Catechol-O-Methyltransferase Activity from Regenerating Liver after Partial Hepatectomy in Rats

You-Hee Kim, Hye-Jung Choi and Chun-Sik Kwak[†]

Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, Daegu 700-712, Korea

The change of catechol-O-methyltransferase (COMT) activity during regeneration of rat liver was studied. Cytosolic, mitochondrial and microsomal COMTs activities were estimated in regenerating rat livers over a period of ten days after 70% (median and left lateral lobes) partial hepatectomy. The values of Km and Vmax in the hepatic enzymes were also measured. The activities of cytosolic and microsomal COMTs in regenerating rat liver after partial hepatectomy were found to be significantly increased between the second and the third day. Whereas the mitochondrial COMT activity did not change. The Vmax values of the cytosolic and microsomal COMTs in the regenerating rat liver were significantly increased at the second day after partial hepatectomy, however, the Km values of the above hepatic enzymes did not vary in all the experimental groups. Therefore, the results suggest that the biosynthesis of COMT was increased during the regeneration of rat liver.

Key Words: Catechol-O-methyltransferase, Partial hepatectomy, Regenerating liver

서 론

Catechol-O-methyltransferase (S-adenosyl-L-methionine: catechol-O-methyltransferase, EC 2. 1. 1. 6, COMT)는 catechol 및 catecholamine에 S-adenosyl-L-methionine으로부터 methyl 기를 이전받아 catechol 또는 catecholamine을 메틸화 시키는 반응을 촉매하는 제 2상 생체이물 생체 변환 (phase 2 xenobiotic biotransformation) 효소로서 (Kim, 1979; Borchardt, 1980) 주로 간세포의 세포질, 미토콘드리아 및 내형질세망에 국재되어 있다 (Borchardt, 1980; Raxworthy et al., 1982; Mun, 1996).

간이 손상을 받으면 간은 손상을 수복하기 위하여 재생이 활발해진다 (Matsumoto et al., 1991). 그러나 간의 재생에 대한 생화학적 지견은 충분치 않다. 재생간의 생화학적 연구를 위해서는 쥐의 간엽을 부분절제하여 형성된 재생간을 실험적 모델로 이용하고 있다. 쥐의 간엽들 중 일부 간엽을 절제하면 남은 간엽은 급격히 재생되어 비대해지며 (Lieberman et al., 1965), 재생이 왕성한 시기의 재생간에서는 대사의 속도를 조절하기 위하여 여러 효소들의 활성도가 변동된다. 특히 재생간에서 활성도가 변동되는 효소들 중에서는 생체이물

생체 변환 효소들의 활성도가 변동이 심하다 (Mun et al., 1988; Kwak et al., 1989; Joo et al., 2002)고 한다. COMT도 생체이물 생체 변환 효소로서 간에 주로 존재하는 효소인 만큼 재생간에서는 이 효소의 활성도가 변동될 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 찾아 볼 수 없었다. 따라서 재생간에서 이 효소의 활성도 변동과 그 기전을 알아냄으로써 간재생시 간의 생체이물 생체 변환 기능의 일단을 파악할 수 있을 것으로 생각된다.

이 연구는 재생간에서 COMT의 활성도 변동을 알아보기 위하여 시행한 연구로써 쥐 간의 중엽과 좌측외엽을 절제한 후 12시간 부터 10일까지 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 이 효소의 활성도를 측정하였으며 아울러 쥐의 간엽을 절제한 후 2일 경과시킨 쥐 간에서 이 효소의 Km값 및 Vmax값도 함께 측정하여 이들 성적을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 요약

S-(5'-Adenosyl)-L-methionine iodide, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, DL-dithiothreitol, Triton X-100, catechol-O-methyltransferase (from porcine liver, C 1897) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine serum albumin) 등은 Sigma사 (미국) 제품을 사용하였으며 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine은 New England Nuclear사 (미국)의 제품을 그리고 PPO (2,5-diphenyloxazole),

*논문 접수: 2004년 12월 27일

수정접수: 2005년 2월 25일

[†]교신저자: 곽춘식, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지,

계명대학교 의과대학 생화학교실

Tel: 053-250-7461, Fax: 250-7461

e-mail: kwak@dsmc.or.kr

bis-MSB {p-bis-(O-methylstyryl benzene)}, toluene (scintillation grade) 등은 Packard사 (미국)의 제품을 사용하였다. 그 외 일반 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320~350 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 한 군을 5마리로 하여 다음과 같이 12개군으로 나누었다.

1) 가수술군

가수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 6일 및 10일에 희생시킨 군 (총 6군).

2) 간엽 절제 수술군

간엽 절제수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 6일 및 10일에 희생시킨 군 (총 6군), 각 실험군은 개별 분리 수육하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다. 간엽 절제 수술 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다.

쥐 간엽 절제 수술은 복부 정중선을 따라 상복부를 약 2 cm 절개하여 간의 중엽과 좌측 외엽을 복강 밖으로 압출하고 인접 조직사이의 인대를 절단한 후 간엽의 기저 부위를 결찰한 뒤 간엽을 절제하였다. 절제한 간엽은 전체 간의 약 70%가 되며 이것을 원래간 (original liver)이라 부르기로 하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사 시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 또한 절제한 원래간은 4°C의 0.25 M sucrose액으로 잘 씻어서 간에 남아 있던 혈액을 가능한 한 모두 제거하였다. 그리고 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

간의 세포분획은 절제한 간엽과 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, Thomas사, 미국)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법 (Kwak et al., 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다. 위의 세포분획

법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사 (미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였고 sucrose linear density gradi-ent용액의 제조는 gradient former (model 570, ISCO, 미국)를 사용하였다

4. 효소 시료 조제

COMT 활성화도 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 마이크로솜 분획 및 미토콘드리아 분획 4.5 ml에 대하여 0.5 ml의 sucrose-Triton X-100 (Triton X-100 10 ml와 sucrose 8.56 g을 증류수에 녹여 100 ml 만든다) 액을 넣어 4°C에서 30분간 방치한 후 이 액을 이 효소 활성화도 측정용 시료로 사용하였으며 세포질 분획은 아무런 처치 없이 원액 그대로 사용하였다.

5. 효소 활성화도 측정

간세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성화도 측정은 효소 시료와 함께 3, 4-dihydroxybenzoic acid와 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시키는 동안에 생성된 방사성 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid를 toluene-isoamylalcohol (7:3) 혼합액으로 추출한 후 그 방사능을 측정하여 효소의 활성화도를 산출하는 Borchardt (1981)의 법에 준하였으며, 효소 활성화도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid의 총량을 pmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성화도 측정방법의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다.

이 실험에서 사용한 방사능 계측기는 Packard Tricarb 4530, liquid scintillation spectrometer (Packard사, 미국)였다.

6. Km값 및 Vmax값의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 COMT의 2종 기질 중 3, 4-dihydroxybenzoic acid를 선택하여 이 기질의 원액과 희석액을 제조한 후 이 기질액들과 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide 원액을 사용하여 COMT의 활성화도를 측정 한 후 이들 성적으로부터 1/vi값을 그리고 기질 농도로부터 1/[S]값을 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 그린 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 Greenberg et al. (1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법 (Gornall et al., 1949)으로 정량하였다.

8. 성적 검정

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

결 과

1. 쥐에서 간엽 절제 후 재생간에서의 COMT 활성도 변동

간엽 절제 후 재생간의 세포질 및 미토콘드리아 COMT의 활성도는 간엽 절제 후 2일 및 3일에 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 간엽 절제 후 재생간의 세포질 COMT의 활성도는 간엽 절제 후 2일에는 원래간보다 약 45% ($P < 0.01$), 3일에는 원래간보다 약 39% ($P < 0.05$)의 증가를 나타내

었으며 (Table 1), 재생간의 미토콘드리아 COMT의 활성도는 간엽 절제 후 2일에는 원래간보다 47% ($P < 0.01$), 3일에는 원래 간보다 약 41% ($P < 0.01$)의 증가를 나타내었다 (Table 3). 그러나 간엽 절제 후 재생간의 미토콘드리아 COMT의 활성도는 실험 전기간 동안 통계학적으로 유의한 변동은 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 1. Activity of cytosolic catechol-O-methyltransferase (COMT) in regenerating rat liver after partial hepatectomy

Post-hepatectomy day	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	Original liver	Regenerating liver
0.5	2,876±452	2,825±427
1	2,892±467	3,314±512
2	2,910±456	4,208±652 ^b
3	2,918±454	4,045±615 ^a
6	2,894±448	2,886±453
10	2,872±443	2,866±448

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Significant difference from original liver; a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$

Table 2. Activity of mitochondrial catechol-O-methyltransferase (COMT) in regenerating rat liver after partial hepatectomy

Post-hepatectomy day	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	Original liver	Regenerating liver
0.5	105±18	108±20
1	110±22	123±24
2	114±20	136±26
3	113±19	124±22
6	108±18	106±17
10	106±17	98±18

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group

Table 3. Activity of microsomal catechol-O-methyltransferase (COMT) in regenerating rat liver after partial hepatectomy

Post-hepatectomy day	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	Original liver	Regenerating liver
0.5	421±62	436±69
1	426±68	496±76
2	431±65	632±87 ^b
3	428±70	605±94 ^b
6	424±66	432±73
10	418±64	423±67

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Significant difference from original liver; b, $P < 0.01$

Table 4. Catechol-O-methyltransferase (COMT) kinetic parameters from regenerating rat livers determined with 3, 4-dihydroxybenzoic acid as substrate

Cell fractions	Km (mM)		Vmax (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	Original live	Regeneration liver	Original live	Regeneration liver
Cytosol	2.84±0.65	2.88±0.62	4,895±720	6,753±986 ^b
Microsome	3.28±0.96	3.31±0.93	718±95	1,057±136 ^b

Michaelis-Menten constants for COMT were determined using 3, 4-dihydroxybenzoic acid, S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide and [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine at 37°C for cytosolic and microsomal fractions of original, and regenerating rat livers at two days after partial hepatectomy. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Significant difference from original livers; b, $P < 0.01$

2. 간엽 절제 후 2일의 쥐 재생간에서 COMT의 Km값 및 Vmax값의 변동

간엽 절제 후 2일의 재생간에서 세포질 및 마이크로솜 COMT의 Km값은 변동이 없었다. 그러나 이들 분획에서 이 효소의 Vmax값은 모두 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 간엽 절제 후 2일 경과시킨 재생간에서 세포질 COMT의 Vmax값은 원래 간보다 약 38% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었으며, 마이크로솜 COMT의 Vmax값은 원래 간보다 약 46% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다 (Table 4).

고 찰

쥐에서 간의 증엽과 좌측 외엽을 절제하면 남은 간엽은 급격히 재생되어 비대해지며 이때 간조직은 재생을 위해 핵산과 단백질 합성이 활발해진다 (Lieberman et al., 1965). 또한 이와 같은 간의 재생기에는 각종 물질대사를 촉매하는 효소들의 활성도도 변동된다. 간재생이 활발한 시기의 재생간에서 그 활성도가 변동되는 생체이물 생체 변환 효소들은 많으며 그 중에서도 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소들은 monoamine oxidase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, microsomal ethanol oxidizing system, aryl sulfotransferase, arylamine N-methyltransferase 및 thiol methyltransferase이며 (Mun et al., 1988; Joo et al., 2002) 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소들은 glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, rhodanese, arylesterase, carboxylesterase 및 cholinesterase 등을 들 수 있다 (Kwak et al., 1989; Joo et al., 2002). 이와 같이 간 세포에 존재하는 생체이물 생체 변환 효소들은 간의 재생기에 간조직에서 그 활성도가 변동된다. 따라서 이 실험에서 측정된 COMT도 간세포에 주로 존재하는 만큼 간의 재생기에 간에서 그 활성도가 변동될 수 있을 것이다.

이 실험에서 쥐의 간엽을 절제한 후 재생간의 세포질 및 마이크로솜의 COMT 활성도는 다같이 간엽 절제 후 2일 및 3일에 유의한 증가를 나타내었다. 이 성적으로 보아 COMT는 간재생이 왕성한 시기에 그 활성도가 증가되는 효소라는 것을 알 수 있었다.

이 실험에서 간엽 절제 후 2일째의 쥐 재생간에서 세포질 및 마이크로솜 COMT의 Km값과 Vmax값을 측정 했을 때 Km값은 모두 변동이 없었으나 Vmax값은 모두 유의한 증가를 나타내었다. 이와 같이 재생간에서 이들 효소의 Km값이 변동이 없으면서도 Vmax값이 증가되고 또한 그 활성도가 증가된 것은 촉매 효율 증가에 기인한 것이라 볼 수는 없다. 따라서 재생간에서 이 효소의 활성도가 증가된 것은 그 합성이 증가되어 나타난 결과가 아닌가 생각된다.

재생기의 간에서는 간조직의 재생을 위하여 우선적으로 핵산과 단백질 합성이 증가되고 (Lieberman et al., 1965) 아울러 열량소 대사도 활발해진다 (Schofield et al., 1987; Dixit et al., 1992)고 한다. 이러한 현상과 함께 간재생을 위해 유리한 쪽으로 먼저 대사가 진행되는 것이라는 가설 (Mun et al., 1988; Kwak et al., 1989)이 있어, 이 실험에서 측정된 COMT는 간재생과는 유관한 효소가 아닌가 생각된다. 그러나 이 실험만으로는 재생간에서 이 효소의 활성도 증가가 어떤 원인에 의한 것인지는 분명치 않다. 따라서 재생간에서 이 효소 활성도의 증가 원인과 기전을 분명히 알기 위해서는 앞으로 더욱 추구해 보아야 하겠다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 결과를 볼 때 쥐 간의 COMT는 간재생이 활발한 시기의 재생간에서는 그 합성이 증가되는 효소로 생각된다.

REFERENCES

- Borchardt RT. Catechol-O-methyltransferase in Method in Enzymology (Jakoby WB. Ed). 1981. Vol 77, pp 267-272. Academic Press. NY, USA.
- Borchardt RT. N- and O-methylation in Enzymatic basis of detoxication (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol II, pp 43-62. Academic Press. NY, USA.
- Dixit A, Baquer NZ, Rao AR. Inhibition of key enzymes of carbohydrate metabolism in regeneration mouse liver by ascorbic acid. Biochem Int. 1992. 26: 143-151.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum protein by means of biuret reaction. J Biol Chem. 1949. 177: 751-766.
- Greenberg DM, Rothstein M. Method for isolation and degradation of labelled compounds. in Method in enzymology (Colowick SP, Kaplan NO. Eds). 1957. Vol 4, pp 708-731. Academic Press. NY, USA.
- Joo I, Mun KC, Kwak CS. Thiol methyltransferase activity in regenerating liver after partial hepatectomy in rats. Keimyung Med J. 2002. 21: 244-250.
- Kim BK: Enzyme nomenclature, IUB. 1979. pp 134-135. Academic Press. NY, USA.
- Kwak CS, Kim YH, Mun KC, Lee SH. Glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in regenerating rat liver. Keimyung Univ Med J. 1989. 8: 78-86.
- Kwak CS, Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. 1. Isolations of mitochondria and microsome. Keimyung Univ Med J. 1986. 5: 45-53.
- Lieberman I, Kane P. Synthesis of ribosome in the liver after

- partial hepatectomy. *J Biol Chem.* 1965. 240: 1737-1741.
- Matsumoto K, Nakamura T. Molecular structure and function of hepatocyte growth factor. *Metabolism (Jpn).* 1991. 28: 599-618.
- Mun KC. Catechol-O-methyltransferase activity in cholestatic rat's liver induced by bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol.* 1996. 29: 142-145.
- Mun KC, Park EM, Kim YH, Kwak CS. Monoamine oxidase activity in regenerating rat liver. *Keimyung Univ Med J.* 1988. 7: 258-265.
- Raxworthy MJ, Gulliver PA, Hughes PJ. The cellular location of catechol-O-methyltransferase in rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1982. 320: 182-188.
- Schofield PS, Sugden MC, Corstorphine CG, Zammit VA. Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver. *Biochem J.* 1987. 241: 469-474.
-