대한산업의학회지 제 17 권 제 4 호 (2005년 12월)
Korean J Occup Environ Med, 2005;17(4):343-351

납 노출 근로자들에서 ALAD 및 VDR의 다형질성이 조혈기능 지표에 미치는 영향

순천향대학교 의과대학 예방의학교실 및 산업의학연구소

이성수 · 김남수 · 김진호 · 김용배 · 황보영 · 김화성 · 안규동 · 이병국

— **Abstract** —

The Effect of ALAD and VDR Polymorphism on the Hematopoietic Biomarkers in Lead Exposed Workers

Sung-Soo Lee, Nam-Soo Kim, Jin-Ho Kim, Yong-Bae Kim, Young Hwangbo, Hwa-Sung Kim, Kyu-Dong Ahn, Byung-Kook Lee

Department of Preventive Medicine, Medical College and Institute of Industrial Medicine, Soonchunhyang University

Objectives: This study was conducted with new workers who entered lead industries from 1992 to 2001 to evaluate the genetic susceptibility of ALAD (δaminolevulinic acid dehydratase) and VDR (vitamin D receptor) gene on health effect of lead exposure.

Methods: Among the subjects of the database of lead industries at the Soonchunhyang University Institute of Industrial Medicine, only new workers were selected for this study. The total of eligible workers for this category was 3,540 workers, including non lead exposed workers of same lead industries. From stored blood in specimen bank of Soonchunhyang University, genotype of ALAD and VDR were measured using PCR method. Variables for this study were blood lead as an index of lead exposure, ZPP (zinc protoporphyrin in blood), urine ALA (δaminolevulinic acid), and hemoglobin as an index of hematopoietic effect of lead. Information on sex, job duration, and weight were collected for personal information. The data were analyzed using SAS (version 8.2) with descriptive analysis of t-test and multiple regression analysis.

Results: Among 3,540 new employed study subjects during period of 1992-2001, 3,204 workers (90.5%) had ALAD genotype 1-1, while 336 workers (9.5%) had variant type of ALAD (1-2 or 2-2). For VDR genotype, 2,903 workers (89.7%) out of total tested 3,238 workers were belonged to type bb and 335 workers (10.5%) were type bB or BB. The distribution of genotype of ALAD and VDR were not different according to the job duration in male workers, but were different in female workers. The effect of ALAD and VDR genotype on blood lead were positively significant in the analysis of all cumulative data of new employed workers for 10 years. The effect of VDR genotype on blood lead were stronger than that of ALAD. While the variant ALAD gene made decrease of mean ZPP and ALA in urine after controlling for blood lead and other covariate, the variant VDR gene made increased the mean ZPP and ALA in urine in all cumulative data analysis and cross sectional analysis by job duration. For hemoglobin, ALAD and VDR genotype did not affect the mean value.

Conclusions: From the above our results, we found that ALAD and VDR genotype exerted significant effect in various way. We confirmed that the finding of a cross sectional study of protective effect of

<접수일: 2005년 10월 24일, 채택일: 2005년 11월 24일>
교신저자: 이 병 국 (Tel: 041-570-2480) E-mail: bklee@sch.ac.kr

* 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2002-042-E00030).

variant ALAD on the effect of blood lead on blood ZPP in our retrospective study design. It was found that VDR did not exert protective effect for lead exposure as the variant ALAD did.

Key Words: ALAD and VDR polymorphism, Blood lead, Hematopoietic biomarkers

서 론

환경 및 산업보건학 분야에서의 납 노출로 인한 건강문제는 주요한 사회문제의 하나로 계속 남아있다. 고농도의 납 노출은 뇌증상, 신기능장해, 빈혈, 생식기능의 이상을 초래한다. 또한 납 노출은 고혈압의 위험인자로 알려져 있고, 저농도의 노출에서도 소아에서는 지능발달에 영향을 준다고 알려져 있다. 최근에는 과거 안전하다고 알려졌던 저농도의 납에서도 건강이상이 나타날 수 있다고 주장되어 현재의 안전농도기준에 우려가 제기되고 있다.

최근 들어 인간의 유전체 지도가 완성됨에 따라 질병에 대한 유전체의 역할이 더욱 강조되고 있다. 납과 같은 중금속도 유전체에 따라 인체에 영향을 다르게 주는 것으로 알려져 있다. 납 노출과 관련된 유전체중 가장 잘 알려진 것은 δaminolevulinic acid dehydratase (ALAD) 유전체와 vitamin D receptor (VDR) 유전체이다 (Weaver 등, 2003).

혈색소 합성에 관여하는 두 번째 효소인 δaminolevulinic acid dehydratase (ALAD)의 활성도는 납에 의해 가장 먼저 영향을 받는 생화학적 효소 중 하나이다. 납이 체내에 흡수되면 선택적으로 이 효소를 억제하여 δaminolevulinic acid (ALA)에서 그 다음 단계인 porphobilinogen으로의 전환을 억제하여 혈액에 ALA량을 증가시킨다. 본 효소는 ALAD1과 ALAD2로 구분되는 2개의 allele를 가지는 다형질 (polymorphism)의 효소로서 표현형으로는 ALAD1-1, ALAD1-2 그리고 ALAD2-2의 3가지로 구분된다 (Wetmur, 1994).

최근의 유전독성학의 연구는 ALAD의 다형질이 체내 흡수된 납의 대사과정에 영향을 주며 이로 인한 인체 영향에도 관여하고, 특히 개인의 납에 대한 감수성이 이 효소의 다형질성과 밀접한 관계가 있다는 보고가 있다 (Alexander 등, 1998; Astrin 등, 1987; Bergdahl 등, 1997).

Wetmur 등(1991)은 ALAD의 이형 유전형질 (ALAD1-2)을 가진 사람들의 혈중 납량이 동형 유전형질을 가진 사람들 (ALAD1-1)보다 유의하게 높았다고 보고하였고, Schwartz 등(1995)은 이형 유전자형을 가진 근로자들의 혈중 납량은 높은 반면 혈중 zinc protoporphyrin (ZPP)의 농도는 오히려 낮아 이형유전자가 납 근로자들에게서 보호효과가 있다고 보고한 바 있다. 한편 Smith 등(1995)은 ALAD의 이형성은 표적장기에 따라 약력학적효과가 달라 납 독성을 증가시키거나 약화시켜, 신기능에 대한 ALAD의 다형성연구에서 이형 ALAD를 나타내는 납 작업군이 정형 ALAD를 가진 납 작업군보다 신기능에 나쁘게 영향을 준다고 보고하였다. 현재까지의 납에 대한 ALAD 유전체 다형질성의 영향은 다면성 (multifaceted)을 가지고 있어 연구결과에 따라 이형유전형질의 보호효과에 대한 이견이 있다.

한편 Vitamin 대사에 관여하는 유전체인 VDR (vitamin D receptor)은 인간에서 3종의 다형질성 유전체를 나타낸다. 이들 유전형질의 다형질성은 경골(tibia)의 납량에 영향을 준다는 보고가 있다(Schwartz 등, 2000). VDR은 calcium 결합 단백질의 형성에 영향을 주기 때문에 뼈의 mineralization과 reabsorption에 밀접한 관계가 있으며 체내 납의 95%가 뼛속에 저장되어 있고 납이 calcium 대사와 밀접한 관계가 있어 VDR 유전체의 이형성과 납 노출과의 관련은 계속 추구되어야 할 과제이다.

즉, ALAD와 VDR과 같은 납 관련 유전체의 다형성은 납의 인체독성에 다르게 영향을 주어 유전형질의 이형성에 따른 납 근로자들의 납에 대한 감수성이 차이가 있다고 알려져 있으나 연구결과가 일치된 결과를 나타내지 못하여 이에 대한 보다 지속적인 연구가 필요한 시점이다.

이에 본 연구자들은 납 근로자들을 대상으로 ALAD와 VDR 유전체 검사를 실시하여 유전형질의 이형성이 조혈기능에의 영향 정도를 비교하여 논란이 되고 있는 이형성과 관련된 연구결과를 재확인하여 이형성에 따른 납에 의한 감수성의 유무를 확인하고자 한다.

대상 및 방법

본 연구자들은 우리나라 납 근로자들의 보건관리업무를 수행하면서 납 근로자들의 혈액을 냉동 보관하여 미래에 사용할 목적으로 혈액시료은행을 구축하여 운영하고 있는 바, 이 은행에 보관된 혈액을 이용하여 1992년도부터 2001년까지 새로 입사한 납 사업장 근로자 3,540명을 대상으로 후향성 코호트 연구를 시행 중에 있다. 본 연구는 이러한 후향성 코호트 연구에 대한 기초 조사의 일환으로 입사 1년 첫 해의 납 취급 근로자 2,683명 및 역시 입사

1년 첫 해의 같은 납 사업장의 사무직(대조군) 857명을 합한 총 3,540명을 대상으로 ALAD 및 VDR 유전자 형질을 분석하고 이들의 유전자 형질이 납 노출의 초기에 근로자들의 건강영향에 미치는 영향을 분석한 단면조사형태의 기초 연구이다.

1) ALAD 유전형질의 분석 (Wetmur 등, 1991)

(1) DNA 추출방법

정맥혈을 항응고제인 15%-K3EDTA Vacutainer에 채혈하여 냉동고에서 보관하였다. DNA 추출방법은 200 μl의 전혈을 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣어 25 μl QIAgen protease K와 200 μl AL buffer를 넣고 잘 섞은 후 70℃ 항온수조에서 10분간 방치하였다. Isopropanol (96~100%) 210 μl를 첨가하여 5초간 진탕 후, 8,000 rpm에서 수초간 원침하였다. 2 ml 용량의 collection tube에 QIAamp spin column을 넣고 시료를 전량 옮긴 후, 8,000 rpm에서 원심분리 하였다. Filter를 이용하여 용액은 제거하고 흡착된 시료에서 순수한 DNA만을 분리하기 위하여 AW buffer를 혼합하여 8,000 rpm으로 1분씩 2회 원심분리 하였으며, 최종적으로 13,000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다.

QIAamp spin column에서 AE buffer 200 μl를 넣고 70℃에서 incubation한 후 실온에서 1분간 방치하고 filter를 부착하여 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 추출된 DNA가 포함된 시료를 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)용으로 사용하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응 (PCR)

중합효소 연쇄반응은 Bio RAD사의 Thermal Gene Cycler을 이용하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 primer는 OPERON (Operon Inc., CA U.S.A)에서 합성한 oligonucleotide primer를 사용하였다. 실험에 이용한 최종 농도는 증류수로 희석하여 4 μg/μl 되게 하였다. primer의 염기배열은 다음과 같다.

ALAD-A: 5'-CCCAACCATCCCTCTCAGTC-3'

ALAD-B: 5'-CCCAACCTCCCTTCCTTTTT-3'

중합효소 연쇄반응 전처리는 10배 농축된 PCR buffer 5 μl, 0.2 mM-dNTP 1 μl, 그리고 1-5 u/100 μl Taq DNA polymerase 0.3 μl (5 unit/μl)를 포함한 용액을 이용하였다. 전처리 용액에 primer A 1 μl (200 μg/μl)와 primer B 1 μl (200 μg/μl)를 넣은 후 template DNA 3 μl (<1 μg/100 μl 105~106 copies)를 넣은 후 증류수로 총 50 μl로 하였다.

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

(3) 제한효소에 의한 DNA의 소화

제한효소 처리 시약인 MspI 2 μl와 incubation buffer (SURE/Cut 5 buffer L) 5 μl를 PCR용 tube에 넣고 중합효소 연쇄 반응한 DNA 시료 20 μl를 가한 후 증류수로 총 50 μl로 맞춘 후 37℃에서 24시간 반응시켰다.

(4) agarose gel 전기영동

10 μl의 반응산물을 0.5 μl/μl ethidium bromide가 혼합된 1.5% agarose gel을 TBE buffer (Tris base 0.089 M, boric acid 0.089 M, EDTA 0.002 M) 상에서 150 V로 40분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 gel은 UV-trans illuminator를 이용하여 139-473 염기쌍 범위 내에서 염색된 DNA 절편을 확인하였다. 시료 DNA의 절편위치는 표준 DNA를 동시에 전기 영동하여 비교 확인하였다.

2) VDR 유전형질의 분석

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

ALAD 유전형질 분석을 위하여 추출된 DNA 시료를 이용하여 Bio RAD사의 Thermal Gene Cycler를 이용한 중합효소 연쇄반응을 하였다.

중합효소 연쇄반응을 위한 primer는 (주)바이오닉스에서 합성한 oligonucleotide primer를 사용하며, 실험에 이용한 최종 농도는 증류수로 희석하여 4 μg/ml 되게 한다. primer의 염기배열 및 PCR 조건은 다음과 같다.

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

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

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

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

(2) agarose gel 전기영동

중합효소 연쇄반응 후의 반응산물 중 6㎕를 취하여 5× 완충용액 (loading buffer) 2 ㎕와 혼합한다. 0.5 ㎍/㎖ ethidium bromide가 혼합된 1.5% agarose gel에 comb를 꼽아 홈을 만들고 전기영동 장치 내의 TBE buffer (Tris base 0.089 M, boric acid 0.089 M, EDTA 0.002 M) 상에서 그 홈으로 완충용액과 혼합된 반응산물을 주입하여 150 V로 40분간 전기영동 한 후 gel을 Gel document system을 이용하여 확인하였다.

(3) 제한효소 (BsmI)에 의한 DNA의 소화

제한효소 처리 시약인 BsmI 0.4 ㎕ (13 unit/㎕)와 incubation buffer (SURE/Cut 5 buffer L) 1 ㎖를 PCR용 tube에 넣고 중합효소 연쇄 반응한 DNA 시료 4 ㎖를 가한 후 증류수로 총 10 ㎖로 맞춘다. BsmI로 처리한 경우는 37℃에서 24시간, ApaI로 처리한 경우는 37℃에서 16시간 반응시키고 agarose gel 전기영동으로 VDR 유전형을 관찰하였다.

(4) BsmI 다형성 측정

증폭된 DNA 염기 크기는 825bp이었고 BsmI 제한효소로 처리한 후에 150-825 염기쌍 범위 내에서 절편이 확인되었다. BsmI 제한효소에 의해 절단된 유전자형은 3가지의 양상을 보이는데 BB는 825bp 염기 절편, Bb는 825, 675, 150 염기쌍의 절편을, bb는 675, 150 염기쌍의 절편을 보일 때 이 유전자의 다형성을 결정하였다.

3) 혈중 납량의 분석

혈중 납 정량분석은 polarized Zeeman 바탕보정장치가 장착되어 있는 원자흡수분광광도계(automic absorption spectrophotometer, Z-8100, Hitachi, Japan)를 사용하였으며, 자동시료 주입장치(autosampler, SSC-200, Hitachi, Japan)가 부착된 기기를 사용하였다.

4) 혈중 ZPP의 분석

혈중 ZPP는 근로자들의 정맥혈 한 방울을 cover glass에 떨어뜨린 후 이를 휴대용 hematoflurometer (model: Aviv-206)를 이용하여 측정하였다 (Blumberg 등, 1977).

5) 요중 δaminolevulinic acid의 분석

요중 ALA 정량분석은 형광검출기(spectrofluorometer, RF-10A, Shimadzu, Japan)가 부착된 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatograph, LC-10AD, Shimadzu, Japan)를 사용하여 분석하였다.

Table 1. Study variables of subjects by type of lead exposure and gender

Variable	Lead exposed (N=2,683)				Control (N=857)			
	Male (N=2,485)		Female (N=198)		Male (N=750)		Female (N=107)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (yrs)	28.8*	7.6	37.9	10.1	32.0*	9.3	28.5	12.0
Weight (㎏)	63.3*	8.2	55.7	7.4	65.1*	8.7	52.2	6.5
PbB (㎍/㎗)	30.2*	14.3	34.0	19.5	14.1*	9.1	8.3	4.8
ZPP (㎍/㎗)	57.8*	42.9	112.5	76.9	39.3*	11.7	51.8	19.5
ALAU (㎎/ℓ)	2.4	4.9	2.3	2.4	1.3	1.1	1.3	0.6
Hemoglobin (g/㎗)	15.2*	1.3	12.8	1.3	15.0*	1.2	12.9	1.1
ALAD genotype								
1-1, N (%)								
1-2 or 2-2, N (%)	2,242 (90.2)		182 (91.9)		683 (91.1)		97 (90.7)	
	243 (9.8)		16 (8.1)		67 (8.9)		10 (9.3)	
VDR genotype								
bb, N (%)	2,016 (89.6)		173 (87.8)		630 (90.8)		84 (87.5)	
bB or BB, N (%)	235 (10.4)		24 (12.2)		64 (9.2)		12 (12.5)	

*; $p<0.05$

PbB; Pb in blood
ALAU; delta aminolevulinic acid in urin
VDR; vitamin D receptor
SD; standard deviation
ZPP; zinc protoprotorphyrin in blood
ALAD; delta aminolevulinic acid dehydrogenase

6) 혈색소의 분석

자동혈구계산기(Coulter counter A.T series, USA)을 이용하여 혈액의 혈색소 (hemoglobin)를 측정하는데 사용하였다.

7) 자료분석

자료의 분석은 SAS 8.2 (SAS Institute Inc.)를 이용하였다. 모든 변수들의 중심경향의 측도 및 분포를 보았고, 변수들간에 산점도 및 상관계수도 살펴보았다. 그리고 조혈기능 지표들 (혈중 ZPP, 요중 ALA, 혈색소)에 대하여 납 노출 여부, 남녀별, 혹은 ALAD 및 VDR 유전인자에 따른 차이를 t-검정을 이용하여 분석하였다. 다중 회귀분석도 시행하였는데 covariates(연령, 성, 납 노출 여부, 체중)를 통제한 후 종속변수로는 조혈기능 지표를, 독립변수로는 유전인자 및 혈중 납량을 택하여 분석하였다. 이러한 분석을 통하여 유전인자와 혈중 납량의 교호작용도 보았고, 종속변수들 중 혈중 ZPP 및 요중 ALA는 분포가 치우쳐 있어 로그변형을 통하여 정규분포화 시켰다.

결 과

납 노출 여부와 성별에 따라 연구대상자 3,540명의 각 변수별로 빈도, 평균 및 표준편차를 구한 바 다음과 같다 (Table 1). 이 중 3,204명(90.5%)이 ALAD 정형 유전형질인 ALAD 1-1형이었으며, 336명(9.5%)이 이형 유전형질인 ALAD 1-2 혹은 2-2형이었다. 납 노출 남자 근로자의 이형 유전형질(ALAD 1-2 혹은 2-2)이 2,485명 중 243명(9.8%)이었으며, 대조군 남자 근로자 750명 중 67명(8.9%)은 이형 유전형질을 나타냈다. 또한 납 노출 여자 근로자 198명중 16명(8.1%)이 ALAD 이형 유전형질을 나타낸 반면, 대조군 여자 근로자 107명중 10명(9.3%)이 ALAD 이형 유전형질을 나타내었다. VDR 유전형질의 분포는 분석완료 한 신규입사자 3,238명 중 2,903명(89.7%)이 정형 유전형질인 bb 형이었으며, 335명(10.5%)이 이형 유전형질인 bB 혹은 BB으로 나타났다. 납 노출남자들의 이형 유전형질(VDR bB 혹은 BB)이 2,251명중 235명(10.4%)이었으며, 대조군 남자근로자 694명중 64명(9.2%)만이 이형유전형질을 나타냈다. 또한 여자 납 노출 근로자들 197명중 24명(12.2%)이 VDR 이형 유전형질을 나타낸 반면, 대조군 여자 근로자 96명중 12명 (12.5%)이 VDR 이형 유전형질을 나타내었다.

남자 납 근로자들의 최초 입사연령은 28.8±7.6년인 반면, 여자 납 근로자들의 최초 입사연령은 37.9±10.1년으로서 여자 납 근로자들의 경우 육아 출산 후 상당기간 지난 후 취업한 것으로 나타났다. 혈중 납량의 평균은 남자 납 근로자들에서 30.2±14.3 ㎍/dl이었으며, 여자 납 근로자들의 평균은 34.0±19.5 ㎍/dl으로서 여자 납 근로자들의 혈중 납량이 높았다($p<0.05$). 대조군의 혈중 납량의 평균은 남자 근로자들에서 14.1±9.1 ㎍/dl, 여자 근로자들에서 8.3±4.8 ㎍/dl으로서 남녀 모두에서 어느 정도 납 노출이 되고 있음을 알 수 있다. 한편 혈중 ZPP의 경우에도 여자 납 근로자들의 평균이 112.5± 76.9 ㎍/dl이 남자 납 근로자들의 혈중 ZPP의 평균 57.8±42.9 ㎍/dl보다 2배 정도 높은 유의한 차이를 나타냈다.

남 노출군과 대조군을 합한 총 연구대상자 3,540명에 대하여 유전형질에 따라 각 변수별 평균과 표준편차를 구한 것은 Table 2이다. ALAD 정형유전형질인 1-1 형인 연구대상자들의 혈중 납량의 평균은 25.5±13.5 ㎍/dl이었으며, 이형 유전형질인 ALAD 1-2 혹은 2-2인 연구대상자들의 혈중 납량의 평균은 26.4±13.3 ㎍/dl로 이형 유전형질의 연구대상자들의 혈중 납량이 유의하게 높았다 ($p<0.05$)(Table 2). 한편 혈중 ZPP의 평균은 정형 유전

Table 2. Study variables of subjects by ALAD and VDR genotype

Variable	ALAD				VDR			
	Type 1-1 (N=3,204)		Type 1-2/2-2 (N=336)		Type bb (N=2,448)		Type Bb/BB (N=790)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (yrs)	30.0	8.6	29.7	8.6	30.2	8.7	30.6	9.3
Weight (㎏)	62.8	8.8	62.6	7.9	62.6	8.7	63.1	8.8
PbB (㎍/dl)	26.2	15.3	27.5	16.0	26.6	15.5	27.6	16.9
ZPP (㎍/dl)	57.0*	43.5	53.8	44.4	56.8*	42.6	65.4	58.9
ALAU (㎎/l)	2.0	3.8	2.0	4.8	1.9	3.1	2.4	7.6
Hemoglobin (g/dl)	14.9	1.5	15.1	1.5	14.9	1.5	15.0	1.6

*; $p<0.05$

형질을 가진 연구대상자들이 53.1±40.8 μg/dl이었으나 이형 유전형질을 가진 연구대상자들은 49.4±34.2 μg/dl로 나타나서 이형 유전형질군에서 낮은 값을 나타냈다 ($p<0.05$). 그 외의 연구변수들에서는 ALAD 유전형질 구분에 따른 평균의 차이가 없었다. VDR 유전형질구분에 따른 연구변수들의 평균을 비교한바 이형 유전형질군에서 혈중 납량이 34.2±8.9 μg/dl로서 정형 유전형질군의 33.9±8.3 μg/dl보다 유의한 차이가 있었으며 ($p<0.05$), 혈중 ZPP와 요중 ALA의 경우에도 이형 유전형질군에서 각각 60.8±52.9 μg/dl와 2.1±4.1 mg/l의 평균으로서 정형유전형질군의 53.5±40.8 μg/dl와 1.8±2.2 mg/l 보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

Table 3은 총 연구대상자들에 대하여 ALAD 및 VDR 유전형질이 조혈기능에 미치는 영향을 중회귀 분석한 결과이다. 교란변수들을 통제한 후 대수 변환한 혈중 ZPP를 종속변수로 한 분석에서 혈중 납량을 통제한 후의 ALAD 유전형질의 이형성은 종속변수에 유의한 영향을 주었으며, VDR 유전형질과 혈중 납량을 통제한 후의 VDR 유전형질 모두 종속변수에 유의한 영향을 주었으나 혈중 납량과 ALAD 혹은 VDR 유전형질과의 교호작용에 의한 영향은 통계적으로 유의하지 않았다. 종속변수로 대수변환 한 요중 ALA에 대한 회귀분석의 경우 혈중 납량만이 종속변수에 유의한 영향을 주었을 뿐 ALAD 혹은 VDR 유전형질은 유의한 영향을 주지 못했고 혈중 납량과 ALAD 혹은 VDR 유전형질과의 교호작용도 없었다. 혈색소에 대한 회귀분석의 경우도 혈중 납량만이 종속변수에 유의한 영향을 주었을 뿐 ALAD 혹은 VDR 유전형질이나 혈중 납량과 ALAD 혹은 VDR 유전형질과의 교호작용도 없었다.

고 찰

Heme 합성과정의 두 번째 효소인 δaminolevulinic acid dehydratase는 다형질성이 있어 동형 유전형질인 ALAD1과 이형 유전형질인 ALAD2로 구분되며 그 빈도는 백인에서는 9:1로 알려져 있다 (Wetmur 등, 1991). 이 2개의 allele는 ALAD1-1, ALAD1-2 그리고 ALAD2-2 등의 3개의 표현형으로 나타난다. 이 유전적 이형성은 인종에 따라 달라 백인에서는 이형 유전자가 약 15~20% 나타나는 반면, 흑인에서는 이형 유전형질이 거의 발견되지 않는다 (Benkmann 등, 1983; Sousa 등, 1991). 본 연구에서는 3,540명의 신규입사 근로자들 중 이형 유전형질을 가진 근로자들이 9.5%로서 Schwartz 등(1995)의 연구결과인 11%보다 약간 낮았으나 일본의 9.0%와 유사하였다(Benkmann 등, 1983).

Wetmur(1994)는 ALAD효소의 이형성이 납의 체내대사와 관련이 있음을 발표한 바 있다. 즉, 이형의 유전형질을 가진 어린이나 성인들이 동형의 유전형질을 가진 사람들보다 혈중 납량이 약 9 μg/dl 정도 평균이 높은 것으로 보고하여, 이형의 유전형질을 가진 사람의 ALAD 효소가 혈액에서 납을 효과적으로 결합시켜 혈액 내의 납 농도를 증가시키므로 이형유전자를 가진 사람이 납에 보다 감수성이 높을 것이라는 주장을 한 바 있다. Alexander 등(1998)은 납 제련 근로자들을 대상으로 한 연구에서 이형 유전형질을 가진 납 근로자들에서 혈중 납량은 23.1 μg/dl로서 동형 유전형질을 가진 납 근로자들의 28.4 μg/dl보다 적었고 혈중 ZPP도 각각 68.6 μg/dl와 57.8 μg/dl로서 이형 유전형질의 납 근로자에서 적었다고 보고한바 있다. 한편 Schwartz 등(1995)은 3개 축전지 회사에 근무하는 납 근로자 290명을 대상으로 ALAD 유전형질을 조사한 바 유전형질구분에 따른 평균 혈중 납량의 차이는 없었으나 혈중 납량 40 μg/dl 이상과 이하에 대하여서는 유전형질의 구분이 유의한 교차비를 나타내었다고 하였다. 한편 이들은 혈중 납량 등을 보정한 후 이형유전형질을 가진 근로자들의 혈중 ZPP가 동형 유전형질을 가진 근로자들보다 낮음을 확인하여 이형 유전형질을 가진 근로자가 납에 의한 건강영향에 보호역할을 하고, 납 근로자들의 현재 폭로수준에 대한 선택인자로 작용함을 보고한 바 있다.

김화성 등(2002)은 납 근로자들을 대상으로 한 연구에서 혈중 납량이 ALAD의 형질구분에 따른 차이는 없었으나, 혈중 ZPP는 이형유전형질을 가진 납 근로자에서 동형 유전자형을 가진 납 근로자들보다 12.2 μg/dl이나 낮아서 Schwartz 등 (1995)의 연구와 같은 결과를 나타냈으며, 단위 혈중 납량 당 혈중 ZPP의 양은 적어 Alexander 등(1998)의 연구에서와 같이 혈중 납량 당 혈중 ZPP의 기울기가 동형 유전자군에서 높았다. 이는 동일한 혈중 납량이 체내에 존재하더라도 이에 의한 영향은 동형 유전자군에서 더 많이 받고 있음을 의미한다고 설명한 바 있다.

본 연구에서는 ALAD와 VDR 형질구분에 따른 평균의 비교에서 ALAD 이형 유전형질군에서 정형유전형질군보다 유의하게 혈중 ZPP가 낮게 나타났으나($p<0.05$) 반대로 VDR 이형 유전형질군에서 정형유전형질군보다 유의하게 혈중 ZPP가 높게 나타났고($p<0.05$) 나머지 비교에서는 유의한 차이는 없었다. 그러나 연령, 성, 납 노출 여부, 체중 등의 변수들을 통제한 후에도 이러한 경향이 나타나는지를 알기 위하여 유전형질이 조혈기능 지표들에 미치는 영향을 회귀분석 한 바 ALAD 유전형질의 이형성은 혈중 ZPP의 감소에 유의한 영향을 나타낸 반면, VDR 이형성은 혈중 ZPP의 증가를 가져와서 서로

Table 3. Linear regression modelling of effect modification by genotype on blood lead with age, gender, lead exposure, weight

Variable	βcoefficient	SE β	p-value	R^2
LogZPP				
Model 1				0.50
PbB (㎍/dl)	0.0210	0.0005	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	-0.0731	0.0207	0.0004	
Model 2				0.50
PbB (㎍/dl)	0.0210	0.0005	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	-0.0793	0.0412	0.0542	
PbB x ALAD12	0.0002	0.0013	0.8610	
Model 3				0.51
PbB (㎍/dl)	0.0209	0.0005	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	0.0564	0.0207	0.0065	
Model 4				0.51
PbB (㎍/dl)	0.0206	0.0005	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	-0.0088	0.0398	0.8254	
PbB x VDR23	0.0024	0.0012	0.0552	
LogALAU				
Model 1				0.23
PbB (㎍/dl)	0.0202	0.0012	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	-0.0685	0.0519	0.1870	
Model 2				0.23
PbB (㎍/dl)	0.0208	0.0012	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	0.0423	0.0920	0.6461	
PbB x ALAD12	-0.0043	0.0029	0.1452	
Model 3				0.25
PbB (㎍/dl)	0.0212	0.0012	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	-0.0089	0.0515	0.8621	
Model 4				0.25
PbB (㎍/dl)	0.0212	0.0012	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	-0.0152	0.0952	0.8733	
PbB x VDR23	0.0002	0.0030	0.9378	
Hemoglobin				
Model 1				0.25
PbB (㎍/dl)	0.0097	0.0016	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	0.0838	0.0746	0.2614	
Model 2				0.25
PbB (㎍/dl)	0.0101	0.0017	0.0000	
ALAD12 (Yes=1, No=0)	0.1806	0.1477	0.2216	
PbB x ALAD12	-0.0036	0.0047	0.4478	
Model 3				0.26
PbB (㎍/dl)	0.0097	0.0017	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	0.1086	0.0740	0.1422	
Model 4				0.26
PbB (㎍/dl)	0.0098	0.0018	0.0000	
VDR23 (Yes=1, No=0)	0.1351	0.1423	0.3427	
PbB x VDR23	-0.0010	0.0045	0.8277	

상반된 영향을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 ALAD 및 VDR 유전형질은 요중 ALA 및 혈색소에 유의한 영향이 관찰되지 않았다.

대부분의 선행연구에서 이형 유전형질에서 혈중 납량이 높은 반면 혈중 ZPP는 오히려 낮은 값을 나타내어 ALAD 이형 유전형질이 납에 의한 건강영향에 보호효과가 있다고 주장하였다. 즉 이형 유전형질군에서 적혈구 내에서 납을 더 단단히 결합된 상태로 존재하여 실질적으로는 납의 독성을 약화시킨다고 설명하고 있다. 본 연구에서도 혈중 납량 통제후의 ALAD 유전형질의 이형성이 혈중 ZPP에 미치는 영향을 본바 동일한 혈중 납량일 경우 ALAD 이형 유전형질군에서 통계적으로 유의한 낮은 혈중 ZPP 값을 나타내어 선행연구들의 결과를 뒷받침하였다. 반면에 VDR 이형 유전형질군은 정형 유전형질군보다 혈중 납량을 통제한 후에도 혈중 ZPP가 높아서 VDR 이형 유전형질군은 납의 영향에 더 취약함을 알 수 있었다. vitamin D 대사에 관여하는 유전자인 VDR 유전자는 칼슘의존성 비타민 D 결합 단백질 효소의 활성화 작용을 하며 3가지의 유전자형이 있다고 알려져 있다. VDR 유전자는 장관을 통한 칼슘흡수에 관여하고 뼛속의 칼슘흡수에도 관여한다. 납이 칼슘과 유사한 작용을 하여 뼛속에 많이 축적되기 때문에 이 유전자의 납과의 관련성은 충분히 예견되어왔다. 최근의 연구에 의하면 VDR의 이형성에 따라 뼛속의 납 축적량이 달라진다는 보고가 있어(Schwartz 등, 2000a; Schwartz 등, 2000b) 납의 독성학적 연구에 VDR 유전자의 역할에 대한 연구가 진행되어 왔다. 본 조사에서도 VDR 유전형질에 따른 혈중 ZPP의 평균 비교에서도 이형유전형질의 평균이 유의하게 높았을 뿐 아니라 교란변수를 통제한 후의 회귀분석에서도 같은 결과를 얻었다. 이로 미루어서 VDR 유전형질의 이형성은 ALAD의 이형성과는 서로 상반되는 영향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

ALAD 및 VDR 유전형질의 이형성이 heme 합성의 최종산물인 혈색소에 미치는 영향에서 ALAD 유전형질은 혈색소량에 따른 차이가 없었다. 이는 Kim 등(2004)의 연구에서 ALAD 이형 유전형질이 정형 유전형질보다 더 높은 혈색소 값을 나타낸다는 결과를 재확인하지 못했으나 회귀계수가 항상 양의 값을 나타낸 점은 ALAD 유전형질의 이형성이 통계적으로 유의하지 않지만 혈색소량이 증가방향으로 영향을 주는 경향이 있음을 알 수 있었다. 또한 VDR 이형 유전형질의 경우 회귀분석에서 혈색소에 통계적으로 유의하지 않지만 양의 영향이 있었다.

ALAD와 VDR의 다형성이 납의 체내축적과 대사작용에 영향을 준다는 것은 이미 여러 보고들에 의해 확인되었다. 그러나 특히 ALAD의 다형성이 인체의 여러 장기들에서의 납의 분포에 어떠한 영향을 주는지는 규명되어야 할 과제이다. Onalaja와 Claudio (2000)는 이에 대하여 두 가지 가설을 제시하고 있다. 첫째는 ALAD 효소, 특히 이형 유전형질 효소에 납의 결합이 증대되며 신장이나 뇌 같은 다른 장기에도 납의 분포가 증가되어 독성이 커진다는 것이고, 둘째는 반대로 ALAD 효소가 납의 저장소 역할을 하여 납을 혈액 내에 가지고 있어 다른 장기로 가는 것을 막기 때문에 신장이나 뇌에 납이 축적되는 것을 보호한다는 것이다. 지금까지 연구된 ALAD 유전형질과 납 폭로에 따른 건강영향에 관한 연구들은 연구결과가 일치하지 않아 상기 두 개의 가설 중 어떤 것이 더 신뢰성이 있는지는 판단하기 어려우나 대체로 이형 유전형질 군에서 혈중 납이 증가하나 다른 장기에의 영향은 적을 것이라는 의견이 적지 않아 후자의 가설에 대한 보고가 많아지고 있다. 본 연구도 후자의 가설을 지지하는 근거가 될 것이다. 그러나 어느 경우의 가설이던지 납독성에 대한 ALAD의 다형성은 여러 측면에서 복잡하게 작용하는 것 같아 향후 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적: 순천향대학교 산업의학연구소가 관리하는 우리나라의 납 노출 사업장의 근로자들 중 1992년 1월 이후부터 2001년까지의 입사 1년 이내의 약 3,540명을 대상으로 하여 연구대상자들로부터 채취되어 냉동 보관된 혈액으로 ALAD 및 VDR 유전자 형질을 분석하고, 이들의 유전자 형질이 납 노출에 따른 건강영향에 미치는 영향을 분석한 단면조사 연구이다.

방법: 납 노출에 따른 건강영향 관련 연구변수로는 납 노출 변수로서 혈중 납량, 납 중독 변수로서 혈중 ZPP 및 요중 ALA, 조혈기능 변수로서 혈색소를 택하였다. 표준화된 설문지를 이용하여 개인관련 변수인 성, 연령, 근무년수 등을 파악하고 체중 등을 측정하였다.

자료의 분석은 기술적 자료의 분석과 t-검정을 이용하였고, 다변량 분석을 위하여 다중 회귀분석을 이용하였다.

결과: 연구대상 신규입사자 3,540명중 ALAD 유전형질 정형(1-1형)을 가진 대상자는 3,204명(90.5%)이었으며, 이형 유전형질(1-2 혹은 2-2형)을 가진 대상자는 336명(9.5%) 이었으며, VDR 유전형질의 정형유전형질(bb 형)을 가진 대상자들은 총 3,238명중 2,903명(89.7%) 이었으며, 이형유전형질(bB 혹은 BB)을 가진 대상자는 335명(10.5%) 이었다.

ALAD 및 VDR 유전형질이 조혈기능 지표인 혈중 ZPP에 미치는 영향을 본 바 ALAD 유전형질의 이형성은 혈중 ZPP의 감소에 유의한 영향을 나타낸 반면,

VDR 이형성은 혈중 ZPP의 증가를 가져와서 서로 상반된 영향을 나타냈다. 또한 ALAD 및 VDR 유전형질은 요중 ALA 및 혈색소에 유의한 영향이 없었다.

결론: 본 연구결과로 미루어서 ALAD 유전형질은 납 근로자들에 대한 보호효과가 있는 것으로 추정되며, VDR 유전형질이 ALAD와는 달리 납에 의한 영향을 더 악화시키는 것으로 추정된다.

참고문헌

Alexander BH, Checkoway H, Costa-Mallen P, Faustman EM, Woods JS, Kelsey KT, Netten C, Costa LG. Interaction of blood lead and δaminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. Environ Health Perspect 1998;106(4):213-6.

Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ. δaminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. Ann N Y Acad Sci 1987;5(4):23-9.

Benkmann HG, Bogdanski P, Goedde HW. Polymorphism of δaminolevulinic acid dehydratase in various populations. Hum Hered 1983;33:62-4.

Bergdahl IS, Gerhardsson L, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Skerfving S. δaminolevulinic acid dehydratase polymorphism: Influence on lead levels and kidney function in humans. Arch Environ Health 1997;52:91-6.

Blumberg WE, Eisinger J, Lamola AA, Zuckerman DM. Zinc protoporphyrin level in blood determination by a portable hematofluorometer; A screening device for lead poisoning. J Lab Clin Med 1977;89:712-23.

Onalaja AO, Claudio L. Genetic susceptibility to lead poisoning. Envrion Health Perspect 2000;108(Suppl 1):23-8.

Kim HS, Lee SS, Kim YB, Hwangbo Y, Lee GS, Ahn KD, Jang BK, Lee BK. The effect of ALAD polymorphism on the relationship of blood and bone lead with hematologic biomarkers in lead exposed workers. Korean J Occup Enviorn Med 2001;13(1):75-86.(Korean)

Kim HS, Lee SS, Lee GS, Hwangbo Y, Ahn KD, Lee BK. The protective effect of δaminolevulinic acid dehydratase 1-2 and 2-2 isozymes against blood lead with higher hematologic parameters. Environ Health Perspect 2004;112(5):538-41.

Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Ahn KD, Springer K, Kelsey KT. Associations of δaminolevulinic acid dehydratase genotype with plant, exposure duration, and blood lead and zinc protoporphyrin levels in Korean lead workers. Am J Epidemiol 1995;142:738-45.

Schwartz BS, Lee BK, Stewart W, Sithisarankul P, Strickland PT, Ahn KD. δaminolevulinic acid dehydratase modifies four-hour urinary lead excretion after oral administration of demercaptosuccinic acid. Occup Environ Med 1997;54:241-6.

Schwartz BS, Stewart WF, Kelsey KT, Simon D, Park S, Links JM, Todd AC. Associations of tibial lead levels with BsmI polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. Environ Health Perspect 2000a;108(3):199-203.

Schwartz BS, Lee BK, Lee GS, Stewart WF, Simon D, Kelsey KT, Todd AC. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta]-aminolevulinic acid dehydratase genes. Environ Health Perspect 2000b;108(10):949-54.

Weaver VM, Schwartz BS, Ahn KD, Stewart WF, Kelsey KT, Todd AC, Wen J, Simon DJ, Lustberg ME, Parsons PJ, Silbergeld EK, Lee BK. Associations of renal function with polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase, vitamin D receptor, and nitric oxide synthase genes in Korean lead workers. Environ Health Perspect 2003;111(13):1613-9.

Smith CM, Wang X, Hu H, Kelsey KT. A polymorphism in the δaminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. Environ Health Perspect 1995;103:248-53.

Sousa M, Silva M, Duarte A, Azevedo E. δaminolevulinate dehydrase (ALAD) polymorphism in mixed Brazilian from the State of Bahia. Gene Geogr 1991;5:33-8.

Wetmur JG, Lehnert, Desnick RJ. The δaminolevulinate dehydratase polymorphism; higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. Environ Res 1991;56:109-19.

Wetmur JG. Influence of the common human δaminolevulinate dehydratase polymorphism on lead body burden. Environ Health Perspect 1994;102(suppl 3):215-9.