Journal of the Korean Chemical Society
2019, *Vol. 63, No. 5*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2019.63.5.387

Note

후 칼럼 동위원소 희석법으로 정량한 혈청 속 셀레노단백질과 한국인 위암의 상관관계 연구

김수진 · 박용남*
한국교원대학교 화학교육과
(접수 2019. 2. 2; 게재확정 2019. 4. 8)

A Study of Relationship between Korean Stomach Cancer and Selenoproteins in Blood Serum Determined by Post Column Isotope Dilution Method

Soo J. Kim and Yong N. Pak*
Deparment of Chemistry Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea
**E-mail: pakyn@knue.ac.kr*
(Received February 2, 2019; Accepted April 8, 2019)

주제어: 셀레늄, 고성능 액체 크로마토그래피-질량분석법, 위암, 후 컬럼 동위원소희석법

Key words: Selenium, HPLC-ICP/MS, Stomach cancer, Post column isotope dilution

셀레노 단백질이 인체 내에서 암 발생과 연관이 있다는 결과들이 그 동안 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다.[1–5] Davis[2]는 임상실험을 통해서 인체에서 셀레늄의 농도가 낮은 그룹에서는 간암 발생률이 약 2배～6배 정도 더 증가한다고 발표하였다. 또한, 일정 지역의 사람들에게 셀레늄을 보충한 식품이나 효모를 섭취하게 하였을 때 암 발생률이 현저하게 감소함을 확인하였다. Meyer[3,4]는 전립선 암환자와 신장 암환자들을 대상으로 연구하였는데 특히 SelP의 농도가 건강한 사람에 비해서 낮음을 보고하였다. Reszka[6]는 방광암 환자들의 경우 방광 종양 발생 시에 Se의 농도와 GPx의 활성도가 증가하지만 발생 단계가 지난 암 환자들의 경우에는 반대로 감소한다는 흥미로운 연구 결과를 발표한 바 있다. 결론적으로 인체내에서 암 발생 단계전과 발생 후의 셀레노 단백질의 농도의 변화는 서로 밀접한 관계가 있는 것으로 보이며 이에 따라 셀레노 단백질이 암 진단에서 생물학적 지표의 보조 척도가 될 수 있을 것으로 예상된다. 이에 따라, 본 연구실에서는 이미 검정곡선법을 사용하여 혈청에서의 셀레노 단백질을 정량하고 암과의 상관관계를 일차로 보고한 바 있다.[7] 이 방법은 비록 간단하고 상대적으로 쉽게 분석할 수 있으나 확실한 결론을 위하여서는 더욱 엄밀한 정확도를 가진 더 나은 정량방법이 요구된다. 본 연구에서는 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에서 좀 더 개선된 분리방법과 정확한 정량법인 동위원소 희석법을 적용하여 한국인 위암과 혈청에서의 셀레노 단백질과의 상관관계를 더욱 확실하게 규명할 수 있을 것으로 생각된다. 동위원소 희석법을 이용한 셀레늄의 분석에서는 일차적으로는 ^{78}Se를 스파이크 동위원소로 사용하고 ^{80}Se를 대응하는 동위원소로 사용하는 것을 생각할 수 있다. 하지만 충돌셀 ICP/MS(Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometer)를 사용하여 Se을 분석할 때에는 매트릭스에 존재하는 Br때문에 ^{80}[^{79}Br^{1}H]가 생성되어 ^{80}Se에 동중간섭을 일으키므로 ^{78}Se/^{80}Se의 측정에 오차를 일으키게 된다. Ahn[8]은 고체상 추출법(Solid Phase Extraction, SPE)을 사용하여 매트릭스에서 Br을 제거한 뒤 동위원소 희석법을 적용한 바 있으나 이 경우에는 셀레늄의 일부가 매트릭스와 함께 제거되어 정확도가 떨어지게 된다. 따라서 본 연구에서는 ^{77}Se을 스파이크 동위원소로 사용하고 ^{78}Se을 대응하는 동위원소 피크로 사용하여 ^{77}Se/^{78}Se를 측정하여 ^{80}[^{79}Br^{1}H]에 의한 간섭을 배제하였다.

또한 크로마토그래피법으로 혈청에서의 단백질들을 분리하는 과정에서 사용되는 용리액에 의한 문제들이 후 컬럼 동위원소 희석법에서 나타날 수 있다. 용리액으로는 그 동안 주로 ammonium acetate(AA)가 사용되었는데 셀레늄의 신호의 세기가 용리액의 농도에 따라서 변하게 되는 현상이 관찰되었고, 이는 탄소가 셀레늄의 이온화를 촉진시키기 때문으로 생각된다.[9] 동위원소 희석법에서는 단순한 신호의 세기변화는 상관없지만 후 컬럼 동위원소 희석법처럼 스파이크 동위원소를 지속적으로 주입하는 경우에

는 바탕에 해당하는 신호가 피크 전후에서 변하게 되고 피크의 모양이 대칭적이지 않게 되어 정확한 농도를 계산하는 것이 어렵게 된다. 따라서 선행연구[10]에서처럼 용리액으로 ammonium nitrate(AN)를 사용하여 탄소원을 제거하고 신호의 변화를 최소화 하고자 하였다.

요약하면 본 연구에서는 ^{77}Se을 사용한 후 컬럼 동위원소 희석법을 적용하고 셀레늄의 신호에 대한 감도가 변하지 않는 안정된 용리액을 사용하여 위암환자의 혈청 내에서 셀레노 단백질에 대한 정확한 분석을 통해 위암진단에 대한 생지표로서의 활용가능성을 타진하였다.

RESULT AND DISCUSSION

^{80}Se에 동중간섭을 일으키는 BrH의 생성을 억제하기 위하여 음이온계 SPE를 사용하여 시료매트릭스에 존재하는 Br의 직접적인 제거를 시도하였다. 0.25 ppm인 셀레늄 표준용액에 10 ppm의 Br을 넣은 용액을 만들고 동위원소 희석법을 적용하여 구한 결과, SPE사용 전과 후에 각각 128%와 69%의 회수율을 얻었다. 즉, 비교적 높은 농도의 Br에서는 SPE 사용 후에도 정확도는 개선되지 않았고, 오히려 SPE 음이온 교환수지가 셀레늄의 일부를 매트릭스와 함께 제거하는 것으로 보인다. 따라서, 본 연구에서는 SPE를 사용하지 않고 ^{77}Se/^{78}Se를 측정함으로서 ^{80}[^{79}Br^{1}H]에 의한 브롬의 간섭을 배제하였다.

위암과 대조군의 셀레노 단백질의 비교

위암환자 30명에 대한 혈청에서의 셀레노 단백질을 분석하고 이를 대조군 30명과의 결과와 비교하여 다음의 *Table* 1에 나타내었다. 대조군으로는 순환기 질환 환자를 사용하였고 그 값들을 일반인에 대한 타 연구들과 비교하였다. 본 연구에서 얻은 순환기 질환 환자들의 값은 90.56 ng·g^{-1}으로 Ahn[8]의 결과인 95.0 ng·g^{-1}과 비슷하고 건강한 일반인을 대상으로 한 타 연구[11,12]의 값 89.26～129.59 ng·g^{-1}과 비교하여 볼 때 같은 범위 안에 있는것으로 보인다.

또한 각 셀레노 단백질의 구성성분비에 대하여 타 연구와 비교하여 보면 역시 비슷하게 측정 범위 내에 존재하는 것으로 보인다. 본 연구에서는 GPx는 26%, SelP는 53%, SeAlb은 22%이며 Reszka[6]의 연구에 따르면 정상인의 GPx는 20%～40% 그리고 SelP는 40%～70%의 비율임을 보고하였고 Xu[13]는 중국인의 혈청에서 GPx는 19.1%, SelP는 45.5%, 그리고 SeAlb은 15.1%로 존재한다고 보고하였다. 순환기 질환 그룹은 농도나 분포에서 일반 건강한 사람들과 차이가 없는 것으로 보이며 따라서 이들의 값을 위암의 대조군값으로 사용하여도 좋다고 결론지을 수 있다.

위암환자의 혈청속의 셀레노 단백질의 총량에 대한 결과를 대조군과 비교하면 이 두 그룹은 확연한 차이를 보여주며 이러한 결과는 검정곡선법을 적용한 Park[7]의 결과와 마찬가지이나 본 연구에서는 더욱 큰 차이를 보여준다. 위암환자 그룹(60.26 ng·g^{-1})은 대조군(90.56 ng·g^{-1})에 비하여 33.5%이상의 감소를 보여주고 있다. Rayman[5]의 리뷰에서 체내 셀레늄의 농도는 식도암과 위 분문의 암에서 각각 최대 65%, 69%까지 감소할 수 있음을 보고하였다. 본 연구의 결과는 비록 모집단이 n=30으로서 크지 않지만 암 환자에서의 셀레노 단백질이 크게 감소하며 본 연구실의 선행 연구에서 보고한 것과 같이 일관성이 있음을 보여주고 있다.

위암 환자와 대조군의 셀레노 단백질의 구성비를 비교해보면 GPx와 SeAlb의 함량은 낮게 나오고 SelP가 높게 나오는 형태로 서로 비슷한 양상을 보여주고 있다. *Fig.* 1에서 나타난 것처럼 두 그룹에 대한 세 가지 셀레노 단백질을 서로 비교해 보면 총 셀레늄에서 두 그룹의 차이는

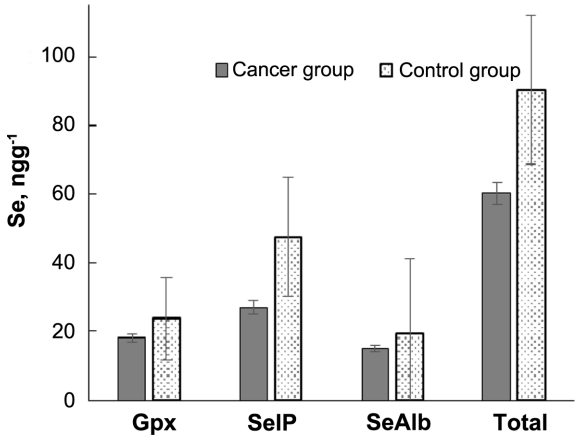


***Figure* 1.** Comparison of stomach cancer and control groups for each selenoprotein concentration.

***Table* 1.** Concentrations of selenoproteins for stomach cancer and control groups determined by PCID

	Cancer group		Control group	
		Park[7]		Park[7]
Gpx	18.12±1.14	15.41±9.01	23.72±11.99	26.12±7.84
SelP	27.05±2.00	50.83±17.91	47.49±17.44	65.15±14.50
SeAlb	15.10±0.92	9.87±5.21	19.34±21.84	14.43±6.99
SUM	60.26±3.00	76.11±28.12	90.56±21.72	105.70±21.20

average ± SD, concentration in ng·g^{-1} (30 samples for each group)

현격하게 잘 나타난다. 이 때 그림의 각 오차막대는 표준편차를 나타내고 있다. 위암환자 그룹에서는 세 종류의 셀레노 단백질을 비교해보면 모두 감소되었고 특히 SelP의 감소(43%)가 가장 두드러져 보인다.

이러한 결과는 Park[7]의 결과와 조금 다르게 나타난 것으로 비록 샘플의 수가 많지 않아 방법에 의한 차이인지 아니면 시료에 의한 차이인지를 결론 지을 수 없지만 후 컬럼 동위원소 희석법을 적용한 본 연구에서의 방법이 더 정확하므로 전자에 좀 더 무게를 둘 수 있다. 그러므로 셀레노 단백질의 총량 또는 SelP의 분석만으로도 어느 정도 위암환자에 대한 일차적인 결론을 내릴 수 있을 것으로 보인다.

Mark[14]는 베이징과 린현에 있는 식도암과 소화기암, 및 위암환자들을 대상으로 셀레늄 함량을 연구하였다. 이들 환자의 셀레늄 함량은 51.3 μg L^{-1}～92.8 μg L^{-1}로 넓은 범위에 거쳐 분포하였고 환자들의 상태와 흡연 여부, 성별 등에 따라 체내 셀레노 단백질 함량의 차이를 보인다고 보고하였다. 좀 더 엄밀한 결론을 위하여서는 흡연유무나 성별, 및 영양상태 등의 여러 변수에 대비하여 더 넓은 시료를 대상으로 확대하여 조사하여야 할 것으로 보인다.

연령대에 따른 암환자그룹의 셀레노 단백질조사

Table 2와 *Table* 3은 각각 대조군과 암환자군의 나이에 따른 종별 셀레노 단백질의 함량을 보여 준다.

대조군의 전체 셀레노 단백질의 함량은 30대에서 70대까지 대체적으로 감소하는 경향을 보이고 있다. 이러한 결과는 Jitaru[15]가 건강한 사람들을 대상으로 한 연구에서 일반적으로 연령대가 높아짐에 따라 전체적으로 낮아지는 결과와 일치한다. 본 연구에서는 GPx나 SeAlb과는 달리 특이하게 SeAlb에 대한 경향성은 보이지 않았다. Klapcinska[16]는 실레지아 지방(체코 북부 및 폴란드 남부 지방)에서 10세에서 105세를 대상으로 체내 셀레늄 농도를 자세히 측정하였는데 10세부터 40세까지는 증가(59.0 μg L^{-1}에서 67.5 μg L^{-1})을 보였으나 41세부터 105세까지는 감소(66.3 μg L^{-1}에서 48.1 μg L^{-1})함을 보고하였는데 본 연구에서도 이러한 경향성을 보이고 있다.

위암환자 그룹 또한 나이에 따라 셀레늄의 농도가 대체적으로 감소하는 경향을 보인다. 연령대 별로 나누어서 두 그룹간의 총 셀레노 단백질의 농도를 비교하여 나타내었다(*Fig.* 2).

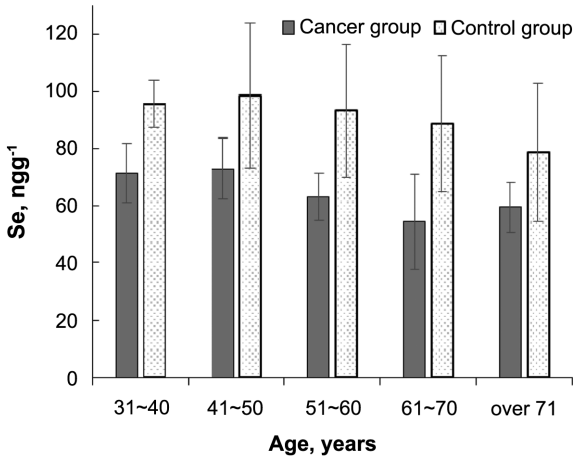


***Figure* 2.** Comparison of two groups with age.

***Table* 2.** Concentrations of selenoproteins for controlled group with age

Age (years)	n	GPx + etc	SelP	SeAlb	Sum
31~40	6	27.08±6.26	49.88±9.27	18.73±4.93	95.69±8.23
41~50	6	24.70±8.43	52.88±18.58	21.14±7.90	98.72±25.33
51~60	7	24.22±5.75	51.14±20.72	17.79±5.33	93.15±23.25
61~70	5	18.26±6.58	48.12±15.30	22.39±16.78	88.77±23.96
over 71	6	25.85±15.85	37.67±14.08	15.20±3.94	78.73±24.34
Total	30	23.72±11.99	47.49±17.44	19.34±21.85	90.56±21.72

average ± SD, concentration in ng·g^{-1}

***Table* 3.** Concentrations of selenoproteins for stomach cancer group with age

Age (years)	n	GPx + etc	SelP	SeAlb	Sum
31~40	3	22.03±7.43	37.17±12.52	12.28±4.06	71.48±10.27
41~50	3	21.18±3.78	34.36±2.74	17.44±6.43	72.98±10.77
51~60	8	16.83±5.40	28.77±4.75	17.43±8.30	63.04±8.21
61~70	8	17.74±9.06	23.38±9.36	13.26±5.31	54.38±16.42
over 71	8	16.94±4.41	27.10±6.31	15.45±13.41	59.49±8.99
Total	30	18.12±1.14	27.05±2.00	15.10±0.92	60.26 ±3.00

average ± SD, concentration in ng·g^{-1} (30 sample)

***Table* 4.** Concentrations of selenoproteins with cancer developing stage

Stage	n	GPx	SelP	SeAlb	Sum
T1	9	19.42±2.78	27.12±9.67	16.07±5.99	62.62±11.61
T2/T3	11	17.30±7.18	29.01±5.50	14.97±8.05	60.98±10.07
T4	10	17.64±7.72	25.01±10.10	14.25±11.67	56.89±16.64
Total	30	18.12±1.14	27.05±2.00	15.10±0.92	60.26±3.00

average ± SD, concentration in $ng \cdot g^{-1}$

***Table* 5.** Experimental conditions of separating selenoproteins with Affinity columns

Analytical column	Heparin and BLUE sepharose
Injection volume, μl	200
Flow rate, $ml \cdot min^{-1}$	0.9
Mobile phase (equilibration buffer)	0.05 M Ammonium acetate (≥99.99%) pH=7
Mobile phase (elution buffer)	1.5 M Ammonium nitrate (≥98%) pH=5

암그룹은 대조군보다 모든 연령대별에서 나이를 막론하고 항상 더 작은 수치를 보여주고 있다. 하지만 연령대를 떠나서 비교하게 되면 그 차이가 없어질 수 있다. 예를 들어 40대의 암환자와 60대의 일반인 그룹은 각각 약 73.0 ng g^{-1}과 78.7 ng g^{-1} 로서 별 차이가 없다. 따라서, 셀레늄 총량을 사용하여 위암을 진단할 때 연령별로 나누는 것이 의미가 있다는 것을 알 수 있다.

Table 2와 3을 사용한 암환자군과 대조군의 비교에서 각 화학종별로 비교해 보면 GPx나 SeAlb보다 SelP가 더 일관성 있게 감소함을 알 수 있다. 즉, SelP나 총량을 사용하여 두 그룹을 비교하는 것이 더 의미가 있는 것으로 보이며 이 결과는 SelP를 사용하여 연구한 다른 연구자[4]의 결과와 일치한다.

위암의 발전단계와 셀레노 단백질의 변화

Table 4은 암 단계에 따른 셀레노 단백질의 농도를 정량한 값이다. 초기를 T1, 중기는 T2와 T3, 말기는 T4로 나타내었고 각 단계별로 약 10여명씩 조사하였다. GPx는 암의 진전에 크게 달라지지 않으며 SelP는 말기에 약간 낮게, 그리고 SeAlb 또한 말기에 가장 낮은 것으로 나타난다. 전체 셀레노 단백질의 함량을 보면 초기에서 말기로 진행됨에 따라 약간 감소하는 경향을 보이지만 값의 차이는 크지 않은 것으로 보인다. 이러한 말기로 갈수록 감소되는 경향성은 방광암 환자의 경우에도 마찬가지로 나타난다고 보고한 Reszka[6]의 연구 결과와 유사하다.

EXPERIMENTAL

동위원소 희석법에 사용한 스파이크는 ^{77}Se(Trace Sciences International Corp., DE, USA)이고 함량은 m/z 77, 78이 각각 97.20% 및 2.40% 포함되어 있으며 나머지들은 미량으로 0.4～0.1% 수준이었다. AA(99.99%)와 AN(98% 이상)는 Sigma-Aldrich(Youngin, South Korea)에서 구입하였다. 위암 환자 혈청은 아주대학교 인체자원 단위은행에서 제공받아 사용하였고, 통제군으로 사용된 순환기질환 혈청은 경북대학교 인체자원 단위은행으로부터 제공받았다. 대조군의 평균 연령은 53.96±15.20세 이며 암환자군은 58.56±14.30세 이다. 혈청은 –70 ℃에 보관하였으며, 분석하기 전 0.45 μm filter를 이용하여 거른 후 분석하였다. 본 연구에서의 실험방법은 선행연구[17]에서 사용한 기법을 기본적으로 적용하였다. Heparin과 Blue 친화 컬럼을 6-way 밸브에 연결시키고 혈청시료를 보내어 SelP와 SeAlb을 분리시킨 뒤, 용리액 0.05 M AA와 1.5 M AN를 사용하여 순차적으로 용리시킨다. GPx는 컬럼에 머무르지 않고 곧장 두 컬럼을 빠져나오게 된다. 본 연구에서는 이동상의 조건만 변하였는데 다음의 *Table* 5에 그 조건을 나타내었다. 평형과 용리 완충액을 처음부터 AN으로 사용할 경우 분무기의 끝에서 염이 쉽게 생성되고 시간이 지남에 따라 플라즈마가 꺼지는 현상과 분무효율의 변화로 신호값이 불안정하였다. 따라서 용리를 시작하는 단계에서는 낮은 농도의 AA를 이용하고 GPx와 SelP가 용리된 후에는 높은 농도의 AN을 사용하여 SeAlb를 용리시키면서 염이 생성 되는 것을 최소화하여 안정된 바탕값을 갖도록 하였다.

Acknowledgments. 위암 환자 혈청과 통제군으로 사용된 순환기질환 혈청은 각 각 아주대학교와 경북대학교 병원 인체자원 단위은행에서 제공받아 연구하였으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kim, H.; Yang, H.; Park, H. *Korean Journal of Nutrition*

2011, *44*, 112.
2. Davis, C. D.; Tsuji, P. A.; Milner, J. A. *Annual Review of Nutrition* **2012**, *32*, 73.
3. Meyer, H.; Endermann, T.; Stephan, C.; Schomberg, L. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e46644.
4. Meyer, H.; Hollenbach, B.; Stephan, C.; Endermann, T.; Morgenthaler, N. G.; Cammann, H.; Kohrle, J.; Jung, K.; Schomburg, L. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2009**, *18*, 2386.
5. Rayman, M. P. *Proceedings of Nutrition Society* **2005**, *64*, 527.
6. Reszka, E. *Clinica Chimica Acta* **2012**, *413*, 847.
7. Park, M.; Pak, Y. *Analytical Science & Technology* **2015**, *28*, 417.
8. Warburton, E.; Goenaga-Infante, H. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2007**, *22*, 370.
9. Kim, S.; Pak, Y. *Bulletin of the Korean Chemcal Society* **2016**, *37*, 1886.
10. Ahn, J.; Kwon, H.; Pak, Y. *Analytical Science & Technology* **2014**, *27*, 92.
11. Ringstad, J; Jacobsen, B. K.; Tretli, S.; Thomassen, Y. *Journal of Clinical Pathology* **1988**, *41*, 454.
12. Kok, F. J.; de Bruijn, A. M.; Hofman, A.; Vermeeren, R.; Valkenburg, H. A. *American Joumal of Epidemiology* **1987**, *125*, 12.
13. Xu, M.; Yang, L.; Wang, Q. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2008**, *23*, 1545.
14. Mark, S. D.; Qiao, Y.; Dawsey, S.; Wu, Y.; Katki, H.; Gunter, E.; Fraumeni, J.; Blot, W.; Dong, Z.; Taylor, P. *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, *92*, 1753.
15. Jitaru, P.; Goenaga-Ingante, H.; Vaslin-Reimann, S.; Fisicaro, P. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *657*, 100.
16. Kłapcińska, B.; Poprzęcki1, S.; Danch, A. *Polish Journal of Environmental Studies* **2006**, *15*, 753.
17. Jeong, J.; Lee, J.; Pak, Y. *Bulletin of the Korean Chemcal Society* **2013**, *34*, 3817.