

흰쥐 담즙울체간의 α -D- 및 β -D-Glucosidase와 β -D-Glucuronidase의 활성도*

계명대학교 의과대학 생화학교실

박은미 · 곽춘식

서 론

간 조직에 담즙울체를 야기시키는 질병은 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄, 원발성 담즙성 간경변증, 담관염 및 담즙울체형 간염 등이다(Halsted, 1976). 이러한 담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 간 세포는 기능장애(Halsted, 1976; Sherlock, 1985a)를 받을 뿐만 아니라 담즙울체의 시간이 경과됨에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적 변화가 연속적으로 나타난다(Desmet, 1979). 그러나 이러한 형태학적 변화가 나타나는 담즙울체간에서 생화학적 지견이 분명치 않는 것이 많으며 이를 해결하려는 노력은 현재도 계속되고 있다. 특히 흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간 경과에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화(Moritz와 Snodgrass, 1972; 장대성 등, 1987; 김효석 등, 1989)가 나타나기 때문에 흰쥐의 총담관을 결찰하여 형성된 담즙울체간은 담즙울체간의 실험 모형으로 널리 이용되고 있다(Kaplan과 Righetti, 1970; 곽춘식 1980a; 곽춘식, 1980b; Toda 등, 1980; 곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식, 1985; 곽춘식과 이상일, 1985; 곽춘식 등, 1987; 정상호와 곽춘식, 1987; 문교철과 곽춘식, 1989).

α -D-Glucosidase(α -D-glucoside glucohydrolase, E C3. 2. 1. 20)는 포유동물 간의 lysosome에 주로 분포되어 있으며(Bruni 등, 1969; Jeffery 등, 1970; Kim, 1979a; Dissous 등, 1981; Tsuji와 Suzuki, 1987) maltose, glycogen 및 각종 oligosaccharide와 polysaccharide에서 말단 비환원 위치에 α -1, 4결합으로 결합되어 있는 α -D-glucosyl기를 가수분해시키는 반응을 촉매하는 효소이다(Bruni 등, 1969;

Jeffery 등, 1970; Kim, 1979a; Dissous 등, 1981 Dahlgvist, 1984). 또한 β -D-glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3. 2. 1. 21)도 포유동물 간의 세포질과 lysosome에 주로 존재하는 효소(Kim, 1979a; Daniels 등, 1981; Daniels와 Glew, 1984; Fabbro 등, 1984)로서 glycoprotein에 결합된 oligosaccharide나 glucocerebroside에 결합되어 있는 ceramide에서 말단 비환원 위치에 β -1, 4결합으로 결합된 β -D-glucosyl기를 가수분해시키는 반응을 촉매하는 효소(Kim, 1979a; Daniels와 Glew, 1984)이다.

β -D-Glucuronidase(β -D-glucuronide glucuronosohydrolase, EC 3. 2. 1. 31)도 간에 풍부히 존재하는 효소(Dingle, 1973; Smith와 Ganschow, 1978; Kim, 1979b; Stahl과 Fishman, 1984; Kurtin과 Schwesinger, 1985; Powell 등, 1988; Takagaki 등, 1988)로서 glycosaminoglycan의 비말단의 β -D-glucuronosyl기를 가수분해하거나 또는 β -D-glucuronide를 가수분해하여 β -D-glucuronic acid를 유리시키는 반응을 촉매하는 효소이다(Kim, 1979a; Stahl과 Fishman, 1984; Powell 등, 1988; Takagaki 등, 1988). 이와같이 이들 glycosidase는 포유동물의 간에 풍부히 존재하므로 담즙울체로 간손상이 야기될 때는 간 조직과 혈청에서 이들 효소의 활성 변동이 있을 것이다. 그러나 이에 대한 연구는 많지 않으며 단지 간과 혈청의 β -D-glucuronidase가 간담도 질환 시 그 활성이 증가한다는 단편적인 보고(Aronsen 등, 1972; Garay 등, 1972; Nagasue 등, 1982)만 있을 뿐이다. 따라서 담즙울체간에서 이들 효소의 활성 변동을 자세히 파악해 보면 담즙울체간에서 glycoprotein, glycosaminoglycan 및 기타 당질의 대사에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것이다.

이 연구는 담즙울체간에서 당질의 분해 또는 당질의 합성 중 수정 과정에 관여하는 효소들인 α -

* 이 논문은 1992년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

D-glucosidase, β -D-glucosidase 및 β -D-glucuronidase의 활성 변동을 파악하기 위하여 시행한 실험으로서 흰쥐의 총담관을 결찰하고 12시간부터 42일까지의 담즙울체간에서 lysosome의 α -D-glucosidase와 β -D-glucosidase, 세포질의 broad-specificity β -D-glucosidase, 총 β -D-glucuronidase와 microsome의 β -D-glucuronidase의 활성도를 각각 측정하는 한편, 혈청에서 β -D-glucosidase, broad-specificity β -D-glucosidase와 β -D-glucuronidase 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 보고코자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치 : 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 320-350g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 17 군으로 나누었다.

1) 정상군 : (1 군)

2) 가수술군 : 가수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 죽인 군(총 8 군)

3) 총담관 결찰군 : 총담관 결찰 후 12시간, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 죽인 군(총 8 군)

총담관 결찰군에서 담관 결찰 후 14일까지 죽은 예가 없었으나 그 후부터는 약 50%가 죽었다. 그래서 28일 및 42일군은 총담관 결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 진양 사료 주식회사 제품인 실험 동물사료를 먹도록 하였다.

총담관 결찰 수술과 가수술은 효소 활성의 일증 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether마취 하에서 실시하였다.

총담관 결찰은 간 근위부와 약 1cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄 상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

시약 : 4-Nitrophenyl α -D-glucopyranoside, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, phenolphthalein glucuronide sodium, phenolphthalein, 4-methylumbelliferone, ethylenediaminetetraacetic acid, sodium dodecyl sulfate, sodium azide, Triton X-100, α -D-glucosidase(type III, from yeast, G 7256), β -

D-glucosidase(from almonds, G 0395), β -D-glucuronidase(from bovine liver, G 0376) 및 단백 표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간 적출 및 시료 조제 : 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시켰다. 그리고는 간 문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25M-sucrose액으로 관류하여 간에 남아있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 그리고 적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하였다. 이 간 절편을 약 1g씩 2번 취하여 각각 9배량의 0.15M-sodium chloride액 또는 0.1M acetate buffer(pH 4.5)를 넣어 teflon glass homogenizer(Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 5회 왕복 마쇄하여 각각 10w/v% 간 조직 균질액을 만들었다. 한편 간 절편 약 3g을 취하여 9배량의 0.25M-sucrose액을 넣어 위와 같은 방법으로 10w/v%의 간 조직 균질액을 만들었다. 그리고는 0.25M-sucrose액으로 제조한 10w/v% 간 조직 균질액 20ml를 취하여 sucrose linear density gradient 원심 분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 세포질과 microsome분획을 분리하였다. 즉 간 조직 균질액을 571 × g(average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음, 그 상청액을 7,796 × g에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻는 상청액을 다시 104,000 × g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이때 얻어진 상청액을 세포질 분획으로 사용하였다. 그리고 이 과정에서 얻어진 pellet을 0.25M-sucrose액에 재현탁시키고 이액을 10~35w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심 분리관 상부에 부하시켜 88,500 × g에서 15분간 원심분리하여 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500 × g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이것을 다시 0.25M-sucrose액에 재현탁시켜 88,500 × g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

위의 세포 분획 과정에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심 분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65 B ultracentrifuge였다. 그리고 microsome 및 cytosol 분획의 분리에 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였으며 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former(ISCO model 570)을 사용하여 제조하였다.

Lysosomal α -D-glucosidase와 lysosomal acid β -D-glucosidase 활성도 측정용 시료는 0.15M sodium chloride액으로 제조한 10w/v% 간 조직 균질액을 105,000 × g에서 1시간 원심분리한 후 얻어진 침사를 0.15M-sodium chloride액으로 현탁시키고 다시 105,000 × g에서 1시간 원심분리하여 얻은 침사에 0.15M-sodium chloride액 일정량을 넣고 재현탁시킨 후 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 2~4°C를 유지하면서 20±4 K cycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄를 하여(Ben Yosef와 Nadler, 1978)사용하였다. 그리고 cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase활성도 측정용 시료는 cytosol 분획을 사용하였다.

총 β -D-glucuronidase활성도 측정용 시료는 0.1 M-acetate buffer(pH 4.75)로 조제한 10w/v% 간 조직 균질액을 0.1% Triton X-100으로 5배 희석하여 5분간 진탕한 액 (Musa 등, 1965)을 사용하였으며 microsome β -D-glucuronidase활성도 측정용 시료는 sucrose linear density gradient 원심분리법(광춘식과 광정식, 1986)으로 분리한 microsome분획을 0.1% Triton X-100으로 2배 희석하여 진탕한 액(Musa 등, 1965)을 사용하였다.

채혈한 혈액은 곧 원심분리하여 혈청을 얻은 후 각종 효소 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

효소 활성도 측정 : 혈청의 α -D-glucosidase와 간의 lysosomal α -D-glucosidase활성도 측정은 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 pH 4.5(50 mM acetate buffer, pH 4.5), 37°C조건에서 30분간 반응하여 생성된 4-nitrophenol을 비색정량하는 Dissous등(1981)의 방법에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백 또는 1ml의 혈청이 반응하여 생성한 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

혈청과 간의 broad-specificity β -D-glucosidase와 간의 lysosomal acid β -D-glucosidase활성도 측정은

4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 pH 5.5(1 M acetate buffer, pH 5.5), 37°C조건에서 1시간 반응하여 생성된 4-methylumbelliferone을 excitation 파장 366 nm, emission 파장 445nm에서 형광을 비색하는 Ben Yosef와 Nadler (1978)법에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백 또는 1ml의 혈청이 반응하여 생성한 4-methylumbelliferone을 nmol로 나타내었다.

간의 total 및 microsome β -D-glucuronidase활성도 측정은 phenolphthalein glucuronide를 기질로 사용하여 pH 4.5(0.1 M acetate buffer, pH 4.5), 38°C조건에서 1시간 반응하여 생성된 phenolphthalein을 540nm 파장에서 비색정량하는 Stahl과 Fishman(1984)법에 의하였으며 혈청의 β -D-glucuronidase활성도의 측정도 phenolphthalein glucuronide를 기질로 사용하여 pH 4.5(1M acetate buffer, pH 4.5), 38°C조건에서 4시간 반응하는 동안에 생성된 phenolphthalein을 비색정량하는 Fishman등(1967)의 법에 의하였다.

이들 β -D-glucuronidase활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백 또는 1ml의 혈청이 반응하여 생성한 phenolphthalein을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제 효소들을 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 β -D-glucosidase들의 활성도 측정에 사용한 분광형광계는 Farrand spectrofluorometer(MK 2)였으며 그 외 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varian Cary 210)였다.

단백정량 : 효소 시료 중의 단백 정량은 0.5N-perchloric acid와 methanol-ether혼합액 (3 : 1)으로 단백을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소 시료 중의 단백을 정제한 다음 biuret법(Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

성적검정 : 유의성 검정은 Student's t-test(Scheffler, 1980)로 하였다.

성 적

흰쥐에서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 및 간의 α -D-glucosidase활성도의 변동 : 총담관을 결찰한

흰쥐의 혈청 및 간의 α -D-glucosidase활성도의 변동은 도 1과 같다. 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 lysosomal α -D-glucosidase와 혈청의 α -D-glucosidase활성도는 담즙울체체의 시간이 경과하면 증가되었다. 즉 담즙울체간의 lysosomal α -D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 2일에는 가수술군에 비해 약 19%의 증가를 나타내었으며 이후 3일에는 약 35%, 7일에는 약 135% ($p < 0.001$), 14일에는 약 163% ($p < 0.001$), 28일에는 약 162% ($p < 0.001$), 42일에는 약 158% ($p < 0.001$)의 증가를 나타내었다. 그리고 이 중 유의성이 있는 활성증가를 나타낸

시기는 총담관결찰 후 7일부터 42일까지였다. 혈청의 α -D-glucosidase활성도도 총담관결찰 후 2일에는 가수술군에 비해 약 12%의 증가를 나타내었으며 이후 3일에는 약 14%, 7일에는 약 46%, 14일에는 약 102% ($p < 0.01$), 28일에는 약 67% ($p < 0.01$), 42일에는 약 50% ($p < 0.05$)의 활성증가를 나타내었다. 그리고 이 중 유의성이 있는 활성증가를 나타낸 시기는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지였다.

흰쥐에서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 및 간의 β -D-glucosidase활성도의 변동 : 총담관을 결찰한 흰쥐의 간 및 혈청의 β -D-glucosidase활성도변동은

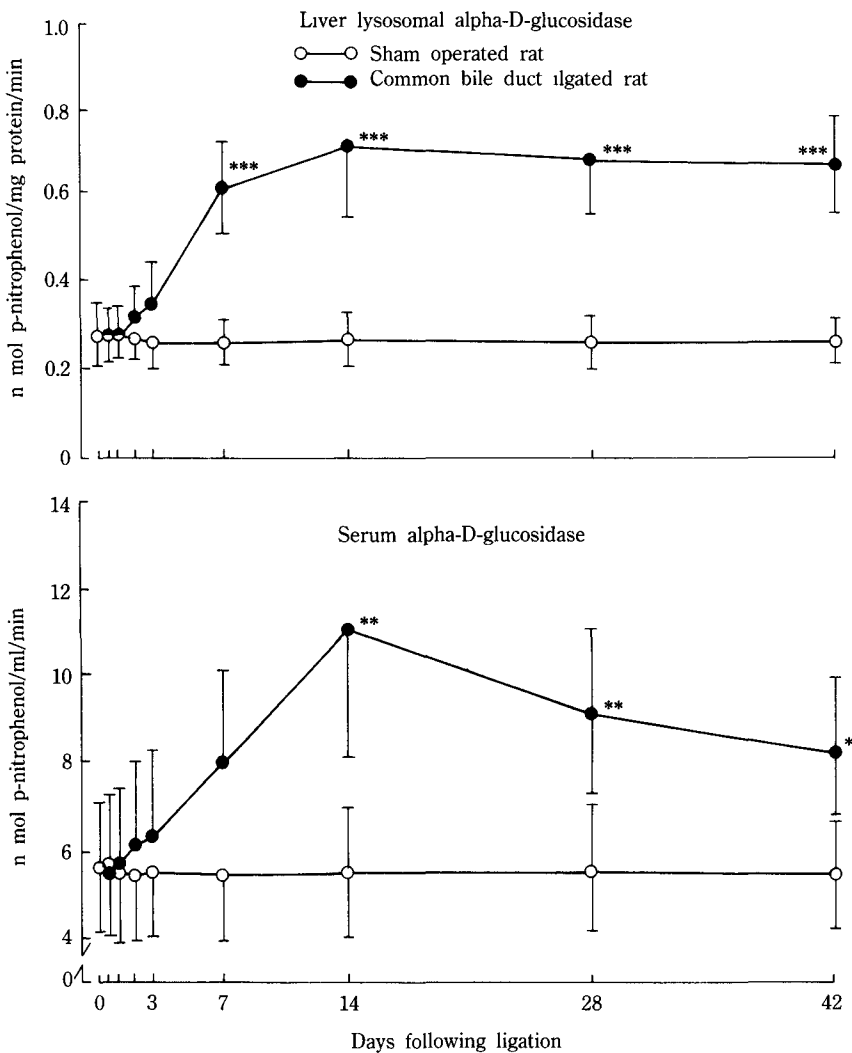


Fig 1. Serum and liver lysosomal alpha-D-glucosidase activities after common bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicate mean \pm SD with 5 rats in each group.

*, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$

도 2 및 도 3과 같다. 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 lysosomal acid β -D-glucosidase활성도는 총담관을 결찰한 후 14일부터 증가되었으며 그 증가의 정도는 총담관결찰 후 14일에는 가수술군에 비해 약 37%의 활성증가를 나타내었다. 그리고 이후 28일에는 약 153% ($p < 0.05$), 42일에는 약 111% ($p < 0.05$)의 활성증가를 나타내었으며 이 증유의성이 있는 활성증가의 시기는 28일부터 42일까지였다. 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase활성도는

총담관 결찰 후 7일부터 42일까지 증가되었으나 유의성은 없었다(도 2).

흰쥐의 총담관을 결찰한 후 혈청의 broad-specificity β -D-glucosidase활성도는 담즙울체의 시간이 경과하면 증가되었다. 즉 혈청의 broad-specificity β -D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 12시간에는 가수술군에 비해 약 35%의 증가를 나타내었으며 이후 1일에는 약 70% ($p < 0.05$), 2일에는 약 68% ($p < 0.05$), 3일에는 약 77% ($p < 0.05$), 7일에는 약 290% ($p < 0.01$), 14일에는 약 332% ($p < 0.01$, 28일

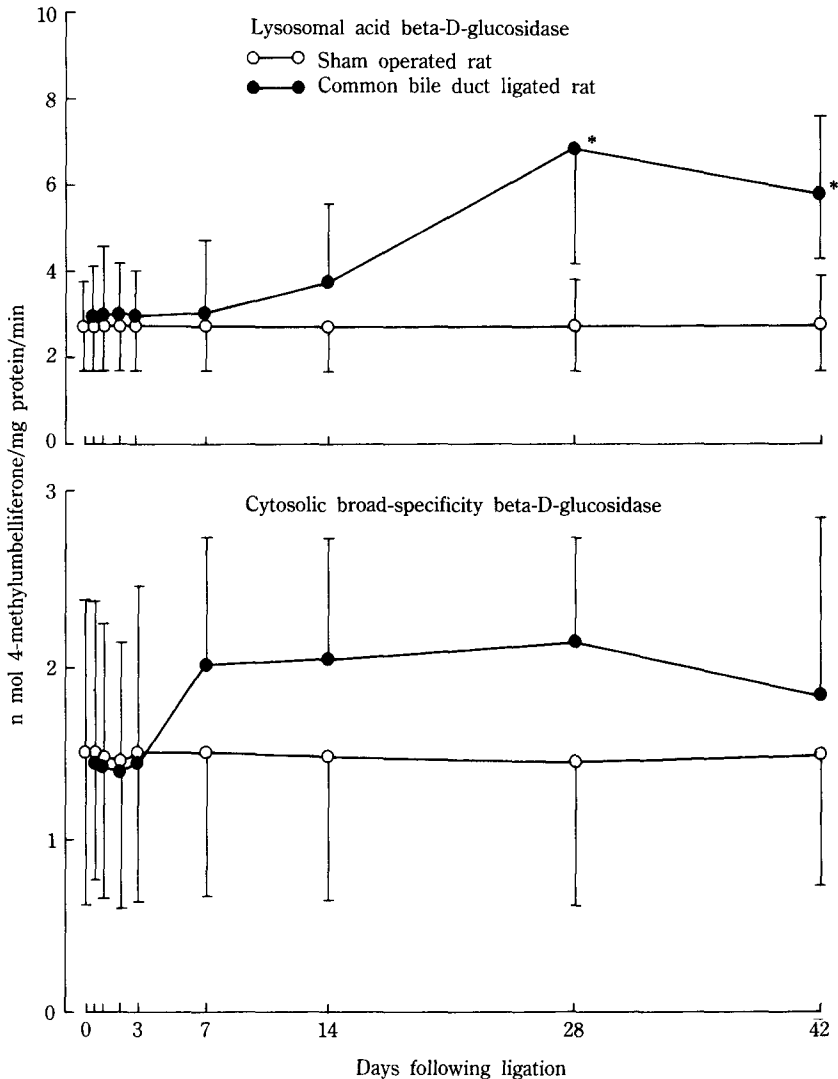


Fig 2. Liver cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase and lysosomal acid β -D-glucosidase activities after common bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicate mean \pm with 5 rats in each group.

*: $P < 0.05$

에는 약 321% ($p < 0.01$), 42일에는 약 64% ($p < 0.05$)의 증가를 나타내었다. 그리고 이 중 유의성이 있는 활성증가를 나타낸 시기는 총담관결찰 후 1일부터 42일까지 였다(도 3).

흰쥐에서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 및 간의 β -D-glucuronidase활성도의 변동 : 총담관을 결찰한 흰쥐의 간 및 혈청의 β -D-glucuronidase활성도 변동은 도 4 및 도 5와 같다. 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간의 총 β -D-glucuronidase와 microsomal β -D-glucuronidase활성도는 담즙울체의 시간이 경과하면 증가되었다. 즉 담즙울체간의 총 β -D-glucuronidase활성도는 총담관결찰 후 1일에는 가수술군에 비해 약 24%의 증가를 나타내었으며 이 후 2일에는 약 39% ($p < 0.05$), 3일에는 약 38% ($p < 0.05$), 7일에는 약 44% ($p < 0.01$), 14일에는 약 125% ($p < 0.01$), 28일에는 약 132% ($p < 0.001$), 42일에는 약 80% ($p < 0.05$)의 증가를 나타내었다. 그리고 이 중 유의성이 있는 활성증가를 나타낸 시기는 총담관결찰 후 2일부터 42일까지 였다. 담즙울체간의 microsomal β -D-glucuronidase활성도는 총담관결찰 후 12시간에는 가수술군에 비해 약 21%의 활성증가를 나타내었으며 이 후 1일에는 약 76%, 2일에는 약 165% ($p < 0.01$), 3일에는 약 212% ($p < 0.01$),

7일에는 약 298% ($p < 0.001$), 14일에는 약 325% ($p < 0.001$), 28일에는 약 322% ($p < 0.001$), 42일에는 약 326% ($p < 0.01$)의 활성증가를 나타내었다. 그리고 이것도 역시 유의성이 있는 활성증가를 나타낸 시기는 총담관결찰 후 2일부터 42일까지 였다(도 4).

흰쥐의 총담관을 결찰한 후 혈청의 β -D-glucuronidase활성도는 담즙울체의 시간이 경과하면 증가 되었다. 즉 혈청의 β -D-glucuronidase활성도는 총담관결찰 후 1일에는 약 16%의 증가를 나타내었으며 이 후 2일에는 약 14%, 3일에는 약 28%, 7일에는 약 49%, 14일에는 약 188% ($p < 0.001$), 28일에는 약 131% ($p < 0.01$), 42일에는 약 114% ($p < 0.01$)의 증가를 나타내었다. 그리고 이 중 유의성이 있는 활성증가를 나타낸 시기는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 였다(도 5).

고 찰

간의 배설 기능에 장애가 오면 담즙색소, 담즙산, cholesterol 및 phospholipid들이 혈중에 증가(Schiff와 Billing, 1967; 광춘식과 장억규, 1979, 1985; 광춘식, 1980a; Sherlock, 1985b)되며 이때 담즙울체간과 혈청에서는 5'-nucleotidase (광춘식과 장억규

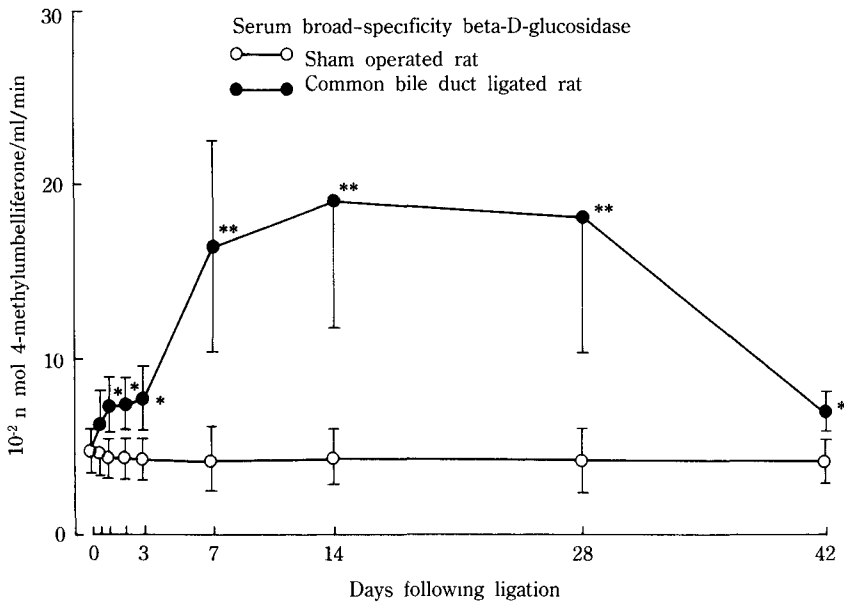


Fig 3. Serum broad specificity beta-D-glucosidase activities after common bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicate mean \pm SD with 5 rats in each group. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

1985; 광춘식 등, 1987), γ -glutamyl transpeptidase (광춘식과 장억규, 1985; 광춘식 등, 1987), leucine aminopeptidase(광춘식, 1980b; 정상호와 광춘식, 1987) 및 alkaline phosphatase(Kaplan과 Righetti, 1970; Righetti와 Kaplan, 1971; Toda 등, 1980; 광춘식 등, 1987)와 같은 간 세포의 막결합 효소들은

그 활성이 증가되며 간 세포질에 존재하는 alanine aminotransferase(김여희 등, 1989), aspartate aminotranferase(김여희 등, 1990), lactate dehydrogenase(광춘식과 이상일, 1985), malate dehydrogenase(광춘식과 이상일, 1985) 및 alcohol dehydrogenase(광춘식 등, 1988) 등은 담즙울체간에서 그

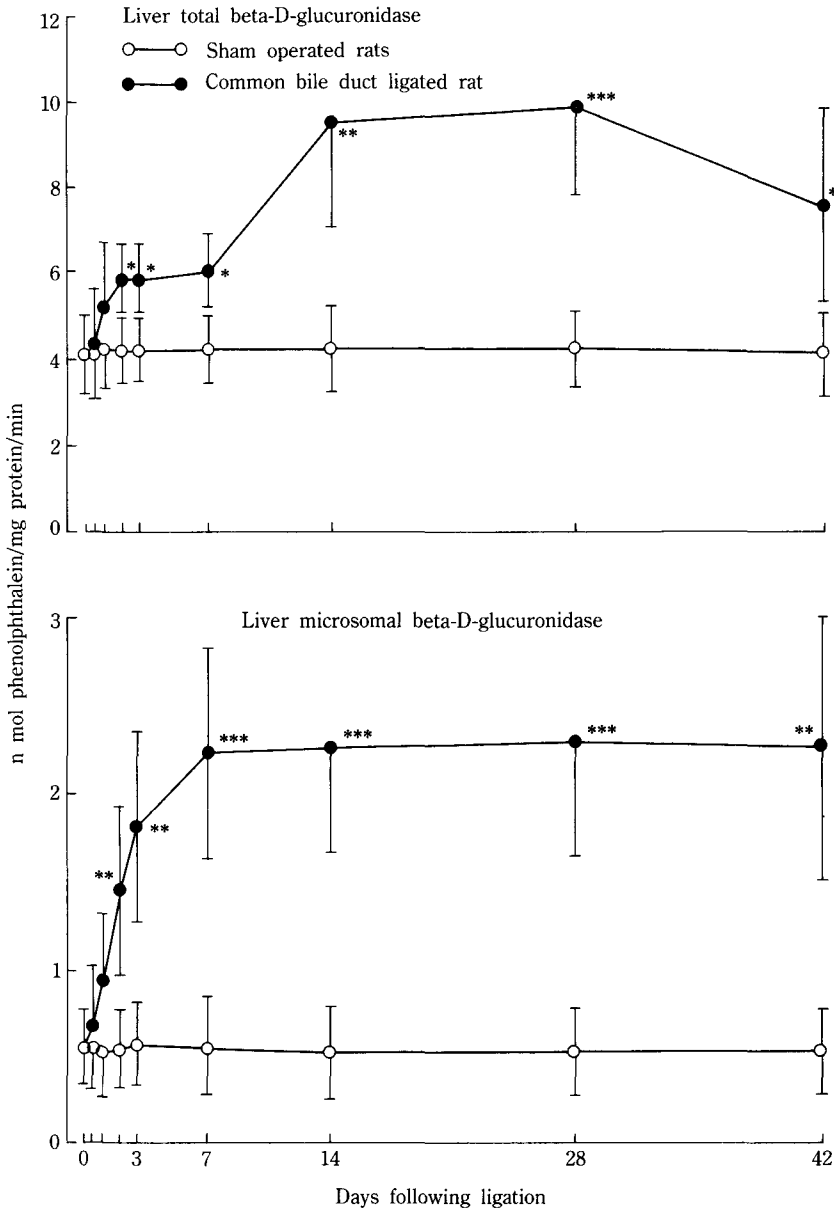


Fig 4. Liver total and microsomal beta-D-glucuronidase activities after common bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SD with 5 rats in each group.

*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001

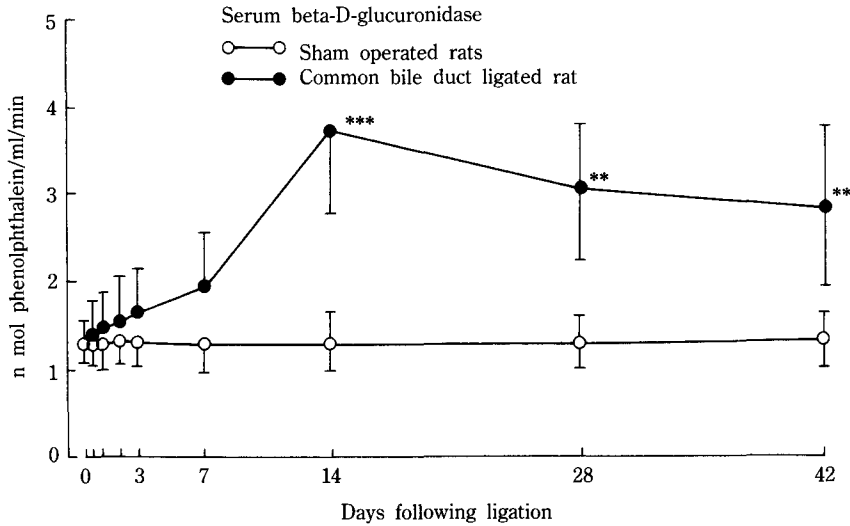


Fig 5. Serum beta-D-glucuronidase activities after common bile duct ligation in rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SD with 5 rats in each group. **; P<0.01, ***; P<0.001

활성이 감소된다고 한다. 그리고 해독 효소의 일종인 glutathione S-transferase는 담즙울체간의 세포질과 mitochondria에서는 그 활성이 감소되고 microsome에서는 그 활성이 증가(권용철 등, 1990)되며 glutathion peroxidase(권용철 등, 1990), monoamine oxidase(문고철과 곽춘식, 1989) 및 catalase(곽춘식 등, 1988)는 담즙울체간에서 그 활성이 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한 담즙울체간에서 세포질에 주로 존재하는 xanthine oxidase(곽춘식, 1985)와 glutathion reductase(권용철 등, 1990)는 그 활성이 증가되며 아울러 microsomal ethanol oxidizing system(곽춘식 등, 1988)과 aldehyde dehydrogenase(곽춘식 등, 1988)의 활성도도 담즙울체간에서 그 활성이 증가된다고 한다. 특히 이들 효소 중 5'-nucleotidase, 7-glutamyl transpeptidase, leucine aminopeptidase 및 alkaline phosphatase의 담즙울체간에서의 활성증가는 주로 담즙울체간에서 그 합성이 증가되어 나타난 결과(Kaplan과 Righetti, 1970; Righetti와 Kaplan, 1971; 곽춘식, 1980b; 곽춘식과 장억규, 1985; 곽춘식 등, 1987)라 하며 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase 및 alcohol dehydrogenase의 활성감소는 주로 담즙울체간에서 투과성 항진으로 이들 효소가 혈중으로 다량 누출되어 나타난 결과(Lind, 1958; 곽춘식과 이상일,

1985; 곽춘식 등, 1988; 김여희 등, 1989; 김여희 등, 1990)라 한다. 이와같이 간 세포에 존재한 효소들은 담즙울체가 있을 때 간조직과 혈청에서 그 활성이 변동된다. 따라서 이 실험에서 측정된 각종 glycosidase들도 간세포에 주로 존재하는 만큼 간 조직에 담즙울체가 있을 때는 그 활성에 변동이 있을 것이다.

현재까지 간담도 질환에서 관찰한 glycosidase들은 α -D-mannosidase와 β -D-glucuronidase로서 간경변 증시에 간 조직에서는 lysosomal α -D-mannosidase의 활성이 증가되고(Robinson 등, 1982) 혈청에서는 lysosomal α -D-mannosidase와 Golgi α -D-mannosidase가 그 활성이 증가된다(Faber 등, 1984)는 보고가 있다. 그리고 β -D-glucuronidase는 원발성 간암과 간경변증시 혈청에서 그 활성이 증가(Garay 등, 1972)되며 쥐와 사람의 담즙울체간에서도 그 활성이 증가된다(Aronsen 등, 1972; Nagasue 등, 1982)는 보고가 있다.

이 실험에서 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 경시적으로 담즙울체간과 혈청의 α -D-glucosidase, β -D-glucosidase 및 β -D-Glucuronidase활성도를 측정했을 때 담즙울체간의 lysosomal α -D-glucosidase는 총담관결찰 후 7일부터 42일까지, lysosomal acid β -D-glucosidase는 총담관결찰 후 28일부터 42일까지, 총 및 microsomal β -D-glucosidase는 총담관

결찰 후 2일부터 42일까지 현저한 활성증가를 나타내었다. 그리고 이때 혈청에서 α -D-glucosidase는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지, broad-specificity β -D-glucosidase는 총담관결찰 후 1일부터 42일까지 그리고 β -D-glucuronidase는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 현저한 활성증가를 나타내었다.

이상 성적에서 담즙울체간과 혈청의 이들 glycosidase활성증가는 위 문헌상의 지견으로 보아 담즙울체간에서 그 합성이 증가되고 아울러 담즙울체간의 투과성 향진이 원인이 되어 이들 효소가 혈중으로 다량 누출되어 나타난 결과가 아닌가 생각된다.

광춘식 등(1987)은 흰쥐에서 총담관을 결찰한 후 경시적으로 담즙울체간의 microsomal 5'-nucleotidase, microsomal γ -glutamyltranspeptidase, microsomal alkaline phosphatase의 활성도를 측정했을 때 담즙울체간의 microsomal 5'-nucleotidase는 총담관결찰 후 3일부터, 간의 microsomal γ -glutamyltranspeptidase와 alkaline phosphatase는 총담관결찰 후 1일부터 현저한 활성증가를 나타내었다고 하였으며 정상호 및 광춘식(1987)은 흰쥐의 총담관을 결찰했을 때 담즙울체간의 microsomal particle bound aminopetidase가 총담관결찰 후 7일부터 현저한 활성증가를 나타낸다고 하였다. 그리고 권용철 등(1990)도 담즙울체간에서 microsomal glutathione S-transferase활성도를 측정했을 때 총담관결찰 후 7일부터 현저한 활성증가를 나타내었다고 하였으며 또한 광춘식 등(1988)도 담즙울체간에서 microsomal ethanol oxidizing system의 활성도를 측정하였을 때 총담관결찰 후 2일부터 현저한 증가를 나타내었다고 한다. 광춘식 등(1987)과 광춘식 등(1988), 정상호 및 광춘식 등(1987) 그리고 권용철 등(1990)은 담즙울체간에서 microsome효소들의 활성증가는 이들 효소의 합성 증가가 그 원인인 것 같다고 하였으며 담즙울체로 인한 담즙산의 체내 증가가 이들 효소의 합성을 유도한 것이라 추론하고 있다. 따라서 이 실험에서 측정된 microsomal β -D-glucuronidase도 이들 효소와 마찬가지로 endoplasmic reticulum에 존재하는 효소이므로 담즙울체간에서 그 합성이 증가된 것이라 생각된다.

흰쥐의 담즙울체간에서 조직 소견을 관찰한 Moritz 및 Sondgrass(1972), 장대성 등(1987) 및 김효석 등(1989)의 보고를 보면 흰쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과했을 때는 많은 간 세포들이 괴

사현상을 나타내었으며 동시에 담도 세포도 증식되기 시작하였다고 하였다. 그리고 1일 후에는 간의 전부위에 괴사 현상이 확산되고 괴사 부위에는 염증세포의 침윤이 보였다고 하였으며 이 후 2주경에는 괴사현상이 약간 감소되는 반면에 담도세포의 증식이 증가되고 섬유화가 시작되었다고 하였다. 그리고 이 후 6주부터는 초기의 경화성 변화가 나타났다 하겠다.

일반적으로 동물체의 조직이 손상을 받을 때는 세포 내 소기관인 lysosome이 관여하게 되며 이 lysosome내에는 40여종의 산성 가수분해 효소가 함유되어 있다(de Duve, 1963; Weissman, 1965; Allison, 1967; de Duve, 1970)고 한다. 이 lysosome효소들은 손상받은 조직의 세포 내 소기관의 파괴된 부분을 소화하고 아울러 세포 사후 자가 용해과정을 촉매하는 것(de Duve 등, 1955; de Duve, 1963; Comolli, 1967; de Duve, 1970)으로 알려져 있다. 이와같은 lysosome효소들 중 간의 lysosome에 비교적 풍부히 존재하는 효소가 바로 이 실험에서 관찰한 glycosidase들이다(Jeffrey 등, 1970; Dingle, 1973; Labadie와 Aronson, 1973; Smith와 Ganschow, 1978; Dissous 등, 1981; Daniels와 Glew, 1984; Fabbro 등, 1984).

이상 담즙울체간의 형태학적 변화와 lysosome효소의 기능을 볼 때 이 실험에서 관찰한 담즙울체간의 lysosomal α -D-glucosidase, lysosomal acid β -D-glucosidase 및 총 β -D-glucuronidase의 활성도 증가는 광범위한 간 세포의 괴사가 원인이 되어 이들 효소의 합성이 증가됨으로서 나타난 결과라 생각되며 또한 간에서 alkaline phosphatase의 합성을 담즙산들이 자극한다는 보고(Ogawa 등, 1990)가 있고 보면 담즙울체로 인한 담즙산의 체내 증가가 이들 효소의 합성을 유도하는 하나의 요인이 되지 않을까 생각된다. 아울러 혈청에서 α -D-glucosidase, broad-specificity β -D-glucosidase 및 β -D-glucuronidase의 활성증가는 담즙울체간에서 이들 효소의 합성 증가와 더불어 담즙울체간의 세포막이 투과성 향진으로 다량 누출되어 나타난 결과라 생각된다. 그러나 담즙울체간과 혈청에서 이들 효소의 활성증가 시기가 서로 상이한 점은 이 실험만으로는 분명하게 설명하기는 어렵다. 따라서 이 문제는 앞으로 계속 추구해 보아야 하겠다.

요 약

담즙울체간에서 α-D-glucosidase, β-D-glucosidase 및 β-D-glucuronidase의 활성변동을 알아보기 위하여 시행한 실험으로서 흰쥐의 총담관을 결찰하고 12시간부터 42일까지의 담즙울체간에서 lysosome의 α-D-glucosidase와 β-D-glucosidase 및 총 β-D-glucuronidase와 microsome의 β-D-glucuronidase활성도를 각각 측정하는 한편 혈청에서 α-D-glucosidase, broad-specificity β-D-glucosidase와 β-D-glucuronidase활성도도 함께 측정하였다.

흰쥐 담즙울체간의 lysosomal α-D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 7일부터 42일까지 현저한 활성증가를 나타내었다. 그리고 혈청의 α-D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 현저한 증가를 나타내었다.

흰쥐 담즙울체간의 lysosomal acid β-D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 28일부터 42일까지 현저한 활성증가를 나타내었으나 cytosolic broad-specificity β-D-glucosidase활성도는 총담관결찰 후 1일부터 42일까지 현저한 증가를 나타내었다.

흰쥐 담즙울체간의 총 β-D-glucuronidase와 microsomal β-D-glucuronidase는 총담관결찰 후 2일부터 42일까지 현저한 활성증가를 나타내었으며 혈청의 β-D-glucuronidase활성도는 총담관결찰 후 14일부터 42일까지 현저한 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 흰쥐 담즙울체간에서 α-D-glucosidase, β-D-glucosidase 및 β-D-glucuronidase는 그 합성이 증가되는 효소라 생각된다. 그리고 담즙울체시 혈청에서 이들 효소의 활성증가는 담즙울체간에서 이들 효소의 누출이 증가되어 나타난 결과라 생각된다.

참 고 문 헌

Allison A: Lysosomes and disease. *Sci Am* 1967; 217: 62-72.

Aronsen KF, Hägerstrand, Norden JG: Enzyme studies in man with extra-hepatic biliary obstruction. *Acta Path Microbiol Scand* 1972; 80: 501-508.

Ben Yosef Y, Nadler HL: Pitfalls in the use of artificial substrates for the diagnosis of Gaucher's disease. *J Clin Pathol* 1978; 31: 1091-1093.

Bruni CB, Auricchio F, Covelli I: Acid α-D-glucosidase glucohydrolase from cattle liver. Isolation and properties. *J Biol Chem* 1969; 244: 4735-4742.

장대성, 광정식, 손태중 : 총담관결찰에 의한 담관 증식성 변화의 초미형태학적 연구. *경북의대잡지* 1987; 28: 113-122.

정상호, 광춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Leucine Aminopeptidase의 활성치. *계명의대논문집* 1987; 6: 210-221.

Comolli R: Cytotoxicity of silica and liberation of lysosomal enzymes. *J Pathol Bact* 1967; 93: 241-253.

Dahlgvist A: α-Glucosidases(disaccharidases), in Bergmeyer HU, Bergmeyer J. Graβ1 M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1984, Vol IV, pp 208-217.

Daniels LB, Coyle P, Chiano YB, et al: Purification and characterization of cytosolic broad specificity β-glucosidase from human liver. *J Biol Chem* 1981; 256: 13004-13013.

Daniels LB, Glew RH: β-D-Glucosidases in tissue, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graβ1 M(eds): *Method of Enzymatic Analysis* ed 3. Weinheim, Verlag Chemic GmbH, 1984, Vol IV, pp 217-226.

de Duve C: The lysosome. *Sci Am* 1963; 208: 64-72.

de Duve C: The role of lysosomes in cellular pathology. *Tringgle* 1970; 9: 200-208.

de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, et al: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 1955; 60: 604-617.

Desmet VJ: Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis, in MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ(eds) : *Pathology of the Liver*. Edinburgh, London and New York, Churchill Livingstone, 1979, pp 272-305.

Dingle JT: The extracellular secretion of lysosomal enzymes, in Dingle JT, Fell HB(eds): *Lysosomes in Biology and Pathology*. Amsterdam, North Holland, 1973, pp 421-436.

Dissous C, Ansart JF, Cheron A, et al: Purification of rat liver lysosomal α-glucosidase. *Anal Biochem* 1981; 116: 35-39.

Fabbro D, Desnick RJ, Gatt S: Lysosomal β-glucosidase of rat liver. *Enzyme* 1984; 31: 122-127.

Faber CN, Glew RH, Stanko RT: Serum α-D-mannosidase in patients with alcoholic liver disease. *Enzyme* 1984; 31: 1-10.

Fishamn WH, Kato K, Anstiss CL, et al: Human

- serum beta-glucuronidase; its measurement and some of its properties. *Clin Chim Acta* 1967; 15: 435-447.
- Garay EAR, Spetale MDR, Morisoli LS: Relationship between bilirubin and β -glucuronidase activity in rats with experimental obstructive jaundice. *Clin Chim Acta* 1972; 37: 171-177.
- 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 Colowick SP, Kaplan ND(eds): *Method in Enzymology*. New York, Academic Press, 1957, Vol 4. pp 708-731.
- Halsted JA: *The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application*. London, Sanders Co, 1976, pp 426-429.
- Jeffrey PL, Brown DH, Brown BI: Studies of lysosomal α -glucosidase. I. Purification and properties of the rat liver enzymes. *Biochemistry* 1970; 9: 1401-1415.
- Kaplan MM, Righetti A: Induction of rat liver alkaline phosphatase: The mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. *J Clin Invest* 1970; 49: 508-516.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic Press, 1979a, pp 278-279.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic Press, 1979b, pp 280-281.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 광규식, 최용한, 정준모 : 총담관결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. 대한내과학회지 1989; 36: 459-470.
- 김여희, 광춘식, 정성광 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Alanine Aminotransferase활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1989; 8: 113-121.
- 김여희, 광춘식, 정성광 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Amino transferase활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1990; 9: 87-95.
- Kurtin WE, Schwesinger WH: Assay of β -glucuronidase in bile following ion pair extraction of pigment and bile acids. *Anal Biochem* 1985; 147: 511-516.
- 광춘식 : Actinomycin D의 투여가 총담관을 결찰한 흰쥐의 혈청지질 분획의 농도에 미치는 영향. 경북의대잡지 1980; 21: 495-499.
- 광춘식 : 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980; 21: 126-134.
- 광춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Xanthine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집. 1985; 4: 125-130.
- 광춘식, 장억규 : 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 Ceruloplasmin에 대한 Actinomycin D의 효과. 한국생화학회지 1979; 12: 103-112.
- 광춘식, 장억규 : 흰쥐 담즙울체 간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4: 1-27.
- 광춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙울체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1987; 6: 67-76.
- 광춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙울체간에서의 알콜대사 효소들의 활성치. 계명의대논문집 1988; 7: 64-75.
- 광춘식, 광정식 : 흰쥐 간세포분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- 광춘식, 이상일 : 흰쥐 담즙울체간의 Malate Dehydrogenase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4: 131-137.
- 권용철, 문교철, 광춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase 및 Glutathione Peroxidase의 활성화도. 계명의대논문집 1990; 9: 159-170.
- Labadie JH, Aronson NN: Lysosomal β -D-mannosidase of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1973; 321: 603-614.
- Lind S: A comparison between the patterns(GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extracts in cardiac hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958; 10: 303-310.
- Moritz M, Snodgrass PJ: Serum enzymes derived from liver cell fraction. II. Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology* 1972; 62: 93-100.
- 문교철, 광춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집 1989; 8: 69-77.
- Musa BU, Doe RP, Seal US: Purification and properties of human β -glucuronidase. *J Biol Chem* 1965; 240: 2811-2816.
- Nagasue N, Inokuchi K, Kanashima R: Serum activities of lysosomal enzymes in patients with liver cell carcinoma. *Dig Dis Sci* 1982; 27: 454-458.
- Ogawa H, Mink J, Hardison WGM, et al: Alkaline phosphatase activity in hepatic tissue and serum correlates with amount and type of bile acid load.

- Lab Invest* 1990; 62: 87-95.
- Powell PP, Kyle JW, Miller RD, et al: Rat liver β -glucuronidase cDNA cloning, sequence comparisons and expression of a chimeric protein in COS cell. *Biochem J* 1988; 250: 547-555.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 491-495.
- Robinson DB, Diven WF, Glew RH: Altered α -mannosidase isozymes in liver in hepatic cirrhosis. *Enzyme* 1982; 277: 99-107.
- Scheffler WC: *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2, USA Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1980, pp 84-89.
- Schiff L, Billing BH: Jaundice, in Schiff L(ed): *Diseases of the Liver* ed 2. Philadelphia, Montreal, Lippincott Co, 1967, pp 197-241.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1985a, pp 79-80.
- Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1985b, pp 214-250.
- Smith K, Ganschow RE: Turnover of murine β -glucuronidase. Comparison among liver, kidney, and spleen and between lysosomes and microsomes. *J Biol Chem* 1978; 253: 5437-5442.
- Stahl PD, Fishman WH: β -D-Glucuronidase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Gra β l M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chime GmbH, 1984, Vol. IV, pp 246-256.
- Takagaki K, Nakamura T, Majima M, et al: Isolation and characterization of a chondroitin sulfate-degrading endo- β -glucuronidase from rabbit liver. *J Biol Chem* 1988; 263: 7000-7006.
- Toda G, Ikeda Y, Kako M, et al: Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta* 1980; 107: 85-96.
- Tsuji A, Suzuki Y: Biosynthesis of two components of human acid α -glucosidase. *Arch Biochem Biophys* 1987; 259: 234-240.
- Weissman G: Lysosome II. *N Engl J Med* 1965; 273: 1143-1149.

= Abstract =

α -D-Glucosidase, β -D-Glucosidase and β -D-Glucuronidase Activities in Cholestatic Rat Liver Induced by Common Bile Duct Ligation

Eun Mee Park, MD; Chun Sik Kwak, PhD

*Department of Biochemistry, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

A study was made on the changes of α -D-glucosidase, β -D-glucosidase and β -D-glucuronidase activities in cholestatic rat liver.

The lysosomal α -D- and β -D-glucosidase, cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase, and total β -D-glucuronidase and microsomal β -D-glucuronidase activities were determined in the cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation over a period of forty two days. The activities of α -D-glucosidase, broad-specificity β -D-glucosidase, and β -D-glucuronidase in the serum were measured together with the above determination of hepatic glycosidases.

The activity of lysosomal α -D-glucosidase in the cholestatic rat liver increased strikingly between the seventh and the fourth-second days after ligation, and that of the serum strikingly increased between the fourteenth and fourth-second days after ligation.

The lysosomal acid β -D-glucosidase activity in the cholestatic rat liver markedly increased between the twenty-eighth and the fourth-second days after ligation. But the cytosolic broad-specificity β -D-glucosidase in the cholestatic liver showed a slight increase between the seventh and the forty-second day after ligation, and that of the serum strikingly increased between the first and the forty-second days after ligation.

The total β -D-glucuronidase and the microsomal β -D-glucuronidase activities in the cholestatic liver increased considerably between the second and the forty-second days after ligation and β -D-glucuronidase activity of serum showed a marked increase between the fourteenth and the fourth-second days after ligation.

According to the above results, α -D-glucosidase, β -D-glucosidase, β -D-glucuronidase in the liver with cholestasis seem to be increasing activities of enzymes with a seemingly cause of the development of synthesis. Especially, when the cholestasis occurred, the activities of these enzymes of serum are higher than those of the control because of increased permeability secondary to liver cell membrane damage, which causes the enzymes to leak into the blood in great quantity.

Key Words: Cholestatic liver, α -D-Glucosidase, β -D-Glucosidase, β -D-Glucuronidase