

Original Article

Plasma renin activity 검사의 검체 보관 방법이 방사면역 측정법 결과에 미치는 영향에 대한 고찰

서울아산병원 핵의학과

최진주 · 백송란 · 유선희 · 이선호

A Study on the Effect of Sample Storage Condition on the RIA Results of Plasma renin activity Test

Jin-joo Choe, Song-ran Back, Seon-hee Yoo and Sun-ho Lee

Department of Nuclear Medicine, ASAN Medical Center, Seoul, Korea

Purpose Plasma renin activity (PRA) test is important for the diagnosis of primary aldosteronism. PRA is an easily deformed substance in vitro and affected by temperature changes. Laboratory of ASAN medical center has consistently found that there was a difference between the initial and re-experimental results. We compared and analyzed the differences in PRA test results according to the sample storage status.

Materials and Methods The measurement of PRA was performed by using the radioimmunoassay. From August to September 2020, 43 PRA re-test samples were tested with different sample storage condition. The first group was re-examined by freezing the plasma-separated samples at -18°C , and the second group was re-examined with refrigerated EDTA sample. Also, additional tests were conducted on 13 PRA samples to verify the effect on thawing temperature differences in plasma-separated samples. The same samples were divided into two parts and stored frozen at -18°C , respectively, and thawing samples in room temperature and those in refrigerator were conducted. Each result was compared and analyzed based on the initial experimental results.

Results The results of re-examination after frozen storing plasma separation samples showed a lower correlation than the results of re-examination with EDTA plasma samples in refrigerator. When calculating the percentage based on the initial test results, the average percentage of each was 404.9% and 133.8%. The correlation coefficient was also $R=0.8501$ and $R=0.9966$, respectively, showing a higher correlation between plasma in the refrigerated sample EDTA tube. In comparison experiments with differences in thawing temperature, average percentage of the results of initial test and room temperature thawing was 94.3% and the average percentage of the results of refrigerated thawing was 88.0%. After again freezing the sample, the average percentage of the second room temperature thawing result is 107.5%, and the second refrigerated thawing group is 112.7%. Both groups showed an increase from first thawing.

Conclusion A comparative analysis of retesting according to differences in sample storage methods in PRA tests showed a higher correlation between the results of retesting of the refrigerated EDTA plasma. And repeated freezing and melting of plasma separation samples, regardless of temperature during defrosting, has been shown to affect results. Therefore, retest of PRA should re-collect plasma from original EDTA plasma to increase reproducibility.

Key Words Radioimmunoassay, Plasma renin activity

서론

- Received: April 23, 2021 Accepted: April 30, 2021
- Corresponding author: **Jin-joo Choe**
- Department of Nuclear Medicine, ASAN Medical Center, Seoul, Republic of Korea
- Tel: +82-2-3010-4575
- E-mail: choejinjoo9511@gmail.com

레닌은 혈압과 체액의 부피를 조절하는 Renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system 에서 분비되는 단백질 효소이다. 레닌은 신장의 방사구체세포에서 합성되며 혈액의 삼투압 증

가나 혈장 저하에 반응하여 분비된다. 레닌은 간에서 분비되는 angiotensinogen을 angiotensin I 으로 절단하며, 생성된 angiotensin I 은 안지오텐신전환효소(Angiotensin converting enzyme, ACE)에 의해 angiotensin II 로 전환된다. angiotensin II 는 생물학적 활성이 있는 상태로 혈관 근육과 부신 피질, 신장의 사구체 등에 작용하는데, 말초 혈관 근육의 수축을 증가시키고 알도스테론의 합성을 증가시켜 나트륨 및 물의 재흡수를 촉진시킨다¹⁾. 이후 angiotensin II 는 말초 조직의 안지오텐신 분해효소에 의해 비활성화 된다.

방사면역측정법 (Radioimmunoassay)에서 혈장레닌활성도(Plasma renin activity, PRA)의 측정은 angiotensin I 의 생성률을 측정하는 원리를 이용한다. 저해제는 ACE를 억제하여, angiotensin I 에서 angiotensin II 로의 전환을 막고, plasma renin과 기질을 일정시간 반응하여 angiotensin I 을 생성한다. 이때 생성되는 angiotensin I 의 제한요인(rate-limiting factor)은 혈장 내 레닌의 농도 변화를 반영한다¹⁾. 결과적으로, 방사면역측정법에서는 angiotensin I 의 생성을 측정함으로써 간접적으로 혈장레닌활성도를 측정하게 된다.

PRA는 이차성 고혈압의 원인 중 하나인 일차성 알도스테론증(primary aldosteronism, PA)의 선별 검사로 이용된다. PA는 저레닌, 고알도스테론증을 동반한 고혈압을 특징으로 하며, 완치가 가능한 고혈압 질환 중 하나이다²⁾. PA의 선별 검사로서 Aldosterone-renin ratio (ARR)가 이용되고, 아침 기립

2시간 이내에 혈장알도스테론(plasma aldosterone concentration, PAC)과 PRA를 동시에 측정한다. PA일 경우, ARR이 20 이상 {PAC : [ng/dL], PRA : [ng/mL/hr]} 이고 PAC는 15 ng/dL 이상인 특징이 있다. 반면 본태성 고혈압 환자는 ARR이 증가하지만 PAC가 15 ng/dL 이하인 경우가 많아 고혈압의 선별 진단에 이용하고 있다³⁾.

검사실에서는 방사면역측정법을 이용한 PRA 검사의 최초의 실험 결과와 재검사 결과에 차이가 있음을 지속적으로 발견하였다. 혈장의 레닌은 온도 변화에 민감한 물질로 알려져 있는데, 본 연구에서는 혈장레닌활성도 결과의 차이가 검체 보관 온도에서 기인한 것인지 알아보고, 검체의 보관 온도 및 해동 온도에 따른 결과 변화를 확인하였다. 또한 검사의 정확성과 재현성을 높일 수 있는 검체 보관 방법을 수립하고 정확한 검사를 위한 지침을 마련하고자 하였다.

검사 대상 및 방법

1. 검체 보관에 방법 대한 재검사 결과 비교

(1) 대상

2020년 8월부터 9월까지 서울아산병원에 의뢰된 PRA 검체 중 재검사 검체 43건을 대상으로 하였다.

Table 1. Procedure of PRA assay

Procedure	Standard	Control	Sample
Tube No.	1~6	7~8	9~
Control(μL)		25	
Sample(μL)			25
Enzyme reaction	Add 25 μL generation buffer and Mix Incubate 37°C water bath for 90 min(no shaking)		
Standard(μL)	50		
1 st day	Maintain 2~8°C using ice maker		
	Add 200 μL Angiotensin I Tracer(I-125)		
	Add 200 μL Angiotensin I 1st Ab and Mix		
	Incubate at 2~8°C for 16~24 hours(no shaking)		
2 nd day	Add 100 μL Angiotensin I 2st Ab		
	Add 100 μL polyethylene glycol solution and Mix		
	Incubate at 2~8°C for 1 hour (no shaking)		
	Centrifuge 2000g at 2~8°C for 20 min		
	Aspirate supernatant liquid		
	Count gamma counter for 1 min		

(2) 비교 방법

0.20~15.3 ng/mL/hr의 농도를 가진 PRA 검사 검체의 보관 방법에 차이를 두었다. 첫 번째 실험군은 실험이 끝난 혈장 분리 자검체(aliquoting specimen)를 다시 냉동 온도(-18℃)에 보관하고, 검사 시작 3시간 전에 실온 해동하여 재검사를 실시하였다. 두 번째 실험군은 냉장 온도(4~8℃)에 보관된 원검체 EDTA tube에서 혈장을 다시 채취하여 재검사를 실시하였다. 최초의 검사 결과를 기준으로 두 실험군의 재검사 결과를 비교 분석하였으며, Bland-altman plot과 회귀 분석을 이용하였다.

(3) 검사 방법

방사면역측정법을 사용하는 Fujirebio사의 kit를 사용하였다. PRA 검사의 절차는 다음과 같다. 플라스틱 튜브에 control 과 sample을 25 μ L 분주한 뒤 generation buffer 25 μ L 분주한다. 37℃ water bath에서 90분간 반응하여 효소반응 단계를 가진다. 효소반응이 끝난 튜브를 바로 얼음 위로 올려 2~8℃를 유지한 상태로, Standard 50 μ L를 분주한다. 모든 튜브에 Angiotensin I Tracer 200 μ L와 Angiotensin I 1st Ab를 200 μ L 분주하고 vortex mixer를 사용해 혼합한다. 이후 2~8℃ 냉장온도에서 16~24시간 동안 반응한다. 다음날 Angiotensin I 2nd Ab 100 μ L와 PEG solution 100 μ L를 분주한다. 혼합 후 2~8℃ 냉장 온도에서 1시간 동안 반응한다. 그 후 4℃에서 20분 동안 2000g 조건으로 원심 분리한다. 원심분리가 끝난 튜브에서 상층액을 Aspiration 한 뒤, 감마카운터에서 1분간 계측한다(Table 1).

2. 검체의 해동 온도 차이에 대한 결과 비교

(1) 대상

2020년 8월 동안 서울아산병원에 의뢰된 PRA 검체 13건을 대상으로 하였다.

(2) 비교 방법

0.20~26.4 ng/mL/hr의 농도를 가진 PRA 검사 검체 13건에 대하여 검체의 해동 온도에 차이를 두어 실험하였다. 같은 검체를 두 개로 나누어 -18℃에 냉동 보관하였다. 실험 시작 전, 3시간 동안 1차 실온 해동(20~24℃)과 1차 냉장 해동(4~8℃) 하였다. 동일한 절차로 실험을 시행하고, 다시 -18℃에 냉동 보관하였다. 같은 방법으로 각각 2차 실온 해동과 2차 냉장 해동 후 실험하였다. 각각의 실험 결과를 검체를 얼리기 전 최초

의 실험 결과와 비교 분석하였다. 분석에는 회귀 분석을 이용하였다.

(3) 검사 방법

검사에 사용된 kit와 절차는 위와 동일하다.

결 과

1. 검체의 보관 방법에 대한 재검사 결과 비교

냉장 보관 원검체 EDTA tube의 혈장의 재검사 결과는 $y = 1.0594x + 0.1365$, 상관계수 $R = 0.9966(N=41)$ 였다. 혈장 분리된 자검체의 냉동 보관 후 재검사 결과는 $y = 1.2048x + 1.046$, 상관계수 $R = 0.8501(N=43)$ 으로 냉장보관 EDTA의 혈장을 재검사 시행 한 결과보다 본 실험 결과와 낮은 상관관계를 보였다(Fig. 1).

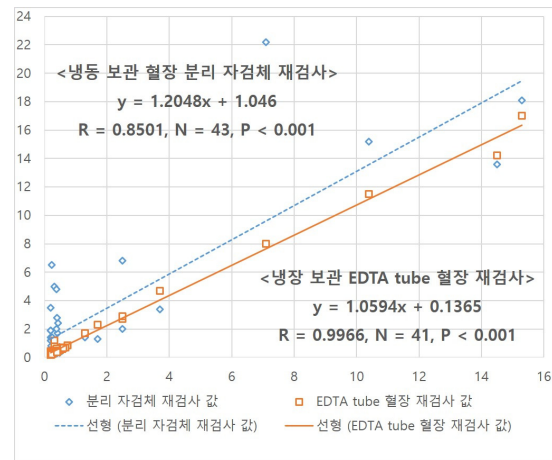


Fig. 1. The correlation between Initial test results and re-examination results.

Bland-altman plot 분석 결과에서도 재검사 결과와 본실험 결과의 차이에 대한 평균이 냉장 보관 원검체 EDTA tube의 혈장은 0.24, 냉동 보관 자검체는 1.4로 더 큰 차이를 보였다. 또한 2SD 범위가 각각 0.74, 5.3으로 냉장 보관된 EDTA의 혈장이 더 높은 재현성을 보였다(Fig. 2).

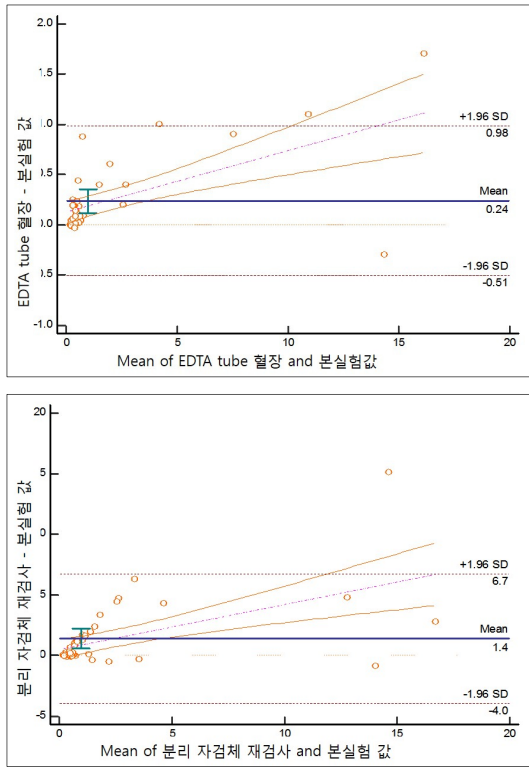


Fig. 2. The measurement value of Bland-Altman plot that compared Initial test results and Re-examination test results.

본 실험 결과를 기준으로 두 그룹의 백분율을 구해보면, 냉동 보관된 혈장 분리 자검체를 재검사한 그룹의 평균은 404.9%로 EDTA tube의 혈장을 재검사 했을 때보다 더 많이 증가하였다. 또한 평균율의 최대값은 2826%, 최소값은 70.8%로 매우 큰 차이를 보였다(Table 2).

Table 2. Percentage of Re-examination results

백분율(%)	냉동 보관 혈장 분리 자검체 재검사	냉장 보관 EDTA tube 혈장 재검사
평균	404.9	114.8
최대값	2826.1	135.3
최소값	70.8	97.9

2. 검체 해동 온도 차이에 대한 결과

본실험 결과와 1차 실온 해동 실험 결과의 회귀 분석 결과는 $y = 1.0176x - 0.2829$ ($R=0.9952$)이고, 1차 냉장 해동한 결과의 회귀 분석은 $y = 0.9518x - 0.1785$ ($R=0.9980$)였다(Fig. 3).

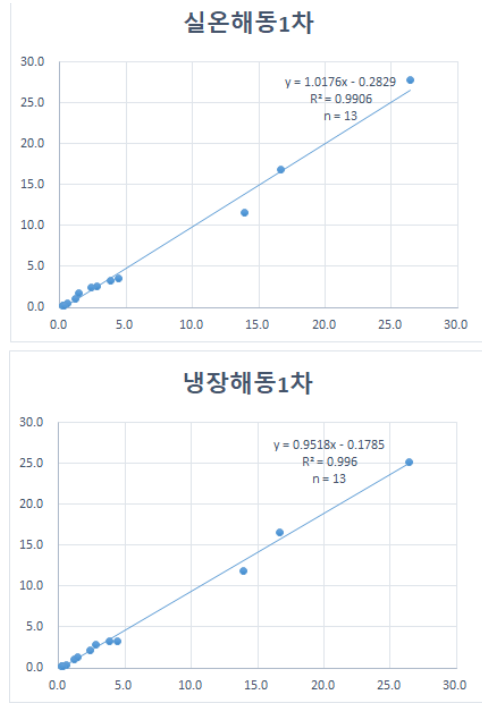


Fig. 3. The correlation between Initial test results and First thawing test results.

이후 2차 실온 해동 실험 결과의 회귀 분석 결과 $y = 0.8406x + 0.646$ ($R=0.9777$) 이고, 2차 냉장 해동한 결과의 회귀 분석 결과 $y = 1.1214x - 0.1261$ ($R=0.9962$) 였다(Fig. 4).

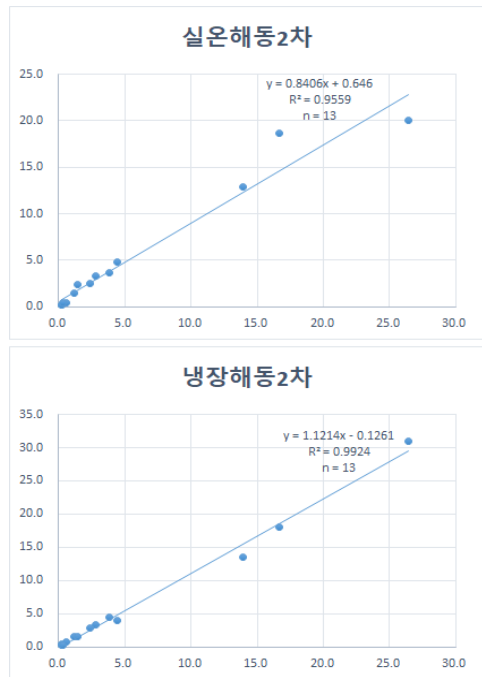


Fig. 4. The correlation between Initial test results and Second thawing test results.

본 검사와 각 검사의 백분율을 비교하였을 때, 실온과 냉장 해동 공통적으로 1차 실험 보다 2차 실험이 평균값과 최대값이 증가하였다(Table 3).

Table 3. Percentage of thawing test results

백분율 (%)	냉동보관 실온 해동		냉동보관 냉장 해동	
	1차	2차	1차	2차
평균	94.3	107.5	88.0	112.7
최대값	121.4	171.4	100.0	148.1
최소값	71.4	75.8	71.4	71.4

결 론

본 연구를 통해 검체의 보관 방법은 RPA 검사 결과에 영향을 미치며, 해동 온도는 검사 결과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 해동 온도에 관계없이 혈장 분리 자검체의 반복적인 얼림과 녹임이 PRA 검사 결과에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 PRA 검사의 재검사를 위하여, 냉장 보관 중인 원검체 EDTA tube에서 다시 혈장을 채취하여 검사하는 것이 검사 결과의 오차를 줄이고 재현성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

고 찰

본 연구에서는 냉장보관 원검체인 EDTA tube에서 채취한 혈장의 결과가 재현성이 높다는 것을 알 수 있었다. 추후, PRA 검사 결과의 재현성이 높은 원인이 원검체 EDTA tube의 안정성 때문인지 또는 자검체의 냉동보관보다 냉장보관이 검체의 안정성을 높이는 것인지 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구의 한계점으로, 포함된 검체의 수가 적고 농도의 분포가 고르지 못하였으므로, 지속적인 결과의 관찰과 PRA 검사의 특이값 유무에 대해 확인할 필요성이 있다.

요 약

PRA 검사는 치료 가능한 고혈압 질환 중 하나인 일차성 알도스테론증의 선별 진단에 이용되는 검사 중 하나이다. 혈장의 레닌은 체외에서 변형이 쉬운 물질이며 온도 변화에 민감한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 검체의 보관온도와 해동온도에 차이를 두어 각각의 결과 차이를 비교 분석하고, PRA 검사의 정확한 결과 보고를 위한 지침의 마련과 재현성을 높일 수 있는 방안을 마련하고자 하였다.

본원에 의뢰된 PRA 검체 43건에 대하여 냉동보관 혈장 분리 자검체와 냉장보관 EDTA tube의 혈장을 재검사 실시하였다. 본검사를 기준으로 회귀분석과 bland-altman plot, 백분율을 비교하여 결과를 분석하였다. 또한, 해동온도에 따른 결과 비교를 위하여 PRA 검체 13건에 대하여 각각 실온해동과 냉장해동을 실시하였다. 실험을 마친 뒤, 다시 얼리고 2차 실온해동과 냉장해동을 실시하여 본검사를 기준으로 결과를 회귀 분석하였다.

혈장 분리된 자검체 재검사를 시행한 결과는 $y = 1.2048x + 1.046$ ($R=0.8501$, $n=43$)이며, 냉장보관 EDTA tube의 혈장으로 재검사한 결과는 $y = 1.0594x + 0.1365$ ($R=0.9966$, $n=41$)였다. Bland-altman plot에서 본실험과 차이에 대한 평균이 EDTA tube 혈장 재검사한 결과가 0.24, 냉동보관 자검체 재검사한 결과가 1.4로 냉장 보관 EDTA tube의 혈장이 높은 상관관계를 나타내었다.

해동온도에 차이를 두고 비교실험 한 결과, 1차 실온해동한 결과보다 2차 실온해동한 결과의 평균 백분율이 증가한 것으로 나타났다. 동일하게, 1차 냉장해동 결과보다 2차 냉장해동 결과의 평균 백분율이 증가하였다.

본 연구를 통해 PRA 검체의 보관 방법과 해동 온도에 따른 결과변화를 비교 분석한 결과, 냉장 보관된 원검체 EDTA tube 혈장의 재검사 결과가 더 높은 상관관계를 나타내었다. 또한, 해동 시 온도에 상관없이 혈장분리 자검체의 반복적인 얼림과 녹임이 PRA 결과에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 PRA의 재검사 시에는 냉장 보관 중인 원검체 EDTA tube에서 혈장을 다시 채취하여 검사하는 것이 검사 결과의 오차를 줄이고 재현성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kim KH, Lee SJ, Kim SK. Renin-Angiotensin-Aldosterone System (Radioimmunoassay), *The Korean Journal of Internal Medicine* 1974;17(11):819-820
2. Kim HS, Kwon WH, Moon KC, Lee IW. Diagnosis of Primary Aldosteronism and Usefulness of Aldosterone/Renin Ratio in Secondary Hypertension. *J Nucl Med Technol* 2008;12(3):241-242
3. Kim SW, Primary Aldosteronism, *Korean J Med* 2012; 82(4):396-400