

조기난소부전 환자에서 X 염색체 불활성화 분석

건국대학교 의과대학 산부인과학교실, *소아과학교실, †연세대학교 의과대학 산부인과학교실,
‡아주대학교 산부인과학교실, §Eugene McDermott Center for Human Growth and Development,
University of Texas Southwestern Medical School
손인숙 · 유달영 · 장동욱 · 차윤정 · 김수녕 · 이지영 · 윤병일 · 정소정*
박기현[†] · 이병석[†] · 황경주[†] · Andrew R. Zinn[§]

=ABSTRACT=

Analysis of X Chromosome Inactivation in Women with Premature Ovarian Failure

In Sook Sohn, M.D., Dalyeong Yoo, M.D., Dong Wook Jang, M.D.,
Yun Jeong Cha, M.D., Soo Nyung Kim, M.D., Ji Young Lee, M.D.,
Byung Il Yun, M.D., So Chung Chung, M.D.*, Ki Hyun Park, M.D.[†],
Byung Seok Lee, M.D.[‡], Kyung Joo Hwang, M.D.[†], Andrew R. Zinn, M.D.[§]

Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea,

**Dept. of Pediatrics, College of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea,*

†Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea,

‡Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea,

*§Eugene McDermott Center for Human Growth and Development,
University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, Texas, USA*

Objective : Premature ovarian failure (POF) is a highly heterogenous condition, and its etiology remains unknown in approximately two-thirds of cases. POF can be caused by Turner syndrome, genetic disease, iatrogenic agents such as chemotherapy and radiotherapy, infection and autoimmune disease. X chromosome inactivation is the random process in females during early embryogenesis to achieve dosage compensation with males. But skewed X chromosome inactivation occurs in the female carriers, secondary to cell-autonomous selection against cells in which the abnormal X chromosome is active. Highly skewed X chromosome inactivation is likely to occur in POF which caused by subcytogenetic X chromosome deletion or translocation and X-linked gene mutation. The present study was performed to investigate whether highly skewed inactivation of X chromosome is observed in POF.

Methods : Eighty-six women with premature ovarian failure were studied and eighty-three normal women were enrolled as a control group. X chromosome inactivation pattern were determined by studying methylation pattern of androgen receptor gene.

Results : Seventy-six of the 86 POF patients were informative for X chromosome inactivation assay, 8 (10.5%) of them showed highly skewed X chromosome inactivation. In the age matched control group, 3 (4.1%) out of the 74 subjects showed highly skewed X chromosome inactivation. However, this finding is not statistically significant ($p=0.2274$). Among highly skewed X inactivation, one case of premature ovarian failure revealed 46,XX,del(X)(p21) by high resolution band karyotyping. Therefore highly skewed X inactivation can provide clues to evaluate the causes in POF.

Conclusion : This study suggests that screening of skewed X chromosome inactivation for the POF will be useful to detect subcytogenetic X chromosome deletion or translocation and X-linked gene mutation associated with POF.

Key Words : Premature ovarian failure, Skewed X inactivation

조기난소부전 (premature ovarian failure, 이하 POF로 약함)은 40세 이전에 6개월 이상 생리가 없으면서 1개월 간격으로 2번 측정된 혈중 난포자극호르몬 (follicular stimulating hormone, 이하 FSH로 약함)이 40 mIU/mL 이상으로 증가된 경우로 불임, 골다공증 및 관상동맥질환의 문제를 가져올 수 있으며, 이로 인한 여러 가지 심리적인 문제점 또한 발생하게 된다.¹ POF의 빈도는 40세 이전을 기준으로 할 때 100명 당 1명이고, 30세를 기준으로 할 때 1000명 당 1명으로 보고되었다.² 원인을 알 수 없는 경우가 2/3에 달하며, POF에서 가장 잘 알려진 원인으로는 터너 증후군이고, 자가면역질환, 항암제나 방사선 치료 및 감염 등이 원인으로 알려져 있다.³ POF와 동반되는 자가면역질환으로는 갑상선기능 저하증이 가장 흔하며, Addison씨 병, 자가면역 다분비선 증후군 및 자가면역 다내분비병증이 있다. POF의 유전적 원인으로는 galactosemia, 염색체 이상, 유전자의 변이 등이 보고되고 있다.⁴ POF와 관련된 X 염색체 이상으로는 X 염색체 단완의 이상에 의해서 원발성 무월경이 나타나며, X 염색체 장완의 이상에 의해 속발성 조기난소부전을 일으킨다고 알려져 있다.⁴ 많은 유전자가 POF의 후보 유전자로 제기되었고, 이화된 예에서 유전자들의 변이분석결과 POF의 약 60%가 유전적 원인에 의한 것으로 보고되었다.^{3,4}

X 염색체 불활성화 (X chromosome inactivation, 이하 XCI로 약함)는 정상여성에서 남성과의 X 염색체 불균형을 보상하고자 두개의 X 염색체중 하나는 불활성화되는 것이다. XCI는 배아발달 초기에 일어나며 어머니나 어머니에게서 온 X 염색체는 무작위로 모계기원 또는 부계기원이 50:50으로 동일한 비율로 불활성화된다. XCI 비율이 90:10 이상인 경우를 극비대칭의 XCI라고 정의하며, 빈도는 매우 다양하여 정상여성에서 1.5%에서 23%까지 보고되고 있다.⁵

이런 극비대칭의 XCI는 여러 가지 원인에 의해 일어날 수 있다. XCI는 초기 배아세포에서 일어나기 때문에 기원이 되는 조상 세포의 수가 적어서 확률적으로 우연히 발생할 수 있으며⁶ 불활성화 과정에 필수적인 XIST (X inactivation-specific transcript) 유전자의 변이에 의해서도 일어날 수 있다.⁷ 특히 발생하는 배아에서 보다 더 나은 유전적 균형을 유지하기 위하여 특정세포가 2차적으로 선택되어 나타날 수 있는데,⁸ 그 예로 결손, 중복 등의 염색체 구조적 결함이 있는 경우에 결함이 있는 X 염색체가 불활성화되며,⁹ X 연관 유전자 돌연변이가 있는 보인자 여성에서 돌연변이를 가진 X 염색체가 선택적으로 불활성화되어 극비대칭의 XCI를 나타낸다.¹⁰ 이런 X-연관 유전자 돌연변이를 갖는 보인자 여성에서 치명적인 돌연변이가 남자자손에게 유전될 경우 자연유산을 초래할 수 있다.^{8,11} 또한 염색체 검사에 의해서 나타

나지 않는 X 염색체의 미세결손이나 전좌 등과 아직 밝혀지지 않은 X 염색체상의 유전자의 돌연변이가 조기난소부전의 원인이 될 수 있으며, 이런 이상을 가진 보인자에서는 극비대칭의 X 염색체 불활성화 (highly skewed X chromosome inactivation)가 나타날 수 있다.^{5,9}

인체 안드로젠 수용체 (androgen receptor, 이하 AR이라 약함) 유전자는 Xq11.2-q12에 위치하며, 첫 번째 엑손에 다형성의 삼염기 반복 배열수를 갖으며 반복배열의 다형성이 있는 곳으로부터 100 bp 이하로 떨어진 곳에 위치하는 메틸화 민감 제한효소 (methylation sensitive restriction enzyme)인 HpaII 절단부위를 이용하여 X 염색체의 불활성화를 진단할 수 있다.¹² 다형성 CAG (Glycin) 반복배열은 11-31개로 대립인자의 차이가 있을 수 있으며, 90%에서 이형접합을 나타내어 모계기원이나 부계기원의 X 염색체의 메틸화 양상을 PCR을 사용하여 진단할 수 있다.¹² 조기난소부전의 원인이 X 염색체의 결실이나 전좌인 경우에는 극비대칭의 XCI를 보일 수 있다. 또한 X 염색체에 있는 조기난소부전과 관련된 유전자의 돌연변이가 극비대칭의 XCI를 보일 수 있으며, 원인 불명의 POF 환자에서 극비대칭의 XCI를 보일 경우 X 염색체 이상이나 X 연관 유전자 돌연변이의 간접적인 증거가 된다.

따라서 본 연구에서는 한국의 POF 환자에서 X 염색체의 결실이나 전좌 및 유전자 변이와 관련된 극비대칭의 XCI를 나타내는지 알기 위하여 AR 유전자의 다형성을 이용하여 XCI 비율을 측정하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

국내 대학병원 및 산부인과 전문병원의 불임클리닉을 내원한 여성 중 40세 이전에 6개월 이상의 무월경을 호소하면서 1개월 이상의 간격으로 측정된 혈중 FSH 농도가 계속 40 mIU/mL 이상을 보이는 경우를 조기난소부전으로 판정하였다. 양측 난소절제술이나 방사선 치료, 항암화학요법 등의 과거력이 있는 여성과 염색체 검사상 이상이 발견된 경우는 제외하였다. 86명의 조기난소부전 환자와 83명의 정상 대조군을 대상으로 X 염색체 불활성화 비율을 측정하였다. 정상 대조군은 규칙적인 생리를 하는 가입기 여성을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) DNA의 추출

말초혈액 5 mL를 EDTA가 함유된 polypropylene tube에 채혈한 후 백혈구에서 DNA를 분리하였다. 혈액 5 mL 당 Nucleus preparation buffer (0.3 M sucrose, 10 mM

Tris-HCl, PH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 45 mL씩 첨가하여 실온에 15분간 반응시켜 세포를 분해시킨 후 4°C, 2500 RPM에서 15분간 원심 분리하였다. 원침 후 상층액을 버리고 침전물에 lysis buffer (0.005 M NaCl, 0.024M EDTA, pH 8.0) 2 mL를 넣은 후 10% (W/V) sodium dodesyl sulfate (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 125 µl, proteinase K 10 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 µg를 첨가하고 5°C에서 2시간 반응시켰다. 분리한 DNA 용액과 같은 분량의 phenol/chloroform (1:1, v/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 단백질을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. Phenol은 20 mM Tris-HCL (pH 8.0)로 조절된 것을 사용하였다. 각 단계별로 DNA 용액에 phenol/chloroform을 넣은 후 실온에서 20분간 혼합하고 2,500 RPM에서 10분간 원심분리를 실시한 뒤 상층액을 새로운 시험관에 옮긴 다음, 동일 분량의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v) 용액을 첨가하여 잘 혼합한 후 2500 RPM에서 10분간 원심분리하고 다시 상층액을 다른 시험관에 옮겨 회수하였다. 분리된 DNA 용액에 1/10부피의 3 M sodium acetate (pH 8.0) (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 두 배 분량의 cold absolute ethanol (100%)를 첨가하고 잘 섞은 후 DNA가 침전되면 끝을 구부린 Pasteur pipette를 이용하여 침전된 DNA를 감아 올린 뒤 건져내어 증류수에 녹이고 자외선 분광계 (UV spectrophotometer)를 이용하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량한 뒤 -20°C에 보관하였다.

2) X 염색체 불활성화 분석

X 염색체 불활성화 분석은 Allen 등¹²의 메틸화에 민감한 제한효소를 이용한 방법을 수정하여 사용하였다. 인체 androgen receptor 유전자는 첫번째 엑손에 11-31개의 CAG repeat을 갖고 있으며, 20 bp와 60 bp 근위부에 메틸화에 민감한 HpaII 제한효소의 절단부위를 가지고 있다 (Fig. 1). HpaII 제한효소는 X 염색체가 불활성화되어 CpG island가 메틸화되어 있으면 자를 수 없으므로 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 반대로 X 염색체가 활성화되어 CpG island가 메틸화되어 있지 않으면 HpaII 제한효소에 의해 절단되어 PCR에 의해 증폭되지 않는다.¹² 각 환자의 DNA를 HpaII 제한효소로 처리한 군 (digested DNA)과 HpaII 제한효소로 처리하지 않는 군 (undigested DNA)으로 나누어 AR 시발체를 이용한 PCR 후 GenescanTM을 이용하여 X 불활성화 비율을 측정하였다. AR 시발체는 HpaII의 절단부위와 CAG repeat을 동시에 포함되도록 제작하였고 (Fig. 1), 제한효소에 의한 절단이 완전한 지를 알기 위하여 digestion control로서 정상 남성의 DNA를 같은 방법으로 처리하였다. Undigested DNA는 X 염색체 불활성화 비율 측정시 internal control

로 사용하였다.

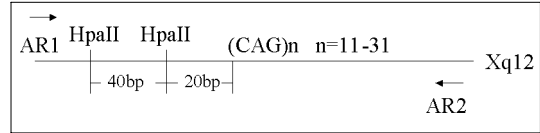


Fig. 1. A diagram of the region amplified in the first exon of the human androgen receptor. HpaII site is within 100 bp 5' to the polymorphic CAG repeat. AR1 and AR2 are oligonucleotide primers.

시발체는 AR 유전자 엑손 1의 다형성 CAG 반복배열 부위를 증폭시키기 위하여 메틸화에 민감한 제한효소의 절단부위와 CAG repeat를 동시에 포함하도록 제작하였다. 전방시발체 (forward primer, 5'-GCTGTGAAGGTTG CTGTTCTCAT-3')와 후방시발체 (reverse primer, 5'-TC CAGAATCTGTTCAGAGCGTGC-3')를 이용하여 PCR을 시행하였다. 각 환자에서 두개의 PCR반응을 시행하였다. 한 sample 당 두개의 tube를 만들어 한쪽에는 500 ng의 DNA와 메틸화에 민감한 제한효소인 HpaII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 unit를 첨가하고 제조 회사의 설명에 따라서 1X reaction buffer 8을 넣어 20 µl의 reaction mixture solution을 만들고, 다른 쪽에는 제한효소를 제외한 500 ng의 DNA (digested DNA)와 1X reaction buffer 8을 넣어 20 µl의 reaction mixture solution을 만들었다 (undigested DNA). Undigested DNA는 각 개인에 특징적인 대립인자의 증폭시에 internal control로 사용하였다. 이것을 잘 혼합한 후 37°C incubator에서 2시간 동안 처리하였다. 효소에 의한 절단이 완전한지를 알기 위하여 digestion control로서 정상 대조군 남성의 DNA를 같은 방법으로 처리하였다. 제한효소를 불활성화 시키기 위하여 65°C에서 10분간 둔 후, 1 µl의 coprecipitate, 2 µl의 3 M sodium acetate 및 40 µl ethanol을 넣고 -20°C에서 overnight하여 4°C에서 20분간 원심분리한 후 DNA를 추출하였다.

Forward primer의 5'-말단에 phosphoamidite로 형광물질을 표지하였다 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 10 µl의 reaction mixture solution에는 reaction buffer (20 mmol/l Tris hydrochloride, PH 8.4, 50 mmol/l potassium chloride), 100 ng의 genomic DNA와 30 pmol의 primer, 1.5 mmol/l magnesium chloride, 10% dimethylsulfoxide (DMSO), 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP, 0.125 mM dGTP, 0.75 mM 7-deaza-2'-dGTP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)와 0.25 unit의 Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. Digested DNA와 undigested DNA를 우선 95°C에서 5분간 initial denaturation시킨 뒤 touchdown PCR로 denaturation은 94°C

에서 15초, annealing은 60℃에서 30초, extension은 72℃에서 30초로 전체 30주기를 시행한 후 72℃에서 15분간 연장 반응시켰다. 형광물질이 붙여진 PCR 산물은 95℃에서 4분간 변성한 후 크기를 측정하기 위하여 internal size standard로서 ROX 500 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 넣고 이것을 4.5% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 ABI 377 Stretch automated sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에서 분리하였다. 데이터는 Genescan software package (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)와 Genotype software package (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 크기를 측정하였다. X chromosome inactivation ratio는 digested DNA에서 나온 allele product ratio를 undigested DNA에서 나온 allele product ratio로 나누어서 구하였다.

3. 통계처리

dBSTAT 통계프로그램을 이용하여 chi-square검정을 시행하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

POF 환자 86명과 정상 대조군 83명 등 총 169명에서 X 염색체 불활성화 정도를 측정하기 위하여 androgen receptor inactivation ratio를 구하였다.

1. 대상군의 임상양상

POF 환자 86명 중 5명 (5.8%)은 원발성 무월경이었고, 81명 (94.2%)은 속발성 무월경 환자였다. 30세 이전에 POF를 보인 환자는 47명 (54.6%)이었고, 30-40세에 POF를 보인 환자 39 (45.4%)명이었다. POF의 평균 연령은 35.7세 (17-64세)였고, 정상 대조군의 평균 연령은 34.8세 (10-55세)였다. 가족력이 있는 경우가 3명 (3.5%), 갑상선 기능저하증이 6명 (7%), lupus가 동반된 경우가 2명 (2.3%)이었다.

2. X 염색체 불활성화 분석

1) Androgen receptor gene의 PCR 결과

Androgen receptor 시발체를 이용한 PCR결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 2). Track A가 HpaII를 처리한 후의 DNA이고, track B가 같은 환자에서 HpaII를 처리하지 않은 DNA이다. 밑에 나온 숫자는 PCR 산물의 크기 (bp), 높이 및 면적을 나타낸 것이다. 면적을 이용하여 X 불활성화 비율을 구해보면 digested allele product ratio를 undigested allele product ratio로 나눈 것으로

(7191÷668)÷(1762÷1624)=9.92이고, 이것을 퍼센트로 나타내면 $[9.92 \div (1+9.92)] \times 100 = 90.8\%$ 로 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보여준다.

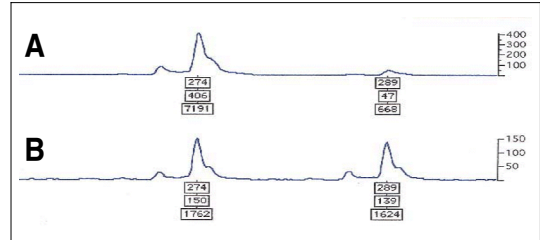


Fig. 2. Typical example of skewed X inactivation results gained by PCR with primers AR in POF patients.

2) X 염색체 불활성화 비율의 분포

Digestion control로서 사용한 정상 남성의 DNA는 항상 활성화되어 있으며, 메틸화되지 않기 때문에 HpaII 제한 효소에 의해 완전히 절단되어 PCR 후 증폭산물이 나타나지 않았다. 또한 조기난소부전 환자 10명과 정상 대조군 9명에서 모계기원과 부계기원의 두 대립인자가 모두 같은 크기의 PCR 산물을 나타내는 동형접합으로 불활성화 비율을 구할 수 없어 결과분석에서 제외하였다 (Fig. 3). 이형접합을 보이는 조기난소부전 환자 76명 (88.4%)과 정상대조군 74명 (89.2%)에서 불활성화 비율을 구할 수 있었다. 90% 이상의 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보이는 경우는 POF 환자 8명과 정상 대조군 3명으로 각각 10.5%, 4.1%로 나와 POF에서 극비대칭을 나타내는 경우가 많았으나 통계적으로 유의 있는 차이는 없었다 ($p=0.2274$). 75% 이상을 비대칭 X 염색체 불활성화 (skewed X chromosome inactivation)로 정의하였을 때 POF는 22.3%, 정상 대조군은 21.6%로 통계적으로 유의 있는 차이는 없었다 (Fig. 4).

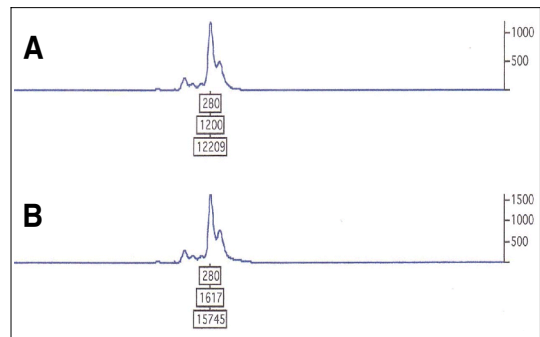


Fig. 3. Typical example of homozygote results gained by PCR with primers AR in POF patients.

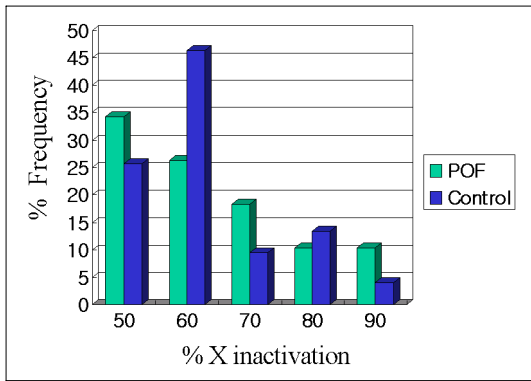


Fig. 4. Distribution of X inactivation ratio in blood of POF and normal females.

3) 극비대칭의 불활성화를 보이는 POF 환자의 특징
 본 연구에서 밝혀진 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보이는 환자를 분석해 보면 8명의 조기난소부전 환자에서 2명은 원발성 무월경으로 염색체 검사상 46,XX였다. 6명은 속발성 무월경 환자로 5명은 염색체 검사상 46,XX를 나타내었다. 그중 3명은 분만한 경험이 있었으며, 반복 유산을 나타내는 병력이나 자손에서 나타나는 이상은 없었다. 분만을 경험한 한명의 여성에서 high resolution band karyotyping에서 X 염색체 단완의 terminal deletion으로 밝혀졌다 (Table 1). 3명의 정상 대조군은 분만을 경험하고 현재 규칙적인 생리를 하는 여성으로 반복유산을 나타내는 병력은 없었다.

고 찰

XCI는 남성과 여성에서 X 연관 유전자의 균형을 맞추기 위하여 발생초기 무작위로 이루어진다. 극비대칭의 XCI는 부모 중 어느 한쪽에서 유래된 X 염색체가 선택적으로 불활성화되는 것이다. X 염색체의 구조적 이상, 즉 결실, 중복 및 X 염색체와 상염색체의 불균형 전좌에

서는 대부분의 세포에서 비정상적인 X 염색체가 불활성화되는 극비대칭의 XCI를 나타낸다.⁹ 반대로 X 염색체와 상염색체의 균형 전좌의 경우는 대부분의 세포에서 정상적인 X 염색체가 불활성화되는 극비대칭의 XCI를 나타낸다.¹³ 이런 극비대칭의 XCI는 보다 나은 유전적 균형을 유지하려는 세포의 이차 선택의 결과일 수 있다.¹⁴ 또한 유사한 선택과정은 X 연관 유전자 변이에서 나타날 수 있다. 이런 돌연변이가 보인자 여성의 남자 자손에 치사적인 결과를 나타내어 보인자 여성에서 자연유산의 빈도가 증가할 수 있다고 보고되었다.^{8,11} 극비대칭의 XCI의 빈도는 1.5%에서 23%까지 다양하게 보고되고 있으며,^{8,15} 나이가 들수록 그 빈도가 증가하여 25세 이하 여성의 혈액세포에서 극비대칭의 비율은 7%이고 60세 이상의 경우 16%로 노인여성에서의 극비대칭의 XCI는 매우 일반적인 것으로 보고되었다.⁵ 이는 빨리 분열하는 혈액세포에서 특별한 X 염색체를 발현하는 세포가 다른 세포에 비해 선택적 우위를 가질 수 있기 때문이다. 이런 2차적 세포 선택현상은 많은 X 연관 증후군에서도 보고되었다.^{16,17} X 염색체의 불활성화를 구별하는 방법은 염색체의 메틸화를 분석하는 것이며, 이를 분석하는 다양한 방법, 조직 및 나이에 따라 정상여성에서의 극비대칭의 비율이 다르게 보고되었다.⁵ XCI에 대한 검사방법은 AR 유전자에 대한 분석이 매우 신뢰할만하고 정확하다고 알려져 있다.⁵ XCI를 검사하는 방법으로 densitometer를 사용하기도 하나 형광 PCR 분석이 더 신뢰할 만한 것으로 보고되고 있다.³ 본 연구에서는 형광 PCR 분석시에 DMSO의 사용으로 GC가 풍부한 부위의 증폭시 크기가 작은 대립인자만 선택적으로 증폭되는 것을 줄일 수 있었다. 두개의 메틸화에 민감한 제한 효소인 HpaII와 CfoI를 사용한 연구에서 극비대칭의 XCI는 25세 이하의 정상 여성에서 7%이고 60세 이상의 정상 여성에서 16%로 나타나서 본 연구에서 나타난 4.1%보다 높게 보고되었다.⁵ 이는 두개의 제한 효소로 처리한 경우가 한 개의 제한효소로 처리한 경우보다 완전하게 자를 수 있고, 두개의 제한 효소로 자르게 되면 DNA 절편

Table 1. Characterization of POF females with skewed X inactivation

Sample No.	Karyotyping	Obstetric History	Family History of X-linked disease
13	46,XX	None	None
24	46,XX	None	None
28	46,XX,del(X)(p21)	G1P1A0	None
30	46,XX	G1P1A0	None
35	46,XX	None	None
43	46,XX	None	None
95	46,XX	None	None
96	46,XX	None	None

이 작아져 2차 구조 형성을 줄일 수 있어 극비대칭의 XCI가 높게 측정될 수 있다. 그러나 본 연구에서 음성 대조군으로 사용한 정상 남성의 DNA가 100% 절단되어 PCR 산물이 전혀 나타나지 않은 것으로 보아 HpaII 제한효소 한가지만으로도 충분한 절단이 된 것으로 사료된다. 또한 비슷한 나이의 정상 대조군에서 극비대칭의 XCI 빈도는 3.2%,¹⁸ 3.5%,⁷ 4.5%,¹⁵ 5%¹¹로 보고되어 본 연구의 결과와 비슷하였고 Lanasa 등⁸이 보고한 1.5%보다는 높게 나타났다. 나이에 따라 극비대칭의 XCI가 증가한다는 보고가 있으나,^{5,19} POF 환자에서 극비대칭의 XCI를 보인 샘플의 나이는 17, 25 (2명), 28, 30, 36 (2명), 38세이고, 정상 대조군에서는 30, 31, 57세로 극비대칭의 XCI는 나이의 효과는 아닌 것으로 사료된다. 본 연구의 결과에서 정상 대조군에 비해 POF 환자에서 극비대칭의 XCI의 비율이 증가되는 경향을 보인 것은 POF의 원인이 되는 X 염색체의 부분 결실이나 전좌 등과 같은 염색체 이상과 POF를 일으키는 유전자의 변이가 유전적 균형을 유지하기 위하여 선택적으로 불활성화된 것으로 사료된다. 만약 염색체 이상과 유전자의 변이가 태아에 치명적이면 이 유전자를 받은 남자자손에서 유산이 되는 습관성 유산을 일으킬 수 있다. 따라서 현재까지 POF의 원인 유전자가 밝혀지지는 않았지만 X 염색체상에 있는 유전자에 의한 변이의 유무를 X 염색체 불활성화에 대한 분석을 통하여 간접적인 방법으로 밝힐 수 있다. 이런 극비대칭의 XCI를 보이는 POF 환자들을 대상으로 습관성 유산에 대한 병력과 X 연관 유전자 이상에 대한 가족력을 조사하고 high resolution karyotyping을 시행하거나 genotyping의 방법으로 미세한 결실이나, 전좌를 밝힐 수 있다. 본 연구에서도 극비대칭의 XCI를 보인 POF 환자에서 7명은 정상 XX를 보였으나, 한 명에서 X 염색체의 단원의 terminal deletion을 발견하였다. 결실이 유전되는 가족에서 자연유산의 빈도가 2배나 많았으며, 남아보다는 여아를 분만하는 비율이 높았다고 보고하였으나,²⁰ 본 연구에서는 극비대칭의 XCI를 보였던 8명의 환자에서 습관성 유산의 병력이나 여아의 출산율이 증가하지는 않았다. 이는 극비대칭의 XCI를 보이는 POF 환자수가 작기 때문일 수 있으며, 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요하리라 사료된다. 현재까지 POF를 일으키는 X 연관 유전자의 변이를 선별하는 효과적인 방법이 없기 때문에 선별검사로 XCI를 검사할 수 있다. 본 연구 결과에서 보듯이 POF 환자에서 정상 대조군에 비해서 극비대칭의 XCI를 나타내는 경향을 보이는 것은 XCI가 POF의 원인으로 알려진 X 염색체의 결실이나 전좌 및 아직 알려지지 않은 유전자의 변이를 알 수 있는 간접적인 방법으로 사료된다.

모든 POF 환자에서 기초검사로 호르몬 검사, 자가항체검사, 염색체 검사 및 알려진 유전자의 변이 분석 의

에도 XCI에 대한 선별검사가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

POF 환자에서 X 염색체의 결실이나 전좌 및 유전자 변이와 관련된 극비대칭의 XCI를 나타내는지 알기 위하여 AR 유전자의 다형성을 이용하여 XCI 비율을 측정하여 동일한 나이의 정상 대조군과 비교하였다. 본 연구는 국내의 조기난소부전 환자의 유전자 변이에 대한 연구 중에서 가장 많은 환자를 대상으로 한 연구이며, 특히 X 염색체 불활성화의 분석은 국내에서 처음으로 보고되는 것이다. 본 연구의 결과 POF 환자에서 정상 대조군에 비해 극비대칭의 XCI를 보이는 경향을 나타내었다. 또한 극비대칭의 XCI를 보인 한 명의 조기난소부전 환자에서 high resolution band karyotyping에서 X 염색체 단원의 terminal deletion이 발견되었다. 이는 X 염색체의 결실이나 전좌 그리고 X 염색체에 있는 POF와 관련된 유전자의 변이가 극비대칭의 XCI를 보인 것으로 사료된다. 따라서 원인 불명의 POF 환자에서 극비대칭의 XCI를 보일 경우 염색체 이상이나 유전자 변이 등의 간접적인 유전적 이상을 시사한다. 현재까지 POF를 일으키는 X 연관 유전자의 변이를 선별하는 효과적인 방법이 없기 때문에 POF에 대한 일차적 선별검사로 XCI 분석이 사용될 수 있다.

- 참고문헌 -

1. de Moraes-Ruehsen M and Jones GS. Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1967; 18: 440-61.
2. Anastasi JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998; 70: 1-15.
3. Conway GS. Premature ovarian failure. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1997; 9: 202-6.
4. Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet* 1998; 35: 637-40.
5. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 2000; 107: 343-9.
6. Lyon MF. X chromosome inactivation and developmental progression in mammals. *Biol Rev* 1972; 47: 1-35.
7. Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 1997; 17: 353-6.
8. Lanasa CM, Hogge WA, Kubik C, Blancato J, Hoffman EP. Highly skewed X chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 252-4.
9. Therman E and Patau K. Abnormal X chromosome in man: origin, behavior and effects. *Humangenetik* 1974; 25: 1-16.
10. Devriendt K, Matthijs G, Leguis G, Schollen E, Blockmans D, Van Geet C, et al. Skewed X chromosome inactivation in female carriers of dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 581-7.

11. Sangha KK, Stephenson MD, Brown CJ, Robinson WP. Extremely skewed X-inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 913-7.
12. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-39.
13. Schmidt M and Dusart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation patterns in females with balanced X; autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 1992; 42: 161-9.
14. McMahon A and Monk M. X chromosome activity in female mouse embryos heterozygous for Pgl1 and Searles translocation. *Genet Res* 1983; 41: 69-83.
15. Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Brais N, Lalonde Y, et al. Non-random X-inactivation patterns in normal females; Lyonization ratios vary with age. *Blood* 1996; 88: 59-65.
16. Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, Bing DH. Non-random inactivation of X chromosome in early lineage haematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 1995; 85: 2471-7.
17. Orstavik KH, Orstavik RE, Eiklid K, Transbjaerg L. Inheritance of skewed X chromosome inactivation in a large family with an X-linked recessive deafness syndrome. *Am J Med Genet* 1996; 64: 31-4.
18. Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haematol* 1997; 98: 512-9.
19. Rousseau F, Heitz D, Oberle I, Mandel JL. Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosome carrying the full mutation. *J Med Genet* 1991; 28: 830-6.
20. Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U. Familial skewed X inactivation: A molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Med Genet* 1997; 61: 160-70.

=국문초록=

목적 : 조기난소부전은 난소발달기전을 이해하는 임상적 모델로, 조기난소부전의 유전적 원인을 밝힘으로써 난소분화 및 난포형성과정에 관련된 유전자를 알 수 있다. 조기난소부전은 40세 이전에 무월경과 성선자극호르몬이 증가되는 임상증후군으로 빈도는 약 1% 정도이다. 아직 조기난소부전의 기전은 밝혀지지 않았고, 터너 증후군, 자가면역질환, 항암제 치료, 방사선 치료 및 감염 등이 원인으로 알려져 있다. 많은 유전자가 조기난소부전의 후보 유전자로 제기되었고, 이환예에서 유전자들의 변이분석과 다른 원인을 조사하였으나, 조기난소부전의 약 60%에서 그 원인을 밝힐 수 없었고, 이들 중 대부분이 유전적 원인에 의한 것으로 보고되었다. 염색체 검사에 의해서 나타나지 않는 X 염색체의 결실이나 전좌 등과 아직 밝혀지지 않은 X 염색체상의 유전자의 변이가 조기난소부전의 원인이 될 수 있으며, 극비대칭의 X 염색체 불활성화 (highly skewed X chromosome inactivation)는 이런 이상을 가진 보인자에서 나타날 수 있다. 따라서 본 연구에서는 조기난소부전 환자에서 X 염색체의 결실이나 전좌 및 유전자 변이와 관련하여 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 나타내는지를 조사하였다.

연구 방법 : 한국의 조기난소부전 환자 86명과 정상 대조군 83명 등 총 169명에서 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 나타내는지 알기 위하여 androgen receptor 유전자의 다형성을 이용하여 X 염색체 불활성화 비율을 측정하여 동일한 나이의 정상 대조군과 비교하였다.

결과 : 본 연구의 결과 한국의 조기난소부전 환자와 정상 대조군의 극비대칭의 X 염색체 불활성화 비율은 각각 10.5%, 4.1%로 조기난소부전 환자에서 극비대칭의 X 염색체 불활성화의 경향을 보였으나, 통계적 의미는 없었다 ($p=0.2274$). 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보인 한 명의 조기난소부전 환자에서 high resolution band karyotyping에서 X 염색체 단완의 terminal deletion이 발견되었다. 이는 X 염색체의 결실이나 전좌, 그리고 X 염색체상에 위치하는 조기난소부전과 관련된 유전자의 변이가 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보인 것으로 사료된다. 따라서 원인 불명의 조기난소부전 환자에서 극비대칭의 X 염색체 불활성화를 보일 경우 염색체 이상이나 유전자 변이의 간접적인 증거일 수 있다.

결론 : 모든 조기난소부전 환자에서 기초검사로 호르몬 검사, 자가항체검사, 염색체 검사 및 원인으로 알려진 유전자 변이분석 외에도 X 염색체 불활성화에 대한 선별검사가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어 : 조기난소부전, X 염색체 불활성화