

진도견의 적혈구내 K, Na 및 reduced glutathione 함량에 관한 조사

김홍태 · 장혜숙 · 장우석 · 진태원 · 장인호 · 장광호
김영홍 · 大和 修* · 前出 吉光* · 이근우¹
경북대학교 수의과대학, *일본 북해도대학 수의학부

Studies on the Concentrations of K, Na and Reduced Glutathione in Red Blood Cells of Jindo Dogs

Hong-tae Kim, Hye-sook Chang, Woo-suk Chang, Tae-won Jin,
In-ho Jang, Kwang-ho Jang, Young-hong Kim, Osamu Yamato*,
Yoshimitsu Maede* and Keun-woo Lee¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

*College of Veterinary Medicine, Hokkaido University

ABSTRACT : Generally, it is known that the composition of the cation of the dog's RBCs is high in potassium(K) and low in sodium(Na). However, it is reported that certain kinds of dogs have HK, HG phenotype which contains a large amount of reduced glutathione(GSH) by the effect of Na-K pump on the cell membrane of RBC with high concentration of K and low concentration of Na. Although this HK phenotype is not regarded as a disease, it is supposed to be an important assignment to examine the distribution and the occurrence rate of the dogs that contain HK cell in their RBCs for the proper clinical treatments as these HK dogs are very sensitive to aromatic disulfide or onions and have a tendency to cause hemolysis. Accordingly, present study was performed to measure the concentration of K, Na and GSH in the RBCs of Jindo dogs and that of Dosa dogs at the same time.

Key words : potassium(K), sodium(Na), reduced glutathione(GSH), Jindo dog.

서 론

일반적으로 개와 고양이 및 육식동물의 적혈구내에는 Na-K-ATPase activity가 완전히 결여됨으로써 적혈구 세포내 K농도가 낮고 Na의 함량이 높은 상태 즉, LK type을 나타낸다는 것은 이미 알려진 사실이다^{2,13,22,24,25}. 그러나 이와는 반대로 적혈구내 유전적으로 Na-K-ATPase activity가 존재함으로써 적혈구 세포내 K농도가 높고 Na농도가 낮은 상태 즉, high K, low Na(HK)의 phenotype을 가진 개에 관하여서도 보고된바 있다^{11,17}. 즉 Maede 등(1977)은 양과 섭취 후 돌발적인 급성 용혈성 빈혈을 나타내는 잡종견에서의 혈액 검사를 통해서 적혈구내 K농도가 높고 Na농도가 낮으며 또한 Na-K-ATPase 활성이 높은 특성을 지

닌 잡종견에 관하여 최초로 보고하였으며, 이 후 Maede 등(1982), (1983), Ogawa(1988) 등을 비롯한 여러 연구가들에 의하여 이러한 HK phenotype을 가진 잡종견에 관하여서 확인된바 있다^{10,23}.

Fujise 등^{7,8}, Maede 등¹⁵, Degen⁴은 순수혈통을 지닌 Shiba 및 Akita종에서도 동일한 결과를 보고 하였으며 특히, Fujise 등(1997)은 이러한 HK phenotype을 지닌 개는 한국과 일본 전역에 분포되어 있으며 가장 높은 발생률은 한국의 진도견이었다고 보고하였다⁷.

Maede 등은 일반적으로 HK phenotype을 지닌 개에서는 유전적으로 적혈구내 reduced glutathione(GSH) 함량도 높다고 하였으나^{16,18,20,21} Fujise 등은 HK phenotype을 나타내면서도 reduced glutathione 함량이 정상인 개에 관해서도 보고하였다^{6,7,9,23}.

비록 이러한 HK phenotype이 질병으로 분류되지는 않지만 정상적인 LK 견에 비해서 양파나 aromatic disulfide의 섭취로 인한 용혈성 빈혈에 대해서는 훨씬

¹Corresponding author.

진 감수성이 높은 것으로 알려져 있다.^{3,5,12,14,19,26,27}

따라서 본 연구에서는 가장 높은 HK phenotype을 지닌 것으로 알려진 한국의 진도견을 대상으로 적혈구내 K, Na 이온 농도를 측정하여 high K(HK), low K(LK)견으로 분류를 함과 동시에 reduced glutathione (GSH) 함량을 측정하여 GSH 함량에 따른 High glutathione(HG) 및 low glutathione(LG) 견으로 분류를 시도하고 아울러 도사견의 적혈구내 K, Na 및 GSH 함량과 비교하여 그 발생율을 비교하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험견

실험견으로서 1999년 1월~5월까지 대구, 경북 지방에서 사육중인 생후 2개월~7년의 건강한 진도견 77두 및 도사견 42두를 대상으로 성별에 관계없이 채혈하여 EDTA(2 mg/ml blood) 및 heparin(20 u/ml blood) 처리된 eppendorf tube에 각각 1.5 ml씩 분주하였다.

검사 항목 및 분석 방법

EDTA 처리한 혈액 : 자동 혈구계산기(HEMAVET® 600, USA)로 CBC 및 Hb 함량을 측정하였으며 micro-hematocrit법을 이용해서 hematocrit치를 측정하였다.

또한 적혈구내 reduced glutathione(GSH) 함량은 Beutler 등의 방법에 따라 측정하였다.

즉, 시료혈액 100 µl에 metaphosphate 1500 µl를 첨가하여 vortex mixer에서 mix한 후 3000rpm의 저속 원심 분리기에서 15분간 원침한 후 이 상층액 1000 µl를 취하여 0.3 M PB 4000 µl 및 DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate derivatives) 500 µl를 첨가하여 412 nm의 UV spectrophotometer (Metertek SP-870, USA)에서 그 흡광도를 산정하였다.

Heparin 처리된 혈액 : Yamato 등²⁷의 방법에 따라 100 µl의 시료 혈액을 0.5% Triton X-100으로 용혈시킨 후 전해질 분석기(AVL 9180 Electrolyte Analyzer, USA)를 사용하여 적혈구 세포내 K, Na의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 총 77두의 진도견의 적혈구내 K, Na 및 GSH의 농도를 측정한 결과 LK phenotype을 나타낸 예는 41두(53.2%), HK phenotype을 나타낸 예는 36두(46.8%)였으며 LK phenotype 진도견 41두의

Table 1. Cellular concentrations of K, Na and glutathione in LK and HK red blood cells of Jindo dogs

phenotype	K (mmol/l cells)	Na (mmol/l cells)	CSH (mmol/l cells)
LK	8.90±2.41 (n=41)	110.58±18.59 (n=41)	4.20±1.47(n=41)
HK	122.64±10.91 (n=36)	24.33±18.57 (n=36)	HG 12.17±2.57 (over>8) (n=10)
			LG 4.93±1.41 (1~7.9) (n=26)

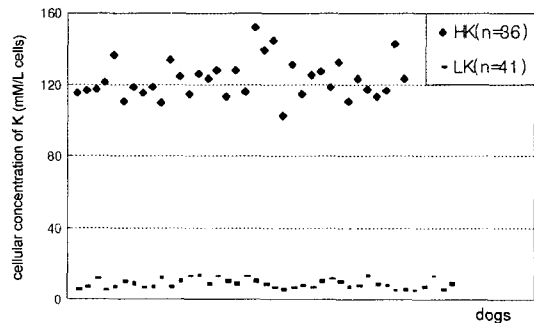


Fig 1. Cellular concentrations of K in LK and HK red blood cells of Jindo dogs.

평균 농도는 K: 8.90±2.41 mM/L, Na: 110.58±18.59 mM/L, GSH: 4.20±1.47 mM/L를 나타내었다.

이러한 결과는 Fujise 등⁷이 39두의 Shiba견에서 보고한 LK phenotype의 K 평균 농도인 8.50±2.0 mM/L, Na 평균 농도인 106±18 mM/L에 비교하여 K, Na의 평균 농도는 일치하였으나 GSH 평균 농도는 1.90±0.58 mM/L에 비하여 높은 경향을 나타내었다.

HK phenotype견은 총 36두로서 그 평균은 K: 122.64±10.91 mM/L, Na: 24.33±18.57 mM/L로서 K 농도는 Fujise 등^{7,8}이 보고한 119±19 mM/L와 일치하였으나 Na 농도는 7.0±1.7 mM/L에 비하여 높은 경향을 나타내었다.

HK phenotype 진도견 36두 중에서 평균 GSH 농도가 8 mM/L 이상인 High glutathione(HG)을 나타낸 예는 10두, 8 mM/L 미만인 low glutathione(LG)은 26두로 HK/HG phenotype 진도견의 평균 GSH 함량은 12.17±2.57 mM/L, HK/LG phenotype 진도견의 평균 GSH 함량은 4.93±1.41 mM/L을 나타내었다.

이러한 결과 역시 Fujise 등^{7,8}이 Shiba견에서 보고한 HK/HG phenotype의 평균 농도인 7.87±1.71 mM/L 및 HK/LG phenotype의 2.46±0.53 mM/L에 비해 현저히

높은 경향을 나타내었다.

그러나 HK phenotype 개에서 Na 및 GSH 농도의 차이가 대상견의 품종 차이인지 유전적 원인에 기인된 것인지는 본 실험만으로는 해석하기가 곤란하나 Fujise 등^{7,8}은 채혈 후 분석시까지의 시간이 길었다고 보고한 점에 미루어 이러한 차이에 기인된 점도 간과할 수 없는 것으로 생각되며 앞으로 좀 더 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 추측된다.

본 실험에서 대조군으로 42두의 도사견의 적혈구내 평균은 K: 6.31 ± 1.12 mM/L, Na: 112.55 ± 14.43 mM/L 및 GSH: 3.75 ± 0.72 mM/L를 나타내었다.

이상의 결과는 Fujise 등^{7,8}이 한국, 일본, 대만, 인도네시아, 몽고 및 러시아에서 각 국의 고유견을 대상으로 HK phenotype의 빈도를 조사한 결과 한국의 진도견과 제주견, 삽사리 및 일본의 Shiba견과 Akida 견에서만 각각 42%, 15%, 6.5% 및 26%와 38%을 나타내었다고 한 보고와 일치하며 아울러 일본견에 있어서 HK의 phenotype은 한국을 경유하여 일본으로 유입되었다는 견해와도 일치하는 결과로 생각된다.

비록 이러한 HK phenotype이 질병으로 분류되지는 않지만 aromatic sulfides의 섭취로 인한 용혈성 빈혈에 대하여서는 감수성이 높으며 또한 수혈시 life-threatening hyperkalemia를 초래할 수 있으므로 임상수술시에 있어서는 특히 진도견의 수혈시에는 반드시 이러한 HK phenotype을 검사하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

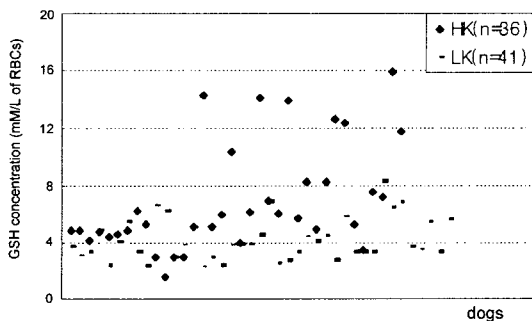


Fig 2. Erythrocyte GSH concentrations in LK and HK Jindo dogs.

Table 2. Cellular concentrations of K, Na and GSH in red blood cells of Tosa dogs

phenotype	K (mmol/l cells)	Na (mmol/l cells)	GSH (mmol/l cells)
LK	6.31 ± 1.12 (n=42)	112.55 ± 14.43 (n=42)	3.75 ± 0.72 (n=42)

결론

개의 적혈구내 cation의 구성으로서는 일반적으로 potassium(K)이 낮고 sodium(Na)이 높은 것으로 알려져 있다.

그러나 몇 종류의 개에서는 적혈구 세포막에 존재하는 Na-K pump의 작용으로 인하여 고 K, 저 Na 및 reduced glutathione(GSH)함량이 높은 HK, HG phenotype을 가지는 것으로 보고되었다.

비록 이러한 HK phenotype이 질병에는 속하지 않지만 aromatic disulfide나 양과 추출물에 대하여서는 감수성이 높고 또한 용혈되는 경향이 있기 때문에 HK cell을 함유한 개의 분포 및 발생률을 규명하는 것은 적절한 임상처치를 위하여 중요한 과제로 추측된다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 사육중인 진도견을 대상으로 하여 적혈구 세포내 K, Na 및 GSH함량을 측정함과 동시에 도사견을 대상으로 하여 비교 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 77두의 진도견 중 HK phenotype을 나타낸 예는 36두로써 46.8%의 발생률을 나타내었으며 K의 평균함량은 122.64 ± 10.91 mM/L였다.
2. LK phenotype은 41두로써 53.2%의 발생률을 나타내었으며 K의 평균함량은 8.90 ± 2.41 mM/L였다.
3. HK/HG(high glutathione)를 나타낸 개는 10두로써 27.8%의 발생률과 평균 GSH 함량은 12.17 ± 2.57 mM/L을 나타내었으며 HK/LG(low glutathione)개는 26두로써 72.2%의 발생률과 평균 GSH 함량은 4.93 ± 1.41 mM/L을 나타내었다.
4. 도사견의 적혈구내 K의 평균 함량은 6.31 ± 1.12 mM/L를 나타내었으며 GSH 평균함량은 3.75 ± 0.72 mM/L을 나타내었다.

참고 문헌

1. Beutler E, Dulong O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med 1963; 61: 882-888.
2. Chan PC, Calabrese V, Theil LS. Species differences in the effect of sodium. Biochim. Biophys. Acta 1964; 79: 424-426.
3. Chan TK, Chan WC, Weed RI. Erythrocyte-hemighosts; A hall mark of severe oxidative injury in vivo. Br. J. Haematol 1982; 50: 575-582.
4. Degen M. Pseudohyperkalemia in Akitas. Journal of the American Veterinary Medical Association 1987;

- 190: 541-543.
5. Fujise H, Dale GL, Beutler E. Glutathione-dependent-protection against oxidative damage of the humans red cell membrane *Blood* 1984; 65: 1096-1101.
 6. Fujise H, Hamada Y, Mori M, Ochiai H. Na-dependent glutamate transport in high K and high glutathione (HK/HG) and high K and high glutathione (HK/HG) and high K and low glutathione (HK/LG) dog red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1239: 22-26.
 7. Fujise H, Hishiyama N, Ochiai H. Heredity of Red Blood Cells with High K and Low Glutathione (HK/LG) and High Glutathione (HK/HG) in a Family of Japanese Shiba Dogs. *Experimental Animal* 1997; 46: 41-46.
 8. Fujise H, Lauf PK. Na⁺-K⁺ pump activities of high and low potassium sheep red cells with internal magnesium and calcium altered by A23187. *J. Physiol* 1988; 405: 605-614.
 9. Fujise H, Mori M, Ogawa E, Maede Y. Variant of canine erythrocytes with high potassium content and lack of glutathione accumulation. *Am. J. Vet. Res* 1993; 54: 602-606.
 10. Fujise H, Yamada I, Masuda M, Miyazawa Y, Ogawa E, Takahashi R. Several cation transporters and volume regulation in high-K dog red blood cells. *Am. J. Physiol* 1991; 260: 589-597.
 11. Inaba M, Maede Y. Increase of Na⁺ gradient-dependent L-glutamate and L-aspartate transport in high K⁺ dog erythrocytes associated with high activity of (Na⁺, K⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 1984; 259: 312-31.
 12. Kobayashi K. The hemolytic effect of onions on canine erythrocytes associated with inherited high Na,K-ATPase activity. *Jap. J. vet. Res* 1987; 35: 137.
 13. Maede Y. Energy metabolism in canine erythrocytes associated with inherited high Na⁺ and K⁺ stimulated adenosine triphosphatase activity. *Am. J. Vet. Res* 1987; 48: 114-118.
 14. Maede Y. High concentration of blood glutathione in dogs with acute hemolytic anemia. *Jap. J. vet. Sci* 1977; 39: 187-189.
 15. Maede Y, Amano Y, Nishida A, Murase T, Sasaki A, Inaba M. Hereditary high-potassium erythrocytes with high Na, K-ATPase activity in Japanese Shiba Dogs. *Res. Vet. Sci* 1991; 50: 123-125.
 16. Maede Y, Inaba M. (Na,K)-ATPase and ouabain binding in reticulocytes from dogs with high K and low K erythrocytes and their changes during maturation. *J. Biol. Chem* 1985; 260: 3337-3343.
 17. Maede Y, Inaba M, Taniguchi N. Increase of Na-K-ATPase activity, glutamate, and aspartate uptake in dog erythrocytes associated with hereditary high accumulation of GSH, glutamate, glutamine and aspartate. *Blood* 1983; 61: 493-499.
 18. Maede Y, Kasai N, Taniguchi N. Hereditary high concentration of glutathione in canine erythrocytes associated with high accumulation of glutamate, glutamine and aspartate. *Blood* 1982; 59: 883-889.
 19. Maede Y, Kuwabara M, Sasaki A, Inaba M, Hiraoka W. Elevated glutathione accelerates oxidative damage to erythrocytes produced by aromatic disulfide. *Blood* 1989; 73: 312-317.
 20. Magnani M, Stocchi V, Piatti E. Red blood cell glucose metabolism in trisomy 10p: possible role of hexokinase in the erythrocyte. *Blood* 1983; 61: 915-919.
 21. Minakami S, Yoshikawa H. Studies on erythrocyte glycolysis. II. Free energy changes and rate-limiting steps in erythrocyte glycolysis. *J. Biochem* 1966; 59: 139-144.
 22. Nakao K, Wada T, Kamiyama T. A direct relationship between adenosine triphosphate level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature (London)* 1962; 194: 877-878.
 23. Ogawa E, Fujise H, Kobayashi K. A dog possessing high glutathione (GSH) and K concentrations with an increased Na, K-ATPase activity in its erythrocytes. *Experimental Animal* 1988; 37: 187-190.
 24. Ortiz OE, Sjodin RA. Sodium and adenosine triphosphate dependent calcium movements in membrane vesicles prepared from dog erythrocytes. *J. Physiol.* 1984; 354: 287-301.
 25. Parker JC. Dog red blood cells : adjustment of salt and water content in vitro. *J. Gen. Physiol* 1973; 62: 147-156.
 26. Reed CF, Young LE. Erythrocyte energy metabolism in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest* 1967; 46: 1196-1204.
 27. Yamato O, Maede Y. Susceptibility to onion-induced hemolysis in dogs with hereditary high erythrocyte reduced glutathione and potassium concentrations. *Am. J. Vet. Res* 1992; 53: 134-137.