

## 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간 및 혈청의 Glyoxalase I 활성에 미치는 영향

제명대학교 의과대학 생화학교실

변용준 · 김여희 · 곽춘식

### 서 롬

최근 주류의 소비량이 늘어남에 따라 음주로 인해 야기되는 질병들이 관심의 대상이 되고 있으며, 그 중에서도 주정대사의 주된 장기인 간에 미치는 주정의 영향이 주목을 받고 있다. 간은 물질대사의 주된 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 (Sherlock, 1985 a) 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 생체변환시켜 배설케 하는 기구를 가짐으로써 생체를 보호하고 있다(Jakoby et al, 1982). 그러나 이러한 기능을 가진 간이라 하더라도 장기간 많은 양의 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증 등이 초래될 수도 있다(Christoffersen and Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985 b).

일반적으로 간담도 질환시 음주는 유해하다고 하며 이 사실은 음주로 인한 간질환의 유발로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 그러나 아직도 그 생화학적 뒷바침은 분명치 않다. 특히 간은 유해물질을 생체변환시키는 주된 장기이므로 간담도 질환시 음주를 하거나 주정 중독이 야기된다면 간조직에서 생체이물 생체변환(xenobiotic biotransformation) 효소의 활성도는 변동이 있을 것으로 생각된다.

Glyoxalase I ((R)-S-lactoylglutathione methylglyoxal-lyase(isomerizing), EC 4. 4. 1. 5)은 주로 2-oxoaldehydes와 환원형 glutathione을 결합시켜 glutathione의 thioesters를 형성케 하는 반응을 촉매하는 효소로서(Racker, 1951; Mannervik, 1980; Kim, 1984) 포유동물의 대부분의 조직(Han et al, 1976; Mannervik, 1980; Stohlmacher and Haferland, 1980; Hays et al, 1989; Thronalley, 1990)과 적혈구(Han et al, 1976; Parr et al, 1977), 백혈구(Gillespie, 1979; Thronally and Bellavite, 1987), 혈장(Di Simplicio and Mannervik, 1983) 등에 분포되어

있으며 간에서는 세포질에 국재되어 있다(Kester and Norton, 1975; Uotila and Koivusalo, 1975; Elango et al, 1998).

Glyoxalase I(이하 GLO-I이라 함)은 생체이물 생체변환 효소의 한가지로 그 생리적 역할은 생체내에서 생성되거나 장내세균이 합성하여 흡수한 2-oxoaldehydes 중 한가지인 methylglyoxal에 환원형 glutathione을 결합시켜 (R)-S-lactoylglutathione을 생성케함으로써 methylglyoxal의 독성을 없애는 것이다(Mannervik, 1980; Thronalley, 1980). 즉 methylglyoxal이 독성을 나타내는 것은 methylglyoxal이 반응성이 활발한 carbonyl기를 두개 가지고 있기 때문에 생체내에서 thiol 화합물과 반응하여 세포증식을 억제하는 methylglyoxalic thiolester를 생성케 하기 때문이며 바로 이 GLO-I이 methylglyoxal를 생체변환시킴으로써 그 독성을 없애는 것이다(Mannervik, 1980; Thronalley, 1990). 그리고 이 효소는 환쥐에서 담즙을 체가 야기되었을 때 간조직과 혈청에서 그 활성도가 증가되는 것(박재신, 1993)으로 밝혀져 있다.

이와같이 생체이물 생체변환 효소인 GLO-I은 담즙을 체시 간조직과 혈청에서 그 활성도가 증가되고, 또한 담즙을 체시 주정 중독을 시키면 간손상이 심해진다는 보고(정성광과 곽춘식, 1992; 김성수 외 1993)가 있고 보면 급성 및 만성 주정 중독시 담즙을 체가 야기된다면 이를 효소의 활성도는 심한 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 만성 주정 중독을 시킨 환쥐에게 총담관 결찰로 담즙을 체를 야기시키거나, 담즙을 체가 진행되는 환쥐에서 급성 주정 중독을 시킨 후 간과 혈청에서 GLO-I의 활성도를 측정하는 한편 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 환쥐와 만성 주정

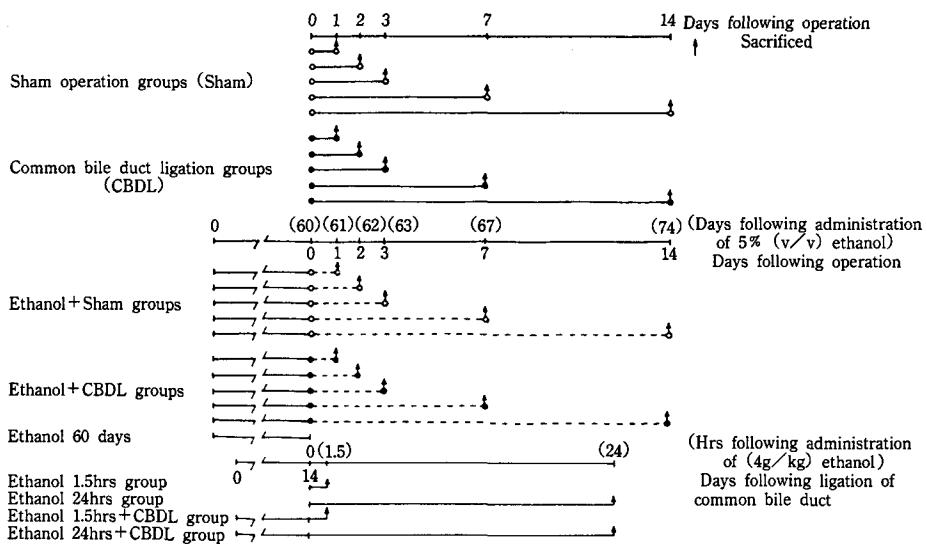


Fig 1. Experimental design.

중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 흰쥐의 간에서 이 효소의 Km치와 Vmax치도 함께 측정하여 이 성적을 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

**동물 및 처치 :** 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g되는 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 나누었다(도1). 즉 정상군(1군), 총담관결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 총담관결찰군(총 5군), 단순개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 가수술군(총 5군), Eagon et al(1987)의 방법에 따라 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 만성 주정 중독군(1군), 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취한 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군(총 5군), 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취한 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군(총 5군), Liu et al(1975)의 방법에 따라 체중 kg당 4 g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 급성 주정 중독군(총 2군), 총담관 결찰 14일 후 체중 kg당 4 g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간

및 24시간에 죽인 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군(총 2군) 등이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 진양사료 주식회사의 실험 동물 사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 만성 주정 중독 후 총 담관을 결찰한 군에서는 물대신에 5% (v/v) ethanol용액(Eagon et al, 1987)을 자유로이 먹게 하였다. 그리고 급성 주정 중독은 흰쥐 체중 kg당 4 g의 ethanol이 투여되도록 25% (v/v) ethanol용액을 조제(Liu et al, 1975)하여 1회 경구 투여하였다.

총담관 결찰술, 가수술 및 간 적출술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다.

총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰 한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

시약 : Methylglyoxal, reduced glutathione, S-lactoylglutathione, glyoxalase (grade X, from yeast) 및 단백표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그외 시약들은 시판하는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출, 세포질 분리 및 효소시료 조제 : 모든 실

험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취 하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 그리고 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다. 간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배량의 sucrose액을 넣은 다음 Teflon glass homogenizer(Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10 w/v%의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 세포질 분획을 분리하였다.

GLO-I 측정용 효소시료의 조제는 분리한 간세포질 분획을 단백량으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose액에 혼탁시켜 사용하였다.

위의 세포 분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심 분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 또한 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였다.

효소 활성도 측정 : 혈청과 간 세포질 분획의 GLO-I의 활성도 측정은 시료와 함께 methylglyoxal과 reduced glutathione을 기질로 사용하여 30°C에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 S-lactoylglutathione을 240 nm 파장에서 비색하여 효소의 활성도를 산출하는 Racker(1951)의 법에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 S-lactoylglutathione을 nmol로 나타내었다.

Km치 및 Vmax치의 측정 : 정상쥐, 가수술 또는 총담관 결찰 후 14일 경과한 쥐, 만성 주정 중독을 시킨 다음 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 쥐, 급성 주정 중독 후 1.5 및 24시간 경과한 쥐 및 총담관 결찰술 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5 및 24시간 경과한 흰쥐의 간세포 분획 시료와 각 효소 기질의 원액과 희석액들을 사용하여 GLO-I

활성도를 측정한 후 이를 성적으로부터  $1/v_i$ 를 그리고 기질농도로부터  $1/[S]$ 를 계산하여 이중 역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출(Segel, 1976)하였다.

단백질 정량 : 효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg and Rothstein (1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법(Gornall et al, 1949)으로 정량하였다.

성적 검정 : 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며, 유의수준은 0.05이하로 하였다.

## 성 적

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 GLO-I 활성도에 미치는 영향 : 쥐 간의 GLO-I 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 별 변동을 나타내지 않았다.

쥐 간의 GLO-I 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 2일에는 약 25% ( $P<0.05$ ), 3일에는 약 31% ( $P<0.05$ ), 7일에는 약 39% ( $P<0.01$ ), 14일에는 약 51% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었다. 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군 보다 총담관 결찰 후 7일에는 약 24% ( $P<0.05$ ), 14일에는 약 36% ( $P<0.001$ )의 감소를 나타내었다 (표 1).

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 GLO-I 활성도에 미치는 영향 : 쥐 혈청의 GLO-I의 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 별 변동을 나타내지 않았다.

쥐 혈청의 GLO-I의 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 2일에는 약 162% ( $P<0.001$ ), 3일에는 약 97% ( $P<0.01$ ), 7일에는 약 65% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 총담관 결찰 후 2일에는 약 123% ( $P<0.001$ ), 3일에는 약 67% ( $P<0.05$ ) 증가를 나타내었다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver glyoxalase I activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Glyoxalase I activities (nmol S-lactoylglutathione min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )			
	(Normal; 677.3±95.8, Ethanol; 653.2±97.3)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	675.3±101.4	722.6±101.6	627.3±92.7	713.6±95.1
2	673.1± 99.3	839.4±103.2 <sup>a</sup>	639.0±89.4	801.4±96.5 <sup>b</sup>
3	671.6±100.2	878.2±106.5 <sup>a</sup>	647.6±93.2	781.7±94.6
7	675.4± 97.8	941.9±130.7 <sup>b</sup>	651.5±96.3	718.3±98.8 <sup>g</sup>
14	678.2± 96.7	1,025.7±128.3 <sup>b</sup>	667.7±95.5	660.1±88.2 <sup>i</sup>

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, b; P<0.01. vs. Sham, d; P<0.05 vs. Ethanol+Sham, g; P<0.05 vs. CBDL, i; P<0.001 vs. CBDL

Table 2. Effect of common bile duct ligation on serum glyoxalase I activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Glyoxalase I activities (nmol S-lactoylglutathione min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )			
	(Normal; 591.4±195.2, Ethanol; 582.1±190.6)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	604.3±201.2	881.6±226.7	593.6±192.4	880.4±208.6
2	603.5±198.5	1,583.4±286.2 <sup>c</sup>	596.2±184.3	1,326.7±232.4 <sup>f</sup>
3	602.1±198.6	1,188.5±242.6 <sup>b</sup>	589.8±186.6	984.3±227.2 <sup>d</sup>
7	592.6±195.5	973.3±235.5 <sup>a</sup>	581.3±183.8	803.6±206.3
14	589.1±193.7	793.9±216.3	578.6±186.1	586.8±196.5

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, b; P<0.01. vs. Sham, c; P<0.001 vs. Sham, d; P<0.05 vs. Ethanol+Sham, f; P<0.001 vs. Ethanol+Sham

관만 결찰한 군에서 이 효소의 활성도를 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총 담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 2일부터 14 일까지 약간 낮은 활성도를 나타내었다(표 2).

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 간과 혈청의 GLO-I 활성도에 미치는 영향 : 쥐 간 및 혈청의 GLO-I 활성도는 급성 주정 중독을 시켰을 때 별 변동을 나타내지 않았다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 간 GLO-I 활성도는 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 각각 약 53%(P<0.01) 및 약 43%(P<0.01)의 증가를 나타내었다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 혈청의 GLO-I 활성도는 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 각각 32% 및 약 30%의 증가를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다.

간과 혈청에서 이 효소의 활성도를 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군과 총담관만 결찰한

군을 비교 했을 때는 별 차이가 없었다(표 3).

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 간의 Km 및 Vmax치의 변동 : 만성 주정 중독을 시킨 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일 경과한 간에서 methylglyoxal에 대한 GLO-I의 Km치를 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 총 담관만 결찰한 군과 각각 비교했을 때 별 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독을 시킨 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일 경과한 간의 GLO-I의 Vmax치는 총 담관만 결찰한 군에 비해 약 33%(P<0.001)의 감소를 나타내었다(표 4).

흰쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 GLO-I의 Km 및 Vmax치의 변동 : 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간 GLO-I의 methylglyoxal에 대한 Km치 및 Vmax치의 변동은 표 5와 같다.

간의 GLO-I의 Km치는 모든 실험군에서 별 차이가 없었다. 쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 간

Table 3. Effect of common bile duct ligation on serum and liver glyoxalase I activity in acute ethanol intoxicated rats

Glyoxalase I activities					
(Liver glyoxalase I; nmol S-lactoylglutathione min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )					
Normal	CBDL 14 days	Ethanol 1.5 hrs	Ethanol 1.5 hrs+CBDL	Ethanol 24 hrs	Ethanol 24 hrs+CBDL
(Liver)					
677.3 ± 95.8	1,025.7 ± 128.3 <sup>k</sup>	652.5 ± 89.7	996.3 ± 116.2 <sup>n</sup>	671.8 ± 92.6	963.5 ± 111.4 <sup>q</sup>
(Serum)					
591.4 ± 195.2	793.9 ± 216.3	578.2 ± 174.3	763.4 ± 201.7	569.6 ± 178.9	741.1 ± 193.6

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

Animal groups are described in Fig. 1.

k; P<0.01 vs. Normal, n; P<0.01. vs. Ethanol 1.5 hrs, q; P<0.01 vs. Ethanol 24 hrs

Table 4. Glyoxalase I kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat liver determined with methylglyoxal

Animal groups	Km (mM)	Vmax (nmol S-lactoylglutathione min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
Sham	37.7±2.5	1,124.6±114.3
CBDL	38.6±2.3	1,464.7±128.5 <sup>b</sup>
Ethanol + Sham	35.8±2.7	1,032.7±111.6
Ethanol + CBDL	36.4±2.6	987.9± 92.4 <sup>i</sup>

Michaelis-Menten constants for glyoxalase I were determined using methylglyoxal at 30°C for cytosolic fractions of male rat livers at 14th day after common bile duct ligation.

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

b; P<0.01 vs. Sham, i; P<0.001 vs. CBDL

Table 5. Glyoxalase I kinetic parameters from cholestasis with acute ethanol intoxicated rat liver determined with methylglyoxal

Animal groups	Km (mM)	Vmax (nmol S-lactoylglutathione min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
Normal	37.2±2.6	1,107.3±106.2
CBDL 14 days	38.6±2.3	1,464.7±128.5 <sup>k</sup>
Ethanol 1.5 hrs	36.6±2.5	1,063.8± 99.6
Ethanol 1.5 hrs+CBDL	37.7±2.6	1,409.4±136.2 <sup>d</sup>
Ethanol 24 hrs	36.4±2.8	1,097.1±104.6
Ethanol 24 hrs+CBDL	37.4±2.7	1,379.5±127.4 <sup>q</sup>

Michaelis-Menten constants for glyoxalase I were determined using methylglyoxal at 30°C for cytosolic fractions of male rat livers of acute intoxication with ethanol done after 14 days of the common bile duct ligation.

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

k; P<0.01 vs. Normal, n; P<0.01 vs. Ethanol 1.5 hrs, q; P<0.01 vs. Ethanol 24 hrs

GLO-I의 Vmax치는 그 대조군인 급성 주정 중독만 시킨군에 비해 각각 약 32%(P<0.01) 및 약 26% (P<0.01)의 증가를 나타내었다. 그러나 이를 군을 총답관만 결찰한 군과 비교 했을 때는 별 차이가 없었다.

## 고 칠

장기간 음주를 했을 때는 지방간, 간염, 간경변증 등(Christofersen and Poulsen, 1979; Wooddell,

1980; Sherlock, 1985 b)의 간질환이 야기될 수도 있으며 주정 중독시에 간세포는 심한 형태학적 변화를 받는다(Christofersen and Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)고 한다. 주정 중독으로 인한 형태학적 변화는 주로 간세포의 mitochondria와 endoplasmic reticulum에서 관찰되며 mitochondria에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 cristae의 배열문란 등이고 endoplasmic reticulum에서 나타나는 변화는 smooth endoplasmic reticulum의 증식(Christofersen and Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)을 들 수 있다. 이외에도 Mallory소체의 증식과 간세포 괴사를 수반하는 형태학적 변화도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생산증가, pyruvate의 생성감소, 지방산의 합성 촉진, 구연산회로의 활성저하 및 지방산의 산화감소 등(Ritchie, 1980; Ellenhorn and Barceloux, 1988)을 들 수 있다. 간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우들은 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 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 간기능의 장애도 나타난다(Halsted, 1976; Sherlock, 1985 a).

흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체간은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며 (Moritz and Snodgrass, 1972; 장대성 외, 1987; 김효석 외, 1989) 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것(Kaplan and Righetti, 1970; Righetti and Kaplan, 1971; Toda et al, 1980)으로 알려져 있다.

간의 배설기능에 장애가 오면 간은 담즙울체가 야기되며(Sherlock, 1985 a) 이 때 담즙울체 간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 증감되는 것으로 알려져 있다. 특히 생체이물 생체변환 효소의 일종인 GLO-I은 담즙울체 간에서 그 활성도가 증가된다(박재신, 1993)고 한다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 ethanol이 acetaldehyde로 산화되고 다시 acetate로 산화되어 이용(Bosron and Li, 1980; Lieber, 1985)되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 acetaldehyde는 간세포의 괴사를 초래하는 물질(Sherlock, 1985 b)로 알려져 있고 또한

주정 중독시 심한 형태학적 변화가 초래(Chang, 1985; Chang, 1987)되는 만큼 담즙울체와 주정 중독이 병행된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것으로 생각된다.

특히 환쥐에서는 주정 중독과 담즙울체가 병행되었을 때는 생체이물 생체변환 효소들의 활성도 변동이 심하다고 한다. 즉 환쥐에서 급성 및 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다 간에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체변환 효소들은 xanthine oxidase(정성광 외, 1994), cytosolic glutathione S-transferase, cytosolic glutathione peroxidase(곽춘식 외, 1990), mitochondrial monoamine oxidase(정성광과 곽춘식, 1992) 등을 들 수 있으며 간에서 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체변환 효소들은 microsomal glutathione S-transferase(곽춘식 외, 1990) arylesterase 및 carboxylesterase(안광욱, 1993)를 들 수 있다. 그리고 급성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때만 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체변환 효소는 catalase(문교철, 1992)이고 만성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때만 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체변환 효소는 microsomal aldehyde dehydrogenase(문교철, 1992)이며 이때 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체변환 효소는 alcohol dehydrogenase와 cytosolic aldehyde dehydrogenase이다(문교철, 1992). 또한 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다 혈청에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체변환 효소들은 alcohol dehydrogenase(문교철, 1992)와 xanthine oxidase(정성광 외, 1994)이며 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체변환 효소는 arylesterase 및 carboxylesterase(안광욱, 1993)를 들 수 있다. 따라서 이 실험에서 측정한 GLO-I은 간에서 그 합성이 활발할 뿐만 아니라 생체이물 생체변환 효소로서 담즙울체시 간과 혈청에서 그 활성도가 증가되는 만큼 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 그 활성도의 변동은 더욱 심해질 것이다.

이 실험에서 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군에서 간과 혈청의 GLO-I의 활성도를 비교했을 때 간에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 7일과 14일에 유의한 활성도 감소를 타나내었으며, 혈청에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 2일부터 14일까지 약간 감소되었다. 그러나

총담관 결찰후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 군과 총담관만 결찰한 군에서 간과 혈청의 GLO-I활성도를 비교했을 때 모두 별 차이가 없었다.

이상 성적으로 보아 간의 GLO-I은 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 그 활성도가 감소되는 효소로 생각된다.

이 실험에서 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 군과 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 GLO-I의 Km치를 총담관만 결찰한 군의 치와 비교 했을 때 별 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 GLO-I의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군의 치보다 유의하게 감소되었다. 즉, 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 쥐의 간에서 GLO-I의 동역학적 척도를 측정 했을 때 Km치는 변동이 없었으며 Vmax치는 유의한 감소를 나타내었다. 이와 같이 만성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때 이 효소의 Km치가 변동이 없으면서 그 활성도가 감소되고 또한 Vmax치가 감소된 것은 이 효소의 활성도 감소가 촉매효율의 감소라 보기는 어려운 것이다.

이상 문현상의 지견과 이 실험 성적으로 보아 간의 GLO-I은 담즙울체시 만성 주정 중독이 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 감소되는 효소로 생각되며, 따라서 이 결과는 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 한가지 자료라 할 수 있다.

## 요 약

이 연구는 간담도 질환 시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 만성 주정 중독을 시킨 환쥐에게 총담관 결찰로 담즙울체를 야기시키거나, 담즙울체가 진행되는 환쥐에서 급성 주정 중독을 시킨 후 간과 혈청의 glyoxalase I(GLO-I) 활성도를 측정하였으며 한편 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 환쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 환쥐의 간에서 이 효소의 Km과 Vmax치를 측정한 것이다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군에서 간과 혈청의 GLO-I의 활성도를 비교했을 때 간에서는 만성 주정 중독 후 총담관을

결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 7일과 14일에 유의한 활성도 감소를 타나내었으며, 혈청에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 2일부터 14일까지 그 활성도가 약간 감소되었다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 군과 총담관만 결찰한 군에서 간과 혈청의 GLO-I 활성도를 비교 했을 때 모두 별 차이가 없었다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 군과 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 군에서 간의 GLO-I의 Km치를 총담관만 결찰한 군의 치와 비교 했을 때 별 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 GLO-I의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군의 치보다 유의하게 감소되었다.

이상의 결과로 보아 간의 GLO-I은 담즙울체시 만성 주정 중독이 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 감소되는 효소로 생각되며, 따라서 이 결과는 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 한가지 자료라 할 수 있다.

## 참 고 문 헌

안광욱 : 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간의 Carboxylesterase 및 Arylesterase 활성에 미치는 영향. 계명대학교 대학원 박사학위논문, 1993; pp. 1-59.

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(4): 331-337.

Chang ES: Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37(2): 213-224.

장대성, 곽정식, 손태중 : 총담관 결찰에 의한 담관 증식성 변화의 초미형태학적 연구. 경북의대잡지 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 환취에서 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 liver*, New York, Churchill Livingstone, 1979, pp. 272-305.
- Di Simplicio P, Mannervik B: Enzymes involved in glutathione metabolism in rat liver and blood after carbon tetrachloride intoxication. *Toxicol Lett* 1983; 18(3): 285-289.
- Eagon PK, Willet JE, Seguiti SM: Androgen responsive functions of male rats liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology* 1987; 93(6): 162-169.
- Elazon N, Janaki S, Rao AR: Two affinity chromatography methods for the purification of glyoxalase from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 83(4): 388-395.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier Science Publishing, 1988, pp. 782-796.
- Gillespie E: Effects of S-lactoylglutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes. *Nature* 1979; 277(5692): 135-137.
- 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 NO(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.
- Han LP, Davison LM, Vanderjagt DL: Purification and kinetic study of glyoxalase I from rats liver, Erythrocytes, brain and kidney. *Biochim Biophys Acta* 1976; 445(2): 486-499.
- Hayes JD, Milner SW, Walker SW: Expression of glyoxalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase isoenzymes in different bovine tissues. *Biochim Biophys Acta* 1989; 994(1): 21-29.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J: *Metabolic Basis of Detoxication. Metabolism of Functional Groups*, New York, Academic Press, 1982, pp. 5-317.
- 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(3): 508-516.
- Kester MV, Norton SJ: The isolation and characterization of mouse liver glyoxalase I. *Biochim Biophys Acta* 1975; 391(1): 212-221.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1984, pp. 430-431.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준모: 총담관 결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. 대내과학회잡지 1989; 36(4): 459-470.
- 김성수, 박성대, 곽춘식: 주정 중독 환취에서 총담관 결찰이 간의 Cathepsin B, D, H와 Acid Phosphatase 활성에 미치는 영향. 대한소화기병학회지 1993; 25(4): 696-708.
- 곽춘식, 김여희, 조준승: Ethanol 중독 환취에서 총담관 결찰이 간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase 및 Glutathione Reductase 활성에 미치는 영향. 한국생화학회지 1990; 23(2): 251-262.
- 곽춘식, 곽정식: 환취 간세포 분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대 논문집 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 rats. *Biochem Pharmacol* 1975; 24(3): 369-378.
- Mannervik B: Glyoxalase I, in Jakoby WB(ed): *Metabolic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press, 1980, Vol II, pp. 263-273.
- 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.
- 문교철: Ethanol 중독 환취에서 총담관 결찰이 간의 Alcohol 대사 효소들의 활성에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1992; pp. 1-62.
- 박재신: 환취 재생간과 담즙을 체간의 Glyoxalase I 및 II와 Epoxide Hydratase의 활성도. 계명대학교 대학원 박사학위논문, 1993; pp. 1-58.
- Parr CW, Bagster IA, Welch SG: Human red cell

- glyoxalase I polymorphism. *Biochem Genet* 1977; 15(1-2): 109-113.
- Racker E: The mechanism of glyoxalase. *J Biol Chem* 1951; 190(12): 685-696.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136(2): 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, 1980, pp. 376-388.
- Segel IH: *Biochemical Calculations*, ed 2, New York, Jone Wiley and Sons, 1976, pp. 214-246.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7, Oxford, Black-well 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.
- Stohlmacher P, Haferland W: Glyoxalase (GLO) in human tissues. *Z Rechtsmed* 1980; 85(3): 165-168.
- Thornalley PJ: The glyoxalase system; new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990; 269(1): 1-11.
- Thornalley PJ, Bellavite P: Modification of the glyoxalase system during the functional activation of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1987; 931(2): 120-129.
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, Oka H, Oda T: Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta* 1980; 107(1-2): 85-96.
- Uotila L, Koivusalo M: Separation of the isoenzymes of glyoxalase I from human red blood cells by electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gel and by ion exchange chromatography. *Acta Chem Scand* 1979; 34(1): 63-68.
- Wooddell WJ: 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 and Serum Glyoxalase-I Activities in Ethanol Intoxicated Rats

Young Jun Byun, M.D., You Hee Kim, M.D., and Chun Sik Kwak, Ph.D.

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

The activities of the rat liver and serum glyoxalase-I(GLO-I) were studied in cholestasis induced by common bile duct(CBD) ligation after chronic ethanol intoxication, and in cholestasis before acute ethanol intoxication to establish the biochemical background of alcohol hazards in hepatobiliary disease.

GLO-I activities in the rat's liver and serum showed less increases when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication than that in the CBD ligation alone.

GLO-I activities in the rat's liver and serum showed no more increases when acute ethanol intoxication was induced after CBD ligation than that in the CBD ligation alone.

On the other hand, when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication, the value of Vmax of the liver GLO-I decreased significantly than that in the CBD was ligated alone. However, the values of Km of the liver GLO-I did not changes in the all experimental groups.

Viewed from above results, when chronic ethanol intoxication is combined with cholestasis, GLO-I in the liver seems to be decrease its activity than that in cholestasis, and the cause of the decrease is thought to be decrease biosynthesis.

Key Words: Cholestasis, Ethanol intoxication, Glyoxalase I