

## A study of relationship between stomach cancer and selenoproteins in Korean human blood serum

Myungsun Park and Yong-Nam Pak★

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education Cheng-Won,  
Chung Buk 28173, Korea

(Received October 5, 2015; Revised December 1, 2015; Accepted December 1, 2015)

## 한국인 혈청에서의 셀레노 단백질과 위암과의 상관관계 연구

박명순 · 박용남★

한국교원대학교 화학교육학과

(2015. 10. 5. 접수, 2015. 12. 1. 수정, 2015. 12. 1. 승인)

**Abstract:** In this study, the relationship between selenoprotein concentrations in blood and stomach cancer have been searched for Korean. The concentration of each selenoprotein in blood serum was analyzed and the correlation between the concentration and stomach cancer was studied to find a potential for using Selenium as a biomarker. In concentration determination, a simple calibration curve method was used with the monitoring of  $m/z$  78 without the use of solid phase extraction. This is a lot more simple than the method using SPE with post column isotope dilution. The result obtained from the analysis of CRM BCR-637,  $72.20 \pm 3.35 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , showed similar value of reference value ( $81 \pm 7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ). The total concentration of Se for the controlled group, cardiovascular patients group, was  $105.70 \pm 21.20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ . This value was the same as normal healthy person reported earlier. Each selenoprotein concentration of GPx, SelP and SeAlb was  $26.12 \pm 7.84$ ,  $65.15 \pm 14.50$ ,  $14.43 \pm 6.99 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. The distribution of each selenoprotein was 24.7%, 61.6%, and 13.7%, which was similar to the normal person. The result of stomach cancer patients, the total concentration of Se was  $76.11 \pm 28.12 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  and each concentration of GPx, SelP and SeAlb was  $15.41 \pm 9.01$ ,  $50.83 \pm 17.91$ , and  $9.87 \pm 5.21 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. The total and each selenoprotein concentration level showed significant decrease for the stomach cancer patients. The level of decrease was 41.0% for GPx, 22.0% for SelP, and 31.6% for SeAlb. However, the distribution of each selenoprotein was not much different. Either total Selenium or each selenoprotein could be used as a possible index for the diagnosis of cancer. However, in age group study, it is shown that young age group (30's-40's) did not show much difference.

**요약:** 본 연구에서는 한국인을 대상으로 하여 혈중 셀레노단백질의 함량과 위암과의 상관관계를 연구하였다. 혈청 속에서의 셀레노단백질의 함량을 종별로 분석하여, 각 단백질의 함량과 위암과의 상관관계

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176

E-mail : pakyn@knue.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

를 알아보고 셀레늄의 위암에 대한 생체지표로서의 가능성을 알아보고자 하였다. SPE를 사용하여 방해 이온들을 제거한 뒤 후컬럼 동위원소법으로 정량한 기존의 복잡한 방법과 달리 SPE를 사용하지 않고 *m/z* 78을 모니터링하고 검정곡선법으로 정량하였다. 표준인증물질인 CRM BCR-637을 사용하여 정확도를 검증한 결과  $72.20 \pm 3.35 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 로서 기준값인  $81 \pm 7 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 에 만족할 만한 결과를 얻었다. 먼저 통제군인 순환기 질환 환자 혈청 속의 셀레노단백질의 총농도를 조사해본 결과  $105.70 \pm 21.20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 으로서 정상인의 값과 차이가 없었다. 각 종별 농도를 보면 GPx와 SelP, 그리고 SeAlb이 각각  $26.12 \pm 7.84$ ,  $65.15 \pm 14.50$ ,  $14.43 \pm 6.99 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 이며 분포는 24.7%, 61.6%, 및 13.7% 이었다. 한국인의 위암 환자의 혈청을 분석한 결과, GPx와 SelP, 그리고 SeAlb의 농도는 각각  $15.41 \pm 9.01$ ,  $50.83 \pm 17.9$ , 그리고  $9.87 \pm 5.21 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 이며 총 농도는  $76.11 \pm 28.12 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 으로 대조군에 비하여 총량과 각 종들도 모두 큰 감소를 보였다. 감소 폭은 GPx는 41.0%, SelP 22.0%, SeAlb 31.6% 이었다. 하지만 종별 분포는 유의미한 차이를 보이지 않았고 따라서 위암 환자의 경우 셀레노단백의 총량을 분석하거나 또는 그 중 하나의 단백질을 사용하여도 암을 진단하는 보조적인 지표가 될 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 나이별에 따른 분석을 보면 노년인 50대 부터 70대에서는 실험군과 대조군이 확실한 차이를 보이거나 30대와 40대에서는 별 차이를 보이지 않고 있으므로 성별, 나이별에 따른 조사가 더 필요할 것으로 보인다.

**Key words:** stomach cancer, selenoproteins, Korean blood serum, AF HPLC-ICP/MS, GPx, SelP, SeAlb

## 1. 서 론

셀레늄은 필수 미량원소로서 항산화효소의 필수적인 조효소로 작용한다. 또한 비타민 E의 항산화 효과를 증진시켜 세포들의 산화성 손상을 막는데 필수적인 역할을 하고 있다.<sup>1,2</sup> 그 밖에 세포 매개성 면역, 체액성 면역, 항 염증 반응 등 면역 조절 기능과 감성신호르몬 생합성에 중요한 역할을 하므로 셀레늄 결핍은 면역 기능 이상, 갑상선 기능 장애, 퇴행성 신경질환의 원인으로 알려져 있다.<sup>3,4</sup> 셀레노단백질이 세포 내 분포하는 위치는 다양하며, 이는 세포 내 다양한 부분에서 생물학적 기능 조절을 할 것이라고 보고 있다.<sup>5</sup> 포유동물에는 약 100여 종류 이상의 셀레노단백질이 존재함을 확인되었으나, 현재까지 특성이 밝혀진 셀레노단백질은 포유 동물에서는 25 종이 된다.

사람의 경우 셀레늄의 영양 상태는 일반적으로 혈장 셀레늄 농도에 기반하고 있으며, 포유동물의 혈장에서 셀레늄은 대부분 세 가지의 단백질, 셀레노단백질 P (Selenoprotein P, SelP), 글루타티온과산화효소 (Glutathione peroxidase, GPx) 그리고 셀레노알부민 (Seleno Albumin, SeAlb)으로 존재한다. 일반적으로 셀레노단백질은 21번째 아미노산인 셀레노시스테인 (SeCys) 잔기를 갖는 단백질을 말하기 때문에 엄밀하게 말하면 셀레노단백질은 GPx와 SelP이고, SeAlb는 셀레늄이 포함된 단백질이다.

SeAlb은 인체 내에서 셀레늄 영양 상태에 대한 잠

재적 생체 지표(bio-indicator) 역할을 할 수 있으며 건강한 사람을 대상으로 한 연구에서 나이에 따라 GPx와 SelP의 농도는 일정하지만 SeAlb의 농도는 감소하는 경향을 보였다.<sup>6</sup> 또한 대장암, 전립선암 모델을 이용한 *in vivo* 연구에서 셀레노메티오닌이 강력한 항암 작용을 나타낸다는 보고<sup>7</sup>를 보았을 때 셀레노메티오닌이 무작위로 대체되어 있는 SeAlb도 항암작용에 관여되어 있을 수 있을 것이다.

SelP는 혈장 셀레노단백질의 40-60%를 차지하는 당단백질이며,<sup>8,9</sup> 간에서 조직으로 셀레늄을 이동시키는 역할을 한다. SelP의 발현을 감소시킨 전립선암 (C4(1)-Tag-derived cell)과 침습암(Pr-14)의 연구에서 과산화수소에 노출될 때에 활성산소종이 증가하는 것은 결국 SelP이 부족하면 생체에서 활성산소종이 더 많이 생기는 것을 의미한다.<sup>10</sup>

GPx는 셀레늄 영양상태의 기능성 지표로 체내에서 생성된 과산화수소를 분해함으로써 세포가 손상되지 않도록 보호하는 항산화 기능을 하는 효소이다. 셀레늄이 결핍된 식이를 섭취하면 혈장 셀레늄의 감소와 함께 혈장의 GPx의 활성도 감소하고, 셀레늄을 보충하면 혈장 셀레늄의 증가와 함께 GPx도 증가한다. 일반적으로 인체에 필요한 셀레늄의 영양섭취기준을 정할 때 혈액 셀레늄 농도보다도 혈장 GPx의 수치가 최대치가 되는 시작점의 셀레늄의 섭취량을 셀레늄의 평균 필요량으로 정하고 있다.<sup>11</sup>

Meyer<sup>12,13</sup>는 독일의 전립선암 환자와 신장암 환자를

대상으로 하여 셀레노 단백질을 조사한 결과, 암환자의 SelP의 농도가 정상인 통제군보다 낮은 것을 알아내고 암환자 진단을 위하여 혈청에 있는 SelP 농도를 유의미하게 사용할 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 Muzembo<sup>14</sup>는 규폐증 환자를 대상으로 규폐증 환자는 정상인 통제군에 비해 Se와 SelP의 농도가 낮으며, 긍정적 상관관계가 있다고 보고하였다. 하지만 최근의 SeAlb에 대한 또 다른 연구에서는 초기 대장암 환자에서의 SeAlb의 농도가 통제군이나 높은 단계의 대장암 환자보다 더 높은 수준임을 보고한 바 있다.<sup>15</sup>

결국 셀레노 단백질과 암과의 상관관계에 대한 연구는 단순한 하나의 단백질이나 총량이 아니라 좀 더 세분하여 셀레노 단백질 모든 종별에 따른 연구할 수 있을 필요가 있지만 현재까지 셀레늄과 암과의 상관관계에 대한 역학적 연구는 분석기법의 한계로 주로 셀레늄 총량을 조사하였거나 어느 특정한 하나의 단백질만을 사용하여 연구하여 왔다. 아직까지 한국인에 대하여 셀레노 단백질과 위암에 대한 총체적 연구는 아직 보고되고 있지 않고 있으며 혈청에서 3개의 셀레노 단백질들을 모두 분석하고 이들 각각의 농도와 암과의 상관관계의 연구는 매우 중요하다고 생각된다.

본 연구실에서는 혈청에서의 셀레노 단백질들의 정량분석을 연구해 왔으며 그 방법을 확립시켰지만 본 연구에서는 기존의 복잡한 방법보다 좀 더 간단하며 빠른 정량방법을 적용하여 한국인의 위암환자와 혈중 셀레노 단백질들 간의 상관관계를 알아보려고 하였다. 본 연구에서는 고체상 추출(Solid Phase Extraction, SPE)을 사용하지 않으므로 인하여 약간의 감도의 손실은 있게 되지만 시료의 손실과 오염을 줄일 수 있었다. 또한 정확하지만 복잡한 후컬럼 동위원소 희석법을 사용하지 않고 검정곡선법을 검증하여 적용시켰다.

## 2. 연구 방법

본 연구에 사용된 기기 및 방법은 선행연구<sup>16-19</sup>에서 발표한 것을 기본으로 하여 본 연구에 맞게 변형시켜 사용하였다. 혈청에서의 셀레노단백질의 분석기술 중 액체 크로마토그래피-유도결합 플라즈마 방법(HPLC-ICP/MS)은 간단하고 정확하며 민감한 분석기술이다. 이는 혈청 속에 있는 극미량( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  수준)의 셀레노단백질을 분리, 정량하기에 적합한 분석 방법이라 할 수 있다. 본 연구에서는 affinity column HPLC를 사용하고 이를 ICP/MS와 연결하여 셀레노단백질을 분석하였다.

### 2.1. 시약 및 시료

본 실험은 극미량의 원소 분석이 이루어지는 정밀한 실험이므로 실험 환경에서 오는 오염을 최소화하여 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 모든 용기와 기구는 산세척 후 탈 이온수로 세척, 건조하여 사용하였다. 시약 및 시료 조제에 사용되는 용매는 Millepore direct-Q system에서 비저항이  $18.2\text{ M}\Omega$  이상인 탈 이온수를 사용하였다. 용기 세척 및 시료 조제에 사용한 질산은 동우화인켄사에서 구입한 반도체급 시약을 사용하였다. 셀레늄 표준용액은 Sodium selenate decahydrate (SeVI, 99.999%, Sigma-Aldrich)를 2% 질산에 묽혀 사용하였다. Glutathione peroxidase from bovine erythrocytes (Sigma-Aldrich), Albumin from human serum (96-99%, Sigma-Aldrich)을 탈 이온수에 묽혀 사용하였다. Human serum CRM은 BCR-637 (IRMM, Geel, Belgium)을 구입하여 사용하였다.

위암환자 혈청은 전남대학교 화순병원 인체자원단 위은행 통제군으로 사용한 순환기질환 혈청은 경북대학교병원 인체자원단위은행에서 제공받아 사용하였다. 혈청은  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 에 보관하였으며, 분석하기 직전에 별도의 전처리 과정 없이  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  filter로 filtering한 후 분석하였다. 대조군은 20명을 대상으로 하였고 위암 환자도 20명으로 하여 조사하였다. 시료에 대한 나이별 정보는 다음과 같다.

### 2.2. 기기 및 실험조건

셀레늄 질량인 78번과 80번의 방해원소인 아르곤 dimers ( $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$ 과  $^{40}\text{Ar}_2$ )를 제거하기 위해 충돌기체로 수소를 사용하였고,  $\text{H}_2$ 의 흐름 속도를  $0\text{ mL min}^{-1}$ 에서  $6\text{ mL min}^{-1}$ 까지  $0.5\text{ mL min}^{-1}$  간격으로 변화시키면서 측정하여 신호대 바탕비가 가장 큰 흐름 속도인  $5.0\text{ mL min}^{-1}$ 에서 실험을 진행하였다. HPLC를 ICP/MS에 사용할 때에 이동상의 유기 용매는 플라즈마를 불안정하게 하고 탄소가 생겨 sampler cone에 탄소 흡

Table 1. Characteristics of patients and controlled groups

Age group (years)	Stomach cancer group (No.)	Control group (No.)
31-40	2	3
41-50	2	4
51-60	4	4
61-70	5	5
71-80	4	4
81-	3	0
Total	20	20

Table 2. Operating conditions of ICP/MS used in the experiment

Plasma Parameters		
RF power	1600	W
RF matching	1.70	V
Sample depth	6.0	mm
Carrier gas	1.00	L min <sup>-1</sup>
Ar/O <sub>2</sub> makeup gas	0.18	L min <sup>-1</sup>
Sampler and Skimer	Ni 1.0 and 0.4 mm id	
H <sub>2</sub> Gas	5.0	mL min <sup>-1</sup>

착이 되거나 torch injector가 막히는 등의 문제가 발생할 수 있으므로 Ar/O<sub>2</sub> 혼합 기체(Ar 80%, O<sub>2</sub> 20%)를 makeup gas로 사용하여 탄소를 산화시켰다. Ar/O<sub>2</sub>의 양은 0.18 L min<sup>-1</sup>로 정하였다. ICP/MS의 최적 기기 조건을 다음의 Table 2에 요약하였다.

HPLC ICP/MS를 사용하여 동위원소 회석법으로 셀레늄을 정량할 때에는 주로 <sup>78</sup>Se와 <sup>80</sup>Se를 측정하여 그 비를 사용한다. 하지만 수소를 사용한 충돌셀 ICP/MS에서는 수소화합물들이 만들어지고 이들에 대한 보정이 필요하게 된다. 결국, 셀레늄의 동위원소 이외에 <sup>79</sup>Br을 모니터링하여 *m/z* 80에 대한 BrH의 생성이 얼마인가를 알아야 한다. 하지만 동위원소 회석법이 아닌 검정곡선법에서는 *m/z* 78을 사용하여 정량하므로 *m/z* 79와 80은 검출할 필요가 없게 되며 훨씬 더 간편하게 된다. 나머지 셀레늄의 동위원소를 측정하는 것은 SeH의 생성비를 측정하여 보정하기 위한 것이다. 크로마토 그래피의 특성상 피크의 세기가 변하기 전에 여러 동위원소들을 빨리 검출해야 하므로 가장 짧은 적분시간인 0.1 초와 피크당 한 개의 질량을 사용하였다. 다음의 Table 3에 요약하였다.

셀레노단백질을 분리하기 위해 Heparin Sepharose (HEP, 7 mm × 25 mm, 1 mL, GE Healthcare Life Science, Sweden)와 Blue Sepharose (7 mm × 25 mm, 1 mL, GE Healthcare Life Science, Sweden, 수동밸브 장착)의 두 개의 affinity column을 사용하였다. 이동상은 equilibration buffer는 0.05 M Ammonium acetate 용액을 만들어 pH를 7.0으로 맞추어 사용하였고, elution buffer는 1.5 M Ammonium acetate 용액을 만들어 pH

Table 3. Data acquisition parameters used for HPLC ICP/MS

Integration time (per point)	0.1 s
Peak pattern	TRA (1)
Acquisition mode	Time resolved analysis
Monitored isotope	<i>m/z</i> 78

Table 4. AF-HPLC separation conditions

Analytical column	Heparin Sepharose and Blue Sepharose (1 mL each)
Injection volume	100 μL
Flow rate	1.00 mL min <sup>-1</sup>
Mobile phase A (equilibration buffer)	0.05 M Ammonium acetate, pH 7.0
Mobile phase B (elution buffer)	1.5 M Ammonium acetate, pH 7.0

를 7.0으로 맞추어 사용하였다. 분석 전에 30분 이상 sonication 과정을 거쳤으며, equilibration buffer를 1.00 mL min<sup>-1</sup>으로 30분 정도 흘려주었다. AF-HPLC의 최적 조건은 Table 4에 나타내었다.

### 2.3. 실험방법

혈청 시료 속의 셀레노단백질을 분리 및 정량하기 위하여 Heparin sepharose (HEP)와 Blue sepharose (BLUE) 컬럼을 six-way valve로 연결하였다. 먼저 GPx와 알부민의 표준 시료를 이용해 컬럼의 성능, 단백질 분리를 위한 최적의 흐름속도등의 조건을 확인하고 혈청 시료 속의 셀레노 단백질들을 분리하였다. Injection volume 등 단백질 분리를 위한 최적 조건을 설정하고 셀레노단백질을 분리하였다. CRM은 SPE의 효율을 확인하기 위해 SPE를 사용하여 간섭 요인을 제거한 시료와 SPE를 사용하지 않은 시료 2 가지로 준비하였다.

암환자 혈청과 통제군인 순환기 질환 환자 혈청에서의 셀레노단백질의 분리 방법은 Human serum CRM에서의 셀레노단백질의 분리 방법과 동일하다. 단 Human serum CRM 분석을 통해 얻은 결과를 토대로 본 연구에서는 시료 준비에서 고체상 추출없이 0.45 μm 필터만 통과시켜 준비했으며 정량은 검정곡선법으로 하였다. 검정곡선법은 Se(VI) 표준용액의 5, 10, 25, 50 ng·g<sup>-1</sup>을 사용하여 HPLC ICP/MS에 주입하여 시료와 같은 과정을 거치게 하였으며, 존재량과 간섭 요인을 고려하여 <sup>78</sup>Se 동위 원소의 면적을 사용하여 검정곡선을 작성하였다.

## 3. 결과 및 고찰

셀레늄을 분석할 때에 선행연구에서는 Br과 Cl에 의한 동중간섭을 피하고자 고체상 추출(SPE)을 사용하였다. 만일 SPE를 사용하지 않으면 혈청 시료중의

Br이 제거되지 않으므로 충돌셀에서 생성되는 <sup>79</sup>BrH에 의하여 <sup>80</sup>Se에 동중간섭이 생기게 된다. 따라서 본 실험에서는 m/z 78 만을 모니터링함으로써 m/z 80을 배제하여 BrH에 의한 동중간섭을 극복하였다. 본 연구에서 m/z 76의 경우에는 감도가 떨어지며 m/z 77에서는 <sup>40</sup>Ar<sup>37</sup>Cl에 의한 동중간섭이 있으므로 m/z 78이 가장 적합하다고 판단하였다. 물론 가장 감도가 높은 m/z 80을 사용하면 유리하지만 이 때 고체상 추출에 의한 제거가 필수적이며 본 실험에서는 m/z 80 대신 다른 동위원소를 사용하여 고체상 추출을 행하지 않아도 되므로 번거로운 추출과정을 생략할 수 있었고 특히 씻어내는 용액에 의한 희석과 특히 오염에 의한 문제를 해결할 수 있었다. 암환자의 혈청시료는 개 당 약 2 mL 이하이며 한 실험당 약 0.5 mL가 소모되므로 시료당 3 번의 실험을 하기에 부족하다. 따라서 SPE를 사용하면 시료의 물리적 손실이 일부 생겨 시료당 2 회의 실험을 할 수 밖에 없다.

3.1. CRM의 분석

CRM인 BCR-637을 대상으로 하여 SPE를 사용하여 음이온 방해이온들을 제거한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교하여 보았다. 고체상 추출을 사용하지 않았을 때의 결과는 72.20 ng·g<sup>-1</sup>으로서 나타났으며 사용하였을 때의 71.08 ng·g<sup>-1</sup>와 큰 차이가 없었으므로 본 연구에서는 SPE를 사용하지 않았다. SPE를 사용하지 않고 CRM에 대한 분석을 한 결과를 다음의 Table 5에 실어 놓았다.

결과를 볼 때에 평균값은 약간 다르지만 95%신뢰 수준으로 볼 때에 통계적으로 같다고 할 수 있다. 그러므로 선행연구에서처럼 SPE를 사용하여 방해음이온들을 제거한 후에 후컬럼 동위원소를 사용하지 않고도 <sup>78</sup>Se를 모니터링하면 직접 검정곡선법으로 분석할 수 있음을 알아내었다. 선행연구<sup>17</sup>에서는 후 컬럼 동위원소 희석법으로 정량하였는데 m/z 78을 대상으

Table 5. Selenoprotein concentration in Human serum CRM without using SPE (unit; ng · g<sup>-1</sup>)

	Experimental data	Certified Se Level
Non-retained (GPx + etc)	11.95±1.04	
SelP	49.21±1.84	
SeAlb	11.03±2.04	
Sum of species	72.20±3.35	81±7

n=3  
average±95% CI

로 하려면 동위원소 함유량이 더 작은 <sup>76</sup>Se이나 <sup>77</sup>Se 셀레늄 동위원소를 사용하여야 한다. 본 연구에서는 검정곡선법으로도 충분히 좋은 결과를 준다고 판단되어서 사용하였다.

3.2. 위암환자 혈청시료에 대한 셀레노 단백질 분석

위암 환자의 혈청 속의 셀레노 단백질의 종별 정량 값과 비교하기 위한 통제군으로 순환기 질환 환자의 혈청 속의 셀레노 단백질을 분리 및 정량하였다. 또한 위암 환자들에 대하여 분석한 종별 셀레노단백질의 함량을 Table 6에 함께 비교하였다.

통제군이 순환기 질환 환자이므로 먼저 이들에 대한 결과를 일반의 건강한 한국인 혈청에서의 셀레늄 농도와 비교하여 보았다. 선행연구나 타문헌<sup>17,20,21</sup>의 결과를 보면 일반인의 혈청내 셀레노 단백질의 총량은 약 110 ng·g<sup>-1</sup> 근처로서 혈청내 셀레늄 총량과 본 연구에 사용된 대조군인 순환기 질환의 환자들의 105.70 ng·g<sup>-1</sup>과는 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한 순환기 질환 환자 혈청 속에 있는 셀레노단백질의 종별분포 또한 일반인에 대한 분포와 다르지 않았다.

위암 환자의 혈청 속에 있는 셀레노단백질의 총량은 76.11 ng·g<sup>-1</sup>으로서 대조군과 비교하여 볼 때에 매우 감소하였음을 알 수 있었다. 95%수준의 신뢰구간

Table 6. Comparison for concentrations of each selenoprotein of stomach cancer and comparison groups

	Controlled group	Stomach cancer	Se Level of healthy person
GPx + etc	26.12±7.84	15.41±9.01	
SelP	65.15±14.50	50.83±17.91	
SeAlb	14.43±6.99	9.87±5.21	
Sum of species	105.70±21.20	76.11±28.12	115.0±3.5 <sup>20</sup> 89.4±7.0 <sup>17</sup> 109.4±20.07 <sup>21</sup>

n=20 (3 runs for each sample), concentration in ng·g<sup>-1</sup>  
average±95% CL

으로 볼 때에 통계학적으로는 차이가 있다고 할 수는 없지만 평균값은 확실히 작아 보인다. 이것은 환자 간의 편차일 수 있지만 실험방법상의 문제일 수도 있다. 따라서 다음 연구에서는 실험의 정밀도를 더 개선시킬 수 있는 방법들에 대하여 연구하는 것이 필요 하겠다. 비록 과정이 더 어렵지만 검정곡선법보다는 후컬럼 동위원소 회석법을 사용한다던가, 동위원소를  $^{76}\text{Se}$ ,  $^{77}\text{Se}$  도는  $^{78}\text{Se}$  등 다양한 셀레늄 동위원소를 사용하는 방법들이다.

분포는 GPx 20.0%, SelP 67.0%, SeAlb 13.0%로 CRM이나 순환기 질환 환자 혈청 속에 있는 셀레노단백질의 분포와 유사하다. 하지만 대조군과 비교할 때 총량 및 각 종별 셀레노단백질의 함량은 모두 현저하게 감소하였고, 감소한 정도는 GPx는 41.0%, SelP 22.0%, 그리고 SeAlb는 31.6%으로 SelP가 가장 작게 감소하였고 GPx가 가장 많이 감소하였다. 각 종별 단백질과 총량에 대한 농도의 비교를 다음의 Fig. 1에 나타내었다.

Song 등<sup>20</sup>에 의한 혈중 셀레늄 농도와 전립선암과의 상관관계 연구에서 보면 대조군의  $116.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 에 비교하여 암환자들의 농도는  $110.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로서 통계학적인 차이는 보이지 않았다. 하지만 전립선암과 위암이 서로 다를 수 있으며 무엇보다 분석학적인 관점에서 볼 때에 셀레늄 총량을 측정하기 위하여 Song등이 사용한 방법은 원자흡수분광법으로서 극미량인 셀

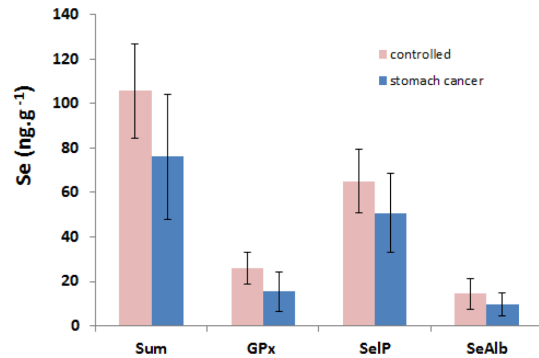


Fig. 1. Comparison of total each selenoprotein in blood serum for stomach cancer and controlled groups.

레늄의 측정에 대한 정확도의 논의 및 검증이 필요한 것으로 보인다.

### 3.3. 나이별 조사

다음은 나이별에 따른 셀레늄의 분포와 총량을 조사하였고 그 결과를 다음 Table 7과 8 및 Fig. 2에 나타내었다.

비록 전체 평균값은 두 그룹 사이에 확실한 차이를 보여주며 암환자그룹이 적은 농도를 있지만 모든 나이영역별로 다 같지는 않다. 젊은 그룹(30-50대)에서는 두 그룹간에 별 차이를 보여주고 있지 않으나 50대 이후부터는(60대는 차이가 없음) 70대 또는 80대

Table 7. Concentration of selenoproteins for control group with age (years)

Age		GPx	SelP	SeAlb	Total
31-40	3	31.43±4.71	57.97±16.87	9.44±1.54	98.84±22.02
41-50	4	33.31±7.70	83.41±3.73	17.31±5.46	134.43±5.82
51-60	4	16.48±2.50	62.20±12.31	19.02±7.20	97.70±20.55
61-70	5	27.84±2.76	59.96±9.02	8.17±3.57	95.97±10.13
71-80	4	22.05±4.23	61.71±8.55	18.53±5.52	102.29±11.12
Average		26.12±7.84	65.15±14.50	14.43±6.99	105.70±21.20

Table 8. Concentration of selenoproteins for stomach cancer group with age (years)

Age		GPx	SelP	SeAlb	Total
31-40	2	25.94±1.73	61.29±19.06	6.21±1.55	93.44±32.34
41-50	2	26.87±1.45	77.45±3.85	22.98±1.69	127.30±4.08
51-60	4	6.72±1.19	44.15±12.27	10.92±2.84	61.79±15.23
61-70	5	19.76±3.37	56.34±16.60	8.46±1.47	84.55±18.67
71-80	4	11.70±7.09	43.09±12.10	6.98±4.00	61.77±17.33
81-90	3	10.07±4.52	36.13±8.95	8.39±0.66	54.59±13.97
Average		15.41±9.01	50.83±17.91	9.87±5.21	76.11±28.12

average±SD, concentration in  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (20 sample, 2 runs for each sample)

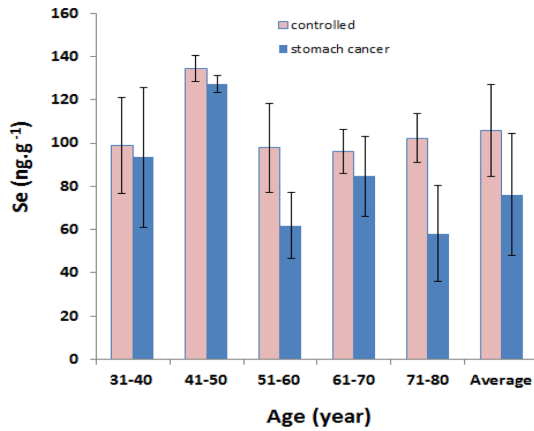


Fig. 2. Comparison of total selenoproteins in blood serum for controlled and cancer groups with age.

에서는 매우 큰 차이를 보여주고 있다. 특히 암환자 그룹에서 나이가 들수록 셀레늄의 양은 매우 감소하고 있다. 물론 아직은 시료의 숫자가 크지 않은 경우이므로 확실한 결론을 내리기에는 무리라고 할 수 있으나 나이별로 다른 차이를 보여주는 것은 시사하는 바가 크다고 할 수 있겠다.

#### 4. 결론 및 제언

본 연구에서는 AF HPLC와 ICP/MS를 결합하여 대표적인 생체 시료인 혈청 시료에서 셀레노단백질을 분리하고 정량하였다. 기존의 방법과 다르게 SPE를 사용하여 음이온 매트릭스를 제거하지 않고 <sup>78</sup>Se을 모니터링하여 비교적 간단하게 검정곡선법으로 정량하여 보았다. 차 후에는 SPE를 사용하고 동위원소 회석법을 적용시킨 엄격한 정량분석법으로 연구하여 둘의 결과를 비교하는 것도 의미 있다고 생각된다. 무엇보다 본 연구를 통해 얻은 결과는 앞으로 건강한 한국인에 대하여 혈청에서의 셀레노 단백질의 기초값으로 사용될 수 있을 뿐 아니라 한국인의 위암을 진단하는데 사용될 수 있는 가능성을 열었다 할 것이다. 앞으로 셀레노 단백질을 biomarker로 이용한 다양한 암의 진단 및 기타 질병의 기초진단에도 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

#### 감사의 글

위암환자 혈청을 제공하여 주신 전남대학교 화순병원 인체자원단위은행과 순환기질환 혈청을 제공하여 주신 경북대학교병원 인체자원단위은행에 감사드립니다.

#### References

1. J. T. Daegen, M. A. Beilstein and P. D. Whanger, *J. Inorg. Biochem.*, **41**, 261-271 (1991).
2. H. Koyama, K. Omura, A. Ejima, Y. Kasanuma, C. Watanabe and H. Satoh, *Anal. Biochem.*, **267**, 84-91 (1999).
3. L. H. Duntas, *Thyroid*, **16**(5), 455-460 (2006).
4. M. H. Borawska, K. Socha, B. Lazarczyk, E. Czyżewska, R. Markiewicz and B. Darewicz, *Nutr. Cancer*, **61**(5), 629-633 (2009).
5. W. C. Hawkes and Z. Alkan, *Biol. Trace Elem. Res.*, **134**, 235-251 (2010).
6. P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann and P. Fisticaro, *Anal. Chim. Acta*, **657**, 100-107 (2010).
7. B. Mukherjee, M. Basu and M. Chatterjee, *Eur. J. Cancer Prev.*, **10**, 347-355 (2001).
8. B. Hollenbach, N. G. Morgenthaler, J. Struck, C. Alonso, A. Bergmann and J. Kohrle, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **22**, 24-32 (2008).
9. C. D. Davis, P. A. Tsuji and J. Milner, *Annu. Rev. Nutr.*, **32**, 73-95 (2012).
10. U. Schweizer, F. Streckfuss, B. A. Pelt, P. Carlson, D. L. Hatfield and J. Kohrle, *Biochem J.*, **386**, 221-226 (2005).
11. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington DC, 2000.
12. H. Meyer, B. Hollenbach, C. Stephan, T. S. Endermann, N. Morgenthaler, H. Cammann, J. Kohrle, K. Jung and L. Schomburg, *AACR*, **1158**, 1055-9965 (2009).
13. H. Meyer, T. Endermann, C. Stephan, M. Stodter, T. Behrends, I. Wolff, K. Jung and L. Schomburg, *PLoS ONE*, **7**(10), e46644 (2012).
14. B. A. Muzembo, N. Dumavibhat, N. R. Ngatu, M. Eitoku, R. Hirota, S. Kondo, Y. Deguchi, Y. Saito, K. Takahashi and N. Suganuma, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **27**, 40-44, (2013).
15. M. Roman, P. Jitaru, M. Agostini, G. Cozzi, S. Pucciarelli, D. Nitti and C. Bedin, *Microch. J.*, **105**, 124-132 (2012).
16. M. Roman, P. Jitaru and C. Barbante, *Metallomics*, **6**, 25-54 (2014).
17. J. Ahn, H. Kwon and Y. Pak, *Anal. Sci. Tech.*, **27**(2), 92-99 (2014).

18. J. Jeong, J. Lee and Y. N. Pak, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **34**(12), 3817-3824 (2013).
19. H. Y. Jang, H. Min, J. Lee and Y. N. Pak, *Anal. Sci. Tech.*, **26**(3), 182-189 (2013).
20. S. H. Song, K. Song, S. Lee and C. Kim, *Kor. J. Urol.*, **47**, 150-153 (2006).
21. H. T. Doo, 'The relationships between serum selenium level and papillary thyroid carcinoma in Korean' M. S. Thesis, Ulsan University (2012).