

비알콜성 지방간염에서 항산화 상태

계명대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실¹, 진단방사선학교실²

박경식·장병국·권기민·정우진·조광범·황재석·안성훈·문교철¹·김영환²

Abstract

Antioxidant Status in Nonalcoholic Steatohepatitis

Kyung Sik Park, M.D., Byoung Kuk Jang, M.D., Ki Min Kwon, M.D., Woo Jin Chung, M.D., Kwang Bum Cho, M.D., Jae Seok Hwang, M.D., Sung Hoon Ahn, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.¹ and Young Hwan Kim, M.D.²

Department of Internal Medicine, Biochemistry¹, and Diagnostic Radiology², Keimyung University College of Medicine, Daegu, Korea

Background/Aims: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is chronic liver disease that can potentially progress to end stage liver disease. Oxidative stress to the vulnerable fatty liver has been reported as a key mechanism in development of NASH. Several antioxidant pathways have been identified, but reports that involved quantitative analysis of each antioxidant systems are rare, and these reports have shown various results. So, we investigated antioxidant status and the degree of oxidative stress by measuring several antioxidant enzymes, the total antioxidant status (TAS), and the metabolites of superoxide in NASH patients. **Methods:** Nineteen NASH patients who were confirmed by liver biopsy and fifteen controls were involved in this study. The levels of body mass index (BMI), AST, ALT, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, TAS, hydrogen peroxide (H₂O₂), and malondialdehyde (MDA) were compared between both groups. The relationship between the histologic severity and the levels of each antioxidants were analyzed in the NASH group. **Results:** The activities of SOD and catalase were lower in the NASH group. The concentrations of TAS and H₂O₂ were higher in NASH group. The level of GPx and MDA showed no significant differences between both groups. There were no significant relationships between the above variables and the pathological severity. **Conclusions:** The disturbed metabolism of superoxide due to the decreased activities of SOD and catalase seem to be important in the pathogenesis of NASH. Further investigations about the nonenzymatic secondary antioxidant mechanism are necessary because the TAS was higher for the NASH group. The lack of difference between both groups for the concentration of MDA indicates that mechanisms other than lipid peroxidation also may be important in the pathogenesis of NASH. (*Korean J Hepatol* 2005;11:135-143)

Key Words: Antioxidant status, Nonalcoholic steatohepatitis

◇ 접수 2005년 1월 20일; 수정본 접수 2005년 5월 3일; 승인 2005년 5월 3일

◇ Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; ASH, alcoholic steatohepatitis; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; Fe²⁺, ferrous ion; Fe³⁺, ferric ion; FFA, free fatty acid; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GR, glutathione reductase; HNE, 4-hydroxynonenal; H₂O, water; H₂O₂, hydrogen peroxide; HX-Fe³⁺, Metmyoglobin; IL-8, interleukin-8; MDA, malondialdehyde; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; O₂, oxygen; O₂⁻, superoxide radical; ·OH, hydroxyl radical; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TAS, total antioxidant status; TG, triglyceride; TGF-β, transforming growth factor-β; TNF-α, tumor necrosis factor-α; ·X-[Fe⁴⁺=O], ferrylmyoglobin

◇ 책임저자 : 박경식, 대구시 중구 동산동 194번지 계명대학교 동산의료원 소화기내과 (우) 700-712

Phone: 053) 250-7088; Fax: 053) 250-7434; E-mail: seenae99@dsmc.or.kr

※ 본 연구의 요지는 2004년 대한간학회 춘계학술대회에서 구연으로 발표되었음.

서 론

비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)은 비음주자에서 조직학적으로 간내지방증과 더불어 염증세포 침윤, 간세포 괴사, 섬유화 등 알콜성 지방간염(alcoholic steatohepatitis, ASH)의 특징을 보이는 질환으로¹⁻³ ASH에서처럼 간경변, 간세포암종 등의 심각한 합병증이 발생할 수 있으므로 그 중요성에 대한 인식이 점차 증가하고 있다.⁴⁻⁶

이 질환의 발병 기전에 관하여는 아직 충분히 밝혀지고 있지는 않으나 two-hit 가설이 주로 받아들여지고 있다.^{7,8} 즉 인슐린 저항성에 의해 간내 지방이 축적되면(first hit) 여기에 사립체(mitochondria) 등에서 생성되는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 산화성 스트레스가 가해짐으로써(second hit) NASH가 발생한다는 가설이다.⁹⁻¹¹ 간내 지방산의 대사 과정에서 사립체는 소량의 ROS를 방출하는데, 항산화 물질들(antioxidants)이 충분히 존재하면 이 소량의 ROS는 정상적인 대사 과정을 거쳐 간세포에 손상을 주지 않지만 부족한 경우 산화성 스트레스는 계속 진행하여 더 많은 양의 ROS가 생성되고 지질 과산화, 각종 유해 cytokine 유도, Fas ligand 유도 등의 과정을 통하여 NASH가 발생하게 된다.^{3,7,8,11}

항산화 물질들은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) 등의 효소 계열과 vitamine C, vitamine E, uric acid, albumin, bilirubin, betaine, ferritin, acetylcysteine 등 다양한 종류의 비효소 계열로 나눌 수 있으며 항산화 효소들은 지질 과산화물, H₂O₂ 등의 생성을 억제함으로써 NASH 발생의 억제에 일차적인 역할을 담당하는 것으로 여겨지나¹¹⁻¹⁴ 각종 항산화효소들의 변화와 산화성 스트레스 발생 간의 관계에 대한 연구는 충분하지 않은 실정이다. 따라서 이번 연구에서는 NASH 환자들을 대상으로 상기 항산화 효소들의 활성도, 총 항산화 상태(total antioxidant status, TAS), H₂O₂ 농도, 지질 과산화

물의 일종인 malondialdehyde (MDA) 농도 등을 측정함으로써 NASH 발생과 항산화 상태의 연관성에 대해 알아보려고 하였다.

대상과 방법

1. 대상

2003년 7월 1일부터 2004년 2월 29일까지 본원에서 간조직검사를 통해 NASH로 진단된 환자 19명을 대상군으로 하였으며 연령 및 성별을 고려하여 선발된 비음주 건강인 15명을 대조군으로 하였다. 전 예에서 본 연구의 취지에 대해 상세히 설명하고 동의를 구하였으며 연구에 관하여 본원 윤리위원회의 승인을 얻었다. 대상군은 상기 기간 중 적어도 3개월 이상 간기능 이상을 보인 환자들에서 음주력을 포함한 상세한 병력 청취, 각종 바이러스표지자검사, 자가면역항체검사, 방사선학적 검사, 혈청 구리 농도, 혈청 철분 검사, 간조직검사 등을 통해 ASH, 약인성 간염, 각종 바이러스성 간염, 자가면역성 간염, 원발성 담즙성 간경변증, 윌슨병, 혈색소증 등을 배제한 후 조직검사를 통해 지방간염으로 진단된 예들을 포함하였다. 주당 40 g 이하의 음주를 비음주의 기준으로 하였으며 위장관 절제술을 받았던 경우나 부신피질 호르몬, 여성 호르몬, 칼슘통로차단제, methotrexate, tetracycline, amiodarone 등 간내 지방 축적을 유발할 수 있는 약제들을 복용한 경우는 대상에서 제외하였다.

2. 방법

1) 기초 신체검사 및 생화학적 검사

공복 상태에서 체중, 신장을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI)를 비교하였으며 BMI가 25 kg/m² 이상인 경우를 비만으로 정의하였다. 공복 상태에서 채혈 후 Hitachi-747 (Hitachi-High Technologies Co., Tokyo, Japan) 기기를 이용하여 총 단백, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total and direct bilirubin, alkaline phosphatase (ALP)

등을 측정하여 비교하였다.

2) 항산화 효소들의 활성도 측정

SOD 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium을 환원시키는 양을 측정하는 Sun 등의 방법¹⁵을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액 중의 nitroblue tetrazolium의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

Catalase 활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 25℃에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson 등의 방법¹⁶에 의했으며 효소 활성도의 단위는 1분 간에 1 mL 혈청이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 μmol 로 나타내었다.

GPx 활성도 측정은 환원형 glutathione, H₂O₂, 환원형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)를 기질로 사용하고 glutathione reductase를 촉매로 하여 혈청과 함께 25℃에서 5분 간 반응시키는 Paglia 등의 방법¹⁷을 사용하였다. 위의 반응 동안 환원형 glutathione이 H₂O₂에 의해 산화형 glutathione으로 되며 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione으로 환원될 때 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340 nm 파장에서 NADPH의 분자흡광계수($E_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 측정하여 효소의 활성도를 산출하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분 간에 1 mL의 혈청이 반응하여 생성된 NADP⁺ 양을 nmol로 나타내었다.

3) TAS의 측정

TAS의 측정은 ABTS[®] kit (Randox Lab Ltd, Crumlin, Antrim, England)를 사용하여 측정하였다. 이 방법의 원리는 metmyoglobin (HX-Fe³⁺)과 H₂O₂를 혼합하면 ferrylmyoglobin (·X-[Fe⁴⁺=O]) radical이 생성되고 여기에 ABTS[®] kit를 반응시키면 ferrylmyoglobin radical이 metmyoglobin으로 산화하면서 청록색의 ABTS^{·+} radical cation이

생성되는데, 600 nm에서 이 물질의 흡광도를 측정하는 것이다. 총 항산화 물질의 양이 풍부하다면 ABTS^{·+} radical cation이 적게 생성되어 흡광도가 낮고 총 항산화 물질의 양이 부족하면 반대로 흡광도가 높게 된다.

4) H₂O₂ 농도 측정

H₂O₂ 농도의 측정에는 ferrous 이온이 산성 조건에서 H₂O₂에 의해 ferric 이온이 된 후 xylenol orange와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange hydrogen peroxide 측정법을 사용하였다.¹⁸

5) MDA 농도 측정

MDA 농도의 측정은 MDA가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법¹⁹에 의하였다. 즉, 시료를 0.25 N 염산에 0.375%의 thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100℃ 수용액 중에서 15분 간 방치한 후 3,000 g에서 5분 간 원심 분리하여 얻은 상층액을 535 nm에서 측정하였다. 시료 중 MDA 농도는 분자흡광계수 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

6) 간조직검사

대상군 모두에서 초음파 유도하에 ACN1610 16 G 생검침(MDTECH Inc., Gainesville, Florida, U.S.A)이 장착된 Pro-Mag 2.2 자동생검장치(MDTECH Inc., Gainesville, Florida, U.S.A)를 이용하여 8번 혹은 9번 늑간을 통해 시행하였으며 생검 조직의 크기에 따라 3조각 혹은 4조각의 조직을 채취하였다.

7) 광학현미경 관찰

생검된 조직들을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 알코올로 탈수하고 파라핀에 포매한 후 3-4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색, Masson's trichrome 염색을 하였다.

괴사 염증 정도와 무관하게 최소한 정도의 섬유화라도 존재하는 경우에 한하여 NASH로 진단하였으며 질환 심화도의 평가에는 Brunt 등의 분류²⁰를 이용하였다. 즉 지방증 등급(grading for steatosis)은 침범된 간세포의 비율에 따라 33% 미만의 간세포가 침범된 경우 경도(Grade 1), 33-66%의 간세포가 침범된 경우 중등도(grade 2), 67% 이상의 간세포가 침범된 경우 고도(grade 3)로 분류하였으며 염증 등급(grading for inflammation)은 지방증의 정도, 위치, 형태, 간세포의 풍선양 팽창(ballooning) 정도, 위치, 소엽의 염증 정도, 문맥의 염증세포 침윤 정도 등을 종합적으로 고려하여 경도(grade 1), 중등도(grade 2), 고도(grade 3)로 분류하였다. 섬유화 단계(staging for fibrosis)는 섬유화의 범위에 따라 간세포나 sinusoid 주위(pericellular or perisinusoidal)에 국한된 경우 1단계(stage 1), 문맥 주위(periportal) 섬유화의 경우 2단계(stage 2), 연결형 섬유화(bridging fibrosis)의 경우 3단계(stage 3), 간경변의 경우 4단계(stage 4)로 분류하였다.

3. 분석 및 통계 처리

통계 처리는 Statistical Package for Social Science for Window TM release 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) 프로그램을 이용하였으며 연속 변수의 비교에는 Mann-Whitney U test를, 빈도 변수의 비교에는 Fisher's exact test, 상관 분석에는 Spearman 상관 계수를 이용하였고 *P* 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 대상군 및 대조군의 임상적 특성

대상군은 남자 13명(68.4%), 여자 6명(31.6%), 평균 연령 31.0 ± 12.8 세였으며 대조군은 남자 11명(73.3%), 여자 4명(26.7%), 평균 연령 30.3 ± 11.2 세로 구성에 있어 차이는 없었다. 평균 BMI는 대상군 28.6 ± 4.3 kg/m², 대조군 22.7 ± 3.0 kg/m²으로 대상군에서 높았으며($P < 0.001$), BMI 25 이상의 비만자 비율도 대상군에서 89.4%로 대조군의 33.3%보다 높았다($P < 0.001$). AST 및 ALT 농도는 대상

Table 1. Characteristics of Both Groups

	NASH Group (n=19)	Control Group (n=15)	<i>P</i> value
No of Male (%)	13 (68.4%)	11 (73.3%)	NS*
No of Obesity (%)	17 (89.4%)	5 (33.3%)	<0.001*
Age (yrs)	31.0 ± 12.8	30.3 ± 11.2	NS [†]
BMI (Kg/m ²)	28.6 ± 4.3	22.7 ± 3.0	<0.001 [†]
AST (IU/L)	89.4 ± 36.2	25.5 ± 7.6	<0.001 [†]
ALT (IU/L)	162.8 ± 68.8	23.7 ± 12.1	<0.001 [†]
T-prot (g/dL)	7.4 ± 0.8	7.2 ± 0.7	NS [†]
Albumin (g/dL)	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.2	NS [†]
ALP (IU/L)	122.8 ± 11.3	108.3 ± 12.5	NS [†]
T-Bil (mg/dL)	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	NS [†]
D-Bil (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	NS [†]

* Fisher's exact test.

[†] Mann-Whitney U test.

Values, mean $\pm$ SD.

NASH, nonalcoholic steatohepatitis; No, number; NS, not significant ($P > 0.05$); BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-prot, total protein; ALP, alkaline phosphatase; T-Bil, total bilirubin; D-Bil, direct bilirubin.

군에서 높았으나 total protein, albumin, total and direct bilirubin, ALP 농도는 양군 간 차이가 없었다(표 1).

2. 항산화 효소들의 활성도

SOD의 활성도는 NASH군 2.36 ± 0.28 U/mL · min, 대조군 2.65 ± 0.30 U/mL · min로 NASH군에서 낮았으며($P=0.008$), catalase의 활성도 역시 NASH군 3.65 ± 1.95 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{mL}$, 대조군 6.29 ± 3.12 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{mL}$ 로 NASH군에서 낮았다($P=0.005$). GPx의 활성도는 NASH군 53.1 ± 58.0 nmolNADP⁺/mL/min, 대조군 25.00 ± 23.48 nmol-NADP⁺/mL/min로 양군 간에 차이가 없었다(표 2).

3. TAS

NASH군에서 1.99 ± 0.26 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 대조군에서 1.51 ± 0.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 로 NASH군에서 높았다($P<0.001$)(표 2).

4. H₂O₂ 및 MDA 농도

H₂O₂ 농도는 NASH군 73.71 ± 12.14 nmol/mL, 대조군 48.06 ± 8.49 nmol/mL로 NASH군에서 높았으며, MDA 농도는 NASH군 1.52 ± 0.42 nmol/mL, 대조군 1.43 ± 0.26 nmol/mL로 양군 간에 차이가 없었다(표 2).

5. NASH군에서 병리학적 심화도와 각 변수들과의 관계

지방증 등급은 1등급 1명(5.3%), 2등급 12명(63.2%), 3등급 6명(31.6%)이었고, 염증 등급은 1등급 14명(73.7%), 2등급 4명(21.1%), 3등급 1명(5.3%)이었으며, 섬유화 단계는 1단계 6명(31.6%), 2단계 12명(63.2%), 3단계 1명(5.3%), 4단계 0명(0%)이었다(표 3). 지방증 등급, 염증 등급, 섬유화 단계 등과 각 항산화 효소 활성도, TAS, H₂O₂ 농도, MDA 농도 등과는 유의한 상관관계가 없었다(표 4).

Table 3. Histologic Findings of NASH Group

Histopathological features (n=19)	N (%)
Steatosis Grade	
1	1 (5.3%)
2	12 (63.2%)
3	6 (31.6%)
Inflammation Grade	
1	14 (73.7%)
2	4 (21.1%)
3	1 (5.3%)
Fibrosis Stage	
1	6 (31.6%)
2	12 (63.2%)
3	1 (5.3%)
4	0 (0.0%)

Table 2. Antioxidative Status and Concentration of MDA and H₂O₂ in Both Groups

	NASH Group (n=19)	Control Group (n=15)	P value*
SOD (U/mLmin)	2.36 ± 0.28	2.65 ± 0.30	0.008
GPx (nmolNADP ⁺ /mL/min)	53.10 ± 58.00	25.00 ± 23.48	NS
Catalase ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{mL}$)	3.65 ± 1.95	6.29 ± 3.12	0.005
TAS ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1.99 ± 0.26	1.51 ± 0.25	<0.001
MDA (nmol/mL)	1.52 ± 0.42	1.43 ± 0.26	NS
H ₂ O ₂ (nmol/mL)	73.71 ± 12.14	48.06 ± 8.49	<0.001

* Mann-Whitney U test.

Values, mean $\pm$ SD.

MDA, malondialdehyde; H₂O₂, hydrogen peroxide; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; NS, not significant ($P>0.05$); TAS, total antioxidant status

Table 4. Relationship between Histologic Severity and Variables in NASH Group

		SOD	GPx	Catalase	TAS	MDA	H ₂ O ₂
Steatosis	* ρ	-0.08	0.29	-0.03	0.25	0.22	-0.09
	$^{\dagger}P$	0.730	0.232	0.916	0.310	0.370	0.22
Inflammation	* ρ	0.09	0.41	-0.29	0.21	0.06	-0.09
	$^{\dagger}P$	0.707	0.082	0.235	0.381	0.802	0.23
Fibrosis	* ρ	0.03	0.19	-0.09	-0.09	-0.24	0.06
	$^{\dagger}P$	0.910	0.443	0.701	0.711	0.318	0.30

*Spearman's ρ (rho). † Relation analysis.NASH, nonalcoholic steatohepatitis; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase; TAS, total antioxidant status; MDA, malondialdehyde; H₂O₂, hydrogen peroxide.

고 찰

NASH의 진단 기준은 보고자에 따라 차이를 보이는데 지방증에 비특이적 염증 소견만 동반되면 NASH로 진단한 보고들도 있으나^{2,3,6,21,22} 위의 소견과 함께 섬유화가 동반되는 경우만을 NASH로 진단한 보고들도 많다.^{1,11,12,23,24} 최근 연구들에 의하면 비알콜성 지방간질환의 예후는 주로 섬유화의 정도에 의해 결정되는 것으로 알려져 있으므로³ 이번 연구에서도 섬유화가 동반된 경우만을 NASH로 진단하였다.

NASH의 발생 기전이 아직 확실히 규명된 것은 아니지만 insulin 저항성에 의한 간내 지방 축적(first hit) 및 여기에 가해지는 산화성 스트레스(second hit)에 의한다는 two-hit 이론이 현재까지의 주된 가설이다.⁷⁻¹² 정상인에서 식사 시 흡수된 triglyceride (TG)는 자유지방산(free fatty acid, FFA) 형태로 간 내로 이동하고 다시 re-esterified TG 형태로 지방세포에 저장되었다가 금식 상태에서 지방세포로부터 다시 FFA 형태로 방출되어 에너지원으로 이용된다. Insulin은 FFA의 지방세포로의 저장 과정에 중요한 역할을 하는데, insulin 저항성이 있는 경우 식사 후에도 지방세포로부터 FFA의 방출이 지속되어 산화성 스트레스에 민감한 FFA가 간 내에 증가한다.^{3,7-10} 간세포는 간내 지방 대사에 중심 역할을 한다. 지방산은 사슬(chain)의 종류에 따라 사립체(mitochondria), 과산화소체(peroxisome), 소포체(microsome) 등에서 산화 과정을 겪는데 매우 긴 사슬(very long chain fatty acid) 혹은 긴 사슬(long chain fatty acid) 지방산의 경우도 과산화소체 및 소포체에서 산화되어 사슬의 길이가 단축되면 궁극적으로 사립체에서 최종 산화 과정을 거치므로 지방산의 산화 과정에서 사립체는 주로 superoxide ($O_2^{\cdot-}$) 또는 H₂O₂ 형태로 소량의 ROS를 방출하게 되는데 항산화 효소인 GPx 또는 catalase에 의해 정상적인 대사 과정을 거친다면 별 문제를 일으키지 않으나, 항산화 효소가 부족하면 금속 이온의 작용에 의해 또 다른 형태의 ROS인 hydroxyl radical ($\cdot OH$)이 생성되고 이 물질에 의해 지방산의 과산화가 일어나 MDA, 4-hydroxynonenal (HNE) 등의 대사물이 생성되어 간의 섬유화를 유발하게 된다(그림 1). 또한 HNE의 경우 사립체의 DNA 구조에 손상을 일으켜 호흡사슬의 장애를 통한 기능 저하가 유발되고 다시 ROS가 증가하는 악순환 과정을 유발한다.^{3,9-11,25} 그간의 보고들에서 MDA, HNE 등의 과산화 지질의 농도가 높았으므로²⁶⁻²⁸ 지질의 과산화에 의한 NASH의 발생을 설명할 수 있었는데 이번 연구에서는 MDA의 농도가 대조군과 유의한 차이가 없었다. 좀더 많은 수를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각되나 지질의 과산화 이외의 NASH 발생 기전도 고려해 볼 수 있다. ROS와 항산화물과의 균형이 깨어지면 tumor necrosis

화소체(peroxisome), 소포체(microsome) 등에서 산화 과정을 겪는데 매우 긴 사슬(very long chain fatty acid) 혹은 긴 사슬(long chain fatty acid) 지방산의 경우도 과산화소체 및 소포체에서 산화되어 사슬의 길이가 단축되면 궁극적으로 사립체에서 최종 산화 과정을 거치므로 지방산의 산화 과정에서 사립체는 주로 superoxide ($O_2^{\cdot-}$) 또는 H₂O₂ 형태로 소량의 ROS를 방출하게 되는데 항산화 효소인 GPx 또는 catalase에 의해 정상적인 대사 과정을 거친다면 별 문제를 일으키지 않으나, 항산화 효소가 부족하면 금속 이온의 작용에 의해 또 다른 형태의 ROS인 hydroxyl radical ($\cdot OH$)이 생성되고 이 물질에 의해 지방산의 과산화가 일어나 MDA, 4-hydroxynonenal (HNE) 등의 대사물이 생성되어 간의 섬유화를 유발하게 된다(그림 1). 또한 HNE의 경우 사립체의 DNA 구조에 손상을 일으켜 호흡사슬의 장애를 통한 기능 저하가 유발되고 다시 ROS가 증가하는 악순환 과정을 유발한다.^{3,9-11,25} 그간의 보고들에서 MDA, HNE 등의 과산화 지질의 농도가 높았으므로²⁶⁻²⁸ 지질의 과산화에 의한 NASH의 발생을 설명할 수 있었는데 이번 연구에서는 MDA의 농도가 대조군과 유의한 차이가 없었다. 좀더 많은 수를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각되나 지질의 과산화 이외의 NASH 발생 기전도 고려해 볼 수 있다. ROS와 항산화물과의 균형이 깨어지면 tumor necrosis

factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β , interleukin (IL)-8, osteopontin 등의 cytokine들이 분비되고 이들은 정상세포 활성화에 의한 교원섬유 합성 증가, 다형핵 백혈구 유인, Mallory 소체 형성, 세포사멸(apoptosis) 등을 일으켜 질환을 악화시킨다.^{3,12,25,29} 또한 정상 간세포들은 세포막에 Fas 수용체를 가지고 있는데 ROS 과잉 상태가 되면 세포막에 Fas ligand를 나타내게 되고 이 부위가 이웃하고 있는 간세포의 Fas 수용체와 결합하여 세포사멸을 유도한다. 추후 이런 기전에 작용하는 물질 및 대사물 등을 함께 고려한 종합적인 연구가 필요하다.

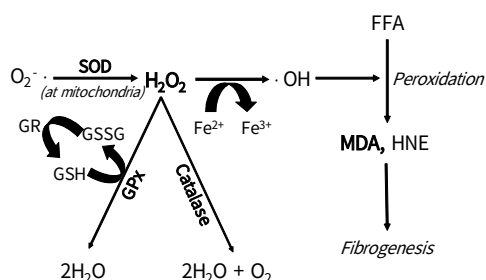


Figure 1. Schematic antioxidant pathway. By superoxide dismutase (SOD), superoxide radical is converted to hydrogen peroxide (H_2O_2). If there is enough catalase or glutathione peroxidase (GPx), H_2O_2 is stabilized into water and O_2 . But if these antioxidant enzymes are deficient, H_2O_2 is converted into hydroxyl radical and following lipid peroxidation and fibrogenesis is occurred.

SOD는 효소계 항산화 기전의 첫 단계로 작용하는데 superoxide radical을 H_2O_2 로 변화하게 하여 catalase 및 GPx에 의해 물과 산소로 안정화시키는데 기여한다. SOD의 활성도가 떨어지면 superoxide radical의 대사가 원활하지 못해 cytokine 분비나 Fas ligand 기전을 통한 간세포 손상이 진행되며 SOD가 정상이라도 GPx나 catalase의 활성도가 낮다면 지질 과산화 기전을 통해 NASH로 진행하게 된다(그림 1). 이번 연구에서 SOD와 catalase의 활성도가 떨어진 점은 이러한 사실과 잘 부합한다. NASH군에서 GPx의 활성도 또한 떨어질 것으로 예상되나 이번 연구에서는 대조군과 차이가 없었는데 혼하지 않은 기존 연구²⁶에서도 이런 결과가

있었던 점은 NASH 환자에서의 ROS 대사 장애가 GPx보다 catalase에 의해 더 많은 영향을 받을 수도 있다는 점을 시사하나 더 많은 수를 대상으로 한 대규모 연구가 필요하겠다. 이번 연구에서 SOD의 활성도 감소에도 불구하고 GPx의 변화 없이 H_2O_2 농도가 증가된 사실은 그림 1에 도식된 기전 중 catalase 활성도의 감소가 질환의 발생에 가장 큰 영향을 미쳤음을 시사한다.

NASH에서 ABTS[®] kit를 이용한 TAS 측정에 관한 보고는 아직 없는데 질환의 특성상 TAS가 떨어질 것이라는 예상과는 달리 이번 연구에서는 NASH군에서 오히려 증가되어 있었다. 향후 추가적인 연구가 필요하겠으나 효소계 항산화 기전의 장애를 극복하기 위한 비효소계 항산화 물질들의 대상성 증가를 고려해 볼 수 있겠다.

NASH군에서 항산화 요소들의 활성도 및 MDA, H_2O_2 농도와 지방증 정도, 염증 정도, 섬유화 단계 등의 병리학적 심화도와의 상관관계는 없는 것으로 나타났는데 기존 연구에서처럼²⁶ 대조군에서 심화도가 균등하게 분포하지 않은 데 기인한 것으로 보인다.

이번 연구의 결과를 요약해서 해석하면 NASH의 발생 기전에 있어 가장 중요한 장애는 catalase 및 SOD의 활성도 감소라고 생각되나 지질의 과산화 물질인 MDA 농도가 양군 간에 차이가 없었다는 점은 지질 과산화 기전이 가장 중요하다는 기존 보고들과 일치하지 않았으므로 더 많은 수를 대상으로 지질의 과산화 기전 외에 활성 산소에 의한 사이토카인 분비, Fas ligand 유도반응 등의 다른 경로를 함께 고려한 추가적인 연구가 필요하겠다. 또한 효소계 항산화 기전의 장애를 극복하기 위해 비효소계 항산화 물질들이 대상성으로 증가되어 있으리라 생각되나 향후 모든 기전을 종합적으로 고려한 대규모의 연구가 필요할 것이다.

요 약

목적: 비알콜성 지방간염(NASH)은 간경변이나 간세포암종 등 말기 간질환의 원인이 될 수 있으며

로 최근 이에 대한 관심이 증가하고 있으며 지방이 축적된 간조직에 가해지는 산화성 스트레스가 이 질환의 중요한 발병 인자임은 잘 알려져 있으나 이의 차단에 관여하는 각종 항산화 효소들의 활성도에 대한 구체적인 연구는 매우 드물며 결과 또한 연구자들마다 다양한 차이를 보인다. 이에 저자들은 항산화 효소들의 활성도, 여러 항산화 물질들에 의해 구성되는 total antioxidant status (TAS), 과산화성 지방 대사물 농도 등을 구하여 이들이 NASH의 발생에 작용하는 기전에 대해 알아보 고자 하였다. **대상과 방법:** 2003년 7월부터 2004년 2월까지 간조직검사를 통해 NASH로 확진된 19명을 환자군으로, 연령과 성별을 고려하여 선 발한 건강인 15명을 대조군으로 하였다. 각 군에서 체질량지수(BMI), AST, ALT, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, TAS, 과산화수소(H_2O_2), 과산화 지질의 일종인 malondialdehyde (MDA) 등의 농도 또는 활성도를 비교하였으며 환자군에서 병리학적 심화도와 각 변수들 간의 상관관계를 구하였다. **결과:** 양군 간 연령 및 성별의 차이는 없었다. 항산화 효소들 중 SOD ($P=0.008$), Catalase ($P=0.005$)의 활성도는 환자군에서 낮았으며 TAS ($P<0.001$), H_2O_2 ($P<0.001$)의 경우 환자군에서 높았다. GPx 활성도 및 MDA 농도는 차이가 없었다. 조직 소견에서 지방 축적 정도, 염증 정도, 섬유화 정도 등과 상기 변수들 간의 상관관계는 없었다. **결론:** NASH의 발병 기전에 있어 항산화 효소들 중 SOD 및 catalase의 활성도 감소가 중요한 기전으로 작용하는 것으로 보인다. 그러나 지질의 과산화물인 MDA 농도가 양군 간에 차이가 없었다는 점은 더 많은 수를 대상으로 지질의 과산화 기전 외에 활성 산소에 의한 사이토카인 분비, Fas ligand 유도반응 등의 다른 경로를 함께 고려한 추가적인 연구가 필요함을 시사한다.

색인단어: 비알콜성 지방간염, 항산화 상태

참 고 문 헌

1. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-1419.
2. Bacon BR, Farahvash MJ, Janny CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-1109.
3. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
4. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002;36:1349-1354.
5. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, et al. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134-140.
6. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology* 1998;114:842-845.
8. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?. *Hepatology* 1998;27:1463-1466.
9. Pagano G, Pacini G, Musso G, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-372.
10. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002;35:373-379.
11. McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:255-262.
12. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002;60:289-293.
13. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.
14. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remade J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17:235-248.
15. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
16. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H_2O_2 solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;49:474-478.
17. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.

18. Bleau G, Giasson C, Brunette I. Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Anal Biochem* 1998;263:13-17.
19. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-1543.
20. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.
21. Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:421-429.
22. George DK, Goldwurm S, MacDonald GA, et al. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998; 114:311-318.
23. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594-598.
24. Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcoholic liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95: 1056-1062.
25. Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:1095-1105.
26. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:57-62.
27. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33:808-815.
28. Loguercio C, De Girolamo V, de Sio I, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. *J Hepatol* 2001;35:568-574.
29. Moseley RH. Progress in understanding the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:204-206.