

## 패혈증 생존 및 사망 환자 혈장에서 단백질 칩을 이용한 분석의 차이

강원대학교 의과대학 내과학교실, <sup>1</sup>마취과학교실, <sup>2</sup>생화학교실 및 강원대학교병원 임상의학연구소  
박명옥, 이희영, 손희정<sup>1</sup>, 성지현<sup>2</sup>, 이승준, 이성준, 하권수<sup>2</sup>, 김우진

### Difference in Protein Markers According to the Survival of Sepsis Patients using Protein Chips

Myoung Ok Park, M.D., Heui Young Lee, M.D., Hee Jung Son, M.D.<sup>1</sup>, Ji Hyun Sung, M.D.<sup>2</sup>, Seung Joon Lee, M.D., Sung Joon Lee, M.D., Kwon Soo Ha, M.D.<sup>2</sup>, Woo Jin Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, <sup>1</sup>Department of Anesthesia, and <sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Biochemistry, College of Medicine, Kangwon National University and the Clinical Research Institute of Kangwon National University Hospital

**Background;** Several clinical scoring systems are currently being used to predict the outcome of sepsis, but they all have certain limitations. Therefore, we sought to identify the proteomic biomarkers, with using proteomic tools, that differed according to the outcome of sepsis patients.

**Methods;** Upon admission to the ICU, blood samples were obtained from the 16 patients with sepsis who were enrolled in this study. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI -TOF MS) was used to identify the markers that could predict the outcome of sepsis.

**Results;** We found six peaks, by using cation and anion chips, that statistically differed between those patients who died and those who survived.

**Conclusion;** The biomarkers we found by using proteomic tools may help predict the prognosis and also plan the treatment of sepsis. (*Tuberc Respir Dis 2006; 61: 41-45*)

**Keywords;** Sepsis, Treatment outcome, Proteomics.

## 서 론

최근 수년간 패혈증의 병태생리학에 대한 이해와 치료에 대한 발전이 있었지만 패혈증 환자의 사망률은 여전히 높으며<sup>1</sup>, 패혈증 환자를 사망에 이르게 하는 핵심 요인은 아직 잘 밝혀지지 않고 있다<sup>2</sup>.

패혈증 환자를 치료함에 있어 예후를 예측하는 것은 매우 중요하다. Acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) II 와 III, simplified acute physiology score (SAPS) II, 그리고 mortality probability model (MPM) II 와 같은 점수체계들은 질병의 정도가 위중한 환자들의 생존가능성을 평가

하는 데는 적절하다<sup>3-6</sup>. 그러나 점수체계는 채점 방식이 복잡하고, 나이<sup>7</sup>, 국가간 차이<sup>8</sup>, 자료수집의 오류<sup>9</sup>, 입원 시기<sup>10</sup>, 의료기관의 요인<sup>11</sup>에 따른 차이가 있을 수 있다는 문제가 있다.

SELDI - TOF MS (Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy) 는 환자의 혈장의 저분자량 단백질 분포 차이를 알아 보는데 유용한 도구이다. 최근 이 방법을 이용하여 난소 암과 전립선 암의 진단과 감염성 질환의 감별진단에 도움이 되었다는 보고 들이 있었고<sup>12-15</sup>, 특정 질환에서 발현의 차이를 보이는 생물학적 지표를 찾는 데 유용한 도구로 보고되고 있다. 그러나, 이 방법을 이용하여 패혈증 환자들의 혈액에서 예후를 예측할 수 있는 바이오 마커를 발굴할 수 있는 지는 현재까지 연구된 바 없다. 본 연구에서는 이에 SELDI - TOF MS를 이용하여 패혈증환자 예후에 따라 차이를 보이는 프로테오믹 마커들을 찾기 위하여 실험을 시행하였다.

Address for correspondence : **Woo Jin Kim, M.D.**  
Department of Internal Medicine, Hyoja-3-dong, 17-1,  
Kangwon National University Hospital, Chuncheon,  
200-947, Korea  
Tel: +82-33-258-2377, Fax: +82-33-258-2455  
E-mail: pulmo2@knuh.or.kr  
Received : Mar. 22, 2006  
Accepted : Jul. 10, 2006

## 방 법

### 1. 대상환자

2004년 3월부터 2005년 2월까지 강원대학교 병원 내과 중환자실에 입원한 16명의 성인 환자를 대상으로 연구를 시행하였다.

패혈증 기준에 맞는 환자를 대상으로 중환자실 내원 시 혈장을 채취하였다<sup>1</sup>. 패혈증 기준은 감염이 있으면서, 체온이 38.5 °C 이상이거나 35.0 °C 미만인 경우, 맥박수가 분당 90회 이상인 경우, 호흡수가 20회 이상이거나 PaCO<sub>2</sub>가 32 mmHg 미만이거나 기계호흡기 필요한 경우, 백혈구 수치가 12,000/mm<sup>3</sup> 이상이거나 4,000/mm<sup>3</sup> 미만인 경우의 네가지 조건 중 두가지 이상을 만족하는 경우로 정의하였다. 혈장은 분석을 진행하기 전까지 -20 °C 이하에서 보관하였다.

본 연구는 강원대학교병원 Institutional Review Board (IRB)의 승인을 받았다.

### 2. 혈장의 전처리

대상환자의 혈장을 처리하기 전에 Montage Albumin Depletion kit (Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 알부민을 제거하였다. 알부민 제거 후, 완충액(9.5M urea, 2% CHAPS, 1% DTT)으로 혈장을 희석하였다. 30분간 반응시킨 후, 시료를 binding buffer (1:10 v/v, Triton-X 100)로 다시 희석하였다.

### 3. SELDI - TOF MS

반응시킨 시료를 각각 CM10 weak cation exchange chip과 Q10 anion exchange chip을 장착한 bioprocessor well (CIPHERGEN Biosystems, Fremont, CA, USA)에 점적하였다. 시료를 점적한 후, 칩을 한 시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 칩은 binding buffer로 두 번 세척하였고, 공기 중에서 건조시켰다. Sinapinic acid (50% acetonitrile, trifluoroacetic acid)를 각각의 칩에 점적하였다. 칩은 Protein Biology

System II (CIPHERGEN)으로 분석하였다. 레이저 강도는 170, 측정 민감도는 7로 time-of-flight spectra를 얻었다.

### 4. 통계분석

두군 간의 peak 세기의 차이는 Biomarker Wizard 3.1 (ProteinChip software<sup>®</sup>, (CIPHERGEN)를 이용하여 통계 분석하였다. 두군 간의 나이와 APACHE II score는 Mann-Whitney 검정으로 분석하였고, 두군 간에 유의한 차이를 보이는 peak의 세기와 APACHE II score가 관련성이 있는 지 알아보기 위해 Spearman's 상관분석(SPSS version 10.0 프로그램, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. p 값은 0.05이하인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

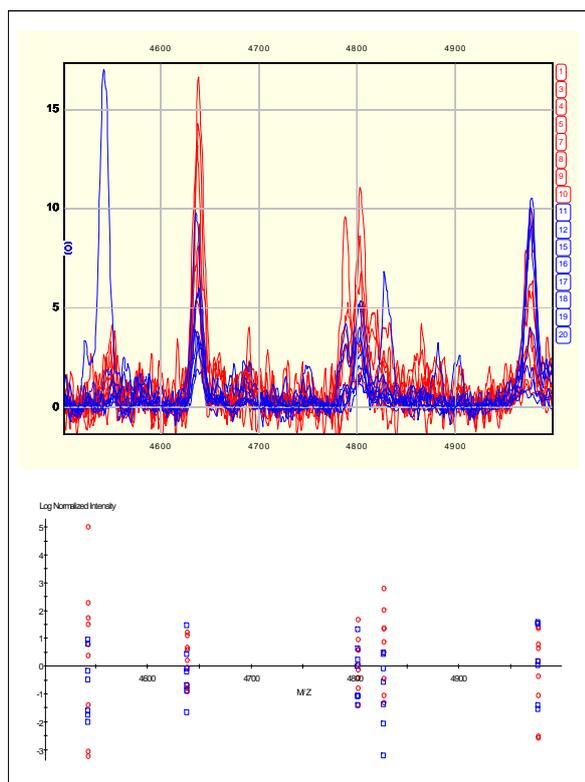
## 결 과

### 1. 대상환자의 임상적 결과

패혈증의 진단기준을 만족하는 16명의 환자를 대상으로 혈장을 분석하였다. 환자들의 주요원인질환은 폐렴과 요로감염증이었다. 대상 환자 중 8명의 환자가 생존하였고 8명의 환자가 사망하였다. 평균 나이는 생존군에서는 71.4세 사망군에서는 72.3세였고, 양군간에 의미있는 차이는 없었다. 기저질환은 심부전이 사망군 중 3명에서 있었고 생존군에서는 없었다. 생존군의 APACHE II score의 평균값은 18.3 ± 6.3점,

Table 1. Characteristics of the subjects

	Survivor group (n=8)	Mortality group (n=8)
Age (mean years)	71.4 (± 9.9)	72.3 (±9.9)
Male (%)	57.1	55.6
APACHE II score	18.3 (± 6.3)	23.7 (± 6.8)
Urinary tract infection (%)	28.6 (2)	44.4(4)
Pneumonia (%)	57.1 (4)	66.7 (6)
Pressure sore (%)	14.3 (1)	0 (0)
Unknown origin (%)	11.1 (1)	0 (0)



**Figure 1.** Log normalized intensity of plasma samples revealed that intensity of m/z value of 4828 were significantly different between circle (mortality group) and rectangle (survivor group)

사망군에서는  $23.7 \pm 6.8$ 점 이었고(Table 1) 사망군의 APACHE II score가 통계적으로 의미있게 높았다 ( $p=0.025$ ).

## 2. Peak identification

CM10 chip에서 총 77개의 peak를 확인하였고, Q10 chip에서 총 69개의 peak를 확인하였다. CM10 chip에서 통계적으로 유의한 차이가 있는 peak는 4개였다. 8227, 4828, 7778, 10846의 m/z 값에 해당하는 peak가 사망군에서 생존군에 비해 의미있게 낮았다 (Fig. 1, Table 2). Q10 chip에서 통계적으로 유의한 차이가 있는 peak는 2개였다(Table 2). 이들은 각각 9439, 13857의 m/z 값을 갖는 단백질로 모두 사망군에서 의미 있게 낮았다.

**Table 2. Proteomic biomarkers which showed difference between two groups**

CM 10 m/z	Mortality group (mean $\pm$ SD)	Survivor group (mean $\pm$ SD)	p-value
8,227	0.01 $\pm$ 6.27	8.16 $\pm$ 1.20	0.013
4,828	0.03 $\pm$ 2.27	2.05 $\pm$ 0.70	0.030
7,778	0.04 $\pm$ 1.67	1.89 $\pm$ 5.34	0.039
10,846	0.04 $\pm$ 1.49	0.44 $\pm$ 1.41	0.039
Q10 m/z	Mortality group (mean $\pm$ SD)	Survivor group (mean $\pm$ SD)	p-value
9,439	2.26 $\pm$ 0.70	4.33 $\pm$ 3.05	0.039
13,857	2.39 $\pm$ 0.96	3.56 $\pm$ 0.76	0.050

## 3. APACHE II score와 peak와의 관계

APACHE II score와 관련성이 높은 peak가 있는지 알아보기 위하여, 두 군간에 차이를 보였던 6개의 peak의 세기(intensity)와 APACHE II score의 관련성을 분석한 결과, 모든 peak에 대해 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

## 고 찰

본 연구에서 패혈증 환자의 예후에 따라 통계적으로 유의한 6개의 proteomic markers를 발견하였다.

본 연구에서는 환자들의 APACHE II 점수가 예후에 따라 의미있는 차이를 보였다. 그런데, 패혈증 환자에서 이러한 생리화학적 분류법은 임상연구에서 흔히 사용되지만 임상적인 적용에 일부 어려움이 있다. 또한, 최근 패혈증의 새로운 치료제들이 개발되었거나 개발 중이고, 어떤 환자에게 고가의 신약을 사용할 결정하기 위해서는 패혈증 환자의 예후와 중증도 평가가 용이한 마커가 필요하다<sup>16</sup>.

SELDI -TOF mass spectrometry는 생화학표지자 (biomarker)의 확인과 생화학분자간 상호작용에 있어 중요한 과학기술이다. 최근 연구에서 단백질체의 차이를 이용하여 진단에 도움을 받았다는 보고가 있었다. 수면병 환자의 혈청에서 23/24 kDa, 47 kDa 등의 단백질이 증가함을 찾아 진단에 이용하고자 하였으며<sup>14</sup>, 또 한 연구에서는 7772, 3933 질량값을 갖는

단백질의 차이로 감염의 진행을 판단하고자 하였다<sup>15</sup>. 그러나 이 방법의 제한점은 단백질을 확인할 수 없다는 것이다. 아마도 이런 단백질은 질병의 병태생리와 관련된 물질일 가능성이 있으며, 이 단백질을 밝혀내기 위해 이차원적인 젤 전기영동으로 차이가 있는 점을 찾고 그 부분을 단백분해효소로 분해한 후, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry<sup>17</sup>으로 확인될 수 있을 것이다. 그러나, 현재까지 SELDI-TOF mass spectrometry는 대부분 단백질의 동정 없이 단백질체의 차이를 신속하게 판단할 수 있는 장점을 이용한 적용으로 연구되고 있다.

이 연구의 제한점으로 환자군의 수가 적다는 것이다. 많은 프로테오믹 방법들이 재연성이 제한된다는 단점이 있지만, 통합된 생물정보학(bioinformatics)을 기초로 더 많은 환자를 대상으로 한다면 재연성 있고 믿을만한 biomarker를 확인할 수 있을 것이다<sup>18,19</sup>.

본 연구에서 확인된 여섯개의 펩타이드는 모두 사망군에서 감소되어 있었다. 이 펩타이드들이 모두 사망군에서 낮았으므로, 이들은 패혈증의 진행과정에서 생성된 다량의 항 염증 매개체일 가능성이거나, 보호효과를 가지는 물질일 가능성이 있다. 단백질의 확인이 가능하다면 패혈증의 병태생리의 이해에도 도움이 될 것으로 사료된다. 최근 procalcitonin<sup>20</sup>과 TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells)<sup>21</sup>이 패혈증의 진단에 도움을 준다는 내용이 발표되었고, 최근 endocan이라는 물질이 혈액내에 증가할수록 패혈증 환자의 중증도와 나쁜 예후를 반영한다는 보고가 있었다<sup>22</sup>. 그러나 아직까지는 예후를 예측할 수 있는 단일 생화학 표지자는 없는 실정이다. 본 연구에서도 각각의 펩타이드를 APACHE II 점수와 상관관계가 있는 펩타이드는 없었고, 단일 단백질로 예후를 판단하기 보다는 여러 마커의 조합으로 판단하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

몇몇 악성종양에 대하여 proteomic pattern diagnostic의 종양 표지자에 대한 접근이 이루어졌고 최근에는 감염성 질환에도 적용되고 있다. 저자들은 패혈증의 예후를 예측할 수 있는 생화학 표지자를 찾으려 하였다. 그러나 이번 연구에서는 적은 수의 환자

를 대상으로 하였으므로 추가적인 생화학표지자 확인과 실용화를 위해서는 더 많은 환자를 대상으로 한 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

결론적으로 프로테오믹 마커는 패혈증 환자의 예후를 예측하고 치료계획을 세우는 데 있어 유용하게 이용될 가능성이 있을 것으로 보인다.

## 요 약

**배 경:** 패혈증 환자의 예후를 예측하는 데 현재 사용되고 있는 임상적 채점 방식은 몇가지 제한점이 있다. 그래서 단백질체학(proteomics) 기법을 사용하여 표지자(proteomic biomarkers)를 찾으려 연구를 진행하였다.

**방 법:** 본 연구에서는 16명의 패혈증환자에게서 중환자실에 입원하자마자 혈장을 채취하였다. 패혈증의 예후를 예측할 수 있는 표지자를 찾기 위해 Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) mass spectrometry를 사용하였다.

**결 과:** 사망환자와 생존환자 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 6개의 단백질표지자를 발견하였고 이들은 패혈증 환자의 예후 예측과 치료계획수립에 도움이 될 것으로 생각된다.

**결 론:** 프로테오믹 마커는 패혈증 환자의 예후를 예측하고 치료계획을 세우는 데 있어 유용하게 이용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
3. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-29.
4. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG, et al. The APACHE III prognostic system: risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest*

- 1991100:1619-36.
5. le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, et al. A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 1984;12:975-7.
  6. Lemeshow S, Teres D, Avrunin JS, Gage RW. Refining intensive care unit outcome prediction by using changing probabilities of mortality. *Crit Care Med* 1988;16:470-7.
  7. de Rooji SE, Abu-Hanna A, Levi M, de Jonge E. Factors that predict outcome of intensive care treatment in very elderly patients: a review. *Crit Care* 2005;9:R307-14.
  8. Livingston BM, MacKirdy FN, Howie JC, Jones R, Norrie JD. Assessment of the performance of five intensive care scoring models within a large Scottish databases. *Crit Care Med* 2000;28:1820-7.
  9. Polderman KH, Thijs LG, Girbes AR. Interobserver variability in the use of APACHE II score. *Lancet* 1999;353:380.
  10. Morales IJ, Peters SG, Afessa B. Hospital mortality rate and length of stay in patients admitted at night to the intensive care unit. *Crit Care Med* 2003;31:858-63.
  11. Rosenberg AL, Hofer TP, Strachan C, Watts CM, Hayward RA. Accepting critically ill transfer patients: adverse effect on a referral center's outcome and benchmark measures. *Ann Intern Med* 2003;138:882-90.
  12. Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA, et al. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1576-8.
  13. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.
  14. Papadopoulos MC, Abel PM, Agranoff D, Stich A, Tarelli E, Bell BA, et al. A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. *Lancet* 2004;363:1358-63.
  15. Zhu XD, Zhang WH, Li CL, Xu Y, Liang WJ, Tien P. New serum biomarkers for detection of HBV-induced liver cirrhosis using SELDI protein chip technology. *World J Gastroenterol* 2004;10:2327-9.
  16. Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 2004;22:793-813.
  17. Ahn WS, Park SP, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Nam GH, et al. Identification of hemoglobin- $\alpha$  and  $\beta$  subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Sci* 2005;96:197-201.
  18. Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends biotechnol* 2004;22:411-6.
  19. Rodland KD. Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. *Clin Biochem* 2004;37:579-83.
  20. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004;363:600-7.
  21. Colonna M, Facchetti F. TREM-1: A new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003;187:S397-401.
  22. Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tsiopoulos A, Gentina T, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:532-7.
-