

## 반추동물 적혈구막 단백질 전기영동법에 의한 분석

— 낮은 적혈구침강속도와와의 관계 —

이 방 환 · 박 영 우\*

전남대학교 수의과대학

광주보건전문대학 임상병리과\*

(1989. 7. 20 접수)

### Electrophoretic analysis of the major proteins of ruminant erythrocyte membrane: Their relation to slow erythrocyte sedimentation rate

Bang-whan Lee, Young-woo Bahk\*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

Department of Clinical Pathology, Kwangju Health Junior College\*

(Received July 20, 1989)

**Abstract:** The proteins of the ruminant erythrocyte membranes were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate, and their relations to the slow erythrocyte sedimentation rate (ESR) of the ruminants were investigated by treating the erythrocytes with proteinases such as trypsin, chymotrypsin and pronase, and glycosidases such as neuraminidase and galactosidase.

Protein content in the erythrocyte membrane was  $2.85 \pm 0.28$  in human,  $3.60 \pm 0.41$  in Korean cattle,  $3.71 \pm 0.36$  in Holstein,  $4.13 \pm 0.83$  in Korean native goat and  $3.94 \pm 0.56$  mg/ml in sheep, showing higher in ruminant animals than in human ( $p < 0.01$ ).

Although the general protein profiles of the ruminant erythrocyte membranes were almost similar to that of human, all the ruminant erythrocyte membranes showed one additional protein band, called band-Q in the previous report on proteins of bovine erythrocyte membrane, which migrated electrophoretically to the mid position between band-2 and band-3 in human erythrocyte membranes.

The glycoprotein profiles of ruminant erythrocyte membranes revealed by periodic acid Schiff (PAS) stain showed a marked difference from that of human. The PAS-1 (glycophorin) and PAS-2 (sialoglycoprotein) present in human erythrocyte membranes were almost absent from the ruminant animals. Instead, a strong PAS-positive band near the origin of the electrophorograms, which was named as PAS-B in the previous report on proteins of bovine erythrocyte membranes, was shown in the ruminant animals except sheep. In addition, the erythrocyte membranes of Korean native goat and sheep showed a moderate PAS-negative band near the tracking dye of the electrophorograms, which was named as PAS-G in this study.

In the erythrocyte treated with the enzymes, the migration of each protein fracture of ery-

이 논문은 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

thocyte membranes in response to each enzyme was diverse according to different species or breed of ruminant animals. Among others, band-Q present in ruminants was slightly or moderately decreased by trypsin-, chymotrypsin-, and pronase- treatments of the erythrocytes, but not only in sheep. It was particularly noticeable that PAS-B, a fraction of glycoprotein, present in ruminants except sheep, was better digested by proteinases than by glycosidases, showing remarkable increase ( $p < 0.01$ ) of the ESR in accord with complete digestion (disappearance) of the PAS-B band by pronase, trypsin or chymotrypsin treatment of erythrocytes. In sheep, there was almost no any response to the various enzymes in general protein and glycoprotein profiles of the erythrocyte membranes except PAS-G, which was markedly decreased by pronase treatment of the erythrocytes. Nevertheless, the ESRs were accelerated in erythrocytes treated with pronase, trypsin, chymotrypsin and neuraminidase.

Erythrocyte osmotic fragility was increased in erythrocytes treated with only pronase among five enzymes in all the human and ruminant animals used in this study.

**Key words:** proteins of erythrocyte membrane, electrophoretic analysis, erythrocyte sedimentation rate (ESR), proteolytic enzymes, ruminant animals.

## 서 론

적혈구침강속도(ESR)의 측정은 비특이적인 것이기는 하지만 아직도 각종 질병의 진단 및 예후판정을 위한 보조진단법으로서 사람이나 가축에서 가치 있게 이용되고 있으나, 유독 buffalo를 제외한 반추동물에서는 적혈구의 연진(rouleau) 형성(RF)이 잘 되지 않으므로 ESR이 극히 저조하여 수의임상에서 전혀 이용되지 못하고 있는 실정이다.<sup>1,2</sup> 동물종 간의 RF의 소인은 주로 적혈구막의 구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 이미 잘 알려져 있다.<sup>3,4</sup>

즉, Fahraeus<sup>4</sup>는 혈장 점도, 혈구나 혈장의 비중, 혈구의 크기 등에 의한 침강속도에 미치는 영향은 미약하고 바로 적혈구 연진형성 또는 응집이 침강속도에 미치는 가장 중요한 요인이라고 하였으며, Fegler<sup>3</sup>는 ESR이 상당히 빠른 말의 적혈구를 ESR이 극히 느린 소와 면양의 혈장에 섞어도 빠른침강 속도를 나타내고, 반대로 소나 면양의 적혈구를 말의 혈장에 넣어도 느린 침강속도를 보였다. 이는 동물종 간의 ESR을 좌우하는 주가 된 소인이 적혈구 자체에 있다는 것을 시사한 것이며, 특히 적혈구 연진형성 또는 응집형성이 ESR을 촉진시키는 점임을 고려해 볼때 동물종간 적혈구막의 성상의 차이가 곧 종간의 ESR의 차이를 야기시킨다고 설명될 수 있다.

반추동물에서 ESR의 임상적 응용이 요구됨에 따라 저자들은 이전에 45°경사 micro-ESR 측정법을 제창한 바 있고<sup>5,6</sup> 이어서 소(한우와 젖소)에서 ESR의 낮은 원인을 밝혀보려고 소의 적혈구막 단백질의 분석연구를

실시하여 그 결과도 이미 보고한 바 있다.<sup>7</sup>

이것을 기초로 하여 더 나아가 반추동물 전반에 걸쳐 ESR이 낮은 이유를 밝혀보려고 한우, 젖소, 산양, 면양의 적혈구막 단백질의 분석과 동시에 적혈구를 효소 처리하여 이에 대응하는 ESR 및 적혈구취약성의 동태를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물:** 한우는 무안의 유당목장에서, Holstein 젖소는 광주시 근교의 개인목장에서, 면양(Corriedale)은 전남대 사육장에서, 한국재배 산양은 화순의 개인목장에서 외관상 뚜렷한 임상증상이 없는 1세 이상의 동물을 무작위로 선정하여 그 혈액을 사용하였고, 사람의 경우에는 건강한 성인의 혈액을 사용하였다.

**시약:** Polyacrylamide gel 전기영동시약으로서 acrylamide, N, N'-methylene-bis-acrylamide(BIS), N, N', N', N'-tetramethylethylene diamine(TEMED), ammonium persulfate 등은 모두 Bio-Rad사 제품을, bovine serum albumin(BSA)과 tris(hydroxymethyl) amino-methane(Tris), trypsin(type III),  $\alpha$ -chymotrypsin(type II), pronase E(type XIV), neuraminidase(type V), heparin(grade II), basic fuchsin 등은 Sigma Chemical사의 것을,  $\beta$ -galactosidase(5531 LA)는 BRL사의 것을, sodium dodecyl sulfate(SDS), Coomassie brilliant blue R-250, acetic acid는 일본의 화광약품사 제품을 사용하였다. 증류수는 금속이온을 제거하기 위해 Barnstead사의 NANOpure cartridge system에 통과시켜서 전기 저항이 18 megaohm-cm가 되는 것을 사용

하였다.

**채혈** : 사람에서는 주정중피정맥(median cubital vein)에서, 소, 양에서는 경정맥에서 1회용 주사기로 무균적으로 약 30ml의 혈액을 채혈하여 heparin (100IU/ml)으로 항응혈 처리하고 주사기에 든 그대로 운반하여 1시간 이내에 실험에 사용하였다.

**적혈구의 분리** : Heparin 처리 혈액을 박과 이 등<sup>7</sup>이 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 4°C에서 1000×g로 5분간 원심하여 혈장과 연층(buffy coat)을 제거하였다. 침전된 적혈구를 4°C pH 8.0의 0.15M NaCl-5mM sodium phosphate buffer(PBS)용액에 부유시켜 가볍게 교반, 세척하고 위와 같이 원심하여 상층액을 버렸다. 이와 같은 조작을 상층액이 맑아질 때까지 3회 이상 반복하고 매 원심시 마다 상층액과 연층을 제거하여 백혈구의 혼입을 방지하였다.

**적혈구막의 분리** : 적혈구막은 Fairbanks 등<sup>8</sup>, Schrier<sup>9</sup> 및 박과 이 등<sup>7</sup>이 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 세척된 적혈구에 20배 용량의 5mM sodium phosphate buffer(pH8.0)를 가하여 용혈시키면서 가볍게 교반한 다음 원심하여 적혈구막을 침전 분리시켰다. 상층액을 제거하여 얻은 적혈구막이 회백색을 띠 때까지 적어도 4회 이상 시행하였으며, 매 시행시 마다 하층에 있는 흰 gelatin성 침전물도 제거하였다.

**적혈구막 단백질량 측정** : 적혈구막의 단백질량은 Lowry 등<sup>10</sup>의 folin phenol방법으로 측정하였으며, BSA를 표준단백으로 삼았다.

**적혈구의 효소처리** : 적혈구의 효소처리에 사용된 효소는 proteinases로는 trypsin, chymotrypsin 및 pronase이고, glycosidases로는 neuraminidase 및 galactosidase 등이다. 적혈구의 효소처리는 일률적으로 Carraway<sup>11</sup>가 기술한 방법에 따랐다. 즉, 잘 세척된 적혈구 1ml를 2.9ml의 PBS(pH 8.0)액에 부유시키고, 여기

에 효소 0.5mg/ml를 가하여 37°C에 1시간 부치하였다. 효소 처리후 0.05mg/ml의 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 가하여 효소작용을 정지시켰다. 그 후, 즉시 적혈구를 PBS액으로 세척한 다음 이로부터 앞에서 기술한 방법으로 적혈구막(ghost)을 분리하였다.

**ESR의 측정** : 전기한 효소처리 적혈구(원심 침전층) 3용량과 자가혈장 7용량을 혼합하여 capillary hematocrit치가 일률적으로 30ml/100ml가 되도록 조정된 혈액에 대한 ESR을 측정하였다. ESR 측정 방법은 내경 1.1~1.2mm, 길이 7.5cm의 nonheparinized capillary hematocrit tube(W. Germany)를 이용하여 사람 혈액에서는 측정관을 수직으로 한 ESR/hr(90°-micro-ESR/hr)을, 그리고 나머지 4종의 반추동물의 혈액에서는 측정관을 45° 경사로 한 ESR(45°-micro-ESR/hr)을 측정하여 각 동물별로 각 효소처리가 ESR에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

**취약성 검사** : 적혈구 취약검사는 NaCl 수용액을 이용한 삼투성 취약검사법에 준하여 spectronic spectrophotometer로 540nm 파장에서 측정하여 % hemolysis를 구하였다. 정상 적혈구에 있어서 용혈개시(최소 저항)의 NaCl액의 농도는 사람에서 0.44%, 소에서 0.59%, 산양에서 0.66%, 면양에서 0.56%로 알려져 있다.<sup>12</sup> 이 실험에서는 정상 용혈개시의 농도보다 높은 등장액에 가까운 농도에서 용혈 발생 여부를 관찰해야 하므로 사람에서는 0.85%와 0.6%, 한우와 Holstein 유우에서는 0.85%와 0.7%, 산양과 면양에서는 0.85%와 0.8%의 NaCl 수용액에서 적혈구 취약검사를 실시하여 그 % hemolysis를 각 효소처리 적혈구별로 비교 평가하였다.

**SDS-PAGE** : 적혈구막 단백질의 전기영동은 Laemmli 방법<sup>13</sup>으로 시행하였다. acrylamide 농도는 8%로,

**Table 1.** Comparison of protein content of erythrocyte membrane between human and ruminant

	Protein content (mg/ml) of erythrocyte membrane				
	Human	Korean cattle	Holstein	Goat	Sheep
No. of animal	8	8	8	8	8
Range	2.3~3.1	3.0~4.0	3.2~4.2	2.8~4.9	3.4~5.2
Mean±SD	2.85±0.28	3.60±0.41**	3.71±0.36**	4.13±0.83**	3.94±0.56**
Statistic analysis	n			n <sub>2</sub> =35	
	F	n <sub>1</sub> =4			
	P			6.98	
	LSD	0.53(t0.05)		<0.01	
		0.71(t0.01)			

\*\* : Highly significant increase in contrast with human (p<0.01).

acrylamide와 BIS와의 농도비는 37.5:1로 하였다. 적혈구막을 10% SDS 함유-시료혼합액에 넣어 37°C에 1시간 부치하여 녹인 다음 gel tube(내경 5mm, 길이 11cm)당 80 $\mu$ g 단백질을 부가하여 tube당 3mA(12 tube에 30mA)로 하여 전기영동하였으며 영동조의 온도는 냉각수를 순환시켜 15°C로 조절하였다. 영동후 gel 상에서 분리된 단백질은 Coomassie blue로, 당단백 분획은 periodic acid-Schiff(PAS) 시약으로 각각 염색하고, 이들 분획의 흡광도를 0.05mm slit를 통해 각각

550nm와 560nm에서 Gilford gel scanner로 측정, 자동기록 하였다.

## 결 과

**적혈구막 단백질 함량의 비교**: 사람과 반추동물의 적혈구막 단백질 함량은 Table 1에 표시된 바와 같이 사람에 비하여 반추동물에서 상당히 높았다( $p < 0.01$ ).

**적혈구의 효소처리에 의한 ESR의 변동**: 5종의 효소로 적혈구를 처리한 혈액군 간의 ESR의 비교는 동물

**Table 2.** Comparison of erythrocyte sedimentation rate in relation to erythrocytes treated with enzymes, such as proteinases and glycosidases, in human and ruminant animals

Species	No. of blood samples	ESR/hr(%) in blood with erythrocytes treated by						Statistic analysis LSD(t0.05) ~ (t0.01)
		Control	Trypsin	Chymo-trypsin	Pronase	Neuraminidase	Galactosidase	
Human (90 $\mu$ -micro-ESR)	8	24 $\pm$ 13.5	50 $\pm$ 12.5**	44 $\pm$ 12.0**	48 $\pm$ 12.3**	41 $\pm$ 13.5**	25 $\pm$ 17.8	9.6~12.8
Korean native cattle (45-micro-ESR)	8	22 $\pm$ 4.4	22 $\pm$ 6.4	18 $\pm$ 1.6	45 $\pm$ 12.6**	18 $\pm$ 2.8	19 $\pm$ 2.9	4.5~ 6.0
Holstein (45-micro-ESR)	8	18 $\pm$ 4.6	47 $\pm$ 23.6**	19 $\pm$ 6.0	47 $\pm$ 14.5**	20 $\pm$ 7.1	17 $\pm$ 4.7	8.7~11.7
Korean native goat (45-micro-ESR)	8	16 $\pm$ 26.8	41 $\pm$ 19.9**	45 $\pm$ 12.8**	62 $\pm$ 21.4**	20 $\pm$ 22.4	18 $\pm$ 18.6	10.8~14.5
Sheep (45-micro-ESR)	8	23 $\pm$ 5.3	53 $\pm$ 9.0**	55 $\pm$ 5.0**	45 $\pm$ 12.4**	40 $\pm$ 12.0**	17 $\pm$ 1.6	6.1~ 8.1

\*\* : Highly significant increase in contrast with the control ( $p < 0.01$ ).

**Table 3.** Comparison of osmotic fragility of erythrocytes treated with the various enzymes in human and ruminant animals

Species	NaCl sol (%)	No. of blood samples	% hemolysis of erythrocytes treated with						Statistic analysis LSD(t0.05) ~ (t0.01)
			Control	Trypsin	Chymo-trypsin	Pronase	Neuraminidase	Galactosidase	
Human	0.85	8	1 $\pm$ 1.2	0 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 1.1	2 $\pm$ 1.9	1 $\pm$ 1.5	2 $\pm$ 2.9	1.7~ 2.3
	0.60		3 $\pm$ 1.9	2 $\pm$ 2.0	11 $\pm$ 17.1	14 $\pm$ 16.5*	4 $\pm$ 3.4	7 $\pm$ 5.1	10.2~13.6
Korean native cattle	0.85	7	2 $\pm$ 3.0	1 $\pm$ 2.2	0 $\pm$ 0.7	11 $\pm$ 7.4**	1 $\pm$ 1.6	0 $\pm$ 0.7	3.8~ 5.1
	0.70		21 $\pm$ 24.2	20 $\pm$ 22.2	24 $\pm$ 28.7	55 $\pm$ 27.2**	12 $\pm$ 16.1	9 $\pm$ 13.0	22.7~30.5
Holstein	0.85	6	5 $\pm$ 6.3	4 $\pm$ 7.6	8 $\pm$ 14.2	19 $\pm$ 19.3*	3 $\pm$ 6.7	1 $\pm$ 1.1	12.7~17.1
	0.70		37 $\pm$ 35.1	35 $\pm$ 34.2	30 $\pm$ 33.0	50 $\pm$ 28.1	30 $\pm$ 29.0	14 $\pm$ 10.8	34.3~46.2
Korean native goat	0.85	8	23 $\pm$ 20.3	27 $\pm$ 25.8	32 $\pm$ 26.6	67 $\pm$ 15.3**	21 $\pm$ 22.9	19 $\pm$ 20.7	22.5~30.1
	0.80		45 $\pm$ 21.8	50 $\pm$ 25.1	54 $\pm$ 25.9	81 $\pm$ 6.3**	46 $\pm$ 19.4	50 $\pm$ 26.0	22.8~29.5
Sheep	0.85	8	20 $\pm$ 17.8	18 $\pm$ 12.2	16 $\pm$ 13.8	57 $\pm$ 29.6**	14 $\pm$ 12.3	14 $\pm$ 11.6	17.6~23.5
	0.80		33 $\pm$ 23.4	31 $\pm$ 19.8	34 $\pm$ 27.6	75 $\pm$ 24.6**	26 $\pm$ 21.0	29 $\pm$ 20.4	23.2~31.0

\* : Significant increase in contrast with the control ( $p < 0.05$ ).

\*\* : Highly significant increase in contrast with the control ( $p < 0.01$ ).

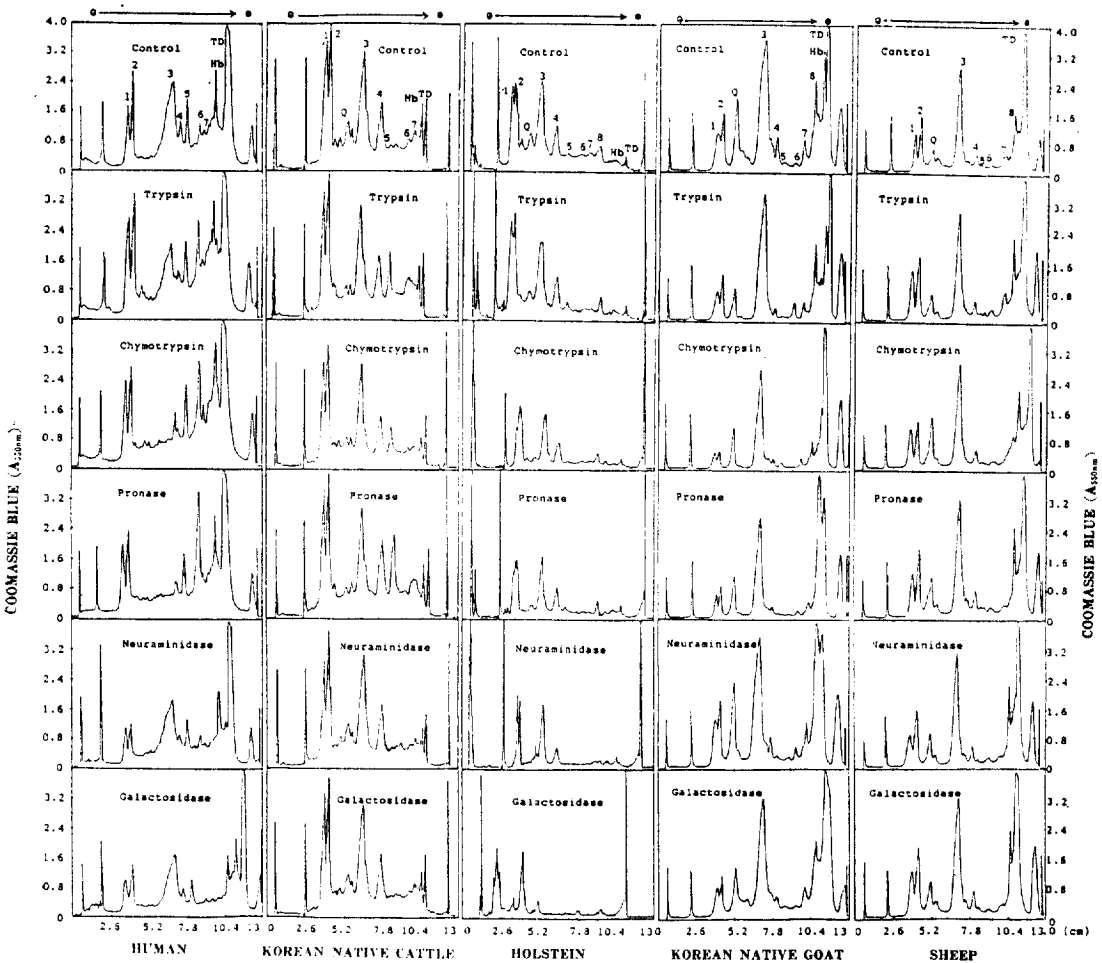
별로 Table 2에 총괄하였다. 이 표에서 보는 바와 같이 5종의 효소중 pronase로 처리한 적혈구에서는 사람과 4종의 반추동물의 모두에서 대조(비처리)에 비하여 ESR의 현저한 증가( $p < 0.01$ )를 일으켰다. 그러나, 적혈구의 trypsin 처리에 있어서는 사람, Holstein 유우, 산양 및 면양에서 만이 ESR의 현저한 증가( $p < 0.01$ )를 보였고, chymotrypsin 처리에 있어서는 사람, 산양 및 면양에서 만이, 그리고 neuraminidase 처리에 있어서는 사람과 면양에서 만이 현저한 증가( $p < 0.01$ )를 보였으며, galactosidase 처리에 있어서는 사람이나 모든 반추동물에서 대조에 비하여 ESR의 유의차가 인정되지 않았다. 동일한 우종이면서 trypsin 처리 적혈구에서 Holstein 품종에서는 ESR의 현저한 증가를 보였으나 한우에서는 증가하지 않는 점이 주목되었다.

**적혈구의 효소처리에 의한 취약성의 변동: 5종의 효**

소로 각각 적혈구를 처리했을때 그 적혈구 취약성에 미치는 각 효소의 효과를 % hemolysis로 Table 3에 표시하였다.

5종의 각각의 효소처리 적혈구군 중에서 pronase처리 적혈구군에서 만이 사람과 모든 반추동물에서 다같이 정도의 차이는 있을지라도 대조군(비처리 적혈구군)에 비해서 % hemolysis의 유의성 증가를 보였고 나머지 효소처리 적혈구군에서는 대조군과의 유의차가 인정되지 않았다.

사람과 반추동물 적혈구막 단백질의 전기영동상: Fig 1에 표시한 바와 같이 사람과 반추동물 적혈구막 단백질의 SDS-polyacrylamide 전기영동상은 대체로 비슷하였으나, 반추동물 적혈구막에서는 사람것의 band 2와 3 사이에 해당하는 위치에, 저자들이 선행한 실험<sup>7</sup>에서 이미 명명했던, 사람에는 없는 band Q가 소 뿐만 아



**Fig 1.** Densitometric scans of Coomassie blue stained polypeptides of human and ruminant erythrocyte membranes, as affected by the enzyme treatments of the erythrocytes.

나라 면양, 산양에서도 나타났다.

사람의 것에서 band 1과 2는 neuraminidase와 galactosidase 처리에서 약간 감소되었으나 그 외 효소 처리에 선 거의 변화가 없었다. Band 3은 trypsin, neuraminidase 및 galactosidase 처리에서 약간 감소되었으나, chymotrypsin과 pronase 처리에선 완전 소실되었다.

한우에 것에서는 band 1, 2 및 3은 모든 효소 처리에서 다 같이 별다른 변화를 보이지 않았다. 그러나, band Q는 trypsin, chymotrypsin 및 pronase 처리에서 다 같이 약간의 감소를 보였다.

Holstein 젖소의 것에서는 band 1, 2 및 3은 다 같이 chymotrypsin, pronase, neuraminidase 및 galactosidase 처리에서 약간 감소되었다. 그러나, band Q는 chymotrypsin과 pronase 처리에서 중등도로 감소되었고, 그외의 효소 처리에 의해서는 약간의 감소를 보였

다.

재래 산양의 것에서는 band 1과 2가 다 같이 chymotrypsin과 pronase 처리에서 중등도로 감소되었고, trypsin 및 galactosidase에 의해서도 약간의 감소를 보였다. Band 3은 chymotrypsin 및 pronase에 의해서 약간의 감소를 보였을 뿐이다. Band Q는 trypsin, chymotrypsin, pronase 및 galactosidase 처리에서 약간의 감소를 보였다.

면양의 것에서는 band 1, 2, 3 및 Q에서 다 같이 모든 효소 처리에서 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다.

Fig 2에 표시한 적혈구막 당단백질의 PAS염색을 비교해보면 반추동물에서는 사람의 PAS-1, 2, 3 등에 해당하는 분획이 산양에서는 존재의 흔적을 보였을지라도 나머지 반추동물에서는 거의 흔적마저 보이지 않았다. 그대신, 저자들이 선행한 소의 실험<sup>7</sup>에서 명명했

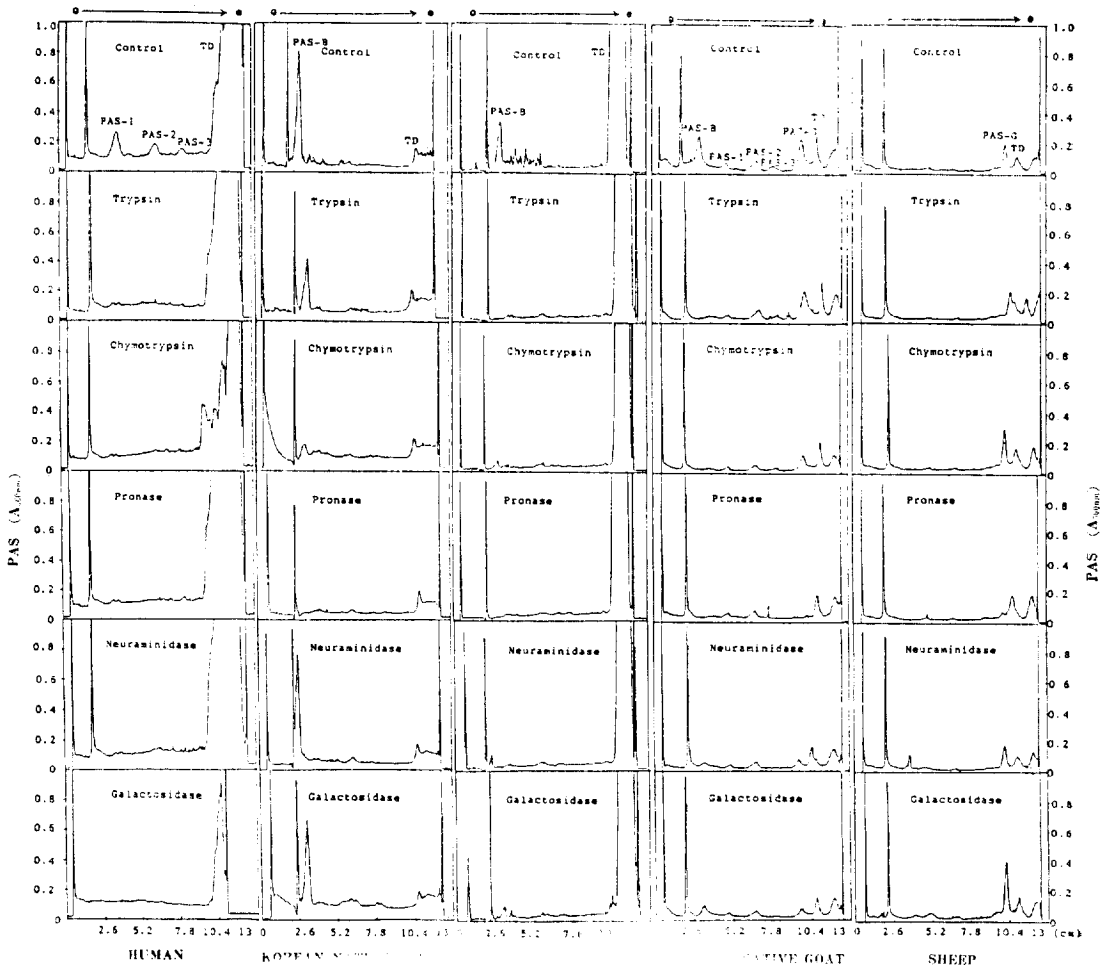


Fig 2. Densitometric scans of PAS-stained glycoproteins of human and ruminant erythrocyte membranes, as affected by the enzyme treatments of the erythrocytes.

**Table 4.** Interrelation of erythrocyte sedimentation rate, erythrocyte fragility and electrophoretic ghost protein fractions in erythrocytes treated with various enzymes such as proteinases and glycosidases

Species	Protein fraction, ESR, Fragility	Erythrocytes treated with				
		Trypsin	Chymotrypsin	Pronase	Neuraminidase	Galactosidase
Human	Band-1	0	0	0	V	V
	Band-2	0	0	0	V	V
	Band-3	V	◆	◆	V	V
	PAS-1, 2, 3	◆	◆	◆	◆	◆
	ESR	##	##	##	##	0
	Fragility	0	0	#	0	0
Korean native cattle	Band-1	0	0	0	0	0
	Band-2	0	0	0	0	0
	Band-Q	V	V	V	0	0
	Band-3	0	0	0	0	0
	PAS-B	V	W	◆	0	0
	ESR	0	0	##	0	0
Hostein	Band-1	0	V	V	V	V
	Band-2	0	V	V	V	V
	Band-Q	V	W	W	V	V
	Band-3	0	V	V	V	V
	PAS-B	◆	W	◆	W	W
	ESR	##	0	##	0	0
Korean native goat	Band-1	V	W	W	0	V
	Band-2	V	W	W	0	V
	Band-Q	V	V	V	0	V
	Band-3	0	V	V	0	0
	PAS-B	◆	◆	◆	W	W
	PAS-G	0	W	◆	W	W
Sheep	ESR	##	##	##	0	0
	Fragility	0	0	##	0	0
	Band-1	0	0	0	0	0
	Band-2	0	0	0	0	0
	Band-Q	0	0	0	0	0
	Band-3	0	0	0	0	0
Sheep	PAS-G	0	0	W	0	0
	ESR	##	##	##	##	0
	Fragility	0	0	##	0	0

0: almost no different from the control(untreated).

V: slightly decreased.

W: moderately or severely decreased.

◆: Completely disappeared.

#: Significant increase( $p < 0.05$ ).

##: Highly significant increase( $p < 0.01$ ).

던 PAS-B가 면양을 제외한 반추동물에서 전기영동상의 원점부위에 뚜렷하게 나타났다. 또한, 특기할 점은 전기영동상의 끝부분에 사람과 소(한우와 Holstein 유우)에는 없는 새로운 음성분획이 재래 산양과 면양에서 나타나 본 연구에서는 이를 PAS-G라 명명하였다.

적혈구를 효소처리하면 사람의 것에서는 PAS-1, 2, 3이 다같이 모든 효소처리에서 소실되었다.

한우의 것에서는 PAS-B가 trypsin처리에서 약간 감소되었고, chymotrypsin에서는 중등도로 감소되었으며, pronase처리에서는 완전 소실되었다.

Holstein젖소에서의 PAS-B는 모든 효소처리에서 상당히 감소되었으며 특히, trypsin과 pronase처리에서는 완전 소실되었다.

재래산양에서의 PAS-B는 trypsin, chymotrypsin 및 pronase처리에서 완전소실되었고, neuraminidase와 galactosidase처리에서는 약간 잔존하였다. PAS-G는 pronase처리에서는 완전 소실되었고, chymotrypsin, neuraminidase, galactosidase 처리에서 중등도로 감소되었다.

면양에서의 PAS-G는 pronase처리에서만 현저한 감소를 보였다.

적혈구의 효소처리와 ESR 및 적혈구 취약성의 관계: 반추동물 적혈구의 효소처리에 의한 막단백의 변량에 상관되는 ESR 및 적혈구 취약성의 변화는 Table 4에 요약하였다.

이 표에서 보는 바와같이 한우, Holstein젖소 및 재래산양에서는 PAS-B의 완전 소실과 일치하여 ESR의 현저한 증가로 반영됨을 알 수 있었는데, 한우의 것은 pronase처리에 의해서, Holstein 젖소의 것은 pronase 처리 또는 trypsin 처리에 의해서, 그리고 재래 산양의 것은 pronase, trypsin 또는 chymotrypsin 처리에 의해서 PAS-B의 완전 소실과 동시에 ESR이 현저히 증가됨을 볼 수 있었다( $p < 0.01$ ).

면양에서는 PAS-G가 pronase처리에 의해서 중등도로 감소를 보였을 뿐, 나머지 모든 단백질 분획에서는 변화가 없음에도 불구하고 galactosidase처리군을 제외한 나머지 모든 효소 처리군에서 ESR의 유의성 증가를 보였다.

대체로 당단백 분획인 PAS-B는 glycosidases에 의한 것보다 proteinases에 의해서 더욱 잘 분해되었고 또한, 재래 산양 및 면양에서만 존재하는 PAS-G도 특히 pronase에 의해서 더욱 잘 분해된 것으로 인정되었다. 적혈구의 취약성은 모든 반추동물에서 5종의 효소 처리중 pronase처리에서만 증가(용혈증가)를 보

였다.

## II 활

사람 적혈구막 단백질의 2/3를 점하는 polypeptide<sup>14-16</sup>는 전기 영동법으로 약 15종 정도가 검출되며 이 중 세포막을 관통하고 있는 단백질은 2종류가 있다고 한다.<sup>14,17,18</sup> 그 중 glycophorin(PAS-1 당단백)은 trypsin, papain 및 bromelain과 같은 단백질 분해효소로 분해될 수 있으나, band 3(polypeptide 3이라고 함)은 trypsin에 의해서는 분해되지 않는 대신 chymotrypsin, pronase 및 subtilisin과 같은 단백질 분해효소에 의해서는 분자량이 작은 단편으로 분해된다고 한다.<sup>14,15,17</sup>

적혈구막 구성 단백질 중 band 3은 사람 이외의 여러 포유류에서도 같은 분포 및 막결합 양상을 보이고 있으나 glycophorin과 sialoglycoprotein(PAS-2 당단백)과 같은 당단백은 동물에 따라서 상이한 분포 및 막결합 양상을 보이고,<sup>19</sup> 이들 중 어떤 것은 적혈구의 성숙과 더불어 소실되어 간다는 사실이 가토에서 보고되고 있다.<sup>20,21</sup>

반추동물의 적혈구막 단백질의 전기 영동상에서 사람의 것과 다른 점을 요약하면 Coomassie blue 염색에서는 4종의 반추동물에서 다같이 사람의 것에서는 없는 band Q가 나타난 점, PAS 염색에서는 사람의 PAS-1, 2 및 3이 반추동물에서는 미량으로(재래 산양) 또는 존재하지 않은(한우, Holstein 젖소 및 면양) 대신에 PAS-B가 면양을 제외하고는 뚜렷하게 나타나는 점, 그리고 재래 산양과 면양에서는 사람이나 한우 및 Holstein 젖소에서 없는 PAS-G가 있는 점을 들 수 있다.

Table 1에서 보는 바와 같이 적혈구막 단백질 함량은 대체적으로 사람에서보다 반추동물에서 높은 경향을 보였다. 이는 아마도 사람에서는 없는 band-Q가 반추동물에서는 더 있다는 것, 그리고 사람의 PAS-1, 2 및 3 대신에 반추동물에서는 PAS-B 또는 PAS-G로 대체되는 것 등에 의해서도 다소 영향된 것으로 고려된다.

이들 막단백 분획 중 중요한 단백질으로는 band 1과 2(합쳐 spectrin이라고 함) 및 band 3인데 이 중 band 1은 막결합 단백질인 spectrin의  $\alpha$ -subunit(분자량 240,000)이고, band 2는 spectrin의  $\beta$ -subunit(분자량 215,000)로 알려져 있다.<sup>14,22</sup> band 3은 적혈구막을 내외로 관통하고 있는 integral protein으로서 anion channel구실을 하는 단백질로 알려져 있다.<sup>14,22</sup>

반추동물 적혈구막 단백질의 전기 영동상에서 이들 주요 단백질 분획의 영동거리(이동도)가 사람 것과 거의 일치한 것을 보면, 사람이나 반추동물에 있어 이들 단백질의 분자량도 동일함을 알 수 있다.



일반적으로 적혈구막의 기능과 막단백 분획과의 관계라든가, 적혈구막에 있어서 막단백의 위치등을 알고자 할 때는 적혈구나, 또는 이로부터 분리한 막단백 분획에 proteinases나 glycosidases를 작용시켜 적혈구막의 외부나, 또는 내부에 노출되어 있는 단백 분획을 분해시켜 막기능의 변화나, 전기영동상의 변화를 보는 것이 상례로 되어 있다.

오래 전, Winzler<sup>23,24</sup>는 사람 적혈구를 단백 분해효소로 처리하면 적혈구막의 당단백인 sialoglycoprotein으로부터 sialoglycopeptide가 유리됨을 관찰하였으며, 또 단백 분해효소에 의해 용혈이 일어남도 보고<sup>25</sup>되고 있다. 이어서 Carraway<sup>11</sup>도 적혈구의 trypsin처리로 적혈구막에서 sial산이 유리됨을 보고 적혈구막의 외면에 노출되어 위치하고 있다고 하였다. 적혈구의 trypsin 처리는 이 밖에도 막관통 단백질인 band-3의 막외부 노출 부위를 분해시킴도 알려져 있다.<sup>26</sup> 또한 pronase<sup>27</sup>나 chymotrypsin<sup>28</sup>도 중요한 적혈구막의 polypeptide, band 3를 분해시키고 분자량 60,000인 분획을 발생시킴도 알려져 있다.

이와같은 사실은 본 연구에서 사람과 반추동물 적혈구에서도 확인되었다. 즉, 사람의 것에서는 모든 효소 처리에 의해 주로 band 3, 4가 약간씩 분해되었고, 특히 chymotrypsin과 pronase처리에서는 band 3이 완전 소실되었으며 PAS-1, 2, 3은 5종의 모든 효소처리에서 완전 소실되었다. 반추동물에서는 Table 4에서 보는 바와 같이 면양을 제외하고는 5종 효소의 막단백분획의 소화 능력은 다양하게 나타났으며, 그 중 특기할 점은 PAS-B에 대한 효소의 분해능력을 들 수가 있다. 즉, 한우에서는 PAS-B가 pronase에 의해서, 젓소에서는 pronase와 trypsin에 의해서, 그리고 재래 산양에서는 pronase, trypsin 및 chymotrypsin에 의해서 각각 완전 소실되었으며, 동시에 이것의 소실과 일치하여 ESR의 현저한 증가를 일으켰다. 이 결과로 보아 당단백의 일종인 PAS-B는 glycosidases보다 proteinases에서 잘 분해되어 ESR을 촉진시킨 것으로 고려되었다. 이것을 바꾸어 말하면, 면양을 제외한 반추동물에 있어서 낮은 ESR은 다분히 PAS-B의 존재에 의해서 영향되는 것이 아닌가 생각된다.

적혈구의 취약성도 역시 pronase처리군에서만 PAS-B의 소실과 일치하여 증가되었다. 이것으로 미루어 보아 5종의 효소중 pronase가 적혈구막 단백을 분해하는 가장 강력한 능력을 가진 것으로 생각된다.

면양에 있어서는 pronase 처리군에서만 PAS-G의 감소가 나타났을 뿐, 나머지 모든 효소 처리군에서는 단백 분획에 거의 영향이 나타나지 아니하였다. 그럼에도 불구하고 ESR은 galactosidase 처리군을 제외한 나머지 모든 처리군에서 현저한 증가로 나타났으며, 적혈구 취약성 역시 pronase처리군에서만 증가되었다. 이와 같이 면양 적혈구막 단백질은 같은 반추동물인 소(한우와 Holstein젓소)와 재래산양 것과는 달리 PAS-B가 없는 점, 그리고 소화효소에 대한 저항이 강하다는 점등이 특이하였다. 이에 관하여는 앞으로 더욱 연구의 여지가 있다고 고려된다

## 결 론

반추동물의 적혈구침강속도가 낮은 원인을 밝혀 보려고 사람, 그리고 한우, Holstein 젓소, 한국 재래산양 및 면양등의 적혈구를 proteinases인 trypsin, chymotrypsin 및 pronase, 그리고 glycosidases인 neuraminidase 및 galactosidase로 처리하여 ESR의 촉진 여부를 검색하고 동시에 적혈구막 단백질상의 변화를 SDS-PAGE 전기 영동법으로 분석하였다.

적혈구막 단백질의 평균 함량은 한우에서  $3.60 \pm 0.41$ , Holstein 젓소에서  $3.71 \pm 0.36$ , 한국 재래 산양에서  $4.13 \pm 0.83$ , 면양에서  $3.94 \pm 0.56$ , 그리고 사람에서  $2.85 \pm 0.28$ mg/ml로서 반추동물의 것에서 사람의 것보다 높았다( $p < 0.01$ ).

반추동물의 적혈구막 단백질의 전기 영동상은 대체로 사람의 것과 비슷하였으나 사람의 것에서는 존재하지 않은 또 하나의 단백 분획(전보에서 band-Q라 명명하였음)이 사람의 band-2와 band-3 사이에 해당하는 위치에 나타났다.

PAS 염색으로 검색한 적혈구막의 당단백 분획상은 사람과 반추동물간에 큰 차가 인정되었다. 즉, 사람에서 존재한 PAS-1(glycophorin) 및 PAS-2(sialoglycoprotein)는 반추동물에서는 거의 나타나지 않고, 그 대신 전기영동상의 원점에 가까운 부위에 강한 PAS 양성 분획(전보에서 PAS-B라 명명하였음)이 면양을 제외한 나머지 반추동물(한우, Holstein 젓소 및 한국 재래 산양)에서 나타났으며, 또한 한국 재래 산양과 면양에서는 전기 영동상의 끝 가까운 부위에 중등도의 PAS 음성분획이 나타나서, 이 분획을 PAS-G라 명명하였다.

Proteinases 또는 glycosidases로 처리한 적혈구에 있어서, 각 효소처리에 대응하는 각 적혈구막 단백 분획의 영동상은 반추동물의 종 또는 품종별로 다양하게 나타났다. 그 중에서도 반추동물에서만 존재하는 band-Q는 면양을 제외한 나머지 반추동물에서는 trypsin, chymotrypsin 및 pronase 처리에 의해서 다소 또는 중등도로 감소 되었다. 특히, 주목되는 점은 당단백분획

인 PAS-B band가 glycosidases보다 proteinases에 의해서 더욱 잘 분해되고 또한, PAS-B band의 완전 소실과 일치하여 ESR이 현저하게 증가( $p < 0.01$ )되는 것이었다. 면양에 있어서는 PAS-G 분획이 pronase처리 적혈구에서만 감소를 보였을 뿐 나머지 모든 단백 또는 당단백 분획이 모든 효소 처리에 의해서 전연 반응을 보이지 않았다. 그럼에도 불구하고 galactosidase를 제외한 trypsin, chymotrypsin, pronase 또는 neuraminidase로 처리한 적혈구에서 ESR의 현저한 증가를 보였다.

적혈구 삼투성 취약성은 사람과 모든 반추동물에서 다같이 5종의 효소중 pronase로 처리한 적혈구만이 증가(용혈의 증가)를 보였다.

감사의 말: 이 실험이 진행되는 동안 실험실을 개방해 주시고 아울러 많은 충고를 주신 전남대학교 의과대학 생화학교실의 李民化 교수님께 심심한 사의를 표합니다.

#### 참 고 문 헌

- Vacca C, Montemagno G, Persechino A, et al. Erythrocyte sedimentation in cattle and buffaloes: A general hypothesis. *Folia Veterinaria Latina* 1974;4:24~39.
- Vacca C, Montemagno G, Persechino A, et al. Research on the erythrocyte sedimentation rate in buffaloes and cattle. *Atte della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie* 1972;26:219~222.
- Fegler, G. Hemoglobin concentration, hematocrit value, and sedimentation rate of horse blood. *Q J Exp Physiol* 1948;35:129~139.
- Fahraeus R. The suspension stability of the blood. *Physiol Rev* 1929;9:241~274.
- Shin SS, Lee BW, Shin JU. Angled capillary method for determining erythrocyte sedimentation rate of goat. *Korean J Vet Res* 1986; 26:187~194.
- Lee BW, Shin JU. Angled tube method for determining erythrocyte sedimentation rate of cattle. *Korean J Vet Res* 1986;26:175~186.
- Bahk YW, Lee BW. Electrophoretic analysis of the major proteins of bovine erythrocyte membrane: Their relation to slow erythrocyte sedimentation rate. *Korean J Vet Res* 1989;29(1): 13~20.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem* 1971; 10:2606~2616.
- Schrier SL. Human erythrocyte membrane enzyme: Current status and clinical correlates. *Blood* 1977;50:227~234.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265~270.
- Carraway KL. Proteolytic enzyme treatment. In: Ellory JC, Young JD, ed. *Red cell membranes: A methodological approach*. New York: Acad Press, 1982:239~250.
- Perk, Frei YF, Herz A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res* 1964; 25:1241~1248.
- Laemmli UK. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 1970;227:680~685.
- Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *Rev J Cell Biol* 1974;62:1~19.
- Jenkins RE, Tanner MJA. The major human erythrocyte membrane protein: Evidence for an S-shaped structure which traverses the membrane twice and contains a duplicated set of sites. *Biochem J* 1975;147:393~402.
- Reichstein E, Blostein R. Arrangement of human erythrocyte membrane proteins. *J Biol Chem* 1975;250:6256~6261.
- Marchesi SL, Steers E, Marchesi VT, et al. Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes. *Biochem* 1970;9:50~57.
- Gratzer WB. The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem J* 1981;198:1~8.
- Finean JB, Michell RH. Membrane proteins and glycoproteins. In: Finean JB, Michell RH. ed. *Membrane structure*. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland Biom Press, 1981;10~18.
- Han YS. Inactivation by trypsin and solubilization by lipase of acid phosphatase in rabbit erythrocyte membranes. *Chonnam Med J* 1975;

- 12:671~674.
21. Koch PA, Garder FH, Carter JR. Red cell maturation: Loss of a reticulocyte-specific membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1973;54:1296~1302.
  22. Macara IG, Kuo S, Cantley LC. Evidence that inhibitors of anion exchange induce a transmembrane conformational change in band 3. *J Biol Chem* 1983;258:1785~1792.
  23. Winzler RJ. A glycoprotein in human erythrocyte membranes. In: Jamieson GA, Greenwalt TJ, ed. *Red cell membrane: Structure and function*. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1969: 157~171.
  24. Winzler RJ, Harris ED, Pekas DJ, et al. A glycoprotein in human erythrocyte membranes. *Biochem* 1967;6:2195~2202.
  25. Keil B, Trypsin. Hess GP. Chymotrypsin-Chemical properties and catalysis. In: Boyer PD, ed. *The enzymes volume III, 3rd ed.* New York and London: Academic press, 1971:213~273.
  26. Steck TL, Fairbanks G, Wallach DFH. Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane: Proteolytic dissection. *Biochem* 1971;10:2617~2624.
  27. Bander WW, Garan H, Berg HC. Human erythrocyte membranes: Specific labelling of surface proteins. *J Mol Biol* 1971;58:783~797.
  28. Triplett RB, Carraway KL. Proteolytic digestion of erythrocytes, resealed ghosts, and isolated membranes. *Biochem* 1972;11:2897~2903.