

## 일차 배양한 흰쥐의 간세포에서 사염화탄소로 인한 독성에 미치는 비테인의 효과

김선여 · 김홍표 · 이미경 · 김승희\* · 문애리\* · 한형미\* · 허 훈 · 김영중#  
서울대학교 약학대학, \*국립보건안전연구원

(Received September 15, 1993)

### Effects of Betaine on the CCl<sub>4</sub>-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Sun Yeou Kim, Hong Pyo Kim, Mi Kyeong Lee, Seung Hee Kim\*, Hyung Mi Han\*,  
Aree Moon\*, Hoon Huh and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*National Institute of Safety Research, 5, Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul 120-020, Korea

**Abstract**—Betaine, a major component of Lycii Fructus, was evaluated for its anti-hepatotoxic activity on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Betaine was found to attenuate carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity both morphologically and biochemically. Typical hepatocyte necrosis due to carbon tetrachloride seemed to be reduced by 50 to 500  $\mu$ M of betaine under microscopical observation. The value of glutamic pyruvic transaminase released from the hepatocytes into the medium significantly decreased as betaine concentration increased. Betaine also significantly elevated the reduced activities of some enzymes, cytochrome P-450, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and glutathione-S-transferase, involved in xenobiotic metabolism due to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. These results demonstrate a possible hepato-protective role of betaine against fatty liver that could be easily induced by carbon tetrachloride.

**Keyword** □ Carbon tetrachloride, cytochrome P-450, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase, glutathione-S-transferase, glutamic pyruvic transaminase, hepatotoxicity, primary cultured rat hepatocytes.

간 보호작용을 가지는 물질을 천연물에서 부터 찾기 위하여 사염화탄소로 독성을 인위적으로 유발시킨 일차배양 흰쥐의 간세포계를 이용하여 천연물을 검색하던 중에 한방에서 자양, 강장제로 널리 사용되는 구기자, Lycii Fructus(Solanaceae)의 총 메탄올 엑스가 간세포 독성을 현저히 완화시키는 것을 알 수 있었다. 이에 구기자의 총 메탄올 엑스를 극성을 달리 하여 일련의 분획물로 분획한 후 각 분획물의 간 보호작용을 사염화탄소로 손상을 입힌 일차배양한 흰쥐의 간세포계를 이용하여 검색한 결과 물 분획물에서

뚜렷한 간 보호 효과를 인지할 수 있었다. 구기자의 물 분획물 중의 중요 성분으로는 이미 비테인이 보고되어 있다. 비테인은 흰쥐를 고지방식으로 사육하였을 때 지방함량을 감소시켰다는 보고가 있다.<sup>1)</sup> 또한, 비테인은 정상상태의 흰쥐에 경구투여하였을 때 간의 인지질을 증가시켰으며, 사염화탄소로 독성을 유발시켰을 때 중성지방의 증가를 어느 정도 막아주었다는 단편적인 보고가 있다.<sup>2)</sup> 그러나, 독성물질의 대사나 해독작용에 미치는 비테인의 효과에 대하여서는 아직까지도 체계적으로 그 기전이 연구된 바 없다. 이에 본 연구에서는 구기자로부터 간 보호작용을 가지는

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

물질의 단리를 시작하기 전에 우선 비테인이 간세포에 어떻게 작용하는 지를 알아보기 위하여 사염화탄소로 인위적으로 독성을 유발시킨 일차배양한 흰쥐의 간세포계를 이용하여 손상을 입은 간세포에서 배양액 중으로 유출되는 GPT 값, 간세포내의 7-ethoxycoumarin-O-deethylase, cytochrome P-450 및 glutathione-S-transferase의 활성에 미치는 영향을 알아보았다.

### 실험 방법

**실험동물**—본 연구에 사용한 흰쥐는 Wistar계 웅성 흰쥐(150~200 g)로 서울대학교 동물사육장에서 공급 받았다.

**시약**—본 연구에 사용한 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, U.S.A.)의 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum은 Hyclone사(Utah, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

**흰쥐의 간세포 배양<sup>3,4)</sup>**—몸무게 150~200 g 되는 웅성 흰쥐로부터 간세포를 분리하여,  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 collagen이 도포된 배양용기(Falcon, 15 × 24 mm)에 이식하였다. 배양액은 Waymouth's MB 751/Lmedium, 10 % fetal bovine serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin(fraction V),  $10^{-6}$  M dexamethasone,  $10^{-7}$  M insulin,  $5.32 \times 10^{-2}$  M L-serine,  $4.09 \times 10^{-2}$  M L-alanine,  $2.67 \times 10^{-2}$  M NaHCO<sub>3</sub>, 10,000 IU/100 ml penicillin, 10,000 IU/100 ml streptomycin 과 500 µg/100 ml amphotericin B 로 구성된 것을 사용하였다.

**세포의 배양**—일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 O<sub>2</sub>(95%)와 CO<sub>2</sub>(5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 세포를 배양하였다.

**사염화탄소에 의한 간세포 독성 유도**—접종한 간세포를 1.5시간 배양하여 기질에 부착시키고 조짐스럽게 새로운 배양액으로 갈아준 다음 24 시간 동안 더 배양한 후 Gravela 등<sup>5,6)</sup>의 방법을 이용하여 10 mM농도의 사염화탄소로 1 시간 동안 처리하여 독성을 유도하였다. 간세포에 입힌 독성 정도 및 독성 회복 효과는 간세포로부터 배양액으로 유리된 glutamic pyruvic transaminase 값을 Reitman과 Frankel<sup>7)</sup>의 방법으로 측정함으로써 알아보았다.

**Ethoxycoumarin-O-deethylase(ECD) 활성 측정**—

Jacobson과 Greenlee 등의 방법<sup>8,9)</sup>을 참고로하여 측정하였다. 24시간 배양한 간세포에 사염화탄소와 비테인을 동시에 처리하여 1.5시간 배양한 후 배양액을 제거하고 ECD활성을 측정하였다. 반응을 즉시 멈춘 것을 대조로 하고, 그외의 검액은 1 시간 배양시킨 후에 -70°C에서 동결시켰다. 이를 녹여 일부는 단백질 정량을 위해 보관하고, 나머지는 37°C 진탕 수온조에서 45분간 배양하여, 생성된 7-hydroxycoumarin의 형광도를 spectrofluorometer로 368 nm에서 excitation maximum 및 456 nm에서 emission maximum을 측정하였다. 시료의 형광도는 hydroxycoumarin 표준용액과 비교하였으며, 1시간 동안 형성된 hydroxycoumarin의 값은 대조의 형광도를 빼서 계산하였다. ECD활성의 단위는 분당 1 pmole의 hydroxycoumarin이 형성되는 양으로 하였다.

**Cytochrome P-450 함량 측정**—Omura등의 방법<sup>10)</sup>에 의하여 cytochrome P-450 함량을 측정하였다. 간단히 기술하면 간세포 균질액을 단백질 양이 2 mg/ml이 되도록 0.1 M Tris완충액(pH 7.4)으로 희석하여 만든 검액을 차등 스펙트럼 측정을 위하여 동량으로 나누고, 즉시 sodium dithionite(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 2~3 mg을 첨가한 다음 잘 섞었다. 일산화탄소 가스를 30초 동안 주입시킨 검액의 400~500 nm 사이 흡광도를 일산화탄소 가스를 주입시키지 않은 검액을 대조액으로 하여 cytochrome p-450 함량을 측정하였다.

**Glutathione-S-transferase(GST) 활성 측정**—Habig 등의 방법<sup>11)</sup>을 이용하여 간세포 균질액을 차등 원심 분리(differential centrifugation)하여 얻은 상등액(post mitochondrial supernant) 일정량에 30 mM glutathione, 30 mM dinitrochlorobenzene 과 100 mM 인산완충액 (pH 6.5)을 각기 첨가한 후 인산완충액을 대조로하여 340 nm에서 직선(linear portion)을 이루는 때의 분당 흡광도를 측정하여 활성을 측정하였다.

**단백질 함량 측정**—단백질의 함량은 Lowry등의 방법<sup>12)</sup>으로 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

비테인이 간에 어떻게 작용하는 지를 알아보기 위

하여 흰쥐의 간으로부터 직접 분리한 간세포를 24시간 동안 배양한 다음 베타인을 10 μM에서부터 5 mM까지 농도를 달리하여 첨가하여 12 시간 더 배양한 후, 그 효과를 현미경 관찰과 배양액으로 유리되는 GPT 값을 측정함으로써 알아보았다. 베타인은 간세포에서부터 배양액으로 유리되는 GPT 값을 10 μM에서부터 1 mM까지 농도 의존적으로 감소시켰다. 이는 간세포를 체외에서 배양하는 동안 일상적으로 일어나는 간세포의 사멸을 베타인이 농도 의존적으로 감소시켜 주는 것으로 설명할 수 있어 베타인은 간세포 보호 작용을 갖는다고 할 수 있겠다. 베타인을 3 mM 이상 첨가하였을 때는 간세포의 크기는 작아졌으나 기질로부터 이탈되지 않았으며, 색소 침투시험을 하였을 때도 핵이 염색되지 않는 것으로 미루어 볼 때 베타인은 고농도에서 간세포의 크기는 다소 감소시키나 별다른 독성을 야기시키지는 않았다. 이러한 베타인의 간보호 효과는 정상 상태에서보다 독성이 일어났을 때 더욱 뚜렷할 것이라고 생각되어 대표적인 간 독성 물질인 사염화탄소로 간세포에 인위적으로 독성을 유기시킨 후에 베타인이 어떻게 독성을 회복시키는 지를 알아보았다.

베타인이 사염화탄소에 의하여 유발된 간세포 독성에 어떠한 영향을 미치는가는 간세포를 24시간 배양한 후에 사염화탄소 10 mM로 독성을 유발시키면서 베타인을 100 μM 에서부터 1 mM 까지 농도를 변화시켜 첨가한 다음 다시 1시간 더 배양하여 독성 회복 정도를 측정함으로써 알아보았다. 일차 배양한 흰쥐의 간세포를 사염화탄소로 독성을 유발시키면 거의 모든 세포가 1시간 안에 괴사를 일으켰다. 그러나, 독성을 유발시키면서 베타인을 첨가한 경우에는 괴사를 일으킨 세포의 수가 훨씬 감소된 것을 현미경으로 관찰할 수 있었으며, 또한 간세포에서부터 배양액으로 유리되는 GPT 값도 500 μM 까지 농도 의존적으로 감소되어 베타인은 간세포가 독성을 입을 때 간보호 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

사염화탄소는 간세포에서 cytochrome P-450의 매개로 반응성이 큰 자유기를 형성하거나 C-Cl결합이 분해됨으로써 독성을 유발시키며 독성이 유발되면 간세포 내의 cytochrome P-450의 함량이 현저하게 감소되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 사염화탄소로 간세포에 독성을 유발시켰을 때 cytochrome

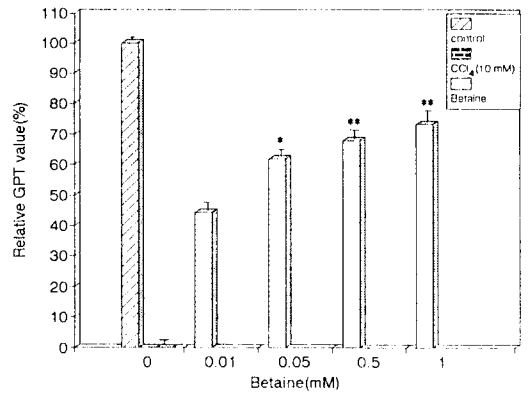


Fig. 1—The effect of betaine on CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes.

I : standard deviation

Significantly different with respect to control

: \* : p<0.05 \*\* : p<0.01

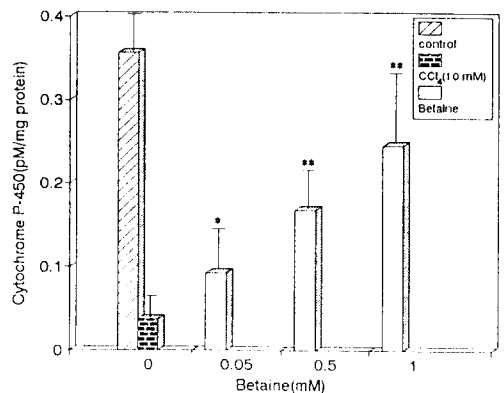


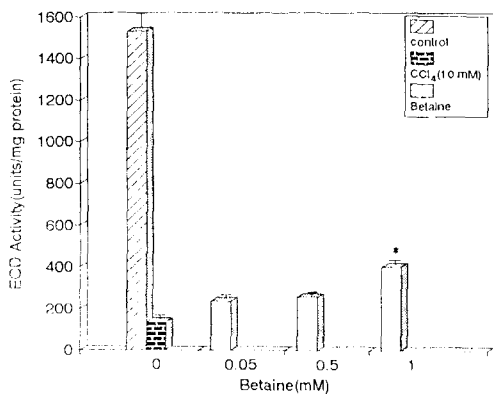
Fig. 2—The effect of betaine on total cytochrome P-450 content in CCl<sub>4</sub>-intoxicated cultured rat hepatocytes.

I : standard deviation

Significantly different with respect to control

: \* : p<0.05 \*\* : p<0.01

P-450 함량이 대략 정상값의 10분의 1 정도로 감소되었다. 그러나 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 베타인을 50 μM에서 1 mM까지 농도를 변화시켜 첨가한 경우에는 독성으로 인하여 감소된 cytochrome P-450의 함량이 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 2). 또한, 간에서의 또 다른 중요한 대사 효소의 하나인

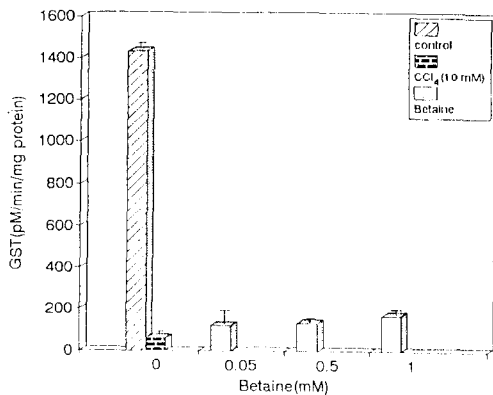


**Fig. 3**—The effect of betaine on the activity of 7-ethoxycoumarin O-deethylase in CCl<sub>4</sub>-intoxicated cultured rat hepatocytes.

I : standard deviation

Significantly different with respect to control :

\* : p<0.05



**Fig. 4**—The effect of betaine on the glutathion-S-transferase content in CCl<sub>4</sub>-intoxicated cultured rat hepatocytes.

I : standard deviation

7-ethoxycoumarin-O-deethylase의 활성도 사염화탄소에 의하여 독성이 유발되면 정상값의 약 10분의 1 정도로 저하되었다. 그러나 비테인을 50  $\mu$ M에서부터 1 mM까지 첨가하면 저하되었던 ECD의 활성이 농도의존적으로 증가되었다(Fig. 3).

한편, 간세포 내에서의 해독작용에 미치는 비테인의 효과를 알아보기 위하여, 사염화탄소로 독성을 유발

시키면서 비테인을 농도를 달리하여 첨가한 후 해독 작용에 관여하는 효소인 glutathione-S-transferase의 활성을 측정하여 보았다. 역시 비테인은 50  $\mu$ M에서부터 1 mM까지 사염화탄소에 의하여 저하된 GST의 활성을 농도의존적으로 증가시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

이러한 결과로 미루어 볼 때, 비테인은 사염화탄소로 인하여 저하된 간세포 내의 약물대사 효소의 활성을 유의성있게 증가시켜 대사 능력을 회복시킴으로써 간보호 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있겠다. 한편, 비테인이 RNA와 단백질의 합성을 억제시켜 세포막을 손상시킴으로써 바이러스성 간염과 기능 및 형태가 유사한 독성을 일으키는 것으로 알려진 galactosamine에 의하여 유발된 간세포에서 유리되는 GPT 값을 독성을 입지 않은 정상세포에서 유리되는 GPT 값의 90% 까지 회복시키는 사실로 미루어 비테인은 간 세포막을 안정화시킴으로써 간 세포막이 파열되는 것을 막아줌으로써 뚜렷한 간 보호 효과를 나타낼 수도 있다는 추정을 내릴 수 있겠다. 또한, 최근 비테인이 cyanobacterium<sup>13)</sup>에서 항산화제로 작용할 가능성이 높다는 보고에 비추어보면 비테인이 자유기의 생성을 억제함으로써 간보호 효과를 나타낼 수도 있다는 추정도 배제할 수는 없겠다.

### 감사의 말씀

이 연구의 일부는 1991년도 한국과학재단 연구비(과제번호 KOSEF 911-0308-014-2) 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

### 문 헌

- 1) Harper, A.E., Monson, W.J., Benton, D.A. and Elvehjem, C.A.: The influence of protein and certain amino acids, particularly threonine, on the deposition of fat in the liver of the rats. *J. Nutrition*, **50**, 383 (1953).
- 2) 黒川省吾: Lycium chinense Miller(枸杞) 果實成分の藥理學的研究. *Shikoku Igaku Zasshi*, **18**, 127 (1962).
- 3) Berry, M.N. and Friend, D.S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.*, **43**, 506 (1969).

- 4) Freshney, R.I.: Culture of animal cells; Manual of basic technique. Alan R. Liss Inc., NY, pp 1-6, 55 (1984).
- 5) Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H.: Assay method for anti-hepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primarycultured hepatocytes. *Planta Medica*, **49**, 222 (1983).
- 6) Gravela, E. and Dianzani, M.U.: Studies on the mechanism of carbon tetrachloride-induced polyosomal damage. *FEBS lett.*, **2**, 93 (1970).
- 7) Reitman, S., and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957).
- 8) Jacobson, M., Levin, W., Poppers, P.J., Wood, A.W. and Conney, A.H.: Comparison of the O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin and the hydroxylation of benzopyrene in human placenta. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 701 (1974).
- 9) Greenlee, W.E. and Poland, A.: An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity. *J. Pharmacol.*, **205**, 596 (1978).
- 10) Omura, T., and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
- 11) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974).
- 12) 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).
- 13) Mamedov, M.D., Hayashi, H., Wada, H., Mohanty, P.S., Papageorgiou, G.C. and Murata, N.: Betaine enhances and stabilizes the evolution of oxygen and the synthesis of APT by cyanobacterial thylakoid membranes. *FEBS Letters*, **294**, 271 (1991).