임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

■ 지질(Lipids)

1) 물에는 안 녹으며 Alcohol , Ether , Acetone 같은 유기용매에 용해되는 생물학적으로 중요한 유기화합물
2) 가수분해에 의해 지방산(Fatty acid)을 내거나 지방산과 Ester결합을 형성
3) 생물의 구성성분 존재하거나 생물체에 에너지로 이용될 수 있는 것
4) 지질들은 체내에서 단백질과 결합 (Lipoprotein) 되어야 운반이 가능하다
5) 혈중의 지질은 단백질과 결합되어 있어서 수용성 지질이며 수화성이 있다
6) 혈중의 지질을 추출할 때는 탈수성 Acetone, Methanol, Ethanol등이 쓰인다
7) 지질은 혈중에 Lipoprotein의 상태로 존재하므로 Lipid를 전기영동 한다는 것은 Lipoprotein(VLDL, LDL, HDL)을 전기영동 한다는 것과 동일
8) 공복일 때 정상인 혈청 중에는 일반적으로 VLDL, LDL, HDL의 3종류 리포단백이 존재하며 식후에는 Chylomicron (CM)이 증가한다.

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

■ 지질(Lipids)의 분류

1. 단순지질 (Simple Lipids)

- 지방산(RCOOH) 과 각종 알콜과의 Ester 의 총칭.
- 지방조직의 98 % 를 차지하며 Triglyceride(TG), Wax 등이 속한다.

2. 복합지질 (Complex Lipids)

- 여분의 수산기가 인산이나 황산등의 무기산, 아미노산이나 또는 당류등과 결합하고 있는 지질로서 인지질(Phospholipid), 당지질 및 황지질 등이 여기에 속한다.
- Lipoprotein(CM, VLDL, IDL, LDL, HDL, VHDL) Lipoamide 등이 여기에 속한다.

3. 유도지질 (Derived Lipids)

- 단순지질이나 복합지질의 가수분해에 의해서 생긴 물질로서, 이들 지질의 구성성분 중 물에 녹지 않는 것을 유도지질이라 한다.
- 스테롤, Fatty acid, 지용성 비타민 (A, D, E)등이 속한다.

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

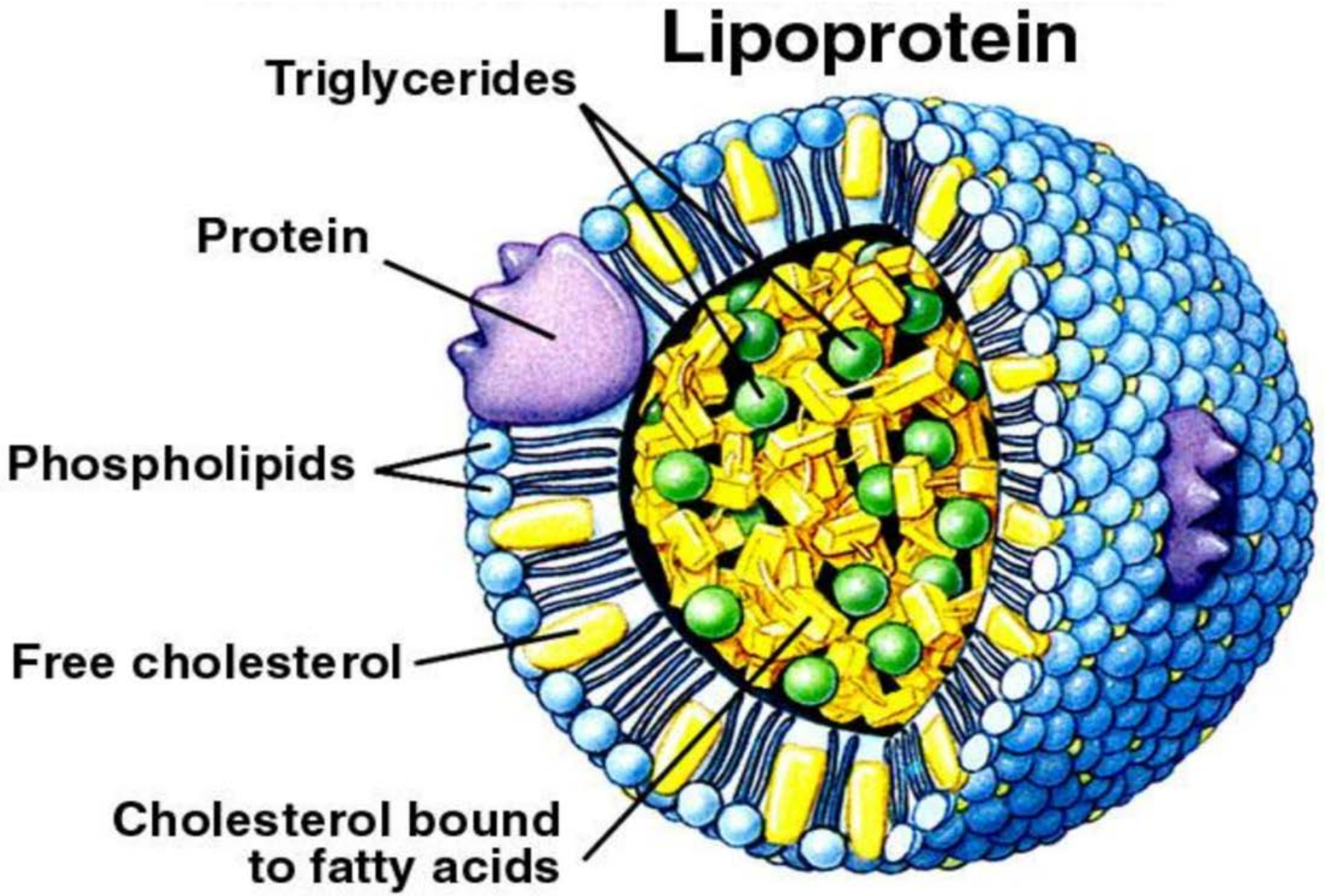
■ 지질단백질(Lipoprotein)

- 혈청 중의 Cholesterol, Triglyceride, Phospholipid, Apo-lipoprotein이 결합된 다양한 크기와 성분 조성차이를 갖는 구형의 입자
- 내부에 지방산에 연결된 콜레스테롤(Ester Cholesterol)과 중성지방(TG) 존재
- 표면에는 Phospholipid, Apo-lipoprotein, 유리콜레스테롤(Free Cholesterol) 존재
- 혈장을 초원심분리하면 지단백을 비중(Density) 별로 분리할 수 있음

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류

- Chylomicron(CM): 가장 크고 비중이 낮음, 대부분 TG(외인성)
- 초저밀도지단백(VLDL): TG 56%(내인성)
- 저밀도지단백(LDL): Cholesterol 운반체
- 고밀도지단백(HDL): 가장 작고 비중이 큼, Protein 함유율이 가장 높다

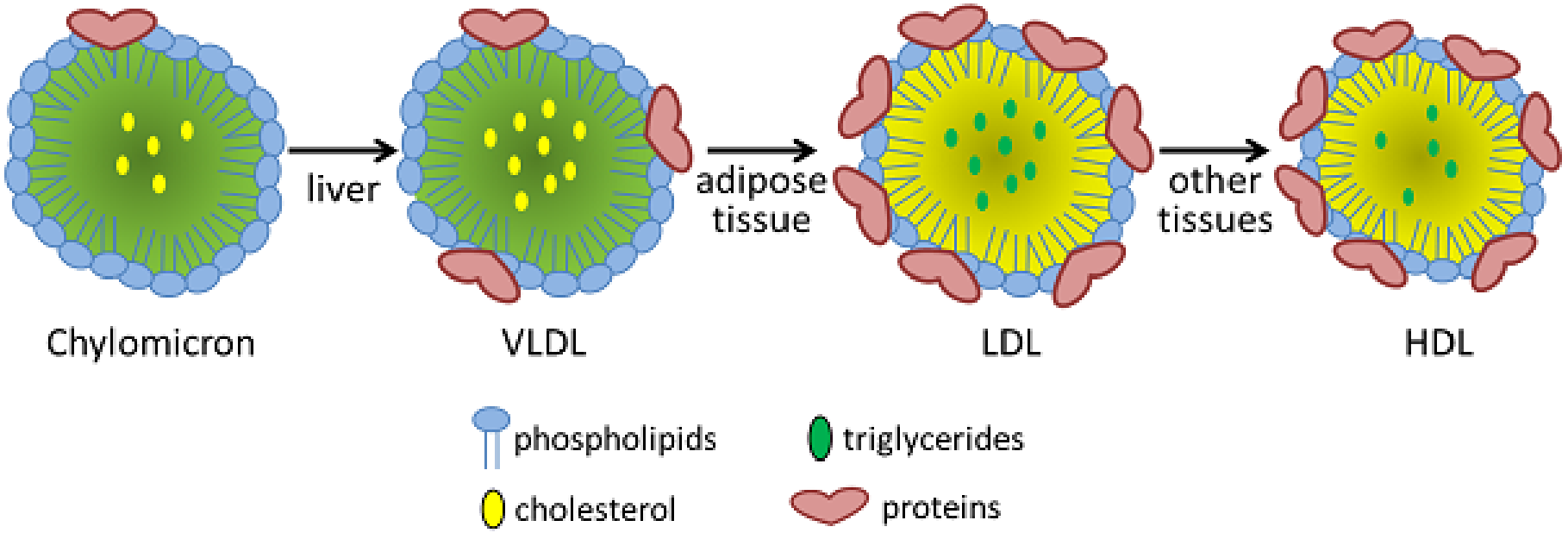
■ 지질단백질(Lipoprotein)의 구조



- 표면은 극성(친수성, 물에 녹음), 내부는 비극성(소수성, 물에 녹지않음)

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

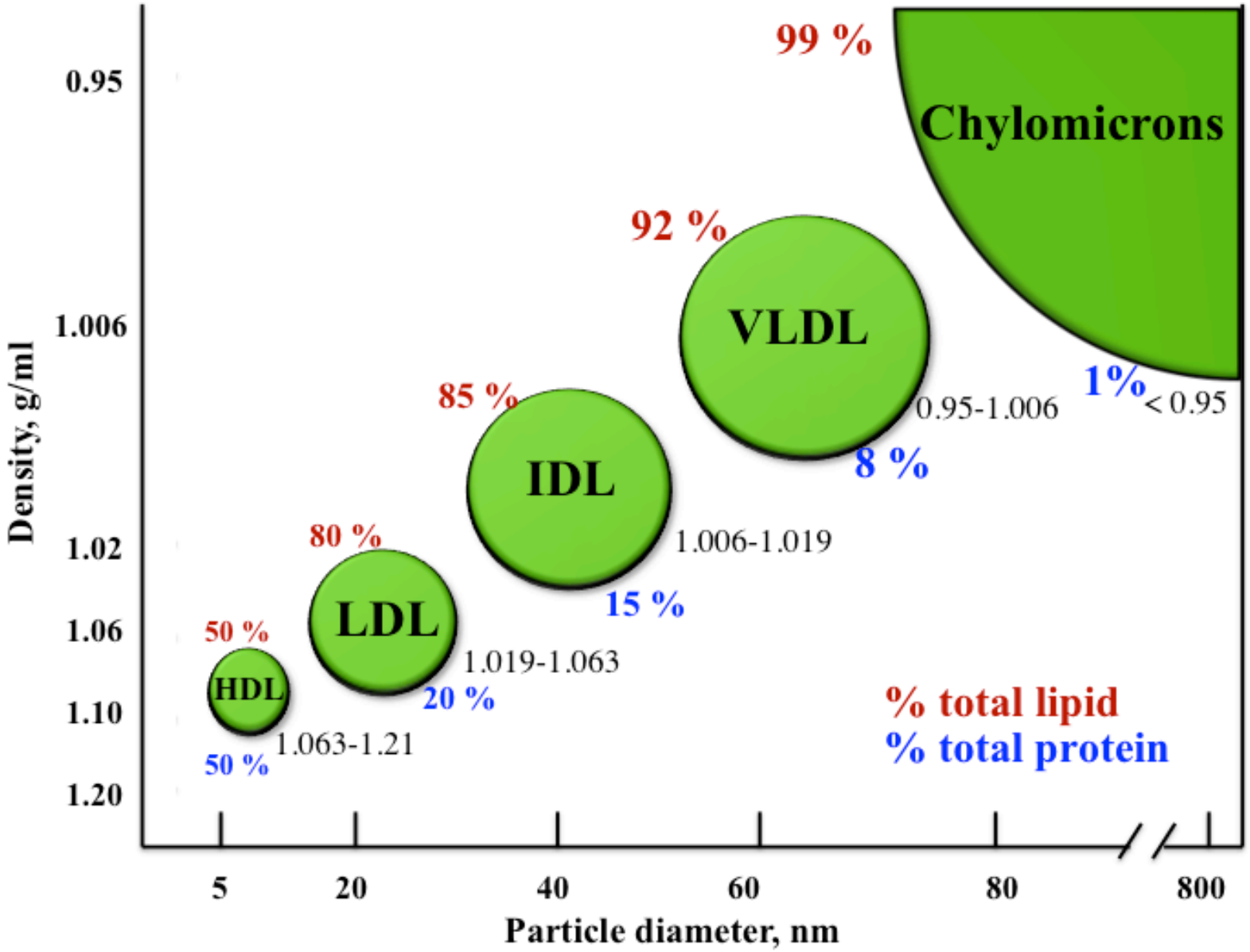
■ 지질단백질(Lipoprotein)의 구성 성분



분류에 따른 각 분획의 구성 (%)

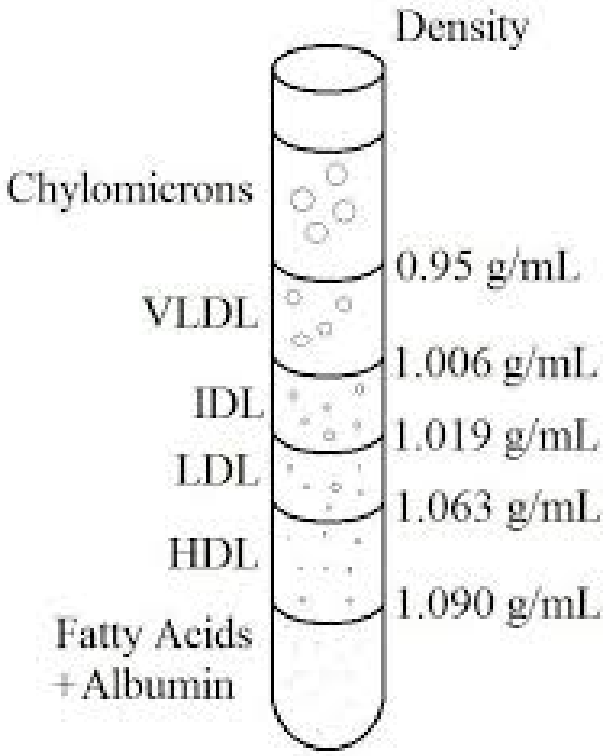
전기영동적인 이동성	종류	Protein	TG	Cholesterol	Phospholipid
Chylomicrons		2%	**98%**	4%	8%
Beta	**LDL**	21%	12%	**45%**	22%
Pre-Beta	**VLDL**	10%	**55%**	13%	22%
Alpha	**HDL**	**50%**	6%	18%	**26%**

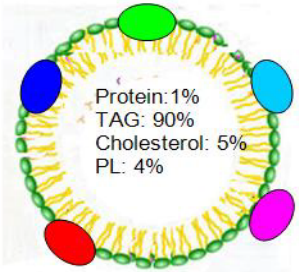
■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류



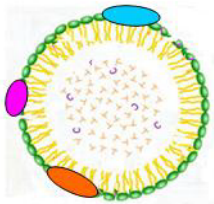
Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류

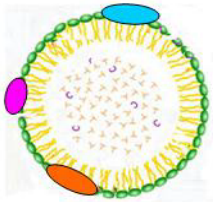




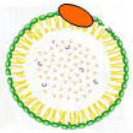
Lipoprotein type: Chylomicron
Density: <0.950 g/mL
Diameter: 80-1000 nm
Major lipids: dietary triacylglycerols
Apolipoproteins: B48, A1, A2, C, E



Lipoprotein type: VLDL
Density: 0.950-1.006 g/mL
Diameter: 30-80 nm
Major lipids: endogenous triacylglycerols
Apolipoproteins: B100, C, E



Lipoprotein type: IDL
Density: 1.006-1.019 g/mL
Diameter: 25-30 nm
Major lipids: endogenous triacylglycerols and cholesterol
Apolipoproteins: B100, C, E



Lipoprotein type: LDL
Density: 1.019-1.063 g/mL
Diameter: 20-22 nm
Major lipids: cholesterol and cholesteryl ester
Apolipoproteins: B100

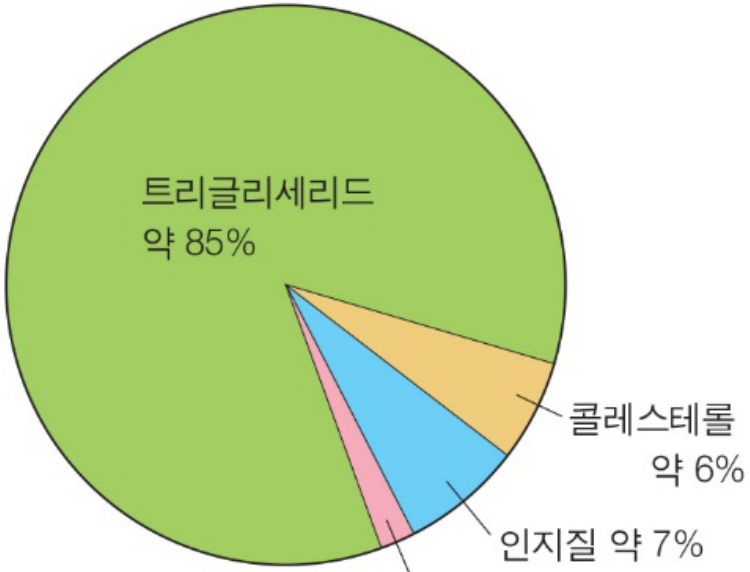


Lipoprotein type: HDL
Density: 1.063-1.090 g/mL
Diameter: 9-15 nm
Major lipids: cholesteryl ester and phospholipid
Apolipoproteins: A1, A2, C, E

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류

킬로미크론

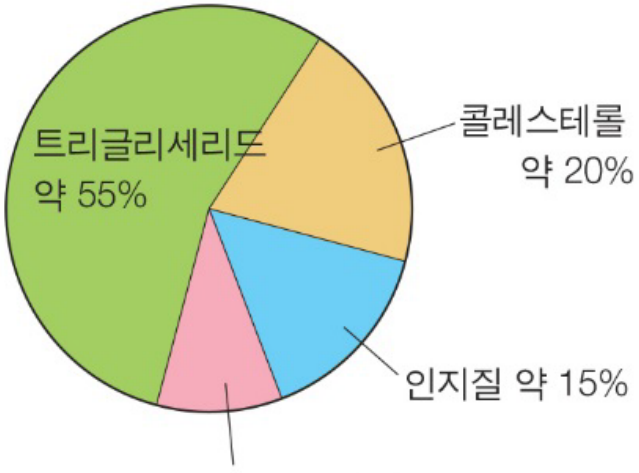
- 직경 : 80~1000 nm
- 비중 : 0.96이하
- 기능 : 음식물 유래의 지질을 혈액으로 운반



아포A-Ⅰ, 아포B-48 → LCAT[1]을 활성화
아포C-Ⅱ → LPL[2]을 활성화
아포E → LDL의 수용체와 결합

VLDL(초저밀도 지질단백질)

- 직경 : 30~70 nm
- 비중 : 0.96~1.02
- 기능 : 간에서 합성된 트리글리세리드와 콜레스테롤을 다량 함유. 트리글리세리드를 말초 조직에 공급한다.

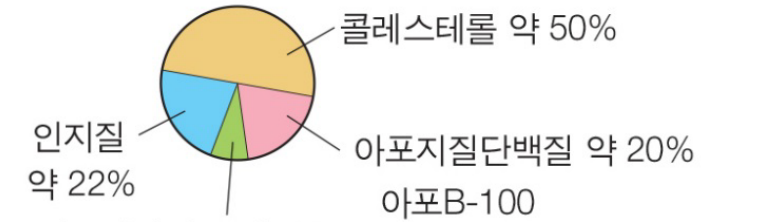


아포B-100 → LDL의 수용체와 결합
아포C-Ⅱ → LPL[2]을 활성화
아포E → LDL의 수용체와 결합

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 분류

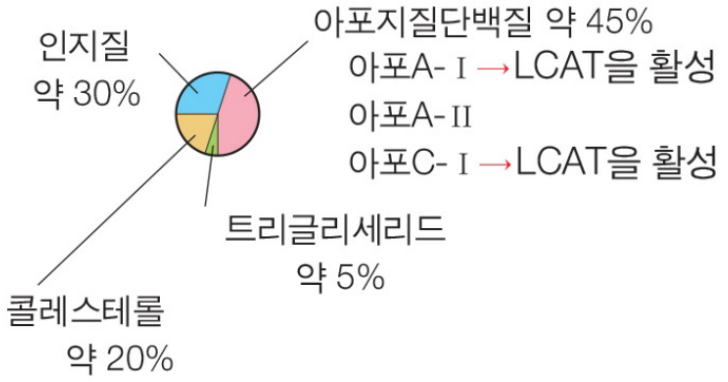
LDL(저밀도 지질단백질)

- 직경 : 20~25 nm
- 비중 : 1.02~1.06
- 기능 : 간에서 합성된 콜레스테롤을 말초조직에 공급한다.



HDL(고밀도 지질단백질)

- 직경 : 8~10 nm
- 비중 : 1.06~1.21
- 기능 : 말초조직에서 남은 콜레스테롤을 간으로 운반한다.

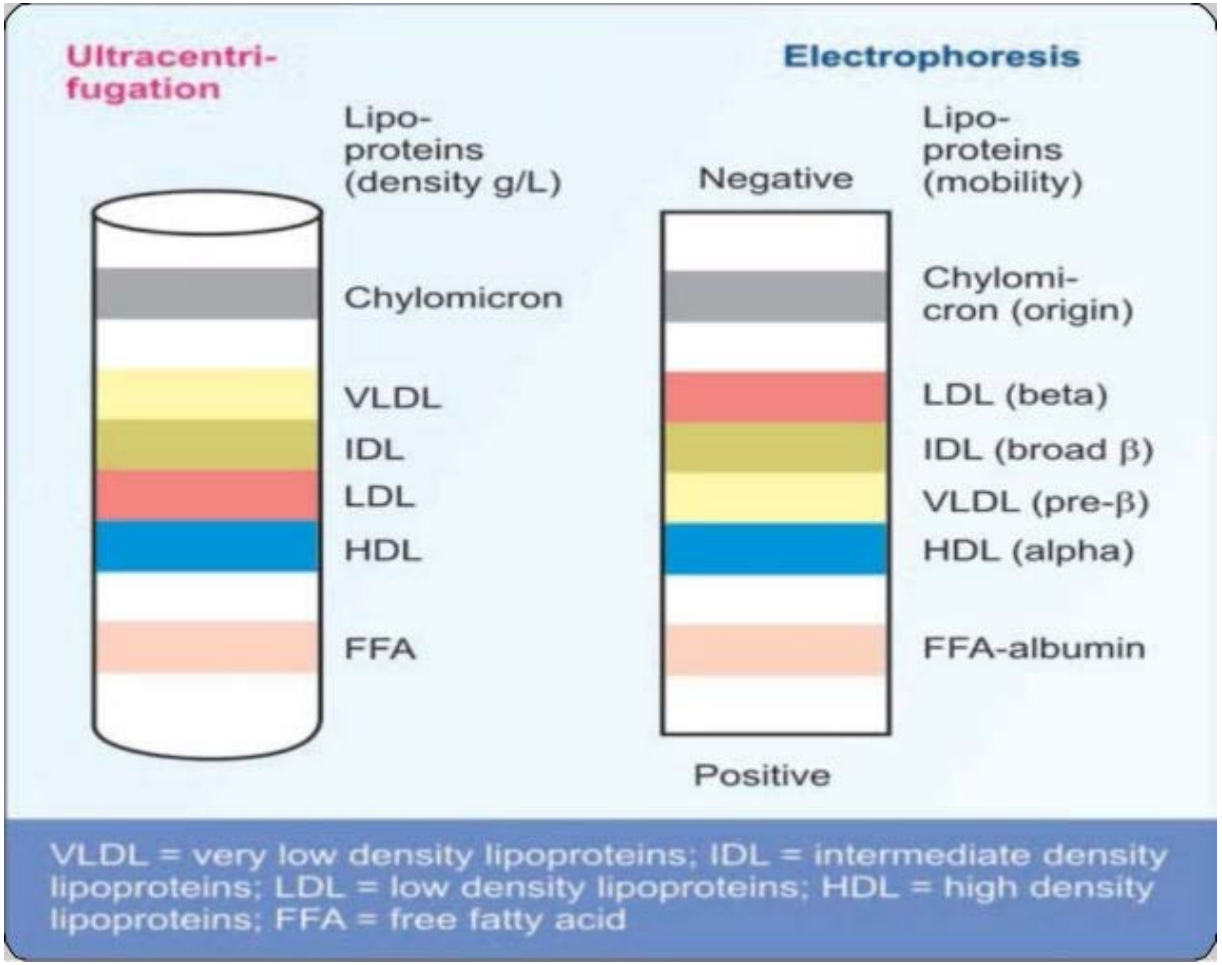


IDL (중간밀도 지질단백질)

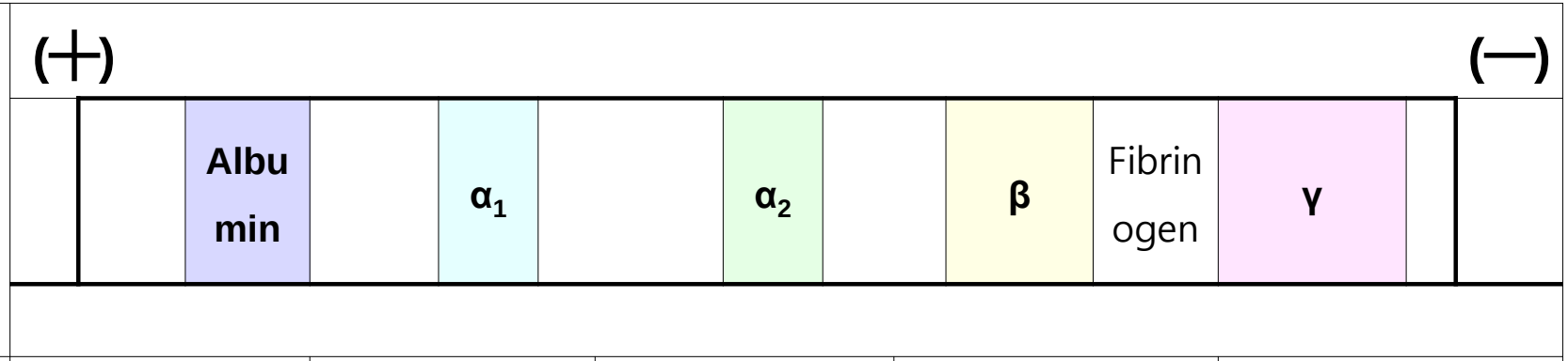
- 조성과 크기는 VLDL과 LDL의 거의 중간 값.
- 기능 : VLDL이 LDL로 변하는 도중에 트리글리세리드가 일부 가수분해를 받은 중간형의 지질단백질. VLDL단편이라고도 불린다.

1) LCAT는 lecithin-cholesterol acyltransferase의 약자로, lecithin(phosphatidylcholine)의 지방산을 콜레스테롤에 옮겨 콜레스테롤을 에스테르화하는 반응을 수행하는 효소이다.
2) LPL는 지질단백질리파아제(lipoprotein lipase(▶ 212쪽 참고)로 트리글리세리드의 가수분해를 행한다.

■ 지질단백질(Lipoprotein)의 구성 성분

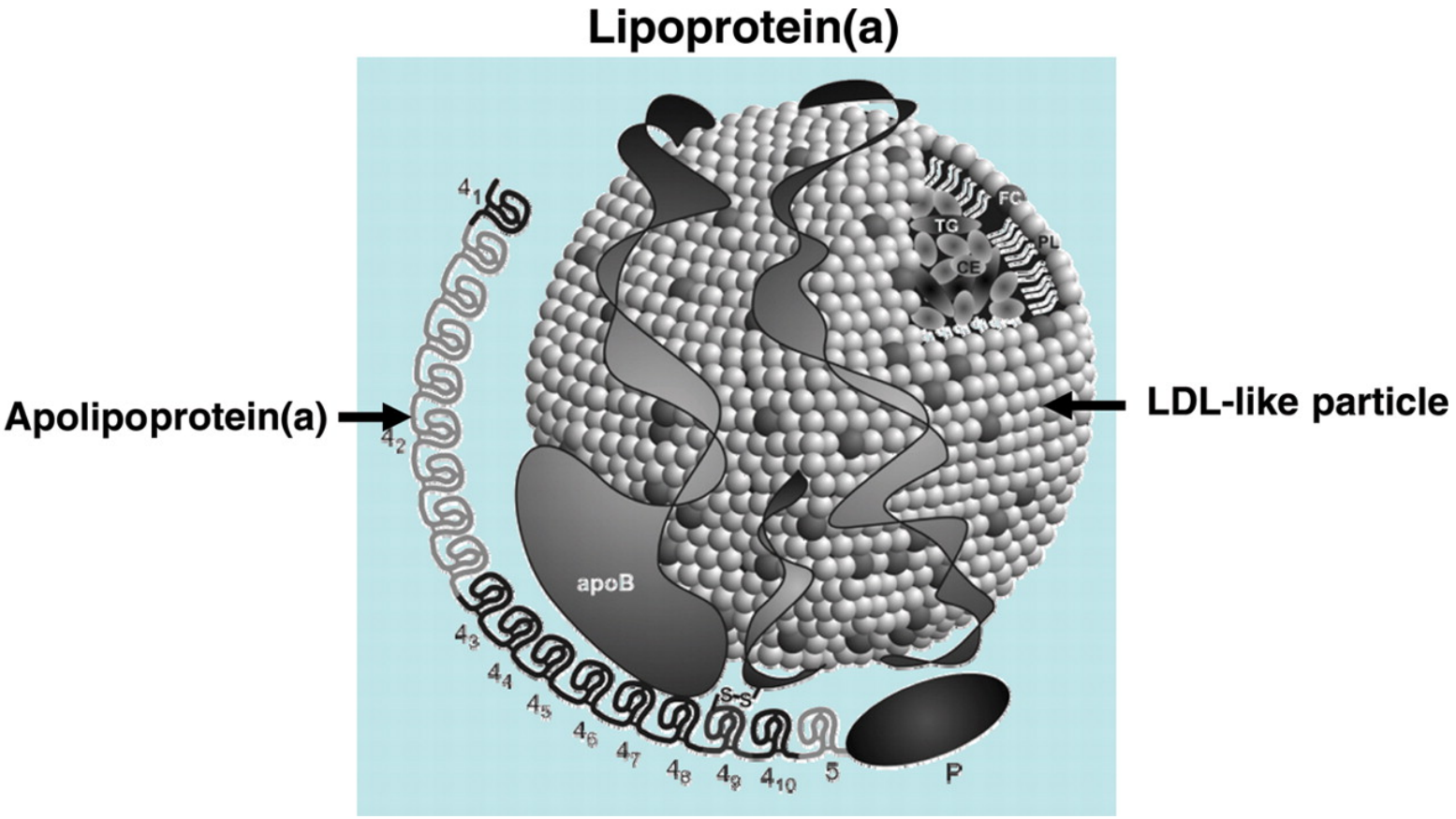


■ 혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)



단백질 분획	Albumin	α_1-Globulin	α_2-Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
정 상 치	50~65%	2~6%	4~8%	8~15%	12~20%
구 체 적 성 분	Pre-Albumin Albumin	α_1-Acid glycoprotein α_1-Antitrypsin α_1-Lipoprotein (HDL) α_1-Fetoprotein Mucoprotein	α_2-Macroglobulin Haptoglobin Ceruloplasmin Glycoprotein Prothrombin	β-Lipoprotein (LDL) Preβ-Lipoprotein (VLDL) Transferrin Hemoglobin (Hemopexin) C_3 Complement C_4 Complement CRP	IgG IgM IgA IgD IgE

■ 기타 지질단백 - Lipoprotein(a)



- 비중은 HDL_2에 가깝지만 입자크기는 LDL과 비슷한(약간 큼) Lipoprotein
- apo(a) 라는 특이 아포지단백을 포함하고 있는 것이 특징
- 플라스미노겐과 유사한 구조를 하고 있어 섬유소와 경쟁적으로 결합하여 혈전용해를 억제하여 관상동맥질환의 위험을 높인다.

■ 총지질 (Total lipid) 측정

- 혈중 지질의 총량
- Total lipid = Triglyceride + Cholesterol + Phospholipid + Free fatty acid
- 정상치 : 400 ~ 800 mg/dl
- 측정법

1) Sulfophosphovanillin 법 (SPV법)

Serum + H_2SO_4 + H_3PO_4 + Vanillin ---------> complex (Pink)

표준액 : Olive oil

2) Kunkel 법

Lipid + Phenol --------> 혼탁정도 측정

3) Bragdon 법

Folch 지질 추출액 (chloroform : methanol = 2:1) 사용

중크롬산칼리를 발색제로 사용하여 종말색은 녹색

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

■ 중성지방(Triglyceride)

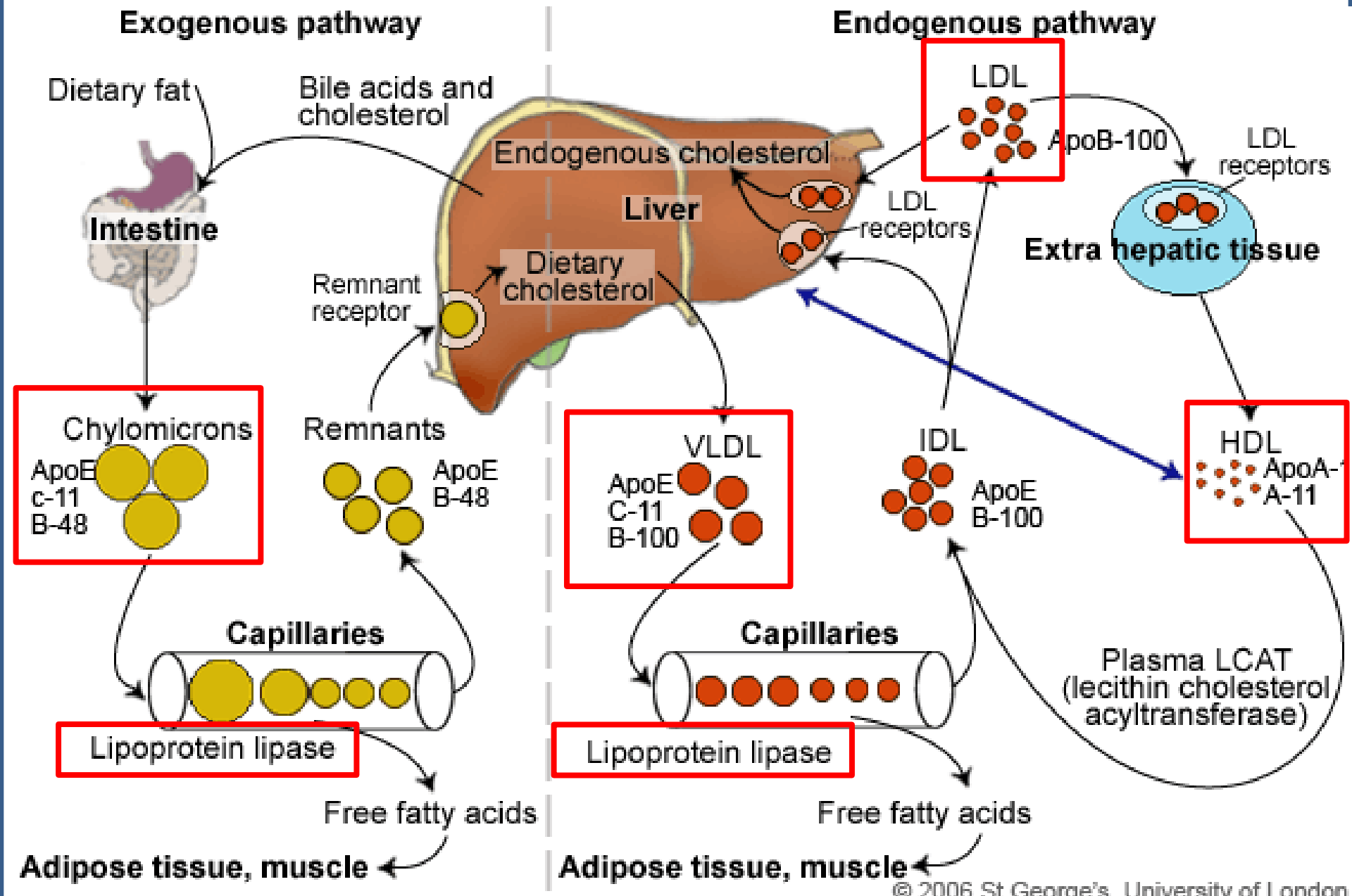
1)3가 Alcohol의 Glycerol 1분자와 3분자의 Fatty acid의 Ester 결합으로 이루어진 지질
2)혈청이 뿌옇게 되는 원인 인자
3)중성지방 (Neutral Lipid)은 Monoglyceride , Diglyceride , Triglyceride의 총칭.
그러나 혈청 중에는 90~95%가 Triglyceride로 존재하기 때문에 통상 Triglyceride와 중성지방은 같은 의미로 사용된다
4) 정상치 (성인 공복시) : 50 - 150 mg/dl
5) 동맥경화, 관상동맥경화, 죽상 경화증과 관련

■ 중성지방(Triglyceride)의 대사경로

1) 외인성 Triglyceride
- 식사 (Triglyceride) --> 장에서 흡수 --> 림프관 --> 혈중 (Chylomicron)
--> 간이나 지방조직에 저장 ----------> Fatty acid와 Glycerol로 분해하여 혈중 방출
- 외인성 TG는 주로 Chylomicron에 포함되어 운반

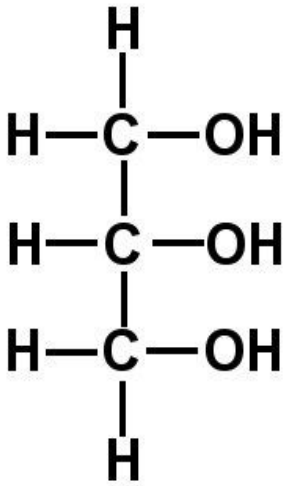
2) 내인성 Triglyceride
- 체내에서 Triglyceride 합성 --> 지질단백구성(VLDL) --> 혈중 방출
- 내인성 TG는 주로 VLDL에 포함되어 운반

Lecture 3. Lipids, Lipoproteins

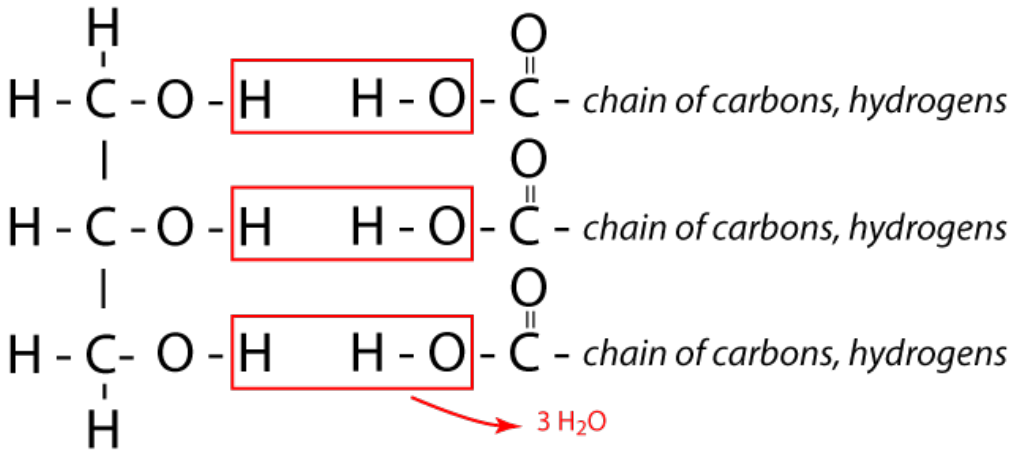


© 2006 St George's, University of London

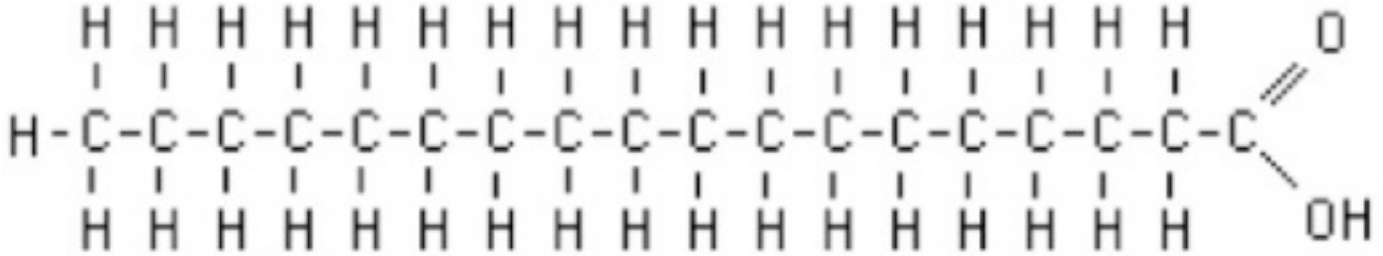
■ 중성지방(Triglyceride) 구조



Glycerol



glycerol 3 fatty acids

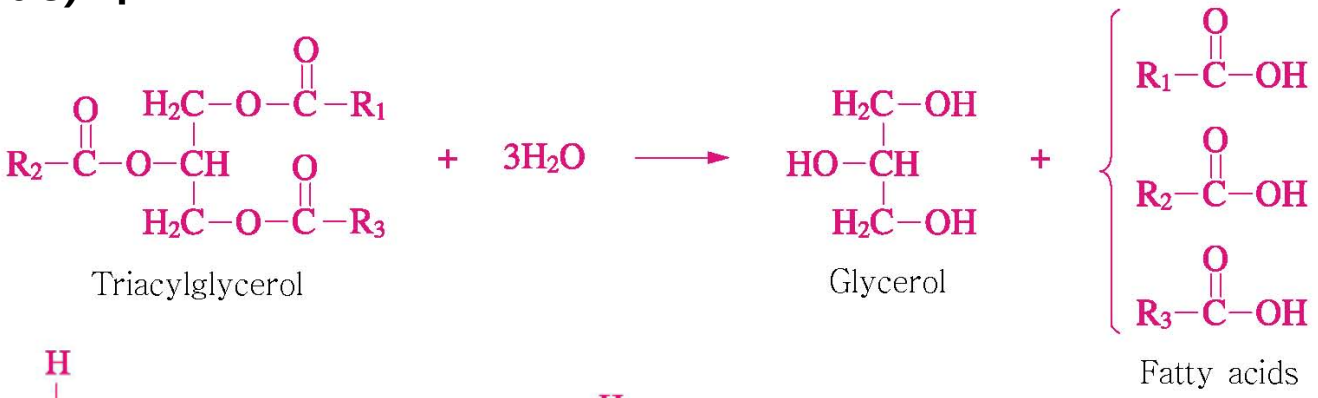


Hydrocarbon chain Carboxyl group

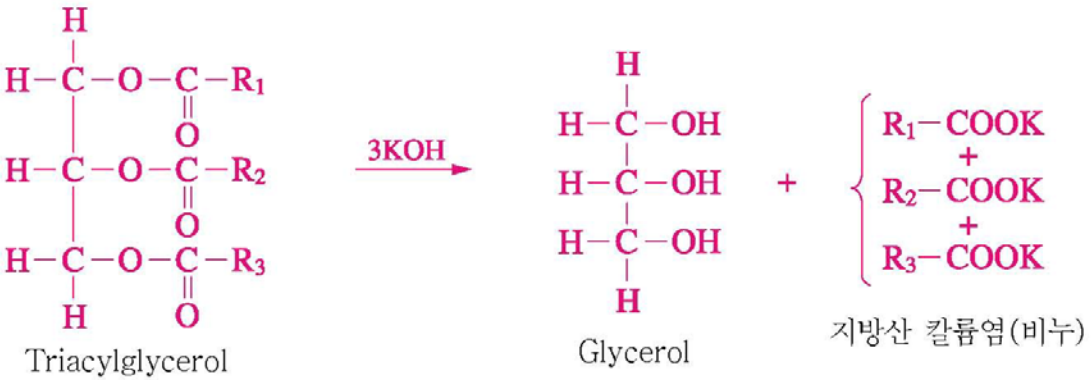
Fatty acid

■ 중성지방(Triglyceride) 구조

- 가수분해

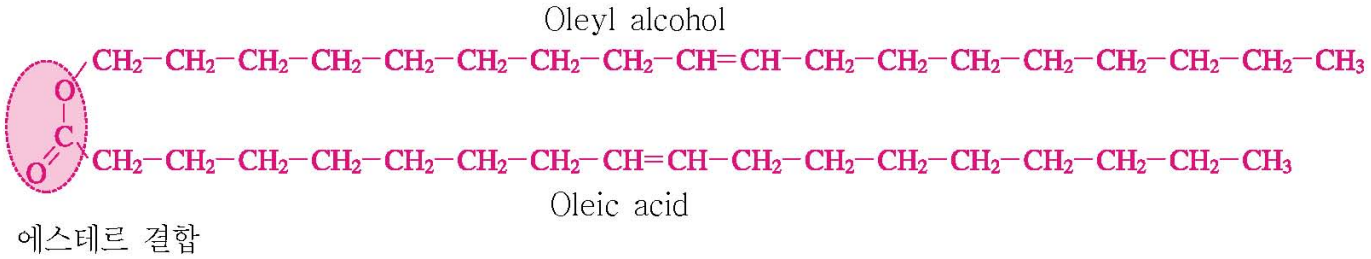


- 비누화(검화)



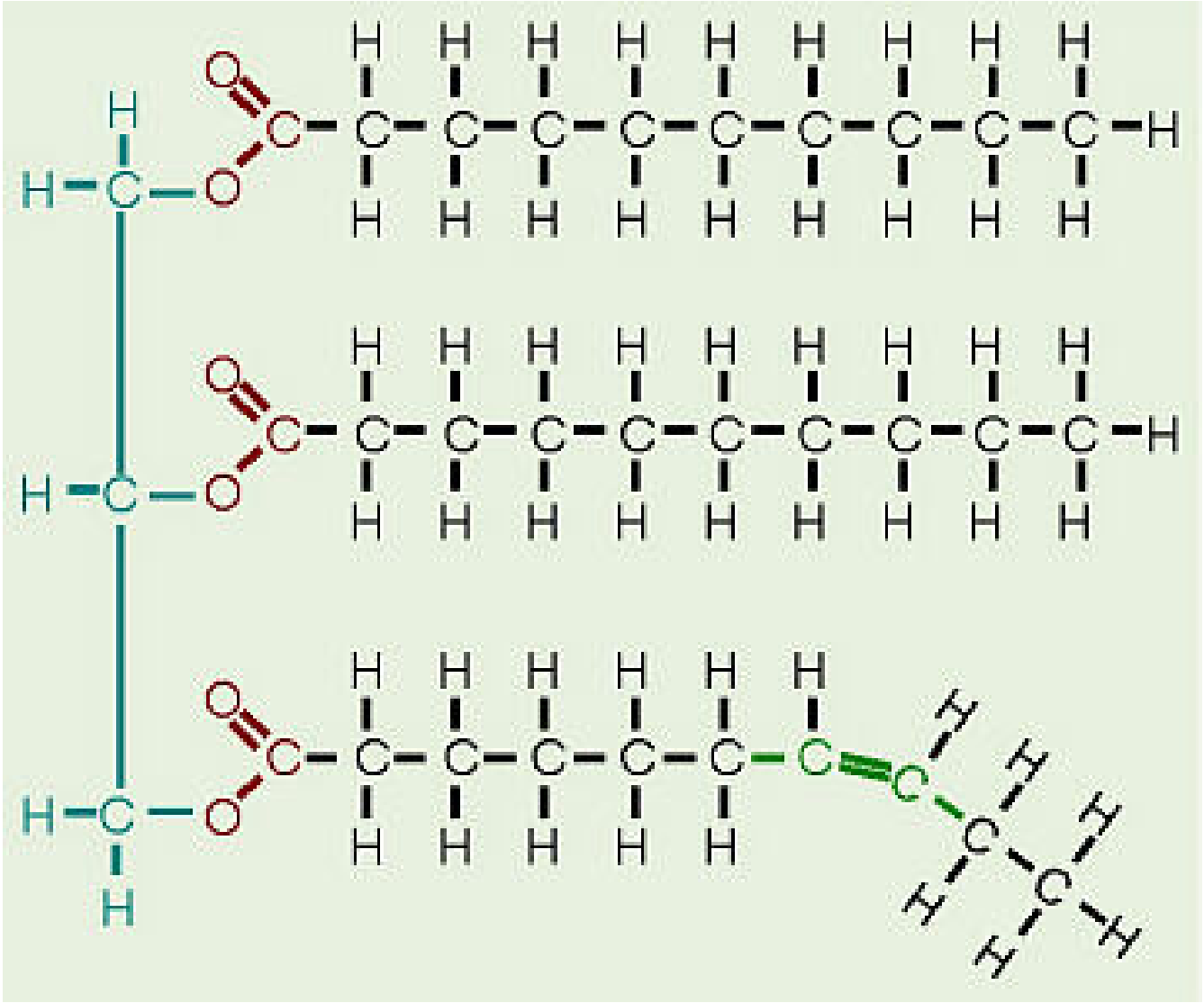
<그림 5-2> 중성지방의 비누화 반응

- 납(Wax)



<그림 5-3> 납의 구조

■ 중성지방(Triglyceride) 구조



Triglyceride

■ 중성지방(Triglyceride) 구조

- 포화 지방산

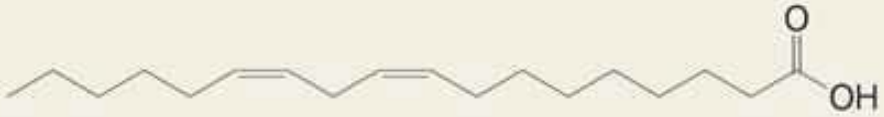
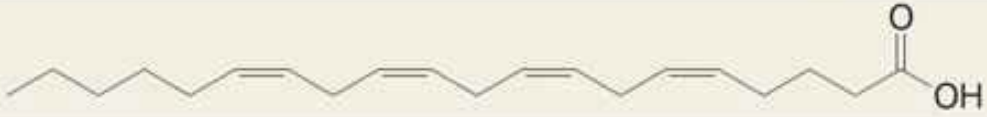
표 4-2 주요 포화지방산의 구조와 녹는점

포화지방산	탄소 수	표기법	구조	녹는점 (℃)
카프르산 (capric acid)	10	$C_{10:0}$		32
라우르산 (lauric acid)	12	$C_{12:0}$		43
미리스트산 (myristic acid)	14	$C_{14:0}$		54
팔미트산 (palmitic acid)	16	$C_{16:0}$		62
스테아르산 (stearic acid)	18	$C_{18:0}$		69
아라키드산 (arachidic acid)	20	$C_{20:0}$		76

■ 중성지방(Triglyceride) 구조

- 불포화 지방산

표 4-3 주요 불포화지방산과 녹는점

불포화지방산	탄소 수	표기법	구조	녹는점 (℃)
팔미톨레산 (palmitoleic acid)	16	$C_{16:1}$		0
올레산 (oleic acid)	18	$C_{18:1}$		13
리놀레산 (linoleic acid)	18	$C_{18:2}$		−9
리놀렌산 (linolenic acid)	18	$C_{18:3}$		−17
아라키돈산 (arachidonic acid)	20	$C_{20:4}$		−50

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

1) 화학적인 방법 : 조작이 복잡하고 정량법으로 문제가 있기 때문에 현재 사용 X

- 추출 : Serum + 추출제 + Zeolite + $Cu(OH)_2$ → TG
- 추출제 : 혈청으로부터 TG 추출 : Chloroform, Isoprophyl alcohol
- Zeolite : 인지질 흡착
- $Cu(OH)_2$, $CuSO_4$, Al_2SiO_3: 당흡착
- 검화 : T.G + KOH ----------→ Glycerol
- 산화 : Glycerol + $2NaIO_4$ ----------→ Formaldehyde
- 발색 : 발색시약으로 산화에 의해 생성된 Formaldehyde를 비색정량
  - a) Van handel 반응 : 발색시약 Chromic acid (청자색, 570nm)
  - b) Hanztsch 반응 : 발색시약 Acetylacetone (황색, 410nm)

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

2) 효소법 : 현재 널리 사용되고 있는 방법

- Serum(Free Glycerol) + ATP $\xrightarrow{\text{Glycerol Kinase(GK)}}$ G-3-P + ADP
- G-3-P + O_2 $\xrightarrow{\text{G-3-P Oxidase(G3OD)}}$ H_2O_2 + dihydroxyacetonephosphate(DAP)
- $2H_2O_2$ $\xrightarrow{\text{Catalase}}$ $2H_2O + O_2$: 혈장 내에 존재하는 내인성 F.G 제거
- TG + H_2O $\xrightarrow{\text{LipoProteinLipase(LPL)}}$ Glycerol + Fatty acid
- Glycerol + ATP $\xrightarrow{\text{Glycerol Kinase(GK)}}$ G-3-P + ADP
- G-3-P + O_2 $\xrightarrow{\text{G-3-P Oxidase(G3OD)}}$ H_2O_2 + dihydroxyacetonephosphate(DAP)
- H_2O_2 + 4-AAP + Phenol $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$ Quinone (Red, 550nm)

■ 중성지방(Triglyceride) 측정

3) UV법 : 효소법 응용

- TG + H_2O ---LipoProteinLipase(LPL)---→ Glycerol + Fatty acid

- Glycerol + ATP ---Glycerol Kinase(GK)---→ G-3-P + ADP

- ADP + Phosphoenolpyruvate(PEP) ---Pyruvate Kinase(PK)---> Pyruvate

- Pyruvate + NADH + H^+ ---Lactate Dehydrogenase(LDH)---> Lactate + NAD (340nm)

- 340nm에서 감소한 NADH양을 측정

■ 콜레스테롤 (Cholesterol)

1) 인체는 하루에 약 1.5 ~ 2.0g의 Cholesterol을 합성, 가장 많은 양을 간에서 합성

2) 생물막을 구성, 담즙산염 (Bile Salt)과 Steroid Hormone 합성에 필요

3) 뇌에 다량 함유하고 있으며 간에서 담즙관을 거쳐 배설

4) Total Cholesterol = Free Cholesterol (30%) + Ester Cholesterol (70%)

5) 지방산과 콜레스테롤은 LCAT(lecithin cholesterol acyltransferase) 작용-->Ester결합

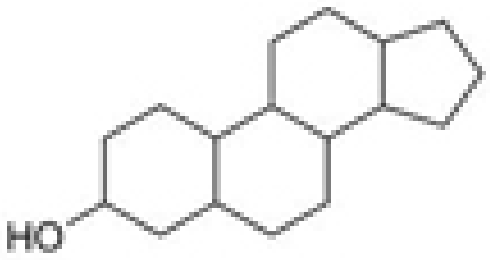
6) Hemolysis, 식사(주로 내인성 경로)의 영향이 거의 없다

7) 정상치

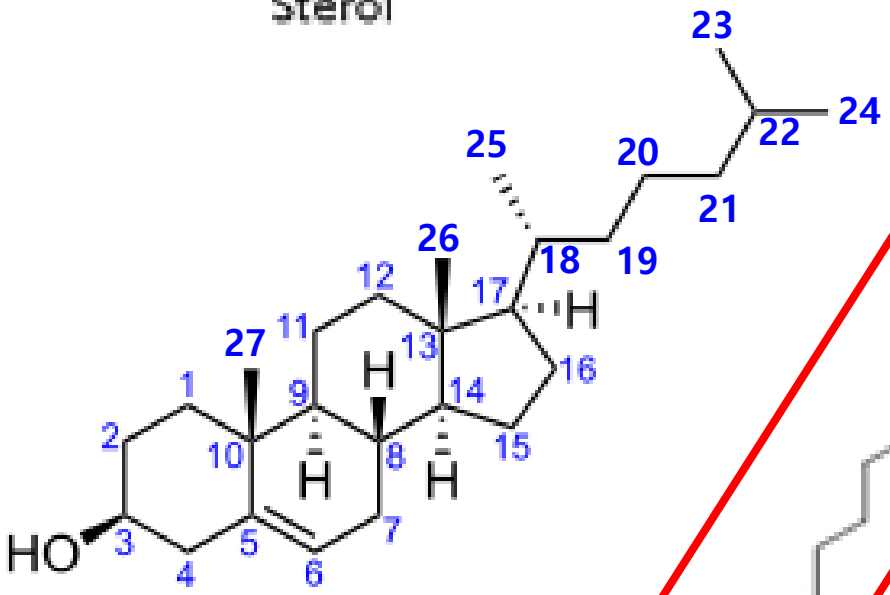
- Total Cholesterol : 150 ~ 250㎎/㎗
- Free Cholesterol : 50 ~ 80㎎/㎗
- Ester Cholesterol : 80 ~ 170㎎/㎗
- Ester Ratio : 65 ~ 80% 간실질 장애의 지표가 된다, LCAT 합성 저하

8) 노인성 질환, 동맥경화, 관상동맥성 심질환등과 관련

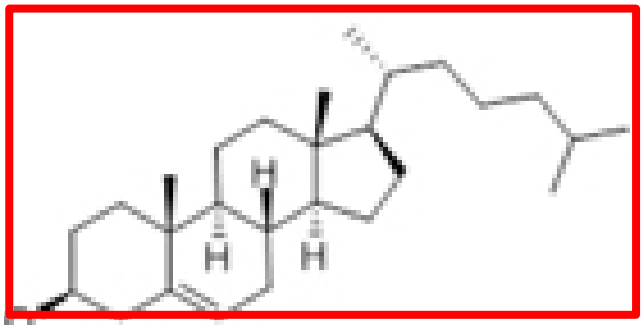
■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 구조



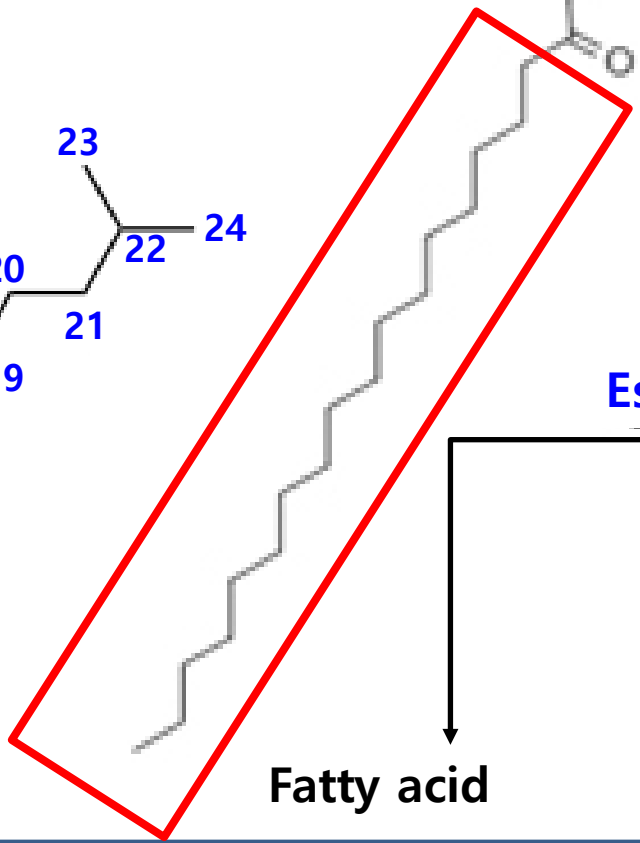
Sterol



C27H46O



Free Cholesterol



Fatty acid

Ester Cholesterol

LCAT

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

a) 1 단계 : 혈청 + 발색

- 신속하다는 것 외에는 별로 해결된 점이 없다

b) 2 단계 : 혈청 + 추출 + 발색 (Lieberman-Burchard법)

- 단백질이나 그 외 유사반응 물질은 제거 되었으나, 정제된 것은 아니다.

c) 3 단계 : 혈청 + 추출 + 검화 + 발색 (Abell-kendall법)

- 모두 유리형으로 전환시켜 발색의 차이를 극복하였다.

d) 4 단계 : 혈청 + 추출 + 검화 + Digitonin + 발색 (Sperry법)

- 반응간섭물질 완전배제

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

a) Lieberman-Burchard법 (2단계)

- 추출 : Serum + 추출시약 ----------> Cholesterol 추출
- 추출시약 (Bloor solution) : Ethanol : Ether = 3 : 1
- 발색 : Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산(발색시약) ---> 청록색 (620nm)
- Ester형과 Free형 간의 발색차이에 의한 문제점

b) Abell kendall법 (3단계)

- 추출 : Serum + Alcohol(추출시약) ------→ Cholesterol
- 검화 : Cholesterol(Free + Ester) + KOH ------→ Free Cholesterol
- 발색 (Lieberman-Burchard 반응 이용)
  Free Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산 ----→ 청록색 (620nm)
- 검화를 통해 Ester형과 Free형 간의 발색차이에 의한 문제점 해결

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

1) 화학적인 방법

c) Sperry법 (4단계)

- 추출 : Serum + Alcohol(추출시약) ------→ Cholesterol
- 검화 : Cholesterol(Free + Ester) + KOH ------→ Free Cholesterol
- 침전 : Digitonin을 추가하여 Free cholesterol을 침전시킨다
- 발색 (Lieberman-Burchard 반응 이용)
  Free Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + 무수초산 ----→ 청록색 (620nm)

d) Killiani법

- 발색 : Cholesterol + H_2SO_4 + 빙초산 + $FeCl_3$ --------> 적갈색 (560nm)

■ 콜레스테롤 (Cholesterol) 측정

2) 효소법

- Ester Cholesterol + H_2O ---(Cholesterol esterase)---> Free cholesterol + Fatty acid
- Free Cholesterol + H_2O + O_2 ---(Cholesterol Oxidase)---> Cholest-4-en-3-one + H_2O_2
- H_2O_2 + 4AAP + Phenol ---(Peroxidase)---> Quinone (Red, 520nm)
- Cholesterol Esterase를 첨가하지 않으면 Free Cholesterol만 측정된다

3) UV법 : 효소법 응용

- Ester Cholesterol + H_2O ---(Cholesterol esterase)---> Free cholesterol + Fatty acid
- Free Cholesterol + NAD^+ ---(CDH)---> Cholest-4-en-3-one + NADH + H^+
- 340nm에서 흡광도 측정

■ 인지질 (Phospholipid)

1) 인지질은 세포막을 구성하고, 지방의 유화 및 흡수, 혈액응고, 산염기 평형, Cholin 대사에 관여한다. * Cholin : 지질 안정화 대사에 중요한 역할을 한다.

2) 혈청 인지질은 지질대사 이상으로 증감하나 Cholesterol과 평행해서 변동하는 경우가 많고 Cholesterol 측정에 많이 이용된다.

3) 인지질은 Cholesterol 농도와 비례하여 변화한다.

* Cholesterol X 1.1 = Phospholipid

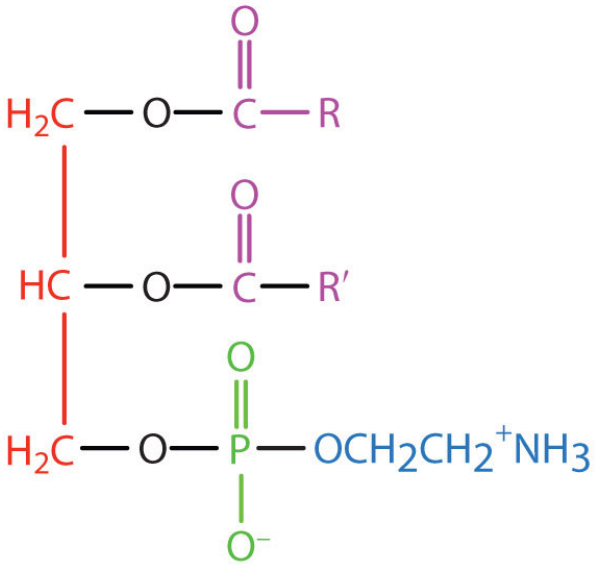
4) 주요구성성분
- Cephalin : 5%
- Lecithin : 60 ~ 70%
- Sphingomyelin : 20%
- Lysolecithin : 5 ~ 10%

5) 인지질 합성장소 : 간 (일부는 장점막에서 합성된다.)

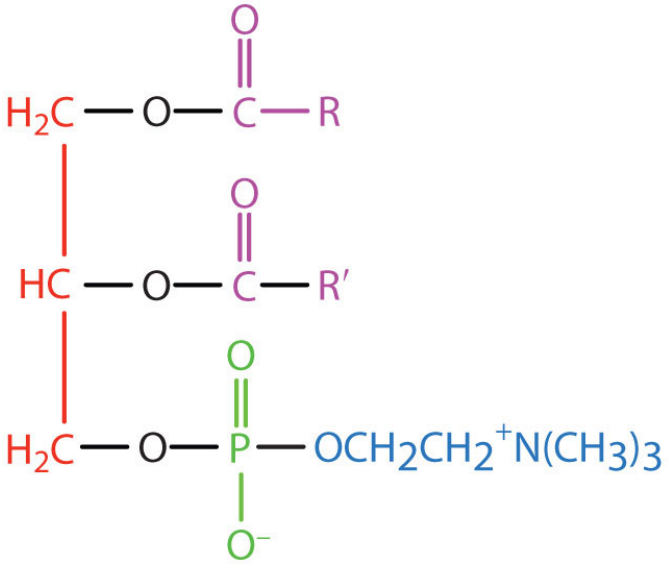
6) 정상치 : 150 ~ 250㎎/㎗

7) 폐쇄성 황달의 경우 Lecithin 증가로 수치가 증가한다

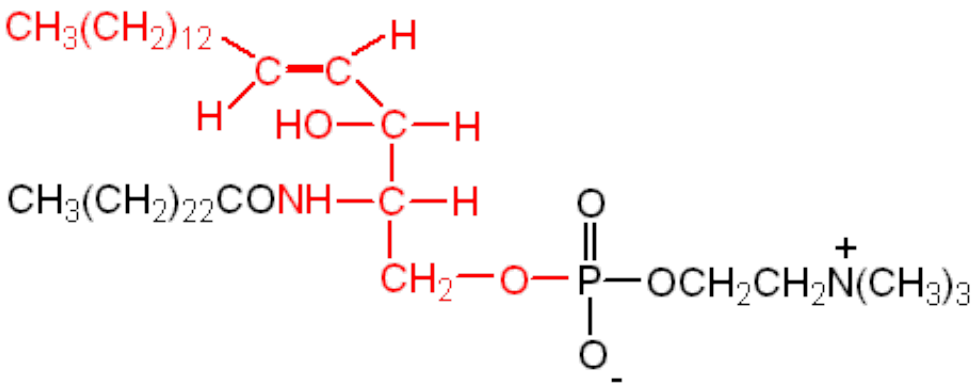
■ 인지질 (Phospholipid) 구조



Phosphatidylethanolamine
(cephalin)



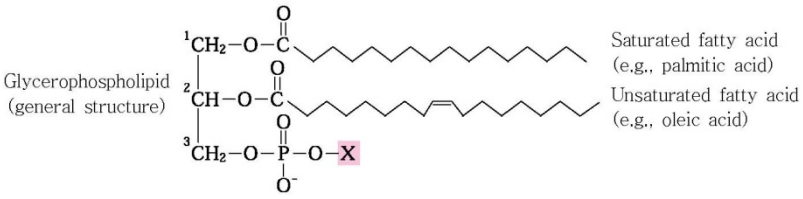
Phosphatidycholine
(lecithin)

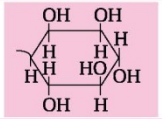
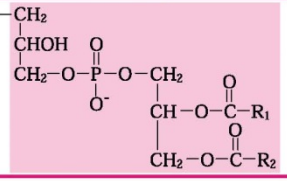


a sphingomyelin

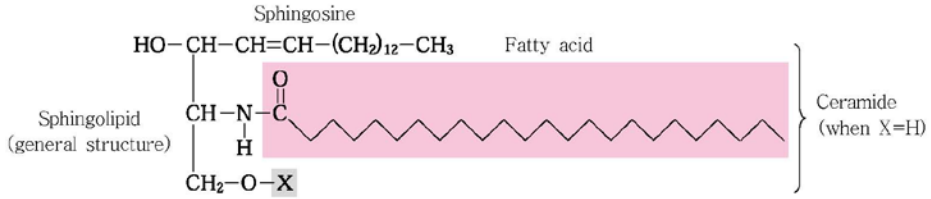
■ 인지질 (Phospholipid) 구조

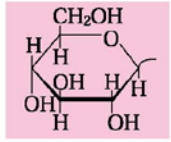
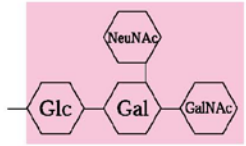
<표 5-3> 글리세로인지질의 종류



Name of X	Formula of X	Name of glycerophospholipid	Net charge (at pH 7)
-	$-H$	Phosphatidic acid	-1
Ethanolamine	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$	Phosphatidyl ethanolamine	0
Choline	$-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	Phosphatidyl choline	0
Serine	$-CH_2-CH(\overset{+}{N}H_3)-COO^-$	Phosphatidyl serine	-1
Glycerol	$-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$	Phosphatidyl glycerol	-1
Inositol		Phosphatidyl inositol	-1
Phosphatidyl glycerol		Cardiolipin	-2

<표 5-4> 스핑고지질의 종류



Name of X	Formula of X	Name of sphingolipid
—	$-H$	Ceramide
Phosphocholine	$-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	Sphingomyelin
Glucose		Glucosylcerebroside
Di-, tri- or tetrasaccharide		Lactosylcerebroside
Complex oligosaccharide		Ganglioside

Neutral glycolipids

- 뼈대분자의 종류는 글리세롤과 스핑고신이 있음.
- 글리세롤을 뼈대분자로 하는 인지질을 포스포글리세라이드 phosphoglycerides)
- 스핑고신을 뼈대분자로 하는 인지질은 스핑고지질(sphingolipids)라 명명

■ 인지질 (Phospholipid) 측정

1) 화학적 방법 (비색법 Fisk-Subarrow법)

- 추출 : Serum + Bloor(추출시약) ------→ Phospholipid
- 감화 : Phospholipid + H_2SO_4 ----→ Phosphate 유리
- 발색 : Phosphate + Molybdate + 1-2-4 ANSA -----> Molybdenum (Blue, 660nm)
- 직접 정량이 불가능하여 무기인을 정량하여 그 값에 분자량비 25를 곱하여 정량
  Phosphate x 25 = Phospholipid

2) 효소법

- Phospholipid + H_2O $\xrightarrow{\text{Phospholipase}}$ Choline + 분해산물
- Choline + $2O_2$ + H_2O $\xrightarrow{\text{Choline Oxidase}}$ Betaine + $2H_2O_2$
- H_2O_2 + 4-AAP + Phenol $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$ Quinone (Red Color, 550nm)

■ HDL-Cholesterol 측정

- HDL중 포함되어 있는 Cholesterol을 의미
- HDL은 혈관이나 말초조직에 축적된 유리형 Cholesterol을 HDL-Cholesterol 형태로 받아드려 간으로 운반, LDL의 세포내로 축적 방지하여 항동맥경화 작용을 한다.
- 운동시 LDL이 HDL로 변화한다.
- 초원심분리법
- 침전법 : ApoB를 포함하는 지질단백 [CM, VLDL, IDL, LDL, Lp(a)] 을 침전시켜 상층에 남은 HDL을 가지고 효소법으로 Cholesterol 측정
  a) Heparin-Mn법
  b) Dextran-$MgSO_4$법