

Von Willebrand 병 분류를 위한 Von Willebrand 인자 검색

한국보훈병원 내과*, 순천향의대 내과**, 서울의대 내과

손영우* · 계경채 · 신현춘 · 이홍복* · 오도연** · 박선양 · 김병국 · 김노경

=Abstract=

Laboratory Assessment of von Willebrand Factor for Classification of von Willebrand Disease

Young Woo Son, M.D.*, Kyung Chae Kye, M.T., Hyun Chun Shin, M.D.,
Hong Bock Lee, M.D.*, Do Yeun Oh, M.D.**, Seonyang Park, M.D.,
Byeong Kook Kim, M.D., Noe Kyeong Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Korea Veterans Hospital*,
Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University College of Medicine**,
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

Background: Von Willebrand Disease(vWD) appears to be the most commonly diagnosed hereditary bleeding disorder. We set up laboratory methods for the correct diagnosis of vWD.

Methods: We diagnosed 12 patients who had von Willebrand factor(vWF) antigen levels below 60% as vWD. Adding 2 family members, 14 patients were studied.

Results: Bleeding times were prolonged over 4 minutes in 4 patients. Ristocetin-induced platelet aggregation data were compatible with vWD in 3 patients. vWF antigen levels were 0-57% and vWF ristocetin cofactor activities were 0-74%. Multimer analysis of vWF revealed that one family had the type I vWD.

Conclusion: We expect increasing numbers of vWD patients will be detected with correct subclassification in the future.

Key Words: Von Willebrand Disease, von Willebrand factor, Ristocetin-induced Platelet Aggregation, von Willebrand factor Antigen, Ristocetin Cofactor activity, Multimer Analysis of von Willebrand factor

서 론

von Willebrand 병(von Willebrand's disease, 이하

vWD라 약함)은 von Willebrand 인자(von Willebrand factor, 이하 vWF라 약함)의 양적인 감소나 질적인 변화로 인해 출혈성 경향을 초래하는 질환이다. vWD는 성인에서 발견되는 선천성 출혈성 질환 중에서는 가장 흔한 질환으로 알려져 있으며¹⁾

본 연구는 1989년도 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어졌다.

증상의 발현 정도가 경한 환자에서 극심한 출혈을 나타내는 환자까지 매우 다양한 임상증세를 보이며 확진을 위해서는 면역학적 방법을 이용한 vWD의 정량이 필요하다. vWF에 대한 생화학적 성상이 규명되고 유전적 결함에 대한 연구가 진척되면서 vWD가 매우 다양한 아형으로 나뉘며 아형마다 임상 증상이나 검사 성적 및 치료 방법에 차이가 있다는 것이 알려지게 되었다²⁾. 최근 우리나라에서도 vWD의 검사 방법이 확립되어³⁾ 정확한 진단이 이루어지게 되었다. 저자들은 vWD의 아형 분석법을 포함한 검사 방법들을 확립하여 12명의 환자를 진단하여 그 성적을 보고한다.

대상 및 방법

대상은 1988년부터 1992년까지 출혈성 경향을 주소로 서울대학교 병원을 찾거나 타병원으로 부터 서울대학교 병원으로 의뢰된 환자를 대상으로 하였다.

환자의 혈액은 3.8% sodium citrate를 항응고제로 하여 채취하여 절반을 혈소판풍부혈장을 만들어서 즉각 검사하였고 나머지는 혈장으로 분리하여 분주한 뒤 -70°C에서 보관하면서 사용하였다. 정상인 10명의 혈장을 합쳐서 normal pooled plasma로 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

출혈시간(bleeding time, 이하 BT라고 약함)은 Duke 방법으로 시행하였다⁴⁾.

Ristocetin-induced platelet aggregation(이하 RIPA라고 약함)은 platelet aggregometer(Daiichi, Japan)를 이용하여 환자의 혈소판풍부혈장에서 검사하였

다⁵⁾. Ristocetin(Sigma, USA)의 농도는 15mg/ml로 하였고 함께 시행하는 혈소판 응집검사에서는 ADP 10μM, epinephrine 200μM, collagen 2mg/ml을 이용하였다.

vWD 항원(이하 vWF:Ag라고 약함)의 정량은 rocket immunoelectrophoresis 방법으로 하였다⁶⁾. Glass plate를 세척해서 56°C oven에서 준비하고 0.05M barbital buffer(10.26g sodium barbital, 3.68g barbital, 최종부피 1l, pH 8.6, Waco, Japan)를 준비하였다. 1:3으로 희석한 barbital buffer에 0.12g Seakem LE agarose(FMC, USA)를 섞어서 15ml의 0.8% agarose를 만든 다음 50μl의 rabbit anti-vWF antibody(Behring, Germany)를 56°C에서 섞었다. 수평판 위에 준비된 glass plate를 놓고 agarose를 부어서 4°C에서 1시간 굳혔다. Well을 만들고 각 well 당 환자의 혈장을 7μl씩 넣고 4°C에서 수평 전기 영동하였다. Running buffer는 barbital buffer를 사용하였다. 처음 30분은 3mA에서 한 뒤 20시간 동안 5mA에서 시행하였다. 전기영동이 끝나면 식염수에서 12시간 세척한 뒤 중류수로 세척해서 60°C에서 3일간 말린 다음 20분간 staining solution(Coomassie brilliant blue R-250 0.5g, methanol 45ml, acetic acid 10ml, 중류수 45ml)에 염색하고 destaining solution(methanol 50ml, acetic acid 10ml, 중류수 50ml)에서 탈색하였다. 정상인의 pooled plasma를 1, 2, 4, 8, 16배 희석하여 well에서 rocket의 끝 부분까지의 길이를 채서 standard curve를 그리고 정상인 10명의 pooled plasma vWF:Ag를 100%로 하여 환자의 vWF:Ag를 %로 표시하였다 (Fig. 1).

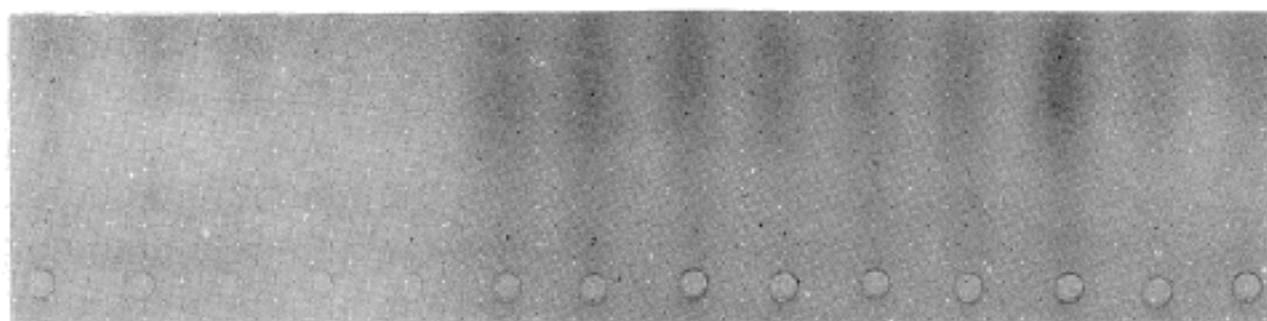


Fig. 1. vWF : Ag by Rocket Immunoelctrophoresis(A. Standard, Undiluted B. Standard, 1:2 diluted C. Standard, 1:4 D. Standard, 1:8 E. Standard, 1:16 F. Case 10, pre-DDAVP G. Case 10, post-DDAVP H. Case 12, pre-DDAVP I. Case 12, post-DDAVP J. Case 11, pre-DDAVP K. Case 11, post-DDAVP L. Case 1 M. Case 1-2 N. Case 1-1).

Ristocetin cofactor activity(이하 vWF:RCo라고 약함)는 다음과 같은 방법으로 측정하였다⁷⁾. 정상인의 혈소판풍부혈장을 37°C에서 1시간 둔 다음 4°C의 buffer A(2% formalin, 0.01M Tris buffer, 0.001M EDTA, 0.15M NaCl, pH7.5)를 동량넣고 섞은 뒤 4°C에서 18시간 정치한 뒤 100g에서 15분 원심 분리하여 적혈구를 제거하였다. Buffer B(0.01M Tris, 0.001M EDTA, 0.15M NaCl, pH7.5)로 2500g에서 10분씩 3번 세척한 뒤 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 이 되도록 혈소판수를 맞춰서 4°C에서 보관하였다. 검체는 환자의 혈장을 사용하며 회석은 buffer B에 4% bovine serum albumin을 첨가해서 사용하였다. 400μl 정상 혈소판풍부혈장에 50μl의 환자 혈장 검체를 넣고 ristocetin을 10mg/ml 넣은 뒤 그려지는 곡선을 관찰하였다. Standard curve(Fig. 2)는 정상인의 pooled plasma를 1, 2, 4, 8배로 회석하여 각각 곡선을 그린 뒤 곡선의 최대기울기를 구하여 log-log 눈금종이에 표시하였다. 정상인을 100%로 하여 환자의 값을 %로 표시하였다.

vWD의 아형분석은 SDS-agarose 전기영동을 이용한 vWF multimer 분석법으로 시행하였다^{8,9,10,11)}.

vWF에 대한 affinity purified monoclonal antibody (Ruggeri ZM 선생님으로부터 기증 받았음, Scripps Research Institute, USA)에 chloramine T 방법으로 5mCi/mg 단백질이 되도록 ^{125}I 를 부착시킨다. Running gel(1.4% agarose, 0.1% SDS, 0.375M Tris-HCl, pH8.8)을 두께 1.2mm가 되도록 gel plate 위에 부어서 4°C에서 2시간 동안 굳혔다. Gel이 굳은 다음 gel의 위쪽 끝에서 폭이 2.5cm이 되게 잘라낸 다음 잘라낸 공간에 stacking gel(0.8% agarose, 0.1% SDS, 0.125M Tris-HCl, pH6.8)을 두께 1.2mm가 되게 부은 뒤 4°C에서 30분간 굳힌 다음 well을 만들었다. 100μl의 1% bromophenol blue 용액을 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2% SDS(pH8) 10ml에 넣은 sample buffer를 준비하여 환자의 혈장을 1:20으로 회석하여 56°C에서 15분간 가열한 다음 well에 20μl씩 넣은 뒤 전기영동 하였다. Running buffer(0.0495M Tris, 0.384M glycine, 0.1% SDS, pH8.35)는 전기영동 직전에 만든 신선한 것을 사용하였다. 전기영동이 시작되어 well에서 검체가 빠져나가고 나면 stacking gel로 well을 메워서 gel전체에 전기가 균일하게 흐르도록 하였다.

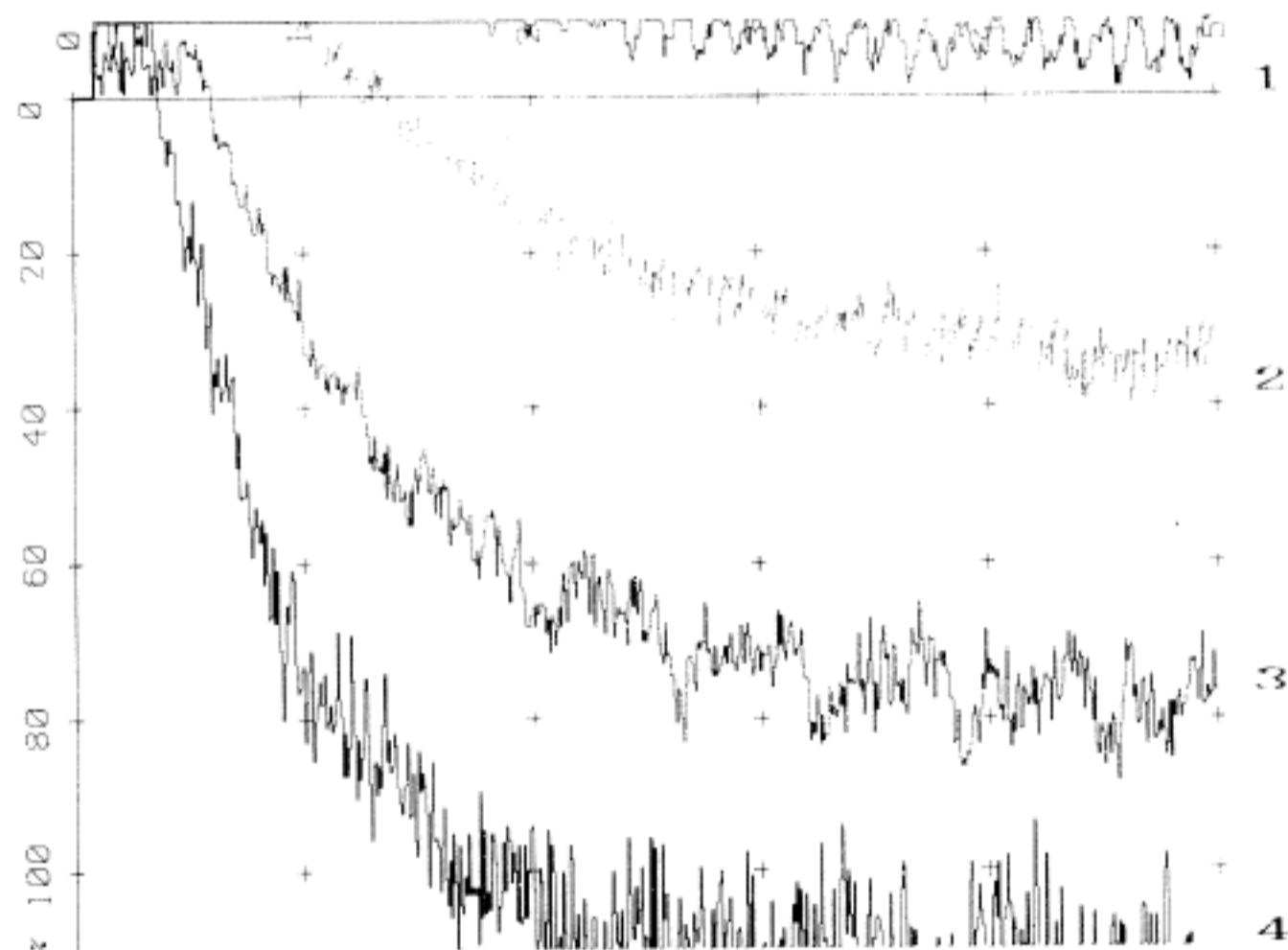


Fig. 2. Standard of vWF:RCo(1. Normal Plasma, 1:8 diluted 2. 1:4 diluted 3. 1:2 diluted 4. Undiluted).

Stacking gel에 검체가 머물 때는 10mA로 하고 running gel에서는 12.5mA로 running시켰다. 전기영동이 끝난 gel은 25% isopropanol과 10% acetic acid로 1시간동안 고정시킨 뒤 1시간 동안 증류수로 여러번 세척한 다음 미리 준비된 antibody(¹²⁵I-anti-vWF 0.04mg protein, 0.2mCi, 100 μ l PBS, pH7.2, 0.1% bovine serum albumin, 0.02% NaN₃)와 실온에서 흔들어 주면서 20시간 동안 반응시켰다. 0.5M NaCl로 6시간 동안 6회 교환하면서 세척하고 0.15M NaCl로 1-2일간 세척한 다음 60°C에서 건조시켰다. X-ray film에 감광시켜서 autoradiography를 시행하였다(Fig. 3).

vWF:Ag와 vWF:RCo 값의 상관 관계는 Spearman rank test로 구하였다¹²⁾.

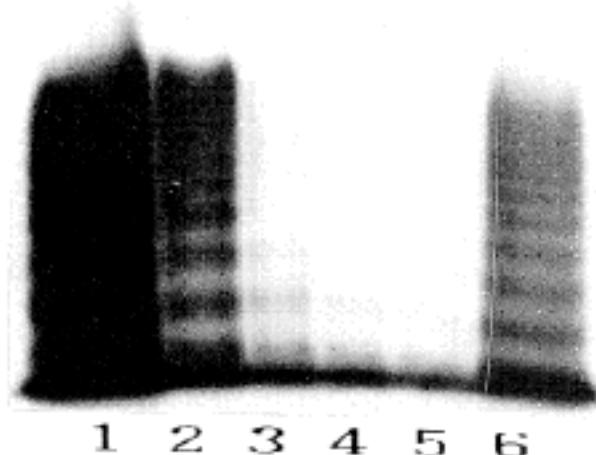


Fig. 3. Multimer Analysis(Lane 1. Normal Platelet 2. Normal Plasma 3. Plasma of Case 1 4. Plasma of Case 1-2 5. Plasma of Case 1-1 6. Platelet of Case 1-1).

결과

vWF : Ag의 참고치를 60-150%로 하였을 때¹³⁾ 값이 참고치보다 낮은 환자 12명을 vWD 환자로 진단하였고 중례1의 자녀 2명에 대한 검사를 추가로 시행하여 모두 14명에 대한 결과를 얻었다.

BT는 6명에서 시행하였는데 Duke 방법에서의 참고치를 1-4분으로 하였을 때 4명에서 BT가 연장되었고 2명에서는 정상범위 이내였다(Table 1).

RIPA는 6명에서 시행하였는데 3례에서 ADP, collagen, epinephrine에는 정상적으로 응집하였고 ristocetin에서만 응집이 일어나지 않는 소견을 보여 vWD에 합당하였다. 중례 4는 ADP, collagen,

epinephrine, ristocetin 모두에서 응집이 저하되었으며 중례 5는 epinephrine에 대해서만 응집이 저하되었고 중례 6은 정상이었다(Table 2).

vWF:Ag은 14명 모두에서 시행하였고 참고치를 60-150%로 하여 그 이하인 환자를 vWD로 진단하는 기준으로 이용하였는데 중례 6의 경우는 60%에 근접하는 값을 보였다(Table 1).

vWF:RCo는 10명에서 검사하여 0%-74% 까지의 값의 보였다. 중례 7에서 74%로 높은 값을 보였다(Table 1).

vWF:Ag과 vWF:RCo사이에는 Pearson's R=0.331(P=0.175)로 상관 관계가 없었다.

Multimer 분석은 중례 1의 가족 3명에 대해 시행하였다(Fig. 3). 환자의 혈장에서는 vWF의 량이 현저히 감소해 있으나 multimer의 pattern은 잘 유지되고 있고 비정상 band는 관찰되지 않았다. 환자의 혈소판에서는 정상적인 vWF의 량과 multimer

Table 1. Laboratory Data of vWD Patients

Case	BT	vWF:Ag(%)	vWF:RCo(%)
1	9'<	0	0
1-1	ND	0	0
1-2	ND	0	0
2	4'30"	47	19
3	10'<	0	0
4	4'30"	33	23
5	1'	16	46
6	3'30"	57	28
7	ND	19	74
8	ND	0	32
9	ND	37	ND
10	ND	5	ND
11	ND	45	ND
12	ND	5	ND

ND=not done

Table 2. RIPA Data of vWD Patients(%)

Case	ADP	Epinephrine	Collagen	Ristocetin
1	67	91	76.5	8
2	76	80	73	16
3	ND	ND	ND	11
4	27	27	53	56
5	60.5	12.5	94	88
6	70	75	60	80

ND=not done

의 pattern이 유지되므로 증례 1의 가족 3명은 아형 분석에서 제I형인 것으로 생각되었다²⁾.

고 안

vWD는 성인에서 발견되는 출혈성 질환 중에서 가장 흔한 질환으로 혈우병보다 흔한 것으로 알려져 있으나 증상이 없는 환자들이 많은 관계로 유병률이 얼마인지 정확히 알기는 매우 어렵고 대략 전인구의 1% 정도로 추정되고 있다¹⁴⁾. 우리나라에서 이미 vWD의 검사법이 확립되었으므로³⁾ 환자의 발견이 활발해지고 vWD의 유병률에 대한 국내에서의 조사도 가능해지리라 기대된다.

저자들은 본 연구에서 vWD를 진단하는 5가지 검사들을 시행하였다.

그 중에서 가장 고전적인 방법이 BT이다. BT는 증례 1이나 3에서 분명히 연장되어 있으나 그 외의 4례에서는 약간 연장되어 있거나 정상범위에 있었다. 최근 들어서 BT가 환자 개개인의 출혈경향을 반영하는 데에는 적합하지 않다는 의견이 대두되고 있다. 즉 BT는 예민도를 높이면 특이도가 저하되고 특이도를 높이면 예민도가 낮아지기 때문에 환자 개개인에 대해서 적절한 정보를 제공하지 못한다고 생각되고 있다. 인구집단중에서 특정한 집단을 찾아내는 역학에서는 가치가 있어도 개개인의 환자에서 출혈경향을 예측하는 임상에서의 가치는 의문시 되고 있다¹⁵⁾. 따라서 임상적으로 vWD가 의심될 경우 BT를 시행해서 정상치가 나온다고 해서 그냥 넘어가서는 안 될 것으로 생각된다.

vWD의 진단은 vWF:Ag을 기준으로 하였다. 송 등³⁾은 한국인 정상 성인 12명에서 vWF:Ag을 측정하여 40-220%의 값을 보고한 바 있으나 본 연구에서는 Wilson 등의 보고대로 정상범위를 60-150%로 하여¹³⁾ 증상이 심한 vWD 뿐만 아니라 증상이 경미한 vWD도 진단되도록 하였다. 그러나 한국인의 vWD의 정확한 정상 범위에 대해서는 추가 보다 많은 수의 정상인을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다. vWD의 아형은 크게 3가지로 나누는데 그중에 제I형은 BT가 연장되고 vWF:Ag이 감소되고 multimer분석은 정상이면서 band의 강도는 떨어지게 되는데 가벼운 제I형 vWD는 정상인과의 갑별이 매우 곤란하며 본 연구에서도 증례 6이 정말로 vWD환자인지는 갑별진단

이 곤란하다. 이는 제I형 vWD에서의 유전 결합이 밝혀지지 않아서 유전자 수준의 진단이 이뤄지지 못하기 때문에 생기는 문제로 생각된다. 제I형 vWD에 해당하는 실험 동물 model인 RIIS/J 생쥐에 대한 연구에서 vWD의 발생이 vWF gene과 연관되어 있지 않고 vWF gene 바깥 부분에서의 결합 때문이라는 결과가 알려져서¹⁷⁾ 제I형 vWD는 정상적인 형태의 vWF를 생산하지만 vWF의 생산량을 조절하는 조절유전자의 결함때문에 발병하는 것으로 생각된다. 제I형 vWD의 유전 결합이 밝혀져야만 가벼운 제I형 vWD와 정상인의 정확한 갑별이 가능해질 것으로 생각된다. 제I형 vWD가 증상이 아주 심한 환자에서 매우 경한 환자까지 다양하게 분포하는 것으로 미루어 유전 결합의 내용도 아주 다양하게 나타날 가능성이 있다고 생각된다.

vWD의 아형 분류를 위해서는 multimer분석이 중요하다. Multimer분석법에는 크게 crossed immunoelectrophoresis 방법^{8,9,10)}과 SDS-agarose 전기영동법^{8,9,10,11)}이 있다. 저자들은 vWD로 진단된 가족 증례 1, 1-1, 1-2에 대해 SDS-agarose 전기영동법으로¹¹⁾ multimer 분석을 시도하여 환자의 혈장에서 정상적인 band의 분포를 보이나 intensity가 감소되어 있고 환자의 혈소판에서는 정상이어서 제I형 vWD로 진단하였다. 송 등³⁾은 제II형과 제III형의 환자를 보고한 바 있어 우리나라에서도 매우 다양한 아형의 환자들이 존재할 것으로 생각되며 향후 vWD 진단시에 아형분석도 함께 실시하는 것이 바람직 할 것으로 생각된다.

치료약제로 내피세포에서 vWF의 분비를 촉진시키는 것으로 알려진 DDAVP²⁾를 증례 10, 11, 12에 대해 무여하여 보았으나(Fig. 1) vWF:Ag의 증가는 관찰되지 않았다. vWD에서의 DDAVP의 효과를 알기 위해서는 앞으로 좀더 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

연구배경: vWD는 비교적 흔한 선천성 출혈질환으로 저자들은 정확한 진단을 위해 검사방법을 확립하였다.

연구방법: vWF:Ag이 60% 미만인 12명을 vWD환자로 진단하였으며 환자의 가족 2명을 포함하여 14명의 환자들에 대해 5종류의 검사를 시행하였다.

결과 : BT는 4례에서 4분 이상으로 연장되었고 RIPA에서는 3례에서 전형적인 vWD의 응집곡선이 나타났다. vWF:Ag에서는 0-57%였고 vWF:RCO는 0-74%였다. 중례 1의 가족 3명에 대한 multimer 분석에서 제 I 형 vWD로 판단되었다.

결론 : 본 검사법들의 확립으로 향후 vWD 진단과 아형분석이 정확하고 활발하게 이뤄질 것을 기대한다.

참 고 문 헌

- 1) Berkowitz SD, Ruggeri ZM, Zimmerman TS : *von Willebrand disease*. In Zimmerman TS, Ruggeri ZM, eds. *Coagulation and bleeding disorders*. New York, Marcel Dekker Inc., 1989, pp 215-259.
- 2) Ruggeri ZM, Zimmerman TS : *von Willebrand factor and von Willebrand disease*. *Blood* 70:895-904, 1987.
- 3) 송경순, 김백순, 권애경, 이삼열 : Western Blot 을 이용한 von Willebrand Factor의 Multimeric Analysis와 기능적 검사에 관한 연구. 대한임상병리학회지 9:43-48, 1989.
- 4) Simmons A : *Technical hematology*. 3rd ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1983, p 235.
- 5) Weiss HJ : *Abnormalities of factor VIII and platelet aggregation -use of ristocetin in diagnosing the von Willebrand syndrome*. *Blood* 45:403-412, 1975.
- 6) Zimmerman TS, Hoyer LW, Dickinson L, Edgington TS : *Determination of the von Willebrand's disease antigen(factor VIII-related antigen) in plasma by quantitative immunoelectrophoresis*. *J Lab Chem Med* 86:152-159, 1975.
- 7) Macfarlane DE, Zucker MB : *A method for assaying von Willebrand factor(ristocetin cofactor)*. *Thromb Diath Haemorrh* 34:306-308, 1975.
- 8) Ruggeri ZM, Zimmerman TS : *Variant von Willebrand's disease*. *J Clin Invest* 65:1318-1325, 1980.
- 9) Zimmerman TS, Robert JR, Ruggeri ZM : *Factor VIII-related antigen : Characterization by electrophoretic techniques*. In Bloom AL ed. *The Hemophilias*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1982, pp 81-91.
- 10) Beattle J, Lopez-Fernandez MF : *Laboratory assays for von Willebrand factor*. In Zimmerman TS, Ruggeri ZM, eds. *Coagulation and bleeding disorders*. New York, Marcel Dekker Inc., 1989, pp 325-342.
- 11) 이재훈, 박선양, 계경채, 이정상, 이문호 : 신증후성 출혈열에서 제 VIII 혈액응고인자와 von Willebrand 인자의 양, 기능 및 구조변화에 대한 연구. 대한혈액학회지 25:413-419, 1990.
- 12) 채서일, 김범종 : SPSS/PC⁺를 이용한 통계분석. 서울, 법문사, 1988, pp 182-184.
- 13) Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK : *Principles of internal medicine*. 12th ed. New York, McGraw-Hill Inc., 1991, p A-5.
- 14) Rodeghiero F, Castaman G, Dini E : *Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease*. *Blood* 69:454-459, 1987.
- 15) Coller BS, Levin J, Bussell JB, Mitus AJ : *Platelets : A. The bleeding time as a predictor of hemorrhage*. In Schafer AI, McArthur JR, eds. *Hematology-1991*. Denver, The Education Program of the American Society of Hematology, 1991, pp 31-32.
- 16) Coller BS : *von Willebrand disease*. In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis*. 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co, 1987, pp 60-96.
- 17) Nichols WC, Cooney KA, Yang A, Bruck ME, Ballew JD, Swank RT, Ginsburg D : *von Willebrand disease(vWD) in the RIHS/J mouse is due to a defect outside of the von Willebrand factor(vWF) gene*. *Blood* 80(suppl 1) : 74a, 1992.