

만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간의 Aryl Sulfotransferase I,II Isozyme의 활성에 미치는 영향

제명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학연구소

조경일 · 곽춘식

Effect of Common Bile Duct Ligation on Hepatic Aryl Sulfotransferase I, II Isozyme Activity in Chronic Ethanol Intoxicated Rats

Kyung Il Jo, M.D. and Chun Sik Kwak, Ph.D.

Department of Biochemistry,

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

=Abstract=

The drinking hazard in hepatobiliary disease was studied by the assays of liver cytosolic, mitochondrial, and microsomal aryl sulfotransferase I, II isozyme, in cholestasis induced by common bile duct (CBD) ligation after chronic ethanol intoxication with rats. The activity of serum aryl sulfotransferase I, II isozyme was also measured.

Liver mitochondrial aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in group of CBD ligation after chronic ethanol intoxication showed a greater decrease between the 3rd and the 14th day after CBD ligation than that in group of CBD ligation alone. However, the cytosolic I, II isozyme activity did not change.

The microsomal aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in the CBD ligation after chronic ethanol intoxication showed a greater decrease between the 7th and the 14th day after CBD ligation than that in the CBD ligation alone.

The serum aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in the CBD ligation after chronic ethanol intoxication showed a greater increase between the 2nd and the 14th day after CBD ligation than that in the CBD ligation alone.

The Vmax values of the liver mitochondrial and microsomal aryl sulfotransferase I, II isozymes in the CBD ligation after chronic ethanol intoxication showed a greater decrease at the 14th day after CBD ligation than that in the CBD ligation alone. However, the Km values of the above hepatic enzymes did not change.

The results indicate that the biosynthesis of the hepatic aryl sulfotransferase I, II isozyme is decreasing in chronic ethanol intoxication with cholestasis than in cholestasis alone. The increased activity of the serum aryl sulfotransferase I, II isozyme in chronic ethanol intxi-

cation with cholestasis than in cholestasis alone reflect that increased hepatic damages which cause this isozyme to leak into the blood in great quantity.

Key Words: Alcoholic intoxication, Aryl sulfotransferase, Cholestasis, extrahepatic

서 론

간은 물질대사의 주된 기관으로서 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 (Sherlock, 1985a) 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 생체 변환 (biotransformation)시켜 배설케 하는 기능을 가짐으로써 생체를 보호하고 있다 (Jakoby et al, 1982). 그러나 이런 기능을 가진 간이라 하더라도 장기간 많은 양의 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증 등이 초래될 수도 있다 (Wooddell, 1980; Sherlock, 1985b; Hall, 1994).

일반적으로 간담도 질환 시 음주는 유해하다고 하며 이 사실은 음주로 인한 간질환의 유발로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 그러나 아직도 그 생화학적 뒷바침은 충분치 않다.

간은 생체이물 (xenobiotic)들을 생체 변환시키는 주된 장기이므로 생체이물의 생체 변환 효소들이 다양 존재하며 (Jakoby et al, 1982) 특히 담즙을체로 간손상이 있을 때는 간에서 이 효소들의 활성도가 변동된다 (곽춘식, 1985; 곽춘식 외, 1988; 권용철 외, 1990; 곽춘식과 이숙형, 1992). 따라서 간담도 질환 시 음주를 하거나 주정 중독이 야기된다면 간조직에서 생체이물 생체 변환 효소의 활성도는 변동이 있을 것으로 생각된다.

Aryl sulfotransferase (3'-phosphoadenosylsulfate:phenol sulfotrans-

ferase, EC 2.8.2.1)는 phenol 화합물을에게 sulfate를 포합시켜 배설시키는 생체이물 생체 변환 효소로서 (Jakoby et al, 1980; Kim, 1984) 포유동물의 간에 주로 분포되어 있으며 (Banerjee & Roy, 1966; Hidaka et al, 1969; Campbell et al, 1987) 혈중에도 출현한다 (Anderson et al, 1991). 이 효소는 사람에서 2종, 쥐에서는 4종의 isozyme (I, II, III 및 IV)이 존재하며 (Jakoby et al, 1980; Sekura et al, 1981; Campbell et al, 1987), 간세포에서는 세포질, 미토콘드리아 및 내형질세망에 국재되어 있으며 (Christ & Walle, 1989; Falany et al, 1990; Ihm & Kim, 1997) 쥐에게 담즙을체를 야기시켰을 때 간의 미토콘드리아 와 마이크로솜 그리고 혈청에서는 그 활성도가 증가되고 세포질에서는 그 활성도가 감소되는 것 (Ihm & Kim, 1997)으로 밝혀져 있다.

이와 같이 생체이물 생체 변환 효소인 aryl sulfotransferase가 담즙을체 시 간조직에서 그 활성도가 변동되고 또한 담즙을체 시 주정 중독을 시키면 간손상이 심해진다는 보고 (정성광과 곽춘식, 1992; 김성수 외: 1993)가 있고 보면 만성 주정 중독 시 담즙을체가 야기된다면 이들 효소의 활성도는 심한 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 간담도 질환 시 음주의 유해함에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로써 만성 주정 중독을 시킨

쥐에게 총담관 결찰로 담즙울체를 야기시킨 후 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜과 혈청에서 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도를 측정하였으며 아울러 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 쥐의 간에서 이 효소의 Km치와 Vmax치도 함께 측정하여 이들 성적을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

2-Mercaptoethanol, 2-naphthol, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS), methylene blue, α -naphthyl sulfate potassium 및 단백질 표준액 ($10\text{ g}/100\text{ ml}$ bovine serum albumin)등은 Sigma사 (St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 시판하는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 채 중 $280\sim320\text{ g}$ 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 22군으로 나누었다. 즉 정상군 (1군), 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 총담관 결찰군 (총 5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 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 섭취시킨 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군 (총 5

군), 5% (v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 계속 5% (v/v) ethanol을 섭취시키면서 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 (총 5군) 등이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전 후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료 주식회사의 실험 동물 사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 물대신에 5% (v/v) ethanol용액 (Eagon *et al*, 1987)을 자유로이 먹게 하였다.

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

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

모든 실험 군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C 의 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.

3. 간세포의 분획

간의 세포 분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 7g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon pestle glass homognizer (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 (꽉춘식과 곽정식, 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

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

4. 효소 시료 조제

Aryl sulfotransferase I, II isozyme 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 단백질 양으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose 액에 혼탁시켜 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

혈청과 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도 측정은 시료와 함께 2-naphthol과 PAPS를 기질로 사용하여 37°C에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 1-naphthyl sulfate를 methylene blue

와 반응시켜 생성된 ion pair pigment를 chloroform으로 추출한 후 651 nm 파장에서 비색하여 효소의 활성도를 산출하는 Sekura *et al* (1981)의 법에 의하였으며 이때 사용한 완충액은 0.5 M sodium phosphate (pH 7.4) 완충액이었다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 1-naphthyl sulfate를 nmol로 나타내었다. 이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제된 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Varian, Cary 210)였다.

6. Km치 및 Vmax치의 측정

가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 쥐, 만성 주정 중독을 시킨 다음 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과된 쥐의 간세포 분획 시료들과 2종의 효소기질 중 PAPS를 선택하여 기질원액과 기질희석액을 제조한 후 이들 기질액과 2-naphthol 기질 원액을 사용하여 aryl sulfotransferase I, II isozyme 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 1/vi치를, 선택한 기질액의 기질농도로부터 1/[S]치를 계산하여 이중 역수도 (double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출 (Segel, 1976)하였다.

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.

8. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.05이하로 하였다.

결 과

1. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간 세포질의 aryl sulfotransferase I, II isozyme 활성도에 미치는 영향
쥐 간 세포질의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 1).

정상쥐의 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서도 간세포질의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 1).

2. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간 미토콘드리아의 aryl sulfotransferase I, II isozyme 활성도에 미치는 영향

쥐 간 미토콘드리아의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 2).

쥐 간 미토콘드리아의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 3일에는 약 20% ($P<0.01$), 7일에는 약 23% ($P<0.05$), 14일에는 약 100% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군을 비교했을 때는 별 차이가 없었다. 그러나 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 정상쥐의 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일에는 약 19% ($P<0.05$),

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(S) following operation	Aryl sulfotransferase I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	Sham	CBDL	(Normal; 0.29 ± 0.04	Ethanol; 0.25 ± 0.05)
1	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.07
2	0.29 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.23 ± 0.05
3	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.05	0.20 ± 0.06
7	0.29 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.19 ± 0.05
14	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.17 ± 0.04

All values are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group ; Sham : Sham operated rats, CBDL : Common bile duct ligated rats, Ethanol : Rats were given 5% (v/v) ethanol solution for 60 days.

7일에는 약 25% ($P<0.05$), 14일에는 약 56% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다 (Table 2).

3. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme 활성도에 미치는 영향

쥐 간 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한

군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

정상쥐의 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서도 간 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 유의한 변동을 나타내지 않았다. 그러나 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 정상쥐의 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial aryl sulfotransferase I, II activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(S) following operation	Aryl sulfotransferase I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 0.56±0.03 Ethanol; 0.53±0.05)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	0.57 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.52 ± 0.06	0.53 ± 0.08
2	0.56 ± 0.05	0.64 ± 0.06	0.50 ± 0.05	0.55 ± 0.07
3	0.56 ± 0.03	0.67 ± 0.05 ^b	0.51 ± 0.07	0.54 ± 0.09 ^g
7	0.56 ± 0.04	0.69 ± 0.08 ^a	0.49 ± 0.08	0.52 ± 0.12 ^g
14	0.57 ± 0.04	1.14 ± 0.12 ^c	0.45 ± 0.13	0.50 ± 0.15 ⁱ

All values are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. a, $P<0.05$ vs. Sham; b, $P<0.01$ vs. Sham; c, $P<0.001$ vs. Sham; g, $P<0.05$ vs. CBDL; i, $P<0.001$ vs. CBDL

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(S) following operation	Aryl sulfotransferase I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 0.74±0.03 Ethanol; 0.70±0.07)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	0.74 ± 0.04	0.72 ± 0.10	0.69 ± 0.08	0.69 ± 0.15
2	0.75 ± 0.03	0.70 ± 0.08	0.70 ± 0.11	0.67 ± 0.12
3	0.74 ± 0.05	0.71 ± 0.09	0.68 ± 0.07	0.65 ± 0.14
7	0.74 ± 0.03	0.76 ± 0.07	0.65 ± 0.09	0.62 ± 0.10 ^g
14	0.73 ± 0.05	0.81 ± 0.12	0.63 ± 0.10	0.56 ± 0.13 ^h

All values are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. g, $P<0.05$ vs. CBDL; h, $P<0.01$ vs. CBDL

관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 7일에는 약 18% ($P<0.05$), 14일에는 약 31% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다 (Table 3).

4. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 만성 주정 중독군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 4).

쥐 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 2일에는 약 40% ($P<0.001$), 3일에는 약 35% ($P<0.01$), 7일에는 약 28% ($P<0.01$), 14일에는 약 24% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 총담관 결찰 후 2일에는 약 51% ($P<0.001$), 3일에는 약

54% ($P<0.001$), 7일에는 약 56% ($P<0.001$), 14일에는 약 86% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그리고 이 효소의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 정상쥐의 총담관만 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일에는 약 20% ($P<0.05$), 7일에는 약 34% ($P<0.01$), 14일에는 약 73% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다 (Table 4).

5. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 간의 arylsulfotransferase I, II isozyme의 Km치 및 Vmax치의 변동

만성 주정 중독을 시킨 쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일의 간에서 aryl sulfotransferase I, II의 기질로 PAPS 사용하여 측정한 Km치 및 Vmax치의 변동은 Table 5와 같다. 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일의 담즙울체간에서 미토콘드리아 및 마이크로솜의 aryl sulfo-

Table 4. Effect of common bile duct ligation on serum aryl sulfotransferase I, II isozyme activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(S) following operation	Aryl sulfotransferase I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 2.78±0.19 Ethanol; 2.87±0.31)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	2.84 ± 0.26	3.05 ± 0.26	2.94 ± 0.33	3.36 ± 0.48
2	2.82 ± 0.22	3.94 ± 0.42 ^c	2.93 ± 0.29	4.43 ± 0.53 ^f
3	2.81 ± 0.24	3.79 ± 0.39 ^b	2.97 ± 0.32	4.56 ± 0.47 ^{f,g}
7	2.79 ± 0.25	3.57 ± 0.36 ^b	3.07 ± 0.35	4.78 ± 0.51 ^{f,h}
14	2.78 ± 0.23	3.46 ± 0.31 ^b	3.21 ± 0.37	5.97 ± 0.58 ^{f,i}

All values are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. b, $P<0.01$ vs. Sham; c, $P<0.001$ vs. Sham; f, $P<0.001$ vs. Ethanol + Sham; g, $P<0.05$ vs. CBDL; h, $P<0.01$ vs. CBDL; i, $P<0.001$ vs. CBDL

transferase I, II isozyme의 Km치를 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 총담관만 결찰한 군과 각각 비교했을 때 별 차이가 없었다 (Table 5). 그러나 이들 세포분획에서 aryl sulfotransferase, I, II isozyme의 Vmax치는 모두 그 대조군인 총담관만 결찰한 군에 비해 유의한 감소를 나타내었다 (Table 5).

고 찰

장기간 다량의 음주를 했을 때는 지방간, 간염 및 간경변증 (Wooddell, 1980 : Sherlock, 1985b : Hall, 1994)에 이환될 수 있으며, 주정 중독 간은 심한 형태학적 변화를 받는다 (Chang, 1985 : Chang, 1987 : Hall, 1994)고 한다. 주정 중독 간의 형태학적 변화는 주로 간세포의 미토콘드리아 와 내형질세망에서 관찰되며 미토콘드리아에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 cristae의 배열문란 (Chang,

1987; Hall, 1994) 등이고 내형질세망에서 나타나는 변화는 평활 내형질세망의 증식 (Chang, 1985; Hall, 1994)을 들 수 있으며 이외에도 간세포 피사를 수반하는 형태학적 변화 (Hall, 1994)도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상 시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생산 증가, pyruvate의 생성 감소, 지방산의 합성 촉진, 시트르산화로의 활성저하 및 지방산의 산화 감소 등 (Ellenhorn & Barceloux, 1988; Hall 1994)을 들 수 있다.

간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우들은 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄 등 (Halsted, 1976)이며 이와 같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 피사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등 (Desmet, 1994)이 나타날 뿐만 아니라 심한 간기능의 장애도 나타난다 (Halsted, 1976 ; Sherlock, 1985a).

주의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가

Table 5. Hepatic aryl sulfotransferase I, II isozyme kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat determined with 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate

Cell fractions	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
Km (mM)				
Mitochondria	1.63 ± 0.29	1.59 ± 0.43	1.67 ± 0.51	1.73 ± 0.55
Microsome	3.05 ± 0.40	2.96 ± 0.46	3.08 ± 0.46	3.16 ± 0.56
Vmax (nmol 1-naphthyl sulfate min⁻¹ mg protein⁻¹)				
Mitochondria	0.68 ± 0.07	1.22 ± 0.10 ^c	0.56 ± 0.15	0.59 ± 0.17 ⁱ
Microsome	0.90 ± 0.05	1.03 ± 0.12	0.80 ± 0.09	0.70 ± 0.15 ^h

Michaelis-Menten constants for aryl sulfotransferase I, II isozyme were determined using 3'-phosphoadenosine 5'phosphosulfate and 2-naphthol at 37°C for mitochondrial, and microsomal fractions of male rat livers at the 14th day after operation.

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. c, P<0.001 vs. Sham; h, P<0.01 vs. CBDL; i, P<0.001 vs. CBDL

야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙율체간은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며 (Moritz & Snodgrass, 1972 ; Kountouras *et al.*, 1984; 장대성 외, 1987 ; 김효석 외, 1989) 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것 (Kaplan & Righetti, 1970 ; Righetti & Kaplan, 1971 ; Toda *et al.*, 1980 ; 꽈춘식과 이숙형, 1992)으로 알려져 있다. 따라서 간담도 질환의 생화학적 연구를 위한 실험적 방법으로 널리 이용하는 것이 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙율체간을 만드는 것이다.

간의 배설기능에 장애가 오면 간은 담즙율체가 야기되며 (Sherlock, 1985a) 이때 담즙율체간에서는 각종 생체이물 생체 변환 효소들의 활성도가 증감되는 것으로 알려져 있다. 즉 담즙율체간에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소는 마이크로솜의 glutathione S-transferase (권용철 외, 1990), xanthine oxidase (꽈춘식, 1985), 마이크로솜의 ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase (꽈춘식 외, 1988), 미토콘드리아 및 마이크로솜의 aryl sulfotransferase (Ihm & Kim, 1997) 등이며 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소는 세포질 및 미토콘드리아의 glutathione S-transferase, glutathione peroxidase (권용철 외, 1990), monoamine oxidase (문교철과 꽈춘식, 1989), catalase, alcohol dehydrogenase (꽈춘식 외, 1988), carboxylesterase, arylesterase, cholinesterase (꽈춘식과 이숙형, 1992), 세포질의 aryl sulfotransferase (Ihm & Kim, 1997) 등으로서 이를 효소의 활성도 증감은 주로 담즙율체간에서 그 합성이 증감되므로서 나타난 결과 (꽈춘식, 1985 ; 꽈춘식 외,

1988 ; 문교철과 꽈춘식, 1989 ; 권용철 외, 1990 ; 꽈춘식과 이숙형, 1992 ; Ihm & Kim 1997)라 한다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 ethanol이 acetaldehyde로 산화되고 다시 acetate로 산화되어 이용되는 것 (Bosron & Li, 1980 ; Lieber, 1985)이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 acetaldehyde는 간세포의 괴사를 초래하는 물질 (Sherlock, 1985b)로 알려져 있고 또한 주정 중독 시 심한 형태학적 변화가 초래되는 (Chang, 1985 ; Chang, 1987) 만큼 담즙율체와 주정 중독이 병행된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것이며 또한 심하다는 보고도 있다 (정성광과 꽈춘식, 1992 ; 김성수 외, 1993).

흰쥐에서 만성 주정 중독과 담즙율체로 간 조직의 손상이 심해질 때는 생체이물 생체 변환 효소들의 활성도가 변동이 심하다 (꽈춘식 외, 1990 ; 정성광과 꽈춘식, 1992 ; 정성광 외, 1994 ; Mun & Kwak, 1999)고 한다. 즉 흰쥐에서 만성 주정 중독시 담즙율체가 야기되면 담즙율체만 있을 때보다 간에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소들은 xanthine oxidase(정성광 외, 1994), 세포질의 glutathione S-transferase, 세포질의 glutathione peroxidase (꽈춘식 외, 1990), 미토콘드리아의 monoamine oxidase (정성광과 꽈춘식, 1992) 및 마이크로솜의 aldehyde dehydrogenase (Mun & Kwak, 1999)를 들 수 있으며 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소는 마이크로솜의 glutathione S-transferase (꽈춘식 외, 1990), alcohol dehydrogenase 및 세포질의 aldehyde dehydrogenase (Mun & Kwak, 1999)를 들 수 있다. 그리고 만

성 주정 중독 시 담즙을체가 야기되면 담즙을체만 있을 때보다 혈청에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소들은 alcohol dehydrogenase (Mun & Kwak, 1999) 와 xanthine oxidase (정성광 외, 1994) 등을 들 수 있고 그 활성도가 감소되는 이 효소들은 carboxylesterase 와 arylesterase (Ahn & Kim, 1999a & 1999b)를 들 수 있다. 따라서 이 실험에서 그 활성도를 측정한 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 간에서 그 합성이 활발할 뿐만아니라 생체이물 생체 변환 효소로서 담즙을체시 간에서 그 활성도가 변동 (Ihm & Kim 1997)되는 만큼 만성 주정 중독 시 담즙을체가 야기되면 그 활성도의 변동은 더욱 심해질 것이다.

이 실험 결과에서 쥐 간의 세포질의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 그 대조군인 총담관만 결찰한 군을 상호 비교했을 때 이들 군 상호간에는 별 차이가 없었다. 그러나 쥐간의 미토콘드리아의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 상호 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 총담관 결찰 후 3일부터 14일에 유의하게 감소된 활성도를 나타내었다. 이 실험 결과에서 쥐간 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 상호 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 총담관 결찰 후 2일부터 14일에 유의하게 감소된 활

성도를 나타내었다.

이상의 결과를 볼 때 쥐간의 미토콘드리아 및 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 만성 주정 중독 시 담즙을체가 야기되면 담즙을체만 있을 때보다 그 활성도가 감소되는 효소라 생각된다.

이 실험에서 만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰한 후 14일군의 간에서 미토콘드리아 및 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 Km치는 변동이 없었다. 그러나 만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰한 후 14일군의 간에서 이 효소의 Vamx치는 총담관만 결찰한 군에 비해 유의하게 감소된 치를 나타내었다. 이와 같이 만성 주정 중독 시 담즙을체를 야기했을 때 이 효소의 Km치가 변동이 없으면서도 담즙을체만 시켰을 때 보다 그 활성도가 감소되고 또한 Vamx치가 감소된 것은 이 효소의 활성도 감소가 축매 효율의 감소라 보기는 어렵다. 따라서 만성 주정 중독 시 담즙을체가 야기되면 이 생체이물 생체 변환 효소는 담즙을체만 있을 때 보다 그 합성이 감소되는 것으로 생각된다.

이 실험에서 만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰했을 때 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 총담관 결찰 후 2일부터 14일에 유의한 증가를 나타내었으며 그 증가의 정도는 총담관만 결찰했을 때보다 더 현저하였다. 이 결과는 만성 주정 중독 시 담즙을체로 간손상이 심해지면 이 효소의 혈중 누출이 심해진다는 것을 나타낸 결과라 할 수 있다. 담즙을체간과 주정 중독 간은 괴사가 진행되는 간이며 (Moritz & Snodgrass, 1972 : 장대성 외, 1987 : 김효석 외, 1989 : Hall, 1994) 간의 괴사가 진행될 때는 간에서 각종 효소들의 누출이 심해진다 (Lind, 1958 : 곽춘식 외, 1988 : 김여희 외, 1990)고 하며, 또한 담

즙울체시 간에서 aryl sulfotransferase isozyme들의 누출이 심해져서 혈중에 그 활성도가 증가된다는 보고 (Ihm & Kim, 1997)가 있고 보면 이 실험에서 흰쥐에게 만성 주정 중독과 담즙울체를 병행시켰을 때 혈청에서 이 효소의 활성도가 담즙울체만 시켰을 때보다 증가된것은 이 효소의 혈중 누출이 담즙울체만 시켰을 때보다 더욱 심해진 것이라 생각된다.

이상 이 실험 결과 와 문현상의 지견으로 보아 간의 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을때보다 감소되는 효소로 생각된다. 또한 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간손상이 심해져서 간에서 혈중으로 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 누출이 더욱 증가되는 것으로 생각되며 이들 결과는 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 하면 간손상이 더욱 심해질 것이라는 것을 시사 해준다.

요 약

간담도 질환시 음주의 유해함에 대한 생화학적 배경의 일단을 알아보기 위하여 시행한 연구로서 쥐에게 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 담즙울체를 야기시킨 군과 총담관만 결찰하여 담즙울체를 야기시킨 군에서 간과 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성을 측정하였으며, 한편 만성 주정 중독을 시킨 쥐에게 총담관을 결찰한 후 또는 총담관만 결찰한 후 14일의 간에서 이 효소의 Km치 및 Vmax치도 측정하여 이를 성적을 양군간에 상호 비교하여 보았다.

쥐 간 미토콘드리아의 aryl sulfotrans-

ferase I, II isozyme의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 상호 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일부터 14일에 유의한 감소를 나타내었다.

쥐 간 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도를 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군을 상호 비교 했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 7일 및 14일에 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 간 세포질의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 이들 군 상호간에 별 차이가 없었다.

만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰한 군에서 혈청의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 활성도는 총담관 결찰 후 2일부터 14일에 유의한 증가를 나타내었으며 그 증가의 정도는 총담관만 결찰한 군보다 더 현저하였다.

만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰한 후 14일군의 간에서 미토콘드리아 및 마이크로솜의 aryl sulfotransferase I, II isozyme의 Km치는 변동이 없었다. 그러나 만성 주정 중독쥐의 총담관을 결찰한 후 14일군의 간에서 이 효소의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군에 비해 유의하게 감소된 치를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 간의 aryl sulfotransferase I, II isozyme은 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 감소되는 효소로 생각되며, 또한 만성 주정 중독 시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간 손상이 심해져서 간에서 혈중으로 aryl sul-

fotransferase I, II isozyme의 누출이 더욱 증가되는 것으로 생각된다. 또한 이들 성적은 담즙을 체로 간손상이 있을 때 음주를 하면 간손상이 더욱 심해질 것이라는 것을 시사해 준다.

참 고 문 헌

- 곽춘식 : 흰쥐 담즙을 체간의 Xanthine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4(2):125-130.
- 곽춘식, 곽정식 : 흰쥐 간세포분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986;5(1):45-53.
- 곽춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙을 체간에서의 알콜대사 효소들의 활성치. 계명의대논문집 1988;7(1):64-75.
- 곽춘식, 김여희, 조준승 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase 및 Glutathione Reductase 활성에 미치는 영향. 한국생화학회지 1990;23(2):251-262.
- 곽춘식, 이숙형 : 흰쥐 담즙을 체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. 한국생화학회지 1992; 25(3) : 251-261.
- 권용철, 문교철, 곽춘식 : 흰쥐 담즙을 체간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase 및 Glutathione Peroxidase의 활성도. 계명의대논문집 1990;9(2): 159-170.
- 김성수, 박성대, 곽춘식 : 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Cathepsin B,D,H 와 Acid Phosphatase 활성에 미치는 영향. 대한소화기병학회지 1993;25(4):696 -708.
- 김여희, 곽춘식, 정성광 : Ethanol 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Aminotransferase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1990;9(1):87-95.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용한, 정준

모: 총담관 결찰시 간세포의 초미형 태학적 변화. 대한내과학회 잡지 1989;36(4):459-470.

문교철, 곽춘식 : 흰쥐 담즙을 체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집 1989;8(1):69-77.

장대성, 곽정식, 손태중 : 총담관 결찰에 의한 담관증식성 변화의 초미형 태학적 연구. 경북의대잡지 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.

Ahn KW, Kim YH: Effects of common bile duct ligation on serum and hepatic carboxylesterase activity in ethanol intoxicated rats. *J Biochem Mol Biol* 1999a;32(4): 331-338.

Ahn KW, Kim YH: Effects of common bile duct ligation on serum and hepatic arylesterase activity in ethanol intoxicated rats. *Keimyung Med J* 1999b;18(3):371 - 386.

Anderson RJ, Garcia MJ, Liebentritt DK, Kay HD: Localization of human blood phenol sulfotransferase activities: novel detection of the thermostable enzyme in granulocytes. *J Lab Clin Med* 1991;118(5) :500-509.

Banerjee RK, Roy AB: The sulfotransferase of guinea pig liver. *Mol Pharmacol* 1966;2(1):56-66.

Bosron WF, Li TK: Alcohol dehydrogenase. Jakoby WB: *Enzymatic Basis of Detoxication*, New York, Academic Press, 1980, Vol 1, pp231-244.

- Campbell NR, Van Loon JA, Sundaram RS, Ames MM, Hansch C, Weinshilboum R: Human and rat liver phenol sulfotransferase: Structure-activity relationships for phenolic substrates. *Mol Pharmacol* 1987;32(6):813-819.
- 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.
- Christ DD, Walle T: Stereoselective sulfation of R, S-4 hydroxypropranolol by canine hepatic cytosol and partially purified phenolsulfotransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251(3):949-955.
- Desmet VJ: Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC: *Pathology of the Liver*, 3 ed., New York, Churchill Livingstone, 1994, pp425-474.
- Eagon PK, Willet JE, Seguiti SM: Androgen responsive functions of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology* 1987;93(6):1162-1169.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier Science Publishing, 1988, pp782-796.
- Falany CN, Vazquez ME, Heroux JA, Roth JA: Purification and characterization of human liver phenol-sulfating phenol sulfotransferase. *Arch Biochem Biophys* 1990;278(2):312-318.
- 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. Colowick SP, Kaplan NO: *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1957, Vol 4, pp708-731.
- Hall PM: Alcoholic liver disease. MacSween RNM, Anthony PA, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC: *Pathology of the Liver*, 3 ed., New York, Churchill Livingstone, 1994, pp317-348.
- Halsted JA: *The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application*. London, Sannders, 1976, pp426-429.
- Hidaka H, Nagatsu T, Yagi K: Formation of serotonin O-sulfate by sulphotransferase of rabbit liver. *Biochim Biophys Acta* 1969;177(2):354-357.
- Ihm JS, Kim YH: Thiosulfate sulfurtransferase and UDP-glucuronosyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *Exp Mol Med* 1997;29(4):197-201.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J: *Metabolic Basis of Detoxication. Metabolism of Functional Groups*. New York, Academic Press, 1982, pp5-317.
- Jakoby WB, Sekura RD, Lyon ES, Marcus CJ, Wang JL: Sulfotransferases. Jakoby WB: *Enzymatic Basis of Detoxication*, New York, Academic Press, 1980, Vol Ⅱ, pp199-228.
- 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, 1984, pp 266-267.
- 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.
- Lieber CS: Alcohol metabolism. Hall P: *Alcoholic Liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects*, Frome and London, Edward Arnold, 1985, pp1 -24.
- 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.
- Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived from liver cell fraction. II . Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972;62(1):93-100.
- Mun KC, kwak CS: Ethanol metabolizing enzymes in cholestatic rats with chronic ethanol intoxication. *Keimyung Med J* 1999;18(2):184-189.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effect of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136(2):491-495.
- Segel IH: *Biochemical Calculations*. 2 ed., New York Wiley and Sons, 1976, pp 214 -246.
- Sekura RD, Duffel MW, Jakoby WB: Aryl sulfotransferase. Jakoby WB: *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1981, Vol 77, pp197-206.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7 ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985a, pp79-80.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7 ed., Oxford Blackwell Scientific Publications, 1985b, pp346-360.
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, Oka H, Oda T: Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta* 1980;107(1-2):85-96.
- Wooddell WJ: Liver disease in alcohol addicted patients. Davidson SV: *Alcoholism and Health*, Century Boulevar, Aspen System, 1980, pp125-134.