

랫트뇨중의 Alanine Aminopeptidase와 β -Glucuronidase 측정에 의한 신장독성 평가에 관하여

申東煥 · 李昌雨*

國立保健安全研究院 · 서울大學教 獸醫科大學*

서 론

체격이 작은 실험동물을 이용하여 腎毒性實驗을 실시하려고할때 기존의 진단방법인 배설시행, 혈액 내의 비단백태질소화합물의 농도, 뇨농축시험, 뇨분석, 조직검사 등은 조기진단이 불가능하거나,^{1,8,15)} 실험기간에 반복적인 시료의 채취가 어려워서 실험수행상 현실적인 어려움이 있다는 점에 대해 전보²²⁾에 상세히 기술한 바 있다.

1970년대에 이르러 뇨중으로 배설되는 효소들을 측정함으로써 작은 실험동물에 있어서 거의 스트레스를 주지 않고 반복검사가 가능하고 통상적인 뇨분석보다도 훨씬 조기에 신손상을 예민하게 진단할 수 있다는 점에서 기존의 신기능검사항목들의 단점을 보완할 수 있는 방법이 개발되어 이용되고 있다. 이러한 뇨효소측정에 의한 신장 이상의 진단은 실험동물^{2,6,17)} 뿐만 아니라 사람^{3,5,7,10,11,13,16,20,21)}과 가축⁴⁾에서도 응용 가능성이 있고, 뇨와 함께 배설되는 효소는 혈정보다는 신장에서 유래하는 효소이기 때문에 신장특이성 있다는 사실이 증명되었다.^{11,20,21)}

Price¹⁶⁾에 의하면 뇨효소는 다음과 같이 세가지 면에서 응용될 수 있다고 한다. 뇨효소의 측정은 신장 손상에 있어서 예민하면서도 동물에 손상을 주지 않는 검사방법으로서 효소의 종류를 잘 선택하면 nephron중 손상을 받은 일차손상부위를 알아낼 수 있고, 뇨효소의 배설량은 용량의존성이 있기 때문에 新物質의 신독성을 추정하는데 이용될 수 있으며, 뇨효소 측정은 신독성이 있는 물질에 노출되는 산업근로자에 대한 screening test로 이용될 수 있다.

이상과 같이 뇨효소 측정에 의한 신장질환과 신독성의 진단에 관한 연구는 최근 20여년간 확대일로에 있으나 측정방법에 있어서 다른 종의 동물이나 다른 종류의 시료에 대해 적용되도록 고안된 방법이 검토 없이 다른 종의 동물의 뇨에 대해 적용하고 있다는 사실이 문헌조사과정에서 발견되었다. 한편 우리나라 수의학계에서는 이와 관련된 보고가 없어서 문헌조사만으로는 이러한 실험의 문제점과 성격을 자세히 파악하기 힘들다. 따라서 저자들은 여러가지 동물에 있어서 각종 뇨효소의 측정에 필요한 적합한 조건을 연구하고 이 진단방법이 갖는 특성을 연구해 오고 있다.^{22,23)}

이 실험에서는 랫트 뇨중의 alanine aminopeptidase (AAP, E.C.3.4.1.2)와 β -glucuronidase(GRS, E.C.3.2.1.31)활성도 측정에 필요한 적합한 조건을 연구하여 측정방법을 정립하고 potassium dichromate를 투여하여 화학적 신독성을 일으킨 랫트에 대해 뇨중으로의 AAP와 GRS배설량을 측정하여 뇨효소 측정에 의한 진단기술과 BUN측정에 의한 진단기술의 차이점을 파악하며 이 뇨효소들의 배설량을 측정하면 신손상을 조기에 진단할 수 있는지 알아보기 위해 이 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 서울대학교 실험동물 사육장에서 Wistar 랫트 수컷을 분양받아 사육한후 임상적으로 건강하고 체중이 350~550g 되는 개체를 실험동물로 사용하였다.

채 뇨 : 분변으로 인하여 뇨가 오염되는 것을 최소화하기 위하여 metabolism cage에 한마리씩 넣어 사육하고 1주일이상 적응시킨후 metabolism cage내의 집뇨용 용기에 방부제로서 1% sodium azide를 0.5ml씩 첨가하여 24시간 뇨를 채취하였으며 채취한 시료는 여과지로 여과하고 3000rpm으로 15분간 원심분리하여 사용하였다.

AAP활성도 측정

1. 기본측정방법 : 기본적인 측정원리는 Mondorf 등¹³⁾에 준하였으며 완충액의 pH와 기질의 농도 및 최적과장수는 기초예비실험에 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^{-2} mol이 되도록 L-alanine-p-nitroanilide를 증류수에 용해하여 사용하였다.

○ 측정절차

Urine 0.4ml + phosphate buffer 1.4ml
 | prewarm to 30℃
 Add substrate 0.2ml
 |
 Reaction at 30℃ for 15min
 |
 Measure absorption increase by p-nitroanilide
 at 400nm

○ 효소 활성도의 산출

활성도 계산식은 다음과 같다.

○ 측정절차

	Sample ml	Sample blank ml	Reagent blank ml	Water blank ml
Urine	0.1	0.1	-	-
Buffer	0.8	0.8	0.8	0.8
D.W.	-	0.1	0.1	0.2
Substrate	0.1	-	0.1	-
incubate at 37℃ for 150min				
0.15N NaOH	1.0	1.0	1.0	1.0
read at 405nm				

$$1.1 \frac{\Delta E}{\epsilon d} \times \frac{FV}{SV} \times 10^6 = \frac{\Delta E}{9.50 \times 10^{-3}} \times \frac{2.0}{4.0} \times 10^6 (U/\ell)$$

ΔE : absorbance change per minute.

ε : extinction coefficient.

d : light path.

FV : final volume.

SV : sample volume.

2. 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정방법은 Mondorf¹³⁾에 준하되 완충액의 pH를 6.4에서 8.0까지의 범위내에서 여러가지로 만들어 3마리의 랫트 뇨에 대해 활성도를 측정하여 완충액의 pH변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH값을 구하였다.

3. 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 2~20mmol/ℓ 범위내에서 여러가지로 만들어 3마리의 랫트 뇨에 대해 AAP활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따른 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk방법¹²⁾에 의해 Michaelis constant(Km)를 구하였다.

GRS활성도 측정

1. 기본측정방법 : 기본적인 측정원리는 Szasz¹⁸⁾에 준하였으며 완충액의 pH와 기질의 농도 및 최적과장수는 기초예비실험에 의해 적합하다고 판단된 값으로 개량하였다.

○ 시 약

① 완충액 : 37℃에서 pH가 5.6인 0.2mol acetic acid-acetate완충액을 사용하였다.

② 기질액 : 50mmol되도록 p-nitrophenyl-β-glucuronide를 증류수에 용해하여 사용하였다.

③ 0.15N NaOH

○ 측정절차

효소활성도의 산출

활성도의 계산식은 다음과 같다.

$$\frac{\Delta E}{\epsilon d} \times \frac{FV}{SV} \times 10^6 = \frac{\Delta E}{18.5 \times 10^3}$$

$$\times \frac{2.0}{0.1} \times 10^6 (U/l)$$

ΔE : absorbance change per minute.

ϵ : extinction coefficient.

FV : final volume.

SV : sample volume.

d : light path.

2. GRS 측정용 표준액과 기질액의 흡수곡선 : 흡광도 측정에 필요한 최적파장수를 구하기 위해 표준용액(p-nitrophenol 15 μ mol in 0.02N NaOH)과 기질액의 흡광도를 345~445nm의 범위 내에서 조사하였다.

3. 완충액의 pH에 의한 영향 : 기본적인 측정방법은 Szasz¹⁸⁾에 준하되 완충액의 pH를 3.5~5.8 범위 내에서 여러가지로 만들어 3마리의 랫트뇨에 대해 GRS 활성도를 측정하여 완충액의 pH변화에 따른 영향을 조사하고 최고의 활성도를 나타내는 pH값을 구하였다.

4. 기질의 농도에 의한 영향 : 기질의 농도를 7~70mmol/l의 범위내에서 여러가지로 만들어 3마리의 랫트뇨에 대해 GRS 활성도를 측정하여 반응액내 기질의 농도에 따르는 영향을 조사하고 Lineweaver와 Burk¹²⁾의 방법에 의해 Km치를 구하였다.

Gel filtration의 영향 : 뇨중의 효소측정에 있어서 gel filtration의 영향을 조사하기 위하여 7마리의 랫트뇨를 각각 Sephadex G-25M으로 충전된 Column PD-10(Pharmacia Fine Chemicals)을 통과시켜 여과하고 여과전과 여과후의 시료에 대해 AAP와 GRS의 활성도를 측정하여 그 성적을 비교하였다.

직선성 : 이 실험에서 채택된 측정방법의 직선성의 한계를 구하기 위해 3마리의 랫트뇨를 pooling하여 gel filtration한후 여러가지 배수로 희석하여 실측치와 이론치를 구하여 그 성적을 비교하였다.

精度(Within-run imprecision) : 이 실험에 채택된 측정방법의 精度를 조사하기 위하여 3마리의 랫트뇨에 대해 AAP와 GRS 활성도를 9~10회 반복측정하여 변이계수(coefficient of variance)를 구하고 분산 분석을 실시하였다.

응용실험 : 응용실험을 위하여 10마리의 랫트에 potassium dichromate 10mg을 증류수 1ml에 용해시켜 각각 피하주사하였고 투여전과 투여후 24, 48, 72와 96시간에 각각 24시간 뇨를 채취하여 gel filtration한후 AAP와 GRS 활성도를 측정하여 potassium dichromate투여에 의한 두 효소의 배설량의 경시적 변동을 조사하였다.

결 과

AAP활성도 측정에 있어서 2마리의 랫트뇨는 phosphate 완충액의 pH가 7.8일때 가장 높은 활성도를 나타내었고 1마리의 랫트뇨는 pH 8.0에서 가장 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 1).

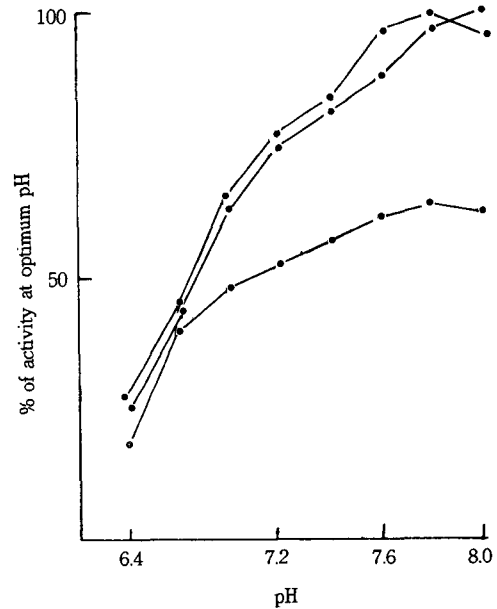


Fig. 1. Effect of pH of phosphate buffer on urinary alanine aminopeptidase activity in three different urines.

AAP활성도 측정에 있어서 기질농도의 변화에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 2와 같았으며 이 성적을 근거로 하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 Km치는 0.8~1.0mmol/l였다(Fig. 3).

GRS활성도 측정에 있어서 효소반응 산물인 p-nitrophenol의 흡광도는 405nm에서 최대였으며 기질인 p-nitrophenyl- β -glucuronide의 흡광도는 405nm부터 거의 무시할 정도였다(Fig. 4).

GRS활성도 측정에 있어서 2마리의 랫트뇨는 acetic acidacetate완충액의 pH가 5.6일때 가장 높은 활성도를 나타냈으며 1마리의 랫트뇨는 5.8에서 가장 높은 활성도를 나타내었다(Fig. 5).

GRS활성도 측정에 있어서 기질농도의 변화에 따르는 활성도의 차이는 Fig. 6과 같았으며 이 성적을

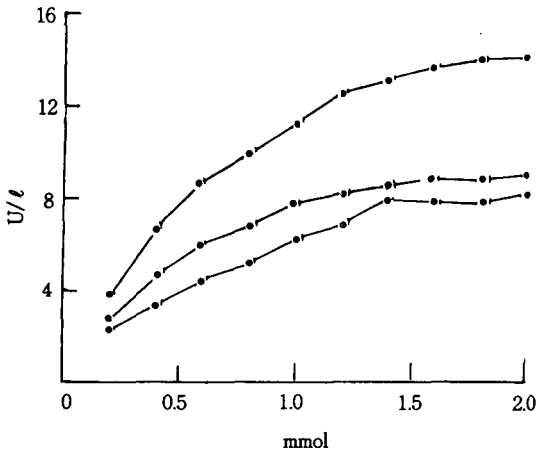


Fig. 2. Effect of variation of L-alanine-p-nitroanilide concentration on activities of alanine aminopeptidase in three different urines.

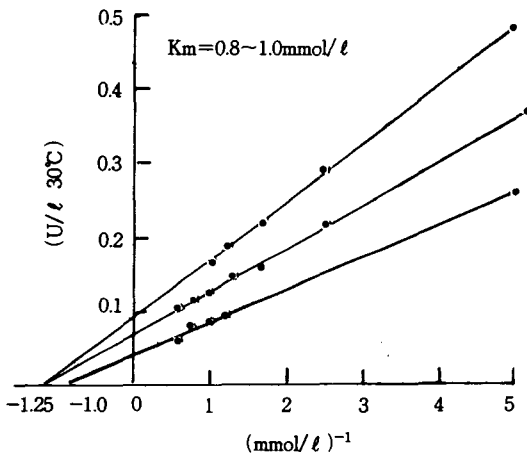


Fig. 3. Lineweaver-burk plot of data shown in Fig. 2.

근거로하여 Lineweaver와 Burk의 방법에 의해 구한 K_m 치는 $0.65\sim 0.79\text{mmol/l}$ 였다(Fig. 7).

7마리의 랫트뇨에 대해 gel filtration한 시료와 안한 시료로 구분하여 AAP활성도를 측정한 결과 gel filtration한 시료는 $29\pm 20\text{U/l}$ 를 나타내었고 안한 시료는 $20\pm 13\text{U/l}$ 를 나타내어 gel filtration한 시료가 안한 시료보다 유의성($p < 0.005$)있게 높은 활성도를 나타내었으며 개체별로도 gel filtration한 시료가 25~53.5%정도 높은 활성도를 나타내었다(Table 1).

GRS활성도에 있어서 gel filtration한 시료가 $57\pm 40\text{U/l}$ 를 나타내었고 안한 시료는 $56\pm 39\text{U/l}$ 를 나타

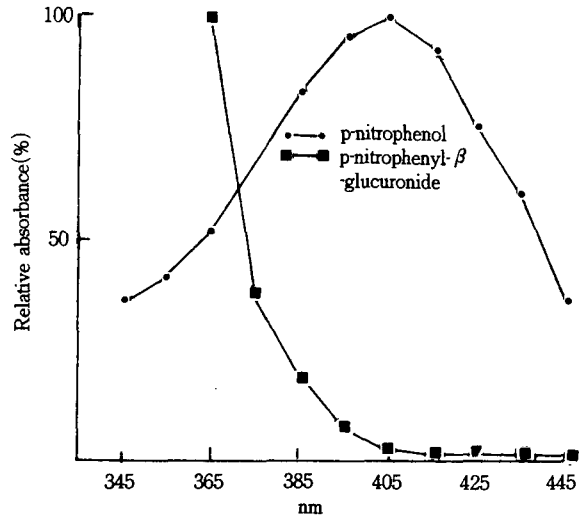


Fig. 4. Absorption spectra of p-nitrophenol($15\mu\text{mol}$) and p-nitrophenyl- β -glucuronide(2.5mmol).

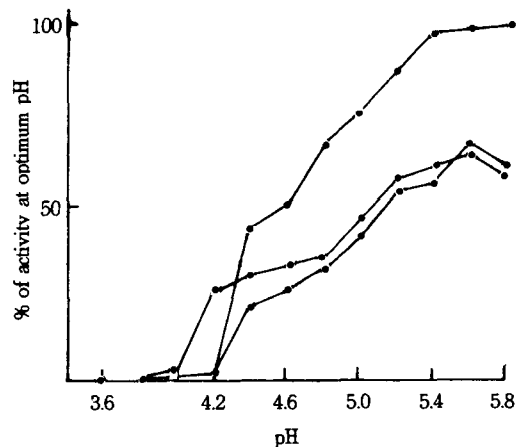


Fig. 5. Effect of pH of acetic acid-acetate buffer on urinary β -glucuronidase activities in three different urines.

내어서 두군간에는 유의차가 인정되지 않았으며 개체별로는 gel filtration에 의해 활성도가 증가한 것도 있고 감소한 것도 있었다(Table 2).

측정방법의 직선성을 조사한 결과 AAP활성도는 약 2U/l 까지 직선상을 나타내었다(Fig. 8).

GRS활성도는 약 3.6U/l 까지 직선상을 나타내었다(Fig. 9).

3마리의 랫트뇨에 대해 AAP활성도를 9~10회 반복측정한 결과 변이계수는 5.5~6.3%였으며 F-검정 결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

3마리의 랫트뇨에 대해 GRS활성도를 9~10회 반

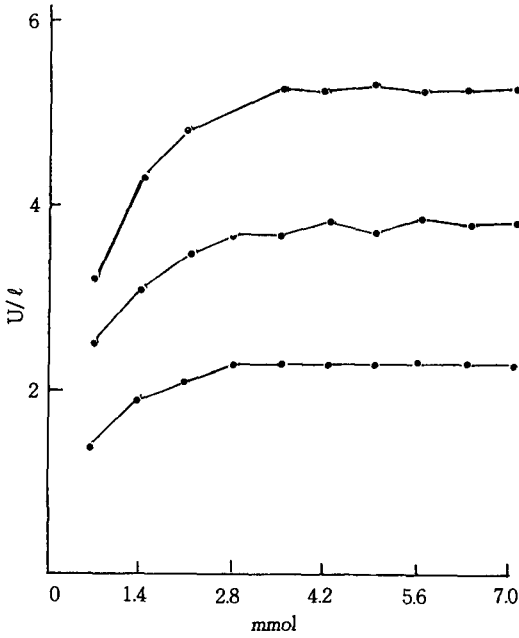


Fig. 6. Effect of variation of p-nitrophenyl- β -glucuronide concentration on activities of β -glucuronidase in three different urines.

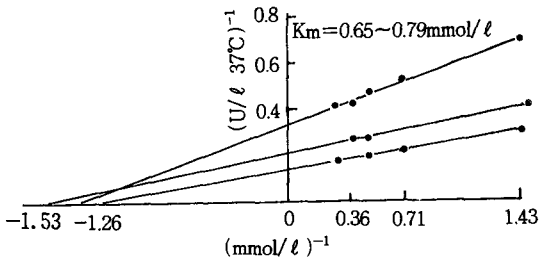


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the data shown in Fig. 6.

복 측정된 결과 변이계수는 1.4~6.2%였으며 F-검정 결과 반복간에 유의차가 인정되지 않았다(Table 3).

potassium dichromate를 투여한 10마리의 랫트중 1마리(No. 1)는 24시간 이후부터 배뇨치 못했으며 다른 2마리(No. 3,6)는 투여후 24시간부터 48시간 사이에 배뇨치 못하였고 또 다른 1마리(No. 7)는 투여후 48시간부터 배뇨치 못하였다. 한편 투여후 지속적으로 배뇨한 개체들은 다뇨나 펄뇨를 나타내었다(Fig. 10).

AAP배설량은 투여전에 비해 현저히 증가하였는데 ($p < 0.0001$) 투여전 24시간 배설량은 $675 \pm 227 \text{mU}/2$.

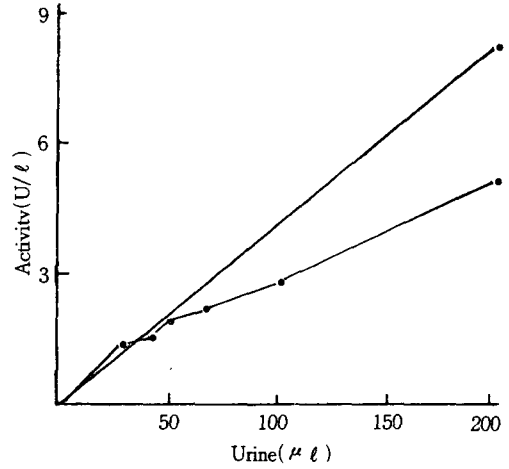


Fig. 8. Linearity of alanine aminopeptidase activity.

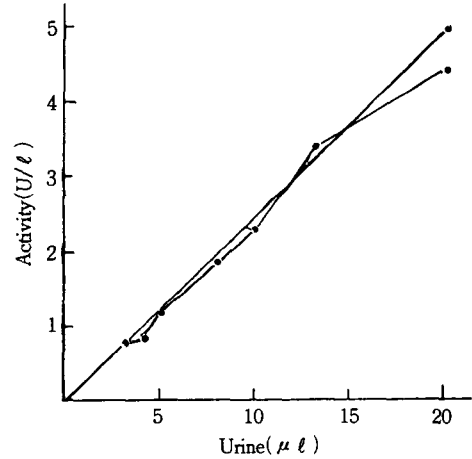


Fig. 9. Linearity of β -glucuronidase activity.

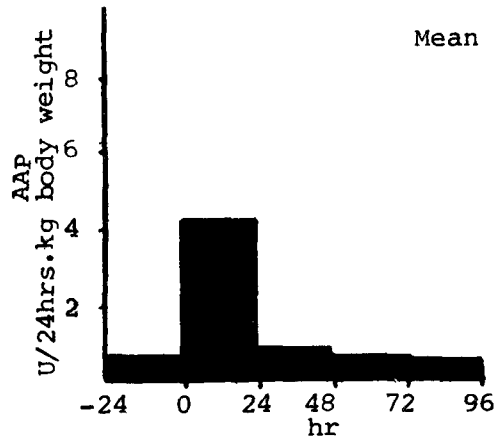


Fig. 11. Change in excretion of alanine aminopeptidase in rats after administration of potassium dichromate.

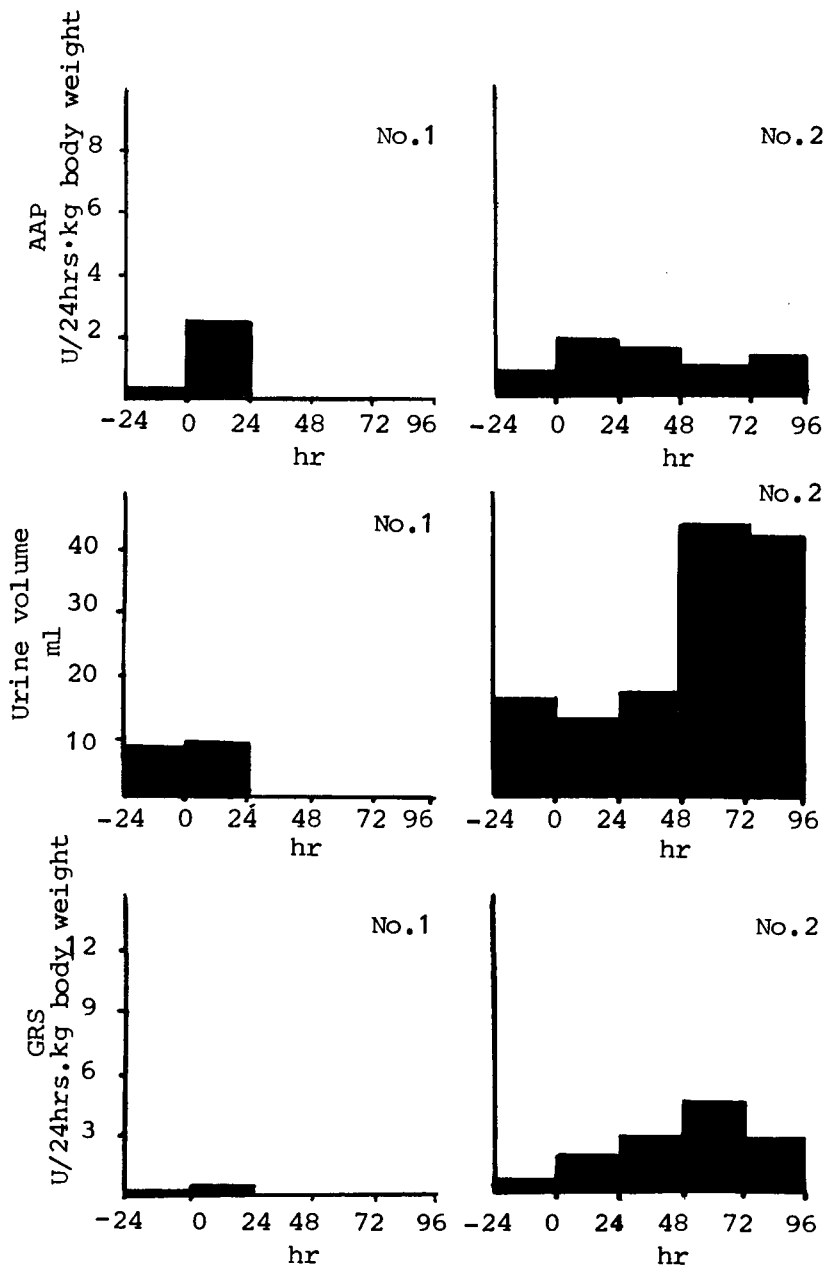


Fig. 10. Changes of urine volume, urinary alanine aminopeptidase and β -glucuronidase excretion after administration of potassium dichromate in 10 individual rats.

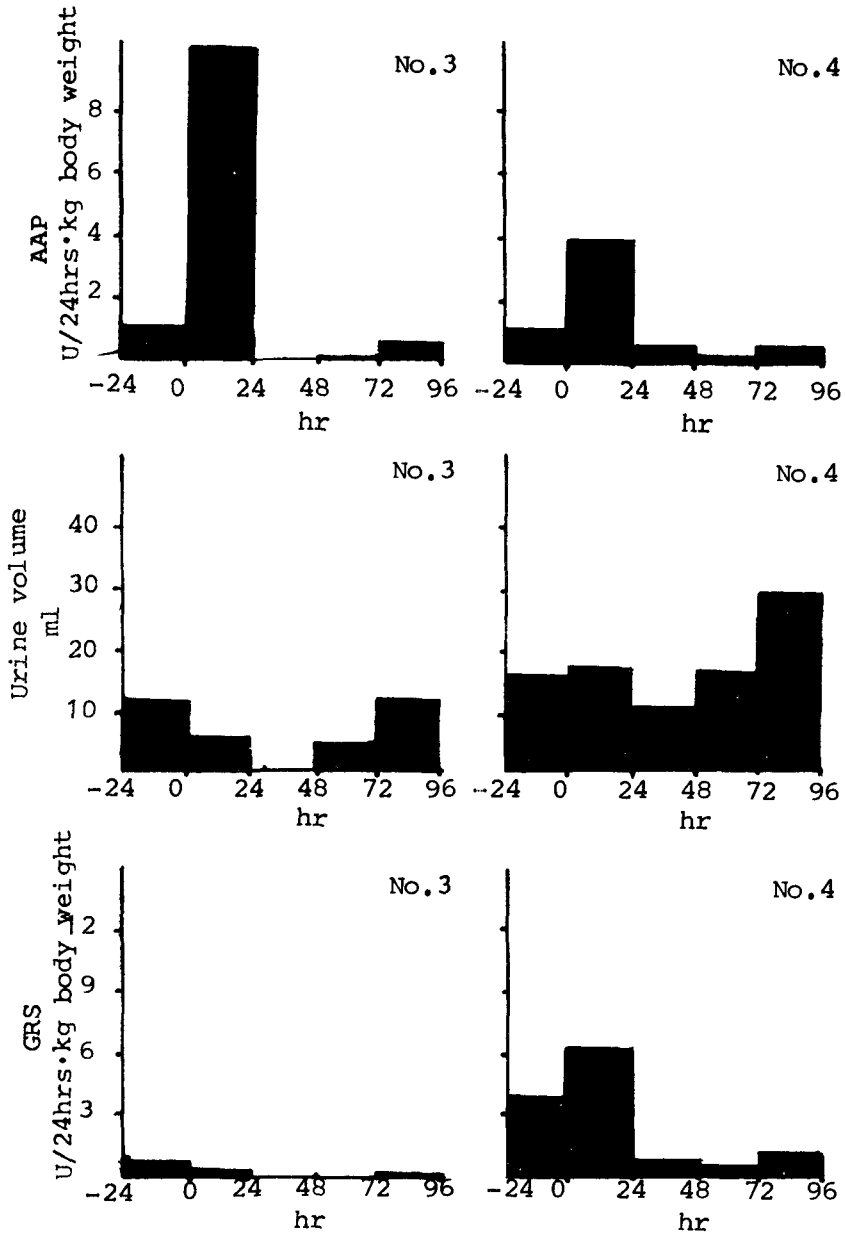


Fig. 10. (continued)

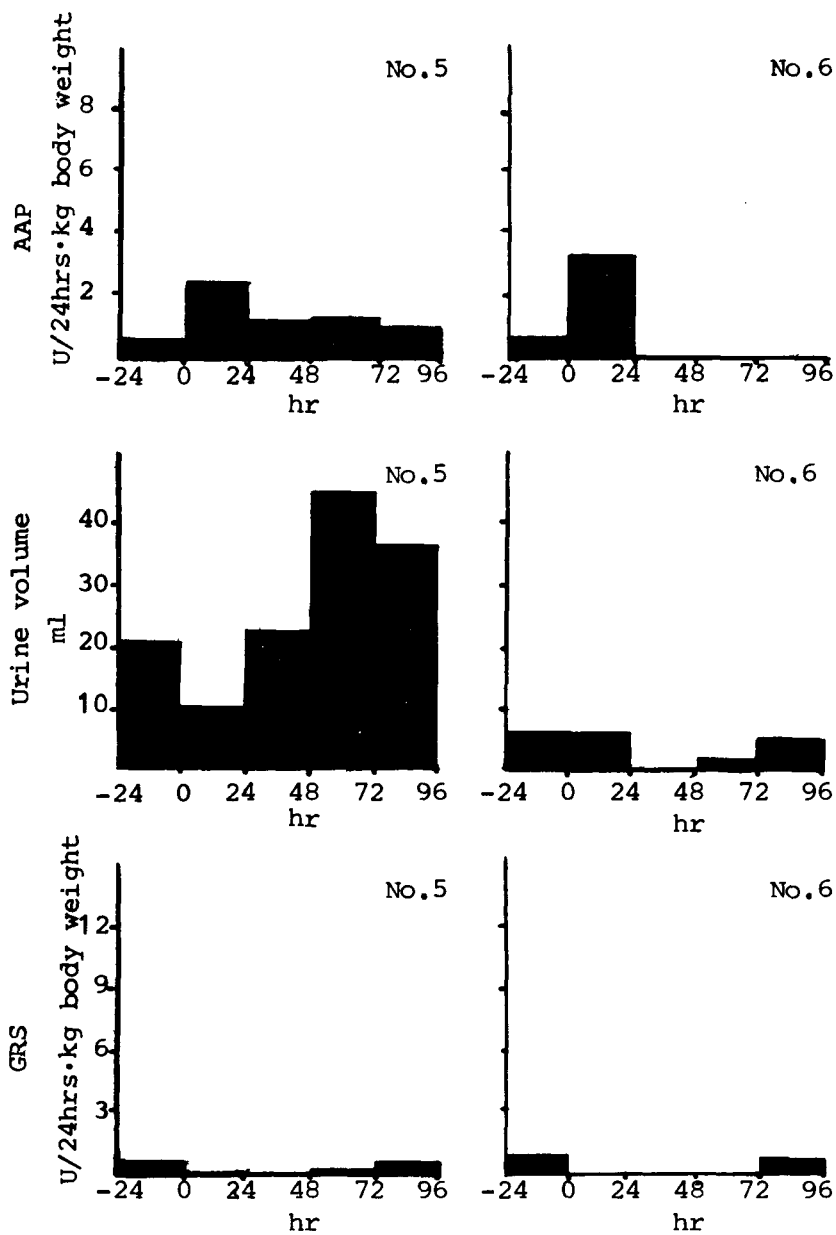


Fig. 10. (continued)

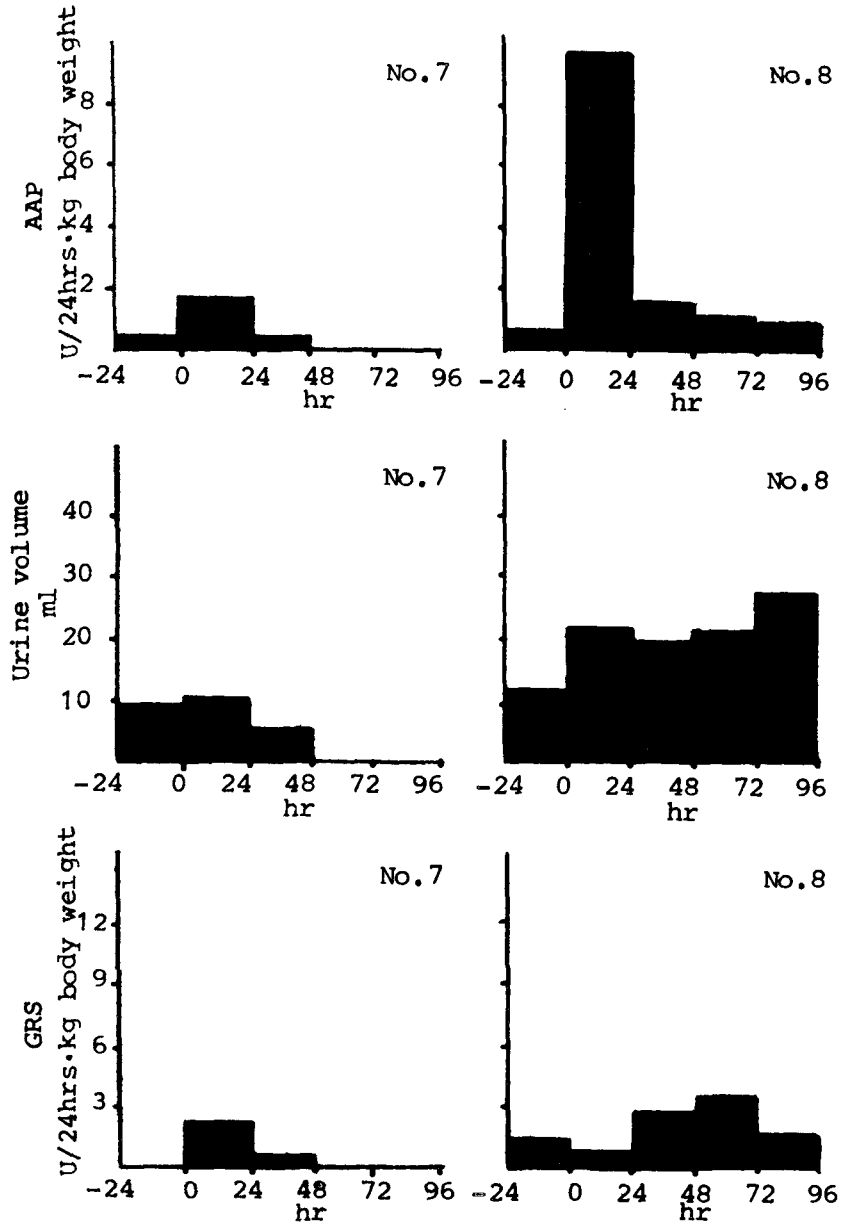


Fig. 10. (continued)

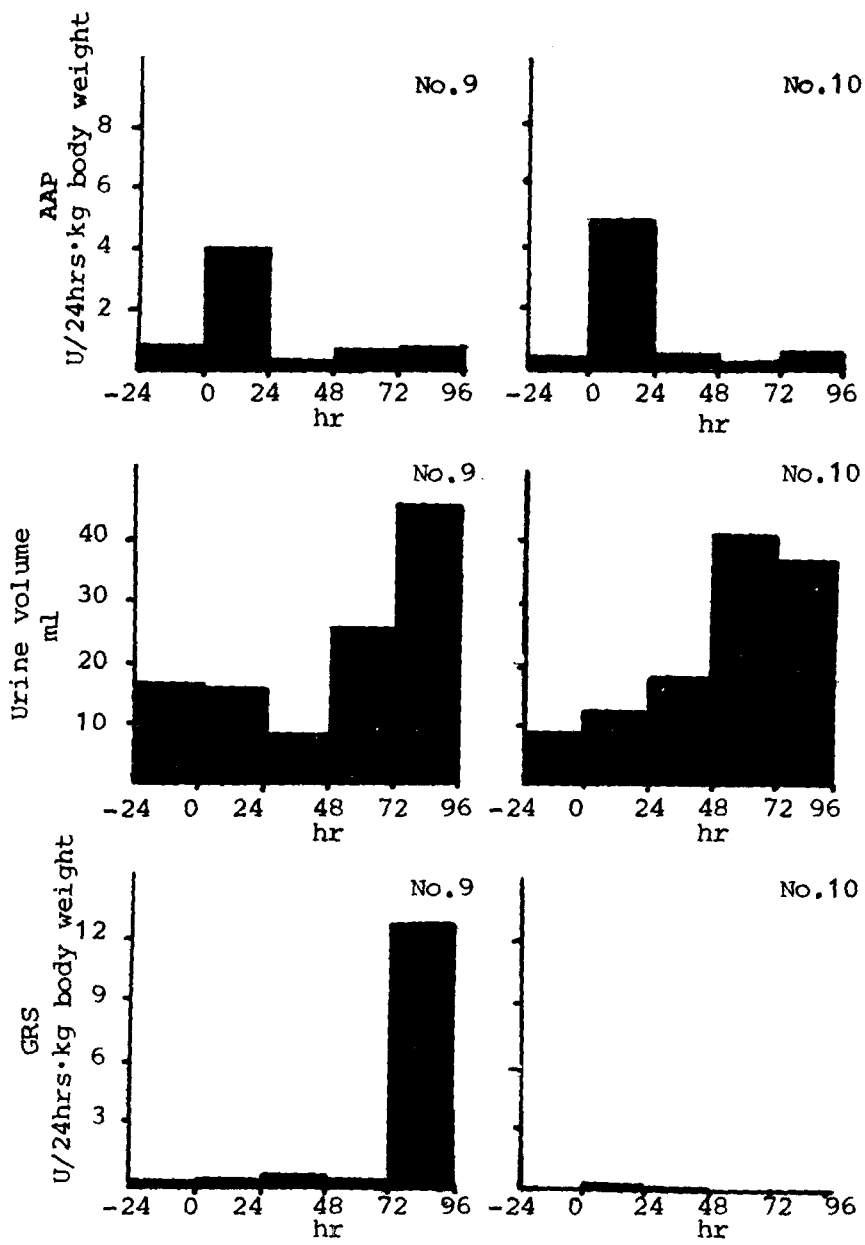


Fig. 10. (continued)

Table 1. Effect of Gel Filtration on Alanine Aminopeptidase Activity in Urine

Urine	U/ℓ at 30°C		Difference (%)
	Before gel filtration	After gel filtration	
1	22	32	+45.5
2	14	19	+35.7
3	8	10	+25
4	16	24	+50
5	20	25	+25
6	16	21	+31.3
7	47	72	+53.2
Mean	20	29*	
SD	13	20	

* : significant at 0.05 level.

Table 2. Effect of Gel Filtration on β-glucuronidase Activity in Urine

Urine	U/ℓ at 30°C		Difference (%)
	Before gel filtration	After gel filtration	
1	47	45	+ 4.3
2	96	99	+ 3.1
3	13	12	- 7.7
4	123	126	+ 2.4
5	30	34	+13.3
6	43	42	- 2.3
7	37	44	+18.9
Mean	56	57	
SD	39	40	

Table 3. Within-Run Imprecision(U/ℓ)

		AAP		GRS	
		Mean	SD	Mean	SD
Rat 1	\bar{X}	16.3	0.9	17.3	0.8
	S				
	CV(%)	5.5		4.6	
	N	10		10	
Rat 2	\bar{X}	14.4	0.9	43.3	2.7
	S				
	CV(%)	6.3		6.2	
	N	10		9	
Rat 3	\bar{X}	19.3	1.1	35.3	0.5
	S				
	CV(%)	5.7		1.4	
	N	9		9	

AAP=alanine aminopeptidase
GRS= β-glucuronidase

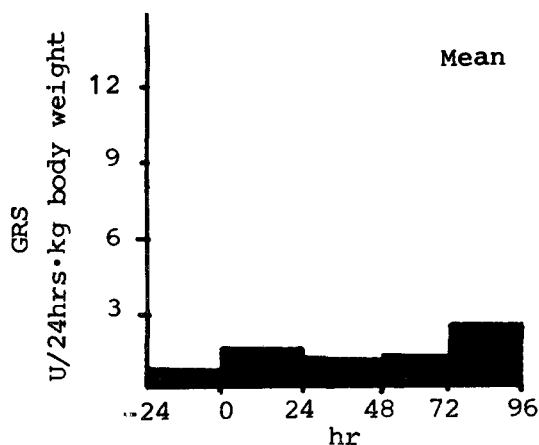


Fig. 12. Change in excretion of β-glucuronidase in rats after administration of potassium dichromate.

4hr · kg body weight이었으며 투여후 24시간 배설량은 4,246±2,567mU/24hr · kg body weight이었다. 그 후 배설량은 감소하여 투여후 72시간부터 96시간 사이의 24시간 배설량은 투여전 수준과 거의 같았다 (Fig. 11).

투여전 24시간동안의 GRS배설량은 921±1 121mU/24hr · kg body weight였으며 투여후 24, 48, 72, 96시간의 배설량은 각각 1.356±1.841, 1.114±1.054, 1.312±1.695, 2.508±4.230mU/24hr · kg body weight로서 경시별로 유의성이 인정되지 않았다(Fig. 12).

고 찰

AAP활성도 측정에 있어서 L-alanine-p-nitroanilide를 기질로 사용하면 파장수 400nm로 측정하는 것이 가장 적합하다는 것은 전보에서 보고한 바 있으며²³⁾ 이 실험에서 phosphate완충액의 pH는 7.8이 가장 적합한 것으로 나타났다. Mondorf 등¹³⁾은 파장을 405nm, 완충액의 pH를 7.6으로 하여 측정하였는데 이러한 차이는 실험실조건과 실험동물의 종의 차이에 기인된 것으로 사료된다.

L-alanine-p-nitroanilide를 기질로 사용할때 AAP의 Km치는 0.8~1.0mmol/l이었으며 이 실험에서 Pfeiderer,¹⁴⁾ Mondorf 등¹³⁾에 준하여 사용한 기질의 최종 농도는 1.66mmol/l였다. 이 실험에서 기질의 최종 농도가 Km치의 10배를 충족시키지 못하기 때문에 반복측정에 따르는 재현성이 낮을 위험성을 의심할 수 있다. 그래서 3마리의 랫트노에 대해 9~10회 반복하여 AAP활성도를 측정하여 반복간의 변이계수를 조사한 결과 5.5~6.3%이었으며 F-검정결과 반복간에 유의성이 없었으므로 재현성은 좋은 것으로 판단되었다.

GRS활성도 측정에 있어서 효소반응의 산물인 p-nitrophenol의 흡광도는 405nm에서 최대였으며 기질인 p-nitrophenyl-β-glucuronide의 흡광도는 405nm에서 거의 무시할 정도였으므로 405nm에서 측정하는 것이 적합한 것으로 나타났다. 이 결과는 Szasz¹⁸⁾의 보고와 일치하는 것이다. 이 실험에서 acetic acid-acetate 완충액의 pH는 5.6이 적당한 것으로 나타났다. Szasz¹⁸⁾는 완충액의 pH가 4.0일때 최대의 활성도를 측정할 수 있다고 하였는데 이 실험의 결과와 일치하지 않는 이유는 Szasz¹⁸⁾는 사람의 혈청내 GRS활성도를 측정하였고 이 실험에서는 랫트노종의 GRS활성도를

측정하여 동물의 종과 시료의 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다.

p-nitrophenyl-β-glucuronide를 기질로 사용할때 GRS의 Km치는 0.65~0.79mmol/l였다. 3마리의 랫트노에 대해 9~10회 반복하여 GRS활성도를 측정하여 반복간의 변이계수를 조사한 결과 1.4~6.2%였고, F-검정결과 반복간 유의성이 없어서 이 방법에 의한 재현성은 좋은 것으로 판단되었다.

gel filtration이 AAP활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 gel filtration한 시료가 안한 시료보다 활성도가 유의성 있게 높았고 개체별로도 20~53.3%까지 높았던 것으로 미루어 보아 랫트노 중에는 AAP의 inhibitor가 존재함을 알 수 있고 inhibitor의 양도 개체별로 다르므로 반드시 gel filtration하여 AAP활성도를 측정해야될 것으로 사료된다.

gel filtration이 GRS활성도에 미치는 영향을 조사한 결과 gel filtration한 시료와 안한 시료 사이에 유의성이 없었고 개체별로는 GRS활성도가 증가한 것도 있고 감소한 것도 있는 것으로 미루어 보아 랫트노 중에는 GRS의 inhibitor나 activator가 존재한다는 것을 알 수 있었고 개체별로 inhibitor나 activator의 양도 다르므로 반드시 gel filtration하여 GRS활성도를 측정해야 하는 것으로 사료된다.

Berscheid 등²⁾은 랫트노의 AAP활성도는 gel filtration에 의해 증가했고 GRS활성도는 증가한 것도 있고 감소한 것도 있었다고 보고하였는데 이것은 이 실험의 결과와 일치하는 것이다.

Kushinsky 등⁹⁾은 노종의 saccharolactone과 일련의 steroid-glucuronide는 GRS에 대한 강력한 inhibitor라고 보고하였다.

Werner 등¹⁹⁾은 gel filtration한 시료가 투석한 시료보다 더 높은 GRS활성도를 나타내기 때문에 투석보다 gel filtration이 GRS inhibitor를 더 효과적으로 제거한다고 하였다.

측정방법의 직선성을 조사한 결과 AAP는 2.0U/l까지 GRS는 3.6U/l까지 직선상을 나타내어 시료중의 활성도가 그 이상일때는 희석하여 측정해야될 것으로 사료된다.

potassium dichromate투여후 AAP배설량이 처음 24시간동안에 투여전 수준의 6.3배나된 것으로 미루어 보아 AAP배설량은 신독성 조기진단의 예민한 지표임이 판명되었다. potassium dichromate를 투여한지 24시간 이후부터 AAP배설량은 감소하여 72시간부터

96시간사이에는 투여전 수준과 비슷했다. 이러한 결과로 미루어 보아 신장질환이 경과하여 AAP배설량이 정상상태와 비슷한 수준인 시점에 AAP배설량을 측정하게 되면 진단에 오류를 일으킬 수 있으며 환축 또는 환자의 경우 질병이 상당히 경과된후 진료를 받게 되기 때문에 뇨중 AAP배설량의 측정은 질병진단의 목적보다는 독성실험에 이용되는 것이 실용적일 것으로 사료된다.

potassium dichromate투여후 GRS배설량은 경시별로 유의성을 나타내지 않아 신질환의 조기진단에는 AAP배설량이 GRS배설량보다 예민한 지표인 것으로 사료된다.

신독성물질을 과량투여하면 꾀뇨증 또는 무뇨증을 나타내는 개체가 있고 이런 경우 뇨중 효소배설량 측정으로는 신독성을 진단할 수 없는 위험성이 있다는 점을 고려하여 실험설계를 하지 않으면 안될 것으로 사료된다. 또한 potassium dichromate 투여후 BUN은 계속적인 증가를 나타내지만,²²⁾ 뇨중으로의 AAP 배설량은 최초 24시간 동안은 현저한 증가를 나타내고 그후 급속히 감소하는 상위한 경향을 나타내기 때문에 신독성실험을 설계할 때 이러한 사실을 고려해야 할 것으로 사료된다.

결 론

랫트뇨증의 AAP와 GRS활성도 측정에 필요한 적합한 조건들을 조사하여 실험방법을 정립하고 랫트를 이용한 신독성실험에 있어서 이들 두효소의 응용 가능성을 조사하기 위하여 수행한 실험결과는 다음과 같다.

1. AAP활성도 측정시 phosphate완충액의 최적 pH는 7.8이었다.
2. AAP의 Km치는 0.8~1.0mmol/l 이었다.
3. GRS활성도 측정시 최적 파장수는 405nm이었다.
4. GRS활성도 측정시 acetic acid-acetate완충액의 최적 pH는 5.6이었다.
5. GRS의 Km치는 0.65~0.79mmol/l 이었다.
6. gel filtration한 시료와 안한 시료의 AAP활성도는 각각 29±20U/l, 20±13U/l로서 유의성(p<0.05)이 있었고 개체별로는 gel filtration한 시료가 25~53.5%정도 높았다.
7. gel filtration한 시료와 안한 시료의 GRS활성도

는 각각 57±40, 56±39U/l로서 유의성이 없었고 개체별로는 gel filtration에 증가한 것도 있었고 감소한 것도 있었다.

8. 측정방법의 직선성을 조사한 결과 AAP활성도와 GRS활성도는 각각 2.0, 3.6U/l까지 직선상을 나타내었다.

9. 측정방법의 재현성을 조사한 결과 AAP와 GRS의 변이계수는 각각 5.5~6.3, 1.4~6.3%였고 F-검정결과 두효소 모두 반복간 유의차가 인정되지 않았다.

10. potassium dichromate투여전 24시간동안과 투여후 24시간동안의 AAP배설량은 각각 675±227mU./24hr·kg, 4,246±2,567mU./24·kg으로서 투여후 24시간동안 현저한 배설량의 증가를 나타내었다.

11. potassium dichromate투여후 GRS배설량은 경시별로 유의하지 않았다.

이상의 결과를 종합하면 랫트를 이용한 신독성실험에 있어서 뇨AAP배설량이 뇨GRS배설량보다 신독성의 조기진단에 더 예민한 지표로 사용될 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Benzamin, M.M. : Outline of Veterinary Clinical Pathology 3rd ed. Iowa State Univ. Press, Ames. (1978) pp. 175~212.
2. Berscheid, G., Groetsch, H., Hropot, M., Klaus, E. and Mattenheimer, H. : Enzymuria of the rat : The preparation of urine for enzyme analysis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1983) 21 : 799.
3. Burchardt, U. : Hamenzymausscheidung bei erkrankungen der inneren organe. Z. ges. inn. Med., Jahrg. 38 (1983) Heft 21 : 565.
4. Crowell, V.A., Divers, T.J., Byars, T.D., Marshall, A.E., Nusbbaum, I.E. and Larsen, L. : Neomycin toxicosis in calves. Am. J. Vet. Res. (1981) 42 : 29.
5. Gibey, R., Dupond, J.L., Alber, D., Floris, R.L. and Henry, J.C. : Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase(NAG), alanineaminopeptidase(AAP) and beta-2-microglobulin in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. Clin. Chim. Acta (1981) 116 : 25.
6. Groetsch, H., Hropot, M., Kief, H. and Klaus, E. : Enzymuria in streptozotocin-diabetic rats. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1986) 24 : 533.
7. Groetsch, H., Mattenheimer, H. : Urine. in Methods of enzymatic analysis. 3rd ed. Vol III edited by bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim (1981) pp. 42~49.
8. Kaneko, J.J. : Clinical biochemistry of domestic animals. 3rd

- ed. Academic Press, N.Y. (1980) pp. 337~400.
9. Kushinsky, S. and Chen, V.L. : Urinary inhibitors of β -glucuronidase. *Enzym. Biol. Clin.* (1967) 8 : 266.
 10. Kushinsky, S., Chen, V.L. and Ottermess, I. : Activity of β -glucuronidase. *Nature* (1967) 214 : 142.
 11. Mattenheimer, H. : Enzymes in the urine. *Medical Clinics of North America* (1971) 55 : 1493.
 12. Lineweaver, H. and Burk, D. : Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* (1934) 56 : 658.
 13. Mondorf, A.W., Breier, J., Hendus, J., Scherberich, J.E., Mackenrodt, 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.
 14. Pfeleiderer, G. : *Methods in enzymology* (1970) vol. 19. Academic Press, N.Y. pp. 514~521.
 15. 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.
 16. Price, R.G. : Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* (1982) 23 : 99.
 17. Robinson, D., Price, R.G. and Dance, N. : Rat-urine glycosidase and kidney damage. *Biochem. J.* (1967) 102 : 533.
 18. Szasz, G. : Serum β -glucuronidase determination with p-nitrophenyl glucuronide. *Clin. Chim. Acta.* (1967) 15 : 275.
 19. Werner, M., Maruhn, D. and Abota, M. : Use of gel filtration in the assay of urinary enzymes. *J. Chromatog.* (1967) 40 : 254.
 20. 副島昭典, 長澤俊彦 : 尿中 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) isoenzyme의 分劃測定と 腎疾患におけるその測定の臨床的意義. *日內會誌* (1984) 73 : 30.
 21. 花田繁子 : 腎疾患における尿ならびに腎組織의 γ -GTP 活性について. *日腎誌* (1982) 24 : 55.
 22. 金永昊, 李昌雨 : Rat에서 뇨중 γ -Glutamyltranspeptidase와 N-Acetyl- β -D-glucosaminidase 측정에 의한 신독성 평가에 관하여. *韓國臨床獸醫學會誌* (1990) 7 : ~ .
 23. 李昌雨, 李慶甲 : 반추동물 신증의 조기진단을 위한 뇨효소 측정법. *韓國臨床獸醫學會誌* (1989) 6 : 127.

Nephrotoxicity Assessment by Determination of Alanine Aminopeptidase (AAP) and β -Glucuronidase(GRS) in Rat

Dong-Hwan Shin, D.V.M., M.S. and **Chang Woo Lee***, D.V.M., Ph.D.

National Institute of Safety Research and College of Veterinary Medicine,
Seoul National University

Abstract

Present experiment was performed in order to establish the optimal reaction conditions for determination of urinary AAP and GRS activities and to investigate the applicability of urinary AAP and GRS in nephrotoxicity test in rat. The results were as follows ;

1. The optimal pH of phosphate buffer for determination of urinary AAP activity was 7.8.
2. The Michaelis constant of urinary AAP ranged from 0.8 to 1.0mmol/ℓ.
3. The optimal wave length for determination of urinary GRS activity was 405nm.
4. The optimal pH of acetate buffer for determination of urinary GRS activity was 5.6.
5. The Michaelis constant of urinary GRS ranged from 0.65~0.79mmol/ℓ.
6. The AAP activities in gel-filtered samples were significantly higher than those in crude samples. Mean values of AAP activities in gel-filtered samples and crude samples were 29 ± 20 and $20 \pm 13U/\ell$, respectively.
7. There was not significant difference between gel-filtered samples and crude samples in urinary GRS

activities. Mean values of GRS activities in gel-filtered samples and crude samples were 57 ± 40 and $56 \pm 39 \text{U}/\ell$, respectively.

8. Limits of linearity of urinary AAP and GRS activities were 2.0 and $3.6 \text{U}/\ell$, respectively.

9. Within-run imprecisions of the assays, were acceptable, as the coefficients of the AAP activities ranged from 5.5 to 6.3% and those of GRS activities ranged from 1.4 to 6.2%, respectively.

10. Urinary AAP excretion was $675 \pm 227 \text{mU}/24\text{hrs} \cdot \text{kg}$ before administration of potassium dichromate, and increased significantly to $4246 \pm 2567 \text{mU}/24\text{hrs} \cdot \text{kg}$ within 24 hours after administration of potassium dichromate.

11. Urinary GRS excretion did not increase significantly after administration of potassium dichromate.

12. From these findings it is concluded that urinary AAP excretion is early and sensitive indicator to detect kidney damage in nephrotoxicity experiment.
