

사람, 소, 말, 개의 적혈구막 단백질의 전기 영동법에 의한 분석 - 적혈구 침강 속도와의 관계 -

박 영 우

상지대학교 한의과대학
(2001년 2월 23일 게재승인)

Electrophoretic analysis of the major protein of erythrocyte membrane in man, bovine, horse, and dog: their relation to erythrocyte sedimentation rate

Yeong-woo Bahk

College of Oriental Medicine, Sangji University
(Accepted by February 23, 2001)

Abstract : The protein of the bovine, horse and dog erythrocyte membrane were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate and their relation to the sedimentation rate of animal erythrocytes were investigated by treating the erythrocytes with proteinases such as trypsin and chymotrypsin. Protein content in erythrocyte membrane was in human, in Jindo dog, in cattle and in horse, showing similar in among. The erythrocyte sedimentation rates bovine erythrocytes from Hostein and Korean native cattle were very slow compared with the human one(1/7 as slow as the human one) as reported previously. Although the general protein profiles of the bovine erythrocyte membranes were almost similar to that of human, bovine erythrocyte membranes showed one additional protein band, called band Q in this study, which migrated electrophoretically to the mid-position between band 2 and band 3 in human erythrocyte membranes. The erythrocyte sedimentation of race horse were very fast compared with the human one are reported previously. Although the general protein profiles of the race horse erythrocyte membranes were almost similar to that of human, band 3 content was showing higher in race horse(34.7%) than in human(25.3%). The general protein profile of the Jindo dog erythrocyte membrane was almost similar to the human patterns, Jindo dog erythrocyte membranes showed one absent protein band. It was band 7. The glycoprotein profiles of the bovine 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 membrane were almost absent from the bovine erythrocyte membranes showed a strong PAS-positive band near the origin of the electrophorograms, which is named as PAS-B in this study. The PAS-1 and PAS-2 present in human erythrocyte membrane were almost absent from race horse erythrocyte membranes, but PAS-2 was more in only race horse from that of human. The PAS-1 and PAS-2 were absolutely absent from the Jindo dog erythrocyte membrane. These results suggest the slow sedimentation rate of bovine erythrocytes is due in part to the presence of band Q protein fraction and PAS-B glycoprotein in the bovine erythrocytes, and that the fast sedimentation rate of race horse erythrocyte is due in part to the presence of more band 3 protein fraction and PAS-E glycoproteins in the race horse erythrocytes.

Key words : proteins of race horse, bovine and dog erythrocyte membrane, eletrophoretic analysis, ESR

서 론

Fahraeus(1921)¹가 사람의 임신 기간 중에 ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate, 적혈구 침강속도)이 촉진된다는 사실을 처음으로 보고한 것이 계기가 되고, 그 후 많은 학자들에 의해서 질병의 임상 진단법으로 폭 넓게 적용될 수 있게 됨에 그 측정방법도 다양하게 개발, 개선되어 왔다^{2,4}.

ERS는 사람이나 모든 동물에 비특이적인 것이지만 각종 질병의 진단, 예후, 판정의 기초자료로 널리 활용되고 있다.

ERS에 영향을 미치는 요인에는 적혈구의 크기, 수, 형태, 혈장단백질, 혈장지질, 혈구의 응집력과 중력, 채혈 부위, 측정관의 기울기, 측정관의 길이와 내경, 측정시의 온도, 혈액저장 온도, 항응고제, 연령 및 성, 채혈시간, 임신, 질병의 상태나 종류 등⁵ 여러 요인이 있으나, 정작 적혈구 침강을 일으키는 가장 중요한 요인은 적혈구의 연정형성(Rouleaux Formation, RF), 즉 응집력으로 알려져 있다⁶⁻¹⁰.

사람과 다른 동물에서는 RF가 잘 일어나지만, 유독 buffalo를 제외한 모든 반추동물에서는 RF가 잘 일어나지 않아 ESR이 극히 저조하며 그 임상적 활용에 어려움이 뒤따랐다^{5,6}.

사람의 ESR 측정시에 측정관이 수직에서 약간만 기울어져도 ESR이 빨라진다는 것은 널리 알려진 사실이다. 근년에 이원리를 기초로 반추동물에 응용한 경사 ESR 측정법을 개발함으로써 이의 임상적 응용의 가능성이 시사되고 있지만^{9,10}, 정작 중요한 요인인 RF에 근본적으로 영향을 미치는 반추동물 적혈구막의 구조와 단백질에 관해서는 저자들에 의해 실시된 한우와 Holstein 젖소를 대상으로 한 것¹¹과 더 나아가 반추동물 전반에 걸쳐 한 것¹²에 따르면 사람의 것에서는 볼 수 없었던 새로운 단백질과 당단백분획(저자들은 이들을 각각 Band Q와 PAS-B로 명명했음)을 관찰한 바 있으며, 또한 단백질 효소와 당단백 분해 효소 처리에 의한 전기 영동상에서도 차이가 있음을 관찰하였다.

이것을 기초로 하여 사람과 동물 전반에 걸쳐 ESR이 제일 빠른 경주말에서는 사람의 것과 비교하여 말에서는 PAS-2가 많음¹³을 밝혀 ESR이 사람이나 동물중 제일 빠른 이유를 찾았었다.

더 나아가 저자는 개에서의 ESR과 취약성이 왜 사람의 그것과 비슷한지를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분석해 그 이유를 찾았고, 동시에 ESR이 사람과 비슷한 개, 제일 느린 소, 제일 빠른 말의 적혈구막 단백을 함께 사람의 것과 서로 비교 분석한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물

광주시에 소재하고 있는 삼호축산(주)에서 외관상 뚜렷한 임상증상이 없는 1세 이상의 한우와 Holstein 종 젖소를 무작위로 선정하여 그 혈액을 사용하였고, 사람의 경우에는 건강한 성인의 혈액을 사용하였다.

경주마(Thoroughbred)는 한국마사회에서 외관상 뚜렷한 임상증상이 없는 3세 이상의 동물을 무작위로 선정하여 그 혈액을 사용하였으며, 개는 진도군청산하의 진도견보육사업소에서 공인한 진도견으로 전남대학교 수의과대학 동물사육장에서 사육중인 외관상 뚜렷한 임상증상이 없는 8개월(체중 7kg-11kg)약견과 33개월(체중 13kg-18kg)인 성견을 무작위로 선정하여 그 혈액을 사용하였다.

시약

polyacrylamide gel 전기영동시약으로서 acrylamide, N, N'-methylene bisacrylamide (BIS), N, N', N', N'-tetramethylethylene diamine (TEMED), ammonium persulfate 등은 모두 BIO-RAD 사 제품을 사용하였고, bovine serum albumin (BSA)과 trishydroxymethyl aminomethane (Tris), trypsin (type III), basic fuchsin 등은 Sigma Chemical 사의 것을, sodium dodecyl sulfate (SDS), Coomassie brilliant blue R, acetic acid는 일본의 화광약품사제품, 그리고 heparin sodium (25,000 IU/5 ml)은 중의 제약사제를 사용하였다. 증류수는 금속이온을 제거하기 위하여 Barnstead 사의 NANOpure cartridge system에 통과시켜서 전기저항이 18 megaohm-cm가 되는 것을 사용하였다.

채혈

사람에서는 주정중피정맥에서, 소와 말에서는정정맥에서, 개는 요측피정맥에서 1회용 주사기로 무균적으로 약 10 ml의 혈액을 채혈하여 heparin(100 IU/ml)으로 항응혈 처리하여 주사기에 든 그대로 운반하여 1시간 이내에 실험에 사용하였으며, 특히 경주마는 채혈 즉시 그 자리에서 실험을 진행하였다.

적혈구의 분리

Heparin 처리 혈액을 Fairbanks 등이¹⁴ 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 4°C에서 1000×g로 5분간 원심하여 혈장과 연층을 제거하였다. 침전된 적혈구를 4°C pH 8.0 의 0.15M NaCl-5 mM sodium phosphate buffer(PBS) 용액을 부유시켜 가볍게 교반, 세척하고 위와 같이 원심하여 상층액을 버렸다. 위와 같은 조작으로 상층액이 맑아질 때까지 적어도 3회 이상 반복하고 매 원심시 마다 상

층액이 맑아질 때까지 연층을 제거하여 백혈구의 혼입을 방지하였다.

적혈구막의 분리

적혈구막은 Fairbanks 등¹⁴, Schrier¹⁵ 및 박과 이 등¹¹ 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 세척된 적혈구에 약 20배 용량의 5 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)를 가하여 용혈시키면서 가볍게 교반한 다음, 4°C 10,000 × g로 10분간 원심하여 적혈구막을 침전 분리시켰다. 상층액을 제거하여 얻은 적혈구막이 회백색을 띠 때까지 적어도 4회 이상 시행하였으며, 매 시행시 마다 하층에 있는 흰 gelatin 성 침전물도 제거하였다.

적혈구막 단백질함량 측정

적혈구막의 단백질함량은 Bradford^{16,17}의 bicinchoninic acid (BCA) 방법으로 측정하였으며, BSA를 표준단백으로 삼았다.

ESR의 측정

ESR 측정 방법은 heparinized whole blood를 plastic ESR 측정관(길이 20 cm, 내경 2 mm)과 내경 1.1~1.2 mm, 길이 7.5 cm의 nonheparinized capillary hematocrit tube (W. Germany)를 동시에 사용하여 각 측정관에 수직으로 한 ESR(90°- plastic - ESR과 90°- micro-ESR)과 45° 경사로 한 ESR(45°- plastic - ESR과 45°- micro - ESR)로 구분하여 말에서는 10분마다, 사람과 소에서는 30분마다 측정하였다.

적혈구의 trypsin, chymotrypsin 처리

적혈구의 trypsin 처리는 Carraway¹⁸가 기술한 바에 따랐다. 즉, 잘 세척된 적혈구 1 ml를 3 ml의 PBS(pH 8.0)액에 부유시키고, 여기에 trypsin (0.2~0.5 mg/ml)을 가하여 37°C에 1시간 부치하였다. Trypsin 처리 후, 0.05 mg/ml의 phenylmethanesulfonyl fluoride을 가하여 trypsin과 chymotrypsin 작용을 정지시켰다. 그 후, 즉시 trypsin, chymotrypsin 처리 적혈구를 PBS 액으로 세척한 다음,

이로부터 적혈구막(ghost)을 분리하였다.

SDS-PAGE

적혈구막 단백질의 전기영동은 Laemmli¹⁹ 방법으로 시행하였다. acrylamide 농도는 10%로, acrylamide와 BIS와의 농도비는 36.5:1로 하였다. 적혈구막을 4% SDS 함유 - 시료혼합액에 넣어 90초간 증탕한 다음 slab gel (두께 1.5 mm, 길이 13 cm)에 40 mg 썬의 단백질량을 부가하여 plate 당 30 mA로 전기영동 하였으며 실내온도가 18°C 이하였으므로 냉각수를 순환시키지 않았다.

영동후 gel 상에서 분리된 단백분획은 Coomassie blue로, 당단백 분획은 Periodic Acid-Schiff(PAS) 시약으로 각각 염색하고 이들 분획의 흡광도를 0.05 mm slit를 통해 각각 550 nm와 560 nm에서 Hewlett-Packard사의 spectrophotometer의 gel scanner로 측정, 자동 기록하였다.

결 과

막단백 함량의 비교

사람과 소, 말, 개의 적혈구 막단백 함량은 Table 1에서와 같이 소에서 약간 높았으나 유의성은 없었다.

동물종간의 ESR 비교

사람과 젓소 및 경주마의 전혈의 ESR을 90°와 45°로 나누어서 측정한 것을 Table 2에 표시하였다. 이 표에서

Table 1. Comparison of protein contents in human and animal ghosts

Sample	Protein value(mg/ml) ± Standard deviation
Human	4.64±0.6 (n=10)
Korean nation cattle	5.33±0.6 (n=10)
Holstein	5.01±0.6 (n=10)
Race horse	4.83±0.5 (n=10)
Jindo dog	4.62±0.6 (n=10)

Table 2. Comparison of the erythrocyte sedimentation rate among human, Holstein and race horse

Species	No. of blood Samples	Plastic-ESR(mm)				(min)	Micro-ESR(mm)			
		90° angle		45° angle			90° angle		45° angle	
		30	60	30	60		30	60	30	60
Human	5	0.9±0.7*	4.9±5.0*	31.2±5.1*	57.8±8.6*	0.1±0.04*	0.3±0.1*	1.5±0.2*	2.1±0.1*	
Holstein	5	0±0	0±0	3.4±1.6	11±2.9	0±0	0.1±0	0.3±0.1	0.8±0.2	
Race horse	5	29.8±32.5**	115.5±13.5**	83±19.3**		1.5±1.3**	2.9±0.3**	3.0±0.4**		

* : Significant increase in human with the Holstein(p<0.05)

** : Highly significant increase in race horse with the Holstein(p<0.01)

보는 바와 같이 Holstein 젖소에 비해 사람과 말에서 90° 각도나 45° 각도에서, 또 plastic 관이나 micro 관 모두에서 ESR의 현저한 증가현상(사람; $p < 0.05$)을 보였다. 특히, 말에서는 엄청난 증가($p < 0.01$)를 일으켰다.

동물종간의 적혈구막 단백질 전기영동상

Fig 5의 위쪽에 표시한 바와 같이 사람과 소, 말 적혈구막 단백질의 SDS-polyacrylamide 전기영동상은 대체로 비슷하였으나, 사람 것의 band 2와 3 사이에 해당하는 위치에서 소에서는 band Q의 흔적은 보였으나, 말에서는 사람의 것에서와 같이 전혀 나타나지 않았다. 그 외 단백질상에서도 말의 것은 사람의 것과 거의 일치함을 알 수 있다. band 3은 사람의 것에 비해 말에서 그 양이 조금 많았다(34.7%).

적혈구막의 당단백질을 PAS 염색으로 비교해보면(Fig 5 아래) 젖소의 것에서는 사람의 것에 없는 PAS-B가 전기영동상의 원점 부위에 강한 양성분획(56.6%)으로 나타났고, 말에서는 사람 것의 PAS-2에 해당하는 위치와 똑같은 부위에 사람 것(12.7%) 보다 더 많은 양(22.7%)이 나타나, 이것을 역시 사람의 것에서와 같이 PAS-2라

명명하였으며, 또한 추적 염색(tracking dye) 바로 앞쪽에 사람과 소의 것에서는 없는 강한 PAS 음성 분획이 새로이 나타나 본 연구에서는 이를 PAS-E라 명명하였다(18%)¹³.

Fig. 3에서 ghosts(stroma)로는 사람에서나 진돗개 모두 거의 같으나 다만 진돗개에서는 band 5만 없었다.

또한 trypsin 처리군에서 서로 비교해보면 사람에서는 band 2와 3이 모두 없어졌으나 진돗개 암수에서는 band 3만 없어졌다. Chymotrypsin 처리군에서도 trypsin 처리군에서와 같이 진돗개 암수에는 band 3이 없어지고 그 자리보다 바로 아래쪽 즉 분자량이 더 작은 단백질상(band)이 나타났으나, 오히려 사람의 것에서는 band 2만 없어졌다.

PAS 염색으로 한 Fig 4를 보면 사람의 ghosts로는 PAS-1이 분명히 나타났고 약하게 PAS-2, 3이 보였으나, trypsin, chymotrypsin 처리로는 사람에서는 당단백이 전혀 보이지 않았다. 진돗개에서는 전혀 PAS-1, 2, 3 등이 보이지 않았다.

Fig 1에 표시한 바와 같이, 사람과 소 적혈구막 단백질의 SDS-polyacrylamide 전기영동상은 대체로 비슷하였

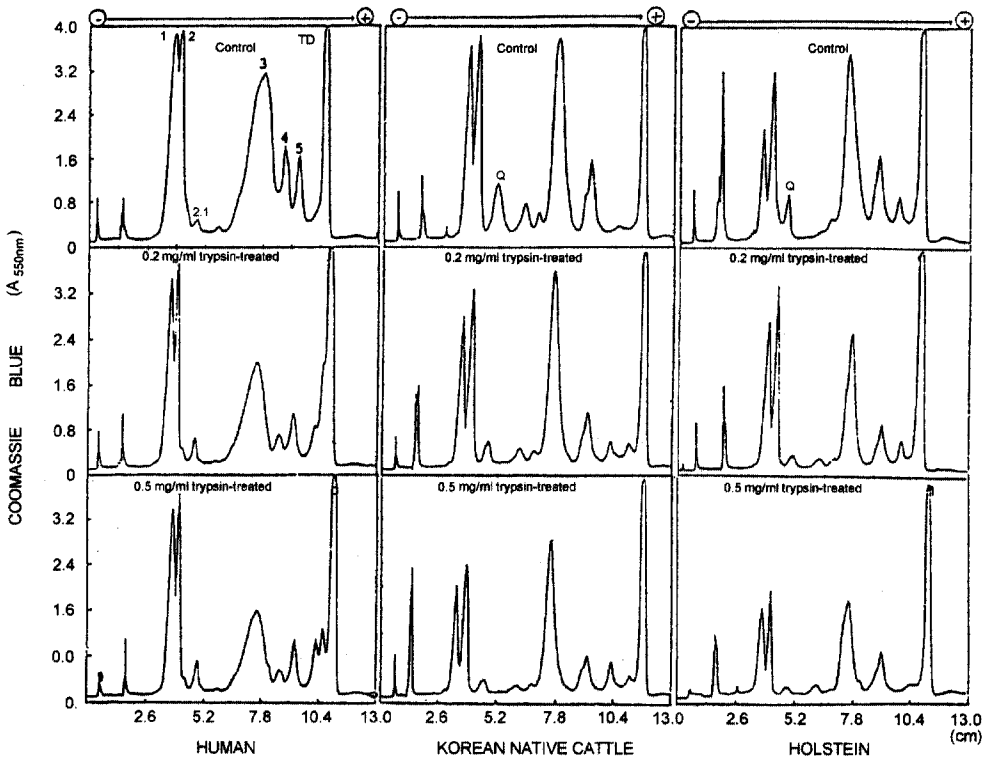


Fig 1. Densitometric scans of Coomassie blue-stained polypeptides of human and bovine erythrocyte membranes, as affected by trypsin treatment of the erythrocytes.

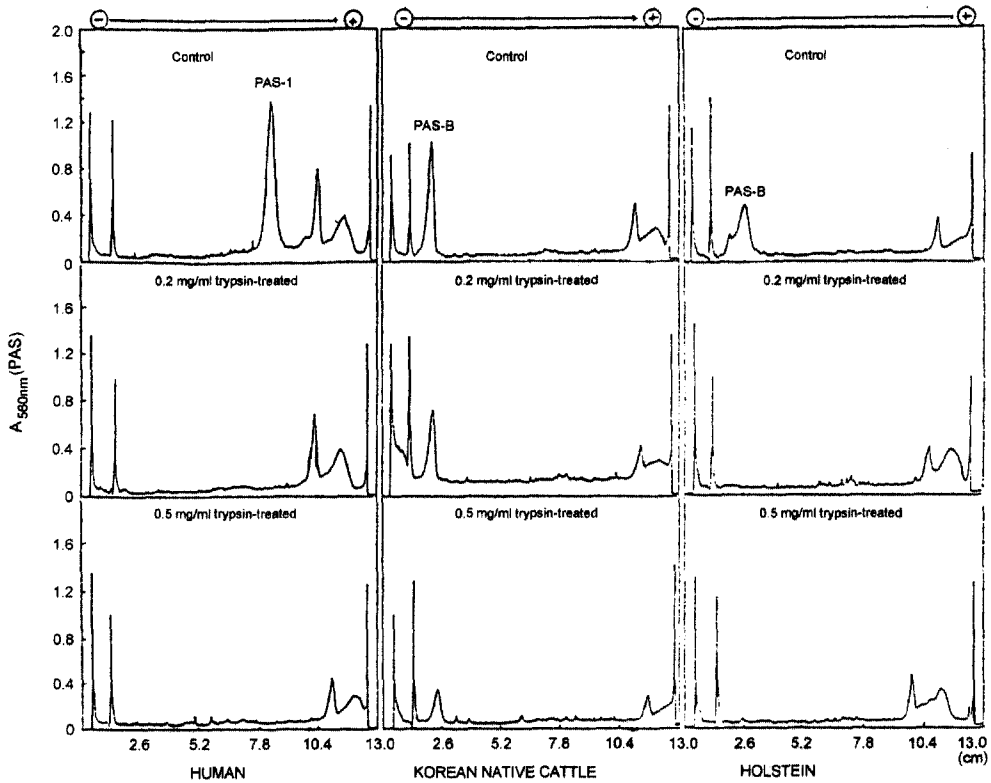


Fig 2. Densitometric scans of PAS-stained glycoproteins of human and bovine erythrocyte membranes, as affected by trypsin treatment of the erythrocytes.

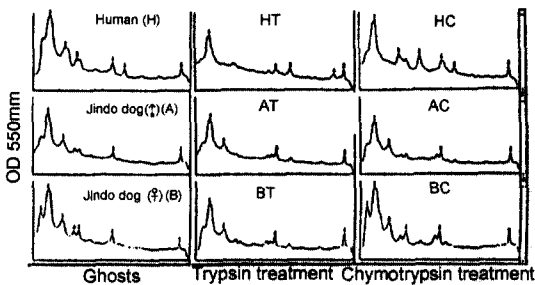


Fig 3. Erythrocyte membrane polypeptide. A densitometric scan of a gel stained for protein with Coomassie brilliant blue after electrophoresis of 20 µl of packed ghostst (about 100 µg of protein). Other is as Fig 1.

으나, 소 적혈구에서는 사람 것의 band 2와 3 사이에 해당하는 위치에서 또 하나의 새로운 단백질 분획이 나타나, 본 연구에서는 이를 band Q라 명명하였다¹¹.

적혈구를 trypsin(0.2 mg/ml와 0.5 mg/ml)으로 37°C에서 1시간 처리하면 band Q가 한우의 것에 비하여 젖소의 것에서 크게 감소하여 거의 소실되었으며, 나머지 단

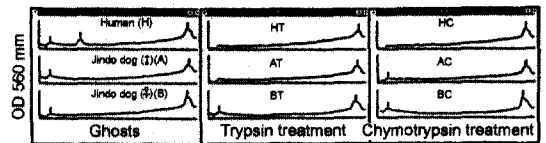


Fig 4. Erythrocyte membrane glycoprotein. A similar gel stained for carbohydrate with PAS reagent. Procedures and nomenclature are described in references 14 and 21.

백분획도 한우에서 보다 사람이나 젖소에서 더욱 많은 감소경향을 보였다.

적혈구막의 당단백질을 PAS 염색으로 비교해 보면 Fig 2에 표시한 바와 같이 젖소와 한우의 것에서는 다 같이 사람의 PAS-1에 해당되는 분획이 없는 대신 전기 영동상의 원점 부위에 강한 PAS 양성 분획이 새로이 나타나, 본 연구에서는 이를 PAS-B라 명명하였다¹¹.

적혈구를 trypsin으로 처리하면 사람의 것에서 PAS-1과 Holstein의 것에서 PAS-B가 모두 소실되었으나, 한우의 것에서는 PAS-B가 trypsin 농도에 대체로 비례하여 감소하였을 뿐, 완전히 소실되지는 아니하였다.

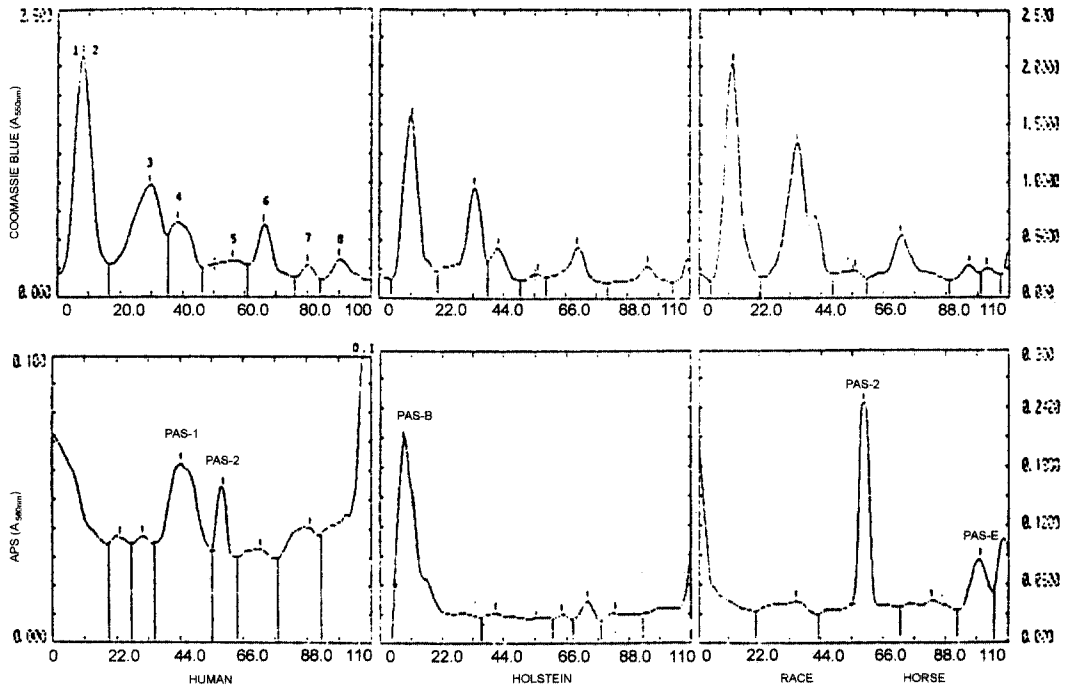


Fig 5. Densitometric scans of Coomassie blue-stained polypeptides(above) and PAS-stained glycoproteins(below) of human, Holstein and race horse erythrocyte membranes.

고 찰

Fahraeus¹는 혈장 점도, 혈구나 혈장의 비중, 혈구의 크기 등에 의한 침강속도에 미치는 영향은 미약하고, 바로 적혈구 연전형성 또는 응집이 침강속도에 미치는 가장 중요한 요인이라고 하였으며, Fegler²⁰는 ESR이 상당히 빠른 말의 적혈구를 ESR이 극히 느린 소와 면양의 혈장에 섞어도 빠른 침강 속도를 나타내고, 반대로 소나 면양의 적혈구를 말의 혈장에 넣어도 느린 침강속도를 보였다. 이것은 동물 종간의 ESR을 좌우하는 주가 된 소인이 적혈구 자체에 있다는 것을 시사한 것이며, 특히 적혈구 연전형성 또는 응집형성이 ESR을 촉진시킨다는 점임을 고려해 볼 때, 동물 종간 적혈구막의 성상의 차이가 곧 종간의 ESR의 차이를 야기시킨다고 설명될 수 있다.

사람의 적혈구를 대상으로 한 연구²¹⁻²³에 의하면 사람 적혈구막 단백질의 2/3을 점하는 polypeptide는 전기영동법으로 약 15종 정도가 검출되며, 이중 세포막의 전체 층을 세포막 외면으로 부터 내면까지 관통하고 있는 단백질은 2종류가 있다고 한다^{21,24,25}. 그 하나는 glycophorin (PAS-1 당단백이라고 함)이고 나머지 band 3은 integral protein으로서 anion channel 구실을 하는 단백질^{21,30}로 알

려져 있으며, 또한 사람 이외의 여러 포유류에서도 사람 적혈구와 비슷한 분포 및 막결합 양상을 보이지만 glycophorin과 sialoglycoprotein과 같은 당단백질은 동물에 따라 다른 분포 및 막결합 양상을 보이고³¹, 이들 중 어떤 것은 적혈구의 성숙과 더불어 소실되어 간다는 사실이 집토끼에서 보고되고 있다^{32,33}.

일반적으로 적혈구막의 기능과 막단백분획과의 관계라든가 적혈구막에 있어서 막단백의 위치 등을 알고자 할 때는 적혈구나, 또는 이로부터 분리한 막분획에 trypsin과 같은 단백질분해효소를 작용시켜 적혈구막의 외부나 또는 내부에 노출되어 있는 단백질분획을 분해시켜 막기능의 변화나 전기영동상의 변화를 보는 것이 상례로 되어 있다.

소나 말의 적혈구막 단백질의 전기영동상에서 이들 주요 단백질분획의 영동거리(이동도)가 사람의 것과 거의 일치한 것을 보면 소나 사람에게 있어 이들 단백질의 분자량의 동일함을 알 수 있다. 사람과 젖소에서 band 1, 2, 3의 양이 거의 서로 같았지만(band 1, 2<31.5%>, band 3<25%>), 말에서는 band 1, 2의 양(32.7%)이 사람과 젖소 것의 양과 비슷하였으나 band 3의 양(32.7%)은 사람과 젖소 것의 양보다 증가되어 있음이 주목되었다. 소에서의 band Q¹¹는 사람과 말의 것에서는 전혀 나타나지

않음도 주목되었다.

Fig 5의 아래쪽 PAS 염색의 그림을 보면, 소에서는 사람과 말에서는 없는 PAS-B¹가 전기영동의 원점부위에 강하게 나타난 반면, 말에서는 사람의 PAS-2(12.7%)와 똑같은 PAS-2(22.7%)가 상당량 나타났으며, 아울러 전기영동 끝 부위에 사람과 소에서는 없는 새로운 강한 PAS 음성분획(본 연구에서 이를 PAS-E라 명명함)이 나타남도 크게 주목되었다.

한편, 말에서는 다른 동물에 비해 연전형성이 월등하기 때문에 ESR이 아주 빠르다²⁶⁻²⁸고 하였는데, 본 실험에서도 말의 적혈구 침강속도가 사람이나 소에서 보다 plastic-ESR에서 90°나 45°로나 30 mm 이상(30분)의 증가 현상을 보였고, micro-ESR로도 90°나 45°에서 1.5 mm 이상(30분)의 증가경향을 나타내었다(Table 2).

일찍이, Winzler²⁹는 사람 적혈구를 trypsin으로 처리하면 적혈구막의 당단백질인 sialoglycoprotein으로부터 sialoglycopeptide가 유리됨을 관찰하였으며, 또 그 후 Carraway¹⁸도 적혈구의 trypsin 처리로 적혈구막에서 sial 산은 적혈구막의 외면에 노출되어 위치하고 있다고 하였다. 사람의 PAS-1은 반 이상(57%)이 sial 산으로 구성되어 있으므로 소의 PAS-B에도 상당량의 sial 산이 함유되어 있을 것으로 생각되며, 아울러 말에서는 PAS-1은 없고 PAS-2와 PAS-E가 음극 쪽보다 중앙과 양극 쪽에 위치해 있으므로 해서 sial 산 함량은 적을 것으로 사료된다. 적혈구막의 외면에 노출되어 있는 당단백질의 sial 산은 적혈구막 자체를 음전하로 대전케 하는 것으로 결국 적혈구끼리의 연전형성을 억제케 하는 요인이 된다. 따라서, 적혈구의 ESR과 막단백 분획과 상관시켜 보면, 소 적혈구의 느린 침강속도는 그 원인의 일부가 소의 적혈구에만 존재하는 band Q와 PAS-B에 있음에 시사한 반면, 말에서는 사람과 같이 band Q가 없고 band 3와 PAS-2가 사람 것의 양보다 많고 아울러 새로운 PAS-E가 더 있으므로 해서 적혈구끼리의 연전형성이 촉진되고 그 결과 적혈구 침강속도도 촉진될 것으로 생각된다.

진돗개 적혈구 막단백의 전기영동상에서 이들 주요단백분획의 영동거리(이동도)가 사람의 것과 거의 완전히 일치한 것을 보면 개나 사람에 있어 이들 단백질의 분자량도 동일함을 알 수 있고, 개에서 band 7(3.4% 차지)이 없었지만 단백질량의 비교에서도 거의 같았다.

그래서 사람과 개에 있어서 적혈구침강율(ESR)이라든지, 취약성(fragility), 크기(size) 등에서 서로 비슷하고, 혈침(hematocrit), 혈색소량(hemoglobin)에서는 개에서 조금 낮고, 적혈구수에서는 개가 조금 많게 나타난다.

개와 사람에서 trypsin, chymotrypsin 두 분해 효소 모두가 band 3을 완전히 분해시켜 소실되었고, 특히 trypsin에 의한 것은 다른 분획도 상당히 분해시켰으며 그 작

은 단편들이 Hb와 TD 사이에 존재함을 알 수 있었다. Chymotrypsin에 의한 것으로는 다른 분획들이 그렇게 소실되지 않았고, 다만 band 3의 완전 소실로 인한 작은 단편들이 band 5와 band 6 사이에 새로이 나타났다(Fig 3).

진돗개의 자용에서는 band 3이 trypsin과 chymotrypsin에 의해 band 3이 약간씩만 분해되어 조금 감소되었고, band 4와 5에서는 많이 분해된 차이이다(Fig 3).

한편, PAS 염색으로 나타나는 당단백을 서로 비교해 보면 본 연구에서도 사람의 ghosts에서는 PAS-1이 뚜렷이 나타나고 PAS-2와 3은 그 흔적만 보였으나 trypsin 처리로는 PAS-1, 2, 3 모두가 완전 분해 소실되었고 chymotrypsin에 의한 것은 PAS-1과 2만 약간 나타났고, PAS-3은 완전 분해되어 보이지 않았다.

그러나 진돗개 자용에서는 당단백이 나타나지 않았으며 그의 효소처리로는 어떤 당단백도 전혀 나타나지 않았다(Fig 4).

한편으로 적혈구의 침강속도(ESR)를 검색하여 capillary tube로 수직으로 검색한 결과는 비처리군인 전혈(whole blood)로서는 진돗개의 것이 사람의 반 정도 속도이고(p<0.01), 처리군에서 trypsin 처리에서는 사람, 진돗개 모두 서로 비슷하였고, chymotrypsin 처리군에서는 진돗개의 것이 훨씬 높았다(p<0.01).

결 과

사람과 동물 중에서 말의 적혈구 침강속도(ESR)가 제일 빠른 원인을 밝혀보려고 사람과 소, 말, 개의 적혈구를 45°와 90°의 plastic-ESR과 micro-ESR로 각각 ESR의 촉진여부를 검색하고, 동시에 적혈구막 단백상을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 전기영동법으로 분석하였다.

적혈구 막단백의 평균함량은 사람이나, 소, 말, 개 등에서 비슷하였다(유의성이 없음).

말의 ESR은 사람 것에 비해 plastic-ESR로는 33배(90°)와 2배(45°)로 빨랐다(30분). 소와의 비교는 엄청나게 말에서 빨랐다.

말의 적혈구막 단백질의 전기영동상은 대체로 사람의 것과 비슷하였으나 band 3의 양이 사람과 소의 것의 양보다 조금 많았다. 진돗개에서는 band 3이 없었다. Periodic acid-Schiff(PAS) 염색으로 검색한 적혈구막의 당단백 분획상은 사람과 말, 소 사이에 서로 큰 차이가 인정되었다. 즉, 사람 것의 PAS-1(glycophorin)의 당단백은 젖소와 말에서는 나타나지 않은 대신 소에서 전기영동상의 원점에 가까운 부위에 강한 PAS-B가 나타났으며, 말에서는 사람의 PAS-2와 똑같은 위치에 많은 양의

중성 분획이 나타나 이를 사람에서와 똑같이 PAS-2라 명명하였고, 아울러 전기영동 끝점부위에 강한 PAS-음성분획이 나타나서 이를 PAS-E라 명명하였다. 진돗개에서 PAS-1, 2, 3이 거의 나타나지 않았다.

이상의 실험 결과로 미루어 보아, 말 적혈구의 빠른 침강속도는 말 적혈구막의 band 3 단백질분획의 양과, PAS-2와 PAS-E 당단백 분획의 존재와 소 적혈구의 낮은 침강속도는 소 적혈구막의 band Q 단백질분획과 PAS-B의 당단백 분획의 존재에 일부 기인된 것으로 시준되었다.

참고문헌

- Fahraeus R. The suspension stability of the blood. *Acta Med Scand*, IV:1-6, 1921.
- Wintrobe MM. Erythrocyte sedimentation rate. In: Wintrobe MM, ed. *Clinical hematology*. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 27-32, 1981.
- Gambino SR, Dire JJ, Monteleone M, et al. The Westergren sedimentation rate, using K³-EDTA. *Am J Clin Pathol*, 45:173-180, 1965.
- Westergren A. The technique of the red cell sedimentation reaction. *Am Rev Tuberc*, 14:94-101, 1926.
- 신종욱. 우 혈액에 있어서 경사시험관법에 의한 적혈구 침강을 측정에 관한 연구. 박사학위논문, 6-8, 1985.
- Vacca C, Montemagno G, Persechino A, et al. Erythrocyte sedimentation in cattle and buffaloes: a general hypothesis. *Folia Veterinaria Latina*, 4:24-39, 1974.
- Vacca C, Montemagno G, Persechino A, et al. Research on the erythrocyte sedimentation rate buffaloes and cattle. *Atte della societa Italiana delle Scienze Veterinarie*, 26:219-222, 1972.
- Fahraeus R. The influence of the rouleau formation of the erythrocytes on the rheology of the blood. *Acta Med Scand*, 161:151-165, 1958.
- Gilligan DR, Ernstone AC. The relationship between the erythrocyte sedimentation rate and the fibrinogen content of plasma. *Am J Med Sci*, 187:552-556, 1934.
- Shin SS, Lee BW, Shin JU. Angled capillary method for determining erythrocyte sedimentation rate of goat. *Korean J Vet Res*, 26:187-194, 1986.
- 박영우, 이방환. 우적혈구막 단백질 전기영동법에 의한 분석. *대한수의학회지*, 29(1):13-20, 1989.
- 이방환, 박영우. 반추동물 적혈구막 단백질의 전기영동법에 의한 분석. *대한수의학회지*, 29(4):445-455, 1989.
- 박영우, 이시영. 경주마 적혈구막 단백질의 전기영동법에 의한 분석. *대한수의학회지*, 32(3):259-264, 1989.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem*, 10:2606-2616, 1971.
- Schrier SL. Human erythrocyte membrane enzyme: current status and clinical correlates. *Blood*, 50:227-234, 1977.
- Bradford MB. Protein measurement with the bicinchoninic acid reagent. *Anal Biochem*, 72:258-262, 1976.
- Dunn MJ. Bicinchoninic acid procedure. In: Harris ELV, Angal S, ed. *Protein purification methods: a practical approach*. IRL Press, 13-16, 1989.
- Carraway KL. proteolytic enzyme treatment. In: Ellory JC, Young JD, ed. *Red cell membranes: a methodological approach*. New York: Acad Press, 239-250, 1982.
- Laemmli UK. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227:680-685, 1970.
- Fegler, G. Hemoglobin concentration, hematocrit value, and sedimentation rate of horse blood. *Q J Exp Physiol*, 35:129-139, 1948.
- Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *Rev J Cell Biol*, 62:1-19, 1974.
- 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*, 147:393-402, 1975.
- Reichstein E, Blostein R. Arrangement of human erythrocyte membrane proteins. *J Biol Chem*, 250:6256-6261, 1975.
- Marchesi SL, Steers E, Marchesi VT, et al. Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes. *Biochem*, 9:50-57, 1970.
- Rosenberg SA, Guidotti G. The proteins of erythrocyte membrane: structure and arrangement in the membrane. In: Jamieson GA, Greenwalt TJ, ed. *Red cell membrane: structure and function*. Philadelphia: JB Lippincott Co, 93, 1969.
- Takagi S, Ito K, Shibata H. Effects of training on plasma fibrinogen concentration and thyroid hormone level in young race horses. *Exp Rep Equine Health Lab*, 11:94-105, 1974.
- Osbaldiston GW. Erythrocyte sedimentation rate studies in dog and horse.
- Archer RK. Hematology in relation to performance and potential. *J S Afr Vet Ass*, 45(4):273-277, 1974.
- Winzler RJ. A glycoprotein in human erythrocyte membranes. In: Jamieson GA, Greenwalt TJ, ed. *Red cell membrane: structure and function*. Philadelphia: JB Lippincott Co, 157-171, 1969.
- Macara IG, Kuo S, Cantley LC. Evidence that inhibitors of anion exchange induce a transmembrane conformational change in band 3. *J Biol Chem*, 258:1785-1792, 1983.
- Finean JB, Michell RH. Membrane proteins and glycoproteins. In: Finean JB, Michell RH, ed. *Membrane structure*. Amsterdam:Elsevier/NorthHolland Biom Press, 10-18, 1981.
- Koch PA, Gardner FH, Carter JR. Red cell maturatuin: loss of a reticulocyte-specific membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 54:1296-1302, 1973.
- Han YS. Inactivation by trypsin and solubilization by lipase of acid phosphatase in rabbit erythrocyte membranes. *Chonnam Med J*, 12:671-674, 1975.