

피부화상에 의한 간 조직의 oxygen free radical 생성계 효소와 해독계 효소의 활성변화

대구보건대학 물리치료과
김 한 수
영남대학교 생물학과
조 현 국
대구보건대학 물리치료과
김 상 수
경희 한방병원
배 주 한
대구대학교 재활과학대학원 물리치료전공
서 현 규

Changes of Activities of Oxygen Free Radical Generating and Scavenging Enzymes in Rat Liver Induced by Scald Burn Injury

Kim, Han-Soo, P.T.

Department of Physical Therapy, Taegu Health College

Cho, Hyun - Gug

Department of Biology, Yeungnam University

Kim, Sang - Soo, P.T.

Department of Physical Therapy, Taegu Health College

Bae, Ju - Han, P.T.

Kyung-Hee Oriental Hospital

Seo, Hyun - Kyu, P.T.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

< Abstract >

The effects of scald burn injury (40-45% of total body surface area), there were not inhalation and secondary infection, on the histological changes and the levels of oxygen free radical generating and scavenging enzymes have been determined in liver tissue of rat models. It was found that dermal epithelium was left out with edema of dermis layer and hydropic swelling of hepatocytes. Burn injury increased liver weight (L.W./B.W.) and serum aspartate aminotransferase content (pThe data of this study suggest that liver damage induced by scald burn injury leads to dysbalance of oxygen free radical generating and scavenging enzymes.

I. 서론

피부화상은 혈관으로부터 간질(interstitial space)로 체액과 단백질이 유출되어 심한 부종을 일으키게 된다. 하지만 이러한 부종이 단시간 내에 화상 그 자체만으로 부패성이 증대되었다고 보기에는 그 기전을 설명하는데 부족함이 매우 많다(Tanaka 등, 1999; Lund 등, 1989). 이러한 까닭으로 화상에 의해 유도되는 behind mechanism을 밝히기 위한 연구들이 이루어졌으며, 그로 인해 연발되는 타장기에 미치는 파급효과에 대해서 많은 논란이 되어 왔다. 그렇지만 MODS (multiple organ dysfunction syndrome)는 화상에 있어서 대단히 중요한 의미를 가지는데(Baric와 Hydo, 1996; Aikawa, 1996), Huang 등(1998)은 화상환자의 28.1%에서 MODS가 유발되며, MODS 유발환자의 사망률은 78-98%에 이른다고 하였다. 간 또한 예외의 장기가 될 수 없으며, 심한 화상으로 인해 간손상이 야기되지만(Huang 등, 1998) 다른 장기에 비해 비교적 적게 다루어져 왔다. 하지만 MODS가 산화적 손상에 의한 이차적 결과(Burton 등, 1995; Li 등, 1989)로 유도된다는 것으로 볼 때 간조직 내의 효소계 변화는 화상과 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 실험은 원인에 scald burn injury를 유도시킨 다음 피부조직의 손상에 이차적으로 유도되는 간조직 내 oxygen free radical의 생성계 효소와 해독계 효소의 활성 변화를 알아보고, 이러한 활성변화 그 자체가 간 손상을 유도할 수 있는지에 대해 검토해 보자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물의 화상 유발 및 처치

실험동물은 체중 300g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 ketamine hydrochloride로 마취시킨 다음, 동쪽의 털을 깎고(40-45% of TBSA: total body surface area) 100℃ 물로 5-6초간 데인 후 각각 5시간 후, 24시간 후에 처치하였다. 동물의 처치는 일중 변동을 고려하여 일정시간에 실시하였고, ether 마취 하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사시킨 후, 피부조직과 함께 4℃ 생리식염수로 간문맥을 통하여 간을 관류하여 간 내에 남아있던 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출된 간은 생리 식염

수를 가능한 모두 제거한 다음 무게를 측정하였으며, 효소활성도 측정 및 조직학적 검사에 사용하였다. 채취한 혈액은 실온에 30분간 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 혈청을 얻어 생화학적 활성측정에 사용하였다.

2. 효소시료의 조제

적출한 간 일부를 취하여 1g 당 4ml의 0.25M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 초원심분리기로 fractionation하여 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻었다.

3. 효소활성의 측정

혈청: Aniline aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 활성 측정은 Reitman과 Frankel(1957)의 방법에 준해 조제된 kit를 사용하였으며, 단위는 혈청 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

간조직: Xantine oxidase(XO) 활성도 측정은 xantine을 기질로 하여 30℃에서 20분간 반응시켜 생성된 uric acid를 292nm에서 흡광도를 측정하는 Stirpe와 Della Corte(1969)의 방법으로 하였다. 효소의 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분동안 반응하여 기질인 xantine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다. 과산화물 함량(lipid peroxide)은 Ohkawa 등(1979)의 방법에 준하였다. 즉 효소 시료 속의 과산화지질물 산성 조건하에서 thiobarbituric acid 용액과 가열 반응시켜 생긴 물질을 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 단위는 조직 1g 당 nmole MDA로 표시하였다. Glutathione peroxidase(GPx) 활성도 측정은 Paglia와 Valentine(1967)의 방법에 준하였다. Glutathione 기질과 조효소인 NADPH를 시료와 함께 25℃에서 5분 동안 반응시켜 340nm에서 흡광도의 변동을 측정하였다. 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분동안 산화시킨 NADPH 양을 nmole로 표시하였다. Glutathione S-transferase(GST) 활성도 측정은 Habig 등(1974)의 방법에 준하였다. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB)과 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate 양을 340nm에서 측정하였다. 활성도 단위는 효소반응액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분동안 반응하여 생성시킨 conjugate의 양을

nmole로 나타내었다. Mitochondria 분획의 catalase 활성도 측정은 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 240nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수($0.041\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 간조직 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안에 반응하여 감소시킨 H_2O_2 양을 nmole로 표시하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정은 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin 등(1987)의 방법에 준해 0.1mM EDTA가 함유된 50mM 인산완충액(pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시켜 생성된 hematein을 560nm에서 측정하여 효소의 활성을 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않고 반응시킨 액 중의 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다. Reduced glutathione(GSH)의 함량측정은 Ellman(1959)의 방법에 준하였다. 간조직 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5ml를 가하고 원심분리한 후, 상등액 일정량을 0.1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)함유 0.1M 인산완충액(pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol을 측정하였다. GSH 함량은 간조직 g 당 μmol 로 표시하였다.

4. 광학현미경 관찰

간과 피부의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 편저로부터 조직 적출 즉시 10% neutral buffered formalin에 고정



Figure 1. Photograph of skin tissue at 24 h after scald burn injury in rats, H & E, $\times 200$. Apical surface (arrow) of tissue was not epithelial cells, because the epithelium with a few dermal connective tissue was left out. The cells consisted of hair root were necrosis (arrowhead), and dermal edema was found.

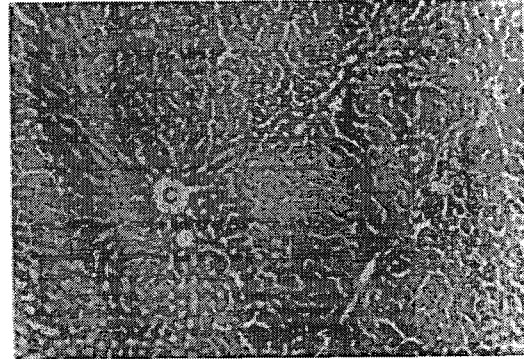


Figure 2. Photograph of liver tissue in normal rats, H & E, $\times 100$. The tissue structure was intact. C : central vein, P : portal triads

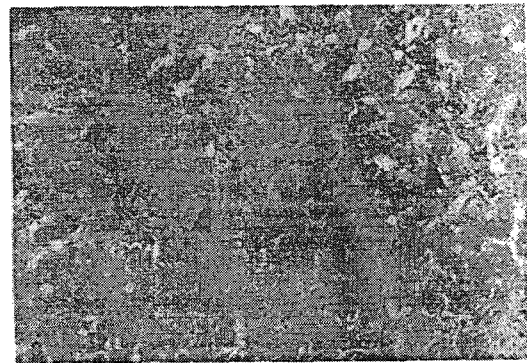


Figure 3. Photograph of liver tissue at 24 h after scald burn injury in rats, H & E, $\times 200$. The volume of hepatocytes was increased, which had hydropic swelling (arrowheads) in their cytoplasm,

시키고, 고정이 끝난 조직을 흐르는 물에 수세한 다음 순차적으로 농도가 증가되는 alcohol로 탈수하여 파라핀 포매하였다. 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편하여(Lipshaw, model-45) hematoxylin과 eosin으로 염색한 다음 광학현미경(Olympus, BH-2)으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. 조직학적 변화

화상에 의한 피부조직의 변화를 관찰하였다(Fig. 1). 화상부의 상피조직(epithelium)은 대부분 탈락되었고, 진

피내 결합조직들은 심한 부종현상으로 삼유다발의 구분이 어려웠다. 진피층 내에서 보이는 모낭 상피세포들은 심한 세포질 부종과 함께 피사를 일으킨 세포들도 관찰되었다. 피부화상 유발 후 간조직의 변화는 5시간 군과 24시간 군 모두 유사한 소견을 보였다. 피부화상군(Fig. 3)은 세포체적이 증가되었으며, 세포질 내 hydropic swelling 현상이 관찰되었다.

2. 장기중량과 혈청 내 aniline aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST)의 활성변동

피부화상의 결과 간의 중량과 혈청 내 ALT, AST의 활성변동 결과는 Table 1과 같다. 화상 후 채증당 간무게의 비율은 5시간군과 24시간군 모두 정상군과 비교하여 점진적으로 증가되었다. 화상 후 5시간군에서 4.77%, 24시간군에서 14.95% ($p<0.05$) 증가되었다. 혈청 중의 ALT 활성은 정상군과 비교하여 화상 후 5시간군이 86.01% 증가되었고, 24시간군이 107.89% ($p<0.05$) 증가되었다. AST의 활성 또한 화상에 의해 증가되었는데, 5시간군이 140.99% ($p<0.05$), 24시간군이 155.17% ($p<0.05$) 각각 증가되었다.

3. 간조직 중의 glutathione(GSH)과 lipid peroxide(LPO)의 함량변동

간조직 중의 GSH와 LPO의 함량변동은 Table 1과 같다. 간조직 중의 GSH와 LPO는 모두 화상 후 5시간군에서 감소되었다가 24시간군에서 증가되는 양상을 보였다.

GSH는 5시간군 ($p<0.01$)과 24시간군 ($p<0.01$) 모두에서 감소되었고, LPO는 5시간군에서 정상군과 비교하여 18.40% 감소되었으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

4. 간조직 중 oxygen free radical 생성계의 해독계 효소의 활성변동

간조직 중 oxygen free radical 생성계 효소와 해독계 효소의 활성변동은 Table 2와 같다. XO의 활성은 정상군과 비교하여 차이를 보이지 않았다. SOD의 경우 화상 후 24시간군에서 11.57% 증가되었고, catalase는 5시간군에서 7.11%, 24시간군에서 24.74% ($p<0.05$) 감소되었다. GPx의 활성은 각 군간의 활성차이는 거의 보이지 않은 반면 GST의 경우 약간의 변화를 보였는데, 정상군과 비교하여 화상 후 5시간군에서는 16.68% 증가되었으나 24시간군에서는 오히려 0.59% 감소되어 나타났다.

IV. 고 찰

화상에 의한 순환계 내 변화는 oxidative hemolysis의 증가, SOD와 적혈구의 GSH와 같은 혈장 내 항산화물질이 감소되며, 지질과산화에 의한 malondialdehyde (MDA) 함량이 크게 증가된다(Bekyravo 등, 1997). 이러한 SOD의 감소와 MDA의 증가는 burn toxin의 염증반응으로 oxygen radical이 증가되고, 이로 인해 peroxidation이 증가되었기 때문으로 보고 있다(Ceinkale 등, 1997). 또한 피부화상은 산화 적혈구의 양을 감소시키고(Herdon과 Traber, 1990), 심한 화상은 폐

Table 1. Changes of liver weight per body weight (L.W./B.W., %), serum aniline aminotransferase, serum aspartate aminotransferase, hepatic glutathione and lipid peroxide contents in dermal scald burn-injured rats

Parameters	Groups	Control	Burn	
			5 h	24 h
L.W./B.W.(%)		3.104 ± 0.058	3.252 ± 0.093	3.568 ± 0.127*
Serum ALT ¹⁾		34.73 ± 0.73	64.60 ± 25.21	72.20 ± 21.43
Serum AST ¹⁾		43.50 ± 0.58	104.83 ± 21.42*	111.00 ± 20.08*
GSH ²⁾		0.105 ± 0.008	0.044 ± 0.002**	0.061 ± 0.002**
LPO ³⁾		0.0163 ± 0.0009	0.0133 ± 0.0003	0.0167 ± 0.0003

Each value represents the mean ± S.E.

* : Significantly different from control group ($p<0.05$)

** : Significantly different from control group ($p<0.01$)

Unit : 1) Karmen unit/ml, 2) μ moles/g of tissue, 3) nmole MDA/g of tissue

Table 2. Hepatic oxygen free radical generating and scavenging enzymes induced by dermal scald burn injury

Parameters	Groups	Burn		
		Control	5 h	24 h
XO ¹⁾		1.862±0.236	0.859±0.371	1.589±0.127
SOD ²⁾		27.82±2.65	27.22±2.65	31.04±2.43
CAT ³⁾		70.14±6.01	65.15±5.38	52.79±1.49*
GPx ⁴⁾		24.47±0.93	24.55±1.78	23.46±0.60
GST ⁵⁾		482.29±47.50	562.75±25.22	479.46±35.32

Each value represents the mean±S.E.

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

Unit : 1) nmoles uric acid formed/mg protein/min, 2) unit⁶⁾/mg protein (⁶⁾: 50% inhibition of autoxidation of hematoxylin), 3) nmoles H₂O₂ reduced/mg protein/min, 4) NADPH oxidized nmoles/mg protein/min, 5) 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate nmoles/mg protein/min

조직의 허혈성 손상을 유도한다(Huang 등, 1998)고 하여 피부화상에 의한 일차적인 원인은 모두가 산화적 손상에 의해 야기되었다는 점을 부인할 수가 없다. 따라서 일차적인 순환계의 산화적 손상은 여러 경로를 통해 타장기에 이차적인 손상을 주게 되는데, 본 실험에서는 이차적인 염증으로 인한 손상(Cetinkale 등, 1999) 이전에 간조직 내 oxygen free radical의 생성계 효소와 해독계 효소의 변화가 간손상을 초래할 수 있을 것인지에 대해 검토하였다.

본 실험에서 나타난 체중당 간무게의 비율에 있어서 화상 유발 후 시간이 경과함에 따라 증가되는 것으로 나타났고, 혈청 내 ALT와 AST가 증가되었을 뿐만 아니라 조직학적 관찰에서 간세포의 체적증가와 수반된 hydropic swelling 현상은 화상으로 인한 간손상이 유도되었음을 증명해 주고 있다. 이러한 사실은 화상 후 간조직 내 물의 함유량이 증가(Huang 등, 1999)되는 현상으로 보아 간세포 자체의 산화적 손상이 야기되어 세포막의 물질 투과장벽에 손상이(Youn 등, 1998) 일어났을 것으로 추측할 수 있다. 이러한 추측은 간조직 중 GSH의 함량감소와 catalase 활성 감소와 밀접히 관계 있는 것으로 나타났다. 이것은 free radical의 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 간손상이 유발된 것으로(Chow와 Tappel, 1974; Leibovitz와 Siegel, 1980) 본 실험 결과에서는 oxygen free radical 생성계 효소인 XO의 활성과 다른 해독계 효소들의 활성 변동이 없는 반면 catalase의 활성이 현저히 감소되었고(Youn 등, 1998), 또한 GSH의 함량이 급속히 감소됨(Youn 등, 1998; Sabeh 등, 1995)으로 보아 생성된 free radical에 대한 해독계의 기능감소에 의해

간손상이 유발된 것으로 사료된다.

최근 화상의 일차적 산화적 손상에 의해 이차적으로 호중구의 축적(Burton 등, 1995), 백혈구 기능이상에 의한 cytokine dysbalance(Peter 등, 1999)와 같은 염증을 매개로 MODS가 유발된다는 보고들이 많다. 하지만 본 실험 결과들을 통하여 볼 때 피부화상은 면역반응과 관계된 이차적인 염증반응에 선행되어 간조직 자체의 free radical 생성계와 해독계 효소간의 불균형을 초래시켜 간조직 자체적으로 손상이 유발될 수 있음을 강력히 시사하고 있으며, 이러한 장기 자체의 손상으로부터 항산화제를 투여함으로써 손상을 감소시킬 수 있다는 실험들(Tanaka 등, 1999; Cetinkale 등, 1999)이 본 실험결과들을 뒷받침해 주고 있다. 결론적으로 피부화상에 의해 간조직은 자체적으로 산화적 손상이 유발되며, 그 원인은 간조직 중 glutathione의 함량과 catalase 활성의 감소에 기인된 것으로 사료된다.

V. 결 론

흡입, 이차적 감염없는 피부화상이 간손상을 유발시키는지를 알아보기 위해, 원경에 40-45% TBSA의 scald burn injury를 유도한 다음, 피부와 간의 병리조직학적 관찰과 간조직 내 oxygen free radical 생성계, 해독계 효소의 활성변화를 관찰하였다. 관찰 결과 화상 후 피부조직은 상피층의 탈락과 진피층의 부종현상이 관찰되었으며, 간조직은 간세포 체적의 증가와 hydropic swelling 현상, 그리고 체중당 간무게의 비율이 증가되었고, 혈청 내 AST의 활성이 증가되었다. 간조직 내 XO의 활성변화는

없었으나, glutathione의 함량이 감소되었고 catalase의 활성이 감소되었다.

이러한 결과들을 종합해 볼 때 피부화상은 간조직 내 oxygen free radical 해독계 효소의 활성 감소로 인한 산화적 손상이 초래되었음을 시사해 주고 있다.

<참 고 문 헌>

- Aebi H : Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis" (H.U. Bergmeyer, eds.). Academic Press, New York., Vol. 2, pp. 673-684, 1974.
- Aikawa N : Cytokine storm in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome associated with surgical insults. *J Jpn Surg Soc*, 97 : 771-777, 1996.
- Baric PS and Hydo LJ : Influence of multiple organ dysfunction syndrome on duration of critical illness and hospitalization. *Arch Surg*, 131 : 1318-1324, 1996.
- Bekyarova G, Yankova T and Marinov M : Lipofuscin product accumulation, insufficient antioxidant defence in erythrocytes and plasma and enhanced susceptibility to oxidative haemolysis after thermal trauma. *Acta Chir Plast*, 39(2) : 60-64, 1997.
- Burton LK, Velasco SE, Patt A, Terada LS, et al : Xantine oxidase contributes to lung leak in rats subjected to skin burn. *Inflammation*, 19(1) : 31-38, 1995.
- Cetinkale O, Belco A, Konukoglu D, et al : Evaluation of lipid peroxidation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal injury. *Burns*, 23(1) : 37-42, 1997.
- Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O, et al : Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns*, 25 : 105-112, 1999.
- Cetinkale O, Senel O and Bulan R : The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns*, 25 : 113-118, 1999.
- Chow CK and Tappel : Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J Nutri*, 104 : 444-451, 1974.
- Ellman GL : Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*, 82 : 70-77, 1959.
- Habig WH, Pabist MJ and Jakoby WB : Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249 : 7130-7139, 1974.
- Herdon DN and Traber DL : Pulmonary circulation and burns and trauma. *J Trauma*, 12 Suppl : S41-S44, 1990.
- Huang Y-S, Yang Z-C, Liu X-S, et al : Serial experimental and clinical studies on the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in severe burns. *Burns*, 24 : 706-716, 1998.
- Leibovits BE and Siegel BV : Aspects of free radical reaction in biological system : Aging. *J Gerontol*, 35 : 45-56, 1980.
- Li LS : Experimental study on lung injury following severe burn. Early changes in function and hemodynamics and morphologic changes in the lung of dogs with burns. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih*, 5(3) : 216-218, 1989.
- Lund T, Onarheim H and Wiig H : Mechanisms behind increased dermal inhibition pressure in acute burn edema. *Am Physiol Soc*, 256 : H940-H948, 1989.
- Martin JP, Dailey M and Sugarman E : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch Biochem Biophys*, 255(2) : 329-336, 1987.
- Ohkawa H, Ohish N and Yaki K : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95 : 351-355, 1979.
- Paglia ED and Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70 : 158-169, 1967.
- Peter FW, Schuschke DA, Barker JH, et al : The effect of severe burn injury on proinflammatory cytokines and leukocyte behavior : its modulation with granulocyte colony-stimulating factor. *Burns*, 25 : 477-486, 1999.
- Reitman S and Frankel S : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol*, 28 : 8, 1957.
- Sabeh F, Baxter CR and Norton SJ : Skin burn injury and oxidative stress in liver and lung tissues of rabbit models. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33(6) : 323-328, 1995.

Stripe F and Della Corte E : The regulation of rat liver xantine oxidase. *J Biol Chem*, 244(14) : 855-863, 1969.

Tanaka H, Lund T, Wiig H, et al : High dose vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally

injured rats. *Burns*, 25 : 569-574, 1999.

Youn YK, Suh GJ, Jung SE, et al : Recombinant human growth hormone decreases lung and liver tissue lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats. *J Burn Care Rehabil*, 19(6) : 542-548, 1998.