

食餌性 蛋白質含量에 따른 흰쥐에 四塩化炭素 投與가
Guanase 活性變動에 미치는 影響

姜 會 洋

啓明大學校 自然科學大學 公衆保健學科

Effect of Carbon Tetrachloride on the Changes of Guanase Activity
in Rats Fed Low or High Proteins Diet

Hoe Yang Kang

*Dept. of Public Health, College of Natural
Science, Keimyung University*

Abstract

The effect of hepatic injury produced by CCl_4 was studied on rats receiving a low protein-high carbohydrate (7% casein), standard protein (20% casein) and a high protein diet (30% casein). The rats fed low protein diet are resistant to CCl_4 in its effects on the liver as judged by histology, serum enzymes (guanase, ALT) and the content of hepatic protein. On the other hand, the pretreatment of hydrocortisone before injection of CCl_4 to the rats fed a standard diet, slightly decreased both serum ALT and guanase activities. In the pretreatment of actinomycin D, the liver and serum guanase activities were significantly decreased. It indicates that the cause of increasing serum guanase is based on the alteration of membrane permeability and the result of accelerated enzyme synthesis in liver cells of CCl_4 intoxicated rats.

I. 緒 論

Guanase (guanine aminotransferase, EC 3.5.4.3)는 生體에서 主로 purine 體 代謝產

物인 guanine 을 脫 amino 化시켜 xanthine 을 生成하는데 關與하는 酵素로서 哺乳動物의 肝臟, 腎臟 및 腦等 여러 組織에 널리 分布되어 있으며 特히 肝에서 他 組織에 比해서 그 活性이 높다고 한다.^{1,2)}

※ 이 論文은 1987 年度 文教部 學術研究助成費에 依하여 研究되었음.

肝疾患의 血清에서 guanase 活性이 增加됨이 많은 研究者들^{1,3-5)}에 依하여 報告되어 왔으며, 또한 實驗動物에 四鹽化炭素(CCl₄)에 依한 肝損傷時 血清中 guanase 活性이 增加됨이 報告되었다.⁶⁻⁸⁾

姜⁶⁾ 등은 實驗動物에 長期間 經시적으로 CCl₄를 반복 투여한 다음 여러 단계의 肝損傷을 유도한 후 血清 및 肝組織中 guanase 活性과 肝損傷時 그 活性增加 原因 機轉이 알려져 있는 alanine aminotransferase(ALT) 活性과 肝組織中 lipid peroxide를 測定하여 상호 비교 관찰하므로써 肝損傷時 血清 guanase 活性增加의 原因機轉이 guanase 酵素合成誘導 및 細胞膜 투과성 증가에 기인 한다는 가설을 제시할 뿐 확실한 기전규명에 대해서는 아직 不分明하다.

한편 生體에 毒物物質 및 藥物投與와 營養과 相互關係에 대하여 많은 관심의 대상이 되어왔다.

특히 實驗動物의 食餌中 蛋白質 含量과 CCl₄의 毒性和의 相關 關係가 있다는 報告가 있는 바⁹⁻¹¹⁾ 蛋白質 食餌條件을 달리하여 成長시킨 實驗動物에 CCl₄ 投與로 肝損傷에 미치는 영향을 검토함은 營養과 毒性學的 側面에서 相當한 意義를 가질 것으로 生覺된다.

또한 蛋白質食餌條件을 달리하여 成長시킨 實驗動物에 CCl₄ 投與로 肝損傷의 모델을 만든 후 肝 및 血清中 guanase 活性變動을 관찰함은 肝損傷時 血清中 guanase 活性의 變動에 대한 原因機轉에 대한 검토의 수단도 될 수 있으리라 생각된다.

이에 著者는 肝損傷時 血清 guanase 活性의 增加原因 機轉을 규명 하고자 흰쥐를 實驗動物로 하여 casein을 7%, 10% 및 20%를 含有시킨 食餌로 成長시킨 후 CCl₄ 投與時 肝損傷의 程度를 肝臟 무게 變動 및 病理組織 檢査로 확인함과 동시에 血清 및 肝組織中 guanase 活性變動과 肝損傷時 肝細胞膜의 투과성

增加로 多量 血中으로 流出 된다는 ALT 活性變動^{12,13)}을 本 酵素와 比較 관찰하였다. 그리고 標準 蛋白質食餌로 成長한 흰쥐에 CCl₄와 actinomycin D 또는 hydrocortisone을 施行하여 投與한 후 이들 酵素活性을 肝 및 血清中에서 測定하여 그 結果를 相互 比較 檢討하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗動物의 飼育

本 實驗動物은 體重이 120g 內外가 되는 外見上 健康한 흰쥐(Sprague Dawley) 숫컷 24마리를 구입하여 標準食餌로 3日間 適應시킨 뒤 飼料成分表(Table 1)에 依하여 各 14마리씩을 低蛋白質食餌群(LP; casein 7%), 標準蛋白質食餌群(SP; casein 20%) 및 高蛋白質食餌群(HP; casein 30%)으로 區分하여 約 1個月 飼育한 후 3群 各各 7마리씩을 50% CCl₄ (v/v. in olive oil) 0.13ml를 1日 간격으로 2回 皮下에 注射하였으며 對照群은 olive oil만 上記와 같이 投與하였다. 處置는 마지막 投與後 2時間 後에 하였다.

2. Actinomycin D 投與

本 實驗群은 다음과 같이 4群으로 分類하였으며 各 實驗群들 中 실험종료 前 죽은 動物을 감안하였으며 최종 6마리로 하여 실시하였다.

- 1) 對照群
- 2) CCl₄ 投與群
- 3) Actinomycin D와 CCl₄를 並行하여 投與한 群
- 4) Actinomycin D만 投與한 群

CCl₄ 投與는 CCl₄와 olive oil의 同量 混合液을 體重 100g 當 0.1ml를 복강내에 注射한 후 18시간째에 다시 投與하고 1日 後에 處置하였다.

Table 1. Composition of experimental(g/kg diet).

Ingredients	Low protein	Standard protein	High proten
Casein	70	200	300
Corn starch	804.36	674.36	574.36
Corn oil	54.8	54.8	54.8
Vitamin A and D mixture (a)	10.2	10.2	10.2
Vitamin B and K mixture (b)	2	2	2
Water souble vitamin mixture (c)	3	3	3
Vitamin B ₁₂ (d)	1	1	1
Salt mixture (e)	40	40	40
α -Cellulose	20	20	40

- a) Vitamin A & D mixture : 51,000 unit of A and 51,000 unit of D dissolved in 100 ml of cornoil.
- b) Vitamin E & K mixture : 5g of α -tocopherol and 0.2g of meandion dissolved in 200ml of corn oil.
- c) Water soluble vitamin mixture : contained(mg) ; cholin chlin chloride 2000, thiamin hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca - panthothenate 100, biotin 0.05, folic acid 4, inositol 500, p-aminobenzoic acid 100.
- d) Vitamin B₁₂ : 5mg of vitamin B₁₂ dissolved in 500ml of distilled water.
- e) Salt mixture : contained(g) ; CaCO₃ 300, potassium phosphate dibasic 322.5, MgSo₄ 102, Ca -phoshate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molbdic acid 0.2

Actinomycin D投與는 CCl₄ 만을 投與한 同一 實驗條件에 並行하여 實施하였으며 Acin-omycin D 50 μ g 을 大腿外側 筋肉에 注射하였다.^{14, 15)}

3. Hydrocortisone 의 投與

實驗動物의 各群은 6 마리씩으로 하여 다음과 같이 나누었다.

1) 對照群

2) CCl₄ 投與群

3) CCl₄ 와 hydrocortisone 을 병행하여 投與한 群

4) hydrocrtisone 만 投與한 群

Hydrocortisone 投與는 CCl₄ 投與 한시간 前에 2 와 同一한 時間條件에서 體重 100g 當 0.75 mg 을 投與하였다.¹⁶⁾

4. 實驗動物의 處置

各 實驗動物의 處置는 酵素 活性의 日中 變動을 考慮하여 쥐를 一定한 時間에 處置할 수 있도록 處置時間을 調節하였으며 12 時間 絶食시킨 後 弱한 ether 麻醉下에서 腹部 正中線을 따라 開腹한 다음 腹部 大動脈에서 血液을 採取하였다. 採血 直後에 4℃의 0.25M Sucrose 液으로 肝臟을 貫流하여 肝臟內에 남아 있는 血液을 除去한 다음 摘出하였다. 摘出した 肝은 生理食鹽水로 臟器表面에 붙은 血液을 가뭇게 씻은 後 濾紙上에서 肝臟內에 남아있는 生理食鹽水を 可能한 모두 除去한 다음 그 一部를 10% formalin에 固定시켜 組織 病理 檢査에 使用하였다.

한편 採血한 血液은 遠心分離하여 血清을 얻

고 肝臟과 더불어 化學檢査에 提供하였다.

5. 肝臟 酵素液의 調製

肝組織은 2~4℃에서 절편으로 만들고 그 중 一定量을 取하여 4倍量의 氷冷의 0.25M sucrose 液을 넣어 teflon glass homogenizer 로 磨碎하여 肝 均質液(20w/v%)을 만들었다. 이 均質液을 700×g에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 다음 그 上層液을 15,000×g에서 20分間 遠心分離하였다. 이때 얻은 可用法 分劃 一定量을 투석막에 넣어 20倍量의 4℃ 0.25M sucrose 液 중에서 magnetic stirrer 로 저으면서 12時間 투석시킨 것을 guanase 活性測定에 使用하였다.

6. Guanase 活性度 測定

肝 및 血清 guanase 의 活性測定은 guanine 을 基質로 하여 37℃에서 20分間 反應시켜 生成된 NH₃ 를 phenol 試液과 alkaline-hypochloride 를 加하여 發生된 靑色調를 比色定量하는 caraway 方法¹⁷⁾에 準하여 實施하였다. 이때 反應液은 400 μM guanine, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.0) 및 酵素液 0.05ml 含有시켜 最終 反應液을 1ml로 하였다.

酵素의 活性 單位는 肝組織에서는 酵素液에 含有된 蛋白 1mg이 1分동안에 反應하여 基質로 부터 生成된 NH₃ 를 n mole 濃度로, 血清에 있어서는 NH₃ 量을 血清 1當 μ mole 로 表示하였다.

7. ALT의 活性度 測定

肝 및 血清 ALT의 活性 測定은 L-alanine 과 α-Ketoglutaric acid 를 基質로 하여 37℃에서 30分間 反應시키는 동안 生成되는 pyruvic acid가 alkali法 下에서 2,4-dinitrophenylhydrazine 과 作用하여 生成되는

色調를 比較 定量하는 Reitman-Frankel 方法¹⁸⁾으로 測定하였다.

그리고 ALT 活性의 單位는 肝組織에서는 protein mg 當, 血清에서는 血清 ml 當 I Karmen Unit로 表示하였다.

8. 蛋白質의 定量

肝組織 中の 蛋白質 定量은 Lowry 等¹⁹⁾에 準해 bovine serum albumin 을 標準品으로 하여 實施하였다.

9. 肝組織의 病理組織學的 檢査

10% formaline 에 固定된 組織片을 paraffin으로 包埋하여 5~6 μ의 두께로 薄切하고 hematoxylin-eosin 染色을 하여 檢鏡²⁰⁾하였다.

얻어진 各種 成績들의 平均値中 相互比較가 必要한 境遇는 student t-檢定法에 依하여 檢定하였다.

III. 實驗結果

1. 成長期間동안 體重의 變動

casein 으로 食餌를 調節하여 低蛋白(casein 7%), 標準蛋白(casein 20%) 및 高蛋白(casein 30%) 食餌條件으로 1個月間 成長하는 동안 體重增加率에 있어서 SP群은 처음 體重的 約 2.5倍, HP群도 2.5倍로 두群 사이에는 別다른 差異를 볼 수 없었다.

LP群은 처음 體重的 約 1.6倍로 SP群 및 HP群보다 體重 增加率이 約 31% 낮게 나타남을 알 수 있었다(Fig.1).

2. CCl₄ 投與에 따른 最終 肝 무게 變動 및 病理組織學的 所見

體重當 肝 무게의 百分率은 LP群, SP群 및 HP群 사이에는 別다른 差를 볼 수 없었으며 CCl₄ 投與로 인한 體重當 肝 무게 變動率에 있

어서는 LP群은 約 47%($P < 0.001$), SP群과 HP群은 두群 共히 約 58%의 有意한 增加를 보였다($P < 0.001$).

CCl₄로 인한 肝 무게 增加率は LP群이 SP群과 HP群보다 낮게 나타났으며 SP群과 HP群間에 類似한 增加率이 나타나는 樣狀을 보였다(Table 2).

한편 病理組織學的 觀察對象으로 삼는 것은 肝 실질 즉 小葉에서 肝組織의 損傷에 관한 것이었으며 肝細胞의 脂肪變性, 壞死, 纖維化 및 梗塞이었다.

olive oil만 投與한 各群에 해당하는 對照群의 肝은 대체적으로 小葉의 크기와 모양이 一定하였으며 肝細胞의 損傷이 없었고 個體間에는 약간의 輕程度의 脂肪變性이 있을 뿐 異狀所見은 없었다(Fig. 2-A, Table 3).

各群의 CCl₄로 인한 肝組織의 病理組織學的 所見에 있어서 LP群은 肝小葉의 中心帶에 脂肪變성과 壞死細胞가 산재해 있으며 심한 纖維化도 나타났었다.(Fig. 2-D, F, Table 3).

SP群과 HP群도 CCl₄ 投與로 因하여 두群 모두 肝小葉의 中心帶 및 中間帶에 脂肪이 浸

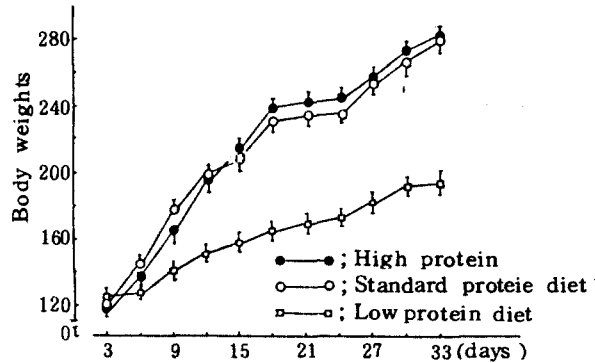


Fig. 1. One month weight gain in rats fed a low, standard or high protein diet. Each value indicates the mean \pm SE of twelve rats.

着되어 심한 脂肪變性이 惹起되었고 肝小葉 中心帶의 中心靜脈의 주위에 細胞의 壞死가 심하게 나타났으며(Fig. 2-E, Table 3), SP群에 있어서는 섬유화도 隨伴되었다(Fig. 2-B, C, Table 3).

3. 肝組織 細胞性 蛋白質 含量 變動

肝組織 1g當 蛋白質 含量은 LP群이 SP群

Table 2. Effects of dietary protein and intradermal injection of CCl₄ on the weight of livers in rats

parameters Groups	CCl ₄	Number of rats	Liver weight	% of liver weight
				Body weight
Low protein diet	-	5	4.46 \pm 0.54	2.69 \pm 0.06
	+	7	* 6.79 \pm 0.70	*** 3.96 \pm 0.15
Standard protein diet	-	5	6.79 \pm 0.57	2.74 \pm 0.09
	+	7	** 10.56 \pm 0.78	*** 4.34 \pm 0.25
High protein diet	-	7	7.13 \pm 0.17	2.77 \pm 0.064
	+	7	*** 10.57 \pm 0.25	*** 4.38 \pm 0.09

Values are mean \pm SE of the number described as above.

- * : Significant difference from its control group ($P < 0.05$)
- ** : // ($P < 0.01$)
- *** : // ($P < 0.001$)

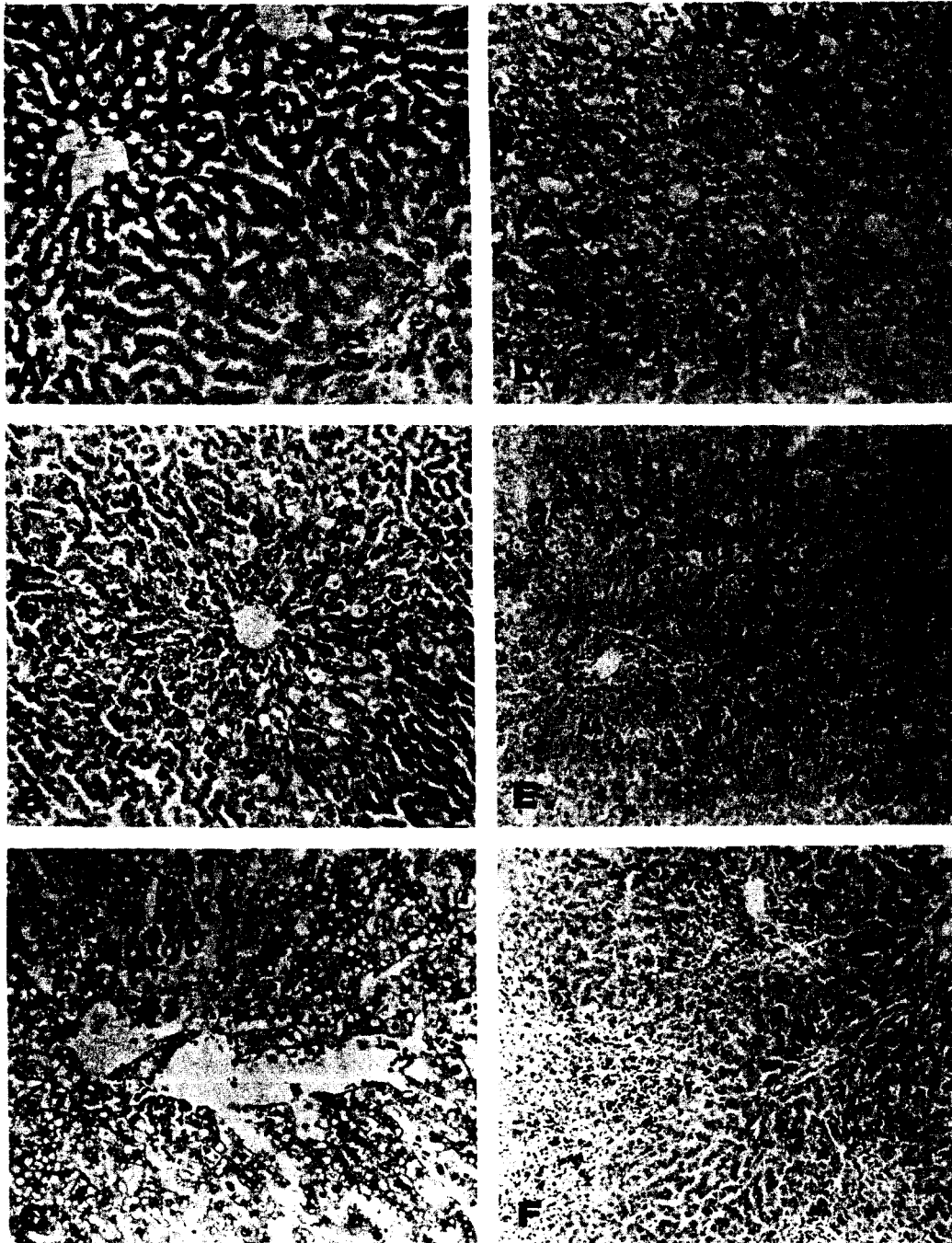


Fig. 2. A. Light micrograph of rat liver, control group(L -C). Hepatic cell cords are regularly arranged. There is no fatty change or fibrosis . H & E stain, $\times 200$.
B. Rat liver, L-T. Moderate fatty change is demonstrated around central vein.

- H & E, × 100.
- C. Rat liver, S-T. Severe fatty change appears around central vein. H & E, × 200.
- D. Rat liver, L-T. Focal necrosis with infiltration of neutrophils is present. H & E, × 400.
- E. Rat liver, H-T. Zonal necrosis around central veins is characteristic. H & E, × 100.
- F. Rat liver, L-T. Fibrosis with inflammatory infiltration is noted in portal areas. H & E, × 100.
- Remark : L-C : The rat fed a low protein diet.
 L-C : The CCl₄ intoxicated rat fed a low protein diet.
 S-T : The CCl₄ intoxicated rat fed a standard protein diet.
 H-T : The CCl₄ intoxicated rat fed a high protein diet.

Table 3. Microscopic finding of rat liver treated with CCl₄

Group		Findings					
		LC	LT	SC	ST	HC	HT
Fatty change	mild	+(2/5)	—	+(1/5)	—	±(4/7)	—
	moderate	—	+(2/7)	—	+(2/7)	—	+(1/7)
	severe	—	+(6/7)	—	+(5/7)	—	+(6/7)
Necrosis	random	—	+(1/7)	—	+(5/7)	—	+(5/7)
	zonal	—	+(5/7)	—	+(4/7)	—	+(4/7)
Fibrosis		—	—	—	+(5/7)	—	+(3/7)
Cirrhosis		—	—	—	—	—	—

(remark) :

Fatty change : mild ; Fatty hepatocytes randomly distributed in central zone of the hepatic lobules.

moderate ; Zonal fatty changes limited in central zone of the hepatic lobules.

severe ; Zonal fatty changes limited! both in central and mid zone of the hepatic lobules

+(*) ; Number of positive/that of used for examination

LC ; The rats fed low protein diet. LT ; The CCl₄ intoxicated rats fed low protein diet

SC ; The rats fed standard protein diet. ST ; The CCl₄ intoxicated rats fed standard protein diet.

HC ; The rats fed high protein diet. HT ; The CCl₄ intoxicated rats fed high protein diet.

보다 14%, HP 群보다는 16% 감소하였으며 HP 群과 SP 群間에는 별다른 차이를 볼 수 없었다.

CCl₄ 投與로 인한 肝組織 蛋白質 含量은 各

各의 對照群에 比하여 LP 群은 7%, SP 群은

27%, HP 群 約 20%, 감소하였으며 SP 群 및 HP 群이 LP 群보다 肝組織 蛋白質 含量은

이 크게 나타남을 알 수 있었다(Table 4).

Table 4. Effect of dietary protein on the activities of guanase and ALT in serum or livers by the acute intoxication of CCl₄.

Groups	Experiments	Number of rats	Hepatic contents of protein	Guanase activities		ALT activities	
				Serum	Liver	Serum	Liver
Low protein diet (7% casein)	Control	5	128.80 ± 9.37	22.66 ± 0.19	5.19 ± 0.19	27.66 ± 0.52	256.50 ± 8.00
	CCl ₄	7	119.68 ± 2.72	47.78 ± 4.54	8.30 ± 0.30	259.62 ± 16.2	250 ± 11.00
Standard protein diet (20% casein)	Control	5	150.10 ± 5.5	14.1 ± 0.71	6.0 ± 0.42	25.60 ± 0.70	350 ± 25
	CCl ₄	7	110.20 ± 3.7	75.64 ± 2.28	7.50 ± 0.50	1560 ± 200	236 ± 13.3
High protein diet (30% casein)	Control	5	154.11 ± 11.7	13.91 ± 2.33	6.20 ± 0.40	26.06 ± 0.85	461.95 ± 31.3
	CCl ₄	7	125.71 ± 5.2	78.07 ± 5.2	7.50 ± 0.58	1876.35 ± 352	350.95 ± 35.7
Unit			mg/g. wt Liver	μ mole NH ₃ form- ed/min/l of serum	n mole NH ₃ /onin /mg of pr- otein	Reitman - Frankel unit	Reitman - Frankel unit/mg protein

*; Significant difference from its control group (p < 0.05)

** ; // (p < 0.01)

***; // (p < 0.001)

4. 肝組織 및 血清 ALT 활성變動

CCl₄ 投與로 인한 血清 ALT 활성變動은 LP 群이 約 9.4 倍, SP 群은 61 倍, HP 群은 72 倍로 增加 되었으며 그 增加率은 SP 群과 HP 群은 LP 群보다 各各 6.5 倍, 7.6 倍로 증가됨을 알 수 있었다.

肝組織中 ALP 活性變動은 對照群에 比하여 各各 LP 群은 約 2.5 %, SP 群은 33 %, HP 群은 24 %로 各各 감소되었었다. SP 群 및 HP 群이 LP 群보다 CCl₄ 投與로 인한 그 活性의 감소율이 현저히 높게 나타남을 알 수 있었다(Table 4).

5. 肝組織 및 血清 guanase 活性變動

CCl₄ 投與에 따른 血清 guanase 活性變動은 各 群의 對照群에 比하여 LP 群은 約 2.1

倍, SP 群은 約 5.4 倍, HP 群은 約 5.6 倍의 현저한 增加(P < 0.001)를 보였으며 各 群間的 增加率은 HP 群 및 SP 群은 LP 群보다 約 2.6 倍의 增加를 보였음을 알 수 있었다.

한편 CCl₄ 投與에 의한 肝 guanase 活性變動은 LP 群은 約 60 % (P < 0.001) SP 群은 約 25 %, HP 群은 20 % (P < 0.05)의 增加를 보였으며 그 增加率은 LP 群이 他 群보다 높은 增加率을 보였으며 HP 群과 SP 群間에는 別 다른 差를 볼 수 없었다(Table 4).

6. CCl₄ 와 actinomycin D 投與를 並行할 때 肝組織과 血清中 guanase 및 ALT의 活性變動.

흰쥐에 CCl₄ 와 actinomycin D를 並行하여 投與한 다음 血清과 肝組織中的 guanase 活性

變動을 관찰한 성적은 Fig. 3 과 같다.

actinomycin D와 CCl₄를 병행하여 投與한 群에 있어서 血清 guanase 活性은 CCl₄ 만을 投與한 群에 比하여 約 21% 감소 되었다. 또한 肝 guanase는 actinomycin D와 CCl₄를 병행해서 投與한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 約 10% 감소되는 경향을 보였다.

한편 血清 ALT 活性은 actinomycin D와 CCl₄를 병행해서 투여한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 오히려 約 34% 增加되었으며 肝 組織中 ALT 活性도 역시 actinomycin D와 CCl₄를 並行하여 投與한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 約 25% 增加되었다(Fig. 4).

7. Hydrocortisone 전처리한 후 CCl₄ 投與했을 때 血清 및 肝組織中 ALT 및 guanase 活性 變動

권위에 hydrocortisone 과 CCl₄의 投與를

並行했을 때 血清과 肝의 guanase 活性 變動은 Fig. 5 와 같다.

血清 guanase 活性 變動은 hydrocortisone 을 전처리한 후 CCl₄를 投與한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 約 21% 감소 되었으며 肝 組織中 guanase 活性에 있어서는 hydrocortisone 과 CCl₄를 並行하여 投與한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 약간 감소되는 경향을 보였으나 두 群間에는 有意한 差를 볼 수 없었다.

한편 實驗動物에 hydrocortisone 과 CCl₄의 投與를 병행했을 때 血清과 肝의 ALT 活性 變動은 Fig. 6 과 같다. 즉 血清 ALT 活性은 hydrocortisone 을 전처리한 후 CCl₄를 投與한 群에서 CCl₄ 만을 投與한 群에 比하여 約 29%의 감소를 보였으며 肝 ALT 活性 變動은 CCl₄와 hydrocortisone 을 병행하여 투여한 群이 CCl₄ 만을 投與한 群보다 약간 增加되는 경향을 보였다(Fig. 6).

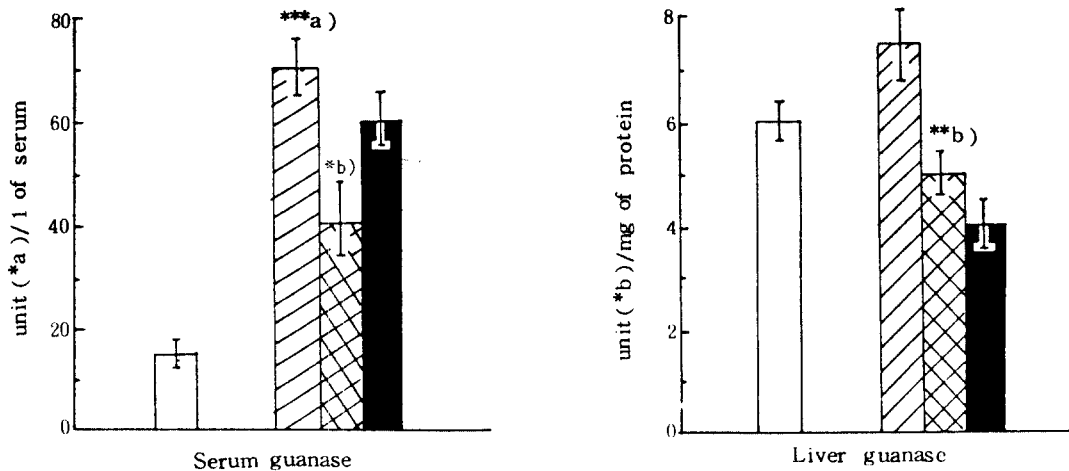


Fig. 3. Effect of actinomycin D on the serum and liver guanase activity in CCl₄ intoxicated rats. The vertical bars are expressed as the mean \pm SE with 6 rats in each groups. unit (*a); μ mole NH₃ formed/min, unit (*b); n mole NH₃ formed/min, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, a); significantly different from the control group, b); significantly different from the CCl₄ treated group. □; Control, ▨; CCl₄, ▩; CCl₄ + Actinomycin D, ■; Actinomycin D.

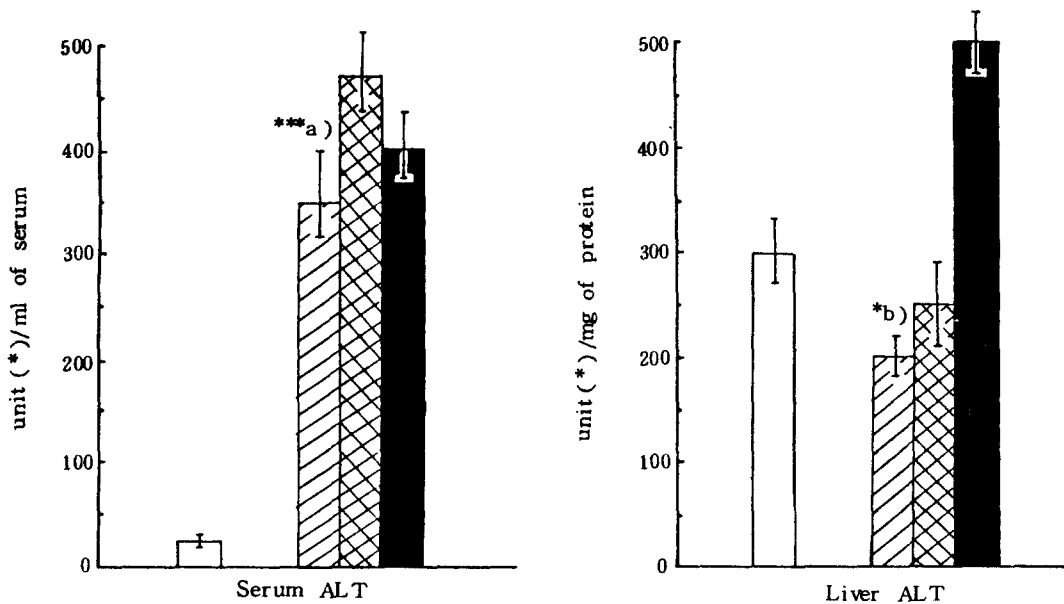


Fig 4. Effect of actinomycin D on the serum and liver alanine aminotransferase (ALT) activity in CCl₄ treated rats.

The vertical bars are expressed as mean \pm SE with 6 rats in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, a), b); significantly different from the control group, unit (*); Karmen unit, \square ; Control, diagonal lines ; CCl₄, cross-hatch ; CCl₄ + Actinomycin D, solid black ; Actinomycin D.

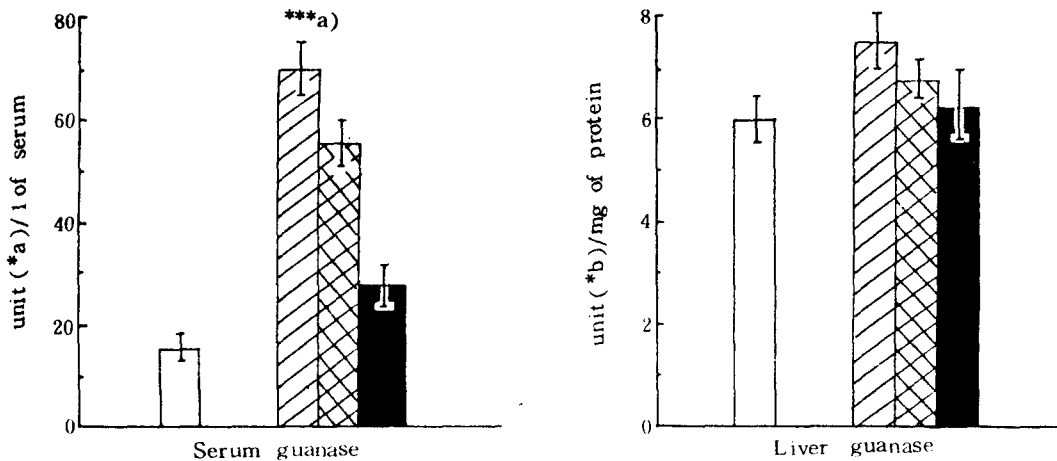


Fig. 5. Effect of hydrocortisone administration on the serum and liver guanase activity in CCl₄ treated rats.

The vertical bars are expressed as mean \pm SE with 6 animals in each group, unit (*a); μ mole NH₃ formed/min, unit (*b); n mole NH₃ formed/min, ***; $p < 0.001$, a); significantly different from the control group, \square ; Control, diagonal lines ; CCl₄, cross-hatch ; CCl₄ + Hydrocortisone, solid black ; Hydrocortisone.

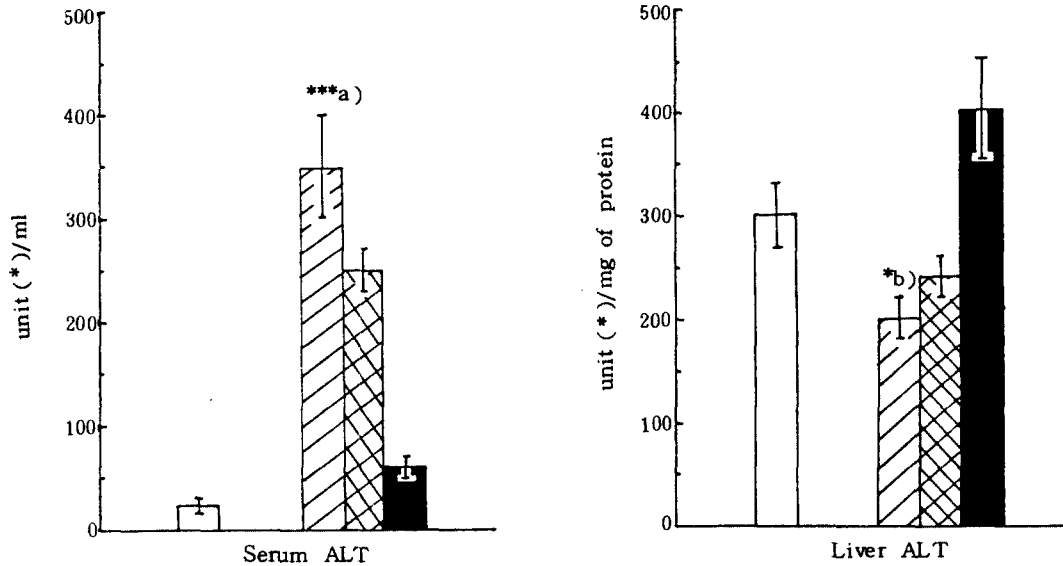


Fig. 6. Effect of hydrocortisone on the serum and liver alanine aminotransferase (ALT) activity in CCl₄ treated rats.

The vertical bars are expressed as mean \pm SE with 6 animals in each group. *; $p < 0.05$, ***; $p < 0.001$, a), b); significantly different from the control group. unit(*); Karmen unit, ; control, ; CCl₄, ; CCl₄ + Hydrocortisone, ; Cortisone, .

IV. 考 察

本實驗에서 casein을 7%(LP群), 20%(SP群) 및 30%(HP群) 含有시킨 食餌로 흰 쥐를 成長시키는 동안 體重增加率이 LP群이 SP群 및 HP群에 比하여 현저히 增加되었으며 SP群과 HP群間에는 별다른 차이가 없었다.

이 실험적은 많은 研究者들의 實驗結果²¹⁻²³⁾와 일치하였다.

또한 이러한 단백질이 조건에서 成長한 實驗動物에 CCl₄ 投與에 의한 體重 100g當 肝 무게 증가율에 있어서 LP群이 SP群과 HP群보다 低下되었으며, SP群과 HP群間에는 별다

른 차이를 볼 수 없었다. 그리고 병리조직검사 소견에서는 SP群과 HP群 共히 간세포의 壞死 정도가 LP群보다 심하게 나타났다. 따라서 低蛋白 食餌條件으로 成長한 흰쥐가 CCl₄에 對한 肝損傷이 적게 나타남을 肝組織의 형태학적 측면에서 확인할 수 있었다. 한편 本實驗條件에서 肝細胞의 壞死가 심하게 나타나는 急性 肝損傷時 肝損傷의 指標로서 肝機能檢査로 많이 利用되는 血清 ALT活性도 역시 HP群 및 SP群이 LP群보다 현저히 높았다. 이 성적은 Weatherholtz等⁹⁾ 및 Mclean等¹¹⁾의 성적과 유사하였다. 그러므로 低蛋白 食餌條件으로 成長한 實驗動物에 있어서 CCl₄에 對한 肝損傷이 高蛋白 食餌群보다 적게 나타남을 확인할 수 있었다. CCl₄에 의한 肝細胞의 損傷機

轉은 肝細胞의 SER에 存在하는 脂溶性 藥物 代謝에 關여하는 複合산화기구에 의하여 CCl_4 가 free radical ($\cdot CCl_3$)로 변하며 이것이 ER 및 細胞膜의 過酸化에 기인한다고 한다.²⁴⁻²⁸⁾

Weatherholtz 등⁹⁾ 및 Webb 등¹¹⁾은 食餌에 蛋白質 含量을 감소시켜 成長시킨 實驗動物에 heptochlor를 投與하면 高蛋白食餌群에 比하여 그 毒性이 감소 한다고 하였으며, Mclean 등¹¹⁾은 低蛋白食餌條件은 CCl_4 로 부터 free radical ($\cdot CCl_3$)生成을 감소시킨다고 報告하였다. 이와같이 高蛋白食餌群이 低蛋白食餌群보다 CCl_4 에 對한 組織細胞損傷이 심하게 나타나는 것은 free radical의 生成率 差異 때문이며 이때 肝損傷은 free radical에 의한 세포막손상에 연유된 바, 高蛋白食餌群이 低蛋白食餌群보다 free radical 生成률이 크기 때문임을 알 수 있다.

本 實驗에서 CCl_4 투여에 의한 肝組織中 guanase 活性 增加率은 LP群이 SP群 및 HP群보다 높게 나타나는 반면 血清中 guanase 活性의 增加率은 LP群이 SP群 및 HP群보다 低下되었다. 이러한 點으로 보아, CCl_4 에 의한 血清 guanase 活性 增加 原因은 肝損傷時 細胞膜 透過性 抗進에 기인함을 암시해 주고 있다.

姜等⁹⁾의 報告에 依하면 肝損傷의 程度(脂肪 變性, 壞死, 硬變)에 따라서 血清 guanase 活性이 달리 나타났으며 이때 肝細胞의 壞死가 심한 時期에 本 酵素의 活性이 가장 높게 나타남을 관찰 하였으며, 또한 肝細胞의 심한 壞死時에 세포막의 투과성 抗進이 수반 된다는 사실을 감안할 때 간 손상시 血清 guanase 活性 增加 原因은 손상된 세포막의 투과성 항진 때문일 것으로 일단 생각된다. 더우기 本 實驗에서 生體膜 安定劑인 glucocorticoid 系의 hydrocortisone^{29,30)}을 CCl_4 와 병행하여 投與한 후 本 酵素의 活性을 測定했을 때 CCl_4 投與에 의하여 증가된 血清 guanase 活性이 감

소 되었으며 이러한 實驗結果는 本 實驗과 同一한 條件에서 관찰한 血清 ALT의 變動과 類似한 樣相을 보였다. 이 結果를 보아 CCl_4 에 의한 肝損傷時 血清中 guanase 活性 增加 原因은 細胞膜 透過性 抗進에 起因된 것으로 생각 된다.

그러나 本 實驗條件에서 肝組織中 本 酵素와 ALT의 變動을 비교 관찰해 볼 때 대체적으로 肝 guanase는 CCl_4 投與로 인하여 대체적으로 그 活性이 增加하는데 반하여 肝損傷時 細胞膜 透過性 抗進으로 血清中 活性이 높게 나타난다는 ALT^{12,13)}는 肝組織中에서 그 活性이 감소되었다.

따라서 肝組織에서의 ALT와 guanase의 活性 變動 양상이 달리 나타남을 알 수 있다. 이러한 點으로 보아 肝損傷時 血清 guanase의 活性 增加 原因은 細胞膜 透過性 以外도 本 酵素의 合成 增加에 기인되는 것으로도 생각되며 또한 hydrocortisone을 전처리 한후 CCl_4 를 투여한 다음 간장중의 guanase 活性 變動은 CCl_4 에 의하여 증가된 효소의 活性이 hydrocortisone을 전처리 하였을 때 약간 감소되는 경향을 보였다. 그러나 本 실험조건에서 肝 ALT의 活性은 이와 달리 CCl_4 에 의하여 약간 감소되던 것이 hydrocortisone을 전처리하므로 增加되는 경향을 보였다. 따라서 세포막 투과성이외도 다른 요인이 關여하고 있음을 또 한번 암시해 주고 있다. 血清 guanase의 活性 增加 原因이 酵素 蛋白質 合成 增加에 일어나는지를 규명할 目的으로 m-RNA의 合成을 억제하여 단백질합성을 저해 한다고 알려져 있는 actinomycin D³¹⁾를 投與한 후 血清 및 肝中の guanase와 ALT 活性 變動을 비교 검토하였다.

血清 및 肝組織中 guanase는 CCl_4 에 의하여 증가된 그 活性이 actinomycin D 전처리로 감소되는 경향을 보였다. 반면 本 實驗條件에서 actinomycin D와 CCl_4 를 병행하여 투여할시 血清 및 肝組織中 ALT는 CCl_4 만 투

여한 群에 비하여 그 活性이 감소하였다. 이러한 實驗結果를 보아 血中의 guanase 活性 增加原因은 세포막 투과성 이외도 肝細胞에서 guanase 의 合成이 유도되어 증가된 분 효소가 血中으로 漏出될 것으로 생각된다. 이것은 肝 guanase 의 合成이 현저히 증가될 것이 심한 肝壞로 因하여 血中으로 多量 漏出되었기 때문에 血清guanase 活性이 현저히 증가된 것으로 생각된다.

V. 結 論

食餌性 蛋白質이 肝損傷에 미치는 영향과 아울러 肝損傷時 血清 guanase 活性이 增加機轉을 규명하는 일환으로 흰쥐를 7% casein 을 함유시킨 食餌條件으로 成長시킨 것을 低蛋白質食餌群(LP), 20% casein 을 標準蛋白質食餌群(SP), 30% casein 을 함유시킨 것을 高蛋白質食餌群(HP)으로 하여 1個月間 사육시킨 후 體重 100 g當 50% CCl₄ 의 0.13ml 를 1日 1回씩 2日동안 皮下로 注射하여 肝損傷을 야기시킨 후 病理組織檢査를 통하여 肝損傷 程度를 확인하였다. 동시에 간 및 혈청중 guanase 및 alanine aminotransferase (ALT) 活性을 測定하여 상호비교 검토 하였다. 또한 肝 및 血清中의 guanase 와 ALT 酵素 活性에 미치는 hydrocortisone 과 actinomycin D의 效果를 檢討하였다.

1. 病理檢査所見은 CCl₄ 投與時 高蛋白質 및 標準蛋白質食餌群이 低蛋白質食餌群보다 肝壞死가 심하게 나타났다.

2. CCl₄ 投與로 因한 肝細胞의 단백질 합량 감소율은 低蛋白質食餌群이 표준 및 高蛋白質食餌群보다 低下되었다.

3. CCl₄ 투여 후 標準 및 高蛋白質食餌群에서 血清 ALT, guanase 活性의 增加率은 저단백식이군보다 현저히 높았으며 肝組織中 guanase 活性은 대체적으로 增加되었으나, ALT

活性은 감소되었다.

이때 CCl₄ 投與로 因한 肝ALT 活性의 감소율에 있어서는 標準 및 高蛋白質食餌群이 低蛋白質食餌群보다 有意하게 높았으나 guanase 는 低蛋白質食餌群이 標準 및 高蛋白質食餌群보다 그 活性增加率이 높았다.

4. Hydrocortisone 을 전처리하고 CCl₄ 를 투여하였을때 血清 guanase 의 活性은 감소되는 경향을 보였으나 肝 guanase 活性은 別다른 변동이 없었다.

5. Actinomycin D와 CCl₄ 는 병행하여 投與한 實驗群에서는 肝 및 血清 guanase 活性은 CCl₄ 만 投與한 群에 비하여 감소되는 경향을 보였다.

以上 成績을 綜合하여 볼때 肝損傷時 血清中 guanase 의 活性增加는 肝細胞에서 酵素合成 增加와 細胞膜 透過性 抗進에 기인한 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. Fox, I.H.: Degradation of purine nucleotide. *Hand B. Exp. pharm.*, 51:93, 1978.
2. Whitehouse, J.L., Santos, C.L., and Knights, E.M.: Serum Guanase as a liver function test. *Prov. Hosp. Med. Bull.*, 1:23, 1964.
3. Coodley, E.L.: Enzyme diagnosis in hepatic disease. *Amer. J. Gastroenterol.*, 56: 413, 1971.
4. Mandel, E.E., Macalincag, L.R.: Evaluation of serum guanase in clinical diagnosis. *Amer. J. Gastroenterol.*, 54:253, 1970.
5. Bergmeyer, H.U: *Methods of enzymatic analysis* 2nd ed. p. 1086, Academic Press, Inc. New York and London, 1974.
6. 강희양, 윤중국: 사업 화탄소에 의한 간 손상시 Guanase 활성변동, 한국환경위생학회

- 지, 12(1) 25, 1986.
7. Hue. A.C. & Free, AH.: An improved method for the determination of guanase in serum or plasma. *Clin. Chem.*, 11:708, 1975.
 8. Prokopowicz, D., Miegoc, H., Jarocki, F. and Wasilewski, J.: Serum guanase activity in rabbits during toxic liver damage. *Z. Versuchstierk.*, 22:211, 1980.
 9. Weatherholtz, W.M., Campbell, T.C., Webb, R.E.: Effect of dietary protein levels on the toxicity and metabolism of heptachlor. *J. nutr.* 98:90, 1969.
 10. Weatherholtz, W.M., Webb, R.E.: Influence of dietary protein on the activity of microsomal epoxidase in the growing rat. *J. Nutr.* 101:9, 1971.
 11. Mclean, A.E.M., Mclean, E.K.: The effect of diet nd 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis-(p-chlorophenyl) ethane(DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem. J.* 100:564, 1966.
 12. Linds, S.: A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extraction in cardiac and hepatic disease. *Scnad. J. Clin. Lab. Invest.*, 10: 303, 1958.
 13. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inove, H.: The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, 239:3590, 1964.
 14. Row, P.B. and Wyngaarden, J.B.: The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J. Biol Chem.*, 241(23):5571, 1966.
 15. Righetti, A.B.B. and Kaplan, M.M.: Effects of actinomycin D on the liver alkaline phosphatase. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 136:491, 1971.
 16. 조윤성, 강영자 : 항염 및 해열 효과에 미치는 Ibuprofen 과 Prednisolone 의 약상호 작용, *약학회지*, 25(3) : 109, 1981.
 17. Caraway, W.T.: Colorimetric determination of serum guanase activity. *Clin. Chem.*, 12:187, 1966.
 18. Reitman. S. and Frankel, S.: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.*, 28:56, 1957.
 19. Lowry. O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall. R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
 20. Ambrogi, L.P.: Manual of histologic and special staining technics, Armed Forces institute of Pathology Washington. D.C., 1957.
 21. Muramatsu, K., and K. Ashida.: Effect of dietary protein levels on growth and liver enzyme activities of rats., *J. Nutr.*, 76:143, 1962.
 22. Pond, W.G., Yen, J.T. and Lindvall, R.L.: Early protein deficiency: Effects on later growth and carcass composition of lean or obese swine., *J. Nutr.* 110:2506, 1980.
 23. 강희양, 윤종국 : 저단백식으로 성장한 흰 쥐에 알환의 급성 투여가 고노산혈증에 미치는 영향, *대한보건협회지*, 12(2) : 81, 1986.
 24. Recknagel, R.O. and Ghoshal, A.K.: Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.*, 15:

- 132, 1966.
25. Recknagel, R.O., and Lombardi, B.: Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to new hypothesis regarding pathogenesis of carbon tetrachloride fat accumulation. *J. Biol. Chem.*, 236:564, 1961.
26. Hasegawa, T., Ogata, M. and Tomokuni, K.: Effect of carbon tetrachloride induced soluble protein of microsomal NADPH oxidase activity of rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 31(17): 2837, 1982.
27. Recknagel, R.O.: A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Science* 33(5):401, 1983.
28. Tresces, A., Iskric, S., Hrsak, I. and Tomasic, J.: Formation of electrophilic chlorine from carbon tetrachloride-involvement of cytochrome p-450. *Biochem. Pharmacol.*, 32(15):2357, 1983.
29. Yue, T.L. and Varma, D.R.: Influence of protein deficiency on lysosomal stabilizing and paw edema suppressant activity of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents in rats. *J. Pharmacol. Experiment. Therap.*, 217(3):776, 1981.
30. Bowman, W.C. and Raud, M.J.: Text book of pharmacology, 2nd 3d. pp. 12. 40, 13.17 and 19.42, Blackwell scientific publications, Oxford London, 1980.
31. Gilman, A.G., Goodman L.S. and Gilman, A.: The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed. pp. 1290-1291, Macmillan publishing Co., N.Y., 1980.