

담즙산 부하에 의한 쥐 간의 Benzoyltransferase의 유도

계명대학교 의과대학 생화학교실 및 의과학연구소

김일경 · 김여희 · 곽춘식

Induction of Hepatic Benzoyltransferase by Bile Acid in Rats

Il Kyung Kim, M.D., You Hee Kim, M.D., Chun Sik Kwak, Ph.D.

*Department of Biochemistry,
Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science,
Taegu, Korea*

Abstract : To elucidate the possible mechanism of the increased activity of benzoyltransferase (BT) in cholestatic liver, rats were divided into eight groups: Normal, sham operated control, bile duct obstruction (BDO) alone (BDO group), BDO plus taurocholic acid (TCA) injection (BDO plus TCA group), BDO plus tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) injection (BDO plus TUDCA group), choledochocaval shunt (CCS) operation (CCS group), CCS plus TCA injection (CCS plus TCA group), and CCS plus TUDCA injection (CCS plus TUDCA group). BT activity was determined in the liver cytosolic, mitochondrial and microsomal preparations isolated from the above experimental rats. The values of Km and Vmax in this hepatic enzyme were measured. The activity of liver microsomal BT showed a significant increase in the CCS group. The activities of liver mitochondrial and microsomal BT showed a significant increase in the BDO group. However, mitochondrial and microsomal BT activities in the liver rose more rapidly in the BDO group than that of the CCS group. Mitochondrial and microsomal BT activities in the liver and its Vmax value were increased more significantly in both the CCS plus TCA group, and the BDO plus TCA group than that of each control group, such as CCS and BDO group. On the other hand, the value of Km of the hepatic subcellular BT did not change in all the experimental groups. However, this hepatic enzyme activity did not change in both the CCS plus TUDCA group and the BDO plus TUDCA group. Above results suggest that TCA induces the biosynthesis of BT in the liver.

Key words : Benzoyltransferase, Bile duct obstruction, Choledochocaval shunt, Taurocholic acid, Tauroursodeoxycholic acid

서 론

Benzoyltransferase (benzoyl coenzyme A: amino acid N-acetyltransferase)는 제 2상 생체이물 생체 변환 (phase II xenobiotic biotransformation) 효소의 일종이며 (Nandi *et al.*, 1979; Killenberg & Webster, 1980; Webster, 1981), 이 효소는 benzoate, salicylate, acetate, propionate, N-butyrate, isobutyrate, isovalerate, 3-methylcrotonate, tiglate, methylmalonate (Nandi *et al.*, 1979), 2,4-dichlorophen-oxyacetate 및 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (Kelley & Vessey, 1986)들에 게 L-glycine, L-asparagine 및 L-glutamine을 포함시키는 반응을 촉매하는 효소로서 포유동물간의 미토콘드리아, 세포질 및 내형질 세망에 많은 양이 분포되어 있다 (Webster *et al.*, 1976; Nandi *et al.*, 1979; Kelley & Vessey, 1986; Kim & Kim, 1999). 이와 같은 benzoyltransferase(이하 BT라 함)는 동물실험에 의해 유도된 실험적 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되는 것(Kim & Kim, 1999)으로 알려져 있다. 그러나 이 효소가 담즙울체간에서 어떤 기전에 의해 그 활성도가 증가되는지를 규명한 보고는 아직도 없다. 현재까지 생체이물 생체 변환 효소로서 담즙울체간에서의 활성도 변동기전이 일부 밝혀져 있는 것은 arylesterase와 carboxylesterase(한병훈과 김여희, 1997 & 1998), cholinesterase(박소경과 곽춘식, 1999), monoamine oxidase와 catechol-O-methyltransferase(도준영, 1998), alcohol dehydrogenase, catalase, 마이크로솜 ethanol oxidizing system 및 aldehyde dehydrogenase(신미정, 1998), arylamine N-methyltransferase와 thiol methyltransferase(이병욱, 1999; 이병욱과 곽춘식, 2000) 등이다. 즉 이들 중 arylesterase, carboxylesterase 및 cholinesterase(곽춘식과 이숙형, 1992), alcohol dehydrogenase와 catalase(곽춘식 외, 1988), monoamine oxidase와 catechol-O-methyltransferase(문교철과 곽춘식, 1989; Mun, 1996)는 담즙울체간에서 그 활성도가 감소되는 효소이며, 그 기전은 담즙울체로 간 세포 내에 증가된 taurocholic acid가 이들 효소의 합성을 억제하는 것(한병훈과 김여희, 1997 & 1998; 도준영, 1998; 신미정, 1998; 박소경과 곽춘식, 1999)이며 마이크로솜 ethanol oxidizing system 및 aldehyde dehydrogenase(곽춘식 외, 1988),

arylamine N-methyltransferase와 thiol methyltransferase(주일, 1998)는 담즙울체간에서 그 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙울체로 간세포 내에 증가된 taurocholic acid가 이들 효소의 합성을 자극한다(신미정, 1998; 이병욱, 1999; 이병욱과 곽춘식, 2000)는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 활성도가 변동되는 효소들에 대해서 taurocholic acid가 어떤 효과를 나타내는지를 알아낸다면 담즙울체간에서 활성도가 변동되는 생체이물 생체 변환 효소들의 활성도 변동기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다. 이 연구는 BT 활성도가 담즙울체간에서 왜 증가되었는지 그 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합(choledochocaval shunt)을 시킨 직후에 간괴사 유발제인 taurocholic acid (Palmer, 1972; Drew & Priestly, 1979; Kitani *et al.*, 1986)를 정맥내 주입시켜 경시적으로 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 이 효소의 활성도를 측정하였던 바 taurocholic acid가 간에서 이들 효소의 합성을 유도하는 것으로 생각되는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

Benzoyl coenzyme A lithium salt, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), tris (hydroxymethyl) aminomethane, glycine, taurocholic acid (from ox bile, sodium salt, T-0750, 이하 TCA로 함), taurooursodeoxycholic acid (sodium salt, T-0266 이하 TUDCA로 함) 및 단백질 표준액(10 g/100 mL bovine serum albumin) 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 그 외 일반시약은 시판되는 특급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 15군으로 나누었

다. 즉 정상군(1군), 가수술군은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였고 담관폐쇄(bile duct obstruction)군은 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였으며 담관폐쇄와 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μ moles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다. 담관폐쇄와 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μ moles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였고 총담관 대정맥문합을 한 군은 총담관 대정맥문합을 한 후 1일 및 2일 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였으며 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45 μ moles)를 상대정맥 내에 주입 한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다. 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa *et al.* (1990)의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45 μ moles)를 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군(총 2군)으로 하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다.

사료는 시판되는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다.

총담관 결찰 수술, 총담관 대정맥문합 수술 및 가수술은 효소활성의 일종 변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원부위의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 총담관 대정맥문합은 상대정맥과 총담관을 medical grade silicon tube를 사용하여 연결하였으며 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (Model 341A, sage instruments, Cambridge USA)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삼관한 후 4 °C의 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.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 고효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4 °C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9 배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon pestle glass homogenizer (Thomas, USA, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4 °C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10%(w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽춘식과 꽈정식, 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4 °C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall 사(Newtown, USA)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865rotor였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO model 570, Lincoln, USA)를 사용하였다.

4. 효소 시료 조제

세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 시료 조제는 이들 분획을 단백질 양으로 5 mg/mL가 되도록 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액으로 희석하여 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

간세포 분획들의 BT 활성도 측정은 시료와 함께 benzoyl-coenzyme A와 glycine을 기질로 사용하여 30 °C에서 반응시키면서 280 nm 파장에서 time scan으로 비색 정량하여 효소의 활성도를 산출하는 Webster (1981)법에 의하였다.

이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 coenzyme A를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Cary 210, Varian, Paloalto, USA)였다.

6. Km치 및 Vmax치의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 BT의 2종 기질 중 benzoyl-CoA를 선택하여 기질 원액과 기질 희석액을 제조한 후 이 기질액과 glycine 기질 원액을 사용하여 BT의 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 1/vi치를 그리고 기질 농도로부터 1/[S]치를 계산하여 이중역수도(double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출(Segel, 1976)하였다.

7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid 와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg & Rothstein (1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret 법(Gornall *et al.*, 1949)으로 정량하였다.

8. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

성 적

1. 쥐에서 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄와 담즙 정체 시간이 간의 BT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시켰을 때 간의 마이크로솜 분획과 쥐에게 담관폐쇄를 시켰을 때 간의 미토콘드리아와 마이크로솜 분획에서 BT 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 후 1일 경과시킨 군에서 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 정상군보다는 약 38% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었으며 총담관 대정맥문합 후 2일 경과시킨 군에서 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 정상군보다는 약 67% ($P<0.01$), 가수술군보다는 약 38% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다. 담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시킨 군에서 간의 미토콘드리아 분획의 BT 활성도는 정상군보다는 각각 약 78% ($P<0.01$) 및 약 68% ($P<0.05$), 가수술군보다는 각각 약 60% ($P<0.05$) 및 약 52% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었으며 간의 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 정상군보다는 각각 약 95% ($P<0.01$) 및 약 115% ($P<0.01$), 가수술군보다는 각각 약 64% ($P<0.01$) 및 약 78% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그리고 간 미토콘드리아와 마이크로솜 분획의 BT 활성도를 총담관 대정맥문합을 시킨 군과 담관폐쇄를 시킨 군 간에 상호 비교했을 때는 담관폐쇄를 시킨 군에서의 BT 활성도가 총담관 대정맥문합을 시킨 군의 BT 활성도보다 약간 더 증가되었으며 양군 모두 수술 후 2일 경과시켰을 때는 1일 경과시켰을 때보다 이 효소의 활성도가 약간 더 증가하였다(Table 1). 간의 cytosol 분획에서 BT의 활성도는 모든 실험군에서 별다른 변동을 나타내지 않았다(Table 1).

2. 쥐에서 총담관 대정맥문합 및 담관폐쇄 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 BT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도

Table 1. Effects of time and model of biliary retention on hepatic subcellular benzoyltransferase (BT) activities in rats

Experimental groups	BT activities (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	7.2 ± 2.72	49.2 ± 12.23	26.4 ± 6.16
Sham 1 day	7.6 ± 2.86	54.7 ± 13.76	31.4 ± 6.76
Sham 2 days	7.8 ± 2.93	54.2 ± 14.08	31.9 ± 6.95
CCS 1 day	8.6 ± 2.97	62.4 ± 14.74	36.4 ± 7.48 ^a
CCS 2 days	9.2 ± 3.26	68.0 ± 15.24	44.1 ± 8.65 ^{b,g}
BDO 1 day	9.4 ± 3.19	87.4 ± 21.47 ^{b,d}	51.5 ± 9.52 ^{b,e}
BDO 2 days	11.2 ± 3.23	82.6 ± 20.18 ^{a,g}	56.7 ± 9.84 ^{c,h}

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 the 2nd day after sham operation, CCS 1 day or CCS 2 days: Sacrificed on the 1st day or the 2nd day after choledocho-caval shunt, BDO 1 day or BDO 2 days: Sacrificed on the 1st day or the 2nd day after common bile duct ligation.

a, P<0.05 vs. Normal; b, P<0.01 vs. Normal; c, P<0.001 vs. Normal; d, P<0.05 vs. Sham 1 day; e, P<0.01 vs. Sham 1 day; g, P<0.05 vs. Sham 2 days; h, P<0.01 vs. Sham 2 days.

는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 36% (P<0.05) 및 약 34% (P<0.05)의 증가를 나타내었다. 그러나 간의 세포질과 미토콘드리아 분획에서는 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 이 효소의 활성도는 유의한 변동이 없

었다. 또한 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때도 간의 3종 세포분획에서 BT 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular benzoyltransferase (BT) activities in rats

Experimental groups	BT activities (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CCS 1 day	8.6 ± 2.97	62.4 ± 14.74	36.4 ± 7.48
CCS 1 day + TCA	9.7 ± 3.45	76.3 ± 15.67	49.6 ± 8.23 ^j
CCS 1 days + TUDCA	8.8 ± 3.06	64.2 ± 13.63	37.3 ± 7.27
CCS 2 days	9.2 ± 3.26	68.0 ± 15.24	44.1 ± 8.65
CCS 2 days	11.3 ± 3.53	82.8 ± 16.36	59.2 ± 9.48 ^m
CCS 2 days + TUDCA	9.4 ± 3.32	66.7 ± 14.24	38.7 ± 7.56

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; CCS 1 day and CCS 2 days, sacrificed 1 or 2 days after CCS operation; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45 μmol/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 day.

및 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 담관폐쇄 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아 분획의 BT 활성도는 대조군인 담관폐쇄만 시킨 군보다 각각 약 41% ($P<0.05$) 및 약 57% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었으며 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 대조군보다 각각 67% ($P<0.05$) 및 약 65% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 간의 세포질 분획에서는 담관폐쇄 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 이 효소의 활성도는 별 변동이 없었다. 또한 담관폐쇄 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때도 간의 3종 세포분획에서 BT 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 3).

3. 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄 후 2일 경과한 실험군에서 간 BT의 Km치 및 Vmax치의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 benzoyl-CoA에 대한 간 BT의 Km치 및 Vmax치를 측정했을 때 Km치는 변동이 없었다 (Table 4, 5).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 2일 경과했을 때 간 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 44% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 90% ($P<0.001$), 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다는 약 32% ($P<0.05$) 증가를 나타내었다. 그리고 총담관 대정맥문합을 시킨

Table 3. Effects of taurocholic acid(TCA), and taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after bile duct obstruction (BDO) on hepatic subcellular benzoyltransferase (BT) activities in rats

Experimental groups	BT activities (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
BDO 1 day	9.4 ± 3.19	87.4 ± 21.47	51.5 ± 9.52
BDO 1 day + TCA	11.9 ± 3.38	123.3 ± 24.20 ^p	86.0 ± 21.93 ^p
BDO 1 day + TUDCA	9.7 ± 3.35	84.4 ± 20.26	53.8 ± 9.43
BDO 2 day	11.2 ± 3.23	82.6 ± 20.18	56.7 ± 9.84
BDO 2 days + TCA	15.3 ± 3.78	129.7 ± 23.90 ^t	93.7 ± 18.95 ^t
BDO 1 day + TUDCA	10.6 ± 3.43	83.8 ± 19.72	54.5 ± 9.62

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

p, $P<0.05$ vs. BDO 1 day; t, $P<0.01$ vs. BDO 2 days.

직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 약 33% ($P<0.05$)의 증가를 나타내었다. 그러나 총담

관 대정맥문합을 시킨 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다 (Table 4).

쥐에게 담관폐쇄를 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 미

Table 4. Rat hepatic microsomal benzoyltransferase kinetic parameters from 2 days after choledo-cho-caval shunt(CCS 2 day) determined with benzoyl-coenzyme A as substrate

Experimental groups	Km (mM)	Vmax (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	0.29 ± 0.07	37.9 ± 7.45
CCS 2 days	0.30 ± 0.06	54.5 ± 10.21 ^b
CCS 2 days + TCA	0.31 ± 0.06	72.1 ± 11.19 ^{i,m}
CCS 2 days + TUDCA	0.28 ± 0.07	50.4 ± 8.92 ^b

Michaelis-Menten constants for benzoyltransferase were determined using benzoyl-coenzyme A and glycine at 30 °C for microsomal fraction of experimental rat livers at 2 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; i, P<0.001 vs. Sham 2 days; m, P<0.05 vs. CCS 2 days.

토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 71% (P<0.01) 및 약 72% (P<0.01)의 증가를 나타내었다. 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 78% (P<0.01) 및 약 67% (P<0.01)의 증가를 나타내었으나 담관폐쇄만 시킨 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다(Table 5).

41% (P<0.05) 및 약 76% (P<0.01)의 증가를 나타내었다. 그러나 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 78% (P<0.01) 및 약 67% (P<0.01)의 증가를 나타내었으나 담관폐쇄만 시킨 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다(Table 5).

Table 5. Rat hepatic mitochondrial and microsomal benzoyltransferase kinetic parameters from 2 days after bile duct obstruction (BDO 2 days) determined with benzoyl-coenzyme A as substrate

Experimental groups	Mitochondria		Microsome	
	Km (mM)	Vmax (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Km (mM)	Vmax (nmol coenzyme A min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Sham 2 days	0.27 ± 0.08	65.7 ± 15.43	0.29 ± 0.07	37.9 ± 7.45
BDO 2 days	0.29 ± 0.07	112.6 ± 22.68 ^b	0.29 ± 0.05	65.1 ± 12.46 ^b
BDO 2 days + TCA	0.27 ± 0.07	158.6 ± 30.28 ^{is}	0.28 ± 0.07	114.3 ± 22.82 ^{it}
BDO 2 days + TUDCA	0.26 ± 0.06	117.2 ± 20.49 ^b	0.30 ± 0.08	63.2 ± 10.59 ⁱ

Michaelis-Menten constants for benzoyltransferase were determined using benzoyl-coenzyme A and glycine at 30 °C for mitochondrial and microsomal fractions of experimental rat livers at 2 days after BDO. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 3 and text.

h, P<0.01 vs. Sham 2 days; i, P<0.001 vs. Sham 2 days; s, P<0.05 vs. BDO 2 days; t, P<0.01 vs. BDO 2 days.

고 찰

간은 대사기능, 생체이물 생체 변환 기능 및 재생기능 등 수 많은 기능을 가진 장기이며 담즙울체로 간이 손상을 받으면 간의 BT와의 활성도는 변동이 초래되는 것 (Kim & Kim, 1999)으로 알려져 있다. 따라서 담즙울체간의 세포분획들에서 이들 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체간에서의 생체이물 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 또한 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

담즙울체가 수반되는 간담도 질환에서 간세포는 기능장애(Halsted, 1976; Sherlock & Dooley, 1993)를 받을 뿐만 아니라 담즙울체의 시간이 경과함에 따라 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타난다 (Desmet, 1994).

쥐의 담즙울체간에서 조직 소견을 관찰한 Kountouras *et al.* (1984), 장대성 외(1987) 및 김효석 외(1989)의 보고를 보면 쥐의 총담관을 결찰한 후 12시간이 경과했을 때는 많은 간세포들이 괴사 현상을 나타내었으며 동시에 담도 세포도 증식되기 시작한다고 하였다. 그리고 1일 후에는 간의 전 부위에 괴사현상이 확산되고 괴사 부위는 염증 세포의 침윤이 보인다고 하였으며 이후 2주경에는 괴사현상이 약간 감소되는 반면에 담도세포의 증식이 증가되고 섬유화가 시작된다고 하였다. 그리고 이후 6주부터는 초기 경화성 변화가 나타난다고 하였다.

실험적으로 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체를 야기시키면 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들은 많으며 그 중에서도 특히 서론에서 기술한 바와 같이 생체이물 생체 변환 효소들이 많다. 이 연구는 생체이물 생체 변환 효소인 BT의 활성도가 담즙울체간에서 왜 변동되었는지 그 기전의 일단을 알아보기 위하여 시행한 것이다. Kim & Kim (1999)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간에서 미토콘드리아 및 마이크로솜 BT의 활성도는 양자 모두 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일 및 7일에 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다고 하였으며 세포질 분획에서는 별 변동이 없었다고 하였다. 이와 같이 BT는 쥐 담즙울체간의 미토콘드

리아와 마이크로솜 분획에서 그 활성도가 증가되는 생체이물 생체 변환 효소라고 하였으며 그 증가 기전에 대해서는 효소단백질 합성의 증가에 의한 것 같다고만 추론하고 있다. 또한 담즙울체간에서 BT의 활성도가 증가된 것은 담즙울체간에서 초기에 나타나는 심한 괴사 현상과 아울러 담도의 증식이 이들 효소의 활성도 증가와 관계가 있다고 하였다. 그러나 어떤 물질이 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도를 증가시키는데 기여하였는지는 분명하게 설명하고 있지 않았다.

이 실험에서도 담즙울체간에서 이 효소의 활성도가 증가됨을 확인하였다. 이 연구에서 해결해야 할 문제는 이 효소 활성도가 담즙울체간에서 어떤 기전에 의해 증가되었는가 하는 것이다. 이를 해명하기 위해 채택한 모델은 4가지인데 Ogawa *et al.* (1990) 및 한병훈과 김여희(1997, 1998)의 방법에 의하였다.

즉 첫째는 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시켜 담즙울체간을 만든 것이고, 둘째는 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시켜 담즙울체간을 만든 것이며, 셋째는 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙울체를 더욱 심화시킨 것이다. 그리고 넷째는 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간 내에 담즙울체를 심화시킨 것이다. 이 4가지 모델 중 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 모델과 총담관 대정맥문합을 시킨 모델은 시간이 경과될수록 간 내 담즙산의 농도가 점차 증가되는 점은 동일하나 다른 점은 시간이 경과될수록 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 모델이 총담관 대정맥문합을 시킨 모델보다 담즙산 농도 증가가 빠르다(Ogawa *et al.*, 1990)는 것이다. 이와 같이 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 모델이 총담관 대정맥문합을 시킨 모델보다 시간이 경과될수록 간 내의 담즙산 농도가 빠르게 증가되는 것은 담관폐쇄로 담관 내 수압이 증가됨으로 인해 담관 내 담즙산이 간 세포 내로 강제 역류되고 아울러 간 내의 담즙산이 간 외로의 배출이 억제되기 때문에 나타난 현상인 것(Toyota *et al.*, 1984)이다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 모델에서는 담관내 수압이 증가되지 않기 때문에 담즙산의 간 세포 내로의 역류가 심하지는 않다 (Toyota *et al.*, 1984)고 한다. 따라서 이 4가지 모델을 사용함으로써 시간경과에 따른 간 내의 담즙산 농도 증가의 효과를 상호 비교할 수 있으며 아울러 총담관

을 결찰하여 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 주입한 모델과 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대정맥 내에 주입한 모델로는 간내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아낼 수가 있는 것이다 (Ogawa *et al.*, 1990; 한병훈과 김여희, 1997 & 1998). 이 연구에서 또 하나의 문제는 담즙산의 종류가 다르면 이를 효소 활성도에 미치는 효과도 달라지는가 하는 것이다. 그래서 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 arylesterase와 carboxylesterase의 합성에 영향을 주지 않는다는 TUDCA (한병훈과 김여희, 1997 & 1998)를 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과를 관찰하여 보았다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 유의한 증가를 나타내었다. 한편 이 실험에서 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 총담관 대정맥문합을 시킨 군보다 담관폐쇄를 시킨 군에서 약간 더 증가되었으며 양군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때 보다 2일 경과시켰을 때 이들 분획에서 BT 활성도가 더 증가되었다.

이 결과로 보아 간의 BT는 간의 담즙울체의 정도가 경한 조건인 총담관 대정맥문합(Ogawa *et al.*, 1990)을 시켰을 때도 그 활성도가 증가되는 것을 알 수 있었으며 아울러 담즙울체의 시간이 경과되어 간의 담즙울체가 점차 심해질수록 간에서 이 효소의 활성도가 더 증가된다는 사실을 알 수 있었다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도와 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 각각의 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 또는 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 한편 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시키고 2일 경과시켰을 때와 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 각각의 대

조군인 가수술군 또는 총담관 대정맥문합을 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 담관폐쇄를 시키고 2일 경과시켰을 때와 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 각각의 대조군인 가수술군 또는 담관폐쇄를 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이 실험에서 측정한 benzoyl-CoA에 대한 BT의 Km치는 모든 실험군의 간 세포분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다.

이 결과로 보아 TCA는 간의 BT 합성을 유도한다고 추정할 수 있으며 특히 TCA를 주입한 실험군들에서 이 효소의 Km치는 변동이 없으면서 Vmax치가 증가된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침 해주는 결과라고 생각한다.

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 이 효소의 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과로 볼 때 TUDCA는 간의 BT의 합성을 유도하지는 않는다고 추정할 수 있다.

이상의 결과들은 간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 얻어진 결과로서 담즙울체를 시킨 각 실험모델에서 간 세포분획들의 BT 활성도가 세포분획에 따라 증가되거나 또는 변동이 없었다. 이런 현상이 왜 일어났는지는 이 실험만으로는 추론하기는 어렵다. 따라서 이 문제는 앞으로 더욱 연구해 보아야 하겠다.

이상 이 실험 결과들과 문현상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체간에서 BT의 활성도 증가는 담즙산들 중 특히 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각된다.

요 약

이 연구는 BT의 활성도가 담즙울체간에서 왜 증가되는지 그 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 또는 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 정맥 내에 주입시킨 다음 경시적으로 BT의 활성도 변

동에 대한 이들 담즙산의 효과를 측정하였다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 유의한 증가를 나타내었다.

간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 총담관 대정맥문합을 시킨 군보다 담관폐쇄를 시킨 군에서 약간 더 증가되었으며 양군 모두 수술 후 1일 경과시켰을 때보다 2일 경과시켰을 때 이들 분획에서 BT 활성도가 더 증가되었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT 활성도와 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT 활성도는 각각의 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 또는 담관폐쇄만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 BT 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시키고 2일 경과시켰을 때와 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 각각의 대조군인 가수술군 또는 총담관 대정맥문합을 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 그리고 쥐에게 담관폐쇄를 시키고 2일 경과시켰을 때와 쥐에게 담관폐쇄를 시킨 직후 TCA를 주입시키고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 BT의 Vmax치는 각각의 대조군인 가수술군 또는 담관폐쇄를 시킨 군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합 또는 담관폐쇄를 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 BT의 Vmax치는 가수술만 시킨 군에 비해서만 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이 실험에서 측정한 benzoyl-CoA에 대한 BT의 Km치는 모든 실험군의 간 세포분획들에서 유의한 변동을 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 담즙을체간에서 BT의 활성도

증가는 담즙산들 중 특히 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각된다.

참 고 문 헌

- 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포 분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. *계명의대논문집* 1986; 5(1): 45-53.
- 곽춘식, 김여희, 문교철: 흰쥐 담즙을체간에서의 알콜대사 효소들의 활성치. *계명의대논문집* 1988; 7(1): 64-75.
- 곽춘식, 이숙형: 흰쥐 담즙을체간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase의 활성도. *한국생화학회지* 1992; 25(3): 251-261.
- 김효석, 박재웅, 김은영, 곽규식, 최용환, 정준모: 총담관 결찰시 간세포의 초미형태학적 변화. *대한내과학회지* 1989; 36(4): 459-470.
- 도준영: Taurocholate부하에 의한 흰쥐 간의 MAO A 및 B와 COMT의 합성 억제. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1998; 1-51.
- 문교철, 곽춘식: 흰쥐 담즙을체간의 Monoamine Oxidase의 활성치. *계명의대논문집* 1989; 8(1): 69-77.
- 박소경, 곽춘식: 담즙산 부하에 의한 흰쥐 간의 Cholinesterase의 합성 억제. *계명의대논문집* 1999; 18(2): 204-217.
- 신미정: 흰쥐 간의 알콜대사효소 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1998; 1-50.
- 이병욱: Taurocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 Arylamine N-Methyltransferase 및 Thiol Methyltransferase의 유도. *계명대학교 대학원 박사학위논문* 1999; 1-47.
- 이병욱, 곽춘식: Taurocholate 부하에 의한 흰쥐 간의 Arylamine N-Methyltransferase의 유도. *대한외과학회지* 2000; 59(2): 141-153.
- 장대성, 곽정식, 손태중: 총담관 결찰에 의한 담관증식 성 변화의 초미형태학적 연구. *경북의대잡지* 1987; 28(2): 113-122.
- 주일: 흰쥐 재생간과 담즙을체간에서의 Arylamine N-methyltransferase 및 Thiol methyltransferase의 활

- 성도. 계명대학교 대학원 박사학위논문 1998; 1-42.
- 한병훈, 김여희: 흰쥐 간의 Arylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. 대한간학회지 1997; 3(2): 154-169.
- 한병훈, 김여희: 흰쥐 간의 Carboxylesterase 활성에 미치는 고부하 Taurocholate의 영향. 계명의대논문집 1998; 17(4): 487-503.
- Desmet VJ: Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC: *Pathology of the Liver*, 3rd ed., New York, Churchill Livingstone, 1994, pp 425-474.
- Drew R, Priestly BG: Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experientia* 1979; 35(6): 809-811.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177(3): 751-766.
- Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labelled compounds. Colowick SP, Kaplan NO: *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1957, Vol 4, pp708-731.
- Halsted JA: *The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application*. London, Saunders, 1976, pp426-429.
- Kelley M, Vessey DA: Interaction of 2,4 dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and 2,4,5 trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T) with the acyl-CoA: amino acid N-acetyltransferase enzymes of bovine liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(2): 289-295.
- Killenberg PG, Webster, LJ Jr: Conjugation by peptide bond formation. Jakoby WB: *Enzymatic Basis of Detoxification*, New York, Academic Press, 1980, Vol II, pp141-167.
- Kim YJ, Kim YH: Benzoyltransferase and phenylacetyltransferase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol* 1999; 32(1): 67-71.
- 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(6 pt 1): G852-G858.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ: Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rats. *Br J Exp Pathol* 1984; 65(3): 305-311.
- Mun KC: Catechol-O-methyltransferase activity in cholestatic rat's liver induced by bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol* 1996; 29(2): 142-145.
- Nandi DL, Lucas SV, Webster, LT Jr: Benzoyl-coenzyme A: glycine N-acetyltransferase and phenylacetyl coenzyme A: glycine N-acetyltransferase from bovine liver mitochondria. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1979; 254(15): 7230-7237.
- 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(1): 87-95.
- Palmer RH: Bile acids, liver injury, and liver disease. *Arch Intern Med* 1972; 130(4): 606-617.
- Segel IH: *Biochemical Calculations*. 2nd ed, New York, John Wiley and Sons, 1976, pp214-246.
- Sherlock S, Dooley J: *Diseases of the Liver and Biliary System*. Cambridge, Blackwell Scientific Publications, 1993, pp370-389.
- 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(5): 536-542.
- Webster LJ Jr: Benzoyl-CoA: amino acid and phenylacetyl-CoA: amino acid N-acetyltransferase. Jakoby WB: *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1981, Vol 77, pp301-307.
- Webster LT Jr, Siddiqui UA, Lucas SV, Strong JM, Mieyal JJ: Identification of separate acyl-CoA: glycine and acyl-CoA: L-glutamine N-acetyltransferase activities in mitochondrial fractions from liver of rhesus monkey and man. *J Biol Chem* 1976; 251(11): 3352-3358.