이학석사학위논문

항산화 물질의 경구투여에 따른 혈중농도 및 지질성분의 변화

2002년 2월

부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

강 철 수

이학석사학위논문

항산화 물질의 경구투여에 따른 혈중농도 및 지질성분의 변화

지도교수 이 명 숙

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함

2002 년 2월

부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

강 철 수

이 논문을 강철수의 이학석사 학위논문으로
인준함

2001 년 12 월

주 심 농학박사 이원재 (인)

위 원 이학박사 김영태 (인)

위 원 이학박사 이명숙 (인)

목 차

Variation of antioxidants and lipid concentration in blood by Oral Feeding of antioxidants

Cheol-Soo Kang

Department of Industrial Microbiology,
Graduate School of Industry,
Pukyong National University, Pusan, Korea

ABSTRACT

In this study, we investigated the influence of antioxidants to the cardiac diseases caused by free radical. This experiments performed by oral feeding of 250mg probucol as antioxidant for two times per day during 4 weeks on two groups, health and cardiac diseases. The experimental groups were consisted of patient group, 13 cardiac disease patients who visited D hospital in Busan and control group, 20 employees of D hospital from May to July in 2000. We have analyzed the blood concentration and the transformation patterns of antioxidants (TAS, SOD, GPX), lipidic components (Total cholesterol and HDL-cholesterol and cardiac risk factor), and total protein and albumin, after treatment with probucol as antioxidants. The results were summarized as fallows:

1. TAS, SOD and GPX were significantly increased in both experimental experimental groups TAS increased as the same extent between the groups, whereas SOD and GPX showed significant differences, especially the transformation patterns.

2. In control group, there was no significant difference in blood concentration of lipidic components. However, in patient group, total cholesterol and HDL-cholesterol were dramatically decreased but CRF was considerably increased.

3. In the experiment with total proteins, there was no significant difference in control group, while prominent increase in patient group. The transformation patterns were shown differently in the two groups.

Ⅰ. 서 론

Free radical은 원자 또는 분자적 오비탈을 지배하는 하나 또는 그 이상의 쌍을 이루지 않는 전자, 즉 홀수전자를 지니는 불안정한 구조를 가진 유리된 상태의 radical을 의미한다[1]. 이러한 free radical은 불안정한 구조로 인해 자신이 안정한 상태로 되기 위하여 주변의 분자로부터 전자를 빼앗으려 하게되고, 일단 안정한 분자가 전자를 잃으면 이 역시 free radical이 된다. 이 두 번째의 free radical은 세 번째의 안정한 분자에서 다시 전자를 빼앗는 연쇄 반응에 의해서 free radical이 생성되게 된다. 이러한 반응에 의해서 분자가 전자를 잃을 때마다 손상을 입고 그 즉시 다른 분자에게 손상을 입히게 되므로 인체 내에서 여러 유해작용을 유발시킨다고 알려져 있다[2-4].

지금까지 알려진 인체 내의 유해 free radical에는 superoxide radical ($^{\bullet}O_2^-$), hydroxyl radical($^{\bullet}OH$), nitric oxide radical($NO^{\bullet}$), peroxyl radical($ROO^{\bullet}$) 등이 있으며 이들이 체내 세포 구조를 공격하여 AIDS, cancer, central nervous system disorders, diabetes, liver damage, Parkinson`s disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cataracts, respiratory disease 등 여러 가지 질환을 유발한다고 보고되고 있다[2]. 이러한 free radical의 하나인 활성산소는 환경, 활성산소의 연쇄반응, 신체 내 에너지 생성과정, 정상적인 대사과정 및 면역체계를 통해 끊임없이 생성되며, 실제 호흡에 의해 체내에 들어온 산소의 약 2%가 superoxide 및 hydroxyl 기를 포함한 활성 산소를 형성하는 것으로 보고되고 있다. 뿐만 아니라 면역체계에서는 침입한 세균, 곰팡이, 바이러스를 파괴하기 위하여 특이적으로 활성산소를 생산한다고 알려져 있다[2, 3]. 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학물질 또한 생산하지 못하지만, 문

제는 활성산소가 과잉 생성되면 이를 활성유해산소(ROS: reactive oxigen species)라 하고 이들이 신체에 손상을 끼치며 여러가지 질병을 일으키는 원인으로 작용하는 것으로 보고되고 있다는 것이다[2, 3].

한편으로는 free radical의 유해작용을 방어할 수 있는 물질과 기전에 대한 연구가 병행되어, 1969년 최초로 McCord and Fridovich[5]에 의해 생물체 내에서 산소 radical의 독성을 방어할 수 있는 superoxide dismutase(SOD)라는 효소가 있음을 발견하게 되었고, 1980년대 접어들어 그 외 항산화제들인 catalase와 peroxidease 등에 의해서 어느 정도 효과적으로 free radical을 약화시킬 수 있는 방어 기작이 있음이 서서히 밝혀지게 되었다. 실제 이러한 항산화제에 관한 연구는 Oberley[6]에 의해 세포 분화와 암 그리고 노화에 있어 항산화 효소의 분포와 양은 세포의 산화 환원력 및 세포의 분화와 사멸까지도 조절할 뿐만 아니라 세포의 유전자에 작용하여 세포분화에 결정적 역할을 하는 것으로 보고되었다. 최근 원핵 또는 진핵 세포 내 SOD와 catalase의 생리적 역할을 확신하는 유전인자의 증식에 관한 잇따른 보고와 더불어 이들의 임상적 응용사례가 부분적으로 시행되어 성공한 사실이 밝혀짐으로써 이들 항산화제의 활용가능성이 점점 커지고 있는 실정이다[7, 8].

이러한 항산화물질은 free radical에 대해 방어하는 기작에 따라 세가지로 분류되어지는데 1차 항산화 물질은 새로운 free radical 종의 형성을 방어하는 것으로 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, caeruloplasmin, transferrin, ferritin 등이 있다. 그리고 2차 항산화물질은 free radical에 의한 세포의 손상과 free radical의 형성을 억제하는 것으로 vitamin E, vitamin C, β-carotene, uric acid, bilirubin, albumin 등이 있으며, 3차 항산화물질은 free radical의 공격으로 손상된 세포의 구조를 치유하는 것으로 DNA repair 효소 및 methionine sulphoxide reductase 등이 알려져 있다[2].

이와 같이 질병 유발기전에 매우 중요한 인자인 free radical과 이를 중화시켜서 세포의 산화를 저지하는 antioxidant에 대한 연구가 우리 나라에서는 미진하여 임상적 활용이 제대로 이루어지지 않는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 free radical로 야기될 수 있는 질환중의 하나인 관상동맥질환 및 심질환 환자를 대상으로 항산화제 및 지질저하제인 probucol을 투여하여 심질환 인자와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 이를 위해 혈액중 항산화물질(total antioxidant status, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, albumin)과 지질성분 (total cholesterol, HDL-cholesterol), 그리고 참고로 total protein의 혈중농도 변화를 측정하여 관상동맥질환 및 심질환에 있어서 항산화제의 효과와 지질성분의 변화, 그리고 단백질과 항산화제와의 관계를 실험한 결과를 보고하고자 한다.

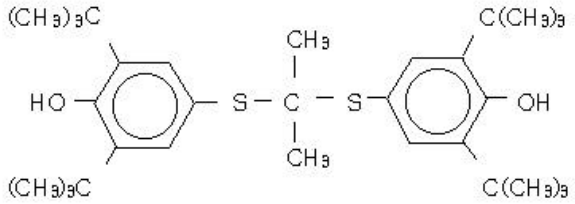
Ⅱ. 재료 및 방법

1. 검사대상

검사대상은 2000년 5월과 7월 사이에 부산소재 D병원을 방문한 환자와 직원을 대상으로 하였다. 대조군으로는 신장질환, 간장질환, 갑상선질환, 심근증 등의 전신질환이 없고, 지질이나 항산화제의 대사에 영향을 주는 약물을 복용하지 않은 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 하였다. 그리고 환자군으로는 관상동맥 조영술이나 심전도, 혈청검사, 부하검사 등에 의해 관상동맥질환으로 진단되거나 관상동맥 중재술 또는 우회 수술을 받은 적이 있는 심질환자 13명을 대상으로 하였으며, 모든 환자의 검사는 연구의 목적을 충분히 설명하고 동의를 얻은 후에 실시하였다.

2. 항산화제

본 실험에 제공된 항산화제는 다림양행의약품(주)에서 제조된 probucol로서 검사대상 33명에게 매일 250mg씩 아침과 저녁, 2회 4주간 경구투여 하였다. Probucol의 약리작용은 체내 콜레스테롤을 저하시킬 뿐만 아니라 항산화 작용을 하고 고지혈증 치료에 효과적인 약제이며 bis-phenol antilipemic의 변형 제제로서 근래 처방되는 다른 antilipemic 약물들과는 약간의 구조적인 차이를 가지고 있다. 상품명은 로데코(250mg)정으로 분자식은 $C_{31}H_{48}O_2S_2$이다. 화학적 구조식은 4,4′-［(1-Methylethylidene)bis(thio)］bis-［2,6-bis(1,1-dimethlyethyl)phenol］로서 다음과 같은 구조로 이루어져 있다.



3. 시료

시료로 사용된 혈액은 probucol투여 전 첫째 날 공복시, 3일, 1주일, 그리고 4주후에 각각 채혈을 하였다. 채혈후 TAS, SOD, GPX 검사는 즉시 실시하였고, 기타 검사를 하기 위한 검체는 -20℃에 냉동보관 하였다가 실험하기 직전에 해동하여 사용하였다. SOD, GPX 실험을 위해서는 전혈을 전처리하여 이용하고, 기타검사 항목은 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청이 이용되었다.

4. 항산화제 및 지질성분 측정방법

1) Total antioxidant status (TAS)

TAS는 세포의 외부에 존재하는 항산화 물질인 transferin, ferritin, TIBC(total iron binding capacity 총철결합능), uric acid, bilirubin, albumin등을 포함하는 총 항산화물이다.

TAS 측정은 혈청내에 존재하는 heme-protein의 일종인 metmyoglobin($HX\text{-}Fe^{3+}$)에 peroxidase와 hydrogen peroxide(H_2O_2)를 반응시키면 ferrylmyoglobin($^{\bullet}X\text{-}[Fe^{4+} = 0]$)과 H_2O가 생성된다. 이때 생성된 ferrylmyoglobin 에 ABTS®(2,2'-amino-di-〔3-ethylbenzthiazoline sulphonate〕를 반응시키면 $ABTS^{\bullet+}$양이온 radical이 생성되고 이것의 발색 정도를 600 nm (Hitachi Japan, model 7170)에서 측정하였

다. 이때 사용된 시약은 Randox(British)사의 Total Antioxidant Status kit이다. $ABTS^{\bullet+}$양이온 radical의 생성은 혈청내에 존재하는 TAS에 의해 억제반응이 나타나고 억제반응 정도는 TAS의 농도에 비례하여 발색이 감소하게 되며 그 반응식을 요약하면 다음과 같다.

$$HX\text{-}Fe^{3+} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} {}^{\bullet}X\text{-}[Fe^{4+} = 0] + H_2O$$

$$ABTS^{\circledR} + X\text{-}[Fe^{4+} = 0] \longrightarrow ABTS^{\bullet+} + HX\text{-}Fe^{3+}$$

2) Superoxide dismutase (SOD)

SOD는 세포 내에서 superoxide radical($O_2^{\bullet-}$)의 독성을 중화시키는 역할을 하는 1차 항산화제의 일종이다. 혈액 0.5ml에서 혈장을 제거하고 생리식염수로 4번세척(3000rpm/10min)한 후 6℃의 증류수로 용량이 2ml가 되게 희석하고 냉장고에 15분간 방치하여 용혈된 검체를 사용하였다. SOD의 측정은 Randox(British)사의 RANSOD kit를 사용하였다. 그 원리는 용혈시킨 검체에 xanthine과 xanthine oxidase를 반응시키면 uric acid와 superoxide radical(O_2^{-})이 생성되고 superoxide radical(O_2^{-})은 I.N.T〔2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchloride와 반응하여 formazan dye를 형성하고 이것의 흡광도를 505nm에서 측정하였다. 이 formazan dye는 superoxide dismutase에 의해 생성이 되고, 억제된 정도는 superoxide dismutase의 농도에 비례하여 발색이 감소하게 되며 반응식을 요약하면 다음과 같다.

$$\text{xanthine} \xrightarrow{XOD} \text{uric acid} + O_2^{-}$$

$$\text{I. N. T} \xrightarrow{O_2^{-}} \text{formazen dye}$$

3) Glutathione peroxidase(GPX)

GPX는 세포내에서 glutathione에 의한 과산화수소의 환원을 촉매시키는 1차 항산화제의 일종이다. 검체는 헤파린 처리한 전혈에 diluting agent를 추가하여 실온에 5분간 방치하고 적혈구 용혈시약인 Drabkin's 시약을 가한후 20분내에 실험하였다. GPX 측정에 사용된 시약은 Randox(British)사의 RANSEL kit를 사용하였다. 그 반응원리는 Cumene hydroperoxide의 존재하에 glutathione(GSH)이 glutathione peroxidase(GPX)와 반응하여 oxidised glutathione (GSSG)으로 변하고, 이 GSSG는 NADPH와 반응하고 glutathione reductase(GR)가 작용하여 glutathione이 환원형으로 바뀌면서 동시에 NADPH가 $NADP^+$로 산화된다. 산화된 $NADP^+$의 양은 GPX의 농도에 반비례하고 이때 흡광도의 감소를 340nm에서 측정한다[9].

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSG + H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} NADP^+ + 2GSH$$

4) Total cholesterol

혈중 total cholesterol은 lipoprotein의 일종으로 지방산과 ester 결합을 한 ester cholesterol이 70%, 나머지 30%는 free cholesterol 형태로 구성되어 있다. Lipoprotein은 단백질에 대한 지질의 비율이 크면 밀도는 감소하게 되고, 전기영동을 하면 chylomicrone, low density lipoprotein(LDL), very low density l ipoprotein(VLDL), high density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol)로 분류된다[10]. 검체중 ester형 cholesterol은 cholesterol esterase (CES)의 작용에 의해 가수분해되어 유리형 cholesterol 과 지방산을 생성한다. 이때 유리형cholesterol은 cholesterol oxidase(COD)의 작용으로 과산화수

소와 delta 4 cholestenon을 생성한다. 생성된 과산화수소는 peroxidase(POD)의 존재하에서 4-aminoantipirin(4-AAP)과 phenol을 산화적으로 축합시켜 키논형의 적색색소를 생성하고 이를 505nm에서 측정하였다. 시약은 아산제약(한국)의 아산테크 T-CHO kit를 사용하였으며 반응식을 요약하면 다음과 같다.

Ester cholesterol $\xrightarrow{CES}$ fatty acid + free cholesterol

Free cholesterol $\xrightarrow{COD}$ H_2O_2 + delta 4 cholestenon

H_2O_2 + 4-AAP + phenol $\xrightarrow{POD}$ 적색 키논형 색소

5) High density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol)

Cholesterol esterase(CHER)와 cholesterol oxidase(CHOD)를 化學修飾(화학수식)하여 low density lipoprotein(LDL), very low density lipoprotein(VLDL), chylomicrone에 대한 반응성을 저하시켜 HDL-cholesterol에만 작용하게 만든다. 먼저 혈액중 HDL 이외의 LDL, VLDL, chylomicrone을 dextrane sulfate 와 cyclodxtrin sulfate복합계와 결합시켜 침전시킨 후 化學修飾된 cholesterol esterase 와 cholesterol oxidase를 반응시키면 HDL-cholesterol만 분해되어 생성된 청자색 키논색소를 585㎚에서 측정한다. 시약은 Kyowa Medex(Japen)사의 デタミナ-L HDL-C kit를 사용하였으며 후자의 반응식을 요약하면 다음과 같다.

HDL-cholesterol + H_2O $\xrightarrow{CHER(化學修飾)}$ cholesterol + 유리지방산

cholesterol + O_2 $\xrightarrow{CHOD(化學修飾)}$ cholestenone + H_2O_2

$2H_2O_2$ +4-AA +HSDA +H_3^+O $\xrightarrow{POD}$ 청자색 키논색소 + $5H_2O$

HSDA : sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline

4-AA : 4-aminoantipirin

Total cholesterol과 HDL-cholesterol의 비(total cholesterol/HDL-cholesterol)로서 cardiac risk factor(CRF)를 산출하였다.

6) Total protein

Biuret법[10]에 기초하여 검체중 단백질은 알카리용액에서 Cu^{2+}로 처리하면 chelate complex가 자색의 착염을 형성하고 이것은 546㎚에서 비색정량 하였다. 시약은 아산제약(한국)의 아산테크 TP kit를 사용하여 측정하였다.

7) Albumin

검체중 albumin은 pH 4.0 부근에서 bromcresol green 과 직접 결합하여 청록색의 복합체를 형성하며 이를 660㎚에서 비색 정량 하였다. 시약은 아산제약(한국)의 아산테크 ALB kit를 사용하여 측정하였다.

5. 자료처리

실험결과 얻어진 자료는 SAS(version 6.12) 프로그램을 사용하여 student's t-test 와 repeated measures ANOVA 로 검정하였고 유의수준은 α=0.05로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 실험대상군의 연령분포

전체적인 실험대상군의 연령은 40세 이하가 13명이었고 50세 이상이 20명이었으며, group 간의 나이 평균에 대한 표준편차는 정상군이 40.9±9.3 세였고 환자군은 53.0±11.6 세로 나타났다(Table 1).

2. 항산화 물질 정상군의 참고치 산출

항산화 물질 정상군 20명의 첫째날 결과치를 남자 와 여자, 40세 이하와 이상으로 나누어 참고치를 산출하고 각각 두 group간에 유의성을 검정한 결과는 다음과 같다.

1) 성별에 따른 분류

TAS, SOD, GPX를 남자와 여자로 나누어 참고치를 산출한 결과 TAS는 남자가 1.096-1.488 mmol/l 였고, 여자는 0.991-1.369 mmol/l 였으며 두 group간에는 참고치가 유의하게 다른 양상을 나타내었다($P<0.05$). SOD는 참고치가 929-1261 u/gHb 과 862-1302 u/gHb 로서 두 group간에 참고치가 비슷한 양상으로 통계학적으로 의의가 없었다($P>0.05$). GPX 또한 참고치가 37-83 u/gHb 과 39-85 u/gHb 로서 두 group간에 참고치가 비슷한 양상으로 통계학적으로 의의가 없었다($P>0.05$) (Table 2).

2) 연령에 따른 분류

TAS, SOD, GPX를 40세 이하와 40세 이상으로 나누어 참고치를 산출한 결과 TAS는 40세 이하에서 1.028-1.478 mmol/l 였고 40세 이상에서는 1.025-1.481 mmol/l였으며, SOD 참고치도 904-1252u/gHb

Table 1. Age distribution of test groups

Age	Normal group 40.9±9.3[2)]		Patient group[1)] 53.0±11.6		Total
	Male	Female	Male	Female	
Below 40	7	4	2	0	13
Above 40	6	3	7	4	20
Total	13	7	9	4	33

[1)] Patient group : Cardiac disease group

[2)] Age (M±SD) M : mean, SD : standard deviation

Table 2. Reference value of antioxidants by sex of normal group

	No. of tests	TAS[1] mmol/l	SOD[2] U/gHb[4]	GPX[3] U/gHb
		Mean±2SD	Mean±2SD	Mean±2SD
Total	20	1.035-1.471	910-1270	39-83
Male	13	1.096-1.488	929-1261	37-83
Female	7	0.991-1.369	862-1302	39-85
P value		0.023	0.781	0.770

[1]TAS : Total antioxidant status

[2]SOD : Superoxide dismutase

[3]GPX : Glutathione peroxidase

[4]U/gHb : Value of U/ml calibrated with hemoglobin

과 45-85 u/gHb로서 3항목 모두 두 group간에 참고치가 비슷한 양상으로 통계학적으로 의의가 없었다(P>0.05) (Table 3).

3. 항산화 물질의 경구 투여에 따른 변화유형

항산화 물질 3항목과 지질 성분 2항목, CRF, 단백질 성분 2항목 등 8항목의 정상군과 환자군의 혈중 농도 변화 유형을 분석하고 두 group 간의 변화 양상을 검정한 결과는 다음과 같다.

1) TAS

정상군은 평균이 각각 1.253, 1.273, 1.321, 1.354mmol/l, 환자군은 1.323, 1.368, 1.424, 1.432mmol/l 로 측정 되었다. 두 group의 TAS측정치 평균을 시간 경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 두 group모두 유의하게 증가하여 통계학적으로 의의가 있었고(p<0.05), 정상군 과 환자군 간의 비교에서는 두 group이 비슷하게 증가하여 유의한 차이를 나타내지 않아 통계학적으로 의의가 없었다 (p>0.05) (Table 4).

2) SOD

SOD의 정상군 평균은 각각 1090, 1001, 1456, 1203 u/gHb, 환자군은 1339, 1493, 1518, 1667 u/gHb로 측정되었다. 두 group의 SOD측정치 평균을 시간 경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 두 group모두 유의하게 증가하여 통계학적으로 의의가 있었고(p<0.05), 정상군 과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 증가되어 유의한 차이를 나타내었다 (p<0.05) (Table 5).

3) GPX

GPX의 정상군 평균은 각각 61, 71, 79, 63 u/gHb, 환자군은 61, 69,

Table 3. Reference value of antioxidants by age of normal group

	No. of tests	TAS (mmol/l) Mean±2SD	SOD (U/gHb) Mean±2SD	GPX (U/gHb) Mean±2SD
Total	20	1.035-1.471	910-1270	39-83
Below 40	13	1.028-1.478	904-1252	35-83
Above 40	7	1.025-1.481	909-1301	45-85
P value		0.991	0.517	0.449

Table 4. TAS value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (mmol/l)	SD	P value	No. of tests	Mean (mmol/l)	SD	P value
Pre-feeding	20	1.253	0.109	0.001	13	1.323	0.073	0.001
After 3days	20	1.273	0.121		13	1.368	0.105	
After 1week	20	1.321	0.116		13	1.424	0.132	
After 4weeks	20	1.354	0.118		13	1.432	0.126	
P value	0.341							

Table 5. SOD value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value
Pre-feeding	20	1090	90.7	0.001	13	1339	163.4	0.001
After 3days	20	1001	86.2		13	1493	122.6	
After 1week	20	1456	128.1		13	1518	121.6	
After 4weeks	20	1203	128.4		13	1677	74.6	
P value	0.001							

71, 89 u/gHb로 측정되었다. 두 group의 GPX 측정치 평균을 시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 두 group모두 유의하게 증가하여 통계학적으로 의의가 있었고($p<0.05$), 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 증가되어 유의한 차이를 나타내었다 ($p<0.05$) (Table 6).

4) Total cholesterol

Total cholesterol의 정상군 평균은 각각 168, 166, 159, 158 mg/dl 였고 환자군은 208, 199, 197, 173 mg/dl로 측정되었다. 두 group의 Total cholesterol 측정치 평균을 시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 두 group모두 유의하게 감소하여 통계학적으로 의의가 있었고 ($p<0.05$), 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 증가되어 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$) (Table 7).

5) HDL-cholesterol

HDL-cholesterol의 정상군 평균은 각각 45, 44, 43, 44 mg/dl 이었고 환자군은 49, 46, 42, 31 mg/dl로 측정되었다. 두 group의 HDL-chol- esterol 측정치 평균을 시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 정상군 에서는 유의한 차이가 없었고($p>0.05$), 환자군에서는 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 나타나 유의한 차이를 나타내었다 ($p<0.05$) (Table 8).

6) CRF (cardiac risk factor)

CRF의 정상군 평균은 각각 3.8, 3.8, 3.8, 3.8이었고 환자군은 4.4, 4.5, 4.8, 5.5 로 계산되었다. 두 group의 CRF 계산치 평균을

Table 6. GPX value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value
Pre-feeding	20	61	11.4	0.001	13	61	11.7	0.001
After 3days	20	71	12.6		13	69	15.5	
After 1week	20	79	12.4		13	71	14.3	
After 4weeks	20	63	12.0		13	89	14.1	
P value	0.001							

Table 7. Total cholesterol value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value
Pre-feeding	20	168	27.6	0.048	13	208	72.0	0.001
After 3days	20	166	19.7		13	199	72.7	
After 1week	20	159	13.2		13	197	76.7	
After 4weeks	20	158	24.6		13	173	70.4	
P value	0.001							

Table 8. HDL-cholesterol value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value
Pre-feeding	20	45	6.3	0.784	13	49	23.3	0.001
After 3days	20	44	6.7		13	46	21.4	
After 1week	20	43	9.6		13	42	17.8	
After 4weeks	20	44	10.6		13	31	9.3	
P value	0.001							

시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 정상군 에서는 유의한 차이가 없었고($p > 0.05$), 환자군 에서는 유의하게 감소하였다.($p < 0.05$) 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 9).

7) Total protein

Total protein의 정상군 평균은 각각 7.4, 7.4, 7.4, 7.4 g/dl였고 환자군은 6.8, 6.6, 7.0, 7.2 g/dl로 측정되었다. 두 group의 total protein 측정치 평균을 시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 정상군 에서는 유의한 차이가 없었고($p > 0.05$), 환자군 에서는 유의하게 증가하였다.($p < 0.05$) 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 10).

8) Albumin

Albumin의 정상군 평균은 각각 4.6, 4.5, 4.5, 4.5 g/dl이었고 환자군은 4.1, 4.0, 4.2, 4.2 g/dl로 측정되었다. 두 group의 albumin 측정치 평균을 시간경과에 따라 각각 비교해 보았을 때 정상군 에서는 유의한 차이가 없었고($p > 0.05$), 환자군 에서는 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 정상군과 환자군 간의 비교에서는 두 group의 변화 양상이 다르게 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$) (Table 11).

Table 9. Cardiac risk factor value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean	SD	P value	No. of tests	Mean	SD	P value
Pre-feeding	20	3.8	1.0	0.893	13	4.4	0.9	0.001
After 3days	20	3.8	0.7		13	4.5	1.0	
After 1week	20	3.8	0.8		13	4.8	1.2	
After 4weeks	20	3.8	0.7		13	5.5	1.3	
P value	0.001							

Table 10. Total protein value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (g/dl)	SD	P value	No. of tests	Mean (g/dl)	SD	P value
Pre-feeding	20	7.4	0.19	0.650	13	6.8	0.48	0.001
After 3days	20	7.4	0.30		13	6.6	0.57	
After 1week	20	7.4	0.27		13	7.0	0.69	
After 4weeks	20	7.4	0.27		13	7.2	0.51	
P value	0.001							

Table 11. Albumin value measured with ANOVA test

Elapsed time	Normal group				Patient group			
	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value	No. of tests	Mean (u/gHb)	SD	P value
Pre-feeding	20	4.6	0.20		13	4.1	0.23	
After 3days	20	4.5	0.17		13	4.0	0.24	
After 1week	20	4.5	0.14	0.062	13	4.2	0.38	0.025
After 4weeks	20	4.5	0.17		13	4.2	0.38	
P value	0.002							

Ⅳ. 고 찰

Free radical은 활성산소가 과잉 생성되면 활성 유해산소가 되고 이들은 신체에 손상을 끼치며 여러가지 질병을 일으키는 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 인체내에 생성된 유해 free radical에는 superoxide radical($^{\bullet}O_2^-$), hydroxyl radical($^{\bullet}OH$), nitric oxide radical($NO^{\bullet}$), peroxyl radical($ROO^{\bullet}$) 등이 있으며, 이들이 체내 세포구조를 공격하여 AIDS, cancer, central nervous system disorders, diabetes, liver damage, Parkinson's disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, cataracts, respiratory disease등 여러 가지 질환을 유발한다고 보고되고 있다[2]. 한편 antioxidant는 free radical의 유해작용을 방어할수 있는 물질로서 방어하는 기작에 따라 세가지로 분류되어지는데, 1차 항산화 물질은 새로운 free radical 종의 형성을 방어하는 것으로 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, caeruloplasmin, transferrin, ferritin 등이, 2차 항산화물질은 free radical에 의한 세포의 손상과 free radical의 형성을 억제하는 것으로 vitamin E, vitamin C, β-carotene, uric acid, bilirubin, albumin등이, 그리고 3차 항산화물질은 free radical의 공격으로 손상된 세포의 구조를 치유하는 것으로 DNA repair enzymes, methionin sulphoxide reductase등이 알려져 있다[2, 3].

Free radical과 antioxidant에 관한 연구의 역사적인 배경은 1945년 Dam and Granados[11]가 vitamin E 결핍 상태에서 과산화가 빨리 증가됨을 보고하였고, 1953년 Tappel[12]에 의해 산소의 독성에 대해 antioxidants가 방어역할을 하는 것이 증명되었다. 나아가 1954년에 Gerschman[13]은 과도한 기압의 산소와 방사선 조사에 의해 oxygen radical이 형성되고 이로 인해 생명이 단축되는 것으로 보고하였다.

한편으로는 oxygen radical이 과연 생물의 조직이나 세포에 어떻게 직접 독성을 미치며 동시에 이에 대해 방어작용이 있느냐 하는 원론적인 문제는 Fee and Valentein[14]에 의해 끊임없이 제기되어 왔으며, 최근 활성산소의 독성에 대한 개념은 점차 확실시 되었고 더 나아가 이제는 이들 oxygen radical 독성이 노화의 원인이 된다고 알려지게 되었다[6]. 이러한 free radical은 외부의 유해환경이나 세포의 에너지 대사 과정 중에 형성되거나 혹은 free radical의 연쇄반응에 의해 생성된다고 알려져 있다[2].

본 연구는 free radical로 인하여 야기될 수 있는 질환중의 하나인 관상동맥질환 및 심질환 환자를 대상으로 항산화제 및 지질저하제인 probucol을 투여하여 심질환 인자와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 이를 위해 정상성인 20명과 심질환 환자군 13명을 대상으로 항산화제인 probucol 250mg을 1일 2회씩 4주간 투여하고 혈액중 항산화제(total antioxidant status, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, albumin) 와 지질성분(total cholesterol, HDL-cholesterol)의 변화를 측정하여 관상동맥질환 및 심질환에 미치는 항산화제의 영향을 실험, 관찰하였다. 이때 투여된 항산화제로는 probucol을 사용하였는데 이는 bis-phenol antilipemic의 변형 제제로서 흰색의 가루 결정체이며 물에 용해되지 않고 알코올에 용해되며 항산화제의 역할을 하는 지질저하제로 알려져 있다. 실제 probucol은 혈청 cholesterol을 감소시킨다고 알려져 있지만, serum triglyceride 농도에 대한 영향은 다양하고, LDL-콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 농도를 감소시키기도 한다. 그리고 VLDL 콜레스테롤에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다[15-17]. 하지만 그 정확한 메카니즘은 알려져 있지 않고, 다만 cholesterol이 합성되는 동안 acetate가 mevalonic acid의 합성에 의해 장으로부터 cholesterol의 흡수를 억제하는 작용을 하는 것으로 추정하고 있다.

Probucol은 순환하는 cholesterol의 전구물질인 desmosterol 과 7-dehydrocholesterol의 생성을 증가시키지는 않고 또한 *in vivo* 또는 *in vitro*상에서 mevalonate가 콜레스테롤 합성에 영향을 미치지도 않는다. 따라서 이 약물은 콜레스테롤 생합성의 마지막 단계에 영향을 미치지 않는 것은 명백하다[15].

Probucol은 다이어트 요법에 이용되고 초기 cholesterol 수치가 250mg/dL 이상인 환자들의 평균 6-23 %에서 혈청 콜레스테롤 농도를 줄여주는 것으로 나타났으며, 초기 혈청 콜레스테롤 농도가 아주 높은 환자들은 가장 높은 수치의 감소를 기록한 것으로 나타났다[15, 16].

먼저 probucol 항산화제의 경구 투여로 인해 나타난 항산화 물질인 TAS, SOD, GPX 변화는 정상군, 환자군 모두 유의하게 증가하였으며, 그리고 정상군에서 성별에 따른 결과는 TAS가 유의한 차가 있는 것으로 나타났고 SOD, GPX는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 권 등이 TAS에서 성별에 따라 유의한 차이가 있다는 것은 본 실험과 일치하는 경향을 보였다[18, 19].

정상군의 연령에 따른 항산화 물질의 농도 변화는 3항목 모두 유의한 차이가 없는 것으로 나타났는데, 이는 Harman[20]이 free radical 생성은 나이가 많아질수록 증가하는 경향이 있다는 보고와 차이가 있는 것으로 나타났다. 항산화 물질로서 TAS, SOD, GPX의 혈중농도 변화유형을 정상군과 환자군 간에 비교한 결과 TAS는 두 그룹이 비슷한 양상으로 증가하였지만 SOD, GPX는 두 그룹의 변화양상이 다르게 증가하였다.

지질성분의 변화는 정상군에 있어서 total cholesterol, HDLC, CRF 모두 변화 양상이 통계학적으로 의의가 없었으며, 환자군에 있어서 total cholesterol, HDL-cholesterol은 유의하게 감소하였고 CRF는 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이 결과는 정상군과 환자군에서 지질성분의 변화 양상은 다르게 나타냄을 알수 있었다.

정상군과 환자군의 비교에서는 total cholesterol, HDL-cholesterol, CRF 모두 혈중 농도의 변화 양상이 다르게 나타났다. 이러한 결과는 probucol이 정상인 지질의 혈중농도 변화에는 크게 영향을 미치지 않지만 고 cholesterol 혈증을 동반한 환자군에 있어서는 감소 폭이 크다는 것을 알수 있었다. 그리고 환자군에서 Total cholesterol과 HDL-cholesterol의 비로서 계산되어지는 cardiac risk factor 는 전체적으로 증가하는 경향을 나타내어 probucol의 경구투여로 인해 나타나는 결과는 항산화 물질은 증가시키고 total cholesterol은 감소시키지만 HDL-cholesterol까지 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이는 고 cholesterol 혈증 환자에게는 긍정적인 면도 있지만 허혈성 심질환이나 고지혈증, 당뇨병, 담석증 등에서 볼 수 있는 HDL-cholesterol의 감소를 나타내고 cardiac risk factor를 증가시킴으로서 HDL-cholesterol의 감소로 유발될 수 있는 허혈성 심질환, 동맥경화를 악화시킬 우려가 있는 것으로 나타났다. 이러한 HDL-cholesterol은 Framingham Study와 Miller and Miller의 보고[21]에 의하면 동맥경화증, 허혈성 심질환의 발생은 HDL-cholesterol량이 감소할수록 발병 가능성이 증가한다고 보고하였다. 또한 HDL-cholesterol량은 흡연과 coffee에 의해 감소되지만 운동이나 적당한 alcohol섭취, 발정 호르몬인 estrogen은 증가시키는 인자로 알려져 있다[22].

사람의 말초 조직세포는 HDL에 대한 특이 receptor가 있고 그 활성은 세포내 cholesterol 함량에 따라 조절을 받아 세포내 cholesterol 제거에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다[23]. 이 보고는 HDL의 항 동맥경화 작용을 지지하는 것으로 주목을 받고 있다.

단백질성분의 혈중농도변화는 정상군에 있어서 total protein 과 albumin 모두 통계학적으로 의의가 없었으며 환자군에 있어서는 유의하게 증가하는 양상을 나타내었다. 정상군과 환자군의 비교에서는

total protein 과 albumin 모두 변화 양상이 다르게 나타났다.

이상의 결과로서 정상 성인 20명과 심질환 환자군 13명을 대상으로 항산화제인 probucol 250mg을 1일 2회씩 4주간 투여하고 혈액중 항산화 물질과 지질성분의 변화를 측정하여 관상동맥질환 및 심질환에 있어서 항산화제의 효과와 지질과 단백질 성분의 변화를 실험한 결과 항산화 물질인 TAS, SOD, GPX의 혈중농도는 정상군과 환자군 모두 유의하게 증가하여 통계학적으로 의의가 있는 것으로 나타났으며, 지질성분의 혈중농도 변화는 정상군에 있어서 total cholesterol, HDL-cholesterol, CRF모두 유의한 차이가 없었고, 환자군에 있어서는 total cholesterol, HDL-cholesterol은 유의하게 감소하였고, CRF는 유의하게 증가 하였다. 그리고 total protein 과 albumin에 있어서 정상군은 모두 유의한 차이가 없었고, 환자군에 있어서는 total protein과 albumin 모두 유의하게 증가하였다.

이상의 결과에서 probucol의 경구투여로 항산화 물질의 혈중농도는 농도는 증가시키고 지질성분은 감소시키는 역할을 하는 것으로 나타났다. 그러나 동맥경화증이나 허혈성 심질환을 감소시키는 HDL-cholesterol은 감소시키나 cardiac risk factor는 증가시킴으로서 심질환 환자의 지질성분을 감소시킬 목적으로의 사용은 자제되어야 될 것으로 사료된다. Probucol이 혈중 항산화 물질을 증가시키는 경향은 free radical로 야기되는 동맥경화증이나 허혈성 심질환 이외의 질환에는 유효하겠지만 관련성에 관해서는 추후 더 검토가 되어야 할 것으로 사료된다. 항산화 물질에 대한 국내 연구는 초기단계로서 크게 활성화되지 않고 있는 실정이며 특히 의학분야에서의 연구가 미진한 것은 질환과의 특이성이 낮은 것이 가장 큰 요인으로 사료된다. 따라서 앞으로의 연구과제는 항산화 물질과 관련된 질병의 기전을 규명하고 이를 토대로 임상검사실에서 진단을 위한 검사, 또는 진단보조검사로서 적극적인 시행이 필요하다 하겠다.

Ⅴ. 요 약

본 연구는 free radical로 인하여 야기될 수 있는 질환중의 하나인 관상동맥질환 및 심질환 환자를 대상으로 항산화제 및 지질저하제인 probucol을 투여하여 심질환 인자와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 이를 위해 정상성인 20명과 심질환 환자군 13명을 대상으로 항산화제인 probucol 250mg을 1일 2회씩 4주간 투여하고 혈액중 항산화 물질(total antioxidant status, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, albumin)과 지질성분(total cholesterol, HDL-cholesterol)의 변화를 측정하여 관상동맥질환 및 심질환에 있어서 항산화제의 효과와 지질과 단백질 성분의 변화를 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 항산화 물질인 TAS, SOD, GPX의 혈중농도를 분석한 결과는 정상군과 환자군 모두 유의하게 증가하여 통계학적으로 의의가 있는 것으로 나타났다($p<0.05$). 정상군과 환자군의 비교에서는 TAS의 두 group이 비슷하게 증가하여 유의한 차이를 나타내지 않아 통계학적으로 의의가 없었으며($p>0.05$), SOD, GPX는 유의한 차이를 나타내어 두 group간에 변화양상이 다르게 나타났다($p<0.05$).

2. 지질성분의 혈중농도 변화는 정상군에 있어서 total cholesterol, HDL-cholesterol, CRF 모두 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 환자군에 있어서는 total cholesterol, HDL-cholesterol은 유의하게 감소하였고 ($p<0.05$), CRF는 유의하게 증가 하였다($p<0.05$). 정상군과 환자군간의 비교에서는 total cholesterol, HDL-cholesterol, CRF 모두 유의한 차이를 나타내어 두 group간에 변화 양상이 다르게 나타났다($p<0.05$).

3. Total protein과 albumin에 있어서 정상군은 total protein과 albumin 모두 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 환자군에 있어서는 total protein 과 albumin 모두 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), 정상군과 환자군의 비교에서는 total protein과 albumin 모두 유의한 차이를 나타내어 두 group간에 변화양상이 다르게 나타났다($p < 0.05$).

Ⅵ. 참고 문헌

1. **김영곤, 김영표.** 1997. *프리라디칼*. 여문각. 1-4.

2. **David, J.L.** 1993. Free radicals and disease prevention. *Keats Publishing Inc.* 1-41.

3. **Pryor, W. A.** 1970. Free radical in biological systems. *Scientific American* **223,** 70-83.

4. **Donald, A.** 1998. Free radical and antioxidant protocols. *Humana Press Inc* **108,** 1-70.

5. **McCord, J.M., I. Fridovich.** 1969. Superoxide dismutase:An enzymic function for erythrocuprein(hemocuprein). *J. Biol. Chem* **244,** 6049-6055.

6. **Overley, L.W.** 1986. in Free Radical, Aging and Degenerative Diseases. *Alan R. Liss. New York*. 326.

7. **Touati D.** 1989. Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the katF gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 3271-3275.

8. **Bilinski T., Z. Krawiec, and A. Litwinski.** 1985. *Biochemistery Biophysiology. Res. Commun.* **130,** 533-539.

9. **Paglia, D.E. and W.N. Valentine.** 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. med* **70,** 158-169.

10. **Norbert, W.T.** 1986. Textbook of Clinical Chemistry. *W.B. Saunders Company*. 583-900.

11. **Dam, H. and H. Granados.** 1945. Free radical and deficiency of vitamine E. *Acyta Physiol. Scand* **10,** 162.

12. **Tappel, A.L., W.O. Lundberg, P.D. Boyer.** 1953. Effect of temperature and antioxidant upon the lipoxidase catalyzed oxidation of sodium linoleate. *Arch. Biochem. Biophys* **42,** 293-304.

13. **Grishman, R.** 1954. Oxygen radical production by high press oxygen and radiation. *Science* **119,** 623.

14. **Fee, J.A., J.S. Valentein.** 1977. In Superoxide and superoxide dismutase. *Academic Press.* 19.

15. **Gerald, K.M.** 1995. AHFS (American Hospital Formulary Service) Drug Infomation. *American Society of Health-System. pharmacists, Inc.* **2,** 1183-1186.

16. **Bridges, A.B., N.A. Scott, J.J.F. Belch.** 1991. Probucol, a superoxide free radical scavenger in vitro, *Atherosclerosis.* **89,** 263-265.

17. **Lee, Y.J., H. Daida, H.Yokoi, H. Miyano, J. Takaya, H. Sakurai, H. Mokuno, H. Yamaguchi,** 1996. Effectiveness of Probucol in Preventing Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *Japan Heart.* J 37, 327-332.

18. **Kwon, Y.I., E.J. Seo, H.S. Hong, H.E. Ahn, C.H. Park, M.H. Rho,** 1999. Study on TAS(total antioxidant status) referencerange and relationship between TAS and hypercholesterolemia and diabetes. Kor. Jour. *Clinical Lab Science* 31, 187-196.

19. **Park, J.H., B.Y. Baik, J. Na, S.I. Chun, W.K. Min,** 1997. Measurement of total antioxidant status. Kor. Jour. *Clinico Chemical Science* 8, 78-81.

20. **Harman, D.,** 1995. Role of antioxidant nutrients in aging. *J. Gerontol* **11,** 298.

21. **Gordon T., W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel, T.R. Dawber,** 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. Am. J. Med 62, 707-714.

22. **이귀녕, 김진규.** 1988. ***임상화학***. **의학문화사**. 156-161.

23. **Oram, J.F.** 1983. Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cell. *J. Clin. Invest* **72,** 1611-1621.

Ⅶ. 감사의 글

참된 나 자신을 깨닫는 길이 쉽진 않지만 부족한 한편의 논문을 통해 나 자신을 표현한다 생각하니 더욱 겸손해지고 주위의 여러 사람들을 다시 한번 되돌아보게 됩니다.

먼저 이 논문이 완성되기까지 끝없는 정성과 열정으로 학문의 길로 인도해주신 지도교수 이명숙 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 경황이 없으신 와중에서도 많은 가르침을 주시고 주심을 맡아 주신 이원재 교수님 그리고 바쁘신 가운데서도 세심한 논문지도를 해주신 김영태 교수님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

미생물학과 김진상 교수님, 이훈구 교수님, 송영환 교수님, 최태진 교수님에게도 그간의 많은 가르침에 감사를 드립니다.

그동안 실험실에서 정이 들고 많은 도움을 준 강지희 선생을 비롯한 이선희, 윤지혜 선생 그리고 영주, 미주, 지선, 수민이, 산업대학원생 구태헌, 여선희, 김수진 선생에게도 고마움을 전하고 싶습니다. 오랜 세월동안 성실한 모습으로 서로를 의지하며 생활하는 직장동료들 그리고 관심과 배려를 아끼지 않는 과장님, 한진영 교수님, 순환기내과 김무현 교수님, 직장 선배님들에게도 고마운 마음을 전합니다. 무엇보다 어려운 역경을 극복하고 훌륭한 사회생활을 하는 우리 5남매에게 찬사를 보내고, 그 바탕에는 항상 한알의 밀알론을 생활의 신조로 살아가시는 존경하는 저희 부모님을 비롯한 사랑하는 아내 그리고 딸 다인, 아들 인욱과도 기쁨을 같이 하고 싶습니다.