

## SELDI-ToF-MS를 이용한 혈청 단백질 패턴 분석에 의한 난소암 생표지자의 개발

인제대학교 의과대학 상계백병원 산부인과<sup>1</sup>, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>2</sup>  
이철민<sup>1</sup> · 강순범<sup>2</sup> · 조용균<sup>1</sup> · 최 훈<sup>1</sup> · 김복린<sup>1</sup>

**목적** : SELDI-ToF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)는 바이오 칩을 이용하는 친화도 기반의 질량분광법이며, 적은 시료로 신속히 결과를 얻을 수 있다. 본 연구는 SELDI-ToF-MS에 의한 혈청 단백질 패턴 분석을 이용하여 난소암을 진단하기 위한 생표지자를 개발하고자 하였다.

**연구 방법** : 2003년 10월부터 2005년 3월까지 인제대 상계백병원에서 총 43명의 상피성 난소암 환자와 총 77명의 대조군을 대상으로 하였다. 수술적 병기는 제Ⅲ기가 가장 많았고(30예, 69.8%), 병리조직학적 유형은 장액성 난소암이 가장 많았다(34예, 79.1%). 제1단계로 21명의 난소암 환자와 39명의 대조군의 혈청을 단백질 칩(SAX2<sup>®</sup> Chip, Ciphergen ProteinChip<sup>®</sup> Arrays)에 분주하고 SELDI-ToF-MS로 분석한 후, decision tree법을 이용한 생물정보학적 분석을 통하여 난소암을 예측할 수 있는 최적 생표지자를 얻었다. 제2단계로 22명의 난소암 환자와 38명의 대조군의 혈청에서 SELDI-ToF-MS로 단백질 패턴을 얻고 제1단계 실험에서 얻은 생표지자를 이용하여 난소암을 예측하였다.

**결과** : 난소암 예측에 대한 SELDI-ToF-MS의 민감도와 특이도는 각각 90.9%와 84.2% (양성예측률 76.9%, 음성예측률 94.1%)였으며, 혈청 CA-125의 민감도와 특이도는 각각 86.4%와 78.9%였다(양성예측률 70.4%, 음성예측률 90.0%). 연령, 병기별 및 조직학적 유형에 따른 진단율의 차이는 없었다.

**결론** : 본 저자들은 바이오 칩을 이용한 혈청 내 단백질 패턴 분석을 이용하여 높은 민감도와 특이도로 난소암을 진단하였다. 향후 더 많은 환자를 대상으로 한 무작위 연구가 이루어져야 하리라 생각된다.

**중심단어** : SELDI-ToF-MS, 난소암, 생표지자, 단백질학, 생물정보학

## 서 론

우리나라에서 악성 신생물로 인한 사망은 2001년 현재 인구 10만 명당 123.5명에 달하여 사망원인 제1위를 차지하고 있다.<sup>1</sup> 난소암은 우리나라에서 연간 약 1,500명 정도가 새로이 이환되며, 전체 암 발생 중 약 3.8%를 차지하여 여성에게 발생하는 암 중 8위를 차지하고 있는데, 이는 미국 등 서구에서 약 4.0%를 차지하는 데 비하여 낮은 수준이지만, 1991년 이래 약 2배 정도로 증가하고 있는 추세에 있다.<sup>2,3</sup> 상피성 난소암은 진단 당시 제3기 또는 제4기의 진행성 난소암으로 발견되는 경우가 약 50%에 달하고 제1기에서 발견되는 경우는 25%에도 미

치지 못하는데, 이는 난소암이 증상이 거의 없고 조직에 대한 직접적 접근이 용이하지 않으므로 조직표본을 쉽게 얻을 수 없어 조기진단이 어렵기 때문이다. 제1기 난소암의 5년 생존율은 90% 이상이고 수술 및 항암화학요법으로 적절히 치료하는 경우 완치를 기대할 수 있는데 비하여, 진행성 난소암의 5년 생존율은 35%를 넘지 못한다. 그러므로 적절한 선별검사 방법이 확립되어 난소암을 조기에 발견할 수 있다면 난소암 환자의 치료성적을 높이고 궁극적으로 생존율을 개선할 수 있으리라 기대한다.

난소암의 선별검사로 현재까지 주목 받아온 것은 혈청 CA-125 검사와 질식 초음파 검사이다.<sup>4</sup> 단클론성 항체 OC 125를 이용하는 혈청 CA-125 검사는 가장 널리 사용되는 난소암의 종양표지물질이지만, 단독으로 사용할 경우 제1기 상피성 난소암 환자 진단에 대한 민감도는 50-60%에 불과하고 양성 예측률은 약 10%에도 미치지 못한다. 더욱이 혈청 CA-125는 자궁내막증, 자궁선근

논문접수일 : 2006년 4월 12일 채택일 : 2006년 5월 12일  
교신저자 : 이철민, 139-707 서울시 노원구 상계 7동 761-1  
인제대학교 의과대학 상계백병원 산부인과  
전화 : 02) 950-1058 · 전송 : 02) 950-1955  
E-mail : morula@chol.com

본 논문은 2004년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

증, 골반염 등의 양성질환에서도 상승하므로 위양성률이 높다. 난소암의 선별검사에 초음파검사와 혈청 CA-125 검사를 같이 시행하면 혈청 CA-125 단독으로 시행하는 경우에 비하여 특이도를 개선할 수 있다고 보고되고 있지만,<sup>5</sup> 민감도는 여전히 약 60-80% 정도로 보고되며, 더욱이 위양성률은 20%까지 보고되었다.<sup>6-8</sup> 따라서 혈청 CA-125에 기반하여 난소암의 위험인자를 가지고 있지 않은 여성을 대상으로 선별검사를 시행하는 것은 임상연구 목적에만 국한하도록 하고 있다.<sup>4</sup>

암은 매우 이질적(heterogenous)이며 다양한 항원을 가지고 있으므로 몇 개의 단백질만으로 암을 진단하기는 어렵다. DNA 칩은 동시에 많은 DNA를 검사하여 유전체 수준에서 암을 진단함으로써 몇 개의 DNA 또는 단백질만으로 암을 진단하는 한계를 극복한 기술이다. 그러나, 세포 기능의 대부분을 매개하는 것은 단백질이다. 단백질은 세포 내에 다양한 종류가 존재하므로 많은 단백질을 동시에 검사한다면 암을 더욱 정확히 진단할 수 있으리라 생각된다.

단백질을 이용한 생표지자(biomarker) 개발은 과거 주로 이차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis; 2DE)에 의존하여 왔다. 2DE는 수백 내지 수천 개의 단백질을 검사하고 동정할 수 있지만, 시간이 많이 소요되고 재현성이 낮아 임상적으로 활용되기에는 한계가 있다.

SELDI-ToF-MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)는 시료를 화학적으로 처리된 바이오 칩의 표면에 흡착시키고 불순 물질을 완충액으로 세척하여 제거하는, 친화도에 기반한 질량분광법이다. SELDI-ToF-MS는 2DE와 같은 전 처치를 필요로 하지 않으며 자동화된 기기를 사용하여 신속하게 분석이 이루어지는 장점이 있다. 혈청을 시료로 하는 경우, SELDI-ToF-MS는 혈청 내의 단백질을 약 30-50,000 kDa 정도의 작은 분자로 분해하고 이를 전자기장 내에서 이동시켜 검출기에 도달하는 시간 차에 의해 분자량에 따른 피크(peak)를 그린다. 이 때 생성되는 대량의 정보로부터 생물정보학적 분석(bioinformatic analysis)을 거쳐 생표지자를 도출한다.

Wright 등이 전립선암의 진단에 활용한 예를 보고한 이래, Petricoin 등, Li 등은 SELDI-ToF-MS를 이용하여 각각 난소암, 유방암을 좋은 성적으로 진단하였다고 보고하였다.<sup>9-11</sup>

Petricoin과 Li 등은 단백질 패턴을 분석하기 위하여 인공지능과 신경망 이론(neural network)에 기초한 유전 알고리즘을 사용하였는데, 이는 생표지자 후보 단백질이 나타날 때마다 판정 기준을 바꾸어 오히려 생표지자 발견을 어렵게 하는 'overfitting' 오류가 있을 수 있다는 단점이 있다.<sup>12,13</sup>

Decision tree는 종속변수가 명목척도인 함수를 해결하는 데 학습에 의하여 지능적으로 분지하는 방법으로 귀납적 추론에 사용되며 대규모의 자료로부터 연관성을 찾아내는 데 적합한 생물정보학적 도구인데 과도한 보정을 가하는 신경망 이론에 비하여 overfitting 오류는 적다고 알려져 있다.<sup>14,15</sup>

국내에서는 SELDI-ToF-MS와 관련한 연구가 미미한 실정이며, 더욱이 SELDI-ToF-MS를 난소암 진단에 이용하고자 한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 이에 본 저자들은 SELDI-ToF-MS와 decision tree를 이용한 혈청 단백질 패턴 분석을 통하여 난소암을 선별 검사할 수 있는 생표지자를 개발하고자 본 연구를 시행하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

2003년 10월부터 2005년 3월까지 인제대의 상계백병원에서 난소 종양이 의심되어 개복수술을 시행하고 병리조직학적으로 상피성 난소암이 확인된 43명과, 난소 종양 외의 양성 부인과 질환으로 수술 받은 환자 77명을 대조군으로 하여 총 120명을 대상으로 하였다(Fig. 1).

#### 1) 제1단계-패턴 인식

2003년 10월부터 2004년 11월까지 상피성 난소암 환자 21명과 대조군 39명으로부터 각각 수술 당일 오전 7시에 혈액 5 cc를 채취하였다. SELDI-ToF-MS를 시행하여 난소암과 대조군의 혈청 내 단백질 패턴을 각각 분석하고, 각 질량전하비 피크(peak)는 전체 이온 프로파일에 대한 표준화 값으로 환산하여 로그값으로 표시하였다(로그 표준화 강도, log-normalized intensity).

Decision tree를 응용한 소프트웨어(Biomarker Patterns™ Software, Ciphergen Biosystems, USA)를 이용하여 생물정보학적 분석을 시행하였으며, 난소암에 대한 생표지자로 적절한 질량전하비를 도출하고 로그 표준화 강도

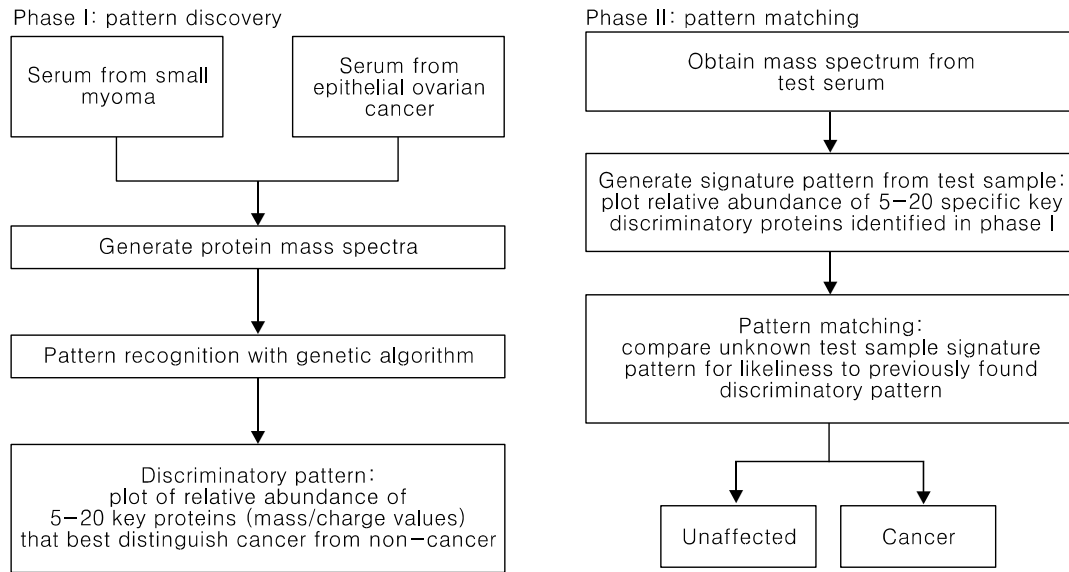


Fig. 1. Phases of N-dimensional proteomic analysis.

의 임계치를 구하였다. Decision tree의 분기규칙(splitting rule)은 Gini법을 적용하였다.<sup>14</sup>

## 2) 제2단계-패턴 적용

2004년 11월부터 2005년 3월까지 상피성 난소암 환자 22명과 대조군 38명으로부터 각각 수술 당일 오전 7시에 혈액 5 cc를 채취하였다. SELDI-ToF-MS를 시행하고 제1 단계 실험에서 얻은 최적화된 질량전하비 및 로그 표준화 강도의 임계치를 이용하여 난소암 예측에 대한 SELDI-ToF-MS의 민감도 및 특이도를 계산하였다.

제1단계(패턴 인식)와 제2단계(패턴 적용) 실험 대상 암환자 간 나이에는 유의한 차이가 없었다( $p=0.209$ ; Student t-test). 대상 환자의 FIGO 병기는 제1기부터 제4기까지 모든 병기가 포함되었으며, 양 군 간 조직학적 분포 및 수술적 병기 분포간에는 차이가 없었다(Table 1).

## 2. 단백질 칩 준비

혈액을 실온에서 1시간 방치한 후 3,000 rpm으로 5분 간 원심 분리하여 4°C 냉장고에 1일 간 보관하였다. 중간층 용액을 취하여 10μl씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. 양이온 교환 단백질 칩(anion-exchange ProteinChip®, SAX2®, CIPHERGEN Biosystems, USA)에 소수성 펜(hydrophobic pen, PAP)으로 원(spot)을 그리고 말렸다. 각 점을 5μl의 75% 아세토니트릴(acetonitrile)로 전처리하고 완

Table 1. Clinicopathologic characteristics of the ovarian cancer patients included in the study

	Phase I (n=21)	Phase II (n=22)	Total
Age	49.5±16.0	55.1±12.5	52.3±14.4*
Histology			
Serous	17 (81.0%)	17 (77.3%)	34 (79.1%)
Endometrioid	3 (14.3%)	1 (4.5%)	4 (9.3%)
Mucinous		1 (4.5%)	1 (2.3%)
Mixed epithelial	1 (4.8%)	2 (9.1%)	3 (7.0%)
Undifferentiated		1 (4.5%)	1 (2.3%)
FIGO stage			
I	3 (14.3%)	2 (9.1%)	5 (11.6%)
II	1 (4.8%)	1 (4.5%)	2 (4.7%)
III	14 (66.7%)	16 (72.7%)	30 (69.8%)
IV	3 (14.3%)	3 (13.6%)	6 (14.0%)

\*Not significant by Student t-test

전히 마르지 않도록 주의하면서 2-3분간 습실(humidity chamber)에 배양(incubation)하였다. 각 원을 5μl의 HPLC-grade water로 세척하여 아세토니트릴을 제거하였다. 액화 아세토니트릴 용액에 녹인 시료를 4μl씩 각 원에 분주하였으며 마르지 않도록 주의하였다.

8 M 요소(urea)와 1% CHAPS PBS로 처리한 후 비특이 단백질을 제거하기 위하여 pH 4.0의 50 mM 나트륨인산염(sodium phosphate)과 0.05% 트리톤(triton) X-100으로

**Table 2.** List of molecular weights of which log-normalized intensity between ovarian cancers and controls were significantly different and adopted as candidates for decision tree analysis in pattern discovery experiment

m/z value (kDa)	Log-normalized Intensity		p-value <sup>†</sup>
	Ovarian cancer	Control	
3719.14	2.4090±1.7261	1.1758±1.8124	0.010
3501.23*	1.3211±1.6376	2.7346±2.1584	0.019
4498.59	3.0872±1.2596	1.9249±1.5306	0.020
25689.60	0.4231±0.1593	0.3084±0.1230	0.021
6983.58	10.1106±9.7161	4.1790±5.7280	0.027
4275.12	-0.3035±0.6669	0.7299±1.7054	0.032
56197.76	0.2019±0.1670	0.4154±0.3533	0.038
3802.39	0.3856±1.3037	1.3485±1.7862	0.040
5110.09	2.1068±1.5371	1.1416±1.1071	0.044
50627.85	1.1254±1.2912	0.6872±0.9143	0.047
3343.80	0.7088±2.2278	1.7425±1.8160	0.049

\*Determined as a biomarker by decision tree analysis, <sup>†</sup> Student t-test

제조된 결합 완충액(binding buffer)을 10배로 희석하여 3회 세척하고 말렸다. 탈착(desorption/ionization)을 위해 각 원 위에 50% 아세토니트릴과 0.5% TFA를 함유한 포화(saturated) SPA로 이루어진 에너지 흡수 분자(energy absorbing molecule; EAM)를 0.5μl씩 첨가하여 결정체(crystal)를 형성하도록 하였다.

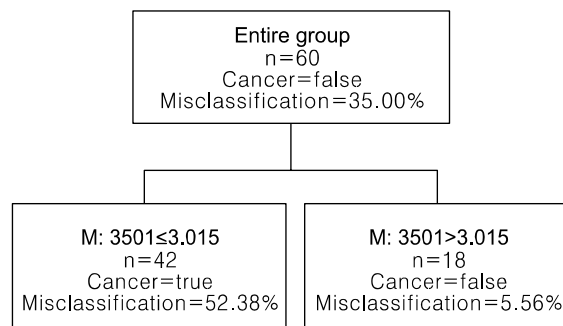
### 3. SELDI-ToF-MS

질량분광기는 230-280 nm 단위의 질소 레이저를 조사하는 ProteinChip Reader<sup>®</sup> model PBSII (Ciphergen Biosystems, USA)를 사용하였고 자료분석에 ProteinChip data analysis software<sup>®</sup> version 3.0 (Ciphergen Biosystems, USA)을 이용하였다. 각 피크에 대하여 난소암과 대조군 혈청의 로그 표준화 강도를 Student t-test로 비교하고 p-value 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

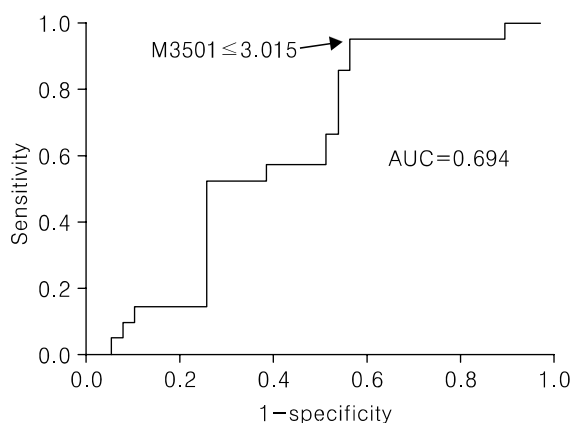
## 결 과

### 1. 패턴 인식

상피성 난소암 환자 21명과 대조군 39명의 혈청을 이용하여 SELDI-ToF-MS를 시행하였으며, 총 156개의 질



**Fig. 2.** Decision tree classification generated by Biomarker Patterns<sup>™</sup> Software to determine optimal m/z value and cutoff for log-normalized intensity. M; peak mass in kDa.



**Fig. 3.** Receiver operating characteristic curve for predicting ovarian cancer by SELDI-ToF-MS in pattern discovery experiment. Decision tree analysis determined 3501 kDa protein with log-normalized intensity of 3.015 or less as a biomarker for ovarian cancer. The area under the curve was 0.694.

량전하비 피크를 얻어 로그 표준화를 거쳤다. 이 중 11개의 질량전하비 피크(로그 표준화 강도)는 난소암과 대조군 간에 유의한 차이를 보였다(Table 2). 난소암과 대조군 간 차이를 보인 질량전하비를 인자로 하여 Biomarker Patterns<sup>™</sup> Software로 분석하였으며, 난소암 예측에 가장 적절한 질량전하비로 3501.23 kDa이 선택되었고, 그 임계치는 3.0148이었다(Fig. 2). 이를 이용하여 ROC 곡선을 작성하였으며 곡선 하 면적(area under the curve, AUC)은 0.694였다(Fig. 3). 검증 통계량(validation statistics)은 Table 3과 같다.

## 2. 패턴 적용

패턴인식 실험과 다른 난소암 환자 22명과 대조군 38 명으로부터 채취한 혈청으로 SELDI-ToF-MS를 시행하

**Table 3. Validation statistics by decision tree analysis in pattern discovery experiment**

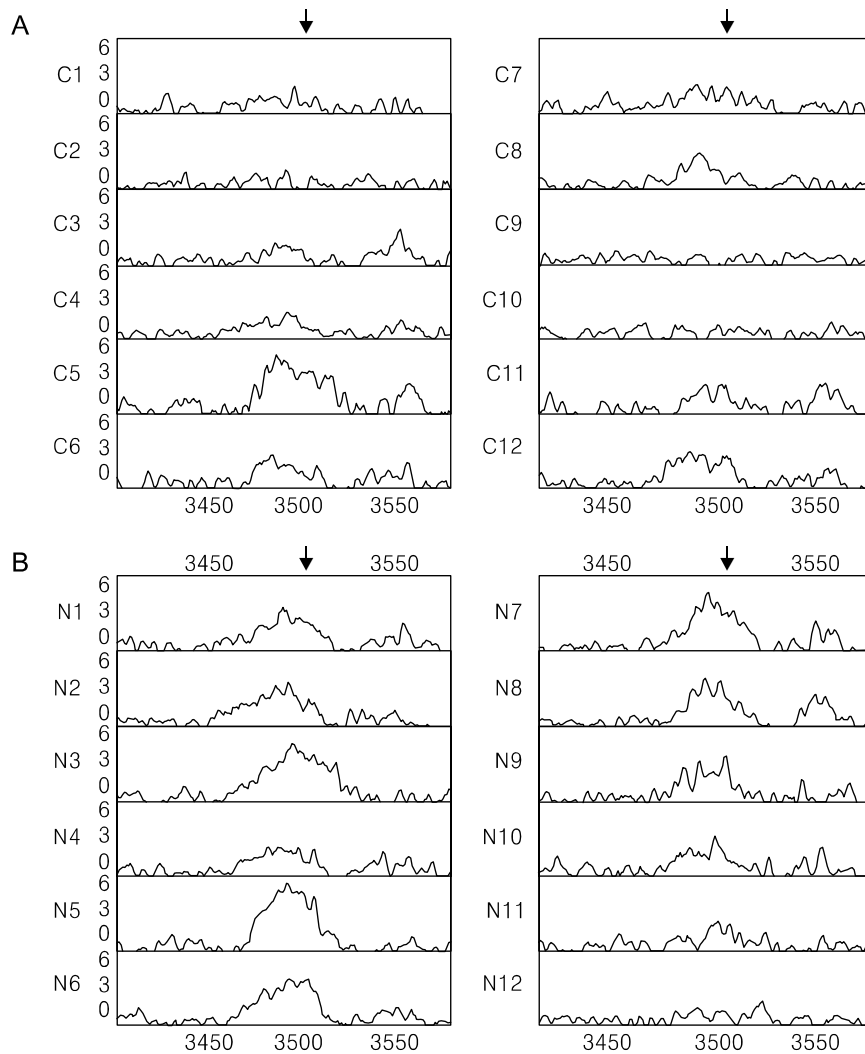
Nodes	Cross-validated relative cost	Resubstitution relative cost	Complexicity
7	1.0615±0.1388	0.1795	0.0000
6	1.0615±0.1382	0.2271	0.0295
5	1.0615±0.1382	0.2930	0.0434
2	1.0456±0.1116	0.6117	0.0465*
1	1.0000±0.0000	1.0000	0.2101

\*Minimum validation error

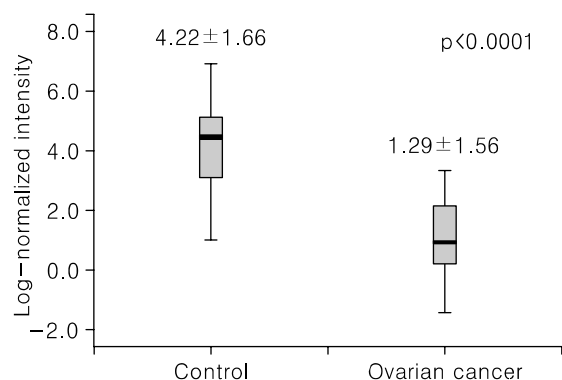
였다. 패턴인식 실험에서 난소암 추정에 적절하리라고 선택된 질량전하비 3501.23 kDa에서 난소암과 대조군의 로그 표준화 강도는 각각  $1.2943 \pm 1.5638$ 과  $4.2203 \pm 1.6594$  (평균±표준편차)로서 난소암 환자 군에서 유의하게 낮았다( $p < 0.001$ )(Fig. 4, 5).

질량전하비 3501.23 kDa의 로그 표준화 강도가 임계치 3.0148 이하인 경우를 난소암으로 추정하였을 때 상피성 난소암 환자 22명 중 20명을 난소암으로 판정하였으며, 대조군 38명 중 32명을 정상으로 판정하여 민감도 90.9%, 특이도 84.2%를 보였다(양성예측률 76.9%, 음성예측률 94.1%)(Table 4).

연령별 성적을 살펴보면, 50세 미만의 난소암 10예에서는 모두 암을 정확히 진단하였으며, 50세 이상 난소암 12예에서는 83.3% (10예)에서 난소암을 진단하였다.



**Fig. 4. (A) Samples of spectra of the peaks forming the splitting rule. The protein peaks were detected on SAX2<sup>®</sup> chip. The peaks of 3501 kD (arrow) appear to be downregulated in the cancer (A) compared to the control (B) groups. (B) Samples of spectra of the peaks forming the splitting rule. The peaks of 3501 kD (arrow) appear to be downregulated in the cancer (A) compared to the control (B) groups.**



**Fig. 5.** Boxplots for log-normalized intensity of 3501 kDa protein from controls and ovarian cancers detected by SELDI-ToF-MS on SAX2® chips in pattern matching experiment.

수술적 병기별로는 제I기 또는 제II기 난소암은 66.7% (3예 중 2예)를 진단하였으며, 제III기 또는 제IV기 난소암은 94.7% (19예 중 18예)를 진단하였다.

조직학적 유형별로는, 장액성 암 17예의 88.2% (15예)에서 진단하였으며, 예후가 나쁜 미분화 난소암 1예, 혼합 상피성 난소암(mixed epithelial carcinoma) 2예, 자궁내막양 암(endometrioid carcinoma) 1예 및 점액성 암(mucinous carcinoma) 1예에서는 모두 암을 정확히 진단하였다.

## 고 찰

혈청 내의 단백질 분포는 특정 병리상태에 따라 달라질 수 있으며, 난소암 환자에서의 특징적 단백질 분포를 관찰함으로써 난소암을 선별할 수 있으리라 예상된다. 혈청은 조직에 비하여 채취가 용이하므로 선별검사를 위한 시료로서 적당하다. 그러나 혈청 내에 존재하는 수많은 종류의 단백질을 동정하고 비교하기 위해서는 많은 양의 정보를 처리하여야 하는데, 최근 비약적으로 발달하고 있는 생명정보학(bioinformatics)은 단백질학적 분석에서 생성되는 대량의 정보를 처리하는데 유용하다.

20세기 초에 원리가 개발된 질량분광법(mass spectrometry)은 시료로부터 극소량의 물질을 검출할 수 있는데, 1980년대에 이르러 단백질과 같이 분자량이 큰 물질도 검출이 가능하게 되어 오늘날 물리학, 생물학 등을 포함한 광범위한 분야에서 사용되고 있으며 탄수화물, 핵산, 스테로이드 등의 분자구조 규명, 환경 공해물질의

**Table 4.** Performance of SELDI-ToF-MS for predicting ovarian cancer from controls in pattern matching experiment. Numbers in parentheses denote the number of correctly classified sample out of total number of samples in the group

	Ovarian cancer (N=22)	Control (N=38)	p-value <sup>†</sup>
Log-normalized intensity*	1.2943±1.5638	4.2203±1.6594	<0.001
Sensitivity	90.9% (20/22)		
Specificity	84.2% (32/38)		
Positive predictive rate	76.9% (20/26)		
Negative predictive rate	94.1% (32/34)		

\* Log-normalized intensity of 3501 kDa in Mean±STD, <sup>†</sup> Student t-test

검출, 운동선수를 대상으로 한 도핑테스트 등, 그 응용범위가 넓은데, 특히 유기물질의 검출, 단백질의 대량동정에 유용하게 사용될 수 있다.<sup>16</sup>

질량분광기(mass spectrometer)는 대상 물질의 분자 중 전자를 얻거나 잃음으로써 이온(ion)으로 전환된 질량(mass)을 측정하는 장치이다. 질량분광기는 분자량을 직접 측정하는 대신 분자에서 생성된 이온의 질량전하비(mass-to-charge ratio, m/z ratio)를 측정한다. 질량전하비는 단위 전하당 질량을 의미하며 표시단위는 Dalton이다.

고체 및 액체 형태의 시료가 모두 분석 가능한데 일반적으로 시료를 승화시켜 기체상태로 질량분광기의 진공관내에 분사하여 주입한다. 기체상태의 분자는 다시 적당한 크기로 잘라지고 이온화 과정을 거친 후 강력한 전자기장에 의하여 진공관내에서 빠른 속도로 이동하여 검출기(detector)와 충돌한다. 검출기는 이온의 흐름을 전류로 변환하고 이온의 비행시간을 계산하여(비행시간법, time of flight; ToF) 질량전하비에 따른 스펙트럼을 보여주는데 이로부터 분자의 질량이 산출된다.

질량분광기를 이용한 단백질의 분석의 일반적 과정은 시료를 이차원 전기영동(two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; 2-D SDS PAGE) 후 트립신(trypsin)으로 잘라내어 순수한 단백질을 분리하여 질량분광기 내에서 기화(vaporization), 이온화의 과정을 거쳐 진공상태의 전장을 통과하여 검출기에 충돌시킨다. 단백질은 일반적으로 휘발성이 낮으므로 기화 및 이온화를 위하여 고분해능 매트릭스 보조 레이저 탈

착 질량분광기(matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI), 표면증강 레이저 탈착 질량분광기(surface-enhanced laser desorption/ionization; SELDI) 등을 사용한다.

다양한 물질이 혼재되어 있는 시료를 질량분광기로 분석하기 전에 정제단계를 거치기도 하는데, 가스 크로마토그래피(gas chromatography), 액체 크로마토그래피(liquid chromatography), 초임계액 크로마토그래피(super-critical fluid chromatography), 모세관 크로마토그래피(capillary electrophoresis) 등 다양한 방법이 있지만 단백질의 분석에는 이차원 전기영동법(2-dimensional electrophoresis)이 가장 많이 사용된다.

질량분광법은 19세기 말 진공관내에 기체상태로 존재하는 이온의 질량측정에 관한 Thompson의 실험에서 그 유래를 찾을 수 있다.<sup>17</sup> 1897년 물리학자인 Thompson 경은 Cambridge 대학 Cavendish 연구소에서 진공관을 이용하여 전자(electron)와 양선(positive ray)의 존재를 증명하는 실험을 하였다. 그는 전자기장이 기체상태의 이온에 미치는 영향을 측정하는 최초의 질량분광기를 고안하였고 이온이 질량전하비에 따라 다른 궤적을 그리는 것을 발견하였으며, 1906년 기체 내에서의 전자전달에 관한 연구로 노벨상을 수상하였다.

1946년 Stephens는 이온이 직선 진공관 내에서 검출기를 향하여 날아가는 속도를 측정함으로써 특정 이온을 분리 동정할 수 있다는 비행시간법의 개념을 확립하였다.<sup>18</sup> 그러나 1970년대까지 질량분광기로 분석할 수 있는 것은 분자량이 적은 물질에 한정되었는데, 이는 분자량이 큰 물질이 기화 또는 이온화하는 것에 제한적이었기 때문이며, 1980년대에는 분자량 크기 제한을 극복하기 위한 연구가 집중적으로 이루어졌다.

비행시간법을 이용한 질량분광기는 시료를 이온화시킨 후 전압 차에 의하여 이온을 source로부터 검출기를 향하여 비행하게 하며 일단 비행을 시작한 이온은 전압이 없는 구역(field-free drift zone)을 통과하게 된다. 이때 이온이 검출기에 도달하는 시간은 이온당 질량( $m/z$  value)에 비례한다.

이온화의 방법에는 분자에 전자를 충돌(bombardment)시키는 방법과 레이저 빔을 가하여 레이저의 강력한 에너지가 분자를 흥분시키고 전자를 유리하여 양전하를 띄게 하는 방법, 그리고 고전압 판 사이의 기체가 플라스마를 형성하여 이온 구름이 되도록 하는 방법 등이 있다.

고분해능 매트릭스 보조 레이저 탈착 질량분광법은 1980년대 중반 Tanaka에 의하여 개발되었다. Tanaka는 고체 또는 액체 시료를 자외선 흡수력이 강한 매트릭스에 넣은 후 레이저 빔을 가함으로써 시료의 기화 및 이온화를 동시에 달성하는 방법을 고안하였으며, 이 공로로 2002년에 노벨화학상을 수상하였다.<sup>19</sup>

SELDI-ToF-MS는 1993년에 Hutchens 등에 의하여 개발되었는데, 단백질을 화학 처리된 표면에 선택적으로 부착시키고 완충제로 세척함으로써 불순물을 제거할 수 있는 친화력(affinity)에 기초한 질량분광법이다. SELDI-ToF-MS는 색층분석 배열(chromatographic array)과 세척법을 결합함으로써 고속, 고분해능을 실현하여 조직과 혈청에 포함된 단백질을 효과적으로 분석할 수 있다.<sup>20</sup> SELDI-ToF-MS의 구체적 방법으로는 스테인리스 강(stainless steel) 또는 알루미늄으로 제작된 칩에 양전하 또는 음전하를 띄게 하고 여러 가지 화학적 처리를 한 후 시료를 올려놓는다. 다음 비특이적 단백질을 제거하기 위하여 세척과정을 거친 후 질소 레이저 탈착 질량분광기로 1,000 Da 미만에서 300 kDa 크기의 다양한 단백질을 비행시간법을 이용하여 이온당 질량의 패턴을 분석한다. SELDI-ToF-MS는 레이저에 의해 검체를 기화하여 파괴하기 때문에 대상 단백질을 동정하지 못한다는 제한이 있는데, 질량분광법을 두번 적용하는 직렬 질량분광법(tandem mass spectrometry)을 이용하면 아미노산 서열분석 및 단백질 동정이 가능하다.

Wright 등은 전립선 특이 항원(prostate specific antigen, prostate specific peptide), 전립선 산성인산분해효소(prostate acid phosphatase), 전립선 특이 막 항원(prostate specific membrane antigen) 등에 대한 항체를 칩의 표면에 부착시킨 후 SELDI-ToF-MS를 적용하여 전립선암에 대한 생표지자를 추출하였다고 보고하였다.<sup>9</sup>

Li 등은 103명의 유방암 환자가 포함된 169명의 대상자로부터 혈청을 채취하여  $Ni^{2+}$ 로 처리한 ProteinChip® (Ciphergen, USA)을 이용한 SELDI-ToF-MS로 단백질 패턴을 분석한 결과 민감도 93%, 특이도 91%로 3개의 생표지자를 얻었다고 보고하였다.<sup>11</sup>

Petricoin 등은 SELDI-ToF-MS를 이용하여 혈청 내 단백질 패턴을 분석함으로써 좋은 성적으로 난소암을 진단할 수 있었다고 보고하였다.<sup>10</sup> 이들은 50명의 난소암 환자 혈청과 50명의 정상인 혈청을 분석하여 단백질 패턴

틴(proteomic pattern)을 관찰한 후 이를 50명의 난소암 환자와 66명의 정상인에서 얻은 은폐된(masked) 116명의 환자 혈청 분석에 적용하였는데 민감도 100% [93-100], 양성예측률 94% [84-99]의 결과를 나타내었다. 이들은 500-2,500 dalton의 작은 펩티드를 검사하였는데, 본 실험은 2,000-100,000 dalton의 큰 분자를 검사하여 생표지자를 찾아가 하였다.

Kozak 등은 109명의 난소암 환자, 19명의 양성 난소종양 환자, 그리고 56명의 정상인으로부터 혈청을 채취하여 음이온 교환(anion-exchange) SELDI-ToF-MS로 단백질 패턴을 분석하여 민감도 95.7%, 특이도 82.6%, 수신기 작동 특성 곡선의 곡선 하 면적(area under the curve; AUC) 0.94로 난소암을 효과적으로 검출하였다고 보고하였다. 이들은 특히 초기 난소암(병기 I/II) 11명 중 10명, 경계성 난소종양 6명 중 6명을 진단하였다.<sup>21</sup>

국내에서는, 화장품에 주로 사용되는 비이온 계면 활성제의 분자량 분포와 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene) 부가 정도를 측정하기 위하여 고분해능 매트릭스 보조 레이저 탈착 질량분광기를 활용하여 보고된 바 있고, 헬리코박터(*Helicobacter pylori*) 분비 단백질의 분석에 이차원 전기영동 및 질량분광법을 이용한 보고가 있다.<sup>22-24</sup> 직렬 질량분광법을 이용하여 특정 단백질을 동정하고 이를 신생아의 대사질환 선별검사에 응용하고자 하는 연구도 보고되었는데, Yoon 등은 31,000명의 신생아에서 혈액을 채취하여 48명(0.16%)에서 비정상 소견을 관찰하였으며 13명에서는 페닐케톤뇨증(phenylketonuria), BH4 결핍 페닐케톤뇨증, 시트룰린혈증(citrullinemia), 호모시스틴뇨증(homocystinuria) 등의 아미노산 이상 질환을 진단하였다고 보고하였다.<sup>25</sup> Lee 등은 메틸말로닐산혈증(methylmalonic acidemia) 1예를, 그리고 O 등은 단풍당뇨증(maple syrup urine disease) 1예를 발견하여 보고하였다.<sup>26,27</sup>

부인과 영역에서는 음이온(negative ionization) MRM mode에서 전자 분무 직렬 질량분광법(electrospray ionization tandem mass spectrometry; ESI-MS-MS)을 이용하여 난소암의 표지물질로 추정되는 아실라이소인산(acyl lysophosphatidic acids; LPAs)을 측정하여 상관계수가 0.99이었음이 보고된 바 있으며, cDNA microarray와 SELDI를 이용한 난소암의 생표지자 연구 현황에 관한 보고가 있다.<sup>28-30</sup>

SELDI-ToF-MS는 매우 많은 질량전하비 피크 데이터

를 생성하는데, 이렇게 생성된 질량전하비 중 질병 진단에 도움이 되는 생표지자를 골라내는 것은 우수한 성능의 컴퓨터와 함께 대용량의 자료로부터 귀납적 분석을 수행하는 적절한 알고리즘을 필요로 한다.

Decision tree는 1984년 Brieman 등에 의하여 지능적 언어 검색을 목적으로 개발되었으며,<sup>14</sup> 1990년대 이후 개발도상국에서 식량 자원 부족에 영향을 미치는 인자를 분석하기 위한 연구에 적용되었고,<sup>31</sup> 최근 여러 연구자에 의해 단백질학적 자료분석에 응용되고 있다.<sup>12,32-34</sup> 특히 Gerton 등은 자궁외임신에 대한 생표지자의 개발에 SELDI-ToF-MS 및 대표적 decision tree 분석도구인 CART (Classification and Regression Trees)를 적용하였다고 보고하였다.<sup>33</sup>

Decision tree는 모든 대상을 포함하는 뿌리 마디(root node)로부터 'Is  $X_m < c$ ?' ( $X_m$ =관측치;  $c$ =역치)와 같은 형태의 식을 이용하면서 이분적으로 분지(binary classification)를 계속하여 최적의 관측치와 역치를 귀납적으로 추출한다. Decision tree에서 분지 기준을 추출하는데 가장 널리 사용되는 것은 Bayes의 결정 법칙(Bayes' decision rule)이다.<sup>35</sup>

본 실험에 사용된 Biomarker Patterns™ Software는 SELDI-ToF-MS 소프트웨어의 'Peak Identification System'과 결합하여 작동하므로 Petricoin 등의 경우와 같이 SELDI-ToF-MS 후 얻어지는 미가공 상태의 비행시간(time-of-flight) 자료를 유전알고리즘(genetic algorithm)으로 분석하는 경우에 비하여 생표지자 추출에 유리하다는 점이 지적된 바 있다.<sup>10</sup> 현재까지 난소암 진단에 SELDI-ToF-MS 결과를 Biomarker Patterns™ Software로 분석한 예는 Vlahou 등의 보고가 유일한데, 민감도와 특이도를 각각 84.6%와 80.0%로 보고한 바 있다.<sup>12</sup>

본 연구에서 SELDI-ToF-MS는 50세 미만 연령의 10예 모두에서 난소암을 정확히 진단하였는데, 폐경 전의 젊은 여성에서 진단율이 더 높았던 점은 SELDI-ToF-MS가 선별검사로써 유용하리라는 점을 시사한다고 생각된다. 수술적 병기별로는 초기 난소암에 비하여 진행성 난소암에서 진단률이 높았다. 그러나 연령, 병기, 조직학적 유형 등의 임상적 특성에 따른 진단률의 차이는 대상 환자의 수가 적어 통계적 의미를 찾아볼 수는 없었다.

혈청을 이용한 단백질 패턴 분석은 암의 조기 발견에 새로운 패러다임을 제시하고 있으나 향후 임상적 적용



을 위해서는 재현성을 제고하여야 하는 과제를 안고 있다고 생각된다. 첫째, 안정적이지 못한 단백질의 특성으로 인하여 시료를 조심하여 다루고 정해진 프로토콜에 의하여 정확히 실험하는 것이 중요하다. 둘째, 질량분광기의 특성상 많은 잡음(noise)이 발생하므로 원 자료로부터의 표준화(normalization) 및 잡음 제거 알고리즘이 개선되어야 할 것이다. 셋째, 신뢰성 있는 생물정보학적 분석도구의 개발이 뒤따라야 할 것이다. 바이오 칩을 이용한 혈청 단백질 분석은 현재도 많은 연구와 함께 이상의 문제점들을 해결하고자 발전하고 있으며, 향후 적용 영역을 넓히게 되리라 기대한다.

본 저자들은 본 연구를 통하여 바이오 칩을 사용한 혈청 단백질 분석과 생물정보학적 분석을 통하여 민감도 및 특이도가 각각 90.9%와 84.2%의 좋은 성적으로 난소암을 진단하였음을 보고하는 바이다.

## 참고문헌

- Kim SH. Yearbook of health and welfare statics. Vol 48. Ministry of Health and Welfare Dec;2002.
- 2001 Annual report of the Korea Central Cancer Registry. Ministry of Health and Welfare, National Cancer Center.
- Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Annual report of gynecologic cancer registry program in Korea for 2000 (Jan. 1, 2000-Dec. 31, 2000). Kor J Obstet Gynecol 2003; 46: 221-58.
- Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. J Clin Oncol 2003; 21(10 Suppl): S200-5.
- Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, Menon U, Rosenthal AN, Davies AP, et al. Screening for ovarian cancer: A pilot randomised controlled trial. Lancet 1999; 353: 1207-10.
- Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: A review of the literature. Hum Reprod 1989; 4: 1-12.
- Rosenthal AN, Jacobs IJ. The role of CA 125 in screening for ovarian cancer. Int J Biol Markers 1998; 13: 216-20.
- van Haaften-Day C, Shen Y, Xu F, Yu Y, Berchuck A, Havrilesky LJ, et al. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: A critical appraisal. Cancer 2001; 92: 2837-44.
- Jr GW, Cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, et al. Proteinchip<sup>®</sup> surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: A novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. Prostate Cancer Prostatic Dis 1999; 2: 264-76.
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 2002; 359: 572-7.
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clin Chem 2002; 48: 1296-304.
- Vlahou A, Schorge JO, Gregory BW, Coleman RL. Diagnosis of ovarian cancer using decision tree classification of mass spectral data. J Biomed Biotechnol 2003; 2003: 308-14.
- Conrads TP, Fusaro VA, Ross S, Johann D, Rajapakse V, Hitt BA, et al. High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. Endocr Relat Cancer 2004; 11: 163-78.
- Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. Monterey, California, USA: Wadsworth, Inc.;1984.
- Baek JH, Cosman P, Feng Z, Silver J, Schafer WR. Using machine vision to analyze and classify Caenorhabditis elegans behavioral phenotypes quantitatively. J Neurosci Methods 2002; 118: 9-21.
- What is mass spectrometry? American Society for Mass Spectrometry. Available at: <http://www.asms.org/whatisms/index.html> [Last accessed; Feb 2, 2006.]
- Thomson JJ. On the masses of the ions in gases at low pressures. Philosophical Magazine 1899; 48: 547-67.
- Stephens WE. Phys Rev 1946; 69: 691.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1988; 2: 151-3.
- Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. Rapid Commun Mass Spectrom 1993; 7: 576-80.
- Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: Potential use in diagnosis and prognosis. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 12343-8.
- Lee MH, Choi JK, Lee BS, Kim SJ. Analysis of surfactant in cosmetics using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Soc Cosmet Scientists Korea 1999; 25: 1-22.
- Chun HJ, Uhm CS, Lee SW, Hyun JH. Proteomics approach in Helicobacter pylori researches. Korean J Gastroenterol 2002; 39: 243-7.
- Kim N. Secreted proteins of Helicobacter pylori identified using pulse-chase analysis. Korean J Gastroenterol 2002; 40: 94-104.
- Yoon HR, Lee KR, Lee DH, Kang SW, Ha YM. Screening of newborns and high risk infants for inherited metabolic diseases by tandem mass spectrometry in Korea; 2 years of the SCL experience. Proc Kor Soc Lab Med 2000; 23(1 Suppl): S157.
- Lee SH, Kim SJ, Kim BG, Hong CS, Hwang YS. A case of methylmalonic acidemia detected by tandem mass spectrometry in newborn screening test. Proc Kor Soc Lab Med 2000; 23(1 Suppl): S178.
- O CG, Jung YS, Yoo BH, Lee DG, Lim IS. A case of maple

- syrup urine disease detected by tandem mass spectrometry in newborn screening test. *J Korean Soc Neonatol* 2003; 10: 88-93.
28. Lee KL. Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in plasma as a potential marker for gynecological cancers using negative ion tandem mass spectrometry. *Korean J Lab Med* 2000; 23(1 Suppl): S184.
  29. Yoon HR, Kim H, Cho SH. Quantitative analysis of acyl-lysophosphatidic acid in plasma using negative ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 788: 85-92.
  30. Kim JH. Identification of bio-markers in epithelial ovarian Cancer: Experiences with cDNA microarray and SELDI. 8th Symposium of Korean Society of Gynecologic Oncology and Colposcopy 2002; 37-45.
  31. Evans DG, Everis LK, Betts GD. Use of survival analysis and Classification and Regression Trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 55-67.
  32. Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 41: 634-42.
  33. Bhattacharyya S, Siegel ER, Petersen GM, Chari ST, Suva LJ, Haun RS. Diagnosis of pancreatic cancer using serum proteomic profiling. *Neoplasia* 2004; 6: 674-86.
  34. Gerton GL, Fan XJ, Chittams J, Sammel M, Hummel A, Strauss JF, et al. A serum proteomics approach to the diagnosis of ectopic pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 306-16.
  35. Xu W, Tse HF, Chan FH, Fung PC, Lee KL, Lau CP. New Bayesian discriminator for detection of atrial tachyarrhythmias. *Circulation* 2002; 105: 1472-9.

## Identification of biomarker for ovarian cancer by serum proteomic analysis using SELDI-ToF-MS

Chul-Min Lee<sup>1</sup>, Soon-Beom Kang<sup>2</sup>, Yong-Kyoon Cho<sup>1</sup>, Hoon Choi<sup>1</sup>, Bok-Rin Kim<sup>1</sup>

*Department of Obstetrics and Gynecology<sup>1</sup>, Inje University Sanggye Paik Hospital,*

*Department of Obstetrics and Gynecology<sup>2</sup>, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Objective :** SELDI-ToF-MS is an affinity-based mass spectrometric method. This study was performed to determine feasibility of serum proteomic pattern analysis using SELDI-ToF-MS for the detection of ovarian cancer.

**Methods :** Forty-three epithelial ovarian cancer patients and seventy-seven controls were included in the study from October 2003 to March 2005 in Sanggye Paik Hospital. Potential tumor biomarkers in sixty serum samples were screened, including twenty-one ovarian cancers and thirty-nine controls. Proteomic pattern was analyzed by SELDI-ToF-MS and optimal discriminating m/z value with proper cutoff of log-normalized intensity was determined by decision tree analysis (Phase I). Another sixty serum samples were obtained from twenty-two ovarian cancers and thirty-eight controls. Through analysis using SELDI-ToF-MS, the performance of diagnosing ovarian cancer was determined by applying previously adopted cutoff log-normalized intensity of m/z value determined in Phase I experiment (Phase II).

**Results :** A biomarker of 3501.23 kDa was selected based on the collective contribution to the optimal separation between ovarian cancers and controls. Sensitivity of 90.9% and specificity of 84.2% was achieved by SELDI-ToF-MS in Phase II experiment. Age, stage, and histologic type did not affect performance of SELDI-ToF-MS for diagnosing ovarian cancer.

**Conclusion :** Serum proteomic analysis by biochip and mass spectrometry is a feasible method in diagnosing ovarian cancer.

**Key Words :** SELDI-ToF-MS, Ovarian cancer, Biomarker, Proteomics, Bioinformatics