

## SELDI-TOF MS를 이용한 유방암 환자 진단을 위한 새로운 혈청 표지자의 개발

아주대학교 의과대학 외과학교실, <sup>2</sup>치료방사선학교실,  
한양대학교 <sup>1</sup>자연과학대학 생명과학교실, <sup>3</sup>의과대학 생화학교실

정용식 · 김호승<sup>1</sup> · 윤태일 · 전미선<sup>2</sup> · 윤용달<sup>1</sup> · 이용성<sup>3</sup> · 이기환<sup>3</sup> · 김혜진 · 김명욱 · 박희봉

### Research of New Biomarker for Breast Cancer Using Proteomic Patterns

Yong-Sik Jung, Ho Seung Kim<sup>1</sup>, Tae Il Yoon, Mi Seon Jeon<sup>2</sup>, Yong-Dal Yoon<sup>1</sup>, Yong-Sung Lee<sup>3</sup>, Ki-Whan Lee<sup>3</sup>, Hye-Jin Kim, Myung-Wook Kim and Hee Boong Park

Department of Surgery and <sup>2</sup>Radiation Oncology, Ajou University School of Medicine, <sup>1</sup>Department of Life Science, Hanyang University School of Natural Science, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Hanyang University College of Medicine

**Purpose:** Early detection and treatment of cancer is a primary focus of health care. Many serum markers are available for breast cancer, but are not good enough for screening. Cancer antigen CA 15-3 is the most widely used biomarker for breast cancer. However, CA 15-3 has low sensitivity and specificity. This study was performed to analyze the serum proteomic pattern in breast cancer patients by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF).

**Methods:** We screened for potential tumor biomarkers in 42 serum samples, including samples from a group of 23 breast cancer patients at different clinical stages [stage I (n=3), stage II (n=11), stage III (n=6), and stage IV (n=1)], and a control group of 19 healthy women. Diluted serum samples were applied to a C16 hydrophobic interaction chip (H4). Complex protein profiles of different groups were compared and analyzed using the Protein Chip software 2.1 (Ciphergen Biosystems).

**Results:** There were 7 significant protein peaks in the breast cancer group and 5 in the control group. Scoring the expression of each peak, the mean score was 8.5 in the cancer group and 3.5 in the control. The results of the

combination of each peak were highly sensitive (91.2%) and specific (94.7%). These proteomic patterns did not correlate with tumor stage and hormonal receptor, c-erb B2.

**Conclusion:** In this preliminary report, we identified protein profiles that were differentiated in breast cancer patients. After proper validation, serum proteomic pattern analysis may ultimately be applied in screening breast cancer as a stand-alone or combined with current options. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2004;7:22-26)

**Key Words:** Breast cancer, Proteomics, SELDI-TOF

**중심 단어:** 유방암, 프로테오믹스, 단백질 패턴 분석

### 서 론

유방암은 조기에 발견하여 적절한 치료가 이루어진다면 완치가 가능한 질환이다. 현재 유방암의 진단은 주로 환자의 증상과 의사의 진찰 그리고 유방 촬영술과 유방초음파 검사로 이루어지고 있다. 서구와 달리 한국인의 유방은 조직이 치밀하여 유방 촬영술은 집단 검사로서의 유용성이 떨어지므로 조기 발견의 수단으로 적합하지 않으며 초음파 검사는 시술자의 능력에 많이 좌우가 되며 가격 대비 효용성으로 볼 때 일차적인 집단 검사로는 시행이 어려운 것이 사실이다. 현재 유방암의 종양 표지자로 가장 많이 사용되는 CA 15-3도 치료 후의 추적관찰에는 유용하지만 종양의 발견에 있어서는 감수성 22%, 특이도 69%로 만족스럽지 못하여 이를 보완하기 위한 새로운 방법들에 대한 연구가 절실히 필요한 상황이다.<sup>(1,2)</sup> 최근 게놈 연구가 완성되어감에 따라 기능성 게놈(functional genomics), 즉 프로테오믹스(proteomics)에 대한 관심이 증가하고 있다. 프로테오믹스란 단백질의 성질의 발현, post- translational modification, 다른 단백질과의 결합에 초점을 두어 연구하여 세포 내 변형 과정과 네트워크 형성을 질병의 진행과정과 연계해 총괄적으로 이해할 수 있는 연구분야로 다시 말해서 프로테오믹스는 유전체 구조와 세포 내 행동 간 겹을 매우는 역할을 하는 도구로서, 게놈의 다이나믹한 단백질 생성물과 그들간

책임저자 : 박희봉, 경기도 수원시 팔달구 인계동 1038-4

☎ 442-834, 박희봉외과 유방클리닉

Tel: 031-233-5571, Fax: 031-233-5955

E-mail: dr@pabc.net

접수일 : 2003년 12월 27일, 게재승인일 : 2004년 1월 12일

의 상호관계를 연구하는 분야라고 할 수 있다.(3) 최근 개발된 SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight)는 칩에 친화적인 단백질을 붙여서 이를 레이저를 이용하여 분석하는 mass spectrometer로서 감수성과 특이성이 매우 높은 기술이다. 최근 이를 이용한 단백질의 분석을 통하여 종양의 발견이나 질환의 특성을 밝히려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 저자들은 SELDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 유방암 환자와 정상 여성의 혈청의 단백질 패턴을 분석하여 이를 이용한 유방암의 진단적인 유용성을 시험하였다.

## 방 법

### 1) 대상

2002년 1월부터 2003년 4월까지 본원에서 유방암으로 진단 및 치료를 받은 환자 중 수술 전 혈청을 분리해 두었던 23예의 환자를 대상으로 하였다. 환자군의 연령은 28세에서 62세까지였으며 평균 연령은 42.2세였다. TNM 병기는 I기가 3명, II기가 11명, III기가 6명, IV기가 1명이었으며 조직학적 진단은 되었으나 정확한 병기 측정이 되지 않은 환자가 2명이었다. 대조군은 건강검진에서 같은 연령 분포도를 보인 유방 및 전신에 특이 질환이 발견되지 않은 19명의 여성으로 하였다.

원심분리기(3,000 rpm)를 사용하여 채취된 혈액으로부터 혈청이 분리되었고 각 환자의 혈청은 10 $\mu$ l 단위로 재분주하여 액체질소에서 얼리고 이것들은 사용 시까지 -70°C에

**Table 1.** Incidence of expression of proteomic patterns in cancer and control group

Key Value (M/Z)	Control group	Cancer group	Sensitivity (%)	Specificity (%)
1452*	5/19	17/23	73.9	73.7
1454 <sup>†</sup>	15/19	6/23	78.9	73.9
2111*	6/19	18/23	78.3	68.4
3903 <sup>†</sup>	13/19	8/23	68.4	65.2
4677*	7/19	16/23	69.6	63.2
4682 <sup>†</sup>	14/19	7/23	73.7	69.6
4818*	6/19	15/23	65.2	68.4
5613 <sup>†</sup>	12/19	6/23	63.2	73.9
7160*	5/19	16/23	69.6	73.7
7704*	4/19	18/23	78.3	78.9
8068*	5/19	17/23	73.9	73.7
8992 <sup>†</sup>	14/19	7/23	73.7	69.6

\*Key value has increased expression in cancer group. Mean sensitivity and specificity was 72.7%, 71.4%; <sup>†</sup> Key value has increased expression in normal group. Mean sensitivity and specificity was 71.6%, 70.4%.

보관하였다.

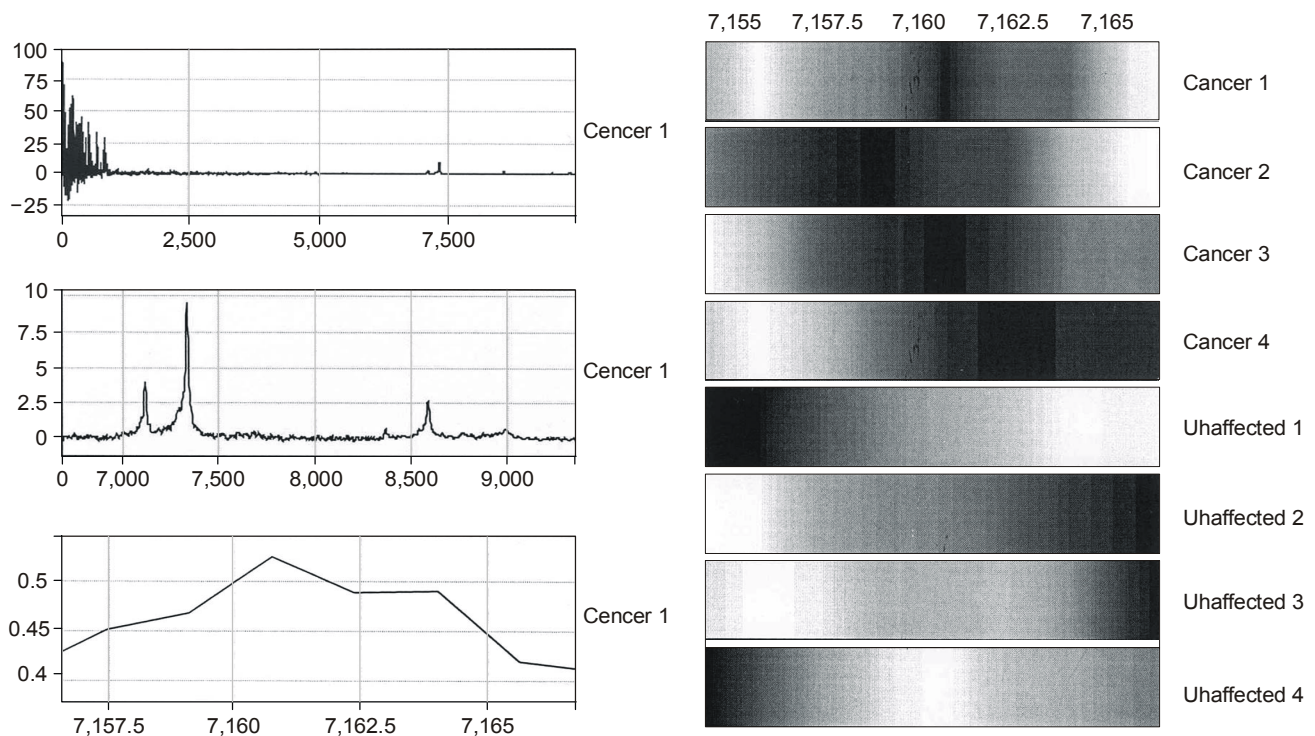
### 2) 단백질 칩 분석

단백질 칩으로는 C16 hydrophobic interaction chip (H4)이 사용되었다. 혈청시료를 녹인 후 pH 7.4인 PBS (phosphate-buffered saline)로 희석된 2 $\mu$ l의 각 혈청 시료를 H4 단백질 칩상에 올려 놓은 후 건조시켰다. 매트릭스(matrix)로는  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid를 사용하였다. 이 cinnamic acid를 acetonitrile과 trifluoroacetic acid의 혼합액(100 : 1)에 녹인 포화 용액 0.5 $\mu$ l를 단백질 칩상에 2번씩 더하여 주고 마른 후 Protein Biology System (PBS) II SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) 질량분석기 (Ciphergen)로 분석하였다. 질량분석기의 분자량 정확도는 0.1%이었고, 분자량 구간은 0~10,000 mass/charge (M/Z)이었다. Laser intensity는 190이었고, detector sensitivity는 7, 시료당 평균 60-shot로 실험결과가 얻어졌다. Software는 Pro-

**Table 2.** Scoring system of cancer and control group by combination of proteomic patterns

Case	Cancer	Normal
1	8	5
2	10	3
3	10	2
4	11	1
5	11	5
6	5	1
7	11	5
8	9	4
9	8	4
10	12	2
11	8	4
12	8	7
13	5	4
14	7	3
15	9	4
16	9	3
17	9	4
18	7	1
19	9	5
20	7	
21	7	
22	7	
23	9	
Mean score	8.5	3.5

Plus one point when below key value expressed; M/Z = 1452, 2111, 4677, 4818, 7160, 7704, 8068; Plus one point when below key value was not expressed; M/Z = 1454, 3903, 4682, 5613, 8992.



**Fig. 1.** Detection of optimum discriminatory biomarker sets derived from mass spectroscopy protein mass/charge intensities (chromatogram and density plot). intensitiesA representative SELDI-TOF mass spectrum is shown with the molecular weight calculation ( $M/Z$  values) along the x-axis and relative intensity along the y-axis. The spectrum is represented as a mass chromatogram (left) or a density plot (right) of the same data. An increasing magnification of the boxed region of the spectrum is shown to reveal complexity of the spectrum. The protein peak at  $M/Z$  7160 identified by the algorithm as belonging to the optimum discriminatory pattern, and is distinguishable above background.

tein Chip software 2.1 (Ciphergen Biosystems)을 사용하였다.

## 결 과

유방암 환자군과 대조군에서의 결과를 chromatography와 density plot으로 표현한 예는 Fig. 1과 같다. 유방암 환자군에서 의미 있게 발현된 키 값(key value,  $M/Z$ )은 1452, 2111, 4677, 4818, 7160, 7704, 8068 등 7개였다. 이와 반대로 유방암 환자군에서 발현이 감소하는 키 값도 5개가 관찰되었다 ( $M/Z=1454, 3903, 4682, 5613, 8992$ ).

각각의 단일 키 값의 민감도와 특이도는 63.2%에서 78.9%까지 나타났다. 각 분획에 대한 발현 빈도는 Table 1에 정리된 바와 같다.

단일 키 값만으로는 만족할 만한 민감도와 특이도를 보여주지 못했으므로 각 분획의 발현을 조합하여 점수를 매겨보았다. 유방암 환자군에서 주로 증가된 7개의 키 값 중 하나가 발현될 때마다 각 1점을 더하고 유방암 환자군에서 주로 감소된 5개의 키 값은 발현이 되지 않을 때 1점을 각각 더하여 환자군과 대조군에서의 점수를 비교해 보았다. 환

자군에서의 평균 점수는 8.5였으며 대조군에서의 평균 값은 3.5로 차이를 보였으며 임의로 cut-off value를 6점으로 정하였을 때 민감도는 91.2%, 특이도는 94.7%로 만족할 만한 결과를 보였다.

유방암 환자군에서 병기나 호르몬 수용체, c-erb B2 등의 발현과 점수 간의 유의한 관련은 발견되지 않았다.

## 고 찰

프로테오믹스(Proteomics)는 유전체 구조와 세포 내 행동 간 갭을 메우는 역할을 하는 도구로서, 계놈의 다이나믹한 단백질 생성물과 그들간의 상호관계를 연구하는 분야이다.(3) 프로테오믹스의 시작점인 단백질 생화학은 한때 매우 느리고 어려운 일로 여겨져 왔다. 고전적으로 단백질의 분석에는 two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)가 사용되어 왔다. 2D-PAGE는 단백질의 정제에서 뛰어난 성적을 보였지만 많은 노력과 시간을 필요로 하여 임상적인 적용에는 제한되었다.(4) 단백질 연구가 유전자 연구보다 매우 느린 이유는 DNA처럼 대량증폭이 불가

능하고 비교적 용액상에서 불안정하여 기능을 쉽게 잃는데 다 조직에서의 분리 정제가 매우 어려워 정제된 단백질을 사용하여 연구해야 하는 일에는 그만큼 적용이 더디었다. 이러한 데에는 단백질 자체가 생합성 후의 변형이 매우 다양하여 일률적인 추출, 분리, 정제방법이 적용되기 어려웠기 때문이기도 하다.

최근에 개발된 SELDI-TOF-MS란 Surfaced Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry를 일컫는 것으로, 단백질 질량분석의 한 방법이다. 특수한 chromatographic 표면 처리를 한 단백질 칩 위에서 직접 검체의 단백질을 포획 및 정제 과정을 거친 후, 표적 단백질을 레이저에 의한 desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry에 의해 검출하는 기술을 말한다.(5,6)

SELDI-TOF의 장점으로는 다른 정제 단계가 필요 없이 단백질을 직접 분리, 검출, 그리고 분석까지 가능하다는 점과 검사의 시간이 짧다는 점, 혈청, 뇌수막액, 소변 등 다양한 검체를 직접 이용할 수 있다는 점, 그리고 0.5~500 $\mu$ l의 적은 검체량을 이용할 수 있고 1 fmole의 농도까지 검출할 수 있다는 점 등이 있다.

이러한 SELDI-TOF의 장점을 이용하여 최근 다양한 질환에서 단백질 패턴에 대한 연구가 진행되고 있다. Wang 등은 전립선 암에서의 특이 단백질에 대한 단클론 항체의 발견에 이러한 기법을 적용하고자 하였으며, 난소암이나 폐암 등에 있어서도 이와 같은 시도가 계속되고 있으며 초기의 결과들이 발표되고 있다.(7-9) 또한 암 연구뿐만 아니라 감염성 질환이나 알츠하이머병 같은 신경학적 질환 혹은 대사성 질환에 있어서의 핵심 단백질의 동정 등 그 영역이 지속적으로 확장되고 있다.(10,11)

암과 관련된 프로테오믹스 연구의 주된 관심은 기존의 종양 표지자를 뛰어 넘는 특이적이면서도 높은 민감도를 갖는 단백질을 발견하는 데 초점이 맞춰져 있으며 이를 통하여 고위험군에서의 조기발견 및 대량검진에 적용 등이 주된 관심사라고 할 수 있다.

아직까지 유방암에서 이러한 특이 단백질은 발견되지 않았으나 최근 연구에서는 SELDI-TOF를 이용한 가능성이 보고되고 있다. Li 등(12)은 유방암 환자에서 3개의 의미 있는 peak가 존재함을 발표하였고 3개의 단백질을 조합했을 때 민감도와 특이도가 각각 93%와 91%로 임상적 적용의 가능성이 높음을 시사하였으며 Paweletz 등(13)은 유두 분비물을 이용한 검사를 시도하여 적용범위를 넓혔다.

저자들의 연구에서는 유방암 환자에서 증가되는 7개의 값(M/Z value)과 감소되는 5개의 값이 발견되었다. 단일 값으로는 유방암에 높은 민감도와 특이도를 나타내는 값은 없었으며 다만 각 발현의 패턴을 조합했을 때는 차이를 보여 임상적 적용의 가능성을 보였다. 12개의 단백질 패턴이 발견된 것은 연구의 초기 단계이고 실험의 대상이 적다는 점이 이유일 것으로 추정되며 또한 전기적 혹은 화학적인

배경 잡음(noise)의 가능성도 배제할 수 없을 것으로 생각되어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

각 키 값에 해당하는 단백질의 동정에 대한 연구도 함께 진행되어야 하며 아마도 저분자량을 갖는 혈청 단백질 혹은 펩타이드로 추정된다. 이러한 단백질은 대부분 환자의 장기 혹은 암조직 자체에서 분리된 것으로 생각되며 대사성 산물일 가능성도 있다.

이러한 SELDI-TOF 기법은 실험과정의 작은 변화에 따라 결과가 달라질 수 있어 반복성 혹은 개연성이 떨어지는 단점이 있으므로 의미 있는 단백질의 동정을 이루기 위해서는 실험 방법의 표준화가 우선적으로 이루어져야 할 것으로 생각되며 다수의 환자군과 대조군을 통한 실험이 이루어져야 할 것으로 생각한다.

## 결 론

23예의 유방암 환자와 19예의 정상 여성을 대상으로 SELDI-TOF mass spectrometry를 시행하여 혈청 단백질 패턴을 분석한 결과 유방암 환자군에서 1452, 2111, 4677, 4818, 7160, 7704, 8068 등 7개의 키 값(key value, M/Z)이 의미 있게 증가함을 관찰하였다. 이와 반대로 유방암 환자 군에서 발현이 감소하는 키 값도 5개가 관찰되었다(M/Z = 1454, 3903, 4682, 5613, 8992).

각각의 단일 키 값의 민감도와 특이도는 63.2%에서 78.9%였으며 단백질 발현의 패턴을 조합했을 때 민감도와 특이도가 각각 93%와 91%로 만족할 만한 결과를 나타내었다. 연구가 지속되고 표준화가 이루어진다면 기존의 진단 방법과 더불어 유방암의 조기 진단에 적용이 될 것으로 기대된다.

## REFERENCES

- 1) Chan DW, Sell S. Tumor markers. In: Burtis CA, Ashwood ER editors. Tietz fundamental of clinical chemistry. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001;390-413.
- 2) Chan DW, Beveridge RA, Muss H, Fritsche HA, Hortobagyi G, Theriault R, et al. Use of Truquant BR Radioimmunoassay for early detection of breast cancer recurrence in patients with stage II and stage III disease. J Clin Oncol 1997;15:2322-8.
- 3) LaBaer J. Genomics, proteomics, and the new paradigm in biomedical research. Genet Med 2002;4(6 Suppl):2S-9S.
- 4) Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-47.
- 5) Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of micromolecules. Rapid Commun Mass Spectrom 1993;7:576-80.
- 6) Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spec-

- trometry. Electrophoresis 2000;21:1164-7.
- 7) Wang S, Diamond DL, Hass GM, Sokoloff R, Vessella RL. Identification of prostate specific membrane antigen (PSMA) as the target of monoclonal antibody 107-1A4 by proteinchip; array, surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) technology. Int J Cancer 2001;92:871-6.
- 8) Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, Clark RA, Tockman MS. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre-malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry. Lung Cancer 2003;40:267-79.
- 9) Emanuel FP, Ali MA, Ben AH, Peter JL, Vincent AF, Seth MS, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 2002;359:572-7.
- 10) Thulasiraman V, McCutchen-Maloney SL, Motin VL, Garcia E. Detection and identification of virulence factors in Yersinia pestis using SELDI Protein Chip system. Biotechniques 2001;30:428-32.
- 11) Austen BM, Frears ER, Davies H. The use of seldi proteinchip arrays to monitor production of Alzheimer's betaamyloid in transfected cells. J Pept Sci 2000;6:459-69.
- 12) Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clinical Chemistry 2002;48:1296-304.
- 13) Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnant C, Liotta LA, et al. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. Dis Markers 2001;17:301-7.