

## 저산소 및 산소재도입시 vitamin C와 E가 간장 약물대사 기능에 미치는 영향

윤기욱 · 이상호 · 이선미<sup>#</sup>

성균관대학교 약학대학

(Received March 10, 2000)

### Effects of Vitamins C and E on Hepatic Drug Metabolizing Function in Hypoxia/Reoxygenation

Ki-Wook Yoon, Sang-Ho Lee and Sun-Mee Lee<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do 440-746

**Abstract** — Liver isolated from 18 hours fasted rats was subjected to N<sub>2</sub> hypoxia (for 45 min) followed by reoxygenation (for 30 min). The perfusion medium used was Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH 7.4, 37°C). Vitamin C (0.5 mM) and trolox C (0.5 mM), soluble vitamin E analog, were added to perfusate. Lactate dehydrogenase (LDH), total glutathione, oxidized glutathione, lipid peroxide and drug-metabolizing enzymes were measured. After hypoxia LDH significantly increased but this increase was attenuated by vitamin C and combination of vitamin C and E. Total glutathione and oxidized glutathione in perfusate markedly increased during hypoxia and this increase was inhibited by vitamins C, E and its combination. Similarly, oxidized glutathione and lipid peroxide in liver tissue increased after hypoxia and reoxygenation and this increase was inhibited by vitamin E and combination of vitamin C and E. Hepatic drug metabolizing function (phase I, II) were suppressed during hypoxia but improved during reoxygenation. While vitamins C and E only increased glucuronidation, the combination of vitamin C and E increased the oxidation, glucuronidation and sulfation. Our findings suggest that vitamins C and E synergistically ameliorates hepatocellular damage as indicated by abnormalities in drug metabolizing function during hypoxia/reoxygenation and that this protection is in major part, caused by decreased oxidative stress.

**Keywords** □ N<sub>2</sub> hypoxia/reoxygenation, drug metabolizing enzymes, vitamin C, trolox C.

최근 간경화 말기환자와 간암환자의 유일한 수술요법으로 수행되고 있는 간 이식의 시행에 있어 수술과정시 수반되는 허혈 및 재관류로 인한 간세포 기능변화와 이를 조절하는 약물개발에 관심이 모아지고 있다. 여러 연구에 따르면 활성산소가 허혈 및 재관류시 일어나는 세포조직 및 모세혈관손상의 주원인이며,<sup>1)</sup> 이런 활성산소의 원천은 주로 xanthine oxidase반응에 의한다고 한다.<sup>2)</sup> 또한 활성산소에 의한 손상은 그 자체뿐 아니라 간장 미세순환계의 Kupffer cell과 호중구를 활성화

시켜 그 손상을 더욱 가중시킨다.<sup>3-5)</sup>

비타민은 극미량으로 생명유지와 체내 대사활성을 조절하며 과거에는 비타민 결핍시에 이를 보충하는 소극적 의미로 사용되었으나, 근래에는 만성질환에 대한 예방 및 치료제로서의 역할이 속속 발표되고 있다. Vitamin C는 천연의 야채, 과일 등에 널리 분포하는 수용성 항산화제로서 알려져 있으나 일부 용량 및 체내 조건변화에 따라 항산화제와 전산화제로 작용한다.<sup>6)</sup> 반면 vitamin E는 지용성 천연 항산화제로 활성산소의 공격으로 인한 과산화지질의 생성을 억제하여 세포막 보호에 뛰어난 효과를 나타낸다.<sup>7)</sup>

간은 생체내 산소 소모율의 20%를 차지하므로 산소

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0331-290-7712 (팩스) 0331-290-7732

량에 매우 민감하며 영양상태에 따라 그 손상정도도 상이하다. 즉 당분해 작용이 일어나 에너지가 공급되는 저산소상태에서도 잘 견디지만, glycogen이 고갈된 경우 저산소 자체 혹은 저산소 및 산소재도입으로 인한 조직손상에 더욱 민감하다.<sup>8-10)</sup> 또한 간은 인체내 가장 큰 선(gland)으로서 담즙분비, 약물대사, 합성, 저장 등 그 기능이 매우 다양하므로 세포손상시 간기능의 비일률적(non-uniform) 변화가 예측된다.

따라서 본 연구에서는 간장구조를 그대로 유지하여 간장기능 변화만을 살펴볼 수 있는 적출관류간 모델을 이용하여 저산소 및 산소재도입시 간조직 손상정도 와 간장기능 중 약물대사효소계의 변동을 살펴보고 vitamin C 와 E를 처치하여 이들 각각의 항산화효과 와 병용효과를 알아보려고 하였다.

### 실험방법

실험동물 체중 250 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 제일상사로 부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 연구실 동물 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후, 일반상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 실험 동물은 실험 18시간 전에 절식시켰으며 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

**시약** - Ascorbic acid(vitamin C) sodium salt, LDH kit, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), 7-ethoxycoumarin,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate( $\beta$ -NADPH) sodium salt, sulfatase 및 vitamin E의 analog인 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid(trolox C)은 Sigma-Aldrich(U.S.A)사로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외는 국내 일급시약을 사용하였다.

**약물 투여** - Vitamin C와 수용성 vitamin E analog인 trolox C는 각각 0.5 mM의 농도로 Krebs Henseleit Bicarbonate buffer(KHBB, pH 7.4, 37°C)에 녹여 저산소상태가 시작될 때에 관류액과 함께 관류시켰다.

**시험군** - 시험군은 정상 적출 관류간 시험을 수행한 군을 대조군으로 하고, 저산소 및 산소재도입군, vitamin C와 E 0.5 mM 단독 처치후와 각 0.5 mM 농도로 병용처치후 저산소 및 산소재도입을 시킨군 등 모두 5군으로 나누어 시행하였다.

**적출 관류간** - 18시간 절식시킨 흰쥐에 pentobarbital sodium(40 mg/kg)을 복강내로 주사하여 마취시킨 후, 개복하여 관상정맥을 묶고 간문맥에 polyethylene catheter(PE-190)를 삽입한 후 일정속도(4 ml/g liver/min)로 관류시켰다. 이어 즉시 하대정맥을 잘라주고, 신장 윗부분의 하대정맥을 결찰한 뒤 간을 적출하여 perfusion block에 옮겼다. 이때 약물대사효소계 측정을 위해서 관류액은 7-ethoxycoumarin(EC) 50  $\mu$ M의 기질이 함유된 KHBB액을 사용하였다. 관류하는 동안 산소 혼합 가스(O<sub>2</sub>:95%, CO<sub>2</sub>:5%)를 KHBB액에 지속적으로 주입하여 간세포에 산소를 공급하였고 모든 관류액은 37°C로 유지시켰다. 적출한 간조직은 안정된 생리적 조건을 유지하기 위해 perfusion block에 옮긴 다음 처음 20분간은 KHBB액을 관류시켜 간을 평형화시켰다. 저산소는 간장에 nitrogen-carbon dioxide mixture(95:5) 가스를 산소 혼합 가스 대신 주입하여 관류시킴으로써 유발하였다. 45분간의 저산소 상태 후 정상 관류속도로 KHBB액에 산소 혼합 가스를 30분간 재도입하여 관류실험을 마쳤다. 평형기간과 저산소 및 산소재도입기간에 각각 15분마다 관류액을 받아 이화학적 검사를 실시하였고 관류를 마친 간을 균질화하여 분석에 이용하였다.

**관류액내 LDH 활성도** - 관류액내 lactic acid dehydrogenase(LDH)는 Sigma kit(Cat. No. #228-50 Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를 사용하여 각각 표준 흡광법으로 측정하였다.

**관류액 및 간조직내 총 glutathione(GSH) 및 GSSG량** - 총 glutathione량은 Brehe 와 Burch의 방법<sup>11)</sup>으로 GSH에 의해서 생성된 thionitrobenzoic acid (TNB)의 양을 412 nm에서 흡광도를 측정하였고, glutathione disulfide(GSSG)는 2-vinyl pyridine으로 reduced glutathione 을 먼저 차단 시킨후 위와 동일한 방법으로 측정하였다.<sup>12)</sup>

**간장내 지질 과산화** - 간장내 지질 과산화는 Masugi 와 Nakamura의 방법<sup>13)</sup>에 준하여 thiobarbituric acid (TBA) assay를 사용하여 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다. Protein 함량은 Bradford의 방법<sup>14)</sup>에 따라 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

**약물대사효소계** - 저산소 및 산소재도입군 또는 약물 처치 후 저산소 및 산소재도입을 시킨 군에 대한

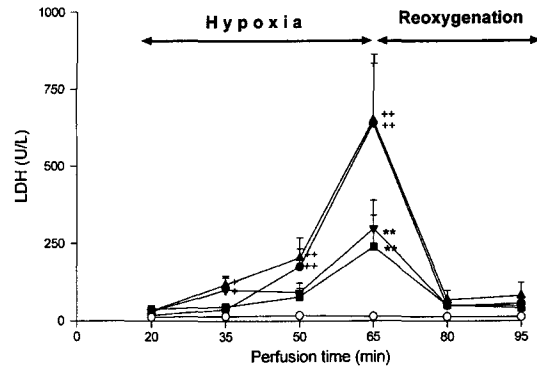
phase I 및 II 대사기능 변동을 7-ethoxycoumarin 대사체 분석을 통해 평가하였다. EC의 대사산물들은 Cha 등의 방법<sup>15)</sup>에 따라 측정하였다. 관류시킨 EC는 phase I 대사효소인 cytochrome P-450에 의하여 O-deethylation되어 hydroxycoumarin(HC)으로 산화된 후 곧이어 phase II 대사효소인 UDP glucuronyltransferase(UDPGT)나 sulfotransferase에 의하여 glucuronide나 sulfate ester 포함체를 형성한다. 이때 HC는 강한 형광을 나타내나, 포함체를 이룬 HC-glucuronide 및 HC-sulfate ester 포함체들은 형광을 잃는다. 그러나 이들 포함체를 가수분해 시키면 다시 HC가 유리되어 HC의 형광이 다시 나타난다. 이러한 HC의 특성을 이용하여 EC의 각 대사산물의 농도를 측정하여 간세포내의 phase I 약물대사효소의 mixed function oxidase (MFO) system과 phase II 약물포함체 중 glucuronidation과 sulfation의 변화를 관찰하였다.

**통계처리** - 각 실험군에 대한 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료 분석은 one-way ANOVA를 이용하여 p<0.05수준에서 유의성을 검정하였다.

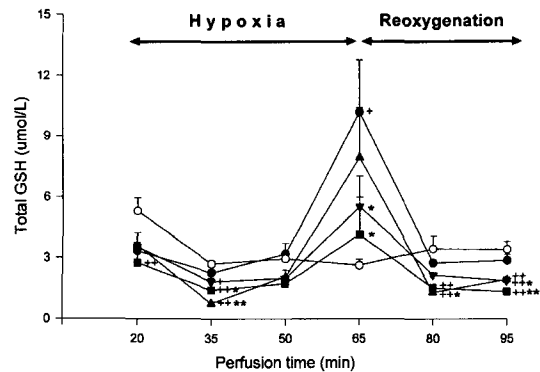
**실험결과**

**관류액내 LDH** - 간장 손상의 지표로 측정된 LDH치는 대조군의 경우 실험기간 동안 관류액내 낮은 LDH치를 나타내었다. 저산소 및 산소재도입군에서는 저산소 상태 전기간에 걸쳐 대조군에 비해 유의성 있는 LDH치 증가를 나타내었으나, 산소 재도입시 대조군 수준으로 감소하였다. Vitamin C 0.5 mM 처치군은 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있는 LDH유리 감소를 나타내었으나, vitamin E 0.5 mM 처치군은 저산소 및 산소재도입군과 차이가 없었다. 그러나 vitamin C와 vitamin E 0.5 mM 병용처치군에서는 저산소 도입후 45분에서 저산소 및 산소재도입군 및 vitamin C 0.5 mM 단독 처치군에 비해 더욱 유의성 있는 LDH유리 감소를 나타내었다(Fig. 1).

**관류액내 총 glutathione(GSH) 및 GSSG** - 대조군의 경우 관류액내 총 GSH양은 실험기간내 거의 일정한 낮은 수치를 나타내었으나, 저산소 및 산소재도입군의 경우 저산소 도입후 45분에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈으며 산소 재도입으로 인해 대조군 수준으로 회복되었다. Vitamin C 0.5 mM 단독 및 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군의 경우



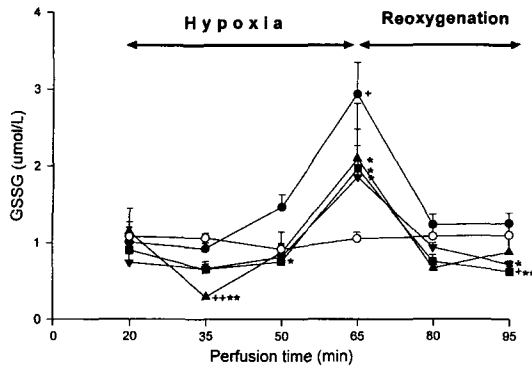
**Fig. 1** - Effects of vitamins C and E on time-dependent release of LDH in hypoxia and reoxygenation. Values are mean ± S.E.M. for 7 to 10 rats per group. +p<0.05, ++p<0.01 compared with control group; \*\*p<0.01 compared with N<sub>2</sub> hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group. ○, control; ●, HP/RO; ■, vitamin C (0.5 mM); ▲, vitamin E (0.5 mM); ▼, vitamin C (0.5 mM)+E (0.5 mM).



**Fig. 2** - Effects of vitamins C and E on time-dependent release of total GSH in hypoxia and reoxygenation. Values are mean ± S.E.M. for 7 to 10 rats per group. +p<0.05, ++p<0.01 compared with control group; \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with N<sub>2</sub> hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group. ○, control; ●, HP/RO; ■, vitamin C (0.5 mM); ▲, vitamin E (0.5 mM); ▼, vitamin C (0.5 mM)+E (0.6 mM).

저산소 도입 15분 및 45분후 뿐 아니라 재관류시 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있게 총 GSH량이 감소하였으며, vitamin E 0.5 mM 처치군에서도 재관류시 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

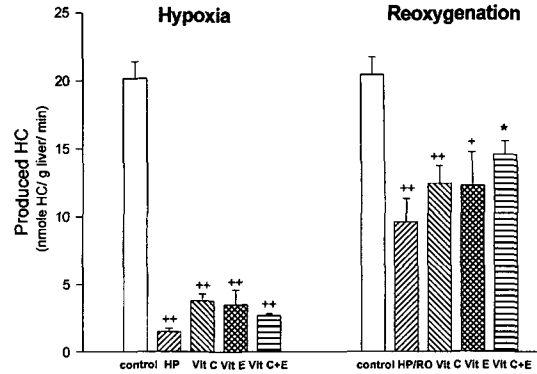
관류액내 GSSG량 역시 총 GSH와 비슷한 경향을 나타냈으며 vitamin C와 E 0.5 mM 단독 처치군과



**Fig. 3** – Effects of vitamins C and E on time-dependent release of GSSG in hypoxia and reoxygenation. Values are mean  $\pm$  S.E.M. for 7 to 10 rats per group. + $p$ <0.05, ++ $p$ <0.01 compared with control group; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with N<sub>2</sub> hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group. ○, control; ●, HP/RO; ■, vitamin C (0.5 mM); ▲, vitamin E (0.5 mM); ▼, vitamin C (0.5 mM) + E (0.5 mM).

두 약물의 병용처치군 모두에서 저산소 도입후 45분과 재관류 30분에서 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있는 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3).

**간조직내 총 GSH, GSSG, GSH/GSSG 및 지질과산화** – 간조직내 총 GSH의 양은 모든 실험군이 대조군과 차이가 없었다. 간조직내 GSSG의 양은 대조군의 경우 0.20  $\mu$ mole/g liver였으나, 저산소 및 산소재도입군에서는 0.49  $\mu$ mole/g liver으로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. Vitamin C 0.5 mM 처치군에서는 저산소 및 산소재도입군과 차이가 없었으나, vitamin E 0.5 mM 처치군과 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군에서는 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있는 GSSG생성 억제 효과를 나타내었다. 총 GSH중의 GSH와 GSSG의 비율을 나타내는



**Fig. 4** – Effects of vitamins C and E on the rate of oxidation of 7-ethoxycoumarin in hypoxia and reoxygenation. Values are mean  $\pm$  S.E.M. for 7 to 10 rats per group. + $p$ <0.05, ++ $p$ <0.01 compared with control group; \* $p$ <0.05 compared with N<sub>2</sub> hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group. □, control; ▨, HP or HP/RO; ▩, vitamin C (0.5 mM); ▤, vitamin E (0.5 mM); ▥, vitamin C (0.5 mM) + E (0.5 mM). HC, hydroxycoumarin.

GSH/GSSG는 vitamin E 0.5 mM 처치군에서 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table D).

간조직내 지질과산화는 저산소 및 산소재도입군은 대조군에 비해 지질과산화 산물인 MDA치가 유의성 있게 증가하였으나 vitamin E 0.5 mM 처치군 및 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군에서는 오히려 대조군 수준보다 감소되는 경향을 나타냈다(Table D).

**약물대사효소계 변동** – 저산소 및 산소재도입시 phase I 대사기능 변화를 관찰한 결과, 저산소시에는 7-ethoxycoumarin의 산화가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, 산소재도입으로 그 기능이 일부 회복되는 경향을 나타내었지만 대조군에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 약물처치군의 경우 저산소상태에서는 모

**Table I** – Effects of vitamins C and E on liver total GSH, GSSG, GSH/GSSG and lipid peroxidation in hypoxia and reoxygenation

	Total GSH ( $\mu$ mole/g liver)	GSSG ( $\mu$ mole/g liver)	GSH/GSSG	MDA (nmole/mg protein)
Control	2.45 $\pm$ 0.53	0.20 $\pm$ 0.02	10.15 $\pm$ 2.21	0.66 $\pm$ 0.03
HP/RO	2.40 $\pm$ 0.25	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>+</sup>	4.62 $\pm$ 0.09 <sup>+</sup>	0.86 $\pm$ 0.07 <sup>++</sup>
HP/RO+Vit. C (0.5 mM)	1.78 $\pm$ 0.41	0.33 $\pm$ 0.08	4.52 $\pm$ 2.09	0.82 $\pm$ 0.02 <sup>++</sup>
HP/RO+Vit. E (0.5 mM)	2.05 $\pm$ 0.26	0.15 $\pm$ 0.04 <sup>*</sup>	10.32 $\pm$ 0.83 <sup>*</sup>	0.63 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>
HP/RO+Vit. C+E (0.5 mM)	2.03 $\pm$ 0.24	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>	8.99 $\pm$ 0.39 <sup>*</sup>	0.63 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.M. for 7 to 10 rats per group. + $p$ <0.05, ++ $p$ <0.01 compared with control group; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group.

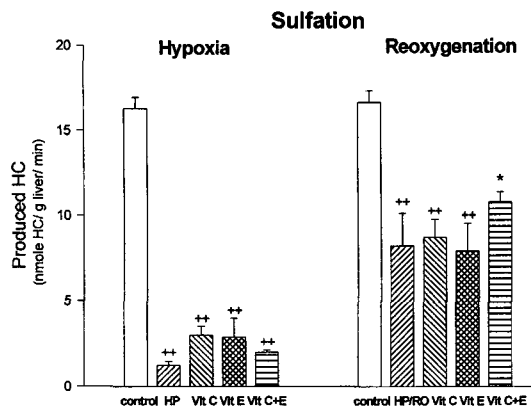


Fig. 5 - Effects of vitamins C and E on the rate of sulfation of 7-ethoxycoumarin in hypoxia and reoxygenation. Values are mean  $\pm$  S.E.M. for 7 to 10 rats per group. ++ $p$ <0.01 compared with control group; \* $p$ <0.05 compared with  $N_2$  hypoxia/reoxygenation (HP/RO) group. □, control; ▨, HP or HP/RO; ▩, vitamin C (0.5 mM); ▪, vitamin E (0.5 mM); ▧, vitamin C (0.5 mM)+E (0.5 mM). HC, hydroxycoumarin.

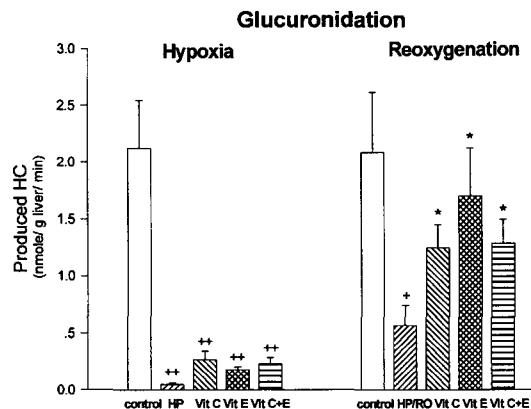


Fig. 6 - Effects of vitamins C and E on the rate of glucuronidation of 7-ethoxycoumarin in hypoxia and reoxygenation. Values are mean  $\pm$  S.E.M. for 7 to 10 rats per group. + $p$ <0.05, ++ $p$ <0.01 compared with control group; \*\* $p$ <0.05 compared with  $N_2$  hypoxia/reoxygenation(HP/RO) group. □, control; ▨, HP or HP/RO; ▩, vitamin C (0.5 mM); ▪, vitamin E (0.5 mM); ▧, vitamin C (0.5 mM)+E (0.5 mM). HC, hydroxycoumarin.

든 약물 처치군이 저산소 및 산소재도입군과 차이가 없었으나, 산소재도입시에는 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군에서만 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성있는 산화능의 회복을 나타내었다(Fig. 4). Phase

II 대사효소에 대한 영향을 알아보기 위해 7-ethoxycoumarin의 sulfation 및 glucuronidation을 측정된 결과, sulfation의 경우 역시 7-ethoxycoumarin의 산화에서의 결과와 동일한 양상을 나타내었으며, 산소재도입시 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군에서만 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5). 그러나 glucuronidation의 경우 산소재도입시 vitamin C, vitamin E 그리고 vitamin C와 E 0.5 mM 병용처치군 모두에서 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성있는 glucuronidation의 증가를 나타내었다(Fig. 6).

## 고 찰

저산소상태란 생체의 산소요구량에 비하여 산소공급량이 부족한 상태를 말하며 이로 인해 해당장기는 조직 손상과 기능저하가 유발된다. 이때 산소를 공급하게 되면 장기의 기능이 회복되리라고 예상되지만 실제로는 그 기능이 더 악화되는 현상을 볼 수 있는데 이를 산소역설이라 한다. 저산소 상태에서는 에너지 불균형 상태가 일어나 고에너지물질인 ATP가 AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine등으로 이화되며, 동시에 xanthine dehydrogenase도 xanthine oxidase로 전환된다.<sup>16-18)</sup> 이때 산소를 재도입 시키게 되면 xanthine oxidase에 의해 hypoxanthine이 xanthine으로 변하게 되며 도입된 산소도 superoxide anion으로 전환된다.<sup>19)</sup> Superoxide anion은 그 자체로서도 조직손상을 일으키기도 하나, 철이나 구리이온 존재하에서는 hydroxyl radical로 전환되어 조직손상을 가중시킨다.<sup>2)</sup> 이렇게 생성된 활성산소들은 지방, 단백질, 핵산, 다당류등과 같은 생체내 여러 거대분자들을 공격하여 세포독성을 나타내며, 특히 지질과산화물을 일으켜 세포막의 변성 및 파괴를 일으키고 이로 인해 세포통합성(cell integrity)에 영향을 주어 세포의 비가역적인 손상을 초래한다. 최근 여러 생체 내 및 생체외 실험에서 보고된 바와 같이 vitamin C는 세포질에서 세가지 형태(reduced ascorbic acid, ascorbate radical, dehydroascorbic acid)로 존재하며 세포에 손상을 유발시키는 hydroxyl radical, superoxide radical과 같은 활성산소를 제거하는 항산화제로도 작용하지만, 용량에 따라서 오히려 활성산소를 더욱 활성화시키는 전산화제로도 작용한다고 한다.<sup>6)</sup> Vitamin E는 천연 항산화제로서 활성산소의

공격으로 인한 지질과산화물을 억제시키고 ATP 재합성을 촉진시키나,<sup>7)</sup> 지용성으로 인해 응급시 사용이 제한되므로 현재 이를 보완하기 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 즉 vitamin E의 수용성 유도체인 trolox C를 관류액에 주입하면 vitamin E의 작용과 유사하게 peroxy radical에 의한 간세포 손상을 liposome의 보호를 통해 억제시킨다고 한다.<sup>7,20)</sup> 또한 vitamin C와 E의 병용투여는 vitamin E가 활성산소를 제거한 후 생성된  $\alpha$ -tocopheryl radical을 vitamin C가 다시 환원시킴으로써 vitamin E의 교체율을 빠르게 하여 항산화작용을 증강시킨다고 한다.<sup>21)</sup> 이와 같이 vitamin C와 E의 항산화 작용과 이들의 협동작용이 생체내의 실험에서 보고되어 있으나, 허혈 및 재관류와 관련된 간장의 기능 변동중 약물대사의 변동에 관한 이들의 연구는 현재까지 거의 보고된 바 없다.

적출관류간 실험을 이용한  $N_2$  hypoxia의 모델에서 Jaeschke등<sup>22)</sup>은 60분간의 저산소상태에서는 세포내의 LDH가 관류액내로의 유출이 급격히 증가하지만, 산소 재도입으로 LDH가 감소한다고 하며 다른 저산소 모델과는 달리  $N_2$  hypoxia는 그 자체가 매우 심한 세포 손상을 야기시키며 오히려 산소재도입시 세포기능이 일부 회복된다고 한다. 본 실험에서도 이와 동일한 실험 결과를 나타내었으며, 이로 인한 간세포의 손상을 vitamin C 단독처치 뿐 아니라 vitamin C와 E 병용처치군에서 유의성있게 억제시킴을 알 수 있었다.

Glutathione은 세포의 산화적 손상에 대해 방어역할을 하는 중요한 비단백성물질로서, 세포가 산화적 손상을 받으면 GSH가 GSSG로 산화됨으로써 활성산소를 무독화시키며, 허혈 및 재관류에 의한 세포손상시 관류액내로 다량 유출되므로 간장 손상지표로 널리 활용된다.<sup>23)</sup> 본 실험에서도 45분간의 저산소상태에서 관류액내 총 GSH와 GSSG양이 급격히 증가하고 산소 재도입에 의해 회복되는 것으로 보아 LDH결과에서와 마찬가지로 저산소는 에너지의 급격한 감소와 더불어 조직의 심한 손상을 유발함을 알 수 있었고, vitamin C와 E 모두 저산소상태로 인한 GSH 및 GSSG의 유출을 억제시킴도 알 수 있었다. 저산소 및 산소재도입 후 간조직에 남아있는 GSH 및 GSSG의 양은 대조군에 비해 예상대로 GSH량은 감소하고 GSSG량은 증가하였으며, 이는 저산소시 뿐 아니라 산소재도입시에도 산화적손상에 의해 다량의 GSH가 GSSG로 산화되고, 특히 vitamin E는 저산소시보다 산소재도입시

생성되는 활성산소로 인한 세포손상을 억제함을 알 수 있었다.

지질과산화는 활성산소가 세포막의 불포화지방산을 공격함으로써 일어나며 이로 인해 세포막뿐 아니라 세포막으로 둘러싸인 소기관 즉 미토콘드리아, 소포체막 등에도 기능손상을 유발한다. 관류를 마친 간조직내에서의 지질과산화를 측정본 실험에서 저산소 및 산소재도입군에서 지질과산화의 함량이 증가하였고, 이러한 증가는 vitamin E 단독처치 및 vitamin C와 E 병용처치에 의해 유의성 있게 억제되었다.

간의 가장 대표적인 기능인 생체 이물질의 생체내 전환(biotransformation)은 phase I 및 phase II 약물대사 효소계의 작용에 의해 이루어지며, 독성물질들은 이들 대사효소들에 의해 극성을 띤 수용성 대사체로 대사되어 체외로 배설된다. Phase I 대사효소계는 세포내 소포체에 다량 존재하고 주로 cytochrome P-450의 작용에 의해 산화 또는 환원이 일어나며 phase II 대사효소계는 주로 UDP-glucuronyltransferase나 sulfotransferase와 같은 대사효소에 의해 포합 또는 가수분해 반응등이 일어난다. 한편 본 연구실의 이전 연구결과에 따르면 간장소포체막에 결합되어 있는 mixed function oxidase의 활성은 그 주위의 지질 분포 및 종류에 의해 영향을 받는다고 한다.<sup>25)</sup> 소포체를 구성하는 인지질인 phosphatidylcholine은 cytochrome P-450의 활성에 직접적 영향은 없으나, cytochrome과 약물을 포함한 기질의 결합과 reductase와 cytochrome의 coupling에 관여한다고 한다. 본 실험에서도 저산소상태시 산화능의 급격한 기능저하가 나타났으며, 산소 재도입시에도 기능이 일부 회복되었지만 여전히 대조군과는 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이는 MFO system에 의한 산화과정이 산소의존적 반응으로 산소의 양에 매우 민감하기 때문으로 여겨지며, 산소재도입시에는 일부 그 기능이 호전되나 활성산소의 생성에 의한 cytochrome P-450의 기능저하로 인해 대조군 수치에는 못미친다고 생각된다. Vitamin C 및 E의 단독처치는 이에 대해 별 영향을 나타내지 못했지만, 병용처치군에서는 산소재도입시 저산소 및 산소재도입군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다.

Phase I 대사 산물인 7-HC는 주로 phase II enzyme에 의해 sulfation과 glucuronidation 과정을 거치며 이때 sulfation의 경우 사용되는 기질이 3'-phospho adenosine-5'-phosphosulfate로서 이의 형성에 ATP가

소모되므로 저산소시와 산소재관류시 다른 포함반응보다 이의 급격한 변화가 예상된다.<sup>27)</sup> 본 실험에서도 phase I 대사효소에서 결과와 마찬가지로 저산소시의 sulfation의 급격한 대사 기능저하가 일어났으며 산소재도입시 기능이 다소 회복되었다. Vitamin C와 E 단독처치로는 미약한 항산화작용을 나타내었으나, 이들의 병용처치로 sulfation능을 현저히 회복시켰다. Glucuronidation은 sulfation보다 약물 포함능에 low affinity를 나타냄을 알 수 있었고, 산소재도입시 산화나 sulfation에 비해 일부 기능만이 회복되었으나 vitamin C와 E 단독 및 병용처치 모두 이를 향상시켰다.

이상의 결과로 보아 N<sub>2</sub>로 유도된 저산소 및 산소재도입은 간장 약물대사능저하를 비롯한 간장손상을 야기시키며, vitamin C와 E는 협동적으로 산화적 손상을 감소시킴으로써 이의 기능을 증진시킴을 알 수 있었다.

## 문 헌

- 1) Granger, D. N., Hollwarth, M. E. and Parks, D. A. : Ischemia- reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta. Physiol. Scand.* **548**, 47 (1986).
- 2) Mayumi, T., Schiller, H. J. and Buckley, G. B. : Pharmaceutical intervention for the prevention of post-ischemic reperfusion injury. *In Free radicals: from basic science to medicine*(G. Poli, Ed) 438 (1993).
- 3) Angermuller, S., Schunk, M. and Kusterer, K. : Alteration of xanthine oxidase activity in sinusoidal endothelial cells and morphological changes of Kupffer cells in hypoxic and reoxygenated rat liver. *Hepatology* **21**, 1594 (1995).
- 4) Jaeschke, H. and Farhood, A. : Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.* G355 (1991).
- 5) Zhong, Z., Qu, W. Connor, H. D. and Thurman, R. G. : Inactivation of Kupffer cells minimizes reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. *Transplant. Proc.* **27**(1), 528 (1995).
- 6) Wu, T. W., Hashimoto, N., Au, J. X., Wu, J. and Carry, D. : Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* **3**, 575 (1991).
- 7) Marubayashi, S., Dohi, K., Ochi, K. and Kawasaki, T. : Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury. Prevention of damage by  $\alpha$ -tocopherol administration. *Surgery* **99**, 184 (1988).
- 8) Bradford, B. U., Marotto, M., Lemasters, J. J. and Thurman, R. G. : New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **236**, 263 (1985).
- 9) Le Couteur, D. G., Rivory, L. P. and Pond, S. M. : The effects of aging and nutritional state on hypoxia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Transplantation* **58**, 531 (1994).
- 10) Younes, M., Wagner, H. and Strubelt, O. : Enhancement of acute ethanol hepatotoxicity under conditions of low oxygen supply and ischemia/reperfusion. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3573 (1989).
- 11) Brehe, J. E. and Burch, H. B. : Enzymatic assay for glutathione. *Anal. Biochem.* **74**, 189 (1978).
- 12) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
- 13) Masugi, F. and Nakamura, T. : Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**, 187 (1978).
- 14) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 15) Cha, Y. N., Dong, M. S. and Hong, S. S. : Functional relationship between initial oxidation of 7-ethoxycoumarin and subsequent conjugation of 7-hydroxycoumarin in isolated perfused rat livers. *Chem. Biol. Interactions* **61**, 125 (1987).
- 16) Anundi, I., King, J., Owen, D. A., Schneider, H., Lemasters, J. J. and Thurman, R. G. : Fructose prevents hypoxic cell death in liver. *Am. J. Physiol.* **253**, G390 (1987).
- 17) Brass, C. A., Narciso, J. and Gollan, J. L. : Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. *J. Clin. Invest.* **87**, 424 (1991).
- 18) Granger, D. N. : Role of xanthine oxidase and granul-

- ocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **255**, H1269 (1988).
- 19) Jaeschke, H., Smith, C. V. and Mitchell, J. R. : Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* **81**, 1240 (1988).
- 20) Doba, T., Burton, G. W. and Ingold, K. W. : Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analogue upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* **835**, 298 (1985).
- 21) Leung, H. W., Vang, M. J. and Mavis, R. D. : The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta* **664**, 266 (1981).
- 22) Jaeschke, H., Smith, C. V. and Mitchell, J. R. : Hypoxic damage generates reactive oxygen species in isolated perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **150**, 568 (1988).
- 23) Borg, D. C. and Schaich, K. M. The physiological functions of glutathione. *In Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine* (Jaime Miquel, Ed.) Boca Raton, Florida, p.63-77 (1989).
- 24) Zeng, L. H., Wu, J., Carey, D. and Wu, T. W. : Trolox and ascorbate: are they synergistic in protecting liver cells in vitro and in vivo? *Biochem. Cell Biol.* **69**, 198 (1991).
- 25) Lee, S. M. and Clemens, M. G. : Effect of  $\alpha$ -tocopherol on hepatic mixed function oxidase in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* **15**, 276 (1992).
- 26) Ullrich, W. and Weber, P. : The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1171 (1972).
- 27) Simon, E. B., Victoria, E. T., Cesario, O. T., Lim, H. K., John K., Samuel, F. S. and Joann, S. : [ $^{14}$ C]7-ethoxycoumarin metabolism by precision-cut rat hepatic slices. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 383 (1995).
- 28) Fujii, Y., Johnson, M. E., and Gores, G. J. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **20**, 177 (1994).
- 29) Chen, L. H. : An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation of vitamin C in rat. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1036 (1981).