

韓國人の異常血色素에 관한 研究

魯 一 協

淑明女子大學校 藥學大學

(Received February 7, 1976)

Ihl-Hyeob Ro (*College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140*): Abnormal Hemoglobin Studies in Koreans

Abstract—Two males and one female in the group of 5020 Korean school children and university students in Seoul and Taejon were found to have a slow hemoglobin to normal hemoglobin A. In all three subjects the slow component migrated at a rate characteristic of the G hemoglobin. By urea-starch-gel electrophoresis in alkaline pH and Chernoff method was demonstrated that another 3 cases of abnormal hemoglobin also were beta-chain variants. This was reconfirmed by hybridization experiment with canine hemoglobin. And the results of family test of 3 cases of abnormal hemoglobin were heterozygous carrier.

東洋에 있어서 異常 Hb 의 分布를 살펴보면 Thailand, Burma, Cambodia 等地는 HbE 가 높은 比率로 分布되어 있고 中國大陸에는 HbH 가, 또 北方大陸에는 HbM 이 많다는 것은 널리 알려져 있으며 日本은 異常 Hb 의 保有頻도가 낮지 않을 것이 豫想된다.

6·25動亂을 契機로 HbS, HbC 의 保有頻도가 높은 黑人兵士와 韓國女性間의 混血兒의 出生等으로 異常 Hb 의 screening test 가 切實히 要望되었다. 著者は 美國 海軍第二醫學研究所(U.S. Naval Medical Research Unit-2)의 Dr. R.Q. Blackwell 와 더불어 1966年 8月 韓國에서 처음으로 大邱地區의 軍人 2110名에 대하여 screening test 한 結果 1名의 異常 Hb 保有者를 發見하여 그 發見地名 및 澱粉電氣泳動實驗結果에 의하여 HbG TAEGU 라고 命名하여 報告^{1,2)}한바 있다.

1968年 著者は 獨自의으로 HbG TAEGU 의 本態를 究明코자 absorption spectrum, alkali denaturation, chain anomaly 및 proband 의 家族調査를 통한 遺傳經路等에 관하여 報告³⁾한 바 있다. HbG TAEGU 는 heterozygot 이며 β -chain anomaly 임이 밝혀졌으며 계속하여 HbG TAEGU

本 研究는 1975年度의 產學協同財團의 研究費支給에 依하여 이루어진 것이며 이에 深謝하는 바입니다.

의 化學構造를 報告⁴⁾한 바 있는데 이에 의하면 β -chain의 22位置의 glutamic acid가 alanine으로 置換되었음이 밝혀졌다.

이때까지 韓國人을 對象으로 한 異常 Hb에 관한 研究는 이것이 始初였으며, 1963年 山岡⁵⁾와 1964年 花田⁶⁾에 의하여 在日僑胞를 대상으로 하여 α -chain 變異型인 Hb FUKUOKA와 Hb KAGOSHIMA가 報告된 바 있었을 뿐이다. 1968年 沈等⁷⁾은 서울地方 居住인 韓國人 男女 8400名에 對하여 檢索試驗한 結果를 報告한 바 있다.

今般 著者는 서울 및 大田地方의 男女學生 5020名에 대하여 異常 Hb의 screening test한 結果, 檢索한 3例의 異常 Hb에 對하여 chainanomaly를 決定한 바 그 結果를 報告코져 한다.

實驗方法

異常 Hb의 檢出法—Hemolysate에 對하여 Smithies vertical starch gel electrophoresis⁸⁾ 및 Blackwell法⁹⁾에 따라 다음과 같이 試驗한다. 電氣泳動用 Robinson starch 75.6g에 Tris-EDTA-borate buffer 560ml를 加한 것을 Erlenmeyer flask에 取하여 振盪하면서 burner上에서 透明하여질 때까지 加熱한다. 透明하게 된 것을 plastic mold (32×6.5cm)에 熱時부어 4~6時間 放置한다. Hemolysate 約 2 μ 를 각 slot에 spotting하여 100V, 4~7mA(3V/cm), 16hrs 電氣泳動시켜 그 移動도에 따라 異常 Hb을 判定한다.

Hemolysate의 調製—血液을 미리 heparin sodium 처리한 容器에 取하여 곧 遠心하여 plasma를 除去하고 赤血球層을 生理食鹽水로 5回 씻어 plasma protein을 完全히 除去한다. 이 洗滌된 赤血球 45ml에 90ml의 蒸溜水와 toluene 40ml를 加하여 振盪混合하고 2日間 -25°에 두었다가 溶血液과 沈澱의 分離가 잘 되도록 同量의 蒸溜水로 稀釋 混合한다. 이것을 4°에서 16,000rpm으로 30分間 遠沈하여 toluene層과 沈澱을 버리고 맑은 上層만 取한다. 對照試驗에 사용하는 正常成人과 어미개(成犬)의 hemolysate도 위와 같은 方法으로 調製한다.

異常Hb의 chainanomaly의 決定—Chernoff法에 약간의 수정을 加하여 다음과 같이 實驗하였다. Cell에는 pH 8.6, 이온強度 0.1의 veronal buffer를, 電極槽에는 28% 飽和 KCl를 사용한다. Starch-gel는 111.40g의 Robinson starch에 pH 8.0의 gel buffer 450ml를 加하여 混合한 다음 70°以下에서 減壓하면서 調製하여 plastic mold에 부어 5~6時間 방치후 사용한다.

Take¹¹⁾法에 따라 만든 globin을, cell-buffer 50ml에 2-mercaptoethanol 0.5ml를 加한 混液에 4g/dl 되도록 溶解하여 遠沈시킨 것 10 μ 를 starch gel slab에 spotting하여 200V, 50mA, 4°에서 16時間, 電氣泳動시켜 그 移動도에 따라 判定한다.

Urea-starch gel electrophoresis—尿素 36.0g (最終尿素濃度 6M)와 Robinson starch 12.50g을 乳鉢에서 잘 混合하여 500ml의 beaker에 넣고 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) 70ml와 2-mercaptoethanol 0.35 μ 를 넣어 잘 부유시켜 500ml의 flask에 옮기고, 70°의 水浴에서 7分間 加熱하여 urea-starch gel을 만든다. 또 Hb濃度 約 3g/dl의 精製된 HbA₁ 및 異常 Hb液 各 20 μ 에 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) 20 μ 및 尿素 30mg(最終濃度 8M)를 加하여 混合溶解시키고 4°에서 하루밤 放置한다. 그 15 μ 를 urea-starch gel의 中央部에 spotting한 다음 15V/cm, 3mA/cm, 4°에서 5時間 電氣泳動시켰다.

Hybridization experiment—Huisman 方法¹²⁾에 準하였으며 Hb濃度 3g/dl의 異常 Hb과, 개의 hemolysate (Hb can) 各各 0.2ml를 混合하고 이것을 二分하여 攪은 0.1 M-acetate buffer (pH 4.7)에서 1日間 透析한 다음, Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1)에 다시 2日間 透

析한다. 나머지 半은 Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1)에서만 2日間 透析시켰다. 電解槽에는 pH 9.0의 boric acid-NaOH buffer 를 넣고 前述한 조건에서 泳動시켰다.

結 果

異常 Hb 의 檢出實驗—Proband 및 正常 hemolysate 에 대하여 Smithies vertical starch gel electrophoresis 한 結果는 Fig. 1과 같다. 便宜上 檢出地名에 따라 Hb SEOUL-(1), (2) 및 Hb TAEJON 이라고 命名한다.

總對象 5020名에 대하여 實驗한 結果, 3例의 異常 Hb 保有者를 檢索하였으며 starch-gel-electrophoresis 結果, 正常 Hb-A 에 뒤따르는 slow-moving hemoglobin 을 가지고 있는 異常 Hb 들이다. 3例의 異常 Hb 들은 서로 거의 같은 移動度를 나타내고 있으며 移動度는 HbG TAEGU 와 類似한 slow-moving hemoglobin 들이다.

參考로 Hb SEOUL-(1)은 實驗當時 國民學校 6學年 男學生, SEOUL-(2)는 大學校 1學年 女學生, Hb TAEJON 은 中學校 1學年 男學生이었다.

異常 Hb 의 Chainanomaly 實驗—A.I. Chernoff 法에 依한 chainanomaly 實驗結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 正常 및 非正常 globin 의 α -chain 은 陰極으로, β -chain 은 陽極으로 移動하였으며 HbG TAEGU

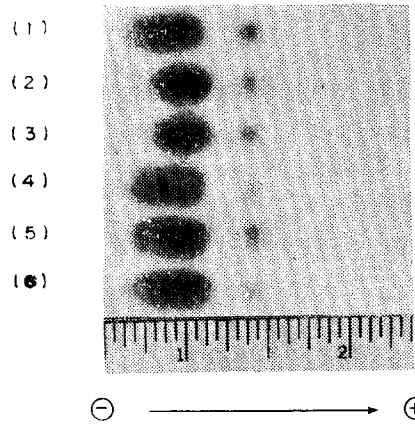


Fig. 1—Starch gel electrophoretic patterns (Tris-EDTA-borate buffer pH 8.9) of hemolysate of normal and proband.

Amidoblack 10B stained.

(1): Hb TAEGU, (2), (3): normal A, (4): Hb SEOUL-1, (5): Hb SEOUL-2, (6): Hb TAEJON.

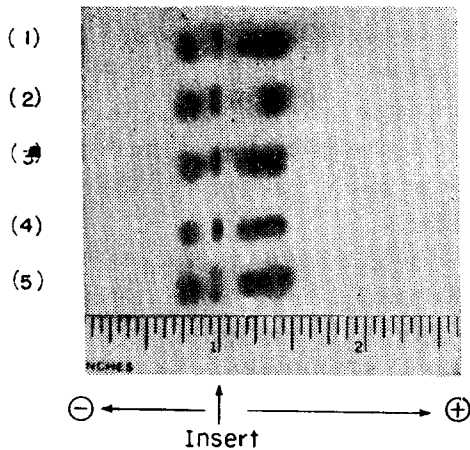


Fig. 2—Vertical starch gel electrophoresis patterns of identifying for chainanomaly of proband's hemolysate.

(1): HbG TAEGU, (2): normal A, (3): Hb SEOUL-1, (4): Hb SEOUL-2 (5): Hb TAEJON

를 비롯하여 Hb SEOUL-(1), (2) 및 Hb TAEJON 은 正常 globin 의 β -chain 보다 차이있게 移動하였다.

Urea-starch electrophoresis 에 依하여 pH 8.1에서 8 M 尿素로 解離시켜 泳動시킨 結果는 Fig. 3과 같이 HbA 에 있어서는 陰極側에 한 個의 band 와, 陽極으로 移動한 2個의 band 가 있으며 Hb SEOUL-(1), (2) 및 Hb TAEJON 은 陰極側은 normal A₁과 같고, 陽極側은 正常 HbA₁의 β^A 보다 빠르면서 正常 A₁에 뒤따르는 band 가 있다.

Hybridization experiment—本實驗의 結果는 Fig. 4와 같다. HbA₁과 Hb can 을 同量 混

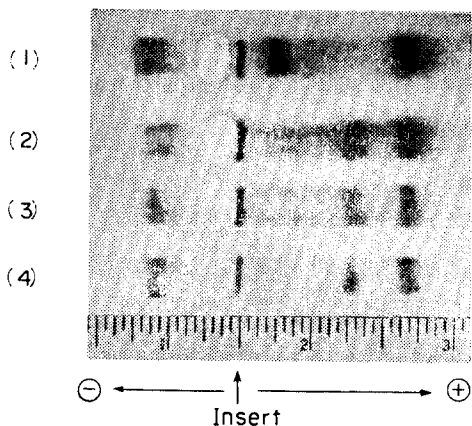


Fig. 3—Urea-mercaptoethanol-tris-EDTA-borate buffer (pH 8.1) starch gel electrophoretic patterns of Hb A₁ and abnormal Hb.

Amidoblack 10 B stained.

(1): Hb A₁, (2): Hb SEOUL-1, (3): Hb SEOUL-2, (4): Hb TAEJON.

합후 pH 4.7의 buffer와 pH 8.1의 buffer에
 透析시킨 混合液 (HbA₁+Hb can hybrid)에서는
 4개의 band 가 있고, 같은 混合液을 pH 8.1의 bu-
 ffer 에서만 透析시킨 것 (HbA₁+Hb can control)

은 HbA₁과 Hb can 에 해당하는 2개의 band 만 나타나 있다. HbA₁+Hb can hybrid에서 생긴
 4개의 band 中에서 2개는 各各 HbA₁과 Hb can 과 一致하는 band 이다. Hb SEOUL-(1), (2) 및
 Hb TAEJON 3例 모두 陽極側에 거의 같은 移動度를 나타내는 2개와 4개의 band 가 있다.

家族關係 調査—前記의 異常 Hb 檢出法에 따라 異常血色素保有者家族에 대하여 調査한 結果
 는 다음과 같다. Hb SEOUL (1) 및 (2)는 모두 어머니로부터, Hb TAEJON 은 兩親 다 死亡하였으
 며 生存하고 있는 兄弟 3名에 對하여 screening test 한 바 1名만이 異常 Hb 保有者인 點으로 보
 아 역시 父母 한쪽에서 遺傳된 heterozygot 이다. Hb SEOUL (1), (2) 및 Hb TAEJON 모두 國民學
 校, 中學校 및 大學校 在學生들이며 外觀上 健康하며 特別한 臨床的 異常이 없다고 한다.

考 察

異常 Hb 의 chainanomaly 를 決定하기 위하여 Hb 에서 globin 을 分離하여 이것에 대하여
 Chernoff 法에 따라 2-mercaptoethanol 를 함유하는 barbital buffer (pH 8.6) 10 μl 를 加하여
 泳動시켰으며 對照로서 正常 globin 의 것과 比較한 結果 β-chain 이라고 할 수 있는 pattern 이다.

다음 urea dissociation electrophoresis 에 의하여 pH 8.1의 8 M 尿素로 解離시킨 다음 Tris-
 EDTA-borate buffer (pH 8.1)를 사용하여 urea-gel 을 만들어 chainanomaly 를 確認한 結果, 3例
 모두 β-chain 이라고 判別할 수 있다.

끝으로 hybridization experiment 에 의하여 再確認하였다. Hb 은 4개의 polypeptide chain 으

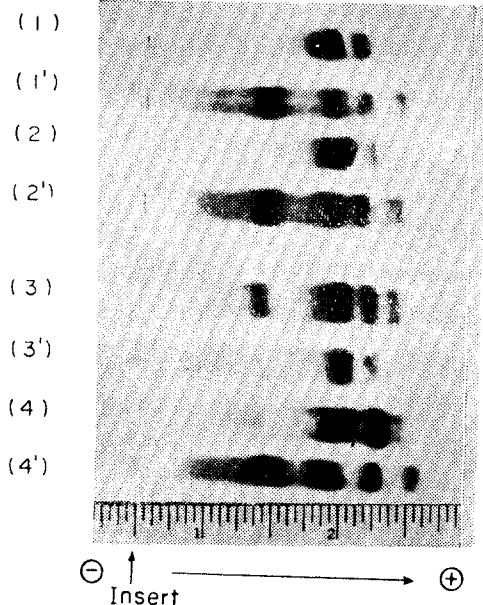


Fig. 4—Starch gel electrophoretic patterns (Tris-EDTA-borate buffer pH 8.1) of hybridization experiments.

Amidoblack 10 B stained.

(1), (1'): Hb SEOUL-1, (2), (2'): Hb SEOUL-2, (3), (3'): Hb TAEJON, (4), (4'): HbG TAEJU

로 된 tetramer로서 pH 4.5~6.5와 pH 11에서 解離하여 주로 dimer로 存在하며, pH 3.5以下와 11.5以上에서 Hb은 變性한다. HbA₁은 $\alpha_2^A\beta_2^A \rightleftharpoons 2\alpha^A\beta^A \rightleftharpoons 2\alpha^A + 2\beta^A$ 와 같이 tetramer, dimer 및 monomer가 相互 平衡狀態에 있으며 pH를 낮추어 주면 平衡은 右側으로 進行하고 中性으로 하여주면 反對로 左側으로 進行되어 $\alpha_2^A\beta_2^A$ 라는 本來의 tetramer로 된다.

HA A₁과 Hb can을 同量 混合하여 pH 4.7의 buffer에서 透析시켜 酸性으로 하면 $\alpha_2^A + \beta_2^A + \alpha_2^{can}\beta_2^{can} \rightarrow 2\alpha^A\beta^A + 2\alpha^{can}\beta^{can} \rightarrow 2\alpha^A + 2\beta^A + 2\alpha^{can} + 2\beta^{can}$ 으로 解離하고 이것을 中和하면 이들各 monomer들은 再結合되어 dimer를 거쳐 tetramer가 形成된다. 이때 形成되는 tetramer의 數는 $2\alpha^A + 2\beta^A + 2\alpha^{can} + 2\beta^{can} \rightarrow \alpha_2^{can}\beta_2^A + \alpha_2^A\beta_2^{can} + \alpha_2^{can}\beta_2^{can} + \alpha_2^A\beta_2^{can}$ 의 네 個가 되며 이中 2個는 本來의 Hb A₁과 Hb can과 같은 tetramer이지만 $\alpha_2^{can}\beta_2^A$ 와 $\alpha_2^A\beta_2^{can}$ 은 새로이 形成된 hybrid tetramer이며 泳動移動도가 各各 다르기 때문에 starch gel 또는 agar gel에서 이것들의 混合物을 電氣 泳動시키면, 陽極으로부터 $\alpha_2^{can}\beta_2^A$, $\alpha_2^A\beta_2^{can}$, $\alpha_2^{can}\beta_2^{can}$ 및 $\alpha_2^A\beta_2^{can}$ 의 順으로 各各 分離된다.

HbG TAEJU (對照), Hb SEOUL-(1), (2) Hb TAEJON과 Hb can, HbA₁과 Hb can을 解離시켰다가 다시 再結合시킴으로서 새로 形成된 hybrid tetramer中 移動도가 느린 것들은 (α^A 와 β^{can} 에서 생긴 것) HbG TAEJU, 其他 Hb SEOUL (1), (2) 및 Hb TAEJON에서나 서로 비슷하지만 移動도가 빠른 것 (α^{can} 과 β^A 에서 생긴 것)들은 서로간에 移動도의 差가 약간 있다. 그中에서 HbG TAEJU의 것이 보다 빠르고 나머지 3例는 大概 비슷한 移動도를 나타내고 있다. 以上の chain-anomaly 試驗結果를 綜合檢討한 結果 Hb SEOUL (1), (2) 및 Hb TAEJON 모두 β -chain 變異型이다.

結 論

男女學生을 對象으로 하여 異常血色素의 檢索試驗, 保有頻度 그리고 檢索된 異常血色素의 變異型을 研究한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 男女學生 5020名의 對象中, 3例의 異常血色素保有者를 檢索하였다. 이 結果에 依하면 過히 높지 않은 約 0.06%의 保有頻度を 나타내고 있다.
2. Hb SEOUL 1 및 2, Hb TAEJON은 HbA 보다 느린 移動도를 나타내는 slow moving hemoglobin들이다.
3. Hb SEOUL 1 및 2, Hb TAEJON은 β -chain 變異型이다.

文 獻

1. R.Q. Blackwell, I.H. Ro, J. T-H Huang and L.C. Chien, *J. Formosan Med. Assoc.*, **55**, 29 (1966).
2. R.Q. Blackwell, I.H. Ro and J. T-H. Huang, *Science*, **158**, 1056 (1967).
3. 魯一協, 淑明女子大學校 論文集, **7**, 377 (1968).
4. R.Q. Blackwell, I.H. Ro, C.S. Liu, H.J. Yang, C.C. Wang and J. T-H. Huang, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **30**, 389 (1970).
5. 山岡憲二, 診療, **10**, 181 (1963).
6. 花田基典, 日本臨床血液協會 symposium, 1964.

7. B.S. Shim, C.S. Kim, S.U. Chon, T.H. Lee, Y.S. Kang and K.J. Hong, *J. Korean Med. Ass.*, **11**, 67 (1968).
8. O. Smithies, *Biochem. J.*, **71**, 585 (1959).
9. R.Q. Blackwell and J. T-H Huang, *Clin. Chem.*, **11**, 106 (1965).
10. A.I. Chernoff and N.M. Pettit, Jr., *Blood*, **24**, 106 (1964).
11. 田家照生, 生化學, **36**, 387 (1964).
12. T.H.J. Huisman, *Adv. Clin. Chem.*, **6**, 231 (1965).