

흰쥐에서 Ursodeoxycholic Acid 및 Silymarin을 함유한 의약조성물(DWP305)의 연용투여에 의한 간내 담즙산 조성변화

조재열* · 연제덕 · 남권호 · 김점용 · 유은숙 · 유영효 · 박명환

(주) 대웅제약 중앙연구소

(Received April 25, 1995)

Compositional Change of Hepatic Bile Acid by Multiple Administration of DWP305, a Combined Preparation Containing Ursodeoxycholic Acid and Silymarin, in Rats

Jae Youl Cho*, Je Deuk Yeon, Kweon Ho Nam, Jeum Yong Kim,
Eun Sook Yoo, Young Hyo Yu and Myung Hwan Park
R & D Center, Daewoong Pharm. Co. Ltd., Kyunggi 462-120, Korea

Abstract—DWP305, a preparation containing combination of ursodeoxycholic acid(UDCA), silymarin and vitamins(B₁ and B₂), is a drug currently being developed for hepatic disorders. In order to evaluate the changes in hepatic function by multiple oral administration(2 and 4 weeks) of DWP305 to rats, it was examined that several biochemical parameters in blood, bile acid composition, and the accumulation of UDCA and lithocholic acid(LCA), a toxic metabolite formed by enterobacteria, using HPLC. In blood biochemical findings, DWP305 did not affect the normal level and there was no difference in total bile acid composition for UDCA, cholic acid(CA), deoxycholic acid(DCA), chenodeoxycholic acid(CDCA) and LCA compared to the UDCA administered group, although total ratio of UDCA and CA was different from normal group. In case of the ratio of taurine and glycine conjugated forms, DWP305(186 mg/kg as a UDCA) administered group was also similar to normal group and UDCA administered group, while high dosing of DWP305 was not difference in the ratio of UDCA administered group(930 mg/kg) but normal group. And the ratio of LCA was in order of UDCA(930 mg/kg), DWP 305(930 mg/kg as a UDCA), UDCA(186 mg/kg) and DWP305(186 mg/kg as a UDCA) administered group, which was less than 4%. The free form of UDCA as well as most of bile acids was not detected at all in rat liver, meaning that there's no accumulation. These results suggest that multiple dosing of rats with DWP305 may not affect hepatic biotransformation and metabolism of bile acids.

Keywords □ Ursodeoxycholic acid, silymarin, fursulthiamine, riboflavin tetrabutryrate, bile acid, HPLC, rat.

담즙산은 물과 담즙색소, 지방산, lecithin, 콜레스테롤 및 무기염류 등과 함께 담즙을 구성하는 생체내 물질로서, 지방물질의 소화 및 소화작용 등의 중요한 기능을 담당한다.¹⁾ 또한 콜레스테롤 전구체로부터 생성되어 간

장 및 소장 등에서 효소학적으로 혹은 장내세균에 의해 conjugation, deconjugation, dehydroxylation, epimerization, oxidation-reduction과 같은 복잡한 반응에 의해 대사된다.¹⁾ 담즙산은 크게 trihydroxycholic acid(cholic acid(CA), muricholic acid(MA)), dihydroxycholic acid(chenodeoxycholic acid(CDCA), deoxycholic acid(DCA), ursodeoxycholic acid

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0342-41-7700 (팩스) 0342-731-7554

(UDCA)), monohydroxycholeic acid(lithocholic acid(LCA))등 세가지로 크게 분류된다. 이중 특히 곰류와 누투리아(남미산 물개의 일종) 담즙에서 분리된 UDCA는 대사과정 및 약리작용 등이 밝혀지면서 많은 연구와 관심이 모아진 대표적인 담즙산이다.²⁾

흰쥐내 UDCA의 대사경로는 대부분 간장에서 tau-uro-sodeoxycholeic acid (TUDCA)와 소량의 glyco-ursodeoxycholeic acid(GUDCA)로 전환된 후, 담관을 통해 십이지장으로 배설된다.³⁻⁵⁾ 또한 포합형은 소장에서 장내세균에 의해 유리형으로 전환되어 재흡수되거나 담즙을체의 원인으로 알려진⁶⁾ lithocholic acid (LCA)로 형성되기도 한다. 이들은 결장에서 재흡수되어 sulfation 과정을 거쳐 무독화되어 배설되기도 하고, 직접 변을 통해 제거되기도 한다.³⁻⁵⁾ TUDCA 및 GUDCA의 일부는 β -muricholic acid(MCA)로 전환되어 7 β -dehydroxylation반응에 의해 hydroxycholeic acid(HDCA)로 바뀌어 변을 통해 배설된다.^{4,5)}

UDCA는 간장질환 치료 목적으로 단독 및 비타민제와 복합 처방되는 약물로서 간질환 치료에 중요한 영향을 미치는 간혈류 증가작용²⁾, 미세담도를 통한 노폐물 배설 작용⁷⁾, 이담작용⁸⁾, 지방흡수 촉진 작용⁹⁾ 등과 같은 다양한 약리작용을 나타낸다. 또한 담즙내 콜레스테롤 포화를 감소시키는 효과가 있어 임상에서 콜레스테롤계 담석 용해제로도 사용되고 있다.^{10,11)} 한편 천연 생약 *Cardus marianus* 표준 추출액인 silymarin은 약효활성 물질로 알려져 있는 flavonolignane계통의 silybin, silydianin, isosilybin 및 silychristin 등이 함유되어 있으며 간세포 재생효과¹²⁾, 과산화지질 생성억제 효과¹³⁾, 간 세포 보호 작용¹⁴⁾ 등이 밝혀져 간질환에 관련된 치료 약물로서 광범위하게 사용되고 있다. 본 연구소에서 개발중인 DWP305는 이들 두 약물과 간장내 생화학 반응의 촉매 비타민인 푸르실치아민과 리보플라빈 테트라부칠산염을 복합한 제제로서 각 성분들의 상이한 약리작용이 복합적으로 나타나 몇몇 간장질환 모델에서 종합적인 간기능 회복 작용을 나타내었다.¹⁵⁾

그러나 임상보고에 의하면 UDCA 및 CDCA의 장기 투여는 사람에서는 큰 유해작용이 없으나 일부 실험동물(토끼나 원숭이류 등)에서 간장장애와 담관 이상증식, 문맥관 염증을 유발하는 LCA의 축적을 유도하는 것으로 보고^{6,16,17)}되면서, UDCA를 함유하는 의약조성물의 개발시 급성 및 아급성 독성시험을 포함하여 표적

Table I— Composition of administered drugs for each group

Group	UDCA (mg)	Silymarin (mg)	Fursulthiamine (mg)	Riboflavin tetrabutryate
Normal	-	-	-	-
C1	186	-	-	-
C2	930	-	-	-
G1	186	186	18.6	9.3
G2	930	930	93	47

Normal : 1% Na CMC

C1 : Ursodeoxycholeic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2 : Ursodeoxycholeic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1 : UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutryate 9.3 mg/kg

G2 : UDCA 930 mg + silymarin 930 mg + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutryate 47 mg/kg

장기인 간장조직내 변화에 대한 구체적 연구들이 요구되었다. 또한 이들 연구는 간내 주요 약리작용과 밀접히 관련된 담즙산에 대한 변화 확인에 의해 정확하고 효과적으로 수행될 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 이와 같은 배경으로 본 실험에서는 UDCA 함유 복합제인 DWP305의 안전성 확보를 위하여, UDCA는 일일 허용량의 100~200배, silymarin은 30~150배에 해당되는 아급성용량(930 mg/kg)으로 15일과 30일간 투여하고, 육안 및 조직학적 소견연구인 아급성시험과 동시에 흰쥐 간조직내 주요 담즙산을 정량하여 정상군, UDCA단독 투여군 및 기존 보고(5~30 mg/kg)들의 전체 담즙산 조성 변화를 비교하여 특이적인 변이를 관찰하였다. 또한 이들 결과를 바탕으로 DWP305의 고용량 투여에 의한 담즙산의 포합비 변화, LCA생성에 미치는 영향, 그리고 연속투여에 의한 담즙산의 간조직내 축적성 등을 평가하였다.

실험방법

시약 및 기기 - 시약으로는 UDCA(대웅제약), *Cardus marianus extract*(Indena, 이탈리아), 푸르실치아민(Vertex, 미국), 리보플라빈(Aldrich, 미국), 치아민아질산(Sigma, 미국), 리보플라빈 테트라부칠산염(田邊製藥, 일본) 및 메탄올, 아세트니트릴, 에탄올(Merck, HPLC grade, 미국) 등을 사용하였으며, 기타 시약은 Sigma(미국) 제품을 이용하였다. 또한 Dimension(Dupont, 미국), HPLC system(PU-980 Pump, 807-IT integrator, 851-AS autosampler,

FP-920 fluorometric detector, Jasco, 일본), centrifuge(Jouan, 프랑스), speed Vac(Eyala, 일본) 등의 기기를 사용하였다.

실험동물 - 시험동물은 체중 200 g내외의 6주령 Sprague Dawley계 흰쥐 수컷을 B & K사(중국, 상하이)로부터 구입하여 (주) 대웅제약 중앙연구소의 동물 사육실에서 일주일간 순응시킨 후 일반상태를 관찰하여 의견상 건강한 동물을 선별하여 시험에 사용하였다. 동물사육환경은 12시간 간격의 인공조명(AM: 08~PM: 08), 조도 300~500 lux, 온도 23±1°C, 배기 10~18 회/hr 조건하에서 polycarbonate cage에 5마리씩 넣어 사육하였다. 고형사료(삼양사료)와 수도물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시험물질 및 투여량 - 시험군은 정상군을 포함하여 5군으로 나누어 시험하였다. 각 군의 투여량은 Table I에서 처럼 DWP305의 아급성시험 용량인 400 mg/kg, 2,000 mg/kg로써 UDCA, silymarin 및 푸르실치아민, 리보플라빈 테트라부틸산염 등을 각각의 비율로 조제하였다. 각 시험군에 해당되는 시험물질은 1% Na CMC용액에 균일하게 현탁시킨 후 sonde를 이용하여 1일 1회, 주당 5회씩 흰쥐 kg당 10 ml를 경구투여하였다.

혈액 생화학적 검사 - 부검전 하룻밤을 절식시킨 후에 오텔로 마취시켜 복부대동맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 12,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 혈청을 얻고 자동 혈액 생화학 분석기인 Dimension을 이용하여 ALB(albumin), GOT(glutamate oxaloacetate transaminase), GPT(glutamate pyruvate transaminase), BUN(blood urea nitrogen), CHOL(cholesterol), GLU(glucose), TBIL(total bilirubin), TP(total protein), TRIG(triglyceride), ALP(alkaline phosphatase), CREA(creatinine), CL(chlorine), Na(sodium), K(potassium)등을 측정하였다.

간장 적출 및 담즙산 추출과정 - 채혈을 종료한 후 단두 및 간 관류를 통하여 충분히 방혈시켰다. 간장을 적출하여 2배 용량의 인산완충액으로 균질화시키고 균질액중 0.5 ml를 다시 0.7 ml의 ethanol과 충분히 혼합후 85°C에서 1분간 가온하여 원심분리(12,000 rpm, 5분)하였다. 동일한 방법을 세번 실시하여 상층액을 얻고 이들을 합하여 centrifugal vaporizer(Speed Vac)로 농축 건조시켰다. 다시 1 ml의 메탄올로 녹인 후 이

Table II—The biochemical findings in rats orally treated with UDCA and DWP305 for 4 weeks (n=10)

Items	Normal	C1	C2	G1	G2
ALB	1.17 ±0.04	1.21 ±0.04	1.18 ±0.05	1.14 ±0.05	1.18 ±0.04
ALP	288.7 ±17.3	285.5 ±18.2	288.1 ±14.55	294.9 ±16.5	302.13 ±17.67
BUN	23.4 ±0.72	22.1 ±0.45	23.8 ±0.76	21.5 ±0.58	21.4 ±0.67
GREAA	0.47 ±0.02	0.43 ±0.02	0.45 ±0.02	0.44 ±0.02	0.47 ±0.02
GLU	151.0 ±5.69	160.0 ±5.16	152.8 ±5.14	163.8 ±5.79	155.3 ±10.95
GOT	124.5 ±6.44	122.1 ±5.66	125.2 ±5.30	113.7 ±3.32	113.6 ±6.21
GPT	59.9 ±2.75	60.3 ±1.50	62.8 ±2.64	63.1 ±1.95	67.3 ±2.56
LDH	751.0 ±40.65	779.6 ±61.0	759.2 ±55.18	783.6 ±4.97	744.1 ±77.78
CHOL	69.2 ±2.47	62.7 ±2.41	65.5 ±2.83	65.6 ±4.97	65.3 ±3.63
TP	6.5 ±0.11	6.42 ±0.09	6.74 ±0.12	6.39 ±0.10	6.63 ±0.13
TBIL	0.055 ±0.004	0.053 ±0.004	0.056 ±0.003	0.056 ±0.005	0.050 ±0.004
TRIG	80.67 ±12.17	93.33 ±17.13	80.11 ±8.42	109.1 ±26.56	90.78 ±12.09
K	4.35 ±0.11	4.38 ±0.08	4.37 ±0.06	4.41 ±0.09	4.45 ±0.07
Na	163.6 ±1.22	163.7 ±1.38	162.9 ±1.73	160.2 ±2.31	161.9 ±1.07
CL	104.4 ±0.75	105.4 ±0.66	104.8 ±0.57	105.9 ±1.18	105.9 ±0.38

Values are Mean±S.E.

ALB: albumin, GOT: glutamate oxaloacetate transaminase, GPT: glutamate pyruvate transaminase, BUN: blood urea nitrogen, CHOL: cholesterol, GLU: glucose, TBIL: total bilirubin, TP: total protein, TRIG: triglyceride, ALP: alkaline phosphatase, CREA: creatinine CL: chlorine, Na: sodium, K: potassium
Normal: 1% Na CMC

C1: Ursodeoxycholic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2: Ursodeoxycholic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1: UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutryrate 9.3 mg/kg

G2: UDCA 930 mg + silymarin 930 mg + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutryrate 47 mg/kg.

중 20 µl를 HPLC로 분석하였다.¹⁸⁾

담즙산의 정량 - 추출된 여액으로 부터 Jasco bile acid analyzing HPLC system을 이용하여 담즙산을 정량하였다. 추출된 담즙산은 Bilepak-II column에 A(acetonitrile/methanol/30 mM ammonium acetate 완충액=30/30/40), B(acetonitrile/methanol/30 mM ammonium acetate 완충액=20/20/60) 이동상을 gradient elution하여 분리하였다. 계속해서 이

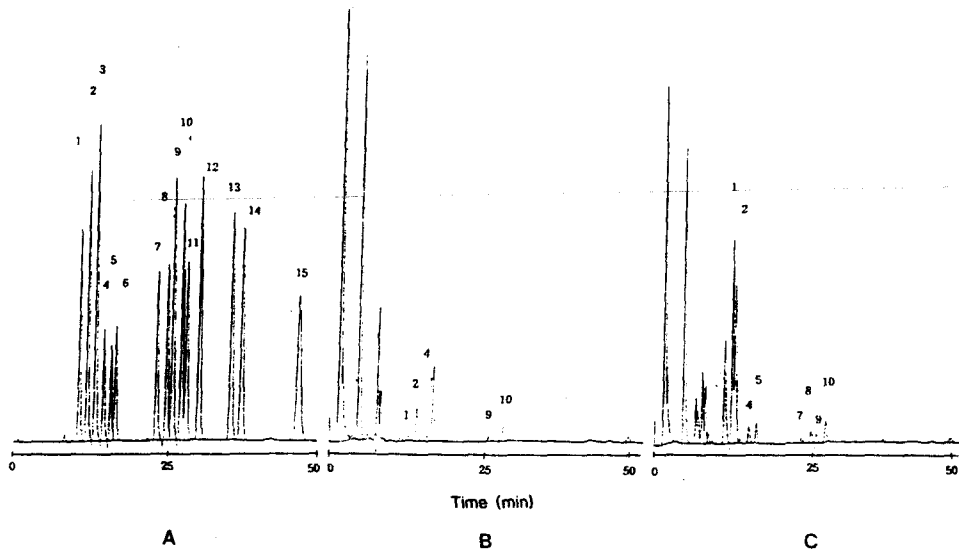


Fig. 1— HPLC chromatogram.

A. standard bile acids in methanol, B. Normal, C. DWP305

* peak

1 : Glycoursodeoxycholic acid(GUDCA), 2 : Tauroursodeoxycholic acid(TUDCA), 3 : Ursodeoxycholic acid (TUDCA), 4 : Glycocholic acid(GCA), 5 : Taurocholic acid(TCA), 5 : Taurocholic acid(TCA), 6 : Cholic acid(CA), 7 : Glycochenodeoxycholic acid(GCDCA), 8 : Taurochenodeoxycholic acid(TCDCA), 9 : Glycodeoxycholic acid(GDCA), 10 : Taurodeoxycholic acid(GDCA), 11 : Chenodeoxycholic acid(CDCA), 12 : Deoxycholic acid(DCA), 13 : Glycolithocholic acid (GLCA), 14 : Tauroolithocholic acid(TLCA), 15 : Lithocholic acid(LCA).

Table III — Bile acids in the liver of rats after repeated oral administration of DWP305 and UDCA once daily for 2 weeks(n=10, mean±S.E.)

Group	Total bile acid (μg/ml)	Taurine form (%)	Glycine form (%)	Free from (%)	Total LCA (%)	Total UDCA (%)	Total UDCA (%)	Total CA (%)	Total DCA (%)
Normal	98.60 ±4.58	95.21 ±2.78	4.84 ±0.58	0	0	4.30 ±0.30	2.60 ±0.31	86.32 ±15.48	6.45 ±1.89
C1	103.28 ±6.49	93.63 ±4.57	6.43 ±0.99	0	0.27 ±0.12	5.27 ±0.12	35.50 ±2.37*	48.95 ±8.67*	10.01 ±1.37*
C2	103.08 ±3.79	73.24 ±6.52*	26.81 ±1.41*	0	0.93 ±0.63	0.93 ±0.63	70.13 ±3.88**	18.49 ±2.47**	4.74 ±0.99
G1	91.86 ±6.21	91.11 ±4.21	8.93 ±1.31	0	0.11 ±0.09	0.11 ±0.09	39.53 ±1.73*	48.17 ±1.59*	7.25 ±1.24
G2	125.20 ±10.46	65.40 ±5.33*	34.61 ±1.89*	0	0.79 ±0.31	0.79 ±0.31	72.24 ±5.61**	16.88 ±0.89**	5.34 ±1.58

Normal : 1%Na CMC

C1 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1 : UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutryrate 9.3 mg/kg

G2 : UDCA 930 mg + silymarin 930 m + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutryrate 47 mg/kg

* : p(0.05 compared to normal group. ** : p(0.01 compared to normal group

들 담즙산을 β-nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 기질로하는 3α-hydroxy steroid dehydrogenase가 부착된 Enzymepak-HSD column 에서 반응시켜 효소학적으로 dihydronicotinamide

adenine dinucleotide(NADH)를 생성하여 NADH 의 형광을 측정하는 post-column reaction방법^{18, 19)} 을 이용하여 정량하였다. 유속은 1 ml/min으로, 검출기는 형광검출기를 이용하였으며 시료의 각 담즙산 농

Table IV — Bile acids in the liver of rats after repeated oral administration of DWP305 and UDCA once daily for 4 weeks(n=10, mean±S.E.)

Group	Total bile acid (µg/ml)	Taurine form (%)	Glycine form (%)	Free from (%)	Total LCA (%)	Total UDCA (%)	Total UDCA (%)	Total CA (%)	Total DCA (%)
Normal	77.41 ±8.41	97.91 ±5.67	2.10 ±1.30	0	0	6.11 ±0.39	2.33 ±0.21	85.69 ±2.61	5.90 ±0.76
C1	90.33 ±6.78	86.87 ±5.97	13.21 ±5.14	0	1.52 ±0.47*	9.59 ±1.34	40.03 ±2.23*	38.08 ±1.48*	10.77 ±1.49*
C2	110.87 ±17.36	61.62 ±11.56*	38.42 ±7.89*	0	3.44 ±0.49*	8.46 ±1.06	70.16 ±2.78**	13.41 ±1.21**	4.53 ±.87
G1	97.45 ±5.63	88.53 ±6.98	11.53 ±6.31	0	0.94 ±0.21	8.95 ±9.92	41.40 ±3.21*	40.77 ±0.79*	7.94 ±0.92*
G2	149.84 ±19.31*	55.91 ±8.32*	44.10 ±3.48**	0	2.38 ±0.23**	7.23 ±0.75	72.19 ±5.01**	14.08 ±0.98**	4.13 ±0.67

Normal : 1% Na CMC

C1 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1 : UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutryrate 9.3 mg/kg

G2 : UDCA 930 mg + silymarin 930 m + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutryrate 47 mg/kg

* : p<0.05 compared to normal group, ** : p<0.01 compared to normal group

도는 표준시료의 면적과 시료의 면적비를 이용하여 계산하였다.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 Duncan multiple range test를 이용하여 검정하였으며 통계학적으로 p<0.05일때 유의성이 있다고 판단하였다.

실험결과

혈액 생화학적 검사 - 전 투여군에서 정상군과 시험물질 투여군 간에 유의성있는 변화는 관찰되지 않았으며(Table II), 간장질환과 관련된 지표들도 정상군과 차이가 없었다.

담즙산의 조성변화 - HPLC에 의해 분석된 담즙산들의 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었으며 각 담즙산의 정량한계는 10에서 50 ng이었다. 가장 짧은 유지시간을 보이는 것은 GUDCA이며 가장 긴 것은 LCA였다. 정상군에 비해 DWP305군은 다소 복잡한 양상을 보였으며 이와같은 결과는 UDCA단독투여군에서도 동일하였다. 정량된 각 시료의 담즙산 양은 Table III와 IV에서 볼 수 있듯 정상군과는 차이를 나타내지만 UDCA 투여군과는 거의 유사했다. 전체 담즙산 중 taurine포함형과 glycine포함 담즙산의 비율은 저용량과 고용량에서 UDCA투여군과 DWP305투여군은 거의 유사하였다. 4주 투여결과를 보면 2주차에 비해 전체 담즙산 중 glycine포함형의 비율이 증가되긴 했으나, UDCA류를 제외하고 대부분의 담즙산은 taurine

포함형의 비율이 크게 변하지 않았다. 이와같은 양상은 동일용량의 UDCA 단독 투여군도 비슷하였다. 또한 2주와 4주 결과에서 전체 담즙산에서 유리형은 확인되지 않았다. 담즙올체 유발 및 간독성의 원인 담즙산으로 보고되는 CDCA류와 LCA류의 비율도 매우 낮아 4주에서 다소 증가된 경향을 보이긴 했으나 3.5% 미만으로 UDCA 단독 투여군(DWP305)정상군 순으로 나타났다.

각 담즙산의 변화

UDCA - Fig. 2, 3과 Table III, IV 등에서 보듯, 각 투여군에서 전체 담즙산중 UDCA류의 비율은 정상군에 비해 용량이 증가함에 따라 상승되어 전체 담즙산에 40%에서 70%를 차지하였다. 또한 동일 용량의 UDCA 투여군도 DWP305와 유사한 결과를 나타냈다. 각 투여군에서 확인된 UDCA류는 대부분 taurine 포함형(TUDCA)이었으며 시간이 지남에 따라 GUDCA가 증가되긴 했으나 유리형의 UDCA는 검출되지 않았다.

CA - CA는 2주와 4주전 투여군에서 정상군보다 상당히 감소한 것으로 나타났다. 정상군의 경우 전체 담즙산중 85% 정도를 차지하던 것이 DWP305투여후 10%에서 40%까지 감소하였으며 이와같은 결과는 UDCA투여군도 같았다. 또한 정상군에서 볼 수있는 glycine포함형(GCA)과 taurine포함형(TCA)의 비율이 DWP305와 UDCA투여 후 크게 전환되었으며 2주보다는 4주

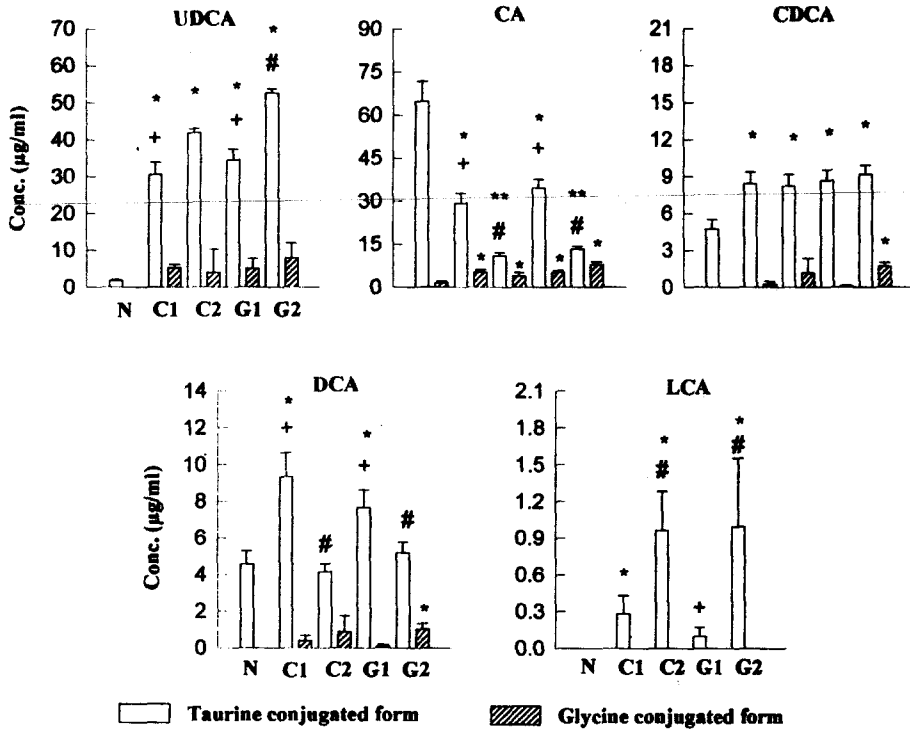


Fig. 2 — The concentration of glycine and taurine-conjugated bile acids in the liver of the rat after repeated oral administration of UDCA for 2 weeks (n=10, mean±S.E.).

* : p<0.05 compared to normal group, ** : P<0.01 compared to normal group, # : p<0.05 compared to DWP305(186 mg/kg as a UDCA), + : p<0.05 compared to DWP305(940 mg/kg as a UDCA)

Normal : 1% Na CMC

C1 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1 : UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutyrate 9.3 mg/kg

G2 : UDCA 930 mg + silymarin 930 mg + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutyrate 47 mg/kg

에서 더욱 뚜렷하였으나 UDCA류 처럼 유리형은 확인 되지 않았다.

CDCA - CDCA의 경우는 정상군과 큰 차이를 보이지 않았으나 DWP305투여군과 UDCA투여군은 4.9%에서 8.9%로, 5.7%에서 9.5%로 2주차에 비해 4주차에 다소 증가되었다. 또한 대부분 TCDCA형태로 검출되던 것이 4주 투여 후에는 소량의 GCDCA형태도 검출되었다.

DCA - 다른 담즙산처럼 glycine포함형보다 taurine포함형이 우세했으나, 시간이 지남에 따라 TDCA는 감소하고 GDCA는 다소 증가되었으며, 유리형의 DCA는 검출되지 않았다. 2주차 저용량의 UDCA 단독투여군과 DWP305 투여군 간의 유의적 차이를 제외하고 전군에서 큰 차이는 없었다.

LCA - 담즙울체의 원인으로 밝혀진 유리형 LCA

는 모든 군에서 검출되지 않았으며 대부분 TLCA와 소량의 GLCA로 확인되었다. Table III, IV에서 처럼 전체 LCA는 2주에 비해 4주에서 다소 증가되었으나 3.5% 미만이었다. 전체 담즙산에 대한 LCA의 비율은 UDCA 고용량>DWP305(고용량)>UDCA 저용량>DWP305(저용량)>정상군 순으로 DWP305군은 동일용량의 UDCA군에 대해 다소 LCA류 생성 비율이 적었다. 또한 Fig. 2, 3에서 볼 수 있듯이 DWP305군에서는 TLCA로만, UDCA투여군에서는 TLCA뿐만 아니라 소량의 GLCA도 확인되었다.

고 찰

본 실험에서는 담도세척능, 간혈류 개선작용, 콜레스테롤계 담석 용해작용 등의 약리작용이 알려진

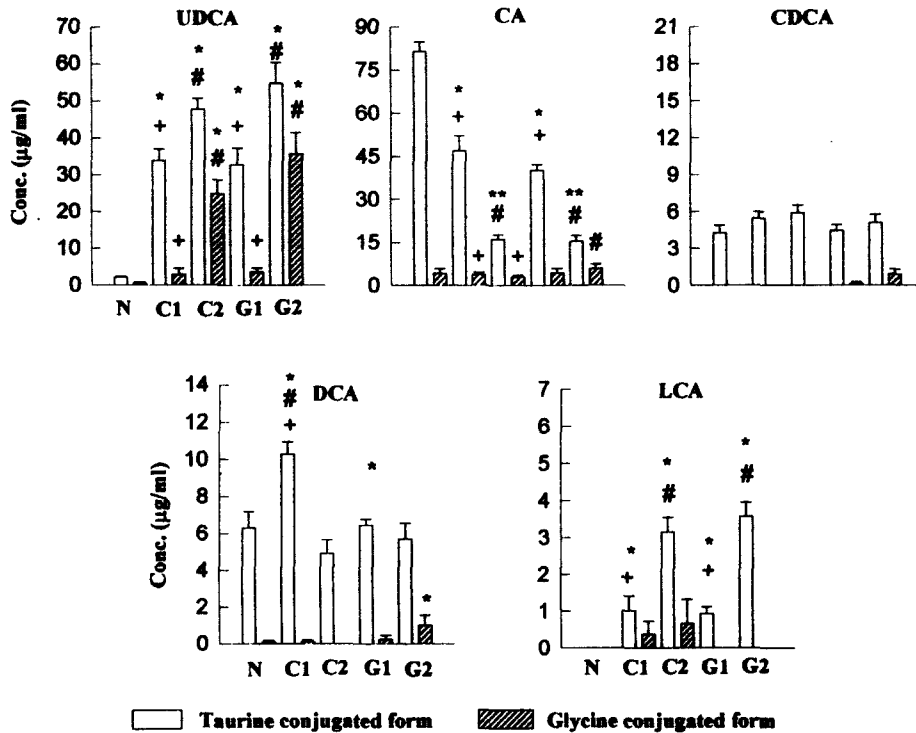


Fig. 3—The concentration of glycine and taurine-conjugated bile acids in the liver of the rat after repeated oral administration of UDCA for 4 weeks(n=10).

* : p<0.05 compared to normal group, ** : p<0.01 compared to normal group, # : p<0.05 compared to DWP305(186 mg/kg as a UDCA), + : p<0.05 compared to DWP305(930 mg/kg as a UDCA)
Normal : 1% Na CMC

C1 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 186 mg/kg

C2 : Ursodeoxycholic acid (UDCA) 930 mg/kg

G1 : UDCA 186 mg + silymarin 186 mg + fursulthiamine 18.6 mg + riboflavin tetrabutryrate 9.3 mg/kg

G2 : UDCA 930 mg + silymarin 930 mg + fursulthiamine 93 mg + riboflavin tetrabutryrate 47 mg/kg

UDCA^{2, 10, 11})와 간세포 재생 및 보호효과가 보고된 silymarin¹²⁻¹⁴) 그리고 푸르셀치아민과 리보플라빈 테트라부틸산염 등의 비타민을 복합한 DWP305를 고용량 연용투여시 간세포내 담즙산 조성에 미치는 영향 및 축적성을 평가하였다.

DWP305 투여군에서 흰쥐 간조직내 taurine과 glycine 포함 담즙산의 비율이나 UDCA, CA 등과 같은 담즙산 조성은 정상군과 다른 양상을 보였으나, 저용량 (186 mg/kg) 투여 결과는 UDCA 186 mg/kg투여군과 5~30 mg/kg으로 투여한 기존 보고³⁻⁵)와 유사하였다. 그러나 고용량의 DWP305투여는 뚜렷한 glycine 포함형 담즙산의 증가와 UDCA 및 CA 등의 감소를 관찰할 수 있었으며 이와같은 결과는 동일 용량의 UDCA투여군과 유사하였다. 그러나 이와같은 결과는

UDCA의 정맥내 infusion시 2시간 이후부터 glycine 포함 담즙산의 비율이 2배 이상 혹은 95% 이상을 차지한 결과^{16, 20})와 비교시 고용량, 연속투여는 흰쥐내 전체 glycine/taurine 포함비를 유지한 것으로 판단된다.

또한 유리형의 담즙산은 ursodeoxycholic acid-¹⁴C를 30 mg/kg로 투여 24시간 후, TLC로 정량된 간조직내에서 단회투여시 5.77%, 21일간 투여시 4.4%, 담즙에서 24시간까지 4.8%로 나타났으며³), 5. 20 mg/kg으로 21일간 투여시 담즙에서 각각 2.5%, 2.4%가 확인되었다.⁵) 그러나 동위원소를 사용하지 않은 본 실험의 결과에서 모든 투여군으로 부터 UDCA를 포함한 유리형의 담즙산은 검출되지 않았다. 이것은 간조직내에서 유리형의 담즙산은 정량한계 이하로 있거나 혹은 생성된 담즙산은 간조직내에서 즉시 taurine이나 gly-

cine과 포함되는 반응이 신속히 진행된다는 것을 의미하나, 기존보고와 다른 이유에 대해서는 더욱 심도있는 연구가 필요하리라 본다. 그러나 HPLC에 의해 분석된 모든 투여군에서 동일 양상이 관찰되는 것으로 보아 연용투여에 의해서도 담즙산의 포함반응 저해에서 기인된 유리형 담즙산의 생성증가는 일어나지 않는 것으로 사료된다. 즉 이와같은 결과는 UDCA를 고용량으로 연용투여하더라도 간조직내에서 UDCA 자체로 축적되지 않고 흰쥐가 갖는 포함능력에 의해 배설형(taurine 및 glycine 포함형)으로 전환된다는 것을 의미하며, DWP305는 UDCA투여군과 마찬가지로 흰쥐의 포함능력을 저해시키지 않는 것으로 생각된다.

한편 일부 실험동물(rabbit, rhesus monkey, baboon)에서 UDCA 및 CDCA의 장기투약으로부터 생성된 LCA가 간장내 담관 이상 증식, 염증세포 침윤, 섬유화 반응, 지방증 등과 같은 간독성 및 조직학적 병변 유발 원인 물질로 보고되면서 간내 독성유도 물질에 대한 연구들이 진행되었다.^{6, 16, 17} 특히 이들에 대한 무독화 능력이 낮은 토끼에 21일간 UDCA 투약(50 mg/kg) 후 확인된 LCA는 전체 담즙산 중 14%였다.¹⁶ 반면에 흰쥐나 hamster 등에서는 특이적인 병변이 유도되지 않는 것으로 보고되었는데 이것은 흰쥐 등은 LCA 포함반응 및 sulfation 등과 같은 무독화 반응³⁾을 통해 담즙으로의 배설을 촉진하기 때문인 것으로 알려졌다. 따라서 5, 20 mg/kg로 21일간 투여시 간조직내 전체 LCA의 비율은 1.2% 이하로 매우 낮은 비율을 보였다.⁴⁾ 이와같은 낮은 비율은 UDCA로서 이들 용량의 186배 및 45배(930 mg/kg)로 투여된 본 실험에서도 거의 유사하여 전체의 약 3%이하였다. Table III과 IV에서 처럼 유리형의 LCA는 검출되지 않았으며 대부분 taurine 포함형으로 확인되었다. 특히 DWP305에서는 다소 적은 LCA 비율을 보였으며 2주, 4주에서 UDCA 투여군과 달리 GLCA는 정량되지 않았으며 대부분 배설능이나 용해성이 큰 taurine 포함형(TLCA)으로 존재하였다. 이와같은 결과는 고용량의 UDCA 연용투여라도 LCA 생성비율의 증가가 진행되지 않았으며 생성된 LCA도 sulfation이나 TLCA와 같은 신속한 배설형의 전환 반응이 저해받지 않는 것으로 보아 이들 투여군은 흰쥐의 무독화 반응에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미하며 간독성과 관련된 GOT, GPT 및 bilirubin치 등과 같은 혈액 생화학적 지표에서도 확인할 수 있었다.

DWP305의 고용량 투여에 의한 담즙산 조성 변화는 기존 문헌³⁻⁵⁾에서 보고된 것처럼 DCA나 CDCA의 증가를 보이지 않았지만, UDCA포함형의 증가와 CA포함형의 감소 등의 결과는 일치하였다. 단독투여한 Ota등의 결과³⁾에서도 UDCA나 HDCA와 같은 dihydroxycholic acid들이 taurine 포함형태로 증가되었고, CA와 같은 trihydroxycholic acid등이 감소되었다. 또한 흰쥐에서 21일간 투여 후, 담즙산 조성 변화를 확인한 Parquet등⁴⁾도 20 mg/kg으로 투약시 CA의 감소를 보고하였다. 즉 투여된 고용량의 UDCA는 간조직내에서 CA, DCA 및 CDCA 등을 증가시키는 것이 아니라 대부분 TUDCA, GUDCA와 같은 포함형의 UDCA로 전환되어 배설되는 것으로 예상된다.

이상의 결과를 종합하면 silymarin 및 UDCA를 함유한 의약조성물(DWP305)의 고용량 연용 투여는 CA 및 UDCA 등과 같은 일부 담즙산의 변화를 가져왔지만 그의 담즙산들은 정상군과 유사한 조성변화를 보였으며 동일용량의 UDCA 단독 투여군과는 모든 담즙산에 대해 비슷한 양상을 보였다. 또한 DWP305 연용 투여는 흰쥐의 담즙산 포함 능력 및 LCA 무독화 반응에 영향을 미치지 않았으며, 투여된 UDCA를 축적시키지 않는 것으로 관찰되었다.

문 헌

- 1) Ganong, W. F. : *Review of medical physiology*. 13th ed., Prentice-Hall International Editions, p418 (1978).
- 2) 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).
- 3) Ota, M., Isobe, J., Tsuji, Y., Kuramoto, T. and Hoshita, T. : Metabolism of bile acids. Absorption, distribution, excretion, and metabolism of orally administrated ursodeoxycholic acid in rats. *Hiroshima Journal of medical sciences* 26, 2231 (1977).
- 4) Parquet, M., Rey, C., Groussard, M. and Infante, R. : Pharmacokinetics and metabolism of (¹⁴C) Ursodeoxycholic acid in the rat. *Biochem. Biophys. Acta*, 665, 299 (1981).
- 5) Hoshita, T., Kono, M., Matsusmoto, M., Uchi-

- yama, M. and Kuramoto, T.: Metabolism of bile acids. 1. Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism of ursodeoxycholic acid. *YAKUGAKU ZASSHI* **94**, 1196 (1964).
- 6) Palmer, R. H. : Bile acids, liver injury, and liver disease. *Arch. Intern. Med.* **130**, 606 (1972).
 - 7) 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).
 - 8) Kitani, K. and Kanai, S. : Effect of ursodeoxycholate on the bile flow in the rat. *Life Sci.* **31**, 1973 (1982).
 - 9) Lanzini, A. and Northfield, T. C. : Effect of ursodeoxycholic acid on biliary lipid coupling and on cholesterol absorption during fasting and eating in objects with cholesterol gallstone. *Gastroenterology* **95**, 408 (1988).
 - 10) Schoenfield, L. J. : Medical dissolution of gallstones. *Tokyo Tanabe Quarterly* **31**, 155 (1980).
 - 11) Iwamura, K. : Clinical studies on cheno- and ursodeoxycholic acid treatment for gallstone dissolution. *Hepato-Gastroenterology* **27**, 26 (1980).
 - 12) Maglino, E., Carosi, P. G., Minoli, L. and Gorini, S. : Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneim. - Forsch.* **23**, 161 (1973).
 - 13) Valenzuela, A., Lagos, C., Schimidt, K. and Videla, L. A. : Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2209 (1985).
 - 14) Tyutykova, N., Tuneva, S., Gorantcheva, U., Tanev, G., Zhivkov, V., Chelibonova-Lorer, H. and Bozhkov, S. : Hepatoprotective effect of silymarin on liver of D-galactosamine treated rats. *Meth. and Exptl. Clin. Pharmacol.* **3**, 71 (1981).
 - 15) Kim, Y. M., Yeom, J. H., Jang, B. S., Lim, S. W., Yoo, E. J., Yeon, J. D., Yu, Y. H., Park, M. H., Lee, S. M. and Cho, T. S. : Hepatoprotective effects of DWP305, a new combined preparation of ursodeoxycholic acid, in rats with hepatic disorder. *Yakhak Hoeji*, submitted (1995).
 - 16) Cohen, B. I., Hofmann, A. F., Mosbach, E. H., Stenger, R. J., Rothschild, M. A., Hagey, L. R. and Yoon, Y. B. : Differing effects of nor-ursodeoxycholic of ursodeoxycholic acid on hepatic histology and bile acid metabolism in the rabbit. *Gastroenterology* **91**, 189 (1986).
 - 17) Schmassmann, A., Hofmann, A. F., Angellotti, A., Ton-Tu, H. -T., Schteingart, C. D., Clerici, C., Rossi, S. S., Rothschild, M. A., Cohen, B. E., Stenger, R. J. and Mosbach, E. H. : Prevention of ursodeoxycholate hepatotoxicity in the rabbit by conjugation with N-methyl amino acids. *Hepatology* **11**, 989 (1990).
 - 18) Nam, K. H., Kim, D. O., Cho, J. Y., Yeom, J. H., Kim, Y. M., Yoo, E. S., Yu, Y. H. and Park, M. H. : Biliary and urinary excretion of DWP305, the combined preparation of ursodeoxycholic acid and silymarin for hepatic disorders in rats. *Yakhak Hoeji* **38**, 646 (1994).
 - 19) Mashige, F., Osuga, T., Tanaka, N., Imai, K. and Yamanaka, M. : Continuous-flow determination of bile acids in serum, and its clinical application. *Clin. Chem.* **24**, 1150 (1978).
 - 20) Drew, R. and Priestly, B. G. : Choleric and cholestatic effects of infused bile salts. *Experientia* **35**, 809 (1979).