: 31 2 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 2, 2004, 6

불임여성에서 *NAT2, GSTM1, CYP1A1* 유전자 다형성과 자궁내막증의 상관관계에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과[1], 생식생물학 및 불임연구실[2]

송현정[1] · 전진현[2] · 최혜원[2] · 허 걸[1] · 강인수[1] · 궁미경[1] · 이형송[2]

Association between Endometriosis and Polymorphisms of *N-acetyl Transferase 2 (NAT2), Glutathione S-transferase M1 (GSTM1)* and *Cytochrome P450 (CYP) 1A1* Genes in Korean Infertile Patients

Hyun Jeong Song[1], Jin Hyun Jun[2], Hye Won Choi[2], Girl Hur[1], Inn Soo Kang[1], Mi Kyoung Koong[1], Hyoung-Song Lee[2]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: To investigate the association between endometriosis and polymorphisms of *N-acetyl transferase 2 (NAT2), glutathione S-transferase M1 (GSTM1),* and *cytochrome P450 (CYP) 1A1* genes in Korean infertile patients.

Materials and Methods: A total of 303 infertile patients who had undertaken diagnostic laparoscopy during January, 2001 through December, 2003 at Samsung Cheil Hospital enrolled in this study. The patients were grouped according to laparoscopic findings: minimal to mild endometriosis (group I: n=147), moderate to severe endometriosis (group II: n=57), normal pelvic cavity (n=99). Peripheral blood was obtained and genomic DNA was extracted. The genotypes of each genes were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). For *NAT2*, RFLP was used to detect the wild type (wt) and mutant (mt) alleles, enabling classification into slow (mt/mt) or fast (wt/wt or wt/mt) acetylation genotypes. For *GSTM1*, PCR was used to distinguish active (+/- or +/+) from null (-/-) genotypes. For *CYP1*A1, *Msp*I digestion was used to detect the wild type (A1A1), heterozygote (A1A2) or mutant (A2A2) genotypes.

Result: The genotype frequencies of *NAT2* slow acetylator was 12.8%, 10.9%, 12.8% in group I, group II and control, respectively. The genotype frequencies of *GSTM1* null mutation was 55.3%, 41.8%, 53.2% in group I, group II and control, respectively. The genotype frequencies of *CYP1A1 Msp*I polymorphism was 16.3%, 9.1%, 18.1% in group I, group II and control, respectively. No significant difference was observed between endometriosis and normal controls in the genotype frequencies of the *NAT2*, *GSTM1*, *CYP1A1 Msp*I polymorphism.

Conclusion: The *NAT2*, *GSTM1*, *CYP1A1* gene polymorphism may not be associated with the

주관책임자: 이형송, 우) 100-380 서울특별시 중구 묵정동 1-19 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7590, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: hslee99@samsung.co.kr
본 연구는 2003년도 제일의료장학재단 연구비 지원으로 수행되었음.

susceptibility of endometriosis in Korean women.

Key Words: Endometriosis, Polymorphism, *NAT2*, *GSTM1*, *CYP1A1*

자궁내막증은 자궁내막의 선 (gland)과 간질 (stroma)이 자궁강 밖에 위치하는 것으로서, 그 정확한 병인과 병태생리는 아직 명확하지 않지만, 환경요인과 유전적 요인이 복합적으로 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

가계 연구 (familial study)와 쌍둥이 연구 (twin study)에 의하면, 자궁내막증 발병 원인으로서 유전적 요인이 있음을 추정할 수 있으며, 그 외 연관분석을 이용한 많은 연구에서도 자궁내막증의 발병과 유전자 다형성의 상관관계가 있다고 보고되고 있다. 그러나 현재까지 자궁내막증 발생에 관여하는 정확한 유전자가 무엇인지에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다.[1~5]

Rier 등[6]과 Yang 등[7]의 원숭이를 이용한 실험에 의하면, 독성물질인 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD or dioxin)이 자궁내막증의 위험요소의 하나로 제기되었으며 또한 최근 이탈리아인들을 대상으로 한 전향적 연구에 의하면 사람에서도 다이옥신과 자궁내막증과의 상관관계가 있음이 증명되었다.[8] 다이옥신이 자궁내막증을 유발하는 기전으로 procarcinogen을 활성화 시키거나, estradiol의 합성과 대사에 변화를 가져오거나, proinflammatory growth factor의 생성을 변화시키거나, remodeling enzyme을 변화시켜 자궁내막증 발병에 관여한다는 여러 가지 가설이 제시되고 있다.[9] 다이옥신은 Arylhydrocarbon receptor (AhR)에 부착하여 세포의 핵으로 이동한 후 세포의 핵에서 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)와 이합체를 형성한 후 특정 유전자 (주로 다이옥신의 대사에 관여하는 효소의 유전자)의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다.[9] 다이옥신 등 환경독성물질이 자궁내막증 발병 인자로 대두됨에 따라 최근 환경독성물질의 해독화 효소의 변이와 자궁내막증의 상관관계에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

Cyochrome P450 (CYP) 효소군에는 약 56개의 효소들이 있으며, 해독과정 I 단계에 관여한다. 이 중 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1은 다이옥신에 의해 유도된다. *CYP1A1* 유전자는 염색체 15q22-q24에 위치하고, 두 가지 다형성 (*Msp*I와 *Ile-Val*)이 있으며 이런 *Msp*I 다형성은 폐암과 상관이 있다는 보고가 있다.[10]

Glutathione S-transferase (GST)는 isoenzyme으로 GSTM1과 GSTT1이 있으며, 해독과정 II 단계에 관여한다. *GSTM1*의 유전자는 염색체 1p13에 위치하며 이 유전자의 결손 (null allele)이 있는 경우는 효소를 생성하지 않는다. *GSTM1* 결손 유전자형은 대장암, 전립선암과 관련이 있다는 보고가 있다.[11,12]

N-acetyl transferase (NAT)는 해독과정 II 단계에 관여하며, *NAT1*과 *NAT2* 두 가지 polymorphic gene에 의해 암호화 되어져 있다. *NAT2* 유전자는 염색체 8p22에 위치하며 적어도 한 개 이상의 wild-type의 *NAT2* allele (∗4)를 가진 경우는 fast acetylators로, 반면 다른 variant alleles (∗5, ∗6, ∗7)만 가진 경우는 slow acetylators로 구분된다.[13] Slow acetylator는 방광암[14]과 관련이 있다는 보고가 있는 반면, fast acetylator는 대장암[15]과 관련이 있다는 보고가 있다.

본 연구에서는 한국인 불임여성에서 *NAT2*, *GSTM1*, *CYP1A1* 유전자의 다형성과 자궁내막증 발생의 연관성이 있는지 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2001년 1월부터 2003년 12월까지 삼성제일병원에 불임증을 주소로 내원한 환자들 중 진단복강경을 시행하여 자궁내막증 유무를 확인한 환자 303명을 대상으로 하였다. 환자는 복강경 소견에 따라 minimal-mild 자궁내막증 환자군 (group I: n=147), moderate-severe 자궁내막증 환자군 (group II: n=57), 자궁내막증의 증거가 없었던 대조군 (n=99)으로 분류하였다. 대조군의 경우 난소 종양이 있거나 자궁내막 생검상 자궁내막 증식증이나 암이 있는 경우, 자궁의 기형이 진단된 경우는 제외하였다. 자궁내막증 병기는 revised American Fertility Society (1985)

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions for *NAT2*, *GSTM1* and *CYP1A1*

		Sequences (5' → 3')	Anneling temp (℃)	Products sizes (bp)
NAT2	Forward	GCT GGG TCT GGA AGC TCC TC	62	547
	Reverse	TTG GGT GAT ACA TAC ACA AGG G		
GSTM1	Foreward	CTG CCC TAC TTG ATT GAT GG	64	218
	Reverse	CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC		
GYP1A1	Forward	CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT	62	340
	Reverse	TAG GGA GTC TTG TCT CAT GCC T		

분류를 이용하여 평가하였다.

2. Genomic DNA 추출

연구 대상자들의 말초혈액을 채혈한 다음 QIAamp Blood Kit (QIAGEN Inc, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 유전자형 검사시까지 4℃ 또는 -20℃에 보관하였다.

3. 중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction)

NAT2, *GSTM1* 그리고 *CYP1A1* 유전자의 polymorphism을 분석하기 위하여 polymorphism loci를 포함하는 부위의 특이적인 primer 쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다 (Table 1). PCR은 total 20 μl 속에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5 units of *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 50~100 ng의 대상 환자 genomic DNA를 섞은 후 시행하였다. 실험에 사용하는 primer 농도는 각각 10 pmol로 하였다. PCR을 수행하는 조건으로 처음 denaturation은 94℃에서 2분 동안 수행하였고 그 이후부터는 40초 동안 수행하였다. 그 후 35 cycles은 94℃에서 40초, 58℃, 60℃, 또는 62℃에서 1분, 72℃에서 1분간 수행하였으며 마지막 cycle에서는 extension 시간을 10분으로 하여 증폭하였다.

4. 유전자형 분석

*NAT2*의 polymorphism 여부를 판단하기 위해 wild allele (*4)과 mutant allele (*5, *6, *7)를 구분하였으며 이를 위해 PCR 산물에 각각 *Kpn*I, *Dde*I, *Taq*I 그리고 *BamH*I 제한효소를 처리한 후 2% agarose gel 전기 영동시키고 UV 하에서 절단된 절편을 확인하여 각 실험 대상 환자들의 genotype을 결정하였다 (Figure 1). *GSTM1*의 경우 PCR 산물의 band를 관찰하여 활성화 (+/+ 또는 +/-) 상태와 null (-/-) mutation 상태를 구분하였다 (Figure 2). 그리고 *CYP1A1*의 경우 *Msp*I 제한효소로 PCR 산물을 절단 후 genotype을 결정하였다.

5. 통계분석

자료는 SPSS version 10.0 통계 패키지를 사용하여 Chi-square test의 방법을 통해 유전자들의 다형성과 자궁내막증간의 관련성에 관한 통계적 분석을 시행하였다. *p* 값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

자궁내막증 환자들의 평균 연령은 31.59±3.38 (Mean ± STD)세 이었고 범위는 24~42세 이었다. 대조군 환자들의 평균 연령은 31.78±3.54 (Mean ± STD)세 이었고 범위는 25~40세 이었다. 두 군간의 유의한 차이는 없었다.

자궁내막증과 *NAT2* 다형성 관련 연구 결과, minimal-mild 자궁내막증 환자군 (group I) 중 slow acetylator일 빈도는 12.8%이었고, moderate-severe 자궁내막증 환자군 (group II)은 10.9%, 대조군은 12.8%로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

자궁내막증과 *GSTM1* 다형성 관련 연구 결과,

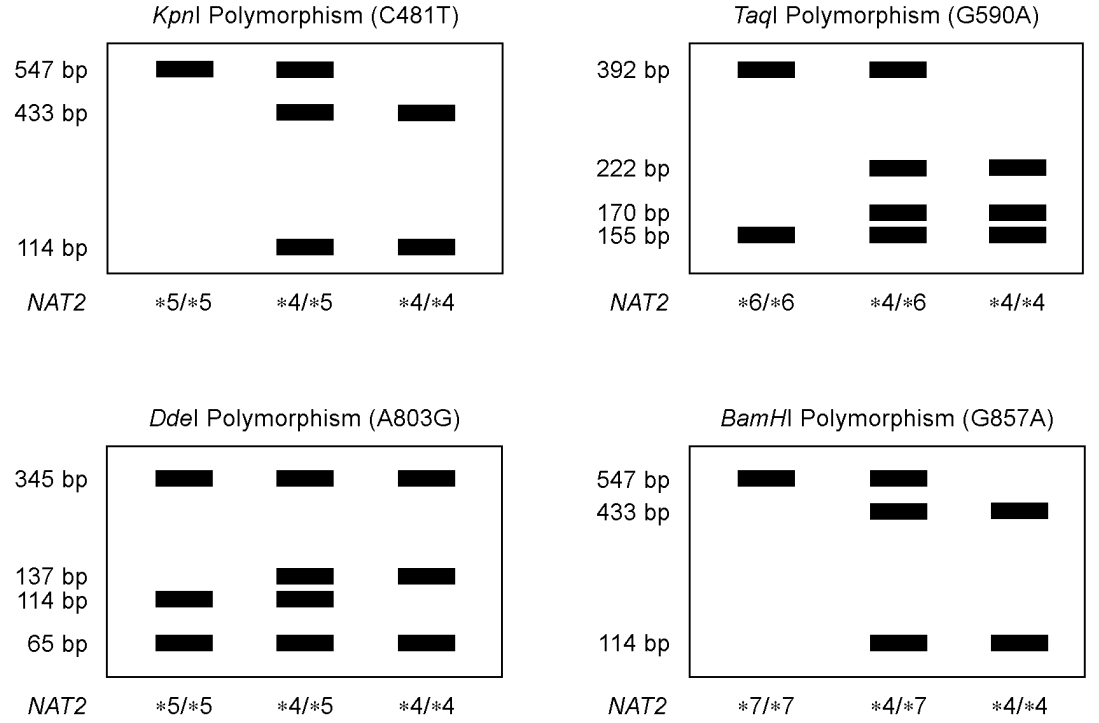

Figure 1. Genotype determination by restriction fragment length polymorphism analysis of the *NAT2* gene PCR products. Following PCR amplification, separate digestions of each PCR product were carried out with the restriction enzymes *Kpn*I, *Dde*I, *Tag*I and *BamH*I to detect the substitutions C481T, A803G, G590A, and G587A, respectively. The sizes of the digested products for each restriction enzyme which allow the individual's genotype to be determined are shown diagrammatically (quoted form Nakago *et al.*, Mol Hum Reprod, 2001).

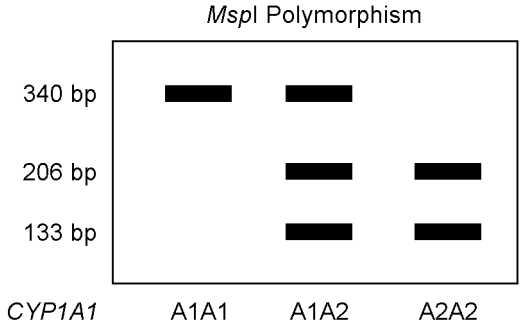

Figure 2. Genotype determination by restriction enzyme digestion of the *CYP1A1* gene PCR products. Following PCR amplification, digestions of each PCR product were carried out with the restriction enzymes *Msp*I. A1A1, wild genotype; A1A2, heterozygous genotype; A2A2, homozygous genotype for polymorphism.

GSTM1 결손 유전자형의 빈도는 group I에서 55.3%, group II에서 41.8%, 대조군에서 53.2%로 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

자궁내막증과 *CYP1A1* 다형성 관련 연구 결과, *CYP1A1 Msp*I 다형성 mutant 유전자형의 빈도는 group I에서 16.3%, group II에서 9.1%, 대조군에서 18.1%로 자궁내막증과 대조군에서 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

고 찰

자궁내막증의 발병에는 유전적 요인 및 환경적 요인이 상호 작용하는 것으로 보이며, 다이옥신과 같은 환경독성물질이 자궁내막증의 발병과 상관있다는 연구 결과가 발표됨에 따라 이러한 환경독성물질을 해독화하는 효소의 유전자 변형과 자궁내막증과의 상관관계에 관한 많은 연구가 진행되었다.

*CYP1A1*에 관하여 Hadfield 등[16]이 영국인을 대상으로 조사한 결과에 따르면, 자궁내막증군에서는

Table 2. Frequencies of observed *NAT2*, *GSTM1* and *CYP1A1* genotypes between endometriosis patients and controls

Gene	Polymorphisms	Control	Group I[a]	Group II[a]	p value
NAT2	Slow[b] (mt/mt)	12.8% (12/94)	12.8% (18/141)	10.9% (6/55)	p>0.05
	Fast[b] (wt/mt, wt/wt)	87.2% (82/94)	87.2% (123/141)	89.1% (49/55)	p>0.05
GSTM1	Null (-/-)	53.2% (50/94)	55.3% (78/141)	41.8% (23/55)	p>0.05
	Active (+/+, +/-)	46.8% (44/94)	44.7% (63/141)	58.2% (32/55)	p>0.05
CYP1A1	Mutant (mt/mt)	18.1% (17/94)	16.3% (23/141)	9.1% (5/55)	p>0.05
	Wild (wt/wt, wt/mt)	81.9% (77/94)	83.7% (118/141)	90.9% (50/55)	p>0.05

[a] Group I, minimal-mild endometriosis; Group II, moderate-severe endometriosis (rAFS, 1985)
[b] Slow, only two variant alleles; Fast, presence of at least one wild-type (*4) allele

21%, 남성 대조군에서는 18%, 자궁내막증에 이완되지 않은 여성 대조군에서는 24%로 *CYP1A1 Msp*I polymorphism에는 차이가 없었다. 그러나 *GSTM1* 결손 변이와 *CYP1A1 Msp*I polymorphism을 함께 가지는 경우 자궁내막증의 위험도가 증가 하였다. 국내에서는 심 등[17]이 한국인 여성을 대상으로 연구한 바에 의하면, *CYP1A1* wild homogeneous type (wt/wt)이 자궁내막증 환자에서 45.1%, 대조군에서 34.3%로 유의한 차이가 없었다. 본 연구에서도 *CYP1A1* mutant type (mt/mt, wt/mt)이 group I, II, 대조군에서 각각 16.3%, 9.1%, 18.1%로 유의한 차이가 없었다.

*GSTM1*에 관하여 Baranova 등[18]이 프랑스 여성을 대상으로 연구한 바에 의하면 *GSTM1*의 결손 변이는 대조군 (45.8%)에 비해 minimal-mild 자궁내막증 (75.6%)과 moderate-severe 자궁내막증 (79.3%)에서 더 높게 나타나 *GSTM1*의 결손 변이가 자궁내막증과 관련성이 있음을 제시하였다. 그러나, Hadfield 등[16]은 *GSTM1* 결손 변이가 남성 대조군에서 45%, 자궁내막증에 이완되지 않은 여성 대조군에서는 52%, 자궁내막증 환자군에서는 45%로 통계학적인 유의한 차이가 없었다. 또한 Baxer 등[19]이 영국 남동부 여성을 대상으로 연구한 바에 의하면 *GSTM1* 결손 변이가 자궁내막증 환자에서 47.6%, 자원한 건강한 여성에서는 48.9%로 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 한국인 여성을 대상으로 심 등[17]이 연구한 바에 의하면, *GSTM1*의 결손 변이는 대조군에서 33.3%, 자궁내막증 3, 4기에서 56.9%로 통계학적인 차이를 보이지 않아 *GSTM1*의 결손 변이가 자궁내막증과 관련성이 없었다. 그러나, 김 등[20]이 연구한 바에 의하면, *GSTM1* 결손 변이가 대조군에서는 49.2%, 환자군에서는 61.5%로 유의한 차이가 있었다. 본 연구에서는 *GSTM1* 결손 변이가 group I, II, 대조군에서 각각 55.3%, 41.8%, 53.2%로 유의한 차이가 없었다.

*NAT2*에 관하여 Baranova 등[18]은 프랑스 여성을 대상으로 한 연구에서 자궁내막증 환자들은 slow acetylators인 비율이 60.0%로서 대조군의 38.9%보다 유의하게 높다고 보고하였다. 그러나 자궁내막증 3, 4기 환자들은 48.3%로 대조군과 유의한 차이가 없었다. 반면 Nakago 등[13]은 영국인들을 대상으로 조사한 연구에서 자궁내막증 3, 4기로 확진받은 환자군에서 fast acetylator가 57.4%로서 자궁내막증에 이환되지 않은 대조군의 33.3% 및 남성 대조군 32.3%보다 높다는 상반된 보고를 하였다. 국내에서는 최 등[21]이 발표한 바에 의하면, 자궁내막증에서 slow acetylator일 빈도는 12.2%, 대조군에서는 10.2%로서 두 군간의 유의한 차이는 없었다. 본 연구에서는 slow acetylator의 빈도가 group I, II, 대조군에서 각각 12.8%, 10.9%, 12.8%로 유의한 차이가 없었다.

이렇게 연구들마다 다른 결과가 나오는 이유는 여러 가지가 있다. 첫째, 수집된 연구 대상자들이 서로 다른 인종이다. 유전자 다형성의 연관성 연구의 결과는 인종마다 다르게 나타나므로 다른 인종의 결과를 그대로 받아 들일 수는 없다. 둘째, 연구마다 대조군 선택이 다양하다. 본 연구에서도 진단 복강경상 자궁내막증이 없는 여성을 대조군으로 하였으나, 불임증을 주소로 온 환자들이라는 것이 본

연구의 한계점이다. 셋째로 유전자 다형성의 빈도와 동시에 개인의 환경적 위험인자의 노출 등 역학적인 요인을 고려하지는 못하였기 때문에 서로 다른 결과가 나올 수 있었다고 사료된다.

이러한 유전자 다형성의 연관성 연구의 결과는 인종, 민족, 대조군의 선별, 환경독성물질에 대한 노출 정도, 성장 환경 등 여러 원인에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 더욱 세심한 주의가 필요하며, 한국인 여성의 자궁내막증 발생에 관련 있을 것으로 생각되는 위험인자를 찾아내기 위한 지속적이고 광범위한 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Moen NH, Magnus P. The familial risk of endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand 1993; 72: 560-4.
2. Kennedy SH, Mardon HJ, Barlow DH. Familial endometriosis. J Assist Repod Genet 1995; 12: 32-4.
3. Treloar SA, O'Connor DJ, O'Connor VM, Martin NG. Genetic influences on endometriosis in Australian twin sample. Fertil Steril 1999; 71: 701-10.
4. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram Jr VC. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. Am J Obstet Gynecol 1980; 137: 327-31.
5. Lamb KRN, Hoffmann RG, Nichols TR. Family trait analysis: a case-control study of 43 women with endometriosis and their best friends. Am J Obstet Gynecol 1986; 154: 596-601.
6. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Fundam Asspl Toxicol 1993; 21: 433-41.
7. Yang JZ, Agarwal SK, Foster WG. Subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the Cynomolgus monkey. Toxicological Sciences 2000; 56: 374-81.
8. Eskenazi B, Mocarelli P, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Olive D, et al. Serum dioxin concentrations and endometriosis: A cohort study in Seveso, Italy. Environmental Health Perspectives 2002; 110: 629-34.
9. Rier S and Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. Semin Reprod Med 2003; 21: 145-53.
10. Xu X, Kelsey KT, Wiencke JK, Wain JC, Christiani DC. Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5: 687-92.
11. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. Carcinogenesis 1993; 14: 1821-4.
12. Murata M, Shiraishi T, Fukutome K, Watanabe M, Nagao M, Kubota Y, et al. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes as risk factors for prostate cancer. Jap J Clin Oncol 1998; 28: 657-60.
13. Nakago S, Hadfield RM, Zondervan KT, Mardon H, Manek S, Weeks DE, et al. Association between endometriosis and N-acetyltransferase 2 polymorphisms in a UK population. Mol Hum Reprod 2001; 7: 1079-83.
14. Risch A, Wallace DM, Bathers S, Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. Hum Mol Genet 1980; 4: 231-6.
15. Ilett KF, David BM, Detchon P, Castleden WM, Kwa R. Acetylation phenotype in colorectal carcinoma. Cancer Res 1987; 47: 1466-9.
16. Hadfield RM, Manek S, Weeks DE, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH, et al. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. Mol Hum Reprod 2001; 17: 1073-8.
17. 심성신, 허성은, 이경순, 문혜성, 안정자, 유한기 등. 해독화 효소 유전자 (GSTM1, GSTT1 and CYP1A1) 다형성과 한국인 여성의 자궁내막증의 연관성에 관한 연구. 대한산부학회지 2003; 46: 403-8.
18. Baranova H, Canis M, Lvaschenko T, Albuisson E,

Bothorishvilli R, Baranov V, et al. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis. Molecular Human Reproduction 1999; 5: 636-41.

19. Baxter SW, Thomas EJ, Campbell IG. GSTM1 null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian cancer. Caricinogenesis 2001; 22: 63-5.

20. 김태준, 김석현, 최영민, 전종관, 박성효, 박인애 등. 한국 여성에서 자궁내막증과 GSTM1, GSTT1 유전자 결손 다형성의 연관성. 대한산부학회지 2003; 46: 1300-5.

21. 최영민, 윤지성, 구승엽, 이규섭, 박성효, 장은란 등. 자궁내막증 환자에서 N-acetyl transferase 2 유전자 다형성 양상. 대한산부학회지 2003; 46: 2113-7.