J. Fd Hyg. Safety 13(3), 258 - 267(1998)

Acetaminophen에 의해 유도된 흰쥐의 간손상에 미치는 Calcium Channel Blocker의 효과 및 조직학적 소견

이은경 · 정기화 · 정춘식†
덕성여자대학교 약학대학

Effect of Calcium Channel Blocker on Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Rats and Histopathologic Examination

Eun Kyong Lee, Ki Hwa Jung and Choon Sik Jeong†
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

ABSTRACT — The acetaminophen (APAP), an antipyretic and analgesic agent, induces the hepatotoxicity by increasing influx of calcium and destabilizing the cellular membrane which can be caused by N-acetyl-*p*-benzoquinoneimine generated by cytochrome P-450 (CYP-450) when it is overdosed. Diltiazem (DIL), a calcium channel blocking agent, has been known to suppress the CYP-450 activities. To study the effect of DIL in APAP treated rats, the serum biotransformational enzyme analyses and the liver histopathologic examination were conducted on the rats which had been administered DIL at 3, 6, 9 and 12 hours after the 3,000 mg/kg of APAP administration. Following a single dose of DIL administered 12 hours after APAP administration, serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, malondialdehyde and calcium contents of liver and microsome were significantly reduced. Glutathione S-transferase (GST) activity was significantly increased. Histopathologic studies showed that DIL had prevented the development of centrilobular necrosis induced by APAP in liver tissue. Our results suggested that diltiazem could inhibit the formation of free radical and the influx of calcium and could increase GST activity. Therefore, diltiazem can be administered at the time of 12 hours after overdosed APAP to diminish the liver damage.

Key words □ Acetaminophen, Diltiazem, ALT, AST, GST, Malondialdehyde, Calcium content

Acetaminophen(paracetamol, N-acetyl-p-aminophenol, 4-hydroxyacetanilide, APAP)은 acetanilide 및 phenacetine의 주요 대사물로서 1800년대 후반기에 합성되었으나 실제 해열 진통제로 많이 사용된 것은 1960년 이후였다.[1-3]

APAP의 과량 투여에 의한 간손상은 1966년 영국에서 처음 보고되었다.[4,5] 영국에서는 전체 약물 중독의 5%를 차지하며 APAP 과량 복용으로 인한 사망이 연 200여명에 이른다고 보고하고 있다.[6,7]

진통제로 사용되는 APAP는 경구투여시 30~60분이면 최고 혈중농도에 이르며, 흡수된 APAP는 대부분 간에서 glucuronide와 sulfate 포합체로 대사되고 일부는 CYP-450 monooxygenase system(mixed function oxidase, MFO)에 의해 *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine(NAPQI)으로 대사된다. 이 대사체는 glutathione(GSH)이 충분한 경우 GSH 포합체를 형성하여 바로 담즙 또는 뇨 중으로 배설되나 과량의 APAP 복용으로 GSH가 부족된 경우 NAPQI는 간세포의 단백질 및 효소와 결합하여 세포의 손상을 일으킨다.[8-10] 그러므로 phenobarbital, ethanol과 같은 CYP-450 유도제는 APAP의 대사체를 증가시킴으로 간손상을 더욱 악화시킨다.[11]

최근 많은 연구에서 APAP 과량 투여후 세포막의 붕괴로 인한 세포내 calcium 이온의 증가가 간세포를 괴사시킨다고 보고하였다. 이와 관련하여 APAP 과량 투여후 19~24시간 사이의 calcium ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 투여는 간세포 괴사를 억제하며 이는 calcium 이온과 관련한 세포 괴사 기전을 입증해 주고 있다.[12,13]

Calcium channel blocker (CCB)는 간의 CYP-450에 의해 대사 되며 다른 약물의 대사를 경쟁적으로 저해한다. 이와 같은 CCB의 약물대사 효소 저해작용은 간에서 toxic free

† Author to whom correspondence should be addressed.

radicals의 형성을 억제함으로써 간세포 괴사에 억제효과가 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 APAP 과량 투여로 인한 중독이 발생하였을 때 비교적 빠른 시간 안에 해독제로 사용할 수 있는 위세척이나 활성탄 또는 acetylcysteine을 시간의 경과로 투여할 수 없는 경우 대체 약물로써 협심증, 부정맥 등을 비롯한 다양한 심혈관계질환의 치료에 사용되는 benzothiazepine계 CCB의 일종인 DIL을 이용하여 APAP에 의한 간 손상의 억제를 기대하고자 한다.

DIL의 작용기전 및 효과적인 투여 시간을 확인하여 그 임상적 적용의 가능성을 알아보기 위해 APAP투여 3, 6, 9 및 12시간 후에 DIL을 복강 내로 투여한 후 간장, 신장 및 비장의 무게를 측정하고 혈청 ALT, AST 및 alkaline의 phosphatase(ALP) 활성도, bilirubin, albumin, total protein (TP), cholesterol, triglyceride(TG), blood urea nitrogen(BUN), creatinine 등의 함량을 관찰하였다. 또한 간 조직 중의 cholesterol, TG, calcium과 malondialdehyde(MDA)의 함량 및 glutatione S-transferase(GST) 활성도를 측정하고 광학현미경을 통하여 간 조직의 손상 정도를 검경하여 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약과 기기

시약은 acetaminophen, bovine serum albumin, glycine, 4-chloro-1-naphtnol, Tris base, Tris acetate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, sodium citrate, Tris hydrochloride, osmium tetraoxide, propylene oxide, toluidine blue, guanidine thiocyanate 및 sodium acetate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), diltiazem(Hanil Pharmaceutical Co., Korea), thiobarbituric acid(TBA, BDH Laboratory, England), EDTA 및 cupper sulfate(Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd.)를 사용하였고 기타 시약은 Duksan pharmaceutical Co.(Korea)로 부터 특급시약을 구입하여 사용하였으며 생화학분석에 사용한 kit는 영동제약제품을 사용하였다.

기기는 high speed centrifuge(DuPont Sorvall Instrument, Model RC-5C), ultracentrifuge(Beckman Co., Ltd., L-80), microscope(Hitachi, H-600), UV spectrophotometer(Hewlett Packard, HP 8452A Diode-Array), Osterizer blender(Oster Co., Listed 564A Household type) 및 Tissue tearor(Biospec Products, Inc., Model 985-370)를 사용하였다.

실험 동물

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(180~220 g)를 삼육실험동물연구소(주)에서 공급받아 실내 온도 22±1°C에서 충분한 물과 고형사료(삼양사료)를 공급하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

간 손상 유발과 DIL 투여

APAP는 식염수에 녹여 예비 실험 결과를 토대로 3,000 mg/kg의 용량으로 16시간 절식시킨 흰쥐에 경구 투여하여 간독성을 유발시키고 이를 6마리씩 6군으로 나누었다. 대조군으로 흰쥐 6마리를 정상군으로 하고 APAP 단독 투여군을 설정하였으며 나머지 4군은 DIL 24 mg/kg을 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후에 각각 1회 복강내로 투여하였다.

APAP 투여 24시간후 흰쥐를 ether로 마취시키고 복부 정중선을 절개하여 심장에서 채혈하여 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리시켜서 얻은 혈청을 검체로 사용하였다. 대조군은 생리식염수를 1회 복강내로 투여 하였다.

간장, 신장 및 비장의 무게 측정

APAP 투여 24시간 후 체중과 간장, 신장 및 비장의 무게를 측정한 후 체중 100 g에 대한 무게로 환산하였다.

혈청 생화학적 분석

APAP 투여 24시간 후에 얻은 혈청에서 ALT, AST 및 ALP의 활성도를 측정하고, bilirubin, albumin, TP, cholesterol, TG, BUN 및 creatinine 함량을 분석하였다.

간장 조직 중의 지질 분석

APAP 투여 24시간후 적출한 간조직 중의 일부를 취하여 phosphate buffer saline(PBS, pH 7)에 넣고 약 1분간 분쇄한 후 10% liver homogenate를 만들어 cholesterol과 TG 함량을 분석하였다.

Microsome과 cytosol 분리

흰쥐 간을 적출하여 PBS로 혈액 등을 제거한 후 간무게의 3배 용량의 0.1 M Tris-KCl buffer(0.1 M Tris Ac, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)를 가하고, 가위로 잘게 세절한 다음 Osterizer blender를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직은 원심분리기로 8,000 g에서 30분, 10,000 g에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 105,000 g에서 90분간 초원심분리하여 상등액인 cytosol을 분리하였다. 침전물을 동량의 0.1 M sodium pyrophosphate buffer(0.1 M sodium pyrophosphate, 1 mM EDTA, pH 7.4)로 현탁시키고 144,000 g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 microsome을 50 mM Tris Acetate buffer(50 mM Tris-Acetate, 20% glycerol, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 재분산시킨 후 분주하여 사용하기

직전까지 -70°C에 보관하였다. 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하였다.

단백정량

단백정량은 Lowry 등[14]의 방법에 따라 실시하였다. 회석된 microsome 및 cytosol 0.6 m*l*에 0.5 m*l* Lowry complex (0.2 m*l*의 4% sodium potassium tartrate, 0.2 m*l*의 2% copper sulfate와 10.0 m*l*의 4% sodium bicarbonate/0.2 N sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼합하였다. 15분후 0.1 m*l*의 Folin Ciocalteou's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분간 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 산출하였다.

지질과산화물 함량 측정

Microsome의 지질과산화물 함량 측정은 Uchiyama 등[15]의 방법에 따라 시행하였다. Microsome 0.5 m*l*에 1% H_3PO_4, 0.67% TBA 시약을 가하고 95°C water bath에서 45분 경과 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 m*l*를 가해서 진탕 추출한 후 원심분리하여 butanol층을 취해 535 nm와 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 MDA 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.

GST 활성도 측정

Cytosol에 존재하는 GST 활성도는 Habig[16] 등의 방법에 따라 시행하였으며 CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)가 GST에 의하여 GSH와 포합되었을 때의 고유의 노란색이 탈색되는 속도를 측정함으로써 산출하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)와 cytosol 단백질 25 μg에 넣고 25°C에서 2분간 방치후 기질로써 1.0 mM의 CDNB와 1.0 mM의 GSH를 가하여 총량을 1.0 m*l*로 한 후 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 100초 동안 흡광도를 측정하였다. Blank로는 가열하여 불활성화한 cytosol 단백질을 사용하였으며 분자흡광계수 9.6 $\mu M^{-1}cm^{-1}$로 환산하여 계산하였다.

Calcium 함량 측정

간균질액과 microsome을 원심분리하여 O-cresolphthalein complexone과 반응시킨 다음 25°C 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검체에서의 calcium 함량을 계산하고 이를 μg/mg protein으로 나타내었다.

조직학적 검경

흰쥐의 간을 2 mm의 두께로 절제하여 10% formalin에 4°C에서 10시간 동안 고정한 후 ethanol로 탈수시켜 xylene으로 처리하였다. 처리 후 paraffin에 포매하여 고체화한 후 microtome을 이용하여 4 μm의 두께로 박절한 조직을 유리슬라이드에 59°C의 열로 부착시킨 다음 xylene으로 처리하고 100% ethanol로 부터 단계적인 농도로 세척하여 절편된 조직을 재수화시켰다. 그 후 통상의 방법으로 hematoxylin-eosin으로 염색하고 광학현미경으로 검경하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준편차를 계산하였고, 각 군간의 차이는 student t-test를 실시하여 p값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험 결과

간장, 신장 및 비장의 무게에 미치는 영향

체중에 대한 간장, 신장 및 비장의 무게를 Table 1에 나타내었다. 간장의 무게는 APAP 단독 투여군(4.06 g)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후에 DIL을 투여한 실험군에서는 각각 4.14, 3.74, 3.41 및 3.62 g으로 APAP 투여 9시간과 12시간 후의 DIL 투여군에서 유의성있게 감소하였다. 신장의 무게는 APAP 단독 투여군(0.43 g)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서는 각각 0.40, 0.41, 0.38 및 0.42 g으로 차이를 보이지 않았으나 비장의 무게는 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 거의 정상군과 같았다.

Table 1. Effects of diltiazem on organ weight in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Liver (g/100 g BW)	Spleen (g/100 g BW)	Kidney (g/100 g BW)
Control	-	3.25±0.41	0.62±0.14	0.43±0.05
APAP	-	4.06±0.50	0.51±0.27	0.43±0.09
APAP+D3h	24	4.14±0.42	0.42±0.13	0.40±0.06
APAP+D6h	24	3.74±0.42	0.38±0.14	0.41±0.03
APAP+D9h	24	3.41±0.24*	0.45±0.17	0.38±0.04
APAP+D12h	24	3.62±0.24*	0.65±0.28	0.42±0.03

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
*P<0.05 compared to the APAP group.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

혈청 생화학치에 미치는 영향

ALT와 AST 활성도를 Table 2에 나타내었다. ALT 활성도는 APAP 단독 투여군(1295.3 KA unit/*l*)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 각각 1483.6, 1206.5, 909.6 및 28.2 KA unit/*l*로 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. AST 활성도는 APAP 단독 투여군에 비하여 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 유의성있는 감소를 보였다.

ALP 활성도와 bilirubin 함량을 Table 3에 나타내었다. ALP 활성도는 정상군(1.19 KA unit/*l*)에 비해 APAP 단독 투여군은 1.12 KA unit/*l*, APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 각각 1.85, 2.20, 1.43 및 0.88 KA unit/*l*로 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 거의 정상군과 같았다. Bilirubin 함량은 APAP 단독투여군(11.7 mg/d*l*)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서는 각각 16.3, 18.2, 11.5 및 14.9 mg/d*l*로 APAP 투여 9시간 후의 DIL 투여군을 제외하고는 bilirubin 함량이 다소 증가하였다.

Albumin과 TP 함량을 Table 4에 나타내었다. Albumin 함량은 APAP 단독 투여군(3.41 g/d*l*)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 각각 3.54, 3.11, 3.29 및 3.27 g/d*l*로 APAP 투여 3시간 후의 DIL 투여군을 제외한 모든 실험군에서 감소하였다.

TP 함량에 있어서는 APAP 단독 투여군(4.40 g/d*l*)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서 다소 증가하였다.

Cholesterol과 TG 함량을 Table 5에 나타내었다. Cholesterol 함량은 APAP 단독 투여군(47.2 mg/d*l*)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서는 각각 79.3, 59.3, 64.6 및 39.2 mg/d*l*로 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 다소 감소하였다.

TG 함량은 APAP 단독 투여군(25.0 mg/d*l*)에 비해 6시간 후의 DIL 투여군에서 다소 감소하였다.

Table 2. Effects of diltiazem on serum ALT and AST activities in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	ALT (KA unit/*l*)	AST (KA unit/*l*)
Control	–	29.6±12.4	119.1±13.1
APAP	–	1295.3±555.6	1584.6±619.3
APAP+D3h	24	1483.6±74.4	1533.3±123.8
APAP+D6h	24	1206.5±670.5	1249.2±498.4
APAP+D9h	24	909.6±581.4	1159.1±357.1
APAP+D12h	24	28.2±17.1*	150.1±92.8*

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
*P<0.001 compared to the APAP growp.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Table 3. Effects of diltiazem on serum ALP activity and bilirubin content in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	ALP (KA unit/*l*)	Bilirubin (mg/*l*)
Control	–	1.19±0.80	8.1±2.3
APAP	–	1.12±0.95	11.7±5.3
APAP+D3h	24	1.85±0.80	16.3±7.7
APAP+D6h	24	2.20±1.08	18.2±14.5
APAP+D9h	24	1.43±0.50	11.5±5.5
APAP+D12h	24	0.88±0.45	14.9±4.2

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Table 4. Effects of diltiazem on serum albumin and TP contents in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Albumin (g/d*l*)	TP (g/d*l*)
Control	–	2.92±0.49	5.79±1.79
APAP	–	3.41±0.29	4.40±1.53
APAP+D3h	24	3.54±1.49	5.57±0.67
APAP+D6h	24	3.11±0.60	5.01±0.76
APAP+D9h	24	3.29±0.38	5.91±1.22
APAP+D12h	24	3.27±0.41	5.94±2.55

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Table 5. Effects of diltiazem on serum cholesterol and TG contents in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Cholesterol (mg/dl)	TG (mg/dl)
Control	–	60.0±19.0	57.7±45.8
APAP	–	47.2±26.9	25.0±22.3
APAP+D3h	24	79.3±56.6	43.2±27.1
APAP+D6h	24	59.3±26.5	19.9±11.9
APAP+D9h	24	64.6±17.6	26.0±23.5
APAP+D12h	24	39.2±30.6	26.2±11.2

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

BUN과 creatinine 함량을 Table 6에 나타내었다. BUN 함량은 정상군(17.4 mg/dl)에 비해 APAP 단독 투여군은 23.9 mg/dl, APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서는 각각 16.3, 37.6, 27.5 및 16.8 mg/dl로 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군이 거의 정상군과 같았다. Creatinine 함량은 정상군에서 0.62 mg/dl이었고 APAP 단독 투여군은 0.63 mg/dl로 별다른 차이가 없었다.

Table 6. Effects of diltiazem on BUN and creatinine contents in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
Control	–	17.4±2.7	0.62±0.18
APAP	–	23.9±10.3	0.63±0.23
APAP+D3h	24	16.3±7.7	0.64±0.09
APAP+D6h	24	37.6±22.8	0.78±0.09
APAP+D9h	24	27.5±11.9	0.60±0.36
APAP+D12h	24	16.8±3.8	0.64±0.27

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

간장 조직중의 지질함량에 미치는 영향

간조직에서의 cholesterol과 TG 함량을 Table 7에 나타내었다. Cholesterol 함량은 APAP 단독 투여군(7.68 mg/g)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12 시간 후의 DIL 투여군은 7.86, 7.53, 6.62 및 6.56 mg/g로 APAP 투여 6시간과 9시간 후의 DIL 투여군에서 감소하였다. TG 함량에 있어서는 APAP 단독 투여군(8.66 mg/g)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 7.88, 6.10, 7.10 및 10.3 mg/g로 APAP 투여 6시간 후의 DIL 투여군에서 유의성있게 감소하였다.

Microsome의 지질과산화물 함량을 Table 8에 나타내었다. MDA 함량은 APAP 단독 투여군(0.74 nmol/mg protein)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 0.55, 0.43, 0.47 및 0.34 nmol/mg protein으로 APAP 투여 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서 모두 유의성있는 감소를 보였다.

GST 활성도에 미치는 영향

Cytosol에 존재하는 GST의 활성도를 Table 9에 나타내었다. 간에서 분리한 cytosol을 CDNB를 기질로 하여 GST 활성도를 측정한 결과 APAP 단독투여군(0.55 μmol/min/mg protein)에 비해 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 각각 0.55, 0.56, 0.69 및 0.72 μmol/min/mg protein으로 APAP 투여 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서 증가를 보였다.

Table 7. Effects of diltiazem on cholesterol and TG contents in liver of rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Cholesterol (mg/g liver)	TG (mg/g liver)
Control	–	6.72±0.15	12.1±5.57
APAP	–	7.68±2.62	8.66±1.67
APAP+D3h	24	7.86±2.39	7.88±1.88
APAP+D6h	24	7.53±2.55	6.10±2.01*
APAP+D9h	24	6.62±0.83	7.10±1.92
APAP+D12h	24	6.56±1.13	10.3±2.11

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
*P<0.001 compared to the APAP growp.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Table 8. Effects of diltiazem on MDA content in liver of rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	MDA (nmol/mg protein)
Control	–	0.40±0.19
APAP	–	0.74±0.23
APAP+D3h	24	0.55±0.23
APAP+D6h	24	0.43±0.13*
APAP+D9h	24	0.47±0.08
APAP+D12h	24	0.34±0.16*

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
*P<0.05 compared to the APAP group.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Table 9. Effects of diltiazem on GST activity in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	GST activity (μmol/min/mg protein)
Control	–	1.00±0.07
APAP	–	0.55±0.07
APAP+D3h	24	0.55±0.20
APAP+D6h	24	0.56±0.20
APAP+D9h	24	0.69±0.06**
APAP+D12h	24	0.72±0.17**

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
**P<0.01 compared to the APAP group.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

Calcium 함량에 미치는 영향

간조직과 microsome에서의 calcium 함량을 Table 10에 나타내었다. 간조직에서의 calcium 함량은 정상군(1.28 μg/mg protein)에 비해 APAP 단독 투여군은 2.27 μg/mg protein으로 2배 정도 증가하였으나 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 1.75, 1.50, 1.09 및 1.31 μg/mg protein으로 유의성있게 감소하였다. Microsome에서의 calcium 함량은 정상군(0.45 μg/mg protein)에 비해 APAP 단독 투여군에서는 0.69 μg/mg protein으로 증가하였으나 APAP 투여 3, 6, 9 및 12시간 후의 DIL 투여군은 각각 0.51, 0.50, 0.46 및 0.56 μg/mg protein으로 유의성있게 감소하였다.

Table 10. Effects of diltiazem on calcium contents of the liver and microsome in rats treated with acetaminophen

Treatment	Dose (mg/kg, i.p.)	Liver (μg/mg protein)	Microsome (μg/mg protein)
Untreated	–	1.28±0.05	0.45±0.13
APAP	–	2.27±0.05	0.69±0.04
APAP+D3h	24	1.75±0.00***	0.51±0.21
APAP+D6h	24	1.50±0.03***	0.50±0.05**
APAP+D9h	24	1.09±0.17***	0.46±0.12*
APAP+D12h	24	1.31±0.25**	0.56±0.06*

The values are expressed as mean±S.D., (n=6).
*P<0.05 compared to the APAP group.
**P<0.01 compared to the APAP group.
***P<0.001 compared to the APAP growp.
APAP: acetaminophen treated rats (3,000 mg/kg).
APAP+D3h: Rats treated with diltiazem 3 hours after acetaminophen administration.
APAP+D6h: Rats treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration.
APAP+D9h: Rats treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration.
APAP+D12h: Rats treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration.

조직학적 소견

광학현미경(100배)으로 관찰한 결과는 Fig. 1에서 Fig.

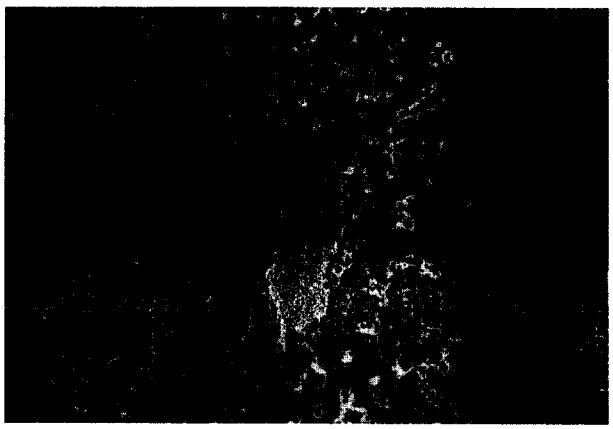

Fig. 1. Histological findings in normal rat (H&E, ×100). Note well-preserved lobular architecture.

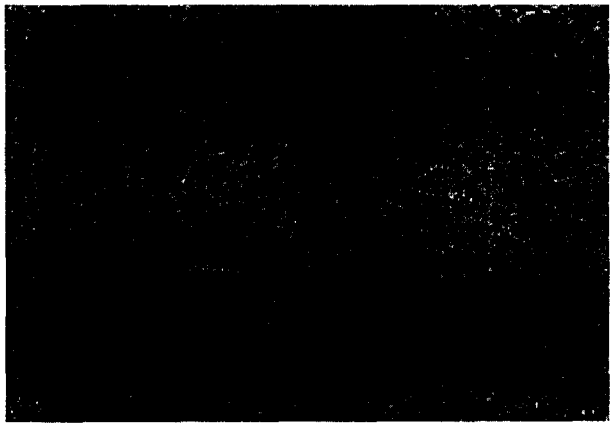

Fig. 2. Histological findings in the rat after acetaminophen administration (H&E, ×100). Note massive necrosis.

Fig. 3. Histological findings in the rat treated with diltiazem 3 hour after acetaminophen administratyion (H&E, ×100). Note massive necrosis.

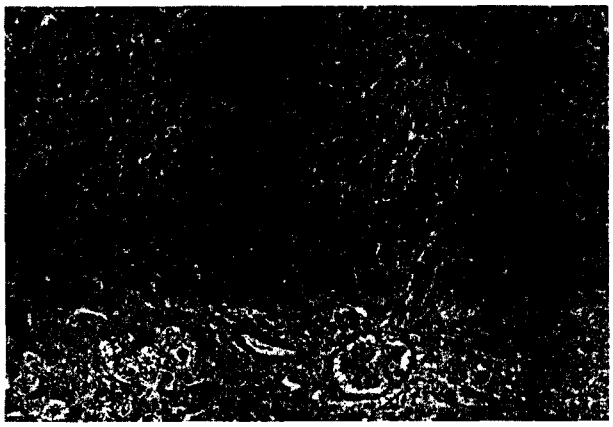

Fig. 4. Histological findings in the rat treated with diltiazem 6 hours after acetaminophen administration (H&E, ×100). Note moderate necrosis and congestion of central vein.

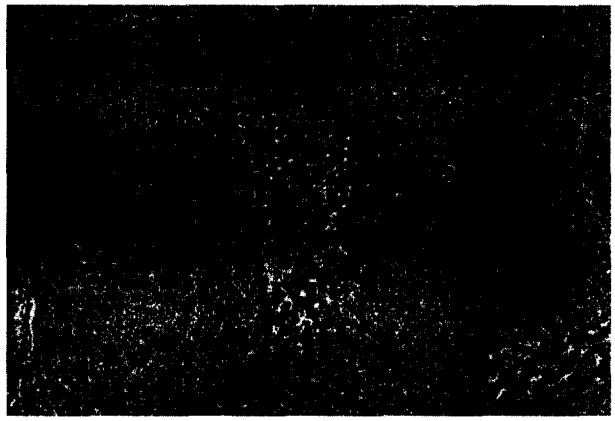

Fig. 5. Histological findings in the rat treated with diltiazem 9 hours after acetaminophen administration (H&E, ×100). Note mild necrosis and pericentral congestion.

Fig. 6. Histological findings in the rat treated with diltiazem 12 hours after acetaminophen administration (H&E, ×100). Note recovery of hepatocyte and balloning degeneration.

6과 같다. Fig. 1의 정상군과 비교하여 Fig. 2과 3에 나타난 것처럼 APAP 단독 투여군과 APAP 투여 3시간 후 DIL 투여군에서는 광범위한 간세포의 손상이 관찰되었다. Fig. 4의 APAP 투여 6시간후 DIL 투여군에서는 central vein의 충혈이 보였으며 Fig. 5의 APAP 투여 9시간 후의 DIL 투여군에서는 세포 손상이 약간 회복되었으나 pericentral vein의 충혈이 관찰되었다. Fig. 6의 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서는 간세포의 손상 정도가 거의 정상군과 같이 회복된 것을 확인할 수 있었다.

결론 및 고찰

Acetaminophen은 가정 상비용 진통제로 사용되고 있으

나 급성 중독은 치명적인 간손상을 일으킬 수 있다. APAP의 과량 복용시 위세척 등의 응급조치 외에 기관지 점액 용해제로 사용되는 acetylcysteine을 3시간 이내에 투여해야 한다.[17] 그러나 시간 경과로 acetylcycteine을 사용할 수 없는 경우 APAP에 의한 간손상을 DIL이 억제할 수 있는지를 확인하고 효과적인 투여 시간을 정하여 임상에 응용하고자 본 연구를 수행하였다.

APAP 독성은 활성대사체인 NAPQI와 GSH 양의 비율에 의존하여 연령, 식이습관, 영양상태, 음주, 약물 복용상태나 병력에 따라 독성의 정도가 다르기는 하지만 사람에서의 간손상은 APAP 250 mg/kg 이상 복용하였을 때 약 50% 정도에서 일어난다.[18] 본 연구에서는 APAP 과량투여 후 3, 6, 9 및 12시간 후 DIL 24 mg/kg을 복강내로 투여하여[19] 간의 무게와 간손상의 지표가 되는 혈청 및 간조직에서의 여러 효소를 분석하였으며 조직학적 병변의 여부를 광학현미경으로 검경하였다.

간세포의 변성 및 괴사의 지표인 ALT, AST 활성도의 저하, 간의 단백 합성 능력을 나타내는 TP의 함량 증가, 간중성지방의 억제로 인한 cholesterol, TG 함량 감소는 APAP에 의한 간손상의 억제효과를 확인할 수 있었다.[20-33]

APAP의 간 손상은 간에서 neutrophil과 macrophage의 축적으로 지질과산화를 포함한 간 세포의 손상을 일으키며[34] 지질과산화물이 생체막에 구조의 변화를 일으키고 내부의 효소계가 파괴됨으로써 혈액 및 조직내 과산화지질 함량이 증가하게 된다는 연구결과[35]에 근거하여 지질과산화물을 TBA법을 이용하여 측정한 결과 본 실험에서 APAP 투여 6, 9 및 12시간 후 DIL을 투여한 실험군에서 유의성 있는 감소를 보였으므로 free radicals의 과다 생성으로 인한 조직손상에 억제 효과가 있는 것으로 판단된다.

GST는 호기성세포의 세포질에 주로 존재하는 phase II 대사효소로 세포내로 유입된 약물들의 대사로 인체 생성되는 oxygen free radical이나 친전자성 독성물질에 GSH의 thiol기를 포함시킴으로써 독성화합물의 해독화 작용을 한다.[36] 본 실험에서 APAP 투여 9 및 12시간 후의 DIL 투여군에서 APAP 단독투여군 보다 GST 활성도가 증가한 것은 APAP 투여로 생성된 NAPQI의 해독화과정에 관여하여 간세포 보호 작용에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

간조직과 microsome에서의 calcium 함량은 정상군과 비교하여 APAP 투여군에서 증가하였는데 이는 간손상이 세포의 calcium 항상성의 교란과 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한 APAP 투여후 DIL을 투여한 실험군에서 calcium 함량이 감소한 결과는 DIL이 세포내 calcium 유입을 억제하여 효과를 나타내는 것으로 확인하였다. 그러나 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서만 정상군과 유사하였던 ALT, AST 등의 실험 결과와 비교하여 볼 때 APAP 투여 3, 6 및 9시간 후의 DIL 투여군에서도 감소한 결과는 작용기전 면에서 좀 더 연구가 필요할 것으로 보인다.

광학현미경의 검경시 APAP 투여로 광범위한 세포의 괴사와 Kuffer 세포의 증가가 확인되었으나 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서는 간세포가 정상군과 같이 회복된 것을 알 수 있었다. 이는 ALT 및 AST 등을 포함한 간 기능의 지표가 되는 여러 분석 자료가 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 억제 효과를 보인 것과 일치하였다.

정상세포에서는 세포내 calcium이 세포막과 미토콘드리아 및 ER에서 일정한 농도로 유지되고 있다. 그러나 APAP와 같은 간 손상물질에 의해서 세포막의 calcium channel, Na^{+}/Ca^{+2} exchange 및 비특이적인 membrane leak 등의 간손상과 대사에너지 감소로 세포내 calcium이 증가된다.[37] 과량의 APAP 투여후 간 세포 내의 calcium 농도가 급격히 증가하는 18~24시간 이내에[23] DIL의 투여가 세포내로의 calcium 유입을 억제하여 세포내 calcium의 축적과 세포 괴사를 억제하는 것으로 추측된다.

이러한 결과로 볼 때 APAP 투여 12시간 후의 DIL 투여군에서 혈청과 간조직에서의 생화학적 분석과 조직학적 관찰에서 간손상의 개선 효과가 확인되었으며 이는 세포내로의 calcium 유입과 지질과산화의 억제 및 GST의 활성도 증가에 기인한 것으로 보인다.

감사의 말씀

본 연구는 98년도 덕성여자대학교와 과기처 선도기술개발과제 연구비의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

국문 요약

해열 및 진통효과를 가진 APAP는 과량 복용시 CYP-450에 의해 독성 유발 물질인 NAPQI로 대사되어 간장과 세포막을 붕괴시켜 세포내 calcium유입을 증가시킴으로서 간세포의 괴사를 일으킨다. DIL은 CYP-450 작용을

억제하는 것으로 알려진 칼슘채널차단제이다. 따라서 본 연구에서는 APAP 300 mg/kg을 경구 투여한 후 3, 6, 9 및 12시간에 DIL을 복강내로 투여하여 DIL이 APAP의 독성에 미치는 영향을 조사하였다. APAP투여 12시간후 DIL 투여군에서 혈청과 간조직의 생화학적 분석과 조직학적 관찰에서 간손상의 개선 효과가 확인되었으며, 이는 세포내로의 calcium 유입과 지질과산화의 억제 및 GST의 활성도 증가에 기인한 것으로 보인다. 그러므로 APAP 과량 복용 12시간 후의 DIL 투여는 간손상의 억제에 효과적일 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Rumack, B. and Peterson, R. : Acetaminophen overdose; Incidence, diagnosis and management in 416 patients. *Pediatrics,* **62**, 901 (1978).
2. Levy, G. and Houston, B.: Effect of activated charcoal on acetaminophen absorption. *Pediatrics,* **58**, 432-435 (1976).
3. Medical index 6th 405-407 (1991).
4. Davidson, D.G.D. and Eastham, W.N.: Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Bri. Med. J.,* **2**, 497-499 (1966).
5. Meredith, T.J. and Vale, J.A.: Non-narcotic analgesics problems of overdosage. *Drugs,* **32**, 177-205 (1986).
6. Paulozzi, L.J.: Seasonality of reported poison exposures. *Pediatric,* **71**, 890-893 (1983).
7. Meredith, T.J. and Vale, J.A.: Epidermiology of analgesic overdose in England and Wales. *Human Toxicology,* **3**, 61S-74S (1984).
8. Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **187**, 211-217 (1973).
9. Prescott, L.F. and Wright, N.: The effects of hepatic and renal damage on paracetamol metabolism and excretion following overdosage. A pharmacokinetic study. *British Journal of Pharmacology,* **49**, 602-613 (1973).
10. Slattery, J. and Levy, G.: Acetaminophen kinetics in acutely poisoned patients. *Clin. Pharmacol. Ther.,* **25**, 184-185 (1979).
11. Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Petter, W.Z., Davies, D.C., Gillette, J.R. and Brodie, B.B.: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **187**, 185-194 (1973).
12. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. and Tayler, P.: The pharmacological basis of therapeutics. 18th Member of Maxwell Macmillan Pergamon Publishing Co. 658-659 (1990).
13. Toxicology and Applied Pharmacology III, 242-254 (1991).
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rasndall, R.R.: Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**, 265-275 (1951).
15. Uchiyama, M. and Mihara, M.: *Anal. Biochem. Biochem.,* **86**, 271-278 (1978).
16. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferase; the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biolo. chem.,* **249**, 7130-7139 (1974).
17. Smilksteine, M.J., Knapp, G.L., Kulig, K.W. and Rumack, B.H.: Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. *N. Engl. J. Med.,* **319**, 1557-1562 (1987).
18. Prescott, L.F. and Critchley, J.A.J.H.: The treatment of acetaminophen poisoning. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.,* **23**, 87-101 (1983).
19. Koubach, A.B. and Souich, P.: Effect of diltiazem on acetaminophen and phalloidine hepatotoxicity. *Research Communication in Chemical Pathology,* **68**, 143-157 (1990).
20. Yamada, S., Murawaki, Y. and Kawasaki, H.: Prevention effect of gomisin A, a lignan component of shizandra fruits, on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Biochem. Pharmacol.,* **46**, 1081-1085 (1993).
21. Kui-Nyung, Y. and Chong-soon, R.: Chemical pathology file. Euihak Munwhasa Co., Seoul (1993).
22. Plaa, G.L. and Hewit, W.R.: Principles and methods of toxicology. Paben press. 407-445 (1983).
23. Beals, D., Hue, D.P. and McLean, A.E.M.: Lipid peroxidation, protein synthesis and protection by calcium EDTA in paracetamol injury to isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.,* **34**, 19-23.
24. Satorres, J., Perez-Mateo, M., Mayol, M.J. Esteban, A. and Graells, M.L.: Protective effect of diltiazem against acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Liver,* **15**, 16-19 (1995).
25. Deakin, C.D., Fagan, E.A. and Williams, R.: Cytoprotective effects of calcium channel blockers. *Hepatology,* **12**, 251-255 (1991).
26. Danielsson, A., Lindstrome, P., Karlsson, K. and Sehlin, J.: Protective effects of calcium channel blockers on acute bromobenzene toxicity to isolated rat hepatocytes. *Scan. J. Gastroenterol.,* **30**, 590-600 (1995).
27. Burcham, P.C. and Harman, A.W.: Effect of acetaminophen hepatoxicity on hepatic mitochondrial and microsomal calcium contents in mice. *Toxicology Letters,* **44**,

91-99 (1988).
28. Ray, S.D., Kamendulis, L.M., Gurule, M.W., Yorkin, R. D. and Lorcoran, G.B.: Ca^{+2} antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *The FASEB Journal,* **7**, 453-463 (1993).
29. Dimova, S., Koleva, M., Ranelova, D. and Stoythchey, T.: Effect of nifedipine, verapamil, diltiazem and trifluoperazine on acetaminophen toxicity in mice. *Arch. Toxicol.,* **70**, 112-118 (1995).
30. Deakin, C.D., Gove, C.D., Fagan, E.A., Tredger, J.M. and Williams, R.: Hepatoprotective effects of a calcium channel blocker after paracetamol overdose in mice. *Human. Toxicol,.* **10**, 119-123 (1991).
31. Arthus, C.G.: Textbook of medical physiology 8th, 754-764 (1991).
32. Hoyumba, A.M. Jr., Greene, H.L., Dunn, G.D. and Schenker, S.: Fatty liver: Biochemical and chemical considerations. *Dig. Dis.,* **20**, 142 (1975).
33. Walker, R.M., Racz, W.J., and McElligott, T.F.: Acetaminophen-induced hepatotoxic congestion in mice. *Hepatology,* **5**, 235-240 (1985).
34. Klinczak, J., Wisnewska-Knypl, J.M. and Kolakowsk, J.: Stimulation of lipid peroxidation and heme oxygenase activity with inhibition of cytochrome P-450 monooxygenase in the liver of rats repeatedly exposed to cadmium. *Toxicology,* **32**, 267-276 (1984).
35. Vos, R.E.M. and Van Bladern, P.J.: Gluthathione S-transferases in relation to thier role in the biotransformation of xenobiotics, *Chem. Biol. Interact.,* **41**, 241-265 (1990).
36. Chiu, S. and Bhakthan, N.M.G.: *Lab. Invest.,* **39**, 193-203 (1978).
37. Schwartz, A. and Triggle, D.J.: Cellular action of calcium channel blocking drugs. *Ann. Rev. Med.,* **35**, 325-339 (1984).