

## 말의 제엽염 진단을 위한 특이적 생물지표

이승우 · 이승현 · 김명철 · 김용백 · 류덕영<sup>1</sup>

서울대학교 수의과대학

(Accepted: January 25, 2014)

### A Specific Biomarker for The Diagnosis of Equine Laminitis

Seungwoo Lee, Seung heon Lee, Myung-Chul Kim, Yong-Baek Kim and Doug-Young Ryu<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

**Abstract :** There is no reliable indicator available for the diagnosis of horse laminitis, although the disease is common and costly. This study was performed to develop a specific diagnostic biomarker for laminitis. We have identified 33 differentially expressed proteins in plasma of a horse suffering laminitis that is experimentally induced by an overdose of oligofructose, in comparison with normal horse plasma. Among the proteins, myosin-9 mRNA was found in RNA sequencing analysis to be expressed specifically in laminitis tissues compared to other horse tissues. It is thus suggested that expression of plasma myosin-9 may be used for the diagnosis of equine laminitis.

**Key words :** equine laminitis, diagnosis, mass spectrometry, next generation sequencing, myosin-9, biomarker.

## 서 론

제엽염은 말과 조랑말에 흔하게 발생하는 질병으로 제엽염을 유발시키는 특이적인 분자 인자는 알려져 있지 않으나 식이, 위장관계 문제, 제왕절개수술 후유증, 비만, 인슐린 저항성 등과 관련되어 있다고 알려져 있다. 또한 다양한 전신병(Systemic disease)이 이차적으로 발생할 수 있다. 미국에서는 연 2%의 제엽염 발병률을 나타내고 있고, 제엽염 발병률의 반 정도는 목초지에서 방목되는 개체에서 나타난다고 보고되고 있다(5,10,14). 발병 단계에 따라 임상적 징후가 나타나지 않고, 제엽과 기저막의 분리가 시작되는 발생기(Developmental phase), 제엽의 붕괴와 심각한 파행이 나타나고, 제3지골이 발굽 내에서 변위를 일으키는 급성기(Acute phase), 제3지골이 심한 변위를 일으켜 발바닥을 뚫고 나오는 회복이 불가능한 만성기(Chronic phase)로 나누어진다(13).

이러한 제엽염에 관한 연구를 위해 적합한 실험 모델을 개발하려고 노력하였으며, 그 결과 녹말, 귀리, 목분 등을 이용하여 실험적 제엽염 유발에 이용하였다(6). 그리고 올리고프럭토스(Oligofructose)를 주입하여 실험적 제엽염 연구에 사용하였다(4,8). 또한 제엽염의 임상적 진단을 위한 생물지표(Biomarker)를 발굴하기 위해 제엽염에 걸린 말의 혈장, 혈청, 조직에서 많은 연구가 되고 있다(5,7,14).

질량분석기(Mass Spectrometry)는 펩타이드의 질량을 분석 및 계산 한 후, 기존의 단백질 데이터베이스에 적용하여 단백질을 찾는 단백질 동정(Protein identification)에 흔히 사용

되고 있으며, 특히 Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)는 혈액, 혈장, 혈청 내 단백질 분석 연구에 흔히 사용되고 있다(12,17). 그리고 제엽염에 걸린 말, 조랑말 등의 혈장 내 단백질을 질량분석기를 이용하여 분석함으로써 제엽염의 발생기전 및 생체지표 발굴에 대한 연구가 이루어지고 있다(3,14).

RNA-seq은 차세대 염기서열 분석법(Next generation sequencing)을 사용하여 RNA에 대한 상보적인 cDNA를 분석한 후, Reference genome에 짧은 시퀀스 조각들을 매핑(Mapping)함으로써 진핵생물의 전사체(Transcriptome)를 분석하는 방법이다. 이 새로운 기술은 엑손(Exon)과 인트론(Intron), 엑손과 인트론 경계, 5'와 3' 말단을 식별할 수 있으며, 그에 따라 진핵생물 전사체의 복잡성을 이해가능하게 하는 방법이다(11,16).

본 실험은 올리고당을 경구 투여하여 제엽염 유발을 평가하고, 질량분석기를 사용하여 제엽염 유발 전, 후 혈장 내 단백질의 발현량을 비교, 분석 한다. 그리고 차세대 염기서열 분석법을 사용하여 제엽조직과 제엽 외 12개 주요장기 조직의 전사체 발현량을 분석함으로써 제엽 조직 특이적이면서 제엽염 유발 후 혈장에서 발현율이 높은 단백질을 선별하고자 한다. 이를 통해 제엽염의 임상적 진단을 위한 생물지표를 발굴하였다.

## 재료 및 방법

### 제엽염의 실험적 유발 및 평가

실험에 사용된 말은 약 600 kg, 20 세, 워블러드(Warmblood) 종으로 약 3 개월 동안 마방에서 관리되었다. 그리고

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : dyryu@snu.ac.kr

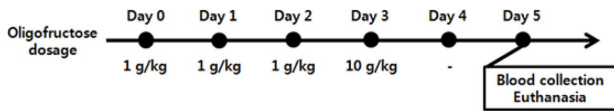


Fig 1. Dosage and dosing schedule of oligofructose.

제염염의 실험적 유발을 위해 프락토올리고당 (썬 올리고 P2®, (주)큐원, 한국)을 사용하였다. 프락토올리고당의 투여량 및 일정은 Fig 1에 나타난 것과 같이 유도 용량 1 g/kg을 사료에 섞어 3 일간 (Day 0, 1, 2) 투여한 후, Day 3에 유도 용량 10 g/kg을 수돗물에 녹여 오전, 오후 2 회에 걸쳐 비강 영양(Nasogastric) 튜브를 이용하여 주입하였다.

신체검사는 Day 3부터 1일 2회씩 실시하였으며, 체온은 전자체온계(MT 1961®, Microlife)를 직장 내에 삽입하여 측정하였다. 발굽의 열감은 차가운 느낌을 0으로 하고, 실온과 동일할 경우(+), 실온보다 높은 열감이 느껴질 때(++)으로 나타내었다. 심박수는 청진기를 이용하여 좌흉부에서 직접 측정하였으며, 파행등급은 미국 말 수의사협회에서 제시한 등급 시스템으로 평가하였다. 또한 위장관계와 관련된 기타 임상증상들이 나타나는지 관찰하였다. 혈액학적, 혈청학적 검사는 Day 5 오전, 오후에 경정맥으로부터 채혈하여 BD vacutainer EDTA-K2 10.8 mg (6 ml)에 보관 한 후, ADVIA 120 혈액검사기기(Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA)와 FUJI DRY-CHEM 3500i (Fuji Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 실시하였다. 조직학적 검사는 제염조직을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하여 평가하였다(1).

### 조직 채취

조직 채취를 위해 마취제 및 진정제(Domosedan®, 10 mg/kg, Orion Co./ Ketamine, 1500 mg/kg, 유한양행)를 투여한 후, 안락사(1 ml당 Embutramide 200 mg Mebezonium iodine 50 mg Tetracaine 5 mg, T-61®, 50 ml, 유럽연합) 및 부검을 실시하였다. 그리고 제염염이 유발된 말의 간, 신장, 폐, 위, 소장, 결장, 맹장, 갑상선, 부신, 근육, 비장, 심장 등 12개의 주요 장기 조직과 4개의 발굽으로부터 제염 조직을 채취하였다. 채취한 조직은 액체 질소에서 급냉 후 -70°C에서 보관하였다.

### 혈장 채취

제염염 유발 전 혈장은 유도용량 투여 전에 경정맥으로부터 채혈하여 BD vacutainer EDTA-K2 10.8 mg (6 ml)에 넣은 후, 원심분리기로 3000 rpm, 10분간 원심 분리하여 채취하였다. 그리고 제염염 유발 후 혈장은 안락사 전에 경정맥으로부터 채혈하여 BD vacutainer EDTA-K2 10.8 mg (6 ml)에 넣은 후, 원심분리기로 3000 rpm, 10분간 원심 분리하여 채취하였다.

### RNA 추출

제염염이 유발된 말의 제염과 12가지 주요장기의 조직 50 mg 당 Trizol 0.75 ml을 넣고 균질화를 실시하였다. 균질화된 시료는 실온에서 5분간 반응시켰으며, Trizol 0.75 ml 당 클로로폼(Chloroform) 0.2 ml을 넣은 후 15초 동안 흔들어 혼합하였다. 그리고 혼합물을 실온에서 3분간 반응시킨 후,

4°C에서 14000 rpm, 15분간 원심분리하여 약 500 ul의 상층액을 확보하였다. 확보된 상층액은 이소프로필알코올(Iso-propylalcohol)과 1:1로 혼합한 후, 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 후 4°C에서 14000 rpm, 10분간 원심분리를 실시하여 RNA 침전물을 확인하였고, 상층액은 모두 제거하였다. 그리고 RNA 침전물에 70% 에탄올(EtOH) 1 ml을 첨가한 후, 4°C에서 8000 rpm, 5분간 원심분리하여 RNA 침전물을 세척하였다. 그 후, 상층액을 모두 제거하고 실온에서 tube 뚜껑을 열어놓은 채 RNA 침전물을 완전히 말렸다. RNA 침전물이 완전히 마르면 20~100 ul의 HPLC 물을 첨가하여 용출과정을 진행하였다. 그리고 DNA가수분해 효소(Dnase I)를 실온에서 15분 처리하여 순수한 RNA를 추출하였다.

### mRNA Next Generation Sequencing 분석

조직에서 추출한 전체 RNA는 Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit를 사용하여 다음과 같이 메신저 RNA 라이브러리(mRNA library)를 제작하였다. 폴리-T 올리고(Poly-T oligo)가 붙어있는 자석구슬(Magnetic bead)을 사용하여 폴리-A (Poly-A oligo)만 포함된 메신저RNA를 정제한 후, 역전사효소(Reverse transcriptase)와 마구잡이시발체(Random primer)를 사용하여 첫 번째 가닥의 상보적 DNA(cDNA)를 합성하였다. 그리고 첫 번째 가닥의 상보적 DNA를 이용하여 두 가닥(Double-stranded)의 상보적 DNA를 합성하였다. 이 후 Ampure XP 자석으로 두 가닥의 상보적 DNA를 분리하였고, End Repair (ERP) 혼합물을 첨가하여 양끝 말단을 평활 말단(Blunt end)으로 만든 후, 3' 말단에 A 염기를 첨가하였다. 그리고 A 염기가 첨가된 두 가닥의 상보적 DNA 양끝 말단에 어댑터(Adapter)를 부착하고, 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 선택적으로 양끝 말단에 2개의 어댑터 분자(Adapter molecule)를 가지는 DNA 단편만을 증폭시켰다. 이와 같이 제작된 메신저 RNA 라이브러리는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer와 정량적 중합효소 연쇄반응(Quantitative polymerase chain reaction, qPCR)을 이용하여 라이브러리의 품질을 확인하였으며, Illumina HiSeq 2000 장비를 사용하여 시퀀싱(Sequencing)을 실시하였다. 생산된 FASTQ 파일은 Solexa QA (Perl-based software package)를 사용하여 시퀀싱의 품질 분석을 실시하였다. 시퀀싱 품질 분석 후, 생산된 RNA-Seq read들은 Equus caballus의 chromosome ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Equus\\_caballus/GFF/ref\\_EquCab2.0\\_top\\_level.gff3.gz](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Equus_caballus/GFF/ref_EquCab2.0_top_level.gff3.gz))에 TopHat (version 1.3.3)을 사용하여 정렬(Alignment)시켰다. 그리고 Cufflink (version 1.2.1)를 사용하여 transcript set으로 조립(Assemble)한 후, Cuffdiff를 사용하여 메신저RNA의 상대적인 양을 비교, 분석하였다(15).

### Nano-LC-ESI-MS/MS (Mass Spectrometry) 분석

제염염 유발 전, 후 말의 혈장 단백질 50 ug을 SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후, 젤을 동일하게 5 등분하여 잘랐다. 젤 조각 각각을 서로 다른 튜브로 나누어 담고, 50% 아세토나이트릴(Acetonitrile, ACN)이 포함된 50 mM 탄산수소암모늄(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)을 첨가하여 쿠마시브릴리언트블루(Coomassie Brilliant Blue, CBB)를 제거하였다. 그리고

100% 아세트나이트릴로 탈수(Dehydration)시킨 후, speedVac으로 20분 동안 진공건조하였다. 젤을 분해(Digestion)시키기 위해서 56°C에서 45분 동안 10 mM DTT가 포함된 50 mM 탄산수소암모늄에 반응시켰으며, 또한 55 mM 요오드아세트아미드(Iodoacetamide)가 포함된 50 mM 탄산수소암모늄으로 어두운 곳에서 30분 동안 시스테인 알킬화(Cysteine alkylation)를 실시하였다. 이 후, 각각의 젤 조각들은 12.5 ng/ $\mu$ l sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI)이 포함된 50 mM 탄산수소암모늄 (pH7.8)에 넣은 후, 37°C에서 오버나이트(Overnight)하였다. 젤 분해 후, 5% 포름산(Formic acid)이 포함된 50% 아세트나이트릴 용액을 첨가하고 20분 동안 실온에서 반응하여 트립신펩티드(Tryptic peptide)를 추출하였다. 그리고 상층액을 모아 speedVac으로 말린 후, 0.1% 포름산으로 재부유하여 정제하였으며, MS 분석 전 C18 ZipTips (Millipore, MA)를 사용하여 농축하였다. 이와 같이 정제된 트립신펩티드는 C18 역상 수지(5  $\mu$ m, 200 Å)로 구성된 용융실리카 마이크로인젝션 컬럼(12 cm  $\times$  75  $\mu$ m)에 로딩하였다. LC 분리는 다음과 같은 선형 그레디언트(Linear gradient) 아래 60분 동안 250 nL/min의 유량으로 수행하였다: 3-40% 용매 B (0.1% 포름산이 포함된 ACN), 용매 A (0.1% 포름산이 포함된 증류수). 컬럼은 nano-electrospray ion source가 장착된 LTQ linear ion-trap mass spectrometer (Finnigan, CA)에 곧바로 연결하였다. Electrospray voltage는 1.95 kV, MS에서 MS/MS로 전환하기 위한 역치 값은 500, MS/MS에 정규화된 충돌에너지는 main radio frequency amplitude (RF)의 35%, 지속시간은 30 ms 이었다. 모든 스펙트라는 data-dependent scan mode에서 얻었다(9). 생산된 LC-ESI-MS/MS fragment 스펙트라는 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 SEQUEST 검색 엔진을 포함하고 있는 BioWorkBrowser (version Rev. 3.3.1 SP1, Thermo Fisher Scientific Inc., CA)를 사용하여 검색하였다. 검색 조건은 trypsin enzyme specificity와 2개의 missed cleavage에 대한 permissible level, peptide tolerance 등 이었다.

## 결 과

### 제염염 유발 평가

제염염 유발에 의한 체온의 변화양상은 Day 0의 12시간 이후부터 지속적으로 상승하였으며, 발굽의 열감은 Day 1의 12시간째에 네 개의 발굽에서 모두 열감이 확인되었다. Day 1 이후 부터 심박수는 지속적으로 상승하였으며, 식욕부진과 설사 증상을 보였다. Day 3에는 앞다리를 넓게 벌리고 서있는 자세를 취하였고, grade 4-5사이의 높은 파행등급을 나타내었다. 그리고 Day 5에 혈액학적, 혈청학적 검사 결과 적혈구, 헤마토크리트, 헤모글로빈이 참고범위보다 높게 관찰되었고, 백혈구수치는 약간 떨어져보였다. 혈당, 크레아티닌, 요산, 총빌리루빈, alkaline phosphatase (ALP)는 2배정도 증가해있었으며, 미약한 저나트륨혈증, 저마그네슘혈증을 보였다. 조직학적 검사의 결과 제염의 결합조직의 혈관은 충혈되어 있었으며, 소수의 호중구 침윤과 수종성 변화가 관찰되었다. 이와 같이 제염염 유발 평가 결과는 이전에 발표된 연구

논문의 결과를 참고하였다(1).

### 제염염 유발 전, 후 혈장 내 단백질 분석

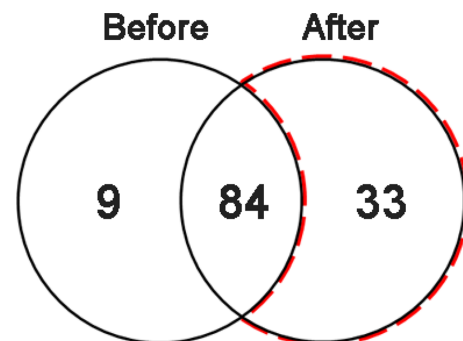
Nano-LC-ESI-MS/MS 분석을 통해 생성된 데이터 중, 신뢰성 범위에 해당하는 값인 detection 된 peptide 수가 2 이상인 단백질들을 토대로 제염염 유발 전, 후 혈장 내 발견되는 단백질 종류를 비교 분석하였다. 그 결과, Fig 2와 같이 제염염 유발 전 혈장 내 발견되는 단백질 종류는 총 93 종으로 그 중 84 종은 제염염 유발 후 혈장에서도 공통적으로 발견되었다. 나머지 9 종은 제염염 유발 후 혈장과 비교하였을 때 제염염 유발 전 혈장 내에서만 발견되는 단백질들이었다. 그리고 제염염 유발 후 혈장 내 발견되는 단백질 종류는 총 117 종으로 제염염 유발 전 혈장 내 발견되는 단백질과 비교해보았을 때 제염염 유발 후 혈장 내에서만 발견되는 단백질은 33종 이었다. 제염염 유발 후 혈장 내에서만 발견되는 제염염 특이적 단백질 33종을 Table 1에 나타내었고, peptide ratio(각각의 단백질 peptide 수/전체 단백질 peptide 수)가 높은 순으로 나타내었을 때, myosin-9이 제염염 유발 후 혈장 내에서 가장 높은 발현량을 나타내었다.

### 제염 조직 및 그 외 12개 주요장기 조직 내 mRNA 분석

제염염이 유발된 개체의 제염 조직과 그 외 12개 주요장기 (신장, 심장, 폐, 간, 대장, 소장, 결장, 비장, 위, 갑상선, 부신, 근육)의 조직에서 발견되는 mRNA의 발현량을 RNA-seq을 통해서 분석하였다. 그 결과, Fig 3과 같이 제염과 그 외 12개 주요장기 조직에서 발견되는 전체 mRNA 종류는 총 14216종이었으며, 그 중 제염 조직 및 그 외 12개 주요장기 조직에서 공통으로 발견되는 mRNA는 8024 종이였다. 그리고 제염 특이적 mRNA는 2492 종, 그 외 12개 주요장기 조직 특이적 mRNA는 3700 종 이었다. 제염 조직 특이적으로 발견되는 2492 종의 mRNA 중 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped) 값이 50 이상인 66 종의 제염 특이적인 mRNA를 발현률 순으로 Table 2에 나타내었다.

### 제염 조직에서 특이적으로 발현되고, 제염염에 의해 혈장 내 발현이 증가되는 단백질 분석

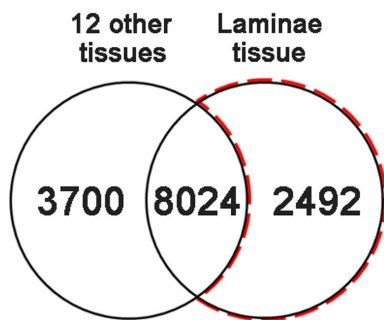
제염염 특이적 혈장 단백질 33 종과 제염 특이적인 2492 종의 mRNA 중 발현율이 높은(FPKM 값 50이상인) 66 종의 mRNA를 비교, 분석한 결과, Figs 4, 5와 같이 myosin-



**Fig 2.** Detection of plasma proteins by nano-LC-ESI-MS/MS in a horse before and after experimentally-induced laminitis.

**Table 1.** Plasma proteins up-regulated in a horse after induction of experimental laminitis

GI number	Proteins	M.W (kDa)	Peptide ratio in blood plasma before experimentally induced laminitis	Peptide ratio in blood plasma after experimentally induced laminitis
338721109	myosin-9	209	0	0.008228461
149692076	thrombospondin-1	129	0	0.002904163
194222987	coagulation factor XIII A chain	82	0	0.002420136
194219197	myosin-11	228	0	0.001694095
126352584	clusterin precursor	52	0	0.001694095
126352367	integrin alpha-IIb precursor	113	0	0.001452081
255522921	serum amyloid A protein precursor	14	0	0.001210068
338720560	neutrophil gelatinase-associated lipocalin-like	23	0	0.000968054
338728730	complement factor H-like, partial	38	0	0.000968054
194211335	tubulin alpha-4A chain	49	0	0.000968054
126352414	integrin beta-3 precursor	86	0	0.000968054
338719929	alpha-actinin-1-like isoform 2	103	0	0.000968054
338722645	fibrinogen beta chain isoform 2	56	0	0.000968054
338727875	myosin regulatory light polypeptide 9-like isoform 2	13	0	0.000726041
338726386	myosin light polypeptide 6-like isoform 2	16	0	0.000726041
149726676	protein Spindly	70	0	0.000726041
338727785	lysine-specific demethylase 2B	149	0	0.000726041
194221780	sacsin	523	0	0.000726041
194206025	vinculin isoform 2	123	0	0.000484027
194223929	complement component C7	100	0	0.000484027
338718513	tubulin beta-2B chain-like isoform 2	41	0	0.000484027
149724305	myosin-10 isoform 1	228	0	0.000484027
338718422	dynein heavy chain 8, axonemal	540	0	0.000484027
338716931	meiosis-specific nuclear structural protein 1-like	44	0	0.000484027
338711954	thyroid hormone receptor alpha-like	53	0	0.000484027
194206384	e3 ubiquitin-protein ligase HERC2	527	0	0.000484027
149724221	profilin-1-like	15	0	0.000484027
149720280	splicing factor 3A subunit 1 isoform 1	88	0	0.000484027
149731503	apolipoprotein D-like	24	0	0.000484027
194210256	zona pellucida sperm-binding protein 3 receptor-like	86	0	0.000484027
338721087	dual specificity protein phosphatase 6 isoform 2	26	0	0.000484027
338724604	coagulation factor V	231	0	0.000484027
338712996	periplakin	209	0	0.000484027



**Fig 3.** Expression of mRNA species in tissues of a horse having experimentally-induced laminitis.

9을 선별하였다.

myosin-9은 제엽 외 주요장기 조직 중 FPKM 값이 0이

였으나, 제엽 조직에서는 54.37로 제엽 특이적으로 발현량이 많은 mRNA이었다. 그리고 동시에 제엽염을 유발시키기 전의 혈장에서는 peptide ratio가 0으로 전혀 존재하지 않았으나 제엽염을 유발 시킨 후에는 혈장 내에서 peptide ratio가 0.008228461으로 증가되었다.

### 고 찰

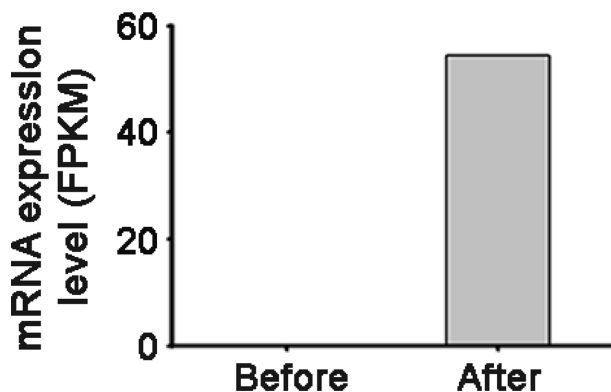
제엽염은 십이지장염, 근위공장염, 맹장염, 급성 수양성 설사 등과 같은 탄수화물 과식증에 의한 위장관계 문제로 인해서 주로 발병되며, 그 외 주요 발병 원인으로 위장관계 문제 외에 태반정체, 패혈성 자궁염 등이 있다. 탄수화물에 의해 제엽염이 유발되는 이유는 포유동물의 위내에서는 짧은 사슬의 탄수화물을 소화시키는 효소가 존재하지 않기 때문

**Table 2.** Sixty-six mRNA species expressed specifically in laminae tissues of a horse having experimentally-induced laminitis

Accession Number	mRNA	FPKM in 12 major organs's tissues	FPKM in laminae tissue
	Unidentified 1	0	2279.52
XM_001490711.2	serpin B3-like	0	1448.20
XM_001496895.2	keratin, type I cuticular Ha6	0	1289.33
XM_001915638.2	alpha-2-macroglobulin-like protein 1-like	0	665.76
XM_003364597.1	metallothionein-1B-like	0	663.44
XM_001499212.2	keratin-associated protein 13-2-like	0	542.44
XM_001491366.1	serpin B4-like	0	513.38
XM_001494298.2	keratin, type II microfibrillar, component 7C-like	0	355.17
XM_001487831.2	superoxide dismutase, mitochondrial-like	0	344.63
XM_003362568.1	keratin-associated protein 3-2-like	0	332.88
XM_003362324.1	cornifelin-like isoform 2	0	331.88
XM_001494378.2	protein S100-A9-like	0	276.37
NM_001123380.1	annexin A2	0	269.67
	Unidentified 2	0	247.91
XM_001916041.2	keratin, type II cuticular Hb6	0	228.26
XM_001917422.1	keratin, type I cuticular Ha4-like	0	194.42
XM_001504409.2	voltage-dependent anion-selective channel protein 1-like	0	163.00
XM_001497467.3	calnexin-like	0	155.47
XM_001916206.2	desmoglein-1-like	0	145.19
XM_001499878.2	phospholipase A2 inhibitor and Ly6/PLAUR domain-containing protein	0	141.10
XM_001916214.1	keratin, type II microfibrillar, component 7C-like	0	119.38
XM_001503993.2	ATPase inhibitor, mitochondrial-like	0	118.68
	Unidentified 3	0	115.50
XM_001502665.3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0	114.43
XM_001495373.1	keratin-associated protein 11-1-like	0	112.62
XM_001494313.2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	0	111.85
XM_001489257.2	corneodesmosin-like	0	110.08
XM_001504383.1	keratin, type II cuticular Hb1-like	0	106.85
XM_001494036.3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	0	104.05
XM_003362571.1	keratin-associated protein 3-3-like	0	100.99
XM_001501742.2	syndecan-1-like	0	97.29
NM_001195587.1	splicing factor, arginine/serine-rich 5	0	88.50
XM_001503172.2	60S ribosomal protein L21-like	0	87.98
XM_001499918.1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1-like	0	80.72
XM_001492148.1	sorcin-like	0	78.62
	Unidentified 4	0	76.89
	Unidentified 5	0	76.42
XM_001491114.1	serpin B13 isoform 2	0	73.24
	Unidentified 6	0	72.60
XM_003363990.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0	69.86
XM_001497327.1	Keratin, high-sulfur matrix protein, IIIA3-like	0	69.58
XM_003364569.1	brain protein 44-like protein-like	0	68.91
	Unidentified 7	0	67.59
XM_003365781.1	putative RNA-binding protein 3-like isoform 2	0	67.41
XM_001497007.2	Keratin, type I cuticular Ha1	0	67.15
XM_001917756.2	cold shock domain-containing protein E1 isoform 4	0	67.10
XM_001497396.1	Keratin, high-sulfur matrix protein, IIIA3-like	0	65.80

**Table 2.** (continued) Sixty-six mRNAs expressed specifically in laminae tissue

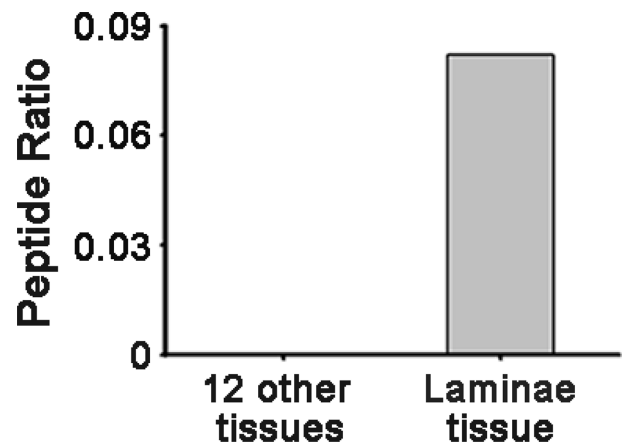
Accession Number	mRNA	FPKM in 12 major organs's tissues	FPKM in laminae tissue
XM_001489751.2	Poly (U)-specific endoribonuclease	0	64.98
XM_001490607.2	glucose-6-phosphate isomerase	0	62.74
XM_001501126.3	histone H1.0-like	0	62.24
XM_001497358.1	transmembrane epididymal protein 1-like	0	59.56
XM_001505015.1	lymphocyte antigen 6D-like	0	58.45
XM_001915640.2	destrin-like	0	57.58
XM_001918147.2	WW domain-containing transcription regulator protein 1	0	57.07
XM_001500202.3	myosin-9	0	54.37
XM_001497417.2	transmembrane epididymal protein 1-like	0	53.93
XM_003365021.1	proline-rich protein 9-like	0	53.82
XM_001499317.3	chromosome transmission fidelity protein 8 homolog	0	53.74
XM_001496664.2	galectin-7-like	0	53.34
XM_001488582.3	NADH dehydrogenase [Bubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2-like	0	53.18
XM_001492385.3	cytochrome c oxidase subunit 6B1-like	0	52.40
XM_001915736.2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	0	52.06
XM_003365240.1	eukaryotic translation initiation factor 4B isoform 2	0	51.11
XM_001504928.1	pleckstrin homology domain-containing family B member 2-like	0	50.72
XM_003364825.1	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform 2	0	50.24
XM_001492168.2	signal recognition particle 72 kDa protein isoform 1	0	50.04

**Fig 4.** Expression of myosin-9 protein in plasma of a horse before and after experimentally-induced laminitis.

이다. 그로인해 섭취된 탄수화물은 맹장으로 이동하게 되고, 정상세균총의 그림양성균에 의하여 발효되어 장내환경을 산성화시킨다. 그리고 사멸된 균에서 생성된 내독소는 독혈증을 일으켜 제염조직의 기저막에 존재하는 matrix metalloproteinase를 활성화시킨다. 이 효소에 의해 기저막과 진피조직의 분리를 일으키거나 염증반응을 일으키게 된다(2,13).

발생기와 급성기 제염염에 대한 신속한 진단에 의한 치료가 실시되지 않을시, 제3지골이 아래쪽으로 심한 변위를 일으켜 발바닥을 뚫고 나오고, 지속적인 파행과 발굽통증, 발굽의 변형 등의 심각한 증상이 동반되는 만성기 제염염으로 악화될 수 있다(13).

그에 따라 제염염에 관한 연구는 다양한 측면에서 이루어져 왔으며, 조기 진단을 위한 생체 지표 개발과 임상적 적용을 위한 노력 또한 지속되어 왔다. 그러나 제염 특이적 제염염 진단을 위한 생체 지표 개발에 있어서 다음과 같은 한계

**Fig 5.** Tissue-specific expression of myosin-9 mRNA in a horse having experimentally-induced laminitis.

점이 있다. 제염 기저막(Lameller basement membrane)의 콜라겐질(Collagen) 단백질은 Type IV Collagen이 대부분 차지하고 있으며, 제염염 유발에 따라 matrix metalloproteinase에 의해 제염 조직은 분리되고, 그로인해 Type IV Collagen이 혈청(Serum)으로 방출되게 된다. 하지만 Type IV Collagen은 제염 특이적인 단백질이 아니며, 정상 말의 혈청 내에서도 존재한다고 알려져 있다(7).

또한 제염염에 걸린 말의 혈장 내 proteomics 분석을 통해 혈장 내 anti-inflammatory protein APOA-IV의 발현량이 정상 말에 비해 높고, 이를 제염염의 생체지표로써 제시하였으나, APOA-IV은 다른 장기의 조직에서도 발현된다고 보고되고 있다(14). 그 외 임상 증상과 더불어 심박동수, packed cell volume, 점막의 창백도, 혈량, 산염기 평형 정도, 혈장 lactate 등의 심혈관계 지표를 진단과 예후 판정에

활용하여 왔다. 하지만 위에 열거한 이들 지표들은 많은 질병 상태에서도 심하게 변화되는 지표이기 때문에, 말의 제염염을 특이적으로 진단하거나 치료에 대한 예후를 판정하는데 이용하는 것은 한계가 있다.

본 연구에서는 제염 조직 특이적인 제염염 진단을 위한 생체지표 발굴을 위해 Nano-ESI-MS/MS 분석법과 차세대 염기서열 분석법을 사용하였다. 그리고 올리고당 투여를 통해 제염염이 유발된 개체의 혈장 내 단백질을 질량분석법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 제염염 유발 전 혈장과 비교하여 제염염 유발 후 혈장에서만 발현되는 33 종의 단백질을 발굴하였고, 그 중 myosin-9의 발현량이 가장 높았다. 그리고 제염염 유발 후 혈장에서만 발현되는 33 종의 단백질 중 제염 조직 특이적으로 발현되는 단백질을 찾고자 차세대 염기서열 분석법을 이용한 RNA-seq을 실시하였다. 그 결과 제염 조직 특이적으로 고발현되는 66 종의 mRNA 중 myosin-9을 확인 할 수 있었다. 제염 특이적인 myosin-9 mRNA에 의해 발현된 myosin-9 단백질은 제염염이 유발됨에 따라 제염 조직의 파괴에 의해 혈액상으로 방출되고, 그로 인해 혈액, 혈장 내에 존재하는 것으로 판단되어진다. 이를 통해 올리고당에 의해 유발된 제염염 진단을 위한 생체지표로서 myosin-9을 제시하고자 한다.

## 결 론

말의 제염염 유발 전과 제염염 유발 후의 혈장을 비교하여 myosin-9 단백질이 제염염 발생 후 혈장에서 증가됨을 규명하였다. 또 제염염이 유발된 말의 제염 조직과 그 외 12개 주요장기 조직의 mRNA 발현을 비교분석하여 myosin-9 mRNA가 제염 조직 특이적으로 발현된다는 것을 확인 할 수 있었다. 이 두 결과를 바탕으로 제염 특이적 제염염 진단을 위한 생체 지표 후보 단백질로 myosin-9을 발굴 할 수 있었다. 이를 이용하여 쉽고, 편리하게 제염염을 조기 진단 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원 생명산업기술개발사업 (과제번호: 111159-4) 지원에 의하여 이루어졌다.

## 참고문헌

- 권미영, 류덕영, 전형선, 김준규, 최봉희, 이승우, 김용백. 올리고당 투여를 통한 급성 제염염의 실험적 유발. 한국임상수의학회지 2013; 30: 75-79.
- Bailey SR, Baillon ML, Rycroft AN, Harris PA, Elliott J. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 2087-2093.
- Bailey SR, Katz LM, Berhane Y, Samuels T, De Brauvere N, Marr CM, Elliott J. Seasonal changes in plasma concentrations of cecum-derived amines in clinically normal ponies and ponies predisposed to laminitis. Am J Vet Res 2003; 64: 1132-1138.
- van Eps AW, Pollitt CC. Equine laminitis induced with ligofructose. Equine Vet J. 2006; 38: 203-208.
- Fontaine GL, Belknap JK, Allen D, Moore JN, Kroll DL. Expression of interleukin-1beta in the digital laminae of horses in the prodromal stage of experimentally induced laminitis. Am J Vet Res 2001; 62: 714-720.
- Garner HE, Coffman JR, Hahn AW, Hutcheson DP, Tumbleson ME. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. Am J vet Res 1975; 36: 441-444.
- Johnson PJ, Kreeger JM, Keeler M, Ganjam VK, Messer NT. Serum markers of lamellar basement membrane degradation and lamellar histopathological changes in horses affected with laminitis. Equine Vet J 2000; 32: 462-468.
- Kalck KA, Frank N, Elliott SB, Boston RC. Effects of low-dose oligofructose treatment administered via nasogastric intubation on induction of laminitis and associated alterations in glucose and insulin dynamics in horses. Am J Vet Res 2009; 70: 624-632.
- Kim S, Jho EH. The protein stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling, is regulated by Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf2). J Biol Chem 2010; 285: 36420-36426.
- Longland AC, Byrd BM. Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. J Nutr 2006; 136: 2099S-2102S.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 2010; 11: 31-46.
- Baldwin MA. Protein Identification by Mass Spectrometry. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 1-9.
- Pollitt CC. Laminitis in perspective. In: Equine laminitis, current concept. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation. 2008; 19-68.
- Steelman SM, Chowdhary BP. Plasma proteomics shows an elevation of the anti-inflammatory protein APOA-IV in chronic equine laminitis. BMC Vet Res 2012; 8: 179-188.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat Protoc 2012; 7: 562-578.
- Twine NA, Janitz K, Wilkins MR, Janitz M. Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. PLoS One 2011; 6: e16266-e16278.
- Vijaya Bhaskar V, Middha A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitation of cremophor el and its applications. Int J Anal Chem 2013; 2013: 135613-135623.