

한국인의 G Protein $\beta 3$ Subunit 유전자의 多形성과 腦血管 질환과의 상관성에 대한 연구

최민희¹ · 이진우¹ · 이경진² · 이효정¹ · 노삼웅¹ · 최 현¹ · 조기호² · 홍무창¹ · 신민규¹ · 김영석² · 배현수^{1,3*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 경희대학교 한의과대학 심계내과학교실, 3: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Prospective Evaluation of the G-protein $\beta 3$ Subunit (GNB3) Gene 825T Polymorphism is Associated With Cerebral Infarction in Korean Population

Min Hee Choi¹, Jin Woo Lee¹, Kyung Jin Lee², Hyo Jung Lee¹, Sam Woong Rho¹, Hyun Choi¹, Ki Ho Cho², Moo Chang Hong¹, Min Kyu Shin¹, Young Suk Kim², Hyun Su Bae^{1,3*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,

2: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 3: Purimed R&D Institute

Background and purpose: Hypertension and obesity has been implicated in the most important risk factors for stroke. The original finding that the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T allele associates with essential hypertension and obesity has been confirmed in several different populations. Hence, our objective was to determine whether the GNB3 C825T polymorphism predicts interindividual variation in stroke. Method: We recruited 361 stroke patients (cerebral infarction, n=278; intracerebral hemorrhage (ICH), n=83) and 199 healthy control subjects. Subjects were genotyped for GNB3 C825T mutation and findings were investigated for association with stroke. Result: The GNB3 T/T type was significantly associated with cerebral infarction prevalence (OR, 1.98; 95% CI, 1.14-3.46; p=0.015). While, ICH was not found to be significantly associated with GNB3 T/T type (OR, 1.63; 95% ICH, 0.74-3.56; p=0.219). Similarly, no significant association was determined between GNB T/C type, and cerebral infarction (OR, 1.09; 95% CI, 0.68-1.74; p=0.716), and ICH (OR, 1.14; 95% CI, 0.59-2.21; p=0.697). Conclusion: In clinical characteristics, this study shows no differences among GNB3 genotypes, that are BMI, WH ratio, hypertension rate, and ischemic heart disease rate, total lipid level, triglycerides level, total cholesterol level, HDL cholesterol level, prothrombine time, with the exception of LDL cholesterol concentrations. However, our subjects showed an inverse relationship between LDL cholesterol level and the risk of cerebral infarction. We have shown that the GNB3 T/T genotype is strongly associated with cerebral infarction. (OR, 1.98; 95% CI, 1.14-3.46; p=0.015)

Key words : GNB3, polymorphism, Stroke, Cerebral Infarction, Intracerebral hemorrhage.

서 론

뇌경색과 뇌출혈로 대표되는 腦血管 질환은 한의학의 中風과 매우 유사한 질환이다. 中風은 갑작스런 의식장애, 운동장애 및 언어장애 등의 증상이 나타나는 질병으로, 西醫學에서는 뇌종양, 수막염, 뇌염 등 중추신경계질환들이 다수 포함되나 腦卒中(stroke)이 대표적이라 할 수 있다¹⁾. 이렇게 韓醫學의 中風과 매우 유사한 질환인 腦卒中(stroke)은 모든 선진국뿐 아니라 대부

분의 개발도상국에서 사망과 장애의 중요한 원인 중 하나이며²⁾, 한국에서는 腦卒中이 사망원인 중 1위를 차지하고 있다³⁾. 中風은 病態에 따라서 中絡, 中經, 中腑, 中臟으로 구분되며, 주요한 原因說로는 內風說, 火熱說, 濕痰說, 瘀血說, 虛說 등의 다섯가지가 있다^{4,5)}. 뇌혈관 질환의 위험인자로는 나이, 성별, 민족, 유전 등의 교정이 불가능한 것과, 고혈압, 심방세동, 흡연, 고지혈증, 과음, 일과성 뇌허혈, 무증상의 경동맥협착증 등의 교정이 가능한 일차적 위험인들이 있다^{6,7)}. 그 밖의 위험인자로 당뇨병, 운동 부족, 비만, 심혈관계 질환, 심근경색, 울혈성 심부전, 대동맥궁축상경화 등이 腦卒中의 발생과 많은 관련이 있는 것으로 보고되었다^{8,9)}. 腦卒中을 일으키는 많은 病態生理學的 기전 중 특히

* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학
· E-mail : hbae@khu.ac.kr · Tel : 02-961-0323
· 접수 : 2003/03/22 · 수정 : 2003/04/15 · 채택 : 2003/05/16

고혈압과 비만은 중요한 위험인자로 볼 수 있다¹⁰⁻¹²⁾. 최근 西醫學에서는 특정 유전자의 多形性 (polymorphism)과 뇌혈관 질환의 연관성에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다. 이러한 연구의 결과로 G-protein $\beta 3$ Subunit (GNB3) 유전자의 C825T allele이 본태성 고혈압과 비만에 모두 관련한다는 연구가 각각 보고되어 있으며¹³⁻¹⁸⁾, 腦卒中 발생의 위험을 또한 증가시킬 수 있을 것으로 추정된다. 이 외에도 angiotensin-converting enzyme (ACE), apolipoprotein E (ApoE) 등의 유전자가 뇌혈관질환의 발병과 관련이 있을 것으로 보고 있다¹⁹⁻²¹⁾. GNB3 유전자는 chromosome 12p13에 위치하여 G-protein의 beta subunit을 곳곳에서 발현시키며, 250번재의 염기종류에 따라 C/C type, T/C type, T/T type으로 구분된다. GNB3 유전자의 多形性이 腦卒中의 발병과 연관되어 있다는 것은 T allele이 G-protein (주로 Gi protein)의 活性刺戟을 증대시킨다는 사실에 바탕한다²²⁾. 또한 T allele은 renin activity를 떨어뜨리며, sodium-proton exchanger의 activity를 증가시켜 고혈압, 비만 등의 질환을 유발한다고 보고되어 있다²³⁾. 이러한 최근의 연구들은 825T allele이 뇌혈관 질환의 발생과 밀접한 관련이 있을 것이라는 주장을 뒷받침해 주는데, 아직까지 국내에서는 이에 대해 심도있는 연구가 이루어지지 않았다.

이에 저자는 2000년도에 경희의료원에 입원한 361명의 환자와 연구에 자발적으로 참여한 199명의 건강한 성인들을 대상으로 뇌혈관 질환의 일반적인 위험인자 (흡연과 음주여부, 고혈압, 당뇨, 허혈성 심장질환, total lipid levels, triglycerides levels, total cholesterol levels, HDL cholesterol levels, LDL cholesterol levels, prothrombine times)와 腦卒中의 발병을 (뇌경색, 뇌출혈로 구분)이 GNB3 유전자의 多形性과 어떠한 연관성을 갖는가에 대해서 조사해 본 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1) 환자군

2000년 3월 1일부터 2000년 12월 31일까지 경희의료원 한방병원 2내과 병동에 입원한 뇌경색과 뇌출혈 환자 361명을 대상으로 하였다. Brain MRI (magnetic resonance imaging)를 시행하여 뇌졸중의 종류에 따라 뇌경색과 뇌출혈의 2군으로 나누어 분석하였다.

2) 대조군

2000년 제2회 한의학국제박람회를 방문한 관람객 중 유전자 검사를 희망하는 199명의 건강한 성인을 대상으로 하였다.

2. 임상기준의 설정

같은 종류의 분석은 모두 동일한 진단도구와 자동분석기를 사용하였으며, 임상검사는 모두 경희의료원에서 행하였다.

1) 고혈압 : WHO-ISH 기준에 따라 수축기 혈압이 160 mmHg 이상이며 이완기 혈압이 100 mmHg 이상이거나, 혹은 혈압강하제를 복용하는 것을 기준으로 하였다²⁴⁾.

2) 당뇨병 : WHO 기준에 따라 금식시 glucose level이 적어도 140 mg/dl 이상이거나, 식후 2시간 후, 혹은 75 g의 glucose를 경구 투여한 후의 glucose level이 적어도 200 mg/dl 이상인 경우를 기준으로 하였다²⁵⁾.

3) BMI (body mass index) : 체중 (kg)과 신장 (cm)의 비율에 의해 측정하였다.

4) WH ratio (waist and hip circumference ratio) : 臍中 높이의 지름과 둔부의 최대치로 측정하였다.

5) 흡연습관 : 현재 흡연을 하는가, 하지 않는가로 구분하였다.

6) 음주여부 : 자가설문지에 의해 음주자와 비음주자로 구분하였다.

7) 심장질환 과거력 : 허혈성 심장질환이 있었다고 스스로 말한 경우와 임상예에 의해 뇌혈관질환을 제외한 허혈성 심장질환이 있었다고 보고된 경우로 하였다.

8) 뇌혈관질환 과거력 : 임상의의 진단으로 확정된 뇌졸중이나 일과성 허혈성 발작 (TIA)이 있었던 경우로 하였다.

3. GNB3 유전자형의 측정

1) DNA 분리

DNA는 Debomoy²⁶⁾ 등이 사용한 방법을 응용하여 말초정맥혈에서 분리하였다. 즉, 2 ml microtube에 1 ml의 정맥혈을 넣고 TKM1 buffer 1 ml, 25 μ l NP-40을 넣어 cell을 분리한다. TKM1 buffer로 세정한 후 TKM2 buffer 160 μ l, 10% SDS 10 μ l를 넣고 55°C에서 10분간 배양한다. 60 μ l의 6 M NaCl을 첨가하여 protein을 침전시킨 후 상청액에 1 ml의 100% ethanol로 DNA를 침전시킨다. 다시 70% ethanol로 DNA를 세정하여 DNA를 얻어 Tris-EDTA buffer에 보관하여 사용하였다.

* <TKM1> buffer의 조성

10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA

* <TKM2> bufer의 조성

10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA

2) PCR reaction

분리된 DNA의 GNB3 유전자형은 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 통하여 확인하였으며, 2 μ l의 10× GeneAmp PCR Buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (PE Biosystem, Norwalk, USA), 2 μ l의 25 mM MgCl₂ Solution, 1 μ l의 5 μ M each primer(sense, 5-TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC-3; antisense, 5-GCA GCA GCC CAG GGC TGG C-3 (synthesized by Genotech co, Daejun, Korea)), 1 μ l의 0.1 μ g/ μ l genomic DNA, 0.5 μ l의 10 mM dNTPs, 0.4 μ l의 2.5 U/ μ l AmpliTaq DNA polymerase (PE Biosystem, Norwalk, USA), 12.1 μ l distilled water를 모두 20 μ l가 되게 하여 다음과 같은 조건에서 PCR하였다. 95°C에서 10분간 denaturation한 후 94°C 1분, 60°C 45초, 72°C 1분의 반응을 35

cycle 실시하고 마지막으로 72°C에서 10분간 배양하였다. PCR은 Programmable Thermal Controller (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, U.S.A.)에서 시행하였다. target DNA의 충분한 증폭을 확인하기 위하여 PCR 반응액 중 5 μ 를 2% agarose gel로 전기영동하였다. 나머지 PCR 반응액은 제한효소인 0.1 U BseDI (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 3.3 mM Tris acetate, 1.0 mM magnesium acetate, 6.6 mM potassium acetate, 0.01 mg/ml BSA를 이용하여 20 μ 가 되게 혼합한 후, 60°C에서 3시간 배양하였다. 이렇게 제한효소 처리한 PCR 반응액은 Tris-acetate-EDTA(TAE) buffer 에서 3% agarose gel로 100 volt, 30분간 전기영동하고 ethidium bromide로 staining한 후 Gel-Doc system (Photodoc system, Bio-Rad co., USA)을 사용하여 유전자형을 구분하였다. BseDI는 5-C \downarrow CNNGG-3 부위를 절단하며, T allele은 268 bp에서, C allele은 116 bp와 152 bp에서 band가 관찰되므로 268 bp만 관찰되면 T/T type(homozygote), 116 bp와 152 bp만 관찰되면 C/C type(hompzygote), 268 bp, 116 bp, 152 bp가 모두 관찰되면 T/C type(heterozygote) 이다.

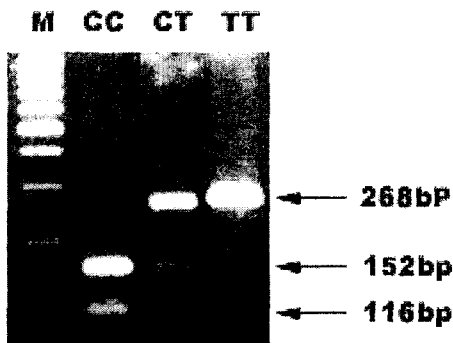


Fig. 1. Detection of GNB3 polymorphism in peripheral blood from individuals with T/T, T/C, or C/C genotype. Displayed is a representative result. M, 100 bp DNA Marker.

4. 통계처리

이 실험결과와 데이터는 연속변수의 일반적인 오차를 고려하여 빈도수와 백분율로 요약하였다. 환자군과 대조군 간의 위험인자의 비교는 chi-square test 또는 one-way ANOVA test를 사용하였다. 위험인자의 유의수준은 95%의 신뢰도로 양측검증을 하였다. 모든 데이터의 분석은 통계프로그램 SPSS for windows (ver 10.1, SPSS Inc., USA)를 사용하였으며, 유의수준은 p value < 0.05로 하였다.

결 과

1. 환자군 및 대조군의 일반적 특징

이 연구의 대상은 361명의 환자군 (n=278, 뇌경색=CI group/n=83, 뇌출혈=ICH group)과 199명의 대조군으로 구성되어 있다. 총 361명의 환자군은 남자 206명 여자 155명으로 구성되어 있고, 평균연령은 56.00 \pm 7.76세였다. 환자군 중 뇌경색군은 총 278명으로 남자 159명, 여자 118명, 평균연령은 56.57 \pm 7.12

세였다. 뇌출혈군은 총 83명이며 남자 47명, 여자 37명, 평균연령은 54.41 \pm 9.29세였다. 뇌경색군과 뇌출혈군, 대조군 사이에 나이와 성별에 있어 특이할 만한 차이점은 없었다.

Table 1. General characteristics of Cerebral Infarction (CI), Intracerebral Hemorrhage (ICH) and control group

Group	Patients			Control
	CI	ICH	Total	
N	278	83	361	199
Sex(male/female)	159/118	47/37	206/155	95/104
Mean Age	56.57 \pm 7.12	54.41 \pm 9.29	56.00 \pm 7.76	50.98 \pm 12.51

Values indicate number of mean \pm S.T.D.

2. GNB3 遺傳子形에 따른 환자의 임상적 특징

GNB3 유전자형에 따른 환자의 임상적 유형은 다음과 같이 요약하였다. 평균연령과 성별은 유전자형에 관계없이 거의 동일하였다 (Table 2). BMI와 WH ratio에서는 특이할 만한 차이점이 관찰되지 않았다 (Fig. 2, 3). 또한 흡연과 음주여부도 유전자형에 따른 차이점은 발견되지 않았다 (Fig. 4, 5). 고혈압과 당뇨병, 허혈성 심장질환의 발병률에서도 통계상 유의한 차이는 없었다 (Fig. 6, 7, 8). LDL cholesterol 농도를 제외한 total lipid levels, triglycerides levels, total cholesterol levels, HDL cholesterol levels, prothrombine times에서도 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Fig. 9, 10, 11, 12, 14). 그러나, LDL cholesterol 농도는 GNB3 유전자 T/T type이 다른 유전자형보다 통계적으로 유의하게 낮은 농도를 보였다 (Fig. 13).

Table 2. Clinical characteristics of the patients with different GNB3 genotypes

	C/C type	T/C type	T/T type	Sig.
N	68	189	104	
Sex(M/F)	39/29	102/87	65/39	N.S.
Age(years)	57.2 \pm 8.1	56.0 \pm 7.2	55.6 \pm 8.1	N.S.

Values indicate number of Mean \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of < 0.05 was considered significant N.S:Not Significant.

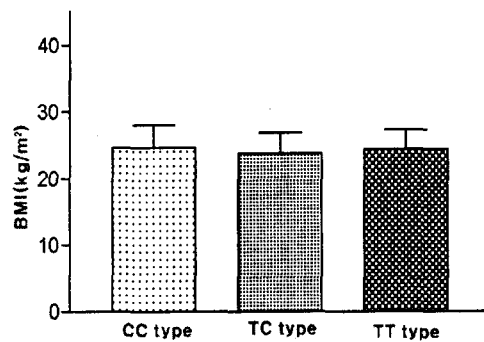


Fig. 2. Body mass index(BMI) of the patients with different GNB3 genotypes BMI was calculated from the simple equation as weight in kilograms divided by height in squared meters. Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of < 0.05 was considered significant.

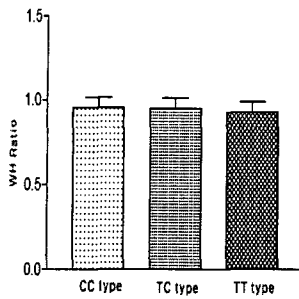


Fig. 3. The ratio of waist and hip circumference ratio (WH ratio) of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

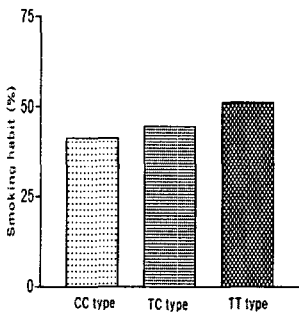


Fig. 4. Smoking habit percent of the patients with different GNB3 genotypes Smoking habit was classified as current smoker and non smoker. Vertical bars represent means. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

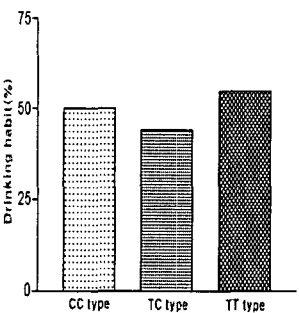


Fig. 5. Drinking habit percent of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

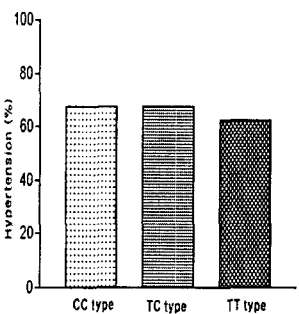


Fig. 6. Hypertension percent of the patients with different GNB3 genotypes Hypertension was defined as a systolic BP >160 mmHg or diastolic BP >100 mmHg according to WHO-ISH criteria, or the patient was receiving treatment with at least on antihypertensive drug. Vertical bars represent means. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

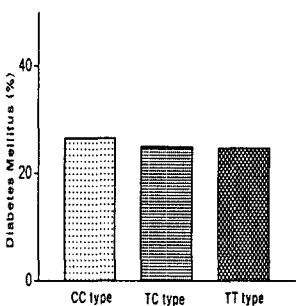


Fig. 7. Diabetes Mellitus percent of the patients with different GNB3 genotypes Diabetes mellitus was diagnosed when the glucose level was at least 140 mg/dl in a fasting state and/or at least 200 mg/dl at 2 h after a meal or 75 g oral glucose loading, according to the World Health Organization criteria. Vertical bars represent means. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

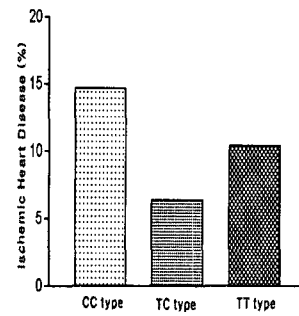


Fig. 8. Ischemic Heart Disease percent of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means. History of cardiovascular disease was defined as a self-reported history of any ischemic heart disease or written information from GPs that indicated presence of any ischemic heart disease excluding cerebrovascular disease. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

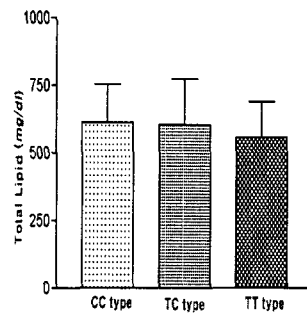


Fig. 9. Total Lipid Concentrations of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

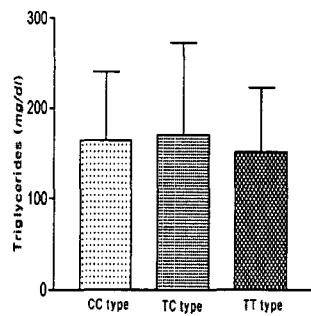


Fig. 10. Triglycerides Concentrations of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

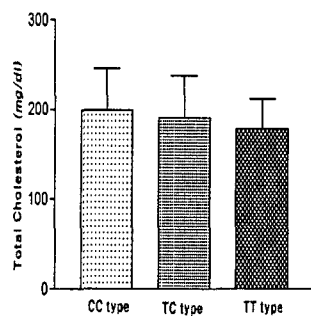


Fig. 11. Total Cholesterol Concentrations of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

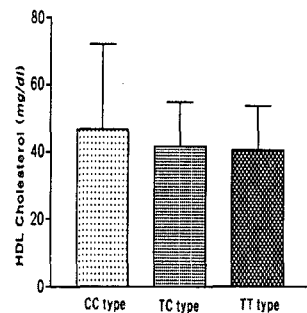


Fig. 12. HDL Cholesterol Concentrations of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means \pm S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

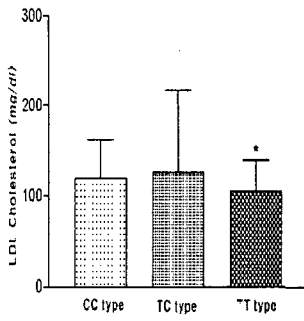


Fig. 13. LDL Cholesterol Concentrations of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means±S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant. * : p<0.05

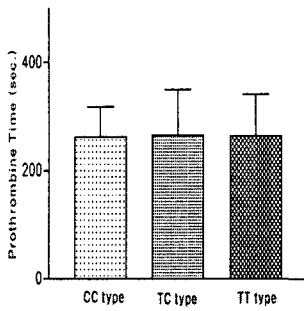


Fig. 14. Prothrombin Time of the patients with different GNB3 genotypes Vertical bars represent means±S.T.D. One-way ANOVA were performed to compare values and Post Hoc multiple comparisons test were done by Dunnett and Dunnetts T3 test. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant.

3. 患者群과 對照群의 GNB3 遺傳子形

환자군과 대조군(CI group, ICH group) 각각의 GNB3 유전자의 대립형질을 Table 3에 요약하였다. T/T type은 대조군보다 환자군에서 더 높은 수치를 나타내고 있으며 (18.6% vs. 28.7%), C/C type은 환자군보다 대조군에서 더 높게 나타나고 있다 (23.1% vs. 18.8%).

Table 3. Distribution of GNB3 genotypes and allele frequencies according to stroke subtypes.

	N	Genotypes			Alleles	
		C/C	T/C	T/T	C allele	T allele
Control	199	46(23.1%)	116(58.3%)	37(18.6%)	278(50.8%)	269(49.2%)
All strokes	362	68(18.8%)	189(52.2%)	104(28.7%)	446(48.1%)	482(51.9%)
CI	279	52(18.6%)	143(51.3%)	83(29.7%)	338(47.8%)	369(52.2%)
ICH	16	16(19.3%)	46(55.4%)	21(25.3%)	108(48.9%)	113(51.1%)

Numbers in parentheses are percentages.

GNB3 유전자의 분석결과, 뇌경색과 뇌출혈의 유병율과 GNB3 유전자형의 연관성을 Table IV에 요약하였는데, GNB3 유전자의 T/T type이 C/C type에 비해 CI group에서 유의하게 높은 수치를 보였다. Fig. 15, 16, 17에서 볼 수 있는 바와 같이 GNB3 유전자의 T/T type이 뇌경색의 유병율과 통계적으로 유의한 연관성을 가지는 것으로 나타났다 (OR, 1.98; 95% CI, 1.14-3.46; p=0.015). 하지만, 뇌출혈군에서는 T/T type의 빈도수가 높게 나타나기는 하지만, 통계적으로 유의한 연관성을 가지지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다 (OR, 1.63; 95% CI, 0.74-3.56; p= 0.219) 또한, GNB3 유전자의 T/C type은 뇌경색군 (OR, 1.09; 95% CI, 0.68-1.74; p= 0.716)과 뇌출혈군 (OR, 1.14; 95% CI, 0.59-2.21; p= 0.697) 모두에서 유의한 연관성을 관찰할 수 없었다.

Table 4. Odds Ratio (95% CI) for GNB3 genotypes and alleles according to stroke subtypes

	T/T vs C/C		T/C vs C/C	
	Odds Ratio (95% CI)	P value	Odds Ratio (95% CI)	P value
All strokes	1.94 (1.14-3.29)	0.143	1.10 (0.71-1.71)	0.665
CI	1.98 (1.14-3.46)	0.015*	1.09 (0.68-1.74)	0.716
ICH	1.63 (0.74-3.56)	0.219	1.14 (0.59-2.21)	0.697

OR and 95% CIs were estimated by logistic regression models. GNB3 C/C type was used as the reference in these analyses. * P<0.05

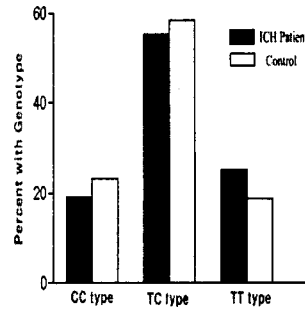


Fig. 15. Genotype frequencies in ICH patients group vs. control group ICH: intracerebral hemorrhage. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant. Frequencies of the T/T genotypes were not significantly different between ICH group and control group.

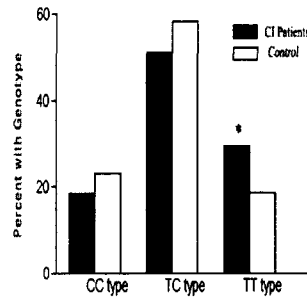


Fig. 16. Genotype frequencies in CI patients group and control group CI: Cerebral infarction. Two tailed probability value of <0.05 was considered significant. Frequencies of the T/T genotypes significantly different between CI group and control group. Odds Ratio, 1.98 ; 95% CI, 1.14-3.46; p=0.015. * P<0.05

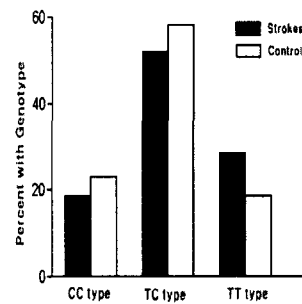


Fig. 17. Genotype Frequencies in whole stroke group and control group. Frequencies of the T/T genotypes were not significantly different between stroke group and control group.

고찰

韓醫學에서 腦血管 疾患과 유사한 疾病을 찾는다면 中風이라 할 수 있는데, 이것의 病症과 原因은 매우 다양하다. 中風의 발병원인으로는 肝風內動, 心火暴盛, 痰熱上擾, 氣滯血瘀, 精氣虛衰, 또는 外感風邪設, 主氣設, 主火設, 主濕設 등 다양하게 보고 있으나^{27,28)}, 주요 原因說로는 內風說, 火熱說, 濕痰說, 瘀血說, 虛說 등의 다섯가지로 요약되고 있다^{4,5)}. 韓醫學은 內經에서부터 출발하여 辨證을 위주로 하는 證治醫學으로 발전해 왔는데, 이것은 누구에게나 六經病症이나 五臟病症의 藥理가 확립적으로 적용된다고 보고 그 病症의 寒熱虛實의 조정에 치료의 주안점을 두었

다. 그러나, 韓醫學에서는 또한 精氣(正氣)를 강조하였는데, 이는 같은 환경이라도 그 사람이 가진 精氣의 정도에 따라 疾病에 걸릴 수 있는 가능성이 달라진다는 것을 의미하며, 이러한 기본 정신이 지금의 體質醫學으로 발전해왔다.

한편, 西醫學에서는 분자생물학적 기법이 발전함에 따라 유전학적 연구를 통해 유전자의 차이에 의한 인간의 體質과 疾病에 대한 연구가 가속화되고 있다. 인간의 DNA는 약 30억개의 염기쌍으로 이루어져 있는데, 약 1000개 중 하나 꼴로 특정위치의 염기에 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이를 SNP (single nucleotide polymorphism, 단일유전자 다양성)라 하는데 이것에 의해 같은 종 내에서 개체간의 차이가 결정된다고 보고 있다. 즉 99.9%의 DNA가 인간으로서 동일하다면 0.1%의 차이가 개개인의 외모, 체질, 성격 및 질병과 수명까지도 결정한다고 보는 것이다. 이러한 유전자간의 차이로 인간의 체질의 차이를 설명하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있는데, 특히 특정 질병에 이환율이 높은 경우의 유전자형에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 이러한 연구는 사람마다 타고난 性質이 달라서 서로 다른 疾病에 걸릴 수 있다는 韓醫學의 이론과 유전자의 차이에 의해 특정질환에 걸릴 수 있다는 西醫學의 이론을 연관지어 생각해 볼 수 있는 가능성을 열어준다.

지금까지 연구에 의하면 특정 유전자의 아형 (subtype)에 따라 특정 질환을 유발할 수 있는 확률이 현저히 높다고 알려진 것들이 있는데, 그 중에서도 GNB3 유전자와 ACE, ApoE 등의 유전자가 뇌혈관 질환의 발병과 관련이 있을 것으로 보고 있다. 이에 저자는 이 중에서 GNB3 유전자의 多形성과 腦血管 疾患과의 연관성에 대해서 알아보았는데, 본 논문과 관련된 이전의 많은 연구결과들은 GNB3 유전자의 T/T type이 뇌경색 발병의 대표적인 위험인자인 고혈압, 비만 등과 연관되어 있다는 것을 제시하고 있으며, 일반적인 병리기전으로 볼 때 고혈압과 비만에 관련된 GNB3 T allele이 뇌경색의 발병과도 연관을 가진다는 것은 놀라운 사실이 아니다²⁹⁾. GNB3 유전자는 chromosome 12p의 gene-rich cluster에 위치하며, 7.5 kb의 길이로, 일반적인 크기인 10 introns과 11 exons으로 구성되어 있으며³⁰⁾, start codon인 ATG는 exon3에 위치하며 stop codon인 TGA는 exon11에 위치한다³¹⁾. 이 유전자의 생성물인 G-protein subunit beta 3는 7 regular WD domains을 구성하는 propeller protein이다³²⁾. GNB3 유전자의 多形성(C825T)은 유전자가 G-protein의 beta3 subunit으로 발현되는 과정 중 exon10에서 나타난다. GNB3 유전자의 exon 10에서 cytosine이 thymine으로 치환되어 있으며 (T allele), exon 9의 nucleotides 498-620이 결손되어 있다 (shortened splice variant). 이러한 frame내의 탈락은 G beta subunit의 WD repeat domain에서 41 amino acids의 유실을 야기한다¹³⁾. 825T allele은 PTX-sensitive G-protein에 결합하는 수용체를 통한 신호전달과정을 증강시키며³³⁾, 또한 BMI의 증가, 인슐린 저항성, 고혈압과 관련된 수소-나트륨 교환의 활성화와 연관되어 있다³⁰⁾. G-protein은 세포 표면의 receptor의 intracellular domain에 결합하여 세포간의 신호전달과정에 관여하는데, T allele은 주로 intracellular signal transduction을 증가시킨다. 그

중에서도 주로 Gi protein을 증가시키는 것으로 보고되어 있으며²²⁾, 결과적으로는 身體의 전체 대사상태를 저하시킨다고 볼 수 있다. 신체의 대사상태가 저하되면 氣血의 循環상태가 원활하게 이루어지지 않아 機體의 氣化機能에 이상이 생겨 인체 내의 노폐물이 생길 수 있는 환경이 되기 쉬운데 이는 위에서 말한 中風의 原因說 중에 痰飲說과 연관지어 생각해 볼 수 있는 단서가 된다.

痰飲이란 機體水液代謝障礙로 형성된 病理產物로³⁴⁾, 이는 인체의 정상적인 水液인 津液이 病理的인 변화에 의해 生成된 것이다. 津液의 生成과 運行, 排泄은 모두 機體의 升降出入에 의해 이루어지며 臟腑의 氣化機能과 밀접한 관계가 있는데 이를 '氣可以化水'라고 한다³⁵⁾. 또한, 질병의 발생과 발전과정 중에 發病因子가 인체에 작용하여 병리적인 변화와 產物을 만들어내는데, 일정한 조건에서 이러한 病理的인 產物이 다시 發病因子가 되어 機體에 작용함으로써 臟腑組織機能의 失調에 여러 가지 복잡한 病理變化를 일으켜 새로운 疾病을 형성하게 된다. 이러한 것을 續發性 發病因子라 하는데 痰飲도 이에 속한다³⁴⁾. G-protein은 세포대사에 관여하여 인체의 전반적인 대사를 조절하는데, 이는 痰飲이 인체의 모든 부분에서 生成될 수 있고 病理變化를 일으킬 수 있는 것과 유사하다고 할 수 있다. 이렇게 볼 때, T allele이 있는 경우에 전체적인 新陳代謝機能이 떨어지게 되면 韓醫學에서 말하는 痰飲이 더 잘 형성될 수 있는 환경이 된다고 類推해 볼 수 있다. 痰飲의 原因에 대해서는 諸家說이 다양한데, 간략하게 보면 內經에서는 濕氣가 流通하는 時期 자체를 病因으로 보았고 巢元方은 氣血의 運行障礙에 의해 飲水停滯이 不消散하여 發病한다고 하였으며, 張機는 脾虛로 食水漿이 轉化하지 못하여 痰病이 나타난다고 했으며, 朱丹溪는 內傷, 外感, 七情 모두가 痰을 生成하는 원인이 된다고 하였다. 이러한 것들을 종합해서 볼 때 痰飲은 內傷, 外感, 七情所傷, 虛勞 등 모두가 原因이 될 수 있는데, 氣血, 津液, 水飲 등의 生理的 水液이 어떠한 원인으로 인해 循環障礙를 일으켜서 壅聚, 閉塞되어 病理的 水液으로 나타난 것이며, 또한 이것이 二次產物이 되어 질병을 유발시키는 것이라 볼 수 있다³⁶⁾. 中風의 痰症의 症狀으로는 肥大한 舌體, 膩한 舌苔, 柔滑한 脈, 둔하고 무거운 頭部상태, 眩暈, 消化不良, 惡心嘔吐, 안색이 뜬 것 같고, 소변이 원활하지 못하고, 피곤하고 누워만 있고 싶으며, 가래나 침이 많은 특징이 있다³⁷⁾. 한편, 許浚은 東醫寶鑑에서 '所謂 肥人多中風者, 肥則腠理緻密而多鬱滯 氣血 難以通利 故多卒中'이라 하여 비만과 中風의 관계에 대해 언급하고 있는데³⁸⁾, 이것을 체질적 요인으로 보고 있다. 이것은 GNB3 유전자의 825T allele이 비만과 밀접한 관계를 가진다는 이전의 연구결과와 관련해 볼 때, 의미있는 부분이라 할 수 있다.

이 실험에서 우리는 GNB3 유전자형에 따른 LDL cholesterol 농도를 제외한 BMI, WH ratio, 고혈압, 허혈성 심장 질환, total lipid level, triglycerides level, total cholesterol level, HDL cholesterol level, prothrombine time에서는 유의한 차이를 발견하지 못했다. 그러나, 실험결과 뇌경색 발병의 위험률과 LDL cholesterol 농도가 반비례의 관계인 것으로 나타났는데, T/T type에서 Total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides 농도는 다른 유전자형에 비해 유의한 차이가 없었던 반면, LDL

cholesterol의 농도는 다른 유전자형보다도 유의하게 낮은 수치를 보였다. 이런 결과가 나오게 된 이유는 명확하지는 않지만, 환자군의 cholesterol 농도가 정상범위 안에 있으며 일반적으로 낮은 수치였기 때문이 아닐까 생각해 볼 수 있다. 이전의 일관된 연구에 의하면, 허혈성 발작과 cholesterol과의 관계는 J shape을 보였으며³⁹⁾, 뇌졸중의 위험률은 cholesterol 수치가 8.1 mM/L (top 5%) 이상인 사람에게서만 증가된 것으로 보고되었다^{40,41)}. 게다가, cholesterol의 방어효과에 대해서도 여러 연구결과에 의해 발표되었다^{42,43,44)}. 그러므로, LDL cholesterol의 농도와 뇌졸중 발병률과의 일반적인 상식과 반대된 결과라 하더라도 큰 의미가 없다고 할 수 있겠다.

본 논문에서는 GNB3 유전자의 다형성이 뇌혈관 질환과 어떠한 상관성을 가지는가를 조사하였으며, GNB3 유전자의 T/T type은 뇌경색의 발병과 밀접한 연관성을 지닌다는 사실을 알 수 있었다. 하지만, 이미 확인된 뇌졸중의 위험인자인 고혈압, 비만, lipid 농도, cholesterol 농도, 음주, 흡연 등과의 연관성은 나타나지 않았는데, 이 사실은 이 실험의 결과를 설명할 수 있는 기전과 관계되는 다른 인자가 있을 수 있다는 것을 의미한다. 또한 T allele을 가진 환자가 痰飲의 症狀을 더 많이 가지고 있는가에 대해서는 실험적인 연구가 더 필요하다고 생각된다. 앞으로 뇌경색, 뇌출혈에서 GNB3 T allele의 역할과, 이에 대한 病態生理學的 기전에 대한 연구가 계속되어야 할 것이다.

결 론

비만 및 고혈압의 위험인자로 알려진 GNB3 유전자와 뇌혈관질환의 관계를 알아보기 위해 경희의료원에 입원한 뇌졸중 환자와 건강한 성인을 대상으로 일반적인 뇌혈관 질환의 위험인자와 GNB3 유전자형을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험에서 설정한 일반적인 뇌혈관질환의 위험인자들과 LDL cholesterol 농도를 제외한 생화학적 지표들(Total lipid levels, Triglycerides levels, Total cholesterol levels, HDL cholesterol levels, prothrombine time)은 GNB3 유전자형에 의한 통계상 유의한 차이가 없었다. LDL cholesterol 농도가 GNB3 유전자의 T/T type에서 유의하게 낮은 수치를 보였으나, 그 수치가 정상범위 안에 있으며 일반적으로 낮은 수치였으므로 큰 의미는 없었다. 환자군이 대조군보다 GNB3 유전자의 T/T type에서 높은 수치를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 환자군 중 뇌경색군은 대조군에 비해 GNB3 유전자의 T/T type이 통계적으로 유의하게 높은 수치가 관찰되었다.

이상과 같은 결과로 볼 때 한국인에 있어 GNB3 유전자의 T allele은 뇌혈관 질환 중 특히 뇌경색과 밀접한 연관성을 가진다는 것을 알 수 있으며, 앞으로 그 기전에 관한 후속연구가 이루어져야 하겠다.

감사의 글

이 연구는 2000년도 경희대학교 연구비 지원에 의한 결과임.

참고문헌

1. 김영석, 臨床中風學, p.303-8, 317-29, 서원당, 서울, 1997.
2. Stegmayr, B., Asplund, K., Kuulasmaa, K., Rajakangas, A. M., Thorvaldsen, P. and Tuomilehto, J. Stroke incidence and mortality correlated to stroke risk factors in the WHO MONICA Project. An ecological study of 18 populations. Stroke 28(7):1367-74, 1997.
3. Korea National Statistical Office, Cases & deaths of communicable diseases, 2000.
4. 장인규. 中風의 病因論에 관한 文獻的 高찰. 경희한의대논문집 2(1):61-5, 1981.
5. 이화준, 조기호, 배형섭, 김영석, 이경섭. 중풍증후의 동서의학적 비교고찰. 대한한방내과학회지 14(1):107-28, 1993.
6. Gorelick, P. B. Stroke prevention: windows of opportunity and failed expectations? A discussion of modifiable cardiovascular risk factors and a prevention proposal. Neuroepidemiology 16(4):163-73, 1997.
7. Straandgaard, S. Hypertention and Stroke. J Hypertens. 14(3):23-7, 1996.
8. Sacco, R. L., Gan, R., Boden-Albala, B., Lin, I. F., Kargman, D. E., Hauser, W. A., Shea, S. and Paik, M. C. Leisure-time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. Stroke 29(2):380-7, 1998.
9. Feigin, V. L., Wiebers, D. O., Nikitin, Y. P., O'Fallon, W. M. and Whisnant, J. P. Risk factors for ischemic stroke in a Russian community: a population-based case-control study. Stroke 29(1):34-9, 1998.
10. Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C. and Heath, C. W. Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. N Engl J Med. 341(15):1097-105, 1999.
11. Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O. and Hennekens, C. H. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, part 2: effects of short term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. Lancet 335(8693):827-38, 1990.
12. Bronner, L. L., Kanter, D. S. and Manson, J. E. Primary prevention of stroke. N Engl J Med. 333(21):1392-400, 1995.
13. Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A., Ritz, E., Wichmann, H., Jakobs, K., Horsthemke, B. Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension. Nat Genet. 18(1):45-8, 1998.
14. Beige, J., Hohenbleicher, H., Distler, A. and Sharma, A. M. G-Protein $\beta 3$ subunit C825T variant and ambulatory blood

- pressure in essential hypertension. *Hypertension* 33(4): 1049-51, 1999.
15. Schunkert, H., Hense, H. W., Doring, A., Riegger, G. A. and Siffert, W. Association between a polymorphism in the G-protein $\beta 3$ subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 32(3):510-3, 1998.
 16. Siffert, W., Forster, P., Jockel, K. H., Mvere, D. A., Brinkmann, B., Naber, C., Crookes, R., Du P Heyns, A., Epplen, J. T., Fridey, J., Freedman, B. I., Muller, N., Stolke, D., Sharma, A. M., al Moutaery, K., Grosse-Wilde, H., Buerbaum, B., Ehrlich, T., Ahmad, H. R., Horsthemke, B., du Toit, E. D., Tilikainen, A., Ge, J., Wang, Y., Yang, D., Husing, D., Roskopf, D. Worldwide ethnic distribution of the G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasians, Chinese, and black African individuals. *J Am Soc Nephrol.* 10(9):1921-30, 1999.
 17. Siffert, W., Naber, C., Walla, M., Ritz, E. G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele and its potential association with obesity in hypertensive individuals. *J Hypertens.* 17(8): 1095-8, 1999.
 18. Hegele, R.A., Anderson, C., Young, T.K., Connelly, P.W. G-protein $\beta 3$ subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Res.* 9(10):972-7, 1999.
 19. Markus, H. S., Barley, J., Lunt, R., Bland, J. M., Jeffery, S., Carter, N. D. and Brown, M. M. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism. A new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. *Stroke* 26(8):1329-33, 1995.
 20. Ueda, S., Weir, C. J., Inglis, G. C., Murray, G. D., Muir, K. W. and Lees, K. R. Lack of association between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and stroke. *J Hypertens.* 13(12Pt2):1597-601, 1995.
 21. Chowdhury, A. H., Yokoyama, T., Kokubo, Y., Zaman, M. M., Haque, A. and Tanaka, H. Apolipoprotein E genetic polymorphism and stroke subtypes in a Bangladeshi hospital-based study. *J Epidemiol.* 11(3):131-8, 2001.
 22. Siffert, W., Roskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Nartung, K., Beckmann, S. and Jakobs, K. H. Enhanced G-protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest.* 96(2):759-66, 1995.
 23. Siffert, W. G-protein $\beta 3$ subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15(9):1298-306, 2000.
 24. Chalmers, J., MacMahon, S., Mancia, G., Whitworth, J., Beilin, L., Hansson, L., Neal, B., Rodgers, A., Ni Mhurchu, C. and Clark, T. World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization. *Clin Exp Hypertens* 21(5-6):1009-60, 1999.
 25. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 727:1-113, 1985.
 26. Lahiri, D. K., Nurnberger, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19(19):5444, 1991.
 27. 전국한의과대학 심계내과학교실, 東醫心係內科學(下), pp.244-246, 서원당, 서울, 1995.
 28. 최은정, 정승현, 신길조, 이원철. 唐, 千金方에 기재된 中風에 관한 考察. 대한한의학회지 17(2):117-32, 1997.
 29. Tanaka, H., Ueda, Y., Hayashi, M., Date, C., Baba, T., Yamashita, H., Shoji, H., Tanaka, Y., Owada, K. and Detels, R. Risk factors for cerebral hemorrhage and cerebral infarction in a Japanese rural community. *Stroke* 13(1):62-73, 1982.
 30. Ansari-Lari, M. A., Muzny, D. M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C. E., Spanos, S., Malley, T., Gibbs, R. A. A gene-rich cluster between CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res.* 6(4):314-26, 1996.
 31. Turner, S. T., Schwartz, G. L., Chapman, A. B. and Boerwinkle, E. C825T polymorphism of the G-protein $\beta 3$ subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 37(2 Part 2):739-43, 2001.
 32. Roskopf, D., Busch, S., Manthey, I. and Siffert, W. G-protein $\beta 3$ gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension* 36(1):33-41, 2000.
 33. Virchow, S., Ansorge, N., Rubben, H., Siffert, G. and Siffert, W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G-protein $\beta 3$ subunit 825 T-allele. *FEBS Lett.* 436(2):155-8, 1998.
 34. 安圭錫, 崔昇勳, 文禧典, 東醫病理學, pp.70-4, 고문사, 서울, 1990.
 35. 金完熙, 申玟圭 外, 東醫生理學, p.103-7, 大韓東醫生理學會, 서울, 1993.
 36. 洪天杓 외, 痰飲에 대한 文獻의 考察, 대한한방내과학회지 9(1):41-2, 1988.
 37. 노진환, 中風辨證診斷基準按에 대한 臨床的 연구, 경희대학교 박사학위 논문, 2001.
 38. 권도익, 뇌졸중 위험인자로서의 비만에 관한 임상적 연구, 경희대학교 박사학위논문, 2000.
 39. Hart, C. L., Hole, D. J. and Smith, G. D. The relation between cholesterol and haemorrhagic or ischaemic stroke in the Renfrew/Paisley study. *J Epidemiol Community Health* 54(11):874-5, 2000.
 40. Wannamethee, S. G., Shaper, A. G. and Ebrahim, S. HDL-Cholesterol, total cholesterol, and the risk of stroke in middle-aged British men. *Stroke* 31(8):1882-8, 2000.

41. Lindstrom, E., Boysen, G. and Nyboe, J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City heart Study. *BMJ*. 309(6946):11-5, 1994.
42. Vatassery, G. T., Smith, W. E., Quach, H. T. and Lai, C. K. In vitro oxidation of vitamin E, vitamin C, thiols, and cholesterol in rat brain mitochondria incubated with free radicals. *Neurochem Int*. 26(5):527-35, 1995.
43. Joseph, J. A., Villalobos-Molinas, R., Denisova, N. A., Erat, S. and Strain, J. Cholesterol: a two-edged sword in brain aging. *Free Radic Biol Med*. 22(3):455-62, 1997.
44. Lars Bastiaanse, E. M., Van der Valk-Kokshoorn, L. J. M., Egas-Kenniphaas, J. M., Atsama, D. E. and Van der Laarse, A. The effect of sarcolemmal cholesterol content on the tolerance to anoxia in cardiomyocyte cultures. *J Mol Cell Cardiol*. 26(5):639-48, 1994.