

주정중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Alkaline Phosphatase활성에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 생화학교실

김 여 희 · 이 속 형 · 곽 춘 식

경상북도 보건환경연구소 미생물과

문 교 철

서 론

Alkaline phosphatase (ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3. 1. 3. 1, ALP)는 pH 8-10에서 ester 결합으로 인산이 결합된 화합물을 가수분해하여 인산을 유리시키는 일군의 효소이다(Kaplan, 1972; Wilkinson, 1976; Kim, 1979).

이 효소는 포유동물의 거의 모든 세포에 분포되어 있으며 장점막, 끌아세포, 간, 신, 태반 및 유선에서 그 활성이 높다(Wilkinson, 1976)고 한다.

이 효소는 특히 담즙을체가 수반되는 간담도 질환에서 간조직과 혈중에 현저히 그 활성이 증가되는 효소(Wilkinson, 1976)로 알려져 있으며 혈중 ALP 활성도 측정은 간담도 질환의 진단과 예후 판정에 이용되는 간기능 검사의 한종목으로 되어있다(Wilkinson, 1976).

한편 음주로 인해 지방간, 간염 및 간경변증이 초래된다(Christofersen과 Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985b)는 보고가 있고 보면 간질환이 있을때 음주를 하거나 주정(ethanol)중독이 야기된다면 간조직과 혈청에서 이 효소의 활성 변동은 더욱 심할 것으로 생각된다. 또한 일반적으로 간담도 질환시 음주는 해롭다고 하나 그 학문적 뒷받침은 분명치 않다. 이 연구는 이러한 문제를 해결하기 위한 일환으로 시도한 실험으로써 만성 주정 중독 흰쥐에게 담즙을체를 야기시키거나 담즙을체가 진행되는 흰쥐에게 급성 주정 중독을 야기시킨 후 혈청과 간

조직에서 ALP의 활성도를 측정하여 그 성격을 비교 검토한 것이다.

재료 및 방법

동물 및 처치: 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280-320g되는 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 나누었다(도1). 즉 정상군(1군), 총담관결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 총담관결찰군(총5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 가수술군(총5군), Eagon등 (1987)의 방법을 수정하여 5% (v/v) ethanol을 60일 간 섭취시킨 후 계속 5% ethanol을 섭취시키면서 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군(총5군), 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 가수술을 한군(총5군), Lie등(1975)의 방법을 수정하여 체중 kg당 4g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 급성 주정 중독군(총2군), 총담관결찰 14일 후 체중 kg당 4g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 총담관결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군(총2군)등이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 진양 사료 주식회사의 실험동물 사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한

* 이 논문은 1991년도 계명대학교 윤종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

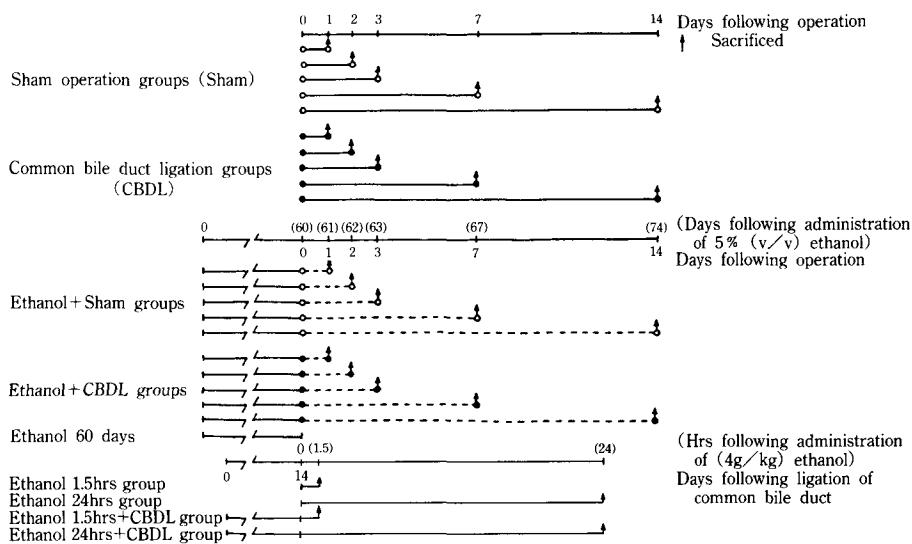


Fig 1. Experimental design.

군 및 만성 주정 중독 후 총담관결찰을 한 군에서는 물대신 5% (v/v) ethanol용액(Eagon 등, 1987)을 자유로이 먹게 하였다. 그리고 급성 주정 중독은 흰쥐 체중 kg당 4g의 ethanol이 투여되도록 25% (v/v) ethanol용액을 조제(Liu 등, 1975)하여 단회 경구 투여하였다.

총담관결찰술, 가수술 및 간적출술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 일정한 시간에 시행하였으며 쥐를 약 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 무균 상태를 유지하면서 실시하였다.

총담관결찰은 간근위부와 약 1cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

간적출은 개복한 흰쥐의 복부 대동맥으로부터 채혈하며 실혈사시킨 다음 간문맥에 삽관하여 4°C의 0.25M sucrose액으로 관류시킨 후 실시하였으며 적출한 간은 곧 세포분획을 실시하였다. 그리고 채취한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

시약 : Disodium phenylphosphate, 4-aminoantipyrine, potassium ferricyanide, phenol, sodium deoxycholic acid, alkaline phosphatase(type IX, from bovine liver, P5760), 및 단백표준액(10g/100ml bovine albumin)등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그외 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간세포의 분획 : 적출한 간은 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그중 약 7.5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass-homogenizer (Thomas사제품, chamber clearance 0.005-0.007 inch)로 2-4°C에서 400rpm의 속도로 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직의 마쇄균질액을 만들었다. 그리고는 이 균질액 50ml를 취하여 sucrose linear density gradient 원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome을 분리하였다. 즉 간 조직의 마쇄 균질액을 571×g(average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 세포막 부분을 제거한 다음, 그 상청액을 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet와 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 104,400×g에서 1시간 원심분리하여 pellet와 상청액을 얻었다. 이때 얻어진 상청액을 cytosol분획으로 사용하였다. 그리고 이 과정에서 얻어진 pellet은 0.25M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10-35w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500×g에서 15분간 원심분리하여 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500×g에서 다시 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이것을 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 88,500×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다. 한편 위의 7,796×g에서 20분간 원심분리하는

과정에서 얻은 pellet을 0.25M sucrose액에 혼탁시키고 이 액을 20-45w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,200×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 7.796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria분획으로 사용하였다.

위의 세포분획 과정에서 모든 조작은 2-4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65 B ultracentrifuge였다. 그리고 이때에 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였으며 sucrose linear density gradient 용액은 gradient former(ESCO model 570)을 사용하여 제조하였다.

효소활성도 측정 : 분리한 microsome 및 mitochondria는 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose 액에 혼탁시켰으며 이 혼탁액을 1w/v% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v% sodium bicarbonate 액으로 희석한 후 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20±0.4K cycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄(파춘식과 장억규, 1985)를 하여 cytosol분획과 더불어 ALP의 효소 시료로 사용하였다.

혈청 및 간 세포분획의 ALP활성도 측정은 disodium phenylphosphat를 기질로 사용하여 효소 시료와 함께 37°C에서 15분간 반응시키는 동안에 생성된 phenol을 ferricyanide존재하에서 4-amminoantipyrine과 축합하여 생성된 quinone화합물의 적색을 비색하여 정량하는 Kind와 King(1954)의 법에 의하였으며 단위는 1분간에 1ml의 혈청또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 phenol을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제된 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대해 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 사용한 분광광도계는 Varian Cary 210 computer controlled enzyme spectrophotometer였다.

단백정량 : 효소액 중의 단백 정량은 0.5N perchloric acid와 methanol-ether혼합액(3:1)으로 단백을 정제(Greenberg와 Rothstein, 1957)한 다음 biuret법(Gornall등, 1949)으로 정량하였다.

성적검정 : 유의성 검정은 Student's t-test(Scheffler, 1980)로 하였다.

성 적

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관결찰이 간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALP활성도에 미치는 영향 : 만성 주정 중독을 시킨 환쥐에게 계속 5% (v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때 간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALP활성도의 변동은 각각 표1, 2 및 3과 같다. 쥐간의 cytosolic ALP 활성도는 만성 주정 중독군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 별 변동을 나타내지 않았다. 정상쥐나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰함으로써 간의 cytosolic ALP활성도는 수술후 1일부터 현저한 증가를 나타내었다. 즉 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 이 효소의 활성도가 수술후 1일에는 약 119% ($P<0.001$), 2일에는 약 220% ($P<0.001$), 3일 및 7일에는 약 228% ($P<0.001$), 14일에는 약 247% ($P<0.01$)로 증가되었다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비하여 이 효소 활성이 수술후 1일에는 약 102% ($P<0.01$), 2일에는 약 192% ($P<0.001$), 3일에는 약 209% ($P<0.001$), 7일 및 14일에는 약 198% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관을 결찰한 군과 비교했을 때는 실험 전기간 동안 그 활성도가 약간 낮은 경향을 나타내었다(표1).

쥐간의 mitochondrial ALP활성도는 만성 주정 중독 군에서는 별 변동을 나타내지 않았으나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 수술후 3일부터 유의한 활성감소를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 그 대조군인 가수술을 한 군에 비해 이 효소 활성도가 수술후 3일에는 약 29% ($P<0.05$), 7일에는 약 33% ($P<0.05$), 14일에는 약 38% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 정상쥐의 총담관을 결찰했을 때 간의 mitochondrial ALP활성도는 수술 후 7일부터 증가되어 14일에는 가수술군에 비해 약 115% ($P<0.05$) 유의한 증가를 나타내었으나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때는 그 대조군인 정상쥐의 총담관을 결찰한 군보다 수술 후 7일부터 그 활성이 낮은 경향을 나타내었다. 그러나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군보다는 그 활성도가 실험 전기간 동안 높았다(표2).

쥐간의 microsomal ALP활성도는 만성 주정 중독

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic alkaline phosphatase (ALP) activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	ALP activities (nmol phenol mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal; 2.20±0.15, Ethanol; 2.26±0.20)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	2.26±0.14	4.96±0.68 ^c	2.28±0.24	4.61±1.42 ^e
2	2.24±0.18	7.17±0.72 ^c	2.38±0.23	6.96±1.59 ^f
3	2.21±0.15	7.24±0.81 ^c	2.27±0.27	7.01±1.26 ^f
7	2.26±0.16	7.41±1.63 ^c	2.25±0.31	6.70±2.05 ^e
14	2.19±0.19	7.61±2.41 ^b	2.31±0.35	6.89±2.55 ^e

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

b; P<0.01 vs. Sham, c; P<0.001 vs. Sham, e; P<0.01 vs. Ethanol+Sham, f; P<0.001 vs. Ethanol+Sham

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial alkaline phosphatase (ALP) activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	ALP activities (nmol phenol mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal; 0.86±0.15, Ethanol; 0.82±0.16)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	0.88±0.14	0.95±0.18	0.77±0.16	1.00±0.23
2	0.89±0.17	0.89±0.16	0.65±0.18	0.93±0.19 ^d
3	0.90±0.13	0.83±0.17	0.64±0.13 ^a	0.94±0.20 ^d
7	0.88±0.16	1.12±0.32	0.59±0.15 ^a	0.80±0.21
14	0.85±0.19	1.83±0.81 ^a	0.53±0.21 ^a	0.77±0.25 ^k

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

a; P<0.05 vs. Sham, d; P<0.005 vs. Ethanol+Sham, g; P<0.05 vs. CBDL

군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 모두가 별 변동을 나타내지 않았다. 정상쥐나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때 간의 microsomal ALP 활성도는 cytosolic ALP 활성도의 변동과 마찬가지로 수술 후 1일부터 현저한 증가를 나타내었다. 즉 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술 군에 비해 이 효소의 활성도가 수술 후 1일에는 약 103% (P<0.001), 2일에는 약 205% (P<0.001), 3일에는 약 213% (P<0.001), 7일에는 약 219% (P<0.001), 14일에는 약 234% (P<0.001)의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비하여 이 효소활성이 수술 후 1일에는 약 111% (P<0.001), 2일에는 약 154% (P<0.001), 3일에는 약 225% (P<0.001)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관을 결찰한 군과 그 활성도를 비교했을 때는 실험 전기간

동안 약간 낮은 경향을 나타내었다(표3).

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALP 활성도에 미치는 영향 : 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALP 활성도의 변동은 표4와 같다. 쥐간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALP 활성도는 급성 주정 중독을 시켰을 때 별 변동이 없었다. 그러나 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 24시간 경과했을 때 cytosolic 및 microsomal ALP 활성도는 그 대조군인 총담관만 결찰하고 14일 경과한 군보다 유의한 증가를 나타내었다. 즉 쥐의 총담관을 결찰하고 14일째 급성 주정 중독을 시키고 24시간 경과했을 때 cytosolic ALP 활성도는 총담관만 결찰하고 14일 경과한 군에 비해 약 53% (P<0.05)의 증가를 나타내었으며 microsomal ALP는

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal alkaline phosphatase (ALP) activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	ALP activities (nmol phenol mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal; 5.23±0.42, Ethanol; 4.96±0.34)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	5.52±0.43	11.21±2.26 ^c	5.03±0.52	10.62±1.75 ^f
2	5.48±0.45	16.74±2.58 ^c	5.05±0.48	12.85±1.89 ^{f,g}
3	5.57±0.39	17.43±2.81 ^c	5.13±0.55	16.67±1.86 ^f
7	5.52±0.41	17.61±3.43 ^c	5.22±0.44	16.58±2.43 ^f
14	5.46±0.37	18.22±3.22 ^c	5.11±0.38	15.02±2.21 ^f

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

c; P<0.001 vs. Sham, f; P<0.001 vs. Ethanol+Sham, g; P<0.05 vs. CBDL

Table 4. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic, mitochondrial and microsomal alkaline phosphatase (ALP) activities in acute ethanol intoxicated rats

Normal	ALP activities (nmol phenol mg protein ⁻¹ min ⁻¹)				
	CBDL 14days	Ethanol 1.5hrs	Ethanol 1.5hrs + CBDL	Ethanol 24hrs	Ethanol 24hrs + CBDL
(Cytosol)					
2.20	7.66	2.35	8.15	2.22	11.76
±0.15	±2.41 ⁱ	±0.27	±1.80 ^{j,p}	±0.35	± 2.08 ^{i,s,u}
(Mitochondria)					
0.86	1.83	0.83	2.10	0.76	2.08
±0.15	±0.81 ^j	±0.21	±0.67 ^{k,o}	±0.18	± 0.76 ^{k,r}
(Microsomes)					
5.23	18.22	5.56	19.76	5.75	25.97
±0.42	±3.22 ⁱ	±0.55	±3.36 ^{j,p}	±2.24	± 4.68 ^{i,s,u}

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

j; P<0.05 vs. Normal, k; P<0.01 vs. Normal, l; P<0.001 vs. Normal, o; P<0.01. vs. Ethanol 1.5hrs, p; P<0.001 vs. Ethanol 1.5hrs, r; P<0.01 vs. Ethanol 24hrs, s; P<0.001 vs. Ethanol 24hrs, u; P<0.05 vs. CBDL 14days

약43% (P<0.05)의 증가를 나타내었다.

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 혈청 ALP활성도에 미치는 영향: 만성 주정 중독을 시킨 환쥐에게 계속 5% (v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 ALP활성도의 변동은 표5와 같다. 쥐 혈청의 ALP활성도는 만성 주정 중독 군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 별 변동이 없었다. 그러나 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 수술후 2일부터 14일 까지 혈청 ALP활성도는 현저한 증가를 나타내었다. 즉 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에

비해 혈청 ALP활성도는 수술 후 2일에는 약 86% (P<0.01), 3일에는 약 207% (<0.001), 7일에는 약 234% (P<0.01), 14일에는 약 485% (P<0.001)의 증가를 나타내었으며 또한 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비하여 이 효소 활성이 수술 후 2일에는 약 78% (P<0.01), 3일에는 약 231% (P<0.001), 7일에는 약 272% (P<0.01), 14일에는 약 539% (P<0.001)의 증가를 나타내었으며 또한 총담관을 결찰한 군보다는 그 활성도가 실현 전기간 동안 높은치를 나타내었다.

Table 5. Effect of common bile duct ligation on serum alkaline phosphatase (ALP) activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	ALP activities (nmol phenol ml ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal; 188.4±53.2, Ethanol; 209.4±58.3)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	191.9±56.8	251.2±57.9	216.5±61.3	293.6±67.8
2	187.2±58.6	348.3±62.6 ^b	211.2±63.4	376.4±71.2 ^c
3	193.6±59.2	593.4±138.3 ^c	226.3±59.5	748.3±154.4 ^f
7	192.4±57.2	643.3±212.2 ^b	218.6±60.6	813.6±261.5 ^e
14	191.0±60.6	1,118.2±283.9 ^c	228.7±65.2	1,462.3±314.6 ^f

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

b; P<0.01 vs. Sham, c; P<0.001 vs. Sham, e; P<0.01 vs. Ethanol+Sham, f; P<0.001. vs. Ethanol+Sham

Table 6. Effect of common bile duct ligation on serum alkaline phosphatase (ALP) activities in acute ethanol intoxicated rats

ALP activities (nmol phenol ml ⁻¹ min ⁻¹)					
Normal	CBDL 14days	Ethanol 1.5hrs	Ethanol 1.5hrs + CBDL	Ethanol 24hrs	Ethanol 24hrs + CBDL
188.4 ±53.2	1,118.2 ±283.9 ⁱ	177.3 ±56.5	1,298.5 ± 267.3 ^{l,p}	197.7 ± 61.1	1,373.8 ± 296.7 ^{l,s}

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

i; P<0.001 vs. Normal, p; P<0.001 vs. Ethanol, 1.5hrs, s; P<0.001 vs. Ethanol 24hrs

총담관을 결찰한 환쥐에서 급성 주정 중독이 혈청 ALP 활성도에 미치는 영향 : 환쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 혈청 ALP 활성도의 변동은 표6과 같다.

환쥐의 혈청 ALP 활성도는 급성 주정 중독을 시켰을 때 별 변동이 없었다. 총담관 결찰후 14일 경과한 군이나 총담관 결찰후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 다같이 대조군인 정상군이나 급성 주정 중독군에 비해 그 활성이 현저히 증가되었다. 그러나 총담관 결찰후 14일에 급성 주정 중독을시키고 1.5 및 24시간 경과했을 때는 그 대조군인 총담관만 결찰하고 14일 경과한 군보다는 그 활성이 약간 증가하는 경향이었다.

고 찰

간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우는 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형간염, 선천성

담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄 등(Halsted, 1976)이며 이와같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등(Desmet, 1979)이 나타날 뿐만 아니라 심한 간 기능의 장애도 나타난다(Halsted, 1976; Sherlock, 1985a).

환쥐의 총담관을 결찰하여 간에 담즙울체를 야기시켰을 때의 조직 소견을 보면 먼저 모든 간엽에서 괴사현상이 나타나며 담즙울체 후 24시간이 경과했을 때는 간전역에 심한 괴사현상이 나타나면서 염증성 침윤도 함께 나타난다(Moritz와 Snodgrass, 1972; 장대성 등, 1987; 김효석 등, 1989)고 한다. 그리고 이후 시간이 경과함에 따라 괴사현상은 점차 소실되는 반면에 담도증식이 활발해지고 2주경 부터는 섬유화가 시작된다(Moritz와 Snodgrass, 1972; 장대성 등, 1987; 김효석 등, 1989)고 한다.

간의 배설기능이 저하되어 간에 담즙울체가 야기되면 간세포의 ALP는 그 합성이 증가되며 혈청에서도

그 활성이 증가되는 것(Kaplan과 Righetti, 1970; Righetti와 Kaplan, 1971; Toda 등; 곽춘식 등, 1987)으로 알려져 있다.

한편 주정은 극성유기 용매로서 음주 후 주로 간에서 대사되며 일정 농도 이상에서는 단백질을 변성시킬 수 있다(Ellenhorn과 Barceloux, 1988). 따라서 장기간 음주를 했을 때는 지방간, 간염, 간경변증 등(Christofersen과 Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985b)이 야기될 수 있으며 이때 간세포는 심한 형태학적 변화를 받는다(Christofersen과 Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)고 한다. 이러한 변화는 주로 간세포의 mitochondria와 endoplasmic reticulum에서 관찰되며 mitochondria에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 cristae의 배열문란 등이고 endoplasmic reticulum에서 나타나는 변화는 smooth endoplasmic reticulum의 증식을 들 수 있다. 그 외에도 Mallory소체의 증식과 간세포의 괴사를 수반하는 형태학적 변화가 관찰된다. 그리고 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생산증가, pyruvate의 생성감소, 지방산의 합성촉진, 구연산화로의 활성저하 및 지방산의 산화감소 등(Ritchie, 1980; Ellenhorn과 Barceloux, 1988)이다. 또한 체내에 흡수된 주정은 주로 간에서 산화되어 먼저 acetaldehyde가 되고 다시 acetate로 산화되어 이용(Bosron과 Li, 1980; Lieber, 1985)되는 것이다. 이러한 대사과정에 생성된 acetaldehyde는 간세포막의 손상과 간세포의 괴사를 초래하는 물질(Sherlock, 1985b)로 알려져 있는 만큼 급성 및 만성 주정 중독시에 담즙을 체로 더욱 심한 간손상을 야기시킨다면 간손상의 정도는 증폭될 것이다. 따라서 이 실험에서와 같이 급성 및 만성 주정 중독시 간에 담즙을 체를 야기시킨다면 혈청과 간조직에서 ALP 활성도의 변동은 더욱 심해질 것이다.

김여희 등(1989, 1990)은 흰쥐에게 급성 및 만성 주정 중독을 시키고 간에 담즙을 체를 야기시켰을 때 간조직의 alanine aminotransferase와 asparatate aminotransferase가 혈중으로 다량 누출되었다고 하였으며 이 성적은 담즙을 체로 인한 간세포의 손상이 주정 중독으로 증폭되어 나타난 결과라 하였다. 따라서 이들 연구자의 보고는 위의 추론을 더욱 뒷받침하는 자료라 생각된다.

이 실험에서 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서 간의 mitochondrial ALP 활성도가 유의한 활성감소를 나타내었는데 이 성적을 볼 때 만성 주정 중독시에는

mitochondrial ALP만 그 합성이 감소되는 것으로 생각된다. 그러나 주정 만성 중독 또는 주정 만성 중독 후 가수술을 한 군에서 혈청 ALP 활성도가 약간 증가되는 것으로 보아 간조직의 ALP가 간세포외로 누출되어 나타낸 결과라는 것도 배제할 수는 없다.

이 실험에서 정상쥐나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때 간세포질과 microsome 분획의 ALP 활성도가 실험 전기간 동안 현저한 증가를 나타내었으며 간의 mitochondria 분획의 ALP 활성도는 담관결찰 후 7일부터 14일까지 증가되었다. 이 성적은 담즙을 체시 간조직의 ALP가 그 합성이 증가된다는 설과 일치되는 결과라 하겠다. 그리고 정상쥐에게 담즙을 체를 야기했을 때 보다 만성 주정 중독 쥐에게 담즙을 체를 야기했을 때 간의 microsome과 mitochondria 분획에서 이 효소의 활성도가 감소되는 것은 분명하게 설명하기는 어렵다. 그러나 정상쥐에게 담즙을 체를 야기했을 때 보다 만성 주정 중독 쥐에게 담즙을 체를 야기했을 때 혈청 ALP 활성도가 증가되는 것으로 보아 이 효소가 간세포외로 누출이 증가되어 나타난 현상이라는 것도 한 가지 요인이라고 생각된다. 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 24시간 경과했을 때 세포질, microsome 분획 및 혈청에서 ALP 활성도가 그 대조군인 총담관만 결찰한 군보다 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과는 담즙을 체시 급성 주정 중독을 시키면 간조직에서 ALP 합성이 증가됨과 동시에 간세포외로 ALP가 누출되어 나타난 결과라 생각된다.

이상 실험의 성적과 추론을 볼 때 담즙을 체로 간손상이 있을 때는 음주가 해롭다고 생각된다.

요 약

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 급성 및 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 담즙을 체를 야기시켜 혈청과 간의 alkaline phosphatase(ALP) 활성도를 측정한 것이다.

흰쥐에게 만성 주정 중독을 시켰을 때 간의 세포질, mitochondria 및 microsome 분획의 ALP 활성도는 변동을 나타내지 않았다.

만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 간의 mitochondria 분획의 ALP 활성도는 수술후 3일부터 14일까지 유의한 활성감소를 나타내었다. 그러나 이 군에서 세포질 및 microsome 분획의 ALP 활성도는

변동이 없었다.

정상쥐나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때 간의 세포질 및 microsome 분획의 ALP 활성도는 실험 전기간 동안 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때는 정상쥐의 총담관을 결찰했을 때보다 실험 전기간 동안 그 활성도가 약간 낮았다.

정상쥐의 총담관을 결찰했을 때 간의 mitochondria 분획의 ALP 활성도는 수술 후 7일부터 14일까지 그 활성이 낮았다.

쥐 간의 세포질, mitochondria 및 microsome 분획의 ALP 활성도는 급성 주정 중독을 시켰을 때 별 변동이 없었다. 그러나 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 24시간 경과했을 때 세포질 및 microsome 분획의 ALP 활성도는 그 대조군인 총담관만 결찰한 군보다 유의한 증가를 나타내었다.

쥐 혈청의 ALP 활성도는 만성 및 급성 주정 중독군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 모두가 별 변동이 없었다. 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서 혈청 ALP 활성도는 수술 후 2일부터 14일까지 현저한 증가를 나타내었다. 그리고 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군은 총담관만 결찰한 군보다는 그 활성도가 실험 전기간 동안 높은지를 나타내었다. 또한 급성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군도 실험 전기간 동안 총담관만 결찰한 군보다 혈청 ALP 활성도는 높은 경향을 나타내었다.

이상 성적으로 보아 간의 ALP는 담즙울체시 만성 주정 중독이 야기되면 그 활성이 담즙울체만 있을 때보다 감소되는 효소라 생각되며 반면에 급성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 그 활성이 증가되는 효소로 보인다.

급성 및 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 혈청 ALP의 활성이 증가되는데 이것은 간손상의 증폭으로 간에서 이 효소의 누출이 증가되어 나타난 결과라 생각된다.

따라서 이 성적은 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안 된다는 것을 뒷받침하는 자료라 할 수 있다.

참 고 문 헌

Bosron WF, Li TK: Alcohol dehydrogenase, in Jakoby WB (ed): *Enzymatic Basis of Detoxication*, New

- York, Academic Press, 1980, vol. 1, pp 231-244.
Chang ES: Light and electron microscopic studies of liver biopsies on alcoholic patients. *J Clin Electron Microscopy* 1985; 18: 331-347.
Chang ES: Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37: 213-224.
장대성, 곽정식, 손태중 : 총담관결찰에 의한 담관 증식성 변화의 초현미경적 연구. 경북의대 잡지 1987; 28: 113-122.
Christofersen P, Poulsen H: Alcoholic liver disease, in Macsween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ (eds): *Pathology of The Liver*. New York, Churchill Livingstone Inc, 1979, pp 232-244.
Desmet VJ: Cholestasis; Extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis, in Macsween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ (eds): *Pathology of the Liver*. New York, Churchill Livingstone Inc, 1979, pp 272-305.
Eagon PK, Willet JE, Seguiti SM: Androgen responsive functions of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology* 1987; 93: 1162-1169.
Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier Science Publishing Co Inc, 1988, pp 782-796.
Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *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*, New York, Academic Press, 1957, vol. 4, pp 708-731.
Halsted JA: *The Laboratory in Clinical Medicine, Interpretation and Application*. London, Saunders Co, 1976, pp 426-429.
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.
Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic Press, 1979, pp 242-243.
김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준모 : 총담관결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. 대한내과학회 잡지 1989; 36: 459-470.
김여희, 곽춘식, 정성광 : Ethanol중독 환쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Alanine Aminotransfe-

- rase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1989; 8: 113-121.
- 김여희, 곽춘식, 정성광: Ethanol중독 환쥐에서 총 담관결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Aminotransferase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1990; 9: 87-95.
- Kind PRN, King EJ: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminoantipyrine. *J Clin Pathol* 1954; 7: 322-326.
- 곽춘식, 장억규: 환쥐 담즙을체 간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성 치. 계명의대논문집 1985; 4: 1-27.
- 곽춘식, 김여희, 문교철: 환쥐 담즙을체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성 치. 계명의대논문집 1987; 6: 67-76.
- 곽춘식, 곽정식: 환쥐 간세포 분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- Lieber CS: Alcohol metabolism, in Hall P (ed): *Alcoholic Liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects*. London, Edward Arnold Ltd, 1985, pp 1-24.
- Liu SJ, Ramsey RK, Fallon HJ: Effect of ethanol on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in the rat. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 369-378.
- Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived from liver cell fraction. II. Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972; 62: 93-100.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 491-495.
- Ritchie JM: The aliphatic alcohols, in Gilman AG, Goodman LS, Gilman A (eds): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 7. New York Macmillan Publishing Co Inc, 1980, pp 376-388.
- Scheffler WC: *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2. USA Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1980, pp 84-89.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985a, pp 79-80.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985b, pp 346-360.
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, et al: Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta* 1980; 107: 85-96.
- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*. London, Edward Arnold Ltd, 1976, pp 129-141.
- Wooddell WJ: Liver disease in alcohol addicted patients, in Davidson SV (ed): *Alcoholism and Health*, Century Boulevard, Aspen system Co, 1980, pp 125-134.

=Abstract=

Effect of Common Bile Duct Ligation on the Serum and Liver Alkaline Phosphatase Activities in Ethanol Intoxicated Rats

You Hee Kim, MD; Sook Hyung Lee, MD; Chun Sik Kwak, PhD

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

Kyo Cheol Mun, MD

*Microbiology Division, Kyōng Sang Buk-Do, Provincial
Government, Institute of Health and Environment, Taegu, Korea*

The activities of the serum and hepatic alkaline phosphatase (ALP) were studied for acute ethanol intoxication after cholestasis, or cholestasis after chronic ethanol intoxication in order to manifest to the biochemical background of alcohol intoxication in hepatobiliary disease.

The group that received common bile duct(CBD) ligation after intoxicating chronically with ethanol showed remarkable increase in the liver cytosolic and microsomal ALP activities. However, the activity showed a less degree than the activity of the CBD ligation group.

The liver mitochondrial ALP activity of the CBD ligation after chronic ethanol intoxication group showed considerable increase after the 7th and 14th day of the ligation. But the activity showed a less degree on the same term than group of CBD ligation.

At the 24th hour following the acute ethanol intoxication which was done on the 14th day after the CBD ligation, the rats showed more significant increase in the liver cytosolic and microsomal ALP activities than the rats with only the CBD ligation for 14 days.

Both the CBD ligation group and the group that received the same ligation after intoxicating chronically with ethanol showed remarkable increase in the serum ALP activity. But the serum ALP activity of the group that received the CBD ligation after chronic ethanol intoxication showed far more significant increase than the group with only the CBD ligation, and also considerable increase in the serum ALP activity was shown when the group was acutely intoxicated with ethanol after the ligation.

In brief, cytosolic and microsomal ALP in the liver is the enzyme whose activity is decreased in chronic ethanol intoxication with cholestasis more than in cholestasis. On the other hand cytosolic and microsomal ALP in the liver are the enzymes with increased activity in acute ethanol intoxication with cholestasis more than in cholestasis. Especially, when the cholestasis with acute and chronic ethanol intoxication occurred, the activity of serum ALP is higher than that of the cholestasis because of increased permeability secondary to liver cell membrane damage, which causes the enzyme to leak into the blood in great quantity.

Accordingly, these results will be the data supporting that alcoholic drink is enzymologically harmful in hepatobiliary disease.

Key Words: Alkaline phosphatase, Cholestasis, Ethanol intoxication