한국인 관상동맥질환자에 있어서 methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine beta synthase 및 methionine synthase 유전자의 복합적 다형성과 혈중 homocysteine 농도와의 상관성

연세대학교 대학원

의 학 과

김 신 영

한국인 관상동맥질환자에 있어서 methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine beta synthase 및 methionine synthase 유전자의 복합적 다형성과 혈중 homocysteine 농도와의 상관성

지도교수 권 오 헌

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 신 영

김신영의 석사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 부족한 본인을 끊임없이 지도 편달해 주신 권오헌 교수님과 바쁘신 가운데도 아낌없는 조언으로 격려해 주신 이경률 교수님, 정남식 교수님과 심원흠 교수님, 논문에 대해 변함없는 관심을 보이시고 자문을 아끼지 않으신 김현숙 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 실험에 도움을 주신 세브란스병원 분자유전계, 영동세브란스병원 임상화학계 직원들에게도 깊이 감사 드립니다.

저 자 씀

차 례

표 차례

그림 차례

국문요약

한국인 관상동맥질환자에 있어서 methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine beta synthase 및 methionine synthase 유전자의 복합적 다형성과 혈중 homocysteine 농도와의 상관성

중등도의 hyperhomocysteinemia는 관상동맥질환의 독립적인 위험인자로 인정 받고 있으며 이의 원인으로는 신기능의 저하, vitamin B_6, vitamin B_{12}, folate와 같은 영양인자의 결핍뿐만 아니라 homocysteine 대사에 관련된 효소인 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR), cystathionine beta synthase(CBS), methionine synthase(MS)의 결핍이나 유전자 다형성으로 인한 activity의 감소 등이 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 한국인에 있어서 homocysteine 대사 관련 효소들의 유전자 다형성에 대한 기초적인 자료를 만듦과 동시에 관상동맥질환자와 정상인과의 차이를 알아보고자 하였고, 유전자 다형성의 관상동맥협착 정도와의 상관성, 혈중 homocysteine 농도와의 상관성에 대하여 알아보고자 하였다.

이 연구를 위해서 대조군과 관상동맥조영술로 관상동맥질환이 확진된

환자군을 선정한 뒤 임상적인 자료를 수집하였으며 기본적인 생화학 검사와 혈중 homocysteine, folate, vitamin B_{12} 농도를 측정하였다. 또한 유전자 다형성을 알아보기 위하여 연구대상군에서 DNA를 분리한 뒤 MTHFR 677 genotype, MTHFR 1298 genotype, MS 2756 genotype 에 대해서는 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)방법을 사용하였으며 CBS 844의 68bp insertion의 여부는 PCR을 사용하였다.

환자군과 대조군은 각각 45명과 53명으로 평균연령은 각각 60.8세와 48.1세로 환자군에서 높았으나 혈중 homocysteine, folate 농도의 차이는 없었다. 환자군에서 관상동맥 협착이 50%이상 진행된 동맥의 수에 따라서 1 vessel, 2 vessel, 3 vessel로 구분하고, 관상동맥 협착이 있으나 50%미만인 경우를 minimal로 구분하면 각각이 22%, 18%, 40%, 20%의 분포를 보였고 2 vessel과 3 vessel의 환자군이 minimal과 1 vessel의 환자군보다 혈중 homocysteine 농도가 더 높았으나 통계학적 차이는 없었다. 반면 folate 농도는 2 vessel과 3 vessel의 환자군이 통계학적으로 유의하게 더 낮은 값을 보였다.

연구대상군의 유전자 다형성 분석 결과 MTHFR 677CC, CT, TT genotype의 경우 환자군에서는 각각 33.3%, 48.9%, 17.8%, 대조군에서는

35.8%, 41.5%, 22.6%로 두 군간의 유의한 차이는 없었다. MTHFR 1298 AA, AC, CC genotype의 경우 환자군에서는 각각 62.2%, 37.8%, 0%, 대조군에서는 62.3%, 34.0%, 3.8%로 두 군간의 유의한 차이는 없었다. MS 2756 AA, AG, GG genotype은 두 군에서 모두 GG genotype은 관찰되지 않았고 환자군에서는 각각 68.9%, 31.1%, 대조군에서는 84.9%, 15.1%로 환자군에서 AG genotype이 유의하게 더 많음을 알 수 있었다. 68bp가 insertion된 형태의 CBS genotype은 연구대상군 모두에게서 관찰되지 않았다.

각각의 유전자 다형성에 따른 혈중 homocysteine 농도는 MTHFR 677 genotype에서만 통계학적 의미를 둘 수 있었는데 CC genotype에선 10.2 μmol/L, CT genotype에선 9.6 μmol/L, TT genotype에선 12.6 μmol/L로 TT genotype에서 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 또한 유전자 다형성과 관상동맥 협착 정도에 따른 혈중 homocysteine 농도는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

혈중 folate 농도를 25 percentile에 해당하는 값인 4.3 ng/mL을 기준으로 하여 low, high folate group으로 구분할 때 low folate group에서는 MTHFR 677 genotype에 따라서 혈중 homocysteine 농도가 통계학적으로 유의한 차이를 보였지만 high folate group에서는 차이가 없었다. 세가지 enzyme에

대한 유전자 다형성으로 genetic interaction analysis를 시행한 결과 어떠한 조합에서도 혈중 homocysteine 농도를 증가시키는 경우는 없었다.

본 연구결과는 비록 실험대상군의 수가 적어 추가적인 자료의 수집이 필요하지만 한국인에서의 MTHFR 677, 1298 genotype에 대한 유전자 다형성의 유병율이 외국의 보고에 비해 큰 차이가 없었으며, MTHFR 677의 유전자 다형성이 hyperhomocysteinemia의 원인임을 확인할 수 있었다. 하지만 다른 형태의 유전자 다형성과 hyperhomocysteinemia와의 연관성은 없었다. 또한 혈중 folate 농도가 낮은 경우에 MTHFR 677의 유전자 다형성이 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향이 더 증대되는 것을 알 수 있었다.

핵심 되는 말: 관상동맥질환, 호모시스테인, methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, cystathionine beta synthase, 유전자 다형성

한국인 관상동맥질환자에 있어서 methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine beta synthase 및 methionine synthase 유전자의 복합적 다형성과 혈중 homocysteine양과의 상관성

<지도 권오헌 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 신 영

I. 서론

Homocysteine은 sulfur기를 포함하는 nonproteinogenic amino acid로써 methionine으로부터 합성되며 크게 두 가지 대사경로에 관여한다. 첫째, remethylation pathway (또는 activated methyl cycle pathway)로 5 - methyltetrahydrofolate로부터 methyl group을 전달 받아 homocysteine이 methionine으로 대사 되는 과정이며, 이때 5 - methyltetrahydrofolate는 5,10 - methylenetetrahydrofolate로부터 methylenetetrahydrofolate

reductase(MTHFR)의 작용에 의해서 합성된다. 둘째, homocysteine이 cystathionine beta synthase(CBS)에 의해 serine과 반응하여 cystathionine을 형성하는 과정이며 이를 transsulfuration pathway라고 한다. 이러한 두 가지 대사경로 이외에도 homocysteinyl-tRNA로 전환되어 반응성이 높은 물질인 homocysteine thiolactone을 합성하는데 관여하는 다른 경로도 밝혀져 있다.[1,2] 혈중 homocysteine 농도의 증가는 동맥경화증과 혈전증을 포함한 관상동맥질환의 독립적 위험인자로 평가되고 있으며[3,4], 또한 신경관 결손(neural tube defects)[5], 염증성 장질환(inflammatory bowel disease)[6]와 알츠하이머 병(Alzheimer disease)[7]와의 상관성이 보고된바 있다.

혈중 homocysteine 농도는 신기능의 저하뿐만 아니라 homocysteine 대사의 보조인자인 vitamin B_{12}, vitamin B_6, folate 등의 섭취가 특히 노년층에서 감소함으로 인해서 증가할 수 있으며, 최근에는 중요한 결정인자의 하나로 homocysteine 대사에 관여하는 효소들의 결핍이나 유전자 다형성으로 인한 activity의 감소를 들고 있다. 특히 MTHFR의 thermolabile variant는 정상적인 형태에 비하여 MTHFR activity가 50%미만으로 감소하고 46℃에서의 thermostability도 감소한다.[8] 이러한 thermolabile MTHFR은 autosomal recessive trait로 유전되며 정상인에서 5%가 발견되는 반면 coronary artery disease를 가진 환자에서는 17%가

발견되며, coronary artery disease를 가진 환자 중 coronary artery stenosis의 severity와도 통계학적으로 유의한 차이가 있음이 발견되었다.[9] 이러한 thermolabile MTHFR의 유전적 원인은 MTHFR gene의 677번째 nucleotide가 cytosine에서 thymine으로 치환되는 것으로 이로 인해 222번째 codon의 alanine이 valine으로 치환되며 thermolabile MTHFR을 형성하게 된다.[10] 특히 folate가 부족한 상황에서 homozygote 형태의 mutation이 있을 경우 hyperhomocysteinemia로의 이환율이 높은 것으로 알려져 있다. Themolabile MTHFR의 심혈관계 질환, 특히 관상동맥질환과의 연관성은 많은 논문에서 입증이 되었지만[11], 일부 논문에서 부정적인 결과를 보이기도 하여 아직까지 정립된 바는 아니다.[12] 두 번째로 흔한 MTHFR 유전자 다형성은 1298번째 nucleotide가 adenine에서 cytosine으로 치환되는 형태이며 이는 homocysteine, folate, vitamin B_{12} 농도와는 관계없이 조기 발병하는 관상동맥질환과의 연관성이 있음이 보고되었다.[13] Transulfuration pathway에 관여하는 효소들에서 많은 유전자 다형성이 알려졌으나 그 중 흔한 것으로는 CBS gene의 833 nucleotide의 thymine에서 cytosine으로의 치환이며 이는 주로 homocystinuria를 보이는 환자에 있어서 CBS enzyme activity의 감소와 연관이 있다. 그러나 실험대상군별로 유전자 다형성의 유병율이 매우 다양하고 68bp insertion

(844ins68)이 동반되는 경우도 있어 이들의 homocysteine 대사에 미치는 영향을 정확히 알지 못하며, 또한 심혈관계질환과의 연관성에 대한 controlled study가 시행되지 못한 상태이다. Methionine synthase (MS) 유전자 다형성 중에서 혈중 homocysteine 농도와 심혈관계질환과의 연관성이 있음이 밝혀진 것으로는 open reading frame의 2756 nucleotide의 adenine에서 guanine으로의 치환이며 이는 919 codon의 aspartate가 glycine으로 변화하게 된다. 특히 DD homozygote 형태가 hyperhomocysteinemia와 관련이 있으며, vascular disease와 neural tube defect의 한 위험인자로 보고되었다.[14]

이러한 MTHFR, CBS, MS gene의 유전자 다형성은 주로 서구인을 대상으로 연구가 되어져 왔으며, 최근 국내에서도 연구가 진행되고 있지만 아직 미흡하다. 하지만 대개의 연구가 MTHFR C677T의 다형성에만 국한된 경우가 많으며 대부분의 경우 혈중 homocysteine 농도와의 연관성은 포함하고 있지 않으며, 단순히 한가지 효소의 유전자 다형성과 혈중 homocysteine 농도와의 상관성만을 관찰하고 있으며 세가지 효소의 유전자 다형성을 동시에 조사하여 전체적인 homocysteine 대사와의 상관성을 살펴본 연구는 없었다. 이에 본 연구에서는 현재까지 혈중 homocysteine 농도와의 연관성이 밝혀진 흔한 형태의 유전자 다형성에 대해서 한국인에서의

유병율을 알아봄과 동시에 이들의 혈중 homocysteine, folate, vitamin B_{12} 농도와의 연관성을 밝히고자 하였다. 이러한 연구를 통해 우선 MTHFR, CBS, MS 유전자 다형성에 대한 기초적인 자료를 제공하며, 더 나아가 이들 검사방법을 진료분야에 적용하여 결손 유전자의 조기 검출을 통한 환자 발생의 예방에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

환자군은 세브란스병원 심장혈관센터에서 관상동맥 조영술을 실시하여 관상동맥질환으로 확진된 환자 45명을 대상으로 하였으며, 질환의 중증도는 협착이 50%이상 진행된 관상동맥(좌전하행 관상동맥, 좌회선 관상동맥, 우관상동맥)의 수로 하였다. 대조군은 세브란스병원 건강증진센터에 내원한 건강한 성인 중 무작위로 추출한 53명을 대상으로 하였다.

2. 생화학적 분석

실험군에서 8시간이상의 공복 후 정맥혈을 채혈하여 혈청을 분리한 다음 당일 혈중 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지질, 총 단백, 알부민, 크레아티닌, 총 빌리루빈을 Hitachi 747 자동분석기 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였다. -70℃에 분리 보관된 검체로 혈중 homocysteine, folate, vitamin B_{12}를 측정하였으며 혈중 homocysteine 농도는 fluorescence polarization immnoassay (Automated IMX® immunoassay system; Abbott Laboratories, Abbott Park, USA)를 사용하여 측정하였으며 혈중 folate와 vitamin B_{12}는 Access® Chemiluminescent Immunoassay System (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA)을 사용하여 측정하였다.

3. 유전자 다형성 분석

Genomic DNA는 제조사(High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에서 권장하는 방법으로 EDTA 전혈로부터 분리하였다. MTHFR C677T polymorphism은 PCR-RFLP방법을 사용하였으며 PCR은 100 ng의 genomic DNA, Taq DNA polymerase (Takara biomedical Inc., Kyoto, Japan) 1 U, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP 그리고 0.2 μM의 primer (forward, 5'-tga agg aga agg tgt ctg cgg ga-3'; reverse 5'-agg acg gtg cgg tga gtg tg-3')와 증류수를 혼합하여 25μℓ 반응액을 만든 뒤 5분간 96℃에서 predenaturation 시키고, 93℃에서 50초, 55℃에서 50초, 72℃에서 30초씩 총 35회의 반응을 반복하였으며 72℃에서 7분간 postextension하였다. 위의 PCR 산물 10μℓ을 10X restriction buffer 8.5μℓ와 HinfI(10unit/μℓ, Takara biomedical Inc., Kyoto, Japan) 1.5μℓ와 혼합한 뒤 37℃에서 overnight incubation을 하였다. HinfI에 의하여 198bp의 PCR 반응 산물은 CC genotype의 경우 변하지 않지만, TT genotype은 175bp와 23bp, CT genotype은 198bp, 175bp, 23bp로 분해된다.

MTHFR A1298C polymorphism은 PCR-RFLP방법을 사용하였으며

PCR은 100 ng의 genomic DNA, Taq DNA polymerase 1 U, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP 그리고 0.2 μM의 primer (forward, 5'-ctt cta cct gaa gaa gag caa gtc-3'; reverse, 5'-cat gtc cac agc atg gg-3')와 증류수를 혼합하여 25μℓ 반응액을 만든 뒤 3분간 95℃에서 predenaturation 시키고, 95℃에서 1분, 55℃에서 2분, 72℃에서 2분씩 총 30회의 반응을 반복하였으며 72℃에서 5분간 postextension하였다. 위의 PCR 산물 10μℓ을 10X restriction buffer 8.5μℓ와 MboII(10unit/μℓ, New England Biolabs, Inc., Beverly, USA) 1.5μℓ와 혼합한 뒤 37℃에서 제조사의 지시에 따라 1시간 동안 incubation 하였다. MboII에 의하여 256bp의 PCR 반응 산물은 AA genotype의 경우 176bp와 30, 28, 22bp의 작은 절편으로 분해되지만, CC genotype은 204bp, 30bp, 22bp로 분해된다.

MS A2756G polymorphism은 PCR-RFLP방법을 사용하였으며 PCR은 100 ng의 genomic DNA, Taq DNA polymerase 1 U, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP 그리고 0.2 μM의 primer (forward, 5'-tgt tcc cag ctg tta gat gaa aat c-3'; reverse, 5'-gat cca aag cct ttt aca ctc ctc-3')와 증류수를 혼합하여 25μℓ 반응액을 만든 뒤 5분간 96℃에서 predenaturation 시키고, 96℃에서

30초, 61℃에서 30분, 72℃에서 30초씩 총 30회의 반응을 반복하였으며 72℃에서 5분간 postextension하였다. 위의 PCR 산물 10㎕를 10X restriction buffer 8.5㎕와 HaeIII(10unit/㎕, Takara biomedical Inc., Kyoto, Japan) 1.5㎕와 혼합한 뒤 37℃에서 제조사의 지시에 따라 2시간 동안 incubation하였다. HaeIII에 의하여 211bp의 PCR 반응 산물은 AA genotype의 경우 분해되지 않지만, GG genotype은 131bp와 81bp로 분해된다.

CBS gene의 68bp insertion 여부는 PCR로 확인하였으며 100 ng의 genomic DNA, Taq DNA polymerase 1 U, 10 mM Tris (pH 8.3), 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP 그리고 0.2 μM의 primer (forward, 5’-ctg cct tga gcc ctg aag cc-3’; reverse, 5'-cgt cct gtc cag cac cgt-3')와 증류수를 혼합하여 25㎕ 반응액을 만든 뒤 3분간 95℃에서 predenaturation 시키고, 92℃에서 1분, 52℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 총 35회의 반응을 반복하였으며 72℃에서 7분간 postextension하였다. 68bp의 insertion이 있을 경우 227bp의 PCR 반응산물을 보이게 되고 없을 경우 159bp의 반응산물을 보이게 된다.

4. 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS software (version 9.0 for Windows; SPSS Inc.,

Chicago, IL, USA)를 사용하였으며 환자군과 대조군의 혈중 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지질, 총 단백, 알부민, creatinine, 총 빌리루빈, homocysteine농도, folate, vitamin B_{12}의 차이는 two sample t-test, 각 군의 genotype의 유병율의 차이는 chi-square test를 사용하였다. 유전자 다형성이 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향, 유전자 다형성과 관상동맥 협착 정도에 따른 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향, 유전자 다형성과 folate농도에 따른 혈중 homocysteine 농도의 차이 등을 보기 위하여 one-way ANOVA를 사용하였다.

Ⅲ. 결과

1. 연구대상군의 일반적, 생화학적 특징

대조군과 환자군의 평균나이는 각각 48.1세와 60.8세로 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 환자군에서의 혈중 creatinine 농도가 유의하게 높았으며 이외 기본적인 생화학검사상의 차이는 없었다. 또한 환자군에서 관상동맥질환의 중증도를 수치화하기 위하여 50%이상의 의미 있는 협착이 있는 관상동맥의 수를 살펴보면 3개의 관상동맥에 모두 병변이 있는 경우가 40%를 차지하였다. 혈중 homocysteine과 folate 농도에 있어서 대조군과 환자군 간의 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며, 혈중 vitamin B_{12} 농도는 환자군에서 대조군보다 유의하게 높았다 (Table 1).

Table 1. Clinical and biochemical data of study population

Characteristics	Control group (n=53)	Patient group (n=45)
Age, years	48.1 ± 11.7	60.8 ± 9.6 [a]
M/F, %	45.3 / 54.7	66.7 / 33.3
Total cholesterol, mg/dL	203.53 ± 32.2	185.6 ± 38.8
LDL - cholesterol, mg/dL	117.4 ± 29.6	105.7 ± 29.8
HDL - cholesterol, mg/dL	56.5 ± 13.1	46.6 ± 12.8
Triglycerides, mg/dL	123.2 ± 89.4	131.9 ± 76.4
Total protein, g/dL	7.5 ± 0.47	6.8 ± 0.48
Albumin, g/dL	4.4 ± 0.26	4.1 ± 0.35
Creatinine, mg/dL	0.85 ± 0.18	1.06 ± 0.29 [a]
Total homocysteine, μmol/L	10.3 ± 2.93	10.6 ± 4.19
Folate, ng/mL	5.9 ± 2.4	6.1 ± 2.7
Vitamin B_{12}, pg/mL	496.1 ± 152.8	726.4 ± 351.8 [a]
No. of stenosed coronary artery		No. of patients (%)
minimal		9 (20%)
1		10 (22%)
2		8 (18%)
3		18 (40%)

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD); [a] p - value < 0.05 by two sample t - test

2. 환자군의 관상동맥질환 중증도에 따른 생화학적 특징

관상동맥질환의 중증도에 따라서 관상동맥 협착이 관찰되지만 협착의 정도가 50%미만으로 minimal CAOD로 분류된 군과 관상동맥 1개에서만 의미 있는 협착이 관찰된 군을 low grade로, 2개 이상의 관상동맥 협착이 관찰된 군을 high grade로 구분하여 비교하면 혈중 folate 농도는 high grade에서 낮은 값을 보였으며 (p-value 0.04) 혈중 homocysteine 농도는 high grade에서 높은 값을 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다 (p-value 0.095) (Table 2).

Table 2. Biochemical data of patient group in disease severity

	Low grade (n=19)	High grade (n=26)	p-value[a]
Total cholesterol, mg/dL	179.4 ± 46.0	189.9 ± 33.3	0.414
LDL-cholesterol, mg/dL	100.4 ± 34.0	109.8 ± 26.1	0.340
HDL-cholesterol, mg/dL	44.9 ± 11.9	47.8 ± 13.5	0.468
Total homocysteine, umol/L	9.44 ± 3.01	11.4 ± 4.74	0.095
Folate, ng/mL	6.31 ± 2.16	5.95 ± 2.99	0.040
Vitamin B12, pg/mL	608.7 ± 249.2	812.3 ± 393.5	0.645

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD); [a] p-value by two sample t-test

3. 연구대상군의 유전자 다형성 분석

MTHFR 677 CC, CT, TT genotype은 환자군에서는 각각 33.3%, 49.9%, 17.8%로 대조군의 35.8%, 41.5%, 22.6%와 차이를 보이지 않았다 (p - value 0.733). MTHFR 1298 AA, AC, CC genotype은 각각 환자군에서는 각각 62.2%, 37.8%. 0.0%이었으며 대조군에서는 62.3%, 34.0%, 3.8%로 차이를 보이지 않았다 (p - value 0.407). MS genotype은 GG genotype을 나타낸 경우는 연구대상군에서 모두 없었으며 환자군에서는 AA, AG genotype이 각각 68.9%와 31.1%이었고, 대조군에서는 84.9%와 15.1%이었으며 이는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다(p - value 0.049). CBS genotype에서는 연구대상군에서 모두 68bp insertion의 형태가 관찰되지 않았다 (Table 3).

Table 3. Prevalence of MTHFR C677T, A1298C, MS A2756G, CBS 844 ins68bp genotype in study population.

	Patient, n (%)	Control, n (%)	χ^2
MTHFR 677			
CC	15 (33.3)	19 (35.8)	
CT	22 (48.9)	22 (41.5)	0.733
TT	8 (17.8)	12 (22.6)	
MTHFR 1298			
AA	28 (62.2)	33 (62.3)	
AC	17 (37.8)	18 (34.0)	0.407
CC	0 (0.0)	2 (3.8)	
MS 2756			
AA	31 (68.9)	45 (84.9)	
AG	14 (31.1)	8 (15.1)	0.049
GG	0 (0.0)	0 (0.0)	
CBS 844			
NN[a]	45 (100.0)	53 (100.0)	
NI	0 (0.0)	0 (0.0)	
II	0 (0.0)	0 (0.0)	

[a] N, normal sequence; I, insertion

4. 유전자 다형성과 혈중 homocysteine, folate, vitamin B_{12} 농도와의 상관성

모든 연구대상군을 MTHFR, MS genotype에 따라 다시 구분하여 각각의 혈중 homocysteine, vitamin B_{12}, folate 농도와의 상관성을 살펴볼 때 MTHFR 677 TT genotype의 경우에만 혈중 homocysteine 농도가 통계학적으로 의미 있게 증가되어 있었다 (Table 4).

Table 4. Correlation of genetic polymorphism and serum homocysteine, vitamin B_{12}, folate concentration

	Homocysteine (μmol/L)	Vitamin B_{12} (pg/mL)	Folate (ng/mL)
MTHFR 677			
CC (n=34)	10.2 ± 4.0	623.2 ± 276.4	6.25 ± 3.01
CT (n=44)	9.6 ± 2.3	623.3 ± 271.6	6.10 ± 2.25
TT (n=20)	12.6 ± 4.3	518.4 ± 331.0	5.38 ± 2.12
p value[a]	0.007	0.348	0.463
MTHFR 1298			
AA (n=61)	10.8 ± 3.3	571.5 ± 282.7	5.76 ± 2.61
AC (n=35)	9.95 ± 4.0	650.8 ± 297.2	6.30 ± 2.32
CC (n=2)	8.3 ± 0.4	671.0 ± 47.9	6.85 ± 3.75
p value[a]	0.401	0.405	0.520
MS 2756			
AA (n=76)	10.3 ± 3.0	597.6 ± 276.3	6.01 ± 2.61
AG (n=22)	10.8 ± 5.2	616.6 ± 325.1	5.87 ± 2.18
p value[a]	0.542	0.785	0.817

[a] p value by one-way ANOVA

5. 환자군의 관상동맥 협착 정도와 유전자 다형성의 상관성

환자군을 관상동맥 협착 정도에 따라 4군으로 분류하여 각각의 MTHFR, MS 유전자 다형성을 살펴보면 관상동맥 협착 정도가 심할수록 MTHFR 677TT, MTHFR 1298AC, MS 2756AG 형태의 genotype이 많은 것으로 관찰되지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 5).

Table 5. Genetic polymorphism according to severity of coronary stenosis.

		minimal	1 - VD[a]	2 - VD	3 - VD	*P*- value[b]
MTHFR 677	CC	3 (33.3%)	2 (20.0%)	3 (37.5%)	7 (38.9%)	0.936
	CT	5 (55.6%)	7 (70.0%)	3 (37.5%)	7 (38.9%)	
	TT	1 (11.1%)	1 (10.0%)	2 (25.0%)	4 (22.2%)	
	Total	9	10	8	18	
MTHFR 1298	AA	5 (55.6%)	5 (50.0%)	7 (87.5%)	11 (61.1%)	0.564
	AC	4 (44.4%)	5 (50.0%)	1 (12.5%)	7 (38.9%)	
	Total	9	10	8	18	
MS 2756	AA	7 (77.8%)	6 (60.0%)	7 (87.5%)	11 (61.1%)	0.566
	AG	2 (22.2%)	4 (40.0%)	1 (12.5%)	7 (38.9%)	
	Total	9	10	8	18	

[a]VD, vessel disease; [b] p value by chi square test

6. 환자군의 유전자 다형성과 관상동맥 협착 정도에 따른 혈중 homocysteine 농도

환자군의 관상동맥 협착 정도와 MTHFR, MS genotype에 따른 혈중 homocysteine농도는 다음과 같다 (Table 6). 전체적으로 n수가 적어 통계학적으로 유의한 의미를 두기가 어려웠지만 MTHFR 677 genotype과 혈중 homocysteine농도와의 상관성은 유지되었다(p value 0.016).

Table 6. Geometric mean and standard deviation of serum homocysteine for each MTHFR, MS genotypes versus coronary angiographic findings.

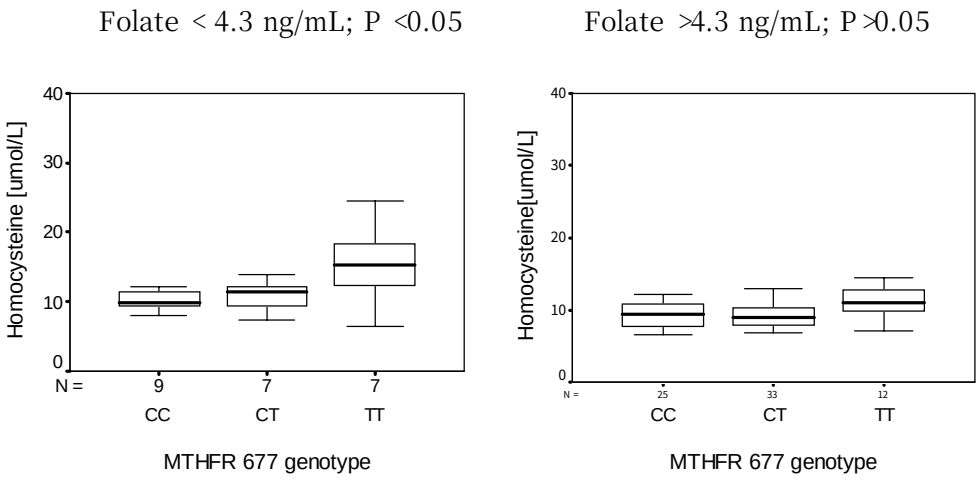
	Coronary angiographic findings				
	minimal	1 - VD	2 - VD	3 - VD	Total
MTHFR genotype					
677CC	8.93 ± 1.67 (3)	8.77 ± 2.06 (2)	9.43 ± 2.52 (3)	13.48 ± 7.24 (7)	11.13 ± 5.41 (15)
677CT	8.38 ± 0.84 (5)	8.43 ± 1.19 (7)	13.42 ± 4.53 (3)	9.56 ± 1.98 (7)	9.46 ± 2.54 (22)
677TT	14.39 ± 0.00 (1)	19.81 ± 0.00 (1)	11.74 ± 7.42 (2)	10.98 ± 3.53 (4)	12.70 ± 4.77[1] (8)
1298AA	9.23 ± 2.90 (5)	10.96 ± 5.08 (5)	11.87 ± 4.57 (7)	10.98 ± 2.25 (11)	10.89 ± 3.51 (28)
1298AC	9.24 ± 1.32 (4)	8.31 ± 1.35 (5)	8.95 ± 0.00 (1)	12.06 ± 7.90 (7)	10.11 ± 5.21 (17)
MS genotype					
2756AA	9.42 ± 2.45 (7)	8.63 ± 1.41 (6)	11.41 ± 4.70 (7)	10.33 ± 1.73 (11)	10.04 ± 2.81 (31)
2756AG	8.58 ± 1.38 (2)	11.14 ± 5.86 (4)	12.16 ± 0.00 (1)	13.08 ± 7.83 (7)	10.11 ± 5.21 (14)

The number of subjects given is in parentheses;[1] p value 0.016 by one - way ANOVA

7. 혈중 folate농도에 따른 MTHFR 677 genotype이 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향

혈중 folate농도를 연구대상군의 25 percentile인 4.3 ng/mL을 기준으로 하여 low folate group과 high folate group으로 구분하여 각각의 경우에 있어서 MTHFR 677 genotype에 따른 혈중 homocysteine농도의 차이를 알아보았다. Low folate group에서는 CT, TT genotype의 경우에서 CC genotype보다 통계학적으로 의미있게 혈중 homocysteine농도가 높았다 (p value 0.022). 반면에 high folate group에서는 MTHFR 677 genotype에 관계없이 일정한 수준을 유지하였다 (p value 0.298)(Fig. 1).

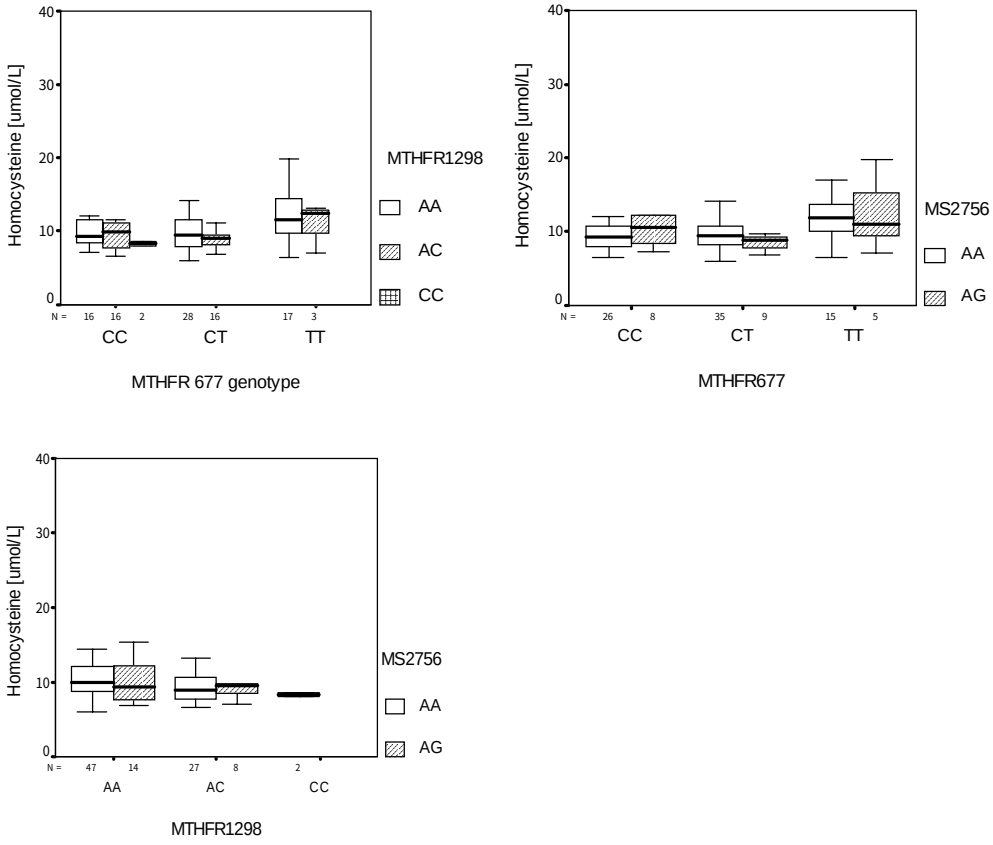
Fig. 1. Influence of MTHFR 677 genotype on homocysteine concentration in study population, divided into group with low and high folate concentration.



8. 복합적 유전자 다형성의 혈중 homocysteine농도에 미치는 영향

MTHFR 677 genotype, 1298 genotype, MS 2756 genotype이 복합적으로 작용할 경우 혈중 homocysteine농도의 변화를 알아보았으나 기존의 MTHFR 677 genotype 단독으로 혈중 homocysteine농도가 변화시킨다는 것 이외에는 특별히 2가지의 유전자 다형성이 복합적으로 작용할 경우 혈중 homocysteine농도를 증가시키지 않았다(Fig. 2).

Fig. 2. Genetic interaction analysis. Median homocysteine levels in the combination of MTHFR 677 genotypes vs. MTHFR 1298 genotypes, MTHFR 677 genotypes vs. MS 2756 genotypes and MTHFR 1298 genotypes vs. MS 2756 genotypes.



IV. 고찰

관상동맥질환은 복합적인 원인의 질환으로서 유전적인 인자뿐만 아니라 환경적인 요인들도 발생에 중요한 역할을 담당하는데 이러한 원인인자 들은 인종이나 민족에 따라서 다르게 작용할 수 있다. 현재까지 알려진 관상동맥질환의 원인인자 중의 하나인 hyperhomocysteinemia는 관상동맥질환 뿐만 아니라 심부정맥 혈전증, neural tube defect, Alzheimer 병 등과 관련이 있다. Homocysteine은 세포독성이 매우 높은 물질이며 세포 내 homocysteine농도는 세포 외 배출기전과 이화작용에 의하여 낮은 농도로 유지된다.[22-24] 주로 신장에서 대사되지만 실제로 요 중으로 배출되는 양은 미미하다.[25] European concerted action program[26]은 의하면 hyperhomocysteinemia는 12 umol/L 이상으로 정의하였으며 Framingham Heart Study에서는 관상동맥질환의 발생 위험도가 11.4 umol/L 이상에서부터 증가한다고 하였으며 혈중 homocysteine을 10 umol/L 이하로 유지하는 것이 바람직하다고 하였다.[27] 중등도의 hyperhomocysteinemia는 혈중 homocysteine농도가 15-30 umol/L 인 것으로 정의되며[28] 이러한 중등도의 hyperhomocysteinemia는 신기능의 장애뿐만 아니라 CBS, MTHFR, MS의 enzyme 결핍이나 enzyme activity의 감소, vitamin B6, vitamin B12, folate와 같은 영양인자의 결핍 등에 의해서 나타날 수 있다. 본

연구에서는 환자군과 대조군에 있어서 혈중 homocysteine농도의 차이는 통계학적으로 의미 있는 수준이 아니었지만 환자군에서 관상동맥질환의 중증도가 증가할수록 혈중 homocysteine농도가 증가하는 경향을 보였다. 다만 통계학적으로 유의한 수준의 차이를 보이지 않은 것은 본 연구대상군의 수가 적기 때문이라고 생각된다.

Homocysteine 대사에 관여하는 효소들의 유전자들의 돌연변이나 다형성에 대하여 많은 연구가 이루어졌으며 가장 흔히 발견되는 돌연변이로는 MTHFR 유전자의 677번째 codon이 cytosine에서 thymine으로의 치환되는 형태이며 이로 인해 37℃에서 MTHFR activity가 약 50% 감소하며 이는 중등도의 hyperhomocysteinemia와 관련이 있다. 본 연구에서는 MTHFR C677T genotype (CC, CT, TT)의 유병률이 환자군에서는 각각 33.3%, 48.9%, 17.8%, 대조군에서는 35.8%, 41.5%, 22.6%로 두 군간의 유의한 차이는 없었다. 이러한 유병율은 다른 연구조사와 비슷한 수준이었다. 또한 각각의 genotype에 따른 혈중 homocysteine의 평균 농도가 10.2, 9.6, 12.6 umol/L로 CC genotype일 경우만 통계학적으로 유의하게 높은 것으로 조사되었다. 현재까지 MTHFR C677T genotype과 hyperhomocysteinemia와의 관계는 널리 인정받고 있지만 다른 유전적 다형성과의 관계는 논란의 여지가 있다. 그 중 MTHFR 유전자 1298번째 condon인 adenine이

cytosine으로 치환되는 경우에도 MTHFR enzyme activity가 50 - 60% 정도 감소한다고 보고되었으며, CBS 유전자 844번째에서 68bp의 insertion이나 MS 유전자의 2756번째 codon이 adenine에서 guanine으로 치환되는 경우에서 hyperhomocysteinemia와의 연관성이 있다는 보고가 있다. 본 연구에서는 MTHFR A1298C genotype (AA, AC, CC)의 경우 환자군에서는 각각 62.2%, 37.8%, 0%, 대조군에서는 62.3%, 34.0%, 3.8%로 두 군간의 유의한 차이는 없었으며 외국의 조사에 비하여 CC genotype의 유병율이 낮은 것으로 조사되었다. 또한 MTHFR A1298C genotype에 따른 혈중 homocystine농도의 유의한 차이도 없었다. MS A2756G genotype (AA, AG, GG)은 두 군에서 모두 GG genotype은 관찰되지 않았고 환자군에서는 각각 68.9%, 31.1%, 대조군에서는 84.9%, 15.1%로 환자군에서 AG genotype이 유의하게 더 많음을 알 수 있었다. 하지만 MS A2756G genotype에 따른 혈중 homocysteine농도의 유의한 차이는 없었다. CBS 844 codon위치에서 68bp의 insertion은 관찰되지 않았는데 이는 MS 2756 GG genotype이 없는 것과 함께 서양인과는 다른 한국인의 유전자 다형성의 특징이라고 할 수 있겠다. MTHFR C677T 이외의 다른 유전자 다형성과 혈중 homocysteine농도와의 상관성에 관하여는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

중등도 hyperhomocysteinemia의 다른 원인으로 folate와 vitamin B_6,

vitamin B_{12} 등의 효소 보조인자(enzyme cofactor)가 있으며 본 연구에서는 folate와 vitamin B_{12}만을 연구대상으로 하였다. 특히 혈중 folate농도를 25 percentile에 해당하는 값인 4.3 ng/mL을 기준으로 한 low folate group에서 MTHFR C677T genotype에 따른 혈중 homocysteine농도가 통계학적으로 유의한 결과를 보였으며 다른 CBS, MS와의 상관성은 없었다. 즉, 혈중 folate농도가 낮은 사람에게서 MTHFR 677 TT genotype이 발현될 경우 다른 genotype에 비하여 혈중 homocysteine농도가 더 많이 증가한다는 것을 의미한다. 이는 folate deficiency시 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF)의 합성이 저하되어 homocysteine에서 methionine으로의 remethylation 과정보다 transsulfuration pathway로 대사된다는 것과 5-MTHF의 결핍으로 transsulfuration pathway의 S-adenosylmethionine (SAM)의 demethylation이 억제되지 않아 SAM이 낮은 농도로 유지되어 결국 혈중 homocysteine농도가 증가하게 두 가지 기전으로 설명될 수 있다. 하지만 vitamin B_{12} deficiency 상태에서 유전자 다형성과의 연관성은 없었는데 이는 환자군이 대조군에 비해서 오히려 vitamin B_{12}가 통계학적으로 유의하게 더 높다는 것과 vitamin B_{12} 결핍 시 homocysteine의 remethylation이 원할 하지 않아 혈중 homocysteine농도가 증가하게 되지만 높은 정도로 유지되는 5-MTHF에 의해 transsulfuration pathway가

activation되어 vitamin B_{12} deficiency의 경우 folate deficiency에 비해서 hyperhomocysteinemia가 심하지 것으로 설명할 수 있다.

기존의 연구에서는 한가지 또는 두가지 정도의 유전자 다형성과 혈중 homocysteine농도와의 연관성을 살펴보았으나 본 연구에서는 homocysteine 대사에 관련되는 주된 효소인 MTHFR, CBS, MS의 가장 흔한 유전자 다형성을 함께 혈중 homocysteine농도와의 상관성을 보았다. 그러나 어떠한 조함에서도 혈중 homocysteine농도에 유의한 영향을 미치는 조합을 찾을 수 없었다. 이는 자료보강과 함께 추가적인 연구를 통하여 많은 자료가 축적된 뒤에 시행하여야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

관상동맥질환의 독립적인 위험인자로 평가되고 있는 중등도의 hyperhomocysteinemia와 homocysteine 대사에 관련된 효소인 MTHFR, CBS, MS의 유전자 다형성, folate, vitamin B_{12}의 상호관계를 알아보기 위하여 대조군과 관상동맥조영술로 관상동맥질환이 확진된 환자군을 선정한 뒤 혈중 homocysteine, folate, vitamin B_{12}를 측정하였고 PCR과 PCR - RFLP 방법을 사용하여 MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MS A2756G, CBS 844 ins68의 유전자 다형성을 조사하였다.

1. 환자군과 대조군은 각각 45명과 53명으로 혈중 homocysteine 평균 농도는 10.6 ± 4.19, 10.3 ± 2.93 umol/L로 차이가 없었다.
2. 환자군의 50%이상의 협착이 진행된 관상동맥의 수에 따라서 minimal, 1 vessel, 2 vessel, 3 vessel로 구분하면 각각이 20%, 22%, 18%, 40%의 분포를 보였고 2 vessel, 3 vessel의 환자군이 minimal, 1 vessel의 환자군보다 혈중 homocysteine 농도(11.4 ± 4.47 vs. 9.44 ± 3.01)가 더 높았으나 통계학적으로 유의하지 않았으며, 혈중 folate 농도(5.95 ± 2.99 vs. 6.31 ± 2.16)는 유의한 차이를 보였다.

3. 실험대상군의 유전자 다형성 분석 결과 MTHFR 677 CC, CT, TT genotype의 경우 환자군에서는 각각 33.3%, 48.9%, 17.8%, 대조군에서는 35.8%, 41.5%, 22.6%로 두 군간의 차이는 없었다. MTHFR 1298 AA, AC, CC genotype의 경우 환자군에서는 각각 62.2%, 37.8%, 0%, 대조군에서는 62.3%, 34.0%, 3.8%로 두 군간의 차이는 없었다. MS 2756 AA, AG, GG genotype은 두 군에서 모두 GG genotype은 관찰되지 않았고 AA, AG genotype이 환자군에서는 각각 68.9%, 31.1%, 대조군에서는 84.9%, 15.1%로 환자군에서 AG genotype이 더 많이 관찰되었다 (p-value 0.049). CBS genotype에서는 68bp이 insertion된 형태는 관찰되지 않았다.
4. 각각의 유전자 다형성에 따른 혈중 homocysteine 농도는 MTHFR C677T에서만 통계학적 의미를 둘 수 있었는데 CC genotype에선 10.2 umol/L, CT genotype에선 9.6 umol/L, TT genotype에선 12.6 umol/L로 TT genotype에서 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 folate, vitamin B_{12} 농도는 유전자 다형성에 따른 차이가 없었다.
5. 환자군의 관상동맥 협착정도와 유전자 다형성사이의 상관관계는 없었고, 관상동맥 협착정도와 유전자 다형성에 따른 혈중

homocysteine 농도도 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

6. 혈중 folate농도를 25 percentile에 해당하는 값인 4.3 ng/mL을 기준으로 하여 low, high folate group으로 구분할 때 low folate group에서는 MTHFR C677T 유전자 다형성에 따라서 혈중 homocysteine 농도가 통계학적으로 유의한 차이를 보였지만 high folate group에서는 차이가 없었다.
7. 실험결과에서 얻은 유전자 다형성으로 genetic interaction analysis를 시행한 결과 어떠한 조합에서도 혈중 homocysteine 농도를 통계학적으로 유의하게 증가시키는 경우는 없었다.

본 연구결과에서 한국인에서의 MTHFR C677T, A1298C에 대한 다형성의 유병율이 외국의 보고와 크게 다르지 않았으나 MS A2756G, CBS 644ins68의 경우에는 낮은 것을 알 수 있었으며, MTHFR C677T의 유전자 다형성이 hyperhomocysteinemia의 하나의 원인으로 확인할 수 있었으며 본 실험에 의하며 다른 형태의 유전자 다형성은 연관성이 적은 것으로 생각된다. 이는 hyperhomocysteinemia를 일으키는 다른 원인들에 대한 변수를 완전히 통제하는 실험을 통하여야만 밝힐 수 있을 것으로 생각되며 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 혈중 folate 농도가 낮은 경우에 MTHFR C677T

유전자 다형성이 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향이 더 증대되는 것을 알 수 있었고 이는 MTHFR 677 TT genotype과 folate 결핍이 동반될 경우 관상동맥질환으로의 이환율이 더 높아진다는 것을 의미하며 건강인에게 이들 검사를 적용하여 관상동맥질환으로의 진행을 사전에 예방할 수 있을 것이라 생각되며 이에 대한 전향적인 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

1. Medina MA, Urdiales JL, Amores - Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism. Eur J Biochem 2001;268:3871 - 82.
2. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S - adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. Am J Clin Nutr 1991;55:131 - 8.
3. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. N Engl J Med 1991;324:1149 - 55.
4. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. Lancet 1999;354:407 - 13.
5. Steegers - Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, et al. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural - tube defects? Metabolism 1994;43:1475 - 80.
6. Mahmud N, Molloy A, McPartlin J, Corbally R, Whitehead AS, Scott

JM, et al. Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patient with inflammatory bowel disease, and its clinical implication. Gut 1999;45:389 - 94.

7. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. Arch Neurol 1998;55:1449 - 55.
8. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. Metabolism 1988;37:611 - 3.
9. Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. Circulation 1993;88:1463 - 9.
10. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111 - 3.
11. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild

hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996;58:35 - 41.

12. Fletcher O, Kessling AM. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? Hum Genet 1998;103:11 - 21.
13. Szczeklik A, Sanak M, Jankowski M, Dropinski J, Czachor R, Musial J, et al. Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia. Am J Med Genet 2001;101:36 - 9.
14. Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. Genet Epidemiol 1999;17:298 - 309.
15. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. JAMA 1992;268:877 - 81.
16. Arnesen E, Refsum H, Bonaa KH, Ueland PM, Forde OH,

Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. Int J Epidemiol 1995;24:704 - 9.

17. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 1995;274:1049 - 57.
18. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC, Selhub J. Post - methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine:initial results from the NHLBI Family Heart Study. Atherosclerosis 1995;116:147 - 51.
19. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. JAMA 1997;277:1775 - 81.
20. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep - vein thrombosis. N Engl J Med 1996;334:759 - 62.

21. 이승환, 김장영, 이한효, 이봉기, 고지연, 유병수 등. 관동맥 질환의 중증도와 혈중 homocysteine농도와의 관련성. 순환기 2000;30:31 - 8.
22. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine:pathways and regulation. Eur J Pediatr 1998;157:S40 - 4.
23. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum:methods and clinical applications. Clin Chem 1993;39:1764 - 79.
24. Christensen B, Refsum H, Vintermyr O, Ueland PM. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine:methionine loading of non - transformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. J Cell Physiol 1991;146:52 - 62.
25. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. Kidney Int 1997;52:495 - 502.
26. van der Griend R, Haas FJ, Biesma DH, Duran M, Meuwissen OJ, Banga JD. Combination of low - dose folic acid and pyridoxine for

treatment of hyperhomocysteinaemia in patients with premature arterial disease and their relatives. Atherosclerosis 1999;143:177 - 83.

27. Montalescot G. Homocysteine: the new player in the field of coronary risk. Heart 1996;76:101 - 2.
28. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med 1998;338:1042 - 50.

Abstract

Genetic variation of the methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine beta synthase and methionine synthase gene in Korean patients with coronary artery obstructive disease and its correlation to homocysteine level

Sinyoung Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Oh Hun Kwon)

Homocysteine has been recognized as a independent cardiovascular risk factor. Moderate hyperhomocysteinemia with homocysteine levels within the range of 15 to 30 umol/L may result from a variety of causes including genetic factors, nutritional factors (e.g. folate, vitamin B_6 and B_{12}) and

renal insufficiency. Genetic factors that contribute to the etiology of hyperhomocysteinemia include common polymorphisms of key enzymes involved in homocysteine metabolism such as methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, A1298C, cystathionine beta synthase (CBS) 844 ins 68, methionine synthase (MS) A2756G.

To assess the influence of these polymorphisms on the homocysteine level, we determined the biochemical marker, such as total cholesterol, creatinine, homocysteine, folate, vitamin B_{12} and the prevalence of MTHFR C677T, A1298C, CBS 844 ins 68, MS A2756G, in 45 patients with angiographically documented coronary artery disease and compared it to that in 53 healthy controls. The results were as follows.

1. There were no significant difference in homocysteine, folate and other biochemical marker between patients and controls. But vitamin B_{12} and creatinine level was significantly higher in patients.
2. Homocysteine level of patients with high grade coronary stenosis (i.e. 2 vessel or 3 vessel) were slightly higher compared to that of low grade coronary stenosis (i.e. minimal or 1 vessel).

3. There were no significant differences in the prevalence of the different genotypes between patients and controls. Of the controls 35.8% were homozygous for the MTHFR 677C allele, 41.5% were heterozygous, and 22.6% were homozygous for the 677T allele. And 62.3% were homozygous for the MTHFR 1298A allele, 34.0% were heterozygous, and 3.8% were homozygous for the 1298T allele. In MS 2756G allele, 84.9% were homozygous for the 2756A allele, 15.1% were heterozygous form. No homozygous for the 2756G allele was found. In CBS 844, 68bp inserted form was not found.
4. The mean homocysteine level was significantly higher in individuals who were homozygous for the MTHFR 677T allele compared with individuals homozygous for MTHFR 677C allele or heterozygous form ($P = 0.007$). But there were no significant differences in other polymorphisms.
5. We could confirm that the MTHFR 677 mutation contributes to a futher increase of homocysteine level in individuals with low folate (<25 percentiles).

6. Genetic interaction analysis was carried out to determine the genotype effects on homocysteine levels become more distinct with gene - gene interaction. But every combination of gene was not significantly increase homocysteine levels.

The prevalence of MTHFR C677T, A1298C polymorphism in Korean was similar to that of population reported to date. But the prevalence of CBS 644ins68, MS A2756G polymorphism is lower. We could confirm that among the studied polymorphism, the MTHFR C677T mutation is the only major genetic determinant of the plasma homocysteine level. And its effect was more intensified in combination with low folate levels.

Key Words: Coronary artery occlusive disease, Homocysteine, Methylenetetrahydrofolate reductase, Methionine synthase, Cystathionine beta synthase, Genetic polymorphism