

한국인에서 Endothelial Nitric Oxide Synthase 유전자의 Insertion/Deletion Polymorphism의 분포

김선정¹ · 강병용² · 배준설³ · 김기태³ · 이강오^{1*}

¹삼육대학교 생명과학과

²삼육대학교 생명과학연구소

³(주)서린 바이오사이언스, 서린 생명과학연구소

The Distribution of the Insertion/Deletion Polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Gene in Koreans

Seon Jeong Kim¹, Byung Yong Kang², Joon Seol Bae³, Ki Tae Kim³ and Kang Oh Lee^{1*}

¹Department of Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

²Research Institute for Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

³Seoulin Bioscience Institute, Seoulin Bioscience, Co. Ltd., Seoul 134-030, Korea

(Received August 20, 2002 / Accepted September 16, 2002)

ABSTRACT : Hypertension is a multifactorial disease. Both genetic and environmental factors have been implicated in its etiology. Since the impairment of nitric oxide (NOS) production plays an important role in the pathogenesis of hypertension, endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) gene is supposed to be a candidate gene of hypertension. Our study group investigated the 27 bp insertion/deletion (Ins/Del) polymorphism of ecNOS gene in 99 Korean normotensives and 98 hypertensives, respectively. There was no significant association with any cardiovascular risk factors as well as hypertension in Koreans. The Ins/Del polymorphism of the ecNOS gene indicated the similar allele distribution among ethnic groups studied. Further studies using larger sample size and subject information is required to describe the general picture of the association between the ecNOS gene polymorphic loci and hypertension

Keywords: Hypertension, Nitric oxide and Polymorphism

서 론

Nitric oxide는 평활근 세포의 증식 및 혈소판 응집을 억제시키는 혈관 팽창성 물질(vasodilator)로서 심혈관계질환의 병인에도 관여한다(Schmidt와 Walter, 1994). 이 물질은 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 생성되는데, 이 효소는 다양한 세포 및 조직에서 L-arginine으로부터 nitric oxide의 생성을 촉진하는 효소이다(Moncada 등, 1991). 현재까지 NOS는 neuronal constitutive NOS(nNOS), endothelial constitutive NOS(ecNOS)와 inducible NOS(iNOS)의 3가지 형태의 아형(subtype)으로 존재하는 것으로 알려졌다. 이들 아형들은 모두 다른 염색체 상에 존재하는 유전자들에 의해 암호화되

는 것으로 알려졌는데, nNOS 유전자는 12번 염색체의 q24.2 부위에 위치에 있으며, ecNOS 유전자는 7번 염색체의 q35-36 부위에 위치해 있다(Marsden 등, 1993). 그리고 iNOS 유전자는 17번 염색체의 cen-q11.2 부위에 위치해 있는 것으로 알려졌다(Chartrain 등, 1994).

ecNOS 유전자는 길이가 21 kb이고 26개의 exon과 25개의 intron으로 이루어져 있다(Marsden 등, 1993). 최근에, 이 유전자의 4번 intron에서 27 bp insertion/deletion (Ins/Del) 다형성이 존재한다는 사실이 밝혀졌고(Wang 등, 1996), 관상동맥질환(Wang 등, 1996) 및 고혈압(Uwabo 등, 1998)과 관련성이 있는 것으로 보고되었다.

이에 본 연구에서는 고혈압과의 관련 가능성이 있는 후보 유전자인 ecNOS 유전자에 존재하는 Ins/Del 다형성을 유전자 표지(genetic marker)로 이용하여, 이 다형성의 한국인 집단에서의 분포를 조사함은 물론, 고혈압과 유의한 관련성

*To whom correspondence should be addressed

이 있는지를 조사하기 위한 환자-대조군 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

연구 대상

건강 검진을 받은 총 197명의 한국인 혈액 시료를 서울 위생병원의 임상병리학교실로부터 동의를 얻어 수집하였다. 이들 중 98명은 고혈압 환자인 것으로 진단되었다. 고혈압의 기준은 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이거나 확장기 혈압이 90 mmHg 이상인 사람을 대상으로 하였다.

Total genomic DNA 분리

DNA의 분리는 Sambrook 등(1989)의 방법을 약간 변형하여 시행하였다. 채혈한 혈액을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 혈장과 적혈구층 사이에 있는 얇은 층인 단핵구층(buffy coat)을 분리하고, 0.2% NaCl과 5% NaCl로 각각 2회씩 세척하여 적혈구를 제거하였다. 세척된 단핵구층에 핵산 용해 완충액(nucleic lysis buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 M EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 0.5% SDS)을 넣어 재현탁(resuspension)시키고, proteinase K(100 ug/ml)를 넣고 섞어준 후 55°C에서 3시간 동안 방치하였다. 여기에 phenol을 동량으로 혼합하여 4,000 rpm에서 원심분리한 후에 상층액(supernatant)을 취하여 다시 phenol/chloroform(1:1)을 동량으로 혼합하여 원심분리하였다. 만일, 단백질 등의 오염물질이 많을 경우에는 위의 과정을 반복하였다. 분리한 상층액에 2배 volume의 cold absolute ethanol을 넣고 여러 번 혼합하여 DNA를 추출하고, 이를 70% ethanol에서 세척한 후 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 용해시켜 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)

PCR은 Saiki 등(1988)의 방법을 약간 변형하여 시행하였다. PCR을 수행하기 위한 primer의 염기서열은 sense primer의 경우에는 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'이고, antisense primer의 경우에는 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGT-CAC-3'이다(Wang 등, 1996). PCR 반응에는 200-400 ng의 genomic DNA, 20 pmol 농도의 primer, 200 uM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 0.01% gelatin, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 총 50 ul의 반응액이 사용되었고, 이 반응액에 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 가한 후 여기에 70 ul의 mineral oil을 넣어 증발을 방지하였다. 이렇게 준비된 반응액을 PCR cycler에서 94°C(1분), 56°C(1분), 72°C(2분)을 1주기로 하여 35주기 동안 PCR을 수행

하였다. PCR 반응이 끝난 반응산물은 2% agarose gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide 염색으로 밴드 형태를 확인하였다.

생화학적 분석(biochemical analysis)

혈청 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC) 농도 및 중성 지방 농도(triglyceride, TG)는 각각 cholesterol oxidase enzymatic method와 glycerol phosphate oxidase enzymatic method로 측정하였다. 혈청 HDL-cholesterol 농도는 dextran sulfate-MgCl₂ 침전법을 이용하여 측정하였으며, 위의 측정된 농도를 기초로 하여 Friedwald (1972)공식에 의해 혈청 LDL-cholesterol 농도를 계산하였다.

통계 분석(statistical analysis)

대립유전자 빈도는 고혈압군과 정상 혈압군에서 유전자형 빈도를 이용하여 계산하였고, Hardy-Weinberg 평형으로부터의 이탈 여부는 χ^2 적합성 검정법을 이용하여 판정하였다. 고혈압군과 정상 혈압군 사이에 유전자형 및 대립유전자 빈도의 차이는 χ^2 -독립성 검정법을 이용하여 유의성 여부를 검정하였다. 고혈압에 대한 상대적 위험도인 odds ratio 값과 이 값에 대한 95% 신뢰구간(confidence interval)은 로지스틱 회귀모형(logistic regression model)에 의해 계산하였다. 다형성의 정도를 나타내는 이형접합도 (heterozygosity) 및 다형정보도(polymorphism information content, PIC)는 Bostein 등(1980)의 방법으로 계산하였다. ecNOS 유전자의 유전자형에 대한 신체계측치들과 생화학적 자료들과의 관련성 여부는 모수적(parametric) 방법인 일원 분산분석법(one-way ANOVA test)을 이용하여 결과를 분석하였다. 모든 통계적 분석은 SPSSWIN ver.8.0 program을 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

ecNOS 유전자의 4번 intron에는 27bp Ins/Del에 의한 다형성이 존재한다는 사실이 알려졌는데(Wang 등, 1996), 이 다형성은 PCR에 의해 135 bp의 4a 대립유전자와 108 bp의 4b 대립유전자로 이루어져 있다(Fig. 1). 본 연구에서 이 다형성을 유전자 표지로 이용하여 환자-대조군 연구를 수행한 결과, 두 군 모두에서 관찰된 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg 평형으로부터 유의하게 벗어나지 않는 양상을 보였으며, 고혈압군과 대조군을 비교했을 때 이 다형성의 유전자형과 대립유전자 빈도에서 두 군간에 유의한 차이가 없었다(Table 1). 또한, 이 다형성을 다양한 신체 계측치 및 생화학적 지표들과의 관련성 여부를 조사한 결과에서도 유의

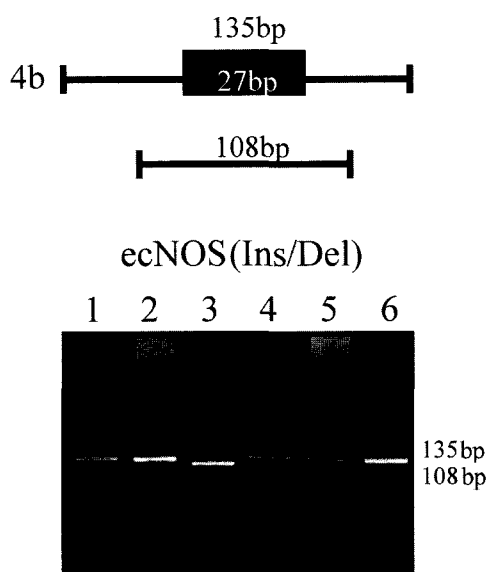


Fig. 1. Schematic diagram of Ins/Del polymorphic patterns of ecNOS gene. Lane 1, 2 and 6, Ins/Ins genotypes; Lane 3 Del/Del genotype; lane 4 and 5, Ins/Del genotypes.

한 관련성을 입증할 수 없었다(Table 2). 즉, ecNOS 유전자에 존재하는 이 다형성은 한국인을 대상으로 하여 고혈압의 유전자 표지로 사용될 수 없다고 여겨진다.

이러한 결과가 나온 이유는 크게 3가지로 설명될 수 있다. 첫째는 ecNOS 유전자가 고혈압에 영향을 미칠 수 있는 후보유전자임에도 불구하고 고혈압의 병태생리학적 경로에

어떠한 영향을 미치지 않는다는 사실로서 설명될 수 있으며, 둘째로, 선택된 Ins/Del 다형성이 고혈압과의 관련성을 밝히는데 적절치 않았으며, 연관 불평형(linkage disequilibrium)을 통해 발견되지 않은 또 다른 다형성이 질병에 영향을 미칠 가능성도 완전히 무시할 수는 없다. 셋째로, 환자군의 선택에 있어서 선택 편견(selection bias)이 일어났을 가능성도 배제할 수 없다. 이 문제는 향후 전향적 연구(prospective study)를 통해서만 해결될 수 있을 것이다. 혈관 내피세포에서 nitric oxide 합성의 이상이 고혈압의 발병에 관여한다는 사실이 임상실험(Panza 등, 1990) 및 동물모델을 이용한 연구(Konishi와 Su, 1983; Luscher와 Vanhoutte, 1986; Lockette 등, 1986; Luscher 등, 1987)에서 확인되었다. 따라서 nitric oxide의 생성에 관련된 단백질을 암호화하고 있는 유전자인 ecNOS 유전자는 고혈압의 유력한 후보 유전자의 하나로 지목되었다.

ecNOS 유전자의 4번 intron에 존재하는 27 bp Ins/Del 다형성은 고혈압과의 관련성을 연구하기 위한 유전적 표지로 이용되었는데, 일본인 집단에서 고혈압과 유의한 관련성이 있는 것으로 알려졌다(Miyamoto 등, 1998; Uwabo 등, 1998). 그러나, 전술한 바와 같이 본 연구에서는 이 다형성의 유전자형과 대립유전자 빈도에서 두 군간에 유의한 차이가 없었다. 이러한 상반된 결과가 나온 이유는 유전적 배경의 차이인 것 같지는 않다. 집단간 대립유전자 빈도를 비교한 결과 한국인(0.12)의 4b 대립유전자의 분포가 일본인(0.03~0.11) 및 호주인 집단(0.14)과 별 차이가 없었기 때문

Table 1. Genotype and allele frequencies of Ins/Del polymorphism of the ecNOS gene in normotensives and hypertensives

| | Genotype No. (%) | | | Allele No. (%) | | H ¹ | PIC ² |
|-----------------------------|------------------|--------|-----------------|----------------|--------|----------------|------------------|
| | 4bb | 4ba | 4aa | 4b | 4a | | |
| Normotensives | 75(76) | 24(24) | 0 (0) | 174(88) | 24(12) | 0.2130 | 0.1903 |
| Hypertensives | 79(81) | 17(17) | 2(2) | 175(89) | 21(11) | 0.1913 | 0.1730 |
| χ^2 | | 3.2940 | | | 0.1927 | | |
| P | | 0.1926 | | | 0.6607 | | |
| Odds ratio(CI) ³ | | | 0.87(0.47-1.62) | | | | |

¹Heterozygosity, ²Polymorphism Information Content, ³95% Confidence Interval. Frequency is given as a percentage in parenthesis.

Table 2. Clinical characteristics according to genotypes of Ins/Del polymorphism in the ecNOS gene

| Variables | Genotypes | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|
| | 4bb (No.) ⁶ | 4ba (No.) | 4aa (No.) |
| Age (year) | 60.0 ± 10.7(153) ⁷ | 57.8 ± 11.7(40) | 57.5 ± 24.7(2) |
| BMI (kg/m ²) ¹ | 23.6 ± 2.4(137) | 24.0 ± 2.8(40) | 22.4 ± 0.1(2) |
| Tg (mg/dl) ² | 130.9 ± 80.6(123) | 112.5 ± 47.1(26) | 170.5 ± 94.0(2) |
| TC (mg/dl) ³ | 150.9 ± 36.9(123) | 147.5 ± 29.4(26) | 148.0 ± 14.1(2) |
| LDL-chol (mg/dl) ⁴ | 98.1 ± 36.5(123) | 96.9 ± 30.3(26) | 82.4 ± 20.9(2) |
| HDL-chol (mg/dl) ⁵ | 26.4 ± 9.7(123) | 28.1 ± 8.5(26) | 31.5 ± 12.0(2) |

¹Body Mass Index, ²Triglyceride, ³Total cholesterol, ⁴LDL-cholesterol, ⁵HDL-cholesterol and ⁶Number. ⁷Values are mean ± SD (Standard Deviation).

Table 3. Comparison of allele frequencies of Ins/Del polymorphism in the *ecNOS* gene from various healthy populations

| Populations | Sample Number | Allele frequencies | | Reference |
|-------------|---------------|--------------------|------|-------------------------------|
| | | 4b | 4a | |
| Australian | 148 | 0.86 | 0.14 | Wang <i>et al.</i> , 1996 |
| Japanese | 120 | 0.97 | 0.03 | Uwabo <i>et al.</i> , 1998 |
| Japanese | 240 | 0.89 | 0.11 | Miyamoto <i>et al.</i> , 1998 |
| Korean | 99 | 0.88 | 0.12 | Present study |

이다(Table 3). 따라서 고혈압이 다인자성 질환이고, 이 질환을 정의할 수 있는 명확한 중간 표현형이 확립되지 않은 상황에서 표본 선정의 차이가 상반된 결과에 부분적으로 관여했을 가능성을 배제할 수 없다. 실제로, 호주 집단에서 4b 대립유전자가 흡연자에게서 관상동맥질환과 관련성을 보인 사실이 이러한 가능성을 더욱 높여준다(Wang 등, 1996). 그러므로 한국인에서 *ecNOS* 유전자와 고혈압과의 관련성을 명확히 입증하기 위해서는 흡연 흡연 여부를 비롯한 표본에 관한 자세한 정보 수집이 이러한 상반된 결과를 이해하는데 중요한 단서가 될 것으로 생각된다.

결론적으로, *ecNOS* 유전자의 intron 4번에 존재하는 27 bp Ins/Del 다형성은 한국인에서 고혈압에 대한 유전자 표지로서 적절치 않은 것으로 보이며, 연구된 다른 민족집단과의 비교를 통해서, 이 다형성의 대립 유전자 빈도는 여러 민족간에 유사한 양상을 나타내었다.

참고문헌

- Bostein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314-331.
- Chartrain, N. A., Geller, D. A., Koty, P. P., Sitrin, N. F., Nussler, A. K., Hoffman, E. P., Billiar, T. R., Hutchinson, N. I., and Mudgett, J. S. (1994): Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene, *J. Biol. Chem.*, **269**, 6757-6772.
- Friedwald, W. T., Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. (1972): Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.*, **18**, 499-502.
- Konishi, M. and Su, C. (1983): Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries, *Hypertension* **5**, 881-886.
- Lockette, W., Otsuka, Y. and Carretero, O. (1986): The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension, *Hypertension* **8**(suppl II), II-61-II-66.
- Luscher, T. F., Raji, L. and Vanhoutte, P. M. (1987): Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats, *Hypertension* **9**, 157-163.
- Luscher, T. F. and Vanhoutte, P. M. (1986) Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* **8**(suppl II), II-55-II-60.
- Marsden, P. A., Heng, H. H. Q., Scherer, S. W., Stewart, R. J., Hall, A. V., Shi, X-M., Tsui L-C. and Schappert, K. T. (1993): Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene, *J. Biol. Chem.* **268**, 17478-17488.
- Miyamoto, Y., Saito, Y., Kajiyama, N., Yosimura, M., Shimasaki, Y., Nakayama, M., Kamitani, S., Harada, M., Ishikawa, M., Kuwahara, K., Ogawa, E., Hamanaka, I., Takahashi, N., Kaneshige, T., Teraka, H., Akamizu, T., Azuma, T., Yoshimasa, Y., Yoshimasa, T., Itoh, H., Masuda, J., Yasue, H. and Nakao, K. (1998): Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension, *Hypertension* **32**, 3-8.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. and Epstein, S. E. (1990): Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension, *N. Engl. J. Med.* **323**, 22-27.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239**, 487-491.
- Schmidt, H. H. H. W. and Walter, U. (1994): NO at work, *Cell* **78**, 919-925.
- Uwabo, J., Soma, M., Nakayama, T. and Kanmatsuse, K. (1998): Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. *Am. J. Hypertens.* **11**, 125-128.
- Wang, X. L., Sim, A. S., Badenhop, R. F., McCredie, R. M. and Wilcken, D. E. L. (1996): A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene, *Nature Med.*, **2**, 41-45.