

가와사끼병 환아의
혈청 프로테옴 지도 비교

연세대학교 대학원
의 학 과
백 승 연

가와사끼병 환아의
혈청 프로테옴 지도 비교

지도교수 김 동 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
백 승 연

백승연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

먼저 여러 가지 면에서 아직 많이 부족한 저를 옆에서 지도해 주신 김동수 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 그리고, 많은 관심을 가지고 지도와 심사를 해주신 이광훈, 최인홍 교수님께도 깊은 감사를 드리며, 소아과 전공의 과정과 대학원 과정동안 많은 가르침을 주신 여러 소아과 교수님들께도 진심으로 감사드립니다.

아울러 항상 자식 잘되기만을 기도하시는 양가 부모님께 고개숙여 감사드리고, 사랑하는 남편과 아들 상훈이에게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 또, 각자의 자리에서 항상 치열하게 살면서, 누나를 믿고 따르는 동생 상원이에게도 고맙다는 말을 전합니다.

그리고, 지금 이 순간에도 힘겨운 병마와 싸우고 있는 이 세상의 사랑스런 어린 환아들이 빨리 쾌유되어 밝게 웃으며 뛰어 다닐 수 있길 진정으로 기원해봅니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 대상 및 방법	7
1. 연구 대상	7
2. 시료 용해 및 재수화(rehydration)	7
3. 이차원 전기영동	8
4. 염색	9
5. 프로테옴 지도 분석	9
III. 결 과	11
1. 가와사끼병 환아군의 임상 양상, 임상병리 검사 소견 및 방사 선학적 검사 소견	11
2. 가와사끼병 환아군과 상기도 감염 대조군의 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 결과 비교	11
IV. 고 찰	23
V. 결 론	27
참고문헌	29
영문요약	34

표 차례

표 1. 가와사끼병 환아군의 임상 양상	13
표 2. 가와사끼병 환아군의 임상병리 검사 소견 및 방사선학적 검사 소견	14
표 3. 상기도 감염 대조군의 임상 양상 및 임상병리 검사 소견	15
표 4. 가와사끼병 환아군과 상기도 감염 대조군의 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 결과 비교	16

그림 차례

- 그림 1. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아1) 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 소견 17
- 그림 2. 상기도 감염 대조군(환아1')과 가와사끼병 환아군(환아1) 혈청의 이차원 전기영동 단백질 비교(1) 18
- 그림 3. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아2) 혈청의 이차원 전기영동 단백질 비교(2) 19
- 그림 4. 상기도 감염 대조군(환아1')과 가와사끼병 환아군(환아2) 혈청의 이차원 전기영동 단백질 비교(3) 20
- 그림 5. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아3) 혈청의 이차원 전기영동 단백질 비교(4) 21
- 그림 6. 가와사끼병 환아군에서 감소된 양상을 보인 15개의 단백질 스폿을 PDQuest (BIO-RAD)로 분석한 결과 22

국문요약

가와사끼병 환자의 혈청 프로테옴 지도 비교

가와사끼병은 1967년 일본의 Tomisaku Kawasaki에 의해 처음 보고 되었으며 주로 5세 이하의 소아에서 호발하는 전신성 혈관염으로 후천성 심장 질환의 중요한 원인으로 생각되고 있다. 현재까지 감염에 의한 가능성이 많이 제시되고 있으나 아직까지도 그 원인 및 병리생태가 밝혀지지 않은 질환이다.

최근 단백질을 양적 및 질적으로 측정하는 학문인 프로테오믹스 (proteomics)가 대두되고 있고, 이에 필요한 고해상도 이차원 전기영동과 mass spectrometry 등의 방법의 개발로 여러 질환의 원인 및 병태 생리를 찾고자 하는 노력이 있어왔다. 이에 본 연구에서는 가와사끼병 환자의 급성기 혈청으로 이차원 전기영동을 시행하여 얻은 프로테옴 지도를 통하여 가와사끼병의 원인 및 병태 생리를 찾을 수 있는 기초자료를 얻고자 하였다.

2000년 1월부터 2001년 7월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브스병원 소아과에 내원하여 임상적으로 전형적인 가와사끼병으로 진단받은 급성기 환자 5명과 발열을 주소로 내원하여 상기도 감염으로 진단받은 환자 5명을 대상으로 하였다. 환자의 혈청을 수집하여 실험 직전까지 -70°C 에 얼렸다가 해동시킨 후, 재수화 (rehydration) 하여 polyacrylamide gel에서 이차원 전기영동을 시행하였다. 염색법

으로 silver staining method를 이용하였고, GS-800 Calibrated Imaging Densitometer를 이용하여 스캐닝한 후, PDQuest를 사용하여 단백질스폿을 양적으로 측정하여 프로테옴 지도를 구하였다.

혈청 프로테옴 지도를 비교한 결과, 가와사끼병 환자군의 혈청에서 15개의 의미있는 단백질스폿의 변화가 발견되었고, 모든 경우에서 상기도 감염 대조군에 비해 감소 소견을 나타내었다. 이 중에서 분자량 91.8 kDa, 등전점 5.77의 단백질스폿과 분자량 92.4 kDa, 등전점 5.85의 단백질스폿은 각각 유사한 분자량과 등전점을 갖는 알부민의 일부로 사료되며, 분자량 76.1 kDa, 등전점 4.80의 단백질스폿, 분자량 75.0 kDa, 등전점 4.70의 단백질스폿 및 분자량 74.4 kDa, 등전점 4.70의 단백질스폿은 α -1-antitrypsin의 일부로 사료된다.

프로테오믹스를 이용한 단백질스폿들의 성분이나 유용성을 더 정확하게 알아보기 위해서 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각되며, 앞으로 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 또는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 등과 SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) 등을 이용한 방법으로 단백질의 규명 및 특성을 파악하는 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 가와사끼병, 프로테오믹스, 이차원 전기영동, 혈청 프로테옴 지도

가와사끼병 환아의 혈청 프로테옴 지도 비교

<지도교수 김 동 수>

연세대학교 대학원 의학과

백 승 연

I. 서 론

가와사끼병은 1967년 일본의 Tomisaku Kawasaki가 처음 보고한 질환으로 주로 소아에서 호발하는 전신성 혈관염이다.¹ 역학 조사에 따르면 가와사끼병 환아의 85%가 5세 이하이며, 10만 명당 120-150명의 유병률을 보이는 것으로 알려져 있다. 남아에서 1.5배 높게 발병하는 것으로 보고되어 있으며, 재발률은 4%로 비교적 낮으나 적절한 치료를 받지 못할 경우 약 20%에서 관상 동맥의 이상이 초래되는 것으로 보고되어 최근에는 후천적 소아 심장질환의 가장 중요한 원인으로 주목받고 있다.²⁻⁴

진단 기준으로는 5일 이상의 발열과 함께 양측성 안구 결막의 충혈, 상기도 점막의 변화(후두 충혈, 입술의 홍조 및 균열, 딸기혀, 구강 점막 비만성 발적), 사지 말단부의 변화(경성 부종, 손 및 발바닥의 홍반, 손가락 끝 및 항문 주위 낙설), 피부 발진, 비화농성 경부

림프절의 종창 등의 5가지 특징적 증상이 있는데, 이들 5가지 중에서 4가지 이상을 만족할 때 진단할 수 있으며, 다른 질환의 가능성이 배제된 상태여야 한다.⁵⁻⁸

가와사끼병의 병인은 아직까지 명확히 알려진 바가 없으며 몇 가지 가설만 제기된 실정이다. 감염설을 비롯하여 유전적 요인의 영향이 제기되어 왔으며, 수피 항원에 의한 기전, 일반 항원에 의한 발병론도 가와사끼병의 가능한 병인으로 알려져 왔다. 그러나, 현재까지 가와사끼병의 병인에 대한 여러 가지 가능성이 제기되고는 있지만, 아직 일반적으로 인정되는 명확한 이론은 없는 상태이다.

가와사끼병의 치료에는 면역 글로불린과 고용량의 아스피린 투여가 효과적이며 발병 10일 이내 투여시, 합병증으로 유발되는 관상동맥의 이상을 3-5%로 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 면역 글로불린은 2 g/kg을 1회 투여하거나 400 mg/kg을 4-5일간 투여하는 방법이 있으며, 전자가 좀 더 빠른 치료효과를 가져오는 것으로 보고되고 있다.^{9,10} 아스피린의 경우 80-100 mg/kg/day 또는 30-50 mg/kg/day를 투여하며 일본 등의 아시아계에서 간독성의 우려 때문에 낮은 용량을 선호하는 경향이 있는 것으로 알려져 있다.¹¹ 관상동맥 합병증의 발병을 감소와 관련된 스테로이드 치료 효과에 대해서도 계속적으로 보고되고 있는데, 면역 글로불린의 반복 투여에도 반응하지 않는 환자에 대한 methylprednisolone 투여시의 치료효과가 보고되기도 하였다.¹² 또, 치료에 반응이 없는 경우 저용량의 methotrexate를 투여하기도 하는데,¹³ 치료효과의 면에서는 연구가 많이 이루어져 있지 않은 실정이다.

1995년 최초의 살아있는 생물체에 대한 전체 게놈이 밝혀진 이후

유전자 정보가 다양한 질환의 진단이나 병인 규명에 도움을 줄 것이라 생각하였으나, 유전자의 기능을 알아내는 데에는 부족한 부분이 노출되어 결국 mRNA를 분석하는 트랜스크립토믹스 (transcriptomics)와 단백을 분석하는 프로테오믹스 (proteomics)가 함께 요구되었다.^{14,15} 최근 인간 게놈 서열 해독 (human genome sequencing projects)이 완성되어 감에 따라 인간 유전체의 기능을 분석하는 기능적 유전체 시대 (functional genomic era)를 맞이하고 있는데, 이에 따라 유전자의 기능을 밝히는 데에 가장 적합한 프로테오믹스 (proteomics)에 대한 연구가 활발히 시도되고 있다.

프로테오믹스는 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis)을 이용하여 단백을 분석하고, 이를 여러 가지 분석 도구들을 이용하여 단백을 확인하는 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로테오믹스 지도는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석된다.¹⁶⁻¹⁸

이차원 전기영동은 25년 전 O'Farrell¹⁹에 의해 처음 기술된 방법으로 단백혼합물을 등전점 (isoelectric point)과 분자량에 의해 분리한 뒤, 단백을 양적과 질적으로 동시에 분석하는 기술로 최근에는 고해상도 이차원 polyacrylamide gel 전기영동 (high resolution 2D-PAGE)이 단백의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 이러한 프로테오믹스 기법을 통해 특정 질환에 대해 단백질 세포 내에서 변형되는 과정을 알 수 있어 조기 진단의 생화학적 표지자 (biomarker) 발견, 치료 약물에 대한 새로운 표적 단백 규명,

치료의 효과 및 독성 파악에 널리 이용되고 있다.^{20,21}

가와사끼병 환아에게 면역 글로불린을 투여시 증상이 호전됨은 이미 널리 보고되고 임상적으로도 이용되고 있는데 이는 가와사끼병 발병시 알려지지 않은 독성 물질이 생성되고 면역 글로불린이 이에 대해 해독 작용을 하는것으로 치료 효과를 유발할 가능성을 제시한다. 한편으로 가와사끼병 환아에게 일반 상기도 감염시와는 다른 혈청 항원이 존재할 가능성도 고려되어야 할 것이며 아직까지 명확한 원인이 밝혀지지 않은 가와사끼병에서 프로테오믹스 기법을 이용하여 질병의 진행과정에서 표현되는 단백질에 대한 분석을 시행하여 특정 독성물질이나 혈청 항원을 찾을 수 있다면, 가와사끼병의 원인과 병인에 대한 이해 및 임상적인 진단과 치료에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 상기도 감염환아와 가와사끼병 환아의 혈청에 대해서 이차원 전기영동을 이용한 프로테옴 지도를 분석하여 가와사끼병에 특이적인 단백을 규명하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 연구 대상

2000년 1월 1일부터 2001년 7월까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 소아과에 내원하여 임상적으로 전형적인 가와사끼병으로 진단받은 급성기 환자 5명을 대상으로 진단의학검사와 방사선학적 검사를 시행하였고, 과거력과 가족력을 조사하였다. 가와사끼병의 진단 기준은 5일 이상의 발열과 다음 5가지 중 4가지 이상을 만족하는 경우-양측성 결막의 충혈, 상기도 점막의 변화, 상하지 말단부의 변화, 발진, 경부 림프절 종대-로 하였다.⁵⁻⁸ 다른 질환의 과거력이나 가족력을 동반하지 않고, 발열을 주소로 내원하여 상기도 감염으로 진단받은 환자 5명을 대조군으로 정하였다.

가와사끼병 환자와 상기도 감염 대조군 환자에서 각각 10 mL의 혈액을 채취하여 15 mL 시험관에 보관하였고, 상온에서 6시간 이상 방치하여 응고시켰다. 이후 250 × g으로 10분간 원침하여 혈청을 분리시킨 다음 실험에 들어가기 전까지 -70°C에 동결 보관하였다.

2. 시료 용해 및 재수화(rehydration)

-70°C로 냉동 보관한 혈청 중 2.5 μ L를 pH 8.0의 1M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiotreitol이 함유된 용해완충

액 50 μL 와 섞은 뒤 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체 시료를 7M urea, 2M thiourea, 2 mM tributyl phosphine, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-]-1-propane-sulfonate, 1.0% carrier ammpolyte, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye 등이 함유된 젤 전기영동 시료 완충액 400 μL 와 혼합하여 희석한 후, 이를 다시 20°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 재수화 tray에 젤 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 400 μL 을 넣고, 18 cm의 pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24시간 방치하여 재수화시켰다.

3. 이차원 전기영동

재수화된 IPG strip은 IPG-phor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 저전압으로부터 서서히 올려 등전화 (isoelectric focusing:IEF)시키고, 이후 3.6g urea, 2% SDS, 5M Tris 2 mL, 50% glycerol 4 mL, 25% acrylamide 1 mL, 200 mM MTBP 250 μL 가 함유된 동질 완충액에서 25분간 동질화 (equilibration)시켰다.

1.875M Tris buffer가 함유된 9% 완충액 40 mL, 40% stock acrylamide 45 mL, 증류수 115 mL를 혼합하고, 16% buffer 40 mL, 40% stocg acrylamide 80 mL, 50% glycerol 80 mL를 혼합하여 9-16% gradient polyacrylamide gel (21 cm \times 21 cm \times 1.5 mm)을 제작하였다. 이 젤에 0.5% agarose, 0.001% bromophenol blue dye

가 함유된 agarose 완충액을 넣고 IPG strip을 embedding시킨 후에 24.8 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS가 포함된 cathode running buffer를 넣었다. SDS-PAGE는 3 mA/gel의 전류로 2시간 prerun 시행 후, 15 mA/gel의 일정한 전류 하에서 전기영동을 시행하였다.

4. 염색

전기영동을 시행한 polyacrylamide gel을 modified silver stain 방법을 이용하여 염색하였다. 먼저 acetic acid 50 mL, methanol 200 mL, 증류수 250 mL로 15분씩 2회 고정 후, methanol 150 mL, 5% sodium thiosulfate 20 mL, sodium acetate 34g, 증류수 330 mL로 30분간 감작시켰다. 10분간 3회 세척 후, 2.5% silver nitrate 50 mL와 증류수 450 mL를 넣고, 1분씩 2회 더 세척하였다. 세척된 젤을 sodium carbonate 12.5g, formaldehyde 200 μ L, 증류수 500 mL로 발색시키고, EDTA 7.3g, 증류수 500 mL로 발색 중단 후, 다시 증류수 500 mL로 5분씩 3회 세척을 시행하였다.

5. 프로테옴 지도 분석

염색이 끝난 후 가와사끼병 환아군 및 상기도 감염 환아들(대조군)의 혈청의 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD, Munich, Germany)를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. 검색된 단백질 스폿을

PDQuest (BIO-RAD)를 이용하여 양적으로 측정하여 각 군의 프로테옴 지도를 얻었다.

가와사끼병 환자군과 대조군을 비교한 후, Student's t test를 이용하여 통계학적으로 의미있게 감소하거나 증가한 단백질 성분의 등전점 (pI)과 분자량 (molecular weight, M.W.)을 비교분석하였는데, p 값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 가와사끼병 환아군의 임상 양상, 임상병리 검사 소견 및 방사선학적 검사 소견

가와사끼병 환아는 남자 3명, 여자 2명으로 총 5명이었으며, 평균 연령은 39개월이었다. 모든 환아는 임상 증상으로 가와사끼병의 진단 기준에 부합하여 진단되었으며, 입원 당시의 진단의학검사상 일반혈액검사서 백혈구 증가, 혈소판 증가, 혈침 속도 항진, CRP 양성 소견을 보였으며, 일반화학검사서 SGOT와 SGPT는 증가 소견을 나타내었다. 상기도 감염 대조군은 마찬가지로 남자 3명, 여자 2명으로 총 5명이었으며, 평균 연령은 37개월이었다. 일반혈액 검사상 검사상 가와사끼병 환아군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, 일반화학검사 결과는 모두 정상이었다. 두 군 모두 요검사서 단백뇨, 농뇨 등의 이상 소견을 보이지는 않았으며, 복부초음파 검사나 심초음파 검사상 정상 소견을 보였다(표 1, 2, 3).

2. 가와사끼병 환아군과 상기도 감염 대조군의 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 결과 비교

가와사끼병 환아군의 혈청을 이용하여 시행한 이차원 전기영동 결과를 PDQuest의 Student's t test로 분석한 결과, 총 15개의 단백

스팟이 상기도 감염 대조군에 비하여 의미있게 감소되었다(표 4).

분자량/등전점이 각각 76.1 kDa/3.80 (A), 75.0 kDa/4.70 (B), 74.4 kDa/4.70 (C), 66.3 kDa/5.77 (D), 91.8 kDa/5.77 (E), 125.5 kDa/5.84 (F), 92.4 kDa/5.85 (G), 83.8 kDa/6.09 (I), 77.0 kDa/6.26 (J), 76.8 kDa/6.39 (L), 103.4 kDa/6.49 (M), 126.5 kDa/6.40 (N), 122.9 kDa/6.74 (O)인 13개의 단백질스팟은 4명 (100%)의 가와사끼병 환아 모두에서 상기도 감염 대조군에 비해 감소 소견을 보였고, 분자량/등전점이 35.3 kDa/6.18 (H), 28.5 kDa/6.68 (K)인 2개의 단백질스팟은 3명 (75%)의 가와사끼병 환아군의 혈청에서 상기도 감염 대조군보다 의미있는 감소를 나타내었다(그림 1, 2, 3, 4, 5, 6).

표 1. 가와사끼병 환아군의 임상 양상

환자	성별	나이 (개월)	5일 이상 의 발열	결막 충혈	상기도 점 막의 변화	상하지 말 단부 변화	부정형 발진	경부 림프 절 종대
1	남	30	+	+	+	+	+	+
2	남	47	+	+	+	+	+	+
3	여	36	+	+	+	+	+	-
4	남	45	+	+	+	-	+	+
5	여	37	+	+	+	+	+	+

표 2. 가와사끼병 환아군의 임상병리 검사 소견 및 방사선학적
검사 소견

환자	백혈구 ($10^3/\mu\text{L}$)	혈소판 ($10^3/\mu\text{L}$)	ESR ¹ (mm/hr)	CRP ² (mg/dL)	SGOT ³ (IU/L)	SGPT ⁴ (IU/L)	U/A ⁵	복부초음파 검사	심초음파 검사
1	18.7	467	45	10.8	86	85	정상	정상	정상
2	21.3	565	32	8.3	95	120	정상	정상	정상
3	17.7	362	28	2.5	102	95	정상	정상	정상
4	19.5	437	19	2.7	89	94	정상	정상	정상
5	16.8	506	42	14.9	77	86	정상	정상	정상

¹ ESR 정상치 0-15 mm/hr

² CRP 정상치 0-0.8 mg/dL

³ SGOT 정상치 5-45 IU/L

⁴ SGOT 정상치 5-45 IU/L

⁵ Urinalysis

표 3. 상기도 감염 대조군의 임상 양상 및 임상병리 검사 소견

환자	성별	나이 (개월)	발열	백혈구 ($10^3/\mu\text{L}$)	혈소판 ($10^3/\mu\text{L}$)	SGOT ¹ (IU/L)	SGPT ² (IU/L)	U/A ³
1'	여	36	+	13.8	389	34	35	정상
2'	남	32	+	10.2	452	24	31	정상
3'	여	45	+	12.7	298	29	40	정상
4'	남	42	+	11.7	396	40	36	정상
5'	남	30	+	9.9	463	39	37	정상

¹ SGOT 정상치 5-45 IU/L

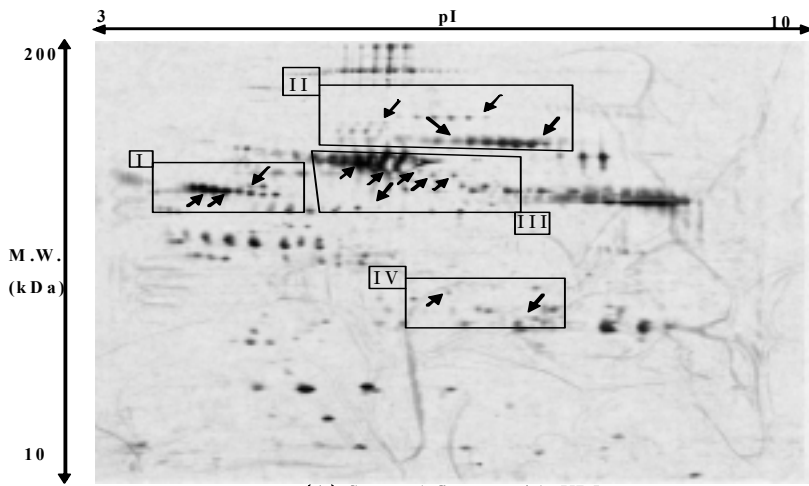
² SGOT 정상치 5-45 IU/L

³ Urinalysis

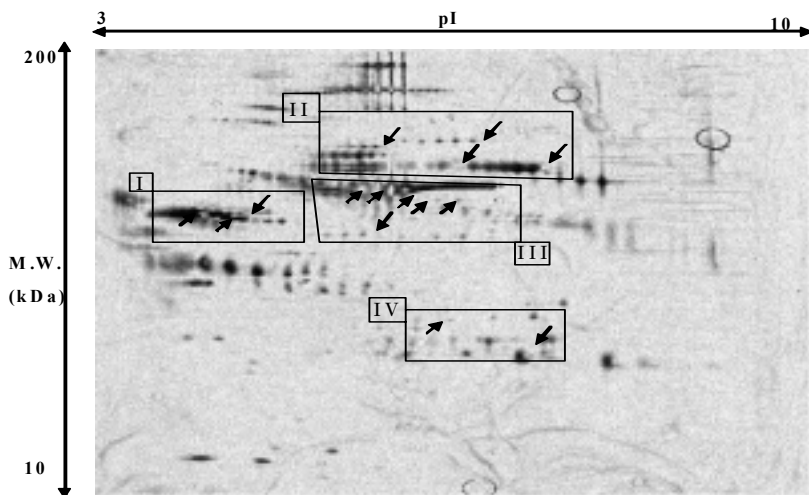
표 4. 가와사끼병 환자군과 상기도 감염 대조군의 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 결과 비교

단백스팟	분자량 (kDa)	등전점 (pI)	변화를 보인 환자수(%)	변화*
A	76.1	4.80	100	감소
B	75.0	4.70	100	감소
C	74.4	4.70	100	감소
D	66.3	5.77	100	감소
E	91.8	5.77	100	감소
F	125.5	5.84	100	감소
G	92.4	5.85	100	감소
H	35.3	6.18	80	감소
I	83.8	6.09	100	감소
J	77.0	6.26	100	감소
K	28.5	6.68	80	감소
L	76.8	6.39	100	감소
M	103.4	6.49	100	감소
N	126.5	6.40	100	감소
O	122.9	6.74	100	감소

* 감소, 증가 소견은 대조군에 비해 가와사끼병 환자에서 감소 또는 증가되었음을 의미함.



(A) Control Group with URI



(B) Kawasaki Disease Patient 1

그림 1. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아1) 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 소견. 상기도 감염 대조군과 비교하여 가와사끼병 환아군에서 모두 15개의 단백질스팟에서 변화가 관찰되었으며, 모두 감소 소견을 나타내었고, 이를 블록 I, II, III, IV로 표시하여 각각의 블록에서 화살표로 나타내었다.

(M.W.: molecular weight)

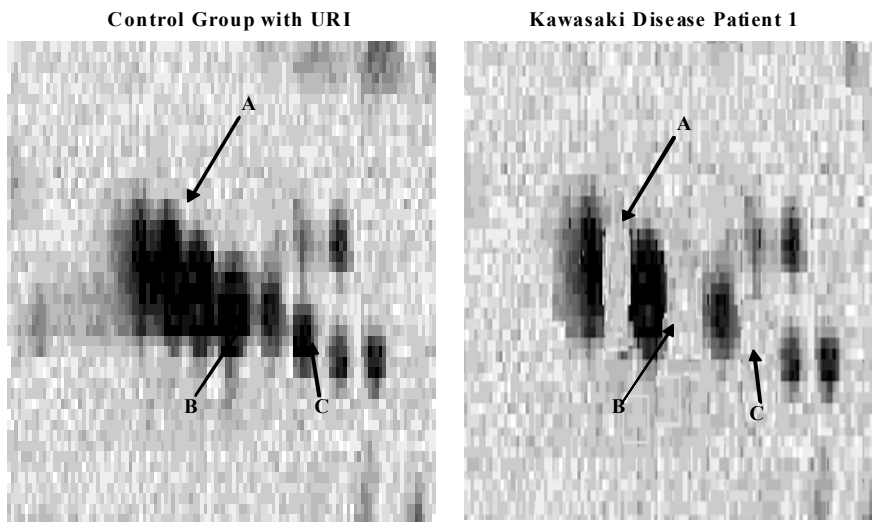


그림 2. 상기도 감염 대조군(환아1')과 가와사끼병 환아군(환아1) 혈청의 이차원 전기영동 단백질스팟 비교(1). 그림 1의 블록 I 부분으로 분자량/등전점이 각각 76.1 kDa/3.80 (A), 75.0 kDa/4.70 (B), 74.4 kDa/4.70 (C)인 단백질스팟이 가와사끼병 환아의 혈청에서 대조군보다 감소된 소견을 보이고 있다.

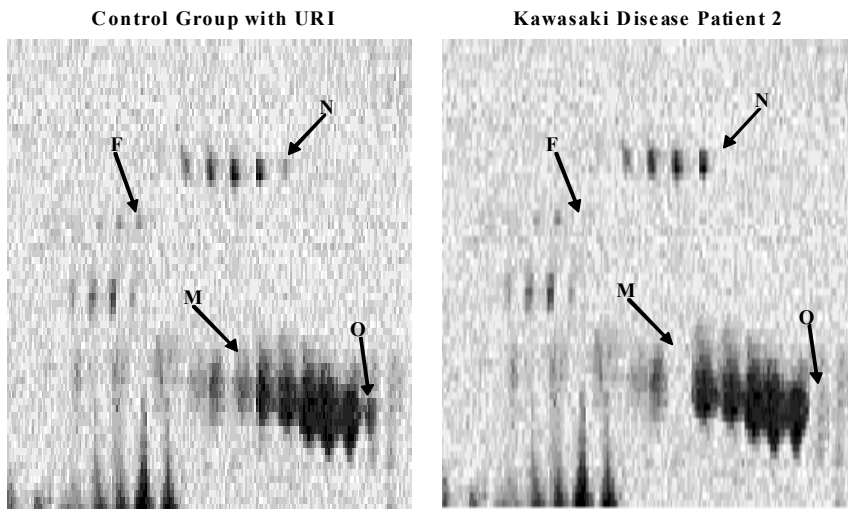


그림 3. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아2) 혈청의 이차원 전기영동 단백질스팟 비교(2). 그림 1의 블록 II 부분으로 분자량/등전점이 각각 125.5 kDa/5.84 (F), 103.4 kDa/6.49 (M), 126.5 kDa/6.40 (N), 122.9 kDa/6.74 (O)인 단백질스팟이 가와사끼병 환아의 혈청에서 대조군보다 감소된 소견을 보이고 있다.

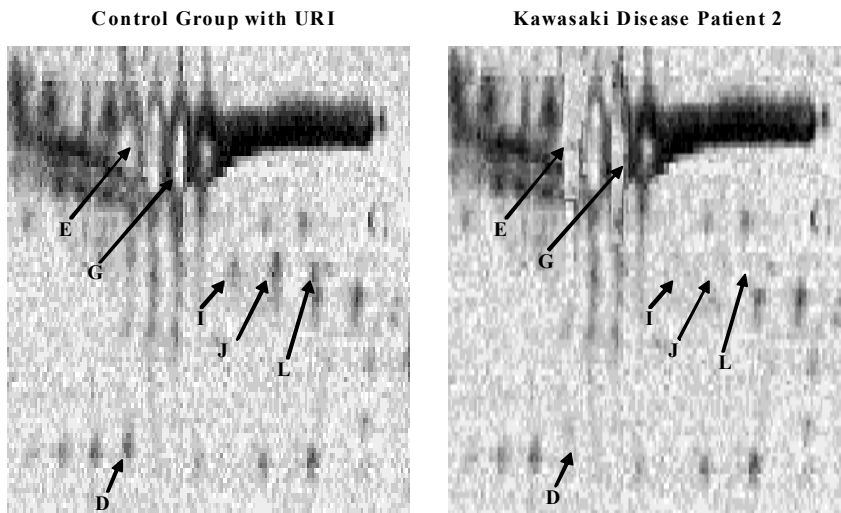


그림 4. 상기도 감염 대조군(환아1')과 가와사끼병 환아군(환아2) 혈청의 이차원 전기영동 단백질스팟 비교(3). 그림 1의 블록 III 부분으로 분자량/등전점이 각각 66.3 kDa/5.77 (D), 91.8 kDa/5.77 (E), 92.4 kDa/5.85 (G), 83.8 kDa/6.09 (I), 77.0 kDa/6.26 (J), 76.8 kDa/6.39 (L)인 단백질스팟이 가와사끼병 환아의 혈청에서 대조군보다 감소된 소견을 보이고 있다.

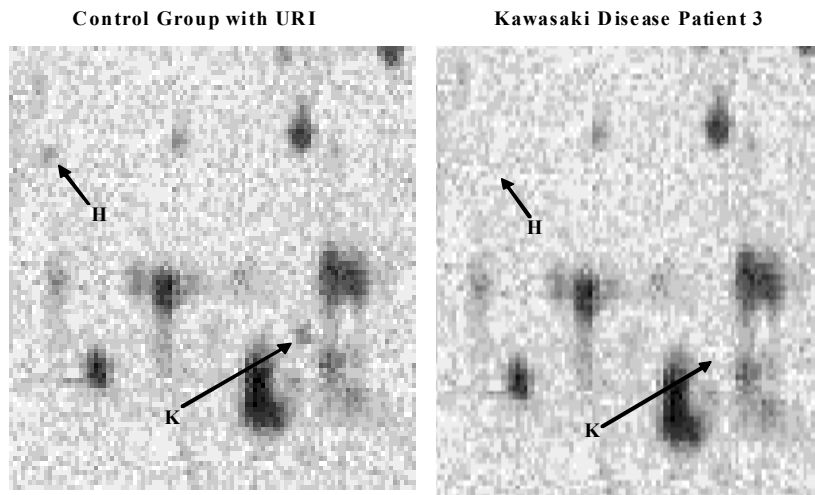


그림 5. 상기도 감염 대조군(환아2')과 가와사끼병 환아군(환아3) 혈청의 이차원 전기영동 단백질스팟 비교(4). 그림 1의 블록 IV 부분으로 분자량/등전점이 각각 35.3 kDa/6.18 (H), 28.5 kDa/6.68 (K)인 단백질스팟이 가와사끼병 환아의 혈청에서 대조군보다 감소된 소견을 보이고 있다.

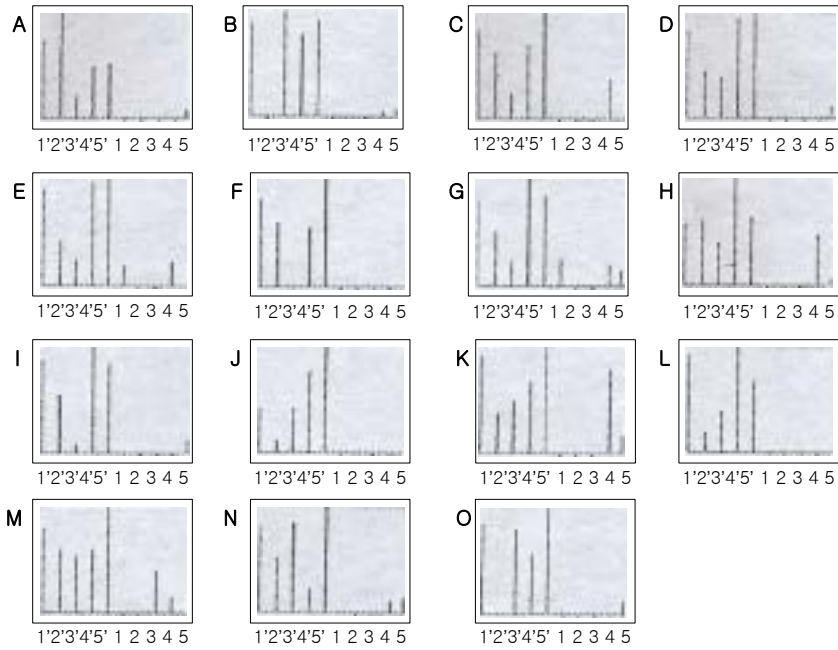


그림 6. 가와사끼병 환아군에서 감소된 양상을 보인 15개의 단백스팟을 PDQuest (BIO-RAD)로 분석한 결과. 1', 2', 3', 4', 5'의 그래프는 상기도 감염 대조군 5명의 분석결과를 나타내며, 1, 2, 3, 4, 5의 그래프는 가와사끼병 환아군 5명의 단백스팟을 양적으로 분석한 결과를 나타내는데, 가와사끼병 환아군에서 의미있는 감소 소견을 보이고 있다.

IV. 고 찰

가와사끼병의 병인은 아직까지 명확히 알려진 바가 없으며 몇 가지 가설만 제기된 실정이다. 상대적으로 호발하는 계절이 있으며 자체 치유가 된다는 점, 또한 모체에서 받은 항체가 유효한 생후 3개월 이내에서는 잘 발병하지 않는 점 등에 근거한 감염설이 제시되고 있으며, 비록 연관된 HLA는 찾지 못했으나 동북 아시아, 특히 일본이나 한국에서 많이 발생하는 역학적인 특수성과 관련하여 유전적 요인의 영향도 있을 것으로 추정하고 있다.⁴

다른 병인으로서는 수피 항원에 의한 기전이 제기되었는데, 이는 가와사끼병의 증세가 이러한 항원에 의해 유발되는 독성 쇼크 증후군과 유사한 면을 보이는데서 제기된 것이다. 수피 항원에 의한 면역반응은 일반 항원에 의한 면역반응과는 달리 다클론성 B 세포 활성화 및 광범위한 염증 사이토카인의 분비를 유발하며, 특정 T 세포 수용체(TCR V beta)를 표지한 T 세포들의 증식을 볼 수 있다. 가와사끼병 환아에서의 TCR V beta 표지 세포 증가는 1992년에 처음 보고되었으며,^{22,23} 1993년 Leung 등이 발표한 내용에 따르면 상기도염과 같은 일반 발열성 질환을 앓고 있는 환아에 비해 가와사끼병 환아에서 수피 항원을 생성하는 *Staphylococcus aureus*의 검출률이 유의하게 높은 것으로 나타났다.²⁴

일반 항원에 의한 발병론도 가와사끼병의 가능한 병인으로 제시되고 있는데, 가와사끼병 환자들의 혈액에서 관찰되는 CD8 세포의 클론 증식과 혈관 조직에서 관찰되는 IgA 형질 세포의 클론 증식

현상이 이를 뒷받침해 주고 있다.^{25,26} 일반적으로 IgA 형질 세포는 비점막성 또는 비림프성 조직은 침투하지 않는 것으로 알려져 있는데, 증상이 심한 가와사끼병 환자의 관상동맥, 췌장, 신장 및 호흡기계에서 IgA 형질 세포의 관찰이 보고되었다. 이는 호흡기계나 위장관계로 항원이 침투하여 야기된 면역 반응의 산물인 IgA 형질 세포가 혈액을 통해 전파된 결과일 것으로 사료되어 일반 항원에 의한 발병 가능성을 설명해 준다. 특히 가와사끼병 환자들의 기관지 부위에서 발견되는 IgA 형질 세포가 일반 호흡기 감염시 형성되는 형질 세포와 유사한데다 앞서 언급한 바와 같이 생후 3개월 이전의 영아에서는 모체에서 받은 항체의 영향으로 발병률이 낮은 것으로 보아 가와사끼병의 원인 항원은 일반인들이 많이 노출되는 상당히 흔한 종류의 항원일 것으로 추정되고 있다.^{27,28} 그러나, 현재까지 가와사끼병의 병인에 대한 여러 가지 가능성이 제기되고는 있지만, 아직 일반적으로 인정되는 명확한 이론은 없는 상태이다.

프로테오믹스가 유전자와 단백질의 이해에 대한 새로운 방법으로 최근 각광받고 있으며, 이를 이용하여 여러 질환의 병인 규명과 진단, 치료에 유용한 생화학적 표지자를 알 수 있게 되었다.²⁹ 아직까지 가와사끼병에 대한 연구에서 프로테오믹스를 이용한 보고는 거의 전무한 상태로, 본 연구에서는 고해상도 이차원 전기영동을 통해 얻은 프로테옴 지도를 이용하여 정상 대조군의 혈청과 비교하여 가와사끼병 환자의 혈청에서 질병에 특이적인 의미있는 단백스팟을 찾아내어고자 하였다. 이런 시도를 통해 가와사끼병의 병인론으로서의 가능성을 지닌 단백을 찾으므로써, 이 질환의 병태생리에 조금더 근접하고, 궁극적으로는 치료에까지 도움을 주고자 하였다.

본 연구에서는 상기도 감염 대조군 혈청에서의 전기영동 결과와 비교하여 볼 때, 가와사끼병 환자군 혈청에서 15개의 의미있는 단백질 스폿의 변화가 발견되었고, 모든 경우에서 상기도 감염 대조군에 비해 감소 소견을 나타내었다.

이중에서 분자량 91.8 kDa, 등전점 5.77의 단백질 (E)와 분자량 92.4 kDa, 등전점 5.85의 단백질 (G)는 각각 유사한 분자량과 등전점을 갖는 알부민의 일부로 생각되어지는데, 정확한 확인을 위해서는 mass spectrometry 등으로 단백질 분리 후 정확한 검증이 필요하리라 사료된다. 혈청 알부민은 일반적인 단백질 대사 이상과 관련되어 의미를 가지는데, 일반적으로 간경화증, 신장염, 심한 화상, 염증반응 등과 관련되어 감소 소견을 보이는 것으로 알려져 있다. 임상적으로 가와사끼병 환자들에서 혈청 알부민의 감소가 흔히 관찰되는데, 이는 본 연구에서의 결과와 일치되는 것으로 지속적인 염증의 결과에 의한 것으로 추측된다.

또, 분자량 76.1 kDa, 등전점 4.80의 단백질 (A), 분자량 75.0 kDa, 등전점 4.70의 단백질 (B) 및 분자량 74.4 kDa, 등전점 4.70의 단백질 (C)는 α -1-antitrypsin의 일부로 생각되어진다. α -1-antitrypsin은 항체 의존성 세포매개성 세포독성과 T 세포 매개성 세포독성에 억제 작용을 하며, T 세포 활성도와 B 세포 활성을 유도하여 세포매개성 면역과 지발형 과민반응을 향상시킬 수 있는 잠재력을 가진 것으로 알려져 있는데,^{30,31} 이 α -1-antitrypsin의 일부로 생각되어지는 단백질의 감소는 가와사끼병의 면역학적 기전과 관련된 병인론과 연관되어 더 연구해 볼 필요가 있을 것으로 생각되어진다. 그 외 가와사끼병 환자에게서 감소된 것으로 나타난 단백질

스팟 중에 몇몇은 complement factor B, serotrasferrin, immnoglobulin light chain으로 밝혀졌는데 이들과 가와사끼병과의 관계에 대해서 밝혀진 바가 없어 역시 더 연구해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

최근 프로테오믹스의 발달로 인간의 체액과 조직 및 적혈구, 혈소판, 대장의 표피세포, 섬유아세포 등의 여러 세포에 대한 표준 지도들이 공개되어 대장암, 골수암, 림프종, 유방암, 방광암 등 여러 질환의 조직 프로테옴 지도가 작성되었다.³² 본 연구의 이차원 전기영동에는 시료로 상기도 감염 대조군과 가와사끼병 환자의 혈청을 이용하였는데, 혈청 성분에 대한 프로테옴 지도는 이미 1998년 공개되었지만,³³ 이는 쥐의 혈청에서 시행한 것으로 인간의 지도와 상당한 차이가 있을 것으로 생각된다. 앞으로 사람의 혈청에서 얻은 정상 프로테옴 지도가 만들어진다면, 여러 가지 다양한 질환과의 비교에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

프로테오믹스를 이용한 단백질들의 유용성을 더 정확하게 알아 보기 위해서는 보다 많은 환자들에서 전기영동 결과와 임상 증상을 연관시켜 연구하는 시도가 필요하며, 의미있는 변화를 보인 여러 단백질들 중에서 아직 구체적인 성분이나 이름이 알려지지 않은 것들이 많기 때문에, 앞으로 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 또는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 등의 방법을 이용한 단백질 규명과 SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) 등을 이용한 단백질 특성을 파악하는 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 이차원 전기영동을 이용하여 가와사끼병 환자와 상기도 감염 환자의 혈청 프로테옴 지도를 비교 분석하여 가와사끼병에 특이적인 단백을 규명하고 그 병인을 이해하고자 하였다.

1. 분자량/등전점이 각각 76.1 kDa/3.80, 75.0 kDa/4.70, 74.4 kDa/4.70, 66.3 kDa/5.77, 91.8 kDa/5.77, 125.5 kDa/5.84, 92.4 kDa/5.85, 83.8 kDa/6.09, 77.0 kDa/6.26, 76.8 kDa/6.39, 103.4 kDa/6.49, 126.5 kDa/6.40, 122.9 kDa/6.74인 13개의 단백질은 5명(100%)의 가와사끼병 환자 모두에서 상기도감염 환자군(대조군)에 비해 감소 소견을 보였고, 분자량/등전점이 35.3 kDa/6.18, 28.5 kDa/6.68인 2개의 단백질은 4명(80%)의 가와사끼병 환자의 혈청에서 대조군보다 의미있는 감소를 나타내었다.

2. 분자량 91.8 kDa, 등전점 5.77의 단백질과 분자량 92.4 kDa, 등전점 5.85의 단백질은 각각 유사한 분자량과 등전점을 갖는 알부민의 일부로 추정되어지며, 지속적인 염증의 결과에 의한 것으로 사료된다.

3. 분자량 76.1 kDa, 등전점 4.80의 단백질, 분자량 75.0 kDa, 등전점 4.70의 단백질 및 분자량 74.4 kDa, 등전점 4.70의 단백질은 α -1-antitrypsin의 일부로 나타났다. α -1-antitrypsin은 항체 의존성

세포매개성 세포독성과 T 세포 매개성 세포독성에 억제 작용을 하며, T 세포 활성도와 B 세포 활성을 유도하여 세포매개성 면역과 지연형 과민반응을 향상시킬 수 있는 잠재력을 가진 것으로 알려져 있는데, 이 α -1-antitrypsin의 일부로 생각되어지는 단백스팟의 감소는 가와사끼병의 면역학적 기전과 관련된 병인론과 연관되어질 수 있다.

의미있는 변화를 보인 여러 단백스팟들 중에서 아직 구체적인 성분이나 이름이 알려지지 않은 경우가 많으므로 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 또는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS), SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) 등을 이용하여 프로테옴 지도에 나타난 단백들을 규명하고 그 특성을 이해하기 위한 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MCLS) prevailing in Japan. *Pediatrics* 1974;54:271-276.
2. Taubert KA, Rowsley AH, Shulman ST. A nationwide survey of Kawasaki disease and acute rheumatic fever. *J Pediatr* 1991;119:279-282.
3. Yanagawa H, Nakamura Y, Ojima T, Yashiro M, Tanihara S, Oki I. Changes in epidemic patterns of Kawasaki disease in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:64-66.
4. Burns JC, Kushner HI, Bastian JF, Shike H, Shimizu C, Matsubara T, et al. Kawasaki Disease: A Brief History. *Pediatrics* 2000;106:27-34.
5. Kawasaki T. Pediatric acute mucocutaneous lymph node syndrome: clinical observation of 50 cases. *Jpn J Allergy* 1967;16:178-222.
6. Yamamoto T, Kimura J,. Acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (Kawasaki): subtype of mucocutaneous ocular syndrome of erythema multiforme complicated with carditis. *Jpn J Pediatr* 1968;21:336-339.
7. Yamamoto T, Oya T, Watanabe A. Clinical features of Kawasaki disease. *Jpn J Pediatr* 1968;21:291-297.

8. Freeman AF, Shulman ST. Recent developments in Kawasaki disease. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2001;14:357-361.
9. Onouchi Z, Kawasaki T. Overview of pharmacological treatment of Kawasaki disease seen in Kawasaki disease. *Drugs* 1999;58:813-822.
10. Shingadia D, Shulman ST. New perspectives in the drug treatment of Kawasaki disease. *Paediatr Drugs* 1999;1:291-7.
11. Han RK, Silverman ED, Newman A, McCrindle BW. Management and outcome of persistent or recurrent fever after initial intravenous gamma globulin therapy in acute Kawasaki disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000;154:694-699.
12. Dahlem PG, von Rosenstiel IA, Lam J, Kuijpers TW. Pulse methylprednisolone therapy for impending cardiac tamponade in immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *Intensive Care Med* 1999;25:1137-1139.
13. Lee MS, An SY, Jang GC, et al. A case of Intravenous Immunoglobulin-Resistant Kawasaki Disease Treated with Methotrexate. *Yonsei Med J* 2002;43:527-532.
14. Fleishmann RD, Adams MD, White O. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus-influenzae*. *Science* 1995;269:496-512.
15. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts and new word. *Electrophoresis* 1998;19:1853-1861.

16. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present, and future. *Electrophoresis* 1996;17:443-453.
17. Anderson JS, Svensson B, Roepstoff P. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nature Biotechnol* 1996;14:449-457.
18. Figeys D, Gygi SP, Zhang Y, Watts J, Gu M, Aebersold R. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: powerful tools for analysis of proteins and proteomes. *Electrophoresis* 1998;19:1811-1818.
19. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021.
20. Klose J. Large-gel 2D electrophoresis. *Meth Mol Biol* 2000;112:1470-1472.
21. Gevaert K, Vanderkerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 2000;21:1145-1154.
22. Abe J, Kotzin BL, Meissner HC. Characterization of T cell repertoire changes in acute Kawasaki disease. *J Exp Med* 1993;177:791-796.
23. Abe J, Kotzin BL, Jujo K. Selective expansion of T cell expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4066-4070.

24. Leung DYM, Meissner HC, Fulton DR, Murray DL, Kotzin BL, Schlievert PM. Toxic shock syndrome toxin secreting *Staphylococcus aureus* in Kawasaki syndrome. *Lancet* 1993;342:1385-1387.
25. Choi JH, Chwae YJ, Shim WS. Clonal expansion of CD8⁺ T cells in Kawasaki disease. *J Immunol* 1997;159:481-486.
26. Rowley AH, Shulman ST, Mask CA, Baker SC. Oligoclonal IgA response in the vascular wall in acute Kawasaki disease. *Pediatr Res* 2000;47:20.
27. Rowley AH, Shulman ST, Mask CA. IgA plasma cell infiltration of proximal respiratory tract, pancreas, kidney, and coronary artery in acute Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2000;182:182-191.
28. Meissner HC, Leung DYM. Superantigens, conventional antigens and the etiology of Kawasaki syndrome. *Pediatr Infect Dis* 2000;19:91-94.
29. Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millenium drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:291-300.
30. Folds JD, Prince II, Spitznagel JK. Limited cleavage of human immunoglobulins by elastase of human neutrophil polymorphonuclear granulocytes. Possible modulator of immune complex disease. *Lab Invest* 1978;39:313.
31. Breit SN, Wakefield D, Robinson JP, Luckhurst E, Clark P,

Penny R. The role of α -1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorder. Clin Immunol Immunopathol 1985;35:363.

32. Sanchez JC, Appel RD, Golaz O, Pasquali C, Ravier F, Bairoch A, et al. Inside SWISS-2D PAGE database. Electrophoresis 1995;16:1131-1151.

33. Haynes P, Miller I, Gemeiner M, Eberini I, Lovati MR, Manzoni C, et al. Proteins of rat serum I: Establishing a reference 2-DE map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Electrophoresis 1998;19:1484-1492.

Abstract

Comparison of Serum Proteome Maps between Children with Kawasaki Disease and Upper Respiratory Infection

Seung-Yon Baek

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dong Soo Kim)

Kawasaki disease, first reported by Tomisaku Kawasaki in 1967, is a kind of systemic vasculitis usually observed in children under 5 years of age and also known as the leading cause of pediatric acquired heart disease. Though there have been some evidences suggesting infection as the cause, the exact pathophysiology of Kawasaki disease is still not completely understood.

Many efforts were made to study the etiology and pathogenesis of several diseases after the field of proteomics had been introduced. Proteomics, the study of quality and quantity of proteins, has developed dramatically after two-dimensional electrophoresis(high resolution) and mass spectrometry were brought in use. In this study, we tried to find a way to evaluate the etiology and pathogenesis of Kawasaki disease by analyzing the serum proteome maps of children in the acute stage of the disease.

We studied 10 patients admitted to the pediatric department of Yonsei Severance Hospital from January 2000 to July 2001. Half

were clinically diagnosed as typical Kawasaki disease and the rest whose main presenting symptom was fever, as upper respiratory infection. Sera collected from the patients were frozen to -70°C . They were melted and rehydrated later for isoelectric focusing method using polyacrylamide gel and two dimensional electrophoresis. The gel were stained by silver method and scanned with GS-800 Calibrated Imaging Densitometer. PDQuest was used to quantify protein and draw proteome maps.

Analysing serum proteome maps, changes of protein spots were observed in 15 sites in the children with Kawasaki disease. The signals were all significantly decreased compared to those of the control group. The spots included a protein spot of molecular weight of 91.8kDa and isoelectric point 5.77 and a spot with 92.4kDa and isoelectric point 5.85 which are suspected as parts of albumin protein. Also, a spot of 76.1kDa and isoelectric point 4.80, a spot with 75.0kDa and isoelectric point 4.70, and a spot with 74.4kDa and isoelectric point 4.70 which are thought to be parts of α -1-antitrypsin.

More studies would have to be performed to define and to understand the functions of protein spots detected in electrophoresis of sera of patients with Kawasaki disease. Further evaluations using methods such as electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) or SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) are expected to provide us with more information about those protein spots observed.

Key Words : Kawasaki disease, proteomics, two-dimensional electrophoresis, proteome map