

한국인 Fragile X 환자들의 혈청단백질 구성

대구효성가톨릭대학교 생물교육과

김 종 봉[†]

국문초록: 한국인 일반 정신박약자들의 핵형 및 혈청단백질을 분석한 결과는 다음과 같다. 정신박약자 35명중 3명에서 fragile X 염색체를 발견하였고 그 빈도는 4~15%였다. Fragile X 증후군 환자들의 혈청단백질의 농도는 $5.73 \pm 0.89(g/dl)$ 이었고 albumin과 globulin의 비는 0.86 ± 0.14 이었다. 일반 정신박약자들의 혈청단백질 농도는 $6.83 \pm 0.72(g/dl)$ 이었고 이중 albumin과 globulin의 비는 0.87 ± 0.47 이었다. Fragile X 증후군환자 및 일반정신 박약자들의 혈청단백질 농도 및 albumin과 globulin의 비는 정상인 및 Down 증후군환자들 보다 낮았다.

I. 서 론

Fragile X 증후군은 가계유전을 하는 유전성 정신박약중 가장 높은 빈도를 차지하는 것으로서 특징적으로 X 염색체 장완의 말단부위 Xq 27.3에 응축, 틸, 절단등의 구조이상을 나타낸다^{11,17}. Fragile X 증후군은 Xq 27.3 좌위에 위치한 FMR-1 유전자의 이상 때문인것으로 밝혀졌다. 정상인의 경우 FMR-1 유전자의 5' exon에 있는 CGG repeat의 수가 4~25인데 fragile X 증후군 환자들은 50개 이상의 과잉으로 존재하고 CpG island의 비정상적인 methylation이 X 염색체 말단부위의 구조적 불안정성을 유발하며 비정상적인 FMR-1 유전자의 산물이 fragile X 증후군의 근본원인이 된다^{8,6,17}. 이의 발생 빈도는 남자의 경우 신생아 1,000~2,000명에 1명의 비율을 차지하며 유전양식은 기본적으로 반성유전을 하는 우성형질이나 그 발현은 불규칙성을 나타낸다. 즉 CGG repeat의 수의 증가등으로 인한 돌연변이 FMR-1 유전자를 가지고 있는 남자보인자의 20%와 heterozygote 여자보인자의 50%는 발현되지 않는다. 또한 fragile X 증후군 환자라 할지라도 fragile X

염색체의 발현은 일정치 않아 전혀 관찰되지 않는 경우도 있으며 일반적으로는 그 빈도가 수~수십% 되는 것으로 보고되었다^{11,17,19}. 이와같이 불규칙하고 다양한 발현의 정도나 증세때문에 이의 진단에 어려움을 겪어왔으나 근래 PCR을 이용한 CGG repeat 수의 검색이 가능하여짐에 따라 진단의 정확성이 크게 높아지고 있다. 그러나 유전자의 이상이 어떠한 과정을 거쳐 정신박약등의 증후들을 유발하는지 또한 인체 생리학적 측면에는 어떠한 영향을 끼치는지는 분명하게 밝혀져 있지 않다. 한편 혈청단백질의 구성상태나 혈청 LDH 등의 활성화 등은 질병의 감염, 장기손상 및 영양상태 등의 요인에 따른 인체내의 병태생리적인 상태를 잘 반영하는 것으로 밝혀졌다. 이에 따라 사람들의 혈청단백질에 관한 많은 연구가 이루어 졌고 이를 바탕으로 질병의 감염이나 치료의 예후 판정을 위한 진단기준으로 널리 사용되고 있다^{12,8,9}. 이와같은 점에서 볼때 fragile X 증후군 환자들은 정신박약, 거대고환, 길다란 얼굴등 겉으로 나타나는 증후들 외에도 유전적 결함으로 인하여 내부장기의 구조나 기능의 결함이 생길수도 있고 그러한 경우 이를 생리, 생화학적으로 잘 반영하는 혈청단백질의 구성에 반영될수 있을 것으로 사료된다. 그러나 한국인 fragile X 증후군 환자들에 관한 혈청단백질에 대한 연구는 이루어진 바 없고 환자에게에 대한 분자유전학적 연구 및 환자들에 대한 세포유전학적 연구만 보고되었을 뿐이다². 이러

*논문접수 1996년 3월 6일, 수정재접수 1996년 5월 1일.

*본 연구는 대구효성가톨릭대학교 특별 연구비에 의하여 수행된 연구의 일부임.

[†]별책요청 저자

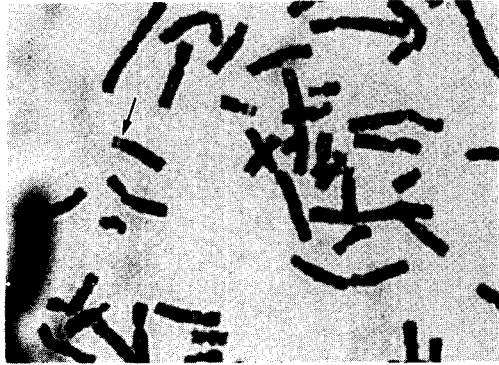


Fig. 1. Metaphase chromosomes. Fragile X chromosome is indicated by arrow.

한 관점에서 본 연구에서는 정신박약자들에 대하여 핵형분석을 실시하여 fragile X 증후군 환자들을 검색하고 이들의 혈청단백질의 구성을 정신박약의 원인이 분명하게 밝혀져 있지 않은 일반 정신박약자들 및 Down 증후군 환자들과 비교 분석하여 FMR-1 유전자의 변이에 따른 혈액 생리학상 특이성이 있는지를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

Fragile X 증후군 환자를 검색하기 위하여 경북 영천의 영광학교, 경주의 경희학교등의 특수학교에 수학하고 있는 정신박약자들을 일차 대상으로 하였다. Down 증후군등 이미 병명이 확인된 사람들은 제외하였고 외모에서 귀가 크고 얼굴이 긴 사람을 일차대상으로 하였다. 남자 22명, 여자 13명으로 부터 혈액을 채취하였으며 이들의 지능지수는 30~80이었다.

핵형 분석

각 대상자로부터 항응고제로 heparin을 사용하여 5~10ml의 혈액을 채혈하여 0.5~1.0ml의 whole blood를 배양하였다. 배지는 염색체 이상의 발현을 높이기 위하여 folic acid, thymidine, hypoxanthin이 결핍된 M배지(Gibco)를 사용하였다. 배지에 4.5%의 fetal calf serum과 penicillin, streptomycin, neomycin을 혼합한 PSN 1%, PHA-M form(1.5ml/100ml)을 첨가하였다. 96시간 배양하였고 X염색체의 q27.3 좌위의 중기세포를 수거하기 위하여 세포를 수거하기전 2시간 전에 0.05µg/ml의 조건으로 colcemid를 처리하였고 공기 건조시켜 염색체 표본을 만들었다. 개개의 염

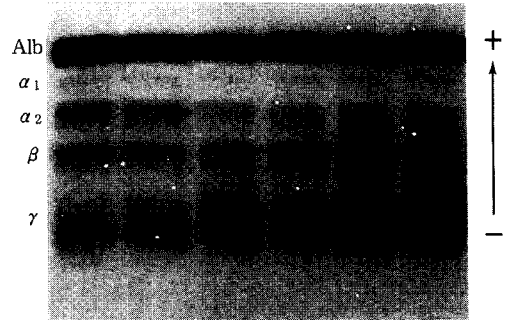


Fig. 2. Electrophoretic patterns of serum protein in mental retardees.

색체를 확인하기 위하여 Seabright¹⁰의 trypsin, giemsa를 사용한 G-banding 방법으로 염색체 분석을 실시하였다. 개인당 100~200개의 세포를 관찰하였으며 이 중에서 관찰한 100개의 중기분열상의 세포중 4개 이상의 세포에서 fragile X 염색체가 관찰된 경우 fragile X 증후군 환자로 간주하였다. 그러나 fragile X 염색체의 구조이상인 분명치 않거나 그 수가 1~2개등으로 적을 경우는 중복 배양을 하여 확인 하였다.

혈청단백질

각 대상자로부터 5~10ml의 혈액을 채혈하여 30분간 3000rpm으로 원심분리하여 분리한 혈청을 시료로 하였다. 혈청단백질의 전기영동은 horizontal cellulose plate electrophoresis system을 이용하였고, 전기영동용 완충액으로 pH 8.6 sodium barbital buffer를 사용하였다. 완충액에 cellulose acetate를 20분간 담구었다가 혈청을 점종한후 180volt에서 20분간 전기영동하였다. Poncau-S용액으로 5분간 염색하였고, 50% acetate acid 용액에 수회 탈색시킨후 37℃의 IOD incubator에 건조시켜 전기영동상을 얻었다. 총 단백질 농도는 clinical refractometer를 사용하여 측정하였다. 혈청단백질의 각 분획별 농도(1)는 얻어진 전기영동상을 525nm에서 densitometer로 scanning하여 총 단백질 농도에 대한 각 분획의 농도를 백분율로 환산 표시하였다.

III. 결 과

핵형 분석

35명의 정신박약자들의 림프구를 배지에 배양하여 핵형을 분석한 결과 모든 대상자들에게서

Table 1. The concentrations of serum protein in patients with fragile X syndrome(g/dl)

Sex	Albumin	Globulin				Total	A/G ratio
		α_1 -fraction	α_2 -fraction	β -fraction	γ -fraction		
Male	3.42	0.17	0.81	0.79	1.41	6.60	1.08
Male	2.69	0.17	0.65	0.67	1.92	6.10	0.79
Female	1.87	0.15	0.64	0.63	1.21	4.40	0.71
Total	2.66±0.63	0.16±0.01	0.70±0.08	0.69±0.04	1.51±0.30	5.73±0.89	0.86±0.14
Mean(%)	45.82±4.37	2.90±0.29	12.34±1.44	12.32±1.32	26.61±4.15	100.00	

Table 2. The concentrations of serum protein in unclassified retarded(g/dl)

Sex	Albumin	Globulin				Total	A/G ratio
		α_1 -fraction	α_2 -fraction	β -fraction	γ -fraction		
mead	3.13±0.52	0.20±0.03	0.77±0.12	0.86±0.16	1.79±0.55	6.80±0.74	0.86±0.62
Male							
%	46.0±5.36	2.89±0.45	11.40±1.80	12.67±2.10	27.00±5.31	100.00	
mead	3.2±0.52	0.19±0.03	0.74±0.16	0.97±0.21	1.77±0.23	6.88±0.08	0.89±0.17
Male							
%	46.60±6.02	2.89±0.45	11.40±1.80	12.67±2.10	27.00±5.31	100.00	
mead	3.16±0.49	0.20±0.03	0.76±0.13	0.90±0.19	1.78±0.46	6.83±0.72	0.87±0.47
Male							
%	46.25±5.62	2.86±0.43	11.18±1.93	13.19±2.42	26.53±4.40	100.00	

염색체 혹은 염색분체 절단이 관찰되었고 개인에 따라서는 dicentric chromosome, acentric chromosome, gap 등의 이상염색체도 관찰되었다. Fragile X 증후군 환자를 판별하기 위해 G-banding 방법으로 이들의 핵형을 분석한 결과 3명의 X 염색체 말단부위에 절단, gap 등의 이상구조가 발견되었고(Fig. 1) 이들의 빈도는 100개의 세포당 4~15개였다.

혈청단백질

Cellulose acetate plate를 이용하여 정신박약자들의 혈청에 대하여 전기영동을 한 결과 albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin, γ -globulin의 5개 분획으로 구분되었다(Fig. 2). Fragile X 증후군 환자의 총혈청 단백질 농도는 5.73±0.89(g/dl)이었고 이 중 albumin이 45.82±4.37%, α_1 -globulin이 2.90±0.29, α_2 -globulin이 12.34±1.44%, β -globulin이 12.32±1.32%, γ -globulin이 26.61±4.15를 차지하였고 albumin과 globulin의 비의 평균은 0.86이었다(Table 1). 또한 일반 정신박약자들의 혈청단백질 농도는 6.83±0.72(g/dl)이었고 이 중 albumin이 46.25±5.62%, α_1 -globulin이 2.86±0.43%, α_2 -globulin이 11.18±1.93%,

β -globulin이 13.19±2.42%, γ -globulin이 26.53±4.40%를 차지하였으며 albumin과 globulin의 비는 0.87±0.47이었다(Table 2). 한편 이들과 비교하기 위하여 같은 연령층에 속하는 Down 증후군 환자 23명의 혈청단백질에 관한 분석을 조사한 결과 Down 증후군 환자의 혈청단백질의 농도는 7.80±1.44이었고 이 중 albumin이 50.19±5.72%, α_1 -globulin이 3.34±1.16, α_2 -globulin이 10.40±2.39%, β -globulin이 12.66±1.18%, γ -globulin이 23.41±6.08%를 차지하였으며 albumin과 globulin의 비는 1.03±0.20이었다(Table 3).

IV. 고 찰

Fragile X 증후군 원인과 관련한 FMR-1 유전자의 돌연변이로서 2가지가 밝혀졌다. 하나는 FMR-1 유전자의 5' 말단에 위치하고 있는 CGG 반복배열수의 증가이고 다른 하나는 CGG 상부의 CpG island의 비정상적인 메틸화이다¹⁸⁾. 이러한 돌연변이는 FMR-1 전사율의 감소 및 염색체 이상을 일으키며 나아가 정신박약 등의 여러가지 fragile X 증후군의 임상적 특징을 유발하는 것으로 알려졌다. 외형적으로 나타난 fragile X 증후

Table 3. The concentrations of serum protein Down's patients(g/dl)

Sex	Albumin	Globulin				Total	A/G ratio
		α_1 -fraction	α_2 -fraction	β -fraction	β -fraction		
mead Male	3.86±0.75	0.26±0.09	0.79±0.19	0.97±0.29	1.83±0.68	7.72±1.46	1.04±1.03
%	50.39±6.02	3.35±1.51	10.43±2.56	12.48±2.05	23.36±6.46	100.00	
mead Male	4.10±0.73	0.29±0.15	0.85±0.10	1.17±0.23	1.99±0.38	8.40±1.35	0.96±0.10
%	48.83±3.40	3.30±1.54	10.23±0.49	13.87±0.96	23.77±3.11	100.00	
mead Male	3.89±0.74	0.26±0.09	0.80±0.18	1.00±0.29	1.85±0.64	7.80±1.44	1.03±0.20
%	50.19±5.72	3.34±1.16	10.40±2.39	12.66±1.18	23.41±6.08	100.00	

* Table 3 is from Ref. 8.

군 환자들의 주요 임상적 특징은 지능장애, 넓은 이마와 돌출된 큰귀, 거대 고환, 자폐증과 착란증, 과민한 행동 등이며 특히 거대 고환은 fragile X 환자의 80% 이상에서 관찰되고 63%에서는 돌출된 귀를 관찰할수 있다고 보고되었다^{5,12)}. 그외에도 fragile X 증후군 환자의 50%가 편평족이며 73%가 증수지(metacarpophalangeal)의 과도 신장을 나타낸다고 보고되었다⁹⁾. 이러한 외형적인 임상적 특징과 관련하여 거대고환은 사춘기에 들어서면서 성선자극호르몬이 정상인보다 과다하게 분비되므로서 발생하며 아울러 갑상선 기능 감퇴증을 수반한다고 보고되었다^{3,14)}. 이러한 연구 결과등을 볼때 fragile X 증후군은 외형적으로 종류나 정도가 다양하게 임상적 특징이 나타남을 알수 있다. 따라서 이의 근본원인이 되는 FMR-1 유전자는 인체의 발생 및 성장과정에서 지적인 능력뿐 아니라 기관들의 형성이나 기능 발현에 직접, 간접적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러므로 인체의 각기관들의 형성과정이나, 기능발현과정 및 조절등이 생리 생화학 적 현상이 밀받침되어 일어나며 혈청단백질의 구성은 체내의 다양한 병리적인 상태를 잘 반영한다는 점과 관련하여 볼때 FMR-1 유전자의 이상이 직접 혈청단백질의 구성에 영향을 끼치지 않는으나 이로 인한 결함이 이차적으로 혈청단백질 구성에 반영될 가능성이 있는것으로 생각된다.

본연구 결과 5.73±0.89(g/dl)의 fragile X 증후군 환자들의 혈청단백질 농도는 6.4~8.0(g/dl)의 정상인 혈청단백질의 농도¹⁹⁾보다 낮고 특히 그 구성비에 있어서 albumin과 globulin의 비가 많은

차이를 나타내었다. 즉 albumin에 비하여 globulin의 양이 많으며 globulin중에서도 γ -globulin이 정상인의 경우 13.4±4.9%를 차지하는데 비하여 fragile X 환자는 26.61±4.15%, 일반 정신박약자들의 경우는 26.53±4.40%를 차지하여 정상인들에 비하여 정신박약자들에서 γ -globulin의 양이 높음을 알수있었다. 이는 Down증후군에서도 같은 경향을 나타내었다. 혈청단백질의 농도가 낮은 것은 간의 이상으로 인한 혈청단백질 합성율의 저하, 소화기관의 흡수를 이상, 영양상태의 불량등의 요인들에 의한다는 보고¹⁹⁾들과 관련하여 볼때 fragile X 증후군 환자들이나 일반적인 박약자들에서 저농도의 혈청단백질도 이러한 요인들에 의한 것으로 추정되나 이들의 장기와 영양상태등에 대한 충분한 조사가 이루어지지 못했기 때문에 확실한 결론을 내릴수 없다. 그러나 γ -globulin을 구성하고 있는 단백질들이 주로 immunoglobulin들이며 Down증후군 환자들에서도 γ -globulin의 농도가 높고 이들이 많은 경우 만성적 간질환을 가지고 있다는 점^{13, 15)}과 관련하여 볼때 본연구에서는 정신박약자들의 간의 이상이 주요 원인일 가능성이 있다. 그러나 연구된 fragile X 증후군 환자들이 3명에 불과하기 때문에 정확한 결론을 얻기 위해서는 더 많은 fragile X 증후군 환자들에 관한 연구가 이루어져야 하며 특히 인체의 각기관의 발달이 연령에 따라서 이루어지기 때문에 FMR-1 유전자의 돌연변이에 따른 이러한 증후군의 발병의 원인을 밝히기 위해서는 유아기와 성장기등 각 연령층에 따른 연구가 이루어져야 할것으로 사료된다.

V. 참고 문헌

1. 서덕규(1993) : 혈청 단백 분획상의 판독법, pp. 123-193, 血清 단백질분획상. 大學書林, 서울.
2. 최수경(1993) : Fragile X 증후군이 있는 한국인 가계의 세포 및 분자유전학적 연구. 박사학위 논문, 동국대학교.
3. Castro-Magana M, Angulo M, Canas A, Shasp A and Fuents B(1988) : Hypothalamic pituitary gonadal axis in boys with primary hypothyroidism and macroorchidism. *J Pediatr*, **112**: 397-402.
4. David JR, Hagerman RS and Eilert RS(1990) : The orthopaedist and fragile X syndrome. *J Bone Joint Surg[Br.]*, **72**: 889-896.
5. Fryns JP, Dereymaeker AM, Hoefnagels M, Volckep and Vanden Berghe H(1986) : Partial fra(x) phenotype with megalotestes in fra(x) negative patients with acquired lesions of the central nervous system. *Am J Med Genet*, **23**: 213-219.
6. Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH. Variation of the CGG repeat at the fragile site results in genetic instability resolution of the Sherman paradox. *Cell*, **67**: 1-20.
7. Hagerman RJ, Altshul-Stark D and McBogg P (1987) : Recurrent Otitis Media in boys with fragile X syndrome. *Am J Dis Child*, **141**: 184-187.
8. Kim JB, Lee WY and Lee HY(1987) : Composition of serum protein and positive rate of HBs Ag in Korean patients with Down's syndrome. *Kor J Zool*, **30(4)**: 371-378.
9. Lee WY and Kim JB(1989) : Studies on the lactic dehydrogenase and alkaline phosphatase of Korean Down's patients. *J. of Basic Sci. Research Institute Hyosung Woman's Uni.*, **3**: 33-40.
10. Moon HR, and Moon SY(1993) : Fragile X chromosome in mentally retarded boys. *J Kor Med Sci*, **8(3)**: 192-196.
11. Opitz JM and Sutherland GR(1984) : Conference report : International workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. *Am J Med Genet*, **84**: 263-266.
12. Reiss AL, Feinstein C and Rosebaumk(1986) : Autism and genetic disorders. *Sc-hizophr Bull*, **12**: 724-738.
13. Rosner, F. K. and P. J. Jervis(1973) : Leukocyte function and serum immunoglobulin in Down's syndrome. *New York state. J of MED*, **73**: 672-675..
14. Rotman A, Assa S, Kauli R and Laron Z(1980) : Prolactin deficiency, obesity and enlarged testes, a new syndrome? *Arch Dis Child*, **55**: 647-649.
15. Salmon, S. E., M. J. Cline, J. Schultz and R. I. Lehrer(1970) : Myeloperoxidase deficiency : Immunologic study of genetic leukocyte defect. *New Eng. J Med*, **282**: 250-253.
16. Seabright M(1971) : A rapid banding technique for human chromosomes *Lancet* **2**: 971-972.
17. Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA and Turner G(1984) : The marker(X) syndrome : A cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet*, **48**: 21- 27.
18. Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH and Thibodeau SN(1993) : Analysis of a CGG Sequence at FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet*, **53**: 1217-1228.
19. Webb T(1989) : The epidermology of fragile X syndrome, pp. 40-55, In : Davies KE(ed). *The fragile X syndrome*. Oxford University Press.

=Abstract=

Composition of Serum Protein in Korean Fragile X Syndrome Patients

Jong-Bong Kim[†]

Dept. of Biology Education, Catholic University of Taegu Hyosung, Kyongsan 712-702

The karyotype and the concentration of serum protein were investigated in Korean unclassified mental retardedees. The results were as follows. Fragile X chromosomes were identified in three patients, and the frequencies of fragile X chromosome were 4~15%. The concentration of serum protein was $5.73 \pm 0.89(\text{g/dl})$, and the A/G ratio was 0.86 ± 0.14 in fragile X syndrome patients. The concentration of serum protein was $6.83 \pm 0.72(\text{g/dl})$, and the A/G ratio was 0.87 ± 0.17 unclassified mental retardedees. The results revealed that the level of globulin concentration and A/G ratio in fragile X syndrome patients and unclassified mental retardedees were lower than in normal group and Down's patients.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(1): 129-134, June 1996]

[†]Corresponding author