

Original Article

Glucagon 검사시 Aprotinin 첨가와 Plastic tube 사용이 미치는 영향

의료법인 삼광의료재단 핵의학검사팀, 삼성서울병원 핵의학과¹
조윤교 · 최삼규 · 서소연 · 신용환¹

The Effects of Aprotinin Addition and Plastic Tube Usage for Glucagon Test Results.

Youn Kyo Cho, Sam Kyu Choi, So Yeon Seo and Yong Hwan Shin¹
Department of Nuclear medicine, Samkwang Medical Laboratories, Seoul, Korea
Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, Korea¹

Purpose: There are 3 warnings for Glucagon tests. First, EDTA tubes that already contain Aprotinin must be used for plasma collection. Second, for freezer storage of centrifuged plasma, glass tubes must be used. Last, glass tubes must be used for testing procedure. So we compared the glucagon results of next 3 situation to those of control group. First, We compared to results by tubes without Aprotinin and with aprotinin. Second, we compared to results by tubes(plastic vs glass) for plasma storage. Third, we compared to results by tubes(plastic vs glass) for testing. We tried to evaluate the results of the 3 different condition. **Materials and Methods:** 40 healthy adults were studied with normal results on the general medical check up and laboratory tests. We compared the results of 3 different condition belows: Blood were collected in EDTA tube containing aprotinin and plasma was stored in the glass tube for 3 days in a freezer and results were obtained by tests in the glass tubes. Results from EDTA plasma without aprotinin, results from plastic tubes for freezer storage, results from plastic tube when testing. Simple linear regression analysis and paired t-test using SPSS were done for statistical analysis. Commercial glucagon kit(RIA-method)which made by Siemens company were used. **Results:** Correlation coefficient between results of EDTA tubes with Aprotinin vs without Aprotinin was $r = 0.783$ ($p = 0.064$). Result of specimen in plastic tubes stored 3 days in a freezer showed lower value compared to those in glass tube($r = 0.979$, $p = 0.005$). Also, results of testing in plastic tubes showed lower values than those testing in glass tubes. ($r = 0.754$, $p < 0.001$). **Conclusion:** It is recommended for glucagon determination to use EDTA tube with Aprotinin which is a inhibitor of protein breakdown enzyme. Results of plastic tube when storage and testing showed lower value than those of glass tubes, so it is recommended to store and test in glass tubes. (Korean J Nucl Med Technol 2011;15(1):117-120)

Key Words : Glucagon, Aprotinin, Plastic tube, Glass tube

서 론

1920년대에 김볼(Kimball)과 멀린(Murlin)은 췌장추출물을 연구했고 그 결과 고혈당(hyperglycemia)을 야기하는 물

질을 발견했다. 이것이 Glucagon이다. 그 후 Glucagon의 아미노산 서열은 1950년대에 밝혀졌고, 체내에서 하는 기능과 관련된 질병은 1970년대에 이르러서야 밝혀졌다. 글루카곤은 췌장에 있는 내분비선 조직인 랑게르한섬(langerhans)에 있는 알파세포(α -cells)에서 합성 분비된다.¹⁾ 아미노산 29개의 Polypeptide 호르몬으로 그 서열은 다음과 같다. NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH. Glucagon은 혈당량이 낮을 때 분비 되서

• Received: . Accepted:
• Corresponding author: Youn Kyo Cho
Department of Nuclear Medicine, Samkwang Medical Laboratories
9-60 Yangjae-Dong, Seocho-Gu Seoul, Korea
Tel: +82-2-3497-5173, Fax : 02-3497-5179
E-mail: ykcho33@smlab.co.kr

혈당량을 높여 혈당량을 일정하게 유지하는 기능을 가지고 있으며, 작동기작은 다음과 같다. 글루카곤은 간세포(hepatocyte)에 있는 글루카곤 수용체(glucagon receptor)와 결합하여 간세포로 하여금 저장해둔 글리코겐을 포도당으로 분해해서 혈액으로 분비하게 한다.^{2,4)} 저장해둔 글리코겐이 바닥이면, 글루카곤은 간으로 하여금 글루코네오제네시스(gluconeogenesis)를 통해 포도당을 만들게 한다. 이렇게 만들어진 포도당도 마찬가지로 혈액으로 분비된다. 이 두 과정을 통해 글루카곤은 간에서 포도당을 분비하게 하고, 저혈당을 막는다. 글루카곤과 마찬가지로 이자에서 분비되는 인슐린(insulin)과 반대 작용을 하며, 인슐린과 함께 혈당량을 일정하게 유지한다.⁵⁾ 또한 요소 생산과 혈중 유리 지방산(free fatty acids), 케토산(ketoacids)의 농도를 증가시킨다. Glucagon의 혈중 반감기는 3~6분이며 주로 간이나 신장에서 대사된다. Glucagon의 측정은 Glucagon 과잉증에 의한 당뇨병, 결핍에 의한 특발성 Glucagon 결손증, 불안정 당뇨병에서 저혈당의 병태 파악의 목적으로 실시된다. 이러한 임상적 의의를 가지고 있는 Glucagon은 kit insert상에 3가지 주의점을 가지고 있다. 첫째 Aprotinin이 첨가된 EDTA tube에 채혈해야 하고, 둘째 이렇게 채혈한 검체 중 Plasma를 따로 분리하여 Glass tube에서 냉동 보관해야한다. 그리고 검사 시 Glass tube를 사용해야한다. 이에 우리는 이 3가지의 요인이 Glucagon검사 결과에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 대상

성별 구분 없이 건강 검진에서 정상 소견을 보인 성인 40명을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) 분류

대조군은 Aprotinin이 첨가된 EDTA tube에 채혈하여 Glass tube에서 3일 냉동 보관 후, 실온 30분 해동하여 Glass tube에서 실험하였고, 실험군은 3개로 나누어 아래와 같이 하였다. Aprotinin 첨가되지 않은 EDTA 용기에 채혈(실험군 1), Plastic tube에 3일 냉동보관(실험군2), Plastic tube에서 실험(실험군3)한 군으로 4분류로 구분하였다.

2) 측정 방법

Glucagon은 방사성 동위원소를 이용한 Siemens사의

Glucagon kit를 이용하여 측정하였다. 측정원리는 경쟁반응으로 RIA(Radioimmunoassay) method이다.

-실험과정

- ① Glass Tube에 zero Standard부터 최고 농도 F, controls, patient sample을 각각 200 μ l씩 pipette한다.
- ② Glucagon Antiserum(Blue)을 100 μ l씩 넣고 vortex한다.
- ③ Cover 한 후 2~8 $^{\circ}$ C 에 24시간 반응시킨다.
- ④ ¹²⁵I-glucagon 을 100 μ l씩 넣고 vortex한다.
- ⑤ Covering 후 2~8 $^{\circ}$ C 에 24시간 반응시킨다.
- ⑥ Precipitating solution 1000 μ l 씩 넣고 vortex 한다.
- ⑦ 15분 동안 centrifuge 한 후 free form과 bound form을 분리한다.
- ⑧ Bound form을 γ -counter 로 계측하여 표준 그래프에서 농도값을 산출한다.

3) 분석방법

통계프로그램 SPSS를 이용한 paired T-test와 단순선형회귀분석으로 비교 분석하였다.

(유의수준. P \leq 0.05)

결 과

◎ Reference Value

•Glucagon : 59-177 pg/ml

T-검정

대조군 분포					
구분	평균	SI	표준편차	평균의 표준오차	
대조군 1	VAR00001	61.9740	40	12.3636	1.9627
대조군 2	VAR00002	59.9520	40	9.8168	1.5534

대조군 분포 상관관계수			
구분 1	구분 2	상관관계수	유의확률
대조군 1	VAR00001 & VAR00002	.893	.000

대조군 분포 검정							
구분 1	구분 2	대조군				F-값	유의확률
		평균	표준편차	최대값	최소값		
대조군 1	VAR00001 - VAR00002	60.9630	20.0875	100.000	0.000	1.996	0.064

Fig. 1. T-test of experimental group 1 (According to Aprotinin addition)

대조군과 실험군들 사이 평균의 차이가 통계학적으로 유의한지를 파악하기 위해 SPSS 10.0 for Windows를 이용하여 paired t-test를 실시하였다. 또한 유의한 차이가 있는 실험군은 어떤 상관성이 있는지 알아보기 위해 단순선형회귀분석을 실시하였다.

Aprotinin이 첨가된 EDTA 용기에 채혈하여 실험한 결과와 Aprotinin이 첨가되지 않은 EDTA용기에 채혈하여 실험한 결과는 유의 확률 P-value는 0.064로 p값 기준 0.05 보다 높아 Aprotinin의 첨가 유무는 Glucagon결과를 평균치로 보았을 때는 차이가 없었으나 대조군과 실험군1사이에 검체별

Table 1. Glucagon concentration according to measuring group

(Experimental group 1 : Without aprotinine, Experimental group 2 : Storage in plastic tube, Experimental group 3 : Measure in plastic tube. Unit :pg/ml)

No	대조군	실험군1	실험군2	실험군3	No	대조군	실험군1	실험군2	실험군3
1	90.84	77.11	90.11	73.39	21	41.71	43.15	38.22	50.16
2	53.21	64.34	53.44	46.75	22	50.76	51.62	52.41	41.05
3	101.33	93.76	100.11	79.51	23	60.32	58.62	60.18	46.52
4	62.10	51.37	61.93	60.98	24	63.91	62.65	63.19	41.07
5	75.88	68.01	69.90	49.65	25	59.85	55.16	59.45	40.25
6	55.71	50.06	54.26	49.18	26	59.83	53.16	59.06	42.06
7	45.46	48.28	46.47	33.31	27	55.90	51.65	53.61	42.22
8	67.97	62.70	66.19	43.44	28	44.85	46.77	46.72	34.25
9	69.39	50.02	69.34	54.49	29	50.98	61.52	49.67	44.06
10	58.26	51.16	55.42	43.96	30	46.23	47.95	47.15	35.25
11	61.17	52.94	56.10	42.44	31	53.32	50.26	51.78	50.44
12	77.17	63.54	73.88	52.29	32	53.68	51.44	53.60	49.10
13	50.99	67.79	53.37	37.07	33	49.26	48.62	50.08	46.52
14	75.57	62.59	75.05	55.57	34	66.61	62.74	64.22	54.22
15	64.22	64.68	66.98	50.09	35	50.98	64.15	50.98	45.41
16	57.66	52.81	47.93	52.68	36	66.57	63.25	65.63	44.52
17	70.09	63.66	68.37	67.44	37	50.44	61.05	46.24	33.41
18	44.63	46.73	44.60	49.84	38	71.06	62.94	68.16	55.06
19	57.01	57.56	58.46	47.63	39	63.61	63.25	61.99	41.52
20	63.71	70.42	58.16	52.21	40	56.72	53.81	55.26	44.85

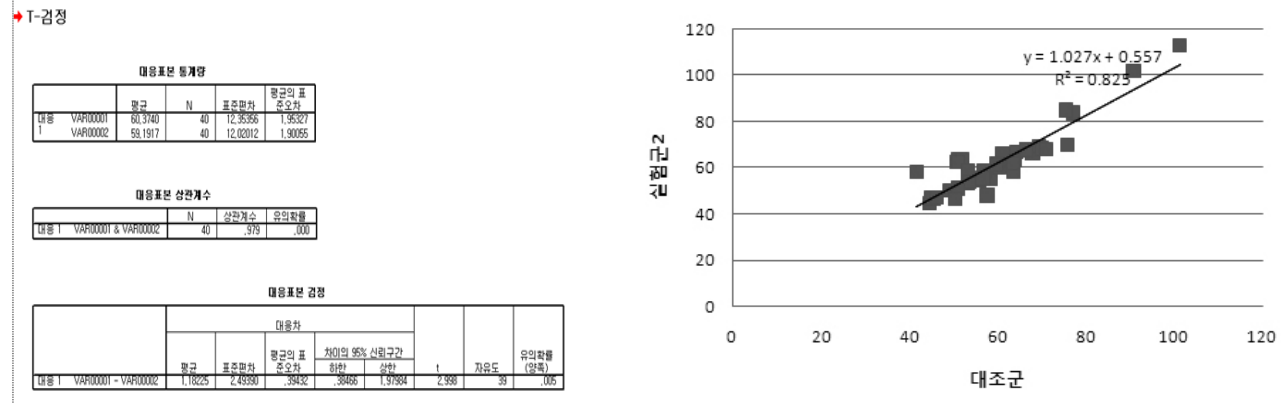


Fig. 2. T-test and Correlation coefficient of experimental group 2 (Storage tube : Glass, Plastic).

로 적게는 0.46에서 크게는 19 pg/mL의 차이가 났다.(Fig. 1), (Table 1) Plastic tube에 3일 냉동 보관하여 실험한 결과는 Glass tube에서 3일 냉동보관하여 실험한 결과보다 유의하게 낮게 나타났다($r=0.979$, $p=0.005$). 선형회귀분석을 통해 추정된 회귀식은 $y=0.95x + 1.6$, $R^2=0.825$ 를 나타내었다(Fig. 2). 또 측정용기 Plastic tube에서 실험한 결과는 Glass tube에서 실험한 결과보다 유의하게 낮게 나타났다($r=0.754$, $p<0.001$).

선형회귀분석을 통해 추정된 회귀식은 $y=0.59x + 12.0$, $R^2=0.568$ 를 나타내었다(Fig. 3).

결론 및 고찰

Glucagon kit insert상에 있는 3가지 주의점이 검사 결과에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 검사를 시행해 보았다. 위에 실험 결과에서 보여주듯이 Aprotinin의 첨가 유무는 Glucagon 검사 결과에 차이가 없었다. 하지만 검체 보관과 실험 과정 중 효소 작용을 일으켜 Glucagon 분해 산물이 생성 될 수 있다. kit insert에 따르면, Aprotinin을 넣은 경우와 넣지 않은 경우의 상관계수에 대하여, 아래와 같이 명기하고 있다. (Without Aprotinin) = 1.07(With Aprotinin) +

→ T-검정

대용	평균	N	표준편차	평균의 표준오차
VAR#0001	60.3740	40	12.3536	1.9527
VAR#0002	48.0965	40	9.7988	1.5404

대용 1	대용 2	N	상관계수	유의확률
VAR#0001 & VAR#0002		40	.754	.000

대용 1	대용 2	대용차					t	자유도	유의확률 (양측)
		평균	표준편차	평균의 표준오차	최대의 95% 신뢰구간 상한	최소의 95% 신뢰구간 하한			
VAR#0001 - VAR#0002		12.27750	8.12889	1.28545	9.67744	14.87756	9.951	39	.000

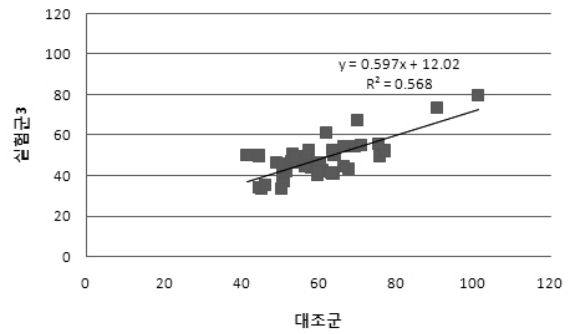


Fig. 3. T-test and Correlation coefficient of experimental group 3 (Measuring tube : Glass, Plastic).

52pg/ml, r=0.77.

이에 우리는 보다 정확한 Glucagon 의 농도값을 구하기 위해 단백분해효소 억제제인 Aprotinin이 첨가된 EDTA tube에 채혈하여 실험하는 것을 권장한다. 또 Plastic tube 사용 시 흡착성으로 인해 환자의 결과가 유의하게 낮게 나타나므로 검체는 분리 후 Glass tube에서 냉동 보관하고 Glass tube에서 실험하여야 한다. 환자의 정확한 진단과 치료를 위해 검사 시 주의점을 정확하게 인지하고 실험하여야 한다고 생각된다.

요 약

Glucagon은 췌장 Langerhans섬 α -세포에서 합성 분비되며, 기능으로는 간 당원분해, 지방분해, 인슐린분비 촉진 작용 등이 있다. Glucagon의 측정은 Glucagon 과잉증에 의한 당뇨병, 특발성 Glucagon 결손증, 불안정 당뇨병에서 저혈당의 진단을 하기위해 실시된다. Glucagon 측정시 세 가지 주의를 요하는데, 첫째, Aprotinin이 첨가된 EDTA tube에 채혈해야 하고 둘째, Plasma를 분리하여 Glass tube에 냉동 보관하여야 하고, 마지막으로 검사시에도 Glass tube에서 측정을 해야 한다. 이에 우리는 EDTA tube에 Aprotinin의 유무에 따른 결과 비교, 검체 보관 용기의 차이에 따른 비교(Plastic tube/ Glass tube), 측정용기에 따른 비교(Plastic tube/ Glass tube)를 하여, 세 가지가 결과에 미치는 영향을 알아보 고자 한다.

성별 구분 없이 건강검진에서 정상 소견을 보인 성인 40명을 대상으로 실험하여 대조군과 세가지 다른 실험군의 Glucagon 결과를 비교하였다. Aprotinin첨가한 EDTA 용기에 채혈 후, 검체를 Glass tube에 3일 냉동 보관하여 Glass tube에서 실험(대조군)한 결과와 Aprotinin첨가하지 않은 EDTA 용기에 채혈한 결과(실험군1), Plastic tube에 3일 냉

동 보관한 후의 결과(실험군2), Plastic tube에서 실험(실험군 3)한 결과를 비교하였다. 통계적인 분석은 SPSS를 이용한 paired t-test와 단순선형회귀분석을 실시하였고 시약은 상품화된 Siemens사의 Glucagon RIA kit를 사용하였다.

Aprotinin이 첨가된 EDTA 용기에 채혈하여 실험한 결과와 Aprotinin이 첨가되지 않은 EDTA용기에 채혈하여 실험한 상관계수는 r=0.783(p=0.064)를 보였다. 검체 분리 후 Plastic tube에서 3일 냉동 보관하여 실험한 결과는 Glass tube의 결과에 비해서 유의하게 낮게 나타났다(r=0.979, p=0.005). 또 측정 시 Plastic tube를 사용한 결과도 Glass tube에서 실험한 결과보다 유의하게 낮게 나타났다(r=0.754, p<0.001).

Glucagon 검사 시에는 단백 분해효소 억제제인 Aprotinin이 첨가된 EDTA tube사용이 권장되며, Plastic tube 사용 시 환자의 결과가 유의하게 낮게 나타나므로 검체는 분리 후 Glass tube에 냉동 보관하고 Glass tube에서 실험하여야 한다.

RFEFRENES

- Bataille D, et al. Glucagon and related peptides; molecular structure and biological specificity. Ann N Y Acad Sci 1988;527: 168-85.
- Cryer PE, White NH, Santiago JV. The relevance of glucose counterregulatory systems to patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Endocr Rev1986;7:131-9.
- Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. Diabetologia. 1985;28:574-8.
- Unger RH,Orci L. Glucagon secretion and metabolism in man. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Philadelphia: Saunders, 1989; 2:1318-32.
- Peacey SR, Rostami-Hodjegan A, George E, Tucker GT, Heller SR : The use of tolbutamide-induced hypoglycemia to examine the intraislet role of insulin in mediating glucagon release in normal humans. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:1458-1461.