

Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 유전자다형과 자연 유산아 발생의 관련성에 관한 연구

포천중문의과대학교 분당차병원 ¹산부인과학교실, ²임상의학연구소, ³생명과학대학원,
⁴강남차병원 유전학연구소, ⁵차중앙연구소

전익범^{1,2,*} · 지승일^{2,3,*} · 신승주¹ · 차선희¹ · 최동희¹ · 임동진^{2,3}
박상희⁴ · 이수민⁵ · 이상화⁵ · 고정재^{2,3} · 김남근^{2,3}

The Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and a Risk of Spontaneously Aborted Embryos

Nick-Beom Jeon^{1,2*}, Seung Il Ji^{2,3*}, Seung Joo Shin¹, Sun Hee Cha¹, Dong Hee Choi¹, Dong Jin Yim^{2,3},
Sang Hee Park⁴, Suman Lee⁵, Sang Hwa Lee⁵, Jung Jae Ko^{2,3}, Nam Keun Kim^{2,3}

¹Department of Gynecology & Obstetrics, ²Institute for Clinical Research, ³Graduate School of Life Science and
Biotechnology, ⁵Functional Genomics Lab. of CHA Research Institute, College of Medicine, Pochon CHA University,
Seongnam 463-712, ⁴Genetics Lab. of Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Seoul 135-081

Objective: This study was performed to understand the influence of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) genotypes on the spontaneously aborted embryos.

Methods: DNA was extracted from tissue samples of 95 spontaneously aborted embryos and 100 samples of normal children randomly and 449 samples of normal adults were selected as the controls. MTHFR genotypes were determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay.

Results: The aborted embryo group had higher frequency of MTHFR 677CC type ($p=0.014$) and lower 677CT type ($p=0.063$) than the controlled child group. The frequency of MTHFR 677CT type was drastically lower than that of controlled adult group ($p=0.032$). In the MTHFR C677T/A1298C combination, 677CC/1298AC genotype of the aborted embryo was significantly higher ($p=0.034$) than that of controlled child group, but it was not statistically significant in controlled adult group ($p=0.063$).

Conclusion: MTHFR 677CC and MTHFR 677CC/1298AC genotypes may represent genetic markers for the risk of spontaneously aborted embryos at least in Koreans.

Key Words: MTHFR, Abortus, Polymorphism, Homocysteine

반복 자연유산 환자는 전체 임신부의 약 1~5%를 차지하며, 이중 원인이 밝혀지지 않은 경우는 약 40~55%에 해당한다.¹⁻³ 최근에는 혈중 호모시스테인 (homocysteine)이 높은 경우 반복 자연유산과 관계가 있다고 밝혀졌다.^{2,4} 5,10-methylenetetrahydro-

folate reductase (MTHFR)는 5,10-methylenetetrahydrofolate를 5-methyltetrahydrofolate로 전환시키면서, 이 메틸기가 호모시스테인에 제공되어 메티오닌을 합성하는 대사과정에 관여한다. MTHFR C677T 경우는 아미노산 알라닌 (alanine; A)이 발린 (valine; V)

주관책임자: 김남근, 우)463-712 경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지, 포천중문 의과대학교 분당차병원 임상의학연구소
Tel: (031) 780-5762, Fax: (031) 780-5766, e-mail: namkkim@naver.com or nkim@cha.ac.kr

*These authors contributed equally to this work

으로, MTHFR A1298C는 글루타메이트 (glutamate; G)가 알라닌 (alanine; A)으로 각각 변하여, 효소의 활성을 20~30%까지 떨어뜨린다.⁵ 이로 인해 호모시스테인이 메티오닌으로 전환되지 못하여 생긴 과량의 호모시스테인이 체내에 축적된다.⁶⁻⁸ 이로 인한 혈중 호모시스테인의 증가는 동맥경화, 심근경색, 정맥성 혈전증, 신경관결손증, 태반조기박리, 태반경색 등의 위험인자이며, 아울러 반복 자연유산의 위험을 증가시킨다는 보고가 있다.^{4,9-12} 또한, 최근 들어 Isotalo 등¹³은 MTHFR 677TT 돌연변이형이 fetal tissue에서 유의하게 높은 결과를 보고하였으며, Zetterberg 등¹⁴은 MTHFR 677TT/1298AA & 677CT/1298AC 조합형 MTHFR C677T와 A1298C 돌연변이 조합형의 빈도가 유의하게 높게 나타난다는 사실을 보고하였다. 또한, Zetterberg 등¹⁵은 MTHFR C677T 유전자와 transcobalamin (TC)의 유전자의 조합형인 MTHFR 677TT/TC 776GG 형과 MTHFR 677TT/TC 776CG 형의 빈도가 유의하게 높게 나타나는 사실을 보고한 바 있다.

그러므로, 본 연구에서는 한국인의 유산아 조직 95개체를 대상으로 하여 유산아 자신의 MTHFR 유전자 돌연변이가 유산의 직접적인 요인으로 작용하는지를 알아보하고자 시도하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1999년 6월부터 2002년 2월까지 포천중문의대 분당차병원 산부인과 및 강남차병원 여성의학연구소에서 임신 20주 이내에 자연유산된 유산아 조직 95개체를 대상으로 하였으며, 대조군은 정상인 소아중에서 무작위로 선정한 100명과 정상인 성인 449명을 각각 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) MTHFR 및 TSEY 유전자 분석

DNA 분리는 DNA 추출키트 (extraction column, QIAmp blood kit, Qiagen Inc., Crawthorn, CA, USA)에 의해 제조자의 프로토콜에 따라서 환자의 혈액에서 추출한 백혈구로부터 분리하였다. MTHFR C677T는 MTHFR 677번 염기를 포함하는 부분을 증폭하기

위해 시발체 세트 (primer set)인 sense primer (5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3')와 antisense primer (5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TC-3')를 사용하여 GeneAmp PCR machine (Perkin Elmer 2400, Wellesley, MA, USA)으로 증폭시켰으며, MTHFR A1298C는 MTHFR 1298번 염기를 포함하는 부분을 증폭하기 위해 시발체 세트 (primer set)인 sense primer (5'-GGG AGG AGC TGA CCA GTG CAG-3')와 antisense primer (5'-GGG GTC AGG CCA GGG GCA G-3')를 사용하여 GeneAmp PCR machine으로 증폭시켰다. 증폭된 단편들에서 MTHFR 677C->T 변이를 인식할 수 있는 제한효소 *HinfI* (10 unit/reaction mixture, MBI Fermentas, USA)으로 37°C에서 3~4시간 동안 분해하였다. A (Ala) 대립유전자에서 얻어진 198 bp 단편은 *HinfI*에 분해되지 않는 반면, V (Val) 대립유전자에서는 얻어진 같은 길이의 단편들은 175 bp와 23 bp 단편으로 분해되었다. 이들 단편들은 3.0% 아가로스 젤로 전기영동한 후 etidium bromide (EtBr)로 염색하여 변이상태를 확인하였다.^{16,17} MTHFR 1298A->C 돌연변이형의 경우는 증폭된 단편들을 변이를 인식할 수 있는 *Fnu4HI* (10 unit/reaction mixture, MBI Fermentas, USA)를 사용하였다. 처리한 단편들은 2.5% 아가로스 젤로 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 관찰하였다. MTHFR 1298AA형은 138 bp의 단편을, MTHFR 1298CC형은 119 bp의 단편으로 각각 관찰되었다.

3. 통계분석

각각의 호모시스테인 수치에서 MTHFR 유전자 돌연변이형 빈도의 유의성 검정은 Fisher's exact test 방법을 이용하였으며, MTHFR C677T와 A1298C 그리고 이들의 조합형에 대한 유의성은 ANOVA를 이용하여 통계패키지 SAS 8.2 for Windows로 분석하였다.

결 과

유산아 조직 95개체와 소아 정상대조군 100명, 성인 정상대조군 449명을 대상으로 MTHFR 유전자 677번 nucleotide가 cytosine (C)에서 thymine (T)으로 그리고, 1298번 nucleotide가 adenine (A)에서 cyto-

Table 1. Individual MTHFR genotype distributions for controls and spontaneous abortion groups

MTHFR genotype	Controls (n=549)			Child control-based		Adult control-based	
	Abortus (N=95) (%)	Child (N=100) (%)	Adult (N=449) (%)	Odds ratio (95% CI)	P	Odds ratio (95% CI)	P
677CC	39 (41.1)	24 (24.0)	145 (32.3)	2.205 (1.193~4.078)	0.014	1.460 (0.927~2.99)	0.120
677CT	39 (41.1)	55 (55.0)	239 (53.2)	0.5698 (0.323~1.0053)	0.063	0.6119 (0.391~0.959)	0.032
677TT	17 (17.9)	21 (21.0)	65 (14.5)	0.8199 (0.402~1.671)	0.594	1.288 (0.716~2.315)	0.252
T allele ratio	0.384	0.485	0.410	-	-	-	-
1298AA	64 (67.4)	77 (77.0)	312 (69.5)	0.6167 (0.327~1.162)	0.151	0.907 (0.565~1.456)	0.714
1298AC	28 (29.5)	21 (21.0)	129 (28.7)	1.572 (0.818~3.020)	0.189	1.037 (0.638~1.686)	0.901
1298CC	3 (3.2)	2 (2.0)	8 (1.8)	1.598 (0.261~9.78)	0.676	1.798 (0.468~6.905)	0.417
C allele ratio	0.140	0.125	0.160	-	-	-	-

MTHFR: Methylenetetrahydrofolate reductase. C: Cytosine, T: Thymine, A: Adenine

sine (C)으로의 돌연변이형에 대한 빈도를 PCR-RFLP 방법으로 조사하였다.

Table 1에서 보는 것처럼 유산아 그룹의 MTHFR C677T 유전자형은 정상형인 677CC, 이형접합성 변이형인 677CT, 동형접합성 변이형인 677TT는 각각 41.1%, 41.1%, 17.9%였으며, 소아대조군의 경우는 24.0%, 55.0%, 21.0%이었으며, 성인대조군의 경우는 32.3%, 53.2%, 14.5%로 각각 나타났다. 유산아 그룹의 MTHFR A1298C 유전자형은 정상형인 1298AA, 이형접합성 변이형인 1298AC, 동형접합성 변이형인 1298CC는 각각 67.4%, 29.5%, 3.2%였으며, 소아대조군의 경우는 77.0%, 21.0%, 2.0%이었으며, 성인대조군의 경우는 69.5%, 28.7%, 1.8%로 각각 나타났다. 유산아 그룹에서는 소아대조군에 비하여 MTHFR 677CC 형의 비율은 높았으며, 677CT 형의 비율은 낮게 나타났다 (Table 1; $p=0.014$ and $p=0.063$). 또한, MTHFR 677CT형의 비율은 성인대조군에 비해서도 현저히 낮게 나타났다 ($p=0.032$). MTHFR 677TT형은 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다.

MTHFR C677T/A1298C 유전자 조합형의 빈도는 Table 2와 같으며, MTHFR 677CC/1298AA 정상형의 빈도를 보면, 성인대조군과는 동일한 빈도를 보였으

며, 소아대조군 보다는 높은 빈도를 보였다. 677CC/1298AC 돌연변이 조합형은 소아대조군에 비해 현저히 높은 빈도를 보였으며 ($p=0.034$), 성인대조군에 비해서도 높은 빈도를 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다 ($p=0.063$). 677CT/1298AA 형의 경우는 소아대조군의 42%보다 유산아 그룹에서 19.5%로 현저히 낮았으나 통계학적인 유의성은 없었다 (Table 2; $p=0.075$).

고 찰

Table 1에서 보는 것처럼 대립유전자의 빈도가 이전의 연구들에서와는 달리 MTHFR 677T 대립유전자의 빈도가 대조군의 0.485와 0.41 보다 낮은 0.380으로 나타났다. 그리고 1298C 대립유전자 역시 대조군의 0.125와 0.16과 비슷한 수준인 0.14로 나타나서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 연구결과는 반복 자연유산 환자들을 대상으로 한 Kim 등¹⁶의 연구결과와 일치하는 것으로 흥미롭다. 이들의 연구결과를 보면, 677T 대립유전자 빈도가 0.44였으며, 1298C의 빈도는 0.148로 나타나서 한국인의 유산아 그룹과 매우 유사하게 나타났다. 이러한 결과

Table 2. Combined C677T/A1298C genotype frequencies for control and spontaneous abortion groups

Genotype	Controls			Child control-based		Adult control-based	
	Abortus (N=95) (%)	Child (N=100) (%)	Adult (N=449) (%)	Odds ratio (95% CI)	p	Odds ratio (95% CI)	p
MTHFR C677T/A1298C							
CC/AA	18 (18.9)	14 (14.0)	85 (18.9)	1.436 (0.670~3.080)	0.440	1.001 (0.569~1.761)	1.000
CC/AC	18 (18.9)	8 (8.0)	52 (11.6)	2.688 (1.108~6.521)	0.034	1.785 (0.990~3.216)	0.063
CC/CC	3 (3.2)	2 (2.0)	8 (1.8)	1.598 (0.261~9.78)	0.676	1.798 (0.468~1.198)	0.417
CT/AA	28 (19.5)	42 (42.0)	162 (36.1)	0.577 (0.319~1.045)	0.075	0.740 (0.458~1.198)	0.238
CT/AC	11 (11.6)	13 (13.0)	77 (17.2)	0.876 (0.372~2.065)	0.829	0.633 (0.322~1.242)	0.220
TT/AA	17 (17.9)	21 (21.0)	65 (14.5)	0.820 (0.402~1.671)	0.594	1.288 (0.716~2.315)	0.430

MTHFR: Methylenetetrahydrofolate reductase. C: Cytosine, T: Thymine, A: Adenine

로 보아 한국인의 반복 자연유산 환자의 유전자형이 비슷한 비율로 유산아 그룹에 전달되고 있음을 알 수 있었다.

유산아 그룹에서의 MTHFR 677CC 유전자형의 빈도 41.1%로 소아대조군의 24.0% 보다 현저히 높았으며 (OR, 2.205; 95% CI, 1.193~4.078; $p=0.014$), MTHFR 677CT 형의 경우는 성인대조군에 비해 현저히 감소하였다 (OR, 0.612; 95% CI, 0.391~0.959; $p=0.032$). 이러한 결과는 지금까지 MTHFR C677T 유전자형과는 관련성이 없다는 이전의 연구보고들과는 다른 사실로 주목할 만하다. 이러한 결과로 미루어 한국인의 유산아 그룹은 MTHFR C677T 유전자에 더욱 의존적이며, 677CC 형의 경우 혈중 호모시스테인의 농도를 낮추는 반면 DNA 과메틸화 (hypermethylation)에 영향을 주어 유산을 유발할 수도 있을 것으로 추정할 수 있다. 또한, 677CC/1298AC 조합형의 경우 유산아 그룹에서의 빈도가 현저히 높아 유산과의 관련성을 보였다 (OR, 2.688; 95% CI, 1.108~6.521; $p=0.034$). 이러한 사실은 스웨덴의 Zetterberg 등¹⁴에 의한 유산아 그룹에 대한 연구결과 및 한국인의 반복 자연유산 환자에서의 결과와도 일치하였다.¹⁶

그러나 한국인의 유산아 그룹에서의 낮은 677T

대립유전자 빈도와 낮은 C677T/A1298C 돌연변이 조합형 빈도는 Isotalo 등¹³, Zetterberg 등^{14,15}의 연구결과와는 일치하지 않았다. 그러나 한국인 반복 자연유산 환자를 대상으로 한 Kim 등¹⁶과 Choi 등¹⁸의 연구결과에 따르면, MTHFR C677T 유전자 돌연변이에 따른 호모시스테인 농도의 증가는 기존의 결과들과 일치하였다. 또한 본 연구결과에서는 677CT/1298CC, 677TT/1298AC과 677TT/1298CC 등 3개 이상의 돌연변이 대립유전자를 가진 3가지 조합형은 관찰되지 않았다. 그러나 Isotalo 등¹³의 경우는 677CT/1298CC 형과 677TT/1298CC 형의 빈도가 신생아의 탯줄혈액에서 채취한 혈액으로 조사한 결과 0.0%이었으나, 유산된 태아조직에서는 3.7%로 높게 나타난다는 사실을 보고한 바 있다. 그러나 이들 돌연변이 조합형은 Zetterberg 등¹⁴이 6주 이상의 유산아 조직을 대상으로 한 연구에서는 발견되지 않았다. 본 연구에서도 이들 돌연변이 조합형들은 발견되지 않았는데 그 이유는 이들 유전자형을 가진 배아 (embryo)는 착상전이나 착상 직후 혹은 임신 6주 이전에 대부분 유산되는 것으로 추정된다.

연구자들의 예상과는 달리 임신 20주까지의 초기 유산시에 MTHFR 677TT 형의 빈도가 17.9%로 나타나 소아대조군의 21.0%에도 미치지 않은 것은 매우

흥미로운 사실로 이들 유전자형은 매우 이른 시기에 유산이 집중되든지 아니면, MTHFR 유전자 이외의 인자들이 관여하고 있을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 실제로, 태반조기박리 (placental abruption)의 경우 호모시스테인, MTHFR 돌연변이, activated protein C resistance, protein C 등의 thrombotic risk factor 들이 2개 중복될 때는 odd 비 값이 3.40 (95% CI=1.80~6.42), 3개가 중복될 때는 6.83 (95% CI=1.52~30.7)으로 각각 나타나서 이들 인자들이 추가적으로 태아의 유산에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.¹⁹ 그러나 Isotalo 등¹³이 유산아 161개체를 대상으로 한 연구결과에 따르면, 유산아 그룹에서 관찰되던 677CT/1298CC와 677TT/1298CC 형이 신생아 그룹에서는 관찰되지 않음을 보고한 바 있다. 이러한 결과로 미루어, 이들 유전자형을 가진 태아들 중 일부는 임신초기 일정시기까지는 임신상태의 유지가 가능함을 알 수 있다.

최근 들어 많은 연구자들이 plasma folate 및 vitamin B의 영양상태에 따라 호모시스테인의 혈중농도가 결정되며 여기에는 MTHFR 뿐만 아니라 methionine synthase (MTR), methionine synthase reductase (MTRR), thymidylate synthase (TS), cystathionine β -synthase (CBS) 등을 포함한 10여개의 유전자가 관여하고 있음을 보고한 바 있다.²⁰⁻²²

Nelen 등¹²은 네델란드 여성을 대상으로 MTHFR C677T 돌연변이가 혈중 호모시스테인의 농도를 높이고 이로 인해 반복 자연유산을 2~3배 높이는 위험인자로 보고하였으며, 2000년에는 네델란드, 이탈리아, 프랑스, 이스라엘, 영국 등 5개 국가들의 data를 종합하여 그 관련성을 보고한 바 있다.^{4,12,23} 그러나 한국을 비롯한 일본, 그리스, 이탈리아, 아일랜드집단 등에서는 MTHFR C677T site에서 이러한 유의한 차이가 발견되지 않았다.^{2,3,24-28} 또한, Kutteh 등²⁹과 Brenner 등³⁰ 역시 MTHFR 677TT 동형접합성 돌연변이가 혈중 호모시스테인 양의 증가와는 관련이 있으나, 반복 자연유산과는 관련이 없다는 보고를 한 바 있다. 그리고 최근 들어 보고된 MTHFR A1298C 돌연변이와 MTHFR C677T/A1298C 돌연변이 조합형에 대한 연구에서 신경관결손증 (neural tube defect), 태반조기박리 (placental abruption)와의 관련성이 보고된 바 있다.^{31,32}

그러나 위와 같이 생식 및 불임관련 질환에 대한 MTHFR 및 호모시스테인 대사관련 유전자 돌연변이와의 관련성에 대한 수많은 연구에도 불구하고, MTHFR C677T와 A1298C 돌연변이 조합형에 대한 연구는 태아의 조기유산과 태아사망 관련성 등의 혈전기전과 임신의 유지 및 유산기전 등과 관련된 매우 흥미로운 부분임에도 불구하고 아직까지 Isotalo 등¹³과 Zetterberg 등^{14,15,33}에 의한 3~4편의 연구논문이 그치고 있는 실정이다. 그러므로 엽산과 호모시스테인 그리고, DNA 합성 및 DNA methylation 등과 관련된 유전자들에 대한 보다 많은 연구가 요구된다.

이들 유산아 그룹의 염색체 구성을 보면, 46, XX와 46, XY로 정상인 경우는 전체 95예 중 58예 (60.0%), 염색체의 수나 구조적인 이상을 가진 개체는 25예 (26.3%), 기타의 원인으로 염색체의 숫자를 알 수 없는 12예 (12.6%)로 이루어졌다. 염색체가 정상인 개체는 MTHFR C677T의 각 대립인자 677C와 677T의 비율이 각각 0.62와 0.38로 유산아 전체 평균과 동일하였으며, 염색체의 수적, 구조적 이상을 갖는 경우들에서도 역시 같은 비율로 나타났다. 다만, 염색체의 구조를 알 수 없는 12예에서만 그 빈도가 0.54와 0.46으로 677T 대립유전자의 빈도가 높게 나타나서 염색체 이상과 MTHFR C677T 유전자 빈도와는 관련이 없는 것으로 생각된다. 또한, MTHFR A1298C 돌연변이형의 빈도를 보면 염색체가 정상인 경우는 1298A와 1298C 대립유전자의 빈도가 각각 0.83과 0.17로 유산아 그룹의 전체 평균 및 성인대조군의 빈도가 비슷한 값을 갖고 있었다. 그러나 염색체 이상을 갖는 개체들에서는 0.76과 0.24로 1298C 대립유전자의 빈도가 높게 나타났다. 염색체가 모두 정상인 개체에서는 대립유전자 빈도가 유산아 전체 평균과 차이가 없었으나 염색체 이상인 그룹에서는 1298C 대립유전자의 빈도가 0.24로 높게 나타났으며, cell의 no growth 등의 원인에 의해 염색체의 이상 유무를 알지 못하는 예들에서는 677T의 빈도가 0.46으로 약간 높게 나타남을 알 수 있다.

결론적으로, 지금까지 알려진 것과는 달리 MTHFR 677CC와 677CT 형의 빈도가 높게 나타나서 유산아의 발생과정 중 자신의 체내 유전자 발현조절기

전의 이상이 반복유산의 원인일 가능성을 제기할 수 있으며, 그 기전으로 DNA 과메틸화 (hypermethylation) 등을 생각해 볼 수 있다. 또한, 한국인의 경우 원인불명의 반복 자연유산 환자에서도 MTHFR C677T 유전자 돌연변이의 빈도가 정상대조군보다 낮게 나타나는 점으로 미루어 한국인에게 작용하는 한국인 특이유전자나 생활습관상의 요인이 작용하고 있을 가능성도 배제할 수 없다. 그러므로 유산아 그룹과 반복 자연유산 환자에서 호모시스테인 대사과정에 관여하는 유전자들과 엽산 (folate), 비타민 B2, B6, B12 등의 미량원소들에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

참 고 문 헌

1. Younis JS, Ohel G, Brenner B, Ben-Ami M. Familial thrombophilia - the scientific rationale for thrombophylaxis in recurrent pregnancy loss? *Hum Reprod* 1997; 12: 1389-90.
2. Raziel A, Kormberg Y, Fridler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45: 65-71.
3. Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S. Recurrent pregnancy loss: Etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 121-9.
4. Nelen WLMD, Blom HJ, Steegers EAP, den Heijer M, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta analysis. *Fertil Steril* 2000; 74: 1196-99.
5. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24: 27-59.
6. Chango A, Boisson F, Barbe F, Quilliot D, Drosch S, Pfister M, et al. The effect of 677C->T and 1298 A->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000; 83: 593-6.
7. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98: 5-7.
8. Fodinger M, Wagner OF, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Recent insights into the molecular genetics of the homocysteine metabolism. *Kidney Int* 59 Suppl 2001; 78: S238-42.
9. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguex A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and proteome homocysteinylolation in human endothelial cells: implications for athero-sclerosis. *Cir Res* 2000; 87: 45-57.
10. Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, et al. Association between polymorphisms of folate and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood* 2001; 97: 3205-9.
11. Wouters MGAJ, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels FJM, Tomas CMG, Borm GF. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60: 820-5.
12. Quere I, Bellet H, Hofet M, Janbon C, Mares P, Gris JC. A women with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 1998; 68: 152-4.
13. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 986-90.
14. Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, et al., Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 113-8.
15. Zetterberg H, Zafiroopoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003; 18: 1948-50.
16. Kim NK, Nam YS, Lee S, Kim SH, Shin SJ, Chang SW, et al. Polymorphisms of 5,10-Methylenetetrahy-

- drofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) gene in recurrent spontaneous abortion. *Kor J Fertil Steril* 2002; 29: 215-22.
17. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7.
 18. Choi YK, Kang MS, Kim NK, Kim SH, Choi DH, Ahn MO, et al. Contribution of thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphism to total plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Kor J Fertil Steril* 2004; 31: 183-90.
 19. Van der Molen EF, Arends GE, Nelen EL, van der Put NJ, Heil SG, Eskes TK, Blom HJ. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1258-63.
 20. Kluijtmans LA, Boers GH, Verbruggen B, Trijbels FJ, Novakova IR, Blom HJ. Homozygous cystathionine beta-synthase deficiency, combined with factor V Leiden or thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in the risk of venous thrombosis. *Blood* 1998; 91: 2015-8.
 21. Eskes TK. Homocysteine and human reproduction. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000; 27: 157-67.
 22. Yates Z, Lucock M. Interaction between common folate polymorphisms and B-vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event. *Mol Genet Metab* 2003; 79: 201-13.
 23. Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet* 1997; 350: 861.
 24. Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *British J Haematol* 1999; 105: 98-101.
 25. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz, Abramovici H. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 126-30.
 26. Grandone E. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677T->C mutation and unexplained early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1056-7.
 27. Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'Mello M, Regan C, Whitehead AS, et al. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 20: 266-70.
 28. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 2000; 15: 458-62.
 29. Kutteh WH, Park VM, Deither SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999; 71: 1048-53.
 30. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999; 82: 6-9.
 31. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1044-51.
 32. Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, Odendaal HJ. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placenta but not with intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97: 174-7.
 33. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 7.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T와 A1298C) 유전자 돌연변이형이 자연유산아 발생의 원인 유전자로 작용하는지에 대해 알아보고자 시도하였다.

연구방법: 95명의 자연유산아 조직과 대조군으로 100명의 정상 소아의 혈액 그리고 449명의 정상 성인의 혈액을 채취하여 DNA를 분리하여 사용하였다. 유전자형은 분리된 DNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응과 제한효소 절편다형 분석방법으로 결정하였다.

결과: 자연유산아 그룹은 소아대조군에서 보다 MTHFR 677CC 형 ($p=0.014$)은 높게, 677CT 형 ($p=0.063$)은 낮게 나타났다. 성인대조군과의 비교에서도 MTHFR 677CT 형의 빈도는 현저히 낮게 나타났다 ($p=0.032$). 그리고 MTHFR 677CC/1298AC 조합형 유전자의 경우 소아대조군 ($p=0.034$)과의 비교에서는 현저히 높은 빈도를 나타냈으나, 성인대조군 ($p=0.063$)과의 비교에서는 높은 경향성은 있었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

결론: MTHFR 677CC와 MTHFR 677CC/1298AC 유전자형은 자연유산아 발생의 위험인자일 가능성이 높으며, 지속적인 연구가 요구된다.

중심단어: Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR, 유전자 다형, 호모시스테인