

## 한국인 다낭난소증후군 환자의 Calpain-10 유전자다형성

이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실, 산부인과학교실<sup>1</sup>

이혜진 · 변건우 · 변은경 · 오지영 · 오지영 · 홍영선 · 성연아 · 정혜원<sup>1</sup>

### Calpain-10 Polymorphism in Korean Women with Polycystic Ovary Syndrome

Hye jin Lee, Gun Woo Pyun, Eun Kyung Byun, Ji Young Oh, Jee-Young Oh,  
Youngsun Hong, Yeon-Ah Sung, Hye Won Chung<sup>1</sup>

Departments of Internal Medicine and Obstetrics and Gynecology<sup>1</sup>, Ewha Womans University School of Medicine

#### ABSTRACT

**Background:** Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by chronic anovulation, hyperandrogenism and insulin resistance, and PCOS is known to be associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus (DM). PCOS has also been proposed to share a common genetic background with type 2 DM. The calpain 10 (CAPN10) gene is known to be associated with type 2 DM in several different population. We examined the association of CAPN10 gene polymorphisms and their influence on the metabolic abnormalities in Korean women who suffer with PCOS.

**Methods:** One hundred sixty four women with PCOS and 325 control women were studied. The CAPN10 gene polymorphisms were genotyped by amplifying the genomic DNA. Anthropometric measures, a 75g oral glucose tolerance test and measurement of insulin sensitivity by the euglycemic hyperinsulinemic clamp technique were performed.

**Results:** The frequencies of CAPN10 UCSNP-43, UCSNP-19, UCSNP-63 and the haplotype combinations were not different between the women with PCOS and the control subjects. In the women with PCOS and who had the UCSNP-43 GA genotype, the post-load 90 minute plasma glucose level was significantly greater and the HDL cholesterol and insulin mediated glucose uptake were significantly lower compared to the women with PCOS and who had the GG genotype.

**Conclusion:** The CAPN10 UCSNP-43 genotype might be responsible for insulin resistance, yet further study is required to confirm the role of this genetic polymorphism in the development of PCOS and the presentation of its disease features. (J Korean Endocr Soc 23:319~326, 2008)

**Key Words:** calpain 10, insulin resistance, polycystic ovary syndrome

#### 서 론

만성 무배란과 안드로젠 과다가 특징인 다낭난소증후군 (Polycystic ovary syndrome, PCOS)은 가임 여성의 5~10% 가 이환 되는 매우 흔한 질환이며, 흔히 인슐린 저항성이 동

반된다. PCOS의 병인은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않으나, 가족 내의 호발 경향은 이 질환의 유전적 소인을 시사한다[1].

PCOS의 유전 양상은 아직 확실하지 않으나 다 유전자 이상에 의한 것으로 생각되며 여러 후보 유전자들이 연구되었다. PCOS의 후보 유전자는 스테로이드 호르몬 생성을 조절하는 경로[2,3], 생식샘자극호르몬의 작용을 조절하는 경로[4], 인슐린 신호전달체계[5,6], 체중 조절 및 에너지 이용 경로에 관여하는 유전자들일 것으로 생각된다[7]. 이중 인슐린 작용에 관여하는 유전자들은 PCOS에서 나타나는 생식

접수일자: 2008년 5월 15일

통과일자: 2008년 6월 13일

책임저자: 이혜진, 이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실

제 이상과 대사 이상을 함께 설명할 수 있는 후보 유전자로 생각되며, 인슐린 유전자, 인슐린 수용체 유전자, 인슐린 수용체 기질 유전자 그리고 calpain-10 (CAPN10) 유전자가 대표적인 유전자이다. PCOS에서 내당능장애나 제2형 당뇨병의 발생이 증가하며, 따라서 제2형 당뇨병과 관련된 유전자가 PCOS 병인에도 작용할 가능성이 있다. CAPN10은 제2형 당뇨병 위험도와 관련이 있고[8,9], 인슐린 분비와 감수성에 중요한 역할을 한다[10,11]. CAPN10의 단일 뉴클레오타이드 다형태(single nucleotide polymorphism, SNP)인 UCSNP-43과 UCSNP-43, -19, -63의 haplotype 조합인 112/121이 제2형 당뇨병과의 관련이 보고된 바 있다[9]. UCSNP-43 A allele은 특발성 조모증과 관련 있는 것이 밝혀졌고[12], 또한 CAPN10 유전자다형성은 서구인에서 PCOS의 위험도를 증가시키는 것으로 보고되었다[13,14].

PCOS는 인종적으로 다양한 병인 및 유전적인 소인이 예상되지만[15] 현재 국내에서는 이러한 연구가 매우 부족한 상태이다. 본 연구에서는 한국인 PCOS에서 중요한 병인 중 하나인 인슐린저항성과 이와 관련된 CAPN10 유전자다형성을 분석하여 이들 유전자다형성이 PCOS의 유병이나 인슐린 저항성 및 대사적 특징과 관련 있는지 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

2001년 3월부터 2006년 3월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 산부인과 및 내분비 내과를 방문한 164명의 PCOS 환자와 325명의 대조군을 대상으로 하였다. PCOS의 진단은 2003년 European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)에서 정한 진단기준에 따라 만성적인 무배란, 임상적 고안드로겐증이나 고안드로겐혈증, 초음파 검사에서 다낭 난소 중 두 가지 이상을 만족하고 비전형적 선천성 부신과증식 등 기타 고안드로겐증의 다른 원인이 배제된 경우로 하였다[16]. PCOS 환자 중 3개월 이내에 경구용 피임제나 스테로이드 복용력이 있는 경우 약 중지 12주 후 검사를 하였다. 대조군은 환자의 연령과 체질량지수를 짝짓기한 21~35세의 정상 월경주기의 여성으로 당뇨병, 고혈압, 불임 등의 가족력이 없는 경우로 하였다. 모든 검사는 이대의료원 목동병원 임상시험 위원회의 승인을 받았고 각 대상에게 동의서를 받았다.

### 2. 연구방법

#### 1) 임상적 특징

모든 대상자에서 표준화된 신장 계측기와 체중계로 신장 및 체중을 측정하고, 체질량지수(body mass index, BMI)는 체중(kg)/[신장(m)]<sup>2</sup>으로 계산하였으며, 허리둘레와 엉덩이 둘레를 측정하였다. 대상자의 배꼽수준에서 전산화단층촬영

(Somatom Sensation, Siemens)을 하여 내장지방 면적(visceral fat area, VFA)을 측정하였다. 혈압은 대상자를 5분 이상 충분히 안정시킨 후 두 차례 측정하여 평균값을 구하였다. 조모증은 Ferriman-Gallwey 방법으로 산출하여 7점 이상인 경우에 조모증이 있다고 정의하였다[17].

#### 2) 혈액검사

대조군은 초기 난포기에, PCOS 환자는 임의로 선택한 날에 8 시간 이상 금식한 후, 다음날 아침 공복상태에서 혈액을 채취하였다. 총 테스토스테론, 디하이드로에피안드로스테론은 상품화된 키트를 사용하여 방사면역측정법으로 측정하였고(Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA), 성선 호르몬 결합 글로불린, 황체호르몬, 난포자극호르몬은 방사면역계수법으로 측정하였다(Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA). 유리 테스토스테론은 총 테스토스테론과 성선 호르몬 결합 글로불린, 알부민농도를 이용하여 Kaufman의 공식으로 계산하였다[18](<http://www.issam.ch/freetesto.htm>).

총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤은 최소한 8시간 이상 금식 후 혈액을 채취하여, 자동 분석기(Hitachi 7150 autochemistry analyzer, Japan)를 이용하여 효소법으로 측정하였다.

모든 대상자에서 8시간 이상 금식한 후 다음날 아침 공복 및 75 g 포도당 섭취 30분, 60분, 90분, 120분 후 혈장 포도당을 측정하여, 세계 보건기구의 기준에 의해 내당능 상태를 판정하였다. 혈당은 포도당분석기(Beckman Model Glucose Analyzer 2)를 사용하여 포도당 산화법으로 측정하였고, 혈청 인슐린 농도는 방사면역측정법으로 측정하였다(Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA).

정상혈당 고인슐린 클램프를 시행하여 인슐린 감수성을 측정하였다. 대상자는 검사 전 최소한 8시간 이상 금식 후 약 30분간 침대에서 안정을 취하고 오전 9시부터 검사를 시작하였다. 동맥화된 정맥혈의 채혈을 위하여 전박부 정맥에 폴리에틸렌 카테터를 넣고 50℃의 온열기를 전박부에 놓았다. 혈당 측정을 위하여 -20, -10, 0분 및 5분부터 120분까지 매 5분마다 채혈하였다. 포도당과 인슐린을 정주하기 위하여 반대편의 전박부 정맥에 카테터를 삽입하였고 인슐린은 -20분부터 0분까지 처음 20분 동안은 2 mU/min/kg의 속도로, 그 이후에는 1 mU/min/kg로 정주하였다. 20% 포도당은 -20분부터 5분까지는 20 mL/hr의 속도로, 그 이후부터는 매 5분마다 측정된 포도당 농도로부터 DeFronzo의 공식을 이용하여 결정하였다[19]. 마지막 15분간의 포도당 주입속도(glucose infusion rate)의 평균값으로 insulin mediated glucose uptake (IMGU)를 계산하여, 인슐린 감수성의 지표로 이용하였다. 대조군의 인슐린 감수성 지표인 IMGU의 10 백분위수 값인 4.5 mg/kg/mg보다 IMGU가 감소되어 있을 때 인슐린저항성이 있다고 정의하였다.

### 3) 유전형분석

대상자의 말초 전혈 4.3 mL을 0.7 mL의 ACE (acid citrate EDTA) 용액이 들어있는 튜브에 채혈하였다. EDTA 튜브에 채취한 200 µL의 혈액시료에서 QIA amp blood kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany)을 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분광광도계로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 농도를 측정한 후, 중합효소 연쇄반응 전까지 -20℃에 보관하였다.

#### (1) UCSNP-43

분리한 genomic DNA에서 UCSNP-43을 포함하고 있는 175 염기쌍을 증폭시키기 위해 DNA 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응을 위해 시발체(primer)를 아래와 같이 제작하였다.

forward primer:

5'-GCAGGGTTGGAGCTTGAGAG-3'

reverse primer:

5'-AAGTCAAGGCTTAGCCTCACCTTCATA-3'

추출한 genomic DNA 0.1 µg과 양방향의 시발체 각각 10 nmol/mL, 5 mM의 dNTP, Taq DNA 중합효소(Promega, Madison, WI) 0.5 unit, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.3)을 20 µL의 PCR 혼합액에 첨가하였다. 중합효소 연쇄반응은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk)을 이용하였으며, 조건은 94℃ 2분으로 초기 변성 후, 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 반복하였고, 72℃에서 7분간 연장 반응 후 종료하였다. 175 염기쌍의 중합효소 연쇄반응 산물을, 제한 효소인 NdeI (New England Biolabs Inc., Beverly, MA)을 사용하여 37℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응물은 ethidium bromide (0.1 µg/mL)를 포함한 2.8% agarose 겔에서 전기영동하였다. Gel blot을 분석하였으며 blot의 사진은 ultraviolet densitometry (Gel-Doc and Chemidoc system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 출력하였다. G allele을 포함하고 있는 반응물은 제한 효소 NdeI에 의해 절단되지 않아 175 염기쌍만을 보이며, A allele를 포함하고 있는 산물은 제한효소에 의해 절단되어 148 염기쌍과 27 염기쌍의 DNA절편을 보인다. 175 염기쌍만을 보이는 경우를 GG 동형접합체로, 제한효소에 잘라져서 148 염기쌍과 27 염기쌍의 두 염기밴드가 보이면 AA 동형접합체로, 이들 염기밴드가 모두 보이는 경우에는 GA 이형접합체로 판독하였다.

#### (2) UCSNP-19

32 염기쌍의 삽입(insertion:I)/결손(deletion:D) 유전자변형을 가진 SNP-19를 포함한 부위를 증폭시키기 위해 DNA 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응을 위

해 시발체를 아래와 같이 제작하였다.

forward primer:

5'-CAGGCCCCAGTTTGGTTCTCTTC-3'

reverse primer:

5'-CTCCCACAAGCCCCACCCT-3'

추출한 genomic DNA 0.1 µg과 양방향의 시발체 각각 10 nmole/mL, 5 mM의 dNTP, Taq DNA 중합효소(Promega, Madison, WI) 0.5 unit, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.3)을 20 µL의 PCR 혼합액에 첨가하였다. 중합효소 연쇄반응은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk)을 이용하였으며, 조건은 94℃ 2분으로 초기 변성 후, 94℃ 30초, 66℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 반복하였고, 72℃에서 7분간 연장 반응 후 종료하였다. 반응물은 ethidium bromide (0.1 µg/mL)를 포함한 2.8% agarose 겔에서 전기영동하였다. Gel blot을 분석하였으며 blot의 사진은 ultraviolet densitometry (Gel-Doc and Chemidoc system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 출력하였다. 109 염기쌍만을 보이는 경우는 DD 동형접합체로, 141 염기쌍만을 보이는 경우는 II 동형접합체로, 109 염기쌍과 141 염기쌍 모두를 보이는 경우는 DI 이형접합체로 판독하였다.

#### (3) UCSNP-63

중합효소 연쇄반응을 위해 시발체를 아래와 같이 제작하였다.

forward primer:

5'-GAACCAGTGCTTGGCAGCTCAC-3'

reverse primer:

5'-GCAGTGCCTGGTGCCTGAAGG-3'

추출한 genomic DNA 0.1 µg과 양방향의 시발체 각각 10 nmole/mL, 5 mM의 dNTP, Taq DNA 중합효소(Promega, Madison, WI) 0.5 unit, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.3)을 20 µL의 PCR 혼합액에 첨가하였다. 중합효소 연쇄반응은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk)을 이용하였으며, 조건은 94℃ 2분으로 초기 변성 후, 94℃ 30초, 61℃ 30초, 72℃ 60초를 35회 반복하였고, 72℃에서 7분간 연장 반응 후 종료하여 477 염기쌍의 중합효소 연쇄반응 산물을 얻었다. 중합효소 연쇄반응 산물은 ethidium bromide (0.1 µg/mL)를 포함한 1% agarose 겔에서 전기영동하여 자외선 하에서 분석하였다. 전기영동한 agarose 겔로부터 원하는 DNA 조각을 잘라 purification시킨 후 DNA sequencers를 통해 DNA sequencing을 수행하고(Takara Korea Biomedical Inc.). Chromas program을 통하여 sequence를 판독하였다.

#### 4) 통계 분석

통계분석은 SPSS 12.0 프로그램을 이용하였고 측정치는 평균과 표준편차로 표시하였다. 대조군과 환자의 유전자다형성 빈도 차이의 분석은 교차분석을 하였고 위험도의 산출은 로지스틱 회귀분석을 하였다. 유전자 변이별 대사적 지표의 차이는 Student's t-test와 비모수통계의 Mann-Whitney U 검증을 하였고 체중 등 외생변수의 효과를 통제하기 위하여 공분산 분석(analysis of covariance)을 하였다. 유의수준은  $P$ 값 0.05 미만으로 하였다.

#### 결 과

##### 1. 대상 환자의 임상 특징과 인슐린 감수성

대상 환자의 임상적 특징은 Table 1에 표시된 바와 같다. PCOS 환자의 평균연령은  $26 \pm 5$ 세, 평균 체질량지수는  $22.9 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$ 이었고, 164명 중 62.8%가 정상체중( $\text{BMI} < 23 \text{ kg/m}^2$ ), 11.6%가 과체중( $23 \leq \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), 25.6%가 비만( $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$ )이었다. 대조군의 인슐린 감수성 지표인 IMGU의 10 백분위수 값인  $4.5 \text{ mg/kg} \cdot \text{mg}$ 보다 IMGU값이 감소되어 있을 때 인슐린 저항성이 있다고 정의하면 PCOS 환자 중 44.5%가 인슐린 저항성이 있었고, 비만한 환자는 85.7%, 비만하지 않은 환자는 30.3%가 인슐

**Table 1.** Clinical and biochemical characteristics in women with PCOS and control

	PCOS (n = 164)	Control (n = 352)
Age (yr)	$26 \pm 5$	$25 \pm 2$
Waist (cm)	$74 \pm 10$	$67 \pm 5^*$
Body mass index ( $\text{kg/m}^2$ )	$22.9 \pm 4.2$	$22.1 \pm 3.6$
Systolic BP (mmHg)	$117 \pm 13$	$118 \pm 10$
Diastolic BP (mmHg)	$75 \pm 10$	$78 \pm 8$
Free testosterone (ng/dL)	$0.9 \pm 0.5$	$0.5 \pm 0.2^*$
SHBG (nmol/L)	$39.9 \pm 25.4$	$55.4 \pm 25.8^*$
LH (IU/L)	$8.4 \pm 5.2$	$5.3 \pm 5.9$
FSH (IU/L)	$5.1 \pm 3.8$	$4.0 \pm 1.8$
Fasting glucose (mg/dL)	$87 \pm 7$	$76 \pm 8^*$
Fasting insulin ( $\mu\text{U/mL}$ )	$6.8 \pm 5.1$	$2.5 \pm 3.2^*$
Total cholesterol (mg/dL)	$169 \pm 41$	$165 \pm 27$
Triglyceride (mg/dL)	$54 \pm 49$	$49 \pm 33$
HDL-cholesterol (mg/dL)	$54 \pm 15$	$58 \pm 9$
IMGU ( $\text{mg/kg} \cdot \text{min}$ )	$4.9 \pm 2.0$	$6.1 \pm 1.4^*$

BP, blood pressure; FSH, follicle stimulating hormone; IMGU, insulin mediated glucose uptake; LH, luteinizing hormone; SHBG, sex hormone binding globulin. \*  $P < 0.05$  vs. PCOS.

**Table 2.** Frequencies of Calpain-10 UCSNP-43, -19, -63 genotypes and haplotypes controls and women with PCOS

	Control (%) (n = 352)	PCOS (%) (n = 164)	OR (95%CI)
UCSNP-43			
GG	286 (81.2)	143 (87.2)	1
GA	66 (18.8)	21 (12.8)	0.64 (0.37~1.08)
UCSNP-19			
DD	41 (11.6)	17 (10.3)	0.89 (0.48~1.66)
DI	146 (41.5)	70 (42.7)	1.03 (0.69~1.52)
II	165 (46.9)	77 (47.0)	1
UCSNP-63			
CC	210 (61.2)	90 (58.8)	1
CT	14 (4.1)	6 (3.9)	0.90 (0.33~2.45)
TT	119 (34.7)	57 (37.3)	1.12 (0.75~1.67)
Haplotype			
111	10 (2.9)	3 (2.0)	0.67 (0.18~2.46)
112	31 (9.0)	13 (8.5)	0.94 (0.48~1.84)
121	155 (45.2)	74 (48.4)	1.14 (0.78~1.66)
122	82 (23.9)	42 (27.5)	1.20 (0.78~1.86)
212	1 (0.3)	0 (0)	-
221	44 (12.8)	13 (8.5)	0.63 (0.33~1.21)
222	20 (5.8)	8 (5.2)	0.89 (0.38~2.07)

린 저항성이 있었다.

## 2. 유전자형 분포

CAPN10 유전자형의 분포는 UCSNP-43 유전자형이 PCOS 환자에서 GG 87.2%, GA 12.8%, 대조군에서 GG 81.2%, GA 18.8%였으며 UCSNP-19 유전자형은 PCOS 환자에서 DD 10.3%, DI 42.7%, II 47.0%, 대조군에서는 DD 11.6%, DI 41.5%, II 46.9%, UCSNP-63 유전자형은 PCOS 환자에서 CC 58.8%, CT 3.9%, TT 37.3%였으며, 대조군은 CC 61.2%, CT 4.1%, TT 34.7%로서 PCOS 환자와 대조군 사이에 차이가 없었다. CAPN10 유전자의 haplotype (UCSNP-43, -19, and -63) 조합의 분포는 PCOS 환자에서 111형 2.0%, 112형 8.5%, 121형 48.4%, 122형 27.5%, 221형 8.5%, 222형 5.2%였고 212형은 관찰되지 않았다. 대조군에서는 111형 2.9%, 112형 9.0%, 121형 45.2%, 122형 23.9%, 212형 0.3%, 221형 12.8%, 222형 5.8%로서 PCOS

환자와 대조군 사이에 차이가 없었다(Table 2). IMGU값 4.5 mg/kg · mg을 기준으로 인슐린저항성군(group 1)과 인슐린 감수성군(group 2)을 나누면 UCSNP-43 GA 유전자형의 빈도가 인슐린 저항성군 18.9%, 인슐린 감수성군 7.8%로 인슐린 저항성군에서 유의하게 높았다(Table 3).

## 3. CAPN10 유전자형에 따른 표현형

PCOS 환자에서 유전자형에 따른 임상적 대사적 특징을 비교해본 결과 CAPN10 UCSNP-19, -63에서는 각각의 유전자형에 따른 차이가 없었다. CAPN10 UCSNP-43 GA 유전자형을 가진 군에서 GG 유전자형을 가진 군에 비해 경구 포도당부하 검사 90분 후 혈당( $140 \pm 34$  vs.  $125 \pm 30$  mg/dL,  $P < 0.05$ )이 의미 있게 증가되어 있었다. 또한 GA 유전자형을 가진 군에서 GG 유전자형을 가진 군에 비해 HDL-콜레스테롤( $46 \pm 13$  vs.  $54 \pm 14$  mg/dL,  $P < 0.05$ )과 IMGU값( $4.2 \pm 1.4$  vs.  $5.0 \pm 2.0$  mg/kg/min,  $P < 0.05$ )이

**Table 3.** Frequencies of Calpain-10 UCSNP-43 genotype in women with PCOS by insulin sensitivity

UCSNP-43 genotype	Group 1(%) (n = 74)	Group 2(%) (n = 90)
GG	60 (81.1)	83 (92.2)*
GA	14 (18.9)	7 (7.8)

\*;  $P < 0.05$  by  $\chi^2$  test. Group 1, Insulin resistant women with PCOS; Group 2, Insulin sensitive women with PCOS; Insulin resistance is defined as less than 10th percentile of IMGU (4.5 mg/kg · min) in regular cycling control women.

**Table 4.** Clinical and biochemical characteristics according to Calpain-10 UCSNP-43 genotype in women with PCOS

	GG (n = 143)	GA (n = 21)
Age (yr)	26 ± 5	27 ± 6
Waist (cm)	74 ± 11	77 ± 10
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.7 ± 4.2	24.4 ± 4.2
Systolic BP (mmHg)	117 ± 13	113 ± 9
Diastolic BP (mmHg)	75 ± 10	72 ± 8
Visceral fat area (cm <sup>2</sup> )	35.5 ± 25.2	60.9 ± 49.3
Free testosterone (ng/dL)	0.9 ± 0.5	1.1 ± 1.6
SHBG (nmol/L)	40.4 ± 24.8	36.4 ± 21.5
DHEAS (μg/dL)	193.9 ± 131.3	177.9 ± 122.8
LH (IU/L)	7.5 ± 4.8	9.6 ± 5.2
FSH (IU/L)	5.0 ± 3.7	5.3 ± 3.8
Fasting glucose (mg/dL)	87 ± 7	85 ± 7
Post load glucose 30' (mg/dL)	136 ± 21	146 ± 16
Post load glucose 60' (mg/dL)	135 ± 32	143.7 ± 34
Post load glucose 90' (mg/dL)	125 ± 30	140 ± 34*
Post load glucose 120' (mg/dL)	117 ± 26	128 ± 27
Fasting insulin (μU/mL)	7.6 ± 5.4	7.6 ± 5.7
Post load insulin 30' (μU/mL)	31.5 ± 23.8	19.3 ± 15.4
Post load insulin 60' (μU/mL)	31.8 ± 24.2	36.7 ± 25.8
Post load insulin 90' (μU/mL)	35.6 ± 25.2	46.9 ± 29.3
Post load insulin 120' (μU/mL)	36.0 ± 28.5	35.0 ± 29.2
Total Cholesterol (mg/dL)	169 ± 40	164 ± 47
Triglyceride (mg/dL)	59.0 ± 48	54.0 ± 45
HDL-Cholesterol (mg/dL)	54.8 ± 14.8	46.5 ± 13.1*
IMGU (mg/kg · min)	5.0 ± 2.0	4.2 ± 1.4*

Data are mean ± SD. \*  $P < 0.05$  vs. GG. BP, blood pressure; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; FSH, follicle stimulating hormone; IMGU, insulin mediated glucose uptake; LH, luteinizing hormone; SHBG, sex hormone binding globulin.

유의하게 감소되어 있었으며 이들은 체중으로 보정한 후에도 의미가 있었다(Table 4). 대조군에서는 각 유전자형에 따른 대사적 특징에 유의한 차이가 없었다.

## 고 찰

PCOS의 가족 내 호발 경향은 이 질환이 유전적 소인이 있음을 시사한다. 그러나 유전방식은 아직 확실하지 않으며, 최근 연구들에 의하면 단일 유전자에 의한 유전보다는 여러 유전자가 환경적 인자와 상호작용하여 PCOS의 표현형을 유발할 가능성을 제시하고 있다[20,21]. 그 원인 유전자는 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나 이 질환의 주요 병인인 인슐린 작용과 관련된 유전자가 원인 유전자일 가능성이 있다. 본 연구에서는 인슐린 작용 및 제2형 당뇨병 위험도와 관련된 유전자인 CAPN10 유전자다형성의 빈도를 분석하고, 그에 따른 표현형을 관찰하였다. 그 결과, PCOS 환자와 대조군 사이에 CAPN10 UCSNP-43, -19, -63 그리고 haplotype 조합의 빈도 차이는 없었으나, UCSNP-43 GA 유전자형의 빈도가 인슐린 저항성군에서 유의하게 높았다. 또한 calpain-10 UCSNP-43 GA 유전자형을 가진 군이 GG 유전자형을 가진 군에 비해 경구포도당부하 검사 90분 후 혈당이 증가되어 있었고 HDL-콜레스테롤과 IMGU 값이 유의하게 감소하여 있었으며 이들은 체중으로 보정한 후에도 의미가 있어 한국인 PCOS 환자에서 CAPN10 UCSNP-43 GA 유전자형과 인슐린 저항성이 연관이 있을 것으로 생각되었다.

Calpain은 모든 조직에서 발견되는 non-lysosomal cysteine proteases로, 지방세포 분화, 인슐린 분비와 작용의 조절, 유리지방산 대사와 관련되어 있으며[22,23], 이러한 특징은 PCOS와도 관련되어 있다. CAPN10 유전자는 염색체 2q37.3에 위치하며 15개의 엑손으로 구성되어 있고, 제2형 당뇨병 원인 유전자 탐색 과정에서 발견되었다. Horikawa 등[9]은 멕시코계 미국인과 북부 유럽인에서 CAPN10 유전자다형성(UCSNP-43, UCSNP-19, UNSNP-63)이 제2형 당뇨병의 위험을 3배 증가시킨다는 보고를 했으며, 그 후 여러 연구에서 CAPN10 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 관련성이 밝혀졌다[24~28]. 국내에서도 CAPN10 SNP-43, -19, -63 111/121 haplotype 조합이 제2형 당뇨병 환자에서 대사증후군의 위험도를 증가시킨다는 보고가 있었다[29].

PCOS 환자에게 제2형 당뇨병의 위험은 2~7배 증가한다[30,31]. 이전에 발표된 역학 연구나 유전자 연구는 PCOS와 제2형 당뇨병이 병인에서 유전적 감수성 인자를 공유할 가능성을 제시하였고, 여러 연구에서 제2형 당뇨병에 관련된 유전자가 PCOS의 병인에도 역할을 함을 증명하였다[7,30,32,33]. CAPN10도 그 유전자 중 하나로, 영국인에서 처음으로 PCOS와 CAPN10 UCSNP-44 allele과의 관계가 보고되었다[34]. 미국 흑인에서는 112/121 haplotype 조

합(UCSNP-43, -19, -63)이 있는 경우 PCOS의 발병 위험이 2배 증가되었다고[13], 백인에서 CAPN10 UCSNP-44 allele이 PCOS 발병과 관련되어 있음이 보고되었다[14]. 스페인 여성에서는 2111과 1221 haplotype (UCSNP-44, -43, -19, -63)에서 조모증이 대조군에 비해 많았으며 UCSNP-19 ins allele를 포함하는 1121 haplotype (UCSNP-44-43, -19, -63)에서 콜레스테롤이 높았다[14]. 이전의 연구들이 CAPN10과 PCOS와의 관련성을 강하게 시사하고 있지만, 아직 논란의 여지가 있다. 이는 PCOS의 표현형이 다양하고, 가임기여성에서만 나타나는 제한 점이 있으며, 각 연구의 진단기준이 통일화되지 못했던 문제가 있다. 또한 기존의 연구는 주로 서구인들을 대상으로 한 연구로 동양인 PCOS 환자를 대상으로 한 연구는 거의 없었다.

PCOS 환자의 임상적 특징은 인종에 따라 다양한 차이를 보이며, 본 연구 결과에서 한국인 PCOS 환자는 특징적으로 비만의 빈도가 낮았다. 아시아인의 기준인 체질량지수 25 kg/m<sup>2</sup>를 기준으로 하면 비만이 25.6%, 정상체중이 62.8%로 비만의 빈도가 서구인에 비해 유의하게 낮다[35]. 따라서 임상 양상이 다른 서구인과 비교해 유전적 특징이 다를 가능성을 생각해 볼 수 있겠다. 본 연구는 참여한 환자군이 많지 않았지만, 단일 기관에서 환자가 모집되어 동일한 진단기준을 사용할 수 있었다는 장점이 있었다. 연구 결과에서 CAPN10의 유전자형 분포는 PCOS군과 대조군에서 차이를 보이지 않아, 기존 서구인 PCOS의 연구와 다른 결과를 보였으며, 단지 CAPN10 UCSNP -43 GA 유전자형을 가진 군이 인슐린 저항성과 관련될 가능성을 보였다. 그러나 그 유전적 관련성의 정확한 기전은 확실하지 않다. 이러한 기존 연구와의 차이가 인종에 따른 차이에 기인한 것인지를 확인하기 위해서는 더 많은 PCOS환자와 대조군에 대한 분석과 함께, 가족을 포함한 연구 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 요 약

**연구배경:** 만성 무배란과 안드로겐 과다가 특징인 다낭난소증후군(Polycystic ovary syndrome, PCOS)은 흔히 인슐린 저항성이 동반된다. PCOS에서 제2형 당뇨병의 위험이 증가되어 있으며, 제2형 당뇨병과 동일한 유전적 배경을 가질 가능성이 있다. 본 연구는 한국인 PCOS 환자에서 Calpain-10 (CAPN10) 유전자다형성의 빈도와, 유전자다형성이 대사 이상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

**방법:** 164명의 PCOS 환자와 325명의 대조군을 대상으로 하였다. CAPN10 유전자다형성을 분석하였고, 신체계측, 75 그램 경구포도당부하 검사를 하였고 정상혈당 고인슐린 클램프 검사를 이용하여 인슐린 감수성을 계산하였다.

**결과:** PCOS 환자와 대조군에서 CAPN10 UCSNP-43,

-19, -63 유전자형과 haplotype 조합의 빈도는 차이가 없었다. CAPN10 UCSNP-43 GA 유전자형을 가진 군에서 GG 유전자형을 가진 군에 비해 경구 당부하 검사 90분 후 혈당이 높았고, HDL-콜레스테롤과 IMGU 값은 유의하게 낮았다.

**결론:** CAPN10 UCSNP-43 유전자다형성은 PCOS에서 인슐린저항성과 관련되어 있을 것으로 생각되나, PCOS 발생과 표현형에 미치는 유전자다형성의 역할을 규명하기 위해서는 보다 여러 기관에서 추출된 환자를 대상으로 대규모 연구가 필요할 것이다.

## 참 고 문 헌

- Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd, Fox J, Dunaif A: Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14956-14960, 1998
- Gharani N, Waterworth DM, Batty S, White D, Gilling-Smith C, Conway GS, McCarthy M, Franks S, Williamson R: Association of the steroid synthesis gene CYP11a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Genet* 6:397-402, 1997
- Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S, Williamson R: Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 3:1873-1876, 1994
- Franks S: Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333:853-861, 1995
- Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T: Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 41:1257-1266, 1992
- Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z: Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 96:801-810, 1995
- Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, Azziz R, Ehrmann DA, Norman RJ, Strauss JF 3rd, Spielman RS, Dunaif A: Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8573-8578, 1999
- Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzsch H, Schröder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI: A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet* 13:161-166, 1996
- Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26:163-175, 2000
- Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C: A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:R69-R73, 2000
- Sreenan SK, Zhou YP, Otani K, Hansen PA, Currie KP, Pan CY, Lee JP, Ostrega DM, Pugh W, Horikawa Y, Cox NJ, Hanis CL, Burant CF, Fox AP, Bell GI, Polonsky KS: Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 50:2013-2020, 2001
- Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millán JL: Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertil Steril* 77:581-587, 2002
- Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, Bell GI, Cox NJ: Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1669-1673, 2002
- Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragón MJ, Figueroa MJ, Velarde P, Royo JL, Real LM, Ruiz A: Comment: CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3971-3976, 2002
- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL: The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome.

- Endocr Rev 26:251-282, 2005
16. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group: Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:19-25, 2004
17. Ferriman D, Gallwey JD: Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 21:1440-1447, 1961
18. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM: A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3666-3672, 1999
19. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-223, 1979
20. Crosignani PG, Nicolosi AE: Polycystic ovarian disease: heritability and heterogeneity. *Hum Reprod Update* 7:3-7, 2001
21. Weiss KM, Terwilliger JD: How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet* 26:151-157, 2000
22. Patel YM, Lane MD: Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1279-1284, 1999
23. Smith LK, Rice KM, Garner CW: The insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease. *Mol Cell Endocrinol* 122:81-92, 1996
24. Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, Kaushal R, Wolujewicz M, McGarvey ST, Tufa J, Viali S, Deka R: Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association. *Am J Hum Genet* 69:1236-1244, 2001
25. Evans JC, Frayling TM, Cassell PG, Saker PJ, Hitman GA, Walker M, Levy JC, O'Rahilly S, Rao PV, Bennett AJ, Jones EC, Menzel S, Prestwich P, Simecek N, Wishart M, Dhillon R, Fletcher C, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Ellard S, McCarthy MI, Hattersley AT: Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. *Am J Hum Genet* 69:544-552, 2001
26. Elbein SC, Chu W, Ren Q, Hemphill C, Schay J, Cox NJ, Hanis CL, Hasstedt SJ: Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87:650-654, 2002
27. Fingerlin TE, Erdos MR, Watanabe RM, Wiles KR, Stringham HM, Mohlke KL, Silander K, Valle TT, Buchanan TA, Tuomilehto J, Bergman RN, Boehnke M, Collins FS: Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort. *Diabetes* 51:1644-1648, 2002
28. Lynn S, Evans JC, White C, Frayling TM, Hattersley AT, Turnbull DM, Horikawa Y, Cox NJ, Bell GI, Walker M: Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population. *Diabetes* 51:247-250, 2002
29. Kang ES, Nam M, Kim HJ, Kim HJ, Myoung SM, Rhee Y, Ahn CW, Cha BS, Lee HC: Haplotype combination of Calpain-10 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 73:268-275, 2006
30. Colilla S, Cox NJ, Ehrmann DA: Heritability of insulin secretion and insulin action in women with polycystic ovary syndrome and their first degree relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2027-2031, 2001
31. Dunaif A: Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 98:33S-39S, 1995
32. McKeigue P, Wild S: Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 349:1771-1772, 1997
33. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S, Conway GS, White D, Todd JA, Franks S, Williamson R: Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 349:986-990, 1997
34. Haddad L, Gharani N, Evans J, Cela E, Franks S, M M Linkage and association of variants of the diabetes susceptibility-gene NIDDM1 CAPN10 with polycystic ovarian syndrome in European parent-offspring trios. 82nd Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, Ontario, Canada, 2000; pp 75
35. Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA: Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 167:1807-1812, 1992