Homocysteine 과다증과 관련된 반복자연 유산에서 methylenetetrahydrofolate reductase 돌연변이에 대한 분석

포천중문의과대학 산부인과학교실, 내과학교실**,
기초과학지원연구소 생체고분자팀*

남윤성 · 최종순* · 하권수* · 이지원* · 오도연**

The Analysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation in Recurrent Spontaneous Abortion Associated with Hyperhomocysteinemia

Y. S. Nam, J. S. Choi*, K. S. Ha*, Z. W. Lee* and D. Y. Oh**

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of medicine,**
College of Medicine, Pocheon CHA University, Pocheon, Korea
Biomolecule Research Team, Korea Basic Science Institute, Taejon, Korea*

Objective : To analyze the methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) mutation in recurrent spontaneous abortion associated with hyperhomocysteinemia.

Material and Method : The blood sample of habitual aborter with high fasting homocysteine level was tested by PCR – RFLP method.

Results : The patient was found to be a homozygosity for MTHFR gene mutation that was confirmed by the finding which is consistent with the mutation at the nucleotide 677 C to T, corresponding to Ala to Val.

Conclusions : Hyperhomocysteinemia due to MTHFR mutation is a cause of recurrent spontaneous abortion. Therefore, the MTHFR mutation should be examined in the workup of recurrent

spontaneous abortion showing hyperhomocysteinemia.

Key Words : Recurrent spontaneous abortion, Hyperhomocysteinemia, MTHFR mutation

아미노산인 homocysteine 은 세포대사에 필수적인 역할을 한다. Homocysteine 은 재메틸화(remethylation) 경로에서 세포내의 methionine 수치를 적절하게 유지하며 황전환작용(transsulfuration)에 의하여 이화작용(catabolism)을 일으킨다. Homocysteine 대사에 관계된 효소의 선천적인 이상과 이 효소의 조인자로 작용하는 비타민의 후천적인 결손은 homocysteine 과다증과 관련되어 있다. 선천적인 homocysteine 뇨증(homocystinuria)에서 homocysteine 수치와 조기혈관혈전(premature vascular thrombosis)과의 관계는 잘 정립되어 있다. Homocysteine 과다증의 원인은 불분명하지만 역학적으로 homocysteine 과다증은 동맥질환과 정맥혈전을 일으키는 독립적인 위험요소라는 것이 증명되었다. 좋은 예가 내열성 없는(thermolabile) methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) 돌연변이에 대한 동형접합체(homozygosity)이다. 실험결과 homocysteine 이 혈관내피, 혈소판, 그리고 혈액응고에 미치는 다양한 영향이 보고되었지만 생체내에서의 기전은 정확히 밝혀져 있지 않다. Homocysteine 과다증에서 엽산을 공급해 주면 homocysteine 수치가 정상으로 회복되며 혈관질환의 위험성을 감소시킨다.

Homocysteine 은 methionine 대사의 중간물질이다. Homocysteine 과다증은 cystathionine β - synthase(CBS)부족증, 내열성 없는 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)의 동형접합성 발현, 후천적인 비타민 B_{12} 혹은 엽산부족 때문에 생긴다.

Homocysteine 과다증은 성인에서 조기 죽상경화(atherosclerosis)와 관련이 있으며 동맥혈전의 위험인자로 추측된다. 최근에는 homocysteine 과다증이 정맥혈전과도 연관되어 있다는 것이 밝혀졌다. Cystathionine β - synthase 부족증에서는 정신지체, 골격계와 눈의 이상을 나타내며 30 세이전에 혈전이 발생할 가능성이 높다. 이 효소부족이 있으면 homocysteine 뇨증이 생기고 정맥혈전과 연관된 경증의 이형접합성(heterozygosity)과는 임상양상에 차이가 있다.

실험결과 homocysteine 은 내피세포에 의한 C 단백질의 활성을 저하시키고 응고인자 V 의 활성을 자극하며 내피세포의 조직인자를 활

성화시켜서 혈전을 유발하게 된다. 그렇지만 homocysteine 과다증 환자의 1/3 에서만 혈전이 발생한다. 그 이유는 활성화 C 단백질내성(activated protein C resistance : APCR) 때문이 아닌가 의심된다. 그래서 homocysteine 과다증과 혈전증이 있는 환자에서는 활성화 C 단백질내성에 대한 검사를 동시에 시행하는 것이 좋다.

최근들어 반복자연유산 환자들에 대한 연구에서 homocysteine 과다증으로 인한 혈전과의 연관성이 보고되고 있다. MTHFR 돌연변이에 의한 반복자연유산이 외국에서는 3 례 발표되었지만 국내에서는 아직 보고된 예가 없다. 본 연구는 homocysteine 과다증과 관련된 반복자연유산 환자에서 MTHFR 돌연변이를 조사하여 homocysteine 과다증의 원인을 확진하고 그에 따른 치료방침을 확립하는 데 있다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

29 세의 여성이 반복자연유산을 주소로 본원을 방문하였다. 환자는 세번의 자연유산과 한번의 자궁외임신을 경험하였다. 자연유산은 모두 2 개월에 일어났고 한번도 태아심박동을 관찰하지 못했다. 월경은 15 세때 시작되었고 주기는 규칙적이었으며 월경량은 보통이었고 약간의 생리통이 있었다. 과거력과 가족력상에는 특이한 점이 없었다. 신장 148cm, 체중 42kg, 혈압 120 / 80 mmHg, 체온 36.5°C, 맥박 80 회/분이었으며 유방과 음모의 발달도 정상이었고 그외에는 특이사항이 없었다.

자궁은 전굴되어 있었고 크기는 정상이었으며 양측 부속기에는 종괴가 촉진되지 않았다. 골반초음파소견상 자궁크기는 정상이었고 난소와 난관도 특이소견을 보이지 않았다. 검사소견상 estradiol : 18.1 pg/mL, FSH : 6.16 mIU/mL, LH : 4.70 mIU/mL, prolactin : 13.27 ng/mL, TSH : 2.56 μU/mL, 톡소플라즈마 면역글로브린 G : 음성, 톡소플라즈마 면역글로브린 M : 음성, 공복시 혈당 : 98 mg/dl, PT : 10.6 초, PTT : 31.8 초, 류마티스 인자 : 음성, 매독검사 : 음성, 홍반성낭창 세포 : 음성, 보체 3 : 96.6 mg/dl, 보체 4 : 27.5 mg/dl, 항카디오리핀항체 : 음성, 루프스항응고제 : 음성, 항포스파티딜세린 면역글로브린 G 항체 : 음성, 항핵항체 : 음성, 항타이로글로브린항체 : 음성, 항마이크로좀항체 : 음성, homocysteine : 21.2

μmol/L(정상 : 5 – 15 μmol / L) 이었고 그외에는 특이사항이 없었다. 추가검사결과 엽산 : 4.0 ng/ml, 비타민 B_{12} : 404 pg/ml 로 후천적인 homocysteine 과다증의 원인을 배제할 수 있었다. 자궁나팔관조영술결과 자궁외임신에 따른 난관절제술로 인하여 좌측 난관이 막혀 있었다. 핵형검사상 남편의 9 번 염색체가 중심절주위 역위(pericentric inversion)를 보였지만 정상인에서 나타날 수 있는 변이로 추정되었다. 정액검사상 숫자 48×10^6/ml, 운동성 64%, 정상형태 3%였다.

엽산 3 mg 을 2 개월가량 투여한 후 다시 homocysteine 을 측정한 결과 3.4 μmol/L 로 정상수치를 보여 임신을 시도하려고 계획 중이다.

2. 연구방법

DNA 분리는 DNA 추출키트(extraction column, QIAmp blood kit, Qiagen)에 의해 제조자의 프로토콜에 따라 환자의 혈액에서 추출한 백혈구로부터 분리하였다. 분리한 DNA 표본은 시발체 세트(primer set)인 sense primer(5' –TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA–3')와 antisense primer(5' –AGGACGGTGCGGTGAGAGTC–3')를 사용하여 GeneAmp PCR machine(Perkin Elmer 9600)으로 증폭시켰다. 198bp 생성물을 증폭시키기 위해 95°C 에서 60 초동안 변성시킨 후 62°C 에서 90 초동안 시발체를 아닐링 시킨 다음 72°C 에서 60 초동안 시발체 연장반응을 시행하는 과정을 35 사이클 반복하였다. 증폭된 단편에서 단편들에서 677 C → T 변이를 인식할 수 있는 제한효소 *Hinf*I(10 unit / reaction mixture)으로 37°C 에서 3 – 4 시간동안 분해하였다. A(Ala) 대립유전자(allele)에서 얻어진 198bp 단편은 *Hinf*I 로 분해되지 않는 반면에 V(Val) 대립유전자에서 얻어진 같은 길이의 단편들은 175bp 와 23bp 단편으로 분해되었다. 이후 *Hinf*I 으로 처리한 단편들을 2.5% agarose gel 로 전기영동한 후 ethidium bromide 로 염색하여 변이상태를 관찰하였다.

결 과

환자의 MTHFR 돌연변이 검사결과 677 염기쌍에서 cytosine 이 thymine 으로 바뀌어 alanine 이 valine 으로 치환된 동형접합성 변이(VV)임이 밝혀졌다(Fig.1).

고 찰

Cystathionine β - synthase(CBS)부족으로 인하여 homocysteine 뇨증(homocystinuria)이 생긴 경우 homocysteine 과다증이 혈관질환을 일으키는 위험인자로 작용한다는 사실이 밝혀졌다. 이 경우 젊은 나이에 동맥질환과 혈전색전증(thromboembolism)이 나타나는 경우가 매우 흔하다. 30 세이전에 합병증이 생길 확률이 50%에 달한다는 보고도 있다.[1] 그렇지만 이 질환의 빈도는 아주 낮기 때문에 전체적으로 건강에 미치는 영향은 미미하다.

더 흔한 것은 혈중 homocysteine 수치가 약간 상승하는 경증의 homocysteine 과다증이다. 내열성이 없는 돌연변이 효소에 대한 동형접합성(homozygosity)으로 인하여 homocysteine 이 methionine 으로 전환하는데 필요한 methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)의 활성이 감소한다. 이것이 homocysteine 과다증의 흔한 원인으로 밝혀졌고 이 돌연변이 대립형질에 대한 이형접합성(heterozygosity)의 빈도는 어떤 인구집단에서 50%에 달하는 것으로 보고되었다.[2,3] 재메틸화(remethylation)에 관여하는 methylenetetrahydrofolate – homocysteine methyltransferase 의 중요성은 연구중에 있다. 위와같은 유전학적 원인뿐만 아니라 비타민 B 부족증, 신부전 등도 homocysteine 과다증을 유발하는 원인이다.

MTHFR 의 유전적 이상은 homocysteine 뇨증 환자에서 조사되었다. 이 경우 가장 흔한 원인은 cystathionine β - synthase 의 부족인데 이것은 황전환작용(transsulfuration)에 작용하는 첫번째 효소이다.[4] MTHFR 부족증 때문에 homocysteine 뇨증이 생기는 경우는 비교적 드물어서 지금까지 50 예만이 보고되었다. 이 환자들은 심한 MTHFR 부족증이 있고 섬유아세포(fibroblast)에서 정상군에 비하여 활성이 15% 밖에 되지 않는다.[5] 이 질환은 여러가지의 신경학적, 혈관증상들과 관계되어 있다. 최근에 homocysteine 뇨증과 응고인자 V 의 돌연변이로 인한 활성화 C 단백질내성(activated protein C resistance : APCR)과의 연관성이 제시되었다.[6]

37°C 에서 활성이 저하되고 46°C 에서 내열성이 없는 MTHFR 의 돌연변이가 관상동맥 질환에서 보고되었다.[7] 대조군의 5%에 비하여 관상동맥질환 환자군에서는 17%가 이상을 보였다. Single strand conformational polymorphism(SSCP)에 의한 조사에서 677 염기쌍에서 cytosine 이 thymine 으로 대치되어 alanine 이 valine 으로 치환된다. 이 돌연변이는 미국에서 아주 흔히 보고되었으며 대립형질의 빈도는 약 35%이다.[8] 그 중 12%가 동형접합체이고 40 – 45%가 이형접합체이다.

그렇지만 이 빈도는 나라에 따라 많은 차이를 보인다. 동형접합체 돌연변이에서는 37°C 에서 대조군의 40 – 50%에 해당하는 활성을 보이며 이형접합체인 경우에는 그 활성이 중간정도이다. 동형접합체에서는 46°C 에서 대조군에 비하여 35%의 잔여활성을 나타내고 이형접합체에서는 중간정도의 활성을 보인다. Alanine 이 valine 으로 치환되어 나타나는 활성은 높은 연관성을 보여서 전체인구 중에서 다른 MTHFR 돌연변이는 존재하지 않는다는 것을 시사한다.

동형접합체 돌연변이에서는 혈중 homocysteine 수치가 유의하게 높지만 엽산이 homocysteine 수치를 조절하는데 중요한 역할을 한다.[9] 동형접합체 돌연변이인 경우 혈중 엽산수치가 정상범위 이하에 있을 때 약간의 homocysteine 과다증을 보인다.[10] 그렇지만 엽산수치가 정상이 되면 homocysteine 과다증은 나타나지 않는다. 이런 관계는 심혈관질환뿐만 아니라 정상군에서도 증명되었다. 이 사실은 엽산을 공급해주면 돌연변이를 가진 사람에서 homocysteine 과다증을 방지할 수 있다는 것을 의미한다.

산모에서 엽산을 공급해주면 신경관결손(neural tube defects)의 빈도가 급격하게 감소된다는 사실이 밝혀졌다. 이분척수(spina bifida) 기형을 가진 아기를 임신한 산모에서 alanine 이 valine 으로 치환된 동형접합체 돌연변이가 증가되었다.[11] 이분척수를 가진 집단에서 동형접합체 돌연변이, 혈중엽산수치의 저하, 효소활성의 저하 등이 관찰되었다. 이제까지의 연구결과 MTHFR 돌연변이는 혈관질환과 이분척수를 일으키는 위험인자라는 사실이 증명되었다. 최근의 연구결과 이 돌연변이가 결장암을 예방하는 효과가 있다는 가설이 제시되었다.[12] 혈중엽산수치가 높은 동형접합체 돌연변이의 경우 결장암의 위험도가 4 배 감소했으며 알코올 섭취가 적은 경우 8 배정도의 감소를 보였다. 이와 관련된 기전으로는 DNA 메틸화의 감소와 dUMP 가 thymidine 으로 전환된다는 가설이 제시되었다.

Homocysteine 을 측정하는 방법으로는 homocysteine 과 homocysteine thiolactone, 유리형의 homocysteine, 그리고 단백질과 결합한 homocysteine 을 포함하는 총 homocysteine 수치가 이용된다. 단백질과 결합된 homocysteine 은 전체양의 70 – 80%에 달한다.[13] 정상 총 homocysteine 의 농도는 공복시에 5 – 15 μmol / L 이다.[14] Homocysteine 과다증은 15 – 30 μmol / L, 30 – 100 μmol / L, 100 μmol / L 이상 등의 3 가지로 분류할 수 있다.[15]

공복시 homocysteine 수치가 정상이지만 homocysteine 과다증이 의심되는 경우에는 methionine 부하검사(methionone loading test)를 시행한

다.[16] Methionine 부하검사시 수치가 2 표준편차 이상이면 homocysteine 과다증이라고 진단할 수 있다. 그렇지만 methionine 부하검사에 대해서는 아직 많은 논란이 있다. 결론적으로 MTHFR 은 homocysteine 의 기저치를 조절하기 때문에 그 활성은 methionine 부하검사로 정확히 측정하기 어렵다. 반면에 황전환작용에 관여하는 효소는 일시적으로 발생한 식후의 homocysteine 상승을 낮추기 때문에 methionine 부하검사로 활성을 측정하는 것이 가능하다.

Homocysteine 과다증의 치료는 원인질환에 따라 다르지만 일반적으로 비타민 공급으로 치료될 수 있다. 치료에 필요한 최소한의 엽산과 pyridoxine 의 양은 확실히 밝혀지지 않았다. 대부분의 환자에서 하루에 1 – 5mg 의 엽산을 복용하면 homocysteine 수치가 급격히 감소한다.[17] 엽산단독이나 엽산과 비타민 B_{12}, B_6, 그리고 비타민 B_6 과 B_{12} 등도 homocysteine 을 감소시킬 수 있다. 대개 치료 4 – 6 주 후 homocysteine 수치가 정상화되지만 2 주만에 회복될 수도 있다. 흥미롭게도 1960 년부터 비타민 B_6 소비량이 늘어난 이후 심혈관질환으로 인한 사망률이 감소되었다.[18]

지금까지 동맥질환의 원인으로 homocysteine 과다증이 제시되었지만 정맥혈전과의 관계는 명확히 증명되지 않았다. Homocysteine 수치가 상위 20%에 속하면 동맥경화의 위험도가 2 배 증가한다. 경증의 homocysteine 과다증은 고혈압과 같은 위험인자와 동반하여 혈전을 유발하는데 상승작용을 한다. 그렇기 때문에 이런 위험인자가 있는 경우 homocysteine 수치를 낮추는 치료를 받아야 한다. 소량의 엽산이 여기에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. Methionine 부하검사시 생기는 homocysteine 과다증에는 비타민 B_6 도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그렇지만 현재 이런 치료에 관한 명확한 통계가 나와있지 않으므로 앞으로 여기에 관하여 심도있는 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 국내에서 처음으로 MTHFR 돌연변이에 따른 homocysteine 과다증과 관련된 반복자연유산을 발견했다는데 그 의의가 있다. 따라서 반복자연유산에 대한 검사시 반드시 homocysteine 과다증을 염두에 두고 이것을 발견했을 때는 MTHFR 유전자검사로 그 원인을 확진하는 것이 필요하다고 하겠다.

인 용 문 헌

1. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β - synthase deficiency. Am J Hum Genet 1985 ; 37 : 1 – 31.
2. Kluijtmans IAJ, van de Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia : A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996 ; 58 : 35 – 41.
3. Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ. Thermolabile 5, 10 – methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. Am J Hum Genet 1995 ; 56 : 142 – 50.
4. Mudd SH, Levy HL, Skovby B. Disorders of transsulfuration. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7 th ed. New York : McGraw – Hill ; 1995. P.1279 – 327.
5. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7 th ed. New York : McGraw – Hill ; 1995. P.3111 – 28.
6. Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C, et al. Coexistence of hereditary homocystinuria and Factor V Leiden effect on thrombosis. N Engl J Med 1996 ; 334 : 763 – 8.
7. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase : an inherited risk factor for coronary disease. Am J Hum Genet 1991 ; 48 : 536 – 45.
8. 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.
9. Van der Put NMJ, Steegers – Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet 1995 ; 346 : 1070 – 1.
10. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in U.S. physicians. Circulation 1996 ; 94 : 2410 – 6.
11. Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molly A, Scott JM. Methylenetetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. Lancet 1996 ; 348 : 1037 – 8.
12. 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.
13. Carey MC, Donovan DE, FutzGerald O, McAuley FD. Homocystinuria : A clinical and pathological study of nine subjects in six families. Am J Med 1968 ; 48 : 7 – 25.
14. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum : methods and clinical applications. Clin Chem 1993 ; 39 : 1764 – 79.
15. Kang SS, Wong PW, Manilow MR. Homocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Ann Rev Nutr 1992 ; 12 : 279 – 98.
16. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. Disordered methionine / homocysteine metabolism in premature vascular disease : its occurrence, cofactor therapy and enzymology. Arterioscler Thromb 1993 ; 13 : 1253 – 60.
17. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid --- an innocuous means to reduce plasma homocysteine. Scand J Clin Lab Invest 1988 ; 48 : 215 – 21.
18. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. Nat Med 1996 ; 2 : 386 – 9.