

## 담도폐색 흰쥐에서 Cholic Acid 투여에 대한 Hepatic Cytochrome P-450 및 b<sub>5</sub>의 변화

이화여자대학교 의과대학 의과학교실

최 금 자

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙·성 낙 응

= Abstract =

### Effects of Exogenous Cholic Acid on Total Hepatic Cytochrome P-450 and b<sub>5</sub> in the Bile Duct-ligated Rats

Kum Ja Choi, M.D.

*Department of Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University*

Young Sook Hong, and Nak Eung Sung

*Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University*

We have investigated the effect of administration of exogenous cholic acid whether total hepatic cytochrome P-450 and b<sub>5</sub> are altered in the bile duct-ligated rats.

The effect of administration of exogenous cholic acid on the hepatic microsomal mixed-function oxidase system is various according to the administration route, dosage and date after administration.

In normal rats, 1ml of 0.5m Mol cholic acid solution per 100g body weight administered intravenously increases hepatic content of cytochrome P-450 and b<sub>5</sub> on the third to fifth days after injection.

Total hepatic cytochrome P-450 and b<sub>5</sub> are decreased after either bile duct ligation or the administration of ethinyl estradiol. In contrast when cholic acid is administered simultaneously with bile duct ligation, the reduction in cytochrome P-450 is relatively prevented.

These effects are similar to the potential of phenobarbital for reversing the bile duct ligation-associated decrease in all components of the mixed function oxidase system.

### 서 론

Hepatic microsomal mixed-function oxidase system은 많은 내인적 및 외인적 물질의 전 대사에 중요

한 역할을 하므로<sup>1)</sup> 각종 간병변은 약물 및 스테로이드나 지방산 같은 다른 mixed-function oxidase system 기질의 대사장애를 초래한다<sup>10)</sup>. Hepatic microsomal cytochrome P-450에는 여러 molecular form이 존재하며<sup>11,12,14)</sup>, 이들은 명백한 기질의 특이성 및

유발가능성이 입증되고 있다.<sup>11,13)</sup>.

흰쥐에서 담도폐색(bile duct ligation)이나 ethinyl estradiol 투여로 유발된 담즙저류(cholestasis)는 hepatic cytochrome P-450량을 감소시키며 이는 hemoprotein 파괴의 증가에 의한다고 보다는 합성물의 저하에 기인한다고 보고되었다<sup>7)8)</sup>. 그러나 Mackinnon 등<sup>9)</sup>은 담즙저류 동물 중에서 담도폐색으로 인한 것에서는 ethylmorphine의 N-demethylation 감소가 mixed-function oxidase system 활성 감소와 비례하지 않는 반면, 정상적인 간내(intrahepatic) 담즙산 농도를 유지하는 ethinyl estradiol에 의한 담즙분비 장애에서는 microsomal drug oxidase와 ethylmorphine의 N-demethylation의 감소가 비례한다고 했다. 즉 담도폐색 후에 나타나는 약물대사와 cytochrome P-450의 감소는 cytochrome P-450합성 자체의 감소이외에 담즙산의 간내축적 같은 부수적 요소들이 약물대사 반응의 억제에 영향을 줄 수 있음을 시사했다.

이에 저자들은 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b5에 대한 담즙산의 직접적인 영향을 알고자 본실험을 시도했다.

## 실험재료 및 방법

### A. 0.5m Mol cholic acid 용액

Cholic acid(Nakarai chemicals, LTD) 40, 856mg을 2ml absolute ethylalcohol에 용해시켜 98ml의 0.9% saline으로 희석했다.

사용한 cholic acid는 정상 흰쥐 bile acid의 60%를 차지하며 인체의 담즙저류시 매우 많이 증가되는<sup>3)4)</sup> weakly detergent bile acid이다. 용량은 정상 흰쥐 간내 함량을 기준으로 했다.

### B. 실험동물

전 실험을 통해 음성 흰쥐(Wistar)를 사용했고 체중은 100~200g 내외를 사용하였다.

실험동물들은 20~22°C의 통풍이 잘되는 방에서 시판 고형사료와 수도물로 사육했다.

### C. 실험방법

#### a) Cholic acid 투여 방법

##### 1) 피하주사

대조군은 체중 100g당 0.9% saline 1ml를, 실험군은 0.5mMol cholic acid 용액을 대퇴부에 5일간 피하주사하고 희생시키기전 24시간동안 금식시킨후 제 5일에 가벼운 ether마취하에서 간장을 절제했다.

##### 2) 정맥주사

대조군은 체중 100g당 0.9% saline 1ml를 실험군은 0.5m Mol cholic acid용액 1ml를 가벼운 ether 마취

하에서 서혜부를 절개하여 대퇴정맥에 직접주사하고 5일간 정상사육후 24시간 금식시켜서 가벼운 ether마취하에서 간장을 절제했다.

#### b) Cholic acid 투여량과 date

대조군은 체중 100g당 0.9% saline 1ml를, 실험군은 각각 0.25m Mol, 0.5m Mol 및 1m Mol cholic acid 1ml를 가벼운 ether마취하에서 우측 서혜부를 절개하여 대퇴정맥에 서서히 주사하고 처치 제 3일과 제 7일에 24시간 금식시킨후 가벼운 ether마취하에서 간을 절제했다.

#### c) 담도를 폐색한 흰쥐에서 cholic acid의 영향

대조군은 체중 100g당 0.9% saline 1ml를 ether 마취하에서 우측 대퇴정맥에 주사하고, 담도폐색군은 가벼운 ether마취하에서 상복부 정중절개에 의해 담도를 이중 결찰했고, 담도폐색과 Cholic acid투여를 함께한 실험군은 상기 두 대조군의 처치를 복합 시행했다. 24시간 금식시킨후 수술 제 3일에 ether마취하에서 간을 절제했다.

#### Microsomal fraction 분리

상기 동물에서 취한 간을 iced-cold isotonic sucrose 로 2회 씻고 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25Mol sucrose로 25% homogenate를 만들었다. 이 homogenate를 15,000×g에서 30분간 원심분리시킨 후 그 상층액을 취하여 다시 105,000×g에서 1시간 원심분리시켜 microsomal 침전물을 0.25Mol sucrose 로 g/ml되게 homogenate 용액을 만들었다.

#### Microsomal cytochrome P-450 및 b5와 Protein 측정법

Microsomal cytochrome P-450은 Omura & Sato 법<sup>12)</sup>에 의하였고 Cytochrome b5는 Smuckler법<sup>13)</sup>으로 측정하였으며, sample의 protein content는 Lowry법<sup>6)</sup>으로 측정하고 이때 standard로는 Bovine Serum Albumine을 사용했다.

## 실험결과

#### a) Cholic Acid 투여 방법

##### 1) 피하주사

Cholic acid 피하주사에 의한 hepatic microsome의 cytochrome P-450과 b5의 변화는 Table 1과 같다.

대조군의 cytochrome P-450은  $3.921 \pm 0.381$  nmoles/mg microsomal protein였고, cholic acid투여군은  $4.766 \pm 0.570$  nmoles/mg microsomal protein으로 양군의 cytochrome치의 차이는 통계적인 의의가 없었다. Cytochrome b5에서도 같은 결과였다.

**Table 1.** Effects of cholic acid administered subcutaneously on total hepatic cytochrome P-450 and b5\*

Group	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	Cytochrome b5 (nmoles/mg protein)
Control#	3.921±0.381	0.109±0.005
Cholic acid#	4.766±0.570**	0.108±0.004**

\* Each value represents Mean±S.D.  
 # Each given for 5 days.  
 \*\* No significantly different from control value.

2) 정맥주사

0.5mMol cholic acid를 정맥주사한 5일후의 hepatic microsomal cytochrome P-450과 b5치의<sup>9</sup> 변화는 Table 2와 같다.

Cytochrome P-450은 대조군에서 2.600±0.140n moles/mg microsomal protein, 실험군은 3.214±0.229nmoles/mg microsomal protein으로 cholic acid 정맥주사후 현저히 증가했으며 (P<0.01), cytochrome b5는 대조군에서 0.046±0.001nmoles/mg microsomal protein, 실험군은 0.069±0.006nmoles/mg microsomal protein으로 cholic acid 정맥주사후 유의있게 증가했다(P<0.01).

**Table 2.** Effects of cholic acid administered intravenously on total hepatic cytochrome P-450 and b5\*

Group	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	Cytochrome b5 (nmoles/mg protein)
Control#	2.600±0.140	0.046±0.001
Cholic acid#	3.214±0.229**	0.069±0.006**

\* Each value represents Mean±S.D.  
 # Each given for 1 day.

**Table 3.** Effects of cholic acid administered intravenously on total hepatic cytochrome P-450 and b5 according to the dosage and date after administration\*

Group	3 days after injection (nmoles/mg protein)		7 days after injection (nmoles/mg protein)	
	Cytochrome P-450	Cytochrome b5	Cytochrome P-450	Cytochrome b5
Control	4.494±0.260	0.560±0.011	5.173±0.595''	0.054±0.005
0.25mMol cholate	5.961±0.181**	0.060±0.008	4.847±0.687#	0.051±0.003
0.5 mMol cholate	6.350±0.456**	0.070±0.009**	5.494±0.952	0.060±0.007
1.0 mMol cholate	5.682±0.512**	0.057±0.009	6.344±0.783	0.067±0.006

\* Each value represents Mean±S.D.  
 \*\* Significantly different from control value. P<0.01.  
 '' Significantly different from 3rd day value. P<0.05.  
 # Significantly different from 3rd day value. P<0.01.

\*\* Significantly different from control value. P<0.01.

b) Cholic acid 투여량 과 date

Cholic acid 투여량 및 경과일에 따른 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b5의 변화는 Table 3과 같다.

제 3 일째 cytochrome P-450은 대조군이 4.494±0.260nmoles/mg microsomal protein이고, cholic acid 함량 0.25mMol, 0.5mMol, 및 1mMol cholic acid 투여군은 각각 5.961±0.181, 6.350±0.456 및 5.682±0.512nmoles/mg microsomal protein으로 대조군보다 모두 유의있게 (P<0.01) 증가했다. 그러나 cytochrome b5는 0.5mMol cholic acid를 투여한 군에서만 유의있게 증가했다(P<0.01).

7일째의 cytochrome P-450 및 b5는 모두 대조군에 비해 유의있는 변화가 없었다. 또한 3일째의 cytochrome P-450과 7일째의 양을 비교하면 대조군에서는 각각 4.494±0.260, 5.173±0.595 n moles/mg microsomal protein으로 7일째에 유의있게 (P<0.05) 증가했고, 0.25mMol cholic acid 투여군들에서는 오히려 7일째에 유의있게 감소되었다(P<0.01).

c) 담도폐색 흰쥐에서 cholic acid 투여의 영향

담도결찰 3일후의 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b5치의 변화는 Table 4와 같다.

Saline을 정맥주사한 대조군의 cytochrome P-450은 3.921±0.381n moles/mg microsomal protein이고, 담도결찰군에서는 2.088±0.365n moles/mg microsomal protein, 담도결찰 및 0.5mMol cholic acid 투여군은 3.061±0.238n moles/mg microsomal protein으로 모두 대조군에 비해 유의있게 감소했다(P<0.01). 그러나 담도결찰과 동시에 cholic acid를 투여한 군에

**Table 4.** Effects of cholic acid administered on total hepatic cytochrome P-450 and b5 in the bile duct ligated-rats\*

Group	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	Cytochrome b5 (nmoles/mg protein)
Control	3.921±0.381	0.109±0.005
Bile duct ligation <sup>##</sup>	2.088±0.365**	0.04 ±0.006**
Bile duct ligation plus cholic acid <sup>##</sup>	3.061±0.238**'	0.066±0.014**'

\* Each value represents Mean±S.D.

<sup>##</sup> After 3 days of bile duct ligation.

\*\* Significantly different from control value. P<0.01.

\*\*' Significantly different from bile duct ligation alone. P<0.01.

서는 담도결찰만을 시행한 군에 비해 유의하게 증가했다(P<0.01).

Cytochrome b5에서도 같은 결과였다.

## 고 찰

간은 microsomal mixed-function oxidase system에 의해 많은 내인적·외인적 물질대사에서 중요한 역할을 하며, 다양한 간질환은 이러한 기능에 장애를 초래한다<sup>8)</sup>.

대부분의 간질환에서 동반되는 cholestasis때의 약물 대사 저하기전은 복합적이어서 cytochrome P-450 apoprotein치의 변화처럼 microsomal membrane에 대한 bile acid의 직접적인 영향등을 포함한다<sup>9)</sup>.

Mixed-function oxidase system의 성분과 활성의 감소에 대해 담즙저류의 병인(pathogenesis of cholestasis)이 어떠한 역할을 하는지는 아직도 불확실하지만 경미한 intrahepatic cholestasis와 심한 extrahepatic cholestasis에서 이 system의 손상 정도는 단순한 이차적 현상이 아니며 hepatic cytochrome P-450의 감소는 합성물의 저하에 기인함이 입증되었다<sup>7)8)9)</sup>.

그러나 이 system의 약리학적 가역성에 대한 중요성과 임상적 적용은 아직도 분명치 않다<sup>2)</sup>.

간세포내 bile salt저류가 cholestasis때 간세포 손상의 주 원인이라는 것은<sup>5)</sup> 주지의 사실이며, Greim등<sup>5)</sup>은 bile acid치의 수준이 microsomal biotransformation system에 장애를 준다고 했다.

Bile acid에는 cholic acid,  $\beta$ -muricholic acid 및 ursodeoxycholic acid 같은 weakly detergent bile acid와 chenodeoxycholic acid 같은 strongly detergent bile acid가 있다<sup>5)</sup>.

정상 흰쥐에서는 cholic acid가 담즙산의 60% 이상을 차지하지만 담도결찰후에는 deoxycholic acid는 사라지고 trihydroxylated bile acids가 정상 4~5배로

증가하며,  $\beta$ -muricholic acid가 30배 증가하여 주 구성원이 된다<sup>5)</sup>. 이처럼 흰쥐에서 담도결찰시 weakly detergent bile acid의 증가는 chenodeoxycholic acid 축적을 막기위한 방어기전으로 간주될 수 있으며 cytochrome P-450 dependent biotransformation system은 strongly detergent chenodeoxycholic acid를 보다 약한 detergent bile acid로 효소학적으로 전환시킴으로써 그 자체를 보호한다고 했다<sup>5)</sup>.

3일간의 담도폐색의 효과는 많은 고분자 단백질 합성을 현저히 증가시키는 반면 hepatic microsomal protein의 주성분이며 분자량 50,000~58,000인 cytochrome P-450양을 50%까지 저하시킨다. 즉 cholestasis가 microsomal cytochrome P-450 protein합성을 저하시키는 것은 특이한 효과로서 전반적인 microsomal membrane damage의 반영은 아니다<sup>7)</sup>.

Mackinnon<sup>9)</sup>등은 담도결찰 동물에서 phenobarbital은 cholestasis와 관계된 mixed-function oxidase system 모든 성분의 감소를 역전시킬 수 있는 가능성이 있다고 했는데 이는 저자들의 실험중 담도결찰 흰쥐에 적당량의 cholic acid를 투여했을 때 비록 양적으로는 적으나 cytochrome P-450 및 b5가 증가한 결과와 비교될 수 있다. 그러나 보다 제한된 microsomal hydroxylation inducer인<sup>9)</sup> 3-Methylcholanthrene은 cytochrome P-450은 증가시키나 cytochrome b5 및 NADH cytochrome C reductase에는 영향을 주지 않는다<sup>2)9)</sup>.

Estrogen은 사람, 쥐 및 영장류의 간기능을 저해하여<sup>3)</sup>, ethinyl estradiol 처치 5일후 cholic acid 합성을 50%로 저하시키는데 이는 cholic acid가 간내 축적되기 때문은 아니다. Cytochrome P-450의 ethinyl estradiol에 의한 감소가 phenobarbital투여로 고정되는 것은 cytochrome P-450 apoproteins의 합성에 있어서 특수한 변화에 기인한다<sup>9)</sup>.

Ethinyl estradiol 처리 흰쥐의 간에서는 bile acids 농도가 증가하지는 않지만 측정불가능한 subcellular

compartment에서 증가될 수도 있으므로 bile acid 합성에 대한 ethinyl estradiol의 방해기전에 bile acid의 참여를 완전히 배제할 수는 없다.

## 결 론

원취에서 hepatic microsomal cytochrome P-450 및 b5에 대한 cholic acid의 직접적인 영향을 알기 위한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 정상 원취에 cholic acid를 투여하면 그 투여방법 투여량 및 투여후 경과일에 따라 cytochrome P-450 및 b5의량은 다르다.

2) Cholic acid 투여로 인한 cytochrome P-450 및 b5 유도효과는 0.5mMol cholic acid 1ml를 체중 100g 당 정맥주사한 후 3~5일에 현저하다.

3) 담도폐색은 cytochrome P-450 및 b5를 50%정도 감소시키며, 이 감소는 담도결찰과 동시에 cholic acid를 최적량 투여하면 줄일 수 있다.

따라서 cholic acid는 cholestasis시 microsomal cytochrome P-450 및 b5의 감소에 직접적인 영향을 준다고 보다는 phenobarbital이나 3-Methylcholanthrene 처럼 microsomal hydroxylation reaction inducer의 역할을 한다고 사료된다.

## —References—

- 1) Baird, M., L. Birnbaum, H. Samis, H. Massie and J. Zimmerman: Allylisopropylacetamide preferentially interacts with the phenobarbital-inducible form of rat hepatic microsomal P-450. *Biochem. Pharmacol.* 25 : 2415, 1976.
- 2) Conney, A.H.; *Pharmac. Rev.* 19 : 317, 1967.
- 3) Davis, R.A. and Kern F. Jr.: Effects of ethinyl estradiol and phenobarbital on bile acid synthesis and biliary bile acid and cholesterol excretion. *Gastroenterology.* 70 : 1130, 1976.
- 4) Dehlinger, P.J. and Schimke, R.: Effects of phenobarbital, 3-Methylcholanthrene, and hematin on the synthesis of protein components of rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.*

- 247 : 1257, 1972.
- 5) Greim, H. et al.: Mechanism of cholestasis. *Gastroenterology.* 63 : 837, 1972.
- 6) Lowry, O.H., N.J. Rorebrough, A.L. Farr and R.L. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
- 7) Mackinnon, A.M. and F.R. Simon: Reduced synthesis of hepatic microsomal cytochrome P-450 in the bile duct ligated rat. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 56 : 437, 1974.
- 8) Mackinnon, A.M. and F.R. Simon: Pharmacological reversal of cholestasis-associated decrease in hepatic cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 24 : 748, 1975.
- 9) Mackinnon, A.M., E. Sutherland and F.R. Simon: Qualitative alteration in hepatic microsomal cytochrome P-450 apoproteins associated with bile duct ligation, and the administration of ethinyl estradiol and 3-Methylcholanthrene. *Biochem. Pharmacol.* 27 : 29, 1978.
- 10) McLuen, E.F. and J.R. Fouts: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 131 : 7, 1961.
- 11) Smuckler, E.A., E. Arrhenius and T. Hulton: Alterations in microsomal electron transport, oxidative N-demethylation and azodye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine induced liver injury. *Biochem. J.* 103 : 55, 1967.
- 12) Omura, T. and R. Sato: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 : 237, 1964.
- 13) Welton, A.F. and S.D. Aust: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 56 : 898, 1974.
- 14) Welton, A.F., F.O. O'Neal, L.C. Chaney and S.D. Aust: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 250 : 5631, 1975.