

흰쥐 재생간의 5'-Nucleotidase 및 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치*

계명대학교 의과대학 생화학교실

안광욱·곽춘식

=Abstract=

5'-Nucleotidase and Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activities in the Regenerating Rat Liver

Kwang Wook Ahn, MD; Chun Sik Kwak, PhD

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

A study was made on the changes in the activities of the followings during 6 post-operative days: Plasma membrane, microsomal, mitochondrial, nuclear and cytosolic 5'-nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase of regenerating rat livers, and rat serum 5'-nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase after 70% (median and left lateral lobes) partial hepatectomy. The activities of alanine aminotransferase in both serum and cytosol of regenerating rat liver were also measured.

The activities of 5'-nucleotidase in the normal rats hepatic subcellular fractions were: 59.20 ± 11.35 (n mol Pi/mg protein/min) in the plasma membrane; 52.86 ± 3.88 in the microsome; 10.56 ± 2.12 in the mitochondria; 11.48 ± 3.62 in the nuclei, and 3.55 ± 0.54 in the cytosol. Those of gamma-glutamyl transpeptidase were: 1.96 ± 0.46 (n mol p-nitroaniline/mg protein/min) in the plasma membrane; 3.38 ± 0.62 in the microsome; 0.88 ± 0.12 in the mitochondria; 1.40 ± 0.13 in the nuclei, and 0.76 ± 0.12 in the cytosol. Normal activity of alanine aminotransferase was 330 ± 56 Karmen unit/mg protein in the rat hepatic cytosol.

After partial hepatectomy in the rats, activities of plasma membrane bound gamma-glutamyl transpeptidase in regenerating livers significantly increased in the span between the second and the third days but plasma membrane bound 5'-nucleotidase showed no change.

The activity of microsomal 5'-nucleotidase in the regenerating liver tremendously increased from the second to the sixth days after partial hepatectomy. And the activity of hepatic microsomal gamma-glutamyl transpeptidase also elevated from the second and the third days after partial hepatectomy.

The activity of mitochondrial 5'-nucleotidase in the regenerating liver decreased between the third and the sixth days after partial hepatectomy. And the activity of hepatic microsomal gamma-glutamyl transpeptidase also elevated from the second and the third days after partial hepatectomy.

* 이 논문은 안광욱의 석사학위 논문임

The activity of mitochondrial 5'-nucleotidase in the regenerating liver decreased between the third and the sixth days of partial hepatectomy. The hepatic nuclear and cytosolic 5'-nucleotidase decreased in the regenerating stage.

The decreased values were seen after two days in cytosolic 5'-nucleotidase and after three days in nuclear 5'-nucleotidase following the operations. However, no significant changes in hepatic mitochondrial, nuclear and cytosolic gamma-glutamyl transpeptidase were noted through out the experiments.

The activity of serum alanine aminotransferase markedly elevated from 12 hours to three days after partial hepatectomy, but serum 5'-nucleotidase and gamma-glutamyl transpeptidase activities remained normal.

서 론

5'-Nucleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydrolase, EC 3.1.3.5, 5'-NT)는 5'-ribonucleotide 들을 가수분해하여 인산을 유리시키는 반응을 촉매하는¹⁾ 효소로써 전해세포의 대부분에서 plasma membrane, microsome 및 mitochondria 등의 막의 외측 표면에 편재되어 있으며 흰쥐에서는 nuclei 및 cytosol 분획에서도 발견된다^{2~7)}. 그리고 이 효소는 동물의 거의 모든 조직에 분포되어 있으며 간, 뇌하수체후엽, 심, 근육, 신경조직, 폐, 선, 혀, 혈관조직, 교관의 순서로 많이 존재한다고^{8~13)} 하며 혈장과 담즙에도 출현하는 것^{14,15)}으로 알려져 있다.

한편 γ -glutamyl transpeptidase ((5-glutamyl)-peptide: amino acid 5-glutamyl transferase, EC 2.3.2.2, γ -GTP)는 γ -glutamyl peptide 들로부터 γ -glutamylamide를 유리시켜 새로운 γ -glutamyl peptide를 생성케 하는 반응을 촉매하는 효소이며^{16~18)} 이 효소도 전해세포의 plasma membrane과 microsome 등에서 막의 외측표면에 편재되어 있으며 cytosol 분획에서도 발견된다^{19~21)}. 그리고 이 효소도 역시 동물이나 인체조직에 널리 분포되어 있으며, 선, 혀, 간의 순서로 많이 존재한다고 하며 혈장, 요, 담즙 및 뇌척수액등에도 출현됨이 밝혀져 있다^{22~26)}.

이 두효소는 간조직에 그 함유량이 많을뿐 아니라 그활성도 왕성하다고 하며 특히 간의 담도세포에 그 함유량이 많다고 하여 alkaline phosphatase(ALP), leucine aminopeptidase (LAP)와 더불어 소위 담도계 효소라 부르기도^{27~32)} 한다.

흰쥐의 간을 부분절제하면 간유된 간엽은 급격히 재생되어 비대해지며 이때 물질대사는 상당히 변동한다^{33~42)}는 것이 잘 알려져 있다. 그리고 담도계

효소이며, 생체막결합 효소인 ALP 및 LAP도 재생간에서 간재생이 활발한 시기에 그 활성이 증가된다고^{41,42)} 한다. 5'-NT 및 γ -GTP도 생체막결합 효소이며 간에서 주로 합성되는 만큼 재생간에서 활성의 변동이 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 재생간의 세포분획 중의 5'-NT 및 γ -GTP 활성도의 변동을 알아보기 위하여 건강한 흰쥐를 사용하여 간을 부분절제한 후 6일동안 경시식으로 혈청과 재생간에서 plasma membrane, microsome, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 5'-NT와 γ -GTP 활성도를 측정하는 한편 cytosol 분획의 alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2, ALT)의 활성도도 함께 측정하여 그 결과를 보고자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치: 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 채 중 320~360g이 되는 Sprague-Dawley 종의 숫흰쥐 55마리를 사용하였으며 정상군, 가수술군 및 간엽절제군으로 나누어서 가수술 또는 간엽 절제수술후 12시간 1일, 2일, 3일 및 6일에 이를 쥐를 각각 5마리씩 죽여 실험에 사용하였다.

각 실험군들은 개별분리 수용하였으며 실험전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 제일 사료주식회사 제품을 사용하였으며 물과 같이 자유로이 먹도록 하였다.

간엽절제수술은 효소활성의 일중변동을 고려하여 쥐를 일정한 시간에 죽일 수 있도록 수술시간을 조절하였으나 12시간 절식시킨 후 가능한 한 무균상태를 유지하면서 약한 ethar 마취 하에서 실시하였다.

흰쥐의 간엽절제수술은 북부정중선을 따라 상복

부를 약 2cm 절개하여 간의 중엽과 좌측외엽을 복장밖으로 압출하고 인접조직간의 인대를 절단한 후 간엽의 기저부위를 결찰한뒤 간엽을 절제하였다. 이 과정에서 절제된 간은 전체간의 약 70%에 해당되며 이것을 original liver(이하 원래 간으로 표현한다)로 하였다.

가수술은 간엽절제만 하지 않고 그의 모든 조작은 간엽절제수술시와 동일하게 하였다.

시약: Sodium deoxycholic acid, 5'-AMP (5'-adenosine monophosphate), L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, glycylglycine, p-nitroaniline, L-alanine, α -ketoglutaric acid, NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide; yeast grade III, sodium salt), LDH (lactic dehydrogenase; bovine heart, type IX), tris(hydroxymethyl) aminomethane, sodium barbiturate, barbital, 종합표준효소(enzyme control 2-N) 및 단백표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma 사의 제품을 사용하였으며 그의 일반시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획: 간엽절제군에서 재생간의 적출은 12시간 절식시킨 후 약한 ether 마취하에서 시행하였으며 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시키고 재생간을 적출하였다. 적출한 재생간은 2~4°C의 0.25M sucrose 액으로 잘 쟁고 면포로 균등히 압박하여 간에 남아있는 sucrose 액을 가능한 한 모두 제거하였으며 절제한 원래간도 같은 방법으로 쟁은 후 세포분획에 제공하였다. 그리고 정상 흰쥐에서 간적출도 재생간과 같은 방법으로 시행하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청을 얻고 곤효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 채취한 원래간과 재생간을 즉시 2~4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그중 4.5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose 액을 넣어 teflon glass homognizer (Thomas 사 제품 chamber clearance 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마세하여 10w/v% 간균질액을 만들었다. 그리고는 간균질액을 약 15ml를 취하여 sucrose density gradient 초원심분리법⁴³⁾으로 microsome, mitochondria 및 cytosol 분획을 분리하였다. 즉 이마세균질액을 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 얻은 상청액을 다시 104,400×g에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 다시 얻었다. 이때 얻은 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 이 과정에서 얻은 pellet은 0.25M sucrose 액에 재현탁시키고 이 액을 10~35w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심관 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 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

한편 위의 7,796×g에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M sucrose 액에 현탁시키고 이 액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 pellet을 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 법⁴⁴⁾을 약간 수정하여 사용하였다. 즉 간마세균질액 약 15ml를 취하여 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet를 70w/v% sucrose 액에 현탁시키 그 일정량을 30~55w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 판자에 부하시켜 70,400×g에서 100분간 원심분리하여 37~41%(d=1.16~1.18) sucrose 액 중부위에 형성된 pellet을 취하여 1mM sodium bicarbonate 액으로 1회 세척하여 이것을 plasma membrane 분획으로 사용하였다.

Nuclei 분획의 분리는 Conover 및 Siebert의 법⁴⁵⁾에 따라 분리하였다. 즉 간마세균질액 약 15ml를 취하여 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet을 75.3w/v% sucrose 액에 현탁시키 22,530×g에서 1시간 원심분리하여 원심분리관의 판자에 생성된 pellet을 취한후 다시 75.3w/v% sucrose 액에 재현탁시키 22,530×g에서 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 Sor-

vall 사의 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 T865 rotor였고 plasma membrane 분획의 분리에 사용한 rotor는 AH-650 rotor였으며 nuclei 분획의 분리에 사용한 rotor는 SS-34 rotor였다. 그리고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO model 570)을 사용하여 제조하였다.

효소액 조제: 분리한 microsome, mitochondria, nuclei 및 plasma membrane은 단백질으로 $5\text{mg}/\text{ml}$ 가 되도록 0.25M sucrose 액에 혼탁시켰으며 이 혼탁액을 1w/v\% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v\% sodium bicarbonate 액으로 바로 회색하여 ultrasonic dismembrator (Fisher model 300)로 $20 \pm 0.4\text{Kcycles/sec}$ 의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파 마사지⁴⁶⁾를 하여 이것을 cytosol 분획과 더불어 5'-NT 및 γ -GTP 효소액으로 사용하였다. 그리고 ALT의 효소액은 cytosol 분획을 그대로 사용하였다.

효소활성도: 측정: 혈청 및 간의 각 세포분획의 5'-NT 활성도의 측정은 5'-AMP를 기질로 사용하여 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 인산을 정량하는 Campbell의 방법⁴⁷⁾에 의하였다. 그리고 이 효소활성의 단위는 1분간에 1ml 의 혈청 또는 1mg 의 단백이 반응하여 생성한 인산을 n mole로 나타내었다.

혈청 및 간의 각 세포분획의 γ -GTP 활성도의 측정은 L- γ -glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용하여 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 p-nitroaniline을 정량하는 Orlowaki 및 Moister의 법⁴⁸⁾에 의하였다. 그리고 이 효소의 활성단위는 1분간에 1ml 의 혈청 또는 1mg 의 단백이 반응하여 생성한 p-nitroaniline을 n mole로 나타내었다.

혈청 및 간 cytosol 분획의 ALT 활성도 측정은 L-alanine과 α -ketoglutarate를 기질로 사용하여 25°C 에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 pyruvic acid가 NADH 및 LDH 공존하에서 lactate로 환원될 때 NADH가 산화되어 NAD^+ 로 되면서 감소하는 흡광도로써 효소활성을 정량하는 Karmen 등의 법⁴⁹⁾에 의하였다. 그리고 이 효소의 단위는 1ml 혈청 또는 1mg 의 단백이 25°C , 340nm 에서 흡광도가 1분 동안에 0.001 감소하는 활성동을 1단위로 하는 Karmen 단위로 나타내었다.

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

단백 질량: 효소액 중의 단백질량은 0.5N -perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Greenberg 및 Rothstein 법⁵⁰⁾으로 효소액 중의 단백을 정제한 다음 biuret 법⁵¹⁾으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법⁵²⁾에 의하여 검정하였다.

성 적

정상흰쥐간의 plasma membrane, microsome mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 5'-NT, γ -GTP 및 cytosol 분획의 ALT 활성도: 정상흰쥐간의 각 세포분획 중의 5'-NT 및 γ -GTP 그리고 cytosol 분획의 ALT의 활성도를 보면 표 1과 같다. 즉 정상흰쥐간의 세포분획 중의 5'-NT의 활성도는 plasma membrane 분획이 $59.20 \pm 11.35\text{n mol Pi/mg protein/min}$ (이하단위 생략함)으로 가장 높았으며 다음은 microsome 분획 52.86 ± 3.88 , 그리고 nuclei 11.48 ± 3.62 , mitochondria 10.56 ± 2.12 , cytosol 3.55 ± 0.54 의 순서였다.

정상흰쥐간 세포분획 중의 γ -GTP의 활성도는 microsome 분획이 $3.38 \pm 0.62\text{n mol p-nitroaniline /mg protein/min}$ (이하단위 생략함)으로 가장 높았으며 다음은 plasma membrane 1.96 ± 0.46 , 그리고 nuclei 1.40 ± 0.13 , mitochondria 0.88 ± 0.12 , cytosol 0.76 ± 0.12 의 순서였다. 한편 정상흰쥐간의 cytosol 분획의 ALT의 활성도는 $330 \pm 56\text{ Karmen unit/mg protein}$ (이하단위 생략함)이었다.

흰쥐에서 간엽절제 후의 혈청 5'-NT, γ -GTP 및 ALT 활성도: 간엽절제 또는 가수술 후 경시적으로 측정한 혈청 5'-NT, γ -GTP 및 ALT 활성도를 보면 표 2와 같다. 간엽절제 후 혈청 5'-NT는 신혈기간동안 가수술군보다 약간 증가된 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었으며 또한 혈청 γ -GTP도 별변동을 보이지 않았다. 그러나 혈청 ALT는 간엽절제 후 12시간부터 급격한 증가를 보였다. 즉

Table 1. Activities of 5'-nucleotidase (5'-NT), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) and alanine aminotransferase (ALT) of normal liver in rats

Fractions	5'-NT		γ -GTP	ALT
	n mol Pi/ mg protein/min	n mol p-nitroaniline/ mg protein/min	Karmen unit/ mg protein	
Plasma membrane	59.20±11.35	1.96±0.46		
Microsome	52.86±3.88	3.38±0.62		
Mitochondria	10.56±2.12	0.88±0.12		
Nuclei	11.48±3.62	1.40±0.13		
Cytosol	3.55±0.54	0.76±0.12		330±56

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

Table 2. Activities of serum 5'-nucleotidase (5'-NT), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) and alanine aminotransferase (ALT) after partial hepatectomy in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP		ALT	
	n mol Pi/ml/min	n mol p-nitroaniline/ml/min	Sham (%)	Hepatectomy (%)	Sham (%)	Hepatectomy (%)
0.5	0.35±0.16 (100)	0.40±0.20 (114)	3.62±0.61 (100)	3.64±0.56 (101)	16.4±6.8 (100)	480.6±95.82*** (2,930)
1	0.38±0.17 (100)	0.41±0.21 (108)	3.60±0.67 (100)	3.60±0.73 (100)	17.6±6.2 (100)	439.0±85.42*** (2,494)
2	0.36±0.14 (100)	0.43±0.24 (119)	3.63±0.65 (100)	3.92±0.87 (108)	16.8±8.1 (100)	284.5±58.44*** (1,693)
3	0.37±0.17 (100)	0.42±0.25 (114)	3.59±0.70 (100)	3.84±1.31 (107)	17.0±6.9 (100)	41.6±15.16** (245)
6	0.34±0.11 (100)	0.39±0.20 (115)	3.62±0.63 (100)	3.66±0.55 (101)	16.6±7.8 (100)	16.2±4.17 (98)

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<0.01, ***; P<0.001).

Table 3. Activities of plasma membrane 5'-nucleotidase (5'-NT) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP	
	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	Original liver (%)	Regenerating liver (%)
0.5	59.64±9.06 (100)	58.86±7.46 (99)	2.05±0.53 (100)	2.16±0.48 (105)
1	62.52±10.30 (100)	64.42±8.91 (103)	2.00±0.68 (100)	2.28±0.77 (114)
2	58.78±13.78 (100)	68.04±14.65 (116)	1.93±0.33 (100)	2.92±0.78* (151)
3	57.90±18.13 (100)	63.72±18.18 (110)	1.94±0.42 (100)	2.86±0.60* (147)
6	61.26±12.26 (100)	58.22±11.37 (95)	1.86±0.67 (100)	1.97±0.49 (106)

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

Significant difference from original livers (*; P<0.05).

Table 4. Activities of microsomal 5'-nucleotidase (5'-NT) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP	
	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min
	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	Original liver (%)	Regenerating liver (%)
0.5	52.98±3.78 (100)	52.94±4.51 (100)	3.47±0.45 (100)	3.49±0.46 (101)
1	51.12±6.02 (100)	55.54±3.54 (109)	3.31±0.62 (100)	3.38±0.65 (102)
2	52.54±3.36 (100)	66.46±6.01* (126)	3.38±0.48 (100)	4.72±0.68*** (140)
3	52.00±3.05 (100)	69.92±7.75* (134)	3.29±0.97 (100)	4.61±1.24*** (140)
6	50.58±3.92 (100)	66.50±7.42* (131)	3.26±0.71 (100)	3.78±0.87 (116)

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

Significant difference from original livers (*; P<0.05, ***; P<0.001).

Table 5. Activities of mitochondrial 5'-nucleotidase (5'-NT) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP	
	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min
	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	Original liver (%)	Regenerating liver (%)
0.5	11.18±2.19 (100)	11.09±2.24 (99)	0.87±0.09 (100)	0.87±0.10 (100)
1	10.79±0.92 (100)	9.76±0.64 (90)	0.84±0.13 (100)	0.87±0.12 (104)
2	10.04±2.30 (100)	9.21±1.75 (92)	0.85±0.25 (100)	1.07±0.27 (126)
3	10.46±1.66 (100)	7.21±1.63* (69)	0.95±0.13 (100)	1.06±0.13 (112)
6	9.84±1.44 (100)	6.83±1.05* (69)	0.92±0.16 (100)	0.97±0.19 (105)

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

Significant difference from original livers (*; P<0.05).

간엽절제 후 12시간에는 가수출군 16.4±6.8에 비해 480.6±95.82로 약 2,830%(P<0.001)의 증가를 보였으며 1일에는 약 2,394%(P<0.001), 2일에는 약 1,593%(P<0.001), 3일에는 약 145%(P<0.001)의 증가를 보이고 이후 6일에는 정상으로 회복되었다.

재생간의 plasma membrane 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도: 재생간의 plasma membrane 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도를 보면 표 3과 같다. 간엽절제 후 재생간의 plasma membrane 분획의 5'-NT 활성도는 2일 및 3일째 재생간에서 약간 증가되었으나 통계학적 의의는 없었다. 그러나 재생간의 plasma membrane의 γ -GTP의 활성

도는 2일째 재생간이 원래 1.93±0.33에 비해 2.92±0.78로 약 51%(P<0.05)의 증가를 보였으며 이후 3일째 재생간에서도 약 47%(P<0.05)의 증가를 보였다. 그러나 이후 6일에는 정상으로 회복되었다.

재생간의 microsome 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도: 재생간의 microsome 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도를 보면 표 4와 같다. 재생간의 microsome 분획의 5'-NT의 활성도는 2일째 재생간부터 증가되었다. 즉 2일째 재생간은 원래 52.54±3.36에 비해 66.46±6.01로 약 26%(P<0.05)의 증가를 보였고 이후 3일째 재생간에서는 약 34%(P<0.05), 6일째 재생간에서는 약 31%(P<0.05)의

Table 6. Activities of nuclear 5'-nucleotidase (5'-NT) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP	
	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min
	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	Original liver (%)	Regenerating liver (%)
0.5	12.42±2.69 (100)	11.60±1.84 (93)	1.38±0.13 (100)	1.35±0.10 (98)
1	11.19±3.56 (100)	10.54±3.60 (94)	1.37±0.17 (100)	1.38±0.15 (101)
2	12.27±3.01 (100)	9.62±5.31 (78)	1.40±0.15 (100)	1.44±0.11 (103)
3	12.55±3.40 (100)	6.81±0.89* (54)	1.37±0.18 (100)	1.43±0.11 (104)
6	11.47±3.59 (100)	12.46±3.26 (109)	1.37±0.15 (100)	1.31±0.16 (96)

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

Significant difference from original livers (*; P<0.05).

Table 7. Activities of cytosolic 5'-nucleotidase (5'-NT), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP) and alanine aminotransferase (ALT) of regenerating liver in rats

Post hepatectomy day(s)	5'-NT		γ -GTP		ALT	
	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	n mol Pi/mg protein/min	n mol p-nitroaniline/mg protein/min	Karman unit/mg protein	n mol Pi/mg protein/min
	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	Original liver (%)	Regenerating liver (%)	Original liver (%)	Regenerating liver (%)
0.5	3.60±0.66 (100)	3.51±0.59 (98)	0.72±0.08 (100)	0.73±0.07 (101)	356±49 (100)	317±41* (89)
1	3.52±0.64 (100)	3.30±0.67 (94)	0.75±0.12 (100)	0.75±0.15 (100)	355±59 (100)	317±48** (89)
2	3.43±0.45 (100)	2.95±0.21* (86)	0.77±0.14 (100)	0.80±0.13 (104)	359±95 (100)	289±96** (81)
3	3.54±0.65 (100)	3.53±0.53 (100)	0.77±0.14 (100)	0.79±0.13 (103)	346±39 (100)	253±39** (73)
6	3.45±0.53 (100)	3.74±0.76 (108)	0.77±0.09 (100)	0.73±0.10 (95)	346±76 (100)	264±40* (76)

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

Significant difference from original livers (*; P<0.05, **; P<0.01).

증가를 보였다. 그리고 재생간 microsome 분획의 γ -GTP도 2일째 재생간부터 증가 되었으나 6일째 재생간에서는 정상치로 회복되었다. 즉 2일째 재생간에서는 원래간 3.38±0.48에 비해 4.72±0.68로 약 40%(P<0.001)의 증가를 보였으며 3일째 재생간에서도 역시 약 40%(P<0.001)의 증가를 보였다.

재생간의 mitochondria 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도: 재생간의 mitochondria 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도를 보면 표 5와 같다. 재생간의 mitochondria 분획의 5'-NT는 3일 및 6일째 재생간에서 약간 감소된치를 보였다. 즉 3일째 재생간에서는 원래간 10.46±1.66에 비해 7.21±1.63으로 약 31%(P<0.05)의 감소를 보였으며 이후 6일

째 재생간에서도 약 31%(P<0.05)의 감소를 보였다. 그러나 재생간의 mitochondria 분획의 γ -GTP는 실험전기간 동안 의의있는 변동은 보이지 않았다.

재생간의 nuclei 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도: 재생간의 nuclei 분획의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성도를 보면 표 6과 같다. 재생간의 nuclei 분획의 5'-NT는 2일 및 3일째 재생간에서 감소된치를 보였다. 그러나 2일째 재생간에서의 감소는 통계학적 의의가 없었다. 즉 2일째 재생간은 원래간에 비해 약 22% 감소를 보였으며 3일째 재생간에서는 약 46%(P<0.05)의 감소를 보였다. 그러나 재생간의 nuclei 분획의 γ -GTP는 실험전기간동안 변동을 보이지 않았다.

재생간의 cytosol 분획의 5'-NT, γ -GTP 및 ALT의 활성도: 재생간의 cytosol 분획의 5'-NT, γ -GTP 및 ALT의 활성도를 보면 표 7과 같다. 재생간의 cytosol 분획의 5'-NT는 2일째 재생간에서 원래간에 비해 약 14%($P<0.05$)의 감소를 보였으며, 재생간 cytosol 분획의 γ -GTP는 실험전기 간동안 변동을 보이지 않았다. 그러나 재생간의 cytosol 분획의 ALT는 실험전기 간동안 의의 있는 감소를 보였다. 즉 12시간째 재생간에서는 원래간에 비해 약 11%($P<0.05$), 1일째 재생간에서도 약 11%($P<0.01$) 그리고 2일째 재생간에서는 약 19%($P<0.01$), 3일째 재생간에서는 약 27%($P<0.01$), 6일째 재생간에서는 약 24%($P<0.05$)의 감소를 보였다.

고 찰

흰쥐의 간을 외파적으로 약 70% 절제하면 잔유된 간엽은 곧 세포분열이 왕성해지며 수출후 36시간에 최고에 달한다^{33,36}고 한다. 그리고 간엽절제후 24시간을 전후하여서는 간의 DNA, RNA 및 단백합성이 증가되고 이들의 상승시기와 일치하여 DNA 및 RNA polymerase 그리고 단백합성에 관여하는 효소들의 활성이 높아진다^{33~38}고 하며 특히 생체막 결합 효소인 ALP와 LAP도 간재생이 활발한 시기에 재생간에서 그 생합성이 증가된다^{41,42}고 한다. 이 실험에서 관찰한 5'-NT와 γ -GTP도 ALP 및 LAP와 마찬가지로 생체막 효소임과 동시에 간에서 그 합성이 활발하다^{27~32}고 알려져 있는 만큼 5'-NT와 γ -GTP는 간재생이 왕성한 시기에 변동이 있을 것으로 예상된다.

이 실험에서 간엽을 절제했을 때 혈청 5'-NT와 γ -GTP 활성도는 의의 있는 증가를 보이지 않았다. 그러나 혈청 ALT의 활성도는 간엽절제후 3일까지 현저한 증가를 보였다. ALT는 간세포질에 많은 양 존재하며 간세포의 손상으로 간세포막의 투과성이 헛될 때 세포외로 유출되어 증가되는 효소이다^{53,54}.

이 실험에서 간엽절제후 6일째 재생간에서 cytosol 분획의 ALT치가 현저한 감소를 보였음에도 불구하고 이때 혈청 ALT치는 정상 수준을 유지하고 있었다. 이런점으로 보아 이 실험에서 혈청 ALT의 증가는 재생간에서 유리된 것이라 보기는 어려우며 오히려 간엽절제 후 간절제 부위에 조금 남아있던 간엽조각이 치유되는 동안에 ALT를 다량 혈중으로 유출시키 것이 아닌가 생각된다. 그러나 간엽절제 후

12시간에서 6일까지의 재생간에서 cytosol 분획에서의 ALT 활성도의 저하는 막연히 재생간에서 ALT 합성이 감소된 것이라 생각해보나 분명치 않으니 그 원인도 본 실험만으로서는 알수가 없다.

흰쥐의 총담관을 결찰하고 담즙을 체를 야기했을 때 담즙울체간의 투과성이 항진되며 동시에 담즙울체간의 5'-NT와 γ -GTP는 그 합성이 증가되는 것⁴⁶으로 알려져 있다. 그리고 이때 혈중에는 5'-NT와 γ -GTP의 활성도가 현저히 증가 된다⁴⁶고 한다. 만약 재생간의 세포막에서 투과성의 변화가 없다면 설령 재생간에서 5'-NT나 γ -GTP의 합성이 증가되더라도 혈중의 5'-NT나 γ -GTP 활성도는 별변동이 없을 것이다. 따라서 이 실험에서의 혈청 5'-NT와 γ -GTP의 성적과 이들의 각 세포분획의 성적을 볼 때 재생간의 세포막 투과성과 정상간의 세포막 투과성간에는 별차이가 없는 것이 아닌가 생각된다.

이 실험에서 재생간의 plasma membrane 분획과 microsome 분획의 γ -GTP는 그 활성도가 의의 있는 증가를 보였으며 mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획은 별변동을 보이지 않았다. 그리고 재생간의 microsome 분획의 5'-NT는 2일, 3일 및 6일째 재생간에서 의의 있는 증가를 보였다. 그러나 plasma membrane 분획 5'-NT는 별변동을 보이지 않았으며 오히려 mitochondria 분획은 3일 및 6일에, nuclei 분획은 3일에 그리고 cytosol 분획은 2일에 의의 있는 감소를 보았다.

이상 이 실험의 결과는 재생간에서 간재생이 왕성한 시기인 2~3일에 5'-NT는 microsome 분획에서 그 활성이 증가되며 mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획에서는 감소됨을 보여주며 γ -GTP는 plasma membrane 분획에서만 증가됨을 보여주고 있다.

이와 같은 실험결과로서는 단지 5'-NT 및 γ -GTP 가 간재생이 활발한 시기에 재생간에서 특별히 조절을 받는 효소라는 것만을 암시해주는 것이며, 각 세포분획에서의 5'-NT 및 γ -GTP의 활성변동은 효소활성의 효율 변동인지, 합성의 변동인지은 이 실험의 결과만으로는 분명히 말 할 수는 없다. 따라서 재생간에서의 이들 효소의 활성변동의 원인 및 기전은 앞으로 계속 추구해 볼 문제이다.

요약

간을 부분절제했을 때의 재생간 세포분획 중의 5'-NT 및 γ -GTP 활성도의 변동을 알아보기 위하-

여 건강한 흰쥐를 사용하여 간을 약 70% 부분절제하고 6일동안 경시적으로 혈청과 재생간에서 plasma membrane, microsome, mitochondria, nuclei 및 cytosol 분획의 5'-NT와 γ -GTP를 측정하는 한편 cytosol 분획의 ALT도 함께 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

정상 흰쥐간 세포분획중의 5'-NT의 활성도는 plasma membrane 분획이 $95.20 \pm 11.35 \text{ n mol Pi/mg protein/min}$ 으로 가장 높았고 다음은 microsome 분획이 52.86 ± 3.88 이었으며 그리고는 nuclei, mitochondria, cytosol 분획의 순서였다.

정상 흰쥐간 세포분획중의 γ -GTP의 활성도는 microsome 분획이 $3.38 \pm 0.62 \text{ n mol p-nitroaniline/mg protein/min}$ 으로 가장 높았으며 다음은 plasma membrane 1.96 ± 0.46 그리고 nuclei, mitochondria, cytosol 분획의 순서였다. 한편 정상 흰쥐간의 cytosol 분획의 ALT 활성도는 $330 \pm 56 \text{ Karmen unit/mg protein}$ 이었다.

간엽절제 후 혈청 5'-NT와 γ -GTP 활성도는 의의있는 증가를 보이지 않았다. 그러나 혈청 ALT의 활성도는 간엽절제 후 곧 상승하여 12시간에 최고치에 달하고 이후 3일까지 높은치를 보이다가 6일에 정상으로 회복되었다.

재생간의 plasma membrane 분획의 5'-NT의 활성도는 실험기간 동안 의의있는 변동을 보이지 않았다. 그러나 γ -GTP의 활성도는 간엽절제 후 2일 및 3일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였다.

재생간의 microsome 분획의 5'-NT의 활성도는 간엽절제 후 2일, 3일 및 6일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였다. 그리고 γ -GTP의 활성도도 2일 및 3일째 재생간에서 의의있는 증가를 보였다.

재생간의 mitochondria 분획의 5'-NT의 활성도는 간엽절제 후 3일 및 6일째 재생간에서 의의있는 감소를 보였다. 그러나 γ -GTP는 변동을 보이지 않았다.

재생간의 nuclei 분획의 5'-NT의 활성도는 간엽절제 후 3일째 재생간에서 의의있는 감소를 보였다. 그러나 γ -GTP는 변동을 보이지 않았다.

재생간의 cytosol 분획의 5'-NT의 활성도는 간엽절제 후 2일에 의의있는 감소를 보였으며 ALT 활성도는 실험전기간 동안 의의있는 감소를 보였다. 그러나 γ -GTP는 변동을 보이지 않았다.

이상의 성적으로 보아 재생간 세포분획에서 5'-NT와 γ -GTP 활성도의 증감은 간재생이 가장 왕성한 시기인 간엽절제 후 2일 및 3일에 주로 나타나는

것으로 보인다.

참 고 문 헌

- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, ed 1. Great Britain, Edward Arnold publisher, 1976, p 144.
- Evans WH, Gurd JW: Properties of a 5'-nucleotidase purified from mouse liver plasma membranes. *Biochem J* 1973; 133: 189.
- Song CS, Bodansky O: Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. *J Biol Chem* 1967; 242: 694.
- Widnell CC: Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions isolated from rat liver. I. The origin of 5'-nucleotidase activity in microsomes. *J Cell Biol* 1972; 52: 542.
- Riemer BL, Widnell CC: The demonstration of a specific 5'-nucleotidase activity in rat tissue. *Arch Biochem Biophys* 1975; 171: 343.
- Maito Y, Tsushima K: Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. *Biochem Biophys Acta* 1976; 438: 159.
- Greger J, Fabianowska-Majewska K: A distinctive activity of 5'-nucleotidase for dTMP in rat liver mitochondria. *Enzyme* 1980; 25: 26.
- Gulland JM, Jackson EM: 5'-nucleotidase. *Biochem J* 1938; 32: 597.
- McManus JFA, Lupton CH Jr, Harden G: Histochemical studies of 5'-nucleotidase. I. Method and specificity. *Lab Invest* 1952; 1: 480.
- Naidoo D: The activity of 5'-nucleotidase determined histochemically in the developing rat brain. *J Histochem Cytochem* 1962; 10: 421.
- Novikoff AB, Essner E: The histochemical demonstration of a specific phosphatase (5'-nucleotidase). *Biochem J* 1952; 50: 534.
- Reis JJ: The specificity of phosphomonoesters.

- terases in human tissues. *Biochem J* 1951; 48: 548.
13. Newman W, Feigin I, Wolf A, Kabat EA: Histochemical studies on tissue enzyme. *Am J Pathol* 1950; 26: 257.
 14. Hill PG, Sammons HG: An assessment of 5'-nucleotidase as a liver function test. *Q J Med* 1967; 36: 457.
 15. Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed 2. New York and London, Academic Press, 1974, Vol 2, p 874.
 16. Goldbarg JA, Friedman OM, Pineda EP, Smith E, Chatterji R, Stein EH, Rutenburg AM: The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys* 1960; 91: 61.
 17. Szczeklik E, Orlowski M, Szewczuk A: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gastroenterology* 1961; 41: 353.
 18. Rosaki SB, Rau D: Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in alcoholism. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 41.
 19. Szewczuk A: A soluble form of γ -glutamyl transpeptidase in human tissue. *Clin Chim Acta* 1966; 14: 608.
 20. Hurgey RP, Curthoys NP: Comparison of the size and physical properties of γ -glutamyl transpeptidase purified from rat kidney following solubilization with papain or with Triton X-100. *J Biol Chem* 1976; 251: 7863.
 21. Horiuchi S, Inoue M, Morino Y: γ -Glutamyl transpeptidase: Sideness of its active site on renal brush-border membrane. *Eur J Biochem* 1977; 87: 429.
 22. Orlowski M, Szewczuk A: Colorimetric determination of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human serum and tissue with synthetic substrates. *Acta Biochem Polon* 1961; 8: 189.
 23. Albert Z, Orlowski M, Szewczuk A: Histochemical demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase. *Nature* 1961; 191: 767.
 24. Naftalin L, Child VJ, Morley DA, Smith DA: Observations on the site of origin of serum γ -glutamyl transpeptidase activity. *Clin Chim Acta* 1969; 26: 297.
 25. Kokot F, Kvska J, Grzybek H: Gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP) in the urine and intestinal contents. *Arch Immunol Ther Exp* 1965; 13: 549.
 26. Bergmeyer HY: *Methods of Enzymatic Analysis*, English ed 2. New York and London, Academic Press, 1974, Vol 2, p 718.
 27. Song CS, Rubin W, Rifkind AB, Kappas A: Plasma membranes of the rat liver, isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J Cell Biol* 1969; 41: 124.
 28. Issa FSM, Llock BM, Hinron R: 5'-nucleotidase in liver plasma membrane and in the serum of normal and jaundiced rats. *Biochem Soc Trans* 1976; 4: 55.
 29. Rutenburg AM, Kim H, Fischbein JW, Hanker JS, Wasserkrug HL, Seligman AM: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity. *J Histochem Cytochem* 1969; 17: 517.
 30. Kaplan MM: Alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 1972; 63: 452.
 31. Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, ed 1. Great Britain, Edward Arnold publishers, 1976, p130.
 32. 鈴木宏：肝臓 alkaline phosphatase(日文). 代謝誌 1976; 13: 293.
 33. Becker FF: Restoration of liver mass following partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1963; 43: 497.
 34. Ksukada K, Lieberman I: Metabolism of nucleolar ribonucleic acid after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 1964; 239: 1564.
 35. Liberman I, Kane P: Synthesis of ribosomes in the liver after partial hepatectomy. *J Biol Chem* 1965; 240: 1737.
 36. Bucher NLR: Experimental aspects of hepatic regeneration. *N Engl J Med* 1967; 277: 738.
 37. 김동성：백서에 있어서 간엽절제후 재생시기의

- 간단백 및 혈장단백의 합성 속도에 관하여. 현대 의학 1968 ; 8 : 192.
38. 김종태 : 재생간의 *in vitro*에 있어서의 단백합성과 Humoral Factor. 경북의대잡지 1968 ; 9 : 39.
39. 권기정 : Ethionine이 백서재생간의 단백합성에 미치는 영향. 경북의대잡지 1969 ; 10 : 177.
40. 박연식, 김종태, 정태호 : 간엽 부분절제한 흰쥐 간장 및 혈청의 Cholesterol 함량변동에 관하여. 현대의학 1968 ; 8 : 517.
41. 박춘식, 조준승 : 흰쥐 재생간의 Alkaline Phosphatase의 활성치. 한국생화학회지 1978 ; 11 : 151.
42. 박춘식 : 간엽 부분절제한 흰쥐의 혈청 및 재생간장의 Leucine Aminopeptidase의 활성도. 경북의대잡지 1980 ; 21 : 500.
43. 박춘식, 꽈정식 : 흰쥐간 세포분획법, I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986 ; 5 : 45.
44. Dorling PR, Le Page RN: A rapid high yield method for the preparation of rat liver cell plasma membranes. *Biochem Biophys Acta* 1973 ; 318 : 33.
45. Conover TE, Siebert G: On the occurrence of respiratory components in rat liver nuclei. *Biochem Biophys Acta* 1965 ; 99 : 1.
46. 박춘식, 장억규 : 흰쥐 담즙을체간장의 5'-Nucleotidase와 Gamma-Glutamyl Transpeptidase의 활성치. 계명의대논문집 1985 ; 4 : 1.
47. Campbell DM: Determination of 5'-nucleotidase in blood serum. *Biochem J* 1962 ; 82 : 34.
48. Orlowski M, Meister A: γ -glutamyl β -nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L and D- γ -glutamyl transpeptidase activities. *Biochem Biophys Acta* 1963 ; 73 : 679.
49. Karmen A, Wróblewski F, La Due JS: Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1955 ; 34 : 126.
50. 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.
51. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949 ; 177 : 751.
52. Schefler WC: *Statistics for the Biological Sciences*, ed 2. Menlo Park, USA; 1980, p 84.
53. Linds S: A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extraction in cardiac and hepatic disease. *Scand J Clin Invest* 1958 ; 10 : 303.
54. Takada Y, Ichihara A, Tanioka H; Inove H: The biochemistry of animal cells the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cells. *J Biol Chem* 1964 ; 239 : 3590.