

Association of Clusterin Polymorphisms with Coronary Heart Disease in Koreans

Jun-Young Kim¹, Su-Won Kim², In-Kyu Lee³ and Min Yoo^{1,*}

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea.

²Medical Education Program For Human Resources, Kyungpook National University, Taegu 700-422, Korea.

³Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu 700-721, Korea

Clusterin is an 80 kDa heterodimeric glycosylated protein and it plays diverse biological roles in various tissues and organs. Clusterin is reported to be associated with the pathogenesis of coronary artery disease and atherosclerosis. Therefore, we investigated the genotype for the A/G polymorphism at the position 4,183 of clusterin gene in Koreans and compared genotype of patients with control group. 100 patients (Male 63, Female 37), who previously underwent coronary artery stent due to ischemic heart disease and 100 controls (Male 36, Female 64) participated in this study. There was a significant association between 4,183 A/G polymorphism in clusterin gene and coronary artery disease (CAD). The present study shows that clusterin gene A/G polymorphism may be associated with the pathogenesis of CAD. Further studies with larger population may be needed for the development of diagnostic methods at genetic level such as DNA chip.

Key Words: Clusterin gene, Polymorphism, Type 2 Diabetes, Korean

관상동맥질환은 산업화된 사회에서 서구인들뿐만 아니라 한국인에게서도 높은 사망률의 원인이며, 식습관과 같은 환경적인 요인뿐만 아니라 유전적 요인들이 관여하는 대표적인 질병으로 동맥경화증이 주원인이다 (Libby et al., 2005). 최근 관상동맥질환이 증가함에 따라 동맥경화증 원인 인자의 종재와 조기 진단에 대한 관심이 증가하면서 관련 유전자들에 대한 연구도 활발해지고 있다 (Wilson et al., 1994; Ouchi et al., 1999; Kersten et al., 2000; Hotta et al., 2000; Peng et al., 2003).

Clusterin 단백질은 Apolipoprotein J로도 불리는데, 사람뿐만 아니라 동물의 여러 기관 및 조직에서 발현되며, 미세 환경에 따라 조직 내에서도 다르게 발현되는 특징을 가지는 다기능 단백질로 잘 알려져 있다 (Jenne, 1992; Hsieh et al., 2005). 사람에게서는 8번 염색체 p21-p12 부분에 존재하는 단독 유전자로부터 clusterin 단백질이 생성되며, 449개의 아미노산 잔기로 구성된 80 kDa의 분자량을 가진다 (DeSilva et al., 1990; Jenne, 1992; Purrello et al.,

1991; Slawin et al., 1990; Yang et al., 2000). 지금까지의 연구 결과를 보면, clusterin은 체장의 형성과정 뿐만 아니라 재생과정에도 관여를 하는 것으로 알려져 있으며 (Calvo et al., 1997; Park et al., 1992; Scaglia et al., 1995), 인슐린 분비 베타세포 (β -cell)로 분화를 유도하는 것으로 보고되어 있다 (French et al., 1993; Schedin et al., 2000; Suh et al., 2001). 또한 최근 결과에 의하면 clusterin은 atherogenesis에 영향을 미치며 (Ishikawa et al., 1998), 혈관질환에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다 (Miyata et al., 2001; Moulson et al., 1999; Sivamurthy et al., 2001). 본 연구는 한국인에게서 clusterin 유전자 다형성의 발현 (polymorphism) 과 관상동맥질환 여부와의 연관성을 조사한 것이다.

본 연구는 대조군 100명, 관상동맥질환 환자군 100명을 대상으로 하였고, 성비는 전체적으로 남자 99명, 여자 101명이었다. 평균 연령은 관상동맥질환 환자군 63.3세, 대조군 63.8세였다. 대조군은 60세 이상, 공복혈당 110 mg/dL 이하, 당화혈색소 5.8% 이하인 100명으로 고혈압, 심근경색, 협심증, 고지혈증, 뇌졸중, 갑상선, 결핵, 간질환, 천식, 관절염, 우울증, 파킨슨병, 골다공증, 전립선 비대증, 암 등의 질병이 없는 사람으로 정하였으며, 남자 36명, 여자 64명이었다. 관상동맥질환 환자군은 2006년 4월부터 2006년 8월까지 경북대학교 병원과 계명대학교

* 논문 접수: 2008년 3월 3일

수정 접수: 2008년 3월 15일

† 교신저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000, 계명대학교 자연과학대학 생물학과

Tel: +82-53-580-5537, Fax: +82-53-580-5537

e-mail: ymin@kmu.ac.kr

동산의료원 내분비내과를 내원하였던 환자 100명으로 관상동맥질환의 과거 병력이 있거나 내원 후 관상동맥질환 진단을 받은 환자를 대상 환자군으로 정하였으며 남자 63명, 여자 37명이었다. 대상자에게 시행된 모든 검사들은 임상시험 심사위원회 (Institutional Review Board, IRB)의 기준에 맞게 환자들의 자발적인 서면 동의하에 이루어졌다.

사회 인구학적 특성, 현재의 병력, 과거력, 흡연력, 음주력은 설문지를 이용하여 자기기입식 방법으로 작성되었다. 조사에 사용된 설문지는 한국인 만성병 역학조사 및 유전체 연구사업의 설문지를 참고하였다. 대상자는 검사 전날 밤부터 최소한 10시간 이상 금식한 공복 상태에서 가벼운 의복을 착용하게 하였고, 자동신장체중계를 이용하여 신장과 체중을 동시에 측정하였다. 체질량지수 (body mass index, BMI = kg/m²)는 측정된 기본 신체 체중 기로부터 산출하였다. 혈액 검사는 전날 밤부터 최소한 10시간 이상 금식한 공복 상태에서 채혈한 후, 공복 혈장 포도당, 당화혈색소, 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방을 측정하였다. 공복혈당은 Modular Analytics SWA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였고, 당화혈색소, 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방은 Histachi Modular D2400 기계 (Roche, Tokyo, Japan)를 이용, 측정하였다.

채혈된 혈액의 일부는 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 처리된 시험관에 넣어 냉장 보관하였다가 실험실로 운반하여 DNA를 분리하였다. DNA 분리는 "Genomic DNA isolation kit (Gentra)"를 이용하였다. 혈액 2 ml에 6 ml의 RBC lysis solution을 넣은 후 5분간 잘 흔들어 주었고, 5분간 4°C에서 3,500 rpm의 속도로 원심분리한 후, 상등액과 분리하였다. Vortex mixer로 세포 덩어리를 잘 풀어준 후 2 ml의 Cell lysis solution을 넣고 10초간 vortex mixer로 다시 잘 섞어준 후 실온에서 10분 이상 방치하였다. 0.7 ml의 protein precipitation 용액을 넣고 충분히 vortex한 후 10분간 4°C에서 3,500 rpm으로 원심분리하여 단백질을 포함한 모든 불순물을 가라앉혔다. 상등액을 조심스럽게 2 ml의 100% isopropyl alcohol에 옮겨 DNA가 보일 때까지 섞었다. 5분 동안 2,500 rpm으로 원심분리한 후 상등액은 버리고, 가라앉은 부분을 70% ethanol로 탈수시켰다. 150 µl DNA 수용액을 넣어 65°C에서 2~3시간 방치한 후 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 유전자 분석을 위해서 Applied Biosystems 7300 Real Time PCR

Table 1. Clinical data of patients and controls

Variables	Controls (n=100)	Cases (n=100)	P
Age (year)	63.83±2.79	63.34±10.69	0.658
BMI ^a (kg/m ²)	23.51±2.89	23.78±4.75	0.633
Sex			
Male	36	63	
Female	64	37	
Total cholesterol (mmol/l)	192.21±32.88	179.48±39.75	0.014
HDL-cholesterol ^b (mmol/l)	46.76±11.37	42.80±8.57	0.006
LDL-cholesterol ^c (mmol/l)	123.52±29.27	117.31±36.13	0.184
Triglyceride (mmol/l)	109.66±48.07	137.78±64.95	0.001
Diabetes (%)	1.5	35.4	0.000
Hypertension (%)	22	48	0.043
FBS (mmol/l)	89.09±5.89	125.08±50.36	<0.001
Smoking (%)	20	54.5	0.000
HbA1C	5.31±0.31	6.78±1.70	<0.001
hsCRP ^d	1.55±3.13	0.75±1.72	0.027

Data are shown as means ± the standard deviation.

^aBody mass index.

^bHigh density lipoprotein cholesterol.

^cLow density lipoprotein cholesterol.

^dHigh-sensitivity C-reactive protein.

(Applied Biosystems)을 사용하였다. PCR을 위한 primer의 염기서열은 sense primer 5'-ATGTGTCCCCTTTTCACCTGG-3', antisense primer 5'-CCTGAAACAGACCTGCATGAAG-3'였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation 반응을 95°C에서 10분, denaturation 반응을 95°C에서 30초, annealing 반응을 58°C에서 30초, extension 반응을 72°C에서 30초로 설정하여 35 cycle 반복해 DNA를 증폭시킨 후 마지막으로 extension 반응을 72°C에서 10분간 유지하였다.

관상동맥질환 환자군과 대조군 사이의 대립형질 (allele)의 빈도와 유전자형 (genotype) 빈도의 차이에 대한 통계 분석은 SPSS version 15.0 프로그램을 사용하였다. 변수는 평균 ± 표준편차로 나타내었고 각각의 단일 염기 다형성이 Hardy-Weinberg 평형을 따르는지 알아보았다. 로지스틱 회귀분석을 이용하여 Odds Ratio (OR)과 신뢰구간 (95% Confidence Interval: CI)을 구하였고, 연령, 성별, 허리둘레 등의 교란변수들을 보정하였다. 통계적 유의수준은 P<0.005로 하였다.

본 연구에 참여한 관상동맥질환이 없는 대조군 100명과 관상동맥질환 환자군 100명의 임상적 특징은 (Table 1)에 나타내었다. 대조군과 관상동맥질환 환자군 대상자의

Table 2. Genotype frequencies of clusterin gene in position 4183

Genotype	Control (n=100)	Case (n=100)	P
GG	97	72	0.000
GA	1	17	
AA	2	11	

평균연령은 각각 63.8과 63.3세로 대조군에서 유의하게 높게 나타났으며 남녀 비는 대조군에서 여성이, 관상동맥질환 환자군에서는 남성이 유의하게 많았다. 흡연 상태는 관상동맥질환 환자군이 대조군에 비해 유의하게 많았다. BMI, 중성지방은 관상동맥질환 환자군에서 의미 있게 높았으나, 고밀도 콜레스테롤은 대조군에서 의미 있게 높았다. 저밀도 콜레스테롤의 경우에는 대조군과 관상동맥질환 환자군 사이에 의미 있는 차이는 없었다.

전체 대상군에서 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium을 따르는 것으로 확인되었다. Clusterin 4608 A>G의 유전자형 (genotype)은 대조군 100명에서 GG 동형접합체 97%, GA 이형접합체 1%, AA 동형접합체 2%였으며, 관상동맥질환 환자군 100명에서 GG 동형접합체 72%, GA 이형접합체 17%, AA 동형접합체 11%였다. 대조군과 관상동맥질환 환자군 사이에서 각각의 유전자형의 분포는 유의한 차이를 보였다 ($P<0.000$) (Table 2). 성별을 보정한 상태에서 clusterin 4608 A>G의 유전자형 (genotype)은 남자의 경우, 대조군 36명에서 GG 동형접합체 94.4%, AA 동형접합체 5.6%, GA 이형접합체는 한 명도 없었으며, 관상동맥질환 환자군 63명에서 GG 동형접합체 69.8%, GA 이형접합체 17.5%, AA 동형접합체 12.7%였으나, 여자의 경우는 대조군 64명에서 GG 동형접합체 98.4%, GA 이형접합체 1.6%였다. AA 동형접합체는 한 명도 없었으며, 관상동맥질환 환자군 37명에서 GG 동형접합체 75.7%, GA 이형접합체 16.2%, AA 동형접합체가 8.1%였다. 남녀 간의 대조군과 관상동맥질환 환자군 사이에서는 남자군 ($P=0.010$)에 비해 여자군 ($P=0.001$)에서 좀 더 의미 있는 차이를 보였다 (Table 3). 대조군과 관상동맥질환 환자군 각각에서 유전자형에 따른 혈압, 총 콜레스테롤, 중성지방, 체질량지수, 허리둘레, 허리엉덩이 둘레비 등의 유의한 차이는 없었다.

Apolipoprotein J 등으로도 불리는 clusterin은 혈관질환에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며 (Miyata et al., 2001; Sivamurthy et al., 2001), atherogenesis에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Ishikawa et al., 1998). 최근 연구결과에 따르면, clusterin 유전자 다형성 중 10580

Table 3. Comparison of males and females for polymorphism

Genotype	Male			Female		
	Control (n=36)	Case (n=63)	P	Control (n=64)	Case (n=37)	P
GG	34	44	0.010	63	28	0.001
GA	0	11		1	6	
AA	2	8		0	3	

C>A, 10613 A>G가 아프리카인에게서 HDL-C의 serum level에 영향을 미치며, 이들 변이가 African-American에게서 Caucasian보다는 드물게 나타나지만, Hispanic에게서는 빈번하게 일어나는 것으로 보고되어 있다 (Nestlerode et al., 1999) 또 다른 연구에서는 11개의 유전자 다형성을 조사한 결과 -4453 G>T, 4183 A>G, 5608 C>T는 상관관계가 없는 것으로 나타났으나, 6316 delT 유전자 다형성은 상관관계가 있는 것으로 보고되었다 (Miwa et al., 2005). 본 연구에서는 관상동맥질환 환자군과 대조군을 각각 100명으로 하여 한국인에서 clusterin 유전자 다형성을 조사하였고, 특히 4183 G>A에서 유의한 차이를 보였다. 이는 이전의 연구결과 (Miwa et al., 2005)와는 다소 차이가 있는데, Miwa 등의 결과에 따르면 일본인에게서는 6316 delT가 4183 A>G 다형성보다 동맥경화와 상관관계가 크다고 보고되었으나, 본 연구결과를 분석해 보면 -4453 G>T, 5608 C>T는 상관관계가 없었으며, 4183 A>G 다형성만 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 이러한 차이를 보이는 원인은 정확하게 지적할 수는 없으나, 인종에 따라 서로 다른 유전적 그리고 환경적인 요인의 차이에 의해 다형성이 미치는 영향력에 차이가 있을 것으로 생각된다. 그러나 이 연구결과에 임상적인 의의를 확인하기 위하여는 향후 대상 환자 수와 대조군을 더욱 늘리고 다양한 clusterin 유전자 다형성을 후보로 하여 추가적인 연구를 할 필요가 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신 인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

REFERENCES

- Calvo EL, Bernatchez G, Pelletier G, Iovanna JL, Morisset J. Down regulation of IGF-I mRNA expression during postnatal pancreatic development and overexpression after subtotal pancreatectomy and acute pancreatitis in the rat pancreas. J

- Mol Endocrinol. 1997. 18: 233-242.
- French LE, Chonn A, Ducrest D, Baumann B, Belin D, Wohlwend A, Kiss JZ, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. *J Cell Biol.* 1993. 122: 1119-1123.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura Y, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000. 20: 1595-1599.
- Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Komiyama K, Masuda S, Asuwa N, Choi-Miura NH, Tomita M. Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998. 18: 665-672.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000. 405: 421-442.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005. 111: 3481-3488.
- Miwa Y, Takiuchi S, Kamide K, Yoshii M, Horio T, Tanaka C, Banno M, Miyata T, Sasaguri T, Kawano Y. Insertion/deletion polymorphism in clusterin gene influences serum lipid levels and carotid intima-media thickness in hypertensive Japanese females. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 331: 1587-1593.
- Miyata M, Biro S, Kaieda H, Eto H, Orihara K, Kihara T, Obata H, Matsushita N, Matsuyama T, Tei C, Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation* 2001. 104: 1407-1412.
- Moulson CL, Millis AJ. Clusterin (Apo J) regulates vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 1999. 180: 355-364.
- Nestlerode CS, Bunker CH, Sanghera DK, Aston CE, Ukoli FA, Kamboh MI. Apolipoprotein J polymorphisms and serum HDL cholesterol levels in African blacks. *Hum. Biol.* 1999. 71: 197-218.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999. 100: 2473-2476.
- Park IS, Bendayan M. Characterization of the endocrine cells in the pancreatic-bile duct system of the rat. *Anat Rec.* 1992. 232: 247-256.
- Peng DQ, Zhao SP, Nie S, Li J. Gene-Gene interaction of PPAR α and ApoE affects coronary heart disease risk. *Int J Cardiol.* 2003. 92: 257-263.
- Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, Grzeschik KH, Ingletti C, Corti A, Sichel G. The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. *Genomics* 1991. 10: 151-156.
- Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 1995. 136: 5461-5468.
- Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M. Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000. 5: 211-225.
- Sivamurthy N, Stone DH, Logerfo FW, Quist WC. Apolipoprotein J inhibits the migration, adhesion, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 2001. 34: 716-723.
- Slawin K, Sawczuk IS, Olsson CA. Chromosomal assignment of the human homologue encoding SGP-2 Buttyan R. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990. 15: 160-164.
- Suh E, Wang Z, Swain GP, Tenniswood M, Traber PG. Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001. 280: 149-156.
- Tobe T, Minoshima S, Yamase S, Choi NH, Tomita M, Shimizu N. Assignment of a human serum glycoprotein SP-40,40 gene (CLI) to chromosome 8. *Cytogenet Cell Genet.* 1991. 57: 193-195.
- Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999. 354: 141-148.
- Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA.* 1994. 272: 1666-1671.
- Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 1994. 221: 917-925.