

韓國營養學會誌 24(6) : 485~495, 1991
Korean J Nutrition 24(6) : 485~495, 1991

식이지질의 조절이 흰쥐 적출관류간장에 의한 Ethoxycoumarin 대사기능에 미치는 영향

이기완¹⁾ · 이기열²⁾ · 차영남³⁾

1) 경원대학교 식품영양학과

2) 연세대학교 식품영양학과

3) 인하대학교 의과대학 약리학교실

Effects of Dietary Lipid on Ethoxycoumarin Metabolism in Isolated Perfused Rat Liver

Lee, Ki Wan¹⁾ · Lee, Ki Yul²⁾ · Cha, Young Nam³⁾

1) Department of Food & Nutrition, Kyungwon University

2) Department of Food & Nutrition, Yonsei University

3) Department of Pharmacology, Medical School, Inha University

ABSTRACT

Using isolated perfused livers obtained from rats that have been fed saturated and unsaturated fatty acid diets, the rates of hepatic microsomal oxidation of 7-ethoxycoumarin(EC) to 7-hydroxycoumarin(HC) and the rates of subsequent conjugation of the produced HC to its glucuronide and sulfate esters have been determined.

Prior to preparing the isolated perfused livers, rats were fed either fat free diet, 10% beef tallow diet, or 10% corn oil diet for 3 weeks. The rates of oxidation from EC to HC and also of the subsequent glucuronidation of HC were higher in the corn oil diet group than those found for the fat free and beef tallow diet groups. When the concentrations of infusing EC were increased stepwise, there was a dose-dependent increase for the release of the glucuronide form of HC metabolites at the expense of the sulfate ester form. This dose dependent shift observed for the corn oil group was more significant than those found for other groups.

These results indicate that corn oil feeding has produced enhancement in the rates of hepatic microsomal drug oxidation and glucuronide conjugation, the reactions catalyzed by enzymes embedded in the hepatic microsomal membranes.

KEY WORDS : dietary lipids · isolated perfused rat liver · ethoxycoumarin o-deethylation and conjugation.

제작일자 : 1991년 11월 10일

서 론

성인병과 관련된 지방 섭취의 문제가 식생활에서 중요한 관심의 대상이 된 아래로 최근에는 식이지방의 종류 및 섭취량이 생체내로 흡수된 약물과 발암물질 등 기타 외부 물질의 생체내 대사에 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다.

인지질 세포막으로 구성된 생체내로 쉽게 흡수되는 약물 또는 독성물질의 대부분은 지용성으로 생체내 대사과정을 통하여 수용성으로 전환되어야 약효 또는 독성작용을 나타내기도 하며, 또한 배설이 용이하게 된다. 이러한 생체내 약물대사 과정은 일반적으로 전기 약물대사 단계인 Phase I 반응과 후기 단계인 Phase II 반응은 구분되며 주로 간장에서 이루어진다¹⁻⁵⁾. 즉 전기 Phase I 반응은 간세포의 소포체막내에 존재하는 cytochrome P-450을 포함하는 효소계인 mixed function oxidase(MFO) system에 의해 촉매되며, 이 과정에서 지용성 약물은 산화되어 관능기를 갖게 되며 반응성이 강한 활성 및 독성물질로 전환된다²⁾. 한편 후기 Phase II 반응은 전기 Phase I 반응에서 생성된 반응성이 강한 일차 대사산물에 세포내 고유의 수용성 보조인자인 UDP-glucuronic acid, activated sulfate 및 glutathione 등을 결합시키는 포함반응으로서 지용성이던 약물은 이들 두 단계 대사과정을 거치면서 약물 자체는 불활성화 및 해독되며, 수용성이 크게 증가되어 신장을 통하여 쉽게 배설될 수 있게 된다³⁾. 이러한 후기 포함반응 중 UDP-glucuronyl transferase(UDPGT)에 의한 glucuronide 포함반응만이 유일하게 소포체막내에서 일어나며 sulfate 포함 및 glutathione 포함반응은 세포질내에서 일어난다³⁾. 특히 간세포의 소포체막내에서 이루어지는 약물대사 양상을 좌우하는 MFO system과 UDPGT 효소의 활성도는 소포체막의 지질 조성과 유동성에 의해 영향을 받으며, 이에 따라서 전반적인 약물대사의 활성도가 좌우된다고 알려져 있다^{6,7)}.

한편 소포체막은 인지질이 주성분인 이중막(bi-

layer matrix) 구조로 이루어졌으며^{8,9)}, 인지질의 꿀격인 glycerol의 beta 위치의 지방산은 주로 linoleic acid로 ester화되어 있다¹⁰⁾. 그러나 소포체막의 ester화된 지방산의 양과 조성은 식이지방에 포함된 포화지방산 및 불포화지방산의 종류 및 섭취량에 의해 공급, 조절된다^{11,12)}. 그리하여 섭취하는 식이지방의 함량 및 지방산의 구성 성분에 따라서 소포체막 인지질속에 있는 약물대사 효소들의 활성도는 직접 또는 간접적인 영향을 받을 수 있다고 보고되었다¹³⁾.

본 연구에서는 섭취하는 식이지질의 종류에 따라 간세포 소포체막내 인지질의 조성이 변하여 소포체막내에 존재하는 약물대사 관련 효소들의 활성도에 영향을 미칠 것으로 예상하여, 이에 따른 약물대사의 Phase I과 Phase II 반응속도에 미치는 영향을 포괄적으로 알아보고자 적출간장관류법을 이용하였다. 따라서 실험동물의 식이를 불포화지방산(linoleic acid)의 공급원인 옥수수기름(P/S ratio : 4.8)을 함유하는 옥수수기름 식이군과 포화지방산의 공급원인 쇠기름(P/S ratio : 0.1)을 함유하는 쇠기름 식이군, 그리고 지방 대신 서당(sucrose)을 함유하는 무지방 식이군으로 구분하여 훈취에 21일간 섭취시켰으며, 각 실험식이군에서 간장을 적출하여 모델약물인 7-ethoxycoumarin (EC)을 간장에 관류시키는 적출간장관류법¹⁴⁾을 이용하여 포괄적인 약물대사에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 즉 적출간장관류법을 이용하여 주입된 EC는 간세포 소포체막내의 MFO system에 의해 전기 대사과정인 o-deethylation에 의하여 7-hydroxycoumarin(HC)으로 산화된 후 곧 이어 후기 대사과정인 포함반응에 의하여 glucuronide나 sulfate ester 등의 수용성이 큰 포함체로 전환되어 간세포 밖으로 배출된다. 따라서 본 실험에서는 간을 통과한 관류액내의 EC 대사산물(free HC, glucuronide HC, sulfate HC) 각각의 농도를 측정하여 Phase I 반응과 Phase II 반응 속도를 동시에 포괄적으로 관찰하므로써, 섭취하는 식이지질의 종류에 따른 즉 간세포 소포체막의 인지질 조성 변화에 따른 EC의 대사양상 차이를 비교하여 식이지질의 종류와 약물대사 속도와의 상호 연관

성에 대하여 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 융성 흰쥐를 사용하였다. 이유 직후부터 기본 분말사료(Purina, Korea)와 물을 제한없이 먹게 하였으며, 사육실 조광은 낮과 밤을 12시간 주기로 조정하였다. 체중이 90-110g 정도되는 어린 흰쥐를 실험식이의

종류에 따라 3군으로 나누고 각 군당 25 마리씩 되게 하였으며, 실험동물은 hanging stainless steel cage당 3마리씩 넣고 1일간 절식 시킨 후 실험식 이를 주기 시작하였다. 각 실험동물은 실험식이 섭취 3주일 경과 후 부터 차례대로 매일 한마리씩 희생시켜 실험에 사용하였다. 이와 함께 실험식이의 종류에 따른 흰쥐의 체중 및 실험 도중 채취한 간부계의 변화를 측정하였으며, 이는 실험결과의 계산에 이용하였다.

2. 실험식이의 조성

실험식이의 조성은 Table 1에서와 같이 무지방 식이군, 쇠기름 식이군 및 옥수수기름 식이군의 3군으로 분류하였다¹⁵⁾. 그리고 지방의 함유율은 전체 식이무게의 10% 수준으로 조정하였으며, 무지방 식이군에서는 지방 대신 동일 무게의 서당으로 대치하였고, 쇠기름 식이군은 식용 쇠기름을, 옥수수기름 식이군은 옥수수기름(Sigma, USA)을 사용하였다. 한편 본 실험에서 사용한 지방급원인 쇠기름과 옥수수기름의 지방산 조성은 Table 2와 같다¹⁶⁾¹⁷⁾.

3. 적률관류간장 실험법

실험동물에 sodium secobarbital(30mg/kg B.W.)을 복강주사하여 마취시킨 후 복부 정중선을 절개하였다. 간문액을 통해 관류용액을 주입하면서 즉시 후대정맥을 절단하여 간으로 부터 혈액을

Table 1. Composition of experimental diets
(unit : wt %)

Ingradiens	Experimental animal groups		
	Fat free	Beef tallow	Corn oil
Carbohydrate			
mixture ¹	75	65	65
Cascin (D,L-methionine)	18 (0.1)	18 (0.1)	18 (0.1)
Fat			
Beef tallow	—	10	—
Corn oil	—	—	10
Salt mixture ³	4	4	4
Vitamin mixture ⁴	1	1	1
Cellulflour	2	2	2

1. Carbohydrate mixture ; starch : dextrose : sucrose=70 : 20 : 10
2. Sucrose in fat-free group ; same amount of sucrose substitute the amount of the fat.
3. Salt mixture(g/100g salt mixture) ; calcium carbonate, precipitated 29.29 ; calcium phosphate, dibasic 0.43 ; potassium phosphate, monobasic 34.31 ; sodium chloride 25.06 ; magnesium sulfate · 7H₂O 9.98 ; ferric citrate · 6H₂O 0.623 ; cupric sulfate · 5H₂O 0.516 ; magnesium sulfate · H₂O 0.121 ; zinc chloride 0.020 ; potassium iodide 0.0005 ; ammonium molybdate 0.0025 ; sodium selenite · 5H₂O 0.01.
4. Vitamin mixture(mg/Kg diet) ; thiamin chloride, 5 ; riboflavin, 5 ; niacinamide 25 ; calcium pantothenate, 20 ; pyridoxin chloride, 5 ; folic acid, 0.5 ; biotin, 0.2 ; cyanocobalamin, 0.03 ; DL-α-tocopherol acetate(in I.U.), 100 ; retinylpalmitate(in I.U.), 4000 ; ascorbic acid, 50 ; cholecalciferol(in I.U.), 400 ; cholin chloride, 2000 ; menadione, 0.5 ; inositol, 100.

Table 2. Fatty acid compositions of corn oil and beef tallow diets
(unit : wt %)

Fatty acid	Dietary lipids	
	Beef tallow	Corn oil
14 : 0	3.3	—
16 : 0	25.5	9.4
16 : 1	3.4	0.1
18 : 0	21.6	1.9
18 : 1	38.7	25.5
18 : 2	2.2	55.2
18 : 3	0.6	1.3
saturated	50.4	11.3
monounsaturated	42.4	25.8
polyunsaturated	2.8	55.2
p/s ratio	0.1	4.8

식이지질의 조절이 약물대사율에 미치는 영향

제거하여 간이 팽배하지 않도록하고, 간을 통과한 관류용액은 대정맥을 통하여 유출되도록 하였다. 이때의 관류용액은 glucose가 함유된 Krebs-Henseleit bicarbonate(KHB) 완충용액을 95 % 산소와 5 % 이산화탄소의 혼합가스로 포화시킨 상태에서 사용하였다¹⁸⁾. 관류속도는 간무게 1g당 3~4ml/min로 조정하였고, 간을 통과하는 관류액의 온도는 37°C를 유지하도록 하였으며, 한번 관류시킨 용액은 재순환시키지 않았다. 간을 주변의 다른 조직으로부터 분리하여 perfusion block으로 옮긴 후 생리적 평형을 유지시키기 위하여 처음 15분간은 KHB 용액만을 관류시켰으며, 계속하여 EC (Sigma, USA)을 25, 50, 100 및 200μM의 농도로 용해시킨 KHB 용액으로 차례로 각 농도마다 일정시간 관류시켰으며, 간을 통과한 관류액은 5분간격으로 채취하여 분석에 사용하였다.

4. 시료의 처리 및 분석

관류액 중에 함유된 EC의 산화된 대사산물인 HC의 농도는 Cha 등¹⁸⁾의 방법으로 분석 측정하였다. 즉 채취한 관류액을 세개의 시험관에 나누어 넣은 후 첫번째 시험관에는 β -glucuronidase(Sigma, USA)를 첨가하여 glucuronide 포합물을 가수분해시켜 glucuronide 포합체형의 HC와 유리형 HC의 합산량을 측정하였으며, 두번째 시험관에는 β -glucuronidase와 arylsulfatase(Sigma, USA)를 첨가하여 가수분해시켜 glucuronide와 sulfate ester 포합체형의 HC 및 유리형 HC의 총량을 측정하였다. 세번째 시험관에는 가수분해효소를 첨가하지 않고 직접 HC의 양을 형광법으로 측정하여 시료중의 유리형의 HC 생성량만을 측정하였다. 따라서 세개의 시험관에서 얻어진 수치를 가감하여 각각의 유리형의 HC, glucuronide 포합형의 HC 및 sulfate 포합형 HC의 농도를 결정하였다.

매 실험마다 각 시험관내의 HC의 함량은 355nm (excitation wave length)와 458nm(emission wave length)에 조준을 맞춘 fluorescence spectrophotometer(Model LS-3B, Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 형광도를 표준농도곡선을 작성하여 비교 산출하였다. 또한 EC를 관류시킨 간장에서 HC의 생성율은 각 실험에서 매 5분마다 채취한 시료에서

측정한 여러 유형의 HC 함량을 실험에 사용한 흰쥐의 간무게로 나누어 주고 관류용액의 유속을 곱해서 nmol HC/g. liver/min. 단위로 나타내었다¹⁹⁾.

5. 소포체의 분리 및 약물대사 관련 효소의 활성도 측정

각 실험식이군의 흰쥐로부터 간을 채취하여 Cinti 등의 방법²⁰⁾으로 소포체를 분리한 후 단백질의 농도를 Lowry 등의 방법²¹⁾으로 측정하였으며, 단백질의 함량이 약 2mg/ml이 되게 1.15 % KCl 용액으로 희석하여 Omura와 Sato의 방법²²⁾으로 cytochrome P-450과 cytochrome b₅의 함량을 측정하였다. 정제한 간소포체의 mixed function oxidase의 활성도는 Ullrich와 Weber의 방법²³⁾을 이용하여 EC(147μM)를 기질로 사용하여 HC로 O-deethylation 되는 속도를 측정하였다. 한편 정제한 간소포체내의 UDP-glucuronyl transferase(UD-PGT)의 활성도는 detergent를 처리하지 않은 상태에서 p-nitrophenol을 기질로 사용하여 Mills와 Smith의 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다.

6. 통계처리

측정된 실험의 결과는 통계 처리하여 평균치와 표준오차(S.D 또는 S.E.M)를 계산하였다. 즉 각 실험식이군별 평균치간의 통계적 유의성은 $\alpha < 0.05$ 또는 $\alpha < 0.01$ 수준에서 One-way ANOVA 및 Student's t-test로 검증하였다.

결 과

1. 실험동물의 체중 및 간무게의 비교

실험식이를 시작한 후 각 식이군에서 흰쥐의 체중 변화를 비교한 결과(Table 3), 실험식이의 섭취 기간이 길어질수록 옥수수기름 식이군의 체중 증가가 무지방식이군과 쇠기름군식이군에 비해 큰 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

한편 각 식이실험군에서 실험 직전에 측정한 흰쥐의 체중과 관류가 끝난 직후의 간무게를 측정하여 체중에 대한 간 무게의 백분율을 환산한

Table 3. Change of body weights of rats during experimental period (unit : g)

Diet	Experimental period(days)			
	Initial	8	15	21
Fat free	102.3 ± 7.4 ¹	135.6 ± 7.3	163.8 ± 8.8	186.4 ± 10.5
Beef tallow	101.3 ± 6.4	136.3 ± 9.5	167.5 ± 12.5	194.4 ± 9.4
Corn oil	100.6 ± 6.8	140.0 ± 7.5	175.6 ± 13.1	202.7 ± 15.0

1. Mean ± S.D. of 15 determinants.

Table 4. Effects of dietary lipids on liver weights and relative liver weight

Diet	Liver weight(g) ¹	Relative liver weight (%) ²
Fat free	6.7 ± 0.7 ³	3.5 ± 0.3
Beef tallow	7.0 ± 0.7	3.5 ± 0.3
Corn oil	7.3 ± 0.8	3.5 ± 0.3

1. Wet liver weight was measured right after the liver perfusion.
2. Relative liver weight is the percentage of liver weight over body weight.
3. Mean ± S.D. of 15 determinations.

결과 세 실험군에서 모두 3.5%로 상호 유의적 차이는 나타나지 않았다(Table 4).

2. 적출간장관류법을 이용한 7-ethoxycoumarin의 산화율 비교

1) 표준식이군과 무지방식이군에서 EC 산화율의 비교

먼저 실험조건을 설정하기 위하여 표준식이(Pu-

rina 사료)로 사육한 대조군 흰쥐와 무지방식이군의 흰쥐를 대상으로 적출간장관류법을 이용하여 100μM 농도의 EC를 50분간 관류시켜 포괄적인 총괄 대사율을 비교하였다(Fig. 1). 이때 HC의 총괄 생성율은 관류시킨 EC가 간세포 소포체의 MFO system에 의해 0-deethylation되는 속도를 나타낸 것으로서 EC의 산화율을 의미한다. 실험 결과 표준식이군에 비하여 무지방식이군에서 산화된 전체 HC 생성률이 유의성 있게 감소하는 경향을 나타내었다.

2) 각 실험식이군에서 총괄적 EC의 산화율 및 포합율의 비교

지방식이에 따른 간 소포체의 인지질막의 조성 변화와 관련하여 소포체막내에 부착된 약물대사 활성도의 변화를 비교하기 위하여 무지방식이군, 쇠기를 식이군 및 옥수수기름 식이군에서 적출한 간장을 대상으로 적출간장관류법을 이용하여 100 μM EC농도 만을 50분간 관류시켜, HC의 생성율을

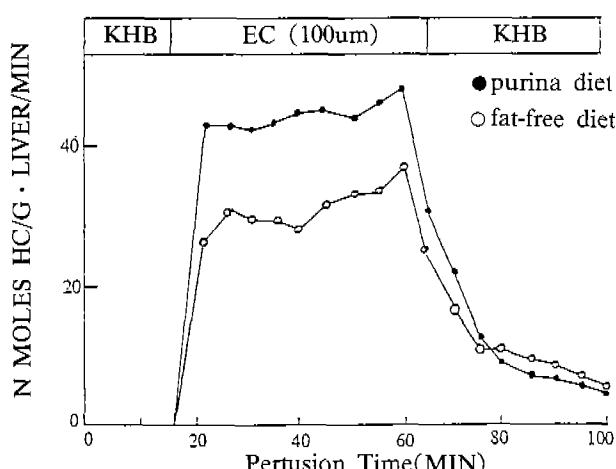


Fig. 1. Total levels of 7-hydroxycoumarin formed from 7-ethoxycoumarin in perfused livers of rats treated Purina diet or fat-free diet.

식이지질의 조절이 약물대사율에 미치는 영향

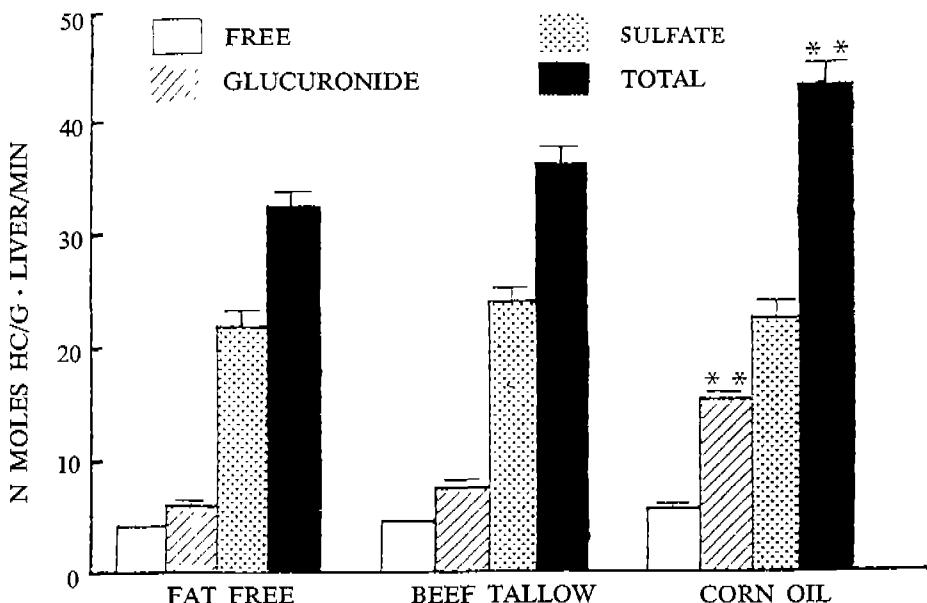


Fig. 2. Effects of dietary lipids on the rates of oxidation and subsequent conjugation by livers infused with 100 μ M 7-ethoxycoumarin.

* indicates significant differences from corresponding category in fat free group at $p < 0.01$

유리형의 HC, glucuronide 포함형태의 HC, sulfate 포함형태의 HC 및 전체 HC 생성율로 표시해 비교하였다(Fig. 2). 실험결과 EC의 전체 산화율(포함된 HC 포함)은 무지방 식이군에서 가장 낮게 나타났으며, 옥수수기름 식이군에서 가장 높게 나타났다. 또한 옥수수기름 식이군이 무지방 식이군이나 쇠기를 식이군에 비해 생성된 HC의 glucuronide 포함율이 유의적으로 많이 증가하였으며, sulfate 포함률은 세 실험식이군간에 그 절대포함율 및 전체 포함비율면에서는 가장 높게 나타났다.

3. 간세포 소포체내의 약물대사 관련 효소들의 활성도 비교

옥수수기름 식이군에서 적출간장관류법을 이용해 관찰한 Phase I 약물대사율의 증가가 간 소포체내의 약물대사 관련 효소의 양적 변화에 의한 것인가 또는 단순한 활성도의 증가에 의한 것인가를 확인하기 위하여 정제한 간 소포체내에 함유된 cytochrome P-450 및 cytochrome b₅의 함량을 측정하였고, 아울러 EC를 기질로 하여 mixed function oxidase(ethoxycoumarin O-deethylase)의 활

성도를 측정한 결과, cytochrome P-450 및 cytochrome b₅의 함량은 세 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, mixed function oxidase의 활성도는 옥수수기름 식이군의 경우 유의적으로 가장 높은 것으로 나타났으며($p < 0.01$), 또한 UDP-GT의 활성도도 옥수수기름 식이군에서 유의적으로 가장 높게 나타났다($p < 0.01$)(Table 5).

4. 관류시키는 7-ethoxycoumarin 농도 증가에 따른 산화 및 포합속도의 비교

각 실험식이군의 적출간장에 25, 50, 100 및 200 μ M 농도의 EC를 낮은 농도에서부터 차례로 주입시켜 관류시키는 EC의 농도 증가에 의한 EC의 산화속도 증가 및 포합속도의 변화 양상을 관찰하였다. 실험결과 50 μ M 이상의 EC를 관류시키면 옥수수기름 식이군의 산화율이 무지방 식이군과 쇠기를 식이군에 비해 유의적으로($p < 0.01$) 증가되었음을 나타내었다. 또한 관류시키는 EC의 농도에 따라 EC의 산화율이 증가되는 양상은 세 실험식이군에서 주입되는 EC의 농도 증가에 따라 산화율이 점차 둔화되는 현상을 보여주었으며, 각

Table 5. Effects of feeding fatty acids diet on hepatic microsomal cytochrome contents and mixed function oxidase activity

	Diet groups		
	Fat-free	Beef tallow	Corn oil
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.358±0.0011 ¹	0.359±0.0017	0.343±0.0019
Cytochrome b ₅ (nmol/mg protein)	0.288±0.0023	0.265±0.0016	0.268±0.0021
Mixed function oxidase 7-ethoxycoumarin (nmol/min/mg protein)	0.45 ± 0.08	0.52 ± 0.03	0.78 ± 0.04**
UDP-glucuronyl transferase p-nitrophenol (nmol/min/mg protein)	15.1 ± 1.2	18.2 ± 1.4	21.6 ± 1.3**

1. Mean±S.E.M. of 5 replications for each treatment group.

**indicates significant differences from corresponding category in fat free group at p<0.01

Table 6. Effects of dietary lipids on the rates of oxidation of 7-ethoxycoumarin(EC) and subsequent conjugation of 7-hydroxycoumarin(HC)

Infused EC concentration (μM)	Diet	Rates of HC formation(nmoles HC/g. liver/min)			
		Free form	Glucuronide	Sulfate	Total
25	Fat free	1.05±0.09 ¹	1.38±0.18	15.27±0.39	17.63±0.59
	Beef tallow	0.86±0.10	1.19±0.05	15.57±0.72	17.69±0.75
	Corn oil	0.97±0.10	3.14±0.22**	15.65±1.43	18.62±1.22
50	Fat free	2.49±0.29	3.73±0.40	19.34±0.77	26.20±0.68
	Beef tallow	2.57±0.11	4.51±0.28	20.06±0.85	27.07±1.01
	Corn oil	2.95±0.14	9.19±0.34**	19.17±1.10	31.31±1.08**
100	Fat free	4.03±0.14	5.78±0.31	22.21±0.80	32.47±0.99
	Beef tallow	4.62±0.14	7.66±0.41	24.18±0.55	35.14±1.56
	Corn oil	5.49±0.40*	15.22±0.45**	22.40±1.33	42.16±1.58**
200	Fat free	6.60±0.18	8.85±0.39	21.29±0.92	37.51±1.30
	Beef tallow	6.88±0.07	9.47±0.39	20.99±0.44	37.68±1.47
	Corn oil	9.54±0.49**	18.62±0.68**	22.18±1.36	50.19±2.09**

1. Mean±S.E.M. of 6 replications for each treatment group.

*indicates significant differences from corresponding category in fat free group at p<0.05

**indicates significant differences from corresponding category in fat free group at p<0.01

실험식이군에서 측정된 EC의 최대 산화율은 두 지방 식이군이 37.5, 쇠기름식이군이 37.7, 옥수수기름 식이군이 50.2nmol HC produced/g. liver /min으로 나타났다(Table 6).

한편 관류시키는 EC의 농도 증가에 따른 포함 속도의 변화는 각 실험식이군에서 공통적으로 전체의 HC의 생성률에서 sulfate ester 포함률이 차지하는 비율은 점차 감소하고, glucuronide 포함

률과 유리형 HC 유출율의 비율이 상대적으로 높아지는 전환현상을 보여주었다.

고찰

간세포내의 소포체막내에 부착되어있는 약물대사 효소들의 활성도는 소포체막을 구성하는 지방산의 종류 및 함량에 의해 직접, 간접적으로 영향을

식이지질의 조절이 약물대사율에 미치는 영향

받게 되며, 또한 이러한 소포체막의 인지질 지방산 조성은 섭취하는 식이지질의 지방산의 종류 및 함량에 의해 조절된다고 보고된 바 있다¹¹⁾⁻³⁾. 그리하여 본 연구에서는 지방산의 종류가 다른 지방식이가 인지질 소포체막내에 존재하는 약물대사 효소들의 활성도에 어떠한 영향을 미치는 가에 대하여 포괄적으로 관찰하고자 하였다.

일차적으로 식이 지방산의 필수성을 검토하기 위하여 표준사료 식이군과 무지방식이군에서 적출한 간장을 대상으로 적출간장관류법을 이용하여 EC의 대사속도를 비교한 결과(Fig. 1), 무지방식이군에서는 표준사료 식이군에 비하여 약물대사 속도가 감소된 경향을 나타내었다. 이는 다른 연구자들이 간의 소포체 분획을 이용한 실험¹¹⁻¹³⁾이나, 적출간장관류법을 이용한 실험²⁵⁾을 통하여 무지방식이군의 경우 지방을 함유한 식이군에 비하여 약물대사 효소들의 활성도가 저하되었다는 보고와 일치하는 결과로 약물대사 차원에서 식이내 지방의 중요성을 간접적으로 입증할 수 있었다.

다음 이차적으로 식이지질의 조성(Table 1)에 따른 약물대사의 변화를 관찰하기 위하여 이유직후인 어린 흰쥐를 불포화지방산의 함량이 높은 옥수수기름을 함유하는 식이와 포화지방산의 함량이 높은 쇠기름을 함유하는 식이 그리고 지방을 전혀 함유하지 않은 식이(Table 2)로 3주 이상 사육하여 생체내 약물대사를 주도하는 간조직내 간세포 소포체막의 지방산 조성에 반영되도록 하였다¹³⁾. 각 실험식이군에서 일괄적으로 100μM 농도의 EC만을 50분간 관류한 경우 무지방식이군에 비하여 쇠기름 식이군 및 옥수수기름 식이군이 약물대사 능력이 크며, 쇠기름 식이군에 비하여 옥수수기름 식이군이 약물대사 능력이 더 큰 양상을 나타내었으며(Fig. 2), 이러한 결과는 다른 연구자의 실험 결과와도 일치하였다²⁶⁾²⁷⁾. Century²⁸⁾는 식이내의 필수지방산 수준을 증가시켰을 때 소포체내의 linoleic acid(18:2)와 arachidonic acid(20:4)의 함량이 증가된다고 보고하였고, Hammer 등¹³⁾은 흰쥐에 각기 지방산 조성이 다른 식이지질을 섭취시키면 10일 경과 후 부터는 소포체막의 지방산 조성이 변화하여 옥수수기름식

이군이 포화지방산 함유군이나 무지방식이군에 비하여 소포체막에 포함된 linoleic acid 양이 많았으며, 이에 비례하여 aminopyrine의 N-demethylation rate도 가장 높았다고 보고하였다. 또한 Wilts²⁶⁾는 생선기름인 herring oil을 섭취시켰을 때 소포체막에 포함된 linoleic acid의 양은 적었으나 불포화지방산인 w-3계 지방산의 함량이 많았고, 약물대사 속도도 옥수수기름 식이군 이상으로 증가된 것을 보여줌으로써 약물대사 효소의 활성도에 미치는 영향에서 식이 불포화지방산의 중요성을 입증한바 있다. 본 연구의 결과에서도 특히 옥수수기름 식이군의 경우 EC로 부터 산화된 전체 HC 양의 증가 양상(Table 6)으로 미루어 불포화지방산의 섭취에 의해 약물대사 효소의 활성도가 증가된 것을 잘 나타내고 있다.

식이내 지방의 양, 특히 섭취하는 불포화지방산의 함량이 약물대사를 증가시키는 원인이 간소포체내의 약물대사 관련 효소의 양적 변화에 의한 것인가 또는 단순한 활성도의 증가에 의한 것인가를 확인하기 위하여 간세포 소포체막에 존재하는 몇몇 약물대사 관련 효소들의 함량 및 활성도를 조사한 결과(Table 5), 간세포 소포체내에 함유된 cytochrome P-450 및 cytochrome b₅의 함량은 세 실험군간에 유의적인 변화가 없었으나, mixed function oxidase 및 UDP-glucuronyl transferase(UDPGT)의 활성도는 옥수수기름(불포화지방산) 식이군의 경우 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과(Table 5, 6)는 식이내 불포화지방산이 소포체막에 존재하는 효소의 함량에는 별영향을 주지 않고 활성만을 증가시켰다는 사실을 반영하는 것이며, 지용성 약물인 EC가 인지질막으로 구성된 간세포 소포체막에서 HC로 산화된 후 간세포 소포체내에서 직접 포합(glucuronidation)되는 비율이 높아졌음을 보여주었다. 그러나 소포체내에서 함유된 불포화지방산이 약물대사 효소의 활성을 증진시키는 기전에 대해서는 아직 규명되어 있지 않다. 다만 이에 대하여 Wade 등⁸⁾과 Hammer 등¹³⁾은 불포화도가 높은 지방산은 전자전달 능력을 갖는 인지질의 합성에 필요하거나, cytochrome P-450의 완전한 형태를 유지할 수 있는 소포체를

구성하기 위해 필요할 것이라고 제안하였고, Ingelman-Sundberg 등²⁹⁾은 막의 인지질을 구성하고 있는 지방산 측쇄의 모양이 소포체막내의 cytochrome P-450 복합체를 활성화 상태로 유지하는데 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 제안하였다. 이밖에도 Strobel³⁰⁾은 필수지방산이 세포질의 NADPH로부터 소포체막에 부착된 cytochrome P-450으로의 전자이동을 촉진시킬 수 있는 유동성 환경을 제공하는데 중요한 역할을 한다고 제안하였으며, 또한 Wills²⁶⁾도 소포체막내에 포함된 불포화지방산이 cytochrome P-450 또는 cytochrome P-448 복합체들을 활성적인 입체구조로 유지시켜 약물이나 발암물질의 대사를 유도한다는 제안을 한바 있다.

한편 간세포내에서 sulfate 포함은 주로 세포질 내에서 이루어지며, glucuronide 포함은 소포체막 내에서 이루어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 EC로부터 산화된 HC의 포함된 양상을 비교한 결과(Fig. 2, Table 6), sulfate 포함체의 생성율은 세 식이군간에 유의적인 차이가 없는 것으로 미루어 sulfotransferase의 활성도는 지방산의 섭취 특히 불포화지방산의 섭취와는 무관한 것으로 볼 수 있으며, 이에 비하여 glucuronide 포함양상은 옥수수기름 식이군에서 가장 크게 나타난 것으로 미루어 glucuronide 포함에 관여하는 효소인 UDPGT가 소포체막내 존재하기 때문에 불포화지방산의 섭취는 약물대사 효소들 중에서 소포체막에 존재하는 효소들에 의한 반응만을 향진시키는 것으로 사료된다.

관류하는 EC 농도의 증가에 따라 생성된 HC 포함체의 형태별 생성율의 변화양상은(Table 6) Conway 등³¹⁾과 Cha 등¹⁸⁾에서 관찰된 관류 농도에 따른 포함체 전환 현상과 일치 하였으며, 이러한 결과로 미루어 sulfate 포함은 glucuronide 포함에 비하여 친화력이 높은 반면에 수용 용량이 적음을 반영한다고 볼 수 있다³²⁾. 그러나 본 실험의 경우 EC가 Phase II의 포함반응이 일어나기에 앞서 Phase I의 산화반응이 선행되어 HC가 생성되어야 한다는 관점에서 EC 관류농도의 증가에 따라 포함형태의 전환현상이 일어나고, 더욱기 불포화지

방산 식이에 의해 소포체막에 부착되어 있는 UDPGT의 활성도가 증진되더라도, 결국은 Phase I 반응 속도가 전체적인 약물대사과정에서의 속도 제한단계(rate limiting step)이기 때문에 양적인 측면에서는 세실험식이군에서 공통적으로 sulfate 포함경로도 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다.

결론적으로 본 실험의 결과를 토대로 불포화지방산의 섭취는 소포체막의 구조의 변화를 유발하여 간접적으로 이에 관련된 약물대사 효소(MFO system 효소군이나 UDPGT)를 활성화된 상태로 유지시키거나 또는 소포체막에 유동적인 환경을 제공하여 소포체막에 존재하는 효소의 기질에 대한 친화력을 증가시키므로써 활성도를 증가시켜 이와같이 약물의 산화를 및 포함율의 증가를 가져올 수 있을 것이라는 가능성을 제시할 수 있다. 그러나 소포체막의 유동성과 약물대사의 관계를 설명하기 위해서는 보다 정확하게 세포막의 유동성을 측정하는 방법이 모색되어야 할것이며 이에 대한 연구가 다방면으로 수행되어야 할것으로 기대된다.

결 论

본 연구에서는 식이지질의 종류에 따른 EC의 대사양상 차이를 적출간장관류법을 이용하여 비교하므로써 식이지질의 종류와 약물대사 속도와의 상호 연관성에 대하여 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 옥수수기름식이의 섭취는 무지방식이와 쇠기름식이에 비하여 EC가 HC로 O-deethylation 되는 반응을 유의적으로 증진시켰다. 또한 옥수수기름식이군의 경우 생성된 HC의 glucuronide의 포함율이 증가하였으나 sulfate 포함율은 차이가 없었다.

2) 간세포 소포체막내에 존재하는 약물대사 관련 효소들의 함량 및 활성도를 비교한 결과 cytochrome P-450 및 cytochrome b₅의 함량은 유사하였으나, mixed function oxidase 및 UDPGT의 활성도는 옥수수기름식이군에서 가장 높게 나타났다.

식이지질의 조절이 약물대사율에 미치는 영향

3) EC의 산화 생성물인 HC이 간세포에서 포함되는 과정에서 낮은 농도의 EC의 관류로 소량의 HC이 생성되었을 때는 대부분이 sulfate ester 포합체를 형성하였으나 관류시키는 EC의 농도가 높아짐에 따라서 glucuronide 포합체의 생성 비율이 증가하는 현상을 나타내었다. 이러한 관류 농도에 따른 포합 형태의 전환 현상은 육수수기름식이균이 가장 현저하였다.

이상의 결과로 식이지방의 조절은 약물대사에 영향을 미치며, 특히 불포화지방산의 섭취는 간접적으로 간 소포체막의 유동성에 영향을 주어 소포체막내에 존재하는 약물대사 효소인 MFO system과 UDPGT의 활성을 증가시켜서 Phase I 산화과정과 Phase II의 포합반응을 함께 증진시킴을 알수 있었다.

Literature cited

- 1) Sipes IG, Grandolfi AJ. Biotransformation of toxicants. In : Klassen CD, Amdur MO, Doull J, ed. *The Basic Science of Poisons*, pp64-98, MacMillan, New York, 1986
- 2) Hodgson E, Dauterman WC. Metabolism of Toxicants : Phase I reactions. In : Hudgson E, Guthrie FE, ed. *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp67-91, Elsevier, New York, 1980
- 3) Dauterman WC. Metabolism of toxicants : Phase II reactions. In : Hudhson E, Guthrie FE, ed. *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp92-132, Elsevier, New York, 1980
- 4) Hodgson E. Metabolism of Toxicants. In : Hodgson E, Levi PE, ed. *A Textbook of Modern Toxicology*, pp51-84, Elsevier, New York, 1987
- 5) Dauterman WC. Physiological factors affecting metabolism of xenobiotics. In : Hodgson E, Guthrie FE, ed. *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp133-142, Elsevier, New York, 1982
- 6) Lambeth JD. On the role of phospholipids and membranes in the regulation of oxidative enzyme. In : Kuo JF, ed. *Phospholipids and Cellular Regulation*, Voll II, pp189-228, CFC press, 1985
- 7) Dutton GJ. Control of UDP-glucuronyltransferase activity. *Biochem Pharmacol* 24 : 1835-1841, 1975
- 8) Wade AE, Norred WP. Effect of dietary lipid on drug metabolizing enzymes. *Fed Proc* 35 : 2475-2479, 1976
- 9) Campbell TC, Hayes JR. Roles of nutrition in the drug metabolizing enzymes system. *Pharmacol Rev* 26 : 191-197, 1974
- 10) Vergroesen AJ. Physiological effects of dietary linoleic acid. *Nutr Rev* 35 : 1, 1977
- 11) Norred WP, Wade AE. Effect of dietary lipid ingestion on induction of drug-metabolizing enzymes by phenobarbital. *Biochem Pharmacol* 22 : 423-436, 1973
- 12) Rowe L, Wills ED. The effect of dietary lipids and Vit. E on lipid peroxide formation, cytochrome P-450 and oxidative demethylation in endoplasmic reticulum. *Pharmacol* 25 : 175-179, 1976
- 13) Hammer CT, Wills E.D. The effect of dietary fats on the composition of the liver endoplasmic reticulum and oxidative drug metabolism. *Br J Nutr* 41 : 465, 1979
- 14) Cha YN, Dong MS, Rho HK, Hong SS. Reduced conjugation capacity as a measure of drug toxicity. In : Chung IM, Park CW, ed. *International Forum on Research and Development for Procedure involving Risk Assessment of Toxicchemicals*, pp219-242, The Korean Society of Toxicology, 1987
- 15) Rogers QR, Harper AE. Amino acid diets and maximal growth in the rat. *J Nutr* 87 : 267, 1965
- 16) Van Niekerk PJ, Burger AEC. The estimation of the composition of edible oil mixtures. *JAOCS* 62 : 531, 1985
- 17) Gunstone FE, Harwood JL, Padley FB. *The lipid handbook*. Chapman and Hall, New York, 1986
- 18) Cha YN, Dong MS, Hong SS. Functional relationship between initial oxidation of 7-ethoxycoumarin and subsequent conjugation of 7-hydroxycoumarin in isolated perfused rat livers. *Chem-Biol Interact* 61 : 125-137, 1987
- 19) Greenle WF, Poland A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 205 : 596-605, 1978
- 20) Cinti DL, Moldeus P, Schenkman. Kinetic parameters of drug metabolizing enzymes in Ca^{+2} -

- sedimented microsomes from rat liver. *Biochem Pharmacol* 21 : 3249-3256, 1972
- 21) Lowry JH, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1952
 - 22) Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239, 7 : 2370-2378, 1964
 - 23) Ullrich V, Weber P. The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin in liver microsomes. *Hoppe Seyler's Physiol Chem* 353 : 1171-1177, 1972
 - 24) Mills GT, Smith EEB. Uridine diphosphoglucose, uridine diphosphogalactose, uridine triphosphate and uridine diphosphoglucuronic acid. In : Bergmeyer HU ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, pp581-595, Academic Press, New York, 1963
 - 25) Lam TC, Wade AE. Effects of benzo(a)pyrene metabolism by perfused rat liver. *Drug-Nutr Interact* 1 : 31-44, 1981
 - 26) Wills ED. The role of the polyunsaturated fatty acid composition of the endoplasmic reticulum in the regulation of the rate of oxidative drug and carcinogen metabolism. In : Coon MJ, Conney AH, Estabrook RW, Gelboin HV, Gillette JR, Erien PJ, ed. *Microsomes, Drug Oxidations, and chemical Carcinogenesis*, Vol I, pp545-548, Academic press, New York, 1980
 - 27) Davison SC, Wills ED. Studies on the lipid composition of the rat liver endoplasmic reticulum after induction with phenobarbitone and 20-methylcholanthrene. *Biochem J* 140 : 461-468, 1974
 - 28) Century B. A role of the dietary lipid in the ability of phenobarbital to stimulate drug detoxification. *J Pharm Ther* 185 : 185-194, 1973
 - 29) Ingelman-Sunberg M. Phospholipids and detergents as effectors in the liver microsomal hydroxylase system. *Biophys Acta* 488 : 225, 1977
 - 30) Strobel HW, Lu AYH, Hedema J, Coon MJ. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of haemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug. *J Biol Chem* 245 : 4851-4854, 1970
 - 31) Conway JG, Kauffman FC, Ji S, Thurman RG. Rates of sulfation of 7-hydroxycoumarin in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Mol Pharmacol* 22 : 509-516, 1982
 - 32) Moldeus P. Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and moluse. *Biochem Pharmacol* 27 : 2859-2863, 1978