



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



의학석사 학위논문

심혈관질환의 위험요인과
혈청 클로토의 연관성

Association between cardiovascular disease
risk factors and serum klotho

2023년 2월

서울대학교 대학원

의학과 예방의학 전공

융합과정 혁신의과학 전공

이재호

심혈관질환의 위험요인과 혈청 클로토의 연관성

지도 교수 민 경 복

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함
2022년 10월

서울대학교 대학원
의학과 예방의학 전공
융합과정 혁신의과학 전공
이 재 호

이재호의 의학석사 학위논문을 인준함
2023년 2월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

배경: 심혈관질환은 전 세계에 걸쳐 높은 사망률의 원인이 되는 질환 중의 하나이다. 심혈관질환의 발병률과 사망률을 감소하기 위해 위험요인들을 최소화해서 1 차예방을 하는 것이 권장되고 관련 주요 마커들의 찾아내는 필요성이 제기된다. 많은 선행연구에서 클로토의 결핍은 심혈관질환과 사망률을 예측하는 중요한 요인으로 제안되었다. 하지만 클로토와 관련한 심혈관질환의 위험요인에 대한 선행연구의 사례는 거의 없었다. 본 연구의 목적은 심혈관질환의 주요 위험요인들과 미국 성인들의 로그 혈청 클로토 수치 사이의 관계를 밝히는 것이다.

방법론: 본 자료는 2007-2016 년에 해당하는 미국 국민 건강 영양 조사를 이용했고 12,039 명의 연구 대상자를 포함한다. University of Washington 소속 연구실의 연구원이 직접 혈청 클로토 샘플을 이중으로 수집하고 분석 작업을 진행했다. Body Mass Index (BMI), 운동, 흡연, 음주, 고혈압, 이상지질혈증, 혈청 지질 매개변수들, 혈압 수치, 공복혈당, 당화혈색소 등이 주요 심혈관질환의 위험요인으로 고려했다. 주요 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토 수치 사이의 관계를 밝히기 위해 다변량 회귀분석과 비선형적 분석인 일반화가법모형, 그리고 제한된 삼차 스플라인을 수행하였다.

결과: 로그 혈청 클로토 수치는 과체중 ($\beta = -0.0290$, $p\text{-value}=0.0003$), 비만 ($\beta = -0.0257$, $p\text{-value}=0.0012$)군에서 정상 체중군들보다 낮았고, 현재 흡연 ($\beta = -0.0656$, $p\text{-value}<0.0001$)과 과거 흡연을 한 경우 ($\beta = -0.0380$, $p\text{-value}<0.0001$)도 흡연을 하지 않았던 경우보다 낮았으며 과한 음주군과 ($\beta = -0.0553$, $p\text{-value}<0.0001$) 적당한 음주군에서도 ($\beta = -0.0216$, $p\text{-value}=0.0112$) 음주를 아예 하지 않는 경우보다 낮았다. 이상지질혈증의 분석은 해당 질환이 없는 경우 질환이 있는 군보다 로그 혈청 클로토 수치가

0.0235pg/ml 만큼 높았다 ($p\text{-value} < 0.0001$). 로그 혈청 클로토 수치는 중성지방이 1mg/dL 증가할 때 0.0002pg/ml 만큼 감소했고 ($p\text{-value} < 0.0001$), 고밀도 콜레스테롤도 1mg/dL 증가할 때 0.0004pg/ml 만큼 증가했다 ($p\text{-value} = 0.0192$). 공복혈당 ($\beta = 0.0009$, $p\text{-value} < 0.0001$)과 당화혈색소에서도 ($\beta = 0.0226$, $p\text{-value} < 0.0001$) 각 1mg/dL 씩 증가할 때 높은 클로토 수치와 관련을 보였다. 로그 혈청 클로토의 성별 충화 분석에서는 이상지질혈증 ($p\text{-value} = 0.001$), High Density Lipoprotein (HDL) ($p\text{-value} = 0.0095$), 그리고 중성지방 ($p\text{-value} = 0.0047$)의 수치가 두 성별에서 유의한 차이를 나타냈다. 비선형적 분석에서는 로그 혈청 클로토의 수치와 중성지방, 고밀도 콜레스테롤, 공복혈당과 당화혈색소에서 유의한 비선형적 관계를 보였다.

결론: 로그 혈청 클로토의 낮은 수치는 높은 BMI, 흡연, 음주, 이상지질혈증, 지질 매개변수 (중성지방, 고밀도 콜레스테롤), 공복혈당, 당화혈색소를 포함한 특정 심혈관질환의 위험요인과 관련이 있다.

주요어: 클로토, 심혈관질환, 노화, 심혈관질환 위험요인, 콜레스테롤
학 번: 2021-24723

목 차

서 론	1
연구 방법	9
1) 연구 자료 및 대상	9
2) 심혈관질환의 위험요인	11
3) 혈청 클로토 (serum klotho)의 측정 방법	14
4) 보정 변수	15
5) 통계 분석 방법	16
연구 결과	18
1) 연구 대상자의 일반적 특성	18
2) 심혈관질환의 위험요인 연속형 변수들과 로그 혈청 클로토의 상관 관계 연관성	23
3) 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토의 관계	25
4) 성별 충화를 적용한 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토의 관계	40
5) 폐경에 따른 혈청 지질 매개변수와 로그 혈청 클로토의 관계	47
연구 고찰	50
결 론	57
참고문헌	58
Abstract	66

표 목차

[Table 1] A review of previous studies on the relevance of klotho and cardiovascular disease	7
[Table 2] Demographics of participants characteristics according to quartile of serum klotho.....	21
[Table 3] Pearson correlation between CVD risk factors and log – transformed klotho	24
[Table 4] Multivariate adjusted regression analysis of the association between CVD risk factors and log – transformed klotho	30
[Table 5] Adjusted multivariate regression analysis of the association between CVD risk factors and log – transformed klotho by gender stratification.....	43
[Table 6] The statistical significance difference of the multivariate regression coefficient estimates of the association between CVD risk factors and log – transformed klotho by gender stratification.....	46
[Table 7] Adjusted multivariate regression analysis of the association between serum lipids and log – transformed klotho for female by the period of menopause and the statistical difference of the coefficient estimates.....	49

그림 목차

[Figure 1] Flowchart of selecting study population.....	9
[Figure 2] Generalized additive models showing the association between log klotho and serum lipids. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	31
[Figure 3] Generalized additive models showing the relationship between log klotho and blood pressure. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	32
[Figure 4] Generalized additive models showing the association between log klotho and glucose. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	33
[Figure 5] Generalized additive models showing the association between log klotho and HbA1c. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	34
[Figure 6] Generalized additive models showing the association between log klotho and serum lipids considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.	35
[Figure 7] Generalized additive models showing the association between log klotho and blood pressure considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.	36
[Figure 8] Generalized additive models showing the association between log klotho and glucose considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.	37
[Figure 9] Generalized additive models showing the	

association between log klotho and HbA1c considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.....	38
[Figure 10] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and serum lipids. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	39
[Figure 11] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and blood pressure. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	40
[Figure 12] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and glucose. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	41
[Figure 13] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and HbA1c. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.....	42
[Figure 14] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and serum lipids considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income	43
[Figure 15] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and blood pressure considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income	44
[Figure 16] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and glucose considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income	45
[Figure 17] Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and HbA1c considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income	46

서 론

심혈관질환은 국내, 미국 등 전 세계에 걸쳐 높은 사망률의 원인이 되고 있는 질환 중의 하나이다[1]. 일반적으로 심혈관질환은 심장이나 혈관과 관련한 질병을 모두 종합적으로 가리키는데, 구체적인 질병으로는 뇌졸중, 고혈압성 심장병, 류마티스 심장병, 관상 동맥 질환, 그리고 기타 여러 혈관이나 심장질환들을 모두 포함한다[2]. 2017년을 기준으로 전 세계 인구 중 1700만명이 넘는 인원이 심혈관질환으로 사망을 하였고 향후 2030년에는 심혈관질환으로 인한 사망 인구수가 2300만명이 넘을 것이라는 관측도 존재한다[3, 4]. 우리나라의 경우도 심장질환이 전체 사망자 중에서 44.9%를 차지할 만큼 심각한 건강 문제라고 할 수 있다[5, 6]. 심혈관질환은 심장과 혈관의 장애까지 모두 포함하는 포괄적인 성격을 가지고 있기 때문에 심혈관질환과 심혈관질환의 위험요인으로 인한 사망률은 점점 더 높아지고 있고, 환자가 사망하지 않더라도 치명적인 합병증으로 이어질 수 있다[7, 8].

심혈관질환의 대표적인 위험요인은 연령, 성별, 유전과 같은 고정위험요인들 이외에도 건강행동요인으로 음주, 흡연, 운동의 여부와 건강상태요인으로 고혈압, 이상지질혈증, 당뇨병, 비만 등이 있다[9, 10]. 혈관질환의 발병률과 사망률을 감소하기 위해 위험요인들을 어느 정도 최소화해서 1차 예방을 하는 것이 필요하다. 최근 노령화 인구가 꾸준히 상승하는 추세를 보이고 있어 추후에도 심혈관질환으로 인한 문제는

점차 심화될 것으로 추정되므로 심혈관질환의 위험요인에 대한 지속적인 관리는 중요하다. 기존에 알려져 있는 위험요인과 더불어 최근에는 심혈관질환의 발생자에서 나타나는 혈중 바이오 마커의 각종 수치에서 유의하게 높은 관련성을 보인 연구들이 많아 이에 대해 확인하는 연구의 필요성이 제기된다[11].

클로토는 흔히 노화 방지 인자로 알려져 있고 신장, 부갑상선 및 뇌에서 발현하는 막횡단 (transmembrane) 단백질을 암호화한다[12]. 클로토는 크게 Membrane과 Secreted의 두 가지 형태로 존재한다 [12]. Membrane 클로토는 신세뇨관 세포에서 주로 발현되고 섬유아세포 성장인자 (Fibroblast Growth Factor, FGF)의 수용체와 복합체를 형성한다[13]. 또한, 인산 염이 소변으로 배설하도록 촉진하는 뼈 유래 호르몬으로 기능을 담당하는 것으로 알려져 있는 FGF-23의 필수 수용체로 기능을 담당하고 있다[13, 14]. Secreted 클로토의 경우는 혈액, 소변, 그리고 뇌척수액 (Cerebrospinal Fluid)에 존재한다[14]. 대체된 RNA splicing에 의해 직접 생성되거나 Membrane 클로토의 세포 외부 표면에서 방출되는 혈액으로 분비되는 특성을 가지고 있다[13, 15]. 따라서 Secreted 클로토는 FGF-23의 필수 수용체 역할을 담당하는 Membrane 클로토와는 다르게 여러 장기의 생화학적 작용을 담당하는 순환 물질의 기능을 하는 것으로 알려져 있다[14, 16]. 최근 클로토와 관련된 연구들은 전체적으로 유전자에 초점을 맞춰 진행되어 왔고 아직까지는 클로토 단백질의

생물학적 방법론에 관하여 정확하게 규명되어 있지 않고 있다[17].

클로토 단백질이 인슐린 유사 성장 인자1 (Insulin-Like Growth Factor-1, IGF-1)의 억제, 에너지와 미네랄 대사의 조절, 산화 스트레스 및 염증 반응의 억제 등 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있어서 더 많은 연구의 필요성이 제기된다[17, 18].

혈청 클로토의 낮은 수치는 만성 신장 질환에서의 염증성 바이오 마커, 암이나 당뇨병 등과 같이 질병과 많은 관련성이 있다[19–24]. 국내 병원의 자료를 바탕으로 한 연구 사례에서는 위암과 갑상선암에 비해 신장암을 앓고 있는 환자에서 낮은 혈청 클로토의 수치를 관측했고 클로토가 신장 이식 환자에서 나타날 수 있는 면역억제제와 관련된 산화 스트레스의 작용 원리로 암 발생의 표지자 역할을 할 수 있다고 밝혔다[19]. 신장 기증을 받은 연구대상자들의 기증을 받은 1년이 지난 시점에서의 추정 사구체 여과율 (Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR)과 기증자의 혈청 클로토 수치와 연관성이 있었다[20]. 신장 조직 이식 후에는 기증자의 혈청 클로토 수치가 높은 그룹에서 기증을 받은 환자들의 eGFR의 수치가 기증자의 혈청 클로토 수치가 낮은 그룹에서 기증을 받은 경우보다 상대적으로 높았다[20]. 신장 조직 발현의 역할을 담당하는 클로토가 기증을 받은 환자들의 신장 기능과 관련이 있다는 것을 보여준다[20]. 또한 클로토는 림프종 중에서 가장 흔한 림프종으로 알려진 미만성 큰 B세포 림프종 (Diffuse Large B Cell Lymphoma, DLBCL)의 발현과 진행

과정에 어느정도 관여를 하였다[21]. 미만성 큰 B세포 림프종의 발현이 확인된 많은 환자들에서 낮은 클로토의 수치가 관측됐다[21]. 또한 클로토가 DLBL 세포의 사멸을 유의하게 유도하여 종양 억제 인자의 역할을 담당하였다[21, 22]. 요산, C-반응성 단백질, 백혈구 수, 그리고 평균 혈소판의 용적 등과 같은 염증성 바이오 마커와 클로토 수치 간의 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다[21]. 당뇨병 전증 단계에 속한 개인의 혈청 클로토 수치는 대체로 감소하였고 당뇨병이 걸린 후에는 혈청 수치가 다시 정상으로 돌아왔다[24].

클로토의 유전적 다형성은 관상 동맥 질환의 조기 발병, 허혈성 뇌출증 및 죽상 동맥 경화증의 독립적인 위험인자로 간주된다 [25–29]. 이에 따라 심혈관질환과 클로토의 관계를 연구한 사례가 많이 존재하였다. 검증된 연구들의 사례에서 클로토는 내피 항상성과 혈관의 원활한 기능을 유지하며 혈관 석회화를 예방하고 보호하는 역할을 담당한다고 제시한다[30]. 혈액 투석을 진행하였던 환자 사례의 연구에서는 심혈관질환의 사망률 증가와 유의한 관계가 있었다[25]. 클로토의 감소된 수치는 투석 환자의 관상동맥질환 (Coronary Artery Disease, CAD) 및 좌심실 기능 장애 또는 만성 신장 질환 환자에서의 혈관 기능 장애의 위험을 증가시키는 요인이 되었다[26, 27]. 인구를 기반으로 한 단면 연구 사례에서는 클로토 수치가 CVD 발병의 확률과 반비례 관계가 있었다 (OR: 0.85, 95% CI: 0.72–0.99) [28]. 또한 건강한 성인에서의 감소된 클로토의 수치는 심외막 지방, 경동맥

내중막의 두께 및 상완 동맥의 유동 매개 확장과 관련성이 있었다[29]. 미국 성인을 대상으로 한 최근 연구에서는 클로토의 수치를 기준으로 4개의 집단으로 나누어 연구한 결과 4분위수에 해당하는 연구 대상자 집단보다는 1분위수에 해당하는 연구 집단에서 울형성 심부전 (OR: 1.46, CI: 1.09–1.97)과 심근경색증 (OR: 1.33, CI: 1.02–1.74)의 발생이 유의하게 높게 관측되었다[31]. 이와 같이 클로토와 심혈관 질환과의 관련성을 제시한 선행연구를 정리한 표는 <Table 1>과 같다.

앞서 언급된 선행 연구에서도 확인 가능하듯이 클로토의 수치는 심혈관질환의 질병 및 사망률을 예측하는 중요한 요인이다. 클로토의 낮은 수치가 심혈관질환의 높은 위험과 관련이 있다는 기존 연구의 사례들을 감안하였을 때 심혈관질환의 중요한 위험요인들이 클로토의 낮은 수치와 관련이 있다는 가설을 고려해볼 수 있다. 하지만 클로토의 수치가 심혈관질환의 대표적인 위험인자라고 알려진 흡연, 음주, 비만, 콜레스테롤의 각종 수치, 공복혈당, 당화혈색소, 운동 및 만성질환과 관련이 있다는 연구는 현재까지 드물어 연구의 필요성이 제기된다.

이러한 문제 의식에서 본 연구는 2007년부터 2016년까지 미국 성인을 대상으로 한 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)의 단면 연구 자료를 바탕으로 혈청 클로토와 심혈관질환의 대표적인 위험인자로 알려진 흡연, 음주, 비만, 콜레스테롤의 각종 수치, 공복혈당, 당화혈색소, 운동 및 만성질환과의 연관성을 알아

보고자 한다.

Table 1. A review of previous studies on the relevance of Klotho and cardiovascular disease

저자(년도)	연구 대상자	결과변수	연구결과
Dan E Arking (2005)	525 명의 아슈케나지 유태인	뇌졸중 발생 여부 심혈관 질환으로 인한 사망률	HDL-C, SBP 가 클로토 유전적 다형성 대립유전자와 관련이 있음. Heterozygous Individuals 가 Wild-type Individuals 보다 뇌졸중 위험이 유의하게 낮았고, Homogenous Individuals 가 유전적 다형성 대립유전자를 가진 경우에는 가장 높은 위험을 보임.
Juan F Navarro- González (2013)	441 명의 스페인 환자	관상 동맥 질환의 유무	심혈관질환 사망률의 경우는 Wild-type Individuals 가 2.15 배 (95%CI,1.18~3.91), Heterozygous Individuals 가 4.49 배 (95%CI,1.35~14.97) 증가하는 수치를 보임. 혈청 클로토의 낮은 수치는 관상 동맥 질환과 유의하게 연관되어 있음. 관상 동맥질환의 중증도에 따라 감소된 혈청 클로토와 관련성을 보임.

Maurits S Buiten
(2014)

1023 명의
이탈리아인 성인

좌심실 기능 장애 여부
및 질량

관상 동맥 질환 및
석회화 점수 지표
(CACscore)

복부 대동맥 석회화
점수 (AACscore)

울혈성 심부전

Jun-Peng Xu
(2022)

8,615 명의 미국
성인

관상 동맥 심장 질환

심근경색증

뇌졸중

협심증

혈청 클로토의 수치가 낮은 환자군에서 유의하게 더 높은 관상동맥질환
및 좌심실 기능장애를 보임.

보정 변수들을 고려하지 않은 분석에서는 좌심실 기능 장애의
여부와 혈청 클로토는 유의함.

보정 변수들을 고려한 분석에서는 혈청 클로토와 CACscore, AACscore,
그리고 좌심실 기능 장애의 여부 및 질량과는 독립적으로 연관되어
있지 않음.

울혈성 심부전과 심근경색증은 혈청 클로토의 수치를 기준으로 한 사분위
분석에서 4분위수에 해당하는 집단보다 1분위수에 해당하는 집단군에서
유의한 결과가 나옴.

Restricted cubic spline curves 분석에서 울혈성 심부전과 심근경색증은
혈청 클로토의 수치와 역-선형적인 관계가 있음.

연구 방법

1) 연구자료 및 대상

본 연구에서는 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)의 자료를 활용하였다. 자료는 미국의 Centers for Disease Control and Prevention에서 국민을 대상으로 실시하는 미국 단위의 대표되는 설문 조사, 신체 검사, 소변 및 혈액 검사이다. 미국 전 국민의 영양 상태와 건강을 파악하기 위하여 실시되며 1999년부터 현 시점까지 2년의 간격을 두면서 데이터를 공개적으로 웹사이트를 통해 배포한다. 미국인을 대상으로 매년 5,000여명을 선정하고 표본의 대표성과 신뢰성을 위하여 복합, 다단계, 확률 표본 설계를 이용한다.

본 연구의 NHANES 자료에서는 혈청 클로토에 대해 조사를 시행한 연구 대상자들을 선정하였다. 2007년부터 2016년까지 해당하는 전체 연구 대상자 50,588명의 응답자 중에 혈청 클로토 정보가 없는 33,203명을 제외하였고, 심혈관 질환 위험요인들의 변수들 중에 결측을 가지고 있는 4,867명을 추가적으로 제외시켰다. 마지막으로 공변량으로 정한 인구 통계학적 변수들 중에 결측이 존재하는 479명을 배제하였다. 최종적으로 총 12,039명을 연구 대상자로 선정하게 되었다.

연구 대상자를 선정하기 전 NHANES에 참여한 전체 대상자에게서 설문 조사 시행 전에 구두 및 서면 동의를 받았다. 본 연구의 프로토콜은 NCHS Research Ethics Review Board를 통하여 승인 심사를 받았다 <Figure 1>.

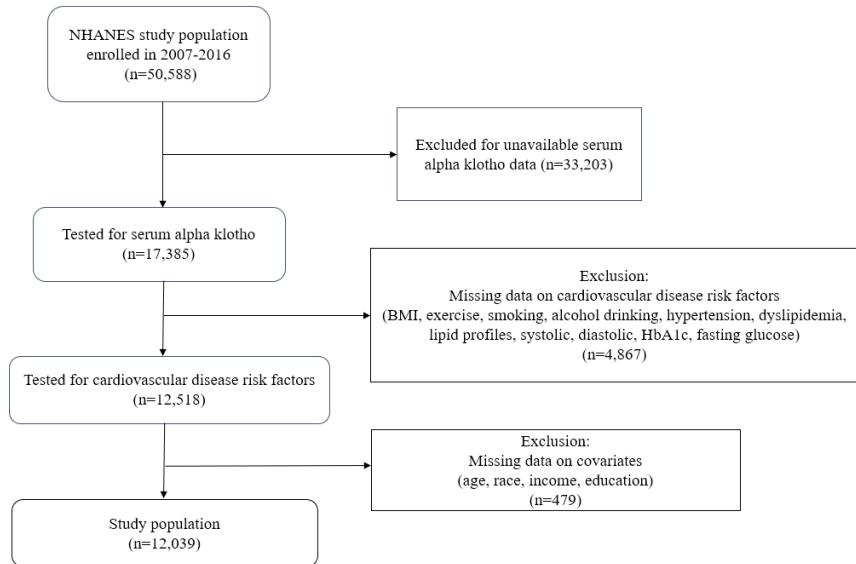


Figure 1. Flow chart of selecting study population

2) 심혈관질환의 위험요인

본 연구의 분석에서 활용한 심혈관질환의 위험요인 변수로 체질량지수 (Body Mass Index, BMI), 운동, 흡연, 음주, 고혈압, 이상지질혈증, 콜레스테롤 지표, 수축기 혈압, 이완기 혈압, 공복혈당, 당화혈색소를 포함했다.

- BMI

BMI는 개인의 체중을 키의 제곱으로 나누어 계산한 다음, 저체중 (<18.5kg/m²), 정상체중 (18.5~24.9kg/m²), 과체중 (25~29.9kg/m²), 비만 ($\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$)의 네 가지 그룹으로 분류하였다.

- 운동

운동 시행의 여부는 하루 최소 10분 이상 지속적으로 달리거나 유산소 운동과 같이 호흡이나 심박수를 크게 증가하는 격렬한 신체 활동을 정기적으로 하는 경우, 하루 최소 10분 이상 지속적으로 빠르게 걷기나 자전거 타기, 수영 또는 배구와 같은 적당한 강도의 신체활동을 하는 경우, 그리고 이에 해당하는 신체활동을 하지 않는 경우로 분류하였다.

- 흡연

흡연상태는 현재의 흡연, 현재 흡연을 하고 있지는 않지만 과거 흡연의 여부, 그리고 흡연을 과거에 한 번도 시행하지 않은 문항으로 구

분하였다.

· 음주

음주는 모든 종류의 알코올 음료를 최근 1년 기준으로 평균적으로 하루에 마신 양을 설문 항목을 활용하여 계산을 하였고 2015–2020년 Dietary Guidelines for Americans의 지침에 따라 음주를 하지 않는 집단, 가벼운 음주를 하는 집단, 적당한 음주를 하는 집단, 그리고 과한 음주를 하는 집단으로 구분하였다[32]. 지난 1년동안 음주를 하지 않는 대상자들은 성별에 관련없이 음주를 하지 않는 집단으로 분류하였고 남자와 여자 모두 평균적으로 하루에 0.5잔 미만 마시면 가벼운 음주를 하는 집단으로 포함하였다. 남자의 경우 평균적으로 하루에 0.5잔 이상 2.5잔 미만 마시면 적당한 음주를 하는 집단으로 분류하였고 여자의 경우 평균적으로 하루에 0.5잔 이상 1.5잔 미만 마시면 적당한 음주를 하는 집단으로 구분했다. 마지막으로 남자의 경우 평균적으로 하루에 2.5잔 이상 마시면 과한 음주를 하는 집단으로 분류하였고 여자의 경우 평균적으로 하루에 1.5잔 이상 마시면 과한 음주를 하는 집단으로 포함하였다.

· 고혈압

고혈압은 이완기 혈압이 높거나 ($\geq 90\text{mmHg}$) 수축기 혈압이 높은 경우로 ($\geq 140\text{mmHg}$) 정의하였다.

- 이상지질혈증

이상지질혈증은 다음 조건 중 하나라도 해당하면 정의하였다. 총 콜레스테롤 $\geq 240\text{mg/dL}$; 중성지방 $>200\text{mg/dL}$; 저밀도 지단백질 (Low Density Lipoprotein, LDL) 콜레스테롤 $\geq 160\text{mg/dL}$; 고밀도 지단백질 (High Density Lipoprotein, HDL) 콜레스테롤 $<40\text{mg/dL}$.

- 생화학적 지표들

NHANES 데이터 베이스에서 활용한 생화학적 지표들로 각 종 콜레스테롤 수치들, 공복혈당, 당화혈색소를 포함했다. 혈청 표본들을 수집하고 난 이후 생화학적 지표들의 특성에 따라 다른 방법을 사용하여 분석을 진행했다. 총 콜레스테롤과 중성지방은 효소적으로 측정이 진행됐다. 고밀도 콜레스테롤은 아포지단백 B 함유를 하고 있는 지질단백질과 렌더링을 한 후 측정을 진행하였다. 저밀도 콜레스테롤은 측정된 콜레스테롤의 지표들을 Friedewald 공식에 대입하여 수치를 산출하였다. 공복혈당은 oxygen rate 방법을 사용하여 혈청의 포도당 측정을 수행하였다. 당화혈색소는 고성능 액체 크로마토그래피 방법을 사용하여 측정을 진행하였다.

- 수축기 혈압과 이완기 혈압

연구 대상자들이 5분 동안 편하게 앉은 자세로 조용히 휴식을 취하고 난 후 Maximum Inflation Level이 결정된 다음 혈압 판독 값을 측정하였다. 혈압 측정이 중간에 그만둔 경우 재측정을 진행하였다.

3) 혈청 클로토 (serum klotho)의 측정 방법

혈청 클로토 샘플은 NHANES의 실험실 구성 항목 자료에서 수집하였다. 샘플을 급속 냉동하여 미국 조지아주 애틀랜타에 위치하고 있는 질병 통제 예방센터에서 -80°C 에 보관을 하였다. 이후 미국 워싱턴 대학의 대사, 내분비학, 영양학부의 Northwest Lipid Metabolism and Diabetes Research Laboratories는 4개의 냉동 샘플을 제외한 혈청 표본을 드라이아이스와 함께 넣어 운송하여 분석을 수행하였다. 수행한 분석의 상세 내용은 아래와 같다. 혈청 클로토 농도에 관한 정량은 효소면역분석인 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 키트 (IBL International, Japan)를 사용하여 수행되었다.

혈청의 샘플은 학교 소속 연구실의 연구원이 직접 모니터링 작업을 수행하였고 매일 이중으로 분석을 하여 기록하였다. 두 번 측정한 농도 값의 평균이 최종 값으로 결정됐다. 저농도 및 고농도의 혈청 클로토를 포함하는 2개의 품질 관리의 샘플에 대해서도 각 플레이트에서 이중으로 분석되었다. 분석 결과는 평가를 위하여 기기에서 Oracle Management System의 실험실로 자동 전송되었다. 만약 샘플의 중복 값이 10% 이상 차이가 존재하거나 샘플의 각 할당된 값이 표준편차 두 배의 범위를 벗어날 경우에는 분석 측정 과정이 재실행됐다. 하한 검출의 한계 범위는 6pg/ml 이었고 모든 샘플의 최종 값이 기준 범위를 초과하여 추가로 샘플 값에 대한 전처리 작업은 수행하지 않았다[33].

4) 보정 변수

본 연구에서는 인구 통계학적 변수를 공변량 변수로 지정하여 통제했다. 인구 통계학적 변수는 나이를 연속형 변수로 활용하였고, 인종의 경우는 멕시코계 미국인, 히스패닉계에 해당하지 않는 백인, 히스패닉계에 해당하지 않는 흑인, 아시아인, 그리고 이에 해당하지 않는 다국적인종들 및 히스패닉계로 범주화 하였다. 가구 소득은 연 \$45,000의 수입을 기준으로 구분하였으며, 학력은 고등학교 졸업을 하지 않는 경우, 고등학교 졸업을 했거나 대학 졸업 이상으로 범주화해서 분석을 진행하였다.

5) 통계 분석 방법

본 연구에서는 혈청 클로토 수치의 사분위수로 나누어 연구 대상자의 특성을 비교하였다. 혈청 클로토 수치의 경우 왼쪽으로 편중되어 있는 분포 (right-skewed)의 특성을 보이기 때문에 왜도를 줄이기 위해 로그 변환 과정을 진행했다. 연속형 변수에 대해서는 일원 분산 분석을 적용했고 범주형 변수에 대해서는 카이 제곱 검정을 사용했다. 연속형 변수는 평균과 표준편차로 제시하였고 범주형 변수는 숫자와 백분율로 제시하였다. 사분위수 분류에 따른 그룹 간의 수치에 대한 경향성은 p for trend를 이용했다. 심혈관질환의 위험요인 변수들 중 연속형 변수에 대해서는 혈청 클로토과 피어슨 상관계수의 연관성을 확인하였다.

혈청 클로토의 수치와 심혈관질환 위험인자요인 변수 간의 영향을 파악하기 위해 다변량 회귀분석을 사용하였다. 회귀분석의 경우 공변량으로 인구 통계학적 변수인 연령, 인종, 교육 그리고 소득을 사용하여 통제했다. 성별에 따른 충화 분석을 진행하여 하위 그룹 분석을 실시했다. 성별에 따른 차이의 계수가 통계적으로 유의한지 Wald Statistics를 수행했고 충화 변수인 성별과 각 심혈관질환 위험요인 변수들 간 교호작용이 존재하는지 p-interaction을 제시했다[34, 35]. 또한 특정 심혈관질환 위험인자요인의 연속형 변수들과 혈청 클로토의 비선형적 관계를 설명하기 위해 Generalized Additive Model (GAM)과 제한된 삼차 스플라인 (Restricted Cubic Splines)을 수행하였다[36, 37]. 심혈관질환 위험인자요인 변수들을

독립 변수로 간주하고 보정을 진행한 전후의 혈청 클로토의 평활
스플라인 기능의 추정한 값을 95% 신뢰구간 (95% CI)으로 시각화
하였다. GAM의 경우는 평활항의 복잡함을 나타내는 지표인 Effective
Degrees of Freedom (EDF)의 수치를 통해 비선형적 정도를 나타냈다.

모든 분석은 SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)의
PROC SURVEY와 R version 4.1.3 (Foundation for Statistical
Computing, Vienna, Austria)을 사용하여 수행하였다. 모든 검정은
양측으로 진행했고 통계적 유의 수준은 $\alpha = 0.05$ 로 설정하였다.

연구 결과

1) 연구 대상자의 일반적 특성

<Table 2>는 연구 대상자들의 인구학적 특성과 분석에서 고려한 심혈관질환의 위험요인들을 반영한 표이다. 총 분석에 12,039명을 포함하였고 혈청 클로토 수치의 사분위수에 근거한 기준으로 총 연구 대상자를 4개의 그룹으로 분류하였다.

전체 연구 대상자의 평균 나이는 대략 58세였고, 전체 대상자의 49.1%가 남성이었다. 혈청 클로토 수치의 4사분위에 해당하는 여성 집단에서 27.6%의 분포로 다른 1,2,3사분위에 해당하는 수치 보다 상대적으로 높은 분포를 보인 반면 남성 집단에서는 22.3%의 분포로 상대적으로 낮은 분포를 보였다. 인종의 경우, 아시아인들이 전체 대상자에서 가장 적은 분포 (6.3%)를 보였고, 기타에 해당하는 다국적 인종에서 높은 분포 (51.5%)를 나타냈다. 소득의 경우, 혈청 클로토 수치의 1사분위에 해당하는 저소득층 집단에서 (26.0%) 4사분위에 해당하는 집단보다 (24.7%) 상대적으로 높은 분포를 보였다. 혈청 클로토 수치의 4사분위에 해당하는 고소득층 집단에서 (25.4%) 1사분위에 해당하는 집단보다 (23.9%) 미세하게 높은 분포를 보이면서 저소득층 집단과는 다른 특징을 보였다. 하지만 클로토 수치의 사분위수 집단 간의 소득 분석에서는 통계적으로 유의한 결과 없이 판측되지는 않았다 ($p-value=0.0506$). 교육 수준의 경우, 고학력을 가진 인구 집단 대상자에서 높은 클로토 혈청 수치를 보였다. 학사 학위 이상을 가진 인구 집단에서 혈청 클로토 수치의 4사분위에

해당하는 집단이 (26.1%) 1사분위에 해당하는 집단 (23.1%)보다 높은 비율을 나타냈고, 고등학교 졸업 미만의 학력과 고등학교 졸업을 한 집단에서는 각각 1사분위에 해당하는 집단에서 (26.2%, 27.6%) 4사분위에 해당하는 집단보다 (24.7%, 22.9%) 높은 비율을 차지하였다.

정상 체중의 경우는 혈청 클로토 수치의 1사분위에 해당하는 집단에서 (23.0%) 4사분위에 해당하는 집단보다 (27.2%) 상대적으로 낮은 분포를 보였고 비만의 경우는 이와 반대로 1사분위에 해당하는 집단에서 (25.6%) 4사분위에 해당하는 집단보다 (24.8%) 상대적으로 높은 분포를 나타냈다. 하지만 BMI의 분석은 혈청 클로토 수치에 따른 사분위수를 구분한 집단 대상 군 차이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p\text{-value}=0.1011$). 격렬한 운동을 하는 경우, 4사분위에 해당하는 집단에서 (26.5%) 1사분위에 해당하는 집단보다 (21.8%) 상대적으로 높은 분포를 보였다. 운동을 아예 하지 않는 경우는 1사분위에 해당하는 집단에서 (26.1%) 4사분위에 해당하는 집단보다 (25.2%) 상대적으로 높았다. 현재 흡연을 하는 경우와 현재 흡연을 하고 있지는 않지만 과거 흡연을 하는 경우 모두 각각 1사분위에 속하는 그룹들이 (28.5%, 27.4%) 4사분위에 속한 그룹들보다 (21.7%, 22.6%) 높은 분포를 보였다. 과한 음주를 하는 경우에는 1사분위에 해당하는 연구대상자들보다 (26.6%) 4사분위에서 (24.1%) 낮은 분포를 보였다. 고혈압의 병력을 가지고 있는 연구대상자는 낮은 혈청 클로토 수치인 1사분위에 27.1%였고, 높은 혈청 클로토 수치인 4사분위에는 24.0%에 해당하였다. 이상지질혈증이 병력을 가지고 있는

연구대상자도 마찬가지로 낮은 혈청 클로토 수치인 1사분위에 26.2%였고, 4사분위에는 23.6%의 분포를 보였다. 심혈관질환의 위험요인 중 생화학적 지표들로 분류한 변수들 중에서는 중성지방의 수치가 1사분위에서 4사분위로 갈수록 평균적으로 수치가 감소하는 경향성을 나타냈다 (p for trend<0.0001). 공복혈당과 당화혈색소 모두 평균적으로 수치가 증가하는 양상을 보였지만 공복혈당은 (p for trend: 0.0787) 당화혈색소와는 (p for trend: 0.0010) 다르게 사분위수에 따른 경향성이 유의하지 않았다. 고밀도 콜레스테롤의 경우 혈청 클로토 수치가 높은 집단인 4사분위에서 수치가 낮은 1사분위보다 평균적으로 높은 콜레스테롤의 수치를 보였고 총 콜레스테롤은 1사분위에서 평균 수치가 4사분위보다 높았다. 수축기 혈압은 1사분위의 평균 혈압 수치가 4사분위에 속한 그룹의 평균 혈압 수치보다 높았고 이완기 혈압은 반대로 4사분위에 속한 그룹의 평균 혈압 수치가 높았지만 통계적으로 유의한 결과 없을 보이지 않았다 (p -value: 0.1639).

Table 2. Demographics of Participants characteristics according to quartile of serum klotho. Values are mean \pm SD or n (%)

serum klotho (pg/ml)	<655.5	655.5 to 803.5	803.5 to 992.3	≥ 992.3	p-value
N	3006	3012	3010	3011	
Age (y)	59.13 \pm 11.16	57.78 \pm 10.83	57.33 \pm 10.74	56.31 \pm 10.64	<.0001
Sex					<.0001
Male	1577 (26.69)	1579 (26.74)	1432 (24.24)	1319 (22.33)	
Female	1429 (23.30)	1433 (23.36)	1578 (25.74)	1692 (27.60)	
Race/Ethnicity					<.0001
Mexican American	225 (23.83)	241 (25.53)	256 (27.12)	222 (23.52)	
White	698 (25.87)	727 (26.95)	702 (26.03)	571 (21.65)	
Black	355 (24.81)	304 (21.24)	314 (21.94)	458 (32.01)	
Asian	153 (20.08)	202 (26.51)	209 (27.43)	198 (25.98)	
Other Race	1575 (25.39)	1538 (24.79)	1529 (24.64)	1562 (25.18)	
Income					0.0560
Low	1622 (25.99)	1528 (24.48)	1550 (24.84)	1541 (24.69)	
High	1384 (23.87)	1484 (25.60)	1460 (25.18)	1470 (25.35)	
Education					<.0001
Less than high school	870 (26.24)	830 (25.04)	798 (24.07)	817 (24.65)	
High school	735 (27.63)	633 (23.80)	682 (25.64)	610 (22.93)	
College or more	1401 (23.10)	1549 (25.54)	1530 (25.23)	1584 (26.13)	
BMI					0.1011
Underweight	30 (22.22)	33 (24.44)	36 (26.67)	36 (26.67)	
Normal weight	631 (23.01)	687 (25.04)	680 (24.79)	745 (27.16)	
Overweight	1066 (25.61)	1061 (25.49)	1044 (25.08)	992 (23.82)	
Obesity	1279 (25.59)	1231 (24.63)	1250 (25.01)	1238 (24.77)	
Exercise					0.0003
Vigorous	401 (21.84)	449 (24.46)	499 (27.18)	487 (26.52)	
Moderate	838 (24.43)	924 (26.93)	849 (24.74)	820 (23.90)	
None	1767 (26.09)	1639 (24.20)	1662 (24.54)	1704 (25.17)	
Smoking					<.0001
Current smoking	680 (28.52)	624 (26.17)	563 (23.62)	517 (21.69)	
Experienced at the past	962 (27.40)	904 (25.75)	852 (24.27)	793 (22.59)	
None	1364 (22.20)	1484 (24.15)	1595 (25.96)	1701 (27.69)	
Alcohol drinking					0.0049
Heavier	481 (26.59)	457 (25.26)	436 (24.10)	435 (24.05)	
Moderate	1082 (24.34)	1153 (25.94)	1130 (25.42)	1080 (24.30)	
Light	668 (24.26)	692 (25.14)	708 (25.72)	685 (24.88)	

None	775 (25.56)	710 (23.42)	736 (24.27)	811 (26.75)	
Hypertension					0.0022
Yes	848 (27.14)	797 (25.50)	731 (23.39)	749 (23.97)	
No	2158 (24.21)	2215 (24.85)	2279 (25.57)	2262 (25.37)	
Dyslipidemia					0.0094
Yes	1192 (26.19)	1164 (25.57)	1122 (24.65)	1074 (23.59)	
No	1814 (24.23)	1848 (24.68)	1888 (25.22)	1937 (25.87)	
Lipid Profiles (mg/dL)					
HDL	52.90 ± 17.12	52.67 ± 16.58	53.37 ± 16.63	53.88 ± 16.94	0.0351
LDL	115.39 ± 37.54	118.83 ± 35.38	118.16 ± 35.70	117.33 ± 34.81	0.9451
TG	145.18 ± 100.82	137.52 ± 96.70	132.26 ± 98.84	127.36 ± 97.44	<.0001
Total Chol	198.90 ± 45.64	198.99 ± 41.77	199.27 ± 40.26	198.40 ± 42.67	0.0254
Blood Pressure (mm Hg)					
Systolic blood pressure	129.05 ± 19.00	128.11 ± 18.66	127.09 ± 18.61	127.10 ± 18.58	<.0001
Diastolic blood pressure	71.08 ± 12.99	72.07 ± 12.48	72.35 ± 12.12	72.17 ± 12.53	0.1639
Glucose (mg/dL)	110.37 ± 28.08	112.31 ± 36.23	112.51 ± 36.25	121.63 ± 53.62	<.0001
HbA1c (%)	5.89 ± 0.95	5.91 ± 1.06	5.92 ± 1.10	6.12 ± 1.49	<.0001

Income: low (Total annual family income <\$45,000) and high (Total annual family income ≥ \$45,000)

HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein; TG: Triglyceride; Total Chol: Total Cholesterol.

HbA1c: Hemoglobin A1c.

2) 심혈관질환의 위험요인 연속형 변수들과 로그 혈청

클로토의 상관 관계 연관성

<Table 3>은 심혈관질환의 위험요인 변수들 중 연속형 변수에 해당하는 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤, 중성지방, 총 콜레스테롤, 이완기, 수축기에서의 혈압 수치, 공복혈당, 당화혈색소와 로그 혈청 클로토 수치 간의 상관 관계를 확인하였다.

로그 혈청 클로토와 고밀도 콜레스테롤과의 상관계수는 0.0201로 통계적으로 유의한 결과가 나왔고 ($p\text{-value}=0.0275$), 저밀도 콜레스테롤과의 상관계수는 0.0151이나 통계적으로 유의한 결과가 나오지는 않았다 ($p\text{-value}=0.2548$). 중성지방과의 상관계수는 음의 방향인 -0.0606으로 유의한 결과가 나왔다 ($p\text{-value}<0.0001$). 총 콜레스테롤과의 상관계수는 음의 방향인 -0.0099가 나왔지만 통계적으로 유의한 결과를 나타내지는 않았다 ($p\text{-value}=0.2786$). 수축기에서의 혈압 수치와는 음의 상관계수인 -0.0455였고 ($p\text{-value}<0.0001$) 이완기에서의 혈압 수치와는 양의 상관계수인 0.0278이었다 ($p\text{-value}=0.0022$). 공복혈당 ($r=0.0988$, $p\text{-value}<0.0001$), 당화혈색소는 ($r=0.0697$, $p\text{-value}<0.0001$) 로그 혈청 클로토와 모두 양의 상관계수를 나타냈다.

Table 3. Pearson correlation between CVD risk factors and log-transformed klotho

Continuous variable	log klotho (pg/ml)	
	r	p-value
Lipid Profiles (mg/dL)		
HDL	0.0201	0.0275
LDL	0.0151	0.2548
TG	-0.0606	<.0001
Total Chol	-0.0099	0.2786
Blood Pressure (mm Hg)		
Systolic blood pressure	-0.0455	<0.0001
Diastolic blood pressure	0.0278	0.0022
Glucose (mg/dL)	0.0988	<0.0001
HbA1c (%)	0.0697	<0.0001

3) 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토의 관계

<Table 4>는 공변량 변수를 보정하지 않은 단변량 회귀분석과 인구통계학적 변수를 보정한 다변량 회귀분석의 결과 값이다. 전체 연구 모집단에서 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토 사이의 연관성을 보여준다. 본 연구에서 활용한 다변량 회귀분석의 경우, 인구 통계학적 변수들인 나이, 인종, 교육 수준, 그리고 수입을 공변량으로 활용하여 분석을 진행하였다.

보정하지 않은 모델에서 과체중과 비만의 분석은 정상 체중의 그룹보다 로그 혈청 클로토 수치가 0.031과 0.025만큼 낮아졌다 ($p-value < 0.0001$; $p-value = 0.0010$). 저체중 분석에서는 정상 체중의 그룹보다 0.0110만큼 수치가 높았지만 결과가 유의하지는 않았다 ($p-value = 0.7000$). 격렬한 운동은 적당한 운동을 한 대상자들보다 로그 혈청 클로토 수치가 0.0200만큼 높았고 ($p-value = 0.0263$) 운동을 전혀 하지 않는 경우는 적당한 운동을 한 대상자들보다 로그 혈청 클로토 수치가 0.0016만큼 낮은 연관성을 보였지만 결과는 유의하지 않았다 ($p-value = 0.8067$). 흡연의 경우, 현재 흡연 ($\beta = -0.0633$)과 현재 흡연을 하지는 않지만 과거 흡연을 한 대상자들의 분석에서 ($\beta = -0.0530$) 로그 혈청 클로토의 수치와 모두 음의 관계를 보였다 ($p-value < 0.0001$; $p-value < 0.0001$). 과한 음주와 ($\beta = -0.0309$) 로그 혈청 클로토의 분석은 음주를 하지 않은 경우와 비교하였을 때 적당한 음주나 가벼운 음주보다 상대적으로 높은 음의 관련성을 보였다 ($p-$

value=0.0047). 고혈압의 분석과 이상지질혈증 분석의 모든 경우 질환이 있는 그룹으로 기준을 지정하였을 때 로그 혈청 클로토의 수치가 각각 0.0248과 0.0231만큼 높았다 ($p\text{-value}=0.0003$; $p\text{-value}<0.0001$). 혈중 지질의 분석에서는 네 가지 종류의 지표 중에서 HDL의 수치만 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0004만큼 높았고 ($p\text{-value}=0.0233$), 중성지방의 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0002만큼 낮았다 ($p\text{-value}<0.0001$). 수축기 혈압의 수치가 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0001만큼 낮아졌지만 ($p\text{-value}<0.0001$), 이완기 혈압의 수치가 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0007만큼 증가하였다 ($p\text{-value}=0.0036$). 공복혈당의 수치는 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0008만큼 높았고 ($p\text{-value}<0.0001$), 당화혈색소의 수치도 1mg/dL 증가할 경우 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0188만큼 높아졌다 ($p\text{-value}<0.0001$).

공변량을 보정한 다변량 회귀분석의 결과를 보면 과체중 분석에서 정상체중보다 0.0290만큼 로그 혈청 클로토의 수치가 낮아졌고, 비만의 분석에서도 동일하게 0.0257만큼 수치가 낮아졌다 ($p\text{-value}=0.0003$; $p\text{-value}=0.0012$). 격렬한 운동은 적당한 운동을 하는 대상자들보다 0.0040만큼 로그 혈청 클로토의 수치가 증가하였지만 단변량 회귀분석 결과와는 다르게 유의하지 않았다 ($p\text{-value}=0.6666$). 현재 흡연을 하는 대상자들과 현재 흡연을 하고 있지는 않지만 과거 흡연을 하였던 대상자들은 전혀 흡연을 하지 않았던 그룹의 사람들보다 각

각 0.0656과 0.0380만큼 감소된 로그 혈청 클로토의 수치를 보였다 ($p\text{-value} < 0.0001$; $p\text{-value} < 0.0001$). 과한 음주와 적당한 음주를 하는 대상자들은 음주를 하지 않은 대상자들보다 각각 0.0553과 0.0216만큼 감소된 로그 혈청 클로토의 수치를 나타냈다 ($p\text{-value} < 0.0001$; $p\text{-value} = 0.0112$). 이상지질혈증의 분석에서는 질환이 있는 대상자들보다 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0235만큼 증가하였지만 ($p\text{-value} < 0.0001$), 고혈압의 분석은 단변량 회귀분석의 결과와는 다르게 유의한 결과가 나오지 않았다 ($p\text{-value} = 0.1513$). 혈중 지질의 분석은 단변량 회귀분석의 결과와 마찬가지로 HDL이 1mg/dL 증가할 때 수치가 0.0004만큼 증가하였고 ($p\text{-value} = 0.0192$), 중성지방은 1mg/dL 증가할 때 수치가 0.0002만큼 로그 클로토의 수치가 감소하였다. 수축기 혈압의 수치와 이완기 혈압의 수치는 단변량 회귀분석 결과 값과는 다르게 다변량 회귀분석에서 모두 로그 혈청 클로토의 수치와 관련성을 보이지 않았지만 공복혈당의 수치와 당화혈색소의 수치는 단변량 회귀분석 결과 값과 마찬가지로 1mg/dL 증가할 때 로그 혈청 클로토의 수치가 각각 0.0009, 0.0266만큼 높았다 ($p\text{-value} < 0.0001$; $p\text{-value} < 0.0001$).

<Figure 2>, <Figure 3>, <Figure 4>, <Figure 5>에서는 심혈관 질환 위험요인 중 연속형 변수를 독립 변수로 설정하였을 때 일반화가법 모형을 사용하여 로그 혈청 클로토의 평활 스플라인 기능의 추정한 값을 시각화 하였다. <Figure 6>, <Figure 7>, <Figure 8>, <Figure 9>는 인구 통계학적 변수들을 기준 모델에 모두 고려하였을 때 일반화가법을 사용하여 로그 혈청 클로토의 평활 스플라인 기능의 추정한 값을 시각화

하였다. 공변량의 보정을 적용하지 않는 <Figure 2>에서 중성지방의 EDF는 5.287 ($p\text{-value} < 0.0001$)이었고 HDL의 EDF는 3.433 ($p\text{-value} = 0.0004$)로 모두 유의하였다. 공변량의 보정을 적용하지 않는 <Figure 4>에서 공복혈당의 EDF는 4.606 ($p\text{-value} < 0.0001$)였고, <Figure 5>에서 당화혈색소의 EDF는 4.611 ($p\text{-value} < 0.0001$)이었다. 공변량으로 보정을 적용한 <Figure 6>에서 중성지방의 EDF는 4.49 ($p\text{-value} < 0.0001$)였고, HDL의 EDF는 3.289 ($p\text{-value} = 0.0008$)로 나왔다. <Figure 8>에서 공복혈당의 EDF는 4.037 ($p\text{-value} < 0.0001$)였고, <Figure 9>에서 당화혈색소의 EDF는 3.546 ($p\text{-value} < 0.0001$)의 값이 나왔다. 공변량으로 보정을 적용한 모델에서 보정을 적용하지 않는 모델보다 HDL, 총 콜레스테롤, 공복혈당, 그리고 당화혈색소 모든 경우 EDF 수치가 낮아졌다. 보정 전후의 그래프 형태에서는 큰 변화가 없었지만 EDF 수치가 감소하면서 보정을 한 후의 모델에서 보정을 적용하기 전 모델보다 비교적 선형적인 관계를 나타냈다.

추가적으로 <Figure 10>, <Figure 11>, <Figure 12>, <Figure 13>에서는 심혈관질환 위험요인 중 연속형 변수를 독립 변수로 설정하였을 때 제한된 삼차 스플라인 모형을 사용하여 로그 혈청 클로토의 평활 스플라인 기능의 추정한 값을 시각화 하였다. <Figure 14>, <Figure 15>, <Figure 16>, <Figure 17>는 인구 통계학적 변수들을 기준 모델에 모두 고려하였을 때 제한된 삼차 스플라인 모형을 이용하여 로그 혈청 클로토의 평활 스플라인 기능의 추정한 값을 시각화 하였다.

두 비선형적 모델에서 공통적으로 중성지방의 수치가 낮은 개인

에서 높은 수치를 가진 개인들보다 로그 혈청 클로토의 수치가 더 높은 경향성을 보였다. 일반화가법모형에서는 HDL의 수치가 높은 개인에서는 로그 혈청 클로토 수치가 더 높은 비선형적 관계를 나타냈지만 특정 수치가 넘어가면 다시 수치가 점차 감소하는 경향성을 나타냈다. 제한된 삼차 스플라인 모형에서는 HDL의 수치가 낮은 개인에서는 로그 혈청 클로토의 수치가 낮았고 특정 수치가 넘어가면 수치가 완만하게 감소하는 형태를 보였다. 공복혈당과 당화혈색소는 일반화가법모형에서 당뇨병의 진단 기준 범위 측정치 이전까지는 로그 클로토 수치에서 거의 변화가 없거나 다소 감소하였으나 진단 기준 범위 이후의 특정 수치가 지나면 로그 클로토 수치가 증가하는 관계를 보였다. 제한된 삼차 스플라인 모형의 경우 <Figure 16>과 <Figure 17>에 제시된 공복혈당과 당화혈색소에서 모두 U자형 곡선의 형태를 보이면서 당뇨병의 진단 기준 범위 측정치 이전까지는 로그 클로토 수치에서 지속적으로 감소하고 특정 수치 이후에는 로그 클로토 수치가 증가하는 양상의 비선형적 모형을 나타냈다.

Table 4. Multivariate adjusted regression analysis of the association between CVD risk factors and log-transformed klotho

log klotho (pg/ml)	Unadjusted Model		Adjusted Model	
	β (SE)	p-value	β^* (SE)	p-value
BMI				
Underweight	0.0110 (0.0286)	0.7000	0.0145 (0.0286)	0.6119
Normal weight	Reference		Reference	
Overweight	-0.031 (0.0078)	<.0001	-0.0290 (0.0081)	0.0003
Obesity	-0.025 (0.0075)	0.0010	-0.0257 (0.0079)	0.0012
Exercise				
Vigorous	0.0200 (0.0090)	0.0263	0.0040 (0.0093)	0.6666
Moderate	Reference		Reference	
None	-0.0016 (0.0065)	0.8067	0.0001 (0.0068)	0.9854
Smoking				
Current smoking	-0.0633 (0.0077)	<.0001	-0.0656 (0.0081)	<.0001
Experienced at the past	-0.0530 (0.0065)	<.0001	-0.0380 (0.0068)	<.0001
None	Reference		Reference	
Alcohol drinking				
Heavier	-0.0309 (0.0109)	0.0047	-0.0553 (0.0114)	<.0001
Moderate	-0.0047 (0.0047)	0.5611	-0.0216 (0.0085)	0.0112
Light	-0.0074 (0.0093)	0.4233	-0.0167 (0.0097)	0.0852
None	Reference		Reference	
Hypertension				
Yes	Reference		Reference	
No	0.0248 (0.0069)	0.0003	0.0104 (0.0072)	0.1513
Dyslipidemia				
Yes	Reference		Reference	
No	0.0231 (0.0058)	<.0001	0.0235 (0.0060)	<.0001
1-unit increase in Lipid Profiles (mg/dL)				
HDL	0.0004 (0.0001)	0.0233	0.0004 (0.0002)	0.0192
LDL	0.0002 (0.0001)	0.1632	0.0001 (0.0001)	0.2670
TG	-0.0002 (0.0001)	<.0001	-0.0002 (0.0001)	<.0001
Total Chol	-0.0001 (0.0001)	0.1497	-0.0001 (0.0001)	0.0711
1-unit increase in Blood Pressure (mm Hg)				
Systolic blood pressure	-0.0001 (0.0002)	<.0001	-0.0003 (0.0002)	0.0517

Diastolic blood pressure	0.0007 (0.0003)	0.0036	0.0001 (0.0003)	0.7508
1-unit increase in Glucose (mg/dL)				
Glucose	0.0008 (0.0001)	<.0001	0.0009 (0.0001)	<.0001
1-unit increase in HbA1c (%)				
HbA1c	0.0188 (0.0025)	<.0001	0.0226 (0.0026)	<.0001

*Adjusted for age, ethnicity, education, and income.

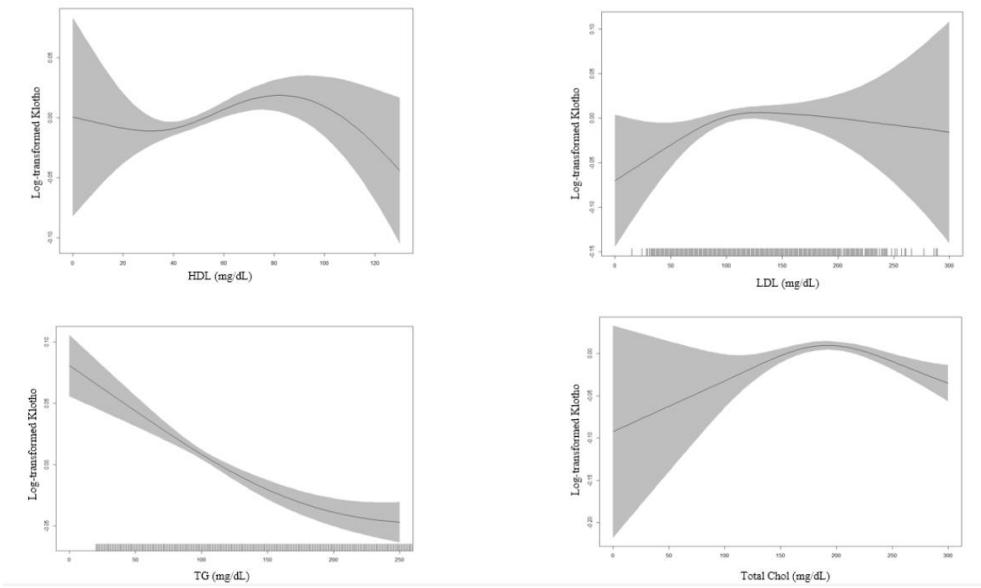


Figure 2. Generalized additive models showing the association between log klotho and serum lipids. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

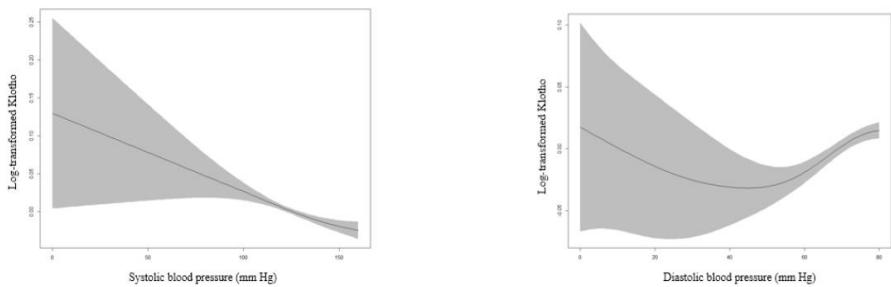


Figure 3. Generalized additive models showing the relationship between log klotho and blood pressure. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

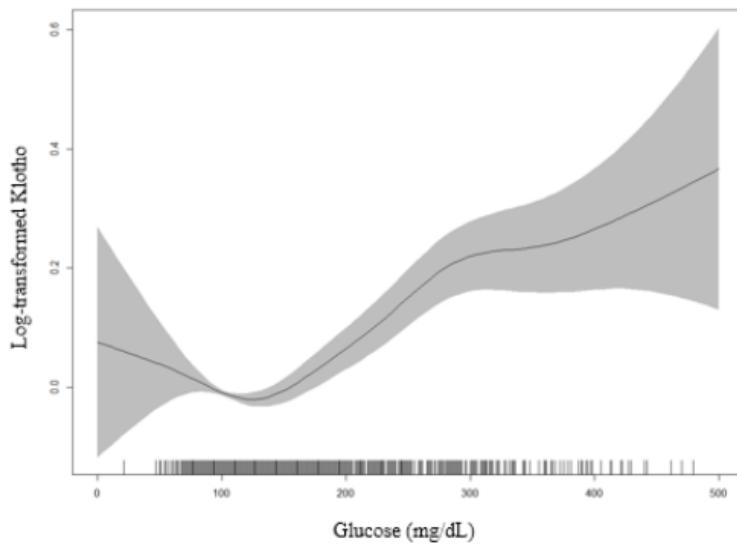


Figure 4. Generalized additive models showing the association between log klotho and glucose. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

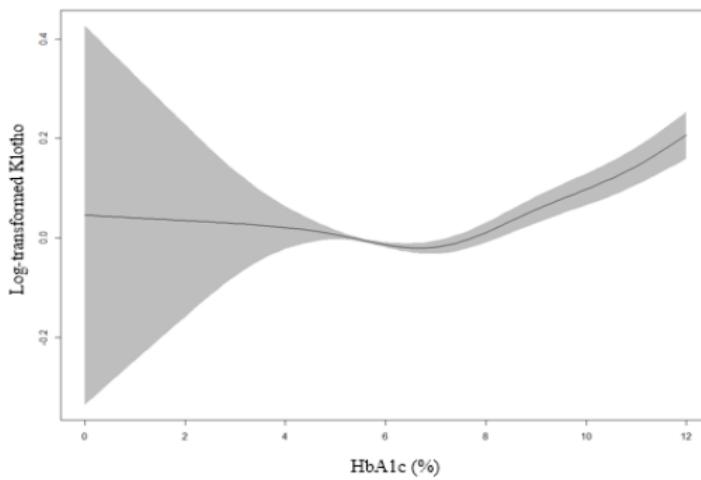


Figure 5. Generalized additive models showing the association between log klotho and HbA1c. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

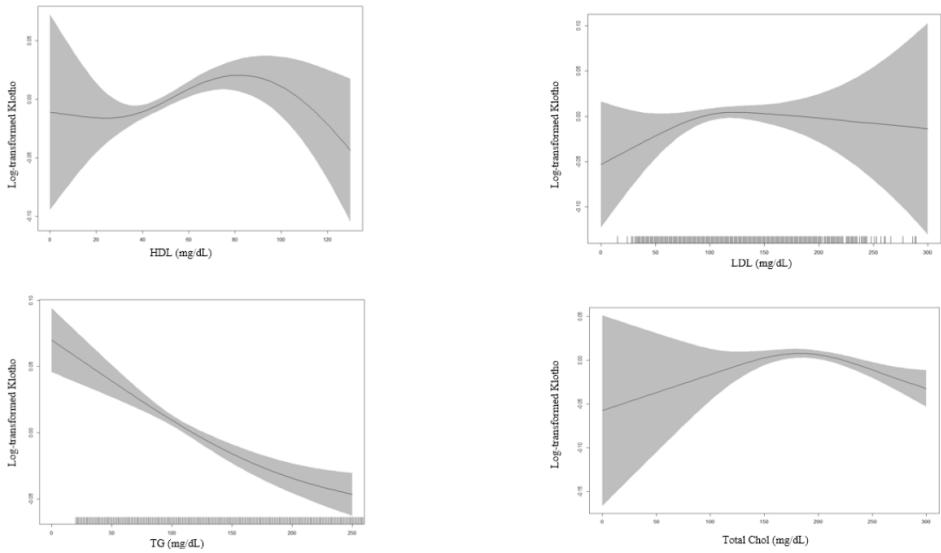


Figure 6. Generalized additive models showing the association between log klotho and serum lipids considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

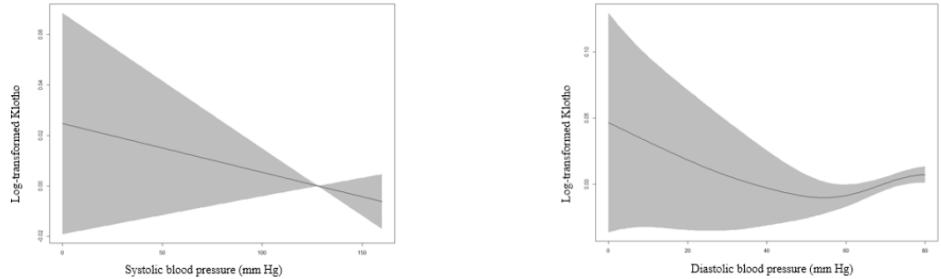


Figure 7. Generalized additive models showing the association between log klotho and blood pressure considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

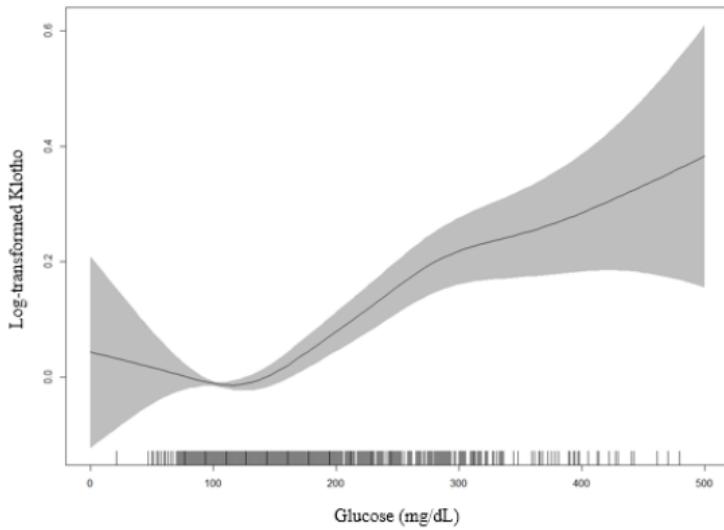


Figure 8. Generalized additive models showing the association between log klotho and glucose considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

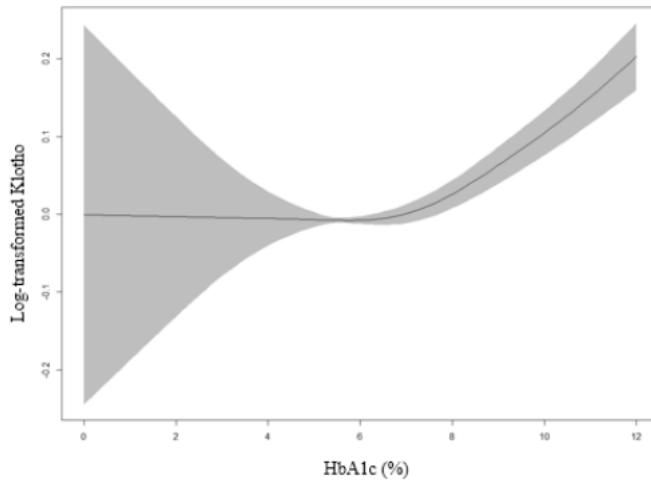


Figure 9. Generalized additive models showing the association between log klotho and HbA1c considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

ethnicity, education, and income.

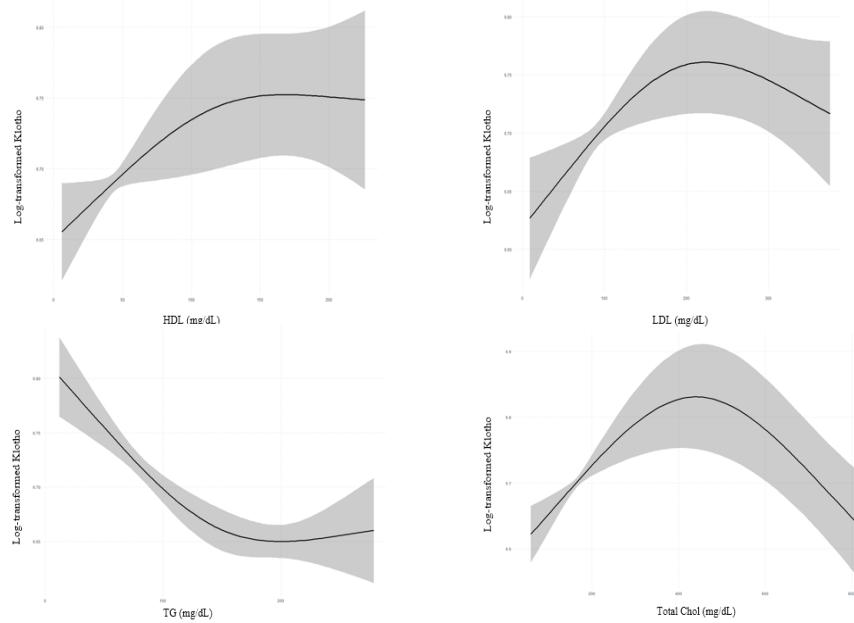


Figure 10. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and serum lipids. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

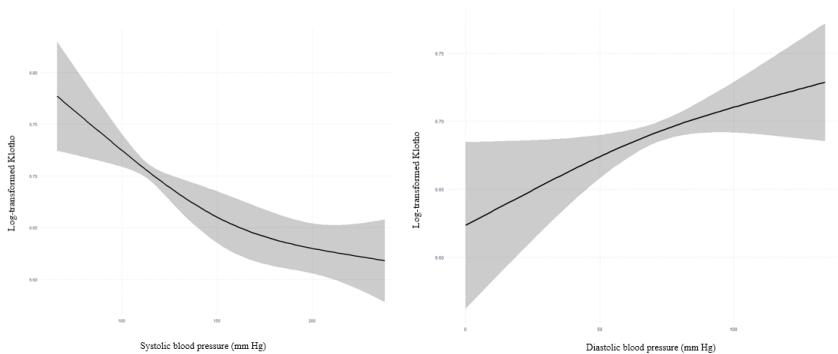


Figure 11. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and blood pressure. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

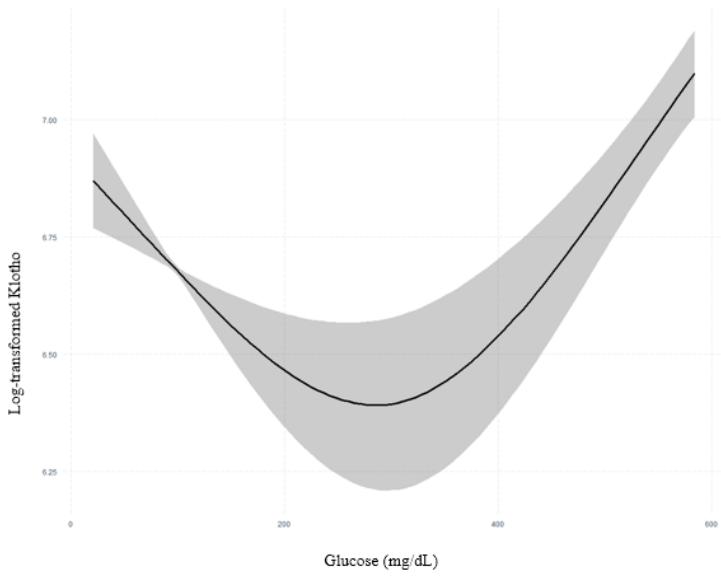


Figure 12. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and glucose. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

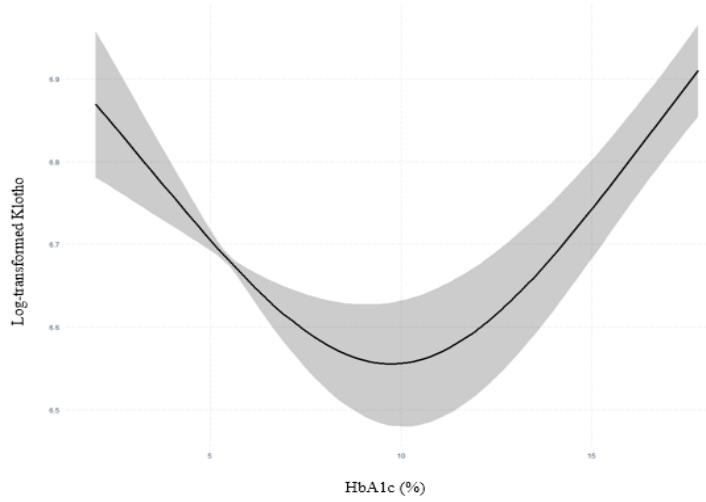


Figure 13. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and HbA1c. Shaded areas indicate a 95% confidence interval.

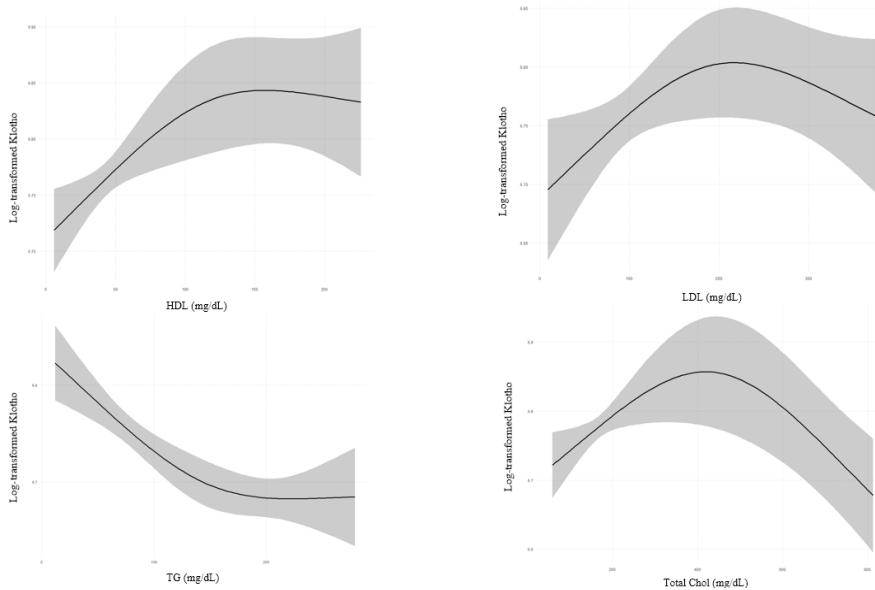


Figure 14. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and serum lipids considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

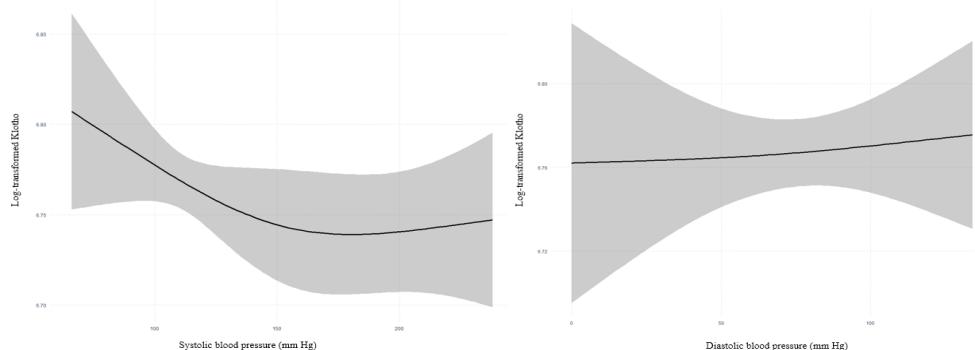


Figure 15. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and blood pressure considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

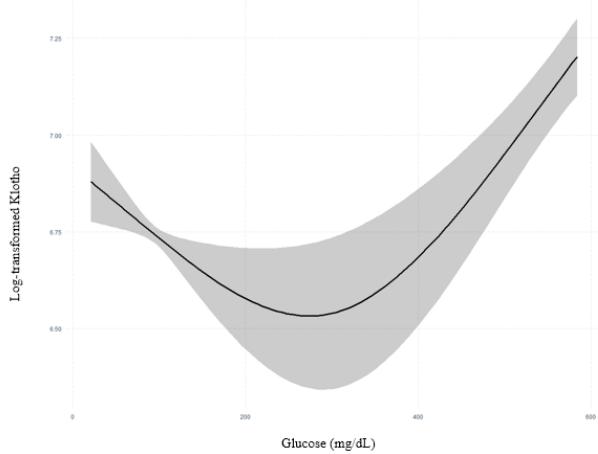


Figure 16. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and glucose considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

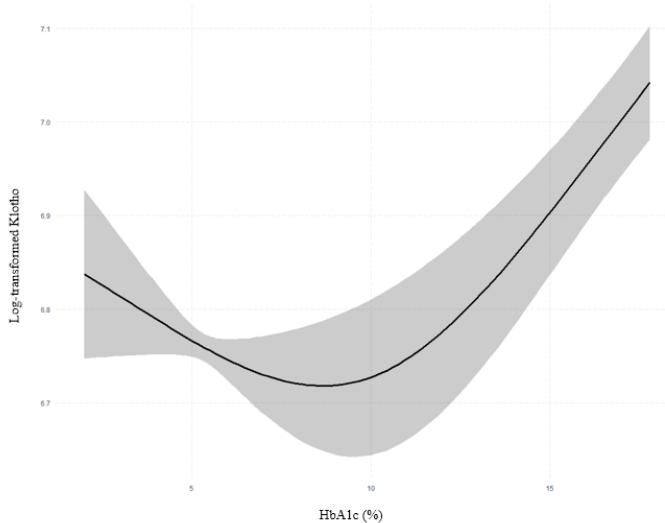


Figure 17. Restricted cubic spline curve of the association between log klotho and HbA1c considering covariates. Shaded areas indicate a 95% confidence interval. The model is adjusted for age, ethnicity, education, and income.

4) 성별 충화를 적용한 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토의 관계

Table 5는 다변량 회귀분석을 사용하여 성별로 계층화한 전체 연구 모집단에서 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토 사이의 연관성을 보여준다. 각 성별에 따라 나타날 수 있는 다른 연관성을 파악하기 위해 실시한 목적으로 인구 통계학적 변수들인 나이, 인종, 교육 수준, 그리고 수입을 공변량으로 활용하여 모델의 결과 값을 제시하였다.

심혈관질환의 위험인자들 중 남성과 달리 여성에서만 유의한 관계를 보인 것은 이상지질혈증, HDL, 중성지방, 그리고 총 콜레스테롤로 모두 혈청 지질 매개변수와 관련된 심혈관질환 위험요인들이었다. Table 6은 Table 5의 다변량 회귀분석에서 관측되는 남성과 여성에서 나타나는 회귀계수의 차이가 유의한지 통계적으로 검증을 하였다. 충화 변수인 성별을 기준으로 각 심혈관질환의 위험요인들과 로그 혈청 클로토의 연관성을 분석한 결과 상호 작용이 통계적으로 유의한 변수들은 이상지질혈증 ($p\text{-interaction}=0.0023$), HDL ($p\text{-interaction}<0.0001$), 중성지방 ($p\text{-interaction}<0.0001$), 총 콜레스테롤 ($p\text{-interaction}=0.0143$), 수축기 혈압 ($p\text{-interaction}<0.0001$), 공복혈당 ($p\text{-interaction}<0.0001$), 그리고 당화혈색소 ($p\text{-interaction}<0.0001$)였다. 이상지질혈증 ($p\text{-value}=0.001$), HDL ($p\text{-value}=0.0095$), 그리고 중성지방은 ($p\text{-value}=0.0047$) 두 성별에서 차이의 계수가 유의하였지만 총

콜레스테롤은 두 성별에서 차이의 계수는 유의하게 나오지 않았다 ($p-value=0.1573$). 이상지질혈증 분석에서 여성의 경우 해당 질환이 없는 대상자에서 질환을 앓고 있는 집단과 비교하였을 때 0.0413만큼 높은 로그 혈청 클로토의 수치를 보였다 ($p-value<0.0001$). HDL은 1mg/dL 증가할 때마다 로그 혈청 클로토의 수치가 0.0005만큼 증가하였다 ($p-value=0.0253$). 중성지방은 로그 혈청 클로토 수치가 0.0003만큼 낮았고 총 콜레스테롤도 0.0003만큼 로그 혈청 클로토의 수치가 낮았다 ($p-value<0.0001$; $p-value=0.0067$).

심혈관질환의 위험인자들 중 공통적으로 모든 성별에서 유의한 관계를 보인 것은 흡연, 음주, 공복혈당, 당화혈색소였다. 흡연의 경우 남성에서 흡연을 하지 않는 대상자들보다 현재 흡연을 하고 있는 집단에서 0.0493만큼 감소된 로그 혈청 클로토 수치를 보였고 ($p-value<0.0001$), 현재 흡연을 하고 있지는 않지만 과거 흡연을 했던 집단에서는 0.0325만큼 수치가 감소하였다 ($p-value=0.0005$). 마찬가지로 여성에서도 흡연을 하지 않는 대상자들보다 현재 흡연을 하고 있는 집단에서 0.0708만큼 감소된 로그 혈청 클로토 수치를 나타냈고 ($p-value<0.0001$), 과거 흡연을 했던 그룹에서도 0.0293만큼 감소된 로그 혈청 클로토의 수치를 보였다 ($p-value=0.0040$). 음주의 경우 남성에서 음주를 하지 않는 대상자들보다 과한 음주를 하는 집단에서 0.0545만큼 낮은 로그 혈청 클로토 수치를 나타냈고 ($p-value=0.0005$), 적당한 음주를 하는 집단에서는 0.0237만큼 낮은 수치를 보였다 ($p-value=0.0405$). 여성에서도 과한

음주를 하는 대상자에서 0.0578만큼 감소된 수치를 나타냈다 ($p-value=0.0005$). 공복혈당의 경우 남성에서는 0.0012만큼 증가하는 로그 클로토의 수치를 보였고 ($p-value<0.0001$), 여성에서도 0.0007만큼 로그 클로토의 수치가 증가하였다 ($p-value<0.0001$). 당화혈색소는 남성에서 0.0274만큼 로그 클로토 수치가 증가하였고 ($p-value<0.0001$), 여성에서는 0.0188만큼 로그 클로토의 수치가 증가하는 것을 확인할 수 있다 ($p-value<0.0001$).

Table 5. Adjusted multivariate regression analysis of the association between CVD risk factors and log-transformed klotho by gender stratification

log klotho (pg/ml)	N	Mean ± SD	β*(SE)	p-value
	Male	log klotho (pg/ml)		
BMI				
Underweight	55	6.67 ± 0.29	0.0069 (0.0389)	0.8585
Normal weight	1257	6.68 ± 0.33	Reference	
Overweight	2373	6.66 ± 0.32	-0.0175 (0.0112)	0.1166
Obesity	2222	6.67 ± 0.33	-0.0129 (0.0116)	0.2655
Exercise				
Vigorous	1060	6.69 ± 0.32	0.0157 (0.0124)	0.2072
Moderate	1604	6.66 ± 0.31	Reference	
None	3243	6.67 ± 0.33	0.0062 (0.0095)	0.5184
Smoking				
Current smoking	1352	6.65 ± 0.34	-0.0493 (0.0112)	<.0001
Experienced at the past	2121	6.65 ± 0.32	-0.0325 (0.0093)	0.0005
None	2434	6.69 ± 0.32	Reference	
Alcohol drinking				
Heavier	761	6.65 ± 0.31	-0.0545 (0.0156)	0.0005
Moderate	2433	6.67 ± 0.32	-0.0237 (0.0116)	0.0405
Light	1220	6.66 ± 0.32	-0.0234 (0.0134)	0.0821
None	1433	6.68 ± 0.34	Reference	
Hypertension				
Yes	1168	6.71 ± 0.34	Reference	
No	4739	6.68 ± 0.32	0.0174 (0.0096)	0.0687
Dyslipidemia				
Yes	2656	6.68 ± 0.32	Reference	
No	3251	6.66 ± 0.32	-0.0050 (0.0082)	0.5398
1-unit increase in Lipid Profiles (mg/dL)				
HDL	5907	6.67 ± 0.34	-0.0006 (0.0003)	0.0538
LDL	5907	6.67 ± 0.34	0.0002 (0.0002)	0.1965
TG	5907	6.67 ± 0.34	0.0001 (0.0001)	0.4540
Total Chol	5907	6.67 ± 0.34	-0.0001 (0.0001)	0.2480
1-unit increase in Blood Pressure (mm Hg)				
Systolic blood pressure	5907	6.67 ± 0.34	-0.0003 (0.0002)	0.2477

Diastolic blood pressure	5907	6.67 ± 0.34	0.0003 (0.0004)	0.3708
1-unit increase in Glucose (mg/dL)				
Glucose	5907	6.67 ± 0.34	0.0012 (0.0001)	<.0001
1-unit increase in HbA1c (%)				
HbA1c	5907	6.67 ± 0.34	0.0274 (0.0037)	<.0001
<hr/>				
Female				
<hr/>				
BMI				
Underweight	80	6.75 ± 0.39	0.0127 (0.0403)	0.7517
Normal weight	1486	6.74 ± 0.34	Reference	
Overweight	1790	6.71 ± 0.35	-0.0302 (0.0118)	0.0106
Obesity	2776	6.71 ± 0.34	-0.0388 (0.0110)	0.0004
Exercise				
Vigorous	776	6.75 ± 0.33	0.0078 (0.0140)	0.5742
Moderate	1827	6.72 ± 0.34	Reference	
None	3529	6.71 ± 0.34	-0.0041 (0.0095)	0.6699
Smoking				
Current smoking	1033	6.67 ± 0.35	-0.0708 (0.0120)	<.0001
Experienced at the past	1391	6.70 ± 0.33	-0.0293 (0.0102)	0.0040
None	3708	6.74 ± 0.34	Reference	
Alcohol drinking				
Heavier	1047	6.68 ± 0.34	-0.0578 (0.0165)	0.0005
Moderate	2014	6.72 ± 0.33	-0.0120 (0.0126)	0.3426
Light	1502	6.71 ± 0.34	-0.0113 (0.0140)	0.4209
None	1569	6.71 ± 0.34	Reference	
Hypertension				
Yes	1634	6.65 ± 0.32	Reference	
No	4498	6.72 ± 0.33	-0.0012 (0.0109)	0.9156
Dyslipidemia				
Yes	1896	6.69 ± 0.34	Reference	
No	4236	6.73 ± 0.33	0.0413 (0.0089)	<.0001
1-unit increase in Lipid Profiles (mg/dL)				
HDL	6132	6.73 ± 0.34	0.0005 (0.0003)	0.0253
LDL	6132	6.73 ± 0.34	-0.0001 (0.0002)	0.8323
TG	6132	6.73 ± 0.34	-0.0003 (0.0001)	<.0001
Total Chol	6132	6.73 ± 0.34	-0.0003 (0.0001)	0.0067

1-unit increase in Blood Pressure (mm Hg)				
Systolic blood pressure	6132	6.73 ± 0.34	-0.0003 (0.0002)	0.2909
Diastolic blood pressure	6132	6.73 ± 0.34	0.0003 (0.0004)	0.4245
1-unit increase in Glucose (mg/dL)				
Glucose	6132	6.73 ± 0.34	0.0007 (0.0001)	<.0001
1-unit increase in HbA1c (%)				
HbA1c	6132	6.73 ± 0.34	0.0188 (0.0036)	<.0001

*Adjusted for age, ethnicity, education, and income.

Table 6. The statistical significance difference of the multivariate regression coefficient estimates of the association between CVD risk factors and log-transformed klotho by gender stratification

log klotho (pg/ml)	$\beta^*(SE)$		p-value**	p-interaction***
	Male	Female		
BMI			0.3430	
Underweight	0.0069 (0.0389)	0.0127 (0.0403)	0.9166	
Overweight	-0.0175 (0.0112)	-0.0302 (0.0118)	0.4350	
Obesity	-0.0129 (0.0116)	-0.0388 (0.0110)	0.1052	
Exercise			0.6452	
Vigorous	0.0157 (0.0124)	0.0078 (0.0140)	0.6727	
None	0.0062 (0.0095)	-0.0041 (0.0095)	0.4433	
Smoking			0.1129	
Current smoking	-0.0493 (0.0112)	-0.0708 (0.0120)	0.1903	
Experienced at the past	-0.0325 (0.0093)	-0.0293 (0.0102)	0.8167	
Alcohol drinking			0.4090	
Heavier	-0.0545 (0.0156)	-0.0578 (0.0165)	0.8845	
Moderate	-0.0237 (0.0116)	-0.0120 (0.0126)	0.4945	
Light	-0.0234 (0.0134)	-0.0113 (0.0140)	0.5324	
Hypertension	0.0174 (0.0096)	-0.0012 (0.0110)	0.0501	0.0786
Dyslipidemia	-0.0050 (0.0082)	0.0413 (0.0089)	0.0001	0.0023
1-unit increase in Lipid Profiles (mg/dL)				
HDL	-0.0006 (0.0003)	0.0005 (0.0003)	0.0095	<0.0001
LDL	0.0002 (0.0002)	-0.0001 (0.0002)	0.1797	0.2130
TG	0.0001 (0.0001)	-0.0003 (0.0001)	0.0047	<0.0001
Total Chol	-0.0001 (0.0001)	-0.0003 (0.0001)	0.1573	0.0143
1-unit increase in Blood Pressure (mm Hg)				
Systolic blood pressure	-0.0003 (0.0002)	-0.0003 (0.0002)	0.9699	<0.0001
Diastolic blood pressure	0.0003 (0.0004)	0.0003 (0.0004)	0.9198	0.3348
1-unit increase in Glucose (mg/dL)				
Glucose	0.0012 (0.0001)	0.0007 (0.0001)	0.0554	<0.0001
1-unit increase in HbA1c (%)				
HbA1c	0.0274 (0.0037)	0.0188 (0.0036)	0.0980	<0.0001

*Adjusted for age, ethnicity, education, and income.

**The p-value is based on Wald Statistics.

***The p-value for interaction is based on the cross product of Wald Statistics.

5) 폐경에 따른 혈청 지질 매개변수와 혈청 클로토의 관계

Table 7은 다변량 회귀분석을 이용해서 연구 모집단 중 여성에서 폐경을 경험한 여성과 경험하지 않는 여성 사이에서 나타나는 혈청 지질 매개 변수와 혈청 클로토 사이의 연관성을 보여준다. 폐경 전후에 따라 다르게 나타날 수 있는 연관성을 파악하기 위해 실시한 목적으로 인구 통계학적 변수들인 나이, 인종, 교육 수준, 그리고 수입을 공변량으로 활용하여 모델의 결과 값을 나타냈다.

폐경을 경험 한 여성에서는 HDL이 1mg/dL 증가할 때 혈청 클로토의 값이 0.0010만큼 높아졌지만 유의하지 않았다 ($p-value=0.2551$). LDL, 중성지방, 총 콜레스테롤은 단위가 증가할 때 혈청 클로토의 값이 각각 0.0002, 0.0005, 그리고 0.0001만큼 낮았지만 모든 결과 값에서 유의한 값이 나오지 않았다 ($p-value=0.6869$; $p-value=0.1245$; $p-value=0.8288$). 아직 폐경을 경험하지 않은 여성에서는 HDL이 1mg/dL 증가할 때 혈청 클로토의 값이 0.0010만큼 낮아졌지만 유의한 값이 나오지 않았다 ($p-value=0.9385$). LDL의 단위가 증가할 때 클로토의 수치가 0.0005만큼 높아졌고, 총 콜레스테롤의 단위가 증가할 때 클로토의 수치가 0.0002만큼 낮아졌지만 모두 유의하지는 않았다 ($p-value=0.4690$; 0.5662). 총 콜레스테롤은 1mg/dL 증가할 때마다 0.0002만큼 혈청 클로토의 값이 0.0002만큼 낮아졌지만 폐경 전후 회귀계수에 대한 차이를 검정한 결과를 참고하면 차이에 대한 결과의 통계 값이 유의하지

않아서 폐경 전후의 변화 차이가 없다는 것을 확인할 수 있다 ($p-$
value=0.4054).

Table 7. Adjusted multivariate regression analysis of the association between serum lipids and log-transformed klotho for female by the period of menopause and the statistical difference of the coefficient estimates

log klotho (pg/ml)	$\beta^*(SE)$	$\beta^*(SE)$	p-value**
	After Menopause	Before Menopause	
1-unit increase in Lipid Profiles (mg/dL)			
HDL	0.0010 (0.0007)	-0.0001 (0.0008)	0.3008
LDL	-0.0002 (0.0004)	0.0005 (0.0006)	0.3317
TG	-0.0005 (0.0003)	-0.0008 (0.0002)	0.4054
Total Chol	-0.0001 (0.0003)	-0.0002 (0.0003)	0.8137

*Adjusted for age, ethnicity, education, and income.

**The p-value is based on Wald Statistics.

연구 고찰

미국 성인의 건강과 영양 상태를 알아보기 위해 시행한 국민 건강 영양 조사의 자료를 이용하여 흡연, 음주, 비만, 콜레스테롤의 각종 수치, 공복혈당, 당화혈색소, 운동, 및 만성질환과 같은 특정 심혈관질환의 위험요인과 로그 혈청 클로토 수치 간의 연관성을 분석했다. 그 결과 심혈관질환의 위험이 높으면 로그 혈청 클로토의 낮은 수치와 연관성이 존재한다는 것을 알아냈다. 즉, 로그 혈청 클로토 수치는 비만, 과체중, 흡연, 음주, 이상지질혈증의 비율이 상대적으로 높고 총 콜레스테롤, HDL의 수치와 관련성을 보였다. 연관성은 연령, 인종, 교육 및 소득의 인구 통계학적 변수들로 보정을 했을 때에도 여전히 유의하였다. 공복혈당과 당화혈색소의 수치가 높으면 예상과는 다르게 로그 혈청 클로토의 높은 수치와 연관성이 존재하였는데 이에 대해서는 추후 연구가 더 필요해 보인다. 성별 증화 분석에서는 공통적으로 흡연, 음주, 공복혈당과 당화혈색소의 수치이외에 여성에서만 이상지질혈증, HDL, 중성지방, 그리고 총 콜레스테롤의 수치가 로그 혈청 클로토와 관련성을 보였지만 총 콜레스테롤의 수치는 남녀간 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 여성에서 나타난 혈청 지질 매개변수의 특징을 주목하여 폐경 전후 변화 차이의 분석을 진행하였지만 유의한 결과가 나오지 않았다. 결론적으로 본 연구를 통해 특정 심혈관질환의 위험요인이 낮은 로그 혈청 클로토의 수치와 연관성이 있음을 밝혔다.

본 연구 결과를 뒷받침할 수 있는 생리학적 기전은 아직까지 명확하지 않지만 클로토의 생물학적 역할인 산화 스트레스와 염증 반응으로 관련하여 생각해볼 수 있다[38]. 클로토 단백질은 초과산화물 불균등화 효소 (superoxide dismutase)의 생성 증가나 활성 산소의 생성 감소를 통해 산화를 방지하고 세포의 노화를 예방해주는 항산화 반응을 유도한다[38]. 또한 유전자 발현을 조절하는 염증 매개체와 상호 작용하는 특징을 가지고 있다[39, 40]. 그렇기 때문에 클로토의 결핍은 산화 스트레스와 염증 촉진을 유발하여 심혈관질환 위험의 연관성이 존재할 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서 심혈관질환의 위험요소로 명시한 비만, 과체중, 흡연, 음주, 높은 콜레스테롤의 수치, 낮은 HDL의 수치, 이상지질혈증과 BMI는 염증 및 산화 스트레스의 위험성을 높여 클로토의 결핍과 관련성이 있을 수 있다[41–44].

흡연과 음주는 심혈관질환의 대표적인 위험요인 중 하나이다. 과도한 흡연은 백혈구를 활성화하여 인체 내의 활성 산소와 질소 종을 방출하고 전염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)의 분비를 촉진한다[45]. 흡연과 혈청 클로토 수치 감소의 연관성을 보고한 연구에서는 양막 강 내 미생물 침입 (microbial invasion of the amniotic cavity)이 있는 임산부 중에서의 흡연자는 비흡연자보다 혈청 클로토의 수치가 상대적으로 낮았다[46]. 금연을 성공한 과거의 흡연자들은 금연을 실패한 현재의 흡연자들보다 상대적으로 더 높은 혈청 클로토의 수치가 확인되었다[47]. 음주와 클로토의 연관성을 밝힌 선행 연구는 비교적 드물지만 최근 연구에서 음주가 클로토 수치에

부정적인 영향을 미친다는 연구 사례가 존재했다[48]. 신체 활동이 부족한 중년의 성인을 대상으로 시행한 단면적 연구에서 음주가 낮은 혈청 클로토의 수치와 연관성을 보였다[48]. 음주의 섭취는 염증 반응 (IL-6, TNF- α 및 c반응성 단백질)의 증가와 산화 스트레스의 화합물인 malondialdehyde나 8-isoprostan을 동반한다[41]. 흡연과 음주와 같은 심혈관질환의 건강행동 위험요인은 산화 스트레스와 염증 반응을 증가시켜 클로토 단백질의 발현 수준을 감소할 수 있다.

BMI 수치의 증가는 체내의 각종 상태를 일정하게 유지하려고 하는 항상성과 관련이 있고 심혈관질환의 중요한 건강상태 위험요인들이다[49]. TNF- α 나 IL-6와 같은 염증 매개체의 염증 반응과 산화 스트레스를 유발하는 아디포넥틴 (adiponectine) 호르몬의 감소는 높은 BMI 수치의 증가로 이어질 수 있다[50, 51]. BMI의 수치와 클로토의 연관성은 여전히 불분명한 부분이 있지만 최근 관련성을 확인하기 위한 연구의 사례들이 존재했다[52]. 과체중과 비만에 해당하는 연구 대상자들이 마른 대상자들보다 뇌척수액의 클로토 수치가 현저히 낮게 나오는 것을 밝혀냈다[52]. 해당 연구 결과에서 나이, 키, 공복 혈당 수치나 콜레스테롤 수치를 포함한 혈청 마커에서는 두 그룹 간의 유의 있는 차이를 발견하지 못했지만, 뇌척수액의 클로토 수치에서는 두 그룹 간의 차이가 유의하게 나왔다[52]. 또한 높은 클로토 수치를 가진 실험용 쥐에서는 지방이 감소하였고, 이와 반대로 전체 체중에서 지방을 제외한 제지방량과 에너지의 소비는 증가하는 것으로 나타났다[53]. 클로토가 에너지 대사와 혈관 형성을 조절하는 작용 과정이 다소 복잡하기 때문에 아직까지 이와

관련한 연구들의 사례가 부족한 것으로 파악했다. 그러므로 지방의 축적이 염증 반응의 증가나 산화 스트레스가 클로토 수치의 감소에 직간접적으로 관여하는지에 대한 생리학적 방법론을 밝히는 추가적인 연구가 필요하다.

총 콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방의 수치를 포함한 지질 매개변수는 신체 내의 혈청 바이오 마커와 클로토의 직접적인 연관성을 평가할 수 있는 심혈관질환의 위험요인이다. 대표적으로 높은 중성지방의 수치는 류마티스 관절염, 루푸스, 건선 등의 염증성 질환들과 관련이 있다 [54]. 높은 중성지방의 지단백질들 수치는 Nuclear Factor Kappa β (NFK β) 와 Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) 과 같은 염증 매개성을 활성화하여 죽상 동맥 경화증을 유발한다[54]. 동물 실험 연구에서는 이상지질혈증에 속한 실험군에서 대조군에 속한 그룹보다 일산화 질소, 지질 과산화, 단백질 카르보닐 (protein carbonyl)과 같은 산화 스트레스 마커들의 수치가 유의한 증가를 보였다[43]. 또한 ApoE Knockout 실험용 쥐에서 고지방 위주의 섭취가 클로토의 mRNA 발현에 유의한 감소를 나타냈다[55]. 혈액 내에 존재하는 다양한 지방 성분이 증가한 상태인 고지혈증이 혈관 벽에 쌓여 염증을 일으키고 산화 스트레스를 발생하여 단백질의 세포 성분을 감소하는 것으로 추정하였다[55]. 동물 실험 연구를 제외하고 사람을 대상으로 진행한 연구 사례는 아직까지 드문 편인데, 최근 국내의 대사증후군과 만성질환의 클로토 연관성 연구에서는 고중성지방혈증이 혈청 클로토의 수치 감소와 독립적으로 연관이 있음을 밝혀냈다[56]. 본 연구에서도 해당 연구 결과와 유사하게 지질 매개변수 중 총 콜레스테롤과

고밀도 콜레스테롤 수치에서 로그 혈청 클로토와 유의한 관련성을 보였고 성별 간 나타나는 계수의 차이가 통계적으로 유의함을 확인했다. 지질 매개 변수 및 이상지질혈증과 클로토 수치 간의 연관성에서 나타나는 성별 간의 차이에 관해서는 아직 명확하게 밝혀진 것은 없다. 하지만 성 호르몬이 지질 역학의 조절자와 성 이형성을 담당하는 중요한 역할을 하고 있기 때문에 클로토 수치가 성별에 따라 다르게 나타날 가능성이 있다[57]. 구체적으로 여성들은 폐경을 하게 되면서 내인성 에스트로겐의 호르몬의 변화가 생겨 폐경 이후 혈관 벽 내부에 점점 콜레스테롤이 축적되는 죽성경화성 심혈관질환의 위험이 높다[58]. 그러므로 폐경을 진행하면서 나타날 수 있는 여성의 내인성 에스트로겐 변화와 관련하여 본 연구 결과를 설명하기 위해 추가적인 분석을 시행했지만 폐경 전후에 대한 통계적 차이가 유의하지 않아 변화 차이가 없다는 것을 확인했다. 혈청 지질 매개변수 및 이상지질혈증과 혈청 클로토 수치의 연관성, 그리고 성별 간의 차이에서 나타나는 수치의 차이를 이해하기 위해서는 추후 연구가 필요하다.

공복혈당과 당화혈색소의 수치가 로그 혈청 클로토의 높은 수치와 관련성을 보였는데 기존 선행 연구에서도 동일한 결과 확인이 가능했다. 추정 사구체 여과율과 당화혈색소와 혈청 클로토의 높은 수치와 연관성을 보였고 대사증후군과 혈청 클로토의 연관성을 살펴본 연구에서는 고혈당과 높은 클로토 수치와의 관련성을 나타냈다[59, 60]. 당뇨병의 위험이 근위 신세뇨관 (Proximal kidney tubules)과 원위 신세뇨관 (Distal kidney tubules) 안에서의 신진대사 요구와 관련이 있는데 이는 클로토의 발현과 절단에 모두 영향을 주어 혈청 수치

증가의 가능성이 있다[59]. 클로토는 지방 세포로 포도당이 순환되는 것을 촉진하는 포도당 수송체 Type 4 (Glucose Transporter Type 4)의 원활한 역할을 방해하고 인슐린에 의한 세포 내 신호 매개체라고 알려진 Akt, GSK3 β , PFKf3 β 의 인산화를 막는 과정을 통해 인슐린의 증가에 감지를 하지 못하거나 정상적인 작용이 일어나지 않는 인슐린 저항성을 유도할 수 있다[61]. 또한 과도하고 균형이 잡히지 않는 영양 섭취는 클로토 단백질이 인슐린 저항성의 특성을 나타내어 몸 안에서 인슐린 작용이 효율적으로 일어나지 않는다[62]. 하지만 본 결과와 상충된 방향의 연구 결과들이 있고 인슐린 저항성과 클로토의 역할을 설명하기 위한 생리학적 기전이 아직 불분명한 만큼 추가적인 연구가 계속 필요하다[63, 64].

연구의 장점은 미국의 국민 건강 영양 조사인 NHANES의 공개 자료를 사용하여 혈청 클로토 수치와 다양한 심혈관질환의 위험요인의 연관성을 알아보았다는 점이다. 대부분의 선행 연구들이 동물 실험 연구이거나 클로토의 유전적 변이체를 사용하여 수행하였지만 본 연구에서는 체내에서 순환하는 혈청 클로토의 수치를 이용하여 미국 성인 인구를 대상으로 진행한 연구였다. 또한 다수의 기존 연구들이 심혈관질환의 종류와 클로토의 연관성을 규명하려는 연구에 머물렀지만 본 연구에서는 심혈관질환의 종류가 아닌 질환의 잠재적 예방을 위한 심혈관질환의 주요 위험요인들과 연관성을 분석했다는 점에서 의의가 있다. 하지만 본 연구가 가지고 있는 몇 가지의 한계점들이 존재한다. 첫째로, 클로토의 수치와 심혈관질환 위험요소들 사이의 연관성을 입증할 수 있는

단면적인 연구 설계만을 고려했다. 그래서 연관성의 인과관계를 설명하는데 있어 다소 어려움이 존재한다. 추후의 연구에서 시간 관계를 고려한 종단적 연구를 시행한다면 심혈관질환 위험요인들의 치료 중재에 관한 클로토의 임상적 중요성을 강조할 수 있다. 둘째, 혈청 클로토의 특성은 24시간동안 체내의 주기 변화에 영향을 받는다[39]. 자정에 순환하는 클로토의 수치는 기준선에서 약 40% 감소하고 난 후 점차 정상 수준으로 가깝게 회복하는 변동적인 특성을 가지고 있다[39]. 하지만 본 연구의 자료는 개인의 신체 주기 변화를 반영한 클로토의 수집에는 제한 사항이 존재하여 안정적인 수치인지에 대한 의문을 제기할 수 있다. 마지막으로, 본 연구의 분석에서 인구 통계학적 변수들을 보정 변수로 활용하였지만 여전히 잔류 교란(residual confounding)의 문제가 발생할 가능성이 있다. 클로토가 심혈관질환의 염증조절에 관여를 한다는 사실을 고려해본다면 연구 대상자들로부터 염증성 마커 (CRP, neutrophile-to-lymphocyte ratio, TNF, IL6, IL10)들을 다양하게 수집하여 보정 변수들 추후 연구에 반영하여 분석을 진행할 수 있다[65, 66].

결론

본 연구를 통해서 낮은 로그 혈청 클로토의 수치가 특정 심혈관 질환의 위험요인들과 관련이 있다는 것을 알아냈다. 독립적인 연구 모집단에서 더 많은 수의 표본을 확보하여 추후 연구를 진행하고 각 종 심혈관질환의 위험요인들과 클로토 간의 연관성 규명을 위한 세포나 동물 연구 등이 많이 시도하여 생리학적 기전을 밝혀낸다면 본 연구 결과의 신뢰성을 더욱 제고할 수 있을 것으로 기대한다.

참고 문헌

1. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics – 2019 Update: A Report From the American Heart Association.* Circulation, 2019. **139**(10): p. e56–e528.
2. Amini, M., F. Zayeri, and M. Salehi, *Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-to-incidence ratio: results from global burden of disease study 2017.* BMC Public Health, 2021. **21**(1): p. 401.
3. Leong, D.P., et al., *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2: Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease.* Circ Res, 2017. **121**(6): p. 695–710.
4. Rudd, K.E., et al., *Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study.* Lancet, 2020. **395**(10219): p. 200–211.
5. 통계청, 2020년 통계청 생명표. 2020.
6. 통계청, 2020년 통계청 사망원인통계. 2020.
7. 신경목, 김., 혜승호, 김권배, 김기식, 김경환, 심초음파검사에 의한 최근 15년간의 심혈관질환의 변화. Keimyung Medical Journal, 1996.
8. New, S.E. and E. Aikawa, *Cardiovascular calcification: an inflammatory disease.* Circ J, 2011. **75**(6): p. 1305–13.
9. Baum, A. and D.M. Posluszny, *Health psychology: mapping biobehavioral contributions to health and illness.* Annu Rev Psychol, 1999. **50**: p. 137–63.
10. Zhang, W., M.I. Ahmad, and E.Z. Soliman, *The role of traditional risk factors in explaining the social disparities in cardiovascular death: The national health and Nutrition*

- Examination Survey III (NHANES III)*. Am J Prev Cardiol, 2020. **4**: p. 100094.
11. Sung, J.M., et al., *Development and verification of prediction models for preventing cardiovascular diseases*. PLoS One, 2019. **14**(9): p. e0222809.
 12. Matsumura, Y., et al., *Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **242**(3): p. 626–30.
 13. Kuro, O.M., *The Klotho proteins in health and disease*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(1): p. 27–44.
 14. Kuro-o, M., *Klotho*. Pflugers Arch, 2010. **459**(2): p. 333–43.
 15. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, *Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5287–97.
 16. Huang, C.L., *Regulation of ion channels by secreted Klotho*. Adv Exp Med Biol, 2012. **728**: p. 100–6.
 17. Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 45–51.
 18. Kurosu, H., et al., *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6120–3.
 19. Park, W.Y., et al., *The efficacy of klotho gene as a biomarker of cancer development in kidney transplant recipients*. Korean Journal of Transplantation, 2020. **34**(1): p. 97–97.
 20. Kim, S.M., et al., *Klotho as a potential predictor of deceased donor kidney transplantation outcomes*. Ann Surg Treat Res, 2020. **98**(6): p. 332–339.
 21. Zhou, X., et al., *Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor*

- suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma.* J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 37.
22. Zhou, X. and X. Wang, *Klotho: a novel biomarker for cancer.* J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(6): p. 961–9.
23. Zhou, X., et al., *Klotho suppresses tumor progression via inhibiting IGF-1R signaling in T-cell lymphoma.* Oncol Rep, 2017. **38**(2): p. 967–974.
24. Yeganeh-Hajahmadi, M., et al., *Klotho and SIRT1 changes from pre-diabetes to diabetes and pre-hypertension to hypertension.* Diabetol Metab Syndr, 2021. **13**(1): p. 115.
25. Nagai, R., et al., *Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases.* Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(5): p. 738–46.
26. Buiten, M.S., et al., *Soluble Klotho is not independently associated with cardiovascular disease in a population of dialysis patients.* BMC Nephrol, 2014. **15**: p. 197.
27. Kitagawa, M., et al., *A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56695.
28. Semba, R.D., et al., *Plasma klotho and cardiovascular disease in adults.* J Am Geriatr Soc, 2011. **59**(9): p. 1596–601.
29. Keles, N., et al., *Low Serum Level of Klotho Is an Early Predictor of Atherosclerosis.* Tohoku J Exp Med, 2015. **237**(1): p. 17–23.
30. Saito, Y., et al., *Klotho protein protects against endothelial dysfunction.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 324–9.

31. Xu, J.P., et al., *Associations Between Serum Soluble α -Klotho and the Prevalence of Specific Cardiovascular Disease*. Front Cardiovasc Med, 2022. **9**: p. 899307.
32. *2015 – 2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition*. December 2015; Available from: <https://health.gov/our-work/food-nutrition/previous-dietary-guidelines/2015>.
33. [cited 2022 11 March]; Available from: https://www.cdc.gov/Nchs/Nhanes/2015-2016/SSKL_I.htm.
34. Helwig, N.E., *Robust nonparametric tests of general linear model coefficients: A comparison of permutation methods and test statistics*. Neuroimage, 2019. **201**: p. 116030.
35. Szklo, M., *Epidemiology : beyond the basics*. 2000: Gaithersburg, Md : Aspen, 2000.
36. Yu, L., et al., *Nonlinear relationship between triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio and chronic kidney disease in US adults: a National Health and Nutrition Examination Survey investigation*. Int Urol Nephrol, 2019. **51**(11): p. 2005–2014.
37. Hua, Y., et al., *Association Between Serum Calcium and the Prevalence of Hypertension Among US Adults*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 719165.
38. Olejnik, A., et al., *The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 5171945.
39. Moreno, J.A., et al., *The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFkappaB*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(7): p. 1315–25.
40. Maekawa, Y., et al., *Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and*

- attenuates NF- κ B activation.* Endocrine, 2009. **35**(3): p. 341–6.
41. van de Loo, A., et al., *The Inflammatory Response to Alcohol Consumption and Its Role in the Pathology of Alcohol Hangover.* J Clin Med, 2020. **9**(7).
 42. Tuon, T., et al., *Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice.* Neurosci Lett, 2010. **475**(1): p. 16–9.
 43. Acharya, P. and R.R. Talahalli, *Aging and Hyperglycemia Intensify Dyslipidemia-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rats: Assessment of Restorative Potentials of ALA and EPA + DHA.* Inflammation, 2019. **42**(3): p. 946–952.
 44. Elfeky, O., et al., *Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation.* Placenta, 2017. **50**: p. 60–69.
 45. Centers for Disease, C., et al., *Publications and Reports of the Surgeon General, in How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* 2010, Centers for Disease Control and Prevention (US): Atlanta (GA).
 46. Lam-Rachlin, J., et al., *Infection and smoking are associated with decreased plasma concentration of the anti-aging protein, α -klotho.* J Perinat Med, 2013. **41**(5): p. 581–94.
 47. Kamizono, Y., et al., *Impact of cigarette smoking cessation on plasma α -klotho levels.* Medicine (Baltimore), 2018. **97**(35): p. e11947.

48. Jurado-Fasoli, L., et al., *Alcohol consumption and S-Klotho plasma levels in sedentary healthy middle-aged adults: A cross sectional study*. Drug Alcohol Depend, 2019. **194**: p. 107–111.
49. Arking, D.E., et al., *Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity*. Circ Res, 2005. **96**(4): p. 412–8.
50. Ellulu, M.S., et al., *Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications*. Arch Med Sci, 2017. **13**(4): p. 851–863.
51. Saltiel, A.R. and J.M. Olefsky, *Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 1–4.
52. Landry, T., et al., *Centrally circulating α -klotho inversely correlates with human obesity and modulates arcuate cell populations in mice*. Mol Metab, 2021. **44**: p. 101136.
53. Rao, Z., et al., *Administration of alpha klotho reduces liver and adipose lipid accumulation in obese mice*. Heliyon, 2019. **5**(4): p. e01494.
54. Welty, F.K., *How do elevated triglycerides and low HDL-cholesterol affect inflammation and atherothrombosis?* Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(9): p. 400.
55. Sastre, C., et al., *Hyperlipidemia-associated renal damage decreases Klotho expression in kidneys from ApoE knockout mice*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83713.
56. Kim, H.J., et al., *Serum klotho is inversely associated with metabolic syndrome in chronic kidney disease: results from the KNOW-CKD study*. BMC Nephrol, 2019. **20**(1): p. 119.

57. Wang, C., et al., *Sex hormones affect endothelial lipase-mediated lipid metabolism and atherosclerosis*. Lipids Health Dis, 2019. **18**(1): p. 226.
58. Palmisano, B.T., et al., *Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism*. Mol Metab, 2018. **15**: p. 45–55.
59. Ciardullo, S. and G. Perseghin, *Soluble α -Klotho levels, glycemic control and renal function in US adults with type 2 diabetes*. Acta Diabetol, 2022. **59**(6): p. 803–809.
60. Cheng, Y.W., et al., *Association between Soluble α -Klotho Protein and Metabolic Syndrome in the Adult Population*. Biomolecules, 2022. **12**(1).
61. Hasannejad, M., et al., *Klotho induces insulin resistance possibly through interference with GLUT4 translocation and activation of Akt, GSK3 β , and PFKf β 3 in 3T3-L1 adipocyte cells*. Res Pharm Sci, 2019. **14**(4): p. 369–377.
62. Unger, R.H., *Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 57–64.
63. Nie, F., et al., *Serum klotho protein levels and their correlations with the progression of type 2 diabetes mellitus*. J Diabetes Complications, 2017. **31**(3): p. 594–598.
64. Farías-Basulto, A., et al., *Circulating Levels of Soluble Klotho and Fibroblast Growth Factor 23 in Diabetic Patients and Its Association with Early Nephropathy*. Arch Med Res, 2018. **49**(7): p. 451–455.
65. Fard, D. and L. Tamagnone, *Semaphorins in health and disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2021. **57**: p. 55–63.
66. Martín-Núñez, E., et al., *Association between serum levels of Klotho and inflammatory cytokines in cardiovascular disease*:

a case-control study. Aging (Albany NY), 2020. **12**(2): p. 1952–1964.

Abstract

Association between cardiovascular disease risk factors and serum klotho

Jaeho Lee

Department of Preventive Medicine
Integrated Major in Innovative Medical Science
Seoul National University College of Medicine

Introduction: Cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of high mortality and morbidity. It is necessary to minimize the risk factors to some extent and find out important markers to reduce the incidence of disease. Klotho deficiency seems important predictor of CVD related mortality and morbidity. But research regarding the association between klotho and individual risk factors of CVD is limited. It is unclear whether CVD risk factors are independently associated with klotho. Our study hypothesized that CVD risk factors are associated with the level of serum klotho. The present study aimed to test our hypothesis by using National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) with various statistical approaches.

Methods: We analyzed the association between CVD risk factors and serum klotho among 12,039 participants with measurements of klotho from 2007 to 2016 in the NHANES. BMI, exercise, smoking, alcohol consumption, hypertension, dyslipidemia, serum lipid parameters, blood pressure, glucose, and HbA1c were considered as CVD risk factors. Multivariate multiple regression models, Generalized Additive Model (GAM), Restricted cubic spline curves and gender stratification analyses were conducted for analysis.

Results: Log serum klotho levels were negatively associated with being overweight ($\beta = -0.0290$, $p\text{-value}=0.0003$), obesity ($\beta = -0.0257$, $p\text{-value}=0.0012$), current smoking ($\beta = -0.0656$, $p\text{-value}<0.0001$), experienced at the past ($\beta = -0.0380$, $p\text{-value}<0.0001$), heavier alcohol drinking ($\beta = -0.0553$, $p\text{-value}<0.0001$), moderate alcohol drinking ($\beta = -0.0216$, $p\text{-value}=0.0112$). There was a positive association between log serum klotho levels and dyslipidemia when the reference was designated as the disease ($\beta = 0.0235$, $p\text{-value}<0.0001$). Log serum klotho levels were significantly decreased by a unit increase in triglycerides ($\beta = -0.0002$, $p\text{-value}<0.0001$) and increased by a unit increase in hdl ($\beta = 0.0004$, $p\text{-value}=0.0192$). Also, log serum klotho levels were significantly increased by a unit increase in

glucose ($\beta = 0.0009$, p-value < 0.0001) and HbA1c ($\beta = 0.0226$, p-value < 0.0001). GAM and Restricted Cubic Splines revealed that there was a significant non-linear relationship between lipid parameters, glucose, HbA1c, and serum klotho.

Conclusions: Lower serum klotho levels are associated with certain CVD risk factors, including high BMI, smoking, alcohol consumption, hyperlipidemia, lipid parameters, glucose, and HbA1c.

Keywords: Klotho, Cardiovascular Disease, Aging, CVD risk factors, Cholesterol

Student Number: 2021-24723