韓國營養學會誌 39(3) : 264~273, 2006

임신부의 MTHFR 유전자형, 호모시스테인 및 비타민 B군 영양상태가 영아 성장에 미치는 영향*

김혜숙[1)2)] · 김영주[3)] · 장남수[1)2)§]

이화여자대학교 생활환경대학 식품영양학과,[1)] 아시아 식품영양연구소,[2)]
이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실[3)]

Effects of Maternal 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Genotypes, Serum Homocysteine and B Vitamin Levels on Postnatal Growth in Their Offsprings*

Kim, Hye Sook[1)2)] · Kim, Young Ju[3)] · Chang, Namsoo[1)2)§]

Department of Food and Nutritional Sciences,[1)] Asia Food and Nutrition Institute,[2)]
Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea
Department of Obstetrics & Gynecology,[3)] Ewha Womans Medical Center, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

Elevated maternal plasma homocysteine concentrations have been associated with adverse pregnancy outcomes. Serum homocysteine levels may be affected by the MTHFR genotypes and the nutritional status of B vitamins including vitamin B_2, B_6, folate and vitamin B_{12}. We investigated whether postnatal growth measurements were influenced by maternal MTHFR genotypes and their mid-pregnancy serum vitamin B and homocysteine levels. In 130 pregnant women of 24−28 wks of gestation, the MTHFR genotypes, serum B vitamins and homocysteine concentrations were analyzed. Physical growth status was assessed in their offsprings by measuring height, weight, and head and chest circumferences from birth up to 24 months. Serum homocysteine levels were higher in the subjects with T/T genotype than those with the C/T or C/C. Heights and head and chest circumferences of offsprings from the T/T mothers were significantly lower than those from the C/C or C/T mothers only when the serum homocysteine levels were above the median. The mean height of offsprings from the T/T mothers was significantly lower than those from the C/C and C/T mothers. The mean weight and head circumferences of offsprings born from the mothers whose mid-term pregnancy PLP levels were in the lowest quartile was significantly lower than those from mothers in the highest quartile. Heights and head circumferences of offsprings from the T/T mothers were significantly lower than those from the C/C or C/T mothers only when the serum FAD levels were in the lowest quartile. These results suggest that postnatal growth up to 24 months may be influenced by the maternal C677T MTHFR genotypes, and mid-pregnancy serum homocysteine and vitamin B status. (*Korean J Nutrition* 39(3): 264~273, 2006)

KEY WORDS : MTHFR genotypes, homocysteine, vitamin B_2, vitamin B_6, postnatal growth.

서 론

임신 중 혈중 호모시스테인 수준의 상승은 태내 성장 지연,[1)] 저체중아 출산[2)]을 비롯한 바람직하지 못한 임신결과[3,4)]와 자연유산,[5)] 태반박리 등[6)]의 임신 합병증과 관련이 있는 것으로 보고되고 있어 임신 중 호모시스테인 수준에 대한 관심이 모아지고 있다. 호모시스테인은 체내에서 메티오닌의 대사로부터 생성되는 황 함유 아미노산의 일종이다.[7)] 호모시스테인은 호모시스테인의 재메틸화 경로와 메티오닌이 과잉으로 존재하거나 시스테인 합성이 필요한 상태에서 활성화되는 황 전이반응 경로의 두 가지 경로를 거쳐 대사된다.[8)] 혈중 호모시스테인 수준에 영향을 미치는 요인은 호모시스테인 대사 경로를 결정하는 유전적 요인과 환

접수일 : 2006년 1월 2일
채택일 : 2006년 3월 23일
*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (01-PJ1-PG1-01CH15-0009).
§To whom correspondence should be addressed.
E-mail : nschang@ewha.ac.kr

© 2006 The Korean Nutrition Society

경적 요인 및 이들의 상호작용이라고 보고된 바 있다.[9]

혈중 호모시스테인 수준에 영향을 주는 유전적 요인으로 알려진 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 유전자는 5, 10-methylenetetrahydrofolate를 5-methyl tetrahydrofolate로 전환시키는데 필요한 효소로 엽산 대사의 rate-limiting step에 관여를 하며 5-methyl tetrahydrofolate는 호모시스테인이 methionine으로 재메틸화되는 과정에 메틸기의 공여자로서 기능을 하게 된다. MTHFR 유전자의 677번째 염기서열이 C에서 T로 바뀌는 C677T MTHFR 유전자형 변이는 이 효소의 활성에 영향을 미치게 되며 따라서 DNA와 RNA의 생합성에 관여하는 엽산의 재분배에도 영향을 주게 된다.[10] 이러한 MTHFR 다형성은 경증의 고호모시스테인혈증을 야기시킨다고 한다.[11] 호모시스테인 수준에 영향을 미칠 수 있는 환경적 요인으로는 비타민 B_2, 비타민 B_6, 엽산, 비타민 B_{12} 등의 영양상태가 알려져 있으며[12,13] 이들은 각기 다른 생화학적 반응단계에서 호모시스테인 대사의 조효소로 작용하여 혈중 호모시스테인 수준에 영향을 미친다.[14]

우리나라 임신부들을 대상으로 한 비타민 B군 영양상태에 관한 연구들[15-18]에서 상당수의 임신부들에 있어 엽산과 비타민 B6 영양 결핍 상태인 것으로 나타났으며, 또한 우리나라 여성의 경우 MTHFR C677T 유전자형의 다형성 비율이 높다는 연구[19,20]에도 불구하고 우리나라 임신부를 대상으로 하여 임신부의 호모시스테인 수준에 영향을 미치는 유전적, 영양적 요인을 함께 살펴 본 연구가 부족한 실정이다. 임신 중 호모시스테인 수준이 태아의 성장과 임신결과에 영향을 미친다는 것을 보여준 연구들[21-23]은 태아 프로그램화 이론 (fetal programming theory)에 근거할 때, 영아의 출생 후 성장 및 건강상태에도 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하였다. 그러나 MTHFR 유전자형과 혈중 호모시스테인 및 비타민 B군 영양상태 사이의 관계를 밝히기 위한 많은 연구들[24,25]은 자간전증, 태반박리 등의 임신 합병증을 가진 임신부를 대상으로 수행되었으며, 이러한 임신 합병증이 없는 정상 임신부에서 혈중 호모시스테인 수준과 비타민 B군 영양상태를 MTHFR 유전자형과 더불어 관찰한 연구는 없는 실정이다. 더욱이 이를 영아의 성장과 함께 연결하여 추적조사한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 건강한 임신부를 대상으로 이들의 MTHFR 유전자형과 임신 중반기 혈중 호모시스테인 수준 및 비타민 B군 영양상태가 출생 후 영아의 성장에 미치는 영향을 파악하고자 수행되었다.

연구방법

1. 연구 대상자, 설문조사 및 신체계측치 조사

본 연구는 전향적 코호트 연구로서 기존에 E 대학 병원 산부인과에 구축된 임산부 코호트를 대상으로 이루어졌다. 임산부 코호트는 임신 24~28주인 임산부 중에서 임신 전 질병의 기왕력이 없는 건강한 임산부를 대상으로 2002년 1월부터 구축하였다. 본 연구의 대상자는 2002년 1월부터 2003년 11월 사이에 출산한 233명의 임산부로부터 태어난 영아 중 생후 24개월에 방문조사가 가능한 영아 130명과 임신 합병증이 없는 이들의 어머니 130명이었다. 설문조사는 이들 영아가 24개월이 되는 시점인 2004년 1월부터 2005년 11월까지 훈련된 조사자에 의한 1 : 1 직접면담을 통해 실시하였으며, 조사 대상 영아의 성별, 연령, 체위, 질병유무, 병원내원 경험유무, 영양보충제 복용유무 등을 조사하였다. 영아 어머니에 대한 의무기록으로부터 임신 직전 임산부의 평균 나이와 신장 그리고 평균 체중을 조사하였으며, 분만 시 영아의 g 단위로 측정한 출생체중, cm 단위로 측정한 출생 신장과 두위도 조사하였다. 24개월 된 영아의 신체계측은 조사자가 전자체중계 (M. Specialties MS-601, Korea)를 이용하여 체중을 재고, 신장, 두위, 흉의, 상완위 둘레는 줄자 (Bigtrade, Korea)를 이용하여 직접 측정하였다.

2. 생화학적 분석

임신 24~28주인 임신부의 공복 시 정맥혈을 채취하여 실온에서 응고시킨 후 3,000 × g에서 10분간 원심분리시켜 분리된 혈청을 분석 직전까지 -70℃에 보관하였다. 혈청 비타민 B_2 농도는 Capo-Chichi 등[26]의 방법에 의해 HPLC (Water 2690, U.S.A)로 분리하여 혈청 내 flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), riboflavin을 fluorescence detector (Waters 474, Waters Co, MN, USA)로 정량하였다. 혈청 비타민 B_6 농도는 비타민 B_6 분석용 kit (Chromsystems, Germany)를 사용하여 혈청 내 PLP (pyridoxal 5'-phosphate)를 HPLC-fluorescence detector로 분석하였다. 또한 혈청 엽산과 비타민 B_{12} 분석은 $^{57}Co/^{125}I$ radioimmunoassay method (RIA)에 의해 이루어 졌다. 혈청 호모시스테인 농도는 Araki 등[27]의 방법을 기초로 하여, 이를 변형시켜 HPLC-fluorescence detector로 분석하였다.

3. MTHFR 유전자형 분석

MTHFR 유전자형을 분석하기 위하여 채취된 전혈로부터 DNA를 추출하였다. DNA 추출에는 QIAamp Blood DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)가 이용되었으며, 전혈 채취 직후 proteinase를 처리하여 단백질을 제거하고 spin column을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 분석 직전까지 −20℃에서 보관되었다. 추출된 DNA는 primer 5'−TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA−3' (up)와 primer 3'−AGGACGGTGCGGTGAGTG−3'(down); 0.5 units의 Taq DNA polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 및 dNTP mix를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR, GeneAmp, USA)을 통해 증폭시켰으며 Frosst 등의 방법[28]에 따라 Hinf I (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 제한효소로 처리하여 2.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 100 volts에서 90분 동안 전기영동 후 Gel analyzer (GeneAmp, USA)를 이용하여 UV light를 통해 band를 확인하였다. 677번째 nucleotide에서 C가 T로 치환된 경우는 198 bp에 해당되는 band 대신에 175 bp와 198 bp에 두개의 band가 나타났으며 이에 따라 MTHFR 유전자형을 C/C, C/T와 T/T형으로 구분하였다.

4. 통계적 자료의 처리 및 분석

모든 자료는 SPSS program (version 11.0)으로 통계처리하여 평균과 표준편차를 구하였다. MTHFR 유전자형에 따른 임신부의 연령 및 체위에 대한 분석과 MTHFR 유전자형에 따른 임신부의 혈청 호모시스테인, 비타민 B_2, PLP, 엽산, 비타민 B_{12} 수준에 대한 분석, 그리고 MTHFR 유전자형에 따른 영아 성장에 대한 분석은 일원분산분석 (one−way ANOVA)을 이용하여 분석한 후 Duncan의 multiple range test를 사용하여 사후 검증하였다. 임신부의 혈중 비타민 수준 및 혈청 호모시스테인 수준에 따른 영아 성장을 비교하고자, 혈청 호모시스테인 수준과 혈청 FMN, PLP 및 엽산 수준을 사분위수로 나누어 일원분산분석 (one−way ANOVA)을 이용하여 분석한 후 Duncan의 multiple range test를 사용하여 사후 검증하였다. 임신부의 MTHFR 유전자형과 혈중 호모시스테인 수준의 상호작용에 따른 영아 성장 그리고 임신부의 MTHFR 유전자형과 혈중 FAD 수준의 상호 작용에 따른 영아 성장을 분석하기 위하여 이원분산분석 (two−way ANOVA)을 실시하고 Duncan의 multiple range test를 사용하여 사후 검증하였다. 본 연구의 모든 유의성 검정은 유의 수준 5%를 기준으로 실시되었다.

결 과

1. 임신부의 연령과 체위 및 MTHFR 유전자형

본 연구대상 임신부의 연령 및 체위는 Table 1에 제시하였다. 조사 대상 임신부 130명의 평균 연령은 31.2 ± 3.5세였으며, 평균 신장은 160.1 ± 5.0 cm, 임신 전 평균 체중은 53.1 ± 7.8 kg이었다. 임신 전 평균 BMI는 21.1 ± 2.6 kg/m^{2}로 정상 범위에 속하였다. 본 연구 대상자의 모체에 대한 MTHFR C677T 다형성을 분석한 결과, C/C형이 33.8%, C/T형이 50.8%, T/T형이 15.4%인 것으로 나타났다. 이들의 평균 연령, 신장, 체중 BMI는 MTHFR 유전자형에 따른 유의적인 차이가 없었다.

2. 임신부의 MTHFR 유전자형에 따른 임신 중반 혈청 호모시스테인 수준 및 비타민 B군 영양상태

임신부의 혈청 호모시스테인 및 비타민 B군 농도를 분석한 결과는 Table 2에 제시하였다. 임신부의 평균 혈중 호모시스테인 농도를 MTHFR 유전자형에 따라 비교한 결과, C/C, C/T 및 T/T형을 가진 임신부들의 혈청 호모시스테인 농도는 각각 7.0 ± 2.4 μmol/L, 7.0 ± 2.0 μmol/L 및 10.2 ± 3.1 μmol/L로 T/T형을 가진 임신부의 혈중 호모시스테인 농도가 C/C형 혹은 C/T형을 가진 임신부에 비해 유의적으로 더 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한 혈청 FMN 농도는 C/T와 T/T형을 가진 임신부가 각각 27.6 ± 11.0 nmol/L, 25.4 ± 8.7 nmol/L로 C/C형을 가진 임신부 (35.1 ± 11.7 nmol/L)보다 유의적으로 더 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 임신부의 FAD, riboflavin, PLP, 엽산 및 비타민 B_{12} 농도는 임신부의 MTHFR 유전자형에 따라 유의적인 차이가 없었다.

3. 임신부의 MTHFR 유전자형이 영아 성장에 미치는 영향

본 연구대상 임신부에서 태어난 영아의 출생 신장, 출생 체중 그리고 출생 두위를 조사하였으며 생후 24개월 때의

Table 1. General characteristics of pregnant women before gestation

	All (n = 130)	MTHFR genotypes		
		C/C (n = 44)	C/T (n = 66)	T/T (n = 20)
Age (yr)[NS]	31.2 ± 3.5[1)]	32.0 ± 3.3	30.8 ± 3.5	30.8 ± 3.5
Height (cm)[NS2)]	160.1 ± 5.0	160.2 ± 4.9	160.0 ± 4.9	160.0 ± 6.2
Weight (kg)[NS]	53.1 ± 7.8	53.3 ± 7.2	52.8 ± 7.6	53.8 ± 9.9
BMI[3)] (kg/m^2)[NS]	20.8 ± 3.0	20.9 ± 3.0	20.7 ± 3.0	20.9 ± 2.8

[1)]Values are mean ± SD
[2)]NS: Not significant by ANOVA test ($p < 0.05$)
[3)]BMI: body mass index

Table 2. Maternal serum homocysteine and B vitamins concentrations according to the MTHFR genotypes

	All (n = 130)	MTHFR genotypes		
		C/C (n = 44)	C/T (n = 66)	T/T (n = 20)
Homocysteine (μmol/L)*[2]	7.4 ± 2.5[1]	7.0 ± 2.4[a3]	7.0 ± 2.0[a]	10.2 ± 3.1[b]
FAD[4] (nmol/L)	48.8 ± 14.2	45.5 ± 16.2	51.6 ± 12.8	46.9 ± 12.9
FMN[5] (nmol/L)*	29.9 ± 11.5	35.1 ± 11.7[a]	27.6 ± 11.0[b]	25.4 ± 8.7[b]
Riboflavin (nmol/L)	26.7 ± 36.4	25.2 ± 28.5	30.1 ± 44.6	17.7 ± 11.6
PLP[6] (nmol/L)	16.3 ± 18.1	16.8 ± 20.8	16.3 ± 17.0	15.4 ± 15.0
Folate (nmol/L)	7.2 ± 6.0	7.5 ± 5.4	7.6 ± 7.0	5.2 ± 2.8
Vitamin B_{12} (pmol/L)	441.8 ± 202.5	426.5 ± 184.0	458.2 ± 226.1	415.7 ± 144.3

[1] Values are mean ± SD
[2] Significantly different according to the MTHFR genotypes by ANOVA (*: $p < 0.05$)
[3] Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)
[4] FAD: Flavin adenine dinucleotide
[5] FMN: Flavin mononucleotide
[6] PLP: Pyridoxal 5'-phosphate

Table 3. Anthropometric measurements at birth and 24 months old in offsprings according to the maternal MTHFR genotypes

	Birth				24 months old			
	All (n = 130)	C/C (n = 44)	C/T (n = 66)	T/T (n = 20)	All (n = 130)	C/C (n = 44)	C/T (n = 66)	T/T (n = 20)
Height (cm)	49.2 ± 2.4[1]	49.1 ± 3.1	49.4 ± 2.1	48.9 ± 1.6	87.6 ± 3.3	88.2 ± 3.3[a2]	87.5 ± 3.3[ab]	86.2 ± 3.3[b]
Weight (kg)	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.3	12.5 ± 1.3	12.5 ± 1.4	12.5 ± 1.3	12.1 ± 1.3
Head circumference (cm)	34.1 ± 1.8	33.9 ± 2.3	34.4 ± 1.4	33.5 ± 1.3	48.6 ± 3.4	47.9 ± 5.1	49.1 ± 1.6	48.7 ± 1.6
Chest circumference (cm)	–	–	–	–	50.6 ± 2.7	50.8 ± 2.5	50.8 ± 2.8	49.9 ± 3.0
Mid-upper arm circumference (cm)	–	–	–	–	16.4 ± 1.5	16.4 ± 1.6	16.6 ± 1.4	15.9 ± 1.6

[1] Values are mean ± SD
[2] Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

신장, 체중, 두위, 흉위 및 상완위 둘레를 측정하였다. 전체 조사 대상 영아의 성별 분포는 남아 43.3%와 여아 56.7%였다.

전체 조사 대상 영아의 출생 시 평균 신장은 49.2 ± 2.4 cm였고, 출생체중은 3.3 ± 0.5 kg , 출생 두위는 34.1 ± 1.8 cm으로 나타났으며, 모체의 MTHFR 유전자형에 따라 다르지 않았다. 전체 조사 대상 영아의 생후 24개월 평균 신장은 87.6 ± 3.3 cm였고, 모체의 MTHFR 유전자형에 따라 다르게 나타났다. 즉, 모체의 MTHFR 유전자형이 T/T형인 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장은 87.6 ± 3.3 cm로 C/C형인 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장 88.2 ± 3.3 cm에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 조사 대상 영아의 24개월 평균 체중은 12.5 ± 1.3 kg이었고, 평균 두위, 흉위 및 상완위 둘레는 각각 48.6 ± 3.4 cm, 50.6 ± 2.7 cm, 16.4 ± 1.5 cm인 것으로 나타났으며, 모체의 MTHFR 유전자형에 따라 다르지 않았다 (Table 3). 본 연구 대상자의 출생 시와 24개월 체위는 한국인 소아 평균 발육치와 비교해 볼 때 모두 정상 범위에 속하는 것으로 나타났다.

4. 임신부의 혈청 호모시스테인 수준이 영아 성장에 미치는 영향

임신 중반의 혈청 호모시스테인 수준과 영아 성장과의 관계를 보기 위하여 임신 중반 호모시스테인 수준을 사분위수로 나눈 후 4개의 사분위수에 속한 영아의 성장 측정치를 비교하였다 (Fig. 1). 임신 중 호모시스테인 수준이 높은 4사분위수에 속하였던 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장은 86.2 ± 2.9 cm로 낮은 1사분위수에 속하였던 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장 88.7 ± 3.5 cm에 비해 유의적으로 더 낮았으나 ($p < 0.05$), 2사분위수와 3사분위수에 속한 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장과는 유의적인 차이가 없었다. 호모시스테인 수준에 따른 출생 신장은 사분위수에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

5. 임신부의 혈청 비타민 B군 농도가 영아 성장에 미치는 영향

임신 중반 혈청 비타민 B군 농도에 따라 영아 성장이 다르게 나타나는지를 살펴본 결과, 영아의 신체계측치는 임신 중반 혈청 FAD와 riboflavin 그리고 비타민 B_{12} 수준에 따라 유의적 차이가 없었다. 임신 중반 혈청 FMN과 PLP 및 엽산 농도는 영아의 성장에 영향을 미치는 것으로

나타났다 (Fig. 2). 임신 중반 모체의 FMN 농도가 낮은 1사분위에 속하였던 영아의 24개월 흉위는 49.2 ± 2.9 cm로 임신 중반 모체의 FMN 농도가 높은 4사분위에 속하였던 영아의 24개월 흉위 51.6 ± 3.8 cm에 비해 유의적으로 낮았으나 ($p < 0.05$), 2사분위수와 3사분위수에 속한 임신부에서 태어난 영아의 24개월 흉위와는 유의적인 차이가 없었다. 임신 중반 모체의 혈청 PLP 수준이 낮은 1사분위에 속하였던 영아의 24개월 체중은 11.8 ± 1.3 kg으로 임신 중반 모체의 혈청 PLP 수준이 높은 4사분위에 속하였던 영아의 24개월 체중 12.8 ± 1.4 kg에 비해 유의적으로 낮았고 ($p < 0.05$), 24개월 두위는 PLP 수준이 낮은 1사분위에 속하였던 영아가 46.5 ± 6.5 cm로 49.3 1.8 cm의 PLP 수준이 3사분위에 속하였던 영아와 49.6 1.5 cm의 PLP 수준이 높은 4사분위에 속하였던 영아에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 또한 혈청 엽산 농도가 낮은 1사분위에 속했던 임신부에서 태어난 영아의 24개월 두위는 46.9 ± 6.8 cm로 임신 중반 혈청 엽산 수준이 높은 4사분위에 속하였던 임신부에서 태어난 영아의 24개월 두위 49.5 ± 1.7 cm에 비해 유의적으로 낮았으나 ($p < 0.05$), 2사분위수와 3사분위수에 속한 임신부에서 태어난 영아의 24개월 두위와는 유의적인 차이가 없었다. 임신부의 혈청 PLP 수준에 따른 출생 체중과 출생 두위

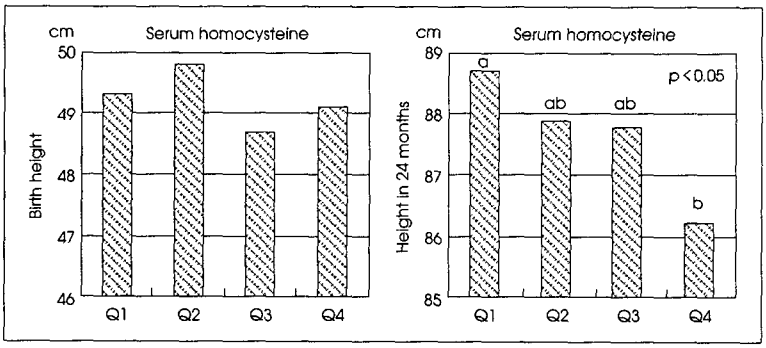

Fig. 1. Offspring's height according to the maternal serum homocysteine levels. Q1: 1st quartile, Q2: 2nd quartile, Q3: 3rd quartile, Q4: 4th quartile. ^{abc}Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

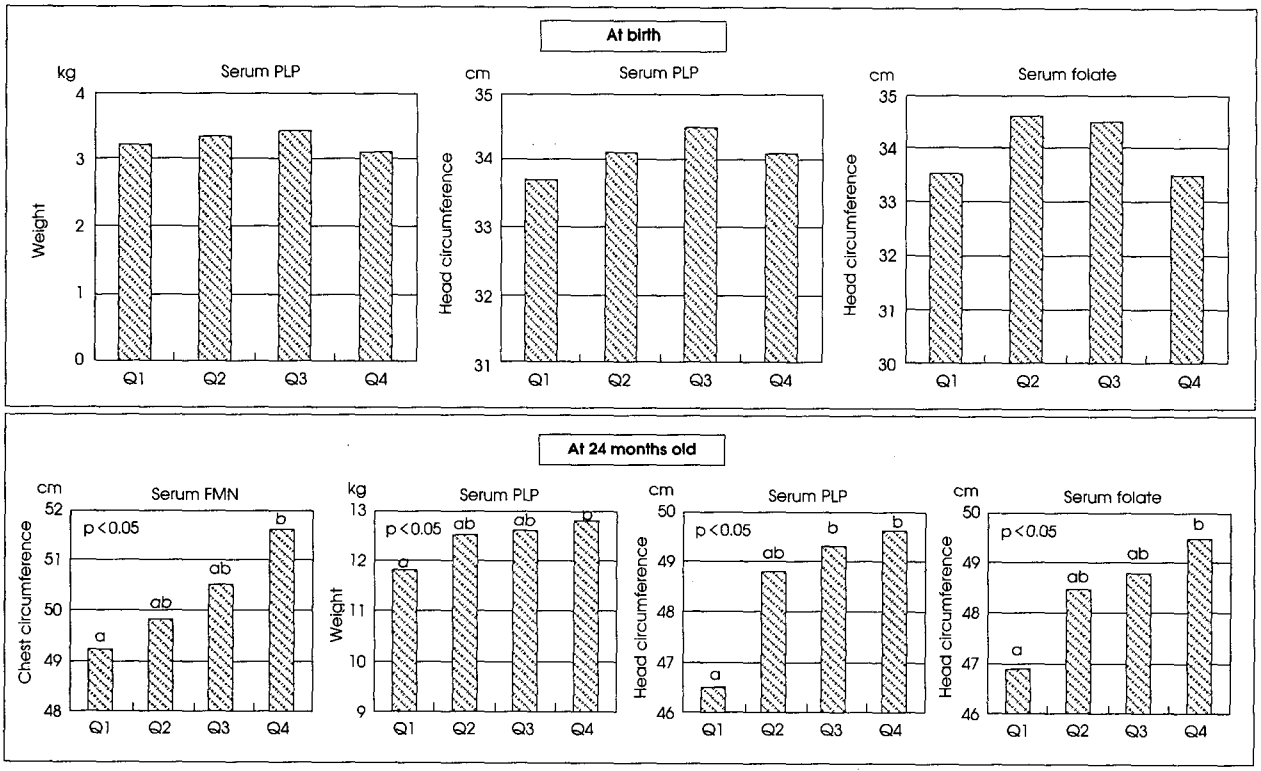

Fig. 2. Offsprings growth measure-ments according to the maternal serum B vitamin levels. Q1: 1st quartile, Q2: 2nd quartile, Q3: 3rd quartile, Q4: 4th quartile. ^{abc}Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

혈청 엽산 수준에 따른 출생 두위는 사분위수에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다.

6. 임신부의 MTHFR 유전자형과 혈청 호모시스테인 및 비타민 B군 수준의 상호작용이 영아 성장에 미치는 영향

Fig. 3는 임신 중반 혈청 호모시스테인 농도와 MTHFR 유전자형의 상호작용에 따른 영아 성장을 분석한 것이다. 혈청 호모시스테인 수준과 MTHFR 유전자형이 영아 성장에 미치는 영향에 관한 분석 분석을 실시한 결과, 영아의 출생 두위, 24개월 신장 및 24개월 흉위는 혈청 호모시스테인 수준 및 MTHFR 유전자형의 상호작용에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났다. 임신 중반의 혈청 호모시스테인 수준이 중간값 이상이면서 동시에 MTHFR 유전자형이 T/T형인 임신부에서 태어난 영아의 출생 두위와 24개월 신장 그리고 24개월 흉위가 유의적으로 더 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 그러나 혈청 호모시스테인 수준이 중간값 미만인 경우 이러한 MTHFR 유전자형에 따른 차이가 나타나지 않았다.

혈청 비타민 B군 농도와 MTHFR 유전자형이 영아 성장에 미치는 영향을 분석한 결과 (Fig. 4), 영아의 출생 두위와 24개월 신장은 혈청 FAD 수준 및 MTHFR 유전자형의 상호작용에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났으며 ($p < 0.05$), 임신 중반의 FAD 수준이 낮은 1사분위에 속하면서 동시에 MTHFR 유전자형이 T/T형인 임신부에서 태어난 영아의 출생 두위와 24개월 신장이 유의적으로 더 낮았다 ($p < 0.05$). 그러나 혈청 FAD 수준이 높은 4사분위에 속하는 경우 이러한 MTHFR 유전자형에 따른 차이가 나타나지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 임신 중반 모체의 혈중 비타민 B_2 농도와 호모시스테인 수준 및 MTHFR 유전자형이 영아 성장에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 그 결과, MTHFR T/T 유전자형을 가진 임신부가 C/C형이나 C/T형을 가진

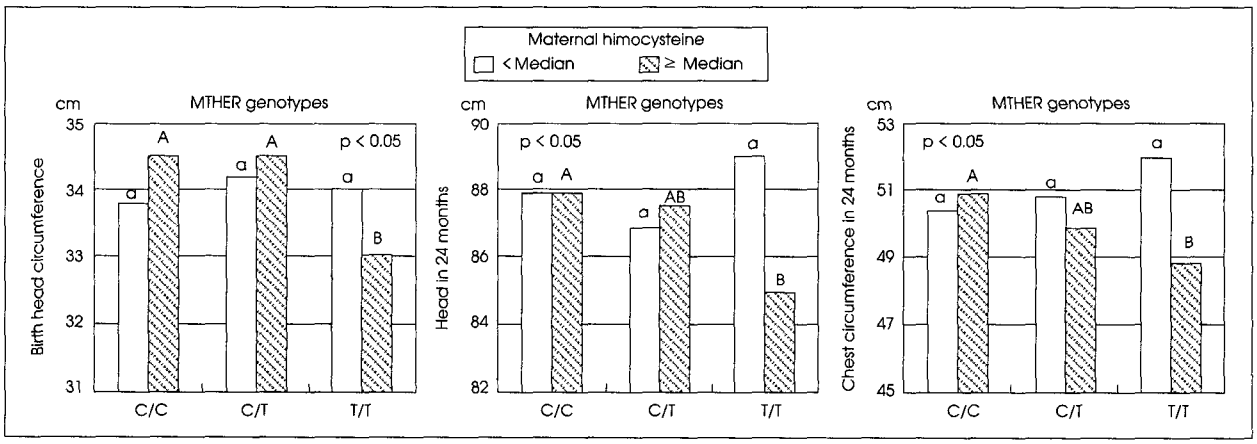

Fig. 3. Comparison of offspring's growth measurements according to the maternal serum homocysteine levels by MTHFR genotypes. $^{abc, ABC}$Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

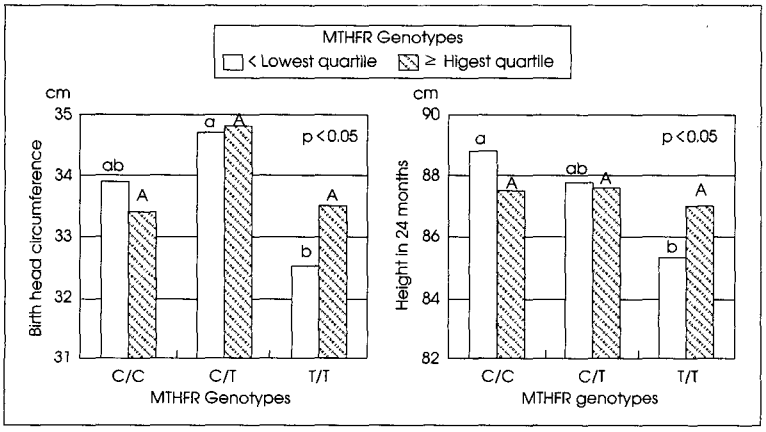

Fig 4. Comparison of offspring's growth measurements according to the maternal serum FAD levels by MTHFR genotypes. $^{abc, ABC}$Different superscript letter indicates the comparison with significant differences between the MTHFR genotypes as determined by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

임신부에 비해 혈청 내 호모시스테인의 농도가 유의적으로 높게 나타났으며 이는 다른 선행 연구들[29-32]의 결과와 일치하는 것이었다. 혈청 호모시스테인 수준에 영향을 미치는 유전적 요인인 MTHFR 유전자의 동형접합성 다형성은 바람직하지 못한 임신결과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Alfirevic 등[33]은 T/T형의 MTHFR 유전자 다형성이 있는 경우 태내성장지연에 관한 위험이 5.0배나 높았고 이들의 혈청 호모시스테인 수준은 C/C형이나 C/T형에 비해 더 높았다고 보고하였다. Gebhardt 등[34]의 연구에서도 C677T와 A1298C의 이형접합성 다형성이 동시에 있는 경우 태반조기박리와 태내성장지연 위험이 높았다고 하였다.

본 연구결과 T/T형의 임신부에서 태어난 영아의 24개월 신장이 낮은 것으로 나타나 임신부의 MTHFR 유전자형이 영아 성장과 관련이 있는 것으로 나타났다. 이는 임신결과에 미치는 영향이 출생 후 영아의 성장까지 연결될 수 있음을 처음으로 관찰한 것이라 할 수 있다. 또한 본 연구에서 임신부의 MTHFR 유전자형과 영아 성장과의 관련성은 임신 중 호모시스테인 수준에 따라 다르게 나타났다. 즉, T/T형의 임신부 중 호모시스테인 수준이 중위값보다 높은 모체에서 태어난 영아의 출생 두위와 24개월 신장 그리고 24개월 흉위가 C/C 혹은 C/T형에 비해 낮았으며, T/T형이더라도 혈청 호모시스테인 수준이 낮은 모체에서 태어난 영아의 경우 이러한 MTHFR 유전자형에 따른 차이가 나타나지 않았다. 이런 점을 볼 때 MTHFR 유전자형의 다형성과 영아 성장과의 관계에서 나타난 상관성은 임신 중 고호모시스테인혈증과 관련되어 있는 것으로 보인다.

본 연구에서 혈청 호모시스테인 수준에 영향을 미치는 영양적 요인인 모체의 비타민 B군 영양상태와 영아 성장을 본 결과, 임신부의 FMN 수준이 낮은 1사분위에 속하는 경우, 24개월 흉위가 작은 것으로 나타났고, PLP 수준이 낮은 1사분위에 속하는 경우는, 영아의 24개월 체중과 두위가 작았으며, 엽산 수준이 낮은 1사분위에 속하는 경우, 영아의 24개월 두위가 작은 것으로 나타났다. 우리나라 임신부를 대상으로 한 안 등[18]의 연구에서는 모체의 혈청 pyridoxal 농도가 아기의 출생 체중, 출생 신장 및 Apgar score 등에 영향을 미친다고 보고하였다. 그 밖에 많은 연구들에서 임신부의 비타민 B_2,[35-37] 비타민 B_6[38-40] 및 엽산 결핍[41-44]이 바람직하지 못한 임신결과와 관련성이 있음을 보여주었다.

임신 중에는 모체와 태아의 대사 항진으로 인하여 이들 비타민 B군에 대한 요구량이 증가하는 시기이다. 즉, 비타민 B_2는 FAD 혹은 FMN의 형태로 여러 가지 체내 대사에 관여하므로 임신 중 비타민 B_2 영양상태 불량으로 인해 혈중 FAD나 FMN이 충분하지 않게 되면 자궁내막 상피조직의 기능저하, DNA 합성 저하 및 미토콘드리아에서의 에너지 생성 부족을 야기시켜 결국 영양막의 착상이 방해되고 태반에 산소공급이 저하될 수 있다.[35] 그밖에도 엽산과 비타민 B_{12}의 태아 및 태반 성장을 위한 DNA 합성에서의 역할 및 태아의 성장발달과 모체의 대사적 요구로 인해 증가된 단백질 대사에서의 비타민 B_6의 역할 역시 정상적인 임신에서는 중요하다고 하겠다. 비타민 B군은 이러한 임신에 대한 고유한 역할 외에도 임신부의 혈청 호모시스테인 수준을 통해 간접적으로 임신결과에 영향을 미칠 수 있다. 즉, 이들 비타민이 결핍된 상태는 임신부의 호모시스테인 수준을 상승시키고, 결국 임신결과에 바람직하지 못한 영향을 미칠 수 있다는 것이다.

본 연구 결과, 모체의 MTHFR 유전자형과 비타민 B군 영양상태의 상호작용에 의한 영향은 비타민 B_2와 영아 성장 발육치 사이에서만 나타났다. 즉, T/T형이면서 혈청 FAD 수준이 낮은 1사분위에 속하는 임신부에서 태어난 영아의 출생 두위와 24개월 신장이 가장 작았다. 최근 비타민 B_2가 호모시스테인 수준을 결정하는 독립인자로 밝혀지면서, Sutterlin 등,[45] Lussier-Cacan 등,[46] Skoupy 등[47]은 비타민 B군과 호모시스테인 수준 간에 음의 상관관계가 있다고 보고하였다. 여러 연구들에서 비타민 B_2 영양상태가 낮은 경우 호모시스테인 수준이 상승하며, 이러한 호모시스테인 수준에 대한 비타민 B_2의 영향은 MTHFR 유전자형이 T/T형일 경우에 더욱 크다고 보고하였다. 따라서 Rozen 등[48]은 MTHFR 유전자형에 다형성을 가지고 있는 경우 혈청 호모시스테인 수준을 낮추기 위해서 엽산과 비타민 B_2 보충이 함께 이루어져야 한다고 제안하였다.

이상의 결과는 임신 중 모체의 호모시스테인 수준과 이에 영향을 미치는 유전적 요인과 영양학적 요인들은 태내 아동의 성장을 통한 임신결과에 영향을 미치고 이러한 영향이 출생 후 2세 때까지도 지속될 수 있다는 가능성을 제시하였다. Luo 등[49]은 출생 후 아동의 성장은 출생 시 체중에 영향을 받으며, 아동기 동안 그 영향이 지속되는 경우가 많다고 하였고, 특히 태내 성장 지연을 보였던 경우 출생 체중에 의한 영향이 더 크게 나타난다고 하였다. 그밖에 영아 성장에 관한 또 다른 가능성은 모체의 영향으로 인해 호모시스테인 수준이 높은 상태로 태어난 영아에서 호모시스테인 대사 이상이 계속될 경우 이 시기 성장을 위한 DNA와 RNA의 합성에 필요한 메틸기 공급에 문제가 생기고,[50] 이로 인해 성장에 영향을 받는다는 것이다.

임신 중 태아의 성장은 태아의 유전자에 의한 자궁 내에서 성장 잠재력에도 영향을 받는다. 그러나 태아 성장에서 더 우위적인 결정은 태아가 발달할 수 있는 영양적이고 호로몬적인 환경이고 특히 영양과 산소 공급에 의해서 이루어진다고 한다.[51] 한 배아 이식 연구[52]가 이를 입증하고 있는데, 이 연구에서 태아의 성장은 난자를 기여한 모체보다 이식을 받은 모체에 의해 더 영향을 받는다는 결과를 얻었다. 바람직하지 않은 자궁 내 환경에 따른 영구적이면서도 장기적인 이러한 영향을 감안할 때, 모체의 영양상태는 더욱 더 중요하며 자궁 내 환경을 최적화하기 위한 노력이 필요하다. 또한 임신 중 호모시스테인 수준이 태아의 성장과 임신 결과에 영향을 미친다는 것을 보여준 연구들은 프로그램화 이론에 근거할 때, 영아의 출생 후 성장 및 건강 상태에도 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 가지고 있다고 하겠다. 최근 여러 가지 질병에 관련된 유전자에 관한 연구가 활발히 진행되면서 각 개인의 유전적 특성을 고려한 영양학적 처방에 대한 필요성이 제기되고 있으며, 동시에 영양상태 등의 환경적 요인이 유전적 요인을 극복할 수 있다는 연구들이 보고되고 있다. 그러나 우리나라 정상 임신부를 대상으로 유전적 요인과 영양학적 요인을 동시에 살펴본 연구는 부족한 실정이며, 이에 관한 장기적이면서 대규모적인 추적조사와 더불어 영아 성장 저하에 대한 위험률이 높은, 고호모시스테인혈증을 가진 임신부를 대상으로 한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 임신 중반 모체의 호모시스테인 수준은 비타민 영양상태와 더불어 출생 후 영아의 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이러한 영향은 모체의 MTHFR 유전자형에 따라 다르게 나타났다. 본 연구의 결과는 영아의 출생 후 성장에 있어 임신 중 모체의 호모시스테인 수준의 중요성을 보여주었고, 유전적 결함을 가진 경우라 하더라도 임신 중 비타민 영양상태를 개선할 경우 임신 중 호모시스테인 수준의 상승으로 인한 출생 후 영아의 성장 저하의 문제를 예방할 수 있음을 제시하였다. 본 연구는 임신부의 영양상태와 이들에서 태어난 영아의 생후 2년까지의 성장을 추적조사한 첫 번째 전향적 연구라는 점에서 의의가 있다고 하겠다. 또한 본 연구결과는 임상적인 관점에서 적용될 수 있는데, 모든 임신부를 대상으로 임신 중반에 실시하는 경구 당 부하 검사와 더불어 혈청 호모시스테인 수준을 분석하고, 혈청 호모시스테인 수준이 높은 임신부에게 비타민 B_2, PLP, 엽산 등을 보충시킨다면 모체의 고호모시스테인혈증으로 인해 야기될 수 있는 영아 성장 저하의 문제를 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 임신 중반의 혈청 비타민 B군 영양상태와 혈청 호모시스테인 수준 및 임신부의 MTHFR 유전자형이 영아 성장에 미치는 영향을 보고자 하였다. 그 결과, 임신 중 모체의 호모시스테인 수준은 비타민 영양상태와 더불어 출생 후 영아의 성장에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이러한 영향은 모체의 MTHFR 유전자형에 따라 다르게 나타났다. 이를 통해 본 연구에서는 임신 중 모체의 호모시스테인 수준과 이에 영향을 미치는 유전적, 영양적 요인들이 태아의 성장을 통한 임신결과 뿐 아니라 출생 후 영아 성장에 까지 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하였다. 본 연구의 결과는 영아의 출생과 성장에 있어 임신 중 모체의 호모시스테인 수준의 중요성을 강조하는 것이라고 할 수 있으며, 호모시스테인 대사에 있어 유전적인 결함을 가진 경우라고 하더라도 임신 중 비타민 영양상태를 개선할 경우 임신 중 호모시스테인 수준의 상승으로 인해 출생 후까지 영향을 미치는 영아 성장 저하의 문제를 예방할 수 있음을 보여주는 것이라고 하겠다. 또한 본 연구는 정상 임신부를 대상으로 유전적요인과 영양적 요인을 파악하고 그들의 영아 성장까지 추적한 첫 번째 연구라고 할 수 있으며, 이와 유사한 연구 결과들이 축적된다면 MTHFR 유전자 다형성과 같은 유전적으로 고 위험 집단에 속한 임신부의 비타민 영양상태 개선을 통해 영아 성장 저하의 문제를 예방하는데 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Literature cited

1) Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Ned* 326: 69-70, 1992
2) Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Enblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen ALB, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 71: 962-968, 2000
3) Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345: 149-151, 1995
4) Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15227-15232, 1996
5) Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early

pregnancy loss. *Fertil Steril* 60: 820-825. 1993
6) Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 66: 23-29, 1996
7) Martin PM, Ola MS, Agarwal N, Ganapathy V, Smith SB. The sigma receptor ligand (+)-pentazocine prevents apoptotic retinal ganglion cell death induced *in vitro* by homocysteine and glutamate. *Mol Brain Res* 123: 66-75, 2004
8) Perry DJ. Hyperhomocysteinaemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12: 451-477, 1999
9) Kang SS, Wong PW, Glickman PB, MacLeod CM, Jaffe IA. Protein-bound homocyst(e)ine in patients with rheumatoid arthritis undergoing D-penicillamine treatment. *J Clin Pharmacol* 26: 712-715, 1986
10) Bailcy LB, Gregory JF. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzyme: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129: 919-922, 1999
11) Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate, and susceptibility to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 6: 74-79, 1999
12) Mason JB. Biomarkers of nutrient exposure and status in one-carbon (methyl) metabolism. *J Nutr* 3: 941S-947S, 2003
13) Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Choline and phosphatidylcholine. In: Modern Nutrition in Health and Disease, 9th Ed. *Williams & Wilkins, Baltimore, MD,* pp.514, 1999
14) Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22: 195-201, 2001
15) Chang NS, Kang M, Paik HY, Kim IH, Cho YW, Park SC, Shin YW. Serum folate and iron levels of pregnant, lactating and non-pregnant, non-lactating women. *Korean J Nutrition* 26(1): 67-75, 1993
16) Lim HS, Lee JI, Lee JA, Folate status of Korean pregnant women and their pregnancy outcomes. *Korean J Nutrition* 32(5): 592-597, 1999
17) Ahn HS, Kim JS, Lee GJ, Kim YT. Serum folate levels of maternal-umbilical cord blood and pregnancy outcomes. *Korean J Nutrition* 33(8): 840-847, 2000
18) Ahn HS, Lee GJ, Kim YT. Relationship between vitamin B_6 status of maternal-umbilical cord plasma and pregnancy outcomes. *Korean J Nutrition* 33(3): 263-270, 2000
19) Park KS, Podskarbi T, Yoo EA, Shin YS. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Koreans. *Korean J Genetics* 20(1): 23-28, 1998
20) Kim NK, Kang GD, Kim HJ, Kim JH, Nam YS, Lee S, Chung HM, Kang SH, Ahn JY, Choi BO, Hwang SG, Oh D. Genetic polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C in healthy. *Korean J Genetics* 24(2): 227-234, 2002
21) Bondevik GT, Schneede J, Refsum H, Lie RT, Ulstein M, Kvale G. Homocysteine and methylmalonic acid levels in pregnant Nepali women. Should cobalamin supplementation be considered? *Eur J Clin Nutr* 55(10): 856-864, 2001
22) Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 71(4): 962-968, 2000
23) Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D, Aitken IW, Willett WC, Selhub J, Xu X. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr* 76(6): 1385-1391, 2002
24) Leeda M, Riyazi N, de Vries JI, Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamin B_6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 179(1): 135-139, 1998
25) Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 66(1): 23-29, 1996
26) Capo-Chichi CD, Gueant JL, Lefebvre E, Bennani N, Lorentz E, Vidailhet C, Vidailhet M. Riboflavin and riboflavin-derived cofactors in adolescent girls with anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 69: 672-678, 1999
27) Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 422: 43-52, 1987
28) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111-113, 1995
29) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1; 93(1): 7-9, 1996
30) Gudnason V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group. *Atherosclerosis* 136(2): 347-354, 1998
31) Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98(23): 2520-2526, 1998
32) Kim KN, Kim YJ, Chang N. 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* 58(1): 10-16, 2004
33) Alfirevic Z, Mousa HA, Martlew V, Briscoe L, Perez-Casal M, Toh CH. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 97(5 Pt 1): 753-759, 2001
34) Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, Odendaal HJ. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. *Eur J*

Obstet Gynecol Reprod Biol 97(2) : 174-177, 2001
35) Wacker J, Fruhauf J, Schulz M, Chiwora FM, Volz J, Becker K. Riboflavin deficiency and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 96(1) : 38-44, 2000
36) Badart-Smook A, van Houwelingen AC, Al MD, Kester AD, Hornstra G. Fetal growth is associated positively with maternal intake of riboflavin and negatively with maternal intake of linoleic acid. *J Am Diet Assoc* 97(8) : 867-870, 1997
37) Sanchez DJ, Murphy MM, Bosch-Sabater J, Fernandez-Ballart J. Enzymic evaluation of thiamin, riboflavin and pyridoxine status of parturient mothers and their newborn infants in a Mediterranean area of Spain. *Eur J Clin Nutr* 53(1) : 27-38, 1999
38) Schuster K, Bailey LB, Mahan CS. Effect of maternal pyridoxine · HCl supplementation on the vitamin B-6 status of mother and infant and on pregnancy outcome. *J Nutr* 114(5) : 977-988, 1984
39) Schuster K, Bailey LB, Mahan CS. Vitamin B6 status of low-income adolescent and adult pregnant women and the condition of their infants at birth. *Am J Clin Nutr* 34(9) : 1731-1735, 1981
40) Chang SJ. Adequacy of maternal pyridoxine supplementation during pregnancy in relation to the vitamin B_6 status and growth of neonates at birth. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 45(4) : 449-58, 1999
41) Pagan K, Hou J, Goldenberg RL, Suzanne P, Tamura CT. Mid-pregnancy serum homocysteine and B-vitamin concentrations and fetal growth. *Nutr Res* 22: 1133-1141, 2002
42) Neggers YH, Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP, Hoffman HJ. The relationship between maternal dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 165: 71-75, 1997
43) Tamura T, Goldenberg RL, Freeberg LE, Cliver SP, Cutter GR, Hoffman HJ. Maternal serum folate and zinc concentrations and their relationships to pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 56(2) : 365-370, 1992
44) Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, Cliver SP, Hoffman HJ Serum concentrations of zinc, folate, vitamins A and E, and proteins, and their relationships to pregnancy outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 165: 63-70, 1997
45) Sutterlin M, Bussen S, Ruppert D, Steck T. Serum levels of folate and cobalamin in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 12(10) : 2292-2296, 1997
46) Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 64(4) : 587-593, 1996
47) Skoupy S, Fodinger M, Veitl M, Perschl A, Puttinger H, Rohrer C, Schindler K, Vychytil A, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Riboflavin is a determinant of total homocysteine plasma concentrations in end-stage renal disease patients. *J Am Soc Nephrol* 13(5) : 1331-1337, 2002
48) Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase: a link between folate and riboflavin? *Am J Clin Nutr* 76(2) : 301-302, 2002
49) Luo ZC, Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Length and body mass index at birth and target height influences on patterns of postnatal growth in children born small for gestational age *Pediatrics* 102(6) : E72, 1998
50) Picciano MF. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? *Am J Clin Nutr* 71(4) : 857-858, 2000
51) Rasmussen KM. The "fetal origins" hypothesis: challenges and opportunities for maternal and child nutrition. *Annu Rev Nutr* 21: 73-95, 2001
52) Brooks AA, Johnson MR, Steer PJ, Pawson ME, Abdalla HI. Birth weight: nature or nurture? *Early Hum Dev* 42(1) : 29-35, 1995