: 30 3 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 3, 2003, 9

한국인 다낭성 난포증후군 환자에서 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase의 677번 유전자 다형성에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원[1], 차병원 생식의학 및 불임유전체 연구센타[2], 차병원[3]

이교원[1] · 정유미[2] · 이숙환[2] · 윤태기[2] · 곽인평[2] · 윤선웅[1] · 최중섭[1]
김계현[1] · 한종설[1] · 김성도[1] · 김남근[3] · 차광렬[3] · 백광현[2] · 이수만[2]

The Study of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Variation (MTHFR C677T) in Infertile Females with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) in Korea

Kyo-Won Lee[1], Yu-Mi Jeong[2], Sook Hwan Lee[2], Tae Ki Yoon[2], In Pyung Kwak[2], Seon Woong Yoon[1], Joong Sub Choi[1], Kye Hyun Kim[1], Jong Sul Han[1], Sung Do Kim[1], Nam Keun Kim[3], Kwang Yul Cha[3], Kwang Hyun Baek[2], Suman Lee[2]

[1]Kangbuk Samsung Hospital, SungKyunKwan University School of Medicine and
[2]Genome Research Center for Reproductive Medicine and Infertility,
[3]CHA General Hospital, College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Objective: To investigate the association of genetic background between MTHFR C677T genotype and infertile females with polycystic ovarian syndrome.

Materials and Methods: We compared 86 infertile females with polycystic ovarian syndrome (PCOS) with 100 healthy fertile females with one or more offspring. Pyrosequencing analysis for MTHFR C677T variation was performed on polymerase chain reaction (PCR) product of study group. To validate pyrosequencing data of C677T variation for randomly selected 50 samples, we compared the pyrosequencing result with the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) result of MTHFR C677T genotype.

Results: The prevalence of the C677T mutant homozygous (TT) was significantly lower (p=0.0085) in females with PCOS (8.14%) than in fertile females (21.00%). MTHFR 677 TT genotype had a decreased risk (3.7-fold) of PCOS compared with wild type (MTHFR 677 CC).

Conclusion: Our data support a role for MTHFR mutant homozygous (677 TT) genotype in reducing risk in Korean infertile females with Polycystic ovarian syndrome.

Key Words: Polycystic ovarian syndrome (PCOS), MTHFR, Pyrosequencing

다낭성 난포증후군 (Polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 생식능력이 있는 여성에게 영향을 미치는 가장 일반적인 내분비적 질환이다. 다낭성 난포증후군의 알려진 특징으로는 과안드로젠혈증 (hyperandrogenism), 만성 무배란주기 (chronic anovulatory cycles), 희발월경과 무월경 등의 월경장애가 동반되

주관책임자: 이수만, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼 1동 606-5, 생식의학 및 불임유전체 연구센타
Tel: (02) 3468-3445, Fax: (02) 3468-3464, e-mail: suman@cha.ac.kr
This work was supported by the Samsung grant, #SBRI C-A2-313-1.

는 특성이 있다.[1] 고안드로젠혈증 및 증가된 황체호르몬 (LH)과 감소되거나 그대로인 난포자극호르몬 (FSH)에 의하여 난소의 다낭성 변화가 일어나는 것으로 추정되고 있다.[2,3]

다낭성 난포증후군의 유전적 원인을 밝히기 위한 노력은 계속 되었지만, 다낭성 난포증후군의 원인 유전자에 대한 설득력 있는 연구는 현재까지 알려져 있지 않다. 현재까지 연구된 가능성 있는 대표적 유전자로는 INS VNTR (Insulin gene variable number of tandem repeats)[4]과 CYP11α[5] 등이 있다.

본 연구에서는 엽산 대사 (folate metabolism)의 핵심 유전자로서 알려진 MTHFR 유전자의 다형성에 대한 연구를 수행하였다. MTHFR 유전자는 대장암 (colorectal cancer)[6], 심장혈관질환 (Cardiovascular disease)[7] 등과 관련이 있으며 MTHFR 677번의 다형성은 이미 많은 집단에서 연구되어져 왔다.

특히, MTHFR C677T 다형성은 전자간증 (preeclampsia), 자궁내 성장지연 (intrauterine growth retardation; IUGR), 사산 (stillbirth) 등과의 관련성이 보고된 적이 있다.[8] 최근에는, 다운증후군 환자에게서도 MTHFR 677번의 다형성과의 관련성이 발표되었다.[9] 더구나, MTHFR 유전자의 다형성으로 인한 습관성 유산 (recurrent pregnancy loss)의 위험성이 증가된다는 논문도 보고되고 있다.[10,11]

엽산 대사 (folate metabolism)의 핵심효소 (enzyme)인 MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase)은 5, 10-methylenetetrahydrofolate로부터 5-methyltetrahydrofolate (5-methyl-THF)로의 환원을 촉진시켜 주는 역할을 한 후, 이 효소는 MS (methionine synthetase)에 의해 호모시스테인 (homocysteine)에서 메티오닌 (methionine)으로 전환할 때 메틸기 (methyl)를 제공하는 역할을 한다.

MTHFR 유전자는 일반적으로 C677T 다형성을 가진다고 알려져 있으며 특히, 677 동형접합성 다형성 (TT)는 효소의 활성을 떨어뜨려 호모시스테인의 수치를 증가시킨다.[12~14] 증가된 호모시스테인은 DNA, 단백질 (protein), 지질 (lipid)의 메틸화 반응에서 중요한 메틸기 공여체인 SAM (S-adenosylmethionine)의 비가 줄어들면서 DNA hypomethylation을 일으키며, DNA 합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[15]

최근, Orio 등[16]에 의해 다낭성 난포증후군에서 MTHFR 유전자의 677번의 다형성과 호모시스테인 수치를 측정한 보고가 있어서 한국인 다낭성 난포증후군 여성에서의 677 다형성에 대한 연구가 요구되며, 한국 집단에서의 연구를 처음으로 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에서는 강북삼성병원과 차병원에 내원한 다낭성 난포증후군 환자로 진단된 86명의 여성과 대조군으로는 정상 임신으로 1명 이상의 아이를 가진 100명의 여성을 대상으로 실시하였다. 대상 환자는 모두 월경 이상을 가지고 있으며 다낭성 난포증후군 환자의 기준으로는 과안드로젠혈증 (hyperandrogenism), 비만, 다모증, 고인슐린혈증, 증가된 LH, LH/FSH의 비가 2~3 이상, 초음파 소견 (sonographic finding)의 특징을 보이고 있고, 다낭성 난포증후군으로 인한 불임증 이외의 내외과적 질환의 병력이 없었다.[17]

2. 연구 방법

MTHFR 677위치의 유전자형 분석은 시발체 세트 (primer set)인 forward primer: 5'-TAT TGG CAG GTT ACC CCA AA-3'와 reverse primer: 5'-Biotin-GAA AAG CTG CGT GAT GAT GA-3'를 중합효소연쇄반응 (PCR) machine (MJ research thermal cycler, Waltham, USA)으로 증폭시켰다. 위와 같은 중합효소연쇄반응 (PCR) 증폭 방법을 통하여 1298번의 증폭 단편은 113 bp가 되도록 하여 생성물을 증폭하기 위해 어닐링 (annealing temperature)을 55℃로 정하며 이 과정을 45회 반복하였다. 이 생성물들은 2% agarose gel로 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 증폭 상태를 관찰하였다. 바이오틴 (biotin)이 붙어 있는 생성물은 pyrosequencing을 수행하기 위한 시발체 (sequence primer)인 5'-GGT GTC TGC GGG A-3'을 이용하여 유전자형을 분석하였다.[18]

Pyrosequencing 실험 결과를 유효화 하기 위해서 연구 대상 중 무작위로 50명의 DNA를 선정하여, 중합효소연쇄반응을 통한 제한효소절편길이 다형성 (Restriction Fragment Length Polymorphism)을 실

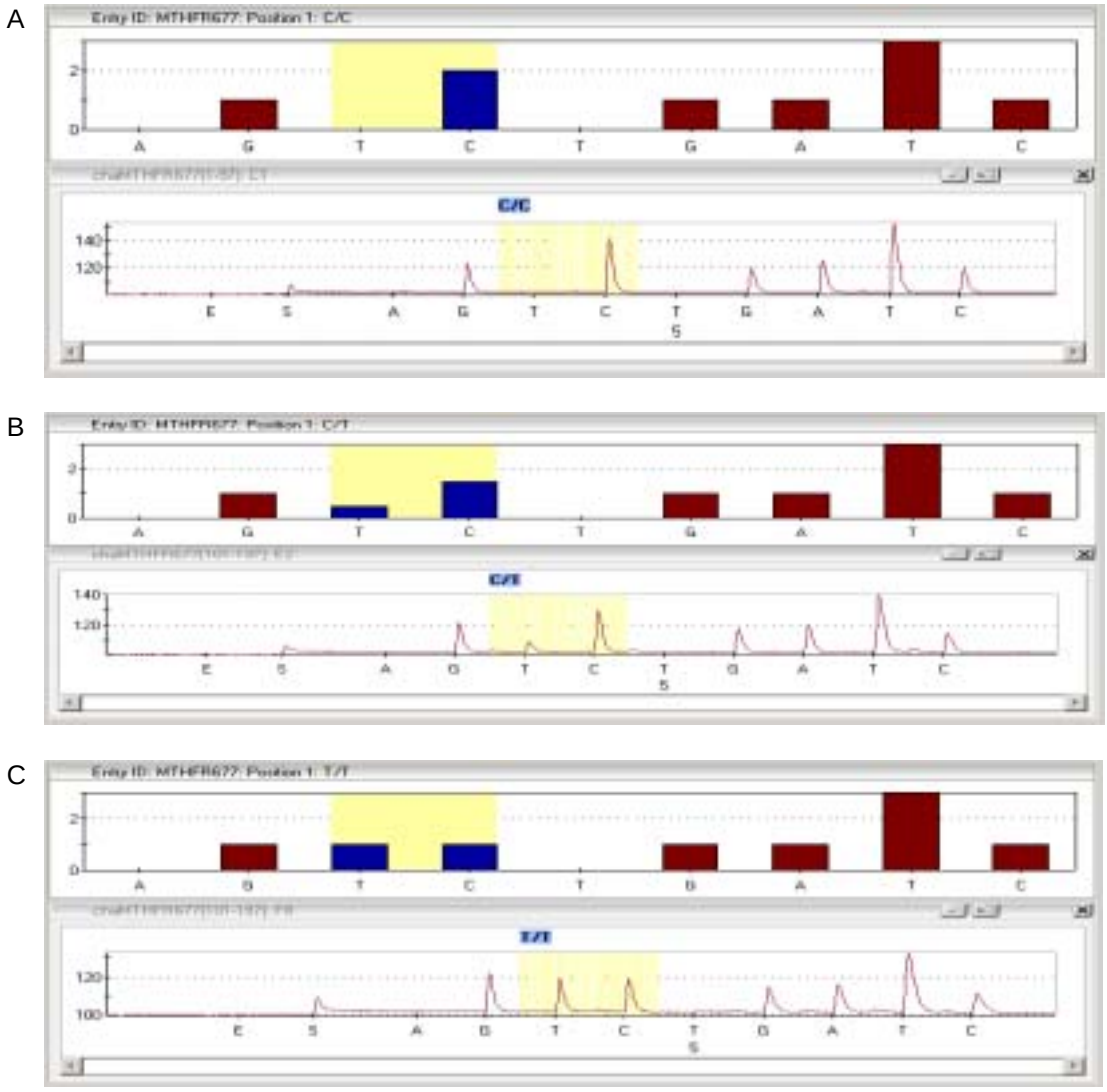

Figure 1. The pyrosequencing and PCR-RFLP data results from infertile females with PCOS and fertile ones. The pyrosequencing analysis of the C677T Polymorphism of MTHFR gene was carried out on all samples for MTHFR **(A)** 677 CC type, **(B)** 677 CT type and **(C)** 677 TT type. The y axis of the bar graph in the pyrosequencing figures (**A**, **B** and **C**) is scaled such that the value of one nucleotide was 0.5. **(D)** The 198-bp of MTHFR 677 CC undigested by HinfI (Lane M, 1 Kb PLUS DNA ladder; Lane 1, 198 bp PCR product as control; Lane 2, MTHFR 677 CC type (198 bp); Lane 3, MTHFR 677 CT type (198 bp and 175 bp); Lane 4, MTHFR 677 TT type (175 bp)).

Table 1. Distribution of the genotypes of MTHFR (5,10-methylenetetrahydrofolatereductase) 677 in fertile female and PCOS (polycystic ovary syndrome) patients

	Female control (n=100)	PCO patient (n=86)	OR (95% CI)	p
677 CC	27.00% (n=27)	38.37% (n=33)	-	-
677 CT	52.00% (n=52)	53.49% (n=46)	-	-
677 TT	21.00% (n=21)	8.14% (n=7)	0.2727 (0.10~0.74)	0.0085
CT + TT	73.00% (n=73)	61.63% (n=53)	-	-
T allele	47.00% (n=94)	34.88% (n=60)	0.6041 (0.40~0.91)	0.0180

OR=odds ratio; CI=confidence interval

시하였다. 677번의 변이는 forward primer: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CG-3'와 reverse primer: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'를 사용하여 PCR machine (MJ research thermal cycler, Waltham, USA)으로 198 bp 생성물을 증폭시키기 위해 95℃에서 변성시키고, 61℃에서 30초 동안 primer를 어닐링 (annealing) 시킨 후, 72℃에서 30초 동안 primer extension 반응을 시행하는 과정을 35회 반복하였다. 677 A→C 변이를 인식할 수 있는 제한효소 HinfI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)으로 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. Alanine에서 얻어진 단편은 분해되지 않는 반면 valine은 175 bp와 23 bp로 분해된다.[19] 이렇게 제한효소로 처리한 단편들은 3% 아가로오스 겔로 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 변이 상태를 관찰하였다.

3. 통계 분석

통계적 분석은 SAS 통계 소프트웨어 (SAS Institute, Cary, NC)를 이용하여 카이제곱 (Chi-square) 검정, 피셔 (Fisher's exact) 검정을 하였다. 남성불임의 비교 위험도를 측정하기 위하여 odd ratio (OR) 값 (odd ratio; OR)과 95% 신뢰구간 (95 percent confidence intervals, 95% CI)을 나타내었다.

결 과

본 연구의 다낭성 난포증후군인 여성들은 86명, 정상인 여성들은 100명이었다. 본 실험에서는 효소의 연속적인 반응을 통한 결과로 피로인산 (pyrophosphate)이 떨어져 나오게 되는 pyrosequencing 방법을 사용하여 MTHFR 유전자 677번 염기가 cytosine에서 thymine으로 치환되는 것에 대한 분석을 하였다. Pyrosequencing에 의해 밝혀진 유전자형은 RFLP 방법을 통하여 유효화 시켰으며 이 결과는 Figure 1에서 보여주고 있다.

Table 1에 의하면, 환자군에서 MTHFR 677 CC, CT, TT type의 빈도는 각각 38.37%, 53.49%, 8.14%, 대조군에서는 27.00%, 52.00%, 21.00%의 빈도를 보였다. 특이 사항은 677 TT type에서 유의성 있는 결과 (p=0.0085)가 관찰되었지만 결과는 오히려 677 TT 다형성 type에서 위험도가 3.7배 (OR=0.2727, 95% CI=0.10~0.74; p=0.0085) 감소함을 알 수 있었다. 또한, T 대립 유전자 (allele)만의 빈도에서도 환자군에서 유의성 있게 낮은 위험도를 보이는 결과를 나타내었다 (OR=0.6041, 95% CI=0.40~0.91; p=0.0180).

고 찰

지금까지 다낭성 난포증후군 환자에게서 유전적인 원인을 찾기 위한 연구들이 많이 진행되어 왔다. 그럼에도 불구하고, 현재까지 의미있는 유전자에 대한 설득력 있는 연구 결과가 나타나지 않았다. 따라서, 본 연구의 결과는 한국인 다낭성 난포증후군 환자에게서는 처음으로 보고되는 것으로, MTHFR 677 TT는 다낭성 난포증후군을 3.7배 억제하는 것으로 분석되었다 (Table 1; p=0.0085). 즉, 통계적으로 677 TT에서 오히려 발병률이 낮은 것으로 보인다.

이와 같은 결과는 677 TT의 다형성으로 인하여, 5,10-methyleneTHF의 축적이 일어나게 되고 이것은

다낭성 난포증후군의 위험을 예방하는 역할을 할 것이다. 다형성으로 인한 MTHFR 활성도가 떨어짐으로 인해 받는 영향보다 DNA 합성 시에 "uracil misincorporation" 되는 것을 막아주는 작용이 다낭성 난포증후군 환자에게 어쩌면 더 중요할 것이다. 다시 말하자면, MTHFR 677 동형접합성 다형성에 의해 dUMP가 dTMP를 형성하는데 필요한 5,10-methyleneTHF의 공급을 활발하게 하여 dTMP의 비율이 적음으로 인한 잘못된 DNA 합성이 줄어들게 될 것이다. 이와 비슷한 결과는 급성백혈병 (acute lymphocytic lukemia)[20]과 근위부결장암 (proximal colon cancer)[21] 등에서 비슷한 결과가 보고된 적이 있다.

다낭성 난포증후군을 가진 이탈리아 여성에게서 MTHFR 유전자의 다형성과 호모시스테인의 수치에 대한 연구에 의하면, 환자들과 정상인 여성에게서 유전자형에서는 유의성 있는 차이는 없었지만, 유전자 677 TT 빈도율만 차이가 있고, 호모시스테인 수치를 조사한 결과 다낭성 난포증후군 여성에서 호모시스테인 수치와 관련성은 없었다.[16] 이탈리아 여성 집단의 연구와 본 연구 결과에서 다낭성 난포증후군 여성에게는 호모시스테인 수치가 미치는 영향보다 MTHFR 유전자의 677 다형성이 DNA 합성에 주는 영향이 더 중요할 수도 있을 것으로 예상된다.

향후 연구에서는 엽산의 농도가 MTHFR 유전자 변이의 정도에 따라 호모시스테인 증가와 같은 다른 인자들의 변화가 더 많이 관찰됨으로,[22] 엽산 수치와 같은 기타 다른 요인이 다낭성 난포증후군에 미칠 수 있는 영향에 대한 연구도 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 1995; 333: 853-61.
2. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. Lancet 1985; 2: 1375-9.
3. Conway GS, Honour JW, Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. Clin Endocrinol (Oxf) 1989; 30: 459-70.
4. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, McCarthy MI, Hague S, Batty S, et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. Lancet 1997; 349: 986-90.
5. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Bergiele AT, Tsianateli TC, Kouli CR. Microsatellite polymorphism (tttta) (n) at -528 base pairs of gene CYP11 alpha influences hyperandrogenemia in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2000; 73: 735-41.
6. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. Cancer Res 1996; 56: 4862-4.
7. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. Am J Clin Nutr 2000; 72: 324-32.
8. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. N Engl J Med 1999; 340: 9-13.
9. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999; 70: 495-501.
10. Candito M, Magnaldo S, Bayle J, Dor JF, Gillet Y, Bongain A, et al. Clinical B12 deficiency in one case of recurrent spontaneous pregnancy loss. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 1026-7.
11. Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, et al. Analyzes of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. Acta Obstet Gynecol Scand 2003; 82: 942-7.
12. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard

CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10: 111-3.
13. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996; 93: 7-9.
14. Kluijtmans LA, Kastelein JJ, Lindemans J, Boers GH, Heil SG, Bruschke AV, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. Circulation 1997; 96: 2573-7.
15. Blount BC, Ames BN. DNA damage in folate deficiency. Baillieres Clin Haematol 1995; 8: 461-78.
16. Orio F Jr, Palomba S, Di Biase S, Colao A, Tauchmanova L, Savastano S, et al. Homocysteine levels and C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 673-9.
17. Kim NK, Nam YS, Ko JJ, Chung HM, Chung KW, Cha KY. The luteinizing hormone beta-subunit exon 3 (Gly102Ser) gene mutation is rare in Korean women with endometriosis and polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2001; 75: 1238-9.
18. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. Anal Biochem 2000; 280: 103-10.
19. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998; 64: 169-72.
20. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 12810-5.
21. Toffoli G, Gafa R, Russo A, Lanza G, Dolcetti R, Sartor F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C --> T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. Clin Cancer Res 2003; 9: 743-8.
22. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. Circulation 1998; 98: 2520-6.