

Propionylthiocholine-Dithiobis 방법에 의한 사람과 몇몇 동물 혈청내의 Cholinesterase 활성도 측정

김순태 · 김성훈 · 도재철 · 이영호 · 모기철 · 허린수
경북대학교 농과대학 수의학과
(1987.1.23 接受)

Determination of Cholinesterase Activities in Sera of Human and Different Species of Animals by Means of the Propionylthiocholine-Dithiobis Procedure

Soon-tae Kim, Sung-hoon Kim, Jae-cheul Do, Young-ho Lee,
Ki-cheul Mo and Rhin-sou Huh

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Kyungpook National University
(Received January 23th, 1987)

Abstract: Determination of cholinesterase activity is a routine practice in many laboratories to detect the influence of cholinesterase inhibiting drugs such as organophosphate and carbamate insecticides.

Among many different methods to determine the cholinesterase activity, the present method was the most recent, simple and accurate one for routine test in clinics.

The results obtained in sera of human and the different species of animals by means of the present method were as follows: 5.76 ± 1.12 U/ml in human, 3.37 ± 0.83 U/ml in german shepherd, 0.61 ± 0.18 U/ml in rat, 14.91 ± 3.10 U/ml in mouse, 1.55 ± 0.51 U/ml in chicken, 0.28 ± 0.11 U/ml in slaughtered cattle and 0.50 ± 0.10 U/ml in slaughtered pig.

서 론

1948년에 동물 체내에서 cholinesterase의 존재가 Augustinsson(1948)에 의하여 처음 보고된 이후 지금까지 많은 연구가 행하여졌으며 특히 혈청내 cholinesterase 활성도의 측정은 간 기능검사, 유기인제 중독 및 cholinesterase 억제물질에 관한 연구 등에 이용 되어 왔다.

cholinesterase 활성도 측정방법(Grainger, 1968)은 일정 시간내에 생성된 CO₂량으로 측정하는 manometric method, 소모된 alkali의 량으로 측정하는 electrometric method와 사용된 기질의 가수분해 양을 측정하는 photometric method 등 다양한 방법들이 개발 되어

있다.

Radeleff와 Woodard (1956)는 electrometric method를 이용하여 소와 양에 있어서 혈청내 정상 cholinesterase 활성도를 측정하였으며 Uete 등(1972)은 기질로써 acetylthiocholine과 butyrylthiocholine를 사용하는 photometric method를 사용하여 건강한 사람의 cholinesterase 활성도를 측정한 바 있으며 Dietz 등(1973)은 기질로서 propionylthiocholine을 사용하여 cholinesterase 활성도를 측정하였다. 또한 Hazelwood와 Heath (1976)는 몇몇 가축의 cholinesterase 활성도를 측정 비교한바 있다. 이들 방법은 각각 처리방법이 복잡하고, 시간이 많이 필요한 단점들이 있어서 본 연구에 있어서는 처리방법이 간단하고 측정시간이 짧은 Dietz 등

본 논문의 요지는 1986년 10월 제30차 대한수의학회 학술대회에서 발표하였음.

(1973)이 보고한 방법을 이용하여 사람을 비롯한 아직 본 방법으로는 보고된 바 없는 몇몇 가축과 실험동물의 혈청내 cholinesterase 활성도를 측정하여 각 동물의 정상치와 종간의 차이 등을 규명하는 한편 수의 임상치의 기초자료로 이용하는데 도움을 주고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시료채취: 건강한 20대 남성 지원자 10명을 대상으로 상완정맥에서 혈액을 채취하고, 한우와 돼지에 있어서는 도축 즉시 경정맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 닭과 독일산 세퍼드에서는 임상적으로 건강한 개체로부터 각각 상완동맥과 상완정맥에서 혈액을 채취하였으며 또한 rat와 mouse는 ether로 마취시킨 후 후대정맥으로부터 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리로 혈청을 분리하여 측정에 사용하였다.

시약: phosphate buffer 용액은 pH = 7.6, $\mu = 0.1$; Na_2HPO_4 4.73g/l 수용액과 KH_2PO_4 13.61g/l 수용액을 섞어서 pH 7.6으로 조정하여 사용하였으며 20mmol propionylthiocholine iodide 용액은 사용직전 2배로 희석하여 기질로 사용하였다. 한편 0.423mmol 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid, DTNB)을 phosphate buffer 용액으로 용해시켜 color reagent로 사용하였다.

처리방법: 2개의 시험관에 DTNB buffer 용액을 각각 3ml 취하여 37°C에 고정된 수욕조에 장치하고 5분 후 기질인 Propionylthiocholine 용액 1ml을 첨가한 다음 2시험관 중 한개의 시험관에만 100배로 희석된 혈청 1ml을 첨가하여 3분동안 37°C에서 반응시켰다. 2개의 시험관 모두에 0.5% quinidine sulfate 용액을 각각 1ml씩 첨가하고 혈청이 첨가되지 않은 시험관에는 희석된 혈청 1ml를 첨가한 후 이것을 blank로 하여 410nm에서 흡광도를 측정하였다.

계산: 다음 공식에 의거 실시하였다.

$$U/ml = \frac{x \times y \times \Delta A}{13.6 \times z}$$

x : 흡광도를 측정할 때 까지 들어간 총시약 및 희석된 혈청의 첨가량

y : 혈청의 희석배수

ΔA : 측정된 시료의 흡광도

z : incubation time

13.6; 1cm cuvette를 사용하여 측정된 5-thio-2-nitrobenzoic acid의 millimolar absorptivity

결과

혈청내 cholinesterase 활성도는 Table 1에 표시된 것처럼 건강한 남성 10명에 대한 값은 4.09~7.33U/ml에 평균치는 5.76±1.12U/ml였고 독일산 세퍼드 13마리에 대한 값은 2.00~5.54U/ml에 평균치는 3.37±0.83U/ml였고, Wistar rat 12마리에서는 0.33~0.90U/ml에 평균이 0.61±0.18U/ml, mouse는 20마리에서 9.54~21.17U/ml에 평균 14.91±3.10U/ml 닭은 19마리에 있어서 0.77~2.60U/ml에 평균 1.55±0.51U/ml였으며, 도축우 14마리와 도축돈 15마리에서는 각각 0.14~0.50과 0.34~0.65U/ml에 평균 0.28±0.11, 0.50±0.10U/ml로서 개체 차이와 종간의 차이가 다양하였다.

각 동물간 혈청내 cholinesterase 활성도 순서는 mouse, 개, 닭, rat, 돼지, 소의 순으로 mouse에서 가장 높았고, 다음이 사람과 rat의 순으로 높았다.

고찰

본 실험에서 사람의 혈청내 cholinesterase 활성도는 4.09~7.33U/ml에 평균 5.76±1.12U/ml로서 이는 동일한 방법으로 측정된 Dietz 등(1973)의 혈청내 cholinesterase 활성도 4.9~11.9U/ml에 평균 5.95±0.18U/ml와 일치하였다. 한편 Hazelwood와 Heath(1976)는

Table 1. Serum Cholinesterase Activity for Six Animals and Human

Species	No. of animals	Activity		
		Values(U/ml)	Mean(U/ml)	S. D.
Human	10	4.09— 7.33	5.76	±1.12
Cattle	14	0.14— 0.50	0.28	±0.11
Pig	15	0.34— 0.65	0.50	±0.10
Dog	13	2.00— 5.54	3.37	±0.83
Rat	12	0.33— 0.90	0.61	±0.18
Mouse	20	9.54—21.17	14.91	±3.10
Chicken	19	0.77— 2.60	1.55	±0.51

Incubation time; 3mins

Incubation temperature; 37°C

photometric method 중 기질로써 acetylthiocholine을 사용하여 측정 한 결과 혈장내 cholinesterase 활성도는 개 (55.1 μ mol/4min), 돼지 (13.4 μ mol/4min), 소 (10.1 μ mol/4min)의 순서로 낮아진다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 일치하였다.

기질을 달리하여 측정 한 정상 사람의 혈청내 cholinesterase 활성도는 propionylthiocholine (Dietz 등, 1973)을 사용했을 때 5.76U/ml, butyrylthiocholine (Uete 등, 1972) 일 때 5.5U/ml인 반면에 acetylthiocholine (Uete 등, 1972)을 사용했을 때는 3.3U/ml로서 기질을 달리하면 같은 개체에서도 서로 다른 활성도를 보이며 acetylthiocholine을 사용하였을 때 보다 propionylthiocholine과 butyrylthiocholine을 기질로 사용하였을 때에 약 1.5배 높다고 하였다.

Schindler와 Mruckenber(1972)의 보고에 따르면 혈청의 저장온도 및 저장기간에 따라 활성도가 달라진다고 보고한 바 있다. 다시 말해서 본 실험에서 채취한 소와 돼지의 시료는 도축된 상태에서 채취 하였기 때문에 Mathew 등(1980, 1982)이 보고한 바와같이 stress가 가해졌을 때 pseudocholinesterase가 증가함을 고려한다면 소와 돼지의 혈청내 cholinesterase 활성도는 정상치보다 약간 높을 것으로 추정된다.

결 론

임상에서 간편하고 신속하게 동물의 cholinesterase 활성도를 측정하는데 알맞는 방법을 제시할 목적으로 rat, mouse, 개, 닭, 돼지, 소를 대상으로 실험을 행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

동물 종간의 차이는 mouse에서 현저하게 높았으며 개 (3.37 \pm 0.83U/ml), 닭 (1.55 \pm 0.51U/ml), rat (0.61 \pm 0.18U/ml), 돼지 (0.50 \pm 0.10U/ml), 소 (0.28 \pm 0.11U/ml)의 순으로 차이가 있었으며 돼지와 소에 있어서 활성도는 다른 동물 보다 낮았다. 본 실험의 결과는 앞으로 비교적 저리 방법이 간단하고 측정시간이 짧은 방법으로 동물의 혈청내 cholinesterase 활성도를 측정하려 할 때 임상적 기초적 비교 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Augustinsson, K.B. (1948) Cholinesterase-a study in comparative enzymology. Acta. Physiol. Scan(Suppl.), 15:52~59.
- Dietz, A.A., Rubinstein, H.M. and Lubrano, T. (1973) Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. Clin. Chem., 19:1309~1313.
- Grainger, M.M. (1968) Blood cholinesterase values. Arch. Environ. Health., 16:821~822.
- Hazelwood, J.C. and Heath, G.E. (1976) A comparison of cholinesterase activity of plasma, erythrocytes, and cerebrospinal fluid of sheep, calves, dog, swine and rabbits. Am. J. Vet. Res., 37:741~743.
- Mathew, R.J., Hsu, L.L. and Semchek, K.M. (1980) Acetylcholinesterase and pseudo cholinesterase activities in anxiety. Am. J. Psychiatry., 137:1118~1120.
- Mathew, R.J., Ho, B.T. and Khan, M.M. (1982) True and pseudo cholinesterase in depression. Am. J. Psychiatry., 139:125~127.
- Radeleff, R.D. and Woodard, G.T. (1956) Cholinesterase activity of normal blood of cattle and sheep. Vet. Med., 51:512~514.
- Schindler, R.L. and Mruckenber, S.M. (1972) Changes in cholinesterase activity in stored equine blood samples. Am. J. Vet. Res., 33(9):1893~1894.
- Uete, T., Miyamoto, Y., Ohnishi, M. and Shimano, N. (1972) Spectrophotometric micromethod for measuring cholinesterase activity in serum or plasma. Clin. Chem., 18:454~458.