

전혈에서 시간과 온도에 따른 Adrenocorticotropic Hormone의 안정성 평가

서울특별시보라매병원 핵의학과
신선영 · 이현주 · 민경선 · 이호영

Preanalytical Stability of Adrenocorticotropic Hormone Depends on Time to Centrifugation

Sun Young Shin, Hyun Joo Lee, Gyung Sun Min, Ho Young Lee

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Boramae Hospital, Seoul, Korea

Background: Preanalytical factors can affect reliability of hormone assay results. Adrenocorticotropic hormone (ACTH) in blood is considered highly unstable because of proteolytic degradation, so storage of blood samples on ice until analysis is recommended. In clinical practice, however, this procedure may present logistical problems because most samples for ACTH measurement must be shipped from the place of sample collection to the laboratory. Therefore, we studied the impact of time and temperature before plasma separation and analysis on the results of ACTH assays. **Methods:** A total number of 22 patients were enrolled in this study. We obtained 2 blood samples. ACTH concentrations were 35~126 pg/mL. ACTH concentrations were measured by immunoradiometric assay (IRMA) using commercial kits (CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette, France). **Results:** ACTH levels showed a significant difference between the samples of 22°C EDTA and 4°C EDTA. Measured ACTH concentrations significantly decreased with time before freezing at -20°C. ACTH levels showed no significant difference between the groups of after storage for 24 hr without centrifugation at 22°C and 4°C. **Conclusion:** We recommend that blood samples be obtained on pre-chilled EDTA collection tubes. The shortest possible time between sample collection and processing is always the best laboratory practice. (**Korean J Nucl Med Technol 2009;13(1):116-119**)

Key Words : Adrenocorticotropic hormone, Time, Temperature

서 론

Adrenocorticotropic Hormone (ACTH)은 부신피질자극 호르몬으로 39개의 분자량 4,500인 아미노산으로 된 폴리펩티드의 사슬로 Ca⁺⁺이온의 존재 하에 부신에 작용하고 cortisol, 17-ketosteroid 등 스테로이드의 합성 분비를 자극한다. ACTH 분비는 시상하부에서 분비하는 부신피질자극 호르몬방출인자(corticotropin releasing factor : CRF)에 의하여

오전 7~9시에 최고치에 달하며 오후 8~11시에 최저치를 보인다. ACTH는 일일 변동이 있기 때문에 채혈시간에 유의해야 한다. 정신적 혹은 신체적 스트레스도 중추 신경계에 영향을 주어 CRF와 ACTH의 분비를 자극한다. ACTH분비는 혈액 중 Cortisol이 증가하면 억제되는데, 혈액 중 cortisol의 증가로 뇌하수체와 시상하부 양쪽의 음성피드백에 의한 것이라 생각된다. ACTH측정은 시상하부-뇌하수체-부신계통의 기능진단에 유용하다.¹⁾

호르몬검사에서 채혈 후 신속한 혈장분리의 과정은 검사 결과의 신뢰성에 영향을 줄 수 있다. 혈중의 ACTH는 단백질의 분해에 의해 매우 불안정한 호르몬으로써 단백질 분해 효소의 활동을 막기 위해 채취된 혈액은 분석되기 전까지 4°C에 보관되어야 한다.²⁻⁵⁾

• Received: March 11, 2009. Accepted: April 2, 2009.
• Corresponding author: Ho-Young Lee
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University,
Boramae Hospital, Boramae Road, Dongjak-gu, Seoul, 156-707, Korea
Tel:+82-2-870-2581, Fax: +82-2-831-0780
E-mail: debobkr@gmail.com

ACTH의 전처리 과정을 보면 미리 냉각된 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) Tube에 혈액을 채취하여 흔든 후, 얼음을 채운 컵에 넣어 즉시 검사실로 옮겨 냉장 원심분리 해야 한다. 얼어진 혈장은 측정될 때까지 -20℃에서 보관한다.⁶⁾

그러나, 임상에서 ACTH검체가 채혈실에서 채취된 후 전혈상태로 검사실로 옮겨져야 하기 때문에 이러한 전처리 과정은 수송의 문제를 가지게 된다. 그러므로, 이 연구에서는 항응고제로 사용되는 EDTA의 온도가 ACTH결과에 미치는 영향과 혈장분리 되기 전 시간과 온도가 ACTH결과에 미치는 영향을 연구하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

2007년 12월부터 2008년 5월까지 본 병원에 내분비내과로 내원하여 ACTH검사를 시행한 외래환자 22명을 대상으로 하였다. ACTH의 농도는 35~128 pg/mL이었고 측정하한 값인 5 pg/mL 이하의 결과는 연구에서 제외하였다. 22명의 환자로부터 2개의 혈액을 채취하였는데, 액체상태의 potassium EDTA가 4.0 MmL당 7.2 mg 함유된 채혈튜브(Flanklin Lakes, NJ, USA)를 사용하였다.

2. 연구방법

-4℃와 22℃(실온)에 보관된 EDTA tube에 각각 채혈한 후, 검체를 test tube에 일정량 덜어 내어 즉시 원심분리 하여 분석되기 전까지 -20℃에 보관하였다. 남은 검체를 일정량 나누어 test tube에 분주하여 실온(22℃)에서 2시간, 4시간, 24시간, 4℃에서 24시간 방치하고 원심분리 하여 측정될 때까지 -20℃에 보관하였다.

3. 대상시약

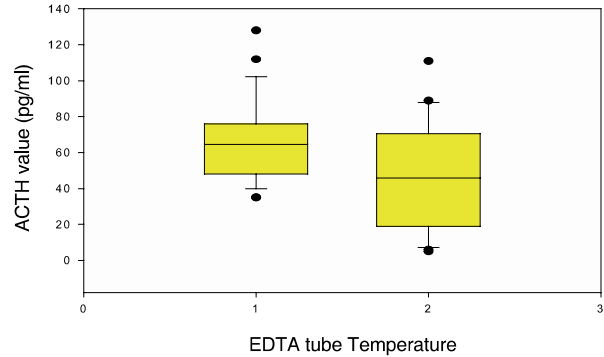


Fig. 1. ACTH concentrations according to EDTA temperature. 1; samples were centrifuged immediately after collection on cooling EDTA Tube, 2; samples were centrifuged immediately after collection on room temperature EDTA Tube.

ACTH농도 측정은 CIS Biointernational (Gif-sur-Yvette, France)에서 생산된 면역방사계수측정법(IRMA)을 이용한 시약을 사용하였다. 이 시약의 측정내정밀도는 6.1% 이하이고, 측정 간 정밀도는 5.3% 이하이다.

4. 통계분석

결과는 냉각상태의 EDTA tube에 채혈하여 즉시 냉장 원심분리한 검체에서 얻어진 ACTH농도(standard condition)와 비교되어졌고, 시간에 따른 변화는 standard condition에 대한 백분율로 표현하였다. 시간과 온도에 따른 ACTH농도 변화의 유의한 차를 분석하기 위하여 Wilcoxon signed-rank test를 이용하였다. Box plot을 이용하여 결과값을 비교하여 그렸고, Line and scatter plot (Simple error bars)을 이용하여 백분율로 계산된 감소율로 ACTH 변화 커브를 그렸다.

결 과

기대했던 것처럼 원심 분리되기 전 시간과 온도에 따라 방치된 검체의 ACTH농도는 즉시 원심 분리된 standard

Table 1. Changes in plasma ACTH concentration according to temperature and time

Condition	Subjects No.	Range of ACTH value (pg/mL)	Relative ACTH Value (%)	p-value
Standard conditon	21	35-128	100	
Standard condition at 22℃	16	ND-111	73.7	0.022
Uncentrifuge 2 hr at 22℃	10	ND-99	52.8	0.009
Uncentrifuge 4 hr at 22℃	10	ND-96	60.9	0.008
Uncentrifuge 24 hr at 22℃	7	ND-75	65.8	0.012
Uncentrifuge 24 hr at 4℃	6	ND-78	48.4	0.018

ND; non-detectable.

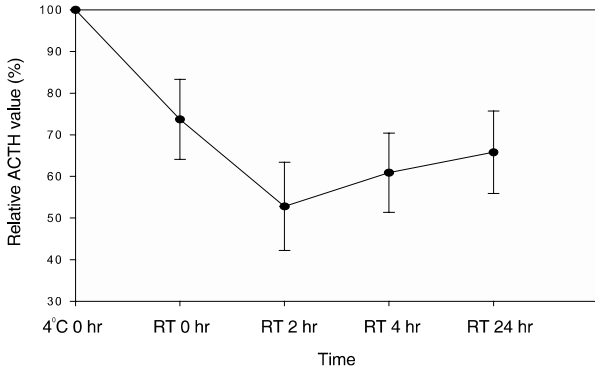


Fig. 2. Fitting plots of ACTH concentrations at 22°C according to time. RT; room temperature.

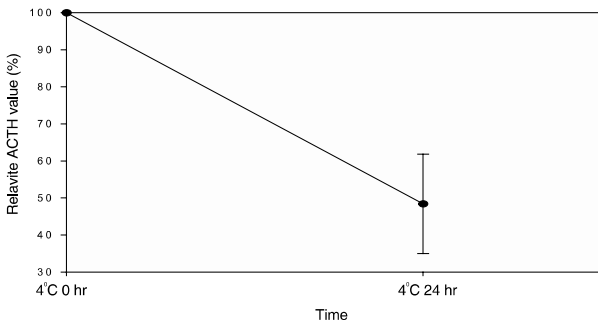


Fig. 3. Fitting plots of ACTH concentrations at 4°C according to time.

condition의 ACTH농도와 비교하여 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Table 1). Standard condition과 실온 상태의 EDTA tube에 채혈하여 즉시 원심 분리한 검체의 ACTH결과를 보면 실온 EDTA결과가 유의하게 낮음을 확인할 수 있었다 ($p < 0.038$) (Fig. 1).

그림 2는 Standard condition을 100%로 봤을 때, %로 나타낸 상대적인 ACTH값으로 실온상태에서 시간에 따른 ACTH 결과의 변화를 그림으로 나타내었다. 실온 2시간까지 ACTH 결과의 감소율이 매우 크며 유의한 차가 있었고 ($p < 0.009$), 2시간 이후로는 감소율이 완만해 지며 그 차도 유의하지 않았다 ($p < 0.05$). 2시간 방치와 4시간 방치 사이의 p 값은 0.786 이었고, 4시간 방치와 24시간 방치 사이의 p 값은 0.465였다.

ACTH의 분해가 실온상태에 방치될 경우, 채혈 후 2시간 이전에 빠르고 유의하게 나타남을 볼 수 있다.

4°C에 보관하였을 때의 ACTH의 변화를 그림 3에 나타내었다. 4°C에서 24시간 방치된 결과인데 standard condition과 비교하여 유의하게 낮아짐을 확인하였다 ($p = 0.043$).

ACTH의 분해를 막기 위해 4°C에 보관하여도 혈중의 ACTH는 유의하게 감소하였다.

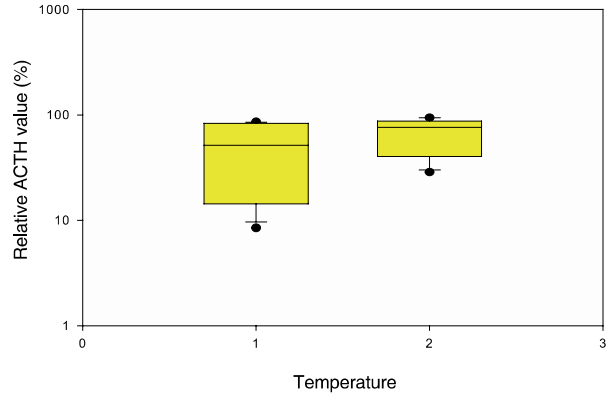


Fig. 4. ACTH concentrations of after 24 hr groups according to temperature. 1; sample were left at 22°C for 24 hr, 2; samples were left at 4°C for 24 hr.

그림 4는 24시간 동안 냉장상태로 보관한 검체와 24시간 동안 실온상태로 보관한 검체를 비교한 결과이다. 두 결과는 유의한 차를 보이지 않았다 ($p = 0.066$). 24시간 이상 방치될 경우에는 온도에 영향을 받지 않음을 확인하였다.

고 찰

이번 연구에서는 이전 연구와 마찬가지로 시간에 따라 혈장 ACTH의 농도가 유의하게 감소됨을 확인하였다.⁷⁾ 이번 연구가 이전 연구와 다른 점은 실온상태의 EDTA tube에 채혈하여 ACTH농도 변화를 확인하였다는 것이다. 실온상태의 EDTA tube에 채혈할 경우 냉장상태에 채혈하여 즉시 원심분리 한 standard condition과 비교하여 26.3% 감소율로 가장 많은 감소가 나타났다. 그 다음으로 높은 감소율을 보인 실험군은 실온에서 2시간 방치된 결과였다. 실온 EDTA에 채혈한 결과와 비교하여 20.9%의 감소율을 나타내었다. 이 결과를 보면 ACTH는 채혈 후 실온상태에서 빠르게 분해되기 시작하고 실온방치 2시간까지 빠르게 분해됨을 알 수 있다.

검체를 4°C로 유지하는 것이 ACTH의 분해를 얼마나 막을 수 있는지 확인해 보면, 24시간 동안 4°C에 방치된 결과는 실온에서 방치된 결과와 유의한 차이가 없었다. 검체를 4°C로 유지하여도 24시간 후에는 거의 분해되어 약 50% 정도 남아 있게 되었다. 이것으로 보아 ACTH의 분해는 온도보다는 시간의 영향을 더 많이 받음을 알 수 있었다.

이번 연구에서는 4°C에서 2시간, 4시간 방치된 ACTH결과를 볼 수 없었는데, 이전 연구를 보면 4°C에서 ACTH의 분해가 실온보다 적게 일어나지만, ACTH의 안정성에 크게 기여하지 않는다는 연구결과가 있었다.⁸⁾

이 연구를 통하여 ACTH검사에서 냉장된 EDTA의 사용이 필수적이라는 결론을 얻을 수 있었고, 검체를 냉장고에 보관하는 것이 ACTH분해를 막는데 크게 효과적이지 않음을 확인하였다. 채혈 후 2시간 이내에 ACTH분해가 빠르게 일어남으로 정확한 검사결과를 위해서는 가능한 채혈과 전처리 과정에 걸리는 시간을 최소화하는 것이 가장 좋은 방법일 것이다.

요 약

목적: 호르몬검사에서 채혈 후, 신속한 혈장분리의 과정은 검사결과와 신뢰성에 영향을 줄 수 있다. 혈중의 Adreno Corticotrophic Hormone (ACTH)은 단백질의 분해에 의해 매우 불안정한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 ACTH검사에서 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) tube의 온도가 환자 결과에 미치는 영향과 전혈에서 시간과 온도에 따른 ACTH의 안정성을 평가하였다.

방법: 전체 22명의 검체를 대상으로 하였으며, 냉장상태의 EDTA tube와 실온상태의 EDTA tube에 채혈한 후(n=18), 즉시 원심분리하여 두 그룹 간의 ACTH 결과를 비교하였다. 전혈상태의 EDTA 검체를 일정량을 나누어 분주하여, 실온에서 2시간(n=11), 4시간(n=11), 24시간(n=7), 냉장에서 24시간(n=7) 동안 방치한 후 원심분리하여 ACTH 농도를 측정하였다. 냉장 EDTA에 채혈 후 즉시 원심분리된 검체의 ACTH 결과와 실온에서 2시간, 4시간 방치된 검체의 ACTH결과를 비교하였고, 냉장에서 24시간 방치된 결과와 실온에서 24시간 방치된 결과를 비교하였다. 통계적인 분석은 paired t-test를 이용하였다.

결과: 실온상태의 EDTA tube에 채혈한 ACTH 결과가 냉장상태의 EDTA tube에 채혈한 결과보다 유의하게 낮게 나타났다($p=0.018$). 채혈 후 즉시 원심분리된 ACTH 결과와 비교하여 실온에서 2시간 방치된 결과가 유의하게 낮았고($p<0.001$), 실온 2시간과 실온 4시간 사이에는 유의한 차가 없었다($p=0.907$). 24시간 동안 방치된 결과를 보면, 실온보관과 냉장보관에서 유의한 차가 없었다($p=0.474$).

결론: ACTH 검사 시에는 냉장고에 넣어둔 EDTA tube의 사용이 권장되며, 채혈 후 2시간 동안 실온에서 방치될 경우 결과가 유의하게 감소되므로, 신속한 원심분리가 요구된다.

REFERENCES

1. 서일택. 핵의학 검사 기술학. 1993년, *교과의학* P234
2. Diver MJ, Hughes JG, Hutton JL, West CR, Hipkin LJ. The long-term stability in whole blood of 14 commonly requested hormone analytes. *Ann Clin Biochem* 1994;31:561-5.
3. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandie TG. Effect of anticoagulants and storage temperature on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem* 2001;34:107-12
4. Ghosh BN, Smith EL, Sayers G. Adrenocorticotrophic hormone: stability studies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;79:23-7.
5. Meakin JW, Tingey WH Jr, Nelson DH. The catabolism of adrenocorticotrophic hormone: the stability of adrenocorticotrophic hormone in blood, plasma, serum, and saline. *Endocrinology* 1960;66:59-72.
6. 1998 내과지침서.
7. Jane Ellis M, Livesey JH, Evans MJ. Hormone stability in human whole blood. *Clin Biochem* 2003;36:109-12.
8. Nicole Reisch, Martin Reincke, Martin Bildlingmaier. *Clinchem* 2007;2:52-53.