

高脂蛋白血症의 脂肪檢査法에 대하여

乙支病院 臨床病理科

許 淑 助 · 文 永 會

= Abstract =

Evaluation of Lipid Screening Methods for Hyperlipoproteinemia

Sook Joe Hur, M.D. and Young Hoe Moon, M.D.

Department of Clinical Pathology, Eul-Ji General Hospital

Combination of rapid and reliable methods for the recognition of most common types of hyperlipoproteinemia according to D.S. Fredrickson seen in routine clinical laboratory are described.

4 Determination include for this kind of phenotyping, determination of cholesterol, triglycerides, total lipids and an electrophoretic analysis of lipoprotein use agarose-gel as a medium with good differentiation obtained.

서 론

혈장의 脂肪농도에 異常이 있거나 異常脂血症을 모두 異常脂蛋白血症(dyslipoproteinemia)이라고 하며 따라서 脂蛋白의 變化에 관계되는 疾患들을 밝히고 다스리는데 脂蛋白에 對한 관심을 가지고 보다 더욱 연구 노력함이 바람직하다고 본다.

脂血症(脂蛋白血症)에는 高脂蛋白血症과 低脂蛋白血症으로 나누고 있고 臨床的으로는 주로 高脂蛋白血症에 대해서 많은 관심을 가지고 연구가 활발히 진행되고 있다. 高脂蛋白血症은 그 원인을 기초로 감별하면 두가지, 즉 Primary 와 Secondary type으로 나누게 된다. 二次的 型은 그 原因疾患(Nephrosis나 Hypothyroidism 등)으로 因하여 代謝에 異常이 생겨서 일어나므로 原因이 잘 조절되면 자연히 소실된다. 그러나 一次的 型은 가족적으로 혹은 산발적으로 發生하여 유전적관계를 가지고 있으며 흔히 음식이나 alcohol 등 식품과 밀접한 관계를 가지고 지역적으로 발생하는 경우가 있고(exogenous hyperlipemia라고 함), 또 탄수화물을 많이 섭취시 일어나는 경우(endogenous

hyperlipemia)도 있다.

지방대사과정에서 plasma 内の Lipoprotein 농도는 지방운반에서의 직접 또는 간접적인 영향을 받게된다. 예를들면 탄수화물대사의 상태에 따라서 脂蛋白농도에 영향이 크게 미치는 경우가 있다.

Hyperlipoproteinemia란 Lipoprotein 종류 하나의 혈장내 농도가 증가한 상태를 말하며 Lipoprotein을 구성하고 있는 성분이 혈장으로부터 제거가 잘되지 않거나 과량으로 생성되어 일어난다. 혈장에 있는 脂質은 주로 Cholesterol, Triglyceride와 Phospholipid가 여기에 속하고 이들이 脂蛋白복합체로서 혈장내에 순환되고 있다. 이들 Lipoprotein은 실험실에서 電氣泳動時에 移動性(mobility)이나 초원심분리법에 의해서 여러가지 종류로 나누며 上記한 脂肪이 서로 다른 比率로 分布되고 있다.

초원심분리법에 따르면 Very low density lipoprotein(VLDL), Intermediate density lipoprotein(IDL), Low density lipoprotein(LDL), 그리고 High density lipoprotein(HDL)으로 나누고 이들은 또 전기영동법에 의해 나타나는 α -Lipoprotein(α -lipop.), β -lipoprotein(β -lipop.), broad- β -lipoprotein(b- β -lipop.)과 pre- β -lipoprotein(pre- β -lipop.)분해과 밀접

접 수: 1982년 2월 23일

한 관계를 가지고 있다.

저자는 이미 D.S. Frederickson의 분류법에 따라 분류된 型的 Hyperlipoproteinemia 중에서 임상적으로 가장 흔한 type을 臨床化學적으로 좀더 빠르고 확실한 방법을 利用하여 쉽게 측정함으로써 脂蛋白血症을 임상에서 진단조절하는데 도움받을 수 있고, 앞으로 지역적으로 식이에 따른 여러가지 型的 脂蛋白血症을 檢査분류하는데 필요한 방법을 종합검토하여 전기영동법과 이에 관계되는 지질의 parameter를 종합하였기에 보고하는 바이다.

측정방법과 자료

1) 콜레스테롤의 측정 (Huang 變法)

上記變法을 측정과정에서 나타나는 短點을 보완하여 Routine test에 알맞게 하였음.

(1) 試 藥 : 빙초산 300 ml을 冷水槽下에서 acetic anhydride 600 ml와 혼합하고 濃硫酸 100 ml을 서서히 加하고 anhydrous sodium-sulfate 20 gm을 혼합하고 실온에서 맑은 용액을 얻어 4°C에 보관한다.

(2) 方 法 : 冷水槽下에서 시험관에 시약 5 ml, 혈청 0.1 ml을 혼합하여 15°C, 30分間 반응시킨 후 spectrophotometes에서 波長 670 nm에서 吸光度를 읽는다.

2) Triglyceride 측정

동상 사용되고 있는 kit시약을 사용하여 측정하였음.

3) 총지질의 측정 (Chabrol과 Charonnat 法의 變法)

(1) 試 藥

- ① Phosphoric acid
- ② Vanillin (0.6 gm% 水溶液)
- ③ 농유산
- ④ 標準시액

(2) 方 法 : 시험관에 농유산 2 ml와 혈청 0.1 ml을 혼합한 다음 boiling waterbath에서 10分間 가열한 다음 냉각시킨다. 여기에 혼합 시약 0.1 ml를 加하여 혼합한 후 37°C, 15分間 呈色시킨 후 냉각시킨다. 그리고 10分內에 537 nm에서 吸光度를 읽는다. 이때 Blank는 0.1 ml 유산, 2 ml 인산, 그리고 0.5 ml Vanillin 액을 혼합하여 사용한다.

4) 脂蛋白電氣泳動分離 測定法

여러가지 medium을 사용하여 측정하나 저자는 Agarose-gel을 medium으로 사용하여, 특히 pre-β와 β-fraction 사이의 분리가 잘 되므로 소개한다.

(1) 檢 體 : 아침에 채취한 혈액을 응고시켜서 혈청을 분리하거나 EDTA를 가하여 항응고 처리하여 얻은 혈장을 4°C에 보관사용한다.

(2) 機器 및 자료 : 전기영동에 사용되는 Chamber는 분리 tank가 20×20 cm 크기이고 buffer well 사이에 platform 밑에 13cm²크기의 냉각수조부를 부착하여 一定溫度(약 10°C)의 냉각수가 순환되게 하여야 한다. medium과 buffer와의 사이에는 Watmans No. 3 여과지를 사용하여 전류를 연결되게 한다. Power Supply는 D.C. 400 voltage, 200 mA가 적당하다. media plate로는 slide glass(2×7.5 cm, 20×20 cm)가 좋다. Agarose는 가능하면 BDH 제품이 좋고 1.2%되게 0.05 M, Veronal Buffer(PH 8.6)에 녹혀 사용하고 Staining solution은 Sudan Black Staining Solution (0.4 gm과 Ethanol 120 ml, Zinc acetate 4 gm, Water 80 ml)를 사용하며 Densitometer는 Gelman Inc.가 좋다.

(3) 분리方法 : Agarose 1.2% gel medium plate을 단들여 陰極쪽 약 2 cm 거리에 templet로 slit를 만들고 여기에 미리 준비된 (10 μl serum과 10 μl agarose gel(2.4%)혼합된 것) 검체를 채운다. 이때 한쪽 Slit에는 Indicator (serum-agarose 혼합액과 1% Brom phenol blue의 혼합된 것)을 채운다.

Medium과 buffer 사이는 filter paper로 연결하고 영동시간은 20 voltage per cm로 유지하여 50~55分間 영동시키면 약 5 cm (Indicator 분리거리)정도 이동된다.

전기영동된 medium은 50% Methanol액에 15分 고정시키고 60°C에 건조시킨 다음 Sudan Black 염색액에 두시간 염색하고 tap water에서 탈색한 다음 계측시켜 건조후 Densitometer 578 nm에서 Scanning하여 분해를 얻는다. 萬一 필요할 때 건조직전에 각 분해를 잘라내어 용출액 (빙초산 : 알콜 : 증류수 = 11 : 5 : 4)에 용출시켜 Photometer에 590 nm에서 吸光度를 측정한다.

結 果

사용된 각 방법에서 결과에 대한 표준편차(S.D.)를

Table 1. Standard deviation of the present electrophoresis method (50 runs on the pooled serum)

beta-lipop.	pre-beta-lipop.	alpha-lipop.
61±2.2%	18±1.6%	21±2.0%

Table 2. Normal values of the present lipoprotein electrophoresis method (50 different sera with a normal content cholesterol, triglyceride and total lipid)

Relative peak area		
beta-lipop.	pre-beta lipop.	alpha-lipop.
58±9.6%	19±8.0%	23±8.6%
#406±84 mg%	133±70 mg%	161±59 mg%
# of total lipid		

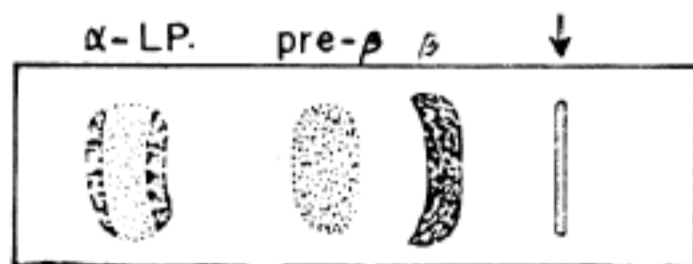
Table 3. Types of hyperlipoproteinemia & parameters for their classification

Type	I	II	IV
Lipids as % of total lipids: cholesterol	>31%	23~31%	<23%
triglyceride	<20%	20~35%	>35%
Cholesterol/Triglycerides	>1.5	0.7~1.5	0.3~0.7

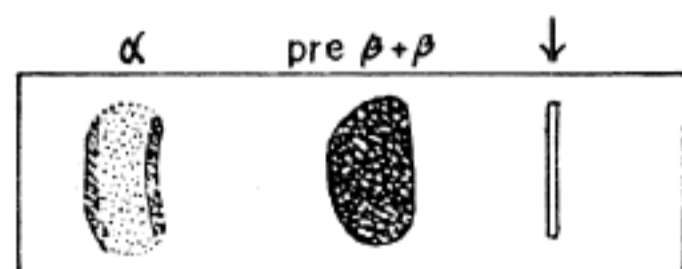
Table 4. Phenotyping of hyperlipoproteinemia by quantitative agarose-gel electrophoresis

Type	normal#	I	II	IV
alpha-lipop.	161±59 mg%	normal	normal	normal
pre-beta-lipop.	133±70 mg%	normal	elevated	elevated
beta-lipop.	406±84 mg%	elevated	upper-elevated	normal
beta/pre-beta		>2	0.7~2	<0.7

#Lipids of lipoprotein fraction as mg% of total lipids and mean±S.D.



TYPE-I. Hyperlipoproteinemia
 Total lipid 860 mg%
 Cholesterol 327(38%)
 Triglyceride 101(11.7%)
 C/T 3.2(>1.5)
 Alpha-LP 160(18.5%)
 Pre-β-LP 130(15.1%)
 Beta-LP 570(66.4%)
 Beta/Pre-β 4.4(>2)



TYPE-II. Hyperlipoproteinemia
 Total Lipid 890 mg%
 Cholesterol 186(21%)
 Triglyceride 204(22.8%)
 C/T 0.9(0.7~1.5)
 Alpha-LP 60(15%)
 Beta-LP } 830(85%)
 Pre-β-LP }
 Beta/Pre-β ±1

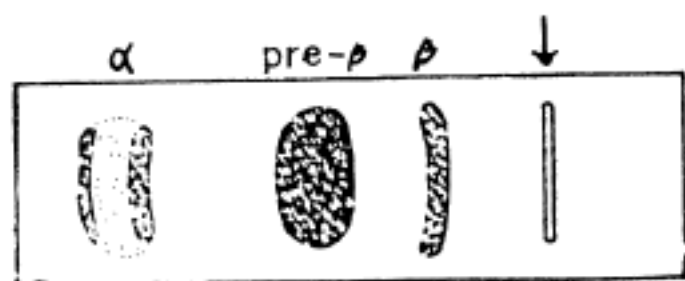
Table 5. Relation of the concentration of agarose and agarose-agar mixture to the migration distance of lipop. in 0.05 m barbital buffer

Type of Lipid	Gel Type & Concent.	Distance from Origin to peak of			
		Alpha	Pre-beta	Beta	B-pre-beta
Normal subject	Agarose	MM			
	1.2%	125	52	32	20
	1.0%	117	58	37	21
	0.8%	125	65	35	30
	0.6%	123	72	34	38
	Agarose-Agar				
8:2	122	73	35	38	
Type-IV	Agarose				
	0.8%	129	50	27	23
	0.6%	125	74	41	33
	Agarose-Agar				
8:2	128	75	42	33	

*Average values from Eight Pattern for Each Variable arenoted.

구하기 위하여 檢體로서 Pooled Serum 을 사용 50회 측정하여 얻은 lipoprotein 분해를 비교하여 표 1에 제시하였으며 S.D.가 전고 재현성이 아주 좋다. 또 정상인의 檢體 30개를 전기영동하여 얻은 결과를 표 2에 나타냈고 이때 정상치는 Cholesterol 130~250 mg%, Triglyceride 27~190mg%, total lipid 400~800 mg%로 나타났다.

Hyperlipoproteinemia에서 가장 흔한 type(Type I, II, IV)를 Parameter 로써 측정된 지질성분결과를 토대로 분리하면 표 3에 나타난 바와 같다.



TYPE-IV. Hyperlipoproteinemia
 Total lipid 1260 mg%
 Cholesterol 152(12.1%)
 Triglyceride 535(42.6%)
 C/T 0.3(0.3~0.7)
 Alpha-LP 75(5.9%)
 Pre-β-LP 1020(81.1%)
 Beta-LP 165(13.0%)
 Beta/Pre-β 0.2(<0.7)

Hyperlipoproteinemia의 Phenotyping을 Agarose gel electrophoresis하여 분리된 분해를 정량측정하고 이를 Parameter로 비교하면 표 4에서 나타난 바와같이 가능하다. 이때 얻어진 α,β,pre-β band는 total lipid의 mg%로 나타냈고 여기에서 β/pre-β比는 高脂蛋白血症의 분류에 더욱 가치있는 가능성을 보이고 있다.

고안 및 결론

Plasma에는 우리몸에 들어있는 Cholesterol의 약 7%가 lipoprotein 형태로 들어있으며, 이중 Atherosclerosis의 주요원인으로 작용한다고 여겨지는 LDL-Cholesterol이 약 2/3 점유하고 있다. LDL량은 주로 LDL-receptor gene의 결함이 있는 경우에 증가하게 되고 일반적으로 우리몸에서 필요한 때는 정상세포에서 Surface receptor가 수시로 만들어지므로 LDL량은 Cholesterol rate의 처리가 잘 되므로 조정가능하다. 예를들면 Hyperlipoproteinemia의 heterozygote의 경우 receptor가 1/2량 生成可能하기 때문에 이에 해당하는 LDL만이 Catabolism으로 처리가능함으로 LDL량은 正常人에 비해 두배 증가한다.

LDL-receptor의 生成에는 여러가지 물질, 즉 Hormone, Metabolic factor가 적용함으로 生成조절되고 있다. 예를들면 갑상선호르몬은 receptor생성을 촉진시

킴으로써 갑상선기능항진증이 있는 경우 Cholesterol Catabolism 으로 처리가 잘 일어나 감소가 있고, 갑상선기능저하 때는 반대현상이 생긴다. 그리고 resin (Cholestyramine 이나 Cholestipol 등)은 이 receptor 생성을 자극하며, 또 Cholesterol 과 bile 의 결합을 일으켜 장에서의 再吸收를 방해함으로 Cholesterol 처리가 잘된다. Enzyme 가운데 HMG Co. A-reductase 는 Cholesterol 생성을 증가시켜 二次的으로 LDL-receptor 생성을 자극하여 이로 인한 Cholesterol 처리를 촉진한다. 반대로 Compactin 은 오히려 上記호소작용을 억제시켜 Cholesterol 合成을 억제시킨다.

대개의 경우 Hypercholesterolemia 를 일으키면서 一次的이거나 二次的인 여러가지 형태의 hyperlipemia 를 일으키고 있다. Type II hyperlipoproteinemia 를 예를 들어보면 二次的인 것은 hypercholesterolemia 를 同伴하면서 metabolic & hormonal disturbance 때문에 이 Secondary type II 를 일으키는 예가 많고 여기에는 Hypothyroidism, Obstructive liver disease, Nephrotic syndrome, Dysproteinemia 등이 原因疾患이다. 一次的 型은 Familial Hypercholesterolemia 중 제일 많은 경우이다.

이때의 특징에서 나타난 바와같이 LDL 농도가 주로 증가함을 볼 수 있다. 더구나 이 경우 임상적 연구결과를 보면 Jensen 보고에서 Type III family 181例중에서 59例(32.5%)가 Coronary heart disease 를 일으키고 Normal cholesterolemia family 150例중에서는 단 2例(1.3%)만이 上記疾患을 일으켰다고 보고하고 있다. 또 Slack 등은 Type III 에서 Ischemic heart disease 발생율이 높다고 하였다. 즉 30歲 以下에서는 5.4%인 것이 30歲以上 60歲 以下에서는 51.4%로 약 10× 증가함을 보이고 있다. 그리고 어린이들에서도 상기 질환에 발병하기 때문에 이를 조기에 발견 예방하기 위해서는 出生直後에 Cord blood 에서 檢體를 채취하여 上記 검사법으로 밝히고 이 병의 解剖學的 病變으로 發達되기 전에 조절함으로써 예방할 수 있다. 따라서 이들 목적으로 좀더 간편 신속하게 검사함으로써 hyperlipoproteinemia 를 screening 할 수 있는 方法들을 비교 선택 제시하였다.

Cholesterol 측정법은 비교적 간단하고 임상검사에 이용하기 가장 알맞는 방법이라고 판단되어 여러가지로 이 방법을 변형화시켜 routine test 로 이용하기 좋은 방법으로 택하였고 다음과 같은 몇가지 점에 대해 관찰하였다.

첫째로 吸光度를 측정하기 위한 波長을 정하는 데 물

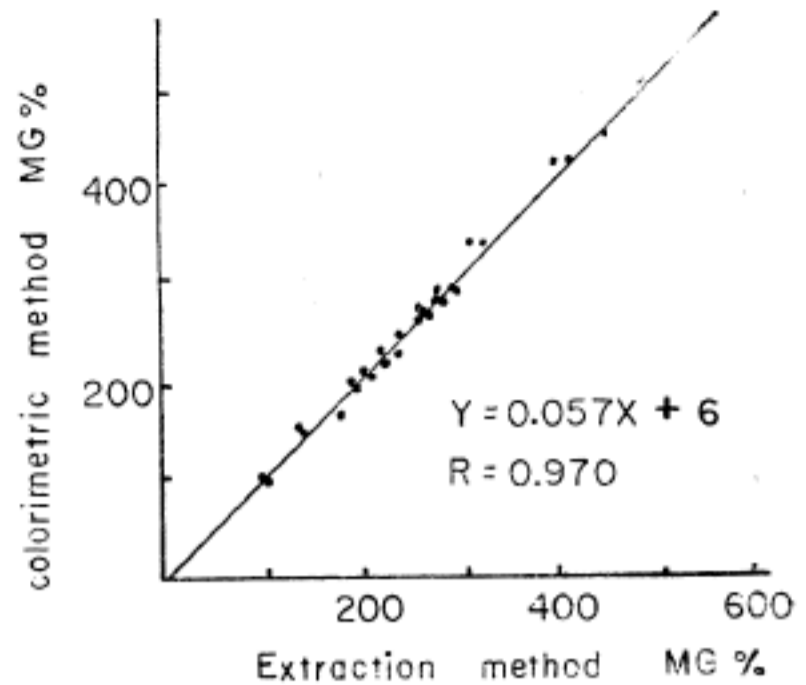


Fig. 1. Comparison of the Colorimetric determination of cholesterol with the extraction method.

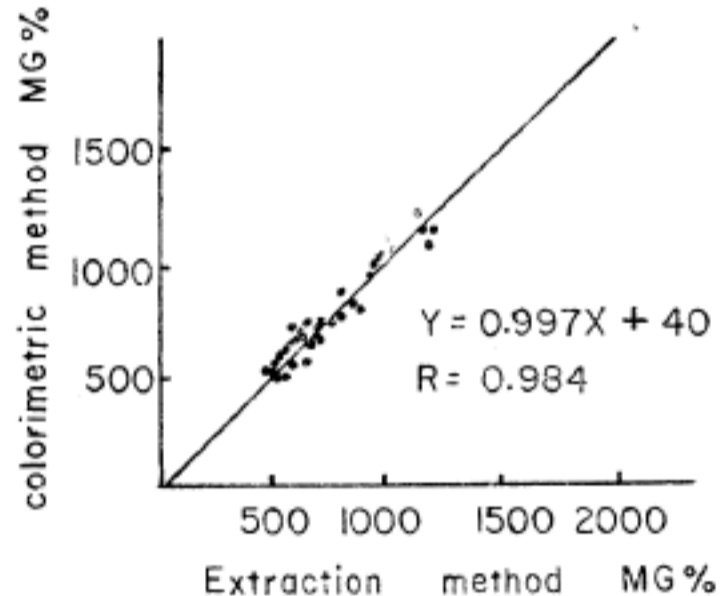


Fig. 2. Comparison with extraction method (Folch) Determination of total lipids.

色反應과정에서 일정시간 간격으로 吸光度측정에 물색된 녹색농도는 파장 607 nm 에서 Peak 로 나타나고 또 반응 온도에 따라 반응시간에 차이가 나타난다. 즉 serum 과 reagent 혼합한 후 0°C에서의 반응속도는 40분에 최고에 이르고, 15°C에서는 30분에, 실온에서는 10분에 최고도에 이르나 온도가 증가함에 따라 吸光度가 10분후에 급속히 하강함을 보였다. 따라서 반응온도는 15°C가 가장 좋은 반응온도이다. 둘째로 出生時에 Cord blood 검체를 조기에 Primary type 을 screening 하기 위해 사용하기 때문에 bilirubin 의 영향을 관찰하여 보면 正常値에서는 거의 없고, 2.5 mg % 이상에서 Cholesterol 측정치에 영향을 미치고 있다. 즉 bilirubin 1 mg % 당 3.6 mg % 씩 증가함으로 보정하여 주어야 한다. 셋째로 본 측정법과 흔히 사용되는

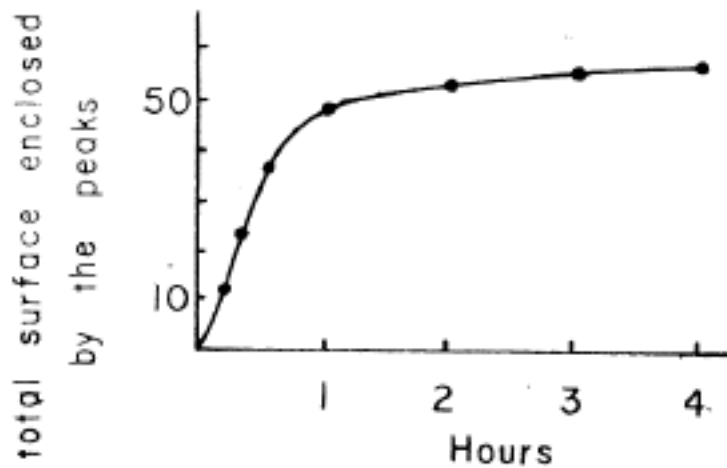


Fig. 3. Total surface(dots) under the peaks(densitometry) of a lipoprotein pattern after increasingly long staining with Sudan Black B.

extraction 법과의 비교는 Fig. 1에서 좋은 관계(상관계수가 0.970)를 보여주고 있다.

Total lipid 측정에서 上記 呈色反應法과 Folch 가 제시한 변법(구출법)과의 비교에서는 Fig. 2.에서 나타난 바와 같이(상관계수, 0.984) 좋은 결과를 보이고 있다.

Triglyceride 측정은 흔히 사용되는 효소법으로 측정 이용하였다.

Lipoprotein electrophoresis 는 사용되는 여러가지 media 가운데 pre- β band와 β -band가 잘 분리되는 agarose gel media 를 사용하는 법을 택하였다. 이때 agarose-gel 은 media 로 사용시에 다음과 같은 장단점이 있다. 즉

① Pre- β 와 β band 사이가 아주 잘 분리된다.

② Media plate 를 만드는 과정에서 시간소모가 크나 만일 검체가 많은 경우 큰 glass plate(20×20 cm)에 만들어 14개 이상의 검체를 적용시키면 오히려 짧은 시간에 검사가능하다.

③ 영동분리후에 고정과정이 아주 간단하다. 50% Ethanol이나 빙초산에 고정하면 되나 Cellulose acetate 사용시는 Barium oxide와 농유산이 들어있는 tank에서 ozone에 의한 산화작용을 일으켜야하는 번거로움이 필요하다.

④ Pre- β 분획과 Sf 12-250 과의 사이에 상관관계가 비교적 양호하게 나타나고 있다.

⑤ Agarose의 농도에 따라서 lipoprotein분획의 분리정도에 다소의 차이가 있기 때문에 적당한 일정농도를 사용하여 media 를 만들어야 한다.

⑥ Buffer solution의 Ionic strength 크기에 따라서 Band의 이동에 영향이 크므로(예, 낮으면 이동이

빠르고 분리되는 거리가 크다) 일정한 크기의 Ionic Strength 를 유지하여야 한다.

⑦ Buffer에 albumin을 첨가하면 분리되는 Band가 넓고 모양의 불규칙성을 제거하여준다(이미 들어있는 metal과 결합하여 lipoprotein의 산화를 방지한다).

⑧ 검체에 어느 일정농도(약 2.5 gm%) agarose를 가하면 분리되는 band를 보다 sharp하게 만든다. 만일 agarose를 첨가하지 않고 영동시간을 길게 한다면 Voltage와 mA를 잘 조절하지 않으면 band가 좁아지고 Crescent shape로 나타난다.

⑨ 특히 pre- β 와 β -band, α -band가 Frederickson 분류법에 따라 가장 흔한 hyperlipoproteinemia의 분류를 위한 lipoprotein의 screening에 아주 중요하다.

고로 Frederickson 분류법에 따라 hyperlipoproteinemia의 phenotyping이 임상생화학적 검사에서의 중요성 때문에 routine test법에서 hyperlipemia의 lipoprotein screening에 보다 빠르고 좋은 방법을 이용한다는 것이 아주 중요한 일이다. 즉 여기에 제시한 네가지 측정법이 일반검사에서의 사용에 가장 빠르고 좋은 방법이라고 사료되며 특히 전기영동에 agarose를 media로 사용할 때 각 fraction, 특히 pre- β 와 β -band를 분리하는 아주 좋은 측정법이라고 말할 수 있다. 앞으로 이상의 제시된 방법중에 사용하는 과정에서 좀더 좋은 점을 가려내어 변법화하는데 노력하여야겠고 우리나라에서의 hyperlipoproteinemia의 발생 빈도와 지역적 type에 따른 분포를 알아내기 위하여 계속 연구하고자 한다.

참 고 문 헌

- 1) LL Abell, DD Levy, BD Brodie and FE Kendall: *J Biol Chem* 195: 357, 1953
- 2) JT Anderson and A Keys: *Clin Chim* 2: 145~1965
- 3) J Dyerberg and N Hjorne: *Clinica Chimica Acta* 28: 203-208, 1970
- 4) M Eggstein and FH Kreutz: *Klin, Wochschr.*, 44: 262 1966
- 5) HS Friedman: *Clin Chim Acta* 19: 291 1968
- 6) DS Frederickson, RS Levy and RS Lees: *New Eng J Med* 276: 34, 94, 148, 215, 273 1967
- 7) Gril KV: *Lab Clin Med* 48 775(1956)
- 8) JA Halsted and Charles H Halsted: 1981, *The*

laboratory in clinical medicine, 2nd ed.

- 9) TC Huang, CP Chen, V Wefler and A raftery: *Anal Chem* 1495 1961
 - 10) AJ Houtsmuller, A Huysson-Haasdyk, A Huy-
sman and E. Rinkel-Van Driel: *Clin. Chim*
Acta 9: 497, 1964
 - 11) J Kohn: *Nature* 186: 312 1961
 - 12) Lees RS and FT Hatch: *J Lab Clin Med* 61:
518 1963
 - 13) RP Noble: *J. Lipid Res.*: 9 693-700(1968)
 - 14) C Pries, CM Van Gent, H Baes, MK Polano,
HAM Hulsman and A Querodo: *Clin Chim*
Acta 19: 181, 1968
 - 15) Ray BR, EO Davidson and HL Crespi.: *J*
Phys Chem 58: 841, 1954
-