Original Articles Korean Circulation J 2000;30(6):702-715

심근경색의 위험인자로서 Thrombomodulin 유전자변이의 의의

연세대학교 의과대학 심혈관연구소,[1] 심장내과,[2] 보건대학원[3]
박현영[1] · 김영미[1] · 권혁문[2] · 지선하[3] · 조승연[2] · 정남식[2] · 심원흠[2] · 장양수[2]

Genetic Variants of Thromobomodulin Gene as Risk Factors for Myocardial Infarction

Hyun Young Park[1], Young Mi Kim[1], Hyuck Moon Kwon[2], Sun Ha Jee[3],
Seung Yeon Cho[2], Nam Sik Chung[2], Won Heum Shim[2] and Yang Soo Jang[2]
[1]Yonsei Cardiovascular Research Institute, [2]Department of Internal Medicine,
[3]Department of Epidemiology and Disease Control, Yonsei University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Thrombomodulin (TM) is thrombin receptor present on the luminal surface of endothelial cells. Because the thrombin-TM complex acts as an anticoagulant, the functional variants or deficiency of TM may lead to increment of thrombotic tendency. In this study, we screened the genetic variants of the TM gene in patients with myocardial infarction (MI) and analyzed the genotype to elucidate the effects of genetic variations of TM gene on the development of the MI. We screened a promoter region and coding sequence of the TM gene using single strand conformation polymorphism-heteroduplex analysis and identified three common genetic variants ; those were TM G-33A, TM Ala455Val, and TM C1922T. The genotype frequencies were investigated in the patients with MI (n=234) and control subjects (n=291) by the method of allele-specific oligomer hybridization. The frequencies of mutant genotypes (TM -33A, TM 455Val, and TM 1922T) were higher in patient group compared to the control subjects in males while there were no significant differences in females. In the multiple logistic regression analysis, TM 455Val and TM 1922T alleles were independent risk factors for MI (OR[95% CI ; 1.799[1.125 -2.878] p=0.014 and 5.624[1.019 -31.025], p=0.048, respectively] in males. However, the genetic variations were not independent risk factors for MI in females. There were significant linkage disequilibriums among three genetic variants. These linkage disequilibriums explain the similar effects of three genetic variants on the development of MI. To investigate the effect of the TM G-33A mutation on TM promoter activity, the two TM promoter constructs (pTM-355 and pTM-125, bearing TM -33G or TM -33A) containing of firefly luciferase gene were transfected into HepG2, BAE, and CHO cells. The promoter activities were higher in the promoter constructs with TM -33G compared to the constructs with TM -33A in pTM-355. These results suggest the possibility of the positive predisposing effect of TM -33A allele on MI in males. The functional study for TM Ala455Val and TM C1922T should be followed to elucidate the genotype effects of these mutations on the development of MI. In this study, we identified three genetic variants of TM gene and showed the significant associations between genetic variants and MI in males. These results proposed that TM gene is an attractive candidate for genetic risk factor for MI in Koreans. **(Korean Circulation J 2000;30(6):702-715)**

KEY WORDS : Thrombomodulin · Gene · Polymorphism · Myocardial infarction.

논문접수일 : 2000년 1월 25일
심사완료일 : 2000년 5월 17일
교신저자 : 박현영, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 심혈관연구소
전화 : (02) 361 - 7355/8365 · 전송 : (02) 365 - 1878 E - mail : hypark@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

급성 심근경색증의 발생기전에 있어 혈전 형성은 아주 중요한 역할을 한다. 대개 고도의 죽상동맥경화반이 진행되어 혈류장애가 초래된 경우에는 측부순환(collateral circulation)의 발달로 오히려 심근 경색의 발생이 흔치 않은 반면, 죽상 동맥경화반의 진행정도에 상관없이 불안정한 동맥경화반의 손상이나 파열로 인해 내막하 지질이 혈액에 노출되고,1)2) 이로 인해 혈소판 응집 및 혈전형성이 촉진되어 혈류장애가 급격히 저하된 경우 발생한다.3-5) 그러므로, 혈전 형성에 관여하는 여러 혈액응고 인자 및 이의 관련인자들은 급성 심근허혈을 유발하는데 있어 중요한 역할을 차지하며, 이들의 변화는 심근 경색의 발생 및 경과에 영향을 미친다.

지난 20여 년간 혈전색전성 질환에서의 유전적 위험요인에 대해서는 많은 연구가 진행되어 왔다. Protein C 혹은 protein S의 결핍이나, 활성화된 protein C 저항성등에서는 이미 유전적 변이가 정맥내에서의 혈전색전증의 발생에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다.6)7) 또한, plasminogen activator inhibitor(PAI)-1이나 혈장 섬유소원의 농도가 증가된 경우 혈전형성의 경향이 높음이 보고되었고,8-10) 특정 유전자이상은 밝혀지지 않았으나 이들의 유전적 성향 및 유전자 다형성과 혈중농도와의 관계에 대한 보고들이 있다.11)12)

Thrombomodulin(TM)은 혈관내피세포에 존재하는 당단백수용체로써 트롬빈과 1 : 1로 결합하여 protein C를 활성화시키며,13) 활성화된 protein C는 혈액응고인자 Va와 VIIIa를 퇴화시켜 혈액응고를 방해한다.14) 뿐만 아니라, TM은 트롬빈과 결합함으로써 트롬빈이 가지고 있는 섬유소응집, 혈소판 활성, 혈액응고인자 V, VIII의 활성화와 같은 작용을 방해함으로써 항응고 효과를 나타낸다.15)16) TM 유전자는 20번 염색체에 존재하며, 다른 유전자와는 달리 인트론(intron)이 없으며 epidermal growth factor type repeats(EGF-like domain)를 포함하고 있다.17) TM 유전자변이는 TM의 형성과 관련되어 혈전색전증과 밀접한 관련이 있으리라 알려져 있으며, 실제 몇몇 혈전성 경향이 있는 환자에서 Asp468Tyr, Pro483Leu, Gly61Ala, Ala25Thr 등의 유전자변이가 밝혀지기도 하였다.18-21) 하지만, 이들 중 대부분은 증례 보고로, 혈전색전증 환자에서조차 그 빈도가 극히 낮아 혈전색전증 발생위험의 예측인자로서의 의의는 없는 것으로 알려진 것도 있다.22) 현재까지 TM 유전자변이 중 비교적 빈번한 것으로 알려진 것으로는 6번째 EGF-like domain에서 Ala이 Val으로 치환된 변이로 서양인의 약 18%의 대립인자(allele)에서 나타나며,23) 심근 경색의 발병여부에 따른 각 유전형의 분포를 보았을 때, 정상대조군에 비해 환자군에서 변이형 대립인자의 빈도가 감소되어 있어, Val 대립인자를 가진 경우 오히려 혈전성 질환의 발생위험이 적음을 시사한 보고가 있으나,24) 비슷한 연구에서 반복된 결과를 얻는 데는 실패하였다.25) 최근 TM 유전자의 유전자전사조절부위에서 새로운 세 가지 유전자변이가 발견되었고, 이 유전자변이가 심근 경색의 발병과 관련이 있을 것임을 시사한 보고가 있었다. 이들은 GG-9/-10AT, G-33A, 그리고 C-133A 유전자 다형성으로, 이 중 전자의 두 유전자다형성은 연구대상 중 동양인에서 주로 발견되었으며, 특히 GG-9/-10AT는 심근 경색 환자들에서만 발견되어 이 질환과 관련이 있음을 시사하였으나, 대상군의 수와 대립인자의 빈도가 낮아 결론을 내리기에는 무리가 있다.25)

본 연구에서는 TM 유전자의 전사조절 부위 및 엑손에서 single-strand conformation polymorphism (SSCP)-heteroduplex 분석을 시행하여 한국인에서 TM 유전자내 존재하는 유전자변이를 찾아보고, 이들 유전자변이에 대해 심근경색환자 및 대조군에서의 유전형분포 및 유전형에 따른 유전자발현정도를 분석함으로써, 이들 유전자변이 및 TM 유전자가 심근경색의 발생에 미치는 영향과 그 기전에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

심근경색증 환자군 234명과 대조군 291명을 대상으로 하였다. 심근경색증 환자군은 1997년과 1998년에 본원에 입원하여 치료받은 환자 중 심근경색증으로 진단 받은 환자들중에서 임의추출하였으며, 심근경색증 환자의 진단은 임상적으로 심전도상 이상 Q파가 관찰되거나 혈액검사상 심근효소(CK-MB)가 상승되고, 혈관벽 운동장애가 확인된 경우로 하였다. 대조군으로는 비정형협심증, 안정성 협심증, 판막질환등으로 혈관조영술을 시행한 환자 중 임상적으로 심근경색증으로 의

심되는 소견이 없으면서 혈관조영술상 관상동맥에서 혈관 내경이 50%이상 좁아진 부위가 발견되지 않은 환자 114명과 건강검진자 중 심근 허혈로 인한 증상이 없으며, 심전도상 정상 소견을 보인 177명을 대상으로 하였다. 남녀 성별에 따른 임상양상은 Table 1과 같다

방 법

DNA 추출

대상군으로부터 혈액 7 ml을 EDTA가 첨가된 시험관에 채취하여 DNA 분리전까지 - 20℃에 보관하였다. 게놈(genome) DNA는 Wizard DNA purification system(Promega Co., Madison, Wisconsin, USA)를 사용하여 말초백혈구로부터 추출하였다.

유전자 변이 검색

유전자 증폭

TM 유전자 전사조절부위 및 엑손 부위의 유전자변이 검색을 위해 Jackman등이 보고한 TM 유전자 염기서열에 의거하여 유전자 증폭을 위한 시발체(primer)를 설계하였다(Table 2).17) 각 유전자 증폭 산물은 일부분이 중복되게 시발체를 설계하여 시발체 염기서열 내에서의 변이도 검색할 수 있도록 하였다.

유전자변이 검색을 위해 심근경색 환자 중 임의로 추출한 48명의 유전자를 이용하여 각 유전자 부위를 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 증폭시켰다. 우선 시발체 중 하나를 T4 polynuleotide kinase (Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 $[\gamma\text{-}^{32}P]$ATP와 37℃에서 1시간 이상 반응시켜 표지(end - labeling)하였다. 유전자 증폭은 20 μl 반응으로 게놈 DNA 50 ng에 Taq polymerase 0.4 units(Ampli - *Taq* Gold™, Roche Molecular System, Inc., Branchburg, New Jersey, USA), 동위원소로 표지한 sense primer와 antisenes primer를 각각 10 pmol, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.0625 mM의 dNTP와 반응완충용액(50 mM KCl, 10 mM Tris - HCl(pH 8.3))를 혼합하여 증폭하였다. 중합효소 연쇄반응은 95℃에서 10분 동안 가열하여 변성(denaturation) 후, 94℃에서 1분간 변성, 55 65℃에서 1분간 재결합(annealing), 72℃에서 1분간 신장(extension)하는 과정을 35회 반복 시행하고, 마지막으로 72℃에서 5분간 신장하였다(Table 3).

SSCP - heteroduplex analysis

중합효소연쇄반응 산물에 변성용액(stop solution ; 95% formamide containing 20 mmol/L EDTA, 0.05% xylene cyanol)을 첨가 후 94℃에서 5분 이상 변성시킨 후 일부 유전자 증폭 산물이 heteroduplex 형태를 이룰 수 있도록 실온에 10분간 방치 후, 0.5% Mutation Detection Enhancement(MDE) gel(FMC BioProducts Co., Rockland, Maine, USA)에서 5W로 15 25시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 건조시키고 phosphor - imaging plate reader(Bio - imaging analyser system 2500®, Fuji Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 전기영동상의 이동속도에 차이가 있는지를 분석하였다. 이동속도에 차이가 있는 유전자 증폭 산물이

Table 1 . Characteristics of study population

	Male		Female	
	MI (191)	Control (174)	MI (43)	Control (117)
Age (years)	57.0±10.9*	47.3±11.2	65.6± 8.7*	48.2±12.1
Smoking (%)	63.4	62.1	9.3	2.6
Diabetes (%)	21.5*	5.7	32.6*	2.6
Hypertension (%)	40.8*	28.7	48.8*	25.6
BMI (Kg/m^2)	24.4± 2.7*	23.7± 2.7	24.6± 4.2*	23.2± 3.3
TC (mg/dL)	193.4±38.8	189.3±36.5	196.8±48.7	192.7±38.4
TG (mg/dL)	149.2±76.9	143.0±81.0	121.6±63.8	131.7±83.9
HDL-C (mg/dL)	32.3±11.1	40.9±10.9	41.1±12.7	43.5±10.5

MI : patients with myocardial infarction, Control : control subjects, BMI : body mass index, TC : total cholesterol, TG : triglyceride, HDL-C : high density lipoprotein-cholesterol
The number in parenthesis represents the number of subjects.
* : $p<0.05$ MI vs. Control by t-test or χ^2-test.

Table 2. Oligonucleotide primers in the PCR amplification of the TM gene

Primer name	Nucleotide no*	Oligonucleotide sequence
TM-1S	-306 -287	5′-GAT GAA AGA GGG CTG CAC GC-3′
TM-1AS	-146 -163	5′-CAT GGG ATC ACC TCG CCG-3′
TM-2S	-187 -167	5′-CGC CAG GGC AGG GTT TAC TCA-3′
TM-2AS	-28 -46	5′-GTG CCC GGC CCT CCC TCC C-3′
TM-3S	-64 -48	5′-CCT TTT CCC GAA CGT CC-3′
TM-3AS	56 72	5′-GCC TCT CCT GTC CGT CC-3′
TM-4S	29 47	5′-CGC GCA CGG CAA GAA GTG T-3′
TM-4AS	188 170	5′-AGG ACC AGG ACC CCA AGC A-3′
TM-5S	161 182	5′-TGG GTA ACA TGC TTG GGG TCC T-3′
TM-5AS	405 384	5′-GCC GTC GCC GTT CAG TAG CAA G-3′
TM-6S	364 382	5′-GTG GCT GCC GAT GTC ATT T-3′
TM-6AS	556 538	5′-CCC CAT TGA GGT CGA GCC G-3′
TM-7S	500 522	5′-TTA CGG GAG ACA ACA ACA CCA GC-3′
TM-7AS	745 725	5′-AGG TGA TCG AGA CGG CGG CAG-3′
TM-8S	634 652	5′-CAG CAG TGC GAA GTG AAG G-3′
TM-8AS	871 854	5′-AGT GCC CCT GGA CCG CTC-3′
TM-9S	833 854	5′-TAA TGT GCA CCG CGC CGC CCG-3′
TM-9AS	1077 1058	5′-CGG CTG GTC GGG GTT GGG AA-3′
TM-10S	992 1011	5′-CAG ACG GGC GCT CCT GCA CC-3′
TM-10AS	1270 1249	5′-GGT CCA CGG GCT CCA CAC ACT-3′
TM-11S	1214 1236	5′-GCC ACT GCT ACC CTA ACT ACG AC-3′
TM-11AS	1373 1356	5′-TGC GGC TCG TGG GGA ATG-3′
TM-12S	1319 1339	5′-CTA GCT ACC TCT GCG TCT GCG-3′
TM-12AS	1567 1549	5′-CGC AGA TGC ACT CGA AGG T-3′
TM-13S	1517 1533	5′-TCT GCT CCG GGG TGT GC-3′
TM-13AS	1717 1701	5′-AGC CCG AAT GCA CGA GC-3′
TM-14S	1672 1692	5′-GGC TCC ACC TTG ACT CCT CCG-3′
TM-14AS	1835 1816	5′-GCC GCG CAC TTG TAC TCC AT-3′
TM-15S	1750 1769	5′-CTG GTG GTG GCG CTT TTG GC-3′
TM-15AS	1957 1936	5′-CAA AGC TGG GGG TGA GGA GGC A-3′

*Nucleotide number is destinated from the transcriptional start point.
TM : thrombomodulin, S : sense oligonucleotide, AS : antisense oligonucleotide

관찰되는 경우 변이여부 및 변이의 위치를 파악하기 위하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열분석

SSCP-heteroduplex 분석 결과 전기영동상 이동속도에 차이를 보여 변이가 의심되었던 유전자 증폭 부위는 homozygote가 관찰된 경우 직접 유전자 증폭에 이용된 시발체를 이용하여 ABI prism 310(PE Corp., Norwalk, Connecticut, USA)로 염기서열을 분석하였으며, 이형접합만 관찰된 경우에서는 유전자 증폭산물을 T-vector(Promega Co., Madison, Wisconsin, USA)에 클로닝(cloning) 후 T7 혹은 SP6 시발체를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

유전형분석

유전자내에서 발견된 유전자다형성의 유전형 분석은 allele-specific oligomer(ASO) 보합결합(hybridization) 분석을 이용하였다.[26] ASO 보합결합을 위해 설계한 oligomer의 염기서열 및 보합결합의 반응조건은 다음과 같다(Table 4).

우선 유전형을 분석하고자 하는 유전자 분절부위를 증폭한 다음 200 μl의 0.4 N NaOH로 변성시킨 후 2장의 나일론막(Hybond-N+, Amersham, UK)에 동량의 유전자 증폭산물을 전이하였으며, 2×SSC(0.3M NaCl, 0.03M trisodium citrate) 용액으로 2회 세척 후 UV를 조사하여 DNA를 나일론 막에 고정시켰다. ASO는 T4 polynuleotide kinase(Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 [γ-^{32}P]ATP로 표지하여 보합결합용액(7% PEG, 10% SDS, 60 mM NaH_2PO_4)에 희석하였다. DNA가 고정된 나일론막을 보합결합용액으로 적절한 온도에서 6시간이상 보합결합시킨 뒤, 2×SSC/0.1% SDS용액으로 처음 2번은 실온에서, 그리고 3번째에는 각 ASO에 적절한 온도에서 10분간 세척하였다. 세척한 나일론막을 imaging plate에 노출시켜 3시간 후 영상을 얻어 유전형을 결정하였다(Fig. 1).

Table 3. Conditions for PCR Amplification of the TM gene

Primers	Sizes of PCR product (base pair)	Annealing temperature (℃)	Addendum
TM-1S/TM-1AS	161	65	
TM-2S/TM2AS	160	65	
TM-3S/TM-3AS	136	60	
TM-4S/TM-4AS	160	65	
TM-5S/TM-5AS	245	55	1M Betaine
TM-6S/TM-6AS	193	55	1M Betaine
TM-7S/TM-7AS	246	65	
TM-8S/TM8-AS	238	55	1M Betaine
TM-9S/TM-8AS	245	55	1M Betaine
TM-10S/TM-10AS	279	65	
TM-11S/TM-11AS	160	65	
TM-12S/TM-12AS	249	65	
TM-13S/TM-13AS	201	60	
TM-14S/TM-14AS	164	65	
TM-15S/TM-15AS	208	65	

The thermal profile included 10 minutes of denaturation at 95℃, 35 cycles containing of denaturation for 1 minute at 94℃, annealing for 1 min at indicated temperature and extension for 1 minute at 72℃, followed by 5 minutes of final extension at 72℃.

유전자형에 따른 유전자발현 정도분석

TM promoter luciferase construct 제작

TM 유전자 전사조절부위의 유전자 변이가 유전자발현에 영향을 미치는지를 분석하기 위하여 두 유전자 전사조절부위를 luciferase 유전자를 가지고 있는 플라스미드(PicaGene)에 클로닝하였다.

우선 말단에 BglII 제한 효소의 절단부위를 포함할 수 있도록 시발체(pTM-355S ; 5′-CGAGATCT-TTGGAAGTGGCTGTAACATGTAT-3′, pTM-125S ; 5′–GCGAGATCTCGGCCAGAGAACCCA-GCAAT-3′, pTM-AS ; 5′-TCAGATCTCCGT-CCCAGCCCAGACACTTC-3′)를 제작하여 유전자 전사조절부위인 -355 64 및 -125 64 부위를 PCR을 이용하여 증폭시켰다.

유전자 증폭 산물과 벡터는 각각 *Bgl*II 제한효소로 37°C에서 6시간 이상 방치하여 절단 후 QIAEXII gel extraction kit(QIAGEN Inc., CA, USA)를 이용하여 정제하였으며, 자체 연결(ligation)을 방지하기 위하여 calf intestinal alkaline phosphatase(Takara Co, Otsu,

Table 4. A list of the allele-specific oligonucleotides, and hybridization and washing conditions for genotyping

Position	Alelle-specific oligonucleotides	Hybridization	Washing condition
TM G-33A	G : 5′-TAAGTGCCCGGCCCTC-3′	45℃	G : 2×SSC/0.2% SDS 60℃
	A : 5′-GAGGGCCAGGCACTTA-3′		A : 2×SSC/0.2% SDS 60℃
TM Ala455Val	Ala : 5′-GCCCTTGCCCGCCACA-3′	45℃	Ala : 2×SSC/0.2% SDS 60℃
	Val : 5′-TGTGGCGGACAAGGGC-3′		Val : 2×SSC/0.2% SDS 60℃
TM C1922T	C : 5′-CCTGGCTCCGTCC-3′	35℃	C : 2×SSC/0.2% SDS 45℃
	T : 5′-CCTGGCTTCGTCC-3′		T : 2×SSC/0.2% SDS 43℃

TM : thrombomodulin. Underlines indicate polymorphic nucleotides.

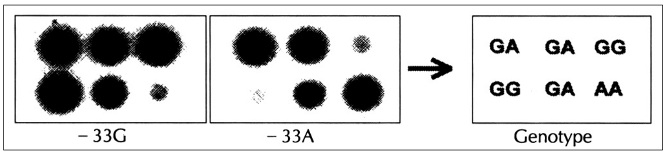

Fig. 1. Identification of the genotype by the allele-specific oligomer (ASO) hybridization of G-33A. The hot spot means the presence of the complement sequence to labeled ASO. The genotype was determined by the presence of the hot spots on the hybridized membrane.

Japan)로 50°C에서 60분간 처리 후 다시 정제하여 정량하였다. 정제된 유전자 증폭산물 약 50 ng과 벡터 20 ng을 T4 ligase(Takara Co, Otsu, Japan)로 16°C에서 밤새 반응시키고 이를 다시 정제하여 TM promoter luciferase construct(pTM-355, pTM-125)를 얻었다. TM promoter luciferase construct는 대장균(Escherichia coli XL-1 blue cells)에 heat-shock 반응으로 형질전환(transformation)시켰으며, 이를 LB 플레이트에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하고 다음 날 여러 콜로니를 취하여 *Bgl*II 제한 효소로 처리하여 유전자 전사조절부위가 올바로 들어간 콜로니만 선택하였으며, 염기서열 분석으로 벡터에 유전자 전사조절부위가 정확히 들어갔음을 확인하였다.

세포배양 및 Transfection

HepG2 세포, Chinese hamster ovary(CHO) 세포 및 소의 대동맥내피세포(bovine aortic endothelial cell, BAE)를 이용하여 각 세포에 TM promoter luciferase construct를 transfection 후 luciferase의 활성도를 측정함으로써 G-33A 유전자 변이의 유전형에 따른 유전자 발현정도를 비교하였다. Transfection을 위해 6 well plate에 각 well 당 10^6개의 세포를 분주한 다음 각 세포에 적절한 배지로 37°C 5% CO_2/95% air에서 80%정도로 semiconfluent 상태까지 배양하였다. TM promoter luciferase construct는 정량하여 0.8 μg를 CMV promoter를 가진 β-gal-actosidase construct 0.2 μg와 함께 혈청이 들어가지 않은 배지 100 μl와 혼합하고, PLUS Reagent(Life Technologies, Inc, Rockville, Maryland, USA) 6 μl를 첨가 후 실온에 15분간 방치하였다. 이를 다시 LipofectAMINE Reagent(Life Technologies, Inc, Rockville, Maryland, USA) 4 μl가 함유된 배지 100 μl와 혼합하여 실온에 15분간 방치하여 semiconfluent 상태에 이른 세포에 transfection하였다. Transfection 직전 세포는 PBS 용액으로 2차례 세척하였으며 혈청이 포함되지 않은 배양액 800 μl를 분주하고 여기에 TM promoter luciferase construct 및 LipofectAMINE PLUS Reagent가 포함된 시약 200 μl를 첨가하여 혼합 후 4시간 배양하고, 4시간 뒤 혈청이 포함된 배지 1 ml을 추가하여 48시간 배양하였다.

Luciferase 활성도 측정

Transfection 후 48시간 배양한 세포를 PBS 용액으로 2차례 세척하고, Reporter lysis buffer(Promega Co., Madison, Wisconsin, USA)를 100 μl씩 각 well에 분주한 다음 실온에서 2분간 방치하였다. 세포는 1.5 ml tube에 옮긴 후 15초간 진탕하여 세포를 파괴하고 12,000 g로 15초간 원심분리한 후 상층액을 분리하였다. 상층액 20 μl에 luciferase assay reagent (Promega Co., Madison, Wisconsin, USA) 100 μl를 혼합 후 즉시 MicroLumat LB96P(EG & G Berthold, Wildbad, Germany)로 luciferase 활성도를 측정하였다.

통계분석 방법

대상군의 선택 및 유전형 분석이 적절하였는지는 Hardy-Weinberg Equation을 이용하여 검증하였으며, 유전자변이간의 연관계수 및 연관관계는 EH program 및 maximum likehood estimation에 의거하여 분석하였다.27-29) 연관관계의 분석을 간단히 요약하면 두 유전자변이간의 연관성이 없을 때 나타날 수 있는 반수체형(haplotype)의 빈도와 실제 관찰된 반수체형의 빈도로부터 연관계수(D′)를 구하고 이로부터 두 유전자 부위의 대립인자의 빈도로부터 D_{max} 혹은 D_{min}로 보정하여 연관계수(|D|)를 구하였다. TM 유전자내 변이유전형이 심근경색의 발생에 미치는 영향은 chi-square test 및 다변량 로지스틱분석으로 알아보았으며, 심근경색 위험요인들의 분석을 위해서는 student t-test, 혹은 ANOVA를 이용하였다. 통계처리는 SAS® System for Windows release 6.12를 이용하였으며, 통계적 유의성은 p value 0.05미만으로 하였다.

결 과

TM 유전자변이

TM 유전자전자조절 부위 및 엑손 부위를 검색한 결과 -33, 1586, 그리고, 1922번째 염기에서 점돌연변이(point mutation)가 발견되었다(Fig. 2). 이 중 5′전사조절부위 및 엑손에 존재하는 TM G-33A와 TM C1586T(Ala455Val)은 기존에 보고된 바가 있는 유전자 변이이며, 3′비전사 부위에 존재하는 TM C1922T 유전자변이는 새로이 발견된 유전자 변이이다.

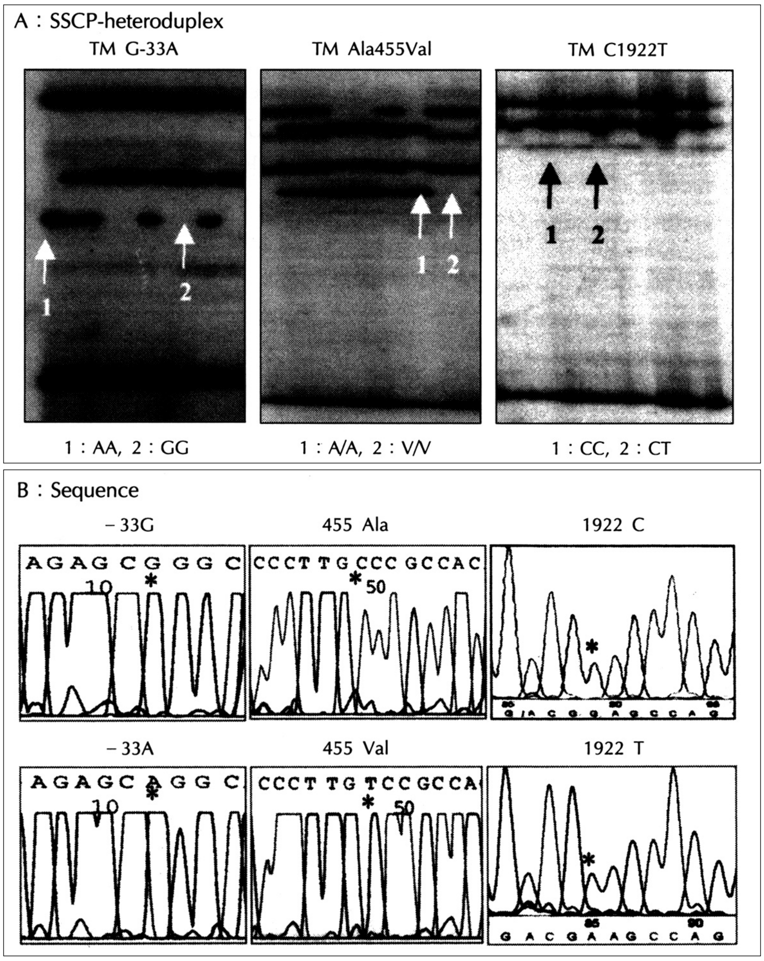

Fig. 2. Mutation detection by SSCP-heteroduplex(A) and sequencing data (B) of the mutations on the TM gene. The asterisk indicates the mutation site.

TM 유전자변이의 유전형 분포

환자군과 대조군 모두에서 유전형의 분포는 Hardy-Weinberg equation에서 벗어나지 않았다. 남녀 성별로 나누어 분석한 환자군과 대조군에서의 유전형 분포 및 대립인자의 분포는 Table 5에서 보는 바와 같다. 남자에서는 심근경색증 환자군에서 세 유전자변이 모두에서 변이유전형을 가진 환자의 빈도가 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가되어 있었으며, 대립인자의 빈도를 분석한 결과에서는 TM Ala455Val에서 TM 455 Val의 빈도만이 통계적으로 유의하게 증가되어 있었으며 다른 두 유전자 변이에서는 변이 대립인자의 빈도가 증가된 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었다. 여자에서는 세 유전자변이 모두에서 유전형과 대립인자의 빈도가 환자군과 대조군간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

TM 유전자변이의 심근경색발생에서의 상대위험도

심근경색증 환자군과 대조군에서 변이유전형을 가진 경우 심근경색발생의 상대위험도를 분석한 결과, 남자에서는 TM -33A 유전자를 가진 경우 심근경색의 발생의 상대위험도가 1.38(95% CI : 1.05 1.82, p=0.023)이었으며, TM 455Val 유전자를 가진 경우의 위험도는 1.28(95% CI : 1.03 1.59, p=0.021)였고, TM 1922T 유전자를 가진 경우 상대 위험도는 2.06 (95% CI : 0.95 4.47, p=0.067)로써 변이유전자를 가진 경우 심근경색의 상대위험도가 높은 것으로 분석되었다. 여자의 경우 TM -33A 유전자를 가진 경우 심근경색의 발생의 상대위험도가 1.17(95% CI : 0.76 1.80, p=0.453), TM 455Val 유전자를 가진 경우의 위험도는 0.88(95% CI : 0.61 1.25 p=0.468), 그리고, TM 1922T 유전자를 가진 경우 상대위험도는

1.92 (95% CI : 0.97   3.81, p=0.059)였다.

TM 유전자변이와 심근경색증의 위험요인과의 관계

TM 유전형에 따라 기존에 알려진 심근경색증 발생의 위험요인의 분포를 분석한 결과는 Table 6, Table 7과 같다. 남자에서 TM G-33A 유전자 변이는 TM -33A 유전자를 가진 경우에 비만도(BMI)가 유의하게 증가되어 있었으며(t=2.21, p=0.03), HDL 콜레스테롤은 TM -33A유전자를 가진 경우 유의하게 감소되어 있었다(t=2.78, p=0.01). 고혈압의 빈도는 TM -33A를 가진 경우에 높았으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(χ^2=3.82, p=0.05). 여자에서는 TM -33A 유전자를 가진 경우 HDL 콜레스테롤이 오히려 증가되어 있었다(t=2.03, p=0.04). 다른 유전자변이에서는 유전형에 따른 위험 요인의 분포에는 유의한 차이가 없었다.

TM 유전자변이의 심근경색발생 위험인자로써의 의의

TM 유전자다형성이 심근경색 발생의 위험인자로써 의의가 있는지를 알아보기 위해 다변량 로지스틱분석을

Table 5. Genotype and allele frequencies in patients with MI and in control subjects

		Genotype frequency		Allele frequency	
Male					
TM G-33A		GG	AG+AA	G	A
	MI (191)	0.775	0.225*	0.882	0.118
	Control (174)	0.868	0.132	0.923	0.077
TM Ala455Val		A/A	A/V+V/V	A	V
	MI (191)	0.560	0.440*	0.754	0.246*
	Control (174)	0.678	0.322	0.822	0.178
TM C1922T		CC	CT+TT	C	T
	MI (191)	0.953	0.047*	0.977	0.023
	Control (174)	0.989	0.011	0.994	0.006
Female					
TM G-33A		GG	AG+AA	G	A
	MI (43)	0.767	0.233	0.872	0.128
	Control (117)	0.821	0.179	0.902	0.098
TM Ala455Val		A/A	A/V+V/V	A	V
	MI (43)	0.628	0.372	0.767	0.233
	Control (117)	0.564	0.436	0.761	0.239
TM C1922T		CC	CT+TT	C	T
	MI (43)	0.884	0.116	0.942	0.058
	Control (117)	0.966	0.034	0.983	0.017

* : $p<0.05$ MI vs. Control by χ^2-test.

Table 6. The distributions of non-parametric risk factors for MI according to TM genotype

	TM G-33A		χ^2	TM Ala455Val		χ^2	TM C1922T		χ^2
	GG	AG+AA		A/A	A/V+V/V		CC	CT+TT	
Male									
Smoking (%)	63.6	59.1	0.46	60.9	65.7	0.86	63.6	36.4	3.38
Diabetes (%)	13.0	18.2	1.19	13.3	15.0	0.20	14.1	9.1	0.23
Hypertension (%)	32.8	45.5	3.82	33.3	37.9	0.78	34.8	45.5	0.54
Female									
Smoking (%)	4.6	3.2	0.12	4.3	4.5	0.00	4.64	0	0.44
Diabetes (%)	11.6	6.5	0.71	11.8	9.0	0.33	10.6	11.1	0.00
Hypertension (%)	31.0	35.5	0.23	33.3	29.9	0.22	31.8	33.3	0.01

Table 7. The distributions of parametric risk factors for MI according to TM genotype

	TM G-33A		t	TM Ala455Val		t	TM C1922T		t
	GG	AG+AA		A/A	A/V+V/V		CC	CT+TT	
Male									
Age (years)	51.9±12.0	54.0±12.6	1.30	51.9±12.2	52.8±12.0	0.69	52.2±12.6	55.6±15.1	0.93
BMI (Kg/m²)	23.9± 2.7	24.7± 2.4	2.21*	23.9± 2.8	24.1± 2.5	0.59	24.0± 2.7	24.4± 2.3	0.41
TC (mg/dL)	190.3±37.4	196.4±39.2	1.17	191.8±38.3	190.8±36.8	0.25	190.8±37.8	211.5±27.6	1.79
TG (mg/dL)	145.5±79.2	149.3±78.0	0.34	145.9±82.6	146.8±73.0	0.10	144.8±77.9	191.5±98.3	1.94
HDL-C (mg/dL)	40.9±11.1	36.7±10.1	2.78*	40.5±10.6	39.5±11.7	0.84	40.2±11.1	36.0± 8.9	1.24
Female									
Age (years)	52.8±13.5	53.3±14.8	0.18	54.1±13.4	51.2±14.0	1.32	52.6±13.8	58.0±10.8	1.15
BMI (Kg/m²)	23.4± 3.4	24.3± 4.2	1.25	23.4± 3.2	23.7± 3.9	0.59	23.4± 3.5	25.5± 4.4	1.62
TC (mg/dL)	191.2±40.3	205.0±44.1	1.66	193.2±40.9	194.6±42.0	0.20	193.6±42.0	197.6±21.8	0.27
TG (mg/dL)	130.4±81.2	123.7±70.0	0.41	133.4±84.3	123.0±71.2	0.81	129.6±80.0	119.8±62.6	0.34
HDL-C (mg/dL)	42.0±10.6	46.5±12.9	2.03*	41.8±10.1	44.3±12.4	1.37	42.8±11.0	44.5±20.0	0.24

BMI : body mass index, TC : total cholesterol, TG : triglyceride, HDL-C : high density lipoprotein-cholesterol
* : $p<0.05$

시행하였으며 다변량분석에 사용된 혼란변수(covariate)는 심근경색 발생의 위험요인이면서 유전자변이와 통계학적인 관련성을 동시에 보이는 변수로 설정하였다. 이 중 연령의 경우 40세에서 65세까지 5년 단위로 나누어 심근경색 발생에서의 위험도 증가를 살펴보았다.

TM G-33A

다변량 로지스틱분석결과 TM -33A 유전형을 가진 경우 상대위험도(Odds ratio) 남자에서는 1.784(95% CI : 0.953 3.341, p=0.070), 여자에서는 1.589(95% CI : 0.525 4.811, p=0.413)로 증가되었으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(Table 8).

TM Ala455Val

TM 455Val 유전형을 가진 경우 남자에서는 상대위험도가 1.799 (95% CI : 1.125 2.878, p=0.014)로 심근경색발생에서 독립적으로 유의한 위험요인으로 분석되었으나, 여자에서는 0.957(95% CI : 0.393 2.330, p=0.992)로 심근경색발생의 위험요인이 아니었다(Table 9).

TM C1922T

TM 1922T 유전형을 가진 경우 남자에서는 심근경색 발생의 상대위험도가 5.624(95% CI : 1.019 31.025, p=0.048)로 유의한 위험요인이었으며, 여자에서는 상대위험도는 3.449(95% CI : 0.589 20.188, p=0.170)로 증가되었으나 통계적으로 유의한 위험요인은 아니었다(Table 10).

Table 8. Multiple logistic regression analysis of TM -33A and risk factors for MI

	Odds ratio	Wald	p value	95% CI
Male				
Age	1.550	44.217	0.0001	1.362 to 1.764
BMI	1.119	5.763	0.016	1.021 to 1.226
Hypertension	1.014	0.003	0.956	0.608 to 1.693
TM -33A	1.784	3.276	0.070	0.953 to 3.341
Female				
Age	2.371	32.079	0.0001	1.759 to 3.197
TM -33A	1.589	0.671	0.4130	0.525 to 4.811

BMI : body mass index, CI : confidence interval

각 대립유전자간의 연관관계

세 유전자변이의 대립인자간의 연관관계를 분석한 결과 각 유전자변이간에는 유의한 상관관계, 즉 연쇄불균형(linkage disequilibrium)이 관찰되었다. TM G-33A와 TM Ala455Val간의 연관계수(coefficient of linkage disequilibrium, |D|)는 0.972(χ^2=178.2, p<0.05)이었으며, TM G-33A와 TM C1922T 간의 연관계수는 0.941(χ^2=523.5, p<0.05), TM Ala455 Val과 TM C1922T간의 연관계수는 0.921(χ^2=362.4,

$p<0.05$)이었다.

유전자 발현조절부위에서의 유전자변이가 유전자발현에 미치는 영향

유전자 발현조절 부위에 존재하는 TM G-33A 유전자변이가 유전자발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 TM promoter luciferase construct를 제작하여 HepG2, CHO, 그리고, BAE에 transfection 후 luciferase 활성도를 비교한 결과, promoter enhancer region을 포함하는 pTM-355 construct의 경우 TM -33G 대립인자의 경우에 비해 TM -33A의 경우 luciferase 활성도가 저하되어 있었으나, promoter enhancer region을 포함하지 않는 TM-125 construct의 경우 유전형에 따른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3).

Table 9. Multiple logistic regression analysis of TM 455Val and risk factors for MI

	Odds ratio	Wald	p value	95% CI
Male				
Age	1.570	53.437	0.0001	1.391 to 1.771
TM 455Val	1.799	6.005	0.0143	1.125 to 2.878
Female				
Age	2.368	31.892	0.0001	1.756 to 3.193
TM 455Val	0.957	0.010	0.9920	0.393 to 2.330

CI : confidence interval

Table 10. Multiple logistic regression analysis of TM 1922T and risk factors for MI

	Odds ratio	Wald	p value	95% CI
Male				
Age	1.703	91.195	0.0001	1.527 to 1.900
Smoking	4.468	38.041	0.0001	2.777 to 7.190
TM 1922T	5.624	3.929	0.0475	1.019 to 31.025
Female				
Age	2.375	31.242	0.0001	1.754 to 3.216
TM 1922T	3.449	1.886	0.1700	0.589 to 20.188

CI : confidence interval

고 찰

TM은 항응고기전에 관여하는 인자로 TM 유전자내 유전자변이는 TM 발현 혹은 활성도를 변화시켜 여러 질병의 발생 및 경과에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구 논문에서는 TM 유전자의 변이가 심근경색의 발생에 미치는 영향을 알아보고자 한국인 심근경색환자들의 혈액으로부터 분리한 게놈 DNA를 이용하여 TM 유전자의 전사조절 부위 및 엑손부위의 유전자변이를 검색한 결과 세 가지의 유전자다형성을 찾아낼 수 있었다. 유전자다형성은 전사조절부위(TM G-33A), 엑손(TM Ala455Val), 그리고 3′비전사부위(TM C1922T)에서 발견되었으며, TM G-33A 및 TM Ala455Val은 이미 심근경색과의 관계에 대해서도 보고된 바가 있다.[24)25)] TM Ala455Val 유전자변이는 서양인에서 흔히 관찰되는 유전자변이로 약 18% 정도에서 Val 대립인자가 관찰되었으며,[23)24)] 본 연구 대상군에서도 Val 대립인자의 빈도는 22%로 관찰되어 한국에서도 비교적 흔한 유전자변이로 생각된다. 유전자전사조절부위에 존재하는 TM G-33A 유전자다형성의 경우 서양인에서는 그 빈도가 극히 낮은 것으로 보고되었는데, Ireland등이 TM 유전자전사 조절부위를 검색한 결과에 의하면 104명의 심근경색 환자 중 1명과 대조군 1인에서 발견되었으며, Flem등의 보고에서도 대조군에서는 394명중 1명 환자군에서는 205명 중 2명 정도에서 발견되었다.[25)30)] 그러나, 본 연구결과에 의하면 TM -33A 대립인자의 빈도는 한국인에서 약 10%에서 발

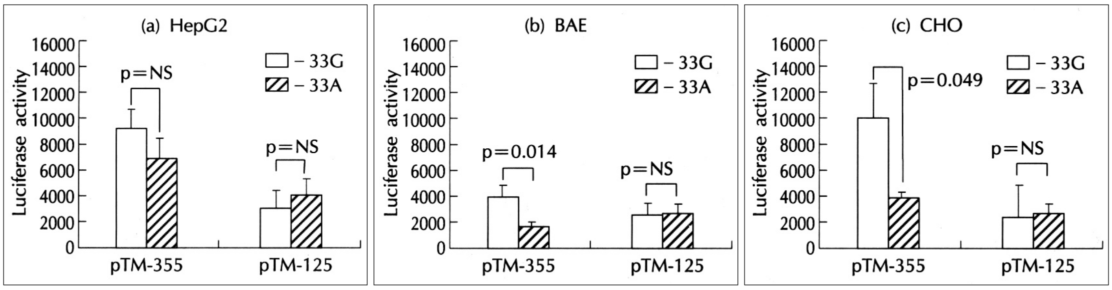

Fig. 3. Luciferase activities of two TM promoter constructs, pTM-355 and pTM-125, in HepG2, BAE, and CHO cells. The firefly luciferase activities were corrected by the beta-galactosidase activities to control the differences of the transfection efficacy.

견되고 있어 비교적 흔한 유전자 변이로, 아마도 아시안 계통에서 유래된 유전자 돌연변이로 추정된다. 3′비전사 부위에서의 변이 대립인자의 빈도는 약 2%에서 관찰되었는데, 현재까지 보고된 바가 없는 새로운 유전자 다형성으로 stop codon으로부터 약 100 bp 떨어진 곳에 위치하고 있어 유전자발현이나 전사에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추정되나 이에 대해서는 향후 연구결과를 기다려 보아야 할 것이다. 이 외에도 TM 유전자내에는 현재까지 GG-9/-10 AT, C-133A, Asp468Tyr, Pro483Leu, Ala25Thr등 다양한 유전자변이가 보고되었으나, 본 연구에서 사용한 유전자검색 방법으로 한국인에서는 관찰할 수 없었다. Ireland등이 동양인에서 비교적 빈도가 높을 것으로 추정한 -9/-10 부위에서의 유전자변이의 경우, 연구결과에서 밝히지는 않았으나 100명의 환자에서 직접 유전자 염기서열을 분석한 결과에서도 변이를 찾을 수 없어 이 유전자변이는 실제 한국인에서 빈도가 극히 낮을 것으로 추정된다.[25] SSCP 분석은 유전자변이 검색에 가장 보편적으로 이용되는 방법으로 PCR 산물의 길이나 조성에 따라 유전자변이의 발견정도에 차이가 있는데 그 예민도는 약 70 94%로 알려져 있으며, heteroduplex 분석은 SSCP와는 달리 DNA의 길이가 길거나 GC 함량이 비교적 낮은 경우 더욱 효율적으로 변이를 검색할 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 두 가지 유전자 검색방법을 복합하여 검색효율을 높이고자 하였으나, 일부 유전자변이는 발견하지 못하였을 가능성을 배제할 수는 없다.

각 유전자변이와 심근경색발생과의 관계를 알아보기 위해 심근경색증환자군과 대조군에서 분석한 결과 남자에서는 환자군에서의 변이유전형의 빈도가 대조군에 비해 유의하게 높았으나, 여자에서는 양군에서의 유전형의 빈도에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 각 유전자변이의 심근경색의 발생에 있어서의 상대위험도를 분석한 결과에서도 남자에서는 TM -33A, TM 455 Val이 상대위험도가 각각 1.38, 1.28로 통계적으로 유의하게 증가되어 있었으나, 여자에서는 상대위험도가 각각 1.17, 0.88로 대조군에 비해 차이가 없었다.

심근경색의 발생에 있어서 유전자 변이의 독립적인 위험인자로써의 의의를 알아보고자 다변량 로지스틱분석을 시행한 결과에서도 남자에서는 TM 455Val 및 TM 1922T, 그리고, 통계적으로는 유의하지 않으나 TM -33A를 가진 경우 상대위험도가 증가되어 있었으나, 여자의 경우에 있어서는 세 가지 유전자 변이 모두에서 심근경색발생의 독립적인 위험인자로써 의의가 관찰되지 않았다. 이는 TM의 유전적 영향이 남녀에 있어 차이를 보일 가능성을 다시 시사하는 것으로, 본 연구결과에 의하면 TM 유전자분석은 심근경색증의 발생을 예견하는데 있어 남자에서만 유의한 척도로 이용될 수 있음을 뜻한다. 기존의 심혈관질환발생의 위험도에 대한 분석에서도 일부 보고에서는 남녀에서 유전적인 영향이 다르게 보고된 바 있어, 유전형과 성별에 따라 다르게 작용할 수 있는 환경적요인의 상호관련에 의한 결과의 가능성도 배제할 수 없다.[31]

세 유전자변이는 TM 유전자내에서도 가깝게 위치해 있어 이들 유전자변이간의 연쇄불균형 여부를 살펴본 결과 각 유전자 변이간에는 유의한 연쇄불균형이 관찰되었다. 즉, TM -33A의 경우 대부분 TM 455Val를 가진 경우에 관찰되었으며, TM 1922T의 경우 TM-33A 유전형을 가진 경우에만 관찰되어 TM 유전자내 변이가 TM Ala455Val 이 일어난 후 TM 455Val 대립인자에서 TM G-33A변이의 발생이 있었고, 이 후 TM -33A 대립인자에서 TM C1922T의 변이가 발생했음을 나타낸다. 따라서, 세 유전자 변이가 심근경색의 발생에 미치는 영향은 독립되었다기보다는 특정 유전자 변이가 심근경색과 관련되어 있고 다른 유전자 변이는 이러한 연관관계 때문에 관찰되었을 것으로 생각된다. 실제, 심근 경색증환자와 대조군 사이의 유전자 변이의 발생빈도의 분석에서 Norlund등의 보고와는 차이를 보이고 있는데, 본 연구에서는 TM 455Val 유전자변이의 빈도가 환자군에서 높은 반면, Norlund등의 연구에서는 TM 455Val 유전자의 빈도가 환자군에서 오히려 감소되어 있었다.[24] 이러한 차이는 TM Ala455Val 유전자변이가 직접적으로 TM의 기능에 영향을 미침으로써 나타난 것이 아니라, 다른 유전자변이와 연관되어 나타난 것이며 유전자변이간의 연관이 민족에 따라 차이가 나타난 때문으로 생각된다. 앞에서도 밝힌 바와 같이 유전자전사 조절부위에 존재하는 TM G-33A 변이는 서양인에서는 거의 관찰되지 않았고, 동양인에서만 비교적 높은 빈도로 나타나며, TM Ala45Val과 밀접히 연관되어 있음은 이러한 가설을 뒷받침해 준다.

본 연구 논문에서는 이러한 사실을 검증하고자 TM

-33 부위의 유전형에 따른 promoter luciferase construct를 제작하여 luciferase 활성도를 비교한 결과, TM-33G 유전형에 비해 TM -33A인 경우 세포에 따라 정도의 차이는 있으나 promoter의 활성도가 감소되어 있음을 관찰할 수 있었다. TM G-33A 유전자 변이는 -22에서 -26에 위치하는 TATA box와 7개의 뉴클레오타이드가 떨어져 있으며,[32] TM 유전자 전사의 조절에 중요한 역할을 하는 부위로 TNF-α 및 heat shock에 반응하는 염기서열과도 매우 근접해 있다.[33] 따라서, TM -33 유전자 전사조절 부위에서의 유전자 변이는 유전자발현정도에 영향을 미치고, 이것이 심근경색의 발생위험도를 증가시키는 것으로 추정된다. TM C1922T 유전자변이 역시 5′조절부위와 밀접한 연관관계로 인해 심근경색 발생과 관련되었을 것으로 생각되나, 이 외에도 3′비전사 조절부위에서의 유전자변이가 직접적으로 유전자 전사에 영향을 미쳐 TM의 합성에 영향을 줄 가능성이 있다. 그러므로, 다변량 로지스틱분석상 TM G-33A 유전형에 비해 TM Ala455Val 혹은 TM C1922T 유전자 변이가 더욱 유의한 위험인자로 나타나며, 성별에 따른 차이를 보이는 것은 본 연구에서 분석되지 않은 또 다른 유전자변이와의 연관 혹은 기능적인 역할을 가지고 있음을 시사하며 이에 대해서는 향후 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 연구에서 한국인에서는 TM 유전자내에는 TM G-33A, TM Ala455Val, 및 TM C1922T 유전자변이가 비교적 흔히 관찰되며, 이들 유전자변이는 특히 남자에서의 심근경색의 발생과 관련이 있어 심근 경색발생의 예측인자로써 의의가 있음을 알 수 있다.

요 약

Thrombomodulin(TM)은 혈관 내피 세포의 표면에 존재하는 당단백수용체로써 트롬빈과 결합하여 protein C를 활성화시킴으로써 혈전 형성 과정에 있 어 항응고 과정에 관여한다. 그러므로, TM 유전자변이로 인한 유전자발현의 이상 혹은 TM의 결함은 항응고 작용에 영향을 미쳐 심근경색과 같은 질환의 발생에 영향을 미칠 수 있다. TM의 유전적 이상에 대해서는 혈전성향을 가진 환자에서 보고된 바 있으며, 최근 TM 유전자변이와 심근경색과의 관련성에 대해 연구되기 시작하고 있다. 본 연구에서는 심근경색의 발생에 미치는 TM 유전자의 역할을 알아보고자 심근경색증 환자에서 비교적 흔히 관찰되는 유전자 변이를 찾아보고 이들과 심근경색증 발생과의 관련성을 분석하였다.

심근경색환자들의 혈액으로부터 추출한 DNA로 single-strand conformation polymorphism-heteroduplex 분석법을 이용하여 유전자변이에 대한 검색을 시행하여 기존에 보고된 바 있는 유전자전사조절부위, 엑손 부위에서 TM G-33A, TM Ala455Val 유전자 변이가 한국인에서도 비교적 높은 빈도로 나타남을 확인하였고, 3′비전사부위에서 TM C1922T 유전자다형성을 새로이 발견하였다. 이들 유전자변이를 allele-specific oligomer 보합결합방법을 이용하여 임상적으로 심근경색으로 진단 받은 234명과 대조군291명(심근경색의 병력이 없으면서 혈관조영술상 정상 소견을 보인 114명, 건강검진자 중 심장 허혈의 임상 소견이 관찰되지 않았던 177명)을 대상으로 세 가지 유전형을 분석하였다. TM Ala455Val 유전형의 빈도는 서양인의 보고와 유사하였으나, TM G-33A에서의 변이유전형 빈도는 한국인에서 훨씬 높은 빈도로 관찰되었다. 그리고, 세 유전자변이간에는 유의한 연쇄불균형이 관찰되어 연관관계가 있음을 알 수 있었다. 남자에서는 변이유전형의 빈도가 대조군에 비해 유의하게 높았으나, 여자에서는 각 유전자형의 빈도가 환자군과 대조군간에 유의한 차이가 없었다. 심근경색의 발생에 미치는 영향을 다변량 로지스틱으로 분석한 결과 TM 455Val 및 TM 1922 T 유전형은 남자에서 심근경색발생의 독립적으로 유의한 요인이었으며(각각 OR[95% CI]=1.799[1.125-2.878], $p=0.014$와 OR[95% CI]=5.624[1.019-31.025], $p=0.048$), TM -33A 유전형의 경우 상대위험도가 증가되어 있었으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(OR[95% CI]=1.784[0.953-3.341], $p=0.07$). 여자에 있어서는 세 유전자변이 모두 심근경색발생에 있어서 유의한 독립적인 요인으로써 의의가 관찰되지 않았다. 유전자전사 조절부위에 존재하는 TM G-33A 유전형이 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보고자 TM G-33A 유전형에 따른 TM promoter luciferase construct를 제작하여, HepG2, BAE, 그리고, CHO cell에 transfection후 luciferase 활성도를 비교하여 본 결과 TM -33G 유전형에 비해 TM -33A 유전형인 경우 세포주에 따라 차이는 있으나, 유전자 전사조절부위의 활성도가 감소되어 있어 TM

G-33A 유전형이 TM 유전자 발현에 영향을 미침을 시사한다.

이상의 결과에서 TM 유전자내 변이유전자를 가진 경우 남자에서 심근경색의 발생위험도가 증가하며, 이는 유전자발현과 엑손 혹은 3′비전사부위에서의 유전자변이가 기능적으로 영향을 미치기 때문으로 추정된다. 따라서, TM 유전자변이에 대한 분석은 남자에서 심근경색발생 위험도를 예측하는데 유의한 지표로 이용될 수 있을 것이다.

중심 단어 : Thrombomodulin · 유전자변이 · 심근경색.

■ **감사문**

본 연구를 위해 수고해주신 심도자실 여러분께 감사드리며 논문교정에 많은 도움을 주신 의과대학 예방의학교실의 서일 교수님, 소아과학교실의 이진성 교수님께도 깊이 감사드립니다.

본 연구는 심혈관연구소 문병기박사기금과 Boston Scientific, Korea의 연구비의 보조로 이루어졌으며, 본 논문의 요지는 1999년 대한순환기학회 추계학술대회에서 발표되었음.

REFERENCES

1) Ferguson RJ, Petitclerc R, Choquette G, Chaniotis L, Gauthier P, Huot R, *et al. Effect of physical training on treadmill exercise capacity, collateral circulation and progression of coronary disease. Am J Cardiol 1974;34:764-9.*

2) Marcus ML. The coronary circulation. In Marcus ML, *ed.: The coronary circulation in health and disease. New York, Mc Graw-Hill Book Co.;1983. p.221-41.*

3) Davies MJ, Thomas AC. *Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. Br Heart J 1985;53:363-73.*

4) Falk E. *Coronary thrombosis: Pathogenesis and clinical manifestation. Am J Cardiol 1991;68:28B-38B.*

5) Falk E, Shah PK, Fuster V. *Coronary plaque disruption. Circulation 1995;92:657-71.*

6) Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, *et al. Inherited thrombophilia: Part 1. Thromb Haemost 1996;76:651-62.*

7) Lane DA, Mannuci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, *et al. Inherited thrombophilia: Part 2. Thromb Haemost 1996;76:824-34.*

8) Engesser L, Brommer EJ, Kluft C, Briet E. *Elevated plasminogen activator inhibitor (PAI), a cause of thrombophilia? A study in 203 patients with familial or sporadic venous thrombophilia. Thromb Haemost 1989;62:673-80.*

9) Ernst E, Resch KL. *Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: A meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med 1993;118:959-63.*

10) Jorgensen M, Bonnevie-Nielsen V. *Increased concentration of fast-acting plasminogen activator inhibitor in plasma associated with familial venous thrombosis. Br J Haematol 1987;65:175-80.*

11) Berg K, Kierulf P. *DNA polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentration. Clin Genet 1989;36:229-35.*

12) Pankow JS, Folsom AR, Province MA, Rao DC, Williams RR, Eckfeldt J, *et al. Segregation analysis of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in the NHLBI family heart study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18:1559-67.*

13) Esmon CT. *The regulation of natural anticoagulant pathways. Science 1987;235:1348-52.*

14) Esmon CT. *The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. J Biol Chem 1989;264:4743-6.*

15) Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. *Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalysed fibrin formation and factor V activation. J Biol Chem 1982;257:7944-7.*

16) Esmon NL, Caroll RC, Esmon CT. *Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. J Biol Chem 1983;258:12238-42.*

17) Jackman RW, Beeler DL, Fritze L, Soff G, Rosenberg RD. *Human thrombomodulin gene is intron deleted: Nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:6425-9.*

18) Norlund L, Zoller B, Ohlin AK. *A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. Thromb Haemost 1997;78:1164-6.*

19) Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA. *Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. Thromb Haemost 1997;78:396-400.*

20) Ohlin AK, Marlar RA. *The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. Blood 1995;85:330-6.*

21) Ohlin AK, Marlar RA. *Thrombomodulin gene defects in families with thromboembolic disease - a report on four families. Thromb Haemost 1999;81:338-44.*

22) Faioni EM, Merati G, Peyvandi F, Bettini PM, Mnnuccu PM. *The G1456 to T mutation in the thrombomodulin gene is not frequent in patients with venous thrombosis [letter]. Blood 1997;89:1467.*

23) Van der Velden PA, Krommenhoek-Van Es T, Allaart CF, Bertina RM, Reitsma PH. *A frequent thrombomodulin amino acid dimorphism is not associated with thrombophilia. Thromb Haemost 1991;65:511-3.*

24) Norlund L, Holm J, Zller B, Ohlin AK. *A common thrombomodulin amino acid dimorphism is associated with myocardial infarction. Thromb Haemost 1997;77:28-251.*

25) Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA. *Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. Circulation 1997;96:15-8.*

26) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. *Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 1986;324:163-6.*

27) Hedrick PW. *Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. Genetics 1987;117:331-41.*

28) Thompson EA, Deeb S, Walker D, Motulsky AG. *The detection of linkage disequilibrium between closely linked markers: RFLPs at the AI-CIII apolipoprotein genes. Am J Hum Genet 1988;42:113-24*

29) Xie X, Otto J. *Testing linkage disequilibrium between a*

disease gene and marker loci. Am J Hum Genet 1993;53:1107(abstract).

30) Flem LL, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger J, Aiach M, *et al. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:1098-104.*

31) Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. *Gender-specific associations of the fibrinogenB β448 polymorphism, fibrinogen levels, and acute cerebravascular disease. Arterioscle Thromb Vasc Biol 1995;17:589-94.*

32) Yu K, Morioka H, Fritze LM, Beeler DL, Jackman RW, Rosenberg RD. *Transcriptional regulation of the thrombomodulin gene. J Biol Chem 1992;267:23237-47.*

33) Tazawa R, Hirosawa S, Suzuki K, Hirokawa K, Aoki N. *Functional characterization of the 5'-regulatory region of the human thrombomodulin gene. J Biochem 1993;113:600-6.*