

Association between *SMAD2* Gene and Serum Liver Enzyme Levels in the Korean Population

Hyo-Jun Ahn¹, Jae Woong Sull² and Yong-Bin Eom^{3,†}

¹Department of Laboratory Medicine, National Health Insurance Service Ilsan Hospital, Goyang 410-719, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Sungnam 461-713, Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan 331-718, Korea

Genome-wide association studies (GWAS) have identified a number of common variants associated with serum liver enzyme homeostasis in population. In the previous study, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in several genes have been reported to be associated with serum liver enzyme levels in European population. We aimed to confirm whether the genetic variation of *SMAD2* (SMAD family member 2) gene influence the serum liver enzyme levels in Korean population. We genotyped variants in or near *SMAD2* in a population-based sample including 994 unrelated Korean adult. Here, we performed association analysis to elucidate the possible relations of genetic polymorphisms in *SMAD2* gene with serum liver enzyme levels. By examining genotype data of a total of 944 subjects in 5 hospital health promotion center, we discovered the *SMAD2* gene polymorphisms are associated with serum liver enzyme levels. The common and highest significant polymorphism was rs17736760 ($\beta=3.51$, $P=5.31E-07$) with glutamic oxaloacetic transferase (GOT), rs17736760 ($\beta=5.99$, $P=1.25E-05$) with glutamic pyruvate transaminase (GPT), and rs17736760 ($\beta=15.68$, $P=9.93E-07$) with gamma glutamyl transferase (GGT) in all group. Furthermore, the SNP rs17736760 was consistently associated with GOT ($\beta=5.25$, $P=1.72E-06$), GPT ($\beta=9.97$, $P=1.16E-05$), GGT ($\beta=26.13$, $P=3.43E-06$) in men group. Consequently, we found statistically significant SNP in *SMAD2* gene that are associated with serum levels of GOT, GPT, and GGT. In addition, these results suggest that the individuals with the minor alleles of the SNP in the *SMAD2* gene may be more elevated serum liver enzyme levels in the Korean population.

Key Words: Serum liver enzyme level, *SMAD2*, SNP, rs17736760, Association

서 론

혈청 간 효소 검사는 임상에서 환자의 간 질환 여부와 함께 간 질환의 중증 정도, 치료의 효과, 약제에 기인한 간 질환 정도 등 인체의 간 상태를 판단하는데 널리 이용되는 검사이다 (Wilke et al., 2007; Lazo et al., 2008). 최근 많은 연구에서 혈청 간 효소 검사는 간 질환 뿐만 아니라 제2형 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 사망률 예측 위험

인자로 중요한 역학적인 의미를 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Lee et al., 2006; Kazemi-Shirazi et al., 2007; Forlani et al., 2008; Monami et al., 2008).

혈청 간 효소 수치는 환경적인 요인과 유전적인 요인에 모두 영향 받으며 기존에 평가된 유전율은 ALT (alanine aminotransferase)가 33%에서 GGT (gamma glutamyl transferase) 61% 정도로 알려져 있다 (Bathum et al., 2001; Whitfield et al., 2002). 지금까지 간 효소 수치에 영향을 주는 일부 유전자가 발견되었지만, 최근 혈색소침착증 (hemochromatosis) 환자에서 *HFE* 유전자 내 돌연변이와 같은 유전에 의한 간 질환 등 유전과 관련된 연구가 발표되고 있다 (Stepec et al., 2008).

간 효소와 관련된 유전체 전장 연관성 연구는 Yuan 등이 스위스, 이탈리아, 영국 등 유럽인을 대상으로 연구한 결과에서 기존에 알려진 *GGT1*, *ABO* 유전자를 포함

*Received: March 11, 2013 / Revised: April 24, 2013

Accepted: May 10 28, 2013

†Corresponding author: Yong-Bin Eom. Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, 456 Ssangyong-Dong, Seobuk-Gu, Cheonan-City, Chung Nam 331-718, Korea.
Tel: +82-41-570-4166, Fax: +82-41-570-4258
e-mail: omnibin@kornu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

하여 6개의 유전자 내 SNP를 추가로 발견했다고 하였다. rs11597390 (gene: *CPNI*), rs2281135 (gene: *PNPLA3*), rs1169313 (gene: *HNFLA*) 등 3개의 SNP는 GOT, GPT, GGT 효소와 유의한 상관성이 있으며 rs1780324 (gene: *NBPF3*, *ALPL*), rs9467160 (gene: *GPLDI*), rs12355784 (gene: *JMJDIC*) 등 3개의 SNP가 ALP와 유의한 상관성이 있는 것으로 발표하였다 (Yuan et al., 2008).

선행 연구들이 유럽인 검체를 대상으로 수행되었기에 본 연구에서 우리는 한국인들에게서 유전체 전장 연관성 분석 (genome-wide association study)으로 *SMAD2* 유전자에서 확인된 SNPs들과 각종 만성 질환 시 증가하는 간 효소 (GOT, GPT, GGT) 수치와의 관련성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

연구 대상자는 2006년 4월에서 12월 사이에 연세대학교 대사증후군 연구사업단과 협력하고 있는 5개 대학병원 검진센터에서 일반 건강 검진을 받은 수검자 13,756명 중 신체계측 (신장, 체중, 비만도, 허리둘레, 혈압 등)과 혈액검사 (중성지방, HDL-콜레스테롤, 공복혈당 등), 문진 (흡연력, 음주력 등)이 누락된 참여자 1,011명을 제외하고 나머지 12,745명 중 무작위로 1,007명을 추출하여 Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 5.0을 이용하여 유전자 분석을 시행하였고, 이중 분석율이 낮거나 유전자 분석과 성별이 불일치한 13명을 제외하고 994명을 대상으로 하였다. 혈청 간 효소 수치는 GOT, GPT, GGT, ALP를 대상으로 하였으며 성별은 남자 561명 (56.4%), 여자 433명 (43.6%)이었고, ALP의 경우 212명의 결과가 누락되어 남자 456명 (58.3%), 여자 326명 (41.7%)으로 782명이 분석 대상이었다.

본 연구는 각 병원의 임상연구심의위원회의 승인을 받았고, 모든 대상자에게 서면으로 연구 동의를 받아 시행하였다.

혈액 검사

대상자들에게 12시간 공복 상태의 정맥혈을 채혈한 후 혈청을 분리하여 -70°C 냉동고에 보관하였다. 공복혈당, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-C (high density lipoprotein cholesterol) 등은 Hitachi-7600 분석기 (Hitachi Ltd. Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 연구 대상자의 모든 종합

검사 결과를 연구 자료로 활용하였고, 각각의 검진센터들의 검사 결과 차이 검정은 대한임상검사정도관리협회에서 시행한 2006년 외부정도관리 결과를 이용하여 그 차이를 보정하였다.

유전자 분석

Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 5.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 유전자 분석을 시행하였으며 quality control call rate (Dynamic Model algorithm)는 86% 이상을 나타내었고, X 염색체 상의 heterozygosity로 대상자 개개인의 성별을 정확하게 구별하였다. Genotype calling은 birdseed v2 algorithm을 통해 시행하였다.

표본의 분석율이 낮거나 (<90%, MIND (Missing rate per INDividule) > 0.1 기준 적용), PLINK를 이용하여 identity-by-state (IBS) 산출식으로 전체 SNP를 분석하여 유전적으로 연관성을 가진 표본을 제외하였다.

500,568 SNPs를 분석하였고, MAF (minor allele frequency) > 0.05 기준에 의해 150,036개의 SNP가 제외되었고, Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ≥ 0.0001 기준에 의해 *P* 값이 0.0001 이하인 14,072개가 제외되었고, genotype call rate < 94% 기준에서 34,578개의 SNP가 제외되어 총 322,208 SNP가 분석에 사용되었다.

통계 분석

자료의 통계 분석은 PLINK version 1.05 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>), Haploview ver. 4.1 (Broad Institute, USA) 및 SAS software ver. 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC)를 사용하였다.

연구 대상자의 성별 분포 및 혈청 간 효소별 분포는 빈도와 백분율로 나타냈고, 대상자의 일반적 특성에 대한 분포 등 연속형 자료는 평균 (mean \pm 표준편차 (SD))로 표시하였으며 범주형 자료는 빈도와 백분율로 표현하였다. 연속형 자료는 독립적인 *t*-검정 (independent *t*-test), 범주형 자료는 카이제곱 (chi-square test)으로 분석하여 표현하였다.

결 과

연구 대상자의 일반적 특성

연구 대상자의 평균 연령은 남자 41.9세, 여자 41.1세였다. 성별로 혈청 간 효소 수치의 평균은 GOT, GPT,

Table 1. Clinical characteristics of the subjects used in this study

Variables	Men		Women		Total
	Mean ± SD				
Age (years)	41.9 ± 8.6		41.1 ± 8.3		41.5 ± 8.5
Height (cm)	171.6 ± 6.0		158.7 ± 5.2		166.0 ± 8.6
Weight (kg)	72.4 ± 10.2		56.8 ± 8.0		65.6 ± 12.1
Body Mass Index (kg/m ²)*	24.6 ± 2.9		22.5 ± 3.0		23.7 ± 3.14
Waist circumference (cm)*	85.6 ± 8.1		75.1 ± 8.3		81.1 ± 9.7
Systolic blood pressure (mmHg)*	125 ± 12.4		115.5 ± 13.76		120.9 ± 13.8
Diastolic blood pressure (mmHg)*	76.5 ± 10.2		70.4 ± 9.6		73.9 ± 10.4
Fasting blood sugar (mg/dL)*	97.1 ± 18.6		89.5 ± 11.6		93.8 ± 16.4
Cholesterol (mg/dL)*	189.6 ± 33.0		179.1 ± 32.5		185.0 ± 33.2
HDL cholesterol (mg/dL)*	49.8 ± 10.5		59.9 ± 13.4		54.2 ± 12.9
LDL cholesterol (mg/dL)*	113.3 ± 29.4		102.6 ± 27.8		108.7 ± 29.2
Triglyceride (mg/dL)*	145.1 ± 110.8		83.0 ± 44.3		118.1 ± 93.4
GOT (mg/dL)*	24.2 ± 9.3		18.9 ± 6.1		21.9 ± 8.5
GPT (mg/dL)*	28.8 ± 19.3		15.6 ± 9.1		23.1 ± 17.0
ALP (mg/dL)*	173.5 ± 38.7		145.9 ± 43.0		162.0 ± 42.7
GGT (mg/dL)*	44.6 ± 48.1		17.5 ± 11.4		32.8 ± 39.3
		N (%)			
Smoking status*	Non	147 (26.2)	403 (93.1)	550 (55.3)	
	EX	153 (27.3)	13 (3.0)	166 (16.7)	
Alcohol drinking*	Current	261 (46.5)	17 (3.9)	278 (28.0)	
	Yes	512 (92.6)	242 (57.3)	754 (77.3)	
Exercise [†]	Yes	172 (62.8)	110 (50.2)	215 (57.3)	
Diabetes		40 (7.1)	12 (2.8)	52 (5.2)	

Abbreviations: SD, standard deviation; * $P < 0.05$; [†] $P < 0.05$ (independent *t*-test, chi-square test)

ALP, GGT 순으로 각각 남자 24.2, 28.8, 173.5, 44.6 mg/dL 이었으며 여자는 18.9, 15.6, 145.9, 17.5 mg/dL 이어서 남자가 여자보다 네 항목 모두 유의하게 높았다 ($P < 0.0001$). 간 효소 이외에도 체질량 지수, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 허리둘레, 공복혈당, 콜레스테롤, 중성지방 등 대부분 남자가 여자보다 평균이 유의하게 높게 나타났고 ($P < 0.0001$), HDL 콜레스테롤의 경우는 남자가 유의하게 낮았다 ($P < 0.0001$) (Table 1).

전체 연구 대상자의 응답자 중 현재 흡연은 278명 (28.0%), 남자 261명 (46.5%), 여자 17명 (3.9%)이었고, 음주를 하는 대상자는 754명 (77.3%), 남자 512명 (92.6%), 여자 242명 (57.3%)이었다. 또한 규칙적인 운동을 하는 대상자는 215명 (57.3%), 남자 172명 (62.8%), 여자 110명 (50.2%)이었다.

체질량지수를 비롯한 거의 대부분의 항목이 *t*-검정 및

카이제곱 검정 결과 남녀간 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다.

개별 간 효소와 SNP와의 연관성 분석

남녀 구분없이 전체를 대상으로 성별, 연령, 흡연 여부, 음주 여부를 통제된 상태에서 혈청 간 효소와 관련 있는 SNP를 분석한 결과는 Table 2과 같다. 가장 유의한 상관성을 나타내는 효소별 10개씩 전체 40개를 제시하였다.

GOT에서는 총 24개의 SNPs가 *P* 값이 10.0E-05 이하로 나타났고, 18번 염색체에 위치하는 *SMAD2* 유전자 내 rs17736760가 *P* 값이 5.31E-07로 가장 유의하게 나타났으며 *C16orf47* 유전자 내 rs7203412 등 약 6개의 SNPs가 1.0E-06 이하로 나타났다.

GPT에서는 *P* 값이 10.0E-05 이하로 유의한 SNP는 50개로 나타났으며 5개 정도의 SNPs가 *P* 값이 10.0E-06

Table 2. The association results of independent SNPs with liver enzyme levels based on linear regression model in Korean adults

No.	SNP	CHR	Position	Gene	Region	A1 A2	MAF	Beta	<i>P</i> value
GOT									
1	rs17736760	18	43361634	<i>SMAD2</i>	Intergenic	T C	0.08	3.51	5.31E-07
2	rs7203412	16	72002536	<i>C16orf47</i>	Intergenic	T C	0.06	3.68	3.66E-06
3	rs8103879	19	22003277	<i>ZNF208</i>	Intergenic	T C	0.08	-1.97	3.68E-06
4	rs11716804	3	150753777	<i>WWTR1</i>	Intron	C T	0.37	1.76	3.76E-06
5	rs11033540	11	36277356	<i>COMMD9</i>	Intergenic	T C	0.1	2.82	3.98E-06
6	rs1975167	19	22006906	<i>ZNF257</i>	Intergenic	T A	0.23	-1.93	6.34E-06
7	rs6489438	12	3097191	<i>TSPAN9</i>	5UTR	A G	0.16	2.22	1.37E-05
8	rs4507321	4	165163284	<i>ANP32C</i>	Intergenic	C T	0.18	2.05	1.49E-05
9	rs4434236	4	24099844	<i>DHX15</i>	Intergenic	C G	0.06	3.16	1.90E-05
10	rs6536779	4	165191612	<i>ANP32C</i>	Intergenic	T C	0.17	2.06	2.02E-05
GPT									
1	rs1222210	11	30318701	<i>C11orf46</i>	Intergenic	T C	0.2	4.11	5.79E-06
2	rs10835647	11	30269844	<i>C11orf46</i>	Intergenic	G A	0.2	4.07	6.54E-06
3	rs2226016	11	30132282	<i>FSHB</i>	Intergenic	T C	0.22	3.74	6.81E-06
4	rs6536779	4	165191612	<i>ANP32C</i>	Intergenic	T C	0.17	4.25	7.06E-06
5	rs4507321	4	165163284	<i>ANP32C</i>	Intergenic	C T	0.18	4.14	7.58E-06
6	rs4921536	5	159260202	<i>ADRA1B</i>	Intergenic	C A	0.13	4.61	1.08E-05
7	rs7902970	10	4760022	<i>AKR1CL2</i>	Intergenic	T A	0.43	-3.18	1.11E-05
8	rs6604920	1	82866969	<i>LPHN2</i>	Intergenic	G A	0.07	6.25	1.17E-05
9	rs17736760	18	43361634	<i>SMAD2</i>	Intergenic	T C	0.08	5.99	1.25E-05
10	rs206731	6	164423647	<i>QKI</i>	Intergenic	A C	0.39	3.2	1.31E-05
GGT									
1	rs1003499	22	48261897	<i>FLJ44385</i>	Intergenic	A G	0.16	12.1	1.52E-07
2	rs16834810	1	235325422	<i>RYR2</i>	Intron	A G	0.08	16.15	1.63E-07
3	rs17090633	4	180561608	<i>AGA</i>	Intergenic	G T	0.27	9.66	2.06E-07
4	rs4531555	12	81089863	<i>CCDC59</i>	Intergenic	A T	0.05	18.56	3.56E-07
5	rs17736760	18	43361634	<i>SMAD2</i>	Intergenic	T C	0.08	15.68	9.93E-07
6	rs9332950	12	16409250	<i>MGST1</i>	Downstream	C G	0.19	11.08	1.27E-06
7	rs638515	12	48590194	<i>FAIM2</i>	Intergenic	T C	0.12	12.1	2.01E-06
8	rs9913537	17	2611762	<i>GARNL4</i>	Intergenic	A G	0.14	11.71	2.16E-06
9	rs153226	5	80406671	<i>RASGRF2</i>	Intron	C T	0.13	11.54	2.84E-06
10	rs9596881	13	53437005	<i>OLFM4</i>	Intergenic	C T	0.06	16.13	3.12E-06
ALP									
1	rs579025	9	78495684	<i>KIAA0367</i>	Intron	A G	0.35	-10.29	3.11E-06
2	rs526347	9	78453967	<i>KIAA0367</i>	Intron	T C	0.39	9.5	5.21E-06
3	rs10505367	8	120660645	<i>ENPP2</i>	Intron	T C	0.1	15.11	5.59E-06
4	rs4584142	8	34539544	<i>DUSP26</i>	Intergenic	T C	0.45	-9.04	7.87E-06
5	rs506965	9	78500475	<i>KIAA0367</i>	Intron	A C	0.36	-9.56	1.21E-05
6	rs12677393	8	34537918	<i>DUSP26</i>	Intergenic	T C	0.46	-8.79	1.73E-05
7	rs6986021	8	120660013	<i>ENPP2</i>	Intron	G A	0.1	14.64	1.79E-05

Table 2. Continued

No.	SNP	CHR	Position	Gene	Region	A1 A2	MAF	Beta	<i>P</i> value
8	rs12680034	8	34508369	<i>DUSP26</i>	Intergenic	A T	0.46	-8.71	1.93E-05
9	rs2305128	8	120668668	<i>ENPP2</i>	Intron	C T	0.1	14.65	1.96E-05
10	rs3793376	8	120655798	<i>ENPP2</i>	Intron	C T	0.11	14.4	1.99E-05

- 1) Abbreviations: CHR, chromosome position; A1, minor allele; A2, major allele; MAF, minor allele frequency; Beta, linear regression coefficient
- 2) *P* values were calculated using linear regression under an additive model adjusting for age, gender, smoking status, alcohol consumption

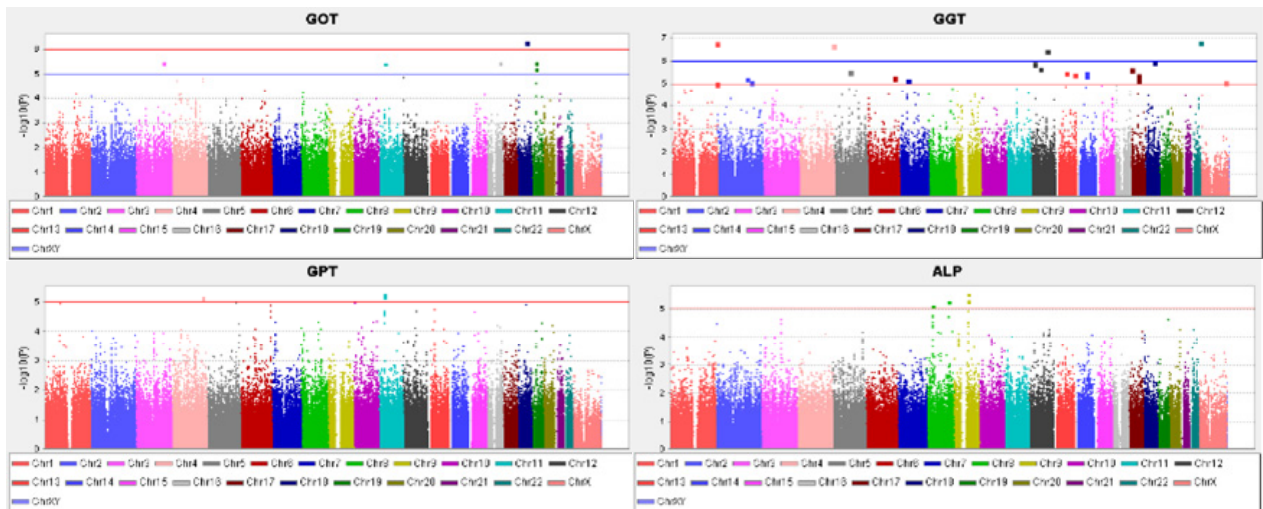


Fig. 1. Genome wide scan plots of the serum liver enzyme levels based on linear regression model in Korean adults (transformed $-\log_{10}$ *P*-value).

이하로 나타났고 가장 유의한 결과를 나타낸 rs1222210 ($P=5.79E-06$), rs10835647 ($P=6.54E-06$) 두 SNPs가 모두 11번 염색체에 *C11orf46* 유전자에 위치하는 것으로 나타났다.

GGT에서 *P* 값이 $10.0E-05$ 이하로 유의한 SNP는 103개로 가장 많은 수의 SNPs가 유의한 관계가 있는 것으로 나타났으며 이 중 22번 염색체에 위치하는 rs1003499 ($P=1.52E-07$, gene: *FLJ44385*)가 가장 유의한 SNP로 나타났다, 1번 염색체에 위치하는 rs16834810 ($P=1.63E-07$, gene: *RYR2*)와 rs17090633 (gene: *AGA*), rs4531555 (gene: *CCDC59*), rs17736760 (gene: *SMAD2*) 등의 순이었고 *P* 값이 $10.0E-07$ 이하인 SNPs가 5개로 나타났다.

ALP에 있어서는 $10.0E-05$ 이하인 SNP가 45개로 나타났다 이 중 9번 염색체에 위치하는 *KIAA0367* 유전자에 속하는 rs579025 ($P=3.11E-06$, location: 78495684)와 rs526347 ($P=5.21E-06$, location: 78453967) 두 개의 SNPs가 가장 유의한 것으로 나타났다. 유의하게 나타난 상위

15개의 SNPs 중에서 위 두 개의 SNPs와 함께 rs506965, rs478792, rs478699 전체 5개의 SNPs가 *KIAA0367* 유전자에 속하는 것으로 나타났고 8번 염색체에 위치하는 *DUSP26* 유전자에 속하는 SNP가 4개 (rs4584142, rs12677393, rs12680034, rs7838144)였으며 같은 8번 염색체에 위치하는 *ENPP2* 유전자에 속하는 SNP가 4개 (rs10505367, rs6986021, rs2305128, rs3793376)로 나타났다 (Table 2).

각각의 혈청 간 효소와 322,208개의 SNPs와 연관성 분석을 통해 구해진 *P*를 log로 치환한 값을 plot으로 나타낸 그림은 Fig. 1에 제시하였다.

전체 간 효소와 SNP와의 연관성 분석

하나의 혈청 간 효소에 대해 유의한 상관성을 나타내는 SNP 중에서 나머지 혈청 간 효소의 결과를 비교하여 효소별 유의성을 상대적으로 비교해 본 결과를 Table 3에 제시하였다. 분석 기준은 개별 효소별로 *P* 값이 $10.0E-05$

Table 3. The association results of the lead SNPs with serum levels of liver enzymes based on linear regression model in Korean adults

No	SNP	Loc	Gene	A1/A2	MAF	GOT		GPT		GGT		ALP	
						Beta	P value	Beta	P value	Beta	P value	Beta	P value
1	rs17736760	18q21.1	SMAD2	T/C	0.08	3.51	5.31E-07	5.99	1.25E-05	15.68	9.93E-07	5.3	1.79E-01
2	rs4507321	4q32.3	ANP32C	C/T	0.18	2.05	1.49E-05	4.14	7.58E-06	5.96	6.18E-03	-0.32	9.07E-01
3	rs6536779	4q32.3	ANP32C	T/C	0.17	2.06	2.02E-05	4.25	7.06E-06	5.52	1.29E-02	-0.09	9.75E-01
4	rs7902970	10p15.1	AKR1CL2	T/A	0.43	-1.19	1.35E-03	-3.18	1.11E-05	-6.76	4.53E-05	3.06	1.33E-01
5	rs2075803	19q13.41	SIGLEC9	G/A	0.5	-1.48	9.16E-05	-2.96	5.05E-05	-5.1	3.58E-03	-2.51	2.31E-01
6	rs7203412	16q22.3	C16orf47	T/C	0.06	3.68	3.66E-06	6.2	7.06E-05	4.08	2.68E-01	-1.05	8.19E-01
7	rs579025	9q21.13	KIAA0367	A/G	0.35	-0.09	8.11E-01	-1.07	1.68E-01	0.41	8.23E-01	-10.29	3.11E-06
8	rs526347	9q21.13	KIAA0367	T/C	0.39	-0.25	5.01E-01	-0.73	3.25E-01	0.67	7.01E-01	9.5	5.21E-06
9	rs10505367	8q24.1	ENPP2	T/C	0.1	0.54	3.74E-01	0.93	4.33E-01	7.25	8.67E-03	15.11	5.59E-06
10	rs4584142	8p12	DUSP26	T/C	0.45	-0.61	9.91E-02	-0.84	2.47E-01	-1.41	4.00E-01	-9.04	7.87E-06

1) Abbreviations: Loc, SNP location; A1, minor allele; A2, major allele; MAF, minor allele frequency; Beta, linear regression coefficient

2) P values were calculated using linear regression under an additive model adjusting for age, gender, smoking status, alcohol consumption

Table 4. The association results of the four SNPs with serum levels of liver enzymes based on linear regression model in Korean adults

SNP	Related enzymes	Loc	Gene	A1/A2	MAF	SEX	GOT		GPT		GGT		ALP	
							Beta	P value	Beta	P value	Beta	P value	Beta	P value
rs-17736760	GOT	18q21.1	SMAD2	T/C	0.08	ALL	3.51	5.31E-07	5.99	1.25E-05	15.68	9.93E-07	5.3	1.79E-01
	GPT					M	5.25	1.72E-06	9.97	1.16E-05	26.13	3.43E-06	7.81	1.20E-01
	GGT					F	1.5	5.02E-02	1.39	2.33E-01	3.35	2.03E-02	3.64	5.55E-01
rs-7203412	GOT	16q22.3	C16orf47	T/C	0.06	ALL	3.68	3.66E-06	6.2	7.06E-05	4.08	2.68E-01	-1.05	8.19E-01
	GPT					M	6.41	6.78E-08	11.53	2.81E-06	8.02	1.97E-01	0.41	9.42E-01
						F	-0.19	8.38E-01	-1.23	3.82E-01	-2.01	2.49E-01	-1.22	8.70E-01
rs-736327	ALP	3q13.1	RETNLB	C/T	0.44	ALL	-0.13	7.21E-01	-0.61	4.01E-01	-0.32	8.53E-01	8.66	2.37E-05
						M	-0.6	3.00E-01	-1.48	2.12E-01	-1.1	7.10E-01	10.4	5.23E-05
						F	0.37	3.64E-01	0.38	5.46E-01	0.72	3.51E-01	5.78	7.25E-02
rs-7639070	ALP	3q13.1	RETNLB	G/T	0.44	ALL	-0.11	7.70E-01	-0.57	4.31E-01	-0.18	9.18E-01	8.56	3.24E-05
						M	-0.58	3.18E-01	-1.43	2.30E-01	-0.83	7.80E-01	10.32	6.74E-05
						F	0.4	3.31E-01	0.39	5.37E-01	0.69	3.72E-01	5.6	8.23E-02

1) Abbreviations: Loc, SNP location; A1, minor allele; A2, major allele; MAF, minor allele frequency; Beta, linear regression coefficient; M, male; F, female

2) P values were calculated using linear regression under an additive model adjusting for age, sex, smoking status, alcohol consumption(ALL) and for age, smoking status, alcohol consumption (M, F)

이하로 유의하게 나타난 결과가 최소한 두 개 이상의 효소에서 중복해서 나타나는 경우를 분석 대상으로 하였다. 18번 염색체 18q21.1에 위치하고 SMAD2 유전자에 속하는 rs17736760 SNP가 GOT ($P=5.31E-07$), GPT ($P=1.25E-05$), GGT ($P=9.93E-07$) 세 효소 모두에서 가장 유의한 상관성이 있는 SNP로 나타났다.

간 효소 관련 후보 유전자 발굴

혈청 간 효소 수치와 관련된 후보 유전자의 선택은 성

별, 연령, 흡연 여부, 음주 여부를 통제된 상태에서 분석된 SNP 중에서 P 값이 10.0E-05 이하인 경우가 각 그룹별로 중복되어 나타나는 SNP를 대상으로 선정하였다.

위와 같은 조건으로 분석한 결과에서 SMAD2 (mothers against decapentaplegic homolog 2) 유전자에서 속하는 rs17736760 SNP가 GOT, GPT, GGT 세 가지 효소에서 전체와 남자 그룹 모두 유의하게 나타났다 (Table 4).

SMAD2 유전자에 속하는 rs17736760 SNP의 유전형은 TT, TC, CC로 나타났고, 성별 구분없이 전체를 분석한

Table 5. Mean serum levels of liver enzymes according to the genotypes of rs17736760 in Korean adults

rs17736760	GOT			GPT			GGT			ALP		
	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C
Genotype	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C
Counts	4	142	830	4	142	830	4	142	830	3	114	654
Frequency	0.004	0.146	0.85	0.004	0.146	0.85	0.004	0.146	0.85	0.004	0.148	0.848
Mean	55.8	23.1	21.5	85	24.6	22.5	229.5	35	31.5	196.3	164.4	161.7
SD	29	10.1	7.6	70.7	19.8	15.4	365.1	36	30.6	57.9	46.9	42.1
P value	5.31E-07			1.25E-05			9.93E-07			1.79E-01		

Abbreviations: GENO, genotype; FREQ, frequency; SD, standard deviation

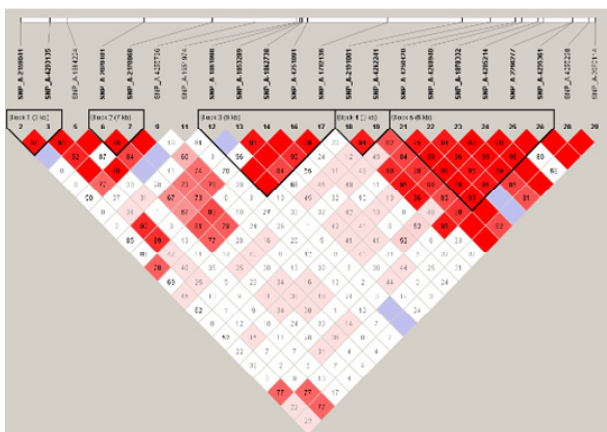


Fig. 2. The linkage disequilibrium blocks of the significant 17 SNPs in the *SMAD2* gene. The panel shows a Haploview of LD (r^2) are generated by using the Haploview program.

결과 각 유전형에 속하는 대상자가 4명 (0.4%), 142명 (14.6%), 830명 (85.0%)으로 구분되었으며, 각 효소별 유전형별 평균값은 T allele (minor allele)을 가진 경우가 C allele (major allele)을 가진 경우보다 높게 나타났다 (Table 5).

SMAD2 유전자 내에 rs17736760 SNP 앞뒤 40 Kb 구역에 존재하는 SNPs들의 연쇄불균형 (linkage disequilibrium, LD)을 살펴 본 결과 rs17736760 SNP를 포함하여 17개의 SNPs가 두 개의 블록으로 묶여 강한 연쇄불균형 상태를 보여주고 있다 (Fig. 2).

고찰

연구 대상자 전체를 대상으로 성별, 연령, 음주 여부, 흡연 여부를 통제된 상태에서 혈청 간 효소와 관련 있는 SNP를 분석한 결과 *SMAD2* 유전자에 속하는 rs17736760가 GOT, GPT, GGT 세 가지 효소에서 모두 유의하게 나

타났다. rs17736760 SNP의 유전형별 세 가지 효소의 평균값도 minor allele을 가진 경우 높게 나타났고 유전자 내에서 강한 연쇄불균형도 나타났다.

SMAD2 유전자는 18q21.1 위치에 존재하며 같은 명칭으로 JV18, MADH2, MADR2, JV18-1, hMAD-2, hSMAD2, MGC22139, MGC34440 등으로 알려져 있고 세포의 다양한 대사에 관여하는 transforming growth factor (TGF)- β 의 신호를 증폭하는 것으로 알려져 있다 (Ju et al., 2006; Ma et al., 2009).

SMAD2 유전자는 형질전환 성장인자 (transforming growth factor- β , TGF- β) 시그널 전달을 매개하는 것을 통해 세포의 증식 (proliferation), 예정세포사 (apoptosis), 분화 (differentiation) 등 다양한 세포 과정을 조절하는 SMAD family에 속하는 유전자로 많은 선행 연구에서 간 질환과 관련 있음이 보고된 바 있다. Ju W 등의 보고에 의하면 쥐의 간에서 이 유전자의 결핍은 간세포의 성장과 분화에 특이적인 영향을 미치는 것으로 보고하였고 (Ju et al., 2006), Ma X 등이 쥐를 대상으로 한 연구에서도 SRC-3 (steroid receptor co-activator-3)의 부족은 SMAD (TGF- β)의 활성화를 감소시키고 간 손상과 섬유증을 감소시키는 것으로 보고하였다 (Ma et al., 2009). 또한 French D 등의 보고에 의하면 백혈병 치료제인 methotrexate polyglutamate (MTXPG) 증가에 더 강한 영향이 있는 것으로 보고되었고 이 MTXPG에 관련 있는 유전자 7개 중 *SMAD2*가 포함된다고 보고하였다 (French et al., 2009). 본 연구 결과와 선행연구의 결과를 종합해 보면 *SMAD2* 유전자는 간 질환과 관련 있으며, 혈청 내 간 효소 수치에도 관련 있는 유전자이다.

혈청 간 효소 수치와 유전적인 정확한 원인을 규명하기 위해서는 충분한 수의 표본을 대상으로 본 연구에서 제시된 SNP와 유전자에 대한 추가적인 재현성 연구를 진행해야 할 것이며, 간 효소는 환경적인 영향도 크기 때

문에 유전·환경 상호 작용에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구는 간 기능과 질환 등 간의 상태를 판단하는데 가장 널리 이용되는 혈청 간 효소 검사에 있어서 효소 수치에 영향을 주는 인자가 다양하고 환경적인 영향이 있음에도 불구하고 간 효소와 관련된 rs17736760 SNP를 찾았고 기존에 밝혀지지 않았던 새로운 *SMAD2* 유전자를 제시하였음에 의의가 있다고 하겠다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 나사렛대학교 연구비 지원에 의해 연구되었습니다. 또한 데이터를 제공해주신 연세대학교 대사증후군 연구사업단 지선하 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Bathum L, Petersen HC, Rosholm JU, Hyltoft Petersen P, Vaupel J, Christensen K. Evidence for a substantial genetic influence on biochemical liver function tests: results from a population-based Danish twin study. *Clin Chem*. 2001. 47: 81-87.
- Forlani G, Di Bonito P, Mannucci E, Capaldo B, Genovese S, Orrasch M, Scaldaferrì L, Di Bartolo P, Melandri P, Dei Cas A, Zavaroni I, Marchesini G. Prevalence of elevated liver enzymes in Type 2 diabetes mellitus and its association with the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2008. 31: 146-152.
- French D, Yang W, Cheng C, Raimondi SC, Mullighan CG, Downing JR, Evans WE, Pui CH, Relling MV. Acquired variation outweighs inherited variation in whole genome analysis of methotrexate polyglutamate accumulation in leukemia. *Blood*. 2009. 113: 4512-4520.
- Ju W, Ogawa A, Heyer J, Nierhof D, Yu L, Kucherlapati R, Shafritz DA, Bottlinger EP. Deletion of *SMAD2* in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Mol Cell Biol*. 2006. 26: 654-667.
- Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, Schickbauer T, Wagner O, Marsik C. Gamma glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver? *Clin Chem*. 2007. 53: 940-946.
- Lazo M, Selvin E, Clark JM. Brief communication: clinical implications of short-term variability in liver function test results. *Ann Intern Med*. 2008. 148: 348-352.
- Lee DH, Silventoinen K, Hu G, Jacobs DR Jr, Jousilahti P, Sundvall J, Tuomilehto J. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28,838 middle-aged men and women. *Eur Heart J*. 2006. 27: 2170-2176.
- Ma X, Xu L, Wang S, Chen H, Xu J, Li X, Ning G. Loss of steroid receptor co-activator-3 attenuates carbon tetrachloride-induced murine hepatic injury and fibrosis. *Lab Invest*. 2009. 89: 903-914.
- Monami M, Bardini G, Lamanna C, Pala L, Cresci B, Francesconi P, Buiatti E, Rotella CM, Mannucci E. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism*. 2008. 57: 387-392.
- Stepec S, Makuc J, Markovic S, Medica I, Peterlin B. Distribution of HFE gene mutations in Slovenian patients with hereditary hemochromatosis. *Ann Hematol*. 2008. 87: 667-669.
- Whitfield JB, Zhu G, Nestler JE, Heath AC, Martin NG. Genetic covariation between serum gamma-glutamyltransferase activity and cardiovascular risk factors. *Clin Chem*. 2002. 48: 1426-1431.
- Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I, Giacomini KM, Krauss RM. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2007. 6: 904-916.
- Yuan X, Waterworth D, Perry JR, Lim N, Song K, Chambers JC, Zhang W, Vollenweider P, Stirnadel H, Johnson T, Bergmann S, Beckmann ND, Li Y, Ferrucci L, Melzer D, Hernandez D, Singleton A, Scott J, Elliott P, Waeber G, Cardon L, Frayling TM, Kooner JS, Mooser V. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet*. 2008. 83: 520-528.