

## Effects of Intravenous Administration of Taurocholic Acid on Liver Lysosomal $\alpha$ -D- and $\beta$ -D-Mannosidase Activities in Rats with Extrahepatic Cholestasis

So-Kyung Park<sup>1</sup>, You-Hee Kim<sup>2</sup> and Chun-Sik Kwak<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Department of Nursing, Kyungdong College of Techno-Information, Kyungsan, 712-718, Korea,

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, 700-712, Korea

The effects of intravenously administered of high concentration of taurocholic acid (TCA) on  $\alpha$ -D- and  $\beta$ -D-mannosidase activities in rat liver lysosomes were studied. These liver lysosomal enzymes, and serum lysosomal  $\alpha$ -D- and  $\beta$ -D-mannosidase isozymes activities were determined in experimental rats with common bile duct ligation (CBDL). The liver lysosomal  $\beta$ -D-mannosidase activity as well as the serum lysosomal  $\alpha$ -D- and  $\beta$ -D-mannosidase isozymes activities were found to be significantly increased in the CBDL plus TCA injected group than in the control group such as CBDL alone group. However, the liver lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase activity was found to be significantly decreased in the CBDL plus TCA injected group. The above results suggest that TCA repress the biosynthesis of the lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase and induce the biosynthesis of the lysosomal  $\beta$ -D-mannosidase in the liver. And that the elevated serum lysosomal  $\alpha$ -D and  $\beta$ -D-mannosidase isozymes activities are most likely due to increased hepatocyte membrane permeability caused by TCA mediated liver cell necrosis

**Key Words:** Common bile duct ligation, Extrahepatic cholestasis,  $\alpha$ -D-mannosidase,  $\beta$ -D-mannosidase, Taurocholic acid

### 서 론

담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들 중 그 기전의 일부가 밝혀져 있는 효소는 alkaline phosphatase<sup>15</sup>,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase<sup>12</sup>, catalase, alcohol dehydrogenase, microsomal, ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase<sup>13</sup>, arylesterase<sup>8</sup>, carboxylesterase<sup>9</sup>, cholinesterase<sup>20</sup>, benzoyltransferase<sup>11</sup>, arylamine N-methyltransferase<sup>21</sup>, cathepsin B, cathepsin D, acid phosphatase<sup>18</sup>,  $\alpha$ -D-glucosidase 및  $\beta$ -D-glucuronidase<sup>19</sup> 등이며 taurocholic acid (TCA)가 이들 효소의 유전자 발현률을 변동시켜 이들 효소의 합성 속도를 변동시킨다는 것이다. 따라서 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들에 대해서 TCA가 어떤 효과를 나타내는지 알아낸다면 담즙울체간에서 그 활성도가 변동되는 효소들 중 그 기전이 밝혀지지 않은 효소들의 활성도 변동 기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다.

$\alpha$ -D-Mannosidase ( $\alpha$ -D-mannoside mannohydrolase, EC 3. 2. 1. 24)는 과당질의 말단 비환원 위치의  $\alpha$ -D-mannosyl 기를 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소이며<sup>3,24,26</sup>,  $\beta$ -D-mannosidase ( $\beta$ -D-mannoside mannohydrolase, EC 3. 2. 1. 25)는 당단백질에 결합되어 있는 과당질에서 말단 비환원 위치의  $\beta$ -D-mannosyl 기를 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소이다<sup>4,25,26</sup>. 이 두가지 효소는 간의 라이소솜에 풍부히 국재되어 있는 효소이며<sup>14,16</sup> 담즙울체간에서는 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase는 그 활성도가 감소되고<sup>17</sup> 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase는 그 활성도가 증가되는 것<sup>17</sup>으로 알려져 있다. 그러나 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도 변동에 대한 기전을 규명한 보고는 아직도 없다. 따라서 쥐에게 총담관 결찰을 시켜 담즙울체를 야기하고 아울러 TCA와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)<sup>8,9,12,15</sup>를 각각 정맥 내에 주사함으로써 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도 변동 기전의 일부가 밝혀질 것으로 생각된다. 또한 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도 변동 기전을 알아냄으로써 간담도 질환 시 라이소솜에 국재되어 있는 효소들의 동태가 일부 파악될 것으로 생각된다.

이 연구는 간세포의 라이소솜에 풍부히 분포되어 있으면서 담즙울체 시 간 라이소솜에서 활성도가 변동되는  $\alpha$ -D-mannosidase와  $\beta$ -D-mannosidase가 담즙울체간에서 그 활성

\*논문 접수: 2004년 3월 20일  
수정재접수: 2004년 5월 12일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 곽춘식, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 생화학교실  
Tel: 053-250-7461, Fax: 053-250-7461  
e-mail: kwak@dsmc.or.kr

도가 왜 변동되는지 그 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰로 총담관을 폐쇄시킨 직후 TCA와 TUDCA를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 혈청과 간에서 이들 효소의 활성도를 측정하여 이들 효소의 활성도 변동 기전의 일부를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 약

4-Nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside, 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-mannopyranoside, 4-nitrophenol, sodium cacodylate trihydrate, bovine serum albumin, glycine, cobalt chloride, Triton X-100, TCA (from ox bile, sodium salt), TUDCA (sodium salt),  $\alpha$ -D-mannosidase (from almonds, M 1266),  $\beta$ -D-mannosidase (from snail, M 9400) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml, bovine serum albumin) 등은 Sigma사 (St. Louis, 미국)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

### 2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 수컷을 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 9군으로 나누었다. 즉 정상군 1군, 가수술군은 가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군으로 하였고 총담관 결찰 (common bile duct ligation) 군은 총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군, 총담관 결찰과 함께 TCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 TCA (체중 100 g당 45  $\mu$ mol)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 총 2군, 총담관 결찰과 함께 TUDCA를 주입한 군은 총담관 결찰 직후 Ogawa 등<sup>15)</sup>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.

총담관 결찰 수술 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 마취 하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래 쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중 결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출 시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA 액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, 미국)를 사용하여 15분 동안 주입하였다.

### 3. 간 적출 및 시료 조제

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터

마취 하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 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.

간 라이소좀 효소 시료의 조제를 위하여서는 적출하여 0.25 M sucrose 액으로 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 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 증류수로 제조한 10% (w/v) 간 마쇄액을 105,000  $\times$ g에서 1시간 원심분리하여 얻은 상청액<sup>16,23)</sup>을 사용하였으며 간 라이소좀의  $\beta$ -D-mannosidase 활성도 측정용 시료는 증류수로 제조한 10% (w/v) 간 조직 균질액<sup>1)</sup>을 사용하였다. 한편 채혈한 혈액은 곧 원심분리하여 혈청을 얻은 후 효소 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

### 4. 효소 활성도 측정

혈청과 간의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 4.5 (0.5 M acetate buffer, pH 4.5), 37°C 조건에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 400 nm 파장에서 비색정량하는 Opheim과 Touster 법<sup>16)</sup>에 의하였으며 혈청과 간의 라이소좀  $\beta$ -D-mannosidase 활성도 측정은 4-nitrophenyl  $\beta$ -D-mannopyranoside를 기질로 사용하여 pH 3.5 (0.25 M acetate buffer, pH 3.5), 37°C 조건에서 1시간 반응시키는 동안에 생성된 4-nitrophenol을 비색 정량하는 Bartholomew와 Perry의 법<sup>1)</sup>에 의하였으며 이들 mannosidase 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질 또는 1 ml의 혈청이 반응하여 생성한 4-nitrophenol을 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사 (미국)의 정제 효소들을 사용하여 검정하였으며 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<sup>6)</sup>으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret 법<sup>5)</sup>으로 정량하였다.

## 6. 성적 검정

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

## 결 과

1. 쥐에서 총담관 결찰과 담즙정체 시간이 간 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase와  $\beta$ -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시켰을 때 간 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도는 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰을 시킨 후 1일 및 2일 경과시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days)에서 간 라이소

좀의 이 효소 활성도는 정상군 보다는 각각 약 19% ( $P<0.05$ ) 및 약 33% ( $P<0.001$ ), 가수술군 (결과 Table에서 Sham 1 day 및 Sham 2 days) 보다는 각각 약 19% ( $P<0.05$ ) 및 약 33% ( $P<0.01$ )의 감소를 나타내었다. 그리고 간 라이소좀의 이 효소 활성도를 총담관 결찰 후 1일 경과시킨 군과 2일 경과시킨 군간에 비교했을 때는 2일 경과시킨 군이 1일 경과시킨 군보다 약간 더 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다 (Table 1).

쥐에게 총담관 결찰을 시켰을 때 간 라이소좀의  $\beta$ -D-mannosidase 활성도는 2일 경과시킨 군에서만 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시킨 군에서 간 라이소좀의 이 효소 활성도는 정상군 보다는 약 63% ( $P<0.01$ ), 가수술군 보다는 약 65% ( $P<0.01$ )의 증가를 나타내었다. 그리고 간 라이소좀의 이 효소 활성도를 총담관 결찰 후 1일 경과시킨 군과 2일 경과시킨 군간에 비교했을 때는 2일 경과시킨 군이 1일 경과시킨 군보다 약 37% ( $P<0.05$ ) 증가하였다 (Table 1).

**Table 1.** Effects of time of biliary retention on liver lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase activities in rats

Experimental group	$\alpha$ -D-Mannosidase	$\beta$ -D-Mannosidase
	(nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
Normal	2.1±0.22	30.8± 5.25
Sham 1 day	2.1±0.23	30.2± 5.43
Sham 2 days	2.1±0.24	30.4± 5.24
CBDL 1 day	1.7±0.27 <sup>ad</sup>	36.8± 7.73
CBDL 2 days	1.4±0.21 <sup>ch</sup>	50.3±10.42 <sup>b,hj</sup>

The data are expressed as mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group; Sham 1 day or Sham 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after sham operation; CBDL 1 day or CBDL 2 days: sacrificed on the 1st or 2nd day after common bile duct ligation.

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

2. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase와  $\beta$ -D-mannosidase 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TCA 및 CBDL 2 days + TCA) 시켰을 때 간 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도는 총담관 결찰만 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days)에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소좀의 이 효소 활성도는 총담관 결찰만 시킨 군보다 각각 24% ( $P<0.05$ ) 및 약 36% ( $P<0.01$ )의 감소를 나타내었다 (Table 2).

**Table 2.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on liver lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase activities in rats

Experimental group	$\alpha$ -D-Mannosidase	$\beta$ -D-Mannosidase
	(nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	
CBDL 1 day	1.7±0.27	36.8± 7.73
CBDL 1 day + TCA	1.3±0.18 <sup>j</sup>	56.7±11.24 <sup>j</sup>
CBDL 1 day + TUDCA	1.7±0.26	37.2± 8.73
CBDL 2 days	1.4±0.21	50.3±10.42
CBDL 2 days + TCA	0.9±0.15 <sup>n</sup>	69.6±12.22 <sup>m</sup>
CBDL 2 days + TUDCA	1.4±0.23	49.6±11.67

The data are expressed as mean  $\pm$  SD with 5 rats in each group; CBDL 1 day or CBDL 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after common bile duct ligation; One of the following bile acids, TCA and TUDCA (45  $\mu$ mol/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. j,  $P<0.05$  vs. CBDL 1 day; m,  $P<0.05$  vs. CBDL 2 days; n,  $P<0.01$  vs. CBDL 2 days

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소좀의  $\beta$ -D-mannosidase 활성도는 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소좀 분획의 이 효소 활성도는 총담관 결찰만 시킨 군보다 각각 약 54% ( $P<0.05$ ) 및 약 38% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다.

쥐에게 총담관 결찰 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TUDCA 및 CBDL 2 days + TUDCA) 시켰을 때 간 라이소좀의  $\alpha$ -D-mannosidase와  $\beta$ -D-mannosidase 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 2).

3. 쥐에서 총담관 결찰과 담즙정체 시간이 혈청의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase와 라이소좀  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시켰을 때 혈청의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰을 시킨 후 1일 및 2일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군보다는 각각 102% ( $P<0.001$ ) 및 약 120% ( $P<0.001$ ), 가수술군 보다는 각각 약 97% ( $P<0.001$ ) 및 약 111% ( $P<0.001$ )의 증가를 나타내었다. 그리고 혈청의 이 효소 활성도를 총담관 결찰 후 1일 경과시킨 군과 2일 경과시킨 군간에 비교했을 때는 서로 간에 별 차이가 없었다 (Table 3).

쥐에게 총담관 결찰을 시켰을 때 혈청의 라이소좀  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 2일 경과시킨 군에서만 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시킨 군에서 혈청의 이 효소 활성도는 정상군 보다는 약 26% ( $P<0.05$ ), 가수술군 보다는 약 25% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다. 그리고 혈청 라이소좀의 이 효소

활성도를 총담관 결찰 후 1일 경과시킨 군과 2일 경과시킨 군간에 비교했을 때는 양군 간에 별 차이가 없었다 (Table 3).

4. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase와 라이소좀  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 라이소좀  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 이 효소 활성도는 총담관 결찰만 시킨군보다 각각 약 36% ( $P<0.05$ ) 및 약 34% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다 (Table 4).

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 라이소좀  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해

**Table 3.** Effects of time of biliary retention on serum lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase isozymes activities in rats

Experimental group	$\alpha$ -D-Mannosidase	$\beta$ -D-Mannosidase
	(nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	
Normal	21.5 ± 3.34	120.6 ± 16.73
Sham 1 day	22.1 ± 3.47	121.4 ± 17.24
Sham 2 days	22.4 ± 3.53	121.6 ± 17.67
CBDL 1 day	43.5 ± 8.65 <sup>c,f</sup>	140.7 ± 21.23
CBDL 2 days	47.2 ± 10.32 <sup>c,i</sup>	152.2 ± 22.42 <sup>a,g</sup>

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1 and text. a,  $P<0.05$  vs. Normal; c,  $P<0.001$  vs. Normal; f,  $P<0.001$  vs. Sham 1 day; g,  $P<0.05$  vs. Sham 2 days; i,  $P<0.001$  vs. Sham 2 days

**Table 4.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on serum lysosomal  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase isozymes activities in rats

Experimental group	$\alpha$ -D-Mannosidase	$\beta$ -D-Mannosidase
	(nmol 4-nitrophenol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	
CBDL 1 day	43.5 ± 8.65	140.7 ± 21.23
CBDL 1 day + TCA	59.2 ± 9.64 <sup>j</sup>	175.5 ± 24.56 <sup>j</sup>
CBDL 1 day + TUDCA	44.1 ± 8.32	142.3 ± 22.85
CBDL 2 days	47.2 ± 10.32	152.2 ± 22.42
CBDL 2 days + TCA	63.2 ± 9.73 <sup>m</sup>	187.4 ± 23.78 <sup>m</sup>
CBDL 2 days + TUDCA	45.6 ± 8.25	154.2 ± 23.18

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

통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 이 효소 활성도는 총담관 결찰만 시킨군 보다 각각 약 25% ( $P<0.05$ ) 및 약 23% ( $P<0.05$ )의 증가를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 이들 효소 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 4).

## 고 찰

임상적 및 병리학적으로 담즙울체를 주 소견으로 하는 간담도 질환으로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙울체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관 수술 후 및 담낭절제 후의 총담관협착증, 간의 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<sup>7,18,19,22</sup>). 이러한 담즙울체성 간담도 질환 시 담즙울체의 시간이 경과하면 간 조직은 괴사, 지방변성, 담도 증식, 섬유화, 경화성 변화 등 형태학적인 변화가 연속적으로 나타남<sup>2)</sup>과 동시에 간세포는 기능 장애가 초래되며<sup>7,22</sup>, 이때 담즙울체간과 혈청에서는 각종 효소들의 활성도가 변동되는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 그러나 그 변동 이전에 대해서는 밝혀져 있지 않은 것이 많다.

Park 등<sup>17)</sup>은 쥐를 모델로 한 실험에서 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase의 활성도가 담즙울체 시 담즙울체간에서는 감소되었고 혈청에서는 증가되었다고 하였으며, 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase 활성도는 담즙울체간이나 혈청에서 모두 증가되었다고 하였다. 이 실험에서도 대조하기 위하여 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체만 야기시켰을 때 담즙울체간에서 이들 효소의 활성도의 증감이 위의 문헌상의 결과와 일치하였다. 이 연구에서는 이런 결과가 어떤 기전에 의해 나타난 현상인지를 알고자 하였다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 담즙울체간에서 유전자 발현률을 변동시킨다는 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소솜의  $\beta$ -D-mannosidase와 혈청의 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다.

이 결과로 보아 담즙울체 시 TCA는 간 라이소솜의  $\beta$ -D-mannosidase의 합성을 자극한다고 추정할 수 있었으며 이런 현상은 담즙울체로 손상을 받은 간세포를 자가분해시키기 위해 일어난 하나의 현상이라 생각된다. 또한 이 결과로 보아 담즙울체 시 간세포 내에 TCA가 부하되면 혈청에서는

간의 라이소솜에서 유래된  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임의 활성도가 증가된다는 것을 알 수 있었으며, TCA가 간괴사를 유발시키는 담즙산<sup>10)</sup>인 만큼 그 증가의 원인은 담즙울체 시 TCA가 간 괴사와 아울러 간세포 막을 용해시켜 간세포의 라이소솜 내에 있던 이 효소를 혈중으로 다량 유출시킨 것이 아닌가 생각된다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군 보다 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 혈청의 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임 활성도는 유의한 증가를 나타내었다. 이 결과로 보아 담즙울체 시 TCA는 간 라이소솜의  $\alpha$ -D-mannosidase의 합성을 억제한다고 추정할 수가 있었다. 그러나 이 실험에서 관찰한 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase가 간세포 내에서 TCA에 의해 그 합성이 촉진되며, 이 현상은 손상 받은 간세포를 자가분해시키기 위해 나타난 하나의 현상이라고 추정한 것과는 달리 이 효소의 간세포 내에서의 합성 억제 현상은 이 실험만으로는 무엇이라 단언하기는 어렵다. 따라서 이를 해결하기 위해서는 추후 더 연구해 보아야 하겠다. 그리고 혈청에서 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase 아이소자임의 활성도 증가는 혈청의 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase 활성도 증가의 추론과 마찬가지로 TCA에 의한 간 괴사와 간세포막의 용해로 간세포막의 투과성이 항진되어 나타난 결과로 생각된다.

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

이상 이 실험의 결과들과 문헌상의 지견을 볼 때 담즙울체간에서 활성도가 증가되는 라이소솜  $\beta$ -D-mannosidase의 활성도 증가는 담즙산 중 TCA에 의해 이 효소의 합성이 유도되어 나타난 결과로 생각되며 반대로 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase 활성도 감소는 TCA에 의해 이 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각된다. 아울러 담즙울체 시 라이소솜  $\alpha$ -D-mannosidase와  $\beta$ -D-mannosidase 아이소자임들의 혈중 활성도 증가는 TCA에 의한 간의 괴사로 간세포막의 투과성이 항진되어 이들 효소가 혈중으로 다량 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bartholomew BA and Perry AL (1973): The properties of synovial fluid  $\beta$ -mannosidase activity. *Biochim Biophys Acta*,

- 315(1):** 123-127.
- 2) Desmet VJ (1994): Cholestasis; extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis, pp.425-474. *In* MacSween RNM, Anthony PP, Sheuer PJ, Burt AD, Portman BC (eds.), "Pathology of the Liver", 3rd Ed., Churchill Livingstone, New York.
  - 3) 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.
  - 4) Frei JI, Cavanagh KT, Fisher RA, Hausinger RP, Dupuis M, Rathke EJ and Jones MZ (1988): Partial purification of goat kidney  $\beta$ -mannosidase. *Biochem J*, **249(3)**: 871-875.
  - 5) Gornall AG, Bardawill CJ and David MM (1949): Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem*, **177(3)**: 751-766.
  - 6) Greenberg DM and Rothstein M (1957): Method for isolation and degradation of labelled compounds. pp.708-731. *In* Colowick SP, Kaplan NO (eds): "Method in Enzymology", Vol. 4. Academic Press, New York.
  - 7) Halsted JA (1976): The Laboratory in Clinical Medicine. Interpretation and Application, pp.426-429. Saunders, London.
  - 8) Han BH and Kim YH (1997): Effect of high taurocholate load on activity of rat liver arylesterase. *Korean J Hepatol*, **3(2)**: 154-169.
  - 9) Han BH and Kim YH (1998): Effect of high taurocholate load on activity of rat liver carboxylesterase. *Keimyung Med J*, **17(4)**: 487-503.
  - 10) Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM and Vlahcevic ZR (1991): Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts: In vivo studies in the rat. *Gastroenterology*, **100(1)**: 203-211.
  - 11) Kim IK, Kim YH and Kwak CS (2001): Induction of hepatic benzoyltransferase by bile acid in rats. *Keimyung Med J*, **20(1)**: 20-30.
  - 12) Kim SK and Kim YH (1997): Induction of rat liver  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase by bile acid load. *Korean J Hepatol*, **3(3)**: 210-226.
  - 13) Kim YH and Shin MJ (2002): Effects of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Exp Mol Med*, **34(2)**: 123-130.
  - 14) Labadie JH and Aronson NN (1973): Lysosomal  $\beta$ -D-mannosidase of rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **321(2)**: 603-614.
  - 15) Ogawa H, Mink J, Hardison WG and Miyai K (1990): Alkaline phosphatase activity in hepatic tissue and serum correlates with amount and type of bile acid load. *Lab Invest*, **62(1)**: 87-95.
  - 16) Opheim DJ and Touster O (1978): Lysosomal  $\alpha$ -mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the Golgi and cytosolic  $\alpha$ -D-mannosidase. *J Biol Chem*, **253(4)**: 1017-1023.
  - 17) Park EM, Mun KC and Kwak CS (1994):  $\alpha$ -D-mannosidase and  $\beta$ -D-mannosidase activities in cholestatic rat liver induced by bile duct ligation. *Korean J Biochem*, **26(4)**: 197-202.
  - 18) Park SK, Kim YH and Kwak CS (2001): Effects of intravenous administration of taurocholate on liver lysosomal cathepsin B and D, and acid phosphatase activities in rat with extrahepatic cholestasis. *Keimyung Med J*, **20(2)**: 146-153.
  - 19) Park SK, Kim YH and Kwak CS (2002): Effect of intravenous administration of taurocholate on liver lysosomal  $\alpha$ -D-glycosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase activities in rats with extrahepatic cholestasis. *Keimyung Med J*, **21(1)**: 91-99.
  - 20) Park SK and Kwak CS (1999): Repression of rat hepatic cholinesterase by bile acid load. *Keimyung Med J*, **18(2)**: 204-217.
  - 21) Rhee BW and Kwak CS (2000): Induction of hepatic arylamine N-methyltransferase by a taurocholate load in rats. *J Korean Surg Soc*, **59(2)**: 141-153.
  - 22) Sherlock S and Dooley J (2002): Disease of the Liver and Biliary System, 11th Ed., pp.1-17. Blackwell Science, Oxford.
  - 23) Shoup VA and Touster O (1976): Purification and characterization of  $\alpha$ -D-mannosidase of rat liver cytosol. *J Biol Chem*, **251(13)**: 3845-3852.
  - 24) Tabas I and Kornfeld S (1979): Purification and characterization of a rat liver Golgi  $\alpha$ -mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharide. *J Biol Chem*, **254(22)**: 11655-11663.
  - 25) Tettamanti G and Masserini M (1984):  $\beta$ -D-Mannosidase. pp. 241-246. *In* Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M (eds), "Method of Enzymatic Analysis", 3rd Ed., Vol. IV. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
  - 26) Webb EC (1992): Enzyme Nomenclature. IUBMB, pp.348-350. Academic Press, New York.