

반복적인 Betaine 투여가 간독성 및 Cytochrome P-450 의존성 약물대사효소계 활성화에 주는 영향

김상겸 · 김영철*

서울대학교 약학대학

(Received March 28, 1996)

The Effect of Repeated Betaine Treatment on Hepatotoxicity and Cytochrome P-450 Dependent Drug Metabolizing Enzyme System

Sang Kyum Kim and Young Chul Kim*

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

Abstract—Betaine is one of the major water-soluble components in *Lycii Fructus*. In the present study the effect of repeated betaine treatment on the hepatotoxicity and the cytochrome P-450-dependent enzyme system was examined in adult female rats. Administrations of betaine (100 or 1,000 mg/kg/day, ip) to rats repeatedly for 4 or 9 days did not evoke hepatotoxic response as determined by increases in glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activities measured 24 hours following the final dose of betaine. The activities of aminopyrine N-demethylase, *p*-nitroanisole O-demethylase and *p*-nitrophenol hydroxylase as well as the contents of cytochrome P-450 were determined in hepatic microsomes of rats treated with betaine (1,000 mg/kg/day, ip) for 4 or 9 days. Repeated treatment of rats with betaine for a period of 4 days induced a marginal decrease in the contents of cytochrome P-450, but did not influence the activities of *p*-nitrophenol hydroxylase, *p*-nitroanisole O-demethylase, or aminopyrine N-demethylase. Extension of the betaine treatment to 9 consecutive days failed to alter the parameters for hepatic drug metabolizing activity determined in the present study. Since repeated large doses of betaine were demonstrated to be tolerated by rats without showing any toxicity or changes in drug metabolizing enzyme activities in the liver, this compound appears to be relatively safe to animals upon long-term ingestion.

Keywords □ Betaine, Hepatotoxicity, Cytochrome P-450, Aminopyrine N-demethylase, *p*-Nitroanisole O-demethylase, *p*-Nitrophenol hydroxylase.

Betaine (trimethylglycine)은 중성의 수용액에서 양쪽성을 가지는 저분자물질로 동물과 식물계에 널리 분포하며 특히 Solanaceae과 식물의 주성분의 하나이다. Solanaceae계 생약 중 하나인 구기자 (*Lycii Fructus*)는 전통적으로 간장보호제로 한약에 혼합되어 사용되어 왔으며 차로도 널리 애호되고 있다. Betaine은 구기자의 물분획층 중의 주요성분으로 구기자

의 약리작용을 매개할 것으로 연구자들에 의해 예상되어 왔다. 그러나 오랫동안 광범위한 구기자의 사용에도 불구하고 이 식물의 주요성분인 betaine의 간에 대한 작용에 관한 연구보고는 많지 않다. 오래전에 betaine을 랫트에 투여하였을 때 고지방식으로 인한 간의 지방함량 증가를 완화시키나 오히려 정상식이에서는 간의 인지질을 증가시키키 보고된 바 있다.¹⁾ 또한 사염화탄소에 의해 유도되는 간조직내 중성지방의 증가가 betaine 투여에 의해 억제됨이 관찰되었다.²⁾ 한편 최근에 들어와서는 랫트에서 betaine을 ethanol과

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-880-7851 (팩스) 02-872-1795

병용투여할 때 ethanol에 의해 유도되는 간의 fatty infiltration 을 억제하는 것으로 보고되었으며, 간조직 내 S-adenosylmethionine의 증가가 그 기전으로 제시된 바 있다.^{3,4)}

Cytochrome P-450은 내, 외인성물질의 대사를 담당하는 monooxygenase system에서 terminal oxidation을 수행하는 enzyme이다. Cytochrome P-450은 주로 간에 고농도로 존재하며, 체내에 침투한 외인성물질의 무독화과정을 주로 매개하지만 반대로 활성화된 형태의 대사체를 생성하여 독성을 유발시킬 수도 있음이 잘 알려져 있다.⁵⁾ 또한 특징적으로 cytochrome P-450은 외인성물질의 노출에 의해 그 양이나 활성이 induction되거나 inhibition되며, 최근에는 isozyme이 분리되면서 각각의 isozyme의 선택적인 inducer, inhibitor와 substrate에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁶⁻⁸⁾

본 연구실험에서는 민간에서 널리 사용되고 있는 구기자의 유효성분과 그 작용을 규명하는 실험의 일환으로 구기자의 유효성분으로 생각되는 betaine 이 간에 주는 영향에 대해 연구실험하였다. 먼저 랫트에게 높은 용량의 betaine을 반복적으로 투여하고 간에 직접적으로 주는 영향을 조사하기 위하여 간독성의 지표를 측정하였다. 또 간의 cytochrome P-450 의존성 대사반응의 활성변화를 측정하여 이 물질이 타 외인성물질의 대사와 독성발현에 주는 영향을 규명하고자 하였다.

실험방법

실험동물

전 실험에 걸쳐 체중 180~220 g의 자성 Sprague-Dawley 랫트를 사용하였다. 실험동물은 분양받은 후 5주 이상 본 대학의 사육실에서 적응시키고 실험에 사용하였다. 사육실은 온도 $22.5 \pm 5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 환경을 유지하고 사료와 물은 제한 없이 공급하였다. Betaine은 (100 또는 1,000 mg/kg, ip) saline에 용해시켜 동물에게 투여하였다. 간독성 평가와 microsomal enzyme system에 미치는 영향을 측정하는 실험에서는 betaine을 최종적으로 투여하고 24시간 후에 복대동맥에서 채혈하여 혈청을 분리하고 간을 절취하였다.

시약

NADPH, aspartic acid, betaine, α -ketoglu-

tarate, trizma base, 4-dimethylaminoantipyrine, L-ascorbic acid, ammonium acetate, 4-nitrocatechol, triethanolamine, trisaminomethane, pyruvate (이상 Sigma 시약), *p*-nitrophenol, sodium hydroxide, *p*-nitroanisoole (이상 Aldrich 시약), diethyl ether, perchloric acid, glycerin, acetic acid, formaldehyde (이상 덕산 시약), sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic (이상 Shinyo 시약) 등을 사용하였다. 그의 실험에 사용한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

Assays

복대동맥에서 채취된 혈액에서 분리한 혈청으로부터 간독성의 지표인 GPT (glutamic pyruvic transaminase), GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 활성은 Reitman과 Frankel의 방법으로 UV spectrophotometer (Beckman DU650)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며⁹⁾, SDH (sorbitol dehydrogenase) 활성은 Gerlach의 방법에 의거하여 측정하였다.¹⁰⁾

Microsomes 분리를 위해 간무게를 측정하고 3배 용량의 homogenizing buffer (1 mM의 EDTA와 50 mM의 Tris-HCl을 포함하는 0.154 M KCl 용액, pH는 7.4)를 가하여 teflon pestle로 분쇄한 후 4°C , 10,000 g로 20분간 원심분리 후 상등액을 취하여 4°C , 105,000 g에서 1시간 동안 초원심분리하였다. 여기서 얻은 microsomal pellet을 buffer에 재분산하고 4°C , 105,000 g에서 1시간 동안 재원심분리하였다.

Microsomal cytochrome P-450의 함량은 Omura와 Sato의 방법에 의거하여 450 nm와 490 nm의 흡광도 차이로부터 측정하고 결과는 nmol/mg protein으로 표시하였다.¹¹⁾

Hepatic microsomal enzyme 활성측정실험에서는 공통적으로 총 반응액의 부피는 1 ml로 하였으며 37°C 에서 반응을 수행하였다. 반응종결 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 각각의 방법으로 발색시켰다. 발색된 sample 들은 즉시 UV spectrophotometer (Beckman DU650)로 흡광도를 측정하고 표준검량선을 이용하여 활성을 정량하였다.

Aminopyrine (AM) N-demethylase 활성은 반응생성물인 formaldehyde를 정량하여 측정하였다. Po-

tassium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM) 0.7 ml에 기질액 (5 mM)과 microsomal suspension 0.1 ml을 가한 후 preincubation 시키고 1 mM의 NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 10분간 반응시킨 후 trichloroacetic acid를 이용하여 반응을 종결시켰다. 반응 생성물인 formaldehyde는 Nash의 방법에 의거하여 발색시키고 흡광도를 측정하여 정량하였다.¹²⁾

p-Nitroanisole (PNA) O-demethylase의 활성은 Shigematsu 등의 방법에 따라 생성물인 *p*-nitrophenol을 4N의 KOH로 발색시켜 측정하였다.¹³⁾ 기질액 (0.1 mM)과 microsomal suspension 0.1 ml을 0.7 ml의 potassium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM)에 가하고 preincubation 시켰다. 2~3분 후 0.1 ml의 NADPH (1 mM)를 가하여 반응을 시작하고 10분후 trichloroacetic acid를 이용하여 반응을 종결시켰다.

p-Nitrophenol (PNP) hydroxylase 활성은 Koop의 방법에 의거하여 10 N의 NaOH에 의해 발색된 4-nitrocatechol의 생성량으로 측정하였다.¹⁴⁾ Ascorbic acid (1 mM), 기질액 (0.1 mM) 그리고 0.1 ml의 microsomal suspension을 0.6 ml의 potassium phosphate buffer (pH 6.8, 1 mM)에 가하여 preincubation 시켰다. 반응의 시작은 NADPH (1 mM)를 가하는 시점으로 하였으며 3분간 반응시키고 perchloric acid를 가하여 반응을 정지시켰다.

Protein content는 Lowry 등의 방법에 의거하여 정량하였다.¹⁵⁾ Bovine serum albumin을 standard로 하여 Folin's reagent로 발색시키고 정확히 30분후 750 nm에서 UV spectrophotometer (Beckman DU650)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과를 평균±표준편차로 표시하고 각 군간의 차이는 two-tailed Student's t-test를 사용하여 유의성을 검증하였다.

실험결과

Betaine의 반복적인 투여가 간에 주는 직접적인 영향을 측정하기 위하여 betaine을 100 mg/kg 또는 1,000 mg/kg 용량으로 4일간 복강내로 연속투여한 후 간독성의 지표인 혈중 glutamic pyruvic transa-

Table I— Serum GPT, GOT and SDH activities in rats treated with betaine for 4 days^a

Group	GPT (units/ml)	GOT (units/ml)	SDH (units/ml)
Control	35.6±6.2	83.7±11.3	11±7
Betaine (100 mg/kg)	34.7±4.7	71.2±14.3	11±4
Betaine (1,000 mg/kg)	37.8±3.2	75.8±15.1	10±5

^aRats were treated with betaine (100 or 1,000 mg/kg, ip) once a day for 4 consecutive days. Control animals were treated with saline only. Rats were sacrificed for the assay 24 hours after the final treatment. Each value represents the mean±SD for 6 rats.

Table II— Serum GPT, GOT and SDH activities in rats treated with betaine for 9 days^a

Group	GPT (units/ml)	GOT (units/ml)	SDH (units/ml)
Control	33.7±5.3	69.1±10.7	13±5
Betaine (100 mg/kg)	38.8±2.0	62.5±6.7	11±3
Betaine (1,000 mg/kg)	29.4±3.6	62.7±7.2	11±3

^aRats were treated with betaine (100 or 1,000 mg/kg, ip) once a day for 9 consecutive days. Control animals were treated with saline only. Rats were sacrificed for the assay 24 hours after the final treatment. Each value represents the mean±SD for 6 rats.

minase (GPT), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 sorbitol dehydrogenase (SDH)의 활성을 측정하였다(Table I). Betaine을 100 mg/kg 용량으로 4일간 투여하였을 때 혈청 중 대표적인 간독성의 지표인 GOT, GPT 및 SDH는 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 또한 betaine의 용량을 10배인 1,000 mg/kg까지 증가시켜 랫트에 투여하였을 때에도 이들 간독성의 지표는 상승되지 않았다. Betaine의 투여를 9일간으로 연장시켰을 때도 혈청 중 GOT, GPT와 SDH 활성에는 변화가 보이지 않았으며 용량을 10배로 증가시켜도 이들 지표에 주는 영향은 나타나지 않았다(Table II). 또한 실험기간 중의 체중 증가율과 최종 도살시에 실시된 주요 장기의 육안관찰에서도 betaine은 대조군에 비해 변화를 유발시키지 못하였다(data not shown).

간의 약물대사활성에 미치는 betaine의 영향을 조사하기 위하여 betaine을 1,000 mg/kg 용량으로 4일간 반복투여하고 최종 투여 24시간 경과시 간의 microsomes을 분리하여 간의 microsomal enzyme

Table III — Hepatic microsomal enzyme system in rats treated with betaine for 4 days^a

	Liver Weight/ Body Weight (%)	Protein Content (mg/g liver)	Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	Aminopyrine	<i>p</i> -Nitroanisole	<i>p</i> -Nitrophenol
				N-Demethylation	O-Demethylation	Hydroxylation
				(nmol/mg protein/min)		
Control	2.72±0.18	18.04±0.37	0.619±0.01	4.68±0.53	1.64±0.19	1.17±0.13
Betaine	2.82±0.25	17.72±1.38	0.506±0.06 ^b	5.11±0.34	1.33±0.10	0.99±0.11

^aRats were treated with betaine (1,000 mg/kg, ip) once a day for 4 consecutive days. Control animals were treated with saline only. Rats were sacrificed for the assay 24 hours after the final treatment. Each value represent the mean±SD for 3 pooled samples each made of livers from 2 rats.

^bSignificantly different from the control group (Student's t-test, P<0.05).

Table IV — Hepatic microsomal enzyme system in rats treated with betaine for 9 days^a

	Liver Weight/ Body Weight (%)	Protein Content (mg/g liver)	Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	Aminopyrine	<i>p</i> -Nitroanisole	<i>p</i> -Nitrophenol
				N-Demethylation	O-Demethylation	Hydroxylation
				(nmol/mg protein/min)		
Control	3.09±0.15	17.61±0.50	0.553±0.02	5.00±0.96	1.44±0.07	1.08±0.07
Betaine	3.13±0.14	18.37±1.13	0.490±0.06 ^b	4.87±0.36	1.36±0.05	1.00±0.07

^aRats were treated with betaine (1,000 mg/kg, ip) once a day for 9 consecutive days. Control animals were treated with saline only. Rats were sacrificed for the assay 24 hours after the final treatment. Each value represent the mean±SD for 3 pooled samples each made of livers from 2 rats.

system의 지표들을 측정하였다(Table III). Cytochrome P-450의 함량은 betaine에 의하여 대조군의 약 85% 정도로 통계적으로 유의성있게 감소되었으나 상대적인 간 무게나 microsomal protein 함량에는 변화가 없었다. 또 betaine이 cytochrome P-450 의존성 대사활성에 주는 영향을 측정하기 위하여 aminopyrine, *p*-nitroanisole 및 *p*-nitrophenol을 기질로 하여 *in vitro* microsomal assay를 실시하였다. 다양한 cytochrome P-450의 isozyme에 의해 대사되는 것으로 알려진 aminopyrine의 N-demethylase 활성은¹⁶⁾ betaine의 4일간의 반복투여에 의해 변화를 보이지 않았다. 또한 cytochrome P-450 1A, 2B 그리고 2E1 등에 의해 매개되는 *p*-nitroanisole O-demethylase 활성이나¹⁷⁾ 2E1의 대표적인 활성지표인 *p*-nitrophenol hydroxylase 활성도¹⁴⁾ betaine 투여에 의해 변화를 보이지 않았다.

Betaine의 microsomal enzyme system에 대한 영향을 증대시키기 위하여 betaine을 매일 1,000 mg/kg의 용량으로 9일간 연속투여하고 최종 투여 24시간 후에 간의 microsomes을 분리하여 위와 동일한 지표를 측정하였다(Table IV). Cytochrome P-450 content, 상대적인 간의 무게와 microsomal protein 함량에서 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 또한 aminopyrine N-demethylase, *p*-nitrophenol hydro-

xylase와 *p*-nitroanisole O-demethylase의 활성이 betaine 투여군에서 전반적으로 정상 대조군에 다소 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성있는 변화를 유발하지는 못하였다.

고 찰

아미노산인 glycine에 methyl group이 3개 결합된 구조를 가지고 있는 betaine의 생체내 생리활성은 아직도 분명하게 밝혀지지 않고 있다. Betaine은 체내에서 주로 인지질과 신경전달물질의 원료인 choline의 산화형 대사체로 존재하며 choline에서 betaine으로의 산화형 대사는 choline dehydrogenase와 betaine aldehyde dehydrogenase로 구성된 choline oxidase system에 의해 매개된다.¹⁸⁾ 이 system은 신장에서 요의 삼투압이 증가할 때 choline을 betaine으로 산화시켜 세포내에 농축시킴으로써 삼투압을 조절하는 중요한 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.^{19, 20)} 또한 betaine은 간에서 one carbon donor인 S-adenosylmethionine의 합성과정에서 betaine-homocysteine methyltransferase에 의해 매개되는 homocysteine의 methionine으로의 methylation 반응에 사용되므로 생체내 물질의 생합성에 매우 중요한 역할을 갖고 있는 것으로 보인다.²¹⁾

한편 최근에 들어와 betaine은 랫트의 일차배양 간세포에서 사염화탄소에 의해 유도되는 세포독성을 현저히 억제하는 것으로 관찰되었으며²²⁾, 또한 랫트를 이용한 동물실험에서도 사염화탄소에 의해 유발되는 혈청중 GTP 활성의 상승을 차단하는 것으로 보고되었다.²³⁾ 사염화탄소의 간독성은 이 산업용 용매의 대사활성화와 밀접히 관련되어 있음을 고려할 때 위의 실험결과들은 betaine 이 간의 약물대사능력에 변화를 유발시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 잘 알려진 예로는 사염화탄소를 투여하여 간의 약물대사능력이 손상되었을 때 사염화탄소나 acetaminophen과 같은 대사활성화를 거치는 물질에 의한 간독성의 발현이 현저히 억제되는 것을 들 수 있다.²⁴⁾

본 연구실험에서는 먼저 높은 농도의 betaine 의 반복적인 투여가 대표적인 간독성의 지표인 혈청중 GOT, GPT와 SDH의 활성에 주는 영향을 측정하였다. 최고 9일 동안 최대 1,000 mg/kg의 용량으로 계속된 betaine 투여는 GOT, GPT 뿐만아니라 간병변에 더욱 민감하고 선택적인 지표로 알려진^{25, 26)} SDH의 활성에도 변화를 유발시키지 못하였다. 이 결과는 고용량의 betaine 투여가 직접적으로 간기능에 이상을 유도하지 않음을 시사한다. 따라서 betaine은 간을 대상으로 할 때 그 자체로는 대단히 저독성의 물질인 것으로 보인다.

한편 betaine이 간접적인 경로를 통해 내, 외인성 물질의 생체내 작용에 변화를 유발할 가능성을 조사하기 위하여 이 물질이 간의 약물대사능력에 주는 영향을 *in vitro*에서 실험하였다. 최근 cytochrome P-450의 isozyme에 대한 연구가 진행되면서 현재까지 약 200여개의 gene이 발견되었으며, 각각의 isozyme에 대한 구조와 선택적인 기질, inducer 및 inhibitor에 대한 많은 정보가 축적되고 있다.²⁷⁾ 특히 cytochrome P-450 1, 2, 3로 각각 명명된 family 들이 외인성물질의 대사에 중추적인 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다.^{5, 6)} Cytochrome P-450의 isozyme 중에서 cytochrome P-450 1A는 polycyclic aromatic hydrocarbons을, cytochrome P-450 2E1은 halogenated hydrocarbons과 nitrosoamines을 대사시켜 궁극적인 독성물질로 전환시키는데 중요한 역할을 담당한다.^{28, 29)} 한편 phenobarbital에 의해 쉽게 induction 되는 cytochrome P-450 2B는 광범위한 기질선택성을 가지는 것으로 보고되어 있다.^{5, 6)}

본 실험에서는 고용량 betaine의 반복적인 투여는 상대적으로 간의 무게나 microsomal protein의 함량에 영향을 주지 못하였다. 4일간의 betaine 투여는 cytochrome P-450의 함량을 약 10% 내외로 통계적으로 유의성있게 감소시켰으나, 9일간으로 투여기간을 연장시켰을 때 cytochrome P-450 함량을 유의적으로 변화시키지 않았다. 이 결과는 betaine의 투여가 전반적인 microsomal enzyme system의 활성에 큰 영향을 주지 못함을 암시한다.

Betaine 이 특정한 기질의 간대사활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 betaine 이 반복투여된 동물로부터의 microsomes에서 aminopyrine, p-nitroanisole, 또는 p-nitrophenol의 대사활성을 측정하였다. Betaine의 반복적인 투여에 의해 전반적으로 대사활성이 다소 감소한 것으로 보이나 어떤 parameter에서도 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. Aminopyrine의 대사는 cytochrome P-450의 전체 활성측정에 사용되는 지표로 외인성물질의 대사에 주로 관여하는 cytochrome P-450 1, 2, 3 family 모두에 의해 매개된다.¹⁶⁾ Betaine의 4일간의 투여는 aminopyrine N-demethylase 활성을 대조군에 비해 약 10% 정도 증가시켰으나 통계적인 유의성은 보이지 않았으며, 또한 9일 동안으로 투여기간을 연장시켜도 이 지표에는 변화를 유발하지 못하였다. p-Nitroanisole O-demethylation 반응은 주로 cytochrome P-450 1A에 의해 매개되나 그 외에도 cytochrome P-450 2E1과 cytochrome P-450 2B에 의해서도 진행되는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 본 실험에서 betaine 은 9일까지 투여되었을 때 p-nitroanisole의 대사활성에 통계적으로 유의성있는 차이를 유발하지 않았다. 또한 사염화탄소나 acetaminophen과 같은 저분자물질의 독성활성화에 주로 관여하는 cytochrome P-450 2E1에 의해 선택적으로 대사되는 것으로 알려진 p-nitrophenol hydroxylation 반응 역시 betaine의 반복적인 투여에 의해 변화하지 않았다.

Betaine은 한약 및 차로 사용되는 구기자의 주요 수용성 성분이다. 따라서 구기자를 응용하는 인체는 betaine에 장기적으로 노출될 가능성이 존재한다. 본 연구실험에서 상당한 고용량의 betaine을 비교적 장기간 투여시에도 랫트에게 그 자체로 간독성을 유발시키지 않았으며 외인성물질의 대사를 담당하는 간의 cytochrome P-450의 함량이나 aminopyrine N-

demethylase, *p*-nitroanisole O-demethylase, 또 *p*-nitrophenol hydroxylase 활성에 변화를 유발하지 않았다. 또한 betaine은 실험종료시 실시된 주요 장기의 육안적 관찰이나 투여기간 중 체중 증가율에도 영향을 주지 못하였다. 따라서 종합적으로 본 연구결과는 betaine은 반복적인 고용량 투여시에도 간기능이나 간의 약물대사능력에 중요한 변화를 유발하지 않는 비교적 안전한 물질임을 시사하고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 1994년도 서울대학교 신의약품 개발연구센터 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Harper, A. E., Monson, W. J., Benton, D. A. and Elvehjem, C. A. : The influence of protein and certain amino acids, particularly theronine, on the deposition of fat in the liver of the rats. *J. Nutr.* **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) Beckenhauer, H. C., Barac, A. J. and Tuma, D. J. : Relationship of administration dietary levels of betaine to hepatic S-adenosylmethionine and triglyceride. *Hepatology* **18**, 265A (1993).
- 4) Barac, A. J., Beckenhauer, H. C. and Tuma, D. J. : S-Adenosylmethionine generation and prevention of alcoholic fatty liver by betaine. *Alcohol* **11**, 501 (1994).
- 5) Guengerich, F. P. : Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 2946 (1988).
- 6) Wrighton, S. A. and Stevens, J. C. : The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **22**, 1 (1992).
- 7) Nelson, D. R. and Coon, M. J. : P-450 cytochromes: structure and function. *Adv. Enzymol.* **60**, 35 (1987).
- 8) Guengerich, F. P. : Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 241 (1989).
- 9) Reitman, S. and Frankel S. K. : A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
- 10) Gerlach, U. : Sorbitol dehydrogenase in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U.), (Verlag Chemie, Weinheim), 112 (1983).
- 11) Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
- 12) Nash, T. : The colorimetric estimation of HCHO by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 415 (1971).
- 13) Shigematsu, H., Yamano, S. and Yoshimura, H. : NADH-dependent O-deethylation of *p*-nitrophenetole with rabbit liver microsome. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 178 (1976).
- 14) Koop, D. R. : Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol. Pharmacol.* **29**, 399 (1986).
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. G., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 16) Imaoka, I., Inoue, K. and Funae, Y. : Aminopyrine metabolism by multiple forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**, 159 (1988).
- 17) Soucek, P. and Gut, I. : Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* **22**, 83 (1992).
- 18) Zeisel, S. H. : Dietary choline: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu. Rev. Nutr.* **1**, 95 (1981).
- 19) Grossman, S. R. and Hebert, S. C. : Renal inner medullary choline dehydrogenase activity: Characterization and modulation. *Am. J. Physiol.* **256**, F107 (1989).
- 20) Somero, G. : Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* **251**, R197 (1986).
- 21) Finkelstein, J. D., Martin, J. J., Karris, B. J. and Kyle, W. E. : Regulation of hepatic betaine homocysteine methyltransferase by dietary be-

- taine. *J. Nutr.* **113**, 519 (1983).
- 22) Kim, S. Y., Kim, H. P., Lee, M. K., Kim, S. H., Moon, A., Han, H. M., Huh, H. and Kim, Y. C. : The effects of betaine on the CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* **37**, 499 (1993).
- 23) Kim, S. Y., Kim, H. P., Lee, M. K., Byun, S. J., Kim, S. H., Moon, A., Han, H. M., Huh, H., and Kim, Y. C. : The effect of betaine on the CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji* **37**, 538 (1993).
- 24) ecknagel, R. O. and Glende, E. A. : Carbon tetrachloride toxicity: An example of lethal cleavage. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263 (1973).
- 25) Asada, M. and Galambos, T. J. : Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: An experimental and clinical study. *Gastroenterology* **44**, 578 (1963).
- 26) Korsrud, G. O., Grice, H. G., Goodman, T. K., Knipfel, J. E. and McLaughlan, J. M. : Sensitivity of several serum enzymes for the detection of thiacetamide-, dimethylnitrosoamine-, diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **26**, 299 (1973).
- 27) Nelson, D. R., Waxman, D. J., Gonzalez, F. J. and Nebert, D. W. : The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* **12**, 1 (1993).
- 28) Raudy, J. L., Kraner, J. C. and Lasker, J. M. : Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 1 (1993).
- 29) Park, S. S., Fugino, T., West, D., Guengerich, F. P. and Gelboin, H. V. : Monoclonal antibodies inhibiting enzyme activity of cytochrome P-450 from 3-methylcholanthrene-treated rats. *Cancer Res.* **42**, 1798 (1982).