

Hb Queens[α 34(B15)Leu→Arg] 가족 1례

계명대학교 의과대학 임상병리학교실¹, 서울대학교 의과대학 임상병리학교실²,
일본 야마구치의과대학 의학부 임상검사의학교실³

전동석¹ · 최귀전¹ · 전효진¹ · 김재룡¹ · 이영준²
박성섭¹ · 조한익² · 오바 유조³ · 하토리 유키오³

= Abstract =

A Family Case of Hb Queens[α 34(B15)Leu→Arg]

Dong Seok Jeon, M.D.¹, Gui Jeon Choi, M.D.¹, Hyo Jin Chun, M.D.¹
Jae Ryong Kim, M.D.¹, Young Joon Lee, M.D.², Sung Sup Park, M.D.²
Han-Ik Cho, M.D.², Yukio Hattori, M.D.³ and Yuzo Ohba, M.D.³

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Keimyung University¹, Taegu, Korea,

Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine², Seoul, Korea,

Department of Clinical Laboratory Science, School of Medicine, Yamaguchi University³, Ube, Japan

A 36-year-old pregnant woman with gestational diabetes mellitus and anemia was found to have an abnormal Hb (comprising 18.7%) in the automated midget low pressure cation-exchange chromatography (DiaSTAT™, Bio-Rad, USA) for Hb A_{1c} assay. The abnormal Hb revealed an abnormal peak emerged slightly later than normal Hb A1 in DiaSTAT™ chromatogram, subsequently confirmed by cellulose acetate membrane electrophoresis and isoelectric focusing. This hemoglobinopathy with high isoelectric point was noted and abnormal α chain globin was prepared by chromatography. Family study was carried out and this α chain variant was also found in four other family members, and all of them had no clinical abnormalities, except well controlled diabetes. As the results from peptide mapping, amino acid analysis and sequencing, abnormal Hb of the patient was finally identified as Hb Queens[α 34(B15)Leu→Arg] without clinical abnormalities.

Key Words : Hb Queens, Cation-exchange chromatography, Hb A_{1c}

서 론

혈색소는 정상인에서 일반적으로 출현하는 정상 혈색소와 주로 유전자의 돌연변이에 의한 이상 혈

색소 등이 있는데, 선천성 이상 혈색소질환은 글로빈 체인의 아미노산 서열변화(이중 대부분이 주로 단일 아미노산 치환)에 의한 집단과 한 종류의 글로빈 체인 합성저하로 기인된 thalassemia 증후군 등이 있는데, 이중 전자의 대부분은 유전코드 한개의 염기치환에 의한다¹⁾. 이와 같은 이상 혈색소질환의 선별검사 방법으로 주로 이용되는 것이 여지, 한천겔, 전분겔 등을 지지체로 이용한 전기영동법

이 있으며, 혈색소의 특성을 자세히 알기 위한 검사법으로는 요소 전기영동법, isoelectric focusing 및 chromatography법 등이 있다²⁾.

이상 혈색소 질환의 일부만이 임상적 증상과 혈액학적 이상소견을 보이는 것으로 알려져 있다. 혈색소 이상 질환에 대한 관심의 고조와 함께 발달된 선별검사법으로 여러 증례가 국내에서도 보고^{1~5)} 되고 있는데, 특히 ion-exchange chromatography 나 HPLC 등으로 신속한 선별검사가 가능하며⁶⁾, 자동화된 HPLC법으로 당뇨환자의 장기간 혈당 추적검사로 이용되는 정기 Hb A_{1c} 검사장비에 의한 측정과정에서 우연히 발견되는 경우가 있다^{7~9)}.

저자들은 cation-exchange low pressure column chromatography법의 DiaSTAT™(Bio-Rad, USA) 자동분석기를 이용한 Hb A_{1c} 검사상 비정상적인 chromatogram을 나타내었던 임신성 당뇨환자의 이상 혈색소 분석한 결과, Hb Queens[α 34(B15)Leu→Arg]로 진단된 무증상 가족례를 경험하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

증례

환자: 김○○, 36세, 여자

주소: 특이적 임상소견 없음, 임신성 당뇨에 대한 정기적 검사를 위해 내원.

과거력: 임신성 당뇨로 거대태아를 분만한 과거력이 있는 36세의 산모로서, 빈혈과 당뇨이외에는 특이한 과거력이 없었음.

가족력: 모친, 큰아들 및 여동생이 당뇨의 병력이 있으나 혈당조절은 비교적 잘 되고 있음.

현병력 및 이학적 소견: 특이적 소견 없음.

검사 소견: 말초혈액 검사상 백혈구 8,780/ μ L, 혈색소 9.9g/dL, 헤마토크리트 34.6%, 혈소판 252,000/ μ L였고, MCV 75.4fL, MCH 21.5pg, MCHC 28.5g/dL, RDW 17.4%, HDW 3.36g/dL의 소견을 나타내었다. DiaSTAT™(Bio-Rad, USA)자동분석기를 이용하여 장기간 당뇨조절에 대한 Hb A_{1c} 검사에서 Hb A_{1c}는 8.0%였으나, 18.7%의 이상 혈색소 분획이 확인되었다(Fig. 1). 말초혈액 도말

검사상 경미한 대소부동증을 나타내었으나, 변형적 혈구는 보이지 않았다. 환자의 적혈구 용출액으로 cellulose acetate electrophoresis 및 isoelectric focusing(IEF) 검사를 시행하였는데, REP Hb-IEF (Helena Lab, USA) kit로 실시한 전기영동상에서 Hb S와 Hb F사이에서 Hb S보다 양극쪽에 위치하는 비정상 분획이 확인되었다(Fig. 2).

환자 적혈구 용출액을 reversed phase HPLC로 분리한 결과 정상보다 빨리 용출되는 약 19%의 비정상 α -체인이 확인되었다(Fig. 3). 환자 적혈구 용출액의 α -체인 분리를 위하여 urea CM-cellulose column chromatography를 시행하여¹⁰⁾ α -체인의 약

Bio-Rad DiaSTAT

Well: 1 1:31 p.m. June 28, 1996

ID _____

Peak	RT	%	(% of Hb A)
Hb A _{1ab}		2.1%	(% of Hb A)
Hb A _{1c}	193	8.0%	(% of Hb A)
Hb A ₁		10.2%	(% of Hb A)
Hb A ₀	375		
Hb S	406	18.7%	Hb Variant

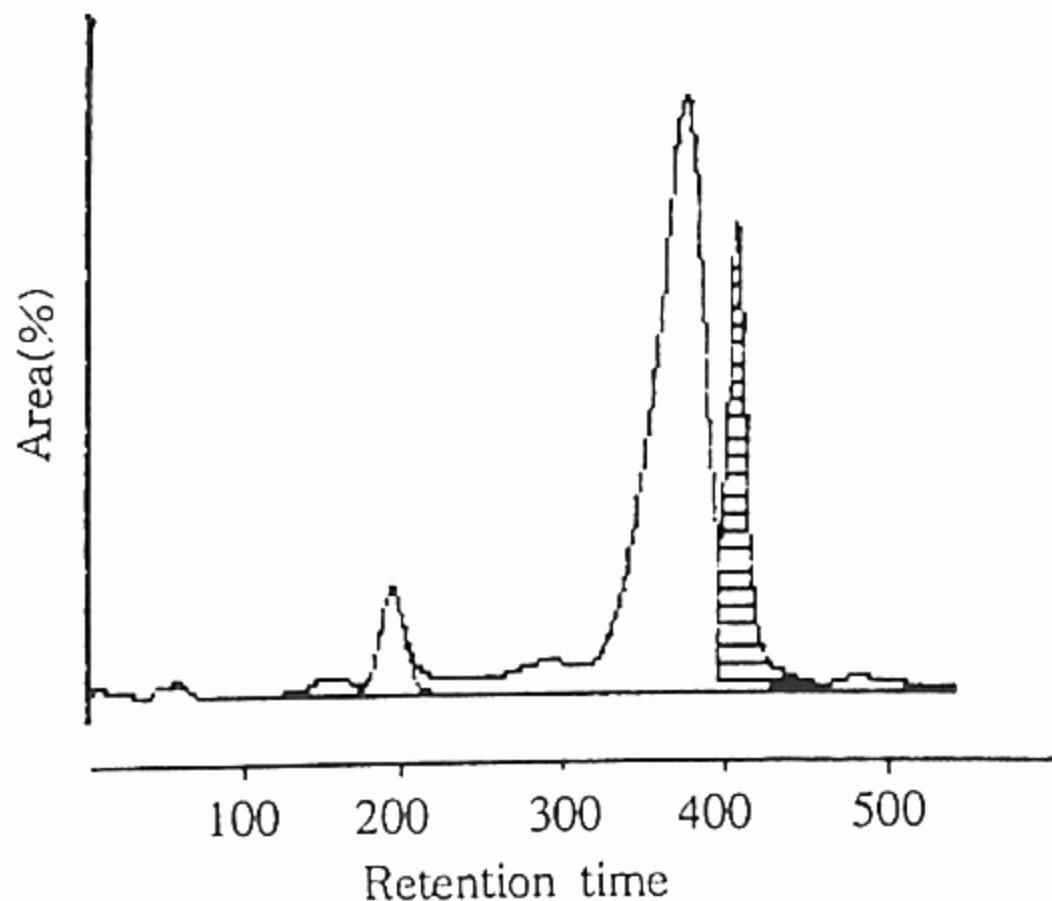


Fig. 1. Chromatogram of the patient(by DiaSTAT™ automated Hb A_{1c} analyzer, midget low pressure cation-exchange chromatography) shows abnormal peak after Hb A₁. The abnormal fraction was about 18.7% of total Hb.

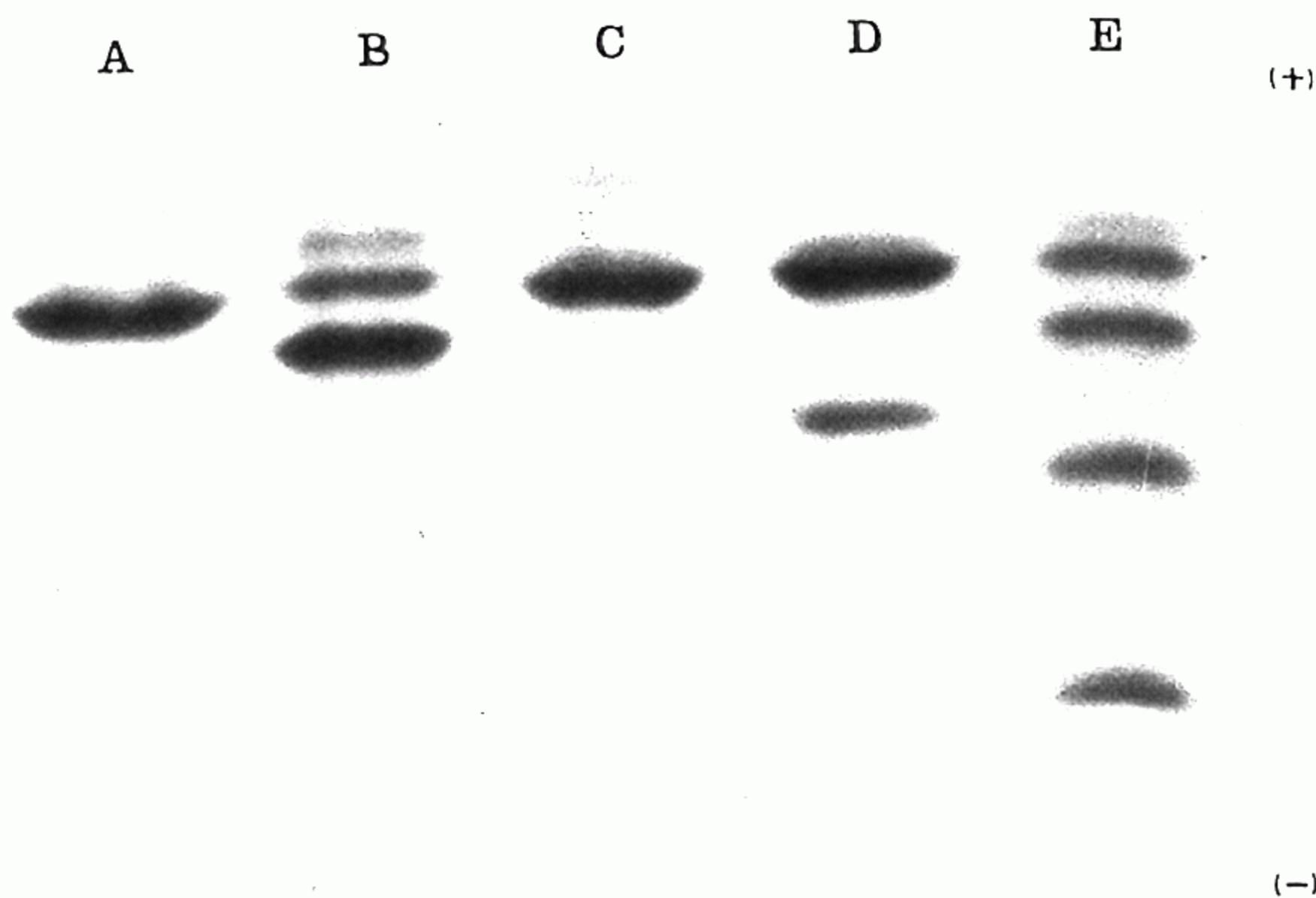


Fig. 2. Isoelectric focusing shows abnormal Hb band from the patient. The presence of an additional abnormal band migrating to the anodic edge of Hb S was definitely noted. A: hemolysate from normal adult, B: cord blood hemolysate, C: hemolysate from normal pregnant woman, D: hemolysate from the patient, E: control hemolysate(Hb AFSC).

20%에 해당하는 비정상 α -체인 분획을 얻었다(Fig. 4). 이를 trypsin 용액(1g/dL globin, 10mg/dL trypsin, pH 8.0)으로 37°C에서 4시간 처리한 후 비정상 α -체인의 peptide mapping을 reversed phase HPLC(μ Bondapak C₁₈ column)로 실시한 결과, α T-5 peak가 소실되어 나타났다(Fig. 5). 빨리 용출되는 2개의 비정상 peak(α T-5a, α T-5b, Fig. 5B 참조)를 rechromatography하여 정제후 gas phase Edman degradation(Protein Sequencer 470A, Applied Biosystems)으로 sequencing한 결과, α T-5a의 아미노 말단 서열(amino terminal sequence)은 Met-Phe-Arg였던 반면에 α T-5b의 서열은 Ser-Phe-Pro-였으므로 α T-5의 3번째 염기가 Leu에서 Arg으로 치환되었음을 알 수 있었다. 이로서 환자의 비정상 Hb은 α -글로빈의 34번째 아미노산인 Leu가 Arg로 치환된 Hb Queens[α 34(B15)Leu → Arg]로 진단하였다.

환자의 백혈구로부터 genomic DNA를 분리하여 α -글로빈 유전자의 전체 exon 2에 대한 α 18, α 19

primer를 이용하여 PCR 후 single strand conformation polymorphism(SSCP)분석 결과 비정상 α -글로빈은 α 1-글로빈 유전자에 이상이 있음을 알 수 있었다.

가족검사를 시행하여 환자와 동일한 비정상 분획유무와 정도를 확인하였다. 원 거주지 관계로 10명의 가족이 검사 가능하였으며, 환자의 모친 남동생, 여동생 및 환자의 큰 아들에서 약 18.5% 전후의 비정상 혈색소분획을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

한국인의 이상 혈색소에 대한 보고중 김창세 등²⁾에 의한 보고에 따르면 1991년 4,000명의 선별검사로 2례의 α -글로빈 이상이 발견되었는데 이중 한 명으로부터 α -글로빈의 아미노산의 양을 상대적으로 비교하여 leucine/arginine으로 치환된 이상 혈색소 질환이라고 하였다. 이상 혈색소 질환은 ion-exchange chromatography나 HPLC 등으로 신

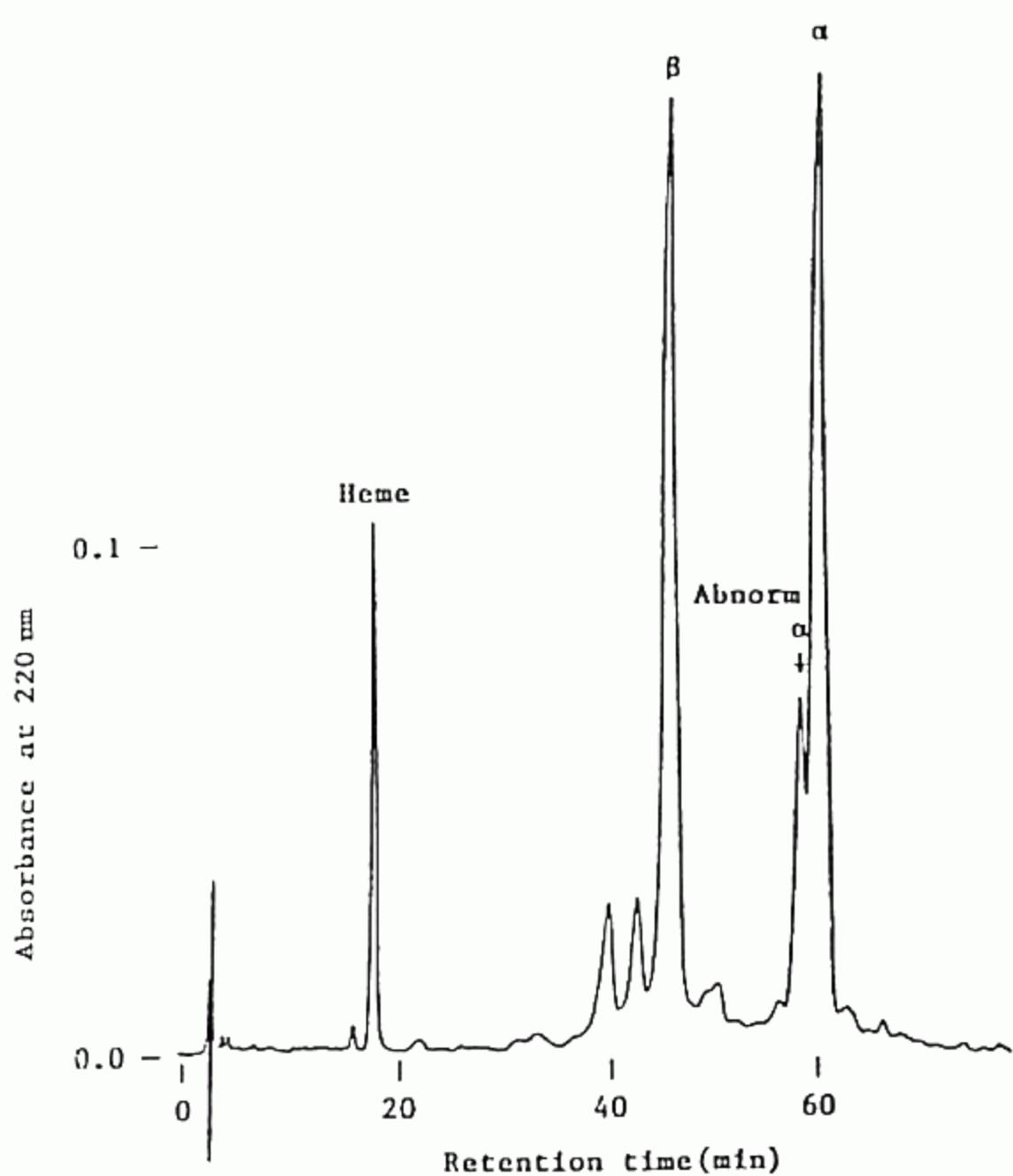


Fig. 3. Reversed phase HPLC of the hemolysate from the patient. The abnormal α -chain eluted slightly faster than normal, only partially separating from the normal α -chain.

<Conditions>

Column: μ BondaSphere C18-300A, 0.4 \times 15cm(Waters)
Developer A: 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)-20% acetonitrile(ACN)
B: 0.1% TFA-80% ACN Gradient program: Linear gradient from B 30% to 45% in 120 min

Flow rate: 0.5mL/min
Sample: Diluted hemolysate(Hb about 1g/dL) 3 μ L (about 30 μ g)

속한 선별검사가이 가능하며, 자동화된 HPLC법으로 당뇨환자의 장기간 혈당추적검사로 이용되는 Hb A_{1c}의 측정과정에 우연히 발견되는 경우가 있다^{7, 9}.

Hb Queens는 Tatsis¹¹에 의하여 1979년 처음 보고된 이상 혈색소로서 뉴욕 Queens병원의 한국인 소녀에서 처음 확인되었고, 일본인, 중국인 및 베트남인 등 동양인에서 보고^{5, 12~14}되고 이남용 등⁵에 의한 국내 첫 보고례는 codon 121(GAA \rightarrow TAA)의 돌연변이에 의한 β -thalassemia minor 환자의 가계도 조사중, β -thalassemia minor는 음성이나 Hb

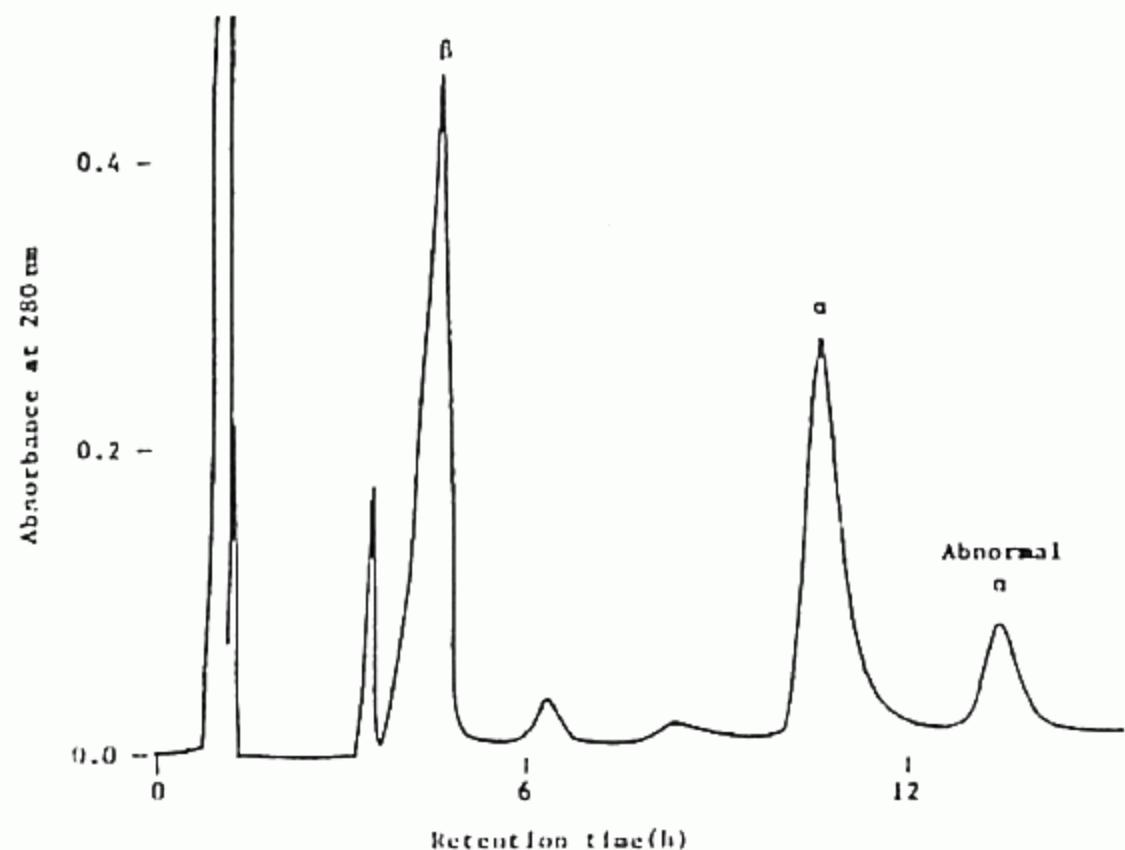


Fig. 4. Urea CM-cellulose column chromatography of the patient. The abnormal α -chain eluted later than normal. It comprised about 20% of the total α -chains.

<Conditions>

Column: Home packed CM-52(Whatman), 0.4 \times 15cm

Developer: A linear gradient of sodium phosphate in 8M urea(pH about 6.9)

Sample: Globin from patient, about 100mg

Flow rate: 45mL/h

Queens가 우연히 발견된 예로서 임상증상은 동반되지 않았다고 한다. Hb Queens는 임상적인 증상은 나타내지 않는 것으로 보고되고 있다. 저자들이 경험한 본 증례의 경우 빈혈이 나타났으나, 이는 임신으로 인한 것으로 사료된다. Hb E와 동반되어 베트남 소아에서 나타난 Hb Queens의 경우에서 볼 수 있었던 소적혈구증과 저색소증은 Hb E에 의한 소견이였으며, Hb Queens의 혈액학적 기능은 정상으로 환아의 고빌리루빈혈증과는 관련이 없다고 하였다¹². 정제 분리된 Hb Queens가 열안정성이 저하되어 있다는 보고¹³가 있는데, 본 증례에서 노 환자의 적혈구 용혈액으로 50°C 열처리 및 isopropanol precipitation 검사한 결과 marginally positive 소견을 보여 주었다. 검체 채취후 장시간 경과에 따른 검체의 노후 및 변성의 가능성을 배제하기 위하여 환자의 신선검체로 재검한 결과, 열처리 및 isopropanol precipitation 검사상 불안정혈색소는 음성으로 나타났다.

Hb Queens는 생체내에서 안정하며, 이종접합 보유자인 경우 용혈을 촉발시킨다는 어떠한 임상적인

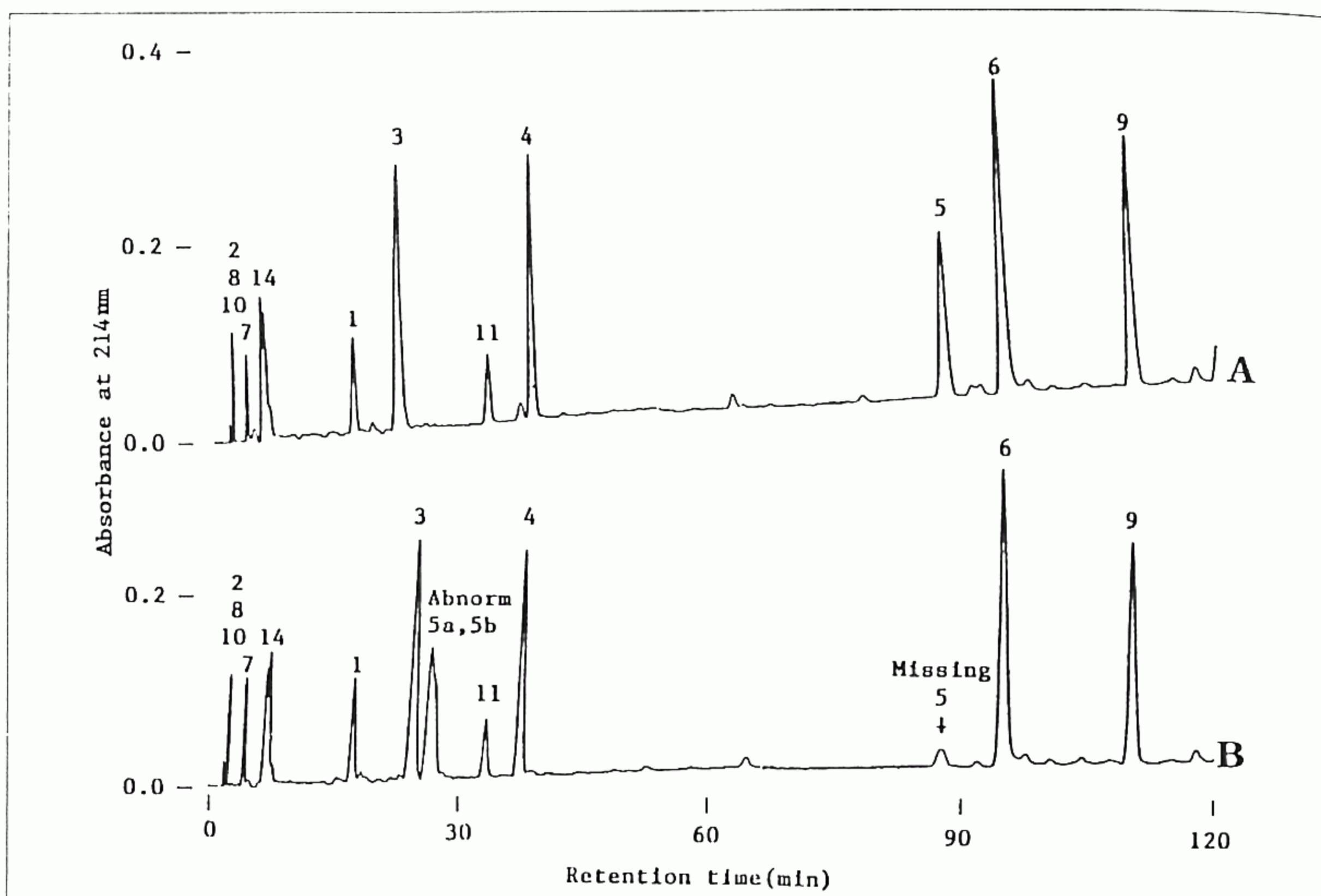


Fig. 5. Peptide mapping of the normal(A) and the patient(B). The abnormal α -chain of patient was digested with trypsin and the product was subjected to reversed phase HPLC on a μ BondaSphere C18-column, $0.39 \times 30\text{cm}$ (Waters). About 0.2mg of the sample was loaded and developed with a linear gradient of ACN(from 0 to 32% in 120 min at a flow rate of 1.5mL/min) in 9mM trimethylamine-10mM acetic acid(TmAc)(pH about 5.6). The number above peaks are the tryptic peptide numbers from the α -chain. One tryptic peptide, α T-5, is missing and there are two mutually overlapping double peaks eluting much faster, just behind α T-3.

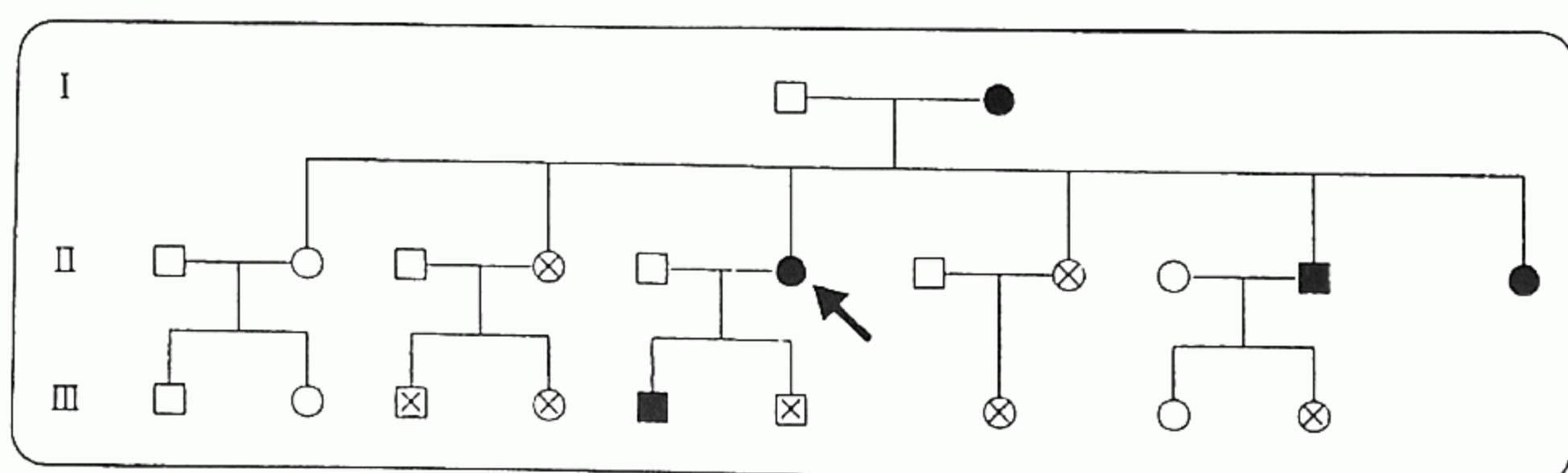


Fig. 6. Pedigree of the family with Hb Queens[α 34(B15)Leu \rightarrow Arg].

● & ■ : Affected female and male as Hb Queens

[α 34(B15)Leu \rightarrow Arg]

○ & □ : Normal female and male

⊗ & ✕ : Not examined female and male

Arrow indicates the proband.

소견 및 검사결과를 얻을 수 없었다고 한다^{14, 15)}. 이는 아마도 총 혈색소에서 다소 소량(주로 20% 미만)의 분획만이 heterozygotes에서 존재하며, 이는 α 2-글로빈 유전자보다 transcription activity가 상대적으로 낮은 α 1-글로빈 유전자의 돌연변이결과로 보고¹⁵⁾ 되었는데, 본 증례에서도 환자의 α -글로빈 유전자의 전체 exon 2에 대한 α 18과 α 19 primer를 이용하여 PCR후 single strand conformation polymorphism(SSCP)분석한 결과 비정상 α -글로빈은 α 2-글로빈 유전자가 아니라 α 1-글로빈 유전자에 이상이 있음을 알 수 있었다.

국내에서의 이상 혈색소 질환의 빈도는 낮을 것으로 생각되나, 최근 이 분야에 대한 관심의 고조, 발달된 분석장비 및 분자생물학적인 진단법의 발전으로 그 보고가 날로 증가할 것으로 사료된다. 임상증상이 없는 이상 혈색소 질환은 다른 검사 시행중 우연히 발견되는 경우가 많다^{5, 7, 9)}. 특히 당뇨 환자의 장기간 혈당조절의 판정을 위한 Hb A_{1c} 검사상 우연히 발견되는 이상 혈색소에 대한 보고는 증가되고 있다. Cation-exchange HPLC(Diamat, Bio-Rad, USA)에 의한 Hb A_{1c} 검사상 우연히 발견된 Hb G Coushatta[β 22(b4)Glu→Ala] 가족례⁷⁾가 그 보기이며 계속 개발되는 HPLC Hb A_{1c} 검사용 자동장비(예를 들면, MDMS-T와 Variant, Bio-Rad, USA) 등에 의한 대규모 선별검사로 앞으로 국내 이상 혈색소 질환의 발견 빈도가 계속 증가할 것으로 사료된다.

요 약

저자들은 임신성 당뇨의 추적검사로 DiaSTAT™(Bio-Rad, USA) 자동분석기를 이용한 Hb A_{1c}검사상 우연히 발견되었던 임신성 당뇨환자의 이상 혈색소를 분석한 결과, Hb Queens[α 34(B15)Leu→Arg]로 진단된 무증상 가족 1례를 경험하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

- 조한익, 박성섭, 이남용, 김상인: 한국인의 혈색소질환. 서울대학교 의과대학 임상병리학교실. 임상병리학의 발전. 초판, 서울, 여문각, 1993, pp180-187
- 김창세, 이상한, 김선주, 차학주, 전국봉, 조만희: 한국인의 이상 혈색소에 관한 연구-이상 α -체인의 구조. 대한의학협회지 34:1109-1115, 1991
- Blackwell RQ, Ro IH, Liu CS, Yang HJ, Wang CC, Huang JT-H: Hemoglobin variant found in Koreans, Chinese, and North American Indians: $\alpha_2\beta_2^{22Glu \rightarrow Ala}$ Am J Phys Anthropol 30:389-392, 1969
- Kim CS: Hemoglobinopathy in Korean(Abstract). In Thalassemia and hemoglobinopathy. The 1st Korean-Japanese Joint Seminar on Thalassemia and Hemoglobinopathy. 1992, p10
- Lee NY, Cho HI, Kim SI, Kim BK, Ohba Y, Hattori Y: A family case of β -thalassemia minor and hemoglobin Queens: α 34(B15) Leu → Arg. J Korean Med Sci 7:385-388, 1992
- Ou CN, Rognerud CL: Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC Clin Chem 39:820-824, 1993
- Lee NY, Park SS, Cho HI, Kim JQ, Jung YS, Kim SI, Lee HK, Ohba Y, Hattori Y: A family case of Hb G Coushatta [β 22(b4)Glu → Ala] detected by cation exchange high performance liquid chromatography(HPLC) for Hb A_{1c} assay. Korean J Hematol 28:151-155, 1993
- 김종원, 김진규, 조성석: 고압 이온교환 액체크로마토그라피(High Pressure Ion-Exchange Liquid Chromatography)를 이용한 Hb A_{1c}의 자동분석. 대한임상병리학회지 9:19-22, 1989
- Delahunty T: Convenient screening for hemoglobin variants by using the Diamat HPLC system. Clin Chem 36:903-905, 1990

- 10) Clegg JB, Naughton MA, Weatherall DJ: *Separation of the α and β -chain of human hemoglobin. Nature* 219:69-70, 1968
- 11) Tatsis B: *Hemoglobin Queens[α 34(B15)Leu→Arg]: A new variant at the $\alpha 1\beta 1$ contact. Blood* 54(Suppl 1):61a, 1979
- 12) Moo-Penn WF, Jue DL, Johnson MH, McGuffey JE, Simpkins H, Katz J: *Hemoglobin Queens: α 34(B15)Leu→Arg, Structural and functional properties and its association with Hb E. Am J Hematol* 13:323-327, 1982
- 13) Yongsuwan S, Svasti J, Fucharoen S: *Decreased heat stability found in purified hemo-*
- globin Queens[α 34(B15)Leu→Arg]. Hemoglobin* 11:567-70, 1987
- 14) Sugihara J, Imamura T, Yamada H, Imoto T, Matsuo T, Sumida I, Yanase T: *A new electrophoretic variant of hemoglobin(Ogi) in which a leucine residue is replaced by an arginine residue at position 34 of the alpha-chain. Biochim Biophys Acta* 701:45-48, 1982
- 15) Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK: *Human α -globin gene expression. The dominant role of the $\alpha 2$ -locus in mRNA and protein synthesis. J Biol Chem* 261:15327-15333, 1986