대한외과학회지 : 제 66 권 제 5 호
Vol. 66, No. 5, May, 2004

□ 원 저 □

담즙울체 쥐에서 간 및 혈청의 Thiosulfate Sulfurtransferase 활성도에 미치는 Taurocholate의 정맥 내 투여의 영향

사랑의 클리닉 외과, 이롬 생명과학연구원 및 [1]계명대학교 의과대학 생화학교실

이 병 욱 · 곽 춘 식[1]

Effects of Intravenous Administration of Taurocholate on Liver and Serum Thiosulfate Sulfurtransferase Activities in Cholestatic Rat

Byung Wook Rhee, M.D. and **Chun Sik Kwak,** Ph.D.[1]

Purpose: To Study the possible mechanisms of change of thiosulfate sulfurtransferase (TST) activity in cholestatic rat liver and serum.
Methods: Rats were divided into seven groups: those receiving a sham operation (Sham group), with a bile duct obstruction (BDO) alone (BDO group), with a BDO plus taurocholic acid (TCA) injection (BDO plus TCA group), with a BDO plus tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) injection (BDO plus TUDCA group), a choledocho-caval shunt (CCS) operation (CCS groups), a CCS operation plus TCA injection (CCS plus TCA group) and a CCS operation plus TUDCA injection (CCS plus TUDCA group). The TST activities in the serum and in the hepatic subcellular fractions isolated from above experimental rats were determined. The K_m and V_{max} values of this hepatic enzyme were measured.
Results: The liver cytosolic, mitochondrial and microsomal TSTs activities, as well as the TST V_{max} values were found to be significantly decreased in the BDO plus TCA and BDO groups compared to the control group. The activity and V_{max} value of the liver cytosolic TST were also found to be significantly decreased in the CCS plus TCA group. Conversely, there was no variation in the K_m values of the hepatic enzymes in any of the above experimental groups. The serum TST activities in the CCS plus TCA and BDO plus TCA groups, were significantly increased compared with the control, CCS and BDO groups. However, the serum and hepatic enzyme activities were unchanged in both the CCS plus TUDCA and BDO plus TUDCA groups.
Conclusion: The above results indicate that TCA represses the biosynthesis of TST in the liver. Also, the elevated TST activity in the serum is most likely due to an increase in the permeability of hepatocytes membrane upon TCA mediated liver cell necrosis. **(J Korean Surg Soc 2004; 66:359-366)**

Key Words: Cholestasis, Sulfurtransferase, Taurocholic acid
중심 단어: 담즙울체, 타우로콜산, 황전달효소

Department of Surgery, Loving Care Clinic, Seoul, Korea, [1]Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Deagu, Korea

서 론

간은 물질 대사의 주된 기관으로서 대사기능, 재생기능 등 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며(*1*) 특히 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해한 물질을 생체 변환시키는 생체이물 생체 변환(xenobiotic biotransformation) 기능을 가짐으로써 생체를 보호하고 있다.(*2*) 그러나 이러한 간이라 하더라도 담즙울체로 간이 손상을 받으면 생체이물 생체 변환 효소인 thiosulfate sulfurtransferase의 활성도가 간에서 변동이 되는 것(*3*)으로 알려져 있다. 따라서 담즙울체 간의 세포분획들에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체 간에서의 생체이물 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

Thiosulfate sulfurtansferase (thiosulfate: cyanide sulfurtransferase, EC 2. 8. 1. 1, TST)는 cyanide, sulfite, organic sulfinate 및 dithiol을 sulfur 포합하여 배설시키는 생체이물 생체 변환 과정을 촉매하는 제2상 생체이물 생체 변환 효소들 중 해독효소이며(*4-7*) 포유동물의 간에 주로 분포되어 있다.(*4,5*) 이 효소는 혈중에도 출현되며(*7*) 간세포에서는 세포질, 미토콘드리아 및 내형질 세망에 국재되어 있다.(*3,5,8*) 이러한 TST는 쥐에서 담즙울체가 야기되었을 때 간 조직에

책임저자 : 이병욱, 서울특별시 강남구 논현동165번지
㊞ 135-010, 사랑의 클리닉 외과
Tel: 02-3445-2277, Fax: 02-3445-2276
E-mail: bwrhee@godpeople.com
접수일 : 2003년 12월 12일, 게재승인일 : 2004년 3월 22일

서는 그 활성도가 감소되고 혈청에서는 그 활성도가 증가되는 것(*3*)으로 밝혀져 있다. 그러나 이 효소가 담즙울체간에서 어떤 기전에 의해 그 활성도가 감소되는지를 규명한 보고는 아직도 없다.

이 연구는 TST 활성도가 담즙울체간에서 왜 감소되었는지 그 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였다. 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합(choledocho-caval shunt)을 시킨 직후에 담즙울체간에서 효소의 합성에 영향을 미친다(*9,10*)는 taurocholic acid (TCA) 또는 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다(*10,11*)는 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)를 정맥 내에 주입시켜 각각 경시적으로 혈청과 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 TST의 활성도를 측정하였으며 아울러 간의 TST에 대한 반응속도분석도 하였다. 그 결과 TCA가 간에서 TST의 합성을 억제하는 것으로 생각되는 성적을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

방 법

1) 시약

Potassium cyanide, sodium thiosulfate pentahydrate, formaldehyde, ferric nitrate, ferric thiocyanate, potassium phosphate monobasic, TCA sodium salt (from ox bile), TUDCA sodium salt, thiosulfate sulfurtransferase (typeII, from bovine liver) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사 (St, Louis, MO, USA) 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-Dawley 종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 15군으로 나누었다. 즉 정상군 (1군, 결과 Table 1 및 4 의 Normal), 가수술군은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 1, 4 및 7에서 Sham 1 day 및 Sham 2 days)으로 하였고 담관 폐쇄군 (bile duct obstruction)은 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 1, 3, 4, 6 및 8에서 BDO 1 day 및 BDO 2 days)으로 하였으며 담관 폐쇄와 함께 TCA 또는 TUDCA를 주입하는 방법은 Ogawa 등(*10*)의 방법을 변개한 김 등(*12*)의 방법에 준하였다. 즉, 담관 폐쇄와 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 TCA (체중 100 g당 45μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 3, 6 및 8에서 BDO 1 day+TCA 및 BDO 2 days+TCA)으로 하였다. 담관폐쇄와 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 TUDCA (체중 100 g당 45μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2 군, 결과 Table 3, 6 및 8에서 BDO 1 day+TUDCA 및 BDO 2 days+TUDCA)으로 하였고 총담관 대정맥문합을 한 군은 총담관 대정맥문합을 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 1, 2, 4, 5 및 7에서 CCS 1 day 및 CCS 2 days)으로 하였으며 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 TCA (체중 100 g당 45μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 2, 5 및 7의 CCS 1 day+TCA 및 CCS 2 days+TCA)으로 하였다. 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 TUDCA (체중 100 g 당 45μmoles)를 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군, 결과 Table 2, 5 및 7의 CCS 1 day+TUDCA 및 CCS 2 days+TUDCA)으로 하였다.

각 실험군의 쥐는 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다.

사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다.

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

3) 간적출 및 세포분획

모든 실험군의 쥐에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한후 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.

한편 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 Co., USA)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(*13*)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

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

4) TST 활성도 측정용 효소 시료 조제

세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 단백질 양으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose 액에 현탁시켜 사용하였다.

5) 효소 활성도 측정

혈청과 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 TST의 활성도 측정은 시료와 함께 potassium cynaide와 sodium thiosulfate를 기질로 사용하여 25°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성된 thiocyanate를 ferric nitrate와 반응시켜 생성된 ferric thiocyanate를 460 nm 파장에서 비색하여 효소의 활성도를 산출하는 Westley(*6*)의 법에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 ferric thiocyanate를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사(USA)의 정제된 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Cary 210, Varian, USA)였다.

6) Km값 및 Vmax값의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 TST의 2종 기질 중 sodium thiosulfate를 선택하여 기질원액과 기질 희석액을 제조한 후 이 기질액들을 사용하여 TST의 활성도를 측정한 후 이 성적으로부터 초기반응속도의 역수(1/vi)값을 그리고 이 효소 활성도 측정에 사용한 기질액의 농도로부터 기질농도의 역수(1/[S])값을 계산하여 이중역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km값과 Vmax값을 산출하였다.

7) 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(*14*)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법(*15*)으로 정량하였다.

8) 성적검정

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

결 과

1) 쥐에서 간의 TST 활성도에 미치는 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄와 담즙 정체 시간의 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 TST 활성도와 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 세포질 분획의 TST 활성도는 변동을 나타내지 않았다. 그러나 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 세포질 분획의 TST 활성도는 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 담관폐쇄 후 1일 경과시킨 군의 간 세포질 분획의 TST 활성도는 정상군보다는 약 15% ($P<0.05$), 가수술군보다는 약 16% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었으며 담관폐쇄 후 2일 경과시킨 군의 세포질 분획의 이 효소 활성도는 정상군보다는 약 20% ($P<0.05$), 가수술군보다는 약 14% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 그리고 간의 세포질 분획의 TST 활성도를 총담관 대정맥문합을 시킨 군과 담관폐쇄를 시킨 군 간에 상호 비교했을 때는 담관폐쇄를 시킨 군이 총담관 대정맥문합을 시킨 군보다 이 효소 활성도가 약간 더 감소하였으며

Table 1. Effects of time and model of biliary retention on hepatic subcellular thiosulfate sulfurtransferase activities in rats

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (μmol ferric thiocyanate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	3.06±0.28	4.20±0.83	0.24±0.06
Sham 1 day	3.11±0.33	4.29±0.87	0.25±0.07
Sham 2 days	3.10±0.31	4.32±0.91	0.25±0.07
CCS 1 day	3.02±0.27	4.27±0.85	0.23±0.06
CCS 2 days	2.87±0.34	4.03±0.81	0.25±0.08
BDO 1 day	2.60±0.28*†	3.97±0.78	0.29±0.09
BDO 2 days	2.46±0.32*‡	3.71±0.82	0.27±0.07

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Sham 1 day or Sham 2 days = sacrificed on the 1st day or 2nd day after sham operation; CCS 1 day or CCS 2 days = sacrificed on the 1st day or 2nd day after choledocho-caval shunt; BDO 1 day or BDO 2 days = sacrificed on the 1st day or 2nd day after common bile duct ligation; CCS = choledocho-caval shunt; BDO = bile duct obstruction. *$P<0.05$ vs. Noramal; † $P<0.05$ vs. Sham 1 day; ‡ $P<0.05$ vs. Sham 2 days.

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

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (μmol ferric thiocyanate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CCS 1 day	3.02±0.27	4.27±0.85	0.23±0.06
CCS 1 day+ TCA	2.76±0.28	3.63±0.76	0.21±0.07
CCS 1 day+ TUDCA	3.08±0.31	4.22±0.87	0.24±0.05
CCS 2 days	2.87±0.34	4.03±0.81	0.25±0.08
CCS 2 days+ TCA	2.23±0.25*	3.44±0.67	0.20±0.07
CCS 2 days+ TUDCA	2.96±0.28	4.15±0.79	0.26±0.06

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group; CCS 1 day+TCA or CCS 1 day+TUDCA, and CCS 2 days+ TCA or CCS 2 days+TUDCA. One of the following bile acids were administered intravenously through the superior vena cava, TCA or TUDCA (45μmoles/100 g body weight) at the time of CCS operation in rats. Then the rats were sacrificed 1 or 2 days after CCS operation. *P<0.01 vs. CCS 2 days.

Table 3. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on hepatic subcellular thiosulfate sulfurtransferase activities in rats

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (μmol ferric thiocyanate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
BDO 1 day	2.60±0.28	3.97±0.78	0.29±0.09
BDO 1 day+ TCA	1.92±0.30†	2.53±0.74*	0.17±0.05*
BDO 1 day+ TUDCA	2.67±0.31	4.12±0.84	0.26±0.07
BDO 2 days	2.46±0.32	3.71±0.82	0.27±0.07
BDO 2 days+ TCA	1.22±0.27‖	2.26±0.71‡	0.13±0.06§
BDO 2 days+ TUDCA	2.52±0.29	3.94±0.87	0.25±0.08

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group; BDO 1 day+TCA or BDO 1 day+TUDCA, and BDO 2 days+ TCA or BDO 2 days+TUDCA. One of the following bile acids were administered intravenously through the superior vena cava, TCA or TUDCA (45μmoles/100 g body weight) at the time of common bile duct ligation in rats. Then the rats were sacrificed 1 or 2 days after common bile duct ligation. *P<0.05 vs. BDO 1 days; † P<0.01 vs. BDO 1 days; ‡ P<0.05 vs. BDO 2days; §P <0.01 vs. BDO 2 days; ‖P<0.01 vs. BDO 2 days.

양 군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때보다 2일 경과시켰을 때 간의 이 효소의 활성도는 약간 더 감소하였다(Table 1).

2) 쥐에서 간의 TST 활성도에 미치는 총담관 대정맥 문합 및 담관폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA 주입의 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때는 대조군보다 약 22% (P <0.01)의 감소를 나타내었다. 그러나 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서는 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일을 경과시켰을 때 이 효소의 활성도는 유의한 변동이 없었다. 뿐만 아니라 간의 세포질 분획에서는 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 경과시켰을 때도 이 효소의 활성도는 유의한 변동을 나타내지 않았다. 또한 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때도 간의 3종 세포분획에서 TST 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다(Table 2). 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 TST 활성도는 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 담관폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST 활성도는 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 26% (P<0.01) 및 약 50% (P<0.001)의 감소를 나타내었고, 간 미토콘드리아 분획의 TST 활성도는 담관폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 36% (P<0.01) 및 약 39% (P<0.05)의 감소를 나타내었으며, 간 마이크로솜 분획의 이 효소 활성도는 담관폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 41% (P<0.05) 및 약 52% (P<0.01)의 감소를 나타내었다. 그러나 담관폐쇄 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때는 간의 3종 세포분획에서 TST 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다(Table 3).

3) 쥐에서 혈청의 TST 활성도에 미치는 총담관 대정맥 문합 또는 담관폐쇄와 담즙 정체 시간의 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 즉 총담관 대정맥문합 후 1일 경과시킨 군에서 혈청의 TST 활성도는 정상군보다는 약 83% (P<0.01), 가수술군보다는

Table 4. Effects of time and model of biliary retention on serum thiosulfate sulfurtransferase activity in rats

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (nmol ferric thiosyanate min^{-1} ml^{-1})
Normal	206±45
Sham 1 day	213±56
Sham 2 days	209±48
CCS 1 day	376±72*‡
CCS 2 days	428±67† ‖
BDO 1 day	1,015±276† §
BDO 2 days	997±245† ‖

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1 and text. *P<0.01 vs. Normal; † P<0.001 vs. Normal; ‡ P<0.01 vs. Sham 1 day; § P<0.001 vs. Sham 1 day; ‖ P<0.001 vs. Sham 2 days.

Table 5. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledochocaval shunt (CCS) on serum thiosulfate sulfurtransferase activity in rats

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (nmol ferric thiocyanate min^{-1} ml^{-1})
CCS 1 day	376±72
CCS 1 day+TCA	490±76*
CCS 1 day+TUDCA	387±62
CCS 2 days	428±67
CCS 2 days+TCA	544±81†
CCS 2 days+TUDCA	402±75

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 2 and text. *P<0.05 vs. CCS 1 day; † P<0.05 vs. CCS 2 days.

Table 6. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on serum thiosulfate sulfurtransferase activity in rats

Experimental groups	Thiosulfate sulfurtransferase activities (nmol ferric thiocyanate min^{-1} ml^{-1})
BDO 1 day	1,015±276
BDO 1 day+TCA	1,227±284
BDO 1 day+TUDCA	968±229
BDO 2 days	997±245
BDO 2 days+TCA	1,410±291*
BDO 2 days+TUDCA	978±253

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 3 and text. *P<0.01 vs. BDO 2 days.

Table 7. Rat hepatic thiosulfate sulfurtransferase kinetic parameters from 2 days after choledocho-caval shunt (CCS 2 days) determined with sodium thiosulfate

Cell fractions	Sham 2 days	CCS 2 days	CCS 2 days +TCA	CCS 2 days +TUDCA
	Km (mM)			
Cytosol	245±42	247±46	242±52	244±38
	Vmax (μmol ferric thiocyanate min^{-1} mg $protein^{-1}$)			
Cytosol	3.82±0.38	3.34±0.41	2.69±0.34*†	3.65±0.36

Michaelis-Menten constants for thiosulfate sjlfurtransferase were determined using sodium thiosulfate and potassium cyanide at 25°C for cytosolic fraction of male rat livers at two days after CCS. The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1, 2 and text. *P<0.01 vs. Sham 2 days; † P<0.05 vs. CCS 2 days.

약 77% (P<0.01)의 증가를 나타내었으며 총담관 대정맥문합 후 2일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군보다는 약 108% (P<0.001), 가수술군보다는 약 105% (P<0.001)의 증가를 나타내었다. 그리고 담관폐쇄 후 1일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군보다는 약 393% (P<0.001), 가수술군보다는 약 377% (P<0.001)의 증가를 나타내었으며 담관폐쇄 후 2일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군보다는 약 384% (P<0.001), 가수술군보다는 약 377% (P<0.001)의 증가를 나타내었다 (Table 4).

한편 혈청의 TST 활성도를 총담관 대정맥문합을 시킨 군과 담관폐쇄를 시킨 군 간에 상호 비교했을 때는 담관폐쇄를 시킨 군이 총담관 대정맥문합을 시킨 군보다 이 효소의 활성도가 훨씬 더 증가하였다. 그러나 양군 모두 날짜 경과에 따른 변동은 유의하지 않았다(Table 4).

4) 쥐에서 혈청의 TST 활성도에 미치는 총담관 대정맥문합 및 담관폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA 주입의 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한

Table 8. Rat hepatic thiosulfate sulfurtransferase kinetic parameters from 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with sodium thiosulfate

Cell fractions	Sham 2 days	BDO 2 days	BDO 2 days+TCA	BDO 2 days+TUDCA
		Km (mM)		
Cytosol	245±42	243±45	238±47	245±44
Mitochondria	269±51	262±58	257±55	265±53
Microsome	602±117	587±126	583±119	594±130
		Vmax (μmol ferric thiocyanate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
Cytosol	3.82±0.38	2.90±0.39†	1.41±0.32‡ ‖	3.05±0.35*
Mitochondria	4.75±1.04	4.06±0.91	2.45±0.80† §	4.32±0.96
Microsome	0.26±0.07	0.28±0.08	0.14±0.06*§	0.26±0.08

Michaelis-Menten constants for thiosulfate sulfartransferase were determined using sodium thiosulfate and potassium cyanide at 25°C for cytosolic, mitochondrial and microsomal fractions of male rat livers at two days after BDO The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1, 3 and text. *P<0.05 vs. Sham 2 days; † P<0.01 vs. Sham 2 days; ‡ P<0.001 vs. Sham 2 days; §P<0.05 vs. BDO 2 days; ‖ P<0.001 vs. BDO 2 days.

증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 30% (P<0.05) 및 약 27% (P<0.05)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다(Table 5).

쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 담관폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 대조군보다 약 41% (P<0.01)의 증가를 나타내었다. 그러나 담관폐쇄 직후 TCA를 주입시켜 1일 경과시켰을 때와 담관폐쇄 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 TST 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다(Table 6).

5) 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄 후 2일 경과한 실험군에서 간 TST의 Km값 및 Vmax값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간의 TST는 2종 기질 중 sodium thiosulfate에 대하여 각각 Km값 및 Vmax값을 측정했을 때 Km값은 모두 변동이 없었다(Table 7, 8).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 약 30% (P<0.01), 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다는 약 19% (P<0.05)의 감소를 나타내었다. 그리고 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST의 Vmax값을 가수술만 시킨 군 또는 총담관 대정맥문합만 시킨 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다(Table 7).

쥐에게 담관폐쇄를 시킨 후 2일 경과시켰을 때는 간 세포질 분획의 TST의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 약 24% (P<0.01)의 감소를 나타내었다.

쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 TST의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 63% (P<0.001), 약 48% (P<0.01) 및 약 46% (P<0.05), 담관폐쇄만 시킨 군보다는 각각 약 51% (P<0.001), 약 40% (P<0.05) 및 약 50% (P<0.05)의 감소를 나타내었다. 그리고 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 약 20% (P<0.05)의 감소를 나타내었다. 그러나 담관폐쇄만 시킨 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다(Table 8).

고 찰

임상적 및 병리학적으로 담즙울체를 주소견으로 하는 간담도 질환들로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙울체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관수술 후 및 담낭절제 후의 총담관협착증, 간외 담도 폐쇄증, 담관암 및 간세포 암종의 총담관 침범으로 인한 담관폐쇄증, 췌장질환 및 총담관 주변 림프절의 종대로 인한 총담관의 외압성 폐쇄증, 기생충으로 인한 담관폐쇄증, 약물 또는 임신으로 인한 담관폐쇄증, 양성 재발성 담즙울체 등을 들 수 있다.(*16,17*) 이러한 담즙울체성 간담도 질환시에는 간세포에서 합성되고, 간세포 외로 유

리되는 효소들은 간 조직과 혈중에서 그 활성도의 변동이 심하게 나타난다는 사실은 잘 알려져 있다. 실험적으로 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체를 야기시키면 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들은 많으며 그 중에서도 특히 생체이물 생체 변환 효소들이 많다. 이들 중 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소들은 arylesterase, carboxylesterase, cholinesterase, alcohol dehydrogenase, catalase, monoamine oxidase, catechol-O -methyltransferase(*11,12*) 및 UDP-glucuronosyltransferase 등(*3*)이며 그 감소기전은 담즙울체로 간세포내에 증가된 TCA가 유전자 발현을 억제시켜 이들 효소의 합성을 억제시킨다(*16,17*)는 것이다. Ihm과 Kim(*3*)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간에서 세포질의 TST 활성도는 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였으며 미토콘드리아 분획에서 TST 활성도는 총담관 결찰 후 7일, 14일, 28일 및 42일에 마이크로솜 분획에서는 14일, 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였다. 이와 같은 TST는 쥐 담즙울체간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소라고 하였으며 그 감소 기전에 대해서는 TST 합성의 감소에 의한 것 같다고만 추론하고 있다. 그리고 담즙울체 시 혈청에서 TST의 활성도가 증가된 것은 담즙울체간에서 나타나는 간세포막의 투과성 항진이 TST의 활성도 증가와 관계가 있다고 하였다. 그러나 어떤 물질이 담즙울체간에서 TST의 활성도를 감소시키는 데 기여하였는지는 분명하게 설명하고 있지 않다.

이 실험에서도 총담관 결찰 후의 담즙울체간에서 TST의 활성도가 감소됨을 확인하였다. 그러나 담즙울체의 정도가 총담관을 결찰했을 때보다 경한 조건(*10,18*)인 총담관 대정맥문합을 시켰을 때는 TST의 활성도가 변동이 없었다. 이 연구에서는 담즙울체 간에서 TST 활성도가 어떤 기전에 의해 감소되었는가 하는 것을 규명하기 위하여 채택한 동물 모델 중 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 모델(BDO 군)과 총담관 대정맥문합을 시킨 모델(CCS 군)은 시간이 경과될수록 간 내 담즙산의 농도가 점차 증가되는 점은 동일하나 다른 점은 그 증가 속도가 총담관 결찰로 담관 폐쇄를 시킨 모델이 총담관 대정맥문합을 시킨 모델보다 빠르다(*10*)는 것이다. 이와 같이 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 모델이 총담관 대정맥문합을 시킨 모델보다 시간이 경과될수록 간 내 담즙산의 농도가 빠르게 증가되는 것은 담관폐쇄로 담관 내 수압이 증가됨으로 인하여 담관 내 담즙산이 간 세포 내로 강제 역류되고 또한 간 내 담즙산의 간 외 배출이 억제되기 때문에 나타난 현상(*18*)이라 한다. 그리고 총담관 대정맥문합을 시킨 모델에서는 담관 내 수압이 증가되지 않기 때문에 담즙산의 간 세포 내로의 역류가 심하지 않다(*18*)고 한다. 따라서 이러한 동물 모델을 사용하면 시간 경과에 따른 간 내 TST 활성도 변동에 대한 간 내 담즙산 농도의 증가 효과를 알 수 있다. 총담관을 결찰하여 담관폐쇄를 시킨 직후 detergent로서 간 세포막의 구성 성분을 용해시키고 또한 간 괴사를 유발시킨다는 TCA (*10,19*)를 상대정맥 내 주입한 모델(BDO+TCA 군)과 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대정맥 내 주입한 모델(CCS+TCA 군)로는 간 내 TCA의 고부하에 따른 TST활성도 변동에 대한 TCA의 효과를 알아낼 수가 있다. 이 연구에서 또 하나 규명해야 할 점은 주입시키는 담즙산의 종류가 다르면 이 효소 활성도에 미치는 영향도 달라지는가 하는 것이다. 그래서 담즙울체간에서 효소들의 합성에 영향을 주지 않으며(*10,11*) 담즙산의 간독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (*10,19,20*)를 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과를 관찰하였다.

이 실험에서 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 TST 활성도와 Vmax 값(효소 반응 최대속도 값)은 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 대정문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 세포질 분획의 TST 활성도와 Vmax값은 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이 실험에서 측정한 sodium thiosulfate에 대한 TST의 Km값(촉매 효율의 척도)은 모든 실험군의 간세포 분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다.

이 결과로 보아 TCA는 간의 TST 합성을 억제한다고 추정할 수 있다. 즉 TCA를 주입한 실험군들에서 이 효소의 촉매 효율은 변동이 없으면서 그 활성도와 효소 반응의 최대속도 값이 감소된 것이 위의 추론을 뒷받침 해주는 결과인 것이며 따라서 담즙울체간에서는 sulfur 포합이 억제되는 현상이 나타날 것으로 생각된다.

이 실험에서 총담관 대정맥문합이나 담관폐쇄로 간에 담즙울체를 야기시키거나 총담관 대정맥문합 직후 또는 담관폐쇄 직후 TCA를 고부하시켰을 때 혈청의 TST의 활성도는 유의하게 증가하였다. 이 결과를 미루어 볼 때 담즙울체 시 혈중에서 TST의 활성도가 증가된 것은 담즙울체간에 있던 TST가 TCA에 의한 간의 괴사(*21,22*)와 세정작용으로 간세포막의 투과성이 항진됨으로써 혈중으로 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

이 실험에서 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 및 혈청의 TST 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간의 TST 합성과 간세포의 투과성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 결과를 볼 때 결론적으로 담즙울체간에서 TST의 활성도 감소는 담즙산 중 특히 TCA에 의해 TST의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각되며

아울러 담즙울체 시 TST의 혈청중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간세포막의 투과성이 항진되어 TST가 간에서 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다. 그리고 이 실험은 기초 실험인 만큼 임상적인 응용에 대해서는 분명하게 말하기는 힘들지만 혈청 TST 활성도의 변동을 담즙울체성 간질환의 중증도와 예후에 대한 평가에 이용할 수 있지 않을까 생각된다.

REFERENCES

1) Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver Biliary System. 11th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2002. p.1-35.
2) Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J. Metabolic Basis of Detoxication, Metabolism, of Funcational Groups. New York: Academic Press; 1982. p.5-317.
3) Ihm JS, Kim YH. Thiosulfate sulfurtransferase and UDP-glucuronosyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. Exp Mol Med 1997; 29:197-201.
4) Westley J. Rhodanese. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 1973;39:327-68.
5) Westley J. Rhodanese and the sulfane pool. In: Jakoby WB, editor. Enzymatic Basis of Detoxication. Vol II, New York: Academic Press; 1980. p.254-62.
6) Westley J. Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (Rhodanese). In: Jakoby WB. editor. Methods in Enzymology. Vol 77, New York: Academic Press; 1981. p.285-91.
7) Drawbaugh RB, Marrs TC. Interspecies differences in rhodanese (thiosulfate sulfurtransferase, EC 2. 8. 1. 1) activity in liver, kidney and plasma. Comp Biochem Physiol [B] 1987; 86:307-10.
8) Koj A, Frendo J, Woitczak L. Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferase in rat liver. FEBS Lett 1975;57:42-6.
9) Kim SK, Kim YH. Induction of rat liver γ-glutamyl transpeptidase by bile acid load. Korean J Hepatol 1997;3:210-26.
10) 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;62:87-95.
11) Rhee BW, Kwak CS. Induction of hepatic arylamine N-methyltransferase by a taurocholate load in rats. J Korean Surg Soc 2000;59:141-53.
12) Kim IK, Kim YH, Kwak CS. Induction of hepatic benzoyltransferase by bile acid in rats. Keimyung Med J 2001;20: 20-30.
13) Kwak CS, Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. 1. Isolations of mitochondria and microsomes. Keimyung Univ Med J 1986;5:45-53.
14) Greenberg DM, Rothstein M. Method for isolation and degradation of labelled compounds. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. Method in Enzymology. Vol 4, New York: Academic Press; 1957. p.708-31.
15) Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum protein by means of biuret reaction. J Biol Chem 1949; 177:751-66.
16) Erlinger S. Cholestasis. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, editors. Schiff's Diseases of the Liver. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p.611-29.
17) Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System. Cambridge: Blackwell Scientific; 2002. p.219-398.
18) Toyota N, Miyai K, Hardison WG. Effect of biliary perssure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular light junction. Lab Invest 1984;50:536-42.
19) Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect againt cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts: In vivo studies in the rat. Gastroenterology 1991;100:203-11.
20) Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chritien Y, Ballet F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary billiary cirrhosis? Lancet 1987;1:834-6.
21) Drew R, Priestly BG. Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. Experimentia 1979;35:809-11.
22) Kitani K, Kanai S, Obta M, Sato Y. Differing transport maxima values for taurine-conjugated bile salts in rats and hamsters. Am J Physiol 1986;251:G852-8.