

사람 양수중 다종의 세포외성 포스포리파제 A₂의 부분정제 및 특성

전용주* · 백석환* · 이지혜* · 문대철* · 민병우** · 장현욱**

*영남대학교 약학대학, **대구 파티마병원

(Received December 20, 1996)

Partial Purification and Characterization of Multiple Forms of Extracellular Phospholipase A₂ in Human Amniotic Fluid

Yong Ju Jeon*, Suk Hwan Baek*, Jee Hae Lee*, Tae Chul Moon*,
Beong Woo Min** and Hyeun Wook Chang**

*College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

**Phatima Hospital, Taegu, Korea

Abstract—Multiple forms of extracellular phospholipase A₂ have been detected in human amniotic fluid (HAF). When HAF was subjected to heparin-Sepharose column chromatography, phospholipase A₂ activity was detected in both heparin-non binding and binding fraction. The activity of heparin-non binding fraction was further purified by sequential uses of column chromatographies on butyl-Toyopearl 650 M and DEAE-Sephacel. DEAE-Sephacel fraction contained three different phospholipase A₂ activities (Peak I, II, III). The molecular weight of DEAE-Sephacel fraction phospholipase A₂ determined by SDS-PAGE were about 52 KDa (Peak I). Peak II, III required micromolar Ca²⁺ ion for its maximum activity, but Peak I enzyme showed calcium independent phospholipase A₂ activity and showed broad range of pH (6.0~10.0) optimum. All these enzymes were not recognized by a monoclonal antibody raised against phospholipase A₂ from human synovial fluid. These results suggest that HAF might contain multiple forms of extracellular phospholipase A₂, which may neither belong to the 14 KDa group II phospholipase A₂ family nor cytosolic phospholipase A₂.

Keywords □ Human Amniotic Fluid, Multiple Extracellular phospholipase A₂ (PLA₂), Calcium independent PLA₂, Group II PLA₂

Eicosanoid 생합성의 전구물질인 아라키돈산은 생체막 구성 성분인 인지질의 2번 위치에 에스테르형으로 결합되어 있으며, 세포내에는 유리상태로는 거의 존재하지 않다고 생각되고 있다. 세포에 어떤 생리적인 자극을 받았을때, 생체막중의 phospholipase가 활성화되어, 이 효소의 작용으로 인지질이 가수분해되어 아라키돈산이 유리된다고 일반적으로 생각 되어지고있다.¹⁾ 이와같이 인지질에서 아라키돈산을 유리시키는 주된 효소는 phospholipase A₂ (PLA₂)와 phospholipase C

(PLC)가 알려져 있다. PLA₂가 주목을 받는 이유는 이 효소가 아라키돈산 cascade(인지질에서 아라키돈산을 유리시켜 생리활성물질을 생합성하는 과정)에 관여하는 효소계의 주요 조절 효소라고 생각하기 때문이다. 지금까지 보고된 PLA₂의 단백질학적 특성 및 생리활성등에 관한 연구에는 사독이나 체장유래의 PLA₂가 주로 이용되었으나, 최근에는 다양한 질병 및 실험동물 염증모델에서 높은 PLA₂ 활성이 보고된 염증성 PLA₂에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉, 그람 음성균에 의한 패혈증²⁾, 카제인유도 복막염³⁾, 지연성 과민증 및 알러지성 포도막염⁴⁾ 등과 사람의 질병, 즉 류머티스성 관절염 환자의 관절액⁵⁻⁷⁾, 건선 피부염 환자의 상피등^{8,9)}에서

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2811 (팩스) 053-811-3871

PLA₂의 높은 활성이 관찰된 바 있다. 지금까지 포유동물에서 정제된 PLA₂는 크게 세포외성과 세포내성으로 구분되며 특히 세포외성의 분비형 PLA₂는 그들의 1차 구조에 기인하여 11-cystein의 존재유무에 따라 group I과 group II로 나누어진다.¹⁰⁾ 채장유래의 group I PLA₂와 염증국소의 group II PLA₂는 14 kd의 분자량을 가진다는 점에서는 비슷하지만 아미노산 배열의 상동성은 단지 30% 정도에 불과하다.¹¹⁾ 그리고 세포내서의 PLA₂는 대략 85 kd의 고분자 단백질로서^{12, 13)} group I, II와는 homology가 없는 것으로 보고되어 있다. 이 세포질 PLA₂는 세포내에서 Ca²⁺의존적으로 막으로의 이행이 가능하며 sn-2위치의 아라키돈산의 특이성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 신호전달에의 관여가 예상되고 있다.

한편, 출산시 아라키돈산 대사산물이 많이 관여하고 있음은 여러 보고를 통하여 잘 알려져 있다. 분만에 있어서 프로스타그란딘(PG)의 역할은 Liggins등의 양을 이용한 실험에서 밝혀졌다.¹⁴⁾ 즉 분만개시 6일전 태아혈중 corticoid의 증가가 시작되고, 여기에 일치하여 모체혈중의 에스트로젠이 증가하며, 프로그스테론이 급격히 감소하였으며, 또한 분만 수 시간전부터 자궁정맥내의 PGF_{2α}가 급격히 증가하는 현상이 보고되어, PG가 분만에 깊이 관여함이 밝혀졌다. 또한 분만시에는 양수중에 유리의 아라키돈산은 6~10배정도 증가하며¹⁵⁾, 분만 개시때 증가되는 아라키돈산은 fetal membrane(양막과 활평용모막)에서 유리된다고 보고하고 있다.¹⁶⁾ Okita등¹⁷⁾은 fetal membrane에 있는 diacyl PE와 PI에서 선택적으로 아라키돈산이 유리 된다고 보고하였다. 사람에게 있어서 분만이 가까워오면 PGE_{2α}와 PGF_{2α}는 혈중, 뇨중, 양수중에 현저히 증가하며 양수, 용모, 탈락막, 태반에 있어서 6-keto-PGF_{1d}의 양을 조사하였을때, 특히 양수중에 고농도로 함유되어 있어서 Mitchell등은 양수가 분만조절에 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. 이와같이 분만의 진행과 더불어 PG의 생산이 증가되기 위해서는 태반, 양막, 자궁등에서 phospholipase A₂에 의한 아라키돈산이 유리되어야만 할 것이다. MacDonald등^{15, 16)}은 진통이 시작되기 전후의 양수를 취하여, 그 중의 아라키돈산량을 분석한 결과, PE와 PI의 아라키돈산이 진통 시작후 감소됨을 보고하고, 진통시작과 더불어 PG의 전구체인 아라키돈산이 PE나 PI에서 특이적으로 공급됨을 시사하였다. 따라서 양막, 자궁내막등에서 아라키돈산을 유리시키는

때는 PLA₂, PLase C, lipase등이 관여하며, 또한 양막에서의 아라키돈산동원에는 Ca²⁺이 중요한 조절인자일 것이라고 Johnston은 보고하였다.¹⁵⁾ 그러나 양수중에는 세포외성 PLA₂에 대한 보고가 전혀 없으며, Takahashi등¹⁸⁾은 양수중의 PI의 량과 PLC와 분만과의 상관관계를 보고한 바 있다. 즉 임신 30주부터 37주까지는 양수중에 PI가 증가하다가 그 이후에는 서서히 감소하며, 양수중의 PLC 활성은 출산이 가까워질수록 증가하므로, 양수중의 PLC가 아라키돈산동원에 깊이 관여하여 분만조절에 중요하다고 지적하였다. 이들은 양수중에는 세포외성 PLA₂활성이 없다고 지적하였다. 이때 기질로서 1-stearoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl PC를 사용하였다. 그러나 저자들은 1-acyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl PE로 사용한 예비실험에서 저자들이 보고한 류마티스 관절염 환자의 관절액⁹⁾, 흉막염 환자의 흉막액중의 세포외성 PLA₂보다 훨씬 강한 활성을 가진 효소가 존재함을 확인하였다.¹⁹⁾

양수에서의 PLA₂의 존재 가능성이 PG의 존재와 더불어 예측되었으나 아직까지 몇 종류의 효소가 존재하는지 또한 단백질화학적 성상이 어떤지 보고가 없기 때문에, 본 연구에서는 양수에 존재하는 세포외성 PLA₂를 정제하고 그 특성을 조사하므로써 출산에 있어서 이들 효소들의 역할에 대한 기초적 지식을 제공함과 동시에, 각종 염증부위에 높게 존재하는 세포외성 PLA₂와 그 생화학적 특성이 어떻게 다른가를 비교, 검토하였다.

실험방법

실험재료 및 시약

실험재료 - 출산시 배출되는 양수를 파티마병원 산부인과에서 제공받아 4°C에서 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 침전물과 세포 혼합물을 제거한 상층액을 효소원으로 -70°C에 보관하여 사용하였다.

시약 - Heparin-Sepharose CL-6B 및 DEAE Sephacel은 Pharmaceas로부터, butyl-Toyopearl 650 M은 Tosoh사로부터, SDS molecular weight marker 및 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, CaCl₂등은 Sigma사로부터, Comassie brilliant blue, 2-mercaptoethanol, TEMED, acrylamide, bis-acrylamide 등은 Bio-Rad사로부터 1.4-bis(2-(phenyloxazolyl)) benzene(POPOP), 2,5-diphenyloxazole(DPO)는 Dojin사로부터 구입하여 사용

하였으며, 이 외의 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

기질의 조제

1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine 및 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine은 Arai등의 방법²⁰⁾에 의해 제조하였으며 [1-¹⁴C] linoleic acid 및 1-acyl-2-[1-¹⁴C]arachidonylphosphatidyl-ethanolamine는 Amersham사에서 구입하여 사용하였다

Phospholipase A₂ 활성의 측정

PLA₂ 활성 측정은 Ethanol/Toluene(1/1, V/V)중 에 녹아있는 1-acyl-2-[1-¹⁴C]linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (1,000 cpm/nmol)을 시험관에 분취한 후, 질소가스로 용매를 휘발시키고 lipid film을 만든 뒤, 일정량의 증류수를 가하여 ultrasonic cleaner (Branson 2200, USA)로 초음파 처리하여 기질로 사용하였다. PLA₂활성은 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 기질 20 nmol 및 효소를 함유한 반응액을 37°C로, 지정된 시간 동안 반응한 후, 생성된 [¹⁴C]유리지방산을 Dole등의 방법²¹⁾에 따라 추출하여 liquid scintillation counter Minaxi Tri-Carb, Packard, USA)로 측정하여 PLA₂ 활성으로 환산하였다.

Phospholipase A₂의 정제

Step 1---Heparin-Sepharose CL-6B column chromatography - 0.15 M NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 미리 평형시켜둔 heparin-Sepharose CL-6B 칼럼 (Bio-Rad, 25 mm×15 cm)에 양수 (300 ml)를 적용한 후, 동일 완충액으로 헤파린칼럼에 결합하지 않은 단백질 분획을 용출시킨 다음, 1분획당 8 ml, 1 ml/10 min의 유속으로 NaCl농도를 step-wise gradient방법으로 1M까지 증가시키므로서 헤파린칼럼에 결합한 단백질분획을 용출시켰다. 각 분획은 280 nm에서 단백질 흡광도를 측정하고 동시에 위에서 서술한 방법으로 PLA₂ 활성을 측정하였다.

Step 2---Butyl-Toyopearl column chromatography

- heparin-Sepharose CL-6B 칼럼에서 얻은 헤파린칼럼-비결합성 PLA₂ 활성 분획 (320 ml)을 모아 소수성 칼럼인 butyl-Toyopearl 650M 칼럼 (Bio-Rad, 15 mm×20 cm)에 적용하였다. 헤파린칼럼-비결합성

PLA₂ 활성 분획을 포화 30% 황산암모늄으로 한후, 0.15 M NaCl, 30% 황산암모늄, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 미리 평형시켜둔 butyl-Toyopearl 칼럼에 적용하였다. 동일 완충액으로 1분획당 8 ml, 1 ml/min의 유속으로 단백질을 용출시킨 후, 황산암모늄 농도를 0%까지 step-wise gradient 방법으로 감소시키면서 1분획당 8 ml, 2 ml/min의 유속으로 단백질을 용출시키고 동시에 PLA₂ 활성을 측정하였다.

Step 3---DEAE-Sephacel column chromatography

- butyl-Toyopearl 칼럼 크로마토그래피에서 얻은 PLA₂ 활성 분획 (208 ml)을 더욱 정제하기 위하여 DEAE-Sephacel 칼럼크로마토그래피에 적용하였다. 먼저 소수성칼럼에서 얻은 활성 분획을 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액에 대해 투석한 후, 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 미리 평형시켜둔 DEAE-Sephacel 칼럼크로마토그래피 (Bio-Rad, 25 mm×15 cm)에 적용한 후, 동일 완충액으로 단백질을 용출시킨 다음, 1분획당 8 ml, 24 ml/min의 유속으로 NaCl 농도를 1 M까지 step-wise gradient 방법으로 증가시키면서 단백질을 용출시키고 각 분획마다 PLA₂ 활성을 측정하였다.

Monoclonal antibody (HP-1)와 교차반응

만성 류마티스관절염 환자의 관절액에서 정제된 PLA₂에 대한 단클론항체 (HP-1)은 동경대학 약학부 Murakami박사로부터 제공받아 사용하였다. 양수중에 함유되어 있는 PLA₂ 적당량을 0.2% BSA-TBS를 함유한 반응액에서 HP-1과 1시간동안 실온에서 반응시킨다음, 그 중 일부를 취하여 위에서 서술한 방법과 동일하게 PLA₂ 활성을 측정하여 두 PLA₂ 사이의 교차결합성 실험을 행하였다.

기타 실험

SDS-polyacrylamidegel electrophoresis는 Laemmli 방법²²⁾에 따라 실시하였고, 단백질 함량은 BSA (bovine serum albumin)을 표준물질로 하여 Pierce protein assay kit²³⁾로 측정하였다.

결과 및 고찰

양수중에는 어떠한 종류의 PLA₂가 존재하는지 알아보기 위하여 Sephadex G-75 칼럼 크로마토그래피를

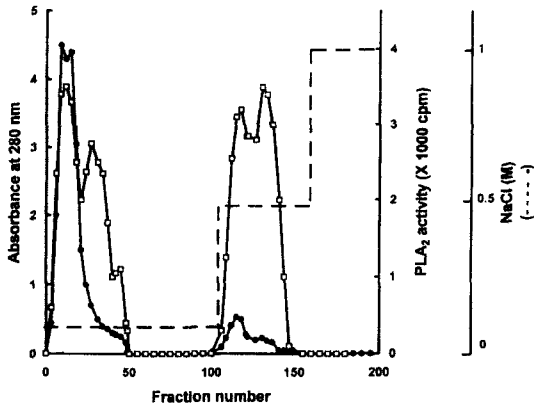


Fig. 1 — Heparin-Sepharose chromatography of human amniotic fluid phospholipase A₂. was applied onto a heparin-Sepharose column (2.5×15 cm) preequilibrated with 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) containing 0.15 M NaCl. The column was washed and then eluted with the same buffer containing 1 M NaCl. The flow rate was 1 ml/10 min per fraction. Protein at 280 nm(●), phospholipase A₂ activity(□).

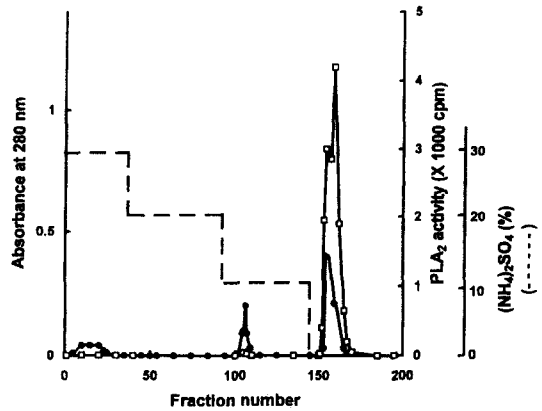


Fig. 2 — Elution profile of butyl-Toyopearl 650 M column chromatography. The pooled heparin non-binding fraction was brought to 30% saturated with solid ammonium sulfate and applied onto butyl-Toyopearl 650M column(1.5×20 cm), which had been 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) containing 1 M NaCl and 30% ammonium sulfate. Protein at 280 nm(●), phospholipase A₂ activity(□).

행한 결과, 고분자형과 저분자형의 PLA₂ 활성이 관찰됨으로서 최소한 2종류의 PLA₂가 존재함이 예상되었다. (data not shown) 또한, heparin-Sepharose CL-6B 칼럼 크로마토그래피에서도 헤파린칼럼에 결합하지 않는 PLA₂와 결합하는 PLA₂ 두 분획이 용출되었다 (Fig. 1). 즉, NaCl 농도를 단계적으로 증가하였을 때 0.15 M 분획(헤파린칼럼 비결합분획)과 0.5 M 분획에서 PLA₂ 활성이 관찰되었으며, 그 중 헤파린칼럼 비결합분획의 PLA₂ 활성은 약 5.6배 정제되고 회수율은 약 79%였다. 일반적으로, 헤파린에 친화성을 가지는 PLA₂는 group II형의 저분자 PLA₂⁵⁻⁷⁾이므로 양수중에는 Sephadex G-75 칼럼에서 관찰된 것과 마찬가지로 최소한 2종류의 PLA₂가 존재함을 알수 있었다. Sephadex G-75 칼럼에서 고분자로 나타난 PLA₂ 활성분획은 헤파린칼럼 비결합성으로, 저분자로 나타난 PLA₂ 활성분획은 헤파린칼럼 결합성 PLA₂임을 확인하였다. Heparin-Sepharose 칼럼에서 나타난 PLA₂ 활성분획 중 헤파린칼럼에 결합하지 않는 분획을 더욱더 정제하기 위하여 소수성 칼럼인 butyl-Toyopearl 칼럼을 선택하여 얻은 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 0.15 M NaCl을 함유한 완충액에서 황산암모늄농도를 단계적으로 감소시키면서(30%→20%→10%) 용출시켰을 때 PLA₂ 활성은 0% 황산암모늄농도에서 나타났

으며 이 단계에서 PLA₂는 약 39배 정제되었다. butyl-Toyopearl 칼럼에서 얻은 PLA₂ 활성분획을 모아 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충액으로 황산암모늄가 완전히 없어질때까지 투석한 다음, DEAE-Sephacel 칼럼에 적용하여 NaCl 농도를 20 mM부터 1 M까지 단계적으로 증가시키면서 단백질을 용출시켰을 때 20 mM (Peak I), 0.3 M (Peak II), 1 M (Peak III) 농도에서 PLA₂ 활성이 나타났다(Fig. 3). 이들중 Peak I에서 용출된 PLA₂ 활성분획은 약 500배 정제되었다. Peak I 효소를 centricon-10(Amicon)으로 농축하여 SDS-PAGE(10%) 하였을 때(Fig. 6) SDS상에서 저분자의 band는 활성이 전혀 없는 분획에서도 나타났기 때문에, 추정되는 분자량은 약 52 KDa의 새로운 PLA₂ 일종이라고 생각된다.

단백화학적 특성을 검토하였다. Peak I의 pH 변화에 따른 효소의 활성 변화를 관찰한 결과(Fig. 5A), 최적 pH가 6.0부터 10.0까지 광범위한 영역에서 효소의 활성을 나타내었으며, Ca²⁺의 농도변화에 따른 영향을 검토한 결과(Fig. 5B), Peak I의 효소인 경우 Ca²⁺ 비의존성을 나타내었으며, Peak II, Peak III의 효소인 경우는 μM농도의 Ca²⁺에서 충분한 효소활성을 나타내는 것으로 보아 양수중의 헤파린칼럼 비결합분획의 PLA₂는 지금까지 보고된 PLA₂와는 다른 효소임이 예

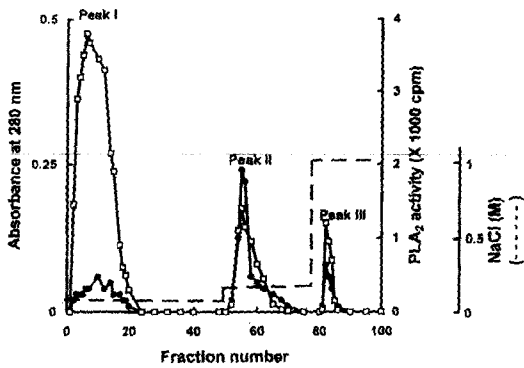


Fig. 3—Elution profile of DEAE Sephacel column chromatography. 0% ammonium sulfate fraction was applied onto DEAE Sephacel column(2.5×15 cm) preequilibrated with 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) containing 20 mM NaCl. Protein at 280 nm (●), phospholipase A₂ activity(□).

상되었다.

세종류 효소의 화학수식에 대한 영향을 비교, 검토한 결과(data not shown) 세종류 효소 모두 -SH기 수식제인 iodoacetamide나 serine esterase 저해제인 PMSF에 대해서는 3 mM 농도까지 증가시켜도 별다른 영향을 받지 않았으나, PLA₂ 저해제인 mepacrine에 의해서는 3 mM에서 세효소 모두 90% 이상 활성이 소실되었다. 그리고 여러 종의 PLA₂에 대해 활성자리수 식제로 알려진 *p*-BPB(*p*-bromophenacyl bromide)에 의해서는 peak I과 peak III는 3 mM 농도에서 70% 정도 활성이 소실되었으나, peak II에 대해서는 별다른 영향을 미치지 못하였다. 이것으로 보아 peak I, peak III의 활성자리에는 histidine 잔기가 관여하리라 예상된다. DTT에 대해서는 peak I, peak III가 60% 정도 활성이 소실되는 것으로 보아 이 두효소의 삼차원적인 구조를 유지하는 데는 disulfide bridge가 중요함이 예상된다. 또한 세효소 모두 인지질 2번위치에 결합한 지방산에 대한 특이성은 없었다.

이들 세효소와 염증부위에 존재하는 PLA₂와의 면역학적 상관관계가 있는지 알아보기 위하여 류마티스성 관절염 환자의 관절액에서 정제한 PLA₂에 대한 단클론 항체인 HP-1과의 교차반응성을 검토하였다(Fig. 4). 그 결과 관절액에서 정제한 PLA₂는 항체의 용량의존적으로 효소활성이 저해된 반면, 양수증의 PLA₂는 활성이 전혀 저해되지 않았기 때문에 류마티스성 관절염 환자의 관절액중의 PLA₂와는 공통의 항원결정기를 가지

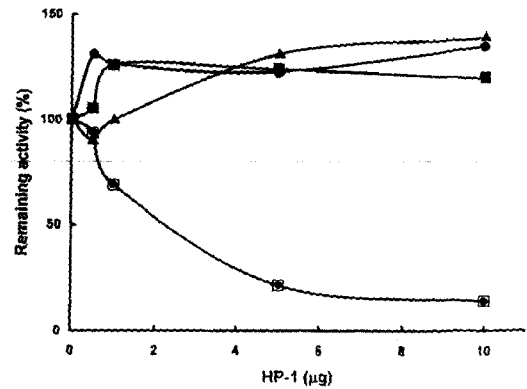


Fig. 4—Effects of anti-human 14 KDa group II phospholipase A₂ monoclonal antibody on the DEAE fraction phospholipase A₂ and human 14 KDa group II phospholipase A₂ activities. DEAE fraction enzyme (30 ng) was incubated with the indicated amount of HP-1 in 200 µl of 0.2% BSA-TBS for 1 h at 4°C. After incubation, aliquot was taken and examined phospholipase A₂ activity. Human 14 KDa group II phospholipase A₂(□), DEAE Peak I(●); Peak II(▲); Peak III(■).

지 않는 것으로 추측되었다. 이점은 위에서 서술한 PLA₂의 각종 단백질화학적 성상이 각종 염증부위에 존재하는 group II에 속하는 저분자 PLA₂와는 그 특성이 전혀 다르며, 고분자 속하는 새로운 PLA₂ 일종임이 강하게 시사되고 있다.

일반적으로 PLA₂는 그들의 아미노산 조성에 따라 세가지의 main group과 여러가지의 subgroup으로 나누고 있으나 최근에는 이들 전통적인 grouping에 적합하지 않는 새로운 형태의 PLA₂가 다양한 세포에서 발견되고 정제되어 그 특성이 밝혀졌다. 이러한 PLA₂ group들은 cPLA₂(세포질PLA₂)로 명명되고 있는데^{12,13} 기존의 group I, II, III PLA₂들이 높은 disulfide bond 함량을 가지며, 저분자의 단백질로서 최대활성발현에 mM 농도의 Ca²⁺을 필요로 하는데 반하여, group IV형인 세포질 PLA₂로 분류된 것들은 분자량이 약 40 KDa 정도이거나 약 85 KDa 정도이며 disulfide bond를 가지고 있지 않으며, 또한 최대활성발현에 µM 농도의 Ca²⁺이 필요한 것으로 보고된 바 있다.^{12,13} 이러한 분류 기준으로 볼 때 양수증의 해파린칼립 비결합성 부위로부터 발견된 세종의 PLA₂는 14 KDa의 group II PLA₂와는 달리 해파린에 친화성이 거의 없고 고분자의 분자량을 가지며 최대활성발현에 있어서의 Ca²⁺요구성이 없거나 미약하므로

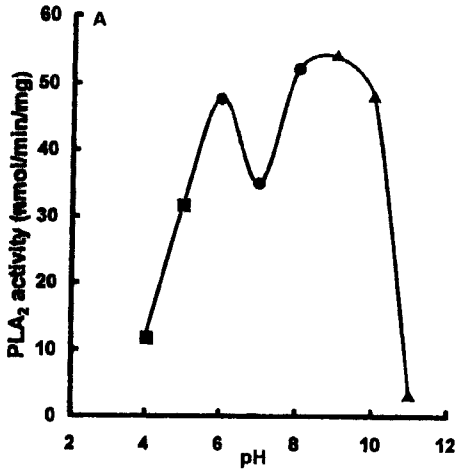


Fig. 5A — The pH dependence of DEAE Peak I phospholipase A₂ activity. A reaction mixture containing DEAE Peak I phospholipase A₂ (30 ng), 6 mM CaCl₂, 10 nmole of 1-acyl-2-[1-¹⁴C] linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine was incubated for 20 min at 37°C in a total volume of 200 μl. The buffers used were 100 mM sodium acetate buffer within a pH range of 4.0~5.0 (■), 100 mM Tris-HCl pH 6.0~8.0 (●) and 100 mM glycyl-NaOH pH 8.5~11.0 (▲).

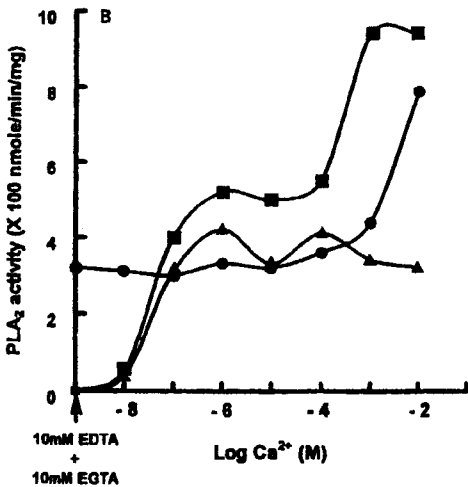


Fig. 5B — Effect of calcium ion on the activity of phospholipase A₂. DEAE Peak I phospholipase A₂ (30 ng) was incubated with 10 nmole of 1-acyl-2-[1-¹⁴C] linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) and various concentration of CaCl₂ in a total volume of 200 μl for 20 min at 37°C. The absolute concentration of free calcium was calculated using an equation based on the stability constant of the EGTA/CaCl₂ system described previously.²⁴ DEAE Peak I (●); Peak II (▲); Peak III (■).

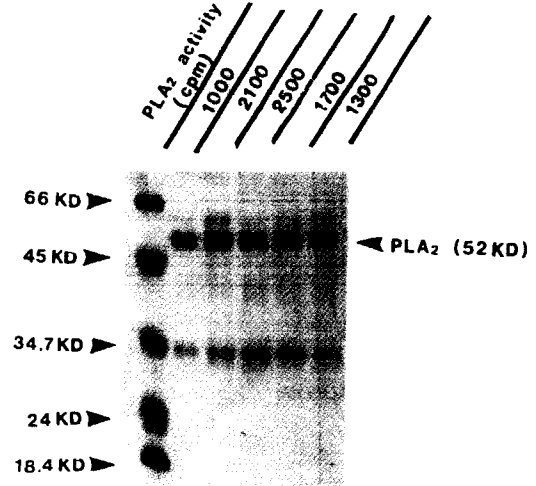


Fig. 6 — Electrophoretic patterns of standard proteins and DEAE Peak I Fractions. Aliquots of the active fractions from DEAE Peak I were boiled for 3 min in the presence of 2-mercaptoethanol and loaded onto 10% SDS-PAGE. Standard Proteins : BSA (67 KDa), Ovalbumin (45 KDa), Pepsin (34.7 KDa), Trypsinogen (24 KDa), β-Lactoglobulin (18.4 KDa).

그 단백질학적 특성의 면에서 group IV형의 PLA₂임이 추측되나 금후 완전 정제를 통하여 그 실체가 구명될 수 있으리라 생각된다.

양수가 출산에 있어서 깊이 관여하고 있음은 이미 잘 알려져 있었다. 그러나 그 작용 기전은 아직도 불분명한 것이 사실이다. 양수중의 PGE₂와 PGF_{2α}는 자궁평활근을 활성화하고 경부결체조직을 이완시킴이 보고되어 있으며¹⁴⁾, MacDonald 등¹⁵⁾은 진통이 시작되기 전후의 양수를 취하여 아라키돈산량을 비교, 분석한 결과, phosphoethanolamine과 phosphoinositol 유래의 아라키돈산량은 점차적으로 감소하는 반면, 프로스타그란딘의 양은 점차 증가하는 것을 관찰, 보고하였다. 인지질로부터 아라키돈산을 유리시키는 효소로서 PLC와 PLA₂ 알려져 있지만 아라키돈산 유리의 율속 효소는 PLA₂이므로 양수중의 출산에 관여 하는 프로스타그란딘으로의 합성에 원료물질인 아라키돈산의 동원에는 PLA₂의 활성화에 의함이 시사된다. Takahashi 등¹⁶⁾은 분만과 PLC의 상관관계를 보고하면서 사람 양수중에는 PLA₂활성이 없다고 보고한 바 있다. 그러나, 이 때 사용한 기질은 phosphatidylcholine이었으며, 본 실험에서도 양수에서 관찰되는 PLA₂의 기질특성을 검토한 결과, phosphatidylethanolamine에 대해

서는 특이성을 나타낸 반면, phosphatidylcholine이 나 phosphatidylserine에 대해서는 특이성이 없는 것으로 관찰되었다(data not shown).

본 연구에서는 헤파리칼럼 비결합성 PLA₂ 세종을 확인하였으나, 완전 정제가 이루어지지 않았고, 그 아미노산 조성을 아직 결정하지 못하였으므로 각각의 PLA₂와 출산과의 상관관계를 밝히지는 못하였다. 그러나 본 연구는 분만, 출산에 있어서 양수의 역할을 규명하는데 기초 자료를 제공할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 영남대학교 학술 연구조성비 지원 (1994년도)에 의하여 수행되었음.

문헌

- 1) Dennis, E. A., in the *Enzyme*, Third Edition (Boyer, P., Edit) Academic Press, New York, **16**, 307 (1983).
- 2) Vadas P. and Hay J. B. and : Involvement of circulating phospholipase A₂ in the pathogenesis of hemodynamic changes in endotoxin shock in rabbits. *Can. J. Phys. Pharmacol.*, **61**, 561 (1983).
- 3) Chang H. W., Kudo I., Tomita M. and Inoue K. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from peritoneal cavity of caseinate-treated rat. *J. Biochem.*, **102**, 147 (1987).
- 4) Vadas P. and Pruzanski W. : Biology of disease : role of secretory phospholipase A₂ in the pathology of disease. *Lab. Invest.*, **55**, 319 (1986).
- 5) Hara S., Chang H. W., Kudo I. and Inoue K. : Purification and characterization of extracellular phospholipase A₂ from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem.*, **105**, 395 (1989).
- 6) Seilhamer J. J., Plant S., Pruzanski W., Schilling J., Stefanski E., Vadas P. and Johnson L. K. : Multiple forms of phospholipase A₂ in arthritic synovial fluid. *J. Biochem.*, **106**, 38, (1989).
- 7) Vadas P., Stefanski E. and Pruzanski W. : Characterization of extracellular phospholipase A₂ in rheumatoid synovial fluid. *Life Sci.*, **36**, 579 (1985).
- 8) Verhagen A., Bergers M., Van Erp P. E. J., Gommans J. M., Van de kerkhof P. C. M. and Mier P. D. : Confirmation of raised phospholipase A₂ activity in the uninvolved skin of psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, **110**, 731 (1984).
- 9) Forster S., Ilderton E., Summerly R. and Yordley H. K. : Epidermal phospholipase A₂ activity is raised in the uninvolved skin of psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, **109**, 30 (1984).
- 10) Kudo I., Chang H. W., Hara S., Inoue K. : Characterization and pathophysiological roles of extracellular phospholipase A₂ in inflamed sites. *Dermatologica* 179 (Suppl. 1) **72**, 1289 (1991).
- 11) Heinrikson R. L., Krueger E. T. and Keim D. S., *J. Biol. Chem.* **252**, 4913 (1997).
- 12) Kim DK, Kudo I, and Inoue K. : Purification and characterization of rabbit platelet cytosolic phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* **1083**, 80 (1991).
- 13) Takayama K, Kudo I, Kim DK, Nagata K, Nozawa Y, and Inoue K. : Purification and characterization of human platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyzes an arachidonyl residue. *FEBS*, **282**, 326 (1991).
- 14) Liggins GC, Fairdough RJ, and Grieves A. : The mechanism of initiation of parturition in ewe. *Recent Prog Horm Res.* **29**, 111 (1973).
- 15) MacDonald PC, Schwarz FM, Duenhoelter JH, Gant NF, and Johnstone JM. : Initiation of human parturition I : Mechanism of action of arachidonic acid. *Obstet. Gynecol.* **44**, 629 (1974).
- 16) Schwarz AE, Okazaki T, MacDonald PC, and Johnstone JM. : Initiation of human parturition III: Fetal membrane content of prostaglandin E₂ and F_{2α} precursor. *Obstet. Gynecol.* **46**, 564 (1975).
- 17) Okita JR, MacDonald PC, and Johnstone JM. : Mobilization of arachidonic acid from specific glycolipids of human fetal membranes during early labor. *J. Biol. Chem.* **257**, 14029 (1982).
- 18) Takahashi H, Murata M, and Moki M. : Phospholipase C activity and phosphatidylinositol in amniotic fluid. *Gynecol. Obstet. Invest.* **25**, 23 (1988).
- 19) Baek SH, Takayama K, Kudo I, Inoue K, Le

- HW, Do JY, and Chang HW. Detection and characterization of extracellular phospholipase A₂ in pleural effusion of patients with tuberculosis. *Life Sci.* **49**, 1095 (1991).
- 20) Arai H., Ioue K., Natori Y., Banno Y., Nazawa Y. and Nojima S. : Intracellular phospholipase activity of tetrahymena pyriformis. *J. Biochem.* **97**, 1525 (1985).
- 21) Dole V. P. and Meinertz H. : Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissue. *J. Biol. Chem.* **235**, 2595 (1960).
- 22) Laemmli U. K. and King J. : Polypeptides of the tail fibers of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **62**, 465 (1971).
- 23) Kaushal V. and Barnes L. D. : Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **157**, 291 (1986).
- 24) Durham ACH : Calcium, *Cell* **4**, 33 (1983).