

한국 여성에서 중증자궁내막증과 CYP1B1 유전자 다형성과의 관련성에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 제일병원 산부인과교실¹, 건양대학교 의과대학 산부인과교실¹,
건국대학교 의과대학 산부인과교실², 이화여자대학교 의과대학 산부인과교실³

조연진 · 허성은¹ · 이지영² · 송인옥 · 궁미경 · 문혜성³ · 정혜원³

Association of the CYP1B1 Gene Polymorphism with the Risk of Advanced Endometriosis in Korean Women

Yeon Jean Cho, Sung-Eun Hur¹, Ji Young Lee², In Ok Song, Mi Kyoung Koong,
Hye Sung Moon³, Hye-Won Chung³

*Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

¹*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University, Daechon, Korea,*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea,*

³*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

Objective: To investigate whether polymorphisms of gene encoding CYP1B1 is associated with the risk of endometriosis in Korean women.

Methods: We investigated 199 patients with histopathologically confirmed endometriosis rAFS stage III/IV and 183 control group women who were surgically proven to have no endometriosis. The genetic distribution of four different CYP1B1 polymorphisms at G¹¹⁹-T, G⁴³²-C, T⁴⁴⁹-C, and A⁴⁵³-G were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism of PCR products.

Results: We found no overall association between each individual CYP1B1 genotype and the risk of endometriosis. The odds ratio of genotype GG/GC+GG/TC+TT/AA compared to GG/CC/CC/AA (reference) was calculated as 2.06 with a 95% confidence interval of 1.003~4.216.

Conclusions: This results suggest that CYP1B1 genetic polymorphism may be associated with development of endometriosis in Korean women.

Key Words: Endometriosis, CYP1B1, Genetic polymorphism

자궁내막증은 자궁강 밖에서 자궁내막의 선과 간질이 존재하는 질환으로서 가입기 여성의 7~10%를 차지하며 아직 정확한 원인과 병태생리는 밝혀지지 않았지만 유전적 요인, 호르몬적 요인과 환경적 요인이 함께 작용하는 것으로 알려져 있다.¹ 자궁내막증은 개인의 유전적 감수성과 관련이 있다는 것이

알려졌으며, 자궁내막증 환자의 직계 가족 여성 또는 일란성 쌍생아 자매에서 자궁내막증의 발생빈도가 높은 것으로 보고되어 자궁내막증이 발병하기 쉬운 유전적 소인이 있을 것으로 추정되나 아직 정확한 원인이 되는 유전자를 찾지는 못하였다.^{2,3} 자궁내막증의 성장과 퇴화는 에스트로겐 의존적인데

주관책임자: 정혜원, 우) 158-710 서울특별시 양천구 목6동 911-1, 이화여자대학교 목동병원 산부인과
Tel: (02) 2650-5568, Fax: (02) 2647-9860, e-mail: hyewon@ewha.ac.kr

실제로 이소성 자궁내막증 착상조직에서 에스트로겐, 프로게스테론 및 안드로겐 수용체가 발현되고 있으며, 국소적, 전신적인 에스트로겐이 에스트로겐 수용체를 통해서 자궁내막조직의 성장을 자극한다.^{4,5}

또한 Rier 등⁶이 dioxin에 만성적으로 노출된 Rhesus monkey에서 dioxin의 혈중 농도가 높을수록 자궁내막증의 발생과 정도가 더 심함을 보고한 후에 여러 연구들에 의하여 자궁내막증이 dioxin과 관계가 있음이 밝혀졌다.^{7,8}

에스트라디올 (estradiol)과 에스트론 (estrone)은 대사 과정 중 CYP1A1과 CYP1B1을 통하여 C-2 또는 C-4에서 hydroxylation되어 catechol estrogen을 형성하는데, CYP1A1은 주로 C-2에서의 hydroxylation을 주도하며, CYP1B1은 주로 C-4에서 estradiol (E₂)와 estrone (E₁)을 4-hydroxyE₂/E₁으로 분해한다. 이러한 CYP1B1은 자궁이나 유방 등과 같이 에스트로겐 관련 기관에 많이 존재한다.⁹

CYP1B1 유전자는 2번 염색체의 단완에 위치하고 있으며 (2p21-22) 3개의 exon 및 2개의 intron으로 구성되어 있다.¹⁰ 현재 CYP1B1 유전자 다형성은 Intron1-13C→T, codon 48C→G, codon 119G→T, codon 432G→C, codon 453A→G 등과 nucleotide 1719에서 T→C의 치환이 일어나지만 아미노산의 변화는 없는 449T→C silent mutation 등,¹¹ 6개의 유전자 다형성이 보고되어 있다.^{12,13}

이러한 CYP1B1의 유전자 다형성과 전립선암, 폐암, 유방암, 자궁내막암 등과의 관계에 대해서는 많은 연구가 진행되었다.^{12,14~17} 또 여러 가지 환경물질에 의해 내인성 에스트로겐 대사를 매개하는 CYP1B1 효소가 활성화 될 수 있는데, 이러한 공해물질의 예로는 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)와 benzopyrene 등이 있으며, 이들은 전암 발생 과정의 제 1상 효소인 cytochrome p450을 활성화시킨다.¹⁸ 특히 dioxin 등은 CYP1A1, 1A2, 1B1의 전구체 (promotor)를 활성화 시켜 월경혈 역류로 인하여 골반 내 복막에 있는 자궁내막조직에서 cytochrome P-450 중 1A1, 1A2, 1B1의 농도를 높이고, 골반 강내에서 이소성 자궁내막조직의 증식을 유도함으로써 자궁내막증을 유발할 수 있다.¹⁹

자궁내막증과 CYP1A1, CYP1A2의 관계를 밝힌

보고는 있으나^{20,21} 아직까지 CYP1B1의 유전자 다형성과 자궁내막증의 발생의 관계에 대한 연구 보고는 없는 실정이다.

CYP1B1은 자궁내막증의 발생과 관련된 에스트로겐의 대사 및 dioxin의 대사 모두와 관련이 있어 자궁내막증의 발생 원인을 밝힐 수 있는 중요한 유전자로 생각하여 본 연구에서는 자궁내막증의 발생과 CYP1B1의 codon 119G→T, 432G→C, 449T→C, 453A→G의 유전자 다형성과의 관계에 대해서 알아보고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1996년 9월부터 2003년 12월 까지 이화여자대학교 목동병원 산부인과를 방문한 17~55세의 한국인 여성 중 수술을 통해 병리조직학적으로 자궁내막증을 확인한 환자에서 Revised American Fertility Society²² 분류에 따라 III기와 IV기 인 199명을 대상으로 하였다. 대조군은 난소 낭종 등의 양성 질환으로 수술을 시행한 환자 중 자궁내막증이 없음을 확인한 여성 183명을 대상으로 하였다. 본 연구는 임상시험 심사원 (Institutional Review Board)에서 심의를 받았으며, 각각의 환자에 대해 사전 동의를 받았다.

2. 연구 방법

연구대상자들의 genomic DNA는 항응고제로 EDTA 용액을 사용하여 피검자로부터 채혈한 혈액을 -20°C 냉동고에 보관하였다가 200 µl의 혈액시료에서 QIA amp Blood kit (QIAGEN Inc., USA)를 사용하여 추출하였으며 이 DNA는 260 nm와 280 nm에서 흡광도 비율이 1.7~1.9로 순수하였다. 모두 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 분석하였으며 사용한 효소 및 allele, 제한 절편은 아래와 같다 (Table 1).

1) CYP1B1 G¹¹⁹-T 유전자형 분석

0.1 µg genomic DNA를 각각의 10 nmol/ml primers, 5 mmol/L dNTP, 0.5 Units Taq polymerase (Promega, Madison, WI), 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 500 mmol/L KCl과 30 mmol/L MgCl₂를 20 µl의 PCR 혼

Table 1. Summary of Genotyping Methods of CYP1B1 polymorphisms

Polymorphisms	PCR primers	Enzyme	Alleles	Restriction fragments (bp)
G ¹¹⁹ -T	5'-TAA ACC CGC TGT CCA TCC A-3' (F)	<i>Ngo</i> MIV	Ala(G)	314,62
	5'-GAG TAG TGG CCG AAA GCC AT-3' (R)		Ser(T)	376
G ⁴³² -C	5'-CAC TGC CAA CAC CTC TGT CT-3' (F)	<i>Acu</i> I	Leu(C)	187,107
	5'-GCA GGC TCA TTT GGG TTG-3' (R)		Val(G)	294
T ⁴⁴⁹ -C	5'-CAC TGC CAA CAC CTC TGT CT-3' (F)	<i>Fok</i> I	T	149,109,36
	5'-GCA GGC TCA TTT GGG TTG-3' (R)		C	258,36
A ⁴⁵³ -G	5'-CAC TGC CAA CAC CTC TGT CT-3' (F)	<i>Mwo</i> I	Ser(G)	147
	5'-GCA GGC TCA TTT GGG TTG-3' (R)		Asn(A)	294

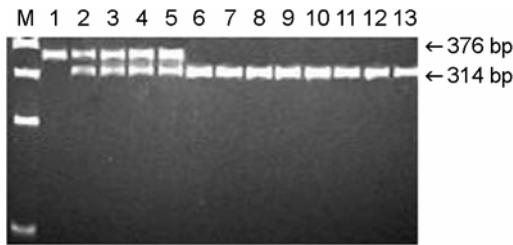


Figure 1. Electrophoresis of the digested PCR products showing CYP1B1 G¹¹⁹-T polymorphisms. Homozygous for CYP1B1 *Ngo*MIV polymorphisms (lanes 6-13, GG), heterozygous for the polymorphism (lanes 2-5, GT), and without the polymorphism (lane 1, TT). M=100 bp DNA marker (62 bp not seen in this picture).

합액에 첨가하여 95°C에서 2분간 변성시킨 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 120초간 extension 하는 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 elongation 하였다. 제한효소 절편길이 다형성 (restriction fragment length polymerease, RFLP)시 효소는 각각 10 U/μl 사용하였고, 배양시 완충액은 50 mM KCH₃CO₂, 20 mM Tris-acetate, 10 mM C₄H₆O₄Mg · 4H₂O, 1 mM DTTI (pH 7.9)을 사용하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 제한효소로 처리한 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV하에 분석하였다. 유전자형은 314, 62 bp의 band가 존재할 경우를 homozygous wild type 유전자형 (G/G)이라 하고 376 bp PCR 산물이 *Ngo*MIV에 의하여 잘리지 않은 경우를 homozygous variant type 유전자형 (T/T)으로 하였으며, 314, 62, 376 bp의 band가 모두 존재할 경우

heterozygous variant type 유전자형 (G/T)이라 하였다 (Figure 1).

2) CYP1B1 G⁴³²-C 유전자형 분석

0.1 μg genomic DNA를 각각의 10 nmol/L primers, 5 mmol/L dNTP, 0.5 Units Taq polymerase (Promega, Madison, WI), 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 500 mmol/L KCl과 30 mmol/L MgCl₂를 20 μl의 PCR 혼합액에 첨가하여 95°C에서 2분간 변성시킨 후 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 120초간 extension 하는 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 elongation 하였다. RFLP를 위하여 효소는 각각 5 U/μl 사용하였고, 배양시 완충액은 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTTI (pH 7.9), S-adenosylmethionine을 사용하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 제한효소로 처리된 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV하에 분석하였다. 유전자형은 294 bp PCR 산물이 *Acu*I 의하여 잘리지 않은 경우를 homozygous wild type 유전자형 (G/G)으로 하고, 187, 107 bp의 band가 존재할 경우를 homozygous variant type 유전자형 (C/C)이라 하고 294, 187, 107 bp의 band가 모두 존재할 경우 heterozygous variant type 유전자형 (G/C)으로 하였다 (Figure 2).

3) CYP1B1 T⁴⁴⁹-C 유전자형 분석

CYP1B1 T⁴⁴⁹-C의 유전자형의 PCR 과정은 위의 CYP1B1 G⁴³²-C와 동일하였다. RFLP를 위하여 효소는 각각 10 U/μl 사용하였고, 배양시 완충액은 50 mM KCH₃CO₂, 20 mM Tris-acetate, 10 mM C₄H₆O₄Mg

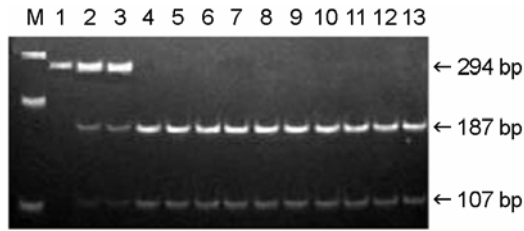


Figure 2. Electrophoresis of the digested PCR products showing CYP1B1 G⁴³²-C polymorphisms. Homozygous for CYP1B1 *AcuI* polymorphisms (lane 1, GG), heterozygous for the polymorphism (lanes 2-3, GC), and without the polymorphism (lanes 4-13, CC). M=100 bp DNA marker.

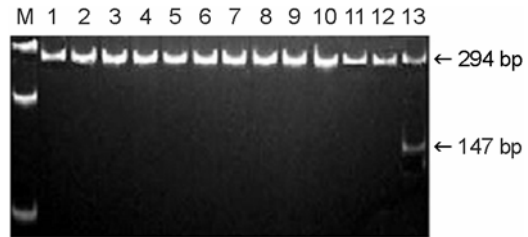


Figure 4. Electrophoresis of the digested PCR products showing CYP1B1 A⁴⁵³-G polymorphisms. Homozygous for CYP1B1 *MwoI* polymorphisms (lane 1-12, AA), heterozygous for the polymorphism (lanes 13, AG). M=100 bp DNA marker.

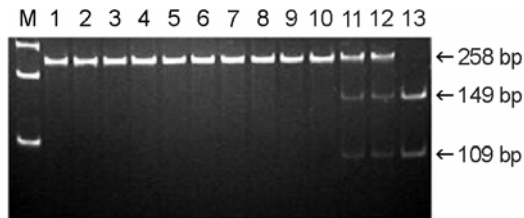


Figure 3. Electrophoresis of the digested PCR products showing CYP1B1 T⁴⁴⁹-C polymorphisms. Homozygous for CYP1B1 *FokI* polymorphisms (lane 13, TT), heterozygous for the polymorphism (lanes 11-12, CT), and without the polymorphism (lanes 1-10, CC). M=100 bp DNA marker (36 bp not seen in this picture).

·4H₂O, 1 mM DTTI (pH 7.9)을 사용하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 제한효소로 처리된 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV하에 분석하였다. 유전자형은 294 bp의 PCR 산물 중 149, 109, 36 bp의 band가 존재하는 있는 경우를 homozygous wild type 유전자형 (T/T)이라 하고, 258, 36 bp의 band가 존재할 경우를 homozygous variant type 유전자형 (C/C)이라 하였으며, 258, 149, 109, 36 bp의 band가 모두 존재할 경우 heterozygous variant type 유전자형 (T/C)으로 결정하였다 (Figure 3).

4) CYP1B1 A⁴⁵³-G 유전자형 분석

CYP1B1 A⁴⁵³-G의 유전자형의 PCR 과정은 위의 CYP1B1 G⁴³²-C와 동일하였다. RFLP를 위하여 효소는 각각 5 U/μl 사용하였고, 배양시 완충액은 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTTI (pH 7.9)을 사용하여 60°C에서 4시간 배양하

였다. 제한효소로 처리된 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV하에 분석하였다. 유전자형은 294 bp의 PCR 산물이 *MwoI* 효소에 의해 잘리지 않는 경우를 homozygous wild type 유전자형 (A/A)이라 하고 294, 147 bp의 band가 모두 존재할 경우 heterozygous variant type 유전자형 (A/G)이라 하고 147 bp의 band만 존재하는 경우를 homozygous variant type 유전자형 (G/G)으로 결정하였다 (Figure 4).

3. 통계 분석

연구결과의 통계분석은 SPSS version 12.0 통계 패키지 (SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하여 χ^2 test와 logistic regression analysis의 방법을 사용하였고, p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있다고 하였다.

결 과

자궁내막증 환자군의 평균 연령은 33.2세 (19~53세)였으며, 대조군의 평균 연령은 34.0세 (17~55세)로 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

1. 자궁내막증과 CYP1B1 G¹¹⁹-T 다형성 관련 연구

본 연구에서 CYP1B1 G¹¹⁹-T의 homozygous wild type allele (G/G)는 자궁내막증 환자군에서는 66.3%, 정상 대조군에서는 62.3%로 두 군 모두에서 가장 흔한 유전자형이며, heterozygous variant type allele

Table 2. The distribution of *CYP1B1* G¹¹⁹-T genotypes and alleles in patients with endometriosis and controls

<i>CYP1B1</i> G ¹¹⁹ -T	Group		OR (95% CI)	p-value
	Controls (n=183)	Endometriosis (n=199)		
GG	114 (62.3%)	132 (66.3%)	1	
GT	62 (33.9%)	61 (30.7%)	0.850 (0.551~1.311)	0.461
TT	7 (3.8%)	6 (3.0%)	0.74 (0.242~2.266)	0.598
GT + TT	69 (37.7%)	67 (33.7%)	0.839 (0.551~1.275)	0.411
G allele	290 (79.2%)	325 (81.7%)	1	
T allele	76 (20.8%)	73 (18.3%)	0.857 (0.599~1.226)	0.713

*Odds ratio of GG genotype/G allele were considered as reference

Table 3. The distribution of *CYP1B1* G⁴³²-C genotypes and alleles in patients with endometriosis and controls

<i>CYP1B1</i> G ⁴³² -C	Group		OR (95% CI)	p-value
	Controls (n=183)	Endometriosis (n=199)		
CC	155 (84.7%)	158 (79.4%)	1	
GC	26 (14.2%)	40 (20.1%)	1.509 (0.878~2.593)	0.136
GG	2 (1.1%)	1 (0.5%)	0.491 (0.044~5.465)	0.562
GC+GG	28 (15.3%)	41 (20.6%)	1.436 (0.846~2.430)	0.177
C allele	336 (91.8%)	356 (89.4%)	1	
G allele	30 (8.2%)	42 (10.6%)	1.321 (0.808~2.160)	0.264

*Odds ratio of CC genotype/C allele were considered as reference

(G/T)와 homozygous variant type allele (T/T)은 자궁내막증 환자군에서 33.7%, 정상 대조군에서 37.7%로 자궁내막증과 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다. G allele과 T allele간의 자궁내막증의 위험도 역시 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

2. 자궁내막증과 *CYP1B1* G⁴³²-C 다형성 관련 연구

본 연구에서 *CYP1B1* G⁴³²-C의 homozygous variant type allele (C/C)는 자궁내막증 환자군에서는 79.4%, 정상 대조군에서는 84.7%로 두 군 모두에서 가장 흔한 유전자형이며, heterozygous variant type allele (G/C)와 homozygous wild type allele (G/G)은 자궁내막증 환자군에서 20.6%, 정상 대조군에서 15.3%로 자궁내막증과 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다. C allele과 G allele간의 자궁내막증의 위험도 역시 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

3. 자궁내막증과 *CYP1B1* T⁴⁴⁹-C 다형성 관련 연구

본 연구에서 *CYP1B1* T⁴⁴⁹-C codon 449의 homozygous variant type allele (C/C)는 자궁내막증 환자군에서는 80.9%, 정상 대조군에서는 85.2%로 두 군 모두에서 가장 흔한 유전자형이며, heterozygous variant type allele (C/T)와 homozygous wild type allele (T/T)은 자궁내막증 환자군에서 19.7%, 정상 대조군에서 14.8%로 자궁내막증과 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다. C allele과 T allele간의 자궁내막증의 위험도 역시 유의한 차이가 없었다 (Table 4).

4. 자궁내막증과 *CYP1B1* A⁴⁵³-G 다형성 관련 연구

본 연구에서 *CYP1B1* A⁴⁵³-G의 homozygous wild type allele (A/A)는 자궁내막증 환자군에서는 98.0%,

Table 4. The distribution of *CYP1B1* T⁴⁴⁹-C genotypes and alleles in patients with endometriosis and controls

<i>CYP1B1</i> T ⁴⁴⁹ -C	Group		OR (95% CI)	p-value
	Controls (n=183)	Endometriosis (n=199)		
CC	156 (85.2%)	161 (80.9%)	1	
TC	25 (13.7%)	37 (18.6%)	1.434 (0.823~2.493)	0.201
TT	2 (1.1%)	1 (0.5%)	0.484 (0.043~5.397)	0.556
TC + TT	27 (14.8%)	38 (19.7%)	1.364 (0.795~2.341)	0.258
C allele	337 (92.1%)	359 (90.2%)	1	
T allele	29 (7.9%)	39 (9.8%)	1.262 (1.763~2.088)	0.362

*Odds ratio of CC genotype/C allele were considered as reference

Table 5. The distribution of *CYP1B1* A⁴⁵³-G genotypes and alleles in patients with endometriosis and controls

<i>CYP1B1</i> A ⁴⁵³ -G	Group		OR (95% CI)	p-value
	Controls (n=183)	Endometriosis (n=199)		
AA	180 (98.4%)	195 (98.0%)	1	
AG	3 (1.6%)	4 (2.0%)	1.231 (0.272~5.575)	0.787
GG	0 (0.0%)	0 (0.0%)		
A allele	363 (99.2%)	394 (89.4%)	1	
G allele	3 (0.8%)	4 (1.0%)	1.228 (0.273~5.526)	0.788

*Odds ratio of AA genotype/A allele were considered as reference

정상 대조군에서는 98.4%로 두 군 모두에서 가장 흔한 유전자형이며, heterozygous variant type allele (A/G)는 자궁내막증 환자군에서 2.0%, 정상 대조군에서 1.6%로 자궁내막증과 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다. 또한 자궁내막증 환자군에서도 homozygous variant type allele (G/G)는 발견할 수 없었다. A allele과 G allele간의 자궁내막증의 위험도 역시 유의한 차이가 없었다 (Table 5).

5. CYP1B1 G¹¹⁹-T, G⁴³²-C, T⁴⁴⁹-C, A⁴⁵³-G의 조합과 자궁내막증 관련 연구

본 연구에 CYP1B1의 각각의 codon의 나올 수 있는 유전자 조합 총 81가지 중 본 연구에서의 대조군, 자궁내막증 환자군에서 발견된 유전자 조합은 총 12가지였다.

이러한 조합 중 GG/CC/CC/AA는 대조군에서 54.4%, 자궁내막증 환자군에서 50.5%로 두 군 모두에서 가장 흔한 유전자 조합이었다. 대조군과 자궁

내막증 환자군을 합한 표본 값이 3이하인 것을 비교 대상에서 제외시킨 후 180명, 자궁내막증 환자군 196명을 대상으로 GG/CC/CC/AA 유전자를 기준으로 하여 자궁내막증의 발생 위험도를 비교하여 보았다. 이때 GG/GC+GG/TC+TT/AA의 유전자형을 갖는 여성은 대조군에서 7.2%, 자궁내막증 환자군에서 13.8%로 자궁내막증과 대조군 사이에 위험도가 2.06 (95% CI: 1.003~4.216, p=0.049)으로 통계적으로 유의하게 증가되어 있음을 알 수 있었다 (Table 6).

고 찰

자궁내막증은 에스트로겐 호르몬 의존성 질환으로서, 내인성 스테로이드 호르몬과 성장인자들이 자궁내막증의 발생에 관여하므로, 스테로이드 호르몬의 합성, 대사, 신호전달 과정의 각 단계에 관여하는 유전자가 자궁내막증의 발생에 연관이 있을 것으로 추정된다.²³ 콜레스테롤부터 pregnenolone, an-

Table 6. The distribution of the combination of CYP1B1 G¹¹⁹-T, G⁴³²-C, G⁴⁴⁹-C, A⁴⁵³-G genotypes and odds ratio of individual genotypes

CYP1B1 genotypes				Group		OR (95% CI)	p-value
G ¹¹⁹ -T	C ⁴³² -G	C ⁴⁴⁹ -T	A ⁴⁵³ -G	Controls (n=180)	Endometriosis (n=196)		
GG	CC	CC	AA	98 (54.4%)	99 (50.5%)	1	
		CC	AG	2 (1.1%)	4 (2.0%)	1.980 (0.354~11.058)	0.436
	GC + GG	TC + TT	AA	13 (7.2%)	27 (13.8%)	2.056 (1.003~4.216)	0.049
GT + TT	CC	CC	AA	54 (30.0%)	55 (28.1%)	1.008 (0.631~1.610)	0.973
	GC	TC + TT	AA	13 (7.2%)	11 (5.6%)	0.838 (0.358~1.960)	0.683

*Odds ratio of GG-CC-CC-AA genotype was considered as reference

drogen, estrone을 거쳐 estradiol이 유도되는데 관여하는 CYP11A, CYP17, CYP19 및 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) 등이 자궁내막증의 발생과 관련 있는 유전자로 연구되고 있으며, 에스트로겐의 대사 과정 중 에스트로겐의 2-hydroxylation과 관련이 있는 CYP1A1, 1A2 등과 2-, 4-hydroxyestradiol의 O-methylation와 관련 있는 COMT (Catecho-O-Methyltransferase) 등을 자궁내막증의 발생과 관련 있는 유전자로 알려져 있다.^{20,24,25}

환경물질인 dioxin과 자궁내막증의 관계도 많은 연구가 있는데,^{7,8} 이렇게 자궁내막증의 유전적 요인 및 환경적 요인에 대한 연구는 독립적으로 진행되어 왔다.

Benzo[a]pyrene이나 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) 등과 같은 환경물질도 CYP1B1을 유도한다.²⁰ Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 단백질은 인간에서 자궁내막 또는 이소성 자궁내막조직에 존재하며, AhR 및 AhR translocator (ARNT)의 mRNA 역시 자궁내막증의 유무와 관계없이 자궁내막에 지속적으로 존재한다. TCDD나 dioxin 유사물질은 세포질에 위치한 Aryl hydrocarbon Receptor를 통해 배위자 (ligand)가 수용체에 붙으면 배위자-수용체 복합체 (Ligand-Receptor complex)를 이루며 AhR translocator (ARNT)에 붙어서 제 1상 해독화 효소 중 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1을 활성화 시킨다.²⁰ CYP1B1 유전자의 경우 -834와 -853의 5' flanking 부위에 xenobiotic responsive element (XRE) 부위가 있어 AhR/ARNT 복합체가 결합하여 CYP1B1이 유도된다.²⁸ 따라서 유도된 CYP1B1에 의해 생성된 4-hy-

droxyestradiol이 에스트로겐과 dioxin에 의해 발생하는 자궁내막증과 관련이 있을 가능성이 높다고 생각해 볼 수 있다.

CYP1B1이 작용하는 일련의 대사 과정 중에서 CYP1B1의 활성도가 개개인 마다 차이를 보이는 것은 유전자 다형성을 통하여 설명할 수 있다.²⁹ Dioxin 대사와 CYP1B1의 유전적 다형성과의 관계에 관한 연구는 Landi 등이 말초 혈액의 림프구에 TCDD에 짧은 시간에 고농도로 노출 시켰을 때 특이하게 CYP1B1 codon 432의 G/C 유전자형에서만 CYP1B1 mRNA의 발현이 높음을 밝혔다.³⁰ 이러한 TCDD는 생체에서 pro-carcinogen을 활성화 시키며, 에스트로겐의 합성 및 대사를 변화시키고, 여러 가지 성장인자들과 사이토카인을 형성하며, 대사와 관련된 여러 가지 효소들의 변화를 일으키는 등 여러 측면에서 자궁내막증의 발병과 관련이 있다.³¹ 그러나 아직까지 TCDD에 의해 CYP1B1의 codon 432 이외의 다형성에 의해 CYP1B1이 어떻게 활성화되는지에 대한 연구는 없다.

CYP1B1의 estrogen hydroxylation 활성도 역시 CYP1B1의 다형성에 따라 현저한 차이를 보인다. Hanna 등은 wild type CYP1B1의 hydroxylation 활성도를 codon 48, 119, 432, 453의 다형성에 따른 활성도와 비교하였으며 codon 119에 다형성이 있는 경우 2,4-hydroxylation 활성도가 가장 높은 것으로 나타났다.²⁹ 뿐만 아니라, 4-OH-E₂와 2-OH-E₂의 비 역시 wild type에서는 2.0인데 비해 각각의 variant type, 즉 codon 48, 119, 432, 453에 다형성이 있는 경우에도 그 비는 3.0에서 3.8까지로 증가함을 보여 4-OH-

E₂의 조직 내 농도가 유전자 다형성이 있는 경우에 더 높음을 알 수 있었다.²⁹ 이러한 4-OH-E₂은 유방암 환자의 마이크로솜에서 높게 나타나고, 정상 유방조직에서는 낮게 나타남으로써 발암작용과의 관련성이 제시되었다.³² 따라서 CYP1B1의 유전자 다형성으로 에스트로겐의 대사에 변형을 생겼을 때는 에스트로겐에 노출되었을 때 생기는 대사산물이 다르게 되고 특히 발암작용이 있는 4-OH-E₂와 같은 산물의 축적 시 에스트로겐 관련 질환으로의 이환 가능성이 높아진다고 할 수 있으며, 자궁내막증의 경우도 이에 해당한다고 생각할 수 있다.

아직까지 CYP1B1의 다형성과 자궁내막증의 발생과의 연관성을 밝힌 문헌은 없으나 자궁내막증처럼 에스트로겐 의존성 질환인 전립선암, 유방암과의 연관성에 대해서는 여러 연구들이 있다.^{12,14,15,33} 국내에서도 Lee 등이 한국인 여성을 대상으로 한 연구에서 CYP1B1 codon 432의 G/C이나 C/C의 유전자형을 갖더라도 유방암의 위험도는 증가하지 않는다고 밝혔다 (OR=1.0, 95% CI: 0.7~1.6).³⁴ 반면 Zheng 등은 중국인을 대상으로 한 연구에서 CYP1B1 codon 432의 G/G 유전자형을 갖는 경우 C/C 유전자형보다 유방암의 위험도가 2.3배 (95% CI: 1.2~4.5) 높을 수 있으며, 특히 폐경 후 여성에서는 그 위험도가 3.1배 까지 더 높다고 하였다.¹⁶ 최근 Wen 등은 대규모 Shanghai Breast cancer 연구 및 meta-analysis 연구에서 codon 48, codon 119, codon 432 모두는 유방암의 위험도와는 관련이 없다고 밝혀 CYP1B1이 에스트로겐 관련 질환 중 유방암의 위험도와 확실히 관련이 있다고 단정 지을 수는 없을 것으로 보인다.³⁵

Codon 449의 유전자 다형성에 대한 연구는 Tanaka 등이 일본인을 대상으로 전립선암의 위험도를 조사한 것 외에는 없으며,¹⁴ 국내에서는 처음으로 유전자 다형성을 조사한 것이다.

Codon 453의 유전자 다형성은 Rylander-Ridqvist 등이 폐경 여성을 대상으로 유방암과 자궁내막암의 위험도를 각각 분석하였는데 통계적으로 유의한 관계를 밝히지 못하였으며,^{36,37} 다만 homozygous variant 유전자형인 G/G의 경우 자궁내막암의 위험도가 감소한다는 보고가 있다.¹⁷

본 연구에서는 자궁내막증의 발생과 연관 지어 한

국인 자궁내막증 환자를 대상으로 하여 CYP1B1 유전자 중 codon 119, codon 432, codon 449, codon 453의 다형성을 조사하였으며, 각 유전자 다형성을 분석한 결과 4가지 다형성 모두 자궁내막증 환자의 위험도와는 연관성이 없는 것으로 밝혀졌다. 앞서 언급한 4가지 유전자형을 조합하여 나올 수 있는 총 81가지 조합 중 본 연구에 포함된 대조군, 환자군에서는 총 12가지의 유전자 조합형이 나왔으며 이를 다시 재분류한 결과 GG/GC+GG/TC+TT/AA는 대조군과 비교하여 자궁내막증의 위험도가 2.06배로 증가함을 알 수 있었다.

본 연구에서 대조군의 CYP1B1의 다형성에 대해서 살펴보면 codon 119 유전자형의 분포는 G/G가 62.3%, G/T가 33.9%, T/T가 3.8%이었으며, codon 432의 유전자형 분포는 C/C가 84.7%, G/C가 14.2%, G/G가 1.1%로 기존의 일본인을 대상으로 한 연구와 유사한 빈도를 보였다.^{14,15,38}

대조군에서 codon 449의 유전자형 분포는 C/C가 85.2%, C/T가 13.7%, T/T가 1.1%로 나타났다. 본 연구에서 C allele의 빈도는 0.92로 일본인을 대상으로 한 연구¹⁴에서 C allele의 빈도가 0.68인 것을 감안하여 보았을 때 한국인에서는 일본인보다 T allele의 빈도가 낮지만 codon 449 유전자 다형성에 대한 연구가 부족한 실정이므로 객관적으로 비교하기에는 어려울 것으로 본다.

대조군에서 codon 453의 유전자형 분포는 A/A가 98.4%, A/G가 1.6%로 나타났으며, 한국인 여성에서 G/G의 유전자형은 없는 것으로 나타났으나, 유럽 인종에서는 16%로 더 높은 것으로 알려져 있으며 일본인에서는 다형성을 관찰할 수 없었다.^{14,38} 대조군을 비교하였을 때 CYP1B1은 각 codon 마다 인종간의 분포가 다르게 나타남을 알 수 있었으며 CYP1B1이 자궁내막증의 발생에 영향을 미치는 정도도 인종마다 다를 것으로 생각해 볼 수 있다.

현재까지 국내 문헌뿐만 아니라 해외 문헌 검색상에서도 자궁내막증 환자와 관련된 CYP1B1 유전자 다형성의 양상은 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서 CYP1B1 유전자의 네 가지 다형성을 개별적으로 분석하였을 때 한국인에서는 자궁내막증의 발생과 유의한 연관성이 없는 것으로 밝혀졌다. 그러나 CYP1B1 유전자 다형성을 조합하였을 경우 GG/

GC+GG/TC+TT/AA의 유전자형을 갖는 여성은 GG/CC/CC/AA의 유전자형을 갖는 여성에 비해 자궁내막증의 위험도 증가함을 알 수 있었다. CYP1B1의 효소 활성도가 개개인의 유전자 다형성에 따라 다르게 나타나는 것을 감안한다면 CYP1B1의 유전자 다형성으로 인하여 나타나는 대사의 차이가 자궁내막증의 발생에 관여하리라는 가정을 해 볼 수는 있지만 본 연구에서는 각 유전자형에 따른 CYP1B1 효소 활성도를 측정하지 못하였으므로 향후 이 분야에 대한 연구가 필요할 것으로 본다.

결론적으로 dioxin에 의하여 활성화 되어 에스트로겐 대사에 관여하는 1상 효소인 CYP1B1의 유전자 다형성은 자궁내막증 발생과 관련성이 있을 것으로 제시되며, 이는 자궁내막증의 발생 기전을 밝혀내는데 중요한 자료로서, 향후 CYP1B1의 다른 유전자 다형성 및 조합에 관한 연구의 바탕이 될 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. Kennedy SH. Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 309-17.
2. Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993; 72: 560-4.
3. Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial endometriosis. *J Assis Reprod Genet* 1995; 12: 32-4.
4. Prentice A, Randall BJ, Weddell A, McGill A, Henry L, Home CH, et al. Ovarian steroid receptor expression in endometriosis and in two potential parent epithelia: endometrium and mesothelium. *Human Reprod* 1992; 7: 1318-25.
5. Bergqvist A, Ferno M. Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison of different cycle phases and ages. *Human Reprod* 1993; 8: 2211-7.
6. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. Endometriosis in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fudam Appl Toxicol* 1993; 21: 433-41.
7. Koninckx PR, Braet P, Kennedy SH, Barlow D. Dioxin population and endometriosis in Belgium. *Hum Reprod* 1994; 9: 1001-2.
8. Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M. Dioxin concentration in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 373-5.
9. Lemon HM, Heidel JR, Rodriguez-Sierra JF. Increased catecholesterol metabolism as a risk factor for nonfamilial breast cancer. *Cancer Res* 1992; 69: 457-65.
10. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, et al. Isolation and characterization of the human cytochrome p450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 28324-30.
11. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, Child A, Barsoum-Homsy M, Turachi ME, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutation disrupting either the hinge region or the conserved core structure from cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 573-84.
12. Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, Parl FF. Association of cytochrome p450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5038-41.
13. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, et al. Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P450 1B1, are the dominant cause of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 325-3.
14. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Polymorphism of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296: 820-6.
15. Watanabe J, Shimada T, Gillam EM, Ikuta T, Suetasu K, Higashi Y, et al. Association of CYP1B1 genetic polymorphisms with incidence to breast and lung cancer. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 25-33.
16. Zheng W, Xie D, Jin F, Cheong J, Dai Q, Wen W, et al. Genetic Polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Bio-*

- markers *Prev* 2000; 9: 147-50.
17. McGrath M, Hankinson SE, Arbeitman L, Colditz GA, Hunter DJ, De Vivo I. Cytochrome P4501B1 and catechol-O-methyltransferase polymorphism and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2004; 25: 559-65.
 18. Shimada T, Watanabe J, Kawajiri K, Sutter TR, Guengerich FP, Gillan EM, et al. Catalytic properties of polymorphic human cytochrome p-450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1607-13.
 19. Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome 1B1. *Cancer Res* 1996; 56: 2979-84.
 20. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: Molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 35-42.
 21. Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *Fertil Steril*. 2003; 79 Suppl 1: 702-9.
 22. American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1985; 43: 351.
 23. Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH. The genetic basis of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13: 309-14.
 24. Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, et al. Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis.: Failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4474-80.
 25. Wieser F, Wenzl R, Tempfer C, Worda C, Huber J, Schneeberger C. Catechol-O-Methyltransferase polymorphism and endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 343-8.
 26. Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the oxidative metabolites of 17β-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 2003; 144: 3382-98.
 27. Nutter LM, Wu YY, Ngo EO, Sierra EE, Gutierrez PL, Abul-Hajj YJ. An o-quinone form of estrogen produced free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol* 1994; 7: 23-8.
 28. Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Critical enhancer region to which AhR/ARNT and Sp1 bind in the human CYP1B1 gene. *J Biochem* 2003; 133: 583-92.
 29. Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich FP, Parl FF. Cytochrome P4501B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: Association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res*. 2000; 60: 3440-4.
 30. Landi MT, Bergen AW, Baccarelli A, Patterson DG, Grassman J, Ter-Minassian M, et al. CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. *Toxicol* 2005; 207: 191-202.
 31. Rier SE, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Toxicol Sci* 2002; 70: 161-70.
 32. Liehr JG, Ricci MJ. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 92: 9220-4.
 33. De Vivo I, Hankinson SE, Li L, Colditz GA, Hunter DJ. Association of CYP1B1 Polymorphism and Breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 489-92.
 34. Lee KM, Abel J, Ko Y, Harth V, Park WY, Seo JS, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 19 and 1B1, alcohol use, and breast cancer risk in Korean Women. *British J of Can* 2003; 88: 675-8.
 35. Wen W, Cai Q, Shu XO, Cheng JR, Parl R, Pierce L, et al. Cytochrome P450 1B1 and Catechol-O-Methyltransferase genetic polymorphism and breast cancer risk in Chinese Women: Result from the Shanghai breast cancer study and a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 329-35.
 36. Rylander-Rudqvist T, Werden S, Granath R, Hum-

- phreys K, Ahlberg S, Weiderpass E, et al. Cytochrome P4501B1 gene polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1533-9.
37. Rylander-Rudqvist T, Werden S, Jonasdottir G, Ahlberg S, Werderpass E, Persson I, et al. Cytochrome P4501B1 gene polymorphisms and postmenopausal endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1515-20.
38. Mammen JS, Pittman GS, Ying L, Abou-Shar F, Bejjani BA, Bell DA, et al. Single amino acid mutations, but not common polymorphisms, decrease the activity of CYP1B1 against (-)benzo[a]pyrene-7R-trasn-7,8-dihydrodiol. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1247-55.

= 국문초록 =

목적: CYP1B1은 자궁내막증의 발생과 관련된 에스트로겐의 대사 및 dioxin의 대사 모두와 관련이 있는 유전자로 생각하여 자궁내막증의 발생위험과 CYP1B1의 codon 119G→T, 432G→C, 449T→C, 453A→G의 유전자 다형성과의 관계에 대해서 알아보려고 하였다.

연구방법: 병리조직학적으로 자궁내막증 III기와 IV기임을 확인한 여성 199명과 대조군으로 자궁내막증 환자군과 연령이 비슷한 여성에서 양성 난소 낭종으로 수술을 시행하여 자궁내막증이 없음을 육안으로 확인한 183명을 대상으로 PCR 및 RFLP를 시행하여 CYP1B1의 codon 119G→T, 432C→G, 449T→C, 453A→G의 다형성을 조사하였다.

결과: CYP1B1에서 Ala¹¹⁹Ser, Val⁴³²Leu, Asn⁴⁴⁹(T⁴⁴⁹→C), Asn⁴⁵³Ser 각각의 유전자 다형성은 그 분포와 위험도에 있어서 자궁내막증 환자와 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. CYP1B1에서 앞서 밝힌 4가지 codon의 다형성을 조합한 결과 GG/CC/CC/AA의 유전자형을 갖는 여성에 비해 GG/GC+GG/TC+TT/AA의 유전자형을 갖는 경우만이 자궁내막증의 위험도가 2.056 (95% CI: 1.003~4.216)으로 유의하게 높은 것을 알 수 있었다.

결론: 이상으로 볼 때 한국인 여성에서 중증자궁내막증 발생은 CYP1B1의 유전적 다형성과 관련이 있는 것으로 보이며, 향후 자궁내막증의 발생 기전을 밝히는데 주요한 자료가 될 것으로 본다.

중심단어: 자궁내막증, CYP1B1, 유전자 다형성