



# 출혈성 질환에서 Tissue Factor Pathway Inhibitor의 농도 분포 및 Thrombin 형성 능력 조사

## Tissue Factor Pathway Inhibitor Levels and Thrombin Generation in Hemorrhagic Disease

이승재 · 송재우

Seungjae Lee, M.D., Jeawoo Song, M.D.

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) regulates blood coagulation. To treat hemorrhagic disease, studies have been conducted to achieve a hemostatic effect by inhibiting TFPI. In this study, blood TFPI levels of healthy and hemorrhagic disease groups were compared, and the effects of blood TFPI level and its activity on coagulation were investigated.

**Methods:** The blood TFPI levels of the healthy, chronic liver disease (CLD), chronic kidney disease (CKD), and hemophilia groups were measured and compared. Thrombin generation assay (TGA) was performed to investigate the effects of TFPI level and its activity on coagulation.

**Results:** The mean blood TFPI levels of the healthy, CLD, CKD, and hemophilia groups were 16.47 ng/mL, 24.90 ng/mL, 49.47 ng/mL, and 17.35 ng/mL, respectively. The healthy and CLD groups showed correlations between their blood TFPI levels and TGA parameters ( $P < 0.05$ ). The TGA parameters of the CLD and hemophilia groups showed significant differences compared with those of the healthy group ( $P < 0.05$ ). In FVIII-deficient plasma with anti-TFPI antibodies, the TGA parameters tended to be normalized according to anti-TFPI antibody levels. However, the differences in TGA parameters caused by FVIII concentration were unclear.

**Conclusions:** Although the TFPI level was related to bleeding in the disease groups, it is difficult to interpret its effects independently because of the various factors that affect the coagulation process. However, TFPI is worth studying to facilitate the development of a treatment strategy for bleeding due to lack of FVIII.

**Key Words:** Blood coagulation, Tissue factor pathway inhibitor, Thrombin generation assay, Anti-TFPI antibody

### 서론

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)는 혈액에 존재하는 혈장 단백질로 활성화 제10응고인자(activated coagulation factor X, FXa)와 결합하여 TFPI/FXa 복합체를 형성한 후 활성화 제7응고인자(activated coagulation factor VII, FVIIa)가 그 보조인자인 조직

인자(tissue factor, TF)와 결합한 TF/FVIIa 복합체에 결합하여 TFPI/FXa/TF/FVIIa 4중 복합체를 형성하게 되고, 이 4중 복합체는 FX를 활성화시킬 수 없기 때문에 FXa에 의한 prothrombin의 활성화를 억제한다. 결과적으로 TFPI는 thrombin에 의한 섬유소 응고 형성(fibrin clot formation) 양을 조절하는 작용을 한다[1]. FVIIa 활성화 증대에 의한 FX의 절단/활성화 작용이 출혈에 따른 응고반응의 첫 단계인 점에서 이 단계에 작용하는 인자들의 변화는 응고과정 전체에 큰 영향을 미칠 수 있다.

Thrombin 형성에 영향을 미치는 요인들에 대한 기존의 연구에 따르면 혈우병 A군과 혈우병 B환자군에서 공통적으로 free TFPI 농도가 높을수록 thrombin 형성이 감소하는 상관관계를 보였으나 정상인군에서는 유의미한 상관관계를 보이지 않았다[2]. 이와 관련하여 항 TFPI 항체를 이용하여 TFPI를 억제시킨 경우 thrombin 형성능력의 변화를 연구한 기존 연구에 따르면 항 TFPI 항체를 투여한 혈우병군과 정상인군 모두에서 thrombin 형성이 증가하는 것이 확인되었다[3].

이러한 연구 자료를 바탕으로 출혈성 질환을 치료하기 위해서

Corresponding author: Jeawoo Song, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0002-1877-5731>

Department of Laboratory Medicine, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea  
Tel: +82-2-2228-2445, Fax: +82-2-364-1583, E-mail: labdx@yuhs.ac

Received: May 22, 2020

Revision received: October 5, 2020

Accepted: October 6, 2020

This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2021, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

항 TFPI 항체로 TFPI를 억제함으로써 응고과정의 초기반응을 제어하여 응고 활성을 지속시키고 지혈 효과를 얻고자 하는 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다[4-6]. 혈우병뿐만 아니라 출혈 위험을 증가시키는 만성 신장질환[7]이나 만성 간질환[8]과 같은 질병의 합병증 치료를 위해서도 TFPI 농도 확인이 유용할 것으로 예상된다. 이러한 치료에서 항 TFPI 제제의 용량을 결정하기 위해 혈액 TFPI 농도가 중요한 고려인자이며, 이에 출혈 위험이 증가하는 질환들의 혈액 TFPI 농도 분포를 조사할 필요가 있다. 하지만 TFPI와 관련된 한국인의 임상적 검사 참고자료가 아직 마련되어 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구는 항 TFPI 항체의 임상적 활용을 위한 기초 연구의 일환으로 정상 성인군과 출혈 위험이 높은 것으로 알려진 만성 간질환, 만성 신장질환, 혈우병군의 혈액 TFPI 농도를 비교하고, 나아가 혈액 TFPI의 농도 및 활성도가 응고작용에 미치는 영향을 조사하고자 시행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 검체

정상 성인군의 혈액 TFPI 농도 측정을 위하여 2018년 7월 한달간 연구 참여를 지원한 사람 140명의 혈액을 수집하였다. BD Vacutainer sodium citrate tube (Becton Dickinson, Oakville, Canada)에 3 mL의 혈액을 채혈하였다. 채혈한 혈액을 25°C 환경에서 3,400 RPM으로 10분간 원심분리하여 혈장을 채취한 후 영하 70°C에 냉동보관 한 검체를 사용하였다. 정상 성인군 지원자 중 미성년자, 체중이 50 kg 미만인 남자, 45 kg 미만인 여자, 임신 중이거나 분만 또는 유산 후 6개월 이내인 자, 의사 소견상 건강상태가 불량하다고 인정되는 경우 연구에 포함하지 않았다. 질환군의 경우 응고검사가 의뢰된 sodium citrate tube (BD)에 채취된 검체들 중 응고검사 진행 후 잔여 혈장 검체를 영하 70°C에 보관하여 연구에 사용하였다. 진단명에 만성 간질환이 포함된 환자의 검체 중 2018년 10월 10일부터 22일까지 수집된 31명의 잔여 검체를 사용하였고, 진단명에 만성 신장질환이 포함된 환자의 검체 중 2018년 8월 28일 하루 동안 수집된 30명의 잔여 검체를 사용하였으며, 진단명에 혈우병이 포함된 환자의 검체 중 2018년 10월 24일부터 30일까지 수집된 혈우병 A 환자 27명(FVIII <1.0 IU/dL: 15명; FVIII 1.0-5.0 IU/dL: 12명)과 혈우병 B 환자 3명(FIX <1.0 IU/dL: 1명; FIX 1.0-5.0 IU/dL: 2명)의 잔여 검체를 사용하였다. 질환군 검체를 수집할 때 채혈 당시 의무기록상 출혈 증상, 수술 및 수혈 과거력, 발열을 동반한 감염 증상이 있는 경우 연구에 포함하지 않았다.

본 연구는 세브란스병원 연구심의위원회의 승인(2017-1550-009)을 받아 진행되었으며, 정상 성인군의 경우 지원자에 한하여 동의서 작성 후 연구에 포함시켰고, 질환군에 대한 동의서는 면제 받았다.

### 2. 장비 및 시약

#### 1) TFPI assay

검체의 TFPI 농도 측정을 위하여 Quantikine ELISA Human TFPI Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하였다. 제조사 매뉴얼에 따라 검체 50 µL를 마이크로플레이트의 각 웰에 분주한 후 실온에서 교반기에 2시간 배양하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 세척 후 각 웰마다 200 µL의 Human TFPI Conjugate를 분주하고 실온에서 1시간 배양하였다. 플레이트를 다시 세척한 후 각 웰마다 200 µL의 Substrate Solution을 추가한 후 30분간 실온에서 배양하였다. 마지막으로 각 웰에 50 µL의 Stop Solution을 첨가한 후 Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher scientific, Vantaa, Finland)을 사용하여 스캔하였다.

#### 2) Thrombin generation assay (TGA)

TFPI 농도와 응고 활성도 사이의 관련성을 관찰하기 위해 Calibrated Automated Thrombogram (Thromboscope BV, Maastricht, Netherlands)과 PPP-Regent LOW (Thromboscope BV)를 사용하여 TGA를 시행하였다. 제조사 매뉴얼에 따라 37°C로 가온된 플레이트의 각 웰에 20 µL의 PPP-Reagent와 80 µL의 혈장을 넣고 20 µL의 FluCa를 첨가하여 발생하는 thrombin 형성 반응을 측정하였다. Thrombin 형성 반응은 Thromboscope software (Thromboscope BV)을 이용하여 측정하였다. 추가로 TFPI의 활성도와 응고 활성도 사이의 관련성을 관찰하기 위해 Factor VIII deficient plasma (Instrumentation laboratory, Bedford, MA, USA), Calibration plasma (Instrumentation laboratory)와 항 TFPI 항체인 MG1113 (GC Labs, Yongin, Korea)을 사용하여 TGA를 시행하였다.

### 3. 연구 방법

#### 1) 정상 성인 및 질환군에서의 혈액 TFPI 농도 분포의 질환별 다양성

출혈 위험이 증가하는 질환의 혈액 TFPI 농도 분포를 조사하기 위해 대조군으로 정상 성인의 혈액 TFPI 농도 분포를 먼저 조사하였다. 연구 참여를 지원한 정상 성인군 검체 140개의 혈액 TFPI 농도를 측정하였고, 이를 바탕으로 혈액 TFPI 농도 값의 성별에 따른 차이와 연령에 따른 변화를 분석하였다. 이후 만성 간질환군 검체 31개, 만성 신장질환군 검체 30개, 혈우병군 검체 30개의 혈액 TFPI 농도를 측정하여 각각 정상 성인군의 혈액 TFPI 농도와 비교하였다. 각 실험군의 측정값에서 Outlier를 제외한 결과값의 95% 분포 범위를 측정범위로 설정하였다.

#### 2) 혈액 TFPI 농도와 응고 활성도 사이의 관련성

혈액 TFPI 농도와 응고기능 사이의 상관관계를 알아보기 위해서

정상 성인군과 질환군 모두를 대상으로 다양한 TFPI level (5.87-82.68 ng/mL)을 포함하도록 89개의 검체를 선택하여 TGA를 진행하고 TGA parameter와 혈액 TFPI 농도 사이의 관련성을 조사하였다. 또한 정상 성인군과 질환군의 TGA parameter 측정값이 유의한 차이가 있는지 비교하였다.

3) 응고능력이 제한된 환경에서 TFPI 활성도가 미치는 영향

정상 성인과 달리 응고 기능이 떨어져 있는 중증 혈우병 환자의 경우 항 TFPI 항체 농도에 따라 TGA parameter 값이 어떤 차이를 보이는지 알아보기 위해서 Factor VIII deficient plasma (Instrumentation Laboratory)에 Calibration plasma (Instrumentation Laboratory)를 첨가하여 factor VIII을 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 IU/dL의 농도가 되도록 처리한 검체와 함께 대조군으로 정상 성인군의 검체 5개를 이용하였다. 각각 항 TFPI 항체(GC Labs)를 0.00, 0.05, 0.50, 5.00, 50.00 µg/mL 농도로 분할하여 spiking하고 20분간 실온 incubation한 후 TGA를 시행하여 첨가한 항 TFPI 항체 농도에 따른 TGA parameter의 변화를 관찰하였다.

4. 통계분석

통계분석을 위하여 Microsoft Excel 2010 (microsoft, Seattle, WA, USA)과 R version 3.5.3 (The R Foundation, Vienna, Austria), Medcalc (Medcalc software, Ostend, Belgium)를 사용하였다. 연속변수의 정규성 검증을 위해 D'Agostino-Pearson test를 시행하였다. 혈액 TFPI 농도 값의 성별에 따른 차이를 비교하기 위하여 t-test를 시행하였고, 연령에 따른 변화를 분석하기 위해 Spearman 상관분석을 시행하였다. 세 질환군과 정상 성인군의 혈장 TFPI 값의 차이를 분석하기 위하여 그룹 간 t-test를 시행하였다. 각 그룹별로 TGA를 진행하고 TGA parameter와 TFPI level과의 관련성을 조사하기 위해 Pearson 상관분석을 시행하였다. 혈액 TFPI 활성도가 TGA parameter에 끼치는 영향을 알아보기 위해 Pearson 상관분석을 시행하였고, 그룹 간 TGA parameter의 분포를 비교하기 위하여 Mann-Whitney test를 사용하였다. 모든 통계분석에서 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

Table 1. TFPI levels of healthy and disease groups

Group	Gender	Age (median)	N	Group TFPI level (mean ± standard deviation) (ng/mL)
Healthy group	Male	22-58 (31.00)	39	8.57-24.37 (16.47 ± 4.03)
	Female	20-60 (31.00)	97	
Chronic liver disease group	Male	37-85 (60.00)	21	1.86-49.92 (24.90 ± 10.93)
	Female	38-83 (66.50)	10	
Chronic kidney disease group	Male	40-87 (68.00)	19	24.12-100.72 (49.47 ± 24.24)
	Female	27-91 (68.00)	11	
Hemophilia group	Male	4-64 (25.50)	30	8.90-26.83 (17.35 ± 4.60)

Abbreviation: TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

결 과

1. 정상 성인 및 질환군에서의 혈중 TFPI 농도 분포의 질환별 다양성

정상 성인군 검체 140개의 결과 중 Outlier를 제외한 136개의 결과와 질환군의 혈액 TFPI 농도 측정 결과를 Table 1에 제시하였다. 정상 성인군을 대상으로 성별에 따른 차이를 비교한 결과 남성의 혈액 TFPI 평균 농도는 18.80 ng/mL, 표준편차 4.21이었고, 여성의 혈액 TFPI 평균 농도는 15.57 ng/mL, 표준편차 3.11로 측정값에 유의한 차이가 관찰되었다(남성>여성, P<0.01). 연령에 따른 변화를 분석한 결과 연령 분포는 20세부터 60세까지였으며(중앙값 31.00) 연령에 따라 증가하는 경향성이 관찰되었다(Spearman's coefficient of rank correlation = 0.27, P<0.01).

만성 간질환군의 혈액 TFPI의 평균 농도는 24.90 ng/mL (범위 1.86-49.92, 표준편차 10.93)로, 정상 성인군과 비교하여 유의하게 높은 level을 보였다(P<0.01). 만성 신장질환군의 혈액 TFPI의 평균 농도는 49.47 ng/mL (범위 24.12-100.72, 표준편차 24.24)로, 정상 성인군에 비해 유의하게 높은 TFPI level을 보였다(P<0.01). 또한 위에 기술한 바와 같이 TFPI 농도가 높은 것으로 나타난 만성 간질환군과 비교하여도 유의하게 높은 농도를 보였다(P<0.01). 혈우병군의 혈액 TFPI의 평균 농도는 17.35 ng/mL (범위 8.90-26.83, 표준편차 4.60)로, 정상 성인군과 유의한 차이를 보이지 않았다(P=0.34) (Fig. 1).

2. TFPI level과 응고 활성도 사이의 관련성

정상 성인군과 질환군의 TGA parameter를 측정하였다. 실험에 포함된 정상성인군 61명의 혈액 TFPI 농도는 평균 15.62 ng/mL (범위 5.87-22.86, 표준편차 3.77)이었다. 질환군의 혈액 TFPI 농도는 만성 간질환군 8명의 경우 평균 25.11 ng/mL (범위 18.24-33.58, 표준편차 5.57), 만성 신장질환군 13명의 경우 평균 38.33 ng/mL (범위 26.42-82.68, 표준편차 17.06), 혈우병군의 경우 평균 18.61 ng/mL (범위 13.70-21.69, 표준편차 2.59)이었다. 혈액 TFPI 농도에 따른 TGA parameter의 변화를 파악하기 위하여 상관성 분석을 시행한

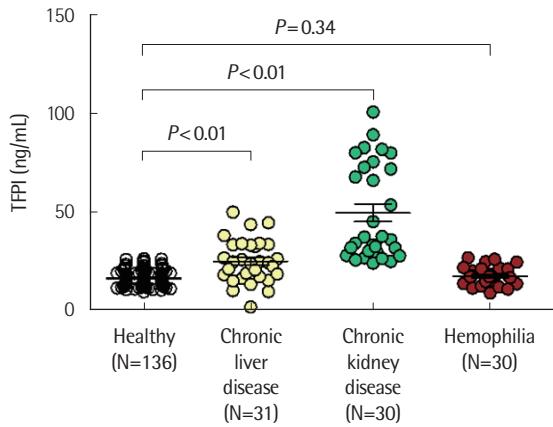


Fig. 1. Blood tissue factor pathway inhibitor (TFPI) levels in healthy, chronic kidney disease, chronic liver disease, and hemophilia groups.

결과, 정상 성인군의 경우 lag time, endogenous thrombin potential (ETP), peak height, time to peak 네 가지 parameter 모두 TFPI 농도와 유의미한 상관성을 보였고 ( $P < 0.05$ ), 만성 간질환군의 경우 lag time과 time to peak 값이 TFPI 농도와 유의한 상관성을 보였다 ( $P < 0.05$ ). 만성 신장질환군과 혈우병군의 경우 TFPI 농도와 TGA parameter 사이의 상관성을 보이지 않았다 ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2).

정상 성인군과 각 질환군 사이의 응고활성도 차이를 알아보기 위해 집단간 TGA parameter의 차이를 분석해 본 결과 만성 간질환군은 lag time, peak height, time to peak 세 가지 항목에서 유의미한 차이를 보였으나 ( $P < 0.05$ ), 만성 신장질환군의 경우 정상 성인군과 비교했을 때 모든 TGA parameter 값이 유의미한 차이를 보이지 않았고 ( $P > 0.05$ ) 혈우병군은 모든 TGA parameter에서 유의미한 차이를 보였다 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3).

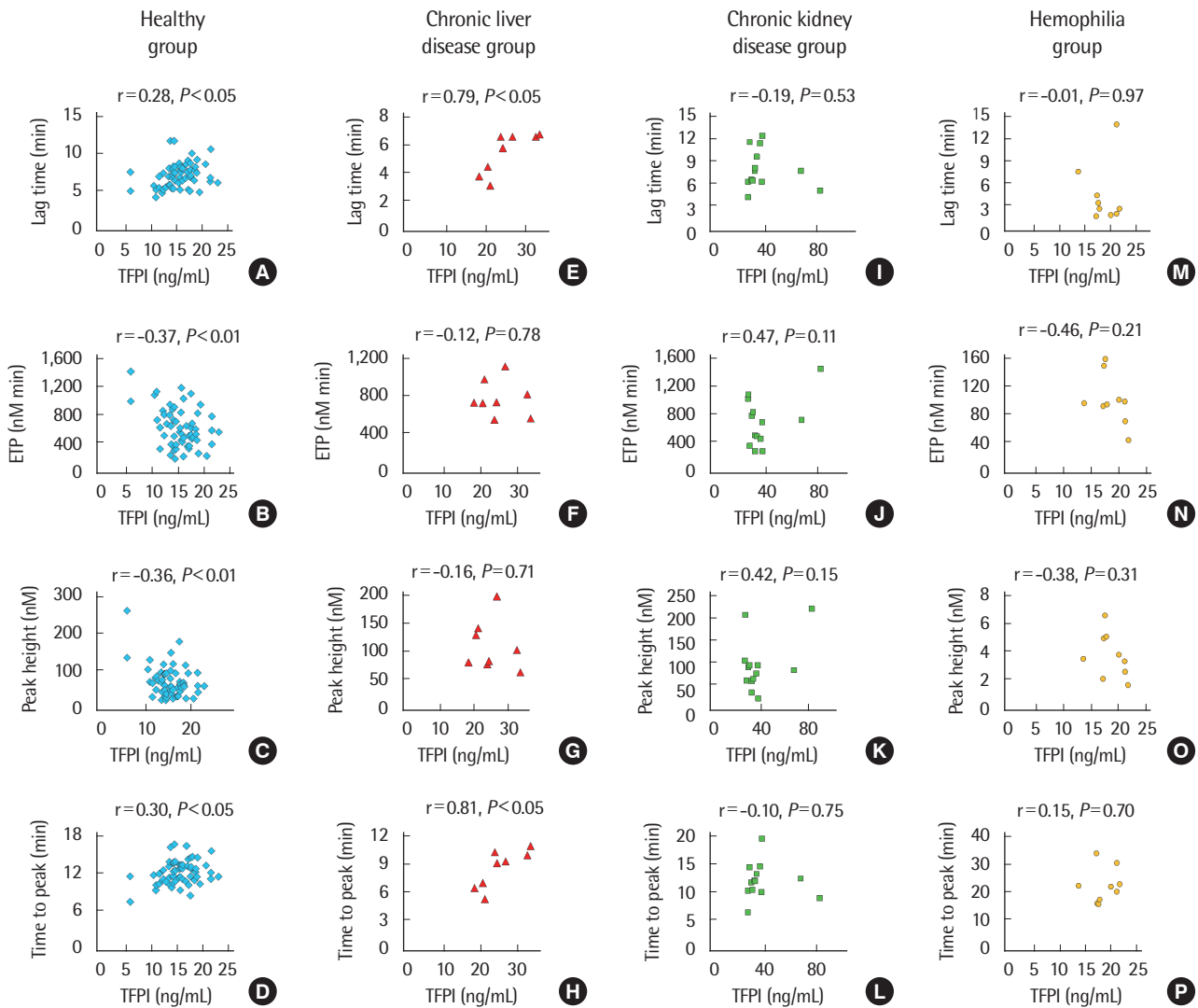


Fig. 2. Thrombin generation assay (TGA) parameters of healthy (A, B, C, D), chronic liver disease (E, F, G, H), chronic kidney disease (I, J, K, L), and hemophilia (M, N, O, P) groups.

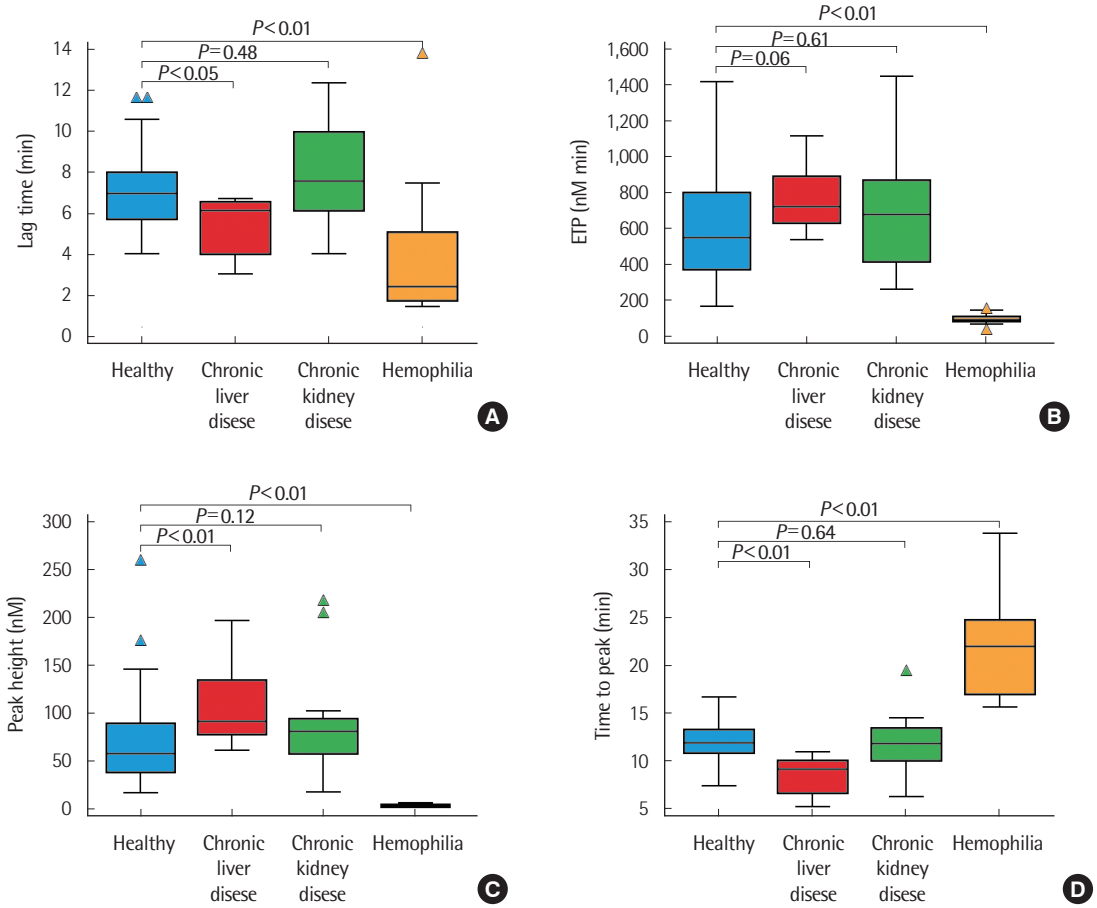


Fig. 3. Comparison of thrombin generation assay (TGA) parameters between healthy and disease groups. (A) Lag time, (B) Endogenous thrombin potential (ETP), (C) Peak height, (D) Time to peak.

### 3. 응고능력이 제한된 환경에서 TFPI 활성도가 미치는 영향

항 TFPI 항체를 첨가하여 혈액 TFPI의 작용을 억제하였다. 실험에 사용된 5개의 정상 성인군 검체 정보와 TGA 결과를 Table 2에 제시하였고, FVIII deficient plasma를 이용한 TGA 결과를 Table 3에 제시하였다. 정상 성인군의 검체를 이용한 실험결과를 종합하여 분석한 결과 항 TFPI 항체 농도에 따른 TGA parameter들의 특정 경향성은 관찰되지 않았다. 한편 FVIII deficient plasma를 이용한 실험 결과, ETP와 peak height가 항 TFPI 항체의 농도 증가에 따라 증가하는 경향성을 보였다. Lag time과 time to peak 값은 항 TFPI 항체 농도가 0.05 µg/mL일 때 감소했다가 점차 정상화되는 양상을 보였다. 하지만 FVIII 농도의 차이는 TGA parameter의 변화에 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 4).

## 고찰

본 연구는 항 TFPI 항체의 임상적 활용성을 평가하기 위한 기초자료 수집을 목적으로, 정상 성인과 출혈 위험이 높은 질환군의

혈액 TFPI 농도를 측정하여 비교하고, 혈액 TFPI의 농도와 활성도가 응고 활성도에 미치는 영향을 조사하였다.

기존 연구에 따르면 만성 간질환 환자의 경우 간기능 저하로 인하여 factor II, V, VII, X과 같은 응고인자뿐만 아니라 antithrombin, protein S, protein C 등과 같은 항응고단백 역시 감소해 있음에도 불구하고 출혈 위험이 높은 것으로 나타나는 것으로 보아 응고인자와 항응고인자의 균형과 응고인자 이외의 요소들 또한 함께 고려할 필요가 있다고 언급하였다[9]. 실제로 thrombin 형성에는 여러 응고인자들과 함께 protein C, antithrombin과 같은 다양한 요인들이 영향을 줄 수 있으므로[10-12], 본 연구결과에서 만성 간질환 환자의 경우 TFPI 농도가 정상인에 비해 높고 thrombin 형성능력이 떨어져 있는 것이 관찰되었지만 thrombin 형성능력의 저하에 TFPI의 농도 증가가 어느 정도 기여했는지 분리하여 판단하기는 어려운 것으로 보인다.

신장기능이 저하된 환자의 경우 기존 연구에서 정상인에 비하여 TFPI 농도가 높은 것으로 보고된 바 있고[13], thrombin 형성능력이 정상 대조군에 비해 낮은 것으로 보고되었으나[14], 만성 신장

Table 2. TGA parameters of five healthy group samples with suppressed TFPI activity

Sample ID	Gender	Age	TFPI (ng/mL)	MG1113 level (µg/mL)	TGA parameters			
					Lag time (min)	ETP (nM*min)	Peak height (nM)	Time to peak (min)
N_050	F	31	22.68	0.00	5.67	1,587.90	148.02	11.30
				0.05	5.33	1,992.34	179.34	11.17
				0.50	4.67	2,457.91	308.91	9.50
				5.00	24.00	1,426.69	314.06	24.33
				50.00	4.00	1,023.67	168.64	8.33
N_058	M	38	13.55	0.00	24.00	1,179.54	263.58	24.33
				0.05	24.00	1,327.38	260.48	24.33
				0.50	24.00	1,285.90	261.89	24.33
				5.00	5.50	1,125.99	152.96	10.00
				50.00	4.83	1,035.20	183.59	9.00
N_060	M	29	17.44	0.00	24.00	1,211.89	252.57	24.33
				0.05	4.83	1,215.01	180.09	9.00
				0.50	6.67	1,111.70	161.61	10.83
				5.00	6.00	1,090.69	145.66	10.50
				50.00	4.50	1,004.60	172.01	8.67
N_088	M	50	26.26	0.00	24.00	1,212.75	254.64	24.33
				0.05	4.67	1,785.11	233.73	9.17
				0.50	4.83	1,538.09	147.35	11.00
				5.00	7.00	1,038.88	101.98	12.67
				50.00	23.33	869.61	131.90	25.33
N_115	M	35	16.57	0.00	23.00	1,016.63	225.43	24.00
				0.05	23.50	1,088.42	233.59	24.17
				0.50	24.00	1,142.75	235.21	24.33
				5.00	23.83	1,133.31	239.43	24.17
				50.00	4.00	937.12	183.46	7.50

Abbreviations: TGA, thrombin generation assay; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; ETP, endogenous thrombin potential.

질환 환자에서 혈전 형성의 위험성이 높아진다는 보고도 쉽게 찾아볼 수 있다[15, 16]. 추론컨대 만성 신장질환은 혈전 형성의 위험성을 높이지만 이를 상쇄하는 방향으로 혈중 TFPI 농도가 증가하는 것으로 보인다. 이러한 추론을 바탕으로 본 연구의 만성 신장질환군의 실험 결과를 분석해 보면, 혈액 TFPI 농도가 정상인에 비해 높았음에도 불구하고 thrombin 형성능력은 정상인과 큰 차이를 보이지 않은 것은 TFPI의 thrombin 형성 억제 효과가 혈전의 형성을 억제하는 선을 넘어서지 못한 것으로 이해할 수 있다.

혈우병군의 혈액 TFPI 농도에 관한 기존 연구에 따르면 정상인과 혈우병군 사이에 통계적으로 의미 있는 차이가 존재하지 않으며, 아울러 성별과 인종의 차이도 영향이 없는 것으로 관찰되었다 [17]. 하지만 다른 연구에 따르면 혈우병 환자의 factor activity level 이 낮을수록 thrombin 형성능력이 떨어지는 것으로 보고되었다 [18]. 두 연구 결과로부터 본 연구의 혈우병 환자군에서 혈액 TFPI 농도와 TGA parameter 사이에 상관성이 관찰되지 않은 부분을 이해할 수 있다.

본 연구의 결과 중 기존의 연구 결과와 차이가 있는 부분이 몇 가지 관찰되었다. 기존 연구에서 인종이나 성별에 따른 혈액 TFPI

농도의 유의한 차이가 없는 것으로 관찰되었으나[17], 본 연구에서는 남성의 혈액 TFPI 농도가 더 높은 것으로 관찰되었다( $P < 0.01$ ). 이는 한국인에게서 관찰되는 인종적 특성일 가능성을 고려해 볼 수도 있으나 오류의 가능성을 배제할 수 없으므로 더 큰 규모의 정상 성인군을 대상으로 한 연구가 필요하다. 기존 연구에서 건강한 그룹의 경우 TFPI 농도가 ETP 값과 peak 값에 영향을 주지 않았고, 혈우병군의 경우 free TFPI 농도와 FVIII 농도가 ETP 값과 peak 값에 영향을 주는 것으로 관찰되었으나[2], 본 연구 결과에서는 정상 성인군에서 TFPI 농도가 모든 TGA parameter와 유의한 상관관계가 있는 것으로 관찰되었고, 반대로 혈우병군에서 TFPI 농도와 FVIII 농도가 TGA parameter에 미치는 영향이 통계적으로 유의하지 않았다. 이러한 차이는 본 연구가 비교적 적은 수의 검체를 이용하여 진행되었고 TGA의 경우 연구 자원의 한계로 인하여 1회 측정된 결과를 분석에 사용하였기 때문에 오류가 발생했을 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 또한 본 연구에서 측정된 혈액 TFPI 농도는 total TFPI의 농도로 free TFPI 농도를 이용한 연구 결과와는 차이가 있을 수 있다. 기존 연구에 따르면 혈액 TFPI의 약 80%까지 지단백과 결합한 상태로 존재할 수 있으므로 total TFPI

Table 3. TGA parameters of FVIII-deficient plasma with variable FVIII concentration in suppressed TFPI activity

Sample ID	FVIII (IU)	MG1113 level (µg/mL)	TGA parameters			
			Lag time (min)	ETP (nM*min)	Peak height (nM)	Time to peak (min)
F8D_0.0	0.0	0.00	5.00	132.46	5.31	22.00
		0.05	4.17	854.38	47.13	11.33
		0.50	4.50	1,129.98	67.42	16.00
		5.00	4.83	1,252.53	78.83	16.17
		50.00	5.00	1,371.72	94.39	15.33
F8D_0.5	0.5	0.00	6.00	222.61	11.15	19.33
		0.05	4.33	328.27	16.24	15.33
		0.50	4.33	1,031.59	60.60	15.17
		5.00	4.67	1,423.12	97.73	14.83
		50.00	5.00	1,418.08	102.89	14.50
F8D_1.0	1.0	0.00	4.83	194.48	7.19	22.00
		0.05	3.67	306.58	13.83	12.83
		0.50	4.50	1,078.31	61.60	16.50
		5.00	4.83	1,460.80	96.66	15.83
		50.00	5.00	1,513.42	105.62	15.33
F8D_2.0	2.0	0.00	4.33	165.26	6.80	21.33
		0.05	3.83	303.12	13.52	13.67
		0.50	4.33	1,044.54	58.47	16.33
		5.00	5.00	1,455.45	95.56	15.83
		50.00	5.17	1,447.07	98.51	15.50
F8D_5.0	5.0	0.00	4.67	179.17	7.76	21.33
		0.05	4.00	289.84	12.83	15.83
		0.50	4.33	954.87	53.33	15.83
		5.00	4.67	1,410.44	94.11	15.33
		50.00	4.83	1,454.09	101.05	15.00

Abbreviations: TGA, thrombin generation assay; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; ETP, endogenous thrombin potential.

농도와 free TFPI 농도는 비례하지 않을 수 있다[19]. 따라서 본 연구의 결과를 검증하기 위해서 더 많은 질환군 검체를 대상으로 total TFPI 농도와 free TFPI 농도를 모두 고려한 실험 디자인이 추후 진행되어야 할 것이다. 혈중 FVIII 농도와 thrombin 형성에 관한 기존 연구에 따르면, 혈우병 A군에서 FVIII 농도가 증가할수록 ETP와 peak 값이 증가하는 결과를 보였다[2]. 하지만 본 연구 결과에서는 FVIII 농도와 TGA parameter 사이에 눈에 띄는 상관관계가 관찰되지 않았다. 이러한 차이는 본 연구가 적은 수의 표본을 사용하였고 1회 측정된 검사 결과를 분석하였기 때문에 FVIII 농도와 thrombin 형성의 상관관계를 충분히 보여주지 못하여 발생했을 가능성이 있으므로 추후 더 많은 표본을 대상으로 한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 연구의 결과들을 종합하여 고려할 때 TFPI는 질환군의 출혈 경향과 어느 정도 연관성을 보이지만 응고과정에 영향을 끼치는 요인이 다양하고 질병에 따라 영향을 미치는 정도가 다양하기 때문에 TFPI의 영향을 독립적으로 해석하기는 어려울 것으로 보인다. 하지만 FVIII이 저하된 환경에서 항 TFPI 항체 투여 시 응고능력이 회복되는 것으로 보아 FVIII 부족으로 인한 출혈증상에 대한

치료제로서 연구할 가치가 있다고 판단된다.

## 요 약

**배경:** Tissue factor inhibitor (TFPI)는 응고작용을 조절하는 물질로, 출혈성 질환의 치료를 위하여 TFPI를 억제함으로써 지혈 효과를 얻고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이 연구에서는 정상 성인군과 출혈 위험이 높은 것으로 알려진 질환군의 혈액 TFPI 농도를 비교하고, 나이가 혈액 TFPI 농도 및 활성도가 응고작용에 미치는 영향을 조사하였다.

**방법:** 정상 성인군, 만성 신장질환군, 만성 간질환군, 혈우병군의 혈액 TFPI를 측정하여 비교하였고, TFPI 농도 및 활성도가 응고작용에 미치는 영향을 분석하기 위해 thrombin generation assay (TGA)를 시행하였다.

**결과:** 정상 성인군, 만성 간질환군, 만성 신장질환군, 혈우병군의 평균 혈액 TFPI 농도는 각각 16.47 ng/mL, 24.90 ng/mL, 49.47 ng/mL, 17.35 ng/mL이었다. 정상 성인군과 만성 간질환군의 경우 혈액 TFPI 농도와 TGA parameter 사이에 상관관계를 보였다( $P < 0.05$ ).

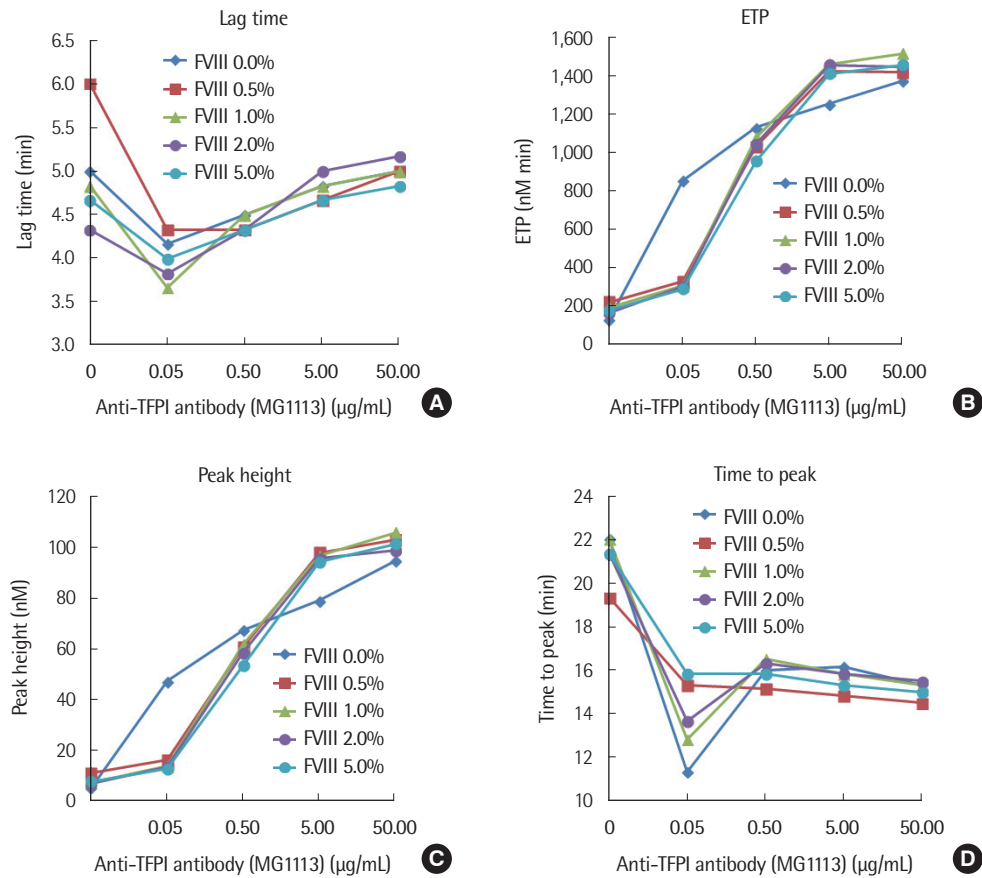


Fig. 4. Changes in thrombin generation assay (TGA) parameters of FVIII-deficient plasma according to anti-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) antibody concentration. (A) Lag time, (B) Endogenous thrombin potential (ETP), (C) Peak height, (D) Time to peak.

만성 간질환군과 혈우병군의 TGA parameter 측정값은 정상 성인군과 의미 있는 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). 항 TFPI 항체를 첨가한 FVIII deficient plasma에서 항 TFPI 항체의 농도에 따라 TGA parameter가 정상화되는 경향을 보였다. 하지만 FVIII 농도에 따른 TGA parameter의 차이는 뚜렷하지 않았다.

**결론:** 혈액 TFPI 농도는 질환군의 출혈경향과 어느 정도 연관성을 보이지만 응고과정에 영향을 끼치는 요인이 다양하기 때문에 혈액 TFPI 농도의 영향을 독립적으로 해석하기 어려울 것으로 보인다. 하지만 FVIII 부족으로 인한 출혈증상에 대한 치료법 개발을 위해서 TFPI를 연구할 가치가 있다.

**이해관계**

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

**REFERENCES**

1. Crawley JT and Lane DA. The haemostatic role of tissue factor path-

way inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:233-42.  
 2. Chelle P, Montmartin A, Damien P, Piot M, Cournil M, Lienhart A, et al. Tissue factor pathway inhibitor is the main determinant of thrombin generation in haemophilic patients. *Haemophilia* 2019;25:343-8.  
 3. Waters EK, Sigh J, Friedrich U, Hilden I, Sørensen BB. Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. *Haemophilia* 2017; 23:769-76.  
 4. Waters EK, Genga RM, Schwartz MC, Nelson JA, Schaub RG, Olson KA, et al. Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 2011;117:5514-22.  
 5. Erhardttsen E, Ezban M, Madsen MT, Diness V, Glazer S, Hedner U, et al. Blocking of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) shortens the bleeding time in rabbits with antibody induced haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:388-94.  
 6. Choi S, Lee S, Kwak H, Song J, Hwang S. MG1113, Anti-TFPI antibody,



- efficiently recovers coagulation efficacy through blocking the Kunitz 2 domain of human TFPI. *Blood* 2016;128:1406.
7. Molnar AO, Bota SE, Garg AX, Harel Z, Lam N, McArthur E, et al. The risk of major hemorrhage with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:2825-32.
  8. Tripodi A and Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med* 2011;365:147-56.
  9. Magnusson M, Berndtsson M, Fischler B, Petrini P, Schulman S, Renne T, et al. Thrombin generation test in children and adolescents with chronic liver disease. *Thromb Res* 2015;135:382-7.
  10. Lane DA and Caso R. Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1989;2:961-98.
  11. Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004;79:109-16.
  12. Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003;124:4S-10S.
  13. Kario K, Matsuo T, Yamada T, Matsuo M. Increased tissue factor pathway inhibitor levels in uremic patients on regular hemodialysis. *Thromb Haemost* 1994;71:275-9.
  14. Gäckler A, Rohn H, Lisman T, Benkö T, Witzke O, Kribben A, et al. Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. *PLoS One* 2019;14:e0212237.
  15. Ocak G, van Stralen KJ, Rosendaal FR, Verduijn M, Ravani P, Palsson R, et al. Mortality due to pulmonary embolism, myocardial infarction, and stroke among incident dialysis patients. *J Thromb Haemost* 2012;10:2484-93.
  16. Ocak G, Lijfering WM, Verduijn M, Dekker FW, Rosendaal FR, Cannegieter SC, et al. Risk of venous thrombosis in patients with chronic kidney disease: identification of high-risk groups. *J Thromb Haemost* 2013;11:627-33.
  17. Gu JM, Patel C, Kauser K. Plasma Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) Levels in Healthy Subjects and Patients with Hemophilia A and B. [https://www.postersessiononline.eu/173580348\\_eu/congresos/WFH2016/aula/-PP-T\\_101\\_WFH2016.pdf](https://www.postersessiononline.eu/173580348_eu/congresos/WFH2016/aula/-PP-T_101_WFH2016.pdf). (Updated on Jul 2016)
  18. Haghpanah S, Bazrafshan A, Silavizadeh S, Dehghani J, Afrasiabi A, Karimi M. Evaluation of thrombin generation assay in patients with hemophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2016;22:322-6.
  19. Broze GJ Jr and Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:262-80.