

Taurocholic Acid 부하에 의한 쥐 담즙율체간에서 5'-nucleotidase의 유도

경북대학교 의과대학 내파학교실*, 계명대학교 의과대학 생화학교실

김성국* · 김여희 · 곽춘식

Induction of Cholestatic Rat Liver 5'-Nucleotidase by Taurocholic Acid Load

Sung Kook Kim, M.D.* , You Hee Kim, M.D., Chun Sik Kwak, Ph.D.

Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine*
and Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea

Abstract : Possible mechanisms of increase of 5'-nucleotidase (5'-NT) activity in cholestatic rat liver and serum were studied. The hepatic subcellular and serum 5'-NT activities in experimental rats with choledoco-caval shunt (CCS) or bile duct obstruction (BDO) were determined. The Michaelis-Menten constants of these hepatic enzymes were measured. The activities of serum and hepatic cytosolic and microsomal 5'-NT as well as Vmax values of 5'-NT were found to be significantly increased in both CCS plus taurocholic acid (TCA) injected group and BDO plus TCA injected group, compared with the CCS and BDO groups, respectively. However, Km values of the above hepatic 5'-NT did not change in any experimental group. The above results suggest that TCA stimulates biosynthesis of 5'-NT in the liver and the elevated 5'-NT activity in the serum is most likely due to an increase in membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

Key Words :Bile duct obstruction, Choledoco-caval shunt, 5'-nucleotidase, Taurocholic acid, Tauroursodeoxycholic acid

서 론

5'-nucleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydro-lase, EC 3.1.3.5, 5'-NT)는 담도계 효소의 일종[1-

3]으로서 주로 adenosine 5'-phosphate와 inosine 5'-phosphate를 가수분해하는 효소이다[3]. 5'-NT는 진핵세포의 세포막, 내형질 세망 및 미토콘드리아막의 외측 표면에 국재되어 있으며 세포핵과 세포질에서

도 발견된다[2,4-8]. 이 효소는 동물의 조직에 널리 분포되어 있으며 간에 풍부히 존재하고[2,9] 혈청과 담즙에도 출현하는 것[9,10]으로 알려져 있다. 이와 같은 5'-NT는 간질환 진단과 예후 판정을 위해 혈청에서 활성도를 측정하는 효소 중의 한가지로서 담즙울체가 수반되는 간담도 질환 시 혈청에서 그 활성도가 현저히 증가되고[10-12] 동물실험에 의해 유도된 실험적 담즙울체간에서도 그 활성도가 증가되는 것[13]으로 알려져 있다. 그러나 이 효소가 담즙울체간에서 어떤 기전에 의해 그 활성도가 증가되는지는 아직도 분명치 않다. 현재까지는 담도계 효소들 중에서는 alkaline phosphatase와 γ -glutamyl transpeptidase에 대해서만 그 변동기전의 일부가 밝혀져 있을 뿐이다. 즉 이들 효소는 담즙울체간에서 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙울체로 인해 간세포 내에 증가된 taurocholic acid가 활성도를 자극시켜 이들 효소의 합성을 증가시킨다[14,15]는 것이다. 이러한 사실로 보아 1차 담즙산인 taurocholic acid가 이들 효소에 대한 inducer가 아닌가 생각된다. 그러므로 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되는 5'-NT도 담도계 효소인 만큼 이 효소에 대해서 taurocholic acid가 어떤 효과를 나타내는지를 알아낸다면 담즙울체간에서 이 효소의 활성도 증가 기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구는 5'-NT 활성도가 담즙울체 시 간과 혈청에서 증가되는 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, Ogawa 등[14]의 방법에 준하여 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄(이하 BDO로 표기함)시킨 직후, 또는 총담관 대정맥문합(이하 CCS로 표기함)을 시킨 직후 taurocholic acid 또는 taurooursodeoxycholic acid를 정맥내 주입시켜 경시적으로 간과 혈청에서 5'-NT 활성도의 변동에 대한 이들 담즙산의 효과를 측정하였던 바 taurocholic acid가 간에서 이 효소의 합성을 유도하는 것으로 생각되는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Barbital sodium, adenosine 5'-monophosphate (AMP), taurocholic acid (from ox bile, sodium salt, TCA), taurooursodeoxycholic acid (sodium salt, TUDCA), manganese sulfate, nickel chloride, trichloroacetic acid, sodium acetate, acetic acid glacial, cupric sulfate, ammonium molybdate, ρ -methylamino- phenol sulfate, 5'-nucleotidase (5'-ND control-E and N), 종합표준효소(enzyme control 2-N) 및 단백질 표준액(10 g/100 mL bovine albumin) 등은 Sigma사(St Louis, 미국)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫쥐를 사용하였으며 한 군을 5마리로하여 다음과 같이 15개 군으로 나누었다.

- 1) 정상군(1군)
- 2) 가수술군: 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 3) BDO군: 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 4) BDO와 함께 TCA를 주입한 군: 총담관 결찰 직후 Ogawa 등[14]의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μ mol)를 상대정맥 내 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 5) BDO와 함께 TUDCA를 주입한 군: 총담관 결찰 직후 Ogawa 등[14]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μ mol)를 상대정맥 내 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 6) CCS군: CCS를 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 7) CCS와 함께 TCA를 주입한 군: CCS 직후 Ogawa 등[14]의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μ mol)를 상대정맥 내 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)
- 8) CCS와 함께 TUDCA를 주입한 군: CCS 직후 Ogawa 등[14]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g

당 45 μmol)를 상대정맥 내 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군) 등이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 실험동물 사료(삼양유지사료주식회사)를 먹도록 하였다. BDO 수술, CCS 수술 및 가수술은 효소활성의 일종 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생 시킬 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식 시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다. BDO 수술은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽 원부위의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출 시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. CCS 수술은 상대 정맥과 총담관을 의료용 silicon tube를 사용하여 연결하였으며, 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, 미국)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사 시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4 °C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다. 간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4 °C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon pestle glass homogenizer (Chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas, 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[16]으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다. 이 세포분획법에서 모든 조작은 2~4 °C에서 시행하였으며 이 때 사용한 원심분리기는 RC-5B

refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge (Du Pont Sorvall, 미국)였다. 이때 사용한 rotor는 SS-34 및 T865 rotor (Du Pont Sorvall, 미국)였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (model 570, ISCO, 미국)를 사용하였다.

4. 효소시료 조제

분리한 마이크로솜과 미토콘드리아는 단백질 양으로 5 mg/mL가 되도록 0.25 M sucrose액에 혼탁시켰으며 이 혼탁액을 1% (w/v) sodium bicarbonate액으로 배로 희석하여 ultrasonic dismembrator (model 300, Fisher, 미국)로 20 ± 0.4 K cycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파 마쇄를하여 이것을 세포질 분획과 더불어 5'-NT 효소액으로 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

혈청 및 간의 각 세포분획의 5'-NT 활성도의 측정은 5'-AMP를 기질로 사용하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 인산을 정량하는 Baginski 등 [17]의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 그리고 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mL의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 인을 nmol로 나타내었다. 이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법은 그 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 표준 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Cary 210, Varian, 미국)였다.

6. Km치 및 Vmax치의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 5'-NT 기질의 원액과 희석액을 사용하여 5'-NT의 활성도를 측정한 후 이를 성적으로부터 초기 반응 속도의 역수($1/v_i$)치를 그리고 기질 농도로부터 기질 농도의 역수($1/[S]$)치를 계산하여 이중역수

도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출하였다.

7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg와 Rothstein법[18]으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법[19]으로 정량하였다.

8. 성적 검정

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

성 적

1. CCS 또는 BDO와 담즙정체 시간이 간의 5'-NT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 CCS 또는 BDO를 시켰을 때 간의 세포질 및 마이크로솜분획의 5'-NT 활성도는 통계학적으로

유의한 증가를 나타내었다. 즉 CCS 후 2일 경과시킨 군에서 세포질 분획의 5'-NT 활성도는 정상군 보다 약 71% ($P<0.01$), 가수술군보다 약 74% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. BDO 후 2일 경과시킨 군의 간 세포질 분획의 5'-NT 활성도도 정상군보다 약 88% ($P<0.001$), 가수술군보다 약 92% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그리고 간 세포질 분획의 5'-NT 활성도를 CCS군과 BDO군 간에 상호 비교했을 때는 서로 간에 차이가 없었다. 그러나 양 군 모두 수술 후 2일 경과시켰을 때는 이 효소의 활성도가 현저하게 증가하였다(Table 1).

CCS 후 2일 경과시킨 군에서 간 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 정상군보다 약 21% ($P<0.01$), 가수술군보다 약 22% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. BDO 후 2일 경과시킨 군의 간 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 정상군이나 가수술군 보다 약 28% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그리고 간 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도를 CCS군과 BDO군 간에 상호 비교했을 때는 서로 간에 차이가 없었다. 그러나 양 군 모두 수술 후 2일 경과시켰을 때는 이 효소의 활성도가 약간 증가하였다(Table 1).

간의 미토콘드리아 분획에서 5'-NT의 활성도는 모든 실험군에서 변동을 나타내지 않았다(Table 1).

Table 1. Effects of time and model of biliary retention on hepatic subcellular 5'-nucleotidase (5'-NT) activities in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	3.68 ± 0.35	10.69 ± 1.95	53.46 ± 3.84
Sham 1 day	3.63 ± 0.42	10.62 ± 1.84	52.83 ± 4.87
Sham 2 days	3.60 ± 0.38	10.57 ± 2.12	53.27 ± 4.08
CCS 1 day	3.83 ± 0.77	11.98 ± 2.13	57.71 ± 5.37
CCS 2 days	6.28 ± 1.50 ^{b,h,j}	12.47 ± 2.35	64.73 ± 6.42 ^{b,h}
BDO 1 day	3.96 ± 0.53	11.78 ± 2.43	59.15 ± 5.60
BDO 2 days	6.92 ± 1.17 ^{c,i,r}	11.53 ± 1.92	68.42 ± 6.62 ^{b,h,p}

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 choledocho-caval shunt; BDO 1 day or BDO 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after common bile duct ligation.

b, $P<0.01$ vs. Normal; c, $P<0.001$ vs. Normal; h, $P<0.01$ vs. Sham 2 days; i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; j, $P<0.05$ vs. CCS 1 day; p, $P<0.05$ vs. BOD 1 day; r, $P<0.001$ vs. BOD 1 day.

2. CCS 및 BDO 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 5'-NT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 CCS를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 CCS 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS군보다 각각 약 51% ($P<0.05$) 및 약 75% ($P<0.05$)의 증가를 나타내

었으며 간 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 대조군 보다 각각 약 44% ($P<0.01$) 및 약 63% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그러나 간의 미토콘드리아 분획에서는 CCS 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 이 효소의 활성도는 유의한 변동이 없었다. 또한 CCS를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때도 간의 3종 세포분획에서 5'-NT 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

쥐에게 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho - caval shunt (CCS) on hepatic subcellular 5'-nucleotidase (5'-NT) activities in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CCS 1 day	3.83 ± 0.77	11.98 ± 2.13	57.71 ± 5.37
CCS 1 day + TCA	5.79 ± 1.26 ^j	14.07 ± 2.81	83.30 ± 12.21 ^k
CCS 1 day + TUDCA	3.67 ± 0.86	10.23 ± 1.67	56.94 ± 5.87
CCS 2 days	6.28 ± 1.50	12.47 ± 2.35	64.73 ± 6.42
CCS 2 days + TCA	10.98 ± 3.06 ^m	13.62 ± 2.95	105.26 ± 12.82 ⁿ
CCS 2 days + TUDCA	5.54 ± 0.97	9.81 ± 1.54	69.32 ± 6.28

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; 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; k, $P<0.01$ vs. CCS 1 day; m, $P<0.05$ vs. CCS 2 days; n, $P<0.001$ vs. CCS 2 days.

2일 경과시켰을 때 간의 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 대조군인 BDO군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 BDO 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 5'-NT 활성도는 대조군인 BDO군보다 각각 약 43% ($P<0.01$) 및 약 68% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었으며 간 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 대조군보다 각각 약 59% ($P<0.001$) 및 약 55% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그러나 간의 미토콘드리아 분획에

서는 BDO 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 이 효소의 활성도는 변동이 없었다. 또한 BDO 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때도 간의 3종 세포분획에서 5'-NT 활성도는 모두 대조군과 차이가 없었다(Table 3).

3. CCS 또는 BDO와 담즙정체 시간이 혈청의 5'-NT 활성도에 미치는 영향

Table 3. Effects of taurocholic acid (TCA), and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on hepatic subcellular 5'-nucleotidase (5'-NT) activities in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
BDO 1 day	3.96 ± 0.53	11.78 ± 2.43	59.15 ± 5.60
BDO 1 day + TCA	5.67 ± 0.96 ^q	13.06 ± 2.77	94.24 ± 11.47 ^r
BDO 1 day + TUDCA	3.89 ± 0.56	12.14 ± 1.84	56.67 ± 5.29
BDO 2 days	6.92 ± 1.17	11.53 ± 1.92	68.42 ± 6.62
BDO 2 days + TCA	11.62 ± 2.93 ^s	12.08 ± 2.35	106.15 ± 13.18 ^u
BDO 2 days + TUDCA	6.74 ± 0.95	11.05 ± 1.62	64.22 ± 5.14

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; r, P<0.001 vs. BDO 1 day; s, P<0.05 vs. BDO 2 days; u, P<0.001 vs. BDO 2 days.

쥐에게 CCS 또는 BDO를 시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 현저하게 증가하였다. 즉 CCS 후 1일 경과 시킨 군에서 혈청의 5'-NT 활성도는 정상군보다는 약 434% (P<0.001), 가수술군보다는 약 411% (P<0.001)의 증가를 나타내었으며, CCS 후 2일 경과 시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군이나 가수술군보다는 약 413% (P<0.001)의 증가를 나타내었다. 그리고 BDO 후 1일 경과시킨 군에서 혈청의 이

효소 활성도는 정상군 보다 약 650% (P<0.001), 가수술군보다는 약 631% (P<0.001)의 증가를 나타내었으며 BDO 후 2일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군이나 가수술군 보다 약 750% (P<0.001)의 증가를 나타내었다(Table 4).

한편 혈청의 5'-NT 활성도를 CCS군과 BDO군 간에 상호 비교했을 때는 BDO군이 CCS군보다 이 효소의 활성도가 훨씬 더 증가하였다. 그러나 양 군 모두에서 혈

Table 4. Effects of time and model of biliary retention on serum 5'-nucleotidase (5'-NT) activity in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mL ⁻¹)
Normal	0.38 ± 0.15
Sham 1 day	0.39 ± 0.18
Sham 2 days	0.38 ± 0.19
CCS 1 day	2.03 ± 0.24 ^{c,f}
CCS 2 days	1.95 ± 0.16 ^{e,i}
BDO 1 day	2.85 ± 0.62 ^{c,f,j}
BDO 2 days	3.23 ± 0.69 ^{c,i,n}

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1 and text. c, P<0.001 vs. Normal; f, P<0.001 vs. Sham 1 day; i, P<0.001 vs. Sham 2 days; j, P<0.05 vs. CCS 1 day; n, P<0.01 vs. CCS 2 days.

청의 이 효소를 수술 후 1일 경과시켰을 때와 2일 경과시켰을 때의 일차 변동을 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다(Table 4).

4. CCS 및 BDO 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청의 5'-NT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 CCS을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 CCS 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS군보다 각각 약 40% ($P<0.01$) 및 약 69% ($P<0.001$)

의 증가를 나타내었다. 그러나 CCS을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 모두 대조군과 차이가 없었다 (Table 5).

쥐에게 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 BDO군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 BDO 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 BDO군보다 각각 약 67% ($P<0.01$) 및 약 58% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 BDO 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 6).

Table 5. Effects of taurocholic acid (TCA), and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on serum 5'-nucleotidase (5'-NT) activity in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mL ⁻¹)
CCS 1 day	2.03 ± 0.24
CCS 1 day + TCA	2.85 ± 0.45 ^k
CCS 1 day + TUDCA	1.84 ± 0.10
CCS 2 days	1.95 ± 0.16
CCS 2 days + TCA	3.29 ± 0.18 ^o
CCS 2 days + TUDCA	1.89 ± 0.11

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Experimental groups are described in Table 2 and text. k, $P<0.01$ vs. CCS 1 day; o, $P<0.001$ vs. CCS 2 days.

Table 6. Effects of taurocholic acid (TCA), and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on serum 5'-nucleotidase (5'-NT) activity in rats

Experimental groups	5'-NT activities (nmol Pi min ⁻¹ mL ⁻¹)
BDO 1 day	2.85 ± 0.62
BDO 1 day + TCA	4.75 ± 0.68 ^q
BDO 1 day + TUDCA	2.76 ± 0.24
BDO 2 days	3.23 ± 0.69
BDO 2 days + TCA	5.11 ± 1.03 ^t
BDO 2 days + TUDCA	2.98 ± 0.32

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Experimental groups are described in Table 3 and text. q, $P<0.01$ vs. BDO 1 day; t, $P<0.01$ vs. BDO 2 days.

5. CCS 또는 BDO 후 2일 경과한 실험군에서 간 5'-NT의 Km치 및 Vmax치의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간의 5'-NT를 이 효소의 기질인 AMP에 대해서 Km치 및 Vmax치를 측정했을 때 Km치는 모두 별 변동이 없었다 (Table 7&8).

쥐에게 CCS를 시킨 후 2일 경과했을 때 간 세포질

및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 77% ($P<0.01$) 및 약 21% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 쥐에게 CCS를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 214% ($P<0.001$) 및 약 102% ($P<0.001$), CCS만 시킨 군 보다는 각각 약 77% ($P<0.05$) 및 약 67% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었

Table 7. Kinetic parameters of rat hepatic 5'-nucleotidase from 2 days after choledoco-caval shunt (CCS 2 days) determined with adenosine monophosphate as substrate

Experimental groups	Cytosol		Microsome	
	Km (mM)	Vmax (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Km (mM)	Vmax (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	4.52 ± 0.50	4.61 ± 0.47	2.86 ± 0.47	66.18 ± 4.91
CCS 2 days	4.64 ± 0.54	8.18 ± 1.97 ^h	2.81 ± 0.41	80.22 ± 7.93 ^h
CCS 2 days + TCA	4.46 ± 0.61	14.49 ± 3.98 ^{im}	2.68 ± 0.53	133.68 ± 15.49 ^{io}
CCS 2 days + TUDCA	4.58 ± 0.58	7.52 ± 1.31 ^h	2.88 ± 0.44	88.72 ± 8.05 ⁱ

Michaelis-Menten constants for 5'-nucleotidase were determined using adenosine monophosphate as substrate at 37 °C for cytosolic and microsomal fractions 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. h, $P<0.01$ vs. Sham 2 days; i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; m, $P<0.05$ vs. CCS 2 days; o, $P<0.001$ vs. CCS 2 days.

Table 8. Kinetic parameters of rat hepatic 5'-nucleotidase from 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with adenosine monophosphate as substrate

Experimental groups	Cytosol		Microsome	
	Km (mM)	Vmax (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Km (mM)	Vmax (nmol Pi min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	4.52 ± 0.50	4.61 ± 0.47	2.86 ± 0.47	66.18 ± 4.91
BDO 2 days	4.58 ± 0.57	8.76 ± 1.44 ^t	2.78 ± 0.43	84.83 ± 7.94 ^h
BDO 2 days + TCA	4.41 ± 0.64	14.87 ± 3.61 ^{ut}	2.66 ± 0.57	132.60 ± 15.82 ^{iu}
BDO 2 days + TUDCA	4.55 ± 0.53	8.52 ± 1.18 ^t	2.84 ± 0.41	78.63 ± 5.86 ^h

Michaelis-Menten constants for 5'-nucleotidase were determined using adenosine monophosphate as substrate at 37 °C for cytosolic and microsomal fractions 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; t, $P<0.01$ vs. BDO 2 days; u, $P<0.001$ vs. BDO 2 days.

다. 그리고 CCS를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 63% ($P<0.01$) 및 약 34% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그러나 CCS군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다 (Table 7).

쥐에게 BDO를 시킨 후 2일 경과했을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 90% ($P<0.001$) 및 약 28% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 쥐에게 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 223% ($P<0.001$) 및 약 100% ($P<0.001$), BDO군보다는 각각 약 70% ($P<0.01$) 및 약 56% ($P<0.001$) 증가를 나타내었다. 그러나 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 이 효소의 Vmax치는 가수술군 보다는 각각 약 85% ($P<0.001$) 및 약 19% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었으나 BDO군과 비교했을 때는 차이가 없었다 (Table 8).

고 찰

이 연구의 주된 목표는 담즙율체간에서 5'-NT 활성도가 어떤 기전에 의해 증가되었는가 하는 것이다. 이를 규명하기 위해 채택한 동물모델 중 총담관 결찰로 BDO를 시킨 모델과 CCS를 시킨 모델은 시간이 경과될수록 간내 담즙산의 농도가 점차 증가되는 점은 동일하나 다른 점은 그 증가 속도가 총담관 결찰로 BDO를 시킨 모델이 CCS를 시킨 모델보다 빠르다 [14]는 것이다. 이와 같이 총담관 결찰로 BDO를 시킨 모델이 CCS를 시킨 모델보다 시간이 경과될수록 간내 담즙산의 농도가 빠르게 증가되는 것은 BDO로 담관 내 수압이 증가됨으로 인해 담관 내 담즙산이 간 세포 내로 강제 역류되고 또한 간내 담즙산의 간 외 배출이 억제되기 때문에 나타난 현상이라고[20]한다. 그리고 CCS를 시킨 모델에서는 담관내 수압이 증가되지 않기 때문에 담즙산의 간 세포 내로의 역류가 그리 심하지 않다[20]고 한다. 따라서 이러한 동물 모델을 사용하므로써 시간 경과에 따른 간내 5'-NT 활성

도 변동에 대한 간내 담즙산 농도의 증가 효과를 알 수 있으며 아울러 총담관을 결찰하여 BDO를 시킨 직후 alkaline phosphatase 합성을 자극하고 세포막의 구성 성분을 용해시킨다는 TCA [14,21]를 상대정맥 내 주입한 모델과 CCS 직후 TCA를 상대정맥 내 주입한 모델로는 간내 TCA의 고부하에 따른 이 효소의 활성도 변동에 대한 TCA의 효과를 알아낼 수가 있는 것이다. 이 연구에서 또 하나의 문제는 담즙산의 종류가 다르면 이 효소의 활성도에 미치는 효과도 달라지는가 하는 것이다. 그래서 alkaline phosphatase 합성에 영향을 주지 않으며, 담즙산의 간독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA[14,21]를 총담관 결찰로 BDO를 시킨 직후 또는 CCS 직후 상대정맥 내에 주입시켜 이 효소의 활성도 변동에 대한 TUDCA의 효과도 관찰하여 본 것이다.

이 실험에서 쥐에게 CCS를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 BDO를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 유의한 증가를 나타내었다. 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT 활성도는 CCS를 시킨 군과 BDO를 시킨 군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때보다 2일 경과시켰을 때 더 증가되었다. 이 결과로 보아 간의 5'-NT는 간내의 담즙율체 정도가 경한 조건인 CCS[18]를 시켰을 때도 그 활성도가 증가되는 것을 알 수 있었으며 아울러 담즙율체의 시간이 경과되어 간의 담즙율체가 점차 심화될수록 간에서 이들 효소의 활성도가 더욱 증가된다는 사실을 알 수 있었다.

이 실험에서 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 활성도는 각각의 대조군인 CCS만 시킨 군 또는 BDO만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 한편 이 실험에서 쥐에게 CCS 또는 BDO를시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 대조군인

CCS만 시킨 군 또는 BDO만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 5'-NT의 Km치는 모든 실험군의 간 세포분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이 결과로 보아 TCA는 간의 5'-NT의 합성을 자극한다고 추정할 수 있으며 특히 TCA를 주입한 실험군들에서 이들 효소의 Km치는 변동이 없으면서 Vmax치가 증가된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷바침하는 결과라고 생각된다.

이 실험에서 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 5'-NT 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다. 그리고 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군에 비해서만 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간의 5'-NT의 합성을 자극하지 않는다고 추정할 수 있었다.

이상의 결과들은 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 얻어진 결과로서 담즙울체를 시킨 각 실험 모델에서 간 세포분획들의 5'-NT의 활성도가 세포분획에 따라 증가되거나 변동이 없었다. 왜 이런 현상이 나타났는지는 이 실험만으로는 무엇이라 추론하기는 어렵다. 따라서 이 문제는 앞으로 계속 추구하여야 하겠다.

이 실험에서 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 현저한 증가를 나타내었다. 그리고 혈청에서 5'-NT 활성도는 CCS을 시킨 군보다 BDO를 시킨 군이 훨씬 더 증가되었다. 그러나 혈청의 이 효소 활성도는 양 군 모두 유의한 일차의 변동은 나타내지 않았다. 또한 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS만 시킨 군 또는 BDO만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입했을 때는 혈청에서 이 효소의 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 보아 담즙울체 TCA가 간 내에 부하되면 혈청의 5'-NT 활성도가 증가된다는 사실을 알 수 있으며 그 증가의 원인은 TCA가 간 세포를 괴사시켜 간 내에서 이들 효소가 혈중으로 다량 유출된 것으로 생각된다.

이상 이 실험 결과들과 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체간에서 5'-NT의 활성도 증가는 담즙산들 중 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체 시 이 효소의 혈청 중 활성도 증가도 TCA에 의한 간 세포의 괴사로 세포막의 투과성이 항진되어 나타난 결과로 생각된다.

要 約

담즙울체 시 간과 혈청에서 5'-NT 활성도가 증가되는 기전의 일부를 알아내기 위하여 쥐에게 총담관 결찰로 BDO 또는 CCS를 시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 정맥내에 주입시킨 다음 경시적으로 간과 혈청에서 5'-NT 활성도의 변동에 대한 이들 담즙산의 효과를 측정하였다. 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 활성도는 각각의 대조군인 CCS만 시킨 군 또는 BDO만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 5'-NT 활성도는 대조군인 CCS만 시킨 군 또는 BDO만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간과 혈청에서 5'-NT 활성도는 모두 대조군과 차이가 없었다. 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜 분획의 5'-NT의 Vmax 치는 가수술만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 CCS 또는 BDO를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 마이크로솜분획의 5'-NT의 Vmax 치는 가수술만 시킨 군에 비해서만 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 5'-NT의 Km치는 모든 실험군의 간 세포분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 담즙울체 간에서 5'-NT의 활성도 증가는 담즙산들 중 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체 시 이 효소의 혈청 중 활성도 증가도 TCA에 의한 간세포의 괴사로 세포막의 투과성이 항진되어 나타난 결과로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Song CS, Rubin W, Rifkind AB, Kappas A: Plasma membranes of the rat liver, isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J Cell Biol* 1969; **41**(1): 124-32.
2. Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*. London: Edward Arnold; 1976. p.85-7.
3. Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. New York: Academic Press; 1984. p.282-3.
4. Song CS, Bodansky O: Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. *J Biol Chem* 1967; **242**(4): 694-9.
5. Widnell CC: Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions isolated from rat liver. I. The origin of 5'-nucleotidase activity in microsomes. *J Cell Biol* 1972; **52**(3): 542-58.
6. Evans WH, Gurd JW: Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Biochem J* 1973; **133**(1): 189-99.
7. Naito Y, Tsushima K: Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver, purification and some properties. *Biochim Biophys Acta* 1976; **438**(1): 159-68.
8. Greger J, Fabianowska-Majewska K: A distinctive activity of 5'-nucleotidase for dTMP in rat liver mitochondria. *Enzyme* 1980; **25**(1): 26-32.
9. Dixon M, Webb EC: *Enzymes*. London: Longman Group; 1979. p.634-6.
10. Hill PG, Sammons HG: An assessment of 5'-nucleotidase as a liver function test. *QJ Med* 1967; **36**(144): 457-68.
11. Connell MD, Dinwoodie AJ: Diagnostic use of serum alkaline phosphatase isoenzymes and 5'-nucleotidase. *Clin Chim Acta* 1970; **30**(2): 235-41.
12. Ellis G, Goldberg DM, Spooner FJ, Ward AM: Serum enzyme test in disease of the liver and biliary tree. *Am J Clin Path* 1978; **70**(2): 248-58.
13. 곽춘식, 김여희, 문교철: 흰쥐 담즙율체간의 plasma membrane, mitochondria 및 microsome의 5'-nucleotidase와 gamma-glutamyl transpeptidase의 활성치. *계명의대논문집* 1987; **6**(1): 67-76.
14. Ogawa H, Mink J, Hardison WGM, Miyagi 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.
15. 김성국, 김여희: 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 γ -glutamyl transpeptidase의 유도. *대한간학회지* 1997; **3**(3): 210-26.
16. 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포 분획법 I. Mitochondria 및 microsome의 분리. *계명의대논문집* 1986; **5**(1): 45-53.
17. Baginski ES, Marie SS, Epstein E, Zak B: Simple, direct determination of serum 5'-nucleotidase without deproteinization. *Ann Clin Lab Sci* 1977; **7**(6): 469-78.
18. Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labelled compounds. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press; 1957. Vol 4, p. 708-31.
19. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; **177**(3): 751-66.
20. Toyota N, Miyai K, Hardison WGM: Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab Invest* 1984; **50**(5): 536-42.
21. Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR: Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts: In vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 1991; **100**(1): 203-11.