J. Fd Hyg. Safety 9(2), 75-80(1994)

Ursodeoxycholic acid가 급성 간손상에 미치는 영향

김 강 석
서울대학교 약학대학

Effects of Ursodeoxycholic Acid on Acute Hepatic Lesion

Kang-Seok, Kim
College of Pharmacy, Seoul National University

ABSTRACT—The effects of ursodeoxycholic acid (UDCA) were studied on the hepatotoxicity induced by several hepatotoxicants such as carbonte trachloride, thioacetamide and 1-naphthylisothiocyanate in ICR male mice. UDCA (50 mg/kg, 100 mg/kg) decreased the elevated serum bilirubin in carbon tetrachloride intoxicated mice, the elevated serum AST, alkaline phosphatase in thioacetamide intoxicated mice, the elevated serum AST and bilirubin in 1-naphthylisothiocyanate intoxicated mice.

Keywords □ Ursodeoxycholic acid, Carbon tetrachloride, Thioacetamide, 1-Naphthylisothiocyanate, s-AST, s-ALT, Alkaline phosphatase, Bilirubin.

간손상의 유형을 살펴보면 크게 간 실질 세포의 병변과 혈관 병변으로 대별할 수 있는데 간 실질 세포의 병변을 다시 급성인 경우와 만성인 경우로 나눌 수 있다. 급성인 경우는 세포 독성과 담즙 분비 이상으로 분류할 수 있고 세포 독성은 간세포 괴사 및 지방증으로 다시 분류할 수 있다. 만성인 경우는 경변, 지방증, 만성 괴사성 염증 및 종양으로 분류되어진다. 저농도에서 간 실질 세포의 죽음과 괴사를 일으키지 않으면서 대사 기전에 연관되어 간손상이 진행되는 합리적인 실험적 유형은 ethionine에서 찾아볼 수 있다.[1,2] Ethionine 투여에 의하여 급격한 ATP 수준의 저하가 생기고[3,4] 그 결과 리보핵산, 단백합성의 저하가 일어난다고 알려져 있다.[4-6] 한편, 간세포의 대사 기전에 의한 간독성 발현의 연구는 저용량의 D(+)-galactosamine에서 uridine nucleotide 고갈의 결과 세포 괴사와 관계없이 급성 간세포 손상이 일어난다는 것이 밝혀졌다.[2,7,8]

Carbon tetrachloride는 현재 간세포 괴사 및 지방증을 유발한다고 알려져 있다. 간세포 괴사는 간소엽 주변에서 그리고 중간 부위에서는 거의 발생하지 않는다고 밝혀져 있다. 이러한 부위에 따른 간세포 괴사는 간손상 기전과 연관성을 갖고 있는 것으로 생각된다.[9] Carbon tetrachloride의 간세포 괴사 작용은 간소엽 중심부에서 발생하며 이는 바로 이 부위에서의 효소계가 carbon tetrachloride의 대사에 관여하여 간손상을 일으키는 대사 물질을 생성하기 때문이라고 생각되고 있다.[10] 또한 지방증은 크게 두 가지 형태로 볼 수 있는데 tetracycline과 같은 경우는 미소포형 지방증을 유발하며 간 실질 세포에 많이 존재하는 경우로서 이 경우 지방 비말은 크기가 작으며 간 세포핵은 중심에 존재한다.

Ethanol, methotrexate 같은 경우는 거대 소포형 지방증을 유발하는데 커다란 지방 비말이 자리잡게 되며 세포핵은 주변으로 밀려나게 된다.[9,11,12]

Thioacetamide는 carbon tetrachloride의 경우와 같이 간 실질 세포의 괴사를 일으켜 간손상을 야기하는 물질로 알려져 있으며 그 기전은 간세포의 반투막 성질의 변화를 유발하여 이온들의 불균형과 특히 칼슘 이온의 유입을 초래하여 미토콘드리아에 손상을 줌으로서 세포 괴사 및 죽음을 유도하는 것으로 알려져 있다.

한편, 어떤 물질들은 간 실질 세포의 손상을 작게 혹은 거의 발생시키지 않으면서 담즙의 정체를 일으키는 경우도 있다.[9,13,14] 이런 물질에 의한 담즙 분비

이상은 크게 두가지로 나눌 수 있다. 하나는 담즙 분비 이상으로 문맥 염증을 수반하는 경우이며 가벼운 간실질 세포의 손상을 유발한다. 이 경우 간 세관성 또는 세담과 염증성 담즙 분비 이상으로 불려진다. 1-naphthylisothiocyanate 같은 것이 그 대표적인 물질이다.

한편, ursodeoxycholic acid(UDCA)는 인간과 동물의 담즙에 소량 함유되어 있는 chenodeoxycholic acid (CDCA)의 7β-hydroxy epimer로서[15,16] 현재까지는 생물학적 중요성이 완전히 밝혀지지는 않은 담즙산의 일종이다. 그러나, UDCA의 약용량을 경구 투여 했을 때 용량 의존적으로 담즙산 중 UDCA의 비율을 증가시키며 담즙산 중의 중요한 조성을 차지하게 된다.[17,18] 담석증 환자의 담즙산 pool size의 감소는 UDCA의 투여로 증가되며 아울러 담즙 분비율도 증가되는 것이 밝혀졌다. 이러한 UDCA의 효과는 대변 중으로 담즙산 배설을 증가시키고 인지질의 변화 없이 담즙 중으로 cholesterol 분비를 감소시킨다고 밝혀졌다.

담즙의 cholesterol 포화 상태는 UDCA에 의하여 감소하게 되며 따라서 담석 중의 cholesterol이 서서히 용해되는 효과가 나타난다고 알려져 있다.[19] 이러한 효과는 UDCA의 용량 및 투여 기간과 관계가 있으며 CDCA 자체가 갖는 간독성 및 부작용을 고려하여 CDCA의 대체 약물 및 병용 약물로서의 연구가 진행되어 왔다.[20,21] 또한, primary biliary cirrhosis(PBC) 환자에 있어서 UDCA 장기 투여에 의하여 안전성에 변화 없이 간기능이 개선되었다는 보고도 있다.[22,23] 이와 같이 UDCA는 담즙산으로서 담즙 분비 이상 및 담도 이상에 관하여 집중적으로 연구되어 왔는데 본 실험에서는 carbon tetrachloride, thioacetamide, 1-naphthylisothiocyanate 등의 간독성 물질로 유발된 생쥐의 간손상에 대한 UDCA (vitamin B_1, B_2첨가) 영향을 알아보기 위하여 혈청효소 활성의 측정 및 carbon tetrachloride와 같이 간독성으로 지방증을 유발하는 물질인 경우에는 간내 조직 중의 중성 지방 축적도 아울러 알아보았다.

실험방법

시약

간독성 유발 물질로는 carbon tetrachloride(Merck Co.), thioacetamide(Sigma Chemical Co.), 1-naphthylisothiocyanate(Sigma Chemical Co.)를 사용하였으며 간독성 억제 약물로는 ursodeoxycholic acid (UDCA)를 대웅제약에서 공급받아 사용하였다. 기타의 시약은 특급 제품을 사용하였다. 실험 동물은 ICR계 웅성 생쥐를 서울대학교 실험 동물 사육장에서 공급받아 항온, 항습 동물 사육 조건에서 4주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

임상 화학적 지표의 측정

생화학적 자동분석기(Impact 400E)를 이용하여 s-AST, s-ALT, alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase의 활성은 kinetic method로 cholesterol, triglyceride, bilirubin 등은 endpoint method를 이용하여 측정하였다.

Carbon tetrachloride 유도 간독성에 대한 UDCA의 영향

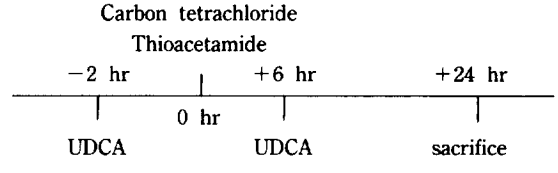
체중 25 g 내외의 ICR계 웅성 생쥐를 1군당 10마리씩 사용하였으며 carbon tetrachloride는 olive oil에 녹여 0.1 ml/kg의 용량으로 경구 투여하였다(Scheme 1). Ursodeoxycholic acid(UDCA)는 저용량으로서 50 mg/kg, 고용량으로서 100 mg/kg을 투여하였으며 이때 vitamin B_1(10 mg/kg)과 B_2(5 mg/kg)를 첨가하여 사용하였다. 채혈 방법은 carbon tetrachloride 투여 24시간 후에 헤파린 처리된 모세관으로 생쥐의 안구 정맥총에서 채혈하여 혈청을 얻었으며 채혈 후 즉시 경추 탈구법으로 치사시킨 후 간을 적출하였으며 혈청 중의 AST, ALT, alkaline phosphatase, bilirubin, triglyceride 및 간 조직 중의 triglyceride 양을 측정하였다.[24]

Thioacetamide 유도 간독성에 대한 UDCA의 영향

실험 동물과 군당 마리수 및 UDCA 투여는 전술한 바와 같으며 thioacetamide는 생리 식염수에 용해하여 50 mg/kg의 용량으로 복강 주사하였다(Scheme 1).

채혈 방법은 앞의 경우와 같으며 혈청 중의 측정 지표는 AST, ALT 및 담도 독성의 주요 지표 중 하

Scheme 1. Time schedule of treatment of carbon tetrachloride, thioacetamide and UDCA

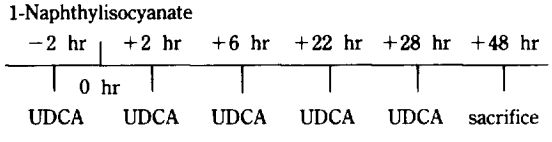


나인 alkaline phosphatase로 하였다.

1-Naphthylisothiocyanate 유도 간독성에 대한 UDCA의 영향

실험 동물과 군당 마리수 및 UDCA 투여는 전술한 경우와 같으며 1-naphthylisothiocyanate는 olive oil에 용해하여 40 mg/kg의 용량으로 경구 투여하였다 (Scheme 2).

Scheme 2. Time schedule of treatment of 1-naphthylisothiocyanate and UDCA



채혈 방법은 앞의 경우와 같으며 측정 지표는 혈청 AST, ALT 및 담즙 분비 이상으로 변화가 예상되는 혈청 효소 중 간 세포막과 담도 세포막에 편재되어 있는 효소인 alkaline phosphatase 및 leucine aminopeptidase를 알아보았고 지방 변화를 보기 위하여 cholesterol을, 그리고 bilirubin을 측정하였다.

통계처리

각 군당 실험 동물은 10마리로 하여 2마리에 해당하는 혈청을 pooling하였으며(n=5) ANOVA'S test를 한 후 Duncan's range test($p<0.05$)를 하였다.

실험결과 및 고찰

Carbon tetrachloride는 대표적인 간독성 유발 물질로서 간손상을 유발하는데 비교적 간편하고 확실

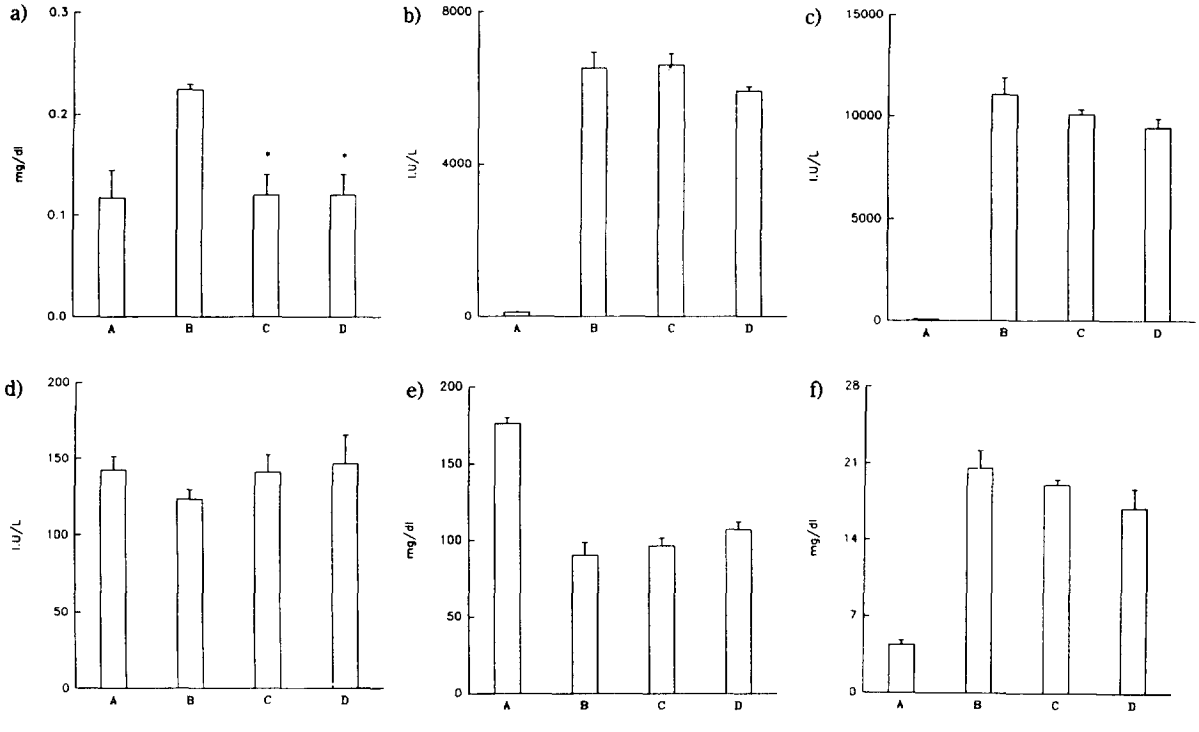


Fig. 1. Effects of UDCA on the serum level of a) bilirubin, b) AST, c) ALT, d) alkaline phosphatase, e) triglyceride and f) liver tissue triglyceride in carbon tetrachloride-intoxicated mice.

a): * A vs B, C, D., B vs C, D: $p<0.05$

A: normal control group, B: carbon tetrachloride group, C: UDCA (low dose) group, D: UDCA (high dose) group.

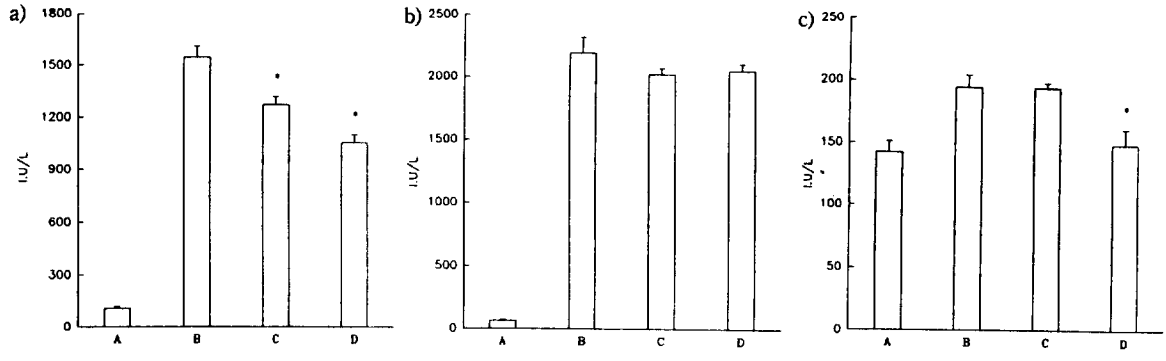


Fig. 2. Effects of UDCA on the serum level of a) AST, b) ALT c) alkaline phosphatase in thioacetamide-intoxicated mice.

a): * A vs B, C, D., B vs C, D: $p<0.05$, c): * A vs B, C., B vs D: $p<0.05$

A: normal control group, B: thioacetamide group, C: UDCA (low dose) group, D: UDCA (high dose) group.

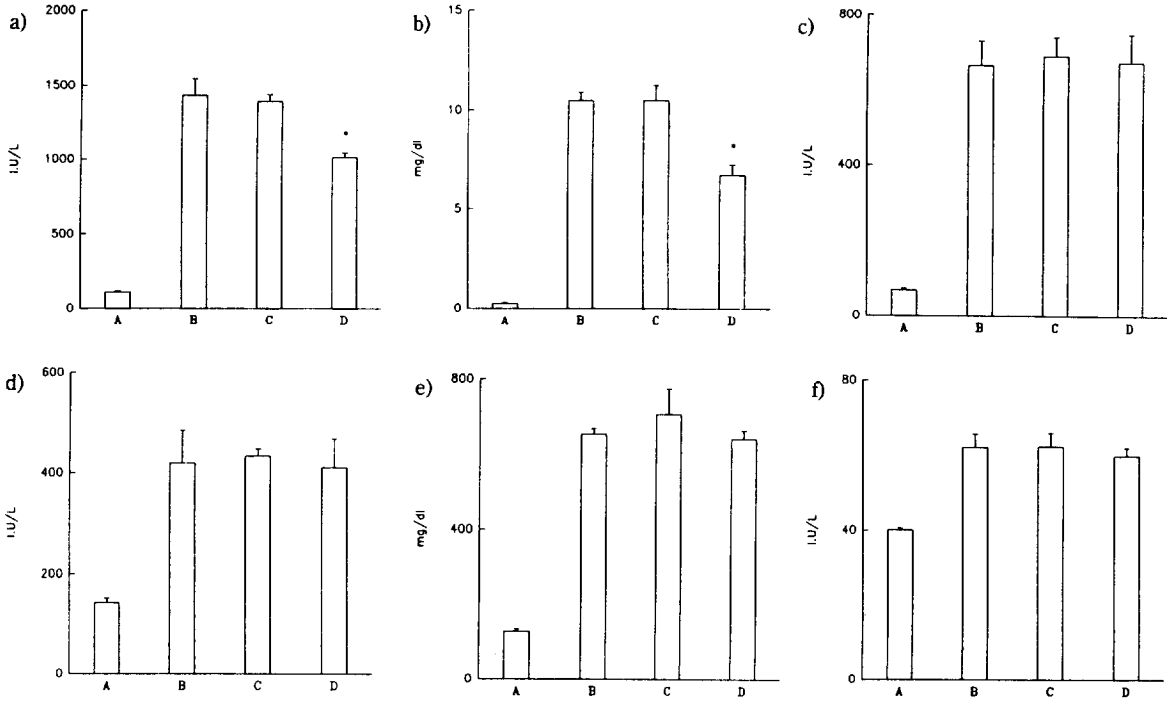


Fig. 3. Effects of UDCA on the serum level of a) AST, b) bilirubin, c) ALT, d) alkaline phosphatase, e) cholesterol, f) LAP(leucine amino peptidase) in 1-naphthylisothiocyanate-intoxicated mice.

a): * A vs B, C, D., B vs D: $p<0.05$, b): * A vs B, C, D., B vs D: $p<0.05$

A: normal control group, B: 1-naphthylisothiocyanate group, C: UDCA (low dose) group, D: UDCA (high dose) group.

하다는 점에서 널리 이용되고 있다. 그 작용은 간 소포체로 대사되어 생긴 자유기가 간 실질 세포내의 단백과 결합하여 세포의 괴사 및 죽음에 관여한다고 생각되고 있다. 현상적으로는 관내 지질의 축적 및 간 실질 세포의 장애가 있다고 보고되고 있다.[25,26]

본 실험에서는 혈청 AST, ALT, bilirubin의 증가, 혈청 triglyceride의 감소 및 간 조직 중의 triglyceride의 증가가 나타났으며 이러한 변화에 대하여 UDCA(vitamin B_1, B_2 첨가 ; 이하시료라고 표기) bilirubin의 증가를 억제하는 경향을 나타냈을 뿐이다 (Fig. 1).

한편, carbon tetrachloride 유도 간 손상에 대한 혈청 효소 활성은 투여 24시간 후에 최고치에 도달하고 36시간 후부터 급속히 감소하여 72시간에서 96시간 후에는 정상 수준에 도달하게 된다. 그런데, 본 실험에서는 carbon tetrachloride 투여 24시간 후에 실험 동물을 희생하여 효소 활성을 보았으므로 효소 활성이 최고치에 도달하였을 때여서 혈청 AST 및 ALT 값이 상당히 높게 나타났다고 본다. 따라서, 독성학적인 측면에서는 별 문제가 없으나 약효를 입증한다는 면에서는 혈청 AST및 ALT의 값이 상당히 높으므로 그 이하의 간손상 측면에서는 시료가 개선 작용을 나타낼 수도 있다는 면이 제외되었다고 볼 수 있다.

Thioacetamide는 간 실질 세포의 소엽 중심부 괴사를 일으키는 물질로 알려져 있으며 본 실험에서 혈청 AST, ALT 및 alkaline phosphatase의 증가가 관찰되었다. 이러한 변화에 대하여 시료는 혈청 AST 및 alkaline phosphatase의 증가를 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 혈청 AST에 대한 시료의 영향이 carbon tetrachloride와 다른 것은 thioacetamide의 세포 괴사에 대한 작용 기전이 carbon tetrachloride의 그것과 같지 않다는 점과 위에서 언급한 carbon tetrachloride의 투여용량이 thioacetamide의 투여용량과 비교하여 상대적인 비교에 차이가 있을 수 있다는 점을 지적해 두고자 한다. Alkaline phosphatase의 가벼운 상승에 대한 영향은 담즙 분비 촉진에 의한 결과라고 생각된다.

1-Naphthylisothiocyanate는 담즙 분비 이상을 유발하는 대표적인 물질로서 본 실험에서는 혈청 AST, ALT, alkaline phosphatase, cholesterol, bilirubin의 현저한 증가가 있었다. 이러한 변화에 대한 시료의 작용은 혈청 AST 및 bilirubin의 증가를 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

한편, alkaline phsphatase 및 leucine aminopeptidase에 대하여 시료의 영향이 나타나지 않는 것은 1-naphthylisothiocyanate 투여에 의한 담즙 분비 이상 상태가 투여한 시료의 용량에서는 큰 영향을 주지 못하기 때문이라고 생각된다.

국문요약

간독성 물질인 carbon tetrachloride, thioacetamide, 1-naphthylisothiocyanate가 웅성 ICR 생쥐에 유발한 간손상에 대하여 ursodeoxycholic acid (UDCA)가 미치는 영향을 연구하였다. 연구 결과 UDCA (50 mg/kg, 100 mg/kg) 투여는 carbon tetrachloride에 의한 생쥐 혈액 중의 bilirubin치의 상승을 억제하였으며 thioacetamide에 의한 혈중 AST 및 alkaline phosphatase 상승을 억제하였고 1-naphthylisothiocyanate에 의한 혈중 AST 및 bilirubin치의 상승도 억제하였다.

참고문헌

1. Farber, E.: Ethionine carcinogenesis. *Adv. Cancer. Res.* **7**, 383 (1963).
2. Farber, J.L., Gill, G., and Konishi, Y.: Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. Am. J. Pathol. **72**, 53 (1973).
3. Shull, K.H.: Hepatic phosphorylase and adenosine triphosphate levels in ethionine treated rats. *J. Biol. Chem.* **237**, 1734 (1962).
4. Villa-Trevino, S., *et.al.*: The role of adenosine triphosphate defficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **238**, 1757 (1963).
5. Villa-Trevino, S., *et. al.*: The inhibition of liver ribonucleic acid systhesis by ethionine. *J. Biol. Chem.* **241**, 4670 (1966).
6. Villa-Trevino, S., *et. al.*: The reversal by adenosine triphosphate of ethionine-induced inhibition of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **61**, 649 (1962).
7. Hisashi, S., John, L.F., Yoichi, and Tongtavuch, A.: D(+)-Galactosamine and acute liver cell injury. *Fed. Proc.* **32**, 1516 (1973).
8. Yoichi, K., Hisashi, M.D., Shinozuka, M.D., John, L. and Farber, M.D.: The inhibition of rat liver nuclear ribonucleic acid synthesis by galactosamine and its reversal by uridine. *Lab. Invest.* **30**, 751 (1974).
9. Zimmerman, H.J.: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. *Hepatotoxicity* (1978).
10. Rees, K.R. and Sinha, K.P.: Blood enzymes in liver injury. *J. Pathol. Bacteriol.*, **80**, 297 (1960).
11. Hoyumpa, A.M., Jr. Green, H.L., Dunn, G.D. and Schenker, S.: Fatty liver-biochemical and clinical considerations. *Am. J. Dig. Dis.*, **20**, 1142 (1975).
12. Scheuer, P.J.: Drugs and toxicants. *Liver biopsy interpretation*. 2nd ed., p. 40 (1973).
13. Klatskin, G.: Toxic and drug-induced hepatitis. *Diseases of the liver* 4th Ed. p. 604 (1975).
14. Popper, H.: Drug-induced hepatic injury. *The liver.* p. 182 (1973).
15. Sjoval, J.: The occurrence of 7B-hydroxylated bile acids in human bile. *Acta. Chem. Scand.* **13**, 711 (1959).
16. Mahowald, T.A., Yin, M.W. and Matschiner, J.T. *et.al.*: Bile acids. VIII. Metabolsm of 7-ketolithocholic acid 24-C in the rat. *J. Biol. Chem.* **230**, 581 (1958).
17. Toni, R. *et. al.*: Metabolism of ursodeoxycholic acid in man. *Gastroenterology* **73**, 1131 (1977).
18. Klas, N., Bo, A., Barbro, L. and Kurt, E.: Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in humans. *Gastroenterology* **85**, 1248 (1983).
19. Ward, A., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight. T.M. and Avery, G.S.: Ursodeoxycholic acid: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **27**, 95 (1984).
20. Richard, R. *et. al.*: Gallstone dissolution treatment with a combination of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic Acids. *Dig. Dis. Sci.* **31**, 1032 (1986).
21. Hans, F., *et. al.*: Comparative efficacy and side effects of ursodeoxycholic acids in dissolving gallstones. *Gastroenterology* **85**, 1257 (1983).
22. Raoul, P., *et. al.*: Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary billary cirrhosis? *Lancet* **1**, 834(1987).
23. Alan, F.H. and Hans, P.: Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Lancet* **2**, 398 (1987).
24. Jordi, F. *et. al.*: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **227**, 497 (1957).
25. Edwards, S., Reynolds, M.D.: Liver parenchymal cell injury. *J. Cell. Biol.* **19**, 139 (1963).
26. Curtis, D., Klaassen and Gabriel, L.P.: Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbontetrachloride, chloroform, 1,1, 2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2018 (1969).