

## 흰쥐 담즙울체간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase 및 Glutathione Peroxidase의 활성도\*

계명대학교 의과대학 생화학교실

권용철·문교철·곽춘식

=Abstract=

### Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase and Glutathione Peroxidase Activities in Cholestatic Rat Liver

Yong Chul Kwon, MD; Kyo Cheol Mun, MD; Chun Sik Kwak PhD

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

Changes in the activities of the following enzymes have been studied over a period of forty two days after the ligation of common bile duct in rats cytosolic, mitochondrial and microsomal glutathione S-transferase, cytosolic glutathione reductase and cytosolic glutathione peroxidase of cholestatic liver

The activity of cytosolic glutathione S-transferase in the cholestatic rat liver strikingly diminished between the third and the forty-second days after the ligation of common bile duct and that of mitochondrial glutathione S-transferase also showed significant decrease between the fourteenth and the forty-second days after operation. However, the microsomal glutathione S-transferase activity in the cholestatic rat liver showed a substantial increase between the seventh and twenty-eight days after operation.

The cytosolic glutathione reductase activity in the cholestatic rat liver elevated considerably between the second and the forty-second days after operation, but the cytosolic glutathione peroxidase activity in the cholestatic rat liver had a significant diminution between the fourteenth and the forty-second days after the ligation of common bile duct.

**Key Words** Cholestatic liver, Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase, Glutathione peroxidase

### 서 론

Glutathione S-transferase(Rx glutathione R-transferase, EC 2.5.1.18, GST)는 생체내에서 주로 친지질성 및 친전자성물질(Rx)에 환원형 glutathione(GSH)을 포함시켜 glutathione의 thioether(R-S-G)

를 형성하는 반응을 촉매하는 효소이다(Jakoby, 1978, Kim, 1979c) 이 효소는 동물의 간(Trip 등 1974, Granhagen과 Sjoholm, 1977, Hayes와 Mantle, 1986b), 신(Fleischer 등, 1977, Hayes와 Mantle, 1986b), 심(Hayes와 Mantle, 1986b, Ishikawa 등, 1986), 폐(Hayes와 Mantle, 1986b), 뇌(Hayes와 Mantle, 1986b), 고환(Mukhtar 등, 1978a, Royer와 Kenney, 1985, Hayes와

\* 이 논문은 권용철의 석사학위 논문임

Mantle, 1986b), 흉선(Hayes와 Mantle, 1986b), 소장(Clifton과 Kaplowitz, 1977, Fleischer 등, 1977, Hayes와 Mantle, 1986b), 결장(Hayes와 Mantle, 1986b), 뇌(Asaoka와 Takhashi, 1983, Theodore 등, 1985, Lie 등, 1986), 태반(Kodate 등, 1986), 적혈구(Marcus 등, 1978), 백혈구(Kaplowitz 등, 1978), 정액(Mukhtar 등, 1978b) 등에 분포되어 있으며 세포내에서는 세포질, 세포핵, mitochondria 및 microsome 분획에 존재한다(Friedberg 등, 1968, Bannikov와 Tchipyseva, 1978, Wahlländer 등, 1979, Lee와 McKinney, 1982, Ryle와 Mantle, 1984)

GST는 다양한 기능을 가진 효소로서 변이원물질, 발암성물질, 독성 및 약리학적활성물질, 이들의 대사산물, 내인성독소들 중에서 친지질성 및 친전자성 성질을 가진 물질의 해독 및 배설에 관여하며, 또한 prostaglandin과 leukotriene의 생합성에도 관계하고 아울러 bilirubin, heme, steroid hormone, bile acid 등과 결합하여 이들의 세포내이행과 운반 및 배설을 시키는 기능도 가진다(Litwack 등, 1971, Kamisaka 등, 1975, Jakoby, 1978, Wolkoff 등, 1979a, Wolkoff 등, 1979b, Vessey와 Zakim, 1981, Hayes와 Chalmers, 1983, Hayes와 Mantle 1986a Pemble 등, 1986, Takikawa 등, 1986) 이러한 기능을 가진 동물의 GST는 많은 종류의 isozyme이 있으며 쥐에서는 14종(Hayes, 1986, Hayes와 Mantle, 1986a), 사람에서는 13종(Vander Jagt 등, 1985)이 있는 것으로 보고되어 있다

이 효소는 사염화탄소 중독시(Mukhtar와 Bend, 1977), 급성 및 전격성간염(Tsuru 등, 1978), 간경변증(Tsuru 등, 1978), 간암(Ohmi와 Arias, 1981) 등에서 혈중에 그 활성이 증가되며, 사염화탄소 중독간(Adachi 등, 1981, Harisch와 Meyer, 1985), 간암조직(Sherman 등, 1983)에서는 그 활성이 저하되어 있다고 한다

Glutathione reductase(NAD(P)H oxidized glutathione oxidoreductase, EC 1.6.4.2, GR)는 생체내에서 가역적으로 환원형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)와 산화형 glutathione(GSSG)으로부터 산화형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP<sup>+</sup>)와 GSH를 생성하는 효소(Kim, 1979a)로서 동물에서는 간, 신, 췌, 심, 갑상선, 적혈구, 폐의 순으로 많이 합성(Manso와 Wróblewsky, 1958, Carlberg와 Mannervik, 1975, Ray와 Prescott, 1975, Moron 등, 1979)되며, 세포내에서는 세포질에 분포되어 있는 것(Goldberg와

Spooner, 1983)으로 알려져 있다 이 효소는 혈중에 출현하는 비기능성 효소의 한가지로 악성종양(Manso와 Wróblewsky, 1958, Kerppola 등, 1959, West 등, 1961, Wakui 등, 1976), 위암(Wakui 등, 1976), 낭종성 섬유증(Shapiro 등, 1975), 만성신염(Melissinos 등, 1981), 사염화탄소 중독시(Kumata 등, 1975), 담석증(Kerppola 등, 1959, Wakui 등, 1976), 급만성 담낭염(Kerppola 등, 1959; West 등, 1961, Wakui 등, 1976) 및 담즙을 채시(Tor 등, 1981) 혈중에 그 활성이 증가된다고 한다

Glutathione peroxidase(glutathione hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.9, GSH-Px)는 생체내에서 과산화수소와 GSH로부터 GSSG와 물을 그리고 기타 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매하는 selenium의 존성 효소(Pierce와 Tappel, 1978, Chance 등, 1979, Kim, 1979b)로서 조직의 산화적손상을 방지하고 산소독을 해독하는 역할을 담당하는 효소이다 (Chow와 Tappel, 1972, Chow와 Tappel, 1973, Player 등, 1977, Chance 등, 1979, Wendel, 1980) 동물에서 이 효소는 적혈구(Mills, 1957; Little 등, 1970, Flohé 등, 1971, Oh 등, 1974, Awasthi 등, 1975), 간(Nakamura 등, 1974, Santoro 등, 1976, Stults 등, 1977, Zakkowski와 Tappel, 1978), 폐(Chiu 등, 1976), 태반(Awasthi 등, 1979) 등에 많은 량 존재하며, 구강암(Goodwin 등, 1983), 다발성경화증(Mehlert 등, 1982), 용혈성질환(Necheles 등, 1968), phenylketonuria(Sciciner 등, 1982, Ward 등, 1984) 환자들의 혈액과 간암조직(Peskin 등, 1978, Kitahara 등, 1983, Casaril 등, 1985)에서 그 활성이 낮은 것으로 보고되어 있다.

이와같이 3종의 glutathione연관 효소는 간에서 많은 량이 합성될 뿐만 아니라 간담도질환시 혈중에서 그 활성이 변동된다 그러나 담즙을 채간에서 이를 효소의 활성변동에 대해서는 알려진 바 없다

이 연구는 담즙을 채간에서 GST, 및 GR, GSH-Px의 활성변동을 알아보기 위하여 시행한 것으로서 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 각 시기에 적출한 담즙을 채간을 세포분획하여 세포질에서 GST, GR 및 GSH-Px의 활성을 그리고 mitochondria와 microsome 분획에서 GST의 활성을 각각 측정하여 그 성격을 보고코자 한다

## 재료 및 방법

동물 및 처지 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~350g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였으며, 가수술군 및 총담관 결찰군으로 나누어서 가수술 및 총담관결찰수술 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 쥐를 각각 5마리씩 죽여 실험에 사용하였다

담관결찰 후 14일까지는 죽는 예가 없었으나 그 이후부터는 약 50%가 죽었다 그래서 28일 및 42일 군은 총담관결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용도록 하였다

각 실험군들은 개별분리수용하였으며 실험전후에 일정한 조건으로 사육하였다 사료는 시판되는 제일 사료주식회사의 제품을 사용하였으며 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다

총담관 결찰은 가급적 간에서 근접한 부위의 총 담관과 바로 아래쪽 약 1cm되는 지점의 총담관을 선택하여 각각 결찰한 후 위 및 아래쪽 결찰된 담관의 중간지점을 절단해 두었다 담관의 결찰은 이중으로 하였으며 간 적출시에 담관의 폐쇄상태를 확인하였다 가수술은 총담관결찰만 하지 않고 그외 조작은 담관결찰군과 동일하게 하였다

시약 Reduced glutathione, oxidized glutathione, 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB), ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt type I (NADPH), glutathione reductase Type III (from bakers yeast), glutathione peroxidase(from bovine erythrocytes), glutathione S-transferase(from rat liver), 단백표준액(10g/100ml, bovine albumin)등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그외 일반시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다

간적출 및 세포분획 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 실혈사시키고 이어 간문맥으로 catheter를 넣어 4°C의 0.25M sucrose액으로 관류하여 간에 남아있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아있는 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다 적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편을 만들고 혼합하여 그중 약 75g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass

homogenizer(Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간균질액을 만들었다 그리고는 이 간균질액 일정량을 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽과 곽, 1986)으로 cytosol microsome 및 mitochondria분획을 분리하였다 즉 이 마쇄균질액을 571 x g(average relative centrifugal force이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분, nuclei 및 plasma membrane 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796 x g에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 104,400 x g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 다시 얻었다 이때 얻은 상청액을 cytosol분획으로 사용하였다 그리고 이 과정에서 얻은 pellet은 0.25M-sucrose액에 재현탁시키고 이액을 10~35w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500 x g에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심관중앙부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500 x g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이 pellet를 다시 0.25M-sucrose액에 재현탁시켜 88,500 x g에서 1시간 재원심분리하여 pellet을 얻었다 이 pellet을 microsome분획으로 사용하였다 한편 위의 7,796 x g에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M-sucrose액에 혼탁시키고 이 액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,000 x g에서 20분간 원심분리하여 얻은 pellet을 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 7,796 x g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이 pellet을 mitochondria분획으로 사용하였다

위의 세포분획에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65 B ultracentrifuge였다 그리고 sucrose density gradient용액의 제조는 gradient former(ISCO MODEL 570)를 사용하여 제조하였다

효소활성도 측정 분리한 microsome과 mitochondria는 단백량으로 3mg/ml가 되도록 0.25M sucrose 액으로 혼탁시켰으며 이 혼탁액을 ultrasonic disemembrator(Fisher model 300)로  $20 \pm 0.4$  Kcycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파마쇄를 하여 이 액을 GST효소액으로 사용하였으며 cytosol분획은 아무처치를 하지 않은 상태로 GST, GR 및 GSH-Px의 효

### 소액으로 사용하였다

Cytosol, microsome 및 mitochondria의 GST활성도 측정은 DNCB와 GSH를 기질로 하여 25°C에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자흡광계수 ( $E_{340\text{nm}}^{\text{mM}} = 9.6 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 효소활성을 산출하는 방법인 Habig등(1974)의 법에 의하였다 이 효소활성의 단위는 1분간에 1 mg의 단백이 반응하여 생성한 conjugated DNCB를 n mol로 나타내었다

세포질 GR활성도 측정은 GSSG와 NADPH를 기질로 하여 37°C에서 2분간 반응시키는 동안에 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340nm파장에서 흡광도를 측정하여 효소활성도를 산출하는 Goldberg와 Spooner(1983)방법에 의하였다 이 효소 활성의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 산화된 NADPH를 p mol로 나타내었다

세포질 GSH-Px의 활성도 측정은 GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 NADPH를 기질로 사용하고 GR를 촉매로 하여 GSH-Px 효소시료와 함께 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 GSH가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 GSSG로 산화되고 이것이 GR과 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340nm 파장에서 time scan을 하여 NADPH의 분자흡광계수 ( $E_{340\text{nm}}^{\text{mM}} = 6.22 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 효소의 활성을 산출하는 방법인 paglia와 valentine(1967)의 법에 의하였다 이 효소활성의 단위는 1분간에 1 mg의 단백이 반응하여 산화된 NADPH를 n mol로 나타내었다

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제효소들을 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다 이 실험에서 각 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varien Cary 210)였다

단백정량 효소액중의 단백정량은 0.25N-perchloric acid와 methanol-ether혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소액중의 단백을 정제한 다음 biuret법(Gornall等, 1949)으로 정량하였다

얻어진 각종 성적들의 평균치중 상호비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법(Schefler, 1980)에 의하여 검정하였다

### 성 적

담즙을체간의 GST활성도의 변동. 흰쥐 담즙을체간의 cytosol, mitochondria 및 microsome분획의 GST활성도의 변동은 도 1과 같다 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙을체간의 cytosol과 mitochondria분획의 GST활성도는 담즙을체의 시간이 경과되면서 감소되었으나 microsome분획의 GST활성도는 증가하는 경향을 나타내었다 즉 담즙을체간의 cytosol분획의 GST활성도는 총담관결찰 후 3일에 가수술군에 비해 약 56% ( $p<0.001$ )의 감소를 보였으며 이후 계속 감소하여 42일째에는 약 72% ( $p<0.001$ )의 감소를 보였다 mitochondria분획의 GST활성도는 총담관결찰 후 14일에 가수술군에 비해 약 36%, 28일에는 약 43% ( $p<0.05$ ), 42일에는 약 42% ( $p<0.05$ )의 감소를 보였다 그러나 microsome분획의 GST활성도는 총담관결찰 후 7일에 가수술군에 비해 약 89% ( $p<0.01$ ), 14일에는 약 100% ( $p<0.01$ ), 28일에는 약 52% ( $p<0.05$ )증가를 보이다가 42일에는 가수술군의 치보다 약간 감소하였다

담즙을체간의 GR 및 GSH-Px의 활성도 변동. 흰쥐 담즙을체간의 cytosol분획의 GR 및 GSH-Px의 활성도 변동은 각각 도2 및 3과 같다 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙을체간의 GR활성도는 담즙을체의 시간이 경과하면 증가되는 경향이 나타내었다 그러나 담즙을체간의 cytosol분획의 GSH-Px활성도는 담즙을체의 시간이 경과하면 감소되는 경향을 나타내었다 즉 담즙을체간의 GR활성도는 총담관결찰 후 2일에 가수술군에 비해 약 39% ( $p<0.05$ ), 3일에는 약 48% ( $p<0.01$ ), 7일에는 약 62% ( $p<0.01$ ), 14일에는 약 72% ( $p<0.001$ ), 28일에는 약 76% ( $p<0.001$ ), 42일에는 약 72% ( $p<0.001$ )의 증가를 보였다 그러나 cytosol분획의 GSH-Px의 활성도는 총담관결찰 후 14일에 가수술군에 비해 약 39% ( $p<0.05$ ), 28일에는 약 53% ( $p<0.001$ ), 42일에는 약 65% ( $p<0.001$ )의 감소를 보였다

### 고 칠

간조직에 담즙을체를 야기시키는 것은 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄, 원발성 담즙성간경변증, 담관염 또는 담즙을체형 간염등 간담도질환에서 볼 수 있다(Halsted, 1976) 이와같은

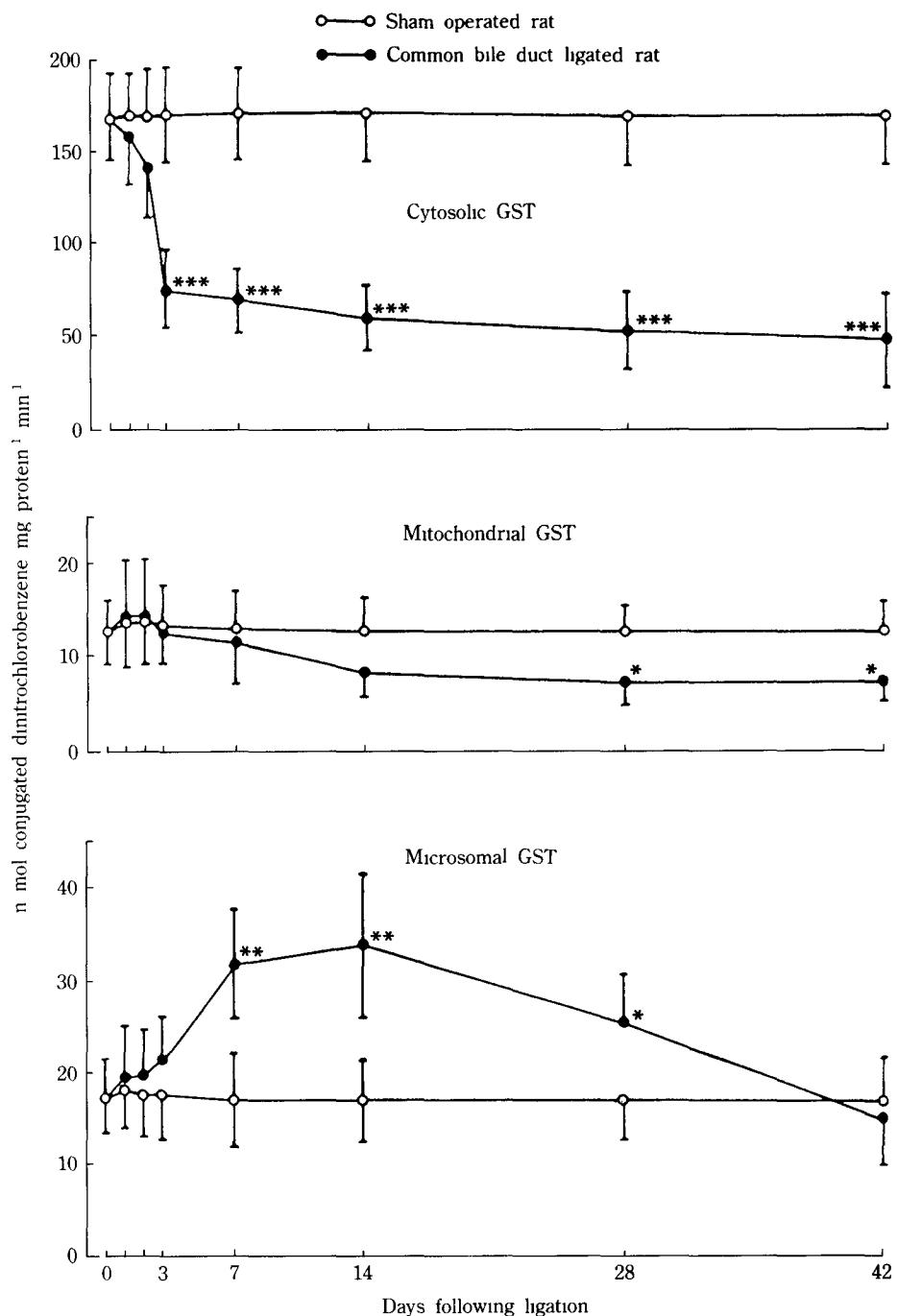


Fig 1 Activities of cytosolic, mitochondrial and microsomal glutathione-S-transferase(EC 2.5.1.18, GST) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation  
Vertical brackets at point indicated mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group \* ,p<0.05, \*\* ,p<0.01,  
\*\*\* ,p<0.001

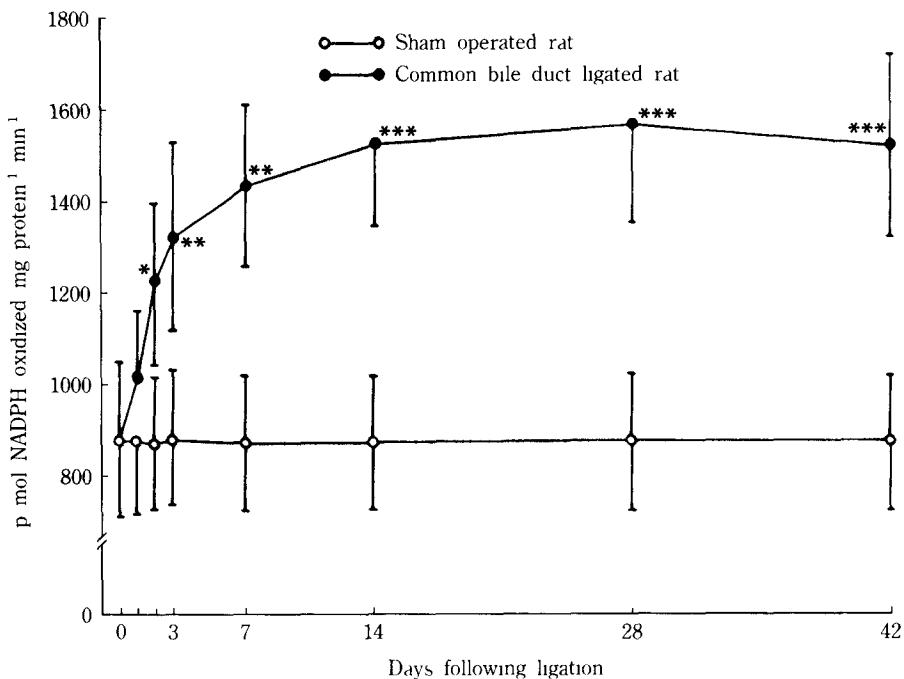


Fig 2 Activity of glutathione reductase(EC 1 6 4 2) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Vertical brackets at point indicated mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group \* , $p<0.05$ , \*\* , $p<0.01$ , \*\*\* , $p<0.001$

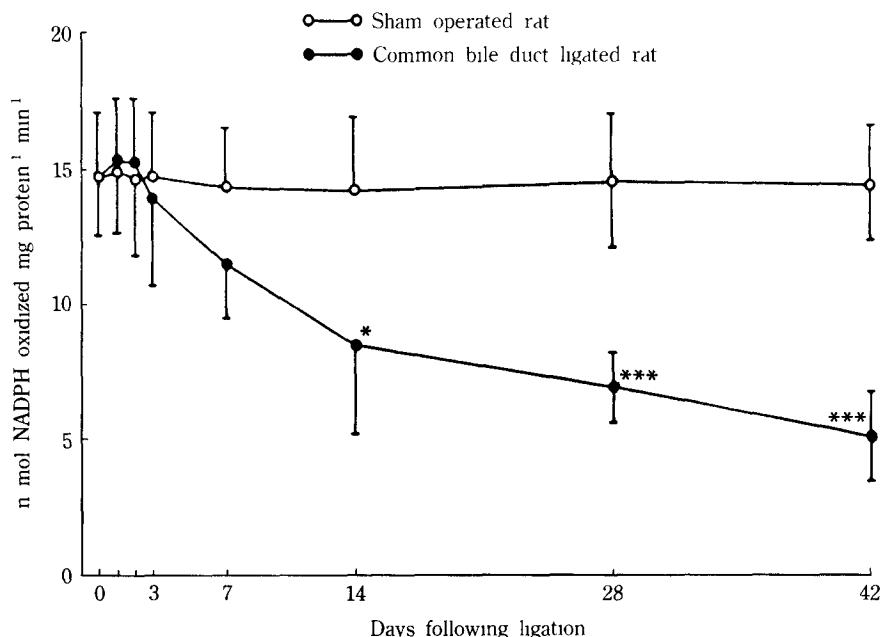


Fig 3 Activity of cytosolic glutathione peroxidase(EC 1 11 1 9) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Vertical brackets at point indicated mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group \* , $p<0.05$ , \*\* , $p<0.01$ , \*\*\* , $p<0.001$

담즙울체가 수반되는 간담도질환에서 간세포는 기능장애를 받을 뿐만 아니라 형태학적 변화도 초래된다(Moritz와 Snodgrass, 1972; 장등, 1987) 그러나 이를 질병에 대한 생리학적 지견은 분명치 못한 것이 많으며 이를 해결하려는 노력은 현재도 계속되고 있다 특히 흰쥐의 총담관을 결찰하면 시간경과에 따라 간조직에 괴사, 담도증식, 섬유화, 경화성변화 등이 일어나기 때문에 흰쥐의 총담관결찰술은 담즙울체간을 만들어 생화학적 연구를 할 수 있는 실험적 model로 이용되고 있다(Kaplan과 Righetti, 1970; Reghetti와 Kaplan, 1971; Moritz와 Snodgrass, 1972; 곽, 1980; Toda등, 1980; 곽, 1985; 곽과 장, 1985; 곽과 이, 1985; 장등, 1987; 정과 곽, 1987; 곽등, 1987; 문과 곽, 1988)

이 연구는 담즙울체의 시간이 경과함에 따라 담즙울체간에서 GST, GR 및 GSH-Px 등 glutathione 연관효소들의 활성화가 어떻게 변동되는가를 알아 본 것이다

흰쥐 담즙울체간에서 증가되는 것으로 알려져 있는 효소는 xanthine oxidase(곽, 1985), 5'-nucleotidase(곽과 장, 1985),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase(곽과 장, 1985), alkaline phosphatase(곽과 장, 1985), leucine aminopeptidase(정과 곽, 1987) 등이며 감소되는 것으로 알려져 있는 효소는 malate dehydrogenase(곽과 이, 1985), lactate dehydrogenase(곽과 이, 1985) alanine aminotransferase(곽과 이, 1985), aspartate aminotransferase(곽과 장, 1985) 및 monoamine oxidase(문과 곽, 1989) 등이다 그러나 담즙울체간에서 GST, GR 및 GSH-Px의 활성도가 어떻게 변동되는지는 알려져 있지 않다

이 실험에서 흰쥐의 총담관을 결찰하고 심한 담즙울체를 야기시켰을 때 담즙울체간의 GST활성도는 cytosol분획에서는 총담관결찰 후 3일부터 그리고 mitochondria분획은 14일부터 그 활성이 현저히 감소되었다 그러나 microsome분획은 총담관결찰 후 7일부터 28일까지 현저히 증가되었다 그리고 담즙울체간에서 GR활성도는 총담관결찰 후 2일부터 현저히 증가되었다

흰쥐에서 담즙울체시 간조직소견을 관찰한 Moritz 및 Snodgrass(1972)와 장등(1987)의 보고를 보면 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과하면 수많은 간세포는 괴사현상을 나타내고 담도세포는 증식된다고 한다 그리고 24시간 후에는 간의 모든 엽에 괴사현상이 확산되고 괴사부위에는 염증세포의 침

윤이 보인다고 하였다 그리고 2주경에는 괴사현상이 약간 감소하는 반면 담도세포의 증식이 증가되고 섬유화가 시작되었다고 하며 6주부터는 초기의 경화성 변화가 나타났다고 한다

GST활성도는 급성 및 전격성간염, 간경변증, 간암등의 간질환에서 혈중에 그 활성이 증가(Ohmi와 Arias, 1981; Tauru등, 1978)되며 간암조직에서는 그 활성이 감소된다(Scherman등, 1983)고 한다 이러한 형태학적 변화와 간질환에서 혈중의 GST활성의 변동을 볼 때 이 실험에서 담즙울체간의 cytosol과 mitochondria분획의 GST활성 감소는 광범위한 간세포의 괴사가 원인이 되어 GST가 세포외로 유출됨으로써 야기된 현상이 아닌가 생각된다 그리고 GST는 내인성 및 외인성의 친지질성 및 친전자성 물질을 해독시키며 특히 bilirubin, bile acid등과 결합하여 이들을 운반하고 배설시키는 기능을 담당한다는 보고(Litwack등, 1971; Kamisaka등, 1975; Jakoby, 1978; Wolkoff등, 1979a; Wolkoff등, 1979b; Vessey와 Zakim, 1981; Hayes와 Chalmers, 1983; Hayes와 Mantle, 1986a; Pemble등, 1986; Takawa등, 1986)가 있고 보면 이 연구에서 담즙울체간의 microsome분획에서의 GST활성증가는 담즙울체로 인한 bilirubin과 bile acil의 간세포내 증가가 원인이 되어 유도된 것이라 생각되나 이 실험만으로서는 분명하게 설명하기는 어렵다

GR활성도는 담즙울체가 심한 간담도질환에서 혈중에 증가(Kerpola등, 1959; West등, 1976; Tor등, 1981)되고 glutathion을 포함시킬 때 필요한 GSH를 생성시키는 효소(Jakoby, 1978; Kim 1979a)인 만큼 담즙울체간에서 그 합성이 증가되리라 생각되며 이 실험성적과 일치된다 그리고 GR은 간손상시 혈중으로 유리되는 효소(Takasugi 1961, West등, 1961)로 알려져 있으므로 만약 담즙울체간에서 GR의 합성이 증가되지 않는다면 담즙울체가 심할 때는 간조직의 GR가 혈중으로 다량 유리됨으로해서 간조직의 GR는 감소될 것이다 그럼에도 이 실험에서 담즙울체간의 GR활성도는 증가되어 있었다 이 현상은 담즙울체간에서 계속적으로 GSH를 필요로 하기 때문에 이를 합성하기 위하여 GR가 유도되어 나타난 결과라 생각할 수 밖에 없다

한편 GSH-Px는 조직의 산화적 손상으로부터 조직을 보호하는 역할을 담당하는 효소(Chow와 Tappel, 1972; Chow와 Tappel, 1973; Chance등, 1979; Player등, 1977; Wendel, 1980)임으로 담즙울체간에

서는 혹 GSH-Px의 활성이 증가되지 않을까 생각했으나 이 실험에서 담즙울체간의 cytosol분획의 GSH-Px의 활성도는 담도결찰 후 14일부터 감소되었다 왜 이러한 현상이 나타났는지는 이 실험만으로서는 설명할 수 없으며 이 문제는 앞으로 계속추구해 보아야 하겠다

### 요 약

담즙울체간에서 GST, GR 및 GSH-Px의 활동변동을 알아보기 위하여 흰쥐의 총담관을 결찰하고 1일부터 42일까지의 담즙울체간의 세포질에서 GST, GR 및 GSH-Px의 활성을 그리고 mitochondria와 microsome에서 GST의 활성을 각각 측정하였다

흰쥐 담즙울체간의 GST활성도는 cytosol분획에서는 총담관결찰 후 3일부터 42일까지, mitochondria 분획에서는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 현저히 감소되었다 그러나 microsome분획은 총담관결찰 후 7일부터 28일까지 현저히 증가되었다

담즙울체간의 GR활성도는 총담관결찰 후 2일부터 42일까지 현저한 증가를 보였다 그러나 담즙울체간의 세포질 GSH-Px활성도는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 현저한 감소를 보였다

### 참 고 문 헌

- Adachi Y, Horn K, Suwa M, et al Serum glutathione S-transferase in experimental liver damage in rats *Gastroenterologia* (Jpn) 1981, 16 129-133
- Asaoka K, Takahashi K Purification and properties of porcine brain glutathione S-transferases *J Biochem* (Jpn) 1983, 94 1191-1199
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase *J Biol Chem* 1975, 250 5144-5149
- Awasthi YC, Dao DD, Lal AK, et al Purification and properties of glutathione peroxidase from human placenta *Biochem J* 1979, 177 471-476
- Bannikov GA, Tchipysseva TA Ligandin in steroidogenically active cells of rat gonads *Br J Cancer* 1978, 38 350-354
- Royer TD, Kenney WC Acidic glutathione S-transferase of rat testis *Biochem J* 1985, 230 125-132

- Carlberg I, Mannervik B Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver *J Biol Chem* 1975; 250 5475-5480
- Casaril M, Gabrielli GB, Dusi S, et al Decreased activity of liver glutathione peroxidase in human hepatocellular carcinoma *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985, 21 941-944
- Chance B, Sies H, Boveris A Hydroperoxide metabolism in mammalian organs *Physiol Rev* 1979, 59 527-605
- 장대성, 곽정식, 손태종 총담관결찰에 의한 담관증식성 변화의 초현미경학적 연구 경북의대잡지 1987, 28 113-122
- Chiu DTY, Stults FH, Tappel AL Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase *Biochim Biophys Acta* 1976, 445 558-566
- Chow CK, Tappel AL An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats *Lipids* 1972, 7 518-524
- Chow CK, Tappel AL Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone exposed rats *Arch Environ Health* 1973, 26 205-208.
- 정상호, 곽춘식 흰쥐 담즙울체간의 Leucine Aminopeptidase의 활성치 계명의대논문집 1987, 6 210-221
- Clifton G, Kaplowitz N The glutathione S-transferase of the small intestine in the rat *Cancer Res* 1977, 37 788-791
- Fleischer GM, Robbins JB, Arias IM Cellular localization of ligandin in rat, hamster and man *Biochem Biophys Res Commun* 1977, 74 992-1000
- Flohé L, Eisele B, Wendel A Glutathionperoxidase I Reindarstellung und Molekulargewichtsbestimmungen *Hoppe-Seyler's Physiol Chem* 1971, 353 987-999
- Friedberg T, Benthey P, Stasiecki P, et al The identification, solubilization and characterization of microsome-associated glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 1968, 254 12028-12033
- Goldberg DM, Spooner RJ Glutathione reductase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (eds) *Methods of Enzymatic Analysis*, ed 3 Vol III Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1983, pp 258-264

- Goodwin WJ, Lane HW, Bradford K, et al. Selenium and glutathione peroxidase levels in patients with epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx *Cancer* 1983; 51 110-115
- Gornall AG, Bardawil CJ, David MM Determination of serum protein by means of biuret reation *J Biol Chem* 1949, 177 751-766
- Greenberg DM, Rothstein M Method for isolation and degradation of labelled compounds, in Colowick SP Kaplan ND (eds): *Method in Enzymology*, Vol 4. New York, Academic Press, 1957, pp 708-731
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB Glutathione S-transferase, the first enzymatic steps in mercapturic acid formation *J Biol Chem* 1974; 249 7130-7139
- Halsted JA *The Laboratory in Clinical Medicine Interpretation and Application* London, Saunders Co, 1976, pp 426-429
- Harisch G, Meyer W Studies on tissue distribution of glutathione and on activities of glutathione reductases after carbon tetrachloride induced liver injury *Ros Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985, 47 399-414
- Hayes JD Purification and physical characterization of glutathione S-transferase K Differential use of S-hexyl glutathione and glutathione affinity matrices to isolate a novel glutathione S-transferase from rat liver *Biochem J* 1986, 223 789-798
- Hayes JD, Chalmers J Bile acid inhibition of basic and neutral glutathione S-transferase in rat liver *Biochem J* 1983, 215 581-588
- Hayes JD, Mantle TJ Inhibition of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases by primary and secondary bile acids *Biochem J* 1986a, 233 407-415
- Hayes JD, Mantle TJ Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues Evidence for three immunochemical distinct groups of transferase in the rat *Biochem J* 1986b, 233 779-788
- Ishikawa T, Milbert U, Oesch F, et al The major isozyme of rat cardiac glutathione transferases Its correspondence to hepatic transferase X *Eur J Biochem* 1986, 154 299-305
- Jokoby WB The glutathione S-transferase A group of multifunctional detoxification proteins *Adv Enzymol* 1978, 46 383-414
- Kamisaka K, Habig WH, Ketley JM, et al. Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin *Eur J Biochem* 1975, 60 153-161
- Kaplan MM, Righetti A Induction of rat liver alkaline phosphatase The mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction *J Clin Invest* 1970, 49 508-516
- Kaplowitz N, Spina C, Graham M, et al Glutathione S-transferase in human lymphoid cell lines and fractionated peripheral leukocytes *Biochem J* 1978; 169 465-470
- Kerppola W, Nikkila EA, Pitlanen E Serum TPN-linked enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitric dehydrogenase, and glutathione reductase activities in health and in various disease states *Acta Med Scand* 1959, 164 357-365
- Kitathara A, Yamaraky T, Ishikawa T, et al Changes in activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rat *Jpn Cancer Res (Gann)* 1983, 74 649-655
- Kim BK *Enzyme Nomenclature* IUB, New York, Academic Press, 1979a, pp 92-93
- Kim BK *Enzyme Nomenclature* IUB, New York, Academic Press, 1979b, pp 106-107
- Kim BK *Enzyme Nomenclature* IUB, New York, Academic Press, 1979c, pp 186-187
- Kodate C, Fukushi A, Narita T, et al Human placental form of glutathione S-transferase (GST- $\pi$ ) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma *Jpn Cancer Res (Gann)* 1986, 77 226-229
- Kumata H, Wakui K, Suguki H, et al Glutathione reductase activity in serum and liver tissue of human and rat with hepatic damage *Tohoku J Exp Med* 1975, 116 127-132
- 곽춘식 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향 경북의대잡지 1980, 21 126-134

- 곽춘식 흰쥐 담즙율체간의 Xanthine Oxidase의 활성치 계명의대논문집 1985; 4 125-130
- 곽춘식, 장억규 흰쥐 담즙율체 간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치, 계명의대논문집 1985, 4 1-27
- 곽춘식, 김여희, 문교철 흰쥐 담즙율체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치 계명의대논문집 1987, 6 67-76
- 곽춘식, 곽정식 흰쥐 간세포 분획법 I Mitochondria 및 Microsome의 분리 계명의대논문집 1986, 5 45-53
- 곽춘식, 이상일 흰쥐 담즙율체 간의 Malate Dehydrogenase의 활성치 계명의대논문집 1985, 4 131-137
- Lee CYG, Mckinney JD. Identity of Microsomal glutathione S-transferases. *Mole Cell Biochem* 1982; 48 91-96
- Li N, Reddanna P, Thyagaraju K, et al Expression of glutathione S-transferases in rat brains *J Biol Chem* 1986; 261 7596-7599
- Little C, Olinescu R, Reid KG, et al Properties and regulation of glutathione peroxidase *J Biol Chem* 1970; 245: 3632-3636
- Litwack G, Ketterer B, Arias IM Ligandin A hepatic protein which binds steroids and bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions *Nature* 1971, 234 466-467
- Marcus CJ, Habig WH, Jakoby WB Glutathione S-transferase from human erythrocytes, non-identity with the enzymes from liver *Arch Biochem Biophys* 1978, 188 287-273
- Manso C, Wróblewsky F Glutathione reductase activity in blood and body fluids *J Clin Invest* 1958; 37 214-218
- Mehlert A, Metcalfe RA, Diplock AT, et al Glutathione peroxidase deficiency in multiple sclerosis *Acta Neurol Scand* 1982, 65 376-378
- Melissinos KG, Delidou AZ, Varsou AG, et al Serum and erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal failure *Nephron* 1981, 28 76-79
- Mills GC Hemoglobin catabolism I Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown *J Biol Chem* 1957, 299 189-197
- Moritz M, Snodgrass PJ Serum enzymes derived from liver cell fraction II Responses to bile duct ligation in rats *Gastroenterology* 1972, 62. 93-100
- Moron HS, Depierre JW, Mannervik B Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver *Biochim Biophys Acta* 1979, 582 67-78
- Mukhtar H, Bend JR Serum glutathione S-transferase Perinatal development, sex difference and effect of carbon tetrachloride administration on enzyme activity in the rat *Life Sci* 1977, 21 1277-1285
- Mukhtar H, Lee IP, Bend JR Glutathione S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen *Biochem Biophys Res Commun* 1978a, 83 1093-1098
- Mukhtar H, Lee IP, Foureman GL, et al Epoxide metabolizing enzyme activities in rat testes: Postnatal development and relative activity in interstitial and spermatogenic cell compartment *Chem Biol Interact* 1978b, 22 153-165
- 문교철, 곽춘식 흰쥐 담즙율체간의 Monoamine Oxidase의 활성치 계명의대논문집 1989, 8 69-77
- Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase *Biochim Biophys Acta* 1974, 358 251-261
- Necheles TF, Boles TA, Allen DM Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant *J Pediatr* 1968, 72: 319-324
- Oh SH, Ganther HE, Hoekstra WG Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes *Biochemistry* 1974, 13 1825-1829
- Ohm N, Arias IM Ligandinemia in primary liver cancer in rat and man *Hepatology* 1981, 1 316-318
- Paghia ED, Valentine WN Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase *J Lab Clin Med* 1967, 70 158-169
- Pemble SE, Taylor JB, Ketterer B Tissue distribution of rat glutathione transferase subunit 7, a hepatoma marker *Biochem J* 1986, 240 885-889
- Peskin AV, Koen YM, Zabarsky IB Superoxide dis-

- mutase and glutathione peroxidase activities in tumors *FEBS Lett* 1978, 1 41-45.
- Pierce S, Tappel AL Glutathione peroxidase activities from rat liver *Biochem Biophys Acta* 1978, 523 27-36
- Player TJ, Mills, DL, Horton AA. Age dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH dependent lipid peroxidation *Biochem Biophys Res Commun* 1977, 78 1397-1402
- Ray LE, Prescott JM Isolation and some characteristics of glutathione reductase form rabbit erythrocytes, *Exp Biol Med* 1975, 148 402-409,
- Rihetti ABB, Kaplan MM Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase *Proc Soc Exp Biol Med* 1971, 136 491-495
- Ryle CM, Mantle TJ Studies on the glutathione S-transferase activity associated with rat liver mitochondria *Biochem J* 1984, 222 553-556
- Santoro L, del Boccio G, Sacchetta P, et al Parziale purificazione propria della glutathione perossidasi dal fegato di coniglio *Boll Soc Ital Biol Sper* 1976, 52 922-927
- Scheffler WC *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2 USA Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1980, pp 84-89
- Shapiro BL, Smith QT, Warick WJ Serum Glutathione reductase and cystic fibrosis. *Pediat Res* 1975, 9 885-888
- Sherman M, Campbell JAH, Titmuss SA, et al: Glutathione S-transferase in human hepatocellular carcinoma *Hepatology* 1983, 3 170-176
- Steiner G, Menzel H, Lombeck I, et al Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state *Eur J Pediatr* 1982, 138 138-140
- Stults FH, Forstrom JW, Chiu DTY, et al Rat liver glutathione peroxidase Purification and study of multiple forms *Arch Biochem Biophys* 1977, 183 490-497
- Takasugi T Diagnosis of liver diseases *Nippon Nai-kagakkai Zasshi* (Jpn) 1961, 50 527-551
- Takikawa H, Sugiyama Y, Kaplowitz N Binding of bile acid by glutathione S-transferase from rat liver *J Lipid Res* 1986, 27 955-966
- Taniguchi N, Tsukada Y, Hirai H: Acquirement of fetal properties in hepatoma on glutathione metabolism *Biochim Biophys Acta* 1974; 354 161-167
- Theodore C, Singh SV, Hong TD, et al. Glutathione S-transferase of human brain: Evidence for two immunologically distinct types of 26,500-Mr subunits *Biochem J* 1985, 225 375-382
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, et al. Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity biliary obstruction An experimental study *Clin Chim Acta* 1980; 107 85-96.
- Tor J, Pascual C, Segura RM, et al: Glucose phosphate isomerase and glutathione reductase in benign and malignant extrahepatic cholestasis. *Clin Chem* 1981; 27 634-635
- Tripp JA, Van Dam J, Tepper T, et al A simple procedure for the purification of porcine ligandine (Y-protein) *FEBS Lett* 1974, 45 6-10
- Tsuru M, Kamisaka K, Hirano M, et al. Quantification of human serum ligandin by radioimmuno assay. *Clin Chim Acta* 1978, 84 251-253
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Garcia KB, et al. Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferase from human liver. *J Biol Chem* 1985, 260 11603-11610
- Vessey DA, Zakim D Inhibition of glutathione S-transferase by bile acids *Biochem J* 1981, 197 321-325
- Wahlländer A, Soboll S, Sies H Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH S-transferase *FEBS Lett* 1979, 97 138-140
- Wakui K, Kumata H, Tadaki H, et al Clinical Significance of serum glutathione reductase in various clinical conditions, especially in liver diseases *Tohoku J Exp Med* 1976, 118 17-24
- Ward KP, Arthur JR, Russell G, et al Blood selenium content and glutathione peroxidase activity in children with cystic fibrosis, coeliac disease, asthma and epilepsy *Eur J Pediatr* 1984, 142 21-24
- Wendel A Glutathione peroxidase, in Jakoby WB (ed). *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol 1 New York, Academic Press, 1980, pp 333-348
- West M, Berger C, Rony H, et al. Serum enzymes

- in disease VI Glutathione reductase in sera of normal subjects and of patients with various disease *J Lab Clin Med* 1961, 57 946-954  
Wolkoff AW, Goresky CA, Sellin J, et al Role of ligand in transfer of bilirubin from plasma into liver *Am J Physiol* 1979a, 236 638-648

- Wolkoff AW, Weisiger RA, Jakoby WB The multiple roles of the glutathione S-transferase (ligandins) *Prog Liver Dis* 1979b, 6 213-224  
Zakowski JJ, Tappel AL Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase *Biochim Biophys Acta* 1978, 526 65-76