

## 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase 활성 변동에 미치는 영향\*

계명대학교 의과대학 생화학교실

### 곽 춘 식

경상북도 보건환경연구원 미생물과

문 교 철·김 상 철

### 서 론

Gram 음성균의 감염에서 독성을 나타내는 인자로 알려진 내독소는 균체의 세포벽에 존재하는 일종의 lipopolysaccharide(Bradley, 1979)로 알려져 있으며 이 lipopolysaccharide를 이용하여 생체에 대한 내독소의 영향을 알아보려는 실험들이(Horwitz 등, 1962; Yoshikawa 등, 1971; Morrison과 Cochrane 1974; Meyrick와 Bringham, 1983) 시행되어 왔으나 아직도 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전은 완전히 규명되어 있지 않다.

이러한 내독소의 해독 기전에 대해서는 내독소에 의한 항체 형성설(Boivin 등, 1933; Laderitz 등, 1966; Rossen 등, 1967; Rudbach, 1971), 내독소 불활성에 관여하는 체액설(Schultz와 Becker, 1967a; Schultz와 Becker, 1967b; Onda 등, 1986), 망상내피계에 의한 내독소 제거설(Benacerraf와 Sebenstyen, 1957; Rutenberg 등, 1967) 등이 있으며 특히 이중에서 망상내피계에 의한 내독소 제거설이 인정을 받고 있다. 이 망상내피계 중에서 간이 내독소 제거에 가장 큰 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 간의 내독소 제거 능력 즉 해독 능력에 대한 연구는 많다(Trapani 등, 1962; Palmerio 등, 1963; Fine 등, 1968; Børneboe 등, 1972; Triger 등, 1972).

Carboxylesterase(carboxylic-ester hydrolase, EC 3. 1. 1. 1)는 carbosylester, thioester 및 arylamide를 가수분해(Kim, 1979; Heymann, 1980a; Heymann, 1982)하며 동물의 간, 폐, 비, 신, 장, 뇌, 지방조직

및 혈청에 분포되어 있는 효소이다(Junge 등, 1974; Junge과 Krisch, 1975; Stoops 등, 1975; Højring과 Svensmark, 1976; Højring과 Svensmark, 1977; Raftell 등, 1977; Hashnotsum 등, 1978; Heymann, 1980a; Main과 Rush, 1980; Tsujita 등, 1982; Cain 등, 1983; Kaur와 Ali, 1983; Tsujita와 Okuda, 1983; Junge, 1984; Johnsen 등, 1986). 이 효소는 세포 내에서는 주로 endoplasmic reticulum에 존재(Junge 등, 1974; Heymann, 1980a; Nousiainen과 Hanninen, 1981; Johnsen 등, 1986)하며 세포질(Ecobichon, 1972; Heymann, 1980a; Nousiainen과 Hanninen, 1981; Johnson 등, 1986), mitochondria(Junge와 Krisch, 1975) 및 lysosome(Tanaka 등, 1987) 중에서도 발견된다.

Arylesterase(arylester hydrolase, EC 3. 1. 1. 2)는 주로 지방산의 방향족 ester를 가수분해하는 효소(Augustinsson, 1961; Kim, 1979)로서 동물의 거의 모든 조직과 체액 중에 분포(Wilde와 Kekwick, 1964; Holmes와 Masters, 1967; Haugen과 Suttie, 1974; Burlina 등, 1977; Dixon과 Webb, 1978; Lorentz 등, 1979; Mackness와 Walker, 1983)되어 있으며 간, 신, 근육, 뇌, 심, 장 및 폐의 순으로 많이 분포되어 있다(Holmes와 Masters, 1967; Dixon과 Webb, 1978). 그리고 이 효소도 endoplasmic reticulum에 풍부 존재하는 것(Haugen과 Suttie, 1974; Burlina 등, 1977)으로 알려져 있다.

Cholinesterase(acetylcholine acylhydrolase, EC 3. 1. 1. 8)는 주로 acetylcholine들을 가수분해하여 choline과 carboxylic acid 음이온을 생성케하는 효소

\* 이 논문은 1992년도 계명대학교 윤종연구비 및 동산의료원 조사 연구비로 이루어졌다.

(Kim, 1979)로서 동물의 거의 모든 조직과 체액 중에 분포(Dixon과 Webb, 1978; Atak 등, 1987)되어 있으며 소장, 심, 대장, 비, 부신, 간, 폐, 골격근, 신의 순으로 많이 분포되어 있다(Dixon과 Webb, 1978). 그리고 세포내에서 이 효소는 endoplasmic reticulum과 세포질에 주로 존재하며(Schwarz와 Ecobichon, 1968) mitochondria에서도 발견된다(Schwarz와 Ecobichon, 1968)고 한다.

간은 물질대사의 중추 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며(Sherlock, 1985) 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 해독하여 배설시키는 해독기구를 가짐으로서 생체를 보호하고 있으며(Jakoby 등, 1982) 특히 이들 3종의 esterase들은 해독 효소의 한 종류(Augustinsson, 1961; Holmes와 Masters, 1967; Junge과 Krisch, 1975; Heymann, 1980a; Heymann, 1980b; Heymann, 1982; Cain 등, 1983)로서 간조직에서 합성이 왕성하여 그 함유량이 많을 뿐만 아니라 타조직과는 달리 혈중으로 이 효소들을 유리시키기도 한다(Wilde와 Kekwick, 1964; Junge과 Krisch, 1975; Burlina 등, 1977; Tsujita와 Okuda, 1983; King, 1987). 또한 내독소의 해독에는 혈중의 이들 esterase들이 관여하는 것(Skarnews, 1966)으로 알려져 있다. 따라서 carboxylesterase, arylesterase와 cholinesterase는 해독효소일뿐만 아니라 혈중의 esterase가 내독소의 해독에 관여하고 간이 내독소의 해독에 중심되는 역할을 하며 간에서 이들 효소의 합성이 왕성하므로 내독소를 투여했을 때는 이를 해독하기 위해 이들 효소들의 활성이 변동될 것으로 생각된다. 그러나 내독소 투여 간에서 이들 효소의 활성 변동에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 내독소 투여 후의 간의 해독 능력을 알아 보기 위하여 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 해독효소의 일종인 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase의 활성도 변동을 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

**동물 및 처치:** 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 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 전양 사료 주식회사의 제품을 먹도록 하였다. 대조군은 생리 식염수를 체중 kg당 1.25ml를 주입하였으며 내독소 주입군은 김정희 등(1987)의 방법에 따라 Sigma사의 내독소(E.coli, 026: B6, lipopolysaccharide, Sigma, USA)를 생리 식염수에 4mg/ml의 농도로 녹여 체중 kg당 5mg이 되도록 우경정맥으로 주입하였다.

**시약:** Sodium pyrophosphate, semicarbazide-HCl, eserine hemisulfate, ethyl valerate, glycine, NAD<sup>+</sup>(nicotinamide adenine dinucleotide; grade III), NADH(reduced nicotinamide adenine dinucleotide; grade III, disodium salt), tris(hydroxymethyl)aminomethane, phenylacetate, diethyl-p-nitrophenyl phosphate, 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), butyrylthiocholine iodide, Triton X-100, phenol, alcohol dehydrogenase(from bakers yeast, A-3263), carboxylesterase(from rabbit liver E-0887), butyrylcholinesterase(from human serum, C-5386) 및 단백표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그외 일반시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

**간 적출 및 세포 분획:** 모든 실험군에서 간의 적출은 12시간 금식시킨 후 ether마취하에서 시행하였으며 복부 대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈 사시켰다. 그리고는 간 문맥에 삽관한 후 4°C의 0.25M sucrose액으로 관류하여 간에 남아있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 면포로 균등히 암박하여 간에 남아있는 sucrose액을 가능한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2-4°C로 냉각한 후 잘게 썰어서 절편으로 만들고 혼합하여 그 중 약 5g을 취하여 9배량의 0.25M sucrose액을 넣은 다음 teflon glass homognizer(Thomas사 제품, chamber clearance 0.005-0.007 inches)로 2-4°C를 유지하면서 400rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직균질액을 만들었다. 그리고는 이 간 균질액 40ml를 취하여 sucrose density

gradinet 원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome 분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄 균질액을  $571 \times g$ (average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분, 핵 및 원형질막 부분을 제거한 다음 그 상청액을  $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었으며 이 과정에서 얻은 상청액을 다시  $104,400 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여 pellet과 상청액을 얻었다. 이때 얻은 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 그리고 위의 과정에서 얻은 pellet를 0.25M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 20-35w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜  $88,500 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet를 모아서  $88,500 \times g$ 에서 1시간 원심분리하여 pellet를 얻고 이 pellet를 다시 0.25M sucrose액에 재현탁시켜  $88,500 \times g$ 에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet를 microsome 분획으로 사용하였다.

한편 위의  $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M sucrose액에 현탁시키고 이 액을 20-45w/v% sucrose linear density gradient 용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜  $45,200 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose 액에 재현탁시켜  $7,796 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria 분획으로 사용하였다.

위의 세포 분획법에서 모든 조작은 2-4°C에서 시행하였으며 이때 사용한 원심분리기는 Du Pont Sorvall사의 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge와 OTD-65B ultracentrifuge였다. 그리고 이때 사용한 rotor는 Du Pont Sorvall사의 SS-34 및 T865 rotor였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former (ISCO model 570)를 사용하였다.

**효소 시료 조제:** Carboxylesterase 및 cholinesterase 측정용 효소 시료의 조제는 분리한 mitochondria 및 microsome 분획을 단백량으로  $5mg/ml$  가되도록 0.25M sucrose액에 현탁시켰으며 이 현탁액을 1% Triton X-100액으로 바로 회석 후 잘 혼합하여 사용(Junge, 1984)하였다. 그리고 cytosol 분획은 아무런 처리없이 원액 그대로 사용하였다. Arylesterase 활성도 측정용 효소 시료는 위의 Triton X-100을 처리한 mitochondria 및 microsome 효소

액과 cytosol 효소액 1ml에 대하여 diethyl-p-nitrophenyl phosphate를 10nmol씩 가해준 후 잘 혼합하여 사용(Junge, 1984)하였다.

**효소 활성도 측정:** 혈청과 간의 cytosol, mitochondria 및 microsome 분획의 carboxylesterase의 활성도 측정은 ethyl valerate를 기질로 사용하여 25°C에서 5분간 반응시키는 동안에 생성된 ethanol이 NAD<sup>+</sup> 및 alcohol dehydrogenase 공존 하에서 acetaldehyde로 산화될 때 NAD<sup>+</sup>가 환원되어 NADH로 되면서 증가하는 흡광도를 339nm 파장에서 측정하여 효소 활성도를 산출하는 Junge(1984)의 법에 의하였다. 그리고 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 NADH를 nmol로 나타내었다.

혈청과 간의 cytosol, mitochondria 및 microsome 분획의 arylesterase의 활성도 측정은 phenylacetate를 기질로 사용하여 25°C에서 3분간 반응시키는 동안에 생성된 phenol을 270nm 파장에서 그 흡광도를 측정하여 산출하는 Junge과 Klees(1984)법에 의하였다. 그리고 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 phenol을 nmol로 나타내었다.

혈청과 간의 cytosol, mitochondria 및 microsome 분획의 cholinesterase 활성도 측정은 butyrylthiocholine을 기질로 하여 37°C에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 thiocholin이 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)와 다시 반응하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate의 분자흡광계수 ( $E_{418nm} = 1.36mM^{-1} Cm^{-1}$ )를 이용하여 효소활성도를 산출하는 방법인 Whitaker(1984)의 방법에 의하였다. 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 5-thio-2-nitrobenzoate를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제된 효소를 사용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광 광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varinia, Cary 210)였다.

**단백질량:** 효소시료 중의 단백 정량은 0.5M-peachlric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소액 중의 단백을 정제한 다음 biuret법(Gornall과

Bardawill, 1949)으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법(Schefler, 1980)에 의하여 검정하였다.

## 성 적

**내독소 투여가 쥐간의 carboxylesterase 활성도에 미치는 영향 :** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 carboxylesterase의 활성도 변동은 표 1과 같다. 내독소 투여군의 cytosolic 및 mitochondrial carboxylesterase는 대조군에 비해 실험 전기간 유의한 활성의 변화가 없었다. 내독소 투여군의 microsomal carboxylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 21%(P<0.01) 및 약 18%(P<0.01)의 의의있는 활성 감소를 나타내었다.

**내독소 투여가 쥐간의 arylesterase 활성도에 미치는 영향 :** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 arylesterase의 활성도 변동은 표 2와 같다. 내독소 투여군의 cytosolic 및 mitochondrial arylesterase는 대조군에 비해 실험 전기간 유의한 활성의 변화가 없었다. 내독소 투여군의 microsomal arylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 53%(P<0.001) 및 약 24%(P<0.05)의 의의있는 활성 감소를 나타내었다.

**내독소 투여가 쥐간의 cholinesterase 활성도에 미치는 영향 :** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 cholinesterase의 활성도 변동은 표 3과 같다. 내독소 투여군의 cytosolic 및 mitochondrial cholinesterase는 대조군에 비해 실험 전기간 유의한 활성의 변화가 없었다. 내독소 투여군의 microsomal arylesterase는 내독소 투여 후 3시간에 14%(P<0.05), 8시간에 약 58%(P<0.001), 24시간에 약 24%(P<0.001)의 의의있는 활성 감소를 나타내었다.

**내독소 투여가 혈청 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase 활성도에 미치는 영향 :** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 혈청 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase의 활성도 변동은 표 4와 같다. 내독소 투여군의 혈청 carboxylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 30%(P<0.05) 및 약 26%

(P<0.05)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 arylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 22%(P<0.01) 및 약 13%(P<0.05)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 cholinesterase는 내독소 투여 후 8시간에 대조군에 비해 약 47%(P<0.01)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다.

## 고 찰

간은 내독소 제거에 관여하는 중요 장기중 한가지(Trapani 등, 1962; Bjørneboe 등, 1972; Triger 등, 1972)이기는 하지만 내독소에 의해 손상을 받는 것(Hirate 등, 1980; Sato 등, 1982)으로 알려져 있다.

내독소 혈증으로 인한 간 손상시에는 4~6시간 부터 간세포에는 괴사현상이 나타나고 8시간 후에는 괴사의 정도가 심해지며 이후 24시간 까지 지속된다(Onda 등, 1986; 김정희 등, 1987)고 한다. 그리고 이때 간의 mitochondria는 종창, 확장, 내부 구조의 분해, 내외막의 분리, 모양의 불규칙화, cristae의 팽창 및 소실 등의 변화(Schumer 등, 1970; White 등, 1973; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)가 일어나고 endoplasmic reticulum은 증식 및 확장 등의 변화(Rangel 등, 1970; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)가 초래되는 것으로 알려져 있다.

이 실험에서 측정한 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase는 해독 효소의 일종으로써 간에 풍부히 존재(Junge 등, 1974; Junge과 Krisch, 1974; Stoops 등, 1975; Raftell 등, 1977; Dixon과 Webb, 1978; Heymann, 1980a; Main과 Rush, 1980; Junge, 1984; Johnsen 등, 1986)하기 때문에 내독소 투여 시에 이들 효소가 내독소 해독에 관여한다면 간에서 이들 효소의 활성도는 증가될 것이다. 그러나 이 실험에서 간의 세포질과 mitochondria에서는 이들 효소의 활성도는 변동이 없었다. 이와 같이 간의 세포질과 mitochondria에서 이들 효소의 활성도가 변동이 없는 것은 간에서 이들 해독효소들의 주된 존재 부위가 endoplasmic reticulum이므로 내독소 해독에는 세포질 및 mitochondria에 존재하는 이들 효소는 거의 관여하지 않는 것으로 생각된다.

그리고 이 실험에서 이들 esterase가 간의 microsome(endoplasmic reticulum)에서는 그 활성도가 감소되어 있었으며 혈중에서는 오히려 그 활성도가 증가되어 있었다. 내독소 투여로 간에 손상이 야기

Table 1. Effect of endotoxin on the liver cytosolic, mitochondrial and miosomal carboxylesterase activities in rats

Hours after endotoxin injection	Carboxylesterase activities (nmol NADH mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
3	189.2±26.1 (100)	193.2±27.2 (102)	69.0±18.5 (100)	75.6±20.3 (110)	280.2±40.5 (100)	263.2±37.8 (94)
8	188.4±27.2 (100)	212.3±28.3 (113)	68.6±18.1 (100)	76.5±21.4 (112)	281.4±41.3 (100)	221.3±30.6** (79)
24	188.1±26.5 (100)	186.8±25.6 (99)	68.2±17.8 (100)	66.6±19.2 (98)	281.6±42.1 (100)	230.8±33.2** (82)

The date are expressed as mean ± 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.

Signinificant difference from control(\*\*; P<0.01).

Table 2. Effect of endotoxin on the liver cytosolic, mitochondrial and miosomal arylesterase activities in rats

Hours after endotoxin injection	Arylesterase activities (nmol NADH mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
3	635.5±180.3 (100)	641.3±192.6 (101)	223.3±65.8 (100)	237.7±68.7 (106)	5,720±865 (100)	5,343±776 (93)
8	632.6±178.5 (100)	743.7±209.8 (118)	221.6±64.7 (100)	230.9±65.1 (104)	5,724±852 (100)	2,718±642*** (47)
24	628.7±176.4 (100)	624.8±167.6 (99)	220.9±65.2 (100)	216.3±54.5 (98)	5,729±857 (100)	4,867±762* (85)

The date are expressed as mean ± SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Signinificant difference from control(\*; P<0.05, \*\*\*; P<0.001).

Table 3. Effect of endotoxin on the liver cytosolic, mitochondrial and miosomal cholinesterase activities in rats

Hours after endotoxin injection	Cholinesterase activities (nmol 5-thio-2-nitrobenzoate mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosol		Mitochondria		Microsome	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
3	35.5±3.4 (100)	34.1±3.7 (96)	9.3±1.7 (100)	9.2±2.1 (99)	35.3±4.6 (100)	30.2±4.3* (86)
8	34.8±3.2 (100)	35.2±3.3 (101)	9.2±1.6 (100)	8.7±2.4 (95)	35.7±4.4 (100)	14.9±3.3*** (42)
24	34.5±3.3 (100)	35.7±3.6 (103)	9.0±1.7 (100)	9.1±1.8 (101)	36.1±4.2 (100)	27.3±4.1*** (76)

The date are expressed as mean ± SD with 10 rats in each group.; Endotoxin was given as described in table 1. Signinificant difference from control(\*; P<0.05, \*\*\*; P<0.001).

Table 4. Effect of endotoxin on the serum carboxylesterase, arylesterase and cholinesterase activities in rats.

Hours after endotoxin injection	Carboxylesterase		Arylesterase		Cholinesterase	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
3	88.0±20.5 (100)	93.2±22.2 (106)	163.7±20.8 (100)	172.6±22.5 (105)	648.7±128.5 (100)	670.1±157.5 (103)
8	87.9±21.4 (100)	114.5±24.8* (130)	164.2±21.2 (100)	199.8±26.4** (125)	646.1±125.3 (100)	949.99±299.8** (147)
24	87.5±21.7 (100)	118.7±26.6* (136)	164.7±21.6 (100)	185.9±23.6** (113)	645.3±125.8 (100)	705.7±153.9 (109)

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

되었을 때는 간세포는 괴사(Onda 등, 1986; 김정희 등, 1987)가 초래되고 mitochondria는 종창, 확장, 내부 구조의 분해, 내외막의 분리, 모양의 불규칙화, cristae의 팽창 및 소실 등의 변화(Schumer 등, 1970; White 등, 1973; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)가 일어나고 endoplasmic reticulum은 증식 및 확장등의 변화(Rangel 등, 1970; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)가 나타나는 만큼 내독소 투여시에는 간 microsome의 이들 esterase는 세포질을 거쳐 혈중으로 다량 유출되는 것으로 생각된다. 또한 간의 rough endoplasmic reticulum이 단백 합성 장소이며 내독소 투여시 endoplasmic reticulum에서 심한 형태학적인 변화가 일어난다는 보고(Rangel 등, 1970; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)와 내독소가 phosphoenol pyruvate carboxykinase, tryptophan oxygenase, monoamine oxidase, xanthine oxidase의 합성을 감소시킨다는 보고(Berry 등, 1966; Berry와 Rippe, 1973; 과춘식 등, 1991)를 볼 때 간의 microsome에서 이들 esterase들의 활성 감소는 어떤 원인에 의한 것인지는 분명치 않지만 내독소에 의해 간의 endoplasmic reticulum에서 이들 esterase의 합성이 감소된 때문이라 생각된다. 따라서 이들 esterase들은 해독 효소의 일종인 monoamine oxidase, xanthine oxidase(과춘식 등, 1991)와 마찬가지로 내독소 투여시에는 그 합성이 감소됨과 동시에 혈중으로 다량 유출된다고 생각된다.

그리고 이 실험과 같은 조건에서 해독효소인 monoamine oxidase와 xanthine oxidase의 활성을 측정한 과춘식 등(1991)의 성적과 이 실험 성적을 보면 간의 monoamine oxidase, xanthine oxidase, carboxylesterase, arylesterase, cholinesterase 등 간

해독 효소들이 모두 그 활성이 감소되었다. 이렇게 내독소 주입시 간에서 이들 esterase를 포함한 해독 효소들이 활성 감소를 나타냄으로 해서 간의 괴사는 더욱 증폭된 것이라 생각된다. 또한 간에서 이들 esterase가 내독소 해독에 관여하는 것으로 생각하였으나 간 microsome에서 이들 esterase의 활성이 저하된 것은 이들 효소가 내독소 해독에는 별로 작용치 않는 것으로 생각되며 오히려 내독소에 의해 그 합성이 저하되는 것이 아닌가 생각된다. 그러나 이 실험만으로는 분명하게 말할수 없으므로 내독소 투여 후 해독 효소들의 동태에 대한 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

## 요 약

내독소 투여 후 간의 해독 능력을 알아 보기 위하여 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 해독효소의 일종인 carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase의 활성변동을 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소 활성도도 함께 측정하였다.

간 cytosolic 및 mitochondrial esterase들의 활성도는 실험 전 기간 의의있는 활성의 변동이 없었다. 내독소 투여군의 간 microsomal carboxylesterase 및 arylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에, 그리고 microsomal arylesterase는 실험 전 기간의 의의있는 활성 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 carboxylesterase 및 arylesterase는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에, 그리고 arylesterase는 내독소 투여 후 8시간에 의의있는 활성 증가를 나타내었다.

이상 결과로 보아 세포질 및 mitochondria에서 이

효소들의 활성이 변동이 없는 것은 해독에 관계하는 이들 효소의 주 존재 부위가 endoplasmic reticulum 이기 때문에 내독소 해독에는 이들 세포질 및 mitochondria의 esterase가 관여하지 않는 것으로 생각된다. 그리고 이들 microsomal esterase들의 활성이 감소된 것은 내독소 투여시 이들 효소의 합성이 감소됨과 동시에 혈중으로 다량 유출되었기 때문이라 생각된다. 그리고 간의 microsome에서 이들 효소 활성이 저하된 것은 내독소 해독에는 이들 esterase가 별로 관여하지 않는 때문이 아닌가 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Atak JR, Perry EK, Bonham JR, et al: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1987; 48: 1845-1850.
- Augustinsson KB: Multiple form of esterase in vertebrate plasma. *Ann N Y Acad Sci* 1961; 94: 844-859.
- Benacerraf B, Sebenstyen MM: Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial system. *Fed Proc* 1957; 16: 860-867.
- 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 inducible liver enzymes by endotoxin and actinomycin D. *J Bacteriol* 1966; 92: 107-115.
- Bøjronboe M, Prytz H, Orskov F: Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972; 8: 58-60.
- Boivin A, Mesrobeanu I, Mesrobeanu L: Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C R Soc Biol* 1933; 113: 490-492.
- Bradley SG: Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. *Annu Rev Microbiol* 1979; 33: 67-94.
- Burlina A, Michelin E, Galzigna L: Characteristics and behaviour of arylesterase in human serum and liver. *Eur J Clin Invest* 1977; 7: 17-20.
- Cain K, Reinr E, Williams DG: The identification and characterization of two separate carboxylesterases in guinea-pig serum. *Biochem* 1983; 215: 91-99.
- Dixon M, Webb EC: *Enzymes*. London, Longman Group Ltd, 1978, pp 634-635.
- Dixon M, Webb EC: *Enzymes*. London, Longman Group Ltd, 1978, pp 634-635.
- Ecobichon DJ: Cytoplasmic carboxylesterases of human and domestic animal liver: Aggregation, dissociation and molecular weight estimation. *Can J Biochem* 1972; 50: 9-15.
- Fine J, Palmerio C, Rutenburg S: New developments in the therapy of refractory traumatic shock. *Arch Surg* 1968; 96: 163-175.
- Gornall AG, Bardawil CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-766.
- Greenberg DM, Rothstein M: Method for isolation and degradation of labelled compounds, in Colowick SP, Kaplan ND(eds): *Method in Enzymology*, New York, Academic Press, 1957, Vol 4, pp 708-731.
- Hashimoto M, Higashino K, Hada T, et al: Purification and enzymatic properties of rat serum carboxylesterase. *J Biochem* 1978; 84: 1325-1333.
- Haugen DA, Suttie JW: Purification and properties of rat liver microsomal esterases. *J Biol Chem* 1974; 249: 2717-2722.
- Heymann E: B-Esterase (serin hydrolases), in Jacoby WB(ed): *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press, 1980b, Voll II, pp 295-297.
- Heymann E: Carboxylesterase and amidases, in Jacoby WB(ed): *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press, 1980a, Voll II, pp 291-323.
- Heymann E: Hydrolysis of carboxylesters and amides, in Jakoby WE, Bend JR, Caldwell J(eds): *Metabolic Basis of Detoxication*, New York, Academic Press, 1982, pp 229-245.
- 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 Invest* 1980; 43: 165-171.
- Højring N, Svensmark O: Carboxylesterase of human brain extract: Purification and properties of a butyrylesterase. *Biochim Biophys Acta* 1977; 481: 500-514.
- Højring N, Svensmark O: Carboxylesterase with different substrate specificity in human brain extracts. *J Neurochem* 1976; 27: 523-528.
- Holmes RS, Masters CJ: The developmental multiplicity and isozyme status of avian esterases. *Biochim Biophys Acta* 1967; 132: 379-399.

- Horowitz HI, Des Prez RM, Hook EW: Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets: II. Enhancement of platelet factor 3 activity in vitro and in vivo. *J Expt Med* 1962; 116: 619-633.
- Jakoby WB, Bend JR, Caldwell J: *Metabolic Basis of Detoxication. Metabolism of Functional Groups*. New York, Academic Press, 1982, pp 5-317.
- Johnsen H, Odden E, Lie O, et al: Metaboism of T-2 toxin by rat liver carboxylesterase. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 1469-1473.
- Junge W: Carboxylesterase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grägl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1984, Vol IV, pp 2-7.
- Junge W, Heymann E, Krisch K: Human liver carboxylesterase, purification and molecular properties. *Arch Biochem Biophys* 1974; 165: 749-763.
- Junge W, Klees H: Arylesterase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grägl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1984, Vol IV, pp 8-12.
- Junge W, Krisch K: The carboxylesterase/amidases of mammalian liver and their possible significance. *Crit Rev Toxicol* 1975; 3: 371-434.
- Kaur S, Ali B: The effects of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene on the hydrolysis of xenobiotics on the rat. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3479-3480.
- 곽춘식, 문교철, 김상철: 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Monoamine Oxidase 및 Xanthine Oxidase 활성 변동에 미치는 영향. 계명 의대논문집 1991; 10: 335-344.
- 곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB. New York, Academic Press, 1979, pp 234-235.
- 김정희, 정재홍, 서인수: 내독소 투여로 인한 급성 간 괴사의 초미형태학적 연구. 계명의대논문집 1987; 6: 177-202.
- King ME: Cholinesterase, in Pesce AJ, Kaplan LA (eds): *Methods in Clinical Chemistry*. ST Louis, Washington DC, Toronto, The CV Mosby Company, 1987, pp 161-168.
- Laderitz O, Staub AM, Westphal O: Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related enterobacteriaceae. *Bactriol Rev* 1966; 30: 192-255.
- Lorentz K, Flatter B, Augustin E: Arylesterase in serum: Elaboration and clinical application of a fixed-incubation method. *Clin Chem* 1979; 25: 1714-1720.
- Mackness MI, Walker CH: Partial purification and properties of sheep serum 'A'-esterases. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2291-2296.
- Main AR, Rush RS: Hydrolysis of choline esters by rabbit liver oligomeric and monomeric carboxylesterases(EC 3.1.1.1). *J Biol Chem* 1980; 255: 7168-7173.
- Meyrick B, Brigham KL: Acute effects of Escherichia coli endotoxin on pulmonary microcirculation of anesthetized sheep. Structure; Function relationship. *Lab Invest* 1983; 48: 458-470.
- Morrison DC, Cochrane CG: Direct evidence for hageman factor (Factor VII) activation by bacterial lipopolysaccharides(endotoxins). *J Expt Med* 1974; 140: 797-811.
- Nousainen U, Hanninen O: On the inducibility of cytosolic and microsomal carboxylesterase by phenobarbital on rat tissues. *Acta Pharmacol Toxicol* 1981; 49: 77-80.
- Onda M, Toba M, Andon T, et al: Ultrastructural studies of experimental endotoxin shock in the liver and spleen: Therapeutic effects of low-dose heparin on reticuloendothelial disturbances. *Circ Shock* 1986; 18:11-19.
- Palmerio C, Zetterstrom B, Shammash J, et al: Denervation of the abdominal viscera for the treatment of traumatic shock. *N Engl J Med* 1963; 269: 709-716.
- Raftell M, Berzins K, Blomberg F: Immunochemical studies of a phenobarbital inducible esterase in a rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1977; 181: 534-541.
- Rangel DM, Byfield JE, Adomian GE, et al: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* 1970; 68: 503-511.
- Rosser RD, Wolff SM, Butler WT: The antibody response in nasal washings and serum to *S. typosa* endotoxin administered intravenously. *J Immunol* 1967; 99: 246-254.
- Rudbach JA: Molecular immunogenicity of bacterial lipopolysaccharide antigens: Establishing a quantitative system. *J Immunol* 1971; 106: 993-1001.
- Rutenberg S, Skarness R, Palmerio C, et al: Detoxification of endotoxin by perfusion of liver and spleen. *Proc Soc Expt Biol Med* 1967; 125: 455-459.
- 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.
- Schultz DR, Becker EL: The alteration of endotoxin by postheparin plasma and its purified fractions. I. Comparison of the ability of guinea pig postheparin and normal plasma to detoxify endotoxin. *J Immunol* 1967a; 98: 478-481.
- Schultz DR, Becker EL: The alteration of endotoxin by postheparin plasma and its purified fractions. II. Relationship of the endotoxin detoxifying activity of euglobulin from postheparin to lipoprotein lipase. *J Immunol* 1967b; 98: 482-489.
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss, GS, et al: Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171: 875-882.
- Schwarz WS, Ecobichon DJ: Subcellular localization and drug-induced changes of rat liver and kidney esterases. *Can J Physiol Pharmacol* 1968; 46: 207-212.
- Skarnes RC: The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum. *Ann N Y Acad Sci* 1966; 133: 644-662.
- Stoops JK, Hamilton SE, Zerner B: Carboxylesterase(Ec 3.1.1.1). A comparison of some kinetic properties of horse, sheep, chicken, pig and ox liver carboxylesterase. *Can J Biochem* 1975; 53: 565-573.
- Tanaka M, Iio T, Tabata T: Purification and characterization of a carboxylesterase from rabbit liver lysosomes. *J Biochem* 1987; 101: 619-624.
- Trapani RJ, Waravdekar VS, Landy M, et al: In vitro inactivation of endotoxin by an intracellular agent from rabbit liver. *J Infect Dis* 1962; 110: 135-142.
- Triger DR, Alp MH, Wright R: Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* 1972; 8: 60-63.
- Tsujita T, Okuda H: Human liver carboxylesterase, properties and comparison with human serum carboxylesterase. *J Biochem* 1983; 94: 793-797.
- Tsujita T, Okuda H, Yamasaki N: Purification and some properties of carboxylesterase of rat adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1982; 715: 181-188.
- White RR, Mela L, Bacalzo LV Jr, et al: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes. *Surgery* 1973; 73: 525-534.
- Whittaker M: Cholinesterase, in Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grägl M(eds): *Method of Enzymatic Analysis* ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1984, Vol IV, pp 52-74.
- Wilde CE, Kekwick RGO: The arylesterases of human serum. *Biochem J* 1964; 91: 297-307.
- Yoder MC, Egler JM, Yudkoff M, et al: Metabolic and mitochondrial morphological changes that mimic Reye syndrome after endotoxin administration on rats. *Infect Immun* 1985; 47: 329-331.
- Yoshikawa T, Tanaka KR, Guze LB: Infection and disseminated intravascular coagulation. *Medicine* 1971; 50: 237-258.

=Abstract=

## Effect of Parenteral Administration of Endotoxin on Changes of Serum and Hepatic Carboxylesterase, Arylesterase and Cholinesterase Activities in Rats

Chun Sik Kwak, PhD

*Department of Biochemistry, Keimyung University  
School of Medicine, Teagu, Korea*

Kyo Cheol Mun, MD; Sang Chual Kim, MS

*Micorobiology Division, Kyong Sang Buk-Do, Provincial Government  
Institute of Health and Environment, Teagu, Korea*

The activities of the cytosolic, microsomal and mitochondrial carboxylesterase, arylesterase and cholinesterase which are detoxifying enzymes in the liver were measured in order to evaluate the detoxifying ability of the liver on parenteral administration of endotoxin. And the activities of these enzymes in the serum were also measured.

For administration of endotoxin, a dose of 5mg of endotoxin(lipopolysaccharide *E. coli* 026: B6, from Sigma chemical company, USA) per kg of body weight was administered through a right external jugular vein. Then the rats were killed after 3, 8 and 24 hours of injection with endotoxin to measure the activities of the above enzymes in serum and their liver.

The activities of the cytosolic and mitochondrial esterases in the liver showed no significant changes throughout the experiment. But microsomal carboxylesterase and arylesterase activities showed a significant decrease between 8 and 24 hours after endotoxin administration, and microsomal cholinesterase activity in the liver showed a significant decrease throughout the experiment after endotoxin administration. Serum carboxylesterase and arylesterase activities showed a significant increase between 8 and 24 hours after endotoxin administration and serum cholinesterase activity showed a significant increase at 8 hours after endotoxin administration.

According to the results, the activities of the cytosolic and mitochondrial esterases in the liver showed no significant changes. It is thought that these results are caused by their main location in the endoplasmic reticulum, and caused by playing a trivial role of these enzymes in the detoxification of the endotoxin. And decreased microsomal esterases activities in the liver are thought due to decreased synthesis of these enzymes in the microsome and due to leak into the blood through the damaged membrane of hepatocyte. The activities of these esterases in the liver is decreased. So it is thought that the detoxifying enzymes in the liver play only a trivial role in the detoxification of the endotoxin.

**Key Words:** Arylesterase, Carboxylesterase, Cholinesterase, Endotoxin