

NCTC-1469 생쥐 간세포주에 나타난 Acetaminophen 간독성

이화여자대학교 의과대학 약리학교실

이 경 은

= Abstract =

Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Cultured NCTC-1469 Cell Line

Kyung Eun Lee

Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University

Acetaminophen is a mild analgesic and antipyretic agent that is safe and effective when taken in therapeutic doses. Ingestion of overdoses, however, may lead to acute liver failure accompanied by centrilobular degeneration and necrosis. The toxicity of acetaminophen is generally thought to be caused by direct interaction of its reactive metabolites with cellular macromolecules. Cell death, defined as an irreversible loss of vital cellular function and structure, can occur by either necrosis or apoptosis. Until recently, investigation into liver cell death has focused on cell necrosis although it is now appreciated that both apoptosis and necrosis may contribute to liver cell death. The present study examined cultured NCTC-1469 cells for LDH release and DNA laddering and their association with cell death. NCTC-1469 cells were cultured in NCTC-135 medium containing 10% horse serum for 72hr, and changed medium to fresh medium containing acetaminophen(from 0.5mM to 6mM). Cell viability was examined by MTT method and cell necrosis was assessed by lactate dehydrogenase leakage. Genomic DNA fragmentation was assessed qualitatively by 1.5% agarose gel electrophoresis. Acetaminophen decreased MTT levels($p < 0.05$) and increased release of LDH($p < 0.05$) in dose-dependent manner. Agarose gel electrophoresis revealed a "ladder" of DNA fragments in all acetaminophen concentration. Cell viability strongly correlated with cell necrosis($r^2 = 0.946$). These results show that acetaminophen induced both necrosis and apoptosis in NCTC-1469 cells and cell death mainly attributed to apoptosis.

KEY WORDS : Acetaminophen · Hepatotoxicity · NCTC-1469 cell · Necrosis · Apoptosis.

서 론

Acetaminophen(AAP)은 임상적으로 자주 사용되

는 해열·진통제로서 paracetamol 또는 N-acetyl-*p*-aminophen이라고도 불린다. AAP는 aspirin과 비교할 때 축적효과가 없고, 탈수에 의한 혈중농도의 변화가 없으며, 감각효과 및 항응고제와의 상호작용이 없

고, 위장관 자극이 적어 치료용량에서는 비교적 안전한 것으로 알려져 왔다. 그러나 과량 복용시에는 심각한 간손상을 일으키며 동물실험과 인간에서 보고되었으며¹²⁾, 특히 규제없이 약국에서 손쉽게 약물을 구입할 수 있어 사고성 급성약물중독 또는 자살 목적으로 과복용되는 대표적인 약물이기도 하다³⁾.

간에서 주로 glucuronidation(55%)과 sulfation(30%)을 통해 대사되는 AAP는 그 자체는 독성이 없으나, 과량 복용시 cytochrome P₄₅₀-의존성 mixed function oxidase를 통해 생성되는 반응성이 크고 친전자성(electrophilic)이며 산화성을 가지는 중간대사물인 N-acetyl-*p*-benzoquinone imine(NAPQI)이 간손상을 유발한다고 한다⁴⁾. 그러나 반응성 대사물인 NAPQI가 생성되어도 우선적으로 간세포의 glutathione(GSH)과 포합반응(conjugation)을 한 후 장과 신장에서 파괴되어 mercapturic acid와 cystein conjugates 형태로 소변으로 배설되므로 독성을 나타내지 않으나⁵⁾, GSH가 고갈되고도 남은 만큼의 NAPQI가 생성되면 치명적인 간손상을 유발하게 된다. 또한 최근에는 실질세포(parenchymal cell)인 간세포(hepatocyte)와 비실질세포(nonparenchymal cell)인 Kupffer cells(KCs)과의 상호작용이 AAP로 유도된 간손상기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있는데⁶⁾, AAP에 의해 활성화된 KCs는 염증매개체와 반응성 산소유리기를 분비하고 이는 또다시 손상된 부위에서의 염증반응을 활성화시키는 신호로 작용하여 간손상을 더욱 증가시키게 된다는 것이다.

일반적으로 세포죽음(cell death)은 살아있는 세포의 기능과 구조의 비가역적인 소실로 정의되며 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)의 두가지 기전을 통해 일어난다⁷⁾. 세포괴사는 세포막 투과도 소실에 의한 세포부종, 세포질 용해의 특징을 나타내며 ATP의 고갈이 동반되기도 하는데 주로 허혈, 저산소증, 고열, 방사선조사, 독성물질에 노출되었을 때 일어나는 병리적인 손상기전이다⁸⁾. 한편 세포고사는 형태학적으로 세포위축, 염색질 농축, 핵 및 DNA 분절 등을 보이는 것으로 구조적으로 손상받지 않고 살아있는 세포소기관을 포함하고 있는 세포막이 건재한 apoptotic bodies라 불리는 구조물이 특징적으로 나타난다. 즉 세포고사는 세포를 여러 개의 작은 조각(multiple small fragments)으로 나누어 세포분열이 일어나지 못하게 해서 결국 세포의

기능과 생존력을 잃게 하는 것으로 식작용에 의해 제거되고 조직학적으로는 cell drop-out의 소견을 보이게 된다⁹⁾. 최근 세포괴사와 세포고사는 모두 간세포 손상 기전에 기여할 것으로 여겨지고 있으며 따라서 AAP로 유도된 간독성에서도 세포괴사 또는 세포고사가 나타날 것으로 생각되나 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 생쥐 간세포주인 NCTC clone 1469 세포주를 이용하여 AAP로 유도된 간독성 기전이 세포괴사인지 또는 세포고사인지를 우선 검색하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험재료

ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받은 NCTC clone 1469(liver, mouse, C3H/AN) 세포주를 사용하였으며, 10% 말혈청을 포함한 NCTC 135배지(Gibco BRL)를 사용하여 배양하였다.

2. 약물 투여

AAP을 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM 및 6mM 농도로 24시간 동안 배양액에 첨가하여 간세포 독성을 유발하였다.

3. 세포생존력 검사 : MTT법

살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 활성을 측정하는 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법으로 세포생존력을 측정하였다¹⁰⁾¹¹⁾. 96well 배양용기에 심어진 1×10^5 세포/100 μ L/well에 10 μ L의 MTT 용액(5mg/mL)을 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 방치한 다음 상층액을 버린 후 100 μ L의 MTT 용매를 넣어주고 ELISA reader (Molecular device)를 사용하여 파장 550nm(비교파장 : 650)에서 흡광도를 측정하였다¹²⁾.

4. 세포괴사 검사 : LDH 유리 측정

48well에 1×10^5 세포/mL의 농도로 NCTC 세포주를 배양하고 24시간에 배양액 50 μ L와 600 μ L의 potassium phosphate-buffered reaction mixture(100mM, pH 7.5 ; 9×10^{-2} mM NADH와 22.7mM sodium pyruvate 함유)를 섞은 뒤 분광광도계(파장 340nm)에서 흡광도의 감소를 측정하였다¹³⁾.

5. 세포고사 검사 : Agarose gel 전기영동법

5×10⁶개의 세포를 4℃에서 2000rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 침전물에 lysis buffer(20 mM EDTA, 100mM Tris, pH 8.0, 0.8% SDS) 20 μl를 섞어주고, RNase(1mg/ml in 10mM tris-HCl pH 7.5, 15mM NaCl) 10μl를 가하여 잘 섞어준 후 37℃에서 1시간 방치하였다. 그 후 10μl의 proteinase K(20mg/ml)를 가하여 50℃에서 5시간동안 방치한 후, loading buffer(10% glycerol, 10mM Tris pH 8, 0.1% bromophenol) 5μl를 가하여 1.5% agarose gel에서 TAE buffer(40mM Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA, pH 8.4)를 사용하여 30V로 5시간동안 전기영동한 후, 자외선 형광으로 가시화하여 플라로이드 필름을 사용하여 촬영하였다¹⁴⁾.

6. 통 계

모든 실험결과는 평균±표준오차로 나타냈으며, 유의성 검정은 student's *t*-test(n=50)를 하여 p값을 *p<0.05, **p<0.01로 표시하였다.

결 과

1. 세포 생존력

NCTC-1469 세포주의 대조군에서 MTT 흡광도는 0.386±0.024였으며 24시간 동안 AAP 투여시 농도 의존적으로 MTT 흡광도가 유의성있게 감소하여 0.5mM AAP 투여시에는 0.379±0.022, 1mM AAP는 0.324±0.015, 2mM AAP는 0.241±0.006, 4mM AAP는 0.180±0.005, 6mM AAP는 0.165±0.005의 흡광도를 나타내었다(Fig. 1).

2. 세포괴사 검사 : LDH 유리

NCTC-1469 세포주의 대조군에서의 LDH 유리(100%)를 기준으로 24시간 AAP 투여시 LDH 유리변화를 %로 표시하였을 때 AAP 0.5mM은 102.9±4.1%, 1mM AAP는 117.2±4.1%, 2mM AAP는 152.2±3.9%, 4mM AAP는 199.6±5.9%, 6mM AAP는 226.5±9.5%의 LDH를 유리하여 농도 의존적으로 LDH 유리가 증가하였다(Fig. 2).

3. 세포고사 검사 : Agarose gel 전기영동법

NCTC-1469 세포주의 대조군 및 6시간 동안 AAP

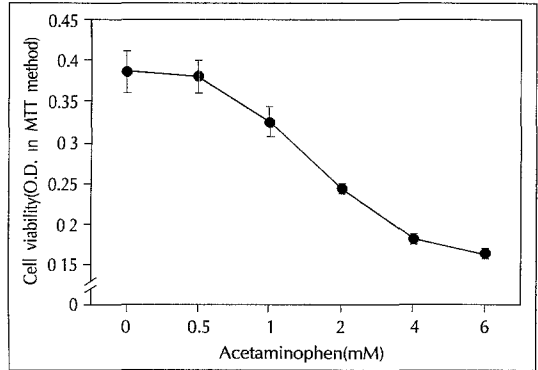


Fig. 1. Effect of acetaminophen on the cultured NCTC-1469 cells, as measured by MTT method. Values are mean±S.E. of fifty replicates. Cells were exposed to 0.5, 1, 2, 4, 6mM acetaminophen for 24hour.

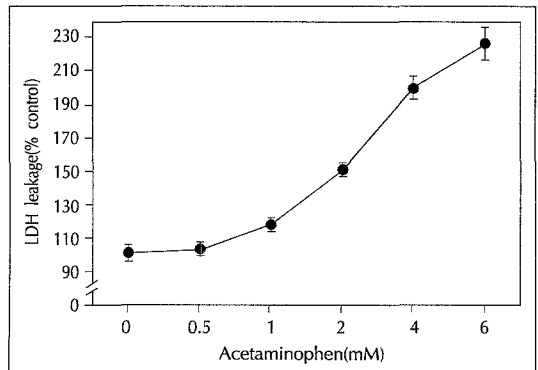


Fig. 2. Effect of acetaminophen on the lactate dehydrogenase release in cultured NCTC-1469 cells. Values are mean±S.E. of fifty replicates expressed as % of control LDH leakage. Cells were exposed to 0.5, 1, 2, 4, 6mM acetaminophen for 24hour.

를 투여한 군에서 DNA는 분절양상을 나타내지 않았으나, 24시간 AAP 투여시 현저한 DNA 분절을 나타내었으며(Fig. 3) 이러한 DNA 분절은 농도에 대한 의존성을 나타내지 않았다.

고 찰

과량의 Acetaminophen(AAP) 투여는 sulfate, glucuronate 및 glutathione(GSH)을 통한 대사과정이 포화되므로 실험동물 및 사람에게서 치명적인 centrilobular 형의 간괴사를 유발한다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁹⁾. AAP 투여에 의한 간독성의 초기 형태학적 변화로는 glycogen 소실, centrilobular hepatocyte의 vacuolization, 핵의

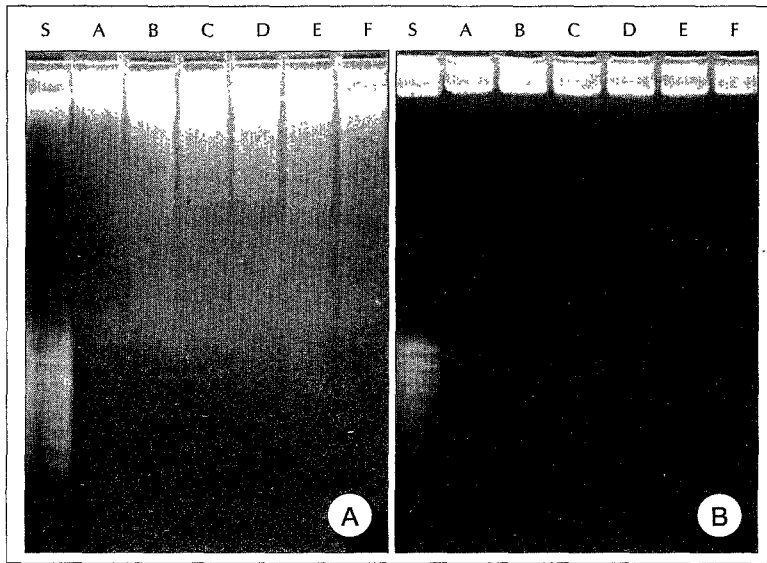


Fig. 3. Qualitative evaluation of acetaminophen induced damage to DNA of cultured NCTC-1469 cells, as determined by agarose electrophoresis. Acetaminophen(AAP) was treated for 24hr(a) or 6hr(b). S : standard(100 base pair), A : 0mM AAP(control), B : 0.5mM AAP, C : 1mM AAP, D : 2mM AAP, E : 4mM AAP, F : 6mM AAP

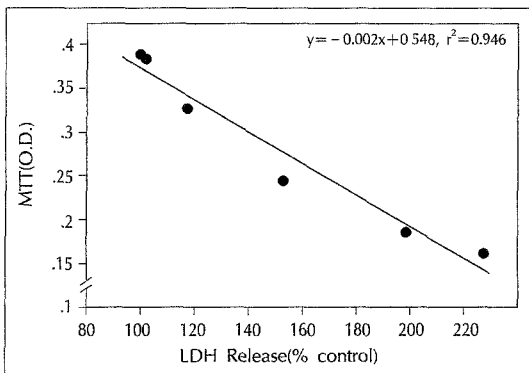


Fig. 4. Linear regression correlation between lactate dehydrogenase leakage and cell viability measured by MTT method.

변화, eosinophilic degeneration을 보이는 pyknotic nuclei를 가진 단일세포 괴사 등이며 후기 변화로는 centrilobular zone에 anuclear, eosinophilic hepatocyte가 다수 존재하는 심한 괴사양상을 보이게 된다²⁰⁾. 본 연구에서 NCTC-1469 세포주에 0.5mM부터 6mM까지의 AAP를 24시간 동안 투여하였을 때 농도 의존적으로 세포생존력의 현저한 감소를 나타내어 AAP 투여에 의한 간세포 독성을 확인할 수 있었다. 한편 배양된 설치류의 간세포는 생체내 상태에 비하여 AAP의 독작용이 적게 나타나므로 보다 높은 농도로

오랜 기간을 투여하여야 한다고 한다²¹⁻²⁵⁾. 이러한 차이는 전체 간조직에 비해 microsome에서 P_{450IIE1}과 P_{450IA2}의 효소가 낮기 때문이거나²⁶⁾ 바닥에 붙어 자라는 간세포에는 GSH양이 풍부하기 때문이라고 한다. 그러나 본 세포주는 다른 논문에서와는 달리 5mM 이하의 AAP 투여로도 현저한 간독성을 유발할 수 있었다. 생체내에서 AAP 투여에 의한 간괴사는 500~100mg/kg의 AAP를 투여하여 최고혈중농도가 3~6mM에 도달하였을 때 발생한다고 하므로²⁷⁾²⁸⁾ 본 연구에서 사용한 용량은 이러한 생체내 혈중농도와 유사한 결과를 보여주고 있다.

일반적으로 세포죽음은 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)로 나뉘어 지는데 AAP에 의한 간세포사망은 주로 세포괴사에 의한다고 오랜동안 알려져 있다. Lactate dehydrogenase(LDH)는 모든 세포에서 안정한 상태로 세포질내 존재하는 효소로서 세포막이 손상을 받으면 세포배양액으로 빠르게 유리되므로 세포괴사의 지표로서 이용된다. 본 연구에서 NCTC-1469 생쥐 간세포주에 0.5mM부터 6mM까지의 APP를 24시간 동안 투여하였을 때 농도 의존적으로 LDH 유리가 현저히 증가되어 AAP 투여에 의한 간세포막 손상, 즉 괴사성 간세포 손상을 확인할 수 있었다. 또한 LDH 유리와 간세포 생존율과의 상관관계에 대한 직선형 회귀분석을

시행하였을 때 $y = -0.002x + 0.548$ 의 직선 방정식을 얻을 수 있었으며 r^2 값은 0.946으로 매우 강한 역상관관계를 나타내었다(Fig. 4). 즉, LDH 유리가 증가할수록 MTT 값의 감소가 나타나므로 AAP 투여는 NCTC-1469 세포주에서 세포괴사에 의한 세포 생존력 감소를 유발한다고 생각되었다. AAP에 의한 간세포괴사의 기전은 아직 명확하지 않으나 간세포내 glutathione 함량 감소, 산소유리기 독성, 세포내 칼슘 변동 등 다양한 원인이 제시되고 있다²⁹⁻³¹.

세포괴사가 일어난 세포에서는 내인성 endonuclease가 활성화되어 DNA가 nucleosome core 사이의 연결부위를 잘라줌으로써 약 180~200bp의 간격으로 잘려진 DNA 모양(laddering)을 보이게 된다³². 본 연구에서 NCTC-1469 생쥐 간세포주에 0.5mM부터 6 mM까지의 AAP를 24시간 동안 투여하고 1.5% agarose gel 전기영동법을 시행하였을 때 모든 농도의 AAP에서 현저한 DNA 분절을 관찰할 수 있었으나 농도에 대한 의존성은 나타나지 않았다. Shen등³³은 AAP 투여로 DNA 분절이 나타나지만 이러한 현상은 LDH 유리에 선행하여 보다 빠른 시간에 발생하므로 세포괴사에 앞서 세포괴사가 일어난다고 보고하였다. 본 연구에서도 이러한 시간적 차이를 확인하기 위하여 6시간째에 DNA 분절을 검사하였을 때 DNA 분절을 관찰할 수 없었다.

요 약

Acetaminophen(AAP)은 임상적으로 자주 사용되는 해열·진통제로서 aspirin과 비교할 때 치료용량에서는 비교적 안전한 것으로 알려져 왔다. 그러나 과량 복용시에는 반응성과 산화성이 큰 중간대사물인 N-acetyl-p-benzoquinone imine에 의해 동물과 인간에서 심각한 간손상을 일으킨다고 한다. 일반적으로 세포죽음(cell death)은 세포괴사(necrosis)와 세포괴사(apoptosis)의 두가지 기전을 통해 일어나며 최근 세포괴사와 세포괴사는 모두 간세포 손상 기전에 관여할 것으로 여겨지고 있으나 이에 대한 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 생쥐 간세포주인 NCTC clone 1469 세포주를 이용하여 AAP로 유도된 간독성 기전이 세포괴사인지 또는 세포괴사인지를 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다. NCTC-1469 세포주에서 24시간 동안 AAP

투여시 농도 의존적으로 MTT 흡광도가 유의성있게 감소하였으며 lactate dehydrogenase 유리는 AAP 농도에 의존적으로 증가하였다. 또한 LDH 유리와 간세포 생존율과의 상관관계에 대한 직선형 회귀분석을 시행하였을 때 매우 강한 역상관관계를 나타내어 AAP 투여는 NCTC-1469 세포주에서 세포괴사에 의한 세포 생존력 감소를 유발한다고 생각되었다. 한편 24시간 AAP 투여시 현저한 DNA 분절을 나타내었으나 농도에 대한 의존성을 나타내지 않았다. 따라서 acetaminophen 투여는 NCTC-1469 생쥐 간세포주에서 세포괴사 및 세포괴사를 유도하며 주로 세포괴사에 의한 간세포 죽음을 야기하는 것으로 생각되었다.

References

- 1) Boyd EM, Berczky GM : *Liver necrosis from paracetamol*. *Brit J Pharmacol* 1966 ; 26 : 606-614
- 2) Davidson DGD, Eastham WN : *Acute liver necrosis following overdose of paracetamol*. *Brit Med J* 1966 ; 2 : 497-499
- 3) 손대곤 · 최성욱 · 장석준 : 급성 acetaminophen 중독의 임상적 고찰. 대한 응급의학회지 1996 ; 7(2) : 207-214
- 4) Rosen GM, Singletary WV, Raukman EJ, Kilenberg PG : *Acetaminophen hepatotoxicity, an alternative mechanism*. *Biochem Pharmacol* 1983 ; 32 : 2053-2059
- 5) Moldeus P : *Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse*. *Biochem Pharmacol* 1978 ; 27 : 2859-2863
- 6) Laskin DL : *Parenchymal and nonparenchymal cell interreactions in hepatotoxicity*. *Adv Exp Med Biol* 1990 ; 283 : 499-505
- 7) Gerschenson LE, Rotello RJ : *Apoptosis : A different type of cell death*. *FASEB J* 1992 ; 6 : 2450-2455
- 8) Fawthrop D, Boobis A, Davis D : *Mechanism of cell death*. *Arch Toxicol* 1991 ; 65 : 437-444
- 9) Kerr J, Searle J, harmon B, Bishop C : *Apoptosis*. In : Potten C, ed. *Perspectives on mammalian cell death*. Oxford university Press, 1987 : 93-128
- 10) Slater TF, Sawyer B, Strauli U : *Studies on succinate-tetrazolium reductase systems*. III. *Points of coupling of four different tetrazolium salts*. *Biochemica et Biophysica acta* 1963 ; 77 : 383-393
- 11) Denizot F, Lang R : *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival*. *Modifications to the tetra-*

- zoliium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986 ; 89 : 271-277
- 12) Carmicheal J, DeGraff WG, Gazder AF, Minna JD, Michell JB : *Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res* 1987 ; 47 : 936-942
 - 13) Hayes MA, Roberts E, Roomi MW, Safe SH, Farber E, Cameron RG : *Comparative influences of different PB-type and 3-MC-type poly-chlorinated biphenyl-induced phenotypes on cytotoxic hepatotoxicity of bromobenzene and acetaminophen. Toxicol Appl Pharmacol* 1984 ; 76 : 118-127
 - 14) Schwartz LM, Osborne BA : *Methods in Cell Biology vol.46 Cell Death, Academic press, 1995 : 73-175*
 - 15) Prescott LF, Wright N, Roscoe P, Brown SS : *Plasma paracetamol half-life and hepatic necrosis in patient with paracetamol overdose. Lancet* 1971 ; 1 : 519-522
 - 16) Prescott LF : *Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. Drugs* 1983 ; 25 : 290-314
 - 17) Savides MC, Oehme FW : *Acetaminophen and its toxicity. J Appl Toxicol* 1983 ; 3 : 96-111
 - 18) Thomas SHL : *Paracetamol(acetaminophen) poisoning. Pharmac Ther* 1993 ; 60 : 91-120
 - 19) Vermeulen NPE, Bessems JGM, van de Straat R : *Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism based prevention. Drug Metab Rev* 1992 ; 24 : 367-407
 - 20) Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB : *Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. J Pharmacol Exp Ther* 1973 ; 187 : 185-194
 - 21) Acosta D, Anuforo DC, Smith RV : *Cytotoxicity of acetaminophen and papaverine in primary cultures of rat hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol* 1980 ; 53 : 306-314
 - 22) Devalia JL, Ogilvie RC, McLean AEM : *Dissociation of cell death from covalent binding of paracetamol by flavones in a hepatocyte system. Biochem Pharmacol* 1982 ; 31 : 3745-3749
 - 23) Hue DP, Griffith KL, McLean AEM : *Hepatocytes in primary culture become susceptible to paracetamol injury after depletion of glutathione using DL-buthionine-SR-sulphoximine(BSO). Biochem Pharmacol* 1985 ; 34 : 4341-4344
 - 24) Bruno MK, Cohen SD, Khairallah EA : *Antidotal effectiveness of N-acetylcysteine in reversing acetaminophen-induced hepatotoxicity. Enhancement of the proteolysis of arylated proteins. Biochem Pharmacol* 1988 ; 37 : 4319-4323
 - 25) Birge RB, Bartolone JB, Nishanian EV, Bruno MK, Mangold JB, Cohen SD, et al : *Dissociation of covalent binding from the oxidative effects of acetaminophen. Studies using dimethylated acetaminophen derivatives. Biochem Pharmacol* 1988 ; 37 : 3383-3393
 - 26) Wortelboer HM, De Kruif CA, Van Iersel AAJ, Falke HE, Noordhoek J, Blaauuboer BJ : *The isozyme pattern of cytochrome P450 in rat hepatocytes in primary culture, comparing different enzyme activities in microsomal incubations and in intact monolayers. Biochem Pharmacol* 1990 ; 40 : 2525-2534
 - 27) Corcoran GB, Racz WJ, Smith CV, Mitchell JR : *Effects of N-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. J Pharmacol Exp Ther* 1985 ; 232 : 864-872
 - 28) Corcoran GB, Wong BK : *Obesity as risk factor in drug-induced organ injury : Increased liver and kidney damage by acetaminophen in the obese overfed rat. J Pharmacol Exp Ther* 1987 ; 241 : 921-927
 - 29) Black M : *Acetaminophen hepatotoxicity. Annu Rev Med* 1984 ; 35 : 577-593
 - 30) Nelson SD : *Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. Semin Liver Dis* 1990 ; 10 : 267-278
 - 31) Mitchell JR : *Acetaminophen toxicity. N Eng J Med* 1988 ; 319 : 1601-1602
 - 32) Wyllie AH : *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature* 1980 ; 284 : 554-556
 - 33) Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB : *Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocyte correlation of nuclear Ca²⁺ accumulation and early DNA fragmentation with cell death. Toxicol Appl Pharmacol* 1991 ; 111 : 242-254