

## The Effects of Extrahepatic Cholestasis on Serum $\alpha$ -D-Mannosidase Isozyme Activities in Ethanol Intoxicated Rats

Si-Woo Bae<sup>†</sup>, Chun-Sik Kwak and Chong-Guk Yoon\*

Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Taegu, 700-712, Korea,

\*Department of Public Health, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

Serum  $\alpha$ -D-mannosidase isozyme activities were measured in rats with ethanol intoxication combined with extrahepatic cholestasis induced by common bile duct ligation for the manifestation of the biochemical background of drinking hazards under the hepatobiliary disease. When chronic ethanol intoxication was combined with extrahepatic cholestasis, the activities of the rat's serum cytosolic, lysosomal and Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase isozymes increased at a more significant rate than those of the cholestasis alone. However, when acute ethanol intoxication was combined with extrahepatic cholestasis, the activities of the above isozymes were seen in the cholestasis alone. The results suggested that the elevated activities of these isozymes in chronic ethanol intoxication with cholestasis rather than in cholestasis alone were indications of increased hepatic damages, which caused these isozymes to leak into the blood in great quantity. Accordingly, the resulting data supported the fact that alcoholic drinks were enzymologically harmful to the hepatobiliary disease.

**Key Words:** Common bile duct ligation, Ethanol intoxication, Extrahepatic cholestasis,  $\alpha$ -D-Mannosidase

### 서 론

장기간 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증이 초래<sup>6,32,37</sup>될 수 있고 이때 간세포는 심한 형태학적 변화를 받는다<sup>4-6</sup>. 주정(에탄올) 중독시에는 간에서 형태학적 변화가 관찰될 뿐만 아니라 대사성 변화도 야기되는 것<sup>9,30</sup>으로 알려져 있다. 간의 배설기능 장애로 간조직에 담즙울체가 야기되면 간조직은 형태학적 변화<sup>7,13,24</sup>가 나타남과 동시에 심한 물질대사의 변동도 초래되고<sup>19,21,25,31,35</sup> 이때 혈중에서는 수 많은 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.  $\alpha$ -D-mannosidase ( $\alpha$ -D-mannoside monohydrolase, EC 3.2.1.24)는 아이소자임이며 주로 포유동물 간의 세포질, 라이소좀, 내형질세망 및 골지체에 분포되어 있으며<sup>1,10,12,27,33,36</sup>, 과당질의 말단 비환원 위치의  $\alpha$ -D-mannosyl기를 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소이다<sup>12,26,34</sup>. 특히 내형질세망과 골지체에 존재하는  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임은 당단백질에 결합되어 있는 아스파라진 연계 과당질의 합성중 수정 과정에 관여하는 것

<sup>2,26,34</sup>으로 알려져 있다.

이와 같은  $\alpha$ -D-mannosidase들은 간조직에 그 함유량이 많을 뿐만 아니라 특히 담즙울체 간과 담즙울체시 혈청에서 그 활성도의 변동이 심하다<sup>28</sup>고 한다. 따라서 혈청의  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임은 주정 중독과 담즙울체로 인한 간 손상이 병행되었을 때는 더욱 심한 활성도 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 찾아볼 수 없었다.

일반적으로 간담도 질환시 음주는 해롭다고 하며 이 사실은 주정 중독으로 인한 간질환의 유발<sup>6,32,37</sup>과 간세포의 형태 및 생화학적 변화로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 그러나 아직도 그 생화학적 뒷받침은 분명치 않다.

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로운 점에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 만성 주정 중독을 시킨 쥐에게 간외성 담즙울체 (extrahepatic cholestasis)를 야기시키거나 간외성 담즙울체가 진행되는 쥐에게 급성 주정 중독을 시킨 후 혈청의 세포질성, 라이소좀 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임의 활성도를 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시 약

4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside, 4-nitrophenol, sodium ca-

\* 논문 접수: 2002년 10월 31일

수정재접수: 2002년 11월 13일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 배시우, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 생화학교실

Tel: 053-250-7463, Fax: 053-250-7461

e-mail: siwoo56@orgio.net

codylate trihydrate, bovine serum albumin, glycine, cobalt chloride, Triton X-100,  $\alpha$ -D-mannosidase (from *Turbo comutus*, M 0893) 및 단백결표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사 (St. Louis, 미국)의 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

## 2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g 되는 Sprague-Dawley종의 수컷을 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 나누었다. 즉 정상군 (1군), 총담관 결찰 (common bile duct ligation) 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 총담관 결찰군 (총 5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 가수술군 (총 5군), Eagon 등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 5% (v/v) 에탄올을 60일간 섭취시킨 후 희생시킨 만성 주정 중독군 (1군), 5% (v/v) 에탄올을 60일간 섭취시킨 후 계속 5% (v/v) 에탄올을 섭취시키면서 총담관 결찰 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 만성 주정 중독 후 총담관 결찰을 한 군 (총 5군), 5% (v/v) 에탄올을 섭취시키면서 가수술을 한 후 1일, 2일, 3일, 7일 및 14일에 각각 희생시킨 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 (총 5군), Liu 등<sup>23)</sup>의 방법에 따라 체중 kg 당 4 g의 에탄올을 경구 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 희생시킨 급성 주정 중독군 (총 2군), 총담관 결찰 14일 후 체중 kg 당 4 g의 에탄올을 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 희생시킨 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군 (총 2군)이다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료주식회사의 실험 동물 사료를 먹게 하였다.

만성 주정 중독군, 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 만성 주정 중독 후 총담관 결찰을 한 군에서는 물 대신 5% (v/v) 에탄올용액<sup>9)</sup>을 자유로이 먹게 하였다. 급성 주정 중독은 쥐 체중 kg 당 4 g의 에탄올이 투여되도록 25% (v/v) 에탄올용액<sup>23)</sup>을 조제하여 1회 경구 투여하였다.

총담관 결찰술, 가수술 및 간 적출술은 효소 활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 실시하였다.

간외성 담즙을 채취하기 위한 수술인 총담관의 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄 상태를 확인하였다. 가수술은 단순 개복술만 시행하였다.

모든 실험군에서 채혈은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 개복한 쥐의 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소

활성도를 측정하였다.

## 3. 효소 활성도 측정

혈청의 세포질성  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 6.2 (0.5 M cacodylate buffer, pH 6.2), 37°C 조건에서 20분간 반응하여 생성된 4-nitrophenol을 400 nm 파장에서 비색정량하는 Shoup와 Touster<sup>33)</sup>의 방법에 의하였으며 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 4.5 (0.5 M acetate buffer, pH 4.5), 37°C 조건에서 10분간 반응하는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 400 nm에서 비색정량하는 Opheim과 Touster<sup>27)</sup> 법에 의하였다. 혈청의 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 5.5 (0.5 M acetate buffer, pH 5.5), 37°C 조건에서 30분간 반응하는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 비색정량하는 Tulsiani 등<sup>36)</sup>의 방법에 의하였다. 이들 혈청의  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도의 단위는 1분간에 1 ml의 혈청이 반응하여 생성한 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

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

## 4. 성적 검증

유의성 검증은 Student's t-test로 하였다.

## 결 과

### 1. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 세포질성 $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 세포질성  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 만성 주정 중독군 (결과 Table에서 Ethanol), 가수술군 (결과 Table에서 Sham) 및 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 (결과 Table에서 Ethanol + Sham) 등에서는 변동을 나타내지 않았다. 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 CBDL)과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 Ethanol + CBDL)의 혈청에서는 이 효소의 활성도가 대조군인 가수술군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 총담관 결찰 후 1일부터 7일까지 현저한 증가를 나타내었다. 즉 이 효소의 활성도가 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 수술 후 1일에는 약 123% ( $P < 0.01$ ), 2일에는 약 141% ( $P < 0.01$ ), 3일에는 약 186% ( $P < 0.01$ ), 7일에는 약 101% ( $P < 0.05$ ), 14일에는 약 45% 증가를 나타내었으며 만성 주정 중독 후

**Table 1.** Effect of common bile duct ligation on serum cytosolic  $\alpha$ -D-mannosidase isozyme activities in chronic ethanol intoxicated rats

| Day (s) following operation | $\alpha$ -D-mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ) |                        |                |                          |
|-----------------------------|---|------------------------|----------------|--------------------------|
|                             | (Normal; 3.37±1.60, Ethanol; 3.26±1.63)   |                        |                |                          |
|                             | Sham  | CBDL                   | Ethanol + Sham | Ethanol + CBDL           |
| 1                           | 3.38±1.72   | 7.54±1.87 <sup>b</sup> | 3.32±1.68      | 10.67±2.32 <sup>fg</sup> |
| 2                           | 3.36±1.64   | 8.09±2.38 <sup>b</sup> | 3.29±1.74      | 12.69±3.10 <sup>fg</sup> |
| 3                           | 3.40±1.70   | 9.73±3.07 <sup>b</sup> | 3.31±1.72      | 16.03±4.13 <sup>fg</sup> |
| 7                           | 3.38±1.67   | 6.80±2.40 <sup>a</sup> | 3.33±1.66      | 8.21±2.82 <sup>d</sup>   |
| 14                          | 3.37±1.69   | 4.92±2.51              | 3.35±1.70      | 6.14±2.48                |

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group; Sham: Sham operated rats, CBDL: Common bile duct ligated rats, Ethanol: Rats were given 5% (v/v) ethanol solution for 60 days. a,  $P<0.05$  vs. Sham; b,  $P<0.01$  vs. Sham; d,  $P<0.05$  vs. Ethanol + Sham; f,  $P<0.001$  vs. Ethanol + Sham; g,  $P<0.05$  vs. CBDL.

**Table 2.** Effect of common bile duct ligation on serum lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase isozyme activities in chronic ethanol intoxicated rats

| Day (s) following operation | $\alpha$ -D-mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ) |                          |                |                           |
|-----------------------------|---|--------------------------|----------------|---------------------------|
|                             | (Normal; 22.22±3.45, Ethanol; 21.69±3.58)   |                          |                |                           |
|                             | Sham  | CBDL                     | Ethanol + Sham | Ethanol + CBDL            |
| 1                           | 22.24±3.72  | 44.14± 9.24 <sup>b</sup> | 21.52±3.63     | 63.47±11.13 <sup>fg</sup> |
| 2                           | 22.30±3.84  | 47.08±12.48 <sup>b</sup> | 21.36±3.69     | 69.18±13.26 <sup>fg</sup> |
| 3                           | 22.36±3.92  | 51.34±10.29 <sup>c</sup> | 20.58±3.66     | 86.57±15.34 <sup>fh</sup> |
| 7                           | 22.41±3.63  | 52.50± 9.87 <sup>c</sup> | 19.43±3.57     | 73.46±12.77 <sup>fg</sup> |
| 14                          | 22.28±3.58  | 56.69± 8.23 <sup>c</sup> | 19.16±3.55     | 71.85±11.86 <sup>fg</sup> |

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. b,  $P<0.01$  vs. Sham; c,  $P<0.001$  vs. Sham; f,  $P<0.001$  vs. Ethanol + Sham; g,  $P<0.05$  vs. CBDL; h,  $P<0.01$ . CBDL.

총담관을 결찰한 군에서도 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술군을 한 군보다 수술 후 1일에는 약 221% ( $P<0.001$ ), 2일에는 약 286% ( $P<0.001$ ), 3일에는 약 384% ( $P<0.001$ ), 7일에는 약 147% ( $P<0.05$ ), 14일에는 약 83%의 증가를 나타내었다. 쥐 혈청의 이 효소 활성도를 총담관 결찰군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군을 비교했을 때는 총담관만 결찰한 군보다 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 실험 전기간 동안 더 현저한 활성도 증가를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 1일에는 약 42% ( $P<0.05$ ), 2일에는 약 57% ( $P<0.05$ ), 3일에는 약 65% ( $P<0.05$ ), 7일에는 21%, 14일에는 약 25% 활성도가 더 높았다 (Table 1).

## 2. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 라이소좀 $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 만성 주정 중독군, 가수술군 및 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 등에서는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았

다. 쥐 혈청의 이 효소의 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 총담관 결찰 후 1일에는 약 98% ( $P<0.01$ ), 2일에는 약 111% ( $P<0.01$ ), 3일에는 약 130% ( $P<0.001$ ), 7일에는 약 134% ( $P<0.001$ ), 14일에는 약 154% ( $P<0.001$ )의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도가 총담관 결찰 후 1일에는 약 195% ( $P<0.001$ ), 2일에는 약 224% ( $P<0.001$ ), 3일에는 약 321% ( $P<0.001$ ), 7일에는 약 278% ( $P<0.001$ ), 14일에는 약 275% ( $P<0.001$ )의 증가를 나타내었다. 이 효소의 활성도를 총담관 결찰군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 실험 전기간 동안 이 효소의 활성도가 더 현저한 증가를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 1일에는 약 44% ( $P<0.05$ ), 2일에는 약 47% ( $P<0.05$ ), 3일에는 약 69% ( $P<0.01$ ), 7일에는 약 40% ( $P<0.05$ ), 14일에는 약 27% ( $P<0.05$ ) 활성도가 더 높았다 (Table 2).

**Table 3.** Effect of common bile duct ligation on serum Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase isozyme activities in chronic ethanol intoxicated rats

| Day (s) following operation | $\alpha$ -D-mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ) |                        |                |                         |
|-----------------------------|---|------------------------|----------------|-------------------------|
|                             | (Normal; 2.21±0.71, Ethanol; 2.09±0.73)   |                        |                |                         |
|                             | Sham  | CBDL                   | Ethanol + Sham | Ethanol + CBDL          |
| 1                           | 2.18±0.78   | 4.14±1.24 <sup>a</sup> | 2.02±0.74      | 5.38±1.32 <sup>e</sup>  |
| 2                           | 2.20±0.82   | 4.60±1.90 <sup>a</sup> | 2.06±0.76      | 7.42±1.86 <sup>fg</sup> |
| 3                           | 2.16±0.85   | 4.79±1.92 <sup>a</sup> | 2.14±0.83      | 8.96±2.25 <sup>fg</sup> |
| 7                           | 2.15±0.74   | 4.51±1.81 <sup>a</sup> | 2.13±0.79      | 5.83±1.96 <sup>e</sup>  |
| 14                          | 2.12±0.77   | 4.16±1.52 <sup>a</sup> | 2.14±0.81      | 4.52±1.77 <sup>d</sup>  |

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. a,  $P<0.05$  vs. Sham; d,  $P<0.05$  vs. Ethanol + Sham; e,  $P<0.01$  vs. Ethanol + Sham; f,  $P<0.001$  vs. Ethanol + Sham; g,  $P<0.05$  vs. CBDL.

**Table 4.** Effect of common bile duct ligation on serum cytosolic, lysosomal and Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase isozyme activities in acute ethanol intoxicated rats

| $\alpha$ -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ) |                         |                 |                                |                |                               |
|---|-------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------|-------------------------------|
| Normal  | CBDL 14 days            | Ethanol 1.5 hrs | CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs | Ethanol 24 hrs | CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs |
| (Cytosol)   |                         |                 |                                |                |                               |
| 3.37±1.60   | 4.92±2.51               | 3.34±1.62       | 5.22±2.67                      | 3.32±1.71      | 5.62±2.84                     |
| (Lysosome)  |                         |                 |                                |                |                               |
| 22.22±3.45  | 57.69±8.23 <sup>l</sup> | 24.93±3.56      | 58.53±8.63 <sup>lp</sup>       | 25.30±3.64     | 62.52±9.21 <sup>ls</sup>      |
| (Golgi apparatus)   |                         |                 |                                |                |                               |
| 2.21±0.71   | 4.16±1.52 <sup>j</sup>  | 2.18±0.67       | 4.28±1.64 <sup>jn</sup>        | 2.31±0.82      | 4.32±1.58 <sup>jq</sup>       |

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group; CBDL 14 days: The rats were sacrificed at 14th day after common bile duct ligation. Ethanol 1.5 hrs or 24 hrs: The rats were sacrificed at the 1.5 hours or 24 hours after acute ethanol intoxication (16 ml of 25% (v/v) ethanol solution per kg of body weight was oral administration). j,  $P<0.05$  vs. Normal; l,  $P<0.001$  vs. Normal; n,  $P<0.05$  vs. Ethanol 1.5 hrs; p,  $P<0.001$  vs. Ethanol 1.5 hrs; q,  $P<0.05$  vs. Ethanol 24 hrs; s,  $P<0.001$  vs. Ethanol 24 hrs.

### 3. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 골지 $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 만성 주정 중독군, 가수술군 및 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 등에서는 유의한 변동을 나타내지 않았다. 쥐 혈청의 이 효소 활성도는 정상쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 총담관 결찰 후 1일에는 약 90% ( $P<0.05$ ), 2일에는 약 109% ( $P<0.05$ ), 3일에는 약 122% ( $P<0.05$ ), 7일에는 약 110% ( $P<0.05$ ), 14일에는 약 96% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도가 총담관 결찰 후 1일에는 약 166% ( $P<0.01$ ), 2일에는 약 260% ( $P<0.001$ ), 3일에는 약 319% ( $P<0.001$ ), 7일에는 약 174% ( $P<0.01$ ), 14일에는 약 111% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다. 이 효소의 활성도를 총담관 결찰군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중

독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 수술 후 1일부터 7일까지 이 효소의 활성도가 더 현저한 증가를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 1일에는 약 30%, 2일에는 약 61% ( $P<0.05$ ), 3일에는 약 87% ( $P<0.05$ ), 7일에는 약 29% 활성도가 더 높았다 (Table 3).

### 4. 총담관을 결찰한 쥐에서 급성 주정 중독이 혈청의 세포질성, 라이소좀 및 골지 $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임의 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 세포질성  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 총담관을 결찰하고 14일 경과한 군 (결과 Table에서 CBDL 14 days)이나 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs 및 CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs) 모두 그 대조군인 정상군이나 급성 주정 중독만 시킨 군 (결과 Table에서 Ethanol 1.5 hrs 및 Ethanol 24 hrs)에 비해 증가되었다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다.

쥐 혈청의 라이소솜 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 총담관을 결찰하고 14일 경과한 군이나 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시킨 군 모두 그 대조군인 정상군이나 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 이 효소 활성도를 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독 시킨 군과 총담관 결찰 후 14일 경과한 군을 비교 했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다 (Table 4).

## 고 찰

주정 중독시에는 간세포가 심한 형태학적 변화를 받는다 고 하며 그 변화는 주로 간세포의 미토콘드리아와 내형질세 망에서 관찰되며 미토콘드리아에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 능선의 배열문란 등<sup>4-6)</sup>이고 내형질세망에서 나타나는 변화는 평활 내형질세망의 증식<sup>4-6)</sup>을 들 수 있다. 이외에도 Mallory 소체의 증식<sup>4-6)</sup>과 간세포 괴사를 수반하는 형태학적 변화<sup>6)</sup>도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 락트산의 생산 증가, 피아루브산의 생성 감소, 지방산의 합성 촉진, 시트르산 회로의 활성 저하 및 지방산의 산화 감소 등<sup>9,30)</sup>을 들 수 있다.

간조직에 담즙울체가 야기되는 경우는 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄 등<sup>11)</sup>이며 이와 같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등<sup>7)</sup>이 나타날 뿐만 아니라 심한 간기능의 장애도 나타난다<sup>11,31)</sup>.

쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체 간은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며<sup>13,24)</sup> 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것<sup>18-21,25,29,35)</sup>으로 알려져 있다. 따라서 간담도 질환의 생화학적 연구를 위한 실험적 방법으로 널리 이용하는 것이 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체 간을 만드는 것이다.<sup>18-21,25,35)</sup>

총담관 결찰로 간에 담즙울체가 야기되면 특히 담도계 효소인 alkaline phosphatase<sup>20,29,35)</sup>, 5'-nucleotidase<sup>20,21)</sup>,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase<sup>19,20)</sup> 및 leucine aminopeptidase<sup>18)</sup>는 간세포와 혈청에서 그 활성도가 증가되며, 세포막의 투과성 항진시 혈중으로 누출되는 alanine aminotransferase<sup>14,19)</sup>, aspartate aminotransferase<sup>15,19)</sup> 및 lactate dehydrogenase<sup>21)</sup> 등은 간세포에서는 그 활성도가 감소되고 혈청에서는 그 활성도가 증가된다고 한다. 그리고 세포질성, 라이소솜 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임은 담즙울체시 혈청에서 그 활성도가 증가하는 것<sup>28)</sup>으로 알려져 있다. 이와 같이 담즙울체시 혈청에서 그 활성도가 증가되는 효소들은 주로 세포막의 투과성 항진으로 간 밖으로 누출되어 나타난 결과<sup>19,21)</sup>라고 한다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 에탄올이 아세트 알데하이드로 산화되고 다시 아세트산으로 산화되어 이용<sup>3,22)</sup>되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 아세트 알데하이드는 간세포막의 손상과 간세포의 괴사를 초래하는 물질<sup>31)</sup>로 알려져 있고, 또한 주정 중독시 심한 형태학적 변화가 초래<sup>4,5)</sup>되는 만큼 담즙울체시 주정 중독이 야기된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것이며 따라서 혈청에서  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임들의 활성도 변동도 심해질 것이다.

김여희 등<sup>14-17)</sup>은 쥐에게 급성 및 만성 주정 중독을 시키고 간에 담즙울체를 야기시켰을 때 간조직의 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase 및 leucine aminopeptidase가 혈중으로 다량 누출되었다고 하였다. 그리고 이들 성적은 담즙울체로 인한 간 손상이 주정 중독으로 증폭되어 나타난 결과라 하였다.

이 실험에서 혈청의 세포질성, 라이소솜 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임이 만성 주정 중독시 간에 담즙울체가 있을 때는 담즙울체만 있을 때보다 그 활성도가 증가되었는데 이 현상은 간에서 이들 효소의 합성 증가에 의한 영향이라 보기는 어려우며 오히려 간 손상의 심한 증폭으로 간에서 이들 효소가 혈중으로 다량 누출되어 나타난 결과라 하겠다.

이 실험에서 혈청의 세포질성, 라이소솜 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도를 담즙울체시 급성 주정 중독을 시킨 군과 담즙울체만 시킨 군간에 비교해 보면 상호간에 별 차이가 없었다. 이 현상은 담즙울체시 급성 주정 중독을 시키면 간 손상의 증폭이 경하게 나타난 것이 아닌가 생각된다. 그러나 이 실험만으로 단정하기는 어려우며 이 문제는 앞으로 계속 추구해 보아야 하겠다.

이상의 성적을 보면 혈청의 세포질성, 라이소솜 및 골지  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도가 총담관만 결찰했을 때보다 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰했을 때 더 현저히 증가된 것은 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간 손상이 증폭된다는 것을 나타낸 결과라 생각된다. 특히 담즙울체 간과 주정 중독 간은 괴사가 진행되는 간이며<sup>6,13,24)</sup> 간의 괴사가 진행될 때는 효소들의 누출이 심해진다<sup>14,15,21)</sup>고 알려져 있는 만큼 혈청에서의 이 결과는 주정 중독으로 간 손상이 증폭되어 간에서 이들 효소의 누출이 증가된 것이라 하겠다. 따라서 이 결과는 담즙울체로 간 손상이 있을 때는 음주를 해서는 안 된다는 것을 반영하는 효소학적 자료라 할 수 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bischoff J and Kornfeld R (1983): Evidence for an  $\alpha$ -D-mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol*

- Chem*, **258(13)**: 7907-7910.
- 2) Bischoff J and Kornfeld R (1986): The soluble form of rat liver  $\alpha$ -D-mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane  $\alpha$ -D-mannosidase. *J Biol Chem*, **261(10)**: 4758-4764.
  - 3) Bosron WF and Li TK (1980): Alcohol dehydrogenase, pp. 213-244. In Jakoby WB (ed.), "Enzymatic Basis of Detoxication", Vol. 1. Academic Press, New York.
  - 4) Chang ES (1985): Light and electron microscopic studies of liver biopsies on alcoholic patients. *J Clin Electron Microscopy*, **18(4)**: 331-347.
  - 5) Chang ES (1987): Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn*, **37(2)**: 213-224.
  - 6) Christoffersen P and Poulsen H (1979): Alcoholic liver disease, pp. 232-244. In MacSween RNM, Anthony PP, Sheuer PJ (eds.), "Pathology of the Liver", Churchill Livingstone Inc., New York.
  - 7) Desmet VJ (1979): Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis, pp. 272-305. In MacSween RNM, Anthony PP, Sheuer PJ (eds.), "Pathology of the Liver", Churchill Livingstone Inc., New York.
  - 8) Eagon PK, Willet JE and Seguiti SM (1987): Androgen responsive functions of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenterology*, **93(6)**: 1162-1169.
  - 9) Ellenhom MJ and Barceloux DG (1988): Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, pp. 782-796. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
  - 10) Faber CN and Glew RH (1984):  $\alpha$ -D-mannosidase, pp. 230-240. In Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (eds.), "Method of Enzymatic analysis", 3rd Ed., Vol. IV, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
  - 11) Halsted JA (1976): The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application, pp. 426-429. Saunders Co., London.
  - 12) Kim BK (1984): Enzyme Nomenclature, IUB, pp. 310-311. Academic Press, New York.
  - 13) Kim HS, Park JY, Kim EY, Kwak KS, Choi YH and Chung JM (1989): Morphologic change of hepatocytes induced by common bile duct ligation. *Korean J Intern Med*, **36(4)**: 459-470.
  - 14) Kim YH, Kwak CS and Chung SK (1989): Effect of common bile duct ligation on the serum and liver alanine aminotransferase activities in ethanol intoxicated rats. *The Keimyung Univ Med J*, **8(1)**: 113-121.
  - 15) Kim YH, Kwak CS and Chung SK (1990): Effect of common bile duct ligation on the serum and liver aspartate aminotransferase activities in ethanol intoxicated rats. *The Keimyung Univ Med J*, **9(1)**: 87-95.
  - 16) Kim YH, Lee SK, Kwak CS and Mun KC (1991): Effect of common bile duct ligation on the serum and liver alkaline phosphatase activities in ethanol intoxicated rats. *The Keimyung Univ Med J*, **10(1)**: 18-27.
  - 17) Kim YH, Park EM and Kwak CS (1991): Effect of common bile duct ligation on the serum and liver leucine aminopeptidase activities in ethanol intoxicated rats. *The Keimyung Univ Med J*, **10(2)**: 196-207.
  - 18) Kwak CS (1980): Effect of actinomycin D on serum and hepatic leucine aminopeptidase in common bile duct ligated rats. *Kyungpook Univ Med J*, **21(1)**: 126-134.
  - 19) Kwak CS and Chang UK (1985): Activities of 5'-nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase of cholestatic liver in rats. *The Keimyung Univ Med J*, **4(1)**: 1-27.
  - 20) Kwak CS, Kim YH and Mun KC (1987): 5'-Nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase activities in the cholestatic rat liver plasma membranes, mitochondria and microsomes. *The Keimyung Univ Med J*, **6(1)**: 67-76.
  - 21) Kwak CS and Lee SI (1985): Malate dehydrogenase activity in the cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **4(2)**: 131-137.
  - 22) Lieber CS (1985): Alcohol metabolism, pp.1-24. In Hall P (ed.), "Alcoholic liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects", Edward Arnold Ltd, London.
  - 23) Liu SJ, Ramsey RK and Fallon HJ (1975): Effect of ethanol on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in the rat. *Biochem Pharmacol*, **24(3)**: 369-378.
  - 24) Moritz M and Snodgrass PJ (1972): Serum enzymes derived from liver cell fraction. II. Responses to bile duct ligation in rats. *Gastroenterology*, **62(1)**: 93-100.
  - 25) Mun KC and Kwak CS (1989): Monoamine oxidase activity in cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **8(1)**: 69-77.
  - 26) Murray RK (2000): Glycoprotein, In Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW (eds.), "Harper's Biochemistry", 25th Ed., Appleton & Lange, Stamford.
  - 27) Ophem DJ and Tourster O (1978): Lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase of rat liver, purification and comparison with the Golgi and cytosolic  $\alpha$ -D-mannosidase. *J Biol Chem*, **253(4)**: 1017-1023.
  - 28) Park EM, Mun KC and Kwak CH (1994):  $\alpha$ -D-mannosidase activities in cholestatic rat liver induced by bile duct ligation.

- Korean J Biochem*, **26(4)**: 197-202.
- 29) Righetti ABB and Kaplan MM (1971): Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med*, **136(2)**: 491-495.
- 30) Ritchie JM (1980): The aliphatic alcohols, pp. 376-388. In Gilman AG, Goodman LS, Gilman A (eds.), "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 7th Ed., Macmillan Publishing Co. Inc., New York.
- 31) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp. 1-17. Blackwell Science, Oxford.
- 32) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp. 381-398. Blackwell Science, Oxford.
- 33) Shoup VA and Touster O (1976): Purification and characterization of  $\alpha$ -D-mannosidase of rat liver cytosol. *J Biol Chem*, **251(13)**: 3845-3852.
- 34) Tabas I and Kornfeld S (1979): Purification and characterization of a rat liver Golgi  $\alpha$ -D-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharide. *J Biol Chem*, **254(22)**: 11655-11663.
- 35) Toda G, Ikeda Y, Kako M, Oka H and Oda T (1980): Mechanism of elevation of serum alkaline phosphatase activity in biliary obstruction: An experimental study. *Clin Chim Acta*, **107(1-2)**: 85-96.
- 36) Tulsiani DRP, Opheim DJ and Touster O (1977): Purification and characterization of  $\alpha$ -D-mannosidase from rat liver Golgi membranes. *J Biol Chem*, **252(10)**: 3227-3233.
- 37) Wooddell WJ (1980): Liver disease in alcohol addicted patients, pp. 125-134. In Davidson SV (ed.), "Alcoholism and Health", Aspen System Co., Century Boulevard.
-