

흰쥐 담즙울체 간의 Leucine Aminopeptidase 의 활성치*

개명대학교 의과대학 생화학교실

정상호·곽춘식

=Abstract=

Leucine Aminopeptidase Activity in the Cholestatic Rat Liver

Sang Ho Chung, 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 42 days following the ligation of common bile duct in rats: Plasma membrane, mitochondrial, nuclear and cytosolic leucine aminopeptidase and microsomal particle bound aminopeptidase of cholestatic livers and serum leucine aminopeptidase. The activities of alkaline phosphatase in the subcellular fractions and cytosolic alanine aminotransferase activity were also measured.

The activities of leucine aminopeptidase in the normal rats hepatic subcellular fractions were: 6.62 ± 1.35 (n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min) in the plasma membrane; 1.49 ± 0.18 in the mitochondria; 1.45 ± 0.43 in the nuclei; and 11.60 ± 0.73 in the cytosol. The activity of normal hepatic microsomal particle-bound aminopeptidase was 4.76 ± 0.69 (n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min). The subcellular fractions of alkaline phosphatase were: 5.30 ± 0.87 (p mol phenol/mg protein/min) in the plasma membrane; 5.04 ± 0.39 in the microsome; 0.86 ± 0.15 in the mitochondria; 2.62 ± 0.20 in the nuclei, and 2.19 ± 0.14 in the cytosol.

After the ligation of common bile duct in the rats, activities of serum leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase elevated markedly throughout the experiments.

The activity of plasma membrane-bound leucine aminopeptidase in the cholestatic liver strikingly diminished during the 42 days following the ligation of common bile duct and that of alkaline phosphatase significantly decreased between the second and the seventh days after operation.

The activity of microsomal particle-bound aminopeptidase in the cholestatic rat liver drastically increased between the seventh and the forty-second days of the operation and the activity of hepatic microsomal alkaline phosphatase markedly increased throughout the experiments.

The activities of mitochondrial and nuclear leucine aminopeptidase in the cholestatic liver showed significant decrease. However, the mitochondrial and nuclear alkaline phosphatase activities in the cholestatic liver showed a substantial increase at the fourteenth and twenty-eighth days respectively after operation.

The cytosolic alkaline phosphatase activity in cholestatic liver considerably elevated, but the cytosolic leucine aminopeptidase activity in the cholestatic liver had a slight elevation after the

* 이 논문은 정상호의 석사학위 논문임.

ligation of common bile duct. And activity of alanine aminotransferase markedly decreased in the hepatic cytosol of the common bile duct ligated rats.

서 론

Leucine aminopeptidase (α -aminoacyl peptide hydrolase (cytosol), EC 3.4.11.1, LAP)는 oligomeric zinc metalloenzyme^{1,2)}으로써 peptide의 N-terminal amino 산 및 imino 산의 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소^{3,4)}이며 특히 N-terminal 위치에 L-leucine이 결합된 peptide의 분해에 가장 민감하게 작용하는 것⁴⁾으로 알려져 있다.

이 효소는 동식물 및 미생물에서 발견되며 동물에서는 모든 조직에 널리 분포되고^{4~8)} 특히 간, 폐, 신, 심이지장에서 이 효소의 합성력이 왕성하며 많은 양이 이들의 세포질에 함존되어 있다⁸⁾고 한다. 그리고 간, 폐, 폐, 신, 대반등에서 생성되는 이 효소는 서로 isozyme인^{9~11)} 것으로 알려져 있다.

이 효소는 세포내에서도 세포질 이외 plasma membrane에서 발견¹²⁾될 뿐만 아니라 microsome 분획에서도 발견되며 이 microsome 분획의 효소는 particle-bound aminopeptidase (α -aminoacyl peptide hydrolase (microsomal), EC 3.4.11.2, PAP)라 부르고¹³⁾ 있다.

이 효소는 장기 이외 혈액, 소변, 대변, 담즙, 심이지장액 등에서도 출현됨이 밝혀져 있고¹⁴⁾, 특히 혈청중의 활성치는 폐쇄성 황달, 간암, 간염, 간경변증, 담낭염, 폐염, 폐암 및 각종 악성종양등에서 증가되며^{8,15~26)} 특히 담즙울체가 수반되는 간담도질환에서 현저히 증가된다고^{8,15,18~20,24,25)} 한다.

이 연구는 담즙울체가 수반되는 간담도질환시에 증가되는 혈청 LAP의 증가기전과 담즙울체 시간의 연장이 담즙울체간의 각종 세포분획중의 LAP 또는 PAP의 활성도에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 시도된 것으로써 흰쥐에서 총담판을 결찰한 후 경시적으로 혈청 LAP의 변동을 관찰하는 한편 각 시기에 적출한 담즙울체간을 세포분획하여 cytosolic-LAP, plasma membrane-LAP, mitochondrial-LAP, nuclear-LAP 그리고 microsomal-PAP를 측정하는 한편 혈청 및 담즙울체간의 각종 세포분획에서 alkaline phosphatase (ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1, ALP) 활성도도 측정하였으며 아울러 cytosol

분획의 alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2, ALT)도 함께 측정하여 그 성격을 상호 비교 검토한 것이다.

재료 및 방법

동물 및 처지: 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320g 이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫흰쥐를 사용하였으며 1군을 5마리로 하여 다음과 같이 15군으로 나누었다.

- 1) 정상군: (1군)
- 2) 가수술군: 가수술후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일째에 죽인군(총 7군)
- 3) 총담판 결찰군: 총담판 결찰후 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 28일 및 42일째에 죽인군(총 7군)

총담판 결찰군에서 담판 결찰 후 14일까지는 죽는 예가 없었으나 그 이후부터는 약 50%가 죽었다. 그 뒤므로 28일 및 42일군은 총담판 결찰 후 28일 및 42일까지 생존한 흰쥐 5마리씩을 사용도록 하였다.

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

총담판 결찰 수술은 효소활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술시간을 조절하였으며 12시간 절식시킨 후 가능한 한 무균상태를 유지하면서 약한 ether 마취하에서 실시하였다.

총담판의 결찰은 가급적 간에서 근접한 부위의 총담판과 이 바로 아래쪽 약 1cm 되는 지점의 총담판을 선택하여 각각 결찰한 후 위 및 아래쪽의 결찰된 담판의 중간지점의 담판을 절단 해두었다. 담판의 결찰은 이중으로 하였으며 채혈 및 간 적출시 담판의 폐쇄상태를 확인하였다. 그리고 가수술은 총담판결찰만 하지 않고 그의 조작은 담판결찰군과 동일하게 하였다.

시약: Sodium deoxycholic acid, L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide-HCl, p-xylene, sodium metaperiodate, L-alanine, α -ketoglutaric acid, NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide; yeast grade III, sodium salt),

LDH(lactate dehydrogenase; bovine heart, type IX), disodium phenylphosphate, 4-aminoantipyrine, phenol, 종합표준효소(enzyme control 2-N) 및 단백표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였으며 그의 일반 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획: 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 절식시킨 후 약한 ether 마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시키고 이어 간문맥으로 catheter를 넣어 4°C의 0.25M sucrose 액으로 판류하여 간에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곤효소 활성도 측정을 하였다. 그리고 적출한 간은 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그중 약 7.5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액에 넣어 teflon glass homogenizer (Thomas 사 제품 chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v% 간균질액을 만들었다. 그리고는 간균질액 약 25ml를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법²⁷⁾으로 microsome, mitochondria 및 cytosol 분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄균질액을 571×g(average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마세부분, nuclei 및 plasma membrane 부분을 제거한 다음 그 상청액을 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻어진 상청액을 다시 104,400×g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이때 얻어진 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 이과정에서 얻어진 pellet은 0.25M sucrose 액에 재현탁시키고 이액을 10~35 w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리판 상부에 부하시켜 88,500×g에서 15분간 원심분리하여 얻어진 원심판 중앙부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 88,500×g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이 pellet을 다시 0.25M sucrose 액에 재현탁시키 88,500×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

한편 위의 7,796×g에서 20분간 심원분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M-sucrose 액에 혼탁시

키고 이액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심판 상부에 부하시켜 45,200×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose 액에 재현탁시키 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이 pellet을 mitochondria 분획으로 사용하였다.

Plasma membrane 분획의 분리는 Dorling 및 Le Page의 법²⁸⁾을 약간 수정하여 사용하였다. 즉 간마세균질액 약 25ml를 취하여 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet을 70w/v% sucrose 액에 혼탁시키 그 일정량을 30~55w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리판자에 부하시켜 70,400×g에서 100분간 원심분리하여 37~41% (d=1.16~1.18) sucrose 액 층부위에 형성된 pellet을 취하여 1 mM sodium bicarbonate 액으로 1회 세척하여 이것을 plasma membrane 분획으로 사용하였다.

Nuclei 분획의 분리는 Conover 및 Siebert의 법²⁹⁾에 따라 분리하였다. 즉 간마세균질액 약 25ml를 취하여 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet을 75.3w/v% sucrose 액에 혼탁시키 22,530×g에서 1시간동안 원심분리하여 원심분리판의 판자에 생성된 pellet을 취한후 다시 75.3 w/v% sucrose 액에 재현탁시키 22,530×g에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이것을 0.25M sucrose 액으로 세척하였으며 이 분획을 nuclei 분획으로 사용하였다.

위의 세포분획법에서 모든 조작은 2~4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge 와 OTD-65B ultracentrifuge 였다. 그리고 microsome, mitochondria 및 cytosol 분획의 분리에 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall SS-34 및 T 865 rotor 였고 plasma membrane 분획의 분리에 사용한 rotor는 AH-650 rotor 였으며 nuclei 분획의 분리에 사용한 rotor는 SS-34 rotor 였다. 그리고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO model 570)을 사용하여 제조하였다.

효소액 조제: 분리한 microsome, mitochondria, nuclei 및 plasma membrane 은 단백량으로 5mg/ml 가 되도록 0.25M sucrose 액에 혼탁시켰으며 LAP 측정 효소액은 이 혼탁액을 그대로 사용하였다. 그러나 ALP 측정용 효소액은 이 혼탁액을 1w/v% sodium deoxycholic acid 가 포함된 1w/v%

sodium bicarbonate 액으로 배로 희석하여 ultrasonic dismembrator (Fisher model 300)로 20±0.4K cycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 총 10분간 초음파마세를 한 액을 효소액으로 사용하였다.

Cytosol 분획은 아무 처리 없이 그대로 LAP, ALP 및 ALT의 효소으로 사용하였다.

효소활성도 측정: 혈청 및 간의 각 세포분획의 LAP 활성도 및 microsome 분획의 PAP 활성도 측정은 L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide를 기질로 사용하여 효소액과 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성되는 5-aminoosalicylic acid를 p-xyleneol 및 sodium metaperiodate와 반응시켜 생성되는 quinoid의 청색을 비색하여 정량하는 Akatsuka 등의 법³⁰⁾에 의하였다. 그리고 이 효소 활성의 단위는 1분간 1 ml 혈청 또는 1 mg의 단백이 생성한 5-aminoosalicylic acid을 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 존재 하에서 4-aminoantipyrine과 축합하여 생성된 quinone 화합물의 적색을 비색하여 정량하는 Kind 및 King의 법³¹⁾에 의하였다. 그리고 이 효소의 활성의 단위는 1분간에 1 ml의 혈청 또는 1 mg의 단백이 생성한 phenol을 p mole로 표시하였다.

간 cytosol 분획의 ALT 활성도 측정은 L-alanine과 α-ketoglutarate를 기질로 사용하여 25°C에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 pyruvic acid가 NADH 및 LDH 공존하에서 lactate로 환원될 때 NADH가 산화되어 NAD⁺로 되면서 감소하는 흡광도로써 효소활성을 정량하는 Karmen 등의 방법³²⁾에 의하였다. 그리고 이 효소의 단위는 1mg의 단

백이 25°C, 340 nm에서 흡광도가 1분간에 0.001 감소하는 활성능을 1단위로 하는 Karmen unit으로 나타내었다.

이 실험에서는 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma 사의 표준효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 이 실험에서 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer (Varian cary 210)였다.

단백 정량: 효소액 중의 단백정량은 0.5N-perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Greenberg 및 Rothstein 법³³⁾으로 효소 액 중의 단백을 정제한 다음 biuret 법³⁴⁾으로 정량하였다.

얼어진 각종 성적들의 평균치 중 상호 비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법³⁵⁾에 의하여 검정하였다.

성 적

정상흰쥐간의 plasma membrane, mitochondria, nuclei, cytosol 분획의 LAP와 microsome 분획의 PAP 그리고 이를 분획의 ALP의 활성도: 정상흰쥐간의 각 세포분획의 LAP 및 ALP 그리고 microsome 분획의 PAP의 활성도를 보면 표 1과 같다. 즉 정상흰쥐간의 세포분획중의 LAP 활성도는 cytosol 분획이 11.60 ± 0.73 n mol 5-aminoosalicylic acid/mg protein/min(이하 단위 생략함)으로 가장 높았으며 다음은 plasma membrane 6.62 ± 1.35 , 그리고 mitochondria 1.49 ± 0.18 , nuclei 1.45 ± 0.43 의 순서였다. 그리고 microsome 분획의 PAP는 4.76 ± 0.69 로 plasma membrane

Table 1. Activities of leucine aminopeptidase (LAP), particle-bound aminopeptidase (PAP) and alkaline phosphatase (ALP) of normal liver in rats

Fractions	LAP	PAP	ALP
	n mol 5-amino salicylic acid/mg protein/min		p mol phenol/mg protein/min
Plasma membrane	6.62 ± 1.35		5.30 ± 0.87
Microsome		4.76 ± 0.69	5.04 ± 0.39
Mitochondria	1.49 ± 0.18		0.86 ± 0.15
Nuclei	1.45 ± 0.43		2.62 ± 0.20
Cytosol	11.60 ± 0.73		2.19 ± 0.14

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

Table 2. Activities of serum leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (ALP) in common bile duct ligated rats

Days following ligation	LAP		ALP	
	n mol 5-aminosalicylic acid/ml/min	Sham (%)	n mol phenol/ml/min	CBDL (%)
1	26.05±2.50 (100)	48.90±7.01*** (188)	195.71±58.88 (100)	240.20±47.88 (123)
2	25.70±2.41 (100)	73.25±4.74*** (285)	190.42±60.23 (100)	333.22±56.59** (175)
3	26.12±2.38 (100)	101.19±9.19*** (387)	198.43±61.46 (100)	558.25±165.34** (281)
7	25.08±2.43 (100)	122.66±26.64*** (489)	194.22±58.76 (100)	635.27±223.15** (327)
14	25.61±2.32 (100)	129.15±22.85*** (504)	195.48±63.26 (100)	1,016.23±277.90*** (520)
28	25.87±2.35 (100)	135.26±24.97*** (523)	193.72±60.28 (100)	1,047.82±267.06*** (541)
42	26.13±2.37 (100)	139.20±24.78*** (533)	199.25±57.62 (100)	1,155.20±311.01*** (580)

The data are expressed as mean±SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (**; P<0.01, ***; P<0.001).

의 LAP 활성도 보다는 낮은치를 보였다.

정상 휘경 세포분화중의 ALP 활성도는 plasma membrane 분화이 $5.30\pm0.87 \mu\text{mol phenol}/\text{mg protein}/\text{min}$ (이하단위 생략함)으로 가장 높았으나 다음은 microsome 5.04 ± 0.39 , 그리고 nuclei 2.62 ± 0.20 , cytosol 2.19 ± 0.14 , mitochondria 0.86 ± 0.15 순서였다.

휘경에서 총담관을 결찰했을 때의 혈청 LAP 및 ALP의 활성도 : 총담관결찰 또는 가수술 후 경시적으로 측정한 혈청 LAP 및 ALP의 활성도를 보면 표 2와 같다. 총담관결찰 후 혈청 LAP의 활성도는 1일부터 급격히 증가하여 42일까지 계속적인 증가를 보였다. 즉 1일에는 가수술군 26.05 ± 2.50 에 비해 48.90 ± 7.01 로 약 88%의 증가($p<0.001$)를 보였으며 2일에는 약 185%($p<0.001$), 3일에는 약 287%($p<0.001$), 7일에는 약 389%($p<0.001$), 14일에는 약 404%($p<0.001$), 28일에는 약 423%($p<0.001$), 42일에는 약 433%($p<0.001$)의 증가를 보였다. 그리고 총담관결찰 후의 혈청 ALP의 활성도도 혈청 LAP의 활성도와 마찬가지로 1일부터 증가하여 42일까지 계속적인 증가를 보였다.

담즙울체간의 plasma membrane 분화의 LAP 및 ALP의 활성도 : 담즙울체간의 plasma membrane 분화의 LAP 및 ALP의 활성도를 보면 표 3과 같다. 총담관 결찰로 형성된 담즙울체간의 plasma membrane 분화의 LAP는 1일째 간부터

감소되어 42일의 담즙울체간까지 계속 감소된지를 보였다. 즉 1일째 담즙울체간에서는 가수술군의 간 6.64 ± 1.40 에 비해 4.55 ± 0.46 으로 약 31%($p<0.05$)를 보였으며 2일군에서는 약 44%($p<0.01$), 3일군에서는 약 56%($p<0.001$), 7일군에서는 약 77%($p<0.001$), 14일군에서는 약 85%($p<0.001$), 28일군에서는 약 84%($p<0.001$), 그리고 42일군에서는 약 79%($p<0.001$)의 감소를 보였다. 그리고 담즙울체간의 plasma membrane 분화의 ALP 활성도도 LAP의 활성도와 마찬가지로 감소되었다. 그러나 그 감소의 정도는 LAP 쪽 보다 덜 현저하였다.

담즙울체간의 microsome 분화의 PAP 및 ALP의 활성도 : 담즙울체간의 microsome 분화의 PAP 및 ALP 활성도를 보면 표 4와 같다. 담즙울체간의 microsome 분화의 PAP는 1일째 간부터 증가되어 42일의 간까지 계속 증가된지를 나타내었다. 그러나 1일 및 3일군의 담즙울체간까지의 증가는 통계학적으로 의의가 없었으며 7일째간부터 의의 있는 증가를 보였다.

즉 7일째 간에서는 가수술군의 4.81 ± 0.69 에 비해 6.48 ± 1.19 로 약 35%($p<0.05$)의 증가를 보였고 14일군에서는 약 36%($p<0.05$), 28일군에서는 약 54%($p<0.01$), 42일군에서는 약 100%($p<0.001$)의 증가를 보였다. 그러나 담즙울체간의 microsome 분화의 ALP는 그 증가도가 PAP 보다 월등하였다.

Table 3. Activities of plasma membrane leucine aminopeptidase(LAP) and alkaline phosphatase(ALP) of cholestatic liver in rats

Days following ligation	LAP		ALP	
	n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min	Sham (%)	n mol phenol/mg protein/min	CBDL (%)
1	6.63±1.40 (100)	4.55±0.46* (69)	5.30±0.85 (100)	4.18±0.61 (79)
2	6.71±1.38 (100)	3.77±0.84** (56)	5.32±0.80 (100)	3.75±0.75* (70)
3	6.59±1.32 (100)	2.91±0.84** (44)	5.35±0.91 (100)	2.71±0.99** (51)
7	6.70±1.28 (100)	1.53±0.67*** (23)	5.33±0.93 (100)	2.95±0.69** (55)
14	6.55±1.42 (100)	0.95±0.33** (15)	5.36±0.85 (100)	3.89±1.22 (73)
28	6.58±1.37 (100)	1.08±0.41*** (16)	5.31±0.87 (100)	3.84±1.10 (72)
42	6.72±1.30 (100)	1.41±0.49*** (21)	5.34±0.94 (100)	4.76±0.42 (89)

The data are expressed as mean±SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

Table 4. Activities of microsomal particle-bound aminopeptidase (PAP) and alkaline phosphatase (ALP) of cholestatic liver in rats

Days following ligation	PAP		ALP	
	n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min	Sham (%)	n mol phenol/mg protein/min	CBDL (%)
1	4.70±0.70 (100)	5.28±0.48 (112)	5.05±0.40 (100)	10.19±2.38** (202)
2	4.76±0.72 (100)	5.79±1.25 (122)	5.02±0.41 (100)	17.04±6.51** (339)
3	4.72±0.68 (100)	5.71±1.72 (121)	5.08±0.38 (100)	16.44±2.61** (324)
7	4.81±0.69 (100)	6.48±1.19* (135)	5.06±0.37 (100)	17.64±1.43*** (349)
14	4.78±0.70 (100)	6.52±1.26* (136)	5.03±0.39 (100)	17.51±2.21*** (348)
28	4.83±0.62 (100)	7.45±1.05** (154)	5.07±0.36 (100)	25.37±10.79** (500)
42	4.77±0.66 (100)	9.52±0.74*** (200)	5.04±0.32 (100)	30.71±12.31** (609)

The data are expressed as mean ± SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

즉 1일군에서는 약 102%(p<0.01), 2일군에서는 약 239%(p<0.01), 3일군에서는 약 224%(p<0.001) 7일군에서는 약 249%(p<0.001), 14일군에서는 약 284%(p<0.001), 28일군에서는 약 400%(p<0.01) 42일군에서는 약 509%(p<0.01)의 증가를 보였다.

담즙율체간의 mitochondria 분획의 LAP 및 ALP의 활성도 : 담즙율체간의 mitochondria 분획의 LAP 및 ALP의 활성도를 보면 표 5와 같다.

담즙율체간의 mitochondria 분획의 LAP는 1일군부터 42일군까지 모두 감소된지를 보였다. 즉 담즙율체간에서는 1일군이 가수출군의 1.50±0.18에 비해 1.20±0.16으로 약 20%(p<0.05)의 감소를 보였으며 2일 및 3일군에서는 약 44%(p<0.01), 7일군에서는 약 47%(p<0.001), 14일군에서는 약 43%(p<0.001), 28일군에서는 약 40%(p<0.001), 42일군에서는 약 43%(p<0.01)의 감소를 보였다.

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

Days following ligation	LAP		ALP	
	n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min	Sham (%)	p mol phenol/mg protein/min	CBDL (%)
1	1.50±0.18 (100)	1.20±0.16* (80)	0.86±0.12 (100)	0.75±0.08 (87)
2	1.51±0.20 (100)	0.84±0.21** (56)	0.87±0.16 (100)	0.71±0.10* (82)
3	1.48±0.20 (100)	0.83±0.22** (56)	0.88±0.10 (100)	0.65±0.14* (74)
7	1.46±0.17 (100)	0.77±0.12*** (53)	0.87±0.13 (100)	0.84±0.24 (97)
14	1.52±0.13 (100)	0.87±0.13** (57)	0.86±0.18 (100)	2.24±0.74** (260)
28	1.47±0.14 (100)	0.88±0.14*** (60)	0.87±0.12 (100)	2.66±0.74** (306)
42	1.48±0.16 (100)	0.85±0.32** (57)	0.88±0.14 (100)	3.44±1.31** (391)

The data are expressed as mean±SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

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

Days following ligation	LAP		ALP	
	n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min	Sham (%)	p mol phenol/mg protein/min	CBDL (%)
1	1.46±0.46 (100)	1.30±0.29 (89)	2.63±0.21 (100)	2.40±0.20 (91)
2	1.48±0.48 (100)	0.99±0.15 (67)	2.60±0.24 (100)	2.01±0.20** (77)
3	1.42±0.50 (100)	0.86±0.15 (61)	2.62±0.19 (100)	1.79±0.49* (68)
7	1.43±0.40 (100)	0.60±0.12** (42)	2.64±0.26 (100)	1.73±0.35** (66)
14	1.49±0.42 (100)	0.66±0.09** (44)	2.62±0.20 (100)	2.62±0.45 (100)
28	1.45±0.41 (100)	0.82±0.30* (57)	2.59±0.22 (100)	3.56±0.54* (137)
42	1.47±0.46 (100)	0.81±0.35* (55)	2.61±0.21 (100)	3.83±1.03* (147)

The data are expressed as mean±SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01).

그러나 담즙율체 간의 mitochondria 분획의 ALP는 시간경과에 따른 변동이 LAP와는 달랐다. 즉 1일에서 3일군까지는 약간의 감소를 보였으나 14일군은 오히려 증가되었으며 그 증가의 정도는 가수술군에 비해 약 160%(p<0.01), 28일군은 약 206%(p<0.01), 42일군은 약 291%(p<0.01)나 증가되었다.

담즙율체간의 nuclei 분획의 LAP 및 ALP의 활

성도: 담즙율체간의 nuclei 분획의 LAP 및 ALP의 활성도를 보면 표 6과 같다. 담즙율체간의 nuclei 분획의 LAP는 mitochondria 분획의 변동과 마찬가지로 1일군부터 감소하여 42일군까지 계속 감소된 치를 보였다. 그러나 1일에서 3일군까지의 감소는 통계학적 의의가 없었으며 7일군부터 의의 있는 감소를 보였다. 즉 7일군에서는 가수술군 1.43±0.40에 비해 0.60±0.12로 약 58%(p<0.01)

Table 7. Activities of cytosolic leucine aminopeptidase (LAP), alkaline phosphatase(ALP) and alanine aminotransferas (ALT) of cholestatic liver in rats

Days following ligation	LAP		ALP		ALT	
	n mol 5-aminosalicylic acid/ mg protein/min	Sham (%)	p mol phenol/mg protein/min	Sham (%)	Sham (%)	karmen unit/mg protein
	Sham (%)	CBDL (%)	Sham (%)	CBDL (%)	Sham (%)	CBDL (%)
1	11.58±0.80 (100)	13.89±0.97** (119)	2.20±0.12 (100)	4.66±0.72*** (212)	334±116 (100)	282±73 (84)
2	11.62±0.70 (100)	15.74±1.25*** (135)	2.17±0.21 (100)	6.89±0.83*** (318)	316±115 (100)	142±71* (45)
3	11.50±0.74 (100)	16.48±2.08** (143)	2.16±0.16 (100)	6.92±1.13*** (320)	310±95 (100)	129±42** (42)
7	11.60±0.76 (100)	17.88±1.44*** (154)	2.21±0.14 (100)	6.81±0.56*** (308)	311±105 (100)	125±34** (40)
14	11.56±0.73 (100)	15.21±1.68** (132)	2.15±0.17 (100)	7.68±2.74*** (357)	320±109 (100)	118±38** (37)
28	11.58±0.78 (100)	13.47±3.01 (116)	2.18±0.12 (100)	9.31±2.76*** (427)	326±98 (100)	103±26** (32)
42	11.51±0.72 (100)	12.52±1.70 (109)	2.19±0.13 (100)	13.40±2.41*** (612)	318±125 (100)	86±32** (27)

The data are expressed as mean±SD with 5 animals in each group; Sham=sham operation, CBDL=common bile duct ligated animals.

Significant difference from sham operated animals (*; P<0.05, **; P<0.01, ***; P<0.001).

의 감소를 보였으며 14일군에서는 약 46%(p<0.05)의 감소를 보였다. 그러나 담즙울체간의 nuclei 분화의 ALP는 7일군까지 약간 감소했으나 28일군부터는 증가되었으며 그 증가의 정도를 보면 28일군에서는 가수술군에 비해 약 37%(p<0.05), 42일군에서는 약 47%(p<0.05) 증가를 보였다.

담즙울체간의 cytosol 분화의 LAP, ALP 및 ALT의 활성도: 담즙울체간의 cytosol 분화의 LAP, ALP 및 ALT의 활성도를 보면 표 7과 같다. 담즙울체간의 cytosol 분화의 LAP는 1일군부터 증가되어 7일군에서는 약 54%(p<0.001) 증가로 최고치에 달하고 이후 점차 저하되어 42일군에서는 정상으로 회복되었다. 그러나 담즙울체간의 cytosol 분화의 ALP는 1일군부터 가수술군에 비해 약 112%(p<0.001)나 급격히 증가되고 이후 계속 증가되어 42일군에서는 약 512%(p<0.001)의 현저한 증가를 보였다. 한편 담즙울체간의 cytosol 분화의 ALT는 1일군부터 감소되고 이후 계속 감소되어 42일군에서는 가수술군에 비해 약 73%(p<0.01)의 현저한 감소를 보였다.

고 졸

간의 배설기능에 장애가 야기되는 간담도계 질환에서 혈중에 현저히 증가되는 효소는 담도계 효소라 부르고 있는 5'-nucleotidase³⁶⁾, γ -glutamyl trans-

peptidase³⁶⁾, ALP³⁶⁾, LAP²⁵⁾ 등과 간세포질에 풍부히 존재하는 ALT, aspartate aminotransferase 그리고 lataate dehydrogenase^{37,38)} 등이다. 담도폐쇄시 이들 효소의 혈중증가기전에 대해서 혈청 5'-nucleotidase, γ -glutamyl transpeptidase, ALP 및 LAP는 간에서 그 생성이 증가되어 혈중에 유리됨으로써 증가된다^{25,36)}고 하며 alanine 및 aspartate aminotransferase와 lactate dehydrogenase는 주로 간세포막의 투과성 항진으로 간외로 유출되어 증가되는 것³⁷⁾으로 알려져 있다.

일반적으로 혈중의 효소 활성치를 증가 시킬 수 있는 인자는 다음과 같다고 생각하고 있다. 즉 조직이 파괴되거나 세포의 투과성이 항진되어 효소가 혈중으로 누출되는 경우, 효소를 함유하는 세포가 이상증식되어 혈중으로 효소가 다량 유리되는 경우, 효소의 배설경로에 장애가 있어서 역류하여 증가되는 경우, 그리고 효소를 활성화시키는 물질이 증가되는 경우와 효소의 분해속도의 저연등을 들 수 있다.

혈청 LAP는 어떤 장기에서 유래된 것인지는 분명치 않다¹⁶⁾고 하나 간, 신, 흉 및 심이지장 등에서 그 생합성이 왕성한 것⁸⁾으로 보아 이들 장기에서 유래된 것으로 생각되며 특히 간담도계 질환 및 흉질환에서 혈중에 증가되는^{8,15~26)} 것으로 보아 이들 장기로부터 유출된 것이 틀림이 없다고 본다.

Fleischer 등¹⁵⁾, Rutenburg 등¹⁶⁾, Arst 등¹⁷⁾,

Shay 등¹⁹⁾, Pineda 등²⁰⁾, 및 Bressler 등²¹⁾들은 간암, 간경변증 및 간의 담관폐쇄 등의 간 및 담도 질환에서 혈청 LAP의 증가를 관찰하였으며 특히 이들 질병중에서도 황달을 수반한 경우에는 이 효소의 활성도가 현저히 높았다고 한다. 이들 연구자의 성적으로 보아 혈청 LAP의 증가는 담즙율체와 밀접한 관계를 가진 것으로 생각된다.

이 실험에서 흑쥐의 총담관을 결찰하고 심한 담즙율체를 야기시켰을 때 혈청 LAP와 ALP의 활성도는 모두 현저히 증가되었다. 이 성적에서 LAP의 혈중증가는 꽉²⁵⁾과 이 및 조³⁹⁾의 성적과 비슷하며 ALP의 혈중증가는 꽉²⁵⁾, 김 및 유⁴⁰⁾ 그리고 Kaplan 및 Righetti⁴¹⁾의 성적과 비슷하다.

담도폐쇄시 혈청 LAP의 증가는 담즙율체간에서 그 생성이 증가되어 혈중에 유리됨으로써 증가되는^{25, 29)} 것으로 알려져 있다. 그러나 이 성적에서 담즙율체간의 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei 분획의 LAP 활성도가 실험 전기간 동안 의의 있는 감소를 나타낸것으로 보아 단순히 담즙율체간에서 그 합성의 증가만이 원인이 된다고 볼 수는 없다. 그리고 담즙율체시 혈청 ALP 활성도의 증가도 LAP와 마찬가지로 그 합성이 증가되어 나타난 결과^{36, 41)}로 알려져 있다. 이 성적에서 담즙율체간의 plasma membrane 분획의 ALP도 LAP 보다는 덜하나 감소되어 있었다. 이런 점으로 보아 담즙율체시 ALP의 혈중증가는 역시 간에서 합성증가만이 유일한 원인이라고 볼 수는 없는 것이다.

이 성적에서 담즙율체간의 cytosol 분획의 LAP와 microsome 분획의 PAP는 모두 증가되어 있었다. 정상 흑쥐간에서 aminopeptidase들이 cytosol과 microsome에 편재되어 있는 점으로 보아 이 성적은 바로 담즙율체간에서 LAP 합성이 증가된다는 것을 보여주는 성적인 것이다.

이 성적에서 cytosol 분획의 ALT는 담즙율체시간이 경과될수록 점점 현저히 감소되고 있었다. 간조직의 ALT는 간세포막의 투과성이 항진될때 세포외로 누출되는³⁷⁾ 것으로 알려져 있는 만큼 이 성적에서 나타낸 ALT의 감소는 담도결찰 후 시간이 경과함에 따라 점점 간세포막의 투과성이 항진된다는 것을 보여주는 것이며 특히 담즙율체간에서 plasma membrane의 LAP 및 ALP 활성도의 감소는 이를 더욱 뒷받침해주는 자료라 생각된다.

이 성적에서 담즙율체간의 cytosol 분획의 LAP와 microsome 분획의 PAP의 증가는 cytosol 분획의 ALP와 microsome 분획의 ALP의 증가보

다 훨씬 낮 험자하였다. 이 성적은 aminopeptidase들이 ALP 보다 간세포막에 대한 투과성이 크다는 것을 보여주는 것이라 생각되며 이 성적에서 담즙율체간의 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei 분획의 LAP와 plasma membrane 분획의 ALP의 감소는 이들 부위에서 LAP 또는 ALP를 수용할려는 결합단백의 합성억제가 그 원인이 아닌가 생각되나 분명치 않으며 이 문제는 앞으로 더욱 추구해 보아야 하겠다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험의 결과로 보아 담즙율체시 야기되는 혈청 LAP의 심한 혈중증가는 담즙율체간의 plasma membrane, mitochondria 및 nuclei에 야기된 어떤 생화학적 변화가 이들 분획에 신합성된 LAP의 결합을 방해하는 것과 아울러 간세포에서의 현저한 합성항진과 세포막의 투과성항진이 그 원인이라 생각된다. 그리고 어떤 물질이 이 효소의 유도인자인지는 분명치 않으나 담즙율체로 인한 담즙산들의 증가가 이 효소의 합성을 유도하는 한가지 요인이 아닌가 생각된다.

요 약

담즙율체가 수반되는 간질환시에 증가되는 혈청 LAP의 증가 기전과 담즙율체 시간의 연장이 담즙율체간의 각종 세포분획중의 LAP 또는 PAP 활성도에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 흑쥐의 총담관을 결찰하고 1일부터 42일까지의 혈청과 담즙율체 간에서 plasma membrane, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 LAP 그리고 microsome 분획의 PAP와 이들 분획의 ALP를 측정하는 한편 cytosol 분획의 ALT도 함께 측정하여 그 성적을 비교 검토 하였다.

정상 흑쥐 간세포분획중의 LAP 활성도는 cytosol 분획이 $11.60 \pm 0.73 \text{ n mol 5-aminosalicylic acid/mg protein/min}$ 으로 가장 높았으며 다음은 plasma membrane 그리고 mitochondria, nuclei 순서였다.

정상 흑쥐 간세포분획중의 ALP 활성도는 plasma membrane 분획이 $5.30 \pm 0.8 \text{ } \mu \text{mol phenol/mg protein/min}$ 으로 가장 높았으며 다음은 microsome, 그리고 nuclei, cytosol, mitochondria 순서였다.

혈청 LAP와 ALP는 총담관을 결찰했을 때 모두 1일부터 그 활성도가 증가되며 이후 계속 증가되어 42일에 LAP는 가수술군에 비해 약 433%, ALP는 약 480%의 증가를 보였다.

담즙율체간의 plasma membrane 분획의 LAP

와 ALP 활성도는 실험 전기간 동안 모두 감소된 치를 보였다. 그러나 그 감소율은 LAP 쪽이 더 현저하였다.

담즙율체간의 microsome 분획의 PAP와 ALP 활성도는 실험 전기간 동안 모두 증가된 치를 보였다. 그러나 그 증가율은 ALP 쪽이 훨씬 현저하였다.

흰쥐 간의 mitochondria 분획중에서도 LAP가 측정되었으며 담즙이 올체된 간의 mitochondria 분획의 LAP의 활성도는 실험 전기간 감소되었다. 그러나 ALP 활성도의 경우는 14일 이후 오히려 증가되었다.

흰쥐 간의 nuclei 분획에서도 LAP가 측정되었으며 담즙율체 간의 nuclei 분획의 LAP와 ALP 활성도도 그 증감의 경향은 mitochondria 분획과 비슷한 경향이었다.

담즙율체간의 cytosol 분획의 LAP 활성도는 1일째 간부터 14일째 까지 약간 증가되었다. 그리고 담즙율체간의 cytosol 분획의 ALP 활성도는 실험 전기간 동안 현저히 증가되었으며 시간이 경과함에 따라 점점 증가되는 경향이 있다. 그러나 담즙율체간의 cytosol 분획의 ALT는 시간경과에 따라 그 활성도는 점점 감소된 치를 보였다.

이상 성적으로 보아 담즙율체가 수반되는 간질환 시 혈청 LAP가 증가되는 것은 간조직에서 이의 합성증가와 세포막, 세포핵 및 mitochondria에서 이 효소의 결합력 저하 그리고 세포막의 투과성 항진이 이 효소의 유출을 죽진하여 혈중에 증가된 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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.
- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, ed 1. Great Britain, Edward Arnold Publishers, 1976, p 116.
- Smith EL: The specificity of certain peptidases. *Adv Enzymol* 1951; 12: 191.
- Makinen KK, Hopsu-Havu VK: The presence of enzymes resembling aminopeptidase B in several rat organs. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1967; 45: 230.
- Jarvinen M, Hopsu-Havu VK: α -N-Benzoylarginine-2-naphthylamide hydrolase (Cathepsin B_i). II. Purification of the enzymes and demonstration of two inhibitors in the skin. *Acta Chem Scand* 1975; 29: 772.
- Smith EL, Bergmann M: The peptidases of intestinal mucosa. *J Biol Chem* 1944; 153: 627.
- 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.
- Lawrence SH, Melnick PJ, Weimer HE: A species comparison of serum protein and enzymes by starch gel electrophoresis. *Soc Exp Biol Med* 1960; 105: 572.
- Kowlessar OD, Haeffner LJ, Sleisenger MH: Localization of leucine aminopeptidase in serum and body fluids by starch gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1960; 39: 671.
- Meade BW, Rosalki SB: Localization of leucine aminopeptidase isozymes. *J Clin Pathol* 1964; 17: 61.
- Roman LM, Hubbard AL: A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane: Localization of leucine aminopeptidase of the bile canalicular domain. *J Cell Biol* 1983; 96: 1548.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. IUB, New York, Academic press, 1979, p 301.
- Goldbarg JA, Pineda EP, Rutenberg AM: The measurement of activity of leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissue. *Am J Clin Pathol* 1959; 23: 571.
- Fleisher GA, Butt HR, Huizenga KA: Enzymatic hydrolysis of L-leucylglycine in serum in hepatic disease. *Proc Staff Meet*

- Mayo Clin* 1957; 32: 410.
16. Pineda EP, Goldbarg JA, Banks BM, Rutenberg AM: Serum leucine aminopeptidase in pancreatic and hepatobiliary disease. *Gastroenterology* 1960; 38: 698.
 17. Arst HE, 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Pineda EP, Goldbarg JA, Rutenberg AM: Serum enzyme in the diagnosis of pancreatic and hepatic disease in anicteric patients. *Surg Forum* 1960; 10: 249.
 21. Bressler R, Forsyth BR, Klatskin G: Serum leucine aminopeptidase activity in hepatobiliary and pancreatic disease. *J Lab Clin Med* 1960; 56: 417.
 22. Miller AL, Worsley L: Serum leucine aminopeptidase in carcinoma of pancreas and other diseases. *Br Med J* 1960; 2: 1419.
 23. Rene RM, Mellinkoff SM: Leucine aminopeptidase: its nonspecificity as a test for carcinoma of the pancreas. *Am J Dig Dis* 1960; 5: 899.
 24. Hoffman E, Nachlas MM, Gaby SD, Abrams SJ, Seligman AM: Limitations in the diagnostic value of serum leucine amino peptidase. *N Engl J Med* 1960; 263: 542.
 25. 박준식 : 총수답관을 결찰한 환경의 혈청 및 간장의 Leucine Aminopeptidase에 미치는 Actinomycin D의 영향. 경북의대잡지 1980; 21: 126.
 26. Phillips BW, Manildi ER: Abnormal serum isoenzyme of leucine aminopeptidase (LAP) in malignant neoplastic disease. *Cancer* 1974; 34: 350.
 27. 박준식, 곽정식 : 환경간 세포분획법, I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1968; 5: 45.
 28. Dorling PR, Le Page RN: A rapid high yield method for the preparation of rat liver cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973; 318: 33.
 29. Conover TE, Siebert G: On the occurrence of respiratory components in rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1965; 99: 1.
 30. 赤塚尹巳, 長澤健, 嶋本三利 : 新合成基質을 사용한 간 特異性 高感度 血清 LAP 測定法의 確立(日文). 臨床病理(補冊) 1982; 26: 85.
 31. Kind PRN, King EJ: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with aminoantipyrine. *J Clin Chem* 1954; 3: 507.
 32. Karmen A, Wróblewski F, La Due JS: Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1955; 34: 126.
 33. Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labeled protein, in Colowick SP, Kaplan No (eds): *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1957, Vol 4, p 708.
 34. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751.
 35. Scheffler WC: *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2. Menlo Park, USA, 1980, p 84.
 36. 박준식, 장여규 : 환경 담즙물체간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성화. 계명의대논문집 1985; 4: 1.
 37. Linde S: A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extracts in cardiac hepatic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1958; 10: 303.
 38. 박준식, 이상일 : 환경 담즙물체간장의 Malate Dehydrogenase의 활성화. 계명의대논문집 1985; 4: 131.
 39. 이정근, 조준승 : 담관결찰 및 4염화탄소 투여가 혈청 및 간의 Leucine Aminopeptidase와

- Alanine Aminotransferase의 활성에 미치는 영향. 경북의대잡지 1984; 25: 123.
40. 김홍웅, 유호열: 흰쥐에 있어서 담즙울체시간의 Alkaline Phosphatase와 단백합성능의 변동에 관하여. 경북의대잡지 1974; 15: 147.
41. Kaplan MM, Righetti A: Induction of rat liver alkaline phosphatase, the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. *J Clin Invest* 1960; 49: 508.