

소 혈청 아밀로이드 단백 A(SAA) 농도 측정의 의의

김덕환·이광원*·A.M. van Ederen**

P.C.J. Tooten**·Th.A. Niewold**·E. Gruys**

충남대학교 수의과대학·국립종축원*

유트레흐트 수의과대학**

서 론

사람은 물론 동물에 있어서 외상, 염증 또는 세균 및 바이러스 감염 등과 같은 여러가지 외적 및 내적 조직손상이 관련되는 동안에는 생리적인 항상성 기전으로서 초기에 비특이적인 급성기 반응이 생체내에서 일어나는데, 이들 반응의 예로서 발열 그리고 급성기 단백질과 같은 혈청단백의 증가가 일어난다.¹⁾

사람에 있어서는 양성 급성기 단백을 혈장내의 증가되는 정도에 따라 3가지 군으로 나누고 있는데 즉, 정상에서 보다 50% 정도까지 증가하는군(I群: ceruloplasmin 및 C₃), 200~300% 정도 증가하는 군(II群: α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, haptoglobin 및 fibrinogen), 그리고 1,000배 정도까지 증가하는 군(III群: C-reactive protein, CRP 및 serum amyloid A, SAA)으로 되어 있다.⁶⁾

SAA는 사람이나 동물의 속발성 및 대부분의 특발성 아밀로이드증의 주요 단백질인 아밀로이드 단백 A (amyloid protein A, AA)의 전구물질로서^{10,18)}, SAA는 혈청내 high density apolipoprotein(apo-HDL) 분획에서 발견되며 그 합성은 주로 간에서 이루어지는 것으로 알려져 있다.⁸⁾

SAA의 생리적 기능은 명확하게 밝혀지지는 않았지만 세균성 내독소의 lipopolysaccharide(LPS)와 결합하며,¹⁹⁾ 그리고 일부 면역학적 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.²⁾

SAA는 인의분야에 있어 CRP와 더불어 질병을 모니터하는데 이용되고 있으며 또한 동물에 있어서

도 말의 SAA¹⁵⁾, 소의 SAA⁷⁾ 등 급성기 단백질에 관한 연구가 이루어진 바 있으나 소의 질병의 진단적인 차원에서의 SAA의 의의에 대하여는 그 검토가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 아밀로이드증의 진단에 있어서의 SAA 측정의 의의와 牛群의 건강상태를 파악하는데 유용한 parameter로서 SAA 측정의 의의를 알아보기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

재료: 소의 질병진단에 있어서 SAA 단백질 측정의 의의를 규명하기 위하여 화란에서 사육되고 있는 최종진단이 확정된 홀스타인 유우(성우) 즉, 아밀로이드증 2두, 급성염증성질병 3두(유방염, 폐염 및 복막염 각 1두) 그리고 만성염증성질병 7두(간농양 1두, 심내막염 2두, 자궁내막염 1두, 흉막염 1두, 창상성제2위 복막염 1두 및 부제병 1두) 총 12두를 대상으로 하였다(Table 1).

또한 농장 牛群의 건강상태를 파악하기 위한 SAA 단백질의 의의를 규명하기 위하여는 한국에서 사육중인 홀스타인 유우의 목장 2개소(A 및 B농장)를 선택하여, A농장 49두(1~12세, 암컷) 그리고 B농장 27두(2~11세, 암컷, 20두 및 2~8개월령, 암컷, 7두) 총 76두를 대상으로 하였다.

방법: 혈액은 경정맥에서 채혈하였으며 채혈된 혈액으로부터 혈청을 분리하여 동결 보존(-20°C)하였다가 SAA 단백질의 측정에 공하였다. 한국에서 사육되고 있는 소는 혈청분리후 동결 보존(-20°C)하였

* 본 연구는 한국과학재단 지원에 의해 수행되었음.

다가 항공편으로 운반하여 SAA 단백질의 측정에 공하였다.

SAA 단백질 농도의 측정은 Boosman 등⁷⁾의 방법에 준하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 측정하였다. 즉, 동결된 혈청을 용해시킨 다음 원심분리(10,000xg, 15분)하여 그 상층액을 SAA 농도측정에 이용하였다. 혈청을 0.1M sodium carbonate buffer(pH 9.6) 용액으로 희석(1:100)한 다음 microtitration plate(Dynatech Laboratories Ltd, Billinghurst, Sussex, UK)의 well에 각각 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간동안 흡착시켰으며, 흡착이 된 plate는 흐르는 물로 잘 세척하였다. 또한 1mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)가 첨가된 0.01M phosphate-buffered saline 용액(pH 7.2)(PBS-S/EDTA)으로 제조한 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)용액 150 μ l를 well에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 가온하였으며 가온이 끝난 후에는 plate를 흐르는 물로 세척하였다.

그리고 BSA의 반응이 끝난 후에는 PBSS/EDTA 용액으로 0.05%가 되도록 tween 20을 첨가한 용액으로 희석(1:1,000)한 affinity chromatography로 정제된 항가토 소 아밀로이드 단백질 A 항혈청(affinity-purified rabbit antibovine amyloid protein A)⁹⁾을 100 μ l를 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시켰으며 반응후에는 plate를 흐르는 물로 잘 세척하였다. 1차 항혈청의 반응이 끝난후 제2차 항혈청(goat anti-rabbit/peroxidase, ICN Biochemicals Ltd, High Wycombe, Buik, UK)을 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 재차 반응시켰다. 그 다음 0.01mM 2,2-azino-di-(3-ethyl-benz-thialozine) sulphonic acid(ABTS, Sigma Chemical Co. St Louis, Mo.)와 50mM citrate buffer(pH 4.0) 용액으로 만든 0.04% H₂O₂ 용액을 지닌 기질액 200 μ l를 분주하여 30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 완료후 분광광도계(Titertek multiscan spectrophotometer, Flow Laboratories Ltd, Irvine, Ayrshire UK)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 plate에는 SAA negative control과 positive control의 소의 혈청을 분주하였고 검체의 SAA 농도는 negative control(0%)과 positive control(100%)에 대한 %로 표시하였다. 또한 조사대상우의 병력 유무에 대하여도 검토하였다.

결 과

질병에 이환된 소의 혈청 SAA 농도 : 아밀로이드증의 진단에 있어서 SAA 농도측정의 의의를 알아보기 위하여 질병에 이환된 소를 아밀로이드증군, 급성염증성 질병군 및 만성염증성 질병군 3군으로 나누어 혈청 SAA 농도를 비교검토하였는데 그 결과는

Table 1. Serum Amyloid A(SAA) Values in Group of Bovine Patients

Cow No.	Diseases	SAA(%) M \pm SD(%)	
		(Range)	
1	Amyloidosis	23	33.5 \pm 14.8
2	Amyloidosis	44	(23~44)
3	Acute mastitis	64	
4	Acute pneumonia	153	132.3 \pm 60.7
5	Acute peritonitis	180	(64~180)
6	Chronic liver abscess	114	
7	Chronic endocarditis	67	
8	Chronic endocarditis	81	62.0 \pm 35.0
9	Chronic endometritis	72	(0~114)
10	Chronic pleuritis	48	
11	Chronic traumatic reticulitis	52	
12	Chronic sole ulcer	0	

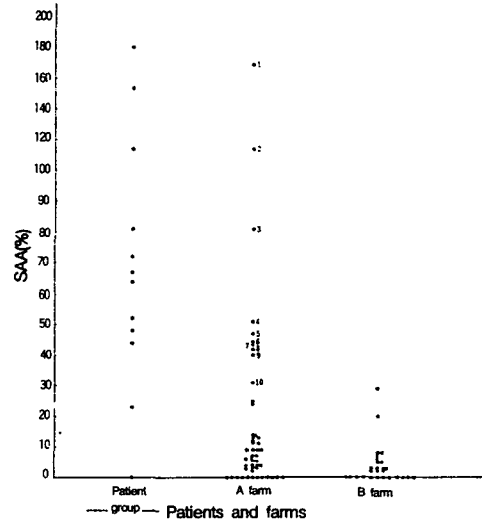


Fig. 1. Serum amyloid A(SAA) values in the group of bovine patients and cows from two farms. The histories of diseases were found in 10 cows from A farm : No.1 and No.2;acute mastitis, No.3;abortion and acute mastitis, No.4, No.5, and No.10;chronic mastitis, No.6;laceration of the teat, 1 week before, No.7;retained placenta, No.8;Downer cow syndrome, 2 weeks before, and No.9;ovarian dysfunction.

Fig 1에 나타난 바와 같다. 즉, 아밀로이드증군은 평균 33.5±14.8(23~44)%이었으며, 염증성 질병군은 아밀로이드증군보다 SAA 농도가 더욱 높은 수준이었는데 급성염증성 질병군이 평균 132.3±60.7(64~180)% 그리고 만성염증성 질병군은 평균 62.0±35.0(0~114)%로서 염증성 질병에 있어서는 급성염증성 질병군이 만성염증성 질병보다 더 높은 SAA 농도를 나타내었다.

牛群의 SAA 농도 및 병력유무: 농장 牛群의 건강 상황을 파악하기 위한 SAA 단백질 농도측정의 의의를 규명하기 위하여 홀스타인 유우목장 2개소를 대상으로 하여 SAA 단백질 농도를 측정된 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

A 농장에 있어서는 조사한 49두의 SAA 농도는 0~169%의 범주이었는데, 이들중 고치(31~169%)를 나타낸 10두에 있어서는 채혈당시(8두) 또는 채혈 2주전(1두) 및 1주전(1두)의 병력이 인정되어 그 세부 내역을 보면 후산정체(1두), 만성유방염(3두), 급성유방염(2두), 급성유방염 및 유산(1두), 난소기능부전(1두), 산후기립불능증(1두) 및 유두열상(1두)이었다. 또한 B농장에 있어서는 조사한 27두의 SAA 농도가 0~29%의 범주였는데 이들에 있어서는 병력이 인정되지 않았다.

고 찰

SAA는 사람이나 동물의 속발성 및 특발성 아밀로이드증의 전구물질^{10,18)}로서 CRP와 더불어 아주 민감한 급성기 반응물질이다. 그 합성은 interleukin 1(IL-1), interleukin 6(IL-6) 및 tumor necrosis factor(TNF)와 같은 cytokines¹²⁾의 개재로 주로 간에서 이루어진다.⁸⁾

SAA는 사람의 질병에 있어서 아밀로이드증을 비롯하여 세균 및 바이러스 감염, 류마치스성 관절염 및 종양 등의 질병에서 증가하는 것으로 알려져 있다.^{5,6,14,16)}

본 연구에서는 질병에 이환된 소를 대상으로 혈청 SAA 농도를 검토하였는데 그 결과 아밀로이드증에 있어서 보다 급성 및 만성염증성 질병군이 더욱 높았고 염증성 질병 가운데는 급성염증성 질병군이 만성염증성 질병군보다 더 높은 수준이었다. 이는 사람의 질병에 대해 조사한 성적^{5,6,14,16)}과 유사한 경향

이었다. 그러나 아밀로이드증의 진단적인 측면에서 보면 염증성 질병에 있어서도 SAA의 증가가 인정되므로 SAA 측정 단독으로는 그 진단이 매우 어려운 것으로 사료된다.

사람의 SAA에는 적어도 3종류의 서로 다른 subunit 구성성분인 isotype(SAA₁, SAA₂ 및 SAA₃)이 존재하며^{11,17)}, 마우스에 있어서는 4종류의 isotype(SAA₁, SAA₂, SAA₃ 및 pseudogene)이 존재하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 이들 SAA isotype중 아밀로이드 형성 전구물질로서 SAA₂가 관련하는 것으로 마우스에서 보고된 바 있다.¹³⁾ 본 연구에서는 혈청 SAA 농도에 대해서만 검토되었으나 아밀로이드증의 진단에 있어서 타질병과의 유증감별을 위해 SAA isotype에 대하여도 앞으로 더욱 구체적인 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

한편 Pepys 등¹⁵⁾은 SAA의 측정이 말에 있어서 세균 및 바이러스 감염증을 진단하고 관리하는데 의의가 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 농장 牛群의 건강상태를 파악하기 위한 수단으로서 牛群의 SAA 농도와 아울러 조사대상우의 병력에 대하여 조사하였는데 고치의 SAA 농도를 나타낸 대부분의 소에 있어서 채혈당시의 병력이 인정되었다. Boosman 등⁷⁾은 *E. coli* endotoxin을 인공적으로 소에(초회: 피내, 총량 46.1μg, 2회: 24시간후, 정맥 1.15μg/kg 및 3회: 48시간후, 정맥, 0.2μg/kg)하여 경시적으로 혈청 SAA 농도의 변화를 조사한 바 있는데 피내주사시에는 SAA 농도의 경미한 변화를 보였지만 정맥주사후 5시간 후부터 증가하여 17~20시간째에 최고치를 나타내었다고 하였다. 이는 본 연구에서 고치의 SAA 농도를 나타내는 소에 있어 급성 및 만성염증성 질병이 인정된 점을 뒷받침하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면 아밀로이드증의 진단에 있어서는 SAA 측정 단독으로는 어려움이 있으며 또한 SAA 측정은 牛群의 건강상태를 파악하는데 유용한 parameter로 생각된다.

결 론

본 연구는 아밀로이드증의 진단에 있어서의 SAA 측정의 의의와 우군의 건강상태를 파악하는데 유용한 파라메타로서 SAA 측정의 의의를 알아보기 위하

여 수행되었다.

소의 아밀로이드증의 진단에 있어서 SAA 측정의 의의를 규명하기 위하여 화란에서 사육중인 최종진단이 확정된 홀스타인 유우 12두(아밀로이드증 2두, 급성염증성 질병 3두 및 만성염증성 질병 7두)를 대상으로 혈청 SAA 농도를 측정하였다. 그 결과 아밀로이드증군에서 보다 염증성 질병군의 SAA 농도가 더 높았는데 염증성 질병군 가운데는 급성염증성 질병군이 만성염증성 질병군보다 더 높은 SAA 농도를 나타내었다.

또한 우군의 건강상태를 파악하기 위한 유용한 파라메타로서 SAA 측정의 의의를 규명하기 위하여 한국에서 사육중인 유우목장 2개소(A 및 B농장)를 선택하여 A농장 49두 및 B농장 27두 총 76두를 대상으로 SAA 농도를 측정하였다. 그 결과 A 농장에서는 SAA 농도가 0~169%의 범주였는데 이들중 31~169%의 고치를 나타낸 10두에 있어서는 병력이 인정되었으며 후산정체(1두), 만성유방염(3두), 급성유방염(2두), 급성유방염 및 유산(1두), 난소기능부전(1두), 산후기립불능증(1두) 및 유두열상(1두)이었다. B농장 유우의 SAA 농도는 0~29%의 범주였는데 이들에 있어서는 병력이 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 아밀로이드증의 진단에 있어서는 SAA 측정 단독으로는 어려움이 있으며 또한 SAA 측정은 우군의 건강상태를 파악하는데 유용한 파라메타로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Abernethy, T.J. and Avery, O.T. : The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patient's sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus. J. Exp. Med.(1941) 73 : 173.
2. Aldo-Benson, M.A. and Benson, M.D. : SAA suppression of immune response in vitro : evidence for an effect on T cell-macrophage interaction. J. Immunol.(1982) 128 : 2390~2392.
3. Benditt, E.P. and Eriksen, N. : Amyloid protein SAA is associated with high-density lipoprotein from human serum. Proc. Natl. Acad. Sci.(1977) 74 : 4025~4028.
4. Benditt, E.P., Eriksen, N. and Hanson, R.H. : Amyloid protein SAA is an apoprotein of mouse plasma high-density lipoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci.(1979) 76 : 4092~4096.
5. Benson, M.D. and Cohen, A.S. : Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic disease. Arthritis Rheu.(1979) 22 : 36~42.
6. Benson, M.D. : Serum amyloid A protein as an acute-phase reactant. J. Lab. Clin. Med.(1981) 97 : 745~749.
7. Boosman, R., Niewold, Th. A., Mutsaers, C.W.A.A.M. and Gruys, E. : Serum amyloid A concentration in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant. Amer. J. Vet. Res.(1989) 50 : 1690~1694.
8. Downton, S.B. and colten, H.R. : Sites and regulation of biosynthesis of SAA. in Marrink, J. and van Rijswijk, M.H.(eds) Amyloid and amyloidosis. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht, (1986) pp. 107~113.
9. Hol, P.R., Langeveld, J.P.M., van Beuningen-janse, E.W., Veerkamp, J.H. and Gruys, E. : A second component in bovine AA amyloid fibrils not identical with protein AA is essential for AA amyloid fibrillogenesis. Scand J. Immunol.(1984) 20 : 53~60.
10. Husebekk, A., Skogen, B., Husby, G. and Marhaug, G. : Transformation of amyloid precursor SAA to protein AA and incorporation in amyloid fibrils *in vivo*. Scand. J. Immunol.(1985) 21 : 283~287.
11. Kluge-Bekerman, B., Long, G.L. and Benson, M.D. : DNA sequence evidence for polymorphic forms of human serum amyloid A(SAA). Biochem. Genet.(1986) 24 : 795~803.
12. Marhaug, G., Sletten, K. and Husby, G. : Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoprotein(apo SAA). Clin. Exp. Immunol.(1982) 50 : 382~389.
13. Meek, R.L. and Benditt, E.P. : Amyloid A gene family expression in different mouse tissues, J. Exp. Med.(1986) 164 : 2006~2017.
14. Mozes, G., Friedman, N. and Shainkin-Kestebaum, R. : Serum amyloid A : An extremely sensitive marker for intensity of tissue damage in trauma patients and indicator of acute response in various diseases. J. Trauma(1989) 29 : 71~

- 74.
15. Pepys, M.B., Baltz, M.L. and Tennent, G.A. : Serum amyloid A protein(SAA) in horses:objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet. J.*(1989) 21 : 106~109.
 16. Rosenthal, C.J. and Franklin, E.C. : Variation with age and disease of an amyloid A protein-related serum component. *J. Clin. Invest.*(1975) 55 : 746~753.
 17. Sipe, j.D., Colten, H.R., Godberger, G., Edge, M.D., Tack, B.F., Cohen, A.S. and Whitehead, A.S.:Human serum amyloidA(SAA):biosynthesis and postsynthetic processing of pre SAA and structural variants defined by complementary DNA *Biochem.*(1985) 28 : 2931~2936.
 18. Tape, C., Tan, R., Nesheim, M. and Kisilevsky, R. : Direct evidence for circulating apo SAA as the precursor of tissue AA amyloid deposits. *Scand. J. Immunol.*(1987) 28 : 317~324.
 19. Tobias, P.S., MacAdam, K.P.W.J. and Ulevitch, R.J. : Interaction of bacterial lipopoly saccharide with acute phase rabbit serum and isolation of two forms of rabbit serum amyloid. *A.J. Immunol.*(1982) 128 : 1420~1427.
 20. Yamamoto, K.I., Shiroo, M. and Migita, S. : Diverse gene expression of isotypes of murine serum amyloid A protein during acute phase reaction. *Science.*(1986) 232 : 227~229.

The Significance on Determination of Bovine Serum Amyloid Protein A(SAA) Concentration

**Duck-Hwan Kim, D.V.M., Ph.D., Kwang-Won Lee,* D.V.M., Ph.D.,
A.M. van Ederen,** P.C.J. Tooten,** Th.A. Niewold,** B.S., Ph.D.,
and E. Gruys,** D.V.M., Ph.D.**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, National Breeding Institute*
Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University**

Abstract

The present study was performed in order to clarify the significance of serum amyloid A(SAA) estimation for the diagnosis of bovine amyloidosis and SAA as a useful parameter for the health status in herds.

Twelve dutch dairy cows with final diagnosis(2 with amyloidosis, 3 with acute inflammatory disease and 7 with chronic inflammatory disease) were used to clarify the significance of SAA determination for the diagnosis of bovine amyloidosis. The SAA concentration in the group of inflammatory disease was higher than that of amyloidotic group. Further the SAA value in the group of acute inflammatory disease was higher than that of chronic ones.

To clarify the significance of SAA estimation as a useful parameter for the health status in herds, two Korean dairy farms(A and B) were selected and the SAA concentration was determined in total 76 cows(49 from A farm and 27 from B farm). The SAA concentration in cows from A farm was ranged with 0~169%. The cows with high level of SAA(31~169%) had the disease histories(1 with retained placenta, 3 with chronic mastitis, 2 with acute mastitis, 1 with abortion and acute mastitis, 1 with ovarian dysfunction, 1 with downer cow syndrome and 1 with laceration of the teat). The SAA value in the cows from B farm was ranged with 0~29% and disease history was not detected.

In conclusion the SAA determination only is thought to be difficult for the diagnosis of bovine amyloidosis. Furthermore SAA estimation is thought to be a useful parameter for the health status in herds.