J. Exp. Biomed. Sci. 11 (2005) 473–479

Effects of Intravenous Administration of Taurocholate on Hepatic Catechol-O-Methyltransferase Activity in Common Bile Duct Ligated Rats

Jun-Young Do and Chun-Sik Kwak[1†]

Department of Internal Medicine, Yeungnam University, College of Medicine, Daegu 705-717, Korea.
[1]Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, Daegu 700-712, Korea

Possible mechanism of decreased catechol-O-methyltransferase (COMT) activity in cholestatic rat liver was studied. Hepatic and serum COMT activities were determined from the experimental rats with common bile duct ligation (CBDL). The Michaelis-Menten constants in this hepatic enzyme were also measured. The activities of cytosolic, mitochondrial and mircosomal COMT as well as their Vmax values were found to be decreased 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. Serum COMT activity increased slightly in the CBDL plus TCA injected group than in the control group. The above results suggest that TCA represses biosynthesis of the COMT in the liver. The elevated activity of the serum COMT is believed to be caused by the increment of membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

Key Words: Catechol-O-methyltransferase, Common bile duct ligation, Taurocholic acid

서 론

Catechol-O-methyltransferase (S-adenosyl-L-methionine : catechol-O-methyltransferase, EC 2. 1. 1. 6, COMT)는 제 2상 생체 이물 생체 변환 효소 (phase 2 xenobiotic biotransformation enzyme)의 일종이며 catechol 및 catecholamine에 S-adenosyl -L-methionine으로부터 메틸기을 이전받아 catechol 또는 catecholamine을 메틸화 시키는 효소이다 (Kim, 1979; Borchardt, 1980). COMT는 간세포의 세포질, 미토콘드리아 및 내형질세망에 국재되어 있다 (Borchardt, 1980; Raxworthy et al., 1982; Mun, 1996).

이 효소는 실험적 담즙울체간 (cholestatic liver)에서 활성도가 감소되며 그 활성도의 감소는 효소단백질 합성의 감소에 기인한 것이 아닌가 추정하고 있다 (Mun, 1996). 그러나 담즙울체간에서 이 효소의 활성도 감소에 대한 기전을 규명한 보고는 아직도 없다. 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소들 중 그 활성도의 감소기전이 일부 밝혀져 있는 것은 arylesterase (Han and Kim, 1997), carboxylesterase (Han and Kim, 1998), cholinesterase (Park and Kwak, 1999), alcohol dehydrogenase, catalase (Kim and Shin, 2002) 및 monoamine oxidase (Do and Kwak, 2004) 등이며 그 활성도 감소기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 taurocholic acid (TCA)가 이들 효소의 합성을 억제 한다는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되는 효소들에 대해서 TCA가 어떤 효과를 나타내는지를 알아낸다면 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되는 효소들의 활성도 변동 기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

이 연구는 COMT의 활성도가 담즙울체간에서 감소되는 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰 (bile duct ligation)로 담관을 폐쇄시킨 직후에 담즙울체간에서 효소 유전자의 발현율을 변동시키는 것으로 추정하는 TCA (Ogawa et al., 1990; Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997)와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) (Ogawa et al., 1990; Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997)를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 간의 세포질, 미토콘드리아, 마이크로솜 및 혈청에서 COMT의 활성도를 측정하였던 바 TCA가 간에서 이 효소의 합성을 억제하는 것으로 생각되는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

*논 문 접 수: 2005년 9월 21일
수정재접수: 2005년 11월 23일
†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

재료 및 방법

1. 시 약

S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide, 3,4-dihydroxybenzoic acid, DL-dithiothreitol, Triton X-100, catechol-O-methyltransferase (from porcine liver, C 1897), TCA (from ox bile, sodium salt, T 0750) TUDCA (sodium salt, T 0266) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며 [methyl-^{3}H] S-adenosyl-L-methionine은 New England Nuclear사 (Boston, MA, USA)의 제품을, 그리고 PPO (2,5-diphenyloxazole), bis-MSB (ρ-bis-(O-methylstyryl benzene)), toluene (scintillation grade) 등은 Packard사 (Downers Grove, IL, USA)의 제품을, 사용하였다. 그 외 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 Ogawa et al. (1990)과 Park and Kwak (1999)의 방법에 준하여 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 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 and Kwak (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 and Kwak (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 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, USA)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간 적출 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. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

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 (chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas Co., USA)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 and Kwak, 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다. 위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4℃에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사 (USA)의 RC-5B refrigerated super-speed 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

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

5. 효소 활성도 측정

혈청과 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도 측정은 효소 시료와 함께 3, 4-dihydroxybenzoic acid와 [methyl-^{3}H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide를 기질로 사용하여 37℃에서 30분간 반응시키는 동안에 생성된 방사성 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid를

Table 1. Effects of time of biliary retention on hepatic subcellular catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	2,862±442	103±19	417±60
Sham 1 day	2,889±478	105±22	424±66
Sham 2 days	2,907±467	111±17	429±63
CBDL 1 day	2,377±312	82±12	328±39[a,d]
CBDL 2 days	2,233±296[a,g]	77±14[a,h]	327±44[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; d, $P<0.05$ vs. Sham 1 day; g, $P<0.05$ vs. Sham 2 days; h, $P<0.01$ vs. Sham 2 days

toluene-isoamylalcohol (7:3) 혼합액으로 추출한 후 그 방사능을 측정하여 효소의 활성도를 산출하는 Borchardt (1981)의 법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid의 총량을 pmol로 나타내었다. 이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 사용한 방사능 계측기는 Packard Tri-carb 4530, liquid scintillation spectrometer (Packard Co., Dowenrs Grove, IL, USA)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-^{3}H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide 원액을 사용하여 COMT의 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 and Rothstein (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 COMT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시켜 1일 또는 2일 (결과 Tabe 1에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days) 경과시켰을 때 간의 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 2일 경과시킨 군의 간 세포질액의 COMT 활성도는 정상군보다는 약 22% ($P<0.05$), 가수술군 (결과 Table에서 Sham 2 days) 보다는 약 23% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었으며 총담관 결찰 후 2일 경과시킨 군의 간 미토콘드리아 분획의 이 효소 활성도는 정상군보다는 약 25% ($P<0.05$), 가수술군보다는 약 31% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다. 그리고 총담관 결찰 후 1일 및 2일 경과시킨 군의 간 마이크로솜 분획의 이 효소 활성도는 1일 경과시킨 군에서는 정상군보다는 약 21% ($P<0.05$), 가수술군 (결과 Table에서 Sham 1 day)보다는 약 23% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었으며 2일 경과시킨 군에서는 정상군보다는 약 22% ($P<0.05$), 가수술군 (결과 Table에서 Sham 2 days)보다는 약 24% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 그러나 간의 이 효소를 수술 후 1일 경과시켰을 때와 2일 경과시켰을 때의 비교 즉 일차 변동을 보았을 때는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 COMT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TCA 및 CBDL 2 days + TCA) 경과시켰을 때 간의 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on hepatic subcellular catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CBDL 1 day	2,377±312	82±12	338±39
CBDL 1 day + TCA	1,865±237[j]	59±10[j]	217±24[l]
CBDL 1 day + TUDCA	2,412±322	81±18	342±42
CBDL 2 days	2,233±296	77±14	327±44
CBDL 2 days + TCA	1,661±209[n]	52±8[n]	202±27[o]
CBDL 2 days + TUDCA	2,248±314	83±15	334±37

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; n, $P<0.01$ vs. CBDL 2 days; o, $P<0.001$ vs. CBDL 2 days

Table 3. Rat hepatic catechol-O-methyltransferase (COMT) kinetic parameters from 2 days after common bile duct ligation (CBDL 2 days) determined with 3, 4-dihydroxybenzoic acid as substrate

Experimental groups	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
	(Km; mM, Vmax; pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$)					
Sham 2 days	2.82±0.63	4,912±727	4.87±0.94	190±25	3.16±0.98	716±98
CBDL 2 days	3.03±0.72	3,766±453[g]	5.01±1.04	126±20[h]	3.28±1.18	545±65[g]
CBDL 2 days + TCA	3.12±0.81	2,726±313[i,n]	5.07±1.12	82±13[i,n]	3.41±1.27	323±38[i,o]
CBDL 2 days + TUDCA	2.98±0.68	3,802±491	4.92±0.98	130±22	3.14±1.04	551±57

Michaelis-Menten constants for COMT were determined using 3, 4-dihydroxybenzoic acid, S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide and [methyl-^{3}H] S-adenosyl-L-methionine 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, 2 and text. g, $P<0.05$ vs. Sham 2 day; h, $P<0.01$ vs. Sham 2 days; i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; n, $P<0.01$ vs. CBDL 2 days; o, $P<0.001$ vs. CBDL 2 days

을 때 간 세포질액의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days) 보다 각각 약 22% ($P<0.05$) 및 약 26% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었고 간 미토콘드리아 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 각각 약 28% ($P<0.05$) 및 약 32% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었으며 간 마이크로솜 분획의 이 효소 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 각각 약 36% ($P<0.001$) 및 약 32% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다 (Table 2).

한편 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TUDCA 및 CBDL 2 days + TUDCA) 경과시켰을 때는 간의 3종 세포분획에서 COMT 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2).

3. 총담관 결찰 후 2일 경과한 실험군에서 간 COMT의 Km값 및 Vmax값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT를 3, 4-dihydroxybenzoic acid를 기질로 사용하여 Km값 및 Vmax값을 측정했을 때 Km값은 모두 변동이 없었다 (Table 3).

쥐에게 총담관 결찰을 시키고 2일 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다 각각 약 23% ($P<0.05$), 약 34% ($P<0.01$) 및 약 24% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 (결과 Table에서 CBDL 2 days + TCA) 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 Vmax값은 가수술만 시킨 군 (결과 Table에서 Sham 2 days)보다는 각각 약 45% ($P<0.001$), 약 57% ($P<0.001$) 및 약 55% ($P<0.001$), 총담관 결찰만 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 2 days)보다는 각각 약 28% ($P<0.01$), 약 35% ($P<0.01$) 및 약 41% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 (결과 Table에서 CBDL 2 day + TUDCA) 경과시켰을 때는 이 효소의 Vmax값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

4. 쥐에서 총담관 결찰과 담즙정체 시간이 혈청의 COMT 활성도에 미치는 영향

정상 쥐와 가수술을 시행한 쥐의 혈청에서는 COMT의 활성이 측정되지 않았다. 그러나 쥐에게 총담관 결찰을 시켰을 때는 혈청의 COMT 활성도가 현저하게 높았다. 즉 혈청의 COMT 활성도는 총담관 결찰 후 1일 경과시켰을 때는 126±32.7 pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$ (이하 단위 생략함)이었으며 총담관 결찰 후 2일 경과시켰을 때는 108±29.4이었다 (Table 4).

5. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청 COMT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때의 혈청 COMT의 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 약간 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 그리고 총담관 결찰 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 COMT 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 5).

고 찰

간은 생체 내 장기들 중 어느 장기보다도 그 생화학적 기능이 다양하고 활발하다. 간은 흡수된 영양소나 약물을 포함한 생체이물들이 반드시 거치는 기관으로 이들 물질을 이곳에서 대사시켜 그 대사물을 배설시키거나 간외 조직에 재분배해 주는 역할을 하며 다른 여러 장기들의 대사 기능과 연계하여 이를 총괄하는 기능을 가진다. 또한 간은 그 고유의 기능으로 알부민을 비롯한 여러 단백질을 생합성하여 보급해 주고 아울러 생체 활성 물질들을 생성하고 처리하는 기능을 가질 뿐만 아니라 왕성한 재생 기능도 가진다. 이러한 간의 기능들 중 특히 생체이물 생체 변환 기능의 한 부분인 해독 기능은 생명 현상 유지에 필수적인 기능이다 (Rhee and Kwak, 2000).

쥐에게 담즙울체를 야기시켜 간이 손상을 받으면 생체이물 생체 변환 효소인 간의 COMT 활성도가 감소되는 것 (Mun, 1996)은 잘 알려져 있으나 그 기전은 알려진 바 없다. 따라서 쥐 담즙울체간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체간에서 생체이물의 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 아울러 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 간의 해독 기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

Mun (1996)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후의 담즙울체간에서 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜의 COMT 활성도는 총담관 결찰 후 1, 2, 3, 7, 14, 28 및 42일에 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다고 하였고, 혈청

Table 4. Effects of time of biliary retention on serum catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$)
Normal	Undetectable
Sham 1 day	Undetectable
Sham 2 days	Undetectable
CBDL 1 day	126±32.7
CBDL 2 days	108±29.4

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1 and text

Table 5. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on serum catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min^{-1} mg $protein^{-1}$)
CBDL 1 day	126±32.7
CBDL 1 day + TCA	154±38.1
CBDL 1 day + TUDCA	127±27.3
CBDL 2 days	108±29.4
CBDL 2 days + TCA	143±35.2
CBDL 2 days + TUDCA	114±28.5

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Experimental groups are described in Table 2 and text

COMT는 정상 쥐에서는 나타나지 않았으나 총담관을 결찰한 쥐에서는 실험전기간 동안 높은 활성도를 나타내었다고 하였다. 그러나 이 보고서에서는 쥐 담즙울체간의 세포분획들에서 COMT의 활성도가 감소되는 기전에 대해서는 분명하게 설명하고 있지 않다. 이번 실험에서도 담즙울체간에서 이 효소의 활성도가 감소됨을 확인하였다.

이 연구에서 특히 규명하고자 하는 것은 COMT의 활성도가 담즙울체간에서 어떤 물질이 관여하여 이 효소의 활성도가 감소되었는가 하는 것이다. 이 연구에서는 이 문제를 규명하기 위하여 Ogawa et al. (1990)과 Park and Kwak (1999)의 방법에 의하였다. 즉 첫째 모델은 대조군으로 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시켜 담즙울체간을 만든 것이고, 둘째 모델은 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간에 담즙울체를 더욱 심화시킨 것이다. 따라서 이 두가지 모델을 사용함으로써 간 내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아 낼 수가 있는 것 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999)이다.

또한 이 연구에서는 주입하는 담즙산의 종류가 다르면 COMT 활성도에 미치는 효과도 달라지는가 하는 것이며 이를 알아내기 위하여 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 arylesterase의 합성에 영향을 주지 않고 (Han and Kim, 1997) 담즙산의 간 독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (Poupon et al., 1987; Kitani, 1988; Leuschner et al., 1989; Ogawa et al., 1990; 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 세포질액 및 미토콘드리아 분획의 COMT 활성도와 이의 Vmax값, 총담관 결찰 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 COMT 활성도 및 총담관 결찰 후 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 COMT의 Vmax값 등은 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 정상군이나 가수술군의 쥐 혈청에서는 COMT가 출현하지 않았으나 총담관 결찰을 시킨 군에서는 수술 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 COMT가 혈청에 출현하였다. 이상의 결과는 Mun (1996)의 결과와 일치하였다. 이 결과로 보아 COMT는 담즙울체의 정도가 심한 조건인 담관폐쇄를 시켰을 때 간에서는 그 활성도가 감소되고 혈중에는 출현하는 것을 알 수가 있었다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 한편 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 Vmax값은 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이 효소의 Km값은 모든 실험군의 간세포분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 TCA는 간의 COMT 합성을 억제한다고 추정할 수 있으며 특히 TCA가 COMT 저해제 (inhibitor)가 아니라는 사실 (Zollner, 1993)과 TCA를 주입한 실험군에서 이 효소의 Km값은 변동이 없으면서 즉 촉매효율의 변동이 없으면서 이 효소의 활성도와 Vmax값이 감소된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침 해주는 결과라고 생각한다.

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포분획과 혈청에서 COMT 활성도는 모두 대조군의 그것과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 간의 COMT 합성을 억제하지 않는다고 추정할 수가 있다.

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 COMT 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 약간 증가 되었다. 이 결과로 보아 담즙울체 시 TCA가 간 내에 고부하되면 혈청의 COMT 활성도는 증가된다는 것을 알 수 있으며 그 증가의 원인은 TCA에 의한 간의 괴사 (Palmer, 1972; Drew and Priestly, 1979; Kitani et al., 1986)로 간 세포막을 손상시켜 간에서 혈중으로 이들 효소의 유출량을 증가시켜 나타난 결과로 생각된다.

이상 이 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체간에서 COMT의 활성도 감소는 담즙산 중 TCA에 의해 이 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체 시 이 효소의 혈중 활성도 증가는 간의 괴사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이 효소가 혈중으로 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

REFERENCES

Borchardt RT. N- and O-methylation in Enzymatic basis of detoxication (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol II, pp 43-62. Academic Press. NY, USA.

Borchardt RT. Catechol-O-methyltransferase in Method in enzymoloy (Jakoby WB. Ed). 1981. Vol 77, pp 267-272. Academic Press. NY, USA.

Do JY, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on hepatic monoamine oxidase A and B activities in cholestatic rats. J Exp Biomed Sci. 2004. 10: 421-427.

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

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 taurochloate load on activity of rat liver arylesterase. Korean J Hepatol. 1997. 3: 154-169.

Han BH, Kim YH. Effect of high taurochloate load on activity of rat liver carboxylesterase. Keimyung Med J. 1998. 17: 487 -503.

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: 203-211.

Kim BK. Enzyme Nomenclature, IUB. 1979, pp 134-135. Academic Press. NY, USA.

Kim SK, Kim YH. Induction of rat liver γ-glutamyl transpeptidase by bile acid load. Korean J Hepatol. 1997. 3: 210-226.

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

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.

Kwak CS. Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. l. Isolations of mitochandria and microsome. The 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.

Mun KC. Catechol-O-methyltransferase activity in cholestatic rat's liver induced by bile duct ligation. J Biochem Mol Biol. 1996. 29: 142-145.

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, 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 billiary cirrhosis? Lancet 1987. 1: 834-836.

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.

Rhee BW, Kwak CS. Induction of hepatic arylamine N-methyltransferase by a taurocholate load in rats. J Korean Surg Soc. 2000. 59: 141-153.

Zollner H. Handbook of enzyme inhibitors. 2nd ed. 1993. Part B, pp 971. VCH verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Germany.