

산란계(*Dakalbwarren*)의 연령에 따른 myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase 활성에 관한 연구

전승기 · 강창원 · 이호일

전북대학교 수의과대학
(1994년 7월 19일 접수)

Activity of myeloperoxidase and leukocyte peroxidase according to ages in the hen(*Dekalbwarren*)

Seung-ki Chon, Chang-won Kang, Ho-il Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received July 19, 1994)

Abstract : This study was undertaken to measure the activity of myeloperoxidase and leukocyte peroxidase of hen. 70 hens were decapitated to observe the activity of enzymes according to ages. The activity of peroxidase by the Lowry's method with bovine serum albumin as standard. Gel filtration chromatography was carried out of sephacryl S-300 column.

The results obtained were summarized as follows;

1. The mean of specific activity of myeloperoxidase and leukocyte peroxidase was 16.80(units/mg) and 15(units/mg), respectively.
2. The specific activity of myeloperoxidase in 35 days hen was significantly increased and showed almost the same level of activity to 350 days hen.
3. The specific activity of leukocyte peroxidase in 35 days hen was significantly increased and showed a little increased tendency from 210 days to 350 days hen.
4. On the sephacryl S-300 column chromatography, two separated peaks of myeloperoxidase activity were observed. The molecular weights of myeloperoxidase were 57,000 dalton and 13,700 dalton.

Key words : hen, myeloperoxidase, leukocyte peroxidase

서 론

Peroxidase는 동물의 여러 장기에 존재하는 주요한 heme 단백질로 hydrogen peroxide 존재시 과산화물에 의한 여러 가지 유기물질의 산화를 촉매하는 역할을 한다. 또한 이는 Brune et al¹과 McLaren et al²에 의해 항미생물 및 항기생충 작용에 관여하는 것으로 알려져 있

다.

Peroxidase의 고유한 특성을 갖는 기질로써는 guaiacol, pyrogallol, o-dianisidin, tetramethylbenzidine, 4-aminoantipyrine, potassium iodide 등이 있으며, peroxidase에 대해서는 Schultz et al³이 human blood, Hosoya와 Morrison⁴이 thyroid gland, Himmelhoch et al⁵이 bone marrow, Yamazaki와 Odajima⁶가 pig blood,

Harrison et al⁷이 canine pus, Klebanoff et al⁸이 horse blood, Olsen et al⁹이 human plasma에서 주로 생화학적인 특성을 연구하였다. 그 밖에도 Wever와 Bakkenist¹⁰가 할로겐화에 의한 미생물의 비가역적인 반응, Bradly et al¹¹이 phagocytosis에 관여함을 보고하였다.

최근들어 Misra 와 Fridovich¹²가 산소헤모글로빈의 자동산화, Pincus¹³는 eosinophil에서 hydrogen peroxide의 방출, Ator et al¹⁴이 hydrogen peroxide와 phenylhydrazine에 의한 촉매활성 저해 등 이와 같은 연구에서 hydrogen peroxide의 중요성이 부각되고 있어, 이와같이 peroxidase의 생화학적 특성에 대한 연구에도 불구하고 이의 생리적 기능에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구는 산란계에 있어서 연령별에 따른 peroxidase 활성을 밝히고자 산란계인 *De-kalwarren*을 이용하여 골수와 전혈에서 peroxidase 활성에 관한 기초연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 육안적으로 건강하다고 인정되는 초생추 70수를 택하여, 연령별로 3일령, 35일령, 70일령, 140일령, 280일령 그리고 350일령체에 각각 10두씩 절두하여 실험에 사용하였다.

효소 추출

골수 : 연령별로 10두 병아리의 대퇴골과 경골에서 골수를 각각 얻고 혼합, 1.5g을 취했다. Himmelhoch⁵와 Kariya¹⁵의 방법을 절충 수정하여 헤모글로빈이 없는 골수성분만을 얻은 다음 2mM EDTA, 0.9% NaCl 용액, 적혈구를 파괴하기 위하여 Gey's 용액에 4-5회 세척하였다. 이 부유액을 400×g, 5분간 원심분리한 다음 pellet을 얻고 0.25M sucrose, 13ml에 균질화하여 400×g, 5분간 2회 원심분리(4℃)후, pellet을 얻었다. 이 시료를 28,000×g, 10분간 원심분리하여 pellet을 냉동시켰다.

냉동된 pellet을 마쇄한 후 0.01M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 10ml에 균질화한 후 28,000×g에 10분간 원심분리하여 얻은 pellet에 1.5M NaCl 10ml에 균질화하였으며, 28,000×g, 30분간 2회 원심분리하여 상층액을 시료로 이용하였다. 모든 실험과정은 4℃에서 실시하였으며, 이상의 과정은 Fig 1에서 보는 바와 같다.

전혈 : 내측부골정맥에서 혈액을 항응고제인 heparin으로 처리하여 채혈, 400×g에 10분간 원심분리하여 buffy coat를 얻고 적혈구를 파괴하기 위하여 Gey's

용액에 4-5회 세척하였다. 백혈구(1.8×10^4 /ml)를 potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 부유시켜 Fig 2의 방법으로 시료를 얻었다.

효소활성 측정 : Peroxidase활성은 Kariya¹⁵방법에서 약간 변형된 방법으로 실시되었으며, 효소의 반응용액 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 0.33mM H₂O₂, 5mM potassium iodide에 시료 200μl을 가한 후 spectrophotometer 350nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(Milton Roy Spectronic 601, USA). 350nm에서 흡광계수 26.0mM⁻¹·cm⁻¹을 이용하여 분당 기질(KI) 1M을 산화시키는 효소의 양을 1unit로 정하였다.

젤 여과 분획법 : 1.6cm×98cm 크기의 column에 sephacryl S-300(Pharmacia, USA)을 충전한 후 0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 용출시켰다. 용출 유속은 24ml/h였고, 5ml씩 분리 분획하였다.

표준 분자량은 adolase(158,000 dalton), ovalbumin(43,000 dalton), ribonulcase A(13,700 dalton)를 사용하였고, Peroxidase 활성은 Kariya¹⁵방법으로 350nm에서 분획별 활성을 측정하였다.

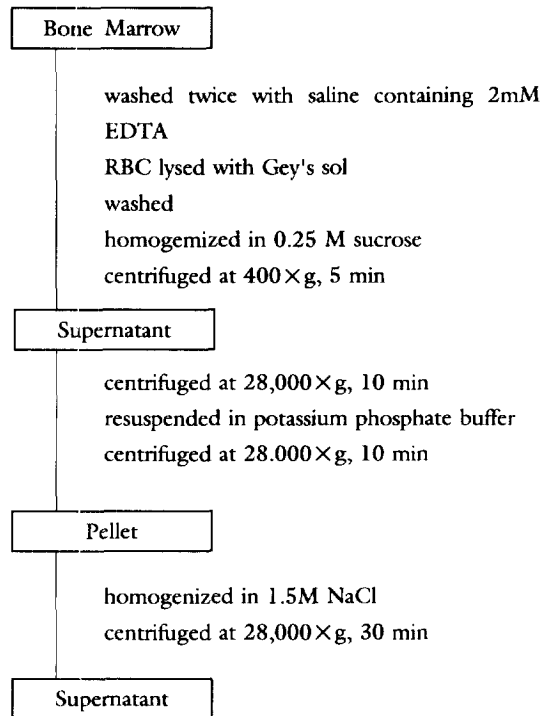


Fig 1. Preparation of myeloperoxidase

결 과

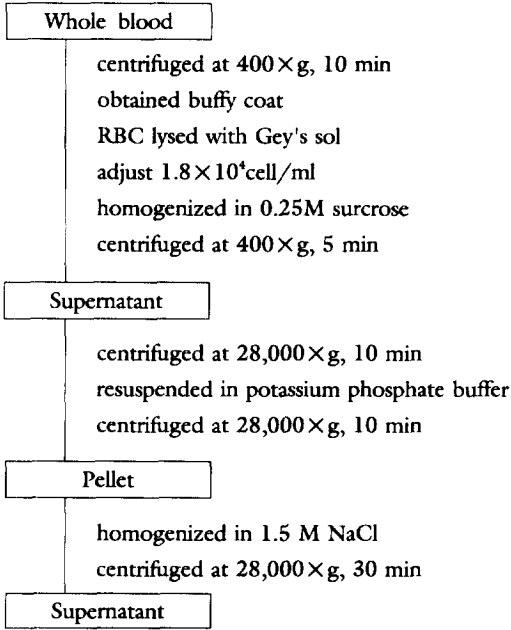


Fig 2. Preparation of leukocyte peroxidase

산란계(Dekalbwarren)의 골수에서 myeloperoxidase의 활성과 전혈에서 leukocyte peroxidase의 활성을 측정한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

Myeloperoxidase 활성은 3일령 5.32 ± 1.05 , 35일령 13.12 ± 1.97 , 70일령 15.85 ± 2.25 , 140일령 18.29 ± 1.58 , 210일령 19.92 ± 1.42 , 280일령 20.08 ± 2.19 , 그리고 350일령 20.15 ± 1.90 의 활성을 보였다.

3일령, 35일령, 70일령, 140일령에서는 각 구간 현저한 유의성($P < 0.05$)을 보였으며 210일령, 270일령, 350일령에서는 각 구간 유의성($P > 0.05$)이 인정되지 않았으나 효소 활성이 증가되는 것을 알수있었다(Fig 3). Myeloperoxidase 활성은 연령이 증가함에 따라서 증가되는 경향($r = 0.775$)을 나타내었다.

Leukocyte peroxidase 활성은 3일령 4.81 ± 1.91 , 35일령 9.53 ± 0.91 , 70일령 13.69 ± 2.01 , 140일령 15.60 ± 2.22 , 210일령 17.43 ± 2.15 , 280일령 17.78 ± 1.52 , 그리고 350일령 18.46 ± 1.76 의 활성을 관찰하였다. 3일령, 35일령, 70일령, 140일령에서는 각 구간 현

Table 1. The activity of myeloperoxidase in bone marrow of hen

Group (Days)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)
3	0.74 ± 0.12	5.32 ± 1.05	$7.10 \pm 0.73^*$
35	0.81 ± 0.11	13.12 ± 1.97	15.93 ± 1.06
70	0.89 ± 0.14	15.85 ± 2.25	17.68 ± 0.86
140	0.97 ± 0.17	18.29 ± 1.58	18.90 ± 0.64
210	1.02 ± 0.15	19.92 ± 1.42	19.47 ± 1.01
280	1.04 ± 0.13	20.08 ± 2.19	19.27 ± 0.71
350	1.05 ± 0.16	20.15 ± 1.90	19.14 ± 0.67

(n=10)

* values expressed as mean \pm SD.

Table 2. The activity of leukocyte peroxidase in whole blood of hen

Group (Days)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)
3	0.58 ± 0.13	4.81 ± 1.19	$8.72 \pm 0.22^*$
35	0.71 ± 0.16	9.53 ± 0.91	13.50 ± 0.97
70	0.85 ± 0.11	13.69 ± 2.01	16.04 ± 1.12
140	0.96 ± 0.17	15.60 ± 2.22	16.25 ± 0.53
210	1.05 ± 0.13	17.43 ± 2.15	16.97 ± 0.82
280	1.06 ± 0.15	17.78 ± 1.52	16.74 ± 0.65
350	1.08 ± 0.12	18.46 ± 1.76	17.00 ± 0.57

(n=10)

* values expressed as mean \pm SD.

저한 유의성($P < 0.05$)을 보였으며 140일령, 210일령, 280일령, 350일령에서는 유의성($P > 0.05$)이 인정되지 않았으나, 210일령에서 350일령까지는 비슷한 수준으로 증가하는 경향($r = 0.832$)을 나타내었다(Fig 3).

140일령의 myeloperoxidase을 시료로 sephacryl S-300 겔여과 분획법을 실시한 결과, 32번 fraction에서 큰 봉우리와 37번 fraction에서 작은 봉우리를 확인하였다(Fig 4). 32번 fraction과 37번 fraction에서 표준 분자량과 비교 분석하여 각각의 fraction에서 분자량이 57,000 dalton, 13,700 dalton임을 관찰하였다(Fig 5).

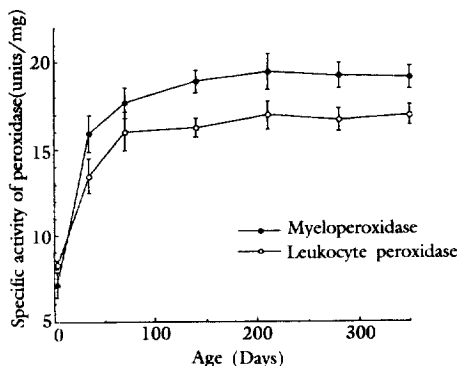


Fig 3. Correlation between the specific activity of peroxidase and ages in hen.

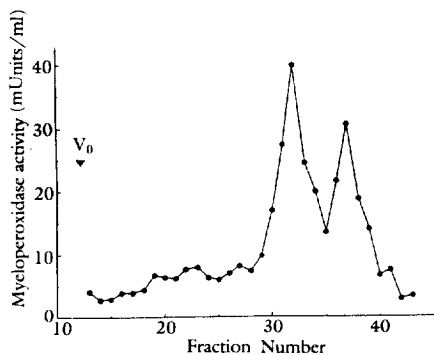


Fig 4. Sephacryl S-300 gel filtration of myeloperoxidase. V₀; void volume

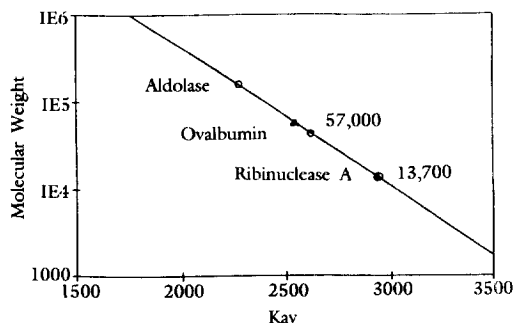


Fig 5. Molecular weight determination of myeloperoxidase after gel filtration. Sample volume was 3 ml. Fractions of 5ml were collected following rate of 24 ml/h. Molecular weight of myeloperoxidase was estimated to be 57,000 dalton and 13,700 dalton. Molecular weight marker proteins were aldolase(158,000) ovalbumin(43,000) and ribonuclease A(13,700). K_{av} is presented as ratio of eluted volume for each protein minus void volume relative to total volume of packed bed minus void volume.

고찰

Myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase에 대한 연구는 식균작용과 호흡효소계 생리대사에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으나 닭에서는 이에 대한 연구가 미흡한 실정인 바 저자는 산란계에서 연령별로 myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase의 활성변화를 관찰하기 위하여 Himmelhoch⁵와 Kariya¹⁵ 방법을 절충 변형하여 측정하였다. Myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase의 활성은 35일령에서 현저한 활성을 보였고, 전반적으로 210일령부터 350일령까지는 거의 같은 수준의 활성을 나타내므로써 발육기에 활성도가 높음을 관찰 할수 있었다.

Choi¹⁶는 peroxidase를 연구한 바 랫트의 뇌에서 기질 O-dianisidine을 이용하여 뇌의 각 부분에서 활성을 조사한 바 연수에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, 선조체에서 가장 낮은 활성을 보였다고 보고하였으며, Kim¹⁷은 합성 또는 생성되는 다양한 페놀류 기질에서 토끼의 헤모글로빈에 대한 기질 특이성을 보고하였다. Olsen et al⁹은 사람의 혈장에서 peroxidase의 spec-

ific activity를 28 units로 보고하였으며, 본 실험 결과에서는 3일령의 myeloperoxidase에서 7.10 ± 0.73 , leukocyte peroxidase에서 8.27 ± 0.22 이었으며, 350일령에서는 각각 19.14 ± 0.67 , 17.00 ± 0.57 unit로 낮은 활성을 보였다. 210일령 이후의 실험군에서는 Kariya et al¹⁵이 랫트의 골수에서 potassium iodide를 기질로 사용하여 peroxidase 활성을 연구한 myeloperoxidase의 활성은 20.9 unit, specific activity은 3.0 units이었다고 보고하였는데 이는 본 실험의 280일령의 활성과 비슷했으며 specific activity는 3일령 보다 활성이 훨씬 낮았다.

본 실험에서는 myeloperoxidase가 leukocyte peroxidase보다 효소활성이 전반적으로 강화되었고, Venge et al¹⁸은 유아의 myeloperoxidase 활성과 성인의 myeloperoxidase 비교한 결과, 유아의 효소 활성이 강화되었다고 보고하였는데, 본 실험에서도 3일령의 활성이 산란이 시작되는 140일령과 산란 최고에 도달하는 210일령의 활성과 비교한 결과 유사하게 높은 활성을 나타내었다.

Yamada et al¹⁹은 사람의 HL-60 세포에서 Sephacryl S-300 겔여과 분획법을 이용하여 두개의 봉우리를 확인하였다고 보고하였으며, Klebanoff et al⁸은 말와 혈액에서 2개의 봉우리를, 그리고 Yamazaki 와 Odajima⁶은 돼지의 혈액에서 1개의 봉우리를 확인하였다고 보고하였으며, Carlson et al²⁰도 Sephadex G-75 겔 여과 분획법으로 사람의 호산구에서 3개의 큰 봉우리과 2개의 작은 봉우리를 확인하였다고 보고하였는데 본 실험에서는 Yamada et al¹⁹과 Klebanoff et al⁸의 결과에 일치하는 2개의 봉우리를 확인할 수 있었다.

Olsen과 Little²¹은 peroxidase의 분자량은 heavy chain을 갖는 52 KD, light chain을 갖는 15 KD로 구성된 하나의 monomer, 즉 77 KD로 되어 있다고 보고하였다. Harrison et al²²은 57 KD와 10 KD, Barkkenist et al²³은 81 KD와 63KD, Olsen et al⁹은 62 KD, 54 KD, 38 KD, 14 KD 였음을 보고하였는데 이들은 서로 상이하여 peroxidase의 분자량은 현재까지 명확히 규명되지 못하는 실정이다. 본 실험에서는 겔여과 분획에서 큰 봉우리의 분획과 작은 봉우리의 분획에서 peroxidase의 분자량이 57,000 dalton과 13,700 dalton 으로 Harrison et al²²이 보고한 분자량과 거의 일치하였다.

연령별 peroxidase의 활성도는 혈구수의 증가와 식균 작용이 활성화 됨에 따라 증가하는 경향이있었는데 출생 후 spleen과 liver에서 조혈기능이 현저히 감소되는 것에 비해 골수에서는 이 기능이 활성화 되므로 Jain²⁴은 골수에서 조혈기능의 활성화는 혈구세포가 성숙되기 이전인

promyelocyte에서 azurophilic granule의 하나인 peroxidase 활성이 증가하고, Lehninger²⁵은 hydrogen peroxide 나 superoxide는 막 지방질의 불포화지방성분을 공격하여 세포의 막 구조를 파괴하므로 세포에 있어서 대단히 유독하다. 호기성 세포는 catalase에 의해 스스로를 보호하며, 과산화물에 의한 여러가지 유기물질의 산화를 촉매하는 peroxidase도 활성이 증가되기 때문에 활성 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

결 론

산란계(Dekalbwarren)의 연령 변화에 따른 골수와 전혈에서 myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase를 측정하였으며, 이들 분자량을 알고자, Sephacryl S-300 겔여과 분획법을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Myeloperoxidase와 leukocyte peroxidase에서 activity는 16.10 units, 13.90 units이었고, specific activity는 각각 16.80 units/mg, 15.00 units/mg 이었다.
2. 35일령에서 myeloperoxidase의 specific activity가 현저히 증가하였고, 210일령부터 350일령까지는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.
3. 35일령에서 leukocyte peroxidase의 specific activity가 현저히 증가하였고, 210일령에서 350일령까지는 약간 증가하는 경향을 보였다.
4. Sephacryl S-300 겔여과 분획법에서는 두개의 봉우리를 확인하였고, peroxidase의 분자량이 57,000 dalton과 13,700 dalton 임을 관찰하였다.

참 고 문 헌

1. Brune K, Schmid L, Galtt M, et al. Correlation between antimicrobial activity and peroxidase content of leukocytes. *Nature* 1973; 245: 209-210.
2. McLaren DJ, Mackenzie CD, Ramalho-Pinto FJ. Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths. *Clin Exp Immunol* 1977; 30: 105-118.
3. Schultz J, Corin R, Oddi F, et al. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. *Arch Biochem Biophys* 1965; 111: 73-79.

4. Hosoya T, Morrison M. The isolation and purification of thyroid peroxidase. *J Biol Chem* 1967; 242: 2828-2836
5. Himmelhoch SR, Evans WH, Mage MG, et al. Purification of myeloperoxidases from the bone marrow of the guineapig. *Biochemistry* 1969; 3: 914-221.
6. Yamazaki I, Odajima T. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood.IV. Some physicochemical properties. *Biochem Biophys Acta* 1972; 284: 360-367.
7. Harrison JE, Pabalan S, Schultz J. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977; 493: 247-259.
8. Klebanoff SJ, Pasquier JM, Jorg A. Purification of horse eosinophi peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; 701: 185-191.
9. Olsen RL, Steigen TK, Holm T, et al. Molecular forms of myeloperoxidase in human plasma. *Biochemistry* 1986; 237: 559-565.
10. Wever R, Bakkenist ARJ. The interaction of myeloperoxidase with ligands as studied by EPR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; 612: 178-184.
11. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 1982; 60: 618-622.
12. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; 247: 6960-6962.
13. Pincus SH. Hydrogen peroxide release from eosinophils. Quantitative, comparative studies of human and guinea pig eosinophils. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 278-281.
14. Ator MA, Ortiz de Montellano PR. Protein control of prosthetic heme reactivity. *Biol Chem* 1987; 262: 1542-1551.
15. Kariya K, Lee E, Hirouchi M, et al. Purification and some properties of peroxidase of rat the bone marrow. *Biochim Biophys Acta* 1987; 911: 95-101.
16. Choi MU. The peroxidase activity of rat brain. *Korean Biochem* 1982; 15: 298-304.
17. Kim SS, Lim JW, Joo HS. Studies on the peroxidase activity of rabbit hemoglobin. *Korean Biochem J* 1991; 24: 564-571.
18. Venge P, Foucard T, Henriksen J, et al. Serum-levels of lactoferrin, lysozyme and myeloperoxidase in normal, infection prone and leukemic children. *Clinica Chimica Acta* 1984; 136: 121-130.
19. Yamada M, Mori M, Sugimura T. Purification and characterization of small molecular weight myeloperoxidase from human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochemistry* 1981; 20: 766-771.
20. Carlson MG, Peterson CG, Venge PC. Human eosinophil peroxidase : Purification and Characterization. *J Immunol* 1985; 134: 1875-1879.
21. Olsen RL, Little C. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem J* 1984; 222: 701-709.
22. Harrison JE, Schultz J. Myeloperoxidase: Confirmation and nature of heme binding in equivalence. Resolution of a carbonylsubstituted heme. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1978; 536: 341-349.
23. Bakkenist ARJ, Wever R, Vulsma T, et al. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; 524: 45-54.
24. Jain NC. Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed. Lea and Febiger 1986; 350-359.
25. Lehninger AL. Principles of Biochemistry. 1st. Worth Publishers Inc 1982; 481-505.