

혈소판 ADP 수용체 P2Y1 유전자 단일염기다형성과 허혈성혈관질환과의 상관관계 연구

¹중앙대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교 의과대학 ²내과학교실, ³예방의학교실, ⁴서울대학교 천연물연구소

박은경¹ · 김호수² · 박성효² · 박진식² · 김인호² · 박선양²
박소연³ · 김진희³ · 홍윤철³ · 윤혜숙⁴ · 이상재¹

The Relationship of P2Y1 ADP Receptor Polymorphisms and Ischemic Vascular Disease

Eunkyoung Park¹, Hyo-Soo Kim², Sung Hyo Park², Jin Sik Park², In Ho Kim², Seonyang Park²,
So-Yeon Park³, Jin Hee Kim³, Yun-Chul Hong³, Hye Sook Yun⁴ and Sang Jae Lee¹

¹Department of Internal Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Departments of ²Internal Medicine and

³Preventive Medicine, Seoul National University College of Medicine,

⁴Natural Product Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea

Background: The platelet ADP receptor P2Y1 plays a key role in platelet aggregation.

Methods: We tested eight sites of P2Y1 and studied the possible link between the presence of P2Y1 polymorphisms and the risk of ischemic vascular disease in a case-control study. The polymorphisms A1622G, C647G and C2259G were selected according to linkage disequilibrium. We evaluated 275 patients with ischemic cerebrovascular disease and 275 control subjects. We also evaluated 171 patients with acute myocardial infarction (AMI), 166 patients with unstable angina (UA), 173 patients with stable angina (SA) and 188 control subjects.

Results: For the cerebrovascular disease patients, A1622G AA, AG [odds ratio (OR), 1.170; 95% confidence interval (CI), 0.784 to 1.748] and GG (OR, 1.031; 95% CI, 0.554 to 1.918) did not show any difference between the case and control subjects. C647G CC, CG (OR, 0.995; 95% CI, 0.639 to 1.550) and GG (OR, 1.012; 95% CI, 0.450 to 2.277) did not show any difference between the case and control subjects. C2259G CC, CG (OR, 0.619; 95% CI, 0.354 to 1.082) and GG did not show any difference between the case and control subjects. For coronary artery disease patients, C2259G GG, CG (for AMI patients OR, 0.880, 95% CI, 0.384 to 2.016; for UA patients, OR, 0.885, 95% CI, 0.410 to 1.911; for SA patients, OR, 1.156, 95% CI, 0.534 to 2.501) and CC did not show any difference between AMI, UA and SA patients and each control subject. C647G GG, CG (for AMI patients OR, 1.351, 95% CI, 0.731 to 2.497; for UA patients OR, 1.292, 95% CI, 0.723 to 2.309; for SA patients OR, 0.977, 95% CI, 0.530 to 1.803) and CC (for AMI patients OR, 0.355, 95% CI, 0.093 to 1.358; for UA patients OR, 0.645, 95% CI, 0.205 to 2.028; for SA patients OR, 0.385, 95% CI, 0.113 to 1.311) did not show any difference between AMI, UA and SA patients and each control subject. A1622G AA, AG (for AMI patients OR, 1.416, 95% CI, 0.786 to 2.549; for UA patients OR, 1.079, 95% CI, 0.611 to 1.904; for SA patients OR, 0.958, 95% CI, 0.529 to 1.732) and GG (for AMI patients OR, 0.525, 95% CI, 0.195 to 1.411; for UA patients OR, 0.568, 95% CI, 0.231 to 1.401; for SA patients OR, 0.441, 95% CI, 0.169

접수 : 2008년 4월 12일, 수정 : 2008년 5월 26일

승인 : 2008년 6월 2일

교신저자 : 박은경, 서울특별시 동작구 흑석동 224-1

☎ 156-755, 중앙대학교병원 내과

Tel: 02-6299-1410, Fax: 02-6280-5631

E-mail: lisa1114@naver.com

Correspondence to : Eunkyoung Park

Department of Internal Medicine, Chung-Ang University Hospital

224-1, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-755, Korea

Tel: +82-2-6299-1410, Fax: +82-2-6280-5631

E-mail: lisa1114@naver.com

to 1.154) did not show any difference between AMI, UA and, SA patients and the control subjects.

Conclusion: The distribution of P2Y1 polymorphisms did not show any association with ischemic vascular disease. (*Korean J Hematol* 2008;43:69-76.)

Key Words: Platelet receptor, Polymorphism, Platelet aggregation, Ischemic vascular disease

서 론

허혈성혈관질환(ischemic vascular diseases)은 선진국에서는 발병률과 사망률이 가장 높은 질환군으로 우리나라에서도 평균 수명의 증가와 더불어 발생이 증가하는 추세에 있다. 관상동맥질환과 허혈성뇌혈관질환은 1차 발병 후 재발의 위험이 높으며, 합병증 및 후유증도 심각하다. 허혈성혈관질환의 병인은 유전적 소인, 호르몬, 흡연, 과체중 등의 환경적 요인과 고혈압, 당뇨병, 호모시스틴혈증(homocysteinemia), 이상지질증(dyslipidemia) 등과 같은 여러 요인이 복잡하게 관련되나, 직접적인 병인은 혈소판의 활성화와 이로 인한 혈전 생성에 따른 혈액 흐름의 방해 및 이에 의한 경색, 허혈이다.¹⁾ 최근까지 우리나라를 포함하여 동양인에서는 인종적 요인 또는 생활 습관의 차이로 허혈성혈관질환의 발생 빈도가 서구보다 낮다고 막연히 알려져 있었다. 최근 산업 구조의 서구화에 따라 각종 후천적인 혈전 호발 요소가 점차 증가하고 동양인의 허혈성혈관질환의 발병률이 빠른 속도로 증가하고 있어 이에 대한 보다 나은 예방 및 치료를 위해 발병 원인 또는 발병 가능성을 증가시키는 요인에 대한 연구는 중요한 과제이다.

손상된 혈관 주변에 혈소판은 여러 단계의 과정을 거쳐 응집괴를 형성한다. 활성화된 혈소판은 유용성응착물질(soluble adhesion molecule)과 결합하고 상호응집되며 섬유소(fibrin)와 결합하여 혈전을 형성한다. 이러한 과정에 여러 리간드(ligand)들이 복잡하게 관여하며, 각각의 리간드가 결합하는 혈소판 수용체들이 밝혀지고 있다. 이 중 혈소판에서 유리된 ADP에 결합하는 수용체에는 P2Y1, P2Y12, P2X1의 3종이 알려져 있으며 혈소판응집과정에서의 역할 등에 대해 연구가 이루어지고 있는데, 최근에는 P2Y1 A1622G SNP에 따라 ADP에 대한 혈소판 반응이 다름이 보고되었다.²⁾

혈소판의 활성화에 따른 허혈성혈관질환 발병에는 후천적 환경적, 후천적 요인과 함께 유전적 요인이 상당한 역할을 할 것으로 생각된다. 유전적 요인은 인종

간에 상당한 차이가 있다고 알려져 있으나, 동양에서 혈소판과 관련한 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 연구는 일본 및 국내에서 일부 이루어지고 있을 뿐이다.³⁻¹⁰⁾

혈소판응집 관련 SNP에 의한 유전적인 요인과 질환의 관련성에 대하여 특수 유전성질환과의 연관성에 대하여는 상당한 진척이 있으나, 허혈성혈관질환과 유전자 SNP의 상관성에 대한 연구보고는 매우 제한적이다. 혈소판 응집에 대한 개인별 민감성 차이에 대하여 국내에서도 최근 연구가 시작되고 있다.⁶⁾

본 연구자들은 지난 2005년 허혈성뇌혈관질환 환자와 정상인의 혈소판 수용체 SNP 차이를 확인하고자 100명의 허혈성뇌혈관질환 환자와 97명의 정상 대조군에서 연구를 진행하였다. 기존에 알려진 혈소판 수용체 각각에 대해 보고된 SNP 위치 9개를 임의로 선택하여 GP IIIa (C1565T), GP Ia (C807T), GP Ib α (Kozak T/C polymorphism, HPA-2), GP IIb (HPA-3), P2Y1 (A1622G), P2Y12 (G52T), thromboxane A2 receptor (C795T, T924T)에 대하여 분석하였고, P2Y1 ADP 수용체 유전자다형성(A1622G의 G allele)이 통계적으로 유의하지는 않았으나 환자군에서 높은 경향을 보였다($P=0.09$).¹¹⁾

본 연구에서는 기존 연구결과를 토대로 혈소판 ADP 수용체 중 P2Y1 SNP 발현과 허혈성혈관질환의 관계를 보고자 하였으며, 대상 환자수와 대상 SNP의 수를 증가시켜 통계학적 검정력을 늘리고자 하였다. 이러한 상관관계를 확인한다면, 관련 유전자 검사로서 한국인에서 허혈성혈관질환의 발병을 예측할 수 있을 것이다.

대상 및 방법

1. 연구대상

대조군은 만 20~59세의 건강한 정상인으로 본 실험에 관한 설명과 함께 참여의사 여부를 확인하여 동의하는 사람만을 선별하여 피험자로 모집하였다. 환자군은 만 20~59세의 세계보건기구(World Health Organization) 진단 기준에 합당한 심근경색증, 불안정성 협

심증, 안정성 협심증 또는 뇌동맥경색증의 현병력을 가진 혈전성 심혈관 질환자를 대상으로 하였다.

2. 연구기간 및 윤리심사

본 연구의 연구기간은 2006년 3월부터 2008년 2월 까지로 하였다. 본 연구는 서울대학교병원 임상시험심의위원회의 승인을 거쳐 시행되었다.

3. 혈액채취 및 시료제작

3.8% 구연산삼나트륨(trisodium citrate, 1 : 9)이 담겨있는 플라스틱관에 혈액을 채취하였다. 180g에서 10분간 원심분리하여 상층액 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP)을 얻고, 나머지는 2,000g에서 15분간 원심분리하여 혈소판결핍혈장(platelet poor plasma, PRP)을 얻었다. PUREGENE blood DNA kit (Gentra Inc. Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 핵산을 추출하고 -80°C 에서 보관하였다.

4. 단일염기확장방법(single base extension analysis)에 의한 SNP의 분석

SNP 표지자의 위치 바로 앞까지 해당하는 염기서열로 짜여진 유전자형분석 시발체(genotyping primer)를 이용하여 SNP의 유전형을 분석하였으며(Table 1) SNaPshot 분석 기기를 이용하였다. SNP 유전자형 분석은 ABI PRISM SNaPshot Multiplex kit (ABI, Foster City, CA, USA)를 이용한 단일염기확장방법을 통해 시행하였다. 핵산은 전진성(forward) 및 후진성(reverse) 시발체와 표준 중합효소 연쇄반응(PCR) 용액을 이용하여 PCR반응을 시행하였다. 10ng의 핵산, 0.5pM의 각 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 시발체, 1 μL 의 10X PCR Gold 완충액(buffer), 250uM dNTP (deoxynucleotides), 3mM MgCl_2 , 0.25 unit i-StarTaq 핵산중합효소(iNtRON Biotechnology, Sungnam, Kyungki-Do, Korea)가 포함된 10 μL 반응액을 사용하여 PCR반응으로 증폭시켰다. PCR반응은 다음과 같이 진행하였다. 95°C 에서 10분 동안 1주기를 시행하였고, 95°C 에서 30초 동안, 55°C 에서 1분 동안, 72°C 에서 1분 동안 30주기를 시행한 뒤, 72°C 에서 7분 동안 1주기를 시행하

였다. 증폭 이후, PCR반응의 생산물을 새우 알칼리성 인산효소(shrimp alkaline phosphatase, SAP) (Roche)와 핵산외부가수분해효소(exonuclease) I (USB Corporation) 각 1 unit를 이용하여 37°C 에서 60분, 72°C 에서 15분 동안 처리하여 증폭된 생산물을 정제하였다. 1 μL 의 정제 증폭된 생산물을 0.15 pmols의 시발체 연장반응을 위한 유전자형분석 시발체를 포함한 SNaPshot Multiplex Ready 반응혼합물에 첨가하였다. 시발체 연장반응은 96°C 에서 10초 동안, 50°C 에서 5초 동안, 60°C 에서 30초 동안 25주기를 시행하였다. 과다한 형광 염료 시약을 제거하기 위하여 1 unit의 SAP를 PCR반응 생산물과 함께 37°C 에서 1시간 동안, 72°C 에서 15분 동안 처리하였다. 연장 생산물을 포함한 최종 반응 용액 1 μL 를 9 μL 의 Hi-Di formamide (ABI, Foster City, CA)에 첨가하였다. 혼합물을 95°C 에서 5분간 배양하고 얼음에서 5분간 처리한 후 ABI Prism 3730xl DNA analyzer를 이용하여 전기영동하였다. 결과는 Gene Scan analysis software (ABI)를 이용하여 분석하였다.

5. P2Y1 SNP의 선택

P2Y1 유전자에서 발견 가능한 A2591T, C1382T, A1622G, C893T, C1881G, C2259G, A1747T, C647G의 유전자형 분석을 시행하였다. 8개의 SNP 중 A2591T는 대립유전자 빈도가 A : T=1 : 0으로 분석에서 제외시켰다. C1382T와 A1622G, C893T와 C1881G, A1747T와 C647G는 각각 서로 인접한 위치에 있어 A1622G, C893T, C647G를 다시 선별하고 인접한 다른 SNP는 제외시켰다. C893T와 A1622G는 완전연관(complete linkage)되어 있었다($|D'|=1$). 최종적으로 C2259G, A1622G, C647G의 3개 SNP를 환자-대조군 분석에 이용하였다(Fig. 1).

Table 1. P2Y1 primers

Primer	Sequence (5'→3')
P2Y1-A1622G-F	TCCTCTGAGGAGAAAATCGATGGATGTA CCTGGT
P2Y1-A1622G-R	AGACACAGCAAAAACAGTCAGTAC

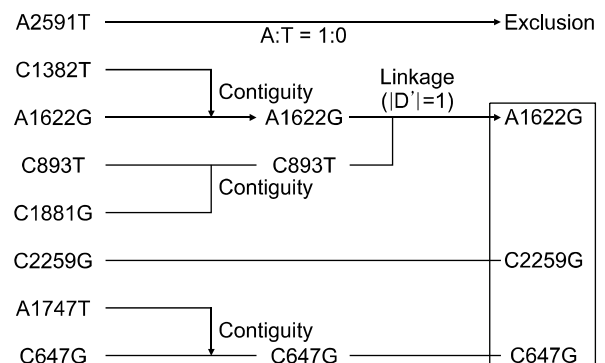


Fig. 1. The selection of P2Y1 polymorphism site.

6. P2Y1 SNP와 허혈성혈관질환과의 상관성에 대한 분석

1) 허혈성뇌혈관질환 환자와 정상인의 P2Y1 SNP 비교

환자-대조군 연구로서 허혈성뇌혈관질환 환자 275명과 연령, 성별 보정 정상 대조군 275명에 대하여 시행되었다. 핵산의 보존 상태가 좋지 않았던 대상자를 제외하면 A1622G는 환자군 271명, 대조군 275명, C647G는 환자군 267명, 대조군 267명, C2259G는 환자군 271명, 대조군 275명을 분석하였다.

2) 관상동맥질환(coronary artery disease) 환자와 정상인의 P2Y1 SNP 비교

환자-대조군 연구로서 급성심근경색증(acute myocardial infarction) 171명, 불안정성협심증(unstable angina) 166명, 안정성협심증(stable angina) 173명과 연령, 성별 보정 정상 대조군 188명에 대하여 시행하였다. 핵산의 보존 상태가 좋지 않았던 대상자를 제외하면 A1622G는 급성심근경색증군 171명, 불안정성협심증군 166명, 안정성협심증군 173명, 연령, 성별 보정 정상 대조군 188명, C647G는 급성심근경색증군 167명, 불안정성협심증군 165명, 안정성협심증군 170명, 연령, 성별 보정 정상 대조군 185명, C2259G는 급성심근경색증군 167명, 불안정성협심증군 164명, 안정성협심증군 170명, 연령, 성별 보정 정상 대조군 188명을 분석하였다.

7. 통계적 분석

환자군과 대조군에서 각 인자들이 차이가 있는지 알아보기 위해 로지스틱 회귀분석(logistic regression)을 사용하였다. 통계적 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하여 odds ratio (OR)와 95% confidence interval (95% CI)를 사용하였다. 흡연, 고혈압, 당뇨병의 혈전 형성 위험인자의 차이에 대하여 대조군 및 환자군(허혈성뇌혈관질환, 급성심근경색증, 불안정성협심증, 안정성협심증)에서

분석을 하였고, 연속변수에 대하여 ANOVA (analysis of variance), 비연속변수에 대하여 카이-제곱 검정(chi-square test)을 사용하였다. P2Y1 환자-대조군 연구에서 혈전 형성에 영향을 주는 유의한 인자에 대하여는 통계적 보정을 하였다. 통계 프로그램은 SAS version 8.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였다.

결 과

1. 허혈성혈관질환 환자 혈소판수용체의 P2Y1 SNP

1) 허혈성뇌혈관질환 환자 혈소판수용체의 P2Y1 SNP

환자군의 연령은 63.5 ± 12.3 세(mean \pm standard deviation), 대조군의 연령은 63.1 ± 12.0 로 차이가 없었고, 성비는 양 군에서 모두 1.3 : 1 (M : F)이었다.

A1622G는 AA가 환자군 124명, 대조군 122명, AG가 환자군 114명, 대조군 122명, GG가 환자군 33명, 대조군 31명으로 환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. C647G는 CC가 환자군 158명, 대조군 149명, CG가 환자군 91명, 대조군 97명, GG가 환자군 18명, 대조군 18명으로 환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. C2259G는 CC가 환자군 227명, 대조군 241명, CG가 환자군 44명, 대조군 33명, GG가 환자군 0명, 대조군 1명으로 환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2).

2) 관상동맥질환 환자 혈소판수용체의 P2Y1 SNP

관상동맥질환 환자군의 연령은 급성심근경색증군 62.8 ± 9.6 세, 불안정성협심증군 62.9 ± 9.6 세, 안정성협심증군 63.1 ± 9.7 세, 대조군의 연령은 62.4 ± 9.6 세로 차이가 없었다. 성비는 급성심근경색증군에서 1.12 : 1, 불안정성협심증군에서 1.18 : 1, 안정성협심증군에서 1.16 : 1, 대조군에서 1.29 : 1이었다. 각 SNP는 각각의 관상동맥질환 환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보

Table 2. The P2Y1 polymorphism in patients with ischemic cerebrovascular diseases

P2Y1 genotype		Control N (%)	Case N (%)	OR (95% CI)
A1622G	AA	122 (44.4)	124 (45.8)	1.000
	AG	122 (44.4)	114 (42.1)	1.170 (0.784, 1.748)
	GG	31 (11.2)	33 (12.1)	1.031 (0.554, 1.918)
C647G	CC	149 (56.5)	158 (59.2)	1.000
	CG	97 (36.7)	91 (34.1)	0.995 (0.639, 1.550)
	GG	18 (6.8)	18 (6.7)	1.012 (0.450, 2.277)
C2259G	CC	241 (87.5)	227 (83.8)	1.000
	CG	33 (12.1)	44 (16.2)	0.619 (0.354, 1.082)
	GG	1 (0.4)	0	—

이지 않았다(Table 3). C2259G의 GG는 대조군 162명, 급성심근경색증군 142명, 불안정성협심증군 139명, 안정성협심증군 146명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. C2259G의 CG는 대조군 26명, 급성심근경색증군 22명, 불안정성협심증군 24명, 안정성협심증군 24명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. C2259G의 CC는 대조군 0명, 급성심근경색증군 3명, 불안정성협심증군 1명, 안정성협심증군 0명으로 환자수가 적어서 통계 분석이 불가능하였다. C647G의 GG는 대조군 110명, 급성심근경색증군 103명, 불안정성협심증군 95명, 안정성협심증군 99명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. C647G의 CG는 대조군 60명, 급성심근경색증군 57명, 불안정성협심증군 63명, 안정성협심증군 59명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. C647G의 CC는 대조군 15명, 급성심근경색증군 7명, 불안정성협심증군 7명, 안정성협심증군 12명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. A1622G의 AA는 대조군 90명, 급성심근경색증군 79명, 불안정성협심증군 78명, 안정성협심증군

81명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. A1622G의 AG는 대조군 73명, 급성심근경색증군 80명, 불안정성협심증군 74명, 안정성협심증군 74명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다. A1622G의 GG는 대조군 25명, 급성심근경색증군 12명, 불안정성협심증군 14명, 안정성협심증군 18명으로 대조군과 급성심근경색증군 사이, 대조군과 불안정성협심증군 사이, 대조군과 안정성협심증군 사이에 차이가 없었다(Table 3).

2. 기타 혈전 형성의 위험인자와 혈소판수용체의 P2Y1 SNP

1) 허혈성뇌혈관질환 환자와 혈전 형성의 위험인자

허혈성뇌혈관질환 환자군과 대조군의 흡연, 고혈압, 당뇨병에 대한 차이를 조사하였다. 각 275명의 환자군과 대조군에서 흡연자는 환자군 99명, 대조군 67명으로 환자군에서 많았다($P=0.004$). 고혈압은 환자군 55명, 대조군 15명으로 환자군에서 많았다($P<0.001$). 당뇨병은 환자군 68명, 대조군 22명으로 환자군에서 많았다($P<0.001$). 흡연, 고혈압, 당뇨병에 대하여 각각 하위 집단 분석(subgroup analysis)을 시행하였고 허혈성뇌혈관질환 환자군과 대조군 사이에 혈소판수용체 P2Y1 SNP의 유의한 차이는 없었다.

Table 3. The P2Y1 polymorphism in patients with coronary artery diseases

Geno types	Control N (%)	AMI N (%)	OR (95% CI)*	UA N (%)	OR (95% CI)*	CSA N (%)	OR (95% CI)*
A1622G							
AA	90 (47.9)	79 (46.2)	1.000	78 (47.0)	1.000	81 (46.8)	1.000
AG	73 (38.8)	80 (46.8)	1.416 (0.786, 2.549)	74 (44.6)	1.079 (0.611, 1.904)	74 (42.8)	0.958 (0.529, 1.732)
GG	25 (13.3)	12 (7.0)	0.525 (0.195, 1.411)	14 (8.4)	0.568 (0.231, 1.401)	18 (10.4)	0.441 (0.169, 1.154)
AG+GG	98 (52.1)	92 (53.8)	1.169 (0.670, 2.038)	88 (53.0)	0.939 (0.550, 1.604)	92 (53.2)	0.812 (0.464, 1.419)
C647G							
GG	110 (59.5)	103 (61.7)	1.000	95 (57.6)	1.000	99 (58.2)	1.000
CG	60 (32.4)	57 (34.1)	1.351 (0.731, 2.497)	63 (38.2)	1.292 (0.723, 2.309)	59 (34.7)	0.977 (0.530, 1.803)
CC	15 (8.1)	7 (4.2)	0.355 (0.093, 1.358)	7 (4.2)	0.645 (0.205, 2.028)	12 (7.1)	0.385 (0.113, 1.311)
CG+CC	75 (40.5)	64 (38.3)	1.115 (0.621, 2.001)	70 (42.4)	1.154 (0.666, 2.002)	71 (41.8)	0.837 (0.469, 1.496)
C2259G							
GG	162 (86.2)	142 (85.0)	1.000	139 (84.8)	1.000	146 (85.9)	1.000
CG	26 (13.8)	22 (13.2)	0.880 (0.384, 2.016)	24 (14.6)	0.885 (0.410, 1.911)	24 (14.1)	1.156 (0.534, 2.501)
CC	0 (0)	3 (1.8)	—	1 (0.6)	—	0 (0)	—
CG+CC	26 (13.8)	25 (15.0)	1.107 (0.504, 2.430)	25 (15.2)	0.910 (0.424, 1.952)	24 (14.1)	1.156 (0.534, 2.501)

*OR adjusted with age, sex, and smoking status.

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; UA, unstable angina; CSA, chronic stable angina.

2) 관상동맥질환 환자와 혈전 형성의 위험인자

관상동맥질환 환자군과 대조군의 흡연, 고혈압, 당뇨병에 대한 차이를 조사하였다. 192명의 대조군, 173명의 급성심근경색증군, 167명의 불안정성협심증군, 173명의 안정성협심증군에서 흡연자는 대조군 48명, 급성심근경색증군 61명, 불안정성협심증군 56명, 안정성협심증군 49명으로 각 군에서 차이를 보였다($P=0.009$). 고혈압은 대조군 9명, 급성심근경색증군 85명, 불안정성협심증군 75명, 안정성협심증군 91명으로 각 군에서 유의한 차이를 보였다($P=0.012$). 당뇨병은 대조군 8명, 급성심근경색증군 40명, 불안정성협심증군 42명, 안정성협심증군 51명으로 각 군에서 유의한 차이를 보였다($P<0.001$). 흡연, 고혈압, 당뇨병에 대하여 각각 하위 집단 분석을 시행하였고 각 관상동맥질환 환자군과 대조군 사이에 혈소판수용체 P2Y1 SNP의 유의한 차이는 없었다.

고 찰

혈소판의 활성화와 혈전형성과정에는 여러 리간드들이 결합하는 혈소판수용체들이 있다. 혈소판수용체의 SNP는 동종면역성혈소판감소증(alloimmune thrombocytopenia)이나 수혈불응증(transfusion refractoriness), 수혈후자반증(post transfusion purpura) 등의 발생에 중요한 역할을 담당하는데 혈소판막당단백 중에서 특히 GP Ia, GP Ib, GP IIIa의 SNP가 허혈성혈관질환 위험의 증가와 관련이 있다고 보고되었다.¹²⁻¹⁷⁾

ADP 수용체에는 P2Y12, P2Y1, P2X1의 3가지 퓨린 수용체가 있는데, P2Y12와 P2Y1 SNP는 ADP에 대한 다양한 혈소판 반응과 연관이 있다.^{2,18-23)} P2Y1 수용체는 G 단백질을 통하여 혈소판의 활성화에 관여하고 혈소판의 형태를 변화시킨다.^{19,20)} P2Y12 수용체는 adenylate cyclase와 결합하여 cAMP의 생성을 저해한다.²⁰⁾ 이는 혈소판의 응집을 극대화하고 응괴를 안정시킨다.^{18,21)} P2Y1 수용체와 P2Y12 수용체는 정상적인 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집에 필수적으로 작용한다. P2X1 수용체는 자극이 되면 비특이적인 이온채널을 통하여 Na^+ 와 Ca^{2+} 이온이 내향 전류를 일으키는 데, 이 수용체의 역할은 아직까지 불분명한 상태이다.^{20,21,24)}

P2Y12 SNP는 H1과 H2, 2개의 haplotype이 보고되어 있는데, H1은 G52T의 G 유전자, H2는 G52T의 T 유전자에 해당한다. Fontana 등은 H2가 ADP에 대한 혈소판의 반응 증가와 관련이 있다고 보고하였으며, 환자-

대조군 연구에서 말초동맥질환과 연관된다고 보고하였다.²⁵⁾ Hetherington 등도 P2Y12 SNP의 혈소판 응집 반응에 따른 차이를 분석하였는데 H2와 혈소판 응집 반응 증가와의 연관성은 없었다.²⁾

ADP 수용체의 다른 한 가지인 P2Y1에 대하여 Hetherington 등은 A1622G SNP가 혈소판 ADP 반응과 유의한 관련이 있다고 보고하였다.²⁾ G 대립유전자를 가진 사람일수록 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집반응이 높았다. 그러나 이 SNP와 관련하여 혈전질환의 위험을 임상적으로 증명하는 자료는 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서 P2Y1 SNP에 관하여 A1622G 이외에 기존에 보고된 적이 없는 A2591T, C1382T, C893T, C1881G, C2259G, A1747T, C647G의 7개 SNP를 추가하여 동시에 분석하였다. 총 8개의 SNP에 대하여 haplotype을 구성하여 전부 분석하였으나 허혈성혈관질환과 정상인 사이의 유의한 차이를 보이지 않았다. P2Y1은 3,122 염기로 구성된 단일 엑손으로 비교적 크기가 작은 유전자이므로 8개의 SNP 위치를 찾아 분석한 것은 P2Y1 전반에 걸쳐 분석한 것이라고 할 수 있다.

최근 국내에서 허혈성혈관질환과 연관되는 SNP를 찾는 연구가 몇가지 이루어졌다. 김 등이 기질 금속성 단백질분해효소(matrix metalloproteinase)-9의 프로모터 부분의 C1562T SNP에서 1562T가 급성심근경색의 유의한 위험인자가 된다고 보고하였다.⁹⁾ 정 등은 아디포넥틴(adiponectin) G276T 및 T45G SNP와 관상동맥질환과의 연관성을 규명하고자 하였으나, 유의한 연관성을 찾지 못하였다.¹⁰⁾ 기존의 허혈성혈관질환과 SNP의 유전적 차이의 관련성을 찾기 위한 연구들은 대부분 1개 또는 2개의 단편적인 SNP에 대하여 분석하였다. 본 연구에서는 P2Y1 SNP에 관하여 A1622G 이외에 기존에 보고된 적이 없는 A2591T, C1382T, C893T, C1881G, C2259G, A1747T, C647G의 총 8개 SNP를 동시에 분석하였다.

동맥경화증과 이에 따른 혈전성 합병증은 다양한 원인에 의하고 환경의 영향을 받기 때문에 SNP가 필연적으로 이러한 질환의 개인 취약성과 연관이 있다고 제안하기 위해서는 신중을 기하여야 할 것이다. 본 연구에서도 흡연, 고혈압, 당뇨병이 허혈성혈관질환 환자에서 높은 비율을 보여 SNP 단독으로 인한 혈전 형성의 영향을 비교 분석하는 데 제한이 있었다. SNP 이외의 유의한 혈전 위험 인자의 영향을 배제하고 분석하기 위해서는 보다 많은 수의 대상 인원이 확보되어야 통계적인 유의성을 찾을 수 있을 것이다. 향후 다수의 SNP 블록 연구 또는 다른 허혈성혈관질환과 관련

된 혈소판 유전자 연구, 허혈성혈관질환의 발병 기전에 관여하는 다른 효소나 수용체에 대한 SNP 연구가 대단위의 환자군에서 이루어진다면 관련 유전자 검사로서 한국인의 허혈성혈관질환 발병을 예측하는 데 도움이 될 것이다.

요 약

배경: 혈소판 ADP 수용체 P2Y1은 혈소판 응집에 중요하다.

방법: 허혈성혈관질환 및 관상동맥질환 환자와 정상인에서 P2Y1의 유전적 차이를 SNP를 이용하여 발견하여 발병가능성을 예측하고자 하였다. P2Y1에서 발견 가능한 8개 유전자를 분석을 시행하여 환자-대조군 연구를 시행하였다. 연관값을 고려하여 최종적으로 A1622G, C647G, C2259G의 3개 위치를 선택하였다. 허혈성뇌혈관질환에 대하여 허혈성뇌혈관질환 환자군 275명과 대조군 275명, 관상동맥질환에 대하여 급성심근경색증 171명, 불안정성협심증 166명, 안정성협심증 173명과 대조군 188명을 대상으로 하였다. SNP는 SNaPshot방법으로 분석하였다.

결과: 허혈성뇌혈관질환 환자에서 A1622G의 AA, AG (OR, 1.170; 95% CI, 0.784~1.748), GG (OR, 1.031; 95% CI, 0.554~1.918)는 환자군과 대조군에서 차이를 보이지 않았다. C647G의 CC, CG (OR, 0.995; 95% CI, 0.639~1.550), GG (OR, 1.012; 95% CI, 0.450~2.277)는 환자군과 대조군에서 차이를 보이지 않았다. C2259G의 CC, CG (OR, 0.619; 95% CI, 0.354~1.082), GG는 환자군과 대조군에서 차이를 보이지 않았다. 관상동맥질환 환자에서 C2259G의 GG, CG (AMI, OR, 0.880, 95% CI, 0.384~2.016; UA, OR, 0.885, 95% CI, 0.410~1.911; SA, OR, 1.156, 95% CI, 0.534~2.501), CC는 급성심근경색, 불안정성협심증, 안정성협심증 및 각 대조군에서 차이를 보이지 않았다. C647G의 GG, CG (AMI, OR, 1.351, 95% CI, 0.731 to 2.497; UA, OR, 1.292, 95% CI, 0.723 to 2.309; SA, OR, 0.977, 95% CI, 0.530 to 1.803), CC (AMI, OR, 0.355, 95% CI, 0.093 to 1.358; UA, OR, 0.645, 95% CI, 0.205 to 2.028; SA, OR, 0.385, 95% CI, 0.113 to 1.311)는 급성심근경색, 불안정성협심증, 안정성협심증 및 각 대조군에서 차이를 보이지 않았다. A1622G의 AA, AG (AMI, OR, 1.416, 95% CI, 0.786~2.549; UA, OR, 1.079, 95% CI, 0.611~1.904; SA, OR, 0.958, 95% CI, 0.529~1.732), GG (AMI, OR, 0.525, 95% CI, 0.195~1.411; UA, OR,

0.568, 95% CI, 0.231~1.401; SA, OR, 0.441, 95% CI, 0.169~1.154)는 급성심근경색, 불안정성협심증, 안정성협심증 및 각 대조군에서 차이를 보이지 않았다.

결론: P2Y1 유전자 단일염기다형성은 허혈성혈관질환 환자와 대조군 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

참 고 문 헌

- 1) Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001;134:224-38.
- 2) Hetherington SL, Singh RK, Lodwick D, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. Dimorphism in the P2Y1 ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:252-7.
- 3) Yamada S, Akita H, Kanazawa K, et al. T102C polymorphism of the serotonin (5-HT) 2A receptor gene in patients with non-fatal acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2000;150:143-8.
- 4) Kim GY. Genetic polymorphism of a platelet glycoprotein IIIa as an inherited risk factor for coronary artery disease in Koreans. *Korean Circ J* 1997;27:1082-6.
- 5) Park S, Park HY, Park C, et al. Association of the gene polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and IIb/IIIa with myocardial infarction and extent of coronary artery disease in the Korean population. *Yonsei Med J* 2004;45:428-34.
- 6) Pyo MK, Yun-Choi HS, Hong YJ. Apparent heterogeneous responsiveness of human platelet rich plasma to catecholamines. *Platelets* 2003;14:171-8.
- 7) Kambayashi J, Shinoki N, Nakamura T, et al. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Thromb Res* 1996;81:85-90.
- 8) Yun-Choi HS, Park KM, Pyo MK. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. *Thromb Res* 2000;100:511-8.
- 9) Kim PJ, Chang K, Koh YS, et al. Functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 is strongly associated with acute myocardial infarction. *Korean Circ J* 2005;35:192-6.
- 10) Jung CH, Rhee EJ, Kim SY, et al. Association between two SNPs (+45T>G and +276G>T) of the adiponectin gene and coronary artery diseases. *Korean J Med* 2006;70:393-401.
- 11) Kim JM, Lee YY, Koo YK, et al. Association between

- platelet polymorphism and cardiovascular diseases in the Korean population. In: 15th Congress of the Korean Society on Thrombosis and Hemostasis; 2005 12.02.: The Korean Journal of Thrombosis and Hemostasis; 2005;12:113.
- 12) Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 2001;85:626-33.
 - 13) Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999;93:2449-53.
 - 14) Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998;92:2771-6.
 - 15) Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIA gene PLA2 polymorphism. *Thromb Haemost* 1998;80:218-9.
 - 16) Goldschmidt-Clermont PJ, Cooke GE, Eaton GM, Binkley PF. PLA2, a variant of GPIIIa implicated in coronary thromboembolic complications. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:90-3.
 - 17) Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, et al. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risk: the stroke prevention in young women study. *Stroke* 1998;29:581-5.
 - 18) Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha, beta-methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001;85:303-8.
 - 19) Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001;107:1591-8.
 - 20) Woulfe D, Yang J, Brass L. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* 2001;107:1503-5.
 - 21) MacKenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem* 1996;271:2879-81.
 - 22) Léon C, Hechler B, Freund M, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 1999;104:1731-7.
 - 23) Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 2003;108:2971-3.
 - 24) Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14: 18-22.
 - 25) Fontana P, Dupont A, Grandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108:989-95.