

흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 간의 Cathepsin B, D, H와 Acid Phosphatase 활성 변동에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 생화학교실

곽 춘식

경상북도 보건환경연구원 미생물과

문교철·김상철

경상북도 보건과

이도영

서론

Gram 음성균의 감염으로 초래되는 내독소 혈증은 전신 장기에 손상(Toba 등, 1982)을 유발하며 특히 간(Hirata 등, 1980; Sato 등, 1982)에 많은 영향을 미친다고 한다. 내독소에 의한 간 손상은 간의 mitochondria에서 adenosine triphosphate(ATP) 생성효소(Schumer 등, 1970; Meal 등, 1971; White 등, 1973)와 당대사에 관여하는 효소의 기능 저하로 초래되는 당대사 장애(Berry 등, 1968; Berry와 Rippe, 1973; Shackleford, 1986), 과종성 혈관내 응고증으로 인한 저용량성 손상(Balis 등, 1978; Balis 등, 1979) 및 간세포의 손상으로 유리되는 lysosome의 분해효소에 의한 간 세포의 자가 용해(Janoff 등, 1962; Filkins, 1971; Hirata 등, 1980) 등을 들 수 있다.

일반적으로 동물체의 조직이 손상을 받을 때는 세포 내 소기관인 lysosome이 관여하게 되며 이 lysosome 내에서 40여종의 산성가수 분해 효소가 함유되어 있다(de Duve, 1963; Weissman, 1965; Allison, 1967; de Duve, 1970). 그리고 lysosome의 효소들 중 대표적인 효소가 바로 cathepsin들과 acid phosphatase이다(de Duve 등, 1955; Comolli, 1967).

Cathepsin B(EC 3. 4. 22. 1)와 cathepsin H는 thiol proteinase에 속하는 효소(Kim, 1979b; Kiminami 등, 1985)이며 cathepsin D(EC 3. 4. 23. 5)는 carboxyl (acid) proteinase에 속하는 효소(Kim, 1979c)이다. 이들 효소는 동물의 거의 모든 조직과 기관에 분포(Barret, 1970; de Lumen 등, 1972; Etherington, 1972; Widmer와 Widmer, 1975; Barrett, 1977a; Whitaker와 Seyer, 1979; Yamamoto 등, 1979; Satav와 Katyare, 1981; Kiminami 등, 1985)되어 있으며 특히, 간, 신, 비, 폐 및 뇌 등에서 그 합성이 활발하다(Barret, 1970; de Lumen 등, 1972; Etherington, 1972; Barrett, 1977a; Yamamoto 등, 1979; Satav와 Katyare, 1981; Kiminami 등, 1985)고 한다. 이 효소들은 세포내에서는 주로 lysosome에 편재(Turk와 Kregar, 1984; Turk 등, 1984)되어 있으며 대부분의 단백질을 가수분해할 수 있는 광범위한 활성을 가지고 있는 것(Barret, 1977a; Barret, 1977b; Bohley 등, 1979)으로 알려져 있다. 이들 효소의 주요 생리 및 생화학적 역할은 pro-protein들을 processing하고 세포 내외의 단백의 분해와 더불어 각종 단백의 교체 속도를 조절하는 것이다(Barret, 1977b; Ansorge 등, 1977; Benuck 등, 1977; Quinn와 Judah, 1978; Barat 등, 1979; Graf 등, 1979; Burbach 등, 1980; Satav와 Katyare, 1981; Gounaris와

* 이 논문은 1992년도 계명대학교 융종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌다.

Slater, 1982; Takahashi 등, 1982).

Acid phosphatase(EC 3. 1. 3. 2; ACP)는 pH 5 부근에서 orthophosphoric monoester들을 가수분해 하여 alcohol과 인산을 유리시키는 효소(Kim, 1979a; Noel와 Lott, 1987)로서 동물의 조직(Straus, 1956; Bonting 등, 1960; Bingham 등, 1969; Kaneko 등, 1970; Payne, 1972; Nyquist와 Mollenhauer, 1973; Lam 등, 1973; Baccino와 Zuretti, 1975; Belville 등, 1978; Lam 등, 1979; Zuretti 등, 1982; Nordstrom 등, 1985), 체액(Bingham 등, 1969; Butterworth 등, 1972; Modder, 1973; Yam, 1974; Keough 등, 1982; Lad, 1984; Theodorsen, 1985) 및 혈구(Bingham 등, 1969; Li 등, 1970; Belville 등, 1978; Theodorsen, 1985) 등에 널리 분포되어 있으며 특히 망상내피계에 속하는 간, 폐, 림프 기관등(Straus, 1956; Kaneko 등, 1970; Zuretti 등, 1982)에서 그 활성이 높을 뿐만 아니라 그 합성도 왕성하다고 한다. 이 효소는 주로 lysosome에 많은 양이 존재(de Duve 등, 1955; Barka, 1960; Comolli, 1967; Lin과 Fishman, 1972; Himeno 등, 1988)하며 그 외 세포질(de Duve 등, 1955; Panara 등, 1980), 세포핵(Lin과 Fishman, 1972; Panara 등, 1980), 내형질세망(Lin과 Fishman, 1972; Panara 등, 1980), 골지체(Ma와 Biempica, 1971; Nyquist와 Mollenhauer, 1973)에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 그리고 이 효소의 생리학적 역할은 세포의 분비작용, 흡수작용 및 노화 작용에 필수적으로 관여하는 것이다(Silbermann과 Frommer, 1961; Bodansky, 1972; Noel와 Lott, 1987).

따라서 내독소에 의한 간 손상시 간세포의 lysosome이 관여하는 만큼 이러한 lysosome 효소인 cathepsin들과 ACP는 내독소 투여시 간에서 활성 변동이 있을 것이다. 그러나 내독소 투여시 간에서 이들 효소의 동태에 관한 자세한 보고는 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 내독소에 의한 간 상해 기전을 효소학적으로 규명하기 위한 일환으로 실시하였으며 특히 내독소 투여로 장애를 받은 lysosome에 의한 간 장애기전과 특히 간세포의 형태학적 변화와의 관계를 간세포 lysosome의 효소인 cathepsin B, D, H와 ACP의 활성도를 측정하여 내독소 혈중에서 이들 효소의 동태를 알아 볼으로서 이를 통해 내독소 혈중에서 이들의 역할을 파악코자 하였다.

재료 및 방법

동물 및 처치 : 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 채 중 280-320g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 내독소 주입군 및 대조군으로 나누어서 각각 내독소 주입 혹은 생리 식염수 주입 후 3시간, 8시간 및 24시간에 쥐를 각각 10마리씩 죽여 실험에 제공하였다.

각 실험군은 개별 분리 수용하였으며 실험 전후에 일정한 조건으로 사육하였다. 사료는 시판되는 진양 사료 주식회사의 제품을 먹도록 하였다. 대조군은 생리 식염수를 채 중 kg당 1.25ml를 주입하였으며 내독소 주입군은 김 정희 등(1987)의 방법에 따라 Sigma사의 내독소 (E. coli, 026: B6, lipopolysaccharide, Sigma, USA)를 생리 식염수에 4mg/ml의 농도로 녹여 채 중 kg당 5mg이 되도록 우경정맥으로 주입하였다.

시약 : N, α -benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide, mersalyl acid, polyoxyethylene-2, 3-lauayl ether, leucine- β -naphthylamide, 4-amino-2, 3-dimethylazo-benzene, disodium-p-nitrophenyl phosphate, p-nitrophe-nol, L-tyrosine, hemoglobin(from bovine erythrocyte, substrate powder), cathepsin B(from bovine spleen), cathepsin D(from bovine spleen), acid phosphatase (ACP LIN-TROL) 및 단백표준액(10g/100ml, bovine albumin) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며 그외 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

간적출 및 세포분획 : 간의 적출은 ether 마취하에 서 실시하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시킨 후 간문맥에 삼관한 다음 4°C의 생리 식염수로 관류하여 간에 남아 있던 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 압박하여 간에 남아 있는 생리 식염수를 가능한 한 모두 제거하였다. 이렇게 적출한 간은 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합한 다음 그중 5g을 취하여 9배 양의 0.25M sucrose액을 넣어 teflon glass homogenizer (Thomas사 제품 chamber clearance 0.005-0.007 inch)로 2-4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간조직 균질액을 만들었다. 그리고는 이 간조직 균질액 40ml를 취하여 sucrose linear density gradient 원분리법(꽉 충식과 꽉정식, 1986)으로 cytosol과 microsome을 분리하였다. 즉 간 조직의 마쇄 균질액을 571×g(average relative centrifugal force, 이하 생략함)에서 10

분간 원심분리하여 조직의 미마쇄 부분, 핵 및 세포막 부분을 제거한 다음, 그 상청액을 $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시 $10,4000 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이때 얻어진 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 이 과정에서 얻어진 pellet은 0.25M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10-35w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 $88,500 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet을 모아서 $88,500 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여 pellet을 얻고 이것을 다시 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 $88,500 \times g$ 에서 1시간 재원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 microsome 분획으로 사용하였다.

한편 lysosome 분획의 분리는 Graham(1984)법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉 간 마쇄 균질액 약 10ml를 취하여 $1,000 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상청액을 다시 $3,000 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 그리고 이 상청액을 또 다시 $1,000 \times g$ 에서 20분간 원심 분리하여 pellet을 얻었으며 이 pellet을 10w/v% sucrose액에 현탁시켜 그 일정량을 37-72w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 관저에 부하시켰다. 그리고는 이 원심분리관을 $95,000 \times g$ 에서 2시간 원심 분리하여 51-57% ($1.23-1.26 g/cm^3$) sucrose액 층 부위에 형성된 pellet을 취한 후 이 pellet을 0.25M sucrose액으로 1회 세척하여 lysosome 분획으로 사용하였다.

위의 세포분획 과정에서 모든 조직은 2-4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65 B ultracentrifuge였다. 그리고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former(ESCO model 570)를 사용하여 제조하였다.

효소시료 조제 : 10w/v% 간 마쇄 균질액의 일정량을 취하여 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20 ± 0.4 K cycle/sec의 속도로 2-4°C에서 2분씩 5회 초음파 마쇄한 후 이 액을 cathepsin B, D 및 H의 효소시료(Barret, 1977b; Barret, 1978; Barret와 Kirsche, 1981)로 사용하였다. 한편 분리한 간의 lysosome 분획과 microsome 분획은 단백량으로 3mg/ml가 되도록 0.25M sucrose 액으로 현탁시키고 이 현탁에 0.1% Tritox X-100을 처리하여 cytosol 분획과 함께 acid phosphatase의 효소시료(Moss, 1984)로 사용하

였다.

효소활성도 측정 : 간의 cathepsin B의 활성도 측정은 N, α -benzoyl-DL-arginine- β -naphthylamide를 기질로 사용하여 효소액과 함께 40°C에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 β -naphthylamine를 정량하는 Barret(1978)의 방법에 의하였으며 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 생성한 β -naphthylamine의 양을 pmol로 나타내었다. 간의 cathepsin D의 활성도 측정은 hemoglobin을 기질로 사용하여 효소액과 함께 37°C에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 tyrosine을 정량하는 Barret(1977b)의 방법에 의하였으며 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 생성한 tyrosine 양을 pmol로 나타내었다. 또한 간의 cathepsin H의 활성도 측정은 leucine- β -naphthylamine를 기질로 사용하여 효소액과 함께 37°C에서 10분간 반응시키는 동안에 생성된 β -naphthylamide를 측정하는 Barret 및 Kirsche(1981)의 방법에 의하였으며 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 생성한 β -naphthylamine의 양을 pmol로 나타내었다. 그리고 간 세포 분획의 acid phosphatase의 활성도 측정은 disodium-p-nitrophenyl phosphate를 기질로 하여 37°C에서 30분간 반응시키는 동안에 생성된 p-nitrophenol을 측정하는 Moss(1984)의 방법에 의하였으며 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 생성한 p-nitrophenol의 양을 nmol 단위로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소활성도 측정법들은 그 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 표준 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varien, Cary 210)였다.

단백 정량 : 효소액 중의 단백정량은 0.5N perchloric acid와 methanol-ether 3:1 혼합액으로 단백을 정제(Greenberg와 Rothstein, 1957) 한 다음 biuret법(Gornall 등, 1949)으로 정량하였다.

성적 검정 : 얻어진 각종 성적들의 유의성 검정은 Student's t-test(Scheffler, 1980)에 의하였다.

성 적

내독소 투여가 쥐간의 cathepsin B, D 및 H 활성도에 미치는 영향 : 체중 kg당 5mg의 내독소를 투

여했을 때 환쥐 간의 cathepsin B, D 및 H의 활성도 변동은 표 1, 2, 및 3과 같다. 내독소 투여군의 cathepsin B의 활성도는 대조군에 비해 각각 약 48% ($P<0.001$) 및 약 37% ($P<0.01$)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다(표 1).

Table 1. Effect of endotoxin on liver cathepsin B activity in rat

Hours after endotoxin injection	Cathepsin B activity (pmol β -naphthylamine mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	292±62 (100)	432±84*** (148)
8	290±58 (100)	396±76** (137)
24	287±55 (100)	322±56 (112)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; For control group, the rats were injected physiologic saline solution, and endotoxin group, a single dose of 5 miligrams of lipopolysaccharide (E. coli 026: B6 from Sigma Chemical Co. USA) was injected per kg body weight. Significant difference from control(**; $P<0.01$, ***; $P<0.001$).

Table 2. Effect of endotoxin on liver cathepsin D activity in rat

Hours after endotoxin injection	Cathepsin D activity (pmol tyrosine mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	7,975±2,357 (100)	12,780±3,235** (160)
8	7,921±2,286 (100)	11,315±2,989* (143)
24	7,896±2,252 (100)	8,496±2,556 (108)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Significant difference from control(*; $P<0.05$, **; $P<0.01$).

내독소 투여군의 cathepsin D도 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 약 60% ($P<0.01$) 및 약 43% ($P<0.05$)의 활성 증가를 나타내었다(표 2).

내독수 투여군의 cathepsin H는 내독소 투여 후

3시간에 대조군에 비해 약 27% ($P<0.01$)의 활성 증가를 나타내었다(표 3).

내독소 투여가 쥐간의 ACP 활성도에 미치는 영향 : 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 환쥐 간의 ACP의 활성도 변동은 표 4, 5 및 6과 같다.

Table 3. Effect of endotoxin on liver cathepsin H activity in rat

Hours after endotoxin injection	Cathepsin H activity (pmol β -naphthylamine mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	1,256±193 (100)	1,595±275** (127)
8	1,250±82 (100)	1,348±293 (108)
24	1,242±173 (100)	1,288±254 (104)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Significant difference from control(**; $P<0.01$).

Table 4. Effect of endotoxin on liver lysosomal acid phosphatase activity in rat

Hours after endotoxin injection	Acid phosphatase activity (nmol p-nitrophenol mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	182.9±16.3 (100)	249.2±24.8*** (136)
8	178.6±15.4 (100)	238.8±26.1*** (134)
24	177.2±17.9 (100)	187.4±28.3 (106)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Significant difference from control(**; $P<0.001$).

lysosomal ACP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 36% ($P<0.001$) 및 약 34% ($P<0.001$)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다(표 4). 내독소 투여군의 cytosolic ACP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 18% ($P<0.001$) 및 약 14% ($P<0.01$)의 활성 증가를 나타내었다(표 5). 내독소 투여군의 microsomal ACP는 실험

Table 5. Effect of endotoxin on liver cytosolic acid phosphatase activity in rat

Hours after endotoxin injection	Acid phosphatase activity (nmol p-nitrophenol mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	29.7 \pm 3.1 (100)	35.1 \pm 2.9*** (118)
8	28.2 \pm 2.8 (100)	32.2 \pm 3.2** (108)
24	27.8 \pm 2.6 (100)	29.2 \pm 3.0 (105)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Significant difference from control(**; P<0.01, ***; P<0.001)

Table 6. Effect of endotoxin on liver microsomal acid phosphatase activity in rat

Hours after endotoxin injection	Acid phosphatase activity (nmol p-nitrophenol mg protein $^{-1}$ min $^{-1}$)	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	38.1 \pm 3.5 (100)	39.2 \pm 3.8 (103)
8	37.6 \pm 3.3 (100)	40.0 \pm 4.2 (106)
24	37.1 \pm 3.0 (100)	40.2 \pm 4.4 (108)

The data are expressed as mean \pm SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1.

전기간 의의있는 활성의 변동이 없었다(표 6).

고 칠

Onda 등(1986)과 김정희 등(1987)의 보고를 보면 흰쥐에게 내독소를 비경구 투여했을 때 간에서는 4-6시간 후부터 괴사가 나타났으며 8시간에 최고에 달하고 이후 점차 회복되었으나 24간 까지도 정상으로 회복되지는 않았다. 내독소를 투여하였을 때 lysosome은 내독소에 의해 손상됨과 동시에 내독소에 의해 손상 받은 간 조직의 소화를 위해 lysosome의 효소가 유도될 것으로 생각된다. 그러나 이 실험에서

내독소에 의해 간의 괴사가 24시간까지 지속되는 데도 간의 cathepsin B, D, H 및 ACP 활성도는 내독소 투여 후 24시간에는 정상으로 회복되고 있다. 이는 24시간 까지 지속되는 괴사 조직의 소화를 위하여 lysosome의 효소들이 내독소 주입 후 24시간 까지 지속적으로 그 활성도가 증가되리라는 생각과는 어긋나는 것이며 이 현상은 이 실험만으로는 분명하게 설명하기는 어렵다. 그리고 약간의 차이는 있으나 3-8시간에 cathepsin들과 ACP의 활성이 증가되었다가 24시간에는 모두 정상으로 회복된 점은 단백의 교체, 분해 속도를 조절하는 이들의 기능(Barret, 1977a; Barret, 1977b; Bohlye 등, 1979)과 무관한 것으로 생각된다.

내독소 투여시 혈중의 ACP 활성이 증가한다는 보고(Janoff 등, 1962; Rangl 등, 1970; Mori 등, 1981)와 내독소 투여시 ACP가 혈중으로 유출된다는 보고(Rangl 등, 1970) 및 이 실험 성적으로 미루어 볼 때 내독소 투여시 ACP는 lysosome에서 cytosol을 거쳐 혈중으로 유출되는 것으로 생각된다. 또한 cathepsin들도 lysosome에 공존하는 효소이고 그 활성의 변화가 lysosomal ACP와 유사한 것으로 보아 ACP와 동일한 과정을 거치지 않을까 생각된다.

이 실험에서 간의 cathepsin B, D, H 및 ACP의 활성도 증가가 내독소 주입 후 3-8시간에만 있었고 각 cathepsin 간의 활성 변동이 큰 차이가 없으며 특히 ACP의 경우 단백 합성 장소인 microsome에서는 활성의 변동이 없는 점으로 보아 내독소 투여 후 3-8시간에 간의 cathepsin들과 간의 lysosomal ACP의 활성도 증가는 합성의 증가와 아울러 내독소에 의한 이들 효소의 촉매 효율의 증가가 한 요인이라 생각된다.

이 실험에서 cathepsin들과 ACP는 내독소에 의한 간의 괴사가 시작되는 내독소 주입 후 4-6시간(Onda 등, 1986) 보다 앞선 내독소 주입 후 3시간 부터 그 활성이 증가되고 있다. 즉 이 실험에서 측정한 lysosome의 효소 활성도 증가가 형태학적인 변화가 있기 전부터 나타났는데 이것은 내독소에 의해 lysosome의 손상과 이로인해 유도된 각종 lysosome 효소의 작용으로 간세포의 괴사와 간세포내 각종 소기관의 형태학적인 변화가 초래된 것이 아닌가 생각된다.

이상의 실험 성적과 추론을 종합해보면 내독소를 투여했을 때는 내독소에 의해 괴사된 간 조직의 소화를 위해 cathepsin B, D, H 및 ACP가 그 합성이 유도되고 아울러 촉매 효율도 증가되는 것으로 생

각된다. 그리고 내독소에 의해 lysosome의 손상을 받아 조기에 이들 lysosome의 효소가 cytosol로 유출되어 간세포의 각종 형태학적 변화가 초래된 것으로 생각된다. 그러나 이 연구가 다른 lysosomal 효소들의 활성 변동을 모두 측정한 것은 아니기 때문에 앞으로 타 lysosomal 효소들에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

이 연구는 내독소 투여로 장애를 받은 lysosome에 의한 간 장애기전과 특히 간세포의 형태학적 변화와의 관계를 lysosome의 대표적 효소인 cathepsin B, D, H 및 ACP 활성도를 측정하여 내독소혈증에서 이들 효소의 동태를 알아 봄으로서 이를 통해 내독소 혈증에서 이들의 역할을 파악코자 실시 하였다.

내독소 투여군의 cathepsin B와 D의 활성도는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 cathepsin H는 내독소 투여 후 3시간에 활성 증가를 나타내었다.

내독소 투여군의 lysosomal ACP의 활성도는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 의의있는 활성 증가를 나타내었으며 내독소 투여군의 cytosolic ACP는 내독소 투여 후 3시간에 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal ACP는 실험 전기간 의의있는 활성의 변동이 없었다.

이상을 성적으로 보아 내독소를 투여했을 때는 내독소에 의해 괴사된 간 조직의 소화를 위해 cathepsin B, D, H 및 ACP가 그 합성이 유도되고 아울러 촉매 효율도 증가되는 것으로 생각된다. 그리고 내독소에 의해 lysosome이 손상을 받아 조기에 이들 lysosome의 효소가 cytosol로 유출되어 간세포의 각종 형태학적 변화가 초래된 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- Allison A: Lysosomes and disease. *Sci Am* 1967; 217: 62-72.
 Ansorge S, Kirschke H, Friedrich K: Conversion of proinsulin into insulin by cathepsin B and L from rat liver lysosomes. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 1723-1727.
 Baccino FM, Zuretti MF: Structural equivalents of latency for lysosome hydrolases. *Biochem J* 1975; 146: 97-108.

- Balis JU, Paterson ES, Gerber L, et al: Glucocorticoid and antibiotic effects on hepatic microcirculation and associated host responses in lethal gram-negative bacteraemia. *Lab Invest* 1979; 40: 55-65.
 Balis JU, Rappaport ES, Gerber L, et al: A primate model for prolonged endotoxin shock, blood-vascular reactions and effects of glucocorticoid treatment. *Lab Invest* 1978; 38: 511-523.
 Barat E, Patti A, Graf L: Action of cathepsin D on human β -lipoprotein: A possible source of human β -melanotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 6120-6123.
 Barka T: On the acid phosphatase of liver and RE cells. *J Histochem Cytochem* 1960; 8: 320-321.
 Barret AJ, Kirschke H: Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L, in Colowick SP, Kaplan ND(eds): *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1981 Vol XII, pp 533-561.
 Barret AJ: Cathepsin B and O the thiol proteinases, in Barret AJ(ed): *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Amsterdam, Elsevier, North-Holland Biomedical Press. 1977a, pp 181-208.
 Barret AJ: Cathepsin D and O the carboxyl proteinases, in Barret AJ(ed): *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Amsterdam, Elsevier, North-Holland Biomedical Press. 1977b, pp 209-248.
 Barret AJ: Cathepsin D purification of isozymes from human and chicken liver. *Biochem J* 1970; 117: 601-607.
 Barrett AJ: A new assay for cathepsin and other thiol proteinases. *Anal Biochem* 1978; 47: 545-547.
 Belville WD, Cox HD, Mahan DE, et al: Bone marrow acid phosphatase by radioimmunoassay. *Cancer* 1978; 41: 2286-2291.
 Benuck M, Grynbaum A, Marks N: Breakdown of somatostatin and substance P by cathepsin D purified from calf brain by affinity chromatography. *Brain Res* 1977; 143: 181-185.
 Berry LJ, Rippe DF: Effect of endotoxin on induced liver enzymes. *J Infect Dis* 1973; 128: S118-S121.
 Berry LJ, Smythe DS, Colwell LS: Inhibition of hepatic enzyme induction as a sensitive assay for endotoxin. *J Bacteriol* 1968; 96: 1191-1199.
 Bingham WG, Paul SE, Suryanarayana KS: Effects of cold injury on six enzymes in rat brain. *Arch Neurol* 1969; 21: 649-660.
 Bodansky O: Acid phosphatase. *Adv Clin Chem* 1972; 15: 43-147.
 Bohley P, Kirschke H, Langner J, et al: Intracellular

- protein turnover, in Holzer H, Tschesche T(eds): *Biological Function of Proteinases*. Berlin, Springer-Verlag, 1979, pp 17-34.
- Bonting SL, Tsoodle AD, de Bruin H, et al: Quantitative histochemistry of the nephron. VII. Various phosphatase in healthy human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1960; 91: 130-137.
- Burbach JPH, Loeber JG, Verhoef J, et al: β -Endorphin biotransformation in brain: Formation of γ -endorphin by a synaptosomal plasma membrane associated endopeptidase distinct from cathepsin D. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92: 725-732.
- Butterworth I, Sutherland GR, Bain AD, et al: Lysosomal enzymes in amniotic fluid. *Clin Chim Acta* 1972; 39: 275-276.
- Comolli R: Cytotoxicity of silica and liberation of lysosomal enzymes. *J Pathol Bact* 1967; 93: 241-253.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, et al: Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* 1955; 60: 604-617.
- De Duve C: The lysosome. *Sci Am* 1963; 208: 64-72.
- De Duve C: The roles of lysosomes in cellular pathology. *Triangle* 1970; 9: 200-208.
- De Lumen BO, Taylor S, Urribarri N, et al: Subcellular localization of acid hydrolases in rat lungs. *Biochim Biophys Acta* 1972; 268: 597-600.
- Etherington DJ: The nature of the collagenolytic cathepsin of rat liver and its distribution on other rat tissues. *Biochem J* 1972; 127: 685-692.
- Filkins JP: Hepatic lysosomes and the inactivation of endotoxin. *J Reticuloendothel Soc* 1971; 9: 480-488.
- Gornall AG, Barawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-766.
- Gounaris AD, Slater EE: Cathepsin B from human renal cortex. *Biochem J* 1982; 205: 295-302.
- Graf L, Kennessey A, Pathy A, et al: Cathepsin D generates β -endorphin from γ -endorphin. *Arch Biochem Biophys* 1979; 193: 101-109.
- Graham J: Isolation of subcellular organelles and membranes, in Rickwood D(ed): *Centrifugation (a practical approach)* ed 2. Oxford, IRL Press, 1984, pp 161-182.
- Greenberg DM, Rothstein: Method for isolation and degradation of labeled protein. in Colowick SP, Ka plan NO (eds): *Method in Enzymology*. New York, Academic press, 1957, Vol 4, pp 708-731.
- Himeno M, Koutoku H, Tsuji H, et al: Purification and characterization of acid phosphatase in rat liver lysosomal contents. *J Biochem* 1988; 104: 773-776.
- Hirata K, Kaneko A, Ogawa K, et al: Effect of endotoxin on rat liver: Analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats. *Lab Inverst* 1980; 43: 165-171.
- Janoff A, Weissmann G, Zweifach BW, et al: Pathogenesis of experimental shock. IV. Studies on lysosomes in normal and tolerant animals subjected to lethal trauma and endotoxemia. *J Exp Med* 1962; 116: 451-466.
- Kaneko A, Ikeda T, Onoe T: Acid phosphatase from different cell types in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1970; 222: 218-221.
- Keough DT, Beak JL, de Jersey J, et al: Iron-containing acid phosphatase: Interaction of phosphate with the enzyme from pig allantoic fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 1643-1648.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1979a, pp 242-243.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1979b, pp 328-329.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1979c, pp 332-335.
- Kiminami E, Tskahara T, Bando Y, et al: Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J Biochem* 1985; 87-93.
- 김정희, 정재홍, 서인수: 내독소 투여로 인한 급성 간피사의 초미형태학적 연구. 계명의대논문집 1987; 6: 177-202.
- 곽춘식, 김정희: 환취간 세포분획법. I. Mitochondria 및 Microsome의 분리, 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- Lad PM, Learn DB, Cooper JF, et al: Distribution of prostatic acid phosphatase isozymes in normal and cancerous states. *Clin Chim Acta* 1984; 141: 51-65.
- Lam KW, Li O, Li CY, et al: Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase. *Clin Chem* 1973; 19: 483-487.
- Lam WK, Yam LT, Wilbur HJ, et al: Comparison of acid phosphatase isoenzymes of human seminal fluid, prostate and leukocytes. *Clin Chem* 1979; 25: 1285-1289.
- Li CY, Yam LT, Lam WKW: Acid phosphatase isozymes in human leukocytes in normal and phthologi-

- cal conditions. *J Histochem Cytochem* 1970; 18: 473-491.
- Lin CW, Fishman WH: Microsomal and lysosomal acid phosphatase isozymes of mouse kidney characterization and separation. *J Histochem Cytochem* 1972; 20: 487-498.
- Ma MH, Biempica L: The normal human liver cell, cytochemical and ultrastructural studies. *Am J Pathol* 1971; 62: 353-390.
- Mela L, Baclo LV Jr, Miller LD: Defective oxidation metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Physiol* 1971; 220: 571-577.
- Modder CP: Investigations on acid phosphatase activity in human plasma and serum. *Clin Chim Acta* 1973; 43: 205-214.
- Mori K, Takagi K, Maeno M, et al: Lysosomal enzyme in endotoxin shock. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 152: 427-432.
- Moss DW: Acid phosphatase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Garβl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis* ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1984, Vol. IV, pp 92-105.
- Noel SA, Lott JA: Acid phosphatase, total, in Pesce AJ, Kaplan LA(eds): *Methods in Clinical Chemistry*. St. Louis, The CV Mosby Company, 1987, pp 683-690.
- Nordstrom L, Ekman P, Eneroth P, et al: Isozyme patterns of prostatic acid phosphatase in serum, urine, and homogenate from men and women. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: 89-100.
- Nyquist SE, Mollenhauer HH: A Golgi apparatus acid phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1973; 315: 103-112.
- Onda M, Toba M, Andoh T, et al: Ultrastructural studies of experimental endotoxin shock in the liver and spleen: Therapeutic effects of low-dose heparin on reticuloendothelial disturbances. *Circulatory Shock* 1986; 18: 11-19.
- Panara F, Cirotto C, Arangi I, et al: Localization of acid phosphatase in the cell fractions of chick liver. *Experimentia* 1980; 36: 119-120.
- Payne JG: The distribution and localization of acid phosphatase in the normal rat spleen. *J Anat* 1972; 3: 482.
- Quinn PS, Judah JD: Calcium dependent Golgi-vesicle fusion and cathepsin B in the conversion of proalbumin into albumin in rat liver. *Biochem J* 1978; 172: 301-309.
- Rangel DM, Byfield JE, Adomian GE, et al: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* 1970; 68: 503-511.
- Satav JG, Katyare SS: Thyroid hormones and cathepsin D activity in the rats liver, kidney and brain. *Experimentia* 1981; 37: 100-102.
- Sato T, Tanaka J, Kono Y, et al: Hepatic cellular injury following lethal Escherichia coli bacteremia in rats. *Lab Invest* 1982; 47: 304-310.
- Scheffler WC: *Statistics for the biological sciences*, ed 2. USA Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1980, pp 84-89.
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss GS, et al: Effect of endotoxin on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171: 875-882.
- Shackleford GM, Hart SF, Berry LJ: Endotoxin treatment inhibits glucocorticoid induction of hepatic enzymes at a late induction step. *Am J Physiol* 1986; 250: E218-E225.
- Silbermann M, Frommer J: Phosphatase within the cartilage of the mandibular condyle of mouse. *J Anat* 1961; 116: 335-345.
- Straus W: Concentration of acid phosphatase, ribonuclease, deoxyribonuclease, β-glucuronidase and cathepsin in "droplets" isolated from the kidney cells of normal rats. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2: 513-521.
- Takahashi S, Murakami K, Miyake YY: Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isozymes. *J Biochem* 1982; 91: 419-422.
- Theodorson LIV: Collection and storage of samples for the determination of prostatic acid phosphatase in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45: 57-65.
- Toba M, Ando T, Miyashita M, et al: Ultrastructural changes of spleen in endotoxin administration. *J Clin Electron Microsc* 1982; 15: 5-6.
- Turk V, Kregar I: Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L in Bergmeyer HU: Bergmeyer J, Garβl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*. Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1984, Vol V, pp 195-209.
- Turk V, Lah T, Kregar I: Cathepsin D, cathepsin E in Bergmeyer HU: Bergmeyer J, Graβl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*, Weinheim, Verlag Chemie GmbH, 1984, Vol V, pp 211-221.
- Weissman G: Lysosomes II. *N Engl J Med* 1965; 273: 143-149.
- Whitaker JN, Seyer JM: The sequential limited degradation of bovine myelin basic protein by bovine

- brain cathepsin D. *J Biol Chem* 1979; 254: 6956-6963.
- White RR, Meal L, Bacalzo LV Jr, et al: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes. *Surgery* 1973; 73: 525-534.
- Widmer F, Widmer C: The effect of beef spleen cathepsin D on pig heart lactate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1975; 168: 252-258.
- Yam LT: Clinical significance of the human acid phosphatase. *Am J Med* 1974; 56: 604-616.
- Yamamoto K, Katsuda N, Himeno M, et al: Cathepsin D of rat spleen. Affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur J Biochem* 1979; 95: 459-467.
- Zuretti MF, Barrera G, Ronchietto M, et al: Acid phosphatase residual latent activity versus lysosomal osmotic fragility in rat liver autophagy. *Exp Mol Path* 1982; 37: 133-139.

=Abstract=

Effect of Parenteral Administration of Endotoxin on Changes of Hepatic Cathepsin B, D, H and Acid Phosphatase Activity in Rats

Chun Sik Kwak, PhD

Department of Biochemistry, Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

Kyo Cheol Mun, MD; Sang Chual Kim, MS

Micorobiology Divison, Kyōng Sang Buk-Do, Provincial Government, Institute of Health and Environment, Taegu, Korea

Do Young Lee, PhD

Health Division, Kyōng Sang Buk-Do, Provincial

Government, Taegu, Korea

The mechanism of hepatic damage by lysosomes, especially the role of lysosome in endotoxic shock and the relationship between lysosomal enzymes and morphologic changes of the hepatocyte was studied through measuring the activity of lysosomal mark enzymes; cathepsin B, D, H and ACP.

Cathepsin B and D activity showed a significant increase between 3 and 8 hours after endotoxin administration. And catepsin H activity showed a significant increase only at 3 hours after endotoxin administration.

Lysosomal ACP activity showed a significant increase between 3 and 8 hours after endotoxin administration. And cytosolic ACP activity showed a significant increase only at 3 hours after endotoxin administration. But microsomal ACP activity showed no significant changes thorough the experiment.

Based on the results above, the biosynthesis and the catalytic activities of the cathepsin B, D, H and ACP are increased in order to remove the necrotic tissues by endotoxin. And the damaged lysosome causes the result that the lysosomal enzymes leak into the cysotol in early stage, and these lysosomal enzymes in the cytosol cause the morphologic changees of the liver.

Key Words: Acid phosphatase, Cathepsin B, D and H, Endotoxin