

## Effects of Intravenous Administration of Taurocholate on Hepatic Monoamine Oxidase A and B Activities in Cholestatic Rats

Jun-Young Do and Chun-Sik Kwak<sup>1†</sup>

Department of Internal Medicine, Yeungnam University, College of Medicine, Daegu, 705-717, Korea

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, Daegu, 700-712, Korea

The possible mechanisms of decreased monoamine oxidase (MAO) A and B activities in cholestatic rat liver were studied. Hepatic and serum MAO activities were determined from the experimental rats with common bile duct ligation (CBDL). The Michaelis-Menten constants in these hepatic enzymes were also measured. The activities of mitochondrial MAO A and B, and microsomal MAO B as well as their Vmax values were found to be decreased significantly in CBDL plus taurocholic acid (TCA) injected group than in the control group, such as CBDL alone groups. However, their Km values in the experimental groups did not vary. Serum MAO activity increased significantly in the CBDL plus TCA injected group than in the control group. The above results suggest that TCA represses biosynthesis of the MAO in the liver. The elevated activity of the serum MAO is believed to be caused by the increment of membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

**Key Words:** Common bile duct ligation, Monoamine oxidase, Taurocholic acid

### 서 론

간은 물질 대사의 주된 기관으로서 대사기능, 재생기능, 배설기능 등 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 (Sherlock et al., 2002a) 특히 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해한 물질을 생체 변환시키는 생체이물 생체 변환 (xenobiotic biotransformation) 기능을 가짐으로써 생체를 보호하고 있다 (Jakoby et al., 1982). 그러나 이러한 간이라 하더라도 담즙울체로 간이 손상을 받았을 때는 생체이물 생체 변환 효소인 monoamine oxidase의 활성도가 간에서 변동된다 (Mun et al., 1989). 따라서 담즙울체 간에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체 간에서의 생체이물 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 생화학적 배경 특히 간의 해독기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

Monoamine oxidase (amine: Oxygen oxidoreductase (flavin containing, deaminating), EC 1. 4. 3. 4, MAO)는 제 1상 생체이

물 생체 변환 (phase 1 xenobiotic biotransformation) 효소의 일종이며 (Tipton, 1980; Mun et al., 1989) 모노아민, 분자산소 및 물로부터 알데하이드, 암모니아 및 과산화수소를 생성하는 효소이다. MAO는 간세포의 미토콘드리아와 내형질세막에 분포되어 있으며 기질 특이성과 억제제에 대한 감수성에 따라 MAO A와 MAO B로 구분하고 있다 (Greenawalt et al., 1970; Corte et al., 1980; Tipton, 1980).

이 효소들은 실험적 담즙울체간에서 활성도가 감소되며 그 활성도의 감소는 효소단백질 합성의 감소에 기인한 것이 아닌가 추정하고 있다 (Mun et al., 1989). 그러나 담즙울체간에서 이 효소의 활성도 감소에 대한 기전을 규명한 보고는 아직도 없다.

이 연구는 MAO A 및 B의 활성도가 담즙울체간에서 감소되는 기전의 일부를 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후에 간괴사를 유발시키고 (Palmer, 1972; Drew et al., 1979; Kitani et al., 1986) 효소 합성에 영향을 미친다 (Han et al., 1997; Park et al., 2004)는 taurocholic acid (TCA)를 정맥 내 주입시켜 경시적으로 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜과 혈청에서 이들 효소의 활성도를 측정하였던 바 TCA가 간에서 이들 효소의 합성을 억제하는 것으로 생각되는 결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

\* 논문 접수: 2004년 10월 4일

수정재접수: 2004년 12월 1일

† 교신저자: 곽춘식, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 생화학교실

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

e-mail: kwak@dsmc.or.kr

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Benzylamine · HCl, 5-hydroxytryptamine · HCl (serotonin), phenol, monoamine oxidase (from bovine plasma, M4636), TCA (from ox bile, sodium salt, T0750), tauroursodeoxycholic acid (sodium salt, T0266, TUDCA) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin)은 Sigma사 제품을 사용하였다. 그 외 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

### 2. 동물 및 처치

동물은 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 준하여 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 9개군으로 나누었다.

#### 1) 정상군 (1군)

#### 2) 가수술군

가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

#### 3) 총담관 결찰 (common bile duct ligation) 군

총담관 결찰 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

#### 4) 총담관 결찰과 함께 TCA를 주입한 군

총담관 결찰 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 따라 TCA (체중 100 g당 45  $\mu$ moles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

#### 5) 총담관 결찰과 함께 TUDCA를 주입한 군

총담관 결찰 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park et al. (1999)의 방법에 준하여 TUDCA (체중 100 g당 45  $\mu$ moles)를 상대정맥 내에 주입한 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 삼양유지사료주식회사 제품인 실험동물 사료를 먹도록 하였다. 총담관 결찰 수술 및 가수술은 효소활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 실시하였다. 총담관 결찰은 간 근위부와 약 1 cm 아래쪽의 원위부의 총담관을 각각 이중결찰한 후 그 중간 부위를 절단하였으며 간 적출시 담관의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, 미국)를 사용하여 15분간 주입하였다.

### 3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를

실혈사시켰다. 그리고는 간문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25 M sucrose액으로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있던 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다. 간의 세포분획은 적출한 간을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5 g을 취하여 9배량의 0.25 M sucrose액을 넣은 다음 Teflon pestle glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inches)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10% (w/v)의 간조직 균질액을 만들었다. 이 간 균질액 모두를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법 (Kwak et al., 1986)으로 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다.

### 4. 효소 시료 조제

MAO 활성도 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 마이크로솜 분획 및 미토콘드리아 분획을 ultrasonic dismembrator (model 300, Fisher, 미국)로 2~4°C를 유지하면서 20±0.4 Kcycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 초음파 마쇄를 한 다음 단백질량으로 5 mg/ml가 되도록 0.25 M sucrose액에 현탁시켰으며 이 액을 MAO 활성도 측정용 효소 시료로 사용하였다.

### 5. 효소 활성도 측정

간의 미토콘드리아 분획과 마이크로솜 분획의 MAO A 활성도 측정은 5-hydroxytryptamine을, MAO B 활성도 측정은 benzylamine을 각각 기질로 사용하여 효소 시료와 함께 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성되는 암모니아의 양을 측정하는 Nagatsu et al. (1966)법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 암모니아의 양을 nmol로 나타내었다. 혈청 MAO 활성도 측정은 benzylamine을 기질로 사용하여 37°C에서 3시간 반응시키는 동안 생성한 benzaldehyde를 비색하는 McEwen et al. (1963)의 방법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 혈청 1 ml가 1시간 반응하여 변동된 흡광도 ( $\Delta A$ )를 100배 곱하여 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 computer controlled enzyme spectrophotometer (Cary 210, Varian, 미국)였다.

### 6. Km값 및 Vmax값의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료

**Table 1.** Effects of time of biliary retention on hepatic subcellular monoamine oxidase (MAO) A and B activities in rats

Experimental groups	MAO A		MAO B	
	(pmol ammonia min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )			
	Mitochondria	Microsome	Mitochondria	Microsome
Normal	1,278±249	556±138	1,621±296	637±149
Sham 1 day	1,283±264	543±144	1,633±308	646±154
Sham 2 days	1,292±255	547±149	1,625±313	641±158
CBDL 1 day	1,096±234	516±147	1,256±272	621±153
CBDL 2 days	1,053±246	508±152	1,168±247 <sup>a,g</sup>	612±162

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham 1 day or Sham 2 days, sacrificed on the 1st or 2nd day after sham operation; 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; g,  $P < 0.05$  vs. Sham 2 days

들과 효소 기질의 원액과 희석액을 사용하여 MAO A 및 B의 활성도를 측정된 후 이들 성적으로부터  $1/v_i$ 값을 그리고 기질 농도로부터  $1/[S]$ 값을 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 그린 다음 이것으로부터 Km값과 Vmax값을 산출하였다.

#### 7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와 methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg et al. (1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법 (Gornall et al., 1949)으로 정량하였다.

#### 8. 성적 검증

유의성 검증은 Student's t-test로 하였으며 유의 수준은 0.05 이하로 하였다.

### 결 과

1. 쥐에서 총담관 결찰과 담즙정체 시간이 간의 MAO A 및 B 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 결찰을 시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days) 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 MAO A 활성도와 간 마이크로솜 분획의 MAO B 활성도는 별 변동이 없었다. 그러나 간의 미토콘드리아 분획의 MAO B 활성도는 총담관 결찰 후 2일 경과시켰을 때 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 후 2일 경과시킨 군에서 간 미토콘드리아 분획의 이 효소 활성도는 정상군 및 가수술군 (결과 Table에서 Sham 1 day 및 Sham 2 days)보다 다같이 약 28% ( $P < 0.05$ )의 감소를 나타내었다. 그러나 간의 이들 효소를 수술 후 1일 경과시켰을 때와 2일 경과시켰을 때의 비교 즉 일차변동을 보았을 때는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 간의 MAO A 및 B 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 간의 미토콘드리아 분획의 MAO A 및 B 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군 (결과 Table에서 CBDL 1 day 및 CBDL 2 days)보다 각각 약 30% ( $P < 0.05$ ) 및 약 32% ( $P < 0.05$ )의 감소를 나타내었으며, 간 미토콘드리아 분획의 MAO B 활성도는 대조군보다 각각 약 36% ( $P < 0.05$ ) 및 약 39% ( $P < 0.01$ )의 감소를 나타내었다. 그러나 간의 마이크로솜 분획에서는 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 MAO B의 활성도만 대조군보다 각각 약 33% ( $P < 0.05$ ) 및 약 37% ( $P < 0.05$ )의 감소를 나타내었다. 한편 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 1 day + TUDCA 및 CBDL 2 days + TUDCA)시켰을 때는 간의 2종 세포 분획에서 MAO A 및 B 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2).

3. 총담관 결찰 후 2일 경과한 실험군에서 간 MAO A 및 B의 Km값 및 Vmax값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 MAO A와 B를 각각 5-hydroxytryptamine과 benzylamine을 기질로 사용하여 Km값 및 Vmax값을 측정 했을 때는 Km값은 모두 변동이 없었다. 또한 수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 마이크로솜 분획의 MAO A의 Vmax값도 모두 통계학적으로 유의한 변동은 없었다. 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A의 Vmax값을 가수술만 시킨 군과

**Table 2.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on hepatic subcellular monoamine oxidase (MAO) A and B activities in rats

Experimental groups	MAO A		MAO B	
	Mitochondria	Microsome	Mitochondria	Microsome
CBDL 1 day	1,096±234	516±147	1,256±272	621±153
CBDL 1 day + TCA	772±182 <sup>j</sup>	418±109	806±197 <sup>i</sup>	413±116 <sup>j</sup>
CBDL 1 day + TUDCA	1,114±225	502±156	1,283±262	617±164
CBDL 2 days	1,053±246	508±152	1,168±247	612±162
CBDL 2 days + TCA	711±174 <sup>m</sup>	404±114	716±168 <sup>n</sup>	387± 97 <sup>m</sup>
CBDL 2 days + TUDCA	1,092±231	517±142	1,151±255	597±167

The data are expressed as mean ± 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 or TUDCA (45 µmol/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 day; n, *P*<0.01 vs. CBDL 2 days

**Table 3.** Rat hepatic monoamine oxidase (MAO) A and B kinetic parameters from 2 days after common bile duct ligation (CBDL 2 days) determined with 5-hydroxytryptamine for MAO A and benzylamine for MAO B

Experimental groups	MAO A				MAO B			
	Mitochondria		Microsome		Mitochondria		Microsome	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
	(Km, mM; Vmax, pmol ammonia min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )							
Sham 2 days	6.38±1.25	2,648±510	9.08±1.87	1,148±298	5.87±0.89	3,412±626	8.58±1.63	1,314±320
CBDL 2 days	6.68±1.39	2,092±474	9.38±1.77	1,008±296	6.11±1.06	2,314±472 <sup>g</sup>	8.82±1.49	1,217±311
CBDL 2 days + TCA	6.52±1.35	1,405±326 <sup>h,m</sup>	9.31±1.85	789±214	6.03±0.98	1,415±318 <sup>i,n</sup>	8.72±1.58	757±257 <sup>h,m</sup>
CBDL 2 days + TUDCA	6.35±1.31	2,180±451	9.18±1.92	1,017±272	5.90±0.93	2,295±498	8.64±1.61	1,192±318

Michaelis-Menten constants were determined using 5-hydroxytryptamine as a substrate for MAO A and benzylamine for MAO B from experimental rat livers at two days after CBDL. The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1, 2 and text. g, *P*<0.05 vs. Sham 2 days; h, *P*<0.01 vs. Sham 2 days; i, *P*<0.001 vs. Sham 2 days; m, *P*<0.05 vs. CBDL 2 day; n, *P*<0.01 vs. CBDL 2 days

**Table 4.** Effects of taurocholic acid (TCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after common bile duct ligation (CBDL) on serum monoamine oxidase (MAO) activity in rats

Experimental groups	MAO (ΔA×100 hr <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )
CBDL 1 day	Undetectable
CBDL 1 day + TCA	7.60±2.62
CBDL 1 day + TUDCA	Undetectable
CBDL 2 days	Undetectable
CBDL 2 days + TCA	16.22±5.43
CBDL 2 days + TUDCA	Undetectable

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Experimental groups are described in Table 2 and text

비교했을 때도 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 3).

쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 2 days + TCA)시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 약 47% (*P*<0.01), 총담관 결찰만 시킨 군보다는 약 33% (*P*<0.05)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰을 시킨 직

후 TUDCA를 주입하고 2일 경과 (결과 Table에서 CBDL 2 days + TUDCA)시켰을 때는 이 효소의 Vmax값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

쥐에게 총담관 결찰을 시키고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO B의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다 약 32% (*P*<0.05)의 감소를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간의 미토콘드리아와 마이크로솜 분획의 MAO B의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다는 각각 약 59% (*P*<0.001) 및 약 42% (*P*<0.01), 총담관 결찰만 시킨 군보다는 각각 약 39% (*P*<0.01) 및 약 38% (*P*<0.05)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때는 이들 효소의 Vmax값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

4. 쥐에서 총담관 결찰 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청 MAO 활성도에 미치는 영향

정상 쥐와 가수술을 시행한 쥐의 혈청에서는 MAO 활성이

측정되지 않았으며 쥐에게 총담관 결찰만 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때도 혈청에서는 MAO 활성이 측정되지 않았다. 그러나 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 MAO 활성도는 각각  $7.60 \pm 2.62 \Delta A \times 100 \text{ hr}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (이하 단위 생략함) 및  $16.22 \pm 5.43$  이었다 (Table 4).

## 고 찰

임상적 및 병리학적으로 담즙울체를 주소건으로 하는 간담도 질환들로는 원발성 담즙성 간경변증, 담즙울체형 간염, 원발성 경화성 담관염으로 인한 담관협착증, 담석에 의한 담관폐쇄증, 담관수술 후 및 담낭절제 후의 총담관협착증, 간 외 담도 폐쇄증, 담관암 및 간세포 암종의 총담관 침범으로 인한 담관폐쇄증, 췌장질환 및 총담관 주변 림프절의 종대로 인한 총담관의 외압성 폐쇄증, 기생충으로 인한 담관폐쇄증, 약물 또는 임신으로 인한 담관폐쇄증, 양성 재발성 담즙울체 등을 들 수 있다 (Erlinger, 1999; Sherlock et al., 2002b; Park et al., 2004). 이러한 담즙울체성 간담도 질환시에는 간세포에서 합성되고, 간세포 외로 유리되는 효소들은 간 조직과 혈청에서 그 활성도의 변동이 심하게 나타난다는 사실은 잘 알려져 있다. 실험적으로 쥐의 총담관을 결찰하여 담즙울체를 야기시키면 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들은 많으며 그 중에서도 특히 생체이물 생체 변환 효소들이 많다. 이들 중 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소들은 arylesterase, carboxylesterase, cholinesterase (Kwak et al., 1992), alcohol dehydrogenase 및 catalase (Kwak et al., 1988)이며 그 감소기전은 담즙울체로 간세포내에 증가된 TCA가 유전자 발현을 억제시켜 이들 효소의 합성을 억제시킨다 (Han et al., 1997; Han et al., 1998; Park et al., 1999; Kim et al., 2002)는 것이다.

Mun et al. (1989)의 보고에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후 담즙울체간에서 미토콘드리아의 MAO A 활성도는 총담관 결찰 후 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 미토콘드리아의 MAO B 활성도는 총담관 결찰 후 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였으며 마이크로솜의 MAO A와 B의 활성도는 총담관 결찰 후 28일 및 42일에 유의한 감소를 나타내었다고 하였다. 또한 혈청에서 MAO 활성은 총담관 결찰 후 3일까지는 측정되지 않았으나 총담관 결찰 후 7일부터 출현하여 이후 42일까지 계속 그 활성도가 증가 되었다고 하였다. 이와 같은 MAO A와 B는 쥐 담즙울체간의 미토콘드리아 및 마이크로솜에서 그 활성도가 감소되는 생체이물 생체 변환 효소라고 하였으며 그 감소 기전에 대해서는 MAO A와 B의 합성 감소에 의한 것 같다고만 추론하고 있다. 그리고 담즙울체 시 혈청에서 MAO

의 활성도가 증가된 것은 담즙울체간에서 나타나는 간세포막의 투과성 항진이 MAO의 혈청내 출현과 아울러 활성도 증가와 관계가 있다고 하였다. 그러나 어떤 물질이 담즙울체간에서 MAO A 및 B의 활성도를 감소시키는데 기여하였는지는 분명하게 설명하고 있지 않다.

이 연구는 담즙울체간에서 MAO 활성도가 감소되는 현상이 어떤 기전에 의해 나타난 것인지를 알고자 하여 시행한 것이다. 따라서 이 연구에서 해결해야 할 과제는 이들 효소가 담즙울체간에서는 그 활성도가 어떤 기전에 의해 감소되었고 담즙울체 시 혈청에서는 이 효소가 어떤 기전에 의해 다량 출현하였는가 하는 것이다. 이 연구에서는 이 문제를 해결하기 위하여 Ogawa et al. (1990)과 Pork et al. (1999)의 방법에 준하여 2 가지 동물 모델을 만들었다. 즉 첫째 모델은 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시켜 담즙울체간을 만든 것이고, 두번째 모델은 쥐에게 총담관 결찰로 담관을 폐쇄시킨 직후 TCA를 상대정맥 내에 다량 주입하여 간에 담즙울체를 더욱 심화시킨 것이며, 이 모델로는 간 내 TCA의 고부하에 따른 TCA의 효과를 알아 낼 수가 있는 것 (Ogawa et al., 1990; Pork et al., 1999)이다. 또한 이 연구에서는 주입하는 담즙산의 종류가 다르면 이들 효소 활성도에 미치는 효과도 달라지는가를 알아내기 위하여 담즙울체간에서 활성도가 감소되는 arylesterase와 carboxylesterase의 합성에 영향을 주지 않고 (Han et al., 1997; Han et al., 1998) 담즙산의 간독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (Poupon et al., 1987; Kitani, 1988; Leuschner et al., 1989; Heuman et al., 1991)를 총담관 결찰로 담관폐쇄를 시킨 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과도 관찰하여 보았다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 후 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO B 활성도가 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 정상군이나 가수술군의 쥐 혈청에서는 MAO가 출현하지 않았으며 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 후 1일 및 2일 경과시켰을 때도 혈청에는 MAO가 출현하지 않았다. 이상의 결과는 Mun et al. (1989)의 결과와 일치하였다. 이 실험에서 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A 및 B 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 그리고 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 마이크로솜 분획의 MAO B 활성도는 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 한편 쥐에게 총담관 결찰을 시키고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO의 Vmax값은 가수술만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 쥐에게 총담관 결찰 직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 미토콘드리아 분획의 MAO A, 간 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 MAO

B 등의 Vmax값은 대조군인 총담관 결찰만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이들 효소의 Km값은 모든 실험군의 간세포분획에서 유의한 변동은 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 TCA는 간의 MAO 합성을 억제한다고 추정할 수 있으며 특히 TCA를 주입한 실험군에서 이들 효소의 Km값은 변동이 없으면서 Vmax값이 감소된 것은 위의 추론을 한층 더 뒷받침 해주는 결과라고 생각한다. 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간세포 분획과 혈청에서 이들 효소의 활성도는 모두 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 간의 MAO 합성을 억제하지 않는다고 추정할 수 있다.

혈청 MAO 활성도는 쥐에게 총담관 결찰을 시킨 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때만 현저하게 높았다. 이 결과로 보아 담즙울체 시 TCA가 간 내에 고부하되면 혈청에 MAO가 출현되고 그 활성도는 증가된다는 것을 알 수 있으며 그 원인은 TCA가 간 세포막을 손상시켜 간에서 혈중으로 이 효소를 유출시켜 나타난 결과로 생각된다.

이상 이 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체간에서 MAO A 및 B의 활성도 감소는 담즙산 중 TCA에 의해 이들 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과로 생각되며 아울러 담즙울체 시 MAO의 혈중 출현 및 활성도 증가는 간의 피사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이 효소가 혈중으로 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

## REFERENCES

- Corte LD, Tipton KF. The turnover of the A- and B-forms of monoamine oxidase in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1980. 29: 891-895.
- Drew R, Priestly BG. Choleretic and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experientia.* 1979. 35: 809-811.
- Erlinger S. *Cholestasis in Schiff's diseases of the liver* (Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. Eds). 1999. pp 611-629. Lippincott-Raven. Philadelphia, USA.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949. 177: 751-766.
- Greenberg DM, Rothstein M. Method for isolation and degradation of labelled compounds in *Method in enzymology* (Colowick SP, Kaplan NO. Eds). 1957. Vol 4, pp 708-731. Academic Press. NY, USA.
- Greenwalt JW, Schnaitman C. An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol.* 1970. 46: 173-179.
- Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver arylesterase. *Korean J Hepatol.* 1997. 3: 154-169.
- Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver carboxylesterase. *Keimyung Med J.* 1998. 17: 487-503.
- Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts: In vivo studies in the rat. *Gastroenterology.* 1991. 100: 203-211.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J. Metabolic basis of detoxication, metabolism of functional groups. 1982. pp 5-317. Academic Press. NY, USA.
- Kim YH, Shin MJ. Effects of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Exp Mol Med.* 2002. 34: 123-130.
- Kitani K, Kanai S, Ohta M, Sato Y. Differing transport maxima values for taurine-conjugated bile salts in rats and hamsters. *Am J physiol.* 1986. 251: G852-G858.
- Kitani K. Ursodeoxycholic acid for cholestatic disease. *Lancet.* 1988. 2: 49.
- Kwak CS, Kim YH, Mun KC. Activities of alcohol metabolizing enzymes in the cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J.* 1988. 7: 64-75.
- Kwak CS, Kwak JS. Cell fractionation method of the rat liver. 1. Isolations of mitochondria and microsome. *The Keimyung Univ Med J.* 1986. 5: 45-53.
- Kwak CS, Lee SH. Carboxylesterase, arylesterase and cholinesterase activities in cholestatic rat liver induced by common bile duct ligation. *Korean Biochem J.* 1992. 25: 251-261.
- Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Guldutuna S, Hubner K, Hellstern A, Gatzert M, Leuschner M. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. *Gastroenterology.* 1989. 97: 1268-1274.
- McEwen CM Jr, Cohen JD. An amine oxidase in normal human serum, *J Lab Clin Med.* 1963. 62: 766-776.
- Mun KC, Kwak CS. Monoamine oxidase activity in cholestatic rat liver. *The Keimyung Univ Med J.* 1989. 8: 69-77.
- Nagatsu T, Yagi K. A simple assay of monoamine oxidase and D-amino acid oxidase by measuring ammonia. *J Biochem (Japan).* 1966. 60: 219-221.
- Ogawa H, Mink J, Hardison WGM, Miyai K. Alkaline phosphatase activity in hepatic tissue and serum correlates with amount and type of bile acid load. *Lab Invest.* 1990. 62: 87-95.
- Palmer RH. Bile acids, liver injury, and liver disease. *Arch Intern Med.* 1972. 130: 606-617.
- Park SK, Kim YH, Kwak CS. Effects of intravenous administra-

- tion of taurocholic acid on liver lysosomal  $\alpha$ -D- and  $\beta$ -D-mannosidase activities in rats with extrahepatic cholestasis. *J Exp Biomed Sci.* 2004. 10: 93-98.
- Park SK, Kwak CS. Repression of rat hepatic cholinesterase by bile acid load. *Keimyung Med J.* 1999. 18: 204-217.
- Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chretien Y, Ballet F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet.* 1987. 1: 834-836.
- Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system.* 11th ed. 2002a. pp 1-35. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver biliary system.* 11th ed. 2002b. pp 219-398. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Tipton KF. Monoamine oxidase in *Enzymatic basis of Detoxication* (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol I, pp 355-370. Academic Press. NY, USA.