

## 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Alkaline Phosphatase 및 5'-Nucleotidase 활성도 변동에 미치는 영향\*

계명대학교 의과대학 생화학교실

### 문교철 · 주 일 · 곽춘식

#### 서 론

Gram 음성균의 감염에서 독성을 나타내는 인자로 알려진 내독소는 관체의 세포벽에 존재하는 일종의 lipopolysaccharide(Bradley, 1979)로 알려져 있으며 이 lipopolysaccharide를 이용하여 생체에 대한 내독소의 영향을 알아보려는 실험들이 시행되어 왔으나, 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전은 완전히 규명되어 있지 않다.

Gram 음성균의 감염으로 초래되는 내독소 혈중은 전신 장기에 손상(Toba 등, 1982)을 유발하며 특히 간에 많은 영향을 미친다(Hirata 등, 1980; Sato 등, 1982)고 한다. 내독소에 의한 간 손상은 간의 mitochondria에서 adenosine triphosphate(ATP) 생성 감소(Schumer 등, 1970; Mela 등, 1971; White 등, 1973)와 당대사에 관여하는 효소의 기능 저하로 초래되는 당대사장애(Berry와 Rippe, 1973; Shackleford, 1986), 파종성 혈관내 응고증으로 인한 저용량성 손상(Balis 등, 1978; Balis 등, 1979) 및 간세포의 손상으로 간세포질내 유리되는 lysosome의 분해 효소에 의한 자가용해(Janoff 등, 1962; Filkins, 1971; Hirata 등, 1980) 등을 들 수 있다. 내독소 혈중에서는 담즙물체가 관찰되고 혈중 bilirubin의 증가, bilirubin 뇨, 세포간과 담세관내 담즙 정체가 동반되는 것으로 알려져 있다(Utili 등, 1977).

Alkaline phosphatase (ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1, ALP)는 pH 8~10에서 ester 결합으로 인산이 결합된 화합물을 가수분해하여 인산을 유리시키는 일군의 효소이다. 이 효소는 포유동물의 거의 모든 세포에 분포되어 있으며 장점막, 골아세포 및 간에서 그 활성이 높다(Wilkinson, 1976)고 한다. 이 효소는 특히 담즙을

체가 수반되는 간담도 질환에서 간조직과 혈중에 현저히 그 활성이 증가되는 효소(Wilkinson, 1976)로 알려져 있으며 혈중 ALP 활성도 측정은 간담도 질환의 진단과 예후 판정에 이용되는 간기능 검사의 한종목으로 되어있다(Wilkinson, 1976).

담도계 효소의 하나인 5'-nucleotidase(5'-ribonucleotide phosphohydrolase, EC 3. 1. 3. 5, 5'-NT)는 5'-ribonucleotide들을 가수분해하여 인산을 유리시키는 효소이다. 이 효소는 동물의 거의 모든 조직에 분포되어 있으며 간에 많이 존재하고(Reis, 1951) 아울러 혈장과 담즙에도 출현하는 것(Hill과 Sammons, 1967)으로 알려져 있다. 이와같이 이 효소는 간조직에 그 함유량이 많을 뿐 아니라 그 활성도 왕성하다(Widnell, 1972; Naito와 Tsushima, 1976; Greger와 Fabianowska-Majewska, 1980)고 한다. 내독소 혈중에서는 담즙물체가 동반되고 이를 효소가 간담도계 효소이므로 내독소 혈증시에는 간과 혈청에서 이를 효소의 활성도가 변동 될 것으로 생각된다. 그러나 내독소 투여시 간과 혈청에서 이를 효소의 활성도 변동에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 내독소 투여 후 담도계 효소인 ALP와 5'-NT의 활성도 변동과 그 기전을 알아보기 위하여 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 ALP 및 5'-NT의 활성도 변동을 측정하는 한편 혈청에서 이를 효소 활성도도 측정하여 그 성격을 비교 검토하였다.

#### 재료 및 방법

**동물 및 처치 :** 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫 흰쥐를 사용하였으며 내독소 주입군 및 대조군

\* 이 논문은 1993년도 계명대학교 융종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

으로 나누어서 각각 내독소 주입 혹은 생리 식염수 주입후 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 체중  $kg$ 당 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  $kg$ 당 5mg이 되도록 우경정맥으로 주입하였다.

시약 : Barbital sodium, adenosine 5'-monophosphate(5'-AMP), manganese sulfate, nickel chloride, trichloroacetic acid, sodium acetate, acetic acid glacial, cupric sulfate, ammonium molybdate, p-methylaminophenol sulfate, 5'-nucleotidase(5'-ND control-E and N), disodium phenylphosphate, 4-aminoantipyrine, potassium ferricyanide, phenol, sodium deoxycholic acid, alkaline phosphatase(type IX, from bovine liver P 5760), 및 단백표준액(10 g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그외 일반 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

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

체혈한 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 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직균질액을 만들었다. 이 간 균질액 40ml를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽준식과 곽정식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome분획을 분리하였다. 이 마쇄 균

질액을 571×g(average relative centrifugal force 이하 생략함)에서 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분, 핵 및 원형질막 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 얻었다. 이때 얻은 상청액을 cytosol 분획으로 사용하였다. 위의 과정에서 얻은 pellet를 0.25M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10~35w/v% sucrose liner density gradient용액을 넣은 원심분리관 상부에 부하시켜 88,500×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 원심관 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet를 모아서 88,500×g에서 1시간 원심분리하여 pellet를 얻고 이 pellet를 다시 0.25M sucrose액에 재현탁시키며 88,500×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet를 microsome분획으로 사용하였다.

위의 7,796×g에서 20분간 원심분리하는 과정에서 얻은 pellet을 0.25M sucrose액에 현탁시키고 이 액을 20~45w/v% sucrose linear density gradient용액을 넣은 원심관 상부에 부하시켜 45,200×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose액에 재현탁시키며 7,796×g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria분획으로 사용하였다.

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

**효소 시료 조제 :** 분리한 microsome과 mitochondria는 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose 액에 현탁시켰으며 이 현탁액을 각각 1w/v% sodium deoxycholic acid가 포함된 1w/v% sodium bicarbonate액으로 희석하거나 1w/v% sodium bicarbonate 액으로 희석한 후 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20±0.4K cycles/sec의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파 마쇄를 하여 이것을 cytosol분획과 더불어 ALP 혹은 5'-NT의 효소시료로 사용하였다.

**효소 활성도 측정 | 혈청 및 간 세포분획의 ALP 활성도 측정은 disodium phenylphosphat를 기질로**

사용하여 효소 시료와 함께 37°C에서 15분간 반응시키는 동안에 생성된 phenol을 ferricyanide존재하에서 4-amminoantipyrine과 축합하여 생성된 quinone화합물의 적색을 비색하여 정량하는 Kind와 King(1954)의 법에 의하였으며 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 phenol을 nmol로 나타내었다.

혈청 및 간의 각 세포분획의 5'NT활성도의 측정은 5'-AMP를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 인산을 정량하는 Campbell(1962)의 방법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 반응하여 생성한 인산을 nmol로 나타내었다.

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

**단백 정량:** 효소액 중의 단백 정량은 0.5M-perchlric acid와 methanol-ether혼합액(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-검정법에 의하여 검정하였다.

## 성 적

**내독소 투여가 쥐간의 ALP 활성도에 미치는 영향:** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 ALP의 활성도 변동은 표 1과 같다. 내독소 투여군의 cytosolic ALP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 25%(P < 0.001) 및 약 27%(P < 0.001)의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal ALP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 26%(P < 0.001) 및 약 36%(P < 0.001)의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial ALP는 대조군에 비해 실험 전 기간 유의한 활성도의 변동은 없었다.

**내독소 투여가 쥐간의 5'-NT 활성도에 미치는 영향:** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 5'-NT의 활성도 변동은 표2와 같다. 내독소 투여군의 cytosolic 5'-NT는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 20%(P < 0.05) 및 약 27%(P < 0.05)의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal 5'-NT는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 23%(P < 0.001) 및 약 16%(P < 0.001)의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial 5'-NT는 대조군에 비해 실험 전 기간 유의한 활성도의 변동은 없었다.

**내독소 투여가 혈청 ALP 및 5'-NT 활성도에 미치는 영향:** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 혈청 ALP 및 5'-NT의 활성도 변동은 표 3와 같다.

Table 1. Effect of endotoxin on the hepatic alkaline phosphatase(ALP) activities in rats

| Hours<br>after<br>endotoxin<br>injection | ALP activities<br>(nmol phenol mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |                       |                    |                       |                    |                   |
|--|---|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
|  | Cytosol   |                       | Microsome          |                       | Mitochondria       |                   |
|  | Control   | Endotoxin             | Control            | Endotoxin             | Control            | Endotoxin         |
| 3  | 2.32±0.17<br>(100) <sup>a</sup>   | 2.89±0.19***<br>(125) | 5.32±0.47<br>(100) | 6.72±0.52***<br>(126) | 0.88±0.16<br>(100) | 0.76±0.14<br>(86) |
| 8  | 2.35±0.16<br>(100)  | 2.99±0.21***<br>(127) | 5.28±0.45<br>(100) | 7.18±0.63***<br>(136) | 0.87±0.14<br>(100) | 0.79±0.19<br>(91) |
| 24                                       | 2.33±0.15<br>(100)  | 2.26±0.15<br>(97)     | 5.25±0.52<br>(100) | 5.73±0.57<br>(109)    | 0.85±0.12<br>(100) | 0.84±0.17<br>(99) |

The data are expressed as mean ± SD with 10 rats in each group.

a; Number in parenthesis means the percentage.

Significant difference from control(\*\*\*(P<0.001)).

Table 2. Effect of endotoxin on the hepatic 5'-nucleotidase(5'-NT) activities in rats

| Hours<br>after<br>endotoxin<br>injection | 5'-NT activities<br>(nmol Pi mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |                      |                     |                        |                     |                     |
|--|---|----------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
|  | Cytosol   |                      | Microsome           |                        | Mitochondria        |                     |
|  | Control   | Endotoxin            | Control             | Endotoxin              | Control             | Endotoxin           |
| 3  | 3.56±0.68<br>(100) <sup>a</sup>   | 4.28±0.65*<br>(120)  | 53.25±3.48<br>(100) | 65.43±4.45***<br>(123) | 11.26±2.23<br>(100) | 11.10±2.32<br>(99)  |
| 8  | 3.58±0.65<br>(100)  | 4.54±0.72**<br>(127) | 53.78±3.39<br>(100) | 62.27±4.61***<br>(116) | 11.12±2.18<br>(100) | 11.62±2.36<br>(104) |
| 24                                       | 3.54±0.64<br>(100)  | 3.70±0.63<br>(105)   | 53.06±3.35<br>(100) | 52.51±4.15<br>(99)     | 11.41±2.13<br>(100) | 11.41±2.27<br>(100) |

Significant difference from control(\*; P<0.05, \*\*; P<0.01, \*\*\*; P<0.001).

Table 3. Effect of endotoxin on the serum alkaline phosphatase(ALP) and 5'-nucleotidase(5'-NT) activities in rats

| Hours<br>after<br>endotoxin<br>injection | ALP activitees<br>(nmol phenol ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |                     | 5'-NT activities<br>(nmol Pi ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) |                      |
|--|---|---------------------|---|----------------------|
|  | Control   | Endotoxin           | Control   | Endotoxin            |
|  | Control   | Endotoxin           | Control   | Endotoxin            |
| 3  | 192.1±55.3<br>(100) <sup>1</sup>                                    | 242.4±60.6<br>(126) | 0.34±0.14<br>(100)  | 0.53±0.37<br>(156)   |
| 8  | 194.2±52.8<br>(100)   | 238.6±56.8<br>(123) | 0.33±0.12<br>(100)  | 0.89±0.47**<br>(270) |
| 24                                       | 195.8±53.2<br>(100)   | 197.3±52.7<br>(101) | 0.32±0.13<br>(100)  | 0.43±0.19<br>(134)   |

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

내독소 투여군의 혈청 ALP활성도는 대조군에 비해 약간의 증가를 나타내었으나 통계학적 의의는 없었다. 5'-NT는 내독소 투여 후 8시간에 대조군에 비해 약 170% (P<0.01)의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다.

## 고 칠

간은 내독소 제거에 관여하는 중요 장기중 한가지(Trapani 등, 1962; Bjørneboe 등, 1972; Triger 등, 1972)이기는 하지만 내독소에 의해 손상을 받는 것(Hirata 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 있으며 담즙을 체도 나타나는 것(Utili 등, 1977)으로 알려져 있다.

이 연구는 흰쥐에게 내독소를 투여한 후 3, 8 및 24시간에 간의 세포질, mitochondria 및 microsome 과 혈청에서 ALP와 5'-NT의 활성도를 측정하여 이 효소들의 활성도 변동과 그 기전이 어떠한가를 알아본 것이다.

이 실험에서 측정한 ALP와 5'-NT는 간 세포질에서 그 활성도가 증가되었다. 이는 이 효소들이 담도계 효소이므로 담즙을 체가 일어나는 내독소 혈증에서는 그 배설의 장애가 원인인 것으로 생각된다. 또한 endoplasmic reticulum에 결합되어 있는 ribosome (microsome)이 단백 합성 장소이므로 microsome에서 이들 효소의 활성도 증가는 이들 효소의 합성 증가가 원인인 것으로 생각된다. 즉 이들 효소의 세포질과 microsome에서의 활성도 증가는 이들 효

소의 합성 증가와 내독소에 의한 담즙을 체로 이들 효소의 배설 장애에 기인된 것이라 생각된다. 또한 이 실험에서 혈중의 이 효소들이 증가를 나타내었다. 이는 이 효소들이 배설 장애로 혈중으로 역류한데 기인된 것으로 생각되며 또한 내독소로 인한 간세포의 손상으로 이들 효소들이 혈중으로 유출된 때 문이라 생각된다.

간에서 이들 효소가 내독소 투여 후 24시간에 그 활성도의 변동을 보이지 않은 점과 간 mitochondria의 에서 그 활성도의 변동을 보이지 않은 점은 이 실험 만으로는 그 이유를 알 수 없으며 앞으로 계속 추구해 보아야 할 것으로 생각된다.

### 요 약

내독소 투여 후의 간의 장애증 특히 담즙을 체에 관계된 변화를, 담도계 효소인 ALP와 5'NT의 활성도 변동을 통해 알아봄으로서 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전 특히 효소학 분야에 대한 이해의 일환으로 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 담도계 효소의 일종인 ALP 및 5'-NT의 활성도변동을 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 비교 검토하였다.

내독소 투여군의 cytosol과 microsome의 ALP 및 5'NT는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial ALP 및 5'-NT는 실험 전기간 유의한 활성도의 변동이 없었다. 내독소 투여군의 혈청 ALP는 약간의 증가를 보였으나 통계학적 의의는 없었으며 5'-NT는 내독소 투여 후 8시간에 의의있는 활성도 증가를 나타내었다.

ALP와 5'-NT는 세포질과 microsome에서의 활성도 증가는 이들 효소들의 합성증가와 내독소에 의한 담즙을 체로 이들 효소의 배설 장애에 기인되었다고 생각된다.

혈중에서 이들 효소의 활성도 증가는 이 효소들이 배설 장애로 인해 혈중으로 역류된 것과 아울러 내독소로 인한 간세포의 손상으로 이들 효소가 혈중으로 유출된 때문이라 생각된다.

### 참 고 문 헌

Balis JU, Paterson ES, Gerber L, et al: Glucocor-

ticoid and antibiotic effects on hepatic microcirculation and associated host responses in lethal gram-negative bacteremia. *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.

Berry LJ, Rippe DF: Effect of endotoxin on induced liver enzymes. *J Infect Dis* 1973; 128: S118-S121.

Bjørneboe M, Prytz H, Frskov F: Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972; 8: 58-60.

Brdley SG: Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. *Annu Rev Microbiol* 1979; 33: 67-94.

Campbell DM: Determination of 5'-nucleotidase in blood serum. *Biochem J* 1962; 82: 34.

Filkins JP: Hepatic lysosomes and the inactivation of endotoxin. *J Reticuloendothel Soc* 1971; 9: 480-488.

Gornall AG, Bardawill 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.

Greger J, Fabianowska-Majewska K: A distinctive activity of 5'-nucleotidase for dTMP in rat liver mitochondria. *Enzyme* 1980; 25: 26-32.

Hill PG, Sammons HG: An assessment of 5'-nucleotidase as a liver function test. *Quart J Med* 1967; 36: 457-468.

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.

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.

김정희, 정재홍, 서인수: 내독소 투여로 인한 급성 간 괴사의 초미형태학적 연구. 계명의대논문집 1987; 6: 177-202.

Kind PRN, King EJ: Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol

- with aminoantipyrine. *J Clin Pathol* 1954; 7: 322-326.
- 곽춘식, 곽정식: 환취 간세포분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- Mela L, Bacalzo LV Jr, Miller LD: Defective oxidation metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Physiol* 1971; 220: 571-577.
- Naito Y, Tsushima K: Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. *Biochem Biophys Acta* 1976; 438: 159-168.
- 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. *Circ Shock* 1986; 18: 11-19.
- Rangel DM, Byfield JE, Adomian GE, et al: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* 1970; 68: 503-511.
- Reis JJ: The specificity of phosphomonoesterases in human tissues. *Biochem J* 1951; 48: 548-551.
- Righetti ABB, Kaplan MM: Effects of actinomycin D on rat liver alkaline phosphatase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 491-495.
- Sato T, Tanaka J, Kono Y, et al: Hepatic cellular injury following lethal *Escherichia coli* bacteremia in rats. *Lab Invest* 1982; 47: 304-310.
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss, GS, et al: Effect of endotoxemia 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.
- Stanley KK, Edwards MR, Luzio JP: Rapid internalization of plasma membrane 5'-nucleotidase in rat spleen lymphocytes in response to rabbit anti-(rat liver-5'-nucleotidase)serum. *Biochem Soc Trans* 1979; 7: 1023-1024.
- Toba M, Ando T, Miyashita M, et al: Ultrastructural changes of spleen in endotoxin administration. *J Clin Electron Microsc* 1982; 15: 5-6.
- 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.
- Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ: Minireview: Endotoxin effects on the liver. *Life Sci* 1977; 20: 553-568.
- 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.
- Widnell CC: Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in subcellular fractions isolated from rat liver. I. The origin of 5'-nucleotidase activity in microsome. *J Cell Biol* 1972; 52: 542-558.
- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*, London, Edward Arnold Ltd 1976, pp 129-141.
- Yoder MC, Egler JM, Yudkoff M, et al: Metabolic and mitochondrial morphological changes that mimic Reye syndrome after endotoxin administration to rats. *Infect Immun* 1985; 47: 329-331.

=Abstract=

## Effect of Parenteral Administration of Endotoxin on Changes of Serum and Hepatic Alkaline Phosphatase and 5'-Nucleotidase Activities in Rats

Kyo Cheol Mun, MD; Joo Il, MD; Chun Sik Kwak, PhD

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

The activities of the cytosolic, microsomal and mitochondrial alkaline phosphatase(ALP) and 5'-nucleotidase(5'-NT) in the liver were measured in order to evaluate the cholestatic changes, one of the hepatic damages under the endotoxin administration. 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 livers.

Cytosolic and microsomal ALP and 5'-NT activities showed a significant increase between 3 and 8 hours after endotoxin administration.

The activity of the mitochondrial ALP and 5'-NT in the liver showed no significant changes throughout the experiment.

Serum ALP activity showed a increase without significace. But serum 5'-NT showed a significant increase at 8 hours after endotoxin administration.

According to the results, it is suggested that cytosolic and microsomal ALP and 5'-NT activity is increased caused by increased biosynthesis and impairment of hepatic excretory function for these enzymes. And it is also suggested that increased activity of the serum ALP and 5'-NT is due to the reflux of these enzymes from the liver and due to leak into the blood through the damaged membrane of hepatocyte.

**Key Words:** Alkaline Phosphatase, Endotoxin, 5'-Nucleotidase