

한국인 조기 난소부전 불임환자에서 황체형성 호르몬 유전자 변이 분석

¹포천중문 의과대학교 생화학교실 및 기초의학연구소 중앙연구실, ²차병원 여성의학 연구소
및 산부인과, ³분당 차병원 산부인과 및 불임센터, ⁴구미 차병원 산부인과

김남근^{1,2} · 이유진¹ · 남윤성³ · 이숙환^{1,2} · 전해선² · 박 찬³ · 김종욱⁴
이경아² · 고정재^{1,2} · 차광열^{1,2}

The Analysis of LH β -subunit Variants in Infertile Patients with Premature Ovarian Failure (POF) in Korea

Nam Keun Kim^{1,2}, Eu Gene Lee¹, Yoon Sung Nam³, Sook Hwan Lee^{1,2}, Hye Sun Jeon²,
Chan Park³, Jong Wook Kim⁴, Kyung Ah Lee², Jung Jae Ko^{1,2}, Kwang Yul Cha^{1,2}

¹Department of Biochemistry and Central Laboratories, Institute of Medical Research, College
of Medicine, Pochon CHA University, Pochon, 487-800; ²Infertility Medical Center and
Obstetrics & Gynecology, CHA General Hospital, Seoul 135-081; ³Obstetrics & Gynecology
and Infertility Medical Center, Pundang CHA General Hospital, Sunnam 463-070;

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Kumi CHA General Hospital, Kumi 730-040, Korea

This study was performed to determine whether the LH β -subunit gene missense mutation is present in Korean infertile patients with 46,XX POF women. The variants of LH β exon 2 (Trp 8Arg; TGG to CGG and Ile15Thr; ATC to ACC) were studied in forty-four 46,XX idiopathic POF and 54 nonpregnant women. The LH β exon 2 variants were more frequent in POF patients (20.5%) than nonpregnant (16.7%) women ($p>0.05$). POF patients with the variant was slightly higher than nonpregnant women with the variant.

Key Words: Premature ovarian failure (POF), Luteinizing hormone, Missense mutation, Endometriosis, Amenorrhea, Infertility

조기난소부전은 40세 이전에 무월경, 여성 호르몬 저하증, 그리고 성선자극 호르몬 분비 증가 등을 초래하는 질환이다. 가임기간 여성들 가운데 조기난소부전의 빈도는 약 1%, 그리고, 무월경 여성에서의 빈도는 약 10%로 나타났다.^{1,6} 조기난소부전의 원인으로 유전적 이상, 효소부족, 성선자극 호르몬 이상, 자가면역질환, 물리적 요인, 그리고 원인불명 등 여러 가지가 제시되었다.³⁻⁵ 이 질환에 대한 유전적 요인에 대한 가능성이 오래 전부터 제기된 바 있다.¹¹

황체형성 호르몬은 난포의 성장발달, 스테로이드 생성의 유도, 난자의 성숙 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 비정상적인 황체형성 호르몬의 분비는 월경불순, 다낭성 난소증후군, 습관성 유산, 황체부족 (luteal insufficiency), 그리고 조기난자성숙 등을 유도한다.^{10,14,17} 최근에 인간 황체형성 호르몬 유전자 (LH β -subunit)에서의 돌연변이가 불임과 관련이 있다는 보고가 있다. 이 유전자의 exon 2에서 두개의 코돈 (8과 15)에서 그 돌연변이가 건강한 여성과 불임여성 모두

* 교신저자: 김남근, 경기도 포천읍 포천읍 동교리 198-1, 487-800, 포천중문 의과대학교 생화학교실
Tel: 0357) 543-1814, Fax: 0357) 543-2818, E-mail: nkkim@netsgo.com

에서 확인되었다.^{7,13} 그러나, 이들 돌연변이가 불임의 직접적인 원인이 되는지는 아직 알 수 없다. 또한, LHβ 유전자 변이체들이 아직 한국인의 조기난소부전 환자에서 조사·보고된 바 없다.

그러므로, 본 연구에서 조기난소부전 환자에서 돌연변이 빈도를 조사하여 이미 발표된 바 있는 비임신 여성들과 비교하고자 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

40세 이전에 난소부전을 주소로 분당 차병원과 차병원 여성의학 연구소에 내원한 44명의 여성을 대상으로 하였다. 44명의 여성 가운데 3명의 환자는 일차성 무월경이었고, 41명의 환자는 이차성 무월경이었다. 환자 동의하에 얻은 혈액에서 DNA를 추출하였다.

2. PCR 증폭, 제한효소 분석 및 통계처리

PCR 반응의 조성은 전체 부피 50 μl 중 10 × PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl, pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), sense primer (5'-TCTTTGTGGGTG GTGTA-CCACGC-3')와 antisense primer (5'-GGAGGATCC-

GGGTGTCAGGGCTCCA-3')를 각각 50 pmol, Taq polymerase 2 단위를 사용하였다. 이 실험에서 사용된 primers는 LHβ 유전자의 exon 2, intron 2, 그리고 exon 3이 모두 포함되도록 제작하였다. 이와 같은 방법으로 794 bp PCR 산물을 얻었다. PCR 증폭과 제한효소 분석은 Roy *et al.*¹⁵의 방법을 약간 변형하여 수행하였다.

통계처리는 χ^2 test를 사용하였으며, 유의수준은 p<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

조기난소부전 환자에서 LHβ exon 2 (LHβ2) 유전자의 두 좌위 (Trp8Arg; TGG to CGG와 Ile15Thr; ATC to ACC)에서 그 유전적 다형 (polymorphism)이 연구되었다. 조기난소부전 환자에서 LHβ2 (Trp8Arg)의 표현형 빈도는 LHβ2 1-1형과 LHβ2 2-1형이 88.6%와 11.4%로 각각 나타났다. LHβ^{2T}와 LHβ^{2C}의 대립형질 빈도는 각각 0.907과 0.093이었다 (Table 1). 조기난소부전 환자에서 LHβ2 (Ile15Thr)의 표현형 빈도는 LHβ2 TT형과 LHβ2 TC형이 각각 86.4%와 13.6%로 나타났다. 조기난소부전 환자에서 LHβ^{2T}와 LHβ^{2C}의 대립형질 빈도는 각각 0.932와 0.068이었다 (Table 1).

Table 1. Comparison of allele frequencies of the LHβ variants in the POF and nonpregnant Korean women

Study group	LHβ Phenotype			Allele Frequency	N
	1-1	2-1	2-2		
Trp8Arg	1-1	2-1	2-2	2	
POF	39	5	0	0.057	44
Nonpregnant women (Kim <i>et al.</i>) ⁸	49	5	0	0.046	54
Ile15Thr	TT	TC	CC	C	
POF	38	6	0	0.068	44
Nonpregnant women (Kim <i>et al.</i>) ⁸	50	4	0	0.037	54

1,T=wild type allele; 2,C=mutant allele.

Table 2. LHβ exon 2 variants in 44 infertile patients with POF and 54 nonpregnant women in Korea

Study group	No. of patients	Frequency of indicated condition (%)	
		Variant LH group	Normal LH group
POF	44	9 (20.5)	35 (79.5)
Nonpregnant women (Kim <i>et al.</i>) ⁸	54	9 (16.7)	45 (83.3)

*; p<0.05.

Table 3. Frequency of LH β -subunit gene mutations in the Korean and Japanese POF infertile women

Study group	Frequency of LH β -subunit variant (%)	
	Korean	Japanese
POF	20.5 (<i>present study</i>)	53.3 (Furui <i>et al</i>) ⁷
Nonpregnant women	16.7 (Kim <i>et al</i>) ⁸	12.0 (Nilsson <i>et al</i>) ¹²

LH β 2 변이체의 빈도는 환자군 (20.5%)에서 건 강한 비임신 여성군 (16.7%) 보다 약간 더 높게 나타났다 ($p>0.05$) (Table 2).

고 찰

Takahashi *et al.*¹⁷은 조기난소부전을 가진 일본 불임환자에서 황체형성 호르몬 유전자 변이가 상당히 높은 빈도 (53.3%)로 나타남을 보고한 바 있다 (Table 3). 그들은 LH 변이체로부터의 단백질 분비가 결과적으로 불임과 조기난소부전을 가지는 배란불순, 황체부족, 체중감소에 의한 무월경 또는 고프로락틴증을 유발한다고 설명하였다. 그들은 또한 호르몬 저항성 난소 (hormonally resistant ovary)에 의한 것이 아닌 LH 유전자 변이와 조기난소부전과의 강한 연관성을 관찰하였다. 그러나, 저자들의 연구에서는 LH β 유전자 변이체의 빈도가 한국인 POF 환자에서 20.5%로 일본인 환자에서 보다 현저히 낮게 나타났다 (Table 3). 일본인 POF 불임환자에서와 비교하여 이렇게 낮은 빈도를 나타내는 이유는 아직 알 수 없다.

Aittomaki *et al.*²과 Layman *et al.*⁹의 보고에 의하면, 조기난소부전을 가진 환자 가운데 43%와 80%가 각각 일차성 무월경이었으며, 반면에 57%와 20%는 각각 이차성 무월경이었다. 그런데, 저자들의 연구에서는 환자들 중 6.8% (3/44)가 일차성 무월경이었고, 93.2% (41/44)가 이차성 무월경으로 나타나서 일차성 무월경이 다른 집단에 비해 낮은 빈도로 나타나는 것을 알 수 있었다. 그리고, Furui *et al.*⁷는 Spac immunoassay kit을 사용한 조사에서 동형접합성 (homozygous) 돌연변이 개체에서는 혈청내 LH가 감지되지 않았으나, 이형접합성 (heterozygous) 개체에서는 낮은 수준으로 감지됨을 보고하였다. Suganuma *et al.*¹⁶는 LH β 유전자의 동형접합성 (homozygous) 돌연변이형을 갖는 일부 환자들에서 월경불순 (menstrual disorder) 이 나타남을 보고하였다. 그러나, 한국 집단에서

는 동형접합성 돌연변이형은 발견되지 않았다. 그러나, 저자들은 제한된 수의 환자들만이 조사되었기 때문에 LH β 유전자의 돌연변이형과 조기난소부전과의 관계를 결론 지을 수 없다. 또한, 아직 세계 다른 나라 POF 환자들에서의 보고가 매우 적으므로 이에 대한 보다 많은 연구가 요구된다.

참 고 문 헌

1. Alper MM, Garner PR, Cher B, Seibel MM. Premature ovarian failure. *J Reprod Med* 1986; 31: 699-708.
2. Aittomaki K, Herva R, Stenman U-H, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, *et al.* Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3722-6.
3. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998; 70(1): 1-15.
4. Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi M-F, Bouchard P. Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 75-80.
5. Conway GS, Kaltsas G, Patel A, Davis MC, Jacobs HS. Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1996; 65(2): 337-41.
6. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 604-6.
7. Furui K, Suganuma N, Tsukahara S-I, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, *et al.* Identification of two point mutations in the gene coding luteinization hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(1): 107-13.
8. Kim NK, Lee EG, Nam YS, Lee SH, Chung KW, Ko JJ, *et al.* The analysis of LH β gene

- mutation in infertile patients with endometriosis and amenorrhea. *Kor J Fertil Steril* 2000; 27(1): 107-10.
9. Layman LC, Amde S, Cohen DP, Jin M, Xie J. The finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; 69(2): 300-2.
 10. Liao W-X, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril* 1998; 69(1): 102-6.
 11. Mattison DR, Evans MI, Schwimmer WB, White BJ, Jensen B, Schulman JD. Familial premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 1341-8.
 12. Nilsson S, Matzuk MM, Pettersson K, Huhtaniemi IT, Millar RP, Coerver KA. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. *Fertil Steril* 1997; 67(6): 998-1004.
 13. Okuda K, Yamada T, Imoto H, Komatsubara H, Sugimoto O. Antigenic alterations of an anomalous human luteinizing hormone caused by two chorionic gonadotropin-type amino acid substitutions. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 584-90.
 14. Rajkhowa M, Talbot JA, Johns PW, Patterson K, Haavisto M, Huhtaniemi I, *et al.* Prevalence of a immunological LH β -subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 43: 297-303.
 15. Roy AC, Liao W-X, Chen Y, Arulkumaran S, Ratnam SS. Identification of seven novel mutation in LH β -subunit gene by SSCP. *Mol Cell Biochem* 1996; 165: 151-3.
 16. Sukanuma N, Asada Y, Furui K, Kikkawa F, Furuhashi M, Tomada Y. Screening of the mutations in luteinizing hormone β -subunit in patients with menstrual disorders. *Fertil Steril* 1995; 63(5): 989-95.
 17. Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, Miyazaki K. Increased prevalence of luteinizing hormone β -subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1999; 71(1): 96-101.
-