

이화여자대학교 대학원

2005 학년도

석사학위 청구논문

만성 신부전 환자에서
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)
유전자 다형성이
고호모시스테인혈증과 말초혈관 동맥경화에
미치는 영향

의 학 과

류 정 화

2006

만성 신부전 환자에서
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)
유전자 다형성이
고호모시스테인혈증과 말초혈관 동맥경화에
미치는 영향

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 7 월

이화여자대학교 대학원

의 학 과 류 정 화

I

류 정 화의 석사학위 논문을 인준함

지도교수 윤 견 일 _____

심사위원 최 규 복 _____

강 덕 희 _____

김 승 정 _____

이화여자대학교 대학원

||

목 차

논문개요	VI
I. 서 론.....	1
II. 연구대상 및 방법	4
III. 결 과	9
IV. 고 찰	29
V. 결 론	33
참고 문헌	34
영문 초록	41

LIST OF TABLES

Table 1. Baseline characteristics in total CRF patients	14
Table 2. Profiles of total CRF patients according to MTHFR 677 genotypes	15
Table 3. Profiles of total CRF patients according to MTHFR 1298 genotype	16
Table 4. Univariate regression analysis of factors affecting ABI in total CRF patients	17
Table 5. Multivariate linear regression analysis of factors affecting ABI in total CRF patients	18
Table 6. Univariate regression analysis of factors affecting ABI in dialysis subgroup within CRF patients group	19
Table 7. Multivariate linear regression analysis of factors affecting ABI in dialysis subgroup within CRF patients group	20
Table 8. Distribution of ABI according to MTHFR 677 polymorphism	21
Table 9. Univariate logistic regression analysis of odds ratio of MTHFR C677T mutation for ABI<0.9 in CRF patients.....	22

LIST OF FIGURES

Figure 1. Polymerase chain reaction of MTHFR polymorphism	23
Figure 2. Distribution of MTHFR polymorphism	24
Figure 3. Plasma homocysteine concentrations according to MTHFR genotypes	25
Figure 4. Correlations of homocysteine levels with vitamin B ₁₂ and folic acid level	26
Figure 5. The relationship between plasma homocysteine levels and ABIs	27
Figure 6. Effects of MTHFR polymorphism on peripheral atherosclerosis	28

논문개요

최근에 신부전 환자들의 심혈관 질환의 발생은 혈중 호모시스테인 농도와 관련이 없고 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T 유전자 다형성과 관련이 있다는 보고가 나오고 있다. MTHFR 유전자 다형성이 혈중 호모시스테인의 농도를 증가시킨다는 기존의 의미 외에, 그 자체로 죽상동맥경화증이나 심혈관계 질환의 독립적인 위험인자가 될지는 매우 흥미로운 사실이다. 따라서 본 연구에서는 만성 신부전 환자에서 MTHFR 유전자 다형성을 조사하여 혈장 호모시스테인 농도, 말초혈관의 동맥경화증 등과의 연관성을 살펴보고자 하였다.

본 연구는 이화의료원에서 2004년 7월에서 2005년 6월까지 신장내과에 입원한 중등도 이상 (GFR 30mL/min 미만)의 만성 신부전 환자 128명의 MTHFR 유전자형을 standard PCR/restriction fragment length polymorphism를 이용하여 분석하였고, Doppler 혈압측정기를 이용하여 ankle brachial index (ABI)를 측정하였다. 환자들의 혈액을 채취하여 호모시스테인, 엽산, 비타민 B₁₂ 등의 농도를 측정하였다. 대조군은 종합검진을 위해 내원한 사람들 중 신장 기능에 이상이 없는 170명을 대상으로 혈액 채취를 하여 MTHFR 유전자 다형성을 환자군과 같은 방법으로 분석하였다. 결과는 다음과 같다.

1. 한국인 만성 신부전 환자에서 MTHFR 677유전자형의 분포는 CC (33.6%), CT (47.7%), TT (18.7%)로 나타났고 이는 신기능이 정상인 군과 차이가 없었고, TT형에서 CC형에 비해 혈장 호모시스테인 농도가 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).
2. 만성 신부전환자의 MTHFR 1298 유전자형의 분포는 AA (63.78%), AC (33.07%),

CC (3.15%)로 대조군과 차이가 없었고, 유전자형에 따른 혈장 호모시스테인 농도의 차이가 없었다 ($p=0.2063$).

3. ABI수치와 혈장 호모시스테인 농도간에는 유의한 상관관계가 없었다.

4. 혈장 호모시스테인 농도는 비타민 B₁₂, 엽산 농도와 각각 음의 상관관계가 있었다 (각각 $r=-0.305$, $r=-0.293$, $p<0.001$).

5. 전체 환자군에서 ABI에 영향을 주는 인자로 볼 수 있는 당뇨, 고혈압, 55세 이상, 흡연력, 심혈관 질환, 투석 기간, 투석 방법, 혈장 호모시스테인 농도를 보정하여 로지스틱스 회귀분석한 결과 MTHFR 677 유전자형이 TT인 군에서 말초혈관질환을 의심할 수 있는 ABI<0.9일 위험도는 CC군에 비해 위험도가 3.226 이었으나 통계적으로는 유의한 차이가 없었다 ($p=0.1435$).

6. 환자군 중 투석환자군에서 ABI에 영향을 주는 인자를 분석하였을 때 투석환자군에서 단변량 회귀분석 결과 MTHFR 677 TT 유전형이 ABI와 음의 상관 관계를 보이는 경향이었으나 ($p=0.053$), 다변량 회귀분석에서 통계적으로 유의한 의미는 없었다.

결론적으로 한국인에서 만성 신부전 환자와 대조군 사이에 MTHFR 유전자 다형성에는 차이가 없었다. MTHFR 677 TT 유전자 변형이 고호모시스테인혈증과 연관이 있었으나 이 두 가지 모두 말초혈관 질환의 위험성과는 통계적으로 유의한 관련이 없었다.

I. 서 론

고호모시스테인혈증 (hyperhomocysteinemia)은 정상인에서 심혈관계 질환의 독립적인 위험인자로 알려져 있다¹⁾. 만성 신부전 환자에서는 고호모시스테인혈증이 흔하게 관찰되고, 특히 말기 신부전 환자들은 정상 신기능을 가진 사람들에 비해 연령 대비 혈중 호모시스테인의 농도가 2~3배 상승해 있다²⁾. 만성 신부전 환자에서 혈중 호모시스테인의 농도가 상승하는 주 원인은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 현재까지 알려진 기전으로는 호모시스테인의 대사에 관여하는 효소의 유전적 결함과 조효소인 비타민 B₆, 비타민 B₁₂의 결핍이 있고, 또한 호모시스테인의 70%정도가 신장에서 제거되기 때문에 신기능 장애도 호모시스테인 농도의 상승에 주요 원인으로 생각되고 있다³⁾.

고호모시스테인혈증의 원인 중 유전적인 결함에 대해서는 1995년 처음 보고된 이후^{4,5)} 많은 연구가 진행되었다. 호모시스테인은 필수 아미노산인 메티오닌 (methionine)에서 시스테인 (cysteine)이 합성되는 과정의 중간 대사 물질이며, 메티오닌의 공급이 빠르게 필요할 경우 엽산과 비타민 B₁₂의 존재 하에 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)의 작용으로 호모시스테인이 재메틸화되면서 메티오닌이 합성된다³⁾. MTHFR은 1p36.3 염색체상에 위치하고, 단일 핵산 변이에 의한 MTHFR 유전자의 돌연 변이가 효소의 활성에 영향을 준다고 알려져 있다. MTHFR 677유전자에서 C→T의 치환 결과 알라닌 (alanine)이 발린 (valine)으로 바뀌게 되고, 그 결과 MTHFR의 활성도가 40%정도 감소하게 되며, 호모시스테인이 메티오닌으로 재메틸화되는 과정이 억제되어, 호모시스테인 농도가 증가하게 된다. 알려진 또

다른 돌연변이인 MTHFR A1298C는 A→C 치환으로 글루타민 (glutamine)이 알라닌으로 바뀌게 되어, 역시 MTHFR 효소 활성이 떨어지지만, 그 효과는 677의 변이보다 약하다고 알려져 있다⁶⁾.

이와 같은 원인들에 의해 고호모시스테인혈증이 나타나는데, 만성 신부전 환자에서 나타나는 고호모시스테인혈증의 의미는 확실치 않다. Bachmann 등은 혈액투석 환자에서 고호모시스테인혈증이 정상인에서와 마찬가지로 혈관질환의 독립적인 위험인자가 된다고 하였고⁷⁾, Killian 등 또한 말기 신부전 환자에서 고호모시스테인혈증이 동맥경화로 인한 합병증의 독립적인 위험인자가 된다고 보고하였다⁸⁾. 반면에, Mohamed 등은 혈액투석을 하는 환자에서 혈장 호모시스테인 농도의 절대값은 환자의 영양 상태, 단백질 섭취, 혈장 알부민 농도와 양의 상관관계를 보였고, 낮은 혈장 호모시스테인 농도를 가진 환자들에서 오히려 심혈관계 질환의 유병율과 전체 사망률 모두 더 높았다고 보고 하였다⁹⁾. 2003년 국내 연구 보고에서도 혈액 투석 환자에서 혈중 호모시스테인 농도에 따른 심혈관계 질환 합병증의 빈도는 차이를 보이지 않았다¹⁰⁾. 이와 같이 만성 신부전 환자에서 고호모시스테인혈증의 임상적 의의에 관해서는 많은 연구에도 불구하고 일치된 의견이 없는 상태이다.

이러한 배경에서, 최근 Wrone 등은 투석 환자들에서 심혈관계 질환의 발생은 혈중 호모시스테인의 농도와 관계가 없고, MTHFR C677T 유전자 돌연변이와 관련이 있음을 관찰하였고, MTHFR 유전자 다형성이 혈장 호모시스테인 농도보다 심혈관 질환을 예측하는데, 의미 있는 지표가 될 수 있다고 주장하였다¹¹⁾. Morimoto 등도 혈액투석 환자에서 MTHFR C677T 돌연변이가 심혈관 질환의 위험인자가 된다고 보고하여 관심을 끌고 있다¹²⁾. 또한, 혈액투석 환자에서 MTHFR C677T 돌연변이는 동정맥루폐

쇄의 중요한 위험인자라는 연구도 있었다¹³⁾. 이와 같이 MTHFR 유전자 다형성이 신부전 환자에서 혈장 호모시스테인 농도를 증가시킨다는 의미 외에 그 자체가 심혈관계 질환의 독립적인 위험인자가 된다면 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

한편, 말초혈관 죽상동맥경화증은 심혈관 질환의 위험인자로 알려져 있고, 전신적인 동맥경화의 믿을만한 지표가 된다⁴⁾. Ankle brachial index (ABI)는 말초혈관의 죽상경화 정도를 측정하는 방법 중에서 말초혈관질환의 병변을 진단할 수 있는 가장 간단하면서도 재연성이 높고 비침습적인 측정방법으로 알려져 있다^{14,15,16,17)}. ABI는 환자들의 연령, 당뇨 유무, 뇌혈관질환, 관상동맥질환, 고콜레스테롤혈증 등과 무관하게 말초혈관의 죽상경화증을 진단하는 방법으로 보고 되고 있으며¹⁸⁾, 실제 동맥 촬영을 해서 혈관 내의 죽상경화 정도를 비교해보았을 때 95%의 민감도와 100%의 특이도를 보인다고 한다¹⁹⁾.

따라서, 본 연구에서는 중등도 이상의 만성 신부전 환자에서 MTHFR 유전자 다형성이 일반인과 차이가 있는지 관찰하고, 또한 이것이 말초혈관 죽상경화의 독립적인 위험인자가 되는지 알아보려고 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

A. 연구 대상

2004년 7월부터 2005년 6월까지 1년간 이대목동병원 신장내과에 입원한 중등도 이상 (GFR 30 mL/min 미만)의 만성 신부전 환자 128명 (남자 60명, 여자 68명)을 대상으로 하였다. 환자들의 평균 연령은 61.9세 (25세~91세)였다. 대상 환자는 24시간 뇨검사에서 크레아티닌 청소율이 30 mL/min 미만인 투석 전의 환자와 안정된 혈액투석 혹은 복막투석 중인 환자로 하였다. 전체 환자 중 투석환자는 69명 (혈액투석 45명, 복막투석 24명)이었다. 감염이 있거나, 혈액학적으로 불안정한 환자들 (급성 심근경색, 심한 심부전, 위장관 출혈 등)은 대상에서 제외하거나, 1개월 이상 안정화된 다음 대상군에 포함시켰다. 환자들은 모두 적어도 3주 이상 매일 복합 비타민 (Renalmin[®]) 1정 (ascorbic acid 60 mg, biotin 300 μ g, calcium pantothenate 10 mg, cyanocobalamin 6 μ g, folic acid 1 mg, nicotinamide 20 mg, pyridoxine hydrochloride 10mg, riboflavin 1.7mg, thiamine nitrate 1.5mg)을 복용 중이었다. MTHFR 유전형 분석을 위한 대조군은 종합검진을 위해 내원한 정상 신기능을 가진 170명을 대상으로 하였다. 환자들에게 연구에 대한 충분한 설명을 하고 서면으로 동의서를 받았다.

B. 연구 방법

1. 생화학적 검사

대상 환자를 12시간 이상 금식하도록 한 후 citrate가 포함된 시험관에 혈액을 채취하여 원심분리하여 얻은 혈장을 -20°C 에 보관 하였다. 혈장 호모시스테인 측정을 위해서는 high performance liquid chromatography (HPLC) (Quest Diagnostics, Lyndhurst, USA)를 시행하였고, 혈장 비타민 B₁₂ 및 엽산은 radioimmunoassay (INC pharmaceutical, Lancaster, USA)를 사용하였다. 혈장 호모시스테인의 정상 상한치는 $12.4\ \mu\text{mol/L}$ 이었고, 비타민 B₁₂, 엽산의 정상 범위는 각각 $200\sim 950\ \text{pg/mL}$, $3\sim 17\ \text{ng/mL}$ 이었다. 그 외에 혈중 요소 질소(BUN), 혈장 크레아티닌, 콜레스테롤, 알부민, C-반응단백 (CRP) 등을 측정하였다.

2. MTHFR 유전자의 polymerase chain reaction (PCR) 분석

MTHFR 유전자 다형성을 측정하기 위해서 표준화된 PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 시행하였다. 환자군과 대조군의 정맥혈액 5mL를 EDTA가 함유된 시험관에 채취하여 DNA 추출 키트 (Nucleogen, Ansan, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 분리한 DNA 표본은 두 가지 유전자 다형성에 맞는 각각의 시발체로 증폭시켰다. 즉 677 유전자형에 대해서 sense primer는 5'-CCTTGAACAGGTGGAGGCC-3', antisense primer는 5'-CAAAGAAAAGCTGCG-TGATGAT-3'을 사용하였고, A1298C 에 대해서는 sense primer로 5'-GCAAGTC-CCCAAGGAGG-3', antisense primer로 5'-GGTCCCCACTTCCAGCATC-3'을 사용하였다. PCR 반응은 DNA를 증폭시키기 위해 94°C 에서 1분 동안 변성시킨 후, 60°C 에서 1분 동안 primer를 아닐링 (annealing)시킨 다음, 72°C 에서 1분 동안

primer 연장반응을 시행하는 과정을 40사이클 반복하였다. PCR 반응체를 MTHFR C677T를 인식하는 제한 효소 *Hin* F1과 A1298C를 인식하는 제한 효소 *Mbo* II로 37°C에서 12시간 반응시킨 후 2% 아가로스 젤에 전기영동을 하였다. MTHFR C677T의 경우 분해되지 않은 158bp의 띠는 정상적인 동형접합형 (CC), 158bp, 130bp, 28bp 의 세 개의 띠는 이형접합형 (CT), 130bp와 28bp의 두 개의 띠는 돌연변이의 동형접합형 (TT)으로 판독하였다. A1298C의 경우 29bp, 37bp, 79bp 의 세 개의 띠는 정상적인 동형접합형 (AA), 29bp, 37bp, 79bp, 108bp의 네 개의 띠는 이형접합형 (AC), 37bp, 108bp 두 개의 띠는 돌연변이 동형접합형 (CC)으로 판독하였다 (Figure 1).

3. ABI 측정

ABI의 측정은 혈액 검사일과 동일한 날에 시행하였다. ABI의 측정을 위해 모든 대상자는 실온에서 누운 자세에서 안정을 취한 후 상완과 종아리에 압박대를 한 후 손목의 요골 동맥 (radial artery)과 하지의 후경골동맥 (posterior tibial artery)의 수축기 혈압을 각각 측정하였다. 혈액투석 환자의 경우 대체적으로 혈압 변화가 심하지 않은 투석 시작 후 대략 2시간 정도 경과한 시점에서 동정맥루 반대편 상하지에서 측정하였다. ABI는 도플러 측정기 (Smartdop 30, HADECO, Japan)를 사용하였고, 상지와 하지의 수축기 혈압을 잰 후 Ankle systolic pressure / Brachial systolic pressure를 계산하여 구하였다.

ABI를 측정하여 0.9 이상은 정상, 0.9 미만은 말초혈관 질환이 있는 것으로 분류하였다. ABI에 영향을 주는 인자로는 이전 연구들에서 제시되었던 성별, 연령 (55세 이

상), 당뇨, 흡연 그리고 고혈압 등을 분석하였다^{20,21,22}. 고혈압은 항고혈압제를 복용 중이거나 ABI 검사 시 반복 측정된 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이거나, 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 경우로 정의하였고, 당뇨병은 세계보건기구의 기준에 따라 과거에 당뇨병을 진단 받았거나, 혈당강하 약물 또는 인슐린 치료를 받고 있는 경우로 하였다. 심혈관계 질환은 허혈성 심장질환 (심근 경색, 협심증)이 있거나, 대동맥 질환 (대동맥 박리, 대동맥류)으로 진단받았거나 치료받고 있는 경우를 포함하였고, 뇌혈관 질환은 뇌경색으로 진료 받았던 기록이 있는 환자를 포함 시켰다. 투석환자의 경우 투석 기간은 처음 투석 시작일로부터 혈액 검사를 시행한 날까지로 하였다. 모든 환자에서 신장과 체중을 측정하였고, 이로부터 체질량지수 (body mass index, BMI=체중(kg)/ [신장(m)]²)를 계산하였다¹⁴.

C. 통계 분석

호모시스테인, 비타민 B₁₂, 엽산 그리고 다른 혈액 검사 수치들과 같은 연속 변수는 “중앙값” 또는 “평균±표준편차”로 표시하였다. 통계분석은 SAS (SAS, version 9.0)프로그램을 이용하였고, MTHFR 유전자형에 따른 종속 변수 분석으로, 연속 변수는 다원분산분석 (ANOVA with Scheffe’s test for post-hoc analysis)를, 범주형 변수는 카이 제곱 검정 (Chi-square test)을 사용하여 비교 분석하였다. ABI에 영향을 주는 인자를 분석하기 위해서 단변량 회귀분석을 한 후 통계적 유의한 연관이 있을 것으로 생각 되는 변수들에 대해서는 다변량 회귀분석을 사용하였다. 혈장 비타민 B₁₂, 엽산 각각의 농도와 호모시스테인 농도의 연관성을 보기 위해서 피어슨

상관분석 (Pearson's correlation)을 시행하였다. MTHFR의 유전형에 따른 ABI 차이를 보기 위해 로지스틱스 회귀분석을 사용하였다. 모든 결과값은 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 해석하였다.

III. 결 과

A. 대상 환자의 임상적 특징

전체 환자군에서 만성 신부전의 원인으로는 당뇨병성 신증 (n=82), 고혈압성 신증 (n=23), 사구체신염 (n=6), 다낭성 신증후군 (n=10), 원인미상의 신부전 (n=7)으로 관찰되었다. 만성 신부전 환자에서 혈장 호모시스테인의 중앙값은 $19.9 \pm 10.3 \mu\text{mol/L}$ 였고, 87.9%에서 정상 상한치인 $12.4 \mu\text{mol/L}$ 보다 높게 나타났다. 혈장 비타민B₁₂의 평균 농도는 $1217 \pm 596 \text{ pg/mL}$ 로 증가되어 있었고, 엽산의 평균 농도는 $15.9 \pm 8.1 \text{ ng/mL}$ 로 정상 범위였다. 혈청 알부민 농도의 평균값은 $3.3 \pm 0.7 \text{ g/dL}$ 였다. 전체 환자들 중 당뇨는 88명 (68.8%)에서 있었고, 고혈압은 110명 (85.9%)에서 각각 나타났으며, 심혈관계 질환은 33명 (25.8%), 뇌혈관 질환은 16명 (12.5%)에서 관찰되었다 (Table 1).

B. MTHFR 의 분포 및 유전자형에 따른 특성

MTHFR 677 유전자의 분포는, 환자군에서 CC, CT, TT 형이 각각 43명 (33.59%), 61명 (47.66%), 24명 (18.75%)이었고, 대조군은 각각 55명 (33.95%), 85명 (52.49%), 32명 (13.58%)으로 두 군 간에 의미 있는 차이는 없었다. MTHFR 1298의 유전자형의 분포도 역시 환자군에서 AA, AC, CC 형이 각각 81명 (63.78%), 42명

(33.07%), 4명 (3.15%)이었고, 대조군의 경우에 86명 (51.81%), 74명 (44.58%), 6명 (3.61%)으로 두 군 간에 차이가 없었다(Figure 2).

MTHFR 677 유전자형에 따른 특성을 살펴보면, 혈장 호모시스테인 농도가 TT형에서 CC형을 보인 환자에 비해 높았고 ($23.5 \pm 16.1 \mu\text{mol/L}$ vs $16.7 \pm 6.6 \mu\text{mol/L}$; $p=0.0204$), C→T치환이 발생한 군인 CT+TT 군 또한 CC 군에 비해 혈장 호모시스테인 농도가 높게 나타났다 ($21.7 \pm 11.5 \mu\text{mol/L}$ vs $16.7 \pm 6.6 \mu\text{mol/L}$; $p=0.009$) (Table 2, Figure 3A). 혈장의 비타민 B₁₂ 나 엽산의 농도는 MTHFR 유전형에 따른 차이가 없었고, 심혈관계 질환의 빈도도 차이를 보이지 않았다. 신부전 환자 중 투석을 받고 있는 사람들의 비율도 유전형에 따른 차이를 보이지 않았다. 그 외 혈장 CRP 값이 CC 군에서 $4.97 \pm 5.95 \text{ mg/L}$ 로 CT 군의 $1.91 \pm 3.15 \text{ mg/L}$ 에 비해 통계적으로 유의하게 높은 것으로 분석되었다.

MTHFR 1298 유전자형의 경우, 호모시스테인을 비롯한 여러 인자들은 유전자형에 따른 차이를 보이지 않았다 (Table 3, Figure 3). 단, CRP 값이 AA 군의 $2.0 \pm 2.71 \text{ mg/L}$ 에 비해 AC 군에서 $5.56 \pm 6.31 \text{ mg/L}$ 로 증가되어 있었다 ($p=0.003$).

MTHFR C677T 와 A1298C 의 유전자 변이가 동시에 존재하는 경우 (이형접합형과 동형접합 변이형 모두 포함)와 변이가 없는 동형접합형 (자연형)인 경우로 나누었을 때, 두 군 간에 호모시스테인 농도는 차이가 없었다 (Figure 3C).

C. 혈장 비타민 B₁₂ 및 엽산과 호모시스테인 농도의 관계

환자군에서 혈장 비타민 B₁₂ 농도는 혈장 호모시스테인 농도와 음의 상관관계를 나타냈고 ($r=-0.305$, $p=0.0006$), 엽산 농도 역시 혈장 호모시스테인 농도와 음의 상관관계를 보였다 ($r= -0.29$, $p=0.001$) (Figure 4).

D. 말초혈관 질환의 위험인자

전체 만성 신부전 환자에서 평균 ABI값은 1.07 ± 0.27 (0.45-1.88)로 정상이었고, 분포를 보면 ABI<0.9인 환자는 36명 (28%), ABI≥0.9인 환자는 92명 (72%)이었다. 단변량 회귀분석을 한 결과 ABI는 성별, 연령 (55세 이상), 당뇨병의 유무, 투석 기간, 투석 방법, 혈장 호모시스테인 농도와 상관관계가 없었으며, MTHFR C677T 돌연변이나, A1298C 돌연변이 여부와도 상관관계가 없었다 (Table 4). ABI<0.9 인 군과 ABI≥0.9인 군 간에 혈장 호모시스테인의 농도 차이는 없었다 (Figure 5). 유의수준이 0.1 미만인 변수인 MTHFR 677TT 유전형, 당뇨 여부, 남자를 대상으로 한 다변량 선형회귀분석 결과에서 이들 변수는 ABI에는 영향을 주지 않았다 (Table 5).

만성 신부전 환자군 중 투석환자들만을 따로 분석한 결과 투석환자군의 평균 ABI값은 1.03 ± 0.26 (0.45-1.65)로 전체 환자군에서와 마찬가지로 정상이었다. ABI의 분포를 보면 ABI<0.9인 환자는 24명 (34.8%), ABI≥0.9인 환자는 45명 (65.2%)이었다. 단변량 회귀분석을 한 결과 ABI는 성별, 당뇨병의 유무, 투석 기간, 투석 방법, 혈장 호모시스테인 농도와 상관관계가 없었으나, 나이 (55세 이상), MTHFR 677 TT 유전형, A1298C 돌연변이와 상관관계가 있는 경향을 보였다 (각각 $p= 0.097$, $p=0.053$, $p=0.054$) (Table 6). 하지만, 유의수준이 0.1 미만인 변수인 MTHFR 677TT 유전형,

나이 (55세 이상), A1298C를 대상으로 다변량 선형회귀분석을 한 결과에서 모두 ABI에는 영향을 주지 않았다 (Table 7). ABI<0.9 인 군과 ABI≥0.9인 군 간에 혈장 호모시스테인의 농도 차이는 없었다.

E. MTHFR 유전자 다형성과 말초 혈관질환의 관계

MTHFR 677 유전형의 ABI 에 따른 분포를 보면, ABI≥0.9 인 군에서 CC, CT, TT 형이 각각 34 명 (37.0%), 43 명 (46.7%), 15 명 (16.3%) 이었고, ABI<0.9 인 군에서는 각각 9 명 (25%), 18 명 (50%), 9 명 (25%)로 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p=0.3325$) (Table 8A).

MTHFR 677 유전자 돌연변이가 ABI 에 미치는 영향을 알기 위해 ABI를 당뇨, 고혈압, 흡연 여부, 연령 (55세 이상), 투석 여부, 투석 방법, 투석 기간을 보정하여 로지스틱스 회귀 분석을 한 결과, CT형은 CC형에 비해 ABI <0.9일 위험도가 1.815 (CI:0.0451~3.155), TT형은 CC형에 비해 ABI<0.9 일 위험도가 3.226 (CI:0.672 ~ 15.625)으로 높았으나, 통계적으로는 유의하지 않았다 (각각 $p=0.4018$, $p=0.1435$) (Table 9A, Figure 6A). MTHFR 1298 유전형의 경우, CC형은 표본수가 적어 분석 하지 못했고, AC형과 AA형을 비교하였을 때, AC형이 AA형에 비해 ABI<0.9일 위험도는 0.244 (CI:0.065~0.916, $p=0.036$)으로 오히려 돌연변이가 일어난 이형접합형에서 말초 혈관질환의 위험도가 낮은 것으로 분석되었다. MTHFR C677T와 A1298C의 유전자 변이가 함께 있는 경우와 돌연변이가 없는 군을 비교하였을 때, 두 군 간에 ABI 값은 차이가 없었다 (Figure 6B).

투석환자군에서 ABI에 따른 MTHFR 677 유전형의 분포를 보면, ABI \geq 0.9인 군에서 CC, CT, TT 형이 각각 19명 (42.2%), 18명 (40.0%), 15명 (17.8%)이었고, ABI $<$ 0.9인 군에서는 각각 6명 (25%), 11명 (45.8%), 7명 (29.2%)으로 전체 만성 신부전 환자군의 분포와 차이가 없었고, 통계적으로도 유의한 차이가 없었다 ($p=0.310$) (Table 8B).

투석환자군에서 MTHFR 677 유전자 돌연변이가 ABI 에 미치는 영향을 알기 위해 ABI를 당뇨, 고혈압, 흡연 여부, 연령 (55세 이상), 투석 여부, 투석 방법, 투석 기간, 혈장 호모시스테인 농도를 보정하여 로지스틱스 회귀 분석을 한 결과, CT 형은 CC 형에 비해 ABI $<$ 0.9일 위험도가 3.311 (CI:0.622~17.544), TT형은 CC형에 비해 ABI $<$ 0.9 일 위험도가 1.969 (CI:0.295~13.158)으로 높았으나, 전체 신부전 환자군에서와 마찬가지로 통계적으로는 유의하지 않았다 (각각 $p=0.167$, $p=0.484$) (Table 9B).

Table 1. Baseline characteristics in total chronic renal failure patients*

Characteristics	Patients (n=128)
Male/female	60 (46.9%)/68 (53.1%)
Age at study (year)	61.9±13.4
Dialysis duration (year)	2.4±2.5
Serum creatinine (mg/dL)	6.9±4.2
Serum cholesterol (mg/dL)	170±46
Serum albumin (g/dL)	3.3±0.7
CRP (mg/L)	3.28±4.63
Total homocysteine (µmol/L)	19.9±10.3
Folate (ng/mL)	15.9±8.1
Vitamin B ₁₂ (pg/mL)	1217±596
Smoking (%)	65(50.8%)
Hypertension (%)	110(85.9%)
Diabetes mellitus (%)	88(68.8%)
Cardiovascular disease (%)	33(25.8%)
Cerebrovascular disease (%)	16(12.5%)
Dialysis (%)	69 (53.9%)
Hemodialysis (% in dialysis group)	45 (65.2%)
Peritoneal dialysis (% in dialysis group)	24(34.8%)

*Data present number (%) or mean±SD

CRP, C-reactive protein

Table 2. Profiles of total CRF patients according to MTHFR 677 genotypes*

Characteristics	CC (n=43)	CT (n=61)	TT (n=24)	p value
Male/female	21/22	29/32	10/14	>0.7
Age at study (year)	59.3±12.9	62.1± 14.6	65.9±9.8	0.1544
Dialysis duration (year)	2.1±2.7	2.4±2.3	3.0±2.5	0.548
Serum creatinine (mg/dL)	6.7±3.3	6.9±4.9	7.2±3.6	0.267
Serum cholesterol (mg/dL)	170±47	173±46	162±44	0.6212
Serum albumin (g/dL)	3.3±0.8	3.3±0.6	3.4±0.5	0.7378
CRP (mg/L)	4.97±5.95 [†]	1.91±3.15	3.15±3.67	0.0203
Total homocysteine (µmol/L)	16.7±6.6	21.0±9.2	23.5±16.1 ^{**}	0.0204
Folate (ng/mL)	16.7±7.6	14.4±8.4	18.0±8.2	0.1356
Vitamin B ₁₂ (pg/mL)	1319±578	1125±625	1255±536	0.269
Smoking (%)	23 (17.97%)	31 (24.22%)	11 (8.59%)	>0.7
Hypertension (%)	34 (26.56%)	54 (42.19%)	22 (17.19%)	0.2634
Diabetes mellitus (%)	32 (25.00%)	40 (31.25%)	16 (12.5%)	0.6132
Cardiovascular disease (%)	12 (9.38%)	14 (10.94%)	7 (5.47%)	0.7785
Cerebrovascular disease (%)	2 (1.56%)	8 (6.25%)	6 (4.69%)	0.0531
Dialysis patients (n=69)				
Hemodialysis (n=45)	15 (11.72%)	19 (14.84%)	11 (8.59%)	>0.7
Peritoneal dialysis (n=24)	10 (7.81%)	10 (7.81%)	4 (3.13%)	>0.7

*Data present number (%) or mean ± SD.

(%) means percentage of variables within each MTHFR genotype group

** p<0.05 versus CC genotype by one-way analysis of variance with Scheffe's post hoc comparisons.

† p<0.05 versus CT genotype by one-way analysis of variance with Scheffe's post hoc comparisons.

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure; CRP, C-reactive protein.

Table 3. Profiles of total CRF patients according to MTHFR 1298 genotypes*

Characteristics	AA (n=81)	AC (n=42)	CC (n=4)	p value
Male/female	39/42	21/21	0/4	0.154
Age at study (year)	60.5±14.3	64.1±11.4	64.8±11.1	0.319
Dialysis duration (year)	2.1±2.7	2.4±2.3	3.0±2.5	0.548
Serum creatinine (mg/dL)	6.8±3.41	7.5±5.4	3.4±1.5	0.167
Serum cholesterol (mg/dL)	168±46	174±49	169±33	0.782
Serum albumin (g/dL)	3.4±0.7	3.2±0.7	3.9±0.8	0.114
CRP (mg/L)	2.00±2.71	5.56±6.31**	3.83±5.52	0.003
Total homocysteine (µmol/L)	21.2±11.5	17.5±7.6	19.8±3.8	0.202
Folate (ng/mL)	16.1±8.7	16.2±8.3	15.4±6.7	0.985
Vitamin B ₁₂ (pg/mL)	1178±604	1402±649	1059±533	0.153
Smoking (%)	31 (38.3%)	34 (80.9%)	0 (0%)	>0.7
Hypertension (%)	73 (90.1%)	33 (78.6%)	3 (75%)	0.18
Diabetes mellitus (%)	51 (63.0%)	32 (76.2%)	4 (100%)	0.126
Cardiovascular disease (%)	22 (27.2%)	10 (23.8%)	1 (25%)	0.921
Cerebrovascular disease (%)	11 (13.6%)	4 (9.5%)	1 (25%)	0.61
Dialysis patients (n=69)				
Hemodialysis (n=45)	24 (29.6%)	20 (47.6%)	1 (25%)	0.375
Peritoneal dialysis (n=24)	16 (19.8%)	7 (16.7%)	1 (25%)	0.375

*Data present number (%) or mean ± SD.

(%) means percentage of variables within each MTHFR genotype group

**p<0.05 versus AA genotype by one-way analysis of variance with Scheffe's post hoc comparisons.

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure; CRP, C-reactive protein.

Table 4. Univariate regression analysis of factors affecting ABI in total CRF patients

Risk factors	β value	<i>p</i> value
Age \geq 55years	-0.12687	0.1012
Male sex	0.11858	0.0765
BMI (kg/m ²)	0.01212	0.2187
Smoking	0.05449	0.2413
Diabetes mellitus	-0.094	0.0598
Hypertension	-0.07087	0.2895
Hemodialysis	-0.09279	0.1902
Serum creatinine (mg/dL)	-0.00112	0.8718
Serum glucose (mg/dL)	0.0007	0.2444
Dialysis duration (year)	-0.01112	0.4245
Homocysteine (μ mol/L)	-0.016	0.857
MTHFR 677 genotype		
CT	-0.03138	0.5474
TT	-0.11302	0.092
CT + TT	-0.098	0.269
MTHFR A1298C		
	-0.145	0.105

ABI, ankle brachial index; BMI, body mass index; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure.

MTHFR A1298C was not divided into AC and CC in this analysis because patients with CC genotype were few.

Table 5. Multivariate linear regression analysis of factors affecting ABI in total CRF patients

Risk factors	β value	<i>p</i> value
Of MTHFR 677 genotype		
TT	-0.09419	0.11
Diabetes mellitus	-0.08916	0.0753
Male sex	0.0438	0.361

ABI, ankle brachial index; BMI, body mass index; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure.

Table 6. Univariate regression analysis of factors affecting ABI in dialysis subgroup within CRF patients group

Risk factors	β value	<i>p</i> value
Age \geq 55years	-0.202	0.097
Male sex	0.185	0.127
BMI (kg/m ²)	0.148	0.229
Smoking	0.059	0.632
Diabetes mellitus	-0.090	0.464
Hypertension	-0.088	0.473
Hemodialysis	-0.179	0.142
Serum creatinine (mg/dL)	-0.003	0.979
Serum glucose (mg/dL)	0.119	0.332
Dialysis duration (year)	-0.071	0.572
Homocysteine (μ mol/L)	-0.114	0.360
MTHFR 677 genotype		
CT	0.025	0.836
TT	-0.234	0.053
CT + TT	-0.175	0.150
MTHFR A1298C	0.233	0.054

ABI, ankle brachial index; BMI, body mass index, MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure.

MTHFR A1298C was not divided into AC and CC in this analysis because patients with CC genotype were few.

Table 7. Multivariate linear regression analysis of factors affecting ABI in dialysis subgroup within CRF patients group

Risk factors	β value	<i>p</i> value
Of MTHFR 677 genotype		
TT	-0.1	0.451
Age (≥ 55 years)	-0.271	0.031
MTHFR A1298C	0.265	0.058

ABI, ankle brachial index; BMI, body mass index; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure.

Table 8. Distribution of ABI according to MTHFR 677 polymorphism*

(A) In total CRF patients

	CC	CT	TT	CC	CT+ TT
ABI					
≥0.9	34 (37.0%)	43 (46.7%)	15 (16.3%)	34 (37%)	58 (63%)
<0.9	9 (25%)	18 (50%)	9 (25%)	9 (25%)	27 (75%)
			<i>p</i> =0.3325		<i>p</i> =0.1979

(B) In dialysis subgroup within CRF group

	CC	CT	TT	CC	CT+ TT
ABI					
≥0.9	19 (42.2%)	18 (40.0%)	8 (17.8%)	19 (42.2%)	26 (57.8%)
<0.9	6 (25%)	11 (45.8%)	7 (29.2)	6 (25%)	18 (75%)
			<i>p</i> =0.310		<i>p</i> =0.124

*Data present number (% in each ABI group).

ABI, ankle brachial index; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; CRF, chronic renal failure

Table 9. Univariate logistic regression analysis of odds ratio of MTHFR C677T mutation for ABI<0.9 in CRF patients

(A) In total CRF patients

	CT	TT
Odd ratio of ABI<0.9	1.815 (CI:0.451-3.155)	3.226 (CI:0.672-15.625)
<i>p</i> value	0.4018	0.1435

(B) In dialysis subgroup within CRF patients group

	CT	TT
Odd ratio of ABI<0.9	3.311 (CI:0.622-17.544)	1.969 (CI:0.295-13.158)
<i>p</i> value	0.167	0.484

Adjusting factors: diabetes, hypertension, smoking, age>55years, dialysis modality, dialysis duration, plasma homocysteine concentration

ABI, ankle brachial index; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase.

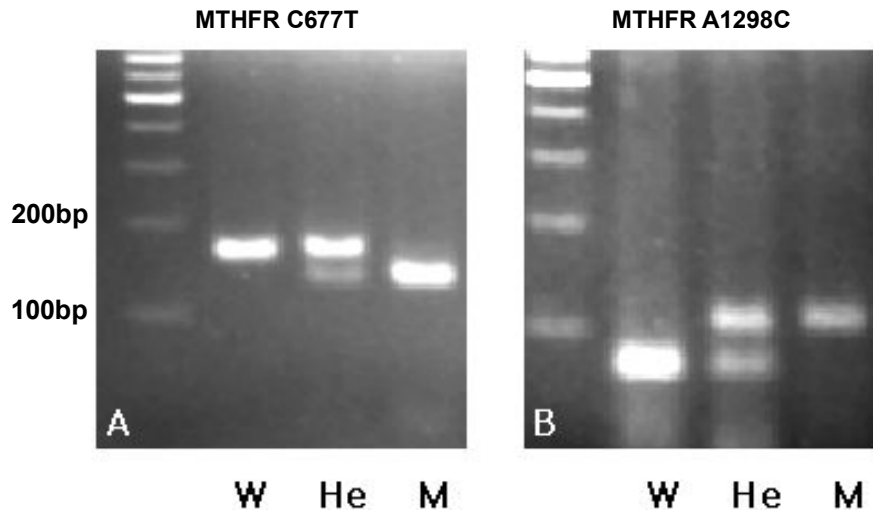


Figure 1. Polymerase chain reaction of MTHFR polymorphism

In MTHFR 677(panel A), W meant CC type, He meant CT type, M meant TT type. In 1298 (panel B), W meant AA, He meant AC, M meant CC type. For the case of nucleotide 677, undigested PCR product (158bp) indicated homozygous wild type (CC), three bands of 158bp, 130bp, and 28bp indicated a heterozygous (CT), and two fragments of 130bp,28bp indicated a homozygous variant (TT). For the case of nucleotide 1298, three fragments of 29bp, 37bp, 79bp indicated wild type (AA), four fragments of 29bp, 37bp, 79bp, and 108bp indicated heterozygous, and two fragments of 37bp, and 108bp indicated homozygous variant types.

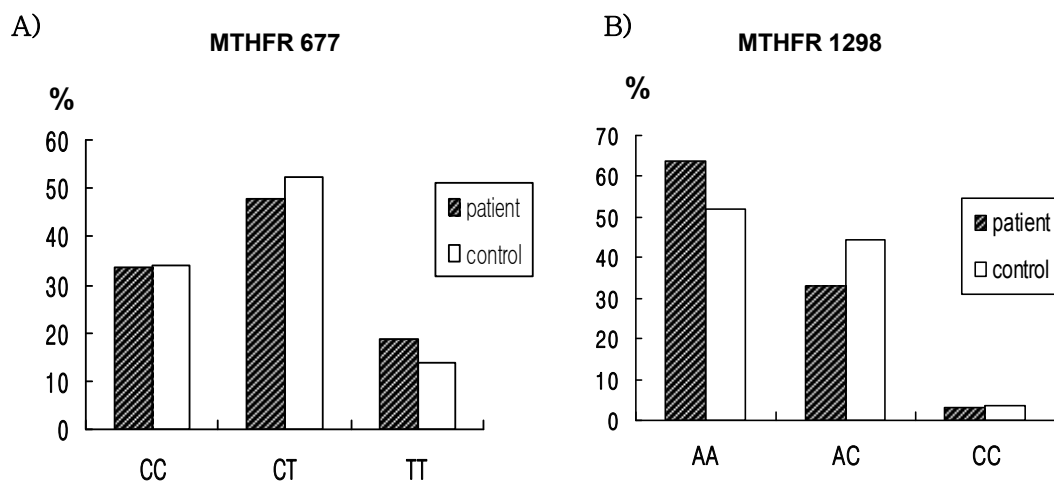


Figure 2. Distributions of MTHFR polymorphism

A) In Distribution of MTHFR 677 genotype, there were no significant differences between patients and control group, and B) in MTHFR 1298, also no significant difference was noted.

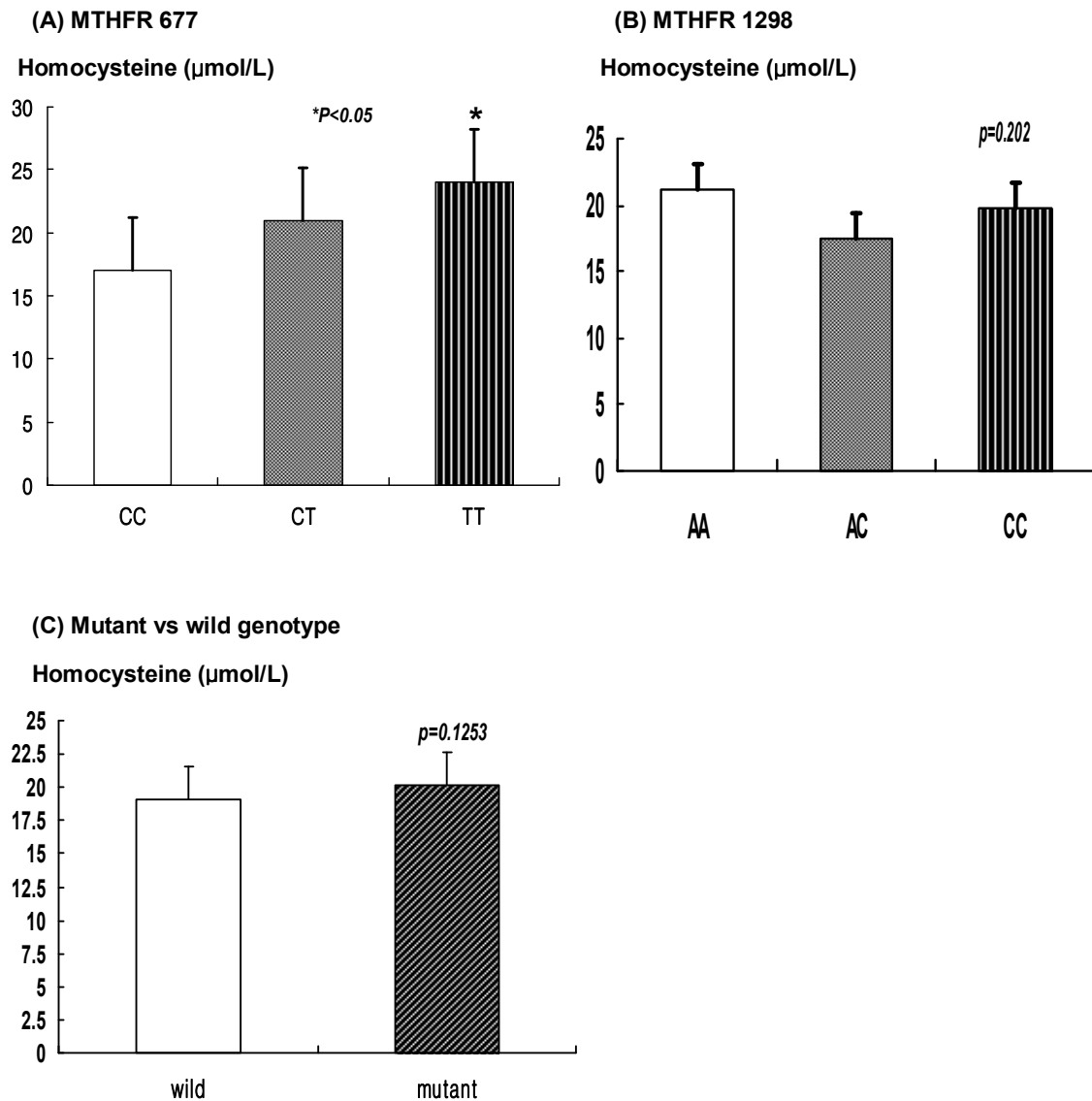


Figure 3. Plasma homocysteine concentrations according to MTHFR genotypes
 A) In MTHFR 677 type, significantly increased plasma homocysteine level was noted in TT group compared to CC group ($* p<0.05$ vs CC genotype) , but there were no significant differences between CC and CT. B) In the case of 1298 type, there were no significant differences according to genotypes. C) In the case of coexistent MTHFR 677 and 1298 mutations, no significant differences in mutant type were noted compared to wild type.

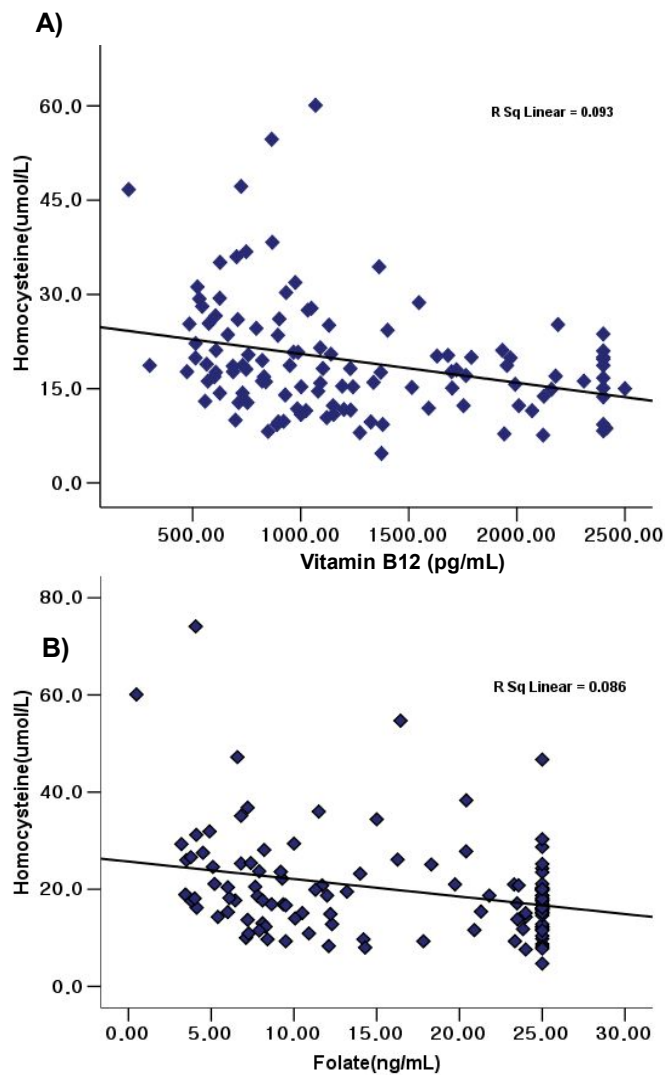


Figure 4. Correlations of homocysteine level with vitamin B₁₂ and folic acid level in CRF patients

Graph A) showed relationship between serum homocysteine concentration and Vitamin B₁₂, and serum homocysteine and vitamin B₁₂ level had a negative correlation ($r=-0.305$, $p=0.0006$). Graph B) showed relationship between serum homocysteine concentration and folic acid level, and there also negative correlation between homocysteine and folic acid level ($r= -0.29$, $p=0.001$).

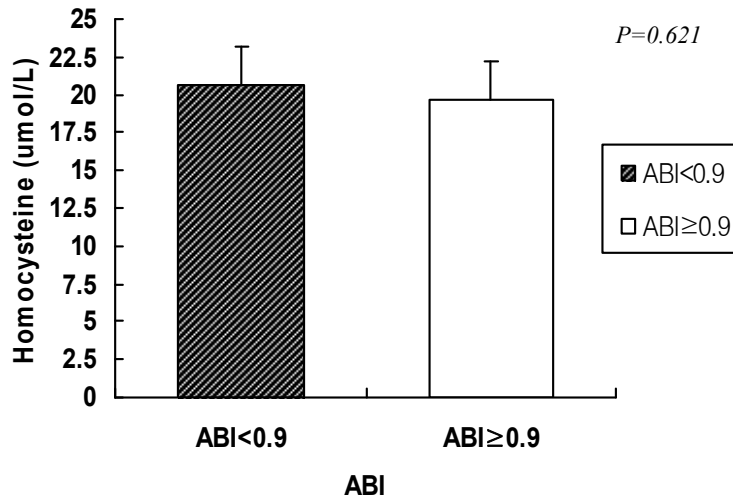


Figure 5. The relationship between plasma homocysteine levels and ABI
No significant differences in plasma homocysteine levels were noted between low ABI (ABI<0.9) and normal ABI groups ($p=0.621$).

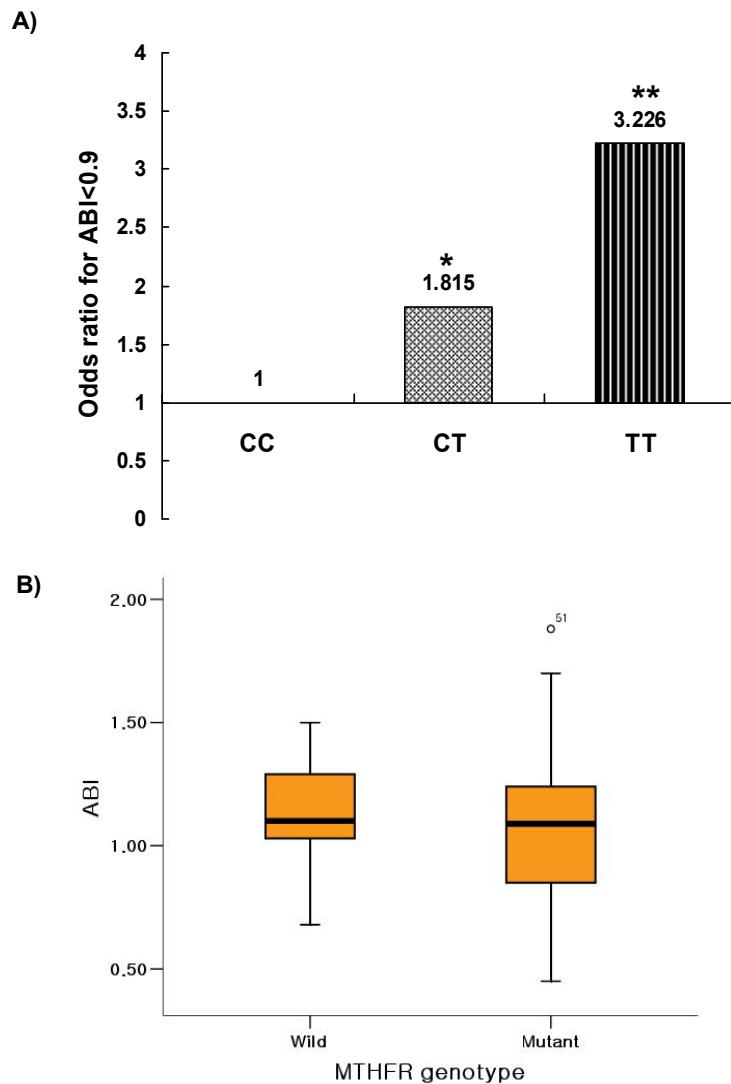


Figure 6. Effects of MTHFR polymorphism on peripheral atherosclerosis in CRF patients

A) In MTHFR 677 polymorphism, CT type showed trends that it had a higher odds ratio of peripheral atherosclerosis (ABI<0.9), but there were no statistical significance. As like this, TT type had a trend of higher odds ratio for peripheral atherosclerosis, however, there were no significant differences. B) In coexistence of MTHFR 677 and 1298 mutation, ABIs of each group showed no significant differences. * $p=0.4018$, ** $p=0.1435$.

IV. 고 찰

본 연구에서 한국인 만성 신부전 환자의 MTHFR 유전자 다형성의 분포는 일반인과 차이를 보이지 않았고, 677TT 유전형의 빈도는 18.3%로 이전의 연구 결과와 비슷한 빈도를 보였다²³⁾. 일반인에서의 분포도 677TT 유전형이 13.5%, 1298CC 유전형이 3.61%로 김 등이 발표한 각각 13.4%, 2%와 유사했다²⁴⁾.

본 연구에서 대부분의 만성 신부전 환자에서 고히모시스테인혈증이 나타났는데, 특히 MTHFR C677T 돌연변이는 고히모시스테인혈증과 밀접한 상관관계가 있었다. 이러한 결과는 투석환자군에서도 동일하게 나타났다. 이는 Wronc 등¹¹⁾ 이나 Hideki 등³⁾ 의 연구와 같은 결과였다. 반면, 국내 환자들을 대상으로 한 이 등의 연구에서 투석을 받고 있는 말기 신부전 환자에서 MTHFR 677 유전형에 따른 한국인의 혈장 호모시스테인의 농도 차이가 없었던 것과는 상반된 결과이다²³⁾. 따라서, 이 등의 연구에서 MTHFR 유전자형에 따라 호모시스테인 농도가 차이가 없었던 이유는 인종간에 따른 TT형의 발생빈도의 차이 때문이 아니었을 가능성이 있고, 이 등의 연구에서 환자들이 고농도의 엽산 (2mg/day)을 복용했던 것이 유전자형에 따른 호모시스테인 농도의 차이가 없었던 원인이 될 수는 있을 것으로 보인다. 한편, 본 연구에서 MTHFR A1298C 돌연변이는 혈장 호모시스테인 농도와 상관관계가 없어, 이전의 연구와 동일한 결과를 보였다²⁵⁾. MTHFR C677T 와 A1298C 돌연변이가 동시에 나타나더라도 혈장 호모시스테인의 농도에는 영향을 주지 않았는데, MTHFR 1298형 에서 AA형의 혈장 호모시스테인 농도가 상대적으로 높았기 때문으로 생각된다.

본 연구에서 MTHFR 677 유전자형의 분석에서는 CC 형이 TT형보다, MTHFR 1298 유전자형의 분석에서는 AC형이 AA형보다 CRP 농도가 높게 측정 되었다. 이는 Dedoussis 등의 연구에서 정상인 중 MTHFR 677 유전형 중 TT형을 가진 군에서 CRP, fibrinogen, 백혈구 수, 아밀로이드-a 수치 등의 염증지표가 CT형이나 CC형을 가진 군에 비해 의미 있게 높게 나타났던 것과는 상반된 결과로²⁶⁾ 이에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것이다. A1298C 유전자변이와 염증지표와의 상관관계를 본 이전의 연구는 찾아보기 어렵다.

만성 신부전 환자에서 혈장 비타민 B₁₂ 나 엽산의 농도는 혈장 호모시스테인 농도와 음의 상관관계를 보였는데, 환자들 모두 엽산의 농도가 정상치이거나, 정상 이상으로 유지되고 있었기 때문에, 혈장 호모시스테인 농도는 엽산의 보충만으로는 정상 수준까지 떨어지지 않는다는 것을 알 수 있다. 일반인에서는 혈장 호모시스테인의 농도가 엽산이나 비타민 B₁₂의 보충에 의해 쉽게 감소한다고 보고되어 있다²⁾. Wrone 등의 최근의 연구 결과에 따르면, 말기 신부전 환자에서 고용량의 엽산 (5mg, 15mg)을 투여해도 혈장 호모시스테인 농도는 엽산 1mg 을 투여하는 경우와 차이가 없었고, 심혈관계 질환의 이환율에도 차이가 없었다고 하였다²⁾. 본 연구에서도 하루 1mg의 엽산 투여로 환자군의 혈장 엽산의 농도가 정상 수준 이상인 것을 감안하면, 고용량의 엽산 치료는 불필요할 것으로 생각된다.

ABI 측정은 말초 혈관의 관류 상태를 객관적으로 평가할 수 있는 가장 간단하고 유용한 지표로 질병의 경중을 반영한다고 알려져 있다^{21,27,28)}. 본 연구에서 단변량 회귀분석한 결과에서 당뇨, 연령 (55세 이상), 체질량지수, 고혈압, 흡연 여부, 혈액투석, 혈장 호모시스테인 농도, 혈청 크레아티닌, MTHFR 유전자 다형성은 모두 ABI

에 영향을 주지 않았다. 투석환자군을 따로 분석한 경우 단변량 분석하였을 때, MTHFR 677TT 유전형은 ABI에 영향을 주는 경향을 보였지만, 다변량 회귀분석에서는 ABI와 상관관계가 없었다. 이 등의 연구에서는 혈액투석, 나이 (55세 이상), 투석 기간이 ABI에 영향을 주는 인자였다¹⁴⁾. ABI에 영향을 주는 인자에 관한 연구는 좀 더 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서는 만성 신부전 환자에서 MTHFR 유전자 돌연변이를 말초혈관 동맥경화의 독립적인 위험인자로 결론지을 수는 없었다. 다만, MTHFR 677 유전자 다형성의 경우 TT형이 CC형에 비해 통계적으로는 의미가 없었지만, 말초혈관 동맥경화의 위험도가 높은 경향 (odds ratio for ABI $<$ 0.9=3.226, p =0.1435)을 보였다. 투석환자군에서도 MTHFR 677 돌연변이와 말초혈관 동맥경화는 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다. Rebecca 등의 연구에서는 제 2형 당뇨병 환자에서 MTHFR C677T 유전자 돌연변이가 다른 전통적인 위험인자에 비해 당뇨병성 말초혈관질환의 중요한 위험인자라고 보고 하였다²⁹⁾. 또한 Lim 등의 연구 결과에서는 혈액투석을 받고 있는 말기 신부전 환자에서 MTHFR C677T 돌연변이가 총경동맥의 내-중막두께 (intima-media thickness; IMT)의 증가와 관련이 있었다³⁰⁾. 그리고, 최근의 11,162명의 심혈관계 질환 환자와 12,758명의 정상 신기능을 가진 사람들을 대상으로 대규모의 다기관 관찰 연구를 했던 결과를 보면, MTHFR 677TT 유전형은 심혈관 질환의 높은 위험인자로서 의미가 있었고, 이러한 관계는 특히 낮은 엽산 농도를 보이는 경우에서 두드러졌다³¹⁾. 이 결과는 만성 신부전 환자를 대상으로 한 연구는 아니지만, 대규모의 환자를 대상으로 한 연구로서 의의가 있다. 반면, Wronc 등은 말기 신부전 환자에서 MTHFR C677T 유전형이 심혈관계 질환의 중요한 지표라고 하였으나¹¹⁾, 그 후 2년

동안의 추적 관찰에서 심혈관계 질환으로 인한 병의 경과나 사망률에 영향을 미치지 않음을 보고하였다³²⁾. 또한, 다기관 연구에서 말기 신부전 환자의 MTHFR C677T 유전자 다형성은 심혈관계 질환이나 이로 인한 사망률과 연관이 없었다는 연구 결과가 있었다⁴⁾. Aucella 등의 최근 연구 결과 또한 MTHFR 유전형과 심혈관계 질환의 이환율 및 사망률 사이에 관련이 없었다고 하였다⁴⁾. 따라서, 본 연구의 결과와 다른 연구 결과들을 종합해 볼 때 MTHFR 유전자 다형성은 정상인이나 신부전 환자에서 고호모시스테인혈증의 독립적인 위험인자이지만, 만성 신부전 환자나 투석을 받고 있는 환자에서 MTHFR 유전자 다형성이 심혈관계 질환의 독립적인 위험인자인지는 확실하지 않다. 앞으로 ABI 이외의, 다른 심혈관계 질환을 측정할 수 있는 지표들과 MTHFR 유전자 다형성의 관련성에 대한 전향적인 대규모의 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

본 연구의 목표는 만성 신부전 환자에서 MTHFR 유전자 다형성이 심혈관계 질환의 위험인자인지를 알아보려고 하였다.

만성 신부전 환자로 연구에 포함된 대상은 총 128명이었고, MTHFR 유전형의 분포는 677 유전자형이나, 1298 유전자형 모두 대조군과 차이를 보이지 않았다. MTHFR C677T 돌연변이는 고호모시스테인혈증과 밀접한 관련이 있었으나, A1298C 형은 관련이 없었다. 혈장 비타민 B₁₂ 와 엽산 농도는 혈장 호모시스테인 농도와 음의 상관관계를 보였다. MTHFR C677T 돌연변이를 가진 군에서 말초혈관 동맥경화의 위험도가 높은 경향을 보였지만 통계적으로는 의미가 없었다.

만성 신부전 환자에서 MTHFR 유전자 다형성이 혈장 호모시스테인의 농도를 높이는 것 외에 심혈관계 질환의 독립적인 위험인자로 결론 내리긴 어렵고, 이에 대해서는 전향적인 대규모의 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. 1991. "Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease." *N Engl J Med*, 324: 1149-1155.
2. Richard Tremblay, Alain Bonnardeaux, David Geadah, Lambert Busque, Michel Lebrun, Denis Ouimet, Martine Leblanc. 2000. "Hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: effects of 12-month supplementation with hydrosoluble vitamins." *Kidney Int*, 58: 851-858.
3. Hideki Kimura, Fumitake Gejyo, Satoru Suzuki, Ryoichi Miyazaki. 2000. "The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation in hemodialysis patients." *J Am Soc Nephrol*, 11: 885-893.
4. Filippo Aucella, Maurizio Margaglione, Elvira Grandone, Mimmo Vigilante, Giuseppe Gatta, Mauro Forcell4, Maria Ktena, Alva De Min, Giovanna Salatin, Deni Aldo Procaccini, Carmine Stallone, Loreto Gesualdo, The Genetic Polymorphisms in Dialysis Study Group. 2005. "The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation does not influence cardiovascular risk in the dialysis population: results of a multicentre prospective study." *Nephrol Dial Transplant*, 20(2): 382-6.

5. Takamichi Nakamura, Katsu Saionji, Yoshimitsu Hiejima, Hideo Hirayama, Kiichiro Tago, Hajime Takano, Munemasa Tajiri, Masaki Kawabata, Makiko Funamizu, Yoshio Makita, Akira Hata. 2002. "Methylenetetrahydrofolate reductase genotype, vitamin B₁₂ and folate influence plasma homocysteine in hemodialysis patients." *Am J Kidney Dis*, 39: 1032-1039.
6. Manuela Fodinger, Walter H. Höler, Gere Sunder-Plassmann. 2000. "Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase." *J Nephrol*, 13: 20-33.
7. Jürgen Bachmann, Martin Tepel, Holger Raidt, Reiner Riezler, Ulrich Graefe, Klaus Langer, Walter Zidek. 1995. "Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients." *J Am Soc Nephrol*, 6: 121-125.
8. Killian Robinson, Anjan Gupta, Vincent Dennis, Kristopher Arheart, Debashish Chaudhary, Ralph Green, Paul Vigo, Ellen L. Mayer, Jacob Selhub, Michael Kutner, Donald W. Jacobsen. 1996. "Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations." *Circulation*, 94: 2743-2748.
9. Mohamed E. Suliman, Rashid Qureshi, Peter Bárány, Peter Stenvinkel, José C. Divino Filho, Björn Anderstam, Olof Heimbürger, Bengt Lindholm, Jonas

- Bergström. 2000. “Hyperhomocysteinemia, nutritional status, and cardiovascular disease in hemodialysis patients.” *Kidney Int*, 57: 1727-1735.
10. 김수현, 김영신, 류연주, 유금혜, 김미연, 최규복, 윤건일, 강덕희. 2003. “혈액투석 환자에서 혈중 호모시스테인 농도의 임상적 의의: 환자의 영양 상태와 동정맥 루폐쇄 사이의 상관을 중심으로.” *대한신장학회지*, 22(4): 405-413.
11. Elizabeth M. Wrone, Janmes L. Zehnder, John M. Hornberger, Linda M. McCann, Norman S. Coplon, Stephen P. Fortmann. 2001. “An MTHFR variant, homocysteine, and cardiovascular comorbidity in renal disease.” *Kidney Int*, 60: 1106 -1113.
12. Kan Morimoto, Takashi Haneda, Kiyotaka Okamoto, Hironori Ishida, Kenjiro Kikuchi. 2002. “Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism, hyperhomocysteinemia, and cardiovascular disease in chronic hemodialysis patients.” *Nephron*, 90: 43-50.
13. Mizuya Fukasawa, Kazumichi Matsushita, Manabu Kamiyama, Yuki Mikami, Isao Araki, Zentaro Yamagata, Masayuki Takeda. 2003. “The methylenetetrahydrofolate reductase C677T point mutation is a risk factor for vascular access thrombosis in hemodialysis patients.” *Am J Kidney Dis*, 41: 637-642.
14. 이영숙, 오희정, 강덕희, 윤건일, 최규복. 2003. “투석 환자에서 ABI (Ankle Brachial Index)와 말초혈관질환의 위험인자.” *대한신장학회지*, 22(6): 722-730.

15. Yrjö Leskinen, Juha P. Salenius, Terho Lehtimäki, Heini Huhtala, Heikki Saha. 2002. "The prevalence of peripheral arterial disease and medial arterial calcification in patients with chronic renal failure: requirements for diagnostics." *Am J Kidney Dis*, 40: 472-479.
16. Fishbane S, Youn S, Flaster E, Adam G, Maesaka JK. 1996. "Ankle-arm blood pressure index as a predictor of mortality in hemodialysis patients." *Am J Kidney Dis*, 27: 668-672.
17. de Vinuesa SG, Ortega M, Martinez P, Goicoechea M, Campdera FG, Luno J. 2005. "Subclinical peripheral arterial disease in patients with chronic kidney disease: prevalence and related risk factors." *Kidney Int*, 67(Suppl 93): S44-37.
18. Ann M. O'Hare, David V. Glidden, Caroline S. Fox, Chi-yuan Hsu. 2004. "High prevalence of peripheral arterial disease in persons with renal insufficiency. Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000." *Circulation*, 109: 320-323.
19. Belch JJ, Topol EJ, Agnelli G, Bertrand M, Califf RM, Clement DL, Creager MA, Easton JD, Gavin JR 3rd, Greenland P, Hankey G, Hanrath P, Hirsch AT, Meyer J, Smith SC, Sullivan F, Weber MA ; Prevention of Atherothrombotic Disease Network. 2003. "Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action." *Arch Intern Med*, 173: 884-892.

20. Alfred K Cheung, Mark J Sarnak, Guofen Yan, Johanna T Dwyer, Robert J Heyka, Michael V Rocco, Brendan P Teehan , Andrew S Levey, The Hemodialysis (HEMO) Study. 2000. "Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients." *Kidney Int*, 58: 353-362.
21. Dormandy JA, Rutherford RB. 2000. "Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC)." *J Vasc Surg*, 31(suppl 1): S1-S44.
22. O'Hare AM, Hsu CY, Bacchetti P, Johansen KL. 2002. "Peripheral vascular disease risk factors among patients undergoing hemodialysis." *J Am Soc Nephrol*, 13: 497-503.
23. Hyun-Ah Lee, Jong-Soon Choi, Kwon-Soo Ha, Dong-Ho Yang, Sung-Keun Chang, Ae-Yong Hong. 1999. "Influence of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on plasma homocysteine concentration in patients with end-stage renal disease." *Am J Kidney Dis*, 34: 259-263.
24. 김남근, 강금덕, 김한집, 김선희, 남윤성, 이수만, 정형민, 강석호, 안정용, 최병옥, 황성규, 오도연. 2002. "건강한 한국인에서 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T 와 A1298C) 유전자 돌연변이 연구." *Korean J. Genetics*, 24: 227-234.
25. Födinger M, Buchmayer H, Heinz G, et al. 2001. "Association of two MTHFR polymorphism with total homocysteine plasma levels in dialysis patients." *Am J Kidney Dis*, 38: 77-84.

26. George V.Z. Dedoussis, Demosthenes B. Panagiotakos, Christos Pitsavos, Christina Chrysohoou, John Skoumas, Despoina Choumerianou, Christodoulos Stefanadis, the ATTICA study group. 2005. "An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease." *Int J cardiol*, 100: 409-414.
27. Jonathan L. Halperin. 2002. "Evaluation of patients with peripheral vascular disease." *Thromb Res*, 106: V303-311.
28. Mary McGrae McDermott, Philip Greenland, Kiang Liu, Jack M. Guralnik, Lillian Celic, Michael H. Criqui, Cheeling Chan, Gary J. Martin, Joseph Schneider, William H. Pearce, Lloyd M. Taylor, Elizabeth Clark. 2002. "The ankle brachial index is associated with leg function and peripheral activity: the walking and leg circulation study." *Ann Intern*, 136: 873-883.
29. Rebecca L Pollex, Mary Mamakesick, Bernard Zinman, Stewart B Harris, Anthony JG Hanley, Robert A Hegele. 2005. "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes." *Cardiovasc Diabetol*, 4: 17-24.
30. Paik-Seong Lim, Wan-Ru Hung, Yau-Huei Wei. 2001. "Polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene: Its impact on plasma homocysteine levels and carotid atherosclerosis in ESRD patients receiving hemo-

- dialysis.” *Nephron*, 87: 249–256.
31. Mariska Klerk, Petra Verhoef, Robert Clarke, Henk J. Blom, Frans J Kok, Evert G. Schouthen, and the MTHFR studies collaboration group. 2002. “MTHFR 677 C→T polymorphism and risk of coronary heart disease.” *JAMA*, 288: 2015–2042.
 32. Elizabeth M. Wrone, John M. Hornberger, Janmes L. Zehnder, Linda M. McCann, Norman S. Coplon, Stephen P. Fortmann. 2004. “Randomized trial of folic acid for prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease.” *J Am Soc Nephrol*, 15: 420–426.
 33. Andrew G. Bostom, Bruce F. Culleton. 1999. “Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease.” *J Am Soc Nephrol*, 10: 891–900.
 34. Gere Sunder-Plassmann, Wolfgang C. Winkelmayr, Manuela Födinger. 2005. “Genetic aspects of hyperhomocysteinemia in chronic kidney disease.” *Semin Nephrol*, 26: 8–13.
 35. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom MJ. 1995. “Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia.” *Am J Hum Genet*, 56: 142–150.

Abstract

Methylenetetrahydrofolate Reductase
(MTHFR) Polymorphism
in Korean Chronic Renal Failure Patients
: Impacts on hyperhomocysteinemia and
Peripheral Atherosclerosis

(Directed by Professor Kyun-Il Yoon, M.D.)

Jung-Hwa Ryu, M.D.

Department of Medical Science

The Gradual School of

Ewha Womans University

Background/Aims: Recently, many studies have been published that prevalence of cardiovascular disease is associated with not increased plasma homocysteine

levels but methylenetetrahydrofolate (MTHFR) C677T gene polymorphism. It is very interesting if MTHFR polymorphism can be not only cause for hyperhomocysteinemia but also independent risk factor for cardiovascular disease or atherosclerosis. In this study, we analyzed MTHFR polymorphism in Korean chronic renal failure (CRF) patients, and investigated relationship between MTHFR polymorphism and peripheral atherosclerosis as well as plasma homocysteine level.

Methods: We reviewed the medical records of cases that admitted with 128 CRF patients including predialysis patients with GFR<30mL/min and end-stage renal disease patients with maintenance dialysis to the Nephrology department of Ewha Womans University Mokdong hospital between July 2004 and June 2005. We analyzed their MTHFR polymorphism by standard PCR/restriction fragment length polymorphism and measured their ankle brachial index (ABI) using blood pressure cuff and Doppler stethoscope. Blood samples for measuring plasma homocysteine, vitamin B₁₂, and folic acid were taken. 170 healthy patients without renal dysfunction were enrolled for control group, and their MTHFR genotypes were analyzed respectively.

Results: The distribution of MTHFR 677 polymorphism of Korean CRF patients was follows: CC genotype, 33.6%; CT genotype, 47.7% and TT genotype 18.7%. It

was not differ from that of control group. Significantly increased plasma homocysteine concentration was noted in TT group compared with CC group ($p<0.05$). The distribution of MTHFR 1298 polymorphism of CRF patients was follows: AA type, 63.78%; AC type, 33.07% and CC type 18.7%. Also it was not different from that of control group. Homocysteine levels according to MTHFR 1298 genotype showed no differences. There were no definite correlations between ABI and plasma homocysteine concentration. Plasma homocysteine levels showed negative correlation with plasma vitamin B₁₂ level as well as folic acid level, respectively ($r=-0.305$, $r=-0.293$, $p<0.001$). In whole patients group, there was a trend of lower ABI in TT group compared with CC group, but, there was no statistical significance (odds ratio for ABI<0.9 in TT; 3.226, $p=0.1435$). In dialysis subgroup within CRF patients group, this trend was also showed.

Conclusions: No difference of the distribution of MTHFR polymorphism was noted between CRF patients and healthy population. In CRF patients, MTHFR C677T mutation was closely associated with hyperhomocysteinemia, but both did not significantly influence to peripheral arterial disease.