



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

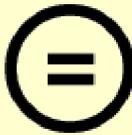
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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](#)

2023년 8월

박사학위 논문

중증 코로나19 환자의 혈액 응고  
병증 규명을 위한 분자기전 연구

조선대학교 대학원

의 과학과

이유미

# 중증 코로나19 환자의 혈액 응고 병증 규명을 위한 분자기전 연구

Study on molecular mechanism of coagulopathy in severe  
COVID-19

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 과학 과

이 유 미

# 중증 코로나19 환자의 혈액 응고 병증 규명을 위한 분자기전 연구

지도교수 김 동 민

이 논문을 이학 박사학위 신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 유 미

## 이유미의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 성 철 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 춘 미 (인)

위 원 조선대학교 교수 박 상 곤 (인)

위 원 서울대학교 교수 조 남 혁 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 동 민 (인)

2023년 6월

조선대학교 대학원

## 목 차

표 목 차 .....	ii
도 목 차 .....	iii
ABSTRACT .....	v
국문 초록 .....	vii
제1장 서론 .....	1
제2장 연구 방법 .....	4
제1절 코로나19 환자의 임상 검체 수집 .....	4
제2절 말초혈액단핵세포(PBMC) 분리 .....	4
제3절 RNA 추출 .....	5
제4절 RNA-sequencing .....	5
제5절 Data analysis .....	6
제6절 Protein level 측정 .....	6
제7절 통계 분석 .....	7
제8절 Experimental design .....	7
제3장 연구 결과 .....	9
제1절 코로나19 환자의 임상적 특성 .....	9
제2절 Differentially expressed gene analysis .....	12
제3절 Protein expression analysis .....	22
제4절 Coagulopathy pathway analysis .....	27
제5절 코로나19 중증 환자에서 생존군과 사망군 분석 .....	35
제4장 고찰 .....	40
제5장 결론 .....	46
참고문헌 .....	47

## 표 목 차

표1. Clinical data according to severity for COVID-19 from which PBMC was extracted and analyzed for this study ..... 11

## 도 목 차

㉔1. SARS-CoV-2 genome structure .....	1
㉔2. Potential clinical consequences of COVID-19-associated coagulopathy .....	2
㉔3. Experimental design .....	8
㉔4. PBMC sampling dates and clinical information in COVID-19 .....	9
㉔5. Heatmap (a), volcano plot (b), and DAVID analysis (c) according to DEGs between COVID-19 and healthy control .....	13
㉔6. Heatmap (a), volcano plot (b), and DAVID analysis (c) according to DEGs between mild COVID-19 and healthy control .....	14
㉔7. Heatmap (a), volcano plot (b), and DAVID analysis (c) according to DEGs between severe COVID-19 and healthy control .....	16
㉔8. Heatmap (a), volcano plot (b) and DAVID analysis (c) according to DEGs between mild and severe COVID-19 .....	17
㉔9. Heatmap (a) and bubble plot (b) of a significant gene between mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway .....	18
㉔10. RNA expression level of a significant gene between mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway .....	21
㉔11. Protein expression in mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway .....	24
㉔12. Protein expression in COVID-19 .....	26
㉔13. RNA and protein(*) expression between COVID-19 and healthy control in the coagulopathy pathway .....	28
㉔14. RNA and protein(*) expression between mild COVID-19 and healthy control in the coagulopathy pathway .....	30
㉔15. RNA and protein(*) expression between severe COVID-19 and healthy control in the coagulopathy pathway .....	32
㉔16. RNA and protein(*) expression between mild and severe COVID-19 in the coagulopathy pathway .....	34
㉔17. DEGs analysis and pathway analysis between survivors and non-survivors in severe COVID-19 .....	36

도18. Protein expression between survivors and non-survivors in severe  
COVID-19 ..... 39

# ABSTRACT

## Study on molecular mechanism of coagulopathy in severe COVID-19

You Mi Lee

Advisor: Prof. Dong-Min Kim

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Chosun University

**INTRODUCTION:** Coronavirus disease 2019 (COVID-19)-associated coagulopathy is a fatal complication that occurs frequently in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection and is related to the mortality of patients. However, the molecular pathogenic mechanisms that cause this clotting disorder are unknown well. Understanding the molecular mechanisms associated with coagulopathy will help alleviate COVID-19-associated coagulopathy.

**METHODS:** Transcriptome analysis was performed with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separated from the blood of patients with COVID-19, and the corresponding protein levels were confirmed by quantitative analysis. 62 cases in the COVID-19 group (30 cases on mild patients, 32 cases on severe patients), 22 cases in control group (10 cases on *Escherichia coli*-induced sepsis patients, 12 cases on healthy persons) were included in the study.

**RESULTS:** Age, pneumonia severity index (PSI) score, white blood cell (WBC), neutrophil, lymphocyte, D-dimer, aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), C-reactive protein (CRP), and troponin-I were significant in severe patients compared to mild patients. In addition, hemoglobin and platelet showed significantly lower levels in the non-survivor group compared to the survivor

group. The 1145 genes were differentially expressed between severe cases and mild cases. Coagulopathy-related genes such as platelet degranulation, blood coagulation, platelet activation, and platelet aggregation were significantly up-regulated in severe cases. It was confirmed that these genes are recapitulated at the protein levels. In addition, there was a significant increase in protein levels of tissue factors, thrombomodulin, D-dimer, and von Willebrand factor (vWF) in non-survivor group compared to survivor group. In *E. coli* sepsis group, protein C decreased compared to the healthy group and the COVID-19 group. Compared to the *E. coli* sepsis group, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and urokinase receptor (uPAR) did not increase in healthy and mild and severe COVID-19, and showed a tendency to decrease in mild group.

**CONCLUSION:** In mild group, *F9*, *F2RL2*, *SELPG*, *A2M*, and *SERPINF2* gene expression decreased, but in severe group, kallikrein-kinin system (*KLKB1*) expression decreased. In addition, platelet activation system (gene expression such as *VWF*, *F2RL3* and *TBXA2R* increased) was activated. Fibrinolysis system (gene expression such as *PLAU*, *PLAUR*) and the antifibrinolysis system (*SERPINB2*, *SERPINE2*) was also activated at the same time. In patients with COVID-19, tissue factor or vWF increased significantly compared to *E. coli* sepsis, but protein S decreased significantly, with which coagulopathy may worsen compared to *E. coli* sepsis.

## 초 록

### 중증 코로나19 환자의 혈액 응고 병증 규명을 위한 분자기전 연구

이유미

지도교수: 김동민

의과학과

조선대학교 대학원

**배경:** 코로나19 관련 응고 병증(coagulopathy)은 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 감염에서 자주 발생하는 치명적인 합병증으로 환자의 사망률과 관련이 있다. 그러나 이 응고 장애를 일으키는 병인 발병기전은 잘 알려져 있지 않다. 응고 장애와 관련된 분자 메커니즘을 이해하는 것은 코로나19 관련 응고 병증을 완화하는 데 도움이 될 것이다.

**방법:** 코로나19 환자의 혈액에서 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리한 후 RNA-sequencing 분석을 통해 유의한 발현 차이를 보이는 유전자들을 확인하였으며, 혈장에서 관련한 protein level을 측정하였다. 62건의 코로나19 검체(경증 환자군 30건, 중증 환자군 32건)와 22건의 대조군 검체(대장균에 의한 패혈증 10건, 건강인 12건)를 대상으로 하였다.

**결과:** 코로나19 중증 환자군은 경증 환자군에 비해 나이, pneumonia severity index (PSI) 점수, white blood cell (WBC), neutrophil, lymphocyte, D-dimer, aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), C-reactive protein (CRP) 및 troponin-I에서 유의한 차이를 보였다. 코로나19 사망군은 생존군에 비해 hemoglobin 과 platelet에서 유의하게 낮은 수치를 보였다. 코로나19 중증 환자군과 경증 환자군 사이에 1,145개의 차등 발현 유전자(differentially expressed gene, DEG)가 확인되었으며, 유전자의 주요 기능 확인 결과 platelet degranulation, blood coagulation, platelet

activation 및 platelet aggregation 등의 응고 병증 관련 유전자이었다. 이런 응고 병증 관련 유전자들이 protein level에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 코로나 19 중증 환자의 생존군에 비해 사망군에서 tissue factor, thrombomodulin, D-dimer, von Willebrand factor (vWF)의 protein level이 유의하게 증가하였다. 대장균 패혈증군의 경우 protein C는 건강인군과 코로나19 환자군에 비해 protein level이 감소하였다. 대장균 패혈증군에 비해 건강인군과 코로나19 경증 및 중증 환자군에서는 tissue factor pathway inhibitor (TFPI)와 urokinase receptor (uPAR) protein level이 증가하지 않았으며, 경증의 경우 오히려 감소하는 경향을 보였다.

**결론:** 코로나19 경증 환자군의 경우 *F9, F2RL2, SELPG, A2M, SERPINF2* 유전자 발현이 감소하였지만, 중증 환자군에서는 이와 더불어 *KLKB1* 발현이 감소하는 등 kallikrein-kinin system 활성이 억제되었으며, *vWF, F2RL3, TBXA2R* 등의 발현이 증가하며 platelet activation system이 활성화되었다. 중증 환자군에서는 또한 *PLAU, PLAUR* 등의 섬유소 용해계(fibrinolysis system)가 활성화되면서, *SERPINB2, SERPINE2* 유전자 발현이 증가하며 항섬유소 용해계(antifibrinolysis system)도 동시에 활성화됨이 확인되어 중증에서 응고 병증이 진행되는 기전을 확인하였다. 코로나19 환자군의 경우 대장균 패혈증군과 비교하여 tissue factor나 vWF가 유의하게 증가하나 protein S는 유의하게 감소하여, 대장균 패혈증군에 비해 더욱 더 응고 병증이 악화되는 기전을 확인하였다.

## 제1장 서론

코로나바이러스감염증-19(코로나19)는 2019년 12월 중국 우한에서 처음 발생한 이후 전 세계적으로 확산되고 있는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)로 인한 신종 호흡기 감염증이다 [1-3]. 전염성이 강한 특성과 전 세계적인 확산때문에 2020년 3월 초부터 세계보건기구 (World Health Organization, WHO)가 세계적 대유행(pandemic)을 선포했다[4]. WHO는 2020년 1월 31일 ‘국제 공중보건 비상사태(Public Health Emergency of International Concern, PHEIC)’를 선포하고 2023년 5월 5일 해제하였다[5]. 코로나19에 대한 치료제와 예방을 위한 백신이 개발되어 사용되었지만[6], 2019년 12월 첫 번째 환자가 증상을 나타낸 이후 확진자와 사망자가 계속해서 증가하여 2023년 6월 현재까지 전 세계 누적 총 7억 4천만 명 이상이 확진되었고 6천900만 명 이상이 사망하였다. 우리나라에서는 2020년1월20일 첫 환자가 보고되었고, 현재 총 3천100만 명의 확진 환자가 보고되었으며 3만 4천 명이 사망하였다[7].

SARS-CoV-2는 코로나바이러스과(coronaviridae)로, 외피에 싸여 있는 단일 가닥 (single-strand), 양극성(positive-sense) RNA 바이러스로 DNA 바이러스보다 변이가 쉽고 잦다. 코로나바이러스의 유전체는 5개 단백질에 대한 유전자를 공통으로 가지고 있으며, 바이러스 복제효소인 RNA dependent RNA polymerase (RdRp), spike (S), envelope (E), membrane (M)과 nucleocapsid (N) 단백질을 암호화하는 유전자가 5´-RdRp-S-E-M-N-3´의 순서로 배열되어 있다[8]. SARS-CoV-2는 대략 약 29-30 kb의 게놈을 가지며, 4개의 구조 단백질(S, E, M, N)과 16개의 비구조 단백질 (nsp1-16)을 암호화한다(Figure 1)[9].

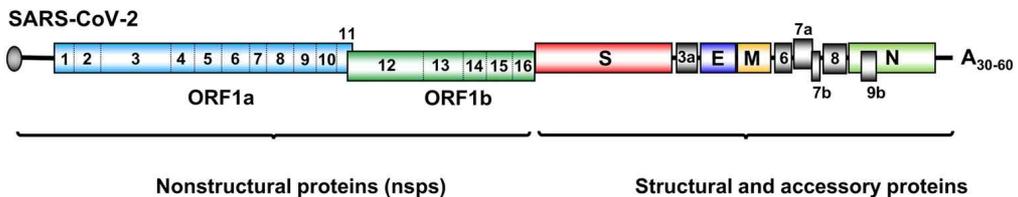


Figure 1. SARS-CoV-2 genome structure

코로나19 환자는 다양한 임상증상과 합병증을 나타낸다. 코로나19 대유행 초기 보고

에 따르면 코로나19 환자의 혈전증(thrombosis) 위험이 현저하게 증가했으며[10], 코로나19 관련 응고 병증이 SARS-CoV-2에 감염된 환자의 이환율과 사망률에 기여한다고 보고되었다[10-20]. 코로나19 관련 응고 병증은 미세혈전 및 거대혈전으로 나타나 폐, 심장, 뇌 및 신장을 포함한 여러 기관에 손상을 줄 수 있다(Figure 2)[21].

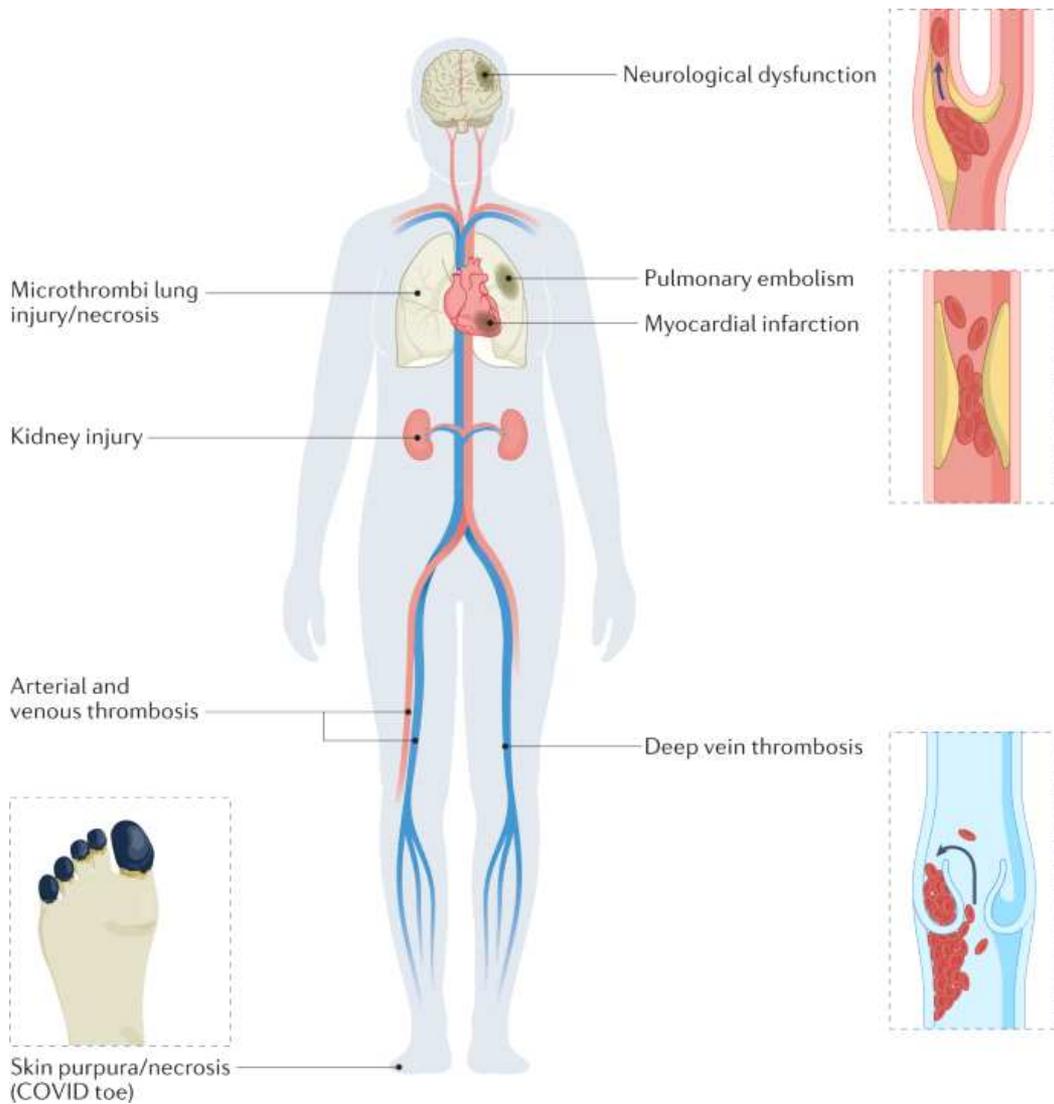


Figure 2. Potential clinical consequences of COVID-19-associated coagulopathy.

다른 일반적인 호흡기 바이러스 감염으로 인한 질병과 비교하여 코로나19 환자는 응고 이벤트의 빈도와 중증도가 더 높으며, D-dimer, C-reactive protein (CRP), P-selectin 및 fibrinogen의 혈장 수치 상승과 관련이 있다[22-24]. SARS-CoV-2에 감염된 환자의 80%는 증상이 없거나 경미할 수 있지만, 약 10%는 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)으로 발전하는 중증의 호흡기 증상을 보인다[25]. 코로나19에서 응고 장애 발생은 ARDS 합병증과 상당한 관련이 있으며, 중증 환자의 경우 응고 장애 발생률이 더 높았다[26]. 또한, 코로나19 환자의 정맥 및 동맥 혈전색전증(thromboembolism) 발생률도 응고 기능 장애와 관련이 있으며, 중증 코로나19 환자의 혈전색전증 발생률은 20%를 넘고, 특히 중환자실에 입원한 코로나19 중증 환자의 경우 30%를 넘는 매우 높은 발생률을 보였다. 일부 연구에서는 70%에 가까운 높은 비율을 보고했다[27-29].

코로나19 관련 응고 병증(coagulopathy)은 SARS-CoV-2 감염에 의한 생명을 위협하는 합병증이며, 염증, 면역, 응고, 섬유소 용해(fibrinolysis), 보체(complement) 및 kallikrein - kinin system 사이의 상호 작용과 연관이 있다고 보고되었으나[30-34], 이러한 상태를 유발하는 근본적인 세포(cellular) 및 분자(molecular) 메커니즘은 명확하지 않다. 코로나19 환자의 혈전 형성을 완화하기 위해서는 계놈, 분자 및 세포 수준에서 이 상태의 병인에 대한 이해가 필요하다.

본 연구에서는 코로나19 환자의 혈액에서 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리 후, RNA 시퀀싱 분석을 시행하여 발현 차이를 보이는 유의한 유전자를 확인하였으며, 혈장에서 관련한 protein level을 측정하였다. 또한 coagulation cascade 및 platelet activation에 대한 경로(pathway)를 동시에 분석하였다. 이처럼 응고 병증과 관련한 유의한 경로를 분석하여 응고 병증에 대한 병인을 확인하고 중증과 경증에서 RNA 발현 및 protein level에서의 차이 등을 확인함으로써 코로나19의 응고 장애 기전에 대한 체계적인 이해에 큰 도움이 될 거라 생각된다.

## 제2장 연구 방법

### 제1절 코로나19 환자의 임상 검체 수집

2020년 2월부터 2021년 1월까지 조선대학교병원에 입원한 코로나19 환자(19세 이상) 28명을 대상으로 하였으며, 코로나19 환자는 비인두 및 구인두 면봉 검체를 이용한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)을 통해 SARS-CoV-2 양성으로 확진하였다. Real-time RT-PCR은 E 유전자와 RdRP 유전자를 대상으로 하는 STANDARD™ M nCoV Real-Time Detection kit (SD biosensor, Korea)를 사용하였으며, 실험은 제조사의 프로토콜에 따라 진행되었다.

입원 후 다양한 시점에서 코로나19 환자의 혈액 검체를 수집하였으며, 코로나19 환자는 중증도와 채혈 시점에 따라 분류하였다. 중증도는 증상과 치료에 따라 경증(무증상 및 가벼운 산소치료를 받은 그룹)과 중증(고유량 산소치료(high flow nasal cannula) 및 기계적 인공호흡(mechanical ventilation)을 받거나 사망한 그룹)으로 나뉘었으며, 채혈 시점에 따라 증상이 시작된 후 22일 이내는 급성기, 그 이후는 회복기로 구분하였다.

코로나19 환자의 임상 데이터 분석을 위해 나이, 성별, pneumonia severity index (PSI) 점수 및 혈액검사 결과에 대한 정보를 수집하였다.

대조군으로 연구 기간동안 대장균에 의한 패혈증으로 확인된 환자 10건과 건강인 12건의 혈액 또한 수집 분석하였다.

본 연구는 조선대학교병원 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인 (CHOSUN 2020-04-003, 2020-06-006, 2020-02-007)을 받았으며, 헬싱키선언의 원칙에 따라 모든 환자 또는 그 법적 보호자로부터 서면으로 사전동의를 받았다.

### 제2절 말초혈액단핵세포(PBMC) 분리

코로나19 환자, 건강인, 대장균 패혈증 환자의 혈액에서 PBMC는 density gradient centrifugation method에 따라 Ficoll Paque Plus (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA)를 사용하여 분리하였다. 분리된 PBMC는 Recovery™ Cell Culture Freezing Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)에 현탁 후 사용하기 전까지 액체질소에 보관하였다. PBMC 분

리 중 채취된 혈장은 단백질을 측정하기 위해 사용하기 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 제3절 RNA 추출

PBMC에서 total RNA 추출은 TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA)를 이용하였으며, 추출 방법은 다음과 같다. 액체질소에 보관 중인 PBMC를 얼음 위에서 녹여 1.5 ml tube에 옮긴 후 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. PBS로 cell pellet을 풀어 원심분리 후 상층액을 제거하였다. TRI Reagent 1 ml 넣어 cell pellet을 조심스럽게 풀어주고 상온에서 5분 배양 후, chloroform-isomyl alcohol (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA) 250  $\mu\text{L}$  넣고, 잘 섞어주었다. 상온에서 5분 배양 후,  $4^{\circ}\text{C}$  원심분리하여 분리된 3개 층의 가장 위층의 맑은 층을 조심스럽게 채취하여 새로운 tube에 옮겼다. Isopropanol (Daejung, Siheung, Korea) 550  $\mu\text{L}$  넣고 조심스럽게 섞어 상온에서 5분 배양 후,  $4^{\circ}\text{C}$  원심분리하여 상층액을 제거하였다. Pellet에 75% ethanol 1 ml 넣고, 조심스럽게 섞어  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리 후 상층액을 완전히 제거하였다. Pellet을 건조한 후 nuclease free water (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) 30  $\mu\text{L}$ 로 용출하였다.

추출한 RNA quality는 RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)을 이용하여 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)로 확인하였으며, RNA 정량은 ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)로 측정하였다.

### 제4절 RNA-sequencing

유전자 발현 정도를 확인하기 위해 QuantSeq 3' mRNA sequencing을 진행하였으며, RNA-seq 전문기업인 e-biogen (Seoul, Korea)에서 수행하였다. QuantSeq 3' mRNA sequencing 분석은 Poly(A)가 존재하는 생물종을 대상으로 RNA를 분리해 3' UTR 부분을 짧게 시퀀싱을 수행하고 유전자 발현을 분석하는 방법으로, 앞서 설명한 절차[35]에 따라 수행되었다.

RNA의 library 구축은 QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Inc., Greenland, New Hampshire, USA)를 이용하였으며, 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 우선 500 ng total RNA와 oligo-dT primers를 사용하여 first-strand

complementary DNA (cDNA)를 합성하였으며, second-strand cDNA 합성은 random primers를 이용하여 진행하였다. 합성된 double-stranded cDNA library는 magnetic beads를 사용하여 모든 반응 성분을 제거하고 정제하였다. Library PCR 증폭은 cluster generation에 필요한 complete adapter sequences를 추가하여 진행한 후 정제하였다. Sequencing은 NextSeq 550 (Illumina, Inc., San Diego, California, USA) 장비를 이용하여 single end 75 bp를 읽어내고, 약 10 M read의 데이터를 생산하였다.

## 제5절 Data analysis

QuantSeq 3' mRNA-Seq read를 Q20의 기준으로 read를 trimming (BBduk)하고 Bowtie2를 이용하여 reference genome에 mapping 하였으며[36], RC (Read Count)는 Bedtools를 이용하여 계산하였다[37]. RC data는 Bioconductor를 사용하여 EdgeR을 이용하여 quantile normalization method로 normalization 하였다[38].

Differentially expressed gene (DEG)과 gene ontology (GO)는 이바이오젠 (E BIOGEN Inc.)에서 제공하는 ExDEGA (Excel-based Differentially Expressed Gene Analysis, v.3.0.1) software를 사용하여 수행하였으며, data mining과 그래픽 시각화에도 사용하였다. 유전자 분류는 database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 을 기반으로 하였으며, 선택된 유전자의 heatmap은 MeV (Multi Experiment Viewer, version 4.9.0)을 사용하여 작성하였다. 선택된 유전자들이 어떤 pathway에 속하는지 확인하기 위해 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) 을 이용하였다.

## 제6절 Protein level 측정

혈장에서 protein level을 측정하기 위해 Luminex Assay (LABISKOMA, Seoul, Korea)를 이용하였으며 측정된 단백질 종류는 다음과 같다. P-selectin (CD62P), coagulation factor III (tissue factor), coagulation factor XIV (protein C), D-dimer, platelet factor 4 (PF4, CXCL4), protein S (PROS1), serpin C1 (antithrombin-III), serpin E1 (PAI-1), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), thrombomodulin, Urokinase receptor (uPAR), u-plasminogen activator (uPA, urokinase), vWF-A2,  $\alpha$ -2-macroglobulin의 14가지의 protein level을 측정하였다. Human Premixed Multi-Analyte Kit (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA)를 사용하였으며,

실험 방법은 다음과 같다. Standard 및 sample 50  $\mu\text{L}$ 를 넣고 희석한 microparticle cocktail 50  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 추가하였다. 상온에서 2시간 배양 후, 각 well의 액체를 제거하였다. 100  $\mu\text{L}$  wash buffer를 넣은 후 다시 액체를 제거하여 세척하였다. 이 스텝을 3번 반복했다. Biotin-antibody cocktail 50  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 넣은 후, 뚜껑을 덮고 shaker를 이용하여 상온에서 800 rpm으로 1시간 동안 배양하였다. Wash buffer 이용하여 세척을 3번 진행하였다. Streptavidin-PE 50  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 넣은 후, shaker를 이용하여 상온에서 800 rpm으로 30분 동안 배양하였다. Wash buffer 이용하여 세척을 3번 진행하였다. Wash buffer 100  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 넣은 후, shaker를 이용하여 상온에서 800 rpm으로 2분 동안 배양하였다. 반응 완료 후 Luminex 기기(Luminex, Austin, Texas, USA)로 측정하였다.

## 제7절 통계 분석

통계 분석은 SPSS version 26 (IBM Corp., Armonk, New York, USA)과 prism version 8.0.1 (GraphPad software, San Diego, California, USA) 프로그램을 이용하였으며, one-way ANOVA와 Mann Whitney U-test를 시행하여  $P$ 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

## 제8절 Experimental design

실험의 개략적인 흐름은 다음과 같다. 건강인, 대장균 패혈증, 코로나19 환자의 전혈에서 PBMC를 분리한 후, RNA를 추출하여 RNA 시퀀싱을 진행하였다. RNA 시퀀싱 결과 데이터를 이용하여 DEGs 확인, 유전자의 주요 기능 분석 등을 통해 유의미한 유전자를 확인하였으며, 이 유전자들의 protein level을 측정하기 위해 multiplex assay를 이용하여 정량하였다(Figure 3).

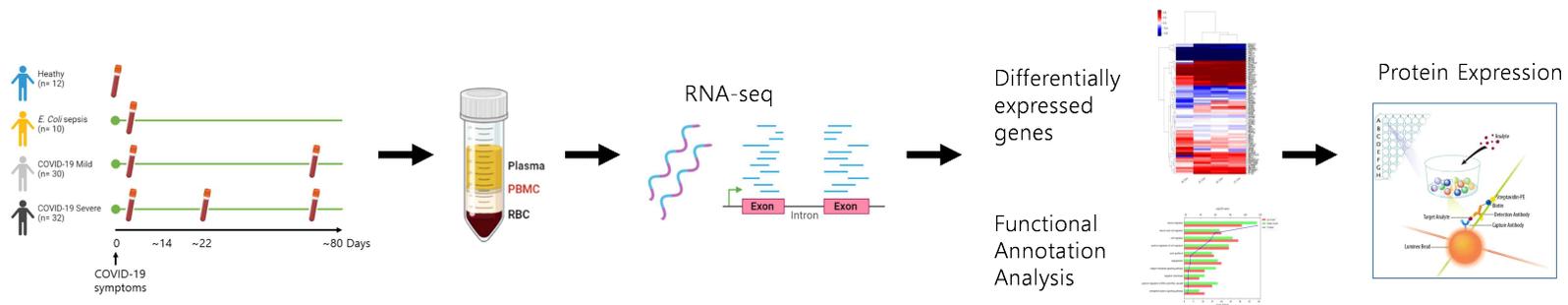


Figure 3. Experimental design. Separate PBMC using the blood of the experimental group. Analyze the data after RNA sequencing. Confirm protein expression of significant genes.

## 제3장 연구 결과

### 제1절 코로나19 환자의 임상적 특성

본 실험을 위해 모집된 코로나19 환자의 PBMC는 28명의 환자로부터 62건이 수집되었다. 코로나19 경증 환자 14명으로부터 30건, 코로나19 중증 환자 14명으로부터 32건의 검체가 수집되었다. 사망환자는 9명이었으며 23건의 검체가 수집되었다(Figure 4).

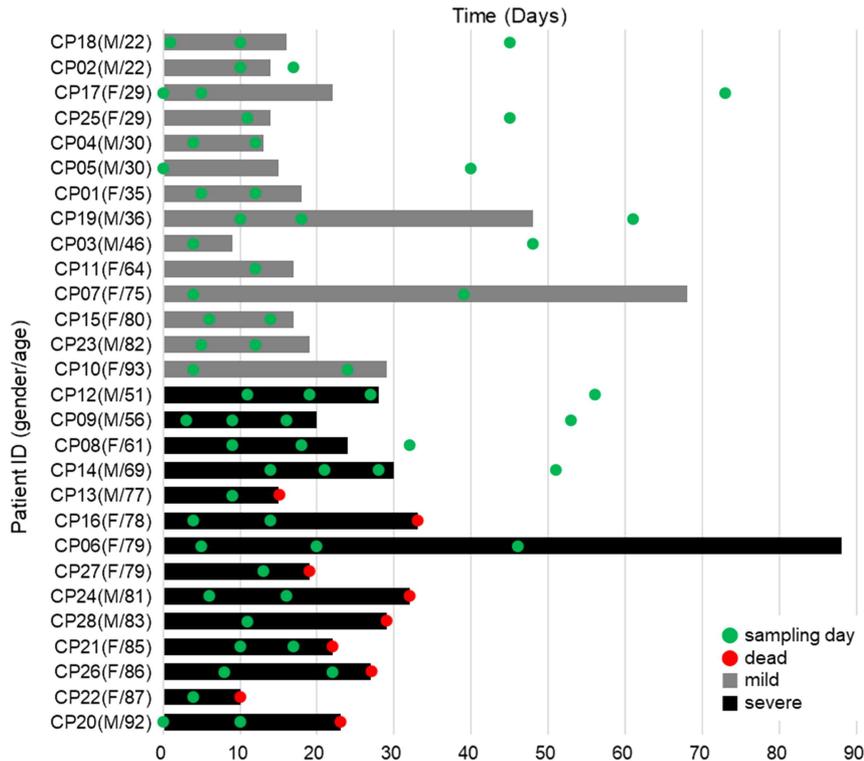


Figure 4. PBMC sampling dates and clinical information in COVID-19. The timeline is the date of discharge after symptom onset. gray bar, mild patients; black bar, severe patients; bar length, hospitalization period after symptoms occur

코로나19 경증 환자군과 중증 환자군의 평균 나이는 각각 35.5세, 79세로 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 ( $P = 0.005$ ), 또한 생존군과 사망군의 평균 나이가 각각 51세와 83세로 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $P < 0.001$ ) (Table 1).

코로나19 중증 환자군은 경증 환자군에 비해 PSI score ( $P = 0.004$ ), white blood cell count (WBC,  $P = 0.001$ ), neutrophil count ( $P < 0.001$ ), D-dimer ( $P < 0.001$ ), aspartate aminotransferase (AST,  $P = 0.001$ ), blood urea nitrogen (BUN,  $P = 0.049$ ), CRP ( $P < 0.001$ ), troponin-I ( $P = 0.013$ ) 수치가 유의하게 증가하였다. Lymphocyte counts는 경증에 비해 중증에서 9.4% ( $0.72 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ,  $P < 0.001$ )로 상당히 감소하였다.

코로나19 사망군의 경우, 중증 환자군과 마찬가지로 PSI score ( $P < 0.001$ ), neutrophil count ( $P = 0.012$ ), D-dimer ( $P < 0.001$ ), AST ( $P = 0.018$ ), BUN ( $P < 0.001$ ), CRP ( $P = 0.001$ ), troponin-I ( $P = 0.001$ )가 코로나19 생존군에 비해 유의하게 증가하였으며, lymphocyte counts ( $P = 0.001$ )는 감소하였다. 추가로 hemoglobin ( $P = 0.001$ )과 platelet ( $P = 0.008$ )는 생존군에 비해 사망군에서 통계적으로 유의하게 낮은 수치를 보였다( $P = 0.001, 0.008$ ) (Table 1).

Table 1. Clinical data according to severity for COVID-19 from which PBMC was extracted and analyzed for this study.

	Normal values	Mild (N=24)	Severe (N=27)	P value	Survivor (N=32)	Non-survivor (N=14)	P value
Age, years		35.5(29.25-72.25, n=14)	79(71-84.5, n=14)	0.005	51(30-72, n=19)	83(79-86, n=9)	<0.001
Sex, Male/Female		7/7(50%/50%, n=14)	6/8(42.85%/57.15%, n=14)	0.769	10/9(52.6%/47.4%, n=19)	3/6(33.3%/66.7%, n=9)	0.438
PSI score		54(30-85, n=21)	79(56-111, n=27)	0.004	54(30-75, n=29)	111(89.25-112.75, n=14)	<0.001
WBC( $10^3/\mu\text{L}$ )	4-10	5.65(4.11-5.88, n=21)	7.98(6.48-11.29, n=27)	0.001	5.87(4.5-7.23, n=29)	8.36(6.42-12.12, n=14)	0.066
Hemoglobin(g/dL)	Male: 14-18 Female: 12-16	12.4(11.2-14.7, n=21)	11.3(9.8-13.1, n=27)	0.081	13.1(11.6-14.5, n=29)	10.25(9.28-11.2, n=14)	0.001
Neutrophil(%)	40-70	57(50.4-61.6, n=21)	86.1(74.6-91.1, n=27)	<0.001	61.6(50.8-78.8, n=29)	87.85(85.58-93.75, n=14)	<0.001
Lymphocyte(%)	35-41	31.1(26.6-38.2, n=21)	9.4(5.7-16.35, n=27)	<0.001	26.6(13.7-37.6, n=29)	6.85(5.33-10.15, n=14)	<0.001
Neutrophil count( $10^3/\mu\text{L}$ )	2-7	2.57(2.32-3.62, n=21)	7.12(4.48-9.89, n=27)	<0.001	3.54(2.44-6.28, n=29)	7.28(5.64-11.18, n=14)	0.012
Lymphocyte count( $10^3/\mu\text{L}$ )	1.8-2	1.62(1.1-2.25, n=21)	0.72(0.5-1.09, n=27)	<0.001	1.48(0.92-1.84, n=29)	0.61(0.44-0.79, n=14)	<0.001
Fibrinogen(mg/dL)	170-400	326(320.5-327.5, n=4)	346(274-436, n=17)	0.574	326(311.5-375.75, n=6)	328.5(260-403, n=12)	0.616
Platelet( $10^3/\mu\text{L}$ )	150-400	212(187-231, n=21)	193(145.5-359, n=27)	0.975	226(187-295, n=29)	151.5(111.75-189.75, n=14)	0.008
D-dimer(ug/mL)	<0.5	1.42(0.55-2.38, n=15)	3.28(2.35-3.99, n=26)	<0.001	1.6(0.64-3, n=23)	3.52(3.23-6.08, n=14)	<0.001
Ferritin(ng/mL)	Male: 300 Female: 200	2000(2000-2000, n=2)	621(493.25-769.5, n=4)	0.133	2000(2000-2000, n=2)	621(493.25-769.5, n=4)	0.133
AST(IU/L)	Male: 8-40 Female: 6-34	18.3(16.2-25.68, n=20)	39.15(26.9-48.18, n=26)	0.001	25(18.08-36.85, n=28)	42.3(27.5-49.3, n=13)	0.018
ALT(IU/L)	Male: 29-33 Female: 19-25	15.9(8.9-27.8, n=21)	23.85(16.83-39.93, n=26)	0.076	23.9(15.7-40.1, n=29)	18.4(13.1-24.4, n=13)	0.332
BUN(mg/dL)	6-23	13.3(10.1-17, n=19)	20.05(11.68-36.18, n=26)	0.049	13(9.1-16.35, n=27)	36.4(26.1-40.5, n=13)	<0.001
Creatine(mg/dL)	0.50-1.4	0.71(0.6-0.8, n=20)	0.77(0.62-0.92, n=26)	0.451	0.68(0.58-0.81, n=28)	0.79(0.63-0.96, n=13)	0.135
CK-MB(ng/mL)	Male : 0.00-4.87 Female : 0.00-3.61	1.17(0.79-1.65, n=6)	1.58(1.08-2.34, n=17)	0.516	1.13(0.83-1.41, n=9)	2.02(1.1-2.95, n=12)	0.095
CRP(mg/dL)	0.00-0.49	0.28(0.03-1.33, n=17)	7.2(1.59-18.1, n=26)	<0.001	1.34(0.11-4.2, n=24)	9.35(4.29-21.49, n=14)	0.001
PT(sec)	11.4-15.4	12.1(11.1-12.7, n=11)	12.25(11.43-13.88, n=22)	0.462	12.1(11.1-12.95, n=15)	12.8(11.5-14.7, n=13)	0.156
APTT(sec)	33-45	29(26.5-30.65, n=11)	30(26.68-35.08, n=22)	0.418	30.2(27-33.2, n=15)	29.4(26.1-35.7, n=13)	0.964
INR	0.80-1.30	1.09(1-1.13, n=11)	1.1(1.03-1.25, n=22)	0.396	1.09(1-1.14, n=15)	1.15(1.03-1.32, n=13)	0.13
Troponin-I(ng/mL)	0.04	0.01(0.01-0.01, n=4)	0.06(0.03-0.19, n=12)	0.013	0.01(0.01-0.02, n=5)	0.07(0.04-0.2, n=10)	0.001

PSI, pneumonia severity index; WBC, white blood cell count; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; CK-MB, creatine kinase myocardial band; CRP, C-reactive protein; PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; INR, international normalized ratio

## 제2절 Differentially expressed gene analysis

유전자 발현 분석은 건강인군(NC), 코로나19군(COVID-19), 코로나19 경증 환자군(COVID-19 mild), 코로나19 중증 환자군(COVID-19 severe), 대장균 패혈증군(*E. coli* sepsis)으로 나누어 실시하였으며, 회복 후 검체는 분석에서 제외하였다. DEG는 fold change (FC) 2.0 이상, normalized data (log2) 1.0 이상, *P*-value 0.05 이하로 정의하였다.

건강인군 대비 코로나19군의 경우 1,401개의 DEGs가 확인되었으며 발현이 증가한 유전자는 381개, 발현이 감소한 유전자는 1,020개였다(Figure 5a). 발현이 증가하거나 감소한 유전자들의 주요 기능(functional annotation) 분석 결과, inflammatory response, signal transduction 등과 관련된 유전자였다(Figure 5c). 유의한 발현 차이를 보이는 응고 병증 관련 유전자는 coagulation cascade와 관련된 coagulation factor IX (*F9*), alpha-2-macroglobulin (*A2M*)과 platelet activation과 관련된 coagulation factor II thrombin receptor like 2 (*F2RL2*), thromboxane A2 receptor (*TBXA2R*)이었다. *TBXA2R* 유전자는 발현이 증가하였으며 나머지 3개 유전자는 발현이 감소하였다(Figure 5b).

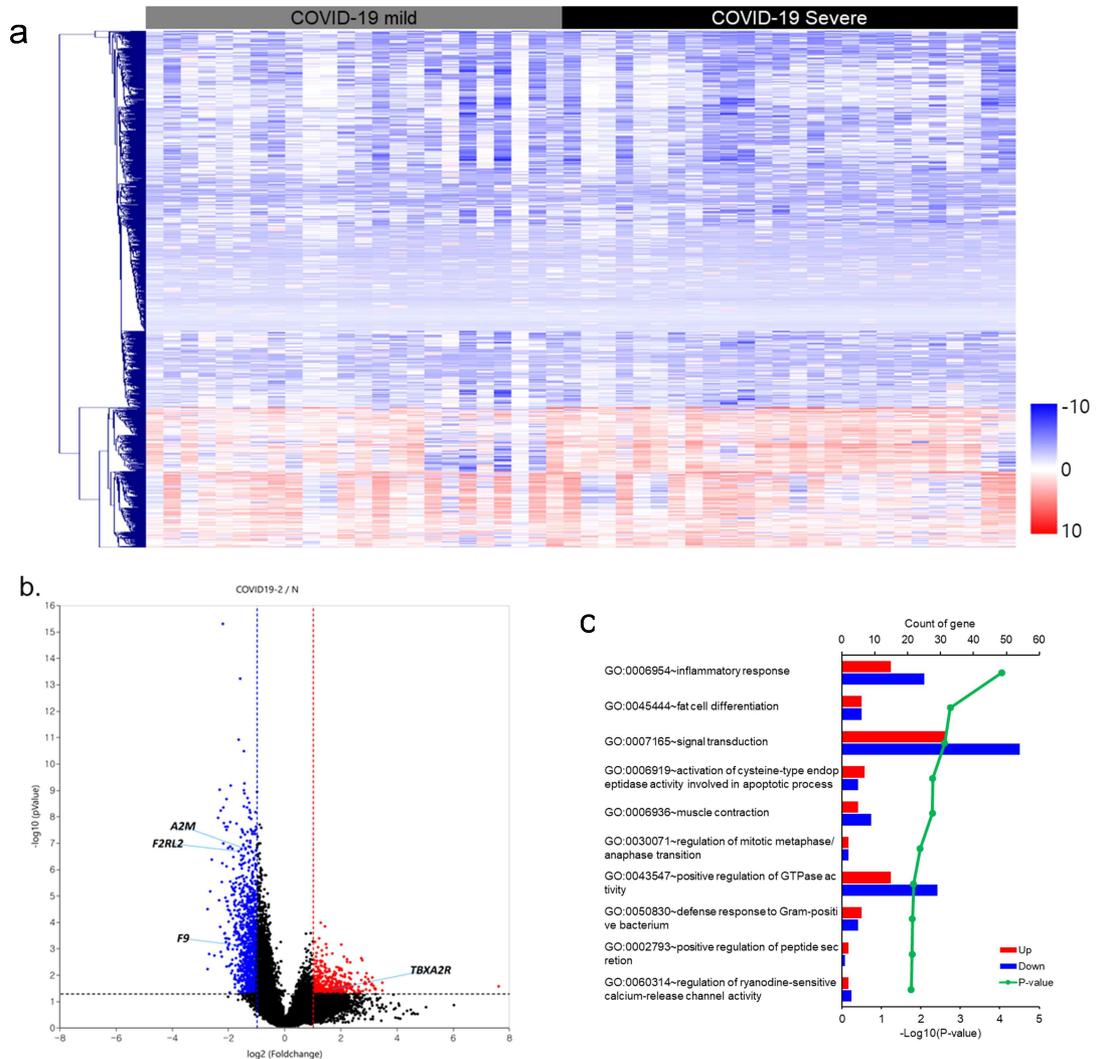


Figure 5. Heatmap (a), volcano plot (b), and DAVID analysis (c) according to DEGs between COVID-19 and healthy control. (Fold change  $\geq 2.0$ , Normalized data(log2)  $\geq 1.0$ ,  $P$ -value  $\leq 0.05$ )

건강인군 대비 코로나19 경증 환자군에서 발현이 증가한 유전자는 517개, 발현이 감소한 유전자는 748개로 총 1,265개 DEGs가 확인되었다(Figure 6a). 유의한 발현 차이를 보이는 유전자들의 주요 기능 분석 결과, neurotransmitter uptake, negative regulation of endothelial cell migration 등과 관련된 유전자였다(Figure 6c). 응고 병증 유전자 중 *F9*, serpin family F member 2 (*SERPINF2*), *A2M*, *F2RL2*가 차등 발

현되었으며 모두 발현이 감소하였다(Figure 6b).

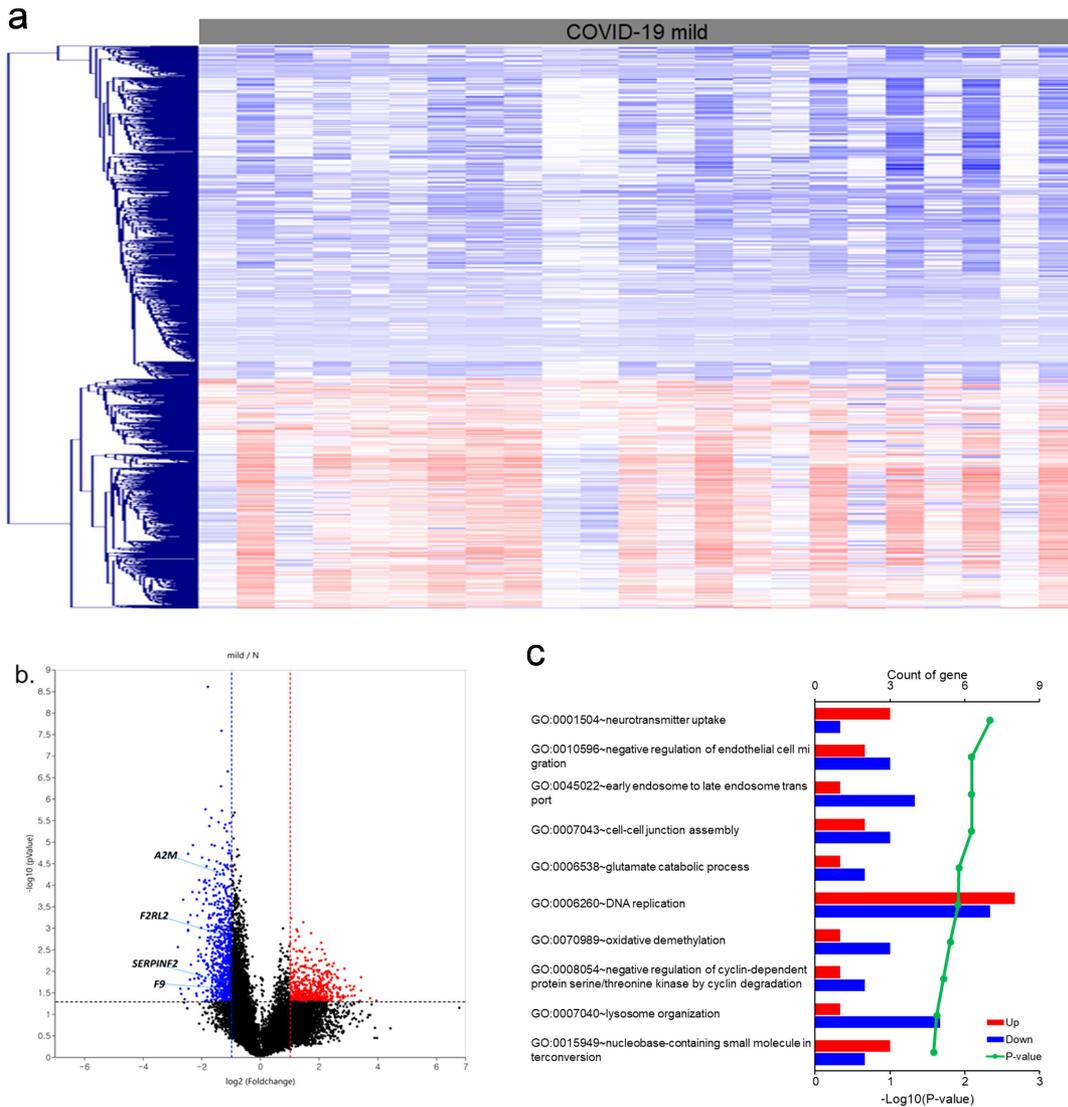


Figure 6. Heatmap (a), volcano plot (b) and DAVID analysis (c) according to DEGs between mild COVID-19 and healthy control. (Fold change  $\geq$  2.0, Normalized data(log2)  $\geq$  1.0,  $P$ -value  $\leq$  0.05)

건강인군 대비 코로나19 중증 환자군의 경우 발현이 증가한 유전자는 725개, 발현이 감소한 유전자는 1,548개로 총 2,273개 DEGs가 확인되었다(Figure 7a). 유의한 발현

차이를 보이는 유전자들의 주요 기능 분석 결과, platelet degranulation, inflammatory response 등과 관련된 유전자였다(Figure 7c). 응고 병증 유전자 중 coagulation factor V (*F5*), tissue factor pathway inhibitor (*TFPI*), coagulation factor XIII A chain (*F13A1*), thrombomodulin (*THBD*), purinergic receptor P2X 1 (*P2RX1*), glycoprotein VI platelet (*GP6*), integrin subunit beta 3 (*ITGB3*), glycoprotein Ib platelet alpha subunit (*GP1BA*), glycoprotein Ib platelet beta subunit (*GP1BB*), glycoprotein IX platelet (*GP9*), integrin subunit alpha 2b (*ITGA2B*), platelet factor 4 (*PF4*), TBXA2R, selectin P (*SELP*), plasminogen activator, urokinase (*PLAU*), plasminogen activator, urokinase receptor (*PLAUR*)의 16개 유전자는 발현이 증가하였으며, *F9*, *A2M*, Kallikrein B1 (*KLKB1*), *F2RL2*의 4개 유전자는 발현이 감소하였다(Figure 7b).

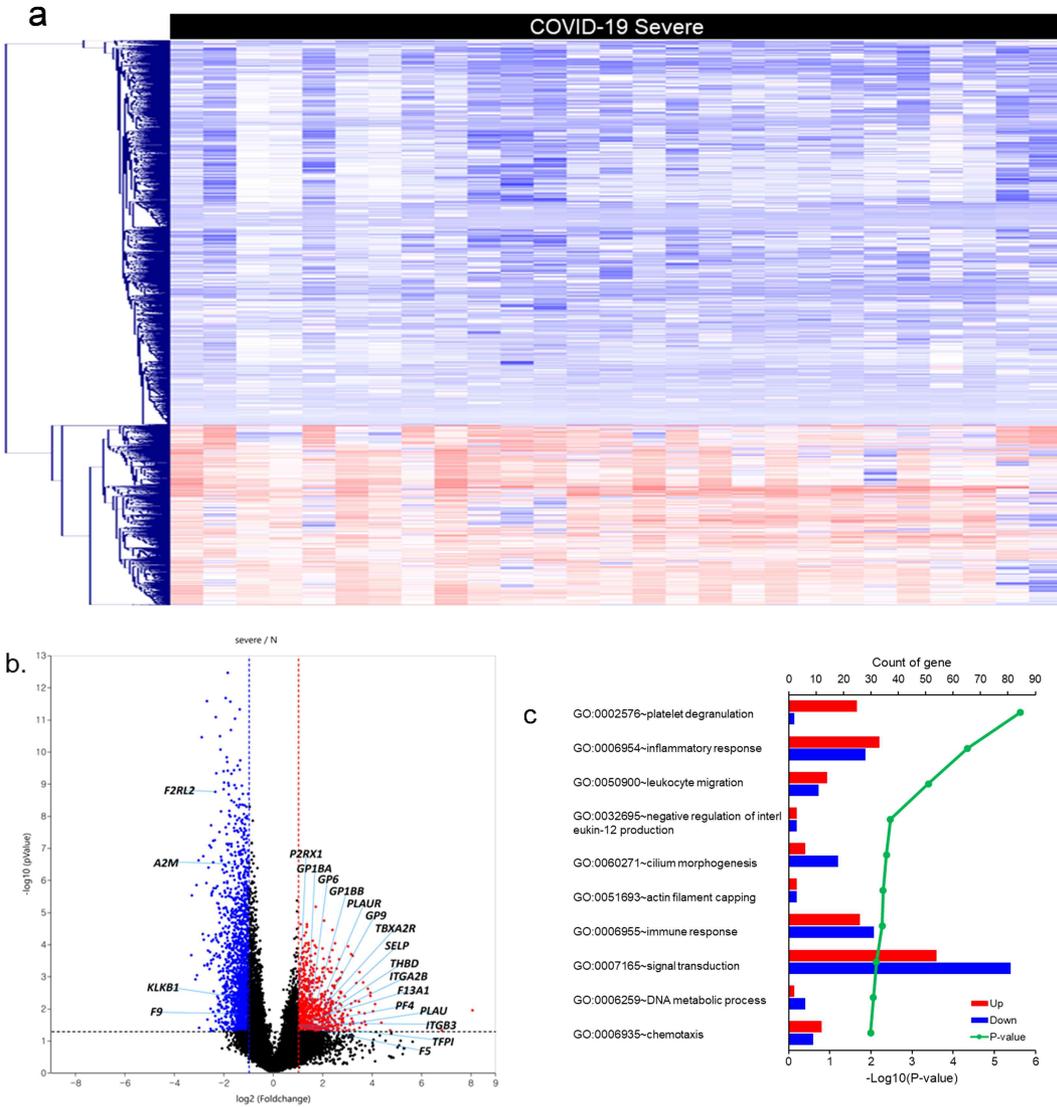


Figure 7. Heatmap (a), volcano plot (b) and DAVID analysis (c) according to DEGs between severe COVID-19 and healthy control. (Fold change  $\geq 2.0$ , Normalized data(log2)  $\geq 1.0$ ,  $P$ -value  $\leq 0.05$ )

코로나19 경증 환자군 대비 중증 환자군에서 발현이 증가한 유전자는 542개, 발현이 감소한 유전자는 603개로 총 1,145개 DEGs가 확인되었다(Figure 8a). 유의한 발현 차이를 보이는 유전자들의 주요 기능 분석 결과, platelet degranulation, blood coagulation, platelet activation, platelet aggregation과 같은 응고 병증 관련 유전자로

확인되었다(Figure 8c).

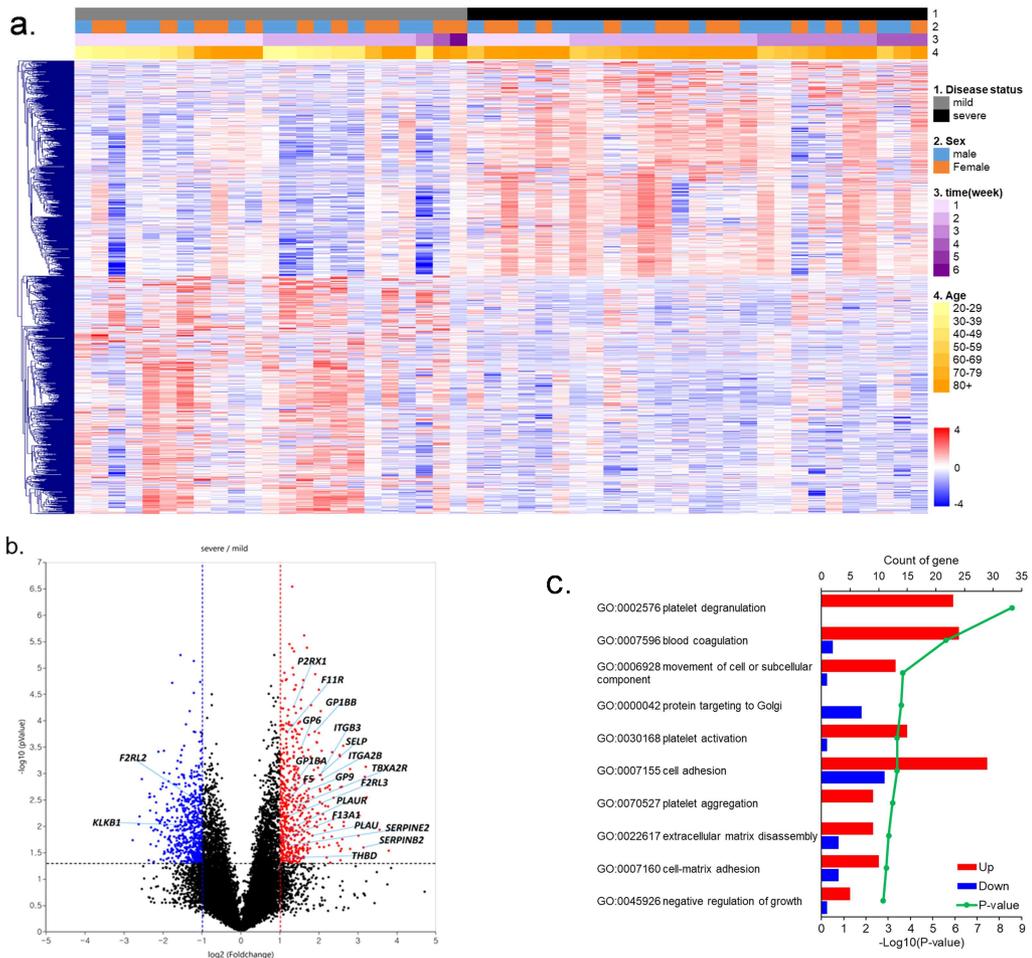


Figure 8. Heatmap (a), volcano plot (b) and DAVID analysis (c) according to DEGs between mild and severe COVID-19. (Fold change  $\geq 2.0$ , Normalized data(log<sub>2</sub>)  $\geq 1.0$ ,  $P$ -value  $\leq 0.05$ )

응고 병증 관련 pathway의 62개 유전자 중 20개 유전자가 유의하게 발현하였다. 발현이 증가한 유전자는 *F5*, F11 receptor (*F11R*), serpin family B member 2 (*SERPINB2*), serpin family E member 2 (*SERPINE2*), *F13A1*, *THBD*, *P2RX1*, F2R like thrombin /trypsin receptor 3 (*F2RL3*), *GP1BA*, *GP6*, *ITGB3*, *GP1BB*, *GP9*, *ITGA2B*, *TBXA2R*, *SELP*, *PLAU*, *PLAU*이었으며, 발현이 감소한 유전자는

*F2RL2*, *KLKB1*이었다(Figure 9).

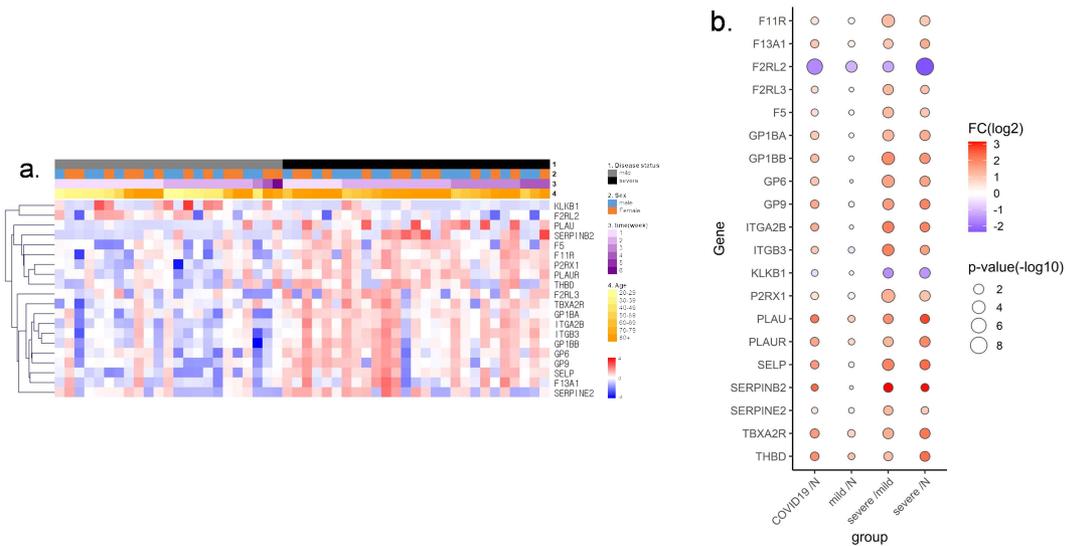
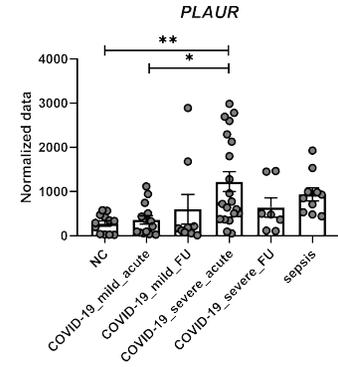
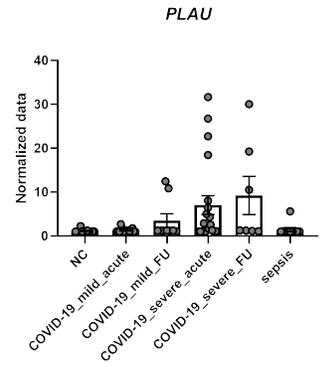
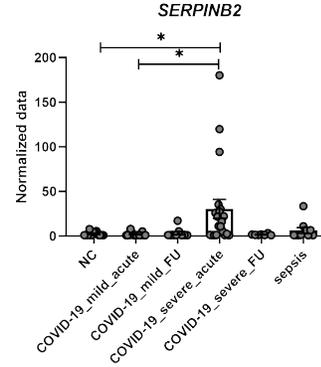
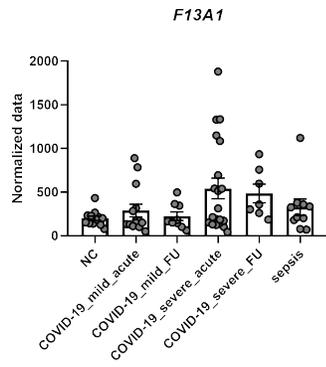
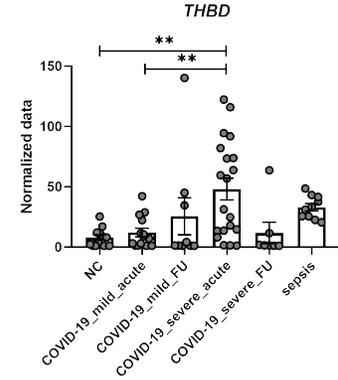
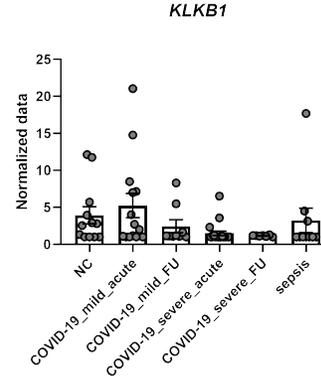
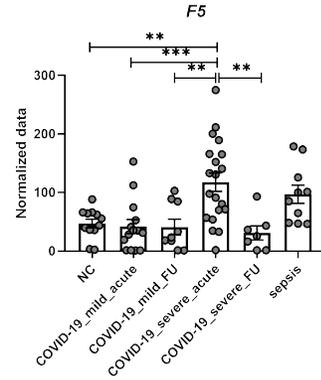
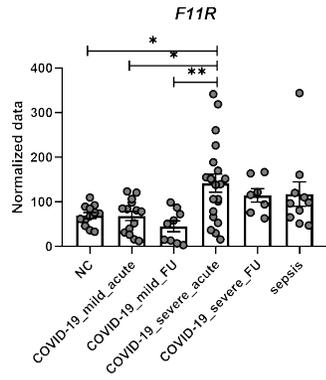
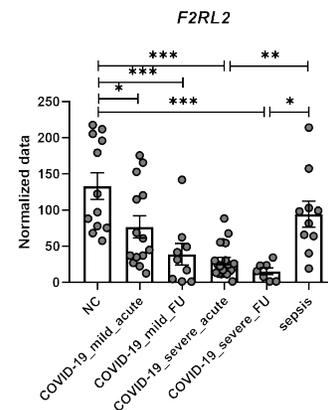
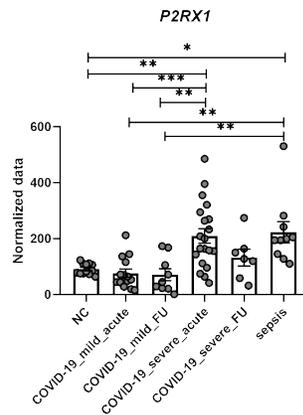
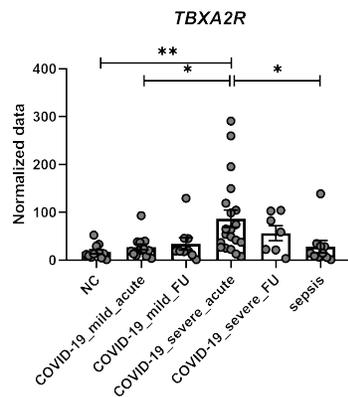
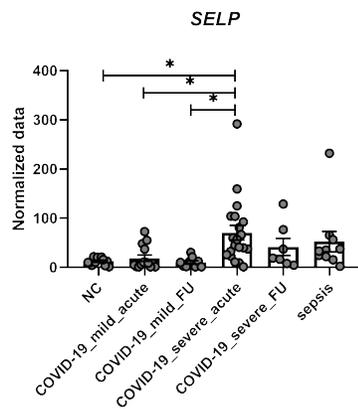
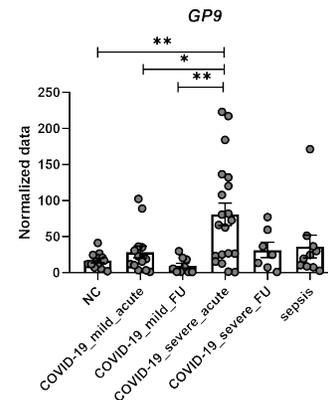
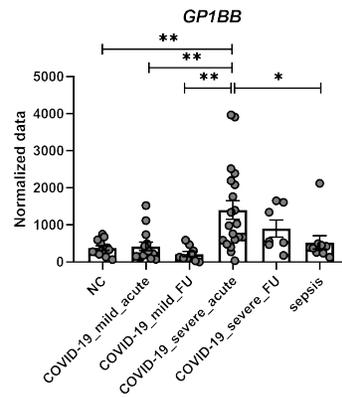
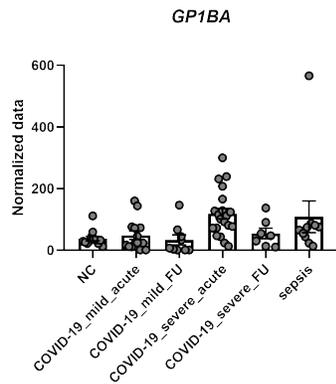
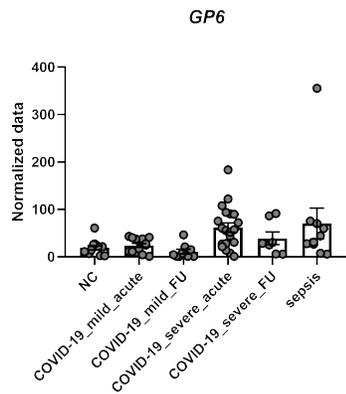


Figure 9. Heatmap (a) and bubble plot (b) of a significant gene between mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway. (Fold change  $\geq 2.0$ , Normalized data(log2)  $\geq 1.0$ ,  $P$ -value  $\leq 0.05$ )

코로나19 경증 환자군 대비 중증 환자군에서 유의한 발현 차이를 보이는 응고 병증 관련 20개 유전자의 RNA level을 확인하였다. 건강인군(NC), 코로나19 경증 환자 급성기군(COVID-19 mild acute), 코로나19 경증 환자 회복기군(COVID-19 mild FU), 코로나19 중증 환자 급성기군(COVID-19 severe acute), 코로나19 중증 환자 회복기군(COVID-19 severe FU), 대장균 폐혈증군(sepsis)으로 그룹을 구분하였다. 코로나19 중증 환자 급성기군과 경증 환자 급성기군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 유전자는 *F11R*, *F5*, *THBD*, *SERPINE2*, *PLAUR*, *GP1BB*, *GP9*, *SELP*, *TBXA2R*, *P2RX1*, *ITGA2B*였으며, 코로나19 중증 환자 급성기군과 대장균 폐혈증군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 유전자는 *GP1BB*, *TBXA2R*, *F2RL2*, *F2RL3*이었다(Figure 10).





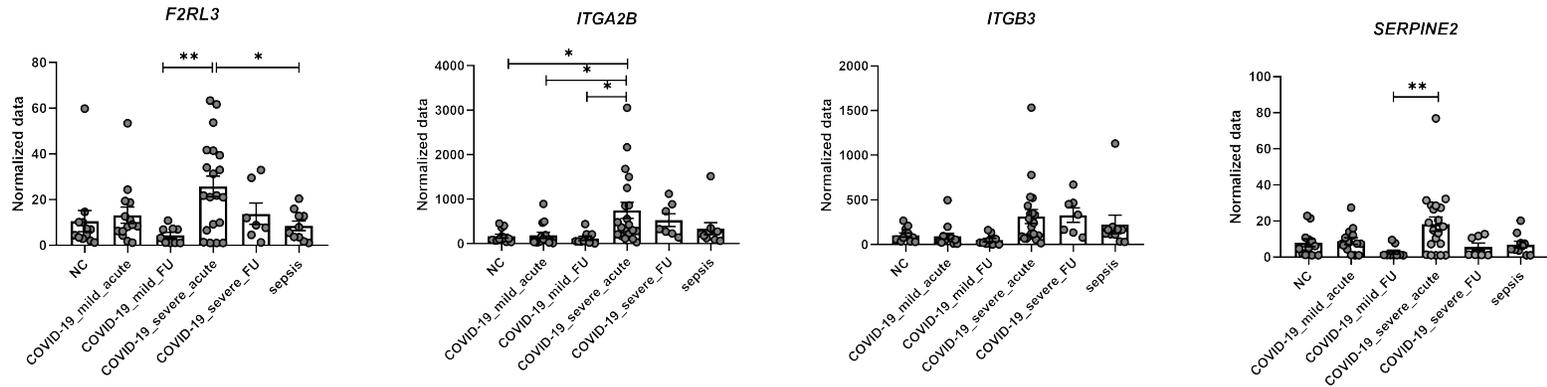


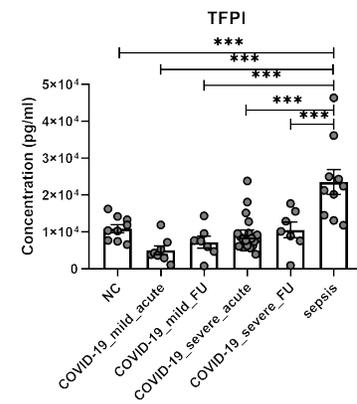
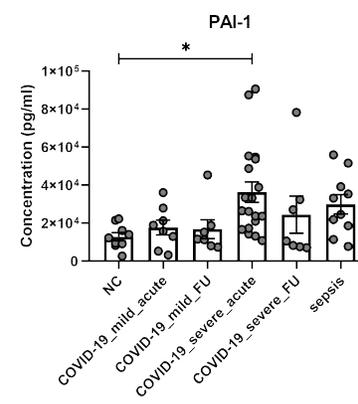
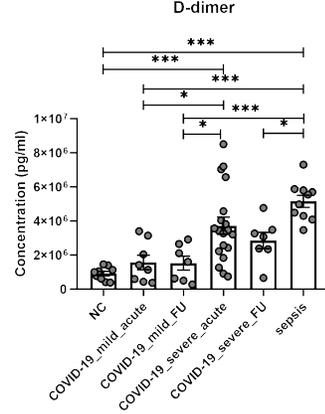
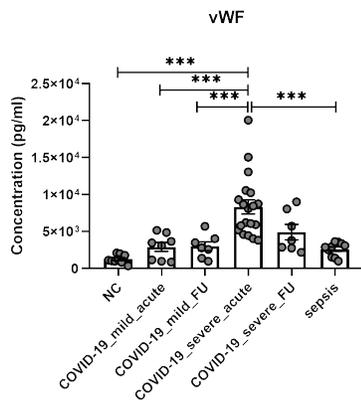
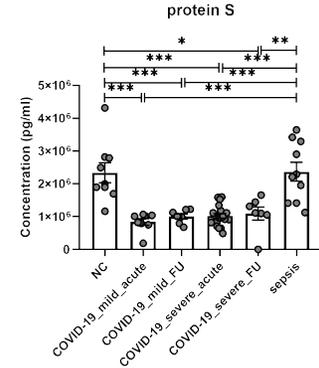
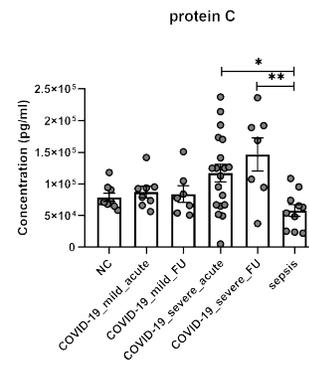
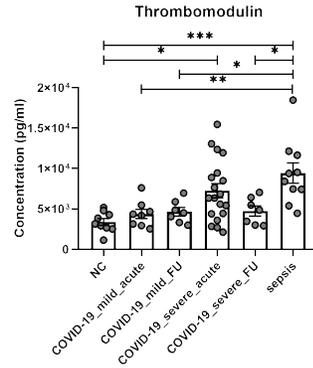
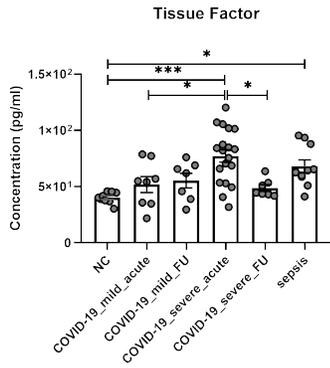
Figure 10. RNA expression level of a significant gene between mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway. ( $P$ -value: \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001)

F11R, F11 receptor; F13A1, coagulation factor XIII A chain; F2RL2, coagulation factor II thrombin receptor like 2; F2RL3, F2R like thrombin /trypsin receptor 3; F5, coagulation factor V; GP1BA, glycoprotein Ib platelet alpha subunit; GP1BB, glycoprotein Ib platelet beta subunit; GP6, glycoprotein VI platelet; GP9, glycoprotein IX platelet; ITGA2B, integrin subunit alpha 2b; ITGB3, integrin subunit beta 3; KLKB1, kallikrein B1; P2RX1, purinergic receptor P2X 1; PLAU, plasminogen activator, urokinase; PLAUR, plasminogen activator, urokinase receptor; SELP, selectin P; SERPINB2, serpin family B member 2; TBXA2R, thromboxane A2 receptor; THBD, thrombomodulin

### 제3절 Protein expression analysis

RNA-sequencing 분석 결과, 코로나19 중증 환자군의 경우 경증 환자군에 비해 응고 병증 관련 유전자가 유의하게 발현 차이를 보이는 것을 확인하였다. 이에 모집된 검체의 혈장을 이용하여 응고 병증과 관련된 14종의 protein level을 측정하였다.

건강인군(NC), 코로나19 경증 환자 급성기군(COVID-19 mild acute), 코로나19 경증 환자 회복기군(COVID-19 mild FU), 코로나19 중증 환자 급성기군(COVID-19 severe acute), 코로나19 중증 환자 회복기군(COVID-19 severe FU), 대장균 패혈증군(sepsis)으로 그룹을 구분하였다. 코로나19 중증 환자 급성기군과 건강인군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 tissue factor, thrombomodulin, protein S, von Willebrand factor (vWF), D-dimer, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)이었으며, 코로나19 중증 환자 급성기군과 경증 환자 급성기군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 tissue factor, vWF, D-dimer였다. 코로나19 중증 환자 급성기군과 대장균 패혈증군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 protein C, protein S, vWF, TFPI, Urokinase receptor (uPAR)로 확인되었다(Figure 11).



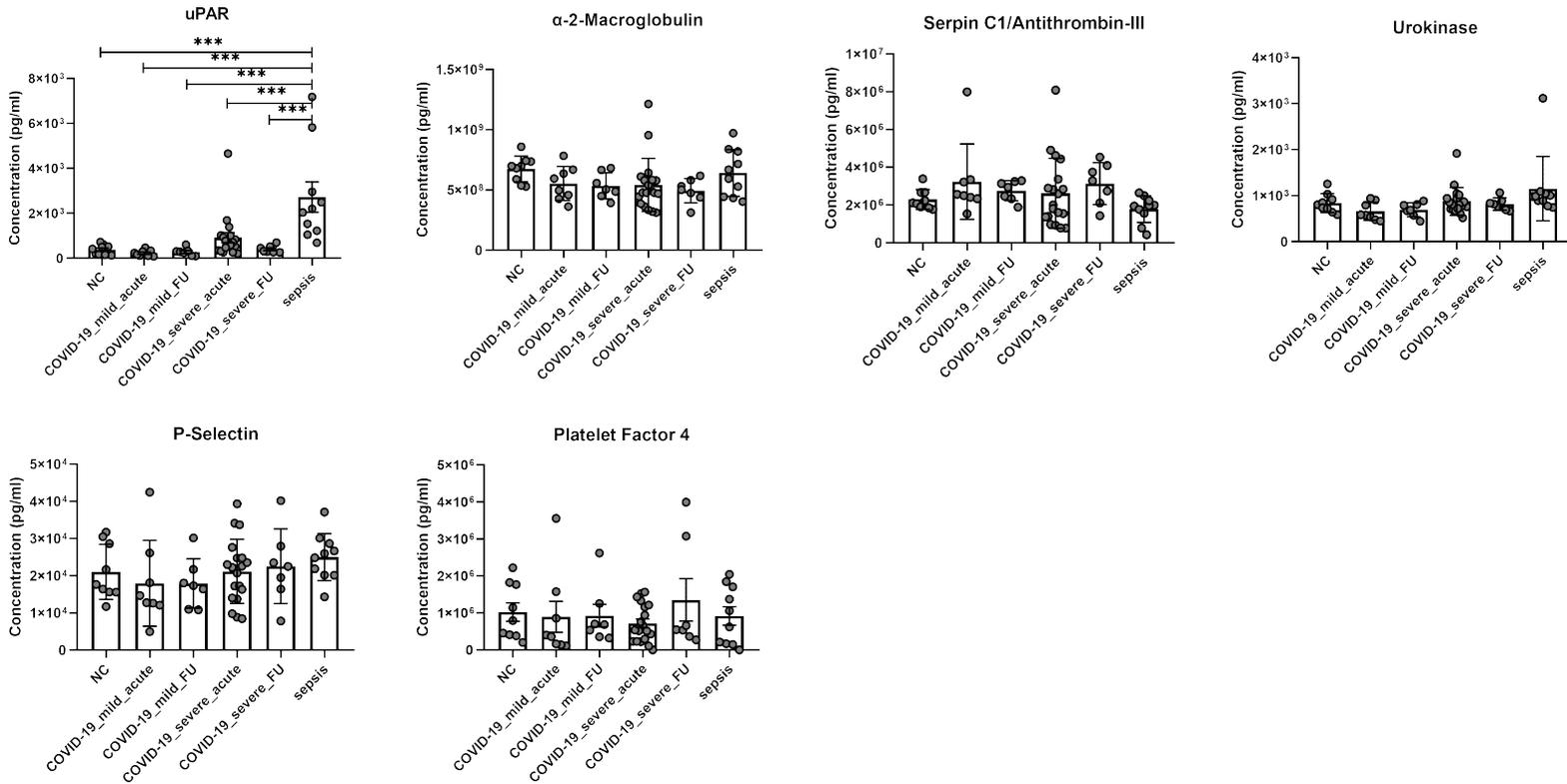


Figure 11. Protein expression in mild and severe COVID-19 in coagulopathy pathway. (*P*-value: \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001)

vWF, von Willebrand factor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; uPAR, urokinase receptor

측정된 14종 단백질의 발현값을 코로나19 급성기군(COVID-19 acute), 건강인군(NC), 대장균 패혈증군(sepsis) 세 그룹으로 분석하였다. 코로나19 급성기군과 건강인군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 tissue factor, PAI-1, D-dimer, protein S, vWF이며, 코로나19 급성기군과 대장균 패혈증군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 D-dimer, TFPI, thrombomodulin, protein C, protein S, vWF, uPAR이었다 (Figure 12).

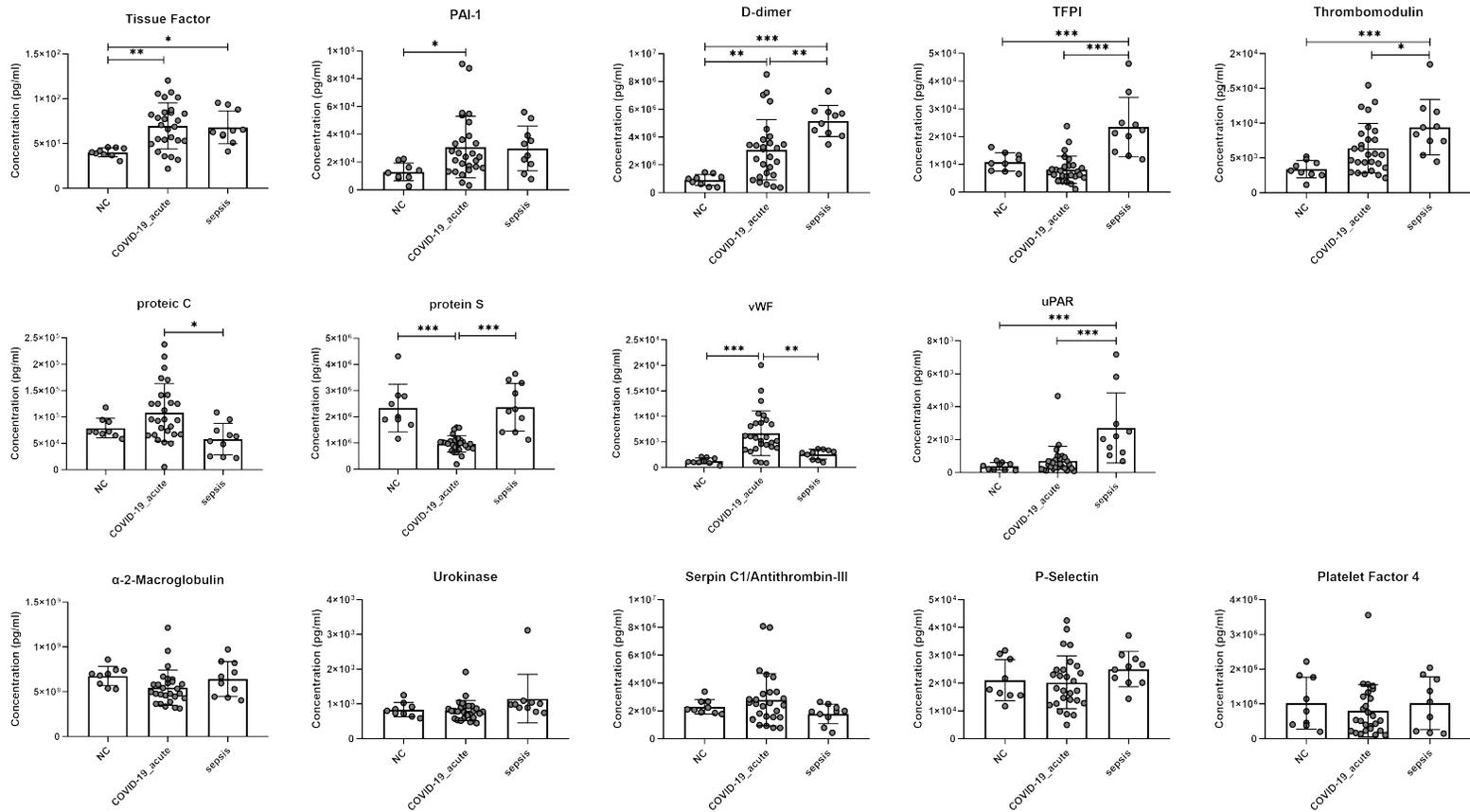


Figure 12. Protein expression in COVID-19. (*P*-value: \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001)

vWF, von Willebrand factor; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor; uPAR, urokinase receptor

## 제4절 Coagulopathy pathway analysis

혈액 응고 기전의 기본 흐름은 혈관이 손상되어 혈관 벽의 콜라겐(collagen)이 노출되면, 1차적으로 혈소판들이 재빨리 그 위에 엉겨 붙어 혈소판 응괴(platelet plug)가 형성됨과 동시에 2차 지혈 과정인 응고인자들의 활성화를 통해 섬유소(fibrin)가 만들어지고 지혈 마개(hemostatic plug)가 형성되어 지혈이 이루어진다. 이러한 1차 지혈 과정과 2차 지혈 과정은 별개의 과정이 아니라 서로 연관되어 있는데, 1차 지혈 과정인 혈소판 활성화가 혈액 응고를 가속화시키고, 2차 지혈 과정의 산물인 thrombin이 혈소판 활성화를 유도한다. 손상이 회복되면 지혈 과정에 형성된 섬유소를 용해하는 과정이 있게 되고, 용해가 완전히 되면 혈액의 흐름이 정상적으로 이뤄지게 한다[39].

응고 병증 관련하여 RNA 발현과 protein level에서 통계적으로 유의하게 발현 차이를 보이는 인자들을 도식화하였다.

코로나19군과 건강인군 사이에 응고 병증과 관련된 각 인자들을 RNA 발현과 protein level에서 확인하였다. 그 결과, 코로나19군의 경우 건강인군에 비해 tissue factor (*F3*)와 vWF (*VWF*)가 발현이 증가하면서 coagulation cascade가 활성화되었으며, 동시에 platelet activation이 일어났다(Figure 13).



코로나19 경증 환자군과 건강인군 사이에 응고 병증과 관련된 각 인자들을 RNA 발현과 protein level에서 확인하였다. 그 결과, 코로나19 경증 환자군의 경우 응고 관련한 *F9*, *F2RL2*, selectin P ligand (*SELPG*), *A2M*, *SERPINF2* 유전자의 발현이 감소하였다(Figure 14).

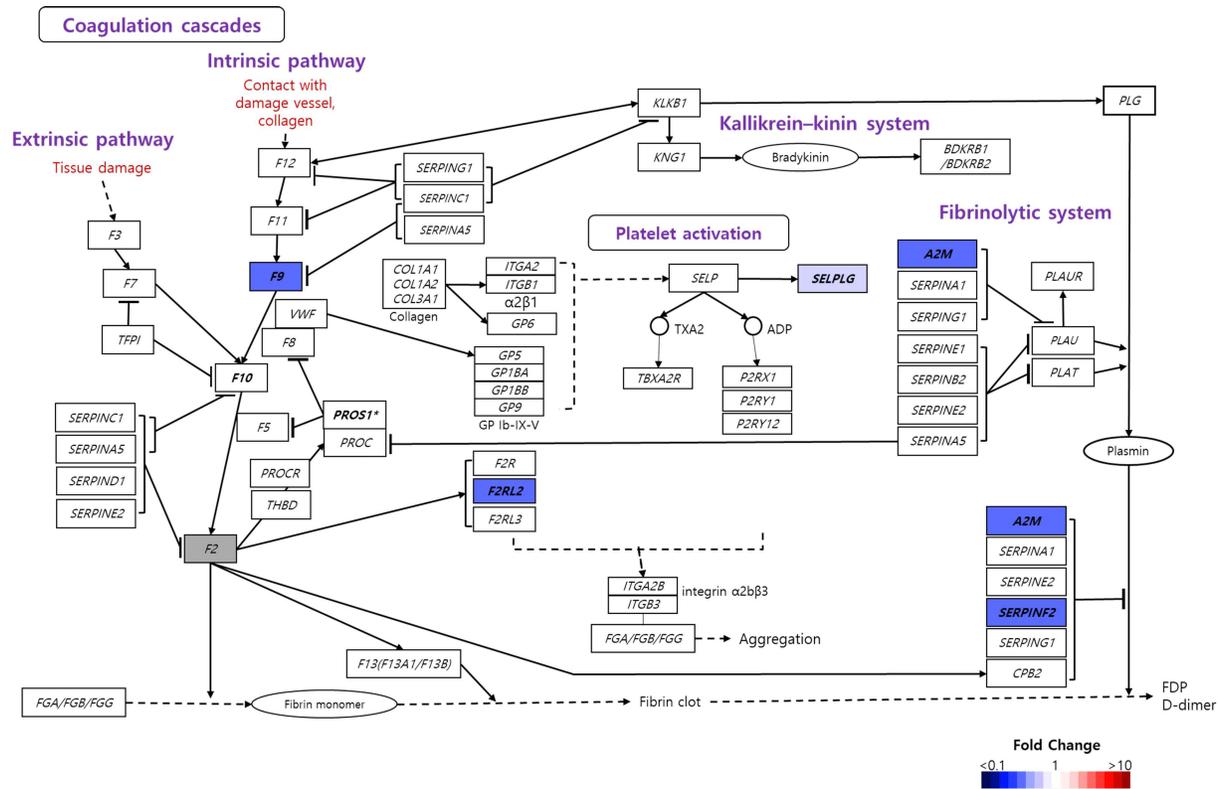


Figure 14. RNA and protein(\*) expression between mild COVID-19 and healthy control in the coagulopathy pathway. ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )

□, gene product, mostly protein but including RNA; ○, chemical compound, DNA and other molecule; →, activation; →→, indirect link or unknown reaction; ⊣, Inhibition; gray, no expression; bold text, significant; red, up-regulation; blue, down-regulation

코로나19 중증 환자군과 건강인군 사이에 응고 병증과 관련된 각 인자들을 RNA 발현과 protein level에서 확인하였다. 그 결과, 코로나19 중증 환자군의 경우 *KLKB1* 유전자의 발현이 감소하면서 kallikrin - kinin system이 불활성화하였으며, urokinase-type plasminogen activator (uPA)가 활성화되어 섬유소 용해가 시작되었다. 또한 uPA의 inhibitor인 alpha-2-macroglobulin (*A2M*) 발현이 감소하였다(Figure 15). 코로나19 중증 환자군의 경우 경증 환자군에서 유의하게 발현이 감소하는 유전자 이외에 추가로 kallikrein - kinin system 유전자 *KLKB1*이 더 감소 발현되었다. 중증 환자군에서 발현이 증가한 유전자는 *F5*, *SELP*, *ITGB1*, *PLAU*, *P2RX1*, *GP1BA*, *ITGA2B*, *ITGB3*, *TBXA2R*, *PLAUR*, *GP6*, *TFPI*, *THBD*, *GP1BB*, *GP9*, *F13A1*이었다.

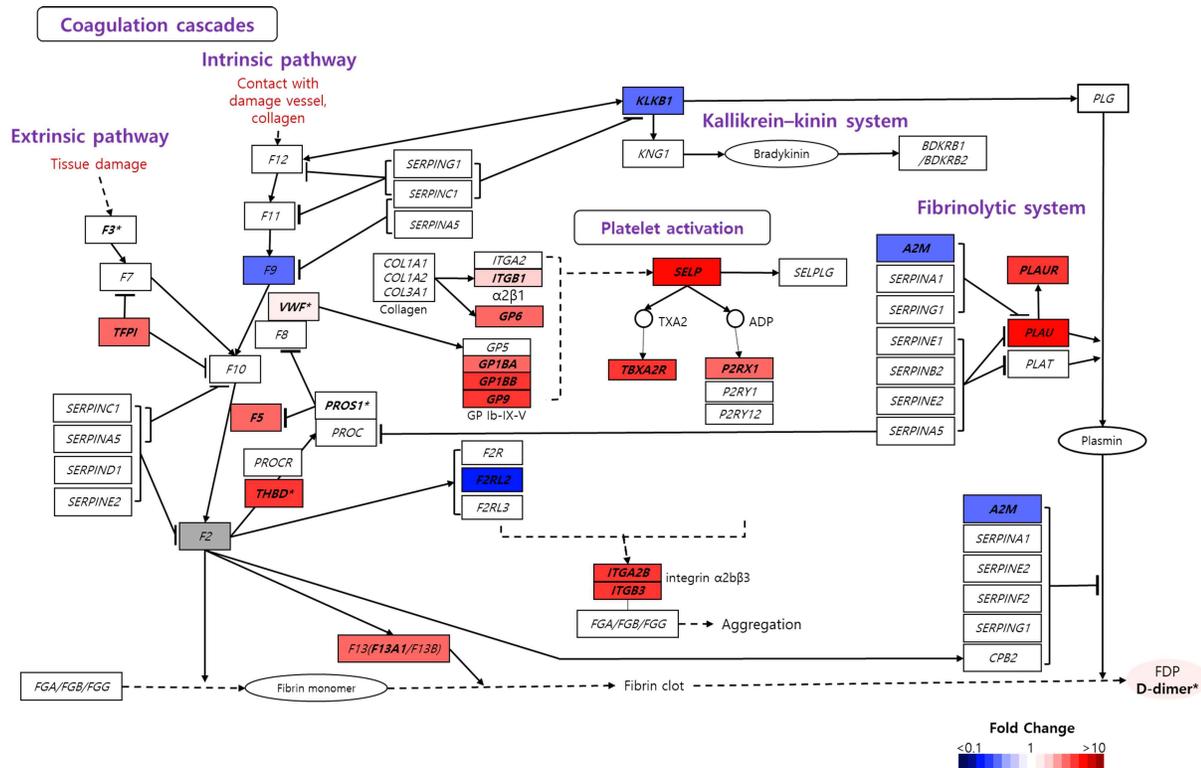


Figure 15. RNA and protein(\*) expression between severe COVID-19 and healthy control in the coagulopathy pathway. ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )

□, gene product, mostly protein but including RNA; ○, chemical compound, DNA and other molecule; →, activation; →→, indirect link or unknown reaction; ⊥, Inhibition; gray, no expression; bold text, significant; red, up-regulation; blue, down-regulation

코로나19 경증 환자군과 중증 환자군 사이에 응고 병증과 관련된 각 인자들을 RNA 발현과 protein level에서 확인하였다. 그 결과, 코로나19 중증 환자군은 경증 환자군에 비해 조직손상(tissue damage)이 일어나면서 tissue factor가 증가하게 되고 coagulation cascade 활성화가 진행되어 fibrin clot 형성이 시작되며, 동시에 uPA가 활성화되어 섬유소 용해가 시작됨이 확인되었다. 이와 함께 uPA에 대한 inhibition인 *SERPINB2*와 *SERPINE2* 유전자의 발현이 증가하여 섬유소 용해를 억제하였다. 또한 *KLKB1*의 발현이 감소하면서 kallikrein - kinin system이 불활성화하였으며, platelet activation system 관련 유전자들의 발현이 증가하며 platelet activation이 활성화됨을 확인하였다(Figure 16).

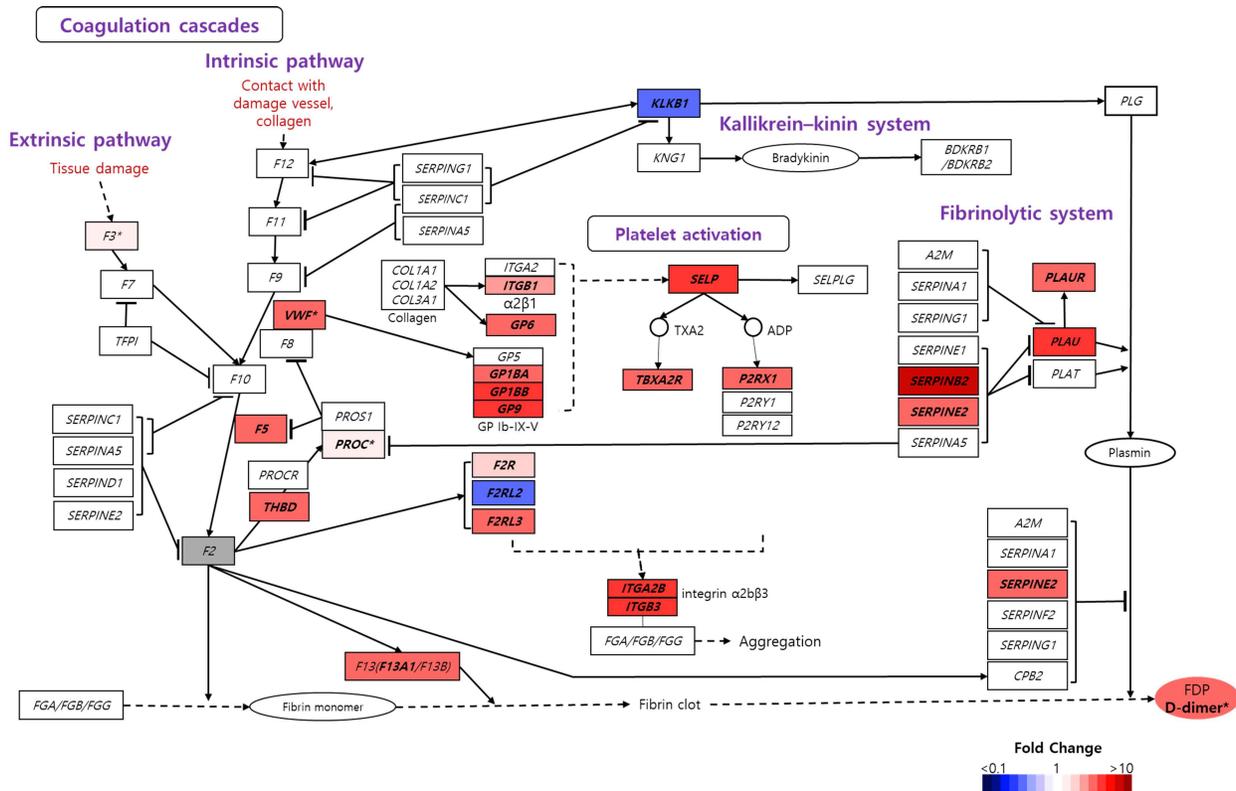


Figure 16. RNA and protein(\*) expression between mild and severe COVID-19 in the coagulopathy pathway. ( $P$ -value  $\leq 0.05$ )

□, gene product, mostly protein but including RNA; ○, chemical compound, DNA and other molecule; →, activation; ⋯→, indirect link or unknown reaction; ⊥, Inhibition; gray, no expression; bold text, significant; red, up-regulation; blue, down-regulation

## 제5절 코로나19 중증 환자에서 생존군과 사망군 분석

코로나19 중증 환자 대상으로 생존군과 사망군 사이에 RNA 발현과 protein level에서 어떤 차이가 있는지 추가로 확인하였다.

DEGs 분석 결과, 1,959개의 DEGs가 확인되었으며, 발현이 증가한 유전자는 607개, 발현이 감소한 유전자는 1,352개였다. 응고 병증 관련하여 유의한 발현 차이를 보이는 유전자는 *F5*, *SERPINB2*, purinergic receptor P2Y1 (*P2RY1*)이었으며, 이들은 모두 발현이 증가하였다. 특히 plasminogen activator inhibitor인 *SERPINB2*가 10배 이상 발현이 증가하였다. 코로나19 중증 환자의 사망군의 경우 coagulation cascade 활성이 일어나며, 섬유소 용해 관련하여 plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2, *SERPINB2*) 반응이 높게 발현되어 섬유소 용해계를 불활성화시킴을 확인하였다 (Figure 17).

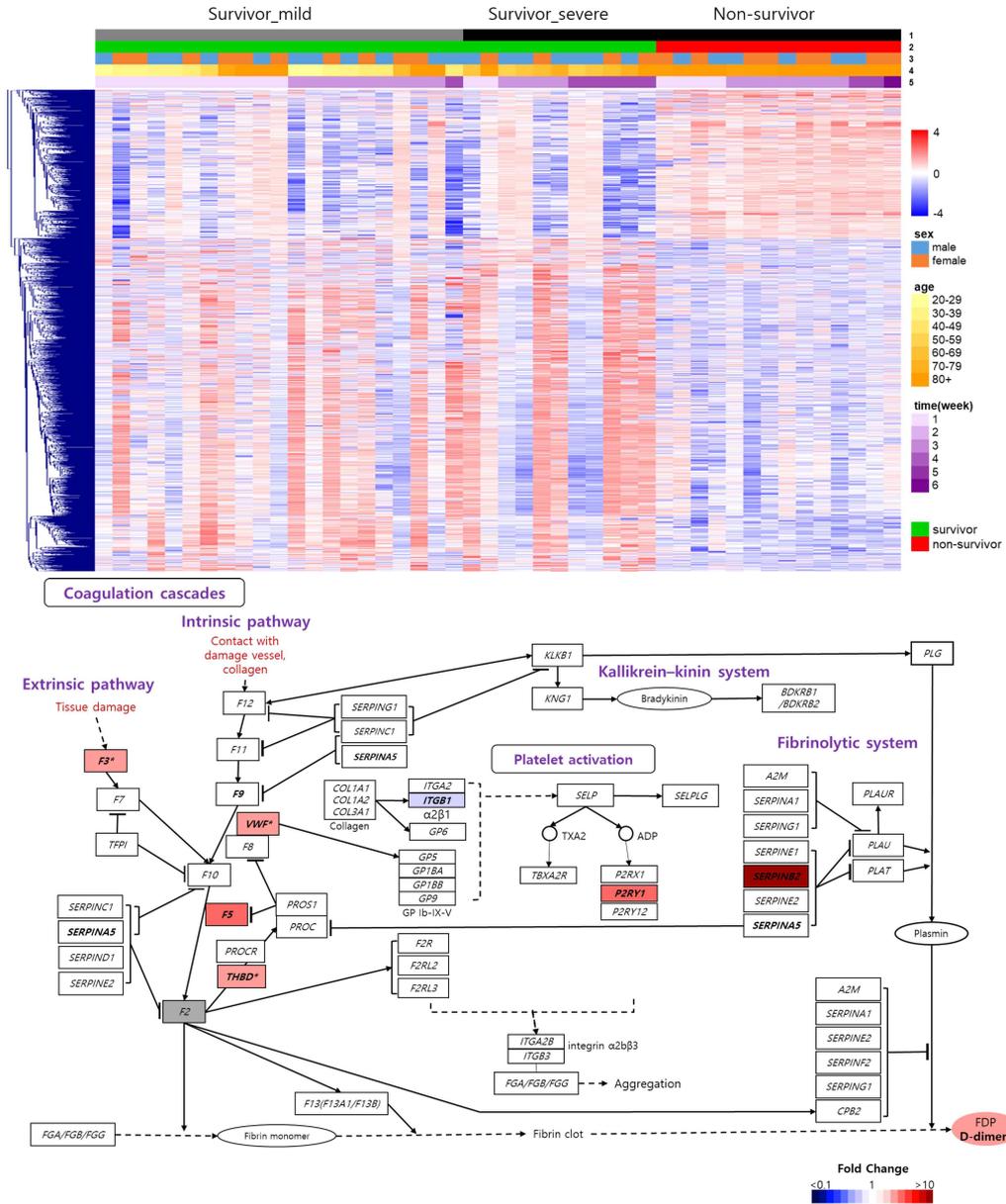
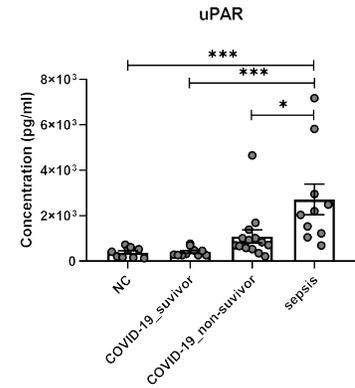
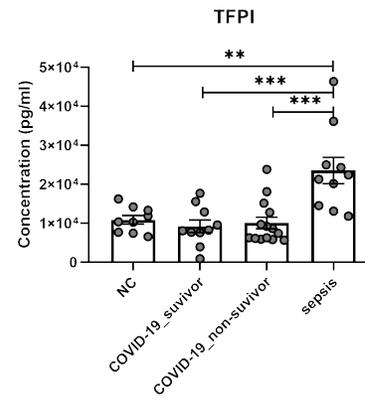
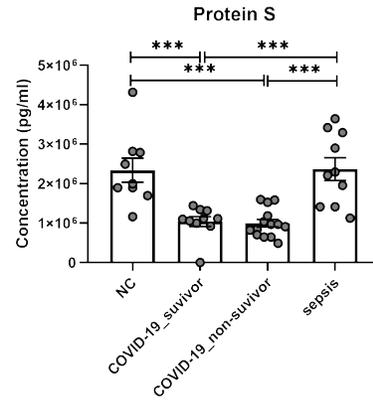
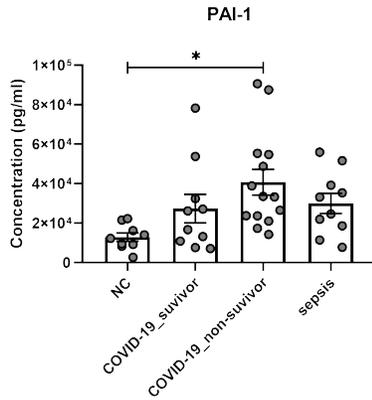
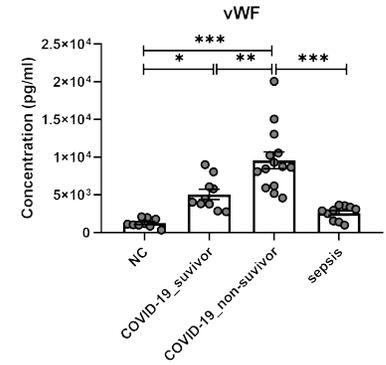
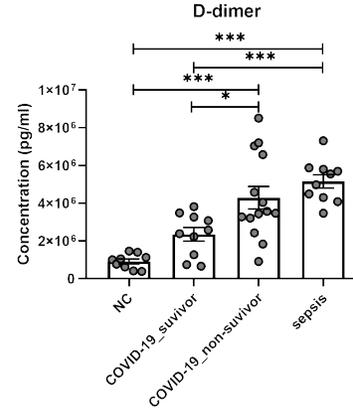
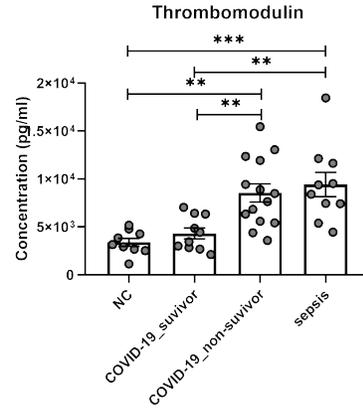
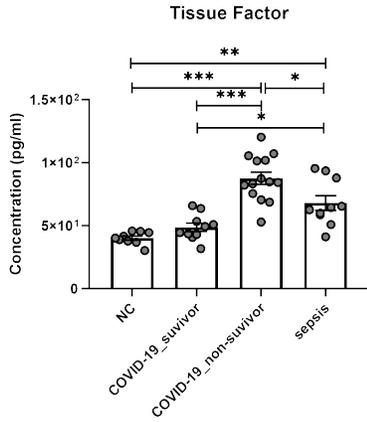


Figure 17. DEGs analysis and pathway analysis between survivors and non-survivors in severe COVID-19. (Fold change  $\geq 2.0$ , Normalized data(log2)  $\geq 1.0$ ,  $P$ -value  $\leq 0.05$ )

- , gene product, mostly protein but including RNA; ○, chemical compound, DNA and other molecule; →, activation; ⇨, indirect link or unknown reaction; ⊣, Inhibition; gray, no expression; bold text, significant; red, up-regulation; blue, down-regulation

코로나19 중증 환자의 생존군과 사망군에서 응고 병증 관련 protein level을 분석한 결과, 코로나19 중증 환자 사망군의 경우 생존군에 비해 tissue factor, thrombomodulin, vWF, D-dimer에서 유의하게 발현이 증가하였다. 또한 코로나19 중증 사망군과 대장균 패혈증군 사이 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 tissue factor, vWF, protein S, TFPI, uPAR이었으며, 건강인군과 대장균 패혈증군 사이에 유의한 발현 차이를 보이는 단백질은 tissue factor, thrombomodulin, D-dimer, uPAR, TFPI이었다(Figure 18).



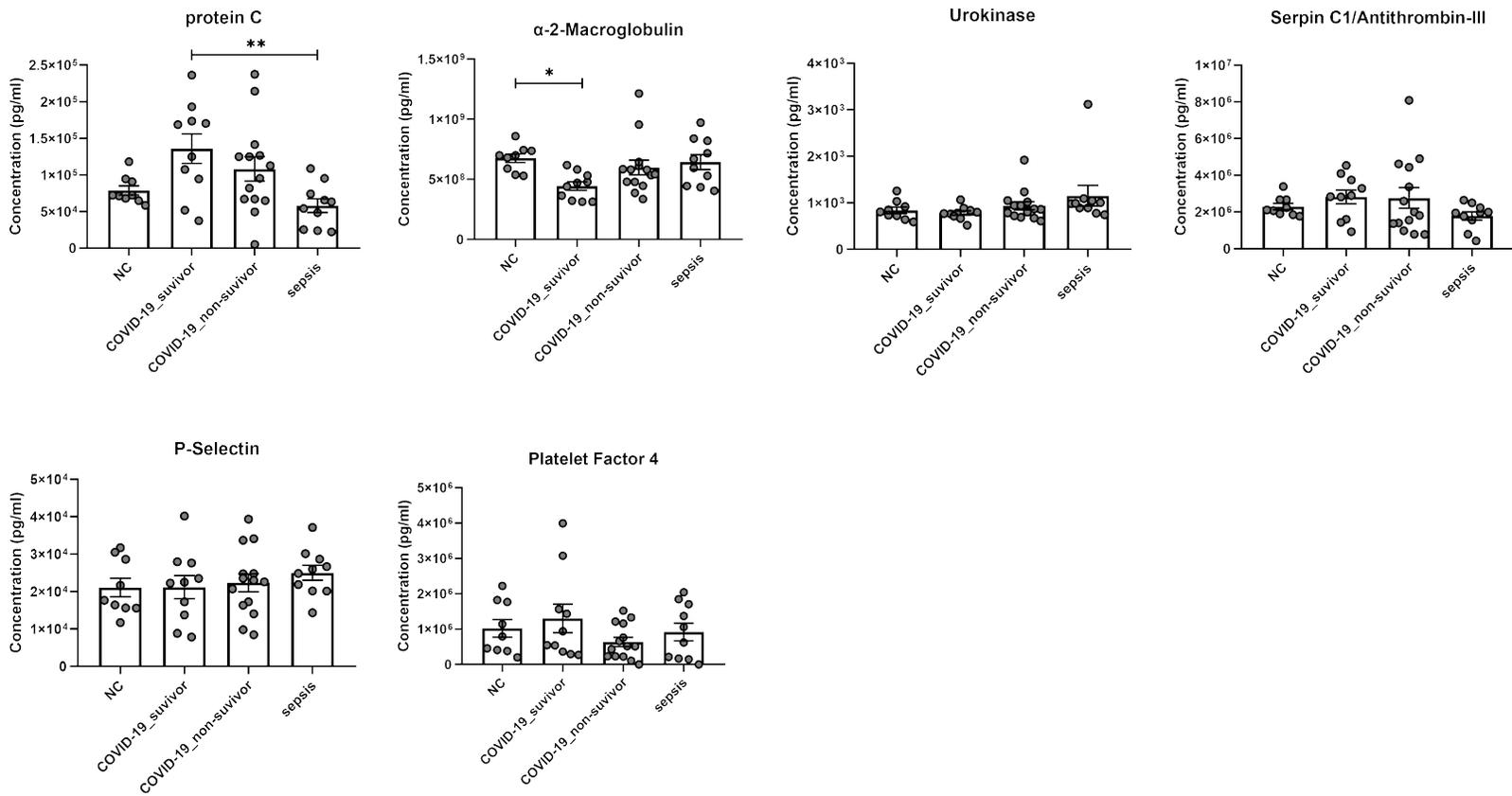


Figure 18. Protein expression between survivors and non-survivors in severe COVID-19. (*P*-value: \*, <0.05; \*\*, <0.01; \*\*\*, <0.001)

## 제4장 고찰

코로나19 관련 응고 병증에 대한 메커니즘은 많은 연구가 진행되고 있지만 이러한 상태를 유발하는 근본적인 세포 및 분자 메커니즘은 명확하지 않다. 코로나19 환자는 다양한 임상증상과 합병증을 보인다. 호흡기 증상이 주요 특징이지만 일부 환자에서는 사망률과 관련 있는 과응고성 이상이 나타난다[22, 40]. 응고 병증과 관련한 유의한 경로를 분석하여 응고 병증에 대한 잠재적인 요인을 분석 및 중증과 경증에서 RNA 발현 양상 및 실제 protein level에서의 차이 등을 확인함으로써 코로나19의 응고 병증 기전에 대한 체계적인 이해에 큰 도움이 될 수 있다.

코로나19 중증 환자의 유전자 발현 분석 결과, 전체적으로 응고 병증 관련한 coagulation cascade와 platelet activation의 유전자들의 발현이 대부분 증가하였다 그러나 kalikrein-kinine system 유전자 *KLKB1*과 platelet activation 유전자 *F2RL2*는 발현이 감소하였다. *KLKB1*은 plasma kallikrein을 암호화하는 유전자이며, plasma kallikrein은 혈액 응고, 섬유소 분해, kinin 생성 및 염증의 표면 의존적 활성화 (surface-dependent activation)에 참여하는 당단백질이다. plasma kallikrein은 kininogen으로부터 kinin (bradykinin 및 kallidin)을 방출시켜 혈압조절 및 염증 활성화를 담당하며, 또한 plasminogen을 활성화하여 plasmin을 생성하여 섬유소 용해계를 활성화시킨다. *KLKB1*의 발현이 감소하는 것은 결과적으로 plasmin의 감소를 불러와 섬유소 용해계의 활성화를 낮추어 응고 이상을 유발한 것으로 생각된다. *F2RL2*는 protease-activated receptor-3 (PAR3)을 암호화하는 G-protein-coupled receptor (GPCR)이다. Protease-activated receptors (PARs)은 독특한 활성화 방식을 보이는데, thrombin 또는 trypsin에 의한 N-말단 분열(cleavage)은 receptor의 자동 활성화 또는 다른 PAR의 활성화를 유발하는 ‘tethered ligand’ 역할을 하는 6-아미노산 서열을 노출시킨다[41]. *F2RL2*는 *F2RL3*의 보조인자로 작용하는데, 본 연구 결과, *F2RL3*의 과발현으로 인해 platelet activation이 진행되면서 *F2RL2*의 발현이 감소한 것으로 보인다.

Tissue factor는 내피세포(endothelial cell)가 손상되면서 혈관에 노출되면서 외인성 응고 캐스케이드가 활성화되기 시작한다. 본 연구 결과 코로나19 중증 환자군에서 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 코로나19 환자의 경우, 폐, 기관지폐세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 순환하는 세포 외 소포 (extracellular vesicles)에서 모두 tissue factor의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, tissue factor의 증가는

응고 활성화 마커, 혈전증, 염증 마커, 질병의 중증도 및 사망률과 관련이 있다[42]. 이러한 tissue factor의 증가는 응고 반응의 활성화를 불러와 코로나19 환자의 응고 이상을 일으키는 것으로 보인다.

Thrombomodulin은 주로 내피(endothelium)에서 발현되는 인자로 응고계를 조절해 혈관 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 하며, 내피세포의 표면에 특이적으로 존재하는 응고저지물질이다. Soluble thrombomodulin은 코로나19 관련 응고 병증의 내피증(endotheliopathy)의 표지인자로 사망률과 유의한 상관관계를 보였으며[14], 코로나19군과 대장균 패혈증군을 비교한 연구에서 두 그룹 모두 soluble thrombomodulin의 혈장 수치가 상승하였으며, 이는 내피세포 활성화가 두 군 모두 증가함을 알 수 있다[43]. 또한 soluble thrombomodulin이 증가하면 활성화된 protein C의 생성이 어려울 수 있다[43-46]. 본 연구결과에서 thrombomodulin은 코로나19군에서 유의하게 증가하였는데, 이런 thrombomodulin의 증가는 protein C 생성을 억제하여 최종적으로 응고 이상을 초래하리라 추정된다.

vWF는 혈관내피세포, 또는 골수의 거대핵세포에서 생산되는 접착인자(adhesion factor)로, 혈장, 혈관내피조직, 혈소판에 존재하는 지혈인자이다. vWF는 platelet activation과 coagulation cascade의 내인성 경로에 모두 작용한다. 이러한 vWF는 코로나19 환자에서 상당히 높게 확인되었으며[47], factor VIII 응고 활성 증가에 의해 vWF가 상승되는데, 증가한 vWF는 내피 자극 및 손상을 의미한다[48]. 또한, 코로나19 관련 응고 병증의 내피증 관련 연구에서 vWF가 사망률과 유의한 상관관계를 보였다[14]. 본 연구 결과에서도 코로나19 중증 환자군에서 protein level이 상당히 증가됨을 확인하였다.

Protein S는 내피세포에서 발생하며 protein C의 보조인자로 항응고 역할을 한다. 코로나19 중증으로 진행된 ICU 입원환자에서 protein S의 감소가 보고되었으며[49], 사이토카인 폭풍(cytokine storm, IL6 상승)과 저산소증(hypoxia)은 모두 protein S를 하향 조절을 야기했다[50]. 즉 IL6 상승에 의해 protein S가 감소하여 혈전색전증이 초래될 수 있음을 보여준다. 더불어 protein S가 감소하게 되면 초기 보체(nascent complement)의 부적절한 보체 활성을 막지 못해 보체계의 활성이 초래된다. 이처럼 protein S의 감소는 코로나19 환자의 질병 진행에 핵심적인 역할을 할 수 있으며, 본 연구 결과 경증과 중증 환자군 모두 protein S가 감소함을 확인하였으며, 이는 혈전색전증 위험의 증가와 염증반응이 증가할 수 있음을 의미한다. 반면, protein C는 코로나19 중증 환자군에서 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 대장균 패혈증군에서의 감소와

대조된다. Protein C는 protein S와 결합하여 factor Va와 factor VIIIa를 불활성화하여 응고 작용을 하며, plasminogen activator에 의한 plasmin 활성화를 촉진시켜 섬유소 용해 과정을 촉진시키는 작용도 한다. 코로나19 환자에서 protein C의 감소가 사망률 증가와 관련이 있다고 보고하였다[51]. 본 연구 결과 protein C는 코로나19군에서 대장균 패혈증군과 비교하여 유의하게 증가하였으나 건강인군과 비교해서는 유의하게 증가하지는 않았다.

TFPI는 미세혈관 내피에서 주로 생성되는 단백질분해효소 억제제이며, 또한 FVIIa/TF 복합체의 작용을 차단하여 FXa를 직간접적으로 억제한다. 패혈증의 경우 내피세포에서 TFPI의 방출을 유도한다[52]. 코로나19군에서 tissue factor가 증가한 데 비해 TFPI는 거의 증가하지 않고, 대장균 패혈증군에 비해 현저히 낮게 나타났다. TFPI의 낮은 발현은 TF경로 활성화를 나타내며 이는 응고를 촉진한다[53]. 이번 연구 결과에서 SARS-CoV-2 감염은 경증에서도 protein S와 TFPI가 감소되며, 이에 따라 tissue factor가 증가하여 응고를 증가시켜 혈전색전증 등의 응고 병증을 촉진하는 것으로 생각된다.

코로나19와 달리 대장균 패혈증에서는 TFPI가 증가하여 TF경로를 불활성화하여 응고가 억제되어, 대장균 패혈증의 경우 코로나19보다 혈전색전증이 덜 발생하는 것으로 생각되나 이러한 기전에 대해서는 추가 연구가 필요하리라 생각된다.

uPA는 plasminogen을 plasmin으로 변환을 촉매하는 enzyme으로 혈액 응고를 용해하는 작용을 한다. 코로나19 중증 환자군에서 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였으나, 대장균 패혈증군에서는 발현이 낮은 것을 보이며 통계적으로 유의하지는 않았다. uPAR은 plasmin 생성을 localizing하고 촉진하는 역할을 하여 섬유소 용해를 촉진시키며, 질병 진행 중 초기에 분해되어 가용성 반응물인 soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR)을 생성한다. suPAR의 증가는 중증 호흡부전(severe respiratory failure, SRF)의 조기 예측인자 및 사망 위험에 대한 바이오마커로 사용할 수 있다고 보고되었다[54]. 높은 수준의 suPAR은 중증 코로나19 감염 합병증인 신장 손상을 예측하고 잠재적 원인이 될 수 있으며, 단백질체와 전사체 연구 결과 suPAR의 증가는 과응고 상태와 연관성이 있었다[55]. 또한 최근 연구에 따르면 suPAR은 패혈증 진단에 사용하는 바이오마커로서 패혈증에서 suPAR수치가 유의하게 증가하였으며, 패혈증의 중증도를 반영한다고 보고하였다[56]. 본 연구 결과 uPAR은 코로나19 중증 환자군에서 발현이 증가했으며, 대장균 패혈증군에서 코로나19 중증 환자군보다도 통계적으로 유의하게 발현이 증가한 것을 확인하였다.

섬유소 용해와 관련된 *SERPINB2* 유전자는 PAI-2 단백질을 암호화하며, PAI-2는 monocyte에서 방출되며 섬유소 용해의 강력한 억제제로 작용한다. Marco R et al.에 보고에 따르면, PAI-2의 경우 코로나19 사망군에서 유의하게 증가하였다[57]. 본 연구 결과에서도 *SERPINB2* 유전자는 코로나19 중증 환자군에서 상당히 RNA 발현이 증가하였는데 경증 대비 8배 이상, 사망군의 경우 생존군에 비해 10배 이상 증가하였다.

D-dimer는 정상적으로 혈중에 존재하지 않고 혈전이 형성되어 용해된 경우에만 생산된다. 따라서 D-dimer는 코로나19 환자와 응고 이상 환자를 평가하기 위해 혈액검사로 측정하는데, D-dimer의 증가는 나쁜 예후와 관련이 있으며[58], 사망자에서 유의하게 높았다[22]. 본 연구 결과에서도 중증 환자군에서 증가한 것을 확인하였으나 D-dimer의 경우 폐색전증(pulmonary embolism) 등의 다른 응고 관련 질환에서도 증가한 양상을 보여 진단에 특이적인 인자로 보기는 어렵다[59].

코로나19 경증 환자군의 경우, 응고 병증 관련하여 coagulation cascade 관련 유전자 *F9* (내인성 경로 응고 인자로, *F10*을 활성화), *A2M* (protease inhibitor로 thrombin (*F2*)을 억제), 섬유소 용해 관련 유전자 *SERPINF2* (plasmin을 억제하며, 섬유소 및 다양한 다른 단백질을 분해), platelet activation 관련 유전자 *F2RL2* (platelet activation 관련 receptor로 platelet 활성을 감소), *SELPLG* (P-selectin glycoprotein ligand-1을 암호화하며, 세포접착분자인 P selection과 결합)가 모두 발현이 감소하여 과응고 반응은 일어나지 않았다. 그러나 코로나19 중증 환자군의 경우에는 *KLKB1*이 감소하여 kalikrein-kinine system 활성이 억제되었으며, coagulation cascade (*THBD*, *F5*, *F13* 등)와 platelet activation 발현이 증가(*SELP*, *TBXA2R*, *P2RX1* 등)하였다. 이러한 kalikrein-kinine system의 활성 억제는 섬유소 용해계(*PLAU*, *PLAUR* 등 발현 증가) 활성을 억제하여 응고 병증을 유발할 수 있다. 또한 대장균 패혈증군에 비해 *TBXA2R*가 현저히 상승한 것을 확인하였으며, *F2RL2*이 현저히 감소하였다. *F2RL2*는 *F2RL3*의 과발현으로 인해 platelet activation이 진행되면서 발현이 감소한 것으로 보인다.

*TBXA2R*은 thromboxane A2 receptor를 암호화하는 유전자이며, granule에서 방출된 thromboxane A2의 receptor이다. thromboxane은 활성화된 혈소판에 의해 생성되어 인접한 혈소판을 활성화시키는 agonist로서 혈액 응고와 혈관 수축을 유도하는 물질이며, thromboxane A2는 활성화 형태이지만 매우 불안정하여 분해되어 불활성화 형태의 thromboxane B2를 형성한다. 중증으로 중환자실에 입원한 코로나19 환자는 전신 염증, 혈전성 합병증의 위험이 큰 혈관 내 응고증, 정맥 혈전색전증 등이 주로 IL-1에 의

해 매개되었으며, IL-1은 thromboxane A<sub>2</sub>의 형성을 자극함으로써 비 내피세포에서도 혈소판 혈관 혈전 생성을 유발하며, 활성화된 호중구(neutrophils)와 대식세포(macrophages)에서 thromboxane B<sub>2</sub> 방출을 유도하였다[59]. 이처럼 *TBXA2R*의 증가 발현은 과응고 반응을 의미하며, 본 연구 결과 코로나19 중증 환자군에서는 증가, 대장균 패혈증군에서는 감소하는 것을 확인하였다.

코로나19 환자에서 생존과 사망을 구분하는 원인을 확인하는 것이 환자의 치료 및 좋은 예후를 위해 매우 중요하다. 코로나19 중증 환자를 대상으로 생존군과 사망군으로 구분하여 분석하였을 때, tissue factor, vWF, F5, thrombomodulin과 같은 coagulation cascade 관련 인자의 발현이 증가하였으며, platelet activation 관련 인자는 크게 발현하지 않았다. 그러나 섬유소 용해 관련 *SERPINB2* (PAI-2)와 D-dimer가 상당히 증가한 것을 확인하였다. *SERPINB2*는 플라스미노겐 활성화제 억제제로, 발현이 증가하여 섬유소 용해를 불활성화시키는 것이 확인되었다. 이러한 인자들이 코로나19 환자에서 응고 병증을 유도하여, 생존과 사망을 구분하는 인자로 생각된다. 대장균 패혈증군과 비교하였을 때, tissue factor, thrombomodulin, uPAR, TFPI, D-dimer, protein S는 생존군에 비해 유의하게 protein level이 증가하였다. 사망군과 비교해서는 tissue factor, uPAR, TFPI, protein S의 protein level은 증가하였으나 vWF는 사망군에 비해 감소한 것을 확인하였다. protein S는 코로나19군에서는 protein level이 감소하였으나, 대장균 패혈증군의 경우 건강인군과는 protein level에서 의미 있는 차이를 보이지 않았다. uPAR과 TFPI는 코로나19군이나 건강인군에 비해 대장균 패혈증군에서 통계적으로 유의하게 protein level이 증가하였다. 또한 protein C는 건강인군과 코로나19 환자군에 비해 대장균 패혈증군의 protein level이 감소하였으며, TFPI와 uPAR은 대장균 패혈증에 비해 건강인군과 코로나19 경증 및 중증 환자군에서는 protein level이 증가하지 않았으며, 경미한 환자군은 오히려 감소하는 경향을 보였다.

즉 건강인에 비해 코로나19 경증 환자군의 경우는 *F9*, *F2RL2*, *SELP*, *A2M*, *SERPINF2* 등 유전자 발현이 모두 감소하였지만, 중증 환자군에서는 이와 더불어 *KLKB1* 발현이 감소하는 등 kallikrein-kinin system 활성이 억제되었으며, *VWF*, *SELP*, *TBXA2R* 등의 platelet activation system이 활성화되었다. 중증 환자군에서는 또한 *SERPINB2*, *SERPINE2* 등의 섬유소 용해계가 활성화되면서 항섬유소 용해계(antifibrinolysis system)도 동시에 활성화됨이 확인되었다. 이처럼 경증과 중증에 있어서 병인적 메카니즘에 있어서 큰 차이를 보였다.

코로나19 응고 병증에서 유의한 인자들을 확인한 결과, 중증과 경증을 구분하는 인

자는 내피세포 활성화와 관련한 coagulation factor인 tissue factor, thrombomodulin, protein C, vWF D-dimer, protein S였으며, 코로나19 중증 환자에서 생존과 사망을 구분할 수 있는 인자 또한, tissue factor, vWF, F5, thrombomodulin, D-dimer, PAI-2와 같이 내피세포 기능 장애를 일으키는 인자들이었다. 이러한 코로나19 중증 환자를 조기 예측할 수 있는 바이오마커의 확인은 환자의 효과적인 예후 예측을 가능하게 하며 환자의 나쁜 예후로의 진행을 막을 집중 치료를 계획할 수 있게 한다.

본 연구의 제한점은 분석에 사용한 코로나19군, 건강인군, 대장균 패혈증군의 임상 검체 수가 적다는 점이다. 또한 코로나19 환자가 2020년 2월부터 2021년 1월 사이 모 집되어, 초기 SARS-CoV-2 (V clade (Pango Lineage B)) 및 2차 유행(second wave) 시점의 spike 유전자의 D614G 변이의 SARS-CoV-2 (GH clade (Pango Lineage B.1.497))의 감염군만 수집되어 알파, 베타, 감마, 델타, 오미크론 등의 variants 유전자에 감염된 환자는 포함되지 않았다. 이처럼 SARS-CoV-2 변이의 종류가 다양하지 않아 추후 더 많은 임상 검체를 이용한 분석이 필요할 것으로 생각된다. 코로나19 응고 병증을 일으키는 기전은 매우 다양하므로 다른 경로에 대한 분석도 추후 진행되어야 한다고 생각된다.

## 제5장 결론

본 연구는 코로나19에서 많이 발생하는 응고 병증의 발생 기전을 이해하기 위해 코로나19 환자의 PBMC에서 RNA-sequencing을 통해 응고 병증 관련 분자기전을 확인하고자 하였다.

코로나19 환자의 임상데이터 분석 결과, 나이, PSI score, WBC, neutrophil, D-dimer, AST, BUN, CRP, troponin-1, lymphocyte는 중증 환자군에서 유의미한 차이를 보였으며, 사망군의 경우 hemoglobin과 platelet에서도 낮은 수치를 보이며 유의미한 차이를 보였다.

RNA-sequencing 분석 및 protein 발현 분석을 통해 코로나19 중증 환자군은 경증 환자군에 비해 내피세포 활성화 관련 coagulation factor인 tissue factor, thrombomodulin, protein C, vWF 그리고 D-dimer가 유의하게 발현이 증가하였으며, protein S는 유의하게 발현이 감소함을 확인하였다.

또한 코로나19 중증 환자의 사망군의 경우 tissue factor, thrombomodulin, vWF, D-dimer에서 유의하게 발현이 증가됨을 확인하여, 이러한 내피세포 활성화 관련 응고 병증 인자가 코로나19 환자의 생존과 사망을 예측하는 중요한 변수임을 확인하였다.

결론적으로 이번 연구를 통해 코로나19 경증 환자군의 경우 *F9*, *F2RL2*, *SELPG*, *A2M*, *SERPINF2* 유전자 발현이 감소하였지만, 중증 환자군에서는 이와 더불어 *KLKB1* 발현이 감소하는 등 kallikrein-kinin system 활성화가 억제되었으며, *VWF*, *F2RL3*, *TBXA2R* 등의 platelet activation system이 활성화되었다. 중증 환자군에서는 또한 *PLAU*, *PLAUR* 등의 섬유소 용해계가 활성화되면서 *SERPINB2*, *SERPINE2* 등의 항섬유소 용해계(antifibrinolysis system)도 동시에 활성화됨이 확인되었다. 중증 환자에서 생존군과 사망군의 비교 분석 결과 사망으로 진행되는 군의 경우 coagulation cascade activation이 더욱 심하게 일어나며, *SERPINB2* 유전자의 발현이 증가되어 섬유소 용해를 불활성화하여 응고 작용이 더욱 악화됨을 확인하였다. 코로나 19 환자의 경우는 패혈증과 비교하여 tissue factor나 vWF가 유의하게 증가하나 prot S는 유의하게 감소하여 패혈증에 비해 더욱 더 응고 병증이 악화될 수 있음을 확인하였다.

## 참고문헌

1. Huang C, Wang Y, Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223), 497 - 506.
2. Xiong TY, Redwood S, Prendergast B, Chen M. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. *European heart journal*. 2020;41(19), 1798 - 1800.
3. Zhu N, Zhang D, Wang W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*. 2020;382(08):727 - 733.
4. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a Pandemic. *Acta bio medica: Atenei parmensis*. 2020;91(01), 157 - 160.
5. World Health Organization (Accessed on 5 May 2023) Online: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic).
6. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *Statpearls* [Updated January 9, 2023]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
7. Korea Disease Control and Prevention Agency. Updates on COVID-19. <https://ncov.kdca.go.kr/>
8. Brian DA, Baric RC. Coronavirus genome structure and replication. *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*. 2005;287, 1 - 30.
9. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng Z-M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & bioscience*. 2021;11(1), 136.
10. Cui S, Chen S, Li X, Liu S & Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18, 1421 - 1424.
11. Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*. 2020;382, 1708 - 1720.
12. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of

- adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The lancet*. 2020;395, 1054 - 1062.
13. Nahum J, Morichau-Beauchant T, Daviaud F, et al. Venous thrombosis among critically ill patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA network open*. 2020;3(5), e2010478.
  14. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, Chang CH, et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *The Lancet Haematology*. 2020;7(8), e575 - e582.
  15. Iba T, Warkentin TE, Thachil J, Levi M & Levy JH. Proposal of the definition for COVID-19-associated coagulopathy. *Journal of clinical medicine*, 10(2), 191.
  16. Trimaille A & Bonnet G. COVID-19 and venous thromboembolism [French]. In *Annales de Cardiologie et D'angiologie*. 2020;69, 370 - 375.
  17. Nicolai L, Leunig A, Brambs S, Kaiser R, et al. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*. 2020;142, 1176 - 1189.
  18. Zhang C, Shen L, Le KJ, Pan MM, Kong LC, et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized coronavirus disease 2019 patients: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7, 151.
  19. Zhang L, Feng X, Zhang D, Jiang C, Mei H, et al. Deep vein thrombosis in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: prevalence, risk factors, and outcome. *Circulation* 2020;142, 114 - 128.
  20. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. *Annals of internal medicine*. 2020;173(4), 268 - 277.
  21. Conway E, Mackman N, Warren R, Wolberg A, Mosnier L, Campbell R, et al. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nature Reviews Immunology*. 2022;22(10), 639 - 649.
  22. Tang N, Li D, Wang X & Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2020;18(4), 844 - 847.
  23. Ali N. Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict

- risk for severity of COVID-19. *Journal of medical virology*. 2020;92(11), 2409 - 2411.
24. Agrati C, Bordoni V, Sacchi A, Petrosillo N, et al. Elevated P-selectin in severe COVID-19: considerations for therapeutic options. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2021;13(1), e2021016.
  25. Marietta M, Ageno W, Artoni A, De Candia E, Gresele P, Marchetti M, et al. COVID-19 and haemostasis: a position paper from Italian Society on Thrombosis and Haemostasis (SISET). *Blood Transfusion*. 2020;18(3), 167 - 169.
  26. Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA internal medicine*. 2020;180(7), 934-943
  27. Jenner WJ, Gorog DA. Incidence of thrombotic complications in COVID-19: On behalf of ICODE: The International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2021;52(4), 999 - 1006.
  28. Middeldorp S, Coppens M, van Haaps TF, Foppen M, et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(8), 1995 - 2002.
  29. Llitjos JF, Leclerc M, Chochois C, Monsallier JM, Ramakers M, Auvray M, Merouani K. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(7), 1743 - 1746.
  30. Campbell RA, Hisada Y, Denorme F, Grover SP, et al. Comparison of the coagulopathies associated with COVID-19 and sepsis. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2021;5(4), e12525.
  31. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(5), 319 - 329.
  32. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(2), 120 - 128.
  33. Connors JM & Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and

- anticoagulation. *Blood* 2020;135(23), 2033 - 2040.
34. Connors JM & Levy JH. Thromboinflammation and the hypercoagulability of COVID-19. *J thromb Haemost.* 2020;18(7), 1559 - 1561.
  35. Moll P, Ante M, Seitz A, & Reda T. QuantSeq 3' mRNA sequencing for RNA quantification. *Nature Methods.* 2014; volume 11, pages i - iii
  36. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nature methods,* 2012;9(4), 357 - 359.
  37. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6), 841 - 842.
  38. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, et al.. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology.* 2004; 5(10), 1-16.
  39. Chaudhry R, Usama SM, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. *StatPearls [Internet].* Publishing 2022.
  40. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American college of cardiology.* 2020;75(23), 2950 - 2973.
  41. Hanzelmann S, Wang J, Guney E, Tang Y, Zhang E, et al. Thrombin stimulates insulin secretion via protease-activated receptor-3. *Islets.* 2015;7(4), e1118195.
  42. Sachettor ATA, Mackman N. Tissue Factor and COVID-19: An Update. *Curr Drug Targets.* 2022;23(17), 1573-1577.
  43. Bouck EG, Denorme F, Holle LA, et al. COVID-19 and sepsis are associated with different abnormalities in plasma procoagulant and fibrinolytic activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2021;41(1), 401-414.
  44. Mast AE, Wolberg AS, Gailani D, Garvin MR, et al. SARS-CoV-2 suppresses anticoagulant and fibrinolytic gene expression in the lung. *eLife.* 2021; e64330.
  45. Juneja GK, Castelo M, Yeh CH, Cerroni SE, Hansen BE, et al. Biomarkers of coagulation, endothelial function, and fibrinolysis in critically ill patients with COVID-19: a single-center prospective longitudinal study. *Journal of thrombosis and haemostasis.* 2021;19(6), 1546 - 1557.

46. Francischetti IM, Toomer K, Zhang Y, Jani J, Siddiqui Z, et al. Upregulation of pulmonary tissue factor, loss of thrombomodulin and immunothrombosis in SARS-CoV-2 infection. *EClinicalMedicine*. 2021;39, 101069.
47. Khalid A, Suliman AM, Abdallah EI, Abakar MAA, Elbasheir MM, et al. Influence of COVID-19 on lymphocyte and platelet parameters among patients admitted to intensive care unit and emergency. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022;26, 2579-2585.
48. Escher R, Breakey N, Lämmle B. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. *Thrombosis research*. 2020;190, 62.
49. Corrêa TD, Cordioli RL, Campos Guerra JC, et al. Coagulation profile of COVID-19 patients admitted to the ICU: An exploratory study. *PLoS One*. 2020; 15(12), e0243604.
50. Chatterjee S, Sengupta T, Majumder S & Majumder R. COVID-19: a probable role of the anticoagulant Protein S in managing COVID-19-associated coagulopathy. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(16), 15954 - 15961.
51. Stanne TM, Pedersen A, Gisslen M & Jern C. Low admission protein C levels are a risk factor for disease worsening and mortality in hospitalized patients with COVID-19. *Thrombosis Research*. 2021;204, 13 - 15.
52. Al Otair HA, Abdel Gader AG, Khurshid SM, et al. The Levels of Tissue Factor Pathway Inhibitor in Sepsis Patients Receiving Prophylactic Enoxaparin. *Turkish Journal of Hematology*. 2016;33(2), 112 - 118.
53. Al-Tamimi AO, Yusuf AM, Jayakumar MN, et al. SARS-CoV-2 infection induces soluble platelet activation markers and PAI-1 in the early moderate stage of COVID-19. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2022;44(4), 712-721.
54. Rovina N, Akinosoglou K, Eugen-Olsen J, Hayek S, Reiser J & Giamarellos-Bourboulis EJ. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as an early predictor of severe respiratory failure in patients with COVID-19 pneumonia. *Critical Care*. 2020;24, 1-3.
55. Sarif J, Raychaudhuri D, D'Rozario R, Bandopadhyay P, et al. Plasma Gradient of Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Is Linked to Pathogenic Plasma Proteome and Immune Transcriptome and Stratifies Outcomes

- in Severe COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2021;12, 738093.
56. Zhao JJ, Lou XL, Chen HW, Zhu FT & Hou YQ. Diagnostic value of decoy receptor 3 combined with procalcitonin and soluble urokinase-type plasminogen activator receptor for sepsis. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2018;23, 1 - 10.
57. Ranucci M, Sitzia C, Baryshnikova E, Di Dedda U, Cardani R, Martelli F, & Corsi Romanelli M. Covid-19-Associated Coagulopathy: Biomarkers of Thrombin Generation and Fibrinolysis Leading the Outcome. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(11), 3487.
58. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, Zhang Z. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2020;18(6), 1324 - 1329.
59. Conti P, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Kritas SK, et al. IL-1 induces thromboxane-A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) in COVID-19 causing inflammation and micro-thrombi: inhibitory effect of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(5), 1623-1627.