

랫드에서 담도폐쇄에 의한 지질과산화와 간섬유화(경화) 촉진에 관한 연구

김기영^{1,2*} · 서의석² · 임진아²

¹원광대학교 의과대학 병리학교실, ²한의학전문대학원

Bile Duct Obstruction Stimulates Lipid Peroxidation and Liver Fibrosis (Cirrhosis) in Rat

Ki-Young Kim^{1,2*}, Eui-Seuk Suh² and Jin-A Lim²

¹Department of Pathology Medical School and ²Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan City, Korea

(Received July 3, 2001)

(Accepted August 2, 2001)

ABSTRACTS : The oxidative stress causes the cell damage and death and thereby, stimulates membrane lipid peroxidation. In this study, the correlation between the lipid peroxidation product and the parameter of liver fibrosis (cirrhosis) was investigated in cholestasis induced rats. The Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups (sham: sham operation, BDL/S-I and BDL/S-II : bile duct ligation/scission) and were observed for 2 or 4 weeks. After observation period, the organs were weighed and the ratio of organ weight/body weight was calculated. Sera and liver tissue were used for the measurement of malonaldehyde (MDA), parameter of clinical biochemistry, total collagen content and the staining. The ratio of organ weight/body weight in BDL/S-I and BDL/S-II was significantly increased compared to sham operated group. Serological parameters (Alanine transaminase, Aspartate transaminase, Alkaline phosphatase and Total bilirubin) in BDL/S-I and BDL/S-II group were significantly higher than those in sham operated group. Concentration of MDA in BDL/S-I (261%) and BDL/S-II group (790%) was significantly increased compared to MDA in sham operated group. And the content of hydroxyproline (hyp) in BDL/S-I and BDL/S-II group was significantly increased 2~4 times than in sham operated group. The good correlations between hyp in liver tissue and MDA in sera of sham operated group and all operated groups were found ($r = 0.825$). The significantly higher value of MDA, hyp and serological parameters in BDL/S-I and BDL/S-II group suggests the stimulation of lipid peroxidation and chronic liver damage. Especially the activation of lipid peroxidation and the stimulation of liver fibrosis was stronger in BDL/S-II group than in BDL/S-I group. The stronger fibrosis, portal-portal septum formation, the more massive bile duct proliferation in portal triads and stroma, and hepatocytes swelling were observed in liver tissue of BDL/S-II group compared to BDL/S-I group. Conclusively, a good correlation between MDA as a lipid peroxidation marker and hyp as a liver fibrotic parameter could be connected with the process of liver fibrosis. Moreover, cholestasis condition may cause jaundice, activation of lipid peroxidation, and collagen accumulation in liver. Additionally, optimal observation period of bile duct obstruction for the screening of antioxidant and antifibrotic effect in rats would be four weeks.

Key Words : Bile duct obstruction, Lipid peroxidation, MDA, hyp, Cholestasis, Liver fibrosis (Cirrhosis)

I. 서 론

Oxidative stress에 의한 ROS(reactive oxygen species)의 생성은 노화, 발암, 동맥경화, 간섬유화(Szuster-Ciesielska

등, 2001; Ljubuncic 등, 2000), 신장염(Diamond, 1992), 피부질환(Cracowski 등, 2001), 당뇨병(Stanely와 Menon, 2001)의 원인으로 보고되고 있다. ROS(NO, OH, O₂)는 분자상 산소가 활성산소로 변화하여 다른 분자들과 반응하면서 인체에 유해한 organic peroxy free radical을 생성한다. 불포화지방산이 풍부한 세포막은 생성된 자유기(free

*To whom correspondence should be addressed

radical)의 표적이 되고, 그 결과로서 세포소기관(organelles)이 정상적인 구조와 기능을 잃게 되어 국소적인 손상과 더불어 aldehyde와 같은 지질과산화의 분해산물이 생성부위에서 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포손상을 일으키게 된다(Radi 등, 1991).

지질과산화 분해산물은 황인, CCl_4 , 간독성 물질, 알콜남용, 만성 담즙울체(chronic cholestasis) 등에 의한 실험적 간손상 또는 간섬유화에서 증가되며(Ohkawa 등, 1979; Bacon 등, 1983; Chance 등, 1979), 또한 사람과 랫드의 간조직, 혈장뿐만 아니라 심장조직, 신장조직 등에서도 증가되는 것으로 알려져 있다(Tasi 등, 1993; Cutrin 등, 2000). 간손상 특히 간섬유화의 유도방법에는 CCl_4 (Martinez-Hernandez, 1985; Tamayo, 1983), methotrexate(Custer 등, 1977; Woolley, 1983), thioacetamide(Willemer 등, 1984), ethanol(Tsakamoto 등, 1986), DMN(Savolainen 등, 1988) 등의 투여와 총담관결찰수술(Koutras 등, 1984; Milani 등, 1989, 1990) 등이 보고되고 있다. 그 중에서 가장 많이 사용되고 있는 CCl_4 투여방법은 간섬유화 유도기간이 6~10주가 소요되고 관찰시기동안에 치사율이 매우 높으며(약 30~40%) 간섬유화의 유발정도가 개체에 따라서 차이가 크다는 단점을 보이는 반면(Tamayo, 1983), 총담관결찰 방법은 단 1회의 수술이라는 간편함과 간종대, 비종대가 뚜렷하게 나타나고(Kim 등, 1993, 2000) 임상에서 나타나는 담즙성 간경화와 매우 유사하다는 장점이 있다.

총담관결찰은 간세포에서 분비되는 담즙이 extrahepatic bile duct를 거쳐 십이지장으로 배설되지 못하고 intrahepatic bile duct로 역류하여 원발성 또는 속발성 담즙성 간경화(섬유화)를 유발하며 담즙의 주성분인 bilirubin의 이상대사로서 황달을 출현시킨다. 간섬유화는 간경화의 전단계로서 간조직에 콜라겐의 과도한 축적과 새로운 콜라겐 합성, 분해의 불균형이 그 원인이라고 보고되고 있고(Schuppan, 1990), 간섬유화가 진행되면 염증세포는 대부분이 사라지고, 염증이 만성적으로 지속될 때 콜라겐 섬유(collagen fiber)들이 과도하게 출현한다. 이렇게 형성된 콜라겐 섬유는 분해되지 않고 간조직내에 그대로 존재하기 때문에 간섬유화는 간조직 1g당 증가한 총콜라겐양으로 이해된다(Eder와 Gediqk, 1990). 정상적인 간에서 총콜라겐양은 약 1mg/g이며, 간섬유화(경화)시에는 4~10배 이상으로 증가되고(Seyer 등, 1980), 혈청중 콜라겐양과 조직중 총콜라겐양 사이에는 좋은 상관관계가 있다는 보고도 있다(Galambos 등, 1985; Ruwart 등, 1989). 또한 간경화에서는 간세포(hepatocytes)의 수적 감소와 myofibroblast, fat storing cell(hepatic stellate cell)의 증가로 인한 과도한 콜라겐 침착, 콜라겐 섬유띠(collagen fiber bundle) 형성 그리고 딱딱한 조직의 scar 형성에 의한 간구조의 파괴가 나타난다.

따라서 본 연구에서는 담즙울체에 기인하는 간섬유화

(경화)에서 지질과산화 분해산물과 총콜라겐양의 증가는 어떠한 연관성이 있는가를 알아보고자 지질대사산물인 malondialdehyde(MDA)와 염증과 간피사의 진단지표인 transaminase의 효소활성 그리고 간섬유화 지표인 hydroxyproline(hyp)을 측정하여, 정상군과 간섬유화 유도군의 각 지표사이에서 유의성과 상관성을 관찰하였으며, 또한 최적의 실험기간을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

대한바이오링크에서 공급받은 11주령의 Sprague-Dawley 웅성 랫드(180~200g)를 3개군(Sham군, BDL/S-I군, BDL/S-II군)으로 구분하여 사육하였다. 사육환경은 밤과 낮의 리듬을 구분하였고, 사료(퓨리나사료)와 물을 자유롭게 공급하였다.

2. 간섬유화 유도

5일 동안의 순화기간 후에 랫드의 복강을 절개하여 생리 식염수 2ml를 넣고 다시 봉합하는 sham수술을 시행하여 sham군으로 사용하였고, 간섬유화는 Koutras 등(1984)의 방법에 따라 랫드의 총담관의 원위담도와 근위담도를 절찰한 후 담관을 절단하여 2주(BDL/S-I군) 또는 4주(BDL/S-II군) 동안을 관찰하였다.

3. 일반적인 관찰

매주마다 체중을 측정하였고 수술 후 3일부터 귀, 발 등에서 황달의 유무를 관찰하였다. 부검시 간, 비장, 신장의 무게를 측정하여 장기/체중의 무게비를 계산하였으며, 담즙양과 담즙색을 관찰하였다.

4. 실험재료의 채취

2주 또는 4주간 관찰 후, 부검시 심장에서 혈액을 채취하여 원심분리한 후 혈청을 $-20^{\circ}C$ 에 보관하여 사용하였다. 간의 일부는 hydroxyproline(hyp) 측정을 위하여 $-70^{\circ}C$ 에서 보관하였으며 나머지 간조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 Hematoxylin & Eosin(H&E), Masson's trichrome 염색에 사용하였다.

5. 혈청생화학적 검사

Alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST),

total bilirubin(t-bili), alkaline phosphatase(ALP), blood urea nitrogen(BUN), creatinine을 BML-kit를 사용하여 분석하였다.

6. 총콜라젠양 측정

간조직내 hyp양의 측정은 Jamall 등(1981)의 방법에 따라 염산으로 간조직을 가수분해시켜, chloramine-T로 산화시킨 후 Ehrlich's reagent solution(p-dimethylamino benzaldehyde)으로 발색시켜 558 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

7. MDA 측정

Ohkawa 등(1979)의 방법에 따라 혈청시료와 표준물질(tetramethoxypropane)에 0.2% SDS, 20% acetic acid, 0.8% thiobarbiturate를 가하여 95°C에서 반응시킨 후 냉각시켰다. 그런 다음 butanol을 가하고 원심분리한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다.

8. 조직염색 및 관찰

간조직을 H&E, Masson's trichrome 방법으로 염색한 후, 담관증식과 섬유화를 +~+++로 구분하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 통계처리

Student's t-test를 이용하여 mean tandard deviation으로 표시하였고 p-value를 구하여 유의성을 검증하였으며, 각 지표들 사이에서 상관관계를 조사하였다.

III. 결 과

1. 일반적인 관찰

Sham군의 동물에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 수술 2주군(BDL/S-I군)과 수술 4주군(BDL/S-II군)의 동물에서 수술 후 2~3일 사이에 귀, 눈주위 등에 황달이 출현하여 2주 또는 4주 동안 지속되었다. BDL/S-I군 동물에서는 근위담도에 담즙이 2~5 ml, BDL/S-II군에서는 3~20 ml 가량이 정체되었다.

2. 장기무게 및 장기/체중의 무게비 변화

간무게는 BDL/S-I군에서 sham군 보다 20%가 증가되었

Table 1. The weight and ratio of organ weight/body weight in sham operated rats and BDL/S operated rats

Group	Sham	BDL/S-I	BDL/S-II
body weight (g)	257.2±13.2	198.3±14.8*	275.6±13.3*
liver weight (g)	9.66±1.3	11.66±0.98*	21.10±1.90**
kidney weight (g)	1.92±0.21	2.23±0.46**	2.34±0.18**
spleen weight (g)	0.60±0.10	1.13±0.31**	1.42±0.21**
ratio of L/B (%)	3.75±0.24	5.89±0.45**	7.66±0.69**
ratio of K/B (%)	0.75±0.05	1.13±0.029**	0.85±0.06**
ratio of S/B (%)	0.24±0.05	0.58±0.19**	0.52±0.08**
number of animal	6	6	11

The data shows mean±SD.

* Significantly different from sham operated group (p < 0.05).

** Significantly different from sham operated group (p < 0.005).

Sham : sham operated group, BDL/S-I : 2 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation, BDL/S-II : 4 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation. L/B : liver/body weight, K/B : kidney/body weight, S/B : spleen/body weight.

고(p < 0.05), BDL/S-II군에서 118%가 증가되었으며(p < 0.005), BDL/S-I군과 BDL/S-II군 모두에서 유의성이 검증되었다(Table 1). 신장과 비장의 무게 역시 BDL/S-I군과 BDL/S-II군 모두에서 유의성 있게 증가되었다. 간/체중의 무게비는 sham군과 비교했을 때 BDL/S-I군에서 57%(p < 0.005), BDL/S-II군에서 104%(p < 0.005)의 증가를 나타냈으며, 모두 유의성이 검증되었다. Table 1에 나타난 것과 같이 신장/체중의 무게비와 비장/체중의 무게비 역시 유의성 있는 증가가 관찰되었다(p < 0.005).

3. 혈청생화학적 변화

BDL/S-I군에서 ALT, AST, ALP, t-bili의 수치가 sham군보다 유의성 있게 높게 나타났고(Table 2, p < 0.005), BUN과 creatinine의 수치는 약간 증가했으나 유의성은 없었다. BDL/S-II군에서 ALT, AST, ALP, t-bili, creatinine의 수치가 sham군 보다 유의성 있게 높았으며(Table 2, p < 0.005), BUN의 수치는 증가했으나 유의성은 없었다.

Table 2. The value of clinical biochemistry in sera of sham operated rats and BDL/S operated rats

Group	Sham	BDL/S-I	BDL/S-II
AST (IU/ml)	44.02±13.2	238.5±44.8*	317.3±72.3*
ALT (IU/ml)	15.9±3.4	32.3±4.6*	30.4±2.25*
BUN (mg/dl)	17.7±1.6	19.5±4.2	21.7±4.8
ALP (K-A)	161.38±95.1	261.0±65.5*	291.06±38.2*
t-Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.18	8.4±1.3*	6.48±0.56*
creatinine (mg/dl)	0.93±0.10	1.04±0.2	1.18±0.27*
N	6	6	11

The data shows mean±SD.

* Significantly different from sham operated group (p < 0.005).

Sham : sham operated group, BDL/S-I : 2 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation, BDL/S-II : 4 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation.

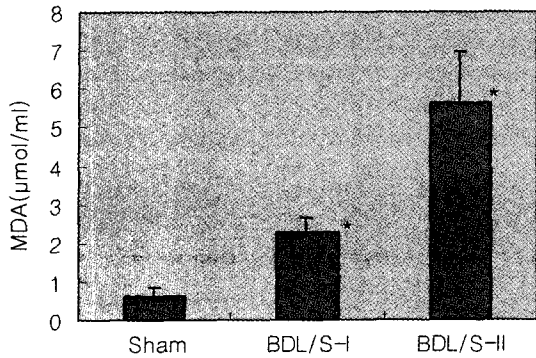


Fig. 1. The diagram of malondialdehyde (MDA) in sera of sham operated rats and BDL/S operated rats (BDL/S-I, BDL/S-II). * Significantly different from normal ($p < 0.005$). BDL/S-I : 2 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation. BDL/S-II : 4 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation.

4. 혈청중 MDA의 변화

Sham군에서 지질과산화 분해산물인 MDA의 농도가 $0.63 \pm 0.22 \mu\text{mol/ml}$ 인 반면에 BDL/S-I군에서 $2.28 \pm 0.36 \mu\text{mol/ml}$, BDL/S-II군에서는 $5.61 \pm 1.36 \mu\text{mol/ml}$ 이었으며(Fig. 1), sham군과 비교했을 때 BDL/S-I군에서 262%, BDL/S-II군에서 790% 증가하였으며 유의성이 있는 것으로 나타났다($p < 0.005$).

5. 간조직중 hydroxyproline의 변화

평균값에서 표준편차는 크게 나타났지만, BDL/S-I군은 약 2배($528.99 \pm 229.7 \mu\text{g/g}$, $p < 0.05$), BDL/S-II군은 약 4배($1023.80 \pm 277.1 \mu\text{g/g}$)로 sham군($242.03 \pm 74.8 \mu\text{g/g}$)보다 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2, $p < 0.005$).

6. Correlation(상관성) 관찰

Sham군과 BDL/S-I군, BDL/S-II군에서 상관성을 관찰했을 때, 혈청중 AST와 간조직중 hyp는 혈청중 MDA와 좋은 상관성이 있었다($\text{AST/MDA} : r = 0.833$, $\text{hyp/MDA} : r = 0.825$). Sham군의 MDA는 AST, hyp와 약한 상관성

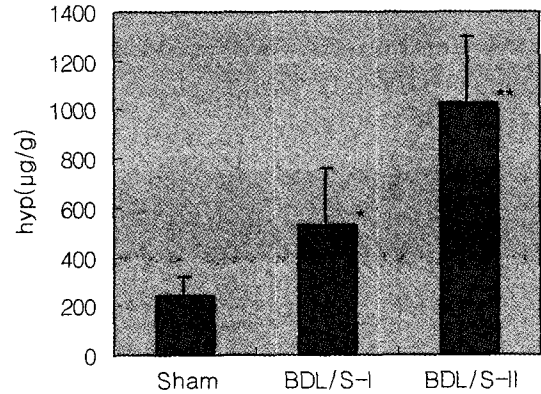


Fig. 2. The diagram of hydroxyproline(hyp) in liver tissue of sham operated rats and BDL/S operated rats (BDL/S-I, BDL/S-II). * Significantly different from sham operated group ($p < 0.05$). ** Significantly different from sham operated group ($p < 0.005$). BDL/S-I : 2 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation. BDL/S-II : 4 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation.

을 나타냈고($\text{AST/MDA} : r = 0.66$, $\text{hyp/MDA} : r = 0.656$), BDL/S-I군의 MDA는 ALT, t-bili, hyp와 좋은 상관성이 있었으나($\text{ALT/MDA} : r = 0.777$, $\text{t-bili/MDA} : r = 0.678$, $\text{hyp/MDA} : r = 0.784$), BDL/S-II군에서는 뚜렷한 상관성이 관찰되지 않았다(Table 3).

7. 조직학적 관찰

H&E로 염색한 sham군 간조직의 stroma와 portal triad에서 hepatocytes의 핵붕괴나 세포괴사 등의 형태학적 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3a). Masson's trichrome 방법으로 염색한 BDL/S-I군의 간조직에서는 과도한 담관증식(++~+++)이 주로 portal triads에서 많이 출현했고 섬유화(+~++)와 간세포 증창, 핵붕괴 등도 관찰되었다(Fig. 3b). BDL/S-II군의 간조직에서도 portal-portal septum형성, 과도한 담관증식(++~+++)이 portal triads와 약한 담관증식(+~++)이 stroma에서 나타났으며, 섬유화(++~+++)의 정도가 BDL/S-I군보다 강하게 관찰되었다. 또한 BDL/S-I군보다 간세포 증창과 핵붕괴가 광범위하게 나타났으며(Fig. 3c), 특히 BDL/S-I군과 BDL/S-II군의 간조직에서 두꺼운 콜라겐 섬유가 새롭게 형성된 담관주위에서 관찰되

Table 3. The correlation of the MDA and the other parameter from sham operated rats and BDL/S operated rats

	AST/MDA	ALT/MDA	ALP/MDA	t-bili/MDA	t-bili/hyp	hyp/MDA	n
Sham	$r = 0.666$	$r = 0.550$	$r = 0.014$	$r = 0.509$	$r = 0.230$	$r = 0.656$	6
BDL/S-I	$r = 0.260$	$r = 0.777$	$r = 0.584$	$r = 0.678$	$r = 0.725$	$r = 0.784$	6
BDL/S-II	$r = 0.316$	$r = 0.409$	$r = 0.569$	$r = 0.419$	$r = 0.694$	$r = 0.342$	11
all sample of animal	$r = 0.833$	$r = 0.508$	$r = 0.550$	$r = 0.593$	$r = 0.594$	$r = 0.825$	23

Sham : Sham operated group. n: The number of animal. BDL/S-I : 2 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation. BDL/S-II : 4 weeks observed group after bile duct ligation and scission operation.

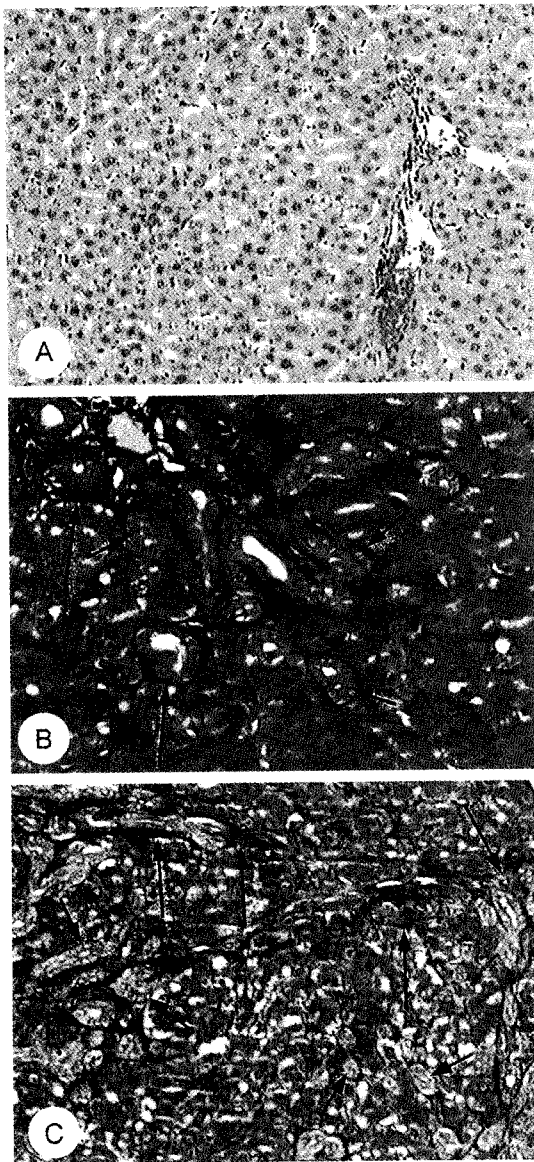


Fig. 3. A : The normal liver tissue of sham operated rats (H&E staining, $\times 100$). B : The fibrotic liver tissue of BDL/S-I group rats (Masson's trichrome staining, $\times 100$). C : The cirrhotic liver tissue of BDL/S-II group rats (Masson's trichrome staining, $\times 100$). \leftarrow : collagen fiber, \leftarrow : bile duct proliferation.

었다(Fig. 3b, 3c).

IV. 고 찰

세포의 신호전달과정에서 ROS는 2차 전달자(second messenger)로서 세포의 성장, 분화, 괴사, 죽음 등에 관여하며, ROS에 속하는 지질과산화물의 생성촉진 또는 활성화는 간손상을 초래하는 것으로 알려져 있다(Ljubuncic 등, 2000; Simile 등, 2001). 지질과산화에 대한 연구에서 DMN

(Shimizu 등, 1999), CCl_4 (Rhoden 등, 2000; Simile 등, 2001), Iron(Bacon 등, 1983; Morel 등, 1990), 내독소(Szuster-Ciesielska 등, 2001; Marja-Liisa 등, 2001; Cracowski 등, 2001; Young과 McEneny, 2001), 담즙울체(Sokol 등, 1993; Tasi 등, 1993; Ljubuncic 등, 2000) 등으로 간손상 또는 간섬유화를 유도했을 때 간세포활성지표와 지질과산화분해물인 MDA 또는 nitric oxide, superoxide dismutase의 증가, 콜라겐 유전자의 전사조절 또는 전사촉진이 일어난다는 보고가 있다(Bacon 등, 1983; Chance 등, 1979; Anthony 등, 1978; Geerts 등, 1989; Ohkawa 등, 1979). 그러나 담즙대사이상에 의한 간섬유화에서 지질과산화 분해물과 간섬유화(경화) 지표와의 상관성에 대한 연구는 아직까지 보고되어 있지 않다.

따라서 본 실험에서는 담즙울체를 유도한 실험적 간섬유화(경화)에서 지질과산화의 분해산물인 MDA와 간괴사, 염증, 황달지표인 ALT, AST, ALP, total bilirubin(t-bili), 신부전 지표인 BUN, creatinine, 간섬유화지표인 hydroxyproline(hyp)등을 정량하여 서로의 연관성과 실험적 간섬유화의 적합한 관찰시기를 조사하였다.

BDL/S-I군, 즉 총담관결찰 수술 2주후 실험군에서는 일반적으로 나타나는 간종대, 비종대와 더불어 지질과산화 분해물인 MDA의 수치가 $2.28 \pm 0.36 \mu\text{mol}/\text{m}$ 로 sham군 ($0.63 \pm 0.22 \mu\text{mol}/\text{m}$) 보다 유의성있게 증가되었는데, 이는 담즙울체가 간, 신장조직에서 지질과산화를 촉진시킨다는 Bomzon 등(1997)과 Ljubuncic 등(2000)의 보고와 일치된다. Kim 등(1993, 2000)은 담도손상(bile duct obstruction)을 유도한 동물의 간조직중 hyp양과 콜라겐 합성지표인 혈중 procollagen type III peptide 수치의 증가를 보고하였는데, 이는 본 실험에서 BDL/S-I군의 hyp수치가 sham군 보다 119% 유의성(Fig. 1) 있게 증가한 것으로, 이러한 결과는 sham군에서는 관찰되지 않는 portal triad 주위에 새로운 담관 형성과 함께 담관 구성세포인 상피세포주위에 콜라겐섬유의 띠와 축적을 정량적으로 반영한 것이라고 생각할 수 있다(Fig. 3b). 그 근거로서는 근위담관을 결찰하면 담즙이 간내담관으로 역류하면서 portal triad를 구성하는 담관주위에 새로운 담관들이 증식하고, 그 담관주위에 세포외기질(extracellular matrix) 중의 하나인 콜라겐섬유가 과도하게 축적된 형태학적 변화가 나타났기 때문이다. 간조직중의 콜라겐을 구성하는 hyp는 총아미노산의 약 10%에 상당하고 콜라겐 합성의 촉진과 콜라겐 분해의 저해는 간조직중 총콜라겐양의 축적을 의미하는 것으로, Milani 등(1990)은 담도결찰한 간조직의 증식된 담관주위에서 vimentin과 collagen type III 유전자의 발현이 관찰된다고 보고한 것이 이를 뒷받침한다. 이외에 간괴사와 염증 지표인 ALT, AST와 담즙울체의 지표인, ALP 및 황달 지표인 t-bili 수치의 유의성 있는 증가(Table 2)는 Kim

등(1993)의 보고와 유사하며, 이러한 결과는 담즙중의 bilirubin이 간외담관으로 배설되지 못하고 혈중으로 유입되어 전신적으로 순환하는 것과 과도하게 증식된 담관에 의해 간세포(hepatocytes)의 고립과 파괴의 결과로서 나타난 것이라 생각된다.

Nam 등(1997)은 담즙울체에 의한 creatinine 수치가 수술 1주후에 57%가 증가하고, 신장/체중의 무게비가 1주후 또는 6주후에는 큰 변화가 없다고 보고하였는데, 본 실험에서는 신부전의 지표인 BUN, creatinine 수치가 BDL/S-I군에서 약 11.8~18.5%, BDL/S-II군에서 22.5~26.9% 증가했고, 신장/체중의 무게비는 BDL/S-I군에서 33.6%, BDL/S-II군에서 13.3%의 유의성있는 증가를 나타냈다. 이 결과는 담즙울체에 의한 신기능장해가 간섬유화 유도 초기 단계보다는 심화되는 단계에서 나타난다고 생각할 수 있으며, 본 실험의 결과로 미루어 볼때 담즙울체에 기인하는 실험적 신기능장해의 유발은 적합한 것으로 사료된다.

본 연구의 핵심이 되는 지질과산화 분해물인 MDA와 간조직중 hyp와의 상관성은 BDL/S-I군에서 좋은 것으로 나타났고($r=0.784$), sham군에서도 상관성이 있었으며($r=0.656$), 또한 BDL/S-I군에서 t-bili와 MDA, t-bili와 hyp가 Table 3에 표시한 것처럼 좋은 상관성을 나타냈으나 sham군에서는 상관성이 없었다. 이러한 결과는 담즙울체는 지질과산화를 촉진하고, 과도한 지질과산화는 간세포의 괴사에 관여하며, 동시에 과도하게 증식된 담관에서 콜라젠이 증가되면서 MDA, t-bili, hyp가 서로 상관성을 나타낸 것이라고 사료된다. 이는 Kim 등(1993, 2000)이 보고한 혈청 생화학적 변화와 간조직중 세포외기질 단백질인 콜라젠의 증가, Yasuda 등(1999)이 보고한 담즙울체에 의한 지질과산화 촉진, Lee 등(1995)의 지질과산화가 콜라젠의 유전자전사를 촉진시킨다는 연구결과가 그 근거이다. BDL/S-I군의 데이터를 종합하면 지질과산화는 담즙울체에 의한 hyp 증가와 매우 밀접한 연관성이 있는 것으로 생각되며, 위에서 언급한 모든 결과는 총담관결찰 수술 2주 후에 간섬유화가 확실하게 유도된다는 것을 설명한다.

BDL/S-II군인 총담관결찰 수술 4주후 실험군의 혈청생화학적 지표, MDA 농도, hyp양 모두가 BDL/S-I군 보다 높게 나타났다(Table 2, Figs. 1, 2). 특히 비장, 신장의 무게는 Table 1에서와 같이 BDL/S-II군 보다 BDL/S-I군에서 유의성 있게 높은 반면에, 간무게는 BDL/S-II군(118%)에서 BDL/S-I군(20.7%) 보다 유의성 있는 증가가 나타났다. 이는 간섬유화의 초기(수술 후 1~2주 사이)에 비장, 신장의 손상이 간손상과 함께 수반되며 심각한 간손상이 간섬유화를 넘어서 간경화로 진행되는 시기는 대체로 수술 후 2주에서 수술 4주 후에 뚜렷하게 나타난다고 생각할 수 있다. Table 3에 나타낸 것과 같이 단지 MDA와 hyp의 상관성은 BDL/S-I군에서 $r=0.784$, BDL/S-II군에서 $r=0.342$,

모든 혈청에서 $r=0.825$ 로 나타났는데 이것을 어떻게 이해할 것인가는 sham군과 BDL/S-I군의 MDA와 hyp의 mean±SD의 영역이 좁은 반면에 BDL/S-II군에서는 mean±SD의 영역 넓기 때문이며, 또한 sham군과 BDL/S-I군, BDL/S-II군을 종합하여 regression을 구하면 좋은 상관성이 나타난다. 본 연구와 일치하는 결과로 Yasuda 등(1999)은 DMN으로 간섬유화를 유도한 랫드에서 지질과산화 분해물인 MDA와 hepatic collagen양 사이에서 유사한 변화양상을 보고하고 있으나, 담즙울체로 유도한 간섬유화에서 뚜렷한 조직중 hyp와 혈청중 MDA와의 상관관계에 대한 보고는 본 연구에서 처음으로 시도한 것이다. 따라서 BDL/S-I군과 비교했을 때 BDL/S-II군에서 관찰된 높은 MDA와 혈청생화학적 수치, 간조직중 콜라젠 축적(hyp 수치), 조직학적 소견 등을 종합하면 지질과산화와 관련하여 그 대사기전과 항산화효과 검색 등의 연구에 기본이 되는 적합한 실험기간은 총담관결찰 후 3~4주라고 생각된다.

위의 결과로써 지질과산화의 지표인 MDA와 간섬유화(경화)의 지표인 hyp와의 좋은 상관성은 담즙울체에 기인하는 간섬유화에서 지질과산화를 촉진시키는 결과를 나타내고, hyp와 더불어 지질과산화 분해물의 변화를 관찰하는 것은 간보호 효과 및 항섬유화 효과를 동시에 검색할 수 있는 좋은 지표이다. 또한 총담관결찰방법을 사용하여 항산화와 항섬유화 효과를 검색하려면 최소한 2주 이상 4주가 최적의 관찰시기가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 한의학전문대학원 BK21사업비와 명인제약의 지원에 의해 수행된 것으로 감사 드립니다.

참고문헌

- Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulson, H.E., Schener, P.T. and Sobin, L.H. (1978): The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J. Clin. Pathol.*, **31**(5), 395-414.
- Bacon, B.R., Tavill, A.S., Brittenham, G.M., Park, C.H. and Recknagel, R.O. (1983): Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.*, **71**, 429-439.
- Bomzon, A., Holt, S. and Moore, K. (1997): Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin. Nephrol.*, **17**, 549-562.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.

- Cracowski, J.L., Marpeau, C., Carpentier, P.H., Lambert, B., Hunt, M., Stanke-Labesque, F. and Bessard, G. (2001): Enhanced *in vivo* lipid peroxidation in scleroderma spectrum disorders. *Arthritis Rheum.*, **44**(5), 1143-1148.
- Custer, R.P., Freeman-Narrood, M. and Narrood, S.A. (1977): Hepatotoxicity in Wistar rats following chronic methotrexate administration: A model of human reaction. *J. Natl Cancer Inst.*, **58**, 1011-1017.
- Cutrin, J.C., Zingaro, B., Camandola, S., Boveris, A., Pompella, A. and Poli, G. (2000): Contribution of gamma glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney. *Kidney International.*, **57**(2), 526-533.
- Diamond, J.R. (1992): The role of reactive oxygen species in animal models of glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.*, **19**, 292-300.
- Eder, M. and Gediqk, P. (1990): *Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie*. 33. Auflage, Springer-Lehrbuch, 68.
- Galambos, M.R., Collins, D.C. and Galambos, J.T. (1985): A radioimmunoassay procedure for type III procollagen: Its use in the detection of hepatic fibrosis. *Hepatology*, **5**, 38-42.
- Geerts, A., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P. and Wisse, E. (1989): *In vitro* differentiation of fat-storing cell parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J. Hepatol.*, **9**, 59-68.
- Jamall, I.S, Finelli, V.N. and Que Hee, S.S. (1981): A single method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.*, **112**(1), 70-75.
- Kim, K.Y., Scuppan, D. and Kim, J.B. (1993): The establishment of experimental liver fibrosis model in rats by two different methods of biliary obstruction. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*, **9**(1), 39-48.
- Kim, K.Y., Kim, J.S. and Yu, B.S. (2000): The study of liver cirrhosis (fibrosis) in rats by the 3 differential BDL obstruction. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*, **16**(4), 317-326.
- Koutras, J., Billing, B.H. and Scheuer, P.J. (1984): Prolonged bile duct obstruction: A new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.*, **65**(3), 305-311.
- Lee, K.S., Bruck, M., Houghlum, K. and Chojkier, M. (1995): Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type IIs mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2461.
- Ljubuncic, P., Tanne, Z. and Bomzon, A. (2000): Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut*, **47**(5), 710-716.
- Marja-Liisa, S., Heikki, A., Anni, H., Fulvio, U., Tom, M., Antonella, R., Dentscho, K. and Harry, H. (2001): Lipid peroxidation in human proteinuric disease. *Cell Biol. Immunol. Pathol. Intern. Soc. Nephrol.*, **59**(2), 481-487.
- Martinez-Hernandez, A. (1985): The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab. Invest.*, **53**, 166-186.
- Milani, S., Kim, K.Y., Schuppan, D. and Herbst, H. (1989): Vimentin expression of new formed rat bile duct epithelial cells in secondary biliary cirrhosis. *Virchow Archiv A Pathol. Anat.*, **415**, 237-242.
- Milani, S., Herbst, H., Kim, K.Y., Schuppan, D. and Hahn, E.G. (1990): Procollagen expression by nonparenchymal rat liver cells in experimental biliary fibrosis. *Gastroenterology*, **98**, 175-184.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, J., Pasdeloup, N., Brissot, P. and Cillard, P. (1990): Kinetic evolution of free malondialdehyde and enzyme leakage as indices of iron damage in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1647-1655.
- Nam, J.S., Kim, K.Y. and Lee, Y.S. (1996): Markers of collagen change in chronic secondary renal disease model in rat. *Kor. J. Toxicol.*, **12**(2), 213-221.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation; The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481-487.
- Rhoden, E.L., Pereira-Lima, L., Kalil, A.N., Lucas, M.L., Mauri, M., Menti, E., Rhoden, C.R., Pereira-Lima, J., Zettler, C.G. and Bello-Klein, A. (2000): Effects of ischemia and reperfusion on oxidative stress in hepatic cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Kobe. J. Med. Sci.*, **46**(4), 171-80.
- Ruwart, M.J., Wilkinson, K.F., Rush, B.D., Vidmazz, T.J., Hahn, E.G., Peters, K.M., Hendley, K.S., Appelman, H.D., Kim, K.Y. and Schuppan, D. (1989): The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology*, **10**(5), 801-806.
- Savolainen, E.R., Brocks, D., Ala-Kokko, L. and Kivirikko, K.I. (1988): Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *J. Biochem.*, **249**, 753-757.
- Schuppan, D. (1990): Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver; Collagen and glycoproteins. *Sem. Liv. Dis.*, **10**(1), 1-10.
- Seyer, J.M. (1980): Interstitial collagen polymorphism in

- rats with carbon tetrachloride -induced cirrhosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **629**, 490-498.
- Shimizu, I., Ma, Y.R., Mizobuchi, Y., Liu, F., Miura, T., Nakai, Y., Yasuda, M., Shiba, M., Horie, T., Amagaya, S., Kawada, N., Hori, H. and Ito, S. (1999): Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology*, **29**, 149-160.
- Simile, M.M., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., De Miglio, M.R., Muroli, M.R., Calvisi, D.F., Carru, A., Pascale, R.M. and Feo, F. (2001): 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication *J. Hepatol.*, **34**(3), 386-94.
- Sokol, R.J., Devereaux, M., Khandwala, R. and O'Brien, K. (1993): Evidence for involvement of oxygen free radical in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, **17**, 869-881.
- Stanely Mainzen Prince, P. and Menon, V.P. (2001): Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. *Phytother. Res.*, **15**(3), 213-218.
- Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. (2001): Alcohol-relate cirrhosis with pancreatitis; The role of oxidative stress in the progression of the disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **49**(2), 139-146.
- Tasi, L.Y., Lee, K.T., Tsai, S.M., Lee, S.C. and Yu, S.H. (1993): Changes of lipid levels in blood and liver tissues of patients with obstructive jaundice. *Clin. Chim. Acta.*, **215**(1), 41-50.
- Tamayo, R.P. (1983): Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, **3**, 112-120.
- Tsukamoto, H., Towner, S.J., Ciofalo, L.M. and French, S.W. (1986): Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*, **6**, 814-822.
- Willemer, S., Samens, K., Lindner, J. and Schmiegelow, P. (1984): Die Altersabhaengigkeit der fruehen Reaktion im Glycosaminoglykanstoffwechsel der Rattenleber auf eine einzeitige Thioacetaminschadigung. *Z. Gastroenterologie*, **17**, 150-156.
- Woolley, P.V. (1983): Hepatic and pancreatic damage produced by cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Review*, **10**, 117-137.
- Yasuda, M., Shimizu, I., Shiba, M. and Ito, S. (1999): Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology*, **29**, 719-727.
- Young, I.S. and McEneny, J. (2001): Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**(2), 358-62.