

정상 한국인에서 Apo(a) 단백질 크기와  
유전자 다형성이 혈중 Lp(a) 농도에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

노 경 호

정상 한국인에서 Apo(a) 단백질 크기와  
유전자 다형성이 혈중 Lp(a) 농도에  
미치는 영향

지도 김 정 호 부교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

노 경 호

노경호의 석사학위논문을 인준함

심사위원 김 정 호 인

심사위원 송 경 순 인

심사위원 장 승 누 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

## 감사의 글

이 논문을 완성하기까지 끊임없는 관심과 사랑으로 많은 도움을 주신 존경하는 김정호, 송경순 지도교수님과, 장양수 교수님, 그리고 박현영 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 연구에 많은 시간을 할애할 수 있게 해주신 김현숙 교수님과 실험에 도움을 주신 김현옥 교수님께 역시 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 준 임상의학 연구센터 선생님들과 의국 동료, 선후배 선생님들께 깊이 감사드립니다.

28년간 항상 저를 가장 가까이서 지켜봐 주신 사랑하는 부모님과 하나밖에 없는 사랑하는 누나와 매형, 그리고 제 연구와 논문 작성을 도와주신 모든 분들에게 마음속 깊은 감사를 드립니다.

마지막으로 제가 의대에 들어간 것을 가장 기뻐하셨던 할아버지께 사랑하는 마음을 담아 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 대상군 .....	6
2. 방법 .....	6
가. DNA 추출 .....	6
나. Lp(a) 정량측정 .....	6
다. 혈중 지질 검사 .....	7
라. Apo(a) K4-VNTR 결정 .....	7
마. Apo(a) 유전자에서의 +93 C/T 유전자형 측정 .....	8
바. Apo(a) 유전자에서의 pentanucleotide repeats polymorphism (PNRP)측정 .....	9
3. 통계 분석 .....	10
III. 결과 .....	12
1. 혈청 Lp(a) 농도 .....	12
2. Apo(a) 표현형, K4-VNTR결정 .....	13
3. Apo(a) 유전자에서의 +93 C/T 유전자형 .....	15
4. Apo(a) 유전자에서의 PNRP .....	17
5. Apo(a) 표현형과 Lp(a) 농도와의 관계 .....	18
6. +93 C/T 유전자형과 Lp(a) 농도와의 관계 .....	19
7. K4-major에 따른 각 군에서 +93 C/T 유전자형과 Lp(a) 농도와의 관계 .....	19
8. PNRP와 Lp(a) 농도와의 관계 .....	21
9. K4-major에 따른 각 군에서 PNRP와 Lp(a) 농도와의 관계 .....	22
10. PNRP와 +93 C/T 유전자형과의 관계 .....	23
11. 다중회귀분석을 이용한 Lp(a)와 LN[Lp(a)]의 농도에 영향을 주는 인자 분석 .....	24
IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	31
참고문헌 .....	34
영문요약 .....	40

## 표 차례

Table 1. +93 C/T genotype frequency in male and female .....	16
Table 2. Lp(a) concentrations according to the +93 C/T genotype by K4-VNTR groups .....	20
Table 3. Lp(a) concentrations according to the apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism by K4-VNTR groups .....	22
Table 4. Simple regression analysis between Lp(a) or LN[Lp(a)] and other risk factors .....	25

## 그림 차례

Fig. 1. Distribution of serum Lp(a) concentrations in normal subjects(n=173). .....	12
Fig. 2. Distribution of serum LN[Lp(a)] concentrations in normal subjects(n=173). .....	13
Fig. 3. Apo(a) phenotype, K4-VNTR determination. ....	14
Fig. 4. Frequency of K4-major number. ....	14
Fig. 5. Frequency of K4-minor number. ....	15
Fig. 6. Apo(a) +93 C/T genotype by amplification refractory mutation system. ....	16
Fig. 7. PNRP determination by PCR and 3.5% MetaPhor <sup>®</sup> agarose gel electrophoresis. ....	17
Fig. 8. Regression equation between K4-major and Lp(a) concentration. ....	18
Fig. 9. Lp(a) concentrations by different apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism groups. ....	21
Fig. 10. Linkage disequilibrium between apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism and +93 C/T polymorphism. ....	23

## 국문요약

### 정상 한국인에서 Apo(a) 단백질 크기와 유전자 다형성이 혈중 Lp(a) 농도에 미치는 영향

Lipoprotein(a)[Lp(a)]는 크기가 다양한 apolipoprotein(a)[apo(a)]와 저비중 지단백 (low density lipoprotein, LDL)의 결합체로서 혈중 농도는 동맥경화증 발병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Lp(a)의 혈중 농도는 개인적 차이가 많으며 이는 주로 Apo(a) 유전자 다형성 및 단백질 크기 등 유전적 요인에 의한 것이라고 알려져 있다. 이에 본 연구자는 정상 한국인을 대상으로 apo(a) 유전자 다형성 및 단백질 크기를 조사하여 이들이 혈중 Lp(a)농도에 미치는 영향을 알아보았다.

이를 위해 연세의대 부속 세브란스병원의 40세 이상 건강검진 수검자 173명(남자 107명, 평균 연령 55세; 여자 66명, 평균 연령 53세)을 대상으로 채혈하여 Lp(a)의 농도를 효소면역법 (APO-TEK, Sigma Diagnostics, USA)으로 측정하였다. 또한 Western blot법으로 Apo(a) 단백질의 Kringle 4 variable number of tandem repeat (VNTR)를, DNA 증폭법으로 pentanucleotide repeat polymorphism (PNRP)과 +93 C/T 다형성을 검사하였다. SPSS를 사용하여  $\chi^2$  검정, ANOVA, 상관성 및 회귀분석 하였으며 그 결과는 다음과 같았다.

1. 정상 한국인 173명에서 Lp(a)의 농도 (평균  $\pm$  표준편차)는  $54.1 \pm 53.5$  nmol/L로서 낮은 값 쪽으로 편향된 분포를 보였다. 남자와 여자는 각각  $59.1 \pm 61.0$  nmol/L,  $45.9 \pm 37.4$  nmol/L로서 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.081$ ). 각 농도의 로그변환 분석결과도 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.575$ ).

2. 정상 한국인 apo(a) 단백질의 K4-VNTR-major는 그 범위가 15-48이며 중앙값은 33이었다. Lp(a)의 농도와 K4-major는 서로 유의한 음의 상관관계를 보였다 ( $r=-0.633$ ,  $p=0.001$ ).

3. +93 C/T 유전자형 분포는 C/C, C/T, T/T 형이 각각 69.4%, 29.5%, 1.2%, 대립인자 비율은 C 0.841, T 0.159이었으며 유전자형에 따른 Lp(a) 농도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ( $p=0.171$ ).

4. PNRP 유전자형은 (TTTTA)<sub>n</sub> 염기반복의 수로 볼 때 8/8 (58.8%), 9/8 (28.5%), 9/9 (4.8%), 8/5 (4.2%)의 분포를 보였으며 남녀간 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.196$ ). 대립인자 비율은 8, 9, 5가 각각 0.76, 0.20, 0.03 이었다. PNRP 유전자형 따른 Lp(a)농도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ( $p=0.196$ ).

5. +93 C/T 유전자형과 PNRP 유전자형의 상호 연관성을 볼 때, C/C 유전자형의 82.3%가 PNRP 8/8 유전자형인 것에 비해 9/8 유전자형은 6.2%에 불과한 반면, C/T 유전형의 78.0%가 9/8 유전형인 것에 비해 8/8 유전자형은 8.0%에 불과하여 통계적으로 유의한 상관성 (Spearman  $r=0.723$ ,  $p < 0.001$ )을 나타내었으며 +93 C/T 유전자형과 PNRP 유전자 다형성간에는 강한 연쇄적 불균형 (linkage disequilibrium)이 있음을 알 수 있었다.

6. Lp(a) 농도와 관련한 다중 회귀 분석 결과, K4-VNTR ( $p=0.0001$ )과 LDL 콜레스테롤 ( $p=0.002$ )은 유의한 상관성을 보였으나 PNRP는 유의한 상관성이 없었다.

결론적으로 정상 한국인에서 apo(a) 단백질 (K4-VNTR)는 Lp(a) 혈중 농도에 영향을 주지만 PNRP 또는 +93 C/T 유전자 다형성은 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다.

---

핵심되는 말: Apolipoprotein(a), Lipoprotein(a), C/T polymorphism, Kringle 4 variable number of tandem repeat, pentanucleotide repeat polymorphism

# 정상 한국인에서 Apo(a) 단백질 크기와 유전자 다형성이 혈중 Lp(a) 농도에 미치는 영향

<지도 김정호 부교수>

연세대학교 대학원 의학과

노경호

## I. 서론

Lipoprotein(a)는 저비중 지단백 (low density lipoprotein, LDL)과 유사한 지단백으로서, 다형성을 보이는 당단백인 apolipoprotein(a)[apo(a)]가 이황화 결합으로 LDL에 결합된 형태를 이루고 있다.<sup>1</sup> Apo(a)는 plasminogen과 강한 상동구조를 보이는 kringle을 포함하는 단백질로서, 동맥경화증 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> Apo(a)는 plasminogen과 매우 비슷하기 때문에 fibrinolysis에서 plasminogen을 경쟁적으로 방해한다.<sup>3</sup> 실제로 사람의 Lipoprotein(a) 혈중 농도는 0 mg/dL에서 200 mg/dL까지 다양하며 높은 Lp(a) 혈중 농도는 관상동맥 질환과 뇌경색을 비롯한 동맥경화성 질환의 독립적인 위험인자임이 밝혀져 있다.<sup>4</sup> 이는 백인과 아시아인에서는 뚜렷하고, 흑인에서는 관련성이 적은 것으로 알려져 있다.<sup>2</sup> Lp(a)의 농도는 백인에 비해 흑인이 높고 또한 인종적으로 차이가 있다고 알려져 있다.<sup>5,6</sup>

비록 개인 내에서는 Lp(a)의 농도가 일정하지만, 개인차가 심해서 약 1000배 정도까지 그 차이가 나는 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> 백인에서 시행한 쌍둥이와 가족 검사를 보면 Lp(a)의 농도는 유전적으로 결정이 되며 그 중에도 apo(a) 유전

자에 의해 Lp(a)농도의 90%이상을 결정짓는 것으로 밝혀졌다.<sup>8-10</sup> Apo(a)의 repeated Kringle은 plasminogen의 4번째 Kringle과 매우 유사하기 때문에 Kringle 4라고 불린다.<sup>1</sup> 이 apo(a) Kringle motif의 repeat 회수 (variable number of tandem repeat, K4-VNTR)의 차이로 인해서 단백질의 크기가 결정되고 K4-VNTR과 Lp(a)의 혈중 농도는 음의 상관관계가 있다고 알려져 있다.<sup>6,11,12</sup> Boerwinkle등(1992)은 apo(a) K4-VNTR이 Lp(a) 농도에 끼치는 영향은 약 69%로 설명하며<sup>8</sup> 그 외의 다른 유전적인 요인이 존재하는 것으로 추측되고 있다. Cohen등(1993)은 apo(a) 대립유전자의 크기가 같은 가계 연구에서 DNA Single stranded conformation polymorphisms (SSCP) 방법으로 apo(a)유전자의 5' flanking region, K4-1, K4-33/34, K4-35/36 위치의 다형성을 검사하여 Lp(a) 농도와 연관성이 있는 것을 밝혔다.<sup>13</sup> 그러나 K4-37에서 4168 Met/Thr 다형성은 Lp(a) 농도에 영향이 없었다.<sup>14</sup>

Kraft등(1992)은 apo(a) signal 염기서열 1.4kb N말단부위 쪽, apo(a)유전자의 promoter 부위에 위치한 pentanucleotide repeat polymorphism(PNRP)을 Lp(a)의 농도에 영향을 주는 인자로 제시하였다.<sup>10</sup> 한국인을 대상으로 apo(a) 표현형 및 Pentanucleotide(TTTTA) Repeat가 Lp(a) 농도에 미치는 연구가 발표된 바 있다.<sup>15</sup> 그러나 이 연구에서 사용한 Lp(a) 농도 측정은 apo(a) K4-VNTR에 영향을 받을 수 있는 방법을 사용했다는 점과, 또한 polyacrylamide gel로 단백을 분리하여 apo(a) phenotyping을 여섯 가지 군으로만 분류하여 K4-VNTR의 영향을 정확히 고려하지 않았다는 문제가 있었다. 한편 인종적으로 한국인과 유사한 일본인을 대상으로 한 연구 결과에서는 PNRP의 횟수가 8/8 유전형 보다 9/8 유전형에서 Lp(a)의 의미 있는 감소 양상을 보였다.<sup>16</sup> 그러나 이 연구 역시 apo(a) 표현형을 여섯 가지 군으로만 분류하여 K4 VNTR을 충분히 고려하지 못한 한계가 있었다. 또한 최근에는 Apo(a)유전자의 5' untranslated region에 위치한 +93 C/T 다형성은 C에서 T로의 변화로 인해 시작codon의 변화가 생겨서 in vitro실험에서 60%까지 apo(a)유전자의 표현이 감소하였다고 했다.<sup>17,18</sup> 이 다형성은 비록 오스

트리아인이나 덴마크, 프랑스인 들에게서는 Lp(a) 농도에 큰 영향을 주지 않았지만 흑인에서는 C/C 유전자형에 비해 C/T 유전자형에서 Lp(a) 농도가 의미 있게 감소하였다.<sup>18,19</sup> 일본인들에서는 C/T 유전자형을 비롯해서 5' 쪽의 핵산 다형성에 의해 apo(a) 유전자의 표현 (expression) 및 Lp(a) 농도가 영향을 받는다는 보고가 있다.<sup>20</sup>

본 연구에서는 한국인에서 K4-VNTR, PNRP, +93 C/T 유전자형에 의한 Lp(a) 농도의 영향을 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상군

연구대상자는 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원의 40세 이상의 건강 검진자 173명을 대상으로 하며 한국인으로 한정하였다. 12시간 금식후의 정맥혈을 K<sup>+</sup> EDTA vacutainer tube와 plain vacutainer tube에 채혈한 뒤 plain tube의 검체는 혈청 분리하여 K4-VNTR의 측정을 위해 -70℃ 이하에 냉동 보관하였으며 DNA검사를 위한 EDTA 전혈 검체도 -70℃ 이하에 냉동 보관하였다. 정상인 남자의 평균 연령은 55.2±6.8세였고 (n=107), 여자의 평균 연령은 53.2±7.5세로 (n=66) 성별간의 유의한 차이는 없었다 (p=0.072). 검사 당시 당뇨, 간 질환 그리고 심혈관 질환을 가지고 있거나 금식상태가 불확실해 보이는 대상자는 제외하였다.

### 2. 방법

#### 가. DNA 추출

-75℃ 냉동 보관한 tripotassium EDTA 항응고제 처리 혈액을 녹인 후 Easy DNA<sup>®</sup> (Invitrogen BV, Gronigen, Netherlands)로 게놈 DNA를 추출하였다.

#### 나. Lp(a) 정량측정

혈청내 Lp(a)의 측정은 sandwich ELISA (APO-TEK, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) 방법을 이용해서 측정하였다. 검사 방법은 다음과 같았다. 1:400 희석한 검사 대상자의 혈청과 6가지 농도의 보정물질 그리고 2가지 농도의 대조혈청을 100 uL씩 취하여 microplate well에 넣은 후 37℃에서

60분간 반응시켰다. 세척액으로 5회씩 세척을 한 후 conjugate를 각 well에 100 uL씩 넣고 다시 37°C에서 60분간 반응시켰다. 다시 5회씩 세척을 하고 TMS 기질을 100 uL씩 넣고 실온에서 (18°C-26°C) 20분간 반응시켰다. 반응 정지액을 각 well에 100 uL씩 넣고 450nm에서 ELISA reader로 30분 이내에 발색도를 측정하였다. 보정물질을 기준으로 각 검체의 Lp(a) 농도를 산출하였다.

이 방법은 anti-ApoB 항체를 사용함으로 말미암아 apo(a)의 K4-VNTR에 의한 영향을 극소화한 방법으로 알려져 있다.<sup>21</sup>

#### 다. 혈중 지질 검사

대상자의 혈청은 Hitachi 747-200(Hitachi, Tokyo, Japan) 자동생화학분석기를 사용하여 총 콜레스테롤(Total cholesterol, Daichii, Tokyo, Japan), 중성지방(Triglyceride, 아산제약, 서울, 한국), 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL cholesterol, Daichii, Tokyo, Japan)을 효소법으로 측정하였으며, 저밀도지단백 콜레스테롤(LDL cholesterol) 값은 Friedewald 공식으로 산출하였다.<sup>22</sup>

#### 라. Apo(a) K4-VNTR 결정

Apo(a) K4-VNTR은 고해상도 SDS-agarose Western blot방법을 사용하였다.<sup>23,24</sup> 혈청을 beta-mercaptoethanol과 반응시킨 후에 1.5% SDS-agarose gel에 의하여 20시간 동안 냉수조에서 분리한 후에 3시간 동안 PVDF membrane에 전사하여 단 클론 항인apo(a)항체(PerImmune, Rockville, MD, U.S.A.)로 반응시킨 후에 세척 후 제2차 항체와 반응시키고, ECL western blotting으로 apo(a) 표현형을 결정하였다. 다섯 가지의 apo(a) isoform 표준물질 (Immuno AG, Vienna, Austria) 혼합액을 사용하여 각 band의 이동 거리에 대한 검체의 이동 거리의 상관식을 통해 K4-VNTR을 산출하였다. 육안적으로 진한 band를 K4-major로 결정하였고 연한 band는 K4-minor로 결정하였다. 두 band의 농도가 동일한 경우에는

K4-VNTR의 크기가 작은 것을 K4-major로 결정하였다.<sup>24</sup> 한편 두 isoform중 K4-VNTR의 크기가 작은 것을 K4-small로 크기가 큰 것을 K4-large로 하였다.<sup>25</sup> K4-VNTR band가 한 개만 보인 경우에는 이를 K4-small과 K4-major로 하였고 K4-large와 K4-minor는 없는 것으로 간주하였다. K4-small과 K4-large의 평균을 K4-mean으로 산출하였다.<sup>25</sup> 단, 한 개의 band만 보인 경우는 이 band를 K4-mean으로 간주하였다. 이 방법은 apo(a) genotyping과 좋은 상관관계를 가진 방법으로 증명된 바 있다.<sup>26</sup>

마. Apo(a) 유전자에서의 +93 C/T 유전자형 측정

+93 C/T 유전자형은 ARMS (amplification refractory mutation system) 방법으로 분석하였다.<sup>18,27</sup>

(1) 100 - 400 ng의 추출한 DNA를 사용하였다.

(2) 각 검체별로 2개의 PCR (Polymerase chain reaction)반응을 준비하였다. CTUP, CTLO, C-specific, 그리고 T-specific으로 이름 붙인 네 종류의 DNA primer를 사용하였다. DNA primer의 염기서열은 다음과 같았다.

Upper: CTUP 5'-AAA GGC AAT GTG GAG CAG CTG AG

Lower: CTLO 5'-TGA ATT GCA CAT AAA GCC ATG GC

C-specific: 5'-GTC CCA ATC CCA GGA CG

T-specific: 5'-GTC CCA ATC CCA GGA CA

각각의 PCR tube에 100 - 400 ng의 DNA sample과 CTUP primer 0.6 mM, CTLO primer 0.1 mM, C또는 T특이 primer 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM, dNTP 0.2 mM 그리고 *Taq* 중합효소(Takara, Otsu, Japan) 0.5 U을 각각 넣어 총 반응 PCR 양은 20 uL로 하였다.

(3) 95°C에서 3분간 denaturation을 시켰다.

(4) 첫 번째 PCR단계: denaturation temp. 94°C 40초, annealing temp. 64°C 30초, extension temp. 72°C 30초 총 15회 반복하였다.

(5) 두 번째 PCR단계: denaturation temp. 94°C 40초, annealing temp. 55°C 30초, extension temp. 72°C 30초 총 25회 반복하였다.

(6) 마지막 PCR후에 72°C 5분간 extension 시켰다.

(7) 395 bp의 apo(a)특이 결과물과 225 bp의 C또는 T특이 결과물은 100 bp DNA ladder (Bioneer, Seoul, Korea)와 함께 2% agarose gel로 20V에서 90분간 전기영동후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

(8) UV 광선으로 증폭된 DNA를 확인하고 사진 촬영하였다.

C 특이적 반응에서만 225 bp의 band가 보이는 경우는 C/C homozygote로 T 특이적 반응에서만 225 bp의 band가 보이는 경우는 T/T homozygote로 양쪽에서 모두 보이는 경우는 C/T heterozygote로 결정하였다.

#### 바. Apo(a) 유전자에서의 pentanucleotide repeats polymorphism (PNRP)측정

전사 시작부위로부터 N말단 부위방향 1373 bp 위치인 5' control 부위에 존재하는 (TTTTA)<sub>n</sub> 반복인 PNRP를 PCR후 분자량에 따른 전기영동상의 이동속도의 차이로 분석하였다.<sup>28</sup>

(1) 100 - 400 ng의 추출한 DNA를 사용하였다.

(2) PCR 반응을 준비하였다. Pro 1A와 Pro 1B로 이름 붙인 두 종류의 DNA primer를 사용하였다.<sup>28</sup> DNA primer 염기서열은 다음과 같았다.

Pro 1A: 5' GAA TTC ATT TGC GGA AAG ATT G 3'

Pro 1B: 5' CTT CAA CCG GGG TGA GAG TCT C 3'

PCR tube에 100 - 400 ng의 DNA sample과 Pro 1A와 Pro 1B primer 각각 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM, dNTP 0.2 mM 그리고 *Taq* 중합효소 0.5 U을 각각 넣어 총 반응 PCR양은 25 uL로 하였다.

- (3) 94°C 2분간 denaturation을 시킨다.
- (4) PCR조건: denaturation temp. 94°C 40초, annealing temp. 62°C 30초, extension temp. 72°C 30초 총 35회 반복하였다.
- (5) 마지막 PCR후에 72°C 5분간 extension 시켰다.
- (6) PCR 결과 산물을 10 bp DNA ladder (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)와 함께 3.5% MetaPhor<sup>®</sup> agarose gel에 loading하고 120V에서 160분간 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.
- (7) UV 광선으로 증폭된 DNA를 확인하고 사진 촬영하였다.

PCR후 결과 산물의 크기를 10 bp marker와 비교 측정하여 PNRP의 반복 횟수를 결정하였다. DNA 증폭 후에 95 bp 크기의 산물이 관찰되는 경우는 (TTTTA)<sub>8</sub>, 100 bp 크기의 산물이 보이는 경우는 (TTTTA)<sub>9</sub>로 결정하였으며 1회 반복 횟수의 차이는 5 bp의 크기 차이를 보였다. 결과 산물에서 하나의 band가 보이는 경우는 homozygote로 두 개의 band가 보이는 경우는 heterozygote로 결정하였다. Heterozygote인 경우에 작은 크기의 대립인자의 반복 횟수를 PNRP-small로 큰 크기의 대립인자의 반복 횟수를 PNRP-large로 규정하였고, 이 두 대립인자 반복횟수의 평균을 PNRP-mean으로 산출하였으며, 두 대립인자 반복횟수의 차이를 PNRP-diff로 산출하였고 이 방식은 Rosby 및 Berg의 방법을 따른 것이었다.<sup>25</sup>

### 3. 통계 분석

SPSS<sup>®</sup> 9.0 for Windows 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)으로 independent T-test와  $\chi^2$  검정, one way ANOVA, 그리고 Kruskal-Wallis 검정을 시행하고 결과를 분석하였다. 대상군의 Lp(a) 농도의 분포가 낮은 값 쪽으로 편향된 결과를 보이므로(skewness = 2.29) 자연대수로 변환한 LN[Lp(a)]의 형태로 바꾸어 마찬가지로 방법으로 통계분석을 시행하였다.

가. +93 C/T 유전자형의 결과, 즉, CC, CT, TT 세 가지 유전자형 및 각 대립인자에 따른 Lp(a), LN[Lp(a)] 농도의 차이를 one way ANOVA와, Kruskal-Wallis 검정으로 분석하였다.

나. 남,녀 성별에 따른 +93 C/T 유전자형, PNRP, 그리고 K4-VNTR의 각 군간의 빈도의 차이가 있는지를  $\chi^2$  검정으로 분석하였다.

다. 남,녀 성별에 따른 두 군에서 대상자의 평균 연령의 차이와 측정된 Lp(a), LN[Lp(a)]의 농도에 차이가 있는가에 대해 independent T-test로 비교하였다.

라. PNRP의 다형성 및 각 대립인자에 의해 분류한 각 군에서 Lp(a), LN[Lp(a)] 농도에 차이가 있는가에 대해 one way ANOVA와, Kruskal-Wallis 검정으로 분석하였다.

마. PNRP의 두 대립인자의 합, 차이와 Lp(a), LN[Lp(a)]의 농도 간의 상관관계를 분석하였다.

바. K4-VNTR과 Lp(a)의 농도의 상관성을 분석하였다.

사. Lp(a)의 농도는 K4-VNTR에 의한 복합 영향을 받기 때문에 Pentanucleotide repeat 및 +93 C/T 유전자형에 의한 영향만을 보기위해 K4-VNTR를 기준으로 세 개의 군을 나누어 각 군 안에서 PNRP와 +93 C/T 유전자형에 의한 Lp(a), LN[Lp(a)]의 농도에 차이가 있는가에 대해 one way ANOVA와, Kruskal-Wallis 검정으로 분석하였다.

아. Lp(a), LN[Lp(a)]의 농도에 영향을 줄 수 있는 각각의 인자들을 단순회귀분석으로 분석하였으며  $p < 0.2$  인 인자들을 대상으로 다중회귀분석을 하였다.

### III. 결과

#### 1. 혈청 Lp(a) 농도

정상 한국인 173명에서 시행한 Lp(a) 평균 농도와 표준편차는  $54.1 \pm 53.5$  nmol/L이었으며 최소값, 최대값은 각각 1.4, 368.3 nmol/L이며 중앙값은 42.3 nmol/L이었다. Lp(a)의 농도 분포는 낮은 값쪽으로 편향되어 있었다 (skewness=2.28) (Fig. 1). Lp(a)의 농도를 자연대수로 변환 시켰을 때 LN[Lp(a)] 평균 농도와 표준편차는  $3.53 \pm 1.04$  이었으며 중앙값은 3.75 였다(Fig. 2). Lp(a) 농도의 자연 Log변환후 skewness는 -0.547로 편향성이 줄어들었다. 남자군의 Lp(a)의 평균 농도와 표준편차는  $59.1 \pm 61.0$  nmol/L였으며 여자 군에서는  $45.9 \pm 37.4$  nmol/L로 두 군에서 Lp(a)의 농도는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p=0.081$ ). LN[Lp(a)]로 변환 후 남녀간의 차이를 보았을 때 남자 군은  $3.57 \pm 1.11$  였으며 여자 군에서는  $3.48 \pm 0.93$ 로 남녀간의 차이는 없었다 ( $p=0.575$ ).

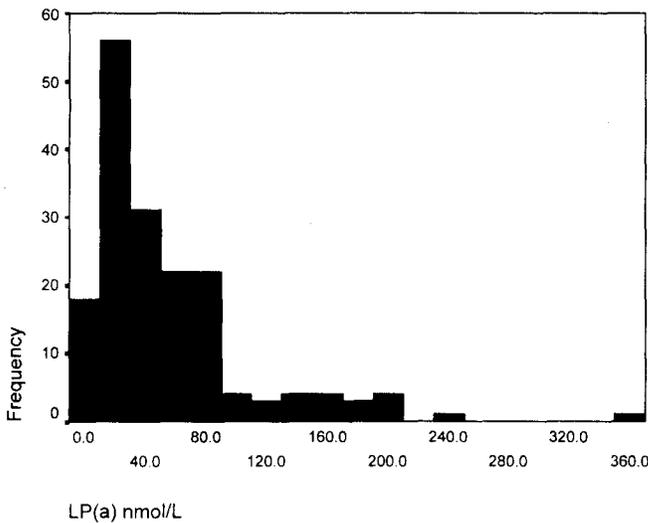


Fig. 1. Distribution of serum Lp(a) concentrations in normal subjects(n=173).

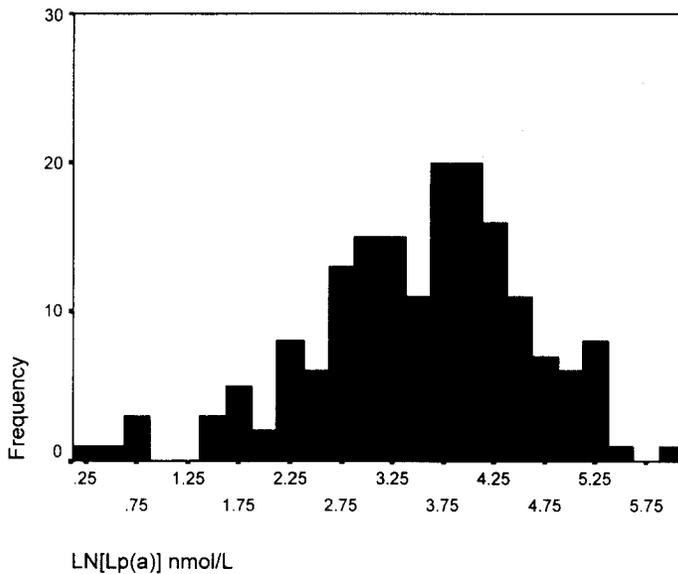


Fig. 2. Distribution of serum LN[Lp(a)]<sup>1</sup> concentrations in normal subjects(n=173).

<sup>1</sup> LN[Lp(a)] means natural logarithm value of Lp(a), nmol/L.

## 2. Apo(a) 표현형, K4-VNTR결정

총 173명의 실험 대상자중 74명 (42.8%)에서 한 개의 band를 관찰할 수 있었으며 99명 (57.2%)에서 두 개의 band를 볼 수 있었다 (Fig 3). 두 개의 band를 보이는 경우 짙은 band (K4-major)를 기준으로 할 때 분포는 15-48이었으며 중앙값은 33, 최빈값은 35였다 (Fig 4). 99명에서 보인 옅은 band (K4-minor)에서 분포는 15-45이었으며 중앙값은 36, 최빈값은 34였다 (Fig 5).

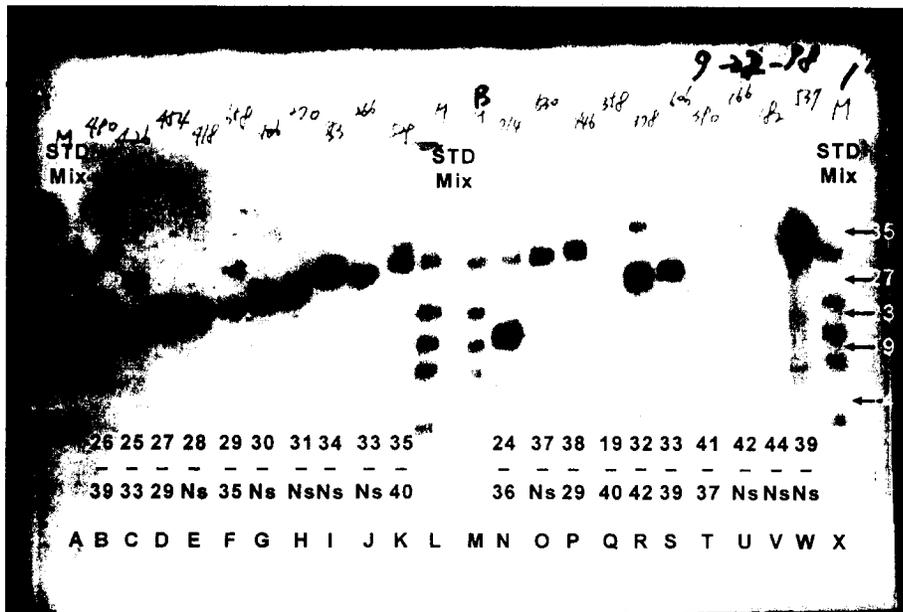


Fig. 3. Apo(a) phenotype, K4-VNTR determination. Lane A, L, M and X are size marker. Each lane's two numbers mean that upper number is K4-major band and lower is K4-minor.

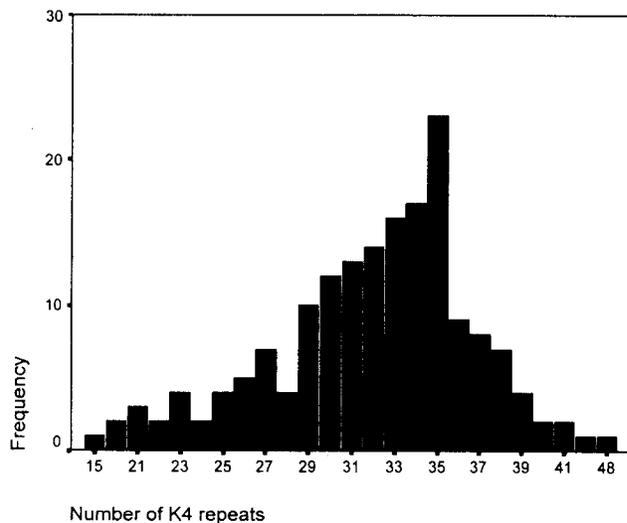


Fig. 4. Frequency of K4-major number.

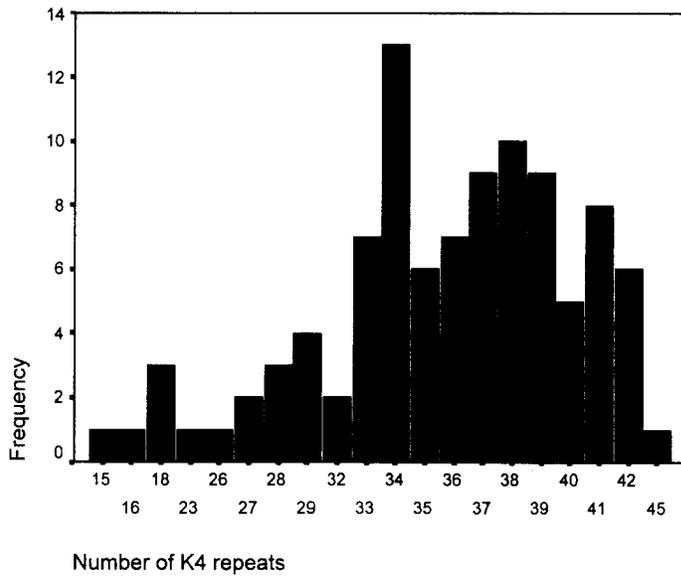


Fig. 5. Frequency of K4-minor number.

### 3. Apo(a) 유전자에서의 +93 C/T 유전자형

+93 C/T 유전자형 판정은 Fig. 6과 같이 하였다. 대상군 173명중 C/C 유전자형은 120명 (69.4%)으로 그 빈도가 가장 높았으며 C/T유전자형은 51명 (29.5%), T/T 유전자형은 2명 (1.2%)의 빈도를 나타내었다. 대립인자 비율은 C 대립인자 0.841 및, T 대립인자 0.159 이었다. 성별에 의한 +93 C/T 유전자형의 차이는 유의하지 않았다 ( $\chi^2=1.916$ ,  $p=0.166$ ; Table 1).

Table 1. +93 C/T genotype frequency in male and female

		C/T genotype			Total	
		C/C	C/T	T/T		
Sex	M	Count	70	36	1	107
		%	65.4	33.6	0.9	100
	F	Count	50	15	1	66
		%	75.8	22.7	1.5	100
Total	Count	120	51	2	173	
	%	69.4	29.5	1.2	100	

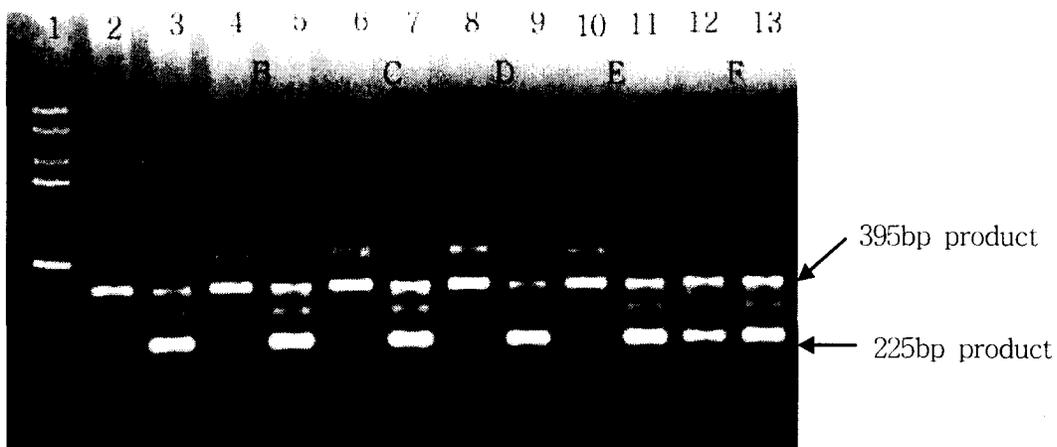


Fig. 6. Apo(a) +93 C/T genotype by amplification refractory mutation system. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 3, 5, 7, 9, 11, 13: C-specific PCR product; lane 2, 4, 6, 8, 10, 12: T-specific PCR product; subjects A, B, C, D, E : C/C homozygotes, subject F: C/T heterozygote

#### 4. Apo(a) 유전자에서의 PNRP

PNRP 유전자형 판정은 Fig. 7과 같이 하였다. 전체 대상자 173명중 측정이 불가능하였던 8명을 제외한 165명중 8/8 유전자형은 97명 (58.8%)으로 그 빈도가 가장 높았으며 9/8 유전자형은 47명 (28.5%), 9/9 유전자형은 8명 (4.8%), 8/5 유전자형은 7명 (4.2%)의 빈도를 나타내었다. 대립인자 비율은 8회 반복이 0.76, 9회 반복이 0.20, 그리고 5회 반복이 0.03 이었다. 성별에 의한 PNRP의 차이는 유의하지 않았다 ( $\chi^2=1.675$ ,  $p=0.196$ ).

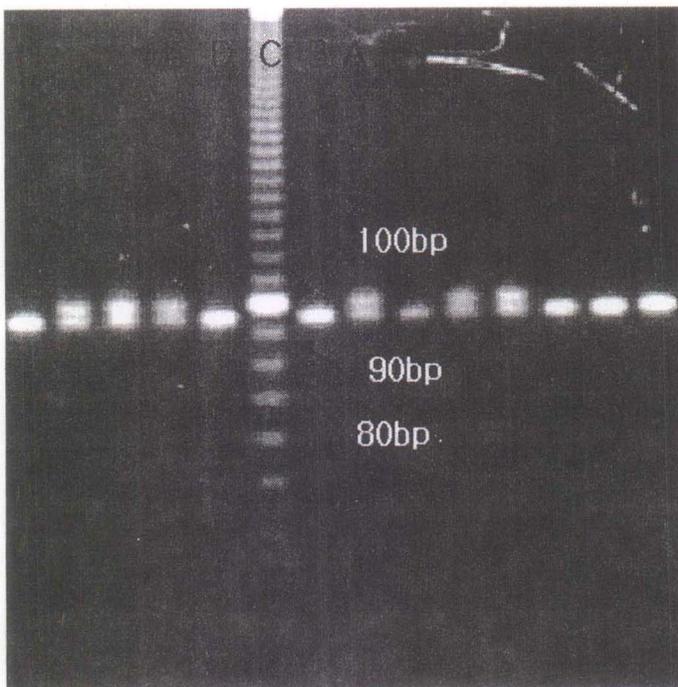


Fig. 7. PNRP determination by PCR and 3.5% MetaPhor<sup>®</sup> agarose gel electrophoresis. Lane A, E are 9/8 heterozygotes (100/95 bp size bands are seen), Lane B, D are 8/8 homozygotes (only 95 bp size band is seen), Lane C is 10 bp DNA ladder.

### 5. Apo(a) 표현형과 Lp(a) 농도와의 관계

K4-major와 Lp(a)의 농도는 음의 상관관계를 보였다 ( $r=-0.633$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 8). K4-major와 LN[Lp(a)]간에도 역시 상관계수는  $-0.598$ 로서 음의 상관관계를 나타내었다 ( $p=0.001$ ). K4-mean과 Lp(a)도 의미 있는 음의 상관관계를 보였으며 ( $r=-0.555$ ,  $p=0.0001$ ) 또한 K4-small도 Lp(a)와도 의미 있는 음의 상관관계를 보였다. ( $r=-0.530$ ,  $p=0.0001$ )

$$Y = -6.849X + 273.0 \quad R^2=0.408, \quad p=0.001$$

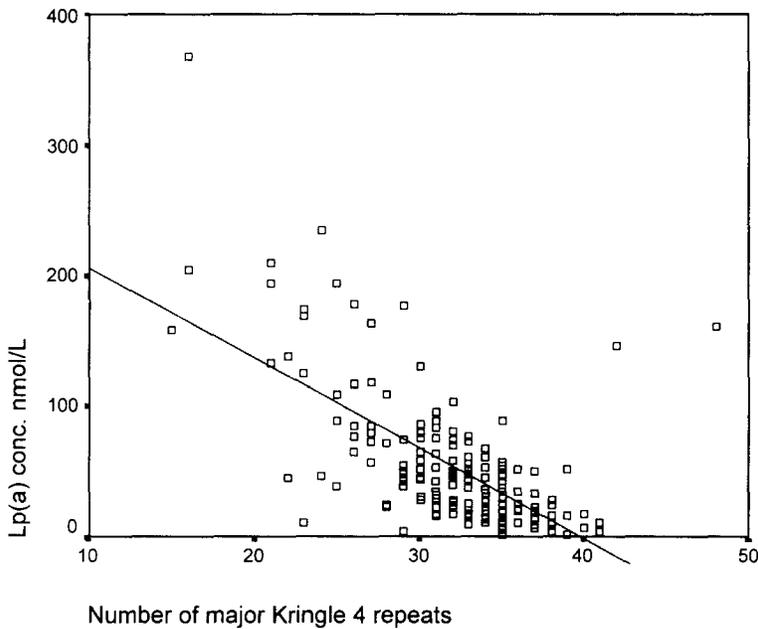


Fig. 8. Regression equation between K4-major and Lp(a) concentration.

#### 6. +93 C/T 유전자형과 Lp(a) 농도와의 관계

C/C 유전형인 사람의 Lp(a) 농도와 표준편차가  $53.9 \pm 48.8$  nmol/L 이었으며 C/T 유전형인 사람의  $56.3 \pm 64.0$  nmol/L, T/T 유전형인 사람의  $10.3 \pm 1.2$  nmol/L를 나타내었다 (Table 3). +93 C/T 유전자형에 의한 각 유전형에서의 Lp(a)와 LN[Lp(a)]의 농도는 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $\chi^2=3.537$ ,  $p=0.171$ ).

#### 7. K4-major에 따른 각 군에서 +93 C/T 유전자형과 Lp(a) 농도와의 관계

K4-VNTR이 Lp(a) 농도에 미치는 영향을 최소화 시키기 위해 K4-major를 26이하, 27-28, 29이상의 세군(L, M, H)으로 나눈 후 각 군에서 +93 C/T 유전자형이 Lp(a)와 LN[Lp(a)]에 미치는 영향을 보았을 때 유의한 차이는 보이지 않았다 (Table 2). M군과 L군에서 C/C 유전자형과 C/T 유전자형 사이의 Lp(a)농도의 차이를 보았을 때 역시 통계적으로 유의한 차이는 없었다. (M군,  $p=0.556$ ; L군,  $p=0.459$ )

Table 2. Lp(a) concentrations according to the +93 C/T genotype by K4-VNTR groups

K4 Group	C/T Poly	n	Lp(a) nmol/L		p value	LN[Lp(a)] <sup>1</sup>		p value
			Mean	SD		Mean	SD	
H	C/C	96	39.8	33.3	0.383	3.32	0.95	0.383
	C/T	42	35.5	25.5		3.22	0.96	
	T/T	1	9.4			2.25		
	Total	139	38.3	31.1		3.28	0.95	
M	C/C	9	76.5	43.0	0.197	4.17	0.66	0.197
	C/T	2	95.6	32.4		4.53	0.35	
	Total	11	80.0	40.5		4.24	0.62	
L	C/C	15	130.4	60.4	0.480	4.75	0.55	0.480
	C/T	7	169.7	104.6		4.96	0.67	
	T/T	1	11.2			2.42		
	Total	23	38.3	31.1		4.71	0.76	
Total	C/C	120	53.9	48.8	0.171	3.56	1.02	0.171
	C/T	51	56.3	64.0		3.51	1.10	
	T/T	2	10.3	1.2		2.33	0.12	
	Total	173	54.1	53.5		3.53	1.04	

<sup>1</sup> LN[Lp(a)] means natural logarithmic value of Lp(a), nmol/L.

## 8. PNRP와 Lp(a) 농도와의 관계

PNRP에 따른 Lp(a)농도의 차이를 보았을 때, 8/8 유전자형은 Lp(a) 농도가  $50.6 \pm 44.0$  nmol/L였으며 9/8 유전자형은  $57.3 \pm 64.0$  nmol/L, 9/9 유전자형은  $40.2 \pm 53.7$  nmol/L, 8/5 유전자형은  $79.8 \pm 84.8$  nmol/L를 나타내었다. 각 유전자형들의 Lp(a)의 유의한 차이는 없었다 ( $\chi^2=1.675$ ,  $p=0.196$ ). LN[Lp(a)]의 변환 후에도 PNRP에 의한 유전자형간의 차이는 유의하지 않았다 ( $\chi^2=1.675$ ,  $p=0.196$ ). PNRP 9/9 유전자형에서 Lp(a)농도의 평균이 9/8 형에 비해 낮은 것처럼 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다( $p=0.477$ ) (Fig 9). 그러나 Lp(a) 농도와 PNRP 두 대립인자의 평균인 PNRP-mean과는 약하지만 유의한 음의 상관관계를 보였다 ( $r=-0.1596$ ,  $p=0.0466$ ). PNRP 두 대립인자 중 작은 것인 PNRP-small과 Lp(a) 농도와도 유의한 음의 상관관계를 보였다 ( $r=-0.198$ ,  $p=0.0132$ ). PNRP 두 대립인자의 차이인 PNRP-diff와 Lp(a) 농도와는 유의한 양의 상관관계를 보였다 ( $r=-0.176$ ,  $p=0.0277$ ). PNRP 대립인자 중 큰 것인 PNRP-large와 Lp(a) 농도와는 상관성이 없었다 ( $p=0.971$ ).

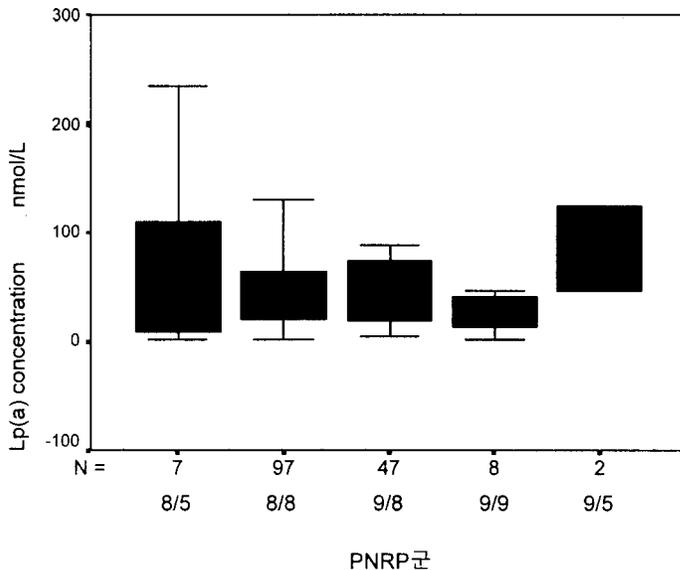


Fig. 9. Lp(a) concentrations by different apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism groups.

9. K4-major에 따른 각 군에서 PNRP와 Lp(a) 농도와의 관계

K4-VNTR을 26이하, 27-28, 29이상의 세군(L, M, H)으로 나눈 후 각 군에서 PNRP 유전자 다형성이 Lp(a)에 미치는 영향을 보았을 때, H군과 L군, 그리고 전체에서는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 다만 M군(K4 VNTR 26-28)에서는 PNRP 유전자형이 8/8인 경우보다 9/9인 경우 Lp(a)의 농도 및 LN[Lp(a)]의 값이 유의한 차이를 보였다 (Lp(a):  $p=0.014$ , LN[Lp(a)]:  $p=0.006$ ) (Table 3). 그러나, 이 군의 수가 적어서 ( $n=10$ ) 의미 있는 결론을 내리기가 어려웠다.

Table 3. Lp(a) concentrations according to the apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism by K4-VNTR groups

K4 Group	PNRP	n	Lp(a) nmol/L		p value	LN[Lp(a)]		p value
			Mean	SD		Mean	SD	
H	8/8	85	40.6	33.6	0.302	3.36	0.92	0.302
	9/8	38	38.8	26.3		3.37	0.84	
	9/9	5	21.4	18.5		2.54	1.38	
	Total	128	39.3	31.2		3.33	0.92	
M	8/8	5	109.8	34.6	0.022*	4.66	0.30	0.022*
	9/8	3	67.0	8.5		4.20	0.13	
	9/9	2	22.9	0.9		3.13	0.04	
	Total	10	79.5	42.7		4.22	0.65	
L	8/8	7	130.2	51.3	0.779	4.79	0.43	0.742
	9/8	6	169.7	121.4		4.73	1.23	
	9/9	1	168.4			5.13		
	Total	14	146.7	79.7		4.80	0.75	
Total	8/8	97	50.6	44.0	0.391	3.53	0.98	0.391
	9/8	47	57.3	64.0		3.60	0.99	
	9/9	8	40.2	53.7		3.01	1.37	
	Total	152	52.1	51.3		3.52	1.01	

\* p-value < 0.05

### 10. PNRP와 +93 C/T 유전자형과의 관계

PNRP와 +93 C/T 유전자 다형성간의 연관성을 통계적으로 분석한 결과 강한 연쇄적 불균형을 확인하였다. 113명의 C/C 유전자형 군중 82.3%가 PNRP결과 8/8 유전자형을 나타내었으며 9/8 유전자형은 6.2% 였다. 이와는 대조적으로 50명의 C/T 유전자형 군에서는 78.0%가 9/8 유전자형을 나타내었으며 8/8 유전자형은 8.0%여서 통계적으로 유의한 상관성을 볼 수 있었다 (spearman  $r=0.723$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 10).

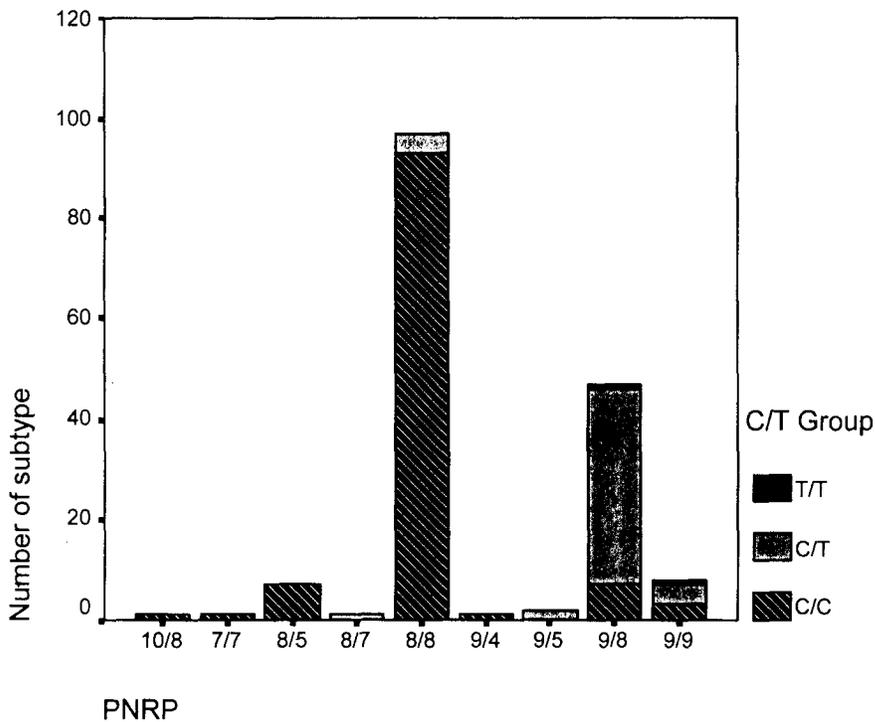


Fig. 10. Linkage disequilibrium between apo(a) pentanucleotide repeat polymorphism and +93 C/T polymorphism.

11. 다중회귀분석을 이용한 Lp(a)와 LN[Lp(a)]의 농도에 영향을 주는 인자 분석

Lp(a)와 LN[Lp(a)]의 농도에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 인자인 연령, 성별, PNRP-large(2개의 대립인자중 큰수), PNRP-small(2개의 대립인자중 작은수), PNRP-mean(2개의 대립인자의 평균), K4-major, K4-minor, K4-mean(2개의 대립인자의 평균), K4-mean×PNRP-mean(K4-mean과 PNRP-mean의 곱), C/T 유전자형, 혈중 Total Cholesterol, 혈중 TG, 혈중 HDL Cholesterol, 그리고 혈중 LDL Cholesterol의 영향을 각각 상관분석을 시행한 결과 Lp(a)에 영향을 주는 인자는 K4-major, K4-minor, K4-mean, K4-mean×PNRP-mean, 혈중 TG, 혈중 HDL Cholesterol, 혈중 LDL Cholesterol로 나타났으며 LN[Lp(a)]에 영향을 주는 인자는 연령, K4-major, K4-minor, K4-mean, K4-mean×PNRP-mean, 혈중 Total Cholesterol, 혈중 HDL Cholesterol, 혈중 LDL Cholesterol로 나타났다 (Table 4).

Table 4. Simple regression analysis between Lp(a) or LN[Lp(a)] and other risk factors

Factor	Lp(a)		LN[Lp(a)]	
	F	Sig.	F	Sig.
Age	2.718	0.101	3.965	0.048*
Sex	2.479	0.117	0.315	0.575
PNRP-large	1.373	0.172	0.903	0.343
PNRP-small	2.739	0.100	0.584	0.446
PNRP-mean	0.383	0.537	0.016	0.899
K4-major	119.4	<0.001*	98.5	<0.001*
K4-minor	9.91	0.002*	5.481	0.021*
K4-mean	77.19	<0.001*	57.3	<0.001*
K4-mean × PNRP-mean	29.93	<0.001*	24.64	<0.001*
C/T genotype	0.033	0.855	0.767	0.382
T. Cholesterol	3.596	0.060	4.762	0.030*
Triglyceride	4.938	0.028*	1.716	0.192
HDL Cholesterol	4.234	0.041*	4.763	0.030*
LDL Cholesterol	4.510	0.035*	8.284	0.005*

\* p-value < 0.05. PNRP-large means the larger VNTR allele of two. PNRP-small means smaller band two alleles. PNRP-mean means the average band of two alleles. K4-major means the number of VNTR of denser band by human eye on SDS-agaorose gel ECL western blotting method. K4-minor means the fainter band by human eye on SDS-agaorose gel ECL western blotting method. We regarded the smaller band as major band, if the two band intensity is similar by human eye. K4-mean is the average of smaller and larger band of K4-VNTR. We regarded the K4-mean was the K4-VNTR itself, if only one band is detected. K4-mean × PNRP-mean means the product of K4-mean mulitplied by PNRP-mean.

상기 Table 4.에서와 같이 단순 회귀방정식에서  $p < 0.2$  이상인 인자들만 단계선택법으로 다중회귀분석을 시행한 결과 다음과 같은 상관 관계식을 얻을 수 있었다.

$$Lp(a) = -6.579 \times K4\text{-major} + 0.142 \times TG + 0.262 \times LDL\text{-C} + 266.92$$
$$R^2=0.475$$

$$LN[Lp(a)] = -0.121 \times K4\text{-major} + 0.074 \times LDL\text{-C} + 7.311$$
$$R^2=0.420$$

#### IV. 고찰

고농도의 혈장내 Lp(a) 농도는 관상동맥질환의 독립적인 유전성 위험인자로 알려져 있으며 Apo(a)유전자의 표현에 영향을 미치는 유전적 요인에 의해 혈장 내 Lp(a) 농도가 영향을 받게된다. 이중 Apo(a) K4-VNTR이 약 40-69%의 영향을 주게 되며,<sup>46,10</sup> PNRP 유전자형이 약 10%의 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup> 후자의 경우 한편, 덴마크계인 등 백인(Caucasian)에 국한된 것이며 흑인에서는 그 영향이 없었다.<sup>28</sup>

정상 한국인 173명에서 시행한 Lp(a) 평균 농도와 표준편차는  $54.1 \pm 53.5$  nmol/L였으며 중앙값은 42.3 nmol/L였다. Lp(a)의 농도 분포는 낮은 값쪽으로 편향되어 있었다. 이러한 Lp(a) 농도의 편향성은 백인종과 아시아인종에서 측정된 결과와 유사했으며<sup>9</sup> 아시아인 중 중국인 및 일본인에서의 연구 결과와도 유사하였다.<sup>16,29</sup> 성별에 의한 차이를 보았을 때 남자군의 Lp(a)의 평균 농도와 표준편차는  $59.1 \pm 61.0$  nmol/L 였으며 여자 군에서는  $45.9 \pm 37.4$  nmol/L로 두 군에서 Lp(a)의 농도는 유의한 차이를 보이지 않았다( $p=0.081$ ). Lp(a)값을 자연대수로 바꾼 경우에도 남녀간의 차이는 없었다( $p=0.575$ ). K4-major와 Lp(a)의 농도는 뚜렷한 음의 상관관계를 보였으며( $r=-0.633$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 8), K4-mean 및 K4-small과 Lp(a)도 상관성을 비교하여도 유사하였다. ( $r=-0.555$ ,  $p=0.0001$ ;  $r=-0.530$ ,  $p=0.0001$ ). 이런 음의 상관관계를 보이는 기전은 비비 (baboon) 간세포 배양 시험에 의한 것이지만, Apo(a) 크기가 큰 단백질은 Lp(a) 분비가 지연되어 혈중 농도가 낮게 되는 것 때문으로 받아들여지고 있다.<sup>30</sup>

Apo(a)유전자의 5' 비번역 부위에 위치한 +93 C/T 다형성에서 T의 존재는 새로운 시작 codon의 생성과 곧 이은 stop codon에 의해 변화가 생겨서 in vitro실험에서 +93 C/T 다형성 부위에서의 false start codon에 의해 60%까지 apo(a)유전자의 표현이 감소한다는 연구 결과가 있었다.<sup>17</sup> 이 다형성에 의한 Lp(a) 농도 변화는 백인에서는 그 영향이 없었으며 흑인에서는 C/C형에 비해 C/T형이 Lp(a) 농도가 의미 있게 감소하였다.<sup>18</sup> 일본인에서 C/T 유전자형에서 C/C 유전자형에 비해 Lp(a) 농도가 의미 있게 감소되어 있다는 보고로 인해 동양인은 오히

려 이 점에서 흑인과 유사할 수 있다고 생각할 수 있었다.<sup>16</sup>

한편, 본 연구에서는 C/C 유전자형은 69.4%으로 그 빈도가 가장 높았으며 C/T 유전자형은 29.5%, T/T 유전자형은 1.2%의 빈도를 나타내어 그 빈도는 타 연구와 유사하였으나, 각 유전자형에 따른 Lp(a) 농도는 C/C 유전자형에서는  $53.9 \pm 48.8$  nmol/L, C/T 유전자형에서는  $56.3 \pm 64.0$  nmol/L, T/T 유전자형에서는  $10.3 \pm 1.2$  nmol/L로 의미 있는 차이를 보이지 않았다( $p = 0.171$ , Table 2). 단지, T/T 유전자형에서 Lp(a)의 농도가 낮은 경향을 보였으나 대상자의 수가 2명으로 너무 적어 각 유전자형간에 Lp(a) 농도의 통계학적 유의성을 논하기는 곤란하였다.

PNRP 유전자형의 분포를 보았을 때 측정이 불가능하였던 8명을 제외한 165명중 8/8 유전자형은 97명 (58.8%)으로 그 빈도가 가장 높았으며 9/8 유전자형은 47명 (28.5%), 9/9 유전자형은 8명 (4.8%), 8/5 유전자형은 7명 (4.2%)의 빈도를 나타내었다. 성별에 의한 PNRP의 차이는 유의하지 않았다. 이러한 빈도는 한국인 관상 동맥 질환 환자와 정상인에서 측정된 PNRP의 결과와 유사하였고 중국인들과도 유사하였다.<sup>15,23</sup> 본 연구결과 대립인자 비율은 8회 반복이 0.76, 9회 반복이 0.20, 그리고 5회 반복이 0.03 이었다.

PNRP를 측정하기 위해 일반적으로 polyacrylamide gel로 분리하나 저자들은 대량의 검체를 동시에 검사하기 위해 intermediate melting point agarose gel인 MetaPhor<sup>®</sup> gel 에서 PCR후 결과 산물의 크기를 측정하였다. PNRP의 반복 횟수를 결정할 때 반복 횟수 1회의 차이가 5 bp의 크기 차이를 보이므로 2시간 30분 정도의 전기영동으로 판별이 가능하였고, 10 bp 간격의 DNA 크기 표지자를 사용함으로써 정확한 DNA 크기 측정이 가능하였다(Fig. 7). 그 편리성 때문에 PNRP 검사시 추천할 만한 방법으로 사료된다.

PNRP와 C/T 유전자 다형성간의 연관성을 통계적으로 분석한 결과 강한 연쇄적 불균형이 관찰되었다. 113명의 C/C 유전자형군중 82.3%가 PNRP결과 8/8 유전자형을 나타내었으며, 50명의 C/T 유전자형군의 78.0%가 9/8 유전자형을 나타

내에서 통계적으로 유의한 상관성을 볼 수 있었다 (spearman  $r=0.726$ ,  $p < 0.001$ ). 이러한 연쇄적 불균형은 백인종에서 보인 결과와 동일한 결과였다. K4 VNTR을 세군으로 나누어 K4 VNTR의 영향을 최소화하고 각 군별로 C/T와 PNRP의 유전자형에 따른 Lp(a)의 농도 변화를 보았을 때 H군과 L군에서는 통계적 차이가 없었고, 다만, M군(K4-major, 27-28)에서 PNRP 8/8형에 비해 9/9형에서 분산분석 후에 다중비교를 통해 Lp(a) 및 LN[Lp(a)]의 감소가 통계적으로 의미 있게 나타났다는데 이는 대상군 수가 적은 단점이 있다. 한편, 다중회귀분석을 한 결과 Lp(a)에 영향을 미치는 인자는 K4-VNTR 수와 혈중 중성지방, LDL cholesterol의 농도였고 PNRP는 영향을 주지 않았다. Mooser 등은(1995) (TTTTA)<sub>11</sub>에서 Lp(a) 농도가 의미 있게 낮았다는 것을 밝혔으나, 전사 활성도(transcriptional activity)의 차이는 밝힐 수 없었다.<sup>31</sup> 본 연구에서 (TTTTA)<sub>11</sub> 유전자형을 가지고 있는 대상자가 없어 확인하지는 못하였으나, (TTTTA)<sub>9</sub> 이 (TTTTA)<sub>8</sub> 에 비해 Lp(a) 농도를 낮춘다는 가설을 확인하기 곤란하였다. 한편 C/T 유전자 다형성과 PNRP가 연쇄적 불균형이 있으므로, 백인종에서 C/T 유전자 다형성은 Lp(a) 농도에 영향을 주지 않지만 PNRP는 Lp(a) 농도에 영향을 준다는 연구 결과보다는 본 연구와 같이 두 가지 유전자형 모두 Lp(a) 농도에 영향을 주지 않는다는 것이 더 논리적이라 할 것이다. 그 외에, 지금까지의 Lp(a)농도에 대한 영향에 관한 연구는 대부분 ELISA법으로 Lp(a)농도를 측정하였는데, 본 연구와 같이 항apoB 및 항apo(a) 두 가지 항체를 사용하여 연구한 것은 많지 않았다.<sup>5,19,21</sup> 일반적인 방법으로는, 적더라도, apo(a) K4-VNTR에 의해 영향을 받으므로 분석 결과가 다르게 나왔을 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로의 연구에서는 Lp(a) 농도의 표준화가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 LDL 콜레스테롤 측정은 Friedewald공식을 사용하였다.<sup>22</sup> 이 방법은 Lp(a)농도에 영향을 받는 방법이라서,<sup>32,33</sup> LDL 콜레스테롤이 Lp(a)농도에 영향을 준다는 발견은 그리 중요한 것이 아니라고 생각된다. 한편, Lp(a)농도를 자연대수 값으로 변환한 후에는 중성지방이 영향을 주지 못하는 것으로 보아

중성지방 농도 역시 중요한 인자는 아니라고 생각되었다.

본 연구는 K4-VNTR을 Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)를 사용한 유전자형으로 검사하지 못하였고 대신, apo(a) 단백질의 크기를 측정한 다음 간접적으로 산출하였는데 이는 비록 그 상관성은 좋다고 하더라도,<sup>26</sup> 단백질의 표현이 되지 않은 대립인자가 상당수 존재하여 실제보다 heterozygosity가 낮다는 제한점이 있었다. 즉, apo(a) 유전자형을 PFGE법으로 검사하면 heterozygosity가 90-95% 정도 이상인데, 본 연구에서는 heterozygosity는 57%였다. 그러나 같은 표현형 방법으로 백인종에서는 75%였고,<sup>19</sup> 반면에 홍콩지역의 중국인을 대상으로 역시 같은 방법으로 측정한 결과, 58%로 본 연구와 유사하여 방법상의 제한점도 있지만 동양인에서 heterozygosity가 적을 가능성이 있다고 생각된다.<sup>29</sup> 그러나 apo(a) isoform으로 검출되지 않는 크기는 대개 K4-VNTR 36 이상에서 많았고 이 경우 대개 Lp(a) 농도가 작으므로 연구 결과에 매우 큰 차이를 보이지는 않을 것으로 생각되었다. 또한 본 연구는 K4-VNTR이 다양한 것에 비해 연구 대상자가 수가 상대적으로 적은 것이 제한점이라고 할 수 있다.

결론적으로, 한국인에서 K4-VNTR이 혈중 Lp(a) 농도에 가장 큰 영향을 주는 유전적 요소임을 확인하였고, +93 C/T 유전자형과 PNRP 유전자형과는 강한 연쇄적 불균형을 확인하였으며, 이 두 가지 유전자형이 Lp(a) 혈중 농도에 미치는 영향은 없거나, 있더라도 미미할 것으로 사료되었다.

## V. 결론

본 연구에서는 동맥경화증 발병에 기여하는 것으로 알려진 Lp(a)의 농도에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 Apo(a) 단백질 크기와 현재 그 영향에 대해 연구가 이루어지고 있는 PNRP와 +93 C/T 유전자 다형성에 대해 정상한국인에서 그 영향을 평가하고자 하였다.

1. 세브란스병원에서 검진 대상자로 173명 (남, 107; 여, 66)을 대상으로 하여 Lp(a)의 농도, K4-VNTR, PNRP, +93 C/T 다형성을 보았다.
2. 정상 한국인 173명에서 Lp(a)의 농도는  $54.1 \pm 53.5$  nmol/L였으며 분포는 낮은 값쪽으로 편향되어 있었다. 남자군과 여자군의 Lp(a)의 평균 농도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $59.1 \pm 61.0$  nmol/L vs  $45.9 \pm 37.4$  nmol/L)( $p=0.081$ ).
3. K4-major와 Lp(a)의 농도는 음의 상관관계를 보였으며( $Y = -6.849X + 273.0$   $R^2=0.408$ ,  $p<0.01$ ) 외국의 예와 비슷한 결과를 나타냈다. K4-major의 최빈값은 35, 중앙값은 33이었으며 15에서 48까지의 범위를 나타냈다.
4. +93 C/T 다형성에서 C/C 유전자형이 69.4%로 그 빈도가 가장 높았으며 C/T 유전자형은 29.5%, T/T 유전자형은 1.2%의 빈도를 나타내었다. C 대립인자 0.841, T 대립인자 0.159로 확인되었으며 백인종과의 차이는 보이지 않았다. 성별에 의한 C/T 유전자형의 빈도차이는 유의하지 않았다 ( $p=0.166$ ).
5. +93 C/T 유전자형에 따른 Lp(a)농도의 차이를 보았을 때 C/C 유전자형은 Lp(a) 농도와 표준편차가  $53.9 \pm 48.8$  nmol/L였으며 C/T 유전자형은  $56.3 \pm 64.0$  nmol/L, T/T 유전자형은  $10.3 \pm 1.2$  nmol/L를 나타내었다. +93 C/T 유전자형에 따른 Lp(a)농도는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다( $p=0.171$ ).
6. PNRP 유전자형 중에 8/8 유전자형은 97명 (58.8%)으로 그 빈도가 가장 높았으며 9/8 유전자형은 47명 (28.5%), 9/9 유전자형은 8명 (4.8%), 8/5 유전자형은 7명

(4.2%)의 빈도를 나타내었다. 성별에 의한 PNRP의 차이는 유의하지 않았다 ( $p=0.196$ ). 대립인자 비율은 8회 반복이 0.76, 9회 반복이 0.20, 그리고 5회 반복이 0.04 이었다.

7. PNRP에 따른 Lp(a)농도의 차이를 보았을 때 8/8 유전자형은 Lp(a) 농도와 표준편차가  $50.6 \pm 44.0$  nmol/L였으며 9/8 유전자형은  $57.3 \pm 64.0$  nmol/L, 9/9 유전자형은  $40.2 \pm 53.7$  nmol/L를 나타내었다. 각 유전자형에서 Lp(a)농도의 유의한 차이는 보이지 않았다( $p=0.196$ ).

8. K4-VNTR을 26이하, 27-28, 29이상의 세군(L, M, H)으로 나눈 후 각 군에서 +93 C/T 유전자 다형성과 PNRP가 Lp(a)에 미치는 영향을 보았을 때 M군(K4-VNTR 27-28)에서 PNRP 유전자형이 8/8인 경우보다 9/9인 경우 Lp(a)의 농도 및 LN[Lp(a)]의 값이 유의한 차이를 보였으나 (Lp(a):  $p=0.014$ , LN[Lp(a)]:  $p=0.006$ ), H군과 L군, 그리고 전체에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

9. PNRP와 +93 C/T 유전자 다형성간의 강한 연쇄적 불균형이 관찰되었다. 113명의 C/C 유전자형군중 82.3%가 PNRP결과 8/8 유전자형을 나타내었으며, 50명의 C/T유전자형군의 78.0%가 9/8 유전자형을 나타내어서 통계적으로 유의한 상관성을 볼 수 있었다 (spearman  $r=0.723$ ,  $p < 0.001$ ).

10. 다중회귀분석으로 Lp(a) 및 LN[Lp(a)]에 영향을 주는 인자를 분석하였을 때 K4-VNTR-major와 혈중 TG, LDL cholesterol이 Lp(a)의 농도에 영향을 주며 K4-VNTR-major와 혈중 LDL cholesterol이 LN[Lp(a)]에 영향을 주는 것으로 나타났다. 실제로 가장 중요한 인자는 K4-VNTR이며, 다른 인자의 기여는 확인할 수 없었다.

백인에서는 영향을 주되, 흑인에서는 영향이 없는 것으로 알려진 apo(a) 유전자 PNRP 유전자형이 한국인에서는 영향을 주지 않는 것으로 해석되었다. 또한 apo(a) 유전자 +93 C/T 유전자 다형성의 경우에는, 백인 및 일본인의 C/T 유전자형에서 C/C 유전자형에 비해 Lp(a)농도가 의미 있게 감소한다는 보고와 상이하였고 이는 인종적인 차이라고 생각되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 정상 한국인에서 Lp(a)의 농도에 영향을 주는 주된 인자는 K4-VNTR이며 음의 상관관계를 확인하였다. 그 외 혈중 TG 및 LDL cholesterol의 농도가 Lp(a)의 농도와 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132-7.
2. Utermann G, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Stanbury JB, Wyngaarden JB, et al. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Inc; 1995. p. 1887-912.
3. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989;339:301-3.
4. Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM. Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986;74:758-65.
5. Marcovina SM, Albers JJ, Wijsman E, Zhang ZH, Chapman NH, Kennedy H. Differences in Lp(a) concentrations and apo(a) polymorphs between black and white Americans. *J Lipid Res* 1996;37:2569-85.
6. Sandholzer C, Hallman DM, Saha N, Sigurdsson G, Lackner C, Csaszar A, et al. Effects of the apolipoprotein(a) size polymorphism on the lipoprotein(a) concentration in 7 ethnic groups. *Hum Genet* 1991;86:607-14.

7. Albers JJ, Marcovina SM, Lodge MS. The unique lipoprotein(a): properties and immunochemical measurement. *Clin Chem* 1990;36:2019-26.
8. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest* 1992;90:52-60.
9. Demeester CA, Bu X, Gray RJ, Lusic AJ, Rotter JI. Genetic variation in lipoprotein (a) levels in families enriched for coronary artery disease is determined almost entirely by the apolipoprotein (a) gene locus. *Am J Hum Genet* 1995;56:287-93.
10. Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, Sandholzer C, Utermann G. The apolipoprotein(a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet* 1992;90:220-30.
11. Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups: Evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J Clin Invest* 1994;93:2526-34.
12. Kraft HG, Lingenhel A, Pang RWC, Delport R, Trommsdorff M, Vermaak H, et al. Frequency distributions of apolipoprotein(a) kringle IV repeat alleles and their effects on lipoprotein(a) levels in Caucasian, Asian, and African populations: the distribution of null alleles is non-random. *Eur J Hum Genet* 1996;4:74-87.

13. Cohen JC, Chiesa G, Hobbs HH. Sequence polymorphisms in the apolipoprotein(a) gene: Evidence for dissociation between apolipoprotein(a) size and plasma lipoprotein(a) levels. *J Clin Invest* 1993;91:1630-6.
14. Kraft HG, Haibach C, Lingenhel A, Brunner C, Trommsdorff M, Kronenberg, et al. Sequence polymorphism in kringle IV 37 in linkage disequilibrium with the apolipoprotein (a) size polymorphism. *Hum Genet* 1995;95:275-82.
15. Hong SH, Min WK, Cheon SI, Lee CC, Song J, Kim JQ. Association between apolipoprotein(a) polymorphism and Lp(a) levels in Koreans. *Mol Cells* 1998;8:544-9.
16. Park HY, Nabika T, Notsu Y, Kobayashi S, Masuda J. Effects of apolipoprotein A gene polymorphisms on lipoprotein(a) concentrations in Japanese. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:304-8.
17. Zyslow BR, Lindahl GE, Wade DP, Knight BL, Lawn RM. C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:58-64.
18. Kraft HG, Windegger M, Menzel HJ, Utermann G. Significant impact of the +93 C/T polymorphism in the apolipoprotein(a) gene on Lp(a) concentrations in Africans but not in Caucasians: Confounding effect of linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet* 1998;7:257-64.

19. Valenti K, Aveyrier E, Leaute S, Laporte F, Hadjanc AJ. Contribution of apolipoprotein(a) size, pentanucleotide TTTTA repeat and C/T(+93) polymorphisms of the apo(a) gene to regulation of lipoprotein(a) plasma levels in a population of young European Caucasians. *Atherosclerosis* 1999;147:17-24.
20. Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A. Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5 prime flanking region. *J Clin Invest* 1997;99:1361-6.
21. Marcovina SM, Albers JJ, Gabel B, Koschinsky ML, Gaur VP. Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clin Chem* 1995;41:246-55.
22. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
23. Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke BA. Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein (a). *Am J Hum Genet* 1991;49:1063-74.
24. Marcovina SM, Zhang ZH, Gaur VP, Albers JJ. Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:1192-6.

25. Rosby O, Berg K. LPA gene: Interaction between the apolipoprotein(a) size('kringle IV' repeat) polymorphism and a pentanucleotide repeat polymorphism influences Lp(a) lipoprotein level. *J Intern Med* 2000 ;247:139-52.
26. Marcovina SM, Hobbs HH, Albers JJ. Relation between number of apolipoprotein(a) kringle 4 repeats and mobility of isoforms in agarose gel: Basis for a standardized isoform nomenclature. *Clin Chem* 1996;42:436-9.
27. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17:2503-16.
28. Trommsdorff M, Kochl S, Lingenhel A, Kronenberg F, Delpont R, Vermaak H, et al. A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasians. *J Clin Invest* 1995;96:150-7.
29. Pang RW, Chen B, Janus ED, Lam KS. Frequency distributions of plasma apolipoprotein(a) levels and phenotypes: a comparison between southern and northern Chinese populations. *Chinese Med J* 1997;110:465-73.
30. White AL, Hixson JE, Rainwater DL, Lanford RE. Molecular basis for "null" lipoprotein(a) phenotypes and the influence of apolipoprotein(a) size on plasma lipoprotein(a) level in the baboon. *J Biol Chem* 1994;269:9060-6.

31. Mooser V, Mancini FP, Bopp S, Petho-Schramm A, Guerra R, Boerwinkle E, et al. Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum Mol Genet* 1995;4:173-81.

32. Warnick GR. Lipoprotein(a) is included in low-density lipoprotein by NCEP definition. *Clin Chem* 1994;40:2115-6.

33. Li KM, Wilcken DE, Dudman NP. Effect of serum lipoprotein(a) on estimation of low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald formula. *Clin Chem* 1994;40:571-3.

## Abstract

# The effects of apolipoprotein(a) size and genetic polymorphisms on serum lipoprotein(a) levels in Korean adults

Kyung Ho Roh

*Division of Medical Sciences  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Jeong-Ho Kim)

High level of serum lipoprotein(a) [Lp(a)] is a major risk factor for atherothrombotic disease in Asians and Caucasians. Lp(a) consists of a low density lipoprotein(LDL) and apolipoprotein(a)[Apo(a)]. Apo(a) varies in size among individuals owing to different numbers of kringle 4, which are homologous to plasminogen. The sizes of Apo(a) are known to be determined genetically by the number of kringle 4 (K4) repeat, and to be related to serum Lp(a) concentration. In addition, pentanucleotide repeat polymorphism (PNRP) of 5' flanking region and C/T(+93) polymorphism of Apo(a) gene have been reported to be related to Lp(a) concentration in Caucasian and in some Asian studies. In an effort to determine which genetic polymorphisms control Lp(a) levels, Apo(a) genotypes including PNRP and C/T(+93) as well as K4 variable number of tandem repeat (VNTR) were examined in 173 Korean normal adults.

The mean age of male(n=107) and female(n=66) was  $55.2 \pm 6.8$  and  $53.2 \pm 7.5$  years, respectively. Serum Lp(a) was measured by enzyme immunoassay APO-TEK kit (Sigma Diagnostics, USA). Apo(a) phenotype for K4 VNTR was determined by high-resolution SDS-agarose ECL Western blotting method. PNRP is determined by 3.5% MetaPhor<sup>®</sup> agarose gel after DNA amplification. C/T(+93) polymorphism was determined by amplification refractory mutation system (ARMS). Statistical analysis (T-test, ANOVA, Kruskal-Wallis and  $\chi^2$  test) was done by SPSS<sup>®</sup>.

The results were as follows;

1. Serum Lp(a) was  $54.1 \pm 53.5$  nmol/L and the distribution was skewed to the lower levels. There was no significant difference between male( $59.1 \pm 61.0$  nmol/L) and female( $45.9 \pm 37.4$  nmol/L).

2. K4 variable number of tandem repeat(VNTR) according to major isoform ranged from 15 to 48(median; 33) with no significant sex difference. There was statistically significant negative correlation between Lp(a) and K4-major ( $r=-0.633$ ,  $p = 0.001$ ).

3. The distribution of C/T(+93) polymorphism was C/C(69.4%), C/T(29.5%), and T/T(1.2%). There was no difference of Lp(a) levels among three different genotype( $p = 0.171$ ).

4. The distribution of PNRP was 8/8(58.8%), 8/9(28.5%), 9/9(4.8%), 8/5(4.2%), and 9/5(1.2%). There was no difference of Lp(a) levels among different genotypes( $p = 0.196$ ). Nor was there any difference when the data were analyzed after log transformation of Lp(a) or when analyzed by subgroups of K4 VNTR.

5. There was evidence of a strong linkage disequilibrium between PNRP and C/T(+93) polymorphism ( $p < 0.001$ ).

6. In multiple regression model, Lp(a) level was significantly related with, K4-major, serum triglyceride and LDL cholesterol levels, but not with +93C/T polymorphism or PNRP.

In conclusion, negative correlation between serum Lp(a) and K4 number of Apo(a) was confirmed in normal Korean adults. However, this study suggests that PNRP and C/T(+93) polymorphisms do not play a critical role in determining serum Lp(a) levels in Korean population.

---

Key Words : Apolipoprotein(a), Lipoprotein(a), lipoproteins, C/T polymorphism, Kringle 4 variable number of tandem repeat, pentanucleotide repeat polymorphism, genotype, phenotype