

ELISA법으로 측정된 소아 혈중 LEPTIN 치에 관한 연구

충남대학교 의과대학 소아과학교실

송 수 호 · 정 용 현

A Study on Serum Leptin Values by Elisa Method in Children

Soo Ho Song, M.D. and Young Hun Chung, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Chungnam National University,
Taejeon, Korea

Purpose: Leptin is an adipocyte-derived blood-borne satiety factor that acts on its cognate leptin receptor in the hypothalamus, thereby regulating food intake and energy expenditure. We measured the leptin concentrations in serum of normal and obese children with human leptin ELISA kit, unlike previous study with leptin RIA kit and investigated the relationship between leptin concentrations and body mass index, gender, and age.

Methods: We measured serum concentrations of leptin in 67 children who were visited to the Department of Pediatrics, Chungnam National University Hospital during the period of 5 months from February, 1999 to June, 1999. Height, weight, obesity index, and body mass index were measured in 67 subjects. Leptin values in serum were measured by sandwich ELISA method. Data analysis was done according to the obesity, body mass index, gender and age.

Results: The mean concentration of leptin was 7.69 ± 8.83 ng/ml in normal children group and 36.34 ± 18.57 ng/ml in obese group. Serum leptin concentrations were significant correlation with the body mass index ($p < 0.01$). Serum leptin concentration was significant higher in the group of over 10 years of age ($p < 0.01$). Leptin levels showed no significant difference by gender.

Conclusion: Serum leptin levels were significantly higher in obesity group than in control one, and they were correlated with body mass index and age. Measurements of leptin value by sandwich ELISA method are very useful and easily applicable to determine obesity. (**J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 3: 175 ~ 180**)

Key Words: Leptin, ELISA method, Obesity

접수 : 2000년 4월 19일, 승인 : 2000년 7월 19일

책임저자 : 정용현, 301-721, 대전광역시 중구 대사동, 충남대학교병원 소아과외국

Tel: 042-220-7246, Fax: 042-255-3158, E-mail: rookie@hanbat.chungnam.ac.kr

서 론

서구에서 비만은 전 인구의 15%를 차지하며 많은 질환의 기저요인이 된다¹⁾. 최근들어 앉아서 일하는 직업들의 증가와 고지방식이로의 변화 등은 비만인구를 더욱 증가시키게 되었다¹⁾. 그러나 이러한 환경에 있는 사람 모두가 비만하지는 않다는 사실은 비만에 다른 인자가 관여함을 시사하게 되었고 이러한 인자를 찾아내기 위한 많은 연구들이 시행되었다. 1953년 Kennedy²⁾는 체중 조절에는 호르몬성 인자가 관여한다는 가설을 세웠고 1994년 Zhang 등³⁾은 비만 유전자(ob유전자)를 positional cloning으로 분리해냄으로써 이 분야에 괄목할만한 발전을 가져오게 되었다.

지방세포의 ob유전자에 의해 합성되는 Leptin은 167개의 amino acid로 구성된 호르몬으로 hypothalamus에 negative feedback으로 작용하여 Hypothalamic neuropeptide Y의 합성 및 분비를 저해하여 식욕을 감소시키며 열량의 소모를 증가시켜 체내 지방량을 조절함으로써 체중을 조절한다고 알려졌다. 즉, 음식물의 섭취는 체내의 insulin 및 glucocorticoid의 분비를 증가시키며 지방의 축적을 유발하고 leptin의 분비를 증가시킨다. 정상적으로는 leptin 분비가 증가하면 체중의 감소가 일어나야 되나 ob mouse에서와 달리 사람에게서는 leptin의 농도가 증가함에도 체중의 감소가 일어나지 않는다는 leptin에 대한 수용체의 저항성의 증가 때문인 것으로 알려지고 있다⁴⁾.

Leptin 농도에 영향을 주는 인자로는 체지방량, body mass index, sex, age, insulin, glucocorticoid, growth hormone 등이 있다⁵⁾. 최근들어 국내에서도 비만아에서의 leptin 농도에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으나 그 결과가 일치하지 않고 대부분의 연구는 Leptin RIA kit를 이용하여 이루어진 바 저자들은 human leptin ELISA kit를 이용하여 혈중 leptin 농도를 측정하여 ELISA법의 유용성을 규명하고 비만아와 정상아 및 연령과 성별에 따른 차이를 비교해 보고자 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1999년 2월 1일부터 1999년 6월 30일까지 충남 대학교병원에 내원한 아동을 대상으로 하였다. 남아 41명, 여아 26명 총 67명의 소아를 무작위로 추출하여 이들의 혈액으로부터 leptin을 측정하였다. 대상 환자의 키와 몸무게를 0.01단위까지 측정하고 이로부터 비만도를 계산하여 19례의 비만군과 48례의 정상군으로 나누었다. 비만도는 1999년도 대한소아과학회의 신장별 표준 체중치를 이용하여 각 연령별, 성별 신장대비 표준체중의 120% 이상 되는 환아를 비만으로 정의하였고 각각의 환아에 대한 체질량 지수는 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{체질량 지수(body mass index)} = \frac{\text{체중(Kg)}}{\text{신장(m)}^2}$$

대상군의 특성으로서 평균 연령은 비만군에서 9.67±4.83세, 정상군에서 4.59±4.32세이었고 성별은 비만군에서 남아 12명 여아 7명, 정상군에서 남아 29명 여아 19명이었다. 체중은 비만군에서 47.90±20.56 Kg, 정상군에서 17.04±10.14 Kg이었고 체질량 지수는 비만군에서 24.65±4.57 Kg/m², 정상군에서 15.69±1.92 Kg/m²이었다. 대상군중 비만을 일으키는 명백한 원인 질환이 있는 경우는 연구 대상에서 제외하였다.

비만도는 5단계로 나누어 각각의 성별로 비교하였고 체질량 지수는 4단계로 나누어 성별에 따라 비교하였다. 또한 각각의 연령 및 성별에 따라 leptin농도를 비교하였다.

혈청은 plain tube에 혈액 2 cc를 채취하고 30분 정도 수직으로 세워 놓은 후 2시간 이내에 원심분리 하였으며 serum만을 따로 분리해 -20°C로 냉동 보관하였다. Leptin 농도는 human leptin ELISA kit (R&D systems Co, USA)를 이용하여 sandwich ELISA법으로 일괄적으로 측정하여 그 값을 구하였다. 측정 및 washing은 Behring ELISA processor II를 이용하였고 통계처리는 SPSS version 7.5 inde-

pendent-sample T test, case summarize 및 frequency 를 이용하였고 P value 0.05 미만을 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

가할수록 혈중 leptin치는 유의하게 증가하였다 (Table 1, 2).

결 과

1. 비만군과 정상군에서의 leptin치

비만군에서의 혈청 leptin의 농도는 평균 36.34±18.57 ng/ml이었으며 정상군에서는 평균 7.69±8.83 ng/ml로 비만군에서 정상군보다 유의하게 높았다. 각각의 비만도에 따른 leptin의 농도는 비만도가 80 미만군에서 5.99±4.02 ng/ml, 80에서 100미만까지의 군에서 7.86±11.53 ng/ml, 100에서 120미만까지의 군에서 7.94±4.03 ng/ml, 120에서 140미만까지의 군에서 27.29±15.75 ng/ml, 140 이상의 군에서 48.77±15.08 ng/ml로 각각의 군에서 비만도가 증

2. 체질량지수별 leptin치

체질량지수가 15 미만인 경우의 leptin 치는 5.06±2.67 ng/ml이었고 15~20 미만인 경우 10.23±11.08 ng/ml이었으며 20~25 미만인 경우는 25.20±15.16 ng/ml, 25 이상인 경우는 52.44±10.03 ng/ml이었다. 체질량지수가 20 미만인 군과 20 이상인 군을 비교하였을 때 20 이상인 군에서 혈중 leptin치가 의미있게 높았다(Table 3, 4).

3. 성별 leptin치

남아에서는 13.97±14.75 ng/ml이었고 여아에서는 18.72±21.89 ng/ml로서 남녀간의 통계적 유의성은 없었다(Table 3).

4. 연령별 leptin치

1세 미만 군에서의 평균 농도는 10.70±15.45

Table 1. Serum Leptin Values in Various Groups by Obesity Index

Obesity index	No	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)
< 80	5	5.99	4.02
80~100	26	7.86	11.53
100~120	17	7.94	4.03
120~139	11	27.29	15.75
≥140	8	48.77	15.08
Total	67	15.82	17.85

Table 2. Comparison of Leptin Values by Obesity Index

Obesity index	No	Leptin (ng/ml)	SD (mg/ml)
≥ 120	48	36.34	18.57
<120	19	7.69	8.83
p-value		<0.01	

Table 3. Serum Leptin Values in Various BMI Group & Sex

BMI	Male			Female		
	No	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	No	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)
<15	9	3.93	1.68	10	6.08	3.04
15~20	21	8.06	4.07	10	14.79	18.39
20~25	8	27.61	14.25	1	5.93	0
≥25	3	49.12	6.78	5	54.43	11.82
Total	41	13.97	14.75	26	18.72	21.87

Table 4. Comparison of Serum Leptin Values by Body Mass Index

BMI	No	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)
< 20	49	8.23	9.27
≥ 20	18	36.45	19.45
p-value		<0.01	

Table 5. Serum Leptin Values in Various Groups by Age

Age group (y)	No	Serum leptin level (ng/ml)	SD (ng/ml)
<1	16	10.70	15.45
1~6	20	10.51	10.80
6~10	10	10.67	11.36
≥10	21	27.23	22.47
Total	67	15.82	17.85

ng/ml, 1세에서 6세 미만 군에서는 10.51 ± 10.80 ng/ml, 6세에서 10세 미만군에서는 10.67 ± 11.36 ng/ml, 10세 이상군에서는 27.23 ± 22.47 ng/ml이었고 10세 미만군의 평균은 10.62 ± 12.43 ng/ml, 10세 이상의 군에서는 27.23 ± 22.47 로 10세 이상군에서 의미있게 높았다(Table 5, 6).

고 찰

1953년 Kennedy²⁾에 의해 체중조절에 호르몬성 인자가 관여할 것이라는 가설이 세워진 이후 많은 과학자들이 실체를 알아내기 위해 연구를 거듭해 왔고 1994년 Zhang 등³⁾에 의해 비만 유전자가 positional cloning으로 분리되었다. Geffroy 등⁹⁾은 fluorescence in situ hybridization법으로 비만 유전자를 7q32로 localization하였다. 이 비만 유전자로부터 생성된 leptin은 167개의 amino acid로 구성된 호르몬으로 시상하부의 neuropeptide Y를 억제하여 음식 섭취를 감소시킨다고 하며⁷⁾, 또한 직접적으로

Table 6. Comparison of Leptin Values by Age

Age	No	Leptin (ng/ml)	SD (ng/ml)
<10	46	10.62	12.43
≥10	21	27.23	22.47
p-value		<0.01	

fatty acid와 triglyceride의 생성을 억제하고 동시에 lipid oxidation을 증가시킴으로써 intracellular lipid concentration을 억제한다고 한다⁸⁾. 즉, Fatty acid 합성의 rate-limiting enzyme인 acetyl-CoA carboxylase activity를 leptin이 억제함으로써 lipid metabolism에 작용하게 된다⁹⁾. 음식섭취의 조절과 energy 균형에 관여하는 인자에는 short-term system과 long-term system의 두 가지 mechanism이 존재하는데 plasma glucose concentration, body temperature, plasma amino acid cholecystokinin (CCK) 등이 short-term system의 대표적 인자들이며^{10,11)} leptin은 long-term system으로 음식을 먹은 직후에 측정하여도 그 값은 올라가지 않는다⁵⁾.

Zhang 등³⁾은 실험 모델인 ob/ob mice에서 leptin이 유전자의 결함으로 생성되지 못했을 경우 ob/ob mice는 탐식을 하게 되어 뚱뚱해지는 것을 발견하였고 이 mice에게 leptin을 투여하면 탐식이 줄며 체중의 감소를 보이는 것을 밝혔다. 그러나 사람의 경우에는 지방이 증가하게 되면 leptin의 혈중 농도는 증가하지만 leptin에 대한 수용체의 저항성이 증가하게 됨으로써 지방조직의 양이 유지된다고 생각된다⁴⁾. 즉, 비만인에서의 문제는 leptin에 대한 감수성이 떨어져 있는 것이다.

현재까지의 연구에서 혈중 leptin의 농도는 비만도와 체질량지수 등과 상관관계가 있다고 하며¹²⁾ 본 연구에서도 비만군에서 정상군보다 leptin 농도가 유의성있게 증가되어 있었고(p-value < 0.01) 체질량 지수와도 유의한 상관관계가 있었다(p-value < 0.01). Hassink 등¹³⁾은 정상 소아의 혈중 leptin 농도를 7.8 ± 6.5 ng/ml, 비만아에서 38.6 ± 21.0 ng/ml로 보고하였으며 국내의 연구에서는 최 등¹⁴⁾은 정

상아군 4.8 ± 4.6 ng/ml, 비만아군 8.7 ± 6.0 ng/ml로 보고하였고, 하 등¹⁵⁾은 정상아군 3.6 ± 3.3 ng/ml, 비만아군 13.7 ± 5.4 ng/ml로 보고하였다. 본 연구에서는 정상아군 7.7 ± 8.8 ng/ml, 비만아군 36.3 ± 18.6 ng/ml로 Hassink 등의 연구와 비슷한 결과를 나타내었다. 이는 Hassink 등¹³⁾의 연구에서 인종간의 차이가 없다는 것과 일치한다.

Leptin 농도와 성별의 관계는 여아에서 남아보다 높다가 성장 말기로 가면 남녀간 차이가 없어진다는 보고가 있고⁹⁾, 비만도가 25% 이하에서는 남녀간의 차이는 없으나 이보다 더 비만한 경우에는 여자의 경우 남자보다 더 빨리 상승한다는 보고도 있다¹⁶⁾. 본 연구에서는 남녀간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았는데($p\text{-value} > 0.05$) 이는 외국의 보고¹³⁾ 및 최 등¹⁴⁾의 보고와는 일치하지 않으나 국내 연구 중 하 등¹⁵⁾의 연구와 일치하는 것으로 이는 본 연구의 대상군에서 남녀간에 체지방량이나 체지방 분포의 유의한 차이가 없었기 때문인 것으로 사료된다.

Leptin 농도와 연령 및 사춘기와의 관계는 여아에서는 사춘기가 시작되면서 꾸준히 leptin 농도가 상승하나 남아에서는 Tanner stage III 이후부터는 leptin 농도가 감소하는데 이는 여아와는 달리 남아에서는 체지방량 보다는 근육량이 증가하기 때문이라고 한다¹⁷⁾. Hassink 등¹³⁾의 연구에서 여아에서는 사춘기가 가까울수록 혈중 leptin 농도가 증가하다가 사춘기가 끝나면 급격하게 감소한다고 하였는데 이는 몸의 변화가 급격히 이루어지는 사춘기의 여아들은 생식에 필요한 지방 조직의 축적을 위해 leptin에 대한 저항성이 필요한 것으로 생각된다¹⁸⁾. 이러한 관점에서 leptin은 reproductive axis의 metabolic signal로도 작용한다고 생각된다¹⁹⁾. 본 연구에서는 10세 이하에서는 남녀 모두 나이의 증가에 따른 leptin 농도의 유의성 있는 변화는 없었으나 10세 이상인 군과 10세 미만인 군을 비교하였을 때는 10세 이상군에서 serum leptin 농도가 유의성 있게 높았다($p\text{-value} < 0.01$).

혈중 leptin 농도에 영향을 줄 수 있는 다른 요인 들로는 체내의 insulin, glucocorticoid, growth hor-

mone 등이 있다⁵⁾. 본 연구는 이러한 인자들이 관여할 수 있는 질환들에 대해서는 배제하고 시행되었다.

요 약

목 적: Leptin은 지방세포에서 분비되어 hypothalamus에 작용함으로써 식욕과 에너지소모를 조절한다고 알려졌다. 그러나 비만아에서는 Leptin 수용체의 저항성 증가에 의해 비만이 지속된다고 보고된다. 최근들어 국내에서도 비만아에서의 Leptin 농도에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으나 그 결과가 일치하지 않고 대부분의 연구는 Leptin RIA kit를 이용하여 이루어진 바 저자들은 human leptin ELISA kit를 이용하여 혈중 leptin 농도를 측정하여 ELISA법의 유용성을 규명하고 비만아와 정상아 및 연령과 성별에 따른 차이를 비교해 보고자 본 연구를 실시하였다.

방 법: 1999년 2월 1일부터 1999년 6월 30일까지 충남대학교병원에 내원한 아동을 대상으로 총 67명(남아 41명, 여아 26명)의 소아를 무작위로 추출하였다. 1999년도 대한소아과학회의 신장별 표준 체중치를 이용하여 각 연령별, 성별 신장대비 표준 체중의 120% 이상 되는 환아를 비만으로 정의하여 비만아동 19명(남아 12명, 여아 7명)과 정상아동 48명(남아 29명, 여아 19명)으로 분류하였다. 67명의 대상아동에 대해 신장, 체중, 비만도, 체질량 지수를 조사하고 ELISA법을 이용하여 Leptin 농도를 측정하였다. 이것을 비만군과 정상군, 체질량지수별, 성별, 연령별로 나누어 비교분석 하였다.

결 과:

- 1) 정상아의 평균 Leptin 치는 7.69 ± 8.83 ng/ml이었다.
- 2) 비만아에서 평균 Leptin 치는 36.34 ± 18.57 ng/ml이었다.
- 3) 체질량 지수가 20 이상인 군에서 20 미만인 군보다 혈중 leptin 치가 유의하게 높았다($p < 0.01$).
- 4) 10세 이상인 군에서 10세 미만인 군보다 유의하게 높았다($p < 0.01$).

5) 남녀간의 혈중 leptin 치는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

결론: ELISA법을 이용한 혈중 leptin 치는 RIA법을 이용한 혈중 leptin 치와 같이 비만한 군에서 높게 나타났으며, 이에 관련된 인자로는 비만도, 체질량 지수 및 연령 등이 있었다. 특수 시설이 필요한 RIA법보다 일반 검사실에서 용이하게 측정할 수 있는 ELISA법이 널리 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Wilding, John. Science, medicine, and the future: Obesity treatment. *BMJ* 1997;315:997-1000.
- 2) Kennedy GR. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond* 1953;140:578-92.
- 3) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
- 4) Editorials. Obesity, leptin and the brain. *N Engl J Med* 1996;334:324-5.
- 5) Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentration in normal weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.
- 6) Geffroy S, De Vos P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B. Localization of the human ob gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1995;28:603-4.
- 7) Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995;377:530-2.
- 8) Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4637-41.
- 9) Bai Y, Zhang S, Kim KS, Lee JK, Kim KH. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem* 1996;271:13939-42.
- 10) Schneider BS, Friedman JM, Hirsch J. In *Brain peptides* (eds Krieger D, Martin J & Brownstien M) 251-80 (Wiley, USA, 1983).
- 11) Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out big picture. *Cell* 1996;87:377-89.
- 12) Havel PJ, Kasim-Karakas S, Muller W, Johnson PR, Gingerish RL, Stern JS. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and over weight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4406-13.
- 13) Hassink SG, Sheslow DV, de Lancy E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 1996;98:201-3.
- 14) 최연호, 김순기, 현인영. 소아의 혈중 leptin 값에 대한 연구: 정상 집단에서의 분석. *소아과* 1998;41:960-5.
- 15) 하경아, 김일란, 박미정, 장재현, 정철영. 비만아동에서 혈중 leptin 농도. *소아과* 1998;41:953-9.
- 16) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduce subject. *Nat Med* 1995;1:1155-61.
- 17) Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Muller J, et al. plasma leptin level in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2904-10.
- 18) Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chate BT, Rabinowitz D, et al. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-6.
- 19) Saad MF, et al. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effect of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(2):453-9.