

흰쥐 담즙율체간의 Superoxide Dismutase의 활성 *

계명대학교 의과대학 생화학교실

박소경 · 곽춘식

Superoxide Dismutase in Bile Duct Ligated Rats

So Kyung Park, M.D. and Chun Sik Kwak, Ph.D.

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

=Abstract=

The activity change of superoxide dismutase and its mechanism in rat cholestatic liver were evaluated. The activity of superoxide dismutase was measured in the liver which obtained from common bile duct ligated rats (CBDL) and sham operated rats, respectively. And mRNA expression of this enzyme was also measured by reverse transcription-polymerase chain reaction in each group.

The activity of superoxide dismutase was higher in the CBDL group, but mRNA expression of superoxide dismutase was similar to the sham operated group. These results indicate that increased activity of superoxide dismutase in the cholestatic liver was due to the increased catalytic activity for this enzyme. The increase of superoxide dismutase activity may result in hepatic damage in the cholestasis by activating hydrogen peroxide release.

Key words: Bile duet ligation, Superoxide dismutase

서 론

간조직에 담즙율체가 야기되는 경우는 원발성 담즙성 간경변, 담관염, 담즙율체형 간염, 선천성 담도 폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도 폐쇄 등이다 (Halsted, 1976).

이들 질환에서 간에 담즙율체가 초래되면 간조직은 염증, 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등 (Desmet, 1994)이 나타나며 동시

에 간기능도 장애가 나타난다 (Halsted, 1976; Sherlock & Dooley, 1993). 흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙율체가 야기되며 시간이 경과됨에 따라 간은 염증, 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며 (Moritz & Snodgrass, 1972; 장대성 외, 1987; 김효석 외, 1989) 이때 간기능도 장애가 오는 것 (Toda *et al*, 1980)으로 알려져 있다. 따라서 간 담도 질환의 생화학적 연구를 위한 실험적

*이 논문은 계명대학교 대학원 학생 학술연구장학금에 의하여 이루어 졌음.

model로는 총담관을 결찰한 쥐의 간을 널리 사용하고 있다.

한편, 활성산소 (free radical)는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자로 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임없이 활성산소를 생성한다 (Moslen, 1994; Puchard & Kelly, 1996). 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 활성산소는 반응성이 높아 생체 분자들의 구조와 기능을 변화시켜 신체에 손상을 끼치며 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 작용한다 (Moslen, 1994; Puchard & Kelly, 1996). 이러한 통제되지 않는 과잉 활성산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥 경화 (Reaven, 1994), 심장 질환 (Ferrari, 1994), 암 (Ames & Shigenaga, 1993) 및 노화 (Ames & Shigenaga, 1993) 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며 또한 간 등의 소화기계 질환에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Yagi, 1994). 활성산소 중 가장 먼저 생성되는 것은 superoxide 음이온인데 (Halliwell & Gutteridge, 1989; Murray, 1996; Babior *et al.*, 1997). 이 superoxide 음이온은 superoxide dismutase의 작용을 받아 과산화수소가 된다 (Halliwell & Gutteridge, 1989; Murray, 1996; Babior *et al.*, 1997). 즉, 생체는 활성산소에 의한 산화적 손상에 대하여 이를 방어하는 1차적 항산화제로써 항산화 효소계를 가지고 있는데 이들 항산화 효소 중 가장 먼저 항산화 반응에 관여하는 것이 superoxide dismutase이다.

따라서 흰쥐의 총담관을 결찰하여 간에 담즙율체를 야기시키면 염증, 고사 및 섬유화 등을 비롯한 각종 변화가 유발 될 것이고 이에 따르는 활성산소 대사의 변화를 유발할 것이다. 따라서 담즙율체간에서는 활성산소 대사에서 가장 중요하고 초기에 반응하는 효소인 superoxide

dismutase의 활성 변화가 있을 것이다.

이 연구에서는 담즙율체를 야기하고 2주 경과한 쥐의 간에서 superoxide dismutase의 활성을 측정하고 또한 이 효소에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하여 superoxide dismutase 활성 변동의 원인을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280-320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 각 군을 5마리로 하였다. 가수술군은 가수술 후 14일에 실험한 군으로 하였으며 총담관 결찰군은 총담관 결찰 후 14일에 실험한 군으로 하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료 주식회사의 제품을 자유로이 먹도록 하였다. 총담관 결찰술과 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 일정한 시간에 시행하였으며 수술은 쥐를 약 12시간 금식 시킨 후 ether 마취하에서 무균 상태를 유지하면서 실시하였다.

총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄 상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

2. 방법

1) Superoxide dismutase의 활성도 측정

간 세포질에서 superoxide dismutase 활성 측정은 xanthine oxidase를 superoxide anion 발생

system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium가 환원되는 양을 측정하는 Sun *et al* (1988)의 방법을 사용하였다. 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액중의 nitroblue tetrazolium의 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

2) RNA 분리

쥐의 간 0.1 g을 RNazol-B 용액 (Bioteck Laboratory, USA) 1~2 ml로 완전히 균질화한 후 chloroform 100 μ l로 처리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하였다. 수용액 층의 RNA는 동량의 isopropanol을 처리한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전 회수하였다.

3) cDNA 합성

전체 RNA에 oligo d(T)₁₆, 10 \times buffer Ⅱ, MgCl₂, 10 mM dNTPs, 20 U/ μ l RNase inhibitor, 50 U/ μ l reverse transcriptase (Roche Molecular System, USA)를 첨가하여 최종 20 μ l가 되게 넣고 42°C에서 1시간동안 반응시키고, 역전사효소의 활성을 제거하기 위해 99°C에서 5분간 열변성하여 cDNA합성반응을 종료하였다.

4) 중합효소 연쇄반응

쥐의 Cu/Zn superoxide dismutase를 지시하는 mRNA에 대한 염기 서열을 확인한 후 superoxide dismutase의 sense primer로 5'-GAGCAGAAGGCAAGTGGTGA-3'와 antisense primer로 5'-TAGCAGGCCAGCAGATGAGT-3'의 서열이 되도록 primer를 (주) 바이오니아에 주문 제작하였으며 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 superoxide dismutase mRNA의 발현 여부를 조사하였다.

중합효소 연쇄반응은 합성된 cDNA 1.3 μ l에 10 \times buffer Ⅱ, MgCl₂, 10 mM dNTPs, primer, 5

U/ μ l Taq polymerase, reverse transcription product를 첨가하여 최종 20 μ l가 되게 하였다. DNA 증폭은 Thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)에서 94°C에서 5분간 열처리한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 하여 총 34회 시행한 후 72°C에서 5분간 extension 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐의 간에서 superoxide dismutase에 대한 449 base pair짜리 band를 확인하여 superoxide dismutase의 발현 여부를 확인하였다.

5) 전기영동

1.5% agarose gel에 1 \times TAE (Tris base, glacial acetic acid, 0.5 M EDTA) 완충액과 최종농도 0.3 μ g/ml ethidium bromide를 사용하였으며, 중합효소 연쇄반응 반응물 20 μ l와 100 bp size marker (GibcoBRL, USA) 5 μ l를 100 V (12 \times 14 cm, 4.5 V/cm) 직류 하에서 30분 동안 전기영동한 후 UV 상에서 사진으로 기록하였다.

6) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 발현

Cu/Zn superoxide dismutase에 대한 실험 결과를 검정하기 위하여 대조군으로 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. GAPDH의 sense primer의 염기 서열은 5'-ATCACTGCCACTCAGAAGAC-3'과 antisense primer로 5'-CTTGCTCTCAGTATCCTTGC-3'이 되도록 (주) 바이오니아에 주문 제작하였으며 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 GAPDH mRNA의 발현 여부를 조사하였다.

PCR은 합성된 cDNA 1.3 μ l에 10 \times buffer Ⅱ, MgCl₂, 10 mM dNTPs, primer, 5 U/ μ l Taq polymerase, reverse transcription product를 첨가하여 최종 20 μ l가 되게 하였다.

DNA 증폭은 Thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)에서 94°C에서 5분간 열처리한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 하여 총 30회 시행한 후 72°C에서 5분간 extension 반응을 추가하였다. 이러한 반응을 통하여 쥐의 간에서 GAPDH에 대한 512 base pair짜리 band를 확인하여 GAPDH의 발현 여부를 확인하였다.

결 과

간 cytosol의 superoxide dismutase 활성도는 대조군인 가수술군에서는 24.82 ± 10.23 unit/min mg protein 이었으며 총담관 결찰군에서 38.18 ± 5.07 unit/min mg protein으로 총담관 결찰군에서 유의한 증가를 보였다 ($P < 0.05$, Fig. 1). 1

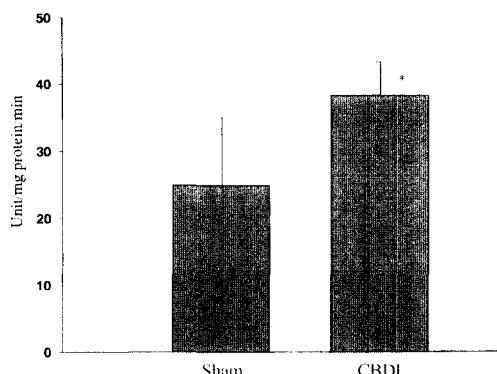


Fig. 1. Superoxide dismutase activity in common bile duct ligated rats.
Data are expressed as mean \pm SD from 5 rats in each group.
Significant difference from sham operated group ($*p < 0.05$).
Sham: sham operated group, CBDL:common bile duct ligated group

Superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 정도는 Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System에서 읽은 superoxide dismutase에 대한

density를 각각의 GAPDH density로 나누어 relative index를 구하여 계산하였다. 양군 사이의 relative index를 비교했을 때 대조군인 가수술군은 1.05 ± 0.04 였고, 총담관 결찰군에서는 1.00 ± 0.08 로 양군 간의 유의한 차이는 없었다 (Fig. 2).

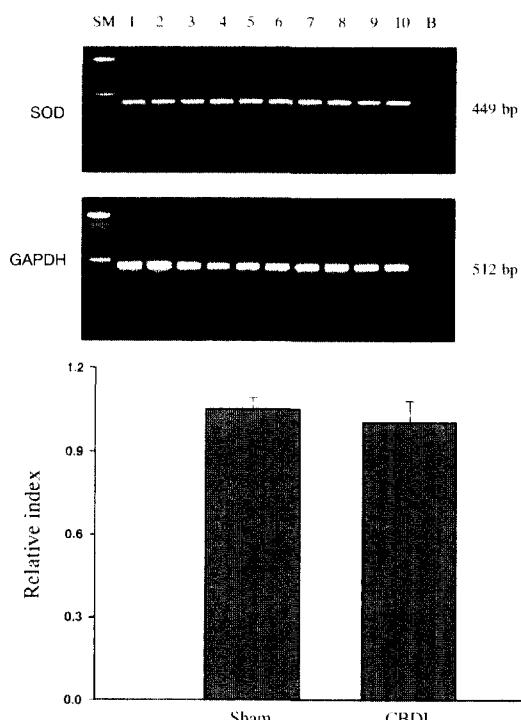


Fig. 2. mRNA expression for superoxidized dismutase in common bile duct ligated rats.
Relative index was defined as the ratio between SOD and GAPDH. SM:size marker, 1 to 5: sham operated rats (Sham), 6 to 10: common bile duct ligated rats (CBDL), B: blank, SOD: superoxide dismutase, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

고 칠

정상인에서 활성 산소의 생성은 세포내의 항

산화계에 의해 평형을 유지하고 있다 (Halliwell & Gutteridge, 1989; Murray, 1996; Babior *et al.*, 1997). 세포질내의 superoxide는 superoxide dismutase에 의해 과산화수소로 바뀌어 지며 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 인체에 무해하게 바뀌어 진다 (Halliwell & Gutteridge, 1989; Murray, 1996; Babior *et al.*, 1997). 이렇게 활성산소를 제거하는 반응의 시작은 superoxide dismutase의 작용과 더불어 시작된다고 할 수 있으며 활성산소의 제거 반응에서 가장 중요한 효소가 superoxide dismutase라 할 수 있을 것이다. 즉, superoxide dismutase는 superoxide anion을 과산화수소로 바꾸어 줌으로써 활성산소의 처리에 가장 먼저 작용하고 중요한 역할을 하는 효소이다.

한편 간조직에 담즙을 체가 야기되는 경우는 원발성 담즙성 간경변, 담관염, 담즙을 체형 간염, 선천성 담도 폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도 폐쇄 등 (Halsted, 1976)이며 이들 질환에서 간에 담즙을 체가 초래되면 간조직은 염증, 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등 (Desmet, 1994)이 나타나며 동시에 간기능도 장애가 나타난다 (Halsted, 1976; Sherlock & Dooley, 1993). 흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙을 체가 야기되며 시간이 경과됨에 따라 간은 염증, 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며 (Moritz & Snodgrass, 1972; 장대성 외, 1987; 김효석 외, 1989) 이때 간기능도 장애가 오는 것 (Toda *et al.*, 1980)으로 알려져 있다. 이렇게 간조직에 염증, 괴사 등의 변화가 일어나면 이들 간 세포로부터 핵산 대사를 특히 purine nucleotide들이 방출되고 이는 xanthine oxidase의 기질 (Leibovitz & Siegel, 1980; Rodwell, 1996)이 되어 xanthine oxidase의 활성을 유도한다. 이러한 xanthine

oxidase의 활성 증가는 superoxide 음이온의 생성을 유발 (Leibovitz & Siegel, 1980; Rodwell, 1996)하게 된다.

담즙을 체간에서는 xanthine oxiadsae의 활성 증가와 함께 superoxide 음이온의 생성이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다 (Mun *et al.*, 1996). 이러한 superoxide 음이온이 superoxide dismutase의 기질이 되는 만큼 superoxide dismutase의 활성 증가를 유도할 것으로 생각된다. 따라서 이 실험 결과 담즙을 체간에서 superoxide dismutase의 활성이 증가되었는데, 이는 기질인 superoxide 음이온의 증가에 기인된 것으로 생각된다. 또한 Ichikawa *et al* (1994)에 따르면 superoxide dismutase의 활성 증가는 과산화수소의 과량 생성을 야기한다고 한다. 따라서 이 효소의 활성의 증가는 과산화수소의 증가를 가져오게 되고 이는 더욱 더 간 손상 야기하게 될 것으로 생각된다.

그리고 이 실험에서 superoxide dismutase에 대한 RT-PCR 결과 superoxide dismutase에 대한 mRNA 발현은 대조군과 큰 차이가 없었다. 이는 담즙을 체간에서 superoxide 음이온의 증가로 이 효소에 대한 mRNA에 대한 발현 요구가 있더라도 담즙을 체간에서는 superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 없이 그 활성이 증가됨을 의미한다. 즉, 이는 담즙을 체간에서 superoxide dismutase의 활성 증가는 합성의 증가에 기인된 것이 아니라 촉매 효율의 증가에 기인된 것으로 생각된다.

따라서 이 실험의 결과와 문헌적 고찰을 종합해 보면 담즙을 체간에서는 superoxide dismutase에 대한 mRNA의 발현 증가 없이 촉매 효율의 증가로 인해 이 효소의 활성이 증가되어 있는 것으로 생각되며, 이러한 superoxide dismutase의 활성 증가는 반응 산물인 과산화수소의 증가를 가져오게 되고 이는 더욱 더 간 손

상 야기하게 될 것으로 생각된다.

요 약

담즙율체성 간 손상에서 superoxide dismutase의 활성 변화와 그 변화의 원인을 파악하고자 흰쥐에서 총담관을 결찰한 14일에 항산화 효소인 superoxide dismutase의 활성도를 측정하고 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction)을 통하여 그 원인을 분석하였다. 총담관 결찰군에서 superoxide dismutase 활성이 증가되었으나 이 효소에 대한 mRNA 발현에는 변화가 없었다.

담즙율체성 간 손상이 있을 때는 superoxide dismutase의 활성은 이 효소의 합성 증가가 아니라 촉매 효율의 증가에 기인되어 증가되는 것으로 생각되며 이러한 활성 증가는 과산화 수소의 양을 증가시켜 담즙율체 간에서 간손상을 증가시키는 하나의 원인이 되리라 생각된다.

참 고 문 헌

김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준
모: 총담관 결찰시 간세포의 초미형태학적
변화. 대한내과학회지 1989; 36: 459-470.

장대성, 곽정식, 손태중: 총담관결찰에 의한 담
관증식성 변화의 초미형태학적 연구. 경북의
대잡지 1987; 28: 113-117.

Ames BN, Shigenaga MK: Oxidants are a major
contributor to cancer and aging. Halliwell B,
Aruoma OI: *DNA and free radicals*. New York,
Ellis Horwood, 1993, pp 1-5.

Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM:
The NADPH oxidase of leukocytes: The
respiratory burst oxidase. Scandalios JG:

*Oxidative stress and the molecular biology of
antioxidant defenses*. New York. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, 1997, pp 737-783.

Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid
peroxidation. Colowick SP, Kaplan NO: *Methods
in enzymology*. Vol 52, New York, Academic
Press, 1978, pp 302-310.

Desmet VJ: Cholestasis; Extrahepatic obstruction
and secondary biliary cirrosis. MacSween RNM,
Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC:
Pathology of the liver, 3rd ed, New York,
Churchill Livingstone, 1994, pp 425-474.

Ferrari R: Oxygen free radicals at myocardial
level: Effect of ischemia and reperfusion.
Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine.
A systems approach to laboratory technology,
clinical correlations, and antioxidant therapy*. New
York, Plenum Press, 1994, pp 99-112.

Halliwell B, Gutteridge JMC: Protection against
oxidants in biological systems: the superoxide
theory of oxygen toxicity. Halliwell B,
Gutteridge JMC: *Free radicals in biology and
medicine*. Oxford, Clarendon Press, 1989, pp 86
-187.

Halsted JA: *The laboratory in clinical medicine.
Interpretation and application*. London, Sannders
Co., 1976, pp 426-429.

Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal
antioxidant enzymes: their regulation and
function. *Kidney Int* 1994; 45: 1-9.

Leibovitz BE, Siegel BW: Aspects of free radical
reactions in biological systems: aging. *J Gerontol*
1980; 35: 45-56.

Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived
from liver cell fraction. II. Responses to bile duct
ligation in rats. *Gastroenterology* 1972; 62:

- 93-100.
- Moslen MT: Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, 1994, pp 17-27.
- Mun KC, Kwak CS, Kwon KY: The protective effect of allopurinol on cholestatic liver injury induced by bile duct ligation. *J Korean Med Sci* 1996; 11: 239-243.
- Murray RK: Red and white blood cells. Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW: *Harper's Biochemistry*, 24th ed, East Norwalk, Appleton & Lange, 1996, pp. 733-749.
- Punchard NA, Kelly FJ: Introduction. Punchard NA, Kelly FJ: *Free radicals. A practical approach*. Oxford, Oxford University Press, 1996, pp 1-8.
- Reaven PD: Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, 1994, pp 165-170.
- and antioxidant therapy. New York, Plenum Press, 1994, pp 113-128.
- Rodwell VW: Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides. Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW: *Harper's Biochemistry*, 24th ed, East Norwalk, Appleton & Lange, 1996, pp 370-385.
- Sherlock S, Doole J: *Diseases of the liver and biliary system*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1993, pp 370-389.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
- 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: 85-96.
- Yagi K: Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal and pancreatic disease. Armstrong D: *Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy*. New York, Plenum Press, 1994, pp 165-170.