

反芻動物 赤血球의 酵素처리가 ESR에 미치는 영향

조교수 박 영 우

I. 緒 論

적혈구 침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR)의 측정은 非特異的인 것이기는 하지만 아직도 각종 질병의 진단, 예후(경과) 및 판정의 보조진단법으로서 사람이나 가축에서 가치있게 이용되고 있으나,¹⁻³⁾ 유독 buffalo를 제외한 반추동물에서는 적혈구의 連鎖形成(rouleaux formation, RF)이 되지 않아 ESR이 극히 저조하고, 그래서 임상진단에 전혀 응용되지 못하고 있다.^{4,5)} 이 RF는 적혈구와 혈장과의 관계보다는 주로 적혈구막의 구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 이미 알려져 있다.^{6,7)} 근본적인 문제는 적혈구막의 성상이다.

즉, Fahaeus⁷⁾는 혈장 점도, 혈구나 혈장의 비중, 혈구의 크기 등에 의한 침강 속도에 미치는 영향은 미약하고, 바로 적혈구 연전형성 또는 응집(aggregation)⁸⁾이 침강 속도에 미치는 가장 중요한 요인이라고 하였으며, Fegler⁶⁾는 ESR이 상당히 빠른 말의 적혈구를 ESR이 극히 느린 소와 면양의 혈장에 섞어도 빠른 침강 속도를 나타내고, 반대로 소나 면양의 적혈구를 말의 혈장에 넣어도 느린 침강 속도를 보였다고 보고하였다. 이는 動物種 간의 ESR을 좌우하는 주가 된 素因이 적혈구 자체에 있다는 것을 시사한 것이며, 특히 적혈구 연전형성 또는 응집형성이 ESR을 촉진시키는 점임을 고려해 볼 때, 동물간 적혈구막의 성상의 차이가 곧 種間的 ESR의 차이를 야기시킨다고 설명할 수 있다.

이렇게 반추동물에서 ESR의 임상적 응용이 요구됨에 따라 저자들은 우선 이전에 45° 경사 micro-ESR 측정법을 제창한 바 있고,^{9,10)} 이어서 소(韓牛와 젃소)에서 ESR의 낮은 원인을 밝혀보려고 소의 적혈구막 단백질의 분석연구를 실시하여 그 결과도 이미 보고한 바 있다.¹¹⁾

이것을 기초로 하여 더 나아가 반추동물 전반에 걸쳐 ESR이 낮은 이유를 밝혀 보려고 한우, 젃소, 산양, 면양의 적혈구막 단백질 정량과 동시에 적혈구를 효소처리하여 이에 대응하는 ESR 및 적혈구 취약성의 변화를 관찰하여 사람의 것과 비교한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 試 藥

Bovine serum albumin(BSA)과 trypsin(type III), α -chymotrypsin(type II), pronase E(type XIV), neuraminidase(type V), heparin(grade II) 등은 Sigma chemical 社의 것을, β -galactosidase(5531 LA)는 BRL 社의 것을, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 일본 和光藥品社의 製品을 사용하였다. 증류수는 금속이온을 제거하기 위하여 Barnstead 社의 NANOpure cartridge system에 통과시켜서 전기저항이 18 megaohm-cm가 되는 것을 사용하였다.

2. 實驗動物

韓牛는 무안군 소재 유당농장에서, 젖소는 광주시 근교의 개인 목장에서, 면양은 전남대 사육장에서, 재래 산양은 화순의 개인 목장에서 외관상 뚜렷한 임상증상이 없는 1세 이상의 동물을 무작위로 선정하여 그 혈액을 사용하였고, 사람의 경우에는 건강한 성인의 혈액을 사용하였다.

3. 採 血

사람에서는 주정중피정맥 (median cubital vein)에서, 소, 양에서는 경정맥에서 1회용 주사기로 무균적으로 약 30ml의 혈액을 채혈하여 heparin(100 IU/ml)으로 항응혈 처리하고 주사기에 든 그대로 운반하여 1시간 이내에 실험에 사용하였다.

4. 赤血球의 分離

Heparin 처리 혈액을 차과李 등¹¹⁾이 기술한 방법으로 분리하였다. 즉, 4°C에서 1,000 × g로 5분간 원심분리하여 혈장과 연층(buffy coat)을 제거하였다.

침전된 적혈구를 4°C, pH 8.0의 0.15 M NaCl-5mM sodium phosphate buffer(PBS) 용액에 浮遊시켜 가볍게 교반, 세척하고 위와 같이 원심분리하여 상층액을 버렸다. 이와 같은 조작을 상층액이 맑아질 때까지 3회 이상 반복하고, 매 조작시마다 상층액과 연층을 제거하여 백혈구의 혼입을 방지하였다.

5. 赤血球의 酵素處理

적혈구의 효소처리에 사용된 효소는 단백분해효소로 trypsin, chymotrypsin, pronase을, 당단백분해효소로는 neuraminidase 및 galactosidase 등을 사용하였다. 적혈구의 효소처리 는 일률적으로 Carraway¹²⁾가 기술한 방법에 따랐다. 즉, 잘 세척된 赤血球 1ml 를 2.9ml

의 PBS(pH 8.0)액에 浮遊시키고, 여기에 효소 0.5mg/ml 을 가하여 37°C에 1 시간 반응시켰다. 효소처리후 0.05mg/ml 의 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 가하여 효소작용을 정지시켰다. 그후, 즉시 적혈구를 PBS액으로 세척한 다음 이로부터 적혈구만 남게 하였다.

6. ESR의 測定

前記한 효소처리 적혈구(원심침전층) 3 용량과 자가혈장 7 용량을 혼합하여 capillary hematocrit 치가 일률적으로 30ml/100ml 이 되도록 조정된 혈액에 대한 ESR을 측정하였다. ESR 측정방법은 내경 1.1~1.2mm, 길이 7.5cm의 nonheparinized capillary hematocrit tube(W. Germany제)를 이용하여 사람과 반추동물 모든 혈액에서 측정관을 수직으로 한 ESR/hr(90°-micro ESR/hr)과 45°경사로 한 ESR/hr(45°-micro ESR/hr)을 측정하여 각 동물별로 각 효소처리가 ESR에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

7. 脆弱性 檢査

적혈구 취약검사는 NaCl 수용액을 이용한 삼투성 취약검사법에 준하여 spectronic spectrophotometer로 540 nm 파장에서 측정하여 % hemolysis를 구하였다. 정상 적혈구에 있어서 용혈개시(최소저항)의 농도는 사람에서 0.44%, 소에서 0.59%, 산양에서 0.66%, 면양에서 0.56%로 알려져 있다.¹³⁾ 이 실험에서는 정상 용혈개시의 농도 보다 높은 等張액에 가까운 농도에서 용혈 발생 여부를 관찰해야 하므로 일괄하여 0.85%에서 0.05% 단위로 0.70%까지 적혈구 취약검사를 실시하여 그 % hemolysis를 각 효소처리 적혈구 별로 비교 평가하였다. 특히 사람에서는 0.60%의 용혈도를 추가하였다.

8. 赤血球膜의 分離

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

9. 赤血球膜 蛋白質含量 測定

적혈구막의 단백질함량은 Lowry 등¹⁶⁾의 Folin phenol 방법으로 측정하였으며, bovine serum albumin(BSA)를 표준단백질로 삼았다.

III. 結 果

1. 赤血球膜 蛋白質含量的 比較

사람과 반추동물의 적혈구막 단백질함량은 Table 1에 표시된 바와 같이 사람에 비하여 반추동물에서 상당히 높았다($P < 0.01$).

Table 1. Comparison of protein content of erythrocyte membrane between human and ruminant

	Protein content (mg/ml) of erythrocyte membrane				
	Human	Korean native cattle	Holstein	Korean goat	Sheep
No. of animal	8	8	8	8	8
Range	2.3 - 3.1	3.0 - 4.0	3.2 - 4.2	2.8 - 4.9	3.4 - 5.2
Mean \pm S. D.	2.85 \pm 0.28	3.60 \pm 0.41**	3.71 \pm 0.36**	4.13 \pm 0.83**	3.94 \pm 0.56**
Statistic analysis	n	n ₁ = 4		n ₂ = 35	
	F			6.98	
	P			< 0.01	
	L. S. D	0.53(t0.05)		0.71(t0.01)	

** : Highly significant increase in contrast with human ($p < 0.01$).

2. 赤血球의 酵素처리에 의한 ESR의 變動

5종의 효소로 적혈구를 처리한 혈액군 간의 ESR의 비교는 동물별로 Table 2에 총괄하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 같은 종이라도 90°경사 ESR 보다 45°경사 ESR이 훨씬 빠르다는 것을 알 수 있으며, 이 차이는 사람에서 보다 반추동물에서 몇가지 효소처리를 제외하곤 더욱 심하였다. 이런 경향은 사람의 全血에서도 90°경사 보다 낮은 각도(45°경사)에서 10배 이상의 증가 현상을 보였으며, 반추동물에서도 전혈을 서로 비교해 봐도 45°경사에서 증가 경향을 나타내었다.

사람의 ESR이 전혈에서 반추동물의 것보다 45°경사든 수직이든 간에 훨씬 빨랐다. 적혈구를 분리, 세척한 후 측정된 ESR은 양 각도 모두에서 더욱 빨라졌지만($p < 0.01$), 반추동물에서는 수직에서 별 변화가 없었고 45°경사에선 촉진되었다.

5종의 효소 중 pronase로 처리한 적혈구에서는 사람과 4종의 반추동물 모두에서 세척적혈구군에 비해서 현저한 증가($p < 0.01$)를 보였고, chymotrypsin 처리에 있어서는 사람, 재래산양 및 면양에서 만이, 그리고 neuraminidase 처리에 있어서는 사람과 면양에서 만이 현저한 증가($p < 0.01$)를 보였으며, galactosidase 처리에 있어서는 사람이나 모든 반추동물에

Table 2. Comparison of erythrocyte sedimentation rate in relation to erythrocytes treated with enzymes, such as proteinases and glycosidases, in human and ruminant animals

Species (n = each8)	Samples	ESR(mm/hr)	
		45° Angled Mean ± S.D	90° Angled Mean ± S.D
Human	Whole blood	24.2 ± 6.3	2.1 ± 2.0
	Washed RBC ^a	57.6 ± 6.1 [*]	24.0 ± 13.5 [*]
	RBC treated with trypsin ^b	62.8 ± 3.0	49.9 ± 12.5 ^{**}
	RBC treated with chymotrypsin	62.1 ± 2.7	43.9 ± 12.0 ^{**}
	RBC treated with pronase	65.2 ± 3.2	47.5 ± 12.3 ^{**}
	RBC treated with neuraminidase	61.1 ± 3.6	40.4 ± 13.5 ^{**}
	RBC treated with galactosidase	59.3 ± 9.3	25.4 ± 17.8
Korean native cattle	Whole blood	3.1 ± 1.6	0 ± 0
	Washed RBC	22.3 ± 4.4	0.2 ± 0.1
	RBC treated with trypsin	22.3 ± 6.4	0.2 ± 0.2
	RBC treated with chymotrypsin	18.2 ± 1.6	0.2 ± 0.3
	RBC treated with pronase	45.3 ± 12.6 ^{**}	6.7 ± 7.4 ^{**}
	RBC treated with neuraminidase	18.1 ± 2.8	0.2 ± 0.2
	RBC treated with galactosidase	17.0 ± 2.9	0.1 ± 0.1
Holstein	Whole blood	7.2 ± 2.7	0.0 ± 0.0
	Washed RBC	18.3 ± 4.6	0.3 ± 0.5
	RBC treated with trypsin	47.3 ± 23.6 ^{**}	34.4 ± 32.1 ^{**}
	RBC treated with chymotrypsin	19.3 ± 6.0	0.2 ± 0.3
	RBC treated with pronase	47.2 ± 14.5 ^{**}	17.5 ± 25.2 ^{**}
	RBC treated with neuraminidase	19.8 ± 7.1	0.1 ± 0.1
	RBC treated with galactosidase	17.1 ± 4.7	0.1 ± 0.1
Korean goat	Whole blood	7.4 ± 9.4	0.1 ± 0.3
	Washed RBC	15.7 ± 26.8	0.3 ± 0.4
	RBC treated with trypsin	19.5 ± 22.4	0.3 ± 0.6
	RBC treated with chymotrypsin	45.2 ± 12.8 ^{**}	2.5 ± 2.2
	RBC treated with pronase	62.4 ± 21.4 ^{**}	48.5 ± 30.9 ^{**}
	RBC treated with neuraminidase	40.7 ± 19.9 ^{**}	10.8 ± 25.8 ^{**}
	RBC treated with galactosidase	18.0 ± 18.6	0.3 ± 0.6
Sheep	Whole blood	9.5 ± 2.6	0.1 ± 0.1
	Washed RBC	22.7 ± 5.3	0.4 ± 0.3
	RBC treated with trypsin	53.1 ± 9.0 ^{**}	12.6 ± 19.6 ^{**}
	RBC treated with chymotrypsin	55.4 ± 5.0 ^{**}	14.8 ± 15.8 ^{**}
	RBC treated with pronase	45.3 ± 12.4 ^{**}	5.5 ± 9.4
	RBC treated with neuraminidase	40.2 ± 12.0 ^{**}	4.0 ± 8.0
	RBC treated with galactosidase	16.8 ± 1.6	0.2 ± 0.3

^a The ESR of washed RBC was measured after washed RBC was suspended in 2.3 volumes of autologous plasma.

^b Trypsin treated of RBC was carried out by incubating 25 % washed RBC suspension in PBS, pH 8.0, with 0.5mg/ml trypsin for 1hr at 37°C. The trypsinized RBC was suspended in autologous plasma, and its ESR was measured as described for washed RBC. The other enzyme treatment was so with this.

* Significant difference ($p < 0.01$) between whole blood and washed RBC.

** Significant difference ($p < 0.01$) between washed RBC and enzyme-treated RBC.

서 세척적혈구군에 비하여 ESR의 유의차가 인정되지 않았다. 동일한 牛종이면서도 trypsin 처리 적혈구에서 Holstein 품종에서는 ESR의 현저한 증가를 보였으나 한우에서는 증가하지 않는 점이 주목되었다.

3. 赤血球의 酵素처리에 의한 脆弱性的의 변동

5종의 단백분해 효소로 각각 적혈구를 처리했을 때 그 적혈구 취약성에 미치는 각 효소의 효과를 % hemolysis로 Table 3에 표시하였다.

Table 3. Comparison of osmotic fragility of erythrocytes treated with the various enzymes in human and ruminant animals

Species (n = each8)	Samples	% H ₂ O				
		0.85	0.30	0.75	0.70	0.60
Human	Whole blood	0.2 ± 0.4	0.5 ± 1.3	0.5 ± 1.3	0.5 ± 1.4	2.7 ± 8.1
	Washed RBC	0.8 ± 1.2	0.7 ± 0.8	0.7 ± 0.8	0.9 ± 0.8	3.1 ± 0.9
	RBC treated with trypsin	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.6	0.5 ± 1.3	0.5 ± 1.3	2.0 ± 1.2
	RBC treated with chymotrypsin	0.8 ± 1.1	0.5 ± 1.0	1.1 ± 1.1	0.9 ± 1.1	11.4 ± 7.6
	RBC treated with pronase	2.2 ± 1.9	2.0 ± 1.9	5.6 ± 10.0	6.6 ± 11.4	13.9 ± 1.6*
	RBC treated with neuraminidase	1.0 ± 1.5	1.2 ± 3.1	2.6 ± 1.3	1.7 ± 1.8	3.5 ± 0.0
	RBC treated with galactosidase	2.5 ± 2.9	1.9 ± 1.9	3.2 ± 3.6	2.9 ± 3.4	6.8 ± 3.3
Korean native	Whole blood	3.0 ± 4.8	7.0 ± 12.9	11.8 ± 13.4	24.7 ± 20.6	
	Washed RBC	1.7 ± 3.0	4.3 ± 4.8	10.4 ± 15.4	21.4 ± 24.2	
	RBC treated with trypsin	1.4 ± 2.2	3.0 ± 4.9	9.6 ± 20.8	20.4 ± 22.2	
	RBC treated with chymotrypsin	0.3 ± 0.7	2.8 ± 4.9	14.3 ± 30.0	24.4 ± 28.7	
	RBC treated with pronase	10.8 ± 7.4**	23.8 ± 18.6	42.1 ± 26.3	55.0 ± 27.2**	

Species (n = each8)	Samples	% Hac 1				
		0.85	0.80	0.75	0.70	0.60
cattle	RBC treated with neuraminidase	1.1 ± 1.6	1.4 ± 1.8	4.3 ± 6.2	12.0 ± 16.1	
		0.4 ± 0.7	1.7 ± 2.6	5.9 ± 9.2	8.6 ± 13.0	
Holstein	Whole blood	2.6 ± 3.7	7.3 ± 9.4	19.2 ± 27.5	31.6 ± 35.0	
	Washed RBC	5.1 ± 6.3	13.0 ± 15.3	22.1 ± 24.9	36.6 ± 35.1	
	RBC treated with trypsin	3.5 ± 7.6	9.9 ± 22.1	27.1 ± 28.4	35.0 ± 34.2	
	RBC treated with chymotrypsin	8.1 ± 14.2	14.9 ± 23.6	22.3 ± 28.6	30.0 ± 33.0	
	RBC treated with pronase	18.6 ± 19.3*	27.5 ± 28.0	39.9 ± 30.9	50.3 ± 28.1	
	RBC treated with neuraminidase	3.2 ± 6.7	7.2 ± 13.1	14.6 ± 20.1	29.9 ± 29.0	
	RBC treated with galactosidase	0.9 ± 1.1	2.3 ± 3.7	7.1 ± 6.6	13.8 ± 10.8	
	Whole blood	17.4 ± 17.6	41.8 ± 25.4	70.6 ± 12.0	85.6 ± 4.7	
	Washed RBC	23.2 ± 20.3	45.2 ± 21.8	71.5 ± 12.2	87.0 ± 10.4	
	RBC treated with trypsin	27.4 ± 25.8	50.2 ± 25.1	72.6 ± 17.8	80.8 ± 12.0	
Korean goat	RBC treated with chymotrypsin	31.7 ± 26.6	54.4 ± 25.9	73.3 ± 17.0	82.3 ± 8.7	
	RBC treated with pronase	67.0 ± 15.3**	80.8 ± 6.3**	84.5 ± 5.4	85.2 ± 6.4	
goat	RBC treated with neuraminidase	21.3 ± 22.9	45.9 ± 19.4	73.0 ± 17.1	80.0 ± 14.8	
	RBC treated with galactosidase	19.3 ± 20.7	50.4 ± 26.0	75.7 ± 22.7	82.8 ± 7.1	
Sheep	Whole blood	17.0 ± 13.2	31.7 ± 24.1	53.1 ± 26.7	72.0 ± 21.6	
	Washed RBC	19.5 ± 17.8	32.5 ± 23.4	52.1 ± 25.9	71.2 ± 24.4	
	RBC treated with trypsin	17.7 ± 12.2	30.9 ± 19.8	47.5 ± 22.2	66.4 ± 20.3	
	RBC treated with chymotrypsin	15.8 ± 13.8	34.0 ± 27.6	56.2 ± 27.7	69.8 ± 25.9	
	RBC treated with pronase	57.2 ± 29.6**	74.9 ± 24.6**	85.0 ± 19.7	87.4 ± 20.0	
	RBC treated with neuraminidase	14.5 ± 12.3	26.0 ± 21.0	48.2 ± 20.0	68.7 ± 23.8	
	RBC treated with galactosidase	14.2 ± 11.6	28.9 ± 20.4	54.4 ± 28.8	70.7 ± 22.1	
	Whole blood	17.0 ± 13.2	31.7 ± 24.1	53.1 ± 26.7	72.0 ± 21.6	
	Washed RBC	19.5 ± 17.8	32.5 ± 23.4	52.1 ± 25.9	71.2 ± 24.4	
	RBC treated with trypsin	17.7 ± 12.2	30.9 ± 19.8	47.5 ± 22.2	66.4 ± 20.3	

* : Significant increase in contrast with the washed RBC ($p < 0.05$).

** : Highly significant increase in contrast with the washed RBC ($p < 0.01$).

Table 3에서 알 수 있는 바와 같이 정상 용혈개시의 농도 보다 높은 등장액에 가까운 농도에서 용혈 발생 여부를 관찰해야 하므로 사람에서는 0.85%와 0.6%, 韓牛와 Holstein 젖소에서는 0.85%와 0.7%, 산양과 면양에서는 0.85%와 0.8%의 NaCl 수용액에서 서로 비교 평가하였다.

5종의 각 효소처리 적혈구군 중에서 pronase 처리 적혈구군에서만 사람과 모든 반추동물에서 정도의 차이는 있을지라도 다같이 대조군(비처리 적혈구군)에 비해서 % hemolysis의 유의성 증가를 보였고 나머지 효소처리 적혈구군에서는 대조군과의 유의차가 인정되지 않았다. pronase 처리 적혈구군에 있어서 사람의 0.85%에서, 그리고 Holstein 젖소의 0.7%에서 % hemolysis의 통계학적 유의차는 인정되지 않았을지라도 그 평균치에 있어서는 대조군에 비하여 증가 경향을 보였다.

IV. 考 察

사람 적혈구막 단백질의 2/3를 점하는 polypeptide¹⁷⁻¹⁹⁾는 전기영동법으로 약 15종 정도가 검출되며 이 중 세포막을 관통하고 있는 단백질은 2종류가 있다고 한다.^{17) 20) 21)} 그 중 glycophorin(PAS-1) 당단백질은 trypsin, papain 및 bromelain과 같은 단백분해효소로 분해될 수 있으나, band 3(polypeptide 3이라고도함)은 trypsin에 의해서는 분해되지 않는 대신 chymotrypsin, pronase 및 subtilisin과 같은 단백분해효소에 의하여서는 분자량이 작은 단편으로 분해된다고 한다.^{17) 18) 20)}

적혈구막 구성단백질 중 band 3은 사람 이외의 여러 포유류에서도 같은 분포 및 막결합 양상을 보이고 있으나 glycophorin과 sialoglycoprotein(PAS-2 당단백)과 같은 당단백질은 동물에 따라서 상이한 분포 및 막결합 양상을 보이고,²²⁾ 이들 중 어떤 것은 적혈구의 성숙과 더불어 소실되어 간다는 사실이 家兪에서 보고되고 있다.^{23) 24)}

Table 1에서 보는 바와 같이 적혈구막 단백질 함량은 대체적으로 사람에서 보다 반추동물에서 높은 경향을 보이고 있는데, 이는 아마도 사람에게는 없는 band Q가 반추동물에는 더 있다는 것,¹¹⁾ 그리고 사람의 PAS-1, 2 및 3 대신에 반추동물에서는 PAS-B로 대체되는 것,¹¹⁾ 등에 의해서 영향된 것으로 사료된다.

이들 막단백분획 중 중요한 단백질로는 band 1과 2(합쳐 spectrin이라고함) 및 band 3인데 이 중 band 1은 막골격 단백질인 spectrin의 α -subunit(분자량 240,000)이고 band 2는 spectrin의 β -subunit(분자량 215,000)로 알려져 있다.^{17) 25)} Band 3은 적혈구막을 내외로 관통하고 있는 integral protein으로서 anion channel 구실을 하는 단백질로 알려져 있다.^{17) 25)}

일반적으로 적혈구막의 기능과 막단백 분획과의 관계라든가, 적혈구막에 있어서 막단백질의

위치 등을 알고자 할 때는 적혈구나, 또는 이로부터 분리한 막단백 분획에 proteinases 나 glycosidases 를 작용시켜 적혈구막의 외부나, 또는 내부에 노출되어 있는 단백분획을 분해시켜 막기능의 변화나, 취약성의 변화를 보는 것이 상례로 되어 있다.

오래 전, Winzler^{26,27)} 는 사람 적혈구를 단백분해효소로 처리하면 적혈구막의 당단백질인 sialoglycoprotein 으로부터 sialoglycopeptide 가 유리됨을 관찰하였으며, 또 Boyer²⁸⁾ 는 단백분해효소에 의해 용혈이 일어남도 보았다. 이어서 Carraway¹²⁾ 도 적혈구의 trypsin 처리로 적혈구막에서 sial 산이 유리됨을 보고 적혈구막의 외면에 노출되어 위치하고 있다고 하였다. 적혈구의 trypsin 처리는 이 밖에도 막관통 단백질인 band 3 의 막외부 노출부위를 분해시킴도 알려져 있다.²⁹⁾ 또한 pronase³⁰⁾ 나 chymotrypsin³¹⁾ 도 중요한 적혈구막의 poly peptide, band 3 을 분해시키고 분자량 60,000 인 분획을 발생시킴도 알려져 있다.

이와 같은 사실은 본 연구에서 사람과 반추동물 적혈구에서도 유사하게 추측되었다. 즉, 한우에서는 pronase 에 의해서, Holstein 젖소에서는 pronase 와 trypsin 에 의해서, 그리고 재래산양에서는 pronase, trypsin 및 chymotrypsin 에 의해서 각각 ESR 의 현저한 증가를 일으켰다. 이 결과로 보아 glycosidases 보다 proteinases 에서 막외부 단백질이 잘 분해되어 ESR 을 촉진시킨 것으로 고려되었다.

적혈구의 취약성도 역시 pronase 처리군에서만 증가되었다. 이것으로 미루어 보아 5 종의 효소 중 pronase 가 적혈구막 단백질을 분해하는 가장 강력한 능력을 가진 것으로 생각된다.

면양에 있어서의 ESR 은 galactosidase 처리군을 제외한 나머지 모든 효소처리군에서 현저한 증가로 나타났으며, 적혈구 취약성 역시 pronase 처리군에서만 증가되었다. 이와 같이 면양 적혈구막에 관하여는 앞으로 더욱 연구의 여지가 있다고 고려된다.

V. 結 論

반추동물의 적혈구 침강속도가 낮은 원인을 밝혀 보려고 사람, 한우, Holstein 젖소, 그리고 한국재래산양 및 면양 등의 적혈구를 proteinases 인 trypsin, chymotrypsin, pronase 그리고 glycosidases 인 neuraminidase 및 galactosidase 로 처리하여 ESR 의 촉진 여부를 검색하고 동시에 적혈구막의 취약성 검사도 하였다.

적혈구막 단백질의 평균 함량은 한우에서 3.60 ± 0.41 , Holstein 젖소에서 3.71 ± 0.36 , 한국 재래산양에서 4.13 ± 0.83 , 면양에서 3.94 ± 0.56 , 그리고 사람에서 2.85 ± 0.28 mg/ml 로서 반추동물의 것이 사람의 것 보다 높았다 ($p < 0.01$).

Proteinases 또는 glycosidases 로 처리한 적혈구에 있어서 ESR 의 반응은 반추동물의 종 또는 품종별로 다양하게 나타났다. 특히 주목되는 것은 glycosidases 처리군에서 보다 proteinases 처리군 쪽에서 ESR 이 현저하게 증가 ($p < 0.01$) 되는 점이었다. 면양에 있어서는

galactosidase를 제외한 trypsin, chymotrypsin, pronase 또는 neuraminidase로 처리 적혈구에서 ESR의 현저한 증가를 보였다.

적혈구의 삼투적 취약성은 사람과 모든 반추동물에서 다같이 5종의 효소 중 중 pronase로 처리한 적혈구만 증가(용혈의 증가) 현상을 보였다.

參 考 文 獻

1. Wintrobe MM. Erythrocyte sedimentation rate. In : Wintrobe MM, ed. *Clinical hematology*. 8th ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 27 ~ 32 (1981).
2. Gambino SR, Dire JJ, Monteleone M, et al. : The Westergren sedimentation rate, using K₃-EDTA. *Am J. Clin Pathol* **45**, 173 ~ 180 (1965).
3. Westergren A. : The technique of the red cell sedimentation reaction. *Am Rev Tuberc.* **14**, 94 ~ 101 (1926).
4. Vacca C, Montemagna G, Persechino A, et al. : Erythrocyte sedimentation in cattle and buffaloes : a general hypothesis. *Faia Veterinaria Latina.* **4**, 24 ~ 39 (1974).
5. 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).
6. Fegler G. : Hemoglobin concentration, hematocrit value, and sedimentation rate of horse blood. *Q. J. Exp physiol.* **35**, 129 ~ 139 (1948).
7. Fahraeus R. : The suspension stability of the blood. *Physiol Rev.*, **9**, 241 ~ 274 (1929).
8. Lee BW, Park YJ. : Indirect calculation for volume of packed red cell (VPRC) by means of erythrocyte sedimentation rate (ESR) of diluted blood in dogs. *Korean J. Vet Res.* **29** (2), ~ 49 (1989).
9. Shin SS, Lee BW, Shin JU. Angled capillary method for determining erythrocyte sedimentation rate of goat. *Korean J. Vet Res.* **26**, 187 ~ 194 (1986).
10. Lee BW, Shin JU. Angled tube method for determining erythrocyte sedimentation rate of cattle. *Korean J. Vet Res.* **26**, 175 ~ 186 (1986).
11. Bahk YW, Lee BW. Electrophoretic analysis of the major proteins of bovine erythrocyte membrane; Their relation to slow erythrocyte sedimentation rate. *Korean J. Vet Res.* **29** (1), 13 ~ 20 (1989).
12. Carraway KL. Proteolytic enzyme treatment. In : Ellory JC, Young JD, ed. *Red cell membranes : A methodological approach*. New York : Acad Press, 239 ~ 250 (1982).
13. Perk, Frei YF, Herz A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *Am J. Vet Res.* **25**, 1241 ~ 1248 (1964).
14. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**, 2606 ~ 2616 (1971).
15. Schrier SL. Human erythrocyte membrane enzyme : Current status and clinical correlates. *Blood.* **50**, 227 ~ 234 (1977).
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, et al. Protein measurement with the folin phenol

- reagent. *J. Biol Chem.* **193**, 265 ~ 270 (1951).
17. Steck TL. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *Rev J. Cell Biol.* **62**, 1 ~ 19(1974).
 18. 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).
 19. Reichstein E, Blöstein R. Arrangement of human erythrocyte membrane proteins. *J. Biol Chem.* **250**, 6256 ~ 6251(1975).
 20. 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).
 21. Gratzler WB. The red cell membrane and its cytoskeleton. *Biochem J.* **198**, 1 ~ 8 (1981).
 22. Finean JB, Michell RH. Membrane proteins and glycoproteins. In : Finean JB, Michell RH, ed. *Membrane structure*. Amsterdam: Elsevier / North-Holland Biom Press. 10 ~ 18(1981).
 23. Han YS. Inactivation by trypsin and solubilization by lipase of acid phosphatase in rabbit erythrocyte membranes. *Chonnam med J.* **12**, 671 ~ 674(1975).
 24. Koch PA, Garder FH, Carter JR. Red cell maturation : Loss of a reticulocyte-specific membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **54**, 1296 ~ 1302(1973).
 25. 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).
 26. 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).
 27. Winzler RJ, Harris ED, Pekas DJ, et al. A glycoprotein in human erythrocyte membranes. *Biochem.* **6**, 2195 ~ 2202(1967).
 28. Kei B. Trypsin. Hess GP. Chymotrypsin-Chemical properties and catalysis. In : Boyer PD, ed. *The enzymes volume III*, 3rd ed. New York and London : Academic press. 213 ~ 273(1971).
 29. Steck TL, Fairbanks G, Wallach DFH. Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane : Proteolytic dissection. *Biochem.* **10**, 2617 ~ 2624(1971).
 30. Bander WW, Garan H, Berg HC. Human erythrocyte membranes : Specific labelling of surface proteins. *J. Mol Biol.* **58**, 783 ~ 797(1971).
 31. Triplett RB, Carraway KL. Proteolytic digestion of erythrocytes, resealed ghosts, and isolated membranes. *Biochem.* **11**, 2897 ~ 2903(1972).

The Effect of Enzyme Treatments on Ruminant ESR

Young-Woo Bahk

Kwangju Health Junior College

> Abstract <

Their relations to the slow erythrocyte sedimentation rate (ESR) of the ruminants were investigated by treating the erythrocytes with proteinases such as trypsin, chymotrypsin and pronase, and glycosidases such as neuraminidase and galactosidase.

Protein content in the erythrocyte membrane was 2.85 ± 0.28 in human, 3.60 ± 0.41 in Korean cattle, 3.71 ± 0.36 in Holstein, 4.13 ± 0.83 in Korean native goat and 3.94 ± 0.56 mg/ml in sheep, showing higher in ruminant animals than in human ($p < 0.01$).

In the erythrocyte treated with the enzymes, ruminants except sheep was better digested by proteinases than by glycosidases, showing remarkable increase ($p < 0.01$) of the ESR in accord by pronase, trypsin or chymotrypsin treatment of erythrocytes. In sheep, the ESRs were accelerated in erythrocytes treated with pronase, trypsin, chymotrypsin and neuraminidase.

Erythrocyte osmotic fragility was increased in erythrocytes treated with only pronase among five enzymes in all the human and ruminant animals used in this study.