

성별 및 채뇨 시각별 ^1H NMR 기반 뇨 대사체 프로파일링 연구

정진영^{1), †}, 황금숙^{2), 3), †}, 박종철^{2), 3)}, 김동현^{4), 5)}, 하미나^{6), *}

¹⁾한림대학교 고령사회연구소, ²⁾한국기초과학지원연구원 서울센터,
³⁾충남대학교 분석과학기술대학원, ⁴⁾한림대학교 의과대학 사회의학교실,
⁵⁾한림대학교 임상역학연구소, ⁶⁾단국대학교 의과대학 예방의학교실

^1H NMR-Based Urinary Metabolic Profiling of Gender and Diurnal Variation in Healthy Korean Subjects

Jin-Young Jeong^{1), †}, Geum-Sook Hwang^{2), 3), †}, Jong-Chul Park^{2), 3)},
Dong-Hyun Kim^{4), 5)} and Mina Ha^{6), *}

¹⁾*Institute of Aging, Hallym University*

²⁾*Korea Basic Science Institute, Seoul Center*

³⁾*Graduate School of Analytical Science and Technology, Chungnam University*

⁴⁾*Department of Social and Preventive Medicine, College of Medicine, Hallym University*

⁵⁾*Hallym Research Institute of Clinical Epidemiology*

⁶⁾*Department of Preventive Medicine, Dankook University College of Medicine*

ABSTRACT

Objectives : This study was undertaken to examine the metabolomic changes due to gender and diurnal variation at sampling time and to identify an appropriate time point for urine sampling in epidemiologic studies using metabolomic profiles.

Methods : Urine samples were collected twice a day (morning and afternoon) from 20 healthy Korean adults after fasting for 8 hours. The metabolomic assay was investigated using ^1H NMR spectroscopy coupled with the principal components analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The metabolites responsible for differentiation between groups were identified through the loading plot of PLS-DA and quantified using Chenomx NMR Suite with a 600 MHz library.

Results : Metabolites responsible for differentiation in gender and sampling time were creatinine, trimethyl amine oxide (TMAO), hippurate, mannitol, citrate and acetoacetate. Dimethylamine showed difference only as a factor of diurnal time. The level of creatinine was higher in men compared to women, and the levels of citrate,

접수일: 2010년 8월 25일, 채택일: 2010년 12월 10일

† 정진영과 황금숙은 제1저자로서 동일한 정도로 기여함.

*Corresponding author:

Tel: +82-41-550-3854, Fax: +82-41-556-6461

E-mail: minaha@dku.edu

TMAO, hippurate, mannitol, and acetoacetate were higher in women compared to men. The levels of creatinine, TMAO, hippurate, dimethylamine and mannitol were higher in the morning rather than the afternoon while those of citrate and acetoacetate were higher in the afternoon rather than the morning.

Conclusions : Since urinary metabolomic profiles varied by gender and diurnal cycle, urine sampling should be performed at the same time point for all participants in epidemiologic studies using metabolomic profiles.

Key words : Diurnal variation, ^1H NMR spectroscopy, Metabolomic profiles, Multivariate statistical analysis, Urine sample

서 론

‘대사체군학(Metabolomics)’은 소변, 혈장 또는 조직과 같은 생물학적 시료에 존재하는 여러 가지 낮은 분자량의 대사체를 동시에 분석하여, 정량 및 정성적인 정보를 제공하는 기술이다[1]. 대사체 프로파일링(metabolic profiling)연구는 세포 또는 조직 내의 대사체의 거동, 분비 변화 등을 체계적으로 확인하고 정량화한다. 이를 통해 대사체군을 생리적 혹은 병리적 상태와 연관 지어 대사체 네트워크를 조사하고, 특정 질환의 대사체 변화를 네트워크 모델로 이해하는 새로운 패러다임이다[2]. 대사체 프로파일링 연구는 약물의 부작용과 독성을 전임상기에 스크리닝(screening)하는 약물안전성 연구에 활용할 수 있다[3]. 또한 질병상태에서 변화되는 대사체를 검출함으로써 증상발현 이전에 질병을 조기진단 하는 것이 가능하게 된다[4]. 그러므로 질병진단의 표지물질 및 생체지표 도출도 가능하게 될 것이다.

이전의 연구들로부터 대사체 프로파일은 성[5-7] 연령[6,7], 식이[8,9], 그리고 문화적[10,11] 요인들과 관련된 자연적 변이(natural variation)가 있음이 밝혀졌다. 또한 생체주기에 따른 시료 자체의 개인 내 변이[6,12,13]로 인해 도출된 대사체와 질병과의 연관성이 약화될 수 있다. 그러므로 병리적으로 의미 있는 비정상적 대사체를 발견하기 위해서 그리고 질병과 지표와의 관련성이 약화되는 것을 보정할 수 있는 근거를 마련하기 위해서는 해당 집단에서의 일반적인 대사체 프로파일에 대한 정보 수집이 선행되어야 한다. 즉 기 구축된 건강한 정상인들의 대사체 프로파일이 질병이 있는 사람들에서 발견될 수 있는 특이적 대사체를 구별해 낼 수 있는 비교기준이 될 수 있는 것이다. 또한, 인체의 대

사과정에 관여하는 각종 호르몬의 분비가 일주기 리듬을 가지고 있기 때문에 많은 종류의 대사체는 일주기 변동을 가지는 것으로 알려져 있다[10,13].

대사체 프로파일링 분석을 위해서는 첨단장비와 측정된 대량의 데이터들을 분석하고 체계적으로 분류하는 통계프로그램이 필수적이다. 현재 주 분석 장비는 nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)과 mass spectroscopy (MS)이다[14]. 이 중에서도 NMR은 전처리 과정이 크게 필요하지 않으면서 정성 및 정량 분석이 가능할 뿐 아니라, 고속 자동화 분석을 이용하여 대량 시료 분석이 가능하다. 또한, 재현성이 뛰어나기 때문에 [1] 데이터베이스 및 라이브러리를 통하여 분석 데이터로부터 대사체를 쉽게 확인할 수 있는 장점을 가지고 있다[2].

본 연구는 한국인의 정상적인 소변시료에서 배출되는 대사체의 일반적인 기저 양상, 즉 대사체 프로파일을 만들기 위한 대규모 역학적 대사체군 연구를 수행하기에 앞서, 개체 내 변이 중 특히 일주기 변동이 대사체군 프로파일에 미치는 영향을 평가하고, 소변시료 수집의 표준화된 방법을 찾아내기 위하여 수행되었다. 즉 대사체군 패턴과 프로파일을 이용한 대규모 역학연구를 위하여 소변시료를 수집할 때, 일주기 변동이 대사체군에 미치는 영향의 크기가 반드시 고려되어야 하는지를 판단하고, 일주기 변동으로 인한 개체 내-개체 간 변이를 최소화하기 위한 방법을 제시하고자 하였다.

연구 방법

1. 연구대상과 시료 수집

연구대상자는 2008년 1월 한림대학교 성심병원과 단국대학교병원의 건강검진센터에 근무하는 직원을 대상으로 모집하였다. 연구목적은 설명, 이에

동의하는 20명(남녀 각각 10명)의 자원자로부터 동의서를 받았다. 대상자의 입적기준은 첫째, 과거 고혈압, 당뇨, 뇌졸중 등의 주요 만성질환 진단을 받은 적이 없고, 둘째, 연구 참여 당시 질병치료를 위한 약물을 복용하지 않는 것이다. 대상자의 평균연령은 남 39.7세(범위 30~49세), 여자 29.0세(범위 23~38세)였다. 소변시료는 같은 날 오전(7~9시)과 오후(4~6시)에 각각 10 mL씩 수집되었고, 수집 후 1시간 내에 -80°C 에 냉동보관 되었다. 대상자들은 전날 저녁 식사 이후 공복상태를 유지, 다음 날 아침 연구를 위한 첫 소변을 받은 후 식사를 하였다. 이후 오후 소변시료 수집을 위해 또 다시 8시간 이상 공복을 유지하였다. 이때 약간의 물 섭취는 허락되었고, 섭취한 물의 양을 기록하여 오후 소변 수집 시 고지하도록 하였다. 참여자들이 섭취한 물의 양은 평균 800 cc였다. 본 연구는 한림대학교 성심병원과 단국대학교병원의 임상연구윤리심의위원회(The Institutional Review Board)로부터 승인 받았다.

2. 시료의 전처리 및 분석

수집된 소변시료는 15,000 g * 20분간 4°C 를 유지하여 원심분리 되었으며, 상층액 400 μL 을 취한 다음, sodium azide 0.018% (W/Vol)가 첨가된 0.2M의 sodium phosphate buffer 200 μL 를 혼합하였다. 이 혼합액에서 500 μL 를 취한 다음, 5 mM DSS와 100 mM imidazole을 포함하는 D_2O 용액 50 μL 를 혼합하였다. 혼합된 소변 용액은 6.8 ± 0.1 로 pH를 맞추는 후 600 MHz Varian Inova-600 MHz NMR spectrometer (Varian, Inc., Palo Alto, CA)를 이용하여 분석하였다.

1) ^1H -NMR 분석

전 처리된 소변시료들에 대한 ^1H -NMR 스펙트럼은 Noesy1D sequence를 사용하여 결과를 얻었다. 분석은 25°C 에서 진행하였으며, NMR 측정조건은 다음과 같다.

Spectral width 9615.4 Hz, data point 76924, acquisition time 4s, relaxation delay 2s, mixing time 0.1s의 조건으로 64번 스캔 하였다. 용매인 물의 피크를 최소화하기 위해 pre-saturation 방법을 사용하였으며, 이때 saturation delay 1.5초, saturation power는 6인 saturation frequency에서 측정하였다.

2) NMR 데이터의 통계 분석

각 시료에 대하여 NMR 데이터를 얻은 후, Chenomx 소프트웨어(Chenomx NMR Suite 5.0, Chenomx Inc, Edmonton, Canada)를 사용하여 binning 분석을 수행하였다. Binning은 내부 기준물질인 sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate 5 mM을 기준으로, NMR스펙트럼을 0.01 ppm으로 일정범위 영역까지 조각 내었다. 범위 지정 시 물 영역에 해당되는 4.7~4.9 ppm, urea영역 5.4~6.4 ppm, imidazole 영역인 7.3~7.38 ppm, 8.26~8.42 ppm, 그리고 DSS영역인 1.7~1.8 ppm, 2.88~2.94 ppm영역은 분석에서 제외하였다. 그리고 SIMCA-P (version 11, Umetrics, Sweden)를 사용하여 PCA (principal components analysis)와 PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) 분석을 하였다. PCA 분석 시 집단에서 벗어나는 이상치(outlier)들을 제거하였고, PCA와 PLS-DA를 통하여 생체 주기별, 성별 분석을 진행하였다. 또한, Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA)을 이용하여 스펙트럼을 정렬함으로써 모든 스펙트럼이 균일한 조건에서 분석되도록 하였다. Spotfire (Spotfire DecisionSite 9.1, version 9.1.0) 그래픽 소프트웨어를 사용하여 spectral binning 분석에서 나온 결과들을 스펙트럼화하여 관찰, 각 집단별 스펙트럼들에서 상대적인 차이를 보이는 대사체를 확인하였다.

PCA는 다량의 변수를 가진 대량 데이터를 분류 및 분석하는데 유용한 다변량 분석 방법이다[9,15]. 일반적으로 데이터가 가진 정보의 개관을 제공하기 위해 그리고 이상치(outlier)들을 확인, 그룹화 또는 집단 간에 분리되는 양상을 관찰하기 위해 조사의 시작단계에 적용된다. Score plot과 loading plot 이라는 두 형태의 도표를 사용하여 그래픽적으로 분석한다. Score plot에서 집단 간의 다른 대사체 패턴을 확인할 수 있으며, loading plot은 score plot에서 보여지는 분리 패턴을 해석하는 수단으로 사용될 수 있다. 그러므로 PCA와 같은 다변량 통계 분석을 통하여 생리적 변이와 관련된 생화학적 대사물질의 변화에 대한 정보를 얻을 수 있다[9,15].

생체 주기별, 그리고 성별 소변시료의 전체 구간에 대한 비교를 위해 chenomx 소프트웨어를 이용하여 baseline과 phase를 동일하게 맞추었다. 전체 스펙트럼 범위는 0~10 ppm이며, 붉은색 표시부분은 기준 물질로 사용한 DSS로서 피크의 위치와 적분값을 일정하게 맞추기 위해 사용하였다.

마지막으로 chemomx 6.1 소프트웨어와 NMR Suite 라이브러리를 이용하여 스펙트럼 패턴 분석과 PLS-DA 분석에서 성별, 채뇨 시각별로 농도의 차이가 관찰된 대사체들에 대한 정량 값(평균±표준

편차)을 산출하였다. 이때 남녀 간 대사체의 정량 값 비교 시는 연령을 보정하였으며, 채뇨 시각에 따른 통계적 유의수준은 paired t-test로 구하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

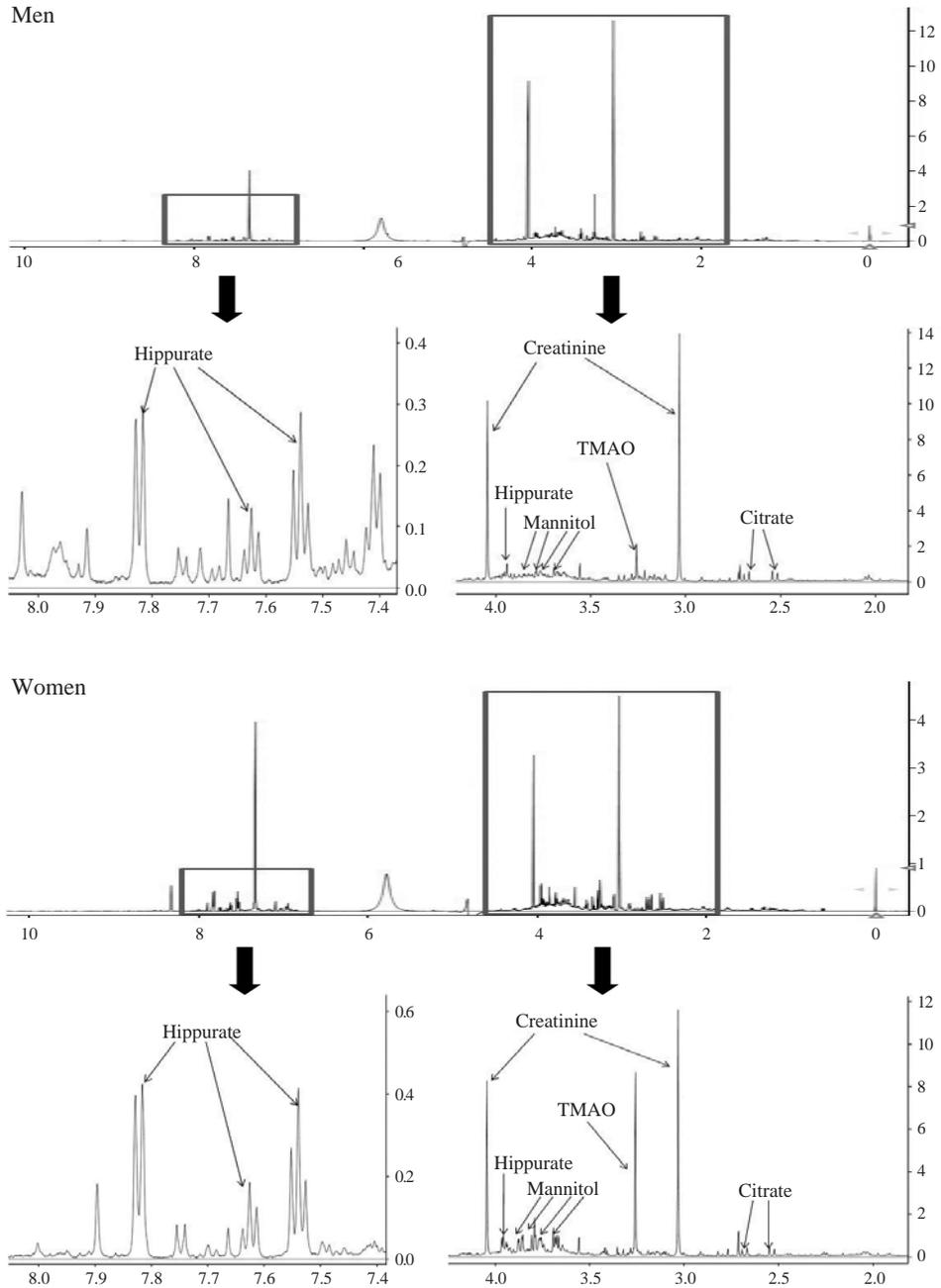


Fig. 1. Metabolomic spectral patterns according to gender in urine samples of healthy Korean adults. TMAO; trimethyl anine oxide.

Table 1. Summary of urinary metabolites according to gender and diurnal variation among healthy Korean adults 2008

Metabolite	Chemical shift (ppm)	Gender			Diurnal variation		
		Men	Women	p-value	Morning	Afternoon	p-value*
		Mean ± SD					
Citrate	2.66~2.7, 2.51~2.56	2368.1 ± 1085.2	3570.2 ± 1830.3	0.073	2272.6 ± 1511.9	2969.1 ± 1589.0	0.001
Creatinine	4.03~4.05, 3.02~3.04	14393.7 ± 3365.1	11963.2 ± 3961.2	0.519	13178.4 ± 3788.3	7372.3 ± 3802.3	<.001
TMAO	3.25~3.27	752.7 ± 170.9	2406.5 ± 2588.6	0.487	1579.6 ± 1976.8	431.9 ± 564.3	0.007
Hippurate	7.8~7.84, 7.6~7.64, 7.52~7.56, 3.95~3.97	3289.8 ± 1687.7	5094.9 ± 4521.7	0.217	4192.4 ± 3448.4	1390.8 ± 1528.5	0.001
Dimethylamine	2.7~2.71	—	—	—	650.5 ± 504.6	278.9 ± 171.4	0.004
Mannitol	3.86, 3.74~3.82, 3.65~3.7	2509.2 ± 1486.9	2887.8 ± 2269.5	0.152	2698.8 ± 1964.8	929.5 ± 860.0	0.002
Acetoacetate	2.26~2.27, 3.43~3.44	258.2 ± 101.9	289.4 ± 144.8	0.015	273.8 ± 131.6	537.6 ± 835.6	0.173

TMAO; trimethyl anine oxide.

*p-value calculated by t-test for gender difference and by paired t-test for diurnal difference.

연구 결과

1. 성별 대사체 스펙트럼 비교

스펙트럼 패턴 분석결과, 남녀 간 소변시료의 전체적인 NMR 스펙트럼의 피크 양상은 비슷하였으나 특정 피크에서 정량적인 차이가 관찰되었다. 대사체들이 관찰되는 스펙트럼을 구간별로 확대하여, 성별 간 피크 적분 값을 관찰한 결과 hippurate, trimethyl anine oxide (TMAO), citrate, creatinine, mannitol 피크에서 차이를 보였다. Creatinine (3.02~3.04 ppm과 4.03~4.05 ppm)은 남녀 모두에서 강력한 세기의 피크를 보였고, TMAO (3.25~3.27ppm)는 여자에서 더 높은 세기의 피크로 관찰되었다. Citrate와 mannitol은 남녀 군 모두에서 낮은 피크의 세기를 보였다(Fig. 1).

NMR 스펙트럼을 0.01 ppm으로 조각 내어 구간별로 계산된 각 피크의 적분 값에 대한 결과를 SIMCA-P 프로그램을 이용하여 PCA 다변량 분석 (Multivariate Analysis)한 결과, 남녀 간 프로파일 패턴에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. PLS-DA 분석결과 y축을 기준으로 남자는 위쪽 여자는 아래 쪽으로 나뉘어졌다. PLS-DA의 loading line-plot을 통해서는 citrate, TMAO, mannitol 이외에도 acetoacetate가 성별 간 차이가 있었다. Spotfire 프로그램 분석결과, PLS-DA에서와 유사하게 hippurate, crea-

tinine, TMAO, citrate, mannitol에서 남녀 간 차이가 있었다. Creatinine은 남자에서, 그리고 그 외 다른 대사체들은 여자에서 더 많이 배출되었음을 알 수 있었다(Fig. 2).

대사체의 평균 정량 값에 대한 통계적 유의성을 살펴보면, 스펙트럼 패턴 분석과 PLS-DA 분석에서와 마찬가지로 성별에 따른 차이가 관찰되었다. Acetoacetate는 여자에서 유의하게 높았으며, citrate 또한 여자에서 높았으나 경계역의 유의성을 보였다. 그 외 TMAO, hippurate, mannitol은 여자에서, creatinine은 남자에서 높았으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Table 1).

2. 채뇨 시각에 따른 대사체 스펙트럼 비교

스펙트럼 패턴 분석결과, 채뇨시각별 전체적인 NMR 스펙트럼의 피크 패턴은 비슷하나 특정 피크에서 정량적인 차이를 보였다. 대사체들이 관찰되는 스펙트럼을 확대한 결과, hippurate, TMAO, citrate, creatinine, mannitol, acetoacetate, dimethylamine의 대사체가 오전, 오후의 채뇨 시각에 따른 차이를 보였다(Fig. 3).

SIMCA-P 프로그램을 이용한 PCA 분석결과 오전시료에서 4개의 이상치가 관찰되었으며, 오전과 오후의 그룹이 y축 방향으로 나누어지고 있었다. PLS-DA 분석에서는 PCA에서보다 분리가 더욱 명확하였다. PLS-DA의 loading line-plot 분석을 통해

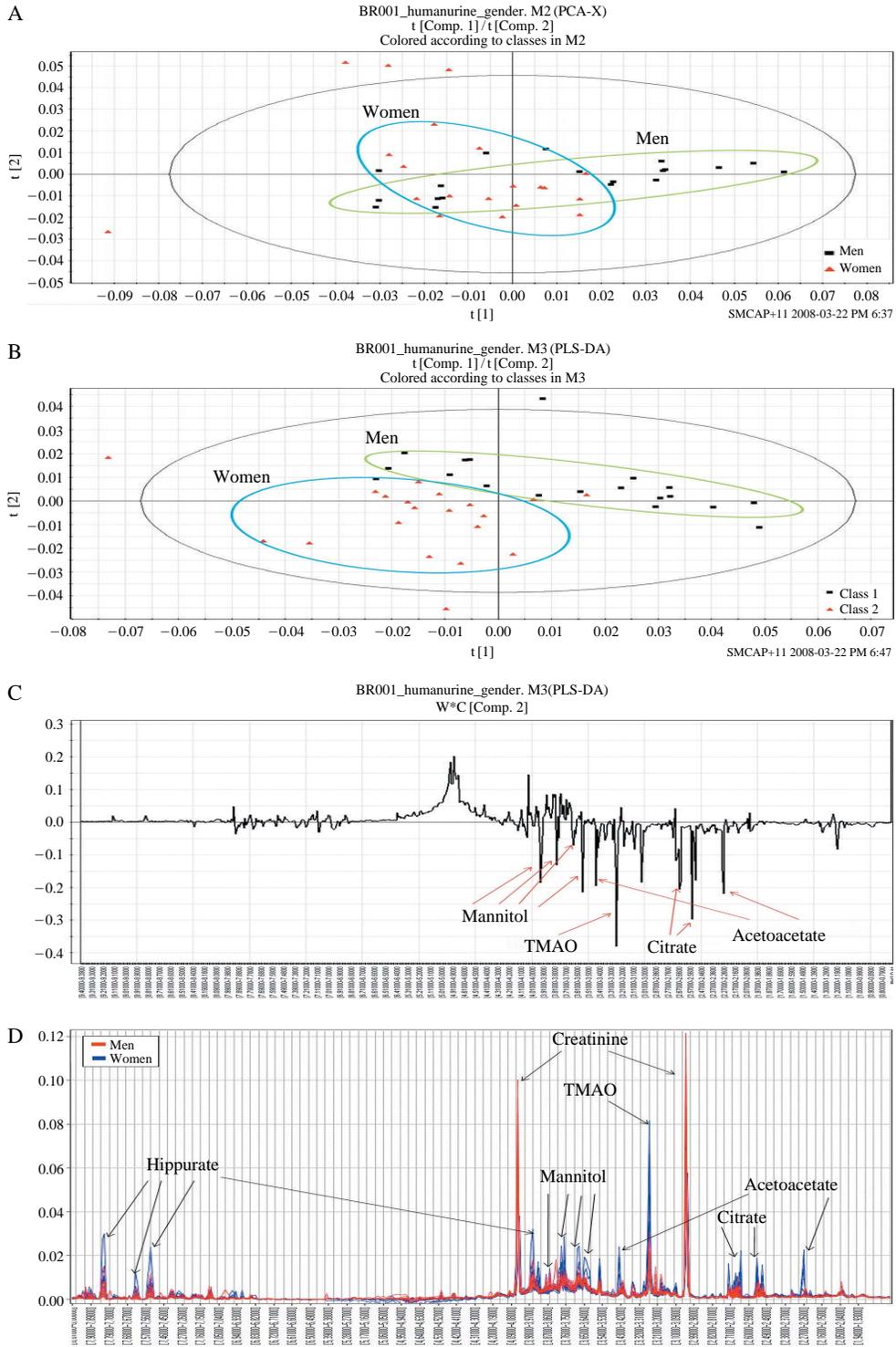


Fig. 2. Spectral analysis of metabolomic pattern according to gender using PCA (A), PLS-DA (B), loading line-plot (C), and Spotfire program (D) in urine samples of healthy Korean adults. TMAO; trimethyl anine oxide.

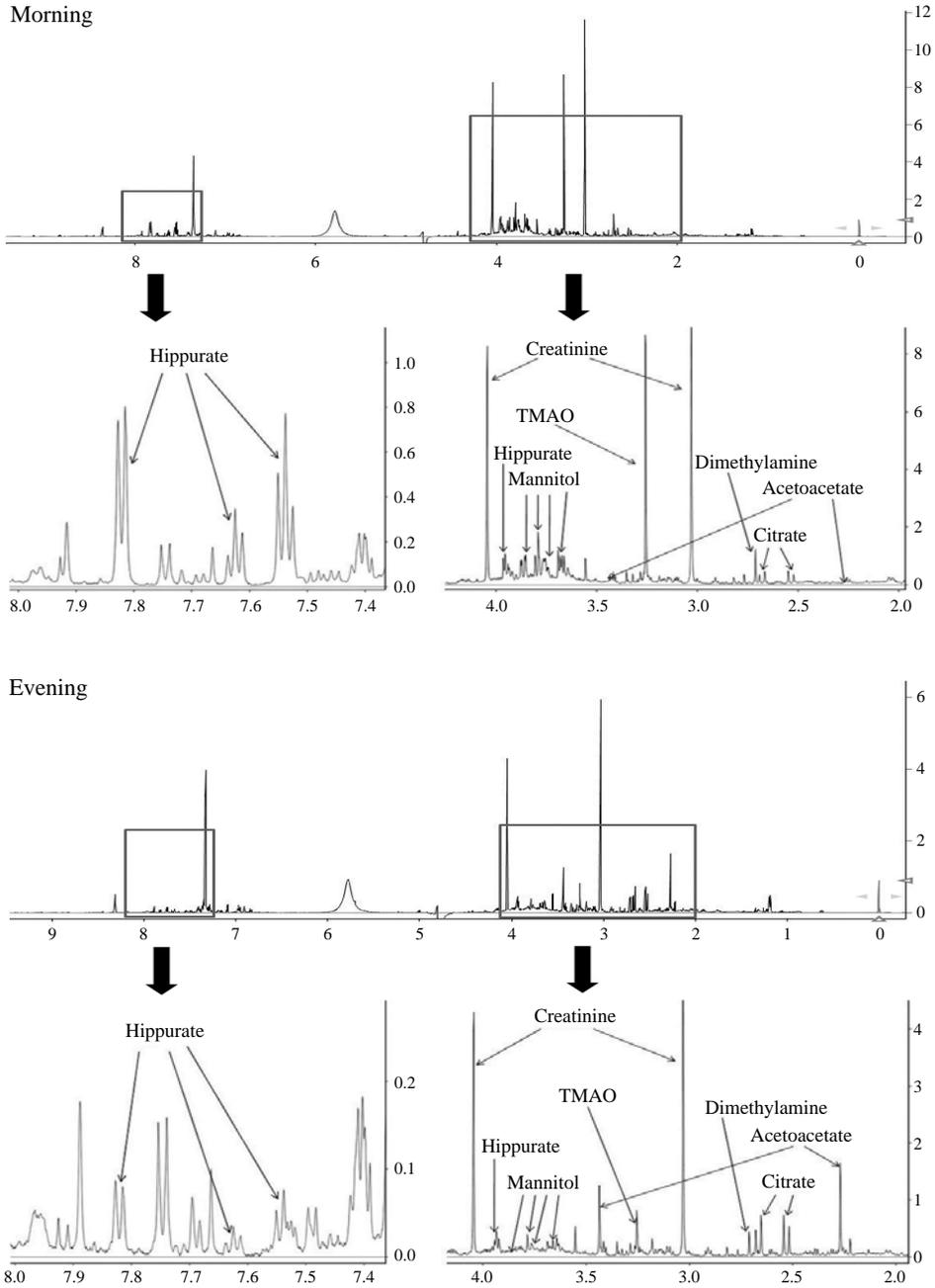


Fig. 3. Metabolomic spectral patterns according to sampling time using NMR in urine samples of healthy Korean adults. TMAO; trimethyl anine oxide.

서 hippurate, mannitol, TMAO, citrate, creatinine, dimethylamine, 그리고 acetoacetate가 해당하는 bin 영역에서 차이가 있음을 확인하였다. Spotfire 프로

그램 분석에서도 creatinine, hippurate, mannitol, dimethylamine, 그리고 TMAO는 오전 채뇨에서, acetoacetate와 citrate는 오후 소변에서 많이 배출되

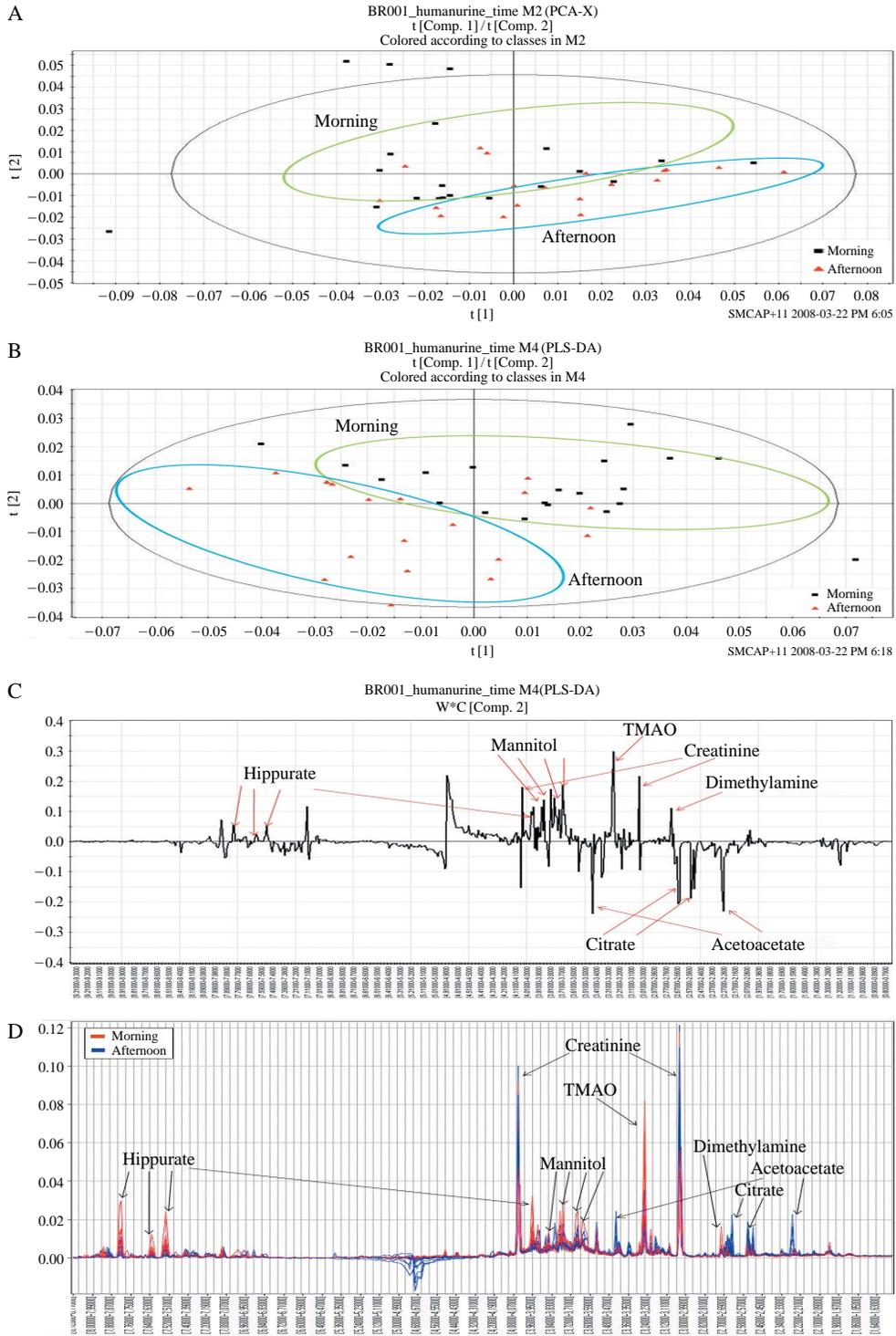


Fig. 4. Metabolomic spectral patterns according to sampling time using PCA (A), PLS-DA (B), loading line-plot (C), and Spotfire program (D) in urine samples of healthy Koran adults. TMAO; trimethyl anine oxide.

었다(Fig. 4).

대사체의 평균 정량 값에 대한 통계적 유의성을 살펴보면, 스펙트럼 패턴 분석과 PLS-DA 분석에서와 마찬가지로 체노 시각에 따른 대사체 배출량의 차이가 관찰되었다. Citrate는 오후 소변에서, creatinine, TMAO, hippurate, dimethylamine, mannitol은 오전 소변에서 배출량이 유의하게 많았다. Acetoacetate는 오후 소변에서 배출량이 많았으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Table 1).

고 찰

본 연구대상자의 소변에서 성별에 따른 대사체 농도의 차이를 나타내는 대사체는 citrate와 acetoacetate였으며, 체노 시각에 따라 농도의 차이가 관찰된 대사체는 citrate, creatinine, TMAO, hippurate, dimethylamine, 그리고 mannitol이었다.

Citrate는 TCA cycle의 중간산물로 간과 신장질환, 칼로리 제한, 일반적인 스트레스와도 상관성이 있다[16,17]. Citrate의 소변농도는 조직의 pH가 알칼리성이면 증가하고 산성이면 감소한다[18]. Citrate는 식이의 효과보다는 개인의 대사과정의 결과로서 사람 소변에서 매우 변하기 쉽다[19]. 이전의 연구들에서도 citrate는 여자에서 더 높다[5,7,20]. 여자의 소변 침전물은 남자에 비하여 유의하게 많은 양의 혈액과 상피세포를 포함하는데 이것이 citrate 증가의 원인일 수 있다[20]. 다른 한편 폐경 후 여성에서 에스트로겐 대체용법이 citrate 배출을 증가시켰고[21], 동물실험에서 에스트로겐의 투여는 지방산의 이용도를 증가시키고 탄수화물의 이용도를 감소시켰다[22]. 또한 20~30대의 여자는 같은 연령대의 남자보다 더 많은 지질을 합성하고, 지질의 합성에 glucose를 우선적으로 사용하는데 이는 미토콘드리아 내에 pH를 낮게 하며 결국 여자에서 citrate의 배출이 증가하게 되는 결과를 야기한다[5]. 이러한 소견들은 모두 20~30대인 본 연구의 여성 참여자에서 남성에 비하여 citrate 배출이 더 많은 이유를 설명할 수 있다. 에스트로겐과 프로게스테론의 수준은 운동하는 동안 기질(substrate) 사용에 있어서의 차이를 설명하는데 중요한 역할을 한다[5]. 오후 소변에서 citrate 농도가 높은 것은 참여자의 활동량의 차이에 의한 것으로 생각된다.

골격근 내에 쌓여있는 creatine의 약 2%는 비효소적 수단을 통해 꾸준히 creatinine으로 변환된다[23]. Creatinine은 비교적 안정된 비율로 인간의 몸으로부터 배설되며 육체적 활동과 스트레스에 의해 약간 영향을 받으나 식이, 온도 또는 마신 액체의 양에는 영향을 받지 않는다[24]. 통계적 유의성은 관찰되지 않았으나 본 연구에서 남자의 creatinine 농도가 높은 것은 골격근량의 차이에 의한 것으로 생각되며 이는 기존의 연구결과와 일치한다[11,25]. Creatinine이 오전시료에서 더 높았던 것도 기존의 연구결과와 일치하는 소견으로서[6,13], 사구체 여과율의 생체 내 일주기에 의해 설명되지 않는 4%의 차이는 오전 소변이 더 농축되어 있기 때문으로 설명되고 있다[6].

일반인 집단 내에서 TMAO 대사작용의 차이는 간에서 trimethylamine (TMA)를 TMAO로 대사시키는 능력에 의한다[9]. TMA를 TMAO로 완전히 산화시키지 못하면, 비산화된 TMA가 조직에 축적되어 이로 인한 체취를 발생시키고 trimethylaminuria를 배출한다[26]. 높은 TMAO 농도는 생선섭취에 의한 것으로도 보고되어 있다[10,11]. TMAO는 깊은 바다에 사는 생선에 있는 부동성 물질(antifreeze agent)로서 자연적으로 합성되고 높은 수준으로 조직에 축적된다[27]. 생선섭취를 많이 하는 지역[10,11]과 소금이 많이 든 음식을 섭취한 후[9] TMAO의 배출이 증가한다고 알려져 있는데, 본 연구대상자의 TMAO 배출은 생선에 의한 것보다는 소금이 많이 든 음식의 섭취에 의한 것으로 보인다. TMAO의 체노 시간에 따른 차이를 조사한 연구는 없으나 오전에 TMAO 배설이 더 많은 것은 오전 소변이 더 농축되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

Hippurate는 포유류의 간 속에서 식품첨가물 등을 통해 섭취된 벤조산(benzoic acid)이 해독되어 생성된 후 소변으로 배출되는 물질이다[28]. 정상적으로 사람 소변에서 발견되며, 식이뿐 아니라 장내 미생물(gut microflora)에 의해 발생하는 대사체이다[29,30]. 사람의 장내 미생물의 차이는 스트레스나 식이와 같은 외적 요인에 의해 발생한다[31]. 사람 소변으로 배출되는 hippurate의 양은 식사 전 후에 유의한 차이가 없으나[20] 개인 간 차이는 크게[12], 이는 벤조산의 섭취량에 기인한 것으로 보인다. Hippurate의 유의한 감소는 요세관에서 hippurate의 배출에 장애가 있는 것으로 매우 중요한 대사

체 지표이다[32]. 본 연구에서 오전에 hippurate 농도가 높은 것은 이전에 수행된 다른 연구와도 일치하는 결과로 오전 소변의 농축도가 높은 것에서 비롯된다[12].

생선과 해산물(seafood) 섭취는 dimethylamine의 배출을 유의하게 증가시킨다[8]. Dimethylamine은 인간과 동물의 소변에서 발견되는 가장 풍부한 short-chain aliphatic amines [33]으로 TMA의 산화에 의해 만들어진 TMAO로부터 형성되므로 [34] TMAO와 dimethylamine은 같은 요인에 의해 영향을 받을 것으로 짐작된다. 본 연구에서의 dimethylamine 배출은 TMAO의 경우처럼 소금섭취에 의한 것으로 생각된다. Dimethylamine은 오전에 더 높은 농도를 보였는데, 이는 장내 미생물의 구성과 활동 수준의 차이에 의한 것으로 설명되고 있다[6]. 즉 TMAO로부터 직접 dimethylamine로의 변환은 동물실험에서 혈관 또는 복막으로 투여된 경우가 아닌 구강섭취에 의해서만 일어났으며 이는 장내 미생물의 구성과 활동수준의 차이에 의한 것이라 설명이다[35].

Mannitol은 인공감미료로서 껌의 코팅제와 같이 음식산업에서 약방의 감초처럼 흔히 사용하는 혼합물이며 임상적으로는 이뇨제로 사용된다. 많은 음식에서 발견되며[36,37], 소변 내 mannitol의 양은 섭취한 음식과 가장 밀접한 관련성을 가지고 있다[6].

Acetoacetate는 케톤체(ketone body)의 하나로 간에서 생산되며 글루코즈가 즉시 사용 가능하지 않을 경우 에너지원으로 사용된다[4]. Acetoacetate는 탄수화물이 적을 때 지방산이 대사되면서 생성된다. 글루코즈가 부족한 기간 동안에 케톤체는 글루코즈 이용을 아끼고[38] 단백질을 분해를 감소시키는 핵심적인 역할[39]을 한다. 다른 조직과 달리, 뇌는 혈액 글루코즈 수준이 위태로워질 때 에너지로서 지방산을 사용할 수 없다. 이 경우 케톤체가 뇌에 에너지를 제공하는데 이는 공복 시와 기아 시 동안에 요구하는 뇌의 에너지의 거의 2/3에 이른다[4]. 밤새 공복을 유지한 경우 케톤체는 몸이 요구하는 에너지의 2~6%를 공급한다. 반면 3일간 공복이 유지되는 경우 필요 에너지의 30~40%를 케톤체가 공급한다[4]. 오전 소변에서 더 낮은 acetoacetate의 농도가 관찰된 것은 오전 시료 수집 전에 유지한 공복기간이 오후 소변 수집 전에 비해 상대적으로 길었기 때문일 것이다. 또한 기초대사량이 높

은 남자에서 공복기간에 필요로 하는 에너지가 여자보다 많을 것이므로, 공복기간 동안 케톤체로부터 공급되는 에너지 또한 여자보다 클 것으로 추측된다. 이로 인해 남자에서 여자보다 더 낮은 농도의 acetoacetate가 관찰되는 것으로 생각되며 남녀 간 차이를 발생시키는 요인에 대한 후속연구가 필요하다.

본 연구에서 분석한 대사체 각각의 특성과 용도는 그 자체로 의미를 가진다기 보다는 단지 대사체군 프로파일링 시에 모든 대상자의 시료수집 시간을 동일하게 하여야만 할 것인지에 대한 근거를 마련하는데 그 일차적인 의미가 있다고 하겠다.

본 연구대상자는 20명의 작은 표본이며, 또한 2개의 대학병원 근무자를 기반으로 수행되었기에 본 연구의 결과를 일반화 시킬 수 없다는 제한점을 가지고 있다. 그러나 본 연구는 대사체 연구에 있어서 고려해야 할 중요한 요건 중의 하나인 표준화된 시료 수집을 위한 예비조사로 결과의 일반화에 목적을 두고 수행하지 않았다. 건강한 일반인을 대상으로 표준화된 시료를 수집하기 위해서는 시료 수집조건에 따른 변화정도 및 정상시료들에서 발견되는 일반적인 특성을 관찰하는 것이 대사체 연구 이전에 선행되어야 한다. 본 연구는 성별 간 그리고 채뇨 수집 시각에 따른 대사체 변화를 관찰하였으며, 이를 통해 대사체 연구에서 소변시료의 수집시간을 동일하게 하는 것이 수집된 시료간 비교를 가능하게 하며, 시료별 변화도를 최소화 할 수 있는 방법임을 제안하였다.

감사의 글

이 논문은 2007년 국립독성연구원의 연구용역 사업비(관리번호 0715 안전성 636)의 지원을 받아 수행된 것임.

참고 문헌

1. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF. A 1H NMR-based metabolomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33(5): 1103-1115.
2. Keun HC. Metabolomic modeling of drug toxicity. *Pharmacol Ther* 2006; 109(1-2): 92-106.

3. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, *et al.* Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 187(3): 137-146.
4. Laffel L. Ketone bodies: a Review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15(6): 412-426.
5. Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal Biochem* 2006; 352(2): 274-281.
6. Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, *et al.* Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal Chem* 2007; 79(18): 6995-7004.
7. Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, Seferiadis KI, Bairaktari ET. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. *NMR Biomed* 2008; 21(3): 195-207.
8. Mitchell SC, Zhang AQ, Smith RL. Dimethylamine and diet. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(5): 1734-1738.
9. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Bingham S, Davis A, Holmes E, *et al.* Biofluid 1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem* 2005; 16(4): 236-244.
10. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, *et al.* Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a 1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 36(4): 841-849.
11. Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, *et al.* Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* 2006; 78(7): 2199-2208.
12. Bollard ME, Holmes E, Lindon JC, Mitchell SC, Branstetter D, Zhang W, *et al.* Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution 1H NMR spectroscopy of urine and pattern recognition. *Anal Biochem* 2001; 295(2): 194-202.
13. Park IJ, Jeon HS, Kwak YS, Shin OH. Diurnal variation of urinary excretion of protein metabolites and electrolytes. *Korean J Clin Pathol* 1999; 19(4): 404-408. (Korean)
14. Fan TW. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 1996; 28(2): 161-219.
15. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S. Introduction to multi and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS). Umeå: Umetrics: 1999: 43-64.
16. Salek RM, Maguire ML, Bentley E, Rubtsov DV, Hough T, Cheeseman M, *et al.* A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol Genomics* 2006; 29(2): 99-108.
17. Holmes E, Nicholls AW, Lindon JC, Ramos S, Spraul M, Neidig P, *et al.* Development of a model for classification of toxin-induced lesions using 1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biomed* 1998; 11(4-5): 235-244.
18. Simpson DP. Citrate excretion: a window on renal metabolism. *Am J Physiol* 1983; 244(3): F223-F234.
19. Guneral F, Bachmann C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin Chem* 1994; 40(6): 862-866.
20. Zuppi C, Messana I, Forni F, Rossi C, Pennacchietti L, Ferrari F, *et al.* 1H-NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites. *Clin Chim Acta* 1997; 265(1): 85-97.
21. Dey J, Creighton A, Lindberg JS, Fuselier HA, Kok DJ, Cole FE, *et al.* Estrogen replacement increased the citrate and calcium excretion rates in postmenopausal women with recurrent urolithiasis. *J Urol* 2002; 167(1): 169-171.
22. D'Eon T, Braun B. The roles of estrogen and progesterone in regulating carbohydrate and fat utilization at rest and during exercise. *J Womens Health Gend Based Med* 2002; 11(3): 225-237.
23. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80(3): 1107-1213.
24. Sperlingová I, Dabrowská L, Stránský V, Kucera J, Tichý M. Human urine certified reference material CZ 6010: creatinine and toluene metabolites (hippuric acid and o-cresol) and a benzene metabolite (phenol). *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(7): 2419-2424.
25. Delanghe J, De Slypere JP, De Buyzere M, Robbriht J, Wieme R, Vermeulen A. Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin Chem* 1989; 35(8): 1802-1803.
26. Rehman HU. Fish odor syndrome. *Postgrad Med J* 1999; 75(886): 451-452.
27. Yancey PH, Rhea MD, Kemp KM, Bailey DM. Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004; 50(4): 371-376.

28. Brewster D, Jones RS, Parke DV. The metabolism of shikimate in the rat. *Biochem J* 1978; 170(2): 257-264.
29. Nicholls AW, Mortishire-Smith RJ, Nicholson JK. NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem Res Toxicol* 2003; 16(11): 1395-1404.
30. Williams RE, Eyton-Jones HW, Farnworth MJ, Gallagher R, Provan WM. Effect of intestinal microflora on the urinary metabolic profile of rats: a ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Xenobiotica* 2002; 32(9): 783-794.
31. Phipps AN, Wright B, Stewart J, Wilson ID. Use of proton NMR for determining changes in metabolite excretion profiles induced by dietary changes in the rat. *Pharm Sci* 1997; 3(3): 143-146.
32. Lundina TA, Knubovets TL, Sedov KR, Markova SA, Sibeldin LA. Variability of kidney tubular interstitial distortions in glomerulonephritis as measured by ¹H-NMR urinalysis. *Clin Chim Acta* 1993; 214(2): 165-173.
33. Asatoor AM, Simenhoff ML. The origin of urinary dimethylamine. *Biochim Biophys Acta* 1965; 111(2): 384-392.
34. Zhang AQ, Mitchell SC, Ayesh R, Smith RL. Dimethylamine formation in man. *Biochem Pharmacol* 1993; 45(11): 2185-2188.
35. Mitchell SC, Zhang AQ, Noblet JM, Gillespie S, Jones N, Smith RL. Metabolic disposition of [¹⁴C]-trimethylamine N-oxide in rat: variation with dose and route of administration. *Xenobiotica* 1997; 27(11): 1187-1197.
36. Parry DM, Duerksen DR. Assessment of intestinal permeability with lactulose/mannitol: gum chewing is a potential confounding factor. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(8): 2515-2516.
37. Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobden GJ. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int Dairy J* 2002; 12(2-3): 151-161.
38. Francois B, Bachmann C, Schutgens BH. Glucose metabolism in a child with 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A lyase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1981; 4(1): 163-164.
39. Nair KS, Welle SL, Halliday D, Campbell RG. Effect of beta-hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J Clin Invest* 1988; 82(1): 198-205.