

# Quantitative Transmission Disequilibrium Test를 이용한 지질대사관련 유전자의 혈중 지질농도 결정에 미치는 영향분석

연세대학교 의과대학 심혈관계질환유전체연구센터,<sup>1</sup> 국립보건연구원 생명과학센터 심혈관질환팀<sup>2</sup>  
박찬미<sup>1</sup> · 엄상미<sup>2</sup> · 장양수<sup>1</sup> · 박현영<sup>2</sup>

## Estimating the Genetic Variance of Five Lipid-Relevant Genes for Determining the Plasma Lipid Profiles

Chanmi Park, PhD<sup>1</sup>, Sangmi Eom, MS<sup>2</sup>, Yangsoo Jang, MD<sup>1</sup> and Hyun-Young Park, MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cardiovascular Genome Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul,

<sup>2</sup>Division of Cardiovascular Diseases, Center for Biomedical Sciences, National Institutes of Health, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** The plasma lipid levels play crucial roles in the development of atherosclerotic diseases. We estimated the genetic variance of the lipid levels according to the contributions of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes in 5 candidate genes. **Subjects and Methods:** We selected SNPs in the ATP binding cassette A1 (ABCA1) gene, the apolipoprotein A5 (APOA5), apolipoprotein E (APOE) gene, the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene and the hepatic triglyceride lipase (LIPC) gene in 383 individuals from 100 Korean families. The genotype was determined by Orchid's SNP-IT<sup>TM</sup> technology. The association analysis of the quantitative traits was performed using the quantitative transmission disequilibrium test. **Results:** A component analysis of the phenotypic variance explained 24.7% of the genetic variance on the total cholesterol, 26.4% of the genetic variance of the high density lipoprotein (HDL)-cholesterol, 11% of the genetic variance of the triglycerides, 35.6% of the genetic variance of the low density lipoprotein (LDL)-cholesterol and 18.9% of the genetic variance of the LDL-C/HDL-C, respectively. The association of the SNPs in the candidate genes explained a major fraction of the genetic phenotypic variance in the LDL-C/HDL-C ratio, but not in the other lipid profiles. The association with SNPs explained 38.5% of the variance for the total cholesterol, 32.2% of the variance for HDL-cholesterol and 29.5% of the variance for LDL-cholesterol relative to the polygenic background. An analysis of the contribution of each gene to the genetic variance showed that ABCA1, APOE, CETP and LIPC influenced the variations in total cholesterol, LDL-cholesterol and LDL-C/HDL-C. The variation in HDL-cholesterol was influenced by ABCA1, APOA5 and APOE. **Conclusion:** We identified that the genetic variance for the total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol, and the LDL-C/HDL-C ratio was significantly influenced by the genetic polymorphisms in 5 candidate genes in the Korean population. Further studies are necessary to identify other genes that can explain a major fraction of the genetic variance for the lipid levels. (Korean Circ J 2008;38:197-204)

**KEY WORDS:** Lipids; Single nucleotide polymorphism.

## 서 론

동맥경화성 심혈관질환의 발생에 있어 혈중 지질농도의 중

요성에 대해서는 많은 역학 및 임상연구를 통해 널리 알려져 있는데, 지질농도의 결정에는 식이 등 생활습관과 더불어 유전적 소인이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 혈중 지질농도는 여러 유전자의 영향 및 이들과 환경적인 영향이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 관련 유전자의 영향에 대해서는 단일염기 다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)에서의 상관분석을 중심으로 연구가 진행되어 왔는데 지질 구조 및 대사와 관련된 유전자와 혈중 지질농도와의 상관관계에 대해 많은 연구가 진행되었다.<sup>1-3)</sup>

Received: October 18, 2007

Revision Received: November 16, 2007

Accepted: November 26, 2007

**Correspondence:** Hyun-Young Park, MD, Division of Cardiovascular Diseases, Center for Biomedical Sciences, National Institutes of Health, 194 Tongil-ro, Eunpyeong-gu, Seoul 122-701, Korea  
Tel: 82-2-380-1534, Fax: 82-2-388-0924  
E-mail: hypark65@nih.gov.kr

한국인을 대상으로 한 연구에서도 몇몇 유전자내 SNP가 혈중 지질농도와 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되었다. Apolipoprotein E (APOE) 유전자다형성 E2/E3/ E4 대립 인자는 총콜레스테롤 농도, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) 등과 밀접한 관련이 있었고, cholesterol ester transfer protein (CETP) 유전자내 C-619A, Taq1B와 ABCA1 유전자내 R219K는 high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), 그리고 hepatic triglyceride lipase (LIPC) 유전자내 C-514T는 총콜레스테롤 및 아포지단백 농도와 유의한 관련성을 나타내었다.<sup>4-8)</sup> 그리고, ApoA5의 프로모터에 존재하는 C-1131T 유전자다형성은 중성지방 농도 증가와 유의한 관련성을 보여주었다.<sup>9)</sup>

그러나 지질농도와 같은 양적표현형에 대한 연관성 (linkage) 및 관련성 (association) 연구는 최근에서야 보고되기 시작하고 있는데, 유전자변이와의 상관관계를 분석하거나 양적형질을 구성성분으로 나누어 모형화하는 방법이 제시되고 있다. 후자의 경우 가계 자료를 이용한 분석으로 이와 관련한 국내에서의 분석 결과는 없는 실정이다. 혈중 지질농도와 같은 양적 형질의 유전적 영향은 주로 가계도를 이용한 유전율 (heritability)을 가지고 설명하는데, 연구대상 및 보고자에 따라 차이가 있으나 현재까지 지질농도의 유전율은 약 40~60%로 알려져 있다.<sup>10-12)</sup>

본 연구는 가계자료를 바탕으로 이전의 상관분석에서 혈중 지질농도와 관련이 있는 것으로 알려진 유전자내 SNP 및 이로 구성된 haplotype을 이용하여 transmission disequilibrium test (QTDT) 분석으로 각 유전자의 혈중 지질농도의 변화에 미치는 영향을 분석함으로써 유의한 영향을 미치는 유전자를 발굴하고자 하였다. QTDT 분석은 가계를 바탕으로 한 상관분석의 일종으로 부모-자녀 간 트리오에서 특정 대립 유전자에 대하여 부모로부터 자녀에게 전달된 대립유전자와 전달되지 않은 대립유전자를 비교분석하여 그 유전자가 질병 또는 형질과의 연관성 여부를 판단하는 방법이다. 대상 유전자는 선행연구 등에 의해 혈중 지질농도와 연관이 있었던 것으로 분석된 ATP-binding cassette A1 (ABCA1), apolipoprotein A5 (APOA5), APOE, CETP, LIPC이며, 가계 자료를 이용하여 혈중 지질농도 변화 중 유전적 요인이 미치는 영향을 분석하고, 이를 바탕으로 분석 대상 유전자내 SNP 또

는 이들로부터 유래된 haplotype을 이용하여 관련 유전자들에 의해 결정되는 변화의 정도를 추정하였다.

## 대상 및 방법

### 대 상

1999년부터 2004년까지 연세대학교 의과대학 심혈관계질환유전체연구센터의 연구에 참여한 가계 중 부모-자녀간 구성에서 자녀가 18세 이상인 100가계 383명 (남자 197명, 여자 186명)을 최종 대상군으로 선정하였다. 가족 구성원 중 관동맥질환의 기왕력 또는 증상이 있거나 당뇨병, 뇌혈관질환, 말초혈관질환, 만성신부전 및 지질저하제를 투여하고 있는 경우는 연구대상에서 제외하였다. LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 농도의 유전적 영향 분석을 위해 중성지방 농도가 400 mg/dL 이상인 경우 연구대상에서 제외하였다. 대상군은 2세대로 구성된 가계가 98가계, 3세대가 2가계로 가계당 구성원 수는 최소 3명 최대 23명으로 평균  $4.05 \pm 2.14$ 명 이었으며, 연구대상자들의 연령 및 혈중 지질농도의 분포는 Table 1과 같다. 한편, 분석대상 유전자내 SNP의 빈도를 우선 관찰하기 위하여 심혈관계질환 유전체연구센터의 표준시료 48명을 대상으로 SNP 빈도를 구하였으며, 표준시료는 48명의 혈연관계가 없는 일반 여성으로 구성되었다.

모든 대상자에서 병력 및 가족력의 조사와 함께 신장과 체중을 측정하여 체질량지수를 계산하였다. 본 연구는 참여한 모든 대상들로부터 유전체연구에 대한 서면동의를 받은 후 진행되었고, 연세대학교 의과대학 기관생명윤리심의위원회의 심의를 통과하였다.

### 혈중 지질 농도측정

혈액은 최소 8시간 이상의 공복 후 정맥에서 채혈하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다. 혈청 총콜레스테롤과 중성지방은 효소법으로 측정하였고, HDL-cholesterol은 침전제를 이용하여 chylomicron, LDL, very low density lipoprotein (VLDL)을 침전시킨 후 상층액에 있는 HDL-cholesterol을 다시 효소법으로 측정하였다. LDL-cholesterol은 Friedewald 공식 (total cholesterol-HDL cholesterol-triglyceride/5)을 이용하여 계산하였다. 중성지방 농도는 Gaussian normal dis-

**Table 1.** Clinical characteristics of study population

	N	Age (y)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	LDL-C/HDL-C
Father	90	56.3 ± 8.5	25.1 ± 2.7	201.1 ± 37.5	36.4 ± 9.4	256.8 ± 112.1	116.5 ± 37.6	3.3 ± 1.3
Mother	97	53.2 ± 8.5	23.9 ± 2.8	210.7 ± 41.3	45.2 ± 12.8	186.8 ± 110.2	129.7 ± 34.4	3.0 ± 0.9
Sons	106	26.8 ± 8.5	23.9 ± 4.0	193.1 ± 39.1	42.0 ± 10.4	196.2 ± 164.0	114.7 ± 31.9	2.8 ± 1.1
Daughters	87	29.0 ± 9.7	21.2 ± 2.8	191.4 ± 37.5	49.6 ± 9.9	110.8 ± 92.8	120.5 ± 32.1	2.5 ± 0.9
Grandfather	1	66.0	23.8	199.0	46.0	97.0	133.6	2.9
Grandmother	2	70.0 ± 12.7	23.2 ± 5.2	184.5 ± 10.6	28.0	134.0 ± 86.3	110.0	3.9
Total	383	41.3 ± 16.2	23.6 ± 3.4	199.0 ± 39.4	43.1 ± 11.7	188.1 ± 133.6	120.6 ± 34.3	2.9 ± 1.1

Mean ± SD. BMI: body mass index, TC: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, TG: triglycerides, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C/HDL-C: LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio

tribution에 적합하도록 logarithm 값을 이용하여 분석하였다.

### 유전형 분석 및 haplotype 추정

DNA는 냉동보관된 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 혈액으로부터 DNA isolation kit (Gentra Genomic DNA purification kit, MN, USA)을 이용하여 추출하였다. 각각의 SNP를 포함하는 유전자부위를 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭 후 SNPstream 25K system (Orchid Biosciences, Princeton, NJ, USA)을 이용한 Orchid's SNP-IT™ technology로 분석하였다. 즉, PCR산물을 extension primer와 함께 annealing시키고, 다음으로 biotin 또는 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 표지된 각각의 dideoxynucleotide와 반응시킨 후 substrate로서 para-nitrophenyl phosphatase (pNPP) 또는 tetramethyl benzidine (TMB)를 반응시켜 발색 반응을 분석함으로써 유전형을 결정하였다. 유전형분석의 검증은 내부 대조군 및 직접염기서열 분석을 통해 확인하였다. Haplotype은 E-M algorithm에 근거한 우도비접근법을 이용하여 분석하였다.<sup>13)</sup> 가계자료에서 부모 세대는 일반 인구집단자료에서와 같이 E-M algorithm에 근거하여 독립적으로 haplotype의 추정이 가능하다. 그러나 자녀세대의 haplotype은 두 부모의 haplotype에 제한을 받으며 재조합의 발생가능성이 있다. 따라서 부모의 haplotype 분석 결과를 바탕으로 하고, 재조합 가능성 등을 고려하여 haplotype을 추정하였다.

### 유전자의 혈중지질농도 결정에서의 기여도 분석

가계자료로부터 양적형질과 분석된 유전표지자 (SNP 또는 haplotype)의 상관관계를 검증하기 위해 양적형질의 평균과 분산을 동시에 모형화하였고, 모수 추정은 QTTD 프로그램을 이용하였다.<sup>14)15)</sup> 양적형질과 유전표지자의 상관관계가 없다고 가정한 귀무가설과 상관관계가 있다고 가정한 대립가설의 우도 (likelihood)를 비교하여 귀무가설이 기각되면 양적형질과 유전표지자의 상관관계가 있다고 정의하였다. 양적형질의 분산은 크게 환경적인 부분, 유전적 (polygenic)인 부분, 부가적 (additive)인 부분으로 나누어 분석하였다. 양적형질에서 환경, 유전자, SNP 또는 haplotype 등 부가적인 부분이 차지하는 영향력은 모형화를 통해 계산된 환경적 분산 ( $V_{env}$ ), 유전자 분산 ( $V_{poly}$ ), 부가적 분산 ( $V_a$ )을 전체 양적형질의 분산 ( $V$ )으로 나눈 값으로 구하였다.

각 지질농도와 특정 유전자와의 관련성은 유전자좌위 관련 부가적 분산 및 이의 유의성 분석으로 알아보았다. Haplotype의 부가적 분산 ( $V_{hap}$ ), SNP의 부가적 분산 ( $V_{SNP}$ )은 Fulker 등<sup>16)</sup>이 제안한 다변량정규분포 유전모형을 이용하여 추정하였으며, 기타 유전자의 영향은 잔여분산 (residual covariance)으로 추정하였다. 각 분산 성분들의 유의성은 우도비검정 (likelihood ratio test, LR test)을 통해 결정하였다. 한편, 특정 유전자의 기여도는 그 유전자가 포함된 모

형과 포함되지 않은 모형 각각에서 유전적 분산을 추정하여 그 비율로 정의하였다.

## 결 과

### 지질관련 유전자다형성의 대립인자 및 Haplotype빈도

혈중지질농도에 영향을 미치는 것으로 알려진 ABCA1, APOA5, APOE, CETP, LIPC 5개 유전자에 존재하는 31개 SNP 중 표준시료 48명에서의 대립인자의 빈도가 0.05미만이거나 완전 연관을 보이는 SNP 7개를 제외한 24개 SNP를 분석대상으로 하였으며, 이들의 유전자위치, 염기변화, 연구대상 중 founder에서의 대립인자의 빈도는 Table 2와 같다. 그리고 연구대상군에서 추정한 haplotype의 빈도는 Table 3에서 보는 바와 같다.

### 혈중 지질농도에 미치는 유전적 영향

가계자료를 바탕으로 QTTD를 이용하여 각 혈중 지질농도에 미치는 환경적 요인, 유전적 요인, 그리고, 본 연구에서 분석한 haplotype 및 SNP의 설명력을 구한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서 null model은 각 혈중 지질농도에 미

**Table 2.** SNP characteristics including localization, rare allele frequencies in unrelated founders

Gene	SNP	Localization	Rare allele frequency in Korea
ABCA1	C-477T	Promoter	0.42
	T69C	5'UTR	0.29
	R219K	Exon/Non-syn	0.41
	M883I	Exon/Non-syn	0.35
	rs363717	3'UTR	0.15
APOA5	C-1390T	Promoter	0.09
	G-1020A	Promoter	0.04
	G-3A	Kozak	0.38
	V150M	Exon/Non-syn	0.16
	G182C	Exon/Non-syn	0.12
APOE	T1259C	3'UTR	0.27
	G-219	Promoter	0.31
	rs440446	Intron	0.42
	rs769450	Intron	0.21
	C112A	Exon/Non-syn	0.09
CETP	A158C	Exon/Non-syn	0.07
	G-971A	Promoter	0.24
	G-629T	Promoter	0.48
	Taq1B	Intron	0.37
	I405V	Exon/Non-syn	0.45
LIPC	C-514T	Promoter	0.39
	V95M	Exon/Non-syn	0.29
	V155V	Exon/Syn	0.19
	T224T	Exon/Syn	0.06

SNP: single nucleotide polymorphism, ABCA1: ATP binding cassette A1, APOA5: apolipoprotein A5, APOE: apolipoprotein E, CETP: cholesterol ester transfer protein, LIPC: hepatic triglyceride lipase, UTR: untranslated region, syn: synonymous, non-syn: non-synonymous

**Table 3.** Haplotypes estimated from the study population and haplotype frequencies

Gene and SNPs	# SNP	Haplotype	Frequency (n)	Frequency (%)
ABCA1	5	CCAGA	180	22.2
ABCA1 C-477T		CCGGA	136	16.8
ABCA1 T69C		CCGAA	77	9.5
ABCA1 R219K		TTGAA	72	8.9
ABCA1 M883I		TTAGA	69	8.5
ABCA1 rs363717		TTGGA	47	5.8
		TCAGA	41	5.1
APOA5	6	CGAGGT	262	32.3
APOA5 C-1390T		CGGGGC	197	24.3
APOA5 G-1020A		CGAAGT	153	18.9
APOA5 G-3A		CGGGTT	88	10.9
APOA5 V150M		TGAGGT	67	8.3
APOA5 G182C				
APOA5 T1259C				
APOE	5	TCGTC	484	59.8
APOE G-219T		GGATC	142	17.5
APOE rs440446		TGGCC	72	8.9
APOE rs769450		GGGTT	68	8.4
APOE C112A				
APOE A158C				
CETP	4	GCGA	337	41.6
CETP G-971A		GAAG	145	17.9
CETP C-629A		AAAG	123	15.2
CETP Taq1B		GCGG	51	6.3
CETP I405V		AAGA	47	5.8
LIPC	4	CGGC	232	28.6
LIPC C-514T		TGGC	190	23.5
LIPC V95M		CAGC	141	17.4
LIPC V155V		TAGC	75	9.3
LIPC T224T		CGTC	64	7.9
		TGTC	45	5.6

SNP: single nucleotide polymorphism, ABCA1: ATP binding cassette A1, APOA5: apolipoprotein A5, APOE: apolipoprotein E, CETP: cholesterol ester transfer protein, LIPC: hepatic triglyceride lipase

치는 환경적요인 및 가계에서의 유전적 효과만을 분석한 것이고 haplotype-based full model 또는 SNP-based full model은 본 연구에서 분석한 haplotype과 SNP의 영향을 함께 분석한 것이다. Null model에서 제시된 바와 같이 혈중 지질농도에 따라 차이는 있으나 유전적 영향의 기여도는 총콜레스테롤의 경우 24.7%, HDL-cholesterol은 26.4%, 중성지방은 11.0%, LDL-cholesterol은 35.6%로 모두에서 환경적인 영향이 컸다. 다음으로 혈중 지질농도에 미치는 유전적 영향 중 본 연구에서 분석한 haplotype 또는 SNP이 미치는 효과를 분석하였는데, 환경적인 영향은 null model과 유사하였다. 혈중 총콜레스테롤에 미치는 유전적 영향 중 본 연구에서 분석된 5개 유전자로부터 유래된 haplotype의 설명력은 48.2%, SNP의 영향은 38.5%이었으나 통계적 유의성은 SNP에서만 관찰되었다. HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 역시 SNP에서만 유의한 결과가 관찰되었는데, HDL-cholesterol의 경우 32.2%, LDL-cholesterol의 경우 29.5%였다. 동맥경화지수를 나타내는 LDL-cholesterol/HDL-cholesterol의 비율 (LDL-C/HDL-C)에 미치는 유전적 영향력의 대부분은 분석된 SNP에 의해 설명되었다. 중성지방의 경우 유전적 영향력이 전체 분산의 11.0%로 다른 지질농도에 비해 환경적인 영향력이 큰 것으로 분석되었고, 이 중 분석된 5개 유전자가 차지하는 비중은 96%로 분석되었으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다.

#### 각 유전자의 혈중 지질농도에 미치는 영향

혈중 지질농도에 미치는 각 유전자의 영향력을 분석하기 위하여 대상 유전자를 포함한 경우와 제외한 경우를 비교하여 유의성을 분석하였으며 그 결과는 Table 5에 제시하였다. 총콜레스테롤 농도에는 APOA5 유전자를 제외한 ABCA1 (28.9%), APOE (22.6%), CETP (23.6%), LIPC (20.3%) 유전자가 유의한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. HDL-cholesterol 농도에는 ABCA1, APOA5, APOE 유전자가 관련이 있으며, 이 중 APOE 유전자의 영향이 50.9%로 가장 컸다. LDL-cholesterol에 미치는 영향은 ABCA1, APOE, CETP,

**Table 4.** Partition of phenotypic variance into variance components

Variance component	Null model		Haplotype-based full model			LR test p	$V_{hap}/(V_{hap} + V_{poly})$	SNP-based full model			LR test p	$V_{SNP}/(V_{SNP} + V_{poly})$
	$V_{env}$	$V_{poly}$	$V_{hap}$	$V_{env}$	$V_{poly}$			$V_{SNP}$	$V_{env}$	$V_{poly}$		
TC	0.753	0.247	0.120	0.751	0.128	NS	48.2	0.089	0.768	0.142	<0.001	38.5
HDL-C	0.736	0.264	0.154	0.669	0.176	NS	46.7	0.171	0.469	0.360	<0.001	32.2
lnTG	0.890	0.110	0.155	0.845	0.000	NS	-	0.152	0.848	0.000	0.542	-
LDL-C	0.644	0.356	0.147	0.543	0.309	NS	32.2	0.152	0.485	0.362	<0.001	29.5
LDL-C/HDL-C	0.811	0.189	0.174	0.783	0.043	NS	80.2	0.184	0.808	0.007	<0.001	96.0

$V_{env}$ : environmental variance component,  $V_{poly}$ : polygenic variance component,  $V_{hap}$ : variance component due to haplotype as regressor,  $V_{SNP}$ : variance component due to SNP genotype as regressor. In the 'null model' only  $V_{env}$  and  $V_{poly}$  are estimated. In the 'full model' haplotype or SNP, data are included as fixed effect. Significance of multiple haplotype or SNPs was tested using likelihood ratio test comparing the likelihoods of the 'null model' and 'full model'. TC: total-cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, lnTG: logarithmic value of triglycerides, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C/HDL-C: LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio, LR test: likelihood ratio test

**Table 5.** Locuswise contribution and its significance of SNPs to the genetic variance of lipid profiles

		All SNPs	ABCA1	APOA5	APOE	CETP	LIPC
TC	Estimated	0.089	0.026	0.012	0.020	0.021	0.018
	%		28.9%	12.8%	22.6%	23.6%	20.3%
	Full	-1131.460	-1279.639	-1396.676	-1215.421	-1270.115	-1293.035
	Locus excluded		-1153.690	-1140.845	-1222.853	-1159.825	-1141.721
	LR test		22.229	9.385	91.393	28.364	10.260
	p		<0.001	0.153	<0.001	<0.001	0.036
HDL-C	Estimated	0.171	0.005	0.042	0.087	0.026	0.010
	%		2.6%	24.6%	50.9%	15.0%	5.9%
	Full	-700.329	-794.009	-866.433	-751.337	-794.447	-799.323
	Locus excluded		-713.248	-713.426	-759.835	-709.663	-707.117
	LR test		12.919	13.097	59.507	9.334	6.789
	p		0.024	0.042	<0.001	0.053	0.148
lnTG	Estimated	0.152	0.028	0.068	0.025	0.013	0.034
	%		18.5%	45.0%	16.7%	8.4%	22.3%
	Full	-9.852	-25.937	-21.926	-30.522	-31.785	-26.909
	Locus excluded		-15.230	-16.180	-11.943	-10.761	-14.305
	LR test		5.379	6.328	2.091	0.907	4.454
	p		0.371	0.387	0.836	0.924	0.348
LDL-C	Estimated	0.152	0.022	0.030	0.043	0.015	0.017
	%		14.8%	19.5%	28.2%	9.9%	11.1%
	Full	-878.012	-991.189	-1088.851	-941.215	-994.665	-998.328
	Locus excluded		-898.551	-888.724	-950.530	-891.914	-888.008
	LR test		20.539	10.712	72.518	13.902	9.996
	p		0.001	0.098	<0.001	0.008	0.041
LDL-C/HDL-C	Estimated	0.184	0.020	0.008	0.102	0.024	0.017
	%		11.1%	4.5%	55.3%	13.0%	9.3%
	Full	-1066.568	-1206.208	-1329.000	-1138.851	-1208.950	-1213.721
	Locus excluded		-1089.725	-1074.398	-1161.159	-1084.912	-1079.104
	LR test		23.156	7.830	94.591	18.344	12.536
	p		<0.001	0.251	<0.001	0.001	0.014

QTD procedure was performed to calculate the likelihood of the data under a specified model. The full model contains all variants within all genes as regressors. For the reduced model, variants of the tested gene locus were excluded. SNPs: single nucleotide polymorphisms, ABCA1: ATP binding cassette A1, APOA5: apolipoprotein A5, APOE: apolipoprotein E, CETP: cholesterol ester transfer protein, LIPC: hepatic triglyceride lipase, TC: total-cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, lnTG: logarithmic value of triglycerides, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C/HDL-C: LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio, LR test: likelihood ratio test

LIPC 유전자가 각각 14.8%, 28.2%, 9.9%, 11.1% 이었다. LDL-C/HDL-C에도 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자가 유의한 영향을 미쳤으며 이 중 APOE 유전자가 55.3%로 가장 큰 영향을 미쳤다.

## 고 찰

혈중 지질농도는 여러 유전자 및 환경적인 영향이 복합적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며 따라서, 현재까지의 대부분 연구는 각 유전자내 기능적 SNP의 유전형과 혈중 지질농도의 상관관계 분석을 중심으로 진행되어 왔다. 최근 유전형 분석의 대량화 및 통계적 방법의 개발로 haplotype을 이용한 상관분석이 진행되고 있으며 이는 SNP에 비해 추가적 정보를 제공하고 있으나, 혈중 지질농도의 결정에 어느 정도 영향을 미치는 지에 대한 양적인 정보제공에는 제한이

있어 왔다.

가계를 이용한 혈중 지질농도 관련 연구는 quantitative trait loci (QTL) 분석을 통한 새로운 유전자발굴과 관련되어 많은 연구가 진행되어 왔으나 보고자마다 제시된 관련 유전자좌위에 차이가 있으며 이는 대상군 및 민족에 따른 유전적 영향의 차이 등에 의한 것으로 생각된다.<sup>17-20)</sup>

본 연구는 가계자료에서의 유전형 분석 자료를 이용하여 한국인에서 LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-C/HDL-C, 중성지방에 미치는 각 유전자의 기여도를 SNP 및 haplotype을 이용하여 분석함으로써 특정 지질형질에 유의한 영향을 미치는 유전자를 발굴하고자 하였다. 분석대상 유전자는 기존의 보고들을 통해 혈중 지질농도와 관련이 있는 것으로 알려진 5개 유전자로 하였으며, 이들 내에 존재하는 SNP 중 변이 대립인자의 빈도가 5% 이상인 SNP만 선별하였다. 분석된 SNP 중 인트론에 3개, 엑손에 있으나 아

미노산 합성에는 변화를 주지 않는 synonymous SNP이 2개이었으며 나머지는 프로모터에 존재하거나 유전자발현이나 단백질합성, 혹은 아미노산을 변화시켜 기능적으로 영향이 있을 것으로 추정되는 것이었다.

우선 가계를 대상으로 각 혈중 지질농도에서의 유전적 기여도를 분석한 결과 총콜레스테롤은 24.7%, HDL-cholesterol은 26.4%, 중성지방은 11.0%, LDL-cholesterol은 35.6%이었다. 기존의 보고들에 의하면 유전율은 지질 분획에 따라 다소 차이가 있으나 40~60%로 보고하였는데,<sup>3)11)21)</sup> 본 연구결과는 QTDT를 이용하여 혈중 지질농도의 분산에서 유전적 기여도를 분석한 것으로 기존의 유전율과는 차이를 보였다. QTDT를 이용한 다른 연구자의 유전적 기여도 분석 결과는 본 연구와 큰 차이를 보이지 않았다.<sup>22)</sup>

본 연구에서 분석한 유전자를 대상으로 혈중 지질농도에 미치는 영향을 분석한 결과 총콜레스테롤, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, LDL-C/HDL-C 모두에서 SNP에 의해서는 유의한 영향이 있는 것으로 분석되었으나 haplotype에 의해서는 통계적으로 유의한 결과가 나오지 않았다 (Table 4). 이러한 결과의 원인으로 본 연구에서는 단순한 유전표지자라기보다는 대부분 기능에 영향을 미칠 수 있는 SNP을 선별하였기 때문일 가능성이 높다. 일반적으로 유전적 성향을 분석하기 위해 유전표지자들로 구성된 haplotype을 이용하나 이는 기능적 SNP과의 연관성을 분석할 때 주로 활용한다. 최근 haplotype과 SNP과의 상대적 유용성에 대한 연구가 진행되었는데, 기능적으로 영향을 미치는 SNP의 경우 haplotype보다 분석결과에서 유의성이 높다고 보고된 바 있다.<sup>23)24)</sup> 따라서 본 연구에서는 기능적 SNP의 영향력이 우선 설명되었고, haplotype의 경우 기능적 SNP이 여러 haplotype으로 나누어 분석되었기 때문에 오히려 설명력의 유의성이 낮았던 것으로 추정된다.

한편, 지질농도의 유전적 영향 중 본 연구에서 분석한 5개 유전자 (ABCA1, APOA5, APOE, CETP, LIPC)가 차지하는 비중은 총콜레스테롤 38.5%, HDL-cholesterol 32.2%, LDL-cholesterol 29.5%로 전체 설명력의 1/3 수준이었다. 이는 위에서 분석한 5개 유전자 외 지질 농도에 영향을 미치는 다른 유전자가 존재함을 시사하는데 lipoprotein lipase, LDL receptor, apolipoprotein B, apolipoprotein A1, APOA1/C3/A4 gene cluster 등 지질대사 관련 유전자의 역할에 대한 추가분석과 더불어 새롭게 발굴되는 유전자에 대한 향후 분석이 필요하다.

중성지방의 경우 SNP과 haplotype 모두에서 유의한 영향력이 없는 것으로 추정되었는데 여러 상관분석에서 APOA5 유전자내 프로모터의 유전자변이가 중성지방 농도와 차이를 보인 것과는 다른 결과이다.<sup>9)25)26)</sup> 아마도 중성지방의 농도가 개인에 따라 상당한 차이를 보이고, 개인에서도 측정 시기에 따라 차이를 보이는 것을 고려할 때 본 연구대상에서 서로 연령층이 상이한 가계 내에서의 유전적 성향을 분

석하였기 때문에 그 영향이 과소평가되었을 가능성이 있다.

다음으로 각 유전자를 포함한 경우와 제외한 경우에서의 유전적 설명력의 차이를 비교함으로써 혈중 지질농도에 미치는 각 유전자의 영향력을 분석한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 총콜레스테롤 농도에는 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자가 관련되었으나 APOA5의 경우는 관련성이 없었다. 기존의 여러 보고에서도 APOA5 유전자다형성의 경우 혈중 콜레스테롤 농도와는 관련이 없는 것으로 분석되었다.<sup>9)25)27)</sup> HDL-cholesterol의 경우 APOE가 50.8%로 가장 유의한 영향을 미쳤으며, APOA5는 24.6%, ABCA1의 경우 영향력이 2.6%에 불과하였다. 기존에 HDL-cholesterol 농도와 관련이 있는 것으로 널리 알려진 CETP의 경우 설명력이 15.0%였으나 통계적으로 유의성은 높지 않았는데 ( $p=0.053$ ), 실제 한국인에서 CETP 유전자가 미치는 영향에 대해 대규모 상관분석이 필요할 것으로 생각된다. LIPC 유전자의 경우에도 이전의 연구에서 유전적 영향이 50% 이상인 것으로 보고하였으나 본 연구에서는 유의적 관계가 관찰되지 않았다.<sup>22)</sup> 이는 연구자 등이 한국인에서 상관관계 분석에서도 혈중 HDL-cholesterol과 LIPC 프로모터 내 유전자변이와는 관련이 없었던 결과 (unpublished data)와 일치한다. LDL-cholesterol의 경우 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자가 관련된 것으로 분석되었으며 이는 총콜레스테롤과 유사한 결과이다. ABCA1 유전자의 경우 기존의 보고에 의하면 혈중 HDL-cholesterol과 관련성이 높은 것으로 보고되었으나 본 연구에서는 총콜레스테롤, LDL-cholesterol에 영향을 미치는 것으로 분석되었다.<sup>3)28)</sup> 대부분의 상관연구에서 ABCA1 유전자는 이들 지질 분획과는 관련성이 낮은 것으로 보고되어 향후 더 많은 가계를 대상으로 하거나 상관분석을 이용하여 실제 한국인에서 지질농도의 결정에 영향을 미치는지에 대한 분석이 필요하다. LDL-C/HDL-C에는 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자 모두 유의한 영향을 미쳤는데, 이는 설명력의 정도에 다소 차이는 있으나 기존의 보고와 유사하며 APOE의 설명력이 55.3%로 가장 높았다.<sup>22)</sup> APOE 유전자의 경우 상관분석에서 혈중 콜레스테롤과의 관련성이 보고되었을 뿐 아니라, 가계자료 분석에서 총콜레스테롤, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, LDL-C/HDL-C과 유의한 연관성이 보고된 바 있으며, 이는 본 연구결과와 일치하는 것이다.<sup>29)</sup>

이상의 결과에서 한국인에서 혈중 지질농도의 결정에 유전적 영향이 관여하며, 본 연구에서 분석된 5개 유전자가 혈중 총콜레스테롤, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol의 농도결정에 중요한 역할을 함을 알 수 있었고, 이와 더불어 혈중 지질농도의 결정에 본 연구에서 분석되지 않은 다른 유전자의 존재가능성을 제시하였다.

본 연구의 제한점으로는 분석된 가계수가 적어 보다 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 없었다는 점이다. 이는 심혈관계질환유전체연구를 위해 수집된 가계 중 혈중 지질농도에

영향을 미칠 수 있는 질환이나 약제를 투여 받는 환자들을 배제하였기 때문인데, 특히 haplotype 분석을 위해서는 보다 많은 가계를 대상으로 한 분석이 필요하다. 그리고 가계를 이용한 자료에서는 유전자의 양적기여도 및 이에 미치는 영향에 대한 분석 결과는 얻을 수 있으나 각 유전형에 따른 혈중 지질농도의 예측치는 얻기 어렵기 때문에 유사한 인구집단 (population)에서의 상관분석 결과와의 비교분석이 필요하다.

또한 본 연구결과는 추후 국내 다른 가계집단 혹은 쌍둥이 코호트 등 유전율을 예측할 수 있는 집단에서의 결과와 비교분석이 필요하다. 그리고 본 연구는 혈중 지질농도와 관련된 유전자 중 5개를 우선 선별하여 분석한 결과로 apolipoprotein B, LDL receptor 등 지질대사 관련 다른 유전자들의 영향에 대한 전반적인 분석이 되지 못하였으므로 향후 대상군의 확대와 더불어 보다 다양한 유전자를 동시에 분석한 결과에 대한 연구가 필요하다.

한국인에서 지질농도에 미치는 여러 유전자의 상관분석 결과는 많이 보고되었으나, 본 연구와 같이 가계자료를 바탕으로 QTDT를 이용하여 혈중 지질농도의 유전적 영향 및 특정 유전자의 유전적기여도를 분석한 연구는 현재까지 보고된 바가 없다. 특히 여러 유전자를 동시에 분석하여 상호 기여도의 차이를 분석한 결과는 보고된 바가 없어 본 연구결과는 한국인에서 각 지질농도의 양적형질 결정에 미치는 유전적 영향에 대한 정보와 더불어 이들 유전자들로 설명되지 않은 다른 유전자의 효과에 대한 정보를 제공함으로써 향후 관련 연구의 중요한 자료로 제시될 수 있을 것으로 기대한다.

결론적으로 가계자료에서 QTDT분석을 이용하여 지질대사 관련 유전자내 유전자 다형성이 혈중 지질농도의 결정에 미치는 영향력을 분석한 결과 본 연구에서 분석한 5개 유전자는 총콜레스테롤, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-C/HDL-C에 유의한 영향을 미쳤다. 그러나 유전적으로 결정되는 지질농도의 일부분만이 분석된 SNP에 의해 설명되었으며, 이는 지질농도에 미치는 다른 유전자의 존재 또는 분석된 유전자내 다른 기능적 SNP의 존재가 가능성을 시사한다.

## 요 약

### 배경 및 목적

혈중 지질농도는 여러 유전자의 영향 및 이들과 환경적인 영향이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있는데, 현재까지 지질대사 관련 유전자와 혈중 지질농도와의 상관관계에 대해서는 많은 보고가 있으나 양적 형질에 미치는 유전자의 기여도에 대한 보고는 적다. 본 연구는 가계자료에서 혈중 지질농도와 관련이 있는 것으로 분석된 유전자내 SNP 및 이로 구성된 haplotype을 이용하여 각 유전자의 혈중 지질농도 variance에 미치는 영향을 분석함으로써 각 혈중 지질농도의 결

정에 유의한 영향을 미치는 유전자를 발굴하고자 하였다.

### 방 법

부모-자녀간 구성에서 자녀가 18세 이상인 100가계 383명 (남자 197명, 여자 186명)을 대상으로 하였으며 가계당 구성원 수는 최소 3명 최대 23명으로 평균  $4.05 \pm 2.14$ 명이었다. ABCA1, APOA5, APOE, CETP, LIPC 5개 유전자 내 SNP 유전형의 분석은 단일염기확장 방법인 Orchid's SNP-IT™ technology를 이용하였다. 통계분석은 QTDT 프로그램을 이용하였다.

### 결 과

연구대상 가계에서 혈중 지질농도에 미치는 유전적기여도를 분석한 결과 총콜레스테롤은 24.7%, HDL-cholesterol은 26.4%, 중성지방은 11.0%, LDL-cholesterol은 35.6%이었다. 5개 지질대사 관련 유전자로부터 추정된 haplotype은 혈중 지질농도에 통계적으로 유의한 영향을 미치지 못하는 것으로 분석되었다. 지질농도에 미치는 유전적 영향 중 분석된 5개 유전자내 SNP의 효과를 분석한 결과 총콜레스테롤, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 LDL-C/HDL-C에 미치는 영향이 38.5%, 32.2%, 29.5%, 96.0%로 분석되었다.

혈중 지질농도에 미치는 각 유전자의 영향력을 분석한 결과 총콜레스테롤 농도에는 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자, HDL-cholesterol 농도에는 ABCA1, APOA5, APOE 유전자, LDL-cholesterol에는 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자가 유의한 영향을 미쳤다. 한편, LDL-C/HDL-C은 ABCA1, APOE, CETP, LIPC 유전자가 영향을 미쳤으며 이 중 APOE 유전자가 55.3%로 가장 큰 영향을 미쳤다.

### 결 론

가계자료에서 QTDT분석을 이용하여 지질대사 관련 유전자내 유전자 다형성이 혈중 지질농도의 결정에 미치는 영향력을 분석한 결과 5개 유전자는 총콜레스테롤, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-C/HDL-C에 유의한 영향을 미쳤다. 그러나 유전적으로 결정되는 지질농도의 일부분만이 분석된 SNP에 의해 설명되었으며, 이는 지질농도에 미치는 다른 유전자의 존재 또는 분석된 유전자내 다른 기능적 SNP가 존재함을 시사한다.

**중심 단어:** 혈중 지질농도; 유전자다형성.

### Acknowledgments

본 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (E00059). 유전체분석은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업으로 지원된 심혈관계질환유전체연구센터 (A000385)에 수집된 시료를 활용하였음.

### REFERENCES

- 1) Tai ES, Tan CE. *Genes, diet and serum lipid concentrations: lessons from ethnically diverse populations and their relevance to coronary heart disease in Asia. Curr Opin Lipidol* 2004;15:5-12.
- 2) Vincent S, Planells R, Defoort C, et al. *Genetic polymorphisms*

- and lipoprotein responses to diets. *Proc Nutr Soc* 2002;61:427-34.
- 3) Sviridov D, Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:157-63.
  - 4) Park KW, Choi JH, Kim HK, et al. The association of cholesteryl ester transfer protein polymorphism with high-density lipoprotein cholesterol and coronary artery disease in Koreans. *Clin Genet* 2003;63:31-8.
  - 5) Shin MH, Kim HN, Cui LH, et al. The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *J Korean Med Sci* 2005;20:361-6.
  - 6) Ko YK, Cho EY, Park HY, Jang Y, Kim S, Lee JE. Association of R219K polymorphism in the ABCA1 gene with plasma lipid levels and coronary artery disease in Koreans. *Korean Circ J* 2003;33:44-51.
  - 7) Park KW, Chae IH, Choi JH, et al. The relationship of the C-514T polymorphism of the human hepatic lipase gene promoter with plasma HDL-C concentrations in Koreans. *Korean Circ J* 2002;32:25-30.
  - 8) Park JS, Oh SJ, Kim KS, Ahn SH, Kim YK. Effect of diet and apolipoprotein E (Apo E) polymorphism on the variation of serum lipid profile in Korean males. *Korean Circ J* 1999;29:266-75.
  - 9) Jang Y, Kim JY, Kim OY, et al. The -1131T→C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriglycerolemia: elevated small, dense LDL concentrations and oxidative stress in nonobese Korean men. *Am J Clin Nutr* 2004;80:832-40.
  - 10) Hunt SC, Hasstedt SJ, Kuida H, Stults BM, Hopkins PN, Williams RR. Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins. *Am J Epidemiol* 1989;129:625-38.
  - 11) Perusse L, Rice T, Despres JP, et al. Familial resemblance of plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipoprotein and hepatic lipases in the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3263-9.
  - 12) Chen TJ, Ji CY, Pang ZC, Wang SJ, Hu YH, Qin Y. Heritability of serum lipids and lipoproteins and its related factors in twins aged 5 to 19 years of China. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2004;38:237-9.
  - 13) Rohde K, Fuerst R. Haplotyping and estimation of haplotype frequencies for closely linked biallelic multilocus genetic phenotypes including nuclear family information. *Hum Mutat* 2001;17:289-95.
  - 14) Abecasis GR, Cookson WO, Cardon LR. Pedigree tests of transmission disequilibrium. *Eur J Hum Genet* 2000;8:545-51.
  - 15) Abecasis GR, Cardon LR, Cookson WO. A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am J Hum Genet* 2000;66:279-92.
  - 16) Fulker DW, Cherny SS, Sham PC, Hewitt JK. Combined linkage and association sib-pair analysis for quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1999;64:259-67.
  - 17) Feitosa ME, Rice T, Borecki IB, et al. Pleiotropic QTL on chromosome 12q23-q24 influences triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol levels. *Hum Biol* 2006;78:317-27.
  - 18) Hsiao CF, Chiu YF, Chiang FT, et al. Genome-wide linkage analysis of lipids in nondiabetic Chinese and Japanese from the SAPHIRE family study. *Am J Hypertens* 2006;19:1270-7.
  - 19) Lin JP. Genome-wide scan on plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol levels, accounting for the effects of correlated quantitative phenotypes. *BMC Genet* 2003;4 (Suppl 1):S47.
  - 20) Shah SH, Kraus WE, Crossman DC, et al. Serum lipids in the GENECARD study of coronary artery disease identify quantitative trait loci and phenotypic subsets on chromosomes 3q and 5q. *Ann Hum Genet* 2006;70:738-48.
  - 21) Knoblauch H, Busjahn A, Munter S, et al. Heritability analysis of lipids and three gene loci in twins link the macrophage scavenger receptor to HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2054-60.
  - 22) Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, et al. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet* 2004;13:993-1004.
  - 23) Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol* 2004;27:321-33.
  - 24) Bader JS. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests. *Pharmacogenomics* 2001;2:11-24.
  - 25) Lee KW, Ayyobi AF, Frohlich JJ, Hill JS. APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FE-RHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;176:165-72.
  - 26) Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* 2002;11:3031-8.
  - 27) Talmud PJ, Martin S, Taskinen MR, et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease. *J Lipid Res* 2004;45:750-6.
  - 28) Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1322-32.
  - 29) Knoblauch H, Bauerfeind A, Krahenbuhl C, et al. Common haplotypes in five genes influence genetic variance of LDL and HDL cholesterol in the general population. *Hum Mol Genet* 2002;11:1477-85.