원 저

韓國疫學會誌 : 第29卷 第2號
Korean Journal of Epidemiology
Vol. 29, No. 2, Dec, 2007, 165-175

혈청 아디포넥틴 측정 키트(AdipoMark)의 개발과 심혈관질환 위험요인과의 관련성 연구

지선하[1,2], 이승복[2], 민성식[2], 박정용[3], 김현숙[3], 김상연[1,2], 윤지은[1,2], 이선주[1,2], 지은정[1,2], 이희연[1,2], 송혜윤[1,2]

연세대학교 보건대학원 국민건강증진연구소[1], 대사증후군 연구사업단[2], 연세대학교 의과대학 진단검사의학과[3]

서 론

비만은 당뇨병이나 심뇌혈관질환, 최근에는 암 발생의 위험요인으로 대두되면서 세계적인 보건문제가 되었다. 비만도를 대변하는 측정방법은 체질량지수(body mass index), 허리둘레, 그리고 허리둘레-엉덩이둘레비가 있다. 최근에는 비만 중에서도 체지방보다는 내장지방이 당뇨병이나 인슐린 저항성의 주요원인이라는 보고[1-8]와 함께 현존하는 가장 정확한 방법은 컴퓨터단층촬영(fat computed tomography)에 의한 지방측정으로 보고되고 있다. 그러나 컴퓨터단층촬영은 가격면에서 비싸고, 개인병원이나 중소병원에서 설치가 어려우며, 촬영시 방사선의 노출위험도 있으므로, 단순히 복부비만을 보기 위해서는 허리둘레를 여전히 선호하기도 한다. 기존 연구에 의하면 컴퓨터단층촬영에 의한 지방측정과 허리둘레의 상관성은 높지만[9-12], 관상동맥의 위험도를 예측하는 데는 방법간의 큰 차이가 없는 것으로 보고되었다[12].

비만도를 측정하는 또 다른 방법으로 지방세포에서 분비되는 혈청 아디포넥틴이 있다. 아디포넥틴은 지방조직(adipose tissue)에서 주로 합성되며, 탄수화물, 지방대사, 혈관발육에 영향을 주는 단백질 효소이다. 아디포넥틴은 인슐린 저항성을 개선하고 항염증작용을 하는 것으로 알려지면서, 임상이나 역학연구에서 많이 활용되고 있다[13,14]. 즉, 국내외적으로 혈청 아디포넥틴과 각종 대사증후군과의 연구가 활발히 진행되면서 앞으로 비만을 정확히 진단하는데 필수검사가 될 가능성이 높지만, 역시 측정이 쉽지 않고 다소 고가라는 단점이 있다.

따라서 이 연구는 최근 비만연구나 비만진단의 수요가 급격히 증대되고 있는 상황에서 아디포넥틴을 쉽게 측정할 수 있는 키트(kit)를 개발하고, 이를 실제 대규모역학 연구에 적용하여 심혈관질환 위험요인과의 관련성 분석을 통해서 그 유용성을 파악하고자 하였다. 구체적인 연구목적은 다음과 같았다.

첫째, 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트를 이용한 측정치와 기존제품에 의한 측정치와의 상관성을 분석하였다.

둘째, 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트를 이용한 측정치와 체질량지수 및 허리둘레와의 상관성을 분석하였다.

셋째, 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트를 이용한 측정치와 심혈관질환 위험요인들과의 관련성을 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 아디포넥틴 측정 키트 제작

1) 시약

재조합 인간 아디포넥틴 단백질과 단클론 항체를 제작하기 위해, 표준 단백질 서열(Genebank Accession # NP_004788)에서 신호서열을 제외한 mature peptide 부위(아미노산 His15~N244)를 (주)메스디아(한국)와 GenScript(미국)에 유전자 합성, 발현 벡터 구축, E. coli에서의 단백질 생산, 마우스에서의 단클론항체제작을 의뢰하였다. 2종의 단클론항체중 1종은 코팅항체로

접수 : 2007년 10월 16일 채택 : 2007년 12월 18일
교신저자 : 지선하
주소 : 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 보건대학원
전화 : 2228-1523 팩스 : 365-5118
Email : jsunha@yuhs.ac
본 연구는 서울시 산학연 협력사업의 지원에 의해 이루어진 것임(10526)

사용하고, 1종은 바이오틴(biotin)을 부착하여 검출항체로 사용하였다. 인간 혈청을 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)의 표준단백질로 사용하였으며, 상업적으로 판매되는 효소면역분석법 키트(R&D systems)[15]를 이용하여 정량 및 보정하였다.

2) 방법

인간 아디포넥틴 효소면역분석법은 다음 과정으로 수행하였다. 2μg/ml의 코팅항체를 PBS(pH 7.2)에 녹인 후, Well당 100μl씩 ELISA plate(Corning #2592)에 넣고 2-8℃에서 밤샘 방치하였다. 선행 실험에서 코팅항체 2μg/ml과 검출항체 0.1μg/ml이 분석감도와 신호대 잡음비면에서 최적이었다. 400μl의 세척용액(PBST, 0.05% Tween20/PBS)으로 3회 세척한 후, 300ul의 blocking buffer(2% BSA/PBS)로 실온에서 2시간 blocking하였다.

표준단백질은 25.0ng/ml~0.39ng/ml 농도로 샘플희석용액(2%BSA/PBS, 0.01%ProClin300)에 2배 연속희석하여 준비하고, 시료는 샘플희석용액에 2000배 희석하여 준비하였다. Well당 100μl씩 분석완충용액(30mM EDTA, 1%BSA, PBS)을 ELISA plate에 첨가한 후, 50μl의 표준단백질, 희석된 시료를 각각 해당 well에 첨가하고, 실온에서 2시간 배양하였다. 400μl의 세척용액으로 4회 세척 후, 시약희석용액(1%BSA, 0.01% ProClin300, PBS)에 0.1μg/ml 농도의 biotin화된 검출항체를 녹인 후, well당 100μl씩 첨가하고, 실온에서 2시간 배양하였다. 400μl의 세척용액으로 4회 세척 후, 시약희석용액에 0.1μg/ml 농도의 Streptavidin-HRP (Jackson Immuno Research)를 녹인 후, well당 100μl 씩 첨가하고, 실온에서 30분 배양하였다. 400μl의 세척용액으로 4회 세척 후, TMB 발색시약(KPL)을 well당 100μl를 첨가하고, 차광한 후 실온에서 15~30분 배양하면서 색변화를 관찰하였다. 100μl의 1N HCl을 각 well에 첨가하여 발색반응을 중지시키고, 파장 450nm에서 효소면역분석법 측정기(RT-2100C, Rayto)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 분석물 농도는 4 parameter fit 표준곡선에서 구하였다.

3) 개발한 아디포넥틴 키트의 정밀도, 회수율, 선형성 평가

이 연구에서 개발한 혈청 아디포넥틴 키트는 영하 75도에 냉동보관 되었던 인간 혈청 대조군 시료를 이용하여 표준곡선상의 고, 중, 저 농도에 해당하는 대조군 시료들을 이용하여 평가하였다. 이때, intra-assay precision은 농도 값을 알고 있는 3개의 인간 혈청을 1회 분석 내에서 20회 시험하여 평가하였고, inter-assay precision은 농도 값을 알고 있는 3개의 인간 혈청을 10회의 독립적인 분석을 시행을 하여 평가하였다.

회수율(recovery)은 3개의 저 농도의 인간 혈청에 다른 인간 혈청을 첨가하여 인위적으로 표준곡선내 3개 농도에 해당되는 시료를 만든 후 시행하였다. 즉, 여러 농도의 아디포넥틴이 포함된 인간 혈청을 저 농도 인간 혈청에 첨가한 후, 아디포넥틴의 함량을 2개 microplate에서 6회 측정한 후, 평균값을 사용하였다.

선형성 (linearity)은 3종의 인간 혈청을 표준곡선 범위에 포함되게 분석 시행 전에 2배 연속 희석하였다. 즉, 선형성을 알아보기 위해, 3종의 시료를 시료희석용액에 표준곡선범위에 포함되게 연속희석한 후, 2개 microplate에서 6회 실험을 수행하여 평균값을 사용하였다.

4) 개발한 아디포넥틴 키트와 기존 제품들과의 관련성 평가

기존의 상업적으로 판매되는 제품들과의 비교를 위해 2개 제품으로서 R&D systems(미국), AdipoGen(한국)을 선정하였고, 14개 인간혈청 시료에 대해, 각 제품에 수록된 실험방법을 이용하여 측정하였다.

2. 역학 연구 자료에 적용

1) 연구 대상

연구대상은 세브란스 건강증진센터와 이대 목동병원 종합검진센터에서 2006년 4월부터 12월까지 본 연구에 참여하겠다고 동의한 대상자 4,459명 (남자 2,648명, 여자 1,811명)이었다. 이 연구계획서는 연세의료원 임상연구심의위원회(IRB)를 통과하였고, 자료 수집시 개인별로 동의서를 받았다.

2) 측정변수

신장과 체중은 각각 측정기기를 사용하여 직접 측정된 값을 연구에 사용하였다. 체질량지수(Body Mass Index, BMI)는 체중(kg)/신장(m)^{2}로 계산하였다. 허리둘레는 수검자들이 속옷만을 입은 상태에서 허리를 노

출시킨 채 장골과 가장 아래 늑골의 중간부분을 줄자로 수평으로 측정한 값을 사용하였다. 허리둘레는 측정자간의 오차를 줄이기 위해 측정자들을 교육훈련하고 평가하여 측정자간의 신뢰성을 높이고자 하였다.

혈압은 안정된 상태에서 수축기혈압, 이완기혈압을 측정하였다. 혈액검사로는 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백콜레스테롤 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)를 측정하였다. 측정 장비는 Hitachi 7600-200(Hitachi high-technologies Co., Tokyo, Japan) 자동화학분석기를 사용하였다. 이밖에 공복시 혈당, AST(Aspartate aminotransferase), ALT(Alanine aminotransferase), GGT(Gamma Glutamyl Transferase), WBC(White Blood Cells), CRP(C-reactive protein) 등이 측정하였다. 저밀도지단백콜레스테롤 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)은 Liquid Selective Detergent method를 이용하여 직접 측정된 수치를 사용하였다.

이 연구에서 인슐린 저항성은 HOMA (homeostasis model assessment)로 평가되었으며 다음과 같은 공식에 의해 계산되었다.

(공식) HOMA-IR=공복시 인슐린 (μl U/ml) x 공복시혈당 (mmol/l)/22.5

이밖에 연구대상자들은 인구 사회학적 특성, 흡연력, 음주력, 운동습관, 과거력, 약복용력 등을 자기기입식 방법으로 측정하였다. 흡연여부는 비흡연, 과거흡연, 현재흡연으로 구분하였으며 흡연량은 개비로 환산하여 10개비 미만, 10개비 이상-20개비 미만, 20개비 이상-40개비 미만, 40개비 이상으로 구분하였다. 흡연기간은 년 단위로 연속변수로 정리하였다. 음주여부는 음주(현재음주, 과거음주포함), 비음주로 구분하였으며, 음수횟수와 음주량을 사용하여 절대 알코올 양으로 환산하였다. 운동여부는 운동함, 운동하지 않음으로 구분하였다.

3. 통계분석

연구대상자의 일반적인 특성은 평균±표준편차와 빈도를 이용하여 제시하였다. 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트로 측정된 수치와 기존 특정 키트인 R&D systems[15]와 AdipoGen[16]으로 분석한 수치와의 관련성은 단순회귀분석을 이용하였다. 또한 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트로 측정된 수치와 체질량지수 및 허리둘레를 포함하여 심혈관질환 위험요인들과의 상관성은 연령을 통제한 상태에서 Pearson Correlation 분석을 하였다. 모든 분석은 SAS 9.1을 사용하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 보았다.

연구 결과

1. 개발한 아디포넥틴 키트의 정밀도, 회수율, 선형성 평가

이 연구에서 개발한 혈청 아디포넥틴 키트는 'AdipoMark' 라는 명칭을 부여하였다. 표 1은 연구팀이 개발한 AdipoMark에 대한 정밀도 평가 결과이다. 표 1에서 보는 것처럼, 검사내 정밀도 (intra-assay precision) 20개 검체와 검사간 정밀도 (inter-assay precision) 10개 검체를 각각 이용하여 정밀도를 본 결과를 보여주고 있다. 검사내 정밀도에서는 가장 낮은

Table 1. Performance characteristics: precision

Type of precision	Sample No (Amount)	1 (1.69)	2 (7.27)	3 (14.21)
Intra-assay precision (precision within an assay)	N	20	20	20
	Mean, ng/ml	1.69	7.27	14.21
	SD, ng/ml	0.11	0.53	0.91
	CV, %	6.26	7.41	6.37
Inter-assay precision (precision between assays)	N	10	10	10
	Mean, ng/ml	4.37	8.69	16.37
	SD, ng/ml	0.196	0.746	1.031
	CV, %	4.5	8.6	6.3

SD: standard deviation, CV: coefficient of variation.

Table 2. Performance characteristics: recovery

Sample No	Spiked amount (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Recovery* (%)
1	20.7	22.37	21.93	98
	11.5	13.17	12.12	92
	2.3	3.97	3.65	92
2	20.7	24.50	22.83	93
	11.5	15.30	14.02	92
	2.3	6.00	5.86	96
3	20.7	22.51	23.32	104
	11.5	15.61	14.60	94
	2.3	6.41	6.09	95

Varying amount of human adiponectin were added to three human serum samples and the adiponectin content was determined.
* The % of recovery = observed/expected x 100.

아디포넥틴 농도에서는 변이계수가 6.26%, 가장 높은 아디포넥틴 농도에서는 변이계수가 6.37%로서 큰 차이가 없었다. 또한 검사간 정밀도 평가결과 같은 아디포넥틴 농도의 경우에 변이계수가 각각 4.5%, 6.3%로 비교적 안정적이었다.

표 2는 AdipoMark에 대한 회수율 평가 결과이다. 아디포넥틴 검체의 예상치와 관찰치의 비율로 나타내는 회수율은 90% 이상을 보여주었다.

표 3은 AdipoMark에 대한 선형성 평가 결과이다. 선형성은 네 가지 검체 희석비율에 따라 회수율로 평가하였다. 대부분의 경우에서 회수율이 90% 이상이었다.

2. 개발한 아디포넥틴 키트와 기존 제품들과의 관련성 평가

기존의 상업적으로 판매되는 제품들과의 비교를 위해 2개 제품으로서 R&D systems(미국), AdipoGen(한국)을 선정하였고, 14개 인간혈청 시료에 대해, 각 제품에 수록된 실험방법을 이용하여 측정하였다. 그림 1은 본 연구에서 개발된 키트로서 AdipoMark와 외국제품인 R&D systems과의 관련성을 분석한 결과이다. 두 키트간의 결정계수는 0.97로 매우 높음을 알 수 있다. 또한 본 연구에서 개발된 키트로서 AdipoMark와 국내 제품인 AdipoGen 과의 관련성 분석에서도 결정계수 0.9309로서 비교적 우수함을 보였다 (그림 2). 그

Table 3. Performance characteristics: linearity

Sample No	Dilution ratio	Expected (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Recovery* (%)
1	1:2	10.079	9.633	96
	1:4	5.0395	4.968	99
	1:8	2.519	2.655	105
	1:16	1.259	1.259	100
2	1:2	4.038	4.383	109
	1:4	2.019	2.150	107
	1:8	1.009	1.028	102
	1:16	0.504	0.438	87
3	1:2	7.398	6.712	91
	1:4	3.699	3.382	91
	1:8	1.849	1.672	90
	1:16	0.924	0.972	105

* The % of recovery = observed/expected x 100.

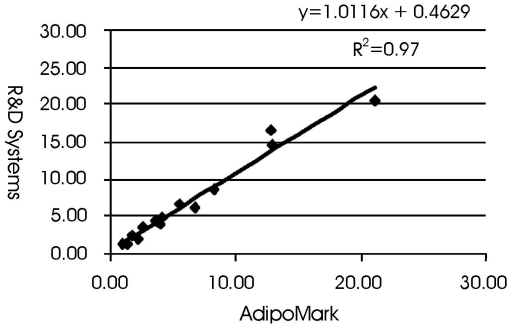

Fig. 1. Inter correlation of serum adiponectin between R&D systems and AdipoMark.

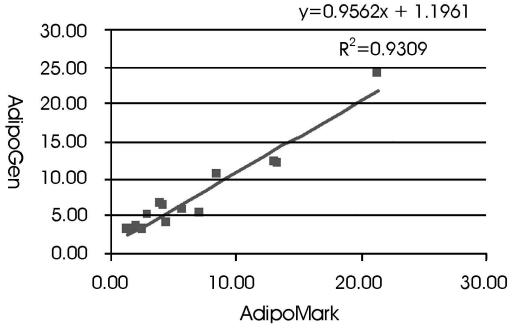

Fig. 2. Inter correlation of serum adiponection between AdipoGen and AdipoMark.

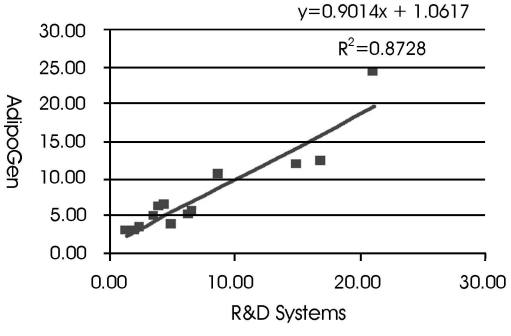

Fig. 3. Inter correlation of serum adiponectin between AdipoGen and R&D Systems.

러나 R&D systems과 AdipoGen과의 관련성 분석결과 결정계수 0.8728로서 낮은 상관성을 보였다 (그림 3).

3. 역학인구집단에 적용 사례

앞서 개발된 아포포넥틴 측정 키트(AdipoMark)를 일반 인구집단에 적용하여 비만도와 심혈관질환 위험요인들과의 상관성을 알아보았다. 표 4는 남자에서 허리둘레를 여섯 구간으로 나누고 각 연령구간별로 혈청 아디포넥틴의 평균값을 보여주고 있다. 연령 군에 관계없이 허리둘레가 클수록 혈청 아디포넥틴 수준은 낮아지고 있다. 연령이 49세 까지는 비슷한 수준을 보이다가 50대 이후부터 아디포넥틴의 수준이 약간 증가하는 경향을 보였다. 표 5는 여자에서의 결과인데 남자에서의 아디포넥틴 평균은 7.2μg/ml 비해 여자는 10.8 μg/ml로서 여자에서 높을 것을 알 수 있다. 또한 연령이 50세 이전에 비해 50세 이후에 아디포넥틴이 증가

Table 4. Serum adiponectin level by waist circumference and age group in men

WC*, cm	Age, year				P-value	Total
	<40	40-49	50-59	≥ 60		
	N (mean±SD)	N (mean±SD)	N (mean±SD)	N (mean±SD)		N (mean±SD)
<70.0	18 (10.2±7.8)	15 (10.9±4.9)	5 (10.7±5.5)	9 (14.4±10.5)	0.5721	47 (11.3±7.4)
70.0 - 74.9	56 (8.8±4.1)	63 (8.8±4.1)	21 (8.1±3.8)	13 (11.1±10.0)	0.3504	153 (8.9±4.8)
75.0 - 79.9	107 (7.8±3.7)	173 (8.0±4.2)	73 (9.5±5.3)	28 (9.8±5.8)	0.0110	381 (8.4±4.5)
80.0 - 84.9	157 (7.0±3.7)	303 (6.8±3.6)	160 (7.2±3.7)	55 (9.6±4.7)	<0.0001	675 (7.2±3.8)
85.0 - 89.9	129 (6.2±3.4)	315 (6.3±3.1)	170 (6.7±3.7)	64 (7.3±3.5)	0.1033	678 (6.5±3.4)
≥ 90.0	168 (6.2±3.3)	289 (6.2±3.4)	177 (6.5±4.0)	80 (8.2±4.8)	0.0003	714 (6.5±3.8)
p-value**	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0011		
Total	635 (7.0±3.9)	1158 (6.9±3.7)	606 (7.2±4.1)	249 (8.8±5.5)		2648 (7.2±4.1)

*WC: waist circumference.
**p-values were obtained by ANOVA.

Table 5. Serum adiponectin level by waist circumference and age group in women

WC*, cm	Age, year				P-value	Total
	<40	40-49	50-59	≥ 60		
	N (mean±SD)	N (mean±SD)	N (mean±SD)	N (mean±SD)		N (mean±SD)
<70.0	250 (11.9±6.6)	175 (12.3±5.7)	54 (13.7±7.0)	9 (11.9±5.4)	0.3090	488 (12.2±6.3)
70.0 - 74.9	166 (10.3±5.2)	207 (10.7±5.4)	82 (12.8±6.8)	24 (15.1±5.9)	<0.0001	479 (11.1±5.7)
75.0 - 79.9	91 (9.0±4.0)	161 (9.5±5.4)	94 (11.5±5.8)	40 (11.1±5.9)	0.0036	386 (10.0±5.4)
80.0 - 84.9	42 (8.5±3.9)	100 (8.9±4.7)	73 (11.3±6.1)	40 (12.3±6.3)	0.0003	255 (10.0±5.4)
85.0 - 89.9	19 (7.8±4.5)	36 (7.0±4.0)	39 (10.1±6.3)	28 (11.4±6.1)	0.0064	122 (9.1±5.6)
≥ 90.0	11 (8.6±5.0)	22 (7.0±3.9)	30 (11.1±6.1)	18 (10.6±4.7)	0.0302	81 (9.5±5.4)
p-value**	<0.0001	<0.0001	0.0192	0.1145		
Total	579 (10.5±5.7)	701 (10.3±5.5)	372 (11.9±6.4)	159 (12.1±6.0)		1811 (10.8±5.9)

*WC: waist circumference.
**p-values were obtained by ANOVA.

하여 있는 것을 알 수 있다.

표 6은 잘 알려진 심혈관 위험요인들과 혈청 아디포넥틴과의 상관성을 남녀별로 보여주고 있다. 남자에서 아디포넥틴과 상관성이 가장 높은 것은 HDL 콜레스테롤로서 양의 상관관계 (r=0.2743, p<0.0001)를 보이고 있다. 또한 허리둘레와도 비교적 높은 상관관계 (r=0.2276, p<0.0001)를 보였고, 나머지 대부분 심혈관질환들과 음의 유의한 상관관계를 보였다. 그러나 혈압과는 낮은 상관관계를 보였다. 여자의 경우는 남자와 유사한 결과를 보였다. 단, 남자에서 결과와 차이점은 여자에서 아디포넥틴은 ALT와 유의한 상관성을 보이지 않았다.

고 찰

이 연구는 지방세포(adipocyte)에서 분비되는 혈청 아디포넥틴 농도를 측정하는 효소면역분석법 (ELISA) 키트(AdipoMark)를 개발하고 이에 대한 유용성을 평

Table 6. Age-adjusted correlation coefficient of serum adiponectin level with cardiovascular risk factors in men and women

	Men (N=2,561)		Women (N=1,714)	
	r	p-value	r	p-value
WC, cm	-0.2276	<0.0001	-0.2328	<0.0001
BMI, kg/m2	-0.1883	<0.0001	-0.1775	<0.0001
SBP, mmHg	-0.0566	0.0042	-0.0707	0.0034
HDL-C, mg/dL	0.2743	<0.0001	0.3154	<0.0001
Triglyceride, mg/dL	-0.1879	<0.0001	-0.1654	<0.0001
FBG, mg/dL	-0.1356	<0.0001	-0.2154	<0.0001
Insulin, μU/mL	-0.1728	<0.0001	-0.1321	<0.0001
HOMA_IR	-0.1830	<0.0001	-0.1629	<0.0001
White blood cell count	-0.1449	<0.0001	-0.1643	<0.0001
ALT, IU/L	-0.0611	0.0020	0.0363	0.1332

WC: waist circumference; BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; FBG: fasting blood glucose; ALT: alanine aminotransferase.
r: correlation coefficient.

가하고자 하였다. 이 연구에서 개발한 키트 AdipoMark에 대한 정밀도, 회수율, 선형성을 평가한 결과 우수한 결과를 보였다. 또한 본 연구팀이 개발한 키트 AdipoMark를 타사 제품인 R&D systems[15]과 AdipoGen[16]와의 상호관련성을 평가한 결과 검사성적간의 상관성이 매우 높았다. 마지막으로 본 연구팀이 개발한 키트 AdipoMark를 이용하여 대규모 검체에 대한 혈청아디포넥틴을 측정한 후 주요 심혈관질환 위험요인과의 상관성을 분석결과 의미 있는 관련성을 보였다.

이 연구에서 개발된 효소면역분석법 키트의 정밀도로서 검사내 변이와 검사간 변이를 본 결과 가장 낮은 아디포넥틴 농도에서는 변이계수가 6.26%, 가장 높은 아디포넥틴 농도에서는 변이계수가 6.37%이었고, 검사간 정밀도 평가결과 같은 아디포넥틴 농도의 경우에 변이계수가 각각 4.5%, 6.3%이었다. 비교 제품인 AdipoGen의 경우 검사내 변이가 3.82, 검사간 변이는 5.15이었다[16]. 또한 인체내 인슐린 측정용 효소면역분석법 키트의 검사내 변이계수 4-10%, 검사간 변이계수 9-13%의 예와 비교하면 본 연구의 정밀도 수준은 우수한 것으로 판단된다[17].

또한 아디포넥틴 측정의 민감성을 평가하는 방법으로 회수율(recovery)은 세 종류의 분석시료를 사용하여 실시하였다. 회수율은 최저 95%에서 최고 104%이었다. 비교 제품인 AdipoGen의 경우 회수율은 최저 91.8%에서 100.2%[16]. 일반적으로 인슐린 측정용 효소면역분석법 키트의 회수율이 102 -106%까지 보고된 것을 보면[18], 이 연구의 회수율은 만족할 만 것으로 판단된다. 효소면역분석법 키트의 선형성 평가는 두 가지 방법으로 시행되었다. 한 가지는 자체적으로 분석시료는 1:2, 1:4, 1:8로 희석하여 예상값과 결과값을 비교하여 회수율(%)을 평가하는 방법으로서 이는 평균 98.5% (최저 87%, 최고 109%)이었다. 선형성 평가에 대한 다른 연구의 예를 보면, 인슐린 측정용 효소면역분석법 키트의 선형성을 93에서 110%로 보고된 것을 보면, 본 연구의 선형성은 우수한 것으로 판단된다[18]. 선형성 평가의 다른 한 가지 방법은 본 연구의 효소면역분석법 키트를 두가지 기존 제품과의 상호 관련성을 평가하였다. 결과적으로 본연구의 효소면역분석법 키트는 R&D System R2=0.97, AdipoGen R2=0.93의 높은 관련성을 보였다. 반면에 비교 제품들 간의 비교로서 R&D System 과 AdipoGen 과는 R2=0.87을 보여 본 연구의 효소면역분석법 키트의 우수성을 간접적으로도 증명되었다.

그러나 본 연구에서 개발한 키트의 제한점으로는 개발된 아디포넥틴 키트의 타당성을 간접적으로 평가하였다는 점이다. 즉, 기존에 이미 제품화되어 상용화되고 있는 R&Dsystems[16]과 AdipoGen[17] 검사방법과 비교를 한 것으로 간접적으로 타당도를 입증할 수 있었다. 그러나 기존에 사용되고 있는 제품보다 본 연구에서 개발한 키트 Adipomark의 장점으로는 첫째, 검체의 희석비율을 100 이하로 줄였다. 이는 기존제품에서 검체의 희석비율이 AdipoGen[17]은 2000배와 비교하면 크게 개선된 것이며, 수입제품인 R&Dsystems [16] 100배와 동일하였다. 희석비율을 낮추게 되면 검사의 절차를 줄임으로서 검사시간이 줄고, 그만큼 오차가 줄어든다는 장점이 있다. 둘째, 본 연구에서 개발한 키트의 검사시간은 기존 제품에서 4시간 걸리던 것을 2:30분정도 줄였다는 장점이 있다.

또한 본 연구에서 개발한 효소면역분석법 키트를 이용하여 일반인구집단에서 혈청 아디포넥틴 수준을 측정하고, 비만도와 심혈관질환 위험요인들과의 관련성을 알아보았다. 연구대상자수는 4,459명이었으며, 평균연령은 45.8세 (범위 24세 - 87세)였고, 심장병이나 암과 같은 질환을 가지고 있지 않았다. 연령을 보정한 후에 혈청 아디포넥틴은 허리둘레와의 관련성에서 남자는 -0.2276, 여자 -0.2328 로 남녀 공히 통계학적으로 유의하였다. 그러나 체질량지수 (BMI)와의 관련성은 남자 -0.1883, 여자 -0.1775로 허리둘레와의 상관성보다 다소 낮았다. 또한 혈청 아디포넥틴은 HDL 콜레스테롤과도 높은 관련성(남자 0.2743, 여자 0.3154)을 보였다. 국내 다른 연구자들에서 의해서 보고된 혈청 아디포넥틴 수준과 심혈관질환 위험요인과의 상관성을 비교하여 보면 본 연구결과와 비슷한 수준을 보였다. 즉, 우선 관상동맥질환 환자를 대상으로 실시한 연구결과 비교하면, 혈청아디포넥틴과의 상관계수가 중성지방은 -0.190, HDL-C은 0.264, 공복시혈당은 -0.168, 인슐린은 -0.085, HOHA_IR은 -0.132로 보고되었다[19]. 또한 건강검진센터를 내원한 일반인 남자 204명, 여자 214명을 대상으로 실시한 연구에서는 혈청 아디포넥틴과 체질량지수와의 상관성은 남자 -0.32, 여자 -0.31, 공복시 혈당은 남자 -0.07, 여자 -0.18, HDL-C은 남자 -0.24, 여자 0.37로 유의한 관련성을

보였다. 그러나 같은 연구에서 혈청 아디포넥틴은 수축기 혈압과의 관련성은 남자 0.01, 여자 0.13로 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다[20].

이 연구에서 남자보다 여자에서 혈청 아디포넥틴 수준이 높은 것은 다른연구에서도 같은 결과를 보였으나[13,21], 일부 연구에서는 남녀간에 차이가 없었다는 연구도 있었다[22]. 여자에서 아디포넥틴의 수준이 높은 것은 남자에 비해 내장지방의 분포가 많거나 호르몬의 영향으로 추측되지만 아직 명확한 기전을 밝혀지지 않은 상태이다.

이 연구에서 남녀 공히 아디포넥틴은 HDL 콜레스테롤과 가장 높은 상관관계를 보였다. 아디포넥틴은 HDL 콜레스테롤과 관련이 크다는 보고는 이전 연구에서도 있었으나[21] 아직 확실한 기전은 밝혀지지 않았다. 또한 아디포넥틴의 hepatic lipase 활성화에 대한 영향은 중심성 비만이나 인슐린 저항성에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다[13].

낮은 수준의 아디포넥틴이 당뇨병의 발생을 높인다는 보고는 많다[23,24]. 최근에서 낮은 아디포넥틴은 심혈관질환의 발생과도 관련이 있다는 보고도 있으나 전향적 연구는 아직 많지 않은 상태이다[25]. 이러한 관련성의 근원은 모두 아디포넥틴이 인슐린 저항성을 개선시키고, 항염증작용을 한다는 기능으로 설명이 가능한 결과들이다. 만약 이러한 관련성이 앞으로 계속되는 연구를 통해 더욱 증명되고 확실히 된다면 아디포넥틴은 비만이나 당뇨병치료 혹은 심혈관질환의 예측하는데 필수적인 검사가 될 것으로 믿는다.

아직까지는 아디포넥틴에 대한 연구는 소규모로 단면적인 연구가 대부분이어서 연구결과에 대한 원인-결과의 방향성을 확증하기는 미흡한 실정이다. 최근 아디포넥틴의 임상적 및 역학적 중요성이 국내외적으로 대두되면서 앞으로 이 분야에 대한 연구가 좀 더 활발히 수행되어야 할 것으로 본다. 따라서 앞으로 대규모 인구집단을 대상으로 전향적 연구를 통해 혈청 아디포넥틴과 당뇨병이나 심뇌혈관 질환 발생과의 관련성을 밝혀야 할 것이다.

결 론

이 연구는 대사증후군의 가장 근간을 이루는 비만과 내장지방세포와 관련성이 높은 혈청 아디포넥틴을 정량적으로 측정할 수 효소면역분석법 (ELISA) 키트를 개발하였고, 이에 대한 정밀도, 회수율, 선형성을 평가한 결과 매우 우수하였다. 또한 본 키트를 이용하여 대규모 인구집단 4,459 명에 적용하여 심혈관질환 위험요인들과의 상호관련성을 알아본 결과, 남자에서 아디포넥틴과 상관성이 가장 높은 것은 HDL 콜레스테롤로서 양의 상관관계 ($r=0.2743$, $p<0.0001$)를 보였다. 또한 허리둘레를 포함하여 모든 심혈관질환들과 음의 유의한 상관관계를 보였다.

결론적으로 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트는 타사제품에 비해 검사시간과 회석비율 면에서 우수함을 보였다. 또한 이를 이용하여 대규모 인구집단에 적용하여 비만지수를 포함하여 심혈관질환 위험도와 관련성을 평가한 결과 타당도를 간접적으로 평가할 수 있었다. 향후 이 연구에서 개발한 아디포넥틴 키트가 비만과 당뇨병을 포함하여 대사증후군의 진단 및 연구에 기초적인 도움이 되기를 희망한다.

참고문헌

1. Tanaka Y, Kikuchi T, Nakasaki K, Hiura M, Ogawa Y, Uchiyama M. Lower birth weight and visceral fat accumulation are related to hyperinsulinemia and insulin resistance in obese japanese children. Hypertens Res 2005;28:529-536
2. Sironi AM, Gastaldeli A, Mari A, Ciociaro D, Postano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, Ferrannini E. Visceral fat in hypertension influence in insulin resistance and β-cell function. Hypertension 2004;44:127-133
3. Kim CS, Nam JY, Park JS, Kim DM, Yoon SJ, Ahn CW, Lim SK, Kim KR, Lee HC, Huh KB, Cha BS. The correlation between insulin resistance and the visceral fat to skeletal muscle ratio in middle aged women. Yonsei medical journal 2004; 45:469-478
4. Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, Fukushima M, Nakamura T, Kuroe A, Nakai Y, Ishbashi S. Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. metabolism

2003;52:1274-8
5. Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Maruyama N, Morioka K, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in japanese metabolically obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. Diabetes care 2003;26:2341-2344
6. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging. Diabetes 2002; 51:2951-2958
7. Banerji MA, Faridi N, Atluri R, Chaiken RL, Lebovitz HE. Body composition, visceral fat, leptin, and insulin resistance in asian indian men. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:137-144
8. Cefalu WT, Wang ZQ, Werbel S, Bell-Farrow A, Crouse JR, Hinson WH, Terry JG, Anderson R. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. Metabolism 1995;44:954-959
9. Brundavani V, Murthy SR, Kurpad AV. Estimation of deep-abdominal-adipose-tissue accumulation from simple anthropometric measurements in indian men and woman. European journal of clinical nutrition 2006;60:658-666
10. Chan DC, Watts GF, Barrett PHR, Burke V, Waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as predictors of adipose tissue compartments in men. Q J Med 2003;96:441-447
11. Han TS, McNeil G, Seidell JC, Lean ME, Predicting intra-abdominal fatness from anthropometric measure:the influence of stature. Int J Obes Relat Metab Disord 1997;21:587-593
12. Snell-Bergeon JK, Hokanson JE, Kinney GL, Dabelea D, Ehrlich J, Eckel RH, Ogden L, Rewers M, Measurement of abdominal fat by CT compared to waist circumference and BMI in explaining the presence of coronary calcium. International journal of obesity 2004;28:1594-1599
13. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin tobody fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. Diabetologia 2003;46:459-469
14. Snehalatha C, Viswananthan V, Mukesh B, Haffner SM, Simon M, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. Diabetes Care 2003;26: 3226-3229
15. http://www.rndsystems.com/ (2007년 12월 2일 방문)
16. http://www.adipogen.com/ (2007년 12월 2일 방문)
17. Assink HA, Brouwer HJ, Blijenberg BG, Leijnse B. The influence of the label on the quality of a solid-phase immunoassay: evaluation of a commercial ELISA kit for serum ferritin. J Clin Chem Clin Biochem 1983;21(11):695-702
18. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND, Mistry J, Sinha MK. Development of a novel ELISA for human insulin using monoclonal antibodies produced in serum-free cell culture medium. Clin Biochem 2007;40(1-2):98-103
19. Kim OY, Koh SJ, Jang Y, Chae JS, Kim JY, Kim HJ, Cho H, Lee JH. Plasma adiponectin is related to other cardiovascular risk factors in nondiabetic Korean men with CAD, independent of adiposity and cigarette smoking: Cross-sectional analysis. Clinica Chimica Acta 2006;370:63-71
20. Im JA, Kim SH, Lee JW, Shim JY, Lee HR, Lee DC. Association between hypoadiponectinemia and cardiovascular risk factors in nonobese healthy adults. Metabolism. 2006;55(11):1546-1550
21. Schulze MB, Rimm EB, Shai I, Rifai N, Hu FB. Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. Diabetes Care 2004;27: 1680-1687
22. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsu-

linemia. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:1930-1935

23. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(6):1595-1599.
24. Diez JJ and Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. Eur J Endocrinol.2003148(3):293-300. Review.
25. Hajer GR, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Edlinger M, Visseren FL. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. Am Heart J 2007 154(4):750:1-7

=Abstract=

Development of ELISA-kit of Quantitative Analysis for Adiponectin and Their Correlation with Cardiovascular Risk Factors

Sun Ha Jee[1,2], Seungbok Lee[2], Sungsik Min[2], Jungyong Park[3], Hyon-Suk Kim[3], Sang Yeun Kim[1,2], Ji Eun Yun[1,2], Sun Ju Lee[1,2], Eun Jung Jee[1,2], Hee Yeon Lee[1,2], Hye Yun Song[1,2]

Institute for Health Promotion, Graduate School of Public Health, Yonsei University, Seoul, Korea[1], Metabolic Syndrome Initiatives, Seoul, Korea[2], Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea[3]

Purposes: To develop a rapid, sensitive, qualitative ELISA-kit for serum adiponectin and examine correlation with adiponectin and cardiovascular risk factors.

Methods: On the base of monoclonal antibodies against adiponectin, apply indirect ELISA to study the performance parameter of the kit. The correlation was examined between adiponectin and cardiovascular risk factors including waist circumference, body mass index, triglyceride, and HDL cholesterol.

Results: The limited concentration of detection of the ELISA-kit was 1ug/ml. Linearity with R&D system and AdipoGen with this ELISA-kit was acceptable: the linear equation with R&D system was y=1.0116x + 0.4629 (R2=0.97) and linear equation with AdipoGen was y=0.9562x + 1.1961 (R2=0.93), respectively. The average recovery rate of the ELISA-kit ranged 92 to 104%. The correlation coefficient of waist circumference with adiponectin was -0.2276 ($p<0.0001$) among men and -0.2328 ($p<0.0001$) among women.

Conclusion: This ELISA-kit was quick, sensitive, and stable and can be used to determine adiponectin in serum.

Key Words: Adiponectin, ELISA, Kit, Cardiovascular risk factor