

주정 중독 흰쥐에서 총담관 결찰이 간의 Mitochondria 및 Microsome의 총 Monoamine oxidase와 혈청의 Benzylamine oxidase활성에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 생화학교실 및
경북대학교 의과대학 비뇨기과학교실**

김여희 · 안광욱 · 곽춘식 · 정성광**

서 론

주류의 소비량이 늘어남에 따라 음주로 인해 야기되는 질병들이 관심의 대상이 되고 있으며 특히 주정 대사의 주된 장기인 간에 미치는 주정의 영향은 더욱 주목을 받고 있다.

간은 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 해독하여 배설시키는 해독기구를 가짐으로써 생체를 보호하고 있다(Jakoby 등, 1982). 그러나 이러한 기능을 가진 간이라 하더라도 장기간 다량의 음주를 하면 간은 지방간, 간염, 간경변증 등의 병변이 야기될 수 있으며(Christoflersen과 Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985) 특히 주정 중독시에 간 세포에는 심한 형태학적 및 생화학적 변화가 야기된다(Christoflersen과 Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)고 한다.

일반적으로 간담도 질환시 음주는 해롭다고 하며 이 사실은 음주로 인한 간 질환의 유발로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 따라서 간 질환시 음주를 하거나 주정 중독이 야기된다면 간 조직에서 해독 효소들의 활성 변동은 심할 것으로 생각된다.

Monoamine oxidase(Amine: oxygen oxidoreductase(flavin containing, deaminating), EC 1.4.3.4, MAO)는 간에서 많은 양이 합성(Greenawalt와 Schnaitman, 1970; Houslay와 Tipton, 1974; Ekstedt, 1976; Corte와 Tipton, 1980)되는 해독 효소의 일종(Tipton, 1980)으로 monoamine, 분자산소 및 물로부터 aldehyde, ammonia 및 과산화수소를 생성하는 효소(Kim, 1979)이며 생체에서는 주로 신경

전달 물질인 생체 amine들을 분해하여 생체 amine들의 체내농도를 조절하는 역할을 담당하는 효소이다(Bardesley, 1974). 이 효소는 세포내에서는 주로 mitochondria에 존재하나 endoplasmic reticulum에도 분포되어 있는 것(Greenawalt와 Schnaitman, 1970)으로 알려져 있다. 이 효소는 기질특이성과 억제제에 대한 감수성에 따라 MAO A와 B로 구분하며 tyramine을 기질로 사용하여 MAO활성도를 측정했을 때는 총 MAO활성도를 얻을 수 있다고 한다(Corte와 Tipton, 1980). 또한 이 효소는 간경변증(McEwen과 Castell, 1967; Ito 등, 1971; Kirchner와 Castell, 1972; Ono 등, 1975; Grossner와 Roebrock, 1983), 간암(McEwen과 Castell, 1967; Costa와 Brakefield, 1979) 및 만성간염(McEwen과 Castell, 1967)시 혈중에서 그 활성이 증가되고 특히 간의 섬유화가 진행될 때 혈중에서 그 활성도가 증가된다(Kirchner와 Castell, 1972)고 한다. 그리고 흰쥐에서는 담즙울체가 야기되었을 때 간 조직에서 그 활성도가 감소하는 것(문교철과 곽춘식, 1989)으로 알려져 있다.

이와같이 해독효소인 MAO는 간담도 질환시 혈청에서 그 활성도가 증가되고 흰쥐의 담즙울체간에서는 그 활성도가 감소되는 점으로 보아 담즙울체시 주정 중독을 야기시키면 간손상이 항진되어 간에서 이 효소의 활성도 변동은 더욱 심해질 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 연구는 많지 않으며 단지 간조직에서 MAO isozyme이 담즙울체와 주정 중독이 병행되었을 때는 그 활성도가 담즙울체만 시켰을 때 보다 증가된다는 보고(정성광과 곽춘식, 1992)만 있을 뿐이다.

* 이 논문은 1993년도 계명대학교 음주연구비 및 동산의료원 조사 연구비로 이루어졌음.

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행하였으며 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 담즙을체를 야기시키거나 담즙을체가 진행되는 흰쥐에게 급성 주정중독을 시킨 후 간의 mitochondria와 microsome분획에서 총 MAO 활성도를 측정하고 아울러 혈청에서 MAO의 일종인(McEwen과 Cohen, 1963) benzylamine oxidase 활성도를 측정하여 그 성적을 보고코자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치 : 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320g 되는 Sprague-Dawley종의 수컷흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 나누었다(도 1). 즉 정상군(1군), 총담관결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 총담관결찰군(총 5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 가수술군(총 5군), Eagon 등(1987)의 방법에 따라 5%(v/v) ethanol을 60일간 섭취 시킨 만성 주정 중독군(1군), 5%(v/v) ethanol을 60일간 섭취시킨 후 계속 5% ethanol을 섭취시키면서 총담관결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군(총 5군), 5%(v/v) ethanol을 60일간 섭취

시킨 후 계속 5%(v/v) ethanol을 섭취시키면서 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 죽인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군(총 5군), Liu 등(1975)의 방법에 따라 체중 kg당 4g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 급성 주정 중독 군(총 2군), 총담관결찰 14일 후 체중 kg당 4g의 ethanol을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 죽인 총담관결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군(총 2군)등이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 진양사료 주식회사의 실험 동물사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 만성 주정 중독 및 총담관결찰을 한 군에서는 물대신 5%(v/v) ethanol용액(Eagon 등, 1987)을 자유로이 먹게 하였다. 그리고 급성 주정 중독은 흰쥐 체중 kg당 4g의 ethanol이 투여되도록 25%(v/v) ethanol용액을 조제(Liu 등, 1975)하여 1회 경구투여하였다.

총담관결찰술, 가수술 및 간적출술을 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 일정한 시간에 시행하였으며 쥐를 약 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 실시하였다.

총담관결찰은 간의 근위부와 약 1cm 아래쪽의

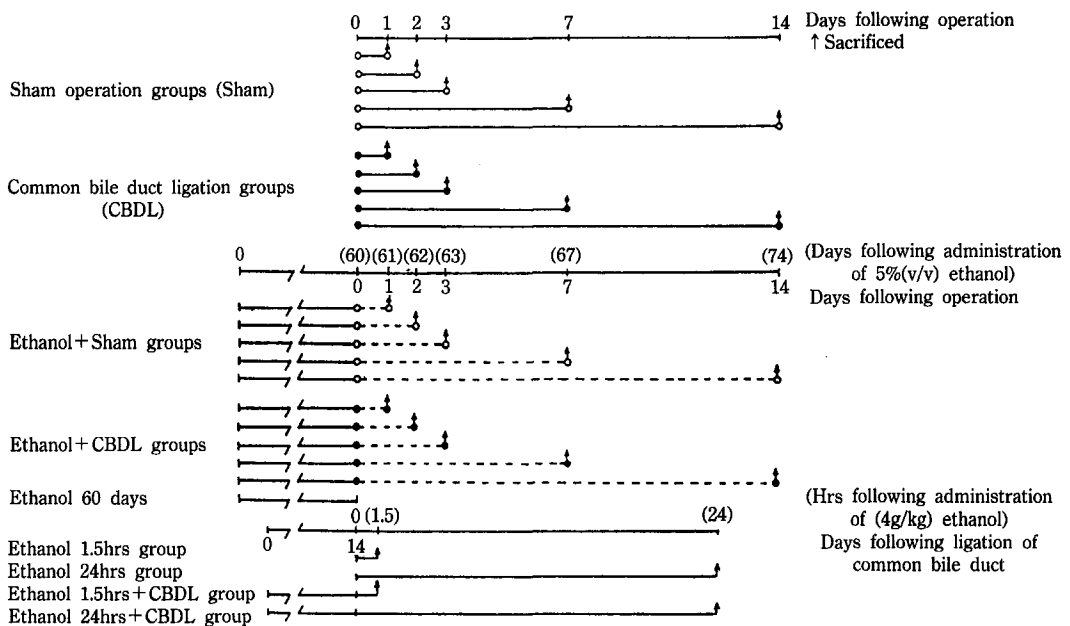


Fig. 1. Experimental design.

원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사 시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소활성도를 측정하였다.

시약 : Tyramine hydrochloride, benzylamine hydrochloride, monoamine oxidase(from bovine plasma, M 4636) 및 단백질준액(10g/100ml bovine albumin)은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그의 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간의 세포분획 : 간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣은 다음 teflon glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005-0.007 inches)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직의 마쇄 균질액을 만들었다. 이 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 mitochondria와 microsome을 분리하였다. 즉 간 조직의 마쇄 균질액을 571×g(average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 세포막부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 상청액을 다시 104,000×g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이 과정에서 얻어진 pellet을 0.25M sucrose액에 재현탁 시키고 이 액을 10~35 w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500×g에서 15분간 원심분리하여 원심관 중앙부와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500×g에서 다시 1시간 원심분리하여 pellet을 얻은 후 이것을 다시 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 88,500×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다. 한편 위의 7,796×g에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M

sucrose액에 현탁시키고 이 액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,200×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria분획으로 사용하였다.

위의 세포분획 과정에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이 때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sroval사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 그리고 이 때에 사용한 roter는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 roter였으며 sucrose linear density gradient 용액은 gradient former(ISCO model 570)을 사용하여 제조하였다.

효소활성도 측정 : 분리한 microsome 및 mitochondria는 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 2~4°C를 유지하면서 20±0.4k cycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄를 한 다음 단백질량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액에 현탁시켜 효소 시료로 사용하였다.

간의 mitochondria와 microsome의 총 MAO활성도 측정은 tyramine을 기질로 사용하여 효소액과 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성된 ammonia의 양을 측정하는 Nagatsu 및 Yagi(1966)법에 준하였으며 단위는 1분간에 1mg의 단백질이 생성한 ammonia의 양을 nmol로 나타내었다.

혈청 benzylamine oxidase활성도 측정은 benzylamine을 기질로 사용하여 37°C에서 3시간 반응시키는 동안에 생성한 benzaldehyde를 비색하는 McEwen 및 Cohen(1963)의 방법에 준하였으며 단위는 혈청 1ml가 1시간 반응하여 변화된 absorbance값을 100배 곱하여 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제된 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대해 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 사용한 분광광도계는 Varian Cary 210 computer controlled enzyme spectrophotometer였다.

단백 질량 : 효소시료 중의 단백질량은 0.5M perchloric acid와 methanol-ether혼합액(3 : 1)으로 단백을 정제(Greenberg와 Rothstein, 1957)한 다음 biuret법(Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

실적 검정 : 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

성 적

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 간의 mitochondrial 총 MAO활성도에 미치는 영향 : 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 계속 5%(v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때 간의 mitochondrial 총 MAO활성도의 변동은 표 1과 같다. 즉 tyramine을 기질로 한 쥐간의 mitochondrial 총 MAO활성도는 만성 주정 중독군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서 다같이 현저한 증가를 나타내었다. 흰쥐에게 5%(v/v) ethanol을 60일간 투여함으로써 주정 비투여군(정상군)에 비해 이효소는 약 48%(P<0.01)의 활성도 증가를 나타내었으며 만성 주정 중독 후 가수술을 하여도 가수술만 한 군에 비해 수술 후 1일에는 약 47%(P<0.01), 2일에는 약 45%(P<0.01), 3일에는 약 48%(P<0.01), 7일에는 약 49%(P<0.01), 14일에는 약 54%(P<0.01)의 활성도 증가를 나타내었다.

한편 정상쥐나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰함으로써 간의 mitochondrial 총 MAO활성도는 수술 후 3일부터 현저한 감소를 나타내었다. 즉 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 이 효소의 활성도가 수술 후 3일에는 약 32%(P<0.01), 7일에는 약 34%(P<0.01), 14일에는 약 59%(P<0.01)의 감소를 나타내었다. 그리고 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 총담관 결찰군에 비하여 이 효소의 활성도가 총담관결찰 후 1일에는 약 58%(P<0.001), 2일에는 약 74%(P<0.001), 3일에는 약 86%(P<0.001), 7일에는 약 83%(P<0.01), 14일에는 약 98%(P<0.001)의 증가를 나타내었다.

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 간의 mitochondrial 총 MAO활성도에 미치는 영향 : 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 mitochondrial 총 MAO활성도의 변동은 표 2와 같다. 쥐간의 mitochondrial 총 MAO의 활성도는 급성 주정 중독 후 1.5시간 및 24시간에 유의하는 증가를 나타내었다. 즉 쥐간의 mitochondrial 총 MAO는 급성 주정 중독 후 1.5시간 및 24시간에 주정 비투여군에 비해 각각 약 27%(P<0.05) 및 약 31%(P<0.05)의 활성도 증가를 나타내었다.

총담관결찰 후 14일에 급성 주정 중독에 시키고 1.5시간 및 24시간 후에 mitochondrial 총 MAO활

성도는 급성 주정 중독만 시킨 그 대조군에 비해 현저하게 감소되었다. 즉 총담관결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 후 1.5시간 및 24시간에는 담관결찰 없이 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 간의 mitochondrial 총 MAO는 각각 약 31%(P<0.01) 및 약 39%(P<0.01)의 활성도 감소를 나타내었다. 그러나 총담관결찰만 시킨 군에 비해서는 그 활성도가 높았다. 즉 쥐간의 mitochondrial 총 MAO는 총담관결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과했을 때는 총담관만 결찰한 군에 비해 각각 약 116%(P<0.001) 및 약 96%(P<0.01)의 활성도 증가를 나타내었다.

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 간의 microsomal 총 MAO활성도에 미치는 영향 : 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 계속 5%(v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때 간의 microsomal 총 MAO 활성도의 변동은 표 3과 같다. 쥐간의 microsomal 총 MAO활성도는 만성 주정 중독 군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서 모두 유의하는 증가를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독군은 정상군에 비해 약 36%(P<0.05)의 활성도 증가를 나타내었으며 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에서는 정상쥐에서 가수술을 한 군에 비해 수술 후 1일에는 약 31%, 2일에는 약 34%(P<0.05), 3일에는 약 37%(P<0.05), 7일에는 약 34%(P<0.05), 14일에는 약 38%(P<0.05)의 활성도 증가를 나타내었다. 그러나 만성 주정 중독을 시킨 쥐와 정상쥐에서 총담관 결찰을 했을 때 이 효소의 활성도는 모두 유의하는 변동이 없었다.

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 간의 microsomal 총 MAO활성도에 미치는 영향 : 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때는 간의 microsomal 총 MAO활성도의 변동은 표 4와 같다.

쥐간의 microsomal 총 MAO는 총담관 결찰 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 후 24시간 군에서 그 대조군인 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 그 활성도가 약 43%(P<0.05)감소되었다. 그러나 그의 다른 군에서는 이 효소의 활성도가 변동을 나타내지 않았다.

만성 주정 중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 benzylamine oxidase 활성도에 미치는 영향 : 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 계속 5%(v/v) ethanol을 먹이면서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 benzylam-

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial total monoamine oxidase activities using tyramine as substrate (Total-MAO) in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Total-MAO activities (nmol ammonia mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	Sham	(Normal; 2.81±0.42, CBDL	Ethanol; 4.16±0.48 ^k) Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	2.80±0.43	2.54±0.42	4.11±0.49 ^b	4.02±0.47 ⁱ
2	2.82±0.42	2.31±0.35	4.09±0.57 ^b	4.02±0.44 ⁱ
3	2.79±0.41	1.91±0.32 ^b	4.12±0.62 ^b	3.55±0.58 ⁱ
7	2.81±0.44	1.85±0.30 ^b	4.18±0.66 ^b	3.38±0.51 ⁱ
14	2.81±0.40	1.15±0.31 ^b	4.32±0.54 ^c	2.28±0.68 ^h

All values are expressed as mean ±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

b; P<0.01 VS. Sham, c; P<0.001 VS. Sham, f; P<0.001 VS. Ethanol+Sham, h; P<0.01 VS. CBDL., i; P<0.001 VS. CBDL, k; P<0.01 VS. Normal.

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver mitochondrial total monoamine oxidase activities using tyramine as substrate (Total-MAO) in acute ethanol intoxicated rats

Normal	CBDL 14days	Total-MAO activities (nmol ammonia mg Protein ⁻¹ min ⁻¹)			
		Ethanol 1.5hrs	Ethanol 1.5hrs + CBDL	Ethanol 24hrs	Ethanol 24hrs + CBDL
2.81	1.15	3.57	2.48	3.69	2.25
±0.42	±0.31	±0.51 ^j	±0.47 ^{n,u}	±0.49 ^l	±0.46 ^{q,t}

All values are expressed as mean ±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

j; P<0.05 VS. Normal, n; P<0.01 VS. Ethanol 1.5hrs, q; P<0.01 VS. Ethanol 24hrs, t; P<0.01 VS. CBDL 14days, u; P<0.001 VS. CBDL 14days.

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal total monoamine oxidase activities using tyramine as substrate (Total-MAO) in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Total-MAO activities (nmol ammonia mg protein ⁻¹ min ⁻¹)			
	Sham	(Normal; 1.18±0.21, CBDL	Ethanol; 1.60±0.34 ^d) Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	1.19±0.21	1.20±0.22	1.56±0.30	1.41±0.28
2	1.18±0.22	1.18±0.24	1.58±0.32 ^a	1.43±0.33
3	1.17±0.23	1.17±0.22	1.60±0.35 ^a	1.28±0.37
7	1.18±0.24	1.18±0.20	1.58±0.31 ^a	1.09±0.36 ^d
14	1.17±0.22	0.97±0.21	1.61±0.37 ^a	1.08±0.35 ^d

All values are expressed as mean ±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

a; P<0.05 VS. Sham, d; P<0.05 VS. Ethanol+Sham, j; P<0.05 VS. Normal.

Table 4. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal total monoamine oxidase activities using tyramine as substrate (Total-MAO) in acute ethanol intoxicated rats

Normal	CBDL 14days	Total-MAO activities (nmol ammonia mg Protein ⁻¹ min ⁻¹)			
		Ethanol 1.5hrs	Ethanol 1.5hrs + CBDL	Ethanol 24hrs	Ethanol 24hrs + CBDL
1.18	0.97	1.28	0.98	1.53	1.03
±0.21	±0.21	±0.27	±0.26	±0.33	±0.24 ^p

All values are expressed as mean ±SD with 5 rats in each group.

Animal groups are described in Fig. 1.

p; P<0.05 VS. Ethanol 24hrs.

Table 5. Effect of common bile duct ligation on serum benzylamine oxidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	Benzylamine oxidase activities ($\Delta A \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ hr}^{-1}$)			
	Sham	CBDL	Ethanol+Sham	Ethanol+CBDL
1	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
2	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
7	n. d.	7.4±3.1	n. d.	7.3±3.7
14	n. d.	18.6±4.8	n. d.	17.7±5.1

All values are expressed as mean \pm SD with 5 rats in each group.
Animal groups are described in Fig. 1.
n. d.; not detected.

Table 6. Effect of common bile duct ligation on serum benzylamine oxidase activities in acute ethanol intoxicated rats

Benzylamine oxidase activities ($\Delta A \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ hr}^{-1}$)					
Normal	CBDL 14days	Ethanol 1.5hrs	Ethanol 1.5hrs +CBDL	Ethanol 24hrs	Ethanol 24hrs +CBDL
n. d.	18.8±4.5	n. d.	19.0±4.6	n. d.	18.8±5.0

All values are expressed as mean \pm SD with 5 rats in each group.
Animal groups are described in Fig. 1.
n. d.; not detected.

ine oxidase 활성도의 변동은 표 5와 같다. 가수술 군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군은 실험 전 기간동안 혈청 benzylamine oxidase의 활성은 측정되지 않았다. 총담관 결찰군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 수술 후 3일까지 혈청의 benzylamine oxidase의 활성도는 측정되지 않았으나 7일 후부터 그 활성도가 측정되었다. 즉 총담관을 결찰한 군에서는 7일군에서 7.4±3.1 $\Delta A \times 100 \text{ ml}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ (이하 단위 생략함), 14일 군에서는 18.6±4.8이었고 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 7일 군에서 7.3±3.7, 14일군에서는 17.7±5.1로서 양군간에 그 활성도는 별 차이가 없었다.

총담관을 결찰한 흰쥐에서 급성 주정 중독이 혈청 benzylamine oxidase 활성도에 미치는 영향 : 흰쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 혈청 benzylamine oxidase 활성도의 변동은 표 6과 같다. 즉 쥐 혈청의 benzylamine oxidase 활성도는 급성 주정 중독 후 1.5시간이나 24시간에는 그 활성도가 측정되지 않았다. 그러나 총담관결찰 후 14일 경과한 군과 총담관결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시킨 군에서는 그 활성도가 측정되었다.

즉 총담관결찰 후 14일 경과한 군은 18.8±4.5, 총담관결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간

및 24시간 경과했을 때는 각각 19.0±4.6 및 18.8±5.0이었다. 그러나 총담관결찰군과 총담관결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군 간에 그 활성도는 별 차이가 없었다.

고 찰

장기간 다량의 음주를 했을 때는 지방간, 간염, 간경변증 등(Christoflersen과 Poulsen, 1979; Wooddell, 1980; Sherlock, 1985)의 간질환이 야기될 수 있으며 주정 중독시에는 간 세포가 심한 형태학적 변화를 받는다(Christoflersen과 Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)고 한다. 주정 중독으로 인한 형태학적 변화는 간세포의 mitochondria가 종창, 변형 및 cristae의 배열문란이 되고 smooth endoplasmic reticulum이 증식이 되며 이외에도 Mallory소체의 증식(Christoflersen과 Poulsen, 1979; Chang, 1985; Chang, 1987)과 간세포의 괴사(Christoflersen과 Poulsen, 1979)가 관찰된다. 그리고 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 lactate의 생산증가, pyruvate의 생성감소, 지방산의 합성촉진, 구연산회로의 활성저하 및 지방산의 산화감소 등(Ritchie, 1980; Ellenhorn과 Barceloux,

1988)을 들 수 있다.

간 조직에 담즙울체가 야기되는 경우들은 원발성담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담도폐쇄, 중앙이나 담석에 의한 담도폐쇄 등(Halsted, 1976)이며 이와 같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등(Desmet, 1979)이 나타날 뿐만 아니라 심한 간기능의 장애도 나타난다(Halsted, 1976; Sherlock, 1985).

흰쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체간은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며(Moritz와 Snodgrass, 1972; 장대성 등, 1987; 김효석 등, 1989) 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것(Kaplan과 Righetti, 1970; Righetti와 Kaplan, 1971; 박춘식, 1980; Toda 등, 1980; 박춘식과 장억규, 1985; 박춘식과 이상일, 1985; 박춘식 등, 1987; 정상호와 박춘식, 1987; 문교철과 박춘식, 1989)으로 알려져 있다.

흰쥐에서 총담관결찰로 간의 배설기능이 저하되면 담도계 효소인 alkaline phosphatase(Kaplan과 Righetti, 1970; Righetti와 Kaplan, 1971; Toda 등, 1980; 박춘식 등, 1987), 5'-nucleotidase(박춘식과 장억규, 1985; 박춘식 등, 1987), γ -glutamyl transpeptidase(박춘식과 장억규, 1985; 박춘식 등 1987) 및 leucine aminopeptidase(박춘식, 1980; 정상호와 박춘식, 1987)는 간세포에서 그 활성이 증가되며 세포막이 투과성 향진시 혈중으로 누출되는 alanine aminotransferase(박춘식과 장억규, 1985; 김여희 등 1989), aspartate aminotransferase(박춘식과 장억규, 1985; 김여희 등, 1990) 및 lactate dehydrogenase(박춘식과 이상일, 1985) 등은 간세포에서 그 활성이 감소된다고 한다. 또한 해독 효소인 MAO도 담즙울체간에서 그 활성이 감소되는 것(문교철과 박춘식, 1989)으로 알려져 있다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 ethanol이 acetaldehyde로 산화되고 다시 acetate로 산화되어 이용(Bosron과 Li, 1980; Lieber, 1985)되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 acetaldehyde는 간세포막의 손상과 간세포의 괴사를 초래하는 물질(Sherlock, 1985)로 알려져 있고 또한 주정 중독시 심한 형태학적 변화가 초래(Chang, 1985; Chang, 1987)되는 만큼 담즙울체와 주정 중독이 병행된다면 간 손상의 정도는 더욱

심해질 것이며 아울러 간조직에서 총 MAO의 활성도 변동도 심해질 것이다. 한편 MAO는 ethanol분해시 생성되는 acetaldehyde에 의해 방출되는(Ellis, 1966; Feldstein, 1971) 생체 amine을 산화시키는 효소이므로 담즙울체시 주정 중독을 야기시킨다면 총 MAO 활성도 변동은 담즙울체만 시켰을 때 보다 훨씬 심해질 것이다.

이 실험에서 흰쥐에게 만성 주정 중독을 시켰을 때 간 mitochondria의 총 MAO와 microsome의 총 MAO의 활성도는 현저히 증가하였으며 급성 주정 중독시에는 mitochondria의 총 MAO 활성도가 증가하였다. 이 성적은 주정 중독으로 MAO의 합성이 유도되는 것이라 생각된다.

이 실험에서 흰쥐에게 총담관 결찰로 담즙울체만 야기시켰을 때는 간 mitochondria의 총 MAO 활성도만 현저히 감소하였다. 이 성적은 문교철과 박춘식(1989)의 보고와도 일치하며 MAO는 담즙울체간에서는 그 합성이 저하되는 효소라 생각된다.

이 실험에서 흰쥐에게 만성 주정 중독 후 총담관 결찰로 담즙울체를 야기시켰을 때와 총담관결찰 후 급성 주정 중독을 시켰을 때 간 mitochondria의 총 MAO는 주정 중독만 시켰을 때보다는 그 활성도가 낮았으나 담즙울체만 시켰을 때 보다는 그 활성도가 높았다. 그리고 microsome의 총 MAO는 주정 중독만 시켰을 때는 활성도가 증가되었으나 그의 조건에서는 변동을 나타내지 않았다. 이 성적은 간의 MAO가 담즙울체시 주정 중독이 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다 그 활성이 증가된다는 것을 나타낸 결과로서 이는 ethanol과 acetaldehyde에 의해 생체 amine의 방출이 촉진된다는 설(Ellis, 1966; Feldstein, 1971)을 한층 더 뒷받침 하는 결과라 생각된다. 즉 ethanol과 acetaldehyde에 의해 생체 amine의 방출이 촉진되고 이를 분해하기 위해 MAO의 합성이 유도된 것이라 할 수 있다. 그러나 이 결과만으로는 담즙울체시 주정 섭취가 생체에 해를 주는 것인지 또는 해독기능을 상승시키는 것인지는 분명치 않다.

이 실험에서 MAO의 일종인 혈청의 benzylamine oxidase는 담즙울체를 시킨 모든 쥐에서 총담관결찰 후 7일부터 그 활성이 측정되었으나 상호간에 별 차이가 없었다. 혈청의 MAO와 간의 MAO는 서로 성상이 같지 않은 것으로 알려져 있으나 간의 MAO가 혈중으로 유리될 때는 혈청 MAO의 형태로 변형될 것이라는 추론이 있으므로 이 연구에서 담즙

을체시 주정 중독이 야기되었을 때는 쥐 혈청의 benzylamine oxidase가 담즙울체만 있을 때 보다는 그 활성도가 증가될 것으로 생각했었다. 그러나 별 변동이 없는 것은 이 실험만으로는 분명하게 그 이유를 설명하기는 어렵다. 따라서 이 문제는 앞으로 더욱 추구해 보아야 하겠다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 성적으로 보아 간의 총 MAO는 급성 및 만성 주정 중독시에 그 함성이 증가되는 효소라 생각된다. 그리고 간의 총 MAO는 담즙울체시 주정 중독이 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다 간에서 그 활성이 증가되는 효소이며 그 증가의 원인은 생합성의 증가라 생각된다. 따라서 이 성적은 담즙울체로 간손상이 있을 때는 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 자료라 할 수 있다.

요 약

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로움에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 급성 및 만성 주정 중독을 시킨 흰쥐에게 담즙울체를 야기시켜 간의 mitochondria 및 microsome의 총 monoamine oxidase(MAO)와 혈청의 benzylamine oxidase활성도를 측정 한 것이다.

흰쥐에게 만성 주정 중독을 시켰을 때 간의 mitochondria와 microsome의 총 MAO활성도는 현저한 증가를 나타내었으며 급성 주정 중독을 시켰을 때는 mitochondria의 총 MAO활성도만 유의한 증가를 나타내었다.

총담관 결찰로 담즙울체만 시켰을 때는 간 mitochondria의 총 MAO만 그 활성도가 현저히 감소하였다.

만성 주정 중독 후 총담관결찰로 담즙울체를 야기했을 때와 총담관결찰 후 급성 주정 중독을 시켰을 때는 간 mitochondria의 총 MAO만이 주정 중독만 시켰을 때 보다는 그 활성도가 낮았다. 그러나 담즙울체만 시켰을 때 보다는 그 활성도가 높았다.

혈청의 benzylamine oxidase는 담즙울체를 시킨 모든 쥐에서 총담관 결찰 후 7일부터 그 활성이 측정되었으나 상호간에 별 차이는 없었다.

이상의 성적으로 보아 간의 MAO는 주정 중독시에 그 활성도가 증가되는 효소이며 또한 담즙울체시 주정 중독이 야기되면 이 효소의 활성도가 담즙울체만 있을 때 보다 증가되는 효소로 생각된다. 그리고 그 증가의 원인은 생합성의 증가라 생각된다.

참 고 문 헌

Bardsley WG, Grabeb MJ, Scott N: The amine oxidases of human placenta and pregnancy plasma, *Biochem J* 1974; 139: 169-181.

Bosron WF, Li TK: Alcohol dehydrogenase, in Jakoby WB(ed): *Enzymatic Basis of Dectoxication*. New York, Academic Press, 1980, Vol 1, pp 231-244.

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

Chang ES: Light and electron microscopical studies of liver biopsies on alcoholic patients. *J Clin Electron Microscopy* 1985; 18: 331-347.

Chang ES: Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37: 213-224.

Christoflensen P, Poulsen H: Alcoholic liver disease, in MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ(eds): *Pathology of The Liver*. New York, Churchill Livingstone Inc, 1979, pp 232-244.

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

정성광, 광춘식 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관결찰이 간의 Monoamine oxidase활성에 미치는 영향. *한국생화학회지* 1992; 25: 210-218.

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

Costa MRC, Breakefield XO: Short communications. Distinct forms of monoamine oxidase expressed in hepatoma and HeLa cells in culture. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 525-528.

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

Eagon PK, Willet JE, Seguiti SM: Androgen responsive funticons of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion, *Gastroenterology* 1987; 93: 1162-1169.

Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. New York, Elsevier Science Publishing Co Inc,

- 1988, pp 782-796.
- Ellis FW: Effect of ethanol on plasma corticosterone levels. *J Pharmacol Exp Ther* 1966; 153: 121-127.
- Ekstedt B: Substrate specificity of the different forms of monoamine oxidase in rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1976; 25: 1133-1138.
- Feldstein A: Effect of ethanol on neurohumoral amine metabolism, in Kissin B, Begleiter H(eds): *The Biology of Alcoholism*. New York, Plenum Press, 1971, Vol 1, pp 127-159.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-766.
- Greenawalt 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.
- 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.
- Grossner AM, Roebuck P: The diagnostic potential of the combined determination of serum monoamine oxidase and N-acetyl- β -glucosaminase for fibroproliferative liver disease. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 19-23.
- Halsted JA: *The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application*. London, Saunders Co, 1976, pp 426-429.
- Ito K, Nakagawa J, Minakuchi C, et al: A clinical evaluation of serum monoamine oxidase, with special reference to hepatic fibrosis. *Digestion* 1971; 4: 49-58.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J: *Metabolic Basis of Detoxication. Metabolism of Functional Groups*. New York, Academic Press, 1982, pp 5-317.
- 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, 1979, pp 82-83.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 박춘식, 최용환, 정준모 : 총담관결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. 대한내과학회잡지 1989; 36: 459-470.
- 김여희, 박춘식, 정성광 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Alanine Aminotransferase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1989; 8: 113-121.
- 김여희, 박춘식, 정성광 : Ethanol중독 흰쥐에서 총담관결찰이 혈청 및 간의 Aspartate Aminotransferase 활성에 미치는 영향. 계명의대논문집 1990; 9: 87-95.
- Kirchner JP, Castell DO: Serum monoamine oxidase: An index of hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1972; 62: 771.
- 박춘식 : 총수담관을 결찰한 흰쥐의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980; 21: 126-134.
- 박춘식, 장억규 : 흰쥐 담즙울체 간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4: 1-27.
- 박춘식, 김여희, 문교철 : 흰쥐 담즙울체간의 Plasma Membrane, Mitochondria 및 Microsome의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1987; 6: 67-76.
- 박춘식, 박정식 : 흰쥐 간세포 분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- 박춘식, 이상일 : 흰쥐 담즙울체 간의 Malate Dehydrogenase의 활성치. 계명의대논문집 1985; 4: 131-137.
- Lieber CS: Alcohol Metabolism, in Hall P(ed): *Alcoholic Liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects*. London, Edward Arnold Ltd, 1985, pp 1-24.
- Liu SJ, Ramsey RK, Fallon HJ: Effect of ethanol on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in the rat. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 369-378.
- McEwen CM Jr, Castell DO: Abnormalities of serum monoamine oxidase in chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 36-47.
- McEwen CM Jr, Cohen JD: An amine oxidase in normal human serum, *J Lab Clin Med* 1963; 62: 766-776.
- 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, 박춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. 계명의대논문집 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.
- Ono T, Eto K, Sakata Y, et al: Laboratory methods, A new colorimetric assay for monoamine oxidase in serum and its clinical application. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 1022-1031.

Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 491-495.

Ritchie JM: The aliphatic alcohols, in Gilman AG, Goodman LS, Gilman A(eds): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed 7. New York, Macmillan Publishing Co Inc, 1980, pp 376-388.

Sherlock DS: *Diseases of the Liver and Biliary System*, ed 7. Oxford, Blackwell Scientific Publications,

1985, pp 1-14, 79-80 and 346-360.

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.

Wooddell WJ: Liver disease in alcohol addicted patients. in Davidson SV(ed): *Alcoholism and Health*. Century Boulevard, Aspen System Co, 1980, pp 125-134.

= Abstract =

Effect of Common Bile Duct Ligation on Liver Mitochondrial and Microsomal Total Monoamine Oxidase and Serum Benzylamine Oxidase Activities in Ethanol Intoxicated Rats

You Hee Kim, MD; Kwang Wook Ahn, MD;
Chun Sik Kwak, PhD; Sung Kwang Chung, MD**

*Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, and Department of Urology, Kyungpook National University School of Medicine**, Taegu, Korea*

The activities of the hepatic mitochondrial and microsomal total monoamine oxidase(MAO), and serum benzylamine oxidase were studied for cholestasis induced by common bile duct ligation and acute ethanol intoxication developed, or cholestasis after chronic ethanol intoxication for manifestation of the biochemical background of alcohol intoxication in hepatobiliary disease.

There were marked increases in the mitochondrial and microsomal total MAO activities of the liver in the rats treated with chronic ethanol intoxication, and showed a significant increase in the mitochondrial total MAO after treatment with acute ethanol intoxication.

When common bile duct was ligated in the rats, mitochondrial total MAO activity in the liver significantly decreased.

When common bile duct was ligated after chronic ethanol intoxication and acute ethanol intoxication was done after common bile duct ligation, the activity of the mitochondrial total MAO in the liver decreased more significantly than the group only with ethanol intoxication was performed. However, the activity showed a higher degree on the same time points than the groups only with the common bile duct ligation.

The serum benzylamine oxidase activity in the group with only common bile duct ligation or the ethanol intoxication with cholestasis were measured between the 7th and 14th day, with no difference between two groups.

According to the above results, the hepatic MAO seems to be an enzyme in which its activity increases in acute and chronic ethanol intoxication. And total MAO in the liver is the enzyme with increased activity in ethanol intoxication with cholestasis more than in cholestasis. The cause of the increase is the development of biosynthesis. Accordingly, these results will be the data supporting that alcoholic drink is enzymologically harmful in hepatobiliary diseases.

Key Words: Cholestasis, Ethanol intoxication, Monoamine oxidase