

γ -Glutamyltransferase의 조직내 분포에 관한 연구

—단일클론항체의 효소면역측정법, 방사면역측정법, 면역조직화학검사,
자가방사기록검사 적용에 관하여—

고려대학교 의과대학 생화학교실

김 명 곤 · 박 윤 규 · 류 총 곤

— Abstract —

Distribution of Murine Tissue Specific γ -Glutamyltransferase:

—Comparison of Six Monoclonal Antibody Applications in Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Radioimmunoassay, Immunohistochemistry, and Autoradiography—

Meyoung-kon Kim, M.D., Youn-Kyu Park, M.D. and Chông-Kun Ryu, M.D.

Department of Biochemistry, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

γ -Glutamyltransferase (GGT: E.C. 2.3.2.2.) is a glycoprotein enzyme which is involved in glutathione metabolism and amino acid transport through the plasma membrane. It is distributed widely in several organs including liver and kidney. Several isozymes of GGT have been reported and some of the isozymes may be associated with hepatocarcinogenesis.

We have produced six monoclonal antibodies (mAbs) against GGT purified from the liver of 2-acetamidofluorene (AAF) treated rats. All of the six mAbs were obtained by immunizing mice with liver GGT. Six hybridomas which produced anti-GGT Abs were extensively subcloned and injected into the peritoneal cavity of BALB/c mice to obtain large quantities of Abs. These mAbs were purified from ascites by ammonium sulfate precipitation and protein A sepharose CL-4B column chromatography.

Using these mAbs we performed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), immunohistochemistry (IHC), and autoradiography (ARG) to study the distribution of GGT isozyme in tissue. The results indicate that GGT-mAb 1 is specific for the AAF treated liver GGT, GGT-mAb 5 for the normal liver GGT, and GGT-mAb 6 for the normal kidney GGT. These mAbs may be used to evaluate the distribution of GGT isozymes in different tissues.

Key Words: γ -Glutamyltransferase, Monoclonal antibodies, Immunoassay

서 론

γ -Glutamyltransferase [이하 GGT로 약함: (5-glutamyl) peptide: amino acid 5-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2.]는 포유동물의 간, 신장, 소장, 췌장, 뇌, 부고환 등의 장기에 분포하는 당단백질 (glycoprotein)로 된 효소이다¹⁾. GGT는 여러 isozyme 형태

로 존재하고 장기에 따라 그 분포 위치가 달라²⁾ 간 세포에서는 형질내세망에, 신세뇨관 세포에서는 원형질막에 존재한다¹⁾. GGT의 주요기능으로는 생체 조직 내의 단백질의 흡수 및 분비과정에 관련된 세포내 cysteine moiety의 유지, 세포막을 통한 아미노산을 전달하는 transpeptidation과, xenobiotics의 대사에 관련된 glutathione catabolism의 조절, glutathione 황화합물의 분해 등이 있고 기타 개체의 성장, 세포의 분화, 그

리고 발암과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾.

근자에 인체에 관련된 GGT 연구로는 유리 산소기나 xenobiotics 등에 의한 세포손상을 방지하는 주요 효소들 중의 하나인 glutathione 관련 효소로서의 기능에 관한 연구, 만성 알코올 중독환자에서 GGT의 혈중농도가 상승된다는 보고, 그리고 여러 간담도계 질환(hepatobiliary disease) 초기의 진행과정에서 GGT의 조직 및 혈중농도가 상승된다는 보고 등이 있다. 궁극적으로 GGT의 활성이 증가된 조직은 간암으로 발전되는 경향이 크고 실제로 간암조직은 GGT 활성이 높다는 점으로 미루어 GGT의 증가현상은 간암전구세포 또는 간암세포의 존재를 알 수 있는 지표로 이용될 수도 있다 하겠다.

한편 간 종양에 관련된 단일클론 항체(monoclonal antibodies, 이하 mAb로 약함)의 연구로는 Hixon 등⁶⁾의 백서의 oval cell에 대한 mAb, Taniguchi 등⁷⁾의 human primary hepatoma에 대한 mAb, 그리고 Dunsford 등⁸⁾의 발암물질 처리 백서의 preneoplastic liver cell에 대한 mAb 등의 보고가 있다. 현재 임상적으로 간염 진단을 위한 hepatitis viral antigens(HBs, HBe, HBe) 등에 대한 mAb들은 널리 사용되고 있으나 간 종양 진단을 위한 mAb는 드물고, 간담도계 질환의 진단에 사용되고 있는 기존의 α -fetoprotein에 대한 mAb 등이 사용되기는 하나 항원항체 반응의 반응특이도 면에서 미흡한 점이 있다.

본 실험은 단일클론 항GGT항체(monoclonal anti- γ -glutamyltransferase antibodies)를 이용하여 백서에서의 GGT 분포의 조직 특이성을 관찰하고자 효소면역 측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay), 방사면역 측정법(RIA: radioimmunoassay), 면역조직화학검사(IHC: immunohistochemistry), 자가방사기록검사(ARG: autoradiography) 등에 적용하여 발암물질 투여 및 정상 백서의 간 조직에서 GGT의 분포 및 특성을 규명하고, 나아가 여러 간담도계 질환, 특히 간 종양 발생에 있어서 조기진단을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

발암물질 투여군은 생후 8~9주된 체중 200~250 g의

외견상 건강한 Wister계 웅성 백서를 사용하였고, 항원 면역군은 생후 8~9주된 25~35 g의 BALB/c 마우스를 사용하였다.

2. GGT의 정제 및 단일클론 항GGT항체의 생성

백서에 간암을 발생시키기 위한 2-acetamidofluorene(이하 AAF로 약함)의 투여는 Solt-Farber 등⁹⁾의 방법과 Cameron 등¹⁰⁾의 방법에 준하였다. 발암물질 투여군 및 정상군의 간 조직으로부터 GGT를 정제하기 위하여 시행한 각 크로마토그래피 과정은 Yim 등⁹⁾, Park 등¹⁰⁾, Kim 등¹¹⁾의 방법에 준하여 이온교환 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피, 젤여과 크로마토그래피의 순서로 시행하였다. GGT의 단백질 정량은 Lowry법¹²⁾에 준하였고, GGT의 활성도 측정은 Strömmer 등¹³⁾, Yim 등⁹⁾, Park 등¹⁰⁾, Kim 등¹¹⁾의 방법에 준하였다.

단일클론 항GGT항체 생성을 위한 면역는 발암물질 투여군의 간 조직 GGT($0.32 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 마우스 복강내 투여하였고, 최종면역 3일 후 희생, 비장을 적출하여 세포융합에 사용하였다. 세포융합은 Goding 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 마우스 골수종세포주(SP2-Ag14 non-secreting mouse myeloma, ATCC CRL 1581)와 면역 마우스의 비장세포를 polyethylene glycol-4,000을 사용 융합하였다. 세포융합후 hybridoma cell cloning은 Galfre 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 한계희석법으로 3회 반복 시행하였고, 분비되는 단일클론 항GGT항체를 증량하기 위하여 마우스의 복수를 생성하게 하는 생체 배지법¹⁶⁾을 시행하여 ammonium sulfate precipitation과 면역친화 크로마토그래피로 정제하였다.

3. 단일클론 항GGT항체의 정성 및 정량

단일클론 항GGT항체의 immunoglobulin(이하 Ig로 약함) 종류를 알아보기 Hudson 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 Ig subtyping을 시행하였다. 단일클론 항GGT항체의 Ig 정량은 spectrophotometer(DU series, Beckman Co., NJ)를 이용한 280 nm에서의 자외선흡광도 측정법으로 시행하였고, Langone 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 "mouse IgG solution at 1 mg/ml = 1.44 absorbance units"으로 환산하였다.

단일클론 항GGT항체의 정성 및 정량 정도의 확인을 위한 전기영동은 Laemmli 등¹⁹⁾의 불연속법에 준하여 sodium dodecylsulfate-PAGE(SDS-PAGE)와 poly-

Table 1. Purification of γ -Glutamyltransferase (GGT) Derived from the Liver of 2-Acetamidofluorene (AAF) Treated Rat

Step	Total protein (mg)	Total GGT activity (U)	Specific GGT activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Homogenation	34475.0	604.4	0.1	1.0	100.0
Papain treatment & ASF ^a (45~90%)	1407.4	419.7	0.3	2.6 ^c (4.0) ^d	69.4
Ion exchange chroma. ^b	70.0	367.3	5.3	42.6 ^c (21.7) ^d	60.8
Affinity chroma. ^b	8.6	177.8	20.7	167.9 ^c (67.4) ^d	29.4
Gel filtration chroma. ^b	1.9	125.6	66.1	550.9 ^c (75.6) ^d	20.8

a: Amomonium sulfate fractionation. b: chromatography. c: This work. d: CN, Lee et al. *Korea UMJ* 24(3):122, 1987.

crylamide gel electrophoresis (PAGE)를 시행하였고, gel의 단백질염색은 Wilson 등¹⁹⁾의 Coomassie brilliant blue staining 과 Switzer 등²⁰⁾의 silver staining 방법에 준하여 실시하였다. 또한 단일클론 항GGT 항체와 백서의 각 조직내 GGT의 항원항체반응 상의 특성을 관찰하고자 Burnett 등²¹⁾의 방법에 준하여 Western hybridization을 실시하였다.

4. 단일클론 항GGT항체의 면역측정법 적용

단일클론 항GGT항체와 정제한 GGT의 항원항체반응 상의 특성을 관찰하기 위해 효소면역측정법 (ELISA)은 Burnette 등²¹⁾의 방법에 준하여 시행하였는데 시료가 마우스의 복수 및 정제과정 중의 분획일 때는 면역 마우스 혈청내 항체역가 측정을, hybridoma cell의 세포 배양배지일 때는 hybridoma cell cloning시 시행한 방법을 택하였다. 방사면역측정법 (RIA)은 효소면역측정법과 같은 목적으로 그 결과를 비교하여 보기 위하여 Mishell 등²²⁾의 방법에 준하여 방사성동위원소 표지항체를 이용 시행하였다. 2차 항체로 anti-mouse Ig peroxidase conjugate (KPL Co., MD) 대신에 ¹²⁵I labelled sheep anti-mouse Ig (Amersham Co., IL)을 사용한 것 이외에는 위의 효소면역측정법과 동일하게 시행하였다.

한편 본 실험에서 생성 정제한 단일클론 항GGT항체의 면역조직화학검사 (IHC) 및 자가방사기록검사 (ARG) 상 적용 여부 및 결과 비교를 위하여 IHC는 Polak 등²³⁾의 방법에 준하여 LSAB kit (DAKO Co.,

Japan)를 이용한 avidin-biotin-peroxidase complex 법으로 시행하였고, ARG는 Laskey 등²⁴⁾의 방법에 준하여 intensifying screen을 이용한 solid-state scintillation법으로 시행하였다.

결 과

1. GGT의 정제 및 단일클론 항GGT항체의 생성

GGT의 정제결과와 발암물질 투여군 간 조직의 경우 16마리에서 적출한 간 조직 250 g을 정제하여 단백질 1.9 mg, 효소활성도 125.6 units (U), 비활성도 66.1 U/mg, 순도 550.9배, 수율 20.8%를 얻었고 (Table 1), 정상군 간 조직의 경우 10마리에서 적출한 간 조직 100 g를 정제하여 단백질 3.8 mg, 효소활성도 35.5 U, 비활성도 9.2 U/mg, 순도 3,297.9배, 수율 49.3%를 얻었다.

단일클론 항GGT항체 생성 과정에서 면역 전에 마우스의 혈청내에 항GGT항체의 존재 여부를 검색한 결과 10마리에서 모두 1:320 이하 (1:320 1마리, 1:160 5마리, 1:80 3마리, 1:40 1마리)의 항체역가를 보였기에 실험에 사용하였다. 최초면역 3주 후부터 2주 간격으로 측정된 항원 면역군의 혈청 내 항GGT항체역가는 계속 증가하는 양상을 보였고 세포융합 전에 채혈한 혈청의 항체역가는 7마리 모두 1:5,120 이상으로 나타났다 (Table 2).

세포융합은 항원 면역군 7마리에서 채취한 비장세포와 마우스 골수종세포로 시행한 결과 840개의 wells중

Table 2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Anti-GGT Antibodies in Sera of GGT Immunized Mice

Mouse (Sex/ B.W. ^a)	GGT Group- Organ ^b	Anti-GGT antibody screening ^c			
		Initi- ation	First booster	Second booster	Final booster
1 (♀/25)	AAF-Li	80	640	2,560	>5,120
2 (♀/28)	AAF-Li	40	640	1,280	>5,120
3 (♀/28)	AAF-Li	160	640	5,120	>5,120
4 (♂/28)	AAF-Li	160	320	640	>5,120
5 (♀/30)	AAF-Li	80	1,280	5,120	>5,120
6 (♀/30)	AAF-Li	160	1,280	2,560	>5,120
7 (♂/30) ^d	AAF-Li	320	1,280	2,560	>5,120
8 (♂/30) ^d	AAF-Li	160	1,280	5,120	>5,120
9 (♂/32)	AAF-Li	80	320	1,280	>5,120
10 (♂/35) ^d	AAF-Li	160	320	1,280	>5,120

a: Body weight (g). b: GGT of the liver of AAF treated rat. c: Titration data of two-fold serial dilution analysis. d: These mice were ruled out due to morsus in tail.

Table 3. Mass Production of Monoclonal Anti-GGT Antibodies in Mouse Ascites

Hybridoma	Average ascites volume (ml/mouse)	Protein concentration ^a (mg/ml)			Total amount of immunoglobulin ^d (mg)
		Crude	ASP ^b	IAC ^c	
GGT-Hyb 1	5.0	32.58	4.91	2.05	1.83
GGT-Hyb 2	6.0	26.75	1.46	1.11	0.85
GGT-Hyb 3	6.5	25.40	0.37	0.29	0.15
GGT-Hyb 4	6.5	26.85	1.46	1.30	1.24
GGT-Hyb 5	5.5	23.11	2.18	1.87	1.60
GGT-Hyb 6	3.5	31.12	23.66	17.54	11.25

a: Lowry method. b: c: d: These data were calculated by the method of Langone et al¹⁶⁾.

221개의 wells에서 융합세포 집락이 육안적으로 관찰되었고, 이 가운데 14개의 well에서(특이 융합 효율 6.33%) 세포융합 4주 후 시행한 항체 분비 검색에서 양성반응을 보였다. 단일클론성을 갖는 hybridoma cell을 얻기 위하여 반복 시행한 cloning 결과 1차에서 14개, 2차에서 15개, 3차에서 6개의 hybridoma cell clones를 분리 Ig subtyping을 시행하여 세분화된 subisotype을 구하였다. 최종 6개의 hybridoma cell line secreting monoclonal anti-GGT antibody 1~6(GGT-Hyb 1-6)가 분리되었다(Table 3).

Hybridoma cell clones를 48마리의 마우스 복강내 주입하여 1개의 clone당 채취한 복수의량은 평균 5.5 ml, 단백질 농도는 평균 27.64 mg/ml이었다(Table

3). 이러한 결과는 마우스 48마리 중 38마리에 대한 평균값으로, 마우스에서 생성된 복수의량, 색, 그리고 점성 등에 있어서는 개체 차이를 크게 나타내었다. 배제된 10마리는 pristane에 의한 복막 자극에 대한 과민반응 및 복강내 hybridoma cell 주입 8주후에도 무반응을 보이는 경우이었다. 단일클론 항 GGT항체를 마우스복수로 부터 ammonium sulfate precipitation과 면역침착 크로마토그래피를 시행하여 정제하여 6개의 단일클론 항GGT항체(GGT-mAb 1-6) 분획을 얻었고, 1개의 분획당 단백질 농도는 각각 평균 5.67과 4.03 mg/ml을 나타내었다(Table 3).

Table 4. Type and Amount of Monoclonal Anti-GGT Antibodies

Designation	Hybridoma	Total volume (ml)	Type of binding rat GGT	Type of Immunoglobulin ^a	Total amount of immunoglobulin ^b	
					(A ₂₈₀)	(mg)
GGT-mAb 1	GGT-Hyb 1	6.0	AAF-Li ^c	IgG2a	0.439	1.83
GGT-mAb 2	GGT-Hyb 2	7.0	AAF-Li	IgG2b	0.175	1.85
GGT-mAb 3	GGT-Hyb 3	7.0	AAF-Li	IgG2b	0.031	1.15
GGT-mAb 4	GGT-Hyb 4	14.0	All	IgG2a	0.128	1.24
GGT-mAb 5	GGT-Hyb 5	13.0	NI-Li ^d	IgM	0.177	1.60
GGT-mAb 6	GGT-Hyb 6	13.0	NI-K ^e	IgG2a	1.246	11.25

a: These data were calculated by the method of Langone et al¹⁶⁾. b: These results were obtained by immunoglobulin subisotyping after third cloning. c: GGT of the liver of AAF treated rat. d: GGT of the liver of normal rat. e: GGT of the kidney of normal rat.

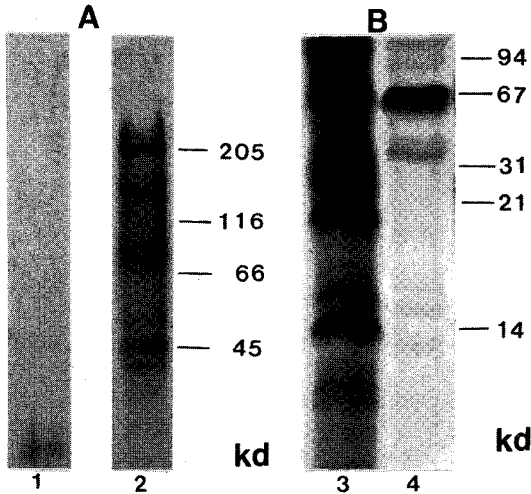


Fig. 1. Electrophoretic (SDS-PAGE) pattern of GGTs of rats in silver stain (A) and of monoclonal anti-GGT antibodies in Coomassie blue stain (B)

1: AAF treated rat liver GGT. 2: Normal rat liver GGT. 3: Mouse ascites. 4: Fraction after ammonium sulfate precipitation.

2. 단일클론 항GGT항체의 정성 및 정량

단일클론 항GGT항체의 Ig subisotyping을 3차 cloning 후 15개 hybridoma cell clones의 상층배지로 실시한 결과 IgG2a 3개, IgG2b 2개, IgG2b 2개, IgM 1개 이었고, 6개의 단일클론 항GGT항체의 Ig 정량 결과

A₂₈₀ 흡광도는 평균 0.366, 분획량은 평균 9.8 ml, Ig량은 평균 2.82 mg이었다 (Table 4).

전기영동은 SDS-PAGE 상에서 정상군의 간 조직 GGT는 210, 150, 110, 45, 30 Kd 부위에서 5개의 분획을 보였고 발암물질 투여군의 간조직 GGT는 140, 100, 40 Kd 부위에서 3개의 분획을 각각 보였다 (Fig. 1). 다음으로 PAGE 상에서는 40 Kd 부터 200 Kd까지의 부위에서 분획 양상을 나타내었다 (Fig. 2).

정제된 GGT를 시료로 SDS-PAGE를 시행하여 얻은 gel을 Western blot하여 단일클론 항GGT항체와 반응시켜 hybridization한 결과 발암물질 투여군 및 정상군의 간 조직 GGT는 모두 40 Kd 부위에서 양성반응을 보였다 (Fig. 3).

3. 단일클론 항GGT항체의 면역측정법 적용

6개의 단일클론 항GGT항체를 이용하여 효소면역측정법 (ELISA)을 시행한 결과 (Table 5) (GGT-mAb 1-4)의 경우 발암물질 투여군의 간 조직으로부터 정제된 GGT에 대한 항체역가 1 : 1,600~3,200으로 다른 GGT에 비해 높은 친화성을 나타내어 Western hybridization의 결과와 연관성을 보인 반면 GGT-mAb 5,6의 경우는 항체역가 1 : 100~800으로 효소면역측정법의 1 : 100~3,200에 비해 전반적으로 낮은 수준이었으나 각 GGT에 대해 상대적 비교를 해보면 발암물질 투여군의 간 조직으로부터 정제된 GGT는 GGT-mAb 5에서 다른 단일클론 항GGT항체 들에 비해 높은 친화성을 보

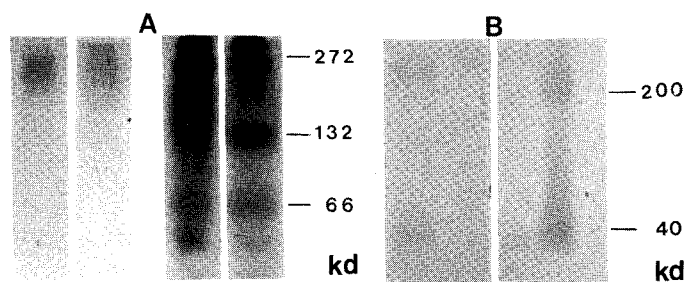


Fig. 2. Electrophoretic (PAGE) pattern and enzyme stain of GGTs of rats in coomassie blue and silver stain (A) and in enzyme stain with L- γ -glutamyl- ρ -nitroanilide (B)
1: GGT of the liver of AAF treated rat. 2: GGT of the liver of normal rat.

Table 5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Radioimmunoassay (RIA) for Determination of Anti-GGT Antibodies Binding to Tissue Specific GGT

Designation	Type of binding rat GGT in W-blot	Type of rat GGT coated in ELISA and RIA ^a		
		AAF-Li ^b ELISA/RIA	NI-Li ^c ELISA/RIA	NI-K ^d ELISA/RIA
GGT-MAb 1	AAF-Li ^b	1,600/400	100/200	100/400
GGT-MAb 2	AAF-Li	1,600	100	50
GGT-MAb 3	AAF-Li	3,200	200	200
GGT-MAb 4	All	3,200	100	50
GGT-MAb 5	NI-Li ^c	800/200	400/800	50/100
GGT-MAb 6	NI-K ^d	1,600/100	200/200	100/400

a: Titration data of two-fold serial dilution analysis. b: GGT of the liver of AAF treated rat. c: GGT of the the liver of normal rat. d: GGT of the kidney of normal rat.

Table 6. Antigen-antibody Reaction between Three GGTs and Six Monoclonal Anti-GGT Antibodies in Western Hybridization (W-hyb), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), RadioImmunoassay (RIA), Immunohistochemistry (IHC), and Autoradiography (ARG)

Designation	Type of binding rat GGT in W-blot	Type of binding rat GGT	W-hyb	ELISA/RIA	IHC	ARG
GGT-mAb 1	AAF-Li ^a	+	+	+	±	±
GGT-mAb 2	AAF-Li	±	+	+	+	+
GGT-mAb 3	AAF-Li	±	+	+	+	+
GGT-mAb 4	All	±	+	— ^d	+	±
GGT-mAb 5	NI-Li ^b	+	+	+	—	—
GGT-mAb 6	NI-K ^c	+	+	+	+	+

a: GGT of the liver of AAF treated rat. b: GGT of of the liver of normal rat. c: GGT of the kidney of normal rat.

d: This result was not worked out.

—: negative. ±: trace. +: positive.

였다(Table 5, 6).

단일클론 항GGT항체의 면역조직화학검사(IHC)상의 반응 특성을 알아본 결과 사용한 조직절편과 단일클론 항GGT항체에 따라 서로 다른 양상을 보였다. 즉, 발암물질 투여군의 간 조직에서 GGT-mAb 2의 경우 central vein의 endothelium에는 반응하지 않고 주변 부위의 hepatocyte에만 양성반응을 보이는 독특한 양상

을 나타내었고(Fig. 4. A, B), GGT-mAb 3의 경우 central vein의 주변 부위 뿐만 아니라 portal vein에 가까운 부위의 hepatic lobule의 hepatocyte에도 양성반응을 보이는 양상을 보였다(Fig. 4. C, D).

역시 같은 종류의 단일클론 항GGT항체를 이용하여 자가방사기록검사(ARG)를 시행한 결과(Fig. 5) 각 조직절편에 반응하는 단일클론 항GGT항체의 종류는 면역조직화학검사의 결과(Table 6)와 유사하여 GGT-mAb 1의 경우 발암물질 투여군의 간 조직(Fig. 5. A)과 비장조직(Fig. 5. E)에 양성반응, 정상군의 간 조직(Fig. 5. C)에 음성반응을 나타내었으나, GGT-mAb 5의 경우(Fig. 5. B, D, F)는 위의 모든 조직에서 음성반응을 나타내었다.

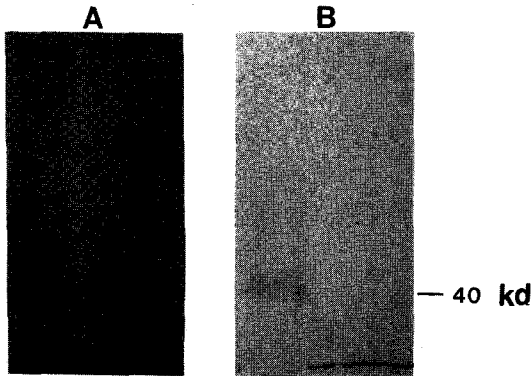


Fig. 3. Western hybridization of GGT transferred to nitrocellulose membrane with monoclonal anti-GGT antibodies

A: GGT-mAb 1. B: GGT-mAb 5.

1. GGT of the liver of AAF treated rat.
2. GGT of the liver of normal rat.

고 찰

1. GGT의 정제 및 단일클론 항GGT항체의 생성

백서의 hepatocellular carcinoma를 발생시킬 수 있는 여러 화학적 발암 유도방법 중 본 실험에서는 GGT의 정제용으로 Solt-Farber 등⁷⁾의 방법에 준하여 AAF 투여 후 정상식으로 교체하여 장기간 사육함으로써 간암을 확실하고 안정되게 발생시키고자 하였고, 면역조직화학검사용으로 Cameron 등⁸⁾의 방법에 준하여 최초 diethylnitrosamine 처리 후 AAF를 투여하며 일정시

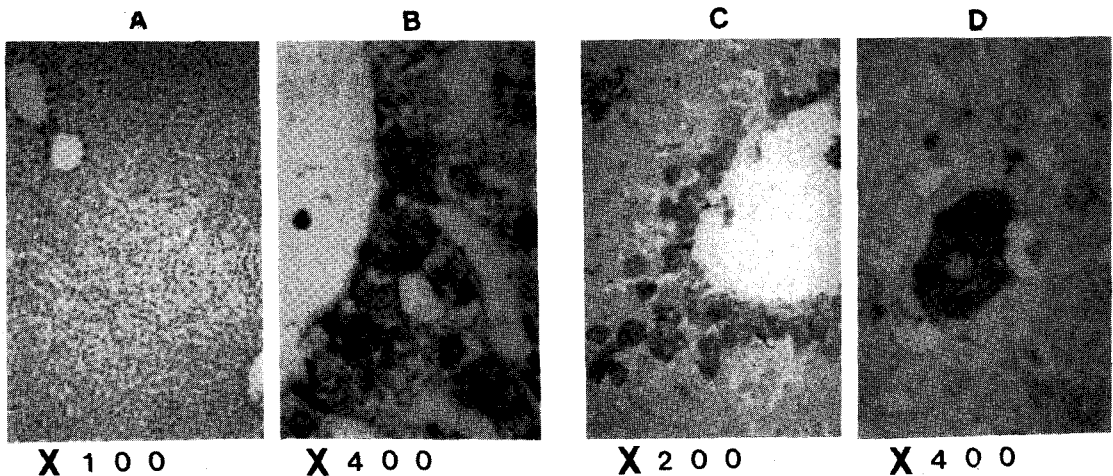


Fig. 4. Immunohistochemical expression between GGT in the liver of AAF treated rat (AAF-Li) and monoclonal anti-rat GGT antibodies.

A and B: AAF-Li (3 cycles) and GGT-mAb 2. C and D: AAF-Li (5 cycles) and GGT-mAb3.

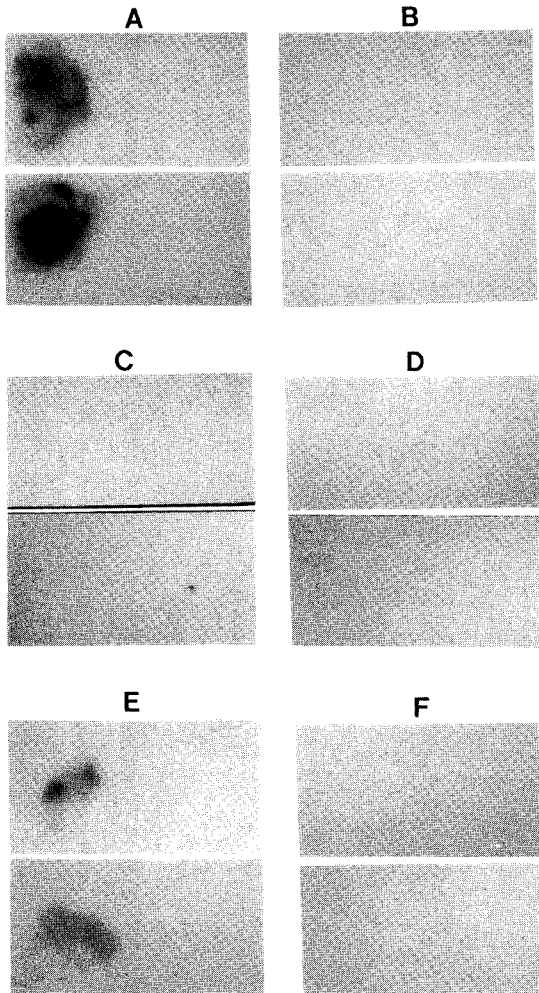


Fig. 5. Autoradiographic appearances between GGT in the livers (AAF-Li, NI-Li) and spleen (AAF-Sp) of rats and monoclonal anti-GGT antibodies

A: AAF-Li and GGT-mAb 1. B: AAF-Li and GGT-mAb 5. C: NI-Li and GGT-mAb 1. D: NI-Li and GGT-mAb 5. E: AAF-Sp and GGT-mAb 1. F: AAF-Sp and GGT-mAb 5.

간 간격으로 조직을 적출 조직학적 변화를 관찰하고자 하였다.

발암물질 투여군의 간 조직 GGT 정제의 경우 본 실험과 Lee 등²⁵⁾의 결과와 비교하여 보면 최종 순도에 있어서 전자는 550.9, 후자는 75.6으로 7배 이상 정제효율이 향상되었다(Table 1).

단일클론 항GGT항체의 생성을 위하여 발암물질 투

여군의 간 조직으로부터 정제한 GGT를 마우스에 면역한 결과 본 실험의 면역전 항GGT항체 역가는 1 : 320이었는데 최종면역 후 1 : 5,120 이상으로 증가한 바 (Table 3), Galfre 등¹⁵⁾의 항원에 대한 최종면역 후의 혈청내 항체역가가 최초면역 전에 비해 10배 이상 차이를 보여야 한다는 수준이나 Hurrell²⁶⁾, Langone 등¹⁶⁾ 등의 면역방법에 따른 1 : 1,000이상의 항체 수준보다 월등히 높았으므로 충분한 면역상태임을 알 수 있었다.

세포융합은 면역 마우스의 비장세포와 골수종세포로 융합, 세포배양 배지에서 안정된 증식을 이루는 세포주로 만들었고, 이후 시행한 hybridoma cell cloning 결과 840개의 wells중 221개의 wells에서 융합세포 집락을 보였는데 Donati 등²⁷⁾의 2,300개의 wells중 284개의 wells에서 세포융합 양성반응하고, 이중 5개의 단일클론 항GGT항체를 생성하였다는 것과 비교해 볼 때 세포융합률에 있어서는 약간 낮으나 융합세포에 대한 단일클론 항체 생성세포의 비율인 특이융합효율에서는 높은 수준으로 본다.

단일클론 항GGT항체의 증량 및 정제에 대하여 Hurrell²⁶⁾은 마우스의 복수 생성을 이용한 생체배지법이 hybridoma cell의 대량배양법보다 효율에 있어 100~1,000배 우수하여 1~6 mg/ml의 항체를 얻을 수 있었다고 하였는데, 본 실험에서도 면역친화 크로마토그래피과정 후 6개의 단일클론 항GGT항체 (GGT-mAb 1-6) 분획이 분리되었고 1개의 분획당 분획량은 평균 9.8 ml, Ig량은 평균 2.82 mg으로 (Table 3) Hurrell²⁶⁾의 결과와 비슷한 수준이었다.

2. 단일클론 항GGT항체의 정성 및 정량

단일클론 항GGT항체의 Ig subisotype을 살펴보면 본 실험의 경우 IgG2a 3개, IgG2b 2개, IgM 1개를 확인할 수 있었는데, Taniguchi 등⁵⁾이 human primary hepatoma GGT에 대해 6개의 IgM clones, Green 등⁴⁾이 dimethylnitrosamine으로 유도한 mesenchymal kidney tumours GGT에 대해 5개의 IgG clones중 1개의 IgG2a clone을 얻은 점 등과 비교해볼 때 본 실험의 단일클론 항GGT항체의 생성 및 정제 과정의 효율성은 이들과 비슷한 수준으로 볼 수 있다.

백서의 간 조직 GGT를 전기영동한 결과 SDS-PAGE 상에서 (Fig. 1. A) 정상군의 경우 5개, 발암물질 투여군의 경우 3개의 분획을 보였는데, 이는 burlina²⁸⁾,

Dunsford 등⁶⁾, Kojima 등²⁹⁾의 보고와도 상이한 결과로 이들의 보고 역시 서로 다르다는 점과 여건에 따라 다를 수 있을 것으로 본다. 단일클론 항GGT항체의 SDS-PAGE 결과 crude sample인 마우스의 복수는 다양한 단백분획을 나타내는데 비하여 ammonium sulfate precipitation을 시행한 시료는 Ig의 heavy와 light chain의 두 분획이 뚜렷한 바 항체의 정제가 진행된 것을 알 수 있었다(Fig. 1. B).

한편 PAGE 상에서 2개의 분획 사이에 다양한 소견을 보여 Meister 등¹¹⁾의 결과와 유사하였고, GGT의 구조 연구의 문제점 중의 하나인 glycosylation을 배제하지 못한 바 tailing 소견을 보여 정확한 분자량판별이 어려웠다.

Western hybridization 과정 중 nitrocellulose membrane transfer를 위한 SDS-PAGE 결과 위의 실험에서와 동일한 단백분획을 보였고, 분자량 측정물질로 prestained SDS-PAGE standard solution (Sigma Co., MO)를 사용함으로써 서로 다른 Western hybridization사이의 비교가 가능하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 Dunsford 등⁶⁾이 transplantable Morris hepatoma의 GGT로 생성한 OV-6 등의 단일클론 항체에서 56 Kd 부위의 GGT subunit에 양성반응을 보였다는 것과는 다른 양상으로 같은 백서의 간 중앙이라도 중앙 유도방식이 다른 암종사이에서는 서로 다른 종양특이 단일클론 항체가 생성될 수 있기 때문으로 사료된다. 한편 본 실험에서 발암물질 투여군 및 정상군의 간 조직 GGT 모두 40 Kd 부위에서 양성반응을 나타내었는데 이는 사용한 단일클론 항GGT항체의 종류가 다르다는 점에서 주목된다. 특정 GGT분획에 결합할 단일클론 항GGT항체는 다른 GGT 분획에서는 전혀 반응하지 않았다. 이러한 결과는 항원의 구조에 있어서 같은 분자량을 갖지만 다른 형태의 항원결정기를 갖을 가능성과 각 단일클론 항GGT항체가 서로 다른 항원결정기에 결합할 가능성에 그 원인이 있는 것으로 보며 이에 대한 연구는 추후 중이다.

3. 단일클론 항GGT항체의 면역측정법 적용

단일클론 항GGT항체와 GGT의 항원항체반응 상의 적용을 보고자 시행한 효소면역측정법(ELISA)에서 음성 대조군으로는 세포배양배지 또는 마우스 골수종세포의 상층배지, 양성 대조군으로는 마우스의 복수 생성이

전에는 Park 등¹⁰⁾이 제작한 가토의 항GGT혈청, 이후에는 마우스의 복수 또는 ammonium sulfate precipitation을 시행한 항체 분획 등이 항원 항체 반응상 적절하였다.

효소면역측정법상 6개의 GGT-mAb을 적용한 결과(Table 5, 6)는 Taniguchi⁵⁾ 등이 human primary hepatoma GGT에 대한 단일클론항체 γ -120와 조직 특이 GGT의 효소면역측정법상 상대적 친화성에 대한 보고와 유사한 결과로 즉, Western hybridization 상 어느 한 조직의 GGT에만 선택적인 반응 양상을 보인다 하더라도 효소면역측정법에서는 다른 조직의 GGT에서도 교차 반응이 일어날 수 있으므로 그 상대적 친화성을 통하여 결과 분석을 하여야 된다고 본다. 또한 방사면역측정법(RIA)의 결과와 비교하여 볼 때 효소면역측정법의 경우 Western hybridization과 낮은 연관성을 보이는 바 위양성률이 높다는 것을 의미하는 것으로 본다. 방사면역측정법과 비방사면역측정법에 대한 Edwards³⁰⁾의 분석에 따르면 방사능 붕괴반응이 pH, 온도 등의 물리화학적 변수의 영향을 받지 않으므로 같은 실험조건에서의 측정 시 정밀도나 에민도 등에 있어서는 비방사면역측정법이 방사면역측정법을 능가하지 못하나, 비방사면역측정법의 경우 방사선장해의 위험이 없다는 점, 측정 시 사용되는 시약의 유효기간이 길다는 점, 표지후 분리 과정이 필요없는 경우도 있다는 점 등의 이유로 그 사용이 증가하는 추세에 있다고 한 바 본 실험의 결과도 이에 따라 설명될 수 있다 하겠다.

면역조직화학검사(IHC)상 6개의 GGT-mAb을 적용한 결과 GGT-mAb 3의 경우(Fig. 4. C, D) Hixon 등⁴⁾이 발암물질 투여 백서의 oval cells에 대한 단일클론항체 258.7 및 270.11과 유사한 양상이나, GGT-mAb 2의 경우(Fig. 4. A, B)는 간 조직 GGT에 대한 현재까지 보고된 Hixon 등⁴⁾, Taniguchi 등⁵⁾, Dunsford 등⁶⁾의 단일클론 항GGT항체를 생성 결과에서는 볼 수 없는 central vein과 바로 인접한 부위의 hepatocyte에 만 양성반응을 보이는 독특한 양상이었다. 또한 GGT-mAb 2의 경우 사용한 간 조직은 Cameron 등⁸⁾의 방법에 의해 3 cycles 즉 15주 동안 AAF를 투여한 것인데, Dunsford 등⁶⁾이 계속적인 diethylnitrosoamine 투여 5주 후부터 periportal area에서부터 단일클론 항체 H-4에 양성반응을 보이는 세포가 등장하였다는 결과와 발암부위 및 시기를 비교해 볼 때 서로 다른 발암물질 및

발암방법에 의한 다른 결과라 하겠다. 자가방사기록검사(ARG)는 방사성동위원소 및 이의 표지 화합물 또는 조직은 photographic plate 상에서 반응하여 radiograph를 제작하는 기술로 magnification의 정도, 사용하는 emulsion 및 방사성동위원소의 종류 등에 따라 분류되는데, Laskey 등²⁴⁾은 film images를 향상시키기 위해 이용되는 고히상 scintillation의 종류에 따라 ^3H , ^{14}C , ^{35}S 등의 방사성동위원소에 사용되는 organic scintillator와 ^{125}I 와 ^{32}P 등의 방사성동위원소에 사용되는 intensifying screens으로 자가방사기록검사를 분류하기도 하였다. 자가방사기록검사는 측정상의 해상력, 정밀도, 예민도 등의 측면에서 면역조직화학검사에 비하여 우수한 반면 미세 자가방사기록검사가 개발되어 있기는 하나 실제적인 면에 광학 및 전자 현미경을 이용한 조직학적 부위를 구분하기 어려운 단점을 갖고 있으므로 이들 검사법에 사용되는 단일클론항체의 특성이나 검사목적 등에 따라 적절한 방법을 선택하거나, 또는 두 검사법을 모두 병행한다면 진단의 신뢰성을 높일 수 있다고 본다.

본 실험의 경우 일반적인 자가방사기록검사 방법인 silver crystal 및 gelatin을 함유한 emulsion과 환원제인 developer를 사용하는 방법을 택하지 않고 단순히 sheep anti-mouse Ig에 효소인 peroxidase 대신 방사성동위원소인 ^{125}I 를 표지한 2차 항체를 사용하는 방법을 택하였으나 그 결과에 있어서 양성 또는 음성 반응으로 분명히 구분 판독할 수 있는 소견을 보였다. 자가방사기록검사 효율에 영향을 주는 인자로는 specimen의 두께, emulsion 처리 상태, development 상태, 1개 이상의 particle이 silver crystal과 반응할 가능성, 노출시 latent image의 소실 정도 등을 들 수 있겠는데 이들 인자의 조건이 적합하였으므로 emulsion과 developer를 사용하지 않았어도 판독 가능한 결과를 얻은 것으로 사료된다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 단일클론 항GGT항체의 효소면역측정법, 방사면역측정법, 면역조직화학검사, 그리고 자가방사기록검사에서의 적용은 모두 가능하였고 일부 결과에서의 차이 외에는 전반적으로 유사한 양상을 보였다 (Table 6). 그러나 각 검사법 마다 보편적인 적용을 위하여서는 어떤 검사에 대해서는 양성반응을 보이면서 또 다른 검사에 대해서는 음성반응을 보이는 일부 검사 결과 간의 차이에 대한 원인 규명과 정성 및

정량 결과를 위한 의사결정분석법, 정도관리 등의 확립이 추구되어야 할 것으로 본다.

결 론

단일클론 항 GGT 항체 (monoclonal anti- γ -glutamyltransferase antibodies)를 이용하여 백서에서의 GGT 분포에 대한 조직 특이성을 보고자 발암물질 투여군의 간 조직으로부터 정제한 GGT를 항원으로 마우스에 면역하여 얻은 비장 세포와 마우스 골수중세포 (SP2-Ag14)를 세포융합, hybridoma cell을 생성하였다. 이로 부터 분리되는 단일클론 항GGT항체를 증량, 정제, 정성 및 정량 실험을 실시하였고, 이를 효소면역 측정법 (ELISA), 방사면역측정법 (RIA), 면역조직화학검사 (IHC). 자가방사기록검사 (ARG) 등에 적용한 결과는 다음과 같다.

1) 발암물질 (AAF) 투여군의 간 조직으로부터 정제한 GGT는 수율 20.8%, 정제배수 550.9배로 정제되었고, 세포융합은 특이융합 효율 6.33%로 6개의 hybridoma cell clones (GGT-Hyb 1~6)를 분리하였다.

2) 단일클론 항GGT항체의 정성 및 정량 결과 IgG2a 3개, IgG2b 2개, IgM 1개 등 6가지로, 평균 2.82 mg의 immunoglobulin을 포함하는 단일클론 항GGT항체 (GGT-mAb 1-6)를 얻었고, Western hybridization 상 GGT-mAb 1-3은 발암물질 (AAF) 투여군의 간 조직, GGT-mAb 5는 정상군의 간 조직 GGT 40 Kd분획에서 각각 반응하였고 다른 GGT와는 전혀 반응하지 않았다.

3) 단일클론 항GGT항체에 의한 효소면역측정법, 방사면역측정법, 면역조직화학검사, 자가방사기록검사의 적용은 모두 가능하였다.

이상을 종합하여 볼 때 발암물질 투여군의 간 조직 GGT에 대한 단일클론 항GGT항체의 특성을 알 수 있었고, 이를 효소 및 방사면역측정법 등에 적용이 가능함을 통하여 백서의 조직내 GGT의 분포 및 발현 특성 등을 관찰할 수 있었으며, 나아가 간담도계 질환, 특히 간 종양의 조기 진단을 위한 기초자료로 사용 가능할 것으로 본다.

REFERENCES

- 1) Meister A, Anderson ME: *Glutathione. Annu Rev Biochem* 52:711, 1983
- 2) Tate SS, Meister A: γ -glutamyltranspeptidase from kidney. *Meth in Enzymol* 113:400, 1985
- 3) Meister A, Tate SS: *Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. Annu Rev Biochem* 45:599, 1976
- 4) Hixon DC, Allison JP: *Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline-deficient diet. Cancer Res* 45:3750, 1985
- 5) Taniguchi N, House S, Kuzumake N, Yokisawa N, Yamagiwa S, Iizuka S, Makita A, Sekiya C: A monoclonal antibody against γ -glutamyltranspeptidase from primary human hepatocellular carcinoma: its use in ELISA of sera of cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 75:841, 1985
- 6) Dunsford HA, Sell S: *Production of monoclonal antibody to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. Cancer Res* 49:4889, 1989
- 7) Solt DB, Cayama E, Tsuda H, Enomoto K, Lee G, Parber E: *Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetaminofluorene plus partial hepatectomy or carbon tetrachloride. Cancer Res* 43:188, 1983
- 8) Cameron R, Kellen J, Kolin A, Malkin A, Farber E: γ -Glutamyltranspeptidase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 38:823, 1978
- 9) Yim HK, Park YG, Ryu CK: *Purification and characterization of γ -glutamyltranspeptidase of kidney influenced by concurrent occurrence of hepatoma in rat. Korea UMJ* 25(1):353, 1988
- 10) Park YG, Ryu CK: *Immunological study of isozyme pattern of γ -glutamyltranspeptidase from various tissue. New Medical J (Korea)* 32(2):25, 1989
- 11) Kim MH, Ryu CK: *Study of isozyme pattern of γ -glutamyltranspeptidase purified with immunoadsorbent. Korea UMJ* 26(3):509, 1989
- 12) Lowry OH, Rosenburg NJ, Farr AL, Randall RJ: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem* 193:265, 1951
- 13) Strömmer JH, Theodorsen L: *Recommended method for the determination of γ -glutamyltranspeptidase in blood. J Clin Lab Invest* 36:119, 1976
- 14) Goding JW: *Antibodies production by hybridomas. J Immunol Methods* 39:285, 1980
- 15) Galfre G, Milstein C: *Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. Meth in enzymol* 73(B):3-46, 1981
- 16) Langone JJ, Van Vunakis H: *Immunological techniques, part I; Hybridoma technology and monoclonal antibodies. Meth in Enzymol* 121:1, 1986
- 17) Hudson L, Hay EC: *Practical immunology (2nd, Ed). Blackwell Scientific, Oxford, 1980*
- 18) Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature* 227:681, 1970
- 19) Wilson CM: *Staining of proteins on gels; Comparison of dyes and procedures. Meth in Enzymol* 91: 236, 1983
- 20) Switzer RC, Merrill CR, Shifrim S: *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem* 24:905, 1978
- 21) Burnette WH: *Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem* 112:195, 1981
- 22) Mischell BB, Shiigi SM (eds): *Solid phase radioimmunoassays. In selected methods in cellular immunology. WH Freeman, NY* 373, 1980
- 23) Polak JM, Van Noorden S: *Immunocytochemistry: practical applications in pathology and biology. John Wright PSG, Littleton, Mass, 1983*
- 24) Laskey RA: *The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. Meth in Enzymol* 65:363, 1980
- 25) Lee CN, Park YG, Ryu CK: *Characterization of partially purified γ -glutamyltranspeptidase in hepatocellular carcinoma induced by 2-acetamidofluorene in rat. Korea UMJ* 24(3):117, 1987
- 26) Hurrell JGR: *Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications. CRC Press, Boca Ranton, FL, USA 1982*
- 27) Donati R, Sabolovic N, Wellman M, Artur Y, Siest G: *Monoclonal antibody to human kidney γ -glutamyltranspeptidase. Clinica chimica Acta* 174: 149, 1988

- 28) Burlina A: *Improved method for fractionating γ -glutamyltransferase by electrophoresis on cellulose acetate. Clin Chem 24:502, 1978*
- 29) Kojima J, Kanatani M, Nakamura N, Kashiwagi T, Kohjoh F, Akiyama M: *Electrophoretic fractionation of serum γ -glutamyltransferase in human hepatic cancer. Clin Chim Acta 106:165, 1983*
- 30) Edwards R: *Immunoassay; An introduction. William Heinemann Medical Books, London, 1985*