

주정 중독 환취 간의 Glyoxalase II 활성에 미치는 총담관 결찰의 영향

계명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학연구소

노태연 · 김여희

Effect of Common Bile Duct Ligation on Glyoxalase II Activity in Ethanol Intoxicated Rat Liver

Tae Youn No, M.D., You Hee Kim, M.D.

Department of Biochemistry, Keimyung University

School of Medicine, & Institute for Medical Science, Taegu, Korea

-Abstract-

To understand the biochemical background of alcohol hazards in hepatobiliary disease, the activities of the rat liver cytosolic and mitochondrial glyoxalase-II (GLO-II) were measured in cholestasis induced by common bile duct (CBD) ligation after chronic ethanol intoxication, and in cholestasis before acute ethanol intoxication.

GLO-II activities in the rat's liver cytosol and mitochondria showed more decrease when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication than that in the CBD ligation alone.

On the other hand, when CBD was ligated after chronic ethanol intoxication, the value of V_{max} of the liver cytosolic and mitochondrial GLO-II decreased significantly than that in the CBD was ligated alone. However, the values of K_m of the liver cytosolic and mitochondrial GLO-II did not change in the all experimental groups.

Viewed from above results, when chronic ethanol intoxication is combined with cholestasis, GLO-II in the liver seems to be decreased its activity than that in cholestasis, and the cause of the decrease is thought to be decreased biosynthesis. Accordingly, this result will be the datum supporting that alcoholic drink to be enzymologically harmful in hepatobiliary disease.

Key Words : Ethanol intoxication, Cholestasis, Glyoxalase II

서 론

간은 물질대사의 주된 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 (Sherlock, 1985a) 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 생체 변환시켜 배설하는 기구를 가짐

으로써 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 (Christofersen and Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985b).

일반적으로 간담도 질환시 음주는 유해하다고 하며 이 사실은 음주로 인한 간 질병의 유발로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 그러나 그 생화학적 뒷받침은 아직도 충분치 않다. 따라서 이에 대한 생화학적 연구는 많이 있어야 하겠다.

Glyoxalase II (S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase, EC 3.1.2.6, GLO-II)는 glutathione의 thioesters를 가수분해하여 환원형 glutathione과 2-hydroxy acid를 생성케하는 반응을 촉매하는 효소로서 (Racker, 1951; Kim, 1979; Mannervik, 1980) 포유동물 간의 세포질에 풍부히 존재하며 (Oray and Norton, 1980; Hsu and Norton, 1983; Principato et al., 1987; Talesa et al, 1988; Thornalley, 1990) 간의 미토콘드리아에서도 발견된다 (Talesa et al., 1988). 그리고 이 효소는 glyoxalase I 및 환원형 glutathione과 함께 glyoxalase system이라 불리지고 있다 (Thornalley, 1990).

Glyoxalase system의 생리적 역할은 아직 분명 치는 않으나 현재까지 알려진 것은 생체내에서 생성되거나 장내세균이 합성하여 흡수한 2-oxoaldehydes 중 한가지인 methylglyoxal을 분해하여 lactic acid를 생성케함으로써 methylglyoxal의 독

성을 없애는 것이다 (Mannervik, 1980; Thornalley, 1990). 즉 methylglyoxal이 독성을 나타내는 것은 methylglyoxal이 반응성이 활발한 carbonyl기를 두 개 가지고 있기 때문에 생체 내에서 thiol 화합물과 반응하여 세포증식을 억제하는 methylglyoxalic thioester를 생성하기 때문이며 바로 이 glyoxalase system이 methylglyoxal를 분해 함으로써 그 독성을 없애는 것이다 (Mannervik, 1980; Thornalley, 1990). 이러한 점으로 보아서 glyoxalase system은 세포증식을 조절하는 역할을 한다고 추정하고 있다(Mannervik, 1980; Thornalley, 1990). 그리고 이 효소는 흰쥐에서 담즙을 체가 야기되었을 때 간 세포질에서 그 활성도가 감소되는 것 (박재신, 1993)으로 밝혀져 있다.

이와 같이 간에 풍부하게 존재하고 세포증식에 관여하는 GLO-II는 담즙을 체 시 간 세포질에서 그 활성도가 감소되고, 또한 담즙을 체 시 주정 중독을 야기하면 간 손상이 심해진다는 보고 (정성광과 곽춘식, 1992; 김성수 외 1993)도 있으며, 급성 및 만성 주정 중독 시 담즙을 체를 야기하여 간 손상을 증폭시키면 이 효소의 활성도 변동은 더욱

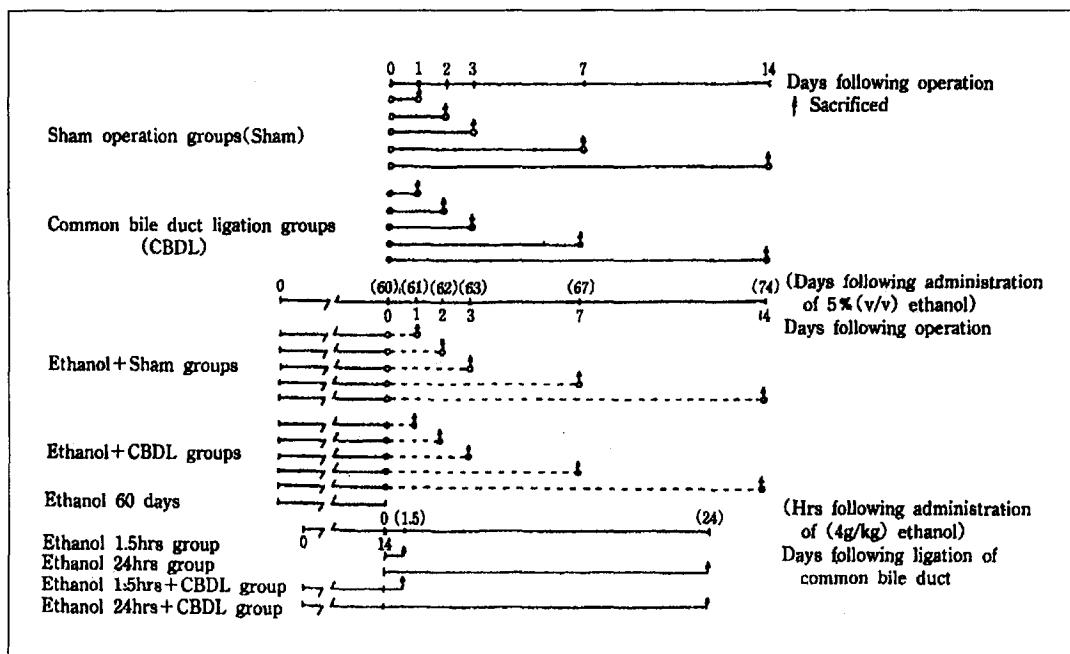


Fig. 1. Experimental design

더 심해질 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 주정중독을 야기시킨 흰쥐에게 총담관 결찰로 담즙울체를 야기하거나, 담즙울체가 진행되는 흰쥐에서 급성 주정 중독을 야기한 후 간 세포질과 미토콘드리아에서 GLO-II의 활성도를 측정하는 한편 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 야기한 흰쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 흰쥐의 간에서 이 효소의 Km치와 Vmax치도 함께 측정하여 이 성적을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

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

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료주식회사의 실험 동물사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 물 대신에 5% (v/v) ethanol용액 (Eagon et al., 1987)을 자유로이 먹게 하였다. 그리고 급성 주정 중독은 흰쥐 체중 kg당 4g의 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 회생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 에테르 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간적출 시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순개복술만 시행하였다.

시약: S-Lactoylglutathione 및 단백질표준액 (10g/100ml bovine albumin)은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간 적출, 세포분획 및 효소시료 조제: 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 에테르마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간 문맥에 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.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배량의 0.25 M 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 간 조직 균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(과춘식과 과정식, 1986)으로 세포질과 미토콘드리아 분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄균질액을 571 × g (average relative centrifugal force)에서 10분간 원심 분리하여 조직의 미마쇄부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796 × g에

서 20분간 원심 분리하여 pellet와 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 $104,000 \times g$ 에서 1시간 원심 분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이때 얻은 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다.

한편 위의 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet를 0.25 M sucrose액에 혼탁시하여 이 액을 20~45% (w/v) sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하 시켜 $45,200 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25 M sucrose액에 재현탁시켜 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하여 pellet를 얻었으며 이 것을 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.

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

GLO-II 측정용 효소시료의 조제는 분리한 간 세포질 분획을 단백량으로 $5 \text{ mg}/\text{ml}$ 가 되도록 0.25

M sucrose액에 혼탁하여 사용하였다.

효소 활성도 측정 : 간의 세포질 및 미토콘드리아 분획의 GLO-II의 활성도 측정은 시료와 함께 S-lactoylglutathione을 기질로 사용하여 37°C에서 3분간 반응시키는 동안에 소모된 S-lactoyl-glutathione를 240 nm 파장에서 비색한 후 생성된 reduced glutathione량으로 환산하여 효소의 활성도를 산출하는 Principato et al. (1987)의 법에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 reduced glutathione을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Varian, Cary 210)였다.

Km치 및 Vmax치의 측정 : 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 야기시키고 1.5 및 24시간 경과한 흰쥐의 간 세포분획

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

Day(s)	Glyoxalase II activities (nmol reduced glutathione min^{-1} mg protein^{-1})			
	(Normal; 510.6 ± 125.3 , Ethanol; 496.2 ± 118.7)			
following operation	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	511.6 ± 126.3	473.5 ± 140.2	492.5 ± 118.6	384.6 ± 102.3
2	510.8 ± 126.5	429.4 ± 112.4	483.3 ± 120.3	346.2 ± 87.7
3	509.2 ± 123.9	386.5 ± 92.3	478.2 ± 122.2	$239.8 \pm 73.8^{e,g}$
7	510.1 ± 123.2	319.2 ± 82.6^a	479.7 ± 119.6	$207.5 \pm 69.3^{e,g}$
14	509.6 ± 124.4	189.7 ± 69.5^b	473.4 ± 117.2	152.9 ± 54.4^f

All values are expressed as mean \pm 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, e; $P < 0.01$ vs Ethanol + Sham, f; $P < 0.001$ vs Ethanol + Sham, g; $P < 0.05$ vs CBDL

시료와 효소 기질의 원액과 회석액들을 사용하여 GLO-II 활성도를 측정한 후 이를 성적으로부터 1/vi치를 그리고 기질 농도로부터 1/[S]치를 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 작도

한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출 (Segel, 1976)하였다.

단백질 정량 : 효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial glyoxalase II activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Glyoxalase II activities (nmol reduced glutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 40.2±13.3, Ethanol; 38.2±13.6)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	41.0±14.3	42.1±14.8	40.6±14.9	40.2±13.6
2	40.4±13.9	43.7±15.3	40.9±14.4	37.5±13.2
3	40.1±13.6	42.1±14.4	39.3±14.6	32.9±12.3
7	39.5±13.3	40.2±14.2	38.6±14.2	24.3±9.8
14	38.6±13.5	38.5±14.5	37.7±13.8	20.6±7.4 ^{a,b}

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 Ethanol + Sham, b; P<0.05 vs CBDL

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic and mitochondrial glyoxalase II activities in acute ethanol intoxicated rats

Glyoxalase II activities (nmol reduced glutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)						
Normal	CBDL 14 days	Ethanol 1.5 hrs	Ethanol 1.5 hrs +CBDL	Ethanol 24 hrs	Ethanol 24 hrs +CBDL	
510.6 ± 125.3	189.7 ± 69.5 ^a	498.2 ± 120.6	183.6 ± 72.4 ^b	516.8 ± 126.1	194.3 ± 68.7 ^c	(Cytosol)
40.2 ± 13.3	38.6 ± 14.5	39.8 ± 12.9	39.1 ± 13.2	41.4 ± 13.4	39.5 ± 13.7	(Mitochondria)

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

Animal groups are described in Fig. 1.

a; P<0.01 vs normal, b; P<0.01 vs Ethanol 1.5 hrs, c; P<0.01 vs Ethanol 24 hrs

Table 4. Glyoxalase II kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat liver determined with S-lactoylglutathione

Cell fractions	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
	Km (mM)			
Cytosol	32.4 ± 2.6	33.5 ± 2.3	32.7 ± 2.8	33.2 ± 3.3
Mitochondria	37.7 ± 2.8	37.2 ± 3.2	39.6 ± 3.6	40.2 ± 3.4
Vmax (nmol reduced glutathione min⁻¹ mg protein⁻¹)				
Cytosol	1,062.4 ± 140.1	473.3 ± 108.6 ^a	958.4 ± 152.3	302.3 ± 57.4 ^{bc}
Mitochondria	72.8 ± 10.2	71.7 ± 9.7	72.4 ± 9.4	40.4 ± 6.8 ^{bd}

Michaelis-Menten constants for glyoxalase II were determined using S-lactoylglutathione at 37°C for cytosolic and mitochondrial fractions of male rat livers at the 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.

a; P<0.001 vs Sham, b; P<0.001 vs Ethanol + Sham, c; P<0.05 vs CBDL, d; P<0.001 vs CBDL

Table 5. Glyoxalase II kinetic parameters from cholestasis with acute ethanol intoxicated rat liver determined with S-lactoylglutathione

Animal groups	Cytosol		Mitochondria	
	Km (mM)	Vmax (nmol reduced glutathione min⁻¹ mg protein⁻¹)	Km	Vmax
Normal	37.1 ± 2.7	1,096.4 ± 146.6	36.8 ± 3.1	72.4 ± 9.4
CBDL 14 days	33.5 ± 2.3	473.3 ± 108.6 ^a	37.2 ± 3.2	71.7 ± 9.7
Ethanol 1.5 hrs	31.7 ± 2.9	996.5 ± 156.8	36.5 ± 2.8	73.2 ± 10.3
Ethanol 1.5 hrs + CBDL	33.4 ± 2.6	456.1 ± 112.5 ^b	38.4 ± 2.6	71.4 ± 11.5
Ethanol 24 hrs	32.2 ± 2.3	1,114.2 ± 153.3	36.9 ± 3.3	73.6 ± 10.7
Ethanol 24 hrs + CBDL	34.1 ± 2.5	506.2 ± 98.3 ^c	39.1 ± 3.5	71.1 ± 12.2

Michaelis-Menten constants for glyoxalase II were determined using S-lactoylglutathione at 37°C for cytosolic and mitochondrial 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.

a; P<0.001 vs Normal, b; P<0.001 vs Ethanol 1.5 hrs, c; P<0.001 vs Ethanol 24 hrs

으로 단백질을 정제하는 Greenberg and Rothstein (1957)법으로 효소시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법 (Gornall et al., 1949)으로 정량하였다. 성적 검정 : 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며, 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

성 적

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간 세포질의 GLO-II 활성도에 미치는 영향: 쥐 간 세포질의 GLO-II 활성도는 만성 주정 중독군과 만

성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다.

쥐 간 세포질의 GLO-II 활성도는 정상 쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 7일에는 약 37% ($P<0.05$), 14일에는 약 63% ($P<0.01$)의 감소를 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 군보다 총담관 결찰 후 3일에는 약 38% ($P<0.05$), 7일에는 약 35% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다 (Table 1).

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관 결찰이 간 mitochondria의 GLO-II 활성도에 미치는 영향: 쥐 간 미토콘드리아의 GLO-II 활성도는 만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 정상 쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 총담관 결찰 후 14일에 만 약 45% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군에서 이 효소의 활성도를 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 14일에 약 46% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다 (Table 2).

총담관을 결찰한 환쥐에서 급성 주정 중독이 간 세포질과 mitochondria의 GLO-II 활성도에 미치는 영향: 쥐 간 세포질의 GLO-II 활성도는 급성 주정 중독을 야기시켰을 때 유의한 변동을 나타내지 않았다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 야기하고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 간 세포질의 GLO-II 활성도는 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 각각 약 63% ($P<0.01$) 및 약 62% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다. 그러나 간 미토콘드리아의 GLO-II 활성도는 모든 실험군에서 유의한 변동이 없었다. 간 세포질 및 미토콘드리아에서 이 효소의 활성도를 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 야기한 군과 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

만성 주정 중독 환쥐에서 총담관을 결찰한 후

14일에 간 GLO-II의 Km치 및 Vmax치의 변동: 만성 주정 중독을 야기시킨 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일 경과한 간 세포질과 미토콘드리아에서 S-lactoylglutathione에 대한 GLO-II의 Km치를 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 총담관만 결찰한 군과 각각 비교했을 때 유의한 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독을 야기시킨 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일 경과한 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군에 비해 각각 약 36% ($P<0.05$) 및 약 44% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다 (Table 4).

환쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 야기시켰을 때 간 GLO-II의 Km치 및 Vmax치의 변동: 간 세포질 및 미토콘드리아 GLO-II의 Km치는 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었다. 쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 야기시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후의 간 세포질 GLO-II의 Vmax치는 그 대조군인 급성 주정 중독만 야기시킨 군에 비해 각각 약 54% ($P<0.001$) 및 약 55% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다. 그러나 이들 군의 Vmax치를 총담관만 결찰한 군의 치와 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다. 그리고 간 미토콘드리아의 Vmax치는 모든 실험군에서 유의한 차이가 없었다 (Table 5).

고 찰

장기간 많은 양의 음주를 했을 때는 지방간, 간염, 간경변증 등(Christofersen and Poulsen, 1979 ; Wooddell, 1980 ; Sherlock, 1985b)의 간 질환이 야기될 수도 있으며, 주정 중독 시에 간세포는 심한 형태학적 변화가 일어난다 (Christofersen and Poulsen, 1979 ; Chang, 1985 ; Chang, 1987). 주정 중독으로 인한 형태학적 변화는 주로 간세포의 미토콘드리아와 endoplasmic reticulum에서 관찰되며 미토콘드리아에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 cristae의 배열 문란 등이고 endoplasmic reticulum에서 나타나는 변화는 smooth endoplasmic reticulum의 증식 (Christofersen and Poulsen, 1979 ; Chang, 1985 ;

Chang, 1987)을 들 수 있다. 이 외에도 Mallory소체의 증식과 간세포 괴사를 수반하는 형태학적 변화도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상 시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생성 증가, pyruvate의 생성 감소, 지방산의 합성 촉진, 시트르산화로의 활성 저하 및 지방산의 산화 감소 등(Ritchie, 1980 ; Ellenhorn and Barceloux, 1988)을 들 수 있다.

간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우들은 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담도 폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도 폐쇄 등이며 (Halsted, 1976) 이와 같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간 조직은 괴사, 담도 증식, 섬유화 및 경화성 변화 등이 나타날 뿐만 아니라 (Desmet, 1979) 심한 간 기능의 장애도 나타난다 (Halsted, 1976 ; Sherlock, 1985a).

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

간의 배설 기능에 장애가 오면 간에은 담즙울체가 야기되며 (Sherlock, 1985a) 이때 담즙울체간에서는 각종 효소들의 활성도가 증감되는 것으로 알려져 있다. 특히 세포증식에 관여하는 효소인 GLO-II는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소된다 (박재신, 1993).

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 대사 과정에서 생성된 acetaldehyde는 간세포의 괴사를 초래하는 물질 (Sherlock, 1985b)로 알려져 있고 또한 주정 중독 시 심한 형태학적 변화가 초래되기 때문에 (Chang, 1985; Chang, 1987) 담즙울체와 주정 중독이 병행된다면 간 손상의 정도는 더욱 클것으로 생각된다.

특히 흰쥐에서는 주정 중독과 담즙울체가 병행되었을 때는 간세포에 국재하는 효소들의 활성도 변동은 커진다. 즉 흰쥐에서 급성 및 만성 주정

중독 시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간세포에서 그 활성도가 증가되는 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 간세포에서 그 활성도가 감소되는 효소들은 microsomal glutathione S-transferase (곽춘식 외, 1990), arylesterase, carboxylesterase (안광우, 1993) 및 glyoxylase-I (변용준, 1995)를 들 수 있다. 그리고 급성 주정 중독 시 담즙울체를 야기했을 때만 그 활성도가 증가되는 효소는 catalase (문교철, 1992)이며 이때 그 활성도가 감소되는 효소는 alcohol dehydrogenase와 cytosolic aldehyde dehydrogenase이다 (문교철, 1992). 따라서 이 실험에서 측정한 GLO-II도 간에서 그 합성이 활발할 뿐만 아니라 담즙울체 시 간 세포질에서 그 활성도가 감소되기 때문에 만큼 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 그 활성도의 감소는 더욱 커질 것으로 생각된다.

이 실험에서 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군에서 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II 활성도를 비교했을 때 간 세포질에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일과 7일에 유의한 활성도 감소를 나타내었으며, 간의 미토콘드리아에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 14일에 그 활성도가 유의하게 감소되었다. 그러나 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 야기한 군과 총담관만 결찰한 군에서 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II 활성도를 비교했을 때는 모두 유의한 차이가 없었다. 그러므로 간의 GLO-II는 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 그 활성도가 감소되는 효소로 생각된다.

이 실험에서 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 야기한 군과 만성 주정 중독을 야기한 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 GLO-II의 Km치를 총담관만 결찰한 군의 치와 비교했을 때 유의한 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨

군에서 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군의 치보다 유의하게 감소되었다. 즉, 만성 주정 중독을 야기한 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 쥐의 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II의 동역학적 척도를 측정한 결과 Km치에는 변동이 없었으며 Vmax치는 유의한 감소를 나타내었다. 이와 같이 만성 주정 중독 시 담즙울체를 야기했을 때 이 효소의 Km치에는 변동이 없으면서 그 활성도가 감소되고 또한 Vmax치가 감소된 것은 이 효소의 활성도 감소가 촉매 효율의 감소라 보기는 어려운 것이다.

이상 문현상의 지견과 이 실험 성적으로 보아 간의 GLO-II는 담즙울체 시 만성 주정 중독이 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 감소되는 효소로 생각된다. 그리고 glyoxalase system에 속하는 glyoxalase-I도 담즙울체 시 만성 주정 중독이 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간에서 그 합성이 감소되는 효소(변용준, 1995)로 알려져 있으므로 이 실험의 결과와 함께 종합해 볼 때 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간세포의 재생은 저하될 것으로 생각된다.

따라서 이 결과는 담즙울체로 간 손상이 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 야기한 흰쥐에게 총담관 결찰로 담즙울체를 야기시키거나, 담즙울체가 진행되는 흰쥐에게 급성 주정중독을 야기한 후 간 세포질과 미토콘드리아의 glyoxalase II (GLO-II) 활성도를 측정하였으며 한편 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 야기한 흰쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 흰쥐의 간에서 이 효소의 Km치와 Vmax치를 측정하였다.

만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군에서 간의 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II의 활성도를 비교했을 때 간 세포질에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총

담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일과 7일에 유의한 활성도 감소를 나타내었으며, 간 미토콘드리아에서는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 14일에 그 활성도가 유의하게 감소되었다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 군과 총담관만 결찰한 군 사이에 간 세포질 및 미토콘드리아의 GLO-II 활성도를 비교했을 때 모두 유의한 차이가 없었다.

총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 야기한 군과 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 GLO-II의 Km치를 총담관만 결찰한 군의 치와 비교했을 때 유의한 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간 세포질과 미토콘드리아의 GLO-II의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군의 치보다 유의하게 감소되었다.

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

참 고 문 헌

곽춘식, 곽정식 : 흰쥐 간세포 분획법. I. Mito-chondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986 ; 5(1) : 45-53.

곽춘식, 김여희, 조준승 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase 및 Glutathione Reductase 활성에 미치는 영향. 한국생화학회지 1990 ; 23(2) : 251-262.

김성수, 박성대, 곽춘식 : 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Cathepsin B, D, H와 Acid Phosphatase 활성에 미치는 영향. 대한소화기병학회지 1993 ; 25(4) : 696-708.

김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준모 : 총담관 결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. 대한내과학회지 1989 ; 36(4) : 459-470.

문교철 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Alcohol 대사 효소들의 활성에 미치는 영

- 향. 경희대학교 대학원 박사학위논문 1992 ; 1-62.
- 박재신 : 흰쥐 재생간과 담즙율체간의 Glyoxalase I 및 II와 Epoxide Hydratase의 활성도. 계명대학교 대학원 박사학위논문 1993 ; 1-58.
- 변용준 : 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간 및 혈청의 Glyoxalase I 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1995 ; 14(4) : 330-339.
- 안광옥 : 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Carboxylesterase 및 Arylesterase 활성에 미치는 영향. 계명대학교 대학원 박사학위논문 1993 ; 1-59.
- 장대성, 곽정식, 손태중 : 총담관 결찰에 의한 담관증식성 변화의 초미형태학적 연구. 경북의대 잡지 1987 ; 28(2) : 113-122.
- 정성광, 곽춘식 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Monoamine Oxidase 활성에 미치는 영향. 한국생화학회지 1992 ; 25(3) : 210-218.
- 정성광, 김여희, 곽춘식 : 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1994 ; 13(1) : 64-72.
- 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.
- 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.
- 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, Seguiti SM : Androgen responsive function of male rats liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology* 1987 ; 93(6) : 162-169.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG : *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier Science Publishing, 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 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.
- Hsu YR, Norton SJ : Multimeric forms of rat liver glyoxalase II. *Enzyme* 1983 ; 30(4) : 259-264.
- 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.
- Kim BK : *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic Press, 1979, pp 240-241.
- 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. Response

- to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972 ; 62(1) : 93-100.
- Oray B, Norton SJ : Purification and characterization of mouse liver glyoxalase II. *Biochim Biophys Acta* 1980 ; 611(1) : 168-173.
- Principato GB, Rosi G, Talesa V, Giovannini E : Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wister rats. *Biochim Biophys Acta* 1987 ; 911(3) : 349-355.
- 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*, 7 ed., New York, Macmillan Publishing, 1980, pp 376-388.
- Segel IH : *Biochemical Calculations*. 2 ed., New York, Jone Wiley and Sons, 1976, pp 214-246.
- Sherlock DS : *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7 ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1985a, pp 79-80.
- Sherlock DS : *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7 ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985b, pp 346-360.
- Talesa V, Uotila L, Koivusalo M, Principato G, Giovannini E, Rosi G : Demonstration of glyoxalase II in rat liver mitochondria partial purification and occurrence in multiple forms. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 955(1) : 103-110.
- 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.
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, Oka H, Oda T : Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta* 1980 ; 107(1-2) : 85-96.
- Wooddell WJ : Liver disease in alcohol addicted patients, in Davidson SV (ed): *Alcoholism and Health*, Century Boulevard, Aspen System, 1980, pp 125-134.