

## 담즙울체 쥐에서 Taurocholate 부하에 의한 간의 Xanthine Oxidase 유도

계명대학교 의과대학 생화학교실

정상호 · 문교철

### Induction of Hepatic Xanthine Oxidase by Taurocholate in Cholestatic Rats

Sang Ho Chung, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.

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

**Abstract :** Possible mechanisms of increase of xanthine oxidase (XO) activity in cholestatic rat liver and serum were studied. These hepatic and serum enzyme activities were determined in experimental rats with choledoco-caval shunt (CCS) or bile duct obstruction (BDO). The Michaelis-Menten constant of this hepatic enzyme were also measured. The activities of hepatic and serum XO as well as the Vmax value of this hepatic enzyme were found to be significantly increased in both CCS plus taurocholic acid (TCA) injected group, and BDO plus TCA injected group than in the control groups such as CCS alone and BDO alone. In addition, these serum and hepatic XO activities did not change in both the CCS plus tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) injected group and the BDO plus TUDCA injected group. On the other hand, the Km value of the above hepatic enzyme did not change in any experimental group. Above results suggest that TCA induces biosynthesis of XO in the liver. The elevated activity of serum XO is most likely caused by increased hepatocytes membrane permeability due to TCA mediated liver cell necrosis.

**Key Words :** Bile duct obstruction, Choledoco-caval shunt, Taurocholic acid, Tauroursodeoxycholic acid, Xanthine oxidase.

### 서 론

Xanthine oxidase (xanthine : oxygen oxidoreductase, EC 1. 1. 3. 22, XO)는 간에서 많은 양이

합성되는 생체이물 생체 변환 효소이다[1]. 이 효소는 aldehyde, epinephrine, purine, pyrimidine 들과 특히 hypoxanthine과 xanthine을 기질로 하며, 분자 산소와 물과 더불어 이들 기질을 산화시켜 기질 산

화물과 초과산화물 음이온을 생성케 한다[2-4]. 이 효소는 주로 세포질에 국재하고 담즙울체를 수반하는 간염에서 혈중에 그 활성도가 증가된다[5]. 또한 쥐에서 담즙울체가 야기되었을 때 혈액과 간 조직에서 그 활성도가 증가되는 것[6]으로 밝혀져 있다.

그러나 담즙울체간에서 XO 활성도의 증가 기전을 규명한 보고는 아직 없다. 생체이물 생체 변환 효소 중 담즙울체간에서의 활성도 증가 기전이 일부 밝혀져 있는 것은 benzoyltransferase [7], arylamine N-methyltransferase [8] 및 glyoxalase I [9] 등이며, 그 활성도 증가기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 taurocholic acid (TCA)가 이들 효소의 합성을 자극한다[7-9]는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되는 효소들에 대해서 TCA가 어떤 효과를 나타내는지를 알아내다면 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되는 효소들의 활성도 변동 기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구는 담즙울체간에서 XO의 활성도 증가기전을 알아 보기 위하여 시행하였다. 쥐에게 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합 (choledoco-caval shunt)을 시킨 직후에 담즙울체간에서 효소 유전자의 발현율을 변동시키는 것으로 추정하는 TCA [10-12]와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) [10-12]를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 혈청과 간 세포질 분획에서 XO의 활성도를 측정하는 한편 이 간 세포질 분획에서 이들 효소의 Km치 및 Vmax치도 측정하였다. 이 실험 결과 TCA가 간에서 XO의 합성을 유도하는 것으로 생각되는 성격을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Xanthine sodium,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide sodium (from yeast), uric acid, TCA (from ox bile, sodium salt), TUDCA

(sodium salt), XO (grade III, from buttermilk) 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 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫쥐를 사용하였으며 한 군을 5마리로 하여 다음과 같이 크게 8개 군으로 나누었으며, 이들을 다시 1~2개 군으로 세분하여 총 15군으로 나누었다. 즉 1) 정상군(1군), 2) 가수술군; 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 3) 총담관 폐쇄군; 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 4) 총담관 폐쇄 및 TCA주입군; 총담관 결찰 직후 Ogawa 등[10]의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45  $\mu$ mol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 5) 총담관 폐쇄 및 TUDCA 주입군; 총담관 결찰 직후 Ogawa 등[10]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45  $\mu$ mol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 6) 총담관 대정맥 문합군; 총담관 대정맥 문합을 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 7) 총담관 대정맥 문합 및 TCA 주입군; 총담관 대정맥 문합 직후 Ogawa 등[10]의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45  $\mu$ mol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군), 8) 총담관 대정맥 문합 및 TUDCA주입군; 총담관 대정맥 문합 직후 Ogawa 등[10]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45  $\mu$ mol)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 실험 동물 사료(삼양유지사료주식회사)를 먹도록 하였다. 총담관 결찰, 총담관 대정맥문합 및 가수술은 효소 활성의 일종 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 의료용 silicon tube를 사용하여 연결하였으며, 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA 액의 상대정맥 내에 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, 미국)를 사용하여 15분 간 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 sucrose액을 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 9배량의 0.25 M sucrose 액을 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 초원심분리법 [13]으로 세포질 분획을 분리하였으며, 이 때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사(미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 또한 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였다.

### 4. 효소 시료 조제

XO 활성도 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 세포질 분획을 -20 °C에서 12시간 보관한 후 녹여서 사용하였다[14].

### 5. 효소 활성도 측정

혈청과 간 세포질 분획의 XO의 활성도 측정은 시료와 함께 xanthine을 기질로 사용하여 37 °C에서 5분간 반응시키는 동안에 생성되는 요산을 292 nm에서 비색하여 정량하는 Rowe와 Wyngaarden[15]의 방법에 의하였으며 이 효소의 활성도 단위는 1 분간에 1 mL의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 요산을 nmol로 나타내었다. 이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소 활성도 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 XO 기질로 xanthine sodium을 사용하여 기질 원액과 기질 희석액을 제조한 후 이 기질액들을 사용하여 XO 활성도를 측정한 후 이를 성적으로부터 초기 반응 속도의 역수( $1/v_i$ )치를, 그리고 기질의 농도로부터 기질 농도의 역수( $1/[S]$ )치를 계산하여 이 중 역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이 것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출하였다.

### 7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg & Rothstein법[16]으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법[17]으로 정량하였다.

### 8. 성적 검정

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

## 성 적

### 1. 총담관 대정맥 문합 또는 담관폐쇄와 담즙정체 시간이 간 및 혈청의 XO 활성도에 미치는 영향

총담관 대정맥 문합군의 간 세포질 분획과 혈청의 XO 활성도는 가수술군에 비해 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다. 그러나 총담관 폐쇄군의 간 세포질과 혈청의 XO 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시킨 군에서 간 세포질 분획의 XO 활성도는 정상군보다는 각각 약 65% ( $P<0.01$ ) 및 약 92% ( $P<0.001$ ), 가수술군 보다는 각각 약 64% ( $P<0.01$ ) 및 약 91% ( $P<0.001$ )의 증가를 나타내었으며 혈청의 XO 활성도는 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시킨 군에서만 정상군보다는 약 52% ( $P<0.01$ ), 가수술군 보다는 약 44% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었다. 그리고 간 세포질 분획과 혈청의 XO 활성도를 총담관 대정맥 문합군과 총담관 폐쇄군간에 상호 비교를 했을때는 총담관 폐쇄군에서 통계학적으로 유의한 증가

를 나타내었다. 즉 총담관 폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시킨 군에서 간 세포질 분획의 XO 활성도는 총담관 대정맥 문합군보다는 각각 약 52% ( $P<0.01$ ) 및 약 62% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었고 혈청의 XO 활성도는 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시킨 군에서만 약 30% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었으며 두 군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때 보다 2일 경과시켰을 때 간과 혈청의 이 효소 활성도는 약간 더 증가하였다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다(Table 1).

### 2. 총담관 대정맥 문합 및 담관폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA가 간 및 혈청의 XO 활성도에 미치는 영향

총담관 대정맥 문합 및 TCA주입군 또는 총담관 폐쇄 및 TCA 주입군의 간 세포질 분획과 혈청의 XO 활성도는 총담관 대정맥 문합군 또는 총담관 폐쇄군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥 문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO 활성도는 총담관 대

**Table 1.** Effects of time and model of biliary retention on liver and serum xanthine oxidase activities in rats

Experimental groups	Xanthine oxidase activities	
	Liver (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Serum (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )
Normal	8.04 ± 1.32	38.52 ± 2.08
Sham 1 day	8.12 ± 1.43	40.05 ± 4.57
Sham 2 days	8.07 ± 1.35	40.76 ± 4.15
CCS 1 day	8.76 ± 1.51	43.62 ± 4.23 <sup>a</sup>
CCS 2 days	9.53 ± 1.65	45.27 ± 4.27 <sup>a</sup>
BDO 1 day	13.28 ± 2.18 <sup>b,e,k</sup>	49.78 ± 10.42 <sup>a</sup>
BDO 2 days	15.45 ± 2.97 <sup>c,i,n</sup>	58.67 ± 10.08 <sup>b,h,m</sup>

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. a,  $P<0.05$  vs. Normal; b,  $P<0.01$  vs. Normal; c,  $P<0.001$  vs. Normal; e,  $P<0.01$  vs. Sham 1 day; h,  $P<0.01$  vs. Sham 2 days; i,  $P<0.001$  vs. Sham 2 days; k,  $P<0.01$  vs. CCS 1 day; m,  $P<0.05$  vs. CCS 2 days; n,  $P<0.01$  vs. CCS 2 days.

정맥 문합군 보다 각각 약 42% ( $P<0.05$ ) 및 약 46% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었으며 혈청에서의 XO 활성도는 각각 약 39% ( $P<0.05$ ) 및 약 43% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다(Table 2). 총담관 폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO 활성도는 총담관 폐쇄군보다 각각 약 58% ( $P<0.01$ ) 및 약 60% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었으

며 혈청에서의 XO 활성도는 각각 약 46% ( $P<0.05$ ) 및 약 38% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다(Table 3). 그러나 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청의 XO 활성도는 모두 대조군인 총담관 대정맥 문합군 혹은 총담관 폐쇄군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2&3).

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

Experimental groups	Xanthine oxidase activities	
	Liver (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Serum (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )
CCS 1 day	8.76 ± 1.51	43.62 ± 4.23
CCS 1 day + TCA	12.44 ± 2.18 <sup>j</sup>	60.80 ± 14.62 <sup>j</sup>
CCS 1 day + TUDCA	8.92 ± 1.53	44.12 ± 4.16
CCS 2 days	9.53 ± 1.65	45.27 ± 4.27
CCS 2 days + TCA	13.92 ± 2.34 <sup>j</sup>	64.61 ± 15.14 <sup>m</sup>
CCS 2 days + TUDCA	9.81 ± 1.72	46.72 ± 4.43

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 xanthine oxidase activities in rats

Experimental groups	Xanthine oxidase activities	
	Liver (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Serum (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )
BDO 1 day	13.28 ± 2.18	49.78 ± 10.42
BDO 1 day + TCA	20.96 ± 3.24 <sup>p</sup>	72.82 ± 18.52 <sup>p</sup>
BDO 1 day + TUDCA	13.78 ± 2.25	50.26 ± 14.63
BDO 2 days	15.45 ± 2.97	58.67 ± 10.08
BDO 2 days + TCA	24.72 ± 4.46 <sup>t</sup>	81.06 ± 18.13 <sup>s</sup>
BDO 2 days + TUDCA	16.12 ± 2.83	60.08 ± 15.14

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

### 3. 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄 후 2 일 경과 실험군에서 간 XO의 Km치 및 Vmax치의 변동

수술후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간의 XO를 이 효소의 기질인 xanthine sodium에 대해서 Km치 및 Vmax치를 측정했을 때 Km치는 모두 변동이 없었다(Table 4 & 5).

쥐에게 총담관 대정맥 문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 가수술군보다는 약 72% ( $P<0.001$ ), 총담관 대정맥문합군보다는 약 46% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었다(Table 4). 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 가수술군보다는 약 86% ( $P<0.01$ )의 증가를 나

**Table 4.** Kinetic parameters of xanthine oxidase from rat liver 2 days after choledoco-caval shunt (CCS 2 days) determined with xanthine sodium as substrate

Experimental groups	Km ( $\mu$ M)	Vmax (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
Sham 2 days	57.1 $\pm$ 6.8	20.22 $\pm$ 3.41
CCS 2 days	59.8 $\pm$ 6.4	23.83 $\pm$ 4.14
CCS 2 days + TCA	58.2 $\pm$ 7.1	34.80 $\pm$ 5.45 <sup>ab</sup>
CCS 2 days + TUDCA	57.8 $\pm$ 6.6	20.26 $\pm$ 4.30

Michaelis-Menten constants for xanthine oxidase were determined using xanthine sodium as substrate at 37 °C for cytosolic fraction of experimental rat livers at two days after CCS. The data are expressed as mean  $\pm$  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.

**Table 5.** Kinetic parameters of xanthine oxidase from rat liver 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with xanthine sodium as substrate

Experimental groups	Km ( $\mu$ M)	Vmax (nmol uric acid min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
Sham 2 days	57.1 $\pm$ 6.8	20.22 $\pm$ 3.41
BDO 2 days	58.2 $\pm$ 7.2	37.62 $\pm$ 7.43 <sup>b</sup>
BDO 2 days + TCA	61.8 $\pm$ 6.4	64.52 $\pm$ 10.78 <sup>ab</sup>
BDO 2 days + TUDCA	57.6 $\pm$ 7.0	40.30 $\pm$ 7.08 <sup>b</sup>

Michaelis-Menten constants for xanthine oxidase were determined using xanthine sodium as substrate at 37 °C for cytosolic fraction of experimental rat livers at two days after BDO. The data are expressed as mean  $\pm$  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.

타내었다. 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 가수술군보다는 약 219% ( $P<0.001$ ), 총담관 폐쇄군보다는 약 72% ( $P<0.01$ ) 증가를 나타내었다. 그리고 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 가수술군보다는 약 99% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 폐쇄군과 비교했을 때는 유의한 차이가 없었다(Table 5).

## 고 찰

동물 실험에서 담즙울체를 야기시켜 간이 손상을 받으면 간의 XO 활성도가 증가되는 것[6]은 알려져 있으나 그 기전은 알려진 바 없다. 따라서 쥐의 담즙울체간의 세포질에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체간에서 생체이물의 생체변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 아울러 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독 기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

곽춘식[6]에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간에서 세포질 XO의 활성도는 총담관 결찰 후 1, 2, 3 및 6일에 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다고 하였고, 혈청 XO의 활성도는 총담관 결찰 후 2, 3 및 6일에 유의한 증가를 나타내었다고 하였다. 그러나 이 보고에서는 쥐 담즙울체간의 세포질 분획에서 XO 활성도가 증가되는 기전에 대해서는 분명하게 설명하고 있지 않다. 이 실험에서도 담즙울체간에서 이 효소의 활성도가 증가됨을 확인하였다. 이 연구에서 특히 규명하고자 하는 것은 이 효소 활성도가 담즙울체간에서 어떤 물질의 관여에 의해 증가되었는가 하는 것이다. 이를 규명하기 위해 채택한 동물 모델은 4가지이며 Ogawa 등[10] 및 한병훈과 김여희[12]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 총

담관 결찰 모델이 총담관 대정맥 문합 모델보다 그 증가의 속도가 빠르다는 것이다 [10,18]. 셋째 모델은 쥐에게 총담관 대정맥 문합 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙울체를 심화시킨 모델이며, 넷째 모델은 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙 울체를 더욱 심화시킨 모델이다. 따라서 이 네 가지 모델을 사용함으로써 시간 경과에 따른 간 내의 담즙산 농도 증가의 효과를 상호 비교할 수 있으며 아울러 셋째 모델과 넷째 모델로는 간 내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아낼 수가 있다[10,12].

이 연구에서 또 하나 규명 해야 할 것은 부하시키는 담즙산의 종류가 다르면 이들 효소 활성도에 미치는 효과도 달라지는가 하는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소인 arylesterase와 담즙울체간에서 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소인 arylamine N-methyltransferase의 합성에 영향을 주지 않는다는 TUDCA[8,12]를 총담관 폐쇄 직후 또는 총담관 대정맥 문합 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과를 관찰하여 보았다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 활성도는 별 변동을 나타내지 않았다. 그러나 혈청의 XO 활성도는 총담관 대정맥 문합을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 한편 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 혈청에서 XO 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로서 간의 XO는 간의 담즙울체의 정도가 경한 조건인 총담관 대정맥문합을 시켰을 때는 그 활성도가 별 변동을 나타내지 않는 것을 알 수 있었으며, 혈청 XO는 담즙울체가 심한 경우에만 그 활성도가 증가되는 것을 알 수 있었다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO 활성도는 대조군인 총담관 대정맥 문합군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 또한 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO

활성도는 대조군인 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 한편 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 각각의 대조군인 총담관 대정맥 문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 이 실험에서 측정한 xanthine sodium에 대한 XO의 Km치는 모든 실험군의 간세포 분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이 결과로 보아 TCA는 간의 XO의 합성을 유도한다고 추정할 수 있었으며 특히 TCA를 주입한 실험군에서 이들 효소의 Km치는 변동이 없으면서 Vmax치가 증가된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침해 주는 결과라고 생각된다. 그리고 이 추론에서와 같이 XO가 TCA에 의해 합성이 증가된 것은 증가된 XO가 담즙울체로 손상된 간세포 내의 purine nucleotide의 이화를 촉진시켜 손상된 간세포의 용해를 용이하게 하기 위해 나타낸 하나의 현상이 아닌가 생각된다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간의 XO의 유전자 발현에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 XO 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 XO 활성도는 대조군인 총담관 대정맥 문합군 또는 총담관 폐쇄군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과를 미루어 볼 때 담즙울체 시 혈중에서 이 효소의 활성도가 증가된 것은 담즙울체간의 세포질에 있던 이 효소가 TCA에 의한 간의 괴사[19,20]로 간세포막의 투과성이 항진되어 다량 혈중으로 유출되어 나타난 결과로 생각된다. 이 실험에서 총담관 대정맥문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 XO 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간세포의 투과성에는 영향을 미치지 않는 담즙산이라는 것을

알 수 있었다.

이상 실험 결과로 보아 담즙산 중 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체 시 이 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 XO 활성도 증가 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 상대정맥 내에 주입시킨 다음 경시적으로 간과 혈청의 XO 활성도를 측정하여 이 효소에 대한 이들 담즙산의 효과를 알아보았다.

쥐에게 총담관 대정맥 문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 및 간 세포질 분획의 XO 활성도는 총담관 대정맥 문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 및 간 세포질 분획의 XO 활성도는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청과 간 세포질 분획의 XO 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다.

쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 XO의 Vmax치는 총담관 대정맥 문합만 시킨 군 또는 총담관 폐쇄만 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 총담관 대정맥 문합 또는 총담관 폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 이 효소의 Vmax치는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 또한 이 실험에서 측정한 이 효소의 Km치는 모든 실험군의 간 세포분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 담즙울체 간에서 XO의 활성도

증가는 담즙산 중에서 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙을체 시 이 효소의 혈청 중 활성도 증기는 TCA에 의한 간의 괴사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이 효소가 간에서 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Bray RC: Xanthine oxidase. In: Boyer PP, Lardy H, Myrback K, editors. *The Enzymes*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1963. Vol 7, p. 533-55.
- Krenitsky TA, Neil SM, Elion GB, Hitechings GH: A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1972; **150**(2): 585-99.
- Krenitsky TA: Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in purine and purine analogue metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1973; **41**: 57-64.
- Younes M: Concerning the determination of xanthine oxidase in biological material via its ability to produce superoxide. *Biochem Pharmacol* 1981; **30**(6): 673.
- Giler S, Sperling O, Brosh S, Urca I, De Vries A: Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clin Chim Acta* 1975; **63**: 37-40.
- 곽춘식: 흰쥐 담즙을체간의 xanthine oxidase의 활성치. *계명의대논문집* 1985; **4**(2): 125-30.
- 김일경, 김여희, 곽춘식: 담즙산 부하에 의한 쥐 간의 benzoyltransferase의 유도. *계명의대학술지* 2001; **20**(1): 20-30.
- 이병욱, 곽춘식: Tourocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 arylamine N-methyltransferase의 유도. *대한의과학회지* 2000; **59**(2): 141-53.
- 정상호, 김여희, 곽춘식: 쥐에서 turocholate 부하에 의한 간의 glyoxalase I의 유도. *계명의대학술지* 2001; **20**(1): 1-11.
- 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.
- 김성국, 김여희: 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase의 유도. *대한간학회지* 1997; **3**(3): 210-26.
- 한병훈, 김여희: 흰쥐 간의 arylesterase 활성에 미치는 고부하 taurocholate의 영향. *대한간학회지* 1997; **3**(2): 154-69.
- 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포 분획법 I. Mitochondria 및 microsome의 분리. *계명의대논문집* 1986; **5**(1): 45-53.
- Battelli MG: Enzymic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase (D form) to oxidase (O form). *FEBS Lett* 1980; **113**(1): 47-51.
- Rowe PB, Wyngaarden JB: The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J Biol Chem* 1966; **241**(23): 5571-6.
- 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.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; **177**(3): 751-66.
- 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): 536-42.
- Palmer RH: Bile acids, liver injury, and liver disease: *Arch Intern Med* 1972; **130**(4): 606-17.
- Drew R, Priestly BG: Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experimentia* 1979; **35**(6): 809-11.