

한국인의 GSTM1, GSTT1 유전자와 당뇨병망막병증의 연관성에 대한 분석

Association of the GSTM1 and GSTT1 Genes with Diabetic Retinopathy in the Korean Population

김영휘¹ · 양지명^{1,2} · 장재용¹ · 지영석¹

Yung Hui Kim, MD¹, Jee Myung Yang, MD^{1,2}, Jae Yong Jang, MD¹, Yong-Sok Ji, MD, PhD¹

전남대학교 의과대학 안과학교실¹, 한국과학기술원 의과대학원²

Department of Ophthalmology, Chonnam National University Medical School¹, Gwangju, Korea

Graduate School of Medical Science and Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology², Daejeon, Korea

Purpose: To investigate the correlation between Glutathione-S-transferase (GST) genes and diabetic retinopathy (DR) in patients with type 2 diabetes mellitus (DM).

Methods: In this case-control study, 131 patients who were diagnosed with DR, 105 diabetic patients who did not have DR, and 45 nondiabetic controls were examined from January 2013 to November 2015. To analyze deletion of the GSTT1 and GSTM1 genes, polymerase chain reactions of DNA in a buffy coat from peripheral blood were performed via electrophoresis.

Results: There were no statistically significant differences in age, sex, or spherical equivalent between the 236 type 2 diabetic patients and the 45 normal controls ($p > 0.05$). In both univariate and multivariate analyses, the duration of type 2 DR was longer ($p = 0.004$, $p = 0.013$), and HbA1c was higher ($p = 0.004$, $p = 0.007$) in the DR group than in the non-DR group. Presence of a GSTM1 deletion is associated with a lower frequency of DR ($p = 0.017$, $p = 0.012$).

Conclusions: Deletion of the GSTT1 gene is not associated with an increased risk of DR, whereas GSTM1 deletion is associated with a lower risk of DR in patients with type 2 DM in the Korean population. Additional studies with larger sample sizes and different types of GST genes are needed to confirm this study.

J Korean Ophthalmol Soc 2017;58(3):313-320

Keywords: Deletion, Diabetes mellitus, Glutathione-S-transferase, Retinopathy

당뇨망막병증은 당뇨병 환자에서 지속적인 고혈당으로 인해 모세혈관에 손상이 발생하여 망막 전반에 허혈손상이

일어나고, 신생혈관의 증식이 일어나 실명으로 이어지는 대표적인 허혈성 망막 질환이다. 당뇨병망막병증은 혈당 조절 정도, 혈압 및 기타 동반 질환, 전신 상태, 기타 다양한 환경적 요인뿐만 아니라 유전적인 요인이 연관되어 있다. 기존의 여러 연구들에서 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 당뇨병망막병증 및 기타 미세혈관질환의 발생과 진행에 영향을 준다는 것이 보고되고 있다.¹⁻⁵ Glutathione-S-transferase (GST)는 ROS의 지속적인 산화스트레스로 인한 세포의 구조적 및 기능적 손상에 대해 항산화 역할을 하는 효소로서, ROS에 의한 세포독성의 2차 부산물을 중화한다고 알려져 있다.⁶ 이 중 Glutathione-S-transferase M1 (GSTM1)

■ Received: 2016. 11. 17. ■ Revised: 2017. 1. 24.

■ Accepted: 2017. 3. 1.

■ Address reprint requests to **Yong-Sok Ji, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Chonnam National University
Hospital, #42 Jebong-ro, Dong-gu, Gwangju 61469, Korea
Tel: 82-62-220-6742, Fax: 82-62-227-1642
E-mail: redvein@naver.com

* This study was supported by Chonnam National University
Hospital Biomedical Research Institute (no. CRI-13039-1).

© 2017 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

과 T1 (GSTT1) 유전자는 흡연 및 종양발생과의 연관성이 알려져 있으며, 최근 몇몇의 연구에서 GSTT1, GSTM1 유전자의 변이와 당뇨병성 신증 및 당뇨병 환자에서의 심혈관계 질환과의 연관성에 대한 연구와 제1형 당뇨병 환자에서 GST 유전형에 따른 당뇨망막병증 발생의 영향에 대한 연구가 있어왔다.⁷⁻¹³

GSTT1과 GSTM1 유전자의 변이와 당뇨병 환자에서 당뇨망막병증 발생과의 상관관계에 대한 연구는 아직까지 미흡하며, 특히 동양인을 대상으로 한 연구는 발표된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 제2형 당뇨병을 가진 한국인을 대상으로 GSTT1과 GSTM1 유전자의 변이에 따른 당뇨망막병증의 유병률에 대한 연관성을 분석하고자 하였다.

대상과 방법

2013년 1월부터 2015년 11월까지 전남대학교병원 안과에 내원한 30세 이상의 성인 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 환자 대조군 연구를 진행하였다. 당뇨망막병증이 있는 군은 중등도 이상의 비증식당뇨망막병증 및 증식당뇨망막병증만이 포함되었다. 당뇨망막병증이 발생하지 않은 제2형 당뇨병 환자의 경우 유병기간은 10년 이상인 환자만을 대상으로 하였다. 제1형 당뇨병, 혈액학적 이상이 있는 경우, 만성 췌장염, 쿠싱병, 약제에 의해 발생한 당뇨병 및 다낭성난소증후군 등의 다른 원인에 의해 발생한 당뇨병의 경우와 중등도 이상의 당뇨신병증이 있는 경우는 연구에서 제외하였다. 또한 안과적인 수술 및 외상의 기왕력이 있는 경우, 백내장 등 매체혼탁이 심하여 안저를 관찰할 수 없는 경우, 망막혈관폐쇄, 안저혈중후군 등 망막혈관에 영향을 주는 안과적 질환이 있는 환자도 연구에서 제외하였다. 본 연구는 전남대학교병원 기관윤리심의위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 받았다(승인번호: CNUH-2015-004).

모든 대상자에서 내원 시 구면렌즈대응치, 세극등 현미경을 이용한 전안부 검사, 2.5% 트로픽아미드-페닐레프린 염산염(Mydrin[®]-P, Santen, Osaka, Japan)을 이용한 양안의 산동 및 안저검사를 시행하였다. 조기치료당뇨망막병증연구(Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study, ETDRS)¹⁴의 중증도 정의에 의해 미세동맥류(microaneurysm), 망막출혈, 면화반(cotton wool spot), 망막내미세혈관병증(intraretinal microvascular abnormalities), 경성삼출물(hard exudates), 정맥염주 또는 신생혈관 등의 유무를 조사하였다. 또한 대상자의 나이, 성별, 제2형 당뇨병의 유병기간, 인슐린 치료 유무, 고혈압, 이상지질혈증, 뇌혈관발작의 과거력, 관상동맥질환의 과거력, 흡연의 유무를 조사하였다. 신장(cm) 및 체중(kg)을 측정하였고 이를 통해 체질량지수(body mass index [BMI],

Table 1. Primer sequences for GST multiplex PCR

| Primer | Sequence |
|-------------------------|-------------------------|
| GSTM1 forward primer | GAAGTCCCTGAAAAGCTAAAGC |
| GSTM1 reverse primer | GTTGGGCTCAAATATACGGTGG |
| GSTT1 forward primer | TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC |
| GSTT1 reverse primer | TCACCGGATCATGGCCAGCA |
| β-globin forward primer | GAAGAGCCAAGGACAGGTAC |
| β-globin reverse primer | CAACTTCATCCACGTTCCACC |

GST = glutathione-S-transferase; PCR = polymerase chain reaction; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1; GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1.

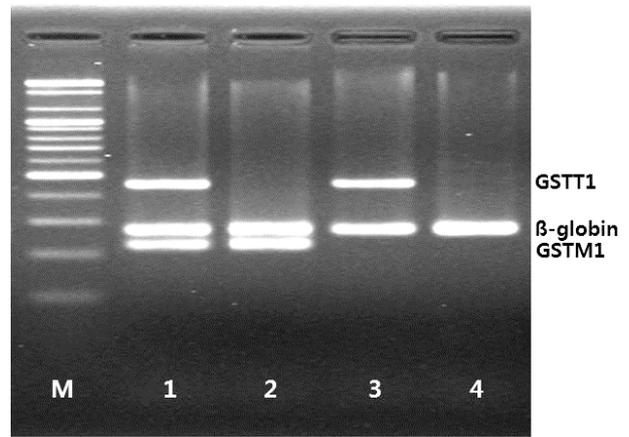


Figure 1. A multiplex polymerase chain reaction (PCR) analysis of GSTM1 and GSTT1 gene polymorphism. GSTT1 and GSTM1 PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Lane M is a 60 base-pair DNA ladder (molecular weight marker). Lane 1 GSTT1-present/GSTM1-present, Lane 2 GSTT1-null/GSTM1-present, Lane 3 GSTT1-present/GSTM1-null, Lane 4 GSTT1-null/GSTM1-null sample. GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1.

kg/m²)를 계산하였다.

GSTT1 및 GSTM1 유전자 분석을 위해 대상자들로부터 혈액샘플을 원심분리하여 DNA가 포함된 백혈구연층(buffy coat)을 얻고, 이를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 유전자의 유무를 분석하였다. 유전자 증폭을 위한 GSTT1 및 GSTM1 프라이머와 양성대조군으로 사용된 β-globin 프라이머의 유전자서열은 다음과 같았다(Table 1). GSTT1 유전자 산물은 459 base pair (bp), GSTM1 유전자 산물은 219 bp, β-globin은 268 bp로 질량에 따라 1.5% 아가로스 겔 위에서 전기영동을 통해 분석하였다(Fig. 1).

통계학적 분석은 SPSS 18.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 군 간 연속형 변수 비교를 위해 student *t*-test를, 범주형 변수 비교를 위해 chi-square (χ^2) 또는 Fisher's exact test를 시행하였다. 제2형 당뇨병 환자에서 당뇨망막병증의 발생에 대한 위험인자를 분석하

Table 2. Comparison of clinical characteristics and GST genotypes frequencies between T2DM and control

| Characteristics | T2DM (n = 236) | Control (n = 45) | p-value |
|---|----------------|------------------|---------|
| Age (years) | 58.3 ± 10.9 | 54.2 ± 17.6 | 0.129 |
| Sex (male/female, n) | 133/103 | 27/18 | 0.651 |
| Spherical equivalent (D) | -0.05 ± 2.02 | -0.19 ± 2.1 | 0.663 |
| GSTT1 (null/present, n) | 133/103 | 16/29 | 0.010 |
| GSTM1 (null/present, n) | 100/136 | 23/22 | 0.279 |
| GSTT1-GSTM1 (null-null/except null-null, n) | 79/157 | 10/35 | 0.137 |

Values are presented as mean ± SD unless otherwise indicated.

GST = glutathione-S-transferase; T2DM = type 2 diabetes mellitus; GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1.

Table 3. Comparison of GST genotypes among 3 populations

| | T2DM with DR (n = 131) | T2DM without DR (n = 105) | Normal control (n = 45) | Pearson χ^2 | p-value |
|----------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------|---------|
| GSTT1* | | | | | |
| Null | 71 (54.2) | 62 (59.0) | 16 (35.6) | 7.12 | 0.029 |
| Present | 60 (45.8) | 43 (41.0) | 29 (64.4) | | |
| GSTM1* | | | | | |
| Null | 47 (35.9) | 53 (50.5) | 23 (51.1) | 6.22 | 0.045 |
| Present | 84 (64.1) | 52 (49.5) | 22 (48.9) | | |
| GSTT1-GSTM1* | | | | | |
| Null homo | 47 (35.9) | 32 (30.5) | 10 (22.2) | 3.00 | 0.223 |
| Hetero, Present Homo | 84 (64.1) | 73 (69.5) | 35 (77.8) | | |

Values are presented as n (%) unless otherwise indicated.

GST = glutathione-S-transferase; T2DM = type 2 diabetes mellitus; DR = diabetic retinopathy; χ^2 = chi square; GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1; Null homo = GSTT1/GSTM1 (null/null); Hetero = GSTT1/GSTM1(null/present) or (present/null); Present Homo = GSTT1/GSTM1(present/present).

*Chi-square test; $p < 0.05$ is considered statistically significant.

Table 4. Comparison of clinical characteristics and GST genotypes frequencies between two studied groups

| Characteristics | T2DM with DR (n = 131) | T2DM without DR (n = 105) | OR (95% CI) | p-value |
|--|---------------------------|------------------------------|------------------|---------|
| Age* (years) | 57.6 ± 10.5 | 59.3 ± 11.4 | | 0.222 |
| Sex† (male/female, n [%]) | 72/59 (55/45) | 61/44 (58/42) | 1.14 (0.68-1.91) | 0.630 |
| Spherical equivalent* (D) | 0.02 ± 2.2 | -0.14 ± 1.8 | | 0.542 |
| DM duration* (years) | 14.9 ± 8.3 | 11.9 ± 1.8 | | 0.004 |
| Insulin therapy† (yes/no, n [%]) | 62/69 (47/53) | 49/56 (47/53) | 1.03 (0.61-1.72) | 0.512 |
| HTN† (yes/no, n [%]) | 67/64 (51/49) | 57/48 (54/46) | 0.88 (0.53-1.48) | 0.364 |
| Dyslipidemia† (yes/no, n [%]) | 6/125 (5/95) | 7/98 (7/93) | 0.67 (0.22-2.06) | 0.338 |
| CVA history† (yes/no, n [%]) | 12/119 (11/89) | 13/92 (12/88) | 1.14 (0.48-2.67) | 0.549 |
| CHD history† (yes/no, n [%]) | 13/118 (11/89) | 10/95 (10/90) | 0.37 (0.17-1.04) | 0.085 |
| Smoking† (yes/no, n [%]) | 29/111 (22/78) | 25/80 (24/76) | 0.55 (0.31-1.17) | 0.487 |
| HbA1c* (%) | 8.3 ± 2.1 | 7.6 ± 1.7 | | 0.004 |
| Height* (cm) | 163.6 ± 8.7 | 162.3 ± 7.6 | | 0.239 |
| Weight* (kg) | 67.4 ± 14.9 | 65.7 ± 10.4 | | 0.324 |
| BMI* (kg/m ²) | 25.2 ± 5.7 | 24.9 ± 3.5 | | 0.626 |
| GSTT1† (null/present, n [%]) | 71/60 (54/46) | 62/43 (59/41) | 0.82 (0.49-1.38) | 0.270 |
| GSTM1† (null/present, n [%]) | 47/84 (36/64) | 53/52 (51/49) | 0.55 (0.33-0.93) | 0.017 |
| GSTT1-GSTM1† (null-null/except null-null, n [%]) | 47/84 (36/64) | 32/73 (31/69) | 1.28 (0.74-2.21) | 0.231 |

Values are presented as mean ± SD or n (%) unless otherwise indicated.

GST = glutathione-S-transferase; T2DM = type 2 diabetes mellitus; DR = diabetic retinopathy; OR = odds ratio; CI = confidence interval; DM = diabetes mellitus; HTN = hypertension; CVA = cerebrovascular accident; CHD = carotid artery disease; HbA1c = hemoglobin A1c; BMI = body mass index; GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1.

†Student *t*-test: $p < 0.05$ is considered statistically significant; †Chi-square test: $p < 0.05$ is considered statistically significant.

Table 5. Comparison of GST genotypes according to severity of diabetic retinopathy (n = 131)

| | Moderate NDPDR (n = 14) | Severe NPDR (n = 9) | PDR (n = 108) | Pearson χ^2 | p-value |
|----------------------|----------------------------|------------------------|------------------|------------------|---------|
| GSTT1* | | | | | |
| Null | 6 (4.4) | 4 (3.1) | 47 (36.0) | 0.11 | 0.946 |
| Present | 8 (5.9) | 5 (3.8) | 61 (46.8) | | |
| GSTM1* | | | | 2.24 | 0.326 |
| Null | 11 (8.1) | 7 (5.4) | 65 (49.8) | | |
| Present | 3 (2.2) | 2 (1.5) | 43 (33.0) | | |
| GSTT1-GSTM1* | | | | 2.24 | 0.326 |
| Null homo | 11 (8.1) | 7 (5.4) | 65 (49.8) | | |
| Hetero, Present Homo | 3 (2.2) | 2 (1.5) | 43 (33.0) | | |

Values are presented as n (%) unless otherwise indicated.

GST = glutathione-S-transferase; NPDR = non-proliferative diabetic retinopathy; PDR = proliferative diabetic retinopathy; χ^2 = chi square; GSTT1 = glutathione-S-transferase theta 1; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1; Null homo = GSTT1/GSTM1 (null/null); Hetero = GSTT1/GSTM1 (null/present) or (present/null); Present Homo = GSTT1/GSTM1(present/present).

*Chi-square test: $p < 0.05$ is considered statistically significant.

기 위해 단변량분석 및 다변량분석으로 95% 신뢰구간 및 오즈비(odds ratio)를 통한 로지스틱 회귀분석을 시행하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 정의하였다.

결 과

제2형 당뇨병 환자 236명과 정상대조군 45명이 본 연구에 포함되었다. 제2형 당뇨병환자 중 당뇨망막병증이 발생한 군은 131명, 당뇨망막병증이 발생하지 않은 군은 105명이었다. 236명의 당뇨병 환자군과 45명의 정상대조군 간의 나이, 성별 및 구면렌즈대응치의 차이는 없었다. GST 유전자분석에서 당뇨병 환자군이 정상대조군에 비해 GSTT1 유전자가 결손된 비율이 높았다($p=0.010$). GSTM1 유전자결손($p=0.279$)과 GSTT1 유전자와 GSTM1 유전자가 모두 결손된 경우($p=0.137$)는 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

당뇨병 환자군을 당뇨망막병증이 발생한 군과 발생하지 않은 군으로 세분하여 정상대조군과 함께 각 세 군을 비교한 결과(Table 3), GSTT1 유전자결손은 제2형 당뇨병환자군이 정상대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 비율을 보였다(54.2%, 59.0%, 35.6%, $\chi^2=7.12$, $p=0.029$). GSTM1 유전자결손은 당뇨망막병증이 발생하지 않은 군과 정상대조군에 비해 당뇨망막병증이 발생한 제2형 당뇨병 환자군에서 통계적으로 유의하게 낮은 비율을 보였다(35.9%, 50.5%, 51.1%, $\chi^2=6.22$, $p=0.045$). 그러나 GSTT1과 GSTM1 모두 결손된 경우는 세 군 간 차이는 없었다($p=0.223$).

제2형 당뇨병 환자 236명 중, 당뇨망막병증이 발생한 군이 당뇨망막병증이 발생하지 않은 군보다 당뇨병의 유병기간이 더 길었고(14.9 ± 8.3 년, 11.9 ± 1.8 년, $p=0.004$), 혈중

Table 6. Risk factors for diabetic retinopathy in patients with T2DM

| Risk factors | OR | 95% CI | p-value |
|---------------|------|-----------|---------|
| GSTM1-null | 0.50 | 0.31-0.69 | 0.013* |
| T2DM duration | 1.05 | 1.02-1.08 | 0.007* |
| HbA1c | 1.20 | 1.13-1.27 | 0.012* |

Multivariate logistic regression analysis.

T2DM = type 2 diabetes mellitus; OR = odds ratio; CI = confidence interval; GSTM1 = glutathione-S-transferase mu 1; HbA1c = hemoglobin A1c.

* $p < 0.05$ is considered statistically significant.

HbA1c % 수치가 높았다($8.3 \pm 2.1\%$, $7.6 \pm 1.7\%$, $p=0.004$). GST 유전자 분석에서 GSTT1 유전자결손은 두 군 간 차이는 없었으나, GSTM1 유전자결손의 비율은 유의하게 낮았다(36%, 51%, $p=0.017$). GSTT1과 GSTM1 유전자 모두 결손된 경우도 두 군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.270$, $p=0.231$) (Table 4). 당뇨망막병증 환자의 severity에 따른 GST 유전자 유무의 차이는 보이지 않았다(all $p>0.05$) (Table 5).

제2형 당뇨병환자에서 당뇨망막병증 발생의 위험인자를 분석하기 위한 로지스틱 회귀분석에서 제2형 당뇨병의 긴 유병기간(OR=1.05, 95% CI=1.02-1.08; $p=0.007$), 높은 HbA1c % (OR=1.20, 95% CI=1.13-1.27; $p=0.012$)가 위험인자로, GSTM1 유전자결손(OR=0.50, 95% CI=0.31-0.69; $p=0.013$)은 위험도를 낮추는 인자로 분석되었다(Table 6).

고 찰

당뇨망막병증은 당뇨병의 유병기간이 10년 이상 지속되는 환자의 약 80% 이상에서 발견되는 가장 흔한 미세혈관 합병증이다. 현재까지 많은 연구자들이 당뇨망막병증의 발

생에 여러 유전인자가 관여할 것으로 추정하고 있다.¹⁵⁻¹⁸ 이를 뒷받침하는 근거로, 고혈당이 오래 지속되는 제2형 당뇨병 환자에서 초기의 당뇨병망막병증은 거의 모든 환자에서 발생하지만, 증식당뇨망막병증은 약 50%에서 발생한다고 알려져 있어¹⁵ 고혈당의 정도와 당뇨병의 유병기간 외에 당뇨병망막병증의 발생에 유전자나 다른 환경인자가 관여하고 있음을 시사한다.

이전의 몇몇 연구들에서 GST 유전자의 결손과 당뇨병망막병증 발생의 위험도를 분석하였다.¹⁹⁻²⁴ GST 유전자는 아주 흔하며 다양한 기능을 갖는 내인성 항산화효소로, 체내의 해독(detoxification) 과정 중 제2 단계(phase 2)에서 glutathione에 활성산소 및 벤즈피렌(benzopyrene) 등의 여러 발암물질을 결합시켜 이들을 중화시키며 당뇨병을 포함한 여러 대사관련질환, 성인병 및 종양의 발생과 연관이 있다.^{7,9,10} GST 유전자는 최소 8개의 서로 다른 염색체 자리에 위치해 있는데(α ; GSTA, μ ; GSTM, θ ; GSTT, π ; GSTP, σ ; GSTS, κ ; GSTK, ω ; GSTO, τ ; GSTZ), 이 중 특히 GSTM1과 GSTT1 유전자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

Moasser et al²²은 404명의 제2형 당뇨병 환자와 201명의 정상인을 대상으로 한 연구에서 GSTM1 유전자의 결손이 제2형 당뇨병과 연관이 높으며(OR=1.43, 95% CI=1.01-2.04, $p=0.03$) GSTT1 유전자의 결손은 제2형 당뇨병과 정상인 간의 차이는 보이지 않았고(OR=1.41, 95% CI=0.92-2.18, $p=0.09$) GSTT1과 GSTM1 유전자가 모두 결손된 경우 제2형 당뇨병과 연관이 높다(OR=1.88, 95% CI=1.06-3.38, $p=0.02$)고 하였다. 본 연구에서는 GSTT1 유전자의 결손과 제2형 당뇨병은 통계적으로 유의한 연관이 있었으나, GSTM1 유전자의 결손은 제2형 당뇨병과 정상인 사이의 통계적 차이가 없었다. GSTT1과 GSTM1 유전자가 모두 결손된 경우에도 유의한 차이를 보이지 않았다. 기존 연구가 코카시안을 대상으로 시행되었음에 비해 본 연구는 한국인을 대상으로 시행되었고 연구대상자가 더 적었기 때문에 이와 같은 결과의 차이가 발생한 것으로 보인다. 또한 본 연구에서 당뇨병망막병증이 있는 환자의 대부분(82.8%)이 증식당뇨망막병증으로 진단된 환자였기 때문에 당뇨병망막병증의 중증도(severity)에 따른 GST 유전자의 분포에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

제2형 당뇨병환자에서 당뇨병망막병증의 발생에 대해서는 서로 다른 결과들이 보고되었는데, Dadbinpour et al²¹은 GSTT1 유전자 결손은 당뇨병망막병증의 발생과 연관이 없었으나 GSTM1 유전자의 결손은 당뇨병망막병증의 발생의 위험도를 높이는 인자라고 하였고, Moasser et al²²은 GSTT1 및 GSTM1 유전자의 결손이 당뇨병망막병증 발생과는 연관

이 없음을 보고하였다. 본 연구에서는 GSTT1 유전자의 결손은 제2형 당뇨병과 연관성은 있었으나 당뇨병망막병증의 발생과는 연관이 없었으며 GSTM1 유전자의 결손은 제2형 당뇨병 환자에서 당뇨병망막병증의 발생의 위험을 낮추는 인자로 분석되었다. Cilenšek et al²⁰은 코카시안을 대상으로 284명의 제2형 당뇨병 환자와 320명의 정상인에 대한 연구에서 GSTM1 유전자 결손이 본 연구의 결과와 마찬가지로 당뇨병망막병증의 위험을 낮추는 인자라고 하였으며, GSTT1 유전자 결손은 당뇨병망막병증 발생의 위험 인자라고 보고하였다. 이와 비슷한 연구결과로 Hovnik et al¹⁹은 제1형 당뇨병 환자에서 GSTM1 유전자 결손이 당뇨병망막병증 발생의 위험을 낮추는 인자라고 분석하였다.

몇 가지 연구에서 GSTM1 유전자 결손이 암 발생의 위험을 낮춘다는 보고가 있는데,²⁵⁻²⁸ GSTM1 유전자가 결손된 경우 체내에서 이소티오시안산(isothiocyanate)이 유리된다고 알려져 있다. Xiao and Singh²⁹는 이소티오시안산이 핵인자 카파비(Nuclear factor kappa B, NF- κ B)로 조절되는 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 같은 유전자의 발현을 감소시켜 신생혈관발생을 억제한다고 보고하였다. Medeiros et al³⁰은 유방암 환자에서 GSTM1 유전자 결손이 없는 정상형에서 GSTM1 유전자 결손이 있는 경우에 비해 종양내 미세혈관 밀도(intratatumoral microvessel density, MVD index)가 유의하게 높았으며 이는 저산소증에 의해 유발되는 일련의 대사경로에 따른 신생혈관형성이 GSTM1 유전자와 연관이 있음을 시사한다고 하였다. 이 같은 결과들이 본 연구의 결과처럼 당뇨병망막병증의 발생에 있어 GSTM1 유전자결손과 신생혈관발생의 억제를 간접적으로 보여주는 증거라고 생각되며 향후 GSTM1 유전자와 VEGF 유전자의 발현 정도의 관계를 다룬 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또 다른 연구들에 의하면, 당뇨병망막병증에서 망막미세혈관내의 백혈구 포착(leukocyte entrapment)이 증가되고 류코트리엔 B4 (leukotriene B4, LTB4)의 합성이 증가되면 프로스타글란딘(prostaglandin) 등의 염증물질의 발현이 증가되어 망막의 혈관 변화를 일으키게 되는데,³¹⁻³³ Joachim and Rutkowski³⁴의 *in vitro* 연구에서는 프로스타글란딘 합성이 GST에 의해 유도된다고 하였다. 이것은 GSTM1 유전자의 결손이 있는 경우 프로스타글란딘의 합성이 상대적으로 감소되어 망막의 혈관변화를 억제해 당뇨병망막병증 발생이 낮아질 것으로 생각되며 마찬가지로 본 연구결과와 어느 정도 연관이 있을 것으로 생각한다.

GSTM1 유전자의 결손이 당뇨병망막병증 발생의 위험도를 낮추는 인자임을 설명하는 다른 기전으로, 기존의 몇몇 연구에서는 GSTM1 유전자 결손이 상대적으로 다른 항산화효소

의 상향조절(upregulation)을 유도한다고 하였다. Otto-Knapp et al³⁵은 GSTM1 유전자의 결손이 망간초산화효소 불균등화 효소(Manganese superoxide dismutase, MnSOD) 등의 다른 항산화효소의 발현을 상향조절한다고 하였으며, MacLeod et al³⁶은 GSTM1 유전자의 결손이 좀 더 높은 항산화 활성도를 갖는 시토크롬 P1A2 (cytochrome P1A2, CYP1A2)의 발현을 상향조절한다고 설명하였다. 본 연구의 결과도 GSTM1 유전자의 결손이 다른 항산화효소의 상향조절을 유도하여 당뇨망막병증 발생의 위험도를 낮추는 인자로 작용했을 것으로 보인다.

또한 추가적으로, 본 연구에서는 다변량 로지스틱 회귀 분석에서 유전인자 외에도 긴 당뇨병의 유병기간과 높은 HbA1c가 제2형 당뇨병 환자에서 당뇨망막병증 발생의 위험인자로 분석되었는데 이는 Jee et al³⁷의 한국인을 대상으로 한 대단위 연구에서 보여준 결과와 일치한다.

본 연구의 제한점은, GSTT1과 GSTM1 외에 GST의 다른 아형 유전자들의 분석을 시행하지 않았기 때문에 이들 간의 유전자-유전자 상호작용에 의해 당뇨망막병증 발생위험도가 영향을 미칠 수 있었을 것으로 생각한다. 또한 GST 유전자뿐만 아니라 생체 내에서 항산화 및 해독작용에 관련된 MnSOD, 카탈라아제(catalase, CAT), CYP1A2, 유도 일산화질소 합성효소(inducible Nitric oxide synthase, iNOS) 또는 신생혈관발생과 연관된 VEGF 등의 다른 유전자들의 분석 및 프로스타글란딘과 GST의 다른 아형(subtype)과의 관계 분석 등을 함께 시행하지 않았던 점 역시 본 연구의 제한점으로 생각한다. 기존의 여러 연구³⁸⁻⁴¹에서 위와 같은 유전자들이 당뇨망막병증 발생에 영향을 미치는 것으로 여겨지며 추후 GST 유전자와 함께 이러한 유전자들에 대한 분석과 당뇨망막병증 발생률에 대한 추가적인 연구 및 고찰이 필요할 것으로 보인다. 또한 당뇨망막병증 발생에 있어 GSTT1, GSTM1 유전자와 환경과의 상호작용을 통제하지 않고 분석한 것도 제한점이라고 생각한다.

결론적으로, 한국인을 대상으로 시행한 본 연구에서는 GSTT1 유전자 결손은 제2형 당뇨병환자의 당뇨망막병증 발생위험을 증가시키지 않는 반면, GSTM1 유전자 결손은 당뇨망막병증 발생을 억제하는 인자로 보이며, 향후 이에 대한 대다수의 환자 대조군 연구 및 추가적인 유전자 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.

2) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:837-53.

3) Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1998;21:1167-72.

4) Ebara T, Conde K, Kako Y, et al. Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparin sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105:1807-18.

5) Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000;106:453-8.

6) Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463-99.

7) Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferase--a review. *Curr Med Chem* 1999;6:279-309.

8) Datta SK, Kumar V, Pathak R, et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Ren Fail* 2010;32:1189-95.

9) Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000;463:247-83.

10) Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:733-43.

11) Chen K, Jiang QT, Ma XY, et al. Associations between genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1, smoking and susceptibility to colorectal cancer: a case-control study. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004;26:645-8.

12) White NH, Sun W, Cleary PA, et al. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the diabetes control and complications Trial. *Arch Ophthalmol* 2008;126:1707-15.

13) Bekris LM, Shephard C, Peterson M, et al. Glutathione-s-transferase M1 and T1 polymorphisms and associations with type 1 diabetes age-at-onset. *Autoimmunity* 2005;38:567-75.

14) Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* 1991;98(5 Suppl):786-806.

15) Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes* 1997;46:1829-39.

16) Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A systemic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes* 2009;58:2137-47.

17) Huang YC, Lin JM, Lin JH, et al. Genome-wide association study of diabetic retinopathy in a Taiwanese population. *Ophthalmology* 2011;118:642-8.

18) Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, et al. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Hum Mol Genet* 2011;20:2472-81.

19) Hovnik T, Dolzan V, Bratina NU, et al. Genetic polymorphisms in genes encoding antioxidant enzymes are associated with diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:2258-62.

20) Cilenšek I, Mankoč S, Petrovič MG, Petrovič D. GSTT1 null genotype is a risk factor for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes, whereas GSTM1 null genotype might confer pro-

- tection against retinopathy. *Dis Markers* 2012;32:93-9.
- 21) Dadbinpour A, Shiekhha MH, Darbouy M, Afkhami-Ardekani M. Investigating GSTT1 and GSTM1 null genotype as the risk factor of diabetes type 2 retinopathy. *J Diabetes Metab Disord* 2013; 12:48.
 - 22) Moasser E, Azarpira N, Shirazi B, et al. Genetic polymorphisms of glutathione-s-transferase M1 and T1 genes with risk of diabetic retinopathy in Iranian population. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17:351-6.
 - 23) Doney AS, Lee S, Leese GP, et al. Increased cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetes is associated with the glutathione S transferase theta-null genotype: a Go-DARTS study. *Circulation* 2005;111:2927-34.
 - 24) Sun L, Zhang Y, Xiong Y. GSTM1 and GSTT1 nul genotype and diabetic retinopathy: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8:1677-83.
 - 25) Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett* 2002; 180:165-71.
 - 26) Lin HJ, Probst-Hensch NM, Louie AD, et al. Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:647-52.
 - 27) London SJ, Yuan JM, Chung FL, et al. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 2000;356: 724-9.
 - 28) Yadav DS, Devi TR, Ihsan R, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes and the risk of aerodigestive tract cancers in the Northeast Indian population. *Genet test Mol Biomarkers* 2010;14:715-23.
 - 29) Xiao D, Singh SV. Phenethyl isothiocyanate inhibits angiogenesis in vitro and ex vivo. *Cancer Res* 2007;67:2239-46.
 - 30) Medeiros R, Soares R, Vasconcelos A, et al. Glutathione S-transferase genotype GSTM1 as a predictor of elevated angiogenic phenotype in patients with early onset breast cancer. *Angiogenesis* 2004;7:53-8.
 - 31) Poulaki V, Qin W, Joussem AM, et al. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF. *J Clin Invest* 2002;109: 805-15.
 - 32) Gubitosh-Klug RA, Talahalli R, Du Y, et al. 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2008;57:1387-93.
 - 33) Talahalli R, Zarini S, Sheibani NS, et al. Increased synthesis of leukotrienes in the mouse model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1699-708.
 - 34) Joachim A, Ruttkowski B. Prostaglandin D(2) synthesis in oesophagostomum dentatum is mediated by cytosolic glutathione S-transferase. *Exp Parasitol* 2011;127:604-6.
 - 35) Otto-Knapp R, Jurgovsky K, Schierhorn K, Kunkel G. Antioxidative enzymes in human nasal mucosa after exposure to ozone: possible role of GSTM1 deficiency. *Inflamm Res* 2003;52:51-5.
 - 36) MacLeod S, Sinha R, Kadlubar FF, Lang N. Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2. *Mutat Res* 1997;376:135-42.
 - 37) Jee D, Lee WK, Kang S. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2011. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:6827-33.
 - 38) Petrovic MG, Gilensek I, Petrovic D. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with diabetic retinopathy in Slovene (Caucasians) type 2 diabetes patients. *Dis Markers* 2008;24:59-64.
 - 39) Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'yanov KV, et al. The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab* 2006;32:63-8.
 - 40) Nomiya T, Tanaka Y, Piao L, et al. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Hum Genet* 2003; 48:138-41.
 - 41) Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho YS. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;41: 1191-6.

= 국문초록 =

한국인의 GSTM1, GSTT1 유전자와 당뇨망막병증의 연관성에 대한 분석

목적: 제2형 당뇨병 환자의 Glutathione-S-transferase (GST) 유전자의 변이와 당뇨망막병증 발생의 연관성에 대해 분석하고자 하였다.
대상과 방법: 2013년 1월부터 2015년 11월까지 당뇨망막병증으로 진단받은 환자 131명과 유병기간이 10년 이상인 제2형 당뇨병 환자 중 당뇨망막병증이 발생하지 않은 105명, 그리고 당뇨병이 없는 정상대조군 45명을 대상으로 환자 대조군 연구를 시행하였다. 대상자들의 GSTM1 및 GSTT1 유전자 분석을 위해 사전 동의하에 말초혈액에서 얻어진 혈액샘플로부터 중합효소연쇄반응을 통해 각 유전자의 결손 유무를 분석하였다.

결과: 단변량분석에서 당뇨망막병증이 발생한 군이 발생하지 않은 군보다 제2형 당뇨병의 유병기간이 길었고($p=0.004$), HbA1c 값이 더 높았다($p=0.004$). GSTT1 유전자결손은 두 군 간의 차이는 없었으나, GSTM1 유전자결손은 당뇨망막병증이 있는 군에서 더 낮은 비율을 보였다($p=0.017$). 로지스틱 회귀분석에서 당뇨의 유병기간($p=0.013$), 높은 HbA1c ($p=0.007$), GSTM1 유전자결손이 없는 경우 ($p=0.012$)가 당뇨망막병증 발생의 위험인자로 분석되었다.

결론: 한국인을 대상으로 시행한 본 연구에서 GSTT1 유전자결손은 당뇨망막병증 발생의 위험성을 증가시키지 않는 반면, GSTM1 유전자결손은 당뇨망막병증 발생의 억제와 연관이 있었다. 향후 이에 대한 대다수의 환자 대조군 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.
(대한안과학회지 2017;58(3):313-320)