

## 담도 결찰한 백서에 있어서 담즙산 및 UDCA 투여에 따른 혈중 지용성 비타민의 농도 변화에 관한 연구

건국대학교 의과대학 소아과

심재건 · 오명호 · 김기혁

### Serum Fat Soluble Vitamins in Bile Duct Ligated Rats

Jay Geon Sim, M.D., Myung Ho O, M.D. and Kee Hyuck Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Kon-Kuk University Hospital

**Purpose:** The aims of this study are to measure the serum levels of fat soluble vitamins (vitamin A and D) from bile duct ligated rats, and to evaluate the effect of oral bile acids administration to facilitate absorption of fat soluble vitamins.

**Methods:** We measured serum ALT, total bilirubin, vitamin A, and vitamin D of Sprague-Dawley rats 1 week before and 4 weeks after experimental bile duct ligation. Rats were consisted with 3 groups. Group 2 had been fed bile acids and group 3 ursodeoxycholic acid after operation for 4 weeks. Multi-vitamin was given to all groups.

**Results:** 1) Base line (mean value before duct ligation): ALT 74.2 IU, total bilirubin 0.26 mg/dL; vitamin D 13.01 ng/mL vitamin A 0.87  $\mu$ g/mL, total bile acids 25.16  $\mu$ mol/L. 2) Four weeks after ligation: ALT 100.7 IU, total bilirubin 2.58 mg/dL; vitamin D 7.89 ng/mL vitamin A 1.37 $\mu$ g/mL, total bile acids 278.22  $\mu$ mol/L. 3) 4 weeks after ligation, each group (group 1, group 2 and group 3) showed vitamin D (7.62, 8.10 and 7.99) ng/mL, vitamin A (1.68, 1.06 and 1.33)  $\mu$ g/mL, total bile acids (233.17, 345.80 and 268.57)  $\mu$ mol/L, which were statistically not significant.

**Conclusion:** Serum level of vitamin A is increased after bile duct ligation although vitamin D is decreased. Oral administration of bile acids does not affect the serum levels of vitamin A and D in bile duct ligated rats. (**J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 2: 59~64**)

**Key Words:** Cholestasis, Bile acids, Rat, Vitamin D

접수 : 1998년 11월 20일, 승인 : 1999년 2월 22일

책임저자 : 심재건, 380-060, 충청북도 충주시 교현동 620-5, 건대부속병원 소아과

Tel: 0441) 845-2501 (223), Fax: 0441) 844-4826

\*이 논문은 1997년도 건국대학교지원 연구비에 의한 논문임.

(This paper was supported by Kon-Kuk University, 1997)

## 서 론

담즙은 인간을 비롯한 동물에서 생리적인 활동을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이는 간에서 생성되어 대변으로 배설되며, 담즙의 분비는 빌리루빈, 콜레스테롤과 같은 성분의 배설에 중요하다. 또한 장관 내에서 지방을 용해(solubilization)하고, micelle을 형성하여 지방 성분의 소화와 흡수를 촉진시킨다. 따라서 장관내에서 담즙은 지용성 비타민의 흡수에 주요한 역할을 한다.

간 자체의 질환 또는 담도의 이상을 유발하는 여러가지 질환에 의하여 담즙이 십이지장으로 배출되지 못하는 경우 담즙 정체가 일어나며, 이로 인하여 담즙이 간세포와 담도(biliary passage)에 축적되게 된다. 배설되어야 할 담즙이 혈중에 남아 있게됨으로 해서 유발되는 소양증, xanthoma, 뼈의 변화 등의 증상 외에도, 지방의 흡수 장애 및 이에 동반되는 문제가 임상적으로 담즙 정체성 질환 환자를 치료하는데 있어서 중요하다.

특히 소아에서 담즙 정체성 황달로 인한 담즙 분비 장애가 장기간 지속되는 경우, 이로 인한 지용성 비타민의 부족을 치료하고 예방하는 것이 영양상태 유지 및 성장에 중요하다. 현재 담즙 정체성 황달이 장기간 지속되는 경우 지용성 비타민의 부족을 치료, 예방하기 위해서 지용성 비타민을 비경구적으로 반복하여 투여하여야 한다<sup>1)</sup>.

여러 실험 동물을 이용하여 담도 폐쇄를 유발시킬 수 있으나, 담도 폐쇄에서 영양학적인 변화를 연구하기 위한 실험 동물 model은 확립되어 있지 않으며, 담도 폐쇄를 일으킨 실험 동물에서 혈중 지용성 비타민의 농도 변화에 대한 연구도 이루어져 있지 않다.

이에 저자들은 rat에서 수술적으로 담도 폐쇄를 유발시켰을 때 일어나는 지용성 비타민의 혈중 농도 변화를 조사하여 담도 폐쇄에 의한 영양학적인 실험 동물 모델로 rat의 이용 가능성에 대해 알아보고자 하였다.

또한 경구적으로 투여된 담즙산이 장관 내에서

비타민 흡수에 끼치는 영향에 대해서도 알아보고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 대 상

생후 4주된 백서(Sprague-Dawley; 체중 250~300 g, male) 30마리를 대상으로 하였으며, 이 백서들은 사육 기간동안 24°C의 항온과 12시간 주기의 광원을 유지하였다. 상품화된 pellet 사료(삼양사)와 물을 자유로이 먹을 수 있도록 하면서 사육하였다.

### 2. 방 법

1) 혈액 채취: 백서를 ether 마취하에 심장에서 2 ml의 혈액을 채혈하였고, 채혈 후 1주일 동안 회복시켰다. 채혈된 혈액은 serum 분리하여 -70°C에 보관하였다.

2) 담관 결찰<sup>2,3)</sup>: 백서는 수술전 3시간동안 금식시켰으며, 전저치로 atropin을 피하 주사하였다. Ketamine과 diazepam을 복강내에 주입하여 마취하였다. 마취된 백서를 꼬리가 술자를 향하고 등을 밑으로 위치하게 하였다. 정중선을 따라 개복하였으며, 근육과 복막을 옆으로 제치고, 십이지장과 간을 위로 젖혀서 담도를 노출시켰다. 결합조직에서 담도를 분리시킨후, 횡장 조직 앞 4 mm 정도의 떨어진 담도 2군데에서 silk suture로 담도를 결찰하였고, 결찰한 담도의 가운데를 절단하였다. 복막과 복근은 silk로 봉합하였다. 수술도중 체온이 저하되지 않도록 heat lamp를 사용하였고, 수술 후 주변 온도를 33°C로 유지하며 마취에서 회복시켰다.

3) 비타민 및 bile acids의 투여: 담도를 결찰한 백서는 각 10마리씩 3개의 군으로 나누었다. A군은 vitamin만을 투여하였고(10마리), B군은 vitamin과 bile acids mixture를(10마리), C군은 vitamin과 ursodeoxycholic acid (UDCA)를 투여하였다(10마리).

Vitamin은 Alvityl syrup (영진약품)을 0.5 ml/day/rat의 용량으로 음수에 섞어서 섭취시켰다. UDCA (Sigma)와 bile acid mixture (Sigma)는 ethanol에 녹여 pellet형 사료에 흡수시킨 후 이를 다시 건조하

**Table 1.** Serum Levels Before and After Bile Duct Ligation

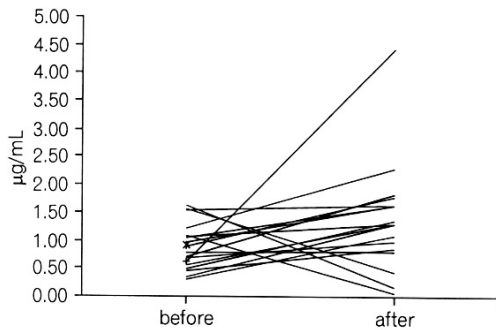
	before (N=10) mean±S.D.	after (N=16) mean±S.D.	p
AST (IU)	74.2±30.7	91.8±42.2	0.23
bilirubin (mg/dL)	0.3±0.1	2.1±2.7	0.016
vitamin A (µg/mL)	0.9±0.4	1.4±1.0	0.0001
vitamin D (ng/mL)	13.0±1.9	7.9±4.2	0.0032
bile acids (µmol/L)	25.2±23.2	278.2±318.3	0.050

S.D.: standard deviation

**Table 2.** Serum Vitamin Levels After Bile Duct Ligation

	group A (N=7)	group B (N=5) mean±S.D.	group C (N=8)
AST (IU)	101.6±50.7	65.0±8.8	71.0±59.7
bilirubin (mg/dL)	2.5±3.3	0.5±0.3	6.8±6.9
vitamin A (µg/mL)	1.7±1.4	1.1±0.6	1.3±0.7
vitamin D (ng/mL)	7.6±4.4	8.1±2.7	8.0±5.1
bile acids (µmol/L)	233.2±236.1	345.8±428.0	268.6±319.2

P>0.096



**Fig. 1.** Serum vitamin A levels before v.s. after bile duct ligation.

여 사용하였으며 각각 50 mg/day/rat의 용량을 투여하였다.

각 군은 4주간 음수와 사료를 통해 vitamin, bile acids, UDCA를 계속 섭취시키면서 사육하였으며, 담도 결찰 후 4주가 되는 날에 다시 채혈하였다. 채혈한 blood는 곧 원심 분리하여 혈청을 채취하였

으며, 검사를 시행할 때까지 -70°C에 보관하였다.

**4) 혈청 검사:** 담도 결찰 전과 결찰 4주에 채혈하여 보관하였던 혈청으로 ALT, total bilirubin, vitamin A, vitamin D<sub>3</sub>, total bile acids 농도를 측정하였다. Vitamin A는 HPLC를 이용하여 측정하였고, vitamin D<sub>3</sub>는 radioimmunoassay (25OH-VitD<sub>3</sub>-CT, Biosource, Belgium)로, bile acids는 enzymetry method (Enza bile 2, Daichi, Japan)로 측정하였다.

**결 과**

수술전 간기능(ALT)의 평균은 74.20 IU, 빌리루빈의 평균은 0.26 mg/dL 이었다. 담도 결찰후 ALT는 91.75 IU, 빌리루빈은 2.06 mg/dL 이었다(Table 1).

담도 결찰 4주까지 생존한 백서는 A군 7마리, B군 5마리, C군 8마리였다.

Total bile acids의 농도는 빌리루빈의 농도와 동일하게 담도 결찰 후 현저하게 증가하였으며, vita-

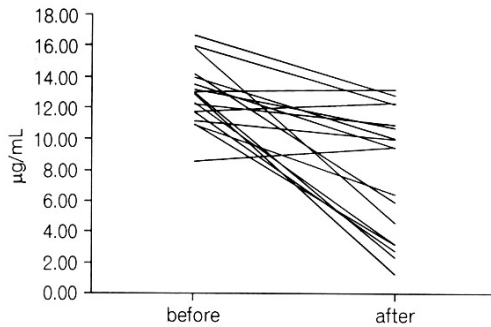


Fig. 2. Serum vitamin D levels before v.s. after bile duct ligation.

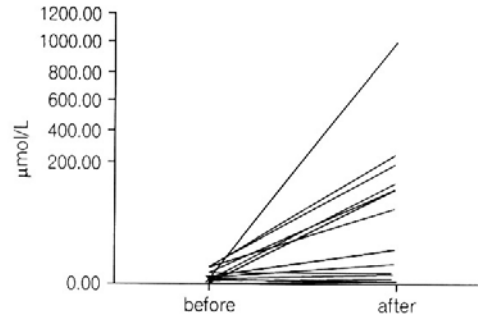


Fig. 3. Serum bile acids levels before v.s. after bile duct ligation.

min D<sub>3</sub>의 농도는 결찰 후의 농도가 결찰 전에 비하여 0.6배정도의 농도로 감소하였으나, vitamin A는 결찰 후 혈중 농도가 결찰 전에 비하여 1.6배정도 증가하였다(Table 1).

담도 결찰후 간 기능 검사 수치와 vitamin A는 A군이 가장 높았고, 빌리루빈은 C군이, vitamin D와 bile acids는 B군이 수치적으로는 가장 높았으나, 각 군간에 이들 검사의 결과는 통계적인 유의성은 없었다(0.96 > p > 0.096)(Table 2, Fig. 1~3)

### 고 찰

백서의 담관을 인위적으로 결찰하여 혈중 비타민 농도의 변화를 측정된 자료는 저자들이 아는 한 아직까지 발표된 바가 없으며, 또한 담관 결찰된 백서를 이용하여 영양학적인 실험을 위한 동물 모델을 시도한 결과도 발표된 논문이 거의 없다.

백서에 있어서 콜레스테롤로부터의 담즙의 생성 및 enterohepatic circulation 과정 자체는 인간과 거의 차이가 없을 것으로 생각되나, 장관 내에서 담즙산의 성분 및 구성 비율은 차이가 있을 것으로 사료된다.

저자들의 실험 결과에서 백서는 담관 결찰 후 빌리루빈 및 총 담즙산의 농도는 담관 결찰전에 비하여 혈중 농도가 10배 정도 상승하고 있으며, 이는 담관 결찰로 유발된 담도 폐쇄에 의한 예상된 결과이다. 백서에서 ALT 정상 수치는 발표된 자료

가 거의 없으나 저자들의 실험 결과에서는 인간보다는 조금 높게 측정되고 있다. 간 기능 검사로 이용한 ALT의 수치는 담즙산 농도의 현저한 상승에도 불구하고 담도 결찰 후에도 수치 변화가 많이 심하지 않다. 담도 결찰 4주 후의 ALT 농도는 상승하고 있으나, 백서에서는 충분한 량의 채혈이 쉽지를 않아 용혈이 잘 일어나기 때문에 이로 인한 오차가 있을 가능성이 있어, 본 자료가 건강한 백서 및 담즙 정체성 황달이 생긴 백서에서의 ALT에 대한 reference로 사용되기에는 무리가 있다고 판단된다. 또한 담도 결찰 후 간기능에 이상은 초래되었을 것으로 짐작되나 혈중 빌리루빈이나 담즙 농도의 상승에 비하여 ALT 농도가 많이 올라가지 않은 것은 담도 결찰 후 4주라는 백서로서는 비교적 많은 시간이 경과하여, 담즙 정체로 인한 간염이후 간의 섬유화가 진행하면서<sup>4)</sup> 검사 결과가 영향을 주었을 가능성이 높으나, 이런 가능성은 검증하지 못한 상태이다.

담즙 정체시 영양 부족에 관계되는 문제는 거의 모두가 장관내의 담즙의 부족에 의해 유발된다. 장기간 담즙 정체증을 보이는 환자에서 칼로리와 단백질의 공급을 유지시키는 외에 담즙 부족에 따른 지방 흡수 장애를 예방하여야 하며 neutral fat는 거의 흡수되지 않으므로, bile salt가 없이도 흡수 가능한 MCT oil의 형태로 공급하는 것이 필요하다. 또한 fat-soluble vitamin (A, D, K)도 경구로는 흡수가 되지 않으므로 비경구적 경로를 통하여 투여하

여야 한다<sup>1)</sup>.

담도 결찰 후 백서는 예상한 대로 혈중 vitamin D의 농도는 감소한 결과를 보이고 있으나, vitamin A의 혈중 농도는 오히려 상승되었다. 많은 실험에서 백서에 vitamin A가 함유되지 않은 식이를 공급하여 vitamin A 부족증을 유발시켰으나<sup>5,6)</sup>, 충분한 vitamin A를 공급하면서 담즙의 분비를 수술적으로 차단시킨 경우 장관내에서 vitamin A의 흡수에 대한 자료는 아직 발표된 바가 없다. 실험 결과에서 거의 모든 백서에서 vitamin A의 혈중 농도는 담도 결찰 전보다 결찰 후가 더 높게 측정되고 있다. 이는 백서에 있어서 vitamin D와는 다르게 vitamin A는 장관에서 흡수되는데 있어서 담즙의 역할이 중요하지 않을 가능성이 있다. 아니면 일부 vitamin A의 수용성 metabolite가 투여되었거나<sup>7)</sup>, 담즙에 영향을 받지 않는 vitamin A 대사에 관여하는 효소의 가능성을 고려해 볼 수 있으나<sup>8)</sup>, 이에 대한 검증은 본 실험만으로는 불가능하다.

담즙의 생성은 음성 되먹이기 기전(negative feedback control)으로 조절되며, enterohepatic circulation을 통하여 간으로 들어오는 담즙량에 의해서 담즙 생산량은 조절되며, 경구로 UDCA를 투여하면 chenodeoxycholic acid와 cholic acid 모두 소장에서의 흡수가 저해되는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. 본 실험 결과에서는 담즙산을 경구 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비하여 혈중 담즙산의 농도가 현저하게 더 높게 측정되지는 않고 있으며, 또한 UDCA 투여군도 담즙산 투여군에 비하여 검사 결과들이 의미있는 차이는 보이지 않고 있다. 이는 UDCA가 cholic acid, chenodeoxycholic acid 보다 cholestasis를 더 심하게 유발시킨다는 결과와는 일치되지 않는 결과를 보인다<sup>4,6)</sup>.

제반 결과를 볼 때 백서에서 수술적으로 담도 결찰을 하여 담도 폐쇄를 일으키는 것은 비교적 간단한 술기이며, 담도 폐쇄의 결과도 만족스러우나, 담도 폐쇄 후 유발되는 여러 변화는 사람을 대상으로 한 결과와는 일부 차이가 있다. 담도 폐쇄가 유발된 백서에 있어서 혈중 vitamin D와 빌리루빈 및 담즙산 농도는 예상 결과와 잘 일치하여, 항

후 백서를 담도 폐쇄의 실험 동물로 사용할 때 최소한 혈중 vitamin D<sub>3</sub> 농도는 이용 가능할 것으로 판단된다. 백서에 있어서 vitamin A의 장관내 흡수 및 체내 대사에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이번 실험 결과로 담도 폐쇄된 백서의 식이에 담즙 성분을 함께 투여하여도 지용성 vitamin의 흡수가 촉진되지는 않는 것으로 판단된다. 담즙산 투여군에 있어서 혈중 담즙산 농도의 상승이 투여하지 않는 경우보다 현저하게 상승하지 않은 것은 enterohepatic circulation을 통한 장관내 담즙의 흡수가 거의 일어나지 않았거나, 혈중내 담즙산의 농도가 높아 간에서 담즙 생성이 억제되었을 가능성이 있으나 정확한 이유를 알기 위해서는 이를 규명하기 위한 실험이 따로 시행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목 적:** 저자들은 백서에서 수술적으로 담도 결찰 전과 결찰 4주 후에 지용성 비타민(vitamin A와 D)의 혈중 농도 변화 및 담도 결찰 후 담즙산을 투여했을 때 장관내 지용성 비타민의 흡수 변화에 대하여 알아보려고 하였다.

**대상 및 방법:** 생후 4주된 Sprague-Dawley rats를 대상으로 하여 수술적으로 담도를 결찰하였다. 담도 결찰 전과 결찰 4주후의 혈중 ALT, total bilirubin, vitamin A, vitamin D의 농도를 측정하였다. 백서들은 담도 결찰 후 4주간 사육하였으며, 사육 기간 중 비타민만을 투여한 군, 담즙산을 투여한 군 및 UDCA를 투여한 3군으로 나누었다.

**결 과:**

- 1) 수술전 혈중 농도(평균): ALT 74.2 IU, total bilirubin 0.26 mg/dL; vitamin D 13.01 ng/mL vitamin A 0.87 µg/mL, total bile acids 25.16 µmol/L.
- 2) 수술 4주후 농도(평균): ALT 100.7 IU, total bilirubin 2.58 mg/dL; vitamin D 7.89 ng/mL vitamin A 1.37 µg/mL, total bile acids 278.22 µmol/L.
- 3) 수술후 각 군간의 혈중 vitamin A와 vitamin D

의 농도 차이는 없었다.

결론: 담도 결찰 후 vitamin A 혈중 농도는 상승하였으며, vitamin D 농도는 감소하였다. 경구로 담즙산을 투여할 때 혈중 지용성 vitamin 농도는 투여하지 않은 경우와 차이가 없었다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Dellert SF, Balistreri WF. Neonatal cholestasis. In: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, editors. Pediatric gastrointestinal disease. 2 ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1996; 1010-2.
- 2) 김성덕. 실험동물 마취학. 서울: 의학문화사, 1993: 30-4, 63-7, 133-40.
- 3) Waynforth HB. 실험동물 및 외과수기. 서울: 대한교과서주식회사, 1985: 124-7, 133-8.
- 4) Sherlock S, Dooley J. Disease of the liver and biliary system. 9th ed. Seoul: Science Publications Center, 1993: 214-35.
- 5) Anzano M, Lamb A, Olson J. Growth, appetite, sequence of pathological signs and survival following the induction of rapid, synchronous vitamin A deficiency in the rat. *J Nutr* 1979; 109: 1419-31.
- 6) Nauss K, Phua C, Ambrogi L, Newberne P. Immunologic changes during progressive stages of vitamin A deficiency in the rat. *J Nutr* 1985; 115: 909-18.
- 7) Nau H, Elmazar M, Ruhl R, Thiel R, Sass J. All-trans-retinoyl-beta-glucuronide is a potent teratogen in the mouse because of extensive metabolism to all-trans-retinoic acid. *Teratology* 1996; 54: 150-6.
- 8) Ritter S, Smith J. Multiple retinoids alter liver bile salt-independent retinyl ester-hydrolase activity, serum vitamin A and serum retinol-binding protein of rats. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1291: 228-36.
- 9) Tavill A. The synthesis and degradation of liver-produced proteins. *Gut* 1972; 13: 225-41.