

뇨중 trypsinogen-2 검출을 이용한 개의 급성 췌장염 진단

한홍율 · 황철용 · 박선일 · 오태호

서울대학교 수의과대학 내과학교실
(1999년 6월 2일 접수)

Detection of urinary trypsinogen-2 for diagnosis of canine acute pancreatitis

Hong-ryul Han, Cheol-yong Hwang, Son-il Pak, Tae-ho Oh

*Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine,
Seoul National University, 151-742, Korea.*

(Received Jun 2, 1999)

Abstract : We performed this study to evaluate the potential clinical marker of urinary trypsinogen-2 together with amylase, lipase and urinary amylase creatinine clearance ratio (ACCR) for the diagnosis of acute pancreatitis in dogs. In the experiment on daily changing patterns of amylase, lipase and ACCR measurements in experimentally induced pancreatitis dogs, compared to values measured in pre-induction state, significant difference was seen in amylase until 5th day of induction, and for lipase significant difference was found during the 7th day of observation period ($p < 0.05$). No significant difference was found in ACCR for the study period ($p > 0.05$). On SDS-PAGE analysis of urine from experimentally induced pancreatitis dog, The 26kd band was markedly increased compared with that of normal state and that band was confirmed trypsinogen-2 using substrate interaction and isoelectric focusing assay after being eluted.

When assessing the appearance of 26kd band on urine SDS-PAGE 87.1% (range: 50~100%) of experimentally induced pancreatitis dogs showed positive results, whereas no corresponding band was seen in dog without pancreatic disorders. With this result, determination of urinary trypsinogen-2 assay was found to have a high diagnostic value with a 70% of sensitivity and 100% of specificity as a routine test for pancreatitis, although the detection of trypsinogen-2 in urine can be varied on the progression stage of pancreatitis at the initial visit to animal clinic. We therefore suggest that the promising results in this study be used for the development of dipstick test for detecting acute pancreatitis in the future research.

Key words : canine, pancreatitis, urinary trypsinogen-2, diagnosis.

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(981-0612-064-1) 지원으로 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Hong-ryul Han, Department of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea.

진단적 지표가 될 수 있는지를 평가하고자 하였다.

서 론

췌장조직의 염증성 질환인 췌장염은 여러가지 유발요인들에 의해 야기되는 복합적인 질환이나 실제 임상에서는 대부분의 경우 그 임상증상의 발현이 일반 소화기 질환시 흔히 관찰되는 구토, 설사 및 복통 등 다른 질환과 감별가능한 특이조건이 없기에 단순 임상증상의 관찰만으로는 확진하기 어려우며 특이적 진단법도 현재까지는 없는 실정이다^{1,2}.

인의 분야에서는 이러한 급성 췌장염의 기본 진단수단으로 혈중 amylase와 lipase 수치를 일반적으로 이용하고 있으나 현재까지 연구에 의하면 이들 측정치의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 만족스럽지 못한 것이 사실이다³. 현재까지 개발된 진단법중 가장 확실한 방법은 Contrast-enhanced computed tomography(CT)로 급성 췌장염 병변의 심화정도까지 알 수 있는 장점이 있다. 그러나 CT 검사 자체에 많은 비용이 들고 contrast 물질에 의한 부작용의 위험이 있기 때문에 임상적으로 적용하는 데는 아직까지 많은 제약이 있다⁴.

한편 개와 고양이의 췌장염 진단에도 인의에서와 같이 혈중 amylase나 lipase의 활성도 측정이 유효하다고 제시된 이후 이들 췌장염을 진단하기 위한 기본수단으로 이용하고 있다. 그러나 Strombeck *et al*⁵은 혈청 lipase 활성도의 증가를 고려하지 않은 amylase 활성도만의 증가는 진단의 효용성이 낮다고 보고하였다. 또한 dexamethasone을 투여한 개에서 췌장염 소견 없이도 혈중 amylase와 lipase 활성도가 증가될 수 있다는 보고도 있으며 신부전과 간부전이 있는 개에서도 이들의 혈중 활성도가 증가할 수 있기에 단순한 혈중 amylase 활성도 또는 lipase 활성도 만으로는 개의 췌장염을 확진하기 어려운 점이 있다^{7,8}. 이와 함께 소동물 임상에서는 인의와는 달리 비용-편익(cost-benefit) 측면에서 CT나 초음파를 통한 진단이 극히 제한적일 수밖에 없기 때문에 질환의 성격상 신속하고 정확한 진단을 요하는 급성 췌장염에 대한 신속진단법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 개의 급성 췌장염 진단법으로 이용되고 있는 혈중 amylase, lipase 활성도 검사법 및 Amylase creatinine clearance ratio(ACCR) 등과 같은 일반적 검사법과 함께 신속진단 kit 개발가능성을 알아보기 위해 노중 trypsinogen-2의 검출이 급성 췌장염의 또 다른

재료 및 방법

실험동물 : 실험적 췌장염 유발에는 임상적으로 건강하다고 인정되는 생후 1년 이상의 체중 15~30Kg의 개를 암수 구별없이 10두를 선발하여 실험에 이용하였다. 모든 실험견은 췌장염 유발 전에 내부 기생충 검사를 위한 분변검사 및 일상적인 혈액학적 및 혈청 화학적 검사를 실시하고 약 2주간 각 케이지에서 한 마리씩 사육하며 환경적용 과정을 거치도록 하였다.

기존의 췌장염 진단에 활용되는 혈청 amylase, lipase 활성도와 노중 trypsinogen-2 검출법과의 진단의 효율성을 비교하고자 선택된 개체는 서울대학교 수의과대학 부속동물병원 내과 외래 환견중 복부 동통과 구토증으로 췌장염 이환이 의심된 개체중 혈청 amylase 활성도와 lipase 활성도 측정결과(VetTesT 8008™, IDEXX, USA) 정상범위(Amylase : <1500U/l, Lipase : < 900IU/l)를 초과한 4마리의 환견으로 삼았다. 이중 초음파 검사시 췌장영역에서 이상을 보여 췌장염으로 진단된 환견은 3두였으며 1두는 초음파 검사상 이상을 보이지 않아 대증치료만 실시한 환견이었다. 또한 정상적인 ACCR 범위를 파악하고자 임상적으로 건강하다고 판단되는 20두의 애완견을 무작위로 선정해 축주의 동의를 얻은 후 시료를 채취하였다.

실험적 췌장염 유발 : 실험견들은 수술실시 24시간 전부터 절식시켰으며 마취는 atropine sulfate(아트로핀®, 제일제약) 0.05mg/Kg 투여 5분후 Acepromazine(세다젝트®, 삼우화학공업)을 투여하고 다시 5분후 Ketamine HCl (Ketalor®, 유한양행) 30mg/kg을 근육 주사하였다.

마취후 dorsal recumbency로 보정하여 술야소독을 실시하고 상복부를 정중 절개하여 개복한 후 췌장을 노출시켰다. 이후 췌장 부도관을 췌관이 개구하고 있는 십이지장 부근에서 둔성 분리하고 22G indwelling catheter를 삽입한 후 부도관 주변을 가결찰하고 장착된 catheter를 통해 oleic acid(0.5ml/kg)를 췌장으로 서서히 주입하였다. 이후 catheter를 제거하고 oleic acid의 복강누출을 막기 위해 췌장부도관을 결찰하였다.

술후 실험견들은 96시간동안 절식시켰으며 lactated Ringer's solution(90ml/Kg/day)을 2~3일간 투여하고 감염을 예방하기 위하여 4일간 Enrofloxacin(마이트릴®, 바이

엘)을 1일 2회 근육주사(0.5mg/Kg)하였다. 절식기간 이후에는 1일 2회 애견용 건조사료와 통조림 사료를 급여하였다.

시료채취 : 실험적 췌장염 유발군은 술전과 술후 7일째까지 매일 오전 자발적인 배뇨시 뇨를 채취하였으며 자발적 배뇨를 보이지 않는 경우에는 요도 카테터를 이용하여 채뇨하였다. 채뇨후 정정맥에서 채혈을 실시하고 혈청을 분리하여 채취된 뇨와 혈청은 검사에 이용될 때까지 -20℃에서 냉동 보관하였다. 실제 췌장염으로 의심되는 환축의 뇨 또한 요도 카테터로 채취하여 동일한 방법으로 냉동 보관하였다. ACCR 정상범위 설정을 위해 선정된 개에서는 채혈과 동시에 요도 카테터를 이용해 채뇨하였다.

혈액 · 혈청학적 검사 : 혈중과 뇨중의 Amylase치는 생화학 분석기(HITACHI 7170, Japan)를 이용한 효소법으로, 혈중 Lipase치는 개량비탁법으로 측정하였다. 혈중과 뇨중의 Creatinine치는 amylase 분석에 이용된 동일한 생화학 분석기를 이용하여 측정하였다. ACCR은 다음과 같은 식에 의해 산출하였다⁹.

$$ACCR = \frac{\text{Amylase clearance (Camy)}}{\text{creatinine clearance(CcR)}} \times 100(\%)$$

$$\frac{\text{Uamy} \times \text{SCR}}{\text{Say} \times \text{Ucr}} \times 100(\%)$$

SDS-Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용한 뇨중의 trypsinogen 분획검출 : 실험적 췌장염 유발군의 유발후 매일 채취한 뇨와 췌장염 의심환군의 뇨를 분자량 10,000 이상인 물질만 정치시키는 centrifugal filtration devices(Ultrafree-15[®], Millipore Co., USA)를 이용하여 4℃, 2500rpm에서 원심분리하여 농축하였으며 농축정도는 BCA Protein Assay kit[™](Pierce, USA)를 이용하여 총 단백질 함량을 측정 후 총 단백질 함량이 4mg/ml가 되도록 하였다. 영동은 Laemmli¹⁰ 방법에 준하여 minigel electrophoresis unit(Mighty Small[™])를 이용하여 15% acrylamide 함유 separating gel과 5% acrylamide 함유 stacking gel에서 200V, 100mA 조건에서 실시하였다. 염색은 Coomassie blue 염색법을 사용하였다.

Native gel electrophoresis를 이용한 뇨중 trypsinogen 분획검출과 용출 : SDS-PAGE 시와 동일한 방법으로 처리한 뇨 시료를 8% acrylamide 함유 native separating gel과 5% acrylamide 함유 native stacking gel에서

200V, 60mA 조건에서 peristaltic pump를 이용하여 electrophoresis unit를 냉각시키면서 영동시켰다. 영동후 분획 용출은 Retamal¹¹의 방법에 준하여 다음과 같이 수행하였다. 먼저 양쪽 한 well을 surgical blade을 이용하여 종으로 자른 후 Coomassie blue 혹은 silver stain으로 염색하였다. Trypsinogen 분획의 용출을 위해 염색된 gel strips에서 trypsinogen 분획으로 여겨지는 분획을 확인한 후 다시 이 strip을 원 gel과 나란히 위치시키고 이를 기준삼아 횡으로 이 분획위치부를 역시 surgical blade를 이용하여 잘라냈다. 잘라낸 gel strips는 250mM Tris buffer/250mM EDTA(pH 7.4)로 5분간 3회 세척하였으며 중간중간에는 3차 증류수로 세척하였다. 이후 pasteur pipet으로 수분을 제거하고 spatula를 이용해 직경이 2-5mm 정도가 되게 gel strips을 균질화 시킨 후 SDS가 0.1%(v/v) 첨가된 20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 buffer 량과 gel 조각량이 1:1 정도가 되도록 첨가하고 ice bath 상태에서 3분간 sonication 시켰다. 이후 gel 성분제거를 위해 sonication을 실시한 시료를 sephadex G-25(Pharmacia, Sweden)를 미리 1cm 높이로 충전시키고 완전히 건조시킨 5ml syringe column에 넣고 4℃, 500g에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리된 용출물은 다시 동일조건하에서 전기영동을 실시하여 용출유무를 확인하였다.

TAME를 이용한 효소-기질반응 : Native gel electrophoresis 후 용출시킨 용출물 내 trypsinogen의 존재를 간접적으로 확인하기 위해 trypsin에 선택적으로 가수분해되는 p-toluenesulphonyl-L-arginine methyl ester(TAME) 기질을 이용해 용출물내 trypsin의 존재유무를 검사하였다.

이를 위해 우선 용출물 내에 trypsinogen이 함유되어 있다는 가정하에 Huttunen¹²의 방법에 준하여 다음과 같이 trypsin으로 활성화 시켰다. 즉, 용출액 400μl를 CaCl₂ 0.1mol/L와 0.15M NaCl에 부유시킨 enterokinase가 1% 농도로 첨가된 0.05M tris-HCl buffer(pH 8) 9.6ml에 첨가한 후 37℃에서 17시간 정치하여 활성화 시켰다. 이후 활성화액 100μl를 0.001M TAME와 0.01M Ca가 첨가된 0.04M Tris-buffer(pH 7.8; Trypsin reagent TAME, Worthington biochemical Co, USA)에 넣고 분광광도계 (U-1100 Hitachi spectrophotometer, Japan)로 247nm UV에서 시간별로 흡광도 변화를 관찰하였다. TAME의 trypsin과의 표준반응양상 확인을 위해서는 bovine trypsin(Cat. No. LS003708, Worthington biochemical Co, USA)을 이용하였다.

동전점 전기영동(isoelectric focusing electropho-

resis) : 용출물의 pI 값을 알아보기 위한 등전점 전기영동은 SDS-PAGE에 사용된 동일한 전기영동 장치하에서 Acrylamide 농도가 7% 이고, Ampholytes(pH 3.5~10)를 2.4% 첨가한 Native Isoelectric Focusing Gel에서 150V, 20mA에서 30분, 이후 200V, 40mA에서 150분간 실시하였다. 영동 후 분획은 silver stain으로 확인하였다.

통계처리 : 췌장염 유발 전·후의 혈청내 amylase, lipase, ACCR 수치에 대한 일별 변화에 대한 유의성 검정은 paired t-test와 wilcoxon test를 이용하였다. 한편 췌장염 유발실험에 이용된 개에서 췌장염 유발 후의 ACCR 변화정도를 정확히 파악하고자 유발전 ACCR 자료와 임상적으로 건강한 20두의 ACCR 수치를 paired t-test로 검정하였다. 결과에는 평균±SEM을 제시하였다. 모든 검정은 SAS(ver 6.04 Carry, NC, USA)통계 패키지를 이용하였고 유의수준은 $\alpha = 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결 과

정상견과 췌장염 유발견의 ACCR 비교 : 정상견 20두의 혈청 amylase, creatinine, 뇨중 amylase와 creatinine 측정결과를 이용하여 산출한 평균 ACCR은 0.010 ± 0.005 (Mean±SEM)였다. 췌장염 유발견군의 유발전 평균 ACCR은 0.008 ± 0.001 (Mean±SEM)으로 정상견의 수치와 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 정상견군과 췌장염 유발견군간의 일별 ACCR은 유의한 차이를 보이지 않았으며 췌장염 유발군에서도 술전과 술후에 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$, Fig 1).

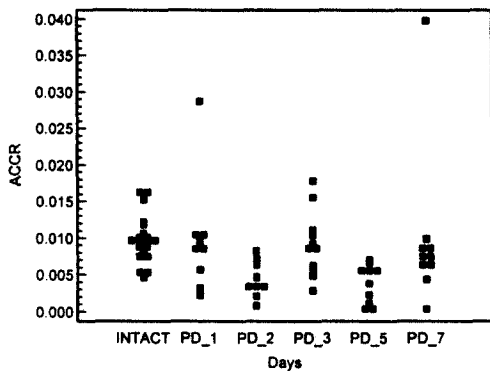


Fig 1. Comparison of ACCR in 20 intact dogs and 10 dogs with experimentally induced pancreatitis. INTACT, intact dogs; PD, dogs with experimentally induced pancreatitis in days after postinduction.

췌장염 유발견의 혈청화학적치의 변화 : 췌장염 유발견의 혈청내 amylase 활성도는 술후 제 1일째부터 증가한 후 술후 2일째에 최고치를 보였고 이후 점진적으로 감소하는 경향을 보였다. 췌장염 유발전 활성도와 비교한 통계적 검정에서 술후 5일째까지 활성도에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$, Fig 2).

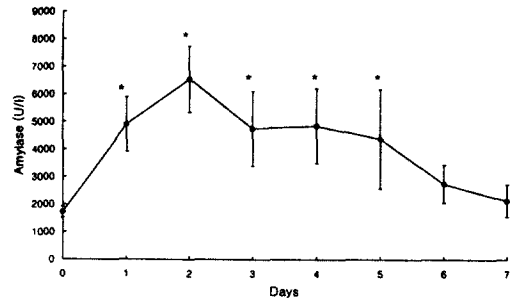


Fig 2. Sequential changes of serum amylase activity(Mean ± SEM) in dogs with experimentally induced pancreatitis. *: significant difference of activity compared with that of preinduction state($p < 0.05$).

혈청내 lipase의 활성도는 술후 제 1일째부터 증가한 후 술후 3일째에 최고치를 보였고 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 췌장염 유발전 활성도와 비교할 때 전 실험기간동안 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$, Fig 3).

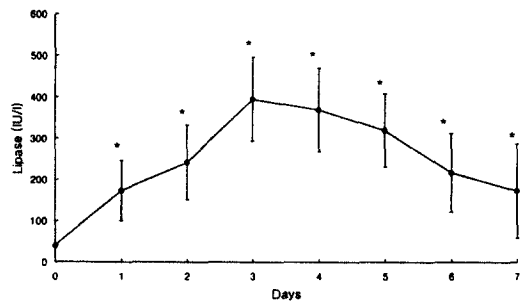


Fig 3. Sequential changes of serum lipase activity(Mean ± SEM) in dogs with experimentally induced pancreatitis. *: significant difference of activity compared with that of preinduction state($p < 0.05$).

SDS-PAGE에서의 trypsinogen 분획상 : 췌장염 유발견과 췌장염 이환이 의심되는 환경의 뇨를 SDS-PAGE 실시한 결과 26KDa대에 가장 강한 분획이 출현함을 확

인할 수 있었다(Fig 4, 5). 췌장염 유발견에 대한 일별 채취뇨의 26KDa대 분획 출현양상은 아래 Table 1과 같았으며 출현율은 평균 87.1%(범위: 50~100%)였다. 또한 3두의 췌장염 진단환견 뇨에서 26KDa대 분획출현율은 66.7%였다. 한편 혈청 amylase와 lipase 활성치는 높으나 초음파상 이상점을 나타내지 않은 1두의 환견 뇨에서는 26KDa대에서 밴드가 출현하지 않았다.

Fig 4. SDS-PAGE of urine samples from three experimental dogs: lane 1 and 6, bovine trypsinogen(MW. 24KDa); lane 2, clinically normal; lane 3-4, experimentally induced pancreatitis; lane 5, in-patient with pancreatitis.

Fig 5. Daily expression patterns of 26KDa band on SDS-PAGE using urine samples from a dog with experimentally induced pancreatitis. Lane 1 and 8, bovine trypsinogen(MW. 24KDa); D1 through D6 indicates urine samples collected each day.

TAME를 이용한 효소-기질반응 : Native gel electrophoresis 후 용출시킨 용출물과 TAME를 반응시킨 후 247nm UV에서 관찰한 시간별 absorbance 변화는 Fig 6과 같다. 즉, 용출물 내에는 trypsinogen이 함유되어 trypsin으로 활성화되고 TAME의 가수분해를 야기해 흡광도가 상승함을 알 수 있었다. 반응시간별 흡광도는 표준 trypsin(bovine pancreas trypsin; 1µg/ml)과 TAME 반응시 나타나는 흡광도의 상승형태와 동일한 경향을 보였다. 이를 통해 유발견 뇨의 SDS-PAGE 상에서 강하게 출현하는

Table 1. Sequential expression patterns of 26KDa band on SDS-PAGE using urine samples from dogs with experimentally induced pancreatitis

Dog \ Day	1	2	3	4	5	6	7
1	-	+	-	-	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+	+
8	-	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
%	50	80	90	90	100	100	100

Note: +/- indicates whether 26KDa band expressed or not.

26KDa대 분획은 trypsinogen임을 확인할 수 있었다.

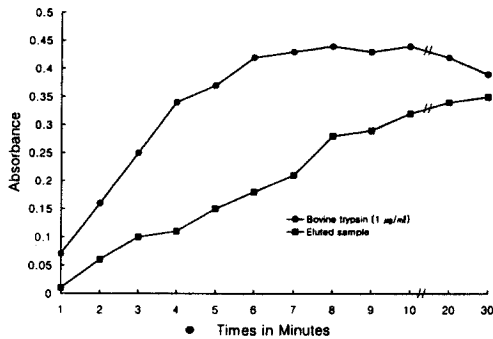


Fig 6. TAME hydrolysing activity of 26KDa band eluted samples after native gel electrophoresis of urine from dogs with experimentally induced pancreatitis. Hydrolysis is expressed as an increase of absorbance at 280nm.

등전점 전기영동 : Native gel electrophoresis 후 용출시킨 용출물의 등전점 전기영동 결과는 Fig 7과 같다. 즉, 분획은 pI값 4.0~5.0 사이에 위치했다.

Fig 7. Isoelectric focusing electrophoresis of 26KDa band eluted from native gel electrophoresis. Lane 1 and 4, Isoelectric focusing standards(coomassie blue stain: Bio-Rad, No. 161-0310, USA); lane 2 and 3, eluted samples(silver stain).

이상의 TAME를 이용한 효소-기질반응과 등전점 전기영동 결과 췌장염 유발견과 췌장염 이환의심견의 뇨 SDS-PAGE 상에서 26KDa 분획대에 강하게 나타나는 분획은 trypsinogen으로 확인되었고 등전점 전기영동 결과를 바탕으로 하면 trypsinogen-1(cationic, pI = 5.0~5.5) 보다는 trypsinogen-2(anionic, pI = 3.5~4.5)임을 확인되었다.

고 찰

췌장은 당대사에 관여하는 insulin과 glucagon을 산생하는 내분비계와 소화효소의 분비를 주된 기능으로 하는 외분비계를 동시에 가진 유일한 기관이다^{13,14}. 정상상태시 췌장이 자신이 분비하는 단백분해 효소로부터 손상받지 않는 이유는 이들 효소들은 췌장에서는 비활성화된 형태로 막에 둘러싸여 합성·저장되고 췌장의 선세포 사이사이와 혈중에는 특이효소 억제물질이 존재하기 때문이다^{15,16}. 그러나 여러 원인에 의해 이러한 정상적 자가방어 기전이 파괴되면 자가소화에 의해 췌장염이 발생하게 된다³. 이러한 췌장의 정상 자가방어 기전을 파괴할 수 있는 요인들로는 고지혈증¹⁶, 췌관의 폐쇄¹⁷, 약물³, 고지방 식이¹⁸ 등이 있으며 이러한 원인 이외에도 만성 간질환¹⁹, 세균 및 바이러스 감염, 허혈, 면역 매개성 질병과 췌장 도관의 부분적 또는 완전폐쇄 등의 요인이 보고되었다^{13,15,20}.

이러한 급성 췌장염의 기본 진단수단으로는 혈중 amylase와 lipase 활성도 측정법이 일반적으로 이용되고 있으나 현재까지 연구에 의하면 이들 측정치의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)가 만족스럽지 못한 것이 사실이다⁴. 즉, amylase와 lipase는 췌장 뿐만 아니라 장점막 등에도 존재하고 주로 신장을 통해 체외로 배설되기에 장폐색이나 신장에 이상이 있는 경우에도 췌장염과 상관없이 혈청에서의 활성도가 증가하게 된다^{6,21}. 또한 이들 효소활성도는 급성 췌장염 이환 후 시간이 경과되면 정상수준으로 감소되는 경우도 있는데 이는 췌장의 정상기능 회복이라기 보다는 외분비에 관여하는 췌장 선세포의 파괴로 인해 효소분비가 감소되어 나타나는 현상으로 이러한 시기에는 진단상 오류를 야기하는 단점이 있는 것으로 보고되고 있다².

실제 본 연구에서 췌장 도관을 통한 oleic acid 주입법으로 유발된 급성 췌장염 개의 일별 혈청내 amylase와 lipase의 활성도를 유발전의 활성도와 비교해 본 결과 유발후 2~3일경까지 유의성 있게 증가되는 경향을 보이다가 감소되었는데 7일간의 관찰기간중 6, 7일째는 유발전과 비교한 amylase의 활성치는 유의성 있는 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig 2, Fig 3).

사람에서는 이러한 혈청 amylase와 lipase 활성도 측정법의 급성 췌장염 진단수단으로서의 단점을 보완하고자

ACCR을 이용하고 있는데 정상수치는 2~4% 수준이며 5% 이상시는 췌장염으로 진단할 수 있다⁹. 그러나 본 연구에서 정상견의 평균 ACCR은 0.010 ± 0.005 (Mean \pm SEM)로 사람보다 훨씬 낮으며 급성 췌장염 유발견의 유발후 일별 변화상에서도 유발전과 비교해 유의성 있는 변화가 나타나지 않고 증가와 감소가 불규칙하게 반복되는 등 개에서는 급성 췌장염의 진단 수단으로 이용될 수 없는 것으로 보이는데(Fig 1) 이는 개를 대상으로 한 다른 연구에서의 결과와도 일치한다²².

사람을 대상으로 한 몇몇 연구들을 통해 amylase와 lipase의 혈중 활성도 측정과 함께 혈중 trypsinogen 활성도 측정이 급성 췌장염의 진단과 질병의 경중을 판단하는데 유용한 것으로 나타나고 있다²³⁻²⁵. Trypsinogen은 췌장의 외분비세포에서 분비되는 proteinase의 일종으로 십이지장으로 분비된 후에는 enterokinase의 작용에 의해 trypsin으로 활성화되어 소화에 관여한다. Trypsinogen은 그 전하점(electric point)에 따라 다시 여러개의 isoenzyme으로 분류할 수 있는데 주요 isoenzyme은 trypsinogen-1(cationic)과 trypsinogen-2(anionic)이며 이들은 췌장주 구성성분의 일부분으로 소장으로 분비되나 극히 일부분만이 순환혈류에 함유해 들어오게 된다²⁶. 순환혈류로 들어온 trypsinogen은 분자량이 낮기 때문에 신장의 사구체를 쉽게 통과하며 이유는 분명하지 않으나 trypsinogen-2는 세뇨관에서의 재흡수율이 trypsinogen-1보다 낮아 뇨중에는 trypsinogen-2가 trypsinogen-1보다 훨씬 높은 농도로 출현하는 것으로 보고되고 있다. 최근까지 사람에서 췌장염 진단을 위한 이러한 혈중 trypsinogen 활성도의 측정은 주로 trypsinogen-1을 측정하는데 주안점을 두고 연구되어 왔으나 급성 췌장염시는 trypsinogen-1보다는 trypsinogen-2의 농도상승률이 상대적으로 훨씬 높은 것으로 보고되고 있으며^{27,28} 앞서 기술한 trypsinogen-2의 뇨중 출현특성에 기초를 두어 이를 급성 췌장염 진단에 활용하는 방안도 심도 있게 연구되고 있다^{25,29}. 개와 고양이에서도 혈중 trypsinogen 수치측정이 급성 췌장염의 진단적 수단으로 활용할 수 있는지의 연구가 진행되고 있으나 대부분 trypsinogen-1과 trypsin을 인식하는 radioimmunoassy를 원리로 한 검사법에 대한 연구^{30,31}이며 본 연구자의 견해로는 개에서는 trypsinogen-2의 진단적 가치 평가에 관한 연구는 전무한 것으로 생각된다. 이러한 인의쪽에서의 trypsinogen-2의 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 개의 급성 췌장염의 진단적 marker로서 뇨중

trypsinogen-2 검출법의 활용가능성을 평가하고자 2개의 군을 대상으로 검증하였다. 첫번째 군은 인위적으로 췌장염을 유발한 군(n=10)이며, 두번째 군은 서울대학교 수의과대학 부속동물병원에 내원한 환축으로 임상소견과 혈청 amylase 및 lipase 활성도측정시 정상범위를 초과해 췌장염이 의심되는 4두의 환축으로 이중 3두는 초음파검사서 하행 십이지장 주위 췌장영역의 에코 변화 또는 종괴상 확인을 통해 췌장염으로 최종 진단되어 이에 대한 치료를 실시한 경우이나 나머지 1두는 초음파 검사시는 췌장 이상소견이 발견되지 않아 구토와 복부 동통증에 대한 대증치료만을 실시한 환축이었다. 췌장염 유발견과 실제 환견의 뇨를 전기영동해 단백질 분획을 확인한 결과 여러 분획중 특히 26KDa 대에서의 분획이 상대적으로 강하게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig 4). 이 분획대가 실제로 trypsinogen 분획대 인지의 여부는 분획을 용출시킨 후 이 분획용출물을 활성화 되게 한 후 활성화 산물인 trypsin의 존재여부를 판정하는 효소-기질 반응검사와 등전점 전기영동을 실시해 확인하였다. 효소-기질 반응검사서 기질로 이용된 TAME는 trypsin에 친화성이 높은 기질로서 trypsin 가수분해능 판정시 오류를 일으킬 수 있는 chymotrypsin에 의해서는 가수분해 되지 않는 장점이 있어 trypsin 활성도 측정시험에 가장 많이 이용되는 기질이다. 본 연구에서 용출물을 활성화시키고 TAME와 반응시켜 시간별로 흡광도의 변화를 관찰한 결과 TAME가 가수분해되어 흡광도가 상승하였는데 이는 용출물내에 trypsin이 존재함을 의미하며 이는 곧 용출물의 원천인 전기영동상 26KDa대 분획이 trypsinogen임을 증명해주는 결과이다. 그러나 표준 trypsin 반응양상과 비교해볼 때 용출물의 흡광도가 낮았는데 이는 용출물내 trypsin 함유량이 상대적으로 낮았기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 또한 용출물의 등전점 전기영동상에서는 분획들이 양성쪽인 pI값 4.0~5.0에 위치했는데 이러한 결과는 trypsinogen의 pI값을 측정한다 다른 연구결과³²와 일치해 trypsinogen-2임을 뒷받침한다.

이상의 결과들로 뇨의 전기영동시 26KDa대 분획이 trypsinogen-2라고 할 때 인위적 췌장염 유발견의 경우 일별 trypsinogen-2의 출현율을 보면 유발후 1일에 50%, 2일 80%, 3일 90%, 4일 90%, 5일 100%, 6일 100%, 7일 100%로 평균 87.1%(median, 90%)로 나타났다(Table 1). 서울대학교 수의과대학 부속동물병원의 자체 췌장염 진단기준(혈청 내 amylase와 lipase 활성도 증가, 초음파 검사시 췌장염

역의 예외변화나 이상형태 존재)을 통해 췌장염으로 진단된 실제 환견 3두의 초진시 채취한 뇨 시료 전기영동 분석결과에서는 2두에서 trypsinogen-2 분획이 확인되어 66.7%의 출현율을 보였다. 한편 췌장염 의심견중 췌장염이 아닌 것으로 진단된 1두에서는 trypsinogen-2가 출현하지 않았다. 이러한 결과는 첫째, 인위적 유발견에서 보는바와 같이 trypsinogen-2 분획 출현양상이 질병의 진행 단계에 따라 다르게 나올 수 있으며(50~100%) 둘째, 실험적 결과를 실제 임상에 적용한 결과 서울대 수의과대학 부속동물병원의 자체 췌장염 진단기준을 통해 췌장염으로 진단된 환축에서 trypsinogen-2의 출현율이 70%로 나타났는데 이러한 결과는 실험적 결과와 일치하는 결과로 최초 내원 당시 환축별로 췌장염의 진행단계가 차이가 있었기 때문인 것으로 추정되며 셋째, 혈중 amylase와 lipase의 활성도가 정상보다 높으나 초음파 검사상 정상소견으로 췌장염이 아닌 것으로 진단된 환축에서는 trypsinogen-2 분획이 출현하지 않았는데 이는 trypsinogen-2의 특이도가 매우 높아 췌장염을 확진하는 수단으로 활용될 수 있음을 시사하는 것으로 요약된다. 그러나 혈청 amylase와 lipase 활성도가 정상범위 이상이면서 췌장염이 아닌 환축이 1두 밖에 되지 않는데 이는 연구기간동안 이러한 조건을 만족하는 환축을 얻기가 매우 어려웠기 때문이다.

이상의 연구결과로 미루어 볼 때 뇨중 trypsinogen-2 검출법은 췌장염의 진행단계에 따라 다소 차이가 있으나 진단의 최소 민감도는 70%이며 특이도는 100%로 진단적 가치가 우수하다는 것을 시사한다. 또한 이러한 본 연구결과들은 앞으로 trypsinogen-2를 순수도가 높게 정제한다면 이를 이용해 monoclonal antibody를 생산할 수 있고 그 결과를 바탕으로 개의 급성 췌장염 진단시 뇨 시료를 이용한 dipstick 신속진단 Kit 개발이 가능하리라는 것을 보여주는 중요한 기초자료를 제시한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 현재 개의 급성 췌장염 진단법으로 이용되고 있는 여러 검사법과 함께 사람에서와 같이 뇨중 trypsinogen-2의 검출이 급성 췌장염의 진단적 지표가 될 수 있는지를 평가하기 위한 일환으로 10마리의 개에서 인위적으로 췌장염을 유발하여 혈청 amylase, lipase 활성도

및 ACCR의 질병경과에 따른 변화를 파악하였고 유발견의 뇨를 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 통해 26 KDa대의 단백질 분획의 출현율을 정시적 파악하여 trypsinogen-2의 민감도와 특이도를 산출하였다. 한편 SDS-PAGE 상에서 trypsinogen-2 분획으로 여겨지는 분획을 용출시킨 후 효소-기질법(TAME)과 등전점 전기영동(Isoelectrofocusing)을 통해 trypsinogen-2 분획으로 최종 확인하였으며 임상적으로 정상인 개와 그 결과를 비교하였다. 또한 이러한 실험적 결과를 실제로 본 병원에 내원하는 환축에 적용하여 trypsinogen-2가 어느 정도 진단적으로 가치가 있는지를 평가하였다.

급성 췌장염에서 이들 효소의 일별 변화양상을 실험적으로 알아보고자 인위적 유발견에서 유발전후의 혈중 amylase와 lipase 활성도 및 뇨의 amylase creatinine clearance ratio(ACCR)를 비교한 결과 amylase의 경우 유발 후 5일째까지 유의한 차이를 보였으며 lipase의 경우 전 실험기간동안 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), ACCR은 유발전과 후에 유의한 변화가 없었다($p > 0.05$). 또한 췌장염 유발견의 뇨에 대한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 상에서의 26KDa대 단백질 분획 출현양상을 실제 내원한 4두(췌장염 확진 3두, 정상 1두)의 결과와 비교하였고 SDS-PAGE 상에서 trypsinogen-2 분획으로 여겨지는 분획을 용출시킨 후 효소-기질법(TAME)과 등전점 전기영동(isoelectrofocusing)을 통해 trypsinogen-2 분획으로 확인하였다. 분획출현율을 기준으로 판정한 결과 인위적 유발견에서는 평균 87.1%(범위: 50~100%), 3두의 췌장염 확진견에서는 70%, 1두의 정상견에서는 분획이 나타나지 않았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 trypsinogen-2는 췌장염의 진행단계에 따라 차이가 있으며 진단의 최소 민감도는 70%, 특이도는 100%로 진단적 가치가 우수하다는 것을 시사하는 것으로 사료된다. 따라서 향후 충분한 양의 췌장즙을 획득하여 trypsinogen-2를 순수 정제할 수 있다면 monoclonal antibody를 이용한 개의 급성 췌장염 신속진단 뇨 dipstick kit 개발이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Wilson C, Imerie CW, Carter DC. Fatal acute pancreatitis. *Gut*, 29:782-788, 1988.
2. Williams DA. Diagnosis and management of pan-

- creatitis. *J Sm Anim Prac*, 35:445-454, 1994.
3. Williams DA. Exocrine pancreatic disease. In Etinger SJ, ed *Textbook of small animal internal medicine*. 4th ed, WB Saunders company, Philadelphia:1372-1392, 1995.
 4. Wong ECC, Butch AW, Rosenblum JL, Landenson JH, et al. *Clin Chem*, 39:234-243, 1993.
 5. Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med*, 330:1198-1210, 1994.
 6. Strombeck DR, Farver T, Kaneko JJ. Serum amylase and lipase activities in the diagnosis of pancreatitis in dogs. *Am J Vet Res*, 42(11):1966-1970, 1981.
 7. Parent J. Effect of dexamethasone on pancreatic tissue and on serum amylase and lipase activities in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 180(7):744-746, 1982.
 8. Polzin DJ, Osborne CA, Stevens JB, et al. Serum amylase and lipase activities in dogs with chronic primary renal failure. *Am J Vet Res*, 44(3):404-410, 1983.
 9. Dreling DA, Leichtling JJ. The amylase-creatinine clearance ratio. *Am J Gastroenterol*, 61:290-296, 1973.
 10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227:680-685, 1970.
 11. Retamal CA, Thiebaut P, Alves W. Protein purification from polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 268:15-20, 1999.
 12. Huttunen R. The trypsinogen and chymotrypsinogen contents of the pancreas during acute experimental pancreatitis of the rat. *Scand J Gastroent*, 10:177-180, 1975.
 13. Murtaugh RJ. Acute pancreatitis: Diagnostic dilemmas. *Seminars Vet Med Surg (Small Anim)*, 2:282-295, 1987.
 14. Bunch SE. Disease of the exocrine pancreas. In Morgan, RV, ed *Hand book of small animal practice*, 2nd ed, Churchill livingstone, New York, p459, 1992.
 15. Hall JA, Macy DW, Husted PW. Acute canine pancreatitis. *Compendium Education Article*, 10(4):403-414, 1988.
 16. Straus JH. Pancreatitis. In Bojrab MJ, Smeak DD, Bloomberg MS, ed *Disease mechanism in small animal surgery*, 2nd ed, Lea & Febiger, Malvern:237-242, 1993.
 17. De Giorgio R, Sternini C, Widdison AL. Differential effects of experimentally induced chronic pancreatitis on neuropeptide immunoreactivities in the feline pancreas. *Pancreas*, 8:700-710, 1990.
 18. Anderson NV, Strafuss AC. Pancreatic disease in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 139(7):885-891, 1971.
 19. Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S, et al. Serum Amylase elevation following hepatic resection in patients with chronic liver disease. *Am J Surg*, 171(2):235-8, 1996.
 20. Steer ML, Meldolesi J. Pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Rev Med*, 39:95-105, 1988.
 21. Drazner FH. Diseases of the pancreas. In Johnes BD, ed *Canine and Feline Gastroenterology*. WB Saunders company, p295, 1986.
 22. Akuzawa M, Morizono M, Nagata K, et al. Changes of serum amylase, its isoenzyme fraction and amylase-creatinine clearance ratio in dogs with experimentally induced acute pancreatitis. *J Vet Med Sci*, 56(2):269-273, 1994.
 23. Rinderknecht H, Renner IH, Carmack C. Trypsinogen variation in pancreatic juice of healthy volunteers, chronic alcoholics, and patients with pancreatitis and cancer of the pancreas. *Gut*, 20:886-891, 1979.
 24. Clavien PA, Burgan S, Moossa AR. Serum enzymes and other laboratory tests in acute pancreatitis. *Br J Surg*, 76:1234-1243, 1989.
 25. Hedström J, Sainio V, Kemppainen E, et al. Urine trypsinogen-2 as marker of acute pancreatitis. *Clin Chem*, 42:685-690, 1996.
 26. Rinderknecht H, Geokas MG. Anionic and cationic trypsinogens(trypsin) in mammalian pancreas. *Enzyme*, 14:116-130, 1972/1973.
 27. Kimland M, Russick C, Marks WH, et al, Immuno-reactive anionic and cationic trypsin in human serum. *Clin Chim Acta*, 184:31-36, 1989.
 28. Ikonen O, Koivunen E, Hurme M, et al. Time-resolved immunofluorometric assays for trypsinogen-1 and 2 in serum reveal preferential elevation of trypsinogen-2 in pancreatitis. *J Lab Clin Med*, 115:712-718, 1990.
 29. Kemppainen E, Hedström J, Puolakkainen P, et al. Ra-

- pid measurement of urinary trypsinogen-2 as a screening test for acute pancreatitis. *N Engl J Med*, 336:1788-1793, 1997.
30. Williams DA, Batt RM. Sensitivity and specificity of radioimmunoassay of serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Vet Med Assoc*, 192:195-201, 1988.
31. Simpson KW, Batt RM, McLean L, Morton DB. Circulating concentration of trypsin-like immunoreactivity and activities of lipase and amylase after pancreatic duct ligation in dog. *Am J Vet Res*, 50:629-632, 1989.
32. Koivunen E, Huhtala ML, Stenman UH. Human ovarian tumor-associated trypsin. *J Biol Chem*, 264:14095-14099, 1989.
-