

## 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Glutathione S-transferase, Glutathione peroxidase 및 Glutathione reductase 활성 변동에 미치는 영향\*

계명대학교 의과대학 생화학교실 및 경상북도 보건환경연구원 미생물과\*\*

곽춘식, 문교철\*\*, 김상철\*\*

### 서 론

Gram 음성균의 감염에서 독성을 나타내는 인자로 알려진 내독소는 균체의 세포벽에 존재하는 일종의 지질을 함유한 다당류(Singleton과 Sainsbury, 1987)인 lipopolysaccharide(Bradley, 1979)이며 이중 지질 함유 부위인 lipid A가 lipopolysaccharide의 독성을 나타내는 부위(Singleton과 Sainsbury, 1987)로 알려져 있다. 그리고 이러한 lipopolysaccharide를 이용하여 생체에 대한 내독소의 영향을 알아보려는 실험들이 시행되었으나 아직도 내독소의 독성에 관한 분자 생물학적 기전은 명확히 규명되어 있지 않다.

현재까지 알려진 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 특히 간의 내독소 해독 능력에 대한 연구(Trapani 등, 1962; Palmerio 등, 1963; Fine 등, 1968; Bjørneboe와 Prytz, 1972; Triger 등, 1972)가 많이 이루어지고 있다.

Glutathione S-transferase(Rx: glutathione R-transferase, EC 2, 5, 1, 18, GST)는 생체내에서 주로 친지질성 및 친전자성물질(Rx)에 환원형 gluta-

thione(GSH)를 포함시켜 glutathione의 thioester(R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매하는 효소이다(Jakoby, 1978; Kim 1979). 이 효소는 동물의 간에 다량 분포(Trip등, 1974; Grahnen과 Sjöholm, 1977; Hayes와 Mantle, 1986)되어 있으며 간세포내에서는 세포질, 세포핵, mitochondria 및 endoplasmic reticulum에 존재한다(Friedberg등, 1968; Bannikov와 Tchipyseva, 1978; Wahlländer등, 1979; Lee와 McKinney, 1982; Ryle와 Mantle, 1984)고 알려져 있다. GST는 다양한 기능을 가진 효소로서 변이원성물질, 발암성 물질, 독성 및 약리학적 활성 물질과 이들의 대사산물 그리고 내인성독소들 중에서 친지질성 및 친전자성 성질을 가진 물질의 해독 및 배설에 관여한다. 이 효소는 사염화탄소 중독시(Mukhtar와 Bend, 1977), 급성 및 전격성간염(Tsuru 등, 1978), 간암(Ohmi와 Arias, 1981)등에서 혈중에 그 활성이 증가되며, 사염화탄소 중독간(Adachi 등, 1981; Harisch와 Meyer, 1985), 간암조직(Sherman등, 1983)에서는 그 활성이 저하되어 있다고 한다.

Glutathione peroxidase(glutathione: hydrogen peroxidase, EC 1, 11, 1, 9, GSH-Px)는 생체내에서 과산화수소와 GSH로부터 산화형 glutathione(GSSG), 물 그리고 기타 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매하는 효소(Pierce와 Tappel, 1978; Chance등, 1979; Kim, 1979)로서 조직의 산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독하는 역할을 담당하는 효소이다(Chow와 Tappel, 1972 및 1973; Player등, 1977; Chance등, 1979; Wendel, 1980). 이 효소도 동물의 간에서 세포질에 다량 분포(Nakamura 등,

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

1974; Stults 등, 1977)되어 있으며, 인체 및 흰쥐의 간암조직(Peskin 등, 1978; Kitathara 등, 1983; Casari 등, 1985), 다발성경화증(Mehrlert 등, 1982), 용혈성 질환(Necheles 등, 1968), Phenylketonuria (Steiner 등, 1982; Kitathara 등, 1983; Casari 등, 1985)에서 그 활성이 낮은 것으로 보고되고 있다.

Glutathione reductase(NAD(P)H: oxidized glutathione oxidoreductase, EC 1. 6. 4. 2, GR)는 생체내에서 가역적으로 환원형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)와 GSSG로부터 산화형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP<sup>+</sup>)와 GSH를 생성하는 반응을 촉매하는 효소(Kim, 1979)로서 이 반응을 통하여 GST와 GSH-Px의 기질인 GSH를 공급하고 있다. 이 효소도 동물의 간 세포질에 주로 분포되어 있는 것(Carlberg와 Mannervik, 1975; Moron 등, 1979; Goldberg와 Spooner, 1983)으로 알려져 있다. 이 효소는 혈중에 출현하는 비기능성 효소의 한가지로 악성종양(Manso와 Wröblewsky, 1958; Kerppola 등, 1959; West 등, 1961; Wakui 등, 1976), 사염화탄소 중독시(Kumata 등, 1975), 간암(Taniguchi 등, 1974; Wakui 등, 1976), 급만성간염(Wakui 등, 1976) 및 담즙울체시(Tor 등, 1981) 혈중에 그 활성이 증가되고 흰쥐의 담즙울체 간에서 그 활성이 증가되는 것(권용철 등, 1990)으로 알려져 있다.

간은 물질대사의 중추 기관으로서 대단히 복잡하고 다양한 기능을 가진 장기이며 체외로부터 흡수되거나 체내에서 생성된 유해물질을 해독하여 배설시키는 해독기구를 가짐으로서 생체를 보호하고 있다. 특히 GST는 친지질성 물질을 해독하는 것으로 알려져 있으며 내독소는 독성을 나타내는 지질부분을 함유한 lipopolysaccharide(Singleton과 Sainsbury, 1987)이다. 따라서 GST는 친지질성 물질을 해독하는 해독효소일 뿐 아니라 간에서 그 합성이 왕성하므로 내독소를 투여했을 때 이를 해독하기 위해 그 활성이 변동될 것으로 생각된다. 그러나 내독소 투여 간에서 이들 효소의 활성 변동에 대한 보고는 아직 찾아 볼 수 없었다.

이 연구는 내독소 투여 후 간의 해독 능력을 파악하기 위한 일환으로 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 해독효소의 일종인 GST의 활성도를 간의 세포질, mitochondria 및 microsome에서 측정하는 한편 해독 효소인 GSH-Px와 이들 효소의 기질 공급 효소인 GR의 활성도를 간에서 측정하였으며

아울러 혈청에서 GST 및 GR의 활성도도 함께 측정하여 그 성적을 보고코자 한다.

### 재료 및 방법

**동물 및 처치 :** 동물은 4주이상 같은 조건으로 사육한 체중 280-320g이 되는 Sprague-Dawley종의 숫흰쥐를 사용하였으며 내독소 주입군 및 대조군으로 나누어서 각각 내독소 주입 혹은 생리 식염수 주입후 3시간, 8시간 및 24시간에 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 (1987)의 방법에 준하여 Sigma사의 내독소 (*E. coli*, O26: B6, lipopolysaccharide, Sigma, USA)를 생리 식염수에 4mg/ml의 농도로 녹여 체중 kg당 5mg이 되도록 우 경정맥으로 주입하였다.

**시약 :** Reduced glutathione, oxidized glutathione, 2, 4-dinitrochlorobenzene(DNCB), ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt type III(NADPH), glutathione reductase Type III(from baker's yeast), glutathione peroxidase(form bovine erythrocytes), glutathione S-transferase(form rat liver) 및 단백 표준액(10g/100ml bovine albumin) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 그 외 일반 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

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

체혈한 혈액은 원심분리하여 혈청은 얻고 곧 효소 활성도를 측정하였다.

간의 세포분획은 적출한 간들을 즉시 2-4℃로 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℃를 유지하면서 400rpm의 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 세포질, 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 세포질 분획으로 사용하였다. 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 원심판 중앙 부위와 상부에 형성된 pellet를 모아서 88,500×g에서 1시간 재원심분리하여 pellet를 얻었다. 이 pellet를 microsome분획으로 사용하였다.

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

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

효소시료 조제 : 분리한 microsome과 mitochondria는 단백질량으로 3mg/ml가 되도록 0.25M sucrose액으로 현탁시켰으며 이 현탁액을 ultrasonic dismembrator(Fisher model 300)로 20±0.4k cycle/sec의 조건으로 2분씩 5회 10분간 초음파마쇄를 하여 이 액을 GST효소 시료로 사용하였으며 세포질분획은 아무 처치를 하지 않은 상태로 GST, GR

및 GSH-Px의 효소 시료로 사용하였다.

효소 활성도 측정 : 혈청, 세포질, microsome 및 mitochondria의 GST활성도 측정은 DNCB와 GSH를 기질로 하여 25℃에서 2분간 반응시키는 동안에 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자흡광계수( $E_{340nm}^{1cm} = 9.6mM^{-1}cm^{-1}$ )를 이용하여 효소활성을 산출하는 방법인 Habig 등(1974)의 법에 의하였다. 이 효소 활성의 단위는 1분간에 1mg의 단백 혹은 1ml의 혈청이 반응하여 생성한 conjugated DNCB를 nmole로 나타냈었다.

혈청 및 세포질 GR의 활성도 측정은 GSSG와 NADPH를 기질로 하여 37℃에서 2분간 반응시키는 동안에 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340 nm파장에서 흡광도를 측정하여 효소활성도를 산출하는 Goldberg와 Spooner(1983)방법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백 혹은 1ml의 혈청이 반응하여 산화된 NADPH를 pmole로 나타내었다.

세포질 GSH-Px의 활성도 측정은 GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 NADPH를 기질로 사용하고 GR를 촉매로 하여 GSH-Px 효소시료와 함께 25℃에서 5분간 반응시키는 동안에 GSH가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 GSSG로 산화되고 이것이 GR과 NADPH에 의해 GSH로 환원될 때 NADPH는 산화되며 이 NADPH가 NADP<sup>+</sup>로 산화되는 정도를 340nm파장에서 time scan을 하여 NADPH의 분자흡광계수( $E_{340nm}^{1cm} = 6.22mM^{-1}cm^{-1}$ )를 이용하여 효소의 활성도를 산출하는 방법인 Paglia와 Valentine(1967)의 법에 의하였다. 이 효소 활성도의 단위는 1분간에 1mg의 단백이 반응하여 산화된 HADPH를 nmol로 나타내었다.

이 실험에서 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 Sigma사의 정제된 효소를 사용하여 검증하였으며 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.

단백 정량 : 효소액 중의 단백질 정량은 0.5M-perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3 : 1)으로 단백을 정제하는 Greenberg와 Rothstein(1957)법으로 효소시료중의 단백을 정제한 다음 biuret법(Gornall과 Bardawill, 1949)으로 정량하였다.

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

Table 1. Effect of endotoxin on the hepatic glutathione-S-transferase(GST) activities in rats

Hours after endotoxin injection	GST activities (nmol conjugated dinitrochlorobenzene mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )					
	Cytosol		Microsome		Mitochondria	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
3	168.5±24.8 (100)	152.7±22.5 (91)	18.1±4.4 (100)	17.3±4.6 (96)	13.4±4.7 (100)	12.8±4.3 (96)
8	169.7±23.6 (100)	142.4±23.4* (84)	18.3±4.1 (100)	10.2±3.0*** (56)	13.8±4.5 (100)	13.6±4.1 (99)
24	170.3±24.2 (100)	144.6±25.1* (85)	18.6±4.5 (100)	12.2±3.1** (66)	13.5±4.2 (100)	13.3±4.6 (99)

The data 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 5mg of lipopolysaccharide (*E. coli* 026: B6 from Sigma Chemical Co. USA) was injected per kg body weight.

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

였다.

성 적

내독소 투여가 쥐간의 GST 활성도에 미치는 영향 :  
 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간의 GST 활성도 변동은 표1과 같다. 즉 내독소 투여군의 세포질 GST의 활성도는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 16% (P<0.05) 및 약 15% (P<0.05)의 유의있는 활성 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 microsomal GST의 활성도는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 44% (P<0.001) 및 약 34% (P<0.01)의 유의있는 활성 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial GST의 활성도는 실험 전 기간 유의있는 활성의 변동을 나타내지 않았다.

내독소 투여가 쥐간의 GR 활성도에 미치는 영향 :  
 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간의 GR 활성도 변동은 표2와 같다. 즉 내독소 투여군의 GR의 활성도는 내독소 투여 후 24시간에 대조군에 비해 약 16% (P<0.05)의 유의있는 활성감소를 나타내었다.

내독소 투여가 쥐간의 GSH-Px 활성도에 미치는 영향 :  
 체중 kg당 5mg의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간의 GSH-Px 활성도 변동은 표3과 같다. 즉 내독소 투여군의 GSH-Px의 활성도는 내독소 투여 후 8시간에 대조군에 비해 약 18% (P<0.05)의 유의있는

Table 2. Effect of endotoxin on the hepatic glutathione peroxidase(GSH-Px) activities in rats

Hours after endotoxin injection	GSH-Px activities (nmol NADPH oxidized mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	15.1±2.6 (100)	13.4±2.3 (89)
8	15.3±2.4 (100)	12.6±1.9* (82)
24	15.5±2.7 (100)	13.8±2.1 (89)

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

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

Table 3. Effect of endotoxin on the hepatic glutathione reductase(GR) activities in rats

Hours after endotoxin injection	GR activities (pmol NADPH oxidized mg protein <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	
	Control (%)	Endotoxin (%)
3	902±162 (100)	852±148 (94)
8	908±165 (100)	807±132 (89)
24	911±160 (100)	766±125* (84)

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

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

Table 4. Effect of endotoxine on the serum glutathione-S-transferase(GST) and glutathione reductase(GR) activities in rats

Hours after endotoxin injection	GST activities (nmol conjugated DNCB $ml^{-1} min^{-1}$ )		GR activities (pmol NADPH oxidized $ml^{-1} min^{-1}$ )	
	Control (%)	Endotoxin (%)	Control (%)	Endotoxin (%)
	3	39.8±22.3 (100)	39.4±24.1 (99)	64.2±10.2 (100)
8	40.3±23.6 (100)	67.2±27.4* (167)	65.3± 7.8 (100)	127.5±32.6**** (195)
24	40.7±22.6 (100)	70.3±25.4* (173)	66.0±10.5 (100)	111.4±26.2**** (169)

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

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

DNCB = dinitrochlorobenzene.

활성감소를 나타내었다.

내독소 투여가 혈청 GST 및 GR 활성도에 미치는 영향 : 체중  $kg$ 당  $5mg$ 의 내독소를 투여했을 때 흰쥐 간의 GST 및 GR 활성도 변동은 표 4 와 같다. 즉 내독소 투여군의 혈청 GST의 활성도는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 67% ( $P < 0.05$ ) 및 약 73% ( $P < 0.05$ )의 유의있는 활성증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 GR의 활성도는 내독소 투여 후 3시간, 8시간 및 24시간에 대조군에 비해 각각 약 62% ( $P < 0.001$ ), 약 95% ( $P < 0.001$ ) 및 약 69% ( $P < 0.001$ )의 유의있는 활성 증가를 나타내었다.

## 고 찰

내독소 혈중으로 인한 간 손상시에는 4-6시간 부터 간에는 괴사현성이 나타나며 8시간 후에는 괴사의 정도가 최고에 달하고 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 나타나는 것으로 알려져 있다.

내독소가 독성을 나타내는 것은 lipid A라는 지질을 함유하고 있기 때문이며 (Singleton과 Sainsbury, 1987) 이러한 내독소의 제거에 중요 역할을 하는 장기중

한가지가 간인 것(Trapani 등, 1962; Björneboe 등, 1972; Triger 등, 1972)이다.

GST는 친지질성 물질을 해독하는 해독효소일 뿐만 아니라 간에서 그 합성이 왕성하므로 내독소를 투여했을 때는 이를 해독하기 위해 간에서 GST의 활성도가 증가됨과 동시에 그 합성도 증가 되리라 생각했었다. 그러나 이 실험에서 간 mitochondrial GST의 활성도는 변동이 없었으며 간 세포질 및 microsome의 GST는 그 활성이 감소하였다. 그리고 혈중에서는 GST의 활성도가 증가되었다. 이와같이 GST가 세포질 및 microsome에서 그 활성도가 감소되고 동시에 혈중에서 그 활성도가 증가된 것은 내독소 투여로 간에서 괴사 및 소기관의 형태학적인 변화가 나타나는 것으로 미루어 볼 때 이 성적은 바로 간의 GST가 혈중으로 유출되는 것을 반영한 성적이라 할 수 있다. 또한 rough endoplasmic reticulum(microsome)이 단백 합성 장소이며 내독소 투여시 microsome에서 심한 형태학적인 변화가 일어난다는 보고(Rangel 등, 1970; Yoder 등, 1985; 김정희 등, 1987)와 내독소가 phosphoenol pyruvate carboxykinase, tryptophan oxygenase, monoamine oxidase, xanthine oxidase, carboxylesterase, arylesterase 및 cholinesterase에서 이들 효소의 합성을 감소시킨다는 보고(Berry 등, 1966; Berry와 Rippe, 1973; 곽춘식 등, 1991; 곽춘식 등, 1992)로 볼 때 microsome에서의 GST의 활성도 감소는 내독소에 의해 microsomeal GST의 합성이 감소된 때문이라 생각된다. 따라서 GST는 monoamine oxidase, xanthine oxidase(곽춘식 등, 1991), carboxylesterase,

arylesterase 및 cholinesterase(곽춘식 등, 1992)처럼 내독소 투여시 그 합성이 감소됨과 동시에 혈중으로 유출된다고 생각된다.

이 실험에서 mitochondrial GST의 활성도가 변동을 보이지 않은 것은 이 실험 만으로 그 이유를 분명히 설명하기는 어려우나 내독소 해독에는 mitochondrial GST가 관여 하지 않는 것으로 추측된다.

이 실험에서 간의 GSH-Px는 그 활성도가 감소하였는데 이 효소의 기능이 산화적 손상 방지에 관여하여 간을 보호하는 역할(Chow와 Tappel, 1972 및 1973; Player 등, 1977; Chance 등, 1979; Wendel, 1980)임을 볼 때 내독소 투여로 그 활성도가 감소된 것은 이 실험 만으로 명확히 설명하기는 어렵다.

GR는 간 손상시 혈중으로 유리되는 것(Manso와 Wröblewsky, 1958; Kerppopu 등, 1959; West 등, 1961; Taniguchi 등, 1974; Wakui 등, 1976; Tor 등, 1981)으로 알려져 있으며 이 실험에서도 간에서는 그 활성도가 감소되고 혈중에서는 그 활성도가 증가되는 점으로 보아 내독소 투여시에는 간에서 혈중으로 유출되는 것으로 생각된다. 또한 간 GR의 활성도 감소는 간 GST의 활성도가 감소되기 때문에 기질의 공급의 필요성 감소도 한가지 요인이라 생각된다.

이 실험과 같은 조건에서 해독 효소인 monoamine oxidase, xanthine oxidase, carboxylesterase, arylesterase, cholinesterase, GST, GSH-Px 등 간 해독 효소들이 모두 그 활성도가 감소 되었다. 이렇게 내독소 주입시 간에서 이들 glutathione 관련 해독 효소들을 포함한 기타 해독 효소들이 모두 활성의 감소를 나타냄으로써 간의 피사는 더욱 증폭된 것이라 추측되며 따라서 내독소 해독에는 간 해독 효소들이 거의 관여치 않는 것이 아닌가 생각된다. 그러나 이 실험만으로는 명확히 말할 수 없으며 앞으로 내독소 투여후 해독 효소들의 동태에 대한 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

### 요 약

내독소 투여 후의 간의 해독 능력을 파악하기 위한 일환으로 흰쥐에게 내독소를 투여하고 경시적으로 간의 세포질, mitochondria 및 microsome에서 해독 효소의 일종인 GST의 활성도를 측정하는 한편 간에서 해독 효소인 GSH-Px와 이들 효소의 기질 공급

효소인 GR의 활성 변동을 측정하였으며 아울러 혈청에서 GST 및 GR의 활성도도 함께 측정하였다.

내독소 투여군의 세포질 및 microsomal GST의 활성도는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 의의 있는 활성 감소를 나타내었다. 내독소 투여군의 mitochondrial GST의 활성도는 실험 전 기간 의의 있는 활성의 변동을 나타내지 않았다.

내독소 투여군의 GR의 활성도는 내독소 투여 후 24시간에 의의 있는 활성 감소를 나타내었다.

내독소 투여군의 GSH-Px의 활성도는 내독소 투여 후 8시간에 의의 있는 활성 감소를 나타내었다.

내독소 투여군의 혈청 GST의 활성도는 내독소 투여 후 8시간 및 24시간에 의의 있는 활성 증가를 나타내었다. 내독소 투여군의 혈청 GR의 활성도는 내독소 투여 후 3시간, 8시간 및 24시간에 의의 있는 활성 증가를 나타내었다.

이 실험 성적으로 보아 내독소 투여시에는 간 세포질 및 microsome의 GST와 간의 GR은 혈중으로 유출되며 microsome의 GST는 그 합성이 감소된다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

Adachi Y, Horii K, Suwa M, et al: Serum glutathione S-transferase in experimental liver damage in rats. *Gastroenterologia (Jpn)* 1981; 16: 129-133.

Bannikov GA, Tchipyseva TA: Ligandin in steroidogenically active cells of rat gonads. *Br J Cancer* 1978; 38: 350-354.

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.

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

Boivin A, Mesrobianu I, Mesrobianu L: Technique pour la preparation 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.

- Carlberg I, Mannervik B: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975; 250: 5475-5480.
- Casari M, Gabrielli GB, Dusi S, et al: Decreased activity of liver glutathione peroxidase in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 941-944.
- Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Chow CK, Tappel AL: Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone exposed rats. *Arch Environ Health* 1973; 26: 205-208.
- Chow CK, Tappel AL: An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids* 1972; 7: 518-524.
- Fine J, Palmerio C, Rutenburg S: New developments in the therapy of refractory traumatic shock. *Arch Surg* 1968; 96: 163-175.
- Friedberg T, Benthey P, Stasiecki P, et al: The identification, solubilization and characterization of microsme-associated glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 1968; 254: 12028-12033.
- Goldberg DM, Spooner RJ: Glutathione reductase, in, Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grafl M (eds), *Methods of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chemie GmbH 1983, Vol III, pp 258-264.
- Gornall AG, Bardawil CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reation. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-766.
- Grahn A, Sjöholm I: The preparation of ligandin with glutathione S-transferase activity from porcine liver cytosol by affinity chromatography on bromosulphophthalein sepharose. *Eur J Biochem* 1977; 80: 573-579.
- 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.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB: Glutathione S-transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Harisch G, Meyer W: Studies on tissue distribution of glutathione and on activities of glutathione related enzymes after carbon tetrachloride induced liver injury. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985; 47: 399-414.
- Hayes JD, Mantle TJ: Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues: Evidence for three immunochemical distinct groups of transferase in the rat. *Biochem J* 1986; 233: 779-788.
- Jakoby WB: The glutathione S-transferase: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol* 1978; 46: 383-414.
- Kerppola W, Nikkila EA, Pitlanen E: Serum TPN-linked enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitric dehydrogenase, and glutathion reductase activities in health and in various disease states. *Acta Med Scand* 1959; 164: 357-365.
- Kim BK: *Enzyme Nomenclature*. IUB New York, Academic Press, 1979, pp 92-93, 106-107 and 186-187.
- 김정희, 정재홍, 서인수 : 내독소 투여로 인한 급성 간 괴사의 초미형태학적 연구. 계명의대논문집 1987; 6: 177-202.
- Kitathara A, Yamaraky T, Ishikawa T, et al: Changes in activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn Cancer Res (Gann)* 1983; 74: 649-662.
- Kumata H, Wakui K, Suguki H, et al: Glutathione reductase activity in serum and liver tissue of human and rat with hepatic damage. *Tohoku J Exp Med* 1975; 116: 127-132.
- 곽춘식, 광정식 : 흰쥐 간세포분획법 I. Mitochondria 및 Microsome의 분리. 계명의대논문집 1986; 5: 45-53.
- 곽춘식, 문교철, 김상철 : 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Monoamine Oxidase 및 Xanthine Oxidase 활성 변동에 미치는 영향. 계명의대논문집 1991; 10: 335-344.
- 곽춘식, 문교철, 김상철 : 흰쥐에게 내독소의 비경구 투여가 혈청 및 간의 Carboxylesterase, Arylesterase 및 Cholinesterase 활성 변동에 미치는 영향. 계명의대논문집 1992; 11: 561-570.
- 권용철, 문교철, 곽춘식 : 흰쥐 담즙울체간의 Glutathione S-Transferase, Glutathione Reductase 및 Glutathione Peroxidase의 활성치. 계명의대논문집 1990; 9: 159-170.
- Laderizt O, Staub AM, Westphal O: Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and

- related enterobacteriaceae. *Bacteriol Rev* 1966; 30: 192-255.
- Lee CYG, Mckinney JD: Identity of microsomal glutathione S-transferase. *Mole Cell Biochem* 1982; 48: 91-96.
- Manso C, Wröblewsky F: Glutathione reductase activity in blood and body fluids. *J Clin Invest* 1958; 37: 214-218.
- Mehlert A, Metcalfe RA, Diplock AT, et al: Glutathione peroxidase deficiency in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1982; 65: 376-378.
- Moron HS, Depierre JW, Mannervik B: Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim Biophys Acta* 1979; 582: 67-78.
- Mukhtar H, Bend JR: Serum glutathione S-transferase: Perinatal development, sex difference and effect of carbon tetrachloride administration on enzyme activity in the rat. *Life Sci* 1977; 21: 1277-1285.
- Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K: Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1974; 358: 251-261.
- Necheles TF, Boles TA, Allen DM: Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant. *J Pediatr* 1968; 72: 319-324.
- Ohmi N, Arias IM: Ligandinemia in primary liver cancer in rat and man. *Hepatology* 1981; 1: 316-318.
- 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.
- Paglia ED, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
- 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.
- Peskin AV, Koen YM, Zbarsky IB: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in tumors. *FEBS Lett* 1978; 1: 41-45.
- Pierce A, Tappel L: Glutathione peroxidase activities from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1978; 523: 27-36.
- Player TJ, Mills DL, Horton AA: Age dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 78: 1397-1402.
- Rangel DM, Byfield JE, Adomian GE, et al: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* 1970; 68: 503-511.
- Rossen RD, Wolff SM, Butler WT: The antibody response in nasal washings and serum to *S. typhosa* 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 Exp Biol Med* 1967; 125: 455-459.
- Ryle CM, Mantle TJ: Studies on the glutathione S-transferase activity associated with rat liver mitochondria. *Biochem J* 1984; 222: 553-556.
- 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 euglobin from postheparin to lipoprotein lipase. *J Immunol* 1967b; 98: 482-489.
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss GS, et al: Effect of endotoxin on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171: 875-882.
- Sherman M, Campbell JAH, Titmuss SA, et al: Glutathione S-transferase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1983; 3: 170-176.
- Sigleton P, Sainsbury D: *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, ed 2. Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, A Wiley-Interscience Publication, 1987, pp 506-507.
- Steiner G, Menzel H, Lombeck I, et al: Plasma glutathione peroxidase after selenium supplementation in patients with reduced selenium state. *Eur J Pediatr* 1982; 138: 138-140.
- Stults FH, Forstorm JW, Chiu DTY, et al: Rat liver glutathione peroxidase purification and study of multiple forms. *Arch Biochem Biophys* 1977; 183: 490-497.
- Taniguchi N, Tsukada Y, Hirai H: Acquisition of



- fetal properties in hepatoma on glutathione metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1974; 354: 161-167.
- Tor J, Pascual C, Segura RM, et al: Glucose phosphate isomerase and glutathione reductase in benign and malignant extrahepatic cholestasis. *Clin Chem* 1981; 27: 634-635.
- 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.
- Trip JAJ, Van Dam J, Tepper T, et al: A simple procedure for the purification of porcine ligandine(Y-protein). *FEBS Lett* 1974; 45: 6-10.
- Tsuru M, Kamisaka K, Hirano M, et al: Quantification of human serum ligandin by radioimmuno assay. *Clin Chim Acta* 1978; 84: 251-253.
- Wahländer A, Soboll S, Sies H: Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH S-transferase. *FEBS Lett* 1979; 97: 138-140.
- Wakui K, Kumata H, Tadaki H, et al: Clinical significance of serum glutathione reductase, in various clinical conditions, especially in liver diseases. *Tohoku J Exp Med* 1976; 118: 17-24.
- Wendel A: Glutathione peroxidase, in Jakoby WN (ed), *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York, Academic Press, 1980, Vol 1, pp 333-348.
- West M, Berger C, Rony H, Zimmerman D: Serum enzymes in disease VI, Glutathione reductase in sera of normal subjects and of patients with various disease. *J Lab Clin Med* 1961; 57: 946-954.
- 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.
- 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 Glutathione S-Transferase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activities in Rats**

**Chun Sik Kwak, PhD; Kyo Cheol Mun, MD\*\*; Sang Chual Kim, MS\*\***

*Department of Biochemistry, Keimyung University, School of Medicine, and Micorobiology Division, Kyông Sang Buk-Do, Provincial Government, Institute of Health and Environment\*\*, Taegu, Korea*

The activities of the cytosolic, microsomal and mitochondrial glutathione S-transferase(GST) which are detoxifying enzymes in the liver were measured in order to evaluate the detoxifying ability of the liver to endotoxin. The activities of glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase(GR) in the liver, GST and GR in the serum were also measured.

For administration of endotoxin, a dose of 5mg of endotoxin (lipopolysaccharide E, coli O26: 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 microsomal GST in the liver showed a significant decrease between 8 and 24 hours after endotoxin administration, but that of the mitochondria showed no significant changes throughout the experiment. The activity of the GR in the liver showed a significant decrease at 24 hours after endotoxin administration. The activity of the GSH-Px in the liver showed a significant decrease at 8 hours after endotoxin administration. Serum GST and GR activities showed a significant increase between 8 and 24 hours and between 3 and 24 hours after endotoxin administration respectively. According to the results, cytosolic GST, microsomal GST and hepatic GR leak into the blood through the damaged membrane of hepatocyte. And it is suggested that the synthesis of the microsomal GST in the liver is decreased.

**Key Words:** Endotoxin, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glutathione S-transferase