

총담관을 결찰한 흰쥐 혈청의 Mitochondrial Aspartate Aminotransferase의 활성치*

계명대학교 의과대학 생화학교실

김여희 · 문교철 · 곽춘식

=Abstract=

Serum Mitochondrial Aspartate Aminotransferase Activity in Common Bile Duct Ligated Rats

You Hee Kim, MD; Kyo Cheol Mun, MD; Chun Sik Kwak, PhD

Department of Biochemistry, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

To study the effect of hepatobiliary disorders on serum mitochondrial aspartate aminotransferase activity, total and mitochondrial aspartate aminotransferase were determined in serum after the ligation of common bile duct in rats. The activity of hepatic mitochondrial aspartate aminotransferase was also measured.

The activity of total aspartate aminotransferase in serum drastically elevated between the twelve hours and forty-two days after the ligation of common bile duct in rats. However, the mitochondrial aspartate aminotransferase activity in serum showed a marked increase from twelve hours to fourteen days after operation.

The activity of mitochondrial aspartate aminotransferase in the cholestatic liver strikingly decreased between the third and the forty-second days of the operation.

서 론

Aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2 oxoglutarate aminotransferase, EC 2. 6. 1. 1, AST)는 pyridoxal phosphate를 조효소로 사용하는 dimeric enzyme (Wilkinson, 1976 ; Kim, 1979; 및 Iriate 등, 1984)으로서 생체내에서 가역적으로 L-glutamic acid와 oxaloacetic acid로부터 α -ketoglutaric acid와 L-aspartic acid를 생성하는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소이다(Cohen, 1940 ; Cohen과 Hekhuis, 1941 ; Wilkinson, 1976; 및 Kim, 1979). 이 효소는 포유동물의 조직에 널

리 분포되어 있으며 심근, 간 및 담도조직, 골격근, 신등에 많이 존재한다(Wróblewski와 LaDue, 1956)고 한다. 그리고 세포내에서는 세포질과 mitochondria에 위치하며 양자는 물리적, 화학적, 동역학적 및 면역학적 성질이 서로 다른 isozyme인 것(Boyd, 1961 ; Nisselbaum과 Bodansky, 1964 ; Teranishi 등, 1978; 및 Rej, 1980)이 밝혀져 있다.

이들 효소는 혈액 및 뇌척수액에도 출현(Karmen 등, 1953 ; Wróblewski, 1959)하며 혈액에서는 심근경색증, 골격근 손상, 진행성 근위축증, 감염성 단핵구증, 간염, 간경변증, 간암 및 담도폐쇄시에 혈청 총 AST(*t*AST)의 활성이 증가(Wróblewski, 1959)되며 특히 mitochondrial AST(*m*AST)활성

* 이 논문은 1987년도 계명대학교 윤종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

은 잔엽, 잔경변증, 간암 등에서 증가(Schmidt 등, 1967; 有島, 1978; Kamei 등, 1979; Panteghini 등, 1984; 및 설 등, 1984)되며, mAST 와 t-AST 를 함께 측정하면 간세포의 상해 정도를 판정하는데 유용하다는 보고(佐佐木, 1976; 有島, 1978; 및 설 등, 1984)도 있다. 그러나 간질환시에 증가하는 혈청 mAST 의 활성증가기전에 대해서는 분명하게 밝혀져 있지는 않다.

이 연구는 간질환에서 증가하는 mAST 활성의 증가기전을 규명하기 위한 일환으로 시도된 것이며, 흰쥐의 총담판을 결찰하고 42일간 혈청에서 tAST 와 mAST 의 활성도를 측정하는 한편 간의 mAST 도 함께 측정하여 그 성격을 상호 비교 검토한 것이다.

재료 및 방법

동물: 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 개중 280~320g 이 되는 Sprague-Dawley 종의 수컷쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 총담판 결찰군 8군, 가수술군 8군, 정상군 1군으로 나누어서 가수술 또는 담판결찰수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 이를 흰쥐를 죽여 실험에 사용하였다.

총담판 결찰군에서는 담판결찰 후 14일까지는 죽는 예가 없었으나 그 이후부터는 약 50%가 죽었다. 그러므로 28일 및 42일 군은 총담판 결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용도록 하였다.

사료는 시판되는 제일사료주식회사의 제품을 사용하였는데 실험기간중 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다.

수술은 효소활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 결직시킨 후 가능한한 무균 상태를 유지하면서 경한 ether 마취하에서 실시하였다.

총담판 결찰은 가급적 간에서 균질한 부위의 총담판과 이 바로 아래쪽 1cm 되는 저점의 담판을 선택하여 각각 결찰한 후 양 결찰 부위의 중간 지점을 절단해 두었다.

담관의 결찰은 이중으로 하였으며 채혈 및 간적출시 담관의 폐쇄 상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 총담판 결찰만 하지 않고 그의 조작은 담판결찰군과 동일하게 하였다.

시약: Sodium deoxycholic acid, L-aspartic acid, α -ketoglutaric acid, NADH(reduced nicot-

inamide dinucleotide; yeast grade III, sodium salt), MDH (malic dehydrogenase, porcine heart, transaminase 측정용), 종합표준효소(enzyme control 2-N), 단백표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma 사의 것을 사용하였으며 혈청 mAST 분리용 시약(E-CT88)은 Eiken 사의 것을 사용하였다. 그외 일반 시약들은 시판되는 특급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획: 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 결직시킨 후 경한 ether 마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로 부터 채혈하여 뒤를 신힐사시키고 이어 간문맥으로 catheter 를 넣어 4°C의 0.25M sucrose 액으로 판류하여 간에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 sucrose 액을 가능한 한 모두 제거하였다. 그리고 적출한 간은 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 2g 을 취하여 9배량의 0.25M sucrose 액을 넣어 teflon glass homogenizer (Thomas 사 제품 chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm 의 속도로 조심스럽게 5회 왕복마쇄하여 10w/v% 간균질액을 만들었다. 이 간균질액을 사용하여 sucrose density gradient 초원심 분리법(곽과 와, 1986)으로 cytosol 과 mitochondria 분획을 분리하였다. 즉 이 간균질액을 571×g (average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미파쇄부분, nuclei 및 plasma membrane 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet 과 상청액을 얻었다. 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 104,400×g에서 1시간 초원심분리하여 상청액을 얻었으며 이 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 7,796×g에서 원심분리하여 얻은 pellet 를 0.25M sucrose 액에 혼탁시키고 이 액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심판 상부에 부하시켜 45,200×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 다시 0.25M sucrose 액에 재혼탁시키 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet 를 얻었으며 이 pellet 를 mitochondria 분획으로 사용하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall 사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge 와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 그리고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient

former (ISCO model 570)를 사용하여 제조하였다.

효소액 조제: 분리한 mitochondria 분획은 단백량으로 $5\text{mg}/\text{ml}$ 가 되도록 0.25M sucrose 액에 혼탁시킨 후 1w/v% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v% sodium bicarbonate 액으로 바로 회석하여 tube mixer로 10분간 강하게 진탕한 것을 다시 0.25M sucrose 액으로 10배 회석하여 간 mAST 효소액으로 사용하였다.

혈액은 원심분리하여 혈청을 얻었으며 cytosol 분획과 더불어 아무 처리 없이 그대로 AST 효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정: 혈청 tAST와 간내 AST의 활성도 측정은 L-aspartic acid와 α -ketoglutaric acid를 기질로 하여 25°C 에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 oxaloacetic acid가 NADH 및 MDH 공존하에 malate로 전환될 때 NADH가 NAD^{+} 로 되면서 감소하는 흡광도로써 그 활성을 정량하는 Karmen법 (1955)에 의하였다.

혈청 mAST 활성도 측정은 cytosolic AST 항체와 혈청을 반응시켜 혈청 중의 cytosolic AST를 제거함으로써 혈청 mAST가 분리되는 Eiken 사의 kit를 사용하여 혈청 mAST를 분리한 후 Karmen법 (1955)에 준하여 그 활성도를 측정하였다.

이 Eiken 사의 혈청 mAST 분리용 kit는 사람 혈청에서 mAST를 분리하도록 만들어진 것이다. 이 실험에서 먼저 Eiken 사의 cytosolic AST 항체와 정상 흰쥐 및 총담관을 결찰한 흰쥐 간의 cytosol 분획과 반응시켰을 때 흰쥐 간 cytosol 분획에 함유된 AST는 약 92%가 반응하였다. 따라서 이 kit를 사용하여 흰쥐 혈청 mAST를 분리하도록 하였다.

AST 활성도의 단위는 혈청 1ml 또는 단백 1mg 이 25°C , 340nm 에서 흡광도가 1분에 0.001 감소하는 활성능을 1단위로 하는 Karmen 단위로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 Sigma 사의 표준효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 Varian Cary 210, computer controlled enzyme spectrophotometer 였다.

단백정량: 효소액 중의 단백정량은 0.5N perchloric acid와 methanol:ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제(Greenberg와 Rothstein, 1957)한 다음 biuret 법 (Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

얻어진 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우는 student의 t-검정법(Scheffler, 1980)에 의하여 검정하였다.

성 적

총담관을 결찰했을 때의 혈청 tAST 및 mAST 활성도의 변동: 흰쥐에서 총담관결찰 또는 가수술 후에 경시적으로 측정한 혈청 tAST 및 mAST의 활성도의 변동은 도 1과 같다. 총담관 결찰 후 혈청 tAST 활성도는 12시간에 급격히 증가되어 가수술군에 약 16배($p<0.01$)의 증가를 보이고 이후 점차 감소되나 42일에도 가수술군에 비해 약 6배($p<0.001$)나 높은 활성 증가를 보였다.

총담관 결찰 후의 혈청 mAST의 활성도도 혈청 tAST 활성도와 같이 총담관결찰 후 12시간에 급격히 증가되어 가수술군 보다 약 29배($p<0.01$)나 높은 활성 증가를 보였으며 이후 점차 감소되어 총담관 결찰 후 28일째에는 가수술군의 치로 회복되었다.

총담관을 결찰했을 때의 간의 mAST 활성도의 변동: 흰쥐에서 총담관 결찰 또는 가수술 후 경시적으로 측정한 간의 mAST 활성도의 변동은 도 2

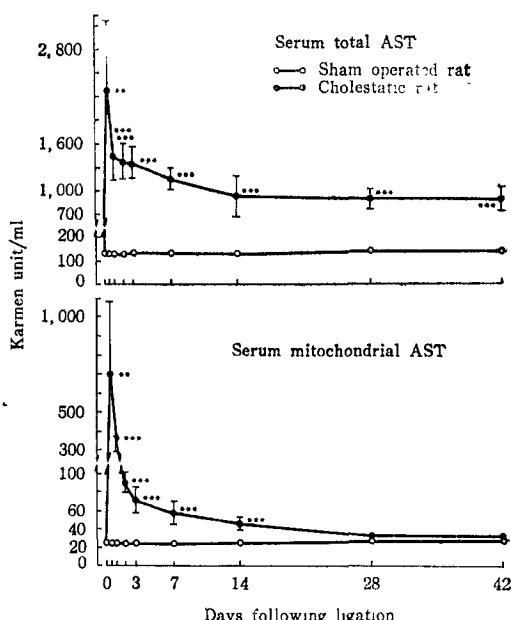


Fig. 1. Aspartate aminotransferase activity of serum after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean $\pm \text{SD}$ with 5 rats in each group.
; $p<0.01$, *; $p<0.001$.

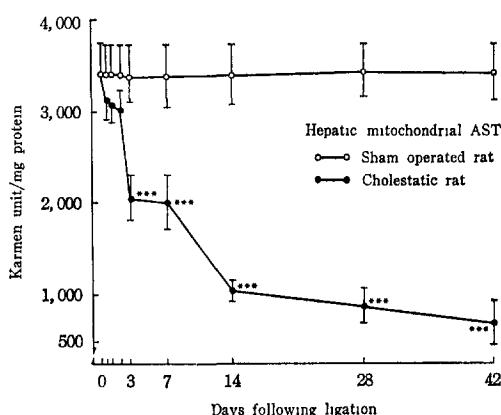


Fig. 2. Mitochondrial aspartate aminotransferase (AST) activity of liver after bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SD with 5 rats in each group.
***; $p < 0.001$.

와 같다. 총담관 결찰 후 경시적으로 측정한 간의 mAST 활성도는 혈청 mAST 활성도의 변동과는 반대로 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 즉 담관결찰 후 2일까지는 별다른 변동을 보이지 않다가 3일 및 7일에는 가수술군에 비해 약 40% ($p < 0.001$)의 활성 감소를, 그리고 14일에는 약 70% ($p < 0.001$) 28일에는 약 75% ($p < 0.001$), 42일에는 약 80% ($p < 0.001$)의 활성 감소를 보였다.

고 考

담즙울체간의 조직 소견을 관찰한 Moritz와 Snodgrass(1972) 및 장동(1987)의 보고에 의하면 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간에는 부분적으로 심한 간세포 괴사가 나타나며 이때부터 담도세포의 증식이 시작되었다고 한다. 그리고 1일 후에는 간의 전역에 심한 괴사가 나타나고 염증세포의 침윤이 보였다고 한다. 1주 및 2주경에는 간세포의 괴사현상이 점차 감소하는 반면 담세관의 증식이 증가되었으며 2주 후에는 간문맥의 확장과 섬유화가 시작되고 4주 후에는 담세관의 신생이 증가되어 소엽의 중심부까지 파급되었으며 6주부터는 초기의 경화성 변화가 나타났다고 한다. 이와 같이 간에 담즙이 울체되어 시간이 경과하면 간조직의 염증 및 괴사가 야기되고 나아가서 경화성 변화까지도 초래된다.

이 실험에서도 흰쥐를 사용하여 Moritz와 Snodgrass(1972) 및 장동(1978)이 적용했던 방법에 따라 총담관을 결찰하고 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일,

14일, 28일 및 42일에 혈청의 tAST와 mAST 그리고 간의 mAST의 활성도를 측정하였다.

AST는 alanine aminotransferase 및 lactate dehydrogenase와 같이 주로 심 및 간세포의 투파성이 항진되었을 때 세포외로 누출되어 혈중에 증가되는 효소 (Linds, 1958; Takada 등, 1964)로 알려져 있다. 그러나 mAST의 혈중 증가기전은 분명치 않다. 현재 알려져 있는 혈중 비기능성 효소의 증가기전은 첫째 합성 항진 및 분해속도 저연과 더불어 혈중으로 다량 유출되는 경우와 둘째 세포막의 투파성 항진으로 혈중에 다량 유리되는 것과 세번째 배설로 차단으로 혈청을 역류되는 것을 들 수 있다.

이 실험에서 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과되었을 때 혈청의 tAST는 현저히 상승되었으며 이후 점차 감소되나 42일 후에도 가수술군에 비해 약 6배나 높은 활성 증가를 나타내었다. 혈청 tAST는 담즙울체시 증가되고 특히 간질질세포에 괴사가 있을 때 혈중에 그 활성이 증가되는 것 (Linds, 1958; 박과 장, 1985)으로 알려져 있는 만큼 실험기간 중 한결같이 혈청 tAST의 활성이 증가한 것은 당연한 것으로 받아들여진다.

이 실험에서 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과되었을 때 혈청의 mAST도 혈청 tAST와 마찬가지로 그 활성이 현저히 증가되었다. 그러나 28일 후에는 정상으로 회복되었다. 즉 간조직의 괴사가 심한 시기인 담도결찰 후 12시간부터 14일까지는 그 활성이 증가되고 괴사현상이 경한 시기인 28일 이후에는 그 활성이 정상으로 회복된 것이다. 또한 간의 mAST 활성도는 담도결찰 후 3일부터 감소되어 이후 계속 감소되는 치를 보였으며 42일에는 가수술군에 비해 무려 80%나 감소된 치를 보였다. 이 성적은 간에서 담즙울체시간이 연장되면 간 mAST는 계속 그 활성이 감소한다는 것을 보여 주는 성적인 것이다. 이상의 성적으로 미루어 볼 때 간합도 질환시 증가하는 혈청 mAST 활성도 증가는 간 mAST의 간의 누출 증가가 주된 원인으로 생각되며 이 효소의 간의 누출의 정도는 간괴사의 정도와 비례될 것으로 생각된다. 그리고 장기간 간에 담즙울체가 계속되면 간조직은 섬유화와 경변성 변화가 야기되고 (장동, 1987) 이로 인해 간 mAST의 합성은 감소되고 따라서 mAST의 간의 누출량도 저하되고 나아가서 혈청 mAST의 활성도가 감소될 것이다. 그러나 이 실험만으로는 충분히 설명하기는 어렵다.

만약 어떤 간질환 환자의 혈청에서 tAST 활성은

증가되고 mAST 활성은 정상 수준 또는 감소되어 있다면 판정하는데 주의를 요하며 심한 간장애 특히 섭유화 및 경화성 변화가 진행되고 있지 않을 것인지 생각해 보아야 하겠다. 그리고 이런 점을 확실히 하기 위해서는 앞으로 좀 더 연구하여야 하겠다.

요 약

간질환시에 증가하는 혈청 mAST 활성의 증가 기전을 알아 보기 위한 일환으로 흰쥐의 총담판을 결찰하고 경시적으로 혈청 tAST와 mAST의 활성도를 측정하는 한편 간의 mAST 활성도도 함께 측정하였다.

혈청 tAST 활성도는 총담판 결찰 후 12시간에 급격히 증가되었으며 이후 점차 감소되나 42일 후에도 높은 활성 증가를 보였다. 혈청 mAST의 활성도도 총담판 결찰 후 12시간에 급격히 증가되었고, 그러나 총담판 결찰 후 28일에는 정상으로 회복되었다.

총담판 결찰 후 간의 mAST 활성도는 혈청 mAST와는 달리 총담판 결찰 후 3일부터 감소되어 42일까지 계속 감소되는 치를 나타내었다.

이상 성적으로 보아 간담도질환시 증가하는 혈청 mAST 활성 증가는 간 mAST의 간의 누출의 증가가 주된 원인으로 생각되며 심한 간손상으로 mAST의 합성이 감소되면서 일어나는 간의 누출량의 감소로 혈중 mAST의 활성도가 저하될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

有島恒明: 사람 및 실험적 간세포암에 있어서 혈청 GOT, GPT 활성 및 mitochondria GOT 활성에 대해서(日文). 日本消化器病學會雑誌 1978; 75: 324.

Boyd JW: The intracellular distribution latency and electrophoretic mobility of L-glutamic oxaloacetate transaminase from rat liver. *Biochem J* 1961; 81: 434.

장대성, 박정식, 손태중: 총담판 결찰에 의한 담판 종식성 변화의 초미형내학적 연구. 경북의대지 1987; 28: 113.

Cohen PP: Kinetics of transaminase activity. *J Biol Chem* 1940; 136: 585.

Cohen PP, Hekhuis GL: Rate of transaminase

in normal tissues. *J Biol Chem* 1941; 140: 711. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751.

Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labeled compounds, in Colowick SP, Kaplan NO(eds): *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1957, Vol 4, p 708.

Iriarte A, Farach HA, Martinez-Carrion M: Coenzyme active site occupancy as an indicator of independence of the subunits of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J Biol Chem* 1984; 259: 7003.

Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M: Apoenzyme of aspartate aminotransferase isozymes in serum and its diagnostic usefulness for hepatic diseases. *Clin Chim Acta* 1979; 96: 97.

Karmen A, Wróblewski F, LaDue JS: Quantitative estimation of glutamic-oxaloacetic transaminase activity in human serum. *Clin Res Proc* 1953; 1: 90.

Karmen A: A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 131.

Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB New York, Academic Press, 1979, p 188.

박춘식, 박정식: 흰쥐간 세포분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45.

박춘식, 장여규: 흰쥐 담즙율체 간장의 5-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4: 1.

Linds S: A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extraction in cardiac and hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958; 10: 303.

Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived from liver cell fraction. II. Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972; 62: 93.

Nisselbaum JS, Bodansky O: Immunochemical and kinetic properties of anionic and cationic glutamic oxaloacetic transaminases separated

- from human heart and human liver. *J Biol Chem* 1964; 239: 4232.
- Panteghini M, Malchiodi A, Calarco M, Bonora R: Clinical and diagnostic significance of aspartate aminotransferase isozymes in sera of patients with liver diseases. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 153.
- Rej R: An immunochemical procedure for determination of mitochondrial aspartate aminotransferase in human serum. *Clin Chem* 1980; 26: 1964.
- 佐佐木良美: 간질환에 있어서 혈청 GOT isozyme의 임상적 의의(日文). 肝臟 1976; 20: 356.
- Schesler WC: *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2. USA Menlo Park, 1980, p 84.
- Schmidt E, Schmidt W, Otto P: Isoenzymes of malic dehydrogenase, glutamic oxaloacetic transaminase and lactic dehydrogenase in serum in diseases of the liver. *Clin Chim Acta* 1967; 15: 283.
- 설미영, 김성률, 이은엽, 김순호: 각종 질환에 있어 혈청 비토콘드리아 GOT 활성에 관한 연구. 대한임상병리학회지 1984; 4: 17.
- Takada Y, Ichihara A, Tanioka H, Inoue H: The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cells. *J Biol Chem* 1964; 239: 3690.
- Teranishi H, Kagamiyama H, Teranishi K, Wada H, Yamano T: Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of glutamic oxaloacetic transaminase from human heart. *J Biol Chem* 1978; 253: 8842.
- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, Great Britain, Edward Arnold Publishers, 1976, p 87.
- Wróblewski F, LaDue JS: Serum glutamic oxaloacetic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91: 569.
- Wróblewski F: The clinical significance of transaminase activities of serum. *Am J Med* 1959; 27: 911.