

혈장 lipoprotein lipid의 NMR spectrum 분석

메틸기 및 메틸렌기의 line width에 의한 악성 종양 진단

송 인 찬 , 민 병 구

서울대학교 의과대학 의공학교실

NMR Spectrum Analysis of Plasma Lipoprotein Lipid

I.C. Song , B.G. Min

Dept. of Biomed. Eng., Seoul National Univ.

Abstract

NMR spectrum analysis is performed to obtain the preliminary data for cancer detection. As NMR spectrum of plasma is dominated by the resonances of water, the resonances of plasma lipoprotein lipid is obscured by the water resonance. Thus, we can obtain the signal of plasma lipoprotein lipid using Ultracentrifugation. we analyzed the spectrum measuring the mean line widths of the methyl and methylene resonances for normal control group. As a result, the line width was  $CH_3 14.2 \pm 5.4$  Hz,  $CH_2 20.0 \pm 6.5$  Hz. To obtain a potentially valuable approach to the detection of cancer, the performance of additional clinical trials in larger populations will be made.

서 론

생체 표본에 대한 H<sup>1</sup>NMR spectrum은 여러 연구자에 의해 분석, 연구되어 왔으나 spectrum의 복잡성과 생체 표본의 주성분인 물에 의한 보고자 하는 신호의 가림으로 인하여 그에 대한 정확한 분석이 어려웠다. 현재 water-suppression method와 고자기장의 NMR spectrometer의 등장으로 이에 대한 난점은 해결됐다. 또한 생체표본의 동적상태를 알 수 있는 완화 과정에 대한 변수(T1, T2)를 측정하는 NMR 기술이

개발되었다. 혈액의 경우 암 진단 목적으로 spectrum분석에 대한 연구가 진행되었다. 악성 종양(malignant tumor)을 가진 동물의 혈청에 대한 완화 시간 T1를 측정할 예가 있으나 그 결과는 매우 다양하였다. 대개, 악성 종양을 가진 환자의 혈청에 대한 T1은 정상인의 그것보다 증가됨이 보여졌다. 그러나 진단에 대한 정보를 주기에는 T1의 편차가 심하였다. 이러한 초기 연구에서 악성 종양의 구별함의 실패는 측정된 NMR 신호의 변수가 생체표본내에 존재하는 모든 종류의 proton에서 나온 신호 영향을 받기 때문이라 생각된다. 생체 표본 경우 proton 공명현상은 주로 물 proton의 영향을 받는다. 그래서 스핀(spin)을 가지고 있는 분자들의 운동에 영향을 받는 완화 시간 T2의 변화는 cell과 tissue의 분자적 구성 성분의 구조와 물의 mobility의 변화를 의미한다. Fossil등의 의한 연구에서는 composite proton NMR 신호를 걸정함에 있어서 물 아닌 다른 성분의 proton 신호의 중요성을 제시함으로써 water-suppression method를 사용하여 혈장내의 lipoprotein중 aliphatic lipid proton spectrum을 얻어 내어 메틸기(CH<sub>3</sub>)와 메틸렌기(CH<sub>2</sub>)의 half maximum line width를 측정함으로써 모든 종류의 악성 종양 환자의 진단에 이용할 수 있음을 예시했다. 이 연구 경우 악성 종양 환자의 half maximum width가

정상인의 그것보다 작아짐이 나타났는데 이는 암에 대한 host response로 lipoprotein lipid의 supramolecular ordering 감소가 초래되어 메틸기와 메틸렌기의 mobility의 증가때문이라 추정하고 있다. 본 연구에서는 앞선 연구에서 사용된 water-suppression method가 아닌 ultracentrifugal method를 사용하여 혈장을 두층으로 분리하여 각 층에 대한 spectrum를 구하여 분석을 시도하였다. 이는 각 층의 lipid density를 높여 주는 효과로 lipid 신호 성분의 S/N비의 향상을 가져오게 한다. 비교, 분석된 spectrum를 통하여 암의 조기 진단에 대한 임상적 의의를 고찰하고 치료에 대한 반응을 monitoring 할 수 있는 지 알고자 한다.

개 념

NMR 현상은 공명 현상의 일종으로 두가지 과정으로 나눌 수 있는데 주어진 계의 핵(nucleus)이 외부 자기장 하에서 공명 조건( $\omega = \gamma H_0$ )을 만족하는 주파수 성분의 RF 에너지를 흡수하여 여기상태로 되는 과정과 여기 상태로 된 핵의 상태가 열적인 평형 상태로 되돌아 가는 완화 과정으로 규정된다. 완화과정이란 흡수된 에너지를 외부로 방출하는 mechanism을 말하는 데 주로 그 계의 Hamiltonian과 관계된다. 이 과정은 스핀-격자(spin-lattice; longitudinal relaxation time)완화 시간 T1 으로 결정되는 과정과 스핀-스핀(spin-spin; transverse) 완화시간 T2로 결정되는 과정으로 나눌 수 있다. 이들 두 변수에 대한 정확한 의미는 밝혀 지지 않았지만 Bloch에 의해 현상론적으로 설명되었다. Bloch에 의한 이론식에 의하면 주어진 계의 핵들의 자화 정도(magnetization)는 다음과 같이 주어진다. 외부 자기장이 주어진 좌표계에서 Z 방향을 향한다고 가정한다. lab system 관점에서

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \vec{H} - \frac{M_x \hat{i} + M_y \hat{j}}{T2} - \frac{(M_z - M_0) \hat{k}}{T1}$$

- .  $\vec{M}$  : 자화 정도(magnetization)
- .  $\vec{H}$  : 자기장(magnetic field)
- .  $\gamma$  : gyromagnetic ratio
- . T1 : 스핀-격자 완화시간(spin-lattice relaxation time)
- . T2 : 스핀-스핀 완화시간(spin-spin relaxation time)
- .  $M_0$  : 평형 상태의 자화 정도

T1의 물리적 의미는 핵들이 격자와 상호 작용을 통하여 열적 평형 상태로 가는 과정을 규정하는 시간 상수로서 이론적, 실험적으로 입증되었다. T2는 핵 스핀들간의 상호 작용에 의해 영향을 받는 데 Bloch에 의한 이론식에 의하면 균일한 외부 자기장 하에서 spectrum의 line width가 Mz의 free decay와 똑같음을 알 수 있다. ( $\omega = 1/\pi * T2$ ,  $\omega$ : line width) 실제 외부 자기장의 불균일성으로 인해 T2는 영향을 받는 데 그에 관련된 식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \gamma H$$

- . T2\*: effective relaxation time
- . T2 : true intermolecular relaxation time
- . H : degree of static field inhomogeneity

line width는 생체 표본내의 각 스핀들이 가지고 있는 공명 주파수(Larmor frequency)의 차이로 기인한 것인데 그들의 운동에 의해서도 영향을 받는다. 운동에 의한 line width 변화에 대한 영향을 설명하면 다음과 같다. 스핀을 가진 분자의 운동이 상대적으로 빠른 경우에 각 스핀이 받는 극부적 자기장(local field)은 시간에 대해 변화할 것이다. 이 변화의 주기보다 긴 시간동안 스핀이 받는 극부적 자기장은 시간에 대한 평균치가 된다. 이때 이 자기장의 세기는 순간적으로 받는 자기장

세기보다 작아진다. 그러므로 펄스 식에 의해 line width는 감소하게된다. 일반적인 NMR 신호의 FID(free induction decay)에 대한 이론에 의하면 스핀을 지닌 분자들의 운동이 있는 경우 그것은 다음과 같이 주어진다.

- .  $F(t) = \exp(i\omega_0 t) * \int \exp(iX(t)) * P(\omega, t) d\omega$
- .  $X(t) = \int \omega(t) dt$  : 운동에 의한 공명 주파수 변화의 시간 적분 값
- .  $P(\omega, t)$  :  $\omega$ 로부터 공명 주파수의 변화의 확률 분포
- .  $\omega_0$  : 독립변 핵이 가지고 있는 공명 주파수
- .  $F(t)$  : free induction decay

$F(t)$ 에 대한 분석은 그 계의 동적 상태의 정보를 주는  $X(t)$  와  $P(\omega, t)$ 를 알게 하는 가능성을 제시한다.

실 험 방 법

1) 시료 준비

overnight fast( 12시간내지 14시간 )후에 오전 8시,9시 사이에 0.1% EDTA 관에 혈청 20cc를 채혈한다. 10cc는 lipid battery check를 위해 lab으로 보내고 10cc는 당일 분리하여 4도에 보관한다.

2) 혈액군 분리

본 연구에서는 본헌을 참조하여 6개의 군으로 나누고 각 군은 110명을 대상으로 한다. 각 군을 살펴 보면,

- . Group I : normal control
- . Group II : patients with malignant tumor
- . Group III: patients with non-tumor disease
- . Group IV : patients with benign tumor
- . Group V : pregnant patients
- . Group VI : patients with treated malignant tumor

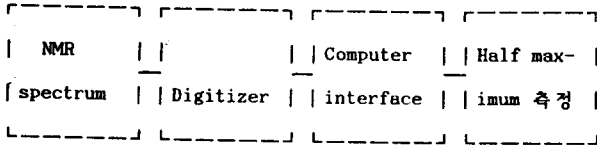
Group II는 생검으로 확인된 악성 종양을 가진

환자로 치료 전에 표본을 얻고 Group VI는 치료가 종결되었거나 진행중인 환자군이다. 정상 대조군은 건강한 병원 직원 및 의과 대학생을 대상으로 하고 환자군은 1987년 5월부터 1988년 12월 사이 서울 대학교 병원 입원 환자 및 외래 환자를 대상으로 한다. 성별, 연령에 따른 변수를 제거하고자 모든 비교군이 유사한 성별 분포가 되도록 한다. 악성 종양은 생검으로 확인된 환자로 하고 특정 종양에 지우치지 않고 우리나라의 악성 종양 발생 빈도를 참조하여 다양한 분포가 되도록 한다. 이번 실험에서는 정상 대조군의 표본에 대해 spectrum분석을 시도하였다.

3) Ultracentrifugal method에 의한 시료 준비

혈액의 혈장 경우 질량 단위로 물성분이 90-91%, 단백질 성분이 6.5-8% 그 외 소수의 분자량을 가진 물질로 이루어져 있다. 그러므로 이 시료로 NMR spectrum을 보면 메틸기 및 메틸렌기의 신호 성분이 물성분의 신호 성분에 가려져 나타나지 않음을 볼 수 있다. 이 문제점은 전술한 바와 같이 water-suppression method를 이용하여 해결할 수 있다. 현 연구에서 사용하는 FT 80A NMR spectrometer에는 이 방법이 적용되지 않아 다음과 같은 방법으로 메틸기 및 메틸렌기의 신호 성분을 얻어낼 수 있었다. 그 과정을 살펴보면 우선 혈액을 얻은 후 centrifugation(rpm:  $5 \times 10^3$ , 시간 10 분)로 혈장을 다른 성분으로부터 분리하였다. 이 분리된 혈장을 4도 온도로 낮춘 후 (냉동실에서 30분 보관) Ultracentrifugation(rpm:  $4 \times 10^4$ , 시간 5시간)로 두 층으로 분리하였다. 분리된 두 층의 혈장을 중수(D<sub>2</sub>O) 용매에 넣어 합성한 후 NMR tube에 넣어 spectrum을 측정하였다. (D<sub>2</sub>O 첨가 이유는 본 pulse형 NMR은 D<sub>2</sub>O-locking된 기종이기 때문이다.)

1. Digitizer program: 메틸기 및 메틸렌기의 신호의 half maximum width 측정 curve - fitting의 기본적인 과정으로서의 스펙트럼의 data를 컴퓨터에 interface 시키는 것이다. 그 과정에 대한 block diagram은 다음과 같다.



2. Curve fitting program: 균일한 표본의 경우 그 물질의 단일 완화 과정에 의해 line 형태가 이론적으로 결정되는 데 혈액인 경우 복합적 성분을 가진 불균일 물질이기 때문에 이에 대한 적용이 어렵다. 그러나 본 연구에서는 주된 관심인 lipoprotein에 의한 완화 과정이 메틸기 및 메틸렌기의 spectrum에 많은 영향을 미친다고 가정하고 Bloch에 의한 이론식으로부터 T2, correlation time의 합 수로 curve fitting에 필요한 식을 얻을 수 있다.

결과 및 토론  
정상군에 대한 lipid NMR spectrum 분석은 다음과 같다.

Line width (단위:Hz)

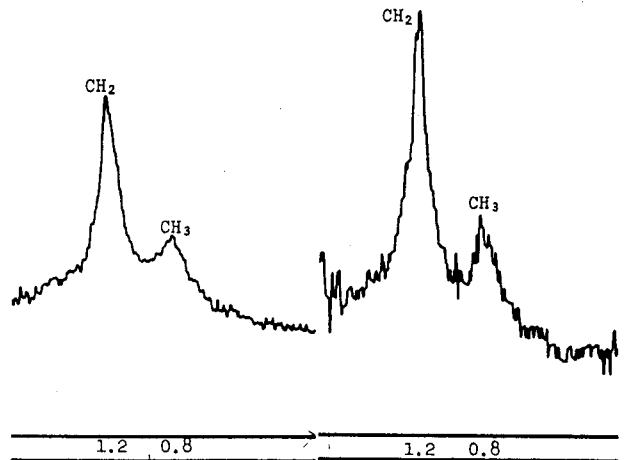
# \	CH2	CH3	비 고
1	12	16	상 층
2	8	16	"

3	8	12	"
4	12	-	"
5	12	24	"
6	20	20	"
7	24	-	"
8	12	-	"
9	20	20	"
10	14	32	"

\* 하층 경우 base line 설정이 어려워 측정값을 얻어낼 수 없었다.

\* #: 각 정상인의 번호

◦ 80 MHz NMR spectrometer spectrum of plasma lipoprotein lipid



본 논문은 소수의 정상군에 대한 NMR spectrum 분석을 시도하였다. 진단 목적에 활용할 자료를 얻기 위해서는 더 많은 정상군에 대한 spectrum 분석이 있어야 되겠고 장차 악성 증상을 가진 환자에 대한 추가 분석이 수행되어야 할 것이다. 또한, water suppression method를 사용하여 얻어진 spectrum 과의 비교, 분석은 의미가 있겠다. 좀더 분석적인 방법인 curve-fitting에 사용될 lipoprotein 의 운동에 관한 이론식( 주로 dipolar-dipolar coupling에 관계됨)를 찾기 위하여 간단한 모델하여 컴퓨터를 통한 simulation 시도 또한 의미있을 것이다.

참고 문헌

- (1) Eric T. Fossel, Justine M. Carr., & Jan McDough, " Detection of malignant tumors" :Water-suppression proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma"N. Eng.J. Med. 1986;315:1369-1379
- (2) John L. Bjorkstam, John Listerud & Marco villa, "Motional Narrowing of a Gaussian NMR line" J.Magn. Reson 1985;65,383-394
- (3) Robert Dixon & Kenneth E. Ekstrand, "The physics of proton NMR" Med. Phys. 1982; 916,Nov/Dec
- (4) Pal Sohar, "Nuclear magnetic resonance spectroscopy"Vol I 1983,CRC Press
- (5) Oleg Jardetzky,G.C.K.Roberts, "NMR in molecular Biology" 1981, Academic Press
- (6) Steim J.M., Edner O.F. & Bargoot F.G., " Structure of human serum lipoprotein nuclear magnetic resonance supports a micellular model" Science ,1986;162;909-911
- (7) Chapman D.,Leslie R.B., Hirz R., Scanu A .M., "High-resolution NMR spectra of high density serum lipoproteins" Biochem.Biophys.Acta, 1969;176:524-536