

흰쥐에 四鹽化炭素 投與가 血清 Acid Phosphatase 活性에 미치는 影響

尹鍾國 · 申重圭* · 車相殷**

啓明大學校 自然科學大學 公衆保健學科

*慶山大學 保健經濟學科

**安東 看護保健專門大學 產業衛生學科

An Effect of Carbon Tetrachloride Treatment on the Serum Levels of Acid Phosphatase Activity in Rats

Chong Guk Yoon · Joong Ku Sin* · Sang Eun Cha**

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

** Dept. of Health Economics, Kyung San University*

*** Dept. of Industrial Hygiene, Andong Nurse and Health Junior College*

ABSTRACT

To clarify a cause of increased serum level of acid phosphatase in CCl_4 -treated rats, the acid phosphatase activity of liver was compared with that serum. Concomitantly, the serum and liver acid phosphatase activity of CCl_4 -treated rats were compared with that of CCl_4 -treated rats pretreated with prednisolone or actinomycin D.

In CCl_4 -treated rats, the activity of serum acid phosphatase was significantly increased whereas that of liver acid phosphatase was rather slightly decreased. the pretreatment of prednisolone led to the decreased activity of serum and liver acid phosphatase in CCl_4 -treated rats. But the pretreatment of actinomycin D rather increased the activity of liver and serum enzyme.

In conclusion, it is likely the increased activity of serum acid phosphatase is based on the excess leaking of acid phosphatase into blood by the increased membrane permeability of both liver cell and lysosome in it.

I. 緒 論

최근 産業의 急速한 發展에 따른 有害公害物質이 人體의 健康에 심각한 影響을 미치는 주목할만한 事實이다. 더욱이 産業場에서 有害産業公害物質이 人體에 暴露됨으로 因하여 야기되는 中毒性

疾患의 診斷 및 豫後判定을 기하는 것은 毒性學的 측면에서 매우 의의가 있다고 생각한다. 그러므로 이들 有害産業公害物質類인 xenobiotics의 一種으로 肝毒素로 알려져 있는 四鹽化炭素(CCl_4 이하 CCl_4 略함)을 實驗動物에 投與하여 肝損傷의 모델로 만든 후 肝損傷時 炎症反應過程 中 進行되는 肝細胞의 lysosome의 加水分解酵素의 變動樣相을

觀察함은 中毒性疾患의 病態生化學的 基礎資料提示에 상당한 的의를 얻을 수 있으리라고 사료된다. 이들 lysosomal 加水分解酵素의 一種인 acid phosphatase(EC 3. 1. 3. 2)는 pH 5部近에서 orthophosphoric monoester를 加水分解하여 알콜과 磷酸을 遊離시키는 酵素²⁾로서 動物의 組織^{3,4)}, 體液⁵⁾ 및 血球⁶⁾ 등에 널리 분포되어 있으며, 特히 reticuloendothelial系에 屬하는 肝, 肺, lymph조직⁷⁾과 前立腺⁸⁾에 그 活性이 높다고 한다. 이 酵素는 細胞內에서 主로 lysosome에 많은 量이 存在⁹⁾하며 그 외 細胞質¹¹⁾, 核¹²⁾, 내형질細網¹³⁾과 골기체¹³⁾에도 存在하는 것으로 알려져 있다. 疾病時 이 酵素의 活性變動에 대해서는 잘 알려져 있으며 前立腺癌¹⁴⁾, 腎臟癌¹⁵⁾, 한냉損傷時 腦組織¹⁶⁾ 등에서 이 酵素의 活性이 增加되는 것으로 報告되고 있다. 特히 肝硬變이나 肝損傷이 있을 때 肝組織에서 그 活性變動에 대해서는 잘 알려져 있으나, 血清中 本 酵素의 活性變動에 대해서는 잘 알려진 바가 없다. 그러나, 최근 CCl₄에 의한 肝損傷時 血清中 本 酵素活性이 增加된다는 尹等의 報告¹⁷⁾와 CCl₄ 投與時 lysosome으로부터 細胞質로의 流出이 增加된다는 報告¹⁸⁾가 있을 뿐, CCl₄에 의한 肝損傷時 血清中 本 酵素의 活性增加에 대한 原因機轉에 대해서는 아직까지 不分明하다.

그러므로 CCl₄에 의한 肝損傷時 血清中 acid phosphatase活性變動의 機轉을 究明하는 一環으로 今에 CCl₄ 投與후 肝 및 血清中 本 酵素의 活性變動을 觀察하는 한편 生體膜의 安定劑인 prednisolone¹⁷⁾과 m-RNA合成을 阻害하며 蛋白質合成을 抑制하는 것으로 알려져 있는 actinomycin D¹⁹⁾를 前처리한 후 CCl₄를 投與한 實驗群과 CCl₄만을 投與한 實驗群間에 本 酵素의 活性變動을 相互比較 觀察코져 하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

實驗動物은 尹等의 方法²⁰⁾에 의하여 作成된 標準食餌로 成長시킨 260~280g의 Sprague-Dawley種 小鼠를 使用하였다.

CCl₄投與는 50% CCl₄溶液(v/v in olive oil) 0.1 ml/100g body wt.을 24時間 간격으로 2回 腹腔

內 注射하였으며, 對照群은 olive oil만 投與하였다.

Prednisolone投與는 CCl₄投與 1時間 前에 體重 100mg¹⁷⁾을 大腿肌肉에 注射하였으며, prednisolone만 投與한 群은 各 群의 實驗期間에 並行하여 prednisolone만 投與하였다.

Actinomycin D 投與는 DDL₁만을 投與한 同一 實驗條件에 並行하여 實施하였으며 actinomycin D를 四鹽化炭素 投與 1時間 前에 體重 100g當 50 μg²¹⁾을 大腿外側肌肉에 注射하였다. 모든 實驗動物의 處置는 마지막 注射後 1日 後에 ether麻醉下에 腹部大動脈으로 부터 採血하고 肝은 生理食鹽水로 灌流하여 肝組織 內에 남아있는 血液을 除去한 다음 摘出하였다. 한편 採血한 血液은 遠心分離하여 血清을 얻고 肝과 더불어 化學檢査에 提供하였다.

2. 肝 組織液의 酵素液 調製

肝組織은 4℃下에서 질련으로 만들고 그 中 一定量을 稱量하여 4倍量의 氷冷 0.25M sucrose를 添加하여 teflon glass homogenizer로 磨碎하여 肝均質液(20w/v)을 만들었다. 이 均質液을 4℃下에서 700×g 速度로 10分間 遠沈시켜 核 및 未磨碎分을 除去한 다음 그 上層液을, 105,000×g에서 1時間 遠沈하여 上層液을 얻었다. 이를 肝 acid phosphatase活性 測定에 使用하였다.

3. Acid phosphatase活性測定

肝 및 血清中 acid phosphatase活性測定은 Bessey-Lowry-Brock法²²⁾에 依하였으며 酵素單位는 肝組織에서는 酵素反應液 中에 含有된 protein mg 및 血清 1ml가 1時間 동안에 p-nitrophenol 1 μmole을 遊離시키는 것으로 나타내는 Bessey-Lowry unit로 하였으며, 對照群值에 대한 百分率로도 나타내었다. 한편 蛋白質의 定量은 Lowry等의 方法²³⁾에 依하였다.

4. 血清中의 alanine aminotransferase (ALT) 活性測定

ALT 活性測定은 Reitman과 Frankel의 方法²⁴⁾에 依하였으며, 酵素單位는 血清 1ml當 Karmen unit²⁵⁾로 表示하였다.

III. 實驗結果 및 考察

1. CCl₄投與로 인한 體重當 肝 무게 및 血清 alanine aminotransferase(ALT)活性變動

本 實驗에서 CCl₄를 投與한 實驗群이 對照群에 比하여 體重當 肝 무게는 有意하게(p<0.001) 約 40% 增加되었으며, 血清 ALT活性値는 約 9倍의 현저한 增加를 보였다(Table 1).

Table 1. Effect of CCl₄ treatment on the % weight of liver/ body wt. and serum alanine aminotransferase levels in rats

Parameters Groups	Liver weight / body wt. (%)	Serum ALT activities
Control	2.83 ± 0.07	32.50 ± 1.52
CCl ₄	3.93 ± 0.22***	294.30 ± 25.70***

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats

***Significantly different from the control group (P<0.001)

따라서 本 實驗條件에서 深한 肝損傷의 實驗動物의 모델이 確認되었다. 이 같은 實驗動物의 모델下에서 血清 acid phosphatase活性이 大照群보다 約 45% 有意하게(p<0.01) 增加되었다(Table 2). 이 結果는 尹等¹⁷⁾의 成績과 類似하였으며 이들의 報告에 依하면 CCl₄에 依한 急性 肝損傷時 lysosome의 marker酵素의 一種인 acid phosphatase의 活性이 血清 中에서 增加한다고 하였다. 또한 CCl₄로 肝損傷을 誘導한 實驗動物에 있어서 肝細胞의 lysosome으로부터 加水分解酵素의 一種인 β-glucuronidase酵素가 cytosol로의 漏出이 促進된다는 younes等¹⁸⁾의 報告와 CCl₄에 依한 急性 肝損傷時 肝細胞膜의 透過性이 亢進된다는 점²⁰⁾을 考慮해 볼 때 本 實驗에서의 CCl₄投與時 血清中 acid phosphatase活性이 增加된 肝細胞의 lysosome으로부터 acid phosphatase의 遊離가 促進되어 放出된 本 酵素가 血中으로 流出增加에 기인됨을 암시해 주고 있다.

그러므로 CCl₄에 因한 急性肝損傷時 血清中 acid phosphatase 活性 增加되는 原因은 lysoso-

Table 2. Effect of CCl₄ treatment on the serum levels of acid phosphatase in rats

Enzyme activities Groups	Serum acid phosphatase activities (Bessey-Lowry unit /ml of serum)
Control	0.90 ± 0.04
CCl ₄	1.30 ± 0.08**

Each value represents the mean ± S.E. of 6 rats

**Significantly different from the control group(P<0.01)

me으로부터 本 酵素의 漏出이 增加되는 여부를 檢討하는 一環으로 肝 acid phosphatase活性과 lysosome膜 및 生體膜 安定劑로 알려져 있는 prednisolone¹⁷⁾을 前處理한 後 CCl₄投與時 肝 및 血清 acid phosphatase活性을 測定하였다.

2. CCl₄를 投與한 경우와 prednisolone前處理 後 CCl₄ 投與時 肝 및 血清 中 acid phosphatase活性變動

本 實驗에서 CCl₄ 投與時 血清 acid phosphatase活性이 增加되는 반면, 肝細胞의 acid phosphatase活性은 오히려 減少되는 傾向을 보였다(Fig. 1). 이같은 實驗結果는 CCl₄에 依한 急性 肝損傷時 肝細胞의 透過性 增加로 因하여 本 酵素가 肝細胞로 부터 血清으로 流出 增加로 因하여 血清中 acid phosphatase活性이 높게 나타남을 암시해 주고 있다. 더우기 本 實驗에서 prednisolone 前處理 後 CCl₄投與時 肝 組織의 homogenate를 105,000×g에서 遠沈한 上層液中 acid phosphatase活性値는 CCl₄만 投與한 경우에 比하여 約 28%의 有意한(p<0.05) 減少를 나타내었다(Fig. 1). 따라서 CCl₄投與로 因한 肝損傷時 lysosome內에 局在되어 있는 acid phosphatase 酵素가 lysosome外의 細胞質로 流出이 促進됨을 알 수 있다. 또한 血清中 acid phosphatase活性値는 역시 prednisolone前處理 後 CCl₄를 投與한 實驗群이 CCl₄만 投與한 群보다 約 31% 減少되었다.

以上 實驗成績을 綜合하여 볼 때 CCl₄投與로 因한 急性 肝損傷時 血清中 acid phosphatase活性이 增加되는 原因은 損傷된 肝細胞의 lysosome膜의 透過性 增加로 因하여 肝細胞質로의 放出이 促

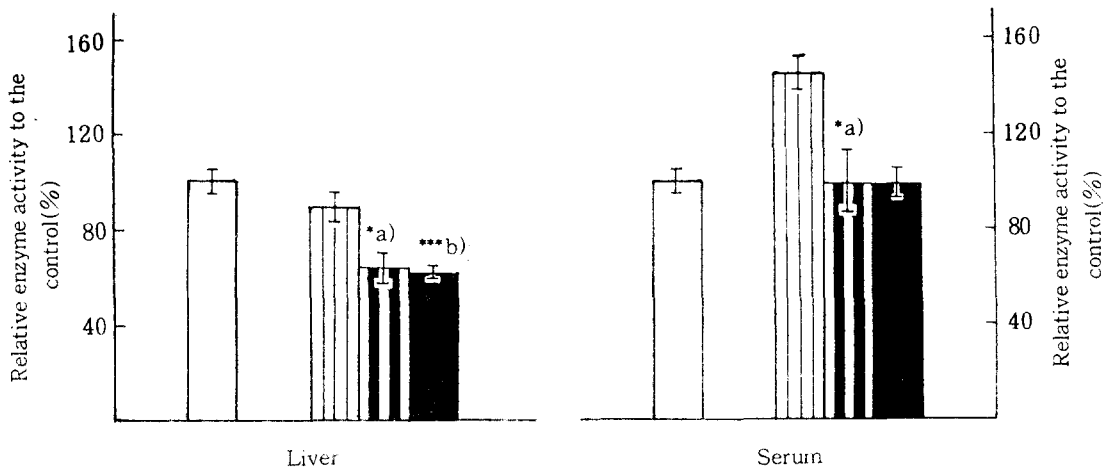


Fig. 1. Effect of prednisolone pretreatment on the liver and serum acid phosphatase activity in CCl₄-treated rats. Pretreatment of prednisolone, 0.75mg/100g of body weight was done intramuscularly an hour before administration of CCl₄.

The vertical bars are expressed as the mean \pm S.E. with 6 animals in each group.

* a) Singnificantly different from the CCl₄-treated group (P < 0.05)

*** b) Significantly different from the control group (P < 0.01)

□ Control ▨ CCl₄ ▤ Prednisolone + CCl₄ ■ Prednisolone

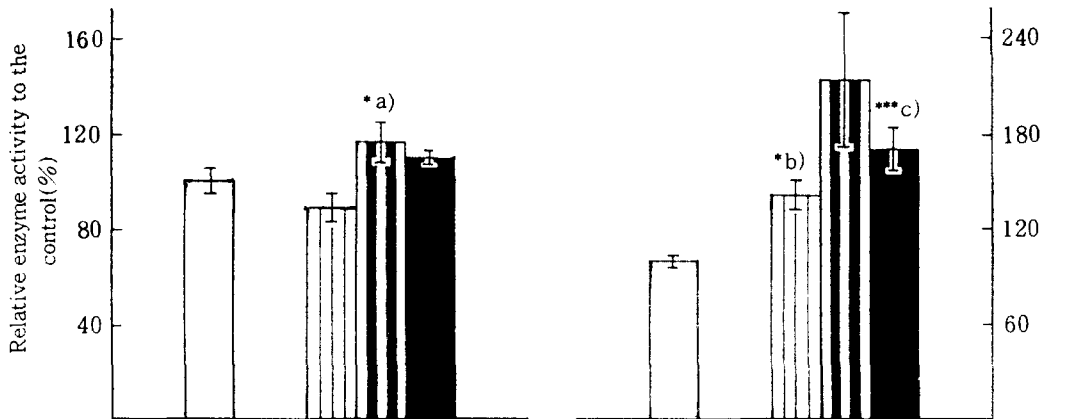


Fig. 2. Effect of actinomycin D pretreatment on the liver and serum acid phosphatase activity in CCl₄-treated rats. The vertical bars are expressed as the mean \pm S.E. with 6 rats in each group. Actinomycin D (50 μ g/100g of body wt.) was given an hour before intraperitoneal administration of CCl₄, after that of 18 hours, the same treatment was done once more a above and then 24 hour later, the animals were sacrificed.

* a) Significantly different from the CCl₄-treated group (P < 0.05)

* b) Significantly different from the control group (P < 0.05)

*** c) Significantly different from the control group (P < 0.01)

□ Control ▨ CCl₄ ▤ Actinomycin D + CCl₄ ■ Actinomycin D

進됨과 더불어 細胞膜의 透過性 亢進으로 因하여 本 酵素의 血清으로 漏出 增加에 起因되기 때문일 것으로 생각된다. 그러나 어떤 酵素인 경우에는 CCl₄投與로 因한 肝損傷時에 酵素 蛋白 合成誘導가 促進된다는 報告²⁰⁾가 있는 바, CCl₄投與時 血清中 acid phosphatase活性이 增加되는 原因이 酵素蛋白 合成誘導에 연유된다는 事實도 排除할 수 없기 때문에 本 實驗에서 m-RNA合成을 抑制하여 酵素蛋白合成을 阻害하는 것으로 알려져 있는 actinomycin D²¹⁾를 前處理한 다음 CCl₄投與한 後 肝 및 血清 acid phosphatase活性을 觀察하였다.

3. Actinomycin D 前處理 後 CCl₄投與時 肝 및 血清 acid phosphatase活性變動

本 實驗에서 actinomycin D 前處理 後 CCl₄를 投與한 實驗群에서 肝 acid phosphatase活性은 오히려 CCl₄만 投與한 群보다 31% 有意하게(p<0.05) 增加되었으며, 血清 acid phosphatase는 CCl₄投與群보다 約 48% 增加되었다. 따라서 CCl₄로 因한 急性 肝損傷時 血清中 acid phosphatase活性이 增加됨은 本 酵素의 合成誘導와는 無관한 것으로 생각된다(Fig. 2).

以上 實驗成績을 綜合하여 볼 때 CCl₄投與로 因한 肝損傷時 血清中 acid phosphatase活性 增加는 肝細胞 內 lysosome 및 細胞膜 透過性 亢進에 依하여 나타난 結果로 생각된다.

IV. 要約 및 結論

CCl₄에 依한 肝損傷 時 血清中 acid phosphatase活性의 增加 原因을 究明코자 흰쥐에 prednisolone 및 actinomycin D를 前處理한 後 CCl₄投與時 血清 및 肝 acid phosphatase活性을 CCl₄만 投與한 경우와 比較觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

흰쥐에 CCl₄ 投與時 肝組織 acid phosphatase活性은 減少되는 傾向을 보였으나 血清中 本 酵素의 活性은 有意한 增加를 나타내었다.

CCl₄投與로 增加된 血清 및 肝 acid phosphatase 活性은 prednisolone前處理로 減少되었으며 actinomycin D 前處理하므로써 오히려 肝 및 血清中 本 酵素의 活性이 增加되었다. 따라서 CCl₄

投與로 因한 急性 肝損傷時 血清中 acid phosphatase活性 增加는 肝 細胞內 lysosome 및 細胞膜 透過性 亢進에 起因된 結果로 생각된다.

參 考 文 獻

- 1) Matsubara, T., Mori, S., Touchi, A., Masuda, Y. and Takeuchi, Y. : Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. : Evidence for different susceptibilities of rat liver lobes, *J. Pharmacol.*, **33**, 435~445, 1983.
- 2) Noel, S. A. and Lott, J. A. : Acid phosphatase, total, in Pesce, A. J., Kaplan, L. A. (eds): Methods in clinical chemistry, ST. Louis, The C. V. Mosby Co., 683~690, 1987.
- 3) Baccino, F. M. and Zuretti, M. F. : Structural equivalents of latency for lysosome hydrolases, *Biochem. J.*, **146**, 97~108, 1975.
- 4) Payne, J. G. : The distribution and localization of acid phosphatase in the normal rat spleen, *J. Anatomy.*, **3**, 482~488, 1972.
- 5) Yam, L. T. : Clinical significance of the human acid phosphatase, *Am. J. Med.*, **56**, 604~616, 1974.
- 6) Belville, W. D., Cox, H. D. and Mahan, D. E. : Bone marrow acid phosphatase by radioimmunoassay, *Cancer.*, **41**, 2286~2291, 1978.
- 7) Kaneko, A., Ikeda, T. and Once, T. : Acid phosphatase from different cell types in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta.*, **222**, 218~221, 1970.
- 8) Lam, K. W., Li, O. and Li, C. Y. : Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase, *Clin. Chem.*, **19**, 483~487, 1973.
- 9) Comolli, R. : Cytotoxicity of silica and liberation of lysosomal enzymes, *J. Path. Bact.*, **93**, 241~253, 1967.
- 10) Barka, T. : On the acid phosphatase of liver and RE-cell, *H. Histochem. Cytochem.*, **8**, 320~321, 1960.
- 11) Panara, F., Cirotto, C., Arangi, I. et al. : Localization of acid phosphatases in the cell

- fractions of chick liver, *experientia.*, **36**, 119~120, 1980.
- 12) Lin, C. W. and Fishman, W. H. : Microsomal and lysosomal acid phosphatase isoenzymes of mouse kidney characterization and separation, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 487~498, 1972.
 - 13) Nyquist, S. E. and Mollenhauer, H. H. : A golgi apparatus acid phosphatase, *Biochem. Biophys. Acta.*, **315**, 103~112, 1973.
 - 14) Schultz, R. E., Varello, M. A., Tsou, K. C. et al. : Simultaneous flow cytometric deoxy-nucleic acid and acid phosphatase analysis of benign and malignant lesions of the prostate, *J. Urol.*, **134**, 1133~1136, 1985.
 - 15) Scherstein, T., Wahlqvist, L. and Jilderos, B. : Lysosomal enzyme activity in liver tissue, kidney tissue, and tumor tissue from the patients with renal carcinoma, *Cancer.*, **27**, 278~283, 1971.
 - 16) Bingham, W. G., Paul, S. E. and Suryanarayana Sastry, W. G. : Effect of cold injury on six enzymes in rat brain, *Arch. Neurol.*, **21**, 649~660, 1969.
 - 17) Yoon, C. G. and Huh, K. : Effect of carbon tetrachloride intoxication on the type conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase in rats, *Arch. Pharm. Res.*, **10**(1), 36~41, 1987.
 - 18) Younes, M., Albrecht, M. and Siegers, C. P. : Interrelation between lipid peroxidation and lysosomal enzyme release in the presence of CCl₄, cumene hydroperoxide or thioacetamide, *Res. Comm. Chem. Pathol. and Pharmacol.*, **40**(1), 121~132, 1983.
 - 19) Righetti, A. B. B. and Kaplan, M. M. : Effect of actinomycin D on the rat liver alkaline phosphatase, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 491~495, 1971.
 - 20) 尹鍾國·申重圭·李相一 : 흰쥐의 간 xanthine oxidase 활성에 미치는 ethionine의 영향, 한국환경위생학회지, **16**, 121~126, 1990.
 - 21) 윤종국·강희양·이상일 : Effect of carbin tetrachloride on the activity of aniline hydroxylase in rats fed on a low protein diet, J. Institute of Natural Science(The Institute of Natural Science Keimyung University Taegu Korea), **7**, 125~135, 1988.
 - 22) Bessey, O. A., Lowry O. H. and Brock, J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem.*, **164**, 321~329, 1946.
 - 23) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. Farr, A. L. and Radall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
 - 24) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalaoetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58~63, 1957.
 - 25) Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, J. S. : Transaminase activity in human blood, *J. Clin. Invest.*, **34**, 126~131, 1955.
 - 26) 윤종국 : 흰쥐에 사염화탄소에 의한 간손상시 actinomycin D 및 prednisolone이 혈청 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향, 연구 논문집 (계명대학교 기초과학 연구소), **7**(1), 113~123, 1988.