

## 만성 B형 간질환에서의 지질과산화

연세대학교 의과대학 내과학교실, 약리학교실\*

김경철 · 이관식 · 한광협 · 최 원 · 전재윤  
이상인 · 문영명 · 강진경 · 박인서 · 김혜영\*

### =Abstract=

### Lipid Peroxidation in Chronic Liver Diseases Type B

Kyung Chul Kim, M.D., Kwan Sik Lee, M.D., Kwang Hyub Han, M.D., Won Choi, M.D.,  
Chae Yoon Chon M.D., Sang In Lee, M.D., Young Myung Moon, M.D.,  
Jin Kyung Kang, M.D., In Suh Park M.D., and Hyeyoung Kim, Ph.D.\*

*Department of Internal Medicine and Pharmacology\*,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background/Aims :** Oxidative stress is known to play a role in the pathogenesis of a certain liver diseases such as alcoholic liver disease, metal storage disease, and ischemia/reperfusion injury. Recently oxidative stress(lipid peroxidation) has also been implicated in hepatic fibrosis, which is now regarded as a common response to chronic liver injury regardless of its nature. Development of fibrosis and cirrhosis are the major complications of chronic hepatitis B. So we aimed to detect lipid peroxidation in chronic hepatitis B and to investigate its potential role in the pathophysiology of the disease.

**Methods :** The subjects were histologically-proven 56 patients, including fatty liver(FL, n=8), healthy HBsAg carrier(n=6), chronic persistent hepatitis(CPH, n=8), mild chronic active hepatitis(CAH-m, n=10), severe CAH(CAH-s, n=16), and liver cirrhosis(LC, n=8). All patients were serologically HBsAg-positive except those with FL. Lipid peroxidation was detected in serum and liver specimen with TBARS(thiobarbituric acid-reacting substances) assay. Western blot and immunohistochemical stain of liver specimen were also performed, using polyclonal antibody against malondialdehyde (MDA).

**Results :** 1. There were no significant differences in serum TBARS levels among groups( $p=0.24$ ). 2. The mean tissue TBARS level(nmol/g) was significantly higher in CAH-s group( $175.4 \pm 41.5$ ) than in other groups(FL  $54.0 \pm 6.4$ , Carrier  $51.1 \pm 15.9$ , CPH  $63.9 \pm 2.9$ , CAH-m  $68.9 \pm 7.9$ , LC  $22.6 \pm 5.1$ ) ( $p<0.05$ ). 3. Tissue TBARS levels correlated with serum ALT levels( $r=0.5934$ ,  $p<0.05$ ). 4. Western blot showed MDA bands only in CAH-s group.

**Conclusions :** This study shows that lipid peroxidation can be detected in situ and commonly occurs in severe chronic hepatitis B. Oxidative stress may be related to active necroinflammatory change

of the liver and contribute to the progression of the disease in chronic hepatitis B.

**Key Words :** Chronic hepatitis B, Oxidative stress, Lipid peroxidation, Hepatic fibrosis

책임저자\* : 이관식, 서울시 강남구 도곡동 146-92, 영동세브란스병원 내과

## 서 론

간손상에 대한 산화성 스트레스(oxidative stress)의 역할은 일부 간질환에서는 비교적 잘 알려져 있으며 그 대표적인 예로는 알코올성 간질환, 중금속에 의한 건손상, 허혈-재관류 손상, 사염화 탄소( $CCl_4$ )에 의한 간손상 등이다.<sup>2</sup> 그동안 산화성 스트레스는 상기 기술한 일부의 제한적인 질환에서만 영향을 미친다고 알려져 왔으나, 최근 여러가지 원인에 의해 만성적인 간손상으로 유발되는 간섬유화(hepatic fibrosis) 과정에 산화성 스트레스가 관여한다는 것이 밝혀지면서<sup>3,4</sup> 산화성 스트레스는 여러가지 간질환에 폭넓게 영향을 미칠 것으로 예상되고 있다. 따라서 만성 B형 간질환에서도 만성적 간손상 및 간섬유화 과정에 산화성 스트레스가 영향을 미치는가에 대한 연구가 필요 하리라 생각되나, 현재까지는 이에 대한 문헌 보고가 극히 드문 실정이다.

산화성 스트레스가 조직손상을 유발하는 기전 중의 하나가 지질과산화(lipid peroxidation)이며, 이 과정에서 대사산물로 malondialdehyde나 4-hydroxynonenal 등의 반응성이 높은 알데하이드(aldehyde)가 생성되어 세포내 단백질이나 DNA와 결합하여 손상을 준다.<sup>5</sup> 이에 저자들은 만성 B형 간질환에서의 산화성 스트레스의 역할에 대한 평가를 하고자 각종 만성 B형 간질환 환자를 대상으로 혈청과 간조직에서 지질과산화물을 측정하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1995년 8월부터 1996년 7월까지 연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에 만성 간질환으로 내원한 환자중 병리조직학적으로 확진된 56예를 대상으로 하였다. 간경변증 환자중 3예는 간세포암 절제술시 주변 비암조직의 쇄기생검(wedge biopsy)으로 간조직을 얻었고, 다른 모든 환자는 복강경하 생검으로 간조직을 얻었다. 대상 환자를 조직학 소견에 따라 지방간 8예, 만성 HBsAg 전강보유자 6예, 만성 지속성 간염 8예, 만성 활동성 간염 26예, 간경변증 8예로 분류하였다. 만성 활동성 간염은 조직 소견에 따라 경도의 10예와 중증도의 16예로 재분류하였다. 지방간 8예를 제외한 모든 환자에서 혈청학적으로 HBsAg 양성이었다. 각 대상군의 남녀비, 연령 및 혈청 ALT치는 Table 1과 같다.

### 2. 방법

지질과산화물을 측정하기 위해  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동 보관된 혈청 및 간조직과 파라핀 포매조직을 이용하였다. 냉동 보관된 혈청으로 TBARS(thiobarbituric acid-reacting substances) 검사를 시행하였고, 냉동 보관된 조직으로는 TBARS 검사와 malondialdehyde(MDA)에 대한 Western blot을 시행하였으며, 파라핀 조직에서는 MDA에 대한 면역조직화학 검사를 시행하였다.

**Table 1.** Clinical features of the patients

Group	Mean age (Range)	Sex (M/F)	Mean s-ALT (IU/ml)
FL(n=8)	34(20~60)	8/0	76
Carrier(n=6)	24(20~27)	6/0	22
CPH(n=8)	29(21~38)	7/1	69
CAH-m(n=10)	27(20~36)	9/1	112
CAH-s(n=16)	35(21~48)	14/2	181
LC(n=8)	38(30~47)	8/0	56
Total(n=56)	31(20~60)	52/4	84

FL, fatty liver ; Carrier, healthy carrier ; CPH, chronic persistent hepatitis ; CAH-m, mild chronic active hepatitis ; CAH-s : severe chronic active hepatitis ; LC : liver cirrhosis, compensated

### 1) TBARS 검사

혈청 TBARS는 Yagi<sup>6</sup> 방법에 의해 측정하였다. 이를 간략하면, 각 대상마다 100 μl의 혈청을 원심분리한 후 침전물에 1% TBA(thiobarbituric acid) 1 ml와 glacial acetic acid 1 ml를 반응시키고 120°C로 50분간 가열하였다. n-butanol 5 ml을 첨가하여 진탕하였고 n-butanol층으로 발색 복합체를 추출하여 형광도(excitation 515 nm, emission 546 nm)를 측정하였다. 조직 TBARS는 Ohkawa<sup>7</sup>등의 방법으로 시행하였다. 이를 간략하면, 조직을 균질화(homogenization) 시킨후 균질 조직(tissue homogenate) 120 μl을 8% SDS 0.15 ml와 0.8% TBA 0.15 ml에 반응시키고 95°C로 15분간 가열하였다. 원심분리후 상층액의 발색복합체를 추출하여 형광도(excitation 515 nm, emission 553 nm)를 측정하였다. 기준(standard) MDA로는 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane(Sigma)을 사용하였으며, TBARS의 단위는 혈청 및 조직에서 각각 혈청 1 ml당 nmol MDA(nmol/ml) 및 조직 1g당 nmol MDA(nmol/g)로 표시하였다.

### 2) MDA에 대한 Western blot

MDA에 대한 다클론 항체(polyclonal antibody)를 일차항체로 사용하고 horseradish peroxidase(HRP) conjugated 이차항체를 사용하여 시행하였다. 각 대상의 냉동 조직에서 조직균질화 및 단백질 정제 과정을 거친후, Bradford 방법으로 OD(optical density) 595 nm에서 단백질 10 μg을 각각 분리하였다. 단백질을 10% SDS-polyacrylamide겔에서 전기영동 시행후 nitrocellulose 흡착지에 전기이동시켰다. 흡착지를 분리하여 5% non-fat milk로 밤새 차단한후 일차항체(1 : 1000)를 60분간 반응시키고 PBS-T 용액으로 세척후 이차항체(1 : 1000)를 60분간 반응시킨 다음 enhanced chemiluminescence 방법으로 관찰하였다.

### 3) MDA에 대한 면역조직화학 검사

파라핀 포매조직에서 일차항체로는 MDA에 대한 다클론 항체를 사용하고 효소로는 alkaline phosphatase를 사용하여 통상적인 avidin-biotin-conjugate complex(ABC)법으로 시행하였다. 이를 간략하면, 조직절편을 만들어 deparaffinization 과정을 거친후 5% NGS blocking액을 30분간 처리하고 일차항체(1 : 250)를 30분간 반응시켰다. PBS 용액으로 세척후 biotinylated 이차항체(1 : 600)를 30분간 반응시킨후 avidin-biotin-alkaline phosphatase를 처리하여 NBT-BCIP로 발색하였다.

### 4) 통계 분석

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였으며, 통계적 분석은 Kruskal-Wallis test 및 Spearman 상관분석을 이용하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 혈청 및 조직 TBARS

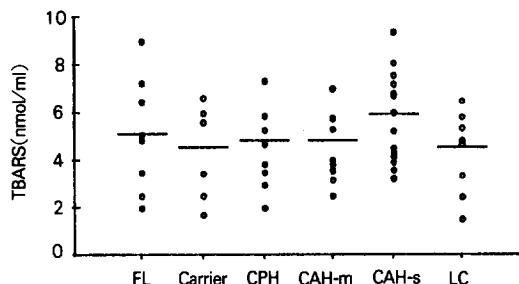
각 군의 혈청 및 조직 TBARS의 평균치는 Table 2와 같다. 혈청 TBARS의 평균치는 모든 군에서 4~6 nmol/ml 사이로 측정되었으며 각 군간에 유의한 차이는 없었다( $p=0.24$ )(Fig. 1). 조직 TBARS의 평균치는 중증도의 만성 활동성 간염군에서 가장 높았으며, 경도의 만성 활동성 간염, 만성 지속성 간염, 지방간, 만성 건강보유자, 간경변증 순이었다. 중증도의 만성 활동성 간염군의 평균치는 다른 모든 군에 비해 유의하게 높았으며 ( $p<0.05$ ) 그외의 다른 군간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

**Table 2.** Serum and tissue levels of TBARS

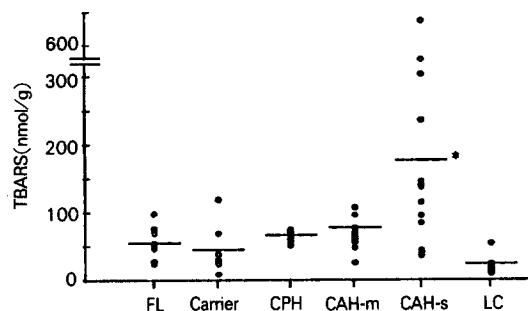
Group	Serum TBARS (nmol/ml)	Tissue TBARS (nmol/ml)
FL	5.1±0.9	54.0±6.4
Carrier	4.3±0.8	51.1±15.9
CPH	4.4±0.5	63.9±2.9
CAH-m	4.5±0.4	68.9±7.9
CAH-s	5.9±0.5	175.4±41.5*
LC	4.3±0.6	22.6±5.1

TBARS, Thiobarbituric acid-reacting substances

\* $p<0.05$  vs. other groups by Kruskal-Wallis test



**Fig. 1.** Serum TBARS(thiobarbituric acid-reacting substances) levels showed no significant differences among the different groups, including fatty liver(FL), healthy HBsAg carrier(carrier), chronic persistent hepatitis(CPH), mild chronic active hepatitis(CAH-m), severe chronic active hepatitis(CAH-s), and liver cirrhosis(LC).  $p=0.24$  by Kruskal-Wallis test.



**Fig. 2.** The mean tissue TBARS(thiobarbituric acid-reacting substances) level was significantly higher in severe chronic active hepatitis (CAH-s) group compared with other groups, including fatty liver(FL), healthy HBsAg carrier(carrier), chronic persistent hepatitis (CPH), mild chronic active hepatitis(CAH-m), and liver cirrhosis(LC). \* $p<0.05$  by Kruskal-Wallis test.

## 2. 혈청 TBARS, 조직 TBARS 및 혈청 ALT의 상관관계

혈청 TBARS치와 조직 TBARS치의 상관관계를 분석한 결과 상관관계가 없었다( $r=0.3810$ ,  $p=0.07$ ). 조직 TBARS치는 혈청 ALT치와 상관계수( $r$ ) 0.5934로 유의한 상관관계가 있었으나( $p<0.05$ ) (Fig. 3), 혈청 TBARS치는 혈청 ALT치와 상관관계가 없었다( $r=0.2611$ ,  $p=0.09$ ).

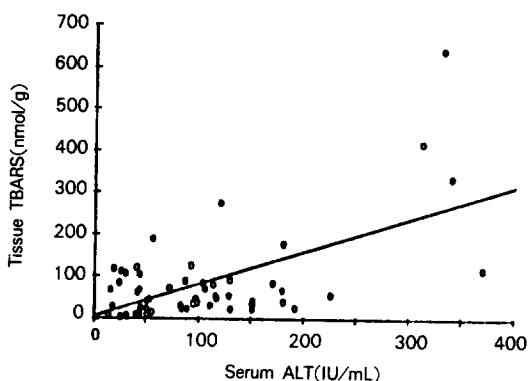


Fig. 3. Tissue TBARS(thiobarbituric acid-reacting substances) levels correlated with serum ALT levels.  $r=0.5934$ ,  $p<0.05$  by Spearman's correlation test.

## 3. MDA에 대한 Western blot

조직에서 MDA에 대한 Western blot을 시행한 결과 중증도의 만성 활동성 간염군에서는 220KDa 와 97.4KDa 사이에서 밴드를 관찰할 수 있었으나 다른군에서는 뚜렷한 밴드를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4).



Fig. 4. Western blot, using polyclonal antibody against malondialdehyde, showed bands between 220 KDa and 97.4KDa only in severe chronic active hepatitis(lane 6 and 7). Lane 1, fatty liver; lane 2, healthy HBsAg carrier ; lane 3, chronic persistent hepatitis; lane 4 and 5, mild chronic active hepatitis ; lane 8 and 9, liver cirrhosis.

## 4. MDA에 대한 면역조직화학 검사

각 군의 면역조직화학 검사 결과는 Fig. 5와 같다. 중증도의 만성 활동성 간염군에서는 문맥 및 문 맥주변으로 MDA에 대해 강한 양성반응을 관찰할 수 있었고, 만성 건강보유자군은 음성반응을 보였으며 그외의 다른군에서는 약한 양성반응을 보였다.

**Fig. 5.** Immunohistochemistry, using polyclonal antibody against malondialdehyde, showed a strong positive stain around portal and peripo-tal area in severe chronic active hepatitis(E), but weak or no stain in other groups. Fatty liver(A), healthy HBsAg carrier(B), chronic persistent hepatitis(C), mild chronic active hepatitis(D), liver cirrhosis(F).

## 고 찰

유리기(free radical)의 생성과 제거의 불균형으로 유리기가 많아질 때 세포나 조직은 산화성 스트레스(oxidative stress)를 받게된다. 과다한 유리기의 생성은 조직손상을 유발하여 궁극적으로 질병을 일으키는 요인으로 알려져 있고, 대표적인 허혈-재판류 조직손상 뿐만 아니라 각종 성인병, 발암 및 노화에 이르기까지 다양한 질병이 과다하게 생성된 유리기에 의한 산화성 스트레스에 기인한다고 여겨진다<sup>8</sup>. 간손상에 대한 유리기의 역할은 일부 간질환에서는 비교적 잘 알려져 있으며, 그 대표적인 예로는 알코올성 간질환, 중금속(철, 구리)에 의한 간손상, 허혈-재판류 손상 및 파라콰트 또는 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)와 같은 독물에 의한 간손상 등이 있다<sup>1-2</sup>. 아직까지는 상기 기술한 일부의 제한적인 질환에서만 영향을 미친다고 알려져 왔으나, 근래 간세포, 간성상세포(hepatic stellate cell, Ito cell), 쿠퍼세포 등의 분리와 배양이

가능해지고 분자생물학 등을 이용한 구체적인 발병기전에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 산화성 스트레스가 여러가지 간질환에 폭넓게 영향을 미친다는 것을 알 수 있게 되었다. 또한 산화성 스트레스는 간섬유화(hepatic fibrosis)의 중요한 원인중의 하나로 알려지고 있는데, 산화성 스트레스에 의해 교원질(collagen) 유전자의 전사율이 증가되며<sup>4</sup>, 간섬유화 과정에 핵심적 역할을 하는 간성상세포가 활성 및 증식한다는 보고가 있다.<sup>9</sup>

산화성 스트레스가 조직손상을 유발하는 기전 중의 하나로 지질과산화(lipid peroxidation)가 알려져 있다. 여러가지 원인에 의해 생성된 과산화수소는 환원된 철이나 구리이온과 산소기(oxygen radical)의 도움을 받아 하드록실기(hydroxyl radical)를 형성한다. 이는 세포막에 있는 다불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)과 결합하여 지질과산화를 초래하고, 대사산물로 malondialdehyde(MDA)나 4-hydroxynonenal 등의 반응성이 높은 알데하이드가 생성되어 세포내 단백질이나 DNA와 결합하여 손상을 주거나 일부 유전자의 전사율을 증가시킨다<sup>5</sup>. 지질과산화는 알코올<sup>10</sup>, 철 과부하(iron-overload)<sup>11</sup>, 포르피린증(porphyrinia)<sup>12</sup>, 사염화탄소<sup>13</sup> 등에 의한 간질환에서 조직손상과 간섬유화 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다. 정확한 병태생리적 기전은 아직 밝혀지지 않았지만 in vivo 또는 in vitro 실험에 의하면 지질과산화에 의해 생성된 활성 알데하이드는 교원질 유전자의 발현을 증가시키고<sup>4</sup>, 간성상세포의 활성 및 증식에 관여하며<sup>9</sup>, 쿠퍼세포를 자극하여 TGF- $\beta_1$ 과 같은 섬유화성 사이토카인(profibrogenic cytokine)의 분비를 촉진 시키는 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup>

따라서 산화성 스트레스에 의한 지질과산화는 간섬유화에 중요한 역할을 하고, 간섬유화는 여러 가지 원인에 의해 간에 만성적인 손상이 지속될 때 초래되는 공통적인 반응으로 현재 인식되고 있다<sup>15</sup>. 이러한 관점에서 지질과산화는 만성 바이러스성

간질환에서도 간섬유화 과정에 관여하여 전체적인 병의 경과에 영향을 미칠 수 있음을 짐작할 수 있다. 바이러스성 간염을 포함한 여러 원인의 만성 간 질환을 대상으로 한 Paradis 등<sup>16</sup>의 지질과산화에 대한 연구에 의하면 원인에 관계없이 모든 대상의 만성 간질환에서 지질과산화가 일어나며, 이는 결국 국 간섬유화에 공통적으로 관여할 것이라고 시사해 주고 있다. Venkataramani 등<sup>17</sup>의 만성 C형 간 염환자를 대상으로 한 연구에서는 보다 구체적으로 C형 간염의 간섬유화 과정에 지질과산화가 관여함을 제시하고 있다. 이에 반해 B형 간염에서의 산화성 스트레스의 역할에 대해서는 문헌 보고가 없는 실정이다. 본 연구에서 TBARS(thiobarbituric acid-reacting substance) 검사와 MDA에 대한 Western blot 및 면역조직화학 검사 결과에 의하면 B형 간염중 중증도의 만성 활동성 간염에서는 지질과산화가 활발히 일어난다는 것을 알 수 있었다.

TBARS 검사는 지질과산화를 측정하는 방법중 가장 자주 이용되는 방법으로, 지방산의 과산화물인 MDA가 일정한 조건(산성 및 가열)하에서 TBA(thiobarbituric acid)와 반응하여 발색복합체를 형성하는 것을 이용한다<sup>18</sup>. TBARS 검사는 지질과산화 및 이에 의한 조직손상을 잘 반영하는 것으로 보고되고 있으며<sup>19</sup>, 조직 및 혈청에 대한 방법이 각각 알려져 있다<sup>6, 7</sup>. 활성 유리기와는 달리 활성 알데하이드는 비교적 오래 지속하고 원래의 지질과산화가 유발된 장소로부터 혈액으로의 유출이 가능하여<sup>5</sup> 혈청에서의 TBARS 검사도 유용한 것으로 알려져 있으며, 실제로 조직 및 혈청에 대한 TBARS 검사의 일반적인 감수성 및 재현성을 보여주는 많은 보고가 있다<sup>7, 20</sup>. 본 연구 결과에 의하면 간조직에서의 TBARS치는 중증도의 만성 활동성 간염군에서 대조군(만성 건강보유자 및 지방간)에 비해 뚜렷하게 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나 혈청 TBARS치는 각 군간에 유의한 차이가 없었다. 혈청 TBARS치에 차이가 없는 본 연구결과는 기존의 Suematsu 등<sup>21</sup>과 Higueras 등<sup>22</sup>

의 만성 활동성 간염환자에서 대조군에 비해 혈청 TBARS가 유의하게 증가되었다는 보고와는 일치하지 않았는데, 이는 기존의 연구대상이 주로 만성 C형 간염 환자였다는 차이점이 있다. 또한 혈청 TBARS치에 영향을 미칠 수 있는 알코올 섭취<sup>10</sup>, 고지혈증<sup>23</sup>, 혈청 철<sup>24</sup>, 빌리루빈 및 혈당치<sup>18</sup> 등을 고려하지 않았던 것이 각 군간에 차이가 없었던 원인이 아니었나 생각할 수 있다. 본 연구에 의하면 혈청 TBARS치와 조직 TBARS치간에 상관관계가 없는 것으로 분석되었는데, 이는 조직에서 증가되었던 TBARS가 혈청 TBARS로 반영이 안 될 수 있음을 시사하기도 하지만, 상기 기술한 혈청 TBARS 측정법의 한계도 고려해야 할 것이다.

중증도의 만성 활동성 간염에서 지질과산화물이 가장 높게 측정되고 조직 TBARS치가 혈청 ALT치와 상관관계가 있는 것으로 미루어, 지질과산화와 간조직의 활발한 괴사성 염증반응과 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 만성 C형 간염환자를 대상으로 한 Paradis 등<sup>25</sup>의 연구에서도 간조직의 지질과산화 정도와 간염의 활성도가 상관관계가 있는 것으로 보고하고 있다.

본 연구에서 MDA에 대한 면역조직화학 검사상 중증도의 만성 활동성 간염에서 강한 양성을 관찰하였는데 C형 간염을 대상으로 한 Paradis 등<sup>25</sup>의 보고와 유사하였다. 즉 문맥 주변의 세포외기질(extracellular matrix)과 동모양혈관(sinusoidal) 세포 주위에 강한 염색을 보였고 이는 괴사성 염증이 활발한 부위이며 간섬유생성(hepatic fibrogenesis)이 활발히 진행되는 부위이다. 바이러스성 간염환자에서 괴사성 염증부위에 간성상세포가 활성화된다는 보고가 있으며<sup>26, 27</sup>, Venkataramani 등<sup>17</sup>은 만성 C형 간염환자에서 활성화된 간성상세포의 지표인  $\alpha$ -SMA(smooth muscle actin)와 MDA에 대한 염색을 동시에 시행하여 지질과산화물이 강하게 염색되는 부위에 간성상세포도 활성화됨을 구체적으로 제시하였다. 이는 만성 C형 간염에서 염증반응이 활발한 부위에 지질과산화가

활발히 일어나며 주변의 간성상세포가 활성화되어 간섬유화가 진행되는 일련의 과정을 시사한다. 본 연구에서는 지질과산화와 간섬유화의 직접적인 관계에 대해서는 규명을 못했으나, 만성 B형 간염에서도 상기 과정과 유사한 간섬유화 과정이 진행될 것으로 생각된다.

본 연구에서 간경변증 환자에서는 지질과산화가 대조군과 유의한 차이가 없었다. Suematsu 등<sup>21</sup>은 간경변증 환자를 대상성(compensated)과 비대상성(decompensated)으로 분류하여 지질과산화를 측정한 결과 대상성 간경변증 환자에서는 대조군과 유의한 차이가 없었으나, 비대상성인 경우 활동성 간염환자와 유사한 값으로 대조군에 비해 유의하게 증가되었다고 보고하였다. 본 연구에서 간경변증 환자는 모두 대상성이었는데, 본 연구와 Suematsu 등<sup>21</sup>의 연구결과로 미루어 대상성 간경변증 환자에서는 지질과산화가 뚜렷하지 않으며, 비대상성인 경우에 지질과산화가 증가하는 것을 알 수 있었다.

사염화탄소 또는 철 과부하 등의 동물실험에서는 항산화제의 첨가에 의해 지질과산화가 감소되고<sup>28, 29</sup> 염증반응 및 간섬유화도 감소한다는 다수의 보고가 있다<sup>30~32</sup>. 이러한 결과로 만성 바이러스성 간염의 치료에서 항산화제의 역할을 기대할 수 있는데, 실제로 Venkataramani 등<sup>17</sup>은 인터페론에 치료반응이 없는 중증도의 만성 C형 간염 환자에서 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol을 투여하여 투여전후의 간섬유화 지표를 비교한 결과 간섬유화의 진행을 억제할 수 있다고 보고하고 있다.

결론적으로 본 연구에서는 만성 B형 간염중 중증도의 만성 활동성 간염에서 지질과산화가 활발히 일어나며, 이는 조직의 심한 괴사성 염증반응과 관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 이미 제시되고 있는 다른 원인의 만성 간질환과 마찬가지로 이러한 지질과산화는 간섬유화를 진행시키는 과정이라고 생각되며, 이를 입증하기 위해서는 간섬유화의 핵심적 역할을 하는 간성상세포의 활성화에 대한 연구가 동시에 이루어져야 됨은 물론

이러한 일련의 과정에 관여하는 세포 및 유전자 수준의 구체적인 기전에 대한 규명이 필요하리라 생각된다.

## 요 약

**목적 :** 간손상에 대한 산화성 스트레스의 역할은 중금속 및 독물에 의한 간질환, 알코올성 간질환 등 일부 간질환에서는 비교적 잘 알려져 있다. 최근에는 여러가지 원인에 의해 유발되는 간섬유화 과정에 산화성 스트레스가 관여한다고 보고되고 있는데, 만성 B형 간질환에서도 산화성 스트레스의 영향에 대한 평가가 필요하리라 생각된다. 이에 연자들은 만성 B형 간질환 환자의 간조직과 혈청에서 산화성 스트레스에 의해 유발되는 지질과산화를 측정하였다. **방법 :** 병리조직학적으로 확진된 지방간(FL) 8예, 만성 HBsAg 건강 보유자(Carrier) 6예, 만성 지속성 간염(CPH) 8예, 만성 활동성 간염(CAH) 26예, 간경변증(LC) 8예를 대상으로 하였고 이들 중 지방간을 제외한 전 예에서 혈청 HBsAg 양성이었으며, 만성 활동성 간염은 경도(CAH-m, 10예)와 중증도(CAH-s, 16예)로 재분류하였다. 지질과산화를 측정하기 위해  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동 보관된 혈청 및 조직과 파라핀 포매조직을 이용하였다. 냉동 혈청 및 냉동 조직 일부에서 TBA (thiobarbituric acid) 반응법으로 과산화물(TBARS, thiobarbituric acid-reacting substances)을 측정하였으며, 남은 조직에서는 단백질을 정제한후 10  $\mu\text{g}$ 의 단백질에서 malondialdehyde (MDA)의 다클론 항체를 이용한 Western blot 방법으로 MDA를 측정하였다. 파라핀 포매조직에서는 MDA의 다클론 항체를 이용하여 통상적인 alkaline phosphatase법으로 면역조직화학 염색을 하였다. **결과 :** ① 혈청 TBARS(nmol/ml)의 평균치는 FL  $5.1 \pm 0.9$ , Carrier  $4.3 \pm 0.8$ , CPH  $4.4 \pm 0.5$ , CAH-m  $4.5 \pm 0.4$ , CAH-s  $5.9 \pm 0.5$ , LC  $4.3 \pm 0.6$ 로 각군간에 유의한 차이는 없었다( $p=0.24$ ). ② 조직

TBARS(nmol/g)의 평균치는 FL 54.0±6.4, Carrier 51.1±15.9, CPH 63.9±2.9, CAH-m 68.9±7.9, CAH-s 175.4±41.5, LC 22.6±5.1로 CAH-s군에서 다른군에 비해 유의하게 높았다( $p<0.05$ ). ③ 조직 TBARS치는 혈청 ALT치와 유의한 상관관계가 있었다( $r=0.5934$ ,  $p<0.05$ ) ④ MDA에 대한 Western blot상 CAH-s군에서만 band를 관찰할 수 있었다. ⑤ 면역조직화학 검사상 CAH-s군에서는 문맥 및 문맥주변으로 MDA에 대해 강한 양성반응을 보였으나 다른군에서는 뚜렷한 양성반응을 관찰할 수 없었다. 결론 : 이상의 성적으로 만성 B형 간질환중 특히 중증도의 만성 활동성 간염에서 지질과산화가 활발히 일어나며, 이는 조직의 심한 괴사성 염증반응과 관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 이미 제시되고 있는 다른 원인의 만성 간질환과 마찬가지로 이러한 지질과산화는 간섬유화를 진행시키는 과정이라고 생각되며, 이를 입증하기 위해서는 앞으로 간섬유화의 지표를 포함한 연구가 필요하겠다.

### 참 고 문 헌

1. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterol* 1994;41:343-348.
2. Kaplowitz N, Tsukamoto H. Oxidative stress and liver disease. In Saunders WB, ed. *Progress in liver diseases*. Philadelphia : PA, 1996:131-159.
3. Kamimura S, Gaal K, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease : Association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* 1992; 16:448-453.
4. Bedosa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen  $\alpha_1(I)$  gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury : A link to tissue fibrosis ? *Hepatology* 1994;19:1262-1271.
5. Enterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
6. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976;15:212-216.
7. Ohkawa H, Oshiri N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
8. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now ? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
9. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF- $\alpha$  and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest* 1995;96: 2461-2468.
10. Muller A, Sies H. Role of alcohol dehydrogenase activity and the acetaldehyde in ethanol-induced ethane and pentane production by isolated perfused rat liver. *Biochem J* 1982;206:153-156.
11. Bacon BR, Tavill AT, Brittenham GM, Park CH, Recknagel RO. Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J Clin Invest* 1983;71:429-439.
12. Poh-Fitzpatrick MB. Pathogenesis and treatment of phototoxic manifestations of the porphyrias. *Semin Liv Dis* 1982;2:164-176.
13. Burk RF, Lane JM, Patel K. Relationship of oxygen and glutathione in protection against carbon tetrachloride-induced hepatic microsomal lipid peroxidation and covalent binding in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:1996-2001.
14. Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene exp-

- ression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 1995;21:1304-1309.
15. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis : Mechanisms and treatment strategies. *N Eng J Med* 1993;328:1828-1835.
  16. Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Bedosa P. In situ detection of lipid peroxidation in chronic liver diseases. *Hepatology* 1996;24(Pt. 2):237A.
  17. Venkataramani A, Houglum K, Lyche K, Chojkier M. Oxidative stress mediates activation of stellate cells and fibrogenesis in patients with chronic hepatitis C : Beneficial effects of d- $\alpha$ -tocopherol. *Hepatology* 1996;24(Pt. 2):150A.
  18. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biol Sci* 1990;15:129-135.
  19. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Methods Enzymol* 1978;12:302-310.
  20. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys Lipids* 1987;45:337-351.
  21. Suematsu T, Kamada T, Abe H, Kikuchi S, Yagi K. Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin Chim Acta* 1977;79:267-270.
  22. Higueras V, Raya A, Rodrigo JM, Serra MA, Roma J, Romero F. Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1994;16:131-133.
  23. Ylä-Hertuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84: 1086-1095.
  24. Houglum K, Filip M, Witztum JL, Chojkier M. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest* 1990;86:1991-1998.
  25. Paradis V, Mathurin P, Charlotte F, et al. Lipid peroxidation in chronic hepatitis C : In situ detection and correlations with pathological features. *Hepatology* 1996;24(Pt. 2):375A.
  26. Inuzuka S, Ueno T, Torimura T, Sata M, Abe H, Tanikawa K. Immunohistochemistry of the hepatic extracellular matrix in acute viral hepatitis. *Hepatology* 1990;12:249-256.
  27. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, et al. Sequential changes in human Ito cells and their relation to postnecrotic liver fibrosis in massive and submassive hepatic necrosis. *Virchows Arch* 1995; 426:95-101.
  28. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:165-169.
  29. Nishigaki I, Kuttan R, Oku H, Ashoori F, Abe H, Yagi K. Suppressive effect of curcumin on lipid peroxidation induced in rats by carbon tetrachloride or  $^{60}\text{Co}$ -irradiation. *J Clin Biochem* 1987;13:23-27.
  30. Houglum K, Brenner DA, Chojkier M. d- $\alpha$ -Tocopherol inhibits collagen  $\alpha_1(\text{I})$  gene expression in cultured human fibroblast. *J Clin Invest* 1991;87:2230-2235.
  31. Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* 1992;16:1014-1021.
  32. Liu SL, Esposti SD, Yao T, Diehl AM, Zerin M. Vitamin E therapy of acute  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor Kappa B binding. *Hepatology* 1995;22:1471-1481.