

한국인의 저베타지단백혈증에서의  
Apolipoprotein B 및 Apolipoprotein E  
다형성 양상

연세대학교 대학원

의 학 과

임 환 섭

한국인의 저베타지단백혈증에서의  
Apolipoprotein B 및 Apolipoprotein E  
다형성 양상

지도 권 오 현 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함




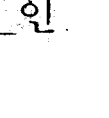

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

임 환 섭

임환섭의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 최 오 현 인   
심사위원 양 영 호 인   
심사위원 안 용 호 인   
심사위원 김 현 숙 인   
심사위원 김 정 호 인 

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 나오기까지 시종일관 아낌없는 지도를 하여주신 權五憲 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 연구과정 중에 부족한 저에게 여러모로 지도와 격려를 아끼지 않으시고 귀한 시간을 내주시며 자문을 하여주신 梁榮浩 교수님, 安龍鎬 교수님, 金賢淑 교수님, 金正浩 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 특히 실험과정에서 많은 도움을 주신 본 교실 의국원과 박영숙 선생님, 남상민 선생님, 신정식 선생님께도 감사를 드립니다.

아울러 오늘에 이르기까지 무한한 사랑을 베풀어주신 양가 부모님의 사랑과 기도에 깊은 감사를 드립니다. 또한 이 논문을 쓰는 동안 항상 곁에서 사랑과 헌신으로 묵묵히 지켜준 아내 지연, 그리고 사랑하는 아들 재현, 재영과도 이 기쁨을 나누고자 합니다.

이 모든 것을 주관하신 하나님께 이 영광을 돌립니다.

저 자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 연구 재료 .....	4
가. 연구대상 .....	4
2. 연구 방법 .....	5
가. 혈중 지질검사 및 DNA 추출 .....	5
나. ApoB 절단형 검사 .....	5
다. ApoE 다형성 검사 .....	5
라. ApoB 8344 다형성 검사 .....	6
마. ApoB <i>EcoRI</i> 다형성 검사 .....	6
3. 통계분석 .....	7
III. 결 과 .....	7
1. 대상군 .....	7
2. ApoB 절단형 결과 .....	8
3. ApoE 다형성 결과 .....	9
4. ApoE 8344 다형성 결과 .....	10
5. ApoE <i>EcoRI</i> 다형성 결과 .....	12
VI. 고 찰 .....	14
V. 결 론 .....	16
참고문헌 .....	17
영문요약 .....	21

## 그림 차례

<b>Fig. 1.</b> Detection of truncated apoB by SDS-agarose gradient gel .....	8
<b>Fig. 2.</b> Analysis of apoE genotyping with two restriction enzymes ( <i>Afl</i> III, <i>Hae</i> II) on 3% agarose gel .....	9
<b>Fig. 3.</b> Analysis of apoB 8344 polymorphism .....	11
<b>Fig. 4.</b> DNA sequence of apoB 8344 polymorphism area of C-specific or T-specific PCR product .....	11
<b>Fig. 5.</b> Analysis of apoB <i>Eco</i> RI polymorphism .....	13

## 표 차 례

<b>Table 1.</b> Synthetic oligonucleotide sequences used for apoB 8344 polymorphism .....	6
<b>Table 2.</b> Synthetic oligonucleotide sequences used for apoB <i>EcoRI</i> polymorphism .....	6
<b>Table 3.</b> Demographics and lipid distribution of subjects .....	7
<b>Table 4.</b> ApoE genotyping and allele frequencies of all subjects .....	9
<b>Table 5.</b> ApoE genotyping and allele frequencies of HBL and normal controls .....	10
<b>Table 6.</b> ApoB 8344 polymorphism and allele frequencies of all subjects .....	12
<b>Table 7.</b> ApoB 8344 polymorphism and allele frequencies of HBL and normal controls .....	12
<b>Table 8.</b> ApoB <i>EcoRI</i> polymorphism and allele frequencies of all subjects .....	13
<b>Table 9.</b> ApoB <i>EcoRI</i> polymorphism and allele frequencies of HBL and normal controls .....	14

한국인의 저베타지단백혈증에서의  
Apolipoprotein B 및 Apolipoprotein E  
다형성 양상

저밀도지단백(low density lipoproteins, LDL)의 농도가 정상대조군의 5 percentile 이하인 경우를 저베타지단백혈증(hypobetalipoproteinemia, HBL)이라 정의한다. 역학적 연구에 의하면 이러한 경우에 죽상 경화증에 의한 심장혈관계 질환의 위험률이 평균보다 낮으나, 일부 환자에서는 운동계 혹은 신경계로(motor or sensory tracks)의 경한 장애와 각종 암, 폐 질환 및 위, 장관계의 이환율이 정상인에 비하여 높은 것으로 알려져 있다. HBL은 apoE 유전자형 및 apoB 8344 다형성, apoB *EcoRI*과 연관성이 있다는 보고가 있다.

본 연구에서는 132명의 HBL군과 137명의 정상대조군을 대상으로 apoB 절단형, apoE 유전자형, apoB 8344 다형성 및 apoB *EcoRI* 다형성 등을 비교 분석하였다. HBL군과 정상대조군간의 나이나 성별 및 체질량 지수간의 통계학적 차이는 없었다. ApoE 유전자형중 apoE 2/3의 비율은 HBL군에서는 21.2%였으나, 정상대조군에서는 9.5%로 나타났다. ApoE 3/4의 경우는, HBL군과 정상대조군에서 각각 19.7%와 27.0%로 나왔다. 이는 HBL군에서의 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자 비율이 정상대조군에 비해 유의하게 높고 apoE  $\epsilon$ 4 대립인자의 비율이 유의하게 낮게 나온 기존 연구의 결과와 일치하는 소견이었다. 반면에 apoB 8344 다형성의 비율은 HBL군과 정상대조군에서 유의한 차이가 없었다. 다만, 서양인에서는 leucine 대립인자(T allele) 비율이 17%인데 비해 한국인에서의 비율은 69.5%로 높게 나왔다. 반면, proline 대립인자(C allele)의 비율이 한국인에서 적은 것으로 나타나, 이는 종족간의 차이가 있음을 보여주었다. ApoB *EcoRI* 다형성은 대부분 R+/+ 유전자형(93.2%)을 가지고 있었으며, R+ 대립인자의 빈도는 0.967로 나타났으며, HBL군과 정상대조군간의 차이는 없었다.

결론적으로 타 연구자들이 보고하였던 HBL과 apoB 8344와 apoB *EcoRI* 다형성간의 연관성은 본 연구에서 밝힐 수 없었으나, 한국인에서도 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자가 HBL의 유전적 원인 중의 하나라는 사실을 확인할 수 있었다.

---

핵심되는 말: 저베타지단백혈증, apolipoprotein B, apolipoprotein E, 다형성, apoB 8344, *EcoRI*



# 한국인의 저베타지단백혈증에서의 Apolipoprotein B 및 Apolipoprotein E 다형성 양상

<지도 권 오 현 교수>

연세대학교 대학원 의학과

## 임 환 섭

### I. 서 론

저밀도지단백(low density lipoproteins, LDL)의 농도가 정상대조군의 5 percentile 이하인 경우를 저베타지단백혈증(hypobetalipoproteinemia, HBL)이라 정의한다. 역학적 연구에 의하면 이러한 경우에 죽상 경화증에 의한 심장혈관계 질환의 위험율이 평균보다 낮으나,<sup>1,2</sup> 일부 환자에서는 운동계 혹은 신경계로(motor or sensory tracks)의 경한 장애와,<sup>3</sup> 각종 암, 폐 질환 및 위, 장관계의 이환율이 정상인에 비하여 높은 것으로 알려져 있다.<sup>4,5</sup> 저베타지단백혈증 중 가계조사를 통하여 상염색체 우성(autosomal dominant inheritance)으로 유전되는 경우, 이를 가족성 저베타지단백혈증(Familial hypobetalipoproteinemia, FHBL)이라 한다. 이러한 가계의 이형접합체(heterozygotes)인 경우, 대부분이 건강하고 지방을 흡수하는데 문제가 없으며 콜레스테롤치가 낮지만, 지방 흡수에 문제가 많고 심각한 합병증을 동반하는 abetalipoproteinemia나 chylomicron retention disease와 대조적인 양상을 보인다.<sup>6</sup> 그러나 동형 접합체(homozygotes)인 FHBL의 경우, abetalipoproteinemia와는 구분할 수 없을 정도의 심각한 임상증상을 보인다. 저콜레스테롤혈증을 보이는 대부분의 가계는 아포지단백B (apolipoprotein B, apoB)의 절단형(truncated form)외에는 다른 분자생물학적 원인이 아직 밝혀져 있지 않다. ApoB의 생성 및 분비에 장애가 생기면 여러 가지 지질성 가족력 질환들과 연관되는 것으로 알려져 있다. 여기에는 apoB 함유 지단백이 전혀 없는 질환인 abetalipoproteinemia, homozygous hypobetalipoproteinemia가 있으며, 미량의 apoB 함유 지단백이 혈중내에 존재하는 normotriglyceridemic abetalipoproteinemia, heterozygous hypobetalipoproteinemia와 같은 질환들이 발생할 수 있다.

ApoB는 인체에서 apoB 100과 apoB 48의 두 가지 형태로 존재하며, 그 유전자는 염색체 2번(2p23)에 위치하고 있다.<sup>7,8</sup> ApoB 100은 인체에서 가장 긴 단백질 중의 하나로서 그 분

자량이 550,000 dalton에 이르며 4,536개의 아미노산으로 구성되어 있는 단 사슬의 단백질이며, 그 유전자는 간 및 장에서 합성되며 VLDL, IDL, LDL, Lp(a)의 필수적인 구조적 요소이다. 반면에 apoB 48은 264,000 dalton의 분자량을 가지며 apoB 100의 아미노산 48%, 즉 2,152개의 아미노산으로 구성되어 있다. 그 유전자는 43 kilobase에 달하고, 29개의 exon과 19개의 intron으로 구성되어 있다.<sup>9</sup> 또한 장(intestine)에서 만들어진 apoB 100의 RNA transcript editing에 의하여 생성된다. FHBL을 일으키는 apoB 절단형의 명명은 절단되고 남은 apoB 길이의 apoB 100 전체 크기에 대한 비율로 표현된다. 지금까지 apoB 2에서부터 apoB 89까지 약 30종이 알려져 있으며,<sup>10,11</sup> 이러한 절단형 apoB의 대부분은 frame shift를 일으키는 nonsense 변이로서 premature stop codon을 생성하여 만들어지게 된다. 그 외에 insertion 이나 splice site 변이로 말미암아 생성되기도 한다.<sup>12~15</sup> 이러한 변이는 apoB 100에 비해 분비 속도가 늦어지게 됨으로 말미암아 콜레스테롤치가 낮아지는 것으로 알려지고 있다.<sup>16,17</sup> Asymptomatic heterozygous FHBL은 가장 흔한 primary hypobetalipoproteinemia로서 발병률은 1/400에서 1/3,000 정도로 보고 된 바 있으며, 혈중 콜레스테롤치는 130 mg/dL을 거의 넘지 않으며, 중성지방은 정상 범위를 넘지 않는 것으로 조사되었다.<sup>18</sup> 그러나 절단형 apoB의 빈도는 서양인에서도 5% 이하인 것으로 보고되었다.<sup>19,20</sup>

71명의 노르웨이인 저콜레스테롤혈증 환자의 apoB 유전자 exon 26을 single-strand conformation polymorphism으로 검색한 결과, 대조군에 비하여 의미 있는 빈도의 증가를 보인 다형성은 codon 2712의 8344<sup>C→T</sup>이었다(저콜레스테롤혈증군, 0.281; 고콜레스테롤혈증군, 0.180, p=0.027).<sup>21</sup> 이 다형성은 proline-rich cluster를 형성하여  $\beta$  구조를 형성하는데 관여하는 부위로 이미 그 관련성이 예측된 바 있었다.<sup>22</sup> 그간 apoB의 다형성은 고콜레스테롤혈증에서 주로 연구되어 왔고, 저콜레스테롤혈증에서는 연구가 거의 없는 실정이었다. 저콜레스테롤혈증과 연관된 유전자는 백서에서의 apoB editing complex (apoBEC1)의 과표현 (overexpression) 또는 저밀도지단백 수용체의 과표현이 알려져 있을 뿐, 대부분의 저콜레스테롤혈증의 유전자적 요인은 알려져 있지 않다. 최근 apoB truncation이 없는 가계에서 intron 5의 splice donor site에서의 치환 변이(665+1 G→T transversion)가 발견되기는 했으나,<sup>23</sup> 아직 이에 대한 연구가 부족한 실정이다. 절단형 apoB의 경우에는 세포 내에서의 분비능력이 apoB 크기에 따라 비례하는 양상이 있으나,<sup>17</sup> apoB 89와 같은 단백질은 apoB 100보다 더 빨리 대사되며,<sup>24</sup> 이는 저밀도지단백의 주요 리간드인 apoB가 수용체와 반응하는데 수용체 결합부위 및 3차 구조에 의한 것이라고 추론해 볼 수 있다. Exon 26의 codon 2712의 8344<sup>C→T</sup> 부위도 수용체와의 결합 부위에서 가까운 곳이다. ApoB 절단형이 발견되지 않은 저베타지단백혈증 가계에서 in vivo 실험을 통해 apoB의 대사는 흡수나 생성보다는 제거(clearance)의 문제일 것이라는 관점에서 apoB signal peptide쪽의 다형성보다는 수용체 결합 부위 쪽의 다형성에 더 관심을 가지게 된다.<sup>25</sup>

저베타지단백혈증을 보이는 대상자들에게서 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자가 의미 있게 높은 것은

로 밝혀져 있다.<sup>21</sup> Framingham Heart Study에서도 저밀도지단백의 원인으로 절단형 apo B는 아주 희귀한 반면, E2/E3 유전자형에 의하여 더 흔하게 나타나는 것으로 보고하고 있다.<sup>20</sup> 이는 apoE가 분자량 34,000 dalton의 단백질로서 초저밀도지단백, 유미지립(chylomicron) 및 고밀도지단백을 포함한 여러 혈청 지단백을 구성하고 있으며,<sup>26</sup> 저밀도지단백과 유미지립 잔여수용체의 연결물질 역할을 한다는 사실과도 관련이 있어 보인다.<sup>27</sup> 한편, apoE는 한편 조직 손상 및 세포 성장의 조정과 면역조절에 관여하는 것으로도 알려져 있다.<sup>27</sup> 대부분의 apoE는 간, 뇌, 비장, 신장 및 대식세포 등과 같은 장기와 세포에서 합성되는 것으로 알려져 있다.<sup>27</sup> ApoE는 3가지 동종형인  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ 가 존재하는데, 이중  $\epsilon 3$ 형이 가장 흔한 동종형(isoform)이다. ApoE  $\epsilon 4$ 와 apoE  $\epsilon 3$ 과의 차이점은 아미노산 염기서열 112번째인 cysteine이 arginine으로 바뀐 상태로 존재하며, apoE  $\epsilon 2$ 는 아미노산 염기서열 158번째인 arginine이 cysteine으로 바뀐 상태로 존재하는 것으로 apoE  $\epsilon 3$ 과 감별이 가능하다.<sup>26</sup> 이들 apoE 동종형들은 일반인에서의 혈중 콜레스테롤치와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup> 또한 apoE 다형성은 LpAI:AILI 농도와 아주 밀접한 관계가 있으며, E3/E3 동형접합체에서는 가장 높은 수치를, E3/E4 이형접합체에서는 가장 낮은 수치를 보여주는 것으로 보고되었다.<sup>29</sup> ApoE는 염색체 19번내에 존재하는 구조적인 유전자(structural gene)로서 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있으며, 299개의 아미노산을 가진 성숙한 apoE 폴리펩타이드를 형성한다.<sup>26,30</sup> 한편, apoB에는 insertion/deletion, *Xba*I, *Eco*RI 다형성 등과 같은 여러 가지 DNA 다형성이 있다.<sup>29,31</sup> *Xba*I 다형성은 저밀도지단백 콜레스테롤치와는 일치하지 않는 것으로 보고되어 있다. 이에 비해 apoB *Eco*RI 다형성은 동맥경화증과 발병률과의 연관성이 더 많은 것으로 보고되고 있다. 또한 저콜레스테롤혈증과 apoB *Eco*RI과의 연관성도 보고된 바 있다.<sup>32,33</sup>

본 연구에서는 apoB 절단형을 저베타지단백혈증 환자에서 확인하고, 저베타지단백혈증에서의 apoB 다형성 즉, apoB 8344 및 apoB *Eco*RI의 다형성과 apoE의 유전자형을 분석하여 이들 다형성 및 유전자형 양상의 종류와 빈도, 다형성과 중성지방, 총콜레스테롤간의 관계를 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구재료

#### 가. 연구대상

1997년부터 1999년까지 영동세브란스병원 및 세브란스 건강증진센터 및 명지병원에 내원한 피검자의 검체중 혈중 콜레스테롤치가 140 mg/dL 이하(5 percentile 이하)인 환자나 피검자를 대상으로 하였다. 저베타지단백혈증을 진단하기 위해 최근 수년간의 콜레스테롤치를 확인하여 일시적으로 낮게 나온 경우는 제외하였다. 그리고, 간경화, 저단백혈증, 각종

암 및 갑상선기능항진증 등으로 인한 일시적인 저콜레스테롤혈증인 경우는 제외하였다. 정상대조군은 건강한 성별, 연령상 통계학적 차이가 없는 군을 대상으로 하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 혈중 지질검사 및 DNA 추출

피검자를 검체 채취전 12~14시간 동안 금식을 시킨 뒤, EDTA 시험관에 검체를 채취하였다. 혈장을 분리 한 뒤, aprotinin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 단백질 분해 (proteolysis)를 최소화하였다. 환자의 혈청은 Hitachi 747-200 (Hitachi, Tokyo, Japan) 자동생화학분석기를 사용하여 총 콜레스테롤(Daichii, Tokyo, Japan), 중성지방(아산제약, 서울, 한국), 고밀도지단백 콜레스테롤(Daichii, Tokyo, Japan)을 효소법으로 측정하였으며, 저밀도지단백 콜레스테롤치는 Friedewald 공식으로 산출하였다.<sup>34</sup> DNA 추출은 냉동된 EDTA 혈액을 해동한 후에 Easy-DNA kit (Invitrogen BV, Gronigen, Netherlands)로 분리하여 추출하였다.

### 나. ApoB 절단형 검사

ApoB 절단형 단백질은 peristaltic pump 및 gradient maker를 이용하여 제조한 gradient gel (2~6%)을 사용하여 수직 전기영동법으로 분리하였다. 검체와 검체완충액은 2:19  $\mu$ l로 loading 하였다. 전류를 400 mA로 고정시킨 가운데 24시간 동안 전기영동을 실시한 후, transfer cell을 이용하여 PVDF membrane으로 전사하였다. 제1차 항체(C1.4 항체, 미국 미주리주 Washington 의과대학의 지질대사연구소 Schonfeld G.박사로부터 공여 받은 apoB N말단 특이항체)를 1:10,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 흔들며 주며 반응시킨 후,<sup>35</sup> TBS-T 완충액으로 3회, 5분씩 세척하였다. 여기에 제2차 항체(Anti-mouse Ab, Dako, Copenhagen, Denmark)를 1:2,000으로 희석하여 실온에서 1시간 정도 방치한 후, TBS-T 완충액으로 역시 3회, 5분씩 세척 후에 ECL western blotting 용액(Amersham-Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England)을 반응시켜 X-ray film processor (FujiFPM 100A, Tokyo, Japan)를 사용하여 필름으로 감광시켜 검출하였다.

### 다. ApoE 다형성 검사

ApoE 다형성 검사는 Zivelin 등이 사용한 방법으로 검출하였다.<sup>36</sup> DNA 증폭은 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 100 ng의 DNA 추출물에 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Takara, Shiga, Japan), 2.5 mM dNTP (Takara, Shiga, Japan), 10% DMSO (Takara, Shiga, Japan), oligonucleotide apoEZ5 및 apoEZ3 (바이오니아, 대전, 한국), Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)를 넣어 증폭시켰다. 증폭조건은 초기 denaturation은 94°C에서 5분간 실시하고, 94°C에서 30초간의 denaturation, 57°C에서 30초간의 annealing, 70°C에서 30초간의 extension하는 과정을 40회 반복 시행한 후, 마지막 extension은 70°C에서 5분간 실시하였다.

제한효소에 의한 증폭된 DNA절단은 다음과 같이 하였다. *Af*III (5,000 U/mL, Biolabs, Encinitas, CA, USA), *Af*III 및 BSA가 첨가된 x10 buffer와 증류수를 섞은 후, 여기에 *Hae*II

(2,000 U/mL, Biolabs, Encinitas, CA, USA), BSA가 첨가된 *Hae*II x10 buffer와 증류수를 첨가하였다. 여기에 증폭된 PCR product를 첨가한 후, 37°C water bath에서 24시간 동안 반응시켰다. 이를 3% agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후, apoE 다형성을 검출하였다.

#### 라. ApoB 8344 다형성 검사

Amplification refractory mutation system 원리를 사용하였다.<sup>37</sup> 사용한 primer는 Table 1과 같다. PCR mixture C (Primer U, 0.6  $\mu$ M + Primer L, 0.1  $\mu$ M + Primer C, 0.2  $\mu$ M), PCR mixture T (Primer U, 0.6  $\mu$ M + Primer L, 0.1  $\mu$ M + Primer T, 0.2  $\mu$ M)에 환자의 검체를 각각 첨가하였다. 이를 초기 denaturation으로서 95°C에서 3분간 실시한 후, 94°C에서 40초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 하는 과정을 15회 반복 실시하였다. 후에 94°C에서 40초간의 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 하는 과정을 25회 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 이를 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 apoB 8344 다형성을 관찰하였다.

**Table 1.** Synthetic oligonucleotide sequences used for apoB 8344 polymorphism

Primer U (sense)	5'-agatgcagaa cagtgagctgc-3'	(8161-8181)
Primer L (antisense)	5'-tt cagagccagc ggattaatc-3'	(8602-8582)
Primer C (C-specific)	5'-gtg gggaagctgg aaattctg-3'	(8363-8344)
Primer T (T-specific)	5'-gtg gggaagctgg aaattcta-3'	(8363-8344)

#### 마. ApoB *Eco*RI 다형성 검사

Table 2와 같은 oligonucleotide를 사용하여 apoB 부위를 증폭한 후에 *Eco*RI 제한효소를 사용하여 제한효소 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism)법으로 판독하였다.<sup>38</sup>

*BEco*RI-5' primer (바이오니아, 대전, 한국)와 *BEco*RI-3' primer (바이오니아, 대전, 한국) 각각에 genomic DNA를 첨가하여, 이를 초기 denaturation으로서 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 40초간 denaturation, 60°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 하는 과정을 37회 반복 시행하였다. 후에 마지막으로 72°C에서 3분간 반응시켰다. 이 PCR product에 제한효소 *Eco*RI를 사용하여 처리한 후, 37°C water bath에서 3시간 30분간 반응시킨다. 이를 2% agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후, apoB *Eco*RI 다형성을 관찰하였다.

**Table 2.** Synthetic oligonucleotide sequences used for apoB *Eco*RI polymorphism

<i>BEco</i> RI-5'	5'-CAC CCT gAg AgA AgT gTC TTC A-3' (12413-12434)
<i>BEco</i> RI-3'	5'-AgT gCA AAg TTC CTC CCT AgT g-3' (12782-12761)

### 3. 통계분석

통계분석은 SAS version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였다. 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고, group t-test 및 ANOVA검정을 하였다. 유전자형의 실험군과 정상대조군간의 차이는 chi-square test와 fisher's exact test를 실시하여 p 값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

## III. 결 과

### 1. 대상군

HBL군과 정상대조군간의 연령 및 성별의 차이는 없었다(Table 3). 중성지방의 경우, 남자는 HBL군에서 유의하게 낮았으나, 여자의 경우에는 유의한 차이가 없었다. 고밀도지단백

Table 3. Demographics and lipid distribution of subjects (Mean±SD)

Group	Female		Male	
	HBL* (n=58)	Normal (n=57)	HBL (n=74)	Normal (n=80)
Age	44.8 <sup>1)</sup> ± 9.4	47.1± 9.2	46.6 <sup>2)</sup> ± 11.1	48.5± 7.8
BMI**	22.2 <sup>3)</sup> ± 3.0	22.5± 2.6	22.8 <sup>4)</sup> ± 2.5	24.0± 2.2
T. cholesterol	129.1 <sup>5)</sup> ± 12.5	206.7± 28.8	129.8 <sup>6)</sup> ± 10.8	203.6± 25.5
Triglyceride	87.7 <sup>7)</sup> ± 56.2	104.2± 51.9	98.1 <sup>8)</sup> ± 50.7	117.6± 46.4
HDL-C	46.1 <sup>9)</sup> ± 11.7	52.3± 12.8	46.5 <sup>10)</sup> ± 12.2	47.5± 11.8
LDL-C	65.5 <sup>11)</sup> ± 16.7	133.5± 27.2	63.6 <sup>12)</sup> ± 17.3	132.5± 23.0

\* HBL, hypobetalipoproteinemia cases

\*\* BMI, Body Mass Index = Weight(Kg)/[Height(m)]<sup>2</sup>

<sup>1)</sup> Not significantly different vs normal female (p=0.2129)

<sup>2)</sup> Not significantly different vs normal male (p=0.2394)

<sup>3)</sup> Not significantly different vs normal female (p=0.6102)

<sup>4)</sup> Significantly different vs normal male (p=0.0005)

<sup>5)</sup> Significantly different vs normal female (p<0.0001)

<sup>6)</sup> Significantly different vs normal male (p<0.0001)

<sup>7)</sup> Not significantly different vs normal female (p=0.1031)

<sup>8)</sup> Significantly different vs normal male (p=0.01037)

<sup>9)</sup> Significantly different vs normal female (p=0.0072)

<sup>10)</sup> Not significantly different vs normal male (p=0.6033)

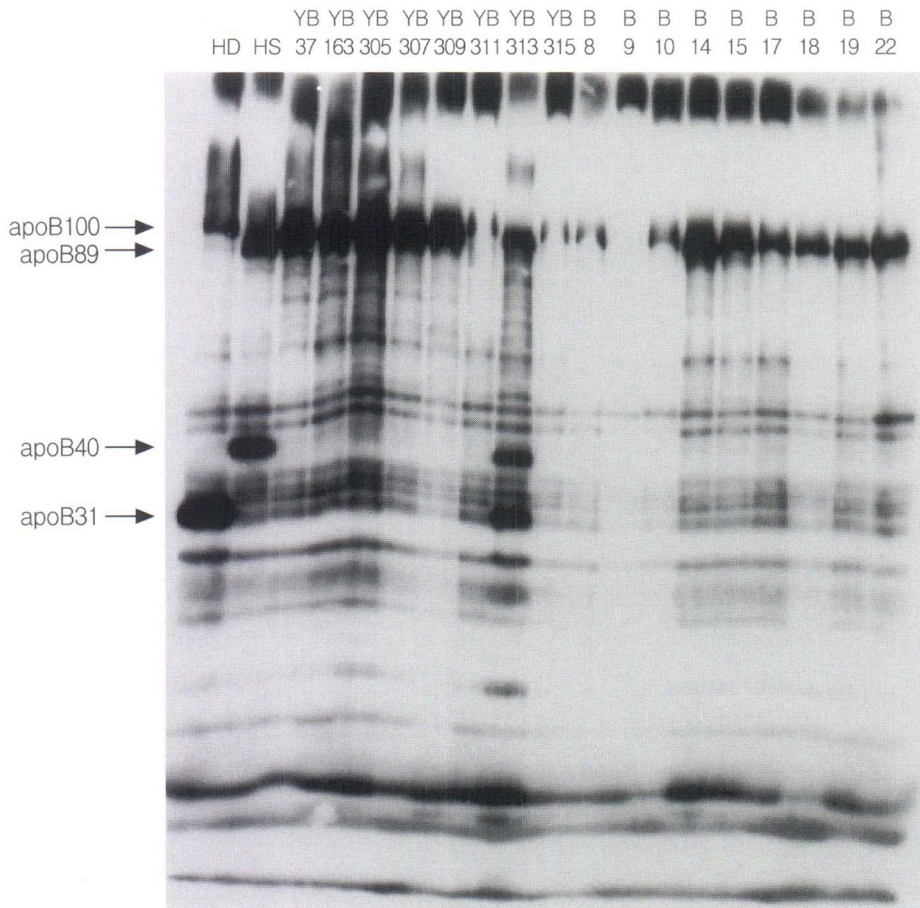
<sup>11)</sup> Significantly different vs normal female (p<0.0001)

<sup>12)</sup> Significantly different vs normal male (p<0.0001)

콜레스테롤의 경우, 여자 중 HBL군에서 유의하게 낮았으나, 남자의 경우에는 유의한 차이가 없었다 (Table 3). 체질량 지수(Body Mass Index, BMI)의 경우, 남자에서만 HBL군이 정상대조군에 비하여 유의하게 낮았으나, 여자에서는 유의한 차이가 없었다(Table 3).

## 2. ApoB 절단형 결과

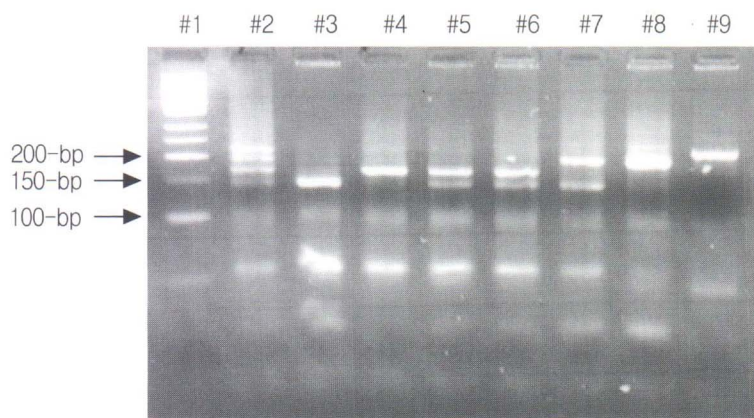
HBL군 중에서 aprotinin처리가 가능했던 30명에서 apoB truncation을 발견할 수 없었다 (Fig. 1). 양성대조군은 미국 미주리주 Washington 의과대학의 지질대사연구소 Schonfeld G. 박사에 의하여 제공된 apoB 40/89와,<sup>39,40</sup> apoB 31 절단형 검체를 사용하였다(Fig. 1).<sup>16</sup> 이 중 Fig. 1.에서의 313번 검체에서는 apoB 40 절단형과 유사한 band가 관찰되었으나, 반복검사와 DNA sequence에서는 정상으로 판명되었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Detection of truncated apoB by SDS-agarose gradient gel. Known apoB truncation sample, HS, apoB 40/89, compound heterozygotes; HD, apoB31 were run together which were kindly donated from Dr. Schonfeld in Washington University in St. Louis.

### 3. ApoE 다형성 결과

ApoE 다형성은 *AfIII*과 *HaeII* 제한효소로 처리하여 얻은 전기영동 결과 Fig. 2와 같은 양상을 보였다. ApoE 유전자형 및 대립인자의 비율은 Table 4와 같았다. ApoE 유전자형 비율



**Fig. 2.** Analysis of apoE genotyping with two restriction enzymes (*AfIII*, *HaeII*) on 3% agarose gel. Lane #1, 50-bp DNA Ladder Marker; Lane #2, apoE 2/4, 168-bp 195-bp 218-bp products; Lane #3, apoE 3/3, 145-bp products; Lane #4, apoE 2/2, 168-bp products; Lane #5 & #6, apoE 2/3, 145-bp, 168-bp products; Lane #7, apoE 2/4, 145-bp 195-bp, products; Lane #8, apoE 4/4, 195-bp, 195-bp 218-bp products; Lane #9, uncut apoE 218-bp PCR products.

**Table 4.** ApoE genotyping and allele frequencies of all subjects

ApoE polymorphism	Female	Male	Total
2/2	1 (0.9%)	5 (3.3%)	6 (2.2%)
2/3	22 (19.1%)	19 (12.3%)	41 (15.2%)
2/4	3 (2.6%)	2 (1.3%)	5 (1.9%)
3/3	67 (58.3%)	85 (55.2%)	152 (56.5%)
3/4	21 (18.3%)	42 (27.3%)	63 (23.4%)
4/4	1 (0.9%)	1 (0.7%)	2 (0.7%)
Total	115	154	269 (100.0%)
$\epsilon$ 2 allele	0.117	0.101	0.108
$\epsilon$ 3 allele	0.770	0.750	0.758
$\epsilon$ 4 allele	0.113	0.149	0.138

\* No significant difference among apoE genotype frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.244$ ) and by Fisher's Exact Test (2-tail,  $p=0.207$ ). No significant difference among apoE allele frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.426$ ) and by Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.432$ ).



**Table 5.** ApoE genotyping and allele frequencies of HBL and normal controls

ApoE polymorphism	Female		Male		Total	
	HBL	Normal	HBL	Normal	HBL	Normal
2/2	1 (1.7%)	0	4 (5.4%)	1 (1.3%)	5 (3.8%)	1 (0.7%)
2/3	16 (27.6%)	6 (10.5%)	12 (16.2%)	7 (8.8%)	28 (21.2%)	13 (9.5%)
2/4	2 (3.5%)	1 (1.8%)	1 (1.4%)	1 (1.3%)	3 (2.6%)	2 (1.5%)
3/3	28 (48.3%)	39 (68.4%)	41 (55.4%)	44 (55.0%)	69 (52.3%)	83 (60.6%)
3/4	10 (17.2%)	11 (19.3%)	16 (21.6%)	26 (35.5%)	26 (19.7%)	37 (27.0%)
4/4	1 (1.7%)	0	0	1 (1.3%)	1 (0.8%)	1 (0.7%)
Total	58	57	74	80	132	137
$\epsilon$ 2 allele	0.172	0.061	0.142	0.063	0.155	0.062
$\epsilon$ 3 allele	0.707	0.833	0.743	0.756	0.727	0.788
$\epsilon$ 4 allele	0.121	0.105	0.115	0.181	0.117	0.150

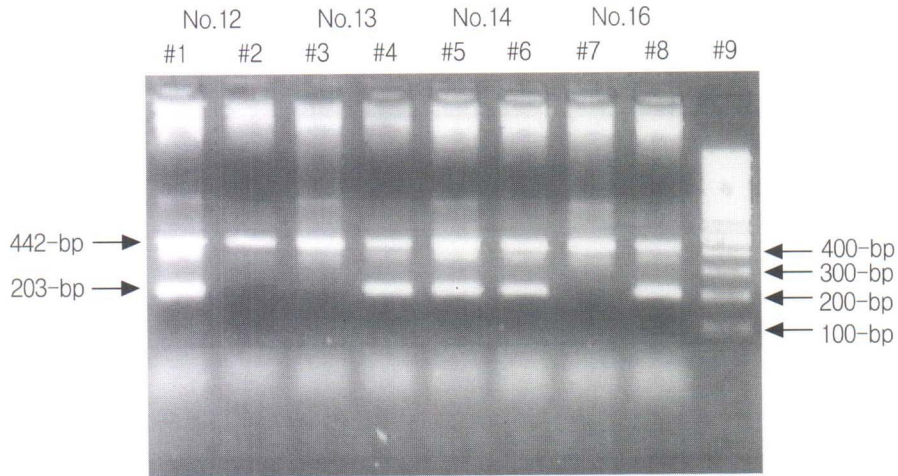
\* Significant difference among apoE genotype frequencies for all subjects found by Chi-Square test (p=0.043) and Fisher's Exact Test (2-Tail, p=0.025). Significant difference among apoE allele frequencies for all subjects found by Chi-Square test (p=0.002) and by Fisher's Exact Test (2-Tail, p=0.00165).

은 HBL군과 정상대조군간에서 유의한 차이를 보였고, HBL군은 정상대조군에 비하여 apoE 2/3의 비율이 많고, apoE 3/4군의 비율이 적은 것을 알 수 있었다(Table 5). ApoE 대립 인자는 HBL군에서 정상대조군과 유의한 차이를 보여서 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자의 비율이 정상대조군에 비해 HBL군에서 유의하게 높고, apoE  $\epsilon$ 4 대립인자의 비율이 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다. 남녀로 나누어 다시 통계분석을 한 결과, 유전자형의 유의한 차이의 정도는 줄었으나, 대립인자의 비율의 차이는 유사하였다(Table 5).

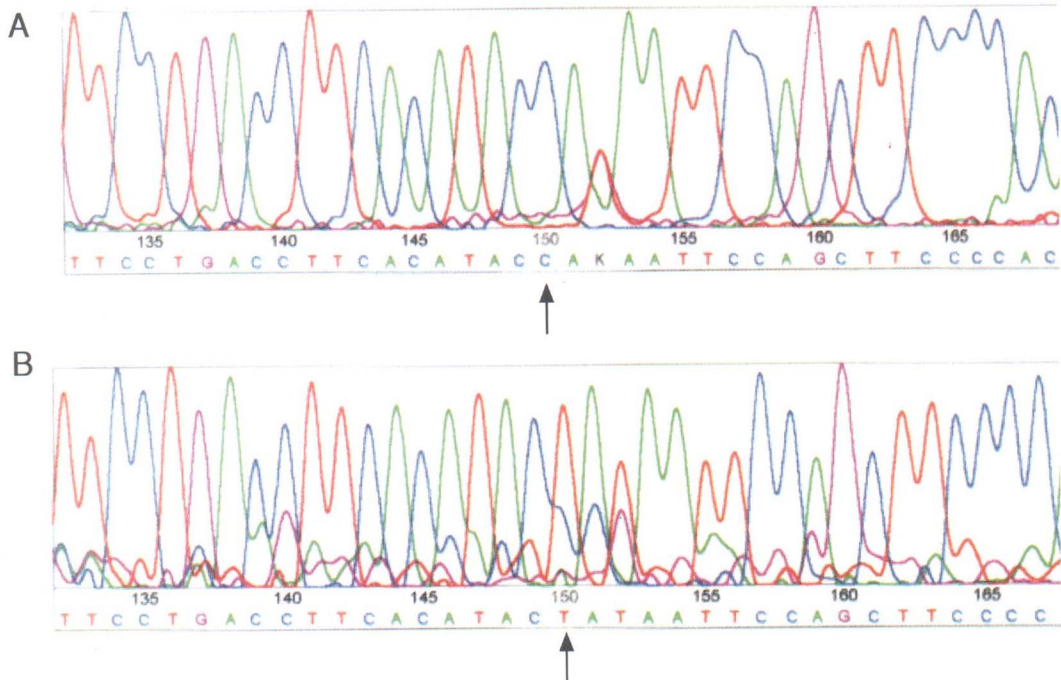
ApoE 유전자형 및 대립인자빈도는 정상대조군에 비하여 HBL군에서 통계학적인 차이를 보였다(Table 5).

#### 4. ApoB 8344 다형성 결과

ApoB 8344 다형성의 양상은 Fig. 3과 같았다. C-specific 및 T-specific PCR product의 DNA 염기 서열 분석 결과는 Fig. 4와 같았다. ApoB 8344 다형성의 유전자형의 비율은 T/T, C/T, C/C 순 빈도로 나타났고 남녀간의 차이는 발견되지 않았다(Table 6). ApoB 8344 다형성을 조사한 결과, 남녀 모두 C/C, C/T, T/T 유전자형의 HBL군과 대조군의 차이는 없었으며, 남녀별로도 차이가 관찰되지 않았다(Table 7).



**Fig. 3.** Analysis of apoB 8344 polymorphism. Lane No #1, #3, #5, #7 used T-specific primer. Lane No #2, #4, #6, #8 used C-specific primer. Lane #9 showed 100-bp DNA ladder marker. No. 12 patient showed T/T polymorphism. No. 13 patient showed C/C polymorphism. No. 14 patient showed C/T polymorphism. No. 16 patient showed C/C polymorphism.



**Fig. 4.** DNA sequence of apoB 8344 polymorphism area of C-specific or T-specific PCR product. A. C-specific; B, T-specific.

**Table 6.** ApoB 8344 polymorphism and allele frequencies of all subjects

ApoB 8344 Polymorphism	Female	Male	Total
C/C	7 (6.3%)	17 (11.3%)	24 (9.2%)
C/T	44 (39.6%)	68 (45.0%)	112 (42.8%)
T/T	60 (54.1%)	66 (43.7%)	126 (48.1%)
Total	111	151	262 (100.0%)
C allele	0.261	0.338	0.305
T allele	0.739	0.662	0.695

\* No significant difference among apoB 8344 genotype frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.168$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.181$ ). No significant difference among apoB 8344 allele frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.060$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.068$ ).

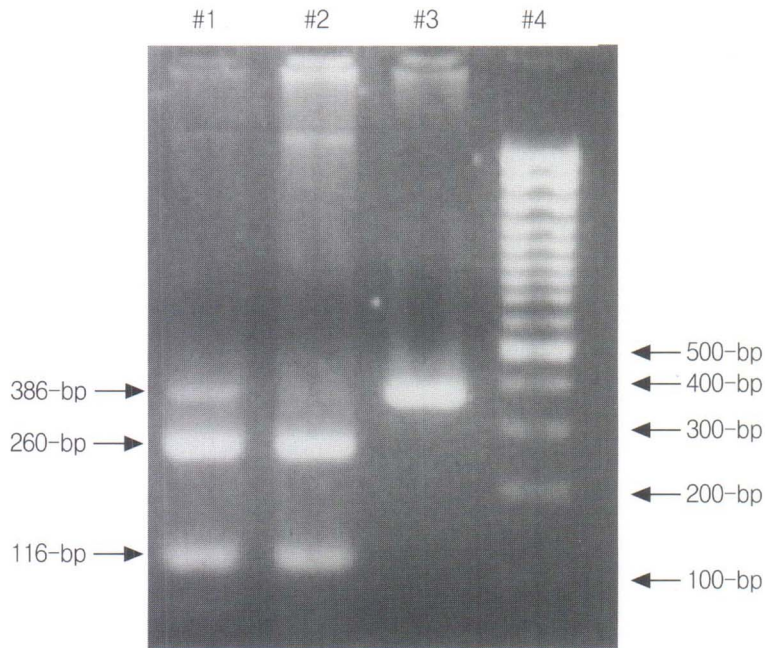
**Table 7.** ApoB 8344 polymorphism and allele frequencies of HBL and normal controls

ApoB 8344 Polymorphism	Female		Male		Total	
	HBL	Normal	HBL	Normal	HBL	Normal
C/C	3 (5.2%)	4 (7.6%)	9 (12.3%)	8 (10.3%)	12 (9.2%)	12 (9.2%)
C/T	29 (50.0%)	15 (28.3%)	29 (39.7%)	39 (50.0%)	58 (44.3%)	54 (41.2%)
T/T	26 (44.8%)	34 (64.2%)	35 (48.0%)	31 (39.7%)	61 (46.6%)	65 (49.6%)
Total	58	53	73	78	131	131
C allele	0.302	0.217	0.338	0.353	0.313	0.298
T allele	0.698	0.783	0.662	0.647	0.687	0.702

\* No significant difference among apoB 8344 genotype frequencies for all subjects found by Chi-Square test ( $p=0.844$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.885$ ). No significant difference among apoB 8344 allele frequencies for all subjects found by Chi-Square test ( $p=0.704$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.776$ ).

## 5. ApoB *EcoRI* 다형성 결과

ApoE *EcoRI* 다형성의 전기영동 양상은 Fig. 5와 같이 판독하였다. ApoB *EcoRI* 다형성은 R+/+ 93.2%, R+/- 6.8%이었으며, R-/-는 관찰되지 않았고 남녀간의 차이도 관찰되지 않았다(Table 8). HBL군과 정상대조군에서 유의한 차이는 관찰되지 않았고 이는 남녀별로도 마찬가지였다(Table 9).



**Fig. 5.** Analysis of apoB *EcoRI* polymorphism. Lane #1 showed R+/-, Lane #2 showed R+/+, Lane #3 showed uncut PCR product, Lane #4 100-bp DNA ladder marker.

**Table 8.** ApoB *EcoRI* polymorphism and allele frequencies of all subjects

ApoB <i>EcoRI</i> Polymorphism	Female	Male	Total
R+/+	100 (93.5%)	119 (93.0%)	219 (93.2%)
R+/-	7 (6.5%)	9 (7.0%)	16 (6.8%)
Total	107	128	235 (100.0%)
R+ allele	0.967	0.965	0.966
R- allele	0.033	0.035	0.034

\* No significant difference among apoB *EcoRI* genotype frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.882$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=1.000$ ). No significant difference among apoB *EcoRI* allele frequencies found by Chi-Square test ( $p=0.884$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=1.000$ ).

**Table 9.** ApoB *Eco*RI polymorphism and allele frequencies of HBL and normal controls

ApoB <i>Eco</i> RI Polymorphism	Female		Male		Total	
	HBL	Normal	HBL	Normal	HBL	Normal
R +/+	46 (92.0%)	54 (94.7%)	47 (92.2%)	72 (93.5%)	93 (92.1%)	126 (94.0%)
R +/-	4 (8.0%)	3 (5.3%)	4 (7.8%)	5 (6.5%)	8 (7.9%)	8 (6.0%)
Total	50	57	51	77	101	134
R+ allele	0.960	0.974	0.961	0.967	0.960	0.970
R- allele	0.040	0.026	0.039	0.033	0.040	0.030

\* No significant difference among apoB *Eco*RI genotype frequencies for all subjects found by Chi-Square test ( $p=0.557$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.607$ ). No significant difference among apoB *Eco*RI allele frequencies for all subjects found by Chi-Square test ( $p=0.564$ ) and Fisher's Exact Test (2-Tail,  $p=0.613$ ).

#### IV. 고 찰

저콜레스테롤증을 유발할 수 있는 원인으로는 환경적인 원인과 유전적인 원인 두 가지로 나누어 볼 수 있다. 유전적인 원인으로는 apoB 절단형과 비절단형으로 구분할 수 있으며, 이 중 apoB 절단형은 1.3%의 빈도로 유발된다고 한다.<sup>20</sup> 현재까지 간경화, 저단백혈증, 각종 암 및 갑상선기능항진증 등으로 인한 일시적인 저콜레스테롤증인 경우를 제외하고 apoB 절단형이 저콜레스테롤증을 유발하는 가장 흔한 원인중의 하나로 생각된다. ApoB 비절단형인 저콜레스테롤혈증과 apoE 유전자형과의 관련성이 보고되었는데 apoE 2/3의 비율이 정상인 10.9%에 비하여 38.7%로 높았다고 한다.<sup>20</sup> 본 연구에서는 정상인이 9.5%, HBL군이 21.2%로 Welty 등의 비율보다는 적었으나,<sup>20</sup> 오히려 Synder 등의 8.2% 및 28.9%에 좀더 가까운 비율이었고 대체적으로 유사한 결과였다.<sup>41</sup>

이 중  $\epsilon 3$ 는 모형(parent form)으로서 대부분의 대립인자들이 여기에 속한다. 반면에  $\epsilon 2$ 와  $\epsilon 4$ 는 변형(variant form)으로서,  $\epsilon 2$ 는 제3형 고지단백혈증과 관련이 있으며 지질의 수용체 결합 능력이 매우 감소되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>42</sup> 반면에  $\epsilon 4$ 는 지질의 수용체 결합능력은 정상이지만,<sup>42</sup> 혈장내 콜레스테롤 및 초저밀도지단백의 증가와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>27,42,43</sup> ApoE의 대사를 연구한 보고에 의하면, apoE4의 대사가 apoE3의 대사에 비해 증가되어 있다고 한다.<sup>44</sup> 한편, 콜레스테롤의 장 흡수율이 apoE  $\epsilon 4$  대립인자를 가지고 있는 사람이 제일 크고, apoE  $\epsilon 2$ 를 가지고 있는 사람은 제일 작으며, apoE  $\epsilon 3$ 는 중간 정도라는 보고도 있으며,<sup>45</sup> apoE 다형성이 LDL콜레스테롤의 증감을 일으키는 원인으로

로 생각된다.

또한 apoE  $\epsilon$ 4 대립인자는 총 콜레스테롤, 저밀도지단백 콜레스테롤 및 apoB 치의 증가와 관련이 있었다.<sup>29</sup> 반면에 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자는 저밀도지단백 수용체에 대한 결합친화력을 감소시켜 세포내로의 콜레스테롤의 운반을 저하시킨다. 이는 저밀도지단백 수용체의 표현을 상향 조절하여 저밀도지단백의 대사를 증가시켜서 저콜레스테롤증을 유발하게 되며, apoE  $\epsilon$ 4 대립인자는  $\epsilon$ 2 대립인자와는 서로 상반되는 작용하므로  $\epsilon$ 4 대립인자가 많은 경우에는 고콜레스테롤증이 유발되는 것으로 알려져 있다.<sup>46</sup>

저베타지단백혈증이 있는 환자는 정상인에 비하여 apoE 2/3 유전자형이 3배정도 많은 것으로 나타났으며, apoE 3/4의 유전자형을 가진 저베타지단백혈증 환자군의 50% 이상에서는 정상인보다 높은 저밀도지단백 콜레스테롤치를 가진 것으로 보고되었다.<sup>20</sup> 본 연구에서 나타난 HBL군의 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자의 비율이 높고, apoE  $\epsilon$ 4 대립인자의 비율이 낮게 나온 것은 Welty 등과 유사한 소견이었다.<sup>20</sup> Leren 등도 저콜레스테롤군과 고콜레스테롤군 간의 apoE 유전자형 검사를 실시하여, 고콜레스테롤군보다 저콜레스테롤 군에서의 apoE  $\epsilon$ 2 대립인자의 발현 빈도가 의의있게 높았으며, apoE  $\epsilon$ 4 대립인자의 발현빈도가 낮게 나타나는 것으로 보고하였다.<sup>21</sup> 저베타지단백혈증은 남녀간의 발생 빈도에는 차이가 없었으나, 중성지방, 초저밀도지단백 콜레스테롤, 저밀도지단백 콜레스테롤치가 여자가 남자보다 낮은 반면에 고밀도지단백 콜레스테롤은 높은 것으로 나타났으며, apoE 2/3 유전자형은 낮은 저밀도지단백 콜레스테롤의 흔한 이유인 것으로 조사되었다.<sup>20</sup> 본 연구에서의 apoE 2/3 유전자형은 정상대조군에서, apoE 3/4 유전자형은 HBL군에서 더 많이 관찰되었다. 본 연구에서 나타난 apoE 유전자형 및 대립인자의 비율은 종전의 본 기관의 연구와 유사한 결과를 보였고,<sup>46</sup> 구미와도 별 차이가 없어서 종족간의 차이는 없으므로, 종전 연구 결과의 해석과 합치한다고 생각되었다.<sup>47</sup>

본 연구에서는 모든 대상자에게서 aprotinin처리 혈액을 얻기 어려워서, apoB 절단형 검사를 하지 못하고 단지 30명의 대상자에게서만 시행한 단점이 있었다. 그러나 apoB 절단형의 유병율이 워낙 낮으므로, 본 실험 대상군 모두를 검사하여도 apoB 절단형을 발견할 가능성은 적을 것으로 사료된다. 실제 apoB 절단형을 발견하여 이를 이번 연구 대상군에서 제외시켰다 할지라도, apoE 2/3와 유전자형이 저콜레스테롤혈증과 연관되어 있다는 본 실험 결과에 변화를 주지는 않을 것으로 추정하였다. 한편, HBL군이 정상대조군에 비해 콜레스테롤 섭취량이 적었던 것이 아닌가, 또는 운동을 많이 하여 콜레스테롤이 줄어 든 것이 아닌가 하는 점을 생각해 볼 때, 정상대조군의 식생활 및 운동량을 겸하여 조사하지 못한 것이 제한점이라 생각되었다. HBL군 중 남자에서는 BMI가 정상대조군에 비하여 약간 감소되어 있었으나 큰 차이가 없었고, 여자군에서는 HBL군과 정상대조군 사이의 BMI차이가 없었다는 점과, 정상대조군이 서울 지역 거주자인 점을 고려하면, 식생활 및 운동량에 큰 차이는 없었을 것으로 생각되며, Synder 등도 식생활 및 운동량으로 이렇게 지속적으로

낮은 콜레스테롤을 유지한다는 것은 곤란하다는 유사한 주장을 하였다.<sup>41</sup>

한편, Leren 등에서 유의한 차이를 보였던 apoB 8344는 본 연구에서는 의미 있는 차이를 보이지 않았다.<sup>21</sup> 이러한 차이는 Leren 등이 저콜레스테롤혈증과 고콜레스테롤혈증을 비교한데 비해,<sup>21</sup> 본 연구에서는 고콜레스테롤혈증을 제외한 정상대조군과 저콜레스테롤혈증을 비교한 차이에서 기인한다고 생각되기도 하나, Leren 등과의 통계학적 차이가 크지 않아서 이 다형성이 저콜레스테롤혈증을 유발시킨다는 가설은 한국인에서는 설명하기 곤란하다고 생각된다.<sup>21</sup> 다만, 서양인에 비해 T 대립인자가 다음과 같이 높게 나온 것은 흥미로운 사실이었다. Huang 등에서는 C 대립인자(proline allele)가 83%, T 대립인자(leucine allele)가 17%로 조사되었으나,<sup>15</sup> 한국인에서는 C 대립인자가 30.5%, T 대립인자가 69.5%로 다소 상이한 결과를 보였다. 이러한 차이가 한국인의 콜레스테롤치가 서양인보다 낮은 것과 연관성이 있다는 직관적인 추론이 가능할 수도 있었으나, 본 연구에 의하면 HBL군과 정상대조군의 apoB 8344 대립인자 발현빈도는 통계학적인 차이가 없었을 뿐만 아니라, 전체 대상자들 및 apoE 3/3군만을 대상으로 apoB 8344 다형성군에 따른 총콜레스테롤 및 저밀도지단백 콜레스테롤치의 차이 여부를 ANOVA 검정을 실시하였으나 의미 있는 차이를 보이지 않아(각각 p=0.677 및 0.384), apoB 8344 다형성의 콜레스테롤 농도와는 연관성이 없는 것으로 사료되었다.

ApoB *EcoRI* 다형성 결과는 HBL군에서는 R+/+ 92.1%, R+/- 7.9%, 정상대조군에서는 R+/+ 94.0%, R+/- 6.0%로서 통계학적 차이는 관찰되지 않았으며, 대립인자 빈도는 R+ 대립인자가 HBL군에서는 0.96, 정상대조군에서는 0.97, R- 대립인자는 HBL군에서는 0.04, 정상대조군에서는 0.03으로 나타났다. 이는 Pan 등이 보고한 R+ 대립인자 0.95, R- 대립인자 0.05와 유사한 결과를 보여주었다.<sup>38</sup> De Benedictus 등은 거주지역에 따른 apoB *EcoRI* 다형성에 차이가 있음을 보고하였다.<sup>32</sup> 이탈리아 남부에 거주하는 사람들은 R+/+, R+/-, R-/- 발현빈도가 각각 30.0%, 44.4%, 25.6%인 반면, 이탈리아 북부 거주자는 각각 65.2%, 28.3%, 6.5%로 보고한 바 있어서 종족간의 차이를 볼 수 있었으나,<sup>32</sup> 중국인과 한국인 사이에는 큰 차이가 없는 것을 확인하였다.<sup>38</sup>

결론적으로 타 연구자들이 보고하였던 HBL과 apoB 8344 및 apoB *EcoRI* 다형성간의 연관성은 본 연구에서 밝힐 수 없었으나, HBL과 apoE ε2대립인자와의 연관성을 확인할 수 있었다.

## V. 결 론

한국인 저베타지단백혈증에서의 apoB 및 apoE 다형성에서는 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 중성지방치의 경우, 남자는 정상대조군에 비하여 HBL군에서 유의하게 낮았으나, 여

자에서는 유의한 차이가 없었다. 고밀도지단백 콜레스테롤의 경우에는 여자에서 HBL군에서 유의하게 낮았으나, 남자의 경우에 유의한 차이가 없었다.

2. HBL군에서는 apoB 절단형을 발견할 수 없었다(n=30).

3. ApoE 유전자형 비율을 HBL군에서 유의하게 apoE 2/3군의 비율이 많고, apoE 3/4군의 비율이 적었다(p=0.025). 또한 HBL군과 정상대조군 모두에서  $\epsilon 3$  대립인자의 발현빈도가 가장 많았으며, HBL군에서의  $\epsilon 2$  대립인자의 발현빈도가 정상대조군에 비하여 높게 나타났다(p=0.002).

4. ApoB 8344 다형성을 조사한 결과, 남녀 모두 C/C, C/T, T/T 유전자형의 HBL군과 정상대조군간의 통계학적 차이는 없었다. 다만, 서양인에서의 C 대립인자 비율 0.83, T 대립인자 비율 0.17에 비해, 한국인에서는 C 대립인자가 0.305, T 대립인자가 0.695로 민족적인 차이를 보였다.

5. ApoB *EcoRI* 다형성은 HBL군과 정상대조군간의 통계학적인 차이는 없었지만, 서양인에 비하여 R- 대립인자 비율이 낮았고 중국인과 유사한 비율을 보였다.

이상의 결과로 저베타지단백혈증과 apoB 다형성 및 apoB *EcoRI*과의 상관관계는 밝힐 수 없었으나, apoE  $\epsilon 2$  대립인자가 한국인의 HBL군의 유발 인자 중 한 가지임을 밝힐 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Glueck CJ, Gartside P, Fallat RW, Sielski J, Steiner PM. Longevity syndromes: familial hypobeta and familial hyperalpha lipoproteinemia. J Lab Clin Med 1976;88:941-57.
2. Stamler J, Dyer AR, Shekelle RB, Neaton J, Stamler R. Relationship of baseline major risk factors to coronary and all-cause mortality, and to longevity: findings from long-term follow-up of Chicago cohorts. Cardiology 1993;82:191-222.
3. Linton MF, Farese RV Jr, Young SG. Familial hypobetalipoproteinemia [Review]. J Lipid Res 1993;34:521-41.
4. Iribarren C, Reed DM, Chen R, Yano K, Dwyer JH. Low serum cholesterol and mortality. Which is the cause and which is the effect? Circulation 1995;92:2396-403.
5. Sherwin RW, Wentworth DN, Cutler JA, Hulley SB, Kuller LH, Stamler J. Serum cholesterol levels and cancer mortality in 361,662 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. JAMA 1987;257:943-8.
6. Pessah M, Benlian P, Beucler I, Loux N, Schmitz J, Junien C, et al. Anderson's disease: genetic exclusion of the apobetalipoprotein-B gene in two families. J Clin Invest 1991;87:367-70.
7. Knott TJ, Rall SC, Innerarity TL, Jacobson SF, Urdea MS, Levy-Wilson B, et al. Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. Science 1985;230:37-43.
8. Carlsson P, Danfors C, Olofsson SO, Bjursell G. Analysis of the human apolipoprotein B gene,



- complete structure of the B-74 region. *Gene* 1986;49:29-51.
9. Pullinger CR, Hillas E, Hardman DA, Chen GC, Naya-Vigne JM, Iwasa JA, et al. Two apolipoprotein B gene defects in a kindred with hypobetalipoproteinemia, one of which results in a truncated variant, apoB-61, in VLDL and LDL. *J Lipid Res* 1992;33:699-710.
  10. Farese RV, Linton MF, Young SG. Apolipoprotein-B gene mutations affecting cholesterol levels. *J Int Med* 1992;231:643-52.
  11. Srivastava N, Noto D, Averna M, Pulai J, Srivastava RA, Cole TG, et al. A new apolipoprotein B truncation (apoB-43.7) in familial hypobetalipoproteinemia: genetic and metabolic studies. *Metabolism* 1996;45:1296-304.
  12. Groenewegen WA, Krul ES, Averna MR, Pulai J, Schonfeld G. Dysbetalipoproteinemia in a kindred with hypobetalipoproteinemia due to mutations in the genes for apoB (apoB 70.5) and apoE (apoE2). *Arterioscler Thromb* 1994;14:1695-704.
  13. Welty FK, Ordovas J, Schaefer EJ, Wilson PW, Young SG. Identification and molecular analysis of two apoB gene mutations causing low plasma cholesterol levels. *Circulation* 1995; 92:2036-40.
  14. Huang LS, Kayden H, Sokol RJ, Breslow JL. ApoB gene nonsense and splicing mutations in a compound heterozygote for familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1991;32:1341-8.
  15. Talmud PJ, Krul ES, Pessah M, Gay G, Schonfeld G, Humphries SE, et al. Donor splice mutation generates a lipid-associated apolipoprotein B-27.6 in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1994;5:468-77.
  16. Aguilar-Salinas CA, Barrett PH, Parhofer KG, Young SG, Tessereau D, Bateman J, et al. Apolipoprotein B-100 production is decreased in subjects heterozygous for truncations of apolipoprotein B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:71-80.
  17. Parhofer KG, Barrett PH, Bier DM, Schonfeld G. Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in apoB-89, apoB-75, apoB-54.8 and apoB-31 heterozygotes. *J Lipid Res* 1996;37:844-52.
  18. Granot E, Deckelbaum RJ. Hypocholesterolemia in childhood. *J Pediatr* 1989;115:171-85.
  19. Wu J, Kim J, Li Q, Kwok PY, Cole TG, Cefalu B, et al. Known mutations of apoB account for only a small minority of hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1999;40:955-9.
  20. Welty FK, Lahoz C, Tucker KL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ. Frequency of apoB and apoE gene mutations as causes of hypolipoproteinemia in the Framingham Offspring population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1745-51.
  21. Leren TP, Bakken KS, Hoel V, Hjermann I, Berg K. Screening for mutations of the apolipoprotein B gene causing hypocholesterolemia. *Hum Genet* 1998;102:44-9.
  22. Huang LS, Gavish D, Breslow JL. Sequence polymorphism in the human apoB at position 8344. *Nucleic Acid Res* 1990;18:5922.
  23. Pulai JJ, Zakeri H, Kwok PY, Kim JH, Wu J, Schonfeld G. Donor splice mutation (665 + 1 G : T) in familial hypobetalipoproteinemia with no detectable apoB truncation. *Am J Med Genet* 1998;80:218-20.
  24. Parhofer KG, Barrett PH, Bier DM, Schonfeld G. Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein, apoB-89, are cleared from human plasma more rapidly than apoB-100-containing

- lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* 1992;89:1931-7.
25. Pulai JJ, Averna M, Srivastava RA, Latour MA, Clouse RE, Ostlund RE, et al. Normal intestinal dietary fat and cholesterol absorption, intestinal apolipoprotein B (apoB) mRNA levels, and apoB-48 synthesis in a hypobetalipoproteinemic kindred without any apoB truncation. *Metabolism* 1997;46:1095-100.
  26. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-8.
  27. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein expanding role in cell biology [Review]. *Science* 1988;240:622-30.
  28. Schaefer EJ, Lamson-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. *Arteriosclerosis* 1994;14:1105-13.
  29. Regis-Bailly A, Visvikis S, Steinmetz J, Feldmann L, Briancon S, Danchin N, et al. Frequencies of five genetic polymorphisms in coronarographed patients and effects on lipid levels in a supposedly healthy population. *Clin Genet* 1996;50:339-47.
  30. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985;260:6240-7.
  31. Boerwinkle E, Chan L. A three codon insertion/deletion polymorphism in the signal peptide region of the human apolipoprotein B (apo B) gene directly typed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4003.
  32. De Benedictis G, Rose G, Mazzei R, Leone O, Crescibene L, Brancati C, et al. EcoRI-RFLP of the apo B gene: a study in a sample group from South Italy. *Ann Hum Genet* 1991;55:103-13.
  33. Rajput-Williams J, Knott TJ, Wallis SC, Sweetnam P, Yarnell J, Cox N, et al. Variation of apolipoprotein B gene is associated with obesity, high blood cholesterol levels and increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1988;2:1442-6.
  34. 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.
  35. Krul ES, Kleinman Y, Kinoshita M, Pflieger B, Oida K, Law A, et al. Regional specificities of monoclonal anti-human apolipoprotein B antibodies. *J Lipid Res* 1988;29:937-47.
  36. Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U. Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clin Chem* 1997;43:1657-9.
  37. 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.
  38. Pan JP, Chiang AN, Tai JJ, Wang SP, Chang MS. Restriction fragment length polymorphism of apolipoprotein B gene in chinese population with coronary heart disease. *Clin Chem* 1995;41:424-9.

39. Krul ES, Kinoshita M, Talmud P, Humphries SE, Turner S, Goldberg AC, et al. Two distinct truncated apolipoprotein B species in a kindred with hypobetalipo-proteinemia. *Arteriosclerosis* 1989;9:856-68.
40. Talmud P, King-Underwood L, Krul E, Schonfeld G, Humphries SE. The molecular basis of truncated forms of apolipoprotein B in a kindred with compound heterozygous hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1989;30:1773-9.
41. Synder SM, Terdiman JF, Caan B, Feingold KR, Hubl ST, Smith RS, et al. Relationship of apolipoprotein E phenotypes to hypocholesterolemia. *Am J Med* 1993;95:480-8.
42. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982;257:2818-21.
43. Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571-7.
44. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Stark D, Wilson D, Brewer HB Jr. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J Clin Invest* 1986;78:815-21.
45. Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apolipoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987;80:578-81.
46. Kim JH, Lee EJ, Kwon OH. Apolipoprotein E genotyping and phenotyping in type II diabetes mellitus patients with hypertriglyceridemia. *Clin Biochem* 1997;30:47-52.
47. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkila E, Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1986;27:227-35.

## Abstract

# Polymorphisms of Apolipoprotein B and Apolipoprotein E in Korean Hypobetalipoproteinemia

Hwan Sub Lim

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Oh Hun Kwon)

Hypobetalipoproteinemia (HBL) is characterized by plasma concentration of apolipoprotein B (apoB) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) below the fifth percentile of healthy population. Previous studies showed that HBL patients have lower risk of atherosclerotic disease, but tends to have higher risk of having motor or sensory track disabilities, various cancers, pulmonary and gastrointestinal diseases. HBL is revealed to be associated with apoE polymorphism. ApoB polymorphisms, such as apoB 8344 and apoB *EcoRI* have been also suggested to be related to HBL.

In this study, HBL (n=132) and, age- and sex-matched healthy control (n=137) were compared for apoE genotyping, apoB 8344 polymorphism and apoB *EcoRI* polymorphism. ApoE genotyping and apoB *EcoRI* were determined by polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (RFLP). ApoB 8344 polymorphism was determined by PCR- amplification refractory mutation system (ARMS). We also searched for truncated apoB by ECL western blotting in 30 HBL subjects, but could not find any truncated form. ApoE genotyping frequencies showed significant difference between HBL and normal control group (p=0.025), as follows; for apoE 2/3, 21.2% versus 9.5%; for apoE 3/4, 19.7% versus 27.0%. We could find elevated apoE  $\epsilon$  2 allele frequencies in HBL group than normal control group (0.155 versus 0.062; p=0.0017). ApoB 8344 polymorphism showed no significant difference between HBL and normal control groups. Unexpectedly, we found ethnic allele difference in this polymorphism of T allele (Leucine) frequency, 0.695 versus 0.170 of Caucasian; on the other hand, C allele (Proline) showed lower frequency in Korean. But we could not find any difference of cholesterol level in C and T allele groups. We also found that most (93.2%) of our subjects have apoB *EcoRI* R+/+ genotype similar to that of Taiwanese, but different from that of Caucasian. There were no significant apoB *EcoRI* genotyping or allele frequency differences between HBL and normal groups.

In conclusion, we could not find any relationship between HBL with apoB 8344 and apoB *EcoRI* polymorphisms, but apoE  $\epsilon$ 2 allele seems to be a significant genetic factor for HBL in Korean.

---

Key Words: hypobetalipoproteinemia, apolipoprotein B, apolipoprotein E, polymorphism, apoB8344, *EcoRI*