

프로테오믹스 기법을 이용한 혈소판농축액의 보관 및 백혈구제거에 따른 단백질프로파일 변화 분석

유숙원¹ · 서인범¹ · 조윤정²

강원대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 고려대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Protein Profile Changes in Platelet Concentrates According to Storage and Leukoreduction - Analysis Using Proteomics Technology

Sook Won Ryu, M.D.¹, In Bum Suh, M.D.¹, and Yoonjeong Cho, M.D.²

Department of Laboratory Medicine¹, College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon; Department of Laboratory Medicine², College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Knowing how the protein profile of platelet products changes with storage or leukoreduction may give us greater insight into cell physiology and the cause of transfusion reactions other than cytokines and chemokines.

Methods : We filtered four packs of platelet concentrates (PC) within 24 hr of blood collection and after 120 hrs of storage. Four aliquots of each supernatant in PC were obtained: pre-storage+pre-filtration, pre-storage+post-filtration, post-storage+pre-filtration and post-storage+post-filtration. Routine chemistry tests and a two-dimensional electrophoresis (2-DE) were performed. The stained images were analyzed and the significant spots were identified using a peptide mass finger printing (PMF) with matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) analysis after trypsin digestion.

Results : The protein spots increased with storage and decreased after filtration ($P<0.05$, pre-storage+post-filtration). The spot density of various proteins, including macrophage inflammatory protein-2 alpha, megakaryocyte colony stimulating factor and interleukin-22 changed with storage and leukoreduction.

Conclusions : The database of identified protein spots and their changes produced in this study is a useful basic tool for future studies on the mechanism of transfusion reactions. Further studies should validate the significance of each protein spot. (*Korean J Lab Med* 2008;28:53-63)

Key Words : PC, Supernatant, Storage, Filtration, Protein profile, 2-DE, PMF, MALDI-TOF

서 론

접 수 : 2007년 10월 2일 접수번호 : KJLM2074
수정본접수 : 2007년 10월 25일
게재승인일 : 2007년 10월 29일
교 신 저 자 : 조 윤 정
우 136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 진단검사의학교실
전화 : 02-920-5612, Fax : 02-920-5538
E-mail : eqcho1ku@korea.ac.kr

*본 논문은 2006년도 정부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-331-E00302).

혈소판제제는 혈소판이 부족하거나 기능에 문제가 있는 환자에게 수혈되며 혈액종양환자 등 면역이 떨어진 환자에게 수혈되는 경우가 많은데 이들은 백혈구로 인한 면역성 수혈부작용이 정상 인보다 치명적으로 발현될 수 있다. 혈소판제제 내 면역성 수혈부작용을 일으키는 물질로 알려진 것들은 백혈구뿐 아니라 보관 중에 백혈구에서 혈장 내로 분비되는 여러 시토카인(cytokine)과

혈소판에서 방출되는 케모카인(chemokine) 등이 있어 보관 전에 백혈구를 제거하는 것이 권장된다[1-5]. 그러나 보관 전 백혈구 제거 혈소판제제를 투여 받은 환자에게서도 수혈부작용은 여전히 보고되고 있어 이 외의 다른 원인에 대한 의문이 제시되고 있다[6-10]. 현재까지 혈소판제제의 보관에 따른 변화에 대한 연구는 혈액세포 또는 수혈관련 효과 및 부작용과 관련되는 혈장 성분을 표적으로 하여 면역분석법 또는 효소법 등으로 측정, 분석하는 수준이었고, 혈장 내 단백질의 전반적인 변화에 관하여는 구체적으로 연구된 바가 없다[11, 12]. 최근 프로테오믹스 기술의 발달로 혈장 내 단백질의 분리 기술은 일반적으로 수 fg/mL까지 가능하게 되었으며 인간 프로테오믹스 기구의 설립으로 사람의 혈청 내 일반 단백질 데이터베이스의 구축 및 질환 표지, 표적 단백질의 발굴이 활발히 진행되고 있다[13, 14]. 그러나 혈액은행 분야에 프로테오믹스 기법을 도입한 연구는 미미한 실정이다[15]. 본 연구에서는 보관 및 백혈구제거에 따른 농축혈소판제제(platelet concentrate, PC) 내 혈장의 단백질 프로파일을 분석하여 혈소판제제 내 단백질 프로파일에 대한 데이터 구축에 기여하고, 나아가 수혈 관련 반응과 관련된 가능성이 있는 단백질을 유추할 수 있는 기반을 마련하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 검체 준비 및 처리

대상 혈액은 전혈에서 분리된 PC 4단위를 이용하였다. 선별기준은 헌혈자의 헌혈 혈액에서 ALT 검사상 부적격 판정을 받았으나(ALT, 65-70 IU/L) 총단백 및 알부민값이 정상인 것을 선별하였다. 이 혈액제제는 헌혈혈액으로는 부적격하여 연구용으로 사용할 수 있는 혈액으로 혈액관리법규에 합당하게 구하였고 연구는 강원대학교병원 기관윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다(IRB No. 07-25). 각각 PC를 2개씩 분주하여 본래의 백에 있는 한 개는 혈소판 교반기에서 20-24°C에 120시간 동안 상온 보관하고 나머지 한 개는 백혈구 제거 필터(PXL8, Pall, NY, USA)로 백혈구를 제거하였다. 보관 전 백혈구제거 전, 후 검체는 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 -70°C 냉동고에 저장하였다. 보관 전 검체의 소요시간을 보면 채혈부터 부적격 판정까지 20시간 정도가 소요되었고 검체 운반, 일반생화학 검사와 백혈구제거 및 검체 분주에 3시간이 걸려 모두 채혈 후 24시간 이내에 시행하였다. 보관은 120시간 동안 시행하였으며 상온 보관 후 PC도 같은 방법으로 처리하였다. 즉 한 PC 당 보관 전+백혈구제거 전, 보관 전+백혈구 제거 후, 상온 보관 후+백혈구 제거 전, 상온

보관 후+백혈구 제거 후의 4가지 검체가 생성되어 총 16검체를 대상으로 실험하였다.

2. 일반 생화학 검사

각각의 분리된 검체에 대해 일반 생화학적 검사 항목인 glucose, BUN/Creatinine, uric acid, total protein, albumin, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, lactate dehydrogenase (LD), creatine kinase (CK), amylase, C-reactive protein (CRP), total bilirubin, direct bilirubin 및 electrolyte (Na, K, Cl, Ca, Phosphorus)를 자동생화학분석기인 TBA-200FR (Toshiba, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였으며 동시에 이차원 전기영동검사를 시작하였다.

3. 단백질 프로파일 분석

1) 검체 전처리 및 IPG strip의 재수화(rehydration)

-70°C로 저장한 검체 중 80 μ L를 pH 8.0의 1 M Tris 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiotreitol이 함유된 용해 완충액 50 μ L와 섞은 뒤 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체시료를 7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-]-1-propanesulfonate, 1.0% carrier amphotolyte, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye 등이 함유된 겔 전기영동 시료완충액 400 μ L와 혼합하여 희석한 후, 이를 다시 20°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상청액을 수집하였다. 재수화 tray에 겔 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 80 μ L를 넣고, 24 cm의 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3-10, nonlinear, 24 cm, Amersham bioscience, Piscataway, NJ, USA)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24 시간 방치하여 재수화하였다.

2) 이차원 전기영동

재수화된 IPG strip은 Ettan™ IPGphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 저전압으로부터 서서히 올려 등전화 시키고, 이후 3.6 g urea, 2% SDS, 5 M Tris 2 mL, 50% glycerol 4 mL, 25% acrylamide 1 mL, 200 mM 2-tert-butyl-4-methylphenol (MTBP) 250 μ L가 함유된 동질 완충액에서 25분간 균질화(equilibration)시켰다. 1.875 M tris buffer가 들어있는 9% 완충액 40 mL, 40% stock acrylamide 45 mL, 증류수 115 mL를 혼합하고 16% buffer 40 mL,

40% stock acrylamide 80 mL, 50% glycerol 80 mL를 혼합하여 Ettan Dalt six (Amersham bscience) gel caster를 이용하여 폴리아크릴아마이드겔을 제작하였다. 이 겔에 0.5% 아가로오즈, 0.001% bromophenol blue dye가 함유된 아가로오즈 완충액을 넣고 IPG strip을 묻은(embedding) 후에 24.8 mM tris, 192 mL glycine, 0.1% SDS가 포함된 cathode running buffer를 넣었다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Ettan Dalt six (Amersham bscience)를 이용하여 3 mA/gel의 전류로 2시간 pre-run 시행 후 15 mA/gel의 일정한 전류에서 이차원 전기영동을 한 검체당 2번씩 수행하였다.

3) 은염색

전기영동을 시행한 폴리아크릴아마이드겔을 matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI)- time of flight (TOF) 분석이 가능한 변형 은염색법으로 염색하였다. 은염색은 silver staining kit protein (Amersham Biosciences)을 이용하여 지침서에 따라 염색하였다. 먼저 에탄올 200 mL, 빙초산(glacial acetic acid) 50 mL를 증류수와 섞어 500 mL가 되도록 고정액을 만든 후, 30분간 전기영동 겔을 고정한 후, 에탄올 150 mL, 5% sodium thiosulfate 20 mL, sodium acetate 34 g을 증류수와 섞어 500 mL가 되도록 감작액(sensitizing solution)을 만든 후, 30분 이상 교반기에 넣어 감작시켰다. 10분간 3회 세척 후, 2.5% silver nitrate solution 50 mL를 500 mL이 되도록 증류수와 섞어 은반응(silver reaction)액을 만들어 교반기에서 20분간 반응시켰다. 다시 1분씩 2회 세척한 후, 세척된 겔을 sodium carbonate 12.5 g, 37% formaldehyde 0.1 mL를 증류수에 넣어 만든 500 mL의 발색액(developing solution)으로 3-5분간 발색시키고, ethylenediaminetetraacetic acid -sodium (EDTA- Na_2) 7.3 g을 증류수에 넣은 500 mL의 반응 정지 액으로 10분간 처리하여 발색 반응을 중단 시킨 후, 증류수로 5분씩 3회 세척하였다.

4) 이미지 분석

염색이 끝난 후 GS-800 calibrated imaging densitometer (Bio-Rad, Munich, Germany)를 이용하여 스캔하였다. 스캔된 각각의 이미지를 이미지분석 소프트웨어(ImageMaster 2D Platinum Version 5.0, Amersham Biosciences)를 이용하여 분석하였다. 스캔된 이미지 파일을 소프트웨어를 이용하여 각각의 단백질 spot을 검출하였고 검출된 각각의 spot을 수작업을 통하여 보정하였다. 각각의 검출된 단백질 spot의 상대 정량 분석을 위하여 전체 영역을 대상으로 소프트웨어를 이용하여 각 spot의 매칭 및 상

대 정량 분석을 하였고, 다시 과도하게 염색이 된 spot을 제외하고 정상적으로 염색된 영역만을 선택하여 각각의 spot을 소프트웨어를 이용하여 보정하였다. 선택된 각각의 영역에서 검출된 spot의 vol%를 비교하여 상대 정량 분석하였으며, 각각의 처리에 따라 동시에 10% 이상의 변화를 보이는 단백질 spot을 peptide mass finger printing (PMF) 분석을 위하여 선정하였다.

5) 트립신 처리와 탈수화

선택된 단백질 spot은 파이펫을 이용한 수작업으로 각각을 트립신 효소로 처리한 후 MALDI-TOF로 질량 분석하여 동정하였다. 염색된 spot을 잘라 작은 겔 덩어리로 자른 후 20 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate로 탈색시킨 후 증류수로 세척하였다. 세척 후 200 mM ammonium bicarbonate로 20분간 반응시킨 후 다시 증류수로 세척하였다. Acetonitrile로 탈수화를 반복한 후 30분간 건조시켰다. 50 mM ammonium bicarbonate 30 μL 와 5 μL trypsin (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)의 트립신과 반응시킨 후 37°C에서 12-16시간동안 재활성화(reactivation)시켰다. 그 후 50 mM ammonium bicarbonate용액 30 μL 을 37°C에서 교반하며 반응시켰다. 원심 분리 후 상청액을 100 μL 의 acetonitrile을 이용하여 37°C에서 10분간 탈수하였다. 각각의 상청액을 6시간 이상 탈수화 과정을 반복하여 탈수시킨 후, MALDI-TOF를 시행하였다.

6) 단백질 동정을 위한 PMF

기질(matrix)은 alpha-cyano-1-hydroxycinnamic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 기질(10 mg/mL) 1 μL 와 용출된 peptide 1 μL 를 MALDI plate에 놓고 질량 분석을 시행하였다. 질량분석은 Voyager-DE-STR TOF mass spectrometer (Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 실시하였다. 가속전압은 20,000 voltage로 하였고 reflector mode와 delayed extraction 조건을 이용하였다. 단백질의 동정은 분석된 질량값을 PMF 분석도구인 Aldente (ExPASy server, Basel, Swiss)를 이용하였다.

7) 통계처리

보관 전 및 후의 일반 생화학 검사의 결과와 검출된 단백질의 수의 비교를 위해 비모수적 검정방법인 윌콕슨의 부호순위 검정 (Wilcoxon's signed-rank test) 및 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)을 사용하였으며 모든 통계분석은 SPSS window, ver. 12.0을 사용하였다. 모든 분석의 통계적 유의성 여부는 양측 유의수준 5% 하에서 판단하였다.

Table 1. Chemistry test results of supernatant of platelet concentrate according to storage without leukoreduction

	Pre-storage (within 24 hr)		Post-storage (after 120 hr)		% change	P value*
	Mean (Median)	SD	Mean (Median)	SD		
C-reactive protein	0.04 (0.04)	0.01	0.06 (0.06)	0.03	43.8	0.102
Creatine kinase	142.0 (142.0)	20.6	196.3 (193.0)	31.0	38.2	0.068
Lactate dehydrogenase	329.3 (333.5)	25.8	434.3 (423.5)	103.5	31.9	0.068
HDL-cholesterol	38.5 (38.5)	3.9	44.8 (44.5)	6.1	16.3	0.066
Total bilirubin	1.3 (1.2)	0.2	1.4 (1.3)	0.5	16.3	0.102
BUN	13.2 (13.0)	2.5	13.8 (12.9)	3.7	4.6	0.593
Potassium	3.5 (3.5)	0.3	3.6 (3.6)	0.2	4.3	0.063
Calcium	7.6 (7.5)	0.4	7.9 (7.8)	0.3	4.0	0.063
Phosphorus	11.9 (11.9)	0.3	12.3 (12.3)	0.4	3.8	0.066
Total protein	6.2 (6.2)	0.1	6.4 (6.4)	0.1	2.8	0.066
T-cholesterol	155.8 (150.0)	33.7	160.0 (154.0)	34.8	2.7	0.066
Albumin	3.6 (3.7)	0.2	3.7 (3.7)	0.2	1.4	0.157
Chloride	80.8 (80.0)	4.1	81.8 (81.0)	4.1	1.2	0.046 [†]
Sodium	171.5 (173.0)	5.2	173.3 (175.0)	5.8	1.0	0.059
Uric acid	5.8 (5.9)	0.6	5.9 (5.9)	0.6	0.9	0.157
Creatinine	1.1 (1.1)	0.1	1.1 (1.1)	0.0	0.0	1.000
LDL-cholesterol	100.3 (93.5)	27.8	96.5 (91.0)	32.2	-3.7	0.144
Amylase	46.0 (46.0)	4.4	44.0 (44.0)	4.2	-4.3	0.066
Triglyceride	141.3 (140.0)	7.3	133.5 (134.0)	2.6	-5.5	0.068
Direct bilirubin	0.2 (0.2)	0.02	0.2 (0.2)	0.02	-7.7	0.059
Glucose	298.0 (348.5)	153.7	209.8 (246.0)	117.6	-29.6	0.068

*P values are calculated by Wilcoxon's signed-rank test; [†]statistically significant.

결 과

Table 2. Chemistry test results of supernatant in pre-storage platelet concentrate before and after leukoreduction

	Pre-filtration Mean±SD	Post-filtration Mean±SD	% change	P value*
Direct bilirubin	0.16±0.02	0.37±0.04	126.2	0.068
Total bilirubin	1.3±0.2	1.5±0.2	20.4	0.059
Phosphorus	11.9±0.3	13.1±0.9	10.3	0.068
HDL-cholesterol	38.5±3.9	44.8±6.1	9.1	0.144
T-cholesterol	155.8±33.7	169.3±37.1	8.7	0.066
Triglyceride	141.3±7.3	151.8±10.5	7.4	0.068
Albumin	3.6±0.2	3.82±0.2	5.5	0.066
Total protein	6.2±0.1	6.5±0.1	4.8	0.066
BUN	13.2±2.5	13.5±2.4	2.3	0.066
Glucose	298±153	302±155	1.3	0.066
Chloride	80.8±4.1	81.8±4.1	1.2	0.046
Lactate dehydrogenase	329.3±25.8	331.8±33.4	0.8	0.715
Uric acid	5.8±0.6	5.8±0.6	0.0	1.000
Creatinine	1.1±0.1	1.1±0.1	0.0	1.000
Amylase	46±4.4	45.8±5.7	-0.5	0.705
LDL-cholesterol	100.3±27.8	96.8±33.3	-3.5	0.465
Calcium	7.6±0.4	7.1±0.5	-5.6	0.066
C-reactive protein	0.04±0.01	0.38±0.01	-6.3	0.564
Sodium	171.5±5.2	160±2.4	-6.7	0.068
Potassium	3.5±0.3	3.2±0.3	-7.9	0.066
Creatine kinase	142±20.6	126.5±29.8	-10.9	0.068

*P values are calculated by Wilcoxon's signed-rank test.

1. 일반 생화학 검사 프로파일의 변화

보관 전(24시간 내) 및 상온 보관 후(120시간 후) 4단위 PC 내 혈장의 생화학적 검사결과의 평균은 다음과 같다(Table 1). 보관 후 증가한 항목을 % change 별로 보면 가장 많이 증가한 항목은 CRP, CK, LD의 순이었으며 가장 큰 감소를 보인 항목은 glucose였다. 그러나 이 변화치는 통계적으로 유의하지는 않았으며 Cl만이 통계적으로 유의하게 보관 후 증가하였다. 백혈구제거에 의한 변화를 보면 % change상 증가한 항목은 direct 및 total bilirubin과 phosphorus이며 감소한 항목은 CK, K 및 Na 등이었으나 통계적으로 유의하지 않았다(Table 2, 3). 백혈구제거를 보관 전 및 후에 실시하는 경우 두 조건에 따른 생화학 검사 결과의 차이를 비교한 결과 calcium만이 보관 전에 백혈구제거를 하는 경우가 상온 보관 후 백혈구제거를 하는 경우보다 통계적으로 유의하게 감소하였고 그 외의 항목은 모두 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 4).

2. 프로테옴분석에 의한 단백질 프로파일의 변화

1) 단백 spot 수의 변화

4단위 PC의 보관 전+백혈구제거 전, 보관 전+백혈구제거 후,

Table 3. Chemistry test results of supernatant in post-storage platelet concentrate before and after leukoreduction

	Pre-filtration Mean±SD	Post-filtration Mean±SD	% change	P value*
Direct bilirubin	0.15±0.02	0.36±0.04	138.3	0.068
Total bilirubin	1.4±0.5	0.7±0.4	15.8	0.066
Phosphorus	12.3±0.4	13.4±0.4	8.9	0.066
HDL-cholesterol	44.8±6.1	47.3±6.1	5.6	0.068
T-cholesterol	160±34.8	172.5±36.7	7.8	0.068
Triglyceride	133.5±2.7	140.5±6.2	5.2	0.068
Albumin	3.7±0.2	3.9±0.2	5.4	0.066
Total protein	6.4±0.1	6.7±0.1	5.2	0.059
BUN	13.6±3.7	12.7±3.7	-7.8	0.581
Glucose	209.8±117.6	214±119.1	2.0	0.068
Chloride	81.8±4.1	83±4.5	1.5	0.059
Lactate	434.3±103.5	373.8±102.1	-13.9	0.068
dehydrogenase				
Uric acid	5.8±0.6	5.8±0.6	0.0	1.000
Creatinine	1.1±0	1±0.5	-6.8	0.083
Amylase	44±4.2	45±5.4	2.3	0.414
LDL-cholesterol	96.5±32.2	101±39.1	4.7	0.465
Calcium	7.9±0.3	7.6±0.4	-2.9	0.066
C-reactive protein	0.06±0.02	0.05±0.02	-6.3	0.285
Sodium	173.3±5.7	163±2.9	-5.9	0.068
Potassium	3.6±0.2	3.4±0.2	-6.2	0.059
Creatine kinase	196.3±31	175.3±29.6	-10.7	0.068

*P values are calculated by Wilcoxon's signed-rank test.

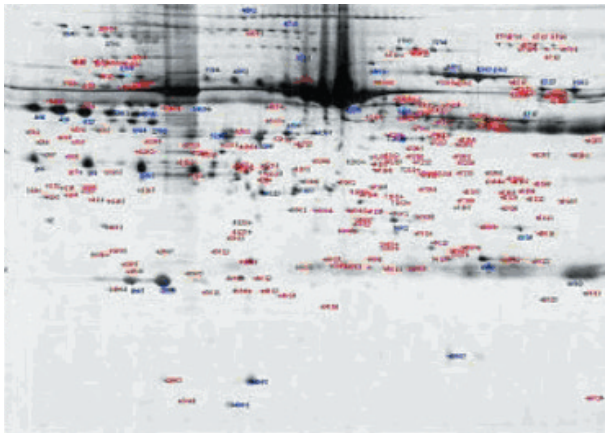


Fig. 1. 2-DE protein profiles of supernatant in pre-storage + pre-filtration PC. Aliquots were rehydrated in a 24-cm IPG strip covering the pH range of 3 to 10 and were subjected to isoelectric focusing. In the second dimension the protein were separated on a SDS-PAGE and stained with modified silver stain.

상은 보관 후+백혈구 제거 전, 상온 보관 후+백혈구 제거 후, 총 16개에 대해 이차원전기영동분석을 시행한 후(Fig. 1) 각 단백질 spot의 개수를 분석하여 검출하였다. 이 결과 각 평균 973.25±26.9개(보관 전+백혈구제거 전), 998.5±32.6개(상온 보관 후+백혈구제거 전), 928.25±22.6개(보관 전+백혈구 제거 후), 992.5±13.4개(상온 보관 후+백혈구제거 후)였다. 보관 전에 백혈구제거

Table 4. Mean difference in chemistry test results of supernatant between pre-storage and post-storage leukoreduced platelet concentrate

	Mean difference±SD		
	Pre-storage (within 24 hrs) changes from pre- filtration to post- filtration*	Post-storage (after 120 hrs) changes from pre- filtration to post- filtration*	P value†
Direct bilirubin	0.2±0.04	0.2±0.02	0.715
Total bilirubin	0.3±0.1	0.2±0.1	0.450
Phosphorus	1.2±0.8	1.1±0.5	0.461
HDL-cholesterol	3.5±3.1	2.5±1.3	0.713
T-cholesterol	13.5±3.8	12.5±2.1	0.414
Triglyceride	10.5±5.3	7.0±4.1	0.066
Albumin	0.2±0.1	0.2±0.1	0.157
Total protein	0.3±0.1	0.3±0.1	1.000
BUN	0.3±0.4	-1.1±2.2	0.144
Glucose	4.0±1.4	4.3±2.6	0.785
Chloride	1.0±0.0	1.3±0.5	0.313
Lactate dehydrogenase	2.5±13.3	-60.5±37.5	0.068
Uric acid	0.0±0.0	0.0±0.1	1.000
Creatinine	0.0±0.0	-0.1±0.1	0.083
Amylase	-0.3±1.5	1.0±2.2	0.102
LDL-cholesterol	-3.5±8.9	4.5±8.1	0.144
Calcium	-0.4±0.1	-0.2±0.1	0.046‡
C-reactive protein	-0.003±0.01	-0.01±0.02	0.357
Sodium	-11.5±3.9	-10.3±3.6	0.102
Potassium	-0.3±0.1	-0.2±0.1	0.357
Creatine kinase	-15.5±22.8	-21.0±5.1	0.715

*Amount of changes are calculated by subtracting pre-filtration from post-filtration; †P values are calculated by Wilcoxon's signed-rank test; ‡statistically significant.

Table 5. The number of protein spots in supernatant of platelet concentrate

	Pre-filtration	Post-filtration	P value*
Pre-storage (within 24 hr)	973.25±26.9	928.25±22.6	0.048 [†]
Post-storage (after 120 hr)	998.50±32.6	992.50±13.4	0.254

*P values are calculated by Kruskal-Wallis' test; †statistically significant.

거를 시행한 경우 보관 후에 비하여 통계적으로 유의하게 단백질 spot의 수가 감소하였다(Table 5).

2) 보관에 따른 단백질 성상의 변화

보관 전 및 후의 백혈구 제거 전 혈장의 이차원 전기영동 분석 결과 10% 이상의 vol% 농도 차이를 보이는 단백질 spot은 25개였으며 PMF 분석을 한 결과, 16개의 단백질 spot이 동정되었다(Table 6). 밀도가 증가한 단백질은 phosphate carrier protein 등 세포막 단백질과 혈장 단백질인 알부민, 거대핵세포집락자극인자(megakaryocyte colony stimulating factor; thrombopoietin 전구물질),

Table 6. Percent change of identified protein spots in supernatant of platelet concentrate according to storage

No	ID	MW (kDa)	pI	P value	Cov* (%)	Pre-storage (within 24 hr)		Post-storage (after 120 hr)		% change
						Mean %Vol	SD	Mean %Vol	SD	
603	GUC1C	22	5.5	1.1E-10	54	6558.0	1103.3	11431.5	3616.5	74.3
717	MPCP	35	9.3	2.5E-06	32	23517.6	1959.5	38593.3	5785.2	64.1
775	TPO	37	9.5	1.6E-08	32	3726.4	2527.0	5792.3	3945.5	55.4
807	RIR2	45	5.3	3.7E-11	35	4838.9	156.1	7245.5	296.4	49.7
604	SGCD	32	9.2	8.1E-08	31	80153.5	33116.2	115976.3	5148.2	44.7
917	ALBU	66	5.7	3.9E-11	25	55883.2	50004.3	77771.1	2293.3	39.2
876	KAD4	25	8.5	4.9E-09	40	64371.3	36928.7	81268.9	9246.7	26.3
854	IL22	17	7.1	7.8E-08	37	53196.2	5687.8	66157.5	6719.3	24.4
734	HPT	27	6.3	1.4E-15	53	93712.9	13763.6	115819.1	18839.2	23.6
730	ALBU	66	5.7	2.3E-10	27	91908.9	16376.5	109659.6	24751.2	19.3
702	ATP4B	33	7.0	1.2E-07	27	3022.4	464.6	3337.2	2272.5	10.4
692	ALBU	66	5.7	7.0E-19	44	173209.2	28424.6	175899.9	63775.0	1.6
906	KAC	12	5.6	6.3E-08	58	176437.8	41050.0	167253.4	43672.7	-5.2
636	XRCC4	38	4.9	7.4E-07	34	36734.9	7477.0	33119.6	7655.5	-9.8
810	CECR2	58	5.5	2.7E-06	22	14525.9	2197.4	12746.9	1943.9	-12.2
615	MED31	16	8.7	8.5E-09	58	50796.2	13535.2	42855.1	11780.8	-15.6
958	APOA1	28	5.3	9.8E-15	54	43274.5	19932.5	33862.4	18009.9	-21.7
932	MIP2A	8	9.8	1.2E-07	67	109936.3	40473.4	76024.2	63924.8	-30.8
743	OASL	59	8.0	4.8E-07	22	45294.5	7854.7	30611.9	5459.7	-32.4

P value is probability of a random match between the query and the entry in the data base ($P < 1E-05$); *Sequence coverage.

Protein ID description: 603, Splice isoform 2 of O95843; 717, Phosphate carrier protein; 775, Splice isoform 2 of P40225; 807, Ribonucleoside-diphosphate reductase M2; 604, Delta-sarcoglycan (SG-delta); 917, Serum albumin; 876, Adenylate kinase isoenzyme 4; 854, Interleukin 22; 734, Haptoglobin beta chain; 702, Potassium-transporting ATPase beta chain; 730, 692, albumin; 906, Ig kappa chain C region; 636, Splice isoform 2 of Q13426; 810, Splice isoform B of Q9BXF3; 615, Mediator of RNA polymerase II transcription; 958, Apolipoprotein A-I (1-242); 932, Macrophage inflammatory protein 2-alpha; 743, 59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-1.

Abbreviations: MW, molecular weight; pI, isoelectric point; Cov, coverage.

합토글로빈 전구물질(haptoglobin precursor), 인터루킨(interleukin, IL)-22 등이 있었으며 감소한 단백질은 apolipoprotein A-1과 세포핵 관련 단백질, macrophage inflammatory protein 2-alpha (MIP-2a) precursor 등이 있었다.

3) 백혈구제거에 따른 단백질성상의 변화

보관 전 백혈구제거 전후에 차이를 보이는 단백질 spot을 PMF 분석 한 결과, 36개의 단백질 spot이, 상온 보관 후 백혈구제거 전후에는 20개의 단백질 spot이 차이를 보였다. 이중 동정된 것은 다음과 같다(Table 7, 8). 밀도가 많이 증가한 단백질은 Potassium-transporting ATPase beta chain (ATP4B) 등이었고, 많이 감소한 것은 IgG kappa chain, NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit (NB4M) 등이었다.

고 찰

혈소판제제의 보관에 따른 변화는 백혈구의 세포 증식능 감소, 세포자멸사(apoptosis)를 통한 IL-1, IL-6, IL-8 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) 등 시토카인의 출현, 혈소판의 활성화와

이에 의한 growth-regulated oncogene-alpha (GRO-a), epithelial cell derived neutrophil activating protein-78 (ENA-78), regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted (RANTES) 등의 케모카인의 방출이며 이는 발열성비용혈수혈부작용과 관련된다[2, 3, 11].

발열성비용혈수혈부작용의 임상양상은 두드러기 및 가벼운 열로부터 과민성 쇼크에 이르기까지 다양하며 부작용의 빈도와 강도는 혈소판제제 내의 백혈구의 혼입 양, 보관시간, 케모카인 및 시토카인 등과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [3, 4, 16]. 따라서 보관 전에 백혈구를 제거하는 것이 보관 후 제거(bedside filtration)보다 권장되고 있다[5]. 그러나 백혈구제거 혈소판제제를 수혈 받은 이에게서도 여전히 부작용이 보고되고 있는 점, 지질이나 보체의 조각(complement fragment)이 수혈 부작용과 연관된다는 연구 보고, 혈장 제거 혈소판제제 사용이 보관 후 백혈구제거보다 수혈부작용을 예방하는데 효과적이었다는 보고 등은 기존의 알려진 시토카인 외의 혈장 내 다른 성분이 수혈 부작용과 연관이 있음을 의심케 한다[6-10]. 이에 본 연구에서는 PC 내 혈장의 보관 및 백혈구제거 의한 생화학검사 및 프로테옴(proteome)의 변화를 분석하였다.

Table 7. Percent change of identified protein spots in pre-storage platelet concentrate after leukoreduction

No	ID	MW (kDa)	pI	P value	Cov* (%)	Pre-filtration		Post-filtration		% change
						Mean %Vol	SD	Mean %Vol	SD	
775	TPO	37	9.5	1.60E-08	24	3726.4	2526.9	8968.4	241.5	140.7
702	ATP4B	33	7	1.20E-07	19	3022.4	464.6	6845.6	2474.8	126.5
960	APOA1	28	5.3	9.80E-15	31	23667.6	16189.8	53333.7	7567.8	125.3
693	TRAIIP	58	8.8	2.00E-06	15	5549.2	1341.5	10428.9	2133.9	87.9
807	RIR2	45	5.3	3.70E-11	27	4822.9	111.5	8206.9	4125.8	70.2
810	CECR2	58	5.5	2.70E-06	14	14535.9	2197.4	24519.7	4417.3	68.8
717	MPCP	35	9.3	2.50E-06	24	23517.6	1959.5	36732.5	5168.4	56.2
959	APOA1	28	5.3	9.80E-15	34	31290.5	2645.2	46830.7	4785.9	49.7
709	BOK	23	9.3	2.00E-07	32	18332.8	706.3	11526.9	930.1	38.3
958	APOA1	28	5.3	9.80E-15	46	43274.5	19932.5	59508.4	27814.4	37.5
854	IL22	17	7.1	7.80E-08	29	5196.2	5687.8	69461.2	15175.9	30.6
604	SGCD	32	9.2	8.10E-08	23	80153.5	33116.2	101515.8	40831.7	26.7
735	TPM2	29	4.6	3.10E-08	27	50393.1	5854	63443.3	13110.9	25.9
743	OASL	59	8	4.80E-07	14	45294.5	7854.7	55838.7	10263.7	23.3
703	ACA	16	4.7	1.00E-07	21	81655.6	12815.5	97793.5	15424.5	19.8
876	KAD4	25	8.5	4.90E-09	32	40627.6	33023.4	46999.5	30960.1	15.7
603	GUC1C	22	5.5	1.10E-10	46	6558	1103.3	5698.7	1036.2	-13.1
906	KAC	12	5.6	6.30E-08	50	176437.8	41050.1	134479.9	43106.7	-23.8
615	MED31	16	8.7	8.50E-09	50	50796.2	13535.2	36999.8	5236.9	-27.2
601	NB4M	15	10	1.00E-07	36	115464.8	54555.2	69748.8	4822.5	-39.6

P value is probability of a random match between the query and the entry in the data base ($P < 1E-05$); *Sequence coverage.

Protein ID description: 702, Potassium-transporting ATPase beta chain; 775, Splice isoform 2 of P40225; 960, Apolipoprotein A-I (1-242); 807, Ribonucleoside-diphosphate reductase M2; 693, TRAF-interacting protein; 876, Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondria; 810, Splice isoform B of Q9BXF3; 735, Splice isoform 3 of P07951; 959, Apolipoprotein A-I (1-242); 717, Phosphate carrier protein; 703, ACA protein (Fragments); 854, Interleukin 22; 743, 59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-I; 709, Bcl-2-related ovarian killer protein; 958, Apolipoprotein A-I (1-242); 604, Delta-sarcoglycan (SG-delta); 603, Splice isoform 2 of O95843; 906, Ig kappa chain C region; 615, Mediator of RNA polymerase II transcript; 601, NADH-ubiquinone oxidoreductase B14 subunit.

Abbreviations: See Table 6.

기본 생화학 검사의 변화를 살펴보면 상온 보관 후 통계적으로 유의하지는 않았지만 %상 CRP, CK, LD 등이 증가하였으며 포도당이 감소하였다. 이는 보관 시 혈액세포의 파괴로 인하여 효소가 증가하였으며 세포의 당 대사에 관련하여 포도당이 소모된 것으로 생각된다. 백혈구제거 후의 생화학 검사에서는 항목 당 미미한 변화를 보여 통계적으로 유의한 변화는 없었으며, 백혈구제거를 보관 전 및 후에 실시하여 두 조건에 따른 생화학 검사 결과의 차이를 비교한 결과 칼슘만이 보관 전에 백혈구제거를 하는 경우가 보관 후 백혈구제거를 하는 경우보다 통계적으로 유의하게 감소하는 결과를 보였다. 이는 향후 좀더 많은 혈소판제제로 실험을 하여 자료를 축적할 필요가 있을 것이다.

프로테오미란 어떤 세포, 조직 또는 기관에 존재하는 단백질 전체 세트를 말하며 혈소판은 핵을 가지지 않은 세포로 이의 생물학(biology)의 이해에 프로테오믹스가 매우 유용하여 최근 혈소판 및 다른 혈구세포의 프로테오미에 대한 많은 연구가 이루어졌다[17-21]. 그러나 수혈의학에서의 프로테오믹스에 대한 연구는 활발하지는 못한 실정이고 최근 적혈구제제 내 혈장의 보관에 의한 변화와 혈소판제제 내 혈소판세포의 변화에 대한 보고 등이 있었다[22,

23]. 본 연구에서는 PC 내 혈장의 보관 및 백혈구제거에 의한 프로테오미의 변화를 연구하였으며 백혈구제거에 따른 변화를 보관 전과 상온 보관 후로 나누어 비교하였다.

보관 후 단백질 spot 수가 증가한 결과는 다른 연구의 결과와 일치하였다[22, 23]. 변화된 단백질 중 동정된 것을 보면 증가한 것은 주로 세포 내 단백질이 많았으며 이는 보관 시 세포의 파괴 등에 기인한 것이라 추정할 수 있다. 또한 합토클로빈 전구물질의 증가는 보관에 따른 적혈구의 용혈에 의한 것이라고 생각된다. 상온 보관 후 밀도가 감소한 단백질은 주로 세포핵의 대사 조절에 관여하는 단백질이었으며 이들의 주요기능은 다음과 같다(Table 9, 10).

백혈구제거 후의 단백질 spot 수의 변화를 보면 보관 전 및 후의 모든 PC에서 백혈구제거 후에 수가 감소하였다. 그러나 보관 전 + 백혈구 제거 후의 검체에서는 spot 수의 변화가 커서 통계적으로 유의한 반면, 상온 보관 후+백혈구 제거 후의 검체의 spot 수의 변화는 유의하지 않았다(Table 5). 최근 적혈구제제에서 채혈 후 백혈구 여과를 시행한 군과 대조군을 42일간 보관하여 상청액의 spot의 변화를 본 연구가 있었는데 1, 14, 28, 42일째 모두 백혈구제거 후 제제의 spot 수가 유의하게 감소하였다[22]. 본 연구

Table 8. Percent change of identified protein spots in post-storage platelet concentrate after leukoreduction

No	ID	MW (kDa)	pI	P value	Cov* (%)	Pre-filtration		Post-filtration		% change
						Mean %Vol	SD	Mean %Vol	SD	
702	ATP4B	33	7.0	1.2E-07	19	3337.2	2272.4	10135.7	2228.1	203.7
775	TPO	37	9.5	1.6E-08	24	5792.2	3945.5	14423.8	2369.2	149.0
807	RIR2	45	5.3	3.7E-11	27	7245.5	296.4	12973.1	4996.7	79.1
703	ACA	16	4.7	1.0E-07	21	75472.8	14090.1	126464.7	28806.7	67.6
960	APOA1	28	5.3	9.8E-15	31	344096.5	23117.8	56866.6	5090.9	66.8
735	TPM2	29	4.6	3.1E-08	27	42874.9	8864.0	71425.3	16230.8	66.6
876	KAD4	25	8.5	4.9E-09	32	81268.9	39246.7	120201.9	58800.8	47.9
693	TRAIP	58	8.8	2.0E-06	15	5529.7	1232.6	7831.2	2025.5	41.6
810	CECR2	58	5.5	2.7E-06	14	12746.9	1943.9	18044.7	3010.8	41.6
709	BOK	23	9.3	2.0E-07	32	10743.1	1414.1	15101.5	3995.8	40.6
743	OASL	59	8.0	4.8E-07	14	30611.9	5459.7	39369.3	5158.4	28.6
854	IL22	17	7.1	7.8E-08	29	66157.5	6719.3	83291.5	4892.2	25.9
717	MPCP	35	9.3	2.5E-06	24	38593.3	5785.2	48441.4	3408.8	25.5
958	APOA1	28	5.3	9.8E-15	46	33862.7	18009.9	37881.9	20331.5	11.9
604	SGCD	32	9.2	8.1E-08	23	115976.4	55148.2	126549.1	56424.3	9.1
601	NB4M	15	10.0	1.0E-07	36	83186.7	32144.0	72022.4	17603.8	-13.4
615	MED31	16	8.7	8.5E-09	50	42855.1	11780.8	34260.5	6451.7	-20.1
603	GUC1C	22	5.5	1.1E-10	46	11431.5	3616.5	8720.0	1941.2	-23.7
906	KAC	12	5.6	6.3E-08	50	167253.4	43672.7	86629.4	27899.8	-48.2

P value is probability of a random match between the query and the entry in the data base ($P < 1E-05$); *Sequence coverage.

Protein ID description and abbreviations: See Table 7.

Table 9. Increased proteins of supernatant in platelet concentrate according to storage

Name of protein	Comment	Predominant source
Guanylyl cyclase activating factor	Calcium regulatory protein in rod photoreceptor	Eye
Phosphate carrier protein	Transport phosphate	Membrane protein
Megakaryocyte colony stimulating factor	Major physiologic regulator of platelet	Platelet
Ribonucleoside-diphosphate reductase M2	DNA synthesis	Nucleus
Delta-sarcoglycan (SG-delta)	Component of sarcoglycan complex	Muscle
Albumin(including fragment)	Regulate osmotic pressure	Plasma
Potassium-transporting ATPase β chain	Transport K ⁺ , H ⁺	Membrane protein
Haptoglobin precursor: α and β chain	Acute phase, scavenge protein	Plasma
Interleukin-22	Inflammatory cytokine	Lymphocytes
Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	Catalytic activity	Mitochondrial matrix

Table 10. Decreased proteins of supernatant in platelet concentrate according to storage

Name of protein	Comment	Predominant source
Ig Kappa chain C region	Constant region of immunoglobulin	Plasma
DNA-repair protein XRCC4	DNA repair	Nucleus
Cat eye syndrome critical region protein 2	RNA or single stranded DNA binding	Nucleus
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31	Regulate transcription	Nucleus
Apolipoprotein A-I	Lipid transporting/binding protein	Plasma
Macrophage inflammatory protein 2-alpha (Precursor)	Hematoregulatory chemokine	WBC
59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein	Interact with ligand binding domain of thyroid receptor	Most tissue (esp. WBC etc)

에서는 보관 전에 백혈구제거를 한 경우는 통계적으로 유의하게 spot 수가 감소한 반면, 상온 보관 후에 백혈구 제거를 한 경우는 감소가 미미하였다. 이는 상온 보관 중에 PC 내 백혈구에서의 시토키인의 방출 뿐 아니라 많은 단백질 분해 등의 결과로 spot 수

가 증가하고 여과가 잘되지 않은 것으로 여겨진다. 이 결과를 보면 사이토카인 외의 다른 단백질을 보더라도 보관 전 백혈구제거가 보관 후보다 안전할 수 있다는 것을 시사한다고 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서는 백혈구 제거를 미리 하고 상온에 보관하는 조건이

없어 결과를 이전 연구의 결과와 정확히 비교하기에는 제한이 있었다. 향후 이 조건을 추가하여 생화학검사와 프로테오믹 분석을 하는 것이 필요하리라 생각된다. 또한 향후 적혈구제제에서도 보관 전 및 후에 백혈구여과를 시행하여 본 연구인 혈소판제제에서의 결과와 비교하는 실험도 추가로 해 볼 수 있겠다. 보통 적혈구 제제를 보관하는 4°C의 저온에서는 백혈구의 형태가 덜 유연하여 필터에 잘 걸려 백혈구의 제거율이 훨씬 좋고, 혈소판제제 내의 보관 온도인 22°C에서는 4°C보다 보관 중 백혈구가 더 많은 시토키인을 방출하며, 혈소판에서 분비되는 RANTES, IL-8은 양전하를 띠며 상온 보관 중 혈장이 산성으로 변하여 양전하의 양이 더욱 증가되어 여과가 잘 안 되므로 두 조건을 비교하는 것도 의미가 있으리라 생각된다[24, 25].

Vol%상 감소하는 것 외에 백혈구제거 후 없어진 spot들에 대한 동정이 필요하였으나 연구 디자인상 전후 두 겔에서 변화된 것만 동정하게 되어 사라진 spot의 동정이 어려웠다. 이는 추후 multiple liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) methods 등의 다른 방법으로 연구하여 추가 동정하는 것이 필요하리라 생각된다. 백혈구제거 후 단백질 spot 수는 감소하였지만 단백질 spot의 vol% 비교 시에는 증가하는 단백질 spot이 훨씬 많았다. 이것에 대한 추정치는 단백질 spot이 백혈구제거 과정 중 세포의 변형 등으로 농도가 증가될 수 있다는 가능성을 생각해 볼 수 있으며 백혈구제거가 어떤 세포에 변형을 주는 지에 관하여는 추가적인 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다. 그러나 백혈구제거 후 농도가 감소된 단백질 중 수혈관련부작용과 연관이 있어 보이는 것은 찾기 어려웠다. 이는 추후 더 많은 검체와 다른 방법으로 추가 연구해야 할 것이다.

본 연구에서는 과도하게 염색되거나 큰 부분을 차지하는 단백을 제외시키고 단백질 spot의 밀도를 비교, 분석하였다. 이차원 전기영동의 이미지 분석 시 양이 많은 단백질 spot을 비교정량할 경우에는 직선성이 유지되는 범위를 벗어나기 때문에 부정확하므로 본 연구에서와 같이 이를 제외시킨 후 분석하는 방법이 정확하다고 생각된다.

본 연구에서 다른 보고에서 언급되지 않은 혈액학적, 면역학적으로 의미 있는 몇 가지 단백질이 동정되었는데, 이들을 살펴보면 다음과 같다. 보관 후 감소하는 단백질 중 MIP-2a가 동정되었는데 MIP-2a는 분자량이 6 kDa 정도 되는 단백질로 지질다당질(lipopolysaccharide)의 자극을 받은 쥐의 대식세포에서 분비되는 강력한 호중구의 주화소(chemotactic agent)로 처음 기술되었다[26]. 이는 케모카인 Cx family에 속하는 혈액조절 케모카인으로 염증이 있는 곳에서 활성화된 단구와 백혈구에서 주로 분비되고 강력한 조혈기능을 가지고 있어 항암요법 후 혈구 감소증

의 예방 및 말초조혈모세포의 동원을 위한 면역조절인자(immunomodulator)로 쓰이고 있다[27, 28]. 보통 보관 후 염증성 시토키인이 증가하는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 MIP-2a의 농도의 감소를 보였다. 보관 및 백혈구제거 후 밀도가 증가한 것 중 거대핵세포집락자극인자가 있는데 이는 committed progenitor cell에서 거대핵세포로 성숙되고 증식되는데 관여하는 단백질이며 혈소판의 중요한 생리학적 조절인자이다[29]. 보관 및 백혈구제거 후 증가한 IL-22는 2000년에 새롭게 발견된 시토키인으로 활성화된 T림프구에서 분비되며 IL-10과 구조적으로 비슷하여 IL-10-related T cell derived inducible factor로 명명되기도 한다[30]. IL-22는 IFN- γ 의 작용을 억제하여 항 염증작용을 일으키는 IL-4에 대한 억제작용을 하여 염증반응에 관여한다[31]. 추가적으로 의미 있는 변화를 갖는 각 단백질에 대해 더 많은 검체를 이용하여 Western blot 및 ELISA법을 이용한 확인, 측정이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 PC의 혈장 내 보관 및 백혈구제거에 의한 생화학검사와 단백질 프로파일 변화를 알 수 있었다. 이들은 혈장에 존재하는 단백질 외에 세포 내 핵의 대사 또는 주기에 관련되는 단백질, 조직 내 구성단백, 세포막 단백질 등이 있었다. 이들 중 수혈부작용과 관련된 만한 지표를 뚜렷이 밝혀내지는 못하였지만 향후 이런 데이터들이 쌓여 부작용 관련 물질을 유추해내는 기반이 될 수 있으리라 사료된다. 또한 극미량의 단백질 변화를 추가로 밝혀내기 위해 형광염색을 이용하여 민감도 및 재현성을 높인 two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D DIGE) 기법 또는 LC-MS-MS methods, multidimensional protein identification technology (MUDPIT) 등을 이용한 연구가 필요하며, 나아가 실제 이러한 단백질의 변화가 수혈에 어떤 영향을 갖는지에 대한 임상 연구도 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 혈소판제제 내 보관 또는 백혈구제거 후의 단백질프로파일의 변화를 아는 것은 세포의 생리뿐 아니라 시토키인 및 케모카인 외에 수혈부작용의 원인을 찾아내는데 도움이 될 수 있을 것이다.

방법 : 혈소판농축액 4단위를 채혈 후 24시간 이내와 120시간 이후로 나누어 백혈구제거를 실시하였다. 각각의 농축혈소판내 상청액은 보관 전+백혈구제거 전, 보관 전+백혈구제거 후, 상온 보관 후+백혈구제거 전, 상온 보관 후+백혈구제거 후 4가지로 나뉘었다. 이 검체로 일반생화학검사와 이차원전기영동을 시행하였다. 염색된 이미지를 트립신 효소로 처리한 후 matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)로

질량 분석하여 변화된 단백을 동정하였다.

결과 : 단백 spot의 수는 상온 보관 후 증가하였고 백혈구제거 후 감소하였다($P < 0.05$, 보관 전+백혈구제거 후 검체). 다양한 단백질이 밀도 변화를 보였는데 이 중 macrophage inflammatory protein-2 alpha (MIP-2 alpha), 거대핵세포집락자극인자(megakaryocyte colony stimulating factor), 인터루킨(interleukin)-22 등이 있었다.

결론 : 본 연구를 통한 동정 및 변화된 단백질에 대한 데이터는 향후 수혈부작용의 기전을 밝히는데 유용한 기초자료가 될 것이다. 추가로 각 의미 있는 단백질에 대한 확진 연구가 시행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Heddle NM. Febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. *Curr Opin Hematol* 1995;2:478-83.
- Seghatchian J, Krailadsiri P, Dilger P, Thorpe R, Wadhwa M. Cytokines as quality indicators of leucoreduced red cell concentrates. *Transfus Apher Sci* 2002;26:43-6.
- Boehlen F and Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? *Transfus Med* 2001;11:403-17.
- Muylle L and Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang* 1994;66:14-7.
- Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM. The effect of pre-storage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion* 2004; 44:10-5.
- Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion* 2004;44:16-24.
- Kluter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* 1999;39:1179-84.
- Miletic VD and Popovic O. Complement activation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1993;33:150-4.
- Silliman CC, Johnson CA, Clay KL, Thurman GW, Ambruso DR. Compounds biologically similar to platelet activating factor are present in stored blood components. *Lipids* 1993;28:415-8.
- Heddle NM, Klama L, Singer J, Richards C, Fedak P, Walker I, et al. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med* 1994;331:625-8.
- Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993;33:195-9.
- Seghatchian J. The platelet storage lesion: A comparative analysis of six leukoreduction processes in terms of biocompatibility, microvesiculation, retention of prions, and generation/removal of biological response modifiers. *Transfus Apher Sci* 2005;15:[Epub ahead of print].
- Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD. Proteomics approaches to biomarker detection. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005;4:69-75.
- Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5:3226-45.
- Reddy KS and Perrotta PL. Proteomics in transfusion medicine. *Transfusion* 2004;44:601-4.
- Sarkodee-Adoo CB, Kendall JM, Sridhara R, Lee EJ, Schiffer CA. The relationship between the duration of platelet storage and the development of transfusion reactions. *Transfusion* 1998;38:229-35.
- Omenn GS. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 2004;4:1235-40.
- O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, et al. Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* 2002;2:288-305.
- Garcia A, Zitzmann N, Watson SP. Analyzing the platelet proteome. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:485-9.
- Kakhniashvili DG, Bulla LA Jr, Goodman SR. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:501-9.
- Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:311-26.

22. Annis AM, Glenister KM, Killian JJ, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion* 2005;45:1426-33.
23. Thiele T, Steil L, Gebhard S, Scharf C, Hammer E, Brigulla M, et al. Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates. *Transfusion* 2007;47:1221-33.
24. Ledent E and Berlin G. Factors influencing white cell removal from red cell concentrates by filtration. *Transfusion* 1996;36:714-8.
25. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors. *Transfusion* 1995;35:117-24.
26. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:612-6.
27. King AG, Johanson K, Frey CL, DeMarsh PL, White JR, McDevitt P, et al. Identification of unique truncated KC/GRO beta chemokines with potent hematopoietic and anti-infective activities. *J Immunol* 2000;164:3774-82.
28. Driscoll KE. TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol Lett* 2000;112-113:177-83.
29. Fishley B and Alexander WS. Thrombopoietin signalling in physiology and disease. *Growth Factors* 2004;22:151-5.
30. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275:31335-9.
31. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005;174:3695-702.