

## Rat에서 뇨중 $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase와 N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase 측정에 의한 신독성 평가에 관하여

金永昊·李昌雨\*

Excerpta Medica Korea · 서울大學校 獸醫科大學\*

### 서론

질병이나 독성물질에 의한 신장의 손상을 진단할 수 있는 방법은 임상가나 독성학자의 지대한 관심사이다. 사람과 동물의 신기능검사는 몇종의 물질을 단위 시간내에 어느정도 효율적으로 배설할 수 있는지를 측정하는 배설시험, 비단백태질소화합물의 혈액내 정체정도를 측정하는 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine 농도의 측정, 신세뇨관의 수분 재흡수능력에 근거를 둔 뇨농축시험, 통상적 뇨분석 및 조직검사 등으로 대별할 수 있다.<sup>2,8,9,18)</sup>

이러한 신기능검사 항목중 배설시험, BUN, creatinine, 뇨농축시험 등은 신단위의 60~70% 이상이 손상을 받아야 비로서 이상을 나타내기 때문에<sup>2,18,20)</sup> 조기에 신손상을 진단하기 어려운 단점이 있으며 체중이 작은 실험동물에 있어서 BUN, creatinine 및 조직검사는 질병의 경과중 또는 실험기간중 반복하여 시료채취가 현실적으로 어렵고 단 한번의 시료채취도 심한 스트레스를 주지 않고서는 불가능한 단점이 있다.

통상적인 뇨분석은 BUN, creatinine, 뇨농축시험 보다는 조기에 신손상을 진단할 수 있으나 작은 실험동물에 있어서는 metabolism cage를 사용하여도 결과의 판단에 지장을 주지 않을 정도로 뇨를 순수하게 채취하기는 곤란하다. 1970년대에 이르러 뇨중으로 배설되는 효소들을 측정함으로써 작은 실험동물에 있어서 거의 스트레스를 주지않고 반복검사가 가능하며 통상적인 뇨분석보다는 훨씬 조기에 신손상을 예민하게 진단할 수 있다는 점에서 기존의 신

기능검사 항목들의 단점을 보완할 수 있는 방법이 개발되어 이용되고 있다.

Groetsch와 Mattenheimer<sup>14)</sup>는 사람의 뇨중에서 30종 이상의 효소가 발견되었으며 그중 lysosomal enzyme인  $\beta$ -D-glucuronidase(GRS), N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase(AGS), arylsulfatase와 brush border enzyme인 alanine aminopeptidase(AAP), alkaline phosphatase 및  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GTP)가 다른 효소들보다 신질환의 진단적 지표로서 가치가 있다고 하였다.

Mattenheimer<sup>26)</sup>는 뇨중의 효소가 혈장으로부터 유래할 수 있지만 주로 신조직에서 유래하는 것이며 분자량이 69,000이상인 효소는 사구체를 극히 소량만 통과할 수밖에 없다고 함으로써 비록 뇨에서 발견되는 것과 같은 효소가 신장 이외의 다른 조직에 공존하더라도 이것의 배설량 증가는 신장조직의 손상을 의미하는 지표가 된다는 이론적 근거를 제시하였다.

한편 이를 뒷받침할 수 있는 연구결과로서 花田<sup>38)</sup>는 사람의 뇨중에 배설되는  $\gamma$ -GTP는 간조직에 존재하는  $\gamma$ -GTP와는 전기영동적 특성이 다르고 신장에 존재하는  $\gamma$ -GTP와는 일치하므로 뇨중  $\gamma$ -GTP의 유래가 신장이라는 사실을 증명하였고, 副島와 長澤<sup>39)</sup>는 isoenzyme의 측정에 의해 뇨중의 AGS가 혈장에서 유래하는 것 즉, 다른 조직으로부터 유래하는 것이 아니고 신조직에서 유래하는 것임을 증명하였다.

신세뇨관 손상이 있는 사람에 있어서 뇨중으로  $\gamma$ -GTP<sup>1,32,34)</sup>와 AGS<sup>21,36)</sup>의 배설량이 증가하므로

이 두효소의 뇨중배설량 측정은 신질환 진단의 지표로 이용될 수 있다고 하였다.

Gibey 등<sup>10)</sup>은 gentamicin투여에 의해 Dieppe와 Doyle<sup>6)</sup>는 항류마티스 약품투여에 의해 신손상이 일어난 사람에게 있어서 뇨중 AGS배설량이 증가하며 이것의 측정은 독성을 감시하는 수단으로 이용할 수 있음을 제시하였다.

Brogren 등<sup>4)</sup>은 chlorinated organic solvent와 같은 신독성물질을 취급하는 산업근로자의 신장건강상태를 감시하는 지표로서 뇨중 AGS배설량을 이용할 수 있다고 하였고, Kind<sup>19)</sup>는 신장이식수술을 한 사람에게 있어서 거부반응 여부의 조기판단에 있어 뇨중 AGS배설량을 지표로 삼을 수 있다고 하였다.

Roberts와 Seawright<sup>31)</sup>가 mercury chloride를 투여한 말에 있어서 Shaw<sup>33)</sup>가 mercury chloride를 투여한 양에 있어서 각각 뇨중의  $\gamma$ -GTP배설량이 증가하는 것을 확인한 바 있다.

Rat에 있어서는 신독성화학물질,<sup>11,28)</sup> aflatoxin B<sub>1</sub>,<sup>15)</sup> aminoglycoside,<sup>7)</sup> 면역매개 등<sup>17)</sup>에 의한 신손상에 있어서 AGS<sup>17,28)</sup> 또는  $\gamma$ -GTP<sup>7,11,15)</sup>의 뇨중배설량이 증가하며 이러한 사실을 진단의 지표로 이용할 수 있다고 하였다.

이상과 같이 뇨효소 측정에 의한 신질환과 신독성의 진단에 관한 연구는 최근 20여년간 확대일로에 있으며 측정방법에 있어서는 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 이와관련된 연구발표가 없어서 문헌조사만으로는 이러한 실험의 문제점과 성격을 자세히 파악하기 힘들다. 소의 뇨중  $\gamma$ -GTP와 AGS활성도 측정을 위한 적합한 조건에 대해서는 저자(李)가 이미 보고한 바 있다.<sup>22)</sup>

이 실험의 목적은 rat 뇨중의  $\gamma$ -GTP(E.C. 2.3.2.2)와 AGS(E.C. 3.2.1.30)활성도 측정에 필요한 적합한 조건들을 조사하여 측정방법을 정립하며 potassium dichromate를 투여하여 화학적 신독성을 일으킨 rat에 대해 뇨중  $\gamma$ -GTP와 AGS배설량의 경시적 변동을 조사하고 기존의 통상적 검사항목인 BUN을 조사하여 뇨효소 측정에 의한 진단기술과 BUN측정에 의한 진단기술의 성격을 비교하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

Wistar rat의 수컷을 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받아 사육한후 임상적으로 건강하고 체중이 350~550 g 된 것을 실험동물로 사용하였다.

체 뇨: 뇨가 분변으로 오염되는 것을 최소화하기 위하여 metabolism cage에 한마리씩 넣어 사육하고 1주일이상 적응시킨후 metabolism cage내의 집뇨용 용기에 방부제로서 sodium azide(1%)를 0.5ml씩 첨가해서 24시간 뇨를 채취하였으며 이렇게 채뇨한 시료는 여과지로 여과하고 3000rpm으로 15분간 원심분리하여 사용하였다.

### $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase활성도 측정

1. 기본측정방법: 기본적인 측정원리는 Naftalin 등<sup>27)</sup>에 준했으며 기질의 pH와 농도 및 파장수는 기초예비실험에 의해 적합한 것으로 판단된 값으로 개량하여 측정하였으며 그 절차는 전보<sup>22)</sup>에 기술한 바와 같았다.

2. 완충액의 pH에 의한 영향: 기본적인 측정방법은 Naftalin 등<sup>27)</sup>에 준하되 완충액의 pH를 6.4에서 8.2까지의 범위내에서 여러가지로 만들어 3두의 rat 뇨에 대해  $\gamma$ -GTP활성도를 측정하여 완충액의 pH 변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH 값을 구하였다.

3. 기질의 농도에 의한 영향: 기질의 농도를 0.4~4.4mmol/l의 범위내에서 여러가지로 만들어 3두의 rat 뇨에 대해  $\gamma$ -GTP활성도를 측정하여 반응액 내 기질의 농도에 따르는 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk의 방법<sup>23)</sup>에 의한 Michaelis constant (Km)를 조사하였다.

### N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase활성도 측정

1. 기본측정방법: 기본적인 측정원리는 Maruhn<sup>25)</sup>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- $\beta$ -D-glucosaminide 10 mmol in citrate buffer(0.1 mol, pH 3.6 at 37°C).

2-amino-2-methyl-propan-1-ol/HCl buffer(0.75 mol, pH 10.5 at 25°C, AMP buffer).

○ 절 차

Solutions	Test ml	Sample blank ml	Reagent blank ml
Substrate-buffer	0.2	-	0.2
Urine	0.2	0.2	-
Physiological saline	-	-	0.2
Buffer(citrate)	-	0.2	-
Close containers and incubate in waterbath at 37°C, 15min.			
AMP buffer	0.2	0.2	0.2
Read absorbance of 4-nitrophenol at 405nm 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.

d : light path.

FV : Final volume.

SV : Sample volume.

2. 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정방법은 Maruhn<sup>25)</sup>에 준하되 citrate완충액의 pH를 3.2~4.4의 범위내에서 여러가지로 만들어 3두의 rat노에 대해 AGS활성도를 측정하여 완충액의 pH변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH값을 구하였다.

3. AMP 완충액의 pH : AMP완충액의 pH는 최종 pH가 10.0을 초과하도록 하기위해 10.5로 조절하였다.

4. 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 1~15mmol/l 의 범위내에서 여러가지로 만들어 3두의 rat노에 대해 AGS활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따르는 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk의 방법<sup>23)</sup>에 의한 Michaelis constant(Km)를 구하였다.

Gel filtration의 영향 : 뇨중의 효소활성도 측정에 있어서 gel filtration의 영향을 조사하기 위하여 rat 7두의 뇨를 각각 Sephadex G-25M으로 충전된 Column PD-10(Pharmacia Fine Chemical)에 통과시켜 여과하고 여과전과 여과후의 시료에 대해 γ-GTP와 AGS의 활성도를 측정하여 그 성적을 비교하였다.

직선성 : 이 실험에서 채택된 측정방법에 의한 직선성의 한계는 3두의 rat노를 pooling하여 gel filtra-

tion한후 여러가지 배수로 희석한 희석노의 실측치와 희석노의 이론치를 구하여 비교하였다.

실험의 精度(Within-Run Imprecision) : 실험의 정도를 조사하기 위하여 3두의 rat노에 대해 γ-GTP와 AGS의 활성도를 9~10회 반복측정하여 변이계수를 구하고 분산분석을 실시하였다.

응용실험 : 응용실험을 위하여 10두의 rat에 potassium dichromate 10mg씩을 증류수 1ml에 용해하여 각각 피하주사 하였으며 투여전과 투여후 24, 48, 72, 96시간에 각각 24시간뇨를 채취하여 gel filtration을 한후 γ-GTP와 AGS의 활성도를 측정하여 potassium dichromate 투여에 의한 두효소의 배설량의 경시적 변동을 조사하였다. 또한 이 rat들은 실험종료 직후(투약후 96시간) 부검하여 신장의 조직 절편을 만들고 hematoxylin-eosin복염색을 하여 신장의 손상정도를 경검하였다.

한편 별도의 rat 10두에 대해서는 potassium dichromate를 10mg씩 각각 피하주사하고 투여전과 투여후 24, 48, 72, 96시간에 혈액을 채취하여 BUN값의 경시적 변동을 조사하였다.

결 과

γ-GTP측정에 있어서 glycyglycine을 함유한 Tris-HCl 완충액의 pH는 7.6일때 최대의 활성도를 나타냈다(Fig. 1).

γ-GTP활성도 측정에 있어서 기질의 농도에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 2와 같았으며 이 성적을 근거로 하여 Lineweaver와 Burk<sup>23)</sup>의 방법에 의해 구한 Michaelis constant는 1.1~1.2mmol/l 이었다(Fig. 3).

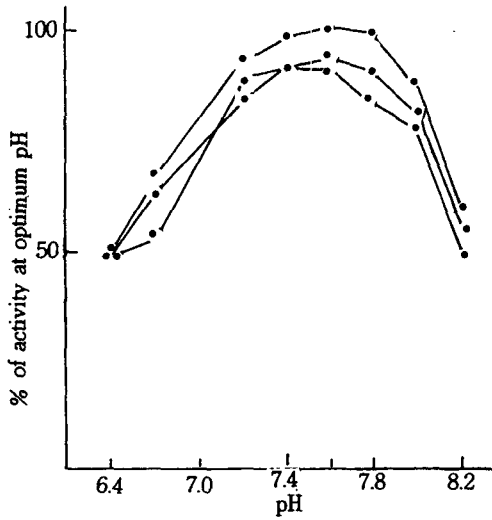


Fig. 1. Effect of pH of glycylglycine-Tris-HCl buffer on  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activities in three different urines.

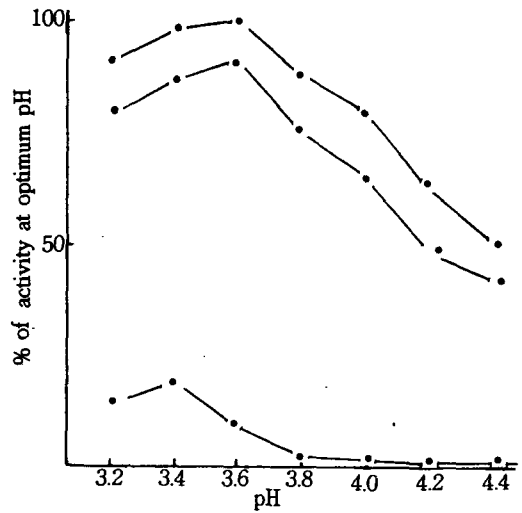


Fig. 4. Effect of pH of citrate buffer on N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activities in three different urines.

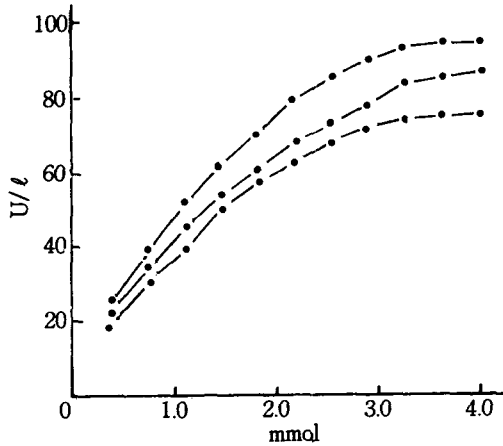


Fig. 2. Effect of variation of  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide concentration on activities of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in three different urines.

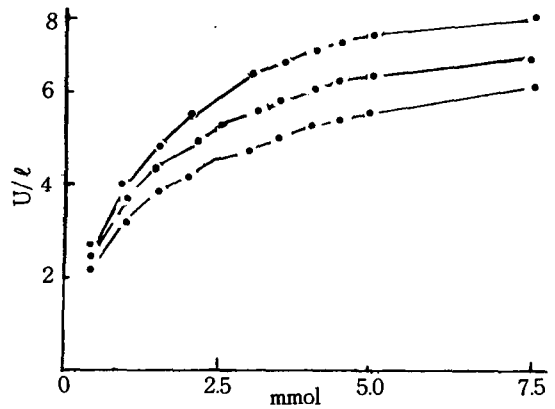


Fig. 5. Effect of variation of 4-nitrophenyl-N- $\beta$ -D-glucosaminide concentration on activities of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in three different urines.

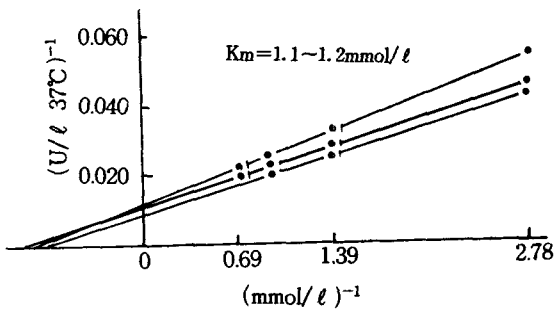


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of data shown in Fig. 2.

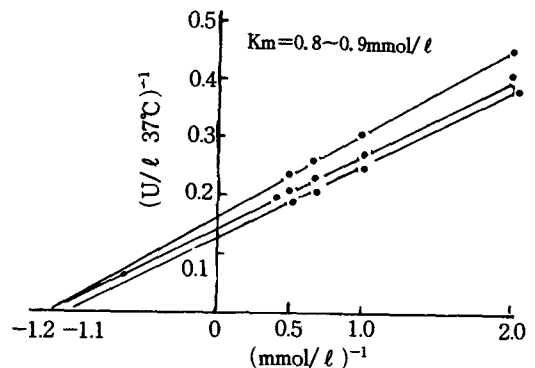


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of data shown in Fig. 5.

**Table 1. Effect of Gel Filtration on  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Activity in Urine**

Urine	U/ℓ at 37°C		Difference (%)
	Before gel filtration	After gel filtration	
1	2598	2644	+ 1.8
2	1194	1191	- 0.3
3	667	550	-17.5
4	1732	1654	- 4.5
5	2087	1934	-7.3
6	1158	1441	+24.4
7	1691	1578	- 6.7
Mean	1590	1570	
SD	644	645	

**Table 2. Effect of Gel Filtration on N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Activity in Urine**

Urine	U/ℓ at 37°C		Difference (%)
	Before gel filtration	After gel filtration	
1	19	29	+52.6
2	17	26	+52.9
3	18	21	+16.7
4	18	26	+44.4
5	20	28	+40
6	13	18	+38.5
7	20	25	+25
Mean	18	25*	
SD	2	4	

\*: significant at 0.01 level.

AGS활성도 측정에 있어서 citrate완충액의 pH는 1두의 뇨는 3.4일때 2두의 뇨는 3.6일때 가장 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 4).

AGS활성도 측정에 있어서 기질농도의 변화에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 5와 같았으며 이 성적을 근거로하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 Michaelis constant는 0.8~0.9mmol/ℓ 이었다(Fig. 6).

7두의 rat뇨에 대해 gel filtration한 시료와 gel filtration안한 시료로 구분하여  $\gamma$ -GTP활성도를 측정 한 결과 gel filtration한 시료는 1570±645U/ℓ (평균 ±표준편차)를 나타내었고 gel filtration안한 시료는 1590±644U/ℓ 를 나타내어서 두군간에서의 유의차는 인정되지 않았으며 개체별로는 gel filtration에 의해  $\gamma$ -GTP활성도가 증가한 것도 감소한 것도 있

었다(Table 1).

AGS활성도에 있어서는 gel filtration한 시료가 25 ±4U/ℓ 이었고 gel filtration 안한 시료는 18±2U/ℓ 로서 gel filtration한 시료가 안한 시료보다 유의성(p <0.01)있게 높은 AGS활성도를 나타내었으며 개체 별로는 gel filtration한 시료 모두가 안한 시료보다 높은 AGS활성도를 나타내었다(Table 2).

$\gamma$ -GTP와 AGS의 활성도는 각각 약 135U/ℓ, 7U/ℓ 까지 직선상을 나타내었다(Fig. 7, 8).

3두의 rat뇨에 대해  $\gamma$ -GTP활성도를 10회 반복측 정한 결과 변이계수는 3.8~6.4%이었으며 F-검정 결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

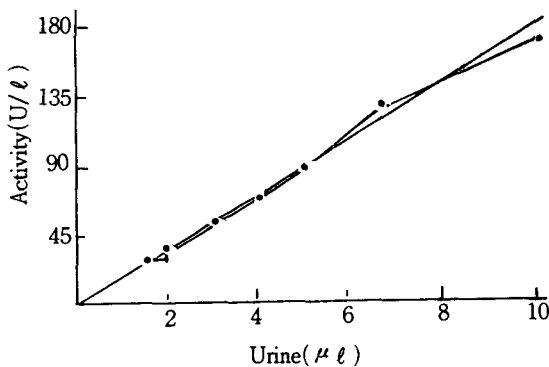
3두의 rat뇨에 대해 AGS활성도를 9~10회 반복측 정한 결과 변이계수는 2.5~4.1%이었으며 F-검정

**Table 3.** Within Run Imprecision(U/ℓ)

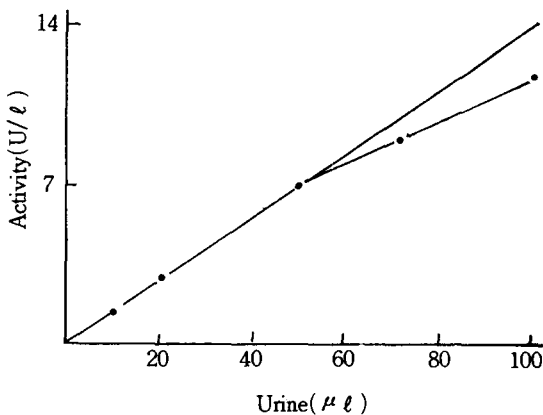
		γ-GTP	AGS
Rat 1	$\bar{X}$	595.2	14.8
	S	34.2	0.6
	CV(%)	5.7	4.1
	N	10	10
Rat 2	$\bar{X}$	470.9	20.4
	S	30.0	0.5
	CV(%)	6.4	2.5
	N	10	10
Rat 3	$\bar{X}$	851.4	22
	S	32.3	0.7
	CV(%)	3.8	3.2
	N	10	9

γ-GTP : γ-glutamyltranspeptidase.

AGS : N-acetyl-β-D-glucosaminidase.



**Fig. 7.** Linearity of γ-glutamyltranspeptidase activity.



**Fig. 8.** Linearity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity.

결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

potassium dichromate를 투여한 10두의 rat중 1두(No. 1)는 투여후 24시간까지 배뇨하였으나 그 후엔 배뇨치 않았으며 다른 1두(No. 3)는 투여후 24시간부터 48시간 사이에는 배뇨치 않다가 그후 다시 배뇨하기 시작하였고 또다른 1두(No. 7)는 투여후 48시간부터 배뇨하지 못하였다. 한편 투여후 지속적으로 배뇨한 rat에 있어서도 다뇨 또는 횡뇨를 나타내는 개체들이 있어서 potassium dichromate투여후의 배뇨량은 일정한 경향을 나타내지 않았다(Fig. 9).

γ-GTP배설량은 투여전에 비해 투여후 현저히 증가하였는데( $p < 0.01$ ), 투여전 24시간 배설량은  $22.1 \pm 11.2 \text{ U/24hrs} \cdot \text{kg body weight}$ 이었으며 투여후 24시간동안  $102.3 \pm 44.5 \text{ U/24hrs} \cdot \text{kg body weight}$ 를 배설하여 투여전에 비해 약 4.6배의 γ-GTP를 배설하였으며 그후 배설량은 감소하여 투여후 72시간부터 96시간 사이의 24시간 배설량은 투여전 수준보다 유의성 있게 낮았다(Fig. 10).

또한 AGS배설량도 투여전에 비해 투여후 현저히 증가하였는데( $p < 0.01$ ), 투여전 24시간 배설량은  $0.5 \pm 0.2 \text{ U/24hrs} \cdot \text{kg body weight}$ 이었으며 투여후 24시간동안  $5.8 \pm 3.3 \text{ U/24hrs} \cdot \text{kg body weight}$ 를 배설하여 투여전에 비해 약 11배의 AGS를 배설하였고 그후 배설량은 감소하였으나 투여후 96시간까지도 투여전 수준으로 감소하지는 않았다(Fig. 11).

BUN은 투여전에 비해 투여후 현저히 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 투여전  $26 \text{ mg/dℓ}$ 에서 투여후 96시간의  $15 \text{ mg/dℓ}$ 에 달하기까지 계속 증가하였다(Fig. 12).

potassium dichromate를 주사한후 96시간의 rat의 신장조직은 Fig. 13과 같이 근위극세뇨관세포에 coagulation necrosis가 현저히 나타났으며 근위극세뇨관 내강에는 cast가 충전되어 있었다. 또한 투여후 배뇨하지 못한 rat의 신장조직은 Fig. 14와 같이 Bowman's space가 심하게 확장되어 있었다.

## 고 찰

glycylglycine을 함유한 Tris-HCl완충액의 pH가 뇨중 γ-GTP활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 7.6(37°C)에서 가장 높은 활성도를 나타냈으

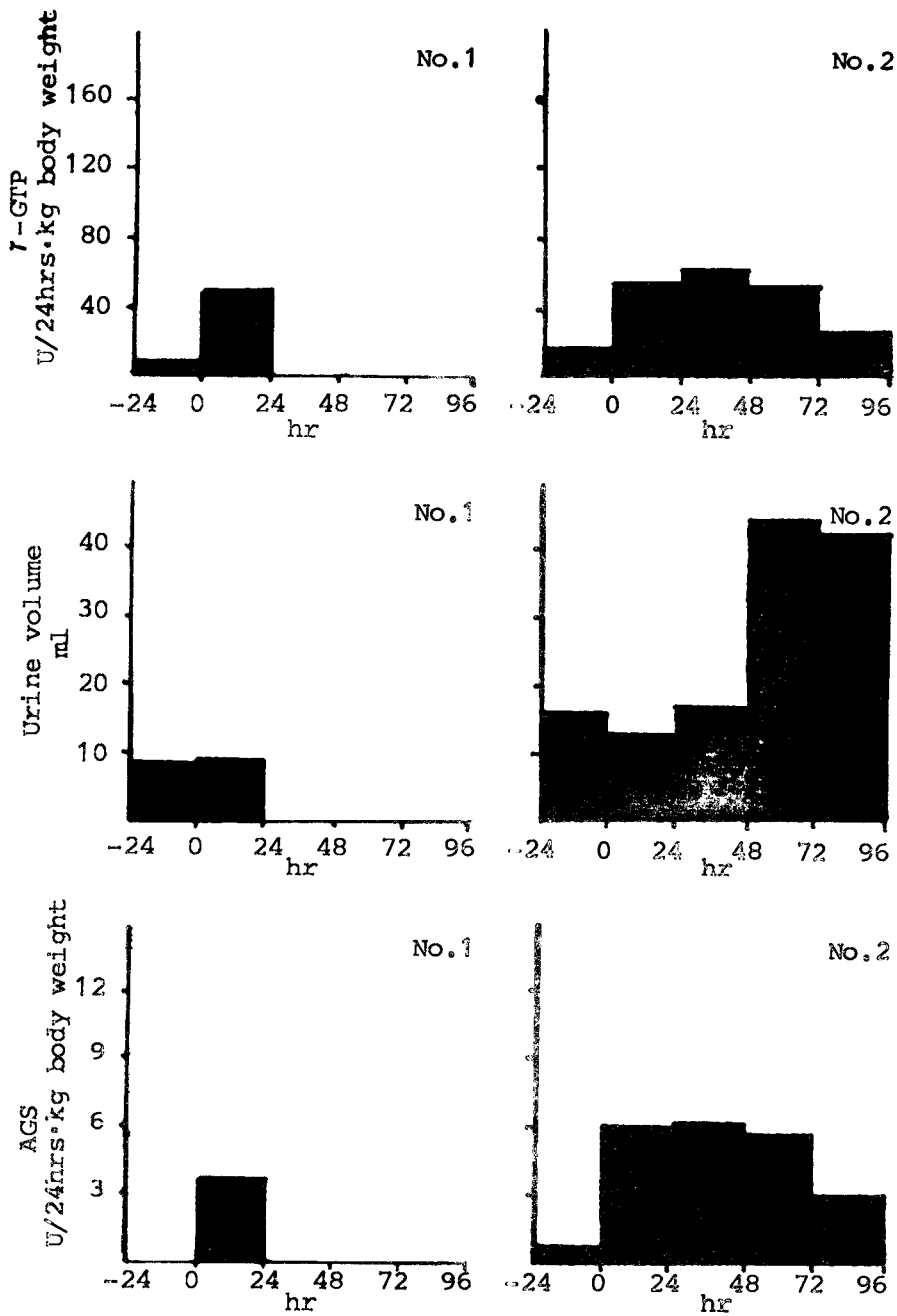


Fig. 9. Changes of urine volume and urinary  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase excretion after administration of potassium dichromate in 10 individual rats.

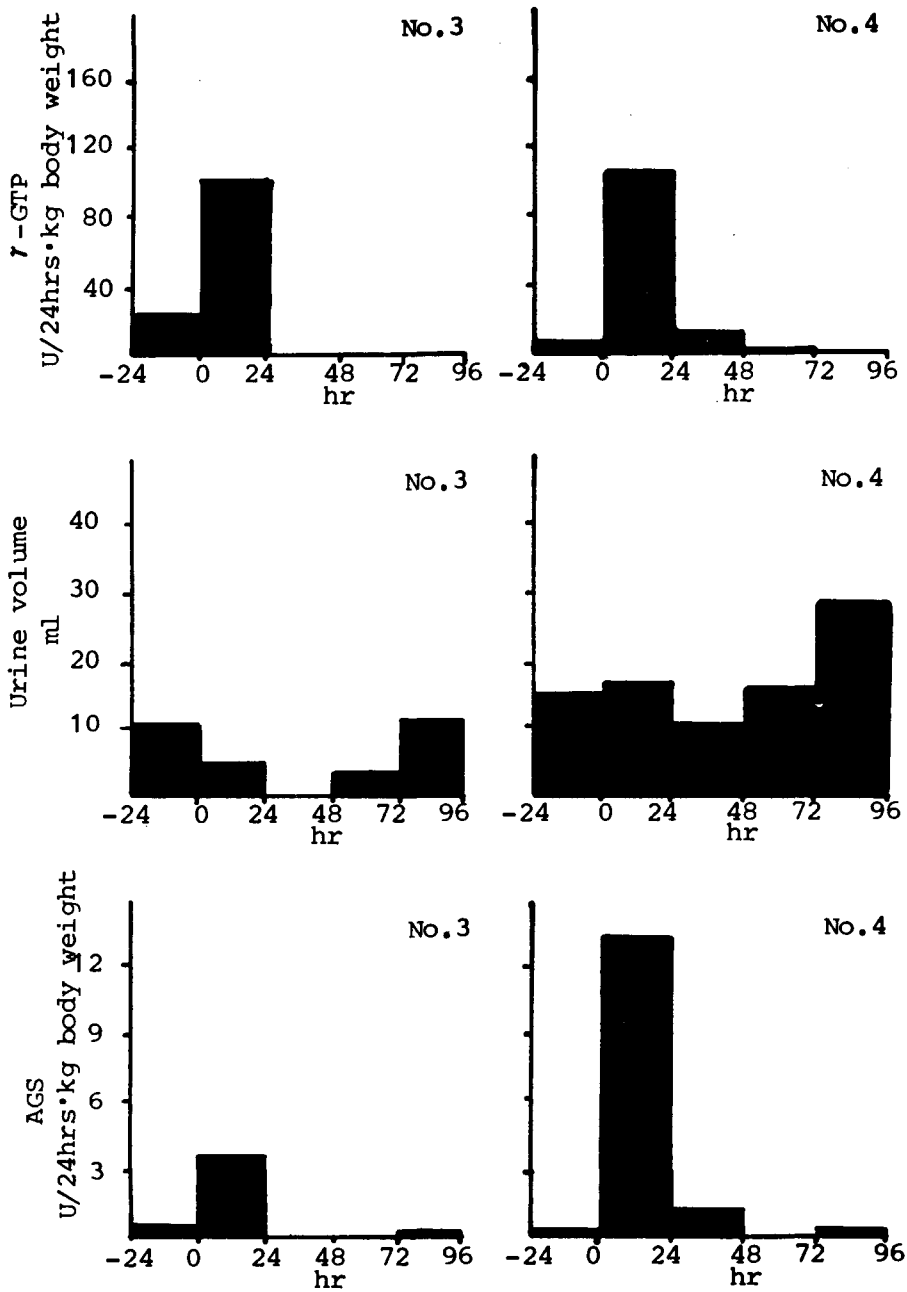


Fig. 9. (continued)



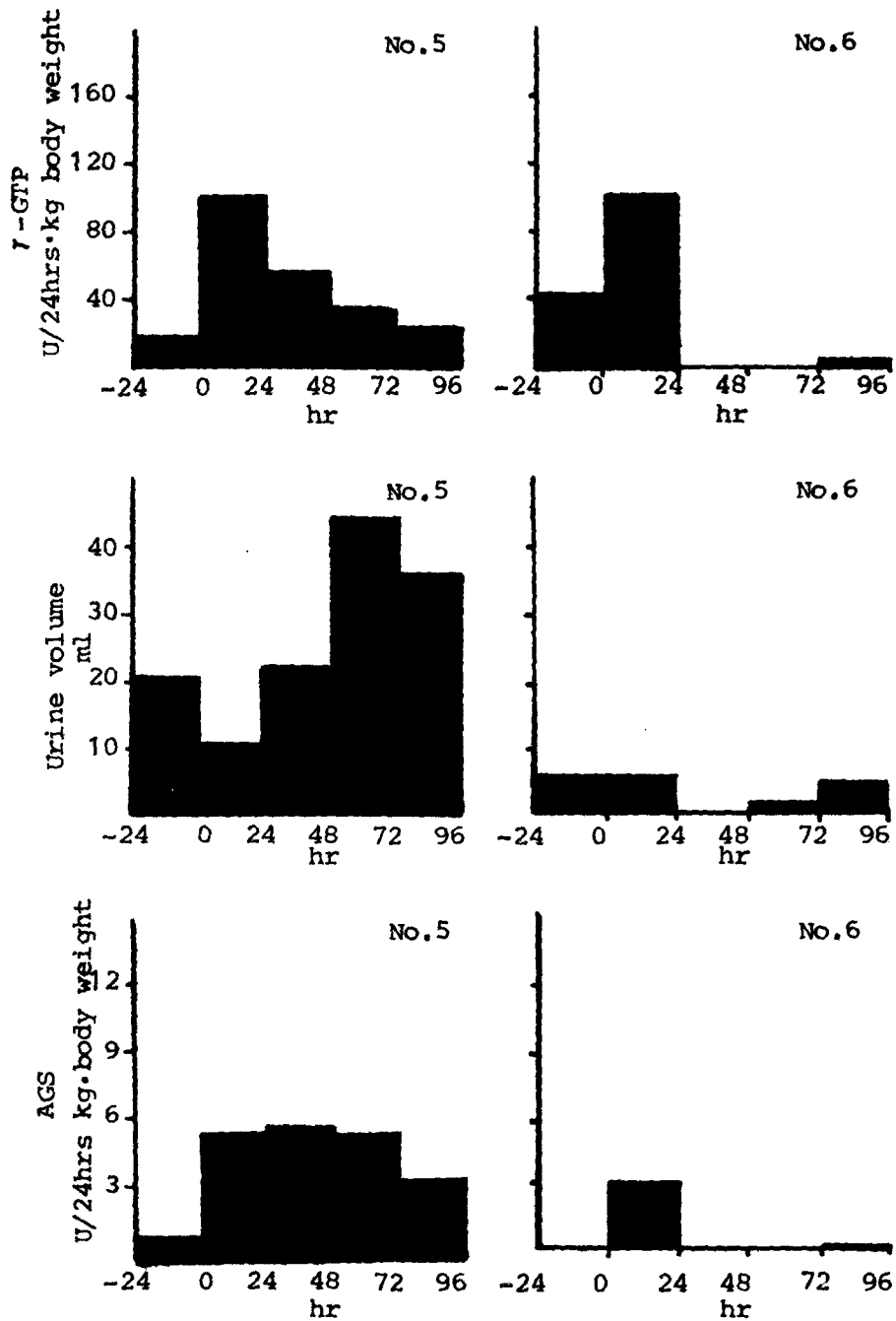


Fig. 9. (continued)

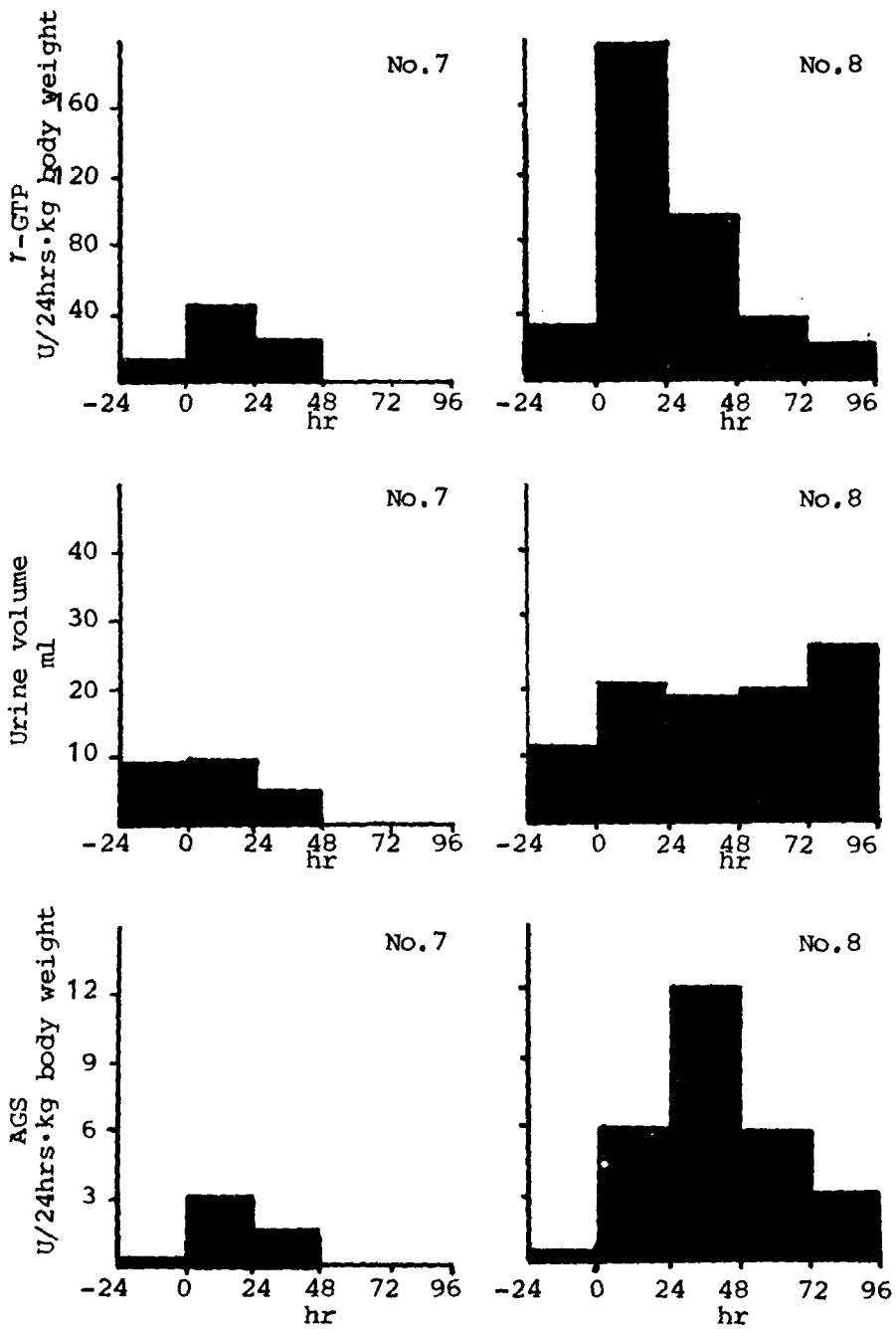


Fig. 9. (continued)

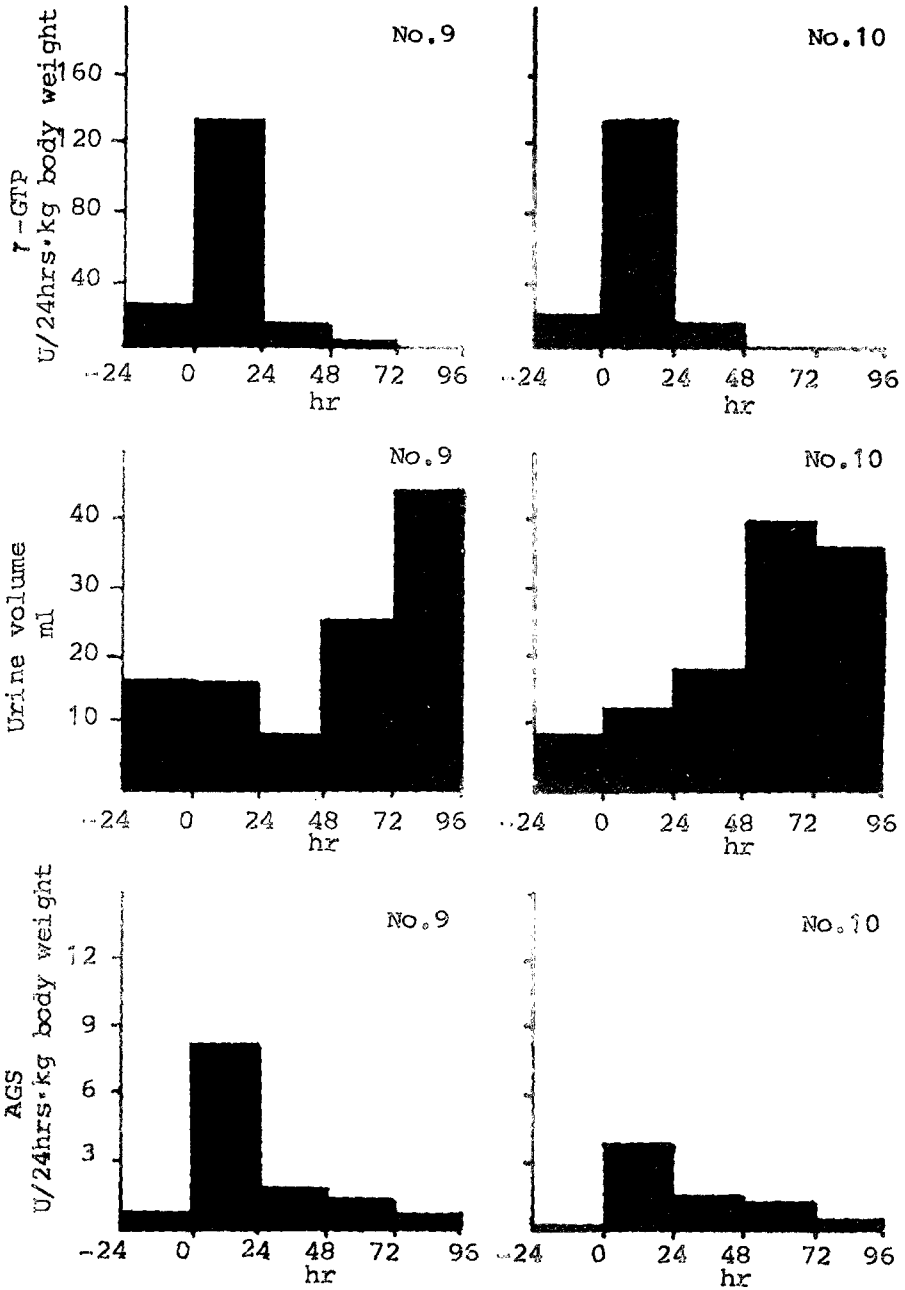


Fig. 9. (continued)

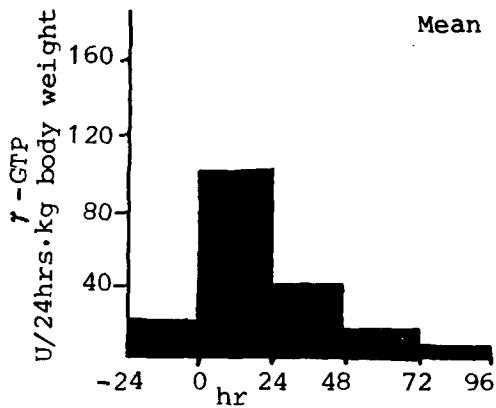


Fig. 10. Change in the mean excretion of  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase in rats after administration of potassium dichromate.

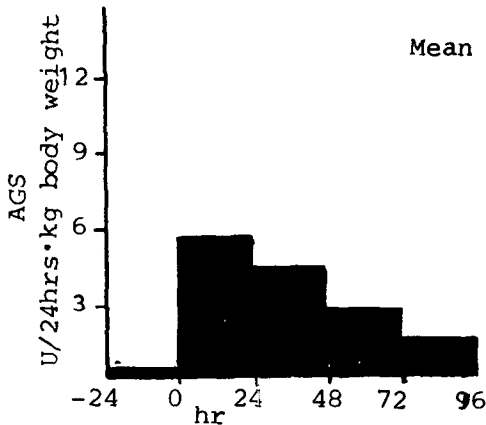


Fig. 11. Change in the mean excretion of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in rats after administration of potassium dichromate.

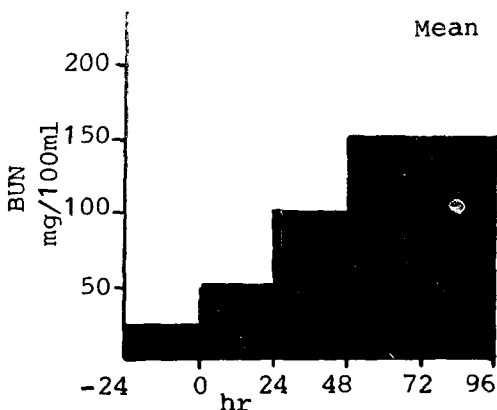


Fig. 12. Change in mean blood urea nitrogen concentration in 10 rats after administration of potassium dichromate.

며 이 결과는 Naftalin 등<sup>27)</sup>이 사람 혈청중의  $\gamma$ -GTP측정에 있어서 pH 7.8이 가장 적합하다고 한 것과는 약간의 차이를 나타내었다.

$\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용했을때  $\gamma$ -GTP의 Michaelis constant는 1.1~1.2mmol/l이었으며  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide는 실온에서 4mmol/l 밖에 용해되지 않으며 4.4mmol/l의 과포화용액은 3일간만 용액상태를 유지할 수 있기 때문에 기질의 농도를 Michaelis constant의 10배로 유지하기는 곤란하다. Naftalin 등<sup>27)</sup>은 22mg/10ml(8.3mmol/l에 해당)의 과포화용액을 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 3.8~6.4%이었고 F-검정결과 반복간에 유의성이 인정되지 않아서 기본적인  $\gamma$ -GTP측정방법에 있어서 기질액의 농도를 4.4mmol/l로 결정하는 것이 무난하다고 판단되었다.

citrate완충액의 pH가 rat노증 AGS활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 3.6에서 최대의 활성도를 나타내었다. Maruhn<sup>25)</sup>은 사람의 노증 AGS활성도를 pH 4.15에서 측정하고 Knoll 등<sup>21)</sup>은 pH 4.4에서 측정한 것과는 다른 결과인데 이것은 동물종의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

4-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide를 기질로 사용했을때 AGS의 Michaelis constant는 0.8~0.9mmol/l이었으며 이 실험에서의 기질액의 농도는 용해의 제한성<sup>25)</sup> 때문에 10mmol/l로 하였고 그 결과 반응액내 기질의 최종농도는 5mmol/l이었으며 이 농도는 Michaelis constant의 10배를 충족시키지 못하는 것이었다. 따라서 실험오차가 클 가능성을 가정하여 재현성을 조사한 결과 9~10회 반복측정의 변이계수는 2.5~4.1%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의성이 인정되지 않아서 기질의 농도를 10mmol/l로 하는 것은 무난한 것으로 판단하였다.

이 실험에 있어서 gel filtration이  $\gamma$ -GTP와 AGS활성도에 미치는 영향을 살펴보면 gel filtration안한 시료의 평균  $\gamma$ -GTP활성도는 1590U/l 이고 gel filtration한 시료의 평균  $\gamma$ -GTP활성도는 1570U/l로

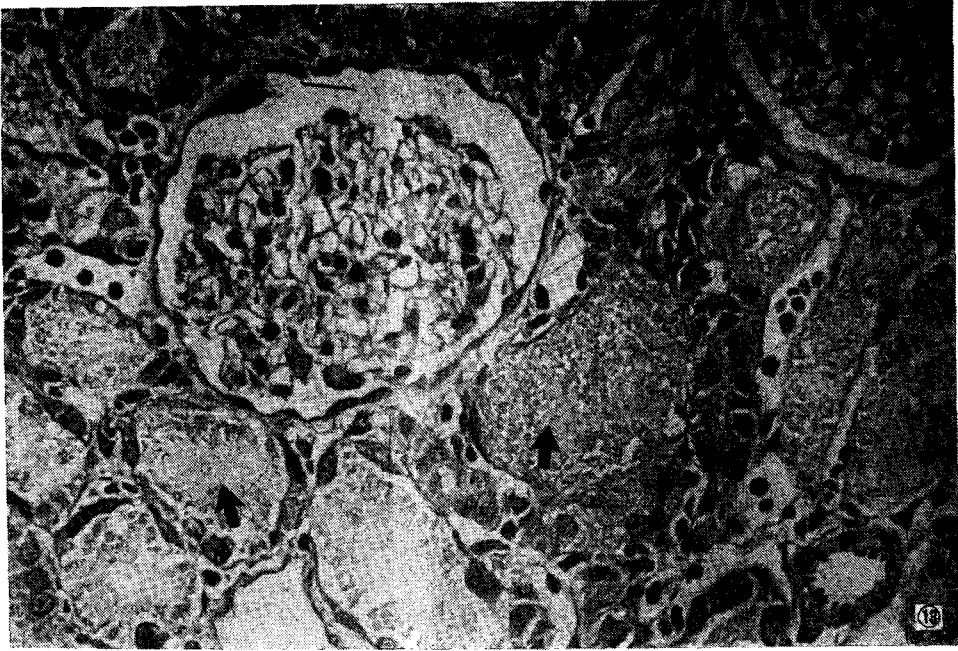


Fig. 13. Renal tissue of the rat administered with potassium dichromate. The coagulation necrosis of the cells in proximal convoluted tubules and the engorgement of the tubules with casts(arrow) are shown(400 $\times$ ).

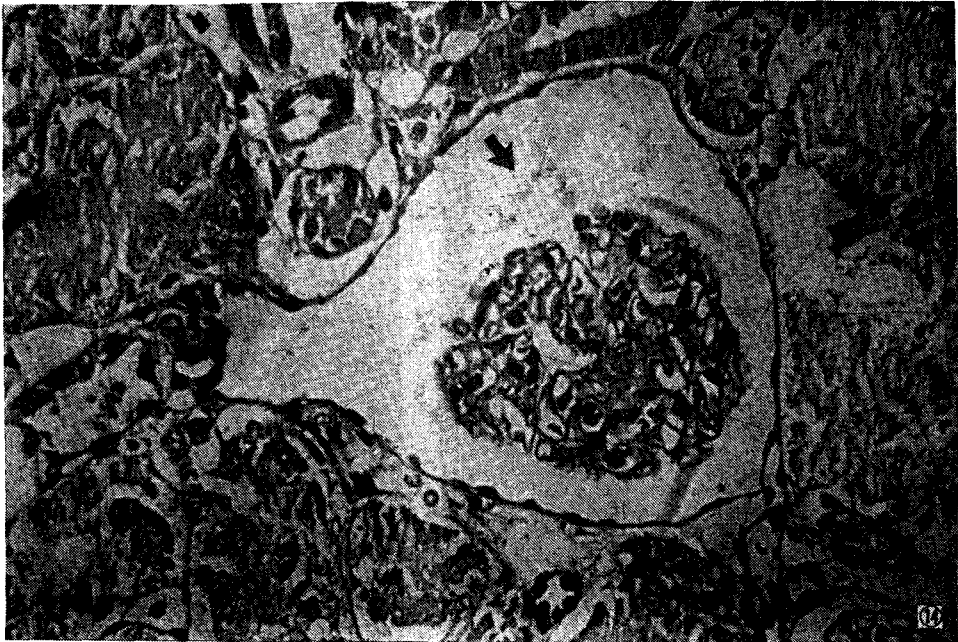


Fig. 14. Renal tissue of the rat which revealed anuria after administration of potassium dichromate. The Bowman's space is dilated(arrow 400 $\times$ ).

서 두군간에 유의차는 인정되지 않았으며 개체별로는 gel filtration에 의해  $\gamma$ -GTP활성도가 증가한 것도 감소한 것도 있는데 이 성적은 개체별로 뇨중에  $\gamma$ -GTP inhibitor의 작용이 강한 개체와  $\gamma$ -GTP stimulator의 작용이 강한 개체가 있기 때문인 것으로 생각되며 이 때문에 뇨중의  $\gamma$ -GTP측정에 앞서 반드시 gel filtration하여 inhibitor와 stimulator를 제거하지 않으면 안될 것으로 사료되었다. 또한 gel filtration 안한 시료의 평균 AGS활성도는 18U/l 이고 gel filtration한 시료의 평균 AGS활성도는 25U/l로서 gel filtration한 시료의 AGS활성도가 유의성 있게 높았으며 개체별로도 gel filtration한 시료 모두가 하지 않은 시료보다 높은 활성도를 나타내었는데 이 성적은 rat 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 등<sup>3)</sup>과 Werner 등<sup>37)</sup>의 보고와 일치하는 결과이었다.

측정방법의 직선성에 있어서는  $\gamma$ -GTP와 AGS활성도가 각각 135U/l 와 7U/l 까지 직선성을 나타내어서 활성도가 그 이상이 되는 시료는 희석을 해서 측정하여야 하는 것으로 사료되었다.

potassium dichromate를 피하주사한 rat에 있어서 뇨중  $\gamma$ -GTP배설량은 처치후 24시간내에 현저히 증가하였고 그후 배설량은 감소하여 처치후 72시간부터 96시간사이의 24시간 배설량은 처치전 수준보다도 유의성 있게 낮게 나타났으며 뇨중 AGS 배설량은 처치후 24시간내에 현저히 증가하였고 그후 배설량은 감소하였으나 처치후 96시간까지도 처치전 수준으로 감소하지는 않았다. 이 성적으로  $\gamma$ -GTP와 AGS는 신장손상을 조기에 진단할 수 있는 예민한 지표로서의 진단적 가치가 있음이 확인되었으며 선인들<sup>1,4-7,10-13,15-17,19-21,24,28-36)</sup>의 연구결과와 일치하였다.

potassium dichromate를 피하주사한 rat에 있어서 BUN은 24시간 후부터 지속적인 증가를 나타내었다. 따라서 신독성물질 투여후 경시적인 BUN농도의 변동과 뇨중 효소배설량의 변동은 상이한 성격을 갖고 있음을 알 수 있었다.

potassium dichromate투여후 배뇨치 못한 개체가 있었는데 이것은 조직소견에서 보듯이 근위극세뇨

관의 내강에 cast가 충전되어 뇨가 세뇨관을 따라 내려가지 못했기 때문인 것으로 판단되며 배뇨를 못할 정도로 손상을 받은 개체에 있어서는 뇨중효소측정에 의한 신독성의 진단은 불가능하다는 사실을 알 수 있었다.

이상을 종합하면 신독성물질을 투여했을때 뇨중 효소의 배설량의 증가는 초기에 일시적으로 나타나기 때문에 신독성 조기진단의 예민한 지표임을 알 수 있으나 과량의 독성물질이 투여되거나 독성물질에 계속적으로 노출되면 세뇨관세포와 brush border 내의 enzyme이 고갈되어버려 효소배설량이 오히려 정상수준이하로 떨어질 수 있고 세뇨관이 폐쇄되어 배뇨를 못하게 되므로 판단을 하기 어렵게 될 경우가 있다는 점을 고려하여 실험계획을 수립해야 한다는 사실을 알 수 있었다.

## 결 론

Rat 뇨중의  $\gamma$ -GTP와 AGS활성도 측정에 필요한 적합한 조건들을 조사하여 실험방법을 정립하고 rat를 이용한 신독성 평가에 있어서 이들 두효소의 응용가능성을 조사하기 위하여 수행한 실험결과는 다음과 같다.

1. Glycylglycine을 함유한 Tris-HCl완충액의 pH는 7.6(37°C)일때 최대의 활성도를 나타내었다.
2. 기질인  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide용액의 농도를 4.4mmol/l로 하여  $\gamma$ -GTP활성도를 측정하였을때 10회 반복측정의 변이계수는 3.8~6.4%이었고 반복간에 유의성은 인정되지 않았다.
3. Citrate완충액의 pH는 3.6(37°C)일때 최대의 AGS활성도를 나타내었다.
4. 기질 4-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide용액의 농도를 10mmol/l로하여 AGS활성도를 측정하였을때 9~10회 반복측정의 변이계수는 2.5~4.1%이었으며 반복간에 유의성은 인정되지 않았다.
5. Gel filtration안한 시료의  $\gamma$ -GTP활성도는  $1590 \pm 644$ (평균  $\pm$  표준편차)U/l 이고 gel filtration한 시료의  $\gamma$ -GTP활성도는  $1570 \pm 645$ U/l로 두군간에 유의차는 인정되지 않았고 개체별로는 gel filtration에 의해  $\gamma$ -GTP활성도가 증가한 것도 감소한 것도 있었다.
6. Gel filtration한 시료의 AGS활성도는 25  $\pm$

4U/ℓ 로 gel filtration 안한 시료의 AGS활성도  $18 \pm 2U/\ell$  보다 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 높았으며 개체별로도 gel filtration 한 시료 모두가 안한 시료보다 높은 활성도를 나타내었다.

7.  $\gamma$ -GTP와 AGS활성도는 각각 약 135U/ℓ, 7U/ℓ 까지 직선성을 나타내었다.

8. Potassium dichromate를 피하주사한후 96시간 동안 매 24시간 뇨에 대해  $\gamma$ -GTP와 AGS배설량의 경시적 변동을 조사한 결과  $\gamma$ -GTP의 투여전 24시간 배설량은  $22.1 \pm 11.2U/24hrs \cdot kg$  body weight이였으며 투여후 24시간동안에 투여전 수준의 4.6배로 증가하여 최대치인  $102.3 \pm 44.5U/hrs \cdot kg$  body weight를 나타내었고( $p < 0.01$ ) 그후 배설량은 감소하여 투여후 72시간부터 96시간 사이의 24시간 배설량은 투여전 수준보다 유의성 있게 낮았다. AGS의 투여전 24시간 배설량은  $0.5 \pm 0.2U/24hrs \cdot kg$  body weight이였으며 투여후 24시간 동안에 투여전 수준의 11배로 증가하여 최대치인  $5.8 \pm 3.3U/24hrs \cdot kg$  body weight를 나타내었고 그후 배설량은 감소하였으나 투여후 96시간까지도 투여전 수준으로 감소하지는 않았다.

9. Potassium dichromate를 피하주사한 별도의 rat에 있어서의 BUN은 24시간 후부터 지속적인 증가를 나타내었다.

이상으로 rat를 이용한 신독성평가에 있어서 brush border enzyme인  $\gamma$ -GTP와 lysosomal enzyme인 AGS의 24시간 배설량은 신장손상에 대한 예민한 지표로 이용할 수 있다고 사료되었다.

## 참 고 문 헌

- Bahre, G., Kley, R. und Brass, H. : Die Aktivität der  $\gamma$ -Gutamyl-Transpeptidase im 24-Stunden-Urin bei verschiedenen Nephropathien. Dt. med. Wochenschr. (1974) 99 : 2214.
- Benjamin, M.M. : Outline of Veterinary Clinical Pathology. 3rd ed. Iowa State Univ. Press, Ames. (1978) pp. 175 ~ 212.
- Berscheid, G., Groetsch, H., Hropot, M. and Klaus, E. : Enzymuria of the Rat : The Preparation of Urine for Enzyme Analysis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1983) 21 : 799.
- 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.
- Dance, N., Price, R.G., Cattell, W.R., Lansdell, J. and Richards, B. : The Excretion of N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase and  $\beta$ -Galactosidase by Patients with Renal Disease. Clin. Chim. Acta (1970) 27 : 87.
- Dieppe, P.A. and Doyle D.V. : Renal damage during treatment with antirheumatic drugs. Br. Med. J. (1978) September : 644.
- Dierickx, P.J. : Urinary Gamma-Glutamyl Transferase as an Indicator of Acute Nephrotoxicity in Rats. Arch. Toxicol. (1981) 47 : 209.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. : Veterinary Laboratory Medicine. 2nd ed. Iowa State Univ. Press, Ames. (1977) pp. 153~174.
- Ettinger, S.J. : Textbook of Veterinary Internal Medicine. edited by Ettinger, W.B. Saunders, Philadelphia (1975) pp. 1487~1491.
- Gibey, R., Dupond, J.L., Alber, D. et al. : Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase(NAG), alanine-aminopeptidase(AAP) and beta-2-microglobulin( $\beta_2M$ ) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. Clinica Chimica Acta (1981) 116 : 25.
- Gordon, J.A., Gattone, V.H. and Schoolwerth, A.C. :  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Excretion in Cisplatin-Induced Acute Renal Failure. Am.J. Kid.D. (1986) 8 : 18.
- Gresco, D.S., Turnwald, G.H. Adams, R. et al. : Urinary  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. Am. J. Vet. Res. (1985) 46 : 2332.
- Groetsch, H., Hropot, M., Kief, H. and Klaus, E. : Enzymuria in Streptozotocin-Diabetic Rats. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1986) 24 : 553.
- Groetsch, H. and Mattenheimer, H. : Urine in Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim. (1981) pp. 42~49.
- Grosman, M. E. et al. : Alterations in Renal Function Induced by Aflatoxin B<sub>1</sub> in the Rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1983) 69 : 319.
- Haga, H.J. and Andersen, K.J. : Isoenzymes of N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase in Kindney Cortex and Urine of Normal and Nephritic Rats. Renal Physiol., Basel (1985) 8 : 348.
- Ito, M., Nagamatsu, T. and Suzuki, Y. : Pharmacological Studies on Experimental Nephritic Rats (9). Changes in Activities on Urinary Enzymes in the Modified type of Masugi's Nephritis and Their Sources. Japan J. Pharmacol. (1980) 30 : 471.
- Kaneko, J.J. : Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic Press, New York (1980) pp. 337~400.
- Kind, P.R.N. : N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in urine of patients with renal disease, and after renal transplants and surgery. Clin. Chim. Acta.
- Kluwe, W.M. : Renal Function Tests as Indicators of Kidney Injury in Subacute Toxicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology (1981) 57 : 414.
- Knoll, V.E. und Rautenstrauch, H. : Vergleichende Untersuchung zur diagnostischen Wertigkeit von Dixkelektrophorese der Urinproteine und N-Acetylglucosaminidase-ausscheidung zur Erkennung von tubularen Nierenschadigungen bei chronischer Polyarthrit. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1980) 18 : 53.

22. Lee, C.W. and Lee, K.K. : Measurement of urine enzymes for the early diagnosis of nephrosis in ruminants. *J. Korean Soc. Vet. Clin. Med.* (1989) 6 : 127~141.
23. Lineweaver, H. and Burk, D. : Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* (1934) 56 : 658.
24. Mályusz, M. and Braun, D. : Enzymuria (the Output of  $\gamma$ -GTP and NAG) in the Course of Experimental Renovascular Hypertension. *Enzyme* (1981) 26 : 32.
25. Maruhn, D. : Rapid Colorimetric Assay of  $\beta$ -Galactosidase and N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase in Human Urine. *Clin. Chim. Acta* (1976) 73 : 453.
26. Mattenheimer, H. : Enzymes in the Urine. *Medical Clinics of North America* (1971) 55 : 1493.
27. Naftalin, L., Sexton, M., Whitaker, J. F. and Tracey, D. : A routine procedure for estimating serum  $\gamma$  glutamyltranspeptidase activity. *Clin. Chim. Acta* (1969) 26 : 293.
28. 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.
29. Plummer, D.T., Noorazar, S., Obatomi, D.K. and Haslam, J.D. : Assessment of Renal Injury by Urinary Enzymes. *Uremia Investigation* (1985-86) 9 : 97.
30. Price, R.G. : Urinary Enzymes, Nephrotoxicity and Renal Disease. *Toxicology* (1982) 23 : 99.
31. 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.
32. Schmidt, E. and Schmidt, F.W. :  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. *Dtsch. Med. Wschr.* (1973) 98 : 1573.
33. Shaw, F.D. : The effect of mercuric chloride intoxication on urinary  $\gamma$  glutamyltranspeptidase excretion in the sheep. *Res. Vet. Sci.* (1976) 20 : 226.
34. Thiele, K.G. :  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Aktivität im Urin Bei Gesunden und Nierenkranken. *Klin. Wochenschr.* (1973) 51 : 339.
35. Tucker, S.M., Boyd, P.J.R., Thompson, A.E. and Price, R.G. : Automated Assay of N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase in Normal and Pathological Human Urine. *Clin. Chim. Acta* (1975) 62 : 333.
36. Wellwood, J.M., Ellis, B.G., Price, R.G., Hammond, K., Thompson, A.E. and Jones, N.F. : Urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase Activities in Patients with Renal Disease. *Br. Med. J.* (1975) 3 : 408.
37. Werner, M., Maruhn, D. and Atoba, M. : Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes. *J. Chromatog.* (1969) 40 : 254.
38. 花田繁子 : 腎疾患における尿中ならびに腎組織の $\gamma$ -GTP活性について. *日腎誌* (1982) 24 : 1009.
39. 副島昭典, 長澤俊彦 : 尿中 NAG isoenzyme の分劃測定と, 腎疾患 におけるその測定の臨床的意義. *日内會誌* (1984) 73 : 1140.

## Nephrotoxicity Assessment by Determination of Urinary $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GTP) and N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosa- minidase (AGS) in Rat

Young-Ho Kim, D.V.M., M.S. and Chang-Woo Lee, D.V.M., Ph.D.

Excerpta Medica Korea and College of Veterinary Medicine, Seoul National University

### Abstract

Present experiment was performed in order to establish the optimum conditions for quantitation of  $\gamma$ -GTP and AGS activities in rat urine and investigate the applicability of the these enzymes in experimental assessment of nephrotoxicity in rats. The results obtained were as follows.

1. The optimal pH of Tris-HCl buffer containing glycylglycine for determination of urinary  $\gamma$ -GTP activity was 7.6(37°C).
2. The Michaelis constant of urinary  $\gamma$ -GTP ranged from 1.1 to 1.2 mmol/ℓ.
3. The optimal pH of citrate buffer for determination of urinary AGS activity was 3.6(37°C).



4. The Michaelis constant of urinary AGS ranged from 0.8 to 0.9mmol/ℓ .
5. Coefficient of variance for within-run imprecision of urinary  $\gamma$ -GTP ranged from 3.8 to 6.4% and that of urinary AGS ranged from 2.5 to 4.1%.
6. There was no significant difference between gel-filtered samples and crude samples in the mean activity of urinary  $\gamma$ -GTP and the intra-individual differences by gel-filtration were either increased or decreased. Mean values of  $\gamma$ -GTP activities in gel-filtered samples and crude samples were 1570 and 1590 U/ℓ , repectively.
7. The mean activity of urinary AGS increased significantly after gel-filtration and all the individual urines revealed higher activities after gel-filtration.
8.  $\gamma$ -GTP and AGS activities were linear to 135 and 7U/ℓ , respectively.
9. Urinary  $\gamma$ -GTP and AGS excretion before administration of potassium dichromate were  $22.1 \pm 11.2$  and  $0.5 \pm 0.2$  U/24hrs  $\cdot$  kg body weight respectively and increased significantly to  $102.3 \pm 44.5$  and  $5.8 \pm 3.3$ U/24hrs  $\cdot$  kg body weight respectively within 24 hours after administration.
10. BUN increased continuously from 24 hours following exposure to potassium dichromate in all 10 rats.

From these findings it is concluded that the urinary  $\gamma$ -GTP and AGS excretions are early and sensitive indicators for nephrotoxicity assessment in rat.