

백서 급성 심근경색 모델에서 Adenylate Kinase 3의 혈청학적 동태 연구

한양대학교 과학기술대학 생화학과,¹ 한양대학교 의과대학 흉부외과학교실,² 심장내과학교실³
한재승¹ · 김효준¹ · 김 혁² · 김경수³

Serological Kinetics of Adenylate Kinase 3 in Rat Acute Myocardial Infarction

Jae-Seung Han, MS¹, Hyo Joon Kim, PhD¹, Hyuck Kim, MD² and Kyung-Soo Kim, MD³

¹Division of Molecular Immunology, Department of Biochemistry & Molecular Biology, College of Science and Technology, ²Thoracic Surgery, ³Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Currently used serological markers for the diagnosis of acute myocardial infarction differ in appearance time and specificity for myocardial infarction, allowing no ideal single serological marker for myocardial infarction. Adenylate kinase (AK) is a ubiquitous enzyme which contributes to the homeostasis of the cellular adenine nucleotides pool. AK is abundant in the myocardium, and we postulated that AK3 could be used as a biochemical marker for the diagnosis of acute myocardial infarction (AMI). **Materials and Methods :** We constructed an AMI rat model with ligation of the anterior descending artery. We measured the concentration of serum AK3 in the AMI rat model by enhanced chemiluminescence (ECL) sandwich ELISA using monoclonal antibodies against recombinant AK3. **Results :** The serum AK3 level started to increase in 3 hours and reached a peak at 6 hours after ligation of the rat coronary artery. The significant elevation of AK3 was retained for 2 days ($p < 0.05$). **Conclusion :** AK3 is a useful serological marker for acute myocardial infarction in the rat. (Korean Circulation J 2004;34(3):288-295)

KEY WORDS : Myocardial infarction/enzymology ; Adenylate kinase.

서 론

급성심근경색은 신속한 재관류를 통해서 성공적으로 치료될 수 있으며 이를 위해서는 심근경색의 신속한 진단이 선행되어야 한다. 심근경색의 진단에는 환자의 증상, 심전도 소견과 함께 심근효소가 중요한 역할을 한

다. 현재 이용되는 심근경색의 생화적 지표인 심근효소에는 myoglobin, troponin T, troponin I, creatine kinase-MB 등이 있다. 각각의 심근효소들은 심근 특이성, 혈중 발현시기의 차이 등에 따른 장단점이 있어 단일 효소만으로는 정확한 진단이 어려워 상호 보완적으로 사용되고 있다.

Adenylate kinase(AK)는 AMP, ADP, ATP(혹은 GTP)를 상호 변환시켜, 세포 내 adenine(or guanine) nucleotide 구성의 항상성에 기여하는 효소이다. AK는 박테리아에서 포유류까지 모든 유기체에서 발견되고, ATP 합성과 이용이 많은 세포에 특히 풍부하다.¹⁻³⁾

논문접수일 : 2003년 8월 19일

심사완료일 : 2003년 10월 27일

교신저자 : 김경수, 133-792 서울 성동구 행당동 17번지

한양대학교 의과대학 심장내과학교실

전화 : (02) 2290-8312 · 전송 : (02) 2298-9183

E-mail : kskim@hanyang.ac.kr

척추동물의 adenylate kinase(AK)는 구조, 세포 소기관의 위치, 기질 특이성에 기초하여 발견된 순서에 의해 다섯 가지 Adenylate kinase isozymes(AK1, AK2, AK3, AK4, AK5)로 분류된다. AK1은 골격근, 뇌, 적혈구, 심근 등의 모든 조직 세포에 존재하고, AK2는 간, 신장, 비장, 뇌, 심장 등의 조직에서, AK3는 뇌, 골격근 등을 제외한 간, 심장, 신장에 존재한다.³⁾ Mouse에서 밝혀진 AK4는 중추신경계에서 발현되고, AK5는 사람의 뇌에 존재한다.⁴⁾ AK3는 미토콘드리아의 matrix에 존재하는 isozyme으로 hypoxia에 의해 AK3의 mRNA 및 효소단백질의 발현이 3배 이상 유도됨이 보고되었다.⁵⁾⁶⁾

심근세포는 다른 세포와는 달리 미토콘드리아가 세포 용적의 40%를 차지할 정도로 많이 함유되어 있으므로, AK3는 심근경색 진단 지표로 유력한 효소임을 예상할 수 있다. 또한 AK3는 뇌 및 골격근에 존재하지 않기 때문에,⁷⁾⁸⁾ myoglobin, creatine kinase의 단점인 근육손상에 따른 심근경색 표지로서의 위 양성이 없을 것으로 예상할 수 있다. 이에 저자들은 AK3의 새로운 심근경색 지표로서의 가능성을 알아보기 위해 백서 심근경색 모델에서 심근경색 시 시간 경과에 따른 혈중 AK3의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

백서 급성 심근경색 모델

Sprague Dawley종의 남성 백서 132마리(10주령, 200~250 g, 대한 바이오 링크)를 사용하였다. 동물 사육실의 온도는 17~25℃로 유지하였고, 12시간 주기로 낮과 밤을 유지하였으며 물과 혼합사료(Samtaco, Kyonggi, Korea)를 충분히 공급하여 사육하였다.

백서를 100% diethyl ether(Merck, Germany)로 전신마취 시킨 뒤, ketamine(Yuhan-yanghang, Korea)을 30 mg/kg과 xylazine(Bayer-korea, Korea)을 3 mg/kg를 혼합하여 복강내 주사를 하여 마취하였다.⁹⁾ 마취된 백서를 수술대에 사지를 고정시키고, 산소 관을 통해 기도를 확보하여 호흡을 유지한 뒤, 심전도 유도바늘을 사지에 삽입하여, 심전도 기기(SECG-100A, Samsung, Korea)로 심전도를 측정하였다. 심전도상으로 정상소견임을 확인한 뒤, 좌측 흉부의 털을 제거하고, 흉골 좌측 연의 피부를 세로로 약 3 cm 정도를 수직 절개하였다. 피부하층을 박리하여 좌우로 고정하고, 사흉근

이 나타나면 늑골로부터 박리하여 벌려 놓았다. 좌측 늑골을 확인 후, 5번과 6번 늑골 사이를 천자하여 흉강을 개방하였다. 고정기로 늑골 사이를 벌려 심장과 폐가 노출되도록 시야를 확보하고, 98% 산소를 공급하여 양압으로 호흡을 유지시켰다. 심낭을 개방한 뒤, 폐동맥과 좌심방이(left atrial appendage) 사이의 좌전하행지 관상동맥의 위치를 확인하고, 5호 봉합바늘로 심근과 함께 관상동맥을 결찰하여 심근경색을 유도하였다. 심전도상 S-T분절이 상승, 육안상 좌심실의 창백 등으로 심근경색이 유도되었음을 확인하였다. 늑골을 봉합하고, 사흉근을 덮고, 외피를 봉합한 후, 심전도를 측정하여 S-T분절이 상승을 재확인하였다.¹⁰⁾

예비실험에서 심근경색 조작 후 조직학적 검사를 통해 조작의 완벽함을 확인하였다. 즉 심근경색 후 3일에 심장의 대동맥 근부위에 0.01% Evans blue(Sigma, MO) 0.5 mL을 주사기로 서서히 넣어서 염색 유무로 경색여부를 확인하였고,¹⁷⁾ 또한 대동맥에 4% formaldehyde를 넣어 심장조직을 고정한 뒤, 심장을 적출하여 횡축으로 2 mm 정도로 절편을 낸 뒤 0.1% triphenyltetrazolium chloride(TTC)(Sigma, MO)로 37℃에서 15분간 반응시켜 조직의 괴사 유무를 확인하였다.¹¹⁾¹²⁾

심근경색 유도 수술 3일 전 백서의 꼬리 정맥에서 26 G 주사기로 0.5 mL의 전혈을 채취한 뒤, 심근경색 유도 후 1, 3, 6, 12, 18시간 및, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 14, 15일에 각각 0.5 mL씩 꼬리 정맥에서 전혈을 채취하였다. 정상 대조군으로는 개흉술을 시행하지 않은 그룹과 심근경색 없이 흉부 개방 후 심낭까지 개방한 그룹(sham group)도 같은 시간별로 전혈을 채취하였다. 각각의 시간별로 채취한 전혈을 37℃에서 1시간 보관한 뒤에, 4℃에서 12시간 보관하여 2500×g, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 준비하였다. 준비된 혈청은 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

AK3 특이적 단클론 항체

본 연구에서 사용한 단클론 항체 SJB3-34, SJB3-36, 및 SJB3-38은 유전자 재조합 human AK3(rAK3)를 항원단백질로 접종하여 유도한 단클론 항체들로 (주)SJBimed(Kyunggi, Korea)에서 공급을 받았다. Sandwich ELISA에는 conformational epitope을 인식하는 SJB3-34와 SJB3-36을, Western-blot analysis에는 linear epitope을 인식하는 특성의 SJB3-38을 사

Table 1. Time dependent serum adenylate kinase 3 levels in rat acute myocardial infarction

Time	LCPS mean (\pm SE)	AK3 ng/mL mean (\pm SE)	N	p
0	1310.19 (\pm 181.28)	0	10	
1 h	1228.45 (\pm 94.94)	-0.02 (\pm 0.02)	10	0.756
3 h	2466.33 (\pm 304.91)	0.21 (\pm 0.02)	10	0.01*
6 h	2929.78 (\pm 192.16)	0.29 (\pm 0.06)	10	0.00
12 h	2317.04 (\pm 368.36)	0.18 (\pm 0.07)	10	0.04
18 h	2576.54 (\pm 233.13)	0.23 (\pm 0.04)	10	0.007*
24 h	1926.36 (\pm 204.72)	0.11 (\pm 0.04)	10	0.05
2 d	2366.45 (\pm 233.43)	0.19 (\pm 0.04)	10	0.007*
3 d	1176.73 (\pm 350.64)	-0.03 (\pm 0.06)	8	0.718
4 d	1581.22 (\pm 174.37)	0.05 (\pm 0.03)	8	0.359
5 d	1011.74 (\pm 139.63)	-0.06 (\pm 0.03)	8	0.228
7 d	1098.02 (\pm 189.38)	-0.04 (\pm 0.03)	8	0.442
9 d	940.21 (\pm 154.06)	-0.07 (\pm 0.03)	5	0.215
11 d	1269.00 (\pm 171.60)	-0.01 (\pm 0.03)	5	0.902
14 d	1015.60 (\pm 140.35)	-0.06 (\pm 0.03)	5	0.305
15 d	1087.43 (\pm 347.32)	-0.04 (\pm 0.06)	5	0.548

LCPS: luminescence counts per second, N: number of samples, AK3: adenylate kinase 3, SE: standard error. *: $p \leq 0.05$

용하였다.

백서 급성 심근경색 모델에서 시간별 혈청 AK3의 정량

백서 급성심근경색 모델에서 심근경색 후 시간 경과에 따른 혈청 AK3의 농도 변화 추이를 알아보기 위하여 아래와 같이 enhanced chemiluminescence (ECL) sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA)를 수행하였다.

면역분석에 사용한 완충액의 조성은 다음과 같다. Coating buffer ; 0.05 M bicarbonate pH 9.6, blocking buffer ; 0.5% casein in PBS, 0.02% sodium azide, washing buffer ; 50 mM tris, 150 mM NaCl, 0.5 g/L Tween-20, assay-buffer (pH 7.4) ; 50 mM tris, 150 mM NaCl, 20 μ M diethylene triamine pentaacetic acid, 5mg/L tartrazine, 5 g/L BSA, 및 dilution buffer ; 0.1% BSA in PBST, stopping buffer ; 0.2 M H₂SO₄.

Reactin-bind white opaque 96well microplate (Pierce, IL)에 단클론항체 SJB3-34를 coating buffer로 단백질 농도가 10 μ g/mL이 되도록 희석하여 plate에 100 μ L/well씩 분주한 뒤, 4°C에서 10시간 이상을 반응시켰다. Washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하고, blocking buffer를 300 μ L/well씩 분주하여 37°C에서

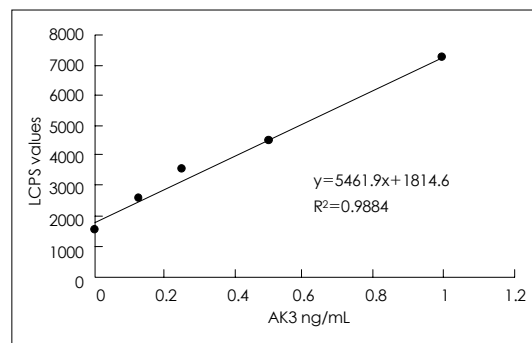


Fig. 1. Standard linearity-relationship between AK3 concentration and LCPS values from ECL sandwich ELISA. The linearity coefficient ($R^2=0.9884$) proved the good linear relationship. AK3: adenylate kinase 3, ECL: enhanced chemiluminescence, ELISA: enzyme-linked immunoadsorbent assay, LCPS: luminescence counts per second.

2시간 반응시킨 후 washing buffer로 200 μ L/well씩 3번 세척하였다. 정량용 표준항원으로 rAK3를 농도가 0, 0.125, 0.25, 0.5 및 1 ng/mL이 되도록 정상 백서의 혈청을 이용하여 조제하여 각각 100 μ L와 assays buffer 150 μ L를, 또한 심근경색이 유도된 백서의 혈청도 100 μ L도 마찬가지로 assays buffer 150 μ L와 섞어, 250 μ L/well씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. Washing buffer로 200 μ L/well씩 3번 세척하고, biotin conjugated monoclonal antibody SJB3-36 (0.2

mg/mL)을 100 μ L/well씩 분주한 뒤, 37°C에서 1시간 반응시켰다. Washing buffer로 200 μ L/well씩 3번 세척하고, streptavidin-HRP 0.1 mg/mL를 PBS buffer로 1:10,000으로 희석하여 100 μ L/well씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS buffer로 200 μ L/well씩 5번 세척한 뒤, supersignal-ECL kit(Pierce, IL) reagent A와 B를 1:1로 섞은 뒤 1:10 희석율로 PBS와 희석한 뒤, 200 μ L/well씩 분주하였다. 상온에서 1분 동안 반응시킨 뒤, 5분 이내에 Micro-beta Trilux 1450 Luminescence detector(Wallac, Finland)로 5초간의 luminescence counts per second(LCPS)를 측정하였다. 표준항원 LCPS값을 standard curve로 하여 심근경색 혈청의 AK3농도를 환산하였다.

총 104개의 혈청 검체에 대한 Enhanced chemiluminescence sandwich ELISA를 시행하여 혈중 AK3의 농도를 측정하였다. 정상군, sham group 사이의 AK3의 농도차이는 없었기 때문에 심근경색 혈청의 농도를 정상군의 농도를 zero point로 보정하여 농도를 나타내었다. rAK3 특이적 단클론 항체를 이용한 Sandwich ELISA의 표준 정량을 위하여, LCPS value와 rAK3농도의 상관성을 조사한 결과 상관계수 0.988의 매우 양

호한 직선성을 보였다(Fig. 1). LCPS값이 정상 백서의 정상치인 1310이하인 경우 AK3의 농도는 undetectable로 간주하였다.

정상 백서 조직에서의 AK3 발현 검토

백서의 간, 심장, 골격근 각각의 mitochondrial fraction 단백질 함량이 50 μ g씩이 되도록 전기영동 한 후, transfer된 membrane에 HRP-conjugate된 anti-rAK3 단클론 항체(SJB3-38)를 이용하여 백서의 각각의 조직에서 AK3를 확인하였다(Fig. 3).

Mitochondrial enzyme인 AK3의 발현을 확인하기 위해 백서의 간, 심장, 골격근의 각 조직 1 g씩을 0.2 M mannitol buffer(0.05 M sucrose, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) 5 mL에 넣고 균질화 시켰다. 균질화된 각 조직을 1000 \times g, 5분간 원심 분리하여 상층액을 분리한 뒤, 상층액을 3500 \times g, 10분간 원심 분리하였다. 침전물을 회수하여 0.2 M mannitol buffer 200 μ L로 재부유시킨 뒤, 5000 \times g, 10분간 원심 분리하였다. 침전물을 회수하여 0.2 M mannitol buffer 100 μ L에 재부유시켜 mitochondrial fraction을 분리하였다.¹³⁾

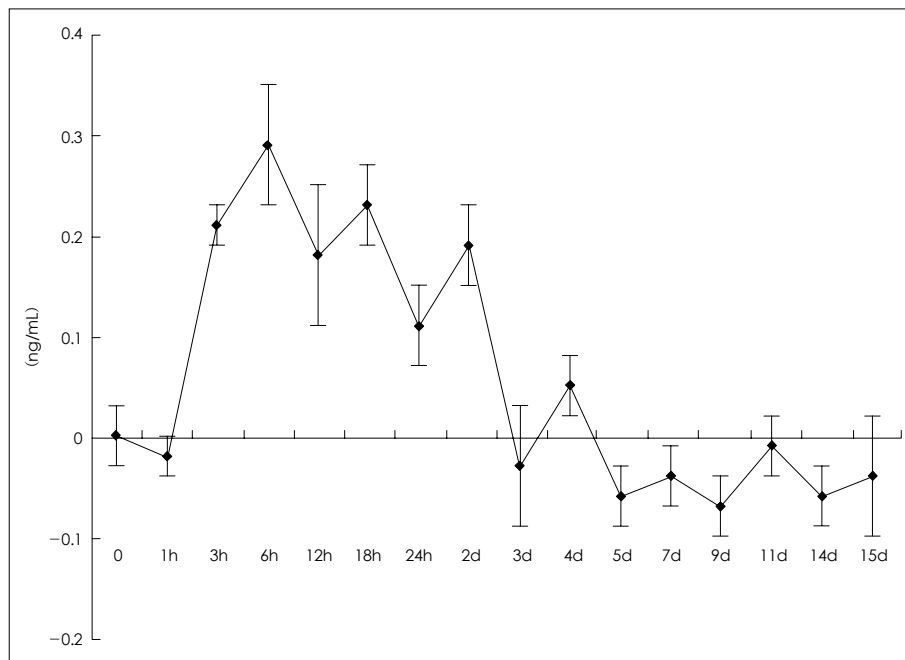


Fig. 2. Time-dependent AK3 releasing pattern from rat acute myocardial infarction model. Each points were mean \pm SE. *: the p-values of ≤ 0.05 . SE: standard error.

준비된 백서의 간, 심장, 골격근 각각의 mitochondrial fraction을 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 희석율로 PBS에 희석하였고, 표준 단백질로 2 mg/mL BSA를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 ug/mL를 준비하였다. 시료의 단백질 정량은 BCA assays kit (Pierce, IL)를 이용하여 96 well microtiter plate에 표준 단백질과 희석된 각각의 mitochondrial fraction을 25 uL/well씩 분주하였고, Reagent A와 B를 50 : 1로 섞은 뒤, 200 uL/well씩 넣고 30초간 흔들어 준 다음, 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤, ELISA reader (EL-312e, Bio-Tec, VT)로 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

백서의 간, 심장, 골격근의 mitochondrial fraction들의 단백질 함량이 50 ug이 되도록 2×Laemmli buffer와 1 : 1로 혼합한 뒤, 12% SDS-PAGE(16 mA, constant current)로 전기영동 하였다.¹⁴⁾ 전기영동 후, polyvinylidene fluoride membrane에 tris-glycine(20% MeOH) buffer로 70 V, 4°C에서 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% non-fat milk로 blocking시킨 후, horseradish peroxidase(HRP) conjugate된 anti-rAK3 단클론 항체(2 µg/mL)와 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤, 충분히 세척하였다. HRP의 효소반응은 Western-Blot ECL plus kit(Amersham,

Buckinghamshire, U.K)를 이용하여 5분간 반응시킨 뒤, ECL용 film에 노출시켰다. 미리 염색된 protein marker (NEB, MA)의 분자량과 이동거리의 semi-log graph를 작성하여 recombinant AK3와 백서 AK3의 분자 크기를 측정하였다(Fig. 1C).

자료처리

Mean, standard deviation (SD), standard error (SE)의 자료처리는 Microsoft EXCEL 97 software(Microsoft)를 이용하여 처리하였고, independent sample t-test는 SPSS software version 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하였다.

결 과

백서 급성 심근경색 모델에서 시간별 AK3 혈청농도

정상 대조군 및 sham 대조군의 혈청에서는 혈중 AK3는 감지되지 않았고 심근경색 유도 후 혈중 AK3 농도는 3시간 후 0.21 ± 0.02 ng/mL로 증가하기 시작하여 6시간 후 0.29 ± 0.06 ng/mL로 최고치를 보이고 48시간 (0.19 ± 0.04 ng/mL)까지 유의하게 상승되었다($p < 0.05$). 3일 이후 15일까지에는 정상 대조군과 차이를 보이지 않았다.

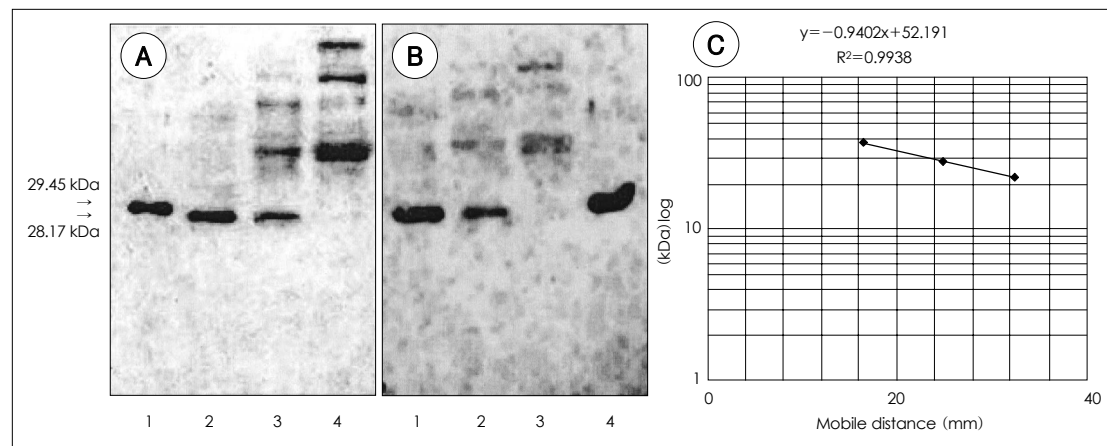


Fig. 3. Detection of AK3 in rat tissues by Western-Blot. Fifty micrograms of each mitochondrial fraction proteins were analysed and AK3 was detected by SJB3-38 mAb. AK3 detection was made with protein A affinity purified SJB3-38 mAb (A) or with rAK3-affinity purified SJB3-38 (B). In (C), standard curve for the determination of molecular weight of a protein by the linearity-relationships between protein M.W. and its electrophoretic mobility on SDS-PAGE. The calculated M.W. of human rAK3 was 29.45 kDa (24.5 mm) and that of rat AK3 was 28.17 kDa (25.7 mm). (A) lane 1: rAK3 (50 ng), lane 2: liver, lane 3: heart, lane 4: skeletal muscle. (B) lane 1: liver, lane 2: heart, lane 3: skeletal muscle, lane 4: rAK3 (50 ng). AK3: adenylate kinase 3, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

정상 백서 조직에서 AK3 확인

단클론 항체는 정제방법에 따라 약간의 비특이적 교차인식 반응이 예상되므로 protein A affinity에 의해 정제한 경우(Fig. 3A)와 rAK3 affinity chromatography에 의해 정제한 경우(Fig. 3B)의 두 가지 결과를 모두 제시하였다. Recombinant human AK3와 백서 AK3의 분자량은 각각 29.45, 28.17 kDa임을 확인하였다(Fig. 3A). 백서 AK3는 human AK3의 경우와 마찬가지로 간과 심장에 존재하고(Fig. 3A lane 2, lane 3 & Fig. 3B lane 1, lane 2), 골격근(Fig. 3A lane 4, & Fig. 3B lane 3)에는 존재하지 않음을 확인하였다. 백서의 심장 균질 액을 BCA법으로 정량 한 단백질 농도가 12.6 mg/mL이었고, positive control인 rAK3(50 ng)의 band intensity를 Labworks Image & Analysis software(UVP, Cambridge, U.K)로 분석한 결과로 비교해 볼 때, 대략 1/3 정도의 intensity를 가지므로, 백서 심장에서 428.4 ng AK3/g heart의 농도를 갖는 것으로 추정된다.

고 찰

백서 급성심근경색 모델에서 혈청 AK3 농도는 심근 경색 후 3시간부터 0.21 ng/mL로 증가하기 시작하여 경색 후 6시간 후에 0.29 ng/mL로 최고치에 도달하고 48시간까지 0.19 ng/mL로 유의하게 증가되었고 3일 이후에는 혈청에서 소실되었다.

백서의 좌전하행지 결찰을 통한 심근경색 모델에서 creatine kinase의 경우 심근경색 후 6시간에 증가하기 시작하여 30시간에 최고치에 도달하고 48시간이 지나면 정상범위로 돌아온다.¹⁵⁾ 백서에 isoproterenol을 주사하는 심근경색모델에서는 Troponin T는 6시간 이후에 증가하여 48시간 이후에는 정상으로 감소하고 creatine kinase는 6시간에 발현하여 24시간에 정상으로 감소하며 lactic dehydrogenase는 경색 후에 유의한 차이를 보이지 않았다.¹⁶⁾ 같은 모델에서 myoglobin은 심근 경색 후 30분에 발현하기 시작하여 2시간 30분 후에 정상으로 감소하였다.¹⁷⁾ 이들과 비교할 때 AK3는 심근 경색 후 myoglobin 보다는 늦게 증가하지만 creatine kinase, troponin T보다는 조기에 증가한다. 지속기간도 myoglobin, creatine kinase보다 더욱 오래 지속되며 troponin T와는 유사하다.

백서 심장 전체의 심근경색에서 예상되는 AK3의 유출량은 약 430 ng이고, 백서의 전체 혈액량이 대략 16 mL이므로 26.8 ng AK3/mL blood이고, 혈청 100 uL을 사용하여 ELISA assays를 수행하므로 백서 AK3 2.68 ng/mL정도가 백서의 혈청에서 확인 가능한 최대 AK3 농도라 할 수 있다. 이번 연구에서는 심근경색 정도는 백서가 생존 가능하도록 심장 크기의 1/4정도로 유도되었다. 따라서 확인할 수 있는 AK3의 양은 대략 0.67 ng/mL로 추정된다. Fig. 2에서 2시간부터 2일 사이에 방출되는 AK3의 총 양은 이와 동일 범위로 확인되었다.

이번 연구에서 백서의 혈액에 유출된 AK3의 양은 다른 심근경색 지표보다 낮고, 조직 발현 양도 낮은 것으로 분석되었다.¹⁸⁾ 이는 설치류의 AK3와 사람의 AK3는 homology가 60% 정도이므로, 분석에 사용한 단클론 항체가 human AK3로 유도한 것으로 백서 AK3에 대한 인식 능이 크게 저하되어 실질적인 혈중 농도보다 낮게 평가되었으리라 추정된다.

백서 AK3는 human AK3의 경우와 마찬가지로 간과 심장에 존재하고, 골격근에는 존재하지 않음을 이번 연구를 통해 확인하였다. 본 연구진의 선행연구결과⁷⁾ 및 Noma 등³⁾의 연구 결과에서 human의 경우에도 골격근에서는 AK3가 발현되지 않았으며, human AK3와 백서 AK3의 조직 특이성이 유사함을 보고하였다.¹⁹⁾

Myoglobin의 경우 골격근 손상 시에도 증가하므로 심근에 특이적인 troponin T 보다는 특이도가 떨어지지만 AK3는 비교적 특이도가 높은 것으로 생각된다. 그러나 간에도 존재하기에 임상 적용 시에는 간질환에 의한 위양성 반응에 주의해야 하겠다.

본 실험으로 확인된 바와 같이 백서 AK3의 조직 특이적 발현 양상이 human AK3와 동일한 점과 human AK3와 murine AK3의 아미노산 배열이 비교적 높은 homology를 지니므로,²⁰⁾ 심근경색 동물모델로써 백서의 사용은 타당하다고 사료된다.

Adenylate kinase는 1973년 Bernstein 등에 의해 심근경색 시 혈청 내에서 증가하는 것을 보고되어 심근 경색 지표로서의 가능성이 제시되었으나 조직 특이성이 없어 더 이상 심근경색지표로서 연구되지 않았다.²¹⁾ 최근 들어 Adenylate kinase의 isoform들과 AK3의 심장특이성이 밝혀지고 이들에 대한 단일클론항체들이 제작 가능하게 되어 이번 연구를 시행하였다.³⁾

AK3는 백서 심근경색의 혈청학적 지표로서 기존의 다른 지표에 비해 조기에 진단이 가능하고 장기간 지속되며 그 특이성도 높음을 알 수 있었다. 임상에서 AK3는 심근경색의 새로운 혈청학적 지표로서 사용할 수 있으리라 생각되며 이에 따른 추가 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

배경 및 목적 :

현재 심근경색의 혈청학적 지표로 사용되는 효소들은 발현시기, 특이도 등이 상이하여 단일 효소만으로는 정확한 진단이 어려운 실정이다. Adenylate kinase(AK)는 세포 내 adenine(or guanine) nucleotide 구성의 항상성에 기여하는 효소로서 ATP 합성과 이용이 많은 심근세포에 특히 풍부하다. AK3의 새로운 심근경색 지표로서의 가능성을 알아보기 위해 백서 심근경색 모델에서 시간 경과에 따른 혈중 AK3의 변화를 조사하였다.

방 법 :

백서의 좌전하행지를 결찰하여 급성심근경색 동물모델을 제작하고 심근경색 후 시간 경과에 따른 혈청 내 AK3 농도를 recombinant AK3에 대한 단일항체를 이용한 enhanced chemiluminescence-sandwich ELISA assays를 수행하여 조사하였다

결 과 :

백서 급성 심근경색 모델에서 혈청 AK3는 발병 후 3시간부터 혈액 내에 유출되기 시작하고, 6시간에 최대치에 이르렀으며, 또한 의미있는 혈청 수치는 발병 이후 2일까지 지속되었다($p < 0.05$).

결 론 :

AK3는 백서에서 급성 심근경색의 혈청학적 진단지표로서 유용함을 확인하였다.

중심 단어 : 심근경색/혈청 효소학 ; 아데닐레이트 카이네이즈.

REFERENCES

- 1) LH N. Adenylate kinase. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes*. vol. VIII, part A Academic Press: Orlando; 1973. p.279-305.
- 2) Khoo JC, Russell PJ. Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue. *Biochim Biophys Acta* 1972;268:98-101.
- 3) Noma T, Fujisawa K, Yamashiro Y, Shinohara M, Nakazawa A, Gondo T, Ishihara T, Yoshinobu K. *Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix*. *Biochem J* 2001;358:225-32.
- 4) van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. *Identification of a novel human adenylate kinase: cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein*. *Eur J Biochem* 1999;261:509-17.
- 5) Wood SM, Wiesener MS, Yeates KM, Okada N, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ. *Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha): characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression*. *J Biol Chem* 1998;273:8360-8.
- 6) O'Rourke JF, Pugh CW, Bartlett SM, Ratcliffe PJ. *Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR: role of hypoxia-inducible factor-1*. *Eur J Biochem* 1996;241:403-10.
- 7) Lee SM. *Studies on the tissue-specific expression of human adenylate kinase and its clinical applications for the markers of myocardial injury [thesis]*. Seoul: Hanyang University; 1999. p.9-12.
- 8) Wilson DE, Povey S, Harris H. *Adenylate kinases in man: evidence for a third locus*. *Ann Hum Genet* 1976;39:305-13.
- 9) Lee JM, Kim CM, Youn HJ, Oh YS, Yoo KD, Moon KW, Chung WS, Choi KB, Hong AJ. *The effects of carvedilol on ventricular remodeling after myocardial infarction in rat*. *Korean Circ J* 2001;31:1171-84.
- 10) Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. *Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in lewis inbred rats*. *Am J Physiol* 1997;272:H722-7.
- 11) Nam JH, Lee JE, Kim EJ, Park SJ, Jin BC, Park TJ, Choi JY, Choi DJ, Seo BG. *Influence of the angiotensin II AT1 receptor antagonist on reperfusion injury rat myocardial ischemia model*. *Korean Circ J* 2001;31:1150-8.
- 12) Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang E, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK. *Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase*. *Nat Med* 2002;8:473-9.
- 13) Kakkar R, Seitz DP, Kanthan R, Rajala RV, Radhi JM, Wang X, Pasha MK, Wang R, Sharma RK. *Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in an experimental rat model of cardiac ischemia-reperfusion*. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:59-66.
- 14) Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 1970;227:680-5.
- 15) Staab RJ, de Paul Lynch V, Lau-Cam C, Barletta M. *Small animal model for myocardial infarction*. *J Pharm Sci* 1977;66:1483-5.
- 16) Bleuel H, Deschl U, Bertsch T, Bolz G, Rebel W. *Diagnostic efficiency of troponin T measurements in rats with experimental myocardial cell damage*. *Exp Toxicol Pathol* 1995;47:121-7.
- 17) McMurtry JP, Wexler BC. *Detection of early myocardial infarction by radioimmunoassay of myoglobin*. *Angiology* 1979;30:806-15.
- 18) Yamada M, Shahjahan M, Tanabe T, Kishi F, Nakazawa A. *Korean Circulation J* 2004;34(3):288-295.

- Cloning and characterization of cDNA for mitochondrial GTP: AMP phosphotransferase of bovine liver. J Biol Chem* 1989;264:19192-9.
- 19) Inouye S, Yamada Y, Miura K, Suzuki H, Kawata K, Shinoda K, Nakazawa A. *Distribution and developmental changes of adenylate kinase isozymes in the rat brain: localization of adenylate kinase 1 in the olfactory bulb. Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:618-22.
 - 20) Yoneda T, Sato M, Maeda M, Takagi H. *Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: cloning of the fourth adenylate kinase. Brain Res Mol Brain Res* 1998;62:187-95.
 - 21) Bernstein LH, Horestein JM, Sybers HD, Russell PJ. *Adenylate kinase in human tissue: II. Serum adenylate kinase and myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol* 1973;5:71-85.