

흰쥐 재생간에서 활성 산소 대사

한동대학교 선린병원 내과, 계명대학교 의과대학 생화학교실*

박세관 · 박학열* · 문교철* · 김여희* · 곽춘식*

Metabolism of Oxygen Free Radicals in the Regenerating Liver of Rats

Sea Kwan Park, M.D., Hak Youle Park, M.D.*, Kyo Cheol Mun, M.D.*,
You Hee Kim, M.D.*, and Chun Sik Kwak, PhD.

Department of Internal Medicine, Handong University Sunlin Hospital, Pohang;

**Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Background/Aims: To know the metabolism of oxygen free radicals in the regenerating liver, the 70% (median and left lateral lobes) partial hepatectomy was performed in the Sprague-Dawley rats. **Methods:** The original livers were obtained immediately after the partial hepatectomy, while the regenerating livers were obtained at 3 days after the partial hepatectomy. The levels of xanthine oxidase, superoxide anion, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, and malondialdehyde were measured. RT-PCR for superoxide dismutase was also performed. **Results:** Compared to the original livers, the regenerating liver showed higher levels of xanthine oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase superoxide production, and malondialdehyde and lower level of hydrogen peroxide. RT-PCR did not show any significant change. **Conclusions:** The results suggest that malondialdehyde level is increased by xanthine oxidase via the increased production of superoxide anion. Superoxide dismutase activity is induced by the increase of superoxide anion. The increase of catalase and glutathione peroxidase levels causes the depletion of hydrogen peroxide level in the regenerating liver. (**Korean J Gastroenterol 2002;40:255-262**)

Key Words: Oxygen free radicals; Antioxidant enzymes; Liver regeneration

서 론

간은 아주 큰 재생 능력을 가진 장기로서 성장과 크기가 잘 조절되고 있다. 간이 바이러스 감염 혹은 화학적 손상이나 외상을 받거나, 간암 혹은 간이식 등에 의한 간염 또는 간세포의 수술적 절제는 간의 크기 증가를 통한 간세포의 증식을 유발한다.¹⁻³ 이에 대한 동물 모델로 흰쥐에게 실험적으로 간절제술을 행하게 되는데,^{4,5} 흰쥐에서 간의 중엽과

좌측 외엽을 절제하면 남아있는 간엽은 급격히 재생되어 증식 비대해지며, 재생기의 간에서는 간조직의 재생을 위해 우선적으로 핵산과 단백질 합성이 증가되고 아울러 열량소 대사도 활발해진다.^{4,6-11}

한편 활성 산소(oxygen free radical)는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자^{12,13}로 우리 몸에서는 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성 산소를 생성한다.^{12,13} 이들 없이는 에너지를 생성하지도

접수: 2002년 5월 31일, 승인: 2002년 8월 17일
연락처: 문교철, 700-712, 대구광역시 중구 동산동 194번지
계명대학교 의과대학 생화학교실
Tel: (053) 250-7786, Fax: (053) 252-1605
E-mail: mun@dsmc.or.kr

Correspondence to: Kyo-Cheol Mun, M.D., Ph.D.
Department of Biochemistry, Keimyung University School of
Medicine
194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea
Tel: +82-53-250-7786, Fax: +82-53-252-1605
E-mail: mun@dsmc.or.kr

감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 그러나 통제되지 않는 과잉의 활성 산소는 세포에 손상을 주며 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 이러한 유해 산소는 염증반응¹⁴ 등에 관여하며, 유해 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 고혈압,¹⁵ 심장질환,¹⁶ 노화¹⁷ 및 신장질환¹⁸ 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 특히 암과 같이 증식이 활발한 조직이 활성 산소로 인한 손상을 많이 받는 것¹⁹으로 알려져 있다.

따라서 재생간에서는 활성 산소 대사의 변화가 예상되며 이러한 활성 산소 대사의 변화는 재생간에 산화적 손상에 대한 변화를 야기할 것으로 생각된다. 이 연구는 재생간에서 활성 산소에 대한 대사 변화를 알아보기 위하여 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~360 g 이 되는 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하였으며 가슴술과 간엽 절제 수술 후 3일에 실험군당 각각 쥐 8마리를 희생시켜 실험에 제공하였다. 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 자유롭게 먹도록 하였다.

2. 방법

1) 간 절제

간엽 절제 수술은 12시간 금식시킨 후 가능한 한 무균 상태를 유지하면서 ether 마취하에서 실시하였다. 흰쥐의 간엽 절제 수술은 복부 정중선을 따라 상복부를 약 2 cm 절개하여 간의 중엽과 좌측 외엽을 복강 밖으로 노출하고 인접 조직 사이의 인대를 절단한 후 간엽의 기저 부위를 결찰한 뒤 간엽을 절제하였다. 절제한 간엽은 전체 간의 약 70%가 되었으며 이것을 원래간(original liver)으로 하였다. 절제한 원래간은 0.25 M sucrose액으로 잘 씻고 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 혈액을 가능한 한 모두 제거하였다.

2) 간 적출 및 세포 분획

간 절제 3일 후 남아 있던 간으로부터 재생된 간인 재생간(regenerating liver)을 적출하였다.

간엽 절제군에서 재생간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시켰다. 간 문맥에 삽관한 후 4℃의

0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아있던 혈액을 제거한 다음, 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4℃로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 5 g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 teflon glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches, Wheaton Scientific, Millville, Nj, USA)로 2~4℃를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간 균질액을 그대로 사용하거나, 이 간 균질액을 sucrose linear density gradient 원심분리법²⁰으로 cytosol, 및 mitochondria 분획을 분리한 후 사용하였다. 즉, 이 마쇄 균질액을 571 g에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796 g에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 104,000 g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이 때 얻은 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 이 과정에서 얻은 pellet은 0.25 M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10~35% (w/v) sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500 g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이 pellet을 다시 0.25 M sucrose액에 재현탁시켜 88,500 g에서 1시간 재원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

한편 위의 7,796 g에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25 M sucrose액에 현탁시키고 이 액을 20~45% (w/v) sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,200 g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25 M sucrose액에 재현탁시켜 7,796 g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria 분획으로 사용하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4℃에서 시행하였으며 이 때 사용한 원심분리기는 refrigerated superspeed centrifuge와 ultracentrifuge (Du Pont Sorvall, Newtown, CT, USA)였다. 이 때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO, model 570, Lincoln, NE, U.S.A.)를 사용하였다.

3) Xanthine oxidase 활성도 측정

Xanthine oxidase의 활성도 측정은 xanthine을 기질로 사용하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 생성되는 요산을 292 nm에서 비색정량하는 Rowe와 Wyngaarden²¹의 방법에

의하여 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 요산의 양으로 나타내었다.

4) Superoxide 음이온 및 과산화수소 양의 측정

Superoxide 음이온 생성량 측정은 mitochondria 분획을 사용하여 Auchlar와 Voisin²²의 방법을 사용하였으며 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 nitroblue tetrazolium의 양으로 나타내었다.

과산화수소의 측정은 ferrous 이온이 산성 조건에서 과산화수소에 의해 ferric 이온이 된 후 xylenol orange와 결합하여 생성하는 화합물을 560 nm에서 측정하는 xylenol orange hydrogen peroxide 측정법²³을 사용하여 측정하였다.

5) 항산화 효소들의 활성도 측정

Superoxide dismutase 활성도 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium을 환원시키는 양을 측정하는 Sun 등²⁴의 방법을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액 중의 nitroblue tetrazolium의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

Catalase 활성도의 측정은 과산화수소를 기질로 사용하여 25℃에서 30초 반응시키는 동안에 240 nm 파장에서 과산화수소가 환원되어 감소하는 흡광도로써 효소 활성도를 측정하는 Nelson과 Kiesow²⁵의 방법에 의했으며 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 과산화수소를 mol로 나타내었다.

세포질 glutathione peroxidase의 활성도 측정은 환원형 glutathione, 과산화수소 및 NADPH를 기질로 사용하고 glutathione reductase를 촉매로 하여 glutathione peroxidase 효소 시료와 함께 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 환원형 glutathione이 과산화수소에 의해 산화형 glutathione으로 된다. 이것이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원형 glutathione으로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP⁺로 산화되는 정도를 340 nm 파장에서 time scan을 하여 NADPH의 분자흡광계수($E_{340\text{ nm}} = 6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 효소의 활성도를 산출하는 Paglia와 Valentine²⁶의 법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성된 NADP⁺ 양을 nmol로 나타내었다.

6) Malondialdehyde의 측정

Malondialdehyde 양의 측정은 malondialdehyde가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은 색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법²⁷에 의하였다. 즉,

간 균질액을 0.25 N 염산에 0.375% thiobarbituric acid와 15% trichloroacetic acid를 함유한 시약과 혼합하고, 반응액을 100℃ 수용액 중에서 15분간 방치한 후 3,000 g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 535 nm에서 측정하였다. 시료 중 malondialdehyde 농도는 분자흡광계수 $1.56 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

이 실험에서 채택한 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였으며 시료 측정에 사용한 분광광도계는 DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, U.S.A.)이었다.

7) Superoxide dismutase/GAPDH의 mRNA 발현 정도

(1) RNA 분리 및 cDNA 합성

쥐의 신장 0.1 g을 RNAzol-B 용액(Biotech Laboratory, Houston, TX, USA) 1~2 mL로 완전히 균질화한 후 chloroform 100 μL 로 처리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하였다. 수용액층의 RNA는 동량의 isopropanol을 처리한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다.

전체 RNA에 oligo d(T)₁₆, 10×buffer II, MgCl₂, 10 mM dNTPs, 20 U/ μL RNase inhibitor, 50 U/ μL reverse transcriptase (Roche Molecular System, Basel, Swiss)를 첨가하여 최종 20 μL 가 되게 넣고 42℃에서 1시간 동안 반응시키고, 역전사효소의 활성을 제거하기 위해 99℃에서 5분간 열 변성하여 cDNA 합성반응을 종료하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응

쥐의 Cu/Zn superoxide dismutase를 지시하는 mRNA에 대한 염기서열을 확인한 후 superoxide dismutase의 sense primer로 5'-GAGCAGAAGGCAAGTGGTGA-3'과 antisense primer로 5'-TAGCAGGCCAGCAGATGAGT-3'의 서열이 되도록 primer를(바이오니아, 충북 청원군 남이면, 한국)에 주문 제작하였으며 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 superoxide dismutase mRNA의 발현 여부를 조사하였다. 중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3 μL 에 10×buffer II, MgCl₂, 10 mM dNTPs, primer, 5 U/ μL Taq polymerase, reverse transcription product를 첨가하여 최종 20 μL 가 되게 하였다. DNA 증폭은 Thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, U.S.A.)에서 94℃에서 5분간 열처리한 후 94℃에서 1분간 denaturation, 60℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension하여 총 24회 시행한 후 72℃에서 5분간 extension 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐의 간에서 superoxide dismutase에 대한 449 base pair 크기의 band를 확인하여 superoxide dismutase의 발현 여부를 확인하였다.

(3) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase의 발현

Cu/Zn superoxide dismutase에 대한 실험 결과를 검정하기 위하여 대조군으로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. GAPDH의 sense primer의 염기서열은 5'-ATCACTGCCACTCAGAAGAC-3'과 antisense primer로 5'-CTTGCTCTCAGTATCCTTGC-3'이 되도록 주문 제작하였으며 (바이오니아)에, 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 GAPDH mRNA의 발현 여부를 조사하였다. PCR은 합성된 cDNA 1.3 μ L에 10 $\times$ buffer II, MgCl₂, 10 mM dNTPs, primer, 5 U/ μ L Taq polymerase, reverse transcription product를 첨가하여 최종 2 μ L가 되게 하였다. DNA 증폭은 Thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400)에서 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하여 총 28회 시행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐의 신장에서 GAPDH에 대한 512 base pair 크기의 band를 확인하여 GAPDH의 발현 여부를 확인하였다.

(4) Relative index 계산

Superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 정도는 Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.)에서 읽은 superoxide dismutase에 대한 density를 각각의 GAPDH density로 나누어 relative index를 구하였다.

3. 통계 처리

자료는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하고, 실험군 사이의 비교는 Student's t test로 하였으며 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 재생간에서 xanthine oxidase의 활성도

원래간에서의 xanthine oxidase의 활성도는 1.07 ± 0.56 nmol uric acid/min/mg protein이었으며 재생간에서는 1.75 ± 0.45 nmol uric acid/min/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 1, $p < 0.05$).

2. 재생간에서 superoxide 음이온의 생성량

원래간에서의 superoxide 음이온의 생성량은 7.02 ± 1.08 nmol nitroblue tetrazolium/min/mg protein이었으며 재생간에서는 11.65 ± 2.74 nmol nitroblue tetrazolium/min/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 2, $p < 0.01$).

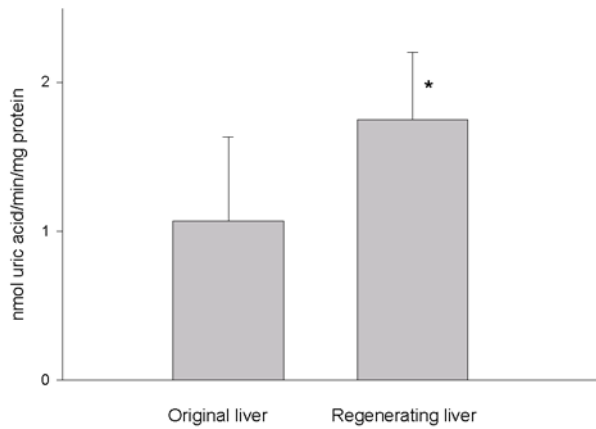


Fig. 1. Xanthine oxidase activity in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.05$ vs. original liver.

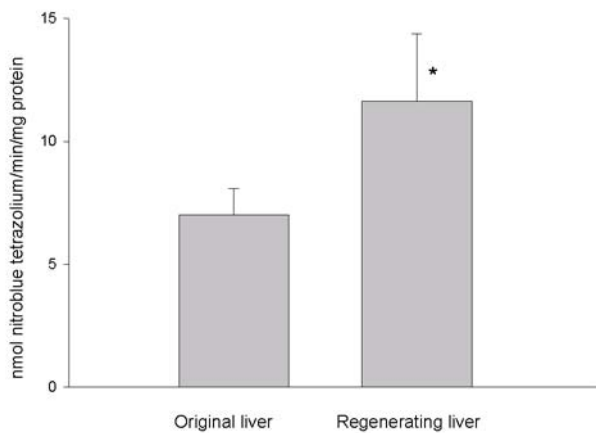


Fig. 2. The amount of superoxide anion production in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.01$ vs. original liver.

3. 재생간에서 superoxide dismutase의 활성도

원래간에서의 superoxide dismutase의 활성도는 18 ± 4 unit/min/mg protein이었으며 재생간에서는 23 ± 3 unit/min/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 3, $p < 0.01$).

4. 재생간에서 과산화수소 생성량

원래간에서의 과산화수소 생성량은 4.24 ± 0.31 nmol H₂O₂/mg protein이었으며 재생간에서는 2.47 ± 1.50 nmol H₂O₂/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 감소를 보였다(Fig. 4, $p < 0.01$).

5. 재생간에서 catalase의 활성도

원래간에서의 catalase의 활성도는 6.25 ± 0.83 μ mol H₂O₂/min/mg protein이었으며 재생간에서는 8.68 ± 2.29 μ mol

H_2O_2 /min/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 5, $p < 0.05$).

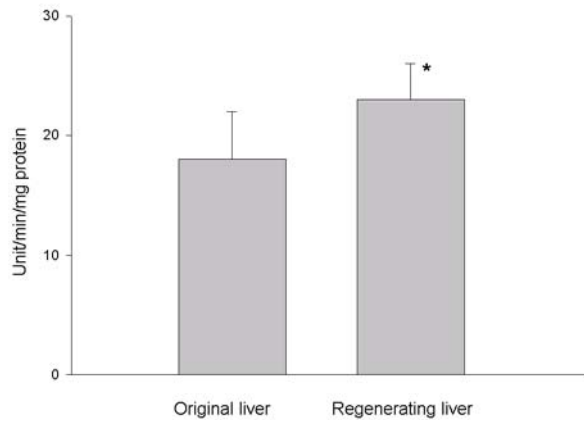


Fig. 3. Superoxide dismutase activity in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.01$ vs. original liver.

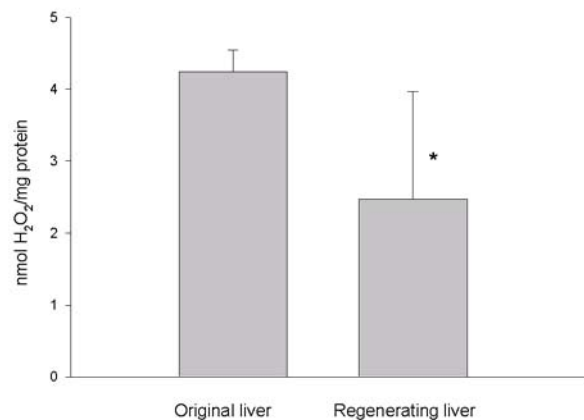


Fig. 4. Hydrogen peroxide production in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.01$ vs. original liver.

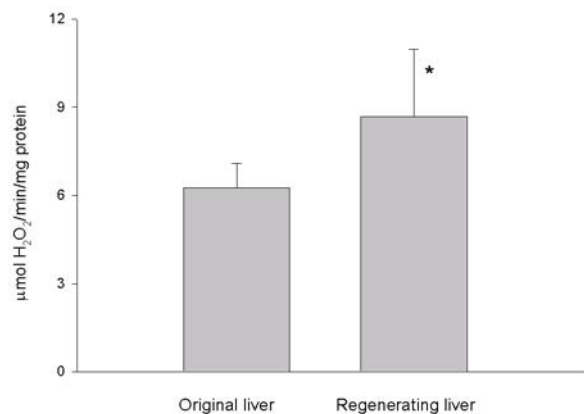


Fig. 5. Catalase activity in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.05$ vs. original liver.

6. 재생간에서 glutathione peroxidase의 활성도

원래간에서의 glutathione peroxidase의 활성도는 29.17 ± 4.95 nmol NADP^+ /min/mg protein이었으며 재생간에서는 42.00 ± 4.60 nmol NADP^+ /min/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 6, $p < 0.001$).

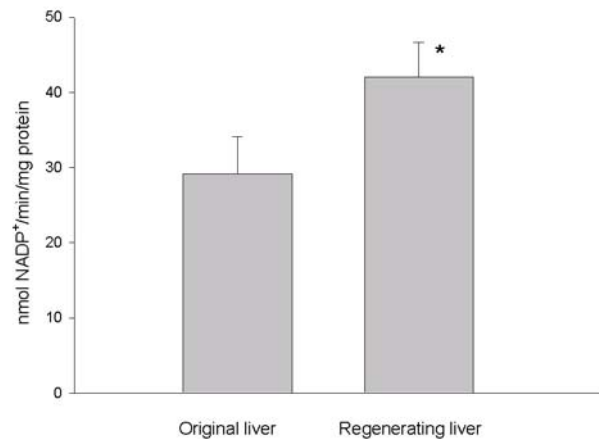


Fig. 6. Glutathione peroxidase activity in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.001$ vs. original liver.

7. 재생간에서 malondialdehyde 농도

원래간에서의 malondialdehyde의 양은 0.71 ± 0.16 nmol malondialdehyde/mg protein이었으며 재생간에서는 0.99 ± 0.06 nmol malondialdehyde/mg protein으로 원래간에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 7, $p < 0.05$).

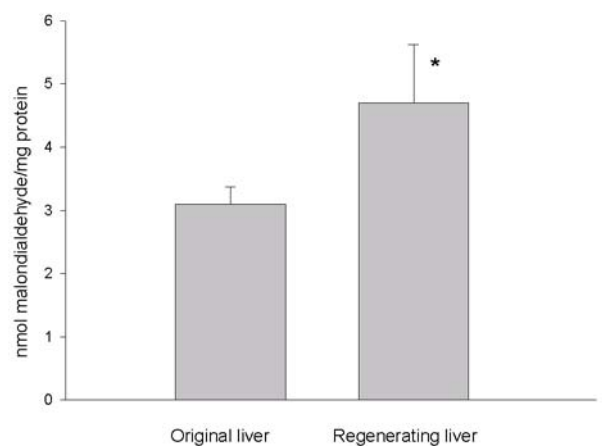


Fig. 7. Malondialdehyde level in the regenerating liver. Regenerating liver was obtained at 3 days after partial hepatectomy. * $p < 0.05$ vs. original liver.

8. Superoxide dismutase/GAPDH의 mRNA 발현 정도

양군 사이의 relative index를 비교했을 때 원래간은 0.75 ± 0.17 이었고, 재생간에서는 0.9 ± 0.31 로 재생간에서 약간의 증가를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.(Fig. 8)

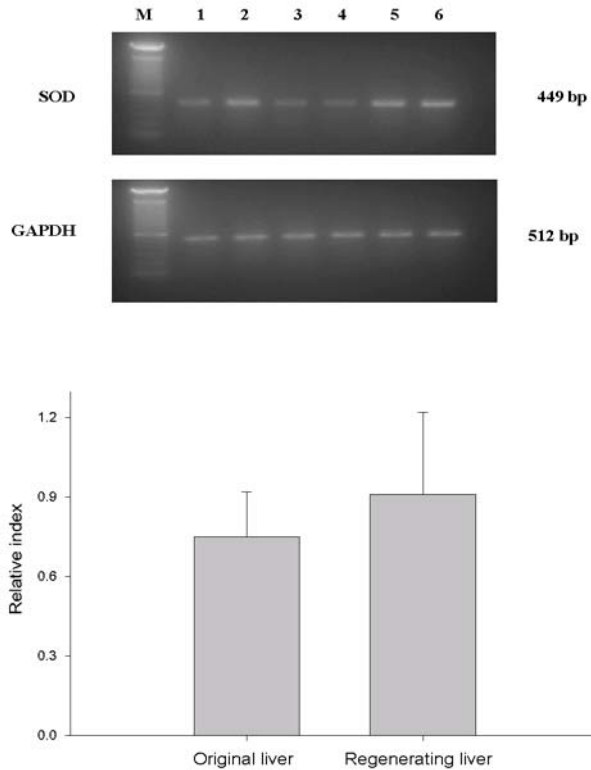


Fig. 8. Superoxide dismutase mRNA expression in the regenerating liver. Relative index was defined as the density ratio between SOD and GAPDH. M, size marker; 1 to 3, original livers; 4 to 6, regenerating livers; SOD, superoxide dismutase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

고 찰

흰쥐에서 간의 중엽과 좌측 외엽을 절제하면 남아있는 간엽은 급격히 재생되어 증식 비대해지며 이 때 간조직은 재생을 위해 핵산과 단백질합성이 증가되고 아울러 열량소 대사도 활발해진다.^{4,6-11} 바로 이 현상은 간 재생을 위해 필수적인 것으로 생각된다. 특히 이러한 현상과 함께 재생간에서의 대사는 간 재생을 위해 유리한 쪽으로 먼저 대사가 진행된다고 알려져 있다. 한편, 생체 내에서 호흡, 면역반응 및 각종 산화 환원반응의 결과로서 활성 산소가 생성되는데,^{12,13} 특히 간도 다른 장기와 같이 정상적인 세포 대사의 결과로 활성 산소를 생성한다.²⁸

한편 간 재생이 활발한 시기에는 purine 대사가 증가되어

있는 것^{29,30}으로 알려져 있으며, xanthine oxidase는 purine의 최종 대사에 관여하며 부산물로 superoxide 음이온을 생성하는 효소로 알려져 있다.³¹ 이 연구에서 xanthine oxidase의 활성 증가, superoxide 음이온의 증가와 더불어 malondialdehyde의 양적 증가가 있었다. 이 연구에서 malondialdehyde의 양적 증가는 간 재생이 활발한 시기에 활발한 purine 대사의 증가의 결과로 xanthine oxidase의 활성 증가에 기인된 것으로 보이며 이에 따라 부산물로 생성된 superoxide 음이온의 생성이 증가에 기인되어 산화적 손상의 지표인 malondialdehyde²⁷의 양적 증가를 유발한 것으로 생각된다. 또한 간세포 균질액에서의 malondialdehyde의 양의 증가는 저자들의 이전 연구³²와도 일치하며 Okamoto 등³³의 결과와 일치된다. 또한 Picibanil (OK-432)이 재생간의 활성 산소 생성을 줄인다는 연구 결과도 보고³³되었기에 향후 각종 항산화제를 비교하는 연구도 추가로 필요하리라 생각된다.

또한 superoxide는 superoxide dismutase의 기질^{31,34,35}로 작용하는 만큼, superoxide의 양적 증가는 superoxide dismutase의 활성 증가를 유발한 것으로 생각된다. 그리고 superoxide dismutase의 활성 증가의 원인을 알아보기 위한 RT-PCR 결과 재생간에서 원래간에 비해 superoxide dismutase에 대한 유전자 표현이 약간 증가되나 통계학적 의의는 없었다. 결과들을 종합하면 재생간에서 항산화 효소의 활성이 유전자 발현에 의해서보다는 효소 활성 조절 물질 등에 의해 영향을 받고 있음을 나타내는 결과라 생각되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

그리고 superoxide는 superoxide dismutase에 의해 과산화수소로 바뀌며 생성된 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 인체에 무해하게 바뀌어 진다.^{31,34,35} 이 실험에서 catalase와 glutathione peroxide의 활성은 증가되어 있고, 과산화수소의 생성량은 감소되어 있었다. 이 결과들은 분명히 과산화수소 처리 효소 모두의 활성 증가로 과산화수소의 양적 감소를 유발한 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과와 문헌적 고찰로 보아 간이 재생될 때는 purine 대사량의 증가로 인한 xanthine oxidase의 증가가 유발되고 이로 인해 과량 생성된 superoxide 음이온에 의해 간세포는 손상을 받고 있는 것으로 생각된다. 또한 비록 superoxide dismutase의 활성 증가가 있기는 하지만 과산화 수소 처리 효소의 활성 증가로 인해 과산화수소로 인한 손상은 적은 것으로 생각된다. 그리고 재생간에서 항산화 효소의 활성은 유전자 발현에 의해서보다는 효소 활성 조절 물질에 의해 조절되고 있다고 생각된다. 따라서 재생간의 손상을 줄이기 위해서는 항산화 효소계의 활성 증가를 유도하기보다는 활성 산소 생성에 관여하는 xanthine oxidase의 활성 억제가 우선되어야 할 것으로 생

각되며 효소 활성 조절 물질에 대한 연구가 우선되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

목적: 흰쥐에게 간절제술을 행하면, 잔류 간엽은 급격히 재생되어 증식 비대해지며 이 때 간은 재생을 위해 핵산과 단백질 합성이 활발해진다. 재생기의 간에서는 간조직의 재생을 위해 우선적으로 핵산과 단백질 합성이 증가되고 아울러 열량소 대사도 활발해진다고 한다. 간의 재생이 활발한 재생간에서는 활성 산소 대사의 변화가 예상되며 이러한 활성 산소 대사의 변화는 재생간에 산화적 손상에 대한 변화를 야기할 것으로 생각되어 이 연구를 수행하였다. **대상 및 방법:** 흰쥐 간을 70% 절제하여 원래간과 절제 3일에 재생간을 얻었다. 각각으로부터 세포 소기관을 분리하고 xanthine oxidase, superoxide 음이온 양, 과산화수소 양, 항산화 효소 및 malondialdehyde 양을 측정하였다. 아울러 superoxide dismutase에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. **결과:** 재생간에서 원래간에 비해 xanthine oxidase의 활성도, superoxide 음이온의 양, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 malondialdehyde의 양이 증가하였으며, 과산화수소의 양은 감소하였고, superoxide dismutase에 대한 유전자 발현은 통계적 의의 없이 약간 증가하였다. **결론:** 간이 재생될 때는 purine 대사량의 증가로 인한 xanthine oxidase의 증가가 유발되고 이로 인해 과량 생성된 superoxide 음이온에 의해 간세포는 손상을 받고 있는 것으로 생각되며 비록 superoxide dismutase의 활성 증가가 있기는 하나 과산화수소 처리 효소의 활성 증가로 인해 과산화수소로 인한 손상은 적은 것으로 생각된다. 또한 재생간에서 항산화 효소의 활성은 유전자 발현에 의해서 보다는 효소 활성 조절 물질에 의해 조절되고 있다고 생각된다.

색인단어: 재생간, 활성 산소, 항산화 효소

참 고 문 헌

1. Tomiya T, Tani M, Yamada S, Hayashi S, Umeda N, Fujiwara K. Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and nonhepatectomized surgical patients. *Gastroenterology* 1992;103:1621-1624.
2. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(suppl 1): 19-31.
3. Rao MS, Papreddy K, Abecassis M, Hashimoto T. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2001;46:1821-1826.
4. Becker FF. Restoration of liver mass following partial hepatectomy. I. Influence of blood flow. *Am J Pathol* 1963;43:497-510.
5. Takaki Y, Hirai S, Manabe N, et al. Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration. *Cell Tissue Res* 2001;305:399-409.
6. Kwon KJ, Ryoo HY. The effect of ethionine on protein synthesis of regenerating liver in rats. *Kyungpook Univ Med J* 1969;10:177-182.
7. Stein TA, Buns GP, Tropp BE, Wise L. Hepatic fat accumulation during liver regeneration. *J Surg Res* 1985;39: 338-343.
8. Schofield PS, Sugden MC, Corstorphine CG, Zammit VA. Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver. *Biochem J* 1987;241: 469-474.
9. Nagino M, Tanaka M, Nishikimi M, et al. Stimulated rat liver mitochondrial biogenesis after partial hepatectomy. *Cancer Res* 1989;49:4913-4918.
10. Dixit A, Baquer NZ, Rao AR. Inhibition of key enzymes of carbohydrate metabolism in regenerating mouse liver by ascorbic acid. *Biochem Int* 1992;26:143-151.
11. Mann DV, Lam WW, Hjelm NM, et al. Human liver regeneration: hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 2001;34:557-565.
12. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In: Armstrong D, ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press, 1994:17-27.
13. Punchard NA, Kelly FJ. Introduction. In: Punchard NA, Kelly FJ, eds. *Free radicals*. Oxford: Oxford University Press, 1996:1-8.
14. Kourounakis PN, Tsiakitzis K, Kourounakis AP, Galanakis D. Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology* 2000;144:205-210.
15. Swei A, Lacy F, Delano FA, Parks DA, Schmid-Schonbein GW. A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation* 1999;6:179-187.
16. Maczewski M, Beresewicz A. The role of endothelin, protein kinase C and free radicals in the mechanism of the post-ischemic endothelial dysfunction in guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:297-310.
17. Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Vina J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res*

- 2000;32:189-198.
 18. Yokozawa T, Chung HY, Kim DW, Goto H. Involvement of superoxide and/or nitric oxide in renal tissue injury. *Exp Toxicol Pathol* 1999;51:517-521.
 19. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* 2000;293:53-62.
 20. Kwak CS, Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. I. Isolations of mitochondria and microsomes. *Keimyung Univ Med J* 1986;5:45-53.
 21. Rowe PB, Wyngaarden JB. The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J Biol Chem* 1966;241:5571-5576.
 22. Auchlar C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* Boca Raton. Florida: CRC Press Inc., 1984:123-132.
 23. 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.
 24. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
 25. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in UV). *Anal Biochem* 1972;49:474-478.
 26. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
 27. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology*. Volume 52. New York: Academic Press, 1978:302-310.
 28. Waz WR, Feld LG. Reactive oxygen molecules in the kidney. In: Armstrong D, ed. *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York: Plenum Press, 1994:171-184.
 29. Gonzalez EM, Krejczy K, Malt RA. Modification of nucleic acid synthesis in regenerating liver by azathioprine. *Surgery* 1970;68:254-258.
 30. Itakura M, Maeda N, Tsuchiya M, Yamashita K. Increased rate of de novo purine synthesis and its mechanism in regenerating rat liver. *Am J Physiol* 1986;251:G585-G590.
 31. Murray RK. Red and white blood cells. In: Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW, eds. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. London: Appleton & Lange, 2000:763-779.
 32. Park HY, Mun KC. Damage induced by oxygen free radicals in the cell fractionation of regenerating liver. *Korean J Gastroenterol* 2002;39:284-288.
 33. Okamoto K, Hamazaki K, Iwagaki H, Orita K, Mori A. Effect of Picibanil (OK-432) on the scavenging effect of free radicals produced during liver regeneration in the rat. *Acta Med Okayama* 1995;49:75-79.
 34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989:86-187.
 35. Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM. The NADPH oxidase of leukocytes: The respiratory burst oxidase. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997:737-783.
-