Original Articles Korean Circulation J 2001;31(8):757-766

관상동맥 질환 환자에서 위험인자로서 Homocysteine 혈중 농도와 대사 효소의 유전형 변이

동아대학교 의과대학 순환기내과학교실,[1] 임상병리과학교실[2]
김상곤[1] · 김영대[1] · 김성근[1] · 장세준[1] · 오일환[1] · 김봉근[1] · 이수훈[1]
박태호[1] · 양두경[1] · 차광수[1] · 김무현[1] · 김종성[1] · 한진영[2] · 김정만[2]

Plasma Homocysteine Concentration and Genotype Variation of Enzyme as Risk Factors in Patients with Coronary Artery Disease

Sang Gon Kim, MD[1], Young Dae Kim, MD[1], Sung Geun Kim, MD[1], Se Jun Jang, MD[1], Il Whan Oh, MD[1], Bong Keun Kim, MD[1], Su Hun Lee, MD[1], Tae Ho Park, MD[1], Doo Gyung Yang, MD[1], Kwang Soo Cha, MD[1], Moo Hyun Kim, MD[1], Jong Seong Kim, MD[1], Jin Yeong Han, MD[2] and Jung Man Kim, MD[2]

[1]Division of Cardiology, [2]Department of Clinical Pathology, Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Increased plasma homocysteine (tHcy) has been implicated as an independent risk factor for coronary artery disease (CAD), but the relationship has not been firmly established. The present study's aim was to determine the difference of plasma homocysteine between patients with CAD and normal controls, and to identify the relation between plasma homocysteine and the genotype variation of its metabolic enzyme, and the serological characteristics. **Methods** : Plasma homocysteine, fasting and post-methionin loading, folate and vitamin B12 were measured among 149 patients and 80 control subjects. Both group consisted of those patients younger than 65 years. Frequencies of prevalent mutations of enzymes involved in homocysteine metabolism, cytosine to thymidine transition (C 677T) of methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) was determined by polymerase chain reaction (PCR) in 85 patients and 47 controls. **Results** : There was no significant difference in homocysteine level between patients and the control group (fasting tHcy ; 10.4±3.6 vs 11.4±8.4 ng/ml, post-methionine loading tHcy ; 18.8±4.9 vs 17.2±9.5 ng/ml, $p > 0.05$ respectively). The genotype frequency of MTHFR C 677T was similar between the two groups. The plasma homocysteine level did not appear to vary with genotypes of MTHFR either in patients or control subjects. Multiple linear regression analysis identified smoking as the most significant factor affecting plasma homocysteine level, followed by age, MTHFR genotype, obesity, and folate level. **Conclusion** : Homocysteine concentration was not different between the controls and patients with CAD. Significant variation of homocysteine level according to genetypic polymorphism of metabolism enzymes was not observed. On multiple linear regression, several factors were identified to be related to homocysteine level, including MTHFR genotype. Further study is

논문접수일 : 2001년 7월 10일
심사완료일 : 2001년 6월 20일
교신저자 : 김영대, 602 - 715 부산광역시 서구 동대신동 3가 1 동아대학교 의과대학 순환기내과학교실
전화 : (051) 240 - 2959 · 전송 : (051) 255 - 8174 E - mail : kimyd@mail.donga.ac.kr

warranted to clarify the significance of homocysteine in the development of CAD. **(Korean Circulation J 2001;31(8):757-766)**

KEY WORDS : Homocysteine · Coronary artery disease · Methylenetetrahydrofolate reductase · Genotype variation.

서 론

Homocysteine은 sulfur기를 함유한 아미노산으로서 이의 과도한 혈중 상승을 특징으로 하는 선천성 질환인 homocysteinuria 환자들에서 어린 나이에 동맥경화성 합병증이 관찰된 이래,[1] 관상동맥 질환을 비롯한 각종 심혈관 질환에 대한 위험인자로서의 가능성에 대해 주목을 받아왔다. 실제 이후의 많은 연구자들은 중등도의 homocysteine 상승 역시 관상 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 말초 동맥 질환 같은 동맥 경화성 혈관 질환에 동반되어 있음을 보고하였다.[2-5] 이러한 homocysteine의 상승은 최근에 와서 이의 대사 과정이 밝혀짐에 따라 그 기전이 알려지게 되었다.

Homocysteine은 필수 아미노산인 methionine이 대사되면서 생기는 물질로서 sulfur기 함유로 인한 유해한 성상을 지니고 있어 체내에서는 remethylation을 통한 methionine으로의 환원과 transsulfuration을 통한 cysteine 생성이라는 2가지 대사 경로를 통해 이를 처리하고 있다. Remethylation이 기저 상태의 homocysteine 농도를 조절하는데 비해 transsulfuration 대사 경로는 주로 음식 섭취후의 homocysteine 상승을 조절하는 역할을 맡다.[6] Homocysteine의 상승, 즉 homocysteinemia는 이러한 대사 과정에 문제가 있으면 발생하며 관련된 대사 효소의 유전적인 결함이나, 대사 기질(substance)의 영양학적인 결핍에 의해서 초래된다. Remethylation cycle의 경우 주요 carbon donor인 5-methylenetetrahydrofolate를 생성하는데 필요한 효소인 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)이나 이 반응의 주요 기질인 folate와 cofactor인 vitamin B_{12}가 주요한 조절 인자이며, transsulfuration의 대사 반응에서는 cystathionine β-synthase(CBS)와 그 cofactor인 vitamin B_6가 주요 역할을 한다.[7] 이들 효소의 활성도가 심하게 저하된 경우, congenital homocysteinuria에서 보듯 극심한 homocysteine의 상승을 초래하지만 전체 인구에서 이들의 발생은 매우 드물게 나타난다.[8] 실제 임상에서 흔하게 관찰되는 중등도의 homocysteine 상승은 기질, 특히 folate의 섭취 부족이나 대사효소의 유전적인 변이로 인한 효소기능의 저하, 또는 이 양자의 병존에 주로 기인한다. 특히 MTHFR의 경우 유전자 염기서열 677번 위치의 cytosine이 thymidine으로 치환된 돌연변이(C677T)에 의해 아미노산 alanine에서 valine으로 바뀐 변이 효소는 고온에서 불안정할 뿐 아니라(thermolabile) 기저 상태에서의 효소 활성도도 저하되는 것으로 알려져 있다.[9][10] MTHFR의 유전형 변이는 비교적 흔하게 존재하며 구미에서의 homozygote mutant의 빈도는 지역에 따라 인구의 5~17%에서 관찰되었고[10-12] 일본에서는 13.5%로 보고되었다.[13] CBS 유전자의 경우 90개 이상의 변이형이 존재하는 것으로 알려져 있고[14] 이 중 흔한 형태로서 8번째 exon에 68개의 염기쌍이 삽입된 변이형(844ins68)은 염기서열 833위치에 thymidine이 cytosine으로 치환된 변이(T833C)를 동반하며 그 빈도는 미국의 경우 인구의 11.7% 정도에서 관찰되는 것으로 보고되었다.[15]

현재까지 homocysteine 상승과 관상동맥 질환과의 동반관계나 homocysteinemia에 관련된 대사 인자는 임상적 혹은 실험적인 방법을 통해 많은 연구가 이루어져 있다. 그러나 homocysteine과 관상동맥 질환과의 상호 관련이 일관성 있게 확립된 것은 아니다. 여태까지 시행된 전향적인 임상 연구에서도 일부에서는 homocysteine의 혈중 상승이 관상동맥 질환 발생에 유의한 상관관계를 나타내었으나,[16-18] 다른 연구들에서는 그러한 관계는 발견되지 않았다.[19-21] 유전형의 경우 역시 MTHFR의 homozygote mutant가 관상동맥 질환 환자군에서 빈도가 높았다는 보고가 있는 반면,[10][13] 다른 연구에서는 이러한 소견이 관찰되지 않았다.[21][22] 또한 homocysteine에 관련된 대부분 연구들은 주로 백인들을 대상으로 한 서구 각국의 연구들이 많았고 한국의 경우 근래 동맥경화 질환에서 homocysteinemia, 혹은 이의

대사에 관련된 인자인 folate, vitamin B_{12}나 대사 효소의 유전형 변이 등에 관한 임상 결과가 발표되었으나[23-27] 일치된 결론을 구하기는 어렵다. 본 연구에서는 환자-대조군(case-control) 방식을 이용, 한국인 관상동맥 질환에서 위험인자로서의 homocysteine의 상관 관계를 밝히고 대사 효소인 MTHFR의 유전형 변이를 조사하여 이들 및 다른 임상 요인들이 혈중 homocysteine 농도에 미치는 영향을 알고자 하였다.

방 법

대 상

1999년 2월부터 11월까지 동아대학교 병원에 입원한 65세 이하의 관상동맥 질환 환자 149명과 같은 연령군에 속한 정상인 80명을 각각 환자군, 대조군으로 하였다. 관상 동맥 질환은 1) 관상동맥 조영술로 진단되거나, 2) 전형적인 증상 및 심전도, 혈청 검사, 부하 검사로 진단된 경우, 3)진단 결과로 경피적 관상동맥 중재술이나 우회 수술을 받은 적이 있는 경우로 규정하였으며, 대조군은 흉통, 기타 비특이적 증상을 주소로 내원하였다가 관상동맥 조영술을 비롯한 임상 진단에서 정상 소견을 보인 사람을 대상으로 하였다.

대상 중 3개월 이내의 급성 심근 경색이나 뇌졸중을 앓거나, 신장 질환, 간장 질환, 갑상선 질환, 전신성 낭창 등의 전신 질환이 있는 경우, 혹은 nicotinic acid, theophylline, methotrexate, L-Dopa 등의 약물 복용 등 homocysteine 혈중 농도에 영향을 줄 수 있는 상태에 있는 사람은 대상에서 제외하였다. 또한 혈중 지질 외에 개인의 위험인자로서 혈압, 혈당, 흡연여부를 확인하고 비만도는 BMI(Kg/m^2)로서 결정하였다.

방 법

혈액 검사

대상군 모두에서 12시간 이상 공복 후 혈중 지질, homocysteine, folate, vitamine B_{12} 측정을 위하여 채혈을 하였다. 혈중 농도는 상용화된 제품을 사용하였으며 homocysteine의 경우 Homocysteine assay kit(Abbott Laboratorites, USA)의 MEIA(microparticle enzyme immunoassay)방식, folate와 Vitamine B_{12} 경우는 각각의 assay kit(Chiron Diagnostics, USA)의 CLIA(Chemiluminescence Immunoassay)방식을 따랐다. Homocysteine은 공복시외에 methionine부하(100 mg/Kg)후 2시간 이후 혈중 농도를 측정하였다.

유전자 변이 분석

대상군 중 일부에서 homocysteine 대사 효소의 유전자 변이 분석을 시행하였으며 가장 흔한 변이 형태인 MTHFR의 C677T 변이(85명의 환자와 47명의 대조군)를 검색하였다. MTHFR의 C677T 유전형 변이는 말초 혈액에서 전혈을 채취하고 High Pure PCR template preparation kit(Quiagen)을 이용하여 DNA를 분리한 후 primer(sense primer : 5'-TGAAGGAG-AAGGTGTCTGCGGGA-3', antisense primer : 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3')로서[10] 변이부위 198 bp의 DNA를 중합 효소 반응[28]에 의해 증폭하였으며 이를 제한 효소 Hinf I으로 소화한 후 2% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다. 여기서 정상 유전형은 198 bp에 하나의 band를 homozygote mutant는 175 bp 위치에 band를 나타내게 되며 heterozygote mutant는 198 및 175 bp에 하나씩 두 개의 band를 보였다(Fig. 1).

통계 분석

자료 분석은 SAS를 이용하였다. 모든 자료의 연속 변수는 평균±표준편차로, 범주형 변수는 백분율(%)로 표시하였다. 관상동맥 환자군과 대조군 사이의 비교분석은 연속 변수에 대해서는 student t-test를 이용하여 검증하였고, 범주형 변수에 대해서는 Cochran-Mantel-Haenszel(CMH) test를 이용하였다. 혈중 homocysteine과 효소 유전형 변이를 비롯한 다른 변수와의 상관관계는 multiple linear regression analysis를 이용하

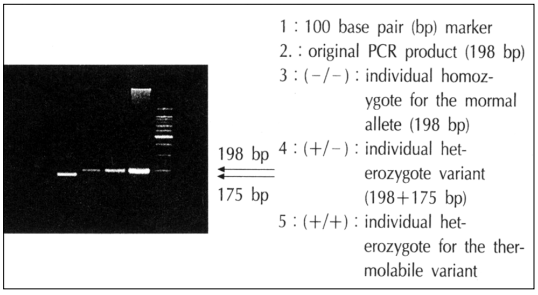

Fig. 1. Genotype Determination by gel electrophoresis of MTHFR (Methylenetetrahydrofolate Reductase) C677T variant.

여 분석하였다. 혈중 homocysteine 농도는 일반 인구에서의 빈도 분포(frequency distribution) 상에서 뚜렷한 비대칭형(skewness)을 보이고 있으므로[24] 상관 관계 분석에서 이를 log 변환하여서 통계처리를 하였다. 모든 경우에 p값이 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성을 두었다.

결 과

대상군의 임상적인 특징

환자군 149명은 안정 협심증 30명, 불안정 협심증 68명, 심근 경색 51명이었으며 평균 연령은 56.2세로서 대조군 55.7세와 유사하였다. 환자군은 남자가 67.8%로서 대조군의 55.0%보다 많았으며, 고혈압, 당뇨, 흡연, 비만의 위험인자 모두 대조군에 비해 유의하게 많았다(Table 1).

혈중 Homocysteine과 비타민의 농도

공복시 homocysteine 농도는 환자군 10.4±3.6 ng/ml, 대조군 9.5±3.1 ng/ml로서 양군간 유의한 차이가 없었으며, methionine 부하 후 homocysteine 농도 역시 환자군 18.8±4.9 ng/ml, 대조군 17.2±8.4 ng/ml로서 양군간 차이가 없었다. Folate나 vitamin B_{12}의 혈중 농도에서도 양군간 유의한 차이가 없었다(Table 2).

MTHFR 효소의 유전형 분포

MTHFR의 유전형은 85명의 환자와 47명의 대조군에서 분석되었으며 환자군에서 정상형 31.8%, heterozygote mutant 51.8%, homozygote mutant 16.5%이었으며 대조군에서는 각각 42.6%, 36.2%, 21.3%로서 양군 사이에 MTHFR 유전형 변이의 유의한 차이는 없었다(CMH test 통계량 2.94, p=0.229)(Table 3).

MTHFR 유전형 변이에 따른 homocysteine과 folate 농도 변화

MTHFR 유전형 변이에 따른 혈중 folate의 농도 변이는 환자, 대조군 모두에서 유의한 차이가 없었으며, 혈중 homocysteine 농도는 대조군 중 MTHFR homozygote mutant에서 정상 유전형에 비해서 증가하는 추세를 보였으나 통계적으로 의의있는 차이는 발견되지 않았다(Table 4).

혈중 Folate 농도와 MTHFR 유전형 변이에 따른 homocysteine 농도 변화

혈중 homocysteine은 단순히 MTHFR 유전형 변이보다 이에 folate 결핍이 병존할 때 더욱 증가하는 것으로 알려져 있으므로[12)22)] 각 대상군을 folate 농도에 따라 저농도군(최저 4분군 : <4.85 ng/ml), 중간 농도군

Table 1. Baseline clinical characteristics

	Patients	Control
No.	149	80
Age	56.2±9.1	55.7±8.1
Sex (F/M)	48/101	36/44
Dx (AP/UA/MI)	30/68/512	
HT*	56	7
DM*	32	8
Smoking*	82	24
Obesity*	25	5

* : p<0.05, Sex (F/M) : Sex (Female/Male)
SA/UA/MI : Stable Angina/Unstable Angina/Myocardial Infarction

Table 2. Laboratory findings of patients and control groups

	Patients	Control
tHcy (F) (nmo./ml)	10.4± 3.6	11.4± 8.4
tHcy (M) (nmo./ml)	18.8± 4.9	17.2± 9.5
Folate (ng/ml)	7.9± 4.2	6.3± 2.9
Vit. B_{12} (pg/ml)	588.6±221.1	694.6±282.7
Total Chol. (mg/dl)	196.3± 39.5	85.2± 44.7
TG (mg/dl)	160.1± 77.3	187.8±115.3
HDL-C (mg/dl)	42.4± 10.1	47.2± 8.4

tHcy (F) : plasmal homocysteine level in fasting state
tHcy (M) (nmo./ml) : plasma homocysteine level after methionine loading
Vit. B_{12} : Vitamine B_{12}, Total Chol. : Total cholesterol
TG : triglyceride, HDL : HDL-cholesterol

Table 3. Frequency of MTHFR genotype

	Patients n (%)	Control n (%)
MTHFR genotype		
-/-	27 (31.8)	20 (42.6)
+/-	44 (51.8)	17 (36.2)
+/+	14 (16.5)	10 (21.3)
Total	85	47

MTHFR : methylenetetrahydrofolate reductase
-/- : Wild type, +/- : Heterozygote
+/+ : Homyzygote mutant

Table 4. Folate (ng/mL) and plasma homocysteine (μmole/L) level according to MTHFR genotypes

MTHFR genotype	No. Pt./Cont. (n=85/n=47)	Folate Pt./Cont.	tHcy (F) Pt./Cont.	tHcy (M) Pt./Cont.
-/-	27/20	6.89±3.97/7.57±3.84	10.81±4.39/ 8.3 ±2.5	19.89±5.98/15.49± 4.19
+/-	44/17	8.60±3.82/6.85±2.58	8.95±3.05/11.67±8.68	17.04±3.92/13.23± 1.98
+/+	14/10	6.28±2.26/5.24±2.32	11.85±5.20/14.22±9.52	22.05±3.81/27.31±19.71

No. : number, Pt. : patients group, Cont. : control group, MTHFR : methylenetetrahydrofolate reductase
tHcy (F) : plasma homocysteine level in fasting state
tHcy (M) : plasma homocysteine level after methionine loading
-/- : wild type, +/- : heterozygote mutant, +/+ : homozygote mutant

Table 5. Plasma homocysteine level (μmole/L) according to MTHFR genotypes and folate levels

MTHFR genotype	No. Pt./Cont. (n=85/n=47)	Pt..	Cont.	Pt. and Cont.
Lowest folate quartile (<4.85 ng/ml)				
-/-	9/5	13.28±5.65	10.32± 1.48	12.22± 4.78
+/-	6/5	11.34±3.16	19.30±13.60	14.96± 9.81
+/+	2/5	11.77±7.38	18.73±12.17	16.74±10.93
Middle folate quartile (4.85 - 8.60 ng/ml)				
-/-	12/9	9.37±2.63	8.11± 2.80	8.83± 2.71
+/-	19/7	9.20±2.57	9.03± 2.07	9.15± 2.41
+/+	10/4	12.47±5.34	9.44± 2.45	11.61± 4.81
Highest folate quartile (>8.60 ng/ml)				
-/-	6/6	9.97±4.14	7.96± 2.62	8.83± 3.51
+/-	19/5	7.94±3.12	7.73± 2.40	7.90± 2.93
+/+	2/1	8.83±4.39	10.77± 0.00	9.47± 3.30

No. : number, Pt. : patients group, Cont. : control group, MTHFR : methylenetetrahydrofolate reductase
-/- : wild type, +/- : heterozygote mutant, +/+ : homozygote mutant

(최저와 최고사이 : 4.85~8.60 ng/ml), 고농도군(최고 4분군 : >8.60 ng/ml)으로 나누어 각 군에서 MTHFR 유전형 변이에 따른 homocysteine 농도 차이가 있는지를 관찰하였다. Folate 저농도군에서 MTHFR 유전형 변이에 따른 homocysteine의 농도는 환자군에서는 세 가지 유전형에 따른 차이가 없었고, 대조군에서는 heterozygote나 homozygote mutant에서 homocysteine 농도가 증가하였으나(각각 10.32±1.48 ng/ml, 19.30±13.60 ng/ml, 18.73±12.17 ng/ml, p>0.05) 통계적인 유의성에는 도달하지 못했다(Table 5). Folate 중간 농도군과 고농도군에서의 homocysteine의 농도는 환자, 대조군 모두에서 MTHFR 유전형 변이에 따른 유의한 차이가 없었다(Table 5).

혈중 Homocysteine 농도에 관련된 인자의 상관 관계 분석

대상군에서 homocysteine 농도에 관련된 인자의 상관 관계를 알아보기 위하여 folate, vitamine B_{12}, MTHFR 유전형, 혈중지질 등과 같은 인자외에 나이, 고혈압, 당뇨, 흡연과 같은 임상적 특징들에 대해서 다중 선형 회귀분석(multiple linear regression analysis)을 시행한 결과 흡연이 가장 뚜렷한 상관 인자였으며(p=0.0002), 다음으로 나이, MTHFR 유전형, 비만 순으로 상관관계를 나타내었으며, 혈중 folate 수치도 비교적 유의한 수준의 상관관계를 보여주었다(p=0.059)(Table 6).

고 찰

혈중 homocysteine의 상승이 관상동맥 질환을 비롯한 동맥경화성 질환과 혈관내 혈전 형성에 연관이 되어 있음은 많은 임상 연구에서 관찰되었고 이들 질환에서의 하나의 독립적인 위험인자로서 간주되어 왔다.[2-5] 중등도의 homocysteine 상승은 이들 혈관 질환에서 12~

Table 6. ANOVA for mutiple linear regression of plasma homocysteine in coronary artery disease (N=229)

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Smoking*	1	1.603	1.603	15.27	0.0002
Age*	1	0.783	0.783	7.46	0.0076
MTGFR*	2	1.052	0.526	5.01	0.0086
Obesity*	1	0.605	0.605	5.76	0.0594
Folate	1	0.383	0.383	3.65	0.0593
HDL	1	0.087	0.087	0.83	0.3648
B_{12}	1	0.067	0.067	0.64	0.4258
TC	1	0.003	0.003	0.03	0.8747
TG	1	0.013	0.013	0.12	0.7305
HT	1	0.012	0.012	0.11	0.7370
DM	1	0.072	0.072	0.69	0.4082
Error	92	9.6586	0.1049		
Corrected total	106	14.3538			

MTHFR : methylenetetrahydrofolate reducase, * : $p<0.05$

47%의 환자에서 관찰되며[2] metaanalysis에서 고 homocysteine혈증의 위험도(odds ratio)는 관상동맥 질환의 경우 평균 1.7, 뇌혈관 질환 2.5, 말초 동맥 질환 경우 6.8 정도로 보고된 바 있다.[29] 그러나 모든 연구들에서 homocysteine의 위험도에 대한 결과가 일치하는 것은 아니다. Multiple Risk Factor Intervention Trial(MRFIT) 연구에서 다른 변수를 교정하고 나서의 homocysteine의 위험도는 0.94였고,[20] 1998년에 발표된 Atherosclerosis Risk in Communities(ARIC) 연구에서는 단지 여성에서만 homocysteine 상승과 관상동맥 질환 사이의 연관성이 관찰되었다.[21]

따라서 homocysteine 상승과 관상동맥 질환과의 연관성은 많은 임상 연구에도 불구하고 다른 위험 인자, 예를 들어 고콜레스테롤혈증 같이 명확한 인과관계를 부여하기에는 부족하다고 할 수 있다. 임상 연구에서 고려해야 할 사항 중 하나는 homocysteine의 수치가 대상군에 따라서 다른 결과를 나타낼 수 있다는 점이다. Homocysteine은 나이가 증가함에 따라서 혈중 농도가 높아지며,[3] 뇌졸중이나 심근 경색의 급성기에서 농도가 변할 수 있고,[30][31] 신질환,[32] 갑상선 질환,[33] nicotinic acid의 섭취 등과 같은 조건[34]에서도 농도 변화가 올 수 있다. 실제로 급성기의 심근 경색을 포함시킨 임상 연구에서는 homocysteine과 관상동맥 질환 사이의 상관 관계가 나타나지 않았고,[35] 84세까지의 노령인구를 포함시킨 US physician 's study[22]에서는 그 상관 관계가 미약하였다. 한국인을 대상으로 한 임상 연구에서도 환자군과 대조군의 평균 연령에 유의한 차이가 있어 양군의 결과를 비교 분석하는데 하나의 한계점이었다.[26] 그러므로 본 연구는 대상군을 선정할 때 homocysteine 농도에 영향을 줄 수 있는 각종 질환 등을 배제하였고 환자군과 대조군 모두 65세 이하의 연령에서 양군의 평균 연령이 비슷한 수준이 되도록 하였다. 그러나 이러한 조건에서도 본 연구에서는 관상 동맥 질환군과 대조군사이의 homocysteine 혈중 농도 차이를 발견할 수 없었다. 이는 심근 경색 환자들을 대상으로 한 연구에서 나이라는 변수를 보정한 후 환자군에서의 homocysteine 농도는 대조군과 유의한 차이가 없음을 보고한 Lee 등[23]의 결과와도 일치한다. 이같은 결과들은 몇 개의 전향적 연구[19-21]에서 나타난 바와 같이 homocysteine이 관상동맥 질환의 독립적인 위험인자로서 기여하지 않을 수도 있음을 시사한다. 실제 최근에는 homocysteine이 자체로서 동맥 경화증 발생에 원인이 되는 요소인가에 대한 의문이 제기되고 있고, homocysteine의 상승은 존재하는 다른 위험인자를 반영하는 종속적인 지표이거나 동맥 경화 병변의 염증 반응에 따른 변수라는 가설도 제시되고 있다.[36] 본 연구에서는 공복시 뿐만 아니라 methionine 섭취 후의 homocysteine 혈중 농도에서도 유사한 결과를 나타내었다.

Homocysteine 대사에 관여하는 효소의 유전형 변이 양상을 관찰하기 위해서 MTHFR 효소에서 흔하게 관찰되는 C677T 변이형을 조사하였다. MTHFR의 C677T 변이형은 표현형이 저하된 효소 활성도로 나타나기 때

문에[9)10)] 이론상 homocysteine 상승과 연관될 수 있지만 임상 연구에서 관상 동맥 질환과의 상관 관계는 분명하지 않다. 이러한 것은 MTHFR 변이보다는 그 결과로서 나타날 수 있는 homocysteine 상승 자체의 상관 관계가 전술하였듯이 명확하지 않은데 기인한다고 할 수 있다. 본 연구 결과에서 관상동맥 질환 환자군의 MTHFR의 C677T 변이 분포는 동형접합체 15.6%, 이형접합체 56.3%로서 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 최근에 발표된 한국인 정상인 빈도인 동형접합체 15.7% 및 이형접합체 48.5%과도[37)] 유사하다. 한편 본 연구와 같이 65세 이하의 관상 동맥 질환 환자들을 대상으로한 일본의 연구에서는 환자군이 일반인에 비해 유의하게 MTHFR C677T 동형 접합체 변이의 빈도가 높음을 보고한 적이 있으며[13)] 아일랜드에서도 유사한 결과를 보고하였다.[38)] 그러나 보다 많은 연구들에서 환자군과 대조군 사이에 MTHFR C677T 변이 빈도의 유의한 차이를 관찰하지 못하였으며,[22)39)40)] 전향적인 ARIC 연구에서도[21)] MTHFR C677T의 유전형 변이와 관상 동맥 질환과의 연관성은 관찰되지 못하였다. 이같은 결과들은 MTHFR C677T 변이가 그 자체만으로는 관상 동맥 질환의 유의한 위험인자가 되지 않을 수도 있음을 시사하는 소견이다.

MTHFR 효소의 유전형에 따른 homocysteine의 농도는 정상, heterozygote, homozygote mutant 사이에 차이가 발견되지 않았다. Homocysteine 수치는 효소의 기능에 의해서만 결정되지 않고 외부적인 요소 특히 folate 같은 기질에 의해서 조정될 수 있으며, MTHFR의 C677T homozygote mutant라 해도 충분한 혈중 folate 존재하에서는 homocysteine의 상승이 나타나지 않음이 보고되었다.[12)] 이는 MTHFR의 C677T mutant에서 분자내 변이를 일으킨 부위는 folate와 결합하는 곳으로서 충분한 folate는 변이 효소의 활성도를 안정화시킬 수 있기 때문으로[10)] 해석된다. 따라서 MTHFR의 C677T mutant가 homocysteine 상승과 연관되는 경우는 혈중 folate 수치가 낮은 경우에서 주로 관찰된다.[12)22)] 따라서 본 연구에서도 folate 농도에 따라 낮은 군, 중간 군, 높은 군으로 나누어 각 군에서 MTHFR 유전형과 homocysteine 농도와의 상관관계를 보았다. 분석 결과 대조군에서 folate 농도가 낮은 경우에 MTHFR 유전형 변이가 있으면 정상 유전형에 비해 homocysteine 농도가 상승되어 있음이 관찰되어 기존의 보고[22)]와 상응하는 소견이었으나 통계적 유의성에는 이르지 못하였고 folate가 중, 고농도인 경우 MTHFR 유전형에 따른 homocysteine의 농도의 변화는 환자, 대조 양군에서 모두 보이지 않았다. 그러나 대상수를 여러군으로 나눈 결과 각각의 숫자가 적어 유의한 통계적 결론을 내리기는 미흡하였다. 근래에 발표된 한국인을 대상으로 한 연구에서는 정상군에서 MTHFR의 homozygote mutant에서 folate와 homocysteine의 역상관관계가 있음을 보고한 바 있다.[26)]

마지막으로 전체 대상군에서 homocysteine 농도에 연관된 인자를 알기 위하여 다중 회귀 분석을 시행한 결과, 뚜렷한 상관 관계를 지닌 인자는 흡연과 연령, MTHFR 유전형, 비만이었고 folate 농도도 비교적 유의한 상관관계를 나타내었다(p=0.059). 흡연은 가장 유의성이 있게 나타났는데 흡연은 Vitamin B_6의 합성을 방해한다고 알려져 있어 Vitamin B_6의 저하가 homocysteine 농도를 상승시키는 주요 기전으로 생각된다. 흡연 다음에 homocysteine 농도와 유의한 상관관계는 연령으로서 이는 기왕에 발표된 국내외 보고와 일치하는 소견이다. MTHFR 유전형 변이와 homocysteine과의 관계는 주로 젊은 연령군에서 뚜렷하고 나이가 들수록 흡연과 같은 비유전적인 요소의 영향이 우세해지는 것으로 알려져 있으며[22)] 본 연구에서 MTHFR 변이에 따른 homocysteine 농도 변화는 크지 않았으나 회귀 분석상 양자간의 상관 관계는 유의성을 나타내었다. 또한 비만이 유의한 인자였고 folate 농도도 비교적 유의한 수준의 상관관계를 보였다. 이러한 결과들은 homocysteine의 혈중 농도는 선천적인 요소인 MTHFR 유전형 외에 흡연, folate 등 homocysteine의 대사에 관련된 후천적 인자들이 유의하게 연관되어 있음을 보여주는 것이라고 할 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 65세 이하의 관상동맥 질환 환자의 혈중 homocysteine 농도는 비슷한 나이의 대조군에 비해서 의미있는 차이를 나타내지 않았으며 대사 효소 MTHFR의 유전형 변이에 따른 유의한 homocysteine 농도 변화는 보이지 않았다. 관상 동맥 환자에서 homocysteine 농도가 유의한 차이를 보여주지 못하는 소견에 대해서는 몇가지 해석을 제시할 수 있다. 첫째로 homocysteine이 동맥 경화 발생에 관여하나 임상 연구에서는 대상군을 환자와 대조군을 이분함으로써 증상이 나타나는 질환으로 발전하기 전의 병변에 대한 정

보가 누락되어 진정한 의미의 상관 관계를 밝히지 못하였을 가능성이다. 실제 현증 환자를 대상으로 하지 않고 동맥 경화 자체를 본 연구, 예를 들어 경동맥의 초음파 소견을 대상으로 삼은 경우, 경동맥의 내막 두께와 homocysteine의 상관 관계는 보다 뚜렷하게 나타나는 것으로 보고되었다.[42] 둘째는 관상동맥 질환의 발생과 관련하여 혈중 homocysteine 농도가 실제적으로 독자적인 요인으로 작용하지 않을 가능성이다. Homocysteine의 농도가 극단적으로 상승된 예, 즉 백단위 umol/L의 농도를 보이는 선천성 homocysteinuria나 혹은 이에 해당되는 농도의 homocysteine이 적용되는 체외 실험과 같은 상황과는 달리 대다수 임상 연구에서 나타나는 환자-대조군 차이는 수 umol/L에 불과하며 이 정도의 homocysteine 농도차가 동맥 경화 발생에 얼마나 기여할 것인지에 관한 의문이 궁극적으로 해소되지 않은 상태이다.[43] 본 연구도 이러한 점을 염두에 두고 시행되었다. 그러나 본 연구의 한계점은 충분한 대상 수를 확보하지 못한 점으로 이는 몇몇 경우, 특히 여러 군으로 나누어 분석한 자료의 결과에 영향을 미쳤다고 생각된다. 예를 들면 대사효소의 변이 분포가 기존의 결과와 다르게 나타난 점이나 저농도의 folate를 가진 대상군에서도 MTHFR 변이형의 homocysteine 농도 변화가 현저하지 않았던 점, 또한 homocysteine에 관련된 인자 중 folate가 통계적 유의성에 미치지 못하였던 점 등이다. 이를 보정하고 homocysteine의 인과적인 역할을 규명하기 위해서는 향후 보다 대상을 확대하고 전향적인 방법으로 연구할 필요가 있다고 사료된다.

요 약

연구목적 :

혈중 homocysteine의 상승은 관상 동맥 질환의 위험 인자로 알려져 있으나 질환 발생과의 인과 관계는 아직 불확실하다. 본 연구는 고령을 제외한 연령층에서 관상 동맥 질환과 정상 대조군 사이의 혈중 homocysteine의 농도차를 비교하고, 이들에서 임상적 특성과 homocysteine의 대사에 관여하는 효소의 유전형 변이를 조사하여 이들과 homocysteine 농도사이의 상관 관계를 밝히고자 하였다.

방 법 :

65세 이하의 관상 동맥 질환 환자와 정상 대조군 각 149명과 80명을 대상으로 공복시 및 메치오닌 투여후의 혈중 homocysteine과 엽산 비타민 B_{12}농도를 측정하였다. 이와 함께 Homocysteine 대사에 관여하는 효소 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)의 cytosine-thymindine 치환변이(C677T)를 조사하였다.

결 과 :

관상 동맥 질환 환자와 정상 대조군 사이에 공복시 및 메치오닌 투여후 혈중 homocysteine(tHcy) 농도는 유의한 차이가 없었으며(공복시 tHcy, 환자군 10.4±3.6, 대조군 11.4±8.4 ng/ml, 메치오닌 투여후 tHcy 환자군 18.8±4.9, 대조군 17.2±9.5 ng/ml, 각 $p>0.05$), 양군간 MTHFR C677T 변이빈도는 유사하였다. MTHFR의 유전형 변이에 따른 혈중 homocysteine의 농도 변화는 관찰되지 않았다. 다중 선형 회귀 분석에서 혈중 homocysteine 농도에 관련된 가장 유의한 인자는 흡연이었으며 다음으로 연령, MTHFR 유전형, 비만, 엽산 농도등이었다.

결 론 :

고령을 제외한 연령에서 관상 동맥 질환 환자와 정상 대조군 사이에 혈중 homocysteine 농도의 유의한 차이는 발견할 수 없었으며, homocysteine 대사 MTHFR 효소의 유전형 변이에 따른 혈중 homocysteine의 변화는 관찰되지 않았다. 관상 동맥 질환의 발생과 homocysteine 사이의 상관 관계를 규명하기 위하여 향후 보다 광범위하고 전향적인 연구가 요망된다.

중심 단어 : 호모시스테인 · 관상동맥 질환 · Methylenetetrahydrofolate reductase · 유전형 변이.

REFERENCES

1) McCully KS. *Vascular pathology of homocysteinuria: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Physiol 1969;56:111-28.*
2) Kang SS, Wong PW, Malinow MR. *Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Ann Rev Nutr 1992;12:279-98.*
3) Malinow MR. *Homocyst(e)inemia and arterial occlusive diseases. J Intern Med 1994;236:603-17.*
4) Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. *Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1996;27:517-27.*
5) Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. *Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998;49:31-62.*
6) Welch GN, Loscalzo J. *Homocysteine and atherothrom-*

bosis. N Engl J Med 1998;338:1042-50.

7) Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. *Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 1993; 39:1764-79.*
8) Mudd SH, Levy HL, Skovby F. *Disorders in transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic and Molecular Basis of Metabolic Disease. New York, NY: McGraw Hill;1995. p.1279-327.*
9) Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Reggie N. *Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. Am J Hum Genet 1991;48:536-45.*
10) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, *et al. A candidate genetic risk factor for vascuelar disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111-3.*
11) Kluijtmans LA, Van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, *et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996;58:35-41.*
12) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg J, *et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulationulation 1996;93:7-9.*
13) Ou T, Yamakawa-Kobayahi K, Arinami T, Amemiya H, Fujiwara H, Kawata K, *et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphism are independent risk factors for coronary heart disease in Japan: a case-control study. Atherosclerosis 1998;137:23-8.*
14) Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, *et al. Cystathionine β-synthase mutations in homocysteinuria. Hum Mutat 1999;13:362-75.*
15) Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. *High prevalence of a mutation in the cystathionine β-synthase gene. Am J Hum Genet 1996;59:1262-7.*
16) Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. *Plasma homocysteine level and mortality in patients with coronary heart disease. N Eng J Med 1997;337:230-6.*
17) Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, *et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. JAMA 1992;268:877-81.*
18) Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. *Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. Arch Intern Med 1998;158:862-7.*
19) Verhoef P, Hennekens CH, Allen RH, Stabler SP, Willett WC, Stampfer MJ. *Plasma total homocysteine and risk of angina pectoris with subsequent coronary artery bypass surgery. Am J Cardiol 1997;79:799-801.*
20) Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. *Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:1947-53.*
21) Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, *et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Circulationulation 1998;98:204-10.*
22) Ma J, Stampfer MJ, Hennkens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, *et al. Methyelenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. Circulationulation 1996;94:2410-6.*
23) Lee EM, Oh DJ, Rhee HJ, Kim EJ, Kim SM, Hwang GS, *et al. Plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in young age: relation with vitamine B6, B12, and folate. Korean Circulation J 1998;28:1307-13.*
24) Jang Y, Cho EY, Lee JH, Chung NS. *Relationship between plasma homocysteine level and cardiovascular risk factor in healthy men. Korean Circulation J 1999;29:135-45.*
25) Kim CH, Choi TM, Chang SG, Hong SY. *Plasma homocysteine, folate and vitamine B12 concentrations in coronary artery disease. Korean Circulation J 1998;28: 516-22.*
26) Moon KW, Chung WS, Youn HJ, Baek SH, Yoo KD, Oh YS, *et al. The frequency distribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and association with the genotypes and total homocysteine level in patients with coronary artery disease. Korean Circulation J 1999;29:781-7.*
27) Han SW, Ryu KH, Kwon YB, Park WJ, Jang MG, Hong KS, *et al. Serum total homocysteine as a risk factor patients with coronary artery disease. Korean Circulation J 1998;28:1953-8.*
28) Saiki PK, Gelfand DH, Stoffel S, Lcharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Scinece 1988;239:487-91.*
29) Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. JAMA 1995;274:1049-57.*
30) Lindgren A, Brattstrom L, Norrving B, Hultberg B, Andersson A, Johansson BB. *Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. Stroke 1995; 26:795-800.*
31) Lindgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattstrom L. *Plasma homocysteine in acute myocardial infarction: homocystein-lowering effect of folic acid. J Intern Med 1995;237:381-8.*
32) Arnadottir M, Hultberg B, Nilsson-Ehle P, Thysell H. *The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. Scand J Clin Lab Invest 1996;56:41-6.*
33) Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, *et al. Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. Metabolism 1998;47:89-93.*
34) Garg R, Malinow MR, Pettinger M, Hunninghake D. *Treatment with niacin increases plasma homocyst(e)ine levels. Circulationulation 1996;94(suppl 1):I-457.*
35) Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, Evans AE, Arveiler D, Cambien F, *et al. Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. Atherosclerosis 1996;126:27-34.*

36) Perterson JC, Spence JD. *Vitamins and progression of atherosclerosis in hyper-homocyst(e)inemiea. Lancet 1998; 351:263.*
37) Oh KW, Lee WY, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Yoon KH, *et al. Homocysteine, folate, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Korean normal subjects. Korean J Med 1999;57:1030-6.*
38) Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Tan KS, McMaster D, Rozen R, *et al. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease; evidence for a common gene mutation. Circulationulation 1996;94:2154-8.*
39) van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor RR. *Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. Circulationulation 1997;95:21-3.*
40) Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, *et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase; correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. Circulationulation 1996;94:3074-8.*
41) Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, *et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile; the Hordaland Homocysteine Study. JAMA 1995;274:1526-33.*
42) Malinow MR, Nieto FJ, Szklo M, Chambless LE, Bond G. *Carotid artery intimal-medial wall thickening and plasma homocysteine in asymptomatic adults: the Atherosclerosis Risk in Community study. Circulationulation 1993;87:1107-13.*
43) Kuller LH, Evans RW. *Homocysteine, vitamins, and cardiovascular disease. Circulationulation 1998;98:196-9.*