기 위하여 효소를 통한 인위적인 방법(superoxide generating system, SGS)을 사용하였다.

Superoxide는 0.5 mM의 hypoxanthine 및 xanthine oxidase 0.08 U/ml를 반응하여 생성시켰으며, 또한 superoxide scavenger인 superoxide dismutase(SOD)를 추가투여하여 간독성을 측정하였다. 0.5 mM의 SNAP 단독 처치군은 대조군에 비해 간독성이 상승한 반면, SNAP와 SGS를 병용 처치한 군에서는 SNAP 단독 처치군보다 유의성있게 LDH가 감소하였다. 이러한 SGS 병용 투여에 의한 간보호 효과는 superoxide scavenger인 SOD의 병용처치에 의해 감소하였다(Table IV).

이상의 결과로 NO donor를 이용한 외인성 NO와 SGS에 의하여 인위적으로 superoxide를 생성시켜 NO와 superoxide가 간독성에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였을 때 0.5 mM SNAP 처치에 의한 NO의 독성은 superoxide에 의해 감소하였다. 따라서 NO의 독성 용량에서는 superoxide가 NO의 독성을

Table V—The changes of endogenous NO production and hepatotoxicity induced by AA and/or NNA in heat-killed *P. acnes*+LPS model

	NOS Activity	Nitrite (µM)		ALT (U/L)	AST (U/L)
		Serum	Cytosol		
Control	11.2±1.68	5.4±0.34	1.0±0.11	40.5±6.36	74.0±5.65
<i>P. acnes</i> +LPS	37.8±12.9*	75.3±5.30*	62.4±24.65*	361.0±78.24*	2820.0±561.7*
<i>P. acnes</i> +LPS+NNA	26.2±8.85*	67.7±10.10*	46.0±6.78*	475.0±25.45*	3375.0±500.0*

Heat-killed *Propionibacterium acnes* given I.V. at 25 mg/kg, lipopolysaccharide (LPS, 4 mg/kg, I.V.) and N-nitro-L-arginine (NNA, 30.69 mg/kg, I.V.) were injected 5 days following treatment with heat-killed *P. acnes*. Blood and liver tissue were obtained 3 hours after LPS and NNA injection. Each value represents the means±SD (n=5). Significantly different from control group (*p<0.05).

차단하는 것으로 사료되며, 서로 free radical의 성격을 상호 차단하는 것으로 보인다.

또한 SD계 흰쥐를 이용하여 내독소 (heat-killed *Propionibacterium acnes* (P. acnes) + LPS)에 의해 유도되는 내인성 NO 및 superoxide가 NO 합성 저해제인 N^G-nitro-L-arginine(NNA)의 투여로 NO의 생성이 저하되었을 때의 독성을 비교 관찰하였다.

대조군에 비해 내독소 투여군에서는 NOS의 활성도 및 NO의 생성이 증가하였으며, 그에 대한 독성도 증가하였다. 이러한 내독소 투여에 의한 간독성의 증가는 NOS의 저해제인 NNA를 병용투여에 의해 오히려 더 증가하였다. 그러므로 NO와 superoxide의 불균형은 어떠한 경우에도 독성을 증가시키는 것으로 여겨지고 있다(Table V).

고 찰

본 실험에서는 NO donor인 SNAP를 이용하여 0.1 mM의 SNAP에 의해 생성되는 NO의 역할을 간세포를 이용한 시험관내 실험에서 관찰하여 본 결과, AA의 독성용량인 4 mM에서 0.1 mM SNAP의 병용치치로 AA에 의한 독성이 감소하였다. 또한 NO scavenger인 Carboxy-PTIO를 처치하였을 때 간독성이 오히려 증가하여 NO가 AA의 간독성을 감소시키는 인자임을 동시에 확인하였다.

그러나 superoxide(O₂⁻)와 NO의 결합으로 생성되는 peroxynitrite 음이온은 생리적인 pH에서 NO₃⁻로 빠르게 전환되지만 상피세포에서 단백질의 sulfhydryl기를 산화시킴으로써 상해를 유발한다고 이미 보고되었다.²⁷⁾ 그 밖에 NO는 대부분의 세포에서 세포독성(cytotoxic)이 있고,³³⁾ 과량의 NO 생성은 septic shock과 관련된 간괴사를 유도 할 수 있음이 보고되어,³⁴⁾ NO의 독성유발물질로서의 작용에 대한 연구도 수행되어지고 있다.

이러한 보고는 간장을 비롯한 장기 및 세포에서 NO가 독성에 직·간접적으로 관여함을 보고한 내용들로 본 실험에서도 NO의 독성학적 의미에 대해서도 동시에 고찰하였다. 먼저 과량의 NO를 SNAP를 이용하여 농도별(0.1, 0.5, 2.5, 6.25 mM)로 처치하여 간독성을 평가한 결과, NO가 AA의 간독성에 보호역할 작용을 하는 농도인 0.1 mM의 SNAP를 제외하고 그 이상의 농도에서는 농도 의존적인 세포독성이 있었다. 또한

0.5 mM의 SNAP를 사용하여 AA의 독성에 보호작용이 있는지의 여부를 확인하기 위하여 AA에 의한 간독성을 측정하여 본 결과, 시험관내 실험에서 독성지표인 LDH의 양이 AA의 농도에 상관없이 AA 보다 모두 높은 것으로 관찰되었다. 이로써 SNAP의 농도가 0.5 mM에서는 자체적으로 독성을 유발하는 농도일 것이라 추정되었으며, NO의 농도가 AA의 독성에 보호 역할을 수행하는 지는 NO의 농도에 의존할 것으로 추정할 수 있었다.

따라서 NO가 독성학적으로도 관련성이 있음을 동시에 확인하였으며, 이러한 독성은 세포내에서 생성되는 oxygen radical과 어느 정도 관련성이 있을 것으로 사료된다.

NO가 oxygen radical과 관련성이 있음을 밝힌 보고에 의하면 Volk등³¹⁾은 간장내피세포를 이용하여 *in vitro*에서 reactive oxygen과 nitrogen species와의 상관관계를 관찰한 결과, superoxide와 NO를 동시에 생성하는 3-morpholinosydnonimine-N-ethylcarbamide(SIN-1)의 독성은 H₂O₂를 제거하는 catalase의 처치로 감소되었으며, 또한 H₂O₂는 SNAP(1 mM), sodium nitroprusside(5 mM)에 의한 독성을 증가시키며, 이러한 독성은 catalase가 가해졌을 때 경감되었다. 이와같이 H₂O₂ 생성을 저하시켰을 때 NO의 독성이 감소하는 경향은 NO와 H₂O₂의 상호작용으로 인하여 반응성이 높은 hydroxyl radical이나 singlet oxygen이 발생되거나 혹은 nitrosonium 양이온(NO⁺)이 H₂O₂와 반응하여 peroxynitrite가 발생한다고 보고되었다. 그러나 다른 보고에 의하면 사람의 백혈구를 이용하여 실시한 실험에서 NO는 여러 가지 질병의 원인물질인 superoxide anion의 scavenger로서 세포독성이 있는 free radical에 대한 chemical barrier로서 작용할 뿐만 아니라,³⁵⁾ NO는 superoxide와 반응함으로써 superoxide의 독성을 저해할 수도 있다는 보고도 있으므로,²⁸⁾ NO가 oxygen radical의 독성을 차단하는 scavenger로의 역할도 수행함을 추정할 수 있었다.

상기 서술한 바와 같이 NO의 독성학적 측면에서 상반된 보고가 있음에도 간세포는 손상을 주는 radical들을 생산해내는 주요 세포일 것으로 추정되어 NO와 oxygen radical과의 관련성을 본 실험에서 알아보고자 하였다. 그 결과 NO donor인 독성용량인 0.5 mM SNAP와 superoxide generating system(SGS)를 병용 처치한 군에서는 SNAP 단독 처치군보다 독성이

감소하였다. 또한 SNAP+SGS+SOD를 병용 처치한 군에서는 SNAP+SGS 병용 처치군보다 다시 증가하는 경향을 보였다. 따라서 NO의 독성 용량에서 superoxide는 NO의 독성을 증가시키지 않으며, 오히려 superoxide를 제거하였을 때 독성이 증가하였다. 따라서 NO의 독성은 superoxide와의 균형과 관련있을 것으로 추정된다.

또한 heat killed *P. acnes* 및 LPS를 이용하여 NO 및 superoxide의 생성을 유도한 후 NO합성효소 저해제인 NNA를 투여하여 NO의 합성을 저해하였을 때 독성이 증가 경향이 있어 시험관내 실험과 유사하게 NO와 superoxide와의 불균형에 따른 독성이 상호 의존적인 것으로 사료된다.

결 론

Acetaminophen(AA)으로 간독성을 유발시킨 후 NO donor를 이용하여 NO가 어떠한 영향이 있는지 여부를 시험관내 실험을 통하여 관찰함과 아울러 NO의 발생정도에 따른 독성학적 의미를 oxygen radical과 연관시켜 확인하고자 하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1) NO donor로 0.1 mM의 SNAP를 사용하여 발생한 외인성 NO는 AA에 의한 간세포 독성 경감작용이 있음을 시험관내 실험에서 관찰할 수 있었다. 그러나, 0.5 mM 이상의 SNAP는 간세포에서 독성이 있는 것으로 관찰되었으며, 0.5 mM 이상의 SNAP는 AA의 간독성을 오히려 증가시켰다. 따라서 NO의 간독성 경감작용은 NO의 농도와 관련성이 있을 것으로 추정할 수 있었다.

2) SNAP의 독성용량(0.5 mM) 및 내독소 투여로 NO의 독성이 superoxide와의 관련성이 있는지 여부를 알아보기 위하여 관찰한 결과, NO와 superoxide의 불균형은 NO 혹은 superoxide의 독성을 상호 증가시킬 것으로 추정된다.

문 헌

- 1) Snyder, S. H. and Brecht, D. S. : Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. May, 28 (1992).
- 2) Keane, J. F., Simon, D. I., Stamler, J. S., Jaraki, O., Scharfstein, J., Vita, J. A. and Loscalzo, J. : Nitric oxide forms an adduct with

serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J. Clin. Invest.* **91**, 1582 (1992).

- 3) Ohshima, H., Tsuda, M., Adachi, H., Ogura, T., Sugimura, T. and Esumi, H. : L-arginine-dependent formation of N-nitrosamines by the cytosol of macrophages activated with lipopolysaccharide and interferon- γ . *Carcinogenesis*, **12**, 1217 (1991).
- 4) Wu, Y., Brouet, I., Calmels, S., Bartsch, H. and Ohshima, H. : Increased endogenous N-nitrosamine and nitrate formation by induction of nitric oxide synthase in rats with acute hepatic injury caused by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide administration. *Carcinogenesis*, **14**, 7 (1993).
- 5) Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Hofmann, K. and Simmons, R. L. : Hepatocytes produced nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J. Exp. Med.* **170**, 1769 (1989).
- 6) Pittner, R. A. and Spitzer, J. A. : Endotoxin and TNF α directly stimulate nitric oxide formation in cultured rat hepatocytes from chronically endotoxemia rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 430 (1992).
- 7) Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W. A., Brill, T., Siewert, R., Grein, H. and Doehmer, J. : Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3559 (1994).
- 8) Billiar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stadler, J., Williams, D. L., Ochoa, J. B., DiSilvio, M., Simmons, R. L. and Murray, S. A. : The association between the synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **262**, 1077 (1992).
- 9) Billiar, T. R., Curran, R. D., Stuehr, D. J., West, M. A., Bentz, B. G. and Simmons, R. L. : An L-arginine-dependent mechanism mediates kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J. Exp. Med.* 1467 (1989).
- 10) Curran, R. D., Ferrari, F. K., Kispert, P. H., Stadler, J., Stuehr, D. J., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. : Nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis.

- FASEB J.* **5**, 2085 (1991).
- 11) Amdur, M. O. : Air pollutions. In *Casarett and Doull's toxicology*. Macmillan, New York. p. 608 (1980).
 - 12) Menzel, D. B. and McMcellan, R. O. : Toxic responses of the respiratory system. In *Casarett and Doull's toxicology*. Macmillan, New York. p. 246 (1980).
 - 13) hshima, H. and Bartsch, H. : Cronic infection and inflammatory processes as cancer risk factor : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253 (1993).
 - 14) Arroyo, P. L., Hatch-Pigott, V., Mower, H. F. and Cooney, R. V. : Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat. Res.* **281**, 193 (1992).
 - 15) Isomura, K., Chikahira, M., Teranishi, K. and Hamada, K. : Induction of mutations and chromosome aberrations in lung cells folloeing in vivo exposure of rats to nitrogen oxides. *Mutat. Res.* **136**, 119 (1984).
 - 16) Esumi, H. and Tannenbaum, S. R. : U.S.-Japan cooperative cancer research program : seminar on nitric oxide synthase and carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**, 297 (1994).
 - 17) Gambassi, F., Pistelli, A., Di Bello, M. G., Lupini, M., Mannaioni, P. F. and Masini, E. : Ischemia-reperfusion injury and histamine release in isolated perfused guinea pig heart : effects of nitric oxide generator. *Pharmacol. Res.* **25**, 11 (1992).
 - 18) Konturek, S. J., Brzozowski, T., Majka, J., Pytko-Polonezyk, J. and Stachura, J. : Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcer. *Eur. J. Pharmacol.* **239**, 215 (1993).
 - 19) Liebmann, J., DeLuca, A. M., Coffin, D., Keeper, L. K., Venzon, D., Wink, D. A. and Mitchell, J. B. : In vivo radiation protection by nitric oxide modulation. *Cancer Res.* **54**, 3365 (1994).
 - 20) Siegfried, M. R., Erhardt, J., Rider, T., Ma, X. and Lefer, A. M : Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 668 (1992).
 - 21) Kuo, P. C. and Slivka, A. : Nitric oxide decreases oxidant-mediated hepatocyte injury. *J. Surg. Res.* **56**, 594 (1994).
 - 22) Kuo, P. C., Slivka, A., Wilmore, D. and Loscalzo, J. : Exogenous delivery of nitric oxide. a novel treatment for toxin-mediated hepatocyte injury. *Surg. Forum* **44**, 53 (1993).
 - 23) Billar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stuehr, A. J., Demetris, A. J. and Simmons, R. D. : Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo : N^G-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J. Leukocyte Biol.* **48**, 565 (1990).
 - 24) Harbrecht, B. G., Billiar, T. R., Stadler, J., Demetris, A. J., Ochoa, J. B., Curran, R. D. and Simmons R. L. : Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Critical Care Med.* **20**, 1568 (1992a).
 - 25) Khatsenko, O. G., Gross, S. S., Rifkind, A. B. and Vane, J. R. : Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11147 (1993).
 - 26) Wink, D. A., Hanbauer, I., Krishna, M. C., Degraff, W., Gamson, J. and Mitchell, B. : Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9813 (1993).
 - 27) Rengasamy, A. and Johns, R. A. : Inhibition of nitric oxide synthase by superoxide generating system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 1024 (1993).
 - 28) Beckmann, J. S., Beckmann, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. : Apparent hydroxy radical production by peroxyxynitrite : implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620 (1990).
 - 29) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
 - 30) Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. : Peroxynitrite oxidation of sulfhydryl. The cytotoxic potential of superoxide and nitric

- oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244 (1991).
- 31) Volk, T., Ioannidis, I., Hensel, M., Degroot, H. and Kox, W. : Endothelial damage induced by nitric oxide : synergism with reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 196 (1995).
- 32) Berisha, H. I., Pakbaz, H., Absood, A. and Said, S. I. : Nitric oxide as a mediator of oxidant injury due to paraquat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7445 (1994).
- 33) Hibbs, J. B. Jr, Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. : Nitric oxide : a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87 (1989).
- 34) Fox, E. S., Broitman, S. A. and Thomas, P. : Biology of disease : bacterial endotoxins and the liver. *Lab. Invest.* **63**, 733 (1990).
- 35) Rubanyi, G. M., Ho, E. H., Cantor, E. H. Lumma, W. C. and Botelho, H. P. : Cytoprotective function of nitric oxide : inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1392 (1991).