

쥐에서 Taurocholate 부하에 의한 간의 Glyoxalase I의 유도

제명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학연구소

정상호 · 김여희 · 곽춘식

Induction of Hepatic Glyoxalase-I by Taurocholate in Rats

Sang Ho Chung, M.D., You Hee Kim, M.D., Chun Sik Kwak, Ph.D.

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

Abstract : The possible mechanisms of increased glyoxalase I (GLO-I) activity in cholestatic rat liver and serum were studied. These hepatic and serum enzyme activities were determined from the experimental rats with choledoco-caval shunt (CCS) or bile duct obstruction (BDO). The Michaelis-Menten constants in this hepatic enzyme were also measured. The activities of hepatic and serum GLO-I as well as the Vmax value of this hepatic enzyme were found to be increased significantly in both CCS plus taurocholic acid (TCA) injected group, and BDO plus TCA injected group than in each control group such as CCS alone and BDO alone. In addition, these serum and hepatic enzyme activities did not change in both the CCS plus taurooursodeoxycholic acid injected group and the BDO plus taurooursodeoxycholic acid injected group. On the other hand, the value of Km of the above hepatic enzyme did not change in any experimental group. Above results suggest that TCA induce the biosynthesis of GLO-I in the liver. The elevated activity of the serum GLO-I is believed to be caused by the increment of membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

Key words : Bile duct obstruction, Choledoco-caval shunt, Glyoxalase I, Taurocholic acid, Taurooursodeoxycholic acid

서 론

Glyoxalase I [(R)-S-lactoylglutathione methylglyoxal-lyase (isomerizing), EC 4.4.1.5, GLO-I]은 생체이

물 생체 변환 효소로서 주로 2-oxoaldehyde와 환원형 glutathione을 결합시켜 glutathione의 thiolester를 형성케 하는 반응을 촉매한다(Racker, 1951; Mannervik, 1980; Webb, 1992). GLO-I은 포유동물의 대부분의 조직(Han *et al.*, 1976; Mannervik, 1980; Stohlmacher & Haferland, 1980; Hayes *et al.*, 1989; Thornalley, 1990)과 적혈구(Uotila & Koivusalo, 1979; Mannervik, 1980), 백혈구(Gillespie, 1979; Thornalley & Bellavite, 1987), 혈장(Di Simplicio & Mannervik, 1983) 등에 분포되어 있으며 간에서는 세포질에 국재되어 있다(Elango *et al.*, 1978; Marmstal & Mannervik, 1979; Hayes *et al.*, 1989). GLO-I의 생리적 역할은 생체 내에서 생성되거나 장내세균이 합성하여 흡수된 2-oxoaldehyde 중 한 가지인 methylglyoxal에 환원형 glutathione을 결합시켜 (R)-S-lactoylglutathione을 생성케 함으로써 methylglyoxal의 독성을 없애는 것이다(Mannervik, 1980; Thornalley, 1990). 즉 methylglyoxal이 독성을 나타내는 것은 methylglyoxal이 반응성이 활발한 carbonyl기를 두 개 가지고 있기 때문에 생체 내에서 thiol 화합물과 반응하여 세포 증식을 억제하는 methylglyoxalic thiolester를 생성케 하기 때문이며 바로 이 GLO-I이 methylglyoxal를 생체 변환시킴으로써 그 독성을 없애는 것이다(Mannervik, 1980; Thornalley, 1990). 그리고 이 효소는 쥐에서 담즙울체가 야기되었을 때 간조직과 혈청에서 그 활성도가 증가되는 것으로 밝혀져 있다(변용준 외, 1995). 그러나 담즙울체간에서 GLO-I 활성도의 증가 기전을 규명한 보고는 아직 없다. 현재까지 생체이물 생체 변환 효소로서 담즙울체간에서의 활성도 변동 기전이 일부 밝혀져 있는 것은 arylesterase와 carboxylesterase(한병훈과 김여희, 1997 & 1998), cholinesterase(박소경과 곽춘식, 1999), monoamine oxidase 와 catechol-O-methyltransferase(도준영, 1998), alcohol dehydrogenase, catalase, microsomal ethanol oxidizing system 및 aldehyde dehydrogenase(신미정, 1998), arylamine N-methyltransferase와 thiol methyltransferase(이병욱, 1999; 이병욱과 곽춘식, 2000) 등이다. 즉 이들 중 arylesterase, carboxylesterase 및 cholinesterase(곽춘식과 이숙형, 1992), alcohol dehydrogenase와 catalase(곽춘식 외, 1988), monoamine oxidase와 catechol-O -methyltrans-

ferase(문교철과 곽춘식, 1989; Mun, 1996)는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되는 효소이며, 그 기전은 담즙울체로 간 세포 내에 증가된 taurocholic acid가 이들 효소의 합성을 억제하는 것(한병훈과 김여희, 1997 & 1998; 도준영, 1998; 신미정, 1998; 박소경과 곽춘식, 1999)이며 마이크로솜 ethanol oxidizing system 및 aldehyde dehydrogenase(곽춘식 외, 1988), benzoyl-transferase와 phenylacetyltransferase (Kim & Kim, 1999), arylamine N-methyltransferase와 thiol methyltransferase(주일, 1998)는 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙울체로 간 세포 내에 증가된 taurocholic acid가 이들 효소의 합성을 자극한다(신미정, 1998; 이병욱, 1999; 이병욱과 곽춘식, 2000)는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들에 대해서 taurocholic acid가 어떤 효과를 나타내는지를 알아낸다면 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들의 활성도 변동 기전은 그 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구는 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되는 GLO-I의 활성도 증가 기전을 알아 보기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰로 담관 폐쇄(bile duct obstruction)를 시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합(choledocho-caval shunt)을 시킨 직후에 담즙울체간에서 효소 유전자의 발현율을 변동시키는 것으로 추정하는 taurocholic acid (Ogawa *et al.*, 1990; 김성국과 김여희, 1997; 한병훈과 김여희, 1997 & 1998)와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 taurooursodeoxycholic acid (Ogawa *et al.*, 1990; 김성국과 김여희, 1997; 한병훈과 김여희, 1997 & 1998)를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 혈청과 간 세포질 분획에서 GLO-I의 활성도를 측정하는 한편 이 간 세포질 분획에서 이 효소의 Km치 및 Vmax치도 측정하였다. 이 실험 결과 taurocholic acid가 간에서 GLO-I의 합성을 유도하는 것으로 생각되는 성적을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

Methylglyoxal, reduced glutathione, S-lactoylglutathione, taurocholic acid (from ox bile, sodium salt, 이하 TCA라 함), taurooursodeoxycholic acid (sodium salt, 이하 TUDCA라 함), GLO-I (grade X, from yeast) 및 단백질 표준액(10 g/100 mL bovine serum albumin) 등은 Sigma사(St. Louis, 미국)의 제품을 사용하였으며 그외 일반 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4 주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 15군으로 나누었다. 즉 정상군(1군), 가수술군은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였고 총담관 폐쇄군은 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였으며, 총담관 폐쇄와 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μmol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다. 총담관 폐쇄와 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μmol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였고 총담관 대정맥문합을 한 군은 총담관 대정맥문합을 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였으며 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μmol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다. 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μmol)를 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다.

사료는 시판되는 실험동물 사료(삼양유지사료주식회사)를 먹도록 하였다.

총담관 결찰, 총담관 대정맥문합 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether 마취 하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래 원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 총담관 대정맥문합은 상대정맥과 총담관을 medical grade silicon tube를 사용하여 연결하였으며, 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA 액의 상대정맥 내에 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, Cambridge, 미국)를 사용하여 15 분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취 하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4 °C의 0.25 M sucrose 액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose 액을 가능한 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간을 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 homogenizer (Chamber clearance, 0.005~0.007 inches, Thomas사, 미국)로 2~4 °C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10%(w/v)의 간 조직균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 세포질 분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄균질액을 571 × g (average relative centrifugal force)에서 10 분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796 × g에서 20분간 원심분리하여 pellet와 상청액을 얻었고 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 104,400 × g에서 1시간 원심분리하여 pellet와 상청액

을 얻었으며 이 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4 °C에서 시행하였으며 이 때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall 사(Newtown, 미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였다.

4. 효소 시료 조제

GLO-I 활성도 측정용 효소 시료 조제는 분리한 간 세포 분획을 단백질량으로 5 mg/mL가 되도록 0.25 M sucrose 액에 혼탁시켜 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

혈청과 간 세포질 분획의 GLO-I의 활성도 측정은 시료와 함께 methylglyoxal과 reduced glutathione을 기질로 사용하여 30 °C에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 S-lactoylglutathione을 240 nm 파장에서 비색하여 효소의 활성도를 산출하는 Racker(1951)의 법에 의하였으며 활성도 단위는 1분간에 1 mL의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 S-lactoylglutathione을 nmol로 나타내었다.

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

6. Km치 및 Vmax치의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포질 분획 효소 시료들과 GLO-I의 기질로 methylglyoxal을 사용하여 기질 원액과 기질 희석액을 제조한 후 이 기질액들을 사용하여 GLO-I 효소 활성도를 측정한 후 이를 성적으로부터 초기 반응 속도의 역수(1/vi)치를, 그리고 기질의 농도로부터 기질 농도의 역수(1/[S])치를 계산하여 이중 역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음

이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출(Segel, 1976) 하였다.

7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid 와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg & Rothstein(1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret 법(Gornall *et al.*, 1949)으로 정량하였다.

8. 성적 검정

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

성 적

1. 쥐에서 총담관 대정맥문합 또는 담관 폐쇄와 담즙정체 시간이 간 및 혈청의 GLO-I 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청의 GLO-I 활성도는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다. 그러나 쥐에게 총담관 폐쇄를 시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청의 GLO-I 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 간세포질 분획의 GLO-I 활성도는 총담관 폐쇄를 시킨 후 2 일 경과시킨 군에서만 정상군이나 가수술군보다 다같이 약 24% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었으며, 혈청의 GLO-I 활성도도 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시킨 군에서만 정상군보다는 약 88% ($P<0.01$), 가수술군보다는 약 82% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그리고 간세포질 분획과 혈청의 GLO-I 활성도를 총담관 대정맥문합을 시킨 군과 총담관 폐쇄를 시킨 군간에 상호 비교를 했을 때는 총담관 폐쇄를 시킨 군에서 이 효소의 활성도가 약간 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 또한 양 군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때보다 2일 경과시켰을 때 간과 혈청의 이 효소 활성도는 약간 증가

하였다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다(Table 1).

2. 쥐에서 총담관 대정맥문합 및 담관 폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간 및 혈청의 GLO-I 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청의 GLO-I 활성도는 총담관 대정맥문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시

Table 1. Effects of time and model of biliary retention on liver and serum glyoxalase I activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase I activities	
	Liver (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Serum (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mL ⁻¹)
Normal	676.7 ± 94.3	587.8 ± 192.5
Sham 1 day	677.3 ± 101.4	605.4 ± 204.6
Sham 2 days	674.1 ± 100.8	604.5 ± 197.8
CCS 1 day	687.4 ± 104.2	676.2 ± 213.7
CCS 2 days	698.5 ± 106.3	728.5 ± 221.5
BDO 1 day	721.6 ± 102.6	879.7 ± 234.8
BDO 2 days	836.4 ± 113.3 ^{a,g}	1,102.6 ± 252.5 ^{b,h}

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham 1 day or Sham 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after sham operation; CCS 1 day or CCS 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after choledochoaval shunt; BDO 1 day or BDO 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after common bile duct ligation.

a, P<0.05 vs. Normal; b, P<0.01 vs. Normal; g, P<0.05 vs. Sham 2 days; h, P<0.01 vs. Sham 2 days.

쳤을 때 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 35% (P<0.05) 및 약 36% (P<0.01)의 증가를 나타내었으며, 혈청에서의 GLO-I 활성도는 총담관 대정맥문합만 시킨 군 보다 다같이 약 50% (P<0.05) 증가를 나타내었다(Table 2). 그리고 총담관 폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 총담관 폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 41% (P<0.01) 및 약 35% (P<0.01)의 증가를 나타내었으며, 혈청에서의 GLO-I 활성도는 총담관 폐쇄만 시킨 군보다 각각 약

72% (P<0.01) 및 약 46% (P<0.05)의 증가를 나타내었다(Table 3). 그러나 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청의 GLO-I 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 2 & 3).

3. 총담관 대정맥문합 또는 담관 폐쇄 후 2일 경과한 실험군에서 간 GLO-I의 Km_i 및 Vmax_i의 변동

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA) and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on liver and serum glyoxalase I activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase I activities	
	Liver (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Serum (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mL ⁻¹)
CCS 1 day	687.4 ± 104.2	676.2 ± 213.7
CCS 1 day + TCA	926.4 ± 121.3 ^j	1,012.7 ± 231.2 ^j
CCS 1 days + TUDCA	702.6 ± 102.6	687.4 ± 208.7
CCS 2 days	698.5 ± 106.3	728.5 ± 221.5
CCS 2 days + TCA	947.3 ± 116.7 ⁿ	1,093.6 ± 246.3 ^m
CCS 2 days + TUDCA	707.4 ± 112.3	736.8 ± 212.7

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; CCS 1 day and CCS 2 days, sacrificed 1 or 2 days after CCS operation; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45 μmol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava.

j, P<0.05 vs. CCS 1 day; m, P<0.05 vs. CCS 2 days; n, P<0.01 vs. CCS 2 days..

Table 3. Effects of taurocholic acid (TCA) and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on liver and serum glyoxalase I activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase I activities	
	Liver (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Serum (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mL ⁻¹)
BDO 1 day	721.6 ± 102.6	879.7 ± 234.8
BDO 1 day + TCA	1,015.7 ± 123.5 ^q	1,513.2 ± 272.2 ^q
BDO 1 day + TUDCA	746.8 ± 98.2	891.6 ± 224.3
BDO 2 days	836.4 ± 113.3	1,102.6 ± 252.5
BDO 2 days + TCA	1,126.2 ± 127.4 ^t	1,613.2 ± 286.3 ^s
BDO 2 days + TUDCA	853.1 ± 108.6	1,125.2 ± 248.4

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; BDO 1 day and BDO 2 days, sacrificed 1 or 2 days after common bile duct ligation; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45 μmol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava.

q, P<0.01 vs. BDO 1 day; s, P<0.05 vs. BDO 2 days; t, P<0.01 vs. BDO 2 days.

수술후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간의 GLO-I 을 이 효소의 기질인 methylglyoxal에 대해서 Km치 및 Vmax치를 측정했을 때 Km치는 모두 변동이 없었다 (Table 4 & 5).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입

하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 45% ($P<0.001$), 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다는 약 36% ($P<0.01$) 의 증가를 나타내었다(Table 4). 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의

Table 4. The kinetic parameters of glyoxalase I from rat liver 2 days after choledocho-caval shunt (CCS 2 days) determined with methylglyoxal as substrate

Experimental groups	Km (mM)	Vmax (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	37.3 ± 2.4	1,078.4 ± 118.9
CCS 2 days	38.1 ± 2.2	1,144.7 ± 126.5
CCS 2 days + TCA	38.8 ± 2.9	1,562.5 ± 138.0 ^{i,n}
CCS 2 days + TUDCA	38.5 ± 2.5	1,159.5 ± 129.6

Michaelis-Menten constants for glyoxalase I were determined using methylglyoxal as substrate at 30 °C for cytosolic fraction of experimental rat livers at two days after CCS. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 2 and text.

i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; n, $P<0.01$ vs. CCS 2 days.

Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 32% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 71% ($P<0.001$), 총담관 폐쇄만 시킨 군보다는 약 30% ($P<0.001$) 증가를 나타내었다. 그리고 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 31% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 폐쇄만 시킨 군과 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다(Table 5).

동물 실험에서 담즙을체를 야기시켜 간이 손상을 받으면 간의 GLO-I 활성도가 증가되는 것(변용준 외, 1995)은 알려져 있으나 그 기전은 알려진 바 없다. 따라서 쥐의 담즙을체간의 세포질에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙을체간에서 생체이물의 해독에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 아울러 담즙을체로 간 손상이 야기되는 간암도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독 기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구에서는 생체이물 생체 변환 효소인 XO와 GLO-I의 활성도가 쥐의 담즙을체간에서 왜 증가되었는지 그 기전의 일부를 알아보기 위하여 시행한 것이다.

변용준 외(1995)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결

Table 5. The kinetic parameters of glyoxalase I from rat liver 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with methylglyoxal as substrate

Experimental groups	Km (mM)	Vmax (nmol S-lactoylglutathione min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	37.3 ± 2.4	1,078.4 ± 118.9
BDO 2 days	37.8 ± 2.8	1,421.4 ± 135.8 ^b
BDO 2 days + TCA	39.2 ± 2.6	1,846.6 ± 155.2 ^{i,u}
BDO 2 days + TUDCA	38.5 ± 2.3	1,417.5 ± 129.2 ^b

Michaelis-Menten constants for glyoxalase I were determined using methylglyoxal at 30 °C for cytosolic fraction of experimental rat livers at two days after BDO. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 3 and text.

h, P<0.01 vs. Sham 2 days; i, P<0.001 vs. Sham 2 days; u, P<0.001 vs. BDO 2 days.

찰한 후 담즙을체간에서 세포질의 GLO-I 활성도가 총 담관 결찰 후 2, 3, 7 및 14일에 유의한 증가를 나타내었다고 하였으며, 혈청 GLO-I 활성도는 총담관 결찰 후 2, 3 및 7일에 유의한 증가를 나타내었다고 하였다. 그러나 이 보고에서는 GLO-I이 쥐 담즙을체간의 세포질 분획에서 그 활성도가 증가되는 기전에 대해서는 분명하게 설명하고 있지 않다. 이 실험에서도 담즙을체간에서 이 효소의 활성도가 증가됨을 확인하였다. 이 연구에서 특히 규명하고자 하는 것은 이 효소 활성도가 담즙을체간에서 어떤 물질의 관여에 의해 증가되었는가 하는 것이다. 이를 규명하기 위해 채택한 주요 동물 모델은 4가지인데 Ogawa *et al.* (1990) 및 한병훈과 김여희(1997)의 방법에 의하였다. 즉 첫째 모델은 쥐의 총담관을 결찰하여 담관을 폐쇄시킨 모델이고 둘째 모델은 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 모델이다. 이 두 모델은 시간이 경과될수록 간내 담즙산의 농도가 점차 증가되는 점은 같으나 다른 점은 시간이 경과될수록 총담관 결찰 모델이 총담관 대정맥문합 모델보다 그 증가의 속도가 빠르다는 것이다(Toyota *et al.*, 1984;

Ogawa *et al.*, 1990). 셋째 모델은 쥐에게 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙을체를 심화시킨 모델이며, 넷째 모델은 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙을체를 더욱 심화시킨 모델이다. 따라서 이 네 가지 모델을 사용함으로써 시간 경과에 따른 간내의 담즙산 농도 증가의 효과를 상호 비교할 수 있으며 아울러 셋째 모델과 넷째 모델로는 간내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아 낼 수가 있다(Ogawa *et al.*, 1990; 한병훈과 김여희, 1997).

이 연구에서 또 하나 규명해야 할 것은 부하시키는 담즙산의 종류가 다르면 이들 효소 활성도에 미치는 효과도 달라지는가 하는 것이다. 따라서 담즙을체간에서 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소인 arylesterase 및 carboxylesterase와 담즙을체간에서 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소인 arylamine N-methyltransferase 및 thiol methyltransferase의 합성에 영향을 주지 않는다는 TUDCA(한병훈과 김여희, 1997 & 1998; 이병욱, 1999; 이병욱과 곽춘식, 2000)를

총담관 폐쇄 직후 또는 총담관 대정맥문합 직후 상대 정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과를 관찰하여 보았다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 활성도는 별 변동을 나타내지 않았다. 그러나 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청에서 GLO-I 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로서 간의 GLO-I은 간의 담즙울체의 정도가 경한 조건인 총담관 대정맥문합(Ogawa *et al.*, 1990)을 시켰을 때는 그 활성도가 별 변동을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 대조군인 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 한편 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 Vmax치는 각각의 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 이 실험에서 측정한 methylglyoxal에 대한 GLO-I의 Km치는 모든 실험군의 간세포 분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이 결과로 보아 TCA는 간의 GLO-I의 합성을 유도한다고 추정할 수 있었다. 특히 TCA를 주입한 실험군에서 이 효소의 Km치는 변동이 없으면서 Vmax치가 증가된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침해 주는 결과라고 생각된다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간의 GLO-I의 유전자 발현에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 폐쇄를 시키고 2일 경과시켰을 때 혈청의 GLO-I 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 대

정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 GLO-I 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄를 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과를 미루어 볼 때 담즙울체간의 세포질에 있던 이 효소가 TCA에 의한 간의 괴사(Palmer, 1972; Drew & Priestly, 1979; Kitani *et al.*, 1986)로 간세포막의 투과성이 항진되어 나타난 결과로 생각된다.

이 실험에서 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 GLO-I 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간세포의 투과성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과로 보아 담즙울체간에서 GLO-I의 활성도 증가는 담즙산 중 특히 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며, 아울러 담즙울체간에서 이들 효소의 혈청 중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간세포막의 투과성이 항진되어 이들 효소가 간에서 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

요 약

이 연구는 담즙울체간에서 활성도가 증가되는 GLO-I의 활성도 증가 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 또는 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 상대정맥 내에 주입시킨 다음 경시적으로 간과 혈청의 GLO-I의 활성도를 측정하여 이 효소에 대한 이들 담즙산의 효과를 알아보았다. 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 및 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 및 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그

리고 쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청과 간 세포질 분획의 GLO-I 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-I의 Vmax치는 총담관 대정맥 문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이 실험에서 측정한 이 효소의 Km치는 모든 실험군의 간 세포질에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 담즙울체간에서 GLO-I의 활성도 증가는 담즙산 중에서 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체시 이 효소의 혈청 중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이 효소가 간에서 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

참 고 문 헌

- 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포 분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. *계명의대논문집* 1986; **5**(1): 45-53.
- 곽춘식, 김여희, 문교철: 흰쥐 담즙울체간에서의 알콜대사 효소들의 활성치. *계명의대논문집* 1988; **7**(1): 64-75.
- 곽춘식, 이숙형: 흰쥐 담즙울체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. *한국생화학회지* 1992; **25**(3): 251-261.
- 김성국, 김여희: 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 γ -Glutamyl Transpeptidase의 유도. *대한간학회지* 1997; **3**(3): 210-226.
- 도준영: Taurocholate부하에 의한 흰쥐 간의 MAO A 및 B와 COMT의 합성 억제. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1998; 1-51.
- 문교철, 곽춘식: 흰쥐 담즙울체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. *계명의대논문집* 1989; **8**(1): 69-77.
- 박소경, 곽춘식: 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 Cholinesterase의 합성 억제. *계명의대논문집* 1999; **18**(2): 204-217.
- 변용준, 김여희, 곽춘식: 주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간 및 혈청의 Glyoxalase I 활성에 미치는 영향.

- 계명의대논문집 1995; **14**(2): 330-339.
- 신미정: 흰쥐 간의 알콜대사효소 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1998; 1-50.
- 이병욱: Taurocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 Arylamine N-Methyltransferase 및 Thiol Methyltransferase의 유도. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1999; 1-47.
- 이병욱, 곽춘식: Taurocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 Arylamine N-Methyltransferase의 유도. *대한외과학회지* 2000; **59**(2): 141-153.
- 주일: 흰쥐 재생간과 담즙울체간에서의 Arylamine N-methyltransferase 및 Thiol methyltransferase의 활성도. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1998; 1-42.
- 한병훈, 김여희: 흰쥐 간의 Arylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *대한간학회지* 1997; **3**(12): 154-169.
- 한병훈, 김여희: 흰쥐 간의 Carboxylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *계명의대논문집* 1998; **17**(4): 487-503.
- Di Simplicio P, Mannervik B: Enzymes involved in glutathione metabolism in rat liver and blood after carbon tetrachloride intoxication. *Toxicol Lett* 1983; **18**(3): 285-289.
- Drew R, Priestly BG: Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experimentia* 1979; **35**(6): 809-811.
- Elango N, Janaki S, Rao AR: Two affinity chromatography methods for the purification of glyoxalase I from rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; **83**(4): 388-395.
- Gillespie E: Effects of S-lactoylglutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes. *Nature* 1979(5, 692); **277**: 135-137.
- 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.

- Han LP, Davison LM, Vander Jagt DL: Purification and kinetic study of glyoxalase-I from rats liver, erythrocytes, brain and kidney. *Biochim Biophys Acta* 1976; **445**(2): 486-499.
- Hayes JD, Milner SW, Walker SW: Expression of glyoxalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase isoenzymes in different bovine tissues. *Biochim Biophys Acta* 1989; **994**(1): 21-29.
- Kim YJ, Kim YH: Benzoyltransferase and phenylacetyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol* 1999; **32**(1): 67-71.
- Kitani K, Kanai S, Ohta M, Sato Y: Differing transport maxima values for taurine-conjugated bile salts in rats and hamsters. *Am J Physiol* 1986; **251**(6): G852 -G858.
- Mannervik B: Glyoxalase I. Jakoby WB: *Metabolic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press, 1980, Vol II, pp263-273.
- Marmstal E, Mannervik B: Purification, characterization and kinetic studies of glyoxalase I from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1979; **566**(2): 362-370.
- Mun KC: Catechol-O-methyltransferase activity in cholestatic rat's liver induced by bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol* 1996; **29**(2): 142-145.
- Ogawa H, Mink J, Hardison WGM, Miyai K: Alkaline phosphatase activity in hepatic tissue and serum correlates with amount and type of bile acid load. *Lab Invest* 1990; **62**(1): 87-95.
- Palmer RH: Bile acids, liver injury, and liver disease. *Arch Intern Med* 1972; **130**(4): 606-617.
- Racker E: The mechanism of glyoxalase. *J Biol Chem* 1951; **190**(2): 685-696.
- Segel IH: *Biochemical Calculations*. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons, 1976, pp214-246.
- Stohlmacher P, Haferland W: Glyoxalase I (GLO) in human tissues. *Z Rechtsmed* 1980; **85**(3): 165-168.
- Thornalley PJ: The glyoxalase system; new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990; **269**(1): 1-11.
- Thornalley PJ, Bellavite P: Modification of the glyoxalase system during the functional activation of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1987; **931**(2): 120-129.
- Toyota N, Miyai K, Hardison WG: Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab Invest* 1984; **50**(5): 536-542.
- Uotila L, Koivusalo M: Separation of the isoenzymes of glyoxalase I from human red blood cells by electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gel and by ion exchange chromatography. *Acta Chem Scand* 1979; **34**(1): 63-68.
- Webb EC: *Enzyme Nomenclature*. IUBMB, New York, Academic Press, 1992, p489.