

정상적인 개에서의 Serum Bone Alkaline Phosphatase의 활성치

조성진¹ · 김남수 · 최인혁
전북대학교 수의과대학

Bone Alkaline Phosphatase Levels in Serum of Normal Dogs

Sung-jin Cho¹, Nam-soo Kim, In-hyuk Choi.

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

ABSTRACT: The bone alkaline phosphatase (BALP) in 130 sera of normal dogs were assayed according to the lectin precipitation method of Rosalki and Foo. The serum BALP activities showed a wide variation as 23.27 (± 14.73) IU/L in young dogs from 6 weeks to 12 months old and were lower in magnitude as 9.24 (± 3.36) IU/L in elder dogs from 1 years to 6 years old. The serum BALP activities in normal dogs were no significant correlation in sex.

Key words: Bone alkaline phosphatase, dog

서 론

골질의 치유과정이나 대사성 골질환 등에서 골형성 정도를 파악하는 것은 질병의 진행상태나 정도를 판단하는데 도움을 준다^{5,9}. 골형성은 주로 골아세포 (osteoblast)가 증식되면서 골기질을 형성하는 과정으로 진행되기 때문에²⁴, 골형성을 양적·질적으로 정확히 측정하기 위해서는 생검에 의한 골조직의 형태학적 방법이 필요하다^{5,7,24}.

그러나 생검에 의한 골형성의 측정은 병변부위의 세포 및 조직수준에서 골형성 정도를 반영할 수는 있으나, 조직손상을 동반하는 침습적 방법이라서 임상에서 사용하기에는 한계가 있으며, 국소적인 골형성의 표시는 가능하나 전신적인 상태를 반영하지는 못하는 단점이 있다^{5,7,27}. 따라서 임상에서 골형성 정도의 평가는 골아세포에서 생성하여 분비되는 효소나 단백질들을 혈중에서 간접적으로 측정하는 생화학적 방법들이 주로 이용되고 있다^{5,9,27}.

혈액중에 골대사와 연관된 물질을 측정하는 생화학적 방법은 임상적으로 쉽게 이용할 수 있으며 치료효과를 판정하는데 있어서도 여러번 반복검사할 수 있는 장점이 있다^{5,27}. 골아세포 활성을 반영하는 생화학

적 지표로는 Carboxyl-terminal procollagen type I peptide (PICP), Bone gla-protein (BGP: Osteocalcin), alkaline phosphatase (ALP) 등이 알려져 있다^{5,9,24,27}.

PICP는 골아세포에서 생성 분비되어 골기질의 무기 성분중 90% 이상을 차지하는 교원성 단백질인 제 1형 콜라겐의 분해산물중 일부가 혈중으로 방출된 것이며, Osteocalcin은 hydroxyapatite 침착을 방해하는 물질을 억제하여²⁴ 골형성에 기여하는 것으로 알려진 비교적 교원성 단백질로 골아세포에서 생성되어 혈중으로 유리되므로 골아세포의 활성을 반영하는 생화학적 지표로 이용되고 있다. 그러나 PICP와 Osteocalcin을 혈중에서 측정하는 방법들은 방사성 동위원소를 이용하기^{5,9,27} 때문에 임상에서 적극적으로 활용하기에는 어려운 점이 많다^{7,23}.

ALP는 인산에스테르 화합물의 가수분해를 촉매하는 효소로⁴ 분비성 상피조직과 골조직 등 생체 여러 곳^{5,16}에서 생성되어 정상견에서도 혈중으로 소량이 유리되는 것으로 알려져 있다⁵. 이 효소의 측정은 비색법이나 전기영동 등 비교적 간단한 방법을 이용할 수 있기^{6,10,16} 때문에 임상에서 일반적인 골형성의 생화학적 지표로 이용하고 있다^{5,6,9,10,16,24}. 그러나 이 효소는 생체 여러 조직에서 생성 유출된 동위효소들이 혼합된 형태로 혈중에 존재하므로^{6,10,16} 골아세포의 활성을 반영하는 데는 그 특이도와 예민도가 결여되는 단점이 있다^{3,17}. 이에 따라 최근 사람의 경우에 있어서는 bone alkaline phosphatase (BALP)만을 분리 측정하여 골형

본 연구는 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어 졌음.

¹Corresponding author.

성의 생화적 지표로 이용하는 추세이다^{1,3,5,7,8,11,12,17,27}.

BALP는 골아세포에서 생성되어 혈중으로 유리되는 당단백으로^{5,7,9,24,27} chromatography¹³, RIA^{7,8}, RIMA^{8,22} electrophoresis^{21,22}, heat-inactivation² 등의 여러 가지 분리·측정법들^{6,9,16}을 이용하여 검사하고 있으나 이들 방법을 임상적으로 실용하기에는 특수한 장비를 이용하거나 검사절차의 복잡성 등 비현실적인 면들이 있다^{1,3,22}. 그러나 최근 lectin에 의한 침전법이 소개되면서^{1,21} 간편한 절차로도^{1,17} 높은 임상신뢰도를 얻어^{1,3,23} BALP의 유용한 검사방법으로 관심의 대상이 되고 있다^{1,3,9,17,20,23}.

최근 반려동물의 노령화에 따른 골대사성 질환의 증가와 교통사고등에 따른 골절환축이 증가함에 따라 골질환에서 질병의 진행상황이나 예후등을 판단하기 위해 골형성의 지표를 필요로 하게 되었다. 또한 골이식이나 골종양등의 연구와 진단에도 골형성의 지표는 유용한 자료가 될 것으로 생각된다^{5,27}. 그러나 지금까지 개를 대상으로한 골형성의 지표는 Total alkaline phosphatase (TALP)만을 일부 이용하고 있고^{4,24} 골아세포의 활성을 특이성 있게 반영하는 골형성의 지표는 접하기 어려웠다.

본 실험에서는 임상적으로 손쉽게 이용할 수 있는 골형성의 지표를 설정하고자 아직까지 보고된 바 없는 개에서의 BALP활성치를 Wheat germ lectin을 이용한 Rosalki와 Foo의 변법²¹을 이용하여 성별과 연령에 따라 측정하였다.

재료 및 방법

공시동물

병력청취와 신체검사 및 일반혈액검사를 통해 임상적으로 건강하다고 판단되는 생후 6주령 이상 7세 이하인 5 kg~20 kg의 개 130두를 대상으로 품종과 체중에는 관계없이 연령과 성별에 따라 분류하였다.

검사혈청의 선별

공시동물로 선정된 개의 요골정맥(cephalic v.) 또는 경정맥(external jugular v.)에서 혈액 10 ml를 취한 뒤 이 중 3ml의 혈액은 EDTA 채혈병에 분주하여 일반혈액검사를 하고, 7 ml의 혈액은 항응고제가 처리되지 않은 시험관에 옮겨 원심분리하여 얻은 혈청으로 생화학적 검사를 하였다. 검사 결과 정상범위에 속하는^{16,18} 130두의 혈청만을 검사대상으로 하여 -70°C에 냉동보관한 뒤 30일 이내에^{1,21} BALP와 TALP를 측정하였다.

혈액검사

일반혈액검사는 자동혈액 분석기(Minos vet. ABX co. France)를 이용하여 RBC, Ht., Hb., MCHC, WBC, Plt., 을 측정하였고, 혈청생화학적검사는 자동혈액화학 분석기(SpotchemTM, SP-4410. Daiichi kagaku co. Japan)를 이용하여 glucose, BUN, total cholesterol, total bilirubin, GOT, GPT, TALP를 측정하였다.

골형성에 직접적인 영향을 미치는 Ca 과 Pi는 UV spectrophotometer (Spectino 601, milton roy co. U.S. A.)를 이용하여 측정하였다. 정상 범위는 Ca: 8.0~12.04 mg/dl, Pi: 2.69~4.96 mg/dl로 하였다^{16,18}.

TALP의 측정

TALP의 측정은 p-nitrophenylphosphate를 기질로 하여 ALP의 발색 정도를 보는 Bessey-Lowry법^{10,21,28}에 따랐다.

준비된 혈청을 4°C에서 24시간 해동하여 사용하였다. Stock substrate sol. (p-nitrophenylphosphate: Sigma chem. co. U.S.A.) 0.5 ml와 alkaline buffer sol. (2-amino-2-methyl-1-propanol: Sigma chem. co. U.S.A.) 0.5 ml를 혼합하고, serum 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 incubation 하였다. 이 용액에 0.05 N NaOH 10 ml를 작용시켜 정색반응을 얻어 blank를 대조로 UV spectrophotometer (Spectino 601, milton roy co. U.S.A.)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하고 이 용액에 HCl 0.2 ml 첨가 혼합한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 값을 뺀 수치를 TALP치로 하였다²⁸.

BALP의 측정

BALP의 침전은 wheat germ agglutinin이 혈청내 BALP의 N-acetylglucosamine과 결합하는 성질^{13,19,21}을 이용한 Rosalki and Foo의 변법^{1,17}에 따랐다.

혈청은 4°C에서 24시간 해동하고, lectin sol.은 wheat germ agglutinin (Triticum vulgaris wheat germ lectin. Sigma chem. co. U.S.A.)을 5 g/L의 비율로 희석하여 만들었다. Triton-X 100 sol.은 Triton-X surfactant (Sigma chem. co. U.S.A.)를 20 g/L의 비율로 희석하여 준비하였다.

준비된 혈청 50 µl에 동량의 lectin sol.을 첨가한 뒤 37°C, 30분간 incubation 하고, 이 용액에 Triton-X 100 Sol. 5 µl를 첨가하여 잘 혼합하고 37°C, 30분간 다시 incubation 하였다. 이렇게 얻은 serum mixture를 2000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액과 침전물로 분리하였다. 침전물에는 혈청내에 존재하는 BALP가 wheat germ agglutinin과 결합하여 있는 것으로 알려져 있다²¹.

상층액을 취하여 TALP의 측정법과 동일한 방법으로 ALP의 활성을 측정하였다. BALP는 TALP에서 상층액의 ALP치를 뺀 값¹으로 하였다.

결 과

정상적인 개 130두의 혈청에서 측정된 BALP치는 표 1과 같다. 1세까지는 TALP는 평균 84.65(±34.83) IU/L로 나타났으나, BALP는 평균 23.27(±14.73) IU/L로 나타나 TALP 보다 낮은수치를 보였다.

TALP의 경우 생후 4개월령의 104.65(±39.58) IU/L에서 1세령의 34.92 (±22.79) IU/L로 66.63%의 감소율을 보였고, BALP는 4개월령의 27.69(±21.21) IU/L에서 1세령의 9.70(±4.85) IU/L로 64.97%의 감소율을 보여, TALP와 BALP가 1세령까지 연령이 증가함에

따라 큰 폭으로 감소하는 경향을 나타냈다. TALP는 1세령의 34.92(±22.79) IU/L에서 3~6세령의 23.03(±9.50) IU/L로 34.04%의 감소율을 보였고 BALP는 2세령의 9.70(±4.85) IU/L에서 3~6세령의 8.47(±1.53) IU/L로 12.68%의 더욱 낮은 감소율을 보였다. 이 기간 동안 TALP의 평균은 30.88(±17.01) IU/L로 55.08%의 높은 변화율을 보였고, BALP는 평균 9.24(±3.36) IU/L로 36.36%의 비교적 낮은 변화율을 보였다.

BALP의 암수 성별에 의한 변화는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다(Table 2).

고 찰

알칼린 인산효소(탈인산 가수분해 효소: orthophosphoric monoester phosphohydrolase: alkaline phosphatase)

Table 1. Alkaline phosphatase activities in serum of dogs

Age (months)	No. of heads	ALP activities (IU/L)				BALP/TALP (%)
		TALP (Mean±S.D.)	Range	BALP (Mean S.D.)	Range	
~4	24	104.65±39.58	21.21~170.03	27.69±21.21	9.40~64.53	26.45
5~8	24	79.33±39.23	26.29~143.23	19.02±7.79	10.06~26.73	23.97
9~12	22	49.87±20.92	19.70~78.01	18.67±8.73	8.60~37.13	37.43
13~24	20	34.92±22.79	12.93~97.46	9.70±4.85	5.20~23.93	27.77
25~36	20	34.68±18.72	9.96~74.59	9.54±3.71	4.29~15.29	27.51
37~84	20	23.03±9.50	11.84~32.21	8.47±1.53	6.43~10.73	36.78
Total	130	58.92±37.77	9.96~170.03	16.95±13.39	4.29~64.53	28.76

Table 2. Alkaline phosphatase activities in serum of dogs according to sex

Sex	Age (months)	No. of heads	ALP activities (IU/L)		BALP/TALP (%)
			TALP (Mean±S.D.)	BALP (Mean±S.D.)	
Female	~4	12	89.99±29.38	26.26±20.52	29.18
	5~8	12	80.89±36.52	17.78±7.32	21.98
	9~12	11	50.15±21.92	18.84±9.09	37.56
	13~24	10	34.78±12.79	11.86±5.55	34.10
	25~36	10	36.17±21.73	8.65±3.28	23.91
	37~84	10	23.15±11.18	8.56±1.19	36.97
	total	65	57.22±33.68	16.75±12.40	29.27
Male	~4	12	123.71±44.31	29.39±22.87	23.75
	5~8	12	77.08±45.74	20.49±8.79	26.58
	9~12	11	49.23±20.37	18.31±8.85	37.19
	13~24	10	35.03±29.86	7.72±3.18	22.03
	25~36	10	31.32±11.65	11.45±4.32	36.56
	37~84	10	22.79±8.73	8.14±2.27	35.71
total	65	61.57±43.65	17.23±14.85	27.98	
Total		130	58.92±37.77	16.95±13.39	28.76

tase : ALP : E.C 3.13.1)는 membrane-bounded metalloenzyme^{4,15,22} 가수분해와 세포내로의 물질이동에 관여하는 것으로 알려져 있다^{4,10,16}. 혈중의 TALP는 1932년 Robison에 의해 사람의 골질환에서 증가하는 것으로 보고된^{6,10} 이래 골형성 지표로 이용되고 있으며, 특히 개에서는 임상적으로 유일하게 이용하고 있는 골형성의 지표이나 간, 콩팥, 태반, 종양, 장 등 신체 여러 곳에서 유래한 동위효소가 함께 측정되므로^{5,10,16} 특이성(specifity)이 결여되어 있다.

따라서 TALP는 골질환의 진행과 골절치유와 관련된 효소의 반응을 민감하게 표현하지 않는 것으로 알려져 있어, 근래에는 골아세포의 활성만을 나타내는 BALP가 골형성의 주요한 임상지표로 주목되고 있다^{2,5,11,13,20,21,22,24,25,27}.

BALP는 골아세포의 세포막에 존재하는 당단백 효소로 인산에스테르 화합물을 가수분해하여 골기질의 matrix vesicle에 국소적으로 PO_4^{3-} 의 농도를 증가시켜 Ca^{2+} 과 결합에 의한 Hydroxy-apatite의 형성을^{11,12} 유도하거나²⁴, calcification의 방해물질을 제거하여²⁴ 골형성에 기여하는^{4,10} 골아세포의 활성지표로 알려져 있다^{7,23}.

이 효소의 분리 측정은 electrophoretic separation, radioimmunoassay, heat inactivation 등의 방법이 이용되어 왔는데, 이들 방법은 검사 절차상의 비실용적인 면이 있었다^{1,3,20}. 본 실험에서는 당단백인 BALP의 N-acetylglucosamin이 wheat germ lectin과 결합하여 침전하는 반응¹⁹을 이용한 Rosalki and Foo의 변법²¹에 따른 간편한 개선법¹을 이용하여 정상적인 개의 BALP를 측정하였다.

사람의 경우 BALP의 연령에 따른 변화는 여러 연구자들이 어린 시기와 사춘기에 높게 나타나고 이후 감소^{1,6,17}하는 것으로 보고하고 있는데, 이것은 골성장기에 골아세포의 활성이 왕성하여 BALP의 혈중 농도가 함께 증가하기 때문^{7,16,24}인 것으로 사료된다. 본 실험에서 얻어진 개에서의 결과도 BALP가 골성장기인 생후 1세 이전에 높게 나타나 골아세포의 활성과 깊은 연관이 있음을 알 수 있었다.

성별에 따른 BALP의 변화는 사람에서 여성이 남성보다 일찍 최고치를 보인뒤 이후 감소하고 폐경기 이후 다시 증가하는 것으로 보고되고 있으며¹⁷, 성인 남성에서는 $39.76(\pm 16.68)$ IU/L로 성인 여성의 $31.36(\pm 12.41)$ IU/L로 보다 높게 나타났으나¹⁷ 개를 대상으로 한 본 실험에서는 성별에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 계절번식을 하는 개에서 성주기가 길고 한정되어 있어 사람의 경우와 달리 골성장이 호르몬의 영향을 덜 받기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 개에서 BALP는 사람에서와 같이 골아세포의 활성을 민감하게 반영하는 임상지표로 활용가치가 있으며, 이를 위한 개에서의 기준치의 설정은 최근 증가하는 골질환축이나 반려동물의 노령화에 따른 골종양 등 골대사성 질환에서 유용한 골형성의 생화학적 지표로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

정상적인 개 130두에서 연령과 성별에 따른 혈청내 BALP치를 구하기 위하여 Lectin에 의한 침전법을 이용한 Rosalki and Foo의 변법으로 측정된 결과, 뼈 성장기인 생후 6주에서 12개월까지는 27.69~18.67 IU/L의 범위에서 높게 나타났고, 1세 이상 6세까지는 9.70~8.47 IU/L로 낮게 나타났으며, BALP는 성별에 유의성 있는 차이가 없었다.

참고문헌

- Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem* 1986; 10: 1960-1966.
- Bouman AA, Scheffer PG, Ooms ME, et al. Two bone alkaline phosphatase assays competed with osteocalcin as a marker of bone formation in healthy elderly women. *Clin Chem* 1995; 41: 196-199.
- Brixen K, Nielsen HK, Eriksen EF, et al. Efficacy of wheat germ lectin-precipitated alkaline phosphatase in serum as an estimator of bone mineralization rate: Comparison to serum total alkaline phosphatase and serum bone glaprotein. *Calcif Tissue Int* 1989; 44: 93-98.
- Coleman JE. Alkaline phosphatase, solution structure and mechanism. In: Meister A. *Advances in Enzymology*. 1st ed. New York: Interscience publication. Vol 55. 1983; 381-451.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1990; 19(1): 1-18.
- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem* 1982; 23(10): 2007-2016
- Duda RJ Jr, O'Brien JF, Katzmann JA, et al. Concurrent assays of circulating bone glaprotein and bone alkaline phosphatase: Effects of sex, age, and metabolic bone disease. *JCE & M* 1988; 66(5): 951-957.
- Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, et al. Bone formation rate and older normal women: Concurrent as-

- sessement with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *JCE & M.* 1988; 67: 741-748.
9. Epstein S. Serum and urinary markers of bone remodeling: Assessment of bone turnover. *The Endocrine Society.* 1988; 9(4): 437-449.
 10. Fishman WH. Perspectives on Alkaline phosphatase isoenzymes. *American Journal of Medicine* 1974; 56: 617-650.
 11. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *JCE & M.* 1993; 4: 1046-1053.
 12. Genge BR, Sauer GR, Wu LNY, *et al.* Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix Vesicle-mediated mineralization. *The Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(34): 18513-18519.
 13. Gonchroff DG, Branum EL, Cedel SL, *et al.* Clinical evaluation of highperformance affinity chromatography for the separation of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinical Chemica Acta.* 1991; 199: 43-50.
 14. Henry JB. *Clinical Chemistry, Chemical Chemistry : In Clinical diagnosis and management.* 18th edition 1991: W.B. Saunders Company. 232-263.
 15. Hofmann MC, Millan JL. Developmental expression of alkaline phosphatase genes. *Eur Urol* 1993; 23: 38-45.
 16. Kaneko JJ. *Clinical biochemistry of domestic animals.* Academic press Inc. 1989; 338-363.
 17. Leung KS, Fung KP, Sher AHL *et al.* Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg* 1993; 75: 288-292.
 18. Meyer DJ. *Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis* 1992. Saunders-s. 61-62, 328-336.
 19. Monsigny M, Roche AC, Sene C, *et al.* Sugerlectin interactions: How does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem.* 1980; 104: 147-153.
 20. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A *et al.* Multicenter evaluation of iso - ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clin. Chem.* 1993; 4: 648-652.
 21. Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin. chem.* 1984; 7: 1182-1186.
 22. Van Hoof VO, Martin M, Blockx P, *et al.* Immunoradiometric method and electrophoretic system compared for quantifying bone alkaline phosphatase in serum. *Clin Chem* 1995; 41(6): 853-857
 23. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, *et al.* Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinica Chemica Acta* 1991; 201: 27-34.
 24. Wasserman RH, Kallfels FA, and Geogrgge Lust. *Bones, Joints, and Synovial Fluid.* In; *Duke's physiology of domestic animals.* Comstock Cornell University press. 1993; 536.
 25. Whitaker N.B., *et al.* Activaties of bone and liver alkaline phosphatase in serum in health and disease. *Clinical Chemica Acta.* 1977;80:209-220.
 26. Wuthier RE. Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian growth plate cartilage. *American Institute of Nutrition* 1993; 123(2 s-uppl.): 301-9
 27. 강무일. 골교체 생화적 표지자의 임상적 응용. 대한골대사학회지. 1994; 2: 246-253.
 28. 이삼열. 임상병리검사법. 1985, 연세대학교 출판부. 226-228.