

四塩化炭素에 의한 肝損傷時 Guanase活性變動

姜會洋·尹鍾國*

啓明大學校 自然科學大學 公衆保健學科
啓明實業專門大學 食品營養科*

Changes in Liver and Serum Guanase Activity following Administration of Carbon Tetrachloride in Rats

Hoe Yang Kang · Chong Guk Yoon*

*Dept. of Public Health, College of Natural Science,
Keimyung University
Dept. of Food and Nutrition,
Keimyung Junior College**

Abstract

This paper was intended to clarify the cause of an increase of serum guanase activity in rats following injection of CCl_4 . The cause of increasing serum guanase was focused on the change of guanase activities in both serum and liver, and additionally, these results were compared with the previously known alanine aminotransferase (ALT). Concomitantly the microscopic investigation on the histologic changes, and the determination of lipid peroxides of liver were combined in this experiment for a correlation to observe that the activity of guanase would be effected by the various degree of hepatic injury induced by CCl_4 .

The serum levels of guanase were increased about 2 fold in the fatty change stage (3-12 days), 5.2 fold representing the peak value in necrosis stage (21days), 4.5 fold in early cirrhosis stage (48 days), and 2 fold in severe cirrhosis stage (92 days). These changes of serum guanase activity showed similar patterns to those of ALT activity and lipid peroxides in liver cell.

The changes of liver guanase activities showed an increase, whereas ALT activities in liver were markedly decreased.

It is likely that the increase of serum guanase activity is based on the excess leaking of guanase into blood by the result of accelerated enzyme synthesis in liver cell of CCl_4 intoxicated rats.

In addition, the possibility could not be ruled out, however, that the increase of serum guanase activity would be caused by the alteration of membrane permeability.

中에서 測定하여 本 酵素와 相互比較 觀察하였다.

I. 緒 論

Guanase (guanine aminohydrolase, EC 3.5.4.3)는 生體內에서 주로 purine 體의 代謝産物인 guanine을 脫 amino化시켜 xanthine을 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 특히 肝에서 他組織에 比하여 그 活性이 높다고 한다.²⁾ 그리고 細胞에서는 cytosol에서 이 酵素의 活性이 높은 것으로 알려져 있다.¹⁾

Whitehouse 등³⁾이 肝炎患者의 血清에서 guanase의 活性이 增加됨을 報告한 以來 많은 研究者들⁴⁻⁶⁾에 依하여 肝損傷時 血清 guanase의 活性이 增加됨이 觀察되었다. 그러나 肝損傷時 血清中 guanase의 變動 原因이나 機轉에 關한 報文은 아직까지 찾아볼 수 없었다.

肝組織의 損傷을 隨伴하는 많은 疾患에서 血清中 酵素 活性의 變動이 그 疾患을 診斷하는 指標로 利用되어 지고 있다. 이와 같은 點을 考慮하여 hepatotoxin의 一種인 四鹽化炭素를 흰쥐에 經時的으로 反復 投與하여 여러 段階의 肝損傷 model을 만든 다음 肝組織의 病理檢査를 通하여 肝損傷의 程度를 確認함과 同時에 肝損傷 程度에 따른 血清 guanase 活性 變動을 肝損傷의 指標로 利用되고 있는 alanine aminotransferase (L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2; ALT)^{7,8)}, 5'-nucleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydrolase EC 3.1.3.5; 5'-NT)^{9,10)} 및 alkaline phosphatase(ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3.1.3.1; ALP)^{11,12)}의 活性 變動과 比較 觀察한 後, 肝損傷時 血中の guanase 活性 增加機轉을 糾明하는 一環으로 本 實驗 條件에서 肝과 血清中 guanase 活性 變動을 相互比較 觀察하는 한편 肝損傷時 細胞膜 透過性 抗進으로 因하여 血清中 그 活性이 增加된다는 ALT^{7,8)}의 活性을 肝 및 血清

II. 材料 및 方法

1. 動物의 處置

(1) 實驗動物의 飼育

實驗動物은 體重이 60~70g이 되는 外見上 健康한 Sprague-Dawley 種의 숫 흰쥐를 飼料 成分表 (Table 1)에 依하여 調劑된 標準食餌로 1個月 程度 飼育한 後 體重이 210~230g 되는 것을 使用하였다. 各 實驗條件의 實驗群들은 各各 群별로 分離 收用하였으며 물과 飼

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

| Ingredients | Quantities |
|-----------------------------------|------------|
| Casein | 200 |
| Corn starch | 674.36 |
| Corn oil | 64.85 |
| Vitamin A and D mixture (a) | 10.2 |
| Vitamin E and K mixture (b) | 2 |
| Water soluble vitamin mixture (c) | 3 |
| Vitamin B ₁₂ (d) | 1 |
| Salt mixture (e) | 40 |
| α -Cellulose | 20 |

* 4081 Kcal

- a) Vitamin A & D mixture: 51,000 unit of A and 5,100 unit of D dissolved in 100ml of corn oil.
- b) Vitamin E & K mixture: 5g of α -tocopherol and 0.2g of menadion dissolved in 200ml of corn oil.
- c) Water soluble vitamin mixture: contained (mg); choline chloride 2000, thiamine hydrochloride 10, riboflavin 20, nicotinic acid 120, pyridoxine 10, Ca-pantothenate 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-phosphate monobasic 75, NaCl 167.5, ferric citrate 27.5, KI 0.8, ZnCl₂ 0.25, CuSO₄ · 5H₂O 0.3, MnSO₄ 5, molybdic acid 0.2.

料的 量은 制限없이 供給하였다.

(2) 四鹽化炭素의 經時別 投與

各 群은 9~10마리로 하여 다음과 같이 總 6 群으로 나누었으며 各 群마다 對照群은 6 마리를 使用하였다.

- ① 3 日群 : 四鹽化炭素 1 回 投與群
- ② 6 日群 : 四鹽化炭素 2 回 投與群
- ③ 12 日群 : 四鹽化炭素 4 回 投與群
- ④ 21 日群 : 四鹽化炭素 6 回 投與群
- ⑤ 48 日群 : 四鹽化炭素 15 回 投與群
- ⑥ 92 日群 : 四鹽化炭素 30 回 投與群

四鹽化炭素 投與는 四鹽化炭素를 olive oil 과 1:1의 混合液을 만들어 體重 100 g 當 0.15 ml를 經時的으로 投與 回數를 달리하여 3 日 間隔으로 皮下 注射하였으며 上記 各 群의 經 時別 處置期間에 따라서 마지막 投與 2 日 後 에 屠殺하였다.

(3) 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 晝를 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°C의 0.25M sucrose 液으로 肝臟을 貫流하여 肝臟內에 남아있는 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 묻은 血液을 가볍 게 씻은 後 濾紙上에서 肝臟內에 남아있는 生理食鹽水를 가능한 모두 除去한 다음 그 一 部를 10% formalin 에 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.

2. 肝臟 酵素液의 調製

肝組織은 2~4°C 下에서 절편으로 만들고 그 中 一定量을 秤量하여 4 倍量의 氷冷의 0.25 M sucrose 液을 넣어 teflon glass homo-

genizer 로 磨碎하여 肝 均質液(20 w/v %)을 만들었다. 이 均質液을 700 xg에서 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 xg (Hitachi RPR 18-3)에서 20 分間 遠心分離하였다. 이때 얻은 上層液을 105,000 xg (Dupont Sorvall OTD 65 B)에서 1 時間 超遠心分離하여 얻은 可用性 分割 一定量을 透析膜에 넣어 20 倍量의 4°C 0.25 M sucrose 液中에서 magnetic stirrer 로 저으면서 5 時間 透析시킨 것을 guanase, ALT 活性 測定에 使用하였다.

3. 酵素의 活性度 測定

(1) Guanase 活性度 測定

肝 및 血清 guanase의 活性 測定은 guanine 을 基質로 하여 37°C에서 20 分間 反應시켜 生成된 NH_3 를 phenol 試液과 alkaline-hypochloride를 加하여 發色된 靑色調를 比色 定 量하는 Caraway 方法¹³⁾에 準하여 實施하였다. 이때 反應液은 400 μ M guanine, 0.1M potassium phosphate buffer (pH 8.0) 및 酵素液 0.05 ml 含有시켜 最終反應液을 1 ml로 하였다. 酵素의 活性 單位는 肝組織에서는 酵素液 中에 含有된 蛋白 1mg이 1 分 동안에 反應하여 基 質로 부터 生成된 NH_3 를 n mole 濃度로, 血清 에 있어서는 NH_3 量을 血清 1l 當 μ mole로 表 示하였다.

(2) ALT의 活性度 測定

肝 및 血清 ALT의 活性 測定은 l-alanine 과 α -ketoglutaric acid를 基質로 하여 37°C에서 30 分間 反應시키는 동안 生成되는 pyruvic acid가 alkali性 下에서 2,4-dinitrophenylhydrazine과 作用하여 生成되는 色調를 比 色 定량하는 Reitman-Frankel 方法¹⁴⁾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 karmen unit¹⁵⁾로 表示하였다.

(3) 5'-NT의 活性度 測定

血清 5'-NT의 活性 測定은 5'-AMP를 基質로 하여 37°C에서 30分間 反應시킨 後 遊離되는 磷酸을 定量하는 Campbell의 方法¹⁶⁾에 依하였으며 이때 反應液은 40 mM veronal 緩衝液(pH, 7.5)에 $MnCl_2$ 2 μ M 과 5'-AMP 2 μ M이 含有되도록 하였다. 그리고 本 酵素의 單位는 1l의 血清에 含有된 酵素에 依하여 30分 동안 基質液과 反應하여 1 μ M의 無機磷을 遊離시키는 活性을 1 unit로 表示하였다.

(4) ALP의 活性度 測定

ALP 活性度 測定은 p-nitrophenylphosphate를 基質로 하여 37°C에서 30分間 反應시킨 後 遊離된 p-nitrophenol에 alkali를 加하여 生成된 色調를 比色 定量하는 Bessey-Brock法¹⁷⁾에 依하였다. 血清 ALP 測定의 反應液은 0.1M glycine-NaOH 緩衝液(pH, 10.5)에 5.4mM disodium p-nitrophenylphosphate와 1mM $MgCl_2$ 가 含有되도록 하였다. ALP 活性 單位는 血清 1ml가 1時間 동안에 p-nitrophenol 1 μ mole을 遊離시키는 것을 酵素 活性의 單位로 나타내는 Bessey-Lowry unit로 하였다.

4. 肝組織의 過酸化脂質含量 測定

摘出한 肝臟 組織 一定量을 0.9% NaCl로 一定 比率로 磨碎均質液을 만든 다음 이 homogenate 一定量을 酢酸 緩衝液으로 (pH, 3.5)하여 一定 濃度 및 一定量의 sodium dodecyl sulfate와 thiobarbiturate를 加하여 發色시킨 것을 比色 定量하는 Yagi等의 方法¹⁸⁾에 依하여 測定하였다. 過酸化脂質의 含量은 吸光度를 蛋白質 量으로 나누어 對照群에 對한 相對值로 表示하였다.

5. 蛋白質의 定量

肝組織 中の 蛋白質 定量은 Lowry等¹⁹⁾ 및 Biuret法²⁰⁾에 準해 bovine serum albumin

을 標準品으로 하여 實施하였다.

6. 肝組織의 病理組織學的 檢査

10% formalin에 固定된 組織片을 paraffin으로 包埋하여 5~6 μ 의 두께로 薄切하고 hematoxylin-eosin 染色을 하여 檢鏡²¹⁾ 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. 實驗成績

1. 四鹽化炭素 投與量에 따른 血清 Guanase 活性 變動

흰쥐에 四鹽化炭素와 olive oil의 混合液(1:1)를 體重 100g 當 0.05, 0.1, 0.15 및 0.2ml로 그量을 달리하여 3日 間隔으로 皮下에 2번 投與한 다음 2日後에 屠殺한 다음 血清 guanase 活性變動은 Fig. 1과 같다.

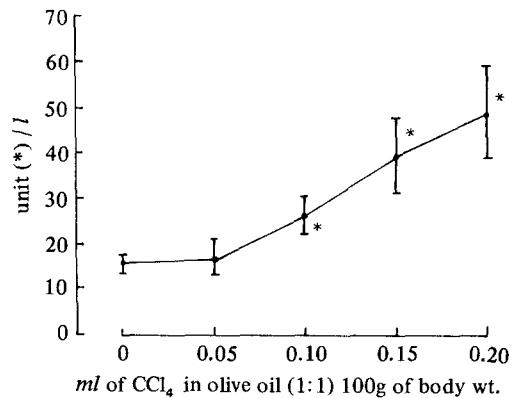


Fig. 1. Dose response of CCl_4 on the serum guanase activities in rats. Rats were given various dose of CCl_4 in olive oil subcutaneously twice with 3 day-interval and sacrificed on the 2nd day after previous final administration of CCl_4 . Each point represents the mean \pm SE of 5 animals. *; $p < 0.05$, Unit(*); μ mole NH_3 formed/min.

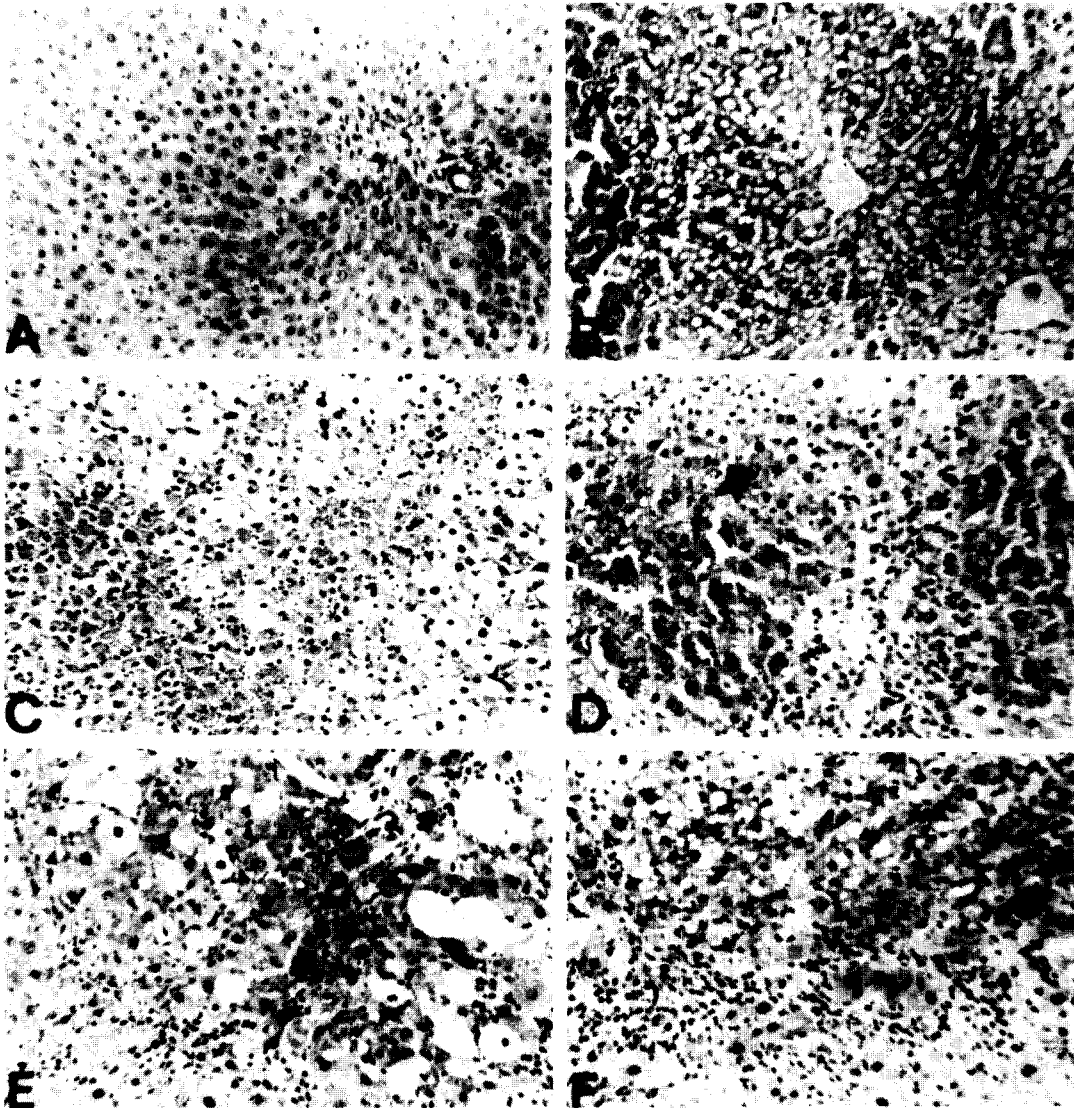


Fig. 2. Light microscopic findings of rat liver treated with CCl_4 and normal control group. A. Control group, the lobules and portal tracts are intact. B. to F, CCl_4 treated group. B. Severe fatty change is seen in entire lobules. C. Zonal necrosis is demonstrated in large areas. D. Fibrosis of portal tracts is characteristic with widening of portal tracts. E. Early cirrhosis with fatty change of hepatocytes occurs. Inflammatory cells are infiltrated in areas of fibrosis. F. Marked cirrhosis characterized by broad fibrosis and microlobulation with fatty change is well demonstrated.

0.05ml 投與群에 guanase 活性은 olive oil 만 投與한 對照群의 guanase 活性值인 15.5 unit와 類似한 値를 보였으며 0.1ml 投與群에서는 對照群에 比하여 約 1.7倍($p < 0.05$), 0.15 ml 投與群에서는 約 2.5倍($p < 0.05$), 0.2ml 投與群에서는 約 3.2倍($p < 0.05$)로 四鹽化炭素 投與量에 따라 血清 guanase 活性値는 比例하여 增加하였다.

이 結果로 보아 四鹽化炭素 投與量과 血清 guanase 活性 變動 間에는 서로 相關性이있음을 알 수 있었다. 따라서 本 實驗에서 血清 guanase 活性이 有意하게 增加되는 0.15ml의 四鹽化炭素 olive oil의 混液을 投與하였다.

2. 四鹽化炭素 投與에 따른 體重과 肝重量의 變動 및 病理組織學的 所見

四鹽化炭素를 흰쥐에 投與 回數를 달리하여 反復 投與한 後 經時的으로 觀察한 病理組織學的 所見은 Table 2와 Fig. 2에, 體重과 肝重量의 變動은 Table 3에 各各 나타내었다.

病理組織學的 觀察 對象으로 삼은 것은 肝實質 즉 小葉에서 肝組織의 損傷에 관한 所見이었으며 肝細胞의 脂肪變性, 壞死, 纖維化 및 肝硬變等이었다. olive oil 만을 投與한 對照群의 肝은 小葉의 크기와 모양이 一定하였으며 肝細胞의 損傷이나 脂肪變性은 없었고 門脈帶에 간혹 炎症細胞가 흩어져 있을 뿐 異狀 所見은 없었다 (Fig. 2-A).

그러나 3日群과 6日群에 있어서는 脂肪變性과 더불어 약간의 纖維化도 隨伴되었다. 12日群에서는 肝小葉의 中心帶 및 中間帶에 脂肪이 浸着되어 심한 脂肪變性이 惹起되었고 (Fig. 2-B) 이때 纖維化도 나타났었다 (Fig. 2-D). 21日群에서는 肝小葉 中心帶의 中心 靜脈의 周圍에 細胞의 壞死가 일어났었다 (Fig. 2-C). 48日群에서는 門脈帶에 纖維化를 隨伴하는 再生小結節이 나타나는 初期 肝硬變症이 觀察되었으며 (Fig. 2-E) 以後 四鹽化炭素를 계속 反

復 投與한 92日群에서는 肝硬變症은 더욱 심하였다 (Fig. 2-F).

한편 四鹽化炭素를 反復 投與한 期間에 따른 體重 增加率은 肝組織에 脂肪變性을 나타내는 6日까지는 正常的인 體重 增加를 보였으나 以後 全 實驗期間에 걸쳐 體重 增加率은 저조하였다.

특히 심한 肝硬變症을 보여주는 92日群은 對照群에 比하여 約 27%의 顯著한 體重 減少를 나타내었다. 또한 體重當 肝 무게의 百分率은 全 實驗期間동안 對照群에 比하여 대체적으로 有意한 增加를 보였고 肝組織의 壞死가 觀察되는 21日群과 肝硬變症의 初期인 48日群은 다른 群에 比하여 다소 높은 値를 보였다.

Table 2. Histopathological findings of the rat liver treated with CCl_4

| Findings | | Days after injection | | | | | | |
|--------------|----------|----------------------|---|---|----|----|----|--------|
| | | Control | 3 | 6 | 12 | 21 | 48 | 92 |
| Fatty change | mild | | | | | | | |
| | moderate | | | + | + | | | |
| | severe | | | | | + | + | + |
| Necrosis | random | | + | + | + | + | + | + |
| | zonal | | | | | | + | |
| Fibrosis | | | | | + | + | + | |
| 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.
 Cirrhosis: + ; Almost large regenerating nodules with fibrosis in portal tracts and centrilobular areas.
 ++; Micronodular cirrhosis.

Table 3. Changes of body and liver weight after administration of CCl₄ in rats.

| Parameters | | unit ; g | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | 3 | 6 | 12 | 21 | 48 | 92 |
| Control | Body weight | 220 ± 10.0 | 242 ± 11.0 | 283 ± 17.5 | 300 ± 17.9 | 321 ± 28.6 | 328 ± 17.44 |
| | Liver weight | 5.72 ± 0.44 | 7.15 ± 0.39 | 7.81 ± 0.88 | 8.15 ± 0.30 | 8.67 ± 0.62 | 8.8 ± 0.76 |
| | Liver weight (% of body weight) | 2.60 ± 0.03 | 2.94 ± 0.04 | 2.74 ± 0.15 | 2.74 ± 0.10 | 2.70 ± 0.02 | 2.68 ± 0.12 |
| CCl ₄ treatment | Body weight | 230 ± 17.0 | 256 ± 10.3 | 242 ± 14.4 | 250 ± 17.8 | 260 ± 13.8 | 240 ± 17.44 |
| | Liver weight | 7.38 ± 0.71 | 10.36 ± 0.53 ^{**} | 10.08 ± 0.33 ^{***} | 11.76 ± 0.80 ^{**} | 12.0 ± 1.45 | 8.4 ± 0.53 |
| | Liver weight (% of body wt.) | 3.2 ± 0.10 ^{**} | 4.04 ± 0.15 ^{***} | 4.10 ± 0.30 ^{***} | 4.70 ± 0.30 ^{**} | 4.60 ± 0.43 ^{**} | 3.4 ± 0.16 [*] |

Values are mean ± SE of 6 rats. *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001

그러나 肝硬變症이 심한 92日群은 他群에 比하여 오히려 肝 무게의 增加率이 減少되었다 (Table 3 參照)

3. 四鹽化炭素 投與時 血清 및 肝組織의 Guanase 活性 變動

흰쥐에 四鹽化炭素를 經時的으로 投與한 後 血清 및 肝組織의 guanase 活性變動을 나타낸 것은 Fig. 3 과 같다.

血清 guanase 活性變動은 肝組織의 脂肪變性 時期인 3日群, 6日群 및 12日群은 各各 29.8, 30, 33unit/l로 對照群活性值인 15.5 unit/l 에 比하여 約 2倍로 有意하게(p < 0.01) 增加되었으며 以後 急激히 增加되어 necrosis 時期인 21日群은 그 活性值가 80 unit/l로 對照群에 比하여 約 5.2倍의 顯著的增加를 보였다. 以後의 期間에는 本 酵素의 活性이 漸次 減少되어 심한 肝硬變 時期인 92日群은 對照群에 比하여 約 2倍로 增加되었으나 그 增加率은 21日群과 postnecrosis 時期인 48日群에 比하여 顯著하게 減少되었다.

한편 肝組織의 guanase 活性에 있어서 3日群은 70.3 unit/mg of protein로 對照群值인 6.3unit 에 比하여 약간 增加되는 傾向을 보였

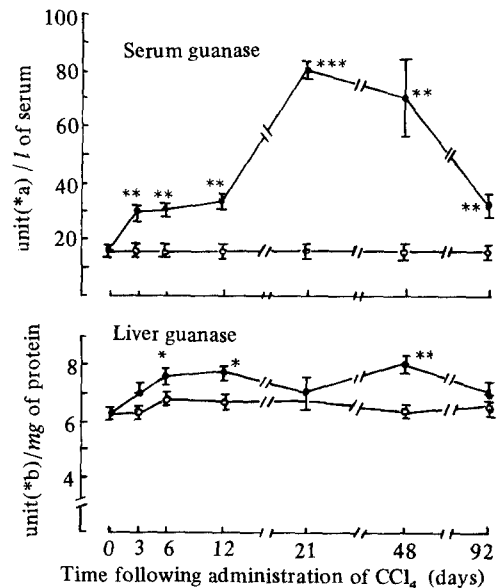


Fig. 3. Changes of guanase activities in both serum and liver in rats after scheduled administration of carbon tetrachloride (CCl₄). Rats were given 0.15 ml CCl₄ in olive oil per 100g of body weight subcutaneously with 3 day-interval. Each point represents the mean ± SE of six rats.

*, p < 0.05, **, p > 0.01, ***, p < 0.001. Unit(*a); μ mole NH₃ formed/min, unit(*b); n mole NH₃/min.

○—○; control, ●—●; CCl₄

으며 6日群과 12日群은 各各 7.53, 7.7 unit로 對照群 보다 各各 11%, 15%의 有意한 ($p < 0.05$) 增加를 보였다. 血清 guanase 活性이 가장 높게 增加되는 時期인 21日째는 對照群 보다 약간 增加되는 傾向을 보여 全 實驗 期間中 그 增加率이 가장 低下됨을 알 수 있었다. 48日群은 本 酵素의 活性值가 8.2 unit로 對照群值인 6.3unit보다 約 30%의 有意한 ($p < 0.01$) 增加를 보였으며 以後 減少되어 92日群은 對照群에 比하여 약간 增加되는 傾向을 보였다.

4. 四鹽化炭素 投與時 血清 및 肝組織의 ALT 活性 變動

흰쥐에 四鹽化炭素를 經時的으로 反復投與한 後 血清 및 肝 ALT 活性 變動을 나타낸 것이 Fig. 4와 같다.

血清 ALT 活性值는 四鹽化炭素를 1回 投與한 3日群에서는 52unit (karmen unit)로 對照群 值인 26 unit에 比해서 約 2倍로 增加되었으나 有意性은 없었다. 6日群과 12日群은 各各의 對照群에 比하여 約 15倍, 20倍로 有意하게 增加되었으며 以後 急激히 增加되어 21日群에서는 1,562 unit로 對照群에 比하여 約 60倍 ($p < 0.001$)로 顯著히 增加되었다. 以後 增加率이 漸次 減少되어 48日群에서는 約 33倍 ($p < 0.01$), 92日群에서는 約 10倍로 有意하게 ($p < 0.001$) 增加되었으나 그 增加率은 21日群에 比해 顯著하게 減少되었다.

한편 肝組織의 ALT는 四鹽化炭素 投與 3日群에서는 257 unit (karmen unit/mg protein)로 對照群 值인 353 unit에 比해서 約 27% 減少되었다. 以後 漸次的인 減少를 보여 21日群은 200 unit로서 對照群 活性值인 346 unit에 比하여 42% ($p < 0.001$)의 顯著的 減少를 보였으며 48日群은 約 66% ($p < 0.001$), 92日群에서는 約 70% ($p < 0.001$)의 顯著的 減少를 볼 수 있었다.

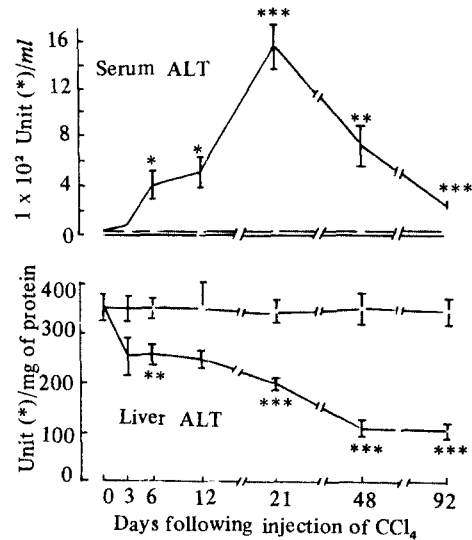


Fig. 4. Alanine aminotransferase (ALT) activities in both serum and liver of CCl₄ treated rats. The vertical line gives the mean \pm SE of 6 rats. \circ — \circ ; control groups, \bullet — \bullet ; CCl₄ treatment, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$, (**); Karmen unit.

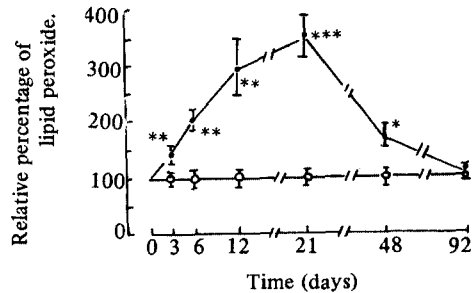


Fig. 5. Changes of liver lipid peroxides in CCl₄ treated rats. Vertical brackets at point indicated mean \pm SE with 6 animals in each group. \bullet — \bullet ; CCl₄ treatment, \circ — \circ ; control groups. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

5. 四鹽化炭素 投與에 따른 肝 過酸化 脂質 含量의 變動

흰쥐에 四鹽化炭素를 經時的으로 投與한 後

肝組織의 過酸化脂質의 含量 變動은 Fig. 5와 같다.

對照群을 100%로 나타내었을때 四鹽化炭素 投與 3日群은 約 1.4倍(p<0.01), 6日群은 2倍(p<0.01), 12日群은 3倍(p<0.01), 21日群은 3.5倍(p<0.001)로 投與期間에 따라 比例하여 增加되었다.

그러나 以後 漸次 減少되어 48日群은 1.6倍(p<0.05), 92日群은 對照群에 類以한 値를 나타내었다.

6. 四鹽化炭素 投與時 血清 Guanase와 ALT, ALP 및 5'-NT活性 變動과 比較

원래 四鹽化炭素를 經時的으로 反復投與하면서 여러 段階의 肝損傷을 誘導시킨 後 血清 guanase 活性과 ALT, ALP 및 5'-NT 活性의 變動을 相互比較한 內容은 Table 4 및 Fig. 6과 같다.

血清 ALT는 本 酵素 活性의 變動 樣相과 類以하게 나타났으나 多少 差異는 있었다. 즉 血清 guanase 活性은 ALT 보다 緩慢한 變動을 보였다. 그리고 postnecrotic 時期인 48日群에 있어서 血清 guanase의 ALT 活性 增加率 보다 다른 時期에 比하여 높게 나타났으며 21日

은 ALT와 guanase 모두 共히 全 實驗期間 동안 가장 높은 活性値가 나타남을 알 수 있었다.

그러나 血清 5'-NT와 ALT는 本 酵素의 活性 變動과는 相異하게 나타났다. 즉 血清 5'-NT와 ALP는 本 實驗期間中 계속 增加되는 樣相을 보였으며 特히 심한 肝硬變症을 나타내는 92日群에서는 이들 酵素의 活性이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다.

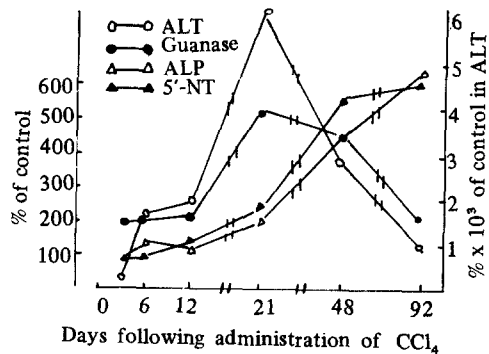


Fig. 6. Comparing the patterns of guanase activity to those of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and 5'-nucleotidase (5'-NT) in serum of CCl₄ treated rats. Each point represents the mean of 6 rats.

Table 4. Comparing the patterns of guanase activity to those of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and 5'-nucleotidase (5'-NT) in serum of CCl₄ treated rats.

| Enzymes | guanase (Unit*) | | ALT (Karmen unit/ml) | | ALP (Bessey-Lowry unit/ml) | | 5'-NT (Campbell unit/ml) | |
|---------|-----------------|------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | Control | CCl ₄ | Control | CCl ₄ | Control | CCl ₄ | Control | CCl ₄ |
| 3 | 15.5 ± 2.3 | 29.8 ± 1.8** | 26.0 ± 1.9 | 51.9 ± 12.2* | 3.7 ± 0.4 | 3.4 ± 0.5 | 9.9 ± 1.3 | 9.5 ± 0.9 |
| 6 | 15.4 ± 2.5 | 30.4 ± 2.9** | 25.6 ± 1.4 | 412.5 ± 117.8* | 3.7 ± 0.4 | 5.1 ± 0.2 | 10.2 ± 1.1 | 10.1 ± 2.6 |
| 12 | 15.5 ± 1.5 | 33.0 ± 2.8** | 25.8 ± 3.3 | 500.0 ± 134.0* | 3.7 ± 0.5 | 4.3 ± 0.5 | 10.7 ± 1.3 | 9.5 ± 1.4 |
| 21 | 15.5 ± 0.8 | 80.0 ± 2.8** | 26.0 ± 2.3 | 1561.8 ± 200.0*** | 3.7 ± 0.5 | 7.4 ± 0.8** | 9.6 ± 1.5 | 23.1 ± 3.5** |
| 48 | 15.4 ± 2.9 | 70.0 ± 14.0** | 26.0 ± 3.8 | 733.0 ± 171.9** | 3.7 ± 0.4 | 16.7 ± 1.2*** | 10.0 ± 1.2 | 56.1 ± 4.4*** |
| 92 | 15.5 ± 1.8 | 32.1 ± 4.1** | 26.2 ± 2.8 | 255.0 ± 23.5** | 3.7 ± 1.5 | 23.6 ± 2.6*** | 10.5 ± 1.4 | 93.9 ± 9.3*** |

Each point represents the mean ± SE of 6 rats. *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001. (unit*); μ mole NH₃ formed/min/ ℓ of serum.

IV. 考 察

四鹽化炭素를 實驗動物에 投與하면 肝細胞는 脂肪變性和 中心性 壞死가 招來되고 長期間 投與하면 壞死와 脂肪變性뿐만 아니라 纖維化와 硬變性 變化도 惹起된다고^{22,23)} 한다. 이러한 四鹽化炭素의 毒作用은 肝細胞의 smooth endoplasmic reticulum에 存在하는 脂溶性 藥物代謝에 關與하는 複合 酸化 機構(mixed function oxidase system)에 依하여 四鹽化炭素가 free radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 變化하며 이것이 ER 및 細胞膜의 過酸化를 일으킨다고 Recknegel 等²³⁾ 많은 研究者들이²⁴⁻²⁶⁾ 報告하였으며 이때 酸化的 磷酸化的 uncoupling으로 因하여 ALT 生成이 減少된다고²⁷⁾ 한다.

本 實驗에서 四鹽化炭素를 흰쥐에 3日間隔으로 反復 投與하는 동안 經時的으로 觀察한 病理組織學的인 主된 病變은 四鹽化炭素 投與 12일까지는 肝組織의 脂肪變性, 21日에는 肝小葉 中心帶의 壞死, 48日에는 纖維化를 同伴하는 肝硬變症이, 그리고 92日에는 심한 肝硬變症이 觀察되었다. 四鹽化炭素를 投與하여 肝損傷을 惹起시키는 過程에서 肝臟의 肥大도 觀察할 수 있었다. 이는 다른 研究者들의 報告와^{22,23,25)} 일치하였다.

한편 Hue 等²⁸⁾ 및 최근 Prokopowicz²⁹⁾ 等은 四鹽化炭素에 依한 肝損傷時 血清 guanase 活性이 增加한다고 報告하였으며 knight 等²⁹⁾은 四鹽化炭素를 實驗動物에 投與時 血清 guanase 活性의 持續的인 增加를 觀察하였다. 그러나 肝損傷의 段階的인 形態學的 變化에 따른 血清 guanase 活性 變動에 對한 報告는 찾아볼 수 없었다. 이에 著者들은 四鹽化炭素를 長期間 經時的으로 投與한 後 段階的인 肝損傷의 model을 만든 後 本 酵素의 活性 變動을 觀察하였다. 本 實驗에서 肝損傷의 段階的인 變化에 따른 血清 guanase 活性은 脂肪變性이 招來되는 段階

에서 約 2 倍로 增加되었으며, 壞死 段階에서는 約 5 倍로 顯著히 增加되어 全 實驗期間에서 가장 높은 値를 나타내었다. Postnecrotic stage인 肝硬變 初期에서도 約 4.5 倍로 顯著한 增加를 보였다. 以後 減少되어 심한 肝硬變이 나타나는 時期에서는 壞死(necrosis) 時期에 比하여 그 增加率이 顯著히 低下되었다.

이러한 結果로 보아서 四鹽化炭素 投與에 의한 肝損傷時 血清 guanase 活性은 肝組織의 脂肪變性, 壞死, 肝硬變性和 같은 全 肝損傷 段階에서 그 活性이 增加되며, 特히 肝細胞의 파괴가 심하게 招來되는 壞死와 硬變 初期 段階에서 血清 guanase 活性이 顯著히 높게 나타남을 알 수 있었다.

이와 같은 四鹽化炭素 投與에 依한 肝損傷時 血清 guanase 活性이 增加되는 機轉을 究明하는 一環으로 本 實驗條件에서 血清 guanase 活性和 並行해서 肝組織 中 guanase 活性을 測定하여 血清 guanase 活性和 相互比較하였다. 四鹽化炭素 投與에 따른 肝 guanase 活性 變動은 血清 guanase 活性的 增加에도 불구하고 全 實驗期間中 增加되었다. 따라서 四鹽化炭素 投與로 因한 肝損傷時 血清 guanase 活性的 增加 原因은 肝組織 細胞에서 guanase 酵素 合成이 誘導되어 增加된 本 酵素가 血中으로 漏出될 것으로 생각된다.

한편 肝損傷時 細胞膜 透過性 抗進으로 肝臟에서 血中으로 多量 流出되어 血中에 그 活性이 增加된다고 알려져 있는 ALT^{27,28)}를 本 實驗條件에서 guanase 活性和 병행하여 測定하였다. 血清 ALT는 血清 guanase 活性 變動과 마찬가지로 全 實驗期間동안 增加되었으나 肝 ALT는 顯著한 減少를 보였다. 따라서 本 酵素의 活性 變動과 相互比較 觀察해 볼때 四鹽化炭素 投與時 血清 guanase 活性 增加는 細胞膜의 透過性 抗進에 依한 것 보다는 오히려 酵素 合成의 增加에 起因된 것으로 생각된다.

그리고 本 實驗에서 血清中 guanase 活性和

ALT 活性變動의 樣相이 過酸化脂質 含量的變動 樣相과도 時期的으로 일치하였다. 過酸化脂質은 肝組織 損傷時 肝細胞膜 變性的 指標로 利用되고³⁰⁾ 있다. 그러므로 肝損傷時 血清中的 guanase 活性增加는 損傷된 肝細胞膜의 透過性增加로 因하여 血液中에 그 活性的增加가 惹起된³¹⁾ 다는 사실도 排除할 수는 없다.

한편 本 實驗條件에 있어서 肝臟道 疾患時에 增加되는 것으로 알려져 있는 血清中 ALT,^{7,8)} ALP^{11,12)} 및 5'-NT^{9,10)}의 活性變動과 guanase의 變動을 視察하여 比較해 보았을 때 血清 guanase는 ALT의 變動과는 類似하였으나 血清 ALP 및 5'-NT의 變動과는 相異하였다. 그러나 纖維化가 심한 初期 肝硬變性 段階에서는 血清 ALP, 5'-NT 및 本 酵素의 活性이 모두 높게 나타남을 알 수 있었다.

以上の 實驗成績을 綜合해 볼 때 血清 guanase는 肝細胞膜 파괴가 심한 壞死時期와 初期 肝硬變時에 그 活性이 增加됨을 알 수 있었다. 따라서 四鹽化炭素와 같은 藥物에 依한 肝損傷의 診斷時에 血清 guanase를 測定함은 肝組織의 病變進行 程度를 알 수 있는 한가지의 指標로 利用될 수가 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

肝損傷時에 血清 guanase 活性 測定은 肝疾患의 診斷에 어떠한 意義를 갖는지를 觀察함과 同時에 血清 guanase 活性的 增加 機轉을 糾明하는 一環으로 흰쥐에 四鹽化炭素와 olive oil의 1:1 混合液 0.15ml를 3日 間隔으로 皮下에 反復 投與하여 肝損傷을 惹起시킨 後 病理組織檢査 및 肝組織 過酸化物的 測定을 通하여 肝損傷 程度를 確認하였다. 同時에 肝 및 血清中 guanase와 alanine aminotransferase (ALT) 活性을 測定하여 相互比較 觀察하였다. 또한 血清中 guanase와 5'-nucleotidase(5'-NT), alanine aminotransferase 및 alka-

line phosphatase(ALP) 活性變動을 比較 檢査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 四鹽化炭素 投與時 血清 guanase는 5'-NT, ALP와는 相異한 變動을 보였으며 ALT의 活性變動과는 類似한 樣相을 보였으나 多小 差異는 있었다.

즉 血清 guanase는 肝組織의 脂肪變性, 壞死 및 硬變時期에 모두 有意한 增加를 보였으며 特히 壞死時期와 初期 肝硬變 段階에서 顯著한 增加를 보였다.

2. 肝組織中 guanase 活性은 四鹽化炭素 投與로 因하여 代償적으로 增加되었으나 ALT의 活性은 顯著히 減少하였다.

3. 四鹽化炭素 投與時 肝細胞의 過酸化物 變動은 血清 guanase 活性變動과 時期的으로 一致하였다.

以上 實驗成績을 綜合하여 볼 때 四鹽化炭素에 依한 肝損傷時에 血清中 guanase 活性增加는 本 酵素의 合成 增加에 起因된 것으로 생각되며, 또한 細胞膜 透過性 增加로 因하여 惹起된 다는 事實도 排除할 수는 없다.

그리고 血清 guanase 活性變動은 肝組織 細胞의 파괴가 심한 損傷이 隨伴되는 肝疾患의 感別 診斷에 應用될 수 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. Fox, I. H. : Degradation of purine nucleotide. Hand b. Exp. pharm., 51:93-124, 1978
2. Knights, E.M., Whitehouse, J.L., Hue, A.C. and Santos, C.L. : Serum guanase determination : A liver-function test. J.Lab. Clin. Med., 65:355-360, 1965
3. Whitehouse, J.L., Santos, C.L., and Knights, E.M. : Serum guanase as a liver function test. Prov. Hosp. Med. Bull., 1: 23-27, 1964

4. Coodley, E.L. : Enzyme diagnosis in hepatic disease. *Amer. J. Gastroenterol.*, 56:413–419, 1971
5. Mandel, E.E., Macalincag, L.R. : Evaluation of serum guanase in clinical diagnosis. *Amer. J. Gastroenterol.*, 54: 253–265, 1970
6. Bergmeyer, H.U : *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. p. 1086. Academic press, Inc. New York and London, 1974
7. Linds, S. : A comparison between the patterns (GOT, GPT, LDH) in serum and tissue extraction in cardiac and hepatic disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10: 303, 1958
8. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inoue, 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
9. Issa, F. S., Mullock, B. M. and Hinron, R. : 5'-nucleotidase in liver plasma membrane and in the serum of normal and jaundiced rats. *Biochem. Soc. Trans.*, 4: 55, 1976
10. Eshchar, J., Rudzki, C. and Zimmerman, H. J. : Serum levels of 5'-nucleotidase in disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 47: 598, 1967
11. Kaplan, M. M. : Alkaline phosphatase. *Gastroenterology*, 63: 452, 1972
12. Reghetti, A. B. B. and Kaplan, M. M. : Disparate responses of serum and hepatic alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase to bile duct obstruction in the rat. *Gastroenterology*, 62:1034, 1972
13. Caraway, W. T. : Colorimetric determination of serum guanase activity. *Clin. Chem.*, 12:187–193, 1966
14. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28: 56, 1957
15. Karmen, A. : A note on the spectrophotometric assay of glutamicoxalacetic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, 34: 131, 1955
16. Campbell, D. M. : Determination of 5'-nucleotidase in blood serum. *Biochem. J.*, 82: 34, 1962
17. Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164: 321, 1946
18. Ohkawa, H., Ohish, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351, 1979
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. Gornall, A. G., Bardawill, G. J. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the buret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177: 751, 1949
21. Ambrogi, L. P. : *Manual of histologic and special staining technics*, Armed Forces Institute of Pathology Washington, D.C., 1957
22. Rubin, E., Hutterer, F. and Popper, H. : Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication, a morphologic and chemical study. *Am. J.*

- Path., 42: 715, 1963
23. Recknagel, R. O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Reviews*, 19 (2): 145, 1967
 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 on microsomal NADPH oxidase activity of rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 31(17): 2837, 1982
 27. Anderson, W. A. D., and Kissane, J. M. : *Pathology*. 7th. ed. PP 94–110, Mosby, St. Louis, 1977
 28. Hue, A. C. & Free, A. H. : An improved method for the determination of guanase in serum or plasma *Clin. Chem.*, 11: 708–716, 1965
 29. Prokopowicz, D., Miegoc, H., Jarocki, F. and Wasilewski, J. : Serum guanase activity in rabbits during toxic liver damage. *Z. Versuchstierk.*, 22 : 211–215, 1980.
 30. Plaa, G. L. and Witschi, H. : Chemicals, drugs and lipid peroxidation, *Am. Rev. Toxicol. Pharmacol.*, 16: 125, 1976