Dementia and Neurocognitive Disorders
2003; 2. 115-9

알쯔하이머병 환자의 혈소판 아밀로이드 전구단백질 이상

이애영 · 조은경* · 김건익 · 김선국
손은희

충남대학교 의과대학 신경과학교실
미생물학교실*

Platelet Amyloid Precursor Protein Abnormalities in Alzheimer's Disease

Ae-Young Lee, M.D., Eun-Kyeong Jo, M.D.*, Kun-Ik Kim, M.D., Sun-Kook Kim, M.D., Eun-Hee Sohn, M.D.

Departments of Neurology and Microbiology*, Chungnam National University, College of Medicine, Daejeon, Korea

Background: Although Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder without any truly effective pharmacological treatment at present, early accurate diagnosis is important for the delaying of disease progression and proper management. It would be desirable to have a peripheral biological marker to identify patients affected by AD. Amyloid β-peptide originates from a larger precursor, the amyloid precursor protein (APP), which can be seen in the platelet of its equivalent to those found in brain. To investigate if there is a correlation between level of platelet APP isoform and AD, we evaluate a cohort of subjects including patients affected by sporadic AD, vascular dementia, and controls. **Subjects & Methods:** Thirty-five patients with sporadic AD diagnosed according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Relatec Disorders criteria (NINCDS-ADRDA) and 26 vascular dementia patients diagnosed by the Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV) criteria and 12 controls were included. Blood sample were drawn from fasting state and collected into 3 mL of 3.8% sodium citrate. Platelets were collected by centrifugation at 500 g for 20 minutes and washed, and the platelet pellet was stored at -80°C until used. APP was assessed by Western blot analysis and quantified by densitometry using Image Analyzer. **Results:** In platelets obtained from patients affected by sporadic AD, the absolute level of APP quantitated by densitometer as well as the result of Western blot was higher compared with those of patients with non-Alzheimer dementia and controls. We observed statistically significant reductions in the ratio of 120 kDa to 130 kDa APP to 110 kDa APP (APPr) for patients with probable AD compared with control subjects and patients with vascular dementia. APPr levels in AD correlated with the severity of dementia measured by CDR. Accuracy levels measured by Receiver Operating Curve analysis showed that a cut-off level of 0.45 resulted in a sensitivity of 71% and a specificity of 74%, with an area under the curve of 0.793. **Conclusion:** Platelet APPr allowed to differentiate AD from normal aging and vascular dementia with high sensitivity and specificity. These findings suggest that platelet APPr may be a helpful peripheral marker for diagnosis and clinical progression of Alzheimer disease.

Key Words: *Alzheimer's disease, Peripheral marker, Platelet APPr*

Address for correspondence

Ae-Young Lee, M.D
Department of Neurology, Chungnam National University Hospital, 640 Daesa-dong, Joong-gu, Daejeon 301-721, Korea
Tel +82-42-220-7807
Fax +82-42-252-8654
E-mail aelee@cnu.ac.kr

서 론

알쯔하이머병은 임상에서 가장 흔히 보는 유형의 치매이지만 진단이 항상 쉬운 것은 아니다. 알쯔하이머병의 조기 진단이 치료 측면에서 매우 중요하지만 임상적 진단결과를 병리학적 진단과 비교하면 진단민감도(diagnostic sensitivity)는 비교적 우수하지만(평균 81%) 진단 특이도(diagnostic specificity)는 그리 높지 않다(평균 70%)[1-3]. 따라서 임상에서 사용이 편리하고 신뢰할 만한 생화학적 진단지표(biochemical marker)가 필요한 실정이다.

베타 아밀로이드 펩타이(β-amyloid peptide)는 알쯔하이머병 환자의 뇌와 혈소판에 많은 아밀로이드 전구단백질(amyloid

precursor protein, APP)로부터 유래하는 것으로, 노인반(senile plaque)과 혈관벽의 아밀로이드원섬유(amyloid fibrils)의 주요 성분이다[4, 5]. 순환하는 APP의 95% 이상이 혈소판에 존재한다[6, 7]. 혈소판 막에는 세가지 APP 이형(isoform)이 존재하고 혈소판과 거대핵세포(megakaryocyte)는 모두 APP695, APP751, APP770을 암호화(encode)하기 위한 3 APP 전사물(transcripts)을 가지고 있다[8]. 기존 연구에 의하면 알쯔하이머병 환자의 혈소판에 존재하는 APP 이형이 정상인과 다르므로 알쯔하이머병 진단의 말초 표식자로서 이용가능성이 제시된 바 있다[9-11].

저자들은 알쯔하이머병 진단에 있어 혈소판 APP가 말초 진단표식자로서 유용성을 평가하고 진행정도에 따른 APPr의 변화를 분석하여 질환의 진행에 대한 지표로서의 가치를 알아 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

충남대학교병원 신경과 기억장애 및 치매 클리닉에 내원한 61명의 치매환자와 12명의 정상 대조군을 대상으로 연구하였다. 알쯔하이머병 환자는 35명이었고 알쯔하이머병의 임상진단은 National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria를 이용하였다[12]. 혈관성 치매는 Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM)-IV criteria에 합당한 26명을 대상으로 하였다(DSM-IV)[13]. 환자군과 연령과 성별을 맞추고 기왕력과 신경학적 진찰 소견상 인지기능에 영향을 줄 만한 신경과적 질환이 없는 12명을 정상 대조군으로 선정하였다. 환자군과 대조군에서 두부외상의 기왕력이 있거나 인지기능에 영향을 줄 수 있는 대사장해 또는 혈액이상이 있는 경우, 알코올이나 약물중독, 우울증 등이 있는 경우는 제외하였고 혈소판 기능에 영향을 줄 수 있는 항응고제, 항혈소판제재, 세로토닌효현제 또는 길항제, 그리고 스테로이드와 같은 약물을 복용 중인 사람은 대상에서 제외하였다. 연구에 참여한 모든 사람에게 신경학적 진찰을 포함한 혈액학적 검사, 요검사, 인지기능검사, Clinical Dementia Rating (CDR)[14], 그리고 신경방사선학적 검사로서 뇌자기공명 촬영을 시행하였다. 인지기능은 한국형 Mini Mental State Examination (K-MMSE)와 modified MMSE (K-3MS)를 이용하여 평가하였다[15].

혈액에서 혈소판을 분리한 후 RNAgent kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 혈액 3 mL를 sodium citrate 3 mL와 잘 섞은 후 200 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 이 과정에서 얻은 혈소판이 풍부한 혈장(platelet-rich plasma)을 피펫으로 분리하여 다시 3,000 g에서 20분간 원심분리하여 영하 80°에 보관하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위하여 APP mRNA primer는 5′primer: 5′CAC CAC AGA GTC GGA AG 3′이고 3′primer: 5′AGG TGT CTC GAG ATA CTT GT 3′를 사용하였고 APP 695 mRNA는 87 base pairs, APP 714 mRNA는 144 base pairs, 그리고 APP 770 mRNA는 312 base pairs로 구성된 것을 이용하였다. 역전사효소 중합효소연쇄반응(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)은 total RNA isolation RNAgent kit (Promega)와 cDNA synthesis를 이용하였다. 총 RNA는 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 이어서 PCR에 의하여 DNA를 증폭하였다. RT-PCR은 각각의 총 RNA를 모두 cDNA로 합성 후 시행하였다. 먼저 RNA 시료를 65℃에서 5분간 가열하여 변성시키고 얼음에 담가 급냉시킨 후 4 μL의 10× RT buffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M $MgCl_2$), 4 μL의 10× dNTP (2.5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)를 가하고 20 μM의 oligo-dT15와 44 U의 RNase inhibitor (Poscochem R&D center, KyoungKi-Do, Korea) 및 10 U의 reverse transcriptase (Poscochem R&D center, Korea)를 가하고 총반응액이 40 μL가 되도록 증류수를 가한 후 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 전기영동은 18 μL의 PCR산물을 취하여 2 μL의 10× gel loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/50% glycerol)와 혼합한 후 1 μL/mL의 ethidium bromide (Sigma)가 포함된 2% agarose gel에 가하여 Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer와 minigel 전기영동장치로 100 volt에서 1시간 전기영동하였다. Agarose gel상의 전기영동에서 PCR밴드가 확인되지 않는 경우 12%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 관찰하였다. DNA band는 UV transilluminator와 polaroid camera를 이용하여 사진촬영한 후 DNA size marker와 비교하여 관찰하였다. 582 base pairs로 구성된 beta-actin은 5′primer: 5′TCA TGC CAT CCT GCG TCT GGA CCT 3′, 3′primer: 5′CCG GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG 3′이었다. 혈소판 APPr의 분석을 위한 모든 실험과정은 환자의 임상진단을 알지 못하는 전문가에 의하여 이루어졌다.

통계는 그룹간 비교를 위하여 ANOVA를 이용하였고 혈소판 APPr과 변수사이의 관련성을 알아 보기 위하여 Pearson correlation을 이용하였다. 알쯔하이머병 진단에 이용하기 위한 APPr의 적절한 진단 민감도와 진단 특이도를 결정하기 위하여 Receiver Operating Characteristic (ROC) curve를 이용하였다. 가장 적절한 절단점은 진단민감도와 특이도 차이(sensitivity-specificity difference)가 최소화되는 점으로 하였다. 통계학적 의미는 $p<0.05$인 경우로 하였다.

결 과

알쯔하이머 환자와 혈관성 치매환자, 그리고 정상 대조군 사

Table 1. Demographic and Clinical Variables of Subjects

Variables	AD (n=35)	VaD (n=26)	Control (n=12)
Age (y)	77.3±11.0	72.6±9.6	75.9±8.8
Sex (F/M)	1.88	1.54	1.92
Duration (m)	109.1±74.9	98.1±58.6	nd
Edu (y)	4.8±1.4	5.8±3.5	5.8±1.7
K-MMSE	12.1±7.2	12.3±8.7	21.2±1.3
K-3MS	29.9±14.3	33.4±27.0	65.5±6.6
CDR	2.2	2.1	nd

AD, Alzheimer disease, VaD, vascular dementia, K-MMSE, Korean version of Mini Mental State examination, K-3MS, Korean version of modified Mini Mental State Examination. CDR, clinical dementia rating scale, Edu education, nd, dot done, y year; m, month

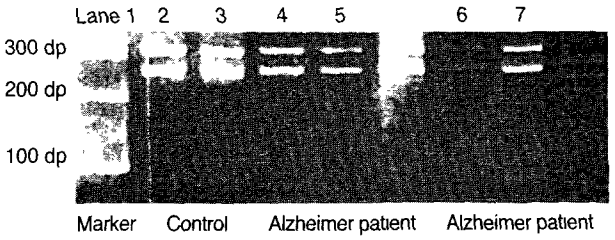

Fig. 1. Representative results of 12% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) APP ratio [APPr, ratio between the upper (130 kDa) and the lower (110 to 106 kDa) in patients with Alzheimer disease (lane 4 & lane 5; lane 6 & lane 7) were lower compared with those of controls (lane 2 & lane 3)

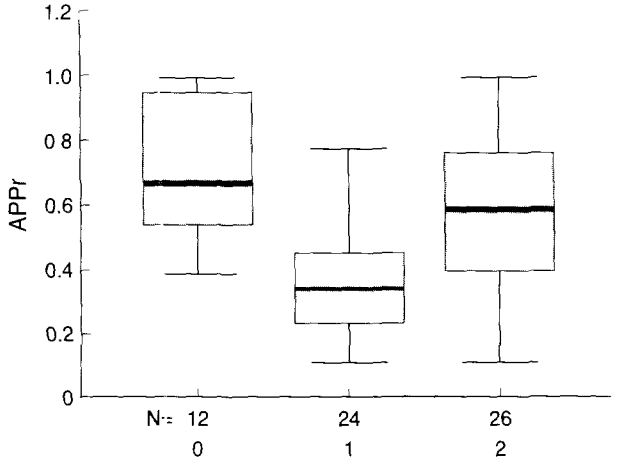

Fig. 2. Ratio between the optical density of the upper band (130 kDa) and the lower bands (106-110 kDa) of the platelet amyloid precursor protein isoforms in 12 control subjects (0), 35 patients with Alzheimer's disease (1), and 26 patients with vascular dementia (2)(p=0.001) Diagnosis: 0=control; 1=AD, 2=VaD

이에 연령이나 성별에는 차이를 보이지 않았다. 교육정도는 혈관성 치매와 정상 대조군이 알쯔하이머 환자군보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다. 두 치매군 사이에 K-MMSE와 K-3MS로 평가한 인지기능상의 차이는 없었다(Table 1).

혈소판 평균 APP ratio [APPr, ratio between the upper

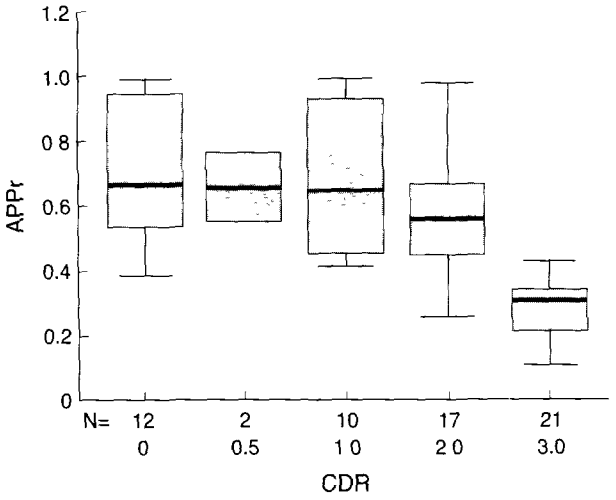

Fig. 3. Changes of platelet APPr according to the CDR Density ratio of platelet amyloid precursor protein isoforms of patients with Alzheimer's disease (AD) grouped according to severity measured by Clinical Dementia Rating score (p=0.001)

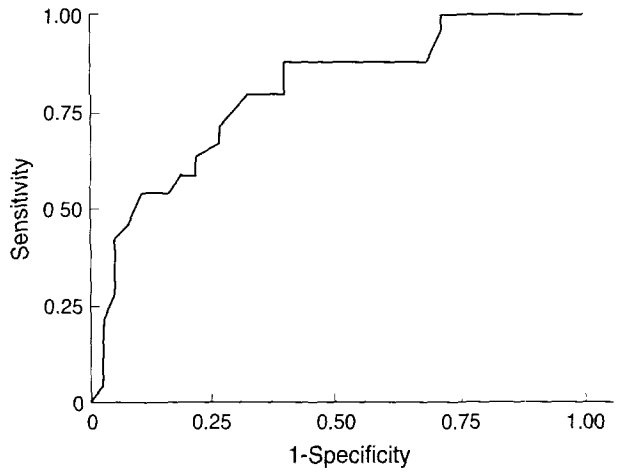

Fig. 4. Receiver Operating Characteristic Curve of APPr Diagnostic value of platelet APPr measured by ROC analysis showed that a cut-off level of 0.45 resulted in a sensitivity of 71% and a specificity of 74%, with an area under the curve of 0.793

(130 kDa) and the lower (110 to 106 kDa)는 정상 대조군에서 0.7, 혈관성 치매환자군 0.6, 그리고 알쯔하이머병 환자군이 0.4로 다른 군과 비교하여 알쯔하이머병에서 APPr이 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다(p=0.001)(Fig. 1, 2)

치매환자에서 질환의 진행을 표시한 CDR 변화에 따른 APPr 변화를 분석한 결과, CDR이 높아질수록 APPr이 낮아지는 것을 알 수 있었다(p=0.001)(Fig. 3).

혈소판 APPr의 진단적 유용성을 알아 보기 위하여 진단 민감도와 진단 특이도를 ROC curve로 나타내었다(Fig. 4). APPr을 0.45로 하였을 때 진단 민감도는 71%이며 진단 특이도는 74%로서 양성 우도비(positive likelihood ratio)는 2.73이었다.

고 찰

본 연구를 통하여 혈소판 APPr이 정상인이나 혈관성 치매환자와 비교하여 알쯔하이머병 환자에서 의미있게 저하되는 것을 알 수 있었다. 또한 CDR을 이용하여 측정한 질환의 정도에 따라 APPr이 저하되므로 진단적 가치뿐만 아니라 질환의 진행을 나타내는 지표로서 사용할 수 있음을 보여 주었다. 이는 알쯔하이머병 환자의 APPr이 정상인의 1/3정도로 낮았으며 K-MMSE로 평가한 인지기능 저하와 높은 상관관계를 보인 알쯔하이머병 환자와 대조군을 비교한 연구와 같은 결과이다[16]. 본 연구에서 APPr은 연령이나 성별, 또는 환자의 교육수준 등 인구학적 변수와 무관하면서도 진단 민감도와 진단 특이도가 70% 이상의 수준을 보여 임상적으로 알쯔하이머병을 진단하고 다른 유형의 치매와 알쯔하이머병을 감별하는데 매우 유용한 검사라고 판단할 수 있다. 그러나 알쯔하이머병 환자의 혈소판 APP변화와 뇌에서 보이는 병리학적 소견과 직접적인 관련성이 아직 밝혀지지 않은 것이 이 검사의 신뢰도를 감소시킬 수 있다. 그러나 혈소판은 순환하는 APP의 95% 이상을 함유하며 APP 대사에 필요한 모든 효소를 가지고 있다는 사실이 혈소판 APP가 전체 APP대사에 매우 중요한 지표가 될 수 있음을 보여 준다[17, 18]. 알쯔하이머병 환자에서 혈소판 APP 함유량(trafficking)변화와 대사이상이 관찰되고 혈소판 세포막의 유동성 변화를 보고한 연구는 중추신경계에서 진행되는 알쯔하이머병의 병리학적 변화를 규명하는데 혈소판이 매우 유용한 지표가 될 수 있음을 보여 주는 연구결과이다[19-21].

혈소판 APPr의 진단적 가치는 APPr을 0.45로 하였을 때 진단 민감도는 71%이며 진단 특이도는 74%로서 양성 우도비(positive likelihood ratio)는 2.73이었다. APPr 절단점 0.45는 치매환자와 경도기억장애 환자를 대상으로 한 다른 연구에서 치료하지 않은 알쯔하이머병 환자의 평균 APPr과 동일한 수준이었다[22]. 실험방법에 따라 차이를 보일 수는 있으나 APPr 절단점을 0.6으로 하는 경우 진단민감도와 특이도가 85% 이상으로 진단적 가치가 더 높아진다[23].

알쯔하이머병 환자에서 관찰된 APPr의 감소 기전은 120-130 kDa로 APP 분할이 감소하거나, 110 kDa 이형으로 APP 분할이 증가하거나 또는 120-130 kDa APP의 분비 또는 분할 증가가 원인이 될 수 있으며 마지막으로 혈소판 알파과립내에서 110 kDa APP의 분비 또는 분할감소 때문으로 추정할 수 있다[24]. 알쯔하이머병에서 관찰되는 APP 이형의 변화기전을 정확하게 알기 위해서는 싸이토카인이나 혈소판 phospholipase A_2 또는 C, 또는 혈소판 protein kinase C 등이 APP 이형변화에 어떤 영향을 주는 지 실험적인 규명이 필요하다고 생각한다. 한 연구에 의하면 ApoE4인 경우 APPr이 낮았고 이는 ApoE 이형에 따라 APP 이형의 결합정도가 달라짐으로써 저농도 지단백 유사 수용체단백질(low-density lipoprotein-like receptor protein)을 통한 재흡수와 분할의 차이때문이라고 보고하였다[11].

본 연구의 단점은 연구대상이 적어서 질환의 정도에 따른 그룹별 혈소판 APPr의 절단점을 제시하지 못했다는 점이다. 또한 정상 대조군과 혈관성 치매환자만을 비교하였을 뿐 다양한 유형의 치매환자를 포함하여 비교하지 못한 점을 들 수 있다. 임상진단기준에 의한 환자의 분류는 임상에서 가장 널리 사용되고 비교적 진단적 신뢰도가 높다고 알려진 임상진단 기준을 사용하기는 하였지만 병리학적 확진없이 임상진단만을 근거로 APPr의 진단가치를 평가하였기 때문에 임상진단 정확도와 병리적 확진율의 차이에서 발생하는 오차를 고려하지 않을 수 없다.

결론적으로 임상에서 혈소판 APPr만으로 알쯔하이머병을 확진할 수는 없으나 알쯔하이머병에 대한 APPr의 양성우도비가 2.73인 점을 감안한다면 이 질환의 진단 정확도를 높이고 다른 유형의 치매와 감별하는데 간편하면서도 유용한 검사이며 질환의 진행을 측정하는 지표로서 사용이 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Jobst KA, Barbetson LP, Shepstone BJ. *Accurate prediction of histologically confirmed Alzheimer's disease and the differential diagnosis of dementia. the use of NINCDS-ADRDA and DSM-III-R criteria, SPECT, X-ray CT, and Apo E4 in medial temporal lobe dementias. Oxford Project to Investigate Memory and Aging. Int Psychogeriatr 1998; 10: 271-302.*
2. Varma AR, Snowden JS, Lloyd JJ, Talbot PR, Mann DMA, Neary D. *Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; 66: 184-8.*
3. Chui HJ, Lee AY. *Reaching a diagnosis of a dementia subtype: Clinical criteria for dementia subtypes. In: Qizilbash N, Schneider L, Chui H, Tariot P, Brodaty H, Kaye J & Erkinjuntti T. Evidence-based Dementia Practice. Blackwell Science, 2002: 106-19.*
4. Rosenberg RN. *A causal role for amyloid in Alzheimer's disease: the end of the beginning. Neurology. 1993; 43: 851-6.*
5. Selkoe DJ. *Alzheimer's disease: a central role for amyloid. J Neuropathol Exp Neurol 1994; 53: 438-47*
6. Schlossmacher MG, Ostaszewski BL, Hecker LI. *Detection of different isoforms patterns of the beta-amyloid precursor protein in human platelets and lymphocytes. Neurobiol Aging. 1992; 13. 421-34.*
7. Chen W, Inesstrosa NC, Ross GS, Fernandez HL. *Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. Biochem Biophys Res Commun. 1995: 213: 96-103*
8. Gardella JE, Gorgone GA, Newman P, Frangione B, Gorevic PD. *Characterization of Alzheimer amyloid precursor protein transcripts in platelets and megakaryocytes. Neursci Lett. 1992; 138: 229-32.*
9. Davies TA, Fine RE, Johnson RJ. *Non-age related differences in throm-*

bin responses by platelets from male patients with advanced Alzheimer s disease. Biochim Biophys Res Comm 1993; 194: 537-43

10. Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Vignolo LA, Lenzi GL, *et al. Differential pattern of platelet APP isoforms as an early marker for Alzheimer disease. Arch Neurol 1998; 55: 1195-200*
11. Rosenberg RN, Bashir F, Fosmire JA, Risser R, Adams P, Svetlik D, *et al. Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease Arch Neurol 1997, 54. 139-44*
12. Mckhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D. *Stadlan E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. Neurology 1984, 34. 939-44.*
13. American Psychiatric Association. *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder. 4th ed. Washington, DC. American Psychiatric Association; 1994.*
14. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. *A new clinical scale for the staging of dementia. Br J Psychiatry 1982; 140. 566-72.*
15. Sohn EH, Lee AY, Park HJ. *The validity and reliability of the Korean Modified Mini-Mental State (K-3MS) Examination. J Korean Neurol Assoc 2003; 21 346-56.*
16. Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, *et al. Amyloid precursor protein in platelets. A peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD Neurology 2001; 57: 2243-8*
17. Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moir R, Fuller S, Milward E, *et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer s disease is released by human platelets. J Biol Chem 1990; 265 15977-83.*
18. Li QX, Whyte S, Tanner JE, Evin G, Beyreuther K, Masters CL *Secretion of Alzheimer disease Aβ amyloid peptide by activation of human platelets. Lab Invest 1998, 78: 461-9.*
19. Davies TA, Long HJ, Sgro K. *Activated Alzheimer disease platelets retain more beta amyloid precursor protein Neurobiol Aging 1997, 18 147-53*
20. Sevush S, Wenche Jy, Horstman LL, Mao WW, Kolodny LK, Ahn YS *Platelet activation in Alzheimer's disease Arch Neurol 1998, 55 530-6.*
21. Zubenko GS, Wusylko M, Cohen BM, Boller F, Teply I. *Platelet membrane abnormality in Alzheimer's disease. Ann Neurol 1987, 22 237-44.*
22. Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Pettenati C, Cottini E, Rozzini L, *et al. Amyloid precursor protein in platelets of patients with Alzheimer disease Arch Neurol 2001, 58: 442-6.*
23. Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pettenati C, Cottini E, Agosti C, *et al Abnormalities in the pattern of platelet amyloid precursor protein forms in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease Arch Neurol 2002; 59: 71-5.*
24. Fukatsu R, Tsuzuki K, Takamunu Y *Is APP in cultured cells and platelets processed in multiple pathways? Soc Neurosci 1996, 22 190. Abstract.*