

## 내독소가 혈청 및 간의 $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase 및 Leucine Aminopeptidase 활성 변동에 미치는 영향\*

계명대학교 의과대학 생화학교실

### 문교철 · 곽춘식

#### 서 론

Gram 음성균의 감염에서 독성을 나타내는 인자로 알려진 내독소는 균체의 세포벽에 존재하는 일종의 lipopolysaccharide로 알려져 있으며 이 lipopolysaccharide를 이용하여 생체에 대한 내독소의 영향을 알아 보려는 실험들이 시행되어 왔으나 아직도 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전은 완전히 규명되어 있지 않다.

Gram 음성균의 감염으로 초래되는 내독소 혈증은 전신 장기에 손상을 유발하며 특히 간에 많은 영향을 미친다(Hirata et al, 1980; Sato et al, 1982)고 하며 내독소에 의한 간 손상은 간의 mitochondria에서 adenosine triphosphate(ATP) 생성 감소(Schumer et al, 1970; Mela et al, 1971; White et al, 1973)와 당대사에 관여하는 효소의 기능 저하로 초래되는 당대사 장애(Berry and Rippe, 1973; Shackleford, 1986), 파종성 혈관내 응고증으로 인한 저용량성 손상(Balis et al, 1978; Balis et al, 1979) 및 간세포의 손상으로 간세포질내로 유리되는 lysosome의 분해 효소에 의한 자가용해(Filkins, 1971; Hirata et al, 1980) 등을 들 수 있다. 또한 내독소 혈증에서는 담즙율체가 관찰되고 혈중 bilirubin의 증가, bilirubin뇨, 세포사이와 담세관내 담즙 정체가 동반되는 것(Utili et al, 1977)으로 알려져 있다.

$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase((5-glutamyl) peptide: amino acid 5-glutamyl transferase, EC 2.3.2.2,  $\gamma$ -GTP)는  $\gamma$ -glutamyl기가 결합된 peptide로부터  $\gamma$ -glutamylamide를 유리시켜 다른 peptide로 전이시키는 반응을 촉매하는 효소로서(Kim, 1984) 세포의 plasma membrane, microsome 등의 막의 외측

표면에 편재되어 있으며 cytosol과 mitochondria에 서도 발견되는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 간에서 그 합성이 왕성하며 특히 담도세포에 그 함유량이 많다고 하여 alkaline phosphatase(ALP), 5'-nucleotidase(5'-NT), leucine aminopeptidase와 더불어 담도계 효소라 부르고 있다(Rutenburg et al, 1969; Song et al, 1969; Kaplan, 1972; Wilkinson, 1976).

Leucine aminopeptidase( $\alpha$ -aminoacyl peptide hydrolase(cytosol), EC 3.4.11.1, LAP)는 oligomeric zinc metalloenzyme으로써 peptide의 N-terminal amino산 및 imino산의 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소이며 특히 N-terminal 위치에 L-leucine이 결합된 peptide의 분해에 가장 민감하게 작용한다(Wilkinson, 1976). 이 효소는 간, 肺, 신에서 그 합성력이 왕성하며 많은 양이 이들의 세포질에 있다(Makinen and Hopsu-Havu, 1967)고 한다. 이 효소는 세포내에서도 세포질 이외 plasma membrane과 mitochondria 및 nuclei에서 발견될 뿐만 아니라 microsome 분획에서도 발견(Roman and Hubbard, 1983)되며 이 microsome 분획의 효소는 particle-bound aminopeptidase( $\alpha$ -aminoacyl peptide hydrolase(microsomal), EC 3.4.11.2, PAP)라 부르고 있다. 혈청중의 이 효소의 활성도는 특히 담즙율체가 수반되는 간담도 질환에서 현저히 증가된다.

따라서 내독소 혈증에서는 담즙율체가 동반되고 이를 효소가 간담도계 효소이므로 내독소 혈증시 이를 효소의 활성도는 변동 될 것으로 생각된다. 그러나 내독소 투여 간에서 이를 효소의 활성 변동에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 내독소 투여 후의 간의 장애를 담도계 효소인  $\gamma$ -GTP와 LAP의 활성도 변동을 알아봄으로

\* 이 논문은 1994년도 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

서 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전 특히 효소학적 분야에 대한 이해의 일환으로 환쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 담도계효소의 일종인 *r*-GTP 및 LAP의 활성변동을 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 비교 검토한 것이다.

### 재료 및 방법

**동물 및 처치:** 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 280~320g이되는 Sprague-Dawley종의 숫환쥐를 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 진양사료 주식회사의 제품을 먹도록 하였다. 대조군은 생리 식염수를 체중 kg당 1.25ml를 주입하였으며 내독소 주입군은 김정희 외(1987)의 방법에 따라 Sigma사의 내독소(*E. coli*, O26: B6, lipopolysaccharide, Sigma, USA)를 생리 식염수에 4mg/ml의 농도로 녹여 체중 kg당 5mg이 되도록 우경정액으로 주입하였다.

**시약:** Sodium deoxycholic acid, L-*r*-glutamyl-p-nitroanilide, p-nitroaniline, p-dimethylaminocinnamaldehyde, L-Leucyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide-HCl, p-xylenol, sodium metaperiodate, 종합 표준 효소(enzyme control 2-N) 및 단백표준액(10g/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 채혈하여 쥐를 실혈사시켰다. 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 한 모두 제거하였다.

한편 채혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2~4°C로 냉

각한 후 잘게 썰어서 철판으로 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 400 rpm의 속도로 조심스럽게 5회 왕복 마쇄하여 10w/v%의 간 조직균질액을 만들었다. 그리고는 이 간 균질액 40ml를 취하여 sucrose density gradient 원심분리법(곽춘식과 곽정식, 1986)으로 cytosol, mitochondria 및 microsome분획을 분리하였다. 즉 이 마쇄 균질액을 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. 그리고 위의 과정에서 얻은 pellet를 0.25M sucrose액에 재현탁시키고 이 액을 10~35w/v% sucrose liner density gradient 용액을 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 재현탁시켜 88,500 ×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet를 microsome분획으로 사용하였다.

한편 위의 7,796 ×g에서 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 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.25M sucrose액에 재현탁시켜 7,796 ×g에서 20분간 원심분리하여 pellet을 얻었으며 이것을 mitochondria분획으로 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 rotor 였고 sucrose linear density gradient 용액의 제조는 gradient former(ISCO model 570)를 사용하였다.

**효소 시료 조제:** 분리한 microsome과 mitochondria는 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액에 현탁시켰으며 이 현탁액을 1w/v% so-

dium bicarbonate액으로 배로 희석하여 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20 ± 0.4 K cycel/sec의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파 마쇄를 하여 이것을 cytosol분획과 더불어 *r*-GTP 효소액으로 사용하였다. 그리고 분리한 cytosol, mitochondria 및 microsome을 단백량으로 5mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액에 혼탁만 시켜 LAP 혹은 PAP 효소액으로 사용하였다.

**효소 활성도 측정:** 간의 각 세포분획과 혈청의 *r*-GTP 활성도의 측정은 L-*r*-glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 p-nitroaniline을 정량하는 Orlowski 및 Meister(1963)법에 의하였으며 이 효소의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혈청 혹은 1mg의 단백이 반응하여 생성한 p-nitroaniline을 nmol로 나타내었다.

혈청과 간의 cytosol 및 mitochondria분획의 LAP 활성도와 microsome 분획의 PAP활성도 측정은 L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide를 기질로 사용하여 효소 시료와 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 생성되는 5-aminoosalicylic acid를 p-xlenol 및 sodium metaperiodate와 반응시켜 생성되는 quinoid의 청색을 비색하여 정량하는 Akatsuka et al (1978)의 법에 의하였다. 그리고 이 효소들의 활성도 단위는 1분간에 1ml의 혈청 또는 1mg의 단백이 생성한 5-aminoosalicylic acid를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 종합 표준 효소를 사

용하여 검정하였으며 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 이 실험에서 각 효소 활성도 측정에 사용한 분광 광도계는 computer controlled enzyme spectrophotometer(Varian, Cary 210)였다.

**단백질 정량:** 효소액 중의 단백 정량은 0.5M-perchlric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소액 중의 단백을 정제한 다음 biuret법으로 정량하였다.

얻어진 각종 성적들의 평균치 중 상호비교가 필요한 경우는 Student의 t-검정법에 의하여 검정하였다.

## 결 과

**내독소 투여가 쥐간의 *r*-GTP 활성도에 미치는 영향:** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간 세포 분획의 *r*-GTP의 활성도 변동은 표 1과 같다. 내독소 투여군의 cytosolic *r*-GTP는 내독소 투여 후 8시간에 대조군에 비해 약 13%(P<0.05)의 의의있는 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal *r*-GTP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 32%(P<0.001) 및 약 41% (P<0.001)의 의의있는 활성도 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial *r*-GTP는 대조군에 비해 실험 전기간 유의한 활성도의 변동이 없었다.

Table 1. Effect of endotoxin on the hepatic *r*-glutamyl transpeptidase(*r*-GTP) activities in rats

Hours after endotoxin injection	<i>r</i> -GTP activities (nmol p-nitroaniline mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosol		Microsome		Mitochondria	
	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin
3	0.74±0.07 (100) <sup>a</sup>	0.78±0.08 (105)	3.51±0.43 (100)	2.40±0.38*** (68)	0.90±0.11 (100)	0.83±0.09 (92)
8	0.75±0.06 (100)	0.85±0.12* (113)	3.54±0.41 (100)	2.09±0.32*** (59)	0.91±0.13 (100)	0.94±0.10 (103)
24	0.74±0.08 (100)	0.76±0.09 (103)	3.52±0.39 (100)	3.22±0.36 (91)	0.89±0.09 (100)	0.92±0.08 (103)

Values are means ± SD with 10 rats in each group.

a: Number in parenthesis means the percentage.

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

**내독소 투여가 쥐간의 LAP 및 PAP 활성도에 미치는 영향:** 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰

쥐 간 세포 분획의 LAP의 활성도 변동은 표 2와 같다. 내독소 투여군의 cytosolic LAP는 내독소 투여

후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 7% ( $P<0.05$ ) 및 약 11% ( $P<0.01$ )의 의의있는 활성도 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal

PAP 및 mitochondrial LAP는 대조군에 비해 실험 전기간 유의한 활성도의 변동이 없었다.

Table 2. Effect of endotoxin on the hepatic leucine aminopeptidase(LAP) and particle-bound aminopeptidase(PAP) activities in rats

Hours after endotoxin injection	LAP and PAP activities (nmol 5-aminosalicylic acid mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosolic LAP		Microsomal PAP		Mitochondrial LAP	
	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin
3	11.76±0.82 (100) <sup>a</sup>	11.43±0.91 (97)	4.82±0.71 (100)	4.73±0.68 (98)	1.46±0.23 (100)	1.40±0.20 (96)
8	11.73±0.80 (100)	10.92±0.84* (93)	4.85±0.73 (100)	4.68±0.66 (96)	1.47±0.25 (100)	1.39±0.18 (95)
24	11.66±0.77 (100)	10.83±0.87** (89)	4.83±0.68 (100)	4.79±0.73 (99)	1.45±0.22 (100)	1.43±0.21 (99)

Values are means ± SD with 10 rats in each group.

Signinificant difference from control(\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ ).

내독소 투여가 혈청  $\gamma$ -GTP 및 LAP 활성도에 미치는 영향: 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 혈청  $\gamma$ -GTP 및 LAP의 활성도 변동은 표 3과 같다. 내독소 투여군의 혈청  $\gamma$ -GTP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 대조군에 비해 각각 약 54% ( $P<0.001$ )

및 약 78% ( $P<0.001$ )의 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 LAP는 내독소 투여 후 3시간에 대조군에 비해 약 13% ( $P<0.01$ )의 의의 있는 활성도 감소를 나타내었다.

Table 3. Effect of endotoxin on the serum  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GTP) and leucine aminopeptidase(LAP) activities in rats

Hours after endotoxin injection	$\gamma$ -GTP activities (nmol p-nitroaniline ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )		LAP activities (nmol 5-aminosalicylic acid ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	
	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin
	Control	Endotoxin	Control	Endotoxin
3	3.67±0.64 (100) <sup>a</sup>	5.65±0.87*** (154)	26.82±2.56 (100)	23.52±2.72** (87)
8	3.71±0.60 (100)	6.59±1.16*** (178)	27.31±2.43 (100)	23.34±2.67 (93)
24	3.65±0.62 (100)	3.52±0.71 (96)	26.30±2.47 (100)	26.27±2.81 (100)

Values are means ± SD with 10 rats in each group.

Signinificant difference from control(\*\*:  $P<0.01$ , \*\*\*:  $P<0.001$ ).

## 고 칠

간은 내독소 제거에 관여하는 중요 장기중 한가지 (Triger et al, 1972)이기는 하지만 내독소에 의해 손

상을 받는 것(Hirata et al, 1980; Sato et al, 1982)으로 알려져 있다.

내독소 혈증으로 인한 간 손상시에는 4~6시간 부터 간세포에는 피사현상이 나타나고 8시간 후에는 피사의 정도가 심해지며 이후 24시간 까지 지속된다

(Onda et al, 1986; 김정희 외, 1987)고 한다. 그리고 이때 간의 mitochondria는 종창, 확장, 내부 구조의 분해, 내외막의 분리, 모양의 불규칙화, cristae의 팽창 및 소실 등의 변화(Schumer et al, 1970; White et al, 1973; Yoder et al, 1985; 김정희 외, 1987)가 일어나고 endoplasmic reticulum은 중식 및 확장 등의 변화(Rangel et al, 1970; Yoder et al, 1985; 김정희 외, 1987)가 초래되는 것으로 알려져 있으며 담즙을 체도 나타나는 것으로 알려져 있다(Utili et al, 1977). 그리고 담도계 효소인 ALP와 5'-NT도 내독소를 투여했을 때 간에서 합성 증가와 함께 이들 효소의 배설 장애로 그 활성도가 증가 되며 혈중에서는 간에서 배설 장애로 인한 간세포막의 장애로 이들 효소의 유출이 증가되어 혈중에 그 활성도가 증가되는 것으로 알려져 있다(곽춘식 외, 1993).

이 실험에서 측정한 *r*-GTP는 microsome에서는 그 활성도가 감소되고 cytosol에서는 약간 그 활성도가 증가되며, 혈중에서는 간의 microsome에서 그 활성도가 감소되는 시기에 그 활성도가 증가되고 있다. 따라서 혈중 *r*-GTP의 활성도 증가는 microsome의 *r*-GTP가 내독소로 인한 장애로 세포질을 거쳐 혈중으로 유출이 증가되어 일어난 결과라 생각된다. 또한 rough endoplasmic reticulum에 결합된 ribosome(microsome)이 단백 합성 장소이며 내독소 투여시 microsome에서 심한 형태학적인 변화가 일어난다는 보고(Rangel et al, 1970; Yoder et al, 1985; 김정희 외, 1987)와 내독소가 phosphoenol pyruvate carboxykinase(Berry and Rippe, 1973), tryptophan oxygenase(Berry et al, 1966), monoamine oxidase(곽춘식 외, 1991) 등의 효소 합성을 감소시킨다는 보고를 볼 때 microsome에서의 *r*-GTP의 활성도 감소는 내독소에 의해 microsomal *r*-GTP의 합성이 감소된 때문이라 생각된다. 따라서 *r*-GTP는 내독소 투여시 간에서 그 합성이 감소됨과 동시에 혈중으로 유출된다고 생각된다. 그러나 mitochondrial *r*-GTP의 활성 변동이 없는 점은 이 실험 성적 만으로는 설명하기 어렵다.

*r*-GTP를 비롯한 ALP, 5'-NT 등 간담도계 효소들은 내독소 혈중에서 간 세포막의 장애로 혈중으로 유출되며 간 세포질에서 그 활성이 감소하였다(곽춘식 외, 1993). 따라서 간 LAP의 감소는 내독소로 인한 간 세포막의 장애로 간 LAP가 혈중으로 유출되는 것으로 생각된다. 그러나 간에서의 감소 시기와 혈중에서의 이 효소의 활성도 변동 시기가 상이하며 특히 혈중에서 이 효소의 활성도가 감소된 것으로

보아 이 효소의 활성도 변동에는 혈중으로 이 효소가 유출되는 것 이외에 다른 요소가 관여하리라 생각되나 이 실험 결과만으로는 그 이유를 정확히 알 수는 없다.

곽춘식 외(1993)는 같은 간담도계 효소인 ALP와 5'-NT가 내독소를 투여했을 때 간에서의 배설 장애와 합성 증가로 간에서 이들 효소의 활성도가 증가한다고 하였다. 그러나 이 실험 성적에서 간의 *r*-GTP와 LAP의 활성도 변동은 내독소 투여시의 간의 ALP와 5'-NT 활성도 변동과는 그 양상이 같지 않았다. 따라서 이 효소들은 내독소로 인한 간 세포막 손상으로 혈중으로 유출되나 ALP와 5'-NT와 같은 배설 장애의 의한 영향은 크게 받지 않는 효소로 생각된다. 그리고 LAP 활성의 변동 시기가 간과 혈중에서 서로 상이한 점과 microsomal PAP 및 mitochondrial LAP의 활성도 변동이 실험 전 기간 동안 보이지 않은 점 등은 이 실험 성적만으로는 설명하기 어려우며 앞으로 계속 연구 해보아야 할 문제라 생각된다.

이상 문헌상의 지견과 이 실험 성적으로 보아 microsome의 *r*-GTP는 내독소로 인해 간 세포막의 장애로 세포질을 거쳐 혈중으로 유리되며 동시에 microsome에서의 그 합성도 감소된다고 생각된다. 그리고 LAP도 내독소로 인한 간 세포막의 장애로 이 효소가 혈중으로 유출된다고 생각된다. 또한 이 효소들은 내독소로 인한 간 세포막 손상으로 혈중으로 유출되나 ALP와 5'-NT와 같은 배설 장애의 의한 영향은 크게 받지는 않는 효소로 생각된다. 그러나 LAP 활성도의 변화 시기가 간과 혈중에서 서로 상이한 점과 microsomal PAP, mitochondrial *r*-GTP와 LAP의 활성도 변동이 실험 전 기간 동안 보이지 않은 점은 이 실험 성적만으로는 설명하기 어려우며 앞으로 계속 연구 해보아야 하겠다.

## 요 약

이 연구는 내독소 투여 후의 간의 장애를 담도계 효소인 *r*-GTP와 LAP의 활성 변동을 알아봄으로서 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전 특히 효소학 분야에 대한 이해의 일환으로 환경에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간 세포질, mitochondria 및 microsome에서 *r*-GTP 및 LAP의 활성변동을 측정하는 한편 혈청에서 이들 효소 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 비교 검토하였다.

내독소 투여군의 cytosolic *r*-GTP는 내독소 투여

후 8시간에 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal  $r$ -GTP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 의의있는 활성도 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial  $r$ -GTP는 실험 전기간동안 유의한 활성도의 변동이 없었다.

내독소 투여군의 cytosolic LAP는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 의의있는 활성도 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal PAP 및 mitochondrial LAP는 실험 전기간동안 유의한 활성도의 변동이 없었다.

내독소 투여군의 혈청  $r$ -GTP는 내독소 투여 후 3시간 및 8시간에 의의있는 활성도 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 LAP는 내독소 투여 후 3시간에 의의있는 활성도 감소를 나타내었다.

Microsome의  $r$ -GTP는 내독소로 인해 간 세포막의 장애로 세포질을 거쳐 혈중으로 유리되며 동시에 microsome에서의 그 합성도 감소된다고 생각된다.

또한 LAP도 내독소로 인한 간 세포막의 장애로 이 효소가 혈중으로 유출된다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 赤塚尹巳, 長澤 健, 鳴本 三利: 新合成基質을 사용한 肝特異性 高感度 血清 LAP 測定法의 確定(日文). 臨床病理(補冊) 1978; 26: 85.
- Balis JU, Paterson JF, Shelley SA, Larson CH, Fareed J, Gerber LI: Glucocorticoid and antibiotic effects on hepatic microcirculation and associated host responses in lethal gram-negative bacteremia. *Lab Invest* 1979; 40(1): 55-65.
- Balis JU, Rappaport ES, Gerber L, Buddingh F, Messmore HL: A primate model for prolonged endotoxin shock, Blood-vascular reactions and effects of glucocorticoid treatment. *Lab Invest* 1978; 38(4): 511-523.
- Berry LJ, Smythe DS, Colwell LS: Inhibition of inducible liver enzymes by endotoxin and actinomycin D. *J Bacteriol* 1966; 92: 107-115.
- Berry LJ, Rippe DF: Effect of endotoxin on induced liver enzymes. *J Infect Dis* 1973; 128: S118-S121.
- Filkins JP: Hepatic lysosomes and the inactivation of endotoxin. *J Reticuloendothel Soc* 1971; 9(5): 480-490.

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.

Hirata K, Kaneko A, Ogawa K, Onoe T: Effect of endotoxin on rat liver: Analysis of acid phosphatase isozymes in the liver of normal and endotoxin-treated rats. *Lab Invest* 1980; 43(2): 165-171.

Kaplan MM: Alkaline phosphatase. *Gastroenterology* 1972; 62(3): 452-468.

Kim BK: *Enzyme Nomenclature*, IUB, New York, Academic Press, 1984, pp 174-175.

김정희, 정재홍, 서인수: 내독소 투여로 인한 급성 간 괴사의 초미형태학적 연구. 계명의대논문집 1987; 6(2): 177-202.

곽춘식, 곽정식: 흰쥐 간세포분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5(1): 45-53.

곽춘식, 문교철, 김상철: 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Monoamine Oxidase 및 Xanthine Oxidase 활성 변동에 미치는 영향. 계명의대논문집 1991; 10(3): 335-344.

곽춘식, 문교철, 김상철: 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Alkaline Phosphatase 및 5'-Nucleotidase 활성 변동에 미치는 영향. 계명의대논문집 1993; 12(3): 303-309.

Makinen KK, Hopsu-Havu VK: The presence of enzymes resembling aminopeptidase B in several rat organs. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1967; 45(2): 230-234.

Mela L, Baclzo LV Jr, Miller LD: Defective oxidation metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Physiol* 1971; 220(2): 571-577.

Onda M, Toba M, Andoh T, Shirota A: Ultrastructural studies of experimental endotoxin shock in the liver and spleen: Therapeutic effects of low-dose heparin on reticuloendothelial disturbances. *Circ Shock* 1986; 18(1): 11-19.

Orlowski M, Meister A:  $r$ -glutamyl  $\beta$ -nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L and D- $r$ -glutamyl

- transpeptidase activities. *Biochem Biophys Acta* 1963; 73: 679-681.
- Rangel DM, Byfield JE, Adomian GE, Stevens GH, Fonkalsrud EW: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* 1970; 68 (3): 503-511.
- Roman LM, Hubbard AL: A domain-specific marker for the hepatocyte plasma membrane: Localization of leucine aminopeptidase to the bile canalicular domain. *J Cell Biol* 1983; 96(6): 1548-1558.
- Rutenberg AM, Kim H, Fischbein JW, Hanker JS, Wasserkrug HL, Seligman AM: Histochemical and ultrastructural demonstration of *r*-glutamyl transpeptidase activity. *J Histochem Cytochem* 1969; 17(8): 517-526.
- Sato T, Tanaka J, Kono Y, Jones RT, Cowley RA, Trump BF: Hepatic cellular injury following lethal *Escherichia coli* bacteremia in rats. *Lab Invest* 1982; 47(3): 304-310.
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss GS, Nyhus LM: Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171(6): 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(2 Pt 1): E218-E225.
- Song CS, Rubin W, Rifkind AB, Kapps A: Plasma membranes of the rat liver. Isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. *J Cell Biol* 1969; 41(1): 124-132.
- Triger DR, Alp MH, Wright R: Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* 1972; 8(1): 60-63.
- Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ: Endotoxin effects on the liver, *Life Sci* 1977; 20(4): 553-568.
- White RR, Mela L, Bacalzo LV Jr, Olofsson K, Miller LD: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes. *Surgery* 1973; 73(4): 525-534.
- Wilkinson JH: *The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology*. London, Edward Arnold, 1976, pp 156-158 and pp 345-348.
- Yoder MC, Egler JM, Yudkoff M, Chatten J, Douglas SD, Polin RA: Metabolic and mitochondrial morphological changes that mimic Reye syndrome after endotoxin administration on rats. *Infect Immun* 1985; 47(1): 329-331.

=Abstract=

## **Effect of Endotoxin on Changes of Serum and Hepatic $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase and Leucine Aminopeptidase Activities in Rats**

Kyo Cheol Mun, MD; Chun Sik Kwak, PhD

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

The activities of the cytosolic, microsomal and mitochondrial  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP) and leucine aminopeptidase(LAP) in the liver were measured in order to evaluate the biochemical background, especially the enzymological background of endotoxin toxicity. 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 O26: B6, from Sigma, 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  $\gamma$ -GTP activity showed a significant increase at 8 hours after endotoxin administration. Microsomal  $\gamma$ -GTP activity showed a significant decrease between 3 and 8 hours after endotoxin administration. The activity of the mitochondrial  $\gamma$ -GTP in the liver showed no significant changes throughout the experiment.

Cytosolic LAP activity showed a significant decrease between 8 and 24 hours after endotoxin administration. The activities of microsomal PAP and mitochondrial LAP in the liver showed no significant changes throughout the experiment.

Serum  $\gamma$ -GTP activity showed a significant increase between 3 and 8 hours after endotoxin administration. The activity of serum LAP showed a significant decrease at 3 hours after endotoxin administration.

According to the results, it is suggested that microsomal  $\gamma$ -GTP flows into the serum through the damaged membrane and the biosynthesis of this enzyme is decreased, and changes of the serum  $\gamma$ -GTP and LAP activities are due to leak into the blood through the damaged membrane of hepatocyte.

**Key Words:** Endotoxin,  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase, Leucine Aminopeptidase