J. Exp. Biomed. Sci. 11 (2005) 37–43

Effects of Intravenous Administration of Taurocholate on Hepatic Aryl Sulfotransferase Activity in Cholestatic Rats

Kyo-Cheol Mun, You-Hee Kim and Chun-Sik Kwak†

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

The possible mechanisms of increased aryl sulfotransferase (AST) isozymes activities in cholestatic rat liver were studied. Hepatic AST-I, II and -III, IV activities were determined from the experimental rats with common bile duct ligation (CBDL). The Michaelis-Menten constants in these hepatic enzymes were also measured. The activities of mitochondrial AST-I, II and -III, IV, and microsomal AST-III, IV as well as their Vmax values were found to be increased significantly in CBDL plus taurocholic acid (TCA) injected group than in the control group, such as CBDL alone groups. However, their Km values in the experimental groups did not vary. The results suggest that TCA stimulates biosynthesis of the AST in the liver.

Key Words: Aryl sulfotransferase, Common bile duct ligation, Taurocholic acid

서 론

간은 대사 기능, 재생 기능, 생체이물 생체 변환 기능 등 수 많은 기능을 가진 장기이며 (Sherlock et al., 2002), 담즙울체로 간이 손상을 받으면 생체이물 생체 변환 효소인 aryl sulfotransferase의 활성도가 간에서 변동되는 것 (Ihm et al., 1995)으로 알려져 있다. 따라서 담즙울체 간에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체 간에서의 생체이물 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 또한 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독 기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

Aryl sulfotransferase (3'-phosphoadenosylsulfate: phenol sulfotransferase, EC 2.8.2.1, AST)는 페놀 화합물들에게 황산을 포합 (conjugation)시켜 배설시키는 제 2상 생체이물 생체 변환 (phase 2 xenobiotic biotransformation) 효소로서 (Jakoby et al., 1980; Kim, 1984) 포유동물의 간에 주로 분포되어 있다 (Banerjee et al., 1966; Hidaka et al., 1969; Campbell et al., 1987). 이 효소는 사람에서 2종, 쥐에서는 4종의 isozyme (AST-I, -II, -III 및 -IV)이 존재하며 (Jakoby et al., 1980; Sekura et al., 1981; Compbell et al., 1987), 간세포에서는 세포질, 미토콘드리아 및 내형질세망에 국재되어 있다 (Christ et al., 1989; Falany et al., 1990; Ihm et al., 1995). 쥐에게 담즙울체를 야기시켰을 때 간의 미토콘드리아와 마이크로솜에서 AST-I, II 및 -III, IV isozyme의 활성도가 증가되는 것 (Ihm et al., 1995)이 밝혀져 있으며 그 활성도의 증가는 효소 합성의 유도에 기인한 것이 아닌가 추정하고 있다 (Ihm et al., 1995). 그러나 이 효소가 담즙울체 간에서 어떤 기전에 의해 그 활성도가 증가되었는지 아직도 분명치 않다.

이 연구는 AST isozyme의 활성도가 담즙울체 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 증가되는 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후에 간괴사를 유발시키고 (Palmer, 1972; Drew et al., 1979; Kitani et al., 1986) 효소 합성에 영향을 미친다 (Han et al., 1997; Park et al., 2004)는 taurocholic acid (TCA)를 정맥 내 주입시켜 경시적으로 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 이들 효소의 활성도를 측정하였던 바 TCA가 간에서 이들 효소의 합성을 자극하는 것으로 추정되는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시 약

2-Mercaptoethanol, 2-naphthol, adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate, methylene blue, α-naphthyl sulfate potassium, TCA (from ox bile, sodium salt, T0750), tauroursodeoxycholic acid (sodium salt, T0266, TUDCA) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin)은 Sigma사 (미국) 제품을 사용하였다. 그 외

*논 문 접 수: 2004년 12월 27일
수정재접수: 2005년 2월 15일
†교신저자: 곽춘식, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 생화학교실
Tel: 053-250-7461, Fax: 053-250-7461
e-mail: kwak@dsmc.or.kr

시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 준하여 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 9개군으로 나누었다.

1) 정상군 (1군)

2) 가수술 (sham operation)군

가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

3) 총담관 결찰 (common bile duct ligation)군

총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

4) 총담관 결찰과 함께 TCA를 주입한 군

총담관 결찰 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 따라 TCA (체중 100 g당 45 μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

5) 총담관 결찰과 함께 TUDCA를 주입한 군

총담관 결찰 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 준하여 TUDCA (체중 100 g당 45 μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다. 총담관 결찰 수술 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 (ether) 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

TCA 및 TUDCA액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, USA)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4℃의 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.

간의 세포분획은 적출한 간을 즉시 2~4℃로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon pestle glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4℃를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법 (Kwak et al., 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

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

4. 효소 시료 조제

AST-I, II 및 -III, IV의 활성도 측정용 시료의 조제는 분리한 세포질, 마이크로솜 및 미토콘드리아 분획을 단백질량으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose액에 현탁시켰으며 이 액을 이들 효소의 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 AST의 활성도 측정은 시료와 함께 2-naphthol과 adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate를 기질로 사용하여 37℃에서 10분간 반응을 시키는 동안에 생성된 1-naphthyl sulfate을 methylene blue와 반응시켜 생성된 ion pair pigment를 chloroform으로 추출한 후 651 nm 파장에서 비색하여 효소의 활성도를 산출하는 Sekura et al. (1981)의 법에 의하였다 (이 법은 AST-I과 AST-II를 합한 AST I, II의 활성도와 AST-III과 AST-IV를 합한 AST-III, IV의 활성도를 측정하는 방법이다). 그리고 이때 AST-I, II 활성도 측정시에는 0.5 M sodium phosphate (pH 7.4) 완충액을 사용하였으며 AST-III, IV 활성도 측정시에는 0.5 M sodium acetate (pH 5.5) 완충액을 사용하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 1-naphthyl sulfate를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 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 AST의 2종 기질 중 adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate를 선택하여 기질 원액과 희석액을 제조한 후 이 기질액들과 2-naphthol 기질 원액을 사용하여 AST-I, II 및 -III, IV의

Table 1. Effects of time of biliary retention on hepatic subcellular aryl sulfotransferase I, II (AST-I, II) activities in rats

Experimental groups	AST-I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	0.29±0.04	0.56±0.03	0.74±0.03
Sham 1 day	0.29±0.03	0.58±0.05	0.75±0.04
Sham 2 days	0.28±0.04	0.57±0.04	0.74±0.05
CBDL 1 day	0.27±0.04	0.64±0.06	0.73±0.09
CBDL 2 days	0.26±0.05	0.65±0.07	0.72±0.11

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; CBDL 1 day or CBDL 2 days, sacrificed on the 1st or 2nd day after common bile duct ligation

Table 2. Effects of time of biliary retention on hepatic subcellular aryl sulfotransferase III, IV (AST-III, IV) activities in rats

Experimental groups	AST-III, IV activities (nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	0.19±0.02	0.66±0.05	0.61±0.08
Sham 1 day	0.21±0.03	0.67±0.06	0.63±0.10
Sham 2 days	0.20±0.04	0.67±0.05	0.62±0.11
CBDL 1 day	0.20±0.05	0.66±0.06	0.74±0.12
CBDL 2 days	0.21±0.06	0.67±0.07	$0.81±0.14^{a,g}$

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; CBDL 1 day or CBDL 2 days, sacrificed on the 1st or 2nd day after common bile duct ligation. a, $P<0.05$ vs. Normal; g, $P<0.05$ vs. Sham 2 days

활성도를 측정한 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 총담관 결찰과 담즙정체 시간이 간의 AST-I, II 및 -III, IV 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days) 경과시켰을 때 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 AST-I, II 활성도, 간세포질 및 미토콘드리아 분획의 AST-III, IV 활성도와 총담관 결찰을 시켜 1일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 활성도는 별 변동이 없었다 (Table 1 & 2). 그러나 간의 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 활성도는 총담관 결찰 후 2일 경과시켰을 때 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 2일 경과시킨 군에서 간 마이크로솜 분획의 이 효소 활성도는 정상군 및 가수술군 (결과 Table에서 Sham 2 days)보다 각각 약 33% ($P<0.05$) 및 약 31% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다. 그러나 간의 이 효소를 수술 후 1일 경과시켰을 때와 2일 경과 시켰을 때의 비교 즉 일차변동을 보았을 때는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2).

2. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 AST-I, II 및 -III, IV 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TCA 및 CBDL 2 days + TCA)시켰을 때 간의 미토콘드리아 분획의 AST-I, II 및 -III, IV 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었으며, 이 때 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 활성도도 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days)보다 각각 약 38% ($P<0.01$) 및 약 43% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었으며 (Table 3), 간 미토콘드리아 분획의 AST-III, IV 활성도는 대조군보다 각각 약 55% ($P<0.001$) 및 약 61% ($P<0.001$)의 증가를 나타내었다. 그리고 간의 마이크로솜 분획에서는 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 AST-III, IV의 활성도가 대조군보다 각각 약 31% ($P<0.05$) 및 약 30% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다 (Table 4). 한편 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TUDCA 및 CBDL 2 days + TUDCA)시켰을 때는 간의 3종 세포분획에서 AST-I, II 및 -III, IV 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 3 & 4).

3. 총담관 결찰 후 2일 경과한 실험군에서 간 AST-I, II 및 -III, IV의 Km값 및 Vmax값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II와 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의

Table 3. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on hepatic subcellular aryl sulfotransferase I, II (AST-I, II) activities in rats

Experimental groups	AST-I, II activities (nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CBDL 1 day	0.27±0.04	0.64±0.06	0.73±0.09
CBDL 1 day +TCA	0.25±0.03	0.88±0.09[k]	0.80±0.15
CBDL 1 day +TUDCA	0.26±0.04	0.66±0.08	0.72±0.12
CBDL 2 days	0.26±0.05	0.65±0.07	0.73±0.11
CBDL 2 days +TCA	0.24±0.05	0.93±0.12[n]	0.83±0.14
CBDL 2 days +TUDCA	0.25±0.04	0.68±0.10	0.74±0.08

The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group; CBDL 1 day or CBDL 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after common bile duct ligation; One of the following bile acids, TCA or TUDCA (45 μmol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. k, $P<0.01$ vs. CBDL 1 day; n, $P<0.01$ vs. CBDL 2 days

Table 4. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on hepatic subcellular aryl sulfotransferase III, IV (AST-III, IV) activities in rats

Experimental groups	AST-III, IV activities (nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CBDL 1 day	0.20±0.05	0.66±0.06	0.74±0.12
CBDL 1 day +TCA	0.18±0.03	1.02±0.14[l]	0.97±0.14[j]
CBDL 1 day +TUDCA	0.21±0.04	0.68±0.07	0.74±0.15
CBDL 2 days	0.21±0.06	0.67±0.07	0.81±0.14
CBDL 2 days +TCA	0.17±0.04	1.08±0.16[o]	1.05±0.18[m]
CBDL 2 days +TUDCA	0.20±0.05	0.70±0.08	0.76±0.13

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; CBDL 1 day or CBDL 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after common bile duct ligation; One of the following bile acids, TCA or TUDCA (45 μmol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. j, $P<0.05$ vs. CBDL 1 day; l, $P<0.001$ vs. CBDL 1 day; m, $P<0.05$ vs. CBDL 2 days; o, $P<0.001$ vs. CBDL 2 days

AST-III, IV를 adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate를 기질로 사용하여 Km값 및 Vmax값을 측정 했을 때 Km값은 모두 변동이 없었다. 또한 수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II 및 -III, IV의 Vmax값도 모두 통계학적으로 유의한 변동은 없었다 (Table 5 & 6). 그러나 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 AST-III, IV의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다 약 23% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다 (Table 6).

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 2 days+TCA)시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 약 64% ($P<0.001$), 총담관 결찰만 시킨 군보다는 약 46% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 2 days+TUDCA)시켰을 때는 이 효소의 Vmax값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 5). 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아와 마이크로솜 분획의 AST-III, IV의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 67% ($P<0.001$) 및 약 63% ($P<0.001$), 총담관 결찰만 시킨 군보다는 각각 약 62% ($P<0.001$) 및 약 32% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다 (Table 6). 그러나 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때는 이들 효소의 Vmax값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 6).

Table 5. Rat hepatic mitochondrial aryl sulfotransferase I, II (AST-I, II) kinetic parameters from 2 days after common bile duct ligation (CBDL 2 days) determined with adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate as substrate

Experimental groups	Km	Vmax
	(Km; mM, Vmax; nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)	
Sham 2 days	1.65±0.29	0.70±0.06
CBDL 2 days	1.63±0.31	0.79±0.09
CBDL 2 days +TCA	1.61±0.25	1.15±0.15[i,n]
CBDL 2 days +TUDCA	1.64±0.28	0.81±0.11

Michaelis-Menten constants for AST-I, II were determined using adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate and 2-naphthol from experimental rat livers at two days after CBDL. The data are expressed as mean ± 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; n, $P<0.01$ vs. CBDL 2 days

고 찰

담즙울체로 간이 손상을 받으면 간세포에서 합성되는 효소들은 간에서 그 활성도의 변동이 심하게 나타난다는 사실은 이미 잘 알려져 있다. 실험적으로 쥐의 총담관을 결찰하여 간에 담즙울체를 야기시키면 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들은 많으며 그 중에서도 특히 생체이물 생체 변환

Table 6. Rat hepatic mitochondrial and microsomal aryl sulfotransferase III, IV (AST-III, IV) kinetic parameters from 2 days after common bile duct ligation (CBDL 2 days) determined with adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate as substrate

Experimental groups	Mitochondria		Microsome	
	Km	Vmax	Km	Vmax
	(Km; mM, Vmax; nmol 1-naphthyl sulfate min^{-1} mg $protein^{-1}$)			
Sham 2 days	2.32±0.35	0.98±0.08	2.26±0.43	1.15±0.13
CBDL 2 days	2.28±0.41	1.01±0.11	2.22±0.45	1.42±0.21[g]
CBDL 2 days + TCA	2.25±0.45	1.64±0.18[i,o]	2.20±0.47	1.87±0.27[i,m]
CBDL 2 days + TUDCA	2.30±0.37	1.04±0.12	2.24±0.41	1.35±0.23

Michaelis-Menten constants for AST-III, IV were determined using adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate and 2-naphthol from experimental rat livers at two days after CBDL. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 3 and text. g, $P<0.05$ vs. Sham 2 day; i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; m, $P<0.05$ vs. CBDL 2 days; o, $P<0.001$ vs. CBDL 2 days

효소들이 많다. 이들 중 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소들은 xanthine oxidase, glyoxalase I, aldehyde dehydrogenase, benzoyltransferase, phenylacetyltransferase, arylamine N-methyltransferase, thiol methyltransferase 및 AST 등 (Ihm et al., 1995; Rhee et al., 2000; Kim et al., 2002; Rhee et al., 2002)이며 이들 중 AST를 제외한 효소 모두는 그 활성도의 증가 기전이 어느 정도 밝혀져 있다 (Rhee et al., 2000; Kim et al., 2002; Rhee et al., 2002). 즉 이들 효소의 활성도 증가 기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 TCA가 효소 합성을 자극하여 이들 효소의 합성을 증가시킨다는 것이다.

Ihm et al. (1995)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체 간에서 미토콘드리아의 AST-I, II 활성도는 총담관 결찰 후 7일, 14일, 28일 및 42일에 미토콘드리아의 AST-III, IV 활성도도 총담관 결찰 후 7일, 14일, 28일 및 42일에 유의한 증가를 나타내었다고 하였으며 마이크로솜에서는 AST-III, IV의 활성도만 총담관 결찰 후 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 유의한 증가를 나타내었다고 하였다. 이와 같은 AST-I, II와 -III, IV는 쥐 담즙울체 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소라고 하였으며 그 증가 기전에 대해서는 AST-I, II와 -III, IV의 합성 유도에 의한 것 같다고만 추론하고 있다. 그러나 어떤 물질이 담즙울체 간에서 이들 효소의 활성도를 증가시키는데 기여하였는지는 분명하게 설명하고 있지 않다.

이 연구는 담즙울체 간에서 AST 활성도가 증가되는 현상이 어떤 기전에 의해 나타난 것인지를 알고자 하여 시행한 것이다. 따라서 이 연구에서 해결해야할 과제는 이들 효소가 담즙울체 간에서는 그 활성도가 어떤 기전에 의해 증가되었는가 하는 것이다. 이 연구에서는 이 문제를 해명하기 위하여 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 준하여 2가지 동물 모델을 만들었다. 즉 첫째 모델은 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시켜 담즙울체 간을 만든 것이고, 두번째 모델은 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간에 담즙울체를 더욱 심화시킨 것이며, 이 모델로는 간 내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아 낼 수가 있는 것 (Ogawa et al., 1990; Park et al., 1999)이다. 또한 이 연구에서는 주입하는 담즙산의 종류가 다르면 이들 효소 활성도에 미치는 효과도 달라지는가를 알아내기 위하여 생체이물 생체 변환 효소로서 담즙울체 간에서 활성도가 증가되는 arylamine N-methyltransferase와 thiol methyltransferase의 합성에 영향을 주지 않고 (Rhee et al., 2000; Rhee et al., 2002) 담즙산의 간독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (Poupon et al., 1987; Kitani, 1988; Leuschner et al., 1989; Heuman et al., 1991)를 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과도 관찰하여 보았다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 활성도와 이 효소의 Vmax값은 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과는 Ihm et al. (1995)의 결과와 일치하였다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II 및 -III, IV 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 활성도도 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 증가를 나타내었다. 한편 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 AST-I, II, 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 AST-III, IV 등의 Vmax값은 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이들 효소의 Km값은 모든 실험군의 간세포분획에서 유의한 변동은 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 간세포 내에서 증가된 TCA가 간의 AST 합성을 자극한다고 추정할 수 있으며 특히 AST 효소 반응에서는 담즙산들이 관여하지 않는다는 사실 (Barman, 1969; Sekura et al., 1979)과 TCA를 주입한 실험군에서 AST의 Km값의 변동이 없으면서 즉 촉매효율의 변동

이 없으면서 그 활성도와 Vmax값이 증가된 것은 위의 추론을 뒷받침 해주는 결과라고 생각한다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간세포분획에서 이들 효소의 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 간의 AST 합성을 자극하지 않는다고 추정할 수 있다.

이상 이 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체 간에서 AST-I, II 및 -III, IV의 활성도 증가는 담즙산 중 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 자극되어 나타난 결과로 추정된다.

REFERENCES

Banerjee RK, Roy AB. The sulfotransferase of guinea pig liver. Mol Pharmacol. 1966. 2: 56-66.

Barman TE. Enzyme handbook. 1969. Vol 1, pp 497. Springer-Verlag. NY, USA.

Campbell NR, Van Loon JA, Sundaram RS, Ames MM, Hansch C, Weinshilboum R. Human and rat liver phenol sulfotransferase: Structure-activity relationships for phenolic substrates. Mol Pharmacol. 1987. 32: 813-819.

Christ DD, Walle T. Stereoselective sulfation of R, S-4'-hydroxy propranolol by canine hepatic cytosol and partially purified phenolsulfotransferase. J Pharmacol Exp Ther. 1989. 251: 949-955.

Drew R, Priestly BG. Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. Experientia. 1979. 35: 809-811.

Falany CN, Vazguez ME, Heroux JA, Roth JA. Purification and characterization of human liver phenol-sulfating phenol sulfotransferase. Arch Biochem Biophys. 1990. 278: 312-318.

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.

Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver arylesterase. Kor J Hepatol. 1997. 3: 154-169.

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: 203-211.

Hidaka H, Nagatsu T, Yagi K. Formation of serotonin O-sulfate by sulphotransferase of rabbit liver. Biochim Biophys Acta. 1969. 177: 354-357.

Ihm JS, Kim YH, Kwak CS. Aryl sulfotransferase activity in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. Kor J Biochem. 1995. 27: 141-147.

Jakoby WB, Sekura RD, Lyon ES, Marcus CJ, Wang JL. Sulfotransferase in Enzymatic basis of detoxication (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol II, pp 199-228. Academic Press. NY, USA.

Kim BK. Enzyme nomenclature, IUB, 1984. pp 266-267. Academic Press. NY, USA.

Kim YH, Shin MJ. Effects of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. Exp Mol Med. 2002. 34: 123-130.

Kitani K, Kanai S, Ohta M, Sato Y. Differing transport maxima values for taurine-conjugated bile salts in rats and hamsters. Am J Physiol. 1986. 251: G852-G858.

Kitani K. Ursodeoxycholic acid for cholestatic disease. Lancet. 1988. 2: 49.

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.

Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Güldütuna S, Hübner K, Hellstern A, Gatzen M, Leuschner M. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. Gastroenterology. 1989. 97: 1268-1274.

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.

Palmer RH. Bile acids, liver injury, and liver disease. Arch Intern Med. 1972. 130: 606-617.

Park SK, Kim YH, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholic acid on liver lysosomal α-D- and β-D-mannosidase activities in rats with extrahepatic cholestasis. J Exp Biomed Sci. 2004. 10: 93-98.

Park SK, Kwak CS. Repression of rat hepatic cholinesterase by bile acid load. Keimyung Med J. 1999. 18: 204-217

Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chritien Y, Ballet F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis ? Lancet. 1987. 1: 834-836.

Rhee BW, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on hepatic thiol methyltransferase activity in cholestatic rat. J Kor Surg Soc. 2002. 63: 1-10.

Rhee BW, Kwak CS. Induction of hepatic arylamine N-methyl-

transferase by a tautocholate load in rats. J Kor Surg Soc. 2000. 59: 141-153.

Sekura RD, Duffel MW, Jakoby WB. Aryl sulfotransferase in Method in enzymology (Jakoby WB. Ed). 1981. Vol 77, pp 197-206. Academic Press. NY, USA.

Sekura RD, Jakoby WB. Phenol sulfotransferases. J Biol Chem. 1979. 10: 5658-5663.

Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 11th ed. 2002. pp 1-35. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.