

## 총담관을 결찰한 흰쥐 혈청 및 간의 Isocitrate Dehydrogenase 활성도와 총담즙산의 농도

주일내과의원, 계명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학 연구소\*

주 일 · 곽춘식\*

### Serum and Liver Isocitrate Dehydrogenase Activities and Total Bile Acids Concentrations in Common Bile Duct Ligated Rats

Il Joo, M.D. and Chun Sik Kwak, Ph.D.\*

*Joo Il Clinic, Department of Biochemistry,  
Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science,\*  
Taegu, Korea*

#### =Abstract=

A study was made on the changes of NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup> dependent isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICD, NAD<sup>+</sup>-ICD) activities in cholestatic rat liver. The cytosolic and mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD and mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD activities were determined in the cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation over a period of forty two days. And the activities of NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup>-ICD in the serum were measured. The concentrations of total bile acids in their serum and liver cytosolic fraction were also measured. The cytosolic and mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD activities of the cholestatic rat liver each showed a marked decrease between the 1st and the 42nd day and the 12th hour and the 42nd day respectively after the ligation. However, the mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD activity in the cholestatic liver markedly increased between the 2nd and the 42nd day after the ligation. On the other hand, the NADP<sup>+</sup>-ICD activity of the serum markedly increased between the 12th hour and 3rd day after the ligation. That of the serum NAD<sup>+</sup>-ICD also showed a marked increase between the 1st and the 7th day after the ligation. The concentrations of total bile acids in the cholestatic liver cytosolic fraction showed a marked increase between the 12th hour and the 7th day after the ligation. That of total bile acids in the serum showed a marked increase throughout the experiments. Viewed from above results, the NADP<sup>+</sup>-ICD in the liver with cholestasis seems to be the decreasing enzyme. But the NAD<sup>+</sup>-ICD in the cholestatic liver thought to be the increasing enzyme in its activity. Especially, when the cholestasis occurred, the activities of these enzymes of serum are higher than those of the controls because of increased permeability

secondary to liver cell necrosis, which causes the enzymes to leak into the blood in great quantity.

**Key Words : Bile duct ligation, Isocitrate dehydrogenase, Total bile acids**

## 서 론

Isocitrate dehydrogenase는 동물조직에 널리 분포되어 있으며 Isocitrate를  $\alpha$ -ketoglutarate로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소 (Kachmar & Moss, 1976; Wilkinson, 1976; Kim, 1979; Bauer, 1982)로서 NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (threo-Ds-Isocitrate : NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (decarboxylating), EC 1. 1. 1. 42, NADP<sup>+</sup> -ICD)와 NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (threo-Ds-Isocitrate : NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (decarboxylating), EC 1. 1. 1. 41, NAD<sup>+</sup>-ICD)가 있다 (Wilkinson, 1976; Dixon & Webb, 1979; Kim, 1979). NADP<sup>+</sup>-ICD는 동물에서 신, 심, 간, 골격근 및 뇌의 순으로 다량 분포 (Dixon & Webb, 1979)되어 있으며 혈중에도 출현된다 (Kachmar & Moss, 1976; Bauer, 1982). 또한 이 효소는 세포내에서 세포질과 mitochondria에만 존재하는 것 (Plaut, 1963; Kachmar & Moss, 1976)으로 알려져 있다. NAD<sup>+</sup>-ICD는 동물에서 심, 골격근, 뇌, 신 및 간의 순으로 다량 분포 (Dixon & Webb, 1979)되어 있으며 역시 혈중에도 출현한다 (Kachmar & Moss, 1976). 그리고 이 효소는 세포내에서 mitochondria에만 존재 (Shen *et al*, 1974; Kachmar & Moss, 1976; Wilkinson, 1976; Mayes, 1996)하며 특히 시트르산 회로 반응에서 isocitrate를  $\alpha$ -ketoglutarate로 전환시키는 과정을 주로 촉매한다 (Mayes, 1996).

ICD를 중 NADP<sup>+</sup>-ICD는 간염, 간암, 폐쇄성 황달 등의 간질환 환자의 혈청에서 특이적으로 그 활성도가 상승 (Kachmar & Moss, 1976; Wilkinson, 1976)되며 특히 간질환 환자의 혈청에서 이 효소의 활성도가 급격한 상승을 나타낸다

는 것은 간실질 세포에서 심한 괴사가 초래되었다는 것을 암시해 주는 것 (Kachmar & Moss, 1976)이라 한다.

간 조직에 담즙을 체를 야기시키는 질병은 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄, 원발성 담즙성 간경변증, 담관염 및 담즙울체형 간염 등이다 (Halsted, 1976). 이러한 담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 간 세포는 기능장애 (Halsted, 1976; Sherlock & Dooley, 1993)를 받을 뿐만 아니라 담즙울체의 시간이 경과함에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도증식, 섬유화, 경화성변화 등 형태학적 변화가 연속적으로 나타난다 (Desmet, 1979). 그러나 이러한 형태학적 변화가 나타나는 담즙울체간에서 생화학적 지견은 분명치 않은 것이 많으며 이를 해결하려는 노력은 현재도 계속되고 있다.

특히 흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간 경과에 따라 간조직은 괴사, 지방변성, 섬유화 및 경화성 변화 (Moritz & Snodgrass, 1972; Kountouras *et al*, 1984; 장대성 외, 1987; 김효석 외, 1989)가 나타나기 때문에 흰쥐의 총담관을 결찰하여 형성된 담즙울체간은 담즙울체간의 실험 모델로 널리 이용되고 있다.

간은 물질대사의 중추기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 (Sherlock & Dooley, 1993) NADP<sup>+</sup>- 및 NAD<sup>+</sup>-ICD의 합성이 왕성할 뿐만 아니라 특히 NADP<sup>+</sup>-ICD가 폐쇄성 황달시 혈청에서 그 활성도가 증가한다는 보고 (Kachmar & Moss, 1976; Dixon & Webb, 1979)가 있고 보면 담즙울체간에서도 이들 효소의 활성도가 변동될 것으로 생각된다. 그러나 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도 변동에 대한 보고는 아직 찾아볼 수 없었다.

이 연구는 담즙울체간에서 ICD의 활성도 변동

과 그 원인의 일단을 알아보기 위하여 시행한 실험으로서 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12 시간부터 42 일까지의 담즙을 체간에서 세포질 및 mitochondria의 NADP<sup>+</sup>-ICD와 mitochondria의 NAD<sup>+</sup>-ICD의 활성도를 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소의 활성도도 함께 측정하였다. 또한 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12 시간부터 42 일까지의 담즙을 체간의 세포질과 혈청에서 총담즙산 농도도 함께 측정하여 이들 성적을 상호 비교 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

NAD<sup>+</sup> ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide; grade III), NADH (reduced  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt; grade III), NADP<sup>+</sup> ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt), NADPH (reduced  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt),  $\alpha$ -ketoglutarate, DL-isocitrate, nitroblue tetrazolium, 2,4-dinitrophenylhydrazine, manganese chloride, EDTA disodium salt (ethylene-diamine tetraacetic acid disodium salt), Triton X-100, diaphorase (from porcine heart), 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (from *Pseudomonas testosteroni*), isocitrate dehydrogenase (from porcine heart, Type VI), bile acid calibrator 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine serum albumin)등은 Sigma사(미국)의 제품을 사용하였으며 그외 일반시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

### 2. 동물 및 처치

동물은 4 주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~350 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 1 군을 5 마리로 하여 다음

과 같이 17 군으로 나누었다.

1) 정상군; (1 군)

2) 가수술군; 가수술 후 12 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일, 14 일, 28 일 및 42 일에 희생 시킨 군 (총 8 군)

3) 총담관결찰군; 총담관결찰 후 12 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 7 일, 14 일, 28 일 및 42 일에 희생 시킨 군 (총 8 군)

총담관결찰군에서 담관결찰 후 14 일까지 죽는 예가 없었으나 그 후부터는 약 50%가 죽었다. 그래서 28 일 및 42 일군은 총담관결찰 후 28 일 및 42 일까지 생존한 쥐 5 마리씩을 사용하였다.

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

총담관결찰수술과 가수술은 효소활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12 시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다.

총담관결찰은 간 근위부와 약 1cm 아래쪽 원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

### 3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12 시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사 시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose 액으로 관류하여 간에 남아있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여

그 중 약 5 g을 취하여 9 배량의 0.25 M sucrose 액을 넣은 다음 teflon pestle glass homognizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005 ~0.007 inches)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5 회 왕복 마쇄하여 10 w/v%의 간조직균질액을 만들었다. 그리고는 이 간균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법 (과준식과 과정식, 1986)으로 세포질 및 mitochondria 분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄균질액을  $571 \times g$  (average relative centrifugal force)에서 10 분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을  $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시  $104,400 \times g$ 에서 1 시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이 때 얻은 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다.

한편 위의  $7,796 \times g$ 에서 20 분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25 M sucrose액에 혼탁시키고 이 액을 20~45 w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜  $45,200 \times g$ 에서 20 분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25 M sucrose액에 재혼탁시켜  $7,796 \times g$ 에서 20 분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria 분획으로 사용하였다.

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

#### 4. 효소 시료 조제

NADP<sup>+</sup>-ICD 효소 시료의 조제는 분리한 세포질 분획을 단백질량으로 10 mg/100 ml가 되도록 0.25 M sucrose액으로 혼탁시켰으며 mito-

chondria 분획은 단백질량으로 10 mg/100 ml가 되게 1% Triton X-100액으로 희석한 후 잘 혼합하여 사용하였다. 그리고 NAD<sup>+</sup>-ICD 효소 시료의 조제는 분리한 mitochondria 분획을 단백질량으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose 액으로 혼탁한 후 1% Triton X-100액으로 배로 희석한 후 잘 혼합하여 사용하였다.

#### 5. 효소 활성도 측정

혈청 및 간의 NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도 측정은 NADP<sup>+</sup>와 isocitrate를, 그리고 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도 측정은 NAD<sup>+</sup>와 isocitrate를 기질로 하여 37°C에서 30 분간 반응시키는 동안에 생성된  $\alpha$ -ketoglutarate를 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 발색시켜 390 nm 파장에서 비색정량하는 Bell & Baron (1960)의 방법에 의하였다. NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도의 단위는 1 분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 NADPH를 nmol로 나타내었으며 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도의 단위는 1 분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 NADH를 pmol로 나타내었다.

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

#### 6. 총담즙산의 정량

혈청 및 간 세포질의 총담즙산의 정량은 시료와 NAD<sup>+</sup> 존재하에서 3  $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase 촉매로 생성된 NADH를 nitroblue tetrazolium 첨가와 diaphorase의 촉매로 반응시켜 생성된 formazan을 530 nm 파장에서 비색정량하여 그 양을 총담즙산 양으로 환산하는 Mashige et al. (1981)의 방법에 의하였다.

## 7. 단백질 정량

효소액 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg & Rothstein (1957)법으로 효소액 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법 (Gornall *et al.*, 1949)으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법에 의하여 검정하였다.

## 성 적

1. 흰쥐에게 총담관을 결찰했을 때 간의 cytosolic 및 mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도의 변동

흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙을 체간의 cytosolic NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관 결찰 후 1일부터 42일까지 현저한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 1일에는 약 28% ( $P<0.001$ ), 2

Table 1. Activities of cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICD) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Day(s) following ligation	NADP <sup>+</sup> -dependent ICD activities (nmol NADPH min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	117.8 ± 8.6	105.9 ± 9.0 (10)
1	121.4 ± 9.3	87.3 ± 10.9 <sup>c</sup> (28)
2	123.2 ± 8.5	80.9 ± 12.8 <sup>c</sup> (34)
3	120.6 ± 8.7	79.2 ± 13.0 <sup>c</sup> (34)
7	118.8 ± 8.2	68.1 ± 14.6 <sup>c</sup> (43)
14	117.5 ± 7.8	63.8 ± 13.4 <sup>c</sup> (46)
28	116.3 ± 7.6	56.8 ± 10.5 <sup>c</sup> (51)
42	116.7 ± 8.0	55.0 ± 8.7 <sup>c</sup> (53)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers. Values in the parentheses indicate percent decrease of the enzyme activities relative to the respective sham operated control values.

Significant difference from sham operated rat livers ( $^cP<0.001$ ).

Table 2. Activities of mitochondrial NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICD) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Day(s) following ligation	NADP <sup>+</sup> -dependent ICD activities (nmol NADPH min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	42.3 ± 4.1	31.9 ± 4.4 <sup>b</sup> (25)
1	44.2 ± 4.6	30.6 ± 4.3 <sup>b</sup> (31)
2	44.7 ± 4.9	30.0 ± 5.0 <sup>b</sup> (33)
3	44.4 ± 4.5	29.8 ± 5.1 <sup>b</sup> (33)
7	42.8 ± 4.2	28.4 ± 5.3 <sup>b</sup> (34)
14	42.5 ± 4.4	27.9 ± 6.6 <sup>b</sup> (34)
28	41.6 ± 3.9	26.3 ± 6.0 <sup>b</sup> (37)
42	41.8 ± 3.7	25.5 ± 4.9 <sup>c</sup> (39)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers. Values in the parentheses indicate same as Table 1.

Significant difference from sham operated rat livers (<sup>b</sup> $P<0.01$ ; <sup>c</sup> $P<0.001$ ).

Table 3. Activities of mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICD) in cholestatic rat liver after common bile duct ligation

Day(s) following ligation	NAD <sup>+</sup> -dependent ICD activities (pmol NADH min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	362.5 ± 59.9	426.8 ± 63.2 ( 18)
1	365.4 ± 63.7	469.8 ± 91.6 <sup>b</sup> ( 29)
2	371.6 ± 62.4	584.6 ± 85.9 <sup>c</sup> ( 57)
3	373.7 ± 59.3	623.8 ± 87.2 <sup>c</sup> ( 67)
7	367.5 ± 58.6	657.8 ± 111.3 <sup>c</sup> ( 79)
14	363.2 ± 58.9	709.0 ± 121.6 <sup>c</sup> ( 95)
28	358.4 ± 57.2	734.2 ± 117.4 <sup>c</sup> (105)
42	357.7 ± 57.8	773.3 ± 140.9 <sup>c</sup> (116)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers. Values in the parentheses indicate percent increase of the enzyme activities relative to the respective sham operated control values.

Significant difference from sham operated rat livers (<sup>b</sup>P<0.01; <sup>c</sup>P<0.001).

일에는 약 34% (P<0.001), 7 일에는 약 43% (P<0.001), 42 일에는 약 53% (P<0.001)의 계속적인 감소를 나타내었다 (Table 1). 그리고 간의 mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도도 총담관 결찰 후 12 시간부터 42 일까지 현저한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12 시간에는 약 25% (P<0.01), 2 일에는 약 33% (P<0.01), 7 일에는 약 34% (P<0.01), 42 일에는 약 39% (P<0.001)의 계속적인 감소를 나타내었다 (Table 2).

## 2. 흰쥐에게 총담관을 결찰했을 때 간의 mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도의 변동

흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙물체간의 mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 42 일까지 현저한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 1 일에는 약 29% (P<0.01), 2 일에는 약 57% (P<0.001), 7 일에는 약 79% (P<0.001), 28 일에는 약 105% (P<0.001), 42 일에는 약 116% (P<0.001)의 계속적인 증가를 나타내었다 (Table 3).

## 3. 흰쥐에게 총담관을 결찰했을 때 혈청의 NADP<sup>+</sup>- 및 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도의 변동

총담관을 결찰한 흰쥐 혈청의 NADP<sup>+</sup>-ICD 활

성도는 총담관결찰 후 12 시간부터 3 일까지 급격한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12 시간에는 약 1,000% (P<0.001), 1 일에는 약 874% (P<0.001), 2 일에는 약 789% (P<0.001), 3 일에는 약 233% (P<0.01)의 증가를 나타내었다 (Table 4). 그리고 혈청의 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 1 일에는 약 37% (P<0.05) 2 일에는 약 56% (P<0.05), 3 일에는 약 67% (P<0.05), 7 일에는 약 45% (P<0.05)의 증가를 나타내었다 (Table 5).

## 4. 흰쥐에게 총담관을 결찰했을 때 간세포질 및 혈청의 총담즙산 농도의 변동

총담관을 결찰한 흰쥐에서 간세포질의 총담즙산 농도는 총담관결찰 후 12 시간부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12 시간에는 약 147% (P<0.001), 2 일에는 약 117% (P<0.01), 7 일에는 약 76% (P<0.05)의 증가를 나타내었다 (Table 6). 그리고 혈청의 총담즙산 농도는 실험 전기간 동안 현저한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 12 시간에는 약 8,213% (P<0.001), 2 일에는 약 6,825% (P<0.001), 7 일에는 약 4,018% (P<0.001), 28 일에는 약 2,

Table 4. Activities of serum NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICD) after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	NADP <sup>+</sup> -dependent ICD activities (nmol NADPH min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	
	Sham	CBDL
0.5	2.6 ± 1.1	28.6 ± 6.4 <sup>c</sup> (1,000)
1	2.7 ± 1.2	26.3 ± 7.3 <sup>c</sup> ( 874)
2	2.8 ± 1.3	24.9 ± 8.6 <sup>c</sup> ( 789)
3	2.7 ± 1.4	9.0 ± 2.5 <sup>b</sup> ( 233)
7	2.6 ± 1.2	3.8 ± 1.8 ( 46)
14	2.5 ± 1.1	3.5 ± 1.6 ( 40)
28	2.5 ± 1.0	3.0 ± 1.5 ( 20)
42	2.4 ± 0.9	2.7 ± 1.2 ( 13)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham: sham operation, CBDL: common bile duct ligated rats. Values in the parentheses indicate same as Table 3.

Significant difference from sham operated rats (<sup>b</sup>P<0.01; <sup>c</sup>P<0.001).

Table 5. Activities of serum NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (ICD) after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	NAD <sup>+</sup> -dependent ICD activities (pmol NADH min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	
	Sham	CBDL
0.5	811.8 ± 176.8	866.4 ± 164.6 ( 7)
1	820.2 ± 181.1	1,125.8 ± 231.1 <sup>a</sup> (37)
2	824.3 ± 174.2	1,286.0 ± 362.2 <sup>a</sup> (56)
3	818.6 ± 177.5	1,365.6 ± 403.5 <sup>a</sup> (67)
7	816.1 ± 173.2	1,182.2 ± 248.4 <sup>a</sup> (45)
14	810.9 ± 170.6	1,019.3 ± 261.3 (26)
28	808.4 ± 167.3	968.1 ± 72.4 (20)
42	809.2 ± 162.8	888.4 ± 58.4 (10)

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham: sham operation, CBDL: common bile duct ligated rats. Values in the parentheses indicate same as Table 3.

Significant difference from sham operated rats (<sup>a</sup>P<0.05).

826% (P<0.001), 42 일에는 약 2,068 (P<0.001)의 증가를 나타내었다 (Table 7).

## 고 칠

간의 배설기능 장애시 간은 담즙을체가 야기되며 (Sherlock & Dooley, 1993) 이때 담즙을체간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 변동된다고 한다. 담즙을체간과 담즙을체 시 혈청에서 증가되는 효소는 5'-nucleotidase,  $\gamma$ -glut-

amyltrans peptidase (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 간 세포의 박결 합 효소들이며 간세포질에 주로 분포하는 alanine aminotransferase (김여희 외, 1989), aspartate aminotransferase (김여희 외, 1990), lactate dehydrogenase 및 malate dehydro-

Table 6. Concentrations of liver cytosolic total bile acid after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	Total bile acid concentration ( $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ of wet liver)	
	Liver of sham	Cholestatic liver
0.5	18.3 $\pm$ 7.4	45.2 $\pm$ 8.4 <sup>c</sup> (147)
1	18.5 $\pm$ 7.2	45.8 $\pm$ 8.6 <sup>c</sup> (148)
2	18.2 $\pm$ 7.6	39.5 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup> (117)
3	18.3 $\pm$ 7.5	38.1 $\pm$ 7.9 <sup>b</sup> (108)
7	18.4 $\pm$ 7.3	32.3 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup> (76)
14	18.5 $\pm$ 7.4	22.9 $\pm$ 7.7 (24)
28	18.2 $\pm$ 7.2	19.1 $\pm$ 7.3 (5)
42	18.1 $\pm$ 6.9	18.2 $\pm$ 6.9

The data are expressed as mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group; Liver of sham: sham operated rat livers. Values in the parentheses indicate same as Table 3.

Significant difference from sham operated rat livers (<sup>a</sup>P<0.05; <sup>b</sup>P<0.01; <sup>c</sup>P<0.001).

Table 7. Concentrations of serum total bile acid after common bile duct ligation in rats

Day(s) following ligation	Total bile concentration ( $\mu\text{mol/l}$ )	
	Sam	CBDL
0.5	9.5 $\pm$ 4.1	789.7 $\pm$ 109.3 <sup>c</sup> (8,213)
1	9.7 $\pm$ 4.5	844.0 $\pm$ 123.2 <sup>c</sup> (8,601)
2	9.6 $\pm$ 4.3	664.8 $\pm$ 141.5 <sup>c</sup> (6,825)
3	9.4 $\pm$ 4.0	527.7 $\pm$ 129.7 <sup>c</sup> (5,514)
7	9.5 $\pm$ 4.2	391.2 $\pm$ 86.4 <sup>c</sup> (4,018)
14	9.4 $\pm$ 4.1	303.4 $\pm$ 75.2 <sup>c</sup> (3,128)
28	9.3 $\pm$ 3.8	272.1 $\pm$ 78.5 <sup>c</sup> (2,826)
42	9.3 $\pm$ 3.9	201.6 $\pm$ 65.6 <sup>c</sup> (2,068)

The data are expressed as mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group; Sham: sham operation, CBDL: common bile duct ligated rats. Values in the parentheses indicate same as Table 3.

Significant difference from sham operated rats (<sup>c</sup>P<0.001).

genase (곽춘식과 이상일, 1985) 등은 담즙율체간에서 그 활성도가 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한 당질 분해 또는 당질의 합성 중 수정과정에 관여하는 효소들인 cytosolic  $\alpha$ -D-mannosidase, Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase, lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase, cytosolic broad-specificity  $\beta$ -D-glucosidase, microsomal  $\beta$ -D-glucosidase 들도 모두 담즙율체간에서 그 활성도가 증가되며 (박은미와 곽춘식, 1992; Park et al, 1994), 담즙율체 시 혈청에서도 cytosolic, lysosomal 및 Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase, lysosomal  $\beta$ -D-mannosidase,  $\alpha$ -D-glucosidase, broad-specificity  $\beta$ -D-

glucosidase와  $\beta$ -D-glucosidase 등의 활성도가 증가되는 것 (박은미와 곽춘식, 1992; Park et al, 1994)으로 알려져 있다. 한편 lysosome에 존재하며 단백질 분해 효소인 cathepsin B와 D도 담즙율체간에서 그 활성도가 증가된다 (Ihm et al, 1994)고 하며 특히 생체이물 생체 변환 효소의 일종인 glutathione S-transferase는 담즙율체간의 세포질과 mitochondria에서는 그 활성도가 감소되고 microsome에서는 그 활성도가 증가 (권용철 외, 1990) 되며 glutathione peroxidase (권용철 외, 1990), monoamine oxidase (문교철과 곽춘식, 1989), catalase, alcohol dehydrogenase (곽춘식 외, 1988),

carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase (곽춘식과 이숙형, 1992)는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소된다고 한다. 그리고 담즙울체간에서 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 담즙울체간에서 증가된다. 이러한 효소중 5'-nucleotidase,  $\gamma$ -glutamyltransepeptidase, leucine aminopeptidase, alkaline phosphatase, cathepsin B 및 cathepsin D의 담즙울체간에서의 활성도 증가는 주로 담즙울체간에서 그 합성이 증가되어 나타난 결과 (Kaplan & Righetti, 1970; Rigetti & Kaplan, 1971; 곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식 외, 1987)라 하며 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 alcohol dehydrogenase의 간에서의 활성도 감소는 주로 담즙울체간에서 투과성 항진으로 이들 효소가 다량 누출되어 나타나 결과 (Lind, 1958; 곽춘식과 이상일, 1985; 곽춘식 외, 1988; 김여희 외, 1989; 김여희 외, 1990)라 한다. 그리고 간에서 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 활성도가 변동된다. 따라서 이 실험에서 측정한 NADP<sup>+</sup>-ICD 및 NAD<sup>+</sup>-ICD도 주로 간에 존재하는 만큼 간조직에 담즙울체가 있을 때는 그 활성도의 변동이 있을 것이다.

이 실험에서 흰쥐 담즙울체간의 cytosolic NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 42 일까지 현저한 감소를 나타내었으며 mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도도 총담관결찰 후 12 시간부터 42 일까지 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 2 일부터 42 일까지 현저한 증가를

나타내었다.

이와 같이 이 실험에서 관찰한 NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 흰쥐의 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되었으며 반면에 담즙울체간의 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 증가되었다. 특히 담즙울체간에서 그 활성도가 증가 또는 감소하는 효소들이 많다는 보고를 볼 때 이 실험에서 관찰한 NADP<sup>+</sup>-ICD는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소하는 효소이며 NAD<sup>+</sup>-ICD는 그 활성도가 증가하는 효소라 하겠다.

담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 간세포는 기능 장애를 받을 뿐만 아니라 담즙울체의 시간이 경과함에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타난다 (Desmet, 1979), 그리고 흰쥐의 담즙울체간에서 조직 소견을 관찰한 Moritz & Snodgrass (1972), Kountouras *et al.* 1984, 장대성 외 (1987) 및 김효석 외 (1989)의 보고를 보면 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과했을 때는 많은 간세포들이 괴사 현상을 나타내었으며 동시에 담도세포도 증식되기 시작하였다고 하였다. 그리고 1 일 후에는 간의 전부위에 괴사현상이 확산되고 괴사 부위는 염증세포의 침윤이 보였다고 하였으며 이후 2 주 경에는 괴사현상이 약간 감소되는 반면에 담도세포의 증식이 증가되고 섬유화가 시작되었다고 하였다. 그리고 이후 6 주부터는 초기의 경화성 변화가 나타났다고 하였다.

이 실험에서 흰쥐의 총담관을 결찰했을 때 혈청의 NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 12시간부터 3 일까지 급격한 증가를 나타내었으며 혈청의 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었다.

폐쇄성 황달환자의 혈청에서 NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도가 현저한 증가를 나타내며 특히 간질환 환자의 혈청에서 NADP<sup>+</sup>-ICD의 활성도가 증가된다 는 것이 간세포의 괴사를 암시해 준다는 설 (Kachmar & Moss, 1976)과 흰쥐의 총담관을 결찰했을 때 12시간 후부터 1 주일 경 까지의 담즙울체간에서 심한 괴사 현상을 나타낸다는 보고 (Moritz & Snodgrass, 1972)가 있고 보면 이

실험에서 총담관을 결찰했을 때 혈청의 ICD 활성도가 증가하는 것은 간괴사와 밀접한 관계가 있다 고 생각된다. 즉 NADP<sup>+</sup>-ICD는 간의 괴사가 심한 시기의 담즙울체간에서 혈중으로 다량 누출되어 혈중에 그 활성도가 증가되는 효소라 하겠다. 그러나 담즙울체간에서 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도가 증가되는 것은 무엇이라 분명하게 설명하기는 어려우나 혹 생체방어 기전의 한가지로 시트르산 회로 반응의 정상적 운용을 위해  $\alpha$ -ketoglutarate의 생성량을 정상 또는 그 이상으로 증가시키기 위한 것이 아닌가 생각된다.

이 실험에서 흰쥐의 총담관을 결찰했을 때 간세포질의 총담즙산 농도는 총담관결찰후 12 시간부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었다. 그리고 총담관결찰 후 혈청의 총담즙산 농도는 실험 전 기간 동안 현저한 증가를 나타내었다. 바로 이 성적에서 혈청의 총담즙산 농도가 실험 전 기간 동안 현저히 증가한 것은 당연하다고 생각된다. 왜냐하면 총담관 결찰시에는 담즙울체가 야기되므로 혈중에 담즙산이 증가될 수 밖에 없는 것이다. 그리고 간세포질의 담즙산 농도는 총담관 결찰 후 12 시간부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었는데 왜 비교적 초기에만 간세포질의 담즙산 농도가 증가되었는지 이 실험만으로는 분명하게 설명하기는 어렵다. 그러나 담즙산들의 체내축적이 간괴사를 초래한다는 보고 (Miyai *et al.*, 1971; King & Schoenfield, 1972; Palmer, 1972; Fisher *et al.*, 1982; Okun *et al.*, 1982; Heuman *et al.*, 1991) 와 담즙울체시 비교적 초기에 간괴사가 심하다는 형태학적 결과 (Moritz & Snodgrase, 1972)를 볼 때 이성적은 담즙산들의 체내축적이 간괴사를 초래한다는 사실 (Kachmar & Moss, 1976)을 더욱 뒷받침하는 자료라 할 수 있다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험성적으로 볼 때 흰쥐 담즙울체간에서 NADP<sup>+</sup>-ICD는 그 활성도가 감소하는 효소이며 NAD<sup>+</sup>-ICD는 그 활성도가 증가하는 효소라 생각된다. 그리고 이들 효소는 담즙울체로 간괴사가 심할 때 혈중 유출이 증가되는 효소이며 아울러 이런 현상은 간세포질 내 담즙산의 저류와 유관한 것으로 생각된다.

## 요약

담즙울체간에서 NADP<sup>+</sup>- 및 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도 변동을 알아보기 위하여 시행한 실험으로서 흰쥐의 총담관을 결찰하고 12 시간부터 42 일까지의 담즙울체간에서 cytosolic 및 mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD 및 mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도와 혈청의 NADP<sup>+</sup>- 및 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도를 측정하는 한편 담즙울체간의 세포질과 총담관결찰 후 혈청에서 총담즙산의 농도도 함께 측정하였다.

흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 cytosolic NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 42 일까지 현저한 감소를 나타내었으며 mitochondrial NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도도 총담관결찰 후 12 시간부터 42 일까지 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 mitochondrial NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 2 일부터 42 일까지 현저한 증가를 나타내었다.

총담관을 결찰한 흰쥐 혈청의 NADP<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 12 시간부터 3 일까지 현저한 증가를 나타내었으며 혈청의 NAD<sup>+</sup>-ICD 활성도는 총담관결찰 후 1 일부터 7 까지 현저한 증가를 나타내었다.

총담관을 결찰한 흰쥐에서 간세포질의 총담즙산 농도는 총담관결찰 후 12 시간부터 7 일까지 현저한 증가를 나타내었으며 혈청의 총담즙산 농도는 실험 전기간 동안 현저한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 흰쥐 담즙울체간에서 NADP<sup>+</sup>-ICD는 그 활성도가 감소하는 효소이며 NAD<sup>+</sup>-ICD는 그 활성도가 증가하는 효소라 생각된다. 그리고 이들 효소는 담즙울체로 간괴사가 심할 때 혈중으로 유출이 증가하는 효소이며 아울러 이런 현상은 간세포질 내 담즙산의 저류와 유관한 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 곽춘식: 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. *경북의대잡지* 1980;21(1):126-134.
- 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포분획법 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, 이수형: 흰쥐 담즙울체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. *한국생화학회지* 1992;25(3):251-261.
- 곽춘식, 장억규: 흰쥐 담즙울체간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. *계명의대논문집* 1985;4(1):1-27.
- 권용철, 문교철, 곽춘식: 흰쥐 담즙울체간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase 및 Glutathion peroxidase의 활성도. *계명의대논문집* 1990;9(2):159-170.
- 김여희, 곽춘식, 정성광: Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Alanine Aminotransferase 활성에 미치는 영향. *계명의대논문집* 1989;8(1):113-121.
- 김여희, 곽춘식, 정성광: Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Aminotransferase 활성에 미치는 영향. *계명의대논문집* 1990;9(1):87-95.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준모:

- 총담관결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. *대한내과학회잡지* 1989;36(4):459-470.
- 문교철, 곽춘식: 흰쥐 담즙울체간의 Momoamine Oxidase의 활성치. *계명의대논문집* 1989;8(1):69-77.
- 박은미, 곽춘식: 흰쥐 담즙울체간의  $\alpha$ -D 및  $\beta$ -D-Glucosidase와  $\beta$ -D-Glucuronidase의 활성도. *계명의대논문집* 1992;11(1):59-71.
- 장대성, 곽정식, 손태중: 총담관결찰에 의한 담관 증식성 변화의 초미형태학적 연구. *경북의대잡지* 1987;28(2):113-122.
- 정상호, 곽춘식: 흰쥐 담즙울체간의 Leucine Aminopeptidase의 활성치. *계명의대논문집* 1987;6(2):210-221.
- Bauer JD: *Clinical laboratory methods*. ed 9, ST Louis, Mosby, 1982, p 586.
- Bell JL, Baron DN: A colorimetric method for determination of isocitrate dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 1960;5:740-747.
- 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.
- Dixon M, Webb EC: *Enzymes* 3 ed, London, Longman Group, 1979, pp 634-636.
- Fisher RL, Anderson DW, Boyer JL, et al: A prospective morphologic evaluation of hepatic toxicity of chendeoxycholic acid in patients with cholelithiasis; the National Cooperative Gallstone Study. *Hepatology* 1982;2(2):187-201.
- 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 labeled 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.
- Heuman DM, Mills AS, Mecall J, Hyleman PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR: Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. *Gastroenterology* 1991;100(1):203-211.
- 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.
- Kachmar JF, Moss DW: Enzymes, in Tietz NW (ed); *Fundamentals of Clinical Chemistry*, ed 2, Philadelphia, WB Saunders, 1976, pp 660-664.
- 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 34-35.
- King JE, Schoenfield LJ: Lithocholic acid, cholestasis, and liver disease, *Mayo Clin Proc* 1972;47(10):725-730.
- 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, LDH) in serum and tissue extracts in cardiac hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958;10:303-310.
- Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kami S, Yamanaka M: Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clin Chem* 1981;27(8):1352-1356.
- Mayes PA: The citric acid cycle; The catabolism of acetyl-CoA, in Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW (eds); *Harper's Biochemistry*, ed 24, Norwalk, Appleton & Lange 1996, pp 168-175.
- Miyai K, Price VM, Fisher MM: Bile acid metabolism in mammals. Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acids in the rat. *Lab Invest* 1971;24 (4):292-302.
- Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived from liver cell fraction. III. Response to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972;62(1):93-100.
- Okum R, Goldstein LI, Van Gelder GA, Goldenthal EI, Wazeter FX, Giel RG: National Cooperative Gallstone Study; nonprimate toxicology of chenodeoxycholic acid, *J Toxicol Environ Health* 1982;9 (5-6):727-741.
- Palmer RH: Bile acids. liver injury, and liver disease. *Arch Intern Med* 1972;130(4): 606-617.
- Park EM, Mun KC, Kwak CS:  $\alpha$ -D-Mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase activities in cholestatic rat liver induced by bile duct ligation. *Korean J Biochem* 1994;26(4):197-201.
- Plaut GWE: Isocitrate dehydrogenase, in Boyer PF, Lardy H, Myrback K (eds); *The Enzymes*, ed 2, New York, Academic Press, 1963, Vol 7, pp 105-126.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;136(2): 491-495.
- Shen WC, Mauk L, Colman RF: Physicochemical properties of the diphospho-

pyridine nucleotide-specific isocitrate dehydrogenase of pig heart. *J Biol Chem* 1974;249(24):7942-7049.

Sherlock S, Dooley J: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Cambridge, Blackwell Scientific Publications, 1993, pp 370-389.

Toda G, Ikeda M, 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.

Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, London, Edward Arnold, 1976, pp 56-58.