

Effects of Extrahepatic Cholestasis on Hepatic α -D-Mannosidase Activity in Chronic Ethanol Intoxicated Rats

Si-Woo Bae[†], 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

Hepatic subcellular α -D-mannosidases activities and its Km and Vmax values were determined in chronic ethanol intoxicated rats with extrahepatic cholestasis induced by common bile duct ligation to manifest the biochemical background of alcohol drinking hazard under the hepatobiliary disease. In case of extrahepatic cholestasis, chronic ethanol intoxication in animals led to the increased activities of liver Golgi and microsomal α -D-mannosidase as well as the Vmax values of these enzymes. However, the difference of Km values on hepatic subcellular enzymes were not found between the experimental groups. Therefore, the results indicate that the liver Golgi and microsomal α -D-mannosidase may be more induced in chronic ethanol intoxication animals in case of cholestasis. Accordingly, the resulting data supported the fact that alcoholic drinks may led to enhancement of the hepatobiliary liver damage.

Key Words: Common bile duct ligation, Ethanol intoxication, Extrahepatic cholestasis, α -D-Mannosidase

서 론

간은 물질대사의 주된 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며³²⁾ 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해한 물질을 생체 변환시켜 배설케 하는 기구를 가짐으로써 생체를 보호하고 있다¹⁴⁾. 그러나 이러한 기능을 가진 간이라 하더라도 장기간 많은 양의 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증 등이 초래될 수 있다^{12,38)}. 간의 배설기능 장애로 간조직에 담즙울체가 야기되면 간조직은 형태학적 변화^{7,16,25)}와 아울러 심한 물질대사의 변동이 초래되며^{20,23,26,32,36)} 이때 간과 혈중에서는 수많은 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려져 있다.

α -D-mannosidase (α -D-mannoside monohydrolase, EC 3.2.1.24)는 아이소자임이며 주로 포유동물 간의 세포질, 라이소좀, 내형질세망 및 골지체에 분포되어 있으며^{2,10,15,28,34,37)} 과당질의 말단 비환원 위치의 α -D-mannosyl기를 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소이다^{15,27,35)}. 특히 내형질세망과 골지체에 존재하는 α -D-mannosidase 아이소자임은 당단백질에 결합되어 있는 아스파라진 연계 과당질의 합성 중 수정과정에 관여하는

것^{32,35)}으로 알려져 있다. 이와 같은 α -D-mannosidase들은 간 조직에 그 함유량이 많을 뿐만 아니라 특히 담즙울체 간과 담즙울체시 혈청에서 그 활성도의 변동이 심하다²⁹⁾고 하며 또한 혈청의 α -D-mannosidase 아이소자임은 만성 주정 중독과 담즙울체로 인한 간 손상이 병행되었을 때는 심한 활성도 증가가 있다¹⁾고 알려져 있다. 따라서 간의 α -D-mannosidase 활성도도 주정 중독시 담즙울체가 야기된다면 심한 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 찾아볼 수 없었다.

이 연구는 간담도 질환시 음주의 유해함에 대한 효소학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 만성 주정 중독을 시킨 쥐와 만성 주정 중독을 시킨 쥐에게 담즙울체를 야기시킨 후 간의 세포질, 라이소좀, 마이크로솜 및 골지 분획에서 α -D-mannosidase의 활성도를 측정하였으며 아울러 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 쥐의 간에서 이 효소들의 Km치와 Vmax치도 함께 측정하여 이들 성적을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시 약

4-Nitrophenyl α -D-mannopyranoside, 4-nitrophenol, sodium cacodylate trihydrate, bovine serum albumin, glycine, cobalt chloride, Triton X-100, α -D-mannosidase (from Turbo cornutus, M 0893) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사

*논문 접수: 2003년 1월 16일

수정 접수: 2003년 1월 31일

[†]별책 요청 저자: 배시우, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 생화학교실

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

e-mail: siwoo56@orgio.net

(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 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 22군으로 나누었다. 즉 정상군 (1군), 총담관 결찰 (common bile duct ligation) 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일에 각각 희생시킨 총담관 결찰군 (총 5군), 단순 개복술 후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일에 각각 희생시킨 가수술군 (총 5군), Eagon 등⁹⁾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, 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) 등이다.

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) 에탄올용액⁹⁾을 자유로이 먹게 하였다.

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

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

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 개복한 쥐의 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시킨 다음 간문맥에 삽관하여 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

3. 시료 조제

적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하였다. 이 간 절편을 약 3 g을 취하여 9배량의 증류수를 넣어 teflon pestle glass homogenizer (chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas사, 미국)로 2~4°C를 유지하

면서 400 rpm의 속도로 5회 왕복 마쇄하여 각각 10% (w/v) 간조직 균질액을 만들었다.

한편 간 절편 약 3 g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣어 위와 같은 방법으로 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었으며 이 간조직 균질액 20 ml를 취하여 sucrose linear density gradient 원심분리법²²⁾으로 세포질과 마이크로솜 분획을 분리하였다.

위의 세포 분획과정에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사 (미국)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 그리고 마이크로솜 및 세포질 분획의 분리에 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사 (미국)의 SS-34 및 T865 rotor였으며 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (model 570, ISCO, 미국)을 사용하여 제조하였다.

라이소좀 α -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 증류수로 제조한 10% (w/v) 간조직 균질액을 105,000 × g에서 1시간 원심분리하여 얻은 상청액^{28,34)}을 사용하였으며 골지 α -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 증류수로 제조한 10% (w/v) 간조직 균질액을 105,000 × g에서 1시간 원심분리하여 얻은 침사에 부피비로 1:1이 되게 0.6% Triton X-100액을 넣어 5분간 진탕한 후 105,000 × g에서 원심분리하여 그 상청액³⁷⁾을 사용하였다.

세포질 α -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 위의 sucrose linear density gradient 원심분리법²²⁾으로 분리한 세포질 분획을 사용하였으며 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 sucrose linear density gradient 원심분리법²²⁾으로 분리한 마이크로솜 분획에 부피비로 1:1이 되게 0.6% Triton X-100액을 넣어 5분간 진탕한 액³⁷⁾을 사용하였다.

4. 효소 활성도 측정

간의 세포질 α -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl α -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 Touster³⁴⁾의 방법에 의하였으며 간의 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도 측정도 세포질 α -D-mannosidase 활성도 측정법과 같은 원리로 측정하는 방법인 Biscoff와 Kornfeld²⁾ 방법에 의하였다.

간의 라이소좀 α -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl α -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 Touster²⁸⁾법에 의하였다. 간의 골지 α -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl α -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 5.5 (0.5 M acetate buffer, pH 5.5), 37°C 조건에서 30분간 반

Table 1. Effect of common bile duct ligation on liver cytosolic α -D-mannosidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day (s) following operation	α -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 8.0±1.14, Ethanol; 8.0±1.10)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	8.1±1.22	7.8±1.25	8.0±1.14	6.7±1.40
2	8.0±1.20	7.4±1.43	7.9±1.15	6.8±1.42
3	8.1±1.18	7.3±1.36	7.8±1.17	6.7±1.47
7	8.1±1.16	7.4±1.40	7.8±1.14	6.6±1.51
14	8.1±1.19	7.1±1.26	7.9±1.20	6.4±1.45

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.

응하는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 비색정량하는 Tulsiani 등³⁷⁾의 방법에 의하였다. 이들 간의 α -D-mannosidase 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사 (미국)의 정제 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 UV spectrophotomer (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 Rothstein¹¹⁾법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법으로 정량하였다.

6. Km치 및 Vmax치의 측정

정상군, 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 군, 만성 주정 중독을 시킨 다음 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 군의 간세포 분획 시료들과 각 효소 기질의 원액과 희석액들을 사용하여 각각 세포질, 라이소솜, 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도를 측정한 후 이들 성적으로부터 1/vi치를 그리고 각 효소 활성도 측정에 사용한 기질액의 기질농도로부터 1/[S]치를 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 Km치와 Vmax치를 산출하였다.

7. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

Table 2. Effect of common bile duct ligation on liver lysosomal α -D-mannosidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day (s) following operation	α -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 2.1±0.22, Ethanol; 2.1±0.24)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	2.2±0.22	1.7±0.28 ^b	1.9±0.21	1.4±0.23 ^e
2	2.1±0.24	1.4±0.23 ^b	2.0±0.22	1.3±0.24 ^e
3	2.2±0.25	1.3±0.20 ^c	2.1±0.23	1.2±0.22 ^f
7	2.2±0.28	1.3±0.24 ^c	2.1±0.26	1.2±0.20 ^f
14	2.2±0.24	1.4±0.18	2.1±0.24	1.2±0.19 ^f

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; e, P<0.01 vs. Ethanol + Sham; f, P<0.001 vs. Ethanol + Sham

결 과

1. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간의 세포질 α -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 간의 세포질 α -D-mannosidase 활성도는 만성 주정 중독군 (결과 Table에서 Ethanol), 가수술군 (결과 Table에서 Sham) 및 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 (결과 Table에서 Ethanol + Sham)에서는 변동을 나타내지 않았다. 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 CBDL)이나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 Ethanol + CBDL)은 다같이 총담관 결찰 후 시간이 경과하면 이 효소의 활성도가 약간 감소되었고 또한 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군을 상호 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 이 효소의 활성도는 약간 감소되었다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다 (Table 1).

2. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 간의 라이소솜 α -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 간의 라이소솜 α -D-mannosidase 활성도는 만성 주정 중독군, 가수술군 및 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 등에서는 변동을 나타내지 않았다. 총담관을 결찰한 군이나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군은 다같이 실험 전기간 동안 그 대조군인 가수술군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 또한 이 효소의 활성도를 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰

Table 3. Effect of common bile duct ligation on liver Golgi α -D-mannosidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day (s) following operation	α -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 2.6±0.23, Ethanol; 2.4±0.23)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	2.7±0.26	3.2±0.45 ^a	2.5±0.24	3.6±0.33 ^f
2	2.7±0.24	3.8±0.41 ^c	2.5±0.25	4.0±0.36 ^f
3	2.7±0.25	3.9±0.56 ^b	2.5±0.26	4.8±0.42 ^{fg}
7	2.6±0.27	4.6±0.62 ^c	2.6±0.24	6.1±0.53 ^{fh}
14	2.6±0.24	4.1±0.58 ^c	2.6±0.27	6.3±0.44 ^{fi}

All values are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Animal group are described in Table 1. a, $P<0.05$ vs. Sham; 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, $P<0.01$ vs. CBDL; i, $P<0.001$ vs. CBDL

Table 4. Effect of common bile duct ligation on liver microsomal α -D-mannosidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day (s) following operation	α -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
	(Normal; 0.6±0.16, Ethanol; 0.5±0.15)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	0.6±0.19	0.8±0.20	0.5±0.17	0.9±0.21 ^d
2	0.6±0.17	0.8±0.22	0.5±0.16	1.1±0.23 ^e
3	0.6±0.20	1.0±0.18 ^a	0.5±0.18	1.6±0.24 ^{fh}
7	0.6±0.19	1.2±0.21 ^b	0.6±0.14	2.2±0.26 ^{fi}
14	0.6±0.18	1.3±0.24 ^c	0.6±0.15	2.3±0.28 ^{fi}

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

Table 5. α -D-Mannosidase kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat liver determined with 4-nitrophenyl α -D-mannopyranoside

Cell fractions	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
	Km (mM)			
Lysosome	14.3±1.42	14.8±1.02	14.5±1.21	14.7±1.13
Golgi apparatus	14.8±0.75	15.2±1.15	14.6±0.98	14.9±1.10
Microsome	6.5±0.28	6.3±0.31	6.5±0.35	6.4±0.33
	Vmax (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
Lysosome	2.5±0.35	1.5±0.27 ^c	2.4±0.33	1.4±0.24 ^f
Golgi apparatus	3.9±0.36	5.7±0.49 ^c	3.8±0.32	7.5±0.55 ^{fi}
Microsome	0.8±0.16	1.5±0.19 ^c	0.7±0.15	2.5±0.25 ^{fi}

Michaelis-Menten constants for α -D-mannosidase were determined using 4-nitrophenyl α -D-mannopyranoside at 37°C for lysosome, Golgi apparatus and microsomal fractions of male rat's livers at the 14th day after operation. The data are expressed as mean±SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 1. c, $P<0.001$ vs. Sham; f, $P<0.001$ vs. Ethanol + Sham; i, $P<0.001$ vs. CBDL

한 군보다 약간 감소되었다. 그러나 통계학적 유의성은 없었다 (Table 2).

3. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도는 만성 주정 중독군, 가수술군 및 만성 주정 중독 후 가수술군을 한 군 등에서는 변동을 나타내지 않았다.

총담관을 결찰한 군이나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군은 다같이 실험 전기간 동안 그 대조군인 가수술군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이들 효소의 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 또한 이들 효소의 활성도를 총담관을 결찰한 군과 만성 주정 중독

후 총담관을 결찰한 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군에 비해 총담관 결찰 후 3일부터 14일까지 더욱 현저한 증가를 나타내었다 (Table 3 및 4).

4. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 간의 라이소솜, 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Km치 및 Vmax치의 변동

만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰한 후 14일의 담즙을 채 간에서 라이소솜, 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Km치를 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 및 총담관만 결찰한 군과 각각 비교했을 때 별 차이가 없었다. 그러나 총담관만 결찰하고 14일 경과시킨 군과 만성 주정 중

독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과시킨 군에서 이들 분획의 α -D-mannosidase의 Vmax치는 각각 그 대조군인 가수술군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 통계학적으로 유의한 변동을 나타내었다. 즉 라이소솜 α -D-mannosidase의 Vmax치는 총담관만 결찰하고 14일 경과시킨 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과시킨 군이 각각 그 대조군인 가수술군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이들 군에서 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Vmax치는 그 대조군에 비해 현저한 증가를 나타내었다. 또한 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Vmax치를 총담관을 결찰하고 14일 경과시킨 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과시킨 군을 비교했을 때는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과시킨 군이 총담관만 결찰한 군에 비해 더 현저한 증가를 나타내었다 (Table 5).

고 찰

주정은 극성 유기 용매로서 음주 후 주로 간에서 대사되며 일정 농도 이상에서는 단백질을 변성시킬 수 있다⁹. 장기간 음주를 했을 때는 지방간, 간염, 간경변증 등^{12,33,38}의 병변이 야기될 수 있으며 이때 간세포는 심한 형태학적 변화를 받는다^{5,6,12}. 이러한 변화는 주로 간세포의 미토콘드리아와 내형질세망에서 관찰되며 미토콘드리아에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 능선의 배열문란 등^{5,6,31}이고 내형질세망에서 나타나는 변화는 평활 내형질세망의 증식^{5,6,31}을 들 수 있다. 이외에도 Mallory 소체의 증식^{5,6,31}과 간세포 피사를 수반하는 형태학적 변화³¹도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 락트산의 생산 증가, 파이프루브산의 생성 감소, 지방산의 합성 촉진, 시트르산 회로의 활성 저하 및 지방산의 산화 감소 등^{9,31}을 들 수 있다.

간조직에 담즙울체가 야기되는 경우는 원발성 담즙성 간경변증, 담관염, 담즙울체형 간염, 선천성 담도폐쇄, 종양이나 담석에 의한 담도폐쇄 등¹³이며 이와 같은 간담도 질환으로 간에 담즙울체가 야기되면 간조직은 피사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화 등⁷이 나타날 뿐만 아니라 심한 간기능의 장애도 나타난다^{13,32}.

쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체 간은 피사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며^{16,25} 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것^{19-21,23,26,30,36}으로 알려져 있다. 따라서 간담도 질환의 생화학적 연구를 위한 실험적 방법으로 널리 이용하는 것이 총담관을 결찰하여 담즙울체 간을 만드는 것이다^{19-21,23,26,36}.

총담관 결찰로 간에 담즙울체가 야기되면 특히 담도계

효소인 alkaline phosphatase^{21,30,36}, 5'-nucleotidase^{21,23}, γ -glutamyl transpeptidase^{20,21} 및 leucine aminopeptidase¹⁹는 간세포와 혈청에서 그 활성도가 증가되며, 세포막의 투과성 항진시 혈중으로 누출되는 alanine aminotransferase^{17,20}, aspartate aminotransferase^{18,20} 및 lactate dehydrogenase²³ 등은 간세포에서는 그 활성도가 감소되고 혈청에서는 그 활성도가 증가된다고 한다. 그리고 세포질, 라이소솜 및 골지 α -D-mannosidase 아이소자임은 담즙울체시 혈청에서 그 활성도가 증가하는 것²⁰으로 알려져 있다. 이와 같이 담즙울체시 혈청에서 그 활성도가 증가되는 효소들은 주로 세포막의 투과성 항진으로 간 밖으로 누출되어 나타난 결과^{20,23}라고 한다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 에탄올이 아세트 알데히드로 산화되고 다시 아세트산으로 산화되어 이용^{4,24}되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 아세트 알데하이드는 간세포 막의 손상과 간세포의 피사를 초래하는 물질³³로 알려져 있고, 또한 주정 중독시 심한 형태학적 변화가 초래^{5,6}되는 만큼 담즙울체시 주정 중독이 야기된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것이며 따라서 간에서 α -D-mannosidase 활성도의 변동도 심해질 것이다.

이 실험에서 쥐에게 만성 주정 중독을 시켰을 때 간의 세포질, 라이소솜, 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이 성적을 볼 때 이들 효소 활성도는 만성 주정 중독시에는 별 영향이 미치지 않는 것으로 생각된다.

이 실험에서 간의 세포질 및 라이소솜 α -D-mannosidase가 만성 주정 중독시 간에 담즙울체가 있을 때는 담즙울체만 있을 때보다 그 활성도가 감소되었는데, 쥐에서 만성 주정 중독시 간에 담즙울체가 있을 때는 담즙울체만 있을 때보다 혈중에서 이들 효소의 활성도가 더욱 현저히 증가한다는 Bac 등¹의 보고를 볼 때 이 현상은 간에서 이들 효소의 합성 감소라 보기는 어려우며 간 손상의 증폭으로 간에서 이들 효소가 혈중으로 누출이 증가되어 나타난 결과가 아닌가 생각된다.

이 실험에서 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도가 간에 담즙울체가 있을 때 통계학적으로 유의하게 증가되었는데 이 성적은 Park 등²⁹의 성적과 일치하였다.

이 실험 성적에서 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군간에 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase 활성도를 비교했을 때 이들 효소의 활성도는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 3일부터 14일까지 더욱 현저한 증가를 나타내었다.

이상의 성적을 볼 때 쥐 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase는 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 그 활성도가 더욱 증가하는 효소로 생

각된다. 한편 이 실험 성적에서 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Km치를 총담관만 결찰한 군의 이들 효소 Km치와 비교했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과시킨 군에서 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase의 Vmax치는 총담관만 결찰한 군의 이들 효소의 Vmax치보다 더욱 증가된치를 나타내었다.

이와 같이 만성 주정 중독시 담즙울체를 야기했을 때 이들 효소의 Km치가 변동이 없으면서도 담즙울체만 시켰을 때보다 그 활성도가 증가되고 또한 Vmax치가 증가된 것은 이들 효소의 활성도 증가가 촉매 효율의 증가라 보기는 어렵다. 따라서 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 이들 효소는 담즙울체만 있을 때보다 그 합성이 증가되는 것으로 생각된다. 그러나 왜 이런 현상이 나타나는지는 이 실험만으로는 추론하기는 어렵다.

이상 이 실험 성적과 문헌상의 지견으로 보아 간의 골지 및 마이크로솜 α -D-mannosidase는 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 증가되는 효소로 생각된다. 따라서 이들 성적은 담즙울체로 간 손상이 있을 때 음주를 하면 간 손상이 더욱 심해질 것이라는 것을 시사해줌과 아울러 이 성적은 담즙울체로 간 손상이 있을 때 음주를 해서는 안된다는 것을 반영하는 효소학적 자료라 할 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Bae SW, Kwak CS and Yoon CG (2002): Effects of extrahepatic cholestasis on serum α -D-mannosidase isozymes activities in ethanol intoxicated rats. *J Biomed Lab Sci*, **8(4)**: 203-209.
- 2) Bischoff J and Kornfeld R (1983): Evidence for an α -D-mannosidase in endoplasmic reticulum of rat liver. *J Biol Chem*, **258(13)**: 7907-7910.
- 3) Bischoff J and Kornfeld R (1986): The soluble form of rat liver α -D-mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane α -D-mannosidase. *J Biol Chem*, **261(10)**: 4758-4764.
- 4) 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.
- 5) Chang ES (1985): Light and electron microscopic studies of liver biopsies on alcoholic patients. *J Clin Electron Microscopy*, **18(4)**: 331-347.
- 6) Chang ES (1987): Ultrastructural morphogenesis of mitochondria in alcoholic liver. *Acta Pathol Jpn*, **37(2)**: 213-224.
- 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, 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) Ellenhorn MJ and Barceloux DG (1988): Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, pp.782-796. Elsevier Science Publishing, New York.
- 10) Faber CN and Glew RH (1984): α -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) Greenberg BA and Perry AL (1957): Method for isolation and degradation of labelled compounds, pp.708-731. In Colowick SP, Kaplan NO (eds): "Method in Enzymology", Academic Press, New York.
- 12) Hall PM (1994): Alcoholic liver disease, pp.317-348. In MacSween RNM, Anthony PP, Sheuer PJ, Burt AD, Portman BC (eds.): "Pathology of the Liver", 3rd Ed., Churchill Livingstone, New York.
- 13) Halsted JA (1976): The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application, pp.426-429. Saunders, London.
- 14) Jakoby WB, Bend JR and Caldwell J (1982): Metabolic Basis of Detoxication, Metabolism of Functional Groups, pp.5-317. Academic Press, New York.
- 15) Kim BK (1984): Enzyme Nomenclature, IUB, pp.310-311. Academic Press, New York.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.

- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Kwak CS and Kwak JS (1986): Cell fractionation method of the rat liver. 1. Isolations of mitochondria and microsomes. *The Keimyung Univ Med J*, **5(1)**: 45-53.
- 23) Kwak CS and Lee SI (1985): Malate dehydrogenase activity in the cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **4(2)**: 131-137.
- 24) Lieber CS (1985): Alcohol metabolism, pp.1-24. In Hall P (ed.), "Alcoholic liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects", Edward Arnold, London.
- 25) 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.
- 26) Mun KC and Kwak CS (1989): Monoamine oxidase activity in cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **8(1)**: 69-77.
- 27) Murray RK (2000): Glycoprotein, pp.675-694. In Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW (eds.), "Harper's Biochemistry", 25th Ed., Appleton & Lange, Stamford.
- 28) Opheim DJ and Touster O (1978): Lysosomal α -D-mannosidase of rat liver, purification and comparison with the Golgi and cytosolic α -D-mannosidase. *J Biol Chem*, **253(4)**: 1017-1023.
- 29) Park EM, Mun KC and Kwak CH (1994): α -D-mannosidase and β -D-mannosidase activities in cholestatic rat liver induced by bile duct ligation. *Korean J Biochem*, **26(4)**: 197-202.
- 30) Righetti ABB and Kaplan MM (1971): Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med*, **136(2)**: 491-495.
- 31) 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, New York.
- 32) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp.1-17. Blackwell Science, Oxford.
- 33) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp.381-398. Blackwell Science, Oxford.
- 34) Shoup VA and Touster O (1976): Purification and characterization of α -D-mannosidase of rat liver cytosol. *J Biol Chem*, **251(13)**: 3845-3852.
- 35) Tabas I and Kornfeld S (1979): Purification and characterization of a rat liver Golgi α -D-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharide. *J Biol Chem*, **254(22)**: 11655-11663.
- 36) 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.
- 37) Tulsiani DRP, Opheim DJ and Touster O (1977): Purification and characterization of α -D-mannosidase from rat liver Golgi membranes. *J Biol Chem*, **252(10)**: 3227-3233.
- 38) Wooddell WJ (1980): Liver disease in alcohol addicted patients, pp.125-134. In Davidson SV (ed.), "Alcoholism and Health", Aspen System, Century Boulevard.