대한소화기학회지 1999;33:697 - 707

콜린결핍 에치오닌 강화 식이로 유발한 췌장염에서 저분자 항산화물질의 효과

연세대학교 의과대학 약리학교실, 인하대학교 의과대학 외과학교실*

최주영 · 조영업* · 노관호 · 김경환

Effects of Small Molecular Antioxidants on Choline-Deficient Ethionine Supplemented Diet-Induced Acute Pancreatitis in Mice

Joo Young Choi, Young Up Cho, M.D.*, **Kwan Ho Roh** and **Kyung Hwan Kim,** M.D.

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine, Seoul;
Department of Surgery, Inha University College of Medicine, Sungnam, Korea*

Background/Aims: It has been suggested that oxygen free radicals are involved in the initiation process of acute pancreatitis. In this study, we evaluated the role of oxygen radicals and the effect of small molecular antioxidants in the development of choline-deficient ethionine supplemented (CDE) diet-induced acute pancreatitis. **Methods:** Acute necrotizing pancreatitis was induced in young female ICR mice (12.5±1.9 g) by feeding CDE diet for 48 hours. Then, the effects of antioxidant (rebamipide, N-acetyl-cysteine, allopurinol, β-carotene, and combination of α-tocopherol and ascorbate) were examined. **Results:** CDE diet resulted in a significant increase in serum amylase level and the concentration of pancreatic malondialdehyde (MDA). It also caused pancreatic edema and increased proinflammatory cytokines such as TNF-α, IL-6 and IL-1β in serum. Treatment of rebamipide, or combination of α-tocopherol and ascorbate significantly decreased the CDE diet-induced pathophysiologic deterioration of pancreas. On the other hand, allopurinol, β-carotene and N-acetyl-cysteine showed little effect. **Conclusions:** These results indicate that oxygen free radicals play an important role in the development of acute pancreatitis. Antioxidants may ameliorate the CDE diet induced acute pancreatitis. Further evaluation of antioxidants such as rebamipide, combination of α-tocopherol and ascorbate is necessary for possible therapeutic application. **(Kor J Gastroenterol 1999;33:697 - 707)**

Key Words: CDE, Oxygen radical, Acute pancreatitis, Antioxidant

접수: 1998년 10월 29일, 승인: 1999년 1월 4일
연락처: 김경환, 120-752, 서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 약리학교실
Tel: (02) 361-5224, Fax: (02) 313-1894
※ 본 연구는 1998년도 복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비 및 1998년도 의과대학 강사연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

서 론

급성 췌장염은 대부분은 합병증 없이 회복되나

20-30%는 패혈증, 쇽, 다발성 장기부전 등의 합병증이 동반되고 10-15% 정도의 사망률을 나타내는 예후가 불량한 난치성 염증 질환이다. 췌장염의 발생빈도는 국가별로 차이가 있으며, 담석과 알콜 섭취가 주원인으로 밝혀지고 있다.[1,2] 국내 보고에 의하면 췌장염 환자의 원인으로는 원인 불명이 44.6%로 가장 많았고 알콜이 26.9%, 담석이 9.7% 등의 순이었다.[3] 임상적으로 췌장염은 극심한 췌장 선세포의 손상과 광범위한 간질성 부종, 출혈 및 손상 부위로의 호중구 과립의 이동 등을 볼 수 있으나 병인론에 대하여는 아직 확실하지 않다. 현재까지 많은 임상적 및 실험적 연구가 진행되어 왔지만 아직도 급성 췌장염의 병인론은 규명되어야 할 부분이 많고, 따라서 만족할 만한 치료 방법도 정립되지 못하고 있다.

급성 췌장염의 사망 원인은 단순한 췌장 자체의 염증보다는 다발성 장기부전으로 추측된다.[4] 이러한 췌장의 국소적 염증이 원위 장기로까지 영향을 미치는 기전은 확실하지 않으나 췌장 내의 대식세포가 활성화되어 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 등의 염증 지향적 cytokine을 분비하여 췌장 이외의 폐, 간, 심장 등의 원위 장기로 염증을 파급시키는 것으로 알려져 있다.[5] 사람이나 동물 실험 모델에서 혈중 cytokine의 양과 췌장염의 중증도가 밀접한 관계가 있음이 보고된 바 있으며, 또한 IL-6가 췌장염의 표지(marker)로 사용 가능하다고 보고되었다.[6] 최근에는 염증을 동반하는 질환에서 활성산소가 병인으로 작용한다는 근거가 제시되고 있다.[7-12] 이 같은 보고는 췌장염의 병인에서 활성산소의 역할에 대한 연구를 촉진시켰다. 췌장염에서 활성산소의 증가는 실험 모델에 따라 다르지만 항산화 물질의 투여가 췌장염의 병리기전에 관여하여 손상을 완화시킬 수 있으리라 추측하고 있다. 실험적 췌장염에 대한 활성산소의 역할 및 제거물질의 치료 효과에 관한 연구는 80년대 중반부터 시작되었으나, 췌장염 병인으로서의 활성산소의 역할과 활성산소 scavenger를 이용한 치료 효과에 대하여는 상반된 보고들이 많다. Sanfey 등[13,14]은 유리지방산 주입, 허혈-재관류 및 담관 폐색에 의한 췌장염 유도의 경우 allopurinol이 췌장 부종과 고아밀라아제혈증을 완화시킴을 관찰하여 활성산소가 췌장염 발생에 관여함을 처음으로 증명하였으며, 이때 활성산소는 xanthine oxidase 반응에 의하여 생성된다고 보고하였다. 또한 흰쥐에 cerulein으로 부종성 췌장염을 유도한 경우 고아밀라아제혈증, 간질성 부종과 췌장 선세포의 공포가 형성되며, 췌장 조직에 지질과산화물이 증가되고 활성산소인 O_2^-의 제거 효소인 superoxide dismutase (SOD)의 감소와 활성산소 제거에 관여하는 glutathione의 현저한 감소가 확인되었다.[15-17] 생쥐에 cerulein으로 급성 췌장염을 유발한 경우에도 췌장 조직 내 지질과산화물의 증가, 고아밀라아제혈증, 췌장 조직의 부종이 확인되었으며, 항산화 물질인 α-tocopherol을 투여한 군에서는 혈중 amylase치 상승 정도가 췌장염군에 비해 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다.[18]

인체의 출혈성 괴사성 췌장염과 유사한 실험 모델인 콜린결핍 에치오닌강화(CDE) 식이에 의한 생쥐 췌장염에서도 활성산소 반응 물질의 증가 및 내인성 활성산소 제거 물질이 감소되었으며,[19,20] 항산화 물질로서 비타민 C 유사 물질인 CV3611이 생존율 증가와 혈중 amylase, lipase 및 elastase의 증가를 완화시킨다고 보고되었다.[21]

Sodium taurocholate로 출혈성, 괴사성 췌장염을 유도하였을 경우 활성산소 반응 물질의 증가와 활성산소 제거에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase의 감소를 확인하였다.[22] 그러나 이 모델의 경우 활성산소 제거 물질의 효과에 대하여 상반된 결과들이 보고되고 있으며 조직 손상이 급격히 유도되기 때문인 것으로 추측된다.[23,24]

본 실험실에서는 흰쥐에 cerulein을 주입하여 부종성 췌장염을 유발하여 활성산소 반응 물질인 malondialdehyde (MDA)의 함량이 증가되고, glutathione이 고갈됨을 관찰하였으며, N-acetyl-cysteine과 β-carotene이 항산화 효과가 있음을 보고하였다.[25] 그러므로 본 연구에서는 CDE 식이를 투여하여 출혈성, 괴사성 췌장염을 유도한 후 활성산소의 지표로서 활성산소 반응 물질인 MDA를 측정하고 조직학적 검색과 혈청 amylase치의 변화를 관찰함으로써 활성산소가 췌장 손상에 관여하는지 알아보고, 세포막 투과가 용이한 저분자 항산화 물질인 rebamipide, N-acetyl-cysteine, allopurinol, β-carotene, 및 α-toco-

pherol과 ascorbate의 효과를 검색하고자 하였다. 또한 혈액 내의 염증 지향적 cytokine의 양을 측정하여 활성산소와 cytokine과의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 췌장염 유발 및 실험군

실험 동물로는 암컷 ICR (Institute of Cancer Research)계 생쥐(10-14 g, 12.5±1.9 g)를 사용하여 실험 전까지 정상 식이를 공급하였다. 대조군은 정상 식이를 계속 공급하였으며 췌장염은 CDE (Harlen Teklad, Madison, WI, U.S.A.) 식이를 투여하여 유발하였다. CDE 췌장염은 생쥐를 16시간 금식시킨 후 48시간 동안 자유롭게 CDE 식이를 먹게 함으로써 유발하였다. 저분자 항산화 물질 처치군은 rebamipide 투여군(100 mg/kg, po), N-acetyl-cysteine 투여군(400 mg/kg, ip), allopurinol 투여군(50 mg/kg, po), β-carotene 투여군(10 mg/kg, sc) 및 α-tocopherol (20 mg/kg, ip)과 ascorbate (50 mg/kg, ip) 병용 투여군으로 나누었으며 CDE 식이 공급 1일 전부터 12시간 간격으로 5회 투여하였다.

2. 시료의 채취

CDE 식이로 실험적 췌장염을 유발시킨 다음, ether 마취 하에 심장에서 혈액을 채취하고 췌장 조직을 신속히 떼어내어 얼음 위에서 지방 조직을 제거하고 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 다음 원심분리하여 혈청에서 amylase치 및 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) 측정에 사용하였고 췌 조직의 일부는 현미경적 검색을 위하여 10% 포르말린 용액에 고정하고 나머지는 MDA 측정에 사용하였다.

3. 혈청 amylase 측정

혈청 amylase 활성은 Bernfeld 방법[26]을 이용하여 측정하였다. 1% starch 용액을 기질로 하여 30℃에서 15분간 반응시킨 후 dinitrosalicylic acid로 정지시키고 100℃에서 5분간 끓여 발색시켰다. 얼음물로 급속 냉각하여 발색 반응을 정지하고 차게 한 다음 spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준 물질로는 maltose를 사용하였다.

4. 혈청 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β) 측정

혈청 cytokine (TNF-α, IL-6, IL-1β)은 Biosource사(Camarillo, California, U.S.A.)의 Immunoassay kit를 사용하여 측정하였다. 혈청 50 μl를 well에 가한 후 50 μl의 biotin conjugate 용액을 가하여 혼합하고 덮개를 덮은 후 1시간 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 세척액으로 여섯 번 세척하고 100 μl의 streptavidin-horse radish peroxidase (HRP) 용액을 가하고 덮개를 덮어 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 세척액으로 여섯 번 세척한 후 100 μl의 chromogen용액을 가하여 25분간 어두운 곳에서 반응시키고 100 μl의 반응정지액을 가한 후 Elisa Reader (Sunnyvale, California, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로는 측정하고자 하는 재조합 TNF-α, IL-6, IL-1β를 사용하였다.

5. 췌장 조직의 조직학적 검사

포르말린에 고정된 조직을 파라핀에 포매하여 박리 표본을 제작한 후 헤마톡실린 에오신 염색하였다. 전체 실험 과정을 알지 못하는 병리학자가 부종(edema), 공포화(vacuolization), 염증(inflamation) 정도를 판정하였다.[27]

6. 췌장 내 MDA 함량 측정

조직의 일부는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 완충 용액을 가하여 15% 균질액을 만든 다음 7000 xg에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 조직 내 MDA 함량은 Ohkawa 등[28]에 의한 thiobarbituric acid법을 변형하여 측정하였다. 조직 균질액 200 μl를 취하여 200 μl의 8% sodium dodesyl sulfate와 잘 혼합한 다음 20% acetic acid (pH 3.5)와 0.8% 2-thiobarbituric acid를 각각 400 μl씩 가하여 100℃에서 60분 이상 가열하였다. 차가운 수돗물로 반응을 정지시키고 원심분리하여 상층액을 spectropho-tometer를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준 물질로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다.

7. 단백질 함량 측정

조직 내의 단백질 함량은 Bradford[29]의 방법으로 측정하였다.

8. 통계 처리

모든 실험 결과는 평균값±표준오차(mean±S.E.)로 표현하였고 각 실험군 간의 변화 양상을 비교 검토하기 위하여 분산분석법(ANOVA)으로 검정하여 p값이 0.05 이하일 때를 의의있는 변동으로 규정하였다.

결 과

1. 췌장 조직의 조직학적 손상도

CDE 식이군은 췌장 조직에서 부종과 공포가 관찰되었으며, 염증세포 침윤 및 췌 조직 괴사 등의 소견을 관찰할 수 있었다. Rebamipide와 α-tocopherol

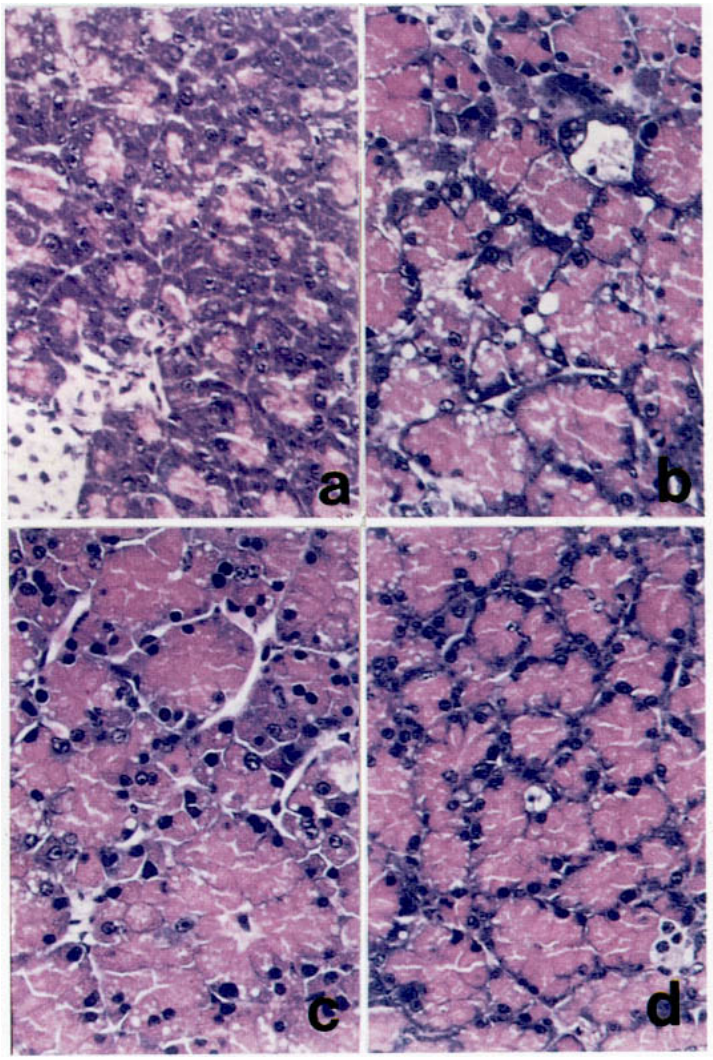

Fig. 1. Light photomicroscopy of mouse pancreas (H&E, ×200). (a) Pancreas in control mouse. (b) Pancreas of mouse fed the CDE diet for 48 hours. Edema, vacuolization, inflammation, and necrosis appear in pancreatic acinar cell. (c) Rebamipide and (d) α-tocopherol and ascorbate pretreated mouse pancreas illustrate less edema and less acinar vacuolization.

과 ascorbate 투여군에서 조직학적으로 췌장의 부종과 공포화가 감소되었다(Fig. 1).

2. 췌장 조직의 무게 변화

췌장의 무게는 생쥐의 몸무게에 대한 췌장의 무게 비율(% of pancreas weight/body weight)로 계산하여 비교하였다. CDE 식이군은 0.99±0.16%로서 대조군의 0.83±0.02%에 비하여 통계학적으로 의미있는 증가를 보였다($p<0.01$). Rebamipide와 N-acetyl-cysteine 투여군은 CDE 식이군에 비하여 증가가 둔화되었으나 의의있는 차이는 아니었으며 allopurinol과 β-carotene 투여군은 CDE 식이군과 별 차이가 없었다(Rebamipide 투여군 0.92±0.02%, N-acetyl-cysteine 투여군 0.93±0.03%, allopurinol 투여군 0.98±0.02%, β-carotene 투여군 0.99±0.02%). 그러나 α-tocopherol과 ascorbate 병용 투여군은 0.86±0.03%로서 CDE 식이군에 비하여 의미 있게 감소하였다($p<0.01$)(Fig. 2).

3. 혈청 amylase치

대조군의 혈청 amylase치는 7512±425 IU/L이었으며 CDE 식이군에서는 18,769±1,256 IU/L로 의의있게 증가하였다($p<0.01$). Rebamipide 투여군과 α-tocopherol과 ascorbate 병용 투여군은 각각 12,311±975 IU/L, 11,742±1,347 IU/L로 CDE 식이군에 비하여 의의 있게 감소하였으며, N-acetyl-cysteine 투여군과 β-carotene 투여군에서도 다소 감소하였다. 그러나 이러한 항산화제의 투여로 인하여 혈청 amylase치가 대조군의 혈청 amylase까지 저하되지는 못하였다(Fig. 3).

4. 췌장 조직의 MDA

대조군의 췌장 조직의 MDA 함량은 85.19±4.66 nmol/g tissue이었으며 CDE 식이군은 142.32±11.43 nmol/g tissue로서 CDE 식이로 인하여 의의 있는 증가를 나타내었으며($p<0.01$) 이는 CDE 식이로 인하여 활성산소가 방출되었음을 의미한다. α-Tocopherol과 ascorbate 병용 투여군에서 101.34±4.63 nmol/g tissue로 통계학적으로 유의한 MDA 함량 억제를 나타내었으며 rebamipide, N-acetyl-cysteine, β-carotene 투여군에서의 MDA 함량은 각각 107.86±6.40, 124.70±7.77, 121.81±7.71 nmol/g tissue로서 다소 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다. Allopurinol 투여군은 132.14±7.54 nmol/g tissue로서 CDE 식이군과 비슷하였다(Fig. 4).

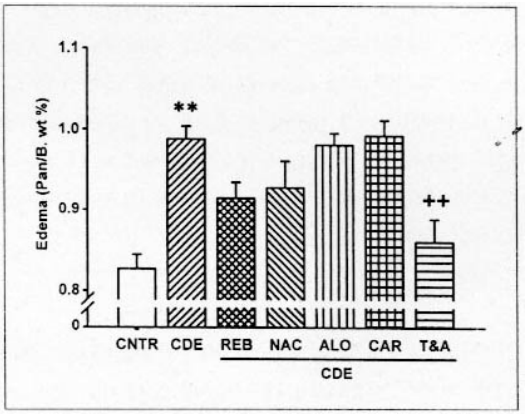

Fig. 2. Changes of weight in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rebamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol and ascorbate (T&A) were administered as described in methods.
** $p<0.01$, different from control.
++ $p<0.01$, different from CDE diet feeding.

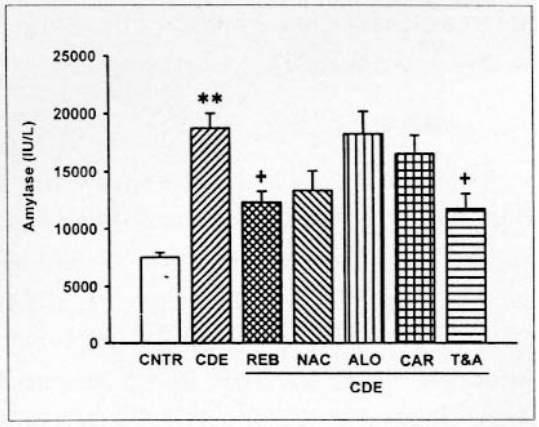

Fig. 3. Changes of serum amylase level in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rebamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol & ascorbate (T&A) were administered as described in methods.
** $p<0.01$, different from control.
+ $p<0.05$, different from CDE diet feeding.

5. 혈청 TNF-α

대조군의 혈청 TNF-α는 4.0±1.4 pg/mL이었으나 CDE 식이군은 196.2±31.2 pg/mL로서 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(p<0.001). Rebamipide 투여군과 α-tocopherol과 ascorbate 병용 투여군에서 각각 80.6±17.6 pg/mL, 50.7±10.3 pg/mL로 CDE 식이군에 비하여 의의 있게 증가가 둔화되었다. Allopurinol 투여군과 β-carotene 투여군은 각각 133.4±26.6, 104.9±19.9 pg/mL로 CDE 식이군에 비하여 증가 둔화 현상을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다. N-Acetyl-cysteine 투여군은 CDE 식이군과 유사한 결과를 보였다(Fig. 5).

6. 혈청 IL-6

대조군의 혈청 IL-6는 8.3±2.7 pg/mL이었으나 CDE 식이군은 554.8±78.9 pg/mL로서 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(p<0.001). Rebamipide 투여군과 α-tocopherol과 ascorbate 병용투여군은 각각 240.8±51.4 (p<0.01), 157.1±56.6 (p<0.001) pg/ml로서 CDE 식이군에 비하여 통계학적으로 의의 있게 감소하였으며, β-carotene 투여군에서도 261.6±37.8 pg/ml로서 의의 있는 감소를 보였다(p<0.05). N-Acetyl-cysteine 투여군과 allopurinol 투여군은 각각 324.6±86.3, 474.6±69.4 pg/mL로서 CDE 식이군과 별 차이가 없었다(Fig. 6).

7. 혈청 IL-1β

대조군의 혈청 IL-1β는 4.2±1.9 pg/mL이었으나 CDE 식이군은 607.6±83.3 pg/mL로서 대조군에 비하여 의의 있게 증가하였다(p<0.01). α-Tocopherol과 ascorbate 병용 투여군은 159.3±60.4 pg/mL로서 CDE 식이군에 비하여 현저히 감소하였으며(p<0.05), Rebamipide 투여군, β-carotene 투여군, allopurinol 투여군은 증가 감소 현상을 나타내었다. N-Acetyl-cysteine 투여군은 CDE 식이군과 별 차이가 없었다(Fig. 7).

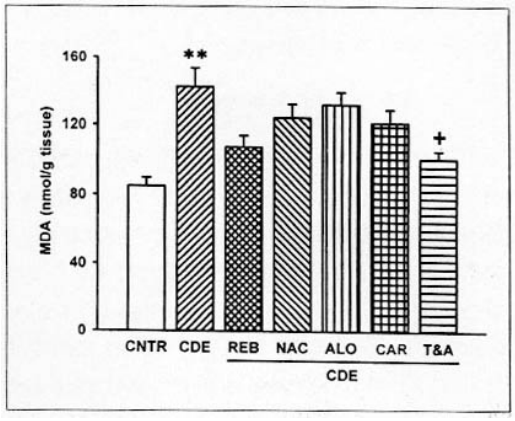

Fig. 4. Changes of pancreatic MDA level in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rebamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol and ascorbate (T&A) were administered as described in methods.
** p<0.01, different from control.
+ p<0.05, different from CDE diet feeding.

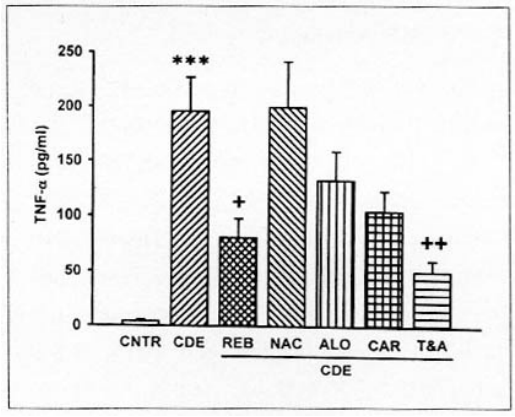

Fig. 5. Changes of serum TNF-α level in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rabamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol and ascorbate (T&A) were administered as described in methods.
*** p<0.001, different from control.
+ p<0.05, different from CDE diet feeding.
++ p<0.01, different from CDE diet feeding.

고 찰

췌장염은 많은 기초적 임상적 연구에도 불구하고

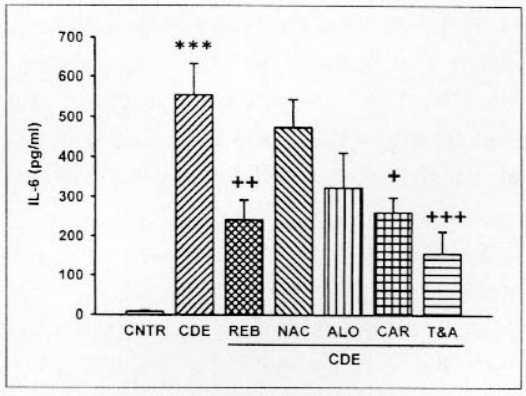

Fig. 6. Changes of serum IL-6 level in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rebamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol and ascorbate (T&A) were administered as described in methods.
*** p<0.001, different from control.
+ p<0.05, different from CDE diet feeding.
++ p<0.01, different from CDE diet feeding.
+++ p<0.001, different from CDE diet feeding.

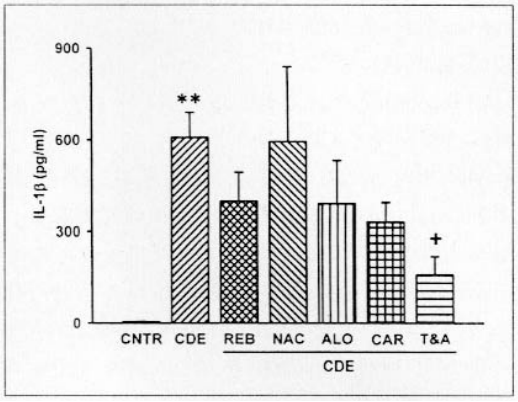

Fig. 7. Changes of serum IL-1β level in CDE diet-induced acute pancreatitis. Control (CNTR), CDE, rebamipide (REB), N-acetyl-cysteine (NAC), allopurinol (ALO), β-carotene (CAR) and α-tocopherol and ascorbate (T&A) were administered as ddescribed in methods.
** p<0.01, different from control.
+ p<0.05, different from CDE diet feeding.

아직까지도 많은 합병증과 사망률을 보이는 소화기 질환이다. 급성 췌장염에 대한 병인론으로서 활성산소의 역할이 여러 연구자들에 의해 보고되고 있으나 활성산소의 생성기전 및 활성산소 제거 물질에 대한 효과는 상반된 결과들이 보고되고 있다.

췌장염에서 활성산소의 역할을 규명하기 위하여는 활성산소 또는 활성산소 반응 물질인 지질과산화물(MDA 또는 conjugated dien)의 증가를 확인하여야 하고, 활성산소 제거 물질을 투여하여 증상을 완화시킬 수 있는지 관찰하여야 한다. 세포 독성을 갖고 있는 활성산소에 대한 생체 내 또는 외적인 방어기전으로는 첫째, 활성산소 생성을 억제하는 물질을 투여하거나(예; allopurinol) 둘째, 효소를 이용하거나(예; superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) 셋째, 효소가 아닌 제거 물질(예, glutathione, αtocopherol, carotenoid 등)을 이용하여 활성산소를 제거할 수 있다. 본 연구에서 계획한 CDE식이에 의한 급성 췌장염 모델은 생쥐를 이용하여 유발한 모델[30,31]로서 개체, 성, 체중 및 식이의 조성에 따라서 유발률이 차이를 보이며 5일간 투여하면 100%의 치사율을 보인다. Choline 결핍 식이만으로는 췌장염이 유발되지 않으며, 0.5%의 ethionine첨가로 인하여 생체 내 adenosine이 S-adenosylethionine으로 변환되어 생체 내 에너지 원인 ATP가 고갈되어 대량 괴사와 출혈을 동반한 췌장염이 유발되며 궁극적으로 사망에 이른다. 이는 사람에 있어서 활성화된 효소가 췌장 조직을 자가분해함으로써 유발되는 출혈성, 괴사성 췌장염과 유사하다고 알려져 있다.[32] 췌장염의 병인으로 최근 활성산소가 췌장염 유발에 중요한 요인으로 보고되었으나,[33-35] 활성산소가 췌장염의 직접적인 원인이라는 사실을 밝혀내지는 못하고 있다.[36-38] 생체 내에는 호흡 등에 의하여 활성산소가 생성되며 생성된 활성산소는 체내의 방어 체계에 의하여 항상성을 유지한다. 최근 스트레스, 알코올, 약물 투여, 허혈 등의 공격인자에 의하여 활성산소의 생성이 증가되고 생성된 과량의 활성산소가 소화기 질환 등 여러 염증성 질환의 병태생리학적 기전에 관여한다는 연구가 보고되고 있고, 체내의 항산화기전이 조직 손상의 보호 작용에 중요한 방어인자로 작용하리라고 추측되고 있다.

급성 췌장염은 급속히 진행되는 질환으로서 임상적으로 췌장염 초기에 일어나는 병태생리기전을 밝히기는 매우 어렵다. CDE 식이 유발 췌장염은 사람의 췌장염과 병인론에서의 관련성은 적으나 병의 진

행 및 병변이 출혈성 괴사성 췌장염과 유사하여 치료제 개발에 적합한 모델이다. 활성산소인 O_2^-를 제거하는 SOD (superoxide dismutase), H_2O_2를 제거하는 catalase는 거대 분자들로, 세포막 투과에 대한 정확한 자료가 없으며 작용 시간이 짧아서(3-5분) 투여할 경우 급성 췌장염에서 충분한 효과를 기대하기 어렵다. 따라서 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 저분자 항산화 물질은 췌장염의 치료제로서 가능성을 생각할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 CDE식이 유도성 췌장염에 저분자 항산화 물질의 효과를 검색함으로써, 치료 약제가 별로 없는 급성 췌장염 치료제를 개발하기 위한 기초 연구 자료를 얻고자 하였다. 본 연구에서 사용한 항산화 물질인 rebamipide는 분자량이 370으로서 소화성 궤양 치료제로 사용되고 있으며 호중구에 의하여 생성되는 superoxide를 억제하며 위점막에서 내인성 prostaglandin 생성을 증가시킬 뿐 아니라 생성된 hydroxyl redical을 제거하여 항궤양 작용을 나타낸다.[39] N-Acetyl-cysteine은 glutathione 유사 물질로 H_2O_2 제거 작용이 있으며 현재 활성산소로 인한 호흡기 질환인 adult respiratory distress syndrome (ARDS)에 사용하고 있다.[40] Allopurinol은 주로 통풍 치료제로 사용되고 있으며 생체 내 활성산소인 superoxide 생성에 관여하는 xanthine oxidase의 활성을 억제한다.[41] β-Carotene은 O_2^- 제거작용이 있으며 erythropoietic protoporphyria (EPP) 치료 목적으로 현재 임상에서 사용 중이다.[42]

본 실험실에서는 cholecystokinin (CCK) 유사 약물인 cerulein으로 급성 췌장염을 유발하여 췌장염 초기에 활성산소가 관여함을 확인하고 저분자 항산화물질이 췌 조직 손상과 amylase 활성을 저하시키고 또한 MDA 함량 저하와 glutathione 고갈을 완화시키는 것을 보고하였다.[25] 본 연구에서는 CDE 식이를 72시간 투여한 경우 50% 이상의 치사율을 보였으며, 3일 동안 시간이 경과함에 따라 혈청 amylase치, 췌장 내 부종, MDA 함량, TNF-α, IL-6, IL-1β의 양이 증가됨을 관찰하였다. CDE 식이로 인한 MDA 함량 증가는 CDE 식이로 인하여 활성산소가 증가함을 의미한다.

급성 췌장염의 발생 초기에 췌장 내 대식세포가 내인성 염증 매개체를 방출하는 것이 밝혀지고 있다. 괴사성 췌장염 모델에서 췌장 손상 하루가 지나면 TNF-α, IL-6, IL-1β 등이 혈액 내로 유리된다고 보고된 바 있다.[43] 급성 췌장염에서 췌장 내에 다량으로 침윤되는 백혈구는 췌장 내 cytokine 생성의 주된 요인이다. 또한 간이나 폐, 비장에서의 염증성 cytokine 발현이 췌장보다 늦게 나타나는 것으로 보아 cytokine의 발현은 손상 장기에 따라 특이적으로 발현된다고 보고되고 있다. 이러한 cytokine은 국소적으로는 췌장염을 악화시키고 국소적, 전신적으로 모세혈관의 투과성을 증가시키고 백혈구의 유착과 유출을 증가시킴으로써 췌장 외에 폐나 간의 원위장기로 염증을 파급시킨다. 최근 보고[44]에 의하면 조직 내 또는 혈청 내의 TNF-α, IL-6, IL-1β치가 사람과 동물 실험 모델에 있어서 췌장염의 중증도와 비례하며 췌장염 초기에 이런 매개체의 유리를 막거나 활동을 차단하는 물질을 투여할 경우 췌장염의 증상을 완화할 수 있으리라 인정되고 있다. 재조합 IL- 1ra를 실험적 췌장염 모델에 투여할 경우 IL-1수용체를 차단함으로써 췌장 부종, 괴사 및 췌장의 amylase치를 감소시키며 TNF-α, IL-6를 감소시키는 것이 보고되었다.[45,46]

α-Tocopherol과 ascorbate 병용 투여군과 rebamipide 투여군에서 CDE 식이로 인한 췌장 부종 및 amylase치의 저하와 췌장 내 MDA 양의 감소를 확인할 수 있었다. 췌장염 유도 시 췌관 내피세포의 손상과 모세혈관 투과성 증가로 인하여 유발되는 활성산소의 근원이 무엇인지는 정확하지 않지만 활성산소가 유발되면 이 활성산소가 TNF-α, IL-6, IL-1β와 같은 염증 매개성 cytokine을 증가시키며 항산화제 투여 시 활성산소를 제거하여 췌장으로부터 cytokine 분비를 저하함으로써 작용을 나타내리라 생각된다. 결론적으로 CDE 식이로 인하여 유발된 활성산소는 실험적 췌장염의 발생에 중요한 인자로 작용하며 저분자 항산화 물질은 실험적 췌장염의 발병 및 진행의 억제 효과를 나타내었다. 이에 따라 급성 췌장염에 대한 임상적 응용이 부분적으로 가능할 것으로 사료된다.

요 약

목적: 췌장염은 담관계 질환, 알코올, 고지혈증, 고칼슘혈증, 유전 등 다양한 요인에 의해 극심한 췌장 선세포의 손상이 유도되고 광범위한 간질성 부종, 출혈 및 손상 부위로의 호중구의 이동 등이 관찰되는 췌장의 염증성 질환으로서 병인론은 아직 확실하지 않다. 최근에는 활성산소가 췌장염의 병인으로 작용한다는 보고들이 제시되고 있다. 본 연구는 CDE 식이로 괴사성 췌장염을 유도하여 활성산소의 역할과 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 저분자 항산화물질의 효과를 규명하고자 하였다. 대상 및 방법: 암컷 ICR계 생쥐(10-14g)를 사용하여 대조군은 정상 식이를 공급하였고 CDE 식이군은 48시간 동안 CDE 식이를 공급하여 췌장염을 유발하였다. 항산화제 투여군은 CDE 식이 공급 12시간 전부터 12시간 간격으로 5회 주사하였다. 48시간 후 혈액을 채취하여 amylase치와 cytokine (TNF-α, IL-6, 및 IL-1β) 농도를 측정하였고 조직 일부는 헤마톡실린 에오신 염색하였으며 나머지는 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하였다. 결과: CDE 식이군은 대조군에 비하여 혈청 amylase치, cytokine 농도가 증가하였으며 췌장 내 MDA 농도와 부종이 통계학적으로 의의 있게 증가하였다. α-Tocopherol과 ascorbate 병용 투여군과 rebamipide 투여군에서 CDE 식이에 의한 amylase치를 저하시키고 MDA 함량을 억제시켰다. 또한 췌장 부종과 cytokine (TNF-α, IL-6, 및 IL-1β)의 유리를 억제시켰다. 결론: CDE 식이로 유발한 생쥐의 급성 췌장염 모델에서 활성산소가 중요한 인자로 작용하며 α-tocopherol과 ascorbate 및 rebamipide는 항산화작용을 통하여 혈중 amylase치와 cytokine (TNF-α, IL-6, 및 IL-1β) 농도를 감소시키고 췌장 조직 내 MDA 함량을 낮출 뿐 아니라 조직 손상을 완화시키며 앞으로 이들 물질의 임상 응용을 위한 연구가 필요하다고 생각한다.

색인단어: 콜린결핍 에치오닌강화 식이, 활성산소, 급성 췌장염, 항산화제

참 고 문 헌

1. Bourke JB, Giggs JA, Ebdon DS. Variations in the incidence and the spatial distribution of patients with primary acute pancreatitis in Nottingham 1969-76 Gut. 1979;20:366-371.
2. Jaakkola M, Nordback I. Pancreatitis in Finland be tween 1970 and 1989. Gut 1993;34:1255-1260.
3. 주기중, 서대홍, 김춘섭, 이창환, 심영웅, 송갑영. 급성 췌장염에 대한 임상적 고찰. 대한소화기병학회지 1994;26:995-1001.
4. Jacobs ML, Daggett WM, Civette JM, et al. Acute pancreatitis: analysis of factors influencing survival Ann Surg 1977;185:43-51.
5. Norman JG, Franz MG, Fink GS, et al. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proxima cytokine blockade. Ann Surg 1995;221:625-634.
6. Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleu kin-6 is a useful marker for early prediction of th severity of acute pancreatitis. Pancreas 1997;14:1-8
7. Aho HJ, Nevalainen TJ, Havia VT, Heinonen RJ Aho AJ. Human acute pancreatitis: a light and elect ron microscopic study. Acta Pathol Microbiol Immu nol Scand [A] 1982;90:367-373.
8. Dabrowski A, Gabryelewicz A. Oxidative stress. An early phenomenon characteristic of acute experimen tal pancreatitis. Int J Pancreatol 1992;12:193-199.
9. Weber H, Merkord J, Jonas L, et al. Oxygen radica generation and acute pancreatitis: effects of dibutyl tin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas Pancreas 1995;11:382-388.
10. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. Changes in lipid peroxide and oxygen radica scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems Digestion 1990;47:130-137.
11. Dabrowski A, Chwiecko M. Oxygen radicals me diate depletion of pancreatic sulfhydryl compounds in rats with cerulein-induced acute pancreatitis. Di gestion 1990;47:15-19.
12. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in

human disease processes. Surgery 1983;94:407-411.
13. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The pathoge nesis of acute pancreatitis. The source and role o oxygen-derived free radicals in three different ex perimental models. Ann Surg 1985;201:633-639.
14. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role o oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. Ann Surg 1984;200:405-413.
15. Schoenberg MH, Buchler M, Beger HG. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. Hepato gastroenterology 1994;41:313-319.
16. Dabrowski A, Gabryelewicz A, Wereszczynska-Sie miatkowska U, Chyczewski L. Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1988;23:1245-1249.
17. **노임환, 손소희, 이명인 등**. Cerulein **유도 급성 췌장염에서의 활성산소라디칼의 역할**. **대한소화기학회지** 1997;30:808-814.
18. **김용태, 류지곤, 윤용범, 최규완, 김정룡**. Cerulein**에 의해 유발된 생쥐의 급성 췌장염에서 산소유리기의 역할과** α-tocopherol**의 치료 효과**. **대한췌담도연구회지** 1997;2:135-140.
19. Schoenberg MH, Buchler M, Younes M, Kirchmayr R, Bruckner UB, Beger HG. Effect of antioxidan treatment in rats with acute hemorrhagic pancreatitis Dig Dis Sci 1994;39:1034-1040.
20. Schoenberg MH, Buchler M, Helfen M, Beger HG Role of oxygen radicals in experimental acute pan creatitis. Eur Surg Res 1992;24(suppl 1):74-84.
21. Nonaka A, Manabe T, Tobe T. Effect of a new syn thetic ascorbic acid derivative as a free radical sca venger on the development of acute pancreatitis in mice. Gut 1991;32:528-532.
22. Sweiry JH, Mann GE. Role of oxidative stress in th pathogenesis of acute pancreatitis. Scand J Gastro enterol 1996;219:10-15.
23. Blind PJ, Marklund SL, Stenling R, Dahlgren ST Parenteral superoxide dismutase plus catalase dimi nishes pancreatic edema in sodium taurocholate-induced pancreatitis in the rat. Pancreas 1988;3:563-567.
24. Schoenberg MH, Buchler M, Baczako K, et al. The involvement of oxygen radicals in acute pancreatitis. Klin Wochenschr 1991;69:1025-1031.
25. Choi JY, Kim KH. Effects of small molecular an tioxidants on cerulein-induced acute pancreatitis in rat. Kor J Physiol Pharmacol 1998;2:629-635.
26. Bernfeld P. Amylase α and β. In: Bernfeld, P, ed Methods in enzymology. Volume 1. New York Academic Press, 1955:149-150.
27. Spormann H, Sokolowski A, Letko G. Effect o temporary ischemia upon development and histolo gical patterns of acute pancreatitis in the rat. Patho Res Pract 1989;184:507-513.
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351-358.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for th quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ana Biochem 1976;72:248-254.
30. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. Am J Pathol 1975;79:465-480
31. Lombardi B, Rao NK. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Influence of the age and sex of th animals and of dietary ethionine, choline, methio nine, and adenine sulfate. Am J Pathol 1975;81:87 99.
32. Nonaka A, Manabe T, Tamura K, Asano N, Imani shi K, Tobe T. Changes of xanthine oxidase, lipid peroxide and superoxide dismutase in mouse acute pancreatitis. Digestion 1989;43:41-46.
33. Brunelli A. Microsurgical evaluation of experimenta pancreatitis after allopurinol: a secretory serological and morphological study. Pancreas 1995;11:55-62.
34. Wisner JR, Renner IG. Allopurinol attenuates cae rulein induced acute pancreatitis in the rat. Gu 1988;29:926-929.
35. Guice KS, Miller DE, Oldham KT, Townsend CM Jr, Thompson JC. Superoxide dismutase and ca talase: a possible role in established pancreatitis. Am J Surg 1986;151:163-169.

36. Ito T, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H. The involvement and sources of active oxygen in experimentally induced acute pancreatitis. Pancreas 1996;12:173-177.
37. Guice KS, Oldham KT, Johnson KJ. Failure o antioxidant therapy (polyethylene glycol-conjugated catalase) in acute pancreatitis. Am J Surg 1989;157 145-149.
38. Steer ML, Rutledge PL, Powers RE, Saluja M Saluja AK. The role of oxygen-derived free radical in two models of experimental acute pancreatitis effects of catalase, superoxide dismutase, dimethyl sulfoxide, and allopurinol. Klin Wochenschr 1991; 69:1012-1017.
39. Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, Kondo M. Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance Arzneimittelforschung 1993;43:363-366.
40. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung pro tection by a thiol-containing antioxidant: N-acetyl cysteine. Respiration 1986;50(suppl 1):31-42.
41. Brunelli A, Scutti G. An ultrastructural study to investigate the effect of allopurinol on cerulein-induced damage to pancreatic acinar cells in rat. In J Pancreatol 1998;23:25-29.
42. Tsuda H, Uehara N, Iwahori Y, et al. Chemopre ventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initia tion of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methyli midazo[4,5-f]quinoline in the rat. Jpn J Cancer Res 1994;85:1214-1219.
43. Norman J, Franz M, Messina J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimen tal acute pancreatitis. Surgery 1995;117:648-655.
44. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in me diating the acute phase protein response and poten tial as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. Gut 1993;34:41-45
45. Norman JG, Fink GW, Denham W, et al. Tissue specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distan organ dysfunction. Dig Dis Sci 1997;42:1783-1788
46. Norman JG, Fink G, Franz M, et al. Active interleukin-1 receptor required for maximal progres sion of acute pancreatitis. Ann Surg 1996;223:163-169.