

흰쥐 담즙율체간에서의 Glucose-6-Phosphate Isomerase 및 Fructose-1, 6-Bisphosphate Aldolase의 활성도

계명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학 연구소

최수련 · 김여희

Activities of Glucose-6-Phosphate Isomerase and Fructose-1, 6-Bisphosphate Aldolase in Cholestatic Rat Liver after Common Bile Duct Ligation

Soo Ryun Choi, M.D. and You Hee Kim, M.D.

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science, Taegu, Korea

=Abstract=

This study was made to know the changes of glucose-6-phosphate isomerase (GPI) and fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (ALS) activities in cholestatic rat livers.

GPI and ALS activities were determined in cytosolic, mitochondrial, and microsomal preparations isolated from cholestatic rat liver, and in the rat serum after common bile duct ligation for a period of forty two days.

The activities of mitochondrial and microsomal GPI in cholestatic rat liver showed a significant increase from the second day to the forty second day, and from the first day to the twenty eighth day, respectively, after the ligation. However, the cytosolic GPI activity in cholestatic liver showed a significant decrease from the twelfth hour to the second day after the ligation.

The activities of both mitochondrial and microsomal ALS in cholestatic rat liver showed a significant increase from the second day to the third day after the ligation. However, cytosolic ALS in cholestatic liver was decreased slightly from the first day to the forty second day after the ligation.

On the other hand, the activities of GPI and ALS in rat serum showed a significant increase from the twelfth hour to the seventh day, and from the first day to the forty second day, respectively, after the ligation.

These results, therefore, suggest that the biosynthesis of liver particulate-bound GPI and ALS are induced in response to cholestasis. And the elevations of both serum GPI and ALS activities seem to be leak of the enzymes into the blood from cholestatic liver.

Key Words : Cholestasis, Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, Glucose-6-phosphate isomerase

서 론

간조직에 담즙을체를 야기시키는 것은 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄, 원발성 담즙성 간경변증, 담관염 및 담즙을체형 간염 등 간담도 질환에서 볼 수 있다 (Halsted, 1976). 이와 같은 담즙을체가 수반되는 간담도 질환에서 간세포는 기능 장애 (Halsted, 1976; Sherlock, 1985)를 받을 뿐만 아니라 담즙을체의 시간이 경과함에 따라 간조직은 괴사, 지방 변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적 변화가 연속적으로 나타난다 (Desmet, 1994). 그러나 이러한 형태학적 변화가 나타나는 담즙을체간에서의 생화학적 지견은 분명치 않은 것이 많으며 이를 해결하려는 노력은 현재도 계속되고 있다. 특히 환쥐의 총담관을 결찰하면 담즙을체가 야기되고 시간 경과에 따라 간조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화 및 경화성 변화 (Kountouras *et al.*, 1984; 장대성 외, 1987; 김효석 외, 1989)가 나타나기 때문에 환쥐의 총담관을 결찰하여 야기된 담즙을체간은 담즙을체간의 생화학적 연구의 실험 모델로 널리 이용되고 있다. 그리고 환쥐의 총담관을 결찰하여 시간을 경과시키면 담즙이 올체된 간은 심한 대사 속도의 변동이 관찰됨과 동시에 대사에 관계하는 여러 효소들의 활성도가 변동된다.

Glucose-6-phosphate isomerase (D-glucose-6-phosphate ketol-isomerase, EC 5.3.1.9, GPI)는 당분해 경로 및 펜토스 인산 경로에서 α -D-glucose 6-phosphate와 D-fructose 6-phosphate를 서로 가역적으로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소로서 (Wilkinson, 1976; Kim, 1984 b; Mayes, 1993 a & b) 포유동물에서는 꿀격근, 신, 간, 심, 뇌의 순으로 풍부하게 분포되어 있으며 혈중에도 출현한다 (Pai, 1969; Wilkinson, 1976; Dixon & Webb, 1979). 그리고 조직에서는 이 효소가 세포질 분획이 주가 되는 세포의 가용성 분획에 많은 양 국재하고 (Gracy, 1982; Mayes, 1993 a & b) 간세포에서는 mitochondria와 endoplasmic reticulum에도 국재하는 것 (김일경, 1995)으로 알려져 있다.

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (D-fructose-1, 6-diphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase, EC 4.1.2.13, ALS)는 D-fructose 1, 6-bisphosphate로부터 glyceraldehyde 3-phosphate와 dihydroxyacetone phosphate 또는 D-fructose 1-phosphate로부터 glyceraldehyde와 dihydroxyacetone phosphate로서 가역적으로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며 (Wilkinson, 1976; Kim, 1984 a) 특히 당분해 과정 중에서 D-fructose 1,6-bisphosphate를 glyceraldehyde 3-phosphate와 dihydroxyacetone phosphate로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다 (Mayes, 1993 a). 포유동물에서 이 효소는 꿀격근, 심, 간, 신, 부신, 비, 흥선, 혈액의 순으로 풍부하게 분포되어 있으며 (Dixon & Webb, 1979), 혈중에도 출현한다 (Visnapuu *et al.*, 1989). 또한 포유동물에서 이 효소는 A, B 및 C 3종의 isozyme으로 존재하며 (Rutter *et al.*, 1968; Penhoet *et al.*, 1969) 간세포에서는 주로 ALS-B가 세포질, 세포핵, mitochondria 및 endoplasmic reticulum에 국재하는 것 (Penhoet *et al.*, 1969; Foenmel *et al.*, 1975; Weiss *et al.*, 1981)으로 알려져 있다.

간은 물질대사의 주된 기관으로서 다양한 기능을 가진 장기이며 담즙을체가 야기되어 간이 손상을 받으면 간세포에서 합성되고, 간세포 외로 유리되는 효소들은 간조직과 혈중에서 그 활성도의 변동이 심하게 나타난다 (Kaplan & Righetti, 1970; Righetti & Kaplan, 1971; Toda *et al.*, 1980; 꽈춘식과 장억규, 1985; 꽈춘식과 이상일, 1985; 정상호와 꽈춘식, 1987; 김여희 외, 1989; 김여희 외, 1990; 박은미와 꽈춘식, 1992; 꽈춘식과 이숙형, 1992; Park *et al.*, 1994). 따라서 GPI와 ALS는 당 대사에 관여하는 효소 (Mayes, 1993 a & b)로서, 간에 풍부하고 혈중에도 유리되기 때문에 총담관 결찰 후의 혈청과 담즙을체간에서는 이를 효소의 활성도 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 자세한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 환쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간부터 42일까지 담즙을체간의 cytosol, mitoch-

ondria 및 microsome과 혈청에서 GPI와 ALS의 활성도를 측정하여 담즙율체간의 세포분획에서 이들 효소의 활성도 변동을 밝히고자 한 것이다.

재료 및 방법

동물 및 처치 : 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~350 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 16군으로 나누었다. 즉 가수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 회생시킨 가수술 군 (총 8군) 및 총담관 결찰 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 회생시킨 총담관 결찰 군 (총 8군) 등이다.

총담관 결찰군에서 담관 결찰 후 14일까지 죽는 예가 없었으나 그 후부터는 약 50%가 죽었다. 그래서 28일 및 42일군은 총담관 결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다.

총담관 결찰 수술과 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 회생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다.

총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이종 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며, 간 적출 시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

시약 : Tris (hydroxymethyl) aminomethane, fructose 6-phosphate, sodium azide, NADP (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt, Sigma grade), glucose-6-phosphate dehydrogenase (from torula yeast, G 7878), enzyme controls (2E, S 1005 and 2N, S 2005), fructose-1,6-bisphosphate aldolase kit

시약 (procedure No.752) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin)은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 그 외 시약들은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간 적출 및 세포분획 : 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 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 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4°C를 유지시키면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복마쇄하여 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법 (곽춘식과 곽정식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄균질액을 $571 \times g$ (average relative centrifugal force)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet와 상청액을 얻었으며 이 상청액을 다시 $104,000 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여 pellet와 상청액을 얻었다. 이때 얻은 상청액을 cytosol분획으로 사용하였다. 그리고 위의 과정에서 얻은 pellet를 0.25 M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10~35% (w/v) sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 $88,500 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심분리관 중앙부위와 상부에 형성된 pellet를 모아서 $88,500 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여

pellet를 얻고 다시 0.25 M sucrose액에 재현탁시켜 $88,500 \times g$ 에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet를 microsome분획으로 사용하였다.

한편 위의 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet를 0.25 M sucrose액에 혼탁시키고 이 액을 20~45% (w/v) sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 $45,200 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25 M sucrose액에 재현탁시켜 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet를 얻었으며 이것을 mitochondria분획으로 사용하였다.

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

효소 시료 조제 : GPI와 ALS 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 cytosol, mitochondria 및 microsome분획을 단백질량으로 $5 mg/ml$ 가 되도록 0.25 M sucrose액에 혼탁시켜 사용하였다.

효소 활성도 측정 : 혈청과 간의 cytosol, mitochondria 및 microsome분획의 GPI 활성도 측정은 시료와 함께 fructose 6-phosphate를 기질로 사용하여 pH 8.7 (50 mM tris buffer, pH 8.7), 25°C 조건에서 5분간 반응시키는 동안에 생성된 glucose 6-phosphate가 NADP 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 공존하에서 6-phosphogluconate와 NADPH로 전환될 때 $340 nm$ 파장에서 증가하는 흡광도로써 효소 활성도를 정량하는 Bueding & MacKinnon (1955)의 방법에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 ml 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 NADPH를 nmol로 나타내었다.

혈청과 간의 cytosol, mitochondria 및

microsome분획의 ALS 활성도 측정은 fructose 1,6-bisphosphate를 기질로 사용하며 pH 7.0 (1.5 mM sodium fluoride in 0.3M tris buffer, pH 7.0), 37°C 조건에서 30분간 반응시키는 동안에 생성된 glyceraldehyde 3-phosphate를 sodium hydroxide와 반응시켜 hydroxypyruvic aldehyde로 전환시킨 다음 2,4-dinitrophenylhydrazine과 다시 반응시켜 생성된 hydrazone을 alkali로 발색시켜 $560 nm$ 파장에서 비색정량하는 Siebly & Lehninger (1949)법을 응용한 Sigma사의 kit 시약에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 ml 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 감소된 fructose 1,6-bisphosphate를 nmol로 나타내었다.

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

단백질 정량 : 효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg & 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 0.05 이하로 하였다.

결 과

흰쥐에서 총담관 결찰 후 담즙울체간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal GPI의 활성도 변동 : 총담관 결찰로 인한 흰쥐 담즙울체간의 cytosolic GPI의 활성도는 총담관 결찰 후 12시간부터 2일까지 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12시간에는 약 16% ($P<0.05$), 1일에는 약 24% ($P<0.01$), 2일에는 약 16% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 담즙울체간의 mitochondrial GPI의 활성도는 총담관 결찰 후 2일부터 42일

까지 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 2일에는 약 42% ($P<0.05$), 3일에는 약 44% ($P<0.01$), 7일에는 약 73% ($P<0.01$), 14일에는 약 156% ($P<0.001$), 28일에는 약 276% ($P<0.001$), 42일에는 약 184% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그리고 microsomal

GPI의 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 28일까지 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 1일에는 36% ($P<0.01$), 2일에는 약 38% ($P<0.01$), 3일에는 약 35% ($P<0.01$), 7일에는 약 27% ($P<0.05$), 14일에는 약 33% ($P<0.05$), 28일에는 약 52% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Activities of cytosolic, mitochondrial, and microsomal glucose-6-phosphate isomerase in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Day(s) following ligation	Glucose-6-phosphate isomerase activities (nmol NADPH min ⁻¹ mg protein ⁻¹)					
	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Liver of sham	Cholestatic liver	Liver of sham	Cholestatic liver	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	498.6±48.9	420.9±37.1 ^a (-16)	36.4±5.9	40.1±7.4 (10)	80.2±11.6	83.1±16.1
1	508.4±51.2	384.5±31.0 ^b (-24)	37.1±6.2	46.6±9.1 (26)	79.8±12.1	108.2±14.0 ^b (36)
2	503.5±49.4	423.4±43.1 ^a (-16)	36.8±5.8	52.3±8.7 ^a (42)	81.3±12.4	112.7±13.4 ^b (38)
3	496.7±43.6	453.8±47.0	37.3±7.3	53.8±7.9 ^b (44)	78.6±12.8	106.2±12.6 ^b (35)
7	492.2±44.5	475.1±48.5	37.8±6.8	65.5±12.4 ^b (73)	80.8±11.8	112.9±13.1 ^a (27)
14	486.4±46.2	477.6±50.0	38.1±6.3	97.7±18.1 ^c (156)	81.2±12.2	107.7±14.6 ^a (33)
28	481.8±42.8	484.9±39.6	37.6±6.1	123.6±17.4 ^f (276)	80.6±11.8	122.8±13.9 ^f (52)
42	482.3±43.7	464.1±41.1	38.4±6.5	109.2±13.4 ^f (184)	81.3±11.3	98.5±16.9 (21)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers.

Significant difference from sham operated rat livers (a; $P<0.05$, b; $P<0.01$, c; $P<0.001$).

Values in the parentheses indicate percent decrease (-) and/or percent increase of the enzyme activities relative to the respective sham operated control values.

환위에서 총담관 결찰 후 담즙율체간의 cytosolic, mitochondrial 및 microsomal ALS의 활성도 변동 : 총담관 결찰 후 담즙율체간의 cytosolic ALS 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 42일까지 약간 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 총담관 결찰 후 담즙율

체간의 mitochondrial 및 microsomal ALS의 활성도는 다같이 총담관 결찰 후 2일 및 3일에 유의한 증가를 나타내었다. 즉 mitochondrial ALS 활성도는 총담관 결찰 후 2일에는 약 29% ($P<0.05$), 3일에는 약 33% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었으며 microsomal

ALS 활성도는 총담관 결찰 후 2일에는 약 48% ($P<0.01$), 3일에는 약 37% ($P<0.05$)

의 증가를 나타내었다 (Table 2).

Table 2. Activities of cytosolic, mitochondrial, and microsomal fructose-1,6-bisphosphate aldolase in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Day(s) follow- ing ligation	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase activities (nmol fructose 1,6-bisphosphate reduced min^{-1} mg protein^{-1})					
	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Liver of sham	Cholestatic liver	Liver of sham	Cholestatic liver	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	76.1 ± 15.7	68.8 ± 22.3	14.1 ± 2.4	15.2 ± 3.1	86.5 ± 13.4	79.4 ± 13.6
1	75.3 ± 16.4	62.2 ± 25.5 (-17)	13.8 ± 2.7	15.0 ± 2.6	85.7 ± 13.3	109.3 ± 22.8 (28)
2	74.8 ± 15.5	60.7 ± 20.6 (-19)	14.0 ± 2.2	18.1 ± 2.3 ^a (29)	85.4 ± 13.7	126.0 ± 23.3 ^b (48)
3	75.0 ± 15.2	59.7 ± 15.8 (-20)	13.9 ± 2.4	18.5 ± 2.6 ^a (33)	84.2 ± 14.2	115.3 ± 22.1 ^a (37)
7	73.2 ± 16.1	55.0 ± 17.1 (-25)	13.7 ± 2.6	17.5 ± 3.5 (28)	83.3 ± 14.9	96.7 ± 17.1 (16)
14	69.7 ± 14.3	56.3 ± 12.1 (-19)	13.8 ± 2.8	17.8 ± 3.3 (29)	83.6 ± 13.5	93.5 ± 18.5 (12)
28	69.5 ± 13.4	58.9 ± 11.7 (-15)	13.6 ± 2.5	15.1 ± 2.8 (11)	83.9 ± 12.9	88.7 ± 14.8
42	69.8 ± 13.8	58.4 ± 12.3 (-16)	13.7 ± 2.3	14.6 ± 3.2	83.5 ± 13.1	86.4 ± 15.6

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers.

Significant difference from sham operated rat livers (a; $P<0.05$, b; $P<0.01$).

Values in the parentheses indicate same as Table 1.

흰쥐에서 총담관 결찰 후 혈청의 GPI 활성도 변동 : 총담관 결찰 후 혈청의 GPI 활성도는 총담관 결찰 후 12시간부터 7일까지 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12시간에는 약 426% ($P<0.001$), 1일에는 약 267% ($P<0.001$), 2일에는 약 229% ($P<0.001$), 3일에는 약 71% ($P<0.05$), 7일에는 약 59% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다 (Table 3).

흰쥐에서 총담관 결찰 후 혈청의 ALS 활성도 변동 : 총담관 결찰 후 혈청의 ALS 활성도는 실험 전기간 동안 유의한 증가를 나

타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12시간에는 약 133% ($P<0.05$), 1일에는 약 230% ($P<0.05$), 2일에는 약 357% ($P<0.01$), 3일에는 약 609% ($P<0.001$), 7일에는 약 559% ($P<0.001$), 14일에는 약 539% ($P<0.001$), 28일에는 약 374% ($P<0.01$), 42일에는 약 323% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다 (Table 4).

Table 3. Activities of serum glucose-6-phosphate isomerase after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	Glucose-6-phosphate isomerase activities (nmol NADPH min ⁻¹ ml ⁻¹)		
	Sham	CBDL	
0.5	216.3 ± 53.2	1,138.2 ± 317.9 ^c	(426)
1	211.6 ± 48.4	776.4 ± 160.4 ^c	(267)
2	214.2 ± 49.7	705.7 ± 171.3 ^c	(229)
3	209.8 ± 51.6	358.3 ± 92.8 ^a	(71)
7	211.3 ± 53.5	336.9 ± 96.5 ^a	(59)
14	213.6 ± 50.6	306.6 ± 85.9	(44)
28	211.1 ± 49.5	299.2 ± 87.2	(42)
42	210.5 ± 48.5	259.3 ± 53.8	(23)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham: sham operated rats, CBDL: common bile duct ligated rats.

Significant difference from sham (a;P<0.05, c;P<0.001).

Values in the parentheses indicate percent increase of the enzyme activities relative to the respective sham operated control values.

Table 4. Activities of serum fructose-1,6-bisphosphate aldolase after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase activities (nmol fructose 1,6-bisphosphate reduced min ⁻¹ ml ⁻¹)		
	Sham	CBDL	
0.5	7.8 ± 1.4	18.2 ± 7.1 ^a	(133)
1	7.6 ± 1.7	25.1 ± 14.4 ^a	(230)
2	7.7 ± 1.9	35.2 ± 13.3 ^b	(357)
3	7.5 ± 2.1	53.2 ± 15.8 ^c	(609)
7	7.4 ± 1.8	48.8 ± 14.9 ^c	(559)
14	7.5 ± 1.6	47.9 ± 17.6 ^c	(539)
28	7.6 ± 1.5	36.0 ± 13.2 ^b	(374)
42	7.5 ± 1.3	31.7 ± 7.4 ^c	(323)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham: sham operated rats, CBDL: common bile duct ligated rats.

Significant difference from sham (a;P<0.05, b;P<0.01, c;P<0.001).

Values in the parentheses indicate same as Table 3.

고 칠

간의 배설기능에 장애가 오면 간은 담즙을 체가 야기되며(Sherlock, 1985) 이때 담즙을 체간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 변동된다고 한다. 특히 흰쥐를 사용하여 담즙을 체간을 만드는 모델 실험에서는 다음과 같이 수 많은 효소들의 활성도가 변동되는 것으로 알려져 있다. 즉 담즙을 체간과 담즙을 체 시 혈청에서 활성도가 증가되는 효소는 5'-nucleotidase(곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식 외, 1987), γ -glutamyltranspeptidase(곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식 외, 1987), leucine aminopeptidase(곽춘식, 1980; 정상호와 곽춘식, 1987)와 alkaline phosphatase(Kaplan & Righetti, 1970; Righetti & Kaplan, 1971; Toda *et al.*, 1980; 곽춘식 외, 1987)등과 같은 주로 간세포의 막결합효소들이며 간 세포질에 주로 존재하는 alanine aminotransferase(김여희 외, 1989), aspartate aminotransferase(김여희 외, 1990), lactate dehydrogenase(곽춘식과 이상일, 1985) 및 malate dehydrogenase(곽춘식과 이상일, 1985) 등은 담즙을 체간에서 그 활성도가 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한 당질대사에 관여하는 효소들인 cytosolic α -D-mannosidase, Golgi α -D-mannosidase, microsomal α -D-mannosidase, lysosomal β -D-mannosidase, lysosomal α -D-glucosidase, cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase, microsomal β -D-glucosidase들은 담즙을 체간에서 그 활성도가 증가되며(박은미와 곽춘식, 1992; Park *et al.*, 1994), 담즙을 체 시 혈청에서도 cytosolic, lysosomal 및 Golgi α -D-mannosidase, lysosomal β -D-mannosidase, α -D-glucosidase, broad-specificity β -D-glucosidase와 β -D-glucosidase 등의 활성도가 증가되는 것(박은미와 곽춘식, 1992; Park *et al.*, 1994)으로 알려져 있다. 그리고 구연산 회로에 관여하는 효소인 mitochondrial NAD⁺-isocitrate dehydrogenase는 담즙을 체간에서 그 활성도가 증가되나 이 효소의 isozyme인 cytosolic 및 mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase는

담즙을 체간에 그 활성도가 감소되며 담즙을 체 시 혈청에서는 NAD⁺- 및 NADP⁺-isocitrate dehydrogenase 활성도가 현저히 증가된다(주일, 1992)고 한다. 한편 lysosome에 존재하며 단백질 분해효소인 cathepsin B와 D도 담즙을 체간에서 그 활성도가 증가된다(Ihm *et al.*, 1994)고 한다. 특히 생체이물 변환 효소의 일종인 glutathione S-transferase는 담즙을 체간의 세포질과 mitochondria에서는 그 활성도가 감소되고 microsome에서는 그 활성도가 증가(권용철 외, 1990)되며, aryl sulfotransferase I, II 및 III, IV isozyme은 담즙을 체간의 세포질에서는 그 활성도가 감소되고 mitochondria와 혈청에서는 그 활성도가 증가되며 microsome에서는 aryl sulfotransferase III, IV isozyme만 그 활성도가 증가된다(Ihm *et al.*, 1995)고 한다. 그리고 glutathione peroxidase(권용철 외, 1990), monoamine oxidase(문교철과 곽춘식, 1989), catalase, alcohol dehydrogenase(곽춘식 외, 1988), carboxylesterase, arylesterase, cholinesterase(곽춘식과 이숙형, 1992), thiosulfate sulfurtransferase 및 UDP-glucuronosyltransferase(임종술, 1993)는 담즙을 체간에서 그 활성도가 감소된다고 한다. 그리고 담즙을 체간에서 세포질에 주로 존재하는 xanthine oxidase(곽춘식, 1985)와 glutathione reductase(권용철 외, 1990)는 그 활성도가 증가되며 아울러 microsomal ethanol oxidizing system(곽춘식 외, 1988)의 활성도도 담즙을 체간에서 증가된다. 이러한 효소 중 5'-nucleotidase, γ -glutamyltransepptidase, leucine aminopeptidase, alkaline phosphatase, cathepsin B 및 cathepsin D의 담즙을 체간에서의 활성도 증가는 주로 담즙을 체간에서 그 합성이 증가되어 나타난 결과(Kaplan & Righetti, 1970; Righetti & Kaplan, 1971; 곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식 외, 1987; Ihm *et al.*, 1994)라 하며 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 alcohol dehydrogenase의 담즙을 체간에서의 활성도 감소는 주로 담즙을 체간에서 투과성 항진으로 이를 효소다량

누출되어 나타난 결과(Lind, 1958; 곽춘식과 이상일, 1985; 곽춘식 외, 1988; 김여희 외, 1989; 김여희 외, 1990)라 한다. 그리고 담즙울체간에서 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase의 활성도 감소는 담즙울체간에서 그 합성이 저하되어 나타난 결과(곽춘식과 이숙형, 1992)라 한다. 이와 같이 간 세포에 존재하는 효소들은 담즙울체가 있을 때 간 조직과 혈청에서 그 활성이 변동된다. 따라서 이 실험에서 측정한 GPI와 ALS도 주로 간에 존재하는 만큼 간조직에 담즙울체가 있을 때는 그 활성도의 변동이 있을 것이다.

이 실험에서 환쥐 담즙울체간의 cytosolic GPI의 활성도는 총담관 결찰 후 12시간부터 2일까지 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 mitochondrial 및 microsomal GPI의 활성도는 각각 총담관 결찰 후 2일부터 42일 및 1일부터 28일까지 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 환쥐 담즙울체간의 mitochondrial 및 microsomal ALS 활성도는 다 같이 총담관 결찰 후 2일과 3일에 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 cytosolic ALS 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 42일까지 약간 감소되었다.

이와 같이 이 실험에서 관찰한 cytosolic GPI와 ALS의 활성도는 환쥐의 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되었으며 반면에 담즙울체간의 mitochondrial 및 microsomal GPI와 ALS 활성도는 증가되었다. 특히 담즙울체간에서 그 활성도가 증가 또는 감소하는 효소들이 많다는 보고를 볼 때 이 실험에서 관찰한 cytosolic GPI와 ALS는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소하는 효소이며 mitochondrial 및 microsomal GPI와 ALS는 그 활성도가 증가하는 효소라 하겠다.

담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 간세포는 기능 장애(Halsted, 1976; Sherlock, 1985)를 받을 뿐만 아니라 담즙울체의 시간이 경과함에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타난다(Desmet, 1994), 그리고 환쥐의 담즙울체간에서 조직 소견을 관찰한 Kountouras *et al.*, (1984), 장대성 외

(1987) 및 김효석 외(1989)의 보고를 보면 환쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과했을 때는 많은 간세포들이 괴사 현상을 나타내었으며 동시에 담도세포도 증식되기 시작하였다고 하였다. 그리고 1일 후에는 간의 전부위에 괴사 현상이 확산되고 괴사 부위는 염증 세포의 침윤이 보였다고 하였으며 이후 2주경에는 괴사 현상이 약간 감소되는 반면에 담도세포의 증식이 증가되고 섬유화가 시작되었다고 하였다. 그리고 이후 6주부터는 초기의 경화성 변화가 나타났다고 하였다. 이 실험에서 환쥐의 총담관을 결찰했을 때 혈청의 GPI 활성도는 총담관결찰 후 12시간부터 7일까지 유의한 증가를 나타내었으며 혈청의 ALS 활성도는 총담관결찰 후 12시간부터 42일까지 유의한 증가를 나타내었다. 황달을 수반하는 급성 간염 환자의 혈청에서 GPI와 ALS의 활성도가 현저한 증가를 나타내며, 특히 이 간질환 환자의 혈청에서 이들 효소의 활성도가 증가되는 것이 간 실질세포의 손상을 암시해 준다는 설(Cohn *et al.*, 1968 & 1969)과 환쥐의 총담관을 결찰했을 때 간에는 괴사가 나타나며 총담관 결찰 후 12시간부터 1주일경 까지의 담즙울체간에서는 심한 괴사 현상을 나타낸다는 보고(Moritz & Snodgrass, 1972)가 있다. 이러한 보고들로 보아 이 실험에서 총담관을 결찰했을 때 혈청의 GPI와 ALS 활성도가 증가하는 것은 간 괴사와 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 즉 GPI와 ALS는 간의 괴사가 진행되는 담즙울체간에서 혈중으로 다량 누출되어 혈중에 그 활성도가 증가되는 효소라 하겠다. 따라서 이 실험에서 담즙울체간의 cytosolic GPI와 ALS 활성도가 감소된 것은 이들 효소가 혈중으로 다량 누출되는 것이 한가지 원인이 아닌가 생각된다. 그러나 이 실험에서 담즙울체간의 mitochondrial 및 microsomal GPI와 ALS 활성도가 증가된 것은 무엇이라 분명하게 설명하기는 어려우나 혹 생체 방어 기전의 한가지로 cytosolic GPI와 ALS의 활성도 감소를 보상하기 위하여 이들 효소의 합성을 증가 시킨 것이 아닌가 생각된다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 성적으로 볼

때 흰쥐 담즙울체간에서는 mitochondrial 및 microsomal GPI 와 ALS는 그 활성도가 증가되는 효소이고 cytosolic GPI 와 ALS는 그 활성도가 감소되는 효소이며, 담즙울체간에서 mitochondrial 및 microsomal GPI 와 ALS의 활성도 증가는 담즙울체간에서 그 합성이 증가되어 나타난 결과라 생각된다. 또한 담즙울체시 혈청에서 GPI 와 ALS의 활성도가 증가된 것은 간의 괴사와 간 세포막의 투과성 항진으로 이 효소들이 혈중에 다량 누출되어 나타난 결과라 생각된다.

요 약

담즙울체간에서 glucose-6-phosphate isomerase (GPI)와 fructose-1,6-bisphosphate aldolase (ALS)의 활성도 변동을 알아보기 위하여 흰쥐 총담관을 결찰한 후 12시간부터 42일까지의 담즙울체간의 세포분획에서 이들 효소의 활성도를 측정하는 한편 혈청에서도 이들 효소의 활성도를 측정하였다.

총담관 결찰 후 흰쥐 담즙울체간의 cytosolic GPI의 활성도는 총담관 결찰 후 12시간부터 2 일까지 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 mitochondrial 및 microsomal GPI의 활성도는 각각 총담관 결찰 후 2일부터 42일 및 1일부터 28일까지 유의한 증가를 나타내었다.

총담관 결찰 후 흰쥐 담즙울체간의 mitochondrial 및 microsomal ALS 활성도는 다같이 총담관 결찰 후 2일과 3일에 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 cytosolic ALS 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 42일까지 약간 감소되었다.

총담관 결찰 후 흰쥐 혈청의 GPI 및 ALS 활성도는 각각 총담관 결찰 후 12시간부터 7일 및 실험 전기간 동안 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 흰쥐 담즙울체간에서는 mitochondrial 및 microsomal GPI 와 ALS는 그 활성도가 증가되는 효소이고 cytosolic GPI 와 ALS는 그 활성도가 감소되는 효소이며, 담즙울체간에서 mitochondrial 및 microsomal GPI 와 ALS의 활성도 증가는 담즙울체간에서 그 합성이 증가되어 나타난 결과라 생각된다.

또한 담즙울체시 혈청에서 GPI 와 ALS의 활성도가 증가된 것은 간의 괴사와 간세포막의 투과성 항진으로 이 효소들이 혈중에 다량 누출되어 나타난 결과라 생각된다.

참 고 문 헌

곽춘식 : 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980; 21(1):126-134.

곽춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Xanthine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집 1985;4(2):125-130.

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

곽춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙울체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1987;6(1):67-76.

곽춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙울체간에서의 알콜대사 효소들의 활성치. 계명의대논문집 1988;7(1):64-75.

곽춘식, 이상일 : 흰쥐 담즙울체간의 Malate Dehydrogenase의 활성치. 계명의대논문집 1985;4(2):131-137.

곽춘식, 이숙형 : 흰쥐 담즙울체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. 한국생화학회지 1992;25(3):251-261.

곽춘식, 장억규 : 흰쥐 담즙울체 간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4(1):1-27.

권용철, 문교철, 곽춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Glutathione S-Transferase, Gluta-thione Reductase 및 Glutathione Peroxidase의 활성도. 계명의대논문집 1990;9(2):159-170.

김여희, 곽춘식, 정성광 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 혈청 및 간의 Alanine Aminotransferase활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1989;8(1):113-121.

- 김여희, 곽춘식, 정성광 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총 담관 결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Aminotransferase 활성에 미치는 영향. *계명의대논문집* 1990;9(1):87-95.
- 김일경 : 흰쥐 재생 간에서의 Glucose-6-Phosphate Isomerase 및 Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase의 활성도. *계명대학교 대학원 석사학위논문* 1995;1-24.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용환, 정준모 : 총 담관 결찰시 간세포의 초미형태 학적 변화. *대한내과학회지* 1989;36(4):459-470.
- 문교철, 곽춘식 : 흰쥐 담즙율체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. *계명의대논문집* 1989;8(1):69-77.
- 박은미, 곽춘식 : 흰쥐 담즙율체간의 α -D- 및 β -D-Glucosidase와 β -D-Glucuronidase의 활성도. *계명의대논문집* 1992;11(1):59-71.
- 임종술 : 흰쥐 담즙율체간의 Aryl Sulfotransferase 및 Thiosulfate Sulfurtransferase의 활성도. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1993;1-43.
- 장대성, 곽정식, 손태중 : 총 담관 결찰에 의한 담관증식성 변화의 초미형태학적 연구. *경북의대잡지* 1987;28(2):113-122.
- 정상호, 곽춘식 : 흰쥐 담즙율체간의 Leucine Aminopeptidase의 활성치. *계명의대논문집* 1987;6(2):210-221.
- 주일 : 총 담관을 결찰한 흰쥐 혈청 및 간의 Isocitrate Dehydrogenase 활성도와 총 담즙 산의 농도. *계명대학교 대학원 석사학위논문* 1992;1-31.
- Bueding E, MacKinnon JA : Studies of the phosphoglucose isomerase of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1955;215(1):507-513.
- Cohn EM, Winsten S, Abramson EB : A study of the serum aldolase test in various types of jaundice. *Am J Gastroenterol* 1968;49(3):219-234.
- Cohn EM, Winsten S, Abramson EB : Serum phosphohexose isomerase-Its values in the differential diagnosis of jaundice. *Am J Gastroenterol* 1969;51(2):101-111.
- Desmet VJ : Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis, in MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC (eds): *Pathology of the Liver*, 3 ed., New York, Churchill Livingstone, 1994, pp 425-474.
- Dixon M, Webb EC : *Enzymes*, London, Longman Group, 1979, pp 634-636.
- Foemmel RS, Gray RH, Bernstein IA : Intracellular localization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem* 1975;250(5):1,892-1,897.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM : Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177(3):751-766.
- Gracy RW : Glucosephosphate isomerase from catfish muscle and liver and from mammalian tissues, in Colowick SP, Kaplan NO (eds): *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1982, Vol 89, pp 550-558.
- 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.
- Ihm JS, Mun KC, Kwak CS : Cathepsin B,D,H, and acid phosphatase activities in cholestatic rat liver. *Korean J Biochem* 1994;26(4):203-207.
- Ihm JS, Kim YH, Kwak CS : Aryl Sulfo-transferase activity in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *Korean J Biochem* 1995;27(3):141-147.
- 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, 1984a, pp 404-405.
- Kim BK : *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic Press, 1984 b, pp 442-443.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ : Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rats. *Br J Exp Pathol* 1984;65(3): 305-311.
- Lind S : A comparison between the patterns (GOT, GPT, LD) in serum and tissue extracts in cardiac hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958;10(2):303-307.
- Mayes PA : Glycolysis and the oxidation of pyruvate, in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): *Harper's Biochemistry*, East Norwalk, Appleton & Lange, 1993 a, pp172-180.
- Mayes PA : The pentose phosphate pathway and other pathway of hexose metabolism, in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): *Harper's Biochemistry*, East Norwalk, Appleton & Lange, 1993 b, pp201-211.
- 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.
- Pai ML : Some observation on the study on serum phosphoglucose isomerase in health and in diseases of liver. *Indian J Physiol Pharmacol* 1969;13(1):77-78.
- Park EM, Mun KC, Kwak CS : α -D-Mannosidase and β -D-mannosidase activities in cholestatic rat liver induced by bile duct ligation. *Korean J Biochem* 1994; 26(4):197-201.
- Penhoet EE, Kochman M, Rutter WJ : Isolation of fructose diphosphate aldolase A, B and C. *Biochemistry* 1969;8(11): 4,391-4,395.
- Righetti ABB, Kaplan MM : Effect of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Med* 1971; 136(2):491-495.
- Rutter WJ, Rajkumar T, Penhoet E, Kochman M, Valentine R : Aldolase variants; structure and physiological significance. *Ann NY Acad Sci* 1968;151(1):102-117.
- Sherlock DS : *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7 ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985, pp 79-80.
- Siebly JA, Lehninger AL : Determination of aldolase in animal tissue. *J Biol Chem* 1949; 177(1):859-872.
- Toda G, Ikeda Y, Kado 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.
- Visnapuu LA, Karlson LK, Dubinsky EH, Szer IS, Hirsch CA : Pediatric reference range for serum aldolase. *Am J Clin Pathol* 1989; 9(4):476-477.
- Weiss TL, Zieske JD, Bernstein IA : Reversible microsomal binding of hepatic aldolase. *Biochim Biophys Acta* 1981;661(2): 221-229.
- Wilkinson JH : *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*. London, Edward Arnold, 1976, pp187-198.