

A Study on the DNA Polymorphisms at β fibrinogen Loci and Plasma Fibrinogen Concentration

Mi-Hwa Lee*, Hee-Choul Ohrr** and Kyung-Soon Song***

*Department of Clinical Laboratory, Chinju Health College

**Department of Preventive Medicine and Public Health, Yonsei University College of Medicine

***Department Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine

Many prospective studies have confirmed the predictive value of plasma fibrinogen levels for vascular diseases, including ischemic heart disease. Several polymorphisms of the β fibrinogen gene have been investigated in relation to plasma fibrinogen levels. The blood samples for DNA were collected from 109 healthy Koreans who have no relationship by blood (67 males and 42 females) in due consideration of some other factors such as gender, age, and smoking status. Four polymorphisms of the β fibrinogen gene that consist of *HaeIII*, *AluI*, *MnII* and *BclII* restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were investigated to examine the associations between RFLPs and plasma fibrinogen levels. In conclusion, the significant associations between *HaeIII*, *AluI*, *MnII* RFLPs (H_1H_2 , M_1M_2 , A_1A_2) and the concentration of plasma fibrinogen were shown by the smokers as well as by the old people more than 50, whereas the association between *BclII* and plasma fibrinogen were shown no connection with the status of age and smoking.

The concentration of plasma fibrinogen was significantly shown higher by the old people (≥ 50) by the younger people (≤ 49) in male and also higher by the smokers than by the nonsmokers.

Key Words: Plasma fibrinogen levels, Fibrinogen gene polymorphism

서 론

혈장 섬유소원 (fibrinogen)은 혈액응고 (hemostasis)와 혈류 (rheology)의 결정인자 가운데 하나로서 간에서 생성되는 분자량 340,000 Da의 당단백이며, $A\alpha$ (분자량 68,000 Da), $B\beta$ (분자량 54,000 Da), γ (분자량 48,000 Da)로 분류된 3종류의 polypeptide chain이 서로 S-S결합을 하고 있다. 이것은 다시 2개의 S-S결합으로 연결되어 $(A\alpha-B\beta-\gamma)_2$ 의 형을 이루고 있으며 약 50 kb의 크기로 제4번 염색체에 위치한다^{3,13}. 섬유소원의 응고기능은 thrombin에 의해 $A\alpha$ chain amino기 끝에 배치된 fibrinopeptide A와 $B\beta$ chain amino기 끝의 fibrinopeptide B를 방출하여 fibrin monomer가 되며, 이것들은 서로 중합하여 fibrin으로 된 소섬유를 이루는데, 활성화된 응고 XIII인자의 작용으로 fibrin 분자 간에 isopeptide에 의한 가교결합을 함으로써 안정된 fibrin 섬유를 형성하여 지혈소자나 창상부위에서 fibrin matrix로서 그 역할을 담당한다^{1,9}.

혈장 섬유소원은 조직 손상이나 감염, 염증 등이 발생하거나

또는 흡연 등과 같은 환경적인 요인이 있을 경우 증가하는 급성상 반응 물질이다^{8,10}. 또한, 성별, 연령, 혈중 cholesterol 농도, 당뇨병, 음주, 사회적 지위, 경구피임약 복용, 비만 및 흡연 변화, 폐경, 계절적 차이 등이 섬유소원을 상승시키는 요인으로 보고되었으며, 그 반면 적당한 음주, 지질강하제 복용, 그리고 운동 등은 섬유소원 농도를 낮춘다고 한다^{12,21,27}. 혈장 섬유소원 농도 상승은 허혈성 심질환 (ischemic heart disease), 뇌졸중 (stroke), 말초혈관 질환 (peripheral vascular disease), 관상동맥성 질환 (coronary artery disease), 동맥경화증 (atherosclerosis), 그리고 혈전증 (thrombosis) 등을 유발하는 주요 위험요인으로 밝혀져 있다^{4,17}.

Humphries 등¹⁵은 혈장 섬유소원 농도와 섬유소원 유전자 다형성의 관련 연구에서 유전자형의 차이가 섬유소원 농도를 결정한다고 하였다. 또한 여러 연구에서 섬유소원 α , β , γ 유전자 가운데 β 유전자가 혈장 섬유소원 농도와 가장 관련성이 높다고 보고하였고, α 유전자와도 일부 관련이 있다는 연구가 있으나, γ 유전자에 관한 연구는 저조하다.

Chung 등⁷과 Kant 등¹⁹에 의해 α 섬유소원과 β 섬유소원의 cDNA 염기서열 그리고 γ 섬유소원의 염색체 염기서열이 밝혀졌고, 이어 관련 연구들이 계속되었다.

현재 섬유소원 유전자에는 11종류의 제한효소 절단길이 다

*논문 접수: 2001년 10월 28일

수정재접수: 2001년 12월 26일

†별책 요청 저자: 이미화

형성 (restriction fragment length polymorphism)이 있는 것으로 보고되었는 바, α 섬유소원과 β 섬유소원의 coding region에는 각각 *RsaI*과 *MnII* 다형성이 위치해 있으며, 5'-flanking region 과 인접한 sequence region에는 α 섬유소원의 *TaqI*과 β 섬유소원의 *AvaII*, *BclIA*, *BclIB*, *BglI*, *HincII*, *HindIII*, *HaeIII* 다형성이 관찰되었다^{14,22}.

섬유소원 농도와 관련된 유전자형에 관한 연구로서 Thomas²⁴ 등은 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 후 *HaeIII*에 의하여 절단된 β 섬유소원의 5'-flanking region에서의 A/A⁴⁵⁵ 유전자형 (H₂H₂)이 섬유소원 농도에 영향을 미치는 것으로 보고하였고, Humphries 등¹⁵은 β 섬유소원의 *BclI* 다형성의 2,2 유전자형 (B₂B₂)이 섬유소원 농도를 유의하게 상승시키고, *AvaII*와 α 섬유소원의 *TaqI* 다형성에서는 관련성 있는 유전자형이 없었다고 발표하였다.

혈장 섬유소원 농도의 상승과 관련된 유전자형을 밝히려는 노력으로서 가계나 종족 간의 유전자형 차이와 섬유소원 농도를 비교 분석한 연구가 계속 보고되고 있다. 특히 심혈관 질환이나 흡연여부 또는 그의 상충요인을 관련시킨 섬유소원 농도와 유전자형에 관한 연구가 계속되고 있으나, 연구자들마다 서로 다른 결과를 나타내고 있다.

이에 본 연구에서는 한국인의 혈장 섬유소원 농도와 섬유소원 유전자 다형성을 조사하여 그 관련성을 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1996년 11월부터 1997년 2월 사이에 연세의대 부속 영동세브란스병원 건강검진센터에 내원하여 건강 판정을 받은 109명을 대상으로 하였다. 대상군은 남자 67명, 여자 42명이었으며, 이들의 연령은 17세부터 73세까지였다. 대상군으로부터 채혈한 각 검체는 3.8% sodium citrate 채혈관에 담아 잘 혼합한 후, 혈장을 원심분리하여 섬유소원을 측정하였으며, 남은 혈액은 DNA를 추출하기 위하여 별도로 -70°C에서 냉동 보관하였다.

2. 방 법

1) 혈장 섬유소원 농도 측정

혈장 섬유소원 농도 측정은 Diagnostica Stago사 (France)의 STA를 사용하여 Clauss⁶ 방법으로 측정하였다. 측정시약은 Fibrinogen Kit (Stago, Asnieres- Sur-Seine, France)를 사용하였다.

2) DNA 추출

5 ml의 혈액에 23 ml의 solution I을 넣어 혼합한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 시험관 바닥에 있는 leucocytic nuclear pellet에 1.13 ml의 solution II를 첨

가하고 pellet을 용해시켰다. 0.25 ml의 solution III를 첨가하고 혼합한 후 37°C에서 12시간 정도 반응시켰다. 반응 후 25 ml의 phenol을 넣고 5분간 혼합한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 다음 상청액을 새로운 시험관에 옮겨 넣었다. phenol과 chloroform 1:1 혼합액 2.5 ml를 넣고 5분간 혼합한 후, 다시 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 새 시험관으로 옮겼다. 옮겨진 상청액을 3 M의 NaOAc 0.25 ml와 5.5 ml의 ethanol을 넣어 5~6회 진도혼화한 뒤 실온에 방치했다. DNA pellet이 떠오르면 1.5 ml eppendorf tube로 옮기고 70% ethanol 0.5 ml를 넣어 3,000 rpm에서 10분간 원심분리했다. 상청액을 제거한 후 진공 건조기로 건조시켰다. TE buffer 0.5 ml를 넣어 DNA pellet을 용해시켰다. 이를 4°C에 보관하여 사용하였다.

DNA 추출용 시약성분

Solution I: 0.32 M sucrose, 10 mM Tris HCl (pH 7.5),
5 mM MgCl₂,
1% Triton ×100

Solution II: 0.075 M NaCl, 0.024 M EDTA (pH 8.0)

Solution III: 5% SDS (sodium dodecyl sulfate)

Phenol

Chloroform

TE buffer : 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA,
50 mg/ml Rnase

3) 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction. PCR)
PCR을 위해 추출한 Genomic DNA를 한국생공에 의뢰하여 합성한 oligopeptide primers를 이용하여 증폭하였다 (Table 1).

DNA 증폭은 PCR용 PremixTM-Top Kit (한국생공, Bioneer)를 사용하여 증폭하였다. PremixTM-Top Kit에 Genomic DNA 5 μ l (400 ng), sense primer 1 μ l (20 pmol/ μ l), antisense primer 1 μ l (20 pmol/ μ l) 등을 섞은 후 증류수로 총량이 50 μ l가 되도록 하였다.

PCR 반응은 thermal cycler (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 사용하여 94°C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension시키는 과정을 35 cycle 시행한 후, 72°C에서 10분간 post-extension시켰다. 이 과정에서 얻은 PCR 반응액 10 μ l를 1.5% agarose gel에 주입시켜 0.5×TAE 완충액 (0.04% Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)에서 50 volt의 전압으로 1시간 전기영동한 후, gel을 EtBr (ethidium bromide)용액에 담그어 염색한 다음, UV transilluminator에서 PCR 반응산물의 크기를 확인하였다. Molecular weight marker로는 1 Kb ladder marker (BM X marker: Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다.

BclI 다형성을 위한 PCR 조건은 위의 조건과는 다르게 하였다. Genomic DNA 4 μ l, sense primer 1 μ l (30 pmol/ μ l), anti-

Table 1. Primers sequences and PCR* product sizes

RFLPs**	Primers sequences: (5'→3')	Product size (bp)**
<i>MnII</i>	GGGACATGGCAAAGCATGG	314
	GGTGAGCAAGAGAAATGAAG	
<i>HaeIII</i>	AAGAATTTGGGAATGCAATCTCTGCTACCT	1,300
	CTCCTCATTGTCGTTGACACCTTGGGAC	
<i>AluI</i>	AAGAATTTGGGAATGCAATCTCTGCTACCT	1,300
	CTCCTCATTGTCGTTGACACCTTGGGAC	
<i>BclII</i>	ACCTGGTTTCTCTGCCACAAG	2,500
	AATAGTTCTCATACCACAGTGT	

*PCR: polymerase chain reaction, **RFLPs: restriction fragment length polymorphism, ***bp: base pairs

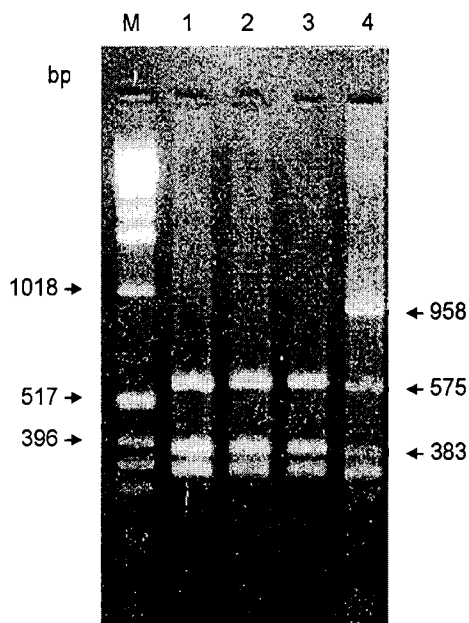


Fig. 1. Digested PCR products with *HaeIII* for polymorphism at the fibrinogen β gene locus.

Lanes 1 to 3: H_1H_1 genotype (575 bp and 383 bp fragments).
Lane 4 : H_2H_2 genotype (958 bp, 575 bp, 383 bp fragments).
Lane M : DNA molecular weight marker (1 Kb ladder).

sense primer 1 μ l (30 pmol/l), dNTP 200 μ M (Pharmacia), *Taq* polymerase 1.5 unit (Bioneer), buffer (Bioneer) 등을 섞은 후 증류수로 총량이 50 μ l가 되도록 하였다.

PCR 반응은 94°C에서 5분간 pre denaturation시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 extension시키는 과정을 35 cycle 시행한 후, 72°C에서 10분간 post extension시켰다. PCR 반응물의 확인은 전술한 조건과 동일하였고, Molecular weight marker로는 1 Kb ladder marker (BM X marker: Boehringer Mannheim, Germany)와 100 bp ladder marker (Gibco BRL, USA)를 사용하였다.

4) 중합효소 연쇄반응 산물의 정제

PCR 반응액을 제한효소로 절단하기 전에 정제하였다. 상층부의 oil을 조심스럽게 제거하고 동량의 chloroform을 넣어 잘 혼합한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 새 시험관에 옮기고, 0.1배의 3 M NaOAc (pH 5.2)와 2.5배의 95% ethanol을 넣어 혼합한 후, 15분간 -70°C에서 냉각시킨 다음 15,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심분리하였다.

침전물을 70% ethanol을 넣어 5분간 원심분리하여 세척하고 진공 건조기로 건조시킨 후, 20 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 녹였다. 이 중 4 μ l를 0.8% agarose gel로 전기영동하여 PCR 증폭 산물을 확인하였다.

5) 제한효소처리

증폭된 DNA 10 μ l에 10배 희석 buffer 2 μ l, 제한효소 0.2 μ l (2 unit/ μ l) 등을 넣은 후 증류수 7.8 ml를 넣어 총량 20 ml가 되게 한 후, 37°C에서 overnight시켰다. 제한효소로는 *HaeIII* (Promega), *AluI* (Bio-Labs), *MnII* (Promega), *BclII* (Bio-Labs)를 사용하였다. 제한효소처리 후 *HaeIII*와 *BclII*은 2% agarose gel에 *AluI*과 *MnII*은 Nusieve agar 3% gel로 전기영동 후 EtBr로 염색하여 UV transilluminator에서 band를 확인하였다.

6) 유전자형의 분류

각 유전자 다형성에서 유전자형의 구분은 Baumann¹⁾의 방법에 따라 분류하였다 (Table 2). *HaeIII*를 사용하여 절단된 575 bp와 383 bp band를 H_1H_1 유전자형으로 하고, 절단되지 않는 958 bp band를 H_2H_2 유전자형으로 하였다 (Fig. 1). *MnII*의 경우는 절단되어 150 bp와 63 bp band를 나타낸 경우를 M_1M_1 유전자형으로 하고 절단되지 않은 340 bp band를 M_2M_2 형으로 하였다 (Fig. 2). *AluI*을 사용했을 때 절단되어 179 bp와 161 bp의 band를 나타낸 경우를 A_1A_1 유전자형으로 하고 절단되지 않은 340 bp band를 A_2A_2 유전자형으로 하였다 (Fig. 3). *BclII*의 경우는 Thomas 등²⁴⁾의 방법에 따라 위와는 반대로 절단되지 않은 2,500 bp를 B_1B_1 유전자형으로 하고 절단된 1,400 bp와 1,100 bp를 B_2B_2 유전자형으로 분류하였다 (Fig. 4).

Table 2. Allele designation and digested fragment sizes

Polymorphism	<i>Hae</i> III		<i>Aha</i> I		<i>Mn</i> II		<i>Bcl</i> II
	H ₁ H ₁	H ₂ H ₂	A ₁ A ₁	A ₂ A ₂	M ₁ M ₁	M ₂ M ₂	
Allele designation	H ₁ H ₁	H ₂ H ₂	A ₁ A ₁	A ₂ A ₂	M ₁ M ₁	M ₂ M ₂	B ₁ B ₁
Digested fragment size (bp)	575	958	179	340	150	213	2,500
	383		161		63		1,100

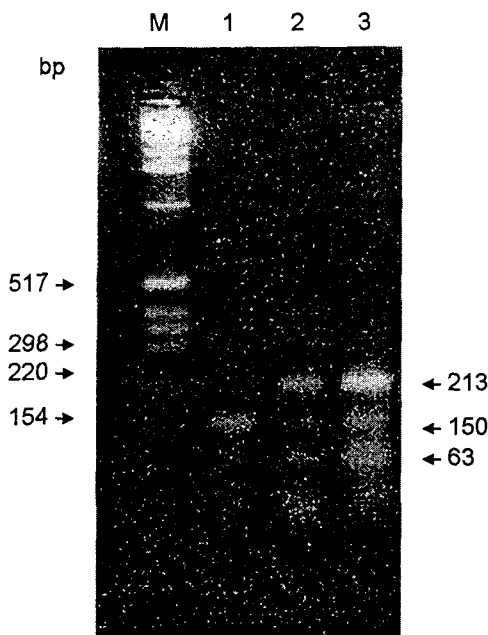


Fig. 2. Digested PCR products with *Mn*II for polymorphism at the fibrinogen β gene locus.

Lane 1 : M₁M₁ genotype (150 bp and 63 bp fragments).
Lanes 2 to 3: M₁M₂ genotype (213 bp, 150 bp, 63 bp fragments).
Lane M : DNA molecular weight marker (1 Kb ladder).

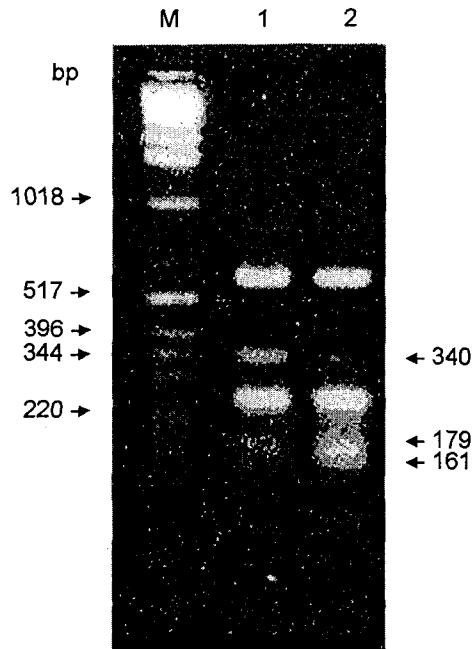


Fig. 3. Digested PCR products with *Aha*I for polymorphism at the fibrinogen β gene locus.

Lane 1 : A₁A₂ genotype (340 bp, 179 bp, 161 bp fragments).
Lane 2 : A₁A₁ genotype (179 bp and 161 bp fragments).
Lane M: DNA molecular weight marker (1 Kb ladder).

3. 분석방법

본 연구의 통계처리는 SAS를 이용하여 실시하였다. 성별, 연령, 흡연여부, 섬유소원 평균농도, 섬유소원 유전자 다형성 등을 조사한 다음, 각 변수들끼리 t 검정을 실시하여 관련성을 분석하였으며, 유전자형에 대해서는 상관분석을 하였다.

결 과

1. 섬유소원 농도에 따른 성별, 연령별, 흡연여부의 비교

전체 연구 대상자의 섬유소원 평균농도는 267.4±67.6 mg/dl 이었다. 이를 성별에 따라 분류하였던 바, 남자군의 섬유소원 평균농도는 267.3±74.1 mg/dl이었고, 여자군의 섬유소원 평균농도는 267.5±56.6 mg/dl로 남녀 사이의 섬유소원 평균농도에는 유의한 차이가 없었다. 섬유소원 농도의 연령별 비교에서, 49세 이하 연령군의 섬유소원 평균농도는 251.8±52.7 mg/dl이

었고, 50세 이상 연령군의 섬유소원 평균농도는 292.2±80.8 mg/dl으로, 50세 이상 연령군이 49세 이하 연령군보다 유의하게 높았다. 섬유소원 농도를 흡연여부에 따라 비교하였을 때, 비흡연자의 섬유소원 평균농도는 258.8±62.1 mg/dl이었고, 흡연자의 섬유소원 평균농도는 277.2±72.2 mg/dl로, 비흡연자와 흡연자 사이에 섬유소원의 평균농도 값의 유의한 차이는 볼 수 없었다 (Table 3).

흡연자와 비흡연자 간에 유의한 차이를 나타낸 남자군만을 연령별로 나누어 비교한 바, 49세 이하 연령군에서 비흡연자의 섬유소원 평균농도는 210.5±62.8 mg/dl이었고, 흡연자의 섬유소원 평균농도는 258.0±55.8 mg/dl로, 흡연자가 유의하게 높았으며, 50세 이상 연령군의 경우 비흡연자의 섬유소원 평균농도는 264.4±53.9 mg/dl이었으나, 흡연자의 섬유소원 평균농도는 307.0±68.1 mg/dl로 흡연자가 유의하게 높아, 두 연령군 모두 흡연자의 섬유소원 평균농도가 비흡연자보다 유의하게 높았다

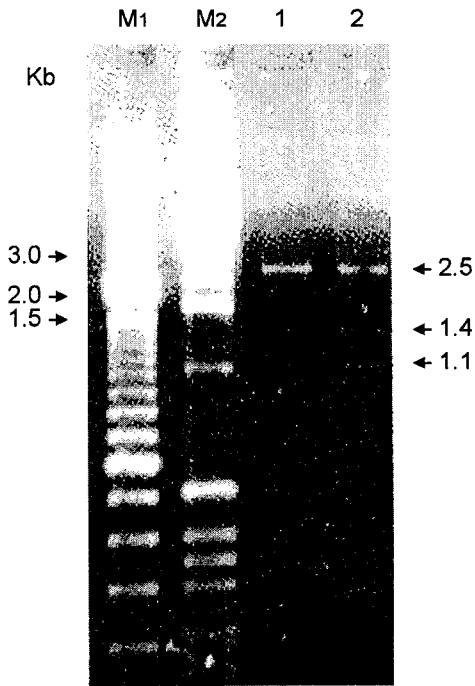


Fig. 4. Digested PCR products with *BclI* for polymorphism at the fibrinogen β gene locus.

Lane 1 : B₁B₁ genotype (2.5 kb fragment).
 Lane 2 : B₁B₂ genotype (2.5 kb, 1.4 kb, 1.1 kb fragments).
 Lane M₁: DNA molecular weight marker (100 bp ladder).
 Lane M₂: DNA molecular weight marker (1 Kb ladder).

(Table 4).

HaeIII, *MnII*, *AluI*, *BclI*의 유전자형 종류에 따라 섬유소원 평균농도를 비교하였다. *HaeIII*의 H₁H₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도는 256.0±57.6 mg/dl이었고, H₁H₂ 유전자형은 287.0±79.0 mg/dl, *MnII*의 M₁M₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도는 256.6±57.6 mg/dl, M₁M₂ 유전자형은 286.8±79.8 mg/dl이었으며, *AluI*에서는 A₁A₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도는 256.0±57.6 mg/dl, A₁A₂ 유전자형은 287.0±79.0 mg/dl이었다. *HaeIII*, *MnII*, *AluI*에서는 H₁H₂, M₁M₂, A₁A₂ 유전자형 모두 섬유소원 평균농도가 H₁H₁, M₁M₁, A₁A₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도보다 유의하게 높았다. *BclI*의 경우 B₁B₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도가 268.4±69.5 mg/dl이고, B₁B₂ 유전자형은 271.7±51.3 mg/dl로, 두 유전자형 사이의 섬유소원 평균농도에는 유의한 차이를 볼 수 없었다 (Table 5).

각 유전자형을 성별로 나누어 섬유소원 평균농도를 비교하여 보았던 바, 각 유전자형 간의 남녀별 섬유소원 평균농도에는 유의한 차이가 없었다.

각 유전자형에 따른 섬유소원 평균농도를 연령에 따라 비교한 결과, 49세 이하의 연령군에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 50세 이상의 연령군에서는 *HaeIII*, *MnII*, *AluI*의 H₁H₂, M₁M₂, A₁A₂ 유전자형의 섬유소원 평균농도가 H₁H₁, M₁M₁,

Table 3. Comparison of fibrinogen levels by gender, age, and smoking status

Characteristics	No. of person (%)	Mean±SD (mg/dl)	p-value
Gender			
Male	67 (61.5)	267.3±74.1	0.9907
Female	42 (38.5)	267.5±56.6	
Age			
≤49 (yrs.)	67 (61.5)	251.8±52.7	0.0021
≥50 (yrs.)	42 (38.5)	292.2±80.8	
Smoking status			
Non-smoker	58 (53.2)	258.8±62.1	0.1563
Smoker	51 (46.8)	277.2±72.7	
Total	109 (100.0)	267.4±67.6	

Table 4. Comparison of fibrinogen levels by age and smoking status in male

Age	Smoking status	No. of person (%)	Mean±SD (mg/dl)	p-value
≤49 (yrs.)				
	Non-smoker	10 (9.2)	210.5±62.8	0.0351
	Smoker	25 (22.9)	258.0±55.8	
≥50 (yrs.)				
	Non-smoker	11 (10.1)	264.4±53.9	0.0425
	Smoker	21 (19.3)	307.0±68.1	

A₁A₁ 유전자형의 섬유소원 평균농도보다 유의하게 높았으며, *BclI*에서는 B₁B₁과 B₁B₂ 유전자형 간의 섬유소원 평균농도에 유의한 차이가 없었다 (Table 6).

각 유전자형의 섬유소원 평균농도를 흡연여부에 따라 비교한 결과, 49세 이하 연령군에서는 흡연자와 비흡연자 모두 유의한 차이가 없었으나, 50세 이상의 연령군에서는 흡연자와 비흡연자 모두 *HaeIII*, *MnII*, *AluI*의 H₁H₂, M₁M₂, A₁A₂ 유전자형의 섬유소원 평균농도가 H₁H₁, M₁M₁, A₁A₁ 유전자형보다 유의하게 높았으며, *BclI*에서는 B₁B₁ 유전자형과 B₁B₂ 유전자형의 섬유소원 평균농도에 유의한 차이가 없었다 (Table 7, 8).

고 찰

혈장 섬유소원이 심혈관 질환의 주요 위험요인이며 흡연, 연령, 혈압, BMI, 비만 등의 요인으로 인하여 그 농도가 상승한다는 것은 여러 연구보고를 통해 잘 알려진 바이다. 그외 다른 관련요인을 찾고자 하는 노력이 계속되고 있으며, 최근

Table 5. Comparison of fibrinogen levels by genotypes

RFLPs	Genotype	No. of person (%)	Mean±SD (mg/dl)	p-value
<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	69 (63.3)	256.0±57.6	0.0203
	H ₁ H ₂	40 (36.7)	287.0±79.0	
<i>MnlI</i>	M ₁ M ₁	70 (64.2)	256.6±57.6	0.0245
	M ₁ M ₂	39 (35.8)	286.8±79.8	
<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	69 (63.3)	256.0±57.6	0.0203
	A ₁ A ₂	40 (36.7)	287.0±79.0	
Total		109 (100.0)	271.5±68.3	
<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	70 (73.7)	268.4±69.5	0.8263
	B ₁ B ₂	25 (26.3)	271.7±51.3	
Total		95 (100.0)	270.1±60.4	

Table 6. Comparison of fibrinogen levels by genotypes and age

Age	RELPS	Genotype	No. of person (%)	Mean±SD (mg/dl)	p-value
≤49 (yrs.)	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	43 (39.4)	250.1±53.1	0.7239
		H ₁ H ₂	24 (22.0)	254.9±53.1	
	<i>MnlI</i>	M ₁ M ₁	44 (40.4)	251.1±53.3	0.8820
		M ₁ M ₂	23 (21.1)	253.2±52.9	
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	43 (39.4)	250.1±53.1	0.7239
		A ₁ A ₂	24 (22.0)	254.9±53.1	
	<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	41 (43.2)	254.5±55.3	0.5877
		B ₁ B ₂	17 (17.9)	262.6±41.4	
≥50 (yrs.)	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	26 (23.9)	265.8±64.3	0.0054
		H ₁ H ₂	16 (14.7)	335.2±88.3	
	<i>MnlI</i>	M ₁ M ₁	26 (23.9)	265.8±64.3	0.0054
		M ₁ M ₂	16 (14.7)	335.2±88.3	
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	26 (23.9)	265.8±64.3	0.0054
		A ₁ A ₂	16 (14.7)	335.2±88.3	
	<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	29 (30.5)	288.0±82.8	0.9248
		B ₁ B ₂	8 (8.4)	291.0±67.1	

에는 섬유소원 농도 상승과 관련하여 유전학적 측면에서 그 근본 원인을 규명하려는 연구가 활발해지고 있다. 본 연구에서는 연구 대상자 109명에 대해 β 섬유소원 유전자형과 성별, 연령, 흡연여부 등을 조사하여 섬유소원 농도 상승과의 관련성을 조사하였다.

연구 대상자를 연령에 따라 49세 이하 (67명, 61.5%)와 50세 이상 (42명, 38.5%)로 분류하였는 바, 50세 이상인 연령군의 섬유소원 농도는 49세 이하인 연령군보다 유의하게 높은 것으

로 나타났는데, 이는 연령이 높을수록 섬유소원 농도가 증가한다는 Stone 등²³⁾과 Folsom 등¹¹⁾의 연구 결과와 유사하였다. 흡연여부에 따라 분류하였을 때, 흡연자가 비흡연자에 비해 섬유소원 농도가 유의하게 높아 Kannel 등¹⁸⁾과 Lowe 등²⁰⁾의 연구와 유사한 결과를 보였다. 특히, 50세 이상 연령군에 속하는 흡연자의 섬유소원 평균농도가 307.0±68.1 mg/dl로 나타나 동일 연령군에 속하는 비흡연자의 섬유소원 평균농도 264.4±53.9 mg/dl 및 49세 이하 연령군에 속하는 흡연자의 섬유소원

Table 7. Comparison of fibrinogen levels by genotypes, smoking status, and age (≤ 49 yrs.)

Smoking status	RELPs	Genotype	No. of person (%)	Mean \pm SD	t-value	p-value	
Non-smoker	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	24 (22.0)	246.9 \pm 51.5	-0.1247	0.9014	
		H ₁ H ₂	14 (12.8)	249.1 \pm 58.3			
	<i>MnII</i>	M ₁ M ₁	24 (22.0)	246.9 \pm 51.5	-0.1247	0.9014	
		M ₁ M ₂	14 (12.8)	249.1 \pm 58.3			
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁	24 (22.0)	246.9 \pm 51.5	-0.1247	0.9014
			A ₁ A ₂	14 (12.8)	249.1 \pm 58.3		
		<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	22 (23.2)	247.0 \pm 53.1	-1.2102	0.2351
			B ₁ B ₂	12 (12.6)	268.5 \pm 41.4		
Smoker	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	19 (17.4)	254.2 \pm 56.1	-0.4233	0.6755	
		H ₁ H ₂	10 (9.2)	263.0 \pm 46.6			
	<i>MnII</i>	M ₁ M ₁	20 (18.3)	256.3 \pm 56.2	-0.1493	0.8824	
		M ₁ M ₂	9 (8.3)	259.4 \pm 45.8			
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁	19 (17.4)	254.2 \pm 56.1	-0.4233	0.6755
			A ₁ A ₂	10 (9.2)	263.0 \pm 46.6		
		<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	19 (17.4)	263.2 \pm 58.0	0.5224	0.6066
			B ₁ B ₂	5 (4.6)	248.6 \pm 42.2		

Table 8. Comparison of fibrinogen levels by genotypes, smoking status, and age (≥ 50 yrs.)

Smoking status	RELPs	Genotype	No. of person (%)	Mean \pm SD (mg/dl)	t-value	p-value	
Non-smoker	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	11 (10.1)	248.2 \pm 46.5	-2.3934	0.0278	
		H ₁ H ₂	9 (8.3)	318.4 \pm 83.1			
	<i>MnII</i>	M ₁ M ₁	11 (10.1)	248.2 \pm 46.5	-2.3934	0.0278	
		M ₁ M ₂	9 (8.3)	318.4 \pm 83.1			
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁	11 (10.1)	248.2 \pm 46.5	-2.3934	0.0278
			A ₁ A ₂	9 (8.3)	318.4 \pm 83.1		
		<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	13 (13.7)	282.0 \pm 86.0	0.1245	0.9027
			B ₁ B ₂	3 (3.2)	275.3 \pm 67.1		
Smoker	<i>HaeIII</i>	H ₁ H ₁	15 (13.8)	278.7 \pm 73.6	-2.0986	0.0488	
		H ₁ H ₂	7 (6.4)	356.7 \pm 96.5			
	<i>MnII</i>	M ₁ M ₁	15 (13.8)	278.7 \pm 73.6	-2.0986	0.0488	
		M ₁ M ₂	7 (6.4)	356.7 \pm 96.5			
	<i>AluI</i>	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁	15 (13.8)	278.7 \pm 73.6	-2.0986	0.0488
			A ₁ A ₂	7 (6.4)	356.7 \pm 96.5		
		<i>BclI</i>	B ₁ B ₁	16 (16.8)	282.8 \pm 82.7	-0.1835	0.8564
			B ₁ B ₂	5 (5.3)	300.4 \pm 73.0		

평균농도 258.0 \pm 55.8 mg/dl와 비교할 때 유의하게 높았는데, 상승에 따른 관련질환에 대한 위험도가 더 높은 것으로 사료
이같은 결과로서 연령이 높은 남자 흡연자들은 섬유소원 농도 된다.

섬유소원 농도의 성별에 따른 비교에서는 남녀 사이에 유의한 차이를 볼 수 없었고 여자군에서는 흡연자와 비흡연자 사이에 섬유소원 농도의 유의한 차이를 보이지 않았다. 남자군의 경우 흡연자가 46명 (69%) 그리고 비흡연자가 21명 (31%)인데 비해, 여자군의 경우는 흡연자가 5명 (12%), 비흡연자가 37명 (88%)으로 흡연자의 수가 너무 적기 때문에 비교 분석에 의의 있는 결과가 나오지 않은 것으로 사료된다. 남자군의 경우는 흡연자의 섬유소원 농도가 비흡연자에 비해 유의하게 높았다.

섬유소원 농도와 섬유소원 유전자 다형성과의 관련성을 조사하기 위하여 여러 연구에서 섬유소원 농도와 유의한 관련이 있는 것으로 보고한 β 섬유소원을 선택하였다. 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭한 후, 여러 연구들에서 의의 있는 결과를 보인 제한효소 *HaeIII*, *BclI*, *MnII*과 *AluI*를 사용하여 각각의 다형성을 섬유소원 농도와 관련시켜 보았다. β 섬유소원의 증폭을 위해 Baumann¹⁾과 Thomas²⁾가 고안한 sequence에 따라서 합성한 3쌍의 oligonucleotide primer를 사용하였는데, 증폭한 결과 *HaeIII*, *AluI* 다형성을 위한 PCR 산물의 크기는 1,300 bp였고 *MnII* 다형성을 위한 PCR 산물은 314 bp였으며 *BclI* 다형성을 위한 PCR 산물의 크기는 2,500 bp였다. β 섬유소원의 *BclI* 다형성을 위한 기존의 연구에서는 Southern blotting 방법을 이용하여 증폭하였는데, 이 방법은 cDNA와 방사선 동위원소를 사용하기 때문에 과정이 복잡하고 시간이 많이 걸리는 단점이 있다.

이러한 단점을 보완하기 위하여 Thomas 등²⁾은 섬유소원의 *BclI* 다형성을 위한 PCR 방법을 고안하였는데, 본 연구에서는 섬유소원의 *BclI* 다형성을 위해 PCR 방법을 이용하여 증폭하였다.

109명의 *HaeIII*, *MnII*, *AluI* 다형성과 95명의 *BclI* 다형성을 조사한 결과, 많은 연구에서 섬유소원 농도 상승과 유의한 관련성이 있다고 하며, 희귀유전자 (rare allele)라고 일컫는 2,2 유전자형 (H_2H_2 , M_2M_2 , A_2A_2 , B_2B_2)은 발견되지 않았다. 연구 대상자 수가 많은 연구에서도 대부분 섬유소원 농도 상승과 밀접한 관련이 있다고 여겨지는 2,2 유전자형의 수는 매우 적었다고 한다. 구체적인 예로 Humphries 등¹⁰⁾은 91명의 연구 대상자 중 *BclI*의 2,2 유전자형 (B_2B_2)을 가진 사람이 4명 (4.4%)이었고, Berg 등²⁾은 118명 중 2명 (1.7%), Connor 등⁷⁾은 247명 중 6명 (2.4%)이 발견되었다고 한다.

본 연구에서는 *HaeIII*, *AluI*, *MnII*, *BclI* 다형성 모두에서 H_1H_1 , A_1A_1 , M_1M_1 , B_1B_1 유전자형과 H_1H_2 , A_1A_2 , M_1M_2 , B_1B_2 유전자형 만이 나타났다. 두 유전자형의 섬유소원 농도를 비교한 결과 *HaeIII*, *AluI*, *MnII* 다형성에서는 H_1H_2 , A_1A_2 , M_1M_2 , B_1B_2 유전자형을 가지고 있는 사람들이 H_1H_1 , A_1A_1 , M_1M_1 , B_1B_1 유전자형을 가진 사람들 보다 섬유소원 농도가 더 높은 것으로 나타났다.

BclI 다형성은 B_1B_1 , B_1B_2 유전자형 모두 섬유소원 농도와

는 관련성이 없는 것으로 나타났는데, Thomas 등²⁾은 *BclI*, *TaqI* 다형성들 가운데 *BclI* 다형성과 *TaqI* 다형성은 섬유소원 농도와 유의한 관련성이 없었다고 하여 본 연구와 매우 유사한 결과를 나타내고 있다. 이러한 연구 결과를 토대로 유전자형에 따른 섬유소원 농도 상승을 예측하여 심혈관 질환 발생 위험을 낮추기 위한 환경적 요인들을 통제한다면, 보다 나은 심혈관 예방 효과를 기대할 수 있다고 사료되며 이를 위해서는 보다 구체적인 관련연구가 이루어져야 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Baumann RE and Henschen AH (1994): Linkage disequilibrium relationships among four polymorphisms within the human fibrinogen gene cluster. *Hum Genet*, **94**: 165-170.
- 2) Berg K and Kierulf P (1989): DNA polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentrations. *Clin Genet*, **36**: 229-235.
- 3) Blomback B, Hessel B and Hogg D (1976): Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human fibrinogen. *Thromb Res*, **8**: 639-658.
- 4) Broadhurst P, Kelleher C, Hughes L, Imeson JD and Raftery EB (1990): Fibrinogen, factor VII clotting activity and coronary artery disease severity. *Atherosclerosis*, **85**: 169-173.
- 5) Chung DW, Que BG, Rixon MW, Mace M Jr and Davie EW (1983): Characterization of complementary deoxyribonucleic acid and genomic deoxyribonucleic acid for the β -chain of human fibrinogen. *Biochemistry*, **22**: 3244-3250.
- 6) Clauss A (1957): Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol*, **17**: 237-240.
- 7) Connor JM, Fowkes FGR, Wood J, Smith FB, Donnan PT and Lowe GDO (1992): Genetic variation at fibrinogen loci and plasma fibrinogen levels. *J Med Genet*, **29**: 480-482.
- 8) Di Minno G, Silver MJ and Cerbone AM (1986): Increased fibrinogen binding to platelets from patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*, **6**: 203-211.
- 9) Doolittle RF (1984): Fibrinogen and fibrin. *Ann Rev of Biochem*, **53**: 195-229.
- 10) Fey GH and Fuller GM (1987): Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol Biol Med*, **4**: 323-338.
- 11) Folsom A (1992): Fibrinogen and cardiovascular risk in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. In: Fibrinogen, a "new" cardiovascular risk factor, ed. by Ernst E, Koenig W, Lowe GDO, et al. London: Blackwell.
- 12) Green F, Hamsten A and Blomback, Humphries S (1993):

- The role of β -fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden. *Thromb Haemost*, **70**: 915-920.
- 13) Hawiger J, Timmons S, Kloczewiak M, Strong DD and Doolittle RF (1982): γ and α chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 2068-2071.
 - 14) Humphries SE, Imam AMA and Robbins TP (1984): The identification of a DNA polymorphism of the α fibrinogen gene, and the regional assignment of the human fibrinogen genes to 4q 26-qter. *Hum Genet*, **68**: 148-153.
 - 15) Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y and Meade TW (1987): Role of genetic variation. *Lancet*, **1**: 1452-1455.
 - 16) Humphries SE, Ye S, Talmud P and Bara L (1995): European Atherosclerosis Research Study: genotype at the fibrinogen locus (G₋₄₅₅-A β -Gene) is associated with differences in plasma fibrinogen levels in young men and women from different regions in Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**: 96-104.
 - 17) Kannel WB, D'Agostino RB and Belanger AJ (1987): Fibrinogen, cigarette smoking, and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J*, **113**: 1006-1010.
 - 18) Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP and D'Agostino RB (1987): Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. *JAMA*, **258**: 1183-1186.
 - 19) Kant JA and Crabtree GR (1983): The rat fibrinogen genes. *J Biol Chem*, **258**: 4666-4667.
 - 20) Lowe GDO, Smith WCS and Tunstall-Pedoe HD (1988): Cardiovascular risk and haemorrhology-results from the Scottish Heart Health Study and the MONICA-Project. Glasgow. *Clin Hemorheol*, **8**: 517-524.
 - 21) Meade TW and North WRS (1977): Population based distributions of haemostatic variables. *Br Med Bull*, **33**: 283-288.
 - 22) Olexa SA and Budzynski AZ (1980): Evidence for four different polymerization sites involved in human fibrin formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**: 1374-1378.
 - 23) Stone MC and Thorp JM (1985): Plasma fibrinogen: A major coronary risk factor. *J Royal Coll Gen Pract*, **35**: 565-569.
 - 24) Thomas AE, Green F, Cruickshank K and Humphries S (1991): The *HaeIII* and *HindIII* polymorphisms of the β fibrinogen gene: racial differences in frequency and association. *Thromb Haemost*, **65**: 897-900.
 - 25) Thomas AE, Lamlum H, Humphries SE and Green FR (1994): Linkage disequilibrium across the fibrinogen locus as shown by five genetic polymorphisms, G/A-455 (*HaeIII*), C/T-148 (*HindIII/AluI*), T/G+1689 (*AvaII*), and *BclI* (beta-fibrinogen) and *TaqI* (alpha-fibrinogen), and their detection by PCR. *Hum Mutat*, **3**: 79-81.
 - 26) Thomas AE, Green FR, Lamlum H and Humphries SE (1995): The association of combined α and β fibrinogen genotype on plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *J Med Genet*, **32**: 585-589.
 - 27) Yarnell JWG, Fehily AM and Milbank J (1983): Determinants of plasma lipoproteins and coagulation factors in men from Caerphilly, South Wales. *J Epidemiol Community Health*, **37**: 137-140.