

한국인에서의 hepatocyte nuclear factor-4 α 의 유전자 다형성과 제2형 당뇨병과의 연관성

김수원 · 유민*

계명대학교 자연과학대학 생물학과

Received November 28, 2008 / Accepted February 28, 2009

Association of Hepatocyte Nuclear Factor-4 α Polymorphisms with Type 2 Diabetes in Koreans. Su Won Kim and Min Yoo*. *Department of Biology, College of Natural Sciences, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea* - Type 2 diabetes is a typical polygenic disease complex, for which several common risk alleles have been identified. The hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α), a transcription factor involved in the regulation of serum lipid and glucose levels, has recently been associated with type 2 diabetes. Therefore, we investigated the genotype for the C>T polymorphism at position 12352 of the HNF-4 α gene in Koreans and compared patient genotypes with those of the control group. 100 patients (63 males, 37 females) with a history of type 2 diabetes (T2DM) and 100 controls (36 males, 64 females) participated in this study. There was no association between 12352 C>T polymorphism in the HNF-4 α gene and T2DM. The present study shows that HNF-4 α 12352 C>T polymorphism may not be associated with the pathogenesis of T2DM. Further studies with larger populations may be needed for the development of diagnostic methods at a genetic level such as DNA chip.

Key words : HNF-4 α gene, polymorphism, type 2 diabetes, Korean

서 론

제2형 당뇨병은 인슐린저항성과 췌장 베타세포의 기능 이상 및 이로 인한 혈당상승을 특징으로 하는 대사성질환이며 질환의 발생은 복합적인 유전적 경향을 보인다. 최근 수년간 새로운 분자생물학적 연구기법의 발달과 함께 제2형 당뇨병의 발현과 관련된 원인유전자를 발견하기 위한 많은 연구결과가 발표되었으며 이 분야에 관심이 고조되고 있다. 그 중에서도 당뇨병의 한 형태인 maturity-onset diabetes of the young (MODY)는 단일 유전자 결함에 의해 발생하는 것으로 알려져 있는데, 젊은 나이에 발생하여(주로 25세 미만), 췌장 베타세포의 기능 장애로 인해 인슐린 분비의 장애를 보인다. 현재까지 MODY를 일으키는 6 종류의 유전자 아형이 밝혀져 있는데, MODY2는 혈당에 따른 인슐린 분비를 조절하는 당 분해과정에 관여하는 glucokinase (GCK) 유전자 변이에 의하며, 나머지 다섯 종류는 베타세포 유전자의 발현을 조절하는 전사인자(transcription factor)의 변이에 의한다.

MODY1은 20번 염색체에 위치한 hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α 유전자 변이에 의하고, 12번 염색체에 위치한 HNF-1 α 유전자 변이에 의한 MODY3, 13번 염색체의 insulin promoter factor 1 (IPF-1) 유전자 변이에 의한 MODY4, HNF-1 β 유전자 변이에 의한 MODY5, 그리고 2번 염색체에 위치한 NeuroD 유전자 변이에 의한 MODY6가 알려져 있다. MODY1 당뇨병의 원인 유전자로 알려진 HNF-4 α 는 췌장의

베타세포, 간세포, 신장세포 등에 존재하는 전사인자로서 포도당의 이동과 대사에 작용하는 여러 단백질 발현을 조절하고, 췌장 베타세포의 발생과 분화를 조절함으로써 인슐린 분비를 조절하며, HNF-1 α 의 발현에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 HNF-4 α 유전자 변이가 있는 경우 포도당의 이동과 분비에 관여하는 유전자 발현이 정상적으로 이루어지지 않는다는 연구결과로 미루어 HNF-4 α 유전자가 인슐린 분비에 관여하고 있음을 짐작할 수 있다. 본 연구는 한국인에게서 HNF4 α 유전자 다형성(polymorphism)의 발현과 제2형 당뇨병 여부와의 연관성을 조사한 것이다.

재료 및 방법

대상

본 연구는 대조군 100명, 제2형 당뇨병 환자군 100명을 대상으로 하였고, 성비는 전체적으로 남자 99명, 여자 101명이였다. 평균 연령은 제2형 당뇨병 환자군 62.8세, 대조군 63.2세였다. 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 64명이였다. 제2형 당뇨병 환자군은 2006년 4월부터 2006년 8월까지 경북대학교 병원과 계명대학교 동산의료원 내분비내과를 내원하였던 환자 100명으로 제2형 당뇨병의 과거 병력이 있거나 내원 후 제2형 당뇨병 진단을 받은 환자를 대상 환자군으로 정하였으며 남자 63명, 여자 37명이였다. 대상자에게 시행된 모든 검사들은 임상시험

*Corresponding author

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

E-mail : ymin@kmu.ac.kr

심사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 기준에 맞게 환자들의 자발적인 서면 동의 하에 이루어졌다.

설문조사 및 신체계측

사회 인구학적 특성, 현재의 병력, 과거력, 흡연력, 음주력은 설문지를 이용하여 자기 기입식 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 계측기로부터 산출하였다.

임상검사

혈액 검사는 전날 밤부터 최소한 10시간 이상 금식한 공복 상태에서 채혈한 후, 당화혈색소, 공복 혈장 포도당, 중성지방, 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤을 측정하였다. 당화혈색소, 총 콜레스테롤, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방은 Histachi Modular D2400 기계 (Roche, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고, 공복혈당은 Modular Analytics SWA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다.

채혈 및 DNA 분리

채혈된 혈액의 일부는 EDTA 처리된 시험관에 넣어 냉장 보관하였다가 실험실로 운반하여 DNA를 분리하였다. DNA 분리는 "Genomic DNA isolation kit (Gentra, Maryland, USA)"를 이용하였다. 6 ml의 RBC lysis solution을 혈액 2 ml에 넣은 후 5분간 흔들어서 섞어주었고, 4°C에서 3,500 rpm의 속도로 5분간 원심분리한 후, 상등액과 분리하였다. Vortex mixer로 잘 풀어준 후 Cell lysis solution 2 ml를 넣고 다시 vortex mixer로 10초간 잘 섞어준 후 10분 이상 실온에서 방치하였다. Protein precipitation 용액 0.7 ml를 넣고 충분히 vortex한 후 4°C에서 3,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 단백질을 포함한 모든 불순물을 가라앉혔다. 상등액을 조심스럽게 100% isopropyl alcohol 2 ml에 옮겨 DNA가 보일 때까지 섞었다. 2,500 rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 상등액은 버리고, 70% ethanol로 탈수시켰다. DNA 수용액 150 µl를 넣어 2~3시간 정도 65°C에서 방치한 후 -20°C에서 보관한 후 사용하였다.

유전자 분석 및 유전자 다형성 검사

유전자 분석을 위해서 Applied Biosystems 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems, California, USA)을 사용하였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation 반응을 95°C에서 10분, denaturation 반응을 95°C에서 30초, annealing 반응을 62°C에

서 30초, extension 반응을 72°C에서 30초로 설정하여 35 cycle 반복해 DNA를 증폭시킨 후 마지막으로 extension 반응을 72°C에서 10분간 유지하였다.

통계학적 분석

제2형 당뇨병 환자군과 대조군 사이의 대립형질(allele)의 빈도와 유전자형(genotype) 빈도의 차이에 대한 통계분석은 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 $p < 0.005$ 로 하였다.

결과 및 고찰

대상자의 일반적 특성 및 건강행태

본 연구에 참여한 제2형 당뇨병이 없는 대조군 100명과 제2형 당뇨병 환자군 100명의 임상적 특징은 Table 1에 나타내었다. 대조군과 제2형 당뇨병 환자군 대상자의 평균 연령은 각각 63.8과 63.3세로 대조군에서 유의하게 높게 나타났으며 남녀 비율은 대조군에서 여성이, 제2형 당뇨병 환자군에서는 남성이 유의하게 많았다. 흡연상태는 제2형 당뇨병 환자군이 대조군에 비해 유의하게 많았다. BMI, 중성지방은 제2형 당뇨병 환자군에서 의미 있게 높았으나, 고밀도 콜레스테롤은 대조군

Table 1. Clinical data of patients and controls

Variables	Controls (n=100)	Cases (n=100)	P
Age (year)	63.24±2.79	62.80±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.

Table 2. Genotype frequencies of HNF-4a gene in position 12352

Genotype	Controls (n=100)	Cases (n=100)	P
CC	97	96	0.86
CT	3	3	
TT	0	1	

Table 3. Genotype frequencies of HNF-4a gene in position 12352

Genotype	Male			Female		
	Controls (n=36)	Cases (n=63)	P	Controls (n=64)	Cases (n=37)	P
CC	34	60	0.010	63	36	0.001
CT	2	2		1	1	
TT	0	1		0	0	

에서 의미 있게 높았다. 저밀도 콜레스테롤의 경우에는 대조군과 제2형 당뇨병 환자군 사이에 의미 있는 차이는 없었다.

HNF4a 유전자 다형성과 type 2 diabetes의 연관성

전체 대상군에서 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium을 따르는 것으로 확인되었다. HNF-4a 12352 C>T의 유전자형(genotype)은 대조군 100명에서 CC 동형접합체 97%, CT 이형접합체 3%, TT 동형접합체 0%였으며, 제2형 당뇨병 환자군 100명에서 CC 동형접합체 96%, CT 이형접합체 3%, TT 동형접합체 1%였다. 대조군과 제2형 당뇨병 환자군 사이에서 유전자형의 분포는 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p<0.86$) (Table 2). 성별을 보정한 상태에서 HNF-4a 12352 C>T의 유전자형(genotype)은 남자의 경우, 대조군 36명에서 CC 동형접합체 34명, CT 이형접합체 2명, TT 이형접합체는 한 명도 없었으며, 제2형 당뇨병 환자군 63명에서 CC 동형접합체 60명, CT 이형접합체 2명, TT 동형접합체 1명였으나, 여자의 경우는 대조군 64명에서 CC 동형접합체 63명, CT 이형접합체 1명였다. TT 동형접합체는 한 명도 없었으며, 제2형 당뇨병 환자군 37명에서 CC 동형접합체 36명, CT 이형접합체 1명, TT 동형접합체가 한 명도 없었다. 남녀 간의 대조군과 제2형 당뇨병 환자군 사이에서는 남자군($p=0.010$)에 비해 여자군($p=0.001$)에서 좀 더 의미 있는 차이를 보였다. 향후 지속적으로 그 수를 늘려가며 실험을 추가할 필요가 있었다(Table 3). 대조군과 제2형 당뇨병 환자군 각각에서 유전자형에 따른 혈압, 총 콜레스테롤, 중성지방, 체질량지수, 허리둘레, 허리엉덩이 둘레비 등의 유의한 차이는 없었다.

요 약

Hepatocyte nuclear factor-4a (HNF-4a)는 췌장 베타세포의

발생, 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자로서, 그 유전자 변이와 MODY와의 연관성이 보고된 바 있다. 특히, 일본인의 경우에는 HNF-4a 12352 C>T가 제2형 당뇨병과의 연관성이 있다고 보고되어 있다[12].

이에 본 연구에서는 HNF-4a의 유전자 변이와 제2형 당뇨병 사이에 어떠한 연관성이 한국인에서도 있는지 알아보았다. 그 결과, HNF-4a의 유전자 변이인 12352 C>T와 제2형 당뇨병 사이에는 구체적인 연관성이 없는 것으로 확인되었다. 이는 제2형 당뇨병과의 연관성이 있다고 보고된 이전의 일본인이나 유럽인을 대상으로 한 연구결과와 다소 차이가 있는 것이며, 한국인을 위한 고유의 통계적 data로서 의미가 있는 것이라 하겠다[5,12]. 이러한 차이를 보이는 원인을 유추해본다면, 인종에 따라 서로 다른 유전적 그리고 환경적인 요인의 차이에 의해 다형성이 미치는 영향력에 차이가 있기 때문으로 생각된다. 이는 당뇨병과 같은 질환이 특정한 한 두 개의 유전자 이상에 의해서 발생되기 보다는, 여러 유전자들이 상호 작용함으로써 발생할 뿐만 아니라 환경적인 요인의 영향을 많이 받기 때문에 인종이나 민족과 같은 인구 집단 사이에 유전인의 차이가 생기는 것으로도 판단된다. 따라서 연구결과의 임상적인 의의를 확실하게 확인하기 위하여서는 향후 대상 환자 수와 대조군을 더욱 늘리고 다양한 HNF-4a 유전자 다형성을 후보로 하여 추가적인 연구를 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

References

- Duggirala, R., J. Blangero, L. Almasy, T. D. Dyer, K. L. Williams, R. J. Leach, P. O'Connell, and M. P. Stern. 1999. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1127-1140.
- Fajans, S. S., G. I. Bell, and K. S. Polonsky. 2001. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.* **345**, 971-980.
- Heman, W. H., S. S. Fajans, M. J. Smith, K. S. Polonsky, G. I. Bell, and J. B. Halter. 1997. Diminished insulin and glucagons secretory responses to arginine in nondiabetic subject with a mutation in the hepatocyte nuclear factor 4A/MODY1 gene. *Diabetes* **46**, 1749-1754.
- Heo, C. H., S. Y. Lee, S. Y. Seol, J. A. Kwon, Y. H. Jeong, C. N. Chung, and Y. I. Sunwoo. 2008. Minisatellite 5 of SLC6A18 (SLC6A18-MS5): Relationship to hypertension and revolutional level. *J. Life Sci.* **18**, 1733-1738.
- Horikawa, Y., N. Iwasaki, M. Hara, H. Furuta, Y. Hinokio, B. N. Cockburn, T. Lindner, K. Yamagata, M. Ogata, O.

- Tomonaga, H. Kuroki, T. Kasahara, Y. Iwamoto and G. I. Bell. 1997. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 β gene associated with MODY3. *Nat. Genet.* **17**, 384-385.
6. Jacob, E. K., C. S. Rose, D. P. Jensen, G. Glumer, K. Borch-Johnsen, and T. Jorgensen. The functional Thr130Ile and Val255Met polymorphisms of the HNF-4 α : gene associations with type 2 diabetes or altered beta-cell function among Danes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 3054-3059.
 7. Kwak, Y. S., W. Y. Ku, B. I. Yoo, Y. W. Jin, K. S. Coi, J. Y. Cho, J. H. Woo, and H. J. Hwang. 2008. Effects of different exercise intensity on excess post exercise oxygen consumption (EPOC), resting metabolic rate (RMR), and biochemical variables on obese and NIDDM patients. *J. Life Sci.* **18**, 1455-1463.
 8. Polonsky, K. S., J. Sturis, and G. I. Bell. Seminars in medicine of in the Beth Israel Hospital, Boston, Non-insulin-dependent diabetes mellitus-a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N. Engl. J. Med.* **33**, 777-783.
 9. Rissanen, J. H., Wang, R. Miettinen, P. Karkkainen, L. Mykkanen, J. Kuusisto, P. Karhapa, L. Niskanen, M. Uusitapa, and M. Laakso. 2000. Variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α and 4 α genes in Finnish and Chinese subjects with late-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 1533-1538.
 10. Stoffel, M. and S. A. Duncan. 1997. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor-HNF-4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13209-13214.
 11. Tattersall, R. B. and S. S. Fajans. 1975. A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* **24**, 44-53.
 12. Wang, H., P. Malchler, P. A. Antirrozzi, and K. A. Hanenfeldt. 2000. HNF-4 α regulates the expression of pancreatic beta cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **275**, 35953-35959.
 13. Yamagata, K., N. Oda, P. J. Kaisaki, S. Menzel, H. Furuta, M. Vaxillaire, L. Southam, R. D. Cox, G. M. Lathro, V. V. Boriraj, X. Chen, N. J. Cox, Y. Oda, H. Yano, M. M. Le Beau, S. Yamada, H. Nishigori, J. Takeda, S. S. Fajans, A. T. Hattarsley, N. Iwasaki, T. Hansen, O. Pedersen, K. S. Polonsky and G. I. Bell. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455-458.
 14. Zhu, Q., K. Yamagata, A. Miura, N. Shihara, Y. Horikawa, J. Takeda, J. Miyagawa, and Y. Matsuzawa. 2003. T3011 mutation in HNF-4 α gene is a loss-of-function mutation in hepatocyte and is association with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia.* **46**, 567-573.