

납 취급 근로자들에서 비타민 D 수용체 (VDR) 유전자의 다형성과 납 노출 지표와의 관련성

장봉기[‡] · 정현정 · 이종화 · 안규동¹⁾ · 이병국¹⁾

순천향대학교 환경보건학과 · 순천향대학교 의과대학 예방의학교실 및 산업의학연구소¹⁾

Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Lead Exposure Indices in Lead Workers

Bong-Ki Jang[‡] · Hyun-Jeong Jeong · Jong-Wha Lee · Kyu-Dong Ahn¹⁾ · Byung-Kook Lee¹⁾

Department of Environmental Health Science, Soonchunhyang University

Department of Preventive Medicine, Medical College and Institute of Industrial Medicine, Soonchunhyang University¹⁾

This study was designed to analyze the relationship between VDR (Vitamin D receptor) genotype and lead exposure indices. VDR genotype of lead workers was analyzed with using BsmI and Apal restriction enzymes. Also, levels of lead and zinc protoporphyrin (ZPP) in blood, δ -aminolevulinic acid in urine (ALAU), δ -aminolevulinic acid in serum (ALAP), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) were measured.

The results were as follows:

1. The frequency of genotype according to BsmI in VDR gene was 0.5 % in BB, 10.2% in Bb, 89.2% in bb. And the frequency of genotype according to Apal in VDR gene was 18.3% in AA, 25.8% in Aa, 55.9% in aa.

2. The mean of lead in blood of each genotype according to BsmI restriction enzyme was 41.27 $\mu\text{g}/\text{dL}$ in BB-Bb and 34.01 $\mu\text{g}/\text{dL}$ in bb, respectively. Levels of lead in blood of BB-Bb genotype was significantly higher than those of bb genotype ($p<0.05$). However, there was no significant difference between other lead exposure indices and genotypes.

3. There was no significant difference between each genotype shown because of Apal restriction enzyme and lead exposure indices. However, the mean of ZPP (84.87 $\mu\text{g}/\text{dL}$) in aa genotype was relatively higher than that (71.02 $\mu\text{g}/\text{dL}$) in AA-Aa.

4. The combination of each VDR genotype gaining from

using BsmI and Apal restriction enzyme resulted in 53.8% in bbaa, 22.0% in bbAa, 13.4% in bbAA, 6.5% in BbAa, 2.2% in Bbaa, 1.6% in BbAA and 0.5% in BBAA.

5. In result to make a comparison between lead exposure indices according to combine genotype, lead workers with the VDR BbAa allele had significantly higher levels of lead in blood ($p<0.05$) and ALAP ($p<0.01$). Also, lead workers with the VDR BbAa allele were high ZPP, ALAU, Hb and Hct, but there was not significant difference.

6. Levels of lead in blood and in bone was significantly high as the period of work got longer ($p<0.01$). It was shown that levels of lead in blood was related with levels of ALAU, ALAP, Hb, Hct.

From the above results, VDR genotype according to BsmI and Apal restriction enzyme, respectively is related to levels of lead in blood. Combined genotype VDR according to BsmI and Apal polymorphisms is related to levels of lead in blood and ALAP. However, it is considered that many more studies should be necessary to figure out whether VDR genotype according to restriction enzymes and its combined forms affect the susceptibility of lead and the relationship between two things.

Key Words: Vitamin D receptor gene, VDR, Polymorphism, BsmI, Apal, Lead exposure indices, Lead workers

* 이 논문은 2002학년도 순천향대학교 기초과학연구소 학술연구조성비 일반연구과제로 지원을

받아 수행하였음

접수일: 2003년 11월 5일, 채택일: 2003년 12월 6일

‡ 교신저자: 장봉기(충남 아산시 신창면 읍내리 646번지 순천향대학교 환경보건학과

Tel: 041-530-1268, E-mail: jangbk@sch.ac.kr)

I. 서 론

체내에 들어온 납은 혈액이나 연부조직에 약 5% 정도 남아 있고, 나머지는 골 조직 내에 저장된다. 골 조직에서도 경골(cortical bone)에 축적된 납은 불활성화된 상태로 장기간 골 조직의 일부로 칼슘 대신 저장되어 이들 중 일부는 서서히 혈액으로 다시 용출되어 체외로 배설된다(Maschi 등, 1995).

혈중 납량은 음식이나 대기중의 납 흡수로 인한 체내 흡수 이외에 뼈속 납의 용출로 인하여 일정한 수준으로 유지되며, 혈중 납의 98% 이상이 적혈구 단백질과 결합한다(DeSilva, 1981; Manton과 Cook, 1984; Simons, 1993; Schwartz 등, 1997). 납은 sulfurhydryl (-SH)기와 결합하여 heme 합성에 관여하는 효소를 포함한 여러 세포의 효소작용을 방해하고, 미토콘드리아 막과 결합하여 단백질과 핵산의 합성을 방해한다.

Wetmur 등(1991)의 납 감수성에 대한 유전독성학적 연구에서 ALAD (δ -aminolevulinic acid dehydratase) 이형 유전형질(ALAD1-2)을 가진 사람들의 혈중 납량이 동형 유전형질(ALAD1-1)을 가진 사람들보다 유의하게 높았다고 보고하고부터 많은 연구자들이 ALAD 유전자형에 따라 체내 흡수된 납의 대사과정이 다르고, 이로 인한 인체 건강에도 영향을 미치는 것으로 보고하고 있어 개인의 납에 대한 감수성이 ALAD의 다형성과 밀접한 관계가 있을 것으로 인식되었으며(Schwartz 등, 1995; Bergdahl 등, 1997; Alexander 등, 1998; 김병기 등, 2000), 이후 특정 유전자의 다형성에 따른 납에 대한 감수성 차이에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔으며, 그 중의 한 유전자가 뼈의 대사와 관계가 있는 VDR (vitamin D receptor) 이다.

VDR 유전자는 vitamin D 대사에 관여하는 표적 유전자의 전사 조절자로서 작용한다. 즉 피부에서 자외선에 의하여 합성되거나 식사를 통하여 섭취된 vitamin D가 간 및 신장에서의 대사과정을 통하

여 활성화된 $1,25(\text{OH})_2$ 비타민 D_3 이 세포 내로 분산하여 핵내에 들어와 VDR에 결합하고 입체 형태학적 변화를 유도하여 결합체를 만들고 이들이 표적 유전자내 비타민 D 반응 요소에 결합하여 유전자 전사에 영향을 주어 여러 가지 단백질의 생산량을 조절한다(Feldman 등, 1996).

사람의 VDR 유전자는 제 12번 염색체의 q13-14에 위치하고(Labuda 등, 1992) 20-70kb의 DNA를 함유하고 있으며 최소한 9개의 exon으로 구성되어 있다(Feldman 등, 1996). exon 제 8번과 제 9번 사이의 intron 내에 BsmI, ApaI 제한효소 부위의 다형성, 제 9번 exon 내 TaqI 제한효소 부위의 다형성, 5' 말단부의 FokI 제한효소 부위의 다형성 및 3' 말단부에 adenine 이 반복되는 poly(A) 다형성의 존재가 보고되었다(Ingles 등, 1997; Haussler 등, 1998).

지금까지 VDR 유전자의 다형성에 관한 연구는 골밀도와의 관련성에 집중되어 왔다. Morrison 등(1992; 1994)은 장에서 칼슘의 흡수, 뼈의 재흡수, 뼈세포의 분화, parathyroid hormone (PTH)의 분비를 조절하는 VDR 유전자내 BsmI 다형성과 $1,25(\text{OH})_2$ 비타민 D_3 에 의하여 증가하는 osteocalcin이 골밀도와 연관성이 있으며, 쌍생아 연구와 집단연구에서 이러한 유전자내 변이와 골밀도와의 연관성을 시사하는 소견을 발표하였다. 또한 여러 인종에서 VDR 유전자내 BsmI, TaqI, ApaI 제한효소에 의하여 인식되는 다형성 양상과 골밀도와의 연관성에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔으나 연구자마다 상이한 결과를 보고하고 있다(Hustmyer 등, 1994; Krall 등, 1995; Uitterlinden 등, 1996).

Spedtor 등(1995)과 Langdahl 등(2000)은 제한효소들에 의하여 절단이 일어나는 유전자형을 BsmI, TaqI, ApaI 제한효소에 따라 각각 bb, tt, aa로, 절단이 일어나지 않는 유전자형을 BB, TT, AA로 표시할 때 BB 또는 tt 유전자형이 각각 bb, TT 유전자형보다 낮은 골밀도를 예측할 수 있다고 보고하였으나, Riggs 등(1995)과

Garnero 등(1996)은 이러한 사실을 확인할 수 없다고 보고하였다. Uitterlinden 등(2001)과 Gennari 등(1998)은 BsmI, TaqI, ApaI 제한효소 3가지 부위의 유전자 다형성을 조합하여 골밀도와의 연관성을 분석하였으나 연구자마다 다른 결과를 보고하고 있다.

한편, VDR 다형성과 납의 감수성에 대하여는 Onalaja와 Claudio(2000)가 일반인을 대상으로 BsmI 제한효소에 따른 VDR 유전형질과 뼈속 납량과의 상관성을 평가하였으며, Schwartz 등(2000)은 납 취급 근로자 집단 사이에서 VDR 유전자형에 대한 뼈속 납량(BB $15.5\mu\text{g/g}$ bone mineral, Bb $14.3\mu\text{g/g}$, bb $13.9\mu\text{g/g}$)의 차이를 보고하였고, 납 노출 기간과 뼈속 납량의 관계는 VDR 유전자형에 의해 결정된다고 하였다. 또한 Lee 등(2000)과 함께 보고한 두 번째 연구에서는 ALAD 유전자형보다 VDR 유전자형이 혈중 납량과의 관련성이 크다고 보고하였다.

이상의 VDR 다형성과 납의 감수성에 관한 연구에서 Onalaja와 Claudio(2000) 및 Schwartz 등(2000)은 BsmI 제한효소에 따른 VDR 다형성 중 BB 형에서 뼈속 납량이 높은 것으로 보고하고 있으나 VDR 다형성과 다양한 납 노출 지표들과의 관련성에 대한 연구가 부족하며, 여러 종류의 제한효소에 따른 VDR 다형성의 조합과 납의 감수성과의 연관성에 대한 연구도 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 납 취급 근로자를 대상으로 BsmI 제한효소와 ApaI 제한효소를 사용하여 VDR 유전자의 다형성을 분석하고, 납 노출 지표로 사용되고 있는 혈중 납, 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP), 요중 δ -aminolevulinic acid (ALAU) 및 혈장 내의 δ -aminolevulinic acid (ALAP), 혈액소(hemoglobin, Hb) 및 혈구 용적치(hematocrit, Hct)를 측정하여, 제한효소에 따른 VDR 유전자형에 대한 납 노출 지표들과의 관련성을 파악함으로써 납 취급 근로자들의 건강보호를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 연구대상

납을 취급하는 작업장에서 근무하는 근로자 186명을 무작위로 추출하여 연령, 성별, 근무기간 등의 일반사항을 조사하였고, 혈중 납량 (blood lead; PbB), 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP), 요중 δ -aminolevulinic acid (ALAU) 및 혈장 내의 δ -aminolevulinic acid (ALAP), 혈색소 (hemoglobin, Hb) 및 혈구용적치 (hematocrit, Hct)를 측정하였다.

2. 실험방법

1) 혈중 납량

시료는 분석 전 1~2시간 정도 roll mixer로 충분히 교반하여, 1% Triton X-100용액으로 10배 희석하였다. 분석에 사용한 기기는 Flameless atomic absorption spectrophotometer (Hitachi Z-8100)며, 혈구용적치로 보정한 혈중 납량을 구하여 사용하였다 (Fernandez, 1975).

2) 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP)

정맥혈을 즉시 휴대용 hematofluorometer (Aviv model 206)를 이용하여 형광 spectrum 423nm에서 혈구용적치 42%로 보정한 농도로 측정하였다 (Lamola 등, 1974; Blumberg 등, 1977).

3) 요중 δ -aminolevulinic acid (ALAU)량 및 혈장 내의 δ -aminolevulinic acid (ALAP)량 측정

초산 산성용액중에 아세트산초산에틸을 가해 가열하여 ALA-pyrrol을 만들고 이것을 초산에틸로 추출하여 그 일정량에 Ehlich시약을 가해 측정하는 Tomokuni와 Ogata법 (1972)을 이용하였다.

4) 혈색소(Hemoglobin, Hb) 및 혈구용적치(Hematocrit, Hct)측정

Cyanmethemoglobin 방법 (Beckman Coulter, Inc., Model Ac-T 8)으로 분석하였고 혈구용적치는 Capillary 원심분리법을

이용하였다.

5) VDR 유전형질의 다형성 분석

(1) DNA 추출방법

정맥혈을 항응고제인 heparin이 처리된 Vacutainer에 채혈하여 냉동 보관하고 DNA 추출은 QIAgen kit를 사용하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)

중합효소 연쇄반응은 Bio RAD사의 Thermal Gene Cycler를 이용하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 primer는 (주)바이오닉스에서 합성한 oligonucleotide primer를 사용하였으며, 실험에 이용한 최종 농도는 증류수로 희석하여 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 하였다. primer의 염기배열 및 PCR 조건은 다음과 같다.

① BsmI에 의한 분석

primer A (BsmI-A) : 5'-CCC AAC CAT CCC TCT CAG TC-3'

primer B (BsmI-B) : 5'-CCC AAC CTC CCT TCC TTT TT-3'

중합효소 연쇄반응 전처리는 10배 농축된 PCR buffer $2\mu\text{l}$, 0.2mM -dNTP $0.4\mu\text{l}$, 그리고 $1.5\text{u}/100\mu\text{l}$ Taq DNA polymerase $0.1\mu\text{l}$ ($5\text{unit}/\mu\text{l}$)를 포함한 용액을 이용한다. 전처리 용액에 primer A $0.4\mu\text{l}$ ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 primer B $0.4\mu\text{l}$ ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 넣은 후 template DNA $2\mu\text{l}$ ($<1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 105~106 copies)를 넣은 후 증류수로 총 $20\mu\text{l}$ 로 하였다.

PCR 조건은 94°C 에서 3분간 1 cycle, 94°C 에서 30초, 60°C 에서 30초, 72°C 에서 1분으로 연속적으로 41 cycle한 후 마지막으로 59°C 에서 1.5분, 72°C 에서 10분간 증폭시켰다.

② ApaI에 의한 분석

primer A (ApaI-A) : 5'-CAGAGCAT GGACAGGGAGCAAG-3'

primer B (ApaI-B) : 5'-GCAACTCCT CATGGGCTGAGGTCTCA-3'

중합효소 연쇄반응 전처리는 10배 농축된 PCR buffer $2\mu\text{l}$, 0.2mM -dNTP $0.4\mu\text{l}$, 그리고 $1.5\text{u}/100\mu\text{l}$ Taq DNA polymerase 0.1

μl ($5\text{unit}/\mu\text{l}$)를 포함한 용액을 이용하였다. 전처리 용액에 primer A $0.4\mu\text{l}$ ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$)와 primer B $0.4\mu\text{l}$ ($200\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 넣은 후 template DNA $2\mu\text{l}$ ($<1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 105~106 copies)를 넣은 후 증류수로 총 $20\mu\text{l}$ 로 하였다.

PCR 조건은 95°C 에서 2분간 1 cycle, 95°C 에서 30초, 60°C 에서 45초, 72°C 에서 1분으로 연속적으로 35 cycle한 후 마지막으로 72°C 에서 7분간 증폭시켰다.

(3) agarose gel 전기영동

중합효소 연쇄반응 후의 반응산물 중 $6\mu\text{l}$ 를 취하여 $5\times$ 완충용액(loading buffer) $2\mu\text{l}$ 와 혼합하여 $0.5\mu\text{l}/\mu\text{l}$ ethidium bromide가 혼합된 1.5% agarose gel에 comb를 꼽아 홈을 만들고 전기영동 장치내의 TBE buffer(Tris base 0.089M , boric acid 0.089M , EDTA 0.002M) 상에서 그 홈으로 완충용액과 혼합된 반응산물을 주입하여 150V 로 40분간 전기영동 한 후 gel을 Gel document system을 이용하여 확인하였다.

(4) 제한효소(BsmI, ApaI)에 의한 DNA의 소화

제한효소 처리 시약인 BsmI(GAATCG CN^{N} ; N=A or G or C or T) 및 ApaI(GGGCC C^{C}) $0.4\mu\text{l}$ ($13\text{unit}/\mu\text{l}$)와 incubation buffer(SURE/Cut 5 buffer L) $1\mu\text{l}$ 를 PCR용 tube에 넣고 중합효소 연쇄 반응한 DNA 시료 $4\mu\text{l}$ 를 가한 후 증류수로 총 $10\mu\text{l}$ 로 맞춘다. BsmI로 처리한 경우는 37°C 에서 24시간, ApaI로 처리한 경우는 37°C 에서 16시간 반응시키고 agarose gel 전기영동으로 VDR 유전형을 관찰하였다.

① BsmI 다형성 판정

증폭된 DNA 염기 크기는 825bp 이었고 BsmI 제한효소로 처리한 후에 $150\text{-}825$ 염기쌍 범위 내에서 절편이 확인되었다. BsmI 제한효소에 의해 절단된 유전자형은 Fig. 1과 같이 3가지의 양상을 보인다. BB는 825bp 염기 절편을 보이고 Bb는 $825, 675, 150$ 염기쌍의 절편을, 그리고 bb는 $675, 150$ 염기쌍의 절편을 보일 때 이 유전자의 다형성을 결정하였다.

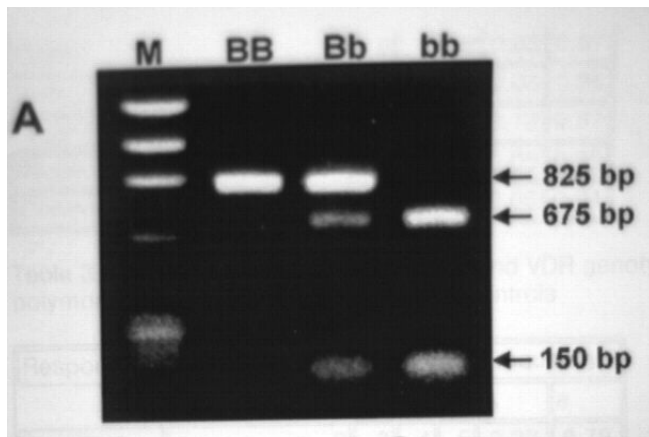


Fig. 1. Fragment sizes for the BsmI RFLP: lane 1 DNA size marker; lane 2 BB, homozygote for the absence of BsmI site; lane 3 Bb, heterozygote; lane 4 bb, homozygote for the presence of BsmI site.

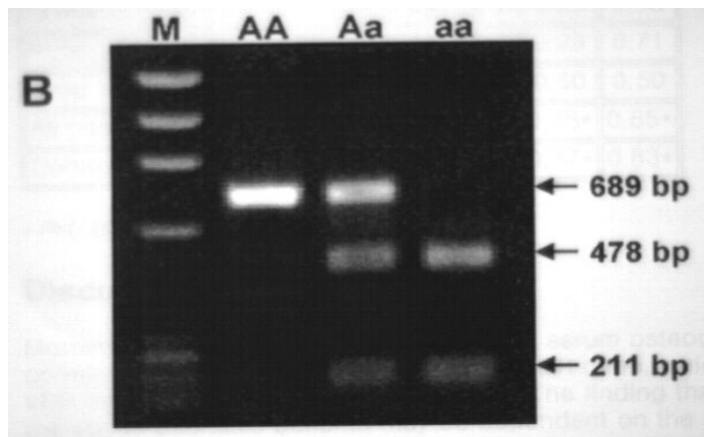


Fig. 2. Fragment sizes for the ApaI RFLP: lane 1 DNA size marker; lane 2 AA, homozygote for the absence of ApaI site; lane 3 Aa, heterozygote; lane 4 aa, homozygote for the presence of ApaI site.

② ApaI 다형성 판정

증폭된 DNA 염기 크기는 689bp이었고 ApaI 제한효소로 처리한 후에 211-689 염기쌍 범위 내에서 절편이 확인되었다. ApaI 제한효소에 의해 절단된 유전자형은 Fig. 2와 같이 3가지의 양상을 보인다. AA는 689bp 염기절편을 보이고 Aa는 689, 478, 211 염기쌍의 절편을, 그리고 aa는 478, 211 염기쌍의 절편을 보일 때 이 유전자의 다형성을 결정한다.

3. 자료분석

수집된 자료는 윈도우용 SPSS 11.0을 이용하여 납 노출 근로자들의 VDR 유전

자 형태별 빈도를 분석하고, 분산분석에 의해 BsmI와 ApaI 제한효소에 따라 나타나는 VDR 유전자형과 납 노출 지표들간의 관련성을 분석하였다.

III. 연구 결과

1. BsmI와 ApaI 제한효소를 이용한 VDR 유전자 형태별 빈도 분석

BsmI과 ApaI 제한효소에 따른 유전자형의 빈도는 각각 BB 0.5%, Bb 10.2% bb 89.2%, AA 18.3%, Aa 25.8%, aa 55.9%로 나타났다(Table 1).

2. BsmI와 ApaI 제한효소를 사용하여 분석한 VDR 유전자형별 납 노출 지표치 차이 비교

1) BsmI 제한효소를 사용하여 분석한 VDR 유전자형별 납 노출 지표치 비교
BsmI 제한효소에 의해 나타난 유전자형 중 BB형의 빈도가 1개만 나와 Bb형의 빈도와 합산하여 분석을 한 결과 혈중 납량의 평균은 BB·Bb 유전자형이 41.27 μ g/dl로서, bb 유전자형의 34.01 μ g/dl보다 유의하게 높게 나타났다($p=0.013$).

그러나 ZPP, ALAU, ALAP, Hb, Hct의 경우는 유전자형에 따른 통계학적인 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 2).

2) ApaI 제한효소를 사용하여 분석한 유전자형별 납 노출 지표치 비교

ApaI 제한효소에 의해 나타난 유전자형별 혈중 납량의 평균은 AA형이 33.76 μ g/dl, Aa 37.73 μ g/dl, aa 33.77 μ g/dl로 Aa형이 약간 높았으나 유의한 차이는 없는 것

Table 1. The frequencies of genotypes of VDR gene

BsmI		ApaI	
Genotype	No. (%)	Genotype	No. (%)
BB	1 (0.5)	AA	34 (18.3)
Bb	19 (10.2)	Aa	48 (25.8)
bb	166 (89.2)	aa	104 (55.9)

Table 2. Summary statistics for selected study variables by vitamin D receptor genotype according to BsmI in 186 lead workers

Indices	BB·Bb (n=20)	bb (n=166)	Total (n=186)	P-value
PbB($\mu\text{g}/\text{dL}$)	41.27 \pm 15.30	34.01 \pm 11.75	34.79 \pm 12.34	0.013
ZPP($\mu\text{g}/\text{dL}$)	88.75 \pm 52.21	77.56 \pm 58.01	78.76 \pm 57.39	0.412
ALAU(mg/ℓ)	2.50 \pm 2.65	1.93 \pm 1.64	1.99 \pm 1.77	0.351
ALAP($\mu\text{g}/\ell$)	32.21 \pm 46.57	15.72 \pm 12.39	17.49 \pm 19.64	0.131
Hb(g/dL)	14.54 \pm 0.99	14.35 \pm 1.44	14.37 \pm 1.40	0.582
Hct(%)	43.27 \pm 3.04	42.72 \pm 4.23	42.78 \pm 4.11	0.580

Table 3. Summary statistics for selected study variables by vitamin D receptor genotype according to ApaI in 186 lead workers

Indices	AA (n=34)	Aa (n=48)	aa (n=104)	P-value
PbB($\mu\text{g}/\text{dL}$)	33.76 \pm 9.74	37.73 \pm 12.57	33.77 \pm 12.86	0.160
ZPP($\mu\text{g}/\text{dL}$)	63.38 \pm 26.57	76.44 \pm 36.99	84.87 \pm 70.33	0.158
ALAU(mg/ℓ)	1.87 \pm 1.58	1.95 \pm 1.84	2.04 \pm 1.82	0.871
ALAP($\mu\text{g}/\ell$)	13.88 \pm 5.49	21.44 \pm 31.75	16.85 \pm 14.54	0.203
Hb(g/dL)	14.67 \pm 1.37	14.38 \pm 1.42	14.67 \pm 1.37	0.351
Hct(%)	43.44 \pm 4.37	42.86 \pm 4.13	42.53 \pm 4.04	0.533

Table 4. Summary statistics for selected study variables by vitamin D receptor genotype according to ApaI in 186 lead workers

Indices	AA·Aa (n=82)	aa (n=104)	P-value
PbB($\mu\text{g}/\text{dL}$)	36.09 \pm 11.59	33.77 \pm 12.86	0.205
ZPP($\mu\text{g}/\text{dL}$)	71.02 \pm 33.52	84.87 \pm 70.33	0.079
ALAU(mg/ℓ)	1.92 \pm 1.73	2.04 \pm 1.82	0.625
ALAP($\mu\text{g}/\ell$)	18.31 \pm 24.72	16.85 \pm 14.54	0.616
Hb(g/dL)	14.50 \pm 1.40	14.67 \pm 1.37	0.264
Hct(%)	43.10 \pm 4.21	42.53 \pm 4.04	0.352

으로 나타났으며, ZPP, ALAU, ALAP, Hb, Hct도 혈중 납량과 마찬가지로 유전자형에 따른 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다 (Table 3).

그러나 BsmI의 경우처럼 AA와 Aa의 빈도를 합산하여 분석한 결과 ZPP량의 평균이 AA·Aa형에서 71.02 $\mu\text{g}/\text{dL}$, aa형은 84.87 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 로 나타나 aa유전자형을 가진 근로자들에게서 유의한 차이는 없었으나 높게 나타났고(p=0.079), 다른 납 노출 지표들 또한 위와 같이 유전자형에 따라 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 4).

3. 두 제한효소에 따라 분석된 유전자형 조합

1) 조합된 유전자형별 빈도
BsmI과 ApaI 제한효소를 이용하여 얻어

진 각각의 VDR 유전자형을 조합한 결과 bbaa 53.8%, bbAa 22.0%, bbAA 13.4%, BbAa 6.5%, Bbaa 2.2%, BbAA 1.6%, BBAA 0.5%의 비율로 형태가 나타났다(Table 5).

2) 조합된 유전자형에 따른 납 노출 지표들과의 비교분석
유전자형을 조합한 경우 Bbaa, BbAA,

BBAA형이 모두 합쳐 전체의 4.2%에 불과함으로 납 노출 지표들과의 비교분석에 의미가 없을 것으로 판단하여 이들 유전자형 조합을 제외하고 분석을 한 결과, 혈중 납량의 평균이 bbaa 33.49 $\mu\text{g}/\text{dL}$, bbAa 35.00 $\mu\text{g}/\text{dL}$, bbAA 34.47 $\mu\text{g}/\text{dL}$, BbAa 44.53 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 로 나타났으며 BbAa 형에서 유의하게 높게 나타났으며(p<0.05), ALAP도

Table 5. Distribution of combined genotypes of VDR according to BsmI and ApaI polymorphisms

Genotype	No.	%
bbaa	100	53.8
bbAa	41	22.0
bbAA	25	13.4
BbAa	12	6.5
Bbaa	4	2.2
BbAA	3	1.6
BBAA	1	0.5

BbAa형이 $40.66\mu\text{g/l}$ 으로 다른 유전형에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($p<0.01$). 그러나 다른 납 노출 지표들은 BbAa 유전자형을 가진 근로자가 다른 유전자형을 가진 근로자에 비해 높게 나타났으나 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Table 6).

4. 납 노출과 관련된 생물학적 지표들과의 상관성 분석

혈중 납량, ZPP, ALAU, ALAP, Hb, Hct 및 근무기간 간의 상관성을 분석한 결과, 근무기간이 길수록 혈중 납량이 유의하게 높았고($p<0.01$), 혈중 납량은 ZPP, ALAU, ALAP, Hb, Hct와 유의한 상관성이 있는 것으로 나타났다(Table 7).

IV. 고 찰

유전독성학적 연구가 활발히 이루어지면서 개인에 대한 납 감수성과 ALAD (δ -aminolevulinic acid dehydratase) 유전자 다형성이 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어 왔고, 이제 ALAD 유전자 다형성은 납독성 연구에서 빼놓을 수 없는 지표가 되었다. 그러나 VDR (vitamin D receptor) 유전자 다형성에 관한 연구는 골밀도에 관련된 연구 외에 다양한 납 노출 지표와의 관련성에 대한 연구는 부족한 실정이며, 여러 종류의 제한효소에 따른 VDR 유전자 다형성의 조합과 납의 감수성과의 연관성에 대한 연구도 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 납 취급 근로자를 대상으로 BsmI 제한효소와 ApaI 제한효소를 사용하여 VDR 유전자의 다형성

Table 6. Summary statistics for selected study variables by combined genotype VDR according to BsmI and ApaI polymorphisms in lead workers

Indices	bbaa (n=100)	bbAa (n=41)	bbAA (n=25)	BbAa (n=12)	Total (n=178)	P-value
PbB($\mu\text{g/dl}$)	33.49 ± 12.80	35.00 ± 10.57	34.47 ± 9.11	44.53 ± 15.13	34.72 ± 12.24	0.032
ZPP($\mu\text{g/dl}$)	84.01 ± 70.56	69.07 ± 27.52	65.68 ± 29.94	94.83 ± 51.46	78.72 ± 57.63	0.241
ALAU(mg/l)	2.04 ± 1.84	1.63 ± 0.77	1.96 ± 1.80	3.04 ± 3.29	2.00 ± 1.80	0.121
ALAP($\mu\text{g/l}$)	16.49 ± 14.38	14.63 ± 9.72	14.44 ± 6.26	40.66 ± 58.53	17.40 ± 19.88	0.000
Hb(g/dl)	14.26 ± 1.42	14.46 ± 1.47	14.55 ± 1.51	14.60 ± 1.22	14.37 ± 1.42	0.700
Hct(%)	42.50 ± 4.10	43.10 ± 4.24	42.98 ± 4.80	43.47 ± 1.99	42.77 ± 4.19	0.787

Table 7. Correlation matrix of the selected parameters indicated lead poisoning in lead-exposed workers

	Work duration	PbB	ZPP	ALAU	ALAP	Hb
PbB	0.194**					
ZPP	0.140	0.429**				
ALAU	0.104	0.402**	0.481**			
ALAP	0.132	0.441**	0.351**	0.689**		
Hb	0.040	0.215**	-0.329**	-0.032	-0.066	
Hct	0.119	0.279**	-0.178*	0.021	-0.039	0.941**

* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$

을 분석하고, 납 노출 지표로 사용되고 있는 혈중 납, 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP), 요중 δ -aminolevulinic acid (ALAU) 및 혈장 내의 δ -aminolevulinic acid (ALAP), 혈색소 (hemoglobin, Hb) 및 혈구용적치 (hematocrit, Hct)를 측정하여, 제한효소에 따른 VDR 유전자형별 납 노출 지표들과의 관련성을 비교해 보았다.

본 연구에서 제한효소에 따른 VDR 유전자형을 분석한 결과, 납 취급 근로자 186명 중 BsmI 제한효소에 의한 VDR 유전자형의 빈도는 BB 0.5%, Bb 10.2%, bb 89.2% 이었고, ApaI 제한효소에 의한 VDR 유전자형의 빈도는 AA 18.3%, Aa 25.8%, aa 55.9%로 나타났다. 이는 우리나라 사람을 대상으로 한 정동진 등(1998)의 BB형이 0.8%, Bb형이 12.4%, bb형이 86.8%, AA형이 6.8%, Aa형이 42.0%, aa형이 51.2%로 나타났다고 보고와 유사하였으나, Aa형의 비율이 본 연구에서 다소 낮게 나타났다. Spector 등 (1995)과 Riggs 등 (1995)은 코카시안 폐경 여성의 VDR 유전자형의 빈도를 조사한 결과 bb 24-42%, Bb 42-58%, BB 14-30%, aa 23-31%, Aa 46-54%, AA 23-30%로 나타났다고 보고하여, 본 연구에서의 BB, AA 유전자형의 비율이 매우 낮은 것으로 나타났다.

BsmI와 ApaI 제한효소를 이용한 VDR 유전자형을 조합하였을 때 본 연구에서는 bbAa 53.8%, bbAa 22.0%, bbAA 13.4%, BbAa 6.5%, Bbaa 2.2%, BbAA 1.6%, BBAA 0.5%의 비율로 나타났다. 이중 bbAa, bbAa, bbAA 형태가 전체의 89.2%를 차지하였다는 것을 알 수 있었는데, 이는 정동진 등 (1998)의 bbAa형이 51.2%로 가장 많았고, bbAa형이 29.6%, BbAa형이 10.0%로서 이 세가지 유전형이 90.8%를 차지하였다고 한 것과 비슷한 결과를 보였다.

VDR 유전자의 다형성과 납의 감수성에 대하여는 Onalaja와 Claudio (2000)가 일반인을 대상으로 BsmI 제한효소에 따른 VDR 유전자형과 혈액 납량과의 상관성을 평가하여, BB 유전자형을 가진 사람들의 혈액 납 함량이 높았고, Bb의 형태

는 중간, bb의 형태는 낮았다는 것을 보고 함으로써, VDR 다형성이 뼈의 납 축적과도 관련이 있다는 것을 시사하고 있다. 또한 Schwartz 등 (2000)은 납 취급 근로자 집단에서 VDR 유전자형에 대한 혈액 납량 (BB형 15.5 μ g/g, Bb형 14.3 μ g/g, bb형 13.9 μ g/g)의 차이를 보고하였고, 납 노출 기간과 혈액 납량의 관계는 VDR 유전자형에 의해 결정된다고도 보고하였다.

본 연구에서 제한효소에 따른 VDR 유전자형과 납 노출 지표들과의 관련성을 분석한 결과, BsmI 제한효소를 이용한 VDR 유전자형과 혈중 납량 사이에는 B-Bb 유전자형을 가진 근로자에게서 유의하게 ($p<0.05$) 높게 나타나, Onalaja와 Claudio (2000) 및 Schwartz 등 (2000)과 유사한 경향을 보였으나, 다른 납 노출 지표들과는 유의한 차이가 없었다.

본 연구는 최초로 VDR 유전자형을 BsmI와 ApaI 제한효소를 사용하여 다양한 납 노출 지표들과의 관련성을 조사하였다는 것에 의의를 두고 있다.

본 연구에서 ApaI 제한효소를 이용하여 있을 경우에는 어떠한 납 노출 지표들과도 차이가 없는 것으로 나타났으나 AA와 Aa형을 조합한 결과 aa 유전자형을 가진 근로자들의 ZPP가 높게 나타났다 ($p=0.079$). 그러나 두 제한효소에 대한 유전자형의 조합결과 BsmI와 ApaI 각각의 결과와는 다른 결과를 보여주었다. 조합된 유전자형 중 BbAa 유전자형을 가진 근로자들의 혈중 납량과 ALAP에서 유의한 차이 ($p<0.01$)를 나타내었고, 다른 납 노출 지표들에서는 유전자형별로 유의한 차이를 보이지 않았으나 BbAa 유전자형을 가진 근로자들이 다른 유전자형을 가진 근로자들 보다 높은 납 노출 지표를 나타내었다.

이를 통해 BsmI와 ApaI 제한효소에 의해 조합된 VDR 유전자 다형성이 각각의 제한효소에 의해 나타나는 VDR 유전자형에 비해 그 형태에 따라 혈중 납량과 ALAP 등에서 관련성이 높은 것을 알 수 있었고, 단일 유전자형에 비해 복합 유전자형이 납 노출 지표와 관련성이 높은 것으로 해석이 되며, 납 감수성과도 연관성

이 크다고 생각된다.

다른 연구자들에 의해 BsmI 외에 ApaI 제한효소에 의해 나타나는 VDR 유전자 다형성 및 두 유전자형의 조합형과 다양한 납 노출 지표와의 관련성을 조사한 연구가 없어 본 연구 결과와 비교할 수는 없었으나, ApaI 제한효소에 따른 VDR 유전자 다형성과 BsmI와 ApaI 제한효소에 의해 조합된 VDR 유전자 다형성에 따른 납 노출 지표와의 관련성을 조사한 것은 본 연구가 최초라 판단된다.

본 연구에서 납 노출 지표들간의 관련성을 조사한 결과, 근무기간이 길수록 혈중 납량이 유의하게 높게 나타났고 ($p<0.01$), 혈중 납량은 다양한 납 노출 지표들과 관련이 있는 것으로 나타났다. 이는 수많은 연구에서 보고되었듯이 혈중 납량과 납 노출 지표들과의 관련성이 있음을 나타내었고, 그 동안의 연구 결과를 뒷받침해주는 결과를 보여주었다.

이상의 결과에서 보면, VDR 유전자 다형성은 조합형이 단일형보다 납 노출 지표들과 관련이 높은 것을 알 수 있고, 따라서 VDR 유전자 다형성이 직업병의 진단과 치료에 새로운 생물학적 모니터링으로서 산업의학 분야에 기여할 수 있는 기초 자료가 될 수 있을 것이라 생각한다. 그러나 납 취급 근로자를 예방 차원에서 보호할 수 있는 지표로서 ALAD 유전자의 다형성이 확립이 되었듯이 앞으로도 VDR 유전자 다형성과 납 노출 감수성에 관한 연구가 활발히 이루어져 VDR 유전자형이 납 감수성 인자로서 납 취급 근로자들에게 보호효과가 있는지를 명백히 할 필요가 있다고 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 납 취급 근로자를 대상으로 BsmI 제한효소와 ApaI 제한효소를 사용하여 VDR (vitamin D receptor) 유전자형을 분석하고 혈중 납량, 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP), 요중 δ -aminolevulinic acid (ALAU) 및 혈장 내의 δ -aminolevulinic acid (ALAP)량, 혈색소 (hemoglobin, Hb)

및 혈구용적치 (hematocrit, Hct)를 측정하여, 제한효소에 따른 VDR 유전자형에 대한 납 노출 지표들과의 관련성을 파악함으로써 납 취급 근로자들의 건강보호를 위한 기초자료를 제공하고자 수행되었으며 다음과 같은 결과 및 결론을 얻었다.

1. VDR 유전자내 BsmI 다형성에 의한 유전자형의 빈도는 BB 0.5%, Bb 10.2% bb 89.2%이었고, ApaI에 의한 유전자형의 빈도는 AA 18.3%, Aa 25.8%, aa 55.9% 이었다.

2. BsmI 제한효소에 의해 나타난 유전자형별 혈중 납량의 평균은 BB-Bb 41.27 $\mu\text{g/dl}$, bb 34.01 $\mu\text{g/dl}$ 로 BB-Bb 유전자형의 혈중 납량이 유의하게 높게 나타났다 ($p<0.05$). 그러나 다른 납 노출 지표들과는 유의한 차이가 없었다.

3. ApaI 제한효소에 의해 나타난 유전자형별과 납 노출 지표들간에서는 유의한 차이가 나타나지 않았으나 AA-Aa과 aa의 ZPP 평균이 각각 71.02 $\mu\text{g/dl}$, 84.87 $\mu\text{g/dl}$ 로 aa 유전자형에서 높게 나타났다 ($p=0.079$).

4. BsmI와 ApaI 제한효소를 이용하여 얻어진 각각의 VDR 유전자형을 조합한 결과 bbaa 53.8%, bbAa 22.0%, bbAA 13.4%, BbAa 6.5%, Bbaa 2.2%, BbAA 1.6%, BBAA 0.5%의 비율로 나타났다.

5. 조합된 유전자형에 따른 납 노출 지표를 비교하였을 때 혈중 납량에서는 BbAa 유전자형을 가진 근로자들에게서 혈중 납량이 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($p<0.05$), ALAP도 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($p<0.01$). 그러나 ZPP, ALAU, Hb, Hct에서는 BbAa 유전자형을 가진 근로자들이 다른 유전자형의 근로자에 비해 높게 나타났으나 통계학적인 유의한 차이는 없었다.

6. 근무기간이 길수록 혈중 납량이 유의하게 높았고 ($p<0.01$), 혈중 납량은 ZPP, ALAU, ALAP, Hb, Hct와 유의한 관련이 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 BsmI 제한효소에 의한 VDR 유전자형에 따라서 혈중 납량에 유의한 차이가 있었으며, ApaI 제한효소에 의한 VDR 유전자형과 조합하였을 때

혈중 납량과 ALAP에서 유전자형별로 유의한 관련성이 있는 것으로 조사되었다. 그러나 제한효소에 따른 VDR 유전자형과 그 조합형이 근로자들의 납 감수성에 영향을 미치는지를 명확하게 규명하기 위해서는 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

김병기, 황보영, 김용배, 리갑수, 이성수, 장봉기, 안규동, 이병국. 모 축전기 제조업 근로자들의 δ -aminolevulinic acid dehydratase 유전형질이 연폭로 지표와 자각증상에 미치는 영향. 순천향산업의학 2000; 6(1): 1-10

이삼열과 정운섭. 임삼병리검사법. 연세대학교 출판부, 1987

정동진, 김정민, 김지연, 김명수, 박재홍 등. 한국인 여성에서 비타민-D 수용체 유전자의 다형성과 골밀도와의 관계. 대한내분비학회지 1998; 13(3): 394-409

Alexander BH, Checkoway H, Costa-Mallen P, Faustman EM, Woods JS, Kelsey KT, Netten C, Costa LG. Interaction of blood lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. Environ Health Persp 1998; 106(4): 213-216

Bergdahl IS, Gerhardsson L, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Skerfving S. delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism; Influence on lead levels and kidney function in humans. Arch Environ Health 1997; 52: 91-96

Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, Zurckermann DM. Zinc protoporphyrin level in blood determination by a portable hemato-fluorometer; A screening device for lead poisoning. Journal Laboratory Medicine 1977; 89: 712-723

DeSilva PE. Determination of lead in plasma and studies of its relationship to

lead in erythrocytes. British Journal Industrial Medicine 1981; 38: 209-217

Feldman D, Malloy PJ, Gross C. Vitamin D metabolism and action. Academic Press Inc., 1996; 205-235

Fernandez FJ. Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption with use of graphite furnace. Clinical Chemistry 1975; 21: 555-561

Ferrari S, Rizzoli R, Manen D, Slosman D, Bonjour JP. Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density; Interaction with age, dietary calcium and 3'-end region polymorphisms. J Bone Miner Res 1998b; 13: 925-930

Garnero P, Borel O, Rendu E, Arlot ME, Delmars PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss. and bone mass in postmenopausal women. J Bone Miner Res 1996; 11: 827-834

Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, et. al. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: Evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 939-944

Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Falchetti A, Morelli A. FokI polymorphism at the translation initiation sites of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. J Bone Miner Res 1999; 14: 1379-1386

Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American woman. J Bone Miner Res 1999; 11: 1850-1855

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA,

- Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 325-349
- Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994; 94: 2130-2134
- Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, Pera GL, Haile RW, et al. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl cancer Inst* 1997; 89: 166-170
- Kall EA, Parry P, Lichter JB, Dawson-Hughes B. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: Influences of years since the menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 978-984
- Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH. Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1447-1453
- Lamola AA, Joselow M, Yamane T. Zinc protoporphyrin (ZPP); A simple sensitive fluorometric screening test for lead poisoning. *Clin Chem* 1975; 21: 93-97
- Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphism in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 608-617
- Manton WI, Cook JD. High accuracy(stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal Industrial Medicine* 1984; 41: 313-319
- Masci O, Sannolo N, Castellion N. Biological monitoring. In *Inorganic lead exposure. Metabolism and intoxication*. edited by Castellino et al. London : Lewis Publishers 1995; pp. 215-256
- Morrison NA, Ai JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulation osteocalcin. *Pros Natl Sci USA* 1992; 89: 6665-6669
- Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Persp* 2000; 108: 23-28
- Riggs BL, Nguyen TV, Melton LJ III, Morrison NA, O'Fallen WM. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 991-996
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickland PT, Ahn KD. Associations of δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korea lead workers. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 738-745
- Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickl PT, Ahn KD, Kelsey K. δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype modifies four-hour urinary lead excretion after oral administration of dimercaptosuccinic acid. *Occupational and Environmental Medicine* 1997; 54(4): 241-246
- Schwartz BS, Lee BK, Lee GS. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 949-954
- Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey K. Associations of tibia lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 199-203
- Simons TJB. Lead transport and binding by human erythrocytes in vitro. *Pfugers*

Archives 1993; 423: 307-313

Spestor TD, Keen RW, Arden NK, Morrison NA, Major PJ, Nguyen TV, et. al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: A twin study in Britain. Br Med J 1995; 310: 1357-1360

Tomokuni KB and Ogata M. Simple method for determination of urinary δ -amino-levulinic acid as an index of lead exposure. Clin Chem 1972; 18: 1534-1536

Uitterlinden AG, Pols HA, van Daele PL, Burger H, van Duijn CM, Hofman A. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: Improved genetic resolution by direct haplotyping. J Bone Miner Res 1996; 10: S161

Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type I α 1 gene in susceptibility for fracture. J Bone Miner Res 2001; 16: 379-385

Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human δ -aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD2) allele; Implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. Am J Hum Genet 1991; 49: 757-763

Zmuda JM, Cauley JA, Danielson ME, Theobald TM, Ferrell RE. Vitamin D receptor translation codon polymorphism and markers of osteoporotic risk in older African-American women. Osteoporosis Int 1999; 9: 214-219