



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



강직성척추염 환자의 활액에서 발현하는 특이 단백질 연구

석사학위논문

강직성척추염 환자의 활액에서 발현하는 특이 단백질 연구

계명대학교 대학원
의학과

이 지 현

이
지
현

지도교수 손창남

2019년
8월

2019년 8월



강직성척추염 환자의 활액에서 발현하는 특이 단백질 연구

지도교수 손 창 남

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2019년 8월

계명대학교 대학원
의 학 과

이 지 현

이지현의 석사학위 논문을 인준함

주 심 백 원 기

부 심 김 상 현

부 심 손 창 남

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 1 9 년 8 월

감사의 말씀

감사문은 제 석사학위논문에서 가장 앞부분에 위치하지만, 가장 마지막에 쓰인 글입니다. 학위의 시작부터 마지막까지를 곱씹게 됩니다.

부족한 저에게 주저함 없이 손을 내밀어 주시고, 함께 해주신 분들께 감사의 인사를 드리고 싶습니다.

제가 평생 존경할 스승님, 손창남 교수님. 감사합니다. 교수님께서 부족한 저를 이까지 끌어주셨습니다. 앞으로 교수님처럼 훌륭한 분과 또 함께할 수 있을지 모르겠습니다. 심사위원장과 심사위원이라는 무거운 자리를 맡아주신 백원기, 김상현 교수님. 제가 좋은 환경에서 실험에만 전념할 수 있도록 물심양면으로 도움을 주셔서 감사합니다. 단백질 분석을 맡아주신 서울대학교 김종서, 정재훈 박사님과 실험 노하우를 아낌없이 알려주신 정희정, 이진설 박사님께도 감사를 표합니다. 시간을 쪼개어 논문 첨삭을 해주신 정혜진 교수님, 최혜정 박사님께도 감사를 전하고 싶습니다. 실험실 안, 가장 가까이에서 저를 지지해준 선생님들과, 실험실 밖, 제 마음 깊숙이 들어와 저를 보듬어 주신 사랑하는 가족과 친구들. 정말 감사합니다.

이 과정을 통해 한 발자국 성장할 수 있어서 행복합니다. 저도 누군가에게 손을 내밀 수 있는 단단하고 따뜻한 사람이 되고 싶습니다. 아직 살아보지 않은 시간 속으로 천천히 그리고 올바르게 걸어가 보겠습니다.

진심으로 감사합니다.

2019년 8월

이 지 현

목 차

| | |
|------------------|----|
| 1. 서 론 | 1 |
| 2. 재료 및 방법 | 3 |
| 3. 성 적 | 8 |
| 4. 고 찰 | 21 |
| 5. 요 약 | 24 |
| 참고문헌 | 25 |
| Abstract | 30 |
| 국문초록 | 33 |

표 목 차

Table 1. The Clinical and Laboratory Features of Patients With Ankylosing Spondylitis, Rheumatoid Arthritis, Gouty Arthritis, and Osteoarthritis 10

Table 2. The List of Proteins Upregulated in Ankylosing Spondylitis .. 12

그림 목 차

| | |
|--|----|
| Figure 1. The number of protein groups and peptides | 13 |
| Figure 2. Verification of the MMP3 levels in Western blot analysis | 14 |
| Figure 3. Verification of the CFHR5 levels in Western blot analysis ... | 15 |
| Figure 4. Verification of the C9 levels in Western blot analysis | 16 |
| Figure 5. Verification of the MBL2 levels in Western blot analysis | 17 |
| Figure 6. Verification of the C4A levels in Western blot analysis | 18 |
| Figure 7. Verification of the APCS levels in Western blot analysis | 19 |
| Figure 8. Verification of the MMP1 levels in Western blot analysis | 20 |

1. 서 론

강직성척추염(ankylosing spondylitis)은 척추와 말초관절을 침범하는 만성염증류마티스 질환으로(1), 유병률은 약 0.5% 정도이다. 강직성척추염 환자들이 적절한 치료를 받지 않을 경우 삶의 질이 떨어지고 심각한 기능장애를 유발할 수 있다(2). 따라서 조기 진단이 중요한데, 말초관절염은 질병 초기에 흔히 발생하고, 질병의 중요한 예측인자일 수 있다(3,4).

강직성척추염의 병인에 대한 여러 가능성이 제기되고 있지만, 명확한 병인은 아직 밝혀지지 않았다. Human leukocyte antigen(HLA)-B27으로 대표되는 유전적 영향이 알려져 있으며, 사이토카인 중에서 종양괴사인자알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α)가 질병에 중요한 역할을 한다는 것이 알려지면서 면역학적 기전에 대한 연구가 활발하다(3,5,6).

관절액이라고 불리는 활액은 점성을 부여하는 히알루론산(hyaluronic acid) 성분으로, 활막 및 염증세포에서 분비하는 단백질들로 구성되어있다(7). 일반적으로 모든 관절에 소량씩 존재하며, 관절 연골에 윤활제 역할과 영양 공급을 한다. 또한, 관절염을 유발시키는 조직과 접촉하고 있어서 질병의 병태생리와 직접적인 관련이 있다. 관절에 염증이 발생하면 활액 세포는 활액을 과생성하고, 이는 관절을 파괴하는 염증반응으로 이어진다. 류마티스 질환의 진단을 위해 여러 혈액 및 영상 검사가 개발되었지만, 이러한 검사들의 한계점을 보완하기 위해 활액 분석을 사용한다. 관절강 속의 활액을 뽑는 시술인 관절천자(arthrocentesis)를 시행하여 염증성 관절염 환자의 활액을 수집한다(8). 수집된 활액에는 염증을 유발하는 특이 단백질이 다량 포함되어 있어서, 바이오마커 발굴을 위한 훌륭한 시료로 사용된다(9).

지난 10년 동안 단백질 분석 기술은 현저하게 발전하였고, 복잡한 병리학 구조를 가진 류마티스 질환의 연구에 활발하게 사용되고 있다(10). 단백질 분석 연구는 주로 3가지 관점에서 이루어진다(11). 첫째, 류마티스 질환의 진단, 둘째, 질병 활성화 및 중증도 평가, 셋째, 치료 반응의 평가를 확인하는 것이다(12). 주요 분석 시료로는 혈액, 활액, 활막 조직 그리고 소변

등이 있다(13). 현재 강직성척추염을 진단하고 질병 활동을 평가할 수 있는 정확한 검사가 없기 때문에, 새로운 바이오 마커가 발견된다면 조기 진단의 가능성이 열릴 수 있다. 이로 인해, 강직성척추염의 조기치료 및 지속적인 관찰은 질병의 악화를 막고, 신체의 항상성 유지 및 삶의 질을 개선하는데 도움을 줄 수 있다.

본 연구는 강직성척추염 환자의 활액을 다른 관절염 환자들과 비교하여 단백질 분석을 실시하였고, 그 결과를 바탕으로 새로운 진단 바이오마커를 발견하고자 하였다. 강직성척추염의 비교군으로 활액을 생성하는 대표적인 질병인 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 통풍관절염(gouty arthritis), 퇴행성관절염(osteoarthritis)을 선정하였다. 퇴행성관절염은 비염증성 관절염이며(15), 통풍관절염과 류마티스관절염은 강직성척추염과 같은 염증성 관절염이다(16). 하지만 통풍관절염은 관절 내 단일 요산염 침착에 의한 것이고(17), 류마티스관절염은 류마티스인자, 항CCP항체(anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-CCP Ab) 등 진단검사가 있다(16). 그러나 강직성척추염에서는 HLA-B27검사가 흔하게 시행되지만 정상집단에서도 상당수 양성 반응이 관찰되므로, 진단적 마커로 볼 수는 없다.

따라서 이 연구의 목표는 강직성척추염 활액의 단백질을 분석하고 다른 류마티스 질환들의 활액과 비교하는 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 연구 대상:

2015년 9월부터 2016년 12월까지 한양대학교 류마티스병원에 방문한 환자들 중 강직성척추염 환자 10명, 계명대학교동산병원 류마티스자가면역센터에 방문한 환자들 중 비교군 30명(류마티스관절염 10명, 통풍관절염 10명, 퇴행성관절염 10명)을 대상으로 하였다. 강직성척추염 대상자들은 18세 이상이면서 1984 modified New York classification criteria를 만족하고(14), 퇴행성관절염(15), 류마티스관절염(16), 통풍관절염(17)은 각각 질환의 분류 기준인 American College of Rheumatology classification criteria를 만족하는 환자이다. 연구 대상자의 연령, 성별과 같은 인구학적 정보와 유병 기간, 혈액학적 검사인 적혈구침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), C-반응성단백질(C-reactive protein, CRP), HLA-B27, 류마티스인자, anti-CCP Ab, 혈중요소산농도, 치료약물 중 항류마티스약제 및 생물학적제제 사용 여부도 조사하였다. 이 연구는 두 병원에서 서면으로 환자의 동의를 얻은 후에 시행되었으며, 계명대학교동산병원 임상연구윤리심의위원회 (Institutional review board, IRB)(2015-12-022)의 승인을 받아 진행하였다.

2.2. 활액 수집:

활액은 무릎관절 통증 및 붓기가 있어 내원한 환자를 대상으로 관절천자를 시행하여 수집하였다. 천자 중 혈액이 오염된 경우는 제외하였으며, 각각의 질환 이외의 원인으로 활액이 생성된 경우도 제외하였다. 채취된 활액을 2,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 각 시료별로 상층액 1 mL씩 5 vial, 침전물 1 vial을 계명대학교동산병원 인체자원은행을 통해 -80 °C에 보관하였다.

2.3. Multiple affinity removal system spin(MARS) depletion:

활액은 완충액 A(Agilent, Santa clara, CA, USA)를 사용하여 1 : 10으로 희석하였다. 활액 속 불순물을 제거하기 위해 membrane filter 0.22 μ m(Agilent, Santa clara, CA, USA)를 사용하였다. 동량의 단백질(500 μ g)로 맞춰진 시료는 16,000 g로 15분 동안 원심분리를 한 후, 상층액을 취하였다. 전체 단백질의 약 70%를 차지하는 알부민(albumin), 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG), 항트립신(antitrypsin), 면역글로불린 A(immunoglobulin A, IgA), 트랜스페린(transferrin), 합토클로빈(haptoglobin, HP) 등 많은 양의 단백질을 제거하기 위해 MARS cartridge(Agilent, Santa clara, CA, USA)를 사용하였다. 준비된 시료 200 μ L와 완충액 A를 순차적으로 주입하여 100 g로 최대 3분간 원심분리 하였다. cartridge로 정제된 시료 및 완충액을 하나의 튜브에 모아서 bicinchonic acid(BCA) assay(Thermo fisher, Waltham, MA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다. 시료를 교환할 때 마다 완충액 A, B를 사용하여 cartridge를 씻어주었다.

2.4. In Solution Digestion:

단백질 분해는 In-solution 과정으로 진행하였다. 8 M 요소(urea)가 첨가된 100 mM ammonium bicarbonate(ABC) 완충액(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 정제된 샘플에 처리하였다. 처리된 샘플을 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 결합을 끊기 위해 10 mM dithiothreitol(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 반응 시켰다. 계속해서 샘플의 알킬화를 위해 30 mM의 iodoacetamide(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 첨가하여 빛 차단 후 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 반응시켰다. 알킬화 후, 샘플 속 요소 농도를 1 M로 만들기 위해 100 mM ABC 완

층액을 사용하여 1: 8으로 희석하였다. 그 다음 트립신 단백질분해효소 (trypsin protease)(Thermo fisher, Waltham, MA, USA)를 1 : 50 = trypsin : sample으로 첨가하고, 37 °C에서 밤새 배양하였다. 남아있는 활성화된 트립신을 0.1% trifluoroacetic acid로 산성화시켰다(18). 산성화된 샘플은 Sep-Pak C18 96-well plate, 100 mg sorbent per well(Waters, Milford, MA, USA)을 사용하여 펩타이드(peptide) 세척(clean up)을 진행하였다. 80% acetonitrile(Merck, Darmstadt, Germany)로 세척된 샘플을 모아준 후, concentrator plus(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 진공 건조시켰다.

2.5. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) 분석 및 데이터 분석:

위의 과정을 통해 준비한 샘플을 서울대 생명과학부 김종서 박사팀에서 EASY-nLC 1000 system(Thermo scientific, Bremen, Germany)이 장착된 Q Exactive TM Orbitrap hybrid mass spectrometer를 사용하여 분석하였다(18). 데이터는 강직성척추염 Label free quantitation(LFQ) intensity(n = 10), 류마티스관절염 LFQ intensity(n = 10), 통풍 LFQ intensity(n = 10) 그리고 퇴행성관절염 LFQ intensity(n = 10)를 개별적으로 분류하였으며, 단백질의 발현이 1.5배 이상인 단백질을 differentially expressed proteins(DEP)로 선정하였다.

2.6. 검증을 위한 Western blot 분석:

히알루로니다아제(Hyaluronidase, HA)를 분해하여 활액의 점성을 감소시키기 위해, HA enzyme(1M sodium phosphate, 3 M NaCl, Bovine serum albumin, HA)을 1 : 20으로 처리한 후, 실온에서 5분 동안 반응을 시켰다. protease inhibitor, phosphatase inhibitor(Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany)가 포함된 lysis buffer(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 1 : 10으로 희석시켰다. 희석된 시료를 얼음 위에서 5분 동안 반응 시킨 후 새 튜브로 옮기고 4 °C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 하였다. 샘플의 상층액을 취하여 BCA assay로 단백질 농도를 측정하였다. 각 샘플의 30 µg 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 전기영동한 후 겔에서 nitrocellulose membrane(Amersham, Chicago, IL, USA)으로 단백질을 이동시켰다. 5% Skim milk와 0.05% Tween-20이 함유된 TBS-T(20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100)를 사용하여 membrane을 1시간 이상 blocking한 후, 일차항체를 4 °C에서 밤새 반응 시키고 이차항체는 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체는 Matrix metalloproteinase-3(MMP3)(1:5000), Complement factor H-related protein 5(CFHR5)(1:500), Complement component C9(C9)(1:5000), Mannose-binding protein C(MBL2)(1:5000), Complement C4-A(C4A)(1:5000), Serum amyloid P-component(APCS)(1:5000), Matrix metalloproteinase-1(MMP1)(1:3000)는 Abcam(Cambridge, UK)은 Thermo Fisher(Waltham, MA, USA)제품을 사용하였다. 이차항체는 Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:10,000, Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD, USA)를 사용하였다. Blotting 된 membrane은 Immobilon Western(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 발현시켜 특정 단백질의 발현을 확인하였다.

2.7. 통계적 처리:

자료의 처리 및 통계학적 분석은 통계프로그램 SPSS for window version 22.0을 이용하였다. 연구 대상자의 임상적 특징에 대한 분석에서 연속변수는 평균과 표준편차로 표시하였고, 명목변수는 숫자와 백분율로 표시하였다. 강직성척추염, 류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염 4군 간

에 Western blot으로 검증 시 Kruskal-Wallis test를 사용하였다.

3. 성 적

3.1. 연구 대상자의 일반적 특성:

연구 대상자의 질환별로 일반적 특성을 비교하였다(Table 1). 강직성척추염 환자군의 평균 나이는 32.6 ± 10.6 세, 남성의 비율이 90.0%였다. 평균 유병기간은 7.0 ± 4.6 년이며, HLA-B27 양성률은 80.0%, 생물학적제제 사용률은 20.0%였다. ESR은 평균 59.5 ± 39.7 mm/hr, CRP는 평균 4.9 ± 4.3 mg/dL이었다. 류마티스관절염 환자군의 평균 나이는 59.6 ± 11.6 , 전부 여성이었다. 평균 유병기간은 4.9 ± 4.9 년이며, 류마티스인자 및 항CCP항체 양성률은 90.0%, 생물학적제제 사용률은 30.0%였다. ESR은 평균 32.7 ± 17.0 mm/hr, CRP는 평균 0.5 ± 3.7 mg/dL이었다. 통풍관절염 환자군의 평균 나이는 62.8 ± 12.8 세, 전부 남성이었다. 평균 유병기간은 0.3 ± 0.9 년이며, 혈중요산농도는 평균 7.1 ± 2.6 mg/dL였다. 퇴행성관절염 환자군의 평균 나이는 64.8 ± 8.5 세, 남성의 비율이 10.0%였다. 평균 유병기간은 5.5 ± 5.9 년이었다.

3.2. 강직성척추염, 류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염의 활액에서 시행한 단백질 분석:

단백체 분석을 통해서 강직성척추염과 관련된 총 569개의 단백질과 6,103 펩타이드를 얻었다(Figure 1). 강직성척추염과 류마티스관절염과 비교하여 증가한 단백질은 69개, 감소한 단백질은 151개, 통풍관절염과 비교하여 증가한 단백질은 41개, 감소한 단백질은 179개, 퇴행성관절염을 비교했을 때 증가한 단백질은 102개, 감소한 단백질은 84개였다.

세 가지 비교군 관절염(류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염)에 비해 강직성척추염에서 공통적으로 1.5배 증가한 DEP는 총 8개; HP, MMP3,

CFHR5, C9, MBL2, C4A, APCS, MMP1였다(Table 2).

3.3. Western blot 분석:

단백체 분석 결과 DEP 8개 중, 활액 내에 많은 양을 차지하고 있는 HP를 제외한 7개; MMP3, CFHR5, C9, MBL2, C4A, APCS. MMP1을 Western Blot으로 검증하였다.

MMP3은 강직성척추염에서 높은 발현을 보인다고 보고되었기 때문에 (19) 양성 대조군으로 사용하였다. 검증 결과, 양성 대조군인 MMP3(50 kDa)는 강직성척추염에서 현저하게 증가하였다(Figure 2). CFHR5과 C9에서는 대조군 질환 대비 강직성척추염에서 전반적으로 강한 발현이 나타났다(Figure 3&4). MBL2(26 kDa)는 강직성척추염 샘플 10개 중 7개에서 발현이 두드러졌으며, 류마티스관절염 6개, 통풍관절염 4개, 퇴행성관절염 1개에서 발현된 것을 비교했을 때, 가장 많은 발현을 보였다(Figure 5). C4A(95 kDa)는 강직성척추염 샘플 10개에서 모두 발현을 보이긴 했으나, 다른 질환에서도 비슷한 강도의 발현을 보였다(Figure 6). APCS(25 kDa)는 4가지 질환 전체에서 강한 발현을 보였기 때문에, 강직성척추염에서 특이적으로 증가하는 형태는 보이지 않았다(Figure 7). 골대사에서 주로 발현되는 단백질인 MMP1(50 kDa)은 강직성척추염에서 강한 발현을 보일 것이라고 예상했으나, 모든 질환에서 발현을 보이지 않았다(Figure 8).

Table 1. The Clinical and Laboratory Features of Patients with Ankylosing Spondylitis, Rheumatoid Arthritis, Gouty Arthritis, and Osteoarthritis

| Diseases/ Number | Gender | Age | ESR (mm/hr) | CRP (mg/dL) | HLA-B27 | RF (ng/mL) | Anti-CCP (U/mL) | Serum UA (mg/dL) | Disease Duration (yr) | bDMARD | cDMARD |
|---------------------|--------|-----|----------------|----------------|----------|---------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|--------|---------|
| A1 | M | 39 | 81 | 5.1 | Positive | NA | NA | NA | 2 | IFX | None |
| A2 | M | 41 | 127 | 15.8 | Positive | NA | NA | NA | 10 | GLM | None |
| A3 | M | 47 | 46 | 4.8 | Negative | NA | NA | NA | 3 | None | MTX+SSZ |
| A4 | M | 21 | 7 | 8 | Positive | NA | NA | NA | 6 | None | None |
| A5 | M | 24 | 53 | 4.7 | Positive | NA | NA | NA | 7 | None | SSZ |
| A6 | M | 35 | 27 | 2.6 | Positive | NA | NA | NA | 17 | None | MTX+SSZ |
| A7 | M | 34 | 79 | 2 | Positive | NA | NA | NA | 5 | None | SSZ |
| A8 | M | 45 | 114 | 2.3 | Positive | NA | NA | NA | 11 | None | SSZ |
| A9 | M | 22 | 39 | 3.2 | Positive | NA | NA | NA | 9 | None | SSZ |
| A10 | F | 18 | 22 | 0.74 | Negative | 9.3 | 0 | 6.1 | 0 | None | None |
| R1 | F | 57 | 64 | 1.4 | NA | 47.4 | >200 | 6.2 | 0.3 | None | MTX+SSZ |
| R2 | F | 47 | 25 | 1.04 | NA | 92 | >200 | 3.1 | 0.5 | None | MTX+SSZ |
| R3 | F | 42 | 45 | 0.46 | NA | 39.5 | >200 | NA | 5 | None | MTX |
| R4 | F | 51 | 2 | 0.01 | NA | 785.4 | >200 | NA | 3 | TCZ | MTX |
| R5 | F | 69 | 47 | 0.04 | NA | 35.7 | 129.5 | NA | 5 | IFX | MTX |
| R6 | F | 62 | 26 | 0.6 | NA | 310 | >200 | NA | 5 | None | MTX+LEF |
| R7 | F | 53 | 39 | 0.54 | NA | 46.3 | >200 | NA | 8 | None | MTX |
| R8 | F | 64 | 33 | 0.08 | NA | 99.7 | 16.6 | 5.8 | 17 | None | HCQ |
| R9 | F | 76 | 20 | 0.85 | NA | 9.3 | 0 | NA | 1 | None | MTX |
| R10 | F | 75 | 26 | 0.02 | NA | 133 | >200 | NA | 4 | ETN | MTX |
| G1 | M | 73 | NA | 0.47 | NA | NA | NA | 8.4 | 0 | None | None |
| G2 | M | 71 | 105 | 1.75 | NA | 9.3 | 0.6 | 9 | 0 | None | None |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|---|----|----|-------|----|------|-----|-----|-----|------|------|
| G3 | M | 47 | NA | 2.31 | NA | NA | NA | 7.5 | 0 | None | None |
| G4 | M | 62 | 68 | 1.6 | NA | NA | NA | 8.6 | 0 | None | None |
| G5 | M | 42 | 66 | 4.53 | NA | 22 | 1.9 | 6.9 | 0 | None | None |
| G6 | M | 63 | NA | NA | NA | 9.3 | NA | 9.9 | 0.2 | None | None |
| G7 | M | 51 | NA | NA | NA | NA | NA | 6.8 | 0.1 | None | None |
| G8 | M | 63 | NA | NA | NA | NA | NA | 9 | 3 | None | None |
| G9 | M | 82 | 54 | 1.9 | NA | 11.4 | NA | 3.5 | 0 | None | None |
| G10 | M | 74 | 52 | 11.44 | NA | 9.3 | 0 | 1.5 | 0 | None | None |
| O1 | F | 70 | 30 | 0.06 | NA | 9.3 | NA | 5.4 | 4 | None | None |
| O2 | F | 53 | NA | NA | NA | 9.3 | 0.6 | NA | 6 | None | None |
| O3 | F | 64 | 48 | 0.1 | NA | NA | NA | 3.4 | 4 | None | None |
| O4 | F | 72 | 17 | 0.13 | NA | 10.5 | 0 | 4.1 | 0 | None | None |
| O5 | F | 63 | NA | NA | NA | 9.3 | 1.1 | NA | 2 | None | None |
| O6 | M | 64 | NA | NA | NA | 9.3 | NA | NA | 6 | None | None |
| O7 | F | 57 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 17 | None | None |
| O8 | F | 72 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 1 | None | None |
| O9 | F | 79 | 15 | 0.03 | NA | 9.3 | 0.9 | 7.3 | 0 | None | None |
| O10 | F | 54 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 15 | None | None |

A: ankylosing spondylitis; Anti-CCP: anti-cyclic citrullinated peptide antibodies; bDMARD: biologic disease-modifying anti-rheumatic drug; cDMARD: conventional disease-modifying anti-rheumatic drug; CRP: C-reactive protein; ETN: etanercept; ESR: erythrocyte sedimentation rate; F: female; G: gout; GLM: golimumab; HCQ: hydroxychloroquine; IFX: infliximab; LEF: leflunomide; M: male; MTX: methotrexate; NA: not available; O: osteoarthritis; R: rheumatoid arthritis; RF: rheumatoid factor; SSZ: sulfasalazine; TCZ: tocilizumab; UA: uric acid

Table 2. The List of Proteins Upregulated in Ankylosing Spondylitis

| Gene symbol | Protein | Fold change (AS/RA) | Fold change (AS/Gout) | Fold change (AS/OA) |
|-------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| HP | Haptoglobin | 2.67 | 5.93 | 27.97 |
| MMP3 | Matrix metalloproteinase-3 | 2.02 | 2.63 | 10.13 |
| CFHR5 | Complement factor H-related protein 5 | 1.61 | 4.52 | 3.23 |
| C9 | Complement component C9 | 1.85 | 1.75 | 1.82 |
| MBL2 | Mannose-binding protein C | 1.68 | 1.52 | 1.61 |
| C4A | Complement C4-A | 1.92 | 2.02 | 1.63 |
| APCS | Serum amyloid P-component | 15.69 | 4.81 | 6.53 |
| MMP1 | Matrix metalloproteinase-1 | 1.97 | 2.75 | 14.96 |

AS: ankylosing spondylitis; OA: osteoarthritis; RA: rheumatoid arthritis;

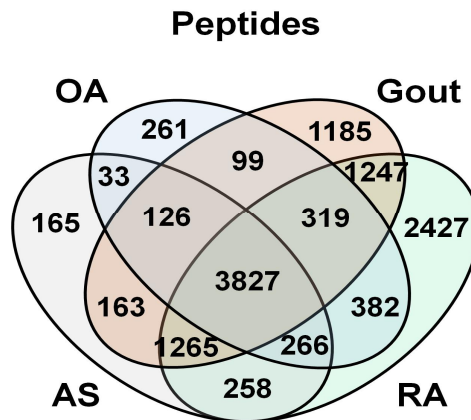
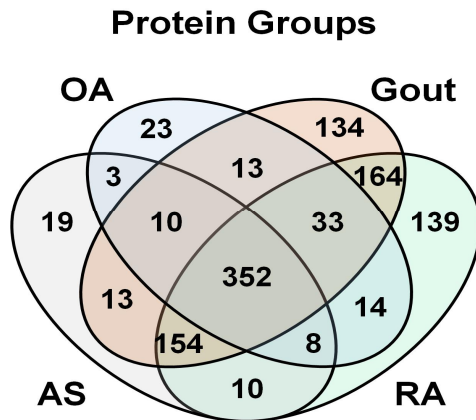


Figure 1. The number of proteins and peptides. Protein analysis revealed 569 total proteins and 6,103 peptides related to ankylosing spondylitis.

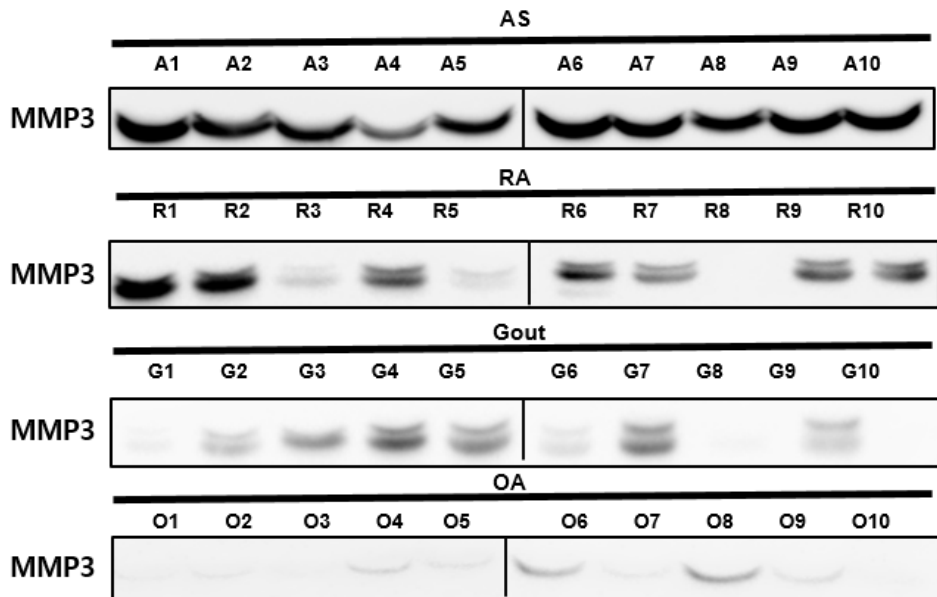


Figure 2. Verification of the MMP3 levels in Western blot analysis. Expression of MMP3 in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

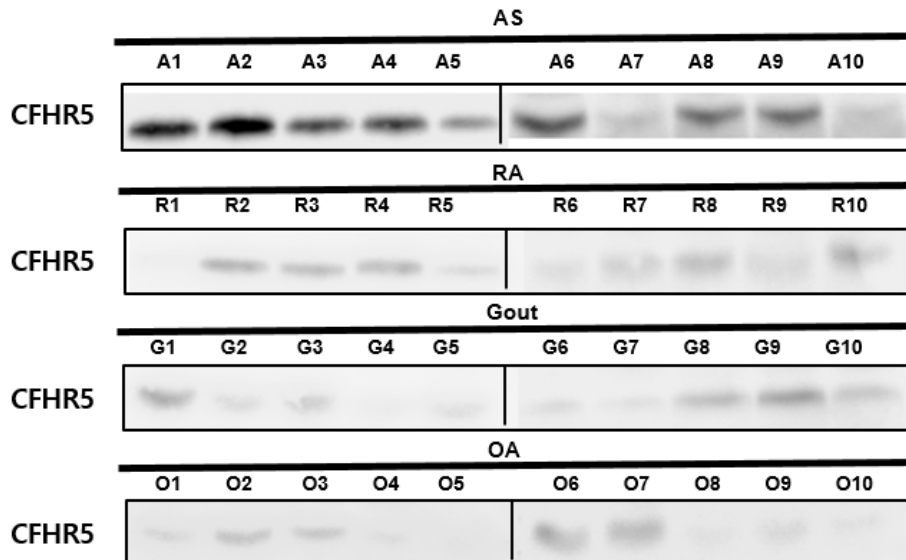


Figure 3. Verification of the CFHR5 levels in Western blot analysis. Expression of CFHR5 in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 500 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

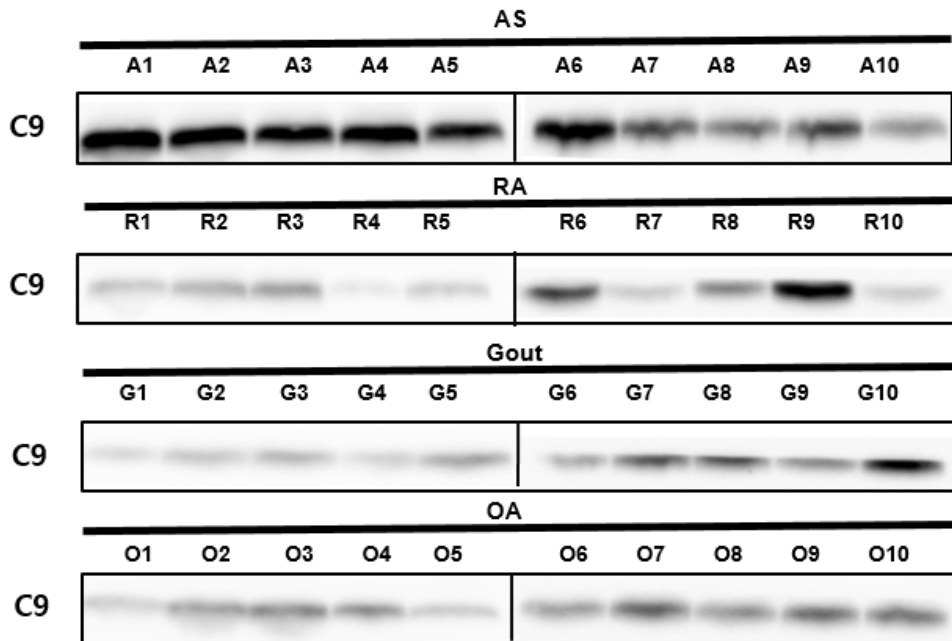


Figure 4. Verification of the C9 levels in Western blot analysis. Expression of C9 in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

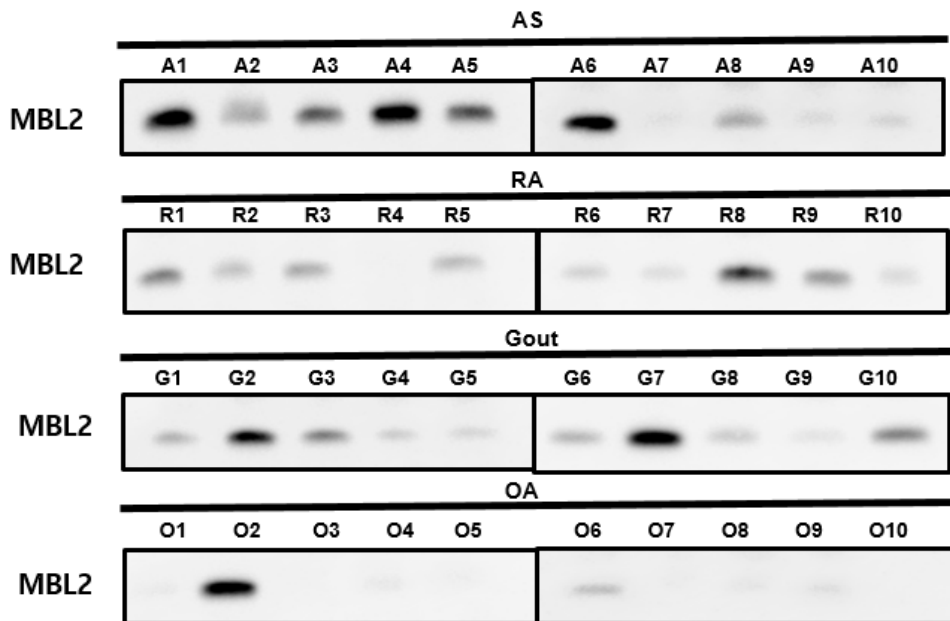


Figure 5. Verification of the MBL2 levels in Western blot analysis. Expression of MBL2 in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

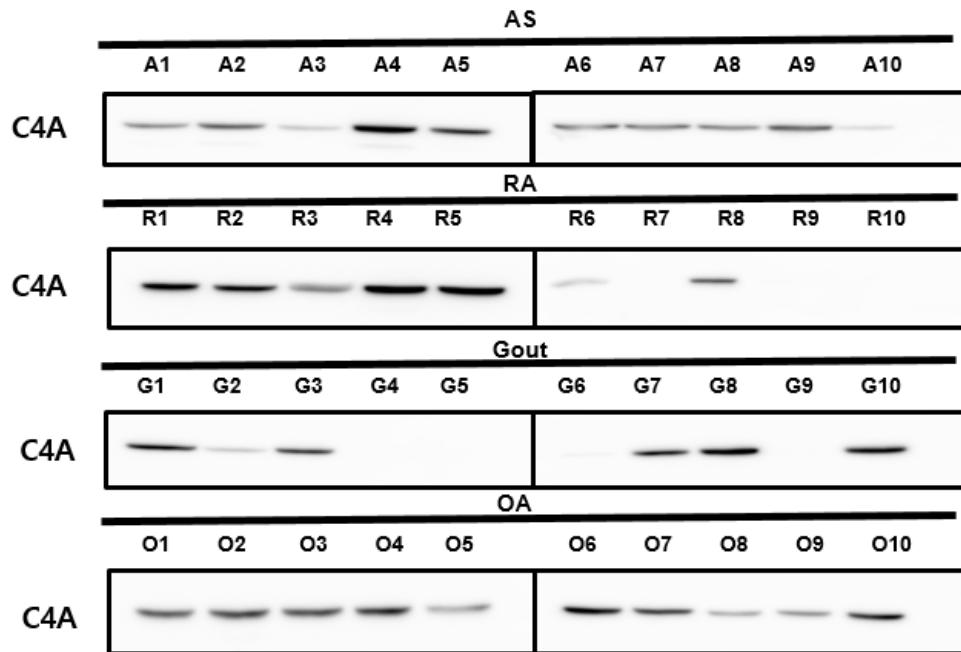


Figure 6. Verification of the C4A levels in Western blot analysis. Expression of C4A in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

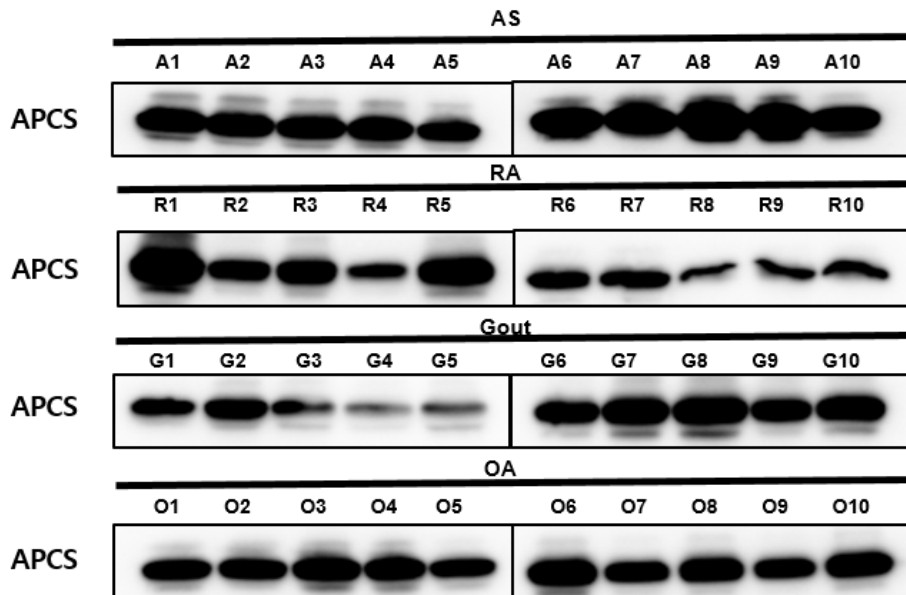


Figure 7. Verification of the APCS levels in Western blot analysis. Expression of APCS in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

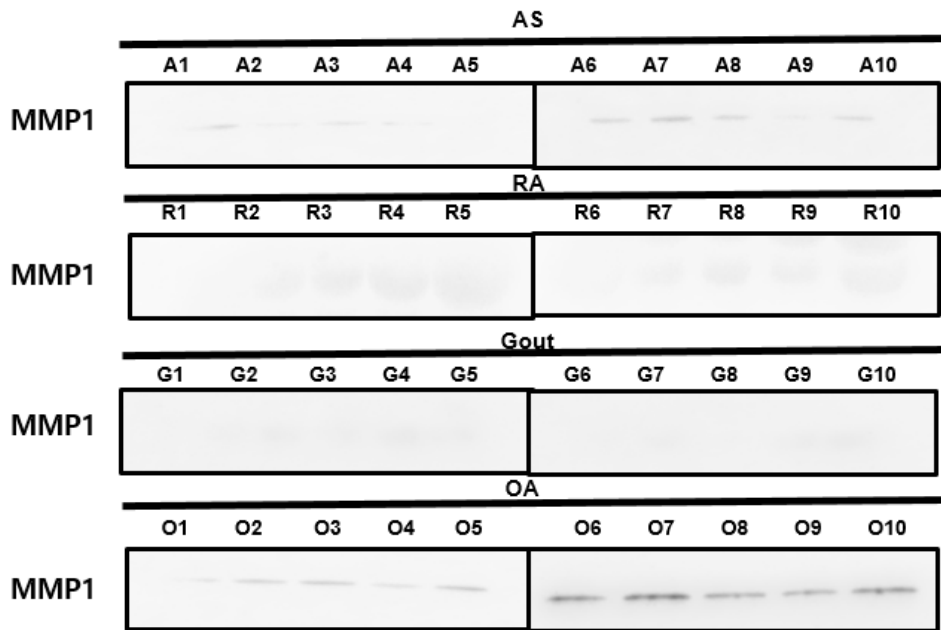


Figure 8. Verification of the MMP1 levels in Western blot analysis. Expression of MMP1 in synovial fluid of AS group(n=10) compared to RA(n = 10), Gout(n = 10) and OA(n = 10) groups. It was diluted 1 : 5000 in skim milk. Equal amount of proteins(30 μ g) were loaded, and they were resolved by SDS-PAGE.

4. 고 찰

강직성척추염은 척추와 말초관절에 생기는 만성염증 자가면역질환이다 (1). 강직성척추염은 병인이 명확하지 않고 구체적인 진단지표가 없어서 조기 진단이 어렵다(20). 단백질 분석은 질병의 진단과 치료에 필요한 지표 단백질을 발견할 수 있는 최첨단 분석 기술로, 최근 여러 류마티스 질환에서 연구가 진행되고 있다.(21).

이 연구에서는 강직성척추염과 다른 비교 질환들(류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염)의 단백질 및 Western blot 분석을 통해 특징적인 단백질을 발견하고자 하였다. 연구에 사용할 시료는 관절염 환자에게서 채취가 가능한 활액으로 선택하였다. LC-MS/MS를 이용하여 분석한 결과, 강직성척추염 대비 나머지 세 가지 질환에서 공통적으로 1.5배 이상 상승한 8가지 단백질(HP, MMP3, CFHR5, C9, MBL2, C4A, APCS, MMP1)을 발견하였다. 그 중, 활액 내에 많은 양으로 존재하는 HP를 제외한 나머지 7가지 단백질들을 Western blot 분석으로 검증하였고, MMP3, CFHR5, C9이 강직성척추염에서 높은 발현을 보였다.

MMP계열의 단백질은 관절염의 발병기전에 관여한다고 알려져 있다. 특히 MMP3은 활액의 섬유아세포 및 연골 세포에 의해 합성되고 분비되는 단백질분해효소로 MMP1, MMP7 및 MMP9와 같은 다른 MMP를 활성화시키는 역할도 한다(22). 최근 연구를 살펴보면, 강직성척추염의 혈청에서 수치가 올라간다는 메타분석 보고가 있다(19). MMP3 단백질 발현 정도를 Western blot 실험으로 확인해 본 결과, 강직성척추염에서 높은 발현을 보였고 이 단백질을 양성 대조군으로 사용하였다.

CFHR5는 보체계(complement system) 단백질 중 대체보체경로(alternative pathway)에서 중요한 역할을 하며, C3와 결합을 하여 활성화하는 것을 돕는다(23). 이 단백질은 강직성척추염의 혈청에서 높은 발현을 보인다는 선행 연구 결과가 있으며(24), 그 외에도 자가면역질환인 전신홍반루푸스 환자의 혈장에서 높은 농도로 관찰되었다는 결과가 있다(25).

C9은 보체계 단백질 중 막 공격 복합체(membrane attack complex, MAC)의 구성원이며, 보체계의 마지막 단계인 C5 활성화 후 세포막에 공극을 유도하여 용해를 유발시키는 역할을 한다(26). 이 단백질 역시 강직성척추염의 혈청에서 높은 발현을 보인다는 연구 결과가 있다(24).

단백체 분석에서 MBL2, C4A는 강직성척추염과 비교군 사이에서 발현의 차이를 보였으나, Western blot 검증 실험에서는 두드러지는 차이를 보이지 않았다. 이 두 단백질 또한 보체계 단백질로, MBL2는 병원성 미생물 표면에서 발견되는 탄수화물 유형을 인식하는 기능이 있다. 이 때, 렉틴 보체경로(lectin pathway)가 활성화 되는 양상을 보인다. 또 다른 기능으로, 노화된 세포와 사멸하는 세포에 결합하기도 한다(27). C4A는 보체계 경로 중, 고전적 보체활성경로(classical pathway)에 관여하는 단백질이다. 이 단백질의 결핍은 전신홍반루푸스와 제 1형 당뇨병과 관련이 있으며, 과다 발현은 정신분열증, 양극성장애 등 정신 질환과 관련이 있다고 알려져 있다(28). 보체계는 체액성 면역(humoral immunity)와 선천성 면역(innate immunity)의 중요한 작동기전이다. 강직성척추염의 동물모델에서 보체 시스템을 억제시켰을 때 치료에 도움이 된다는 선행연구가 있으며(29), 근골격계 질환인 전신경화증환자에서도 보체계가 활성화 된다고 알려져 있다(30).

APCS는 선천면역계와 관련이 있는 단백질로, 강직성척추염의 활액과 혈청에서 증가된 발현을 보였다는 보고가 있다(24,31). 단백질 분석을 통해서 높은 fold-change(강직성척추염/류마티스관절염 : 15.69, 강직성척추염/통풍관절염 : 4.81, 강직성척추염/퇴행성관절염 : 6.53)를 나타냈으나(Table 2), Western blot을 이용한 검증실험에서는 차별적인 발현이 보이지 않았다. 한 연구에서는 쥐에서 CRP와 APCS가 51%의 sequence 상동 관계(homology)를 보였다(32). 이번 연구에서 검증이 이루어지지 않은 단백질들도 향후 연구에서 가능성을 확인해볼 필요가 있다.

본 연구는 크게 네 가지의 중요한 가치가 있다. 첫째, 강직성 척추염의 활액으로 단백질 분석을 실시하여, 569개의 단백질과 6,103개의 펩타이드를 얻었다. 이는 현재까지 강직성 척추염의 활액에서 확인된 단백질의 최대수이다. 둘째, 강직성척추염에서 다양한 연구가 진행된 바 있지만, 3가지 질환

(류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염)을 동시에 비교군으로 연구한 것은 최초이다. 셋째, 강직성척추염에서 증가한 8가지 단백질을 발견하였다. 특히 MBL2, C4A는 강직성척추염에서 처음으로 보고되는 단백질이며, 나머지 단백질들도 활액에서는 최초로 연구된 것이다. 넷째, 8가지 단백질 중 4가지가 보체계로 강직성척추염과 높은 연관성이 있는 것으로 보인다.

본 연구의 한계점은 활액 채취의 어려움으로 환자 수가 비교적 적고, Western blot 외에 추가적인 검증이 없다는 것이다. 시료의 표본 수를 늘리고, 활액 이외에 소변, 혈청, 활막 그리고 동물모델 등을 이용하여, 발견된 단백질들의 추가 검증이 이루어진다면 강직성척추염의 바이오마커로써 가능성이 더욱 높아질 것으로 기대한다.

5. 요약

강직성척추염은 만성염증 류마티스 질환으로, 명확한 병인은 밝혀지지 않았다. 이 연구에서는 강직성척추염의 활액에서 특이적으로 발현하는 단백질을 발견하고자 하였다.

연구를 위해 강직성척추염과 비교군(류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염)을 질환 별로 10명씩 총 40명을 모집하였다. 단백질 분석으로는 최신 실험 기법인 LC-MS/MS를 사용하였고, 4 그룹간의 차이를 확인하였다. 그 결과 1.5 배 이상 상승된 변화를 보이는 8개의 단백질(HP, MMP3, CFHR5, C9, MBL2, C4A, APCS, MMP1)을 발견하였다. 그 중 활액에서 풍부한 단백질인 HP를 제외한 나머지 7개 단백질을 검증하기 위해 Western blot 분석을 진행하였다. 강직성척추염에서 높은 발현을 나타낸다고 보고된 MMP3을 양성 대조군으로 사용하였다. 검증 실험 결과 CFHR5, C9은 강직성척추염에서 증가하였지만, MBL2, C4A, APCS, MMP1은 질병간에 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서는 여러 류마티스질환의 활액을 사용하여 체계적인 단백질 분석을 하였다. 네 질환이 동시에 분석된 것은 최초이며, 발굴된 단백질은 향후 강직성척추염의 바이오마커로써 높은 가능성을 가지고 있다. 추후 샘플의 표본 수를 늘리고 소변, 혈액 등 다양한 시료를 사용한 추가 검증 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Raychaudhuri SP, Deodhar A: The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis. *J Autoimmun* 2014; 48-49: 128-33.
2. Zink A, Braun J, Listing J, Wollenhaupt J: Disability and handicap in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis—results from the German rheumatological database. German Collaborative Arthritis Centers. *J Rheumatol* 2000; 27: 613-22.
3. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A: Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum dis* 2002; 61(Suppl 3): iii8-18.
4. Gladman DD: Clinical aspects of the spondyloarthropathies. *Am J Med Sci* 1998; 316: 234-8.
5. Ranganathan V, Gracey E, Brown MA, Inman RD, Haroon N: Pathogenesis of ankylosing spondylitis – recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 359-67.
6. Boonen A, Chorus A, Miedema H, van Der Heijde D, van Der Tempel H, Van der Linden S: Employment, work disability, and work days lost in patients with ankylosing spondylitis: a cross sectional study of Dutch patients. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 353-58.
7. Smith MD: The normal synovium. *Open Rheumatol J* 2011; 5: 100 - 6.
8. Singh N, Vogelgesang SA: Monoarticular Arthritis. *Med Clin North*

Am 2017; 101: 607-13.

9. Gobezie R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS, Chase M, et al.: High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R36.
10. Mahendran SM, Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Chandran V: Synovial fluid proteomics in the pursuit of arthritis mediators: An evolving field of novel biomarker discovery. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017; 54: 495-505.
11. Park YJ, Chung MK, Hwang D, Kim WU: Proteomics in Rheumatoid Arthritis Research. *Immune Netw* 2015; 15: 177-85.
12. Mohan C, Assassi S: Biomarkers in rheumatic diseases how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? *BMJ* 2015; 351: h5079.
13. Castro-Santos P, Laborde CM, Díaz-Peña R: Genomics, proteomics and metabolomics: their merging roles in the discovery and validation of rheumatoid arthritis biomarkers. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33: 279-86.
14. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 361-68.
15. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. : Development of criteria for the classification and reporting of

- osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
 17. Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yü T-F: Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 895-900.
 18. Jung JH, Ji YW, Hwang HS, Oh JW, Kim HC, Lee HK, et al.: Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. *Sci Rep* 2017; 7: 13363.
 19. Gao JW, Zhang KF, Lu JS, Su T: Serum matrix metalloproteinases-3 levels in patients with ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res* 2015; 14: 17068-78.
 20. Zochling J, Braun J: Quality indicators, guidelines and outcome measures in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(Suppl 47): 147-52.
 21. Cai A, Qi S, Su Z, Shen H, Yang Y, He L, et al.: Quantitative Proteomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Ankylosing Spondylitis by iTRAQ. *Clin Transl Sci* 2015; 8: 579-83.

22. Lerner A, Neidhöfer S, Reuter S, Matthias T: MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2018; 32: 550–62.
23. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT: Complement factor H related proteins(CFHRs). *Mol Immunol* 2013; 56: 170–80.
24. Fischer R, Trudgian DC, Wright C, Thomas G, Bradbury LA, Brown MA, et al.: Discovery of Candidate Serum Proteomic and Metabolomic Biomarkers in Ankylosing Spondylitis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: 1M111.013904.
25. Hu X, Liu H, Du J, Chen Y, Yang M, Xie Y, et al.: The clinical significance of plasma CFHR 1–5 in lupus nephropathy. *Immunobiology* 2019; 224: 339–46.
26. Franc V, Yang Y, Heck AJ: Proteoform Profile Mapping of the Human Serum Complement Component C9 Revealing Unexpected New Features of N-, O-, and C-Glycosylation. *Anal Chem* 2017; 89: 3483–91.
27. Skare TL, Nisihara R, Cieslinski JZ, Zeni JO, Rasera HN, Messias-Reason I, et al.: Mannose-Binding Lectin Deficiency in Brazilian Patients with Spondyloarthritis. *Immunol Invest* 2016; 46: 183–9.
28. Ingram G, Hakobyan S, Hirst CL, Harris CL, Loveless S, Mitchell JP, et al.: Systemic complement profiling in multiple sclerosis as a

- biomarker of disease state. *Mult Scler* 2012; 18: 1401-11.
29. Yang C, Ding P, Wang Q, Zhang L, Zhang X, Zhao J, et al.: Inhibition of Complement Retards Ankylosing Spondylitis Progression. *Sci Rep* 2016; 6: 34643.
 30. Okrój M, Johansson M, Saxne T, Blom AM, Hesselstrand R: Analysis of complement biomarkers in systemic sclerosis indicates a distinct pattern in scleroderma renal crisis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 267.
 31. Bhattacharjee M, Sharma R, Goel R, Balakrishnan L, Renuse S, Advani J, et al.: A multilectin affinity approach for comparative glycoprotein profiling of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Clin Proteomics* 2013; 10: 11.
 32. Floyd-Smith G, Whitehead AS, Colten HR, Francke U: The human C-reactive protein gene (CRP) and serum amyloid P component gene (APCS) are located on the proximal long arm of chromosome 1. *Immunogenetics* 1986; 24: 171-6.

Differential Proteomic Analysis of Synovial Fluid from Ankylosing Spondylitis and Other Rheumatic Diseases

Lee, Jihyun

Department of Internal Medicine

Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Son, Chang-Nam)

(Abstract)

The synovial fluid is a lubricant, composed of hyaluronic acid, inflammatory cells and proteins released from synovial fibroblasts, synovial membrane and inflammatory cells. The development of peripheral arthritis in ankylosing spondylitis develops early in the disease course is a predictor of a more aggressive disease. The objective of this study was to identify differentially expressed protein mediators in synovial fluid of ankylosing spondylitis.

A Total of 40 synovial fluid samples from 10 ankylosing spondylitis and each 10 controls (osteoarthritis, rheumatoid arthritis, gouty arthritis) were collected. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were carried out to identify differentially expressed proteins based on the ratios of the extracted ion current of each protein

between the four groups. 8 proteins showed 1.5 fold change, 7 of which were verified with the exception of the abundant protein Haptoglobin (HP). Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) was used as a positive control, and the remaining 6 proteins were subjected to western blot analysis.

8 proteins were found to be more than 1.5-fold differentially expressed in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients compared to control groups. Proteins such as HP, MMP3, Complement factor H-related protein 5 (CFHR5), Complement component C9 (C9), Mannose-binding lectin2 (MBL2), Complement C4-A (C4A), Serum amyloid P-component (APCS) and Matrix metalloproteinase-1 were found to be upregulated in the synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. CFHR5 and C9 were reported in previous studies with ankylosing spondylitis serum. APCS was reported in synovial fluid as well as serum. However, C4A and MBL2 were newly discovered through this analysis. The study verified the unique expression level of C9 and CFHR5 in ankylosing spondylitis sample, using western blot analysis, as compared to the

other three diseases.

Quantitatively proteomic profiling of the respective synovial fluid sample from 4 diseases, i.e., ankylosing spondylitis, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and gouty arthritis, by LC-MS/MS, was performed. The systematic comparative proteomic analysis of the four groups together was carried out for the first time, leading to several differentially expressed proteins in ankylosing spondylitis. Among them, C9 and CFHR5 were expected, whose expression levels were confirmed by western blot analysis and could be potential biomarker for ankylosing spondylitis.

강직성척추염 환자의 활액에서 발현하는 특이 단백질 연구

이 지 현

계명대학교 대학원

의학과 내과학 전공

(지도교수 손 창 남)

(초록)

활액은 윤활제로서, 활막 및 염증 세포로부터 방출되는 단백질로 구성된다. 강직성 척추염에서 말초 관절염은 질병 초기에 흔히 나타나며, 질병 활성도가 높다. 이 연구의 목표는 강직성척추염의 활액에서 차별적으로 발현된 단백질을 확인하는 것이다.

강직성척추염 10개와 각 10개씩의 비교군(류마티스관절염, 통풍관절염, 퇴행성관절염)으로, 총 40개의 활액 샘플을 수집했다. Liquid chromatography와 tandem mass spectrometry(LC-MS/MS)를 사용하여 4가지 그룹 사이의 추출된 각 이온 전류 비율에 따라 차별적으로 발현된 단백질을 확인했다. Matrix metalloproteinase-3(MMP3)을 양성 대조군으로 사용하고, 많은 양의 단백질인 Haptoglobin(HP)을 제외한 나머지 6개의 단백질을 검증을 위한 Western blot 분석에 사용하였다.

8개의 단백질이 강직성척추염에서 증가되어 있었고, HP, MMP3,

Complement factor H-related protein 5(CFHR5), Complement component C9(C9), Mannose-binding lectin2(MBL2), Complement C4-A(C4A), Serum amyloid P-component(APCS) 그리고 Matrix metalloproteinase-1이었다. 그 중, CFHR5와 C9은 강직성척추염의 혈청에서 보고된 바가 있으며, APCS는 혈청 뿐 아니라 활액에서도 보고가 되었다. C4A와 MBL2는 이번 분석을 통해 새롭게 발견된 단백질이다. 우리는 3가지 질병 대조군과 비교하여 Western blot 분석을 실시하였고, 강직성척추염 샘플에서 C9, CFHR5가 상향조절된 것을 확인하였다.

이 연구는 관절염의 주요 4가지 질환을 가진 환자들로 부터 활액 샘플을 채취하여 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. 네 그룹의 체계적인 단백질 분석은 처음으로 수행된 것이며, 강직성척추염에서 특별히 높은 발현을 보이는 8가지 단백질을 발견하였다. 그 중 Western blot 분석을 통해 C9, CFHR5를 검증했다. 이 두 단백질이 강직성척추염의 잠재적인 바이오마커가 될 것으로 기대한다.