

# 임산부의 혈중 엽산과 호모시스틴 수준이 태반세포의 DNA 메틸화에 미치는 영향

박보현<sup>1)</sup>, 김영주<sup>2,4)</sup>, 이화영<sup>3,4)</sup>, 하은희<sup>1,4)</sup>, 민정원<sup>1)</sup>, 박종순<sup>2)</sup>, 박혜숙<sup>1,4)</sup>

이화여자대학교 의과대학 예방의학교실<sup>1)</sup>, 이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>2)</sup>,  
이화여자대학교 의과대학 해부학교실<sup>3)</sup>, 이화여자대학교 의과학연구소<sup>4)</sup>

## Folate and Homocysteine Levels during Pregnancy affect DNA Methylation in Human Placenta

Bo-hyun Park<sup>1)</sup>, Young-Ju Kim<sup>2,4)</sup>, Jong-soon Park<sup>2)</sup>, Hwa-young Lee<sup>3,4)</sup>, Eun-hee Ha<sup>1,4)</sup>, Jung-won Min<sup>1)</sup>, Hye-sook Park<sup>1,4)</sup>

Departments of Preventive Medicine<sup>1)</sup>, Departments of Obstetrics and Gynecology<sup>2)</sup>,  
Departments of Anatomy<sup>3)</sup>, Medical Research Institute<sup>4)</sup>, Ewha Womans University

**Objectives** : DNA methylation is one of the best characterized epigenetic mechanisms that play a regulatory role in genome programming and imprinting during embryogenesis. In this present study, we investigated the association between DNA methylation in the human placenta and the maternal folate and homocysteine concentrations on the Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphism during pregnancy.

**Methods** : We investigated 107 pregnant women who visited Ewha Woman's University Hospital for prenatal care during their 24~28 weeks-period of gestation. During the second trimester, we measured the serum homocysteine and folate concentrations. The MTHFR 677 genetic polymorphism was determined by performing PCR-RFLP assay. The expression of DNA methylation in the human placenta was estimated by using immunohistochemistry method.

**Results** : Serum folate was negatively correlated with the

serum homocysteine concentration for all the MTHFR genotypes. We found positive correlation between the folate concentrations and the DNA methylation in the human placenta ( $p < 0.05$ ). An increasing concentration of homocysteine was associated with reduced DNA methylation in the human placenta. The coefficient value was -2.03 (-3.77, -0.29) on the regression model ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion** : These findings suggest that the maternal folate and homocysteine levels along with the MTHFR 677 genetic polymorphism during pregnancy affect the DNA methylation in the human placenta.

*J Prev Med Public Health 2005;38(4):437-442*

**Key words** : DNA methylation, Epigenetics, Folate, Homocysteine, MTHFR gene polymorphism, Placenta

## 서론

DNA 메틸화란 DNA 염기서열 상에 메틸기가 화학 결합하는 현상으로 DNA의 염기서열의 변화 없이 후생유전학적인 변화를 가져오는 것을 말한다 [1]. DNA 메틸화의 변화는 염색질 구조에 변화를 일으켜 세포의 전사에 영향을 미쳐 결국 유전자 침묵현상이 유발되어 정상적인 유전자의 활성화에 장애를 일으키게 되며 [2] 다양한 생리학적 반응, 세포의 성장과 교사, DNA 복구단계에 영향을 줄 수 있다 [3-6].

DNA 메틸화에는 호모시스테인이 중요하게 작용한다 [7]. DNA 메틸화의 주요 메틸 공여군인 S-adenosylmethionine(SAM)은 메티오닌에서 전환되는데 이 전환 고리(cycle)는 엽산과 비타민 B<sub>12</sub>에 의존하게 된다. 호모시스테인은 이 전환 고리를 억제함을 통해 DNA 메틸화에 관여하게 되며 따라서 혈중 호모시스테인 농도가 높은 경우 DNA 저메틸화가 초래된다 [8]. 혈중 호모시스테인의 농도에는 엽산과 비타민 B<sub>12</sub>의 조효소 [9], 그리고 MTHFR 유전자 다형성이 관여하게 되어 [10,11], 이들 요인

역시 DNA 메틸화의 변화에 영향을 주게 된다 [7]. 동물 연구에서 엽산의 결핍이 원인이 되어 발암 전 DNA 저메틸화가 유도됨을 관찰하였으며 [12], 사람을 대상으로 한 연구에서도 엽산 부족이 림프구 DNA의 저메틸화를 초래함이 보고되었다 [13].

DNA 메틸화의 형태는 과다하거나 부족한 것으로서 표현될 수 있는데, 암이나 동맥경화의 질병 발생은 DNA 저메틸화와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다 [14-16]. DNA 저메틸화로 인한 염색체의 불안정성은 발암유전자의 변이를 초래하여 암 발생과 연관이 있으며 [17,18], 또한 DNA 메틸화는 동맥경화증과도 연관이 되는 것

접수: 2005년 4월 25일, 채택: 2005년 6월 1일

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KKFR-2004-003-E00058)

책임저자: 박혜숙(서울 양천구 목-1, 전화: 02-2650-5756, 팩스: 02-2653-1086, E-mail: hpark@ewha.ac.kr)

으로 논의되고 있다. Newman [8]은 동맥경화증의 독립적인 위험요인인 고호모시스테인혈증이 DNA 저메틸화와 연관이 있음을 제기하였다. 고호모시스테인혈증으로 인한 DNA 저메틸화는 혈관의 섬유화를 가져오는 유전자의 발현에 변이를 초래하여 내피세포 기능부전으로 인한 동맥경화증의 발생위험을 높일 수 있다 [19-22]. DNA 저메틸화에 관한 연구에서 엽산 결핍이 세포의 형태나 표적 장기, 세포변형의 단계에 있어 감수성을 가지며 특정 부위에 선택적으로 나타남이 보고되었다 [23].

임신 중의 고호모시스테인혈증은 태반 혈관의 기능부전을 유발하여 재태기간의 단축, 자궁내 발육부전 및 저체중아 출산의 위험을 높이는 것으로 보고되고 있다. 본 연구자의 이전연구에서 엽산의 결핍과 호모시스테인의 상승은 제태 기간과 출생 체중 감소에 영향을 미치는 것을 살펴보았으며 [24], 이러한 임신기간 중의 엽산 부족과 부정적인 출생결과 사이에 DNA 저메틸화가 관여할 것으로 생각할 수 있다. 산모에서의 DNA 메틸화에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았으나 동물모델을 통해 자궁태반혈류의 불균형이 DNA 메틸화와 연관이 되어 있음을 관찰한 연구 [25]가 있으며 이로 인한 DNA 저메틸화는 출생 후 간 유전자 발현에 영향을 주어 대사 관련 질환에 지속적으로 영향을 줄 것이라는 문제제기도 있다 [26]. 따라서 본 연구에서는 임신기간 중의 혈중 엽산과 호모시스테인 농도가 태아생존의 환경인 태반에서의 DNA 메틸화에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

2001년 8월부터 2003년 4월까지 산전 진찰을 위해 이화여자대학교 병원 산부인과에 내원한 임신 24-28주의 산모를 대상으로 임상 의사가 코호트에 대한 구체적인 설명과 제안을 하였다. 그 중 연구 참여에 동의한 658명의 산모를 연구 대상으로 하여 산모 코호트를 구축하고 임신 24-28주 기간에 혈중 호모시스테인과 엽산 농도를

측정하였다. 코호트 구성원 중 본 병원에서 출산하여 태반과 임신결과 정보 수집이 가능하였던 130명의 산모를 본 연구의 대상으로 하였으며 임신성 고혈압 환자 4명, 임신성 당뇨병 환자 17명, 다 태아를 출산한 산모 2명을 제외하여 약 82%에 해당하는 107명의 산모를 최종 분석 대상으로 하였다.

### 2. 인구학적 특성 및 출산결과 평가

연구대상 산모의 임신 24-28주 기간의 외래 방문 시 혼련된 간호사가 인구학적 특성, 임신 및 출산관련 특성, 건강 상태 등의 문항을 포함한 구조화된 설문지를 자가 기입식 설문지에 근거하여 조사하였다. 또한 분만 후 분만실에 상근하는 간호사가 의 무기록에 근거하여 임신주수, 신장, 체중, 임신 전후의 체중변화, 분만 시 합병증, 다 태아 여부 등의 출산결과를 수집하였다.

### 3. 혈중 엽산 및 호모시스테인의 생화학적 분석

임신 24-28주 기간의 외래 방문 시 채취한 정맥혈을 혈청으로 분리하여 엽산과 호모시스테인 농도를 분석하였다. 호모시스테인 농도는 Araki 등 [27]의 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)-fluorescence detection method를 참고하여 분석하였다. 혈청 100  $\mu$ l에 10% tri-n-butylphosphine 용액 10  $\mu$ l를 첨가한 후 4  $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 10% trichloroacetic acid 100  $\mu$ l를 첨가하였다. 반응 후 3000 $\times$ g로 5분간 4  $^{\circ}$ C에서 원심분리 한 후 상층액 100  $\mu$ l에 1.55M NaOH 20  $\mu$ l, 4mM EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid)를 함유하는 0.125 M borate buffer(pH0  $\mu$ l, ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole 4-sulfonic acid용액 100  $\mu$ l를 첨가하고 60  $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응물은 냉각시켜 0.45  $\mu$ l filter(HV type, Whatman)로 여과한 후 automatic injector(Waters Co. MA. USA)로 20  $\mu$ l씩 column에 주입하여 Fluorescence Detector(Waters 474-Wateraters Co. MA. USA)로 분석하였다. 분석시 Excitation wave length 는 385 nm로 하였고, Emission wave length 는 315 nm로 결정하였다. 엽산은 Radioimmunoassay

kit(Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA)를 이용하여 분석하였고 interassay 변이계수는 4.0%로 결정하였다.

### 4. MTHFR 677 유전자 다형성 분석

연구대상 산모의 정맥혈로부터 DNA를 추출하여 PCR-RFLP 기법을 시행하여 MTHFR 유전자 다형성을 분석하였다. 산모의 혈액에서 QIAmp blood Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출한 후 분석시까지 -20  $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 준비된 DNA로 Polymerase Chain Reaction-(PCR)을 시행하여 DNA를 증폭시켰다. PCR은 50 ng의 DNA, 200 mM dNTPs, 각 primer 0.3 mmol/3 ml, PCR buffer 및 0.5 unit의 Taq polymerase를 사용하였으며 Sense; 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3', antisense 5'-AGG ACG GTG GGT GAA GTG-3'를 PCR primer로 선택하였다. 반응온도와 시간은 95  $^{\circ}$ C 60초, annealing temperature 72  $^{\circ}$ C 60초로 수행하고 35회를 반복하였다. 5ul의 PCR산물을 16unit의 제한효소(8U/, Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 분해하여 Nucleotide 677 위치에서의 C에서 T로의 치환을 확인하였다. 198-base pair PCR fragment는 HinfI 제한효소에 의해 175(와 23ba)se pair fragment로 잘라졌고 증폭된 생성물은 2.5 se gel에 전기영동 하여 밴드를 확인하였다. 677CC wild type은 198 bp에 밴드가 나타났고 677CT heterozygous 변이형은 198, 175, 23bp 위치에, 677CT homozygous 변이형은 175, 23bp에서 관찰되었다.

### 5. 태반조직의 DNA 메틸화 평가

Chandrika 등 [28]의 방법을 변형하여 태반조직의 DNA 메틸화를 평가하였다. 분만 시 수집된 태반의 일부를 분리하여 4% paraformaldehyde와 0.5% glutaraldehyde의 혼합고정액으로 고정된 후 조직의 수분을 제거하기 위하여 alcohol 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 투명화하였다. 조직에 파라핀을 침투시키고 포매하여 파라핀 블록을 제작하였다. 제작한 블록을 microtome을 이용하여 5-7 $\mu$ m의 두께로 자른 후 Gelatin-coated slide glass에 올리고 56

**Table 1.** Table 1. General characteristics of maternal participants

Characteristics	Mean(SD)
Age(years)	30.8( 3.4 )
Body mass index(kg/m <sup>2</sup> )	20.7( 3.6 )
Weight gain during pregnancy(kg)	13.2( 3.9 )
Gestational duration (weeks)	39.2( 2.0 )

℃에서 건조시켜 조직표본을 제작하였다. 제작된 slide의 파라핀을 xylene으로 제거하고 에탄올에 흡수 한 후 증류수로 수세하였다. Antigen retrieval 수행을 위하여 조직을 10 mM sodium citrate buffer속에 담고 microwave full power에서 1분간 끓인 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10분간 처리하였다. 0.1 mol/L PBS 완충 용액으로 20분간 수세하고 10% Goat serum으로 1시간 동안 Blocking 특이 반응을 억제하였다. 5-methylcytosine(5-MC; Oncogene, USA)항체로 12시간 이상 반응시킨 후 PBS 용액으로 수세하고 biotinylated 2nd antibody로 1시간 반응시킨 후 PBS용액으로 15분간 수세하였다. Avidin-biotin-peroxidase complex(Vector laboratory)로 30분간 처리한 후 PBS 용액으로 15분간 수세하고 DAB로 10분간 발색하였다. Hematoxyline으로 대조염색하고 alcohol로 탈수 한 후 xylene으로 투명화 하였다. DIC(differential interference contrast)현미경(Zeiss) Axioskop 2, Germany)을 사용하여 면역조직화학염색결과를 관찰하였으며 메틸화가 일어난 세포는 5-MC(methyl

cytosine)항체와 반응하여 세포핵이 적색으로 발색됨을 확인하였다. 현미경상에서 ×400 배의 배율로 관찰되는 전체 세포의 수를 측정하고 그 중 메틸화되어 적색으로 발색된 세포수를 측정하여 전체 세포수를 메틸화가 일어난 세포수로 나눈 측정비로 태반 조직 내 세포의 DNA 평가하였다.

**6. 통계분석**

SAS 통계 프로그램(Version 8.0)을 이용하여 자료를 분석하였다. 기술통계분석으로 연구대상자의 일반적 특성을 파악하여 평균과 표준편차로 나타내었다. *MTHFR* 677 유전 다형성이 CC, CT, TT인 군에서 호모시스테인 농도와 DNA 메틸화 발현과의 연관성 분석을 위하여 산모의 연령, 체질량 지수, 임신 시 체중증가를 고려하여 partial correlations분석을 시행하여 상관계수로 제시하였다. 혈중 호모시스테인 농도가 DNA 메틸화 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 다중 회귀분석 모델을 구축하였으며 산모의 연령, 체질량 지수, 임신 시 체중 증가 등을 모델에 포함하여 분석하였다.

**연구결과**

연구대상 산모의 평균연령은 30.8세였으

**Table 2.** Chemical characteristics and *MTHFR* 677 Gene polymorphism at 24~28 weeks of pregnancy and DNA methylation in human placentas after delivery

Characteristics	Mean(SD)
<i>MTHFR</i> Gene polymorphism	
677CC	43(40.2 )
677CT	47(43.9 )
677TT	17(15.9 )
Biochemical characteristics	
Folate(ng/ml)	8.7( 6.3 )
Homocysteine(μmol/l)	5.7( 2.0 )
DNA methylation (%)	32.4(15.09)

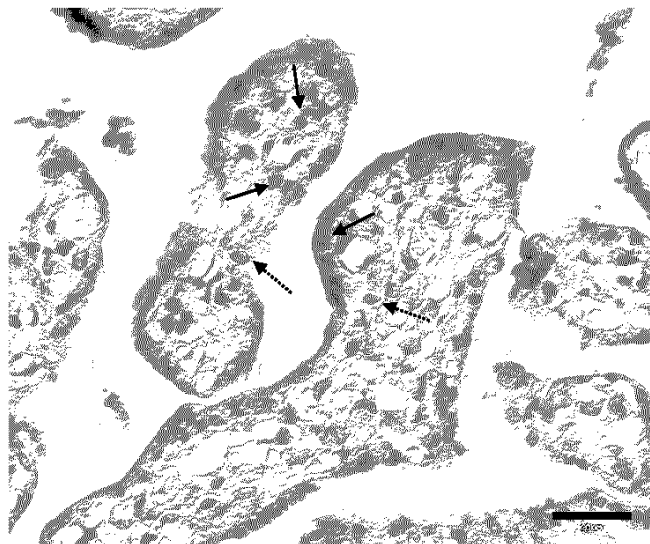
며 임신 전 체질량 지수 평균은 20.7kg/m<sup>2</sup>였고 임신주수 평균은 39.2주 였다 (Table 1). *MTHFR* 677 CC형의 유전자를 가진 산모는 43명으로 40.2%였고 CT형의 산모가 47명으로 약 44%를 차지하여 가장 높은 빈도를 보였다. TT형의 유전다형성을 가진 산모는 17명으로 전체의 16%를 차지했다. 임신 24-28주에 측정된 혈중 엽산 농도 평균은 8.7 ng/ml 이었으며 호모시스테인은 5.7μmol/l 로 나타났었다(Table 2).

면역조직화학염색으로 태반 조직 내 영양막세포에서 DNA 메틸화 발현을 평가하였다. 5-methylcytosine(5MC) 항체와 반응하여 적색으로 발현된 부분이 DNA 메틸화가 진행된 세포이며 청색으로 관찰되어지는 세포들은 항체와 반응이 일어나지 않아 Hematoxyline로만 대조염색 되어진 정상 세포이다 (Figure 1). 연구 대상 산모의 태반 조직에서의 DNA 메틸화 평균은 32.4%로 관찰되었다.

산모의 혈청 호모시스테인 농도가 태반 세포 DNA 메틸화에 미치는 영향을 다중 회귀분석모형으로 분석하였다. 산모의 연령, 체질량 지수, 임신 시 체중 변화를 보정 하였을 때 혈청 호모시스테인이 증가할수록 태반세포 DNA 저메틸화가 초래되었다. 회귀계수는 -2.03 (-3.77,-0.29)이었고 통계적으로 유의하였다 (p<0.05) (Figure 2).

산모의 혈청 엽산 농도와 호모시스테인 수준의 상관성 분석 결과 엽산 농도가 증가할수록 혈중 호모시스테인 농도는 감소하였으며 이는 *MTHFR* 677 모든 군에서 동일하였다. 각 군에서의 상관계수는 CC형에서 r=-0.46, CT형에서 r=-0.27, TT군에서 r=-0.61 이었다 (p<0.05).

엽산 농도와 태반세포 DNA 메틸화의 상



**Figure 1.** Immunohistochemical staining for 5-methylcytosine in placentas. The cell shown in dotted line indicates negative cell and the solid line on the figure indicates positive cell in placenta trophoblast. Bar=20μm

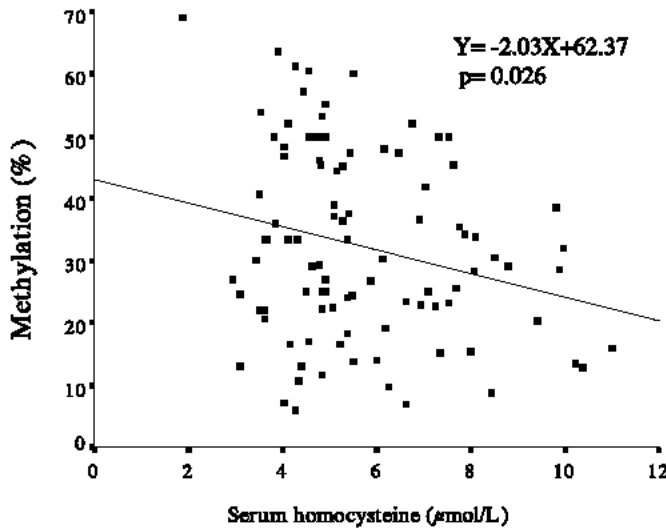


Figure 2. Multiple regression analysis between DNA methylation and serum homocysteine( $Y = -2.03X + 62.37$ ), adjusted for age, body mass index, and maternal weight gain.

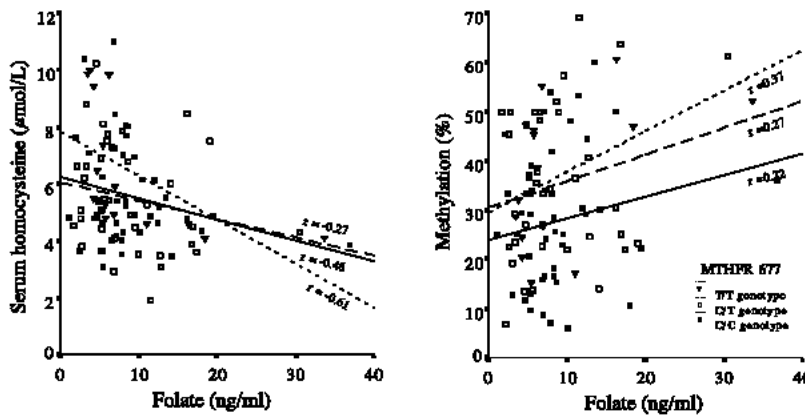


Figure 3. Correlation between serum folate and homocysteine at 24~28 weeks of pregnancy and DNA methylation in placenta by *MTHFR 677* gene polymorphism. Serum homocysteine was negatively correlated with serum folate in all *MTHFR* genotypes, adjusted for age, Body mass index, and maternal weight gain.

관분석에서는 산모의 혈청 엽산 농도 감소와 태반세포의 DNA 저메틸화와의 연관성이 관찰되었으며 TT형 군에서 엽산농도 증가에 따른 DNA 메틸화 수준이 가장 높았다 (TT:  $r = 0.37$ , CT:  $r = 0.27$ , CC:  $r = 0.22$ ) (Figure 3). 산모의 연령, 체질량 지수, 임신 시 체중 변화와 호모시스테인 농도를 보정한 엽산과 DNA 메틸화와의 상관계수는 0.17이었다.

**고찰**

DNA 메틸화란 유전체의 염기서열 중 C

와 G 염기가 집중되어 나란히 존재하는 CpG섬의 배열에서 시토신의 5' 지역에 -CH<sub>3</sub>인 메틸기가 화학 결합하는 현상으로 DNA의 염기서열의 변화 없이 염색질 구조에 변화를 일으켜 세포의 전사에 영향을 미쳐 세포의 성장과 고사, DNA 복구 단계에 영향을 줄 수 있다 [3-6]. 임신기간 중의 태반환경에서의 DNA 저메틸화는 태아의 성장과 발달, 더 나아가서는 출생 후 성인병의 발생위험에 지속적인 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되어져 임신기간 중의 태아환경의 DNA 저메틸화에 영향을 주는 요인을 찾아내고 이를 중재할 수 있

는 방법의 마련이 매우 중요하다.

본 연구에서는 임신 중기 산모의 혈중 호모시스테인과 엽산 수준이 태아환경인 태반세포에서의 DNA 메틸화에 미치는 영향을 전향적으로 평가하였다. 항산화제인 엽산의 혈중 농도가 낮아질수록 호모시스테인 농도는 증가하였으며, 호모시스테인의 농도가 증가할수록 태반세포 DNA 저메틸화가 일어남을 확인하였다. 따라서 임신 중기의 증가된 호모시스테인 농도는 태아환경인 태반세포에서의 DNA 저메틸화를 유도함을 보여주었다.

세포 내에 메틸기를 공급함으로써 메틸화의 생화학적 반응 단계에 참여하는 식이요인인 생리활성요소는 엽산, 비타민 B<sub>6</sub>, 비타민 B<sub>12</sub>, 콜린으로서 이들 식이요인은 DNA 메틸화의 변화를 중재할 수 있다는 측면에서 매우 중요하다. 특히 엽산은 단일탄소 대사에 있어 주요역할을 하고 뉴클레오티드를 구성하는 티민 합성에 사용되어져 세포의 성장과 발달에 중요한 요소이다. 이 엽산의 결핍은 호모시스테인의 재메틸화 과정에 필요한 methyltetrahydrofolate의 합성을 저해함으로써 호모시스테인의 농도를 높여 DNA 저메틸화를 가져올 뿐만 아니라 메틸화 과정 중 세포 내 SAM pool을 교란시켜 S-adenosylhomocysteine의 수준을 증가시키고 methyltransferase 효소활성을 억제하여 DNA 메틸화에 장애를 초래한다고 하였다 [29,30].

본 연구에서는 엽산 수준이 증가할수록 DNA 메틸화가 증가함을 보여주었으며 따라서 메틸화 과정 중 단일탄소 대사를 포함한 엽산 등의 비타민 섭취가 보충되어지면 DNA 저메틸화 현상을 막을 수 있을 것으로 생각되어진다.

엽산 수준과 관련한 DNA 저메틸화 현상에는 유전적 감수성이 관여하는 것으로 알려져 있다. *MTHFR* 유전자 다형성은 엽산과 상호작용하여 *MTFHR* 변이형 군에서 엽산이 결핍된 경우에 호모시스테인 농도가 더욱 높게 나타남이 보고되었다 [31]. 본 연구에서는 *MTHFR 677* 유전 다형성군에서 엽산과 호모시스테인의 상관관계를 분석하였을 때 동형 접합성 변이형 군인 TT형 군에서 엽산 농도가 낮을수록

혈중 호모시스테인 농도가 상당히 증가하는 것으로 분석되었다. 결과에서 표로 제시하지는 않았지만 *MTHFR* 677 유전 다형성군에 따른 혈청 호모시스테인 농도평가를 비교하였을 때 CC형 군에서 5.56 $\mu$ mol/l 이었던 반면 변이형 군인 TT형 군에서는 6.43 $\mu$ mol/l 로 분석되어 C allele를 가진 CC와 CT형 군에 비해 TT형 군에서 호모시스테인의 농도를 높이고 이는 DNA 저메틸화를 초래할 것으로 생각되어진다. 그러나 DNA 메틸화에서는 유전자 다형성에 따라 엽산의 활성도가 다르게 나타난다는 보고도 있다. Slattery 등 [32]의 연구에 의하면 절제된 식이를 섭취한 *MTHFR* 677CC형 군보다 엽산, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub> 등을 충분히 섭취한 *MTHFR* 677TT형 유전 다형성 군에서 대장암의 위험요인이 30-40% 낮음을 보고되었다.

본 연구에서도 *MTHFR* 유전자 다형성에 따라 엽산수준과 DNA 메틸화의 수준의 상관성을 살펴보았을 때 *MTHFR* 677 CC형보다 *MTHFR* 677(TT)형에서 엽산수준 증가에 따른 DNA 메틸화가 증가함을 보여주었다. 이는 DNA 메틸화에 있어서 엽산의 영향에 대한 연구에 엽산수준과 단일탄소대사경로관련 유전자와의 상호작용이 고려되어야 함을 나타내주는 결과이다.

결국 자궁태반 내 엽산 결핍 등과 같은 영양 불균형은 기질을 통하여 태아에게까지 전달되어지며 이러한 자궁태반 내 환경 변화는 태아에게 있어 DNA 저메틸화 등과 같은 후생유전학적인 변화를 일으키어 결국 유전자 기능에 장애를 초래하게 될 수 있음이 고려되어야 한다. 또한 이러한 후생유전학적인 변화는 엽산과 같은 식이요인의 보충을 통해 중재가 가능하며 이 중재효과에 유전적인 감수성이 관여할 수 있으므로 유전-환경 상호작용을 고려한 중재방안의 마련이 필요함을 보여주었다.

본 연구의 제한점으로 DNA 메틸화에 영향을 줄 수 있는 비타민B<sub>6</sub>, 비타민B<sub>12</sub>, 메티오닌 등과 같은 식이 요인과 중금속노출, 환경요인으로서 음주, 흡연을 고려하지 않고 엽산만을 노출 지표로서 하였다는데 있다. 향후 연구에서는 DNA 메틸화와 연관성이 있는 다른 변수들을 고려한 모델을

구축하여 이에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다. 둘째로, 임상 의사가 코호트 등록에 대한 제안을 하였을 때 연구 참여에 동의한 산모만을 연구대상자로 함으로서 선택편견으로 인하여 일반화에 제한이 있을 수 있다 [33].

그러나 본 연구는 전향적인 코호트 연구로서 임신 24-28주에 코호트에 등록된 산모를 대상으로 함으로서 분만 후 태반조직의 무작위 추출이 가능하였으며 노출에 대한 평가가 선행되어 노출과 결과간의 상관성에 타당성이 있다고 생각한다.

또한 산모의 태반을 태아환경으로 인식하고 임신과 관련하여 사람을 대상으로 엽산과 태반의 DNA 메틸화와의 연관성을 분자유전학적 측면에서 접근하여 살펴본 최초의 연구이며 산모에 있어 엽산의 보충이 태반세포의 메틸화 대사에 보호효과로 작용함을 분자수준에서 평가함은 매우 큰 의미를 갖는다. 향후 산모를 대상으로 엽산과 식이요인에 대한 지속적인 중재와 관리가 필요할 것으로 생각되며 현재 진행되고 있는 코호트를 좀 더 확대하여 후속 연구가 활발히 이루어져야 할 것으로 판단된다.

### 요약 및 결론

DNA 메틸화는 배 발생 과정 중 유전체 프로그래밍과 유전자 각인을 조절하는 중요한 후생 유전학적 현상으로 알려져 있다. 본 연구에서는 임신 24-28주 산모의 엽산과 호모시스테인 농도에 따른 태반세포 DNA 메틸화를 *MTHFR* 677 유전다형성군을 고려하여 평가하였다.

산전 진찰을 위해 이화여자대학교 병원 산부인과에 내원한 임신 24-28주 산모 107명을 연구 대상으로 하였으며 외래 방문 시 혈중 엽산, 호모시스테인 농도를 측정하고 *MTHFR* 677 유전다형성을 평가하였다. 면역조직화학염색법으로 분만 후 수집된 태반조직에서 DNA 메틸화를 평가하였다.

혈중 호모시스테인 농도가 증가할수록 태반세포 DNA 저메틸화가 일어남이 관찰되었으며 회귀계수는 -2.03(-3.77, -0.29)

이었고 이는 통계적으로 유의하였다. (p<0.05) 혈중 엽산과 호모시스테인은 음의 상관관계를 보였으며 특히 *MTHFR* (677) TT 군에서 가장 강한 음의 상관관계를 갖는 것으로 분석되었다. (r=-0.61) 또한 인체 내 엽산 농도가 높아질수록 태반세포 DNA 메틸화는 증가하였으며 이는 통계적으로 유의하였다. (p<0.05)

이러한 결과는 모체의 혈중 엽산과 호모시스테인 수준이 태반세포 DNA 메틸화에 영향을 주며 이에 특정 유전자의 다형성이 상호작용을 제시하여 준다. 향후 산모를 대상으로 엽산과 식이요인에 대한 지속적인 중재와 관리가 필요할 것으로 생각되며 이에 대한 후속 연구가 활발히 이루어져야 할 것이다.

### 참고문헌

1. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1:11-19
2. Wolffe Ap, Matzke Ma. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-486
3. Perma AF, Ingrassio D, Zappia V, Galletti P, Capasso G, De Santo NG. Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure: evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. *J Clin Invest* 1993; 91: 2497-2503
4. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem* 1997; 272: 25380-25385
5. Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Mehryk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 433-443
6. Coen VG, Coen DA. Hyperhomocysteinemia and vascular disease: a role for DNA hypomethylation? *Lancet* 2003; 361: 17
7. Zaina S, Lindholm MW, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *J Nutr* 2005; 135(1): 5-8
8. Newman PE. Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA

- methylation producing mutations which initiate atherosclerosis? *Med Hypotheses* 1999; 53(5): 421-424
9. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollest Se. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 22: 195-201
  10. Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme Wr, Roberts JM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia. *J Gynecol Invest* 1999; 6: 74-79
  11. Kim KN, Kim YJ, Chang NS. The interaction of the 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism with folate and vitamin B<sub>12</sub> intakes and serum homocysteine concentrations in pregnant women. *Korean Nutr Soc* 2002; 35(10): 1045-1052 (Korean)
  12. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM, Swendseid ME. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998; 128: 1204-1212
  13. Trasler J, Deng L, Melnyk S, Pogribny I, Hiou-Tim F, Sibani S, Oakes C, Li E, James SJ, Rozen R. Impact of Dnmt1 deficiency, with and without low folate diets, on tumor numbers and DNA methylation in Min mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 39-45
  14. Esteller, M, Herman, JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7
  15. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. *J Nutr* 2002; 132: 2406S-2409S
  16. Hiltunen MO, Yla-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1750-1753
  17. Yao X, Hu JF, Daniels M, Shiran H, Zhou X, Yan H, Lu H, Zeng Z, Wang Q, Li T, Hoffman AR. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2003; 111: 265-273
  18. Chen JS, Faller DV, Spanjaard RA. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 219-236
  19. Laukkanen MO, Marniermaa S, Hiltunen MO, Aittomaki S, Airene K, Janne J, Yla-Herttuala S. Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit ec-sod gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2171-2178
  20. Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Makinen K, Turunen AM, Aalto-Setala K, Yla-Herttuala S. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 2002; 7: 5-11
  21. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EW, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* 2003; 49: 1292-1296
  22. Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 2004; 35: 345-347
  23. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2003; 38: 821-829
  24. Park HS, Kim YJ, Ha EH, Lee HY, Chang NS, Hong YC, Pang MG, Kim WK. The risk of MTHFR variants, folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies and hyperhomocysteinemia during pregnancy associated with short gestational age and reduced birth weight. *Environ Mutagen Carcinige* 2003; 23: 1-6 (Korean)
  25. MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Piroozzi A, Jernigan S, Hsu JL, Janke SM, Pham TD, Lane RH. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* 2004; 18(1): 43-50
  26. Umov FD. Methylation and the genome. the power of a small amendment. *J Nutr* 2002; 132: 2450S-2456S
  27. Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; 422: 43-52
  28. Chandrika JP, Gary LJ, Andra RF, Martin AW, Upendr M, William EG, Douglas CH, Alain N. Immunohistochemical evaluation of global DNA methylation. *Biotech Histochem* 2000; 75(6): 251-258
  29. Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J. Folate deficiency induced homocysteinemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine=s co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* 1994; 298: 415-419
  30. De Cabo SF, Santos J, Fernandez-Piqueras J. Molecular and cytological evidence of S-adenosyl-L-homocysteine as an innocuous undermethylating agent in vivo. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71: 187-192
  31. Kim KN, Kim YG, Chang NS. Effects of the interaction between the C677T 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and serum B vitamins on homocysteine levels in pregnant women. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 10-16
  32. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 513-518
  33. Lee BE, Hong YC, Park HS, Lee JT, Kim JY, Kim YJ, Kim SH, Goo JO, Ha EH. Maternal exposure to environmental tobacco smoke(ETS) and pregnancy outcome(low birth weight or preterm baby) in prospective cohort study. *Korean J Prev Med* 2003; 36(2): 117-124 (Korean)