

주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Cholinesterase 활성에 미치는 영향

개명대학교 의과대학 생화학교실, 동국대학교 의과대학
이미안·후과학교실* 및 경북대학교 의과대학 내과학교실**

곽춘식 · 김영진* · 김성국**

서 론

Cholinesterase(acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8)는 주로 acylcholine들을 기수분해하여 choline과 carboxylic acid 음이온을 생성케 하는 효소(Kim, 1979)로서 농물의 거의 모든 조직과 체액중에 분포되어 있다.

이 효소는 조직과 세액중에 성상이 상이한 isozyme으로 존재하고(Massoulie and Bon, 1982) 신과 선 세포내에서는 endoplasmic reticulum과 세포질 분획에 주로 존재하며 mitochondria 분획에서도 발견된다(Schwarz and Ecobichon, 1968) 간조직에서는 이 효소의 합성이旺盛하여 그 함유량이 많을 뿐만 아니라 타조직과는 달리 혈중으로 이효소를 유리(King, 1987)시키기도 한다. Cholinesterase는 xenobiotic biotransformation 효소의 한종류로서 주로 간세포에서 근이화제인 succinylcholine, 국소마취제인 procaine, 마약성 진통제인 diacetylmorphine 등을 기수분해시키는 역할을 담당(Heymann, 1980, Edwards and Brumfitt, 1983)하기도 한다.

간은 물질대사의 중추기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며(Sherlock, 1985a) 체외로 부터 흡수되거나 체내에서 생성된 xenobiotics를 biotransformation시켜 배설케 하는 기구를 가짐으로서 생체를 보호하고 있다(Jakoby et al, 1982). 이러한 기능을 가진 간이라 하더라도 장기간 많은 양의 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증 등이 초래될 수도 있다(Christofersen and Poulsen, 1979, Wooddell, 1980, Sherlock, 1985b).

근래에 와서 주정의 소비량이 늘어남에 따라 음주로 인해 야기되는 질병들이 관심의 대상이 되고 있으며 특히 주정 대사의 주된 장기인 간에 미치는

주정의 영향은 더욱 주목을 받고 있다 음주로 인해 간질환이 초래된다(Christofersen and Poulsen, 1979, Wooddell, 1980; Sherlock, 1985b)는 보고가 있고 보면 간질환이 있을 때 음주를 하거나 주정 중독이 야기된다면 간조직과 혈청에서 cholinesterase의 활성도 변동은 심할 것이나 그러나 이에 대한 보고는 찾아볼 수 없었다.

이 연구는 간담회 실황시 음주의 해로운 점에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 남습울체를 야기시키거나 남습울체가 진행되는 흰쥐에게 급성 주정 중독을 시킨 후 간의 cytosol, mitochondria 및 microsome의 cholinesterase와 혈청의 cholinesterase 활성도를 추정하는 헌편 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 흰쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 흰쥐의 간에서 이 효소의 Km과 Vmax치도 측정하여 그 성적을 비교 검토하였다

재료 및 방법

동물 및 처치 농물을 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320g되는 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 나누었다(도1) 즉 성상군(1군), 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 총담관 결찰군(총 5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 가수술군(총 5군), Eagon 등(1987)의 방법에 따라 5%(v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 죽인 만성 주정 중독군(1군), 5%(v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독

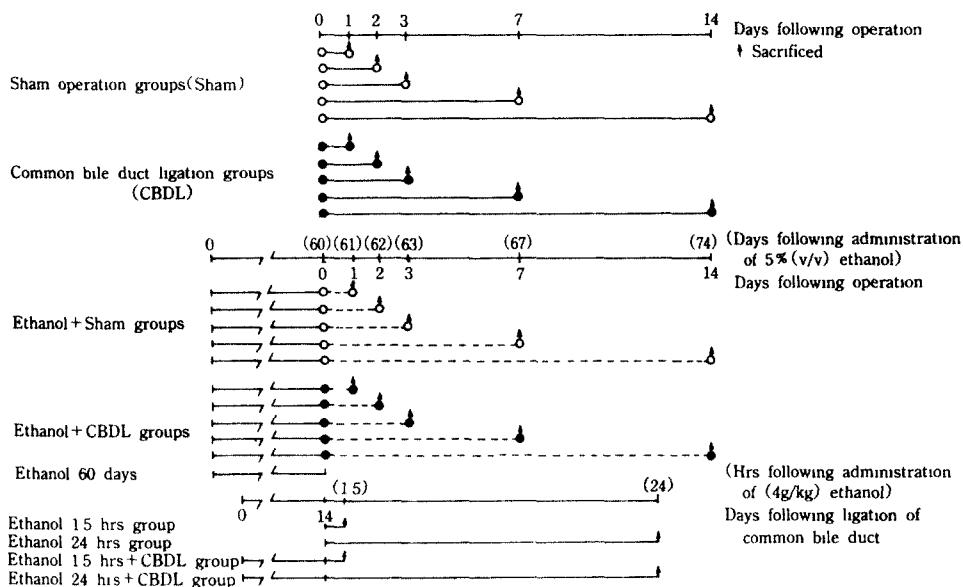


Fig. 1. Experimental design.

후 총담관을 결찰한 군(총 5군), 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 반성 주정 중독 후 가수술을 한 군(총 5군), Liu 등(1975)의 방법에 따라 체중 kg 당 4g의 ethanol을 경구 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 급성 주정 중독군(총 2군), 총담관 결찰 14일 후 체중 kg 당 4g의 ethanol을 경구 투여하고 각각 15시간 및 24시간에 죽인 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군(총 2군) 등이다.

각 실험군은 개별 분과 수용하였으며 실험 전 후에 일정한 조선으로 사육하였다. 사료는 시판되는 실험동물 사료를 먹게 하였다.

반성 주정 중독군, 반성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 반성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 물대신 5% (v/v) ethanol용액(Eagon et al, 1987)을 자유로이 먹게 하였다. 급성 주정 중독은 휘경 체중 kg 당 4g의 ethanol이 투여되도록 25% (v/v) ethanol용액을 조제(Liu et al, 1975)하여 1회 경구 투여하였다.

총담관 결찰술, 가수술 및 간석출술은 효소활성의 일종 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽인 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 급식시킨 후 ether마취 하에서 실시하였다.

총담관 결찰은 간근위부와 약 1cm 아래쪽의 원위

부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

모든 실험군에서 간의 시출은 12시간 급식시킨 후 ether마취 하에서 시행하였으며 복부내동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사 시켰다. 그리고는 간분획에 섭관한 후 4°C의 0.25M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 세거한 다음 간을 자출하였다. 자출한 간은 면포로 관통히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 세거하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소활성도를 측정하였다.

시약 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), butyrylthiocholine iodide, Triton X-100, butyryl-cholinesterase (from human serum, C-5386) 및 단백질준액(10g/100ml bovine albumin)등은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 외 일반시약은 특급 또는 임급품을 사용하였다.

간의 세포분획. 간의 세포분획은 자출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 3g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣은 다음 teflon glass homognizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직

단백액을 만들었나 그리고는 이 산 분설에 보누를 취하여 sucrose density gradient 위험분리법(박준식과 박성식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome분획을 분리하였다.

세포분획시 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였고 sucrose linear density gradient용액의 세조는 gradient former(ISCO model 570)를 사용하였다.

효소 시료 조제 Cholinesterase 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 mitochondria 및 microsome분획을 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액에 혼탁시켰으며 이 혼탁액을 1% Triton X-100액으로 배로 희석한 후 잘 혼탁하여 사용(Junge, 1984)하였다. 그리고 cytosol분획은 아무런 처리없이 원액대로 사용하였다.

효소 활성도 측정 혼탁과 간의 세포질, mitochondria 및 microsome분획의 cholinesterase 활성도 측정은 butyrylthiocholine을 기질로 하여 37°C에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 thiocholine이 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)와 다시 반응하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate의 분자흡광 계수 $E_{412}^{25} = 136 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 효소활성도를 산출하는 방법인 Whittaker(1984)의 방법에 의하였다.

이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혼탁 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 5-thio-2-nitrobenzoate를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 성재된 효소를 사용하여 검증하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 효소 활성도 측정에 사용한 분광 패드계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Varian, cary 210)였다.

단백질 정량 효소액 중의 단백질 정량은 0.5 M-perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 성제하는 Greenberg와 Rothstein(1957) 법으로 효소액 중의 단백을 성제한 다음 biuret 법(Gornall et al, 1949)으로 정량하였다.

Km치 및 Vmax치의 측정·정상치, 가수술 또는 총 남관 결찰술 후 14일 경과한 쥐, 만성 주정 중독을

시킨 다음 가수술 또는 총남관 결찰술 후 14일 경과한 쥐, 금성 주정 중독 후 15 및 24시간 경과한 쥐 및 총남관 결찰술 후 14일에 금성 주정 중독을 시키고 15 및 24시간 경과한 화쥐의 간세포 분획시료들과 효소기질의 혼탁과 희석액들을 사용하여 cholinesterase 활성도를 측정한 후 이를 상식으로부터 1/Vt 차트를 그리고 효소활성도 측정에 사용한 기질농도로부터 1/St 차트를 계산하여 이중역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출(Segel, 1976)하였다.

성적검정 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

결 과

만성 주정 중독 화쥐에서 총남관 결찰이 간의 cholinesterase 활성도에 미치는 영향 만성 주정 중독을 시킨 화쥐에게 세속 5% (v/v) ethanol을 먹이면서 총남관을 결찰했을 때 간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal cholinesterase 활성도의 변화는 각각 표 1, 2 및 3과 같다.

화간의 cytosolic cholinesterase 활성도는 모든 군에서 별 변동을 나타내지 않았다(표1). 또한 화간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서도 별 변동을 나타내지 않았다(표2 및 3).

화간의 mitochondrial cholinesterase 활성도는 정상화의 총남관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총남관 결찰 후 14일에는 약 43% ($P < 0.01$)의 감소를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총남관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 총남관 결찰 후 7일에는 약 29% ($P < 0.05$), 14일에는 약 58% ($P < 0.01$)의 감소를 나타내었다. 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총남관을 결찰한 군과 총남관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총남관을 결찰한 군이 총남관을 결찰한 군보다 총남관 결찰 후 14일에 약 35% ($P < 0.05$)의 유의한 감소를 나타내었다(표2).

화간의 microsomal cholinesterase 활성도는 정상화의 총남관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총남관 결찰 후 1일에는 약 41% ($P < 0.001$), 2일에는 약 51% ($P < 0.001$), 3일에는 약 52% ($P < 0.001$), 7일에는 약 50% ($P < 0.001$), 14일에

는 약 48% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다. 만성 주성 중독 후 총담관을 결찰한 군에서 대조군인 만성 주성 중독 후 기수술은 위 군에 비해 이 효소의 활성도는 총남관 결찰 후 1일에는 약 44% ($P<0.001$), 2일에는 약 51% ($P<0.001$), 3일에는 약 55% ($P<0.001$), 7일에는 약 60% ($P<0.001$), 14

일에는 약 63% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다. 이 효소의 활성도는 만성 주성 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총남관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주성 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관을 결찰한 군보다 총남관 결찰 후 14일에 약 30% ($P<0.05$)의 유의한 감소를 나타내었다(표3).

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic cholinesterase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Cholinesterase activities (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal, 34.4±3.8, Ethanol, 32.9±4.1)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	34.2±4.6	34.9±4.8	33.1±4.3	32.3±4.5
2	34.8±4.4	34.3±4.2	32.4±4.5	32.7±4.3
3	33.9±4.7	35.0±4.3	32.1±4.1	32.2±3.8
7	34.5±3.9	35.9±4.1	32.3±3.8	31.4±3.6
14	35.1±3.7	35.3±3.9	31.9±3.5	30.7±3.4

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

Animal groups are described in Fig. 1.

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial cholinesterase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Cholinesterase activities (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal, 9.0±1.7, Ethanol, 8.3±1.6)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	8.7±1.6	8.6±1.5	8.2±1.6	7.8±1.7
2	8.9±1.9	8.9±1.8	8.3±1.7	7.5±1.6
3	9.0±1.7	9.1±1.6	8.1±1.8	6.9±1.5
7	8.9±1.6	6.8±1.4	8.0±1.6	5.7±1.4 ^d
14	9.1±1.8	5.2±1.3 ^b	8.1±1.7	3.4±1.1 ^{e,g}

b. $P<0.01$ vs. Sham, d. $P<0.05$ vs. Ethanol+Sham, e. $P<0.01$ vs. Ethanol+Sham, g. $P<0.05$ vs. CBDL

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal cholinesterase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Cholinesterase activities (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal, 35.9±5.8, Ethanol, 35.7±5.2)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	35.3±5.2	21.0±3.6 ^c	35.2±5.4	19.8±3.9 ^f
2	35.8±6.0	17.5±3.4 ^c	35.3±5.8	17.4±3.6 ^f
3	36.0±5.6	17.2±3.2 ^c	35.0±5.5	15.6±3.3 ^f
7	35.5±5.3	17.8±2.8 ^c	34.8±5.3	14.0±3.1 ^f
14	35.3±5.1	18.2±3.5 ^c	34.3±4.9	12.7±2.4 ^{f,g}

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 serum cholinesterase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Cholinesterase activities (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate ml ⁻¹ min ⁻¹)			
	(Normal, 656.6±129.3, Ethanol, 647.8±121.3)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	658.7±127.2	458.9±122.6 ^a	644.2±126.2	431.7±128.6 ^d
2	660.5±130.7	420.1±115.3 ^a	641.3±128.3	414.5±135.1 ^d
3	653.9±132.5	427.8±130.9 ^a	644.8±125.8	406.4±131.3 ^d
7	655.3±126.1	428.7±138.5 ^a	640.1±123.2	392.2±133.7 ^d
14	647.8±127.9	417.4±146.3 ^a	636.4±121.1	378.6±129.4 ^d

a. P<0.05 vs Sham, d. P<0.05 vs. Ethanol+Sham

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 cholinesterase 활성도에 미치는 영향 반성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 새속 5% (v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때 혈장의 cholinesterase 활성도의 변화는 표 4와 같다.

쥐 혈청의 cholinesterase 활성도는 만성 주정 중독 군과 반성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 별 변동을 나타내지 않았다.

쥐 혈청의 cholinesterase의 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 1일에는 약 30% (P<0.05), 2일에는 약 34% (P<0.05), 3일 및 7일에는 약 35% (P<0.05), 14일에는 약 36% (P<0.05)의 감소를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 총담관 결찰 후 1일에는 약 31% (P<0.05), 2일에는 약 32% (P<0.05), 3일에는 약 37% (P<0.05), 7일에는 약 39% (P<0.05), 14일에는 약 41% (P<0.05)의 감소를 나타내었다. 그러나 이 효소의 활성도는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 별 차이가 없었다.

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 간과 혈청의 cholinesterase 활성도에 미치는 영향 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간 및 혈청의 cholinesterase 활성도의 변화는 표 5와 같다.

쥐 간의 cytosolic cholinesterase 활성도는 모든 군에서 별 변동을 나타내지 않았다. 또한 쥐 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase와 혈청의

cholinesterase 활성도도 급성 주정 중독 군에서는 별 변동을 나타내지 않았다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 15시간 및 24시간 경과 후의 mitochondrial cholinesterase 활성도는 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 각각 약 49% (P<0.01) 및 약 57% (P<0.01)의 감소를 나타내었으며 microsomal cholinesterase도 각각 약 59% (P<0.001) 및 약 56% (P<0.001)의 활성도 감소를 나타내었다. 또한 혈청의 cholinesterase도 각각 약 44% (P<0.05)와 약 40% (P<0.05)의 활성도 감소를 나타내었다. 그러나 이 효소들의 활성도는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다.

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 간의 cholinesterase의 Km 및 Vmax치의 변화. 반성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일 경과한 쥐 간의 cholinesterase를 butyryl-thiocholine을 가질로 사용하여 Km치 및 Vmax치를 측정했을 때 그 변화는 표 6과 같다.

반성 주정 중독 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 14일의 담즙을 제거에서 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Km치를 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 총담관만 결찰한 군과 각각 비교했을 때 별 차이가 없었다. 그러나 이를 분획에서 cholinesterase의 Vmax치는 모두 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군이나 총담관만 결찰한 군에 비해 현저한 감소를 나타내었다.

흰쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 cholinesterase의 Km 및

Table 5. Effect of common bile duct ligation on serum and liver cytosolic, mitochondrial and microsomal cholinesterase activities in acute ethanol intoxicated rats

Cholinesterase activities					
(Liver cholinesterase; nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹ , serum cholinesterase, nmol 5-thio-2-nitrobenzoate ml ⁻¹ min ⁻¹)					
Normal	CBDL 14 days	Ethanol 1.5 hrs	Ethanol 1.5 hrs +CBDL	Ethanol 24 hrs	Ethanol 24 hrs +CBDL
(Cytosol)					
34.8 ± 3.8	35.3 ± 3.9	37.2 ± 3.2	36.3 ± 3.7	34.9 ± 4.3	35.7 ± 3.4
(Mitochondria)					
9.0 ± 1.7	5.2 ± 1.3 ^j	8.6 ± 2.2	4.4 ± 1.5 ⁿ	9.2 ± 1.9	4.0 ± 1.6 ^a
(Microsome)					
35.9 ± 5.8	18.1 ± 3.5 ^j	34.7 ± 6.7	14.4 ± 3.2 ⁿ	37.1 ± 7.1	16.4 ± 3.7 ^r
(serum)					
656.6 ± 129.3	417.4 ± 146.3 ^j	673.8 ± 141.1	396.7 ± 141.3 ^m	681.4 ± 136.8	411.2 ± 133.8 ^p

j: P<0.05 vs. Normal, l: P<0.001 vs. Normal, m: P<0.05 vs. Ethanol 1.5 hrs,

n: P<0.01 vs. Ethanol 1.5 hrs, o: P<0.001 vs. Ethanol 1.5 hrs, p: P<0.05 vs.

Ethanol 24 hrs, q: P<0.01 vs. Ethanol 24 hrs, r: P<0.001 vs. Ethanol 24 hrs

Table 6. Cholinesterase kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat liver determined with butyrylthiocholine

Cell fractions	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
Km(mM)				
Mitochondria	9.21±1.36	10.25±1.42	9.36±1.43	11.02±1.32
Microsome	3.43±0.34	3.35±0.29	3.48±0.37	3.45±0.43
Vmax(nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹)				
Mitochondria	33.1±5.7	20.2±6.2 ^b	29.6±5.4	11.3±4.9 ^{f,s}
Microsome	60.2±7.2	46.3±6.1 ^a	57.3±7.7	37.2±5.6 ^{f,s}

Michaelis-Menten constants for cholinesterase were determined using butyrylthiocholine at 37°C for mitochondrial and microsomal fractions of male rat livers at the 14th day after operation.

a. P<0.05 vs. Sham, b. P<0.01 vs. Sham, f. P<0.001 vs. Ethanol+Sham, s. P<0.05 vs. CBDL

Vmax치의 변동: 환경에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 cholinesterase를 butyrylthiocholine을 기질로 사용하여 측정한 Km치 및 Vmax치의 변동은 표 7과 같다.

Mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Km치는 모든 실험군에서 별 변동이 없었다.

환경에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과시켰을 때 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Vmax치는 그 대조군인 급성 주정 중독만 시킨 군 보다는 현저한 감소를 나타내었으나 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다

Table 7. Cholinesterase kinetic parameters from cholestasis with acute ethanol intoxicated rat liver determined with butyrylthiocholine

Animal groups	Mitochondria		Microsome	
	Km (mM)	Vmax (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein ⁻¹ min ⁻¹)	Km	Vmax
Normal	9.18±1.38	32.3±5.6	3.40±0.32	59.6±7.4
CBDL 14 days	10.25±1.42	20.2±6.2 ^j	3.35±0.29	46.3±6.1 ⁱ
Ethanol 1.5 hrs	9.76±1.50	33.7±6.4	3.42±0.31	58.7±6.8
Ethanol 1.5 hrs +CBDL	10.13±1.44	23.4±5.4 ^m	3.46±0.36	48.3±5.7 ^m
Ethanol 24 hrs	9.58±1.48	35.3±5.9	3.38±0.33	63.4±6.6
Ethanol 24 hrs +CBDL	9.92±1.52	19.1±6.1 ^a	3.43±0.38	51.3±5.9 ^p

Michaelis-Menten constants for cholinesterase were determined using butyrylthiocholine at 37°C for mitochondrial and microsomal fractions in male rat livers of acute intoxication with ethanol done after 14 days of the common bile duct ligation.

j. P<0.05 vs Normal, m. P<0.05 vs. Ethanol 1.5 hrs, p. P<0.05 vs. Ethanol 24 hrs, q. P<0.01 vs. Ethanol 24 hrs

고 찰

주정은 극성 유기용매로서 음주 후 주로 간에서 대사되며 일정농도 이상에서는 단백질을 변성시킬 수 있다(Ellenhorn and Barceloux, 1988). 상기 간 음주를 했을 때는 지방간, 산염, 간경변증 등(Christofersen and Poulsen, 1979, Woodell, 1980, Sherlock, 1985b)의 간질환이 야기될 수도 있으며 주정 중독시에 간세포는 심한 형태학적 변화를 받는다(Christofersen과 Poulsen, 1979, Chang, 1985, Chang, 1987). 주정 중독으로 인한 형태학적 변화는 주로 간세포의 mitochondria와 endoplasmic reticulum에서 관찰되며 mitochondria에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 cristase의 배열분란(Christofersen and Poulsen, 1979, Chang, 1985, Chang, 1987) 등이고 endoplasmic reticulum에서 나타나는 변화는 smooth endoplasmic reticulum의 증식(Christofersen and Poulsen, 1979, Chang, 1985, Chang, 1987)을 볼 수 있다 이외에도 Mallory 소체의 증식(Christofersen and Poulsen, 1979, Chang, 1985, Chang, 1987)과 간 세포괴사를 수반하는 형태학적 변화(Christofersen and Poulsen, 1979)도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생성증가, pyru-

vate의 생성감소, 지방산의 합성촉진, 구연산회로의 활성저하 및 지방신의 산화감소 등(Ritchie, 1980, Ellenhorn and Barceloux, 1988)을 볼 수 있다.

간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우들은 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담노폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담노폐쇄 등(Halsted, 1976)이며 이와 같은 간담노 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 괴사, 담노증식, 심유화 및 경화성 변화 등(Desmet, 1979)이 나타날 뿐만 아니라 심한 간기능의 장애도 나타난다(Halsted, 1976; Sherlock, 1985a).

흰쥐의 총남관을 걸찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체간은 괴사, 담노증식, 심유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며(Moritz and Snodgrass, 1972; 상대성 외, 1987, 김효석 외, 1989) 동시에 간기능도 정애가 초래된다.

또한 간의 배설기능에 장애가 오면 간은 담즙울체가 야기되며(Sherlock, 1985a) 이때 담즙울체간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 변동된다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사 과정은 ethanol이 acetaldehyde로 산화되고 다시 acetate로 산화되어 이용(Bosron and Li, 1980, Lieber, 1985) 되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 acetaldehyde는 간세포의 괴사를 초래하

는 물질(Sherlock, 1985b)로 알려져 있고 또한 주정 중독시 심한 혈액학적 변화가 초래(Chang, 1985; Chang, 1987)되는 만큼 남습울체와 주정 중독이 병행된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것이다.

환자에서는 주정 중독과 남습울체로 간조직의 손상이 항진될 때는 xenobiotic biotransformation 효소들의 활성도가 변동이 심하나(정성광, 1990; 곽준식 외, 1990; 정성광과 곽준식, 1992; 문교철, 1992) 고 한다. 즉 환자에서 급성 및 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 남습울체만 있을 때 보다 간에서 그 활성도가 증가되는 xenobiotic biotransformation 효소들은 xanthine oxidase(정성광, 1990), cytosolic glutathione S-transferase(곽준식 외, 1990), cytosolic glutathione peroxidase(곽준식 외, 1990), mitochondrial monoamine oxidase(정성광과 곽준식, 1992) 등을 들 수 있으며 간에서 그 활성도가 감소되는 xenobiotic biotransformation 효소는 microsomal glutathione S-transferase(곽준식 외, 1990)를 들 수 있다. 그리고 급성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때만 그 활성도가 증가되는 xenobiotic biotransformation 효소는 catalase(문교철, 1992)이고, 만성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때만 그 활성도가 증가되는 xenobiotic biotransformation 효소는 microsomal aldehyde dehydrogenase(문교철, 1992)이며 이때 그 활성도가 감소되는 xenobiotic biotransformation 효소는 alcohol dehydrogenase와 cytosolic aldehyde dehydrogenase이다(문교철, 1992). 또한 급성 및 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 남습울체만 있을 때 보다 혈청에서 그 활성도가 증가되는 xenobiotic biotransformation 효소들은 alcohol dehydrogenase(문교철, 1992)와 xanthine oxidase(정성광, 1990) 등을 들 수 있다. 따라서 이 실험에서 측정한 cholinesterase는 간에서 그 합성이 활발할 뿐만 아니라 xenobiotic biotransformation 효소로서 남습울체시 간과 혈청에서 그 활성도가 감소(곽준식과 이숙형, 1992)되는 만큼 주정 중독시 남습울체가 야기되면 그 활성도의 변동은 더욱 심해질 것이다.

이 실험에서 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때 간의 mitochondrial cholinesterase 활성도는 총담관 결찰 후 7일 및 14일에 현저한 감소를 나타내었다. 이 성적을 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 총담관만 결찰한 군보다 더 현저한 감소를 나타내었다. 또한 이 실험에서 만성 주정 중독 쥐의

총담관을 결찰했을 때 간의 microsomal cholinesterase 활성도는 실험 전기간 동안 현저한 감소를 나타내었다. 이 성적을 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 총담관만 결찰한 군보다 더 현저한 감소를 나타내었다. 이 실험에서 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰했을 때 혈청의 cholinesterase 활성도는 실험 전기간 동안 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 이 성적을 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다.

이상의 성적을 볼 때 간의 cholinesterase는 만성 주정 중독시 남습울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다 그 활성도가 감소되는 효소로 생각된다.

이 실험에서 총담관결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase 활성도는 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 이 성적을 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다. 이 실험에서 총담관결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시켰을 때 혈청의 cholinesterase 활성도는 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 이 성적을 총담관만 결찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다.

이상 성적으로 보아 간의 cholinesterase는 급성 주정 중독시 남습울체가 야기되었을 때는 만성 주정 중독시 남습울체가 야기되었을 때와는 다르게 그 활성도의 변동은 없는 효소로 생각된다.

이 실험에서 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 환자와 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 환자에서 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Km치는 변동이 없었다. 그러나 이 실험에서 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 쥐간에서 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Vmax치는 현저한 감소를 나타내었다. 이 실험에서 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 쥐간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Vmax치는 별 변동이 없었다. 즉 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 환자 간의 mitochondria와 microsome에서 cholinesterase의 농역학적 척도를 측정했을 때 Km치는 변동이 없었으며 Vmax치는 현저한 감소를 나타내었다. 이와같이 만성 주정 중독시 담즙울체를 이기했을 때 간의 mitochondria와 microsome에서 이들 효소의 Km치가 변동이 없으면서 그 활성도가 감소되고 또한 Vmax치가 감소된

것은 이들 효소의 활성도: 간소가 촉매효율의 간소라 보기는 어려우며 특히 담즙울체간에서는 합성이 저하된다는 보고(곽춘식과 이숙형, 1992)가 있고 보면 이 실험에서의 결과도 역시 효소 합성의 간소라고 생각된다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 성적으로 보아 xenobiotic biotransformation 효소인 간의 mitochondrial 및 microsome의 cholinesterase는 담즙울체시 만성 주정 중독이 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때 보다 감소되는 효소로 생각되며 따라서 이 성적은 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 사료라 할 수 있다.

요 약

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일상을 밝히고자 만성 주정 중독을 시킨 환쥐에게 총담관관찰로 담즙울체를 야기시키거나, 담즙울체가 진행되는 환쥐에게 급성 주정 중독을 시킨 후 간과 혈청의 cholinesterase 활성도를 측정하였으며 한편 총담관관찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 환쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 관찰하여 14일 경과 시킨 환쥐의 간에서 이들 효소의 Km과 Vmax치를 측정하였다.

만성 주정 중독 쥐의 총담관을 관찰했을 때 간의 mitochondrial cholinesterase 활성도는 총담관관찰 후 7일 및 14일에 혈액 간소를 나타내었으며 그 간소의 정도는 총담관만 관찰한 군보다 혈액하였다.

만성 주정 중독 쥐의 총담관을 관찰했을 때 간의 microsomal cholinesterase 활성도는 실험 전기간 동안 혈액 간소를 나타내었으며 그 간소의 정도는 총담관만 관찰한 군보다 혈액하였다.

만성 주정 중독 쥐의 총담관을 관찰했을 때 혈청의 cholinesterase 활성도는 실험 전기간 동안 혈액 간소를 나타내었다. 그러나 이 성적을 총담관만 관찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다.

총담관 관찰 14일 후 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase와 혈청의 cholinesterase 활성도는 혈액 간소를 나타내었다. 그러나 이 성적을 총담관만 관찰한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다. 환쥐에게 총담관 관찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키거나, 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 관찰하여 14일 경과 시킨 쥐의 간에서 mitochondrial 및 microsomal

cholinesterase의 Km치는 변동이 없었다.

만성 주정 중독 후 총담관을 관찰하여 14일 경과 시킨 쥐간에서 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Vmax치는 혈액 간소를 나타내었나 총담관 관찰 14일 후 급성 주정 중독을 시키고 15시간 및 24시간 경과 후의 쥐간에서 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase의 Vmax치는 별 변동이 없었다.

이상의 성적으로 보아 간의 mitochondrial 및 microsomal cholinesterase는 담즙울체시 만성 주정 중독이 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때 보다 감소되는 효소로 생각되며 따라서 이 성적은 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 사료라 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 Microscop* 1985, 18(4): 331-337
- Chang ES. Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn* 1987, 37(2): 213-224.
- 장대성, 곽성식, 손대중: 총담관 관찰에 의한 담관증식성 변화의 초미형태학적 연구. 경북의내잡지 1987; 28(2): 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, 1979, pp. 232-244.
- 정성광, 김여희, 곽춘식. 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간의 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집, 1994, 13(1): 64-72
- 정성광, 곽춘식 Ethanol 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간의 Monoamine oxidase 활성에 미치는 영향 한국생화학회지 1992, 25(3): 210-218.
- 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, 1979, pp 272-305.
- Eagon PK, Willet JE, Seganti SM, Appler ML, Gavaler JS, Van Thiel DH. Androgen responsive functions of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology* 1987; 93(6): 1162-1169.
- Edwards JA, Brimijoin S. Effects of hypophysectomy on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(7): 1183-1189.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG. *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, New York, Elsevier Science, 1988, pp 782-796.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177(3): 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, 1976, pp. 426-429.
- Heymann E. B-Esterase (serine hydrolases), in Jacoby WB (ed). *Enzymatic Basis of Detoxication*, New York, Academic Press, 1980, Vol II, pp 295-297.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J. *Metabolic Basis of Detoxication Metabolism of Functional Groups*, New York, Academic Press, 1982, pp 5-317.
- Junge W. Carboxylesterase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Gra 1 M (eds) *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3, Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1984, Vol IV, pp. 2-7.
- Kim BK. *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1979, pp. 234-235.
- 김효식, 박재웅, 김은영, 곽준식, 최용현, 성준모. 총담관 결찰시 간세포의 초미형내학적 변화. 대한내과학회 잡지 1989; 36(4): 459-470.
- King ME. Cholinesterase, in Pesce AJ, Kaplan LA (eds). *Methods in Clinical Chemistry*, ST Louis, The C V Mosby, 1987, pp. 161-168.
- 곽준식, 김여희, 조준승. Ethanol 중독 환경에서 총담관 결찰이 간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase 및 Glutathione Reductase 활성에 미치는 영향. 한과생화학회지 1990; 23(2): 251-262.
- 곽준식, 이숙형. 환경 담즙물체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. 한과생화학회지 1992; 25(3): 251-261.
- 곽준식, 곽정식. 환경 간세포 분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5(1): 45-53.
- Lieber CS. Alcohol metabolism, in Hall P (ed). *Alcoholic Liver Disease. Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects*, Frome and London, Edward Arnold, 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.
- Massoulé J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 1982; 5: 57-106.
- Moritz M, Snodgrass PJ. Serum enzymes derived from liver cell fraction. II. Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972; 62 (1): 93-100.
- 부교원. Ethanol 중독 환경에서 총담관 결찰이 간의 Alcohol 대사 효소들의 활성에 미치는 영향. 경희대학교대학원 박사학위논문, 1992, 1-62.
- Ritchie JM. The aliphatic alcohols, in Gilman AG, Goodman LS, Gilman A (eds). *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, ed 7, New York, Macmillan, 1980, pp. 376-388.
- Segel IH. *Biochemical Calculations*, ed 2, New York, John Wiley and Sons, 1976, pp. 214-246.
- Sherlock DS. *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7, Oxford, Blackwell Scientific, 1985a, pp. 79-80.
- Sherlock DS. *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7, Oxford, Blackwell Scientific, 1985b, pp. 346-360.
- Schwarz WS, Ecobichon DJ. Subcellular localization and drug-induced changes of rat liver and kidney esterases. *Can J Physiol Pharmacol* 1968; 46: 207-212.

Whittaker M Cholinesterase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M(eds) *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3, Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1984, Vol IV, pp 52-74

Wooddell W.J. Liver disease in alcohol addicted patients, in Davidson SV(ed) *Alcoholism and Health*, Century Boulevard, Aspen System, 1980, pp. 125-134

=Abstract=

Effect of Common Bile Duct Ligation on Liver Cholinesterase Activity in Ethanol Intoxicated Rats

Chun Sik Kwak, PhD; Young Jin Kim, MD*; Sung Kook Kim, MD**

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine,

Taegu, Department of Otolaryngology Dongguk University College of Medicine, Kyungu*, and

Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine**, Taegu Korea

The hepatic and serum cholinesterase activities were studied in cholestasis induced by common bile duct(CBD) ligation and chronic ethanol intoxication, and in cholestasis after acute ethanol intoxication to establish the biochemical background of alcoholic hazard in hepatobiliary disease.

Exclusively, when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication, the activities of hepatic mitochondrial and microsomal cholinesterase decreased more significantly than that of CBD was ligated only.

On the other hand, when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication, the values of Vmax of the hepatic mitochondrial and microsomal cholinesterase decreased more significantly than that of CBD was ligated only. However, the values of Km of above hepatic cholinesterases did not change.

Viewed from above results, the hepatic mitochondrial and microsomal cholinesterase seem to be the enzymes which decrease activities in chronic ethanol intoxication with cholestasis more than in cholestasis, and the cause of the decrease are suggested to be decreased biosynthesis.

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

Key words Cholestasis, Cholinesterase, Ethanol intoxication