

## 배양 간세포내에서의 콜레스테롤 합성에 대한 담즙산의 저해효과

김 성 완

강원대학교 자연과학대학 생화학과

### Inhibitory Effects of Bile Acids on the Cholesterol Biosynthesis in Cultured Hepatocytes

Sung-Wan Kim

Dept. of Biochemistry, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### Abstract

The present work tested the inhibitory effects of bile acids on the cholesterol biosynthesis and the activity of HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes. The uptakes of bile acids in hepatocytes were increased in according to the different bile acid concentrations and culture times. The rate of cholesterol synthesis in cells were inversely decreased to the bile acid concentrations and culture times. As expected, insulin injection (4 units / 100g body weight) showed an enhancing effect of the cholesterol synthesis and the HMG-CoA reductase activity. The addition of bile acids in medium of insulin-treated hepatocytes also showed the suppressing effect. This effect was directly confirmed in isolated hepatic microsomes by the test of HMG-CoA reductase activity. In the test of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the isolated hepatocyte membrane, only the cholic acid did not stimulate the enzyme system. The reason of such difference is not obvious, but this result indicates that the cholic acid could be absorbed by simple diffusion.

**Key words** : hepatocyte, cholesterol biosynthesis, bile acid, insulin, HMG-CoA reductase, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity

#### 서 론

현대의 질병중 큰 비중을 차지하고 있는 각종 혈관 장애와 심장병에서 문제시되는 체내 콜레스테롤을 감소시키기 위한 많은 연구들은 간세포내 콜레스테롤의 합성과 분해경로의 조절효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A(HMG-CoA) reductase와 cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase의 생화학적 성질과 그들의 조절인자 규명에 집중되어 왔다<sup>1-4</sup>. 근래에 개발된 콜레스테롤 합성저해제인 clofibrate 및 thyroxine 유도체<sup>5,6</sup>와 담즙산 결합체인 cholestyramine<sup>7</sup>의 효과는 단기적으로는 인정될 수 있으나, 이러한 약물들의 부작용에 대해서는 아직 더 많은 연구가 요구되고 있다. 간내 콜레스

테롤의 합성은 생리적인 혈중농도를 유지하기 위한 자가조절로 섭취된 콜레스테롤량에 따라 변화되며 그의 분해는 양적으로 볼때 담즙산으로의 대사가 큰 비중을 차지하고 있다. 세포내에서 일어나는 많은 대사들은 각각의 특유한 조절효소들에 의해 대사속도 및 대사량이 조절되고 있으며 이들 효소들이 자체 대사물들에 의하여 feedback inhibition된은 상기 두가지 효소의 경우에도 동일하다 하겠다.

이미 몇가지 연구들에서 담즙산이 간내 콜레스테롤 합성과 분해에 미치는 효과는 알려져 있으나 이들은 대부분 식이실험을 통한 결과들이며 cholestyramine을 투여한 실험결과 역시 간접적인 효과라 할 수 있다. 본 실험에서는 간세포 배양을 통하여 세포내 콜레스테롤

합성 및 HMG-CoA reductase 활성에 대한 담즙산의 저해효과를 직접적으로 조사하고자 하였으며, 또한 배지 내 존재하는 담즙산들의 간세포내 운반기작을 밝히기 위하여 간세포막의 분리시킨  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

간 perfusion에 사용된 모든 시약은 Sigma 회사제품 및 기타의 특급제품을 사용하였다.

콜레스테롤 측정용 kit시약은 Wako 회사제품을, 담즙산 측정효소인 hydroxysteroid dehydrogenase는 Sigma 회사제품을 사용하였다.

### 간세포의 분리 및 배양

실험의 전과정에서 사용된 쥐는 200~250g의 Sprague-Dawley 웅성을 사용하였고 간세포의 분리는 Davis 방법<sup>8)</sup>을 수정한 간조직을 사용하였으며, 0.05% collagenase 용액으로 간세포를 분리하였다. 분리된 간세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생물질을 함유한 20ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DME)에서 suspension하여 petri dish당  $2\sim 4 \times 10^6$  세포수로 조절하여  $\text{CO}_2$  incubator (5%  $\text{CO}_2$ , 95%  $\text{O}_2$ )에서 시간배양하였다. 세포생존율은 0.4% trypan blue 염색약을 사용했으며 최소 80% 이상이였다.

### 담즙산 및 콜레스테롤의 농도측정

본 실험에서 측정한 담즙산은 cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, 그리고 taurocholic acid의 4종류로서 농도측정은 lwata와 Yamaski방법<sup>9)</sup>에 의한 효소법으로 행하였다. 배양된 세포를 원심분리시켜 얻은 cell pellet에 3ml의 chloroform : methanol (2 : 1) 용액을 가하여 2분간 vortex로 지질을 추출한 후 그중 2ml를 취하여 진공건조시키고 0.3ml의 methanol로 희석시킨후 그중 0.1ml는 담즙산 측정 시료로, 20ml는 콜레스테롤 측정시료로 사용하였다.

### Insulin처리

Insulin에 의한 콜레스테롤합성 및 HMG-CoA reductase의 활성변화를 조사하기 위하여 4units/100g body

weight의 insulin(0.1N Na-citrate buffer, pH 4.3)을 복강주사 시킨 후 2일뒤에 쥐의 간세포를 추출하여 세포 배양을 시간별(1, 3, 6, 12hrs)로 하면서 담즙산 및 콜레스테롤합성 정도를 측정하였다. 배지내 각 petri dish 당 담즙산은 배지 ml당 1mg이 되도록 농도를 조절하여 0.2ml씩 주입하였다.

### 간세포 microsome의 분리

간세포 microsome의 분리는 Shapiro와 Rodwell방법<sup>10)</sup>을 수정하여 사용하였다. 일정시간 배양 후 회수된 세포는 즉시 냉각된 triethanolamine buffer (0.1M triethanolamine-HCl, 0.02M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 2.0mM dithiothreitol로 균질시켰다. 간세포 균질액은 3,000rpm과 33,000rpm으로 각각 10분씩 원심분리하여 핵과 mitochondria를 제거한 후 최종적으로 40,000rpm, 60분간 초원심분리하여 microsomal pellet을 얻었다. Microsome pellet에 1ml의 상기 buffer를 가하여 suspension 시킨 후 단백질정량<sup>11)</sup>을 하여 100~200mg protein/ml 되게 농도를 조절하여 분석시까지  $-80^\circ\text{C}$  deep freezer에서 급냉동시켜 보관하였다.

### HMG-CoA reductase의 활성측정

HMG-CoA reductase의 활성측정은 Hulcher와 Oleson방법<sup>12)</sup>으로 행하였다. 반응혼합액은 20ml씩의 HMG-CoA(150nM), NADP(2 $\mu\text{M}$ ), glucose-6-phosphate (G-6-P)(3 $\mu\text{M}$ ), g-6-P-dehydrogenase (2 units), bile acids (0.1~0.6mM)와 100 $\mu\text{l}$  microsomal protein(100~200  $\mu\text{g/ml}$ )을 0.8ml의 0.1M triethanolamine-0.02M EDTA (pH 7.4)에 첨가하여 최종부피를 1ml로 하였다.  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응 후 10mM sodium arsenite용액을 20 $\mu\text{l}$ 첨가하고, 1분후 3% sodium tungstate를 함유한 0.1ml의 2M citrate buffer (pH 3.5)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 원심분리로 단백질침전을 시킨 후 상등액 1ml에 0.4M sodium arsenite를 첨가하여 5분동안 생성되는 dithiol-arsenite complex를 412nm에서 측정하여 1분당 생성된 CoA-SH량을 계산하였다.

### $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase 활성측정

간세포막의 분리는 24시간 배양시킨 간세포를 액체질소로 파괴하여 Pressley 등의 방법<sup>13)</sup>으로 행하였다. 분리된 세포막 용액의 단백질 농도는 Lowry<sup>14)</sup>방법으로

100~200µg/ml되게 조절하였다.

상기효소의 활성 측정은 Muallem과 Karlsh방법<sup>14)</sup>으로 행한 후 ATP가수분해에서 생긴 phosphorus를 Fiske-Subbarow법<sup>15)</sup>으로 조사하였다. 분리된 세포막용액과 담즙산용액을 1 : 1로 혼합하여 25°C, 30분간(pH 7.2) 예비배양한 후 그중 100µl을 취하여 900µl의 반응액 (130mM NaCl, 20mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM ATP, 25mM histidine, 0.2mM EGTA[ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N, N, N', N' tetraacetic acid], 3mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.5)에 가하고 37°C, 30분간 반응시켰다. 300µl의 30% TCA(trichloroacetic acid) 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 0.5ml 상등액에 0.5ml ammonium-molybdate (0.5% w/v), 1.0ml Fiske-Subbarow 용액을 첨가하여 45분간 암실에서 반응시킨 후 생성된 phosphorus를 691nm에서 측정하여 효소활성을 n mole Pi/h/mg protein의 단위로 표시하였다.

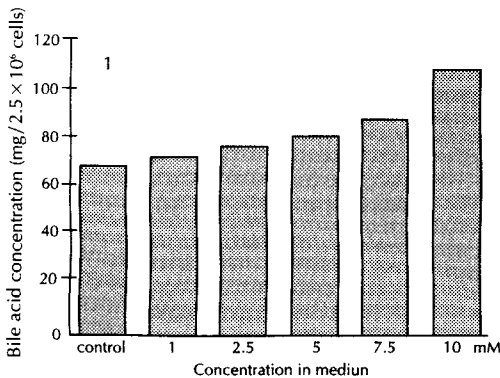
측정자료의 통계처리

본 실험의 모든 data는 duplicate sample의 결과이며, t-test로 나타내었다.

결과 및 고찰

배지내 농도 및 배양시간에 따른 담즙산의 흡수

Fig. 1에서는 간세포를 30분간 배양한 후 1~10mM까지의 cholic acid농도 (Fig. 1-1)에 있어서, 그리고



0~180분까지의 배양시간에 따른 세포내로의 담즙산 흡수에 대한 증가경향 (Fig. 1-2)를 보여주고 있다. 보고된 바에 의하면 간세포내 담즙산들의 합성은 각각의 cholic acid의 흡수에 따라 서로 경쟁적으로 다른 담즙산 합성을 저해하였으며 그 반대의 경우도 동일하였다<sup>16,17)</sup>. 그러므로 상기 결과에서 나타난 cholic acid의 흡수증가 역시 콜레스테롤로부터의 담즙산합성을 저해할것으로 사료되어 진다.

배양시간에 따른 담즙산 흡수 역시 3시간까지 연속적인 증가를 보이고 있으나 taurocholic acid는 전반적으로 cholic acid보다 낮은 정도를 보여 주고 있다.

이러한 차이는 간세포내 1차 산물인 cholic acid와 혈액내 담즙산 운반체인 taurocholic acid의 상호 상이한 성질에 있을 것으로 사료된다<sup>18)</sup>.

배지내 담즙산 농도 및 배양시간에 따른 콜레스테롤 농도변화

Fig. 2에서는 배지내 담즙산 농도와 배양시간의 차이에 따른 간세포내 콜레스테롤 농도의 저하를 보여주고 있다. 이러한 담즙산에 의한 콜레스테롤 감소는 생리적인 조건하에서도 재흡수된 담즙산이 담즙산의 자체생산을 저해하는데 기인될 수 있다<sup>16)</sup>. 즉, 담즙산 합성의 저해는 콜레스테롤 분해저해를 통하여 그의 합성이 저하되는 자가조절<sup>19)</sup>에 기인될 수 있으며 고콜레스테롤혈증의 경우에 콜레스테롤 섭취량의 조절만으로는 간세포내 생산을 줄이는 유일한 요인이 될 수 없음이 이미 다른 실험에서도 밝혀져 있다<sup>20)</sup>.

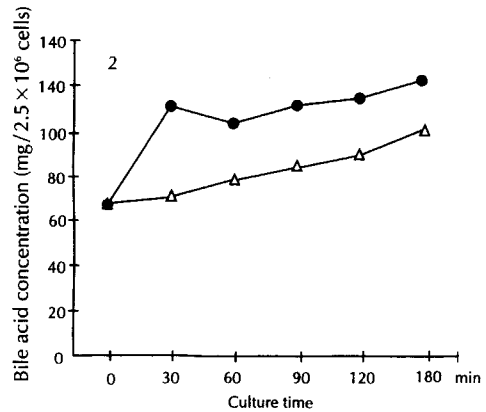
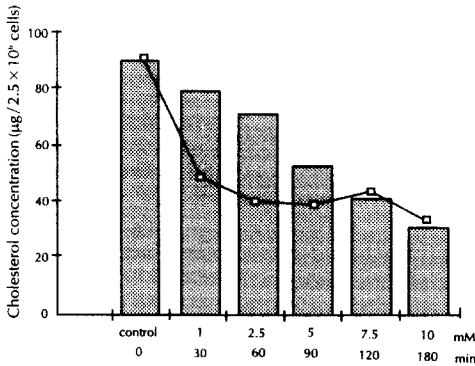


Fig. 1. Uptakes of cholic and taurocholic acid from the various concentrations (Fig. 1-1) and time-dependent (10mM) cultured medium (Fig. 1-2).

■ dependent on the bile acid concentration in medium ●—● cholic acid △—△ taurocholic acid dependent on the culture time

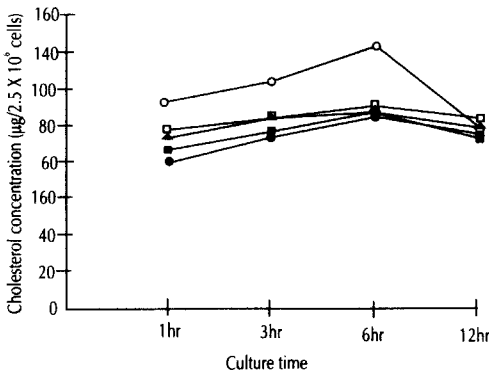


**Fig. 2. Change of cholesterol concentration in the rat hepatocytes dependent on the different bile acid concentrations or culture times.**

■ dependent on the bile acid concentration in medium □—□ dependent on the culture time

Insulin에 의한 콜레스테롤합성 및 HMG-CoA reductase 활성촉진에 대한 담즙산의 저해효과

간내 콜레스테롤 합성의 조절효소인 HMG-CoA reductase의 합성은 thyroid호르몬이나 steroid호르몬에 의해 직접적인 영향을 받고 있다<sup>20</sup>. HMG-CoA reductase의 단기적인 활성은 reductase phosphatase와 kinase에 의한 탈인산화와 인산화 반응으로 활성과 비활성의 형태로 조절되고 있다<sup>21,22</sup>. Fig. 3에서는 insulin 주사 (4 units/100g body weight) 2일 후부터 배양을 했을 때 배지내 담즙산들에 의한 콜레스테롤 합성의 저해효과를 보여주고 있다. Insulin에 의한 간세포내 콜레스



**Fig. 3. Inhibitory effects of bile acids on the cholesterol synthesis during the time-dependent culture after 2 days of insulin injection (4 units/100g body weight).**

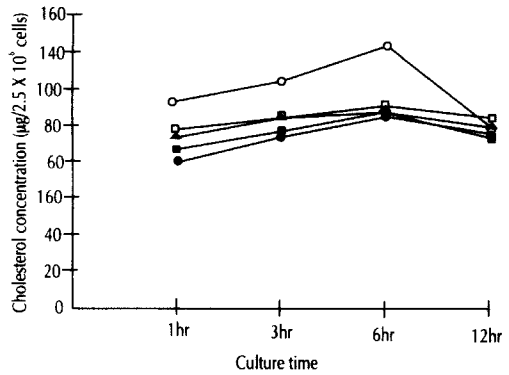
● cholic acid ■ deoxycholic acid  
▲ glycocholic acid □ taurocholic acid  
○ No cholic acid

테롤농도는 배양 후 6시간까지 크게 상승하였으나 ml 배지당 1mg의 담즙산 첨가의 경우에는 상승 억제효과를 보였으나 담즙산들간의 차이는 크게 없었다.

Fig. 4에서는 예상대로 insulin은 HMG-CoA reductase활성을 촉진시키는 반면 배지내에 담즙산을 함유시키면, HMG-CoA reductase의 활성은 저해되고 있음을 보여주고 있다.

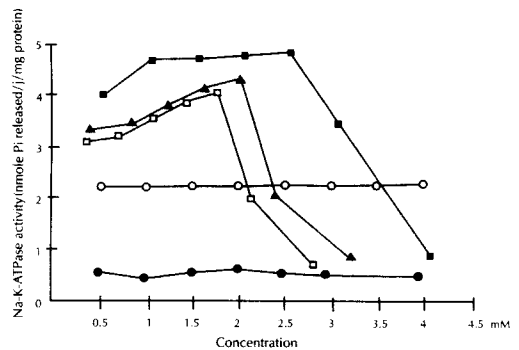
**간세포막내 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase의 활성측정**

세포막내 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase활성은 세포막내외의 K<sup>+</sup>농도에 의해 크게 영향을 받으며 특히, 세포외액의 K<sup>+</sup>농도가 낮을때 그활성이 크게 촉진된다<sup>13</sup>. 간세포내로



**Fig. 4. Inhibitory effects of bile acids on the HMG-CoA reductase activity in the isolated microsomes during the time-dependent culture after 2 days of insulin injection (4 units/100g body weight).**

● cholic acid ■ deoxycholic acid  
▲ glycocholic acid □ taurocholic acid  
○ No cholic acid



**Fig. 5. Change of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the isolated hepatocytes membrane dependent on the different bile acid concentrations.**

● cholic acid ■ deoxycholic acid  
▲ glycocholic acid □ taurocholic acid  
○ No cholic acid

의 deoxycholic acid 운반 역시 상기 효소에 의한 능동 수송으로 행해짐<sup>23)</sup>이 이미 밝혀져 있는데 분리한 간세포막에서 담즙산들의 운반을 위한  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase활성의 측정결과를 Fig. 5에 나타내었다. 효소활성의 증가는 모든 담즙산들에서 1.8~2.5mM의 담즙산 농도까지 높은 수준을 유지하였으나 cholic acid만은 전혀 영향을 주지 않았다. 이러한 사실의 원인은 불확실하나 콜레스테롤 대사의 1차 산물로서의 cholic acid는 다른 담즙산과는 달리 단순확산에 의한 수도 있겠으며 이에 대한 정확한 이동기작은 차후의 실험에서 행해질 것이다.

## 요 약

간세포내 두가지 microsome효소인 HMG-CoA reductase와 cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase는 콜레스테롤 합성과 담즙산으로의 분해의 조절효소임은 이미 알려진 사실이다. 본 실험에서는 콜레스테롤의 대사산물인 4종류 담즙산들이 간세포내의 콜레스테롤 합성 및 HMG-CoA reductase활성에 미치는 효과를 조사하였다. 간세포의 배양에서 간세포로의 담즙산 흡수는 배지내 농도(1mM~10mM)와 배양시간(1/2~3hr)의 차이에 따라 비례적으로 증가하였다. 콜레스테롤 합성저해에 대한 담즙산의 효과는 배지내 담즙산의 농도 및 배양시간에 따라 크게 감소하였다. 분리시킨 microsome내 HMG-CoA reductase의 활성에 대한 담즙산의 저해 효과는 insulin 투여에 의하여 효소활성을 촉진시킨 경우에서도 뚜렷하였으며 콜레스테롤 합성 역시 저하되었다. 분리시킨 간세포막 내  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase의 활성은 1.8~2.5mM정도의 배지내 담즙산 농도까지 증가함을 보였으나 cholic acid 흡수는 상기 효소의 활성에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 아직 불분명하나 1차 대사산물인 cholic acid의 흡수는 단순확산에 의한 것으로 사료되며 이에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

## 감사의 글

본 연구는 1991년도 한국과학재단 연구비에 의하여 이루어진 결과의 일부로서 심심한 감사를 드립니다.

## 문 헌

1. Danielsson, H., Kalls, I. and Wikvall, K. : Regulation of hydroxylation in biosynthesis of bile acids. *J. Biol. Chem.*, **259**(7), 4258(1984)
2. George, R., Davis, P. J., Luong, L. and Poznansky, M. J. : Cholesterol-mediated regulation of HMG-CoA reductase in microsomes from human skin fibroblasts and rat liver. *Biochem. Cell Biol.*, **68**, 674(1989)
3. Reihner, E., Björkhem, I., Angelin, G., Ewerth, S. and Einarsson, K. : Bile acid synthesis in humans : regulation of hepatic microsomal cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity. *Gastroenterol.*, **97**, 1498(1989)
4. Thompson, S. L., Burrows, R., Laub, R. J. and Krisans, S. K. : Cholesterol synthesis in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.*, **262**(36), 17420(1987)
5. Olsson, A. and Lang, P. : One year of the effect of bezafibrate on serum lipoprotein concentrations in hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **31**, 429(1978)
6. Pierides, F., Alvarez, K. D. and Skillen, A. : Clofibrate-induced muscle damage on patients with chronic renal failure. *Lancet*, **2**, 1279(1975)
7. Clarke, C. F., Edwards, P. A., Lan, S. F., Tanaka, R. D. and Fogelman, A. M. : Regulation of HMG-CoA reductase mRNA levels in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 3305(1983)
8. Davis, R. A. : Lipoprotein synthesis and secretion by cultured hepatocytes. *Meth. Enzymol.*, **129**, 272(1986)
9. Iwata, T. and Yamaski, K. : Enzymatic determination and thin-layer chromatography of bile acids in blood. *J. Biochem.*, **56**, 424(1964)
10. Shapiro, D. J. and Rodwell, V. W. : Regulation of hepatic HMG-CoA reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.*, **246**, 3210(1971)
11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
12. Hulcher, F. H. and Oleson, W. H. : Simplified spectrophotometric assay for microsomal HMG-CoA reductase by measurement of coenzyme A. *J. Lip. Res.*, **14**, 625(1973)
13. Pressley, T. A., Haber, R. S., Loeb, J. N., Edelman, I. S. and Ismail-Belgi, F. : Stimulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -activated adenosine triphosphate and active transport by low external  $\text{K}^+$  in a rat liver cell line. *J. Gen. Physiol.*, **87**, 591(1986)
14. Muallem, S. and Karlish, S. J. D. : Regulatory interaction between calmodulin and ATP on the red cell  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *Biochem. Biophys. Acta.*, **597**, 631(1980)
15. Fiske, C. H. and Subbarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375(1925)
16. Einarsson, K., Nilsell, K., Leijed, B. and Angelin, B. : Influence of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver. *N. Engl. J.*, **313**, 277

- (1985)
17. Gregory, D. H., Vlahcevic, E. R., Prugh, M. F. and Swell, L. : Mechanisms of secretion of biliary lipids : role of a microtubular system in hepatocellular transport of biliary lipids in the rat. *Gastroenterol.*, **74**, 93 (1978)
  18. David, W. H. and Martin, C. C. : Chemical species of lipids in bile. *Hepatology*, **12**(3), 68(1990)
  19. Anabalb, R. E., Hardgrave, J. E. and Scallen, T. J. : The *in vivo* regulation of rat liver HMG-CoA reductase. *J. Biol. Chem.*, **256**(2), 571(1981)
  20. Panini, S. R., Gupta, A., Sexton, R. C., Parish, E. J. and Rudney, H. : Regulation of sterol biosynthesis and of HMG-CoA reductase activity in cultured cells by progesterone. *J. Biol. Chem.*, **262**(30), 14435 (1987)
  21. Beg, Z. H., Stonik, J. A. and Brewer, H. B. : HMG-CoA reductase : regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**(8), 3678(1978)
  22. Ingebritsen, T. S., Parker, R. A. and Gibson, D. M. : Regulation of liver HMG-CoA reductase by bicyclic phosphorylation system. *J. Biol. Chem.*, **256**(3), 1138 (1981)
  23. Ismail-Belgi, F., Pressley, T. A., Haber, R. S., Gick, G. G., Loeb, J. N. and Edelman, I. S. : Kinetic analysis of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-activated adenosine triphosphatase induced by low external K<sup>+</sup> in a rat liver cell line. *J. Biol. Chem.*, **263** (17), 8162(1988)
- (1992년 6월 4일 접수)