

항인지질증후군에서 S단백질 결핍증에 대한 연구

포천중문의과대학 산부인과학교실, 유전학연구실*, 임상병리학교실**, 내과학교실***

남윤성 · 김남근* · 강명서** · 오도연*** · 차광열

A Study of Protein S Deficiency in Antiphospholipid Syndrome

Yoon Sung Nam, Nam Keun Kim*, Myung Seo Kang**, Do Yeon Oh***, Kwang Yul Cha

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Genetics,
Department of Clinical Pathology,** Department of Internal Medicine***
College of Medicine, Pocheon CHA University, Pocheon, Korea*

Objective: To evaluate the abnormality of protein S in patients with recurrent spontaneous abortion due to antiphospholipid syndrome.

Material and Method: Antigen and activity of protein S were analyzed by enzyme immunoassay and clotting method, respectively.

Results: Of 18 patients with antiphospholipid syndrome, 4 patients were found to have no abnormality of protein S. There were 14 cases of protein S abnormality. Among them, there were 8 cases of type 1, 1 case of type 2, and 5 cases of type 3 protein S deficiency.

Conclusion: So in the workup of patients with recurrent spontaneous abortion due to antiphospholipid syndrome, the evaluation for protein S is required.

Key Words: Antiphospholipid syndrome, Protein S deficiency

루프스 항응고인자 (lupus anticoagulant)와 항카디오리핀항체 (anticardiolipin antibody)는 전신성홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus) 혹은 자가면역질환 환자에서 특징적으로 발견되는 후천성 항인지질항체이다. 항인지질항체 (antiphospholipid antibody)는 혈전증, 유산, 혈소판감소증과 관련되어 발생한다. 항인지질항체와 연관된 혈전은 동맥과 정맥 모두에서 발생하며 태반혈류에 혈전이 생겨서 유산을 일으킨다. 항인지질항체와 관련된 혈전은 전신성홍반성낭창에 국한되지 않는다. 그러므로 항인지질증후군이라는 용어는 혈전색전증 (thromboembolism)의 합병증을 가진 경우에 광범위하게 사용되게 되었다.

항인지질항체에 대한 연구가 많이 이루어졌지만 혈전을 일으키는 기전에 대해서는 아직도 정확히 밝혀지지 않았다. 지금까지 많은 이론들이 제시되었지만

동맥과 정맥에 복합적으로 혈전을 일으키는 원인에 대해서는 자세하게 알려지지 않았다. 여기에는 하나의 기전만 작용하는 것이 아니라 여러가지 항인지질항체가 관련된 것으로 추정된다. 최근에 제시된 가설이 C단백질 경로에 대한 것이다. 항인지질항체는 C단백질에 다음과 같은 영향을 미친다. (1) thrombin 형성을 방해한다. (2) thrombomodulin-thrombin복합체가 C단백질의 활성을 방해한다. (3) C단백질 복합체의 형성을 방해한다. (4) 직접적으로 혹은 조인자 (cofactor)인 S단백질을 통하여 활성화 C단백질 (activated protein C: APC)의 활성을 방해한다. (5) 활성화 C단백질, 활성화 5번 응고인자, 활성화 8번 응고인자의 기질에 대한 항체를 통하여 기질이 불활성화되는 것을 막는다.

저자들은 반복자연유산에 호소하는 항인지질증후군 환자에서 혈전을 일으키는데 작용하는 S단백질의 변화

양상을 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1998년 1월 1일부터 2000년 12월 31일까지 차병원 불임클리닉을 방문한 반복자연유산 환자 70명 중 항인지질중후군으로 진단된 18명의 환자를 대상으로 연구를 하였다. S단백질 항원 총량과 유리형은 효소면역법으로 S단백질 활성은 응고법으로 측정하였다. 검체는 혈액과 0.1 M trisodium citrate를 9:1로 혼합하여 2,500 rpm으로 10분간 원심분리 후 냉동보관하였다.

1. S단백질 항원

1) kit상품명

Asserachrom Protein S

2) kit제조사

Diagnostica Stago (Fance)

3) 시 약

(1) 시약1: 1차 단일클론 S단백질 항체

(2) 시약2: peroxidase가 결합되어 있는 2차 단일클론 S단백질 항체

(3) 시약3: 3a; ortho-phenylenediamine (OPD, 2HCl) 2 mg
3b; hydrogen peroxide의 재료로 urea peroxide 5 mg

(4) 시약4: 10배로 농축된 phosphate 원충제

(5) 시약5: 20배로 농축된 세척액

(6) 시약6: 측정 S단백질을 포함하고 있는 동결건조 혈장

(7) 시약7: 표준 S단백질을 포함하고 있는 동결건조 혈장

4) 시약준비

(1) 시약 1을 실온에서 30분간 둔다.

(2) 희석된 시약4 2 ml을 시약2와 혼합하여 실온에서 30분간 둔 후 사용전 가볍게 흔들어 준다.

(3) 사용 5분전 OPD/H₂O₂ 용액을 준비한다. 증류수 8 ml에 시약 3a, 3b를 2정씩 녹인다.

(4) 증류수를 사용하여 1:10으로 희석하기 전에 실온에서 15분간 둔다.

(5) 증류수를 사용하여 1:20으로 희석한다.

(6) (7) 증류수 0.5 ml를 혼합하여 실온에서 30분간 둔 후 사용전 가볍게 흔들어 준다.

5) 과정

(1) 시약과 검체를 실온에서 준비한다

(2) calibrator를 210, 105, 52.5, 26.3, 13.1, 6.5%의 농도로 시약4를 이용하여 희석준비한다.

(3) 검체와 control을 시약4를 이용하여 1:101로 희석한다 (혈장 10 μl+시약4 1,000 μl)

(4) 필요한 strip을 준비한다.

(5) 각각의 well에 준비된 시약2를 50 μl씩 분주한다.

(6) blank (희석원충제), calibrator (210, 105, 52.5, 26.3, 13.1, 6.5), control, sample순으로 각각의 well에 100 μl 분주한다.

(7) 실온에서 60분간 둔다.

(8) 세척 5분전 증류수 4 ml에 시약3a, 3b정을 1개씩 (2strip기준) 넣어 시약을 준비한다.

(9) 세척을 실시한다 (1:20으로 희석된 세척 완충제로 300 μl씩 5회).

(10) (8)에서 준비한 시약을 각각 200 μl씩 분주한 후 암실에서 5분간 둔다.

(11) 1M HCl을 100 μl씩 분주 후 암실에서 10분간 둔다.

(12) SLT Reader (Austria)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. S단백질 활성

1) kit상품명

Bioclot Protein S - 300 Act

2) kit제조사

Biopool (USA)

3) 시 약

(1) Bioclot activator reagent: 인간 활성 C단백질, 소 활성 응고인자 X, 토끼 뇌 인지질, 보존제로 sodium azide

(2) Protein S depleted plasma: 면역흡착 (immunoadsorption)에 의해 S단백질을 제거한 인간 혈장

Table 1. Protein S abnormalities in antiphospholipid syndrome

	protein S antigen (total)	protein S antigen (free)	protein S activity
1	↓		↓
2			↓
3		↓	↓
4	↓	↓	
5	↓		↓
6	↓		↓
7	↓	↓	
8	↓	↓	↓
9		↓	↓
10	-	-	-
11	-	-	-
12		↓	↓
13	↓		
14		↓	↓
15	-	-	-
16	↓		↓
17	-	-	-
18		↓	↓

(3) Sample dilution buffer (10배 농축): pH 7.35 에서 0.2 M NaCl, 0.03 M HEPES, 0.015 M sodium azide를 포함하는 완충제 농축액

4) 시약준비

- (1) Bioclot activator reagent: reagent grade water 1 ml과 혼합하여 실온에서 20분간 둔다.
- (2) Protein S depleted plasma: reagent grade water 1 ml과 혼합하여 실온에서 20분간 둔다.
- (3) Sample dilution buffer (10배 농축): reagent grade water 25 ml로 희석한다.

5) 과정

- (1) 시약을 상기방법으로 혼합한다.
- (2) 혈장과 표준희석액을 다음과 같이 준비한다.
- (3) 도수검사시에는 Bioclot activator reagent와 calcium chloride를 37°C reagent well에 넣는다. 자동기계를 이용할 때에는 활성시간을

Table 2. Subtype of protein S deficiency in antiphospholipid syndrome

Type1	8
Type 2	1
Type3	5
Total	14

5분에 맞추고 최대시간을 150초로 한다.

(4) Protein S depleted plasma 0.1 ml과 표준검체 0.1 ml을 섞는다.

(5) 37°C에서 2분간 항온기에 둔다.

(6) Bioclot activator reagent를 0.1 ml 추가한다.

(7) 37°C에서 5분간 항온기에 둔다.

(8) 0.025 M calcium chloride를 0.1 ml 추가한다.

(9) 응고시간을 측정한다

(10) 각각의 희석액에 대해 검사를 반복한다.

결 과

18명의 항인지질증후군 환자 중 4명은 S단백질 결핍증을 보이지 않았다. 나머지 14명에 대한 S단백질 항원과 활성에 대한 분석은 다음과 같다 (Table 1). S단백질 결핍증 중 제1형은 8례, 제2형은 1례, 제3형은 5례가 있었다 (Table 2).

고 찰

항인지질증후군은 정맥, 동맥혈전과 반복자연유산을 동반하는 질환으로 항인지질-단백질 복합체에 대한 항인지질항체가 특징적으로 나타난다. 항인지질증후군은 전신성홍반성낭창과 같은 다른 자가면역질환과 동반할 수도 있고 (속발성) 관련질환없이 단독으로 발생하는 경우도 있다 (원발성). 원발성 항인지질증후군의 10%에서 가족력이 있는데 이것은 유전적인 원인이 아닌가 추측된다. HLA DR4, DR7, DRw53 등이 항인지질증후군과 관련된 것으로 밝혀졌다.

항인지질항체는 β_2 -glycoprotein 1, prothrombin, C단백질, S단백질, thrombomodulin, annexin V, kininogen

등과 같은 항인지질에 결합하는 단백질에 대한 이종 (heterogeneous) 항체이다. 이 항체는 실제로 인지질-단백질 복합체에 대해 작용하므로 항인지질항체라는 용어는 잘못된 것이다. 이 중 β_2 -glycoprotein 1는 여러가지 응고기전에 작용하여 혈액응고의 자연적인 억제제로 작용한다.¹

항인지질항체는 모든 인지질의존성 지혈과정에 영향을 미친다. 이 항체가 있으면 시험관내에서 prothrombin활성을 방해하므로 인지질의존성 지혈검사가 연장된다. 항인지질증후군 환자에서 생기는 혈전기호증 전우병 (thrombophilia)은 항인지질항체와 활성화 C단백질, S단백질, thrombomodulin같은 자연적인 혈액응고 억제제 사이의 상호결과인 것으로 추측된다. 이것은 항인지질항체가 혈전을 일으키는 중요한 요소로 작용한다는 사실을 의미한다. 이 사실은 동물실험에서도 증명되었다. 피동적 혹은 능동적 면역시 항인지질항체는 혈소판감소증, 유산, 혈전증 등을 유발한다.

항인지질증후군을 가진 여성들에서 반 이상이 임신, 산후, 그리고 피임약 복용 중 혈전이 발생한다. 어떤 연구에 따르면 예방적으로 헤파린을 투여하더라도 5~12%의 환자에서 혈전이 발생하였다고 보고하였다.^{2,3}

임신중 항인지질증후군의 합병증으로 반복유산, 자궁내 태아사망, 조산, 자궁내 성장지연 등을 들 수 있다. 항인지질증후군에서는 유산이 임신초기보다 10주 이후에 많이 일어난다. 어떤 학자들은 초기유산이 항인지질증후군을 정의하는 유일한 임상적인 기준이 될 수 있다고 주장하였다.⁴

항인지질항체를 가지고 있지만 증상이 없는 여성에서 유산의 위험성을 측정하기는 어렵다. 이런 경우 유산의 위험성을 증가시키는 요인에 대해서는 정확하게 알려져 있지 않다. 유전적 요인, 감염, 약제, 자가면역질환, 환경인자 등이 가능한 요인으로 추측된다. 전신성홍반성낭창이 있는 산모에서 항인지질항체가 높으면 유산의 위험성이 50~85%나 된다. 항인지질항체의 역가가 높고 유산의 경험이 있는 여성에서 이것을 치료하지 않으면 다음 임신시 80%에서 유산이 반복된다. 태반혈관의 혈전과 경색이 유산을 일으키는 기전으로 생각되고 있지만 이 현상이 모든 경우에서 일어나는 것은 아니기 때문에 다른 기전이 작용하는 것으로 추측된다.⁵

S단백질은 비타민 K의존성 단백질로 간세포에서 주로 생산되지만 내피세포와 거핵구 (megakaryocyte)에서도 생산된다.⁶ S단백질은 응고인자 Va와 VIIIa를 불활성화하는데 조인자로 작용하여 활성화 C단백질의 항응고효과를 도운다.⁷ 인간에서 S단백질의 60%는 C4b 결합단백질과 결합하여 활성이 없지만 40%는 유리형으로 활성화 C단백질의 조인자 역할을 한다.⁸ C4b 결합단백질은 β 쇄와 6개 혹은 7개의 α 쇄로 구성되어 있는 다중구조의 단백질이다.

1984년에 S단백질 결핍증과 혈전과의 관계가 처음으로 보고되었다.⁹ S단백질 결핍증에는 3가지 종류가 있다. 제1형은 항원의 총량과 유리형뿐만 아니라 항원의 활성화도 감소된 것을 말한다. 제2형은 항원의 총량과 유리형은 정상이지만 활성이 감소된 경우이다. 제3형에서는 유리형 항원과 활성이 감소되지만 항원의 총량은 정상이다. S단백질의 활성화는 응고인자 V Leiden 돌연변이 같은 응고인자가 있으면 영향을 받는데 30~40%에서 S단백질 수치가 낮게 나오기도 한다.¹⁰ 나이, 성, 임신, 피임약 같은 약제 등도 S단백질 수치를 변화시킬 수 있다.

지금까지 S단백질 결핍증을 일으키는 약 150가지의 돌연변이가 발표되었다.¹¹ 그 중 missense mutation이 50% 이상을 차지한다. 소수의 환자들이 동형접합체 (homozygote)이거나 복합 이형접합체 (compound heterozygote)이고 대부분은 이형접합체이다. S단백질 결핍증을 일으키는 71개의 단일 염기쌍의 치환이 보고되었다. 그 중 20%는 nonsense mutation, 65%는 missense mutation, 13%는 splice-site mutation, 2%는 자연적인 stop codon이 소실된 경우이다.

S단백질 결핍증은 상염색체 우성으로 유전되며 이형접합체는 혈전증이 발생할 위험성이 높다. 이형접합체에서 45세에 혈전증이 발생하지 않을 확률은 50%이다. 다른 연구에서도 S단백질 결핍증이 있으면 혈전증의 가능성이 있다고 보고하였다.^{12,13} 그렇지만 최근 C단백질이 혈전증과 관계가 있으며 S단백질과는 무관하다는 보고도 있다. 유전적인 S단백질 결핍증은 가끔 동맥혈전과 동반되며 그 빈도는 5~10%로 알려져 있다.¹⁴

S단백질에 대한 2개의 상동성 (homologous) 유전자는 3번 염색체에 위치해 있다.¹⁵ 활동성 유전자인 PROS1은 80 kb에 걸쳐 있으며 15개의 exon으로 구성

되어 있다. 두번째 유전자인 PROS2는 open reading frame이 없으며 다양한 염기변화, stop codon, frame-shift mutation 등을 보이는 가성유전자 (pseudogene)일 것으로 추정된다.

중합효소 연쇄반응으로 S단백질 결핍증의 유전 이상을 진단할 수 있다. 그렇지만 PROS1과 PROS2 사이에는 유사성이 많아서 가성유전자가 아닌 DNA서열에 일치하는 시발체 (primer)를 골라서 PROS1 exon과 양옆의 서열을 선택적으로 증폭시켜야 한다.

공존하는 다른 유전자 이상 때문에 S단백질 결핍증이 있는 환자에서 혈전의 위험성을 평가하는 것은 어렵다. 응고인자 V Arg506Gln 돌연변이와 S단백질 결핍증이 동반되어 있으면 복합 이형접합체의 70% 이상에서 혈전증이 생긴다.¹⁶

혈관내피에서는 thrombomodulin이라는 수용체가 발현되는데 이것은 thrombin과 결합하여 기질의 특이성을 변화시킨다. Thrombomodulin에 결합된 thrombin은 더 이상 혈소판을 활성화하거나 fibrinogen을 fibrin으로 변화시키지 않고 C단백질을 활성화시킨다. 활성화 C단백질 (activated protein C: APC)은 응고인자 Va와 VIIIa를 분해하여 비활성화시키고 thrombin 형성을 방해하므로 생리적인 항응고제로 작용한다. S단백질은 비타민 K의존성 단백질로 활성화 C단백질의 활성을 도운다.

Thrombomodulin은 내피세포에서 생성되고 관강 (lumen)표면에서 발현된다. Cardiolipin을 추가하면 정제된 thrombomodulin의 활성이 올라가는데 이것은 항인지질에 의존성이 있다는 것을 시사한다. C단백질은 비타민 K의존성 당단백질로 serine protease 활성화 C단백질의 전구물질로 작용하며 혈장내 농도는 약 65 nM (4 µg/ml)이다. C단백질은 Arg169 부위에서 분해된 후 12개의 아미노산 활성 peptide를 분비함으로써 thrombin-thrombomodulin에 의해 활성화된다.¹⁷ S단백질은 간세포, 내피세포, 거핵구 등에서 생성되는 비타민 K의존성 당단백이며 혈장내 농도는 350 nM (26 µg/ml)이다. 혈장에서 S단백질의 반은 C4b 결합단백질과 결합해 있다. 유리형의 S단백질만이 활성화 C단백질에 대한 조인자 활성을 가지고 있다. S단백질은 thrombin에 의하여 분해되며 분해 후 활성화 C단백질에 대한 조인자의 활성이 사라진다. S단백질의 활성화 C단백질 의존성 항혈전 기능은 잘 알려

졌지만 활성화 C단백질과 관계없는 항혈전 효과도 있다. S단백질은 응고인자 V과 X에 직접적으로 작용하여 prothrombin활성을 직접 억제하고 적절한 prothrombinase복합체의 형성을 억제한다.^{18,19}

항인지질항체를 가진 환자에서 후천적인 C단백질 혹은 S단백질 결핍증이 많이 보고되었다.^{20,21} 그러나 어떤 연구에서는 항인지질항체가 양성인 환자에서 C단백질의 감소와 항인지질항체 사이의 연관성을 찾을 수 없었다.²² 또 다른 연구에 따르면 정상범위 내에서 S단백질이 유의하게 감소하였지만 유리형의 S단백질 수치에는 변화가 없었다고 한다. 일반적으로 항인지질항체를 가진 환자에서 C단백질과 S단백질이 감소하지는 않지만 어떤 경우에는 C단백질과 S단백질이 동시에 감소하는데 이런 경우 혈전이 발생할 가능성이 높다.²³

결론적으로 항인지질증후군의 경우 혈전을 일으키는 여러가지 기전이 있지만 그 중에서도 C단백질과 S단백질의 역할이 중요하다. 그러므로 항인지질항체로 인한 반복자연유산의 경우 C단백질과 S단백질의 변화에 대한 검사가 필요하다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. Koike T, Ichikawa K, Kasahara H, Atsumi T, Tsutsumi A, Matsuura E. Epitopes on β_2 -GPI recognized by anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1998; 7 (suppl2): 14-7.
2. Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: An update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 614-20.
3. Lima F, Khamshita MA, Buchanan NM, Kerslake S, Hung BJ, Hughes GR. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 131-6.
4. Welsch S, Branch DW. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 71-84.
5. Salafia CM, Parke AL. Placental pathology in systemic lupus erythematosus and phospholipid antibody syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;

- 23: 85-97.
6. Fair DS, Marlar RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood* 1986; 67: 1168-71.
 7. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981; 256: 11128-31.
 8. Dahlback B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77: 1-43.
 9. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64: 1297-300.
 10. Simon P, Gavasso S, Luni S. A protein S functional assay yields unsatisfactory results in patients with activated protein C resistance. *Blood Coag Fibrin* 1995; 6: 286-7.
 11. Grandrille S, Borgel D, Ireland H. Protein S deficiency: a database of mutations. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1201-4.
 12. Pabinger I, Kyrle PA, Heisteringer M. The risk of thromboembolism in asymptomatic patients with protein C and protein S deficiency: A prospective cohort study. *Thromb Haemost* 1994; 71: 441-5.
 13. Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 742-8.
 14. Borgel D, Duchemin J, Alhenc-Gelas M. Molecular basis for protein S hereditary deficiency: Genetic defects observed in 118 patients with type I and type IIa deficiencies. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 218-27.
 15. Watkins P, Eddy R, Fukushima Y, Byers M, Cohen E, Dackowski W, et al. The gene for protein S maps near the centromere of human chromosome 3. *Blood* 1988; 71: 238-41.
 16. Koeleman BPC, Van Rumpft D, Hamulyak K, Reitsma PH, Bertina RM. Factor V Leiden: an additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families? *Thromb Haemost* 1995; 74: 580-3.
 17. Freyssinet JM, Gauchy J, Cazenave JP. The effect of phospholipids on the activation of protein C by human thrombin-thrombomodulin complex. *Biochem* 1986; 238: 151-7.
 18. Mitchell CA, Keleman SM, Salem HH. The anticoagulant properties of a modified form of protein S. *Thromb Haemost* 1988; 60: 298-304.
 19. Heeb MJ. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268: 2872-7.
 20. Harrison RL, Alperin JB. Concurrent protein C deficiency and lupus anticoagulant. *Am J Haematol* 1992; 40: 33-7.
 21. Parke AL. The thrombotic diathesis associated with the presence of phospholipid antibodies may be due to low levels of free protein S. *Am J Med* 1992; 93: 49-56.
 22. Hasselaar P. Risk factors for thrombosis in lupus patients. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 933-40.
 23. Sthoeger ZM. Transient anticardiolipin antibodies, functional protein S deficiency and deep vein thrombosis. *Am J Haematol* 1991; 36: 206-7.