

Original article

Prolactin Monomeric Polyethylene Glycol Measurement Method and Study of Reference Value Verification

Dong Hyuk Ha*, Hwa-Jin Ryu, Hyun-Su Cho, Sun-Young Shin

Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

*Corresponding Author : Dong Hyuk Ha, Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Hospital, 101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, Republic of Korea, Tel :+82-2072-2536, E-mail : 21113@snuh.org

ABSTRACT

Purpose: Prolactin in the blood is separated into three types, and over 90% of prolactin presents as a double monomer (23 kDa). Rarely, it can exist in the size of big prolactin (150 kDa), which is called macroprolactin and is known as an autoantibody complex. When macroprolactin accounts for more than 60% of prolactin in the blood, it is called macroprolactinemia. The presence of such macroprolactin was first reported in a patient with hyperprolactinemia but without typical symptoms. Macroprolactinemia is emerging as an important cause of idiopathic hyperprolactinemia. The polyethylene glycol (PEG) precipitation method using the property of precipitating large-molecular-weight proteins is simple and recently has been widely used as a screening test. The results are in good agreement with the results of gel chromatography. The purpose of this study was to confirm the measurement method and reference value verification of monomeric prolactin in blood prolactin using the PEG precipitation method. **Materials and Methods:** For 40 examinees who visited the Gangnam Center of Seoul National University Hospital in 2021, the prolactin level was verified using radioimmunoassay (RIA). For macroprolactinemia PEG precipitation method, 25% PEG (molecular weight 6000kDa) solution and serum were mixed in equal amounts in a test tube, then left at room temperature for 20 minutes and centrifuged at 4°C for 30 minutes (1500g). The prolactin level was measured in the supernatant. **Results :** After confirming that more than 90% of the 40 tested samples within the reference range <25 ng/mL, the same value as the reference value for prolactin was applied. Since the concentration of monomeric prolactin in serum from which macroprolactin has been removed from blood is diluted 1:1 with PEG, our laboratory is currently reporting the result by multiplying the result by a dilution factor of 2. **Conclusion:** Radioimmunoassay using PEG precipitation method using the property of precipitating large molecular weight proteins is simple and effective for quantitative measurement of monomeric prolactin in blood prolactin.

Key words: Macroprolactin, Monomeric Prolactin, Polyethylene Glycol, Reference Values

서론 및 목적

Prolactin은 뇌하수체전엽에서 분비되는 폴리펩타이드호르몬(polypeptide hormone)으로 혈중의 prolactin은 분자량에 따라 3가지 형태로 나누어지는데, 분자량이 23 kDa인 단량체 프로락틴(monomeric prolactin)이 90%를 차지하고 있고 50 kDa의 big prolactin과 150 kDa의 macroprolactin이 있다[1]. Macroprolactin은 커다란 항원-항체 복합체(antigen-antibody complex)로써 혈액 내 순환하는 prolactin의 1% 정도를 차지하고 있으며, 혈중 prolactin 중 macroprolactin이 60% 이상을 차지할 경우 거대프로락틴혈증(macroprolactinemia)이라고 한다[2]. Macroprolactin은 큰 분자량을 가지고 있지만 생체 내에서 생물학적 활성도가 거의 없으며, 거대프로락틴혈증의 경우 특별한 임상적 증상이 없는 것으로 알려져 있다 [3]. Macroprolactin은 특발성 고프로락틴혈증의 중요한 원인으로 알려져 있는데, 고프로락틴혈증의 원인이 macroprolactin에 의한 것인지, monomeric prolactin 때문인지를 구분하기 위한 방법으로 분자량이 큰 단백질을 침전시키는

Received October 12, 2023

Revised October 31, 2023

Accepted November 02, 2023

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성질을 가지고 있는 polyethylene glycol(PEG)를 사용한 PEG 침전법이 많이 사용되고 있다[4,5] 특히, PEG 침전법은 겔크로마토그래피(gel chromatography)의 결과와도 잘 일치하는 것으로 알려져 있다[6]. 이에 본 연구는 PEG 침전법을 기존 검사법에 적용하여 시행 전 후의 prolactin 측정값의 차이를 비교하고, PEG 침전법 시행 후 monomeric prolactin의 참고치를 검증하고자 하였다.

PEG 침전법 시행 후 특발성 고프로락틴혈증 환자의 프로락틴혈증 분류를 위해 단량체성 프로락틴만 검사를 시행할수 있다. Macroprolactin 과 Big Prolactin은 PEG 침전법 시행후 침전되어 진다.

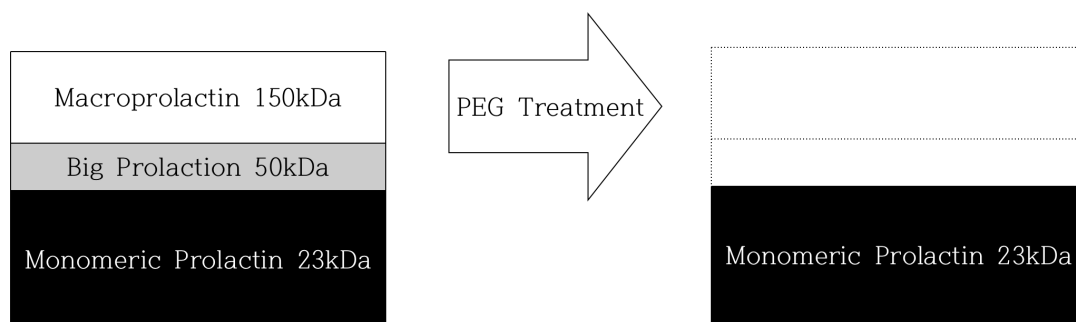


Figure 1. This is the process of PEG treatment. Monomeric prolactin after PEG precipitation for Classification of prolactinemia in patients with idiopathic hyperprolactinemia

대상 및 방법

1. 연구대상

2020년 2월 ~ 2021년 12월 서울대학교병원 핵의학과에 의뢰된 prolactin검사 중 62건(여성 57건, 남성 5건)을 분석하였다. 참고치 검증을 위한 검체는 2021년 서울대학교병원 본원에 내원한 건강검진 수검자 40명(여성 38건, 남성 2건)을 대상으로 하였다 (Table 1.). 시행한 검사 중 농도값이 150 ng/mL을 초과한 2건의 경우 측정값이 거대프로락틴혈증의 범위 내에 포함되었지만 prolactin(monomeric-PRL) 수치가 정상범위 이상으로 측정되어 본 연구에서 제외하였다(Table 1.).

Table 1. Clinical Characteristics of Study Subjects

DATA 비교(n=60)				참고치 검증(n=40)			
Age	n	Sex	n	Age	n	Sex	n
~10				~10			
10~20	4	F	55	10~20	3	F	38
20~30	14			20~30	10		
30~40	33	M	5	30~40	25	M	2
40~50	7			40~50	2		
50~	2			50~			

2. 방법

2.1 Prolactin 측정

Prolactin측정은 방사면역측정법(Radioimmunoassay, RIA)을 이용한 PROLACTIN IRMA(RIAKEY, SHINJINMEDICS, SEOUL, KOREA)로 측정하였으며, 모든 검체는 2번 이상 검사를 시행하였다.

2.2 PEG 침전법

파우더 형태의 PEG(분자량 6000 kDa; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 25% 용액(25 g/D.W 100 mL)으로 제조하였다. 테스트 튜브에 25% PEG용액과 검체인 혈청을 100 μ L 씩 동량으로 섞은 후 약 20분간 실온에 방치 후 4°C에서 30분간 1500 xg으로 원심분리한 상층액을 측정하였다. PEG 용액과 혈청을 동량으로 섞인 후 측정하였으므로 측정된 prolactin 농도값에 희석배수 2를 곱하여 최종 결과를 보고 하였다.

2.3 분석방법

동일한 환자의 검체에서 PEG를 처리한 prolactin 검사값과 PEG 처리하지 않은 prolactin 검사 결과값을 엑셀을 이용하여 t-test 실시하여 비교하였다. 참고치 검증은 40개의 검체를 대상으로 PEG 처리 후 prolactin을 측정하였으며, PEG를 처리하지 않은 기존 prolactin 검사의 참고치인 25ng/mL 이하를 기준으로 참고치 범위 내의 값이 90% 이상인지를 확인하였다.

결과

본 연구에서 시행한 prolactin 검사 60건 중 단 5건만이 PEG 처리 후 prolactin 농도값이 처리 전 prolactin보다 증가하였다. 나머지 55건은 모두 PEG처리 후 prolactin의 농도값이 감소하였고, 감소한 농도값 차의 평균은 22.7 ng/mL이었으며, 중앙값은 6.3 ng/mL이었다. 그 중 참고치인 25 ng/mL 이상이었던가 PEG처리 후 25 ng/mL 이하로 떨어진 경우는 7건이었다. PEG 처리 후 prolactin 농도값과 처리 전 prolactin 농도값 간의 t-test 단측검정으로 실시한 결과 p 값은 0.04 이었다. 참고치 검증을 위한 40건의 검체 중 PEG 처리 후 prolactin 측정한 결과 3건이 참고치 25 ng/mL이상으로 측정되어 검체의 92.5%가 참고치 구간에 포함되었다(Table 2.).

Table 2. Prolactin level of radioimmunoassay after using PEG precipitation method

prolactin reference range: < 25 ng/ml

no	prolactin level	no	prolactin level
1	7.0	21	7.2
2	7.8	22	6.2
3	73.4	23	1.2
4	7.4	24	3.2
5	19.4	25	4.0
6	8.6	26	6.8
7	9.2	27	6.0
8	6.4	28	4.8
9	12.2	29	5.6
10	6.0	30	5.2
11	59.6	31	5.6
12	3.0	32	7.0
13	18.2	33	7.8
14	5.4	34	6.6
15	4.8	35	8.2
16	5.4	36	7.6
17	5.0	37	5.6
18	15.2	38	3.6
19	34.6	39	6.6
20	3.40	40	12.8

Three of the 40 samples were out of reference value, 92.5% was included in the reference value section, the reference value was verified.

고찰 및 결론

PEG처리 후 prolactin 측정은 고 프로락틴 혈증의 원인이 macroprolactin인지 monomeric prolactin인지 구분할 수 있는 것으로 의미가 있다. PEG 침전법은 큰 분자량을 가지는 단백질을 침전시키는 성질을 이용하여 침전반응 후 상층액에서 prolactin을 RIA으로 측정하는 원리를 사용한 방법이다[6]. 최근 본원에서는 PEG처리 전 prolactin 측정과 PEG처리 후 prolactin 측정을 검사코드를 분리하여 결과 보고 하고있다. 본 연구를 통해 PEG처리 전 후의 prolactin 농도값 변화를 분석한 결과 PEG처리 후 prolactin값은 PEG처리 전 prolactin값보다 낮았다($p<0.05$). 그러나 건강한 사람이라고 생각되는 검진 수검자 40명의 검체 중 37명이 PEG처리 후 prolactin 농도값이 참고치 내 범위로 측정되어 PEG처리 전 prolactin 참고치와 동일하게 적용하게 되었다. PEG처리 전 prolactin 값이 PEG처리 후 prolactin 값보다 높은 것으로 확인되었으므로 참고치 검증만으로는 한계가 있다고 생각된다. 추후에 많은 건강한 검진 수검자 검체를 이용하여 참고치 설정이 필요할 것이라 사료된다.

REFERENCES

1. Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974;39(5):928-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-39-5-928>
2. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Macroprolactinemia presenting like a pituitary tumor. *Am J Med.* 1985;78(2):346-50. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90448-6](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(85)90448-6)
3. Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG. Some forms of big big prolactin behave as a complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(8):2342-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.80.8.7629227>
4. Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53(4):863-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-53-4-863>
5. Martin TL, Kim M, Malarkey WB. The natural history of idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(5):855-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-60-5-855>
6. Chen Y, Wang H, Yang W, Jin W, Yu W, Wang W, et al. A new method of using polyethylene glycol (PEG) precipitation of macroprolactin to detect genuine hyperprolactinemia. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6):1169-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21999>
7. Choi YJ, Kang JG, Kim SY, Hong ES, Kim SW, Shin CS, et al. The clinical characteristics of macroprolactinemia. *Endocrinol Metab.* 2005;20(3):216-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.3803/jkes.2005.20.3.216>
8. Lippi G, Plebani M. Macroprolactin: searching for a needle in a haystack? *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(4):519-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2015-1283>
9. Mok JO. Hyperprolactinemia. Letter of the Korean Endocrine Society. 2015;8(1). Retrieved from http://www.endocrinology.or.kr/webzine/201502/sub3_1.html. Accessed September 12, 2023