

대장암의 복수와 이차원전기영동 검사

장 원 영

제주대학교 의학전문대학원 외과학교실

Abstract

Examination of Colorectal Cancer Patient's Asciter by 2D-Electrophoresis

Weon-young Chang

Department of Surgery, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Cellular signaling pathways are changed by genetic aberrations which result in many diseases. These changes can be detected as altered cellular protein profiles in the body fluid. The tissue interstitial fluid (TIF) is the major target for clinical chemistry to quantitatively detect these changed protein profiles using modern proteomic techniques. But the limitation is the marked 1000-1500-fold dilution of body fluid proteins, during their passage from TIF to the circulatory system. Here, we use ascites to find out the possibility as a sample of TIF. This method can be used to understand colorectal cancer patients and utilized to design protein biomarkers for early detection of disease. (J Med Life Sci 2012;9:30-32)

Key Words : Colorectal Cancer, Ascites, 2D-Electrophoresis

서 론

암 환자는 8-25%에서 수술 중 복수가 관찰된다¹⁾. 악성 종양과 관련된 복수는 혈액 중의 액체성분의 일부가 혈관벽으로부터 누출된 것으로서 누출액은 삼출액보다 비중이 작고 단백질의 함유량이나 세포성분이 적은 투명액체지만 질환에 따라서는 혈성인 경우도 있다. 또한 복수에는 조직간액(tissue interstitial fluid)이 흘러나와 악성종양 세포와 수용성 성장인자 등이 축적되어 있다고 알려져 있고, 악성 복수는 악성종양의 성장과 조직 침투를 조장할 수 있다는 증거들이 있다. 따라서 악성 복수의 단백질에 대한 연구는 악성종양의 진단과 치료에 유용한 바이오마커를 찾을 수 있는 대상으로 연구되어 오고 있다³⁾. 그러나 체액 안에 존재하는 알부민이나 면역 글로블린과 같은 고발현 단백질(high abundance protein: HAP)이 존재하기 때문에 의미 있는 저발현 단백질(low abundance protein: LAP)을 발굴하기가 쉽지 않다. 혈청이나 세포의 바이오마커의 후보 단백질을 발굴하기 위하여 최근에 이차원 전기영동(two dimensional(2-D) gel electrophoresis), 영상 분석(image analysis), 질량 분석기(mass spectrometry), 아미노산 서열 분석(amino acid sequencing), bioinformatics를 이용하는 단백질체학(proteomics) 기법이 사용되고 있다^{4,5)}. 본 연구는 그 중 가장 흔히 사용되는 이차원 전기영동 방법을 이용

대장암 환자의 복수에서 고발현 단백질과 저발현 단백질의 분포를 알아보고 바이오마커를 찾을 수 있는 가능성을 알아 보고자 했다.

대상 및 방법

2004년 12월부터 2005년 5월 말까지 제주대학교 병원에서 대장암으로 수술을 시행한 환자 중에서 연구에 동의한 32명 중 4명의 환자에서 복수를 채취했으며 혈액 오염 등이 없는 2명의 환자의 복수를 사용 이차원 전기영동 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 시행하였다. 환자에서 채취한 복수를 원심 분리하여 소형응집체(pellet) 부분과 상층액(supernatant)을 각각은 염색의 large gel과 small gel을 시행하였다.

결 과

환자의 복수를 원심분리 시킨 후 소형응집체와 상층액을 검사하면 소형 응집체에서 보다 복잡한 단백질체(proteome)가 관찰되며, Small gel에서는 보다 단순화된 결과를 얻을 수 있으며 중간에 불꽃 모양이 알부민이 관찰된다. 은 염색의 Large gel에서는 보다 높은 해상도를 얻을 수 있으며 역시 중간에 비행점시 모양의 알부민을 중심으로 각종 단백질체가 관찰되고 있다(Fig. 1).

Address for correspondence : Weon-young Chang, MD
Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : orkorea@jeju.ac.kr

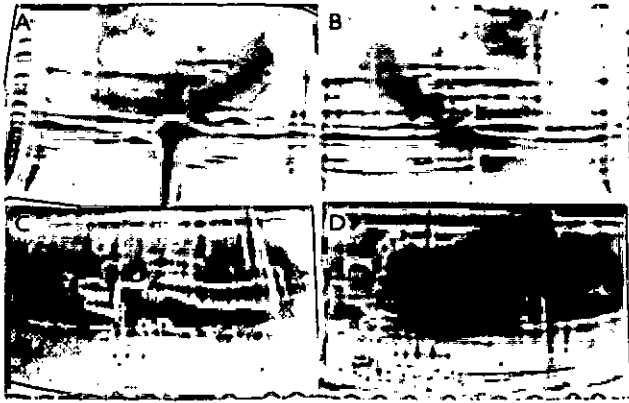


Figure 1. 2D-electrophoresis and silver staining of malignant ascites of colorectal cancer patient. The pellet and supernatant prepared from malignant ascites.

A. 2D-electrophoresis small gel for supernatant. B. 2D-electrophoresis small gel for pellet. C. 2D-electrophoresis with silver stain for supernatant. D. 2D-electrophoresis with silver stain for pellet.

고 찰

2차 전기영동 등의 단백질학 실험에서는 두 비교 집단간에 단백질 발현이 동일하다는 전제하에 진행되었다. 그러나 Simpson 등에 의하면 세포의 단백질 발현은 그 발생 단계에 따라서 차이가 있을 수 있다(e.g., between stem cells and differentiated progenitor cells). 제주대학교 병원 등에서 조사한 1509명의 혈장 단백질 수치는 개인간에 큰 차이를 보이고 있다(Fig. 2).

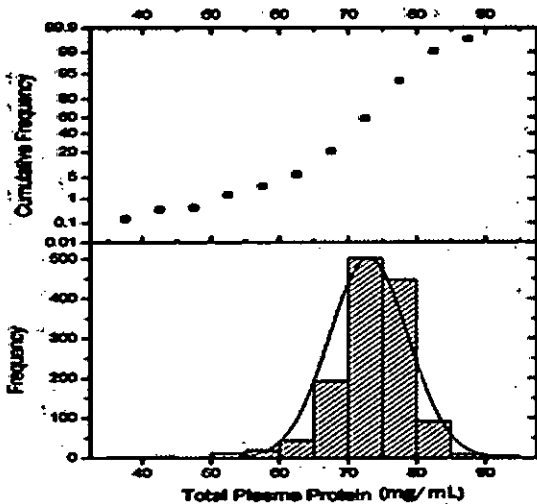


Figure 2. Distribution of total plasma protein levels in 1509 individuals. Data from patients who had either colonoscopy or surgical treatment in Cheju National University Hospital in Korea were analyzed. The large individual differences in the level of total plasma proteins as shown here need to be considered when interpreting proteomics data.

예를 들어 그림 2에서 혈장 단백질이 39 mg/mL 이며 혈청 암태아성 항원(Carcinoembryonic antigen, 이하 CEA)은 4.9 ng/ml 환자 A와 단백질은 92 mg/ml, CEA는 4.9 ng/ml인 환자 B를 비교하였을 때 현재의 임상 검사에서는 두 환자 모두 CEA가 정상으로 보고된다. 그러나 총 단백질을 기준으로 두 환자에서 동일한 92. mg을 조사한다면 환자 B는 1ml의 혈장 내에 4.9 pg의 CEA를 환자 A는 2.4ml의 혈장 내에 11.8 pg의 CEA를 포함하는 결과를 얻게 된다(Fig. 3).

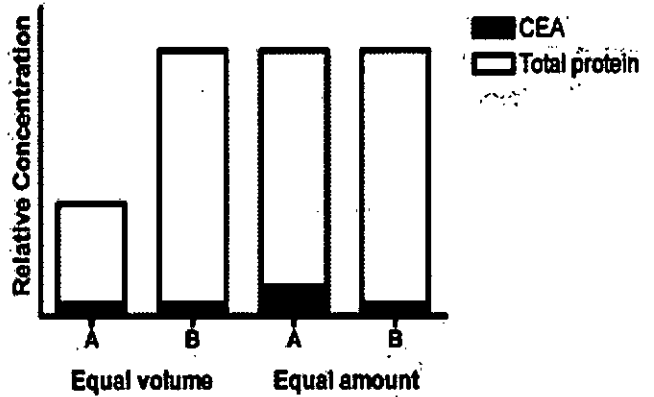


Figure 3. Quantitative proteomics analysis using equal volume of plasma vs. equal amount of total plasma protein. When the same volume of plasma from patients A and B are compared it can be seen that while total protein levels differ, CEA levels remain the same. If plasma samples containing equal amounts of total plasma proteins were analyzed instead (i.e., 92 mg of protein for each patient), it can be seen that CEA levels seemingly differ quite markedly (two-fold). The above-mentioned paradigm for plasma holds true for most body fluids.

따라서 임상 연구에서 특히 연구 대상의 수가 적을 경우 단백질 발현의 해석에 오류를 초래할 수 있다. 대장암 환자의 복수를 이용한 실험에서 이런 오류를 피하기 위해서는 동량의 체액을 비교하는 방법과 같은 비율로 조정된 체액을 비교하는 방법이 주장되었다. 체액의 전체 단백질 중에서 99%는 22종의 고발현 단백질이 차지한다. 이러한 고발현 단백질의 구성 비율 변화도 다발성 골수종 같은 질환에서 진단에 유용한 지표로 사용되고 있다. 그러나 현재 많이 활용되고 있는 CEA와 PSA(prostate specific antigen) 경우에는 저발현 단백질로 이 단백질을 효과적으로 검사하기 위해서 친화성 크로마토그래피, (biospecific affinity chromatography)나 단백질 분획화 (fractionation method) 등을 사용하지만 잠재적인 바이오마커가 고발현 단백질 제거 과정에서 유실될 가능성이 남아있다.

결 론

체액에서 유용한 바이오마커를 찾으려는 노력은 단백질학 분야의 중요한 관심 분야 중 하나이다. 그러나 노력에 비해서 실제

임상에서 미국 식품의약품안전청 승인 후 사용되고 있는 바이오 마커는 극소수이다. 그 이유 중에 하나는 고발현 단백질과 저발현 단백질을 분리하는 효과적인 방법의 부재이다. 본 실험은 복수는 혈장보다 고발현 단백질이 차지하는 부분이 적을 수 있다는 가정하에 시행되었으나 복수도 혈장과 비슷한 양상으로, 고발현 단백질을 제외한 부분의 작은 점에 해당되는 저발현 단백질의 의미를 직접 도출하기는 무리가 있으며 추가 조사가 필요하다는 결론을 얻었다.

“이 연구는 2004년도 제주대학교발전기금 효천학술연구기금의 지원에 의해서 이루어 졌음”

참 고 문 헌

- 1) Salerno F, Restelli B, Incerti P, Annoni G, Capozza L, Badalamenti S, et al. Utility of ascitic fluid analysis in patients with malignancy-related ascites. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1990;25(3):251-6.
- 2) Meunier L, Puiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Chevrette M, Tonin PN, et al. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in an epithelial ovarian cancer in vitro model. *Translational oncology*. 2010;3(4):230-8.
- 3) Ahn SM, Simpson RJ. Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery. *Proteomics Clinical applications*. 2007;1(9):1004-15.
- 4) Haslene-Hox H, Oveland E, Berg KC, Kolmannskog O, Woie K, Salvesen HB, et al. A new method for isolation of interstitial fluid from human solid tumors applied to proteomic analysis of ovarian carcinoma tissue. *PloS one*. 2011;6(4):e19217.
- 5) Kosanam H, Makawita S, Judd B, Newman A, Diamandis EP. Mining the malignant ascites proteome for pancreatic cancer biomarkers. *Proteomics*. 2011;11(23):4551-8.
- 6) Martel J, Young D, Young A, Wu CY, Chen CD, Yu JS, et al. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*. 2011;418(1):111-25.