

전북지역 한우의 red cell fragility와 glutathione peroxidase활성에 관한 연구

조 중 후 · 이 성 희

전북대학교 수의과대학

(1990. 3. 31 접수)

Studies on red cell fragility and glutathione peroxidase activities in Korean native cattle of Chonbuk region

Jong-hoo Cho, Seong-hee Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Mar 31, 1990)

Abstract: The tests related to red cell fragility were performed. Samples of blood anticoagulated with heparin were obtained from Korean native cattle in Chonbuk region abattoir, and classified by the district(Kun) with reference to breeding location. Hemolysis test for red cell fragility was performed with whole blood and glutathione peroxidase activity was measured spectrophotometrically. Blood concentration of selenium, inorganic component of glutathione peroxidase, was also determined fluorophotometrically.

The results obtained were summarized as follows;

1. Percent hemolysis of erythrocytes ranged from 13.53 to 20.74%, and its mean value was low as $17.11 \pm 9.91\%$. Means in all were not district(Kun) in Chonbuk region significantly different.

2. Glutathione peroxidase activity ranged from 2,881 to 4,000mU/ml, and high mean values, $3,352 \pm 1,872$ mU/ml, reflected low percent hemolysis.

3. There was a highly negative correlation between the red cell fragility(Y) and blood glutathione peroxidase activity(X). The linear regression equation for these data was: $Y = 29.86 - 3.75X$ with a correlation coefficient of $r = -.6886$ ($p < 0.01$)

4. Blood selenium concentration ranged from 0.16 to 0.24 $\mu\text{g/ml}$, and mean values was normal level as $0.2 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$.

5. There was a highly positive correlation between blood selenium concentration(X), and blood glutathione peroxidase activity(Y). The linear regression for these data was: $Y = 230 + 15,790X$, with a correlation coefficient of $r = 0.8635$.

Key words: red cell fragility, selenium, glutathione peroxidase.

서 론

Glutathione peroxidase(GSH-Px, EC 1.11.1.9)는 H_2O_2 에 의한 세포독성을 제거하여 생체를 보호하는 효

소로서 특히 적혈구막을 보호하여 용혈을 방지하며 이 효소의 낮은 활성은 적혈구 용혈률을 증대시켜 용혈성 빈혈을 유발할 수 있는 것으로 알려졌다.

GSH-Px는 1 mole당 4 mole의 selenium을 함유하고

있는 metallic enzyme으로 조직 또는 혈중 selenium농도는 이 GSH-Px의 활성에 크게 영향을 주는 것으로 보고되었고 그외에도 여러 기관에 장애의 원인이 되는 것으로 인식되고 있다.¹

소에서 지금까지 알려진 낮은 selenium농도에 기인하는 장애는 발육부진, 근병증(myopathy), 잔유태반(retained placenta), 불임 등이다. Selenium 결핍지역에서 생산된 목초나 건초 등으로 사육된 소는 발병률이 심하다고 보고되었다. selenium 결핍지역은 세계도처에 산재하는 것으로 알려졌으며 특히 Canada, Scandinavia, Australia, New Zealand 및 미국의 일부지방이 결핍지역으로 보고되었다.³ selenium 결핍지역의 확인은 토양검사와 가축체내의 selenium함량 측정으로 가능하다. 그러나 조직 또는 혈액중의 selenium농도의 측정은 매우 복잡하고 시간이 많이 소요되므로 selenium 농도를 간접 추정할 수 있는 GSH-Px활성 측정법의 활용 가능성이 연구되어 왔다.^{2,3,4}

Allen et al,¹ Thompson et al³, Scholz et al⁵ 및 Stevens et al⁶ 등은 selenium농도와 GSH-Px활성간에 높은 상관성이 있음을 보고하였으며 selenium농도의 추정을 위한 GSH-Px활성 측정의 효율성을 확인시켜 주었다.

본 연구는 가축의 종류와 품종에 따라 GSH-Px활성이 다르다는 보고와 국내에서 selenium함량이 조사된 지역이 없는 것에 유념하여 전북지역을 각 지방별로 세분하여 한우를 대상으로 GSH-Px활성과 관련된 시험을 수행하였다. 즉 혈중 GSH-Px활성과 selenium농도를 측정하여 유효농도를 유지하고 있는지를 규명하고, 아울러 적혈구 용혈률을 측정하여 GSH-Px활성과의 상관성, selenium농도와 GSH-Px활성과의 상관성을 밝혀 selenium농도가 한우에 영향을 주고 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험동물과 혈액의 채취 : 전북지역의 전주도축장과 이리도축장에 계류중인 한우로서 건강하게 보이는 성우를 암수 구별없이 채혈의 대상으로 하였다. 시험혈액은 경정맥으로부터 채혈하여 heparin항 응고 혈액을 만들어 실험실에 운반하여 즉시 실험하였다. 실험결과는 실험 대상우를 사육지별로 구분하여 통계처리 하였다.

혈액 GSH-Px활성의 측정 : 혈중 GSH-Px활성은 적혈구가 좌우하므로 혈액 1ml에 증류수 5ml를 가하여 용혈시킨 hemolysate을 GSH-Px활성 측정용 시험용액으로 하였다. GSH-Px활성의 측정은 Paglia and Va-

lentine⁷과 Chow and Tapple⁸의 방법을 수정하여 이용하였다. 방법을 요약하면 용량 3ml의 cell에 다음의 반응용액으로 구성하였다.

- 2.6ml 0.005M EDTA-0.05M PO₄ buffer, pH 7.0
- 0.1ml 120mM GSH
- 0.1ml 10mM NADPH
- 10 μ l 125units/mg GSH-reductase
- 0.1ml 15mg% H₂O₂
- 10 μ l 0.0375M NaNO₃
- 10 μ l hemolysate

위의 반응용액을 25°C에서 340nm에서의 1분당 흡광도 변화($\Delta A/\Delta t$)를 UV/VIS kinetics spectrophotometer (Pye Unicam PU 8610)를 사용하여 측정하였다. 효소활성의 단위는 340nm에서의 NADPH의 absorption coefficient ($1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$) 6.3×10^2 을 사용하여 혈액 1ml당 $\mu\text{mol}(mU)$ 로 계산하였다.⁹

혈중 selenium 농도 측정 : 혈중 selenium농도의 측정은 뉴질랜드 농수산부가 추천하는 형광광도법을 사용하였다.¹⁰ 방법을 요약하면 혈액 2ml를 15ml의 시험관에 취하고 5ml의 분해액(400ml 60% HClO₄+600ml HNO₃)을 가하여 100~200°C에서 분해한 후 EDTA 0.5ml를 가한다. 여기에 7M NH₄OH, 4M HClO₄를 가하여 pH 1.6~1.7로 조절한 후 10% hydroxylammonium chloride용액 0.5ml와 0.2% 2,3-diaminonaphthalene hydrochloride용액 0.5ml를 가하여 반응시킨다. 생성된 형광물질을 cyclohexane 5ml로 추출하여 excitation 366nm, emission 525nm에서 형광광도를 측정하고 표준품으로부터 작성한 표준곡선을 사용하여 혈액 ml당 selenium농도($\mu\text{g/ml}$)를 산출하였다. 이때 사용한 형광광도계는 spectrofluorophotometer(Farrand)였으며 사용된 모든 시약은 selenium을 함유하지 않은 것을 확인한 후 사용하였다.

적혈구 용혈률의 측정 : heparin을 가한 항응고혈액을 0.9% NaCl-0.6% sodium citrate용액으로 2회 세척하였다. 씻은 적혈구를 다시 0.9% NaCl과 0.05M 인산염완충액의 동량혼합액을 가하여 2.5% 적혈구 부유액을 만들어 37°C에서 15분간 incubation시켰다. 다시 원심분리하여 얻은 적혈구에 0.9% NaCl을 가하여 5% 적혈구 부유액을 만들어 Friedman et al¹¹의 방법을 수정한 조¹²의 방법에 따라 dialuric acid에 의한 적혈구용혈률을 측정하였다.

결 과

정상 한우의 적혈구 안정성을 조사하기 위하여 전북지역의 각 군에서 사육된 한우의 적혈구 용혈률을 측

Table 1. Percent hemolysis of erythrocytes and blood glutathione peroxidase activity in Korean native cattle of Chonbuk region

Districts (Kun)	No. of cattle	%hemolysis*	Glutathione peroxidase activity (mU/ml)*
Chonju city	10	20.74± 9.72	2,481± 733
Wanju	10	17.12±10.14	3,490±1,050
Okgu	10	18.17±10.27	3,720±2,315
Iksan	18	14.63±11.09	3,772±1,372
Kimje	10	13.53±10.75	4,100±2,298
Buan	10	16.02± 8.80	3,182±1,502
Chongup	29	16.60± 9.83	3,258±2,122
Imsil	10	18.54±12.90	3,837±2,493
Jinan	10	16.56± 9.01	3,578±1,340
Muju	8	15.91± 7.85	3,688±1,340
Changsu	10	20.3 ±10.11	3,487±1,053
Kochang	8	15.22± 7.80	3,702± 899
Sunchang	8	17.43± 9.02	3,381±1,100
Narawon	10	17.11± 9.91	3,242± 989
Total	161	17.11± 9.91	3,352±1,873

*Values expressed as Mean±SD.

정한 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 최저 김제군의 13.53±10.75%에서 최고 전주시의 20.74±9.72% 범위에 있었으며 전체 평균 17.11±9.91%로 높은 적혈구 안정성을 유지하였으며 지역간에 유의차는 없었다.

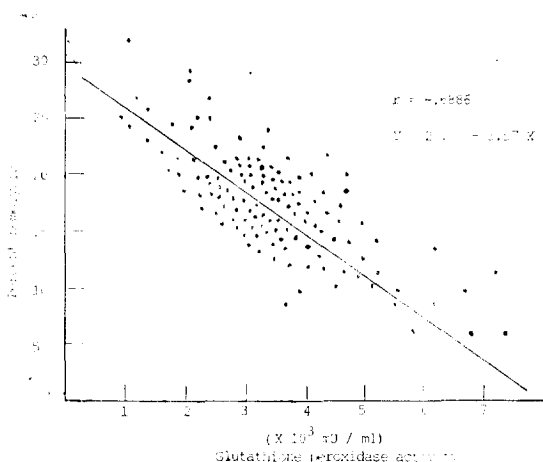


Fig 1. Correlation between percent hemolysis and blood glutathione peroxidase activity in Korean native cattle of Chonbuk region.

적혈구 용혈률에 직접적으로 영향을 주는 효소인 GSH-Px의 활성은 Table 1에서와 같이 김제군에서 가장 높은 4,100±2,298mU/ml였고 전주에서 가장 낮은 2,881±733mU/ml로 전체 평균 3,352±1,872mU/ml로서 대체로 높은 활성을 보였으며 지역간 유의차는 없었다.

적혈구 용혈률이 GSH-Px활성에 의하여 좌우되었는지를 규명하기 위하여 상관관계를 조사한 바 Fig 1과 같았다. 즉, 상관계수 $r = -0.6886$ 로서 고도의 역상관성을 보였으며 GSH-Px활성을 X, 적혈구 용혈률을 Y로 하였을때의 회귀방정식 $Y = 29.86 - 3.57X$ 가 성립되었다.

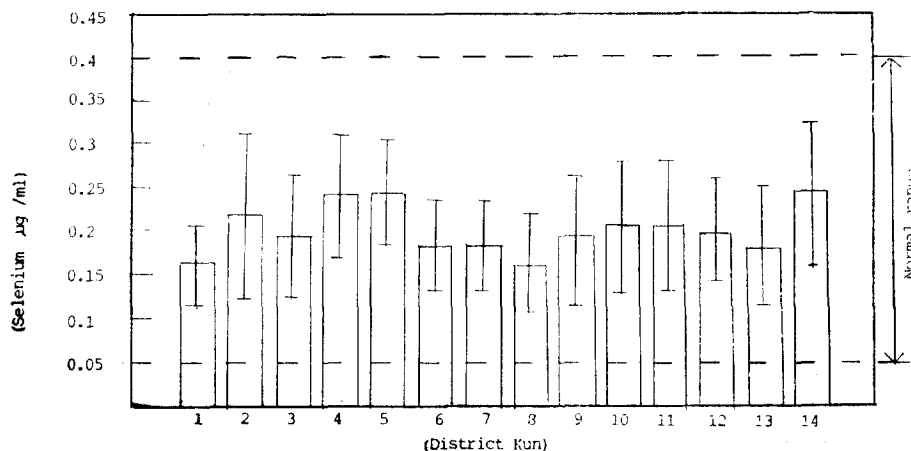


Fig 2. Blood selenium concentration of Korea native cattle in Chonbuk region.

1. Chonju city 2. Wanju 3. Okgu 4. Iksan 5. Kimje 6. Buan 7. Chongup
8. Imsil 9. Jinan 10. Muju 11. Changsu 12. Kochang 13. Sunchang 14. Namwon

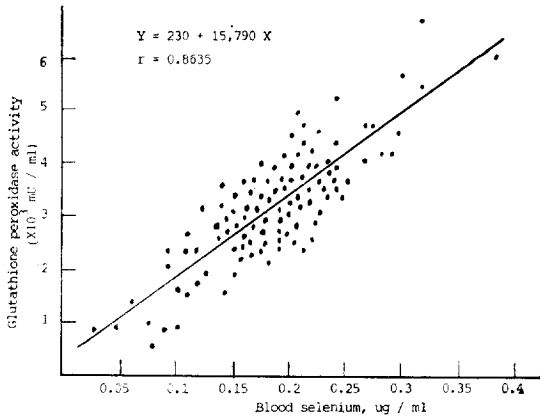


Fig 3. Correlation between blood selenium concentrations and blood glutathione peroxidase activity in Korean native cattle of Chonbuk region.

GSH-Px는 selenium을 함유하는 metallic enzyme으로 혈중 selenium농도가 GSH-Px활성에 영향을 줄 것이 예상되므로 지역별 혈중 selenium농도를 측정하여 Fig 2와 같은 결과를 얻었다. 전체 평균 0.20±0.11µg/ml로서 전 시험군이 정상농도로 알려진 0.05-0.4µg/ml의 범위에 있었다. 지역간에 다소의 차이는 있을지라도 유의차는 인정되지 않았다. 혈중 selenium농도가 GSH-Px활성에 영향을 주었는지를 규명하기 위하여 상관성을 조사한 바 Fig 3와 같이 r=0.8635로서 높은 상관성(p<0.01)을 보였으며 GSH-Px활성을 Y, selenium농도를 X로 하였을때의 회귀방정식은 Y=230+15,790X가 성립되었다.

고 찰

생체내에서 대사 과정에서 생성되는 과산화수소에 의한 세포독성은 치명적이며 적혈구에 작용한다면 적혈구막을 약화시켜 쉽게 용혈을 일으켜 용혈성 빈혈을 유발시킬 수 있다. 그러므로 적혈구의 안정성은 적혈구 용혈을 측정으로 확인할 수 있다.

혈액중의 효소인 GSH-Px는 독성이 강한 과산화수소를 직접 해독할 수 있으며 이 효소는 주로 적혈구에 들어 있으나 혈장에도 소량 들어있는 것으로 밝혀졌다.^{4,5}

본 실험에서 보여준 한우의 적혈구 용혈율은 평균 17.11%로서 전북지역 각군간에 유의차가 없었으며 비교적 큰 적혈구 안정성을 보였다. 이러한 안정성이 높은 GSH-Px활성에 기인하는 것인지를 조사하였는 바 혈중 GSH-Px활성은 2,881~4,100mU/ml였으며 평균

3,352±1,873mU/ml의 활성을 보였다. Scholz et al⁵의 보고에 의하면 Holstein종 착유우에서 1,813mU/ml, 송아지에서는 2,717mU/ml였으며 이와 비교하여 한우에서 매우 높은 것으로 나타났다. 따라서 한우에서의 낮은 적혈구 용혈율로 표시되는 높은 적혈구 안정성은 높은 혈중 GSH-Px활성에 기인하는 것으로 생각된다. 이와같은 결과는 적혈구 용혈율과 GSH-Px활성과의 상관성 조사로 확인되었으며 두 인자간에는 r=-.6886의 극히 높은 역 상관성(p<0.01)을 보였다.

GSH-Px는 1mole당 4mole의 selenium을 함유하는 것으로 알려졌으며 따라서 일정한 수준의 selenium농도가 GSH-Px의 활성을 위해서 반드시 필요한 것으로 보고되었다.^{1,4,5} 또한 Rotruck et al^{13,14}은 실험적으로 selenium을 쥐에 급여하여 과산화수소에 의한 적혈구의 파괴를 억제한다는 사실을 밝혔다. 그러므로 혈액 GSH-Px활성은 selenium농도에 의하여 좌우되는 것으로 보이며 필요 수준의 혈중농도를 유지하기 위해서는 적절한 수준의 selenium을 함유하는 목초 또는 건초의 섭취를 반드시 필요로 한다. 조사료중의 selenium 함량은 근원적으로 토양중의 함량에 좌우되며 따라서 토양중 selenium 함량이 가축의 적혈구 안정성을 결정할 수 있다. 토양중의 selenium 결핍은 혈중 selenium농도를 결정하게 될 것이므로 시험우에 대하여 혈중 selenium농도를 측정한바 평균 0.20±0.11µg/ml였고 그 범위는 0.16~0.24µg/ml로서 Stevens et al⁶이 보고한 정상 범위인 0.05~0.4µg/ml안에 있었으며 전북 지역에서는 selenium 결핍지수가 없는 것으로 생각된다.

혈액 selenium농도와 GSH-Px활성간의 상관성은 r=0.8635로서 고도의 유의성을 보였으며 이는 Allen et al¹, Tompson et al³, Scholz et al⁵, Stevens et al⁶의 보고와 일치하였다.

가축에서 selenium의 결핍은 발육부전, 불임, 근병증 등을 수반하여 동물의 경제성이 저하되기 쉬우므로^{2,3,15} 아직 우리나라 전반에 걸친 조사가 이루어지지 않은 점에 비추어 앞으로 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

또한 실험방법적인 면에서는 적혈구 용혈율과 GSH-Px활성, 혈중 GSH-Px활성과 selenium농도간에 고도의 상관성이 있음에 따라 혈중 selenium농도의 측정법이 복잡하고 많은 시간이 소요되므로 혈중 GSH-Px활성의 측정법이 보다 유용한 것으로 사료된다.

결 론

전북지역의 도축장에 계류중인 한우를 사육지별로

구분채혈하여 heparin가 항 응고혈액을 만들어 적혈구 안정성과 관련된 시험을 수행하였다. 그러기 위하여 적혈구 용혈율을 측정하고 적혈구 용혈율에 직접적으로 영향을 주는 혈중 GSH-Px의 구성무기질인 selenium의 혈중농도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 적혈구 용혈율은 13.53~20.74% 범위내에 있었으며 $17.11 \pm 9.91\%$ 로 대체로 낮았고 지역간 유의차는 없었다.

2. GSH-Px활성은 2,881~4,100mU/ml의 범위내에 있었으며 평균 $3,352 \pm 1,872$ mU/ml로 매우 높았다.

3. 적혈구 용혈율과 혈중 GSH-Px활성과는 상관계수 $r = -0.6886$ 의 높은 역상관성 ($p < 0.01$)을 보였으며 GSH-Px활성을 X, 적혈구 용혈율을 Y로 하였을 때의 회귀방정식 $Y = 29.86 - 3.57X$ 이 성립되었다.

4. 혈중 selenium농도는 0.16~0.24 μ g/ml의 범위내에 있었으며 평균 0.20 \pm 0.11 μ g/ml로서 정상 수준이었다.

5. GSH-Px활성과 selenium농도와의 상관계수 $r = 0.8635$ 의 높은 상관성을 보였으며, GSH-Px활성을 Y, selenium농도를 X로 하였을때의 회귀방정식 $Y = 230 + 15,790X$ 이 성립되었다.

참 고 문 헌

- Allen WM, Parr WH, Anderson PH, et al. Selenium and the activity of glutathione peroxidase in bovine erythrocytes. *Vet Rec* 1975;96:360~361.
- Backall KA, Scholz RW. Reference values for field test to estimate inadequate glutathione peroxidase and selenium status in the blood of cattle. *Am J Vet Res* 1979;40:734~738.
- Thompson RH, McMurray CH, Blanchflower WJ. The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs. *Res Vet Sci* 1976;20:229~231.
- Scholz RH, Hutchinson LJ. Distribution of glutathione peroxidase activity and selenium in the blood of dairy cows. *Am J Vet Res* 1979;40:245~249.
- Scholz RH, Todhunter DA, Cook LS. Selenium content and glutathione peroxidase in tissues of young cattle fed supplemented whole milk diets. *Am J Vet Res* 1981;42:1718~1723.
- Stevens JB, Olson WG, Kraemer R, et al. Serum selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in cattle grazing forages of various selenium concentrations. *Am J Vet Res* 1985;46:1556~1560.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab & Clin Med* 1967;70:158~169.
- Chow CK, Tapple AI. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rat. *J Nutr* 1974;104:444~451.
- Bergmeyer HU. Absorption coefficients of NAD (P)H. In: Bergmeyer HU, ed. *Method of enzymatic analysis*. III Enzymes I: oxidoreductase, transferase. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983;594~595.
- Ministry of Agriculture and Fisheries, New Zealand. *Chemical and biochemical methods: A laboratory manual of standard procedures for use within Animal Health Division*. Wellington: Ministry of Agriculture and Fisheries, 1973;23/1-1-23/4.
- Friedman L, Weiss W, Wherry F, et al. Bioassay of vitamin E by the dialuric acid hemolysis method. *J Nutr* 1958;65:143~160.
- 조종후. 쥐적혈구의 paraquat에 의하여 이르게되는 용혈에 대한 d- α -tocopherol의 시험관내 방어 효과. 한국수의공중보건학회지 1984;8:9~13.
- Rotruck JT, Pople AL, Ganther HE, et al. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J Nutr* 1972;102:689~696.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588~590.
- Calvert CC, Nesheim MC, Scott ML, et al. Effectiveness of selenium in prevention of nutritional muscular-dystrophy in the chick. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;109:16~18.