

총담관 대정맥문합수술을 한 쥐에서 혈청과 간의 라이소좀  
 $\alpha$ -D-Glucosidase 및  $\beta$ -D-Glucuronidase 활성도에  
미치는 Taurocholic Acid의 정맥 내 투여의 효과

계명대학교 의과대학 생화학교실

김여희 · 최혜정 · 곽춘식

**Effects of Intravenous Administration of Taurocholic Acid on  
Lysosomal  $\alpha$ -D-Glucosidase and  $\beta$ -D-Glucuronidase Activities  
of Serum and Liver in Rats with Choledocho-Caval Shunt**

You Hee Kim, M.D., Hye Jung Choi, M.S., Chun Sik Kwak, Ph.D.

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

**Abstract** : The effects of intravenous administration of high concentration of taurocholic acid (TCA) on  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rat liver lysosomes were studied. Above liver lysosomal enzymes, serum lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and total  $\beta$ -D-glucuronidase activities were determined from the experimental rats with choledocho-caval shunt (CCS). The activities of liver lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase as well as the activities of serum lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and total  $\beta$ -D-glucuronidase were significantly increased in the CCS plus TCA injection group than in control group, such as group of CCS alone group. However, these hepatic and serum enzymes activities did not change in the CCS plus tauroursodeoxycholic acid injection group. The above results suggest that TCA stimulates the biosynthesis of the lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase in the liver. And that the elevated lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and total  $\beta$ -D-glucuronidase activities in the serum are most likely due to increased hepatocyte membrane permeability caused by TCA mediated liver cell necrosis.

**Key Words** : Choledocho-caval shunt,  $\alpha$ -D-Glucosidase,  $\beta$ -D-Glucuronidase, Taurocholic acid

## 서 론

담즙울체가 야기되면 간과 혈청에서는 많은 효소들의 활성도가 변동되며 그 활성도 변동에는 담즙울체간에서 증가된 taurocholic acid(TCA)가 관여하는 것[1-6]으로 알려져 있다. 이런 연구를 위해서는 두 가지 동물 모델을 만들어 실험을 하는데[7,8] 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 모델 보다 훨씬 빠르다[7,9]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[7,8]이고, 둘째 모델인 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대 정맥내 주입한 모델로는 간 내 TCA의 저농도 증가에 따른 TCA 효과를 알아낼 수가 있는 것[7,8]이다. 특히 둘째 모델의 특징은 첫째 모델 보다 TCA 효과를 더욱 민감하게 알아 낼 수가 있는 것[10]이다.

이러한 모델 중 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 TCA를 혈중에 주입한 모델로 간에서 각종 효소의 활성도 변동을 조사한 보고는 많다. 즉, alkaline phosphatase[7],  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase [2], catalase, alcohol dehydrogenase, 마이크로솜 ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase [4], arylesterase[1], arylamine N-methyltransferase [3], thiol methyltransferase [5], thiosulfate sulfurtransferase[6], cathepsin B, cathepsin D, acid phosphatase[10], 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 분명하게 알 수가 있을 것이다.

$\alpha$ -D-Glucosidase ( $\alpha$ -D-glucoside

glucohydrolase, EC 3. 2. 1. 20)는 말토스, 글라이코젠 및 각종 과당질과 다당질에서 말단 비환원 위치에  $\alpha$ -1,4 결합으로 결합되어 있는  $\alpha$ -D-glucosyl기를 가수분해시키는 반응을 촉매하는 효소이며 [11-13],  $\beta$ -D-glucuronidase( $\beta$ -D-glucuronoside glucuronosohydrolase, EC 3. 2. 1. 31)는 당아미노글라이칸의 비말단의  $\beta$ -D-glucuronosyl기를 가수분해 하거나  $\beta$ -D-glucuronide를 가수분해하여  $\beta$ -D-glucuronic acid를 유리시키는 반응을 촉매하는 효소이다 [13-15]. 이 두 가지 효소는 간의 라이소솜에 풍부히 국재되어 있는 효소이며[11,16] 담즙울체간에서는 이들 라이소솜 효소들은 그 활성도가 증가됨 [17,18]이 알려져 있을 뿐만 아니라 TCA에 의해서 이들 효소의 유전자 발현률이 증가된다고 추정하고 있다[19].

이 연구는 간 세포의 라이소솜에 풍부히 국재되어 있으면서 담즙울체간의 라이소솜에서 활성도가 증가되는  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도가 담즙울체간에서 왜 증가되었는지 그 기전을 분명하게 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다[2,3,7]고 알려진 tauroursodeoxycholic acid(TUDCA)를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 혈청과 간에서 이들 효소의 활성도를 측정하여 이들 효소의 활성도 변동 기전의 일부를 밝혀 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-nitrophenol, phenolphthalein glucuronide sodium, phenolphthalein, ethylenediaminetetraacetic acid, sodium dodecyl sulfate, bovine serum albumin, glycine, Tritox X-100, TCA(from ox bile, sodium salt), TUDCA(sodium salt),  $\alpha$ -D-glucosidase (type I, from bakers yeast, G5003),  $\beta$ -D-glucuronidase (from bovine liver,

G0501) 및 단백질 표준액(10 g/100 ml, bovine serum albumin) 등은 Sigma사(St. Louis, Mo, 미국)의 제품을 사용하였으며 그의 일반 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

## 2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280-320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 한군을 5마리로 하여 다음과 같이 9개 군으로 나누었다. 즉 정상군 1군, 가수술군(sham operation)은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군으로 하였고 총담관 대정맥문합(cholecho-caval shunt) 군은 총담관 대정맥문합 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군, 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa 등[7]과 Park 및 Kwak[8]의 방법에 따라 TCA(체중 100 g당 45  $\mu$ moles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군, 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 대정맥문합 직후 Ogawa 등[7]과 Park 및 Kwak[8]의 방법에 따라 TUDCA(체중 100 g당 45  $\mu$ mol)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 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 에테르 마취하에서 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, 미국)를 사용하여 15분 동안 주입하였다.

## 3. 간적출 및 시료 조제

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취 하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose 액을 가능한 한 모두 제거하였다.

간 라이소솜 효소 시료의 조제를 위하여서는 적출하여 0.25 M sucrose액으로 관류한 간을 즉시 2-4°C로 냉각시킨 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 잘 혼합하여 사용하였다. 간 절편의 마쇄를 위해서는 Teflon pestle glass homogenizer(chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas사, 미국)를 사용하였으며, 간 절편의 마쇄는 2-4°C를 유지하면서 400 rpm 속도로 마쇄를 하였다.

간 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도 측정용 시료는 0.15 M sodium chloride액으로 제조한 10% (w/v) 간 마쇄액을 105,000×g에서 1시간 원심분리한 후 얻어진 침사를 0.15 M sodium chloride액으로 현탁시키고 다시 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 얻은 침사에 0.15 M sodium chloride액 일정량을 넣고 재현탁시킨 후 ultrasonic dismembrator (model 300, Fisher, 미국)로 2~4°C를 유지하면서 20±4 kcycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄를 하여[20] 사용하였다. 간 라이소솜의  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도 측정용 시료의 조제는 먼저 Graham 법[21]으로 라이소솜을 분리한 후 Triton X-100을 처리한 다음 사용하였다. 즉 0.25 M sucrose액으로 만든 10% (w/v) 간 마쇄 균질액 약 10 ml을 취하여 1,000×g에서 20분간 원심분리하여 침사를 얻었으며 이 침사를 10% (w/v) sucrose 액에 현탁시켜 그 일정량을 37-72% (w/v) sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 관저에 부하시켰다. 그리고는 이 원심분리관을 95,000×g에서 2시간 원심분리하여 51-57% (1.23-1.26 g/cm) sucrose 액층 부위에 형성된 pellet을 취한 후 이 pellet을 0.25 M sucrose액으로 1회 세척한 것을 0.1% Triton X-100으로 2배 희석

하여 진탕한 액을 사용하였다. 위의 효소 시료 조제 과정에서 모든 조작은 2-4°C에서 시행하였으며 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사(미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge 였다. 그리고 sucrose density gradient 용액의 제조는 gradient former(model 570, ISCO, 미국)를 사용하여 제조하였다. 한편 채혈한 혈액은 곧 원심분리하여 혈청을 얻은 후 효소 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

#### 4. 효소 활성도 측정

혈청과 간의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 pH 4.5(50 mM acetate buffer, pH 4.5), 37°C 조건에서 30 분간 반응하여 생성된 4-nitrophenol을 비색정량하는 Dissous 등의 법[12]에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질 또는 1 mL의 혈청이 반응하여 생성한 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

간의 라이소솜  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도 측정은 phenolphthalein glucuronide를 기질로 사용하여 pH 4.5(0.1 M acetate buffer, pH 4.5), 38°C 조건에서 1 시간 반응하여 생성된 phenolphthalein을 비색정량하는 Stahl과 Fishman 법[14]에 의하였으며 혈청의 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도의 측정도 phenolphthalein glucuronide를 기질로 사용하여 pH 4.5(1 M acetate buffer, pH 4.5), 38°C 조건에서 4 시간 반응하는 동안에 생성된 phenolphthalein을 비색정량하는 Fishman 등[22]의 법에 의하였다. 이들  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질 또는 1 mL의 혈청이 반응하여 생성한 phenolphthalein을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제 효소들을 사용하여 검증하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Cary 210, Varian, 미국)였다.

#### 5. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg와 Rothstein 법[23]으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret 법[24]으로 정량하였다.

#### 6. 성적 검정

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

### 성 적

#### 1. TCA 또는 TUDCA 주입이 간 라이소솜의 $\alpha$ -D-glucosidase와 $\beta$ -D-glucuronidase 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일째(결과 Table에서 CCS 1 day 및 CCS 2 days) 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase 및  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도는 변동을 나타내지 않았다(Table 1).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과(결과 Table에서 CCS 1day+TCA 및 CCS 2 days+TCA)시켰을 때 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군(결과 Table에서 CCS 1 day 및 CCS 2 days)에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 57% (p<0.05) 및 66% (p<0.05)의 증가를 나타내었다(Table 2).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소솜의  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 대조군인 총담관 대

**Table 1.** Effects of choledocho-caval shunt (CCS) on liver lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats

Experimental groups	$\alpha$ -D-Glucosidase (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	$\beta$ -D-Glucuronidase (nmol phenolphthalein min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
Normal	0.26 ± 0.05	5.18 ± 0.82
Sham 1 day	0.26 ± 0.06	5.23 ± 0.86
Sham 2 days	0.27 ± 0.06	5.27 ± 0.85
CCS 1 day	0.28 ± 0.07	5.76 ± 0.97
CCS 2 days	0.29 ± 0.06	6.12 ± 0.92

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham 1 day or Sham 2 days, sacrificed on the 1st or 2nd day after sham operation; CCS 1 day or CCS 2 days, sacrificed on the 1st or 2nd day after choledocho-caval stunt.

**Table 2.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on liver lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats

Experimental groups	$\alpha$ -D-Glucosidase (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	$\beta$ -D-Glucuronidase (nmol phenolphthalein min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
CCS 1 day	0.28 ± 0.07	5.76 ± 0.97
CCS 1 day + TCA	0.44 ± 0.11*	7.96 ± 1.57*
CCS 1 day + TUDCA	0.28 ± 0.06	5.70 ± 1.04
CCS 2 days	0.29 ± 0.06	6.12 ± 0.92
CCS 2 days + TCA	0.48 ± 0.12*	8.52 ± 1.77*
CCS 2 days + TUDCA	0.30 ± 0.06	6.07 ± 0.95

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 and TUDCA (45  $\mu$  mol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. \*,  $P < 0.05$  vs. CCS 1 day; #,  $P < 0.05$  vs. CCS 2 days.

정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일째 간 라이소솜의  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 38% ( $p < 0.05$ ) 및 약 39% ( $p < 0.05$ )의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시킨 간(결과 Table에서 CCS 1 day+TUDCA 및 CCS 2

days+TUDCA)에서 이들 효소의 활성도는 대조군과 차이가 없었다(Table 2).

## 2. TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청의 라이소솜 $\alpha$ -D-glucosidase와 총 $\beta$ -D-glucuronidase 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일

췌 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도는 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 보다 각각 약 48% ( $p < 0.05$ ) 및 약 63% ( $p < 0.05$ )의 증가를 나타내었다. 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후

TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 보다 각각 약 38% ( $p < 0.05$ ) 및 약 69% ( $p < 0.05$ )의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 이들 효소 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 4).

**Table 3.** Effects of choledocho-caval shunt (CCS) on serum lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and total  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats

Experimental groups	Lysosomal $\alpha$ -D-glucosidase (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	Total $\beta$ -D-glucuronidase (nmol phenolphthalein min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )
CCS 1 day	0.28 ± 0.07	5.76 ± 0.97
Normal	5.42 ± 1.35	1.26 ± 0.28
Sham 1 day	5.45 ± 1.41	1.27 ± 0.27
Sham 2 days	5.47 ± 1.37	1.29 ± 0.26
CCS 1 day	5.56 ± 1.46	1.36 ± 0.30
CCS 2 days	5.76 ± 1.62	1.47 ± 0.42

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

**Table 4.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on serum lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and total  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats

Experimental groups	Lysosomal $\alpha$ -D-glucosidase (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	Total $\beta$ -D-glucuronidase (nmol phenolphthalein min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )
CCS 1 day	5.56 ± 1.46	1.36 ± 0.30
CCS 1 day + TCA	8.22 ± 1.94*	1.88 ± 0.34*
CCS 1 day + TUDCA	5.50 ± 1.41	1.38 ± 0.27
CCS 2 days	5.76 ± 1.62	1.47 ± 0.42
CCS 2 days + TCA	9.36 ± 2.23#	2.48 ± 0.52#
CCS 2 days + TUDCA	5.68 ± 1.54	1.45 ± 0.37

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 2 and text. \*,  $P < 0.05$  vs. CCS 1 day; m,  $P < 0.05$  vs. CCS 2 days; #,  $P < 0.05$  vs. CCS 2 days.

## 고 찰

임상적 및 병리학적으로 담즙을체를 주소견으로 하는 간담도 질환으로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙을체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관 협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관수술 후 및 담낭절제 후의 총담관 협착증, 간의 담도폐쇄증, 담관암 및 간세포암의 총담관 침범으로 인한 담관폐쇄증, 췌장 질환 및 총담관 주변 림프질의 종대로 인한 총담관의 외압성 폐쇄증, 기생충으로 인한 담관폐쇄증, 약물 또는 임신으로 인한 담관폐쇄증, 양성 재발성 담즙을체 등을 들 수 있다[19,25,26]. 이러한 담즙을체성 간담도 질환 시 담즙을체의 시간이 경과하면 간조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타남[27]과 동시에 간세포는 기능 장애가 초래되며[25,26] 이때 담즙을체간에서는 각종 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 특히 쥐를 사용하여 담즙을체간을 만드는 모델 실험에서 그 활성도가 증가되는 간 효소들의 활성도 변동 기전에 대해서 현재까지 알려져 있는 것은 다음과 같다. 즉, arylesterase[1], carboxylesterase[28], cholinesterase[8], alcohol dehydrogenase, catalase[4], 및 thiosulfate sulfurtransferase[6]는 담즙을체간에서 그 활성도가 감소되며 그 기전은 담즙을체로 간세포 내에 증가된 TCA가 효소 단백질 합성을 억제시켜 이들 효소의 합성을 억제시킨다는 것이고 alkaline phosphatase[7], 5'-nucleotidase[29],  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase[2], 마이크로솜 ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase[4], benzoyltransferase[30], arylamine N-methyltransferase[3], thiol methyltransferase[5], cathepsin B, cathepsin D 및 acid phosphatase[10]는 담즙을체간에서 그 활성도가 증가되며 그 기전은 담즙을체로 간세포 내에 증가된 TCA가 효소 단백질 합성을 자극시켜 이들 효소의 합성을 촉진시킨다는 것이다.

Park과 Kwak[18]은 쥐를 모델로 한 실험에서 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase 활성도가 총담관결찰술 후의 담즙을체간과 혈청에서 모두 증가되었다고

하였고, Kim 등[17]은 쥐를 모델로 한 실험에서 총담관결찰술 후의 담즙을체간에서는 라이소솜  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도가 증가되었다고 하였으며 혈청에서는 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도가 증가되었다고 하였다. 그러나 이번 실험에서 총담관 대정맥문합만 시행한 간에서는 이들 효소의 활성도는 변동이 없었다. 이 현상은 간에 담즙을체의 정도가 미약해서 나타난 결과가 아닌가 생각된다. Park 등[19]은 쥐를 사용한 실험에서 총담관 결찰 후 혈청에 TCA를 주입한 결과 간 라이소솜에서  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase, 혈청에서 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와 총  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도가 모두 증가되었으며, 이 결과는 TCA가 간에서 이들 효소의 합성을 자극하고 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 다르다면 이들 효소 활성도에 미치는 영향도 달라지는가를 알기 위하여 담즙을체간에서 효소들의 합성에 영향을 주지 않으며[2,3,7] 담즙산의 간 독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA[7,31,32]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 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로 보아 담즙을체시 TCA는 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 합성을 자극한다고 확신할 수 있었으며, 이런 결과는 담즙을체로 손상을 받은 간세포를 자가분해시키기 위해 일어난 하나의 현상이라는 Park 등[19]의 생각을 더욱 뒷받침 해주는 결과라 생각된다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와 총  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도가 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로 보아

담즙울체 시 간세포 내에 TCA가 부하되면 혈청에서는 간에서 유래된  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도가 증가된다는 것을 알수 있었으며 그 증가의 원인은 담즙울체 시 TCA가 간세포막을 용해시켜 간 세포의 라이소솜 내에 있던 이들 효소를 혈중으로 다량 유출시킨 것이라 생각된다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간의 라이소솜에서 이 실험에서 측정된 효소들의 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 이 실험에서 관찰한 라이소솜 효소들의 유전자 발현에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다.

이상 실험의 결과들과 문헌상의 지견을 볼 때 담즙울체간에서 활성도가 증가되는 라이소솜의  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도 증가는 담즙산 중 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 자극되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체시 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와 총  $\beta$ -D-glucuronidase의 혈중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이들 효소가 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

## 요 약

담즙울체간의 라이소솜에서 활성도가 증가되는  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도 증가 기전의 일부를 알아내기 위하여 쥐에게 총담관-대정맥 문합을 시킨 직후 TCA 또는 TUDCA를 상대정맥 내에 주입시킨 다음 경시적으로 혈청과 간에서 이들 효소의 활성도를 측정하여 이들 효소에 대한 담즙산의 효과를 알아보았다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청과 간의 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase 활성도는 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 TCA 대신 TUDCA를 주입시켰을 때는 이들 효소의 활성도가 대조군과 별 차이가 없었다.

이상의 결과를 보아 담즙울체간에서 라이소솜  $\alpha$ -D-glucosidase와  $\beta$ -D-glucuronidase의 활성도 증가는 담즙산들 중 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 자극되어 나타난 결과로 생각되며 담즙울체시 이들 효소의 혈중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간세포막의 투과성이 항진되어 이들 효소가 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver arylesterase. *Korean J Hepatol* 1997;3:154-69.
2. Kim SK, Kim YH. Induction of rat liver  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase by bile acid load. *Korean J Hepatol* 1997;3:210-26.
3. Rhee BW, Kwak CS. Induction of hepatic arylamine N-methyltransferase by a taurocholate load in rats. *J Korean Surg Soc* 2000;59:141-53.
4. Kim YH, Shin MJ. Effects of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Exp Mol Med* 2002;34:123-30.
5. 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.
6. Rhee BW, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on liver and serum thiosulfate sulfurtransferase activities in cholestatic rat. *J Korean Surg Soc* 2004;66:359-66.
7. 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.
8. Park SK, Kwak CS. Repression of rat hepatic cholinesterase by bile acid load. *Keimyung Med J* 1999;18:204-17.
9. 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**:536-42.
10. 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**:429-34.
  11. Jeffrey PL, Brown DH, Brown BI. Studies of lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase. I. Purification and properties of the rat liver enzymes. *Biochemistry* 1970;**9**:1401-15.
  12. Dissous C, Ansart JF, Cheron A, Kremble J. Purification of rat liver lysosomal  $\alpha$ -glucosidase. *Anal Biochem* 1981;**116**:35-9.
  13. Webb EC. Enzyme Nomenclature. IUBMB. New York: Academic Press; 1992,p.348-50.
  14. Stahl PD, Fishman WH.  $\beta$ -D-Glucuronidase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M, editors. *Method of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chime GmbH; 1984, Vol IV,p.246-56.
  15. Takagaki K, Nakamura T, Majima M, Endo M. Isolation and characterization of a chondroitin sulfate-degrading endo- $\beta$ -glucuronidase from rabbit liver. *J Biol Chem* 1988;**263**:7000-6.
  16. Contractor SF, Shane B. Purification and characterization of lysosomal  $\beta$ -glucuronidase from human placenta. *Biochem J* 1972;**128**:11-8.
  17. Kim YH, Ihm JS, Kwak CS. Effect of common bile duct ligation on serum and liver  $\beta$ -D-glucuronidase activities in ethanol intoxicated rats. *Keimyung Univ Med J* 1992;**11**:404-17.
  18. Park EM, Kwak CS.  $\alpha$ -D-Glucosidase,  $\beta$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *Keimyung Univ Med J* 1992;**11**:59-71.
  19. Park SK, Kim YH, Kwak CS. Effect of intravenous administration of taurocholate on liver lysosomal  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats with extrahepatic cholestasis. *Keimyung Univ Med J* 2002;**21**:91-9.
  20. Ben-Yoseph Y, Nadler HL. Pitfalls in the use of artificial substrates for the diagnosis of Gaucher's disease. *J Clin Pathol* 1978;**31**:1091-3.
  21. Graham J. Isolation of subcellular organelles and membranes. In: Rickwood D, editor. *Centrifugation, a Practical Approach*. 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1984, p.161-82.
  22. Fishman WH, Kato K, Anstiss CL, Green S. Human serum beta-glucuronidase: its measurement and some of its properties. *Clin Chim Acta* 1967;**15**:435-47.
  23. Greenberg DM, Rothstein M. Method for isolation and degradation of labelled compounds. In: Colowick SP, Kaplan NO. editors. *Method in Enzymology*. New York: Academic Press; 1957, Vol 4, p.708-31.
  24. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;**177**:751-66.
  25. Halsted JA. *The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application*. London: Saunders; 1976, p.426-9.
  26. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver Biliary System*. 11th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2002, p.219-398.
  27. Desmet VJ. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC, editors. *Pathology of the Liver*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994, p.425-76.
  28. Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver carboxylesterase. *Keimyung Med J* 1998;**17**:487-503.
  29. Kim SK, Kim YH, Kwak CS. Induction of cholestatic rat liver 5'-nucleotidase by taurocholic acid load. *Keimyung Med J* 2001;**20**:129-39.
  30. Kim IK, Kim YH, Kwak CS. Induction of hepatic benzoyltransferase by bile acid in rats. *Keimyung Med J* 2001;**20**:20-30.
  31. Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chretien Y, Ballet

- F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary billiary cirrhosis? *Lancet* 1987;**1**:834-6.
32. 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**:203-11.