

## 흰쥐에서 구속스트레스에 대한 우루소데옥시콜린산의 항스트레스 효과

조태순 · 이선미 · 염제호<sup>†</sup> · 유은주\* · 임승욱\* · 장병수\* · 김영만\* · 유영효\* 박명환\*

성균관대학교 약학대학, \*(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received July 12, 1995)

### Anti-stress Effects of Ursodeoxycholic Acid on the Restraint Stress in Rats

Tai Soon Cho, Sun Mee Lee, Je Ho Yeom<sup>†</sup>, Eun Joo Yu\*, Seung Wook Lim\*,  
Byeong Su Jang\*, Young Man Kim\*, Young Hyo Yu\* and Myung Hwan Park\*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 400-746, Korea

\*R & D Center, Daewoong pharmaceutical Co. Ltd., Sungnam 462-120, Korea

**Abstract**— Effects of restraint stress and its modulations by ursodeoxycholic acid(UDCA) were evaluated on some biochemical and biophysical parameters in rats. Restraint stress induced elevations in blood alkaline phosphatase (ALP), cholesterol (CHOL), aspartate transaminase (GOT), alanine transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH) levels. It was also caused adrenal hypertrophy, decrease in weight of spleen and contents of ascorbic acid in stressed rats. As a results, stress indicators such as spleen, ascorbic acid, GOT, GPT, LDH were fastly changed after imposing stress, but those such as ALP, CHOL, adrenal were induced relatively later. UDCA was tested if it has an inhibitory effect against 18-hr restraint induced stress. UDCA lowered ALP, CHOL, LDH level and also effectively elevated the ascorbic acid contents in 25 mg/kg dosage of UDCA. In organ weights, the restraint stress induced increases in spleen and adrenal were attenuated by UDCA in 50 mg/kg dosage. However, stress-induced GOT and GPT levels were unaffected by UDCA.

**Keywords** □ Restraint stress, Ursodeoxycholic acid(UDCA), Alkaline phosphatase(ALP), Cholesterol (CHOL), Aspartate transaminase(GOT), Alanine transaminase (GPT), Lactate dehydrogenase(LDH), Adrenal hypertrophy, Ascorbic acid.

일반적으로 생체에 미치는 자극이 일정한 정도 이상이 될 경우 상해적으로 작용하는데 이때 생체는 그 자극의 종류에 관계없이 일정한 위협에 대한 반응으로 긴장성 두통, 편두통, 고혈압, 소화불량, 피로, 통증, 발모, 피부의 거칠어짐을 일으키고, 만성적으로 지속되면 각종 신경증, 위궤양 등을 유발시키는 등의 비특이적인 전신적증후군(general adaptative syndrome)을 나타내며 이를 스트레스라 정의하고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 반응들은 환경의 변화에 대한 항상성 유지를 위한 생체의 조절

과정이라 할 수 있다. 또한 특이적 반응도 비특이적 반응들과 상호협조적으로 연관되어 서로의 반응에 영향을 미친다. 스트레스는 생체에 가해지는 방법에 따라 크게 신체적 및 정신적으로 나눌 수 있다. 공통적으로는 교감신경계인 뇌하수체-부신계의 기능항진에 의해 모든 반응이 매개되며 정동반응을 일으키는 것과 동시에 운동기능 및 자율기능에도 영향을 미친다고 알려졌다.<sup>2)</sup> 최근에 스트레스에 대한 반응을 억제시키는 약물의 검색이 활발하게 이루어지고 있으며, 그 결과로서 인삼<sup>3)</sup>, *Ocimum sanctum* Linn., *Tinospora malabarica*<sup>4)</sup> 등의 생약과 멜라토닌(melatonin)등의 생체물질이 항스트레스작용을 나타낸다고 보고되었다. 현재 간질환

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

에 널리 사용되고 있는 약물중 우루소데옥시콜린산은 인간과 동물의 담즙에 함유되어 있으며 이담작용<sup>5)</sup>, 간 혈류 증가작용<sup>6)</sup>, 지방의 흡수 촉진작용<sup>7)</sup> 및 미세담도를 통한 노폐물 배설작용<sup>8)</sup>을 가지고 있다. 또한 Kawamura 등<sup>9)</sup>은 우루소데옥시콜린산이 수침구속스트레스에 의해 유발된 췌장을 억제시키고, 또한 위점막의 지질과산화물을 억제시킨다고 보고하였다. 우루소데옥시콜린산의 항스트레스 작용을 정확히 평가하기 위해서는 췌장 이외에 스트레스에 의하여 유발되는 다양한 지표를 이용해야 한다. 따라서 본 연구에서는 일반적으로 약물의 스트레스에 대한 억제효과 실험에 사용하는 비장, 부신의 무게변화, 부신중 아스코르빈산의 함량변화와 이외에 혈액생화학적 지표들을 사용하여 시간에 따른 지표들의 변화 양상을 기초로 약물의 항스트레스 효과 검색을 위한 스트레스 부과조건을 설정하고, 이를 이용한 우루소데옥시콜린산의 항스트레스 작용을 평가하고자 하였다.

**실험방법**

**실험동물** - 한국실험동물원에서 입수한 6주령의 수컷 S.D. 흰쥐를 3일간 순화시킨 후, 일반상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물만을 선별하여 시험에 사용하였다. 체중범위는 200~220 g로 제한하였고 사육환경은 다음과 같다. 동물실 내의 명암은 12시간으로 자동조절시켰으며 온도는 22±3°C, 습도 : 50±14%로 유지하였고 삼양유지(주)의 사료를 급식하였으며 물은 수도수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

**시약 및 기기** - 실험에 사용한 기기로는 흰쥐고정틀, autobalance, homogenizer, 자동혈액분석기(Dimension : DuPont Co.) 및 정량시약(cholesterol, lactate dehydrogenase, 외 3종), UV spectrophotometer 등을 사용하였다.

실험에 사용한 시약은 ursodeoxycholic acid (UDCA), phosphoric acid, trichloroacetic acid, ferric chloride, dipyridyl 등으로 Sigma Chem. Co. (USA)의 1급품을 사용하였다.

**스트레스의 부과** - 흰쥐를 고정틀에 묶어서 고정시키고 상온(20°C)에서 18시간 절식절수 상태로 방치하였다. 약물은 1% CMC에 현탁하여 사용하였으며 투여 간격은 스트레스 부과 2시간전, 스트레스 부과후 4, 16시간으로 경구투여 하였다. 스트레스 부과 18시간 후

에 동물을 희생시켰다.

**혈액의 채취 및 분석** - 복부정중선을 따라 흰쥐를 개복한 후 복대동맥에서 약 2 ml의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 상온에서 약 2시간 동안 방치시킨 다음 3000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액인 혈청을 분리하였으며 자동혈액분석기인 DIMENSION (Dupont Co.)을 이용하여 혈액생화학적 분석을 시행하였다. 혈액의 분석항목은 스트레스와 관련이 있다고 생각되는 alkaline phosphatase (ALP),<sup>10)</sup> cholesterol(CHOL),<sup>11)</sup> aspartate transaminase (GOT),<sup>12)</sup> alanine transaminase (GPT)<sup>13)</sup>, lactate dehydrogenase (LDH)<sup>14)</sup>를 선정하여 스트레스지표로서 사용가능성을 평가하였다.

**장기무게의 측정**<sup>3,15)</sup> - 흰쥐의 복부를 절개하여 비장을 적출하고 장기 주위를 둘러싸고 있는 지방조직을 제거한 후 무게를 측정하였다. 부신도 적출한 후 피막을 완전히 제거하였으며 양쪽 부신을 합하여 무게를 측정하였다.

**부신의 아스코르빈산 함량변화**<sup>16)</sup> - 무게가 측정된 부신을 5% TCA 용액 1 ml에 넣고 약 30초간 균질화시킨 다음, 이 용액을 원심분리용 튜브에 넣어 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 정량반응을 위하여 5% TCA 용액에 상등액 50 µl를 혼합하고 0.1 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(85%), 0.08 ml dipyridyl(1%), 0.01 ml ferric chloride (3%)를 차례로 첨가하였다. 시약을 완전히 섞고 상온에서 15분간 방치한 후 525 nm 에서 흡광도를 측정하여 부신중의 아스코르빈산 함량을 측정하였다.

**통계학적 분석** - 대조군과 시험군의 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하였으며, p값이 5% 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

**결과 및 고찰**

**스트레스 부과시간이 각 지표에 미치는 영향**

**혈액생화학적 요소에 미치는 영향** - 구속 스트레스를 0, 4, 8, 18, 24시간 부과시 혈액생화학적 지표에서는 GOT, GPT, LDH 가 빠른 시간내에 변화를 나타내었는데, 특히 GOT는 스트레스에 민감하여 2시간 이후부터 4시간 사이에서 현저히 증가하였고 시간이 지남에 따라 지속적으로 증가하였다. GPT도 4시간 경과 후 유의적인 증가를 나타내었고 시간이 지남에 따라 증가하

**Table I**—The changes of plasma enzymes level in stressed rats

Group	N	ALP	CHOL	GOT (Unit/dl)	GPT	LDH
Control	8	304± 8.8	69±3.7	94±13.5	63±5.9	726±52.4
4 hr	8	345±12.4	69±5.6	237±62.4**	90±8.5*	935±62.6*
8 hr	8	104±13.7*	93±5.4**	407±63.7**	191±14.2**	930±59.1
18 hr	8	435± 9.6*	93±3.6**	563±67.2**	383±43.8**	950±58.3*
24 hr	8	437±11.4*	97±5.4**	666±67.2**	411±35.9**	946±64.9*

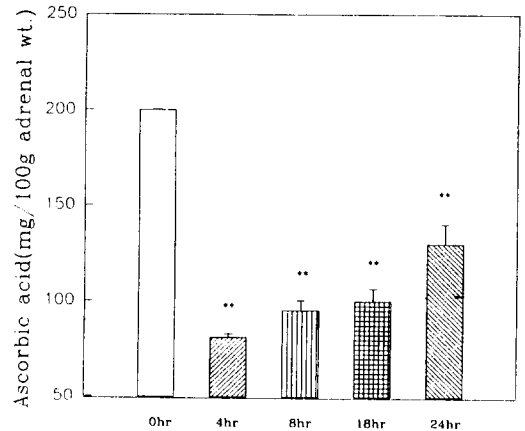
\*p<0.05, \*\*p<0.01 as compared to control

\* Data points are the mean±S.E. of duplicate determination

는 경향을 보였으나 GOT 보다는 시간적으로 변화 속도가 약간 늦어지는 경향을 나타내었다. 이에 비하여 LDH는 다른 양상을 나타내었는데 4시간 경과 후 유의적인 증가를 보였지만 시간이 지남에 따라 증가하지 않았다. 한편 ALP, CHOL은 시간적으로 늦게 변화하여 8시간이 지난 후에 유의적인 증가를 나타내었으며 변화 폭도 크지 않았다(Table I).

이 결과를 토대로 심장, 간 등의 같은 기관에 존재하면서도 혈중의 GOT, GPT와 LDH 농도가 다른 변화양상을 나타내는 원인을 추정해보면, LDH가 GOT, GPT보다 호르몬의 지배를 많이 받고있다고 판단된다. 스트레스가 가해지면 전반적으로 생체에 영향을 미치며 이러한 영향은 호르몬과 밀접한 관련을 가지며 조절되고 있다. 스트레스에 의한 신경내분비계의 반응을 살펴보면 생리적, 심리적 스트레스는 교감신경계의 활동을 증가시켜서 norepinephrine과 epinephrine을 혈액으로 방출시키고, 방출된 epinephrine은 뇌하수체전엽에서 부신피질 자극호르몬을 분비하게 하는데 이는 다시 부신피질을 자극하여 생체내 활동의 원동력인 에너지대사 호르몬 분비를 자극시키고 각 기관에 신호를 전달함으로써 스트레스 상태에 대응하게 된다.<sup>17, 18, 19, 20</sup> 호르몬은 스트레스 반응 초기에 주로 증가하며 시간이 지남에 따라 생체는 스트레스 환경에 적응하게 되어 분비량이 감소한다. 따라서 LDH는 초기 호르몬의 영향으로 신속한 변화를 나타내고 시간에 따른 지속적인 증가를 나타내지 않는다고 사료된다. 이에 비하여 GOT, GPT는 초기에 빠른 변화를 나타내고 지속적인 증가를 보이는 것은 초기에는 호르몬의 영향을 받지만, 그 이후에는 조직과사가 누적적으로 진행됨에 따른 결과라고 사료된다.

**부신의 아스코르빈산 함량변화** - 뇌하수체-부신계의 영향을 직접적으로 받는 부신중의 아스코르빈산 함량은 4시간 이전에 빠르게 감소하였고 시간이 지날수록 증가되었는데 이것은 스트레스에 대한 적응현상으로 호르몬



**Fig. 1**—Effects of restraint stress on ascorbic acid in adrenal of rats(n=8). \*\*p<0.01 as compared to 0hr group.

의 분비가 감소되어 나타난다고 사료된다(Fig. 1).

**장기무게에 대한 영향** - 스트레스를 0, 4, 8, 18, 24시간 부과시 비장은 4시간 부터 유의적으로 변화하기 시작하여 18시간에 정상의 절반으로 감소하였으며 24시간에서 더 이상의 변화를 나타내지 않았다. 부신은 8시간에서 현저한 비대현상을 나타내었고 시간이 경과함에 따라 더 이상의 증가를 나타내지 않았다(Fig. 2). 이러한 현상은 스트레스 반응의 주축인 뇌하수체-부신계의 기능항진으로 나타나며 호르몬의 영향을 크게 받으므로 스트레스 부과 초기에 부신비대 현상이 종료된다고 사료된다.

#### 우루소데옥시콜린산이 스트레스에 미치는 영향

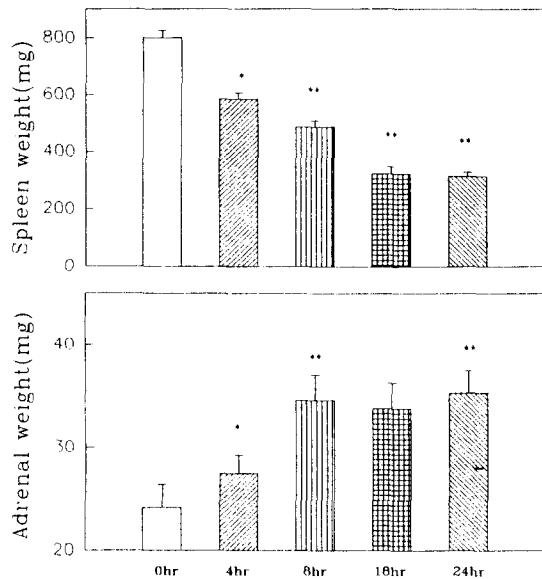
**혈액생화학적 요소에 미치는 영향** - 스트레스에 대한 우루소데옥시콜린산의 영향을 요약하면 12.5 mg/kg 용량에서는 특이한 영향을 나타내지 않았으나 25 mg/kg 용량에서 ALP, CHOL, LDH가 정상에 가깝게 회복되었다. 그러나 50 mg/kg 용량에서는 ALP,

**Table II**— Effects of ursodeoxycholic acid on biochemical indicators in blood

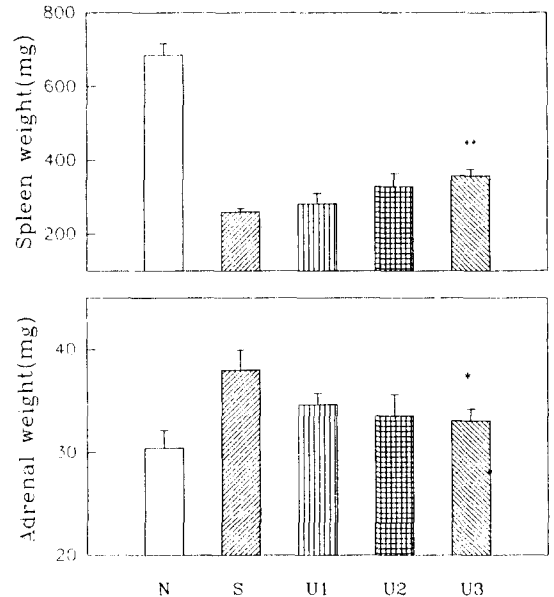
Group	Dose (mg/kg, p. o.)	N	ALP	CHOL	GOT (Unit/dl)	GPT	LDH
Control		8	234± 7.9	80±4.7	151±12.1	63± 6.1	712±58.2
Stress(s)	1%CMC	8	356±40.6	122±7.6	597±82.5	123± 8.7	985±67.1
S+UDCA	12.5	8	294±11.9	107±2.7	118±11.5	118±11.5	770±81.3
S+UDCA	25	8	224± 9.5*	89±3.4**	114±11.2	114±11.2	710±57.9*
S+UDCA	50	8	272±11.9	105±6.6	127±12.5	127±12.5	555±70.7**

\* p<0.05, p<0.01 as compared to stress

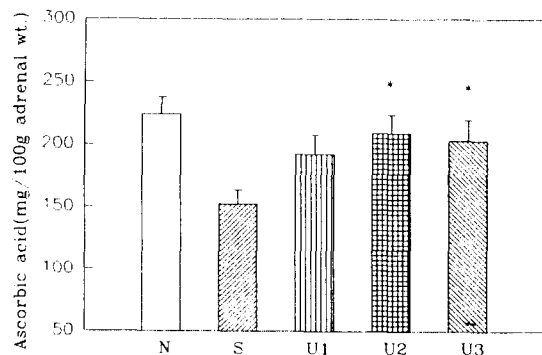
\* Data points are the mean±S.E. of duplicated determination



**Fig. 2**— Effects of restraint stress on spleen, adrenal weight in rats(n=8). \* p<0.05, p<0.01 as compared to 0hr group.



**Fig. 4**— Effects of ursodeoxycholic acid on spleen, adrenal weights in rats(n=8). N : normal, S : stress, U1 : UDCA(25 mg/kg), U2 : UDCA(25 mg/kg), U3 : UDCA(0 mg/kg) \* p<0.05 compared to stress.



**Fig 3**— Effects of ursodeoxycholic acid on ascorbic acid in adrenal of stressed rats(n=8). N: normal, S: stress, U1 : UDCA(12.5 mg/kg), U2 : UDCA(25 mg/kg), U3 : UDCA(50 mg/kg) \*p<0.05 compared to stress.

CHOL이 회복되었으나 25 mg/kg 용량 보다는 완전하지 않았다(Table II).

**부신의 Ascorbic acid 함량변화** - 구속스트레스는 부신의 아스코르빈산 함량을 감소시키는 결과를 나타냈다. UDCA 12.5 mg/kg 용량에서는 유의적인 영향을 나타내지 않았으나, 25, 50 mg/kg 용량에서 통계적으로 유의적인 회복현상을 나타냈다(Fig. 3).

**장기무게에 대한 영향** - 구속스트레스는 모두 비장의 무게를 감소시키고 부신의 무게를 증가시키는 결과를 나타냈다. 우루소데옥시콜린산 12.5, 25 mg/kg 용량에서는 비장의 무게증가 현상이 나타났으나 유의적인 영향을 나타내지 않았고, 50 mg/kg 용량에서 대조군에 비해 통계적으로 유의적인 수치를 나타내어 전체적으

로는 스트레스로 인한 비장 수축을 우루소데옥시콜린산이 용량의존적으로 회복시켰다. 한편 부신의 기능항진에 대한 실험에서도 우루소데옥시콜린산은 용량의존적으로 작용하여 50 mg/kg 용량에서 대조군에 비해 통계적으로 유의적인 수치를 나타내었다(Fig. 4).

## 결 론

본 연구는 구속스트레스가 흰쥐에 부과 되었을 때 스트레스 부과시간이 각 지표에 미치는 영향을 관찰하여 실험조건을 설정하고, 일반적으로 간장질환용제로 사용되고 있는 우루소데옥시콜린산이 스트레스에 의한 변화를 억제시킬 수 있는가 알아보기 위해 수행되었다. 스트레스 부과시간은 0, 4, 8, 18, 24 시간으로 간격을 두었고, 이 결과를 토대로 우루소데옥시콜린산의 항스트레스 약효평가는 16시간에서 설정하고 12.5, 25, 50 mg/kg 용량에서 실험하였으며 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) 구속스트레스 부과시 혈액생화학적 지표들 중에서 GOT, GPT, LDH 는 4시간 이내에 현저한 증가를 보였으며, ALP, CHOL은 시간적으로 후행하여 증가하였다.

2) 구속스트레스 부과시 부신중의 아스코르빈산 함량은 4시간 이전에 빠르게 감소하지만 시간이 지날수록 증가하는 경향을 나타내어 스트레스에 대한 적응현상을 보였다.

3) 구속스트레스 부과시 비장은 4시간 부터 유의적으로 수축하였으며, 부신은 8시간 부터 현저한 비대현상을 나타냈으나 시간의 경과에 따른 증가는 없었다.

4) 우루소데옥시콜린산은 스트레스에 의해 증가된 ALP, CHOL, LDH 를 25 mg/kg 이상 용량에서 유의적으로 억제하였다.

5) 우루소데옥시콜린산을 50 mg/kg 투여시 스트레스에 의해 수축된 비장을 증가시켰고, 비대해진 부신에 대해서도 유의적으로 억제시켰다.

6) 우루소데옥시콜린산은 증가된 부신중의 아스코르빈산 함량을 25 mg/kg 이상 용량에서 유의적으로 억제하였다.

위 결과와 같이 우루소데옥시콜린산은 구속스트레스에 의해 나타나는 생리학적 변화들을 25 mg/kg 이상 용량에서 억제시키는 효과를 가지고 있음이 판명되었다. 한편 우루소데옥시콜린산이 스트레스를 어떻게 억

제시키는가에 대한 메카니즘적인 연구와 더불어 동계열인 콜린산류에 대한 연구가 후행될 것이다.

## 문 헌

- 1) Selye, H.: The stress of life, Toronto, Longmans Green and Co., p. 1 (1958).
- 2) 전통약물로부터 신약개발 연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, p. 163(1993).
- 3) Brekhman, I. I.: Pharmacological investigation of glycosides from Gingseng and Eleutherococcus, *Lloydia* **32**, 46 (1969).
- 4) Sen, P., Maiti, P. C. and Ray, A.: Mechanism of anti-stress activity of Linn, eugenol and in experimental animals, *Indian J. Exp. Biol.* **30**, 592 (1992).
- 5) Kitani, K. and Kanai, S.: Effect of ursodeoxycholic acid on the bile flow in the rat, *Life Sci.* **31**, 1973 (1982).
- 6) 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).
- 7) Lanzini, A. and Northfield T. C.: Effect of ursodesoxycholic acid on biliary lipid coupling and on cholesterol absorption during fasting and eating in subjects with cholesterol gallstones, *Gastroenterology* **95**, 408 (1988).
- 8) Roslyn, J. J., Abedin M. Z., Strichartz, S. D., Abdou, M. S. and Palant C. E.: Regulation of gallbladder ion transport(role of bile lipids), *Surgery* **105**, 207 (1989).
- 9) Kawamura, T., Koizumi, F. and Ishimori, A.: Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats, *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi(JAPAN)*, **86**(10), 2373 (1989).
- 10) Bowers, G. N., McComb, R. B.: A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase, *Clin. Chem.* **12**, 70 (1966).
- 11) Flegg, H. M.: An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method, *Ann. Clin. Biochem.* **10**, 79 (1973).

- 12) Saris, N. E.: Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.* **24**, 720 (1978).
- 13) Wroblewski, F. and LaDue, J. S.: Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 569 (1965).
- 14) Gay, R. J., McComb, R. B. and Bowers, G. N.: Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. *Clin. Chem.* **14**, 740(1968).
- 15) 김낙두 외: 인삼의 항스트레스 작용에 관한 연구. *Kor. J. Pharmacog.* **10**, 61 (1979).
- 16) Shay, H., Komakov, S. A., F. F. Meraze, D. Gruentfein, M. and Siple, H.: *Gastroenterology* **5**, 43 (1945).
- 17) 차영선: 생리학, 서울, 최신행사, 276 (1970).
- 18) Cox, T.: Stress, Hong Kong, The Macmillian Press, p.2 (1978).
- 19) Kvetnansky, R. and Mikulaj, L.: Adrenal and lung catecholamines in rats during adaptation to repeated in mobilization stress. *Endocrinology* **87**, 738 (1970).
- 20) Shum, A., Johnson, G. E. and Flattery, K. V.: Catecholamine and metabolite excretion in cold-stressed immunosympathetized rats. *Am. J. Physiol.* **221**, 64 (1971).