Original Articles Korean Circulation J 1999;29(8):781-787

관동맥질환 환자에서 Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)유전자 다형성의 빈도분포 및 혈중 총 호모시스테인 농도와의 관계

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실
문건웅 · 정욱성 · 윤호중 · 백상홍 · 유기동 · 오용석
전희경 · 박지원 · 채장성 · 김재형 · 최규보 · 홍순조

The Frequency Distribution of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphism and Association between the Genotypes and Total Homocysteine Level in Patients with Coronary Artery Disease

Keon Woong Moon, MD, Wook Sung Chung, MD, Ho Joong Youn, MD, Sang Hong Baek, MD, Ki Dong Yoo, MD, Yong Seok Oh, MD, Hee Kyung Jun, MD, Ji Won Park, MD, Jang Seong Chae, MD, Jae Hyung Kim, MD, Kyu Bo Choi, MD and Soon Jo Hong, MD
Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background : Increased homocysteine levels are an independent risk factor for coronary artery disease (CAD). A common genetic mutation (nucleotide 677 C-to-T) in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), an enzyme required for efficient homocysteine metabolism, creates a thermolabile enzyme with reduced activity. Homozygotes of MTHFR mutation represent 5% to 12% of general population in Canada, America, and Japan. In this study, we examined the distribution of the MTHFR genotypes in CAD patients and healthy volunteers and the association between the genotypes and the total homocysteine level (tHcy). **Methods** : We screened 60 Korean patients with CAD (CAD group) and 97 healthy volunteers (control group) for the MTHFR 677 C-to-T mutation. Fasting and post-methionineload tHcy level, folic acid, and vitamine B12 level were determined with other clinical variables in CAD group. **Results** : The frequency of the MTHFR V/V homozygous genotype was 20% in CAD group (with 40% heterozygous and 40% wild type) and 14% in control group (with 48% heterozygous and 38% wild type). In CAD group, homozygotes of MTHFR mutation had significant higher fasting tHcy level than wild type (homozygote, 18.83±6.37 μmol/L ; wild type, 12.36±3.21 μmol/L ; $p < 0.01$). The tHcy level correlated with the age ($r=0.425$, $p<0.01$), the folate level ($r=-0.534$, $p<0.01$), and the presence of the mutant MTHFR gene ($r=0.565$, $p<0.01$) after adjustment of other clinical variables. **Conclusion** : We find that homozygotes of MTHFR mutation have higher homocysteine level independent of

논문접수일 : 1999년 1월 25일
심사완료일 : 1999년 7월 7일
교신저자 : 문건웅, 150 - 010 서울 영등포구 여의도동 62 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (02) 3779 - 1325 · 전송 : (02) 3779 - 1374
E - mail : echo1@cmc.cuk.ac.kr

folic acid in patients with CAD. Large case-control study needed to confirm whether MTHFR mutation increases the risk of CAD independent of plasma tHcy level. **(Korean Circulation J 21999;29(8):781-787)**

KEY WORDS : Homocysteine · MTHFR · Polymorphism · CAD.

서 론

고호모시스테인 혈증(hyperhomocysteinemia)은 관동맥질환[1]을 비롯하여 심부정맥혈전증,[2] 특발성 폐색전증, 말초동맥폐쇄질환[3] 및 뇌졸중[4]의 독립적인 위험인자이며, 관동맥질환 환자에서는 예후에도 관련되는 것으로 알려져 있다.[5] 특히 흡연, 고혈압, 고콜레스테롤혈증 등의 다른 위험인자가 있는 경우 고호모시스테인 혈증이 동반되면 비교위험도가 최고 25배 이상 증가되는 것으로 보고된 바 있으며[6] 외국의 경우 전체 인구의 5 20% 정도가 고호모시스테인 혈증인 것으로 알려져 있다.[1-6]

고호모시스테인 혈증이 일어나는 원인은 인체 내 정상 대사과정에서부터 비롯된다.[7] 체내 호모시스테인 대사를 살펴보면 음식물 중에 포함되어 있는 필수 아미노산인 메티오닌으로부터 호모시스테인이 합성되며 여러 효소가 작용하여 DNA 합성 및 글루타티온 합성 등이 일어나게 되는데 이 과정에서 엽산 및 비타민 B_6와 B_{12} 등이 보조인자로 작용하게 된다. 이 과정에 관여하는 여러 효소의 선천적결핍이나 엽산 및 비타민과 같은 보조인자의 섭취가 부족한 경우 고호모시스테인혈증이 생기게 되는데 이 중 가장 흔한 N^5,N^{10}-Methylenetetrahydrofolate Reductase(MTHFR)의 돌연변이 중 열불안정성 효소(677 C-to-T mutation)는 효소의 활성도가 감소되어 있어 엽산의 섭취가 불충분할 때 호모시스테인의 혈중농도가 상승한다고 알려져 있으며[8-10] 미국이나 호주, 유럽, 일본 등에서는 전 인구의 5 12%가 열불안정 효소의 동질접합체(homozygote)로 보고되어 있다.[8-13] 하지만 한국 내의 빈도는 알려져 있지 않다.

저자들은 관동맥질환 환자 및 대조군에서 MTHFR의 열불안정성 효소의 동질접합체의 빈도를 알아보고 또 관동맥질환 환자에서 이 유전자의 돌연변이와 혈중 호모시스테인의 농도, 그리고 비타민 농도와의 상관관계를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법

대 상

관동맥질환 환자군(이하 환자군)은 1998년 5월부터 1998년 9월까지 가톨릭대학교 의과대학 부속 성모병원에 입원하여 관동맥질환으로 진단받은 환자 중 60명(평균연령 58.3±10.9세, 남 : 여=26 : 34)을 대상으로 하였다. 관동맥질환의 진단은 심근경색, 관동맥조영술상 주요 관동맥 직경의 50% 이상 협착이 있거나 연축이 증명된 경우와 X 증후군으로 하였다. 주요 관동맥은 좌주관동맥, 좌전하행지 및 주요 diagonal branch, 우관동맥, 좌회선지 및 주요 marginal branch로 정의하였으며 dominance에 따라 descending 또는 posterior descending 관동맥을 포함하였다. X 증후군의 진단은 증상이 있고 운동심전도 검사에서 심근허혈이 증명되었으나 관동맥조영술 상 주요 관동맥의 협착이 없는 경우 경식도초음파를 이용하여 관동맥 혈류를 측정, 관동맥 혈류예비력이 감소되어 있는 경우로 하였다.

대조군은 관동맥질환의 증거가 없는 지원자 97명(평균연령 36.4±16.9세, 남 : 여=61 : 36)을 대상으로 하였다. 환자군과 대조군 모두 혈중 호모시스테인 농도에 영향을 미칠 수 있는 질환(만성신부전, 갑상선기능저하증, 악성빈혈, 유방암, 난소암, 췌장암 등)이나 약제(methotrexate, pheytoin, theophylline 등)를 복용하는 경우는 제외하였다.

방 법

임상정보 및 혈액 생화학적 검사

환자군에 대하여 흡연 여부, 심장질환의 가족력 등을 문진하고 신장, 체중을 측정하였다. 공복시 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 시행 후 공복시 혈장 총 호모시스테인(total homocysteine, tHcy)농도와 엽산 농도 및 비타민 B12의 농도를 측정하였다. 100 mg/kg의 메티오닌을 200 ml의 과일쥬스에 섞어 경구로 투여한

뒤 4시간이 지난 후 혈장 총 호모시스테인 농도를 측정하였다. 총 호모시스테인 농도의 측정은 radioimmunoassay(Arbott)를 사용하였으며 엽산 농도 및 비타민 B12 농도는 radioimmunoassay를 사용하였다.

MTHFR 유전자 검사

전혈 200 μl를 high pure PCR template preparation kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 DNA를 분리한 후 두 개의 primer(Bioneer, 5′-TGAAGG-AGAA-GGTGTCTGCGGGA-3'과 5′-AGGACG-GTGC-GGTGAGAGTG-3')를 사용하여 연쇄중합반응을 이용하여 MTHFR 677번째 염기서열 부위를 증폭하였다. MTHFR 다형성이 있는 경우, 즉 열불안정성 효소의 경우는 677번째 염기서열에 C-to-T 치환이 있으므로 HinfI 제한효소에 의해 198-bp fragment가 175-bp와 23-bp fragment로 나뉘어지므로 3% agarous gel 전기영동을 실시하여 ethidium bromide 용액으로 염색하여 유전자형을 판독하였다(Fig. 1).

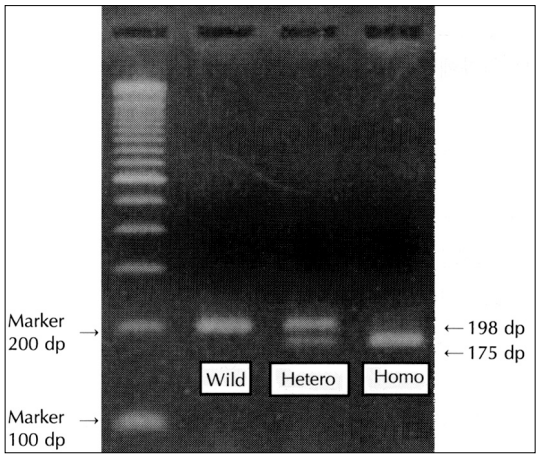

Fig. 1. Examples of genotype determination.

Table 1. Baseline characteristics among the three genotypes in CAD group

	Wild type (N=24)	Heterozygote (N=24)	Homozygote (N=12)
Age (year)	56.21±11.27	59.96± 9.95	58.92±12.30
BUN (mg/dl)	22.44±27.08	18.16± 7.82	16.00± 3.80
Cr (mg/dl)	1.21± 0.76	1.17± 0.25	0.91 ± 0.12
BMI (kg/m2)	25.20± 3.48	23.97± 4.75	24.83± 3.87
SBP (mmHg)	120.5 ±21.4	125.5 ±16.8	125.8 ±15.6
DBP (mmHg)	81.5 ±14.8	77.3 ±10.3	76.7 ± 9.8
TC (mg/dl)	207.6 ±57.6	187.9 ±29.1	184.4 ±31.0
TG (mg/dl)	153.3 ±72.9	158.5 ± 8.1	151.9 ±61.8
HDL (mg/dl)	43.9 ±14.0	38.6 ± 8.1	39.5 ± 8.3
LDL (mg/dl)	133.1 ±45.0	117.6 ± 28.5	114.4 ±30.3

통계 분석

통계분석은 SPSS 7.5를 사용하여 분석하였다. 관동맥 환자군과 대조군 사이의 유전자형 빈도의 차이는 χ^2-test를 사용하였다. 관동맥환자군에서 임상진단 및 관동맥질환의 범위에 따른 유전자형의 분포차이는 χ^2-test를 이용하여 검정하였다. 관동맥 환자군에서 유전자형에 따른 여러 인자의 차이는 Student t-test를 이용하였고 혈중 호모시스테인과 유전자형, 혈중 비타민 농도 및 기타 임상적 독립변수와의 상관관계 분석은 Pearson′s correlation analysis를 사용하였으며 단변수 분석에서 유의한 차이를 보인 변수들에 대하여 부분상관분석 및 회귀분석을 실시하였다. $p<0.05$인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

관동맥질환 환자군과 대조군에서 MTHFR 유전자형의 발생빈도

대조군 97명 중 MTHFR 유전자의 열불안정성 돌연변이의 발생빈도는 동질접합체(homozygote)가 14명(14%), 이형접합체(heterozygote)는 46명(48%), 돌연변이가 없는 wild type은 37명(38%)이었다. 환자군 60명 중 동질접합체는 12명(20.0%), 이형접합체는 24명(40.0%), wild type은 24(40.0%)명으로 두 군간의 유전자형의 발생빈도에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

Table 2. Genotypes vs. Diseases(N=60)

	Acute MI	Old MI	Unstable	Stable	Variant	Syndrome X	Total
Wild type	8	1	4	8	2	1	24
Heterozygote	7	2	5	7	1	2	24
Homozygote	2	2	2	5	1	0	12

MI=Myocardial infarction, Unstable=Unstable angina, Stable=Stable angina, Variant=Variant angina

MTHFR 유전자형과 임상적 특징

관동맥질환 환자군 60명을 MTHFR 유전자형에 따라 세 군으로 분류하여 여러 가지 임상적 특징을 비교하였으나 각 군간의 유의한 차이는 없었다(Table 1). 임상진단에 따른 유전자형의 분포는 차이가 없었으며(Table 2), 이 중 관동맥 조영술을 시행한 54명에 대하여 관동맥 질환의 범위와 유전자형의 분포를 비교한 결과 유전자형에 따른 관동맥질환의 범위의 차이는 없었다(Table 3).

MTHFR 유전자형과 혈중 호모시스테인, 엽산 및 비타민 농도

관동맥질환 환자군 60명 중 혈중 호모시스테인, 엽산 및 비타민 농도를 모두 측정한 49명을 대상으로 유전자

Fig. 3. Genotypes vs. Extents of CAD (N=54)

	0VD	1VD	2VD	3VD	Total
Wild type	6	9	2	6	23
Heterozygote	4	7	6	4	21
Homozygote	2	5	2	1	10

0VD=No significant stenosis, 1VD=1 vessel disease
2VD=2 vessel disease, 3VD=3 vessel disease

Table 4. Total Homocysteine (tHcy)and vitamine levels in CAD group

	Wild type (N=20)	Heterozygote (N=19)	Homozygote (N=10)
tHcy (μmol/l)			
Fasting	12.36± 3.21	14.89± 4.82	18.83± 6.37*
Postload	30.19± 11.62	34.03± 15.43	33.33± 10.29
Increase	17.83± 10.43	19.14± 13.66	14.50± 7.42
Folate (nmol/l)	6.52± 3.60	6.89± 3.54	7.55± 3.70
Vit-B12 (pmol/l)	874.5 ±321.6	818.9 ±381.0	843.5 ±344.8

postload=4 hr after methionine 100 mg/kg P.O.
**p<0.01 vs wild type, increase=postload-fasting

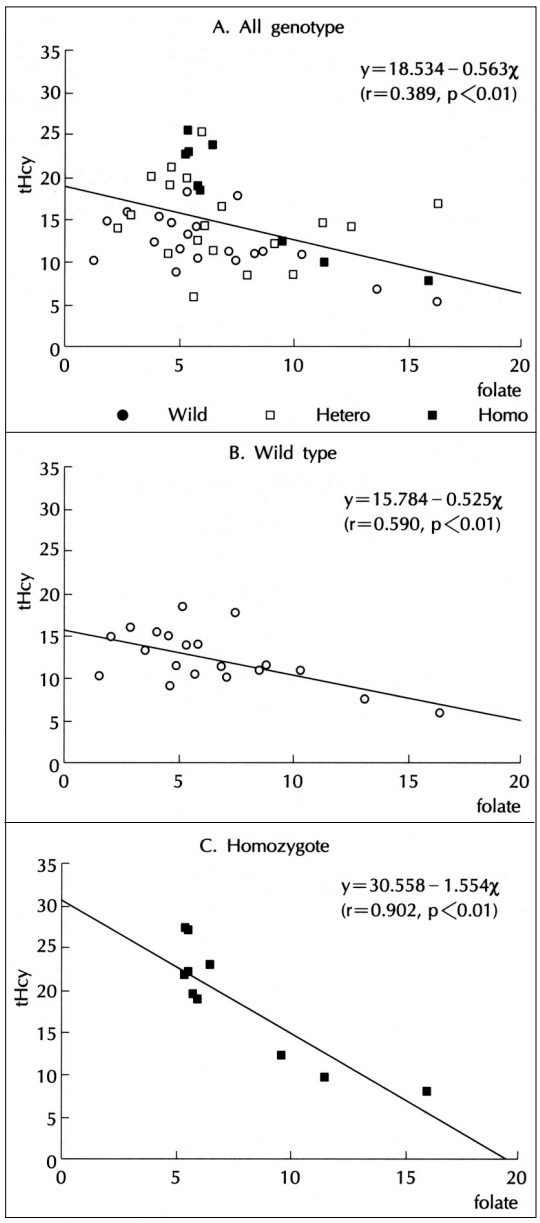

Fig. 2. Total homocysteine (tHcy) and folate in CAD group.

Table 5. Correlation between total homocysteine and other clinical variables in CAD group

Variables	Bivariate anaylsis		After adjustment		Adjust for
	Coefficient	P value	Coefficient	P value	
Age	0.377	<0.01	0.425	<0.01	folate, MTHFR
Sex	0.165	NS			
Cr	- 0.088	NS			
Folate	- 0.389	<0.01	- 0.534	<0.01	age, MTHFR
Vit-B12	- 0.014	NS			
MTGFR	0.467	<0.01	0.565	<0.01	age, folate

자 형에 따른 혈중 호모시스테인, 엽산 및 비타민 농도를 비교하였다(Table 4). 공복시 혈중 총 호모시스테인의 평균농도는 wild type은 12.36±3.21 μmol/L, 동질접합체는 18.83±6.37 μmol/L로 동질접합체의 평균농도는 wild type에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.01$). 이형접합체의 평균 농도는 14.89±4.82 μmol/L로 wild type에 비해 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.072$). 이형접합체와 동질접합체의 평균농도는 차이가 없었다.

체중당 100 mg의 메티오닌을 경구 투여한 후 측정한 부하 혈중 총 호모시스테인의 농도는 세 유전자형간에 차이가 없었고 혈중 엽산농도 및 비타민 B12 농도도 차이가 없었다.호모시스테인 농도의 상관관계 분석

혈중 총 호모시스테인 농도와 호모시스테인 농도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 나이, 성별, 혈중 크레아티닌 농도 및 엽산 농도, 비타민 B12 농도, MTHFR 유전자형에 대하여 상관관계 분석을 시행한 결과 나이, 혈중 엽산농도, MTHFR 유전자형이 혈중 총 호모시스테인 농도와 상관관계가 있었으며 다른 변수의 영향을 통제한 후에도 나이, 혈중 엽산농도, MTHFR 유전자형은 혈중 호모시스테인 농도와 상당한 관련이 있었다(Table 5).

MTHFR 유전자형에 따른 혈중 엽산 농도와 호모시스테인 농도의 상관관계를 계산한 결과 wild type($r=0.590$, $p<0.01$)에 비해 동질접합체($r=0.902$, $p<0.01$)에서 매우 강한 관련성을 보여주고 있었다(Fig 2).

고 찰

고호모시스테인혈증은 관동맥질환의 독립적인 위험인자로 알려져 있으며 관동맥질환 환자의 사망을 예견할 수 있는 예후인자로도 알려져 있다. Stampfer 등은[1] 14,916명의 미국내 남자 의사를 대상으로 평균 5년간 추적검사를 시행한 결과 이 기간 중 271명에서 심근경색이 발생하였으며 고호모시스테인혈증(정상 대조군의 95 퍼센타일 이상으로 정의)이 있는 경우 심근경색의 비교위험도는 3.4배로 측정되었다고 보고한 바 있으며 Nygard 등[5]은 587명의 관동맥질환 환자를 평균 4.6년 추적검사하여 혈중 호모시스테인이 높은 경우 사망률이 증가한다고 보고한 바 있다. 국내에서도 관동맥질환 환자[14] 또는 심근경색 환자[15]에서 대조군보다 혈중 호모시스테인의 농도가 높다는 보고가 있었으나 MTHFR 다형성에 대한 연구는 없었다.

고호모시스테인 혈증은 체내 메티오닌 및 호모시스테인 대사에 관여하는 여러 효소의 활성도가 감소되어 있거나 엽산 및 비타민과 같은 보조인자의 섭취가 부족한 경우 발생할 수 있으며 유전적 요인 중 대표적인 것으로는 N 5, N 10 - Methylenetetrahydrofolate Reductase(MTHFR)의 다형성이 알려져 있다.[8-13] MTHFR 유전자의 염기서열 중 677번째 염기가 cytosine에서 thymine으로 점상돌연변이가 일어나게 되면 아미노산 서열이 알라닌(alanine)에서 발린(valine)으로 바뀌게 되며 효소의 활성도가 매우 감소하게 된다. 이 돌연변이의 발생빈도는 매우 높아 미국이나 호주, 유럽, 일본 등에서는 전 인구의 5 16% 가 열불안정 효소의 동질접합체(homozygote)로 알려져 있으며,[8-13] 이러한 동질접합체인 경우 호모시스테인의 혈중농도가 높고 심혈관질환의 위험도 증가하는 것으로 알려져 있다. 국내에는 Lee 등[16]이 만성신부전 환자 106명 중 MTHFR 돌연변이의 동질접합체의 빈도가 16%라고 보고한 바 있으나 정상인 또는 관동맥질환 환자에서의 빈도는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 이러한 동질접합체의 빈도가 정상군에서는 14%, 관동맥질환 환자군에서는 20%였으며 관동맥질환 환자군에서 MTHFR 유전자형에 따라 호모시스테인의 농도에 차이가 있는 것으로 나타났고 이러한 차이는 혈중 엽산농도 및 나이에 의한 차이를 교정한 후에도 통계적으로 유의하였다.

Jacques 등[17]과 Ma 등,[8] 그리고 Tokgozoglu 등[18]은 각각 환자군 또는 대조군에 대한 연구를 통하여 MTHFR 유전자 돌연변이의 동질접합체의 경우 wild type에 비해 혈중 호모시스테인 농도가 높다고 보고한 바 있으며 또한 혈중 엽산 농도에 따라 혈중 엽산 농도가 정상이하인 경우 혈중 총 호모시스테인 농도에 유의한 차이가 있으며 혈중 엽산농도가 정상이상인 경우에는 통계적으로 유의한 차이는 없다고 보고한 바 있다. 하지만 혈중 엽산농도의 정상치(nmol/L)는 연구자마다 달라 Jacques 등[17]은 15.4, Tokgozoglu 등[18]은 12.9를 기준으로 하였으며 Girelli 등[12]은 대조군에서 평균치가 11.5로 보고한 바 있다. 본 연구에서는 환자군의 혈중 평균 엽산농도가 6.87로 다른 논문들에 비해 낮게 측정되었다. 이는 다른 논문의 경우 대조군을 대상으로 엽산농도를 측정하였고 본 연구에서는 환자군을 대상으

로 하였기 때문으로 생각되며 또한 나라와 민족에 따른 유전적차이 및 생활습관과 식습관의 차이에도 그 원인이 있을 것으로 생각되나 보다 많은 수의 대조군을 대상으로 한 추가연구가 필요하리라 생각된다.

고호모시스테인혈증의 임상적 중요성은 관동맥질환의 독립적 위험인자로써 그 대상환자가 많고[8-13] 흡연이나 고지혈증 등 다른 위험인자가 있는 경우 그 위험도가 훨씬 높아지며[19] 가장 중요한 점은 고호모시스테인 혈증은 식이요법이나 엽산의 보충 등과 같은 방법으로 쉽게 교정될 수 있는 위험인자라는 점이다.[6)19)20)] 본 연구에서도 혈중 총 호모시스테인 농도와 엽산 농도는 통계적으로 유의한 역상관관계를 보여주었으며 특히 이러한 관계는 wild type보다 MTHFR 돌연변이의 동질접합체에서 보다 강하게 나타났다. 이러한 결과는 고호모시스테인 혈증이 있고 MTHFR 유전자의 돌연변이가 있는 경우라 하더라도 식이요법이나 엽산의 보충 등으로 고호모시스테인혈증의 교정이 가능하리라는 것을 시사해 준다. Malinow 등[20]은 관동맥 질환이 있는 환자들이 엽산을 강화한 곡류를 이용하여 아침식사를 만들어 먹는 경우 혈중 호모시스테인 농도가 감소된다고 보고한 바 있다.

본 연구의 제한점으로는 정상 대조군에서 혈중 호모시스테인 농도 및 엽산, 비타민 농도를 측정하지 않아 MTHFR 유전자의 돌연변이가 있는 경우의 관동맥질환의 비교위험도를 계산하지 못하였다는 점이다. 향후 정상 대조군과의 비교를 통하여 MTHFR 유전자 다형성이 있는 경우 비교위험도는 어느 정도인지 또한 MTHFR 유전자 다형성이 혈중 호모시스테인 농도에 독립적인 위험인자로 작용하는지에 대한 연구가 필요하리라 생각된다. 또한 관동맥질환 환자에서 식이요법이나 엽산 보충 등을 통해 고호모시스테인혈증을 교정할 경우 예후에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

연구배경 :

고호모시스테인혈증은 관동맥질환의 독립적인 위험인자로 알려져 있다. 체내 호모시스테인 대사에 필요한 Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) 효소 유전자의 점상 돌연변이(677 C-to-T mutation)가 있는 경우 효소의 활성도가 감소되어 있는 열불안정성 효소가 만들어진다. MTHFR 돌연변이의 동질접합체는 외국의 경우 전 인구의 5 12% 정도의 빈도를 보이는 것으로 알려져 있다.

방 법 :

관동맥질환 환자 60명(환자군)과 관동맥질환의 증거가 없는 지원자 97명(대조군)을 대상으로 연쇄중합반응을 이용하여 MTHFR 유전자형을 판독하였다. 환자군에 대하여 공복시와 메티오닌 부하 후 혈중 총 호모시스테인 농도 및 엽산농도, 비타민 B12 농도를 측정하였다.

결 과 :

MTHFR 돌연변이의 동질접합체의 빈도는 환자군에서 20%(이형접합체 40%, wild type 40%)였으며 대조군에서는 14%(이형접합체 48%, wild type 38%)였다. 환자군에서 공복시 총 호모시스테인 농도는 wild type에 비해 MTHFR 돌연변이의 동질접합체에서 유의하게 높았다(동질접합체, 18.83±6.37 μmol/L ; wild type, 12.36±3.21 μmol/L ; $p<0.01$). 혈중 총 호모시스테인의 농도는 나이($r=0.425$, $p<0.01$), 혈중 엽산농도($r=-0.534$, $p<0.01$), MTHFR 유전자의 돌연변이가 존재유무($r=0.565$, $p<0.01$)와 유의한 상관관계가 있었다.

결 론 :

관동맥질환 환자에서 MTHFR 돌연변이의 동질접합체는 wild type에 비해 혈중 엽산 농도에 관계없이 혈중 호모시스테인 농도가 높았다. 향후 MTHFR 돌연변이의 동질접합체가 혈중 호모시스테인 농도에 독립적인 위험인자로 작용하는지에 대한 추가연구가 필요하다.

중심 단어 : 호모시스테인 · MTHFR · 다형성 · 관동맥질환.

본 논문의 요지는 1998년도 대한순환기학회 추계학술대회에서 발표되었음.

REFERENCES

1) Stampfer MJ, Malinow MR, Willett 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.*
2) den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, *et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deepvein thrombosis. N Eng J Med 1996;334:759-62.*

3) Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, Wong PW, Coull B, Inahara T, *et al. Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation 1989;79*:*1180-8.*
4) Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. *Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. Lancet 1995;346*:*1395-8.*
5) Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE, *et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 1997;337*:*230-6.*
6) Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, *et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease*: *The Europian Concerted Action Project. JAMA 1997;277*:*1775-81.*
7) Welch GN, Lscalzo J. *Homocysteine and atherothrombosis. N Enl J Med 1998;338*:*1042-50.*
8) Ma J, Stampfer MJ, Hennnekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, *et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of mocardial infarction in US physicians. Circulation 1996; 94*:*2410-6.*
9) van Bockxmeer FM, Mamotte CD, VasikaranSD, Taylor RR. *Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. Circulation 1997;95*:*21-3.*
10) Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, *et al. Common mutation in methylenete-trahydrofolate reductase*: *Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. Circulation 1996;94*:*3074-8.*
11) Adcock DM, Fink L, Marlar RA. *A laboratory approach to the evaluation of hereditary hypercoagulability. Am J Clin Pathol 1997;108*:*434-49.*
12) Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, *et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary athero-sclerotic disease: Evidence for an important genetic-environmental interaction. Blood 1998;91*:*4158-63.*
13) Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, *et al. Gentic polymorphism of 5,10-methylenetetrahyd-rofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. Circulation 1997;95*:*2032-6.*
14) Kim CH, Choi TM, Chang SG, Hong SY. *Plasma homocysteine, folate and vitamine B12 concentrations in coronary artery disease. Korean Circulation J 1998;28*:*516-22.*
15) Lee EM, Oh DJ, Rhee HJ, Kim EJ, Kim SM, Hwang GS, *et al. Plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in young age: Relation with vitamine B6, B12, and folate. Korean Circulation J 1998;28*:*1307-13.*
16) Lee HA, Yang DH, Hong SY. *Influence of 5,10-methylenete-trahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism to plasma homocysteine concentration in ESRD patients on matintenance hemodialysis. Korean J Intern Med 1998;55:1065-69.*
17) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, *et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996;93:7-9.*
18) Tokgozoglu SL, Alikasifoglu M, Unsal I, Atalar E, Aytemir K, Ozer N, *et al. Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate. Heart 1999;81:518-22.*
19) 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 intake. JAMA 1995;274:1049-57.*
20) Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, *et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. N Engl J Med 1998;338:1009-15.*