

Clinical Characteristics and *ALB* Gene Mutation Analysis of Korean Patients with Bisalbuminemia

Yong-Hyun Kim, M.D.¹, Yong-Wha Lee, M.D.¹, Byung Ryul Jeon, M.D.¹, You Kyoung Lee, M.D.¹, Hee Bong Shin, M.D.¹,
Dong Hee Kang, M.D.¹, Sung Kyu Park, M.D.², Dae Sik Hong, M.D.², Seung-Tae Lee, M.D.³, Jong-Won Kim, M.D.³,
and Chang-Seok Ki, M.D.³

Departments of Laboratory Medicine & Genetics¹ and Internal Medicine², Soonchunhyang University Bucheon Hospital and Soonchunhyang University College of Medicine, Bucheon; Department of Laboratory Medicine & Genetics³, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background : Bisalbuminemia is a hereditary or an acquired condition characterized by the presence of 2 albumin variants with different mobilities on serum protein electrophoresis (SPE). The clinical significance of bisalbuminemia has not been clearly established. However, some regions of the albumin variant may affect the biochemical analysis of biomolecules such as steroid or thyroid hormones by altering their albumin-binding affinities. In this study, we analyzed the clinical manifestations, genetic variations, and the albumin-binding characteristics in Korean patients with bisalbuminemia.

Methods : We performed SPE for samples from 580 Korean subjects and identified bisalbuminemia on the basis of the results of SPE. The clinical and biochemical characteristics, *ALB* gene mutations, and the structures of the albumin variants of patients with bisalbuminemia were analyzed.

Results : SPE showed bisalbuminemia in 2 patients. One patient showed a genetic variation known as Nagasaki-1 (Asp293Gly) and the other showed a hitherto unreported missense mutation (c.593A>T; Lys198Ile). In both cases, the serum concentrations of the substances with binding affinity for albumin were not affected, and the mutation sites of the albumin were not located with the protein-binding loci.

Conclusions : The 2 Korean patients with bisalbuminemia showed genetic variations, including a novel missense mutation. The *ALB* gene analysis with 3D modeling is useful for determining the nature of bisalbuminemia and for predicting the effects on the albumin-binding affinity of other biochemical compounds. (*Korean J Lab Med* 2010;30:307-11)

Key Words : Bisalbuminemia, Albumin, *ALB*, Mutation, Korean

서 론

비스알부민혈증 또는 알로알부민혈증은 혈청 단백 전기영동의 알부민 구획에서 두 개의 피크가 나타나는 것으로서 유전성 혹은 후천적 형태로 관찰된다[1-3]. 유전성 비스알부민혈증은

4번 염색체의 *ALB* 유전자 두 개의 공 우성 형태의 유전 양상을 보이고, 주로 점 변이 또는 연쇄 중료 변이 등의 형태로 나타나며, 1:1,000에서 1:10,000의 빈도를 나타낸다[4-7]. 후천적 형태는 다량의 베타 락탐계 항생제를 투여받거나 위장 파열이 합병된 췌장 질환 환자에서 관찰된다[8].

비스알부민혈증의 임상적 의미는 대부분 분명하지 않은 것으로 보고되어 왔지만 일부 보고에 의하면 스테로이드 호르몬, 갑상샘 호르몬 및 기타 약물에 대해 변화된 친화력을 보이며 이는 실제로 정상 농도임에도 불구하고 혈중의 알부민 비결합 물질의 농도 변화를 야기시킴으로써 환자의 진단 및 치료에 오류를 초래할 수 있다[9-11].

본 연구에서 비스알부민혈증을 보인 한국인 환자 2예에 대해서 비스알부민혈증의 임상적 양상, 유전자 변이 및 결합 특성이

Received : August 3, 2009
Revision received : March 3, 2010
Accepted : April 21, 2010

Manuscript No : KJLM09-097

Corresponding author : Yong-Wha Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Soonchunhyang University, Bucheon Hospital and Soonchunhyang University College of Medicine, 1174 Jung-dong, Wonmi-gu, Bucheon 420-767, Korea
Tel : +82-32-621-5943, Fax : +82-32-621-5944
E-mail : lywmd@schbc.ac.kr

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

갑상샘 호르몬 등을 포함하는 검사의 결과에 미치는 영향에 대해 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

본원 진단검사의학과에서 시행된 단백 전기영동 검사 580예에 대해서 비스알부민혈증 여부를 조사하였고, 이 중 2예에서 비스알부민혈증이 관찰되었다.

1. 단백 전기영동 검사

Capillarys Protein 6 kit CZE system (Sebia instrument co., Atlanta, GA, USA)으로 혈청 단백 전기영동 검사를 시행하였다. 두 개의 알부민 피크 중 이상 알부민 피크를 감별하기 위해 대조 혈청과 환자 2의 혈청을 1:1의 비율로 혼합하여 단백 전기영동 검사를 시행하였다.

2. 생화학적 분석

비스알부민혈증이 관찰된 두 예에 대하여 알부민에 대해 친화력이 있는 것으로 알려진 지방산, 갑상샘 호르몬 및 칼슘 중 알부민에 결합하지 않은 유리지방산(free fatty acid, FFA), 유리티록신(free thyroxine, fT_4), 유리트리요오드티로닌(free triiodothyronine, fT_3), 트리요오드티로닌(triiodothyronine, T_3) 및 이온화 칼슘(ionized calcium, iCa^{2+})을 측정하였다. 혈청 단백, 알부민 및 FFA는 Toshiba 200 FR (Toshiba Medical Systems Co., Tokyo, Japan)로 측정하였다. T_3 , fT_3 와 fT_4 는 ADVIA Centaur (Bayer Healthcare LLC, Diagnostics Division, Tarrytown, NY, USA)로 측정하였다.

3. 유전자 분석

환자로부터 유전 검사를 위한 검체 제공에 대하여 동의를 받은 후 혈액을 채취하였다. 말초 혈액 백혈구로부터 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 제조사의 지시대로 유전체 DNA를 분리하였다. 알부민 유전자의 모든 14개의 엑손과 인접한 인트론 서열 모두에 대해 저자가 고안한 시발체와 유전자 증폭 장치(Model 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 증합효소 연쇄반응(PCR)을 시행하였다. 증폭 산물 5 μ L를 shrimp alkaline phosphatase 10 U와 exonuclease I 2 U (USB Corp., Cleve-

land, OH, USA)로 처리한 후 ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 직접 염기서열 분석을 시행하였다. 단일 염기 다형성 여부를 판별하기 위해 대조 개체로부터 얻어진 100개의 염색체에 대한 알부민 유전자 염기서열 분석을 시행하였다. 변이 확인을 위해 Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>)에 등록된 자료와 PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)에 보고된 자료를 참고하였다.

4. ALB 변이의 3차원 구조 모형

확인된 분자유전학적 변이가 알부민 구조에 미치는 영향을 보기 위해 알부민의 수정 구조를 이용하여 분석하였다. 알부민 단량체 변이 모형은 RCSC PDB (<http://www.pdb.org/pdb>)에서 제공된 모형의 프로그램을 이용하였다. 알부민의 3차원 모형 구조는 PYMOL (<http://www.pymol.org>)을 이용하여 가시화하였다.

결 과

1. 임상 양상 및 생화학적 분석

1) 증례 1

67세 여자 환자(환자 1)가 심한 허리의 통증으로 본원에 내원하였다. 환자의 혈중 총 단백 및 알부민 농도는 각각 11.2 g/dL 및 3.2 g/dL였으며, 혈청 단백 전기영동 검사에서 M-spike와 두 개의 알부민 피크가 관찰되었다(Fig. 1). 면역전기영동 검사에서 IgG와 kappa형의 단클론성 감마글로불린병증이 확인되었다. 생화학적 검사에서 혈중 FFA, fT_3 , fT_4 와 iCa^{2+} 모두 증가하지 않았다(Table 1). 환자는 베타 락탐계 항생제의 대량투여 또는 췌장질환의 병력은 없었으며, 다발성 골수종으로 진단된 후 화학 치료 및 보존요법을 받던 중 폐렴합병증으로 사망하였다.

2) 증례 2

60세 남자 환자(환자 2)가 10개월간 지속된 허리의 통증을 주소로 내원하였다. 환자의 혈중 총 단백 및 알부민 농도는 각각 8.1 g/dL 및 3.8 g/dL였으며, 혈청 단백 전기영동 검사에서 M-spike와 알부민 구획에서 두 개의 피크가 관찰되었고, 정상 혈청과 1:1 혼합하여 시행한 전기영동 검사에서 변이 알부민은 느

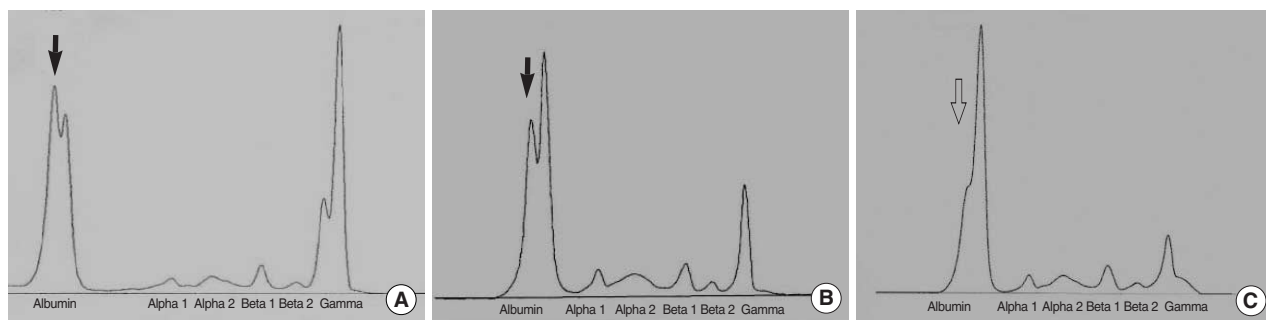


Fig. 1. Capillary electrophoreses of the serum proteins of patient 1 (A) and patient 2 (B) with bisalbuminemia. Two peaks were observed at the albumin region. Solid arrows indicate the characteristic peak of albumin. A 1:1 mixture of the serum of normal control and that of patient 2 showed an abnormal albumin peak (open arrow) with a low peak height (C).

Table 1. Biochemical analysis of the components that show a binding affinity to albumin

Case No.	Total protein (6.6-8.0 g/dL)	Albumin (3.3-5.2 g/dL)	iCa ²⁺ (1.13-1.32 mmol/L)	FFA (176-586 uEq/L)	T ₃ (0.6-1.8 ng/mL)	fT ₃ (1.4-4.4 pg/mL)	fT ₄ (0.8-2.0 ng/dL)
1	11.2	3.2	1.16	307	1.09	1.43	1.40
2	8.1	3.8	1.01	402	1.44	1.34	1.61

Values in parenthesis are reference values.

Abbreviations: iCa²⁺, ionized calcium; FFA, free fatty acid; T₃, triiodothyronine; fT₃, free triiodothyronine; fT₄, free thyroxine.

린 이동성을 나타냈다(Fig. 1). 생화학적 검사에서 혈중 FFA, fT₃, fT₄와 iCa²⁺은 증가하지 않았다(Table 1). 환자는 베타 락탐계 항생제의 대량투여 또는 채장질환의 병력이 없었으며, 다발성 골수종으로 최종 진단된 후 화학 치료를 받고 있다.

2. 유전자 분석

ALB 유전자에 대한 직접염기서열분석 결과 환자 1에서는 엑손 8의 293번째 코돈에서 GAT가 GGT로 이행되는 변이가 관찰되었고(c.878A>G; Asp293Gly), 환자 2에서는 엑손 5의 198번째 코돈에서 AAA가 ATA로 전위를 보이는 변이가 관찰되었다(c.593A>T; Lys198Ile) (Fig. 2). 핵산 번호는 Genebank entry NM_000477의 기준(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>)을 따랐고 이들 두 돌연변이는 100개의 대조군 검체에서 검출되지 않았다.

3. ALB 변이의 3차원 구조 모형

PYMOL을 이용하여 가시화한 알부민의 3차원 구조 모형은 Fig. 3과 같다. 이 중 유전자 변이가 관찰되었던 198번 아미노산과 293번 아미노산은 각각 서브도메인 Ib와 IIb에 위치하며 모두 알부민의 표면 구조를 유지하는 부위로서 알부민 결합과

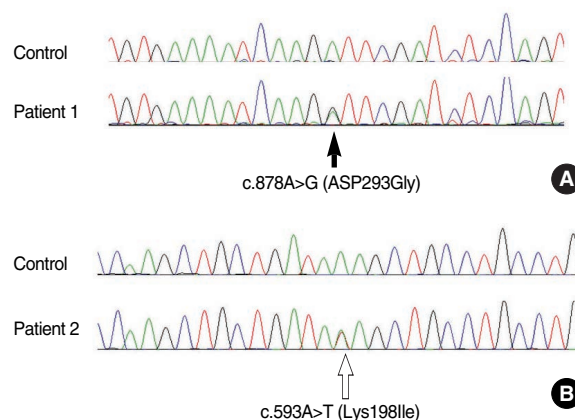


Fig. 2. Mutation analysis of the albumin (*ALB*) gene. Direct sequencing of the *ALB* gene shows overlapping peaks (arrow) at nucleotide position 878 in patient 1 due to a heterozygous A to G transition (c.878A>G; D298G) (A) and at the nucleotide position 593 in the patient 2 due to a heterozygous A to T transversion (c.593A>T; K198I) (B).

관련된 모티프와 관련되어 있지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 단백 전기영동 검사가 시행된 580예 중 2예 (0.3%)에서 비스알부민혈증이 검출되었고, 2예 모두에서 *ALB*

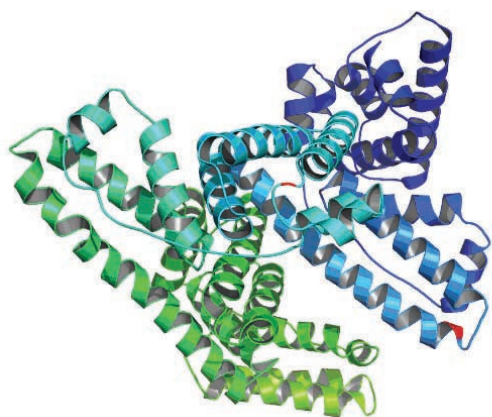


Fig. 3. Ribbon diagram of a monomer of human albumin of Korean patients with bisalbuminemia; the locations of the amino acid replacements are depicted. The substituted amino acid residues are indicated in red.

유전자의 변이가 관찰되었다. 본 연구에서 처음으로 한국인 비스알부민혈증에 대해 *ALB* 유전자 분석을 시행하였는데, 환자 1에서 검출된 *ALB* 유전자의 엑손 8의 Asp293Gly (c.878A>G) 변이는 Nagasaki-1 변이로 이미 알려진 변이였고[12], 환자 2에서 검출된 엑손 5의 Lys198Ile 변이(c.593A>T)는 현재까지 보고된 바 없는 새로운 변이었다. *ALB* 유전자 변이는 현재까지 41예가 The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)에 등록되어 있다. 알부민 Canterbury (Cooperstown)이라고 알려진 Lys313Asn 변이는 Brown과 Shockley 모델에서 혈청알부민의 두 번째 도메인의 두 번째와 세 번째 고리를 연결시키는 경첩 부위에 위치하고 있고[6, 13], 알부민 Yanomama-2로 알려진 Arg114Gly 변이와 알부민 Parkland로 알려진 Asp365His 변이는 효소 절단 위치에 근접해 있는 변이로 알려져 있다[14]. Arg218His 변이는 혈청 알부민에 대한 주요한 리간드 결합부위인 서브도메인 IIA에 위치하고 있고[15, 16], 그 밖에 알부민 Komagome-1의 Lys372Glu, 알부민 Komagome-2의 His128Arg 등이 보고되었다[17]. 본 연구에서 발견된 Asp293Gly는 알부민 Nagasaki-1으로서 알부민 결합에 영향을 주지 않는 부위의 변이로서 본 연구의 3차원 구조 분석을 통해서도 알 수 있었다. 본 연구에서 새롭게 검출된 Lys198Ile도 3차원 구조 분석을 시행한 결과 분자결합 모티프의 변화보다는 표면을 유지하고 있는 구조의 변화로 해석되었으며 이러한 이유로 알부민 결합 물질의 결합에는 영향을 미치지 않은 것으로 판단되었다. 만약 변이가 알부민의 결합 부위에서 발생한다면 알부민의 친화력이 변화함으로써 유리형 물질의 혈중 농도는 변하게 된다. 알부민 구조 중 주요 리간드 결합부위인 218번 아미노산이 아르기닌에서 히스티딘으로 치환

됨으로써 유리형 티록신의 혈중 농도가 증가하였다는 보고가 대표적인 예라 할 수 있다[15, 16]. 그러나 본 연구에서 관찰된 변이는 모두 알부민 결합과 관련 없는 부위에서 발생하였기 때문에 유리형 물질의 혈중 농도가 참고범위와 비교하여 유의하게 변동되지 않았다. 즉, 3차원 구조모형상에서 변이가 일어난 부위가 알부민의 결합 부위가 아니라면 유리형 물질의 측정 없이도 친화력에 영향을 주지 않는다고 볼 수 있다.

비스알부민혈증의 정상 알부민과 변이 알부민을 구분하기 위해 혼합검사를 시행한 결과, 알부민 분획에서 관찰된 두 피크 중 한 피크가 유의하게 감소하였고, 감소한 피크는 비스알부민혈증을 시사하는 변이 알부민 분획을 의미한다. 본 연구에서는 비스알부민혈증의 검출을 위해 모세관 전기영동 검사를 이용하였는데, 알부민 분획을 분리하는데 있어서 모세관 전기영동이 겔 전기영동보다 더 민감하므로 더 많은 예의 비스알부민혈증을 검출할 수 있는 것으로 보고된 바 있다[18].

본 연구에 포함된 단백 전기영동 검사 580예 중 단백분리성 감마병증이 있는 환자는 192예(33.1%)이었고, 이 중 두 예에서 비스알부민혈증이 관찰되었다(0.34%, 2/580)[19].

본 연구를 통해, 한국인에서 비스알부민혈증의 빈도는 매우 낮았으나, 비스알부민혈증 환자에 대한 *ALB* 유전자 분석을 통해 현재까지 보고된 바 없는 Lys198Ile 변이를 검출하였고, *ALB* 유전자 분석을 통한 알부민 변이의 3차원 구조 모형 분석이 알부민 결합 물질의 영향을 예측하는데 도움이 될 것으로 생각되었다.

요 약

배경 : 비스알부민혈증은 단백 전기영동 검사에서 두 개의 알부민 성분을 특징으로 하는 유전적 또는 후천적 상태를 말한다. 비스알부민혈증의 임상적 의미에 대해 명확히 알려진 바는 없으나 일부 변이 알부민은 스테로이드 호르몬 및 갑상샘 호르몬 등 알부민 결합 물질의 친화력을 변화시켜 생화학적 측정에 영향을 미친다. 한국인 비스알부민혈증의 임상적 특성, 유전자 변이 양상 및 생화학 물질 결합특성에 대해 분석하고자 하였다.

방법 : 본원에서 시행된 단백 전기영동 검사 580예를 분석하였고 이 중 비스알부민혈증이 의심된 예에 대하여 임상적, 생화학적 특성 조사, *ALB* 유전자 분석 및 변이 알부민의 3차원 구조 분석을 시행하였다.

결과 : 2예에서 비스알부민혈증이 관찰되었는데, *ALB* 유전자 분석 결과 1예는 Asp293Gly 변이로서 Nagasaki-1으로 알려진 변이이었고 다른 예는 보고된 바 없는 새로운 변이(c.593A>T; Lys198Ile)이었다. 두 예 모두 유리형 생화학 물질의 혈중 농도

가 증가하지 않았고 3차원 구조 분석에서 변이 위치가 단백질 결합 부위가 아닌 것으로 나타났다.

결론 : 한국인 비스알부민혈증 환자 모두에서 유전자 변이가 관찰되었고 이 중 한 예는 새로운 변이이었다. *ALB* 유전자 분석과 3차원 구조 분석이 비스알부민혈증의 특성을 이해하고 알부민 결합 물질의 영향을 예측하는데 유용할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Hoang MP, Baskin LB, Wians FH Jr. Bisalbuminuria in an adult with bisalbuminemia and nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta* 1999; 284:101-7.
2. Le Treut A, Catheline M, Cloarec L. Inherited and familial bisalbuminemia. Acquired transient bisalbuminemia. *Pathol Biol (Paris)* 1977;25:45-55.
3. Dubost JJ, Deseubis T, Sauvezie B, Gentou C, Rampon S. A tricuspid electrophoretic pattern: familial bisalbuminemia with monoclonal immunoglobulin. *Pathol Biol (Paris)* 1985;33:837-8.
4. Arai K, Ishioka N, Huss K, Madison J, Putnam FW. Identical structural changes in inherited albumin variants from different populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:434-8.
5. Giuliani A, Hassan HJ, Casalbone P, Marini L, Orlando M, Tentori L. Structural or functional heterogeneity of normal human serum albumin, allo albumin, bisalbumin. *Clin Chim Acta* 1981;113:43-9.
6. Huss K, Putnam FW, Takahashi N, Takahashi Y, Weaver GA, Peters T Jr. Albumin Cooperstown: a serum albumin variant with the same (313 Lys----Asn) mutation found in albumins in Italy and New Zealand. *Clin Chem* 1988;34:183-7.
7. Carlson J, Sakamoto Y, Laurell CB, Madison J, Watkins S, Putnam FW. Alloalbuminemia in Sweden: structural study and phenotypic distribution of nine albumin variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8225-9.
8. Dyan S, Damasio M, El Ouaer L, Lurie A. Bisalbuminemia in pancreatitis without serous effusion or pseudocyst. *Nouv Presse Med* 1981;10:1746.
9. Arvan DA, Blumberg BS, Melartin L. Transient "bisalbuminemia" induced by drugs. *Clin Chim Acta* 1968;22:211-8.
10. Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Brennan SO, Sugita O. Hormone binding to natural mutants of human serum albumin. *Eur J Biochem* 1990;193:169-74.
11. Kragh-Hansen U, Brennan SO, Galliano M, Sugita O. Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations. *Mol Pharmacol* 1990;37: 238-42.
12. Arai K, Madison J, Huss K, Ishioka N, Satoh C, Fujita M, et al. Point substitutions in Japanese alloalbumins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6092-6.
13. Brennan SO and Herbert P. Albumin Canterbury (313 Lys----Asn). A point mutation in the second domain of serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1987;912:191-7.
14. Brennan SO. The molecular abnormality of albumin Parklands: 365 Asp----His. *Biochim Biophys Acta* 1985;830:320-4.
15. Sunthornthepvarakul T, Angkeow P, Weiss RE, Hayashi Y, Refetoff S. An identical missense mutation in the albumin gene results in familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in 8 unrelated families. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:781-7.
16. Petersen CE, Scottolini AG, Cody LR, Mandel M, Reimer N, Bhagavan NV. A point mutation in the human serum albumin gene results in familial dysalbuminaemic hyperthyroxinaemia. *J Med Genet* 1994; 31:355-9.
17. Madison J, Arai K, Sakamoto Y, Feld RD, Kyle RA, Watkins S, et al. Genetic variants of serum albumin in Americans and Japanese. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9853-7.
18. Jaeggi-Groisman SE, Byland C, Gerber H. Improved sensitivity of capillary electrophoresis for detection of bisalbuminemia. *Clin Chem* 2000;46:882-3.
19. Kalambokis G, Kitsanou M, Kalogera C, Kolios G, Seferiadis K, Tsianos E. Inherited bisalbuminemia with benign monoclonal gammopathy detected by capillary but not agarose gel electrophoresis. *Clin Chem* 2002;48:2076-7.