

반추동물 신증의 조기진단을 위한 뇨효소 측정법

1. 효소활성도 측정을 위한 적합한 조건과 정상범위에 관하여

李昌雨·李慶甲

서울대학교 獸醫科大學

서론

腎症은 신장과 뇨세관에 퇴행성병변 또는 염증성 병변을 일으킨 상태를 의미한다. 동물에 있어서 신증을 일으킬 수 있는 요인은 도처에 광범위하게 널려 있으며, 예를들어 변질된 사료에 섞여 있는 곰팡이 독소, 목초에 섞여 있는 독초, 주위 환경에서 우연한 사고로 섭취할 수 있는 중금속, 농약 및 치료제로 사용하는 약품의 오용 등을 들 수 있다.

이와같이 동물은 신증에 걸릴수 있는 기회가 많지만 현재 이용되는 임상병리학적 기술중 혈청 화학적검사, 뇨분석, 색소배설시험 등의 기술로서는 신단위의 60~70%가 손상을 받아야 비로소 이상을 알아낼수 있기 때문에 조기에 신장손상을 진단하기에 어려운 단점이 있다.^{2,13,22)} 그 때문에 신장의 질병을 조기에 진단하지 못하여 치료시기를 노침으로서 동물사육 농가는 치료조차 못해보고 경제적 손실을 보게된다. 1970년대부터 뇨중으로 배설되는 효소들을 측정함으로써 실험동물에 있어서 신증을 조기에 진단할 수 있는 기술이 개발되기 시작하였으며^{7,9,11,12,21)}, 이 기술은 최근 사람에 있어서 다양한 원인에 의한 신증을 조기 진단하는데 이용되고 있다.^{1, 4, 6, 8, 10, 17, 18, 24, 26, 27, 29, 30)}

뇨효소 측정에 의한 신증의 진단에 대한 이론적 근거는 다음과 같이 보고 되어 있다. Mattenheimer¹⁷⁾는 뇨중에 존재하는 효소는 혈장에서부터 유래할 수도 있지만 주로 신장조직에서 유래하는 것이며 분자량이 69000이상의 효소는 사구체를 극히 소량 밖에 통과할수 없다고 하므로서 비록 뇨에서 발견되는 것과 같은 효소가 신장이외의 다른 조직에 공존하더라도 뇨중 효소배설량의 증가는 신장조직의 손상을 의미하는 지표가 된다고 하였다.

한편 이를 뒷받침할 수 있는 연구결과로서 花田²⁰⁾은 사람의 뇨중에 배설되는 γ -GTP는 간조직에 존재하는 γ -GTP와는 전기영동적 특성이 다르고 신장에 존재하는 γ -GTP와는 일치하므로 뇨중 γ -GTP의 유래가 신장이라는 사실을 증명하였고, 副島와 長澤³⁰⁾은 isoenzyme을 측정함으로써 N-acetyl- β -glucosaminidase가 혈장에서 유래하는것 즉, 다른 조직으로부터 유래하는 것이 아니고 신조직에서 유래하는 것임을 증명하였다.

한편 가축에 있어서 뇨효소 측정에 의한 신증의 진단에 관한 보문은 별로 찾아 볼수 없으며 Roberts와 Seawright²³⁾가 말에서, Shaw²⁵⁾가 양에서 각각 gamma-glutamyltranspeptidase를 측정하

이 논문은 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었다.

고, Crowell⁵⁾이 소에서 alanine aminopeptidase를 측정하여 신증을 진단할 수 있음을 보고한 바 있다.

이상과 같이 뇨효소 측정에 의한 신질환과 신독성의 진단에 관한 연구는 최근 20여년간 확대일로에 있으나 측정방법에 있어서 다른 종의 동물이나 다른 종류의 시료에 대해 적용되도록 고안된 방법을 검토없이 다른 종의 동물의 뇨에 대해 적용하고 있다는 사실이 문헌조사 과정에서 발견되었다. 한편 우리나라 수의학계에서는 이와 관련된 연구발표가 없어서 문헌조사 만으로는 이러한 실험의 문제점과 성격을 자세히 파악하기 힘들다.

이 실험의 목적은 반추동물중 소를 실험동물로 하여 뇨중으로 배설되는 gammaglutamyltranspeptidase(E. C. 2. 3. 2. 2, γ -GTP), N-acetyl- β -D-glucosaminidase(E. C. 3. 2. 1. 30, AGS) 및 alanine aminopeptidase(E. C. 3. 4. 1. 2, AAP)의 활성도 측정에 필요한 적합한 조건을 조사하여 측정방법을 정립하고, *in vitro*에서의 안정성, 정도(imprecision), 정상범위 등을 조사하여, 이 효소들의 측정에 의해 반추동물의 신증을 조기에 진단하기 위한 기초를 수립하는데 있다.

○ 절 차

Solutions	Test ml	Control ml	Standard ml	Blank ml
Urine	0.05	0.05	—	—
Substrate	0.5	—	—	—
Incubate at 37°C for 10 min				
Acetic acid	2.0	2.0	2.0	2.0
Standard sol.	—	—	0.5	—
Distilled water	—	—	—	0.5
substrate	—	0.5	—	—
Sodium nitrite	1.0	1.0	1.0	1.0
Mix and stand at room temperature for 3 min.				
Ammonium sulphamate	1.0	1.0	1.0	1.0
Mix and stand at room temperature for 1 min.				
N-naphthylethylenediamine	1.0	1.0	1.0	1.0
Mix and read at 545 nm.				

재료 및 방법

실험동물 : 서울대학교 수의과대학에서 사육 중인 홀스타인종 젖소 2두, 한우 3두 및 수원시 근교에 위치한 S목장에서 사육중인 홀스타인종 젖소 50두를 실험동물로 사용하였으며 이 동물들은 모두 암컷이었고 실험기간동안 자유급수 시켰다.

채 뇨 : 24시간 뇨를 채뇨하기 위해서는 Foley catheter를 사용하였으며 임의시간의 채뇨를 위해서는 자연방뇨하는 것을 채취하였다. 채취한 뇨는 sodium azide로 방부처리하였으며 여과지로 여과한후 3000rpm으로 원심분리하여 사용하였다.

γ -GTP활성도 측정 ;

1) 기본측정방법 : 기본적인 측정원리는 Naftalin 등¹⁹⁾등에 준했으며 기질의 pH와 농도 및 과장수는 기초 예비실험에 의해 적합한 것으로 판단된 값으로 개량하여 측정하였다.

개량된 방법을 요약하면 다음과 같다.

○ 시 약

Buffer : 0.1mol glycylglycine in 0.1mol Tris-HCl buffer(pH7.6 at 37°C)

Substrate : γ -glutamyl-p-nitroanilide

4.4mmol/l of buffer
 Acetic acid 10%
 Sodium nitrite 0.1%
 Ammonium sulphamate 1%
 N-Naphthylethylenediamine di-HCl 0.05%
 Standard solution of p-nitroaniline, 0.2 μmol

○ 효소활성도의 산출 :

$$\frac{A_{\text{test}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{standard}}} \times 0.1 \times \frac{20}{10} \times 1000$$

2) γ-GTP 측정용 표준액과 기질액의 흡수곡선 : 흡광도 측정에 필요한 최적 파장수를 구하기 위해 표준용액 (p-nitroaniline 0.2 μmol/ml)과 기질액에 의해 생성되는 색의 흡수곡선을 495~595nm의 범위 내에서 조사하였다.

3) 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정 방법은 Naftalin등¹⁹⁾에 준하되, 완충액의 pH를 7.2에서 8.0까지의 범위 내에서 여러가지로 만들어 3두의 소의 뇨에 대해 γ-GTP활성도를 측정하여 완충액의 pH변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH값을 구하였다.

4) 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 0.4-4.4mmol/l의 범위 내에서 여러가지로 만들어 3두의 소의 뇨에 대해 γ-GTP활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따르는 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk의 방법¹⁵⁾에 의한 Michaelis constant(Km)를 구하였다.

AGS활성도 측정 :

1) 기본 측정 방법 : 기본적인 측정 원리는 Maruhn¹⁶⁾에 준했으며 기질의 pH와 농도 및 파장수는 기초예비실험에 의해 적합한 것으로 판단된 값으로 개량하여 측정하였다.

개량된 방법을 요약하면 다음과 같다.

○ 시 약

Substrate-buffer solution :
 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide
 10mmol in citrate buffer (0.1 mol, pH 4.0

at 37°C)

2-amino-2-methyl-1-propanol}HCl buffer (0.75mol, pH 10.5 at 25°C, AMP buffer)

○ 절 차

Solutions	Test ml	Sample blank ml	Reagent bland ml
Substrate buffer	0.4	-	0.4
Urine	0.4	0.4	-
Physiological saline	-	-	0.4
Buffer(citrate)	-	0.4	-
Close containers and incubate in waterbath at 37°C, 15min			
AMP buffer	0.4	0.4	0.4
Read absorbance of 4-nitrophenol at 405 nm against distilled water			

○ 효소활성도의 산출 :

$$\frac{\Delta E}{\epsilon d} \times \frac{FV}{SV} \times 10^6$$

ΔE : Absorbance change per minute

ε : Extinction coefficient (17.0 × 10⁶)

d : Light path

FV : Final volume

SV : Sample volume

2) p-Nitrophenol과 기질액의 흡수곡선 : 흡광도 측정에 필요한 최적 파장수를 구하기 위해 p-nitrophenol(10 μmol in AMP buffer, pH 10.5)과 기질액의 흡수곡선을 340~500nm의 범위 내에서 조사하였다.

3) 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정 방법은 Maruhn¹⁶⁾에 준하되 citrate 완충액의 pH를 3.2~4.4의 범위 내에서 여러가지로 만들어 3두의 소의 뇨에 대해 AGS활성도를 측정하여 완충액의 pH변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH값을 구하였다.

4) AMP 완충액의 pH : AMP 완충액의 pH는 최종 pH가 10.0을 초과하도록 하기 위해 10.5로 조절하였다.

5) 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 1-15mmol/l의 범위 내에서 여러가지로 만들어 3두의 소의 뇨에 대해 AGS활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따르는 영향을 조사하고

Lineweaver와 Burk의 방법¹⁵⁾에 의한 Michaelis constant(Km)를 구하였다.

AAP활성도 측정 ;

1) 기본측정방법 : 기본적인 측정원리는 Crowell등⁵⁾에 준하였으며 완충액의 pH와 기질의 농도 및 최적과장수는 기초에비실험에 의해 적합하다고 판단된 값으로 개량하였다.

○ 시 약

- (1) 완충액. 30℃에서 pH가 7.8이 되도록 0.2mol potassium dihydrogen phosphate와 0.2mol disodium hydrogen phosphate를 이용하여 0.1mol phosphate완충액을 만들었다.
- (2) 기질액. 1.66×10^{-3} mol이 되도록 L-alanine-p-nitroanilide를 완충액에 용해하여 사용하였다.

○ 측정절차

Urine 1.0ml + Buffered substrate 2.0ml
 |
 Reaction at 30℃
 |
 Measure absorption increase at 400nm
 against distilled water

○ 효소활성도의 산출

활성도 계산식은 다음과 같다.

$$\frac{\Delta E}{\epsilon d} \times \frac{FV}{SV} \times 10^6$$

ΔE : Absorbance change per minute

ϵ : Extinction coefficient(9.50×10^3)

d : Light path

FV : Final volume

SV : Sample volume

2) AAP측정용 표준액과 기질액의 흡수곡선 : 흡광도 측정에 필요한 최적 과장수를 구하기 위해 표준용액(p-nitroaniline 0.1μ mol)과 기질액의 흡광도를 340-460nm 범위내에서 조사하였다.

3) 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정방법은 Mondorf 등¹⁶⁾에 준하되, 완충액의 pH를

6.6에서 8.6까지의 범위내에서 여러가지로 만들어 3두의 소의 뇨에 대해 활성도를 측정하여 완충액의 pH값을 구하였다.

4) 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 0.2~2.0mmol/l범위내에서 여러가지로 만들어 3마리의 소의 뇨에 대해 AAP활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따른 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk¹⁵⁾ 방법에 의해 Michaelis constant(Km)를 구하였다.

gel filtration의 영향 : 뇨중의 효소측정에 있어서 gel filtration의 영향을 조사하기 위하여 9두의 소의 뇨를 각각 Sephadex G-25M으로 충전된 Column PD-10(Pharmacia Fine Chemicals)을 통과시켜 여과하고 여과전과 여과후의 시료에 대해 γ -GTP, AGS 및 AAP의 활성도를 측정하고 t-test를 실시하여 여과전과 여과후의 성적을 비교하였다.

精度(Within-run imprecision) : 이 실험에 채택된 측정방법의 精度를 조사하기 위하여 3두의 소의 뇨에 대해 γ -GTP, AAP 및 AGS활성도를 10회 반복 측정하여 변이계수(coefficient of variance)를 구하고 분산 분석을 실시하였다.

안정성 : in vitro에서 뇨효소의 안정성을 조사하기 위해 gel-filtration한 8두의 뇨에 대해 채취 후 5℃와 -20℃에 보존하면서 채취일, 3일후 및 7일후에 효소활성도의 변화를 조사하여 F-test에 의해 보존온도와 보존기일에 따르는 효소활성도의 차이를 비교하였다.

시간별 변화 : 2두의 소에 대해 24시간 뇨를 채취하되 6시간 간격으로 분획뇨를 채취하여 gel-filtration한 후 뇨중 효소활성도를 측정하여 비교하였다.

정상범위 : 45두의 홀스타인종 암소의 뇨를 오전 6시부터 7시 사이에 채취하여 gel-filtration한 후 뇨효소의 활성도를 측정하였다.

결 과

γ -GTP활성도 측정에 있어서 효소반응의 산물

인 p-nitroaniline에 의해 생성되는 색소의 흡광도는 545nm에서 최대이었으며 기질인 γ -glutamyl-p-nitroanilide는 495~595nm의 범위내에서 거의 흡광도를 나타내지 않아서 545nm에서 흡광도를 측정하는 것이 적합한 것으로 나타났다 (Fig 1).

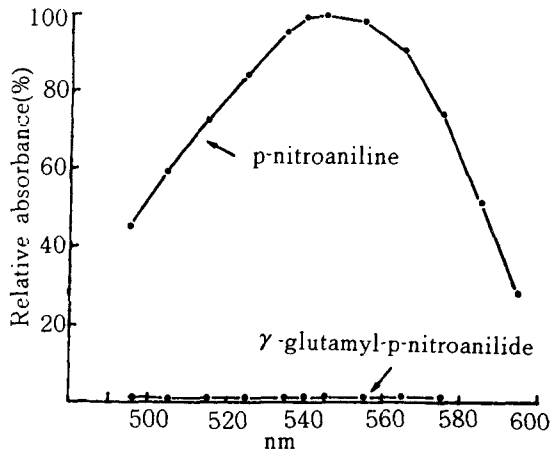


Fig. 1. Absorption spectra of colors produced by p-nitroaniline(0.2 μ mol) and γ -glutamyl-p-nitroanilide(4.4mmol)

γ -GTP측정에 있어서 glycyglycine을 함유한 Tris-HCl 완충액의 pH는 7.6~7.8일때 최대의 활성도를 나타냈다(Fig 2).

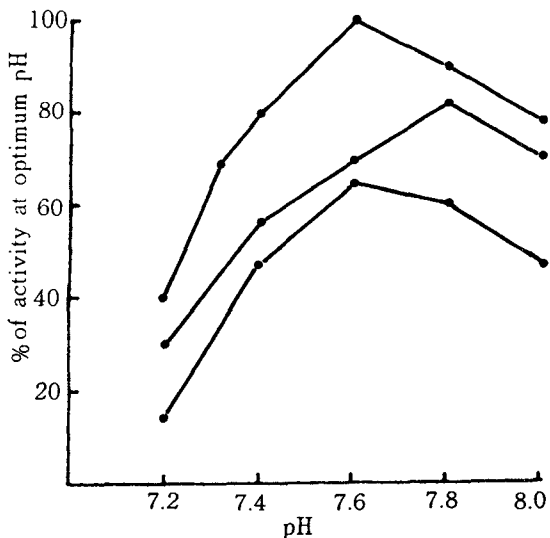


Fig. 2. Effect of pH of glycyglycine-Tris-HCl buffer on γ -glutamyltranspeptidase activities in three different urines.

γ -GTP활성도 측정에 있어서 기질의 농도에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 3과 같았으며 이 성적을 근거로 하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 Michaelis constant는 0.77~0.91 mmol/l이었다(Fig 4).

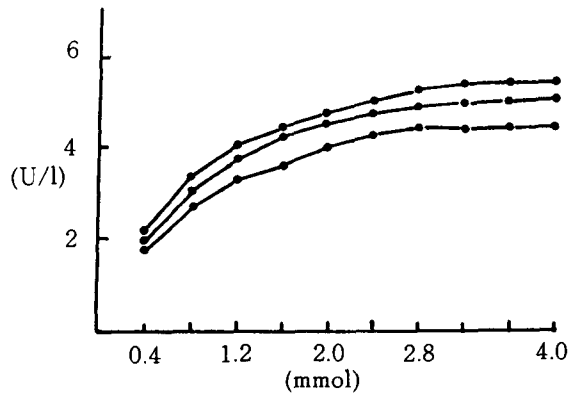


Fig. 3. Effect of variation of γ -glutamyl-p-nitroanilide concentration on activities of γ -glutamyltranspeptidase in three different urines.

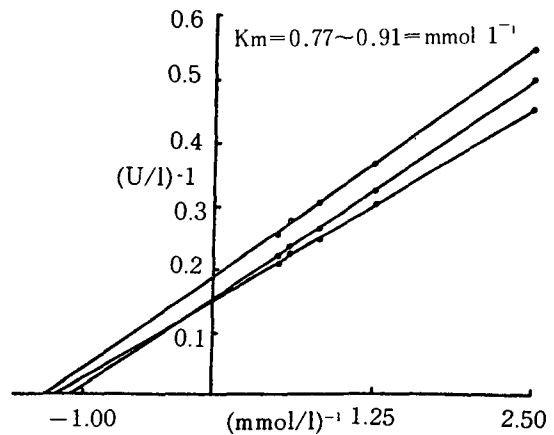


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of data show in Fig. 3.

AGS활성도 측정에 있어서 효소반응의 산물인 p-nitrophenol의 흡광도는 405nm에서 최대이었으며 기질인 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide의 흡광도는 405nm에서 0.068로 거의 무시할 정도이므로 405nm에서 흡광도를 측정하는

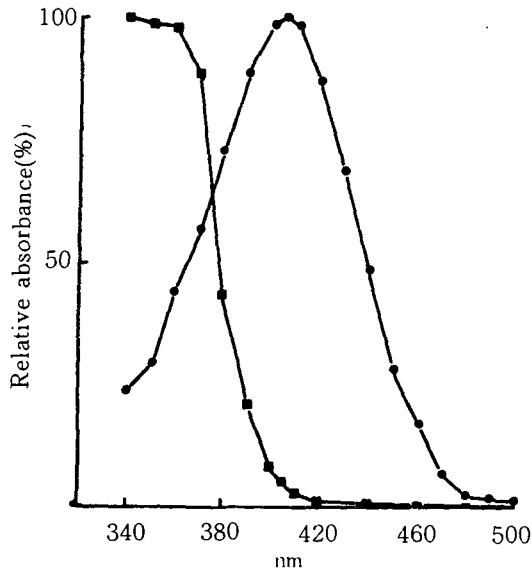


Fig. 5. Absorption spectra of p-nitrophenol (●—●, 10 μmol) and 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (■—■, 3.3mmol).

것이 적합한 것으로 나타났다(Fig 5).

AGS활성도 측정에 있어서 citrate 완충액의 pH는 4.0일때 가장 높은 활성도를 나타내었다 (Fig 6).

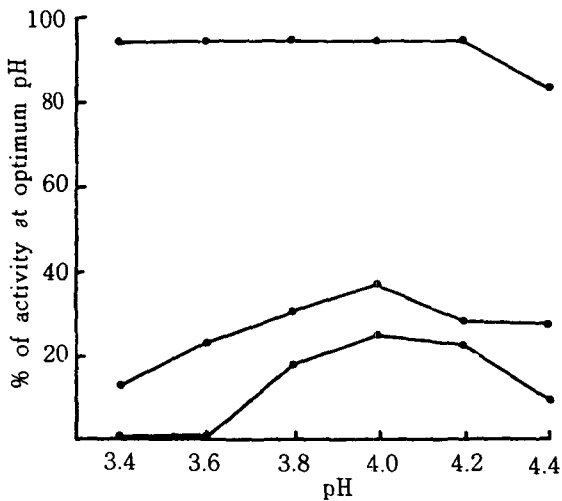


Fig. 6. Effect of pH of citrate buffer on N-acetyl-β-D-glucosaminidase activities in three different urines.

AGS활성도 측정에 있어서 기질농도에 변화에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 7과 같았으며 이 성적을 근거로하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 Michaelis constant는 0.67~1.00mmol/l이었다(Fig 8).

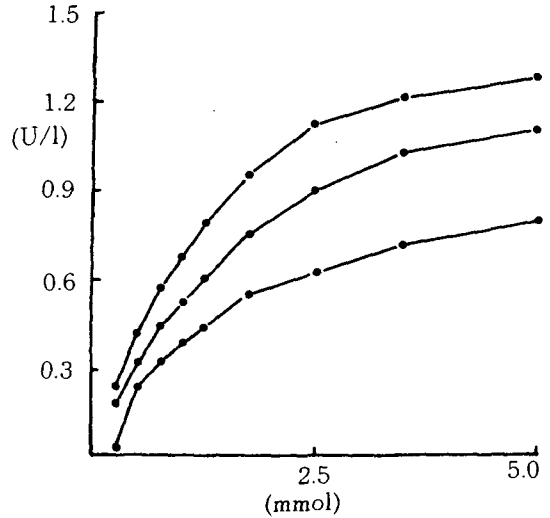


Fig. 7. Effect of variation of 4-nitrophenyl-β-D-glucosaminide concentration on activities of N-acetyl-β-D-glucosaminidase in three different urines.

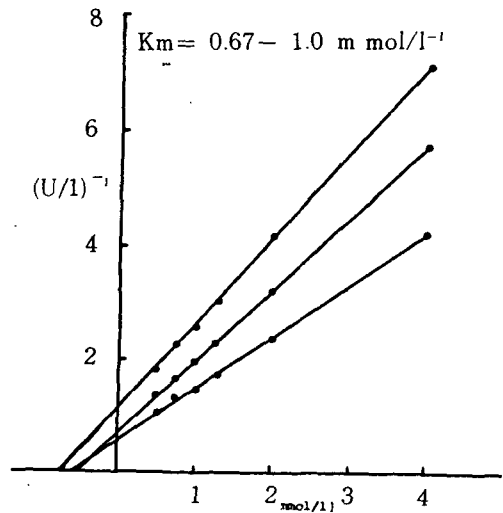


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of data shown in Fig. 7.

AAP활성도 측정에 있어서 효소반응의 산물인 p-nitroaniline의 흡수곡선은 370nm와 390nm에서 두 개의 peak를 나타냈으며 기질인 L-alanine-p-nitroanilide의 흡광도는 400nm부터 무시할 정도로 낮았다(Fig 9).

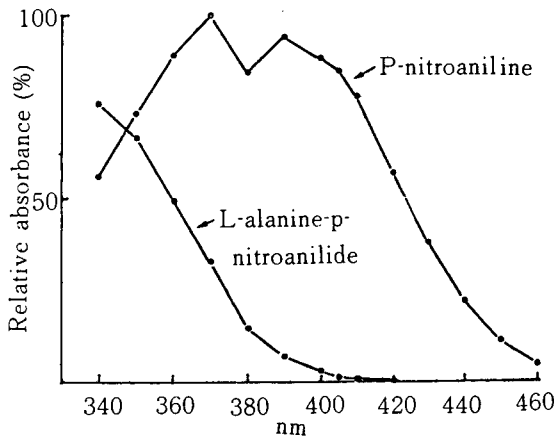


Fig. 9. Absorption spectra of p-nitroaniline(0.1 μ mol) and L-alanine-p-nitroanilide(1.66 mmol). %

AAP활성도 측정에 있어서 2두의 소의 뇨는 phosphate 완충액의 pH가 7.8일때 가장 높은 활성도를 나타내었고 1두의 소의 뇨는 pH8.2에서 가장 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 10)

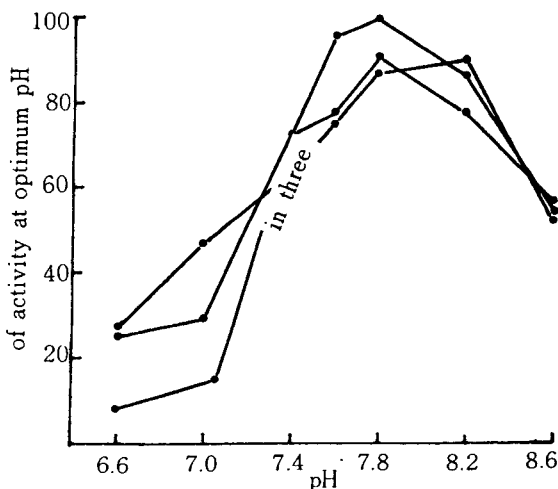


Fig. 10. Effect of pH of phosphate buffer on urinary alanine aminopeptidase activities in three different urines.

AAP활성도 측정에 있어서 기질농도의 변화에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 11과 같았으며 이 성적을 근거로 하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 Km치는 0.38~0.48mmol/였다 (Fig. 12).

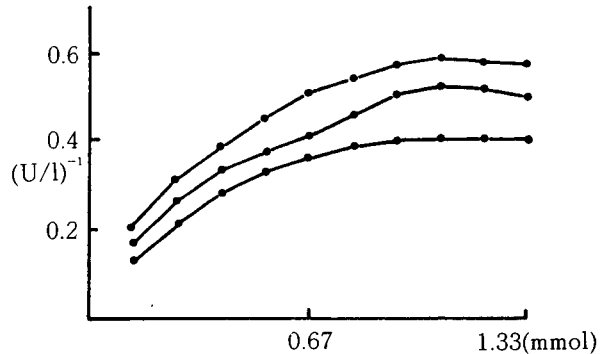


Fig. 11. Effect of variation of L-alanine-p-nitroanilide concentration on activities of alanine aminopeptidase in three different urines.

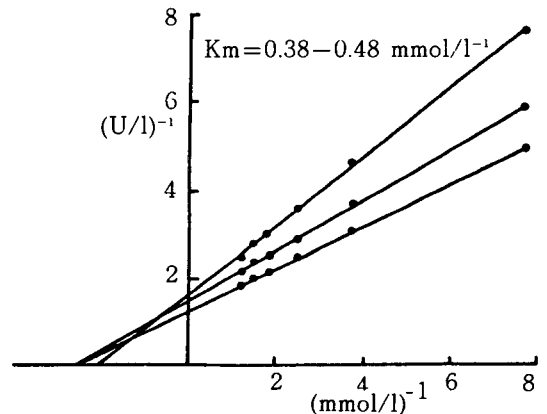


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of data shown in Fig 11.

9두의 소의 뇨에 대해 gel-filtration한 시료와 gel-filtration안한 시료로 구분하여 γ -GTP활성도를 측정된 결과 gel-filtration한 시료는 4.47 ± 1.94 U/l(평균±표준편차)를 나타내었고, gel-filtration안한 시료는 1.94 ± 2.15 U/l를 나타내어서 gel-filtration한 시료가 안한 시료보다 유의성있게 ($p < 0.05$) 높은 활성도를 나타내었고, gel-filtration에 의한 활성도 증가의 정도에는 개체차이가 심하였다(Table 1).

Table 1. Effect of Gel-filtration on Gamma-glutamyltranspeptidase Activity in bovine Urine

Animal No	(U/l)		
	Before gel-filtration	After gel-filtration	Difference (%)
1	6.35	3.01	-52.6
2	0.94	4.14	+340.4
3	4.71	4.82	+2.3
4	0.24	6.01	+2404.2
5	1.18	7.20	+510.2
6	0.94	2.42	+157.4
7	0.30	2.42	+706.7
8	0.71	3.01	+323.9
9	2.12	7.23	+241.0
Mean	1.94	4.47	
SD	2.15	1.95	

AGS활성도에 있어서는 gel-filtration한 시료가 2.25 ± 0.25 U/l이었고, gel-filtration안한 시료는 1.33 ± 0.16 U/l로서 gel-filtration한 시료가 안한 시료보다 유의성 ($p < 0.01$) 있게 높은 AGS활성도를 나타냈으며 개체별로 gel-filtration한 시료 모두가 안한 시료보다 높은 AGS활성도를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Effect of Gel-filtration on N-acetyl-β-D-glucosaminidase Activity in bovine Urine

Animal No	(U/l)		
	Before gel-filtration	After gel-filtration	Difference (%)
1	1.52	2.01	+32.2
2	1.35	2.22	+64.4
3	1.41	2.62	+85.8
4	1.34	2.21	+64.9
5	1.48	2.69	+81.8
6	1.38	2.06	+49.3
7	0.99	1.98	+100.0
8	1.29	2.24	+73.6
9	1.21	2.26	+86.8
Mean	1.33	2.25	
SD	0.16	0.25	

AAP활성도 측정에 있어서는 gel-filtration하지 않은 시료는 반응도중 모두 혼탁되어 측정이 불가능하였다.

3두의 소의 뇨에 대해 γ-GTP활성도를 10회 반복 측정된 결과 변이계수는 4.8~7.2%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

Table 3. Within-run Imprecision

	(U/l)			
		gamma-glutamyl transpoptidase	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	Alanine-aminopeptidase
Animal 1	X	12.99	0.51	1.24
	SD	0.94	0.02	0.06
	CV(%)	7.2	3.9	4.8
	N	10	10	10
Animal 2	X	15.77	0.58	1.20
	SD	0.76	0.03	0.03
	CV(%)	4.8	5.2	2.5
	N	10	10	10
Animal 3	X	14.50	0.33	1.39
	SD	0.84	0.02	0.05
	CV(%)	5.8	6.1	3.6
	N	10	10	10

3두의 소의 뇨에 대해 AGS활성도를 10회 반복 측정된 결과 변이계수는 3.9~6.1%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다 (Table 3).

3두의 소의 뇨에 대해 AAP활성도를 10회 반복 측정된 결과 변이계수는 2.5~4.8%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다 (Table 3).

gel-filtration한 뇨중의 γ -GTP활성도는 5°C와 -20°C에서 보존했을때 채취후 7일까지는 채취일에 비해 통계적인 유의차를 나타내지는 않았으나 개체별로는 무시할수 없는 증감을 나타내는 것이

있고 그 증감의 경향도 일정하지 않았다(Table 4).

gel-filtration한 뇨중의 AGS활성도는 5°C와 -20°C에서 보존했을때 채취후 7일까지는 채취일에 비해 통계적인 유의차를 나타내지 않았고 개체별로 특별히 증감을 나타내는 것이 없었다(Table 5).

gel-filtration한 뇨중의 AAP활성도는 5°C와 -20°C에서 보존했을때 채취후 7일까지는 채취일에 비해 통계적인 유의차를 나타내지 않았으나 채취후 3일에는 채취일에 비해 약간 증가하고 채취후 7일에는 약간 감소하지만 채취일의 수준에 비해

Table 4. Change of Urine Gamma-glutamyltranspeptidase Activity During Storage at 5°C and -20°C (U/l)

Animal No	Day 0	3 Days after collection		7 Days after collection	
		5°C	-20°C	5°C	-20°C
1	2.0	2.3	0.8	2.3	1.1
2	5.6	6.4	10.9	6.0	2.3
3	3.0	4.5	2.3	2.3	2.3
4	4.4	6.4	4.5	3.8	4.5
5	4.5	7.5	4.5	4.5	5.3
6	4.1	5.3	4.1	3.4	4.9
7	6.8	7.5	6.0	4.5	5.6
8	6.8	7.2	5.3	6.0	5.6
Mean	4.7	5.9	4.8	4.1	4.0
SD	1.7	1.8	3.0	1.4	1.8

Table 5. Change of Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity During Storage at 5°C and -20°C (U/l)

Animal No	Day 0	3 Days after collection		7 Days after collection	
		5°C	-20°C	5°C	-20°C
1	0.78	0.81	0.92	0.68	1.03
2	0.45	0.57	0.59	0.57	0.49
3	0.68	0.75	0.79	0.85	0.91
4	0.37	0.37	0.57	0.43	0.59
5	0.94	0.98	1.09	0.89	1.01
6	1.00	1.03	1.11	1.09	1.01
7	1.87	1.83	1.92	1.94	1.88
8	0.62	0.68	0.68	0.68	0.60
Mean	0.84	0.88	0.96	0.89	0.94
SD	0.47	0.44	0.44	0.47	0.44

Table 6. Change of Urine alanine Aminopeptidase Activiy During Storage at 5°C and -20°C (U/l)

Animal No	Day 0	3 Days after collection		7 Days after collection	
		5°C	-20°C	5°C	-20°C
1	0.77	1.08	1.15	0.87	0.84
2	1.41	2.19	2.22	1.85	1.82
3	1.18	1.95	1.85	1.51	1.41
4	1.72	2.59	2.43	2.22	2.05
5	1.75	2.46	2.33	1.99	1.92
6	1.38	2.22	2.02	1.92	1.79
7	2.22	3.03	3.03	2.56	2.59
8	1.88	2.66	2.56	2.53	2.19
Mean	1.54	2.27	2.20	1.93	1.83
SD	0.45	0.58	0.55	0.55	0.52

Table 7. Activities of Urine Enzymes at Different Time of a Day in Two Cows (U/l)

Animal No	1			2		
	γ -GTP	AGS	AAP	γ -GTP	AGS	AAP
12:00~18:00	10.91	3.78	1.71	3.01	0.94	0.67
18:00~24:00	11.30	3.14	1.58	5.65	2.82	1.31
0:00~06:00	6.40	2.58	1.49	3.76	3.04	1.34
06:00~12:00	7.15	2.96	1.62	3.76	2.77	1.28

서는 다소 높은 활성도를 유지하였다(Table 6).

2두에 대해 6시간 간격으로 분획뇨를 채취하여 γ -GTP, AGS, AAP의 활성도를 측정된 결과 채취시간대에 따르는 일정한 변화의 경향은 알 수 없었다(Table 7).

45두의 홀스타인종 암소의 뇨를 오전 6시부터 7시 사이에 채취하여 gel-filtration한후 γ -GTP, AGS 및 AAP의 활성도를 측정된 결과 γ -GTP는 $6.60 \pm 3.26(2.36 \sim 14.50)U/l$ 이었고, AGS는 $1.31 \pm 0.81(0.33 \sim 3.78)U/l$ 이었으며 AAP는 $1.73 \pm 0.55(0.77 \sim 3.03)U/l$ 이었다.

고 찰

소의 뇨중의 γ -GTP활성도 측정의 기본적인 방법에 있어서 효소반응의 생성물인 p-nitro-aniline에 의해 생성된 색은 545nm에서 최대흡광도를 나타내었고 기질은 545nm에서 거의 흡광

도를 나타내지 않아서 545nm에서 측정하여야 최대활성도를 측정할수 있는 것으로 나타났는데 이 결과는 Naftalin 등¹⁹⁾이 540nm에서 측정된 것과 대동소이한 결과이었다.

glycylglycine을 함유한 Tris-HCl완충액의 pH가 뇨중 γ -GTP활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 7.6(37°C)에서 가장 높은 활성도를 나타내었는데 이 결과는 Naftalin 등¹⁹⁾이 사람 혈청중의 γ -GTP측정에 있어서 pH 7.8이 가장 적합하다고 한 것과는 약간의 차이를 나타내었다.

γ -glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용했을 때 γ -GTP의 Michaelis constant는 0.77~0.91mmol/l이었으며 γ -glutamyl-p-nitroanilide는 실온에서 4mmol/l밖에 용해되지 않으며 4.4mmol/l의 과포화용액은 3일간만 용액상태를 유지할수 있기 때문에 기질의 농도를 Michaelis constant의 10배로 유지하기는 곤란하다. Naf-

taline 등¹⁵⁾은 22mg/10ml(8.3mmol/l에 해당)의 과산화용액을 만든후 냉각시켜서 석출되는 기질을 여과해서 제거한후 사용할 것을 권장하지만 이 경우 냉각온도와 냉각시간에 따라 석출하는 기질의 양에 차이가 있으며 실험오차의 범위가 커서 재현성이 낮을 위험이 있다. 저자는 4.4mmol/l 용액을 사용하여 재현성을 조사한 결과 10회 반복측정의 변이계수는 4.8~7.2%이었고 F-검정결과 반복간에 유의성이 인정되지 않아서 기본적인 γ -GTP측정방법에 있어서 기질액의 농도를 4.4mmol/l로 결정하는 것이 무난하다고 판단되었다.

소의 뇨중의 AGS활성도 측정의 기본적인 방법에 있어서 효소반응의 생성물질인 p-nitrophenol의 흡광도는 405nm에서 최대이었고 기질은 405nm에서 흡광을 거의 하지 않아서 405nm에서 측정하는 것이 적합한 것으로 나타났으며 이 결과는 Maruhn¹⁶⁾과 Knoll 등¹⁴⁾이 405nm에서 측정한 것과 일치하는 것이다.

citrate완충액의 pH가 뇨중 AGS활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 3.6에서 최대의 활성도를 나타내었다. Maruhn¹⁶⁾은 사람의 뇨중 AGS활성도를 pH 4.15에서 측정하고 Knoll 등¹⁴⁾은 pH 4.4에서 측정한 것과는 다른 결과인데 이것은 동물종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide를 기질로 사용했을때 AGS의 Michaelis constant는 0.67~1.00mmol/l이었으며 이 실험에서의 기질액의 농도는 용해의 제한성¹⁶⁾ 때문에 10mmol/l로 하였고 그 결과 반응액내 기질의 최종농도는 5mmol/l이었으며 이 농도는 Michaelis constant의 10배를 충족시키지 못하는 것이 었다. 따라서 실험오차가 클 가능성을 가정하여 재현성을 조사한 결과, 10회 반복측정의 변이계수는 3.9~6.1%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의성이 인정되지 않아서 기질의 농도를 10mmol/l로 하는 것은 무난한 것으로 판단하였다.

AAP활성도 측정에 있어서 효소반응산물인

p-nitroaniline의 흡수곡선은 370과 390nm에서 두 개의 peak를 나타냈으나 이 파장에서는 기질인 L-alanine-p-nitroanilide의 흡광도가 높기때문에 부적합하며 400nm에서 색소의 흡광도는 높고 기질의 흡광도는 무시할 정도이므로 400nm에서 흡광도를 측정하는 것이 적합한 것으로 사료된다. phosphate완충액의 pH는 7.8이 적당한 것으로 나타났다.

AAP활성도 측정에 있어서 Mondorf 등¹⁸⁾은 파장을 450nm로 하고 완충액의 pH는 7.6으로 하여 측정하였는데 이러한 조건의 근소한 차이는 실험동물과 실험실조건의 차이에서 기인된 것으로 사료된다.

L-alanine-p-nitroanilide를 기질로 사용할때 AAP의 Km치는 0.38~0.48mmol/l이었으며 이 실험에서 Crowell 등⁹⁾에 준하여 사용한 기질의 최종농도는 1.1mmol/l 었다. 이 실험에서 기질의 최종농도가 Km치의 10배를 충족시키지 못하기 때문에 반복측정에 따르는 재현성이 낮을 위험성을 의심할수 있다. 그래서 3두의 소의 뇨에 대해 10회 반복하여 AAP활성도를 측정하여 반복간의 변이계수를 조사한 결과 2.5~4.8%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의성이 없었으므로 재현성은 좋은 것으로 판단되었다.

이 실험에서 gel-filtration한 시료중의 γ -GTP활성도는 평균 4.47 \pm 1.95U/l이었고, gel-filtration을 하지 않은 시료중의 γ -GTP활성도는 1.94 \pm 2.15U/l로서 gel-filtration은 소의 뇨중 γ -GTP의 활성도를 현저히 증가시켰는데 이것은 소의 뇨중에 γ -GTP inhibitor가 많이 존재하는 것을 의미하며 측정전에 반드시 gel-filtration을 하여야 함을 시사하는 것이라고 사료된다.

또한 gel-filtration안한 시료의 평균 AGS활성도는 1.33 \pm 0.16 U/l이고 gel-filtration한 시료의 평균 AGS활성도는 2.25 \pm 0.25U/l로서 gel-filtration한 시료의 AGS활성도가 유의성 있게 높았으며 개체별로도 gel-filtration한 시료 모두가 하지 않는 시료보다 높은 활성도를 나타내었는데

이 성적은 소의 뇨중의 AGS inhibitor가 gel-filtration에 의해 제거되었기 때문으로 생각되며 개체마다 gel-filtration에 의한 AGS활성도 증가의 정도가 다르기 때문에 측정전에 반드시 gel-filtration해야 될 것으로 판단되었으며 Berscheid 등³⁾과 Werner 등²⁸⁾의 보고와 일치하는 결과이다.

한편 gel-filtration을 하지 않은 시료는 AAP활성도를 측정할때 혼탁이 생겨서 측정이 불가능하기 때문에 사전에 gel-filtration을 하지 않으면 안되는 것으로 사료된다.

gel-filtration한 소의 뇨를 5°C와 -20°C에서 각각 보존하면서 채뇨후 3일후와 7일후에 γ -GTP, AGS 및 AAP활성도의 변화를 조사한 결과 통계적으로 세가지 효소가 모두 채취후 7일까지는 보존온도와 보존기일에 영향을 받지 않는 것으로 나타났지만 개체에 따라서는 γ -GTP와 AAP활성도가 무시할수 없는 증감을 나타내는 것이 있으므로 채취후 일정시간 이내에 측정을 완료하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 한편 AGS는 뇨를 5°C 또는 -20°C에 보존할 경우 최소한 7일간은 보존이 활성도에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

뇨중 효소의 활성도는 채뇨시간에 따라 차이가 나기때문에 24시간 뇨중으로 배설되는 효소량을 측정하는 것이 정확한 진단을 위해 이상적이지만 소와 같은 대동물은 대사 cage를 사용하여 24시간 뇨를 채취하기는 너무 비용이 많이 들고, Foley catheter를 사용할 경우 계속 사용하면 尿路로부터 출혈이 되어 혈액이 혼재하는 단점이 있어서 24시간 뇨를 채취하여 진단에 이용하기는 현실적인 어려움이 있다. 그러므로 대동물에서는 임의적인 시간에 채취한 뇨중의 효소활성도가 정상범위보다 훨씬 높을때 비로서 뇨효소를 이용한 진단이 가능할 것으로 사료된다.

결 론

소의 뇨중으로 배설되는 γ -GTP, AGS 및

AAP의 활성도 측정에 필요한 적합한 조건을 조사하여 측정방법을 정립하고, *in vitro*에서의 안정성, 精度, 정상범위 등을 조사한 결과 다음과 같았다.

1. γ -GTP활성도 측정에 있어서 파장은 545nm에서 측정하는 것이 최대흡광도를 나타내었다.

2. glycylglycine을 함유한 Tris-HCl완충액의 pH는 7.6~7.8(37°C)일때 최대의 활성도를 나타내었다.

3. 기질로서 γ -glutamyl-p-nitroanilide용액의 농도를 4.4mmol/l로 하여 γ -GTP활성도를 측정하였을때 10회 반복측정의 변이계수는 4.8~7.2%이었고 반복간에 유의성은 인정되지 않았다.

4. AGS활성도 측정에 있어서 파장은 405nm에서 측정하는 것이 최대흡광도를 나타내었다.

5. citrate완충액의 pH는 4.0(37°C)일때 최대의 AGS활성도를 나타내었다.

6. 기질로서 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 용액의 농도를 10mmol/l로 하여 AGS활성도를 측정하였을때 10회 반복측정의 변이계수는 3.9~6.1%이였으며 반복간에 유의성은 인정되지 않았다.

7. AAP활성도 측정시 최적파장은 400nm이었다.

8. AAP활성도 측정시 phosphate 완충액의 최적 pH는 7.8이었다.

9. 기질로서 L-alanine-p-nitroanilide 용액의 농도를 1.66mmol/l로 하여 AAP활성도를 측정하였을때 10회 반복측정의 변이계수는 2.5~4.8%이였으며 반복간에 유의성은 인정되지 않았다.

10. gel-filtration은 γ -GTP와 AGS의 활성도를 현저히 증가시켰다.

11. gel-filtration을 하지 않은 소의 뇨는 혼탁으로 인해 AAP측정이 불가능하였다.

12. AGS활성도는 5°C와 -20°C에 보존할 경우 채뇨후 7일간 변화가 없었다.

13. γ -GTP와 AAP활성도는 5°C와 -20°C에 보

존할 경우 통계적으로 채뇨후 7일간 변화가 없지 만 개체에 따라서는 증감을 나타내는 것이 있다.

14. γ -GTP, AGS 및 AAP활성도는 채뇨시간에 따라 변이를 나타내었다.

15. 소의 뇨중 γ -GTP, AGS 및 AAP의 정상치는 각각 6.60 ± 3.26 (2.36~14.50), 1.31 ± 0.81 (0.33~3.78), 1.73 ± 0.55 (0.77~3.03)U/l이었다.

참 고 문 헌

1. Bahre, G., Kley, R. and Brass, H. : Die Aktivitaet der γ -Glutamyl-Transpeptidase im 24-Stunden-Urin bei verschiedenen Nephropathien. Dt. Med. Wochenschr.(1974) 99 : 2214~2218.
2. Benjamin, M.M. : Outline of Veterinary Clinical Pathology. 3rd ed. Iowa State Univ. Press, Ames.(1978) pp.175~212.
3. Berscheid, G., Groetsch, H., Hropot, M. and Klaus, E. : Enzymuria of the Rat : Thd Preparation of Urine for Enzyme Analysis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.(1983) 21 : 799~804.
4. Brogren, C.H., Christensen, J.M. and Rasmussen, K. : Occupational Exposure to Chlorinated Organic Solvents and its Effect on the Renal Excretion of N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase. Arch. Toxicol., Suppl.(1986) 9 : 460.
5. Crowell, V.A., Divers, T.J., Byars, T.D., Marshall, A.E., Nusbaum, I.E. and Larsen, L. : Neomycin toxicosis in calves. Am. J. Vet. Res.(1981) 42 : 29~34.
6. Dieppe, P.A. and Doyle, D.V. : Renal damage during treatment with antirheumatic drugs. Br. Med. J.(1978) September : 664.
7. Dierickx, P.J. : Urinary Gamma-Glutamyl Transferase as an Indicator of Acute Nephrotoxicity in Rats. Arch. Toxicol.(1981) 47 : 209~215.
8. Gibey, R., Dupond, J.L. and Alber, D. *et al* : Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase(NAG), alanineaminopeptidase(AAP) and beta-2-microglobulin(β_2M) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. Clinica Chimica Acta.(1981) 116 : 25~34.
9. Gordon, J.A. Gattone, V.H. and Scholwerth, A.C. : γ -Glutamyl Transpeptidase Excretion in Cisplatin-Induced Acute Renal Failure. Am. J. Kid. D.(1986) 8 : 18~25.
10. Groetsch, H. and Mattenheimer, H. : Urine in Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim.(1981) pp.42~49.
11. Grosman, M.E. *et al* : Alterations in Renal Function Induced by Aflatoxin B₁ in the Rat. Toxicol. Appl. Pharmacol.(1983) 69 : 319~325.
12. Ito, M., Nagamatsu, T. and Suzuki, Y. : Pharmacological Studies on Experimental nephritic Rats(9). Changes in Activities of Urinary Enzymes in the Modified Type of Masugi's Nephritis and Their Sources. Japan J. Pharmacol.(1980) 30 : 471~479.
13. Kaneko, J.J. : Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press, New York(1980) pp.337~400.
14. Knoll, V.E. and Rautenstrauch, H. : Vergleichende Untersuchung zur diagnostischen Wertigkeit von Diskelektrophorese der Urinproteine und N-Acetylglucosaminidase ausscheidung zur Erkennung von tubularen Nierenschadigungen bei chronischer Polyarthrit. J. Clin. Chem. Clin. Bioc-

- hem.(1980) 18: 53~58.
15. Lineweaver, H. and Burk, D.: Determination of Exzyme Dissociation Constants. *J.Am. Chem. Soc.*(1934) 56: 658.
 16. Maruhn, D.: Rapid Colorimetric Assay of β -Galactosidase and N-Acetyl- β -Glucosaminidase in Human Urine. *Clin., Chim. Acta.* (1976) 73: 453.
 17. Mattenheimer, H.: Enzymes in the Urine. *Medical Clinics of North America.*(1971) 55: 1493~1508.
 18. Mondorf, A.W., Breier, J., Hendus, J., Scherberich, J.E., Machenrodt, G., Shah, P.M., Stille, W. and Schoeppe, W.: Effect of aminoglycosides on proximal tubular membranes of the human kidney. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*(1978) 13: 133~142.
 19. Naftalin, L., Sexton, M., Whitaker, J.F. and Tracey, D.: A routine procedure for estimating serum γ -glutamyltranspeptidase activity. *Clin. Chim. Acta.* (1969) 26: 293~296.
 20. Pfeleider, G.: *Methods in enzymology*(1970) Vol. 19. Academic Press, New York. pp.514~521.
 21. Pierce, R.J., Price, R.G. and Fowler, J.S.L.: The Effect of Cadmium Administration on Activities of Enzymes in the Urine of the Rat and Marmoset. *Biochem. Soc. Trans.*(1975) 5: 238.
 22. Plummer, D.T., Noorazar, S., Obatomi, D.K. and Haslam, J.D.: Assesment of Renal Injury by Urinary Enzymes. *Uremia Investigation.* (1985~86) 9: 97.
 23. Roberts, M.C. and Seawright, A.A.: Some effects of chronic mercury chloride intoxication on renal function in a horse. *Vet. Hum. Toxicol.*(1982) 24: 415~419.
 24. Schmidt, E. and Schmidt, F.W.: γ -Glutamyltranspeptidase. *Dtsch. Med. Wschr.*(1973) 98: 1573~1578.
 25. Shaw, F.D.: The effect of mercuric chloride intoxication on urinary γ -glutamyltranspeptidase excretion in the sheep. *Res. Vet. Sci.*(1976) 20: 226~228.
 26. Thiele, K.G.: γ -Glutamyltranspeptidase Aktivitaet im Urin Bei Gesunden und Nierenkranken. *Klin. Wochenschr.*(1973) 51: 339~345.
 27. Wellwood, J.M., Ellis, B.G., Price, R.G., Hammond, K., Thompson, A.E. and Jones, N.F.: Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activities in Patients with Renal Disease. *Br. Med. J.*(1975) 3: 408~411.
 28. Werner, M., Maruhn, D. and Atoba, M.: Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes. *J. Chromatog.*(1969) 40: 254~263.
 29. 花田繁子: 腎疾患における尿中ならびに腎組織の γ -GTP 活性について. *日腎誌.*(1982) 24: 1009~1028.
 30. 副島昭典, 長澤俊彦: 尿中 NAG isoenzymeの分劃測定と, 腎症患におけるその測定の臨床的意義. *日内會誌.*(1984) 73: 1140~1148.

Measurement of Urine Enzymes for the Early Diagnosis of Nephrosis in Ruminants

1. Optimal Conditions for Measurement of Enzyme Activities and Normal Ranges

Chang-Woo Lee D. V. M., Ph. D. and Kyoung-Kap Lee D. V. M., M. S,
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

Present experiment was performed to establish the optimal reaction conditions for measurement of urinary gamma-glutamyltranspeptidase(γ -GTP), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (AGS) and alanine aminopeptidase(AAP) activities in bovine and to investigate *in vitro* stability of the enzymes, within-run imprecision of the methods, and normal ranges.

1. The optimal wavelength for measurement of γ -GTP activity was 545nm.
2. The optimal pH of Tris-HCl buffer containing glycylglycine for measurement of urinary γ -GTP activity was 7.6~7.8(37°C).
3. Coefficient of variance for within-run imprecision of urinary γ -GTP activity ranged from 4.8 to 7.2% and there was no significant difference among replications,
4. The optimal wavelength for measurement of urinary AGS activity was 405nm.
5. The optimal pH of citrate buffer for measurement urinary of AGS activity was 4.0(37°C).
6. Coefficient of variance for within-run imprecision of urinary AGS activity ranged from 3.9 to 6.1% and there was no significant difference among replications.
7. The optimal wavelength for measurement of urinary AAP activity was 400nm.
8. The optimal pH of phosphate buffer for measurement of urinary AAP was 7.8.
9. Coefficient of variance for within-run imprecision of urinary AAP activity ranged from 2.5 to 4.8% and there was no significant difference among replications.
10. γ -GTP and AGS activities were increased significantly by gel-filtration.
11. Turbidity interfered with measurement of urinary AAP activity in bovine unless the specimen was gel-filtered.
12. Preservation of the specimen at 5°C or -20°C did not affect the AGS activity at least for 7 days after collection.
13. Preservation of the specimen at 5°C or 20°C did not affect the γ -GTP and AAP activities statistically, but some individual specimens revealed fluctuation during preservation.
14. γ -GTP, AGS and AAP activities revealed fluctuation by the time of the day when the specimen was collected.
15. The normal ranges of urinary γ -GTP, AGS and AAP activities were $6.60 \pm 3.26(2.36-14.50)$, $1.31 \pm 0.81(0.33-3.78)$, and $1.73 \pm 0.55(0.77-3.03)U/l$, respectively.