Original Articles Korean Circulation J 1999;29(12):1332-1340

산화질소 합성효소 유전자 다형성이 관동맥성형술 후 재협착에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교 의학연구원 심장연구소
서울대학교병원 임상의학연구소 심혈관연구실
최수연 · 채인호 · 김효수 · 손대원 · 오병희
이명묵 · 박영배 · 최윤식 · 이영우

Significance of eNOS Gene Polymorphism for the Prediction of Restenosis after Coronary Angioplasty in Patients with Ischemic Heart Disease

Soo-Yeon Choi, MD, In-Ho Chae, MD, Hyo-Soo Kim, MD,
Dae-Won Son, MD, Byung-Hee Oh, MD, Myoung-Mook Lee, MD,
Young-Bae Park, MD, Yun-Shick Choi, MD and Young-Woo Lee, MD

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Heart Research Institute, Seoul National University, Cardiovascular Laboratory, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background : The restenosis after coronary angioplasty is the unresolved problem even if the improvement of interventional skills and pharmacological therapies. Nitric oxide, known as endothelial derived relaxing factor (EDRF), regulates the vascular tone and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells and platelet adhesions and endothelium-leukocyte interactions. Nitric oxide is produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). We studied the significance of eNOS gene polymorphism for the prediction of restenosis after coronary angioplasty in Koreans with ischemic heart disease. **Methods** : We analyzed the two eNOS poly-morphisms using PCR (eNOS A/B polymorphism is the VNTR in intron 4 and eNOS T/G polymorphism is a missense mutation in exon 7) in 199 Korean patients who had 257 lesions undergoing percutaneous coronary angioplasty (ballooning=152, stenting=105). The angiography was repeated 6 months later to assess the relation between the rate of restenosis and types of eNOS gene polymorphism. **Results** : We found no significant differences of restenosis rate in eNOS A/B and T/G polymorphism in those with balloon angioplasty or with stent (restenosis rate of A/A, A/B, B/B, respectively (n=257) : 25% (1/4), 26% (14/53), 31% (62/200) (p= not significant), and T//T, T/G, G/G (n=249) : 0% (0/3), 36% (16/44), 29% (58/202) (p=not significant)) Patients with A allele (non BB) or GG phenotype had lower restenosis rate, so we analyzed protective effect of non BB and GG phenotype on restenosis, but there was no significant statistical difference (restenosis rate of non BB and GG, BB and non GG respectively : 20% (15/57), 34% (16/47) (p=not significant)). **Conclusion** :

논문접수일 : 1999년 6월 14일
심사완료일 : 1999년 11월 18일
교신저자 : 김효수, 110 - 744 서울 종로구 연건동 28번지 서울대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (02) 760 - 2226 · 전송 : (02) 766 - 8904
E - mail : hyosoo@plaza.sun.ac.kr

eNOS A/B and T/G polymorphism is not associated with a significantly elevated risk of restenosis after coronary angioplasty. **(Korean Circulation J 21999:29(12):1332-1340)**

KEY WORDS : Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism · Restenosis · Coronary angioplasty.

서 론

최근 관동맥성형술은 스텐트(stent), 효과적인 항혈전제 등의 사용으로 그 성적이 향상되고 있으나 관동맥성형술 후 재협착은 아직 해결해야 할 문제로 남아있다. 산화질소(nitric oxide, NO)는 증식억제효과와 항혈전효과를 발휘하는 물질로서 재협착 과정에 상당한 영향을 끼칠 것으로 생각된다. 즉, 주로 혈관내피세포에서 분비되는 산화질소는 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cGMP의 농도를 높임으로써 혈관평활근을 이완시켜 혈관의 긴장도를 조절하는 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)로 알려져 있다.[1] 이는 혈관평활근세포의 이동 및 성장을 억제하는 기능과 혈소판 응집을 억제하는 기능도 있어 심혈관계 동맥경화의 발생과 진행에 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.[2] 이러한 산화질소를 생성하는 산화질소-합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)의 유전자 염기 서열과 그 다형성이 보고된 바 있다.[3][4] 즉, intron 4의 27 bp 반복 횟수의 차이에 따른 유전자의 다형성(A/B polymorphism)과 exon 7의 298번째 아미노산의 염기가 glutamic acid에서 aspartic acid로 치환되면서 생긴 유전자의 다형성(G/T missense variant polymorphism) 등이 알려져 있으며, 이들 유전자의 다형성과 심혈관계질환의 관련성에 대한 여러 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이에 저자들은 재협착의 과정에 깊이 관여하리라고 예상되는 산화질소를 합성하는 효소를 코딩하는 유전자의 다형성이 관동맥성형술후 재협착에 의미 있는 영향을 미치는지를 분석하고자 하였다. 즉, 관동맥성형술을 시행받은 환자에게서, intron 4의 유전자 다형성과 exon 7의 유전자 다형성을 분석한 후, 이들을 일정기간 경과한 후에 추적 관동맥조영술을 실시하여, 유전자형에 따라서 재협착율에 차이가 있는지를 분석하였다.

대상 및 방법

대 상

1996년 1월 1일부터 1998년 7월 1일까지 허혈성 심질환으로 관동맥성형술을 시행한 환자 중, 관동맥조영술상 내경의 50% 이상의 의미 있는 협착이 있는 병변의 성공적인 관동맥성형술을 시행한 환자를(환자수=199, 병변 수=257)을 대상으로 하였다. 관동맥성형술로 풍선성형술과 스텐트 삽입을 시행했으며 스텐트 삽입은 일차적으로 예정된 경우, 풍선성형술의 결과가 만족할만하지 못한 경우, 응급처치로 시행한 경우를 모두 포함하였다. 이들에서 관동맥조영술 시행 시 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 -20℃에서 냉동 보관 한 백혈구에서 DNA를 추출하여 유전자 분석을 하였다. 관동맥성형술을 시행한 환자들은 시술 6개월 후, 또는 그 이전이라도 임상적으로 재협착이 의심되는 증상이 생겼을 때 추적 관동맥조영술을 실시하여 각각의 유전자 다형성에서 재협착률을 알아보았다. 이들은 재협착의 기전을 고려하여 크게 풍선성형술 시행 군(병변 수=152)과 스텐트 삽입을 시행한 군(병변 수=105)으로 세분하였다. 시술 후 항혈전제로 모든 환자에게 aspirin을, 그리고 stent 삽입 군에는 시술 후 2 4주간 추가로 ticlopidine을 투여하였다. 이들 환자들에서 외래진료와 입원시의 면담, 신체검진, 혈액검사, 그리고 의무기록을 중심으로 관동맥조영술 시행시의 나이, 성별, 체질량계수(body mass index), 흡연력, 당뇨병, 고혈압, 혈중 지질 농도를 조사하여 관동맥질환의 위험 인자로 분석하였다. 당시 흡연을 하고 있거나, 금연한 지 1개월 이내인 경우 흡연력이 있다고 하였다. 경구 혈당강하제를 복용하거나 인슐린 주입 치료를 하는 경우와 1996년 미국당뇨병학회에서 개정된 당뇨병의 진단기준에 근거하여 공복 시 혈당이 126 mg/dl 이상이거나, 당뇨병의 증상이 있으면서 우연히 측정한 혈당이 200 mg/dl 이상인 경우 당뇨병이 있다고 진단하였다. 세번 이상 측정한 혈압의 평균에서 이완기 혈압이 90 mmHg

이상이거나 수축기 혈압이 140 mmHg 이상인 경우, 또는 항고혈압제를 복용하고 있는 경우에 고혈압으로 진단하였다. 총 혈청 콜레스테롤 수치가 240 mg/dl 이상일 때 고지혈증이 있는 것으로 하였다. 이전에 성형술을 시행 받은 병변 혈관의 재협착이나 관동맥 우회술 후 이식혈관의 협착으로 관동맥성형술을 시행한 환자는 제외하였다.

관동맥조영술의 분석

두 방향 이상의 영상을 얻어 정량적 관동맥 조영 분석법(quantitative coronary angiographic analysis, QCA)으로 분석하여 내경의 50% 이상의 협착이 있는 경우 관동맥질환이 있다고 하였다. 관동맥성형술(풍선성형술과 스텐트 시술) 전, 직후 및 추적 경과 관찰 시 최소내경(minimal luminal diameter, MLD)와 퍼센트 내경협착(percent diameter stenosis)을 측정하였다. 재협착의 정의는 추적 관동맥조영술상 병변 부위 내경의 50% 이상 협착이 있는 경우로 하였다.

유전자형 분석

eNOS intron 4 A/B 유전자 다형성

eNOS intron 4 내에는 GAAGTCTAGACCTG-CTGCA/GGGGGTGAG의 27 bp로 이루어진 부분이 4회(eNOS polymorphism A), 5회(eNOS polymorphism B) 반복을 하는 두 가지의 유전형질(A allele/B allele)이 있다(variable number of tandem repeats). 이중 5회 반복하는 경우는 19번째 염기가 처음 3개는 A로, 나중 2개는 G로 되어있고, 4회 반복하는 경우는 처음 2개는 A로 나중 2개는 G로 되어있다(Fig. 1). 채취한 혈액의 냉동 백혈구에서 DNA를 추출한 후 4℃ 냉장 보관한 후 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 27 bp의 반복 부분을 증폭하였다. 게놈의 위치는 Miyahara 등이 1994년 발표한 GenBank의 유전자 서열에서 얻었다.[4] Wang 등의 방법을 따라 forward primer(sense)로 5′-AGGCC-CTATGGTAGTGCCTTT-3′(5111에서 5130 bp에 위치)가, reverse primer(antisense)로 5′-TCT-CTTAGTGCTGTGGTCAC-3'(5530에서 5511에 위치)가 사용되었다. 60 μl의 각 PCR 반응액은, 1 μg DNA, 60 pM의 각 primer, 12 μM의 dNTP, 2.5 U Tag DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl 2, 1 mM DTT로 이루어졌다. 이 혼합액을 95℃에서 5분간 가열 한 후, 94℃에서 1분간 가열, 56 ℃에서 1분간 가열, 72℃에서 2분간 가열하는 세 과정을 35회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분간 가열하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 반응산물을 2% NuSieve agarose gel을 사용하여 전기영동법으로 분리하고 ethidium bromide 염색하여 자외선을 쬐어 가시화하였다(Fig. 2).

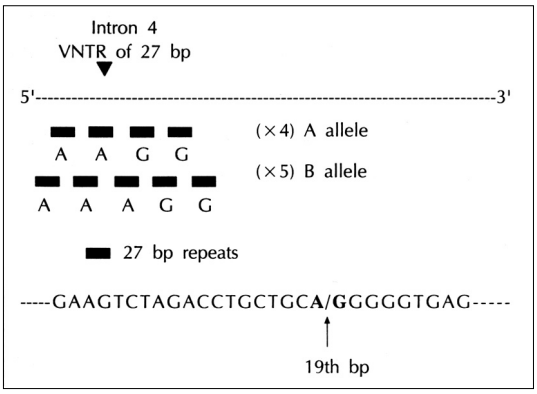

Fig. 1. Schematic presentation of eNOS intron 4 polymorphism (A/B). A smaller rare allele (A allele) has four tandem 27 bp repeats and a common larger one (B allele) has five repeats. The first two repeats has A and the last two has G at the 19th base of the 27 bp repeat in A allele. The first three repeats has A and the last two has G at the 19th base of the 27 bp repeat in B allele. VNTR : variable number of tandem repeats.

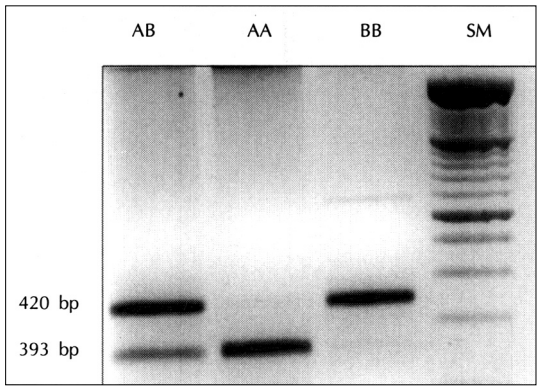

Fig. 2. The PCR product of eNOS intron 4 polymorphism separated by electrophoresis with ethidium bromide staining followed by ultraviolet visualization. The band of 420 bp indicates five repeats (B allele) and the band of 393 bp denotes 4 repeats (A allele). SM : size marker.

eNOS exon 7 G/T 유전자의 다형성

eNOS exon 7에 298번째 아미노산이 glutmate(G)에서 aspartate(T)로 치환되면서 생긴 두 대립 형질이 있다. Forward primer(sense)로 5′-AAGGCA-GGAGACAGTGGATGGA-3′, reverse primer(antisense)로 5′-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGC-TCA-3′을 사용하여 중합효소 연쇄반응을 시행 한 후 그 산물을 제한효소(restriction enzyme) BanII로 digestion 시키면 돌연변이 형질(T allele)은 분해되지 않고 248 bp를 유지하지만, 정상 allele(G allele)은 분해되어 163 bp와 85 bp로 잘려서 이를 2% NuSieve agarose gel을 사용하여 전기영동법으로 분리하고 ethidium bromide로 확인하였다(Figs. 3 and 4).

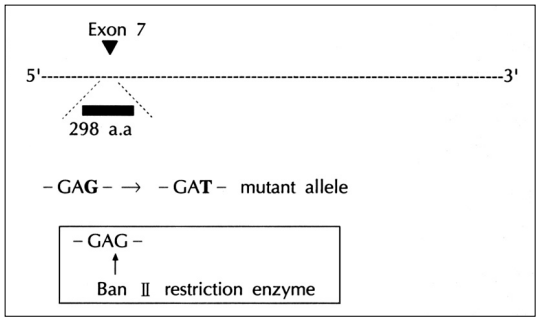

Fig. 3. Schematic presentation of eNOS exon 7 polymorphism (T/G) by missense Glu298Asp variant. The mutant allele (T) has no Ban II cutting site.

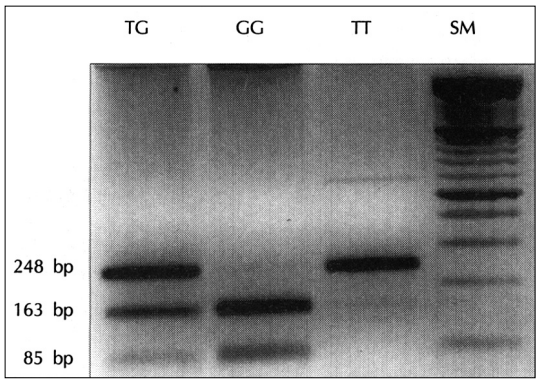

Fig. 4. The PCR-RFLP of eNOS exon 7 polymorphism separated by electrophoresis with ethidium bromide staining followed by ultraviolet visualization. The PCR products of wild type (GG) after digestion with Ban Ⅱ has two bands, 163 bp & 85 bp, respectively. Glu 298Asp homozygote (TT) without Ban Ⅱ cutting site has one band of 248 bp. Glu298 Asp heterozygote (TG) has three bands, 163 bp band and 85 bp band digested by Ban Ⅱ and 248 bp one without digestion. SM : size marker.

통계분석법

관동맥성형술을 시행한 환자들에서 각 유전자형에 따른 재협착률을 알아보고 차이가 있는지 chi-square 법으로 검정하였다. 이에 영향을 미칠 수 있는 요인을 보정하고자 각 유전자형별로 관동맥질환의 다른 위험인자인 나이, 성별, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 체질량계수, 흡연력과 이미 알려진 재협착의 위험인자인 관동맥성형술 직후 최소 내경(minimal luminal diameter)[5)6)] 이 차이가 있는지 chi-square 법으로 검정하였다. P-value가 0.05 이하일 때 통계적인 유의성이 있다고 보았다.

결 과

풍선성형술과 스텐트 삽입군 각각에서 재협착의 유무에 따라서 관동맥질환의 위험인자인 나이, 성별, 체질량지수, 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 흡연력과 재협착의 위험 인자로 알려진 성형술 직후의 최소 내경을 비교해 보았을 때 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=NS). 또 intron 4 A/B, exon 7 T/G 각 유전자형에 따른 각 위험인자의 차이도 없었다(p=NS)(Table 1, 2 and 3). 추적 관찰 시 전체 병변의 30%(77/257), 풍선성형술 병변의 33%(50/152), 스텐트 삽입 병변의 26%(27/ 105)에서 재협착이 왔다. Intron 4 A/B 유전자형에 따른 재협착률은 A/A, A/B, B/B 각각 전체 병변에서 25%(1/4), 26%(14/53), 31%(62/200)(p=NS), 풍선성형술 병변에서 0%(0/2), 30%(7/23), 34%(43/127)(p=NS), 스텐트 삽입 병변에서 50%(1/2), 23%(7/30), 26%(19/73)(p=NS)로 각 군에서 유전자형에 따른 통계적인 유의한 차이는 없었다. A allele 의 빈도가 전체의 2%로 적고, B/B 군에서 재협착율이 더 높은 경향을 보이므로 B allele 열성 효과(recessive effect)를 보기 위해 B/B 군과 non B/B 군으로 나누어 재협착율의 상대 위험도(relative risk)를 비교해 보았다. non B/B 군에 대한 B/B 군의 상대 위험도는 전체 병변에서 1.104(95% CI 0.694 1.757), 풍선성형술 병변에서 1.058(95% CI 0.569 1.969), 스텐트 삽입 병변에서 1.041(95% CI 0.510 2.126)로 통계적인 유의성은 없었다. 역으로 재협착군과 비재협착군

Table 1. Clinical characteristics (mean±SD)

	Ballooning (n=152)		Stent (n=105)	
	Restenosis (-)	Restenosis (+)	Restenosis (-)	Restenosis (+)
Lesion no. (%)	102 (67%)	50 (33%)	78 (74%)	27 (26%)
Male (%)	67%	76%	79%	74%
Age (years)	59±11	58±10	57±10	61±8
BMI (kg/m^2)	24.7±2.6	24±2.3	25.7±2.7	23.6±2.6
F/U interval (days)	258±124	225±144	243±99	194±80
Cholesterol (mg/dl)	207±51	212±56	207±47	212±43
Hypertension (%)	54%	36%	43%	52%
Diabetes (%)	32%	36%	27%	12%
Smoking (%)	47.5%	40.8%	40.8%	25.9%
MLD (mm) after intervention	2.14±0.56	1.94±0.51	2.60±0.70	2.3±0.59
	p=NS*		p=NS*	

*Not significant

Table 2. Basal characteristics in patients with three genotypes of eNOS polymorphism in intron 4 (mean±SD)

	A/A	A/B	B/B
Patient no. (%)	4 (2%)	53 (20%)	200 (78%)
Age (year)	61±5	56±10	59±10
BMI (kg/m^2)	25±1	25±3	25±2
F/U interval (days)	216±119	259±117	235±120
Cholesterol (mg/dl)	219	227±67	204±44
Hypertension (%)	100%	62%	42%
Diabetes (%)	0%	36%	28%
Smoking (%)	41.8%	49%	39.4%
MLD (mm) after Intervention	2.13±0.6	2.23±0.7	2.27±0.6

p=NS

Table 3. Basal characteristics in patients with three genotype of eNOS polymorphism in exon 7 (mean±SD)

	T/T	T/G	G/G
Lesion no. (%)	3 (1.2%)	44 (17.7%)	202 (81.1%)
Age (year)	51±7	59±10	59±10
BMI (kg/m^2)	24±3	25±2	25±3
F/U interval (days)	297±71	236±154	241±110
Cholesterol (mg/dl)	167±31	214±49	208±50
Hypertension (%)	33%	50%	48%
Diabetes (%)	33%	34%	28%
Smoking (%)*	100%	48.8%	39.6%
MLD (mm) after intervention	2.20±0.4	2.12±0.5	2.30±0.7

p=NS, *Smoking (%) of non G/G : G/G=52.2 : 39.6 (*p*=0.120)

으로 분류하여 양 군 사이의 intron 4 A/B 유전자형의 분포 비율을 분석 해 보았을 때도 유의한 차이는 없었다(Table 4, 5 and 6).

Exon 7 T/G 유전자형에 따른 재협착률은 T/T, T/G, G/G 각각 전체 병변에서 0%(0/3), 36%(16/44), 29%(58/202)(p=NS), 풍선성형술 병변에서 0%(0/3), 37%(11/30), 32%(36/113)(p=NS), 스텐트 삽입 병변에서 0%(0/0), 36%(5/14), 25%(22/89)(p=NS)로 각 군에서 유전자형에 따른 통계적인 유의한 차이는 없었다. 대상 환자에서 T/T 유전자형을 가진 경우가 없었으며 T/G 군의 재협착율이 더 높은 경향을 보이므로 T allele 우성효과(dominant effect)를 보기 위하여 non G/G 군과 G/G 군으로 나누어 G/G 군에 대한 non G/G 군의 재협착율의 상대 위험도를 비교해 보았다. 상대 위험도는 전체 병변에서 1.166(95% CI 0.742 1.832), 풍선성형술 병변에서 1.018(95% CI 0.587 1.765), 스텐트 삽입 병변에서 1.445(95% CI 0.655 3.186)로 통계적인 유의성은 없었다. 재협착군과 비재협착군으로 분류하여 양 군 사이의 exon 7 T/G 유전자형의분포 비율을 분석해 보았을 때도 유의한 차이는 없었다(Table 7, 8 and 9).

두 유전적 다형성을 결합하여 재협착에 있어서 나쁜 영향을 미치는 것으로 보이는 B/B & non G/G군과 좋은 영향을 미치는 것으로 보이는 non B/B & G/G군의 재협착율을 비교 분석해 보았을 때 풍선성형술군(33% : 28%, p=0.663)과 스텐트군(36% : 25%, p=0.881)의 병변 모두 B/B & non G/G군에서 재협착률이

높았으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 10). Non B/B & G/G 군에 대한 B/B & non G/G 군의 재협착율에 대한 상대 위험도는 전체 병변에서 1.244(95% CI 0.626 2.471), 풍선성형술 병변에서 1.086(95% CI 0.456 2.585), 스텐트 삽입 병변에서 1.250(95% CI 0.371 4.207)로 통계적인 유의성은 없었다.

Table 4. Restenosis rate in three genotypes of eNOS polymorphism in intron 4

	A/A	A/B	B/B	p-value
Total lesion (n=257)	1/4 (25%)	14/53 (26%)	62/200 (31%)	NS
Ballooning lesion (n=152)	0/2 (0%)	7/23 (30%)	43/127 (34%)	NS
Stenting lesion (n=105)	1/2 (50%)	7/30 (23%)	19/ 73 (26%)	NS

Table 5. Restenosis rate between B/B vs non B/B of eNOS polymorphism in intron 4

	B/B	Non B/B	P value	Relative risk	95% CI
Total lesion (n=257)	62/200 (32%)	15/57 (26%)	0.496	1.104	0.694 - 1.757
Ballooning lesion (n=152)	43/127 (34%)	7/25 (28%)	0.569	1.058	0.569 - 1.969
Stenting lesion (n=105)	19/ 73 (26%)	8/32 (25%)	0.912	1.041	0.510 - 2.216

Table 6. Frequency of genotypes of eNOS polymorphism in intron 4 in restenosis and non-restenosis groups

	Restenosis	A/A	A/B	B/B	p-value
Total	(+)	1/ 78 (1.3%)	15/ 78 (19.2%)	62/ 78 (79.5%)	0.905
	(-)	3/179 (1.7%)	38/179 (21.2%)	138/179 (77.1%)	
Ballooning	(+)	0/ 51 (0%)	8/ 51 (15.7%)	43/ 51 (84.3%)	0.597
	(-)	2/101 (2%)	15/101 (14.9%)	84/101 (83.2%)	
Stenting	(+)	1/ 27 (3.7%)	7/ 27 (25.9%)	19/ 27 (70.4%)	0.701
	(-)	1/ 78 (1.3%)	23/ 78 (29.5%)	54/ 78 (69.2%)	

Table 7. Restenosis rate in three genotypes of eNOS polymorphism in exon 7

	T/T	T/G	G/G	p-value
Total lesion (n=249)	0/3 (0%)	16/44 (36%)	58/202 (29%)	NS
Ballooning lesion (n=146)	0/3 (0%)	11/30 (37%)	36/113 (32%)	NS
Stenting lesion (n=103)	0/0	5/14 (36%)	22/ 89 (25%)	NS

Table 8. Restenosis rate between non G/G vs G/G of eNOS polymorphism in exon 7

	Non G/G	G/G	p value	Relative risk	95% CI
Total lesion (n=249)	16/47 (34%)	58/202 (29%)	0.471	1.166	0.742 - 1.832
Ballooning lesion (n=146)	11/33 (33%)	36/113 (32%)	0.873	1.018	0.587 - 1.765
Stenting lesion (n=103)	5/14 (36%)	22/ 89 (25%)	0.385	1.445	0.655 - 3.186

Table 9. Frequency of genotypes of eNOS polymorphism in exon 7 in restenosis and non-restenosis groupes

	Restenosis	T/T	T/G	G/G	p-value
Total	(+)	0/ 75 (0%)	16/ 75 (21.3%)	59/ 75 (78.7%)	0.335
	(-)	3/174 (1.7%)	28/174 (16.1%)	143/174 (82.2%)	
Ballooning	(+)	0/ 48 (0%)	11/ 48 (22.9%)	37/ 48 (77.1%)	0.435
	(-)	3/ 98 (3.1%)	19/ 98 (19.4%)	76/ 98 (77.6%)	
Stenting	(+)	0/ 27 (0%)	5/ 27 (18.5%)	22/ 27 (81.5%)	0.385
	(-)	0/ 76 (0%)	9/ 76 (11.8%)	67/ 76 (88.2%)	

Table 10. Restenosis rate between worst and best combined genotypesin

	Worst genotypes B/B & non G/G	Best genotypes non B/B & G/G	p-value
Total lesion	16/47 (34%)	15/57 (20%)	NS
Ballooning lesion	11/33 (33%)	7/25 (28%)	NS
Stenting lesion	5/14 (36%)	8/24 (25%)	NS

고 안

관동맥성형술 후 재협착을 예측할 수 있는 인자로서 당뇨병, 고지혈증, 고연령, 고혈압, 불안정 협심증, 좌전하행지 근위부 협착, 다혈관 질환, 시술 직후 최소 내경 등이 알려져 있으나 보고자들마다 차이가 있다.[9)10)]

분자 생물학적 관점에서 관동맥질환과 관련이 있는 angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism, angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism, platelet glycoprotein PLA1/PLA2 polymorphism, apolipoprotein E polymorphism 등의 유전자의 다형성과 재협착과의 관계에 대한 연구가 근래에 활발하게 진행되고 있으며 보고자에 따라, 대상 인종에 따라 다양한 결과가 발표되고 있다.[11-16)] 그러나 아직 산화질소-합성효소 유전자의 다형성과 관동맥성형술 후 재협착에 관한 연구는 없는 실정이다. 혈관내피세포에서 분비되는 산화질소는 혈관평활근 이완, 혈관평활근 세포의 이동 및 성장의 억제, 혈소판 응집의 억제 등의 기능이 있다.[1)2)] 이전의 연구 결과에 의하면 산화질소-합성효소의 유전자형과 혈장 산화질소 및 그 대사산물의 관계는 Wang 등이 1997년, 건강한 유럽 백색 인종 지원자에서 AA homozygote에서 다른 두 유전자형에 비해 혈장 산화질소 및 그 대사산물이 유의하게 높음을 보고한 바 있고, 또 상반된 결과로 Tsukada 등은 1998년 건강한 일본인에서, AA homozygote가 B allele을 가진 군에 비해 혈장 산화질소 및 그 대사산물이 유의하게 낮다고 보고하고 있다.[17)18)] 아직 논란의 여지가 있는 상태이지만 저자들은 산화질소를 생성하는 산화질소-합성효소 유전자의 다형성에 따라 산화질소의 양이나 기능의 변화를 가져와 관동맥성형술 후 재협착에 영향을 줄 수 있다고 가정하였다.

A allele을 포함하는 non B/B 군(A/A and A/B)과 G/G 군에서 재협착율이 낮아 이들 유전자형의 가속성 동맥경화에 대한 예방적 효과를 보고자 하였다. 또 이들 유전자형을 동시에 가진 군과 그렇지 않은 군도 비교 분석해 보았다. 그리고 스텐트 시술 후에는 신생 혈관내피 과증식(neointimal hyperplasia)이, 풍선성형술 후에는 arterial remodeling이 재협착의 주 기전[7)8)]으로 받아들여지고 있는 만큼, 산화질소의 역할과 연관지어 고려해볼 때 스텐트 군에서 그 영향이 더 크게 미칠 것으로 기대했었다. 그러나, 유전자형에 따른 재협착율의 차이는 통계적으로 유의하지는 않았고 이는 스텐트 군과 풍선성형술 군 모두에서 동일하였다.

1996년 Wang 등은 정상 호주인(Caucasians) 153명에서 A/A, A/B, B/B 유전자형의 빈도는 각각 0.7%(n=1), 32.7%(n=50), 66.7%(n=102)이며, 관동맥질환이 있는 549명에서는 3.3%(n=18), 22.1% (n=122), 74.6%(n=409)로 A/A homozygote의 빈도가 관동맥질환자 군에서 높게 나타나며(p-value=0.08), 또한 흡연력이 있는 군에서 A/A homozygote일 때 중증 협착의 관동맥 병변을 가지는 빈도가 더 높았고 심근경색 병력이 더 많았다고 하였다. 이 결과로 이들은 A/A homozygote가 혈관내피 세포의 기능 변화를 가져와 관동맥질환의 위험을 높이는 인자가 된다고 하였다.[19)]

T/G 유전자의 다형성의 경우 1998년 Shimasaki 등은 건강한 일본인 대조 군 607명에서 T/T, T/G, G/G가 각각 0.2%(n=1), 13.2%(n=80), 86.7%(n=526)이고 심근경색의 병력이 있는 환자 군 285명에서 0.4%(n=1), 20.7%(n=59), 78.9%(n=225)이라고 발표하였다. 이들에서 다른 관동맥 질환의 위험인자를 보정하여 다중 로지스틱 분석(multiple logistic regression)을 하였을 때, T/T & T/G군이 G/G군에 비해 심근경색에 대한 상대 위험도 1.5(95% CI 1.2 1.8, p-value 0.039)로 T allele이 우성효과를 가지며 독립적인 위험인자가 될 수 있다고 하였다.[20)]

그 외에도 산화질소-합성효소 intron 4 A/B 유전자의 다형성과 심혈관계질환과의 관계에 대해서는 허혈성 뇌졸중의 발생과는 관련이 없다는 연구가 있고,[21)] A allele이 고혈압,[22)] 심근경색[23)]의 위험인자가 된다는 보고도 있다. 산화질소-합성효소 exon 7 T/G 유전자의 다형성의 경우는 고혈압의 관계는 아직 논란의 여지가 있는 상태이며,[24)] T allele이 이형성 협심증의 위험인자라는 보고가 있다.[25)]

본 연구에서는 A allele이 있는 경우 통계적으로 유의하지는 않았으나, 재협착율이 낮아서 Wang 등이 Caucasians을 대상으로 한 연구와는 상반된 결과를 얻었다. 이는 유전자형의 영향이 인종에 따라 차이가 있다고 볼 수 있겠으나, A allele의 빈도가 적은 것에 기인할 수도 있을 것으로도 생각된다.

본 연구의 결과에서 산화질소-합성효소 A/B, T/G 두 유전자의 다형성은 가속성 동맥경화증의 대표적 상황인 관동맥성형술 후 재협착에 대해 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 이는 재협착이라는 문제가 단순히 한두 가지의 유전자에 의해서 좌우되기보다는 보다 복잡한 발생기전에 의할 것이라는 것을 시사한다.

요 약

연구배경 :

여러 요인이 복합적으로 관여하여 이루어지는 관동맥성형술 후 재협착은 아직 해결해야 할 문제로 남아있으며 관동맥성형술의 제한점이 되고 있다. 산화질소는 혈관의 긴장도를 조절하며 혈관평활근세포의 이동 및 성장을 억제하며 혈소판 응집을 억제하는 기능이 있는 것으로 알려져 있으며 산화질소-합성효소에 의해 생성된다. 한국인에서 산화질소-합성효소의 유전자의 다형성이 대표적 가속성 동맥경화증인 관동맥성형술 후 재협착에 미치는 영향에 대해 전향적 연구를 시행하였다.

방 법 :

허혈성 심질환으로 관동맥성형술(풍선성형술과 스텐트 삽입)을 시행한 환자(전체 환자수=199, 전체 병변수=257, 풍선성형술 병변 수=152, 스텐트 삽입군 병변 수=105)를 대상으로 하였다. 관동맥조영술 시행 시 혈액을 채취하여 DNA를 추출하여 유전자 분석을 하였다. 이들에서 시술 6개월 후, 또는 그 이전이라도 임상적으로 재협착이 의심되는 증상이 생겼을 때 추적 관동맥조영술을 실시하여 유전자 다형성에 따른 재협착률을 알아보았다. 산화질소-합성효소 유전자 다형성은 intron 4 내의 27 bp가 4회(A allele), 5회(B allele) 반복을 하는 두 가지의 유전형질(eNOS A/B polymorphism)과 exon 7의 298번째 아미노산이 glutamate(G)에서 aspartate(T)로 치환되면서 생긴 두 대립형질(eNOS G/T polymorphism)을 중합효소 연쇄반응법으로 분석하였다.

결 과 :

추적 관찰 시 전체 병변의 30%(77/257), 풍선성형술 환자 병변의 33%(50/152), 스텐트 삽입 환자 병변의 26%(27/105)에서 재협착이 왔다. 산화질소-합성효소 intron 4 A/B 유전자형에 따른 재협착률은 A/A, A/B, B/B이 각각, 전체 병변에서 25%(1/4), 26%(14/ 53), 31%(62/200)(p=NS), 풍선성형술 병변에서 0%(0/2), 30%(7/23), 34%(43/127)(p=NS), 스텐트 삽입 병변에서 50%(1/2), 23%(7/30), 26%(19/ 73)(p=NS)로 각 군에서 유전자형에 따른 통계적인 유의한 차이는 없었다. 산화질소-합성효소 exon 7 T/G 유전자형에 따른 재협착률은 T/T, T/G, G/G가 각각, 전체 병변에서 0%(0/3), 36%(16/44), 29%(58/202)(p=NS), 풍선성형술 병변에서 0%(0/3), 37%(11/30), 32%(36/113)(p=NS), 스텐트 삽입 병변에서 0%(0/0), 36%(5/14), 25%(22/89)(p=NS)로 각 군에서 유전자형에 따른 통계적인 유의한 차이는 없었다. 두 유전적 다형성을 결합하여 재협착에 있어서 나쁜 영향을 미치는 것으로 보이는 B/B & non G/G군과 좋은 영향을 미치는 것으로 보이는 non B/B & G/G군의 재협착율을 비교 분석해 보았을 때 풍선성형술군(33% : 28%, p=0.663)과 스텐트 삽입군(36% : 25%, p=0.881)에서 모두 B/B & non G/G군에서 재협착률이 높았으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

결 론 :

관동맥 성형술 후 재협착은 산화질소-합성효소 유전자의 다형성에 의해서 영향을 받지 않는다는 본 연구 결과는, 재협착이라는 문제가 단순히 한 두 가지의 유전자에 의해서 좌우되기보다는 보다 복잡한 발생기전에 의할 것이라는 것을 시사한다.

중심 단어 : 산화질소 합성효소 유전자 다형성 · 관동맥성형술 · 재협착.

본 연구는 1998년도 보건복지부 연구과제(HMP-98-M-2-0024)의 보조에 의하여 이루어졌음.

REFERENCES

1) Moncada S, Higgas A. *The L-arginine nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329:2002-12.*
2) Loscalzo J, Welch G. *Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis 1995;38:87-104.*

3) Nadaud S, Bonnardeux A, Lathrop M, Soubrier F. *Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. Biochem Biophys Res Commun 1994;198:1027-33.*
4) Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, *et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. Eur J Biochem 1994;223:719-26.*
5) Moussa I, Reimers B, Moses J, Di Mario C, Di Francesco L, Ferraro M, *et al. Long-term angiographic and clinical outcome of patients undergoing multivessel coronary stenting. Circulation 1997;96:3873-9.*
6) Kastrati A, Schömig A, Elezi S, Schuhlen H, Dirschinger J, Hadamitzky M, *et al. Predictive factor of restenosis after coronary stent placement. J Am Coll Cardiol 1997;30:1428-36.*
7) Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR. *Patterns and mechanism of in-stent restenosis: A serial intravascular ultrasound study. Cirulation 1996;94:1247-54.*
8) Mintz GS, Popma JJ, Hong MK. *Intravascular ultrasound to discern device-specific effect and mechanisms of restenosis. Am J Cardiol 1996;78:18-22.*
9) McDonald RG, Henderson MA, Hirshfeld JW. *Patient-related variables and restenosis after percutaneous coronary angioplasty-a report from the MHEART Group. Am J Cardiol 1990;66:926.*
10) Kastrati A, Schömig A, Elezi S, Schuhlen H, Dirchinger J, Hadamitzky M, *et al. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. J Am Coll Ca-rdiol 1997; 30:1428-36.*
11) Mamotte CD, van Bockxmeer FM, Tatlor RR. *PLa1/a2 poly-morphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following of coronary angioplasty. Am J Cardiol 1998;82:13-6.*
12) Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard F, Helbecque N, Passard F, *et al. Dual determination of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes as predictors of restenosis of coronary angioplasty. Am J Cardiol 1998;81:79-81.*
13) Kasi JC, Zhang Y, Calvino R, Vazquez-Rodriquez JM, Castro-Bairas A, Jeffery S, *et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and restenosis of coronary angioplasty in unstable angina pectoris. Am J Cardiol 1996;77:875-7.*
14) van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Gibbons FA, Burke V, Tatlor RR. *Angiotensin converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary angioplasty. Circulation 1995;92:2066-71.*
15) Hamon M, Bauters C, Amant C, McFadden EP, Helbecque N, Lablanche JM, *et al. Relation between the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and late luminal narrowing after coronary angioplasty. Circulation 1995;92:296-9.*
16) Beohar N, Damaraju S, Prather A, Yu QT, Raizner A, Kleiman NS, *et al. Angiotensin- I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease. J Investig Med 1995;43:275-80.*
17) Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Blangero J, Almasy L, et al. *Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:3147-53.*
18) Tsukada T, Yokoyama K, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. *Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. Biochem Biophys Res Commun 1998;245:190-3.*
19) Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DL. *A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. Nat Med 1996;2:41-5.*
20) Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, *et al. Association of the missense Glu298 Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarct. J Am Coll Cardiol 1998;31:1506-10.*
21) Yahashi Y, Kario K, Shimada K, Matsuo M. *The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in Japanese population. Blood Coagul Fibrinolysis 1998;9:405-9.*
22) Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K. *Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. Am J Hypertens 1998; 11:125-8.*
23) Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M. *Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. Am J Cardiol 1998; 81:83-6.*
24) Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. *Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. J Hypertens 1998;16:31-5.*
25) Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, *et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. Hum Genet 1998;103:65-9.*