대한임상검사학회지 : 38권 제3호, 179-183, 2006

모근 DNA를 이용한 한국인의 ApoE 유전자형 검사

원광보건대학 임상병리과[1], 한국디엔에이밸리[2]

김 종 호[1] · 정 미 라[1] · 박 상 호[2]

ApoE Allele Test in Korean with Hair Root DNA

Chong-Ho Kim[1], Mi-Ra Jung[1], and Sang-Ho Park[2]

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea[1]
Korea DNA Valley, Seoul 130-805, Korea[2]

Alzheimer's disease (AD) is characterised neuropathologically by the accumulation of neuritic plaques and neurofibrillary tangles as well as by cerebrovascular amyloid deposition and neuronal cell loss. Current advances have shown the apolipoproteinE-epsilon 4 (ApoE4) allele to be highly associated with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease (AD) in Western populations. The association of ApoE allele frequencies and dementia remains unknown in populations from many countries. We recently initiated a project to examine ApoE frequencies in non-demented healthy Koreans. Genomic DNA in hair root from a thousand persons was collected and ApoE gene type was investigated with the methods of polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism. A group of a thousand non-demented Koreans over the age of 40 years were found to be positive in 15.7% of the cases for ApoE4. AD and ApoE4 were closely related. ApoE epsilon 4 was a dangerous factor of AD and ApoE 4 allele made a contribution to the heterogenicity of AD.

Key words : Alzheimer, Allele, ApoE4, PCR

I. 서 론

노년층에서 가장 흔히 관찰되는 퇴행성 뇌 질환인 노인성 치매는 심장병, 암, 뇌졸중에 이어 4대 주요 사인에 속함과 동시에 가장 대표적인 신경정신장애의 하나이다. 치매는 뇌의 신경세포가 손상되어 기억이나 판단능력 및 사회생활 전반에 걸려 장애가 생기는 병으로 뇌의 신경조직이 손상되는 병이다. 치매는 다른 노인성 질환에 비하여 치료 가능성이 매우 낮으며, 집중적이고 장기적인 치료를 필요로 한다. 치매 노인의 부양 부담은 암 환자를 부양하는 것보다 부양부담이 더 크다는 연구결과(Brody, 1985)를 보더라도 치매는 환자 자신은 물론 그 가족들의 삶의 질을 가장 심하게 어렵게 하는 질환이므로 국민 복지를 위하여 최우선으로 해결해야 할 보건문제이다. 퇴행성 신경질환으로 인하여 치매를 유발하는 대표적인 질환인 알쯔하이머병(Alzheimer's disease, AD)에 대한 유전적 원인에 관한 연구가 수행되고있다(방 등, 2000; 한설희, 2001). 알쯔하이머형 치매의 발병 및 질병의 진전은 유전인자와 관련되어 있다고 알려지고 있으며, 발병초기 단계

교신저자: 김종호, (우)570-750 전북 익산시 신용동 344-2
Tel.: 063-840-1213, 011-650-2165
E-mail: chkim@wkhc.ac.kr

에 있어서는 14번 염색체에 존재하는 Presenilin-1 과 Presenilin-2의 이상 변이에 의하여 유발되고 치매의 후기 단계에 관련된 유전적 요인으로서는 일반적으로 신경세포를 발달시키고 혈류에서 콜레스테롤 운반체로서의 역할을 한다고 알려진 19번 염색체에 존재하는 ApoE 유전자로 알려졌다. ApoE는 2, 3, 그리고 4의 세 종류가 존재하는데 그중 ApoE4는 β-amyloid을 축적시키며 neurofibrillary tangles을 형성시키면서 치매를 유발하는 역할을 한다. 곧 치매환자의 약 40%가 ApoE4를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 현재의 치매 연구는 그 특성을 밝혀내는 데 초점을 맞추고 있다. 아포지단백은 지방 운반 물질에 해당되는데, 이는 중추 및 말초 신경계의 손상 후 지방 대사를 조절하는 핵심적 역할을 한다(Boyles 등, 1989; Poirier 등, 1991). 이와 같은 아포지단백을 발현하는 ApoE 유전자에는 다형성이 존재하는데, 이 유전자의 다형성은 알쯔하이머 병의 유병률에 영향을 준다고 보고되고 있다. 서양에서는 알쯔하이머 환자의 대략 70%에서 최소한 하나의 Apo E4 대립유전자를 갖고 있다고 보고되었고 (Roses, 1996), 또한 ApoE4/E4 유전자형을 가진 치매환자의 94%가 병리학적으로 알쯔하이머병이라고 진단된다(Roses, 1995). 이러한 연구결과는 Apo E 유전자형 검사가 알쯔하이머병의 임상적 진단에 도움이 될 수 있으며, 그 진단적 가치와 더불어 감별 진단적 가치를 지니고 있는 것으로 보고되고 있다 (방 등, 2000).

본 연구에서는 우리나라에 실제 거주하는 주민 1000명을 대상으로 미국이나 다른 선진국에서 실시되고 있는 ApoE의 유전자형 검사를 실시하여, 치매 고 위험군의 유형을 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

본 연구의 대상자 선정은 한국인으로서 40세 이상이며, 전문인으로부터 치매 유전자 검사에 대한 전반적인 설명을 듣고 충분히 이해하고 본인이 검사동의서에 서명을 한 사람을 대상으로 하였다. 유전자 검사에 앞서 대상자들이 알쯔하이머병을 유발시킬 수 있는 기타요인을 가지고 있는지 알아보기 위하여 개인면담을 실시하였다. 생년월일, 성별, 주거가족, 친구유무, 취미유무 등에 대한 일반적인 인구학적 자료, 치매 가족력의 유무에 대한 자료, 질환유무에 대한 자료 등 각 개인상황에 대한 자료들을 수집하였다.

2. Genomic DNA 분리

검사 대상자로부터 모근이 포함된 머리카락 다섯 가닥을 채취하여 샘플 용기에 담아 실험실로 옮긴 후 5% Chelex 100(Bio-Rad, USA) 100 μL와 ProteinaseK (Bioneer, Korea) 1.5 μL를 첨가하여 55℃에서 1시간동안 반응하여 모근을 파괴하였다. Genomic DNA를 분리하기 위하여 95℃에서 10분간 끓인 후 10분간 4℃에서 항온 후 4,000× g에서 10분간 원심분리하여 분리하였다.

3. ApoE 유전자형 검사

추출된 genomic DNA는 중합효소연쇄반응법을 시행하였다 (Wenham 등, 1991). Primer는 sense: 5'-TCGGCC GCAGGGCGCTGATGGAC-3', antisense: 5'-CCCAGG CGCTCGCGGATGGCGC-3'을 사용하였다. 시험조건은 PCR에서 첫째 cycle은 95℃에서 2분 동안 pre-denaturation 하였고, 95℃에서 20초 동안 denaturation, 68℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분간 extention의 조건하에서 40회 반복한 다음 72℃에서 3분 동안 최종적으로 post-extention을 thermal cycler를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응에 의해 생성된 물질을 37℃에서 5시간 동안 제한 효소인 10 U *Hha*I(Takara, Japan)과 같이 반응시켰다.

4. Agarose gel 전기영동

증류수 90 mL에 agarose 3.5 g을 가하고 microwave heater에서 용해 한 후 10X TBE buffer(pH, 8.0, tris base 121g, boric acid 61.7g, EDTA 7.44g) 10 mL과 20 mg/mL ethidium bromide 10 μL를 혼합하고 gel을 만들었다. 제한 효소처리가 완료된 샘플 10 μL을 100V에서 1시간 동안 전기영동하여 UV-illuminator(Vision, Korea)에 놓고 대립유전자를 식별하였다.

III. 결 과

치매 유전자 검사를 받은 대상자는 남성 330명과 여성 670명으로 그들의 성별 및 연령대 분포는 Table 1과 같다.

Table 1. Comparison of sex and age in Korean (Man, M=330, Woman, W=670) tested ApoE gene polymorphism

Age	Number (M/W)	Ratio(%)
40～49	290 (93/197)	29
50～59	628 (212/416)	62.8
60 and over	82 (25/57)	8.2

연령대별로 보면 40세에서 49세까지는 29%, 50세에서 59세까지는 62.8%, 그리고 60세 이상은 8.2%로 나타나 50대가 치매 유전자 검사에 가장 관심이 높은 것으로 나타났고, 다음으로 40대, 60대 순이었다. 50대에 들어서면서 기억력의 감퇴나 신체적 기능의 감퇴 등을 현실적으로 경험하기 때문에 자신의 건강에 관심도가 높아지는 것으로 분석된다. 또한 검사대상자들은 검사에 대한 설명을 듣고 이해할 수 있었으며, 독립적인 생활에 장애가 거의 없었다.

치매 유전자 검사에 앞서 조사한 고혈압과 관련된 질환을 가진 대상자는 329명으로 전체의 약 32.9%을 차지하였고, 이들은 Table 2에 나타난 바와 같이 50～59세에서 67.4%로 빈도수가 가장 높고, 다음이 40～49세로 21.0%로 나타났다. 또한 당뇨병 질환을 가진 대상자는 119명으로 11.9%를 차지하였으며, 연령별 분포도를 보면 40대에서 16%, 50대에서 56%, 60대가 12%로 아래 Table 3과 같다.

Table 2. Distribution of hypertensive man (M) and woman (W) in populations tested gene

Age	Number (M/W)	Ratio(%)
40～49	69 (28/41)	21.0
50～59	222 (73/149)	67.4
60 and over	38 (9/27)	11.6

Table 3. Distribution of diabetics in man (M) and woman (W) tested gene

Age	Number (M/W)	Ratio(%)
40～49	19 (15/4)	16
50～59	88 (40/48)	56
60 and over	12 (2/10)	12

본 연구의 검사 대상자 100명 중 ApoE 유전자의 분석 결과는 Table 4와 같으며, 각 대립유전자형에 대한 유형은 Fig 1에 나타난다. ApoE4 유전자를 가진 대상자는 총 157명으로 15.7%이었으며, ApoE-E4/E4 유형을 가진 대상자는 3명으로 0.3%를 나타냈다.

Table 4. Analysis of gene types in Korean tested ApoE

Gene Type	Number (%)
E3/E3	801 (80.1%)
E2/E3	39 (3.9%)
E2/E2	3 (0.3%)
E3/E4	146 (14.6%)
E2/E4	8 (0.8%)
E4/E4	3 (0.3%)

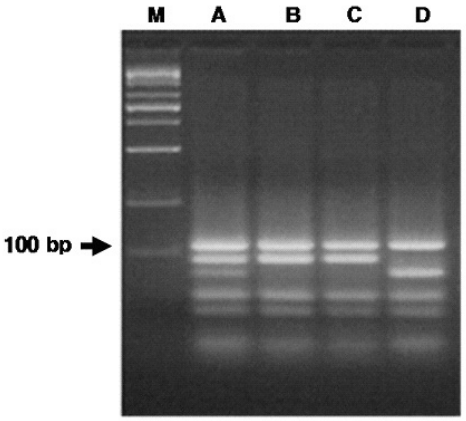

Fig. 1. Amplification product of DNA by PCR of ApoE gene genetypes of E3/E4 (1), E3/E3 (2,3), E4/E4(4), and Marker (M)

알쯔하이머성 치매의 대부분을 차지하는 산발성 후기 치매의 경우 ApoE의 유전형질 구성에 따라 발병률에 높은 관련성이 있다고 보고되었다(방 등, 2000). 즉, ApoE 유전자는 산발적인 퇴행성 알츠하이머 질환의 위험인자인 유전인자이다. 또한 apoE 단백질은 299개의 아미노산으로 이루어져 있으며 콜레스테롤과 트리글리세라이드 대사에 중요한 역할을 한다. 이 단백질을 발현하는 ApoE 유전자는 19q12 -q13 염색체에 존재하며 E2, E3, E4의 3가지 대립 유전자 형태를 취한다. ApoE-E4 대립유전자는 알쯔하이머병의 위험인자로 작용하여 발병 가능성을 높인다는 보고가 있었으며 한국인 알쯔하이머 환자에서도

ApoE -E4의 빈도가 정상 노인에 비해 높다는 연구들이 보고된 바 있다(Saunders 등, 1993; Kim 등, 1999; 방 등, 2000). 검사대상자 1000명 중 ApoE4 유전자를 가진 157명은 알쯔하이머병 유발의 가능성을 배제할 수 없으므로 차후에 관리 프로그램의 참여를 유도시켜 지속적으로 관리할 필요성이 있다. 검사 대상자 중 고혈압이나 뇌졸중, 심장질환을 가지고 있어 약을 복용하고 있는 사람 중 Apo-E4 유전자를 소유한 대상자는 45명으로 나타났고, 또한 당뇨병을 앓고 있는 사람 중에 Apo-E4 유전자를 소유한 사람은 18명으로 나타났다. AoE4가 알쯔하이머병을 증가시키는 기전은 Amyloid precursor 단백질이 대사에 관여한다는 가설(Racchi 등, 1997)을 비롯하여, β-아밀로이드 축적의 증가에 의한다는 가설(Koudinova 등, 1996), 신경세포 손상 후 회복기능의 저하에 의한다는 가설(Poirier, 1994) choline- acetyl-transferase 활성도의 변화를 유도한다는 가설(Poirier 등, 1995), 그리고 ApoE4가 콜레스테롤 대사에 영향을 미친다는 가설(Jarvik 등, 1995) 등 다양하게 제시되고 있다. 또한 E4 대립 유전자를 가진 사람들은 E3를 가진 사람에 비해 총콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤의 혈중 농도가 높으며 ε4 대립유전자를 가진 사람들은 가지지 않은 사람에 비해 관상동맥 질환의 위험성이 높은 것으로 알려져 있다(손 등, 2003). 그리고 고혈압이나 당뇨병, 고콜레스테롤혈증 등과 같은 혈관성 위험 인자들은 혈관성 치매뿐 아니라 알쯔하이머성 치매 발병과도 연관성이 있다는 연구보고가 있으므로(Elias 등, 2000), 본 연구에서 발견된 고혈압이나 당뇨 질환을 가진 대상자들을 계속적으로 관리할 집중 치매예방 및 관리 프로그램의 개발이 필요하다.

IV. 고 찰

본 연구에서 치매 유전자 검사를 한 결과 1000명 중 15.7%에 해당하는 157명이 알쯔하이머성 치매의 발병 가능성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 유전자에 따라 이들의 유형은 우선 ApoE-E4 대립유전자 하나를 가진 집단과 E4 대립유전자를 둘 다 가진 집단으로 나누어진다. 두 집단 중 대립유전자를 둘 다 가진 집단은 하나를 가진 집단보다 치매 발현 가능성이 높으므로 더욱 철저한 관리가 필요하다. 본 연구결과를 종합해 보면, 특성에 따라 고위험 집단의 유형을 다음과 같이 나눌 수 있다. 첫째 집단은 E4 유전자를 소유하고 있으면서 치매 가족력이 있는 집단 (n=36명, 22.9%), 둘째 집단은 E4 유전자를 소유하고 있으면서 심혈관계 질환을 가지고 있는 집단 (n=45명, 28.7%), 셋째 집단은 E4 유전자를 가지고 있으면 당뇨병이 있는 집단(n=18명, 11.5%) 그리고 넷째 집단은 E4 유전자를 가지고 있으면서 나이가 60세 이상인 집단(n=2명, 16.7%)이다. 본 연구를 통해서 밝혀진 이와 같은 고위험 집단은 치매예방을 위한 철저한 관리를 필요로 한다. 우선 첫째와 넷째 집단은 알쯔하이머성 치매에 노출될 가능성이 높은데, 그 이유는 알쯔하이머성 치매 위험요소인 유전인자를 소지하고 있거나(Fitch 등, 1988), 가족력이 있거나(Van Duijn CM 등, 1991), 나이가 많아짐에 따라 치매 유병률이 높아지기 때문이다(Rocca 등, 1990). 알쯔하이머성 치매의 원인을 설명하는 가설에는 유전인자의 유무뿐 아니라, 신체대사활동, 면역상태, 바이러스성 질환, 그리고 독성물질이나 유해환경 등 여러 가설들이 있는데(Yi 등, 1994), 알쯔하이머성 치매의 예방이나 지연을 위해서 다른 위험요인들에 노출되지 않도록 관리를 철저히 해야 할 필요성이 있다. 이를 위하여 대상자와 가족들에게 건강교육을 통해 자기관리에 필요한 지식과 기술을 제공하고 대상자가 만성질환이나 대사성 질환, 면역질환 등을 갖지 않도록 모니터를 해야 하며, 영양이나 수면, 운동량 등을 적절하게 유지시키도록 훈련하고, 인지기능이나 정서기능을 알맞게 자극시키는 다양한 요법을 프로그램화하고, 각 개인에 맞도록 맞춤서비스를 세분화하여 직접 대상자에게 적용할 수 있도록 해야 한다.

참 고 문 헌

1. Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, and Weisgraber KH. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-1, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of rat sciatic nerve. *J Clin Invest* 83:1015-1031, 1989.
2. Brody, EM. Parent care as a normative family stress. *Gerontologist* 25:19-29, 1985.
3. Elias MF, Beiser A, Wolf PA, Au R, White RF and D'Agostino RB, The preclinical phase of Alzheimer disease: a 22-year prospective study of the Framingham Cohort. *Arch Neurol* 57:808-813, 2000.

4. Fitch, N, Becker, R, and Heller, A. The inheritance of Alzheimer's disease: A new interpretation. *Ann Neurol* 23:14-19, 1988.
5. Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schellenberg GD, Yu C and Larson EB. Interaction of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 45:1092-1096, 1995.
6. Kim KW, Jhoo JH, Lee KU, Lee DY, Lee JH, and Youn JY. Association between apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease in Koreans. *Neurosci Lett* 277:145-148, 1999.
7. Koudinova NV, Berezov TT and Koudinov AR. Multiple inhibitory effects of Alzheimer's peptide Aβ 1-40 on lipid biosynthesis in cultured human HepG2 cells. *FEBS Lett* 395:204-206, 1996.
8. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17:525-530, 1994.
9. Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M and Lahiri D. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer's disease. *Proc Natl l Acad Sci* USA 92: 12260-12264, 1995.
10. Poirier J, Hess M, May PC, and Finch CE. Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. *Brain Res Mol* 11:97-106, 1991.
11. Racchi M, Baetta R, Salvietti N, Lanna P, Franceschini G and Paoletti R. Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem J* 322:893-898, 1997.
12. Rocca WA, Bonaiuto S, and Lippi A. Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: A door-to-door survey in Appignano, Macerata porvince, Italy, *Neurology* 40:626-827, 1990.
13. Roses AD. Apolipoprotein E allele as risk factors in Alzheimer's disease. *Ann. Rev Med* 38:387-400, 1996.
14. Roses AD. Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction, of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 37:6-14, 1995.
15. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA and Joo SH. Association of apolipoprotein E allele ε4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472, 1993.
16. Van Duijn CM, Hofman A, and Kay D. Risk factors for Alzheimer's disease: A collaborative re-analysis of case-control studies. *Int J Epidemiol* 20 (Suppl. 2), 1991
17. Wenham PR, Price WH and Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 337:1158-1159, 1991.
18. Yi, ES, Abraham, IL, and Holroyd, S. Alzheimer's disease and nursing: New Scientific and clinical insights. *Nurs Clin North Am* 29:85-99, 1994.
19. 방오영, 곽용태. 알쯔하이머병의 진단 및 감별진단에서의 아포지 단백E 유전자형 검사의적용, 대한신경과학회지, 18:568-574, 2000
20. 손의주, 김재민, 김요식, 김병채, 김명규, 조기현. 알쯔하이머병 환자에서 아포지단백E 유전자형과 혈관성 위험인자와의 관계, 대한신경과학회지, 21:41-45, 2003.
21. 한설희. 알쯔하이머병의 새로운 치료전략, 대한신경과학회지, 19:559-565, 2001.