

제2형 당뇨병환자에서 관상동맥석회 점수와 Matrix Metalloproteinase-3 유전자다형성과의 연관성

강원대학교 의학전문대학원 내과

김상욱 · 조은희

Matrix Metalloproteinase-3 Gene Polymorphism is Associated with Coronary Artery Calcification Scores in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Sang-Wook Kim, Eun Hee Cho

Department of Internal Medicine, Kangwon National University School of Medicine, Chuncheon, Korea

Abstract

Background: Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and is known to be involved in the degradation of plaque. This study examines the association of MMP-3 gene promoter 5A/6A and -709A>G polymorphisms with coronary artery calcium scores in type 2 diabetes patients.

Methods: The study comprises 140 type 2 diabetes patients aged 34~85 years, who showed no evidence of clinical cardiovascular disease before recruitment. Recruitment was based on patient's coronary artery calcium (CAC) scores and polymorphisms were identified.

Results: Multiple regression analysis showed that the CAC scores were significantly associated with age ($P = 0.008$), waist circumference ($P = 0.03$), duration of diabetes ($P = 0.003$) and the serum creatinine level ($P = 0.012$). MMP-3 5A/6A and -709A>G polymorphisms were not associated with CAC across all subjects. However, in the subgroup with a duration of diabetes over 10 years, MMP-3 -709A>G were significantly associated with CAC ($P = 0.037$) adjusted for age, body mass index, waist circumference and duration of diabetes.

Conclusion: Our data suggest that the CAC scores in patients with type 2 diabetes were related with age, waist circumference, duration of diabetes and higher serum creatinine levels. MMP-3 polymorphisms with -709A>G are associated with high CAC in patients with a duration of diabetes over 10 years. (Korean Diabetes J 33:113-123, 2009)

Key words: Coronary vessels, Genetic polymorphism, Matrix metalloproteinase 3, Calcinosi

서론

죽상판은 콜라겐과 같은 기질단백질, 평활근세포, 대식세포, 지질 등으로 구성되어 있는데 콜라겐과 평활근세포가

풍부한 섬유형 죽상판(fibrotic plaque)은 혈관 협착을 잘 일으키는데 반해 지질이 풍부한 죽상판(lipid-rich plaque)은 쉽게 파열되고 파열과 함께 혈전이 형성되어 급성 심근경색을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 죽상판을 구성하는 성분

접수일자: 2009 3월 10일, 통과일자: 2009년 4월 13일

교신저자: 김상욱, 강원대학교 의학전문대학원 내과, E-mail: exoplanet@kangwon.ac.kr

은 개인마다 달라서 섬유형 죽상판인지 지질형 죽상판인지에 따라 죽상경화증의 임상 양상이 다르게 나타난다. 죽상판을 구성하는 기질단백질의 양은 생성과 분해의 균형에 따라 결정되는데 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 기질단백질인 콜라젠과 젤라틴 분해 활성을 지닌 단백질분해효소이다. 이 효소는 섬유형 죽상판 보다 지질형의 죽상판에서 더 높게 발현되는 것으로 알려져 있는데 단백질분해효소의 작용으로 교원 원섬유(collagen fibrils)가 분해되면 죽상판의 안정성이나 내피세포 기저막의 보전성을 약화시키므로 죽상판의 파열에 영향을 주는 것으로 알려져 있다^{2,3)}.

여러 기질금속단백분해효소 중에서 MMP-3 (matrix metalloproteinase-3)는 죽상판에서 발견될 뿐만 아니라⁴⁾, 여러 종류의 기질단백질에 대해 폭넓은 선택성을 보이며 다른 MMP들을 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. ApoE 유전자를 결손 시킨 생쥐에서 MMP-3 유전자를 비활성화 시키면 죽상판의 크기가 커지고 기질단백질의 양도 증가하는 것이 보고되어 있어⁶⁾ MMP-3 유전자는 죽상경화증과 연관되어 있을 것으로 생각되고 있다. 사람에서 MMP-3 유전자 프로모터 부위의 5A/6A 유전자다형성은 기능을 가지고 있는 다형성으로 5A 대립인자를 가진 경우 프로모터 활성도가 증가하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 몇몇 연구에서는 6A 대립인자가 관상동맥 죽상경화증의 급격한 진행과 연관되어 있다는 보고가 있는데^{7,8)}, 이는 MMP-3 유전자의 활성이 저하됨에 따라 죽상판에 기질단백질의 축적이 더 많이 일어나기 때문으로 설명하고 있다. MMP-3 유전자 프로모터 부위에 존재하는 또 다른 유전자다형성인 -709A>G 유전자다형성은 Pima 인디언을 대상으로 한 연구에서 비만 및 제2형 당뇨병과 연관이 있음이 보고된 바 있고⁹⁾, MMP-3 -709A>G 유전자다형성과 심혈관질환과의 연관성을 살펴본 연구로는 Kaplan 등이 A 대립인자가 포함된 일배체형에서 심근경색과 뇌졸중의 위험도가 감소하였다고 보고하였다¹⁰⁾.

한편 MMP-3는 골 형성과 골 흡수, 그리고 골이나 연골 질환과도 관계가 있는 것으로 알려져 있는데¹¹⁾, 이는 MMP-3가 기질단백질에 대해 영향을 미칠 뿐만 아니라 골 형성과 유사한 과정으로 알려진 혈관 석회화에도 관여하여¹²⁾ 죽상판의 성격에 영향을 줄 것으로 생각되고 있다. Helsinki Sudden Death Study에서는 MMP-3 5A/6A 유전자 다형성이 관상동맥 혈관석회화와 관련이 있어서 프로모터 활성이 증가되는 5A 대립인자를 가진 경우 관상동맥의 석회화가 높게 나타났다고 하였다¹³⁾.

본 연구는 위와 같은 배경에서 제2형 당뇨병환자에서 흔

히 발생하는 죽상경화증에 MMP-3 유전자다형성이 관여할 것이라는 가설을 세우고 이를 검증하기 위하여 심혈관 무증상 제2형 당뇨병환자를 대상으로 다검출 나선형 CT (Multi-detector spiral CT, MDCT)를 이용하여 관상동맥석회 점수(coronary artery calcification score, CACs)를 정량하고 MMP-3 유전자의 프로모터에 위치하는 5A/6A, -709A>G 유전자다형성과의 상관관계를 분석하는 연관성 연구(association study)를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2007년 3월부터 동년 7월까지 강원대학교병원 내분비내과 외래를 방문한 제2형 당뇨병환자에서 연구의 목적과 과정에 대해 설명을 듣고 연구에 참여할 것을 동의한 150명의 환자를 대상으로 연구를 시행하였다. 제2형 당뇨병의 진단은 1997년에 제정된 미국당뇨병학회의 진단기준에 따랐으며 연구 참여 당시 30세 이상이며 당뇨병으로 진단된지 1년 이상 경과한 경우로 하였다. 진단 당시부터 인슐린을 사용하였거나 케톤산혈증의 병력이 있는 경우는 제외하였으며, 전형적인 허혈성 심질환의 증상이 있거나 과거에 심혈관조영술 또는 심혈관 중재술을 받은 경우는 연구에서 제외하였다. 만성 간질환이나 혈청 크레아티닌(creatinine, Cr)이 2.0 mg/dL 이상의 만성신장질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 만성 관절염 등의 만성 질환이 동반된 경우, 갑상선기능항진증, 갑상선기능저하증, 쿠싱증후군 등과 같은 내분비질환이 동반된 경우도 연구에서 제외하였다.

본 연구는 강원대학교병원 기관윤리위원회(IRB)의 승인을 받았으며 150명의 환자가 본 연구에 동의하였고 이들로부터 문서화된 동의서를 받았다. 이들 중 연구 참여에 동의하였으나 검사를 받지 않은 8명과 연구 종결 후에 갑상선기능저하증과 특발성 부갑상선기능저하증이 확인된 2명을 제외한 140명의 환자를 대상으로 결과를 분석하였다.

2. 연구 방법

모든 환자에서 문진 및 신체검사를 시행하였고 의무기록지를 조사하였다. 심혈관질환 유무, 흡연력, 당뇨병의 유병기간을 조사하였고, 신장과 체중을 측정하여 체질량지수를 구하였다. 대상자의 허리둘레는 직립자세에서 늑골 하연과 장골 능선 사이의 가장 넓은 둘레를 측정하였으며 환자의 혈압은 자동화된 혈압 측정기(Omrom, HEM-780)를 이용하여 안정 상태에서 5분 간격으로 2회 측정하고 평균값을

분석에 이용하였다. 관상동맥석회 점수는 전산화단층촬영 장비(MSCT, LightSpeed Plus, GE Medical Systems, Milwaukee)를 이용하여 면적과 부피 모두를 측정하였으며 이 중 부피로 측정한 값을 통계처리에 이용하였다. CT 촬영 시 정보 수집 조건(data acquisition parameter)은 이 전의 논문¹⁴⁾에서 보고된 바와 같다.

혈액 채취는 8시간 이상 공복 후 시행하였고 일반화학검사, 혈청 지질검사, 미세알부민뇨, hs-CRP (high sensitivity C-reactive protein) 검사를 시행하였다. hs-CRP는 최하 0.01 mg/dL까지 검출할 수 있는 Latex agglutination법(Denka, Tokyo, Japan)으로 측정하였는데 환자가 측정 1개월 이전에 급성 염증성질환에 이환된 경우 결과 분석에서 제외하였다.

3. 유전자형 분석

연구 대상자의 정맥 혈액에서 연층막을 분리하여 섭씨 영하 80℃에 보관 중인 샘플을 DNA purification kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 본 연구에서 선택한 MMP-3 유전자 다형성 부위 중 5A/6A 유전자다형성의 분석은 Applied Biosystems사(California, USA)의 3730xl DNA analyzer를 이용하여 직접 서열하는 방법을 사용하여 유전자형을 결정하였다. MMP-3 유전자 -709A>G 유전자 다형성의 유전자형 분석은 real-time PCR 시스템을 이용하였는데 상업화된 5' nuclease assay 방법을 이용하여 유전자형을 분석하였다. 분석을 위한 primer와 probe는 TaqMan[®]에 적합하게 제작하였고 하나의 대립유전자는 FAM dye로 다른 대립유전자는 형광을 띤 VIC dye로 표지하였다. 7300 real-time PCR 시스템(Applied Biosystems, CA)을 사용하여 fluorescence intensity를 측정하고 자동화된 소프트웨어를 이용하여 유전자형을 결정하였다.

4. 통계분석

1) 관상동맥석회 점수와 임상 지표와의 상관관계 분석

모든 측정값은 평균 \pm 표준편차 또는 중앙값과 범위로 표시하였다. 관상동맥석회 점수, 중성지방(triglycerides), hs-CRP, 미세알부민뇨(microalbuminuria)는 비정규 분포를 보이므로 로그 변환하여 분석하였다. 이 과정에서 관상동맥석회 점수가 0인 경우 로그 변환을 시행하면 결측치로 처리되어 분석에서 누락되므로, CACs에 1을 더한 값을 로그 변환하여 통계 분석에 이용하였다.

관상동맥석회 점수와 혈압, 칼슘, 인, Ca \times P, 지질, 혈청 Cr 등 여러 변수들 간의 상관관계는 Pearson 상관분석을 이용하여 알아보았다. 다변량 회귀분석은 관상동맥석회 점수

를 종속변수로 연령, 체질량지수, 당뇨병 유병기간, 허리둘레, 혈청 Cr을 독립변수로 하여 분석하였으며 입력 선택방법(enter selection method)을 사용하였다.

2) 유전자형에 따른 관상동맥석회 점수와 연관성 분석

유전자형 분석에서 각 유전자의 대립유전자 빈도가 Hardy-Weinberg 평형을 따르는지 알아보기 위해 χ^2 검정을 하였다. 각 유전자형과 관상동맥석회 점수 사이에 연관성이 존재하는지를 보기 위하여 나이, 체질량지수, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간을 공변수로 하여 보정한 다중회귀분석을 시행하여 분석하였다. 유전자형이 당뇨병의 유병기간이나 혈청 Cr 농도, 성별에 따라 다른 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 하위군 분석을 함께 시행하였다. 하위군 분석에서 당뇨병의 유병기간에 따른 통계 처리는 대상자의 평균 유병기간을 전후하여 10년 미만과 10년 이상으로 나누어 분석하였다. 모든 분석에서 유전형은 상호우성모델(codominant model), 우성 모델(dominant model) 또는 열성 모델(recessive model)의 가정 아래 각각에서 표현형과의 연관성을 보았다.

2개의 유전자다형성 사이에서 Lewontin's D'와 연관불평형계수(linkage coefficient, r^2)를 구하였고 일배체형 분석은 Stephens 등이 제안한 Bayesian 접근방법¹⁵⁾을 이용한 PHASE 알고리즘을 통해 일배체형을 구성하였다. 일배체형 분석에서도 나이, 체질량지수, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간을 공변수로 하여 보정한 다중회귀분석을 통해 관상동맥석회 점수와 연관성을 검증하였다. 통계처리는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., IL) 소프트웨어를 사용하였고, 모든 통계치는 양측 검정으로 P value가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 연구대상자들의 임상적 특성과 관상동맥석회 점수와의 상관관계

대상자의 나이는 평균 62.1 ± 8.2 세였으며, 당뇨병의 유병기간은 평균 9.4 ± 7.1 년이었다. 체중을 키의 제곱으로 나눈 체질량지수(body mass index, BMI)는 25.3 ± 3.0 kg/m²이었으며 평균 허리둘레는 89.0 ± 7.4 cm이었다. 대상환자 140명 중 94명(67%)에서 혈관석회화가 관찰되었고, 혈관석회화 점수가 0인 경우는 46명(33%)이었다. 관상동맥석회 점수는 중앙값이 16.5 AU (Agatston Unit)이었다. 자세한 대상자들의 특성은 표로 나타내었다(Table 1).

Table 1. Baseline characteristics of the study subjects

N	140
Sex (M/F)	80/60
Age (years)	62.1 ± 8.2
Duration of diabetes (years)	9.4 ± 7.1
Smoking (%)	
Non-smoker	76 (54.3%)
Ex-smoker	24 (17.1%)
Current smoker	40 (28.6%)
BMI (kg/m ²)	25.3 ± 3.0
Waist (cm)	89.0 ± 7.4
Systolic BP (mm Hg)	132 ± 16
Diastolic BP (mm Hg)	79 ± 9
Pulse pressure (mm Hg)	53 ± 13
FBS (mg/dL)	139 ± 34
HbA1c (%)	7.3 ± 1.1
Albumin-adjusted calcium (mg/dL)	9.3 ± 0.3
Phosphorus (mg/dL)	3.6 ± 0.6
Ca × P (mg ² /dL ²)	33.0 ± 5.5
hs-CRP* (mg/dL)	0.08 (0.04, 0.19)
Serum creatinine (mg/dL)	1.0 ± 0.2
Microalbuminuria* (mg/g creatinine)	14.8 (7.0, 31.2)
Total cholesterol (mg/dL)	181 ± 31
Triglyceride (mg/dL)	147 ± 79
HDL-cholesterol (mg/dL)	47 ± 10
LDL-cholesterol (mg/dL)	109 ± 27
CAC scores* (AU)	16.5 (0, 128.8)

* Median and interquartile ranges of hs-CRP, microalbumin, CAC scores. BMI, body mass index; BP, blood pressure; Ca × P, calcium phosphorus product; FBS, fasting blood sugar; HbA1c, hemoglobin A1c; HDL, high density lipoprotein; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein.

관상동맥석회 점수와 여러 변수들 간의 상관관계를 보았을 때 연령($r = 0.36$, $P < 0.05$), 허리둘레($r = 0.28$, $P < 0.05$), 당뇨병의 유병기간($r = 0.31$, $P < 0.05$), 혈청 크레아티닌($r = 0.25$, $P < 0.05$)이 유의한 양의 상관관계를 보였다 (Table 2). 저밀도 지단백 콜레스테롤(low density lipoprotein, LDL)이나 hs-CRP, HbA1c, 미세알부민뇨는 관상동맥석회 점수와 유의한 관계를 보이지 않았다.

이상의 상관분석 결과에서 유의하게 나타난 변수인 연령, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간, 혈청 크레아티닌을 독립변수로 하고 관상동맥석회 점수를 종속변수로 시행한 다변량 회귀분석에서는 연령($P = 0.008$), 허리둘레($P = 0.003$), 당뇨병의 유병기간($P = 0.003$), 혈청 크레아티닌($P = 0.012$) 모두 유의한 독립변수로 나타났다 (Table 3).

2. 유전자형에 따른 관상동맥석회 점수와 연관성

MMP-3 유전자에서 선택한 유전자다형성 부위는 5'UTR

부위의 5A/6A와 -709A>G이었다. 유전자형의 분포는 Table 4에 나타난 바와 같다. 대상자 전체에서 나이, 체질량지수, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간을 보정하여 시행한 회귀분석에서 각각의 유전자형과 관상동맥석회 점수와의 유의한 차이가 없었다 (Table 5). 당뇨병의 유병기간이 10년 이상인 하위군을 대상으로 시행한 분석에서 MMP-3 5A/6A 유전자 다형성은 관상동맥석회 점수와 연관성이 없었으나 MMP-3 -709A>G 유전자 다형성이 관상동맥석회 점수와 유의한 연관성을 나타내었다 (Table 6, codominant model, $P = 0.037$, recessive model, $P = 0.011$). Fig. 1은 당뇨병의 유병기간에 따라 전체 대상자를 10년 미만과 10년 이상의 두 군으로 나누고 MMP-3 -709A>G 유전자형에 따라 관상동맥석회 점수를 도식화한 것으로 당뇨병의 유병기간이 10년 이상인 경우 관상동맥석회 점수가 GG 유전자형에서 AA형이나 AG형과 비교하여 유의하게 높게 나타났다.

Table 2. Pearson correlation analysis between the coronary artery calcification score* and the clinical and biochemical variables

Variable	Correlation Coefficient	P value
Age (years)	0.36	< 0.05
Systolic BP	0.15	NS
Diastolic BP	-0.02	NS
Waist circumference	0.28	< 0.05
BMI	0.11	NS
Duration of diabetes	0.31	< 0.05
FBS	0.01	NS
HbA1c	0.07	NS
Calcium	0.03	NS
Phosphorus	0	NS
Ca × P	0.01	NS
hs-CRP	0.03	NS
Serum creatinine	0.25	< 0.05
Microalbuminuria	0.12	NS
Total cholesterol	-0.05	NS
Triglycerides	-0.05	NS
HDL Cholesterol	-0.12	NS

* Log (CACs + 1). BMI, body mass index; BP, blood pressure; Ca × P, calcium phosphorus product; FBS, fasting blood sugar; HbA1c, hemoglobin A1c; HDL, high density lipoprotein; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein.

Table 3. Variables predictive of determining the coronary artery calcification (CAC) score using multiple linear regression analysis with the coronary artery calcium score as dependent variable

	Unstandardized Coefficients		Standardized coefficients	P value
	B	Standard error	Beta	
Age (years)	0.03	0.010	0.215	0.008
Waist circumference	0.03	0.011	0.229	0.003
Duration of diabetes	0.04	0.011	0.236	0.003
Serum creatinine	1.07	0.417	0.192	0.012

Dependent variable: Log (CACs + 1), independent variable: age, waist circumference, duration of diabetes, serum creatinine.

Table 4. Frequencies of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene polymorphisms in the study subjects (n = 140)

Gene	SNP	rs number	Location in gene	Protein coding	Genotype frequency				Minor allele frequency	HWE*
MMP-3	5A/6A	rs3025058	5' UTR	—	6A6A	6A5A	5A5A	N	0.132	0.567
					104	35	1	140		
	-709A>G	rs522616	5' UTR	—	AA	AG	GG	N	0.429	0.644
					46	67	26	140		

* P values of deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium. HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium; 5' UTR, 5' untranslated region.

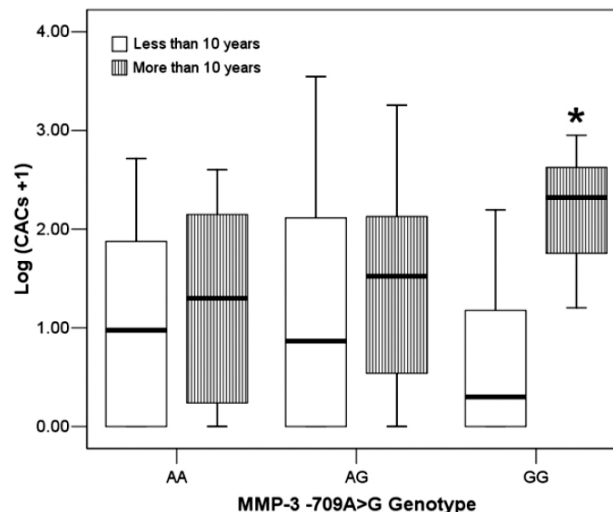
Table 5. Regression analysis of coronary artery calcification score (CACs) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene polymorphisms for all study subjects (n = 140) controlling for age, body mass index, waist circumference and duration of diabetes

Gene	SNP	Genotype	N	Log (CACs + 1)	P value*		
					Additive	Dominant	Recessive
MMP-3	5A/6A	6A/6A	104	1.24 ± 1.07	0.280	-	-
		6A/5A	35	1.24 ± 1.05			
		5A/5A	1	0			
	-709A>G	AA	46	1.14 ± 0.99	0.335	0.489	0.145
		AG	67	1.24 ± 1.10			
		GG	26	1.38 ± 1.04			

* P values of additive, dominant and recessive models.

Table 6. Regression analysis of coronary artery calcification score (CACs) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene polymorphisms for study subjects (n = 65) with the duration of diabetes over 10 years controlling for age, body mass index, waist circumference and duration of diabetes

Gene	SNP	Genotype	N	Log (CACs + 1)	P value*		
					Additive	Dominant	Recessive
MMP-3	-709A>G	AA	19	1.27 ± 1.00	0.037	0.336	0.011
		AG	36	1.42 ± 1.05			
		GG	10	2.21 ± 0.56			

* P values of additive, dominant and recessive models, in **bold** indicate significant association at the $P < 0.05$ level.**Fig. 1.** Box plot showing coronary artery calcification score (CACs) both in 75 subjects with the duration of diabetes less than 10 years (blank box) and in 65 subjects with the duration of diabetes more than 10 years (dashed box) according to matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene -709A>G polymorphisms adjusted with age, body mass index, waist circumference and duration of diabetes (* P value = 0.037).

3. 일배체형 분석

일배체형(haplotype) 분석은 Stephens 등이 제안한 Bayesian 접근방법¹⁵⁾을 이용한 PHASE 알고리즘을 통해

일배체형을 구성하여 분석하였다(Table 7). MMP-3 5A/6A 유전자형과 MMP-3 -709A>G 유전자형은 비교적 강한 연쇄 불평형(linkage disequilibrium, D' = 0.76, r^2 = 0.07) 상태에 있었다.

Table 7. Regression analysis of coronary artery calcification score (CACs) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) haplotypes for the all study subjects (All), and for the study subjects (subgroup, n = 65) with the duration of diabetes over 10 years controlling for age, body mass index, waist circumference and duration of diabetes

Subjects	Loci	Ht -/-	Ht +/-	Ht +/+	P value
All	ht1	21 (1.09 ± 1.01)	82 (1.23 ± 1.06)	37 (1.32 ± 1.09)	0.428
	ht2	22 (1.45 ± 1.02)	75 (1.22 ± 1.11)	43 (1.14 ± 0.99)	0.294
	ht3	1 (0)	34 (1.27 ± 1.04)	105 (1.23 ± 1.06)	0.283
Subgroup	ht1	7 (1.37 ± 0.83)	41 (1.36 ± 1.06)	17 (1.88 ± 0.91)	0.125
	ht2	10 (2.21 ± 0.56)	36 (1.42 ± 1.05)	19 (1.27 ± 1.00)	0.037
	ht3	1 (0)	17 (1.44 ± 1.07)	47 (1.55 ± 0.99)	0.181

* Ht -/-, Ht +/- and Ht +/+ represent the subject without ht, heterozygote of ht, and homozygote of ht, respectively.

전체 환자를 대상으로 분석하였을 때 일배체형에 따른 관상동맥석회 점수의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다 (Table 7, All). 당뇨병의 유병기간이 10년 이상인 하위군을 대상으로 시행한 분석에서는 ht2가 관상동맥석회 점수와 유의한 상관관계가 있었다($P = 0.037$, Table 7, Subgroup). ht2의 구성 대립인자를 보면 -709A>G 유전자 다형성에서 G 대립인자를 포함한 경우에 관상동맥석회 점수와 높은 연관성을 보였다. 이러한 결과는 일배체형을 구성하지 않고 대립인자만으로 연관성을 분석하였을 때와 동일한 결과이다.

고 찰

본 연구의 결과를 요약하면 관상동맥 혈관석회화는 연구 대상자의 약 2/3에서 관찰되었으며, 관상동맥석회 점수는 연령, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간, 혈청 Cr 농도와 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었고 모두 관상동맥 혈관석회화의 독립적인 위험인자로 나타났다. 한편 유전자형 분석에서는 10년 이상의 유병기간을 가진 연구 대상자에서 MMP-3 -709A>G 단일염기유전자다형성이 관상동맥석회 점수와 유의한 연관성을 보였다.

일반인구집단에서 관상동맥 혈관석회화의 유병률을 조사한 연구는 많지 않다. 최근 최 등이 한국인에서 건강검진 수진자를 대상으로 전산화단층 관상동맥조영술(CT coronary angiography)을 시행하고 죽상관과 관상동맥 혈관석회화의 유병률을 조사하여 그 결과를 보고하였는데, 이 연구에서 죽상관이 관찰된 대상자는 전체 대상자의 22%이었고 이들 중에서 단 4%를 제외하고 모든 죽상관에서 관상동맥 혈관석회화가 관찰되었다고 하였다¹⁶⁾. 즉 18%의 관상동맥 혈관석회화 유병률을 보고하였는데, 본 연구에서 연구 대상자의 관상동맥 혈관석회화의 유병률이 67%로 나타난 결과는 위 연구에서 보고된 관상동맥 혈관석회화 유병률보다 3.7배 높

은 것으로 제2형 당뇨병환자에서 무증상 심혈관질환이 높게 나타난다는 기존의 사실을 본 연구에서 다시 확인할 수 있었다.

다변량회귀분석의 결과 연령, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간, 혈청 크레아티닌 모두 관상동맥석회 점수의 독립적인 위험인자로 나타났는데, 연령이 위험인자로 나타난 것은 일반인구집단을 대상으로 한 연구에서 나이가 들에 따라 관상동맥석회 점수가 더 높게 나타난다는 사실과¹⁷⁾ 일치하는 것으로 생각된다. 허리둘레는 내장비만을 반영하는데 Elkeles 등은 제2형 당뇨병환자에서 허리둘레가 혈관석회화의 진행과 밀접한 연관성이 있음을 보고하였다¹⁸⁾. 내장비만의 증가, 즉 병적 지방세포의 축적은 제2형 당뇨병에서 인슐린저항성을 증가시키는 역할을 하는 여러 아디포카인(adipokine)의 증가와 연관되어 있고 심혈관질환 발생의 위험도를 증가시키는 것으로 생각된다¹⁹⁾. 한편 당뇨병의 유병기간과 혈관석회화의 상관관계에 대해서는 당뇨병의 유병기간이 길수록 심혈관질환 위험인자에 대한 노출기간이 증가되므로 혈관석회화의 발생과 진전에 기여하였을 가능성이 있을 것으로 생각되며 이러한 사실도 다른 연구에서 보고된 바 있다²⁰⁾.

일반적으로 만성 염증의 지표로 알려진 hs-CRP나, 심혈관질환의 지표로 알려진 저밀도지단백 콜레스테롤이나 미세알부민뇨가 본 연구에서 관상동맥석회 점수와 연관되어 나타나지 않은 점에 대해 만족할만한 설명을 제시할 수는 없으나 제2형 당뇨병환자에서 발생하는 죽상경화증이 이제까지 전통적으로 알려져 왔던 위험인자 뿐만 아니라 osteoprotegerin과 같은 혈청 단백질들과 매우 밀접한 상관성을 보이며 hs-CRP는 상관관계가 없었다는 연구 결과²¹⁾ 참고할 때, 아직까지 잘 알려져 있지 않은 유전적, 환경적 요인이 더 강력하게 작용하였을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 선정된 인구집단이 일개 병원에 내원한 당뇨병환자만을 대상으로 하였으므로 선택편향(selection bias)에 의한

결과일 가능성도 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과, 혈청 크레아티닌이 관상동맥 혈관석회화의 독립적인 위험인자로 나타난 점에 대해서는, 비교적 정상으로 생각되는 신기능의 경미한 저하일지라도 혈관석회화에 상당한 영향을 줄 수 있다는 결과로 해석할 수 있는데, 이는 제2형 당뇨병환자의 심혈관질환 발생과 관련하여 중요한 연구 결과로 생각된다. 본 연구에서는 혈청 크레아티닌이 2.0 mg/dL 미만인 경우 정상 신기능을 가진 것으로 가정하고 분석하였는데, 제2형 당뇨병환자에서는 혈청 크레아티닌이 조금이라도 상승되어 있는 경우 실제 사구체 여과율은 훨씬 저하되어 있어 칼슘, 인과 같은 미네랄 대사의 이상이 발생하고 이러한 이상이 관상동맥 혈관석회화를 촉진하는 방향으로 작용하였을 가능성이 있는 것으로 생각된다. 이러한 추정을 확인하기 위해 본 연구의 대상자 중에서 혈청 크레아티닌이 1.0 mg/dL 보다 높은 대상자 63명을 제외하고 다변량회귀분석을 시행하였을 때 혈청 크레아티닌은 허리둘레와 함께 독립적인 위험인자로 나타나지 않았으며 (혈청 크레아티닌, $P = 0.056$; 허리둘레, $P = 0.362$), 연령과 당뇨병의 유병기간만이 독립적인 위험인자로 나타났다. 이와 같은 결과는 제2형 당뇨병환자에서 정상 신기능을 나타내는 혈청 크레아티닌의 범위를 매우 좁게 잡아야 할 필요성이 있음을 시사하는 것으로 보인다. 한편 이상의 고찰에 덧붙여 신기능의 저하에 따라 아직 밝혀지지 않은 혈청 인자 또는 유전적 영향이 혈관석회화에 어떤 영향을 주었을 가능성이 있으나 이와 같은 추론은 다른 연구를 통해 다시 검증되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 유전자형 분석에서 관상동맥석회 점수와 연관성을 가진 유전자다형성은 MMP-3 -709A>G이었다. 반면, 심혈관질환과의 연관성이 비교적 잘 알려져 있는 MMP-3 5A/6A 유전자다형성과 관상동맥석회 점수와의 연관성은 본 연구에서 관찰할 수 없었다. MMP-3 5A 대립인자와 심혈관질환과의 연관성은 여러 인종과 집단에서 연구된 바가 있는데, Pollanen 등은 Helsinki Sudden Study에서 5A/5A 유전자형에서 MMP-3 유전자의 프로모터 활성도가 증가되어 있으며 이 유전자형을 가진 경우 관상동맥석회 점수와 높은 연관성을 가진다고 보고하였고⁽¹³⁾, 일본인을 대상으로 한 연구⁽²²⁾에서도 5A 대립인자가 심근경색을 경험한 환자에서 더 많이 발견된다고 보고된 바 있다. MMP-3 5A/6A 유전자다형성이 MMP-3 유전자의 전사활성도와 관련된 기능적 유전자다형성이라는 점, 여러 인종에 걸쳐서 심혈관질환과의 연관성이 비교적 일관성 있게 나타난다는 점에서 관상동맥석회 점수와의 연관성을 관찰할 수 없었던 본 연구의

결과를 체계적으로 설명하기에는 어려움이 있다.

이러한 불일치에 대한 설명으로는 본 연구의 대상자가 제2형 당뇨병환자만을 대상으로 했다는 점에서 일반 인구집단을 대상으로 한 연구 결과와 다른 결과를 보였을 가능성을 생각해 볼 수 있다. Death 등은 혈관내피세포와 대식세포에서 MMP-3의 활성도가 고혈당에 의해 전반적으로 저하된다는 사실을 보고한 바가 있는데⁽²³⁾, 이는 당뇨병환자에서 MMP-3 5A/6A 유전자다형성에 따른 유전자 발현 정도의 차이가 고혈당이라는 조건에서는 그 차이가 크지 않거나 무력화되었을 가능성을 생각해 보게 한다. 즉 고혈당에 의해 5A/6A 유전자형에 따른 차이가 뚜렷하게 나타나지 못했기 때문에 본 연구에서 관상동맥석회 점수와 뚜렷한 상관관계가 나타나지 않았을 것이라고 추정해 볼 수 있다. 이는 최근 Irace 등이 일반 정상인과 당뇨병환자를 대상으로 경동맥재형성(common carotid remodeling)과 관련된 변수들을 측정하였을 때 일반 정상인에서는 5A/6A 유전자형에 따른 차이가 나타난 반면, 당뇨병환자에서는 유전자형에 따른 차이를 관찰할 수 없었다고 하였다⁽²⁴⁾.

MMP-3 -709A>G 유전자다형성 부위는 MMP-3 유전자의 5' 비전사부위에 속하는데 MMP-3 -709A>G 유전자형과 혈관석회화와의 연관성은 문헌상으로 아직 보고된 바가 없다. MMP-3 -709A>G 유전자다형성과 임상적 표현형과의 연관성을 본 연구는 드문데, Traurig 등은 MMP-3 -709A>G 유전자형이 체질량지수와 밀접한 상관성을 보인다고 하여 비만이나 제2형 당뇨병과 관련되어 있을 가능성을 보고하였고⁽⁹⁾, 이 등(unpublished data, 대한당뇨병학회 학술대회 초록집, 2008)도 한국인에서 MMP-3 -709A>G 유전자형과 제2형 당뇨병이 연관되어 있다고 보고한 것이 있을 뿐이다.

본 연구에서 MMP-3 -709A>G 유전자다형성이 관상동맥석회 점수와 연관되어 나타난 결과에 대한 설명으로는 우선 MMP-3 -709A>G 유전자다형성이 관상동맥 혈관석회화에 직접적으로 연관성을 보이는 다형성이라기보다는 관상동맥 혈관석회화와 관련된 아직 알려지지 않은 다른 유전자형과 연쇄불평형(linkage disequilibrium)을 보였을 가능성이 있다. MMP-3 -709A>G 유전자다형성 위치는 5' 비전사부위로 -709A>G 유전자형에 따라 MMP-3 유전자의 발현이 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있어, 즉 기능적 유전자다형성 부위는 아니라는 점에서 본 연구의 결과를 연쇄불평형에 따른 결과라고 해석할 수 있는 가능성을 열어 준다고 하겠다. MMP-3 -709A>G 유전자다형성이 실제로 관상동맥 혈관석회화와 연관된 의미 있는 유전자다형성일지에 대

해서는 다른 인구 집단을 대상으로 분석하거나 가계 분석과 같은 연구를 통해 검증되어야 할 것으로 생각된다. 한편 본 연구에서 10년 이상의 당뇨병 유병기간을 가진 경우에만 MMP-3 -709A>G 유전자다형성이 관상동맥석회 점수와 유의한 연관성을 나타낸 이유로는 유전적 소인이 발현되기 위해서 고혈당과 같은 특정 환경에 일정 기간 노출되는 과정이 필요했을 것으로 설명할 수 있겠으나 더 많은 제2형 당뇨병환자를 대상으로 한 후속 연구를 통해 검증되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 일반 인구 집단이 아닌 병원을 방문한 외래 환자를 대상으로 하였으므로 선택편향(selection bias)이 있을 가능성이 있다. 하지만 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg 평형에서 벗어나지 않아 본 연구의 대상자에서 유전자형이 선택적으로 편향되게 선택되었을 가능성은 희박한 것으로 생각되었다. 둘째, 본 연구의 대상자들이 당뇨병의 유병기간에 비해 당화혈색소 평균이 7.3%로 양호하며, 미세알부민뇨 값도 높지 않고, 수축기 혈압이나 저밀도지단백 콜레스테롤 수치 등도 비교적 낮게 나타난 점은 이들이 병원에서 치료 받고 있는 환자들로서 혈당 조절 및 심혈관질환 위험인자들이 잘 통제된 환자였을 가능성이 있고, 이러한 점이 또다른 선택편향으로 본 논문의 연구 결과에 영향을 주었을 수 있다고 생각된다. 이러한 선택편향을 피하려면 새로 발병하여 이전에 전혀 치료받지 않은 환자를 대상으로 하여야 할 것으로 생각되는데 이는 따로 계획된 연구를 통해 확인되어야 할 것이다. 셋째, 본 연구는 종적 연구가 아닌 횡단면적 연구로서 관상동맥석회 점수와 임상적 특성과의 인과관계를 확인할 수는 없었다. 이는 본 연구의 대상자들을 일정 기간이 경과한 후 추적 조사함으로써 확인하여야 할 것으로 생각된다. 넷째, 대상 환자 수가 비교적 적어 통계적 파워가 낮았고 이것이 몇몇 분석 결과에서 통계적으로 유의한 결과를 얻지 못한 이유 중의 하나로 생각된다.

이상의 연구 결과 제2형 당뇨병환자에서 관상동맥석회 점수는 연령, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간, 혈청 크레아티닌이 독립적인 위험인자이며 10년 이상의 유병기간을 가진 제2형 당뇨병환자에서 MMP-3 -709A>G 유전자형이 관상동맥석회 점수와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

요 약

연구배경: 기질금속단백분해효소(MMP)는 죽상판에서 발견되며 심혈관질환과 연관된 것으로 알려져 있다. 제2형

당뇨병의 주요 사망원인은 심혈관질환으로 본 연구는 기질금속단백분해효소 중 MMP-3 유전자의 프로모터 유전자다형성이 제2형 당뇨병환자에서 관찰되는 관상동맥석회 점수와 연관성이 있는지를 알아보았다.

방법: 대학병원에 내원한 140명의 심혈관 무증상 제2형 당뇨병환자에서 전산화단층촬영으로 관상동맥석회 점수를 정량하고, 임상적, 생화학적 인자들을 측정하였다. 이들 환자에서 MMP-3 유전자의 프로모터 부위에 존재하는 5A/6A 유전자다형성, -709A>G 유전자다형성을 분석하여 각각의 유전자형과 관상동맥석회 점수와와의 연관성 연구를 시행하였다.

결과: 관상동맥 혈관석회화는 전체 대상 환자의 67%에서 관찰되었으며, 다중회귀분석에서 연령($P = 0.008$), 허리둘레($P = 0.003$), 당뇨병의 유병기간($P = 0.003$), 혈청 크레아티닌($P = 0.012$)은 혈관석회화의 독립적인 위험인자로 나타났다. 유전자형 분석에서 MMP-3 5A/6A, -709A>G 유전자다형성은 관상동맥석회 점수와 유의한 연관성이 없었으나 당뇨병의 유병기간이 10년 이상인 환자에서 -709A>G 유전자다형성은 관상동맥석회 점수와 유의한 상관관계($P = 0.037$)를 나타내었다.

결론: 심혈관 무증상인 제2형 당뇨병환자에서 관상동맥 혈관석회화는 흔하게 관찰되며 연령, 허리둘레, 당뇨병의 유병기간, 혈청 크레아티닌이 독립적인 위험인자임을 알 수 있었다. MMP-3 -709A>G 유전자형이 10년 이상의 유병기간을 가진 제2형 당뇨병환자에서 관상동맥석회 점수와 연관성이 있었다.

참 고 문 헌

1. Libby P: *Molecular bases of the acute coronary syndromes*. *Circulation* 91:2844-50, 1995
2. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S: *Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8154-8, 1991
3. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest* 94:2493-503, 1994
4. Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ: *Noncollagenous*

- bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1852-61, 1999
5. Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR: *Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (mmp-3) gene inactivation. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1440-5, 2001
6. Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM: *Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. J Biol Chem* 271:13055-60, 1996
7. Humphries SE, Luong LA, Talmud PJ, Frick MH, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR, Syvanne M: *The 5a/6a polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (mmp-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the local gemfibrozil study. Lipid coronary angiography trial. Atherosclerosis* 139:49-56, 1998
8. de Maat MP, Jukema JW, Ye S, Zwinderman AH, Moghaddam PH, Beekman M, Kastelein JJ, van Boven AJ, Bruschke AV, Humphries SE, Kluit C, Henney AM: *Effect of the stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis. Am J Cardiol* 83:852-6, 1999
9. Traurig MT, Permana PA, Nair S, Kobes S, Bogardus C, Baier LJ: *Differential expression of matrix metalloproteinase 3 (mmp3) in preadipocytes/stromal vascular cells from nonobese nondiabetic versus obese nondiabetic pima indians. Diabetes* 55:3160-5, 2006
10. Kaplan RC, Smith NL, Zucker S, Heckbert SR, Rice K, Psaty BM: *Matrix metalloproteinase-3 (mmp3) and mmp9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke. Atherosclerosis* 201:130-7, 2008
11. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H: *Mt1-mmp-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. Cell* 99:81-92, 1999
12. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J: *Vascular calcification: Pathobiological mechanisms and clinical implications. Circ Res* 99:1044-59, 2006
13. Pollanen PJ, Lehtimäki T, Mikkelsen J, Ilveskoski E, Kunas T, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Nikkari ST, Syrjäkoski K, Karhunen PJ: *Matrix metalloproteinase3 and 9 gene promoter polymorphisms: Joint action of two loci as a risk factor for coronary artery complicated plaques. Atherosclerosis* 180:73-8, 2005
14. Jung HH, Kim SW, Han H: *Inflammation, mineral metabolism and progressive coronary artery calcification in patients on haemodialysis. Nephrol Dial Transplant* 21:1915-20, 2006
15. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: *A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am J Hum Genet* 68:978-89, 2001
16. Choi EK, Choi SI, Rivera JJ, Nasir K, Chang SA, Chun EJ, Kim HK, Choi DJ, Blumenthal RS, Chang HJ: *Coronary computed tomography angiography as a screening tool for the detection of occult coronary artery disease in asymptomatic individuals. J Am Coll Cardiol* 52:357-65, 2008
17. Kronmal RA, McClelland RL, Detrano R, Shea S, Lima JA, Cushman M, Bild DE, Burke GL: *Risk factors for the progression of coronary artery calcification in asymptomatic subjects: Results from the multi-ethnic study of atherosclerosis (mesa). Circulation* 115:2722-30, 2007
18. Elkeles RS, Godsland IF, Rubens MB, Feher MD, Nugara F, Flather MD: *The progress of coronary heart disease in type 2 diabetes as measured by coronary calcium score from electron beam computed tomography (ebct): The PREDICT study. Atherosclerosis* 197:777-83, 2008
19. Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, Cherry L, Whincup PH, Sattar N: *Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. Diabetes Care* 30:1200-5, 2007
20. Godsland IF, Elkeles RS, Feher MD, Nugara F, Rubens MB, Richmond W, Khan M, Donovan J, Anyaoku V, Flather MD: *Coronary calcification,*

- homocysteine, c-reactive protein and the metabolic syndrome in type 2 diabetes: The prospective evaluation of diabetic ischaemic heart disease by coronary tomography (predict) study. Diabet Med* 23:1192-200, 2006
21. Anand DV, Lahiri A, Lim E, Hopkins D, Corder R: *The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. J Am Coll Cardiol* 47:1850-7, 2006
 22. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, Matsuda Y, Takai E, Iwai C, Kurogane H, Yoshida Y, Yokoyama M: *Stromelysin promoter 5a/6a polymorphism is associated with acute myocardial infarction. Circulation* 99:2717-9, 1999
 23. Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK: *High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: Potential impact on atherosclerosis in diabetes. Atherosclerosis* 168:263-9, 2003
 24. Irace C, Cortese C, Migale M, Liberatoscioli L, Mannucci L, Federici G, Gnasso A: *Stromelysin gene promoter polymorphism and common carotid geometry in diabetic subjects. Int Angiol* 27:413-8, 2008