

한국인에서 플라즈미노젠 유전자의  
Ala601-Thr 돌연변이 검색과  
5' flanking 부위 염기서열 규명

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 무

한국인에서 플라즈미노젠 유전자의  
Ala601-Thr 돌연변이 검색과  
5' flanking 부위 염기서열 규명

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 무

한국인에서 플라즈미노젠 유전자의  
Ala601-Thr 돌연변이 검색과  
5' flanking 부위 염기서열 규명

지도교수 송 경 순

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 무

# 이승무의 박사학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

## 감사의 글

이 논문이 무난히 완성되는 것을 하나님께 감사 드립니다. 그동안 끊임없는 지도와 배려를 하여주신 송경순 교수님께 진심으로 감사를 드리며 부족한 논문을 지도하여 주시고 많은 조언을 해주신 오상환 교수님, 민유홍 부교수님, 김정호 부교수님, 허만욱 부교수님께 심심한 감사를 드립니다.

그리고 바쁜 업무중에 연구에 많은 도움을 주신 최종락 조교수와 진단검사의학과 직원 여러분께 감사를 드립니다.

지금까지 모든 것을 뒷바라지하시며 저에게 힘이 되어준 부모님께 고마운 마음을 전합니다.

이 승 무 씬

# 차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	4
1. 검체	4
가. 대상	4
나. 검체	4
2. 혈장 플라즈미노젠 활성화도 측정	5
3. 혈장 플라즈미노젠 항원량 측정	5
4. Ala601-Thr 돌연변이 검사	5
가. 직접 염기서열분석	5
나. RFLP(restriction fragment length polymorphism)	6
5. 5' flanking 부위의 유전형(genotype) 및 대립인자(allele)의 빈도	6
가. 직접 염기서열분석	6
나. RFLP	7
6. 통계학적 처리	7
III. 결과	8
1. 혈장 플라즈미노젠 활성화도 측정 결과	8
2. 혈장 플라즈미노젠 항원량 측정 결과	9
3. Ala601-Thr 돌연변이 검색 결과	10
가. 염기서열분석을 이용한 Ala601-Thr 돌연변이 검색 결과	10
나. RFLP에 의한 Ala601-Thr 돌연변이 확인 검사 결과	10
다. Ala601-Thr 돌연변이 양성 이상플라즈미노젠혈증 환자의 임상 소견	13
4. 5' flanking 부위의 유전형(genotype)과 대립인자(allele)의 빈도	14
5. 5' flanking 부위의 유전형과 관상동맥질환과의 연관성	15
IV. 고찰	16
V. 결론	19
참고문헌	20
영문요약	24

## 그림 차례

- Fig. 1. Nucleotide sequencing results for the Ala601-Thr mutation in the plasminogen gene . . . . . 11
- Fig. 2. Results of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for Ala601-Thr mutation in the plasminogen gene . . . . . 12
- Fig. 3. Results of polymorphisms in the 5' flanking region of the plasminogen gene in subjects with Ala601-Thr mutation . . . . . 15

## 표 차례

Table 1. Plasma plasminogen activity(%) in normal subjects and patients with thrombosis . . . . .	8
Table 2. Distribution of plasminogen activity levels in normal subjects and patients with thrombosis . . . . .	9
Table 3. Distribution of plasminogen antigen levels and Ala601-Thr mutation in patients with hypoplasminogenemia . . . . .	10
Table 4. Detection of Ala601-Thr mutation in patients with thrombosis and hypoplasminogenemia . . . . .	13
Table 5. Genotypes and allelic frequency in the 5' flanking region of plasminogen gene in patients with thrombosis . . . . .	14



## 국문요약

### 한국인에서 플라즈미노젠 유전자의 Ala601-Thr 돌연변이 검색과 5' flanking 부위 염기서열 규명

혈전증 원인의 하나인 플라즈미노젠 결핍증은 혈장 플라즈미노젠 항원량과 활성도가 같이 감소하는 저플라즈미노젠혈증 (hypoplasminogenemia)과 항원량은 정상이나 플라즈미노젠의 기능이상으로 활성도만 감소하는 이상플라즈미노젠혈증 (dysplasminogenemia : dysPLGemia)의 두 가지 유형이 있다. 1996년 Tsutsumi 등은 일본인 125 가계 158 명의 이상플라즈미노젠혈증을 대상으로 시행한 연구에서 Ala601-Thr 돌연변이가 118 가계(94%)에서 발견되었으며 이 중 27%에서 혈전증이 동반됨을 보고한 바 있다. 또한 Kida 등은 일본인에서 플라즈미노젠 유전자의 5' flanking 부위의 염기서열 분석 결과, 새로운 유전자형 II 형(haplotype II)을 발견하였으며 유전자형 I 형과 Ala601-Thr 돌연변이가 관련이 있음을 시사하였다.

이에 본 연구에서는 한국인 혈전증 환자 477 예 (남 291 예, 여 186 예, 평균 연령 61 세)과 정상군 57 예 (남 29 예, 여 28 예, 평균 연령 50 세)를 대상으로 하였으며 혈전증 환자군은 관상동맥폐색질환 223 예, 뇌경색 165 예, 심부정맥혈전증 36 예, 말초동맥폐색질환 19 예, 폐색전 12 예, 다부위 혈전증 8 예 및 기타 혈전성 질환 14 예이었다. 플라즈미노젠 활성도는 STACHROM<sup>®</sup>PLG (Diagnostica Stago, Asniers, France)을 사용한 비색법 (colorimetric assay)으로 측정하여 저플라즈미노젠혈증 환자를 검색하였다. 저플라즈미노젠혈증 환자를 대상으로 플라즈미노젠 항원량을 측정한 결과 정상 또는 증가를 나타낸 경우를 이상플라즈미노젠혈증으로 정하였다. 이상플라즈미노젠혈증을 대상으로 Tsutsumi 등(1996)의 방법에 따라 직접 염기서열분석을 시행하여 Ala601-Thr 돌연변이를 검색하였고 *Fnu4HI*효소에 의한 RFLP (restriction fragment length polymorphism)로 확인하였다. 또한 5' flanking부위의 유전자형을 Kida 등(1998)의 방법에 따라 염기서열 분석 및 RFLP를 시행하여 유전자형과 Ala601-Thr 돌연변이의 연관성에 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈장 플라즈미노젠 활성도를 측정한 결과 정상군 (n=57)에서는 저플라즈미노젠혈증 (70%이하)이 한 예도 없는 반면, 혈전증 환자군 (n=477)에서는 40 예 (8.4%)가 저플라즈미노젠혈증을 나타내었다.

2. 저플라즈미노젠혈증을 보인 40 예에서 플라즈미노젠 항원량을 측정한 결과 간질환, 균혈증, 과중성 혈관내 응고증, 약물 (t-PA, urokinase) 사용 등 후천적 요인에 의한 저플라즈미노젠혈증을 제외한 20 예(50%)는 이상플라즈미노젠혈증의 진단에 합당하였다.

따라서 한국인 혈전증 환자군을 대상으로 한 이상플라즈미노젠의 빈도는 4.2%이었다.

3. 이상플라즈미노젠혈증 20 예에서 Ala601-Thr 돌연변이 검색을 시행한 결과 16 예 (80%)에서 발견되었다. 한국인에서 Ala601-Thr 돌연변이 발생빈도는 혈전증환자군에서 3.4% (16/477), 전체 대상군에서 2.9% (16/534)로 추정되었으며 혈전 질환별 발생빈도는 관상동맥질환 223 예 중 8 예(3.5%), 뇌경색 165 예 중 5 예(3.0%), 심부정맥혈전증 36 예 중 3 예(8.3%)이었다.

4. 5' flanking 부위의 염기서열 및 PCR-RFLP 분석 결과, 제 I 대립인자 빈도는 Ala601-Thr 돌연변이 양성군에서 0.5313으로 음성군에서의 0.1379에 비하여 유의하게 높았다 ( $p < 0.0001$ ).

5. 정상군 57 예와 관상동맥질환자군 22 예에서 시행한 5' flanking 부위의 염기서열분석 결과 정상군은 I/II 형 14 예(24.6%), II/II 형 43 예(75.4%)였으며 관상동맥질환자군은 I/II 형 12 예(54.5%), II/II 형 10 예(45.5%)의 분포를 보였다. 이러한 유전형 분포의 차이는 정상군과 유의한 차이가 있어 5' flanking 부위의 유전형이 관상동맥질환과 관련이 있음을 시사하였다 ( $p=0.0110$ ).

이상의 결과를 종합할 때 한국인 혈전증에서 이상플라즈미노젠혈증의 발생 빈도는 4.2%였으며 이 중 Ala601-Thr 돌연변이는 80%의 높은 빈도로 검색되었다. 따라서 국내에서도 혈전증환자에서 혈장 플라즈미노젠의 검사의 실시가 필요하며 이상플라즈미노젠혈증으로 진단된 경우 유전자 검사를 통한 돌연변이 검색이 필요할 것으로 생각되었다. 향후 더욱 많은 정상인과 돌연변이 가계를 대상으로 혈전증의 발생위험인자로서의 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말 : dysplasminogenemia, plasminogen, mutation, polymorphism, Korean, haplotype, thrombosis

# 한국인에서 플라즈미노젠 유전자의 Ala601-Thr 돌연변이 검색과 5' flanking 부위 염기서열 규명

< 지도교수 송 경 순 >

연세대학교 대학원 의학과

이 승 무

## I. 서 론

동맥성 또는 정맥성 혈전증은 유전적 또는 후천적 요인에 의해 혈소판과 혈액응고계의 활성화와 섬유소용해 장애 등 여러 요인에 의해 발생된다.<sup>1,2</sup>

이 중 섬유소용해 장애로서는 이상섬유소원증, 플라즈미노젠 (plasminogen) 결핍증, plasminogen activator inhibitor의 증가가 있다. 플라즈미노젠 결핍증은 혈장내 항원량과 활성도가 함께 감소하는 저플라즈미노젠혈증 (hypoplasminogenemia)과 항원량은 정상이나 플라즈미노젠의 기능이상으로 활성도만 감소되는 이상플라즈미노젠혈증 (dysplasminogenemia : dysPLGemia)의 두 가지 유형으로 구분된다.

플라즈미노젠은 간에서 생산되며 혈전 용해에 있어서 중요한 역할을 하는 플라즈민 (plasmin)의 전구물질로서 92 kD의 단백질 당단백이며 791 개의 아미노산으로 구성되어 있다. 플라즈민은 활성화되어 섬유소용해와 세포외간질 단백질의 분해에 중요한 역할을 하며, 또한 상처의 치유과정, 죽상경화, 염증 반응, 신경세포의 사멸에도 관여한다. 최근 목양성 결막염 (ligneous conjunctivitis)이 플라즈미노젠 결핍증에서 발생하는 것으로 보고되었다.<sup>2,4-10</sup>

염색체 6 번의 장완에 위치하는 플라즈미노젠 유전자는 53.5 kb의 크기로서 19 개의 엑손과 18 개의 인트론으로 구성되어 있다.<sup>2</sup> 이러한 유전자의 다양한 돌연변이가 플라즈미노젠의 결핍증을 유발하며 혈전증의 위험인자로서 알려져 있다.<sup>11,12</sup>

이제까지 외국에서 관찰된 플라즈미노젠 결핍증 관련 유전자의 이상으로서는 codon 9, 19, 128, 216, 355, 513, 572, 597, 601, 675, 676, 732를 포함한 12 종 이상의 점 돌연변이와 2 종의 결손이 사례로서 보고 된 바 있다.<sup>9-21</sup> 1996년 Tsutsumi 등은 일본인 129 가계, 164 예의 플라즈미노젠 감소증을 분석한 결과, 결핍증은 3 가계, 5 예에 불과하나 125 가계, 158 예가 이상플라즈미노젠혈증으로 대다수를 차지하였다. 이 중 118 가계(94.4%), 143 예(90.5%)에서 Ala601-Thr 돌연변이가 관찰되었으며 이 돌연변이 보유

자의 26.6%에서 혈전증이 동반됨을 보고한 바 있다.<sup>19</sup>

또한 1998년 Kida 등은 일본인에서 플라즈미노젠 유전자의 5' flanking 부위의 염기서열 분석 결과 6 개의 염기 (-469, -413, -389, -245, -18, +10)에 대한 유전자형 (I 및 II)을 관찰하고 각 유전자형의 분포 및 대립인자 비율이 서구인과 차이를 보고한 바 있다. 뿐만 아니라 Ala601-Thr 돌연변이가 유전자형 I 형과 연관성이 있음을 시사하였다.<sup>22</sup>

이에 본 연구에서는 각종 혈전증 환자를 대상으로 혈장 플라즈미노젠을 측정 한 후 결핍증을 보이는 환자에서 Ala601-Thr의 돌연변이를 검색하고 한국인에서의 5' flanking부위의 유전자형을 규명하고자 하였으며 동시에 Ala601-Thr의 돌연변이와 5' flanking부위의 유전자형의 관련성을 관찰하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 검체

#### 가. 대상

정상인 57 예 (남 29, 여 28)와 혈전증 환자 477 예 (남 291, 여 186)를 대상으로 하였다. 정상군의 연령분포는 10-74 (50±18) 세였으며, 혈전증 환자군은 16-92 (61±14) 세였다. 환자군은 관상동맥폐색질환 (223 예), 뇌경색 (165 예), 심부정맥혈전증 (36 예), 말초동맥폐색질환 (19 예), 폐색전 (12 예), 다부위 혈전증 (8 예) 및 기타 혈전성 질환 (14 예)이었다.

#### 나. 검체

정상군과 혈전증 환자군에서 sodium citrate (0.13M)을 담은 채혈관에 혈액 4.5 mL을 채혈하여 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 혈소판결핍혈장을 분리하였다. 혈장은 영하 70℃에 냉동 보관하였으며 말초 혈액 백혈구에서 DNA isolation kit (Easy-DNA kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 영하 70℃에 냉동 보관하였다.

## 2. 플라즈미노젠 혈장 활성화도 측정

플라즈미노젠 활성화도는 자동응고기기 STA (Diagnostica Stago, Genevilliers, France)와 시약인 STACHROM<sup>®</sup>PLG (Diagnostica Stago, Asniers, France)을 사용하여 비색법 (colorimetric assay)으로 측정하였다.

검사의 정밀도는 두 검체에서 각각 31 회 시행하여 1.2%, 1.9% (C.V.)이었으며 정상 참고치는 70-130%이었다.

## 3. 플라즈미노젠 혈장 항원 측정

플라즈미노젠 항원은 두 가지 방법으로 나누어 시행하였다. 한 방법은 비탁면역법 (turbidimetric immunoassay)을 이용하였으며 검사에 사용한 시약은 N-Antiserum Plasminogen (Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA), 검사기기는 Behring Coagulation System (BCS, Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA)이었다. 다른 방법은 면역확산법 (immunodiffusion)으로 Human Plasminogen 'NL' Bindarid<sup>™</sup> Radial Immunodiffusion kit (The Binding Site Ltd., Birmingham, UK)를 사용하였다.

면역확산법 검사의 정밀도는 정상 검체에서 10 회 측정하여 1.5%의 C.V.값을 보였으며, 낮은 검체 4 개를 각각 10 회 측정하여 검체별로 3.2 - 5.6%의 C.V.값을 보였다. 정상 참고치는 7.0-13.0 mg/dL이었다.

## 4. Ala601-Thr 돌연변이 검사

### 가. 직접 염기서열분석

Tsutsumi 등(1996)의 방법에 따라 다음과 같이 검사하였다.<sup>19</sup> 엑슨 15에서 Ala601-Thr 돌연변이를 검색하기 위하여 genomic DNA 100 ng과 sense, antisense 시발체 50 pM에 Taq DNA polymerase를 넣어 denaturation, annealing, extension을 각각 94°C, 52°C, 73°C에서 35 회 증폭하였으며, sense 시발체는 5'-TCTGGAATTCTGTACAATGGAGCAGAACAA-3', antisense 시발체는 5'-CCACGAATTCATCTGTACTGTGTCTTTCTTCT-3'을 사용하였다. 증폭한 DNA는 QIAquick PCR purification kit (Millipore, Bedford, Mass., USA)을 사용하여 정제하였으며 염기서열분석은 Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA polymerase (FS enzyme) (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Perkin-Elmer 9600 thermal cycler와 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 나. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

Ichinose 등(1991)의 방법으로 시행하였다. 증폭된 DNA를 Taq DNA polymerase, 시발체, 반응 혼합액에 넣고 thermal cycler에서 증폭하였으며, 제한 효소 *Fnu4HI* (New England Biolabs Inc., MA, USA) 6 unit 와 37°C, 2 시간 반응시켜 결과를 판독하였다.<sup>13</sup>

#### 5. 5' flanking 부위의 유전형(haplotype) 및 대립인자(allele)의 분포

플라즈미노젠 유전자의 5' flanking 부위의 유전형 및 대립인자의 비율을 규명하기 위하여 Kida 등(1998)의 방법으로 염기서열분석 및 PCR-RFLP를 시행하였다.<sup>22</sup>

#### 가. 직접 염기서열분석

PCR 증폭은 100 검체의 genomic DNA를 sense primer 50 pM, anti-sense primer 50 pM에 Taq DNA polymerase를 넣어 denaturation, annealing, extension을 각각 94°C, 52°C, 73°C에서 35 회 증폭하였으며, 사용된 시발체는 sense; 5'-GGGGAAAGATTGATG TCTTA-3', antisense; 5'-GCATCCACAAACCAGATAGT-3'을 사용하였다. 증폭한 DNA는 QIAquick PCR purification kit (Millipore, Bedford, Mass., USA)을 사용하여 정제하였으며 염기서열분석은 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA polymerase (FS enzyme) (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Perkin-Elmer 9600 thermal cycler와 ABI PRISM 3700 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 5' flanking 부위의 유전형은 -169, -413, -389, -245, -18, +10 bp 6 개 부위의 염기를 관찰하였다.

## 나. RFLP

이를 Kida 등(1998)의 방법대로 PCR-RFLP로 확인하였다.<sup>22</sup> 시발체는 sense; 5'-CAT GAATTCGAAAGATTGATGTCTTATAACATAATT-3', antisense; 5'-C ACAGAAT TCCATGGCATATGTATTTTACTAC-3'을 사용하였으며 PCR 방법은 염기서열분석과 같은 방법으로 시행하였다. 증폭된 genomic DNA를 Taq DNA polymerase, primer, 반응 혼합액에 넣고 Thermal cycler에서 증폭하였으며, 제한 효소 *Afl*III (New England Biolabs Inc., MA, USA)를 이용하여 37°C, 8 시간 반응시켜 결과를 판독하였다.

## 6. 통계학적 처리

- 가. 정상인과 혈전증 환자군의 플라즈미노젠 활성도의 차이를 t 검정 또는 카이 스퀘어 검정을 시행하여 비교하였다.
- 나. Ala601-Thr 돌연변이와 5' flanking 부위의 유전형과의 연관성을 카이 스퀘어 검정을 시행하여 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. 혈장 플라즈미노젠 활성도 측정 결과

정상군 57 예에서 측정된 플라즈미노젠의 활성도는 78-129% (평균; 103%, 표준편차; 11%)였으며 혈전증 환자군 477 예의 활성도는 22-149% (평균; 95%, 표준편차; 20%)로서 두 군의 활성도는 유의한 차이가 있었다 ( $p < 0.0001$ , t 검정) (table 1).

플라즈미노젠 활성도에 따라 각 군을 저활성도 (<80%), 정상활성도 (80-120%), 고활성도 (>120%)로 분류하여 분포를 보았을 때, 정상군은 저활성도 1.8% (1/57), 정상활성도 96.4% (55/57), 고활성도 1.8% (1/57)이었으나 혈전증환자군은 저활성도 4.4% (21/477), 정상활성도 76.5% (365/477), 고활성도 19.1% (91/477)로 각 군별로 활성도의 분포에서 유의한 차이가 있었다 ( $p=0.0021$ , 카이 스퀘어 검정) (table 2).

Table 1. Plasma plasminogen activity(%) in normal subjects and patients with thrombosis

Group	n	Mean±SD	Range
Normal	57	103±11	78-129
Thrombosis	477	95±20*	22-149

\*; significantly decreased in the thrombosis group by t-test ( $p < 0.0001$ )



Table 2. Distribution of plasminogen activity levels in normal subjects and patients with thrombosis

Plasminogen(%)	Group		Total
	Normal	Thrombosis	
<80	1(1.8%)	91(19.1%)	92
80-120	55(96.4%)	365(76.5%)	420
>120	1(1.8%)	21(4.4%)	22
Total	57(100.0%)	477(100.0%)	534

\*; significantly different between normal and thrombosis groups by chi-square test (p <0.0021)

## 2. 혈장 플라즈미노젠 항원량 측정 결과

플라즈미노젠 활성도 70% 이하를 보이는 플라즈미노젠 결핍증 환자 40 예에서 플라즈미노젠 항원량을 측정하였다. 플라즈미노젠 항원량이 감소된 경우가 20 예(50.0%), 정상 또는 증가한 경우가 20 예(50.0%)였다.

활성도와 항원량이 모두 감소한 20 예는 병력지 조회 결과 플라즈미노젠 활성 및 항원량이 감소될 수 있는 후천적 요인인 간질환, 균혈증, 파종성 혈관내 응고증, 또는 약물(t-PA, urokinase) 사용의 과거력 등이 있었다. 활성도의 감소를 보이나 항원량은 정상 또는 증가를 보인 20 예는 이상플라즈미노젠혈증에 해당하였다 (table 3). 이는 혈전증 환자군 477 예 중 4.2%에 해당하였으며, 전체 대상군 534 예의 3.7%에 해당되었다.

Table 3. Distribution of plasminogen antigen levels and Ala601-Thr mutation in patients with low plasminogen activity

Plasminogen antigen	n (%)	Ala601-Thr mutation(%)	
		Negative	Positive
Low	20 (50.0)	20 (100.0)	0 ( 0.0)
Normal or high	20 (50.0)	4 ( 20.0)	16 (80.0)
Total	40 (100.0)	24 ( 60.0)	16 (40.0)

### 3. Ala601-Thr 돌연변이 검사 결과

#### 가. 염기서열분석을 이용한 Ala601-Thr 돌연변이 검색 결과

이상플라스미노겐혈증 20 예에서 엑스 15 번에 대한 직접염기서열분석을 시행하여 16 예(80%)에서 Ala601-Thr 돌연변이를 발견하였다 (fig. 1).

따라서 Ala601-Thr 돌연변이의 발생빈도는 전체 대상군에서는 2.9% (16/534), 혈전증 환자군에서는 3.4% (16/477)였다. Ala601-Thr 돌연변이 유전자의 빈도는 전체 대상의 발생빈도를 기초로 계산하여 0.0146, 혈전증 환자군의 발생빈도로 계산하였을 때는 0.0171이었다.

#### 나. RFLP에 의한 Ala601-Thr 돌연변이 확인 검사 결과

염기서열분석에서 발견된 Ala601-Thr 돌연변이 유전자를 RFLP를 시행하여 확인하였다. 또한 정상인 57 예와 후천적 요인에 의한 저플라스미노겐혈증 환자에서 염기서열분석 및 RFLP를 시행하였으나 Ala601-Thr 돌연변이는 발견되지 않았다 (table 3).

*Fnu4HI* endonuclease를 이용한 RFLP를 시행한 결과 정상 DNA 검체에서는 360 bp 가 230 bp와 130 bp로 나누어 졌으나 Ala601-Thr 돌연변이 양성 DNA는 360 bp에 밴드가 나타남을 보였다. 검사 결과 Ala601-Thr 돌연변이 양성 16 예는 모두 360 bp, 230 bp, 130 bp에 밴드가 모두 나타나 이형접합체 (heterozygote) 양상이었으며 정상군은 230 bp와 130 bp만 밴드가 나타내었다 (fig. 2).

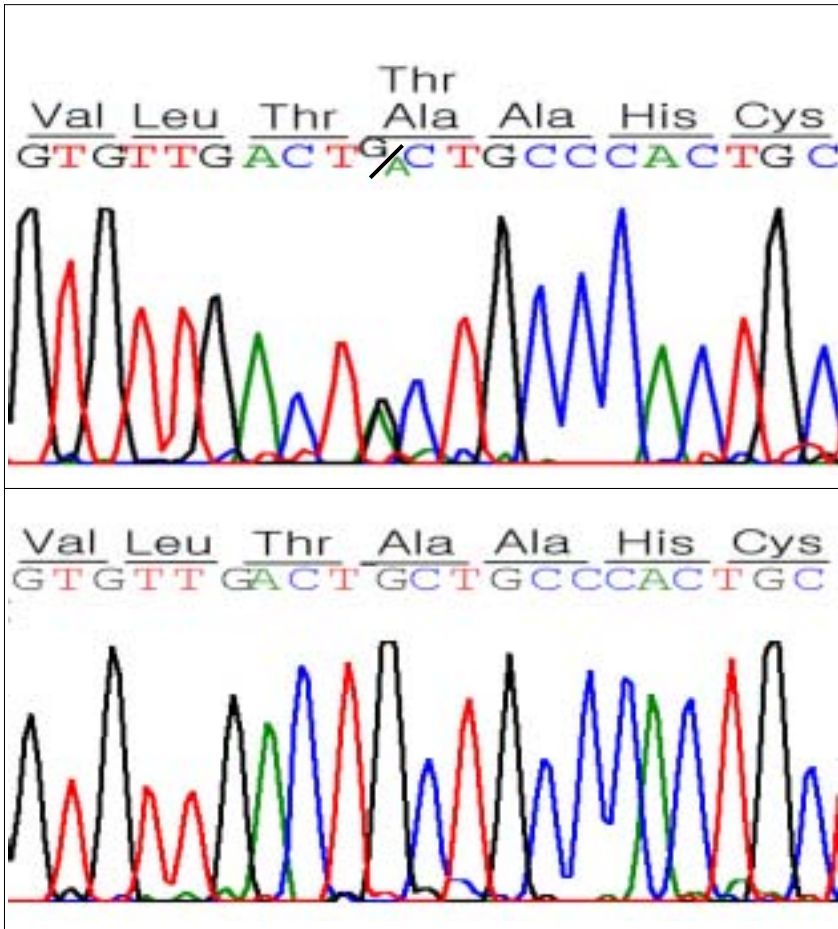


Fig. 5. Detection of Ala601-Thr mutation in the plasminogen gene. DNA sequence of exon 15 from the patient with dysplasminogenemia (upper panel) and a normal control (lower panel). A heterozygous abnormality was detected from the patient with the G to A mutation.

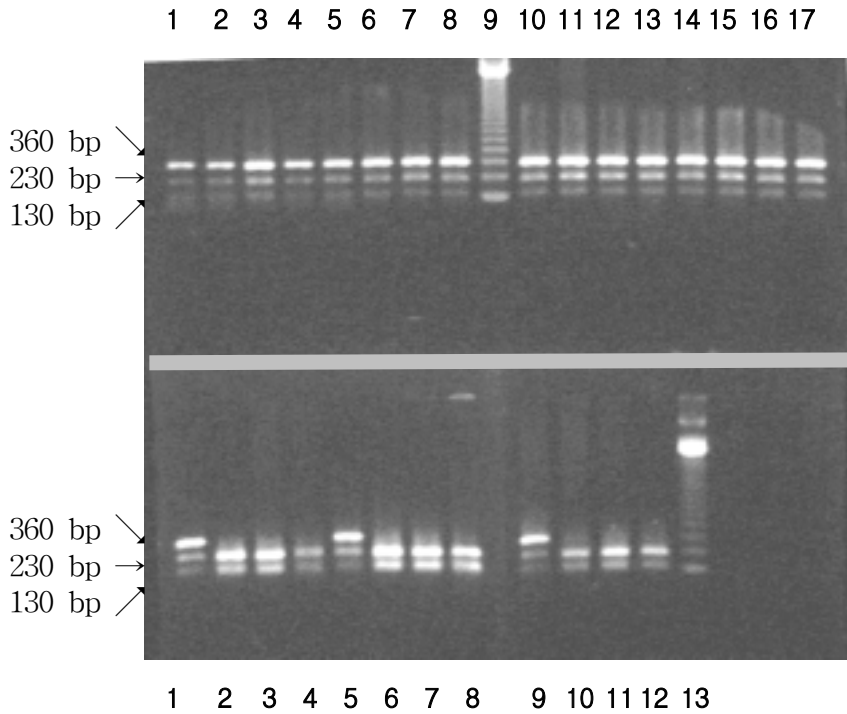


Fig. 2. Results of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for Ala601-Thr mutation in the plasminogen gene. Agarose gel electrophoresis of *Fnu*4HI digest (360 bp into 230 bp and 130 bp) of patients' exon 15. Lane 1-8 and lane 10-17: patients with dysplasminogen. Lane 9: 123 bp ladder marker (Gibco BRL Life Technologies, MD, USA) (upper panel). Lane 1, 5, 9: patients with dysplasminogen. Lane 2-4, 6-8, 10-12: patients without dysplasminogen. Lane 13: 123 bp ladder marker (lower panel).

다. Ala601-Thr 돌연변이 양성 이상플라즈미노겐혈증 환자의 임상소견

돌연변이가 발견된 16 예의 환자 (남 10, 여 6) 평균 연령은 60.8 (42-84) 세이었으며 질환별로 분류하면 관상동맥질환 8 예, 뇌경색 5 예, 심부정맥혈전증 3 예이었으며 다른 혈전증에서는 발견되지 않았다. 이는 관상동맥질환 223 예 중 3.5%, 뇌경색 165 예 중 3.0%, 심부정맥혈전증 36 예 중 8.3%에 해당하였다. 또한 혈전증 환자군에서 플라즈미노겐 저활성도를 보인 경우로서는 관상동맥질환 20 예 중 8 예(40.0%), 뇌경색 9 예 중 5 예(55.5%), 심부정맥혈전증 4 예 중 3 예(75.0%)의 빈도에 해당하였다 (table 4).

Table 4. Detection of Ala601-Thr mutations in patients with thrombosis and hypoplasminogenemia

Thrombosis	n	Mutations(%)
Coronary artery obstructive disease	20	8(40.0)
Stroke	9	5(55.5)
Deep vein thrombosis	4	3(75.0)
Pulmonary embolism	3	0( 0.0)
Multiple thrombosis	1	0( 0.0)
Others	3	0( 0.0)
Total	40	16(40.0)

4. 5' flanking 부위의 유전형(genotype)과 대립인자(allele)의 빈도

5' flanking 부위의 전사시작부위의 6개 위치 -469, -413, -389, -245, -18, +10 bp의 염기서열 분석 결과 제 I 형 (A,C,A,A,T,C) 및 II 형 (G,T,G,G,G,T)의 유전형을 결정할 수 있었으며 이를 PCR-RFLP로 확인한 결과 돌연변이 양성군 (I/I 형: 3 예, I/II 형: 11 예, II/II 형: 2 예)과 음성군 (I/I 형: 0 예, I/II 형: 8 예, II/II 형: 21 예)에서 유의한 분포의 차이를 나타내었다 ( $p = 0.0002$ , 카이 스퀘어 검정) (table 5, fig. 3). 또한 대립인자 비율도 양성군 (I 형: 0.5313, II 형: 0.4687), 음성군 (I 형: 0.1379, II 형: 0.8621)에서 유의한 차이를 보였다 ( $p < 0.0001$ , 카이 스퀘어 검정) (table 5).

Table 5. Genotypes and allelic frequency in 5' flanking region in patients with thrombosis

Ala601-Thr Mutation	Genotypes(%)*				Allele frequency <sup>†</sup>	
	I/I	I/II	II/II	Total	I	II
Positive	3(18.7)	11(68.8)	2(18.5)	16(100.0)	0.5313	0.4687
Negative	0(0.0)	8(27.6)	21(72.4)	29(100.0)	0.1379	0.8621

\*; significantly different between groups of positive and negative for Ala601-Thr mutation ( $p = 0.0002$ , chi-square test)

<sup>†</sup>; significantly different between groups of positive and negative for Ala601-Thr mutation ( $p < 0.0001$ , chi-square test)

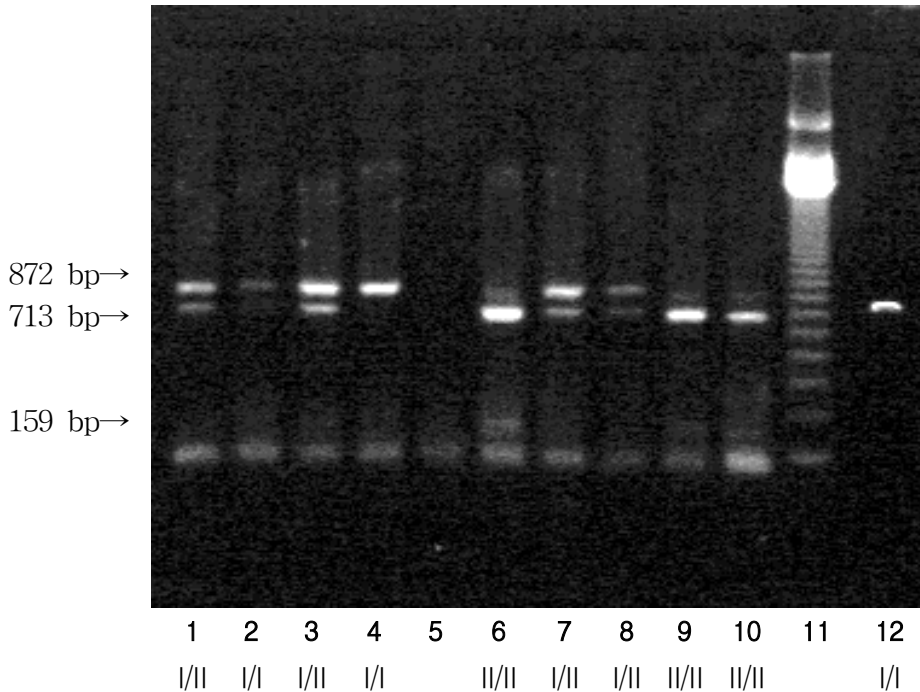


Fig. 3. Results of polymorphisms in the 5' flanking region of the plasminogen gene in subjects with Ala601-Thr mutation. Agarose gel electrophoresis of *Afl*III digest (872 bp into 713 bp and 159 bp) in 5' flanking region of different genotypes from patients with Ala601-Thr mutation. Lane 1, 3, 7, 8: genotype I/II; Lane 2, 4, 12: genotype I/I; Lane 6, 9, 10: genotype II/II. Lane 11: 123 bp ladder marker (Gibco BRL Life Technologies, MD, USA).

##### 5. 5' flanking 부위의 유전형과 관상동맥질환과의 연관성

정상인 57 예와 관상동맥질환자 22 예에서 시행한 염기서열분석 결과 정상군은 I/II 형 14 예(24.6%), II/II 형 43 예(75.4%)였으며 관상동맥질환자군은 I/II 형 12(54.5%), II/II 형 10 예(45.5%)의 분포를 보였다. 이러한 유전형 분포의 차이는 정상군과 유의한 차이가 있어 5' flanking 부위의 유전형이 관상동맥질환과 관련이 있을 것으로 보였다 ( $p=0.0110$ , 카이 스퀘어 검정). 또한 유전형에 따라 플라즈미노젠 활성도를 측정된 결과, II/II 형 ( $n=53$ )의 평균  $\pm$  표준편차(SD)는  $102 \pm 11\%$ , I/II 형 ( $n=26$ )은  $96 \pm 18\%$ 이었으며 이는 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.0791$ , t 검정).

## IV. 고 찰

플라즈미노젠 (plasminogen, PLG)은 섬유소 용해에 주된 역할을 하는 플라즈민의 전구효소로서 저플라즈미노젠혈증, 또는 기능 이상의 이상플라즈미노젠혈증의 경우 혈전증, 목양성 결막염 등의 발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>10-12,23-25</sup>

서구인에서는 PLG Frankfurt, PLG San Antonio, PLG Amsterdam I, II, III, PLG Maryland, Maywood 등, 동양인에서는 주로 일본인에서 보고되어 PLG Tochigi (Ala601-Thr), PLG Osaka-II, III, PLG Nagoya-I, II, PLG Kagoshima, PLG Kanagawa-I 등의 이상플라즈미노젠이 보고되어 있으며 이 외에도 Ser572-Pro, Ala620-Thr 및 Ala675-Thr의 이상플라즈미노젠이 알려져 있다. 이들 이상플라즈미노젠을 가진 환자의 임상증상은 각기 혈전증 또는 결막염 등의 증세를 나타내거나 무증세인 경우도 있다.<sup>3,9-21,26-30</sup>

또한 Kida 등(1998)이 PLG 유전자의 5' flanking 부위의 염기서열분석에서 6개의 염기치환 (-469, -413, -389, -245, -18, +10)을 관찰하여 플라즈미노젠 유전자에 대립유전자 다형증이 있으며 유전형과 Ala601-Thr 돌연변이의 상관성이 있을 수 있음을 보고한 바 있다.<sup>22,31</sup> 본 연구에서는 플라즈미노젠의 기능 및 활성에 영향을 미치는 돌연변이 중 Ala601-Thr 돌연변이와 5' flanking 부위의 염기치환에 의한 대립유전자에 대한 연구를 시행하였다.

정상군 57 예와 혈전증 환자군 477 예에서 측정된 플라즈미노젠의 활성도는 혈전증 환자군 (95±20%)에서 정상군 (103±11%)에 비하여 유의하게 감소한 것을 볼 수 있었다 ( $p < 0.0001$ , t-검정). 전체 대상군 중 40 예(8.4%)에서 70% 이하의 저하된 활성도를 보여 저플라즈미노젠혈증에 해당하였으며 플라즈미노젠 항원량을 측정한 결과 20 예에서 항원량의 감소를 보였으며 이들은 모두 저플라즈미노젠혈증의 후천적 요인인 간질환, 균혈증, 과중성 혈관내 응고증, 또는 약물사용의 과거력이 있었다. 간질환과 균혈증에서 나타나는 저플라즈미노젠혈증은 간기능의 생성저하에 의한 결과이며 혈관내 응고증에서는 플라즈미노젠이 섬유응괴에 침착함으로 발생하는 소모성 저플라즈미노젠혈증이다. T-PA 또는 urokinase 등의 약물 치료에서 혈전용해에 플라즈미노젠의 소모 후에 일시적으로 발생할 수 있다. 남은 20 예는 플라즈미노젠 활성도는 감소되었으나 항원량이 정상 또는 증가되어 이상플라즈미노젠혈증에 해당하였다.<sup>31-35</sup>

이상플라즈미노젠혈증 환자 20 예 중 16 예(80%)에서 Ala601-Thr 돌연변이가 발견되었으며 이는 일본인에서 시행된 연구에서 이상플라즈미노젠 125 가계, 158 예 중 118 가계(94.4%), 143 예(90.5%)에서 Ala601-Thr 돌연변이가 발견된 것에 비하여 낮은 빈도이



었다.<sup>19</sup> Ala601-Thr 돌연변이가 발견되지 않은 4 예는 일본인에서 비교적 많이 발견된 Val355-Phe 돌연변이와 Asp676-Asn 돌연변이 검색을 시행하였으나 음성으로 나타나 그 외 소수의 돌연변이 또는 밝혀지지 않은 돌연변이가 있을 가능성과 밝혀지지 않은 이상플라즈미노젠혈증의 후천적 원인이 있을 것으로 생각되었다.<sup>19</sup>

Ala601-Thr 돌연변이의 발생빈도는 혈전증 환자군 477 예를 대상으로 3.4%, 전체 524 예를 대상으로 2.9%의 발생빈도로 추정되었다. Ala601-Thr 돌연변이 유전자 빈도는 전체대상군에서 발생빈도를 기초로 계산하여 0.015, 혈전증 환자군에서는 0.017로 Kida 등 (1998)이 보고한 일본인의 0.021, 중국인의 0.015와 유사한 결과를 보이거나 서구인에서는 Ala601-Thr 돌연변이가 발견되지 않은 것과는 분명한 차이를 보였다.<sup>22,37</sup>

Ala601-Thr 돌연변이는 플라즈미노젠 유전자의 15 번 엑손에 해당하는 아미노산 서열 601번째인 Alanine(GCT)를 Threonine(ACT)로 점돌연변이를 일으켜 이상플라즈미노젠혈증을 일으키는 것으로 알려졌다. 그 기전은 플라즈미노젠의 단백질해기능을 일으키는 데 중요한 역할을 하는 603 번째 Histidine에 직접적인 영향을 주거나, crystallographic data에 의한 3 차원적 구조에서 섬유소와 결합하는 부위에서 중요한 역할을 하는 Asp-102, His-57에 밀접하게 위치하여 이들의 역할에 영향을 주어 플라즈미노젠 기능의 이상이 일어나는 것으로 추정되고 있다.<sup>28</sup>

5' flanking 부위의 유전형과 대립인자에 대해 염기서열분석과 PCR-RFLP를 시행하였으며 염기서열분석에서 Kida 등(1997)이 보고한 바와 같은 유전형 (genotype)을 확인할 수 있었으며 제 I 형 (A,C,A,A,T,C) 및 II 형 (G,T,G,G,G,T)의 유전형으로 구별하였다.<sup>22,36</sup> 이를 Ala601-Thr 돌연변이 양성군과 음성군으로 나누어 그 빈도를 비교한 결과 대립인자 I 형의 빈도가 Ala601-Thr 돌연변이 양성군 0.5313, 음성군 0.1379로 유의한 차이를 보였으며 이는 일본인의 Ala601-Thr 돌연변이 양성군의 빈도인 0.4415보다 오히려 높은 결과를 보여 Ala601-Thr 돌연변이가 대립인자 I 형과 연계되어 있을 가능성이 높음을 보여 주었다. 이러한 결과는 Ala601-Thr 돌연변이 유전자와 유전형 제 I 형이 같이 유전형으로 유전하는 종족이 일본인과 한국인 사이에 공통적으로 존재했을 수 있다는 가설이 가능함을 시사하며 일부 제 II 형에 Ala601-Thr 돌연변이 유전자가 존재하는 것은 유전되는 과정 중에 유전자 재조합에 의하여 발생되었을 것으로 추론된 바 있다.<sup>22</sup>

정상인 57 예와 관상동맥질환자 22 예에서 시행한 염기서열분석 결과에 의한 유전형은 I/I 동형은 없었으며 I/II 이형과 II/II 동형이 분포하였다. 그러나 유전형의 분포는 정상군과 관상동맥질환자군에서 다른 분포를 보였다. 정상군은 I/II 이형이 24.6%이었으며 관상동맥질환자군은 54.5%로 유의하게 높은 분포를 보였다. I/II 이형과 II/II 동형의 플라즈미노젠 활성도를 비교한 결과는 II/II 동형에서 약간 높으나 통계적으로 유의한 차이

는 없었다. 이러한 결과는 플라즈미노젠이 관상동맥질환의 직접적인 발생인자라기보다는 플라즈미노젠과 유사하게 다형증을 보이며 같은 유전자속에 포함되어 있는 apo(a) 유전자와 관련이 있을 것으로 추정된다. PLG-apo(a) gene family는 플라즈미노젠 유전자, apo(a) 유전자와 그 외 관련된 유전자를 포함하며 이들 대부분은 염색체 6 번의 장완 26-27에 위치하고 있으며 특히 플라즈미노젠 유전자와 apo(a) 유전자는 50 kb의 가까운 거리에 존재하며 동일한 촉진제에 반응하므로 플라즈미노젠 유전자의 다형성과 관련이 있을 가능성을 시사한 바 있다.<sup>22,38</sup>

결론적으로 이상플라즈미노젠혈증이 혈중 플라즈미노젠의 활성도를 저하시킴으로 혈전증의 원인이 될 수 있으며, 발생빈도는 혈전증 환자군의 4.2%로 높았다. 이상플라즈미노젠혈증 환자의 Ala601-Thr 돌연변이 발생빈도는 80%로 매우 높아 일본인에서 시행한 연구결과와 유사함을 알 수 있었다. 또한 5' flanking 부위의 다형증은 Ala601-Thr 돌연변이 유전자와 밀접한 관계가 있으며 플라즈미노젠의 활성화에 유의한 차이를 보이지는 않으나 관상동맥질환의 발생과 관련 있음이 추정되므로 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 생각되는 바이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 각종 혈전증 환자를 대상으로 혈장 플라즈미노젠을 측정된 후 결핍증을 보이는 환자에서 Ala601-Thr의 돌연변이를 검색하고 한국인에서의 5' flanking부위의 유전자형을 규명하고자 하였으며 나아가 Ala601-Thr의 돌연변이와 5' flanking부위의 유전자형의 관련성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장 플라즈미노젠 활성도를 측정된 결과 정상군 (n=57)에서는 저플라즈미노젠혈증(70%이하)이 한 예도 없는 반면, 혈전증환자군 (n=477)에서는 40 예 (8.4%)가 저플라즈미노젠혈증을 나타내었다.

2. 저플라즈미노젠혈증을 보인 40 예에서 플라즈미노젠 항원량을 측정된 결과 간질환, 균혈증, 파종성 혈관내 응고증, 약물 (t-PA, urokinase) 사용 등에 의한 후천적 요인에 의한 저플라즈미노젠혈증을 제외한 20 예는 이상플라즈미노젠혈증의 진단에 합당하였다. 혈전증 환자군 중 이상플라즈미노젠혈증의 빈도는 4.2%에 해당하였다.

3. 이상플라즈미노젠혈증 20 예에서 Ala601-Thr 돌연변이 검색을 시행한 결과 16 예 (80%)에서 발견되었다. 혈전 질환별 발생빈도는 관상동맥질환 223 예 중 8 예(3.5%), 뇌경색 165 예 중 5 예(3.0%), 심부정맥혈전증 36 예 중 3 예(8.3%)이었다.

4. 5' flanking 부위의 염기서열 및 PCR-RFLP 분석 결과, 제 I 대립인자 빈도는 Ala601-Thr 돌연변이 양성군에서 0.5313으로 음성군에서의 0.1379에 비하여 유의하게 높았다 ( $p < 0.0001$ ).

5. 정상군 57 예와 관상동맥질환자군 22 예에서 시행한 5' flanking 부위의 염기서열분석 결과, 정상군은 I/II 형 14 예(24.6%), II/II 형 43 예(75.4%)였으며 관상동맥질환자군은 I/II 형 12 예(54.5%), II/II 형 10 예(45.5%)의 분포를 보였다. 이러한 유전형 분포의 차이는 정상군과 유의한 차이가 있어 5' flanking 부위의 유전형이 관상동맥질환과 관련이 있음을 시사하였다 ( $p=0.0110$ ).

이상의 결과를 종합할 때 한국인 혈전증에서 이상플라즈미노젠혈증의 발생빈도는 4.2%로 나타났으며 이 중 Ala601-Thr 돌연변이는 80%의 높은 빈도를 나타내었다. 따라서 국내에서도 혈전증환자에서 혈장 플라즈미노젠의 활성도 및 항원량의 검사가 필요하며 이상플라즈미노젠혈증인 경우 유전자 검사를 통한 돌연변이 검색이 필요할 것으로 생각되었다. 향후 더욱 많은 정상인과 돌연변이 가계를 대상으로 혈전증의 발생위험인자로서의 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Bachmann F. Plasminogen-plasmin enzyme system. In: Bachmann F, editor. Hemostasis and Thrombosis. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p.275-310.
2. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem* 1990;265:6104-11.
3. Robbins KC. Dysplasminogenemias. *Prog Cardiovasc Dis* 1992;34:295-308.
4. Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, et al. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 1996;2:493.
5. Carmeliet P, Moons L, Ploplis V, Plow E, Collen D. Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasminogen gene. *J Clin Invest* 1997;99:200-8.
6. Xiao Q, Danton MJ, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Bugge TH, et al. Plasminogen deficiency accelerates vessel wall disease in mice predisposed to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10335-40.
7. Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9779-81.
8. Ploplis VA, French EL, Carmeliet P, Collen D, Plow EF. Plasminogen deficiency differentially affects recruitment of inflammatory cell populations in mice. *Blood* 1998;91:2005-9.
9. Schuster V, Mingers AM, Seidenspinner S, Nussgens Z, Pukrop T, Kreth HW. Homozygous mutations in the plasminogen gene of two unrelated girls with ligneous conjunctivitis. *Blood* 1997;90:958-66.
10. Drew AF, Kaufman AH, Kombrinck KW, Danton MJ, Daugherty CC, Degen JL, et al. Ligneous conjunctivitis in plasminogen-deficient mice. *Blood* 1998;91:1616-24.
11. Aoki N, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M. Abnormal plasminogen. A hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1978;61:1186-95.

12. Girolami A, Marafioti F, Rubertelli M, Cappellato MG. Congenital heterozygous plasminogen deficiency associated with a severe thrombotic tendency. *Acta Haematol* 1986;75:54-7.
13. Ichinose A, Espling ES, Takamatsu J, Saito H, Shinmyozu K, Maruyama I, et al. Two types of abnormal genes for plasminogen in families with a predisposition for thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:115-9.
14. Azuma H, Uno Y, Shigekiyo T, Saito S. Congenital plasminogen deficiency caused by a Ser572 to Pro mutation. *Blood* 1993;82:475-80.
15. Mima N, Azuma H, Shigekiyo T, Saito S. A novel missense mutation in two families with congenital plasminogen deficiency: identification of an Ala675 to Thr675 substitution. *Thromb Haemost* 1996;75:96-100.
16. Schuster V, Seidenspinner S, Muller C, Rempen A. Prenatal diagnosis in a family with severe type I plasminogen deficiency, ligneous conjunctivitis and congenital hydrocephalus. *Prenat Diagn* 1999;19:483-7.
17. Kikuchi S, Yamanouchi Y, Li L, Kobayashi K, Ijima H, Miyazaki R, et al. Plasminogen with type-I mutation is polymorphic in the Japanese population. *Hum Genet* 1992;90:7-11.
18. Li L, Kikuchi S, Arinami T, Kobayashi K, Tsuchiya S, Hamaguchi H. Plasminogen with type-I mutation in the Chinese Han population. *Clin Genet* 1994;45:285-7.
19. Tsutsumi S, Saito T, Sakata T, Mlyata T, Ichinose A. Genetic diagnosis of dysplasminogenemia: detection of an Ala601-Thr mutation in 118 out of 125 families and identification of a new Asp676-Asn mutation. *Thromb Haemost* 1996;76:135-8.
20. Higuchi Y, Furihata K, Ueno I, Ishikawa S, Okumura N, Tozuka M, et al. Plasminogen Kanagawa-I, a novel missense mutation, is caused by the amino acid substitution G732R. *Br J Haematol* 1998;103:867-70.
21. Yamaguchi M, Sugiyama S, Noda H, Tatsumi S, Yoshimura M. A novel missense mutation D676N in the plasminogen gene causes loss of functional activity. *Hum Hered* 1997;47:234-6.
22. Kida M, Kawabata HM, Yamazaki T, Ichinose A. Presence of two plasminogen alleles in normal populations. *Thromb Haemost* 1998;79:150-4.
23. Hathaway WE, Goodnight SH editors. *Disorders of Hemostasis and Thrombosis:*

- A Clinical Guide. New York: McGraw-Hill Inc; 1993. p.323-31.
24. Hach-Wunderle V, Scharrer I, Lottenberg R. Congenital deficiency of plasminogen and its relationship to venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1988;59: 277-80.
  25. Kawasaki T, Kambayashi J, Uemura Y, Sakon M, Shiba E, Suehisa E, et al. Involvement of dysplasminogenemia in occurrence of deep vein thrombosis. *Int Angiol* 1995;14:65-8.
  26. Murata M, Ooe A, Izumi T, Nakagawa M, Takahashi S, Ishikawa M, et al. Ala601-Thr type dysplasminogenaemia genetically diagnosed in patients with retinochoroidal vascular disorders. *Br J Haematol* 1997;99:301-3.
  27. Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, Aoki N, Takamatsu J, Kamiya T. Plasminogens Tochigi II and Nagoya: two additional molecular defects with Ala-600-Thr replacement found in plasmin light chain variants. *J Biochem (Tokyo)* 1984;96:277-87.
  28. Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, Aoki N. Plasminogen Tochigi: Inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6132-6.
  29. Scharrer IM, Wohl RC, Hach V, Sinio L, Boreisha I, Robbins KC. Investigation of a congenital abnormal plasminogen, Frankfurt I, and its relationship to thrombosis. *Thromb Haemost* 1986;55:396-401.
  30. Robbins KC, Boreisha IG, Godwin JE. Abnormal plasminogen Maywood I. *Thromb Haemost* 1991;66:575-80.
  31. Booth NA, Anderson JA, Bennett B. Plasminogen activators in alcoholic cirrhosis: demonstration of increased tissue type and urokinase type activator. *J Clin Pathol* 1984;37:772-7.
  32. Gallus AS, Lucas CR, Hirsh J. Coagulation studies in patients with acute infectious hepatitis. *Br J Haematol* 1972;22:761-71.
  33. Asakura H, Ontachi Y, Mizutani T, Kato M, Ito T, Saito M, et al. Depressed plasma activity of plasminogen or alpha2 plasmin inhibitor is not due to consumption coagulopathy in septic patients with disseminated intravascular

- coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:275-81.
34. Velasco F, Torres A, Andres P, Duran MI. Functional activities and concentrations of plasmin inhibitors in normal subjects and D.I.C. patients. *Thromb Haemost* 1982;47:275-7.
  35. Onundarson PT, Haraldsson HM, Bergmann L, Francis CW, Marder VJ. Plasminogen depletion during streptokinase treatment or two-chain urokinase incubation correlates with decreased clot lysability ex vivo and in vitro. *Thromb Haemost* 1993;70:998-1004.
  36. Kida M, Wakabayashi S, Ichinose A. Characterization of the 5'-flanking regions of plasminogen-related genes A and B. *FEBS Lett* 1997;404:95-9.
  37. Ooe A, Kida M, Yamazaki T, Park SC, Hamaguchi H, Girolami A, et al. Common mutation of plasminogen detected in three Asian populations by an amplification refractory mutation system and rapid automated capillary electrophoresis. *Thromb Haemost* 1998;82:1342-6.
  38. Kida M, Wakabayashi S, Ichinose A. Expression and induction by IL-6 of the normal and variant genes for human plasminogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:129-32.

## Abstract

Detection of Ala601–Thr mutation and polymorphism in the 5' flanking region of plasminogen gene in Korean population

Seung Moo Lee

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyung Soon Song)

Plasminogen (PLG) is a key proenzyme of plasmin in the fibrinolytic and thrombolytic systems. Congenital deficiency of PLG (hypoplasminogenemia, hypoPLGemia) and dysPLGemia (dysplasminogenemia) are known to be associated with mild thrombophilia. Tsutsumi *et al.* (1996) have reported that the Ala601–Thr mutation accounted for about 94% cases of dysPLGemia in 118 unrelated Japanese families. Kida *et al.* (1998) found a new haplotype (allele II) of 5' flanking region in the PLG gene in association with Ala601–Thr mutation.

In this study, plasma activities of plasminogen were measured by colorimetric assay using STACHROM<sup>®</sup>PLG (Diagnostica Stago, Asniers, France) for the screening of hypoplasminogenemia in 477 patients (291 men, 186 women, mean age 61 yrs) with thrombosis, including 223 coronary artery obstructive disease (CAOD), 165 ischemic stroke, 36 deep vein thrombosis, 19 peripheral artery obstructive disease, 12 pulmonary embolism, 8 multiple thrombosis, and 14 other thrombosis, and in 57 healthy subjects (29 men, 28 women, mean age 50 yrs). For the detection of



dysPLGemia and Ala601-Thr mutation, PLG antigen levels were also assessed by immunologic methods and genetic analysis was performed by DNA sequencing and restriction fragment length polymorphism(RFLP) according to the method by Tsutsumi *et al.*(1996) in cases with hypoPLGemia. In addition, RFLP analysis in the 5' flanking region of PLG gene was performed to observe the possible association with Ala601-Thr mutation according to the method by Kida *et al.* (1998).

The results were as follows;

1. In the measurement of PLG activities, there were no cases with hypoPLGemia in the normal group (n=57), while 40 cases (8.4%) of the thrombosis group (n=477) had hypoPLGemia.
2. Among 40 cases with hypoPLGemia, 20 cases (50%) were found to have dysPLGemia with normal antigen levels and the remaining 20 cases had hypoPLGemia due to acquired conditions such as liver dysfunction, consumptive coagulopathy or drug therapy.
3. Among 20 cases with dysPLGemia, 16 cases (80%) were found to have the Ala601-Thr mutation in the PLG gene. The frequency of Ala60-Thr mutation was estimated to be 0.0171 in Korean patients with thrombosis.
4. Allelic(I) frequency in the 5' flanking region in the group with Ala601-Thr mutation was 0.5313, which was significantly higher than in the group (0.1379) without Ala601-Thr mutation.
5. There was statistically significant difference of genotype frequency in the 5' flanking region between normal group and patients with coronary artery obstructive disease (i.e., I/II 14(24.5%), II/II 43(75.4%) in normal group; I/II 12(54.5%), II/II 10(45.5%) in CAOD group).

In conclusion, this study suggests that dysPLGemia with Ala601-Thr mutation is present with relatively high frequency in patients with thrombosis in Korean and/or pulmonary embolism population. Therefore, PLG screening tests need to be included for work-up in the patients with thrombosis as well as in family study for the evaluation of genetic defect in the PLG gene.

---

Key Words : dysplasminogenemia, plasminogen, mutation, polymorphism, Korean, haplotype, thrombosis