

## TTP 진단을 위한 Fluorescence-quenching Substrate를 이용한 새로운 ADAMTS-13 활성도 측정법의 유용성

포천중문의과대학교 분당차병원 내과학교실<sup>1</sup>, 진단검사의학교실<sup>2</sup>

장문주<sup>1</sup> · 오소연<sup>1</sup> · 정소영<sup>1</sup> · 강명서<sup>2</sup> · 오도연<sup>1</sup>

### The Usefulness of the New ADAMTS-13 Activity Assay using a Fluorescence-quenching Substrate for the Diagnosis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Moon Ju Jang, M.D.<sup>1</sup>, So Yeun Oh, M.D.<sup>1</sup>, So Young Chong, M.D.<sup>1</sup>,  
Myung Seo Kang, M.D.<sup>2</sup> and Doyeun Oh, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Laboratory Medicine, Bundang CHA Hospital,  
College of Medicine, Pochon CHA University, Seongnam, Korea

**Background:** Ever since medical professionals have recognized the important role of ADAMTS-13 in the pathogenesis of TTP, several methods to diagnosis the activity of ADAMTS-13 in the plasma of TTP patients have been developed. However these assays have not been widely used in practice because they are cumbersome and they require several days to complete. In this study we examine the new, rapid ADAMTS-13 activity assay that uses fluorescence resonance energy transfer and we compared it with the conventional assay to determine its diagnostic advantage.

**Methods:** Seven TTP patients were compared with 60 healthy controls. The plasma ADAMTS-13 activity was measured using the fluorescence-quenching substrate assay method. The results were compared with the results of performing multimer analysis of SDS-agarose gel electrophoresis.

**Results:** It took only 2 hour to complete the fluorescence-quenching substrate assay. The median ADAMTS-13 activity using the fluorescence-quenching substrate was 5.9% (range: 0~29.9%) for the patient group and 99.1% (range: 74.4~143.3%) for the healthy group, respectively. The median ADAMTS-13 activity using multimer analysis of SDS-agarose gel electrophoresis was 5.6% (range: 1.6~28.8%) for the patients group and 87.7% (range: 44.1~120.9%) for the healthy group, respectively. The ADAMTS-13 activities of the two assays were well correlated (correlation coefficient: 0.69).

**Conclusion:** The quantification of ADAMTS-13 activity with using the fluorescence-quenching substrate is rapid and highly specific for the diagnosis of TTP and it is expected to be used widely in the diagnosis of TTP. (*Korean J Hematol* 2005;40:226-230.)

**Key Words:** TTP, ADAMTS-13, Assay

접수 : 2005년 10월 25일, 수정 : 2005년 11월 29일

승인 : 2005년 12월 13일

교신저자 : 오도연, 경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지

☎ 463-712, 분당차병원 내과

Tel: 031-780-5217, Fax: 031-780-5219

E-mail: doh@cha.ac.kr

Correspondence to : Doyeun Oh, M.D.

Department of Internal Medicine, Bundang CHA Hospital,  
College of Medicine, Pochon CHA University

351 Yatap-dong, Bundang-gu, Seongnam 463-712, Korea

Tel: +82-31-780-5217, Fax: +82-31-780-5219

E-mail: doh@cha.ac.kr

## 서 론

1924년 Moschcowitz에 의해 처음으로 보고된 혈전성 혈소판감소성자반증(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)은 미세혈관병성용혈성빈혈, 혈소판감소증, 발열, 미만성 신경학적 이상 신기능 장애 등을 특징으로 하는 혈전성미세혈관병증이다.<sup>1)</sup> TTP의 병인으로 환자의 혈장에서 관찰되는 비정상적으로 큰 von Willebrand factor (VWF) multimer (Unusually Large-VWF multimer, UL-VWF)가 중요하다고 알려져 있는데, UL-VWF는 혈소판 접착능이 대단히 커서 TTP 환자의 미세혈관에 혈소판 혈전을 야기시킨다. TTP 환자의 혈장에서 UL-VWF가 관찰되는 원인은 VWF 절단 효소인 ADAMTS-13의 결핍 때문임이 밝혀졌다.<sup>2)</sup>

급성 TTP는 치료하지 않을 경우 약 90%가 사망하는 치명적인 질환이지만, 혈장 교환술을 조기에 시행하는 경우 사망률을 5~10% 정도로 크게 감소시킬 수 있다.<sup>3,4)</sup> 따라서 TTP의 병인으로 알려진 혈장 ADAMTS-13을 신속 정확하게 측정함으로써 조기에 진단하고 치료 방침을 결정하는 것이 매우 중요하다. ADAMTS-13 활성도를 측정하는 방법은 1998년 이래 sodium dodecyl sulphate (SDS)-agarose 전기영동법과<sup>5)</sup> SDS-polyacrylamide 전기영동법<sup>6)</sup> 소개되어 TTP 병인에서 ADAMTS-13에 대한 이해에 많은 기여를 하였으나 기술적인 복잡함과 검사에 소요되는 시간이 2~3일로 길어 아직까지 대부분의 의료기관에서 진단 검사로 활용되지 못하고 있었다.

Fluorescence-quenching substrate인 synthetic 73-amino-acid peptide를 이용한 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 분석법<sup>7)</sup>은 2004년에 개발된 검사방법으로 ADAMTS-13 활성도의 측정이 수 시간 내에 가능하며 재현성이 높다고 소개되었다. 이에 저자들은 fluorescence-quenching substrate를 이용한 혈장 ADAMTS-13 활성도 측정법을 국내에서 처음으로 정립하여 TTP 환자의 진단에 있어서 기존 검사와 비교하여 FRET 분석법의 진단적 장단점을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

환자군으로 분당차병원에서 TTP로 진단 받은 7명의 환자(남 : 여 4 : 3, 평균 연령 48세, 범위 18~76세)와 건강 대조군으로 2003년 7월부터 2004년 2월까지 건

강검진센터에 방문해 검사상 특이 소견이 없는 60명(남 : 여 32 : 28, 평균연령 42세, 범위 22~72세)을 대상으로 하였다. 검체는 CTAD항응고제가 포함된 tube에 혈액을 채취하여 1,000g에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈장을 이용하였다.

### 2. 방법

ADAMTS-13 활성도는 FRET 분석법과<sup>7)</sup> SDS-agarose gel 전기영동법<sup>5)</sup> 두 가지 방법으로 측정하여 비교하였다.

**1) FRET 분석법:** 정상 혈장 검체 0, 1, 2, 3, 4, 5와 6uL를 각각 substrate solution (FRETS-VWF73, Peptides International, USA) 100uL와 반응시켜 이를 fluorescence spectrophotometer (VICTOR3, PerkinElmer, Japan)를 이용해 60분 동안 5분 간격으로 각각의 형광도를 측정해 각각의 검체 농도에서의 기울기를 구해 표준 곡선을 구한다. 이후 환자 혈장 검체 4uL를 substrate solution과 반응시켜 다른 시간에 측정한 형광도에 따른 기울기를 구해 표준 곡선과 비교해 ADAMTS-13 활성도를 %로 표기하였다. 검사내 변이계수(intra-assay coefficient of variation, CV)는 5.3%이었다.

**2) SDS-agarose gel 전기영동법:** Furlan의 방법<sup>5)</sup>에 따라 실시하였다. 환자의 혈장에 0.15M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액을 넣어 20배 희석하고 phenyl-methylsulfonylfluoride (PMSF) 1mM를 첨가한다. 이후 ADAMTS-13을 활성화시키기 위해 10mM BaCl<sub>2</sub>를 첨가해 37°C에서 5분 동안 반응시키고 여기에 기질로서 VWF (녹십자, Korea)를 첨가한 후 투석시킨다. 투석 방법은 1.5M Urea와 5mM Tris-HCl이 첨가된 투석 완충액(pH 8.0)을 screw-cap tube에 50mL 채운 후, 완충액 상단에 투석막(0.025  $\mu$ m, VSWP, 25mm, Millipore, MA)을 올려놓고 막의 중앙에 VWF와 반응시킨 환자 혈장 시료 10  $\mu$ L를 놓고 37°C에서 20시간 반응시킨다. 투석된 혈장 시료를 SDS-agarose gel로 50voltage, 3시간 동안 전기영동을 하고 nitrocellulose membrane에 electroblotting시킨 후 인간 VWF에 대한 단클론 항체(Dako, Denmark)로 반응시키고, peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG로 다시 반응시킨 후, DAB (Diaminobenzidine)로 발색시켰다. 기질 VWF의 다량체의 소실이 ADAMTS-13 활성도와 비례하므로 VWF 다량체의 길이를 측정하여 분해된 정도를 분석하였다. 20배부터 640배까지 순차적으로 두 배씩 희석한(20, 40, 80, 160, 320 그리고 640배) 정상혈장과 정제된 VWF (녹십자, Korea)를 위와 같은 방법으로 반응시켜 control

로 삼았고, 20배 희석된 ADAMTS-13의 활성도를 100%로 하여 활성도의 표준곡선을 만들었다. 이후 각각의 검체에서 나온 값을 표준곡선과 비교하여 %로 표기하였다. 검사 내 변이계수(intra-assay coefficient of variation, CV)는 6.94%이었다.

### 3. 통계분석

결과는 평균값과 범위로 표기하였다. 측정값의 비교는 SAS 통계프로그램(version 8.2)을 사용하였으며, 상관계수는 이표본 독립 t-검정을 이용하여 분석하고  $P$  값이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. FRET 분석법을 이용한 ADAMTS-13 활성도 측정

TTP 환자군은 12.9% (범위, 0~29.9%), 건강 대조군은 99.1% (범위, 74.4~147.3%)로 측정되었다(Fig. 1). 두 군 간의 ADAMTS-13 활성도는 통계적으로 유의하게 TTP 환자군에서 낮게 측정되었다. 검사에 소요된 실시간은 2시간이었다.

### 2. 측정법에 따른 ADAMTS-13 활성도 비교

SDS-agarose gel 전기영동을 이용해 측정한 ADAMTS-13 활성도의 평균값은 TTP 환자군 10.6% (범위, 1.6~28.8%), 건강 대조군 87.7% (44.1~120.9%)이었다. 이

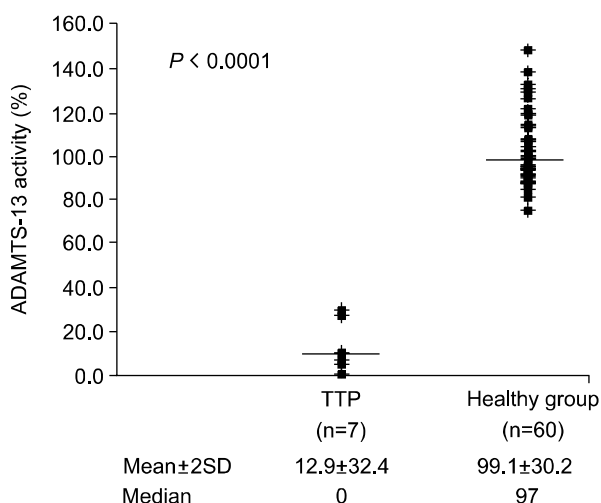


Fig. 1. Plasma ADAMTS-13 activity of TTP patients and healthy individuals with fluorescence resonance energy transfer assay.

측정값을 FRET 분석법과 비교한 결과 상관계수 0.69의 비교적 양호한 상관관계를 보였다(Fig. 2).

## 고 찰

1990년대 이후 VWF와 ADAMTS-13과의 관계에 대한 많은 연구가 이루어지면서 분자 유전학적 수준에서의 새로운 TTP의 병인이 밝혀지게 되었다. 이를 통해 TTP를 진단하고 치료하는 과정에서 ADAMTS-13 활성도 측정의 중요성이 부각되었고 ADAMTS-13 활성도 측정 방법에 대한 많은 연구가 이루어지게 되었다. ADAMTS-13 활성도를 측정하는 방법은 처음으로 1996년 Fulan 등이 SDS-agarose gel을 이용한 전기영동법을 발표하였다.<sup>5)</sup> 이 방법은 희석한 혈장을 BaCl<sub>2</sub>로 활성화 한 후 정제된 VWF와 반응시킨 후 반응물을 전기영동법으로 분리해 immunoblotting을 시행해 VWF 다량체의 양으로 활성도를 측정하는 방법이다. 이 방법은 TTP 환자에서 특이도가 높으며 재현성이 높은 장점을 가지나 검사방법이 복잡하고 검사시간이 최소 3일 이상 소요되는 단점을 가진다. Tsai 등은 guanidine HCl로 처리한 정제된 VWF를 혈장과 반응시켜 이를 SDS-polyacrylamide 전기영동법을 이용해 VWF의 C-말단 176-kDa 절편을 분리하는 방법을 소개하였다.<sup>6)</sup> 이 방법은 ADAMTS-13이 VWF다량체를 분해해 발생하는 절편을 직접 측정하는 장점을 가지나 Fulan 등의 방법과 마찬가지로 복잡하고 시간이 오래 걸리는 단점

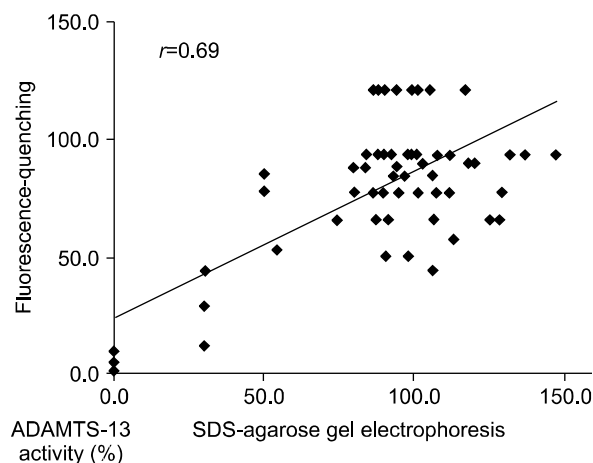


Fig. 2. Comparison ADAMTS-13 activity between fluorescence resonance energy transfer assay and SDS-agarose gel electrophoresis multimer assay.

이 있다 이외에도 ADAMTS-13 활성도의 측정 방법으로 collagen-binding assay,<sup>8)</sup> two site immuno-radiometric assay,<sup>9)</sup> ristocetin cofactor 활성도를 이용한 측정법<sup>10)</sup> 등이 개발되어 이용되고 있다. Studt 등은 이들 검사방법을 비교하여 collagen-binding assay를 제외하고 모두 심한 ADAMTS-13 활성도 결핍(<5%)의 진단 특이도가 높아 TTP의 진단검사로 유용하다고 하였다.<sup>11)</sup> 그럼에도 불구하고 아직 이 방법들은 검사의 복잡성과 검사 소요시간이 길어, 임상적용에 한계가 있다.

TTP가 의심되는 환자의 진료에서 신속한 ADAMTS-13 활성도 측정은 두 가지의 중요한 임상적 의미를 갖고 있다. 첫째, TTP를 정확하게 조기 진단함으로써 혈장교환술을 초기에 시행해 TTP 관련 사망률을 줄이며, 치료 중 주기적인 ADAMTS-13 활성도를 측정함으로써 혈장교환술의 치료반응을 평가할 수 있다. 둘째 의미는, TTP 유사질환과의 감별에 있다. TTP의 진단은 아직까지 임상적 양상에 의존하여 왔는데 범발성혈관 내용고증, 출혈성요독증후군, 동종골수이식 그리고 종양 등에서도 혈전성미세혈관병증을 일으켜 혈장교환술로 호전될 수 있는 TTP와 감별하는 데 많은 어려움이 있었다. 최근 여러 연구에서 혈장 내 ADAMTS-13의 심한 결핍이 TTP 진단에 매우 특이도가 높으며 TTP 유사 질환에서는 ADAMTS-13 활성도가 대부분 정상 범위임이 밝혀짐으로써<sup>12,13)</sup> 질병 초기에 TTP의 임상양상이 유사질환과 감별이 되지 않는 경우 ADAMTS-13의 측정은 이들 질환과의 감별에 많은 도움이 될 수 있음이 알려지게 되었다.

2004년 Kokame 등은 VWF 절단 부위인 A2 domain의 Y1605와 M1606 염기서열을 포함하는 73개의 아미노산으로 구성된 최소 단위의 VWF (VWF73) 기질을 재조합 하였다.<sup>14)</sup> 이를 통해 이전의 ADAMTS-13 활성도 측정법과는 달리 VWF 변성 과정이 필요 없고 혈장과 기질과의 긴 반응시간을 줄일 수 있었다. ADAMTS-13에 의해 분해된 VWF산물을 검출하는 방법으로 이전의 전기영동법을 이용하지 않고 fluorescence spectrophotometer로 간단히 측정하고자 VWF73을 화학적으로 변형해 만든 fluorescence resonance energy transfer (FRET)-VWF73을 기질로 이용하는 방법을 개발하였다.<sup>7)</sup> FRET-VWF73은 D1596에서 R1668까지의 염기서열로 구성된 VWF73에서 Q1599 염기가 2-(N-methylamino) benzoyl group (Nma)에 의해 변형된 2,3-diaminopropionic residue (A2pr)로 치환되고, N1610 염기가 2,4-dinitrophenyl group (Dnp)에 의해 변형된 A2pr로 치환해 합성한 것으로 Nma를 340nm의 에너지

로 자극시 형광전도 에너지가 Dnp로 전달되나 Y1605와 M1606 사이의 결합이 절단되면 Nma에서 440nm의 형광에너지를 방출한다. 이때 방출되는 에너지의 형광도를 측정함으로써 ADAMTS-13 활성도를 간접적으로 계산한다. FRET-VWF73을 이용하여 ADAMTS-13 활성도를 측정한 결과 TTP 환자에서 정상인에 비해 유의한 저하가 관찰되었고 7명의 TTP 환자 중 4명에서 5% 이하의 심한 결핍을 보여 TTP 진단에 특이도가 높은 방법임을 알 수 있었다. 또한 SDS-agarose gel을 이용한 전기영동법과 비교하여 잘 일치하는 결과를 보였으며 간편하고 소요시간이 짧아 일반 검사실에서도 이용할 수 있는 검사방법으로 생각되었다. 그러나 단점으로 최근 ADAMTS-13이 VWF의 A3 domain도 인식한다는 보고가 있어,<sup>15)</sup> 이 경우 FRET-VWF73 기질에 절단부위가 포함되지 않아 활성도를 정확하게 반영하지 못할 수 있다는 점과 SDS-agarose gel의 정제된 VWF를 이용하는 방법에 비해 FRET-VWF73 기질을 사용하므로 검사비용이 고가인 점, 형광도 측정을 위해 fluorescence spectrophotometer가 필요한 점 등이 있다.

요약하자면 Fluorescence-quenching substrate를 이용한 ADAMTS-13 활성도 측정법은 TTP의 진단에 신속하고 특이도가 높은 검사법으로 향후 ADAMTS-13 활성도 감소를 동반한 TTP환자의 조기진단에 널리 활용될 것으로 판단된다.

## 요 약

**배경:** 현재 TTP를 조기진단할 수 있는 유용한 검사법이 없는 실정으로, 이전까지의 ADAMTS-13 활성도 측정법은 최소 2~3일 정도의 검사시간이 소요되어 조기진단과 치료방침 결정에 어려움이 있었다. 최근 Kokame 등은 synthetic 73-amino-acid peptide를 이용하여 fluorescence resonance energy transfer assay를 개발하여 ADAMTS-13 활성도 측정이 1시간 내에 가능하게 되었다. 이에 저자들은 fluorescence-quenching substrate를 이용한 혈장 ADAMTS-13 활성도 측정법의 임상적 유용성에 대해 알아보고자 하였다.

**방법:** 분당차병원에서 TTP로 진단 받은 7명의 환자와, 건강 대조군으로 2003년 7월부터 2004년 2월까지 건강검진센터에 방문한 60명을 대상으로 했다. 혈장 검체를 substrate solution (FRET-VWF73) 100uL와 반응시켜 이를 fluorescence spectrophotometer를 이용해 60분 동안 5분 간격으로 각각의 형광도를 측정해

ADAMTS-13 활성도를 계산한다. 동일한 혈장 검체를 SDS-agarose gel 전기영동법을 이용한 다량체 분석으로 ADAMTS-13 활성도를 측정해 fluorescence-quenching substrate를 이용한 측정법과 비교하였다.

**결과:** Fluorescence-quenching substrate를 이용한 ADAMTS-13 활성도 검사에 소요된 실시간은 2시간이었으며, ADAMTS-13 활성도의 중앙값은 TTP 환자군 12.9% (범위, 0~29.9%), 건강 대조군 99.1% (범위, 74.4~147.3%)이었다. SDS-agarose gel 전기영동을 이용해 측정한 ADAMTS-13 활성도의 평균값은 TTP 환자군 10.6% (범위, 1.6~28.8%), 건강 대조군 87.7% (44.1~120.9%)로 두 검사는 상관계수 0.69로 잘 일치하는 결과를 보였다.

**결론:** Fluorescence-quenching substrate를 이용한 ADAMTS-13 활성도 측정법은 TTP 환자진단에 신속하며 특이도가 높은 검사법으로 생각되며 향후 ADAMTS-13 활성도 감소를 동반한 환자의 조기진단에 널리 활용될 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Moschcowitz E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc NY Pathol Soc* 1924;24:21-4.
- Moake JL, Rudy CK, Troll JH. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982;307:1432-5.
- George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000;96:1223-9.
- Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE. Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS 13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103:4043-9.
- Furlan M, Robles R, Lamie B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87:4223-34.
- Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996;87:4235-44.
- Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005;129:93-100.
- Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lammle B, Furlan M. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost* 1999;82:1386-9.
- Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost* 1999;82:1382-5.
- Bohm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS-13). *Ann Hematol* 2002;81:430-5.
- Studt JD, Bohm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lammle B. Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost* 2003;1:1882-7.
- Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001;98:2730-5.
- Jang MJ, Chong SY, Lee SJ, Kim NK, Kang MS, Oh D. Changes of the activity of ADAMTS-13 in aging, pregnancy and disease. *Korean J Hematol* 2004;39:71-7.
- Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 2004;103:607-12.
- Dong JF, Moake JL, Bernardo A, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2003;278:29633-9.