

흰쥐 재생 간의 Leucine Aminopeptidase 의 활성치*

제명대학교 의과대학 생화학교실

문교철 · 김여희 · 곽춘식

=Abstract=

Leucine Aminopeptidase Activity in the Regenerating Rat Liver

Kyo Cheol Mun, MD; You Hee Kim, MD; Chun Sik Kwak, PhD

Department of Biochemistry, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Changes in the activities of the followings have been studied over a period of 6 days after partial hepatectomy in rats: Plasma membrane, mitochondrial, nuclear and cytosolic leucine aminopeptidase and microsomal-particle bound aminopeptidase of the regenerating liver and serum leucine aminopeptidase. The activities of alkaline phosphatase in the subcellular fractions were also measured.

The activities of leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase in serum markedly elevated from 12 hours to three days after partial hepatectomy in rats.

The activity of plasma membrane-bound leucine aminopeptidase in the regenerating rat liver drastically increased during the first and the third days of the operation. And the activity of microsomal particle-bound aminopeptidase in the regenerating liver significantly increased between the second and the third days after operation.

The activities of nuclear and cytosolic leucine aminopeptidase in the regenerating liver showed a substantial increase at the second day and from first to sixth day respectively after operation. However, no significant change in hepatic mitochondrial leucine aminopeptidase was noted throughout the experiments.

The activities of plasma membrane, microsomal, mitochondrial, nuclear and cytosolic alkaline phosphatase in the regenerating liver markedly increased throughout the experiments.

서 론

Leucine aminopeptidase (α -aminoacyl peptide hydroxylase (cytosol), EC 3.4.11.1; LAP)는 oligomeric zinc metalloenzyme (Carpenter 및 Harrington, 1972; Lederman, 1981)으로서 peptide의 칠소 말단 위치에 결합되어 있는 amino 산이나 imino 산의 peptide 결합의 가수분해를 주변하는 일련의 효소(Smith, 1951; Wilkison, 1976)이며

“이 칠소 말단 위치에 L-leucine이 결합된 peptide의 가수분해에 가장 민감하게 작용하는 것(Smith, 1951)으로 알려져 있다.

이 효소는 풍물의 모든 조직에 널리 분포되어 있으며(Smith 및 Bergmann, 1944; Jarvinen 및 Hopsu-Havu, 1975) 뇌, 콩, 선, 심이지장에서 그 활성력이旺盛하다(Rutenberg 등, 1958; Makinen 및 Hopsu-Havu, 1967)고 한다. 그리고 이 효소는 각 조직에서 cytosol, mitochondria, nuclei, plasma membrane 및 microsome에서 발견되며(Roman 및

* 본 논문은 1986년도 제명대학교 학생학술대회 및 동아의료신 조사연구비로 이루어졌다.

Huberd, 1983; 정 및 박, 1987), 이 중 microsome에서 발견되는 이 효소는 particle bound aminopeptidase (α -aminoacyl peptide hydroxylase (microsomal), EC 3.4.11.2; PAP)라 부르고 (Kim, 1979) 있다.

이 효소는 폐쇄성 황달, 간암, 간염, 간경변증, 해열 및 각종 악성 종양에서 혈중에 그 활성이 증가되며 (Fleisher 등, 1957; Rutenberg 등, 1958; Arst 등, 1959; Bressler 등, 1960; Hammond 등, 1960; Hoffman 등, 1960; Miller 및 Worsley, 1960; Pineda 등, 1960a; Pineo 등, 1960b; Rene 및 Mellinkoff, 1960; Shay 등, 1960; Phillips 및 Manildi, 1974; 박, 1980a) 간조직에서는 탑즙을 제작(박, 1980a)과 재생간(박, 1980b)에서 그 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 그리고 탑즙을 제작의 경우는 각 세포분화 중의 활성화와 탑즙을 제작의 경과에 따른 간조직 세포분화 중의 활성화 변동도 차이를 알려져 있다(정 및 박, 1987). 그러나 재생간에서는 세포분화 중의 활성이나 시간 경과에 따른 활성 변동은 알려져 있지 않다.

이 연구는 흰쥐의 간엽을 부분질제한 후 꽈리기 때 각각 간의 세포분화 중에서 LAP의 활성이 어떻게 변동되는지를 알아보기 위하여 서로한 것으로서, 흰쥐에서 간엽을 절제한 후 6일 동안 혈청과 재생간의 plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 LAP 그리고 microsome의 PAP 활성을 측정하였으며 아울러 이를 분획의 alkaine phosphatase(ortho-phosphoric monoester phospho hydroxylase, EC 3.1.3.1; ALP)의 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 보고고자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치: 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 채종 320~360gm이 되는 Sprague-Dawley 종의 숯 흰쥐를 사용하였으며 1군은 5마리로 하여 다음과 같이 10군으로 나누었다.

1) 가수술군: 가수술 후 12시간, 1일, 2일, 3일 및 6일째에 죽인 군(총 5군)

2) 간엽절제군: 간엽절제 후 12시간, 1일, 2일, 3일 및 6일째에 죽인 군(총 5군)

위의 각 실험군들은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 제일사료주식회사의 제품을 구입하여 사용했으며 물과 함께 자유로이 먹도록 하였다.

수출은 효소활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수출시간을 조절하였으며 12시간 절식시킨 후 가능한 한 무균상태를 유지하면서 약한 ether 마취하에서 실시하였다.

흰쥐의 간엽질제수출은 북부정중선을 따라서 상복부를 약 2cm 절개하여 간의 중엽과 좌측외엽을 북장 밖으로 압출하고 인접조직 간의 인대를 절단한 후 간엽의 기저부를 결찰한 뒤 간엽을 절개하였다. 이 과정에서 절제된 간은 전체 간의 약 70%에 해당되며 이것을 원래간(original liver)으로 사용하였다.

가수술은 간엽절제만 하지 않고 그외 모든 조작은 간엽절제 수술사와 동일하게 하였다.

시약: Sodium deoxycholic acid, L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxy anilide-HCl, p-xylene, sodium metaperiodate, disodium phenyl phosphate, 4-aminoantipyrine, phenol, 종합표준효소(enzyme-control 2-N) 및 단백질준액(10gm/100ml bovine albumin)등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, 그의 일반 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획: 모든 실험군에서 간의 적출은 흰쥐를 12시간 절식시킨 후 ether 마취하에서 시행하였으며 북부대동맥으로부터 채혈하여 신혈사시키고 간을 적출하였다. 적출한 간은 2~4°C의 0.25M-sucrose액으로 잘 쟁고 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 sucrose액을 가능한한 모두 제거하였다. 간엽절제시 절제한 원래간도 같은 방법으로 쟁은 후 세포분화에 제공하였다. 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곧 효소활성도 측정에 사용하였다.

간의 세포분화은 채취한 원래간과 재생간을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 잘 혼합하여 그 중 약 4.5gm을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass homogenizer (Thomas사 제품, chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 5회 왕복 마쇄하여 10w/v% 간균질 용액을 만들었다. 간균질액 약 15ml를 취하여 Dorling 및 Le Page (1973)의 법에 준하여 plasma membrane을 분리하였다. 즉 간마세 균질액 약 15ml를 취하여 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet를 70w/v% sucrose액에 혼탁시켜 그 일정량을 30~55w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 판지에 부하시켜 70,400×g에서 100분간 원심분리한 후 37~41% (d=1.16~1.18) sucrose액총 부위에 형성된 pellet를 취하여 1mM sodium bicarbonate액으로 1회 세척하여 이것을

plasma membrane 분획으로 사용하였다.

Nuclei 분획의 분리는 Conover 및 Siebert(1965)의 법에 따라 분리하였다. 즉 앤마페온질에 약 15ml를 취하여 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet를 75.3w/v% sucrose액에 혼탁시켜 22,530×g에서 1시간 원심분리하여 원심분리관 관자에 생성된 pellet를 취한 후 다시 75.3w/v% sucrose액에 재현탁시켜 22,530×g에서 원심분리하여 pellet를 얻고 이것을 0.25M sucrose액으로 세척하여 이 분획을 nuclei 분획으로 사용하였다. Mitochondria 및 microsome의 분리는 sucrose density gradient 초원심분리법(곽 및 판, 1986)을 이용하여 분리하였으며 cytosol의 분리도 초원심분리법(곽 및 판, 1986)에 의하여 분리하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며, 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall 사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. Sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO model 570)를 사용하여 제조하였다.

효소액의 조제: 분리한 plasma membrane, nuclei, microsome 및 mitochondria는 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액에 혼탁시켰으며 LAP 및 PAP 측정용 효소액은 이 혼탁액을 그대로 사용하였다. ALP 측정용 효소액은 이 혼탁액을 1w/v% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v% sodium bicarbonate액으로 세척하여 ultrasonic dismembrator (Fisher model 300)로 20±0.4 K cycle/sec의 조건으로 2분전 5회 총 10분간 초음파 마쇄를 한 액을 효소액으로 사용하였다. Cytosol 분획은 아무 처리 없이 그대로 LAP, PAP 및 ALP 효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정: 혈청과 간의 각 세포분획의 LAP와 microsome 분획의 PAP 활성도 측정은 L-luecyl-3-carboxyl-4-hydroxyanilide를 기질로 사용하여 효소액과 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성되는 5-aminoosalicylic acid를 p-xylenol 및 sodium metaperiodate와 나옹시지 생성되는 quinoid의 청색을 비색하여 정량하는 赤坂等(1978)의 법에 의하였다. 이 효소활성의 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 생성한 5-aminoosalicylic acid를 n mole로 나타내었다.

혈청 및 간의 각 세포분획의 ALP 활성도 측정은 disodium phenylphosphate를 기질로 사용하여 효소액과 함께 37°C에서 15분간 반응시키는 동안에 생성된 phenol을 ferricyanide 분자 하에서 4-amino-

antipyrine과 촉합하여 생성된 quinone 화합물의 치색을 비색하여 정량하는 Kind 및 King(1954)의 법에 의하였다. 이 효소의 활성의 단위는 1분간에 1ml 혈청 또는 1mg의 단백이 생성한 phenol을 p mole로 표시하였다.

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 표준효소를 사용하여 결정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 효소활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Varian Carry 210)였다.

단백정량: 효소액 중의 단백정량은 0.5N-perchloric acid와 methanol: ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정체하는 Colowick 및 Kaplan (1957)법으로 써 효소액 중의 단백을 정체한 다음 biuret 법(Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호 비교가 필요할 경우는 Student t-검정법(Sheffler, 1980)에 의하여 검정하였다.

성 적

흰쥐에서 간엽절제 후 혈청의 LAP 및 ALP의 활성도: 간엽절제 또는 가수술 후 경시적으로 측정한 혈청 LAP 및 ALP의 활성도는 표 1과 같다. 간엽절제 후 혈청 LAP의 활성도는 12시간부터 증가하여 3일까지 증가를 보았다. 12시간에는 가수술군 26.42±2.45 n mole 5-aminoosalicylic acid/ml/min(이하 단위 생략함)에 비해 36.98±4.64로 약 40%의 증가($P<0.01$)를 보였으며 1일에는 약 50%($P<0.01$), 2일에는 약 72% ($P<0.001$), 3일에는 약 48%($P<0.01$)의 증가를 보았다. 그리고 간엽절제 후 혈청 ALP의 활성도도 혈청 LAP와 마찬가지로 간엽절제 후 12시간부터 3일까지 현저한 증가를 보았다.

재생간의 plasma membrane 분획의 LAP 및 ALP의 활성도: 재생간의 plasma membrane 분획의 LAP 및 ALP의 활성도는 표 2와 같다. 간엽절제 후 재생간의 plasma membrane 분획의 LAP의 활성도는 1일에서 3일째 재생간에서 현저히 증가되었다. 즉 1일째 재생간은 원래간에 비해서 약 121%의 증가($P<0.01$)를 보였고 3일에는 약 98%($P<0.05$)의 증가를 보였으며, 이후 6일에는 정상으로 회복되었다. 재생간의 plasma membrane의 ALP

Table 1. Activities of serum leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (ALP) after partial hepatectomy in rats

Post hepatectomy days	L A P		A L P	
	n mol 5-aminosalicylic acid/ml/min	Sham (%)	p mol phenol/ml/min	Hepatectomy (%)
0.5	26.42±2.45 (100)	36.98±4.64** (140)	197.10±60.12 (100)	360.51±68.22** (183)
1	26.05±2.50 (100)	39.07±5.22** (150)	195.71±58.88 (100)	402.62±113.16* (206)
2	25.70±2.41 (100)	44.20±6.21*** (172)	196.42±60.23 (100)	550.12±167.47** (280)
3	26.12±2.38 (100)	38.66±4.72** (148)	198.43±61.46 (100)	464.80±160.25* (234)
6	25.67±2.33 (100)	29.01±2.54 (113)	195.26±57.78 (100)	254.13±60.43 (130)

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group; Sham = sham operation, Hepatectomy = hepatectomized animals.
Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

Table 2. Activities of plasma membrane leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (ALP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy days	L A P		A L P	
	n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min	Original liver (%)	p mol phenol/mg protein/min	Regenerating liver (%)
0.5	6.64±1.32 (100)	7.92±1.78 (119)	5.33±0.87 (100)	6.93±1.21 (130)
1	6.52±1.43 (100)	14.43±4.24** (221)	5.36±0.92 (100)	8.95±1.41** (167)
2	6.63±1.37 (100)	13.23±3.98* (200)	5.38±0.86 (100)	21.62±4.62*** (402)
3	6.56±1.34 (100)	12.97±4.10* (198)	5.32±0.93 (100)	14.89±2.13*** (280)
6	6.67±1.29 (100)	6.56±2.15 (98)	5.35±0.94 (100)	7.82±1.26* (146)

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group.
Significant difference from original liver (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

활성도도 LAP 와 마찬가지로 증가되었으나 그 증가의 정도와 시기는 약간 상이하였다. 전실험기간에 있어서 모든 재생간에서 증가되었으며 그 증가의 정도를 보면 간염절제 후 2일째 재생간에서는 원래간에 비해 약 302%(P<0.001)의 증가를 보였고 3일째 재생간에서는 약 180%(P<0.001)의 증가를 보였다.

재생간의 microsome 분획의 PAP 및 ALP의 활성도: 재생간의 microsome 분획 중의 PAP 및 ALP의 활성도는 표 3과 같다. 재생간의 microsome 분획 중의 PAP 활성도는 2일째 및 3일째 재생간에서 원래간에 비해 각각 약 91%(P<0.001), 약 60%(P<0.01)의 증가를 보였다. 그리고 재생간의

microsome 분획의 ALP는 전실험기간에 있어서 모든 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 mitochondria 분획의 LAP 및 ALP의 활성도: 재생간의 mitochondria 분획 중의 LAP 및 ALP의 활성도는 표 4와 같다. 재생간의 mitochondria 분획의 LAP의 활성도는 전실험기간을 통해 의의있는 증가를 보이지 않았다. 그러나 재생간의 mitochondria 분획의 ALP는 1일째 부터 6일째 재생간에서 현저한 증가를 보였다. 1일째 재생간은 원래간에 비해 약 69%(P<0.01)의 증가를 보였으며 2일째 재생간은 약 128%(P<0.01), 3일째 재생간은 약 289%(P<0.001) 그리고 6일째 재생간은 약 56%(P<0.05)의 증가를 보였다.

Table 3. Activities of microsomal particle-bound aminopeptidase (PAP) and alkaline phosphatase (ALP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy days	P A P		A L P		
	n mol 5-aminosalicylic acid/ mg protein/min	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	p mol phenol/ mg protein/min	Regenerating liver (%)
0.5	4.82±0.72 (100)	5.40±0.93 (112)	5.07±0.41 (100)	7.24±1.13** (143)	
1	4.78±0.70 (100)	6.07±1.23 (127)	5.06±0.42 (100)	15.62±1.36*** (309)	
2	4.85±0.69 (100)	9.26±1.56*** (191)	5.04±0.39 (100)	21.57±1.58*** (428)	
3	4.86±0.68 (100)	7.78±1.29** (160)	5.06±0.38 (100)	25.36±1.96*** (501)	
6	4.80±0.72 (100)	5.42±0.87 (113)	5.08±0.40 (100)	9.30±1.12*** (183)	

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group.
Significant difference from original livers (**; P<0.01, ***; P<0.001).

Table 4. Activities of mitochondrial leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (ALP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy days	L A P		A L P		
	n mol 5-aminosalic acid/ mg protein/min	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	p mol phenol/ mg protein/min	Regenerating liver (%)
0.5	1.51±0.19 (100)	1.50±0.23 (99)	0.87±0.15 (101)	1.12±0.25 (129)	
1	1.52±0.20 (100)	1.53±0.22 (101)	0.86±0.14 (100)	1.45±0.24** (169)	
2	1.49±0.18 (100)	1.64±0.21 (110)	0.87±0.18 (100)	1.98±0.31*** (228)	
3	1.47±0.17 (100)	1.71±0.20 (116)	0.88±0.16 (100)	3.50±0.72*** (398)	
6	1.50±0.16 (100)	1.51±0.17 (101)	0.85±0.13 (100)	1.33±0.30* (156)	

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group.
Significant difference from original livers (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

Table 5. Activities of nuclear leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase(ALP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy days	L A P		A L P		
	n mol 5-aminosalicylic acid/ mg protein/min	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	p mol phenol/ mg protein/min	Regenerating liver (%)
0.5	1.47±0.47 (100)	1.69±0.59 (115)	2.62±0.22 (100)	3.62±0.54** (138)	
1	1.45±0.50 (100)	2.62±1.03 (139)	2.60±0.25 (100)	7.23±1.14*** (278)	
2	1.43±0.44 (100)	3.03±1.21* (212)	2.64±0.20 (100)	10.24±1.97*** (388)	
3	1.46±0.46 (100)	2.18±0.98 (149)	2.63±0.21 (100)	6.70±1.02*** (255)	
6	1.48±0.50 (100)	1.44±0.63 (97)	2.61±0.23 (100)	3.69±0.62* (141)	

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group.
Significant difference from original livers (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

Table 6. Activities of cytosolic leucine aminopeptidase(LAP) and alkaline phosphatase(ALP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy days	L A P		A L P		
	n mol 5-aminosalicylic acid/ mg protein/min	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	p mol phenol/ mg protein/min	Regenerating liver (%)
0.5	11.62±0.78 (100)	12.83±0.92 (110)	2.21±0.13 (100)	2.92±0.34** (132)	
1	11.60±0.80 (100)	14.12±1.06** (122)	2.18±0.18 (100)	3.87±0.41*** (178)	
2	11.58±0.75 (100)	15.93±1.26*** (138)	2.19±0.17 (100)	4.91±0.73*** (224)	
3	11.63±0.77 (100)	15.61±1.27*** (134)	2.20±0.20 (100)	6.72±0.82*** (305)	
6	11.56±0.74 (100)	15.39±1.31*** (133)	2.17±0.19 (100)	3.22±0.32*** (148)	

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group.

Significant difference from original liver (**; P<0.01, ***; P<0.001).

재생간의 nuclei 분획 및 cytosol 분획의 LAP 및 ALP의 활성도: 재생간의 nuclei 분획 및 cytosol의 LAP 및 ALP의 활성도는 각각 표 5 및 표 6과 같다. 재생간의 nuclei 분획의 LAP 활성도는 1일부터 3일째 재생간까지 증가된 차를 보였다. 그러나 3일째 재생간에서 약 112%(P<0.05) 증가된 것을 제외하고는 통계학적인 의의는 없었다. 반면에 재생간의 nuclei 분획의 ALP의 활성도는 실험기간 동안 모든 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 cytosol 분획의 LAP의 활성도는 1일부터 6일째 재생간에서 의의 있는 증가를 보였다. 1일째 재생간은 원래 간에 비해 약 22%(P<0.001), 3일째 재생간은 약 34%(P<0.001), 6일째 재생간은 약 33%(P<0.001)의 증가를 보였다. 그리고 재생간의 cytosol 분획의 ALP의 활성도도 역시 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 현저한 상승을 보였다.

고 칠

흰쥐에서 간엽을 절제했을 때의 간류간의 재생에 관해서는 이미 잘 알려져 있다. (Becker, 1963; Ksukada 및 Lieberman, 1964; Lieberman 및 Kane, 1965; Bucher, 1967; 김, 1968a; 김, 1968b; 권 및 유, 1969). 흰쥐에서 간의 종엽과 좌주엽(약 70%)을 절제한 후 간재생을 보면 수술 후 곧 RNA, DNA 및 단백의 합성이 왕성하게 일어나고 세포분열은 24시간부터 증가하기 시작하여 48시간 이내에 세포핵의 수는 거의 3배로 증가되어 (Becker, 1963) 간중량도 9~15일까지 계속 증가

된다. 그리고 이를 합성이 왕성한 시기나 세포분열이 활발한 시기는 거의 일정하며 동물에 따른 개체차는 적다(유, 1970)고 한다. 간조직의 재생이 활발한 시기에는 각종 효소들의 활성도도 변동을 반으며(Ksukada 및 Lieberman, 1964; Fausto 및 Van Lecker, 1965; Okubo 및 Chandler, 1974; Nagasue 등, 1976; 꽈 및 조, 1978; Clement, 1979; Sekas 및 Cook, 1979; 꽈, 1980b; Sheid, 1985; 안 및 꽈, 1987) 특히 담도계 효소인 ALP, 5'-nucleotidase, γ -glutamyl transpeptidase 및 LAP들이 간재생이 활발한 시기에 증가된다(꽈 및 조, 1978; 꽈, 1980b; 안 및 꽈, 1987). 그러나 LAP는 재생간의 cytosol에서, 그리고 ALP는 재생간의 총 조직에서(꽈 및 조, 1978)의 활성변동만 알려져 있는 따름이다.

이 연구는 흰쥐의 간엽을 절제한 후 각 시기에 재생간의 세포분획 즉 cytosol, plasma membrane, mitochondria, nuclei 분획 중의 LAP와 microsome 분획 중의 PAP 활성을 측정하고 아울러 이를 분획에서 ALP의 활성도도 측정하여 각 세포분획에서 이를 효소의 합성이 어떻게 변동되는지를 알아본 것이다.

이 실험에서 흰쥐의 간엽을 절제했을 때 헬청 LAP 및 ALP의 활성은 양자 모두 12시간부터 3일까지 현저한 증가를 보였다. 그리고 재생간의 cytosol 분획의 LAP는 1일 내지 6일째 재생간에서 의의 있는 증가를 보였으며 재생간의 plasma membrane 분획의 LAP 활성도는 1일, 2일 및 3일째 재생간에서, microsome 분획의 PAP 활성도는 2일 및

3일째 재생간에서, 또한 nuclei 분화의 LAP 활성도는 2일째 재생간에서 현저한 증가를 보였다. 그러나 mitochondria 분화의 LAP 활성도는 재생간에서 변동을 보이지 않았다. 한편 재생간에서의 ALP 활성도는 이들 전분화에서 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 증가를 보였다. 이 실험에서 혈청 LAP 및 ALP 그리고 재생간의 cytosol 분화의 LAP 성적은 박(1980b)과 박 및 조(1978)의 성적과 일치한다. 박 및 조(1978)에 의하면 간엽절제 후 혈청에서 ALP의 활성도가 증가하는 것을 재생간에서 이의 합성이 촉진되어 혈중으로 많은 양이 유리되어 나타난 결과라고 하였다. 이 실험에서 재생간의 모든 세포들에서 LAP의 활성이 증가된 것으로 보아 박 및 조(1978)의 주문이 더욱 확실시된다.

박(1980b)은 간엽절제 후 혈청에서 LAP의 활성이 증가되는 것은 재생간에서의 합성 증가가 원인인지, 또는 간엽절제부위에 남아 있던 간엽 조직에서 유래된 것인지는 분명치 않다고 하였다. 역시 이 실험 성적으로 써도 분명히 말하기는 어렵다.

이상 이 실험 성적과 문현 장의 지견으로 보아 간엽절제 후 혈청 및 재생간의 ALP의 활성도 증가는 재생간에서의 합성증가와 혈중으로의 다양 유리가 유력시된다. 그러나 간엽절제 후 LAP의 혈중 증가 및 재생간 세포분화중의 활성증가는 무엇이라 분명하게 말하기는 힘들며, LAP는 단지 간재생이 활발한 시기에 조절받아 그 활성이 증가되는 효소라는 것만을 알 수 있을 뿐이다. 따라서 재생간에서의 LAP활성증가는 효소단백의 합성인가인가 또는 측면효율의 증가인가, 그 원인이 무엇인지를 앞으로 밝혀야 하겠다.

요 약

흰쥐의 간엽을 부분절제한 후 각 시기에 재생간의 세포분화 중에서 LAP의 활성이 어떻게 변동되는가를 알아보기 위해 흰쥐의 간을 부분절제하고 6일동안 혈청과 재생간의 plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분화의 LAP와 microsome 분화의 PAP 활성을 측정하였으며 이들 이들 분화의 ALP 활성도도 측정하였다.

간엽절제 후 혈청 LAP와 ALP 활성도는 양자 모두 12시간부터 3일까지 현저한 증가를 보였다.

재생간의 plasma membrane 분화의 ALP 활성도는 간엽절제 후 1일, 2일 및 3일째 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

plasma membrane 분화의 ALP 활성도도 1일에서 6일째 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 microsome 분화의 PAP 활성도는 2일 및 3일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였으나 ALP는 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 mitochondria 분화의 LAP 활성도는 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 별다른 변동을 보이지 않았으나 ALP 활성도는 1일, 2일, 3일 및 6일째 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 nuclei 분화의 LAP 활성도는 2일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였고 ALP 활성도는 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 현저한 증가를 보였다.

재생간의 cytosol 분화의 LAP 활성도는 1일에서 6일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였고, ALP 활성도는 전실험기간을 통해 모든 재생간에서 증가를 보였다.

참 고 문 헌

- 赤塚尹巳, 長澤 健, 鳥本 三利: 新合成基質을 사용한 肝特異性高感度血清 LAP測定法의 確定 (日文). 臨床病理(補冊) 1978; 26: 85.
- 안광숙, 박준식: 흰쥐 재생간의 5'-Nucleotidase 및 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성. 기생의학 논문집 1987; 6권 계제예경
- Arst H, Manning RT, Delp M: Serum leucine aminopeptidase activity, findings in carcinoma of the pancreas, pregnancy and other disorder. *Am J Med Sci* 1959; 238: 598.
- Becker FF: Restoration of liver mass following partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1963; 43: 497.
- Bressler R, Forsyth BR, Klatskin G: Serum leucine aminopeptidase activity in hepatobiliary and pancreatic disease. *J Lab Clin Med* 1960; 56: 417.
- Bucher NLR: Experimental aspects of hepatic regeneration. *N Engl J Med* 1967; 277: 738.
- Carpenter FH, Harrington KT: Intermolecular cross-linking of monomeric proteins and cross-linking of oligomeric protein as a probe of quaternary structure. Application

- to leucine aminopeptidase (Bovine lens). *J Biol Chem* 1972 ; 247 : 5580.
- 정상호, 박준식 : 흰쥐 담즙율체간의 Leucine Aminopeptidase 의 활성치. 계명의대논문집 1987; 6권 제3예정
- Clement P: Effect of partial hepatectomy and hydrocortisone administration on liver and serum sialyltransferase activities. *Biochim Biophys Acta* 1979 ; 583 : 14.
- Colowick SP, Kaplan NO: Method for isolation and degradation of labeled protein, in *Method in enzymology*. New York, Academic Press, 1957 ; 4 : 708.
- Conover TE, Siebert G: On the occurrence of respiratory components in rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1965 ; 99 : 1.
- Dorling PR, Le Page PN: A rapid high yield method for the preparation of rat liver cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973 ; 318 : 33.
- Fausto N, Van Lancker JL: Molecular mechanisms of liver regeneration. IV. Thymidylic kinase and deoxyribonucleic acid polymerase activities in normal and regenerating liver. *J Biol Chem* 1965 ; 240 : 1247.
- Fleisher GA, Butt HR, Huizenga KA: Enzymatic hydrolysis of L-leucylglycine in serum in hepatic disease. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1957 ; 32 : 410.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949 ; 177 : 751.
- Hammond JB, Rosenak BD, Khoo EC: The diagnostic value of serum leucine aminopeptidase concentration in carcinoma of the pancreas. *Am J Dig Dis* 1960 ; 5 : 233.
- Hoffman E, Nachlas MM, Gaby SD, Abrims SJ, Seligman AM: Limitation in the diagnostic value of serum leucine aminopeptidase. *N Engl J Med* 1960 ; 263 : 542.
- Jarvinen M, Hopsu-Havu VK: α -N-benzoyl-arginine-2-naphthylamide hydrolase(cathepsin B₁). KK. Purification of the enzyme and demonstration of two inhibitors in the skin. *Acta Chem Scand* 1975 ; 29 : 772.
- Kim BK: *Enzyme nomenclature*, IUB New York, Academic Press, 1979, p301.
- 김동성 : 백서에 있어서 간엽질제후 재생시기의 간 단백 및 혈장의 합성속도에 관하여. 현대의학 1968a ; 8 : 192.
- 김종태 : 재생간의 in vitro에 있어서의 단백합성과 humoral factor. 경북의대잡지 1968b ; 9 : 39.
- Kind PRN, King EJ: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminoantipyrine. *J Clin Chem* 1954 ; 3 : 507.
- Ksukada K, Lieberman I: Metabolism of nucleolar ribonucleic acid after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 1964 ; 239 : 1564.
- 박준식 : 총수담관을 결찰한 흰쥐 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980a ; 21 : 126.
- 박준식 : 간엽을 부분절제한 흰쥐의 혈청 및 재생간 장의 Leucine Aminopeptidase의 활성도. 경북의대잡지 1980b ; 21 : 500.
- 박준식, 조준승 : 흰쥐 재생간의 Alkaline Phosphatase의 활성치. 한국생화학회지 1978 ; 11 : 151.
- 박준식, 박정식 : 흰쥐간 세포분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986 ; 5 : 45.
- 권기정, 유효열 : Ethionine이 백서재생간의 단백 합성에 미치는 영향. 경북의대잡지 1969 ; 10 : 183.
- Ledeme N, Hennon G, Vincent-Fiquet O, Plaquet R: Purification and enzymatic properties of an L-leucine aminopeptidase from swine liver. *Biochim Biophys Acta* 1981 ; 660 : 262.
- Lieberman I, Kane P: Synthesis of ribosomes in the liver after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 1965 ; 240 : 1737.
- Makinen KK, Hopsu-Havu VK: The presence of enzymes resembling aminopeptidase B in several rat organs. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1967 ; 45 : 230.
- Miller AL, Worsley L: Serum leucine aminopeptidase in carcinoma of pancreas and other diseases. *Br Med J* 1960 ; 2 : 1419.
- Nagasue N, Inokuchi K, Iwaki A, Yukaya H,

- Kobayashi M: Lysosomal enzyme β -glucuronidase. Release from regenerating liver after partial hepatectomy. *Arch Surg* 1976 ; 111 : 919.
- Okubo H, Chandler AM: Regulation of glucosamine synthesis during the first twenty-four hours following injury and partial hepatectomy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974 ; 146 : 1159.
- Phillips BW, Manildi ER: Abnormal serum isoenzyme of leucine aminopeptidase (LAP) in malignant neoplastic disease. *Cancer* 1974 ; 34 : 350.
- Pineda EP, Goldbarg JA, Banks BM, Rutenberg AM: Serum leucine aminopeptidase in pancreatic and hepatobiliary disease. *Gastroenterology* 1960a ; 38 : 698.
- Pineda EP, Goldbarg JA, Rutenberg AM: Serum enzyme in the diagnosis of pancreatic and hepatic disease in anicteric patients. *Surg Forum* 1960b ; 10 : 249.
- Rene RM, Mellinkoff SM: Leucine aminopeptidase; its nonspecificity as a test for carcinoma of the pancreas. *Am J Dig Dis* 1960 ; 5 : 899.
- 유호열 : Ethinoine 장기투여로 경화성 또는 암성변화를 일으킨 환경간의 단백 및 RNA의 합성과 간엽절제후의 재생능. *경북의대잡지* 1970 ; 11 : 221.
- Roman LM, Hubbard AL: A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane: Localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain. *J Cell Biol* 1983 ; 96 : 1548.
- Rutenberg AM, Goldbarg JA, Pineda EP: Leucine aminopeptidase activity, observations in patients with cancer of the pancreas and other disease. *N Engl J Med* 1958 ; 259 : 469.
- Scheffler WC: *Statistics for the biological sciences*, ed 2. USA Menlo Park, 1980, p 84.
- Sekas G, Cook RT: The evaluation of liver function after partial hepatectomy in the rat: Serum changes. *Br J Exp Path* 1979 ; 60 : 447.
- Shay H, Sun DCH, Siplet H: Leucine aminopeptidase significance of serum elevation in disease of the hepatobiliary-pancreatic system. *Am J Dig Dis* 1960 ; 5 : 217.
- Sheid B: Adenosine aminohydrolase activity in the regenerating rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1985 ; 238 : 259.
- Smith EL: The specificity of certain peptidases. *Adv Enzymol* 1951 ; 12 : 191.
- Smith EL, Bergmann M: The peptidases of intestinal mucosa. *J Biol Chem* 1944 ; 153 : 627.
- Wilkinson JH: *The principles and practice of diagnostic enzymology*, Great Britain, Edward Arnold Publishers, 1976, p 116.