大韓獸醫學會誌(1988) 第28卷 第2號
Korean J Vet Res(1988) 28(2): 327~329

韓牛의 先天性溶血感受性檢査에 대한 methylene blue 靑色消失試驗法의 適用

趙 鍾 厚
全北大學校 獸醫學科
(1988. 8. 2 접수)

Application of methylene blue color test for the detection of inherited susceptibility to hemolysis of Korean native cattle

Jong-hoo Cho
Department of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
(Received Aug 2, 1988)

Abstract: Blood samples were obtained from Korean native cattle and dairy cattle of Holstein species in the slaughter house and methylene blue color tests were performed for the detection of the inherited susceptibitity to hemolysis.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase activities expressed as the optical density obtained by methylene blue color test were the highest as 0.54 in male Korean cattle, 0.62 in female Korean cattle and 0.72 in dairy cattle of Holstein species.

Percent hemolysis, packed cell volume and plasma protein contents were measured and compaired with relation to the results of methylene blue color test and no correlation were observed in each.

Key words. hereditary hemolysis, methylene blue color test, glucose-6-phosphate dehydrogenase

緖 論

인체에서 선천적으로 貧血을 일으키기 쉽거나 특정 약물의 투여시 쉽게 빈혈을 일으키는 생체소인으로 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-PD)가 결핍되거나 NAD(P)H-methemoglobin reductase(NAD(P)H-MR)의 활성이 낮은데 기인한다는 많은 보고가 있다.[1~5] 그러므로 가축에서도 인체에서와 같이 G-6-PD나 NAD(P)H-MR활성을 측정함으로써 빈혈을 일으킬 수 있는 선천성소인을 밝히는데 도움이 될 수 있을 것으로 짐작된다. 그러나 실제적으로 G-6-PD나 NAD(P)H-MR 활성의 측정은 매우 복잡하고 시간이 많이 소요되므로 이들 효소활성의 간접적 측정법이 개발되어 이용되고 있다. 그 대표적인 방법으로서 methylene blue와의 반응에 의한 청색소실을 검사하는 방법,[6] Heinz body형성의 측정,[1] methemolglobin환원측정 등[3]이다. 이 중에서 적혈구와 methylene blue와의 반응법은 G-6-PD 활성을 간접측정하는 방법으로 방법이 간편하고 저렴한 시약으로 실시할 수 있으며 단시간에 측정할 수 있어 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 한우의 선천성빈혈의 소인을 파악하고자 도축장에서 채혈하여 methylene blue시험을 실시하였으며 Holstein종의 성적과도 비교하였다. 아울러 빈혈과 관계가 있을 것으로 생각되는 적혈구용혈율, packed cell volume(PCV) 및 단백질함량도 측정하여 methylene blue시험법에 의한 결과와 상관성이 있는지를 검토하였다.

材料 및 方法

供試血液 : 전북 전주시 소재 도축장에 계류중인 한우와 유우(Holstein종)로부터 heparin을 가한 채혈용기에 혈액을 채취한 후 실험실에 옮겨 즉시 PCV을 측정하고 동시에 methylene blue시험과 적혈구용혈율 시험을 실시하였다. 나머지 혈액은 혈장을 분리하여 냉장보관하면서 단백질량을 측정하였다.

Methylene blue 청색소실시험 : Sass 등[6]의 방법을 수정하여 실시하였다. 요약하면 시험관에 saline-glucose 희석액 5.0ml를 취하고 여기에 0.008%의 methylene blue용액 0.50ml와 잘 혼합한 항응고혈액 1.0ml를 가하여 전도 혼합하였다. 37°C의 恒溫水槽 속에 넣어 20분간 반응시킨 후 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 上淸液 중에 잔류하는 靑色度를 파장 615nm에서 물을 바탕시험액으로 하여 흡광도를 측정하였다. 또한 이 방법이 적합한지를 검토하기 위하여 반응시간을 5분 간격으로 30분간 측정하여 그 흡광도를 비교하였다. 이때 흡광도측정을 위하여 사용한 분광광도계는 Grating Cecil 545 Spectrophotometer(U.K.)였다.

Packed cell volume(PCV)의 측정 : Wintrobe의 micromethod에 의하여 측정하였다.

赤血球溶血率試驗 : 원심분리에 의하여 분리된 적혈구를 0.9% 생리식염수로 3회 세척한 후 0.9% 생리식염수를 가하여 7% 적혈구 부유액을 만들었다. 이 적혈구부유액에 대하여 趙[7]의 방법에 따라 dialuric acid에 의한 용혈율을 측정하였다.

혈장단백질의 측정 : 혈장단백질의 측정은 Biuret법에 따랐다.

結果 및 考察

도축장에서 채혈한 韓牛와 Holstein종 乳牛의 혈액으로 methylene blue시험을 실시하여 잔류하는 methylene blue청색의 흡광도를 측정하고 흡광도의 차이에 따라 소의 분포를 조사한 바 Table 1과 같았다. 흡광도가 낮을수록 청색의 소실이 크게 나타나며 G-6-PD의 활성이 높은 것을 의미한다. 반대로 흡광도가 높을수록 G-6-PD의 활성이 낮음을 의미한다. 조사된 소의 성적은 개체에 따라 차이가 많은 것으로 나타났다. 조사된 소의 약 43%가 흡광도 0.70 이상으로 비교적 낮은 활성을 보였으며 특정 약품(예 : primaquine)의 투여에 의하여 빈혈을 유발시킬 수 있는 소인을 가진 것으로 생각된다.

선천성빈혈소인을 검사하기 위한 methylene blue 청색소실시험법의 적합성을 확인하기 위하여 methylene

Table 1. Distribution of optical density in methylene blue test of blood from cattle

Optical density	Number	Percent (%)	Percent(%) by species of cattle		
			Korean cattle (♂)	Korean cattle (♀)	Holstein (♀)
<0.39	4/46	8.70	75.00	0	25.00
0.40~0.49	6/46	13.40	16.67	83.33	0
0.50~0.59	8/46	17.39	62.50	37.50	0
0.60~0.69	10/46	21.74	40.00	30.00	30.00
0.70~0.79	12/46	26.09	8.33	25.00	66.67
>0.80	6/46	17.39	0	50.00	50.00

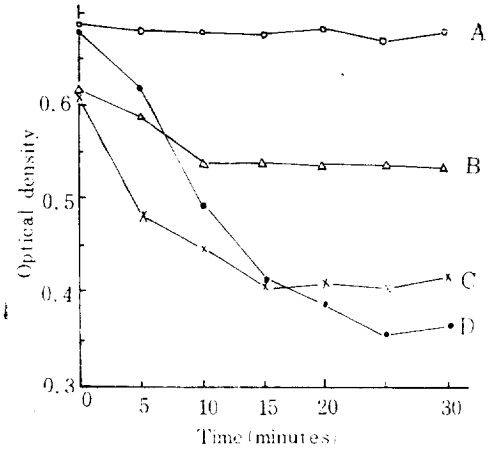

Fig 1. Versatile disappearance of blue color during incubation of methylene blue and blood at 37°C. A; control(not contaning blood). B, C and D; bovine blood.

blue용액과 혈액을 반응시키면서 5분 간격으로 30분간 흡광도변화를 측정한 결과 Fig 1과 같았다. 이러한 결과는 Sass 등[6]의 보고와 유사하였으며 G-6-PD의 간접 측정법으로 신빙성이 있는 것으로 생각되었고 반응시간은 20분으로 충분한 것이 확인되었다.

Methylene blue시험법에서 나타난 흡광도가 빈혈과 관계가 있다면 적혈구용혈율과 관계가 있을지도 모른다. 그러므로 여기에서 흡광도에 따라 분류된 소의 혈액으로부터 적혈구를 분리하여 dialuric acid에 의한 적혈구용혈율을 조사하였으며 아울러 빈혈과 관계깊은 PCV과 단백질함량도 측정하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. Table 2에서 보여 주는 바와 같이 흡광도 0.50미만에서 낮은 적혈구용혈율을 보였으며 0.50이상에서는 다소 높은 적혈구용혈율을 보여 적혈구 안정성이 다소 감소하였으나 흡광도의 차이에 따른 상관성은 없었다. 따라서 적혈구의 안정성이 G-6-PD의 활성에

Table 2. Percent hemolysis, packed cell volume, protein contents and optical density in methyle blue test of blood from cattle

Optical density	Percent % hemolysis (mean±SD)	Packed cell volume (mean±SD)	Protein contents(%) (mean±SD)
0.39	25.93±20.70	44.6±1.7	8.06±0.95
0.40~0.49	37.01±25.41	38.3±3.9	7.47±0.92
0.50~0.59	45.29±30.11	44.4±2.5	7.99±1.02
0.60~0.69	53.14±22.64	37.9±6.76	7.76±1.00
0.70~0.79	44.79±21.64	35.5±9.79	7.59±1.03
0.80	57.53±16.93	36.1±7.55	7.23±1.46

의하여서만 좌우되는 것으로는 생각되지 않는다. PCV와 단백질함량은 G-6-PD의 활성을 나타내는 흡광도와는 전혀 상관성이 없었다.

韓牛와 Holstein종 乳牛 및 암수별 methylene blue시험결과와 적혈구용혈율, packed cell volume 및 단백질함량은 Table 3과 같다. 즉 methylene blue시험결과 흡광도는 한우가 Holstein종 유우보다 낮아 더 높은 G-6-PD활성을 보여 빈혈에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다. 또한 숫소가 암소보다 효소활성이 높은 것으로 나타났으며 빈혈에 더 저항할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 결과에도 불구하고 적혈구용혈율의 차이는 없었으며 PCV는 유우가 한우보다 다소 낮았고, 단백질함량은 유우가 한우보다 높았으나 모두 유의차는 없었으며 한우의 암수간에도 차이가 없었다. 이상의 성적으로 보아 혈액의 PCV나 단백질함량이 methylene blue시험에 영향을 주는 것으로는 생각되지 않는다. 또한 조사된 methylene blue시험성적은 흡광도의 차이에 따른 빈혈소인의 차이가 인정되기는 하나 적혈구안정성에 영향을 줄 정도는 아니었다.

結 論

도축장에서 韓牛와 Holstein종 乳牛의 혈액을 채취하여 적혈구 methylene blue 청색소실시험, 적혈구용혈율, packed cell volume 및 혈장단백질함량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한우수소, 한우암소 및 Holstein종 유우의 적혈구 methylene blue 청색소실시험결과 각각의 흡광도는 0.54, 0.62 및 0.72로 한우가 유우보다 glucose-6-phosphate dehydrogenase활성이 높았다.

2. Methylene blue 청색소실시험결과와 적혈구용혈율, packed cell volume 및 혈장단백질함량과의 상관성은 없었다.

參 考 文 獻

1. Harley JD, Mauer AM. Studies on the formation of Heinz bodies: I. Methemoglobin production and oxyhemoglobin destruction. *Blood* 1957; 16: 1722~1735.
2. Scott EM, Griffith Ⅳ. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase. *Biochim Biophys Acta* 1959; 34:584~586.
3. Brewer GJ, Tarlov AR, Albings AS. The methemoglobin reduction test for primaquine-type sensitivity of erythrocytes. *J Am Vet Med Assoc* 1962; 180:386~388.
4. Kellermeyer RW, Tarlov AR, Brewer GJ. Hemolytic effect of therapeutic drugs: clinical considerations of premaquine-type homolysis. *J Am Vet Med Assoc* 1962; 180:388~394.
5. Hegesh E, Avron M. The enzymatic reduction of ferrihemoglobin. I. The reduction of ferrihemoglobin in red blood cells and hemolysates. *Biochim Biophys Acta* 1967; 146:91~101.
6. Sass MD, Caruso CJ, Axelrod DR. Rapid screening for D-glucose-6-phosphate: NADP oxidoreductase deficiency with methylene blue. *J Lab & Clin Med* 1966; 68:156~162.
7. 趙鍾厚. 귀적혈구의 Paraquat에 의하여 이르켜지는 용혈에 대한 d-α-tocopherol의 시험관내 방어효과. 韓國獸醫公衆保健學會誌 1984; 8:9~13.

Table 3. Methylene blue tests and the related analyses of blood by species of cattle

Cattle	Sex	No of test	O.D. in methylene blue test [mean(range)]	Percent hemolysis %(mean±S.D)	Paked cell volume (mean±S.D)	Protein contents %(mean±S.D)
Korean cattle	Male	14	0.54(0.31~0.73)	48.13±28.41	40.9±5.6	7.70±0.93
Korean cattle	Female	17	0.62*(0.41~0.86)	44.91±23.35	41.6±6.4	7.78±0.95
Holstein	Female	15	0.72*(0.27~0.81)	48.23±20.43	39.6±6.5	7.95±1.09

* $P<0.01$