

Apo E 유전자 변이형이 혈청지질 및 유리아미노산 농도에 미치는 영향

이명숙[†] · 박태선*

성신여자대학교 식품영양학과
*연세대학교 식품영양학과

Effects of Apo E Polymorphism on the Plasma Lipid Profiles and Free Amino Acids in Korean Women

Myoung-Sook Lee[†] and Tae-Sun Park*

Dept. of Food and Nutrition, Sungshin women's University, Seoul 136-742, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract

Apo E polymorphism(e2, e3, e4) was among the first reported genetic polymorphism that explained part of the normal variation in plasma cholesterol concentrations. Among 62 normolipidemic healthy females, aged 19 up to 22 years, the relative frequencies of E3/3 was 0.806(n=50), E3/2 was 0.081(n=5), E3/4 allele was 0.113(n=7), and no E2/2, E2/4 and E4/4 were found. Based on the five samples of E2 allele, five subjects were randomly selected by E3 and E4 groups for the study of effects of apo E polymorphism on the distribution of serum lipid and amino acids profiles. No differences in the anthropometric data among apo E isomers were found, otherwise the pulsation was higher in E4 than that in the others. There were no differences in plasma total HDL-, HDL₃-, HDL₂ & LDL cholesterol, and apo A-I concentrations. However, phenotype means significantly rank E2>E3>E4 allele in average TG levels(p=0.014), and rank E4>E3>E2 in total cholesterol levels(p=0.011). Atherogenic index(AI) such as β -lipoproteins was significantly increased in E2 & E4 than that in E3(p=0.045). Subjects with E3/2 allele had significantly higher concentrations of glutamine, phosphoserine and taurine, while subjects with E3/4 allele showed significantly lower concentrations of arginine and α -aminobutyrate and elevated level of phosphoserine in plasma compared to those of E3/3 allele. Higher level of plasma taurine in subjects with E3/2 or E3/4 allele appears to be related to the elevated level of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations compared to those of E3/3 allele.

Key words: apo E polymorphism, cholesterol, LDL(B/E) or E receptors, amino acid metabolism

서론

Apo E는 지단백질인 chylomicron, chylomicron remnants, very low density lipoprotein(VLDL), high density lipoprotein(HDL₁) 혹은 HDLc의 구성요소로서 LDL 수용체와 apo E 수용체(LDL receptor-related protein, LRP) 모두와의 결합을 매개한다(1,2). Apo E 유전자의 다형성(polymorphism)은 299개의 아미노산 중 112번과 158번의 서열 차이로 인해 표현형이 E2, E3, E4로 나뉘어지며 E4와 E2의 변이형은 고지혈증의 유전적 원인으로 알려짐으로써 다형성과 질병과의 연구가 활발해지고 있다.

Apo E4형은 arginine이, E2형은 cysteine이 112와 158번에 위치한 반면, E3는 112번에 cysteine이, 158번에 arginine이 위치하여 다형성간의 전위차가 발생한다. 이로 인하여 LDL or E 수용체의 결합 영역(binding domain)에 대한 결합력이 변화되어 그 결과 혈청지질 제거율이 달라진다. E2형은 혈청 중성지방의 제거율이 낮아 높은 중성지방수준을 보이며 LDL 수용체 합성의 up-regulation으로 인하여 혈중 콜레스테롤이 전반적으로 낮아진다. E4형은 E2형보다 결합력이 약간 상승하여 지질 분해율이 높아지지만 LDL 수용체 합성의 down-regulation으로 혈중 콜레스테롤과 LDL이 높은 고지혈증을 초래한다(3-5). 따라서 지질대사 이상으로

[†]To whom all correspondence should be addressed

발생하는 모든 질병, 즉 심근경색, 관상선 혈관질환, 뇌졸중, 당뇨병, 비만 등의 유병률을 설명할 수 있는 진단적 근거으로써 apo E 유전자의 변이형을 이용하고자 하는 노력이 시도되고 있다(3,5,6). 특히, 최근 비만과 노화 현상이 type III 고지혈증(dysbeta lipoproteinemia)을 조장한다는 연구논문이 발표되면서 apo E 유전자의 변이형과 성인병과의 상관관계에 관심이 주목되고 있다(6,7).

혈장의 유리아미노산 함량은 체내 총 유리아미노산 pool의 약 1% 정도의 소량이지만, 정상인의 경우 공복 시 혈장 유리아미노산(plasma amino acid: PAA) 농도는 혈장으로 유입 및 유출되는 양과의 균형에 의해 일정한 수준을 유지하고 있으며, 다양한 종류의 포유류에 있어서도 유사한 패턴을 보이고 있다(8,9). 일반적으로 PAA농도는 식이 성분에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 그 예로 아미노산이 불균형된 식사를 섭취하게 되면 흡수될 때 제한 아미노산 농도가 혈장에서 급격히 저하되고 특정 아미노산이 제한된 식이를 장기간 섭취할 경우에도 혈장의 특정 아미노산의 농도가 저하되는 패턴을 나타낸다(10). 따라서 단백질 식품의 질을 평가하는 도구로 PAA 패턴이 사용되기도 한다. 60년대의 초기 연구에 의하면 Holt 등(11)과 Whitehead와 Dean(12)은 kwashiorkor와 같은 극심한 단백질영양 불량시 정상 식이를 섭취하는 경우에 비해 혈장의 valine, leucine, threonine, isoleucine, tryptophan 및 arginine과 같은 필수아미노산 농도는 현저히 감소하는 반면, serine, proline, glycine 및 histidine과 같은 불필수아미노산의 농도는 오히려 증가하는 특징적인 PAA를 나타냄을 보고한 바 있다. 그 외에도 선천성 아미노산 대사질환(13)을 포함하여 급만성 신장질환(14), 간질환(15), 암(16) 및 외상(17)이 있는 경우 PAA 패턴에 각기 특징적인 변화가 초래되고, 따라서 PAA는 이러한 질병의 진단에 이용되기도 한다.

최근 일련의 연구결과에 의하면 카제인과 같은 동물성 단백질은 대두 단백질에 비해 혈장 콜레스테롤 농도를 높이는 효과가 있으며, 이와 같은 카제인의 혈중 콜레스테롤 상승효과는 주로 카제인과 비교되는 대두단백질의 아미노산 조성의 차이에 기인된 것임이 밝혀진 바 있다(18-21). 혈중 콜레스테롤 농도에 영향을 미치는 아미노산 종류를 규명하기 위하여 그 동안 여러 연구들이 진행된 바 있으며, 그 결과 lysine, methionine과 leucine 등은 혈중 콜레스테롤 농도를 상승시키는 효과가 있는 반면(20,21), arginine(22), glycine(23), cystine과 taurine(23-26)은 혈장 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과가 있음이 밝혀졌다.

이와 같이 정상 혹은 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 실험동물에서도 혈중 콜레스테롤을 낮추는 아미노산의 연구는 다양하게 시도되었으나 그 기전에 관한 연구는 분명하지 않다. 따라서 본 연구에서는 apo E 유전자 다형성의 변이형이 지질대사에 미치는 영향에 관한 확실한 기전을 배경으로 고콜레스테롤혈증에 영향을 미치는 아미노산과 apo E와의 관련성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

대상 및 실험계획

대상 선별작업은 성신여자대학교 재학생을 대상으로 본 연구의 취지를 홍보한 결과 1차로 실시된 체질 및 신체 계측에 응한 대상자 105명중 질병의 가족력, 피임약, steroids계 치료제 등의 약물 장기 복용자, 흡연, 알코올 등을 조사하여 62명의 정상인을 최종 대상자로 하였다. 단, apo E 유전자 다형성 분석을 기초로 변이형인 E2와 E4 allele의 상대적 빈도수가 적기 때문에 apo E3 allele 대상자 수를 E2와 E4와 동일하도록 무작위로 조정하였다. 신체계측은 anthropometry 방법으로 체중(wt), 키(ht), 체격지수(BMI), 허리-엉덩이둘레 비율(WHR), 허리-대퇴둘레 비율(WTR) 및 혈압과 맥박을 측정하였다. 체구성 성분 분석으로는 caliper와 bioelectric impedance assay(BIA) 방법을 이용하여 % fat, % LBM 분석자료를 비교 검토하였다. 혈액 생화학 검사로는 total-, HDL-, & LDL-cholesterol, 중성지방, apo B-100, apo A-I, β -lipoproteins, apo E 유전자 다형성과 유리아미노산 분석을 시행하였다.

Anthropometry(체격지수 측정) 및 체지방(% fat) 산출

인체의 계측항목 키, 몸무게, 가슴둘레, 상완둘레, 허리둘레, 대퇴둘레, 엉덩이둘레를 측정하여 BMI[BMI=(Wt/Ht²)*10⁴], WHR(waist to hip ratio), WTR(waist to thigh ratio)로 나타낸다. 피지후의 측정법은 obesity skinfold thickness방법(ST method)으로써 동일한 숙련자가 Langer caliper를 사용하여 triceps과 subscapular를 2번 이상 측정된 평균치를 사용한다. % fat은 오차계수가 2% 이하로 가장 적으며, 비만인에게는 적합한 BIA법(Bioelectrical Impedance Assay)을 이용하였다(27). % fat에 의한 비만판정은 Huenemann과 Buskirk의 판정기준에 따라 25% 이상인 자로 한다(28). Total fat은 체중의 %fat으로 환산하고 체중에서 total fat을 제외하여 LBM(lean body mass)로 표시하였다. TBW

(total body water)는 LBM의 73%로 계산하였다.

혈중 지질농도측정

혈액은 12시간 공복상태를 유지시킨 후 10ml 정도 채취하며 표준방법으로 혈청을 분리한 후 혈액 분석자료로 -70°C 에 보관하는데 리포단백질 분석을 위한 혈액은 냉동보관하지 않고 신선하게 사용하였다. 총 콜레스테롤과 중성지방은 Sigma Co.의 total cholesterol (TC) kits(#334)와 triglycerol(TG) kits(#339)을 이용하여 효소법으로 분석하였다(29,30). 총 HDL cholesterol은 dextran sulfate-Mg침전법으로 VLDL과 LDL을 침전시키고 상층의 HDL 부분에서 cholesterol을 효소법으로 분석한다(31). LDL cholesterol은 Friedewald 공식을 사용하여 계산하였다(32). Apo A-I과 B-100는 radial immunodiffusion assay(RIA) kits(Tago, Burlington, CA)를 이용하여 분석하였다. 동맥경화 지수(AI: atherogenic index)로는 $(\text{TC}-\text{HDL})/\text{HDL}$, $\text{HDL}_3/\text{HDL}_2$, apo B/A, β -lipoprotein을 이용하였다. β -Lipoproteins는 효소법에 의한 National Chemicals kits(#15110, Japan)와 standards(β -lipoproteins 900mg/dl)을 이용하여 흡광도 505nm에서 측정하였다.

Apo E 유전자의 다형성 분석

Apo E 유전자의 다형성은 isoelectric focusing(IEF) 기술을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용된 방법은 미국 Pittsburgh 대학의 Dr. Kamboh와 Dr. Ferrell에 의한 방법을 실험 조건에 맞게 약간 수정하였다(33, 34). 이 방법은 적은 양의 혈청이나 혈장을 이용할 수 있고 전처리과정도 간단하여 널리 보급될 수 있는 기술이다. 5% PAGE-3M urea gel을 만들어 IEF gel로 사용하고 1000volts, 150mA에서 20분 동안 prefocusing한 다음 동일 양의 시료가 점적된 사각 paper를 음극전극 쪽으로 고정시킨 후, 1500 V, 150 mA, 10 W 조건에서 30분 혹은 1시간 가량 gel을 처리(run)하였다. IEF gel은 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 immunoblotting하여 착색은 boric acid와 fast blue BB를 이용하였다. E2/3, E2/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/2, 6형의 phenotypes에 대한 표준혈청(standard)은 Pittsburgh 대학으로부터 받은 혈청을 이용하였다.

유리아미노산 농도 측정

혈청 유리아미노산 농도를 측정하기 위해 1.5ml tube에 시료 100 μ l를 취하고, 1mM norleucine, 20 μ l과 10% sulfosalicylic acid 용액 25 μ l를 첨가하여 mixing한 후

4°C 에서 1시간 동안 방치하였다. 12,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 제거시킨 후 상층액을 깨끗한 tube에 옮기고, 아미노산 농도 분석전에 0.2 μ m filter (Gelman aerodisc LC PVDF)로 여과하였다. 아미노산 농도의 분석은 ion-exchange chromatography에 입각한 아미노산 전용 분석기(Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 실시하였다(35). 이동상으로는 lithium citrate buffer를 농도와 pH를 단계적으로 올라가며 사용하였다(0.20M, pH 2.80; 0.30M, pH 3.00; 0.50M, pH 3.15; 0.90M, pH 3.50; 1.65M, pH 3.55). Lithium high performance ion-exchange column으로부터 각 유리아미노산을 분리시킨 후, ninhydrin과 반응시켜 570nm와 440nm에서 흡광도를 측정하였다. Column의 온도는 47°C , 이동상의 유속은 0.45ml/min로 조정하였으며, 아미노산의 분리가 완료되고 column의 세척 및 regeneration을 거쳐 다음 시료가 주입되기까지는 총 152분이 소요되었다. 동일 시료에 대한 반복측정의 오차계수는 5%미만이었으며, internal standard(norleucine)를 사용함으로써 시료의 전처리와 분석과정에서 발생하는 오차를 보정하였다.

결과 및 고찰

조사 대상자의 특성 및 apo E phenotypes의 상대 빈도수

조사대상자들의 평균 연령 분포는 22.4 ± 1.2 세였다. 평균신장과 체중은 각각 $161.01 \pm 5.59\text{cm}$, $53.94 \pm 6.19\text{kg}$ 로서 한국인 영양권장량의 평균신장 159.5cm, 체중 52.5kg과 거의 비슷한 수준이었다(36). Apo E 유전자의 다형성의 상대 빈도수는 3/3가 0.806, E3/2가 0.087, E3/4가 0.113이고 E2/2, E4/4, E2/4형은 나타나지 않았다. 일반적인 인구 집단 중 대략 60% 이상이 E3/3이고 1~2%는 E2/2이며 2~5%가 E4/4, 나머지는 E4/3, E4/2, E3/2 heterozygote임이 알려졌다는데, 한국인 정상 여성의 상대 분포도 크게 벗어나지 않았다. 중국인 혹은 일본인들의 E3 isoform의 상대 빈도수가 0.82와 0.85로서 구인의 0.79보다 유의적으로 높은 반면, E2 allele는 중국인에서 0.064로 유의적으로 낮은 확률을 보였다(2,3) 한국인을 대상으로 한 연구에서도 2/2와 4/4가 상대적으로 낮은 것은 중국인 일본인과 같은 결과로서 매우 유사함을 알 수 있다(1,5) 이는 한국인에게는 CVD 위험 확률이 낮음을 간접적으로 시사하는 중요한 의미를 지닌다. 즉, Helsinki Study에서와 같이 핀란드인에서는 서구인보다 E4 allele가 50% 가량 높게 나타났는

데, CVD 위험 확률이 일본인과 중국인에 비해서 아주 높아 apo E 유전자의 변이형과 CVD간의 정의 상관관계가 있었다.

따라서 상대적 빈도수가 가장 적은 E2 allele의 대상자수 5명을 기준으로 군간의 대상자를 동일하게 하도록 무작위로 E4와 E3군에 5명씩 배정하였다. 이는 혈청 분석의 경제성도 고려되어진 실험계획이다. 세 군간의 인체계측의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 맥박수에서 E2군이 E3과 E4군에 비하여 유의적으로 낮았다($p=0.013$). 세 군간의 인체계측간의 차이를 보이지 않은 것은 세 군간의 혈청 생화학적 분석간의 차이가 있을 경우 순수한 apo E allele의 영향이라고 볼 수 있었다 (Table 1). 그러나, 삼두박근과 견갑골의 지방분포는 인체 총 지방량과 정의 상관관계($r>0.56$)를 보였으며 혈중 total HDL cholesterol과 부의 상관관계($r<-0.45$)를 보여주었다. 또한 WHR은 BMI, total & LDL cholesterol, apo B-100, β -lipoproteins, HDL₂ cholesterol과 정의 상관 관계를 나타내었다.

Apo E isoforms과 혈중 지질 수준의 변화

Apo E allele군간의 혈중 지질 수준에서는 Table 2에서와 같이 total cholesterol($p=0.011$), TG($p=0.014$), Apo B-100($p=0.047$), β -lipoproteins($p=0.045$)에서 유의적인 차이를 보였다. E2 allele군에서 E3보다 total chole-

Table 1. Mean values of anthropometric data according to apo E isoforms

	$\epsilon 3$ allele (n=5)	$\epsilon 2$ allele (n=5)	$\epsilon 4$ allele (n=5)
Age	20.00 \pm 1.00	21.20 \pm 20.17	22.00 \pm 3.39
BMI ¹⁾	22.51 \pm 1.07	23.09 \pm 1.41	22.31 \pm 4.83
WHR ²⁾	0.73 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02	0.75 \pm 0.02
WTR ³⁾	1.32 \pm 0.10	1.38 \pm 0.09	1.41 \pm 0.09
Triceps ⁴⁾	22.70 \pm 5.73	22.86 \pm 4.32	19.80 \pm 4.56
Subscapular ⁴⁾	14.36 \pm 2.67	16.30 \pm 3.15	12.62 \pm 4.26
% Fat ⁵⁾	25.32 \pm 3.94	25.04 \pm 1.58	25.06 \pm 5.46
% LBM ⁵⁾	42.24 \pm 4.92	46.98 \pm 4.77	43.12 \pm 6.79
SBP	108.20 \pm 6.83	111.40 \pm 11.35	114.40 \pm 11.59
DBP	73.40 \pm 5.27	74.20 \pm 11.65	73.60 \pm 7.20
Pulsation ⁶⁾	83.40 \pm 9.34	75.60 \pm 17.21	94.20 \pm 17.41

Values are mean \pm SD.

¹⁾BMI (body mass index)=kg/m²

²⁾WHR=waist to hip ratio

³⁾WTR=waist to thigh ratio

⁴⁾Body composition measurement using the caliper

⁵⁾Body composition measurement using the BIA(LBM=lean body mass)

⁶⁾Significantly different between $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ allele by the Student's t-test at $p<0.05$.

sterol이 낮고 TG가 유의적으로 높아서 전형적인 apo E 다형성에서 나타나는 지질대사를 보여주고 있다. 그러나, 일반적으로 apo E allele에서 혈중 총 콜레스테롤과 같은 경향을 보이는 LDL 콜레스테롤은 세 군간의 차이를 보이지 않았지만 E4군이 E3과 E2군보다 높은 수치를 보이고 있으며($p=0.037$) LDL의 유일한 아포 지단백질인 apo B-100수치에서도 유사한 결과를 보였다. 이는 E4형이 E2형보다 LDL receptor 결합능이 상승되어 TG가 풍부한 지단백질들의 흡수 제거율이 상승되고 혈중 콜레스테롤 부주의 보상 효과로써 LDL 수용체의 down-regulation이 형성되어 혈중 LDL 제거율이 낮아져서 혈중 LDL 상승이 일어나는 type IV or type V 고지혈증현상을 일으킨다. 이와 같이 E4형은 고콜레스테롤증의 원인이 되는 반면 E2는 반대의 대사과정으로 고 중성지질 혈중(Type III)의 원인이 된다(37-39).

그 외 지질 수준은 세 군간에 차이를 보이지 않았으나, 두 군간의 차이를 보여주는 것도 있다. 즉 total HDL과 HDL₂는 차이가 없으나, HDL₃는 정상형인 E3보다 변이형인 E2와 E4에서 높게 나타났다($p=0.048$). 본 연구의 HDL 콜레스테롤의 결과는 Utermann(3)과 Lenzen(40) 다수의 연구 결과와 같이 HDL 콜레스테롤은 apo E 유전자 다형성과 상관 관계가 없다는 보고와 일치하였다. 그러나, Lee의 연구에서는 HDL₃와 HDL₂ fraction에서는 E2와 E3에서 유의적으로 차이를 보이는데 E2가 E3보다 HDL₃가 높게($p<0.05$), HDL₂는 낮게 나타났다(41)($p<0.05$). HDL₃/HDL₂ ratio에서도 E2가 E3보다 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 결과적으로 total HDL의 결과보다는 HDL₃와 HDL₂ 비율이 apo E 변이형과 관련된 것으로 보여지는데 고지방식이 시 역콜레스테롤 운반기전(reverse cholesterol transport mechanism)에서 전이되어 간의 E receptor의 결합능을 상승시키는 기전과 관련있는 것으로 보인다.

동맥경화지수에서도 세 군간의 차이는 β -lipoproteins수준이 apo E 변이형에서 유의적으로 높았다. 비록 세 군간의 차이는 보이지 않으나, apo B/A는 변이형 E4와 E2에서 E3보다 높고($p<0.05$) HDL₃/HDL₂는 E2이 E4와 E2보다 유의적으로 높았다($p<0.05$). 또한 total-, LDL-, TG는 total HDL, HDL₂ 및 apo B/A와 정의상관관계를 보여주며, HDL₃ 및 apo A/B와 부의 상관관계를 보여주었다($p<0.05$).

Apo E isoforms과 혈청 유리아미노산 농도

ApoE 유전자 변이형인 E2와 E4형 및 정상형인 E3형의 공복시 혈청 유리아미노산 농도가 Table 3과 Fig. 1에 제시된 것과 같다. 우선 혈장의 각 유리아미노산 중

Table 2. Serum lipid profiles and atherogenic indices according to apo E isoforms

	$\epsilon 3$ allele(n=5)	$\epsilon 2$ allele(n=5)	$\epsilon 4$ allele(n=5)
Cholesterol(mg/dl)			
Total	149.81 \pm 30.02 ¹⁾	191.95 \pm 21.74 ^{*2)}	207.31 \pm 24.94 ^{**2)}
T-HDL	43.41 \pm 6.63	47.68 \pm 10.78	48.74 \pm 26.23
HDL ₃	27.66 \pm 5.04	34.64 \pm 13.40	42.50 \pm 11.66*
HDL ₂	15.75 \pm 7.09	13.05 \pm 15.33	6.24 \pm 21.93
LDL	92.98 \pm 29.74	113.59 \pm 26.25	141.09 \pm 29.57*
TG(mg/dl)	67.07 \pm 14.59	153.37 \pm 52.16*	87.44 \pm 44.94
Apolipoprotein(mg/dl)			
Apo A-1	170.80 \pm 14.87	178.60 \pm 26.63	186.80 \pm 27.35
Apo B-100	65.00 \pm 10.23	96.88 \pm 23.47*	95.54 \pm 23.75*
AI			
(TC-HDL)/HDL	2.47 \pm 0.67	3.22 \pm 1.13	4.33 \pm 3.20
HDL ₃ /HDL ₂	2.42 \pm 2.03	5.97 \pm 4.02	1.28 \pm 5.54
Apo B/A	0.38 \pm 0.04	0.56 \pm 0.20	0.52 \pm 0.14
β -lipoprotein(mg/dl)	972.3 \pm 301.6	1332.0 \pm 188.6*	1717.0 \pm 621.7*

¹⁾Values are mean \pm SD.

²⁾Significantly different from the $\epsilon 3$ allele by the Student's t-test at *p<0.05 or **p<0.01.

가장 농도가 높은 아미노산을 왼쪽에 위치시키고 농도 순서대로 오른쪽으로 배열시켜 정렬한 혈장 아미노그램(plasma aminogram)을 살펴보면 E3의 경우 glutamine 농도가 803 \pm 63 μ mol/L로 가장 높았고, 그 다음이 alanine, glycine, sarcosine, valine, lysine과 serine의 순으로 나타났으며, α -aminobutyrate, aspartate, phosphoethanolamine, homocysteine, α -aminoadipate, phosphoserine은 9~49 μ mol/L 범위의 비교적 낮은 농도로 존재하였다.

아미노산의 이화과정에서 생성된 암모니아를 glutamate에 결합시킴으로써 일시적으로 혈중 암모니아 농도를 조절해주는 역할을 담당하는 glutamine은 인체의 혈장 및 골격근에서 발견되는 유리아미노산 중 가장 고농도로 존재하며, 최근에는 소장기능의 유지 및 nucleotide 전구체로서의 기능을 비롯한 다양한 생리활성이 밝혀지면서 조건적 필수성이 제기되기도 하였다(42, 43). Branched-chain 아미노산 중에서는 valine의 농도

가 가장 높아서 279 \pm 64.1 μ mol/L이었고, 그 다음이 leucine(131 \pm 9.9 μ mol/L)과 isoleucine(70.8 \pm 10.0 μ mol/L)의 순으로 농도가 높았다.

단백질 합성에 관여하는 20가지 아미노산 중에서는 methionine(65.4 \pm 48.4 μ mol/L)에 이어 aspartate의 농도가 43.2 \pm 8.3 μ mol/L로 가장 낮았다. 이와 같은 공복 시 혈청 PAA 패턴은 박 등(44)과 다른 연구자에 의해 보고된 정상인의 혈장 아미노그램 패턴과 일치하고 있다(11,45).

Apo E 유전자형에 따른 혈청 유리아미노산 농도는 극히 일부 아미노산을 제외하고는 군간에 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 혈장 아미노그램도 매우 유사한 패턴을 보였다. E2 변이형의 경우 정상형에 비해 glutamine, phosphoserine과 taurine 농도가 각기 20%, 147% 그리고 67% 유의적으로 증가한 것(p<0.05)을 제외하고는 기타 혈장 유리아미노산 농도에 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 한편, E4 변이형의 경우에는 정상형에 비해 arginine과 α -aminobutyrate 농도가 각기 20%(p<0.05) 및 44%(p<0.01) 유의적으로 감소한 반면, phosphoserine 농도는 133% 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 혈청의 taurine 농도는 E2형에서와 마찬가지로 E4형에서도 정상형에 비해 72%의 증가를 보였으나, 표준편차가 큰 관계로 정상형과 E4형간에 통계적 유의성은 나타나지 않았다(p=0.072).

Apo E 유전자 변이형에 따른 혈장 유리아미노산 농도 변화에 관한 연구는 현재까지 보고된 바가 없고, 따라서 본 연구결과와 직접적인 비교를 할 수 없는 것이 아쉽다. 최근 인체실험에서 taurine 보강이 혈중 콜레스테롤 저하효과가 있음을 밝힌 연구결과가 있는데 이는

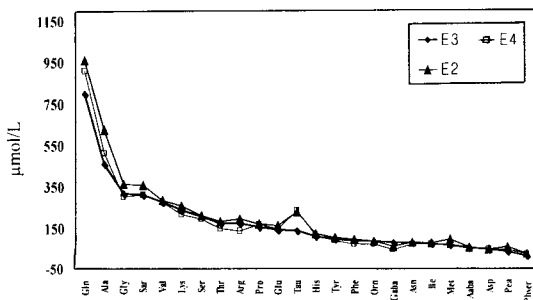


Fig. 1. Plasma aminogram of human subjects with apo E polymorphism.

Table 3. Serum free amino acid concentrations of human subjects with apo E polymorphism (μmole/L)

	ε3 allele(n=5)	ε2 allele(n=5)	ε4 allele(n=5)
EAA			
Arginine	174 ± 22.2 ¹⁾	195 ± 63.1	139 ± 14.6 ^{*2)}
Histidine	112 ± 11.3	124 ± 21.4	117 ± 18.2
Isoleucine	70.8 ± 10.0	76.9 ± 10.7	75.6 ± 11.5
Leucine	131 ± 9.9	75.6 ± 11.5	140 ± 26.9
Lysine	243 ± 19.7	259 ± 67.7	221 ± 42.3
Methionine	65.4 ± 48.4	96.7 ± 35.6	62.5 ± 42.7
Phenylalanine	88.7 ± 10.4	94.9 ± 18.2	71.7 ± 35.2
Threonine	176 ± 34.3	183 ± 40.8	152 ± 39.8
Valine	279 ± 64.1	288 ± 95.0	278 ± 43.0
NEAA			
Alanine	463 ± 60.8	628 ± 165	515 ± 170
α-aminoadipate	13.4 ± 3.8	16.7 ± 6.9	27.7 ± 6.6
α-aminobutyrate	49.0 ± 17.1	53.3 ± 16.7	47.1 ± 9.9
Asparagine	78.4 ± 10.8	82.3 ± 13.7	72.4 ± 10.9
Aspartate	43.2 ± 8.3	45.2 ± 8.1	45.4 ± 14.7
γ-aminobutyrate	80.4 ± 17.8	59.5 ± 12.7	45.5 ± 6.0 ^{**2)}
Citrulline	110 ± 16.2	110 ± 17.8	127 ± 33.3
Glutamate	142 ± 21.8	164 ± 4.7	146.3 ± 22.6
Glutamine	803 ± 63.0	963 ± 116*	912 ± 165
Glycine	322 ± 30.7	366 ± 54.9	305 ± 41.3
Homocysteine	13.9 ± 2.4	14.7 ± 3.5	14.4 ± 2.3
Ornithine	87.7 ± 8.4	86.2 ± 24.5	70.7 ± 28.5
Phosphoethanolamine	33.2 ± 27.0	57.5 ± 8.4	43.4 ± 5.6
Phosphoserine	9.4 ± 7.2	23.3 ± 9.9*	21.2 ± 6.8*
Proline	157 ± 43.3	171 ± 34.0	170 ± 44.5
Sarcosine	314 ± 61.7	361 ± 64.7	316 ± 33.0
Serine	208 ± 21.1	215 ± 40.4	196 ± 36.9
Taurine	138 ± 55.1	230 ± 68.1*	235 ± 82.8
Tyrosine	96.0 ± 13.0	105 ± 23	91.0 ± 13.1

¹⁾Values are mean ± SD

²⁾Significantly different from the ε3 allele by the Student's t-test at *p<0.05 or **p<0.01.

간의 담즙생성 증가에 따라 혈중 콜레스테롤이 감소한 것으로 보인다(46). 그러나, 모든 군에서 혈장의 taurine 농도는 혈장 총콜레스테롤 및 LDL콜레스테롤 농도와 양의 상관관계(p<0.05)를 나타내고 있었다. 이는 증가된 혈중 LDL을 제거하기 위한 콜레스테롤 항상성 조절 기작에 따라 담즙산 생성이 증가되고 궁극적으로 혈액 및 간에서의 taurine pool 크기가 증가하는 것으로 풀이된다. 따라서 차후 연구로써 taurine 식이 투여량에 따른 인체의 혈중 콜레스테롤 kinetic 연구가 필요하다고 본다. 본 연구에서도 apo E 유전자 정상형에 비해 혈장 총콜레스테롤 및 LDL콜레스테롤 농도가 유의적으로 증가한 E2 및 E4 변이형에서 혈장 타우린 농도가 67~72% 증가한 것으로 위의 연구의 결과와 일치하고 있었다. 특히, taurine 농도가 E2에서 유의적으로 증가하였는데, 이는 E2 allele의 LDL up-regulation 대사에 따라 담즙산 생성이 증가하였고 궁극적으로 혈액 및 간에서의 타우린 pool이 증가하였기 때문인 것으로 해석된다.

또한 E2 및 E4형에서 공통적으로 정상형에 비해 phosphoserine 농도가 133~147% 더 높게 나타나 혈청에 존재하는 개별 유리아미노산 중에서 가장 큰 변화폭을 나타내고 있었다. 단백질을 구성하는 serine residue의 phosphorylation 정도는 다양한 대사 효소들의 활성을 조절하는데 주요한 역할을 담당하고 있으나, 단백질 serine residue의 phosphorylation 정도와 혈중 phosphoserine 농도와의 연관성에 관하여는 아직까지 미지수이다.

한편, 최근 동맥경화증 및 심혈관질환의 위험요인으로 지적된 혈중 homocysteine 농도는 본 연구결과 apo E 유전자형에 상관없이 일정한 수준을 나타내고 있었는데, 이것은 본 연구가 건강한 성인을 대상으로 apo E 유전자형을 선별하였기 때문인 것으로 생각된다(47). 즉, homocysteine이 심혈관질환의 지표로 사용되나 본 연구에서 apo E 유전자 다형성에 따른 지질 수준의 차이로써 homocysteine의 변화는 볼 수 없었다. 그러나,

taurine의 변화는 관찰되었는데 이는 apo E 유전자 다형성이 지질 수준에 미치는 대사가 세포의 수용체 조절과 연계되어 담즙생성과 관련된 taurine은 영향을 받지 않지만 methyl transfer기전과 관련된 homocysteine은 영향을 받지 않는 것으로 사료된다. 따라서 앞으로 다양한 apo E 유전자 변이형 뿐 아니라 고콜레스테롤혈증 및 고중성지방혈증 환자, 그리고 심혈관질환자를 대상으로 혈중 아미노산 농도 및 체내 아미노산 대사에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

Apo E 유전자의 다형성의 상대 빈도수는 E3/3가 0.806, E3/2가 0.087, E3/4가 0.113이고 E2/2, E4/4, E2/4 형은 나타나지 않았으나, 한국인의 apo E 상대 분포도를 크게 벗어나지 않았다. 즉, 한국인의 E3 isoform의 상대 빈도수는 중국인 혹은 일본인들과 유사하며 서구인보다 높은면, 변이형인 E2과 E4 allele는 낮다. Apo E allele군간의 total cholesterol, TG, apo B-100, β -lipoproteins에서 유의적인 차이를 보였다. E2 allele군에서 E3보다 total cholesterol이 낮고 TG가 유의적으로 높아서 전형적인 apo E 다형성의 지질대사 특성을 보여주고 있다. 특히 total HDL과 HDL₂는 차이가 없으나, HDL₃는 정상형인 E3보다 변이형인 E2와 E4에서 높게 나타났다. 이는 total HDL의 결과보다는 HDL₃와 HDL₂ subfraction의 비율이 apo E 변이형과 관련된 것으로 보여진다. Apo E 유전자형에 따른 혈청 유리아미노산 농도는 E3형과 비교시 E2형의 경우 glutamine과 phosphoserine농도가 증가하고 E4 변이형의 경우에는 arginine과 α -aminobutyrate 농도가 감소하고 phosphoserine농도는 증가하였다. 특히, taurine 농도가 E2에서 유의적으로 증가하였는데, 이는 E2 allele의 LDL up-regulation 대사에 따라 담즙산 생성이 증가하였고 궁극적으로 혈액 및 간에서의 타우린 pool 크기가 증가된 것으로 사료된다.

문 헌

- Lee, M. S. : Apo E polymorphism & diseases. *Kor. J. Lipid*, **5**, 11(1995)
- Davingnon, J. : Apo E polymorphism & atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, **8**, 1(1988)
- Utermann, G. : Apo E polymorphism in health & disease. *Am. Heart J.*, **113**, 433(1987)
- Kamboh, M. and Ferrell, R. E. : Genetic studies of human apo E. *J. Lipid Res.*, **29**, 1535(1988)
- Yamamoto A. : Heridity Trait of Dyslipoproteinemia in patients with Atherosclerosis. *Kor. J. Lipid*, **3**, 289(1993)
- Kang, S. Y., Woo, J. T., Kim, S. W., Yang, I. M., Kim, J. W., Kim, Y. S., Kim, K. W., Choi, Y. K. and Paeng, J. R. : Apolipoprotein E genotypes in patients with diabetes, cerebrovascular accident, and acute myocardial infarction. *J. Kor. Soc. Endocrinology*, **7**, 273(1992)
- Mclis, E., Kempen, K., Cobbaert, C. and Saris, W. : The effects of weight loss and apo E polymorphism on serum lipids, apo A-I & apo B & Lipoprotein(a). *Int. J. Obesity & Related Metabolic Disorders*, **17**, 711(1993)
- Christensen, H. N. : Free amino acids and peptides in tissues. In "Mammalian protein metabolism" Munro, H. N. and Allison, J. B.(eds.), Academic Press, New York, Vol. 1, p.105(1964)
- Boomgaard, J. and McDonard, B. E. : Comparison of fasting plasma amino acid patterns in the pig, rat, and chicken. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **47**, 392(1969)
- McLaughlan, J. M. : Blood amino acid studies. V. Determination of the limiting amino acid in diets. *Can. J. Biochem.*, **42**, 1353(1964)
- Holt, L. E. Jr., Synderman, S. E., Norton, P. M., Roitman, E. and Finch, J. : Plasma aminogram in kwashiorkor. *Lancet*, **2**, 1343(1963)
- Whitehead, R. F. and Dean, R. F. A. : Serum amino acids in kwashiorkor. I. Relationship to clinical condition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **14**, 313(1964)
- Scriver, C. R. : Inborn errors of amino acid metabolism. *Br. Med. Bull.*, **25**, 35(1969)
- Abel, R. M., Shih, V. E., Abbott, W. M., Beck, C. H. and Fischer, J. E. : Amino acid metabolism in acute renal failure: Influence of intravenous essential L-amino acid hyperalimentation therapy. *Ann. Surg.*, **180**, 350(1974)
- Marchesini, G., Fabbri, A., Bianchi, G. and Bugianesi, E. : Branched-chain amino acids in liver disease. In "Amino acid metabolism and therapy in health and nutrition disease" Clynober, L. A.(ed.), CRC Press, Boca Raton, p.337(1995)
- Norton, J. A., Gorschboth, C. M., Wesley, R. A., Burt, M. E. and Brennan, M. F. : Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. *Cancer*, **56**, 1181(1985)
- Jeevanandam, M., Young, D. H., Ramias, L. and Schiller, W. R. : Aminoaciduria of severe trauma. *Am. J. Clin. Nutr.*, **49**, 814(1989)
- Carroll, K. K. : Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J. Am. Diet. Assoc.*, **91**, 820(1991)
- Sugano, M. and Koba, K. : Dietary protein and lipid metabolism : a multi-functional effect. *Ann. NY Acad. Sci.*, **679**, 215(1993)
- Carroll, K. K. and Kurowska, E. M. : Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *J. Nutr.*, **125**, 5945(1995)
- Huff, M. W., Hamilton, R. M. G. and Carroll, K. K. : Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: Effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. *Atherosclerosis*, **28**, 187(1997)

22. Katan, M. B., Vroomen, L. H. M. and Hermus, R. J. : Reduction of casein-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits and rats by dietary glycine, arginine and alanine. *Atherosclerosis*, **43**, 381 (1982)
23. Sugiyama, K., Ohishi, A., Ohnuma, T. and Muramatsu, K. : Comparison between the plasma cholesterol-lowering effects of glycine and taurine in rats fed on high cholesterol diets. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1647(1989)
24. Sugiyama, K., Kushima, Y. and Muramatsu, K. : Effect of methionine, cystine and taurine on plasma cholesterol level in rats fed a high cholesterol diet. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2897(1984)
25. Gandhi, V. M., Cherian, K. M. and Mulky, M. J. : Hypolipidemic action of taurine in rats. *Ind. J. Expt. Biol.*, **30**, 413(1992)
26. Park, T., Lee, K. and Um, Y. : Dietary taurine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr. Res.*, **18**, 1559(1998)
27. Janka, K. : Assessment of exercise-induced alteration in body composition of patients with coronary heart disease. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **66**, 321(1993)
28. Kim, H. S., Lee, Y. N., Mo, S. M. and Choi, H. M. : Assessment of obesity through anthropometric assessment in junior high school boys and girls. *Kor. J. Lipid*, **4**, 41(1994)
29. Alloin, C. A. : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470(1974)
30. Lowell, B. : Stable reagents for determination of serum TG by a colorimetric, Hantzsch Condensation method. *Clin. Chem.*, **19**, 338(1973)
31. Warnick, G. R. : Precipitation methods of total HDL, and HDL₃ or HDL₂. *Clin. Chem.*, **28**, 6(1982)
32. Friedwald, W. : Estimation of the concentrations of LDL in plasma without use of the preparative Ultracentrifugation. *Clin. Chem.*, **18**, 499(1972)
33. Kelly, L., Kamboh, M. and Ferrell : Genetic studies of human apo E & apoA-IV. *Electrophoresis*, **2**, 52(1991)
34. Lee, M. S. : Apo E isoforms influence on the distribution of human plasma cholesterol & apolipoproteins. *Kor. J. Lipid*, **3**, 221(1993)
35. Moore, S. and Stein, W. H. : Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In "Methods in enzymology" Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.(eds.), Academic Press, New York, Vol. 6, p.819(1963)
36. KIPH(Korean Institute for Population & Health) : *RDA for Koreans*. 5ed., Komun Co.(1990)
37. Eto, M. : Reciprocal effects of apo E allele(ϵ_2 & ϵ_4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clin. Genet.*, **29**, 477(1986)
38. Rall, S. C., Wiesgraber, K. H., Innerarity, T. L., Bersot, T. P., Mahley, R. W. and Blum, C. B. : Identification of a new structural variant of human apo E₂ in type III hyperlipoproteinemic subject. *J. Clin. Invest.*, **72**, 1288 (1983)
39. Utermann, G. : Apo E phenotypes & hyperlipidemia. *Hum. Genet.*, **65**, 232(1984)
40. Lenzen, V. : Genetic polymorphism in human apo E. *Methods Enzymol.*, **128**, 823(1986)
41. Lee, M. S. and Snook, J. T. : Differential effects of PUFA on the reverse cholesterol transport mechanism according to the apo E isoforms in normolipidemic females. *Kor. J. Lipid*, **3**, 291(1993)
42. Lacey, J. M. and Wilmore, D. W. : Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr. Rev.*, **48**, 297(1990)
43. Bergstrom, J., Furst, P., Noree, L. O. and Vinnars, E. : Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.*, **36**, 693(1974)
44. Park, T., Chang, J. S. and Sung, M. K. : Plasma aminogram and urinary excretion of free amino acids in adult vegetarians compared with age-matched omnivores in Korea. *J. Food Sci. Nutr.*, **3**, 368(1998)
45. Tweedle, D. E., Fitzpatrick, G. F. and Brennan, M. F. : Intravenous amino acids as the sole nutritional substrates : Utilization and metabolism in fasting normal human subjects. *Ann. Surg.*, **186**, 60(1977)
46. Oh, J. : Effect of oral taurine supplementation on plasma lipids, taurine concentrations and urinary taurine excretion in healthy female adults. M.S. Thesis, Yonsei University(1999)
47. Graham, I. M. and Meleady, R. : Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. In "Atherosclerosis XI" Jacotot, B., Mathe', D. and Fruchart, J. C. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, p.419(1998)

(1998년 11월 9일 접수)