J. Exp. Biomed. Sci. 12 (2006) 91–97

Effects of Intravenous Administration of Taurocholic Acid on Hepatic Monoamine Oxidase A and B Activities in Rats with Choledocho-Caval Shunt

Jun-Young Do[1], Kyo-Cheol Mun[2], You-Hee Kim[2] and Chun-Sik Kwak[2†]

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

The effects of intravenous administration of high concentration of taurocholic acid (TCA) on monoamine oxidase (MAO) A and B activities in rat liver mitochondria and microsomes were studied. These liver subcellular organelles and serum MAO activities were determined from the experimental rats with choledocho-caval shunt (CCS). The Michaelis-Menten constants in these hepatic enzymes were also measured. The activities of mitochondrial MAO A and B, and microsomal MAO B as well as their V_{max} values were found to be decreased significantly in CCS plus TCA injected group then in the control group, such as CCS alone groups. However their K_m values in the experimental groups did not vary. MAO of serum appeared in the CCS plus TCA injected groups only. The above results suggest that TCA represses biosynthesis of the MAO in the liver. The MAO of serum is believed to be caused by the increment of membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

Key Words: Choledocho-caval shunt, Monoamine oxidase, Taurocholic acid

서 론

간에 담즙울체가 야기되면 간과 혈청에서는 많은 효소들의 활성도가 변동되며 그 활성도 변동에는 담즙울체간에 축적된 taurocholic acid (TCA)가 관여한다 (Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997; Rhee and Kwak, 2000; Kim and Shin, 2002; Rhee and Kwak, 2002; Rhee and Kwak, 2004)고 한다. 이러한 연구를 하기 위해서는 두 가지 동물 모델을 만들어 실험을 하는데 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999) 그 첫째 모델은 쥐에게 총담관 결찰 (common bile duct ligation)로 담관을 폐쇄 시킨 후 TCA를 혈중에 주입하는 모델이며 둘째 모델은 쥐에게 총담관 대정맥문합 (choledocho-caval shunt)을 시킨 후 TCA를 혈중에 주입하는 모델이다. 이 두 모델은 시간이 경과 될수록 간 내 담즙산의 농도가 증가되는 점은 동일하나 다른 점은 그 증가 속도가 첫째 모델이 둘째 모델보다 훨씬 빠르다 (Toyota et al., 1984; Ogawa et al., 1990)는 것이다. 따라서 첫째 모델인 총담관 결찰 직후 TCA를 상대정맥 내 주입한 모델로는 간 내 TCA의 고농도 증가에 따른 효소 활성도 변동에 대한 TCA의 효과를 알아낼 수가 있는 것 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999)이고 둘째 모델인 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대정맥 내 주입한 모델로는 간 내 TCA의 저농도 증가에 따른 TCA 효과를 알아낼 수가 있는 것 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999)이다. 특히 이 둘째 모델의 특징은 첫째 모델 보다 TCA 효과를 더욱 민감하게 알아 낼 수가 있다는 것 (Choi et al., 2004)이다.

이러한 모델 중 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 TCA를 혈중에 주입한 둘째 모델로 간에서 각종 효소의 활성도 변동을 조사한 보고는 많다. 즉, alkaline phosphatase (Ogawa et al., 1990), γ-glutamyl transpeptidase (Kim and Kim, 1997), catalase, alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase (Kim and Shin, 2002), arylesterase (Han and Kim, 1997), arylamine N-methyltransferase (Rhee and Kwak, 2000), thiol methyltransferase (Rhee and Kwak, 2002), thiosulfate sulfurtransferase (Rhee and Kwak, 2004), cathepsin B, cathepsin D, acid phosphatase (Choi et al., 2004) 등이며 TCA가 이들 효소의 합성을 조절하여 이들 효소의 합성 속도를 변동시킨다는 것이다. 따라서 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 혈중에 주입 시킨 동물 모델의 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들에 대해서는 TCA의 효과를 더욱

*논 문 접 수: 2006년 3월 30일
수정재접수: 2006년 5월 1일
†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

분명하게 알 수가 있을 것이다.

Monoamine oxidase [amine: oxygen oxidoreductase (flavin containing, deaminating), EC 1. 4. 3. 4, MAO]는 제 1상 생체이물 생체 변환 (phase 1 xenobiotic biotransformation) 효소의 일종이며 (Tipton, 1980; Mun and Kwak, 1989) 모노아민, 분자산소 및 물로부터 알데하이드, 암모니아 및 과산화수소를 생성하는 효소이다. MAO는 간세포의 미토콘드리아와 내형질세망에 국재되어 있으며 기질 특이성과 억제제에 대한 감수성에 따라 MAO A와 MAO B로 구분하고 있다 (Greenawalt and Schnaitman, 1970; Corte and Tipton, 1980; Tipton, 1980). 이 효소들은 담즙울체간에서 활성도가 감소됨이 (Mun and Kwak, 1989) 알려져 있을 뿐만 아니라 TCA에 의해서 이들 효소의 합성이 억제된다고 추정하고 있다 (Do and Kwak, 2004).

이 연구는 MAO A 및 B의 활성도가 담즙울체간에서 왜 감소되었는지 그 기전을 분명하게 알아내기 위하여 시행하였으며 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다 (Ogawa et al., 1990; Kim and Kim, 1997; Rhee and Kwak, 2000)고 알려진 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 간과 혈청에서 이들 효소의 활성도를 측정하여 이들 효소의 활성도 변동 기전의 일부를 밝혀 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

Benzylamine · HCl, 5-hydroxytryptamine · HCl (serotonin), phenol, monoamine oxidase (from bovine plasma, M4636), TCA (from ox bile, sodium salt, T0750), tauroursodeoxycholic acid (sodium salt, T0266, TUDCA) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin)은 Sigma사 (St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 그 외 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 9개군으로 나누었다. 즉 정상군 1군, 가수술군 (Sham operation)은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군으로 하였고 총담관 대정맥문합 (Choledocho-caval shunt) 군은 총담관 대정맥문합 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군, 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 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, 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park and Kwak, (1999)의 방법에 따라 TUDCA (체중 100 g당 45 μmoles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군으로 나누었다. 각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다.

총담관 대정맥문합 수술 및 가수술은 효소 활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터마취하에서 실시하였다. 총담관 대정맥문합은 상대정맥과 총담관을 medical grade silicon tube를 사용하여 연결하였으며 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA 액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, USA)를 사용하여 15분 동안 주입하였다.

3. 간적출 및 세포 분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터마취하에서 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 세포 분획은 적출한 간을 즉시 2~4℃로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배 량의 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 and Kwak, 1986)으로 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

4. 효소 시료 조제

MAO 활성도 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 마이크로솜 분획 및 미토콘드리아 분획을 ultrasonic dismembrator (model 300, Fisher, USA)로 2~4℃를 유지하면서 20±0.4 Kcycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄를 한 다음 단백질량으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose액에 현탁시켰으며 이 액을 MAO 활성도 측정용 효소 시료로 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

간의 미토콘드리아 분획과 마이크로솜 분획의 MAO A 활성도 측정은 5-hydroxytryptamine을, MAO B 활성도 측정은

Table 1. Effects of choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular monoamine oxidase (MAO) A and B activities in rats

Experimental groups	MAO A		MAO B	
	(pmol ammonia min^{-1} mg $protein^{-1}$)			
	Mitochondria	Microsome	Mitochondria	Microsome
Normal	1,278±249	556±138	1,621±296	637±149
Sham 1 day	1,283±264	543±144	1,633±308	646±154
Sham 2 days	1,292±255	547±149	1,625±313	641±158
CCS 1 day	1,208±249	532±141	1,335±254	632±151
CCS 2 days	1,183±238	521±138	1,286±262	626±148

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.

benzylamine을 각각 기질로 사용하여 효소 시료와 함께 37℃에서 20분간 반응시키는 동안에 생성되는 암모니아의 양을 측정하는 Nagatsu and Yagi (1966)법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 암모니아의 양을 nmol로 나타내었다.

혈청 MAO 활성도 측정은 benzylamine을 기질로 사용하여 37℃에서 3시간 반응시키는 동안 생성한 benzaldehyde를 비색하는 McEwen and Cohen (1963)의 방법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 혈청 1 ml가 1시간 반응하여 변동된 흡광도 (△A)를 100배 곱하여 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사 (St. Louis, USA)의 정제 효소를 사용하여 검정하였으며 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. K_m값 및 V_{max}값의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포 분획 효소 시료들과 효소 기질의 원액과 희석액을 사용하여 MAO A 및 B의 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 1/vi값을 그리고 기질 농도로부터 1/[S]값을 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 그린 다음 이것으로부터 K_m값과 V_{max}값을 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 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 쥐에서 총담관 대정맥문합 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 MAO A 및 B 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일째 간 미토콘드리아와 마이크로솜 분획의 MAO A 및 B의 활성도는 변동을 나타내지 않았다 (Table 1).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아 분획의 MAO A 및 B 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 27% ($P<0.05$) 및 약 35% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었으며, 간 미토콘드리아 분획의 MAO B 활성도는 대조군보다 각각 약 31% ($P<0.05$) 및 약 41% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다. 그러나 간의 마이크로솜 분획에서는 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 MAO B의 활성도만 대조군 보다 약 33% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 한편 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시킨 간에서는 이들 효소의 활성도가 대조군과 차이가 없었다 (Table 2).

2. 쥐에서 총담관 대정맥문합 후 2일 경과한 실험군에서 간 MAO A 및 B의 K_m값 및 V_{max}값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 MAO A와 B를 각각 5-hydroxytryptamine과 benzylamine을 기질로 사용하여 K_m값 및 V_{max}값을 측정했을 때 K_m값은 모두 변동이 없었다. 또한 수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 마이크로솜 분획의 MAO A의 V_{max}값도 모두 통계학적으로 유의한 변동은 없었다. 그리고 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A의 V_{max}값을 가수술만 시킨

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular monoamine oxidase (MAO) A and B activities in rats

Experimental groups	MAO A		MAO B	
	(pmol ammonia min^{-1} mg $protein^{-1}$)			
	Mitochondria	Microsome	Mitochondria	Microsome
CCS 1 day	1,208±249	532±141	1,335±254	632±151
CCS 1 day + TCA	882±176[j]	473±125	915±165[j]	503±138
CCS 1 day + TUDCA	1,256±253	525±132	1,382±241	654±142
CCS 2 days	1,183±238	521±138	1,286±262	626±148
CCS 2 days + TCA	773±155[m]	417±112	758±164[n]	422±123[m]
CCS 2 days + TUDCA	1,203±227	528±141	1,228±253	642±157

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; CCS 1 day or CCS 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after choledocho -caval shunt; One of the following bile acids, TCA or TUDCA (45 μmoles/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. j, $P<0.05$ vs. CCS 1 day; m, $P<0.05$ vs. CCS 2 days; n, $P<0.01$ vs. CCS 2 days

Table 3. Rat hepatic monoamine oxidase (MAO) A and B kinetic parameters from 2 days after choledocho-caval shunt (CCS 2 days) determined with 5-hydroxytryptamine for MAO A and benzylamine for MAO B

Experimental groups	MAO A				MAO B			
	Mitochondria		Microsome		Mitochondria		Microsome	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
	(Km, mM; Vmax, pmol ammonia min^{-1}mg $protein^{-1}$)							
Sham 2 days	6.38±1.25	2,648±510	9.08±1.87	1,148±298	5.87±0.89	3,412±626	8.58±1.63	1,314±320
CCS 2 days	6.42±1.38	2,348±468	9.22±2.16	1,016±268	5.98±0.96	2,590±517	8.69±1.82	1,241±285
CCS 2 days + TCA	6.39±1.36	1,523±292[h,n]	9.24±2.23	811±202	5.94±0.98	1,498±316[i,n]	8.74±1.72	831±257[g,m]
CCS 2 days + TUDCA	6.31±1.28	2,396±431	9.13±1.89	1,044±271	5.83±0.91	2,412±497	8.62±1.57	1,262±304

Michaelis-Menten constants were determined using 5-hydroxytryptamine as a substrate for MAO A and benzylamine for MAO B from experimental rat livers at two days after CCS. 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 days; h, $P<0.01$ vs. Sham 2 days; i, $P<0.001$ vs. Sham 2 days; m, $P<0.05$ vs. CCS 2 days; n, $P<0.01$ vs. CCS 2 days

군과 비교했을 때도 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 3).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A의 V_{max} 값은 가수술만 시킨 군보다는 약 42% ($P<0.01$), 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다는 약 35% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때는 이 효소의 V_{max}값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3). 그리고 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아와 마이크로솜 분획의 MAO B의 V_{max} 값은 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 56% ($P<0.001$) 및 약 37% ($P<0.05$), 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다는 각각 약 42% ($P<0.01$) 및 약 33% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때는 이들 효소의 V_{max}값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

3. 쥐에서 총담관 대정맥문합 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청 MAO 활성도에 미치는 영향

정상 쥐와 가수술을 시행한 쥐의 혈청에서는 MAO 활성이 측정되지 않았으며 쥐에게 총담관 대정맥문합만 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때도 혈청에서는 MAO 활성이 측정되지 않았다. 그러나 쥐에게 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 MAO 활성도는 각각 3.2±0.83 △A × 100 $hr^{-1}ml^{-1}$ (이하 단위 생략함) 및 4.3±1.18이었다 (Table 4).

고 찰

임상적 및 병리학적으로 담즙울체를 주소견으로 하는 간담도 질환으로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙울체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관 수술 후 및 담낭절제 후의 총담관 협착증, 간외 담도폐쇄증, 담관암 및 간세포암의 총담관 침범으로

Table 4. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on serum monoamine oxidase (MAO) activities in rats

Experimental groups	MAO ($\triangle A \times 100\ hr^{-1}\ ml^{-1}$)
CCS 1 day	Undetectable
CCS 1 day + TCA	3.2±0.83
CCS 1 day + TUDCA	Undetectable
CCS 2 days	Undetectable
CCS 2 days + TCA	4.3±1.18
CCS 2 days + TUDCA	Undetectable

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

인한 담관폐쇄증, 췌장 질환 및 총담관 주변 림프절의 종대로 인한 총담관의 외압성 폐쇄증, 기생충으로 인한 담관폐쇄증, 약물 또는 임신으로 인한 담관폐쇄증, 양성 재발성 담즙울체 등을 들 수 있다 (Halsted, 1976; Erlinger, 1999; Sherlock and Dooley, 2002; Park et al., 2004). 이러한 담즙울체성 간담도 질환 시 담즙울체의 시간이 경과하면 간조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타남 (Desmet, 1994)과 동시에 간세포는 기능 장애가 초래되며 (Halsted, 1976; Sherlock and Dooley, 2002) 이때 담즙울체간에서는 각종 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 특히 쥐를 사용하여 담즙울체간을 만드는 모델 실험에서 그 활성도가 증감되는 간 효소들의 활성도 변동 기전에 대해서 현재까지 알려져 있는 것은 다음과 같다. 즉, arylesterase (Han and Kim, 1997), carboxylesterase (Han and Kim, 1998), cholinesterase (Park and Kwak, 1999), alcohol dehydrogenase, catalase (Kim and Shin, 2002) 및 thiosulfate sulfurtransferase (Rhee and Kwak, 2004)는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되며 그 기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 TCA가 효소 단백질 합성을 억제시켜 이들 효소의 합성을 억제시킨다는 것이고 alkaline phosphatase (Ogawa et al., 1990), 5'-nucleotidase (Kim et al., 2001b), γ-glutamyl transpeptidase (Kim and Kim, 1997), microsomal ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase (Kim and Shin, 2002), benzoyltransferase (Kim et al., 2001a), arylamine N-methyltransferase (Rhee and Kwak, 2000), thiol methyltransferase (Rhee and Kwak, 2002), cathepsin B, cathepsin D 및 acid phosphatase (Choi et al., 2004)는 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 TCA가 효소 단백질 합성을 자극시켜 이들 효소의 합성을 촉진시킨다는 것이다.

Mun and Kwak, (1989)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간에서 미토콘드리아의 MAO A 활성도는 총담관 결찰 후 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 미토콘드리아의 MAO B 활성도는 총담관 결찰 후 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였으며 마이크로솜의 MAO A와 B의 활성도는 총담관 결찰 후 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였다. 또한 혈청에서 MAO 활성은 총담관 결찰 후 3일까지는 측정되지 않았으나 총담관 결찰 후 7일부터 출현하여 이후 42일까지 계속 그 활성도가 증가 되었다고 하였다. 그러나 이번 실험에서 총담관 대정맥문합만 시행한 간에서는 이들 효소의 활성도는 변동이 없었다. 이 현상은 간에 담즙울체의 정도가 미약해서 나타난 결과가 아닌가 생각된다. Do and Kwak (2004)은 쥐를 사용한 실험에서 총담관 결찰 후 혈중에 TCA를 주입한 결과 간 미토콘드리아에서는 MAO A가, 간 미토콘드리아와 마이크로솜에서는 MAO B의 활성도가 감소되었고 혈청에서는 MAO가 출현함과 아울러 그 활성도가 증가하였다고 하였으며 이 결과는 TCA가 간에서 이들 효소의 합성을 억제하고 또한 간에서 이들 효소의 혈중 유출을 증가시켜 나타난 결과라고 추론하였다. 이번 실험은 이 사실을 더욱 분명하게 알아내기 위하여 시행한 것이며 또한 이 실험에서는 주입하는 담즙산의 종류가 다르면 이들 효소 활성도에 미치는 영향도 달라지는가를 알기 위하여 담즙울체간에서 효소들의 합성에 영향을 주지 않으며 (Ogawa et al., 1990; Kim and Kim, 1997; Rhee and Kwak, 2000) 담즙산의 간 독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (Poupon et al., 1987; Ogawa et al., 1990; Heuman et al., 1991)를 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 효과를 관찰하였다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A 및 B 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 MAO B 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 쥐에게 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A, 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 MAO B 등의 V_{max} 값은 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이들 효소의 K_m값은 모든 실험군의 간세포 분획에서 유의한 변동은 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 TCA는 간의 MAO 합성을 억제한다고 확신할 수 있으며 특히 TCA가 MAO 저해제 (inhibitor)가 아니라는 사실 (Zollner, 1993)과 아울러 TCA를 주입한 실험군에서 이들 효소의 K_m값은 변동이 없으면서 V_{max}값이 감소된 것은 위의 추론을 더욱 분명하게 해주는 결과라고 생각한다. 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간세포 분획과 혈청에서 이들 효소의

활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 간의 MAO의 유전자 발현에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다.

이 실험에서 혈청 MAO는 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 1일 경과시켰을 때 출현하였으며 2일 경과시켰을 때는 1일 경과시켰을 때 보다 혈청 MAO 활성도가 높았다. 이 결과로 보아 담즙울체 시 TCA가 간 내에 고부하되면 혈청에 MAO가 출현되고 그 활성도가 증가된다는 것을 알 수 있으며 그 원인은 TCA가 간 세포막을 손상시켜 간에서 혈중으로 이 효소를 유출시켜 나타난 결과로 생각된다.

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

REFERENCES

Choi HJ, Kim YH, Kwak CS. Effects of high taurocholic acid load on liver lysosomal cathepsin B and D, and acid phosphatase activities in rats with choledocho-caval shunt. J Exp Biomed Sci. 2004. 10: 429-434.

Corte LD, Tipton KF. The turnover of the A- and B-forms of monoamine oxidase in rat liver. Biochem Pharmacol. 1980. 29: 891-895.

Erlinger S. Cholestasis in Schtiff's diseases of the liver (Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Eds). 1999. pp 611-629. Lippincott-Raven. Philadelphia, USA.

Desmet VJ. Cholestasis: Extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis in Pathology of the liver. 3rd ed. (MacSween RNM. Anthony PP. Scheuer PJ. Burt AD. Portman BC. Eds). 1994. pp 425-474. Churchill Livingstone. 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.

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.

Greenwalt JW, Schnaitman C. An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. J Cell Biol. 1970. 46: 173-179.

Halsted JA. The laboratory in clinical medicine. interpretation and application. 1976. pp 426-429. Saunders. London, UK.

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

Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate 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 IK, Kim YH, Kwak CS. Induction of hepatic benzoyltransferase by bile acid in rats. Keimyung Med J. 2001a. 20: 20-30.

Kim SK, Kim YH, Kwak CS. Induction of cholestatic rat liver 5'-nucleotidase by taurocholic acid load. Keimyung Med J. 2001b. 20: 129-139.

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.

Kwak CS, Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. 1. Isolations of mitochondria and microsome. The Keimyung Univ Med J. 1986. 5: 45-53.

McEwen CM Jr, Cohen JD. An amine oxidase in normal human serum. J Lab Clin Med. 1963. 62: 766-776.

Mun KC, Kwak CS. Monoamine oxidase activity in cholestatic rat liver. The Keimyung Univ Med J. 1989. 8: 69-77

Nagatsu T, Yagi K. A simple assay of monoamine oxidase and D-amino acid oxidase by measuring ammonia. J Biochem (Japan). 1966. 60: 219-221.

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.

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

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

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

Rhee BW, Kwak CS. Effects of intravenous adminstration of taurocholate on liver and serum thiosulfate sulfurtransferase activities in cholestatic rat. J Korean Surg Soc. 2004. 66: 359-366.

Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver biliary system. 11th ed. 2002. pp 219-398. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.

Tipton KF. Monoamine oxidase in Enzymatic basis of Detoxication (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol I, pp 355-370. Academic Press. NY, USA.

Toyota N. Miyai K, Hardison WGM. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. Lab Invest. 1984. 50: 536-542.

Zollner H. Handbook of enzyme inhibitors. 2nd ed. 1993. Part A, pp 45. VCH verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Germany.