

메추리血清 리포蛋白質의 放射免疫分析法

韓秉勳 · 韓龍男 · 柳時容 · 梁賢玉 · 朴明煥

서울大學校 生藥研究所

(Received April 1, 1985)

Radioimmunoassay of High-Density Lipoprotein in Japanese Quail Serum

Byung Hoon Han, Yong Nam Han, Si Yong Ryu,

Hyun Ok Yang and Myung Hwan Park

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 150, Korea

Abstract—The development of radioimmunoassay (RIA) for high-density lipoprotein (HDL) in Japanese quail serum will contribute to the screening of drugs acting on cholesterol transport. We have developed a double antibody RIA method for J. quail HDL. The first antibody was raised in rabbit by immunization of HDL isolated by the dextrane sulfate-Mn²⁺ precipitation method. For the preparation of radiiodinated antigen, HDL was further purified by combination of electrophoretic procedure. Using the second antibody raised in goat by rabbit IgG, we have furnished the RIA method for HDL. It showed high specificity and sensitivity of working assay range, 0.1~33 μ g HDL/tube. There was no correlation between the radioimmunoassay of HDL and the enzyme assay of HDL-cholesterol.

Keywords—radioimmunoassay of high-density lipoprotein, HDL, Japanese quail.

콜레스테롤은 담즙산, 성호르몬, 부신피질 호르몬의 합성원료로서 또한 생체막의 지질 성분으로서 생체에 있어 필수적인 물질이지만, 이 물질의 대사조절은 의학적인 면에서 동맥경화증, 고혈압등의 성인병과 관련되는 중요한 과제로 되어있다. 콜레스테롤은 주로 간에서 합성되어 低比重리포蛋白質(low-density lipoprotein, LDL)에 결합되어 생체 각 기관 및 조직에 수송되어 이용되며 여분의 것은 高比重리포蛋白質(high-density lipoprotein, HDL)에 의해 다시 간장으로 수송되어 대사분해되는 것으로 알려지고 있다.^{1,2)}

최근의 疫學적인 조사에 의하면 HDL-콜레스테롤 즉, HDL의 혈중농도가 낮은 군은 동맥경화성 심질환의 발생율이 높다는 사실이 보고되었다.³⁻⁵⁾ HDL의 혈중 농도와 동맥경화성 질환의 발생율이 역상관 관계에 있으므로 HDL의 혈중 농도를 증가시키는 약물은 동맥경화를 치유하는데 중요할 뿐만아니라 이 질환과 관련된 성인병을 예방하는 연구도 진척시켜주는데 중요할 것으로 생각된다.

본 연구의 목적은 HDL의 혈중 농도를 높여줄 수 있는 약물을 천연물에서 찾기 위해 실험동물 혈청중의 HDL를 직접 정량하기 위한 放射免疫分析法(RIA)을 개발하는데 있다. 본 연구의 실험 동물은 사람의 리포단백질과 매우 유사한 것으로 알려져 있는 메추리를 사용하였다.⁶⁾ 본 실험에서 확립한 메추리血清 HDL의 放射免疫分析法는 특이성이 높았으며 0.1~33 μ g/tube 범위내의 감도로 메추리血清 HDL를 分析할 수 있었기에 보고한다.

實驗方法

試藥—Dextrane sulfate (M.W. 40,000)은 Pharmacia(Sweden), cellulose acetate plate는 Bio-rad (U.S.A), Sodium ^{125}I 는 Amersham (U.S.A), goat anti-rabbit IgG serum은 Miles-Yeda (Israel), polyethylene glycol은 Kokusan (Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 試藥은 一級을 사용하였다.

實驗動物—체중 150~200g의 메추리를 시중에서 구입하여 하룻밤 굶긴 후 채혈하였다.

Lipoproteins의 製造—LDL 및 HDL은 Mn^{2+} -dextrane sulfate 沈澱法⁷⁾에 의해 분리하였다. 요약하면 에테르 마취한 메추리의 경동맥으로부터 채혈하고, 50마리의 동물로부터 얻은 혈액을 합하고 4°C에서 2시간 이상 방치하여 혈액이 응고되도록 하였다. 이를 3,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 얻었다. LDL을 침전시키기 위하여 혈청 25ml에 대하여 10% dextrane sulfate 용액 0.125ml, 1M MnCl_2 1.25ml를 가하여 혼합하였다. 원심분리한 후 침전은 LDL의 정제를 위하여 사용하였고 상등액에는 HDL을 침전시키기 위하여 10% dextrane sulfate 1.5ml, 1M MnCl_2 3.7ml를 가하여 혼합하고 생성한 침전을 원심분리하여 취하였다. 다음 조작은 문헌의 방법⁷⁾에 따라 실시하였다. 최종적으로 분리한 LDL 및 HDL은 각각 0.05M phosphate (pH 7.4)-0.01M NaN_3 용액으로 투석한 후 試料로 사용하였다. 단백질의 농도는 280nm에서의 흡광도(Gilford system 2,600 microprocessor controlled UV/vis spectrophotometer)를 측정하여 결정하였다. ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ at 280nm=10)

電氣泳動—전기영동은 cellulose acetate plate (25×76mm) 위에서 0.05M borate 완충액 (pH 8.6)을 사용하여 275V에서 10분간 실시하였다. 脂質의 염색에는 oil red Om 용액, 蛋白質의 염색에는 amido black 10B 용액을 사용하였다.

HDL의 抗體製造—HDL 2mg/ml의 생리 식염수 용액과 동량의 Freund's complete adjuvant를 현탁시킨 후 이 용액 1ml를 체중 2.5kg의 숫컷 토끼 (New Zealand white)에 피하주사하였다.¹³⁾ 위와 같은 용량으로 每 2週마다 2회, 每 3週마다 2회, 총 5회 주사하였다. 마지막 주사 후 10일에 귀동맥으로부터 채혈하고 혈청을 제조하였다. 이 혈청으로부터 황산암모늄 침전법⁸⁾에 의해 HDL의 immunoglobulin 분획을 분리하였다.

HDL의 Radioiodination— ^{125}I 標識 HDL은 Greenwood의 chloramine-T法⁹⁾에 따라 제조하였다. 2mCi의 Na^{125}I 를 0.1M phosphate 완충액 (pH 7.4)으로 희석하였다. 이 용액 10 μl (133 μCi)를 HDL의 0.05M phosphate 완충액 (pH 7.4) 용액 10 μl (42 μg)에 가하여 혼합하고, chloramine-T 수용액 10 μl (10 μg)를 가하여 5분간 반응시키고, sodium metabisulfite 수용액 10 μl (10 μg)을 가하여 반응을 중지시켰다. 쏘조작은 빙수욕에서 실시하였다. 미반응의 방사성 요오드는 전기영동을 실시하여 제거하였다. (Fig. 2) 전기영동후 cellulose acetate판의 HDL부분을 0.01M EDTA, 0.01M NaN_3 및 0.1% bovine serum albumin을 함유한 생리식염액으로 추출하였다. 정제한 ^{125}I 標識 HDL을 4°C에 보관하고 사용시 적절히 희석하여 15,000~20,000cpm/100 μl 가 되도록 하였다.

放射免疫分析法—모든 희석액은 0.01M NaCl 및 0.01M NaN_3 를 함유하는 0.01M phosphate 완충액 (pH 7.4)으로 조제하였다. 분석에 사용한 플라스틱 시험관은 미리 1% gelatin 용액으로 하룻밤 방치하여 coating한 후 사용하였다. [^{125}I] HDL 100 μl (~20,000cpm), 0.042~42 μg 의 HDL 표준품 또는 검액 100 μl , anti-HDL 100 μl 를 차례로 가하여 혼합하고 37°C에서 1시간 incubation한 후, goat anti-rabbit IgG serum¹⁴⁾ (second antibody) (1:10희석) 100 μl 를 가하여 다시 1시간

incubation한 후 20% (w/v) polyethylene glycol 용액 800 μ l를 가하여 혼합하였다. 각 시험관을 3,000rpm에서 30분 이상 원심분리하고 상등액을 aspirator를 이용하여 버린 후 gamma counter (Abbott, model ANSR)로 방사능을 측정하였다. Incubation 시간은 침전 및 재현성이 극대화되도록 선택된 것이다. RIA의 결과는 semilog 눈금의 단백질 농도에 대하여 B/B₀로 표시하였다.

B=cpm in precipitate in presence of unlabeled antigen

B₀=cpm in precipitate without unlabeled antigen

血清中 HDL-콜레스테롤 및 총콜레스테롤의 분석—메추리 血清中の HDL-콜레스테롤 및 총콜레스테롤의含量은 Sigma社의 kit (No. 350-HDL)를 이용하여 측정하였다.¹⁰⁾ LDL(+VLDL)를 Mg²⁺-phosphotungstate로 선택적으로 침전시키고 원심분리하여 제거한 후 가용성인 HDL分劃의 콜레스테롤을 효소에 의하여 측정하였다.¹¹⁾ 총콜레스테롤은 血清을 그대로 試料로 하였다.

實驗結果 및 考察

리포蛋白質의 分離—메추리 血清의 리포蛋白質을 Mn²⁺-dextrane sulfate에 의한 침전법을 이용하여 분리하였다. 低농도의 Mn²⁺ 및 dextrane sulfate에 의해 LDL分劃을 얻었으며 이 分劃을 전기영동하였을 때 2개의 band를 보여주었다. (Fig. 1) 원점의 것은 chylomicrons으로 생각된다. 高농도의 Mn²⁺ 및 dextrane sulfate에 의해 얻어진 HDL은 전기영동 상에서 2개의 band를 보이며 이는 HDL-I (α_2), HDL-II (α_1)로 생각된다.¹²⁾

HDL의 放射性요오드化—[¹²⁵I] HDL은 Chloramine-T法에 의해 제조하였으며 電氣泳動에 의해 정제하였다. (Fig. 2) 放射能 標識 效率은 약 47%이었다. cellulose acetate plate上的 HDL部分의 抽出 效率은 約 92%이었다.

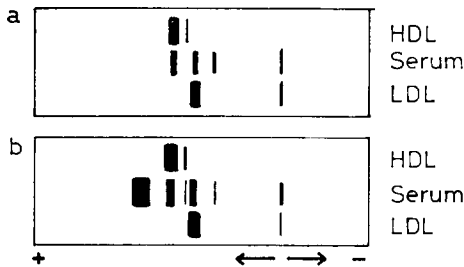


Fig. 1—Electrophorogram of Japanese quail lipoproteins isolated by the dextrane sulfate-Mn²⁺ precipitation method on cellulose acetate plates (25×76mm). Electrophoresis was carried out in 0.05M borate buffer, pH 8.6 at 275 volts for 10min. The bands were developed with oil red Om reagent for lipid staining (a) and amide black 10B reagent for protein staining (b).

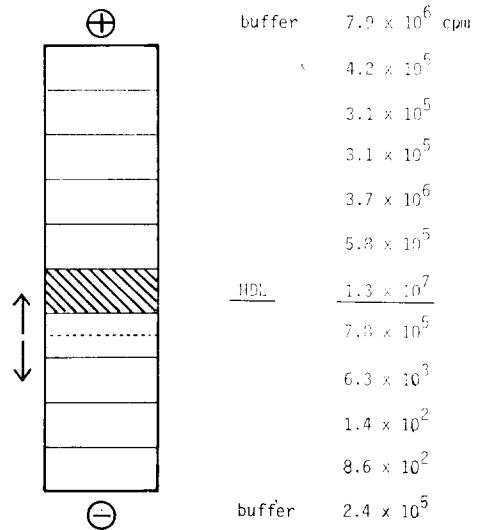


Fig. 2—Purification of radio-iodinated high-density lipoprotein by electrophoresis. The HDL band was scraped off and [¹²⁵I] HDL was extracted with saline containing 0.01M EDTA, 0.01M NaN₃ and 0.1% bovine serum albumin.

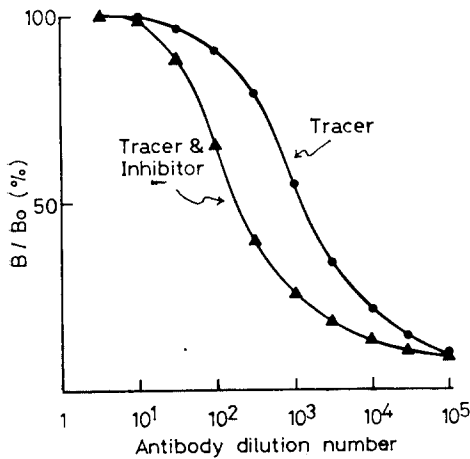


Fig. 3—Antibody dilution curve. All dilutions were made in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.01M NaCl and 0.01M NaN₃. The assay was carried out in plastic test tubes which were precoated with 1% gelatin buffer solution. The following additions were made: 20,000cpm of [¹²⁵I] HDL in 100μl, 100μl of buffer and 100μl of anti-HDL. After 1hr of incubation at 37°C, 100μl of goat anti-rabbit IgG serum(diluted 1:10) was added. After 1hr of further incubation at 37°C, 800μl of 20% (w/v) polyethylene glycol was added. And then the tubes were centrifuged at 3,000rpm over 30min and the supernatants were aspirated out. The tubes were counted in a gamma counter. The curve labelled “tracer and inhibitor” was obtained after addition of cold HDL (0.42μg in 100μl) in place of buffer.

抗體 및 抗原結合—메추리血清 HDL에 對한 토끼의 抗體를 抗血清으로부터 精製하여 IgG分劃으로 얻었다. 이 HDL 抗體에 對한 [¹²⁵I] HDL의 結合能力을 나타낸것이 Fig. 3이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 항체를 10⁻⁵까지 희석하여도 HDL과 結合하였으며 結合曲線은 전형적인 sigmoid 모양을 나타내었다. 이 조건하에서 非標識(cold) HDL 0.42μg을 첨가하였을 때 이 곡선은 왼편으로 이동하였다. HDL의 검량선을 얻기 위한 항체의 농도는 1:500으로 하였다.

또한 HDL의 抗體는 본 실험에서 분리한 LDL分劃 약 320μg 이상에서 교차반응을 나타내었으며 이 양은 HDL의 분석에 하등 영향을 주지 않았다. 메추리 외의 다른 동물의 血清 즉, guinea pig, 흰쥐, 마우스, 토끼의 혈청에 대해서도 메추리의 HDL抗體는 교차반응을 나타내지 않았다.

검량선—[¹²⁵I] HDL의 비표지 HDL에 의한 항체로부터의 치환반응 즉 검량선을 Fig. 4에 나타내었다. 이 검량선은 전형적인 sigmoid 곡선을 나타내었으며 HDL의 양을 약 0.1~33μg 범위내에서 측정할 수 있음을 보여준다.

메추리血清中 HDL의 濃度—메추리 암수 각 11마리로부터 혈청을 얻어 위에서 확립한 방법에 따라 HDL의 농도를 정량하였다. 또한 이들 血清中 總콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 양도 함께 측정하여 Table I에 나타내었다. 이 表에서 보는 바와 같이 HDL의 血清中 含量은 수컷에서 약 470mg/dl, 암컷에서 약 350mg/dl로 측정되어 수컷 對 암컷의 농도비가 약 1.34이었다. HDL-콜레스테롤의 血清中 농도에 있어서는 수컷 對 암컷의 비가 약 1.09로 HDL 농도비와 큰 차이를 보여주었다.

Table I—Contents of HDL and cholesterol in Japanese quail serum (n=11)

	HDL (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	
		HDL	total
male	470.6±59.4	58.9±14.0	134.1±21.5
female	349.6±41.7	54.2±14.3	118.5±13.2

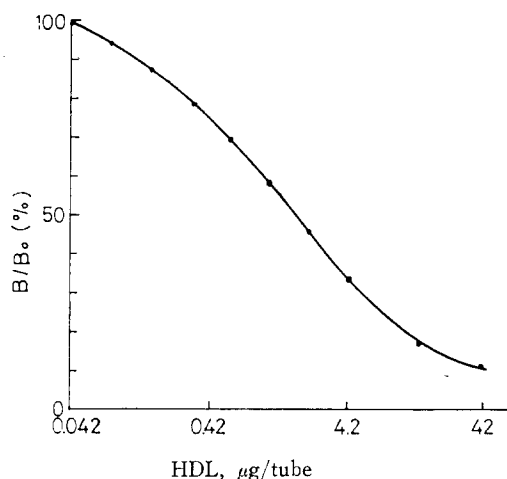


Fig. 4—Calibration curve. 20,000cpm of [125 I] HDL in 100 μ l and 100 μ l of anti-HDL (1:500) were incubated with 0.042 to 42 μ g of standard HDL. The following procedures were performed as described in Fig. 3.

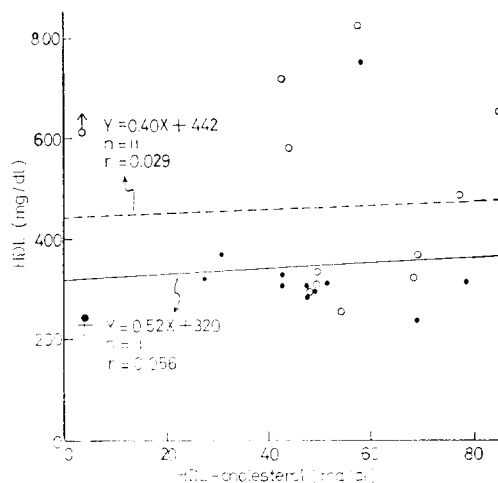


Fig. 5—Correlation between radioimmunoassay of HDL and enzyme assay of HDL-cholesterol.

메추리血清중의 HDL—콜레스테롤의 농도에 대한 HDL의 농도를 각각 plot하여 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 HDL—콜레스테롤의 血清中 농도와 HDL의 血清中 농도와 사이에는 거의 상관관계가 없었다(상관계수; 수컷 $r=0.029$, 암컷 $r=0.056$). 이 결과는 HDL의 콜레스테롤의 양을 측정함으로써 간접적으로 HDL의 양을 환산하는 방법은 타당하지 않음을 나타낸다.

結 論

메추리血清의 高比重리포蛋白質(HDL)에 對한 二重抗體 放射免疫分析法을 開發하였다.

1. HDL은 dextrane sulfate- Mn^{2+} 침전법에 의해 분리하였고 HDL의 一次抗體는 토끼에서 얻고, 토끼 IgG에 대한 염소의 二次抗體를 利用하였다.
2. [125 I] HDL은 chloramine-T법에 의해 제조하였고 電氣泳動에 의해 精製하였다.
3. 본 分析法은 特異性이 높았으며 HDL의 測定범위는 0.1~30 μ g/tube이었다.
4. 본 分析法으로 測定한 메추리 HDL의 血清中 濃도와 酵素法에 의해 測定한 HDL—콜레스테롤의 血清中 濃도와 사이에는 相關關係가 거의 없었으므로 HDL中 콜레스테롤을 測定함으로써 간접적으로 HDL의 양을 환산하는 方法은 타당하지 않음을 알 수 있었다.

文 獻

1. P. Nilsson-Ehle, A.S. Garfinkel and M.C. Schotz, Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism, *Ann. Rev. Biochem.* 49, 667 (1980).
2. M.S. Brown and J.L. Goldstein, Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Ann. Rev. Biochem.* 52, 223 (1983).
3. G.G. Rhoads, C.L. Gulbrandsen and A. Kagen, Serum lipoproteins and coronary heart disease in a *J. Pharm. Soc. Korea*

- population of Hawaii Japanese men, *N. Engl. J. Med.* **19**, 293 (1976).
4. T. Gordon, W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel and T.R. Dawber, High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, *Am. J. Med.* **62**, 707 (1977).
 5. J.L. Goldstein and M.S. Brown, Biochemical aspects of atherosclerosis, *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 897 (1977).
 6. G.L. Mills and C.E. Taylaur, The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals, *Comp. Biochem. Physiol.* **40B**, 489 (1971).
 7. M. Burstein and H.R. Scholnik, *Advances in lipid research*, Academic Press, N.Y., **11**, 67 (1972).
 8. F.E. Kendall, *J. Clin. Invest.* **16**, 921 (1937); A. Nowotny, Basic exercises in immunochemistry, Springer-Verlag, 2nd ed, 1 (1979).
 9. F.C. Greenwood, W.M. Hunter and J.S. Glover, *J. Biochem.* **89**, 114 (1963); P.J. McConahey and F.J. Dixon, Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. *Methods in Enzymology*, **70**, 210 (1980).
 10. M.A. Pesce and S.H. Bodourian, Enzymatic measurement of cholesterol in serum with the centrifichem centrifugal analyzer. *Chin. Chem.* **23**, 280 (1977); **23**, 757 (1977).
 11. M.F. Lopes-Virella, P. Stone, S. Ellis and J.A. Colwell, Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods, *Clin. Chem.* **23**(5), 882 (1979).
 12. R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, T.P. Bersot and T.L. Innerarity, Effects of cholesterol feeding on human and animal high density lipoprotein, *High Density Lipoproteins and Atherosclerosis*, Elsevier, North-Holland, 149 (1978).
 13. M. Landy and A.G. Johnson, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**, 57 (1955); A. Nowotny, Antibody production, *Basic Exercises in Immunochemistry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg NewYork, 211 (1979).
 14. A.R. Midgley, Jr. and M.R. Hepburn, Use of the double-antibody method to separate antibody bound from free ligand in radioimmunoassay, *Methods in Enzymology* **70**, 266 (1980).