啓明醫大學術誌 第22券 1號
Keimyung Med J
Vol. 22, No. 1, June, 2003

담즙울체 쥐에서 간의 Glyoxalase II 활성도에 미치는 Taurocholate의 정맥 내 투여의 효과

계명대학교 의과대학 생화학교실

곽춘식 · 정상호 · 김여희

Effect of Intravenous Administration of Taurocholate on Hepatic Glyoxalase II Activity in Cholestatic Rats

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

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

Abstract : The possible mechanisms of decreased glyoxalase Ⅱ (GLO-Ⅱ) activity in cholestatic rat liver was studied. Hepatic GLO-Ⅱ activity was determined from the experimental rats with choledocho-caval shunt (CCS) or bile duct obstruction (BDO). The Michaelis-Menten constant in this hepatic enzyme was also measured. The activity of hepatic GLO-Ⅱ as well as the Vmax value was found to be decreased significantly in both CCS plus taurocholic acid (TCA) injection group, and BDO plus TCA injection group than in each control group such as CCS alone and BDO alone. However, the GLO-Ⅱ activity did not change in both the CCS plus tauroursodeoxycholic acid injection group and the BDO plus tauroursodeoxycholic acid injection group. On the other hand, the Km value of the GLO-Ⅱ did not vary in any experimental groups. Above results suggest that TCA repress the biosynthesis of GLO-II in the liver.

Key Words : Bile duct obstruction, Choledocho-caval shunt, Glyoxalase Ⅱ, Taurocholic acid, Tauroursodeoxycholic acid

서 론

Glyoxalase Ⅱ(S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase, EC 3.1.2.6, GLO-Ⅱ)는 생체이물 생체 변환 효소로서 glutathione의 thiolesters를 가수분해하여 환원형 glutathione과 2-hydroxy acid를 생성케하는 반응을 촉매하는 효소이다[1]. 이 효소는 포유동물 간의 세포질에 풍부히 존재하며[2,3] 간의 미토콘드리아에서도 발견된다[2]. 그리고 이 효소는 glyoxalase Ⅰ 및 환원형 glutathione과 함께 glyoxalase system이라 불리워지고 있다[3].

Glyoxalase system의 생리적 역할은 아직 분명치는 않으나 현재까지 알려진 것은 생체 내에서 생성되거나 장내세균이 합성하여 흡수한 2-oxoaldehyde들 중 한가지인 methylglyoxal을 분해하여 락트산을 생성케 하므로써 methylglyoxal의 독성을 없애는 것이다[1,3]. 즉 methylglyoxal이 독성을 나타내는 것은 methylglyoxal이 반응성이 활발한 카르보닐기를 두 개 가지고 있기 때문에 생체 내에서 타이올 화합물과 반응하여 세포증식을 억제하는 methylglyoxalic thiolester를 생성케 하기 때문이며 바로 이 glyoxalase system이 methylglyoxal를 분해하므로써 그 독성을 없애는 것이다[1,3]. 이러한 점으로 보아서 glyoxalase system은 세포증식을 조절하는 역할을 한다고 추정하고 있다[1,3]. 그리고 이 효소는 흰쥐에서 담즙울체가 야기되었을 때 간세포질에서 그 활성도가 감소되는 것으로 밝혀져 있다[4]. 그러나 담즙울체간에서 GLO-Ⅱ활성도의 감소 기전을 규명한 보고는 아직 없다.

생체이물 생체 변환 효소로서 담즙울체간에서의 활성도 변동 기전이 일부 밝혀져 있는 것은 arylesterase, carboxylesterase[5,6], cholinesterase[7], alcohol dehydrogenase, catalase, microsomal ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase[8], benzoyltransferase[9], arylamine N-methyltransferase 및 thiol methyltransferase [10,11] 등이다. 즉 이들 중 arylesterase, carboxylesterase[5,6], cholinesterase[7], alcohol dehydrogenase 및 catalase[8]는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되며 그 기전은 담즙울체로 간 세포내에 증가된 taurocholic acid(TCA)가 이들 효소의 합성을 억제하여 이들 효소의 합성을 감소시킨다[5-8]는 것이다. 마이크로솜 ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase[8], benzoyltransferase[9], arylamine N-methyltransferase 및 thiol methyltransferase[10,11]는 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 TCA가 이들 효소의 합성을 자극하여 이들 효소의 합성을 증가시킨다[8,10,11]는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들에 대해서 TCA가 어떤 효과를 나타내는지를 알아낸다면 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들의 활성도 변동 기전은 그 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되는 GLO-Ⅱ의 활성도 감소 기전을 알아보기 위하여 시행하였다. 흰쥐에게 총담관 결찰로 총담관을 폐쇄시킨 직후 또는 총담관대정맥문합(choledocho-caval shunt)을 시킨 직후의 담즙울체간에서 효소 유전자의 발현율을 변동시키는 것으로 추정하는 TCA[5,6,12,13]와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 tauroursodeoxycholic acid(TUDCA)[5,6,12,13]를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 간 세포질 및 미토콘드리아 분획에서 GLO-Ⅱ의 활성도를 측정하는 한편 이 간 세포질 및 미토콘드리아 분획에서 이 효소의 Km치 및 Vmax치도 측정하였다. 실험 결과 TCA가 간에서 GLO-Ⅱ의 합성을 억제하는 것으로 생각되는 성적을 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

Reduced glutathione, S-lactoylglutathione, TCA(from ox bile, sodium salt), TUDCA (sodium salt), GLO-Ⅱ(from bovine liver) 및 단백질 표준액(10 g/100 mL bovine serum albumin) 등은 Sigma사(미국)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280 320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 한 군을 5마리로 하여 다음과 같이 15개 군으로 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 등[12]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 등[12]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μmol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였고, 총담관대정맥문합을 한 군은 총담관대정맥문합을 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였으며, 총담관대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관대정맥문합 직후 Ogawa 등[12]의 방법에 따라 TCA (체중 100 g당 45 μmol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다. 총담관대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관대정맥문합 직후 Ogawa 등[12]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, 총담관대정맥문합 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 흰쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 총담관대정맥문합은 상대정맥과 총담관을 의료용 sillicon tube을 사용하여 연결하였으며, 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA 액의 상대정맥 내에 주입은 syringe pump(model 341A, Sage instruments사, 미국)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취 하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사 시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4℃의 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.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2 4℃로 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, Thomas사, 미국)로 2 4℃를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10%(w/v)의 간 조직균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법[14]으로 세포질 및 미토콘드리아 분획을 분리하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2 4℃에서 시행하였으며 이 때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사(미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사(미국)의 SS-34 및 T865 rotor였고, sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former(model 570, ISCO사, 미국)를 사용하였다.

4. 효소 시료 조제

GLO-Ⅱ 활성도 측정용 효소 시료 조제는 분리한 간세포 분획들을 단백질량으로 5 mg/mL가 되도록 0.25 M sucrose 액에 현탁시켜 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

간의 세포질 및 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도 측정은 시료와 함께 S-lactoylglutathione을 기질로 사용하여 37℃에서 3분간 반응시키는 동안에 소모된 S-lactoylglutathione을 240 nm 파장에서 비색한 후 생성된 reduced glutathione 양으로 환산하여 효소의 활성도를 산출하는 Principato 등[15]의 방법에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 reduced glutathione을 nmol로 나타내었다.

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

6. Km치 및 Vmax치의 측정

수술 후 2 일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 GLO-Ⅱ는 기질로 S-lactoylglutathione을 사용하여 각각 기질 원액과 기질 희석액을 제조 한 후 이 기질액들을 사용하여 GLO-Ⅱ 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 초기 반응속도의 역수(1/vi)치를 그리고 기질의 농도로부터 기질 농도의 역수(1/[S])치를 계산하여 이중역수도(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 Rothstein[16] 법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법으로 정량하였다.

8. 성적 검정

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

성 적

1. 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄와 담즙 정체시간이 간의 GLO-Ⅱ 활성도에 미치는 영향

흰쥐에게 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 1).

2. 총담관대정맥문합 및 총담관폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 GLO-Ⅱ 활성도에 미치는 영향

Table 1. Effects of time and model of biliary retention on hepatic subcellular glyoxalase ·± activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase ·± activities (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)	
	Cytosol	Mitochondria
Normal	509.6°æ123.5	40.3°æ13.2
Sham 1 day	511.8°æ126.4	41.1°æ14.2
Sham 2 days	510.7°æ125.3	40.6°æ13.8
CCS 1 day	502.2°æ112.3	41.2°æ13.4
CCS 2 days	496.4°æ121.3	41.5°æ13.2
BDO 1 day	476.5°æ141.4	42.2°æ14.7
BDO 2 days	430.4°æ107.3	43.8°æ15.2

The data are expressed as mean °æ 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 after common bile duct ligation.

흰쥐에게 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관대정맥문합만 시킨 군 또는 총담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 44% ($P<0.01$) 및 약 47%($P<0.01$)의 감소를 나타내었으며(Table 2) 총담관폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 52%($P<0.01$) 및 약 56% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다(Table 3). 흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관대정맥문합만 시킨 군에 비해 모두 약간 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2). 그러나 흰쥐에게 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 대조군인 총담관폐쇄만 시킨 군 보다 각각 약 45%($P<0.05$) 및 약 53%($P<0.05$)의 감소를 나타내었다(Table 3). 그리고 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획과 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2 & 3).

3. 총담관대정맥문합 또는 담관폐쇄 후 2일 경과한 실험군에서 간 GLO-Ⅱ의 Km치 및 Vmax치의 변동

수술후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간의 GLO-Ⅱ를 기질인 S-lactoylglutathione에 대해서 Km치 및 Vmax치를 측정하였을 때 Km치는 모두 변동이 없었다(Table 4 & 5).

흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 직후 TCA

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular glyoxalase ·± activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase ·± activities (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)	
	Cytosol	Mitochondria
CCS 1 day	502.2°æ112.3	41.2°æ13.4
CCS 1 day+TCA	280.7°æ 76.2[k]	30.3°æ 8.8
CCS 1 day+TUDCA	498.3°æ114.7	40.6°æ12.6
CCS 2 days	496.4°æ121.3	41.5°æ13.2
CCS 2 days+TCA	262.8°æ 71.4[n]	28.3°æ 9.4
CCS 2 days+TUDCA	476.2°æ108.4	39.4°æ11.3

The data are expressed as mean °æ SD with 5 rats in each group; CCS 1 day and CCS 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after CCS operation; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45 ·mol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. k, P<0.01 vs. CCS 1 day; n, P<0.01 vs. CCS 2 days.

Table 3. Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct obstruction (BDO) on hepatic subcellular glyoxalase ·± activities in rats

Experimental groups	Glyoxalase ·± activities (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)	
	Cytosol	Mitochondria
BDO 1 day	476.5°æ141.4	42.2°æ14.7
BDO 1 day+TCA	230.2°æ 68.7[q]	23.4°æ 8.2[p]
BDO 1 day+TUDCA	471.2°æ136.2	42.5°æ14.2
BDO 2 days	430.4°æ107.3	43.8°æ15.2
BDO 2 days+TCA	190.6°æ 65.8[t]	20.5°æ 8.7[s]
BDO 2 days+TUDCA	426.3°æ102.5	41.7°æ14.3

The data are expressed as mean °æ SD with 5 rats in each group; BDO 1day and BDO 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after BDO; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45 ·mol/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.

를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 대조군인 가수술만 시킨 군보다는 약 44%(P<0.001), 대조군인 총담관대정맥문합만 시킨 군보다는 약 42% (P<0.01)의 감소를 나타내었다(Table 4).

흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 대조군인 가수술만

Table 4. Kinetic parameters of glyoxalase II from rat liver 2 days after choledocho-caval shunt (CCS 2 days) determined with S-lactoylglutathione as substrate

Experimental groups	Cytosol		Mitochondria	
	Km (mM)	Vmax (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)	Km (mM)	Vmax (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)
Sham 2 days	33.1°æ2.8	1,047.5°æ171.6	38.2°æ2.6	74.2°æ9.7
CCS 2 days	32.7°æ2.5	1,016.9°æ175.5	38.0°æ3.0	76.0°æ8.9
CCS 2 days+TCA	32.5°æ2.7	589.5°æ102.3^{i,n}	37.7°æ2.9	51.7°æ6.6^{h,n}
CCS 2 days+TUDCA	32.3°æ3.3	991.8°æ156.6	37.3°æ3.3	72.2°æ7.9

Michaelis-Menten constants for glyoxalase II were determined using S-lactoylglutathione at 37°... for cytosolic and mitochondrial fractions of experimental rat livers at two days after CCS. The data are expressed as mean °æ 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; n, P<0.01 vs. CCS 2 days.

Table 5. Kinetic parameters of glyoxalase II from rat liver 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with S-lactoylglutathione as substrate

Experimental groups	Cytosol		Mitochondria	
	Km (mM)	Vmax (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)	Km (mM)	Vmax (nmol reduced glutathione min^{-1} mg $protein^{-1}$)
Sham 2 days	33.1°æ2.8	1,047.5°æ171.6	38.2°æ2.6	74.2°æ 9.7
BDO 2 days	32.9°æ2.7	867.5°æ145.5	37.7°æ3.1	78.1°æ10.1
BDO 2 days+TCA	32.4°æ2.4	428.9°æ 94.6^{i,u}	37.4°æ2.8	37.5°æ 6.3^{i,u}
BDO 2 days+TUDCA	31.6°æ2.9	848.8°æ148.6	37.1°æ3.2	76.4°æ 9.5

Michaelis-Menten constants for glyoxalase II were determined using S-lactoylglutathione at 37°... for cytosolic and mitochondrial fractions of experimental rat livers at two days after BDO. The data are expressed as mean °æ SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 3 and text. i, P<0.001 vs. Sham 2 days; u, P<0.001 vs. BDO 2 days.

시킨 군보다는 약 30%(P<0.01), 대조군인 총담관대정맥문합만 시킨 군보다는 약 32%(P<0.01) 감소를 나타내었다. 그러나 총담관대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 또는 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 대조군인 가수술만 시킨 군 또는 총담관 대정맥문합만을 시킨 군과 비교했을 때는 모두 별 차이가 없었다(Table 4). 흰쥐에게 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 대조군인 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 59%(P<0.001) 및 약 49%(P<0.001), 대조군인 총담관폐쇄만 시킨 군보다는 각각 약 51%(P<0.001) 및 약 52%(P<0.001) 감소를 나타내었다. 그러나 총담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일

경과시켰을 때 간 세포질 및 미토콘드리아 분획에서 이 효소의 Vmax치는 대조군인 가수술만 시킨 군 또는 총담관폐쇄만 시킨 군과 각각 비교했을 때 모두 별 차이가 없었다(Table 5).

고 찰

간은 생체 내 어느 장기보다도 그 생화학적 기능이 다양하고 활발하다. 간은 흡수된 영양소나 약물을 포함한 생체이물들을 대사시켜 그 대사물을 배설시키거나 간외 조직에 분배 해주는 역할을 하며 다른 여러 장기들의 대사기능과 연계하여 이를 총괄하는 기능을 가진다. 또한 간은 알부민을 비롯한 여러 단백질을 생합성하여 보급해 주고 아울러 생체 활성 물질들을 생성 및 처리를 하는 기능을 가질 뿐만 아니라 왕성한 재생 기능도 가진다. 이러한 간의 기능들 중 특히 생체이물 생체변환 기능의 한 부분인 해독 기능은 생명 현상 유지에 필수적인 기능이다. 이러한 간에서 배설기능이 억제되거나, 담즙 성분이 간으로 역류되면 간에는 담즙울체가 야기되며 이때 담즙울체간은 형태학적 변화[17,18]와 함께 간기능장애의 지표가 되는 여러 효소들의 활성도가 변동되는 것이 잘 알려져 있다.

동물 실험에서 담즙울체를 야기시켜 간이 손상을 받으면 간의 GLO-Ⅱ 활성도가 감소되는 것은 알려져 있으나 그 기전은 알려진 바 없다. 따라서 흰쥐의 담즙울체간에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체간에서 생체이물의 해독에 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. 실험적으로 쥐에게 담즙울체를 야기시키면 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들은 많으며 그 중에서도 특히 생체이물 생체 변환 효소들이 많다[5-11]고 한다.

이 연구에서는 생체이물 생체 변환 효소인 GLO-Ⅱ의 활성도가 흰쥐 담즙울체간에서 왜 감소 되었는지 그 기전의 일단을 알아보고자 하였다.

이 실험에서 흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 세포질 분획과 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 별 변동을 나타내지 않았다. 또한 흰쥐에게 총담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 세포질 분획과 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 별 변동을 나타내지 않았다. 따라서 간의 GLO-Ⅱ는 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄 후 2일 경과시켰을 때까지는 그 활성도가 변동되지 않는 것을 알 수 있었다.

이 실험에서 흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때의 간 세포질 분획과 쥐에게 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획 및 미토콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 각각의 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 한편 이 실험에서 흰쥐에게 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 미토콘드리아 분획에서의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 이 실험에서 측정한 S-lactoylglutathione에 대한 GLO-Ⅱ의 Km치는 모든 실험군의 간세포 분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이 결과로 보아 TCA는 간의 GLO-Ⅱ의 합성을 억제한다고 추정할 수 있었다. 특히 TCA를 주입한 실험군에서 이 효소의 Km치는 변동이 없으면서 Vmax치가 감소된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침 해주는 결과라고 생각된다.

그러나 glyoxalase 시스템의 일원인 GLO-Ⅱ[3]의 합성이 억제된 것은 이 실험만으로는 무엇이라 분명하게 설명하기는 어려우며 따라서 이 문제는 앞으로 계속 추구하여야 하겠다.

이 실험에서 흰쥐에게 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획 및 미토

콘드리아 분획의 GLO-Ⅱ 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 GLO-Ⅱ의 유전자 발현에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다.

이상 실험 결과로 보아 담즙울체간에서 GLO-Ⅱ의 활성도 감소는 담즙산 중 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각되며 따라서 GLO-Ⅱ는 담즙울체간에서 그 합성이 감소되는 효소로 생각된다.

요 약

이 연구는 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 GLO-Ⅱ의 활성도 감소 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며 흰쥐에게 총담관대정맥문합을 시킨 직후 또는 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 상대정맥 내에 주입시킨 다음 경시적으로 간의 GLO-Ⅱ 활성도를 측정하여 이 효소에 대한 이들 담즙산의 효과를 알아보았다.

흰쥐에게 총담관대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 GLO-Ⅱ 활성도가 전자는 세포질 분획에서 후자는 세포질 및 미토콘드리아 분획에서 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 TCA대신 TUDCA를 주입시켰을 때는 이 효소의 활성도가 대조군과 별 차이가 없었다.

흰쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 총담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 세포질 및 미토콘드리아 분획에서의 GLO-Ⅱ의 Vmax치는 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이 효소의 Km치는 모든 실험군의 간 세포 분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 담즙울체간에서 GLO-Ⅱ의 활성도 감소는 담즙산들 중 특히 TCA에 의해 이 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mannervik B. Glyoxalase I. In: Jakoby WB, editor. *Metabolic Basis of Detoxication*. New York: Academic Press; 1980,Vol**II**,p.263-73.
2. Talesa V, Uotila L, Koivusalo M, Principato G, Giovannini E, Rosi G. Demonstration of glyoxalase Ⅱ in rat liver mitochondria partial purification and occurrence in multiple forms, *Biochim Biophys Acta* 1988;**955**(1):103-10.
3. 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.
4. 박재신. 흰쥐 재생간과 담즙울체간의 Glyoxalase Ⅰ 및 Ⅱ와 Epoxide Hydratase의 활성도. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1993;1-58.
5. 한병훈, 김여희. 흰쥐 간의 Arylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *대한간학회지* 1997;**3**(12):154-69.
6. 한병훈, 김여희. 흰쥐 간의 Carboxylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *계명의대논문집* 1998;**17**(4):487-503.
7. 박소경, 곽춘식. 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 Cholinesterase의 합성 억제. *계명의대논문집* 1999;**18**(2):204-17.
8. Kim YH, Shin MJ. Effects of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Exp Mol Med* 2002;**34**(2):123-30.
9. 김일경, 김여희, 곽춘식. 담즙산 부하에 의한 쥐 간의 Benzoyltransferase의 유도. *계명의대학술지* 2001;**20**(1):20-30.
10. 이병욱, 곽춘식. Taurocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 Arylamine N-Methyltransferase의 유도. *대한외과학회지* 2000;**59**(2):141-53.
11. 이병욱, 곽춘식. 담즙울체 쥐에서 간의 Thiol Methyltransferase 활성도에 미치는 Taurocholate의 정맥 내 투여의 영향. *대한외과학회지* 2002;**63**(1):1-10.

12. 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.
13. 김성국, 김여희. 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 γGlutamyl Transpeptidase의 유도. *대한간학회지* 1997;**3**(3):210-26.
14. 곽춘식, 곽정식. 흰쥐 간세포 분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. *계명의대논문집* 1986;**5**(1):45-53.
15. Principato GB. Rosi G. Talesa V. Giovannini E. Uotila L. Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from the liver and brain of Wistar rats. *Biochim Biophys Acta* 1987;**911**(3):349-55.
16. 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.
17. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11th ed. Cambridge: Blackwell Scientific Publications; 2002,p.219-398.
18. Desmet VJ. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC. editors. *Pathology of the Liver.* 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994,p.425-74.