

Effects of Extrahepatic Cholestasis on Liver and Serum β -D-Mannosidase Activities in Ethanol Intoxicated Rats

Si-Woo Bae[†], Chun-Sik Kwak¹ and Chong-Guk Yoon²

¹Department of Biochemistry, Keimyung University School of Medicine, Taegu, 700-712, Korea,

²Department of Public Health, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

Liver and serum β -D-mannosidase activities were determined in ethanol intoxicated rats with extrahepatic cholestasis induced by common bile duct ligation (CBD) to manifest the biochemical background of alcohol drinking hazard under the hepatobiliary disease. Liver β -D-mannosidase activity and its Vmax value in CBD ligated rats with chronic ethanol intoxication were found to be significantly decreased than that in CBD ligation alone. However, the difference of Km value on above hepatic enzyme was not found between the experimental groups. On the other hand, serum β -D-mannosidase activity in CBD ligated rats with chronic ethanol intoxication was increased more than that in CBD ligation alone. These results indicate that the biosynthesis of the hepatic β -D-mannosidase decreases and the serum β -D-mannosidase activity increases in cholestasis combined with chronic ethanol intoxication, reflecting damage of aggravated hepatocytic membrane. 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, β -D-mannosidase

서 론

최근 주류의 소비량이 늘어남에 따라 음주로 인해 야기되는 질병들이 관심의 대상이 되고 있으며, 그 중에서도 주정(에탄올) 대사의 주된 장기인 간에 미치는 주정의 영향이 주목을 받고 있다. 간은 물질대사의 주된 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며³⁴⁾ 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 물질 특히, 유해한 물질을 생체 변환시켜 배설케 하는 기구를 가짐으로써 생체를 보호하고 있다¹⁴⁾. 그러나 이러한 기능을 가진 간이러 하더라도 장기간 많은 양의 음주를 하면 지방간, 간염, 간경변증 등을 초래할 수 있다^{12,38)}.

간의 배설기능 장애로 간조직에 담즙울체가 야기되면 간조직은 형태학적 변화^{8,17,29)}와 아울러 심한 물질대사의 변동이 초래되며^{23,25,30,34,37)} 이때 간과 혈중에서는 수많은 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려져 있다.

일반적으로 간담도 질환시 음주는 해롭다고 하며 이 사실

은 주정 중독으로 인한 간질환의 유발^{12,38)}과 간세포의 형태 및 생화학적 변화로 미루어 볼 때 당연하다고 생각된다. 그러나 아직도 그 생화학적 뒷받침은 충분치 않다.

β -D-Mannosidase (β -D-mannosidase monohydrolase EC 3.2.1.25)는 주로 포유 동물 간의 라이소솜에 분포되어 있으며^{7,15,16,26)} 당단백질에 결합된 과당질의 말단 비환원 위치의 β -D-mannosyl기를 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소이다³⁶⁾. 이 효소는 간조직에 그 함유량이 많은 뿐만 아니라 특히 담즙울체 간과 담즙울체시 혈청에서 그 활성도의 변동이 심하다³¹⁾고 한다. 따라서 간과 혈청의 β -D-mannosidase는 주정 중독과 담즙울체로 인한 간 손상이 병행되었을 때는 더욱 심한 활성 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 간담도 질환시 음주의 해로운 점에 대한 생화학적 배경의 일단을 밝히고자 시행한 실험으로서 급성 및 만성 주정 중독을 시킨 쥐와 만성 주정 중독을 시킨 쥐에게 담즙울체를 야기시키거나 담즙울체가 진행되는 쥐에게 급성 주정 중독을 시킨 후 간과 혈청의 β -D-mannosidase의 활성도를 측정하였으며 아울러 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시킨 쥐와 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 쥐의 간에서 이 효소의 Km값과 Vmax값도 함께 측정하여 이들 성적을 보고하고자 한다.

*논문 접수: 2004년 1월 16일

수정재접수: 2004년 2월 5일

[†]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

재료 및 방법

1. 시 약

4-Nitrophenyl β -D-mannopyranoside, 4-nitrophenol, β -D-mannosidase (Snail, M 9400) 및 단백질 표준액 (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-Dawley 종의 수 쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 총 26군으로 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), Liu 등²⁰⁾의 방법에 따라 체중 kg당 4 g의 에탄올을 경구 투여하고 각각 1.5시간 및 24시간에 희생시킨 급성 주정 중독군 (총 2군), 총담관 결찰 14일 후 체중 kg당 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 물대신 5% (v/v) 에탄올 용액⁹⁾을 자유로이 먹게 하였다. 급성 주정 중독은 흰쥐 체중 kg당 4 g의 에탄올이 투여되도록 25% (v/v) 에탄올 용액을 조제하여 단회 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 담즙을체를 야기시키기 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 간의 적출은 이터 마취하에서 시

행하였으며 개복한 쥐의 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사 시킨 다음 간문맥에 삽관하여 4°C의 0.25 M sucrose 액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose 액을 가능한 한 모두 제거하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

3. 시료 조제

적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하였다. 이 간 절편 약 1 g을 취하여 9배량의 증류수를 넣어 teflon pestle glass homogenizer (chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas사, 미국)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 5회 왕복 마쇄하여 10% (w/v) 간 조직 균질액을 만들었다. 이 간조직 균질액을 β -D-mannosidase 측정용 시료로 사용하였다.

4. 효소 활성도 측정

간과 혈청의 β -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 3.5 (0.25 M acetate buffer, pH 3.5), 37°C 조건에서 1시간 반응시키는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 비색정량하는 Bartholomew와 Perry²⁾의 방법에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질 또는 1 ml 혈청이 반응하여 생성된 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

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

6. Km값 및 Vmax값의 측정

정상군, 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 군, 만성 주정 중독을 시킨 다음 가수술 또는 총담관 결찰술 후 14일 경과한 군, 급성 주정 중독 후 1.5 및 24시간 경과한 군 및 총담관 결찰술 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과한 군의 간 시료와 β -D-mannosidase 측정용 효소 기질 (4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside)의 원액과 희석액들을 사용하여 β -D-mannosidase 활성도를 측정된 후

이들 성적으로부터 $1/v_i$ 값 및 이 효소 활성도 측정에 사용한 기질액의 기질농도로부터 $1/[S]$ 값을 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 작도한 다음 이것으로부터 K_m 값과 V_{max} 값을 산출하였다.

7. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

결 과

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

쥐 간의 β -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) 등에서는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다. 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 CBDL)이나 만성 주정 중독 쥐의 총담관을 결찰한 군 (결과 Table에서 Ethanol + CBDL)은 다같이 총담관 결찰 후 2일부터 14일까지 그 대조군인 가수술군이나 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 이 효소의 활성도는 현저한 증가를 나타내었다. 즉 이 효소의 활성도가 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술

군에 비해 수술 후 2일에는 약 75% ($P<0.01$), 3일에는 약 86% ($P<0.01$), 7일에는 약 104% ($P<0.01$), 14일에는 약 113% ($P<0.01$)의 증가를 나타내었다. 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군에서는 그 대조군인 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군 보다 수술 후 2일에는 약 58% ($P<0.01$), 3일에는 약 69% ($P<0.01$), 7일에는 약 55% ($P<0.05$), 14일에는 약 45% ($P<0.05$)의 활성도 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 수술 후 1일부터 14일 까지 이 효소의 활성도는 덜 현저한 증가를 나타내었다. 즉 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 1일에는 약 21%, 2일에는 약 28%, 3일에는 약 29%, 7일에는 약 40% ($P<0.05$), 14일에는 약 47% ($P<0.01$) 활성도가 낮았다. 그러나 총담관 결찰 후 1일, 2일 및 3일에는 통계학적 유의성이 없었다 (Table 1).

2. 총담관을 결찰한 쥐에서 급성 주정 중독이 간의 β -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 간의 β -D-mannosidase 활성도는 총담관을 결찰하고 14일 경과한 군 (결과 Table에서 CBDL 14 days)이나 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독을 시킨 군 (결과 Table에서

Table 1. Effect of common bile duct ligation on hepatic β -D-mannosidase activity in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	β -D-mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min^{-1} mg protein $^{-1}$)			
	(Normal; 30.1 \pm 5.28, Ethanol; 25.2 \pm 4.63)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	31.2 \pm 5.57	38.8 \pm 9.73	25.7 \pm 4.86	30.5 \pm 7.23
2	30.7 \pm 5.44	53.6 \pm 13.42 ^b	24.5 \pm 4.65	38.7 \pm 8.12 ^e
3	30.4 \pm 5.67	56.4 \pm 14.24 ^b	23.8 \pm 4.72	40.2 \pm 8.56 ^e
7	30.6 \pm 5.25	62.3 \pm 17.26 ^b	24.1 \pm 4.82	37.3 \pm 8.17 ^{d,e}
14	31.3 \pm 5.72	66.7 \pm 17.82 ^b	24.3 \pm 4.75	35.3 \pm 7.84 ^{d,h}

All values are expressed as mean \pm 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. b, $P<0.01$ vs. Sham; d, $P<0.05$ vs. Ethanol + Sham; e, $P<0.01$ vs. Ethanol + Sham; g, $P<0.05$ vs. CBDL; h, $P<0.01$ vs. CBDL

Table 2. Effect of common bile duct ligation on hepatic β -D-mannosidase activity in acute ethanol intoxicated rats

β -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min^{-1} mg protein $^{-1}$)					
Normal	CBDL 14 days	Ethanol 1.5 hrs	CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs	Ethanol 24 hrs	CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs
30.1 \pm 5.28	66.7 \pm 17.82 ^k	35.0 \pm 5.62	62.4 \pm 20.18 ^{k,m}	31.2 \pm 5.53	63.5 \pm 21.33 ^{k,p}

All values are expressed as mean \pm 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). k, $P<0.01$ vs. Normal; m, $P<0.05$ vs. Ethanol 1.5 hrs; p, $P<0.05$ vs. Ethanol 24 hrs

Table 3. β -D-Mannosidase kinetic parameters from cholestasis with chronic ethanol intoxicated rat liver determined with 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside

Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
Km (mM)			
49.5±4.74	50.3±4.82	48.9±5.18	50.6±4.92
Vmax (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)			
45.2±6.32	94.3±13.43 ^c	35.5±5.16	48.2±9.28 ^{di}

Michaelis-Menten constants for β -D-mannosidase were determined using 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside at 37°C for homogenate of male rat's livers at the 14th day after operation. The data are expressed as mean \pm SD with 5 rats in each group. Animal group are described in Table 1. c, $P < 0.001$ vs. Sham; d, $P < 0.05$ vs. Ethanol + Sham; i, $P < 0.001$ vs. CBDL

Table 4. β -D-Mannosidase kinetic parameters from cholestasis with acute ethanol intoxicated rat liver determined with 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside

Animal groups	Km (mM)	Vmax (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Normal	49.5±4.67	50.6±7.14
CBDL 14 days	50.3±4.82	94.3±13.43 ^l
Ethanol 1.5 hrs	48.7±4.53	58.5±7.62
CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs	51.2±4.89	91.5±13.63 ^{ln}
Ethanol 24 hrs	49.2±4.82	54.3±7.38
CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs	50.7±4.72	92.2±13.85 ^{lr}

Michaelis-Menten constants for β -D-mannosidase were determined using 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside at 37°C for homogenate in male rat's livers of acute intoxication with ethanol done after 14 days of the common bile duct ligation. The data are expressed as mean \pm SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 2. l, $P < 0.001$ vs. Normal; n, $P < 0.01$ vs. Ethanol 1.5 hrs; r, $P < 0.001$ vs. Ethanol 24 hrs

CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs 및 CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs)은 그 대조군인 정상군이나 급성 주정 중독만 시킨 군 (결과 Table에서 Ethanol 1.5 hrs 및 Ethanol 24 hrs)에 비해 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 이 효소 활성도를 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독 시킨 군과 총담관 결찰 후 14일이 경과한 군을 비교 했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다 (Table 2).

3. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 간의 β -D-mannosidase의 Km값 및 Vmax값의 변동

쥐에게 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰 시켰을 때 간의 β -D-mannosidase를 4-nitrophenol β -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 측정된 Km값은 다른 실험군과 별 차이가 없었다. 한편 총담관만 결찰하고 14일 경과 시킨 군과 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과 시킨 군에서 간의 β -D-mannosidase의 Vmax값을 대조군인 가수술군과 만성 주정 중독 후 가수술을 한 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이 효소의 Vmax값은 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하고 14일 경과 시킨 군이 총담관만 결찰하고 14일 경과시킨 군 보다는 그 증가의 정도가 훨씬 덜

현저하였다 (Table 3).

4. 쥐에서 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 β -D-mannosidase의 Km값 및 Vmax값의 변동

쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시켰을 때 간의 β -D-mannosidase를 4-nitrophenyl β -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 측정된 Km값은 다른 실험군과 별 차이가 없었다. 쥐에게 총담관을 결찰한 후 14일에 급성 주정 중독을 시키고 1.5시간 및 24시간 경과 후 간의 β -D-mannosidase의 Vmax값은 대조군인 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 총담관만 결찰하고 14일 경과한 군과 비교했을 때는 별 차이가 없었다 (Table 4).

5. 만성 주정 중독 쥐에서 총담관 결찰이 혈청의 β -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 β -D-mannosidase 활성도는 만성 주정 중독군, 가수술군 및 만성 주정 중독 후 가수술한 군 등에서는 통계학적으로 유의한 변동을 나타내지 않았다. 쥐 혈청의 이 효

Table 5. Effect of common bile duct ligation on serum β -D-mannosidase activities in chronic ethanol intoxicated rats

Day(s) following operation	β -D-mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ ml ⁻¹)			
	(Normal; 122.6±19.75, Ethanol; 113.6±18.57)			
	Sham	CBDL	Ethanol + Sham	Ethanol + CBDL
1	123.3±18.16	141.7±23.25	118.3±18.64	169.8±20.46 ^c
2	122.7±19.22	153.6±22.28 ^a	118.8±18.82	199.2±26.38 ^{f,g}
3	122.8±18.83	153.3±19.14 ^a	118.6±19.28	206.5±28.23 ^{fh}
7	123.4±19.45	153.8±18.32 ^a	119.6±19.15	204.8±26.84 ^{fh}
14	122.5±19.34	156.2±21.46 ^a	119.7±19.27	208.2±25.74 ^{fh}

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

Table 6. Effect of common bile duct ligation on serum β -D-mannosidase activities in acute ethanol intoxicated rats

β -D-Mannosidase activity (nmol 4-nitrophenol min ⁻¹ ml ⁻¹)					
Normal	CBDL 14 days	Ethanol 1.5 hrs	CBDL 14 days + Ethanol 1.5 hrs	Ethanol 24 hrs	CBDL 14 days + Ethanol 24 hrs
122.6±19.75	156.2±21.46 ^j	126.2±21.24	160.3±25.16 ^{j,m}	124.6±20.36	159.6±26.76 ^{j,p}

All values are expressed as mean \pm SD with 5 rats in each group. Animal groups are described in Table 2. j, $P<0.05$ vs. Normal; m, $P<0.05$ vs. Ethanol 1.5 hrs; p, $P<0.05$ vs. Ethanol 24 hrs

소의 활성도는 정상 쥐의 총담관을 결찰한 군에서는 대조군인 가수술군에 비해 총담관 결찰 후 2일, 3일과 7일에는 약 25% ($P<0.05$), 14일에는 약 28% ($P<0.05$)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 44% ($P<0.01$), 2일에는 약 68% ($P<0.001$), 3일에는 약 74% ($P<0.001$), 7일에는 약 71% ($P<0.001$), 14일에는 약 74% ($P<0.001$)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 증가되었다. 즉 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담관만 결찰한 군보다 총담관 결찰 후 1일에는 약 20%, 2일에는 약 30% ($P<0.05$), 3일에는 약 35% ($P<0.01$), 7일 및 14일에는 약 33% ($P<0.01$)의 활성도가 높았다. 그러나 총담관 결찰 후 1일에는 통계학적 유의성이 없었다 (Table 5).

6. 총담관을 결찰한 쥐에서 급성 주정 중독이 혈청의 β -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐 혈청의 β -D-mannosidase 활성도는 급성 주정 중독을 시켰을 때는 별 변동이 없었다. 혈청의 이 효소의 활성도는 총담관을 결찰하고 14일 경과한 군이나 총담관 결찰 14일 후

급성 주정 중독을 시킨 군은 그 대조군인 정상군이나 급성 주정 중독만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 그러나 이 효소 활성도를 총담관 결찰 14일 후 급성 주정 중독시킨 군과 총담관 결찰 후 14일이 경과한 군을 비교했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다 (Table 6).

고 찰

주정 중독시에는 간세포가 심한 형태학적 변화를 받으며 그 변화는 주로 간세포의 미토콘드리아와 내형질세망에서 관찰된다. 미토콘드리아에서 나타나는 형태학적 변화는 종창, 변형 및 능선의 배열문란 등⁴⁻⁶⁾이고 내형질세망에서 나타나는 변화는 평활 내형질세망의 증식⁴⁻⁶⁾을 들 수 있다. 이외에도 Mallory 소체의 증식⁴⁻⁶⁾과 간세포 괴사를 수반하는 형태학적 변화⁶⁾도 관찰된다. 음주로 인한 간세포 손상시 나타나는 대사성 변화로는 락트산의 생산 증가, 피루브산의 생성 감소, 지방산의 합성 촉진, 시트르산 회로의 활성 저하 및 지방산의 산화 감소 등^{3,10,33)}을 들 수 있다.

임상적 및 병리학적으로 담즙울체를 주소견으로 하는 간담도 질환으로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙울체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관 수술 후 및 담낭절제 후의 총담관 협착증, 간외 담도폐쇄증, 담관암 및 간세포암의 총담관 침범으로 인한

담관폐쇄증, 췌장 질환 및 총담관 주변 림프절의 종대로 인한 총담관의 외압성 폐쇄증, 기생충으로 인한 담관폐쇄증, 약물 또는 임신으로 인한 담관폐쇄증, 양성 재발성 담즙울체 등을 들 수 있다^{13,34}). 이러한 담즙울체성 간담도 질환시 담즙울체의 시간이 경과하면 간조직은 괴사, 지방변성, 담도증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타남⁸)과 동시에 간세포는 기능 장애가 초래되며^{13,34}), 이때 담즙울체간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려진 사실이다.

쥐의 총담관을 결찰하면 간에 담즙울체가 야기되며 시간이 경과함에 따라 담즙울체 간은 괴사, 담도증식, 섬유화 및 경화성 변화가 연속적으로 나타나며^{17,29}) 동시에 간기능도 장애가 초래되는 것^{22-25,30,32,37})으로 알려져 있다. 따라서 간담도 질환의 생화학적 연구를 위한 실험적 방법으로 널리 이용하는 것이 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체 간을 만드는 것이다^{22-25,30,37}).

총담관 결찰로 간에 담즙울체가 야기되면 β -D-mannosidase³¹)와 특히 담도계 효소인 alkaline phosphatase^{24,32,37}), 5'-nucleotidase^{23,24}), γ -glutamyl transpeptidase^{23,24}) 및 leucine aminopeptidase²²)는 간세포와 혈청에서 그 활성도가 증가되며, 세포막의 투과성 항진시 혈중으로 누출되는 alanine aminotransferase¹⁸), aspartate aminotransferase¹⁹) 및 lactate dehydrogenase²⁵) 등은 간세포에서는 그 활성도가 감소되고 혈청에서는 그 활성도가 증가된다고 한다. 이와 같이 담즙울체 간에서 그 활성도가 증가되는 담도계 효소들은 그 합성이 증가된 것이라 하며, 담즙울체시 혈청에서 그 활성도가 증가되는 효소들은 주로 세포막의 투과성 항진으로 간 밖으로 누출되어 나타난 결과^{18,19,23,25})라고 한다.

체내에 흡수된 주정은 간에서 대부분 대사되며 이 대사과정은 에탄올이 아세트 알데하이드로 산화되고 다시 아세트산으로 산화되어 이용^{32,37})되는 것이다. 특히 이러한 대사과정에서 생성된 아세트 알데하이드는 간세포 막의 손상과 간세포의 괴사를 초래하는 물질³⁵)로 알려져 있고, 또한 주정 중독시 심한 형태학적 변화가 초래⁴⁵)되는 만큼 담즙울체시 주정 중독이 야기된다면 간 손상의 정도는 더욱 심해질 것이다. 특히 간의 β -D-mannosidase는 다른 효소와 달리 라이소좀에만 국재되어 있는 가수분해 효소류에 속하는 효소^{26,36})이므로 간조직의 손상이 심해질 때는 간조직과 혈청에서 이 효소의 활성도 변동도 심해질 것으로 생각된다.

이 실험 결과에서 간의 β -D-mannosidase 활성도가 간에 담즙울체가 있을 때는 통계학적으로 유의하게 증가되었으며 이 성적은 Park 등³¹)의 성적과 일치하였다. 이 실험 결과에서 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군과 총담관만 결찰한 군간에 간의 β -D-mannosidase 활성도를 비교했을 때 이 효소의 활성도는 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰한 군이 총담

관만 결찰한 군보다 덜 현저한 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰 후 급성 주정 중독을 시킨 군과 총담관만 결찰한 군간에 이 효소의 활성도를 비교했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다. 이 현상은 담즙울체시 급성 주정 중독을 시키면 만성 주정 중독시 급성 주정 중독을 시켰을 때보다 간 손상이 경하게 나타나서 일어난 현상이 아닌가 생각된다. 따라서 쥐 간의 β -D-mannosidase는 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때 보다는 그 활성도가 저하하는 효소로 생각된다. 한편 이 실험 결과에서 만성 주정 중독을 시킨 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 군에서 간의 β -D-mannosidase의 Km값을 총담관만 결찰한 군의 Km값과 비교했을 때는 상호간에 별 차이가 없었다. 그러나 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰하여 14일 경과 시킨 군에서 간의 β -D-mannosidase의 Vmax값은 총담관만 결찰한 군의 Vmax값 보다는 덜 증가된 값을 나타내었다. 이와 같이 만성 주정 중독시 담즙울체를 야기시키면 이 효소의 Km값이 변동이 없으면서도 담즙울체만 시켰을 때보다 그 활성도가 감소되고 또한 Vmax값이 감소된 것은 이 효소의 활성도 감소가 촉매 효율의 감소라 보기는 어렵다. 따라서 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 이 효소는 담즙울체만 있을 때보다 그 합성이 감소되는 것으로 생각된다. 그러나 왜 이런 현상이 나타나는지는 이 실험만으로는 추론하기는 어렵다.

Kim 등¹⁸⁻²¹)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 하였으며 Bae 등¹)은 이 경우 α -D-mannosidase가 혈중으로 다량 누출되었다고 하였다. 그리고 이들 성적은 담즙울체로 인한 간 손상이 주정 중독으로 증폭되어 나타난 결과라 하였다.

이 실험에서 간의 β -D-mannosidase가 간에 담즙울체만 있을 때보다 만성 주정 중독시 간에 담즙울체가 있을 때는 그 활성도가 감소되었다. 그러나 이러한에도 불구하고 혈청의 β -D-mannosidase는 만성 주정 중독시 간에 담즙울체가 있을 때는 그 활성도가 증가되었다. 이 현상은 위 문헌^{1,18-21})의 추론으로 보아 간 손상의 심한 증폭으로 간에서 이 효소가 혈중으로 다량 누출되어 나타난 결과라 하겠다. 이 실험에서 혈청의 β -D-mannosidase 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.

이상 이 실험 결과와 문헌상의 지견으로 보아 간의 β -D-mannosidase는 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 그 합성이 담즙울체만 있을 때보다 덜 증가되는 효소로 생각되

며 아울러 혈청 β -D-mannosidase 활성도가 총담관만 결찰했을 때보다 만성 주정 중독 후 총담관을 결찰했을 때 더 증가된 것은 만성 주정 중독시 담즙울체가 야기되면 담즙울체만 있을 때보다 간 손상이 증폭된다는 것을 나타낸 결과라 생각된다. 특히 담즙울체 간과 주정 중독 간은 피사가 진행되는 간이며^{6,17,29} 간의 피사가 진행될 때는 효소들의 누출이 심해진다^{18,19,25}고 알려져 있는 만큼 혈청에서의 이 결과는 주정 중독으로 간 손상이 증폭되어 간에서 이 효소의 누출이 증가된 것이라 하겠다. 따라서 이 결과들은 담즙울체로 간 손상이 있을 때는 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) Bartholomew BA and Perry AL (1973): The properties of synovial fluid β -mannosidase activity. *Biochim Biophys Acta*, **315(1)**: 123-127.
- 3) Bosron WF and Li TK (1980): Alcohol dehydrogenase, pp. 213-244. In Jakoby WB(ed.), "Enzymatic Basis of Dectoxication", 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) Christoflersen P and Poulsen H (1979): Alcoholic liver disease, pp.232-244. In MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ (eds.), "Pathology of the Liver", Churchill Livingstion, New York.
- 7) Dawson G (1982): Evidence for two distinct forms of mammalian β -mannosidase. *J Biol Chem*, **257(7)**: 3369-3371.
- 8) Desmet VJ (1994): Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary billiary cirrhosis, pp.425-474. In MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC (eds.), "Pathology of β the Liver", 3rd Ed., Churchill Livingstion, New York.
- 9) Eagon PK, Willet JE and Seguiti SM (1987): Androgen responsive functions of male rat liver. Effect of chronic alcohol ingestion. *Gastroenteology*, **93(6)**: 1162-1169.
- 10) Ellenhorn MJ and Barceloux DG (1988): Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning, pp.782-796. Elsevier Science Publishing, New York.
- 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, Scheuer PJ Burt AD, Portman BC (eds.), "Pathology of the Liver", Churchill Livingstion, New York.
- 13) Halsted JA (1976): The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application, pp.426-429. Sannders, 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) Jones MZ and Dawson G (1981): Caprine β -mannosidosis. *J Biol Chem*, **256(10)**: 5185-5188.
- 16) Kim BK (1984): Enzyme Nomenclature, IUB, pp.310-311. Academic Press, New York.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Kwak CS and Lee SI (1985): Malate dehydrogenase activity in the cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **4(2)**: 131-137.
- 26) Labadie JH and Aronson NN (1973): Lysosomal β -D-mannosidase of rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **321(2)**: 603-614.
- 27) Lieber CS (1985): Alcohol metabolism, pp.1-24. In Hall P (ed.), "Alcoholic liver Disease, Pathobiology, Epidemiology and Clinical Aspects", Edward Arnold, London.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Mun KC and Kwak CS (1989): Monoamine oxidase activity in cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J*, **8(1)**: 69-77.
- 31) Park EM, Mun KC and Kwak CS (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.
- 32) Righetti ABB and Kaplan MM (1971): Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med*, **136(2)**: 491-495.
- 33) 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.
- 34) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp.1-17. Blackwell Science, Oxford.
- 35) Sherlock S and Dooley J (2002): "Disease of the Liver and Biliary System", 11th Ed., pp.381-398. Blackwell Science, Oxford.
- 36) Tettamanti G and Masserini M (1984): β -D-mannosidase, pp.241-246. In Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (eds.), "Method of Enzymatic Analysis" 3rd Ed., Vol IV. Verlag Chemic GmbH, Weinheim.
- 37) 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.
- 38) Wooddell WJ (1980): Liver disease in alcohol addicted patients, pp.125-134. In Davidson SV (ed.), "Alcoholism and Health", Aspen System, Century Boulevard.