梨花醫大誌 : 第 7 卷 · 第 3 號 · 1984
Ewha Med. J. Vol. 7, No. 3, 1984

당뇨병 환자의 혈청 Lipoprotein 에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 생화학교실

홍 영 숙 · 성 낙 응

이화여자대학교 의과대학 내과학교실

경 난 호 · 이 순 남

= ABSTRACT =

Serum Lipoprotein Composition in Diabetes Mellitus

Young-Sook Hong and **Nak-Eung Sung**

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

Nan-Ho Kyung and **Soon-Nam Lee**

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University

Lipoprotein cholesterol and triglyceride levels have been determined in normal and diabetes.

The abnormalities of lipoprotein were investigated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the serum and the 3 major lipoprotein classes for diabetes.

HDL cholesterol levels were lower in the diabetes compared to the normals. VLDL triglyceride levels also elevated in the diabetes.

There were significant shifts in the distribution of lipoprotein cholesterol, with an increase in LDL cholesterol and decrease in HDL cholesterol.

The results of this study suggest that diabetes may be associated with changes in both lipoprotein triglyceride and cholesterol levels.

The electrohoretic patterns of VLDL and HDL in diabetes showed the abnormal pattern in comparison to normal.

서 론

혈청 lipoprotein은 생리학적으로 중요한 작용을 담당하는 triglyceride, phospholipid, cholesterol 및 cholesteryl ester 등의 lipid 화합물을 운반함으로써 각종 대사기능에 관여하는 것으로 알려져 있다[1]. 그러므로 이들 혈청 Lipoprotein 내의 lipid화합물의 조성비율과

혈청 Lipoprotein의 대사기능과는 서로 중요한 관련을 맺고 있다.

혈청 Lipoprotein은 물리·화학적성질에 따라 여러 가지 lipoprotein으로 구분되어지며 보통 밀도 0.92～1.006 g/ml의 lipoprotein을 very low density lipoprotein (이하 VLDL로 약칭), 밀도 1.006～1.063 g/ml의 lipoprotein을 low density lipoprotein (이하 LDL로 약칭), 밀도 1.063～1.21 g/ml의 lipoprotein을 high density lipoprotein (이하 HDL로 약칭)으로 분류한다[2].

혈청 lipoprotein에 관한 연구의 진보에 따라 각종 질환에서 혈청 lipoprotein의 농도가 변화되며 특히 당뇨병과 관련되어 혈청 lipid의 농도가 변화된다는 것을 알게 되었다. 즉 당뇨병환자에서 hypertriglyceridemia가 자주 관찰되며[3] 또한 hypercholesterolmia도 관찰된다는 것이 많은 조사자들에 의해 알려졌다[4][5] 또한 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 각 pattern에서도 특기할 변화가 존재한다는 것이 보고되었다[6][7][8]

이상의 사실들은 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein이 정상인과는 다른 변화된 lipid화합물을 가지며 그러한 변화된 lipid화합물의 조성이 혈청 lipoprotein의 비정상적 기능과 관계됨을 나타내는것이다.

이에 저자는 정상인과 당뇨병환자의 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL 및 HDL을 ultracentrifugation에 의해 분리하여 이들의 protein, triglyceride 및 cholesterol함량을 측정하여 정상인과 비교하고 혈청 lipoprotein의 lipid조성변화를 살펴보기 위해 SDS－polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis에 의해 VLDL, LDL 및 HDL의 electrophoretic pattern과 그 level을 측정하여 당뇨병이 각 lipoprotein에 어떤 영향을 끼쳤는가를 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

A. 실험재료

실험에 사용한 혈청은 이화여자대학교 의과대학 부속병원에서 검사소견이 밝혀진 사람의 혈청을 사용하였다.

당뇨병 환자는 fasting glucose level이 140 mg/dl 이상인 것으로 하였고 정상인은 당뇨병의 증상이 없고 glucose level이 정상값을 나타내는 사람의 혈청을 사용하였다.

B. 실험방법

혈청 lipoprotein은 Havel등[9]의 방법에 따라 Beckman Model L_5－50 초원심분리기를 사용하여 4℃에서 혈청을 원심분리하여 얻었다. VLDL은 혈청 8ml에 0.1% EDTA를 포함하는 0.15M NaCl 3ml를 첨가하여 105,000×g에서 22시간 동안 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 남은 혈청은 153g의 NaCl과 354g의 KBr을 1ℓ에 녹인 혼합수용액 1ml를 혈청 5ml에 첨가하여 밀도를 1.063으로 맞추어 준뒤 다시 105,000×g에서 22시간 동안 원심분리하여 상층액은 LDL로 하층액은 HDL로 사용하였다. 이와같이하여 얻어진 모든 lipoprotein은 0.01% EDTA를 포함하는 0.15M NaCl용액으로 6시간 동안 투석시킨 뒤 sample로 사용하였다.

Whole serum과 각 lipoprotein의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry등[10]의 방법으로 측정하였으며, triglyceride함량은 Handel과 Zilversmit[12]의 방법으로 각각 측정하였다.

또한 이들 lipoprotein의 전기영동적 양상을 살펴보기 위하여 6M urea－7.5% polyacrylamide gel상에서 Laemmli[13] 방법에 따라 전기영동하였으며 coomassie blue로 염색된 polyacrylamide gel들은 520nm에서 scaning하였다.

결 과

A. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 단백질 함량

당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL및 HDL의 단백질 함량은 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 단백질 함량은 정상인에 비하여 의의있는 변화는 없었다. 즉 VLDL의 단백질 함량은 정상인에 비해 당뇨병 환자는 약 20% 증가하였다. LDL에서는 정상인에 비해 약 12% 감소하였고, HDL에서는 약 13% 감소하였다.

B. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 triglyceride 함량.

당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL및

Table 1. Protein concentration in the 3 major lipoprotein classes for diabetic human sera

	Glucose value fasting (mg/dl)	Protein concentration (mg/ml)		
		VLDL	LDL	HDL
Normal	97±11	3.93±0.87	8.96±1.30	9.22±1.70
Diabetic	166±22	4.77±0.95	7.93±2.90	8.08±1.50

HDL의 triglyceride 함량은 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 triglyceride 함량은 정상인에 비하여 VLDL에서는 현저하게 35% 증가하였다. 한편 LDL에서는 10% 감소하였고 HDL에서는 23% 감소하였다.

Table 2. Triglyceride concentration in the 3 major lipoprotein classes for diabetic human sera

	Triglyceride concentration (mg/100ml)		
	VLDL	LDL	HDL
Normal	117±10	43±5	18±2
Diabetic	158± 7	39±4	14±3

Table 3. Cholesterol concentration in the 3 major lipoprotein classes for diabetic human sera

	Cholesterol concentration (mg/100ml)		
	VLDL	LDL	HDL
Normal	41±4	47±7	22±7
Diabetic	18±2	84±8	19±3

C. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 cholesterol 함량.

당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL 및 HDL의 cholesterol함량은 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는바와 같이 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein cholesterol함량은 정상인에 비하여 VLDL에서는 57% 감소하였고 LDL에서는 78% 증가하였으며 HDL에서는 14% 감소하였다.

D. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 SDS-polyacrylamide gel (7.5%) electrophoretic pattern.

SDS-polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis에 의하여 정상인과 당뇨병 환자의 각 혈청에서 원심분리하여 얻은 3가지 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL 및 HDL에서 나타난 전기영동적 양상은 다음과 같다.

혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL 및 HDL을 SDS

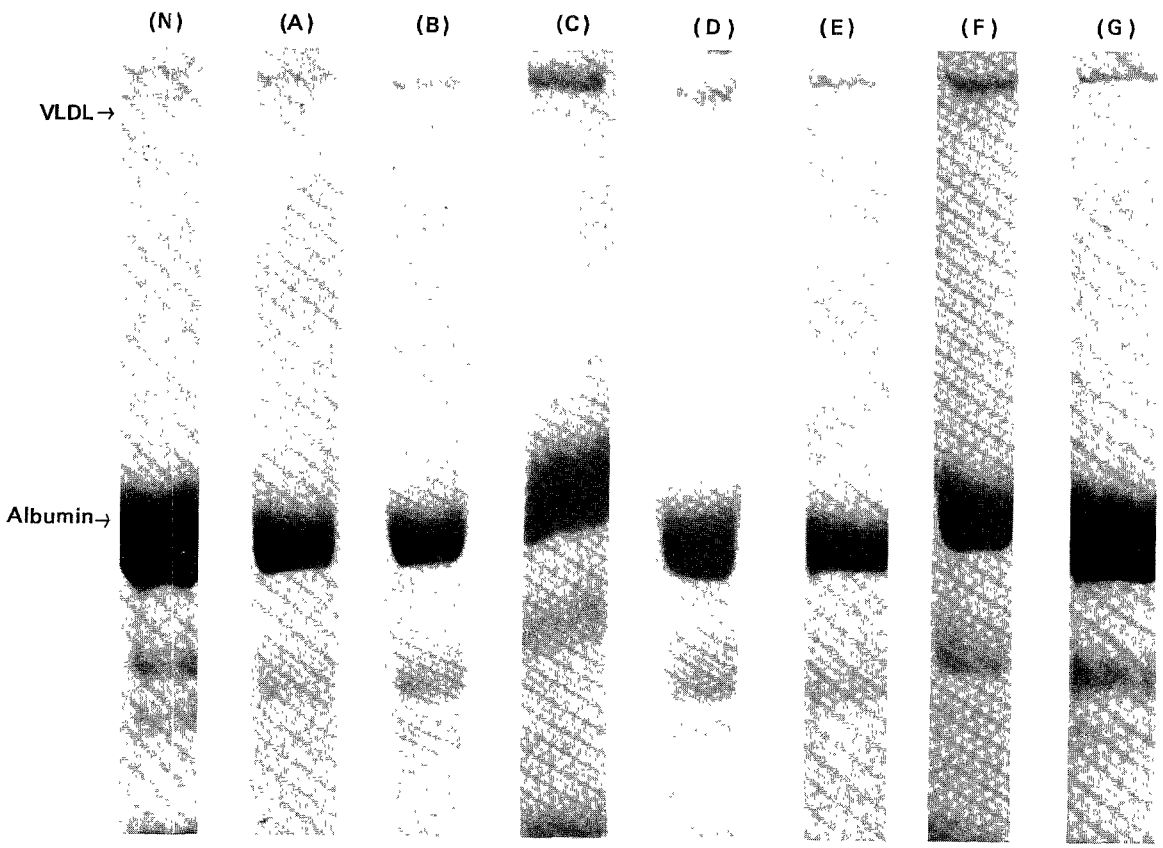

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel (7.5%) electrophoretic pattern of very low density lipoprotein in normal (N) and diabetic human sera (A ~ G).

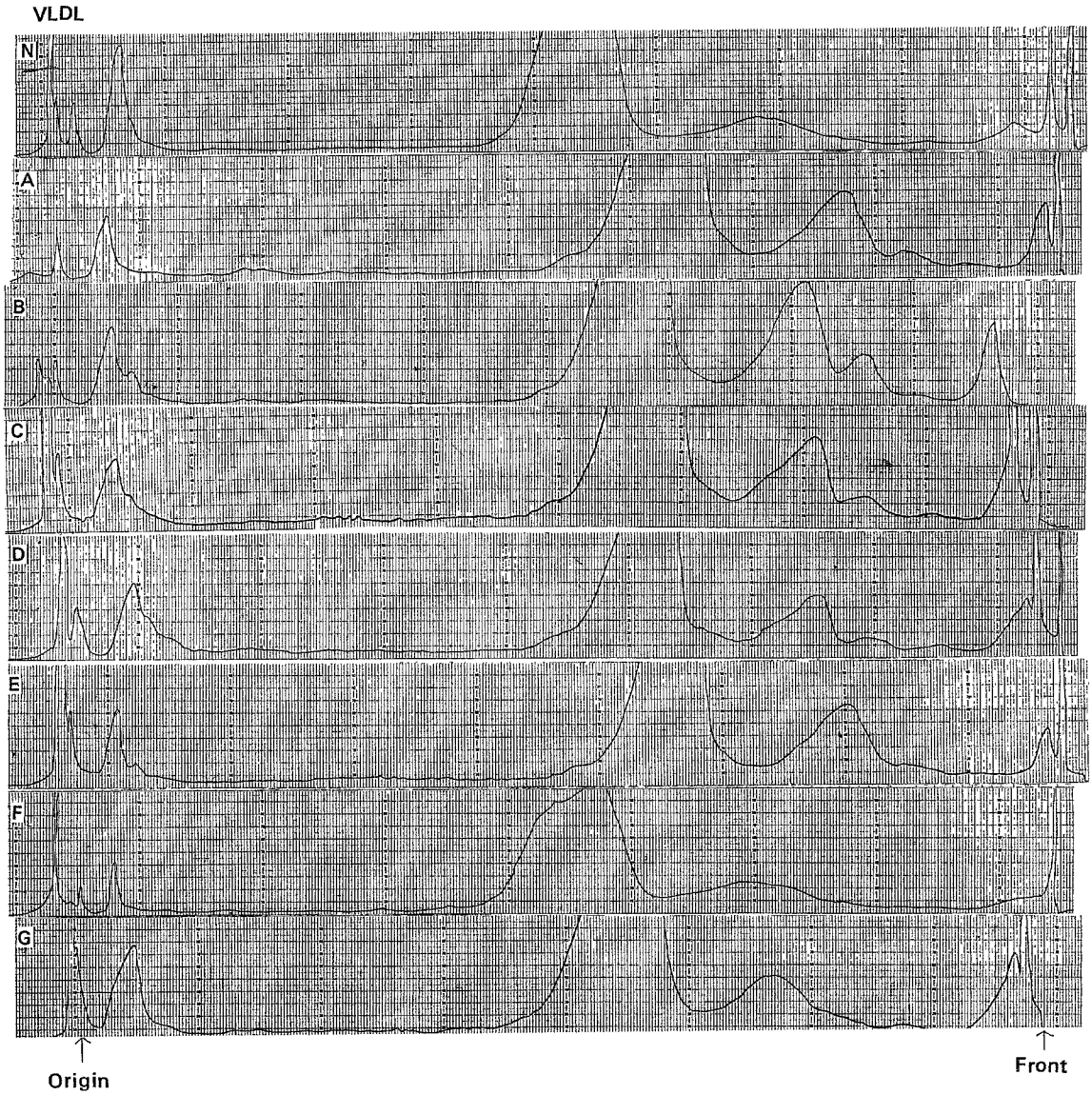

Fig. 2. Densitometric scan of electrophoretic pattern of very low density lipoprotein for normal(N) and diabetic(A~G) human sera.

-polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis 하였을 때 나타난 결과는 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6과 같다.

Fig. 1과 Fig. 2에서 보는바와 같이 정상인의 VLDL의 electrophoretic pattern은 2개의 band로 나타났으며 이에 반해 당뇨병 환자의 A.C.G에서는 1개의 band만이 나타났으며 B.D.E.F에서는 각기 특징적으로 세분화된 1개의 band가 나타났으며 그 크기들은 대체적으로 정상인에 비해 감소하였다.

Fig. 3과 Fig. 4에서 보는바와 같이 정상인의 LDL의 electrophoretic pattern은 5개의 peak를 가진 일련의 band로 나타났으며 이에 반해 당뇨병 환자 A에서는 각 peak의 크기가 현저히 감소되어 나타났고 B에서는 c의 peak크기가 감소되고 d가 이분화된 일련의 band를 나타냈으며 C에서는 b, c, d, e의 peak가 감소된 band를 나타냈으며 D에서는 c와 d의 peak가 증가된 band를 나타냈으며 E, F에서는 a가 특히 증가된 band를 나타냈고 G에서는 a의 크기가 증가

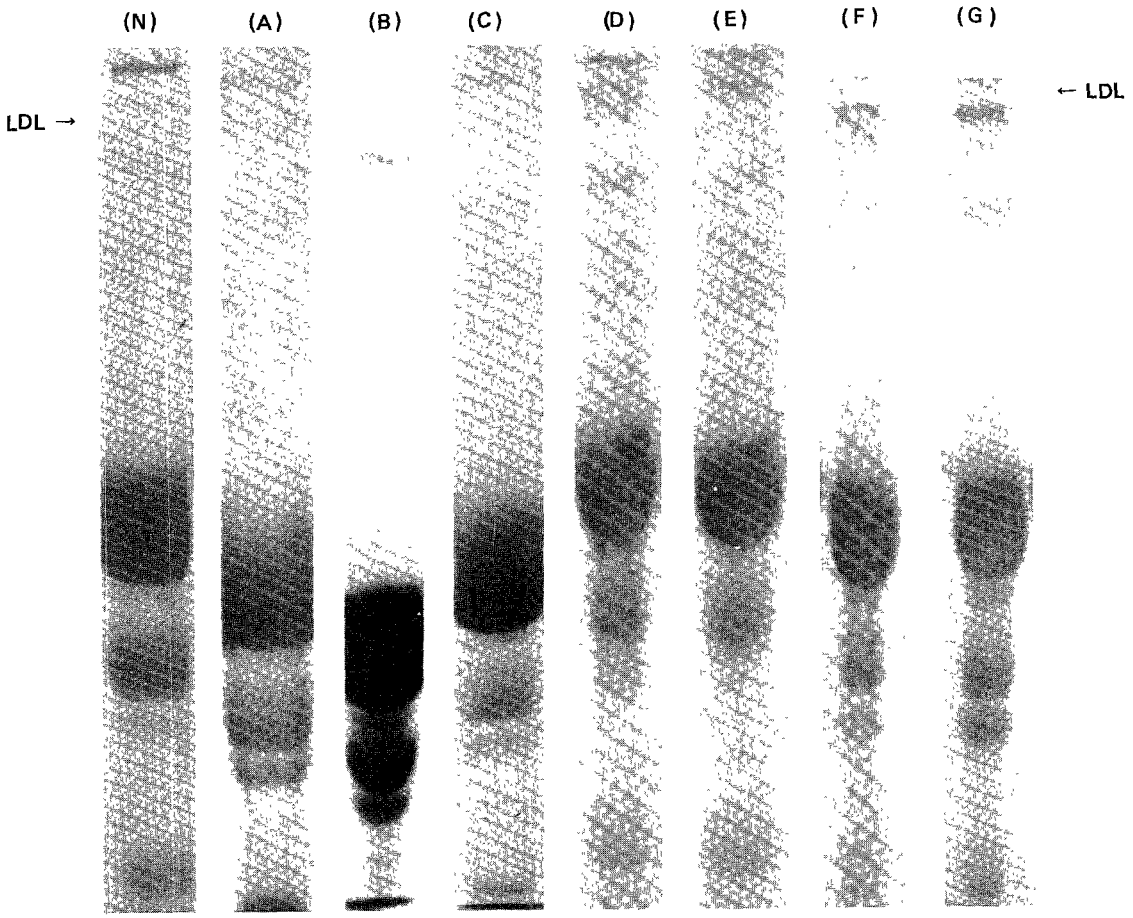

Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel(7.5%) electrophoretic pattern of low density lipoprotein in normal(N) and diabetic human sera(A~G).

되고 b, c가 감소된 band를 나타냈다.

Fig. 5와 Fig. 6에서 보는 바와같이 정상인의 HDL의 electrophoretic pattern은 5개의 특징적인 peak를 가진 일련의 band로 나타났으며 이에 반해 당뇨병 환자 A에서는 a와 b의 크기가 현저히 감소된 band를 나타냈으며 B에서는 e의 크기가 감소된 band를 나타냈으며 C에서는 d의 크기가 증가하고 e peak가 감소된 band를 나타냈으며 D에서는 a, b, e의 크기가 감소되고 반면에 d의 크기가 증가된 band를 나타냈으며 E에서는 a peak가 분리되어 나타났으며 G에서는 b의 크기가 감소된 band를 나타내었다.

이상의 결과와 같이 당뇨병환자의 여러 혈청 lipoprotein의 electrophoresis pattern이 정상인과는 뚜렷하게 변화되어 나타남을 관찰할 수 있었다.

고 찰

A. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 단백질, triglyceride 및 cholesterol 함량.

일찌기 많은 학자들에 의해 당뇨병이 혈청 lipoprotein의 lipid분포에 관련을 가진다는 것을 시사해왔다. Wilson등[14]은 성인 당뇨병 환자의 혈청내 cholesterol과 triglyceride의 농도가 증가되며 이러한 hyperlipidemia의 발생과 혈청 lipoprotein의 비정상성과는 밀접한 관계가 있다고 보고하였다.

또한 Nikkila와 Kekki[15]는 당뇨병 환자의 plasma triglyceride transport kinetics에 대한 연구에서 당뇨병 환자의 plasma내의 지방산이 triglyceride로 전환

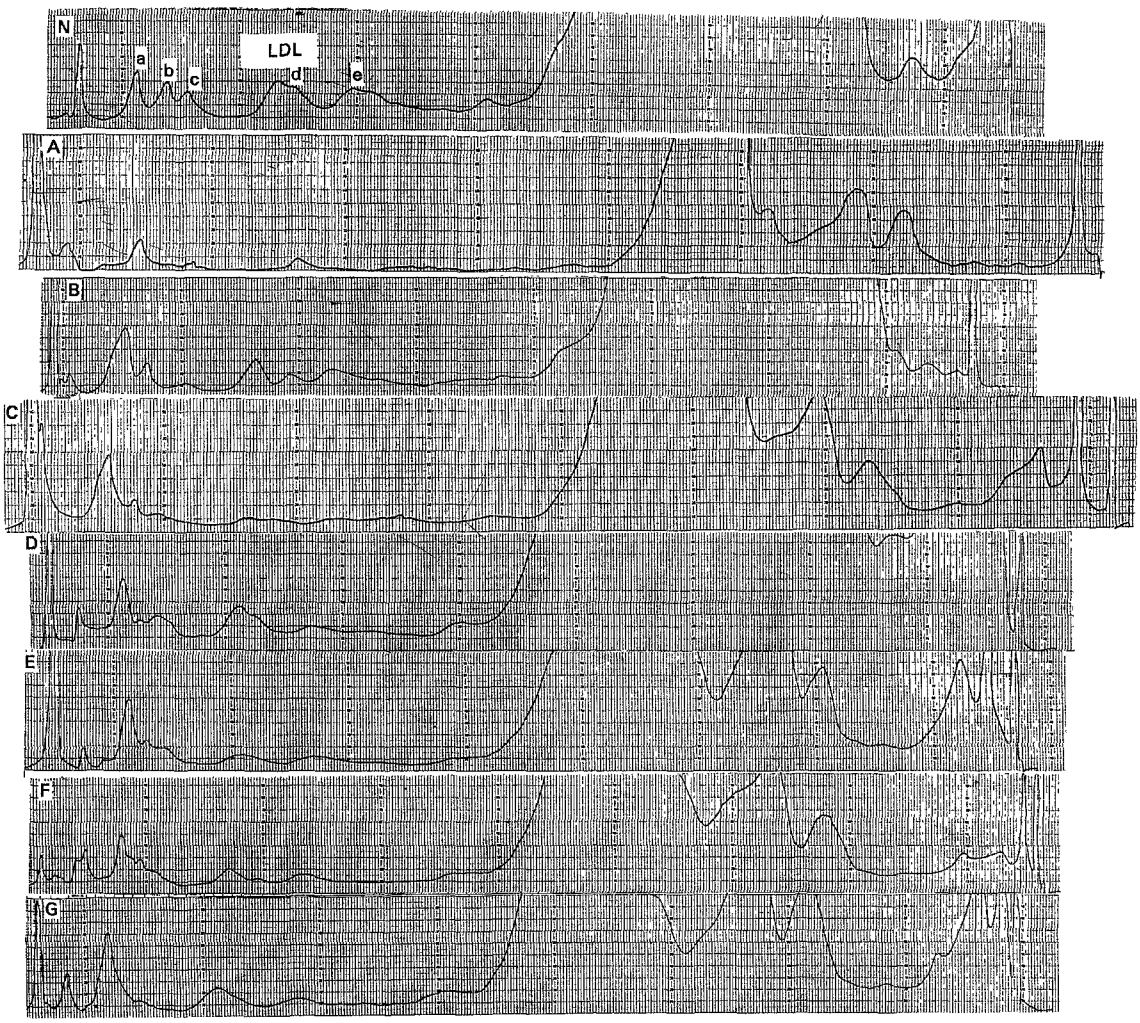

Fig. 4. Densitometric scan of electrophoretic pattern of low density lipoprotein for normal(N) and diabetic (A～G) human sera.

되는 속도가 증가된다고 보고하였다.

한편 Baron등[16]은 실험적으로 흰쥐에게 당뇨병을 유발시켰을때 혈청 lipoprotein인 VLDL, LDL 및 HDL에서 단백질과 triglyceride, cholesterol이 변화된다고 보고하였다.

본 연구의 결과도 당뇨병이 각 lipoprotein의 triglyceride와 cholesterol분포에 관여하고 있음을 나타내고 있다. 즉 대부분의 당뇨병 환자에서 VLDL－triglyceride는 정상인에 비해 증가되었고 LDL－cholesterol은 증가되었으며 HDL－cholesterol은 감소되어 나타났다.

이러한 결과는 다른 보고[17][18]들과도 일치하는 것이며 당뇨병이 혈청의 각 lipoprotein의 triglyceride와 cholesterol분포에 영향을 준다는 것을 확인하는 것이라 하겠다.

B. 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 SDS－polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis.

최근의 많은 보고[19][20][21]들은 여러가지 전기영동법을 이용하여 각종 질환시 혈청 lipoprotein의 electrophoretic pattern이 변화된다고 보고하였으며 일반적으로 혈청 lipoprotein은 전기영동시 특징적인 band양상을 나타내며 각종 질환시 나타나는 band의 양상은 정상인과 뚜렷이 구분되어진다고 알려져 있다.

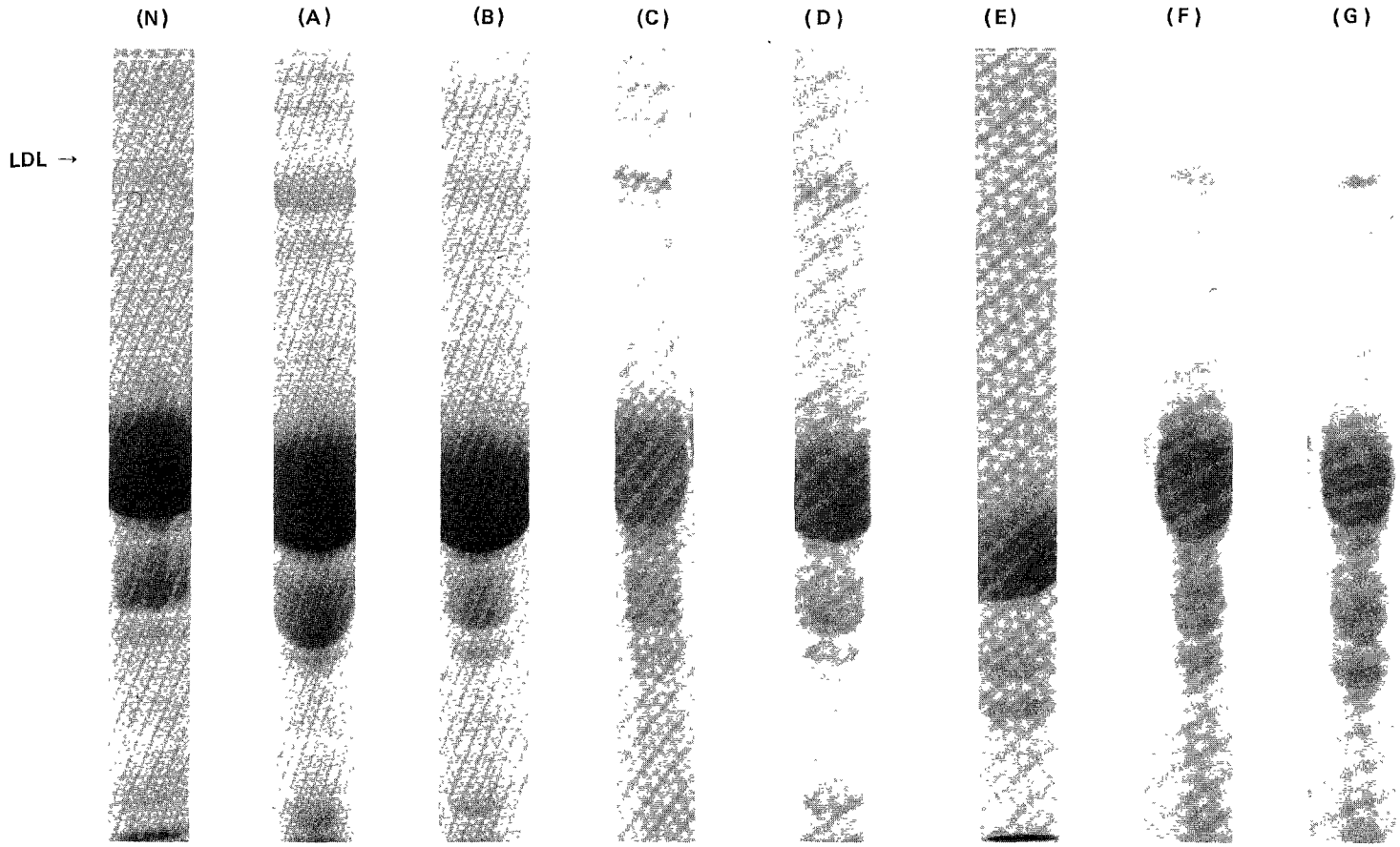

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel(7.5%) electrophoretic pattern of high density lipoprotein in normal(N) and diabetic human sera(A~G).

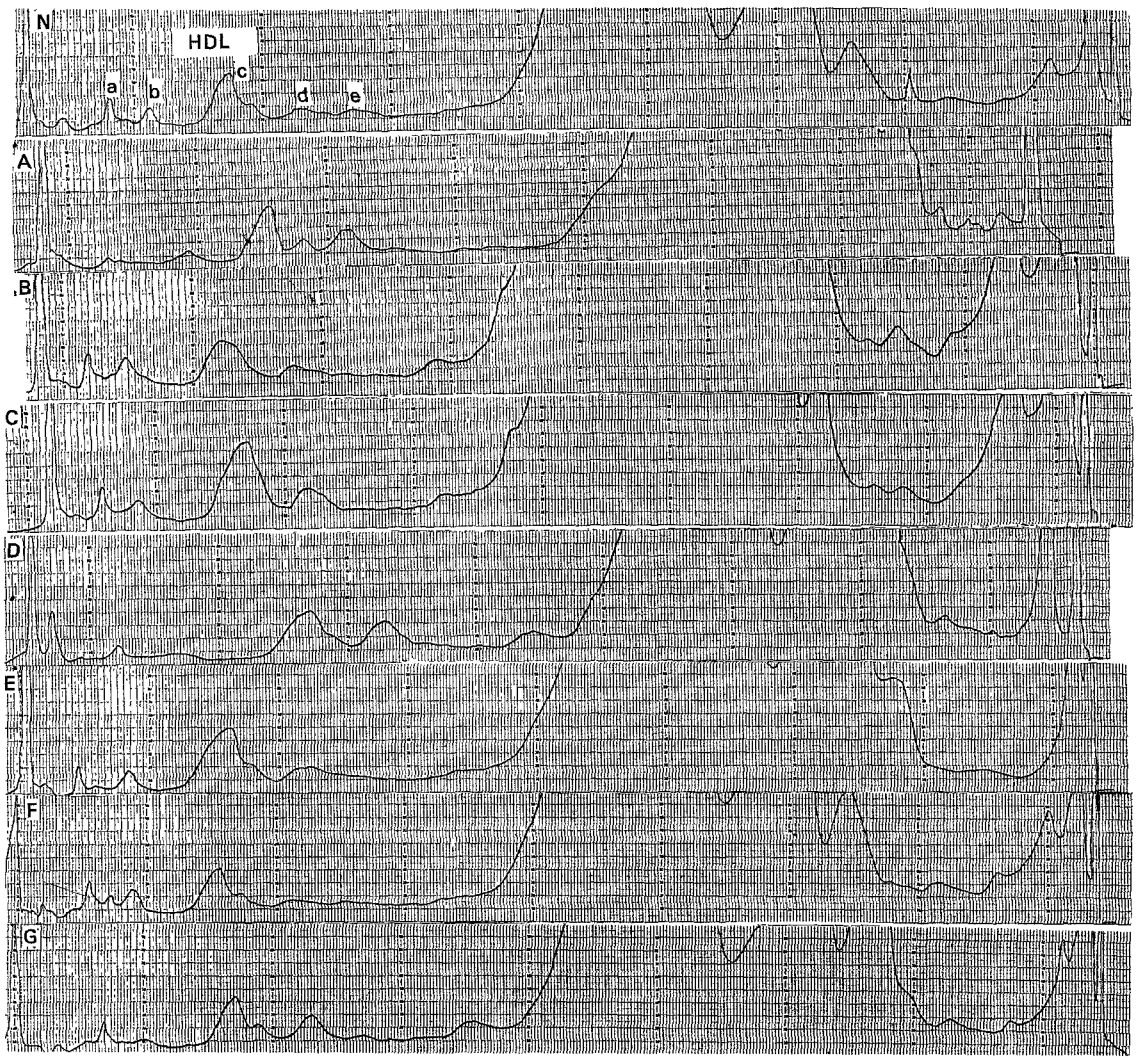

Fig. 6. Densitometric scan of electrophoretic pattern of high density lipoprotein for normal(N) and diabetic (A～G) human sera.

본 실험에서도 SDS－polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis에서 혈청 lipoprotein이 특징적인 band 양상을 나타내며 당뇨병 환자의 band양상이 정상인과 뚜렷이 구분되어짐을 확인하였다. 또한 본 연구의 주요한 목적은 혈청에서 원심분리하여 얻은 각 혈청 lipoprotein의 electrophoretic pattern에서 정상인과 당뇨병에서 어떠한 변화가 있는가를 알기 위한 것으로 정상인의 VLDL의 electrophoretic pattern은 2개의 band로 나타났으나 당뇨병 환자에서는 그 크기가 감소된 1개의 band로 나타났다.

한편 정상인의 LDL의 electrophoretic pattern은 특징적인 5개의 peak를 가진 band로 나타났으나 당뇨병 환자에서는 각 경우마다 특징적으로 peak가 변화된 band를 나타냈다. HDL의 electrophoretic pattern에서도 정상인의 것과는 뚜렷이 구분되어지는 band를 가진 electrophoretic pattern이 당뇨병환자에서 나타났다.

이와같이 각 혈청 lipoprotein의 전기영동적 양상이

변화되었다는 것은 각 lipoprotein 내의 lipid화합물의 분포변화와도 밀접한 관련이 있으며 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 비정상적 대사작용을 증명하는 것이라 하겠다.

결 론

당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein의 단백질, triglyceride 및 cholesterol의 함량 변화와 혈청 lipoprotein을 SDS－polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis한 결과는 다음과 같다.

1) 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein에서의 단백질 함량은 정상인에 비해 약간 증가하는 경향이 있으나 큰 변화는 없었다.

2) 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein에서의 triglyceride 함량은 VLDL 에서는 대부분 증가하였으나 HDL에서는 감소하였고 LDL에서는 큰 변화가 없었다.

3) 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein에서의 cholesterol함량은 LDL에서는 증가하였고 HDL에서는 감소되었다.

4) SDS－polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis한 결과 당뇨병 환자의 혈청 lipoprotein은 정상인과는 다른 electrophoretic pattern을 나타내었다.

정상인의 VLDL의 electrophoretic pattern은 2개의 band로 나타났으나 당뇨병 환자에서는 그 크기가 감소된 1개의 band로 나타났다. 한편 정상인의 LDL의 electrophoretic pattern은 특징적인 5개의 peak를 가진 band로 나타났으나 당뇨병 환자에서는 각 예에 있어 특징적으로 peak가 변화된 band를 나타냈다. HDL의 electrophoretic pattern에서도 정상인의 것과는 뚜렷이 구분되어지는 band를 가진 electrophoretic pattern이 당뇨병 환자에게서 나타났다.

REFERENCES

1) Nichols AV : Functions and interrelationships of different classes of plasma lipoproteins, Proc Nat Acad Sci US, 1969; 64 : 1128－1137.

2) Lehinger AL : Principles of biochemistry, Worth New York. 1982.

3) Schonfeld G, Birge C, Miller JP, Kessler G and Santiago J : Apolipoprotein B levels and altered lipoprotein composition in diabetes. Diabetes 1974; 23 : 827－834.

4) Wilson DE, Schreibman PH, Day VC and Arky RA: Hyperlipidemia in an adult diabetic population, J Chron Dis, 1970; 23 : 501－506.

5) Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T and Kannel WB : Morbidity and mortality in diabetes in the Framingham population, Diabetes, 1974 ; 23 : 105－111.

6) Billimoria JD, Isaacs AJ and Melki K : A lipid and lipoprotein profile of treated and untreated diabetics, Ann Clin Biochem, 1976 ; 13 : 315－321.

7) Eckel RH, Albers JJ, McLean EB, Wahl PW, Bierman EL : High density lipoprotein cholesterol and microangiopathy in juvenile onset diabetes, Diabetes 1978 ; 27 : 447.

8) Howard BV, Savage PJ, Bennion LJ, Bennett PH : Lipoprotein composition in diabetes mellitus, Atherosclerosis, 1978 ; 30 : 153－62.

9) Havel RJ, Eder HA and Bragdon JH : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum J Clin Invest, 1955;34: 1345－1353.

10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RT : Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951 ; 193 : 265－275.

11) Zak B, Dickenman RC, White EG, Burnett H and Cherney RJ : Rapid estimation of free and total cholesterol. Amer J Clin Pathol, 1954 ; 24 : 1307－1315.

12) Handel EU and Zilversmit DB : Micromethod for the direct determination of serum triglycerides, J. Lab Clin Med 1957 ; 50 : 152.

13) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4 Nature, 1970 ; 227 : 680－685.

14) Wilson DE, Schreibman PH, Bay VC and Arry RA : Hyperlipidemia in an adult population, J Chron Dis 1970 ; 23 : 501－506.

15) Nikkild EA and Kekki M : Plasma triglyceride transport kinetics in diabetes mellitus, Metabolism 1973 ; 22 : 1－22.

16) Bar－on H, Roheim PS and Eder HA : Serum lipoproteins and apolipoproteins in rats with streptozotocin－induced diabetes, J Clin Invest 1976 ; 57 : 714－721.

17) Sosenko JM, Breslow JL, Miettinen OS and

Gabbay KH : Hyperglycemia and plasma lipid levels ; A prospective study of young insulin-dependent diabetic patients, New Engl J Med 1980 ; 302 : 650-654.

18) Howard BV, Savage PJ, Bennion LJ and Bennett PH : Lipoprotein composition in diabetes mellitus, Atherosclerosis, 1978 ; 30 : 153-162.

19) Papadopoulos NM and Kintzios JA : Varieties of human serum lipoprotein pattern : Evaluation by agarose gel electrophoresis, Clin Chem 1971 ; 17 : 427-429

20) Frings CS, Foster LB and Lohen PS : Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel, Clin Chem 1971 ; 17 : 111-114.

21) Gros M and Jurman-Gros T : Electrophoretical separation of pre-stained serum lipoproteins on cellulose acetate, agarose gel and polyacrylamide, Clin Chim Acta 1973 ; 45 : 165-167.