

Effects of Intravenous Administration of Taurocholic Acid on Hepatic Catechol-O-Methyltransferase Activity in Rats with Choledocho-Caval Shunt

Jun-Young Do¹, Kyo-Cheol Mun, You-Hee Kim and Chun-Sik Kwak[†]

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

¹Department of Internal Medicine, Yeungnam University, College of Medicine, Daegu 705-717, Korea

The possible mechanism of decreased catechol-O-methyltransferase (COMT) activity in cholestatic rat liver was studied. Hepatic and serum COMT activities were determined from the experimental rats with choledocho-caval shunt (CCS). The Michaelis-Menten constants in this hepatic enzyme was also measured. The activities of cytosolic, mitochondrial and microsomal COMT as well as their V_{max} values were found to be decreased significantly in CCS plus taurocholic acid (TCA) injected group than in the control group, such as CCS alone groups. However, their K_m values in the experimental groups did not vary. Serum COMT activity increased slightly in the CCS plus TCA injected group than in the control group. The above results suggest that TCA represses biosynthesis of the COMT in the liver. The elevated activity of the serum COMT is believed to be caused by the increment of membrane permeability of hepatocytes upon TCA mediated liver cell necrosis.

Key Words: Catechol-O-methyltransferase, Choledocho-caval shunt, Taurocholic acid

서 론

간에 담즙울체가 야기되면 간과 혈청에서는 많은 효소들의 활성도가 변동되며 그 활성도 변동에는 담즙울체간에 축적된 taurocholic acid (TCA)가 관여하는 것 (Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997; Rhee and Kwak, 2000; Kim and Shin, 2002; Rhee and Kwak, 2002; Rhee and Kwak, 2004)으로 알려져 있다. 이러한 연구를 하기 위해서는 두 가지 동물 모델을 만들어 실험을 하는데 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999) 그 첫째 모델은 쥐에게 총담관 결찰 (common bile duct ligation)로 담관을 폐쇄 시킨 후 TCA를 혈중에 주입하는 모델이며 둘째 모델은 쥐에게 총담관 대정맥문합 (choledocho-caval shunt)을 시킨 후 TCA를 혈중에 주입하는 모델이다. 특히 이 둘째 모델인 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 상대정맥 내 주입한 모델로는 간 내 TCA의 저농도 증가에 따른 TCA 효과를 알아낼 수가 있으며 (Ogawa et al., 1990; Park and Kwak, 1999) 이 모델의 특징은 첫째 모델보다 TCA 효

과를 더욱 민감하게 알아 낼 수가 있다는 것 (Choi et al., 2004)이다.

이러한 둘째 모델로 간에서 생체이물 생체 변환 효소 (xenobiotic biotransformation enzyme)의 활성도 변동을 조사한 보고는 많다. 즉, catalase, alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol oxidizing system, aldehyde dehydrogenase (Kim and Shin, 2002), arylesterase (Han and Kim, 1997), arylamine N-methyltransferase (Rhee and Kwak, 2000), thiol methyltransferase (Rhee and Kwak, 2002), thiosulfate sulfurtransferase (Rhee and Kwak, 2004) 등이며 TCA가 이들 효소의 합성을 조절하여 이들 효소의 합성 속도를 변동시킨다는 것이다. 따라서 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 혈중에 주입 시킨 동물 모델의 간에서 그 활성도가 변동되는 효소들에 대해서는 TCA의 효과를 더욱 분명하게 알 수가 있을 것이다.

Catechol-O-methyltransferase (S-adenosyl-L-methionine: catechol-O-methyltransferase, EC 2.1.1.6, COMT)는 제 2상 생체이물 생체 변환 효소의 일종이며 catechol 및 catecholamine에 S-adenosyl-L-methionine으로부터 메틸기를 이전받아 catechol 또는 catecholamine을 메틸화 시키는 효소이다 (Kim, 1979; Borhardt, 1980). COMT는 간 세포의 세포질, 미토콘드리아 및 내혈질세망에 국재되어 있다 (Borhardt, 1980; Raxworthy et al., 1982; Mun, 1996). 이 효소는 담즙울체간에서 활성도가 감소됨이 (Mun, 1996) 알려져 있을 뿐만 아니라 TCA에 의해

*논문 접수: 2007년 3월 5일

수정재접수: 2007년 5월 25일

[†]교신저자: 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

서 이들 효소의 합성이 억제된다고 추정하고 있다 (Do and Kwak, 2005).

이 연구는 COMT의 활성도가 담즙울체간에서 감소되는 기전을 분명하게 알아내기 위하여 시행하였으며, 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후의 담즙울체간에서 효소 유전자의 발현율을 변동시키는 것으로 추정하는 TCA (Ogawa et al., 1990; Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997)와 간의 효소 합성에 영향을 미치지 않는다는 Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) (Ogawa et al., 1990; Han and Kim, 1997; Kim and Kim, 1997)를 각각 상대정맥 내에 주입한 후 경시적으로 간과 혈청에서 COMT의 활성도를 측정하여 담즙울체간에서 이 효소의 활성도 감소 기전의 일부를 밝혀 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide, 3,4-dihydroxybenzoic acid, DL-dithiothreitol, Triton X-100, catechol-O-methyltransferase (from porcine liver, C 1897), TCA (from ox bile, sodium salt, T 0750) TUDCA (sodium salt, T 0266) 및 단백질 표준액 (10 g/100 ml bovine albumin) 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine은 New England Nuclear사 (Boston, MA, USA)의 제품을, 그리고 PPO (2,5-diphenyloxazole), bis-MSB [ρ -bis-(O-methylstyryl benzene)], toluene (scintillation grade) 등은 Packard사 (Downers Grove, IL, USA)의 제품을, 사용하였다. 그의 시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 동물 및 처치

동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320 g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 9개군으로 나누었다.

1) 정상군 (1군).

2) 가수술 (sham operation)군

가수술 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

3) 총담관 대정맥문합 (cholecho-caval shunt)군

총담관 대정맥문합 후 1일 및 2일에 각각 희생시킨 군 (총 2군).

4) 총담관 대정맥문합과 함께 TCA를 주입한 군

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

5) 총담관 대정맥문합과 함께 TUDCA를 주입한 군

총담관 대정맥문합 직후 Ogawa et al. (1990)과 Park and

Kwak (1999)의 방법에 준하여 TUDCA (체중 100 g당 45 μ 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 대정맥문합 수술 및 가수술은 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 쥐를 오후 2시에서 5시 사이에 희생시킬 수 있도록 수술 시간을 조절하였으며 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 실시하였다. 총담관 대정맥문합은 상대정맥과 총담관을 medical grade silicon tube를 사용하여 연결하였으며 가수술은 단순 개복술만 시행하였다. TCA 및 TUDCA액의 상대정맥 내 주입은 syringe pump (model 341A, Sage instruments, USA)를 사용하여 15분간 주입하였다.

3. 간적출 및 세포분획

모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 이터 마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실험사시켰다. 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 (chamber clearance 0.005~0.007 inches, Thomas Co., USA)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 and Kwak, 1986)으로 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획을 분리하였다. 위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사 (USA)의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (model 570, ISCO, USA)를 사용하였다.

4. 효소 시료 조제

COMT 활성도 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 마이크로솜 분획 및 미토콘드리아 분획 4.5 ml에 대해서 0.5 ml의 sucrose-Triton X-100 (Triton X-100 10 ml와 sucrose 8.56 g을 증류수에 녹여 100 ml로 만든다) 액을 넣어 4°C에서 30분간

Table 1. Effects of choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
Normal	2,862±442	103±19	417±60
Sham 1 day	2,889±478	105±22	424±66
Sham 2 days	2,907±467	111±17	429±63
CCS 1 day	2,782±412	92±19	375±46
CCS 2 days	2,716±397	88±15	354±40

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; Sham 1 day or Sham 2 days, sacrificed on the 1st day or 2nd day after sham operation; CCS 1 day or CCS 2 days, sacrificed on the 1st day or 2nd day after choledocho-caval shunt.

방치한 후 이 액을 이 효소 활성도 측정용 시료로 사용하였으며 세포질 분획은 아무런 처치 없이 원액 그대로 사용하였다.

5. 효소 활성도 측정

혈청과 간 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도 측정은 효소 시료와 함께 3, 4-dihydroxybenzoic acid와 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시키는 동안에 생성된 방사성 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid를 toluene-isoamylalcohol (7:3) 혼합액으로 추출한 후 그 방사능을 측정하여 효소의 활성도를 산출하는 Borchardt (1981)의 법에 준하였으며, 효소 활성도 단위는 1 분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid와 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid의 총량을 pmol로 나타내었다. 이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 사용한 방사능 계측기는 Packard Tricarb 4530, liquid scintillation spectrometer (Packard Co., Downers Grove, IL, USA)였다.

6. K_m값 및 V_{max}값의 측정

수술 후 2일 경과한 모든 실험군의 세포분획 효소 시료들과 COMT의 2종 기질 중 3, 4-dihydroxybenzoic acid를 선택하여 이 기질의 원액과 희석액을 제조한 후 이 기질액들과 [methyl-³H] S-adenosyl-L-methionine이 함유된 S-(5'-adenosyl)-L-methionine iodide 원액을 사용하여 COMT의 활성도를 측정 후 이들 성적으로부터 1/vi값을 그리고 기질 농도로부터 1/[S]값을 계산하여 이중역수도 (double reciprocal plot)를 그린 다음 이것으로부터 K_m값과 V_{max}값을 산출하였다.

7. 단백질 정량

효소 시료 중의 단백질 정량은 0.5 M perchloric acid와

methanol-ether 혼합액 (3:1)으로 단백질을 정제하는 Greenberg and Rothstein (1957)법으로 효소 시료 중의 단백질을 정제한 다음 biuret법 (Gomall et al., 1949)으로 정량하였다.

8. 성적 검정

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

결 과

1. 쥐에서 총담관 대정맥문합 시 TCA 또는 TJDCA 주입이 간의 COMT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 후 1일 및 2일째 (결과 Table에서 CCS 1 day 및 CCS 2 days) 간의 세포질액, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 변동을 나타내지 않았다 (Table 1).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CCS 1 day + TCA 및 CCS 2 days + TCA) 경과시켰을 때 간의 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 즉 총담관 대정맥문합 직후 TCA를 주입시키고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질액의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군 (결과 Table에서 CCS 1 day 및 CCS 2 days) 보다 각각 약 20% ($P<0.05$) 및 약 21% ($P<0.05$)의 감소를 나타내었고 간 미토콘드리아 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 30% ($P<0.05$) 및 약 34% ($P<0.01$)의 감소를 나타내었으며 간 마이크로솜 분획의 이 효소 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 각각 약 34% ($P<0.001$) 및 약 39% ($P<0.001$)의 감소를 나타내었다 (Table 2).

한편 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 (결과 Table에서 CCS 1 day + TUDCA 및 CCS 2 days + TUDCA) 경과시켰을 때는 간의 3종 세포분획에서

Table 2. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on hepatic subcellular catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)		
	Cytosol	Mitochondria	Microsome
CCS 1 day	2,782±412	92±19	375±46
CCS 1 day + TCA	2,216±343 ^j	64±11 ^j	246±34 ^l
CCS 1 day + TUDCA	2,806±425	86±17	383±51
CCS 2 days	2,716±397	88±15	354±40
CCS 2 days + TCA	2,158±358 ^m	58±9 ⁿ	215±32 ^o
CCS 2 days + TUDCA	2,687±373	84±13	359±43

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group; CCS 1 day or CCS 2 days, sacrificed 1st or 2nd day after choledocho-caval shunt; One of the following bile acids, TCA or TUDCA (45 μmoles/100 g body weight) was intravenously administered through the superior vena cava. j, *P*<0.05 vs. CCS 1 day; l, *P*<0.001 vs. CCS 1 day; m, *P*<0.05 vs. CCS 2 days; n, *P*<0.01 vs. CCS 2 days; o, *P*<0.001 vs. CCS 2 days

Table 3. Rat hepatic catechol-O-methyltransferase (COMT) kinetic parameters from 2 days after choledocho-caval shunt (CCS 2 days) determined with 3, 4-dihydroxybenzoic acid

Experimental groups	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	K _m	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m	V _{max}
	(K _m ; mM, V _{max} ; pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)					
Sham 2 days	2.82±0.63	4,912±727	4.87±0.94	190±25	3.16±0.98	716±98
CCS 2 days	2.97±0.68	4,592±614	4.96±1.02	118±21	3.22±1.13	605±58
CCS 2 days + TCA	3.12±0.75	3,562±552 ^{g,m}	5.04±1.08	93±12 ^{i,m}	3.36±1.21	355±47 ^{i,o}
CCS 2 days + TUDCA	2.93±0.71	4,517±576	4.91±0.96	136±17	3.12±1.07	582±61

Michaelis-Menten constants for COMT were determined using 3, 4-dihydroxybenzoic acid, S-adenosyl-L-methionine iodide and [methyl-³H]S-adenosyl-L-methionine from experimental rat livers at two days after CCS. 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; i, *P*<0.001 vs. Sham 2 days; m, *P*<0.05 vs. CCS 2 days; o, *P*<0.001 vs. CCS 2 days

COMT 활성도는 모두 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2).

2. 쥐에서 총담관 대정맥문합 후 2일 경과한 실험군에서 간 COMT의 K_m값 및 V_{max}값의 변동

수술 후 2일 경과시킨 모든 실험군에서 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT를 3, 4-dihydroxybenzoic acid를 기질로 사용하여 K_m값 및 V_{max}값을 측정했을 때 K_m값은 모두 변동이 없었다. 또한 수술 후 2일 경과시킨 실험군에서 간 세포질액, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 V_{max}값도 모두 통계학적으로 유의한 변동은 없었다 (Table 3).

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 2일 (결과 Table에서 CCS 2 days + TCA) 경과시켰을 때 간 세포질액, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 V_{max}값은 가수술만 시킨 군 (결과 Table에서 Sham 2 days) 보다는 각각 약 27% (*P*<0.05), 약 51% (*P*<0.001) 및 약 50% (*P*<0.001), 총담관 대정맥문합만 시킨 군 (결과 Table에서 CCS 2 days) 보다는 각각 약 22% (*P*<0.05), 약 21% (*P*<0.05)

및 약 41% (*P*<0.001)의 감소를 나타내었다. 그러나 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 2일 (결과 Table에서 CCS 2 days + TUDCA) 경과시켰을 때는 이 효소의 V_{max}값은 유의한 변동을 나타내지 않았다 (Table 3).

3. 쥐에서 총담관 대정맥문합과 담즙정체 시간이 혈청의 COMT 활성도에 미치는 영향

정상 쥐와 가수술을 시행한 쥐의 혈청에서는 COMT의 활성이 측정되지 않았다. 그러나 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시켰을 때는 혈청의 COMT 활성도가 현저하게 높았다. 즉 혈청의 COMT 활성도는 총담관 대정맥문합 후 1일 경과시켰을 때는 63±16.3 pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min⁻¹ mg protein⁻¹ (이하 단위 생략함)이었으며 총담관 대정맥문합 후 2일 경과시켰을 때는 76±19.6이었다 (Table 4).

4. 쥐에서 총담관 대정맥문합 시 TCA 또는 TUDCA 주입이 혈청 COMT 활성도에 미치는 영향

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시키

Table 4. Effects of choledocho-caval shunt (CCS) on serum catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
Normal	Undetectable
Sham 1 day	Undetectable
Sham 2 days	Undetectable
CCS 1 day	63±16.3
CCS 2 days	76±19.6

The data are expressed as mean ± SD with 5 rats in each group. Experimental groups are described in Table 1 and text.

Table 5. Effects of taurocholic acid (TCA), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) infusions after choledocho-caval shunt (CCS) on serum catechol-O-methyltransferase (COMT) activities in rats

Experimental groups	COMT activities (pmol 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid with 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
CCS 1 day	63±16.3
CCS 1 day + TCA	89±24.8
CCS 1 day + TUDCA	65±17.5
CCS 2 days	76±19.6
CCS 2 days + TCA	104±23.4
CCS 2 days + TUDCA	72±22.7

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

고 1일 및 2일 경과시켰을 때의 혈청 COMT의 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군에 비해 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 그리고 총담관 대정맥문합 직후 TUDCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청의 COMT 활성도는 대조군과 별 차이가 없었다 (Table 5).

고 찰

쥐에서 담즙울체를 야기시켜 간이 손상을 받으면 생체이물 생체 변화 효소인 간의 COMT 활성도가 감소되는 것 (Mun, 1996)은 알려져 있으나 그 기전은 분명하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 쥐 담즙울체간의 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획에서 이 효소의 활성도 변동 기전을 파악해 봄으로써 담즙울체간에서 생체이물의 생체 변환에 대한 새로운 지견을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 아울러 담즙울체로 간 손상이 야기되는 간담도 질환에 대한 간의 해독기능의 일단이 밝혀질 것으로 생각된다.

Mun (1996)에 의하면 쥐의 총담관을 결찰한 후의 담즙을

체간에서 세포질, 미토콘드리아 및 마이크로솜의 COMT 활성도는 총담관 결찰 후 1, 2, 3, 7, 14, 28 및 42일에 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다고 하였고, 혈청 COMT는 정상 쥐에서는 나타나지 않았으나 총담관을 결찰한 쥐에서는 실험전기간 동안 높은 활성도를 나타내었다고 하였다. 그러나 이번 실험에서 총담관 대정맥문합만 시행한 간에서는 COMT의 활성도는 변동이 없었다. 이 현상은 간에 담즙울체의 정도가 미약하여서 나타난 결과로 생각된다.

Do and Kwak (2005)은 쥐를 사용한 실험에서 총담관 결찰 후 혈중에 TCA를 주입한 결과 간의 세포질액, 미토콘드리아, 마이크로솜에서 COMT의 활성도가 감소되었고 혈청에서는 COMT가 출현함과 아울러 그 활성도가 증가하였다고 하였으며 이 결과는 TCA가 간에서 이 효소의 합성을 억제하고 또한 간에서 이 효소의 혈중 유출을 증가시켜 나타난 결과라고 추론하였다. 이번 실험은 이 사실을 더욱 분명하게 알아내기 위하여 시행한 것이며 또한 이 실험에서는 주입하는 담즙산의 종류가 다르면 COMT 활성도에 미치는 효과도 달라지는가를 알아내기 위하여 담즙울체간에서 효소들의 합성에 영향을 주지 않으며 (Ogawa et al., 1990; Kim and Kim, 1997; Rhee and Kwak, 2000) 담즙산의 간독성에 대해 보호 효과를 가진다는 TUDCA (Poupon et al., 1987; Ogawa et al., 1990; Heuman et al., 1991)를 쥐에 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 상대정맥 내에 다량 주입시켜 TUDCA의 효과도 관찰하여 보았다.

이 실험에서 쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입시켜 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 한편 쥐에게 총담관 대정맥문합직후 TCA를 주입하고 2일 경과시켰을 때 간 세포질액과 미토콘드리아 및 마이크로솜 분획의 COMT의 V_{max}값은 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이 효소의 K_m값은 모든 실험군의 간 세포분획에서 유의한 변동을 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 TCA는 간의 COMT 합성을 억제한다고 확신할 수 있으며 특히 TCA가 COMT 저해제 (inhibitor)가 아니라는 사실 (Zollner, 1993)과 TCA를 주입한 실험군에서 이 효소의 K_m값은 변동이 없으면서 즉 촉매효율의 변동이 없으면서 이 효소의 활성도와 V_{max}값이 감소된 것은 위의 추론을 더욱 분명하게 해주는 결과라고 생각한다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TUDCA를 주입하고 1일 및 2일 경과시켰을 때 간 세포분획과 혈청에서 COMT 활성도는 모두 대조군의 그것과 별 차이가 없었다. 이 결과를 볼 때 TUDCA는 간의 COMT 합성에는 관여하지 않는다고 추정할 수가 있었다.

쥐에게 총담관 대정맥문합을 시킨 직후 TCA를 주입하고 1일 및 2일 경과시켰을 때 혈청 COMT 활성도는 대조군인 총담관 대정맥문합만 시킨 군보다 약간 증가 되었다. 이 결과로 보아 담즙울체 시 간 내에 TCA의 농도가 증가되면 혈청의 COMT 활성도도 증가된다는 것을 알 수 있으며 그 증가의 원인은 TCA에 의한 간의 괴사 (Palmer, 1972; Drew and Priestly, 1979; Kitani et al., 1986)로 간 세포막이 손상되어 간에서 혈중으로 이들 효소의 유출이 증가되어 나타난 결과로 생각된다.

이상 이 실험 결과와 문헌상의 지견을 종합해 볼 때 담즙울체간에서 COMT의 활성도 감소는 담즙산 중 TCA에 의해 이 효소의 합성이 억제되어 나타난 결과이며 아울러 담즙울체 시 이 효소의 혈중 활성도 증가는 간의 괴사로 간 세포막의 투과성이 항진되어 이 효소가 혈중으로 유출되어 나타난 결과로 생각된다.

REFERENCES

- Borchardt RT. N- and O-methylation in Enzymatic basis of detoxication (Jakoby WB. Ed). 1980. Vol II, pp 43-62. Academic Press. NY, USA.
- Borchardt RT. Catechol-O-methyltransferase in Method in Enzymology (Jakoby WB. Ed). 1981. Vol 77, pp 267-272. Academic Press. NY, USA.
- Choi HJ, Kim YH, Kwak CS. Effects of high taurocholic acid load on liver lysosomal cathepsin B and D, and acid phosphatase activities in rats with choledocho-caval shunt. *J Exp Biomed Sci.* 2004. 10: 429-434.
- Do JY, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on hepatic catechol-O-methyltransferase activity in common bile duct ligated rats. *J Exp Biomed Sci.* 2005. 11: 473-479.
- Drew R, Priestly BG. Choleric and cholestatic effects of infused bile salts in the rat. *Experientia* 1979. 35: 809-811.
- Gomall 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.
- Han BH, Kim YH. Effect of high taurocholate load on activity of rat liver arylesterase. *Korean J Hepatol.* 1997. 3: 154-169.
- 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.
- Kim BK. Enzyme Nomenclature, IUB. 1979. pp 134-135. Academic Press. NY, USA.
- Kim SK, Kim YH. Induction of rat liver γ -glutamyl transpeptidase by bile acid load. *Korean J Hepatol.* 1997. 3: 210-226.
- Kim YH, Shin MJ. Effects of high taurocholated 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.
- 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.
- Mun KC. Catechol-O-methyltransferase activity in cholestatic rat's liver induced by bile duct ligation. *J Biochem Mol Biol.* 1996; 29: 142-145.
- 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, 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.
- Raxworthy MJ, Gulliver PA, Hughes PJ. The cellular location of catechol-O-methyltransferase in rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1982; 320: 182-188.
- Rhee BW, Kwak CS. Induction of hepatic arylamine N-methyltransferase by a taurocholate load in rats. *J Korean Surg Soc.* 2000. 59: 141-153.
- Rhee BW, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on hepatic thiol methyltransferase activity in cholestatic rat. *J Korean Surg Soc.* 2002. 63: 1-10.
- Rhee BW, Kwak CS. Effects of intravenous administration of taurocholate on liver and serum thiosulfate sulfurtransferase activities in cholestatic rat. *J Korean Surg Soc.* 2004. 66: 359-366.
- Zollner H. Handbook of enzyme inhibitors. 2nd ed. 1993. Part B, pp 971. VCH verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Germany.