

DMN-유발 간섬유화 동물에서 혈류 의존성 약물인 Verapamil의 약물동태에 대한 간질환의 영향

한양대학교 의과대학¹약리학교실 및 의생명과학연구원, ²내과학교실, ³생활과학대학 식품영양학과,
⁴의과대학 실험동물실, ⁵Division of Endocrinology, University of Pennsylvania

홍정욱¹ · 박윤영¹ · 원해단¹ · 김현진¹ · 이주원¹ · 지옥화^{1,3} · 엄애선³
이상구⁴ · 이윤식⁵ · 신인철¹ · 이민호² · 강주섭¹

Effects of Hepatic Disease on Flow-limited Verapamil Pharmacokinetics in the DMN-induced Hepatic Cirrhotic Rats

Jung-Wook Hong¹, Yun-Young Park¹, Hai-Dan Yuan¹, Hyun-Jin Kim¹, Joo-Won Lee¹, Ok-Hwa Jhee^{1,3}
Ae-Son Om³, Sang-Koo Lee⁴, Yun-Sik Lee⁵, In-Chul Shin¹, Min-Ho Lee² and Ju-Seop Kang¹

¹Department of Pharmacology and Institute of Biomedical Science, ²Department of Internal Medicine, College of Medicine,
³Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, ⁴Center for Laboratory Animal Sciences,
College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ⁵Division of Endocrinology,
Diabetes and Metabolism, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

The purpose of this study was to determine the effect of hepatic disease severities on pharmacokinetics of flow-limited verapamil in dimethylnitrosamine (DMN)-induced cirrhotic rats. Hepatic cirrhotic rats (SD rats, 200~250 g) were induced by intraperitoneal injection with 1% DMN solution at a dose of 10 μ g/g by 3 days/week as experimental groups and same dose of saline as control for 4 weeks. The serum verapamil concentrations were quantified at zero, 10 min, 30 min, 1, 2 and 3 hrs after bolus injection of 3 mg/kg of verapamil by a column-switching HPLC method and pharmacokinetic parameters such as Co, MRT, AUC, Vdss, $t_{1/2}$ and CLp were determined in each group. And then some hepatic tissue was obtained and subjected to analysis of the hepatic 4-hydroxyproline content and were inspected by light microscope after hematoxylin and eosin staining. The serum concentrations and pharmacokinetic parameters such as Co, AUC, MRT and $t_{1/2}$ were significantly increased ($p < 0.01$) and Vdss and CLp were significantly decreased ($p < 0.01$) in hepatic cirrhotic rats according to DMN-treated period. The 4-hydroxyproline content was also gradually increased proportionally to DMN-treated period. The pharmacokinetic parameters of verapamil were seemed to change gradually to depend on the hepatic fibrotic severity. Therefore, we suggested that flow-limited drug as like verapamil dosage adjustment is necessary according to hepatic function severity. (*Cancer Prev Res* 10, 34-47, 2005)

Key Words: Flow-limited verapamil, Cirrhosis, HPLC, Pharmacokinetic parameter

책임저자 : 강주섭, ☎ 133-791, 서울시 성동구 행당동 17번지
한양대학교 의과대학 약리학교실 및 의생명과학연구원
Tel: 02-2220-0652, Fax: 02-2292-6686
E-mail: jskang@hanyang.ac.kr

접수일 : 2005년 2월 21일, 게재승인일 : 2005년 3월 14일

Correspondence to : Ju-Seop Kang

Department of Pharmacology and Institute of Biomedical Science, College
of Medicine, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu,
Seoul 133-791, Korea

Tel: +82-2-2220-0652, Fax: +82-2-2292-6686

E-mail: jskang@hanyang.ac.kr

서 론

간장은 약물대사에 중심적인 역할을 하고 있으며¹⁾ 약물대사에 대한 간장의 역할은 지용성 약물을 수용성인 물질로 변화시켜서 담즙이나 소변으로 배설되도록 하는 것이다. 그러므로 간질환은 다양한 병태생리적 변화가 초래되어 간혈류의 감소, 간 혈류단락(hepatic shunt), 간 세포기능 장애, 혈장단백의 양적·질적 변화 및 담즙분비의 이상이 나타날 수 있으므로 이런 장애로 인해 많은 약물의 체내 동태에 변화가 초래될 수 있다. 임상에서도 간질환 환자에서 약물 부작용의 발생빈도가 높음은 잘 알려져 있지만 현재까지 어떤 환자에서 간의 약물 대사에 장애가 발생할 지에 대한 예견지표가 제시되어 있지 않은 실정이다.²⁾ 반면에, 신기능장애 환자에서는 blood urea nitrogen, creatinine 혹은 creatinine 청소율 등을 기초로 하여 투여약물에 대한 용량이나 투여간격을 용이하게 조절할 수 있으나, 간질환 환자에서는 투여용량 혹은 간격을 조절할 수 있는 지표가 없어서 투여용량과 투여간격을 조절하기 어려운 상황이다.³⁾ 간장은 간세포, 혈관상피세포(SEC, sinusoidal endothelial cell), Kupffer 세포 및 성상세포(HSC, hepatic stellate cell) 등으로 구성되어 있다. 이 중에 성상세포가 간섬유화에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{4,5)} 간 내의 세포외기질(ECM, extracellular matrix)을 분비하는 주된 세포로 간성상세포(hepatic stellate cell, Ito cell, lipocyte)는 정상적인 상태에서는 휴지기에 있다가 활성화되면 세포변형이 일어나고 ECM을 다량 분비하고 Disse 강 주위로 침착되면서 간섬유화가 진행되고 결국 간경변으로 악화된다.^{6~8)} 간성상세포로부터 분비되는 대표적인 ECM은 콜라겐이며 이를 자극하는 것은 지질과산화물, TGF β , 아세트알데히드, 섬유화된 간에서 생기는 섬유화 요소 등이 있다.^{9,10)} 만성 간질환, 특히 간경변증 환자에서 간혈류 단락이 생기고 간혈류량과 내인성 제거율이 감소하게 되면 초회통과효과(first-pass effect)가 큰 약물 즉, 간 제거율이 높은 약물(flow-limited drug)의 대사에 현저한 장애가 초래될 수 있고,¹¹⁾ 이런 약물을 경구투여 시에 초회통과효과가 감소하여 전신순환으로 흡수되는 양이 증가하므로 비례적으로 혈중농도가 증가하며 반감기도 길어지게 될 것이다.^{12,13)} 그러므로 정상간장에서 약물대사의 기본원리와 간질환 정도에 따른 약물대사 기능의 변화를 이해하고 이에 근거하여 간질환에서 약동력학의 변화, 감수성의 변화 등을 고려하여 투여용량과 투여간격을 조절해야

한다.¹⁴⁾ 간섬유화의 병리적 연구 및 간섬유화에 관한 연구에는 간섬유화 실험동물 모델^{15~17)}의 확립이 필수적이고 실험동물 모델에서는 임상처럼 알코올이나 간염바이러스에 의한 실험동물 모델을 그대로 이용하기는 곤란하다. 대신 간독성 물질이나 담관결찰 등에 의한 간섬유화 모델이 이용되고 있다. 약물에 의한 간세포손상에는 직접 또는 간접적인 손상이 있는데 직접적인 손상은 약물에 의한 세포손상이며 간접적인 손상은 약물을 CYP450이 대사하여 유리기, 전자친화체, 활성중간대사물 등을 발생시켜서 세포를 손상시키는 것이다. 간성상세포는 전체 간세포의 15% 정도를 차지하며 retinoid를 저장하고 있는 주된 세포이다. 간 손상 후 간성상세포가 활성화되면 성상세포는 섬유세포 생성능력을 가진 근섬유아세포로 분화되며 콜라겐이 분비되어 섬유화가 진행된다.¹⁸⁾ 화학적으로 간섬유화 유도방법에는 사염화탄소(CCl₄),^{19~21)} dimethylnitrosamine (DMN),^{22,23)} 알코올,^{24,25)} TAA (thioacetamide)²⁶⁾ 등이 있고, 면역학적방법,²⁷⁾ 식이결핍²⁸⁾ 및 수술^{29,30)}을 이용하는 등 다양한 방법들이 개발되었다. CCl₄는 간섬유화에 가장 많이 사용되고 있는 물질로서 간세포 CYP450에 의해 CCl₃를 형성하고 산소와 결합하여 CCl₃O₂를 형성하게 되는데, CCl₃는 세포막의 지질과산화물을 유발하여 세포손상을 주게 되며 경화는 보통 2개월 내지 수개월 후에 생기며 간경화 유발에 대한 개체차가 크며, 동물 종에 따라 치사율이 30~60%까지 발생하는 단점이 있다.¹⁹⁾ 또한 알코올은 지방간을 유발하지만 간세포의 괴사나 간경화를 쉽게 유발하지 않고 흰쥐의 경우 알코올에 대한 거부감 때문에 전체 칼로리의 36% 이상을 투여하기 어렵고 대사가 빨라 혈중 알코올 농도를 높은 상태로 유지하기 힘들다는 단점이 있다.³¹⁾ 그러므로 좀더 이상적인 간경화 실험동물 모델은 임상에서의 형태학적 현상들이 재현할 수 있어야 하고, 병리적인 소견에서 처치기간에 따라서 점차적이고 확실한 변화가 있어야 하며, 높은 재현성과 사망률이 낮아야 하고, 마지막으 병태 생리적인 후유증이 있어야 한다.³²⁾ 이러한 의미에서 DMN-유발 간섬유화는 3주간 DMN 투여로 빠른 결합조직결절 형성과 소결절형 간경변을 일으키며 이로 인해서 생긴 간경변에서 사람의 알코올성 간질환과 비슷한 변화가 관찰된다. 또한 문맥압 항진증, 복수, 황달 등 임상증상도 유사하여,³³⁾ 간경화 실험동물 모델에 대한 약물 또는 물질의 효과를 검증하는 실험에서 종종 사용되고 있다.³⁴⁾ 이 실험동물 모델의 장점은 동물의 치사율이 낮으며, 초기의 중간소엽 간손상 이후 소정맥주위 섬유화와 섬유성 격막의 형성을 거쳐 3주간 DMN

투여 후에는 소결절형 간경변이 발생하는 재현성이 높은 것으로 알려져 있다.^{33,35)} 그리고 약물투여를 중단한 후 24주까지도 유지되어 비가역적인 병변인 것으로 알려져 있다.³⁴⁾

따라서 DMN 투여^{23,36,37)}로 간섬유화-유발한 흰쥐에서 간조직 4-hydroxyproline의 정량^{38,39)}과 조직학적 변화 관찰로 간섬유화 정도를 확인하고, 혈류 의존성이 높고 간에서 높은 제거율을 나타내는 약물인 verapamil^{40~43)}의 약동학적 지표변화를 조사하여 간질환의 진행도와 간의 약물 대사능 변화와의 상관관계를 비교하여 간질환에 따른 약물 투여용량의 조절에 대한 기초자료를 제공하려 한다.

재료 및 방법

1. 실험대상 및 사육조건

8주령 200~250 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(중앙 실험동물(주))를 대상으로 하여 실험 1주 전부터 55±5%의 습도, 22±2°C의 온도 및 환기가 조절된 동물실에서 순응시켰으며, 12시간 주기로 명암을 조절하였다. 실험 기간동안 고형사료와 물을 자유롭게 섭취시켰다.

2. 실험군과 대조군의 분류

Dimethylnitrosamine (DMN) (Sigma, St Louis, MO, USA)에 의한 간섬유화 유도는 Tenkins 등(1985)의 방법에 준수하였다. 실험군은 생리식염수에 1% 농도로 희석한 용액을 10µg/g의 용량으로 일주일에 3일 연속하여 4주간 총 12회 복강주사하였고 대조군은 동량의 생리식염수를 같은 방법으로 주사하였다. 실험개시 후 DMN 투여 1, 2, 3 및 4주 간격으로 각각 실험군 12마리와 대조군 5마리씩 희생시켜 체중, 간중량 및 체중과 간 중량의 비율을 측정하였다(Fig. 3~5).

3. 약물동태학적 연구

DMN 투여 4주 후에 12시간 절식시킨 간섬유화 모델 흰쥐를 0.5% pentobarbital (30 mg/kg)로 마취시킨 후 수술대에 배위 고정하고 왼쪽 대퇴부의 정맥과 동맥을 분리, 노출하여 정맥에 25 IU/ml의 헤파린이 채워진 폴리에틸렌관(PE-50)을 거치하고 마취에서 회복되었을 때 verapamil (Sigma, St Louis, MO, USA) 3 mg/kg을 정맥주사하였다. verapamil 투여 전과 투여 후 10분, 30분, 1, 2 및 3 시간제에 혈액 0.5 ml를 채취하여 3,000 g에서 15분간 원심분리한 후 혈청을 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

4. 컬럼 스위칭 HPLC 법을 이용한 혈중 verapamil 농도 정량

1) 시약 및 재료: HPLC-grade acetonitrile은 Merck 사 (Germany)에서 구입했고, propranolol (내부표준물질)과 (±) verapamil hydrochloride (표준물질)은 Sigma 사(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3차 증류수는 Milli-Q system (Milipore S.A., France)에서 ELGA system을 사용하여 얻었다.

2) HPLC 구성: HPLC system (Nanospace, Shiseido, Tokyo, Japan)으로 펌프 A (SI-1/2001), B (SI-2/2001), 기포제거기 (SI-1/2010), 형광측정기(SI-2/2002), 자동주입기(SI-2/3023), 컬럼 변환장치(SI-1 /2012) 및 컬럼오븐으로 구성되어 있고, 데이터 처리장치로는 Ds CHROM data module의 integrator를 사용하였다. HPLC 컬럼은 전처리 컬럼으로 Capcellpak MF ph-1 (4.0×20 mm, Shiseido, Tokyo, Japan), 농축 컬럼으로 Capcellpak C18 UG120 S5 (2.0×35 mm, Shiseido, Tokyo, Japan), 분석 컬럼으로 Capcellpak C18 UG120 (1.5×250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 컬럼 온도는 45°C로 유지하였으며, 컬럼 변환시간은 2.35~3.10분(propranolol), 3.80~4.85분(verapamil)이었다. 전처리 이동상 [50 mM ammonium phosphate (pH 4.5) (Buffer A)], 분석 이동상[50 mM ammonium phosphate: acetonitrile=70 : 30 (v/v)(Buffer B)]로 제조한 후에 0.22µm 막 여과지(Milipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 2회 감압 여과하고 초음파기로 공기를 제거한 후 사용하였다.

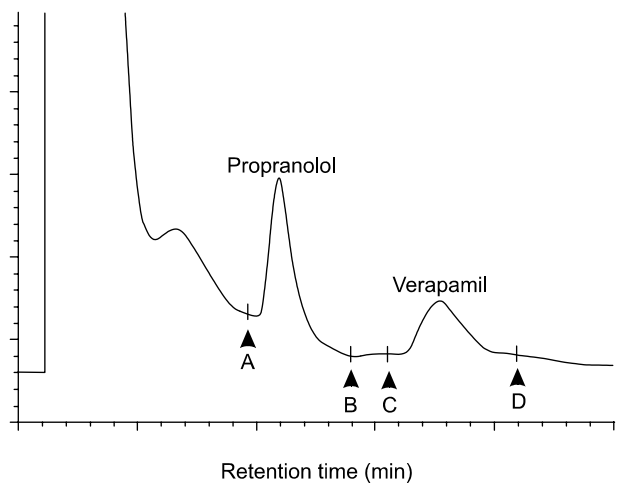


Fig. 1. Pre-treatment process of chromatogram for the switching time for analysis of verapamil. Retention time (min) for switching valve (arrows)(A, 2.35; B, 3.1; C, 3.85; D, 4.85).

전처리 이동상의 유속은 500 μ l/min이었고 분석 이동상의 유속은 120 μ l/min를 유지하였고, 형광측정기의 흥분(excitation)파장은 280 nm로 하였고 여기(emission)파장은 313 nm이었다.

3) 혈청 내 verapamil 농도의 정량: 상기한 기기 조건하에서 컬럼 스위칭 HPLC 방법(Fig. 2)으로 실온에서 전처

리이동상[50 mM ammonium phosphate (pH 4.5)], 분석이동상[50 mM ammonium phosphate : acetonitrile=70 : 30 (v/v)]을 사용하였으며 전처리 및 농축 이동상의 유속은 500 μ l/min, 분석 이동상은 120 μ l/min으로 하여 분석하고 다음과 같이 검량선을 작성하였다. 표준 Verapamil 10 mg을 전처리 이동상[50 mM ammonium phosphate (pH 4.5)]으로

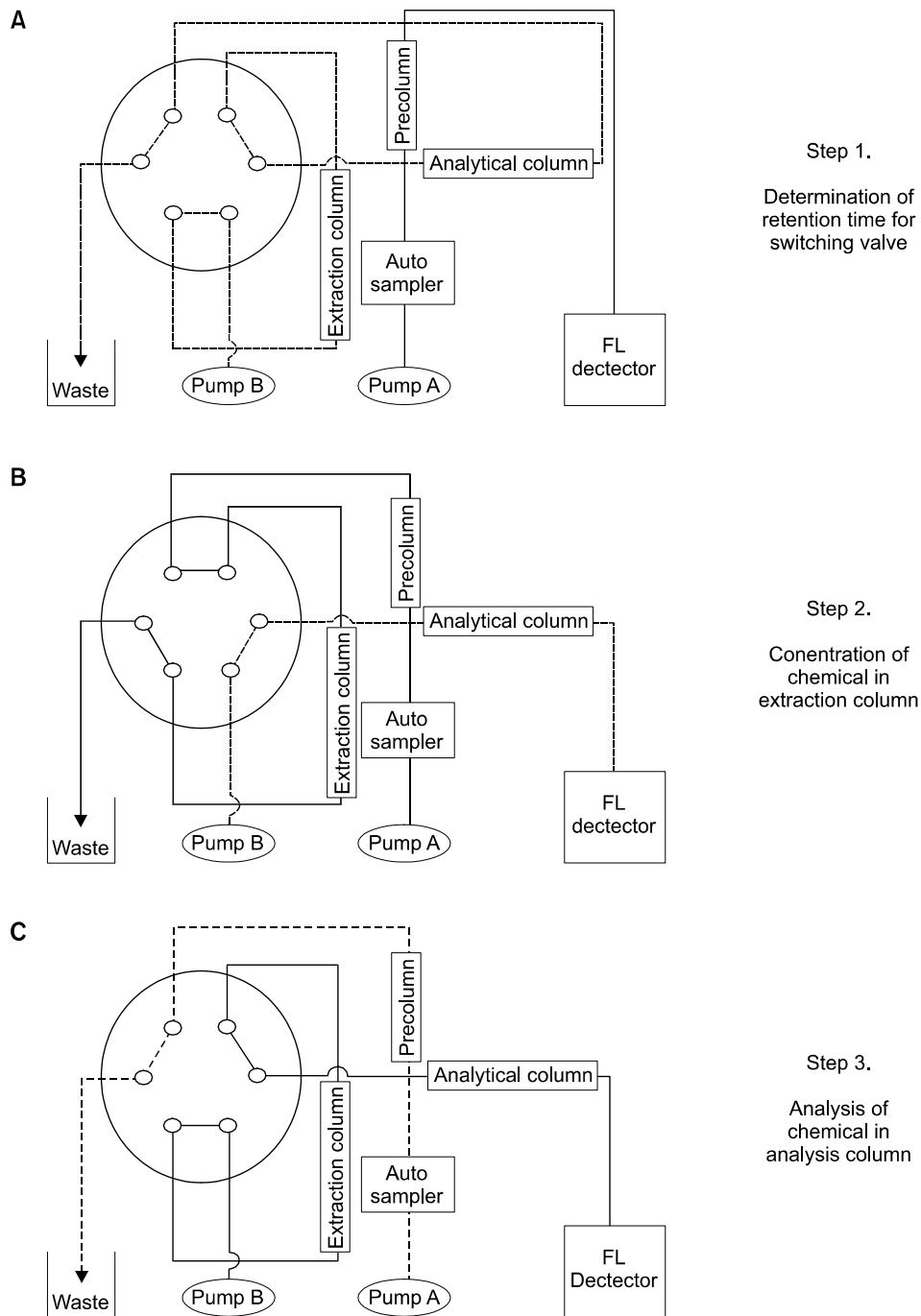


Fig. 2. Triple column systems for the column switching in semi-micro HPLC.

용해시켜 농도가 1,000 μ g/ml가 되도록 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈청으로 희석하여 혈청 내 verapamil의 농도가 각각 10~2,500 ng/ml의 농도가 되도록 표준 혈청을 만들었다.

1단계: 표준 혈청용액 400 μ l에 내부표준물질(I.S, propranolol)이 500 ng/ml가 되도록 첨가한 후, 전처리 및 농축 이동상[50 mM ammonium phosphate (pH 4.5)] 500 μ l를 가하고 30초간 진탕 후에 13,000 \times g에서 10분간 원심분리시킨 후 실린지 필터로 여과한 후 자동주입기에 10 μ l를 주입하고 전처리 이동상을 500 μ l/min의 유속으로 흘러 검체 중에 verapamil을 분리하기 위한 변환시간을 결정하였다(Fig. 1, 2A). 이때 변환 밸브 조절시간은 2.35~3.10분(propranolol), 3.80~4.85분(verapamil)으로 결정하였고, 농축 컬럼과 분석 컬럼은 분석 이동상[50 mM ammonium phosphate : acetonitrile=70 : 30 (v/v)]을 120 μ l/min의 유속으로 이동시켜 평형을 유지하도록 하였다.

2단계: 변환 밸브를 B위치로 전환하여 1단계에서 결정된 밸브 조절시간(2.35~3.10분)동안 A펌프로 이동상 [50 mM ammonium phosphate (pH 4.5)]을 500 μ l/min 유속으로 흘러주면서 전처리컬럼인 Capcellpak MF ph-1 (4.0 \times 20 mm)을 이용하여 제단백시킨 후 농축컬럼 Capcellpak C18 UG120 S5 (2.0 \times 35 mm)에 약물을 농축 시켰다(Fig. 2B).

3단계: 변환 밸브가 C위치로 전환되면(3.10~3.85분) 농축컬럼에 농축된 분석물질이 분석 이동상 [50 mM ammonium phosphate : acetonitrile=70 : 30 (v/v)]에 의해 120 μ l/min의 유속으로 분석컬럼인 Capcellpak C18 UG120 (1.5 \times 250 mm)을 이용하여 형광측정기 파장조건 흥분(excitation)파장 280 nm과 여기(emission) 파장 313 nm에서 내부표준물질(I.S propranolol)을 분리하게 된다. 3.85분에 다시 2단계의 밸브 위치로 자동전환 되어 제단백 후 농축 컬럼에 혈청 내 verapamil을 농축시키고, 이후 변환 밸브가 4.85분에 A위치로 전환되어 B펌프로 120 μ l/min의 유속으로 이동상을 흘러주면서 분석 컬럼을 이용하여 verapamil을 분석하였다(Fig. 2C).

이때 얻은 크로마토그램으로부터 verapamil과 내부 표준물질인 propranolol에 대한 peak-면적비를 구하여 표준 정량 곡선 공식을 얻었고 일내 재현성과 일간 재현성을 통하여 분석방법을 검증하였다.

4) Verapamil의 약동학적 지표의 계산: 혈중 verapamil의 농도를 상기한 방법으로 정량하여 시간에 대한 혈중 농도 곡선을 작성하였고 약동학적 지표를 계산하였다. 초기혈중농도(C_0 ; initial plasma concentration)는 혈중농도

곡선을 농도축으로 외삽하여 구하였다. 농도곡선하 면적(AUC; area under the curve)은 약동학 분석프로그램 (MULTI-LINE FITTING)을 사용하여 선형 사다리꼴 법칙 (linear trapezoid rule)을 적용하여 계산하였다. 혈중제거율 (CLp; plasma clearance)은 dose/AUC로 계산하였고, 평균 머무름시간(MRT; mean residence time)은 $1.44 \times t_{1/2}$ 로 계산하였으며, 항정상상태 분포용적(V_{dss} ; volume of distribution at steady-state)은 Dose/ C_0 로 계산하였고, 배설반감기($t_{1/2\beta}$; terminal elimination half-life)는 $0.693/\beta$ (β =slope of the terminal elimination phase)으로 계산하였다.

5. 혈청학적 검사

약물투여 최종일부터 1주 후마다 실험군과 대조군에서 흰쥐의 체중을 측정하고 실험군과 대조군에서 각각 12마리씩 0.5% pentobarbital (30 mg/kg)로 마취시킨 후 심천자로 혈액을 4~5 ml 채취하여 희생시켰다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치하고 3,000 \times g로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고 각 군에서 총 빌리루빈, 알부민, 총단백질양, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase) 수치를 측정하였다.

6. 조직학적 검사

혈액 채취 후 간 문맥으로 생리식염수로 관류시킨 후 간을 적출하여 간 무게를 측정하고 육안적인 소견을 관찰하였다. 일부 조직은 -70°C의 냉동고에 냉동 보관하였다. 일부는 10% 중성 포르말린에 고정시켜서 파라핀에 포매하여 4 μ m 두께의 절편을 제작한 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 마지막으로 비장을 적출하여 무게와 크기를 측정하였다.

7. 간조직 내 4-hydroxyproline 양의 측정

대조군과 DMN-투여 1, 2 및 4주 후에 채취한 간조직에서 간섬유화 정도를 정량적으로 파악하기 위하여 간조직 내 콜라겐의 양을 의미하는 hydroxyproline의 함량을 Jamall 등(1981)의 방법에 의해 정량하였다.

1) 시약

• Acetate-citrate buffer (pH 6.0): 57 g sodium acetate trihydrate, 37.5 g trisodium citrate (=sodium citrate) 그리고 5.5 g citric acid를 isopropylalcohol (ISA) 395 ml에 용해시키고 증류수로 1 l를 만들고 12 N HCl로 산도를 6.0이 되도록 하였다.

• 6.7% 완충 chloramine T 용액: 1.34 g chloramine T (sigma

C-9887, USA)를 20 ml acetate citrate buffer에 용해시켰다.

· Ehrlich's solution: 10 g p-dimethylaminobenzaldehyde (Sigma D-2004, USA)를 60% perchloric acid (HClO₄) 11 ml에 용해시켜 차광보관한 후, 실험 직전에 3 ml을 취하여 ISA 8 ml와 섞어 사용하였다.

2) 방법: 간조직 0.2 g을 취하여 4 ml의 6 N HCl에 넣고 균질화하여 110°C에서 12시간 동안 가수분해시킨 후, 1,200 ×g에서 15분간 원심분리하였다. 이 중 상층액 50 μl를 취하여 질소가스로 증발건조시켰고, 50% ISA 1.2 ml을 넣어 용해시켰다. 그후 6.7% 완충 chloramine T 용액 0.2 ml을 넣고 실온에서 10분간 방치하였다. 이후 Ehrlich's solution 1 ml를 첨가하고 50°C에서 90분간 발색시킨 후 증류수를 대조로 하여 558 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 4-hydroxyproline의 정량: 4-hydroxyproline 표준물질 (Sigma H-7279, USA)을 50% ISA로 용해시켜 1,000 μg/ml로 만든 후 냉장 보관하고, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 그리고 20 μg/ml가 되도록 희석하여 표준용액을 만들었다. 각 용액 1.2 ml을 취하여, 6.7% 완충 chloramine T 용액 0.2 ml을 넣고 혼합 후 실온에서 10분간 방치하였고 Ehrlich's solution 1 ml 첨가 후 50°C에서 90분간 배양한 후 558 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 자료정리 및 통계학적 분석

수치는 평균±S.E로 표시하였으며, 대조군과 실험군에서 각각 주별 측정된 체중, 간 무게, 체중에 대한 간 무게

의 비율 및 혈액검사 수치의 주별 비교를 위해서 one-way 분산분석을 시행하였으며, Duncan's multiple range test로 사후분석하였다. 각 그룹의 평균치를 비교하기 위해 student's t-test를 이용하여 유의성을 비교하였으며, p < 0.05인 경우를 통계학적으로 의미있는 것으로 하였다.

결 과

1. DMN 투여 후 체중과 간 무게 변화

DMN 투여 후 매주마다 흰쥐의 부검시 대조군에서 5 마리, 실험군에서 12마리씩 주별 체중, 간 무게 및 체중에 대한 간 무게의 비율을 측정하였고 Fig. 3에 제시하였다. 주별 체중변화는 대조군은 59.9±0.96 (1주), 29.4±5.9 (2주), 21.8±7.2 (3주) 및 37.6±7.7 g (4주)으로 주별 유의한 체중 증가를 보였으며(p < 0.01), DMN 투여군의 체중변화는 각각 33.2±7.9 (1주), -9.3±0.87 (2주), -1.3±5.2 (3주), -18.6± 13.3 g (4주)으로 투여 1주째 유의한 증가(p < 0.01)를 보인 후 2주부터 체중감소를 보였으나 DMN 투여 2주와 3주째의 체중변화는 통계학적인 의의가 없었다(Fig. 3). 1주 후부터 간무게는 대조군에서 각각 -0.44±1.9 (2주), 0.52±1.85 (3주) 및 -2.02±0.1 g (4주)으로 2주와 3주째는 유의한 변화는 없었으나, 4주째는 유의하게 감소하였다(p < 0.05). DMN 투여군에서 간무게는 각각 -1.33±0.29 (2주), 3.77±0.4 (3주), -8.8±0.44 g (4주)으로 2주, 3주 및 4주에서 유의한 증감을 보였다(p < 0.01)(Fig. 4). 체중과 간무게 비율에서는 대조군에서

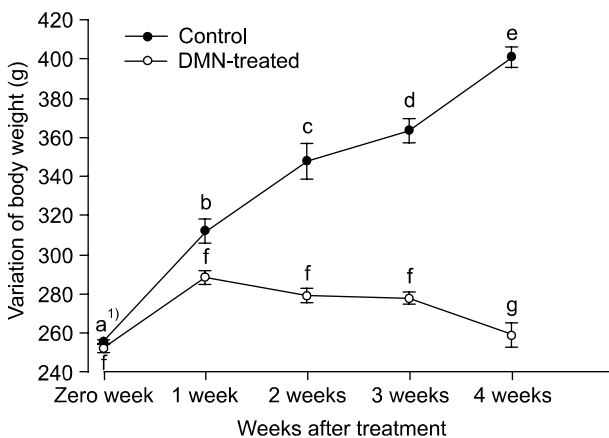


Fig. 3. Change of body weight in control and DMN-treated rats during 4 weeks. Values expressed the mean±S.E.

^{a~g}Indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. p < 0.01.

¹⁾Different letters indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. p < 0.01.

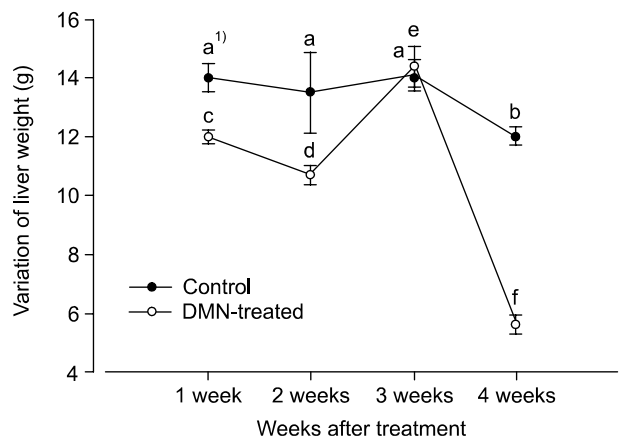


Fig. 4. Change of liver weight in control and DMN-treated rats. Values expressed the mean±S.E.

^{a~f}Indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. p < 0.01.

¹⁾Different letters indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. p < 0.05.

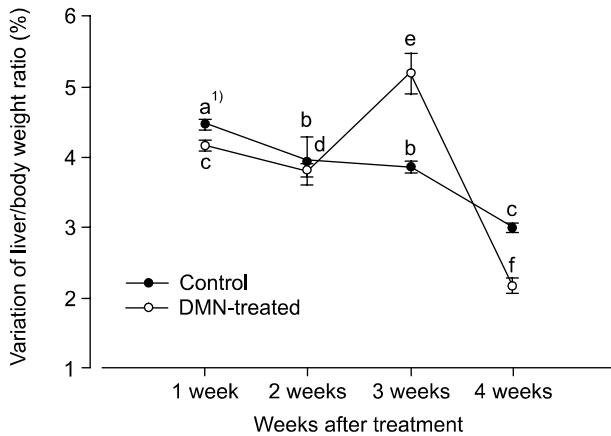


Fig. 5. Change of body weight/liver weight ratio in control and DMN-treated rats. Values expressed the mean±S.E.

^{a-f}Indicated significant difference among groups based on Duncans multiple range test. $p < 0.01$.

¹⁾Different letters indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. $p < 0.05$.

Table 1. Change in body and liver weight in control and DMN-treated rats after 4 weeks

Group	Control (n=12)	DMN-treated (n=12)	p-value ¹⁾
Weight (g)			
Body weight	401.1±5.29 ²⁾	259.3±5.96	0.01
Liver weight	12.03±0.32	5.6±0.32	0.01
Liver/body weight ratio	3.0±0.07	2.17±0.11	0.01

DMN: dimethylnitrosamine.

¹⁾Statistical significance was calculated by student's *t*-test.

²⁾Mean±S.E.

-0.51±0.6 (2주), -0.1±0.56 (3주) 및 -0.87±0.1 g (4주)으로 2주와 4주째에 유의하게 감소하였고($p < 0.05$, $p < 0.01$), DMN 투여군에서 -0.34±0.06 (2주), 1.37±0.31 (3주) 및 -3.02±0.24 (4주)으로 2주, 3주, 4주에서 유의한 증감을 보였다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 5). 대조군과 실험군의 체중, 간 무게, 체중:간 무게 비율은 각각 대조군에서는 401.1±5.29 g, 12.03±0.32 g 및 3±0.07%로 나타났고, 실험군에서는 259.3±5.96 g, 5.6±0.3 g 및 2.17±0.11%로 모두 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Table 1).

2. 혈청 생화학 검사

1, 2, 4주간 실험군과 대조군의 혈청 생화학 검사(total protein, albumin, total bilirubin, AST, ALT, ALP) 수치 변화는 Table 2에 제시하였다. 주별 총 단백질과 알부민은 대조군에서 각각 6.42±0.11과 1.55±0.03 g/dl이었고, DMN 투여군에서는 1주째 5.62±0.04, 1.28±0.02 g/dl, 2주째 5.55±0.07, 1.24±0.01 g/dl 및 4주째 4.6±0.16, 0.98±0.05 g/dl로 대조군에 비해 DMN 투여 기간에 비례하여 유의적으로 감소하였고($p < 0.01$), 총빌리루빈, AST, ALT, ALP의 간수치는 대조군에 비해 DMN 투여 기간에 비례하여 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

3. 약물동태학적 검사

1) 분석조건의 검증: 컬럼 스위칭 HPLC법에서 얻어진 크로마토그램은 Fig. 6에 제시했으며 propranolol과 verapamil의 머무름시간은 각각 11.85~12.35분, 21.85~22.85분이었고 기타 혈청 성분들과 잘 분리되었다. Verapamil의 표준농도 혈청과 내부 표준물질인 propranolol의 peak

Table 2. Serum biochemical profiles in control and DMN-treated rats

Biochemical profile ²⁾	Control	DMN 1 week	DMN 2 weeks	DMN 4 week	p-value ¹⁾
T. protein (g/dl)	6.42±0.11 ^b	5.62±0.04 ^b	5.55±0.07 ^b	4.6±0.16 ^a	0.01
Albumin (g/dl)	1.55±0.03 ^c	1.28±0.02 ^b	1.24±0.01 ^b	0.98±0.05 ^a	0.01
T. bilirubin (mg/dl)	0.35±0.03 ^a	0.22±0.02 ^a	0.24±0.01 ^a	2.41±0.43 ^b	0.01
AST (U/L)	70.08±3.41 ^a	83.75±4.3 ^a	106.33±5.63 ^b	212.92±11.08 ^c	0.01
ALT (U/L)	32.77±1.89 ^a	37.25±1.43 ^a	75.58±4.17 ^b	189.17±14.08 ^c	0.01
ALP (U/L)	103.46±8.07 ^a	437.08±19.61 ^b	521.67±39.53 ^c	760.25±39.77 ^d	0.01

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase

¹⁾Statistical significance was calculated by one-way ANOVA

²⁾Mean±S.E. (n=12)

^{a-d}Indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. $p < 0.01$.

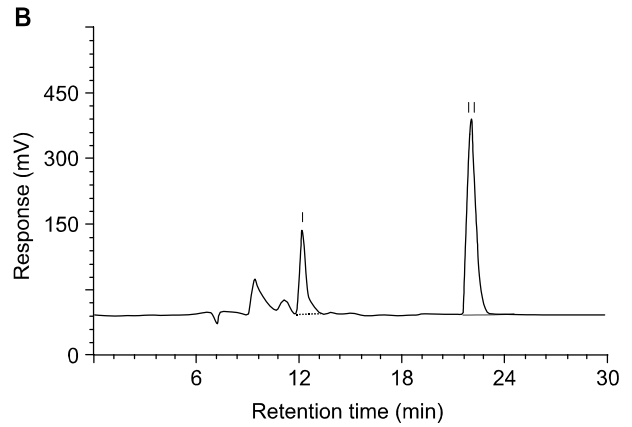
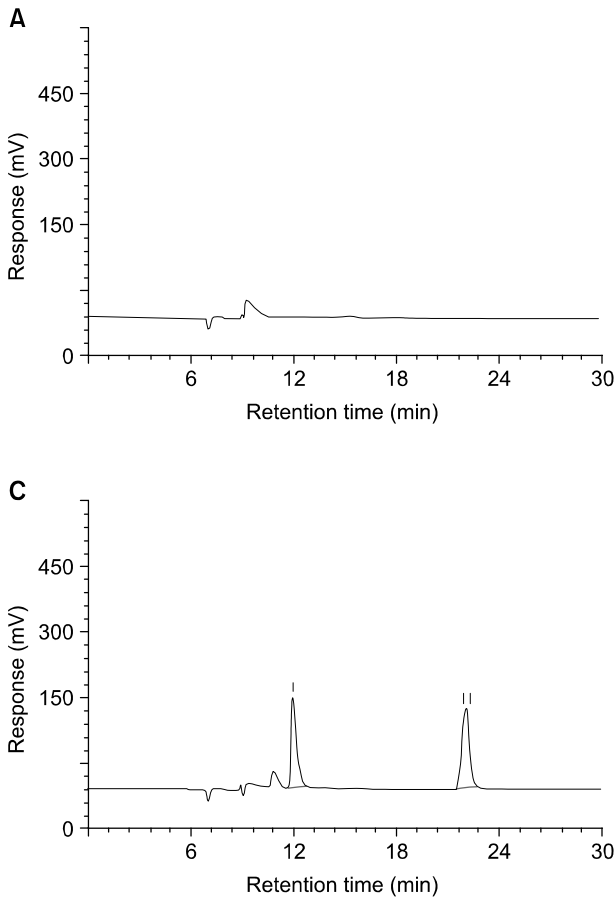


Fig. 7. Calibration curve of serum verapamil analysis ($Y=0.0027 \times X+0.0504$, $r^2=0.9997$).

면적비로 분석하여 구한 verapamil의 표준농도 곡선은 $Y=0.0027 \times X+0.0504$ ($r^2=0.9997$)으로 양호한 직선성을 보여주었고 최저정량한계(lower limit of quantification, LLOQ)는 10 ng/ml이었다(Fig. 7).

또한, 25~2,500 ng/ml의 verapamil 혈청 표준농도 범위

Fig. 6. HPLC chromatogram of blank rat serum (A), rat serum spiked with propranolol (0.5 μg/ml) and verapamil (1.0 μg/ml) (B), and serum collected from DMN-treated hepatic fibrotic rat at 2 hour after single IV injection of 30 mg/kg of verapamil (C). I: propranolol, II: verapamil.

Table 3. Validation data for determination of verapamil in rat serum by HPLC

Spiked concentration (ng/ml)	Intra-day		
	Concentration (ng/ml)	C.V ¹⁾ (%)	A.C ²⁾ (%)
25	26.13 ± 2.37 ³⁾	9.06	104.5
50	56.17 ± 1.1	1.96	112.3
500	478.57 ± 15.88	3.32	95.7
2500	2566.79 ± 84.02	3.27	102.7
Spiked concentration (ng/ml)	Inter-day		
	Concentration (ng/ml)	C.V (%)	A.C (%)
25	24.82 ± 0.51	2.1	99.3
50	56.14 ± 1.16	2.1	112.3
500	494.15 ± 8.79	3.1	98.8
2500	2528.96 ± 9.01	0.6	101.2

¹⁾C.V. (coefficient of variation, %) = S.D/mean × 100

²⁾A.C. (accuracy, %) = Mean/spiked concentration × 100

³⁾Mean ± S.E. (n=3)

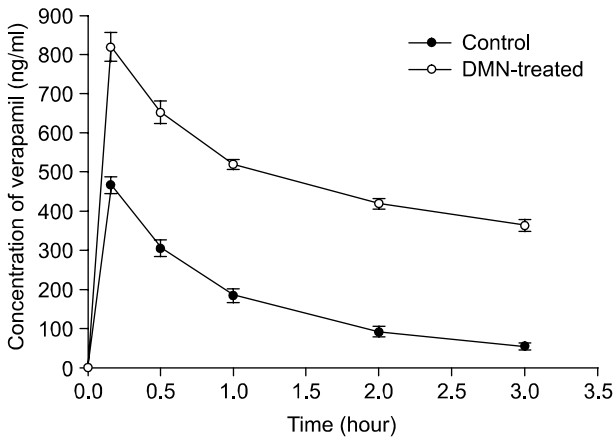


Fig. 8. Time serum concentrations curve of verapamil after bolus IV injection of verapamil (3 mg/kg). Values expressed the mean ± S.E. (n=12)

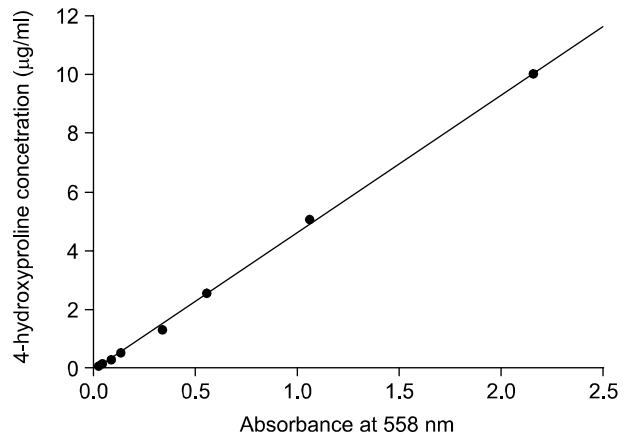


Fig. 9. The standard curve about 4-hydroxyproline concentration (µg/ml) versus absorbance ($Y=4.714 \times X - 0.1498$, $r^2=0.9991$).

Table 4. Pharmacokinetic parameters of verapamil in control and DMN-treated rats

Parameters	Control	DMN 4 weeks	p-value ¹⁾
Co (ng/ml)	587.04 ± 25.88 ²⁾	929.36 ± 52.23	0.01
AUC _{0-3h} (ng · hr/ml)	502.94 ± 39.17	1470.64 ± 39.57	0.01
AUC _∞ (ng · hr/ml)	617.73 ± 56.4	1481.55 ± 40.78	0.01
C _{max} (ng/ml)	467.04 ± 22.33	819.10 ± 36.23	0.01
T _{max} (hr)	0.16	0.16	NS ³⁾
Vdss (ml)	2092.89 ± 133.72	897.29 ± 58.02	0.01
CLp (ml/hr)	1469.89 ± 201.45	168.43 ± 18.71	0.01
MRT (hr)	1.75 ± 0.31	5.95 ± 0.75	0.01
t _{1/2(β)} (hr)	1.22 ± 0.22	4.13 ± 0.52	0.01
ke	0.75 ± 0.15	0.19 ± 0.02	0.01

¹⁾Statistical significance was calculated by student's t-test.

²⁾Mean ± S.E. (n=10)

³⁾Not significant

Co: initial serum concentration, AUC: area under the curve, C_{max}: maximum concentration, T_{max}: time to reach to peak serum concentration, MRT: mean residence time, Vdss: steady-state volume of distribution, CLp: plasma clearance, t_{1/2(β)}: terminal elimination half-life, ke: elimination rate constant.

에서 verapamil의 일내 및 일간변동계수(coefficient of variation, C.V.)는 일내 변동성이 1.96~9.06% , 일간 변동성이 0.6~3.1%로 모두 ±15% 이하로 나타났고, 25, 50, 500, 및 2,500 ng/ml의 농도에서 3회 반복 측정하여 얻은 정확도는 일내 정확성 95.7~104.3%, 일간 정확성 98.8~112.3%로 80~120% 이내로 분석의 정확성을 확보할 수 있었다(Table 3).

2) Verapamil의 시간 농도추이 및 약동학적 지표의 변화: 3 mg/kg의 verapamil을 정맥 내 투여 후 10분, 30분, 1, 2, 그리고 3시간에서 채취한 혈액에서 혈청 내 verapamil을 정량하였다. 대조군의 혈중농도는 각각 467.04 ± 22.33, 305.69 ± 22.07, 184.69 ± 18.43, 91.81 ± 12.18 및 54.92 ± 8.6 ng/ml으로 나타났으며, 실험군에서 각각 819.1 ± 36.23, 651.94 ± 28.23, 520.09 ± 13.2, 419.61 ± 13.31 및 364.73 ± 15 ng/ml로 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p < 0.01). 약동학적 지표는 verapamil의 혈중농도 곡선(Fig. 8)을 토대로 산출하여 비교하였다. 대조군과 실험군의 초기 혈중농도(Co), 농도곡선하면적 (AUC), 최고 혈중농도(C_{max}), 평균 머무름시간(MRT) 및 배설반감기[t_{1/2(β)}]는 각각 유의하게 증가하였고(p < 0.01), 분포용적(Vdss)과 혈중제거율(CLp)은 유의하게 감소하였다(p < 0.01)(Table 4).

4. 간조직 내 4-hydroxyproline 양의 변화

4-hydroxyproline의 표준농도 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5 그리고 10µg/ml에 대한 558 nm의 흡광도는 각각 0.029, 0.048, 0.088, 0.137, 0.343, 0.557, 1.065, 2.161이었고, 이것을 토대로 선형회귀분석으로 구한 표준곡선 $Y=4.714 \times X - 0.1498$ ($r^2=0.9991$)이었다(Fig. 9). 이 식으로 계산한 간조직 내 4-hydroxyproline의 양은 대조군에서 223.14 ± 7.69, DMN 투여 1주는 312.15 ± 10.39, 2주는 474.7 ± 21.05 (p < 0.01) 그리고 4주는 1443.96 ± 47.65 (µg/g of liver)로 대조군에 비해 실험군에서 DMN 투여기간에 비례적으로 유의하게 증가하는 양상을 보였다(p < 0.05) (Table 5).

Table 5. 4-Hydroxyproline level of hepatic tissue in control and DMN-treated rats

	Control	DMN (1 wk)	DMN (2 wks)	DMN (4 wks)	p-value ¹⁾
4-hydroxyproline (μg/g of liver)	223.14±7.69 ^{2)a}	312.15±10.39 ^b	474.7±21.05 ^c	1443.96±47.65 ^d	0.05

¹⁾Statistical significance was calculated by one-way ANOVA

²⁾Mean±S.E. (n=12)

^{a~d}Indicated significant difference among groups based on Duncan's multiple range test. p<0.05.

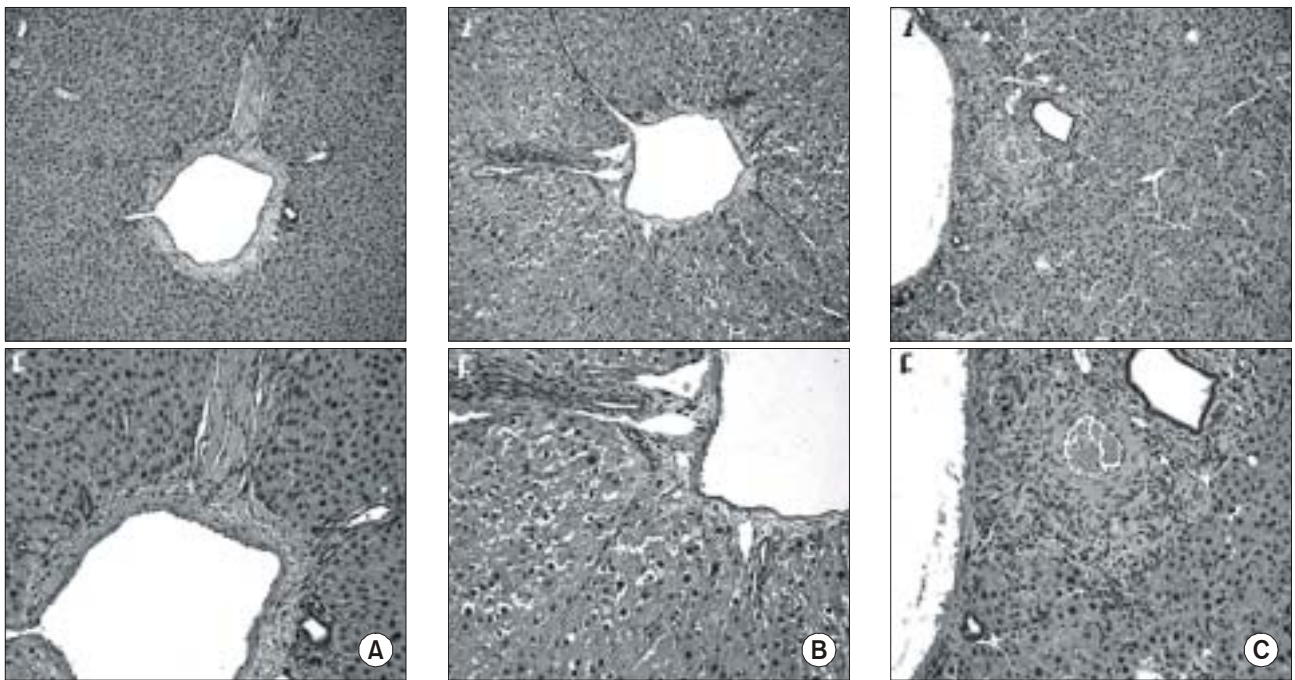


Fig. 10. (A) Light microscopic view of liver in control rat. Well preserved hepatic architecture without inflammatory activity or necrosis. Showing well preserved hepatic cords and central vein. (B) Light microscopic view of liver in DMN-treated rat for 2 weeks. The hepatic architecture is relatively preserved and there was severe centrilobular congestion and marked dilatation of central vein and sinusoids. It also showed hemorrhagic mild bile duct hyperplasia, neutrophilic infiltration, and initiation of fibrosis. (C) Light microscopic view of liver in DMN-treated rat for 4 weeks. The hepatic architecture is severe fibrosis around the central vein, nodular change and regenerating hepatocytes in fibrotic lobules (upper: ×100, lower: ×200, H&E stain).

5. 간조직의 형태학적 변화

1) 육안적 소견: 1주부터 4주까지 실험군에서 간경화는 육안적으로 확인할 수 있었다. DMN 투여 1주 실험군에서는 현저한 변화가 없었으나 2주 후에는 딱딱한 느낌이 있었으며, 투여 3주 후에는 뚜렷한 간과 비장이 비대함을 관찰되었다. 투여 4주 후에는 대부분 복수가 관찰되었으며 간 표면은 창백하였고, 변연부도 불투명하게 관찰되었다.

2) 광학현미경 소견: Hematoxylin-eosin 이중염색 소견은 DMN 투여 1주에서는 정상 소견과 큰 차이는 없으나 문

맥주위의 약한 염증소견이 보였고, DMN 투여 2주에서 간세포가 약간 비대하고 세포질은 불투명하고, 주변과 경계가 뚜렷하지 않은 공포변성이 관찰되었다. 일부 간세포에서는 핵이 농축된 변화도 관찰되었다. DMN 투여 4주에서는 전반적으로 중등도의 종창소견을 나타내며, 일부 간세포는 핵 농축의 변화와 일부에서는 괴사한 변화도 발견되었고, hemosiderin을 함유한 세포가 다수 관찰되었으며, 주변으로 다수의 정상세포의 증식 소견을 보였다. 또한 투명한 작은 공포를 함유한 지방침착도 관찰되며, 소수의 호중구가 침윤된 염증소도 여러 부위에서 관찰되었다(Fig. 10).

고 찰

간섬유화란 다양한 원인에 의한 간세포의 괴사성 염증, Kupffer 세포의 활성화, 사이토카인의 유리, 간성상세포의 활성화, 세포외기질의 합성 촉진 및 기질분해의 장애 등 일련의 과정이 총체적으로 발생하여 간 내 총 세포외기질이 증가된 상태이다. 이 과정에서 중추적으로 역할을 하는 세포는 활성화된 간성상세포로 간 내에 침착되는 세포외기질의 대부분을 분비하며, 또한 성장조절인자를 생성, 분비하여 스스로를 활성화시키기도 한다.⁴⁴⁾ 간경화는 지속적 또는 반복적인 간세포 파괴에 의하여 간세포들이 정상구조를 벗어난 재생결절을 형성하고 이러한 결절들이 섬유조직 격막에 의해 분리되는 것으로서, 만성 간질환의 말기 변화이다. 육안 및 현미경으로 결절의 직경이 3 mm 이상인 경우를 대결절성 간경화증으로, 그 미만인 경우를 소결절성 간경화증으로 분류한다. 만성 바이러스성 간염, 자가면역성 간염에 의한 괴사후성 간경화증은 주로 대결절을 형성하며, 간독성 약물에 의한 기사후성 간경화증은 소결절형 또는 대결절형이다. 알코올성 간질환은 소결절형 간경화를 일으키는 대표적인 질환이다.⁴⁵⁾ Dimethylnitrosamine (DMN) 투여로 유도된 간경화는 결합조직 단백질이 축적되는데, 그 중에서도 콜라겐이 특이적으로 많이 축적된다고 보고되고 있다.⁴⁶⁾ 간경화에 의해 발생하는 콜라겐의 축적은 DMN을 투여하면서 시작되는데, DMN을 복강 내 주사하는 동안 콜라겐의 양이 지속적으로 증가된다. 손상 받은 간에서 콜라겐 합성을 증가시키는 것은 Ito 세포에 의한 것으로 보고되고 있다.⁴⁷⁾ DMN에 의한 간경화 유도는 DMN-demethylase에 의해 탈메틸화되고 monomethyl nitrosamine이 형성되고, 또 반응성이 강한 전자친화성의 중간 산물인 methyl carbonium 이온으로 대사된다. 이 methyl carbonium 이온이 DNA와 여러 가지 세포의 대분자를 메틸화시키며, 이 세포 내의 DNA 화학적 변형이 간 손상과 암유발에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다.⁴⁸⁾ 흰쥐에서 DMN 투여로 의해 유도된 간세포 손상은 사람의 간경화 발생을 이해하는 데 좋은 실험동물 모델로서 DMN의 투여용량, 투여방법 및 투여기간에 있어서는 많은 연구 결과가 보고되고 있다. 이를 위하여 Joseph 등⁴⁹⁾의 방법에 준하여 3일 연속 복강 내 주사하였으며, 10 μ g/g과 20 μ g/g의 DMN을 투여했을 때 모두 간경화가 일어나는 것을 보여주나, 20 μ g/g의 DMN을 투여 한 실험군에서는 생존율이 너무 낮았다.⁴⁹⁾ 이는 심각한 간경

변으로 인한 합병증 때문으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 10 μ g/g으로 투여량을 결정하게 되었다. 간경화가 진행 되면서 Jenkins 등³³⁾에 의하면 DMN 처치 2주 후부터 문맥압과 간정맥압이 대조군에 비하여 유의하게 증가함을 보여주고 있다. 또한 24주 처치 군에서도 유의하게 간문맥압과 간정맥압이 증가함을 보여주고 있다. 문맥압이 증가할수록 간으로 가는 혈류량은 유의하게 감소하고 있다고 보고하고 있다.³³⁾ 본 연구에서도 간경화와 문맥압의 증가로 인하여 비장 무게가 3주까지 유의하게 증가함을 나타내었다. 이러한 결과 등은 복수의 증가와도 밀접한 관련이 있어서 3주 후에는 대부분의 실험군에서 다량의 복수를 발견할 수 있었다.

간경화의 진행이 될수록 간기능의 생화학적 지표의 변화가 두드러지는데, Jezequel 등²⁴⁾은 대부분의 간기능 지표들에 변화가 온다고 보고하고 있다.²⁴⁾ 본 연구에서도 간기능 지표인 총빌리루빈과 알부민, AST, ALT, ALP 측정치를 보면 알부민은 처치 1주 후부터 4주까지 유의하게 감소하였으며, AST, ALT, ALP가 DMN 투여기간에 용량 의존적으로 증가하여 간섬유화 뿐만 아니라 간독성 또한 심화되는 것을 보여 주었다. 간경화가 진행되면서 나타나는 변화들은 결국 DMN 투여로 인한 간세포의 손상과 이에 수반되어 나타나는 세포외기질의 증가로 생각할 수 있다. Jiang 등⁵⁰⁾은 간경화의 기본병리는 세포외 공간의 과도한 기질의 증가라고 보고되었으며, 이를 기질의 대사산물들의 혈청 내 측정으로 평가 할 수 있다고 했다.⁵⁰⁾ 본 연구에서도 간경화가 진행됨에 따라서 세포외기질의 주요성분인 콜라겐 함유량의 변화를 알아보기 위하여 4-hydroxyproline을 측정하였다. 이는 간의 세포외기질 단백질로 콜라겐, proteoglycan, 당단백질 등이 있는데, 이중에 콜라겐은 생체 총 단백질의 1/3을 차지한다. 보통 정상간에서 총 단백질 중 콜라겐의 함량은 5~10%이지만 간경변에서의 콜라겐의 함량은 간 총 단백질의 50% 이상의 비율로 증가한다. 생체 내에는 존재하는 13가지 콜라겐 중에 간에는 I, III, IV, V, VI형 등 5가지가 존재한다. I형과 III형 콜라겐은 주된 간질구성 원섬유이며 IV형은 기저막을 구성한다. VI형 콜라겐은 섬유화 교원섬유속 콜라겐을 이어주거나, 세포표면을 이루는 미세섬유성 콜라겐을 구성한다.⁴⁶⁾ 콜라겐은 반복되는 아미노산 배열[(Gly-Xaa-Yaa)_n]로 이루어져 있으며,⁵¹⁾ Yaa 위치에 proline과 4-hydroxyproline이 높은 비율로 존재하는데 4-hydroxyproline은 총 콜라겐 아미노산의 약 10%를 차지하므로 4-hydroxyproline 정량으로 간조직 내 총 콜라겐 양을 나타낼 수 있다고 한다.³⁸⁾

본 연구에서는 DMN-투여기간에 따라 4-hydroxyproline의 양은 증가하여 DMN 투여 1주에 비해 4주에서 그 양이 약 4배 정도 증가함으로써 간섬유화가 진행됨을 의미한다고 할 수 있다. 간섬유화는 조직검사를 통해 눈으로 직접 확인할 수 있으나, 조직검사는 침습적이며 시술로 인한 합병증 발생 위험이 있고, 자주 시행할 수 없는 단점이 있다. 또 간섬유화가 간 전체에서 나타나는 병변이 아니므로 조직검사상 극히 일부의 조직이 간 전체의 상황을 대표하지 못할 위험이 있다. 이에 과거에도 간섬유화 정도를 측정할 수 있는 여러 가지 인자들을 연구해왔으며, 특히 근래에 비침습적인 생화학적 인자에 대한 연구들이 있었고, 최근 들어 세포외 기질 단백질의 특성 및 기질의 구조와 섬유화의 기전이 해명됨에 따라 섬유화의 진행 정도를 생화학적 방법으로 측정하려는 시도가 이루어져 왔다. 이 중에 hyaluronate,⁵²⁻⁵⁴⁾ type IV collagen 7S domain,^{55,56)} procollagen type III N-peptide^{28,58)} 등을 이용한 방법이 사용되고 있다. 또한 ALT/AST 비율, prothrombin time (PT), thallium-201 스캔의 단락지수(SI, Shunt Index), ICG-R_{max} 등은 섬유화의 진행 정도를 예측할 수 있는 지표임을 나타내었다.⁵⁸⁾ 간세포 괴사 후 섬유화와 그로 인한 간혈류의 변화는 문맥과 체 순환 사이의 측부로를 통한 혈류의 양을 증가시켜 간에서 여러 물질들의 대사 및 제거에 영향을 준다. 간에서 약물들은 대사되는 방법에 따라 크게 혈류 의존성 약물(간내 고제거율 약물)과 효소 의존성 약물(간내 저제거율 약물)로 분류된다. 간 질환시 약물대사에 영향을 미치는 인자로는 간 혈류량(hepatic blood flow), 약물의 단백질결합(protein binding), 간의 고유대사능(hepatic enzyme activity) 등이 있으며,⁵⁹⁾ 약물 중 간 제거율이 큰 약물일 경우에는 주로 간혈류에 의한 영향을 많이 받고, 간 제거율이 작은 약물은 고유대사능과 단백질결합에 의해 영향을 받는 것으로 알려지고 있다.⁶⁰⁾ 그 중 간내 혈류에 의존성이 커서 초회통과효과가 큰 약물들(verapamil, propranolol, lidocaine 등)의 경우 문맥-체 단락으로 인해 간에서 대사되지 못하고 체순환으로 직접 분포됨으로서 문맥-체 단락이 없는 경우에 비해 높은 혈중 약물 농도를 나타내게 된다.⁶¹⁾ 따라서 혈류 의존성 약물의 투여 시 단락되는 혈류량에 따른 약물의 투여용량과 투여기간에 대한 조정이 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 간 혈류 의존성 약물인 verapamil을 사용하였고, 간경화 유발물질로 DMN을 이용하여 흰쥐에서 간경화를 유발하여 혈류 의존성 약물이 verapamil의 약물동태적 변화를 조사하였고, 간조직 4-hydroxyproline의

양을 측정하여 간섬유화 정도를 확인하였다. DMN 투여기간에 따라 혈중 verapamil의 제거율이 감소하여 혈중 농도가 증가되는 것을 보여주었고, 간조직 내의 4-hydroxyproline의 양도 증가하는 것을 볼 수 있었다. 간경화가 진행되면서 verapamil의 혈중 제거율이 감소하는 것은 주로 항정상상태 분포용적(V_{dss})의 감소와 연관이 있으며 이는 간의 분포능의 감소보다는 섬유화가 진행되면서 이에 따른 간혈류량의 감소가 주된 요인으로 생각된다. 향후이런 검사법외에도 간섬유화를 나타내는 다른 지표들과 약동학적 지표들 간에 정확한 통계학적 유의성을 찾고 이를 바탕으로, 간경화 환자에게 약물을 투여시에 환자의 간경화 진행정도를 정확히 평가하고 이에 따라서 약물의 투여용량과 투여간격을 조절을 고려해야 하겠다.

결 론

간질환 환자에서 간혈류량과 내인성 청소율이 감소하기 때문에 간 혈류량과 내인성 제거율이 정상인과 다른 간질환 환자에게 약물을 투여할 때는 환자의 간질환 중증도, 약물의 대사경로 및 투여경로 등을 고려하여 투여 약물의 종류, 용량, 간격 등을 고려해야 된다고 생각되며 앞으로도 정확한 약물요법을 시행하기 위해서는 환자 개인의 간장 약물대사능을 측정할 수 있는 비침습적 지표에 대한 연구가 지속적으로 이루어져서 약물요법의 개인화가 확립되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Wilkinson GR, Branch RA. Effects of hepatic disease on clinical pharmacokinetics. New York, Raven Press, pp 49-88, 1984.
- 2) Reichen J. Assessment of hepatic function with xenobiotics. *Semin Liver Dis* 15, 189-201, 1995.
- 3) 신상구, 손동렬, 이민호, 신재국, 장인진. 임상약리학(초판). 서울대학교 의과대학편, 서울대학교출판부, 137-155, 1995.
- 4) Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis-a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 56, 335-346, 1995.
- 5) Jian Wu, Mark A Zern. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 35, 665-672, 2000.
- 6) Pinzani M. Hepatic stellate (Ito) cells: Expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 22, 700-706, 1995.
- 7) Prokop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and the potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64, 403-434, 1995.

- 8) Brenner DA, Westwick J, Breinol M. Type I collagen gene regulation and the molecular pathogenesis of cirrhosis. *Am J Physiol* 264, G589-G595, 1993.
- 9) Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* 41, 343-348, 1994.
- 10) Roth S, Michel K, Gressner AM. (Latent) Transforming growth factor β in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 7, 1003-1012, 1998.
- 11) Branch RA, Shand DG. Propranolol disposition in chronic liver disease: A physiological approach. *Clin Pharmacokinetics* 1, 264-279, 1976.
- 12) Poupon RY, Poupon RE, Lebrech D, Le Querrec L, Darnis F. Mechanisms for reduced hepatic clearance and elevated plasma levels of bile acids in cirrhosis. A study in patients with an end-to-side portocaval shunt. *Gastroenterology* 80, 1438-1444, 1981.
- 13) Huet PM, Villeneuve JP. Determinants of drug disposition in patients with cirrhosis. *Hepatology* 3, 913-918, 1983.
- 14) Cukier A, Strauss E, Terra Filho M, Santos SR, Vargas FS. Theophylline metabolism in patients with hepatosplenic mansoni- and cirrhosis. *J Hepatol* 15, 35-39, 1992.
- 15) Friedman SL, Bissell DM. Hepatic fibrosis: new insights into pathogenesis. *Hosp Pract* 25, 43-50, 1990.
- 16) Muller A, Macknik F, Zimmerman T, Schubert H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats-usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol* 34, 229-236, 1988.
- 17) Lopez JM, Martinez M. Impaired renal response to splanchnic infusion of hypertonic saline conscious cirrhotic rats. *Am J Physiol* 242, F390-F394, 1982.
- 18) Friedman SL, Wei S, Blanter WS. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol* 264, G947-G952, 1993.
- 19) Iwamoto K, Watanabe J, Araki K, Satoh M, Deguchi N. Reduced hepatic clearance of propranolol induced by chronic carbon tetrachloride treatment in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 234, 470-475, 1985.
- 20) Koh DH, Park GT, Kim JM, Yun YS, Lee SH, Kim DU, Kim JB, Choi YY, JS Kang, Choi HS, Hahm JS, Lee MH. Relationship of propranolol pharmacokinetic parameters with portosystemic shunt in CCl₄-induced cirrhotic rats. *Kor J Hepatol* 8, 277-287, 2002.
- 21) 송일한, 김병호, 김영관. 흰쥐에서 사염화 탄소(CCl₄)에 의한 간섬유화 유도. 대한소화기병학회지 24, 1330-1339, 1992.
- 22) Zimmerman T, Muller A, Macknik G. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in uje: WIST rats. *Z Versuchstierkd* 30, 165-180, 1987.
- 23) Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effect of estradiol on DMN induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology* 29, 719-727, 1999.
- 24) Aykaç G, Uysal M, Yalçın S, Koçak-Toker N, Öz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36, 71-76, 1985.
- 25) Kanbak G, Inal M, Baycu C. Ethanol-induced hepatotoxicity and protective effect of betaine. *Cell Biochem Funct* 19, 281-285, 2001.
- 26) Jézéquel AM, Mancini R, Rinaldesi ML, Macarri G, Venturini C, Orlandi F. A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. *J Hepatol* 5, 174-181, 1987.
- 27) Sun MA, Wang BE, Annoni G, Degli Esposti S, Biempica L, Zern MA. Two rat model of hepatic fibrosis: A morphologic and molecular comparison. *Lab Invest* 63, 467-475, 1990.
- 28) Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD, Vidmar TJ, Peters KM, Henley KS, Appelman HD, Kim KY, Schuppan D, Hahn EG. The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in rat. *Hepatology* 10, 801-806, 1989.
- 29) Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clement B, Rissel M, Deugnier Y, Campion JP, Guillouzo A. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol* 137, 1333-1342, 1990.
- 30) Bueno MR, Daneri A, Armendariz-Borunda J. Cholestasis-induced fibrosis is reduced by interferon alpha-2a and is associated with elevated liver metalloprotease activity. *J Hepatol* 33, 915-925, 2000.
- 31) Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med* 67, 84-94, 2000.
- 32) Lieber CS, DeCarli LM, Feinman L, Hasumura Y, Korsten M, Matsuzaki S, Teschke R. Effect of chronic alcohol consumption on ethanol and acetaldehyde metabolism. *Adv Exp Med Biol* 59, 185-227, 1975.
- 33) Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1, 489-499, 1985.
- 34) Ala-kokko L, Stenback F, Ryhanen L. Preventive effect of malotilate on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J Lab Clin Med* 113, 177-183, 1989.
- 35) Mancini R, Paolucci F, Svegliati Baroni G, Jezequel AM, Orlandi F. Phenotypic analysis of inflammatory infiltrate in rats with dimethylnitrosamine induced cirrhosis. *Int J Exp Pathol* 72, 119-128, 1991.
- 36) Matsuda Y, Matsmoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y, Nishiyama E, Nakamura T. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 26, 81-89, 1997.
- 37) Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth beta prevents progression of liver fibrosis and enhance hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 32, 247-255, 2000.

- 38) Jamall IS, Finelli YN, Que HS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 112, 70-75, 1981.
- 39) Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 29, 225-229, 1996.
- 40) Callaghan R, Desmond PV, Paull P, Mashford ML. Hepatic enzyme activity is the major factor determining elimination rate of high-clearance drugs in cirrhosis. *Hepatology* 18, 54-60, 1993.
- 41) Kuhlmann J. Effects of verapamil, diltiazem, and nifedipine on plasma levels and renal excretion of digitoxin. *Clin Pharmacol Ther* 38, 667-673, 1985.
- 42) Carruthers G, Freeman DJ, Bailey DG. Synergistic adverse hemo-dynamic interaction between oral verapamil and propranolol. *Clin Pharmacol Ther* 46, 469-476, 1989.
- 43) Lay CS, Tsai YT, Kong CW, Chang TT, Lin HC, Yang CM, Lee SD, Chiang BN, Lo KJ. The influence of verapamil and nifedipine on hepatic indocyanine green clearance in patients with HBsAg-positive cirrhosis and ascites. *Clin Pharmacol Ther* 44, 453-457, 1988.
- 44) Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell-matrixinteractions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. *Ann Biol Clin* 52, 205-226, 1994.
- 45) Bissell DM, Friedman SL, Mahler JJ, Roll FJ. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: Report of a conference. *Hepatology* 11, 488-498, 1990.
- 46) Rojkind M, Giambone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76, 710-719, 1979.
- 47) Pinzani M. Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for liver-specific pericyte. *J Hepatol* 22, 700-706, 1995.
- 48) Ruchirawat M, Mostafa MH, Shank RC, Weisburger EK. Inhibitory effects of carbon tetrachloride on dimethylnitrosamine metabolism and DMN alkylation. *Carcinogenesis* 4, 537-539, 1983.
- 49) George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Dimethyl- nitro-amine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 156, 129-138, 2001.
- 50) Jiang Z, You DA, Chen XC, Wu J. Monitoring of serum markers for fibrosis during CCl₄-induced liver damage. *J Hepatol* 6, 282-289, 1992.
- 51) Matsuoka C, Tanaka N, Arakawa Y. Beneficial effects of branched-chain amino acids on altered protein and amino acid metabolism in liver cirrhosis: evaluation in a model of liver cirrhosis induced in rats with carbon tetrachloride. *Hepatology* 27, 117-123, 2003.
- 52) Wang A, Hascall VC. Hyaluronan structures synthesized by rat mesangial cells in response to hyperglycemia induce monocyte adhesion. *J Biol Chem* 279, 10279-10285, 2004.
- 53) Horie T, Sakaida I, Yokoya F, Nakajo M, Sonaka I, Okita K. L-Cysteine administration prevents liver fibrosis by suppressing hepatic stellate cell proliferation and activation. *Biochem Biophys Res* 305, 94-100, 2003.
- 54) Pines M, Knopov V, Genina O, Lavelin I, Nagler A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethyl-nitrosamine induced liver cirrhosis. *J Hepatol* 27, 391-398, 1997.
- 55) 김안나, 김성용, 임선희. 혈청 제4형 콜라겐 7S domain 측정 에 의한 만성 간염의 섬유화 정도 예측. *대한소화기병학회지* 25, 345-341, 1993.
- 56) 정진이, 한광협, 박영년. 각종 간질환 환자에서 혈청 Type IV collagen 측정. *대한소화기병학회지* 25, 337-344, 1993.
- 57) Misaki M, Shima T, Yano Y, Sumita Y, Kano U, Murata T, Watanabe S, Suzuki S. Basement membrane-related and type III procollagen-related antigens in serum of patients with chronic viral liver disease. *Clin Chem* 36, 522-524, 1990.
- 58) Park GT, Jeon DW, Yoo YJ, Choi CS, Jung JW, Kim JB, Yoon BC, Choi HS, Hahm JS, Park KN, Lee MH, Lee JW. Correlation analysis and clinical significance of various noninvasive examinations to determine the progression of chronic liver disease. *Kor J Gastroenterol* 33, 799-807, 1999.
- 59) Callaghan R, Desmond PV, Paull P, Mashford ML. Hepatic enzyme activity is the major factor determining elimination rate high-clearance drugs in cirrhosis. *Hepatology* 18, 54-60, 1993.
- 60) Fenyves D, Garipey L, Villeneuve JP. Clearance by the liver in cirrhosis. I. Relationship between propranolol metabolism in vivo and its extraction by the perfused liver in the rat. *Hepatology* 17, 301-306, 1993.
- 61) Branch RA, Shand DG. Propranolol disposition in chronic liver disease: A physiological approach. *Clin Pharmacokinetics* 1, 264-279, 1976.