

호르텐스극구흡충에서 Alkaline Phosphatase 및 Acid Phosphatase의 특성

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

양용석[†] · 김인식 · 임지애 · 강성구 · 박주연

국문초록: 호르텐스극구흡충 성충 (adult worm)을 재료로 하여 acid phosphatase (Acp)와 alkaline phosphatase (Alp)의 조직 세포에 대한 분포 및 동위효소의 특성을 규명하기 위하여 Gomori lead nitrate 및 Gomori calcium 방법 그리고 전기영동법 등을 시행하였다. 조직 내의 Acp 및 Alp의 분포는 충체의 소장 (intestine)과 난황선 (vitellaria) 그리고 인두 (pharynx)에서 강한 반응을 나타냈다. 동위효소 유형은 Acp에서 179.5 및 209.4 kDa 두 개의 분획이 분리되었고, Alp는 145.9, 207.5 및 220.8 kDa의 세 개의 분획이 분리되었다. 열에 대한 안정도는 Alp가 90℃에서 12초 경과 후에 완전히 불활성화 되었으며, Alp의 최적 온도 및 pH는 40℃와 pH 9이었고 Acp의 최적 pH는 5였다. 그리고 Acp 및 Alp의 최대 활성도 (unit)는 Acp가 71 범위였고, Alp는 189의 범위에 있었다. 이상에서와 같이 호르텐스극구흡충은 phosphatase가 소화관과 난황선에서 주로 분포하고 있었으며 숙주 체내에서 소화관을 중심으로 대사가 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

서 론

극구흡충과 (Family Echinostomatidae)에 속하는 호르텐스극구흡충 (*Echinostoma hortense*)은 두관 (head crown) 및 두극 (collar spine)의 존재와 좌측 방향으로 치우친 난소 (ovary), 충체 중심부에 위치하는 전 후고환 (testes), 구흡반에서 시작하여 인두 식도로 연결된 다음 두 갈래의 맹장 (ceca)으로 나뉘어 충체 말단으로 이어지는 특징적 구조물을 가지고 있다¹⁾. 이 흡충은 우리 나라와 일본을 비롯한 동남아시아 지역에 주로 분포하며 쥐, 개 등 포유 동물을 자연계 종숙주로 하고 있다^{1,24,25)}. 담수산貝類인 풀달팽이 (*Radix auricularia*)¹⁾가 제1중간숙주로 알려져 있으며 미꾸리²⁾, 버들치²⁵⁾ 등을 비롯한 담수어나 개구리, 올챙이 등 양서류¹⁾가 제2중간숙주로 알려져 있다.

이 흡충의 인체 감염 예는 Tani *et al.* (1974)²⁷⁾에 의해 처음 보고되었으며 우리 나라의 경우 높은 감염률을 보이는 유행지역이 보고 되는 등 문제의 흡충으로 제기되고 있다^{2,25)}. 따라서 본 흡충에 대한 여러 방면의 연구가 요구되고 있는데 특히 이 흡충에 대한 숙주-기생충 상호관계, 병변 및 치료약제의 작용기전 등에 대한 연구의 기초자료로 활용할 수 있는 연구는 시급한 과제 중 하나라 하겠다.

일반적으로 흡충류는 숙주로부터 흡수한 영양 물질을 조직 세포내에서 분해한 다음 영양소의 상호전환 과정을 거쳐 최종적으로 포도당과 갈락토스 형태로 에너지 대사에 이용된다^{4,23)}. 세포내 분해과정은 주로 영양물질들이 인산화된 형태로 흡수되기 때문에 인산화합물의 분해가 진행되며 이 과정에 관여하는 각종 가수분해 효소들의 효소학적 연구가 많이 보고되고 있다. 흡충류 생체내에 분포하고 있는 phosphatase는 성충의 신진대사 작용에 있어서 탄수화물과 지질분해 및 합성에 관여하거나 또는 탄수화물에서 지방생성 과정에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 또한 인산 에스테르 화합물을 가수분해하여 유리인산을 발생하게

* 논문 접수: 1999년 5월 4일

수정재접수: 1999년 6월 15일

[†] 별책 요청 저자

** 이 연구는 1998년도 매지학술연구소 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

하거나 합성작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. Neumann (1968)²²⁾은 동물 종 및 조직에 따라 최적 pH가 서로 다른 동위원소 유형이 존재하고 있다고 하였으며 McComb *et al.* (1979)²¹⁾은 효소의 활성이 기질 특이성 및 양이온 등에 대한 효과가 상이하게 나타난다고 하였다. 이상에서와 같이 기생충을 대상으로 한 효소학적 연구로는 *Hymenolepis sp.*를 재료로 한 다수의 보고가 있으나^{14,23)} 호르텐스극구흡충에 대한 연구는 거의 접하지 못한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 pH 및 열의 차이에 따른 동위원소 활성의 유형을 파악하고, 인산 에스테르의 가수분해를 촉매하여 호르텐스극구흡충의 물질대사 및 세포분화에 관여하는 효소로 알려진 phosphatase에 있어서 형태학적 및 조직화학적 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 충체의 준비

*E. hortense*의 피낭유충은 강원도 설강 상류지역에서 채집한 미꾸리 (*Misgurnus anguillicaudatus*)의 항문주위 조직에서 얻었다. 그리고 성충을 얻기 위하여 흰쥐 5마리에 각각 피낭유충 50개씩을 경구 감염시킨 다음 4주 후에 경추탈구법으로 흰쥐를 희생시키고 소장으로부터 충체를 회수하였다. 회수된 충체는 phosphate buffer saline pH 7.2 액에서 3회 세척하여 냉동한 후 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 성충의 단백질 추출물 준비

E. hortense 성충에 0.01 M PBS (pH 7.4) 용액을 가하여 homogenizer로 분쇄한 다음 ultrasonic homogenizer (Cole-Parmer Instrument Co.)로 60 grade에서 15초간 균질화하고 1분간 냉각시키는 과정을 3회 이상 반복하였다. 4℃에서 12시간 방치한 후 원심분리 (20,000 g/hr.)하여 상청액을 취하여 실험에 사용하였다. 이것을 다시 원심분리하여 상청액을 단백질 정량에 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry (1951) 방법에 따라 측정하였으며 단백질 함량은 < 2.54 mg/ml 이었다.

3. 전기영동에 의한 동위원소 검정

Hames and Rickwood (1990)¹¹⁾ 방법에 의해 non-dissociating buffer system을 사용하여 NOVEX ins-

truction manual에 따라 전기영동하였다. 단백질 추출물을 sample buffer로 1:4로 희석하여 각 well당 15 µl씩 주입한 후 running buffer (pH 8.3)로 15 mA, 2시간 30분 전개하였다. 표준단백질 (marker protein)은 분자량 200,000 dalton에서 6,000 dalton 범위의 NOVEX standard protein을 사용하였다.

1) Acid phosphatase (이하 Acp)

Lojda *et al.* (1979)¹⁸⁾이 기술한 방법으로 효소 검정을 하였다. 반응액은 기질인 α -naphthyl sodium phosphate (sigma)를 Michaelis solution (sodium acetate 3H₂O 9.714 g + barbital sodium 14.714 g + D.W 500 ml) 5 ml에 용해시키고 증류수를 12 ml 가한 후 Pararosanilin hydrochloride (sigma)와 HCl을 가한 용액 0.8 ml와 4% NaNO₂ 0.8 ml를 섞은 용액으로 희석하여 NaOH로 pH를 5로 맞춘 후 여과시키고 4℃에서 24시간 정온반응시켜 확인하였다.

2) Alkaline phosphatase (이하 Alp)

Lojda *et al.* (1979)¹⁸⁾이 기술한 방법으로 효소 검정을 하였다. 반응액은 Fast red TR salt (sigma)를 0.2 M Tris-HCl (pH 8.5)에 녹인 후 α -naphthyl sodium phosphate (sigma)를 첨가하여 용해시킨 다음 NaOH와 HCl을 이용하여 pH를 9로 맞춘 후 여과시켜 4℃에서 24시간 동안 반응시켜 효소를 확인하였다.

4. 열에 대한 효소의 안정도

성충의 추출 단백질을 90℃에서 각각 2초, 4초, 6초, 8초, 10초, 12초에서 열처리한 다음 대조군을 포함한 7개의 시료를 gel에 주입하여 12% native PAGE를 이용하여 15 mA에서 2시간 30분 전개시켰다. Lojda *et al.* (1979)의 방법에 따라 Alkaline phosphatase를 발색시켰다.

5. Spectrophotometer를 이용한 효소활성 측정

1) pH의 영향

Acp의 효소활성은 pH 2, 3, 4, 5, 6의 5종류로 pH를 달리한 기질 용액을 만들어 37℃에서 단백질과 반응시켜 분광기 400 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. Alp의 효소활성은 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11의 7종류로 pH를 달리한 기질 용액을 만들어 위와 동일하게 측정하였다.

2) 온도의 영향

0.033 M Tris-HCl (pH 9.5)의 Alp의 기질 용액을 만들어 온도 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃에서 각각 30분간씩 정온반응한 다음 단백질

과 반응시켜 O.D. 값을 측정하였다.

3) 활성도의 측정

Acp와 Alp 활성을 측정하기 위해 phosphatase 기질 (p-nitrophenyl phosphate, disodium, hexahydrate) 0.2 mg과 0.033 M Tris-HCl buffer 1 ml를 혼합한 기질액을 여과하였다. 이 기질액에 총 단백질 함량 100 µg이 되는 추출 단백질을 혼합하여 37°C에서 10분간 유지 후 paranitrophenol의 생성량을 spectrophotometer 400 nm에서 측정하였다. 측정된 O.D. 값은 표준곡선에서 생성량을 환산하였으며, 총 단백질 100 µg 속에 들어있는 효소가 37°C에서 1분 동안에 기질을 분해한 생성물 1 ng을 1 unit로 정의하여 활성도를 비교하였다.

6. 효소 조직화학적 염색

1) Alp 염색

Gomori calcium 염색방법을 이용하였다. 신선한 성충을 냉동절편기에서 7 µm의 두께로 절편하였다. Paraffin 절편을 slide에 부착시킨 후 22°C를 유지시키면서 substrate-diazonium salt에 15분 이상 적용시켰다. 그리고 Peteri dish 내에서 Fast Red TR

액으로 12시간 염색과 수세를 한 다음 Mayer's hematoxylin 용액으로 대조염색을 실시하였다.

2) Acp 염색

Gomori modified lead nitrate 방법을 이용하였다. 즉, 성충을 -25°C 냉동절편기에서 7 µm로 절편하고 poly-L-lysine이 coated된 slide에 부착시킨 후 1시간 정도 건조하였다. 이 검체를 0.05 acetate buffer pH 5.0, sodium beta-glycerophosphate, lead nitrate가 함유된 incubate media에서 (최종 농도를 pH 5.0으로 함) 37°C 2시간 동안 incubation하였다. 이후 증류수에서 수세하고 1% ammonium sulphide에서 2분 동안 처리하고 증류수에서 수세한 후 봉입하였다. 한편 Hematoxylin-eosin counter stain으로 비교하였다.

결 과

1. 전기영동에 의한 동위원소 유형

1) 산성 인산효소

Acp 동위효소 분획유형 (profile pattern)은 *E. hortense* 충체에서 비교적 강하게 나타난 것은 두 개

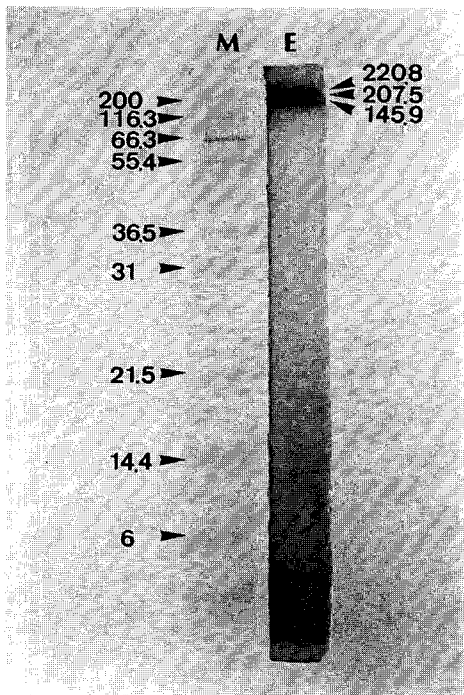


Fig. 1. Isozyme patterns of acid phosphatase on the *E. hortense*. M, marker; E, *E. hortense*

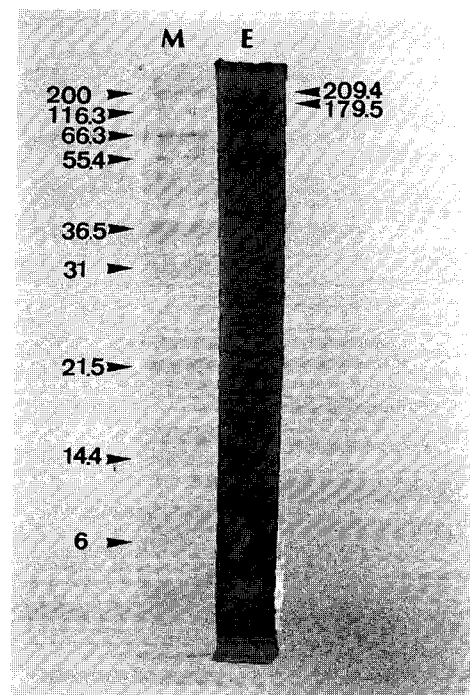


Fig. 2. Isozyme patterns of alkaline phosphatase on the *E. hortense*. M, marker; E, *E. hortense*

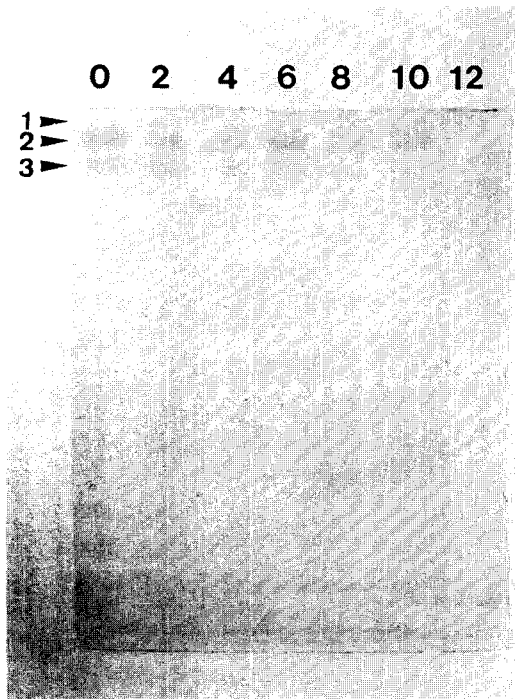


Fig. 3. The stability against heat treatment on the isozyme of alkaline phosphatase in *E. hortense*, heating at 90°C for 2, 4, 6, 8, 10, 12 second. O, control; 2, 2 sec; 4, 4 sec; 6, 6 sec; 8, 8 sec; 10, 10 sec and 12, 12 sec.

(209.4 및 179.5 Kda)의 분획이 분리되었다 (Fig. 1). 두 개의 분획은 활성도가 비슷한 수준의 유형으로 나타났다.

2) 알칼리성 인산효소

심층의 조직에 존재하는 Alp 동위원소 분획유형은 세 개의 분획이 분리되었는데 각각 220.8, 207.5 및 145.9 Kda 이었다. 이 중에서 특히 강하게 나타난 분획은 207.5 Kda 이었다 (Fig. 2).

2. 열에 대한 효소의 안정도

충체에 존재하는 Alp의 열에 대한 안정성을 조사한 결과는 Fig. 3에서와 같다. 즉, 90°C에서 열처리한 Alp는 3번 분획은 8초 동안 처리하였을 때 활성이 없어졌고, 1번 분획은 10초 동안 처리하였을 때 활성이 없어졌으며, 2번 분획은 12초 동안 처리하였을 때 활성이 없어졌다. 충체에 있어 Alp의 동위원소는 90°C에서 12초 동안 열처리 하였을 경우 완전히 불활성화 되었다 (Fig. 3).

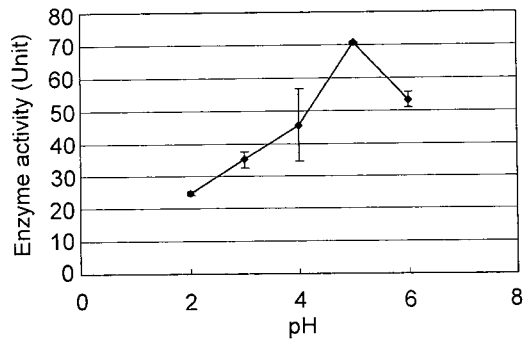


Fig. 4. The effect of pH on the activity of acid phosphatase in *E. hortense*.

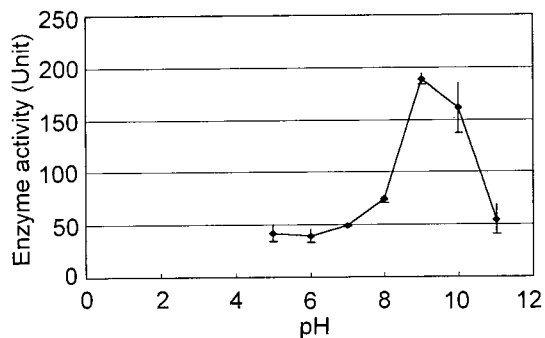


Fig. 5. The effect of pH on the activity of alkaline phosphatase in *E. hortense*.

3. Spectrophotometer를 이용한 활성도의 측정

1) pH의 영향

충체에 존재하는 Acp 활성의 적정 pH는 5종류 (pH 2~6) 사이의 5개 실험구 중에서 pH 5에서 활성도가 제일 높았다 (Fig. 4). 그리고 Alp의 효소활성은 7종류 (pH 5~11) 사이의 7개 실험구 중에서 pH 9에서 활성도가 제일 높았다 (Fig. 5).

2) 온도의 영향

충체에 대한 Alp의 최적 온도는 20°C에서 80°C 사이의 7개 실험구 중에서 활성의 최적 온도는 40°C였다. 20°C에서는 조금 높은 활성을 유지하였으나, 60°C 이하에서는 활성도가 아주 낮은 결과를 보였다 (Fig. 6).

3) 활성도의 측정

충체에 대한 활성도를 측정된 결과, Alp에서 높은 활성도를 보였다. 즉, Alp와 Acp를 비교하여 측

Table 1. Relative amount of alkaline and acid phosphatase activity on the worm of *Echinostoma hortense*

Phosphatase	Oral sucker	Pharynx	Intestine	Ventral sucker	Vitelline follicle	Ovary	Testis	eggs	Tegments of surface
Alp	+	+	+++	+	++	-	-	-	+
Acp	-	+	+++	-	-	-	-	-	+

+++ , intensively stained; ++ , moderately stained; + , slightly stained; - , non stained

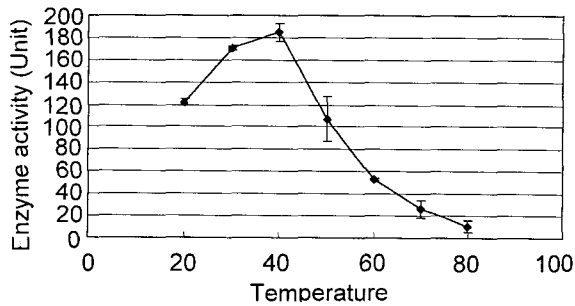


Fig. 6. The effect of temperature on the activity of alkaline phosphatase in *E. horemse*

정하여 보았을 때 Acp의 최고 활성도는 71 ± 0.15 로 측정되었고 Alp는 최고 활성도가 189 ± 5.19 로 나타나 Alp에서 더 높은 활성도를 나타냈다.

4. 조직화학적 효소의 분포

1) Alp의 분포

충체에서 Alp의 활성도를 나타내는 부위는 Fast Red TR의 양성반응은 검은색 (black) 또는 갈색 (brown)으로 관찰되었다 (Plate 6). 즉, *E. hortense*에서 Alp의 활성도가 강하게 나타내는 부위는 소화관 벽 (intestine wall)과 소화관내에 포함된 배설물질 그리고 충란의 난각 부위였으며, vitellaria 및 pharynx도 양성반응을 나타냈다 (Table 1 및 Plate 5, 7, 8). 그리고 구흡반과 복흡반도 약간의 양성반응을 보였다. 그러나 고환과 난소 부위는 음성반응을 보였다 (Plate 5, 7).

2) Acp의 분포

Acp에 강한 양성반응을 보이는 부위는 소화관 벽과 소화관내에 포함된 배설물질, 인두 그리고 충체의 표피이었고 (Table 1 및 Plate 1, 3, 4), 그 외의 부위에서는 음성반응을 보였는데 Alp에서 보다 약한 반응을 보였다.

고 찰

기생충은 각기 고유숙주의 특정부위에서 기생하므로 그 생활환경에 따라 특수한 대사를 영위한다. 따라서 그 대사에 관여하는 효소계의 특이성 규명은 기생 현상을 규명하는데 중요한 의의를 갖는다. Hague and Saddigi (1984)⁹⁾는 세포막 투과와 삼투압 조절에 phosphatase가 중요한 역할을 한다고 하였으며, Malcol and Webb (1979)²⁰⁾에 의하면 phosphatase는 생체내에서 다양한 인산 에스테르를 가수분해시키는 효소로 pH 9.0 부근에서 최대 활성을 나타내는 Alp와 pH 5.0에서 최대 활성을 나타내는 Acp로 대별된다고 하였다. Larsen and Hasselgren (1979)¹⁶⁾는 Alp에는 여러 가지의 종류가 있고 기능도 다를 뿐만 아니라 세포 조직에 따라 Alp가 상이하게 분포된다고 하였다. 또 Benham *et al.* (1977)³⁾은 Alp가 두 종의 효소 group으로서 세포의 표면에 존재하는데 그 기능은 세포에 있어서 물질의 수송, 세포의 증식과 분화에 관여하며 또 세포의 대사 및 유전자 전사의 조절자로서의 역할을 가진다고 보고하였다. Vengesa and Hopfer (1979)²⁹⁾는 Alp가 세포막에 활성을 나타내는 것은 여러 가지의 동물효소의 결과이며, 세포막에서와 같이 세포 내에서도 활성이 나타나는 한편 세포 내에서의 활성은 동물조직의 종류, 발생시기 및 호르몬의 분비 상태에 따라서 다양하게 존재하며, 이러한 다양성 때문에 동물의 종과 각 조직에 따른 활성과 특성을 확인하는 것이 중요하다고 하였다. Ma (1964)¹⁹⁾는 간흡충에 대한 효소 조직화학적 연구에서 Acp가 성충의 외피층에 많이 분포하였고 Alp는 소량 분포한다고 하였으며 Lee *et al.* (1978)¹⁷⁾은 간흡충 충체에 대한 지질의 종류 및 함량을 분석해 본 결과 인지질의 경우 lysophosphatidylcholine, phosphatidylinositol, sphingomyelin, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol,

phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine 등 8종을 검출되었다고 보고하면서 일반적으로 인지질의 경우 자유생활 보다는 기생생활 種에서 지질이 많은 비율을 차지한다고 하였다. Halton (1967)¹⁰⁾에 의하면 기생충의 조직에 분포하는 Alp는 Acp와는 달리 체내 합성보다는 외부로부터 흡수되어 존재하는 것이 더 많다고 하였으며, Chu and Lee (1963)⁶⁾는 회충 조직의 경우 Alp 보다는 Acp가 더 많이 분포한다고 하였다. Thrope (1968)²⁸⁾은 *Fasciola hepatica* 흡충에 대한 phosphatase의 활성도를 보고하였는데 Alp의 경우 배설계와 유조직 부위에서 강하게 나타났고 Acp는 배설계, 맹관, 표피와 유조직 세포에서 강하게 나타났다고 하였다. 그리고 Fujino et al. (1983)⁸⁾은 *F. hepatica* 충체에서 Acp가 Alp에 비하여 더 약하게 나타났다고 보고하면서 효소의 분포는 맹관, 표피, 배설계, 유조직 세포들이며 주로 원형질막과 연관된 것에서 분포하였다고 보고하였다. 한편, Davis et al. (1969)⁷⁾은 흡충류 *Haematoloechus mediplexus*의 경우 특히 소화관에 phosphatase (esterase)가 많이 분포한다고 보고하였다. 또한 Huh et al. (1990)¹³⁾은 *Neodiplostomum seoulensis*의 경우 부착기의 표피, 분비물 및 성체의 표피에서 Alp의 활성도가 있음을 관찰하고 이러한 구조가 성체의 분비 기능 및 숙주 점막에의 부착 등에 관여할 것으로 보고하였으며, Kwak and Kim (1996)¹⁴⁾은 만손열두조충의 경우 Alp가 Acp에 비해 더 많은 분포와 활성을 나타냈다고 하였다.

본 연구에서 *E. hortense* 성충 조직 내 Alp의 분포는 소화관과 난황선에서 강한 활성 분포를 나타냈고 충체의 인두와 흡반 그리고 표피 부위에서도 약간의 활성도를 보였다 (Table 1 및 Plate 5, 7, 8). 특히 소화관에서 강한 활성을 보인 결과는 Fujino et al. (1983)⁸⁾이 보고한 *F. hepatica*, Huh et al. (1990)¹³⁾이 보고한 *N. seoulensis* 및 Davis et al. (1969)⁷⁾이 보고한 *H. mediplexus* 흡충의 성적과 같은 결과를 보이고 있다. 이상의 결과를 비교 분석해 볼 때 *E. hortense* 흡충은 소화관을 중심으로 흡수 및 배설작용이 있는 바 효소작용과 함께 분비의 기능이 활발히 이루어지고 있음을 나타내는 것이라고 생각된다. 또한 흡반과 표피 그리고 인두 등에서도 phosphatase 활성도가 관찰된 것은 활발한 부착의 기능이 있을 것으로 설명할 수 있으며, 상기에서 언급한 *F. hepatica*, *N. seoulensis* 및 *H. mediplexus* 흡충과도 같은 결과를 보이고 있다.

또한 Acp에서 보다는 Alp에서 더 다양한 구조부위에서 강한 활성 부위가 존재하여 효소 조직화학적 연구에 중요한 것임을 시사해주는 결과라고 할 수 있다. 본 연구의 경우 충체의 표피에서 역시 Acp에 비하여 Alp에서 더 높은 활성을 나타냈는데 (Table 1 및 Plate 5, 7), 이 결과는 Chu 및 Lee (1960)⁶⁾가 만손열두조충의 외피층과 외피하근층에 분포하는 Alp가 Acp에 비하여 더 많은 활성을 나타냈다고 보고한 결과와 같은 성적을 보이고 있었다. Halton (1967)¹⁰⁾의 연구에 의하면 기생충의 조직에 분포하는 Alp는 Acp와는 달리 체내에서의 합성보다는 외부로부터 흡수되어 존재하는 것이 더 많다고 보고하였다. 본 연구의 결과 역시 Acp에 비하여 Alp의 분포가 더 높게 나타났는데, 이 효소가 숙주 체내에 존재하는 Acp의 효소를 다량 흡수한 것인지 아니면 충체가 숙주로부터 흡수한 영양물질에 알카리성 인산화합물이 많아 다량으로 분비한 것인지는 보다 구체적인 연구가 요구된다고 하겠다.

Alp와 Acp에 대한 pH의 활성치가 각 조직 세포의 특이성에 따라 다르게 나타남을 보고하였다^{15,21)}. Kim and Kim (1993)¹⁵⁾은 *N. seoulensis*에 존재하는 Alp를 pH 8으로 검출하였을 때 최대 활성을 나타냈으며 활성을 보이는 최적 온도는 50℃였다고 하였다. 본 연구에서도 전기영동에 의한 동위원소 유형을 찾은 다음 Alp의 열에 대한 안정성 여부를 알아 본 결과 2번 (207.5 Kda) 분획이 다른 동위원소에 비하여 안정된 편이었다 (Fig. 1, 2). 그리고 Acp 및 Alp에 대한 최적 pH는 각각 pH 5와 pH 9였는데 (Fig. 4, 5), 이것은 Kim and Kim (1993)¹⁵⁾이 보고한 성적과 거의 일치하는 성적이었다. 또 온도에 대한 Alp의 최적 온도는 40℃ (Fig. 6)로 나타나 Kim and Kim (1993)¹⁵⁾의 *N. seoulensis* 보다는 낮은 최적 온도 범위를 보였다. 물론, phosphatase의 특성과 그 활성도는 기생충의 종류와 숙주 그리고 각 부위에 따라서 차이가 날 것이며, 숙주 환경에 적응할 것으로 추정되는 바 더 구체적인 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

- 1) Asada J (1926): On a new echinostomatid trematode and its life history (in Japanese). *Trans Jap Path Soc*, **16**: 293-294.
- 2) Ahn YK, Ryang YS (1985): *Echinostoma hor-*

- tense* metacercariae naturally encysted on *Odontobutis obscura interrupta* and experimental infection to rats. *Korean J Parasitol*, **23**: 230-235 (in Korean).
- 3) Benham F, Cotel DC, Frank LM, Wilson PD (1977): Alkaline phosphatase activity in human bladder tumor cell lines. *J Histochem Cytochem*, **25**: 266-274.
 - 4) Bryant C (1978): The regulation of respiratory metabolism in parasitic helminths. *Adv Parasitol*, **16**: 311-331.
 - 5) Chai JY, Hong SJ, Shon WM, Lee SH, Seo BS (1985): Studies on Intestinal Trematodes in Korea X IV. Infection status of loaches with the metacercariae of *Echinostoma hortense*. *Korea J Parasitol*, **23**: 18-23.
 - 6) Chu JK and Lee HS (1960): Histochemical studies on the relationship between the ascarides of man and pig. *Korean J Parasitol*, **1**: 15-21 (in Korean).
 - 7) Davis DA, Bogitsh BJ, Nunnally DA (1969): Cytochemical and biochemical observations on the digestic trematodes III. nonspecific esterase in *Haematoloehcus medioplexus*. *Exp Parasitol*, **24**: 121-129.
 - 8) Fujino T, Threadgold LT, Ishii Y (1983): Phosphatases ultracytochemically observed in juveniles and adults of *F. hepatica*. *Jap J Parasitol*, **32**: 1-12.
 - 9) Hague M, Saddigi AH (1984): Esterase activity in some digenetic trematodes. *Jpn J Parasitol*, **33**: 275-282.
 - 10) Halton DW (1967): Studies phosphatase activity in trematoda. *J Parasitol*, **53**: 46-54.
 - 11) Hames BD, Rickwood D (1990): Gel electrophoresis of protein (Second edition). *Oxford University Press N.Y*, 30-44.
 - 12) Hotta H, Chiba K, Hasegawa H (1978): Studies on the Diphyllbothrid cestodes in the Northern Japan.(1) Plerocercoids recovered from several species of fishes and their adult forms. *Dept of Med Zool Niigata Univ of Med*, **4**: 357-368.
 - 13) Huh S, Lee SH, Seo BS (1990): Histochemical findings of the tribocytic organ and tegument of *Fibricola seoulensis*. *Korean J Parasitol*, **28**: 155-160.
 - 14) Kwak KH, Kim CH (1996): Characteristics of alkaline and acid phosphatase in *Spirometra erinacei*. *Korean J Parasitol*, **34**: 69-77.
 - 15) Kim HJ, Kim CH (1993): Localization and isozyme pattern of phosphatase in *Fibricola seoulensis*. *Korean J Parasitol*, **31**: 353-361.
 - 16) Larsson A, Hasselgren G (1979): Potential inhibitors of rat tooth alkaline phosphatase studied by means of different histochemical techniques. *J Histochem Cytochem*, **27**: 982-988.
 - 17) Lee SY, Lee SH, Je JC (1978): Ultrastructural changes of the hepatocytes and biliary epithela due to *Clonorchis sinensis* in guinea pigs. *Korean J Parasitol*, **16**: 88-102 (in Korean).
 - 18) Lojda Z, Gossrau R and Schiebler TH (1979): Enzyme histochemistry. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg. N.Y*, 59-71, 71-87, 117-118.
 - 19) Ma L (1964): Acid phosphatase in *Clonorchis sinensis*. *J Parasitol*, **50**: 235-240.
 - 20) Malcol, D, Webb EC (1979): Enzymes, third edition. *Academic press Inc New York*, pp. 635.
 - 21) McComb RB, Bowers GN, Posem S (1979): Alkaline phosphatase. *Prenum NY*, pp. 375.
 - 22) Neumann H (1968): Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase. *J Biol Chem*, **243**: 4671-4676.
 - 23) Pappas PW, Read CP (1975): Membrane transport in helminth parasites; a review. *Exp Parasitol*, **37**: 469-530.
 - 24) Park JT (1938): A rat trematode, *Echinostoma hortense* Asada, from Korea. *Keijo J Med*, **9(4)**: 283-286.
 - 25) Ryang YS, Ahn YK, Lee KY, Kim TS, Hhan MH (1985): Two cases of natural infection by *Echinistoma hortense* and its second intermediate host in Wonju area. *Korea J Parasitol*, **23**: 33-40 (in Korean).
 - 26) Seo BS, Hong ST, Chai JY, Lee SH (1983): Study on intestinal trematodes In KOREA VIII. A human case of *Echinostoma hortens* infection. *Korea J Parasitol*, **21**: 219-223.
 - 27) Tani S (1976): Studies on *Echinostoma hortense* (Asada 1926)(1) Species identification of human echinostomiasis and its infection source (in Japa-

- nese). *Jap J Parasitol*, **25(4)**: 262-273.
- 28) Thrope E (1968): Comparative enzyme histochemistry of immature and mature stage of *Fasciola hepatica*. *Exp Parasitol*, **22**: 150-159.
- 29) Vengesa PB, Hopfer U (1979): Cytochemical localization of alkaline phosphatase and Na⁺ pump sites in adult rat colon. *J Histochem Cytochem*, **27**: 1231-1235.

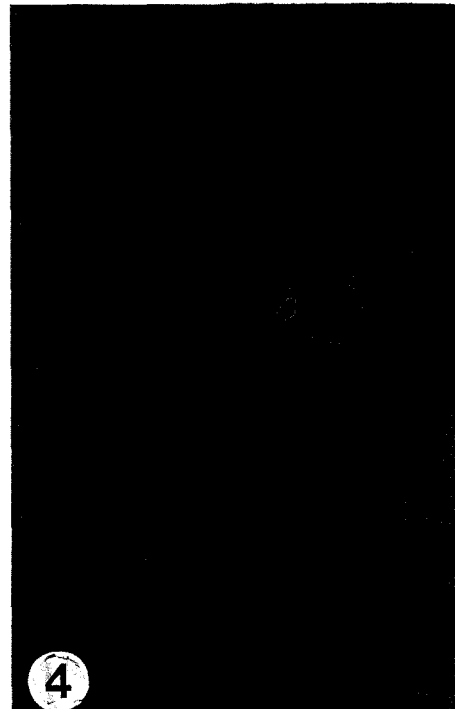


Plate 3. Gomori calcium counter stained on the adult worm of *Echinostoma hortense* (100 X)
Plate 1, 2, 4. Histochemical localization of acid phosphatase on the adult worm of *Echinostoma hortense*, the area of positive reacted (arrows) in the worm (**Plate 1 & 2** 40 X; **Plate 4** 100 X). EG, eggs; EO, esophagus; IN, intestine; O, oral sucker; T, testis; V, ventral sucker; VI, vitelline follicle.



Plate 6. Gomori lead nitrate counter stained on the adult worm of *Echinostoma hortense* (100 X) .
Plate 5, 7, 8. Histochemical localization of alkaline phosphatase on the adult worm of the area of positive reacted (arrows) in the worm (**Plate 5 & 7** 40 X; **Plate 8** 100 X). IN, intestine; PH, pharynx; T, testis; V, ventral sucker; VI, vitelline follicle.

=Abstract=

Characteristics of Alkaline and Acid Phosphatase in *Echinostoma hortense*

Yong-Suk Ryang[†], Insik Kim, Jee-Aee Im, Sung-Gu Kang and Ju-Youn Park

*Department of Medical Technology and Institute of Health Science, College of Health Science,
Yonsei University, Kangwon-Do, Wonju-City 220-710, Korea*

This study was aimed to investigate the enzyme-histochemical localization and characteristics of alkaline and acid phosphatase extracted from adult of *Echinostoma hortense*. Using the Gomori calcium stain and the Gomori lead nitrate stain method, we found that the alkaline and acid phosphatases were localized mostly in the intestine, vitellaria and pharynx of *Echinostoma hortense*. The three isozymes of alkaline phosphatase and two isozymes of acid phosphatase were separated from *Echinostoma hortense* by electrophoresis. The isozymes of alkaline phosphatase were 145.9, 207.5, 220.8 kDa and the isozymes of acid phosphatase were 179.5 and 209.4 kDa. The activity of alkaline phosphatase was denatured completely after heating at 90°C for 12 seconds. The optimum pH and temperature for activity of alkaline phosphatase were about pH 9 and 40°C, while the optimum pH for activity of acid phosphatase was about pH 5. The maximum activity of alkaline phosphatase was at 189 unit, but maximum activity of acid phosphatase was at 71 unit. As the result from above, we observed that alkaline and acid phosphatases function mainly in the alimentary tract and vitellaria. *Echinostoma hortense* performs the parasitism in the intestine of host by using proper isozyme of phosphatase.

Key Words: Alkaline phosphatase, Acid phosphatase, Enzyme-histochemical stain, Isozyme pattern, *Echinostoma hortense*

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 5(1): 119-129, June, 1999]

[†] Corresponding author