

한국인 고지혈증환자에서의 혈청지질수준과 Apo E 및 고지단백혈증(HLP)의 유전자다형성 영향에 관한 연구

이명숙[§] · 김진규* · 김종원**

성신여자대학교 식품영양학과, 서울의대 임상병리과,[†] 성균관의대 임상병리과^{**}

Studies on the Distribution of Plasma Lipid Profiles in Korean Hyperlipidemia according to Hyperlipoproteinemia(HLP) and Apo E Polymorphism

Lee, Myoung Sook[§] · Kim, Jin Q* · Kim, Jong Won**

Department of Food & Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 137-742, Korea

Department of Clinical Pathology,* Medical College, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

Department of Clinical Pathology,** College of Medicine Sungkyunkwan University, Seoul 135-710, Korea

ABSTRACT

The impact of apo E polymorphism on interindividual variation in plasma lipid profiles was studied in 215 well-defined Hyperlipidemia patients, aged 55.12 ± 12.68 years. At least 45% of subjects had primary hyperlipidemia(HL) and the others had NIDDM(11%), hypertension(9%), and so on. Type IV was the most predominant HLP(58.33%), Type IIa, IIb, III and V were distributed by 17.59%, 11.11%, 2.31% and 1.38%, respectively. Type I was not found. 19 subjects(8.8%) was not assigned by HLP (non-HLP). Even though Total-C, LDL-C, and VLDL-C in non-HLP were higher than those in HLP, non-HLP has a low risk of CHD because of lower levels of TG and AI = (TC-HDL)/HDL in non-HLP. Since Type V and III impact the clearance of TG-riched lipoproteins, TG and VLDL-C levels were higher in V and III. Total-C and LDL-C were higher in Type II than those in the others. Apo A-I was not different between HLP comparing non-HLP, otherwise apo B-100 was significantly higher in IIa, IIb, and V. AI such as(TC-HDL)/HDL and LDL/HDL in Type V and II were higher than those in the others. As the relative frequencies of apo E phenotyping, E3/3, E3/4, E3/2, E2/2, E2/4 and E4/4 were 0.782, 0.060, 0.972, 0.032, 0.019 and 0.095. Plasma LDL-C, VLDL-C, TG, ratio of apo A-I /B-100 and(TC-HDL)/HDL were different among apo E isoforms. TG and VLDL-C in E2 allele were higher than that those in the others, otherwise LDL-C in E4 allele was higher than that in the others, respectively. LDL-C and VLDL-C were not different among six apo E phenotypes due to heterozygotes of apo E alleles has counterbalanced effects. Total-, HDL-C, LDL+VLDL-C, apo A-I , apo B-100, ratio of LDL/HDL and Lp(a) were not different among the apo E alleles. Since high ratio of(TC-HDL)/HDL and low ratio of LDL/HDL in apo E2 was happened, AI should be carefully concerned to elucidate the CHD risk. (Korean J Nutrition 33(6) : 639~646, 2000)

KEY WORDS: Apo E polymorphism, Hyperlipoproteinemia phenotypes(HLP), Plasma lipid profiles.

서 론

고지단백혈증의 유전적 다형성은 1967년 Fredrickson과 1970년 WHO의 분류법에 의하여 6형태의 고지단백혈증 다형성(hyperlipoproteinemia phenotypes, HLP)으로 분류되어 지금까지 이용되고 있다.^{1,2)} Type I은 Lipoprotein lipase와 apo C-II의 결핍이 원인으로 고칼로마이크론 혈증을 유발하는 매우 빈도수가 낮은 질환으로, 어린이에게

채택일 : 2000년 8월 11일

*To whom correspondence should be addressed.

서는 지질의 흡수불량 증후군으로 나타나기도 한다. Type IIa는 LDL 수용체 결핍에 의하여 혈중 LDL제거 능력이 상실되어 LDL이 증가하는 가족성 고지혈증(familial hypercholesterolemia) 형태로써 가장 일반적이다. Type IIb는 VLDL합성이 배설보다 항진되는 것이 주원인으로 LDL과 VLDL이 동시에 증가하는 것이다. Type III은 apo E의 유전적 결함으로 apo E 혹은 B/E 수용체와의 결합력이 부족하여 세포 내로의 유입이 차단되어 혈중에는 중성지방이 많은 리포단백질이 축적되어 유발된 고지혈증이다. 특히 LDL과 VLDL의 중간형태인 β -VLDL이 축적되기 때문에 familial 혹은 floating(broad) dysbetaipoprotein-

emia라고 한다. Type IV는 VLDL의 과잉 생산에 의하여 중성지방이 축적되는 형으로 고중성지방혈증로 분류된다. Type V는 매우 드문 형으로 type IV와 lipoprotein lipase(LPL) 결핍이 중복되어 chylomicron 축적이 동시에 나타난다. 임상적으로는 type I과 유사하며 유전성 형태는 type IV와 불분명하다.³⁰⁾ 이외에도 비정상적인 고지단백혈증의 형태가 있으나 병리적인 지단백질로써 가족성을 가지지 않기 때문에 여기서 분류하지 않는다.

최근 관심이 되고 있는 apo E는 칼로마이크론, 칼로마이크론 잔여체, VLDL, HDL의 구성요소로써 LDL(B/E)와 apo E 수용체 모두와의 결합을 매개하여 세포내외간의 콜레스테롤의 재분배하는 아포 지단백질이다.^{6,7)} 인체의 apo E는 유전적으로 E4, E3, E2 alleles를 갖는 다형성의 형태를 이루고 있어 3개의 순수형(homozygous)과 3개의 굴합형(heterozygous)로 존재한다. 6개의 표현형 중 인구 집단의 60%가 E3/3이며 1~2% 정도는 E2/2이며 2~5% 정도가 E4/4형이며 나머지는 E4/3, E4/2, E2/2이다. 이 중 apo E2/2를 갖는 사람들이 type III 고지혈증을 나타내는 것이 보고되면서 인구 집단적 역학조사가 활발하게 진행되고 있다.⁸⁻¹⁰⁾

Apo E2 변이형은 299개의 아미노산 서열 중 158번의 arg이 cys으로 치환된 변이형으로 apo E 혹은 apo B/E 수용체와의 결합부족으로 apo E 혹은 E를 갖는 TG가 많은 지단백질의 혈증 제거능력이 저하되나 LDL 수용체 합성은 up-regulation 됨으로써 LDL 흡수가 촉진되어 혈청 LDL 농도가 떨어진다.^{8,9)} Apo E4 변이형은 112번의 cys 가 arg으로 치환되어 B/E와 E 수용체 모두의 결합력이 상승하여 E2와는 상반된 결과를 초래한다. 중성지방이 많은 지단백질(칼로마이크론, VLDL)이 빨리 분해되고 간의 LDL 수용체 합성은 down-regulation 되기 때문에 흡수율이 낮아져서 혈중 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤을 증가시킨다. 미국과 스칸디나비아 반도국가의 역학조사 연구팀들에서도 혈청 콜레스테롤이 E2/2 < E3/2 < E3/3 < E4/4 등의 순서로 높아졌음을 밝혀졌다.^{6,11)} 인종 간의 apo E2와 E4가 가장 낮은 중국인(0.06)에 있어서 판상선 동맥 혈관질환 유발이 백색인종 보다 훨씬 낮은 결과를 나타냈다. 더욱기 미국 인디언 종족들은 E2 변이형의 상대적 빈도수가 0%로써 이 종족의 고지혈증 발병률이 적은 것과 관련이 있는 것으로 나타났다.^{12,13)}

따라서 대부분의 Type III 환자에서 E2/2가 발견되어 apo E 변이 혹은 결핍 인자가 우선적으로 꼽히고 있다. 물론 E2/2 형을 갖고 있는 사람이 모두 Type III 고지혈증은 아니고 약 5%가 해당되나, Type III 고지혈증 환자는 거의

모두 E2/2 형이며, LDL 혹은 E 수용체와의 결합 능력이 없다. 이와 같은 비정상적인 중성 지방의 축적 형태인 지단백질을 β -VLDL이라 하며, 이것의 축적으로 인한 질병을 Dysbetalipoproteinemia라 한다. 독일인에서는 고콜레스테롤 혈증을 갖고 있는 환자 중 1%가 이에 해당하고 이 환자들 중 10%가 E2/2 형임이 보고되었다. Dysbetalipoproteinemia의 원인인 β -VLDL의 축적은 LDL 및 hepatic lipase(HL) 부족과 CETP부족등으로 축적되기 때문에 E2/2형이 원인인 경우를 1차성 Dysbetalipoproteinemia라고도 한다.^{11,12,13,14,15)} Type III나 Dysbetalipoproteinemia의 2차적인 원인을 Type II, 갑상선 기능저하증, 당뇨병, 비만, 임신, 에스트로겐호르몬 부족과 같은 호르몬 불균형을 들기도 하지만 모두 지질 대사와 관련성 질병이므로 상호 연계적이라고 할 수 있다. 특히, apo E 유전자의 다형성으로 인하여 인체 혈청 콜레스테롤의 개체 편차가 14~24%에 이르러서 지질대사 조절 불능에 의한 모든 질병은 apo E 유전자의 다형성의 영향을 받는다고 믿어진다.¹⁶⁾

그러므로 본 연구의 목적은 한국인 고지단백혈증 환자의 다형성 형태의 분포도와 고지혈증에 영향을 주는 역학적 인자를 조사하고 apo E 변이형이 혈증 지질대사에 미치는 영향을 규명하여 한국형 고지단백혈증연구에 기초자료를 제공하는 것이다.

연구 방법 및 내용

1. 조사 대상 및 실험 설계

1997년 5월부터 1997년 12월 19일까지 삼성의료원에 내원 혹은 외래한 환자 중 고지혈증으로 예상되는 4500명이 예비 선별대상이었는데 대부분이 혈중 콜레스테롤과 중성지방수치를 알고있거나 병원 기록이 보유된 상태이므로 이들 중 혈중 콜레스테롤 250mg/dl 이상 혹은 중성지방이 200mg/dl 이상인 273명을 1차 대상으로 하였다. 이들 중 이미 약물치료를 받고 있는자를 제외한 215명을 최종 대상자로 선정하여 약물요법을 받기 전 채혈하여 HLP 분류를 실시하였다. 혈액 분석내용은 고지혈증 HLP typing, 총콜레스테롤, 중성지방, 지단백질(LDL, VLDL, HDL, LDL, HDL₂) 콜레스테롤, 아포지단백질(apo A-I, apo B-100) 정량, apo E 유전자 다형성, Lp(a) 등이다.

2. 실험 방법

1) 고지혈증 환자의 역학적 조사

예상 HLP 환자 215명을 대상자로 혈중 분석전에 설문조사를 통하여 본인과 가계의 질병여부, 약물복용 여부등의

역학조사와 지나친 흡연과 카페인 섭취 및 운동실시 여부 등을 조사하였고 약물요법을 받기전에 혈액을 채취하여 HLP형태를 분류하였다. 조사된 질병내용은 심장 및 동맥 경화성 질환, 당뇨, 신장, 간, 종양, 호르몬계 질환등이었는데 이는 2차성 고지혈증 분류에 도움을 주었고 아울러 발병 시기와 현재 연령을 기록하였다.

2) Hyperlipoproteinemia phenotypes(HLP) 분류

Fredrickson방법을 수정한 agarose 전기영동법으로 Ciba Corning Diagnostic Kit를 이용하여 분석하였다.¹³⁾ 지질을 제거한 혈청 10μl를 아가로스 필름에 loading한 후 PHAB(0.05M barbital buffer, pH 8.6)에서 45~90분간 전기영동처리한다. 분리한 젤판을 2% TCA에 30분간 침지시킨 후 55 ± 10°C에서 15~20분간 말린다. Fat Red 7B로 4분간 염색하고 바탕은 methanol/water(2:1)로 탈색시킨 후 습기를 제거하고 densitometer 520nm에서 각각의 band를 정량한후 고지혈증 형태를 분류한다. HLP 판독은 지질대사 연구에서 가장 많이 사용되고 있는 Fredrickson과 NHLBI법에 따라 정한다. 이때, 6가지의 고지혈증 분류에 속하지 않지만 혈중 지질이 높은 부류는 non-hyperlipidemia(non-HLP)로 분류한다.

3) Apo E phenotypes 분석

본 연구실에서 사용하는 방법은 미국 Pittsburgh 대학의 Dr. Kamboh와 Dr. Ferrelli에 의한 방법을 실험조건에 맞게 약간 수정한 것이다. 이 방법은 적은 양의 혈청이나 혈장을 이용할 수 있고 전처리 과정도 간단하여 널리 보급될 수 있는 기술이다.¹⁵⁾¹⁹⁾ 혈청은 DTT 용액으로 자질을 제거한 후 5% PAGE-3M 요소겔에 isoelectrofocusing(IEF)한다. 이때 20분간 젤을 prefocus한 다음 시료를 1500V, 150mA, 10W 조건에서 1시간 가량 처리(run)한다. IEF 젤을 24시간 nitrocellulose에 전이시켜서 5% 무지방 우유로 blocking한 후 1st Ab(goat anti apo E)와 2nd Ab(rabbit antigoat IgG Ab)를 이용하여 western blotting을 시행한다. Boric acid와 Fast blue BB로 착색하여 표준혈청과 비교하여 분류한다. E2/3, E2/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/2의 6가지 형태 phenotypes에 대한 표준 혈청(standard)은 1995년도부터 수집된 본 연구실의 한국인 혈청을 이용하였다.

4) 혈중 지질 농도

총콜레스테롤과 중성지방은 효소측정 방법을 이용하여 Sigma Kit를 사용하였다.²⁰⁾²¹⁾ HDL 분획의 분리방법은 dextran sulfate-Mg²⁺ 침전법으로 VLDL & LDL을 침

전시키고 상층에서 다시 HDL₂를 침전시켜 HDL₂ fraction을 얻은 후 총HDL에서 HDL₂를 감하여 HDL₃를 구한다.²²⁾ LDL 콜레스테롤은 Friedewald 방정식(LDL 콜레스테롤 = 총콜레스테롤-HDL 콜레스테롤-0.2 × TG)을 이용하여 계산한다.²³⁾ Apo A-I & apo B-100은 항체 이용법에 의한 immunodiffusion assay로 분석한다.²⁴⁾²⁵⁾ 동맥경화지수는(TC-HDL)/HDL, LDL/HDL, Lp(a), apo B-100/A-I 비율로 계산되었다. 이때 Lp(a)는 enzyme linked immunosandwich assay(ELISA)방법을 이용한 Lp(a) Kit로 분석하였다.²⁶⁾

3. 통계 분석

Apo E 이성체와 HLP간의 정상분포도를 검증 한 후 이들간의 t-test, 상관성, 분산분석 및 회귀분석을 SAS를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 고지혈증 대상자의 형태 분류 및 일반적인 특성

고지혈증 환자 215명의 평균연령은 55.1 ± 12.7세이며, 고지단백혈증 형태분포(HLP)는 type IV가 58.6%(n = 126)로 가장 우세하고 그 다음으로 IIa, IIb, III, V 순으로 16.7%(n = 36), 12.1%(n = 26), 2.3%(n = 5), 1.4%(n = 3)를 차지하였다. Fredrickson법에 분류되지 않았으나 혈중 지질 수준이 높은 고지혈증환자도 8.8%(19명)에 이르러 non-HLP로 분류되었고 HLP에 대한 대조군으로 보았다(Fig. 1).

고지혈증환자에서 46%(n = 98)만이 1차성 고지혈증이고 54%가 2차성 고지혈증 형태로 나타났으며, 합병증의 형태는 Fig. 2와 같다. 1차성 고지혈증에서도 type IV가 58%, type IIa와 IIb가 18.4%, 11.2%로 총 HLP에서 나타난 고지단백혈증 형태의 분포와 유사하였다. 반면 type III

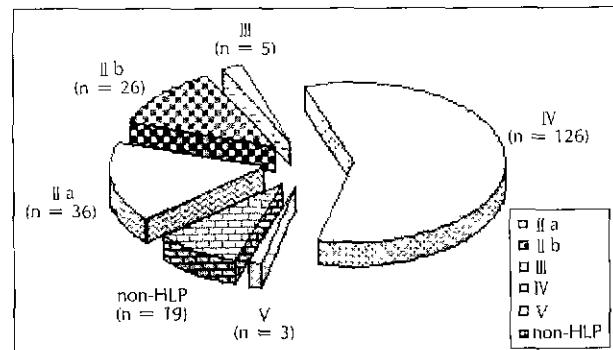


Fig. 1. Hyperlipoproteinemia types in 215 Korean hyperlipidemia patients.

과 V는 일반적으로 다른 합병증이 주로 나타났다. 고지혈증의 합병증은 NIDDM 당뇨병이 11%, 고혈압이 9%, 심장 및 신장 질환 환자 4%, 동맥경화증이 2%순으로 나타났고 다른 지단백질 변형에 의한 질환은 4%이었다. 그 외에도 간질환, 갑상선 질환, 종양질환등이 있었다. 고지단백증의 형태별로 살펴보면 Type IIa와 IV에서 NIDDM과 고혈압이 우세하게 나타났고 Type III과 V는 대부분이 신장 및 간질환을 가지고 있어서 형태와 합병증의 관련성을 살펴볼 수 있었다. 이번 대상자에서는 Type I이 나타나지 않았지만 일반적으로 xanthomas, abdominal pain이 Type I에서 발생하는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾

한국인 영양권장량의 연령분류에 따라 고지혈증의 분포를 살펴보면 50~64세가 38.43%, 30~49세가 29.17%,

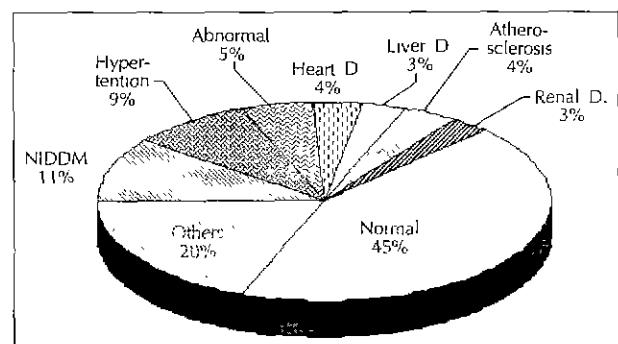


Fig. 2. Hyperlipoproteinemia complications in 215 Korean hyperlipidemia patients.

65~74세가 26.39%순으로 많아서 연령과 고지혈증과의 상관관계가 높았다. 그러나, 고지단백증 type IIa과 IV은 20세 이하에서도 나타나고 type V는 모두 65세 이후에 나타나서 연령에 따라 발생하는 고지단백증의 형태가 나를 알 수 있었다 나이와 혈중지질 간의 상관 관계는 유의적으로 정의 상관관계를 보이고 있으며($p < 0.01$), 특히 총콜레스테롤($r = 0.754$), LDL-C($r = 0.773$), B-100/A-1비율($r = 0.992$), Lp(a)($r = 0.611$) 등이 유의적이었다. 고지혈증의 발생에 대한 성별차이는 HLP에서만 나타났고 non-HLP에서는 나타나지 않았으나, 일반적으로 type IIa에는 여성성이, type III은 남성이 우세하였고 type V에서는 전부 여성인 특성을 보였다.

2. 고지혈증 대상자의 혈중 지질 수준

고지혈증 대상자들의 혈중지질 수준은 Table 1과 같다. HLP와 non-HLP와의 혈중 지질수준의 차이에서는 apo A-I, B-100, Lp(a)등의 아포지단백질을 제외하고 모든 혈중 지질수준에서 유의적인 차이를 보였다. TG와 VLDL은 HLP에서 높았고 total-, LDL-, HDL 콜레스테롤은 non-HLP에서 높았으나, 동맥경화 지수인(TC-HDL)/HDL, LDL/HDL, apo B/A ratio은 모두 HLP에서 높았다. 이는 2가지의 중요한 의미를 지닌다. 첫째, 혈중 지질수준이 높지만 고지단백증 형태로 분류되지 않은 non-HLP는 동맥경화 발병률이 낮다 둘째, 이는 non-HLP의 HDL 수

Table 1. Plasma lipid profiles in HLP and non-HLP according to gender differences(n = 215)

Profiles	HLP(n = 196)			Non-HLP(n = 19)			P-value ^a (HLP vs non-HLP)
	Total (n = 196)	Male (n = 100)	Female (n = 96)	Total (n = 19)	Male (n = 6)	Female (n = 13)	
Age	55 ± 13	50 ± 13	60 ± 10**	58 ± 11	59 ± 16	58 ± 9	0.09
Cholesterol(mM/l)							
T-C	6.10 ± 1.62	5.83 ± 1.70	6.39 ± 1.47**	6.62 ± 0.85	6.48 ± 1.26	6.68 ± 0.60	0.002
LDL	3.46 ± 1.41	3.11 ± 1.26	3.82 ± 1.46**	4.25 ± 0.90	4.02 ± 1.37	4.36 ± 0.58	< 0.001
HDL	1.17 ± 0.30	1.12 ± 0.24	1.21 ± 0.34*	1.62 ± 0.39	1.41 ± 0.24	1.72 ± 0.41**	< 0.001
VLDL	1.48 ± 1.35	1.59 ± 1.59	1.36 ± 1.03	0.75 ± 0.42	1.05 ± 0.26	0.61 ± 0.41**	< 0.001
Total triglyceride(mM/l)							
TG	3.08 ± 1.76	3.16 ± 1.38	2.99 ± 2.08	1.72 ± 0.79	2.28 ± 0.57	1.45 ± 0.74**	< 0.001
Apolipoprotein(mg/dl)							
Apo A-I	157.8 ± 36.9	152.2 ± 26.7	163.6 ± 44.7*	169.9 ± 37.8	168.0 ± 24.2	170.7 ± 43.0	0.06
Apo B-100	163.6 ± 43.6	155.5 ± 35.7	172.0 ± 49.3**	159.3 ± 30.8	164.5 ± 39.4	156.9 ± 26.5	N.S
Atherogenic indices							
(TC-HDL)/HDL	4.6 ± 2.7	4.3 ± 1.7	4.8 ± 3.3	3.3 ± 1.1	3.8 ± 1.4	3.1 ± 0.9	< 0.001
LDL/HDL	3.1 ± 2.0	2.8 ± 1.0	3.5 ± 2.7**	2.8 ± 0.9	3.0 ± 1.3	2.7 ± 0.6	0.04
Lp(a)	20.3 ± 22.3	20.8 ± 23.8	19.8 ± 20.7	24.4 ± 20.2	23.0 ± 13.6	25.1 ± 22.8	N.S
Apo B/A	1.2 ± 0.9	1.0 ± 0.2	1.3 ± 1.3**	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	< 0.01

Values are presented by Mean ± S.D.

^a. P-values for the differences between the total subject of HLP and Non-HLP

* Significantly gender differences between HLP & non-HLP at $p < 0.05$

**. Significantly gender differences between HLP & non-HLP at $p < 0.01$

준이 높아서 나타나는 현상으로 보이며 따라서 역콜레스테롤 기전(Reverse cholesterol transport)에서 주역할을 하는 HDL의 기능이 동맥경화 발병률과의 상관관계에서 중요함을 보여주는 결과로 보인다.^{21,22}

3. 고지혈증 형태에 따른 혈중 지질 수준

고지혈증의 형태에 따른 혈중지질 수준은 Table 2와 같다. TG와 VLDL등과 같은 TG가 풍부한 지단백질의 재거기능이 결핍된 type III과 V에서는 다른 고지단백혈증의 형태보다 TG와 VLDL이 유의적으로 높았다($p < 0.001$). 특히 TG와 VLDL이 250mg/dl 보다 높거나 VLDL/TG 비율이 0.25이상이며 LDL이 감소하면 type III 및 V로 분류되는 데 본 연구에서도 같은 결과가 나타났다. 이는 type IIb에서 TG가 증가하지만 LDL이 감소하지 않는 대사의 결과를 보여주어서 비교분석하기가 용이하였다. LDL 수용체 결핍에 의한 고지단백증인 type II는 혈중 total 및 LDL 콜레스테롤은 상승하는 반면 VLDL과 TG 및 HDL은 감소하는 대사를 보여주었다.^{23,24} 특히 IIa와 IIb의 구분시 TG와 VLDL의 농도에 의한 Fridrickson의 분별법이 정확히 나타나고 있다. 따라서 HLP에서는 혈중 총콜레스테롤은 type V > IIa > IIb > IV > III 순으로, LDL 콜레스테롤은 IIa > IIb > IV > V > III 순으로 나타났다. 전반적으로 total- 및 LDL 콜레스테롤이 non-HLP에서 높게 나타났는데 이들의 혈중 지질의 base-line이 높기 때문이다. US studies를 살펴보면 연령 증가에 따라 TG수준

이 증가하였고 TG 증가에 따라 type IIb의 상대적 빈도수가 증가하여 고지단백혈증 형태와 지질 수준의 관련성이 높은 것을 알 수 있다.^{25,26} 단, type IIa에서의 LDL 콜레스테롤은 통계적인 수치인 20.7~1.1 mmol/l(800~1200mg/dl)까지 증가하지 않아서 본 연구에서의 type IIa 대상자는 글합형 FH로 생각된다.^{27,28} Apo A-I은 고지단백혈증 형태별로 크게 차이가 나지 않았으나, apo B-100는 IIa와 IIb에서 증가하여 LDL 콜레스테롤 증가와 관련된 것을 알 수 있다. 종합적인 결과인 동맥경화지수를 살펴보면, type V, IIb 및 IIa가 고지단백혈증 형태 중 가장 높은 위험률을 보였다. 최근에 관심이 높아진 동맥경화지수인 Lp(a)는 apo B-100과 정의 상관관계를 보이고($r = 0.6, p < 0.01$) type III에서 가장 높게 나타났으나, non-HLP와는 유의적인 차이가 보이지 않고 있으며 type III에서의 다른 동맥경화지수가 높지 않기 때문에 차후 연구가 계속적으로 되어야 할 지수로 보아진다.^{27,28,31}

4. Apo E 유전자 다형성과 HLP

Immunolocalized IEF 형태에서 보면 6개 형태의 apo E 유전자 표현형이 Fig. 3과 같이 나타난다. 5개 밴드를 갖는 E3/2형을 제외하고 나머지 다형성은 6개의 밴드를 보여준다. 215명의 고지혈증 환자 중 166명이 E3/3(r.f. = 0.7721), 23명이 E3/2(r.f. = 0.1069), 13명이 E3/4(r.f. = 0.0602), 7명이 E2/2(r.f. = 0.0325), 4명이 E2/4(r.f. = 0.0186), 2명이 E2/2(r.f. = 0.0093)로 분석되었다. 고지

Table 2. Plasma lipid profiles in five types of HLP comparing non-HLP subjects(n = 215)

Profiles	HLP						non-HLP (n = 19)	P value ^a
	Total (n = 196)	IIa (n = 36)	IIb (n = 26)	III (n = 5)	IV (n = 126)	V (n = 3)		
Cholesterol(mM/l)								
T-C	6.10 ± 1.62	6.68 ± 1.30 ^b	6.10 ± 1.21 ^a	5.67 ± 1.25 ^a	5.88 ± 1.68 ^a	9.26 ± 1.19 ^b	6.62 ± 0.85 ^c	< 0.001
LDL	3.46 ± 1.41	4.25 ± 1.41 ^d	3.79 ± 1.21 ^a	2.46 ± 0.78 ^a	3.21 ± 1.38 ^{ab}	2.76 ± 0.10 ^{bc}	4.25 ± 0.90 ^{cd}	< 0.001
HDL	1.17 ± 0.30	1.35 ± 0.30 ^b	1.05 ± 0.31 ^b	1.33 ± 0.33 ^c	1.14 ± 0.26 ^b	0.76 ± 0.11 ^a	1.62 ± 0.39 ^d	< 0.001
VLDL	1.48 ± 1.35	1.15 ± 0.49 ^{ab}	1.26 ± 0.76 ^b	1.88 ± 0.45 ^{bc}	1.52 ± 1.46 ^c	5.74 ± 1.37 ^d	0.75 ± 0.42 ^a	< 0.001
Total triglyceride(mM/l)	3.08 ± 1.76	2.35 ± 1.07 ^b	2.67 ± 0.92 ^b	4.10 ± 0.99 ^d	3.11 ± 1.32 ^c	12.51 ± 2.43 ^e	1.72 ± 0.79 ^a	< 0.001
Apolipoprotein(mg/dl)								
Apo A-I	157.8 ± 36.9	167.6 ± 41.6 ^b	145.6 ± 38.3 ^a	181.0 ± 43.5 ^b	151.3 ± 20.6 ^{ab}	172.4 ± 38.9 ^{ab}	169.9 ± 37.8 ^b	0.09
Apo B-100	163.6 ± 43.6	172.5 ± 46.7 ^b	172.1 ± 44.8 ^b	142.6 ± 31.0 ^a	157.1 ± 36.8 ^{ab}	290.3 ± 79.4 ^c	159.3 ± 30.8 ^{ab}	< 0.001
Atherogenic indices								
(TC-HDL)/	4.6 ± 2.7	4.0 ± 0.8 ^{ab}	5.6 ± 4.6 ^c	3.4 ± 0.9 ^{ab}	4.4 ± 2.2 ^b	11.6 ± 3.2 ^d	3.3 ± 1.1 ^a	< 0.001
LDL/HDL	3.1 ± 2.0	3.2 ± 0.9 ^{ab}	4.2 ± 3.8	1.9 ± 0.6 ^a	2.9 ± 1.7 ^{ba}	3.7 ± 0.4 ^{bc}	2.8 ± 0.9 ^{ab}	< 0.001
Lp(a)	20.3 ± 22.3	22.3 ± 30.6 ^a	19.4 ± 17.5 ^a	36.6 ± 30.6 ^b	19.6 ± 20.0 ^a	8.6 ± 8.7 ^a	24.5 ± 20.2 ^{ab}	NS
Apo B/A	1.1 ± 0.9	1.2 ± 1.4 ^{bc}	1.5 ± 1.7 ^c	0.8 ± 0.2 ^{ab}	1.0 ± 0.3 ^b	1.9 ± 0.3 ^{bcd}	1.0 ± 0.3 ^{bc}	< 0.001

Values are presented by Mean ± S.D. ^a. P-values for the differences among five types of HLP and non-HLP

a, b, c, d, e Values within the five types of HLP and non-HLP with different superscripts are significantly at $p < 0.05$

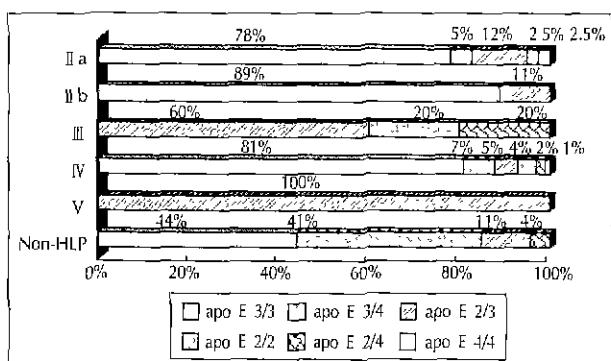


Fig. 3. The relative frequencies of Apo E phenotypes in HLP.

혈증 대상자에서의 apo E allele 분포를 살펴보면 E3, E2, E4 allele가 각각 85.6%, 23%, 4.9%로 나타났다. 일반 한국인을 대상으로 apo E allele의 상대 분포도를 조사한 바로는 E3, E2, E4 allele가 각각 86%, 9%, 5%로 분포되어서 E2 allele가 고지혈증 환자에게서 높게 나타났다. E2 allele가 상대적으로 적은 중국인($r.f = 0.05$)과 일본인($r.f = 0.023$)에게서 E2 allele가 상대적으로 높은 백인들보다 CHD위험도가 낮은 역학적 조사를 바탕으로 apo E 변이형과 고지혈증과의 상관관계가 매우 높은 것을 알수 있고 이는 본 연구에서도 잘 나타나고 있다.^{[21][22][31]} Apo E3/2가 type II a, E2/2과 E3/4는 type IV에 높이 분포되어 있었다. 가장 빈도수가 높은 E3/3을 제외하고 고지혈증 형태별로 살펴보면, type III, II b, V는 모두 E2 allele를 가지고 있으며 type V는 E3/2만 존재하였고, type IV와 II a 경우는 모두 E4 allele를 가지고 있었다. 특히 Type III이 E2/2인 순수형이 대부분인 보고에 비하여 본 연구에서는 굽합형으로 나타나 대조를 보였다.^{[35][36]} Apo E2 allele를 갖는 대상자의 지질 대사가 TG가 높은 지단백질의 혈증 제거기능이 결핍하여 중성지방과 TG가 많은 지단백질이 증가하는데, 이의 분포가 type III과 type V에서 높게 나타나서 일관성있는 결과를 보여주고 있다. 많은 연구들에서 E2/2의 5%만이 type III로 나타나지만 type III는 모두 E2/2 순수형인 것을 고려하면 본 연구에서는 비록 E2 allele를 가지고 있지만 굽합형으로 나타나서 대조를 보였다. 이는 type III를 형성하는데 관련된 호르몬, 식이 습관, 혈소결핍에 따른 질병 등이 관련된 것으로 보인다.^{[14][15][37]} 특히 HL, 지단백질 잔여물의 결합 등이 type III를 유도할 경우 apo E2 allele 결합만으로 볼 수 없기 때문이다. Non-HLP 대상자들은 E2/2와 E4/4 순수형이 존재하지 않았는데 이는 non-HLP가 E2 or E4 allele에 의한 HLP로 발전되지는 않는 것으로 보인다.^[32]

Table 3. Plasma lipid profiles according to apo E isomers in total-, HLP & non-HLP subjects(n* = 430)

Alleles	Total subject(n = 430)				HLP(n = 392)				Non-HLP(n = 38)			
	E3 (n = 366)	E2 (n = 41)	E4 (n = 21)	P ^t value	E3 (n = 337)	E2 (n = 37)	E4 (n = 18)	P ^t value	E3 (n = 31)	E2 (n = 4)	E4 (n = 3)	P ^t value
Cholesterol(mM/l)												
T-C	6.13 ± 1.59	6.08 ± 1.51	6.59 ± 1.33	N.S	6.09 ± 1.64	5.99 ± 1.53	6.55 ± 1.40	N.S	6.57 ± 0.82	6.86 ± 1.21	6.80 ± 0.91	N.S
LDL	3.55 ± 1.38 ^a	3.06 ± 1.35 ^a	4.02 ± 1.49 ^b	0.02	3.49 ± 1.40 ^a	2.89 ± 1.26 ^b	3.91 ± 1.58	0.01	4.15 ± 0.89	4.69 ± 1.14	4.66 ± 0.51	N.S
HDL	1.22 ± 0.33 ^b	1.11 ± 0.33 ^a	1.23 ± 0.31 ^{ab}	N.S	1.18 ± 0.29	1.08 ± 0.32	1.18 ± 0.32	N.S	1.66 ± 0.41	1.40 ± 0.32	1.48 ± 0.03	N.S
VLDL	1.36 ± 1.33 ^a	1.90 ± 1.33 ^b	1.34 ± 0.63 ^{ab}	0.04	1.42 ± 1.36 ^{ab}	2.02 ± 1.32 ^{ab}	1.46 ± 0.56	0.03	0.75 ± 0.36	0.77 ± 0.72	0.64 ± 0.72	N.S
Total triglyceride(mM/l)												
TG	2.82 ± 1.54 ^a	4.19 ± 2.84 ^b	3.00 ± 1.22 ^a	0.0001	2.93 ± 1.55 ^a	4.42 ± 2.88 ^b	3.18 ± 1.22 ^a	0.0001	1.64 ± 0.79	2.10 ± 0.91	1.95 ± 0.63	N.S
Apolipoprotein(mg/dl)												
Apo A-1	159.8 ± 36.2	152.8 ± 41.3	155.8 ± 43.6	N.S	158.40 ± 36.05	151.5 ± 42.44	160.11 ± 41.18	0.54	174.37 ± 35.35 ^b	164.75 ± 35.35 ^b	164.75 ± 30.99 ^a	N.S
Apo B-100	163.8 ± 40.5 ^{ab}	151.8 ± 57.3 ^a	174.2 ± 44.1 ^b	0.11	164.48 ± 41.34 ^{ab}	149.09 ± 59.19 ^a	174.14 ± 44.31 ^b	0.05	156.68 ± 29.58	177.50 ± 29.58	162.33 ± 49.90	N.S
Atherogenic indices												
(TC-HDL)/	4.3 ± 2.3 ^a	5.4 ± 4.5 ^b	4.7 ± 2.3 ^{ab}	0.04	4.4 ± 2.3 ^a	5.5 ± 4.7 ^b	4.9 ± 2.4 ^{ab}	0.05	3.1 ± 1.0 ^a	4.1 ± 1.6 ^b	3.6 ± 0.7 ^{ab}	N.S
LDL/HDL	3.0 ± 1.7	3.3 ± 3.6	3.5 ± 2.1	N.S	3.1 ± 1.7	3.3 ± 3.8	3.6 ± 2.3	N.S	2.6 ± 0.8	3.5 ± 1.2	3.2 ± 0.4	N.S
LP(a)	21.4 ± 22.3	18.4 ± 19.4	13.5 ± 19.2	N.S	20.9 ± 22.7	17.9 ± 19.6	15.3 ± 20.2	N.S	26.8 ± 20.2	2.8 ± 20.4	2.6 ± 0.5	N.S
ApoB/A	1.1 ± 0.7 ^a	1.4 ± 1.9 ^b	1.2 ± 0.3 ^{ab}	N.S	1.1 ± 0.7 ^a	1.4 ± 2.0 ^b	1.1 ± 0.3 ^{ab}	N.S	0.9 ± 0.3 ^a	1.1 ± 0.3 ^{ab}	1.3 ± 0.3 ^a	0.04

*n = Subjects number of E3, E2 & E4 allele were counted by the number of phenotypes. E3 = E3/3 × 2 + E3/2 + E3/4. Values are presented by ANOVA in total, HLP & non-HLP at p < 0.05

^a, ^b, ^c: Differences were evaluated by Mean ± S.D. N.S.: non-significance

5. HLP 대상자에서의 apoE isoform간의 지질 수준 변화

고지혈증 대상자 총 215명과 HLP 및 non-HLP 대상자를 각각 apo E allele 분포에 따른 혈중 지질 수준변화를 살펴보았다(Table 3). 총 대상자의 혈중 지질중에서 LDL-, VLDL-콜레스테롤, TG, apo B-100, (TC-HDL)/HDL ratio등이 apo E 이성체 간에 차이를 보였다. 특히 E2 allele는 TG, VLDL이 높은 반면 LDL이 낮았으며 E4 allele는 정확히 반대의 현상을 보여주어서 대사의 차이를 일관성있게 보여주었다. 즉, E2는 E 혹은 B/E 수용체와의 결합력이 부족하여 세포내로의 유입이 저연되어 혈중에는 중성지방이 많은 리포단백질을 축적되어 typeⅢ 고지혈증을 유발시킨다.^{5,6,7,8)} 그러나, LDL 수용체활성은 상향조절 됨으로써 LDL 흡수가 촉진되어 혈청 LDL 농도가 떨어진다. 반면, E4 allele는 B/E와 B/E 수용체 모두의 결합력이 상승하여 E2와는 상반된 결과를 초래한다. 이 같은 현상은 HLP대상자에서도 apo A-I의 유의적이 차이가 첨가되었을 뿐 같은 지질 수준 경향을 보여주고 있다. 그러나, non-HLP 대상자에서는 apo B/A 비율만이 E2 allele에서 높게 나타난 것을 제외하고 모든 혈중 지질 수준의 차이가 없다.^{9,10,11)}

위의 결과는 apo E 이성체간의 차이를 보았고 6개의 표현형 간의 분석은 제시하지 않았는데, 이는 군합형에서의 상호관계로 인한 결과 해석의 오류를 억제하기 위함이다 예를 들면, E3/4는 HDL 콜레스테롤이 $1.32 \pm 0.3\text{mM/l}$ ($51.2 \pm 11.5\text{mg/dl}$)이나, E4/4의 HDL 콜레스테롤은 $0.9 \pm 0.1\text{mM/l}$ ($38.0 \pm 4.2\text{mg/dl}$)이다. 그러나, 이성체 간의 유의적인 결과는 표현형에도 반영될 것이므로 고지단백혈증 대상자의 혈중 지질 수준의 변화는 명확하게 apo E 표현형에 영향을 받는 것으로 해석할 수 있겠다.

요약 및 결론

본 연구는 삼성의료원에 내원 혹은 외래한 환자중 고지혈증으로 예상되는 환자중 혈중 콜레스테롤 250mg/dl 이상과 중성지방 200mg/dl 이상으로 약물치료를 받지않는 215명을 최종대상자로 선정하여 고지단백혈증 다형성과 apo E 유전자 변이형의 영향에 관하여 조사하였다. 이는 고지혈증의 임상 및 관련 영양인자에 관한 연구자들에게 기초자료로 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

1) 한국인 고지혈증환자의 형태분포(HLP)는 IV(58.6%), Ⅱa(16.7%), Ⅱb(12.1%), Ⅲ(2.3%), V(1.4%)순으로 나타났으며 혈중 지질은 높으나 고지단백혈증의 분류에 속하지 않는 non-HLP도 8.8%에 이른다. 고지혈증의 합병증으로

는 인슐린 비의존성 당뇨(11%), 고혈압(9%), 심장 및 신장질환 환자(4%), 동맥경화증(2%) 순으로 나타났다. 또한 연령이 증가할수록 고지혈증 발생률이 높았고 나이와 혈중 지질간에는 유의적인 정의 상관관계를 보이고 있다($p < 0.01$). 성별차이로는 type Ⅱa는 여성, type Ⅲ은 남성이 우세하였고 type V은 전부 여성인 특성을 보이고 있으나 이는 다음 연구에서 연구 대상자의 수를 증가하여 확인하여 보고하고자 한다.

2) Apo A-1, B-100, Lp(a)등을 제외하고 모든 혈중 지질수준에서 HLP와 non-HLP간의 유의적인 차이를 보였다. TG와 VLDL-C은 HLP에서 높았고 total-, LDL-C, HDL-C는 non-HLP에서 높았으나, 동맥경화 지수 모두가 HLP에서 높았다. 중성지방이 많은 지단백질의 제거 기능이 결핍된 type Ⅲ과 V에서는 TG와 VLDL-C이 유의적으로 높았다. LDL 수용체 결핍에 의한 고지혈증인 type Ⅱ는 혈중 총콜레스테롤 및 LDL-C은 상승하는 반면 VLDL과 TG 및 HDL은 감소하는 대사적 특성을 보여주었다. 특히 Ⅱa와 Ⅱb의 구분시 TG와 VLDL의 농도 증감에 의한 Fridrickson의 분별법이 정확히 나타났다. 혈중 total-C은 type V > Ⅱa > Ⅱb > IV > Ⅲ 순으로, LDL-C은 Ⅱa > Ⅱb > IV > V > Ⅲ 순으로 나타났다. 동맥경화 지수를 살펴보면, type V, Ⅱb 및 Ⅱa가 고지혈증 형태 중 가장 높은 위험률을 보였고 Lp(a)는 apo B-100와 정의 상관관계를 보이고($r = 0.6, p < 0.01$) type Ⅲ에서 가장 높게 나타났으나 본 연구에서는 관련성이 희박하였다.

3) 215명의 고지혈증 환자 중 E3/3(77%), E3/2(10.7%), E3/4(0.6%), E2/2(0.3%), E2/4(0.2%), E4/4(0.93%)로 분포되어 E2형이 정상인 보다 고지혈증 환자에게서 높게 나타났다. Apo E3/2가 type Ⅱa, E2/2과 E3/4는 type IV에 높이 분포되어 있었으며 type Ⅲ, Ⅱb, V는 모두 E2를, type IV와 Ⅱa경우는 모두 E4를 가지고 있었고 type V는 E3/2만 존재하였다. Type Ⅲ가 모두 E2/2 출수형인 보고에 비하여 본 연구에서는 군합형으로 나타나서 대조를 보였다.

4) LDL-C, VLDL-C, TG, apo B-100, (TC-HDL)/HDL등이 고지혈증 대상자중 apo E isoform간의 차이를 보였다. 특히, E2 allele는 TG, VLDL-C가 높은 반면 LDL-C가 낮았으며 E4 allele는 정확히 반대의 현상을 보여주어서 대사의 차이가 일관성이 있었다. HLP 대상자에서도 같은 경향을 보여주고 있어서 고지혈증 대상자의 혈중 지질 수준의 변화는 명확하게 apo E 표현형에 영향을 받는 것으로 보인다.

Acknowledgements

This work was supported by grant(No 971-0603-016-2)from the Basic Research Program of the KOSEF(Korea Science and Engineering Foundation)

Literature cited

- 1) Porkka KV, Nuotio I, Pajukanta P, Ehnholm C, Suurinkeroinen L, Syvanne M, Lehtimaki T, Lahdenkari AT, Lahdenpera S, Ylitalo K, Antikainen M, Perola M, Raitakari OT, Kovanen P, Viikari JS, Peltonen L, Taskinen MR. Phenotype expression in familial combined Hyperlipidemia *Atherosclerosis* 133(2): 245-253, 1997
- 2) Coatner JA, Coates PM, Liawuras CA, Jarvik GP. Familial combined hyperlipidemia in children, Clinical expression, metabolic defects & management. *J Pediatr* 123(2): 177-184, 1993
- 3) Fredrickson DS, Levy RI. Familial hyperlipoproteinemia in the metabolic Bases of inherited disease 3rd ed, New York, McGraw-Hill, 1972
- 4) Leren TP, Borresen AL, Berg K, Hjermann I, Leren P. Increased frequency of the apo E4 isoform in male subjects with multifactorial hypercholesterolemia. *Clin Genet* 27: 458-462, 1985
- 5) Chiselli G, Schaefer EJ, Zech LA, Gregg RE, Brewer HB Jr. Increased Prevalence of apo E4 in type V. *J Clin Invest* 70: 474-477, 1982
- 6) Myoungsook L. Apo E polymorphism and disease. *Korean Society for Lipidology* 5(1): 11-23, 1995
- 7) Davingnon J, et al. Apo E polymorphism & atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8: 1-21, 1988
- 8) Wardell MR. Genetic variation in human apo E. *J Lipid Res* 23(8): 1174-1182, 1982
- 9) Utermann G. Apo E polymorphism in health & disease. *Am Heart J* 113: 433-440, 1987
- 10) Lee MS, Snook JT. Differential Effects of PUFA on the reverse cholesterol transport Mechanism According to the Apo E isoforms in Normohypidemic Females. *Korean Journal of Lipidology* 3(2): 291, 1993
- 11) Yamamoto A. Heredity Trait of Dyslipoproteinemia in patients with Atherosclerosis. *Korean Journal of Lipidology* 3(2): 289, 1993
- 12) Lee MS. Apo E2 & E4 alleles influence on the distribution of the human plasma lipid profiles in normolipidemic Korean women. *Kor J Nutrition* 29(6): 642-650, 1996
- 13) Louhija J, Miettinen HE, Kontula K, Tikkkanen MJ, Miettinen TA, Tilvis RS. Aging and genetic variation of plasma apolipoprotein relative loss of the apolipoprotein E4 phenotype in centenarians. *Arterioscler Thromb* 14: 1084-1091, 1994
- 14) Rall SC, et al. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apo E from type III hyperlipidemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4696-4700, 1982
- 15) Rall SC, et al. Identification of new structural variant of human apo E2 in type III hyperlipidemia. *J Clin Invest* 72: 1288-1297, 1983
- 16) Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet* 42: 104-112, 1988
- 17) Fredrickson DS, Lees RSA System for phenotyping of Hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31: 321, 1965
- 18) Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor defect in FH. *Med North A* 66: 335-362, 1982
- 19) Fonda M, Dacol PG, La Verder Battello C, Iisiccaro M, Torizz M, Cattin I. Lp(a) serum concentration in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chim Acta* 31: 223(1-2): 121-127, 1993
- 20) Alloin CA. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470, 1974
- 21) Lowell B. Stable reagents for determination of serum TG by colorimetric, Hantzsch Condensation method. *Clin Chem* 19: 338-340, 1973
- 22) Warnick GR. Precipitation methods of total HDL, and HDL₂ or HDL₃. *Clin Chem* 28: 6, 1982
- 23) Friedewald W. Estimation of the concentration of LDL in plasma without use of the preparative Ultracentrifugation. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
- 24) Mancini G. Immunochemical Quantitation of antigens by radial immuno-difusion. *Immunochemistry* 2: 235-254, 1965
- 25) Marcovina SM, et al. International federation of clinical chemistry standardization project for measurements of apo A-I and B-100. *JIFCC* 3(5): 186-195, 1991
- 26) Wong WL, Eaton DL, Berloui A, Fendly B, Hass PE. A monoclonal antibody based ELISA of Lp(a). *Clin Chem* 36: 192-197, 1990
- 27) Stein EA. Lipid lipoproteins and apolipoproteins. In Clinical chemistry, Nornert WT, WB, Saunders Co pp.829-900, 1986
- 28) Shepherd J and Fruchart JC. Lipoprotein in health & Disease, In Human Plasma Lipoproteins, Walter de Gruyter, Berlin-New York, pp.1-22, 1989
- 29) Eto M. Apo E polymorphism & hyperlipoproteinemia in type II diabetes. *Diabetes* 25: 1374-1382, 1986
- 30) Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor defect in FH. *Med North A* 66: 335-362, 1982
- 31) Mtigue K, Kozansky KE, Fallon JT, Horpel PC and Strickland DK. The atherogenic Lp(a) is internalized & degraded in a process mediated by the VLDL receptor. *J Clin Invest* 100: 2170-2181, 1997
- 32) Davingnon J NA. Apo E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 8: 1-21, 1988
- 33) Lee MS. Studies on the distribution of plasma lipid profiles & body fatness according to apo E polymorphism in normolipidemic Korean women. *J Food Sci & Nutr* 2(4): 338-347, 1997
- 34) Lee MS. A study on the relationship between the body fat distribution and serum lipid profiles according to apo E isoforms in Korean women. *Kor J Lipidology* 6(1): 13-22, 1996
- 35) Utermann G. Apo E polymorphism in health & disease. *Am Heart J* 113: 433-440, 1987
- 36) Stuyt PM, Stalenhoef AF, Demacker PN, vant Laar A. Hyperlipoproteinemia & apo E4. *Lancet* 2(8304): 934, 1982
- 37) Kitahara M, Shinomiya M, Shirai K, Saito Y & Yoshidas Frequency and role of apo E phenotypes in familial hypercholesterolemia & nonfamilial hypercholesterolemia in Japanese. *Atherosclerosis* 82: 197-204, 1990
- 38) Bredie SIH, Vogelaar JM, Demacher PNM & Stalenhoef AFH. Apo E polymorphism influences lipid phenotype, expression, but not LDL subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 126: 313-324, 1996