

의학박사 학위논문

한국 여성에서 체외수정시술 시
반복 착상 실패와 Vascular
Endothelial Growth Factor,
Cyclooxygenase-2, Plasminogen
Activator Inhibitor-1, Endothelial
Nitric Oxide Synthase 유전자
다형성의 연관성

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

의학과 산부인과학 전공

채 수 진

국문초록

배경: 한국 여성에서 p53 codon 72 tumor suppressor factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C, -460 C/T, -1154 G/A, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 4G/5G, cyclooxygenase (COX)-2 -765 G/C, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) +894 G/T 유전자 다형성과 체외수정시술 시 반복 착상 실패의 연관성을 알아보려고 한다.

방법: 59명의 반복 착상 실패 여성과 100명의 건강한 임신능이 있는 대조군을 대상으로 한국 여성에서 p53 codon 72 tumor suppressor factor, VEGF +405 G/C, -406 C/T, -1154 G/A, PAI-1 4G/5G, COX-2 -765 G/C, eNOS +894 G/T 유전자 다형성을 real-time polymerase chain reaction (PCR) 및 restriction fragment length polymorphism으로 알아보았다.

결과: p53 codon 72 tumor suppressor factor, VEGF +405 G/C, -460 C/T, -1154G/A 유전자 다형성, COX-2 -765G/C 유전자 다형성, PAI-1 4G/5G, eNOS +894 G/T 유전자 다형성은 Hardy-Weinberg 평형을 이루었다. p53 codon 72 tumor suppressor factor, VEGF -460 C/T, eNOS +894 G/T 유전자 다형성은 반복 착상 실패 여성과 대조군 간 유의한 차이를 보이지 않았다. PAI-1 5G/5G 유전자형 (genotype)이 반복 착상 실패 군에서 유의하게 낮았다 ($P=0.023$). COX-2 -765 G/C 유전자 다형성의 C 대립유전자 (allele) 및 G/C 유전자형이 유의하게 반복 착상 실패 여성에서 높았다 ($P<0.001$). VEGF +405 C/C 유전자형이 유의하게 반복 착상 실패 여성에서 높았다 ($P=0.047$). VEGF -1154 A/A 유전자형 및 A 대립유전자가 반복 착상 실패 여성에서 유의하게 높았다 ($P=0.036$).

and P=0.018).

결론: COX-2 -765 G/C 유전자 다형성, PAI-1 4G/5G 유전자 다형성, VEGF +405 G/C, -1154 G/A 유전자 다형성은 한국 여성에서 체외수정시술 시 반복 착상 실패와 연관되어 있을 가능성이 있다.

주요어: p53 tumor suppressor factor; vascular endothelial growth factor; plasminogen activator inhibitor; cyclooxygenase; endothelial nitric oxide synthase; repeated implantation failure; gene polymorphisms

List of tables

Table 1. Grading of cleavage embryo and blastocyst.....	23
Table 2. Clinical features in patients with repeated implantation failure	25
Table 3. Genotype and allele frequency for p53 codon 72 tumor suppressor factor polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls.....	26
Table 4. Genotype and allele frequency for PAI-1 4G/5G polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls .	28
Table 5. Genotype and allele frequency for COX -765 G/C polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls....	30
Table 6. Genotype and allele frequency for VEGF +405 G/C, -460 C/T, and - 1154 G/A polymorphisms between patients with repeated implantation failure and controls.....	31
Table 7. Haplotype analysis of the VEGF +405G/C, -460 C/T, and -1154 G/A gene polymorphisms between patients with repeated implantation failure and controls.....	34

Table 8. Linkage disequilibrium between the markers of the VEGF gene in the controls.....	36
Table 9. Genotype and allele frequency for VEGF +405 G/C, -460 C/T, and -1154 G/A polymorphisms between patients with repeated implantation failure excluding endometriosis and controls.....	38
Table 10. Genotype and allele frequency for eNOS + 894 G/T polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls.	41
Table 11. Distribution frequency of number of susceptible polymorphisms of COX-2 -765G/C, VEGF +405G/C and -1154 G/A gene polymorphism among women experiencing patients with repeated implantation failure and controls.....	42

List of figure

Figure 1. Linkage disequilibrium plot of the VEGF +405G/C, -460 C/T, and -1154 G/A gene polymorphisms.....	37
--	----

목 차

I. 서론.....	1
II. 연구재료 및 방법.....	10
III. 연구결과.....	18
IV. 고찰.....	43
V. 참고문헌.....	54

서론

자궁의 내막에 배아가 착상하는 것은 임신이 성립되는 가장 중요한 반응이며 임신 반응이 일어나기 위해서는 건강한 배아가 좋은 내막에 정상적으로 위치하여 방해받지 않고 내막에 착상하여 태반이 생성되는 반응이 일어나야 한다. 이와 더불어 착상 과정에서는 모체와 배아 사이의 면역학적 반응이 동반되며, 혈관생성 (angiogenesis), 세포외기질 (extracellular matrix)의 분해 및 영양막 세포 (trophoblastic cell)의 증식이 동반되어 일어나게 된다. 착상 반응이 일어나는 데 있어서 일반적으로 중요하다고 알려진 요소들은 정자 및 난자의 상태, 수정의 진행, 배아의 염색체 상태, 자궁 내막의 조건 등이다. 체외수정시술에서는 수정된 배아이식을 통해 최종적으로 착상 여부를 알게 되며, 배아이식 후 임신을 실패하는 경우는 대부분 착상의 실패이며, 반복적인 시도에서 착상이 안 되는 경우에는 착상이 일어나지 않는 원인을 찾기 위한 여러 가지 노력이 필요하다고 할 수 있다.

반복 착상 실패 (repeated implantation failure)의 기준은 여러 연구자마다 다른 의견을 피력하고 있으며, 정확한 기준이 정해져 있지 않다. 일반적으로 기존의 연구들이 체외수정시술 후 2-3 회 이상의 배아 이식을 시행하거나 다수의 배아를 이식한 후 실패한 경우를 일컫는 경우를 대상으로 진행된 것이 대부분이다 (Polanski et al., 2014). 최근의 119 편의 논문을 대상으로 한 대규모 체계적 고찰 (systemic review)에 따르면, 2 회 이상의 연속적인 체외수정시술 혹은 냉동배아이식에서 good quality 인 4 개 이상의

cleavage stage 배아 혹은 2 개 이상의 포배기 (blastocyst) 배아를 이식하고 나서 임신에 실패한 경우를 반복 착상 실패의 기준으로 제시하고 있는 추세이다 (Polanski et al., 2014).

반복 착상 실패가 생겼을 때 임상적으로 제시 가능한 원인으로는 자궁내 기형, 자궁 점막하 근종, 자궁내 유착, 자궁내막염, 자궁내막 증식증, 자궁내막의 폴립과 같은 자궁내막의 이상과 난관의 수종이 있을 수 있으며, 배아 자체의 염색체 이상이 있을 수 있다. 또한 항인지질 항체 증후군 (antiphospholipid antibody syndrome) 혹은 유전적인 혈전성향증 (thrombophilia) 등과 같은 면역학적인 요인과 혈전 요인들이 있을 수 있으며, 그 이외에 흡연, 비만과 갑상선 호르몬 이상과 같은 여러 요인이 반복 착상 실패에 연관되어 있다고 알려져 있다.

이러한 여러 가지 원인에 대한 연구들이 많이 진행되어 왔지만, 많은 경우 원인이 없는 경우 혹은 임상적 치료가 된 후에도 반복 착상 실패가 있는 경우가 있어 추가적인 원인에 대한 연구가 요구되고 있는 상태이다. 최근 착상에 필요한 단계에서 중요한 과정인 혈관 생성에 관련된 효소 및 물질에 대한 유전자들에 대한 다형성 (polymorphism)이 반복 착상 실패와 관련이 있다는 연구들이 외국에서 진행되어 왔으며 이에 대한 한국에서의 연구는 없는 실정이다. 선행 연구에서 유전자 다형성 중 반복 착상 실패와 관련되어 있다고 보고된 유전자 다형성 중 대표적인 것은 p53 tumor suppressor factor, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Plasminogen activator

inhibitor (PAI)-1 유전자 다형성 등이 있다. 대부분의 연구들이 소규모의 대상으로 진행되었으나 각각 유의한 의미를 보고하고 있고, 후속 연구가 진행되지 않은 연구들이 대부분이어서 이에 대한 연구의 필요성이 높다고 사료된다.

1. p53 tumor suppressor factor

p53 tumor suppressor gene은 세포 주기에서 종양 예방에 중요한 역할을 하는 유전자이며 염색체 17p13.1에 위치하며 생식 (reproduction) 분야에서는 배아 착상과 관련된 유전자들과 스트레스 신호를 유도하는 역할을 하는 것으로 추정되고 있으며 혈관생성 (angiogenesis) 세포의 세포자멸사 (apoptosis)에 중요하다고 알려져 있어 인간의 생식에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Ravi, et al., 2000). p53 tumor suppressor 유전자의 다형성으로는 codon 72 (rs1042522) 이 대표적이며, p53 Pro72는 Arg72보다 세포자멸사를 적게 일으키지만 G1 세포 주기 정지 (cell cycle arrest)를 더 잘 일으켜 세포 증식을 억제한다고 알려져 있다 (Pim and banks, 2004). 또한 영양막 (trophoblast)의 성장에 영향을 미쳐 착상에 방해가 될 수 있다고 알려져 있다 (Kay et al., 2006). p53 P72 대립유전자 (allele)은 체외수정시술 환자에서 정상 대조군보다 많이 발견되며, 착상 실패의 위험요소 역할을 하며, 배아 착상에 중요한 cytokine인 leukemia inhibitory factor가 P72 대립유전자를 가진 세포에서 낮게 나타난다고 알려져 있다 (Kang et al., 2009).

반복 착상 실패에서 p53 유전자에 대한 연구는 3개의 선행연구가 있으며, p53 P72 대립유전자가 R72 대립유전자보다 유의하게 반복 착상 실패 군에 연관된 것으로 보고되어 있다 (Kay et al., 2006; Goodman et al., 2009; Lledo et al., 2014). Lledo 등은 44명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형 (genotype) (11.4%), Arg/Pro 유전자형(47.7%), Arg/Arg 유전자형 (40.9%)로 Pro/Pro 유전자형 이 대조군 83명에서 Pro/Pro 유전자형 (6%), Arg/Pro 유전자형 (28.9%), Arg/Arg 유전자형 (61.5%)에 비해 차이가 난다고 하였다 (Lledo et al., 2014). Goodman 등은 70명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형이 대조군 73명에 비해 유의하게 더 많다고 하였다 (Goodman et al., 2009). Kay 등도 70명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형 (7%)이 정상 대조군 (0%)에 비해 많다고 하였다. 위 연구들은 소수의 반복 착상 실패 환자를 대상으로 하였으며, p53 유전자에 대한 추가 연구 및 고찰이 필요하다고 할 수 있다 (Kay et al., 2006).

2. VEGF

VEGF 는 혈관투과성과 혈관내피세포의 성장, 분열, 이동, 분화 및 모세혈관 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 배아 혈관생성에서 VEGF 의 중요성은 쥐에서 시행된 2 개의 연구에서 잘 알려져 있으며, VEGF 대립유전자를 비활성화 시켰을 때 발달장애, 적혈구 숫자의 감소, 배아의 성장이 이루어지지 않는 것이 보고되었다 (Carmeliet, 1993; Ferrara et al., 1993). VEGF 수용체

(receptor)는 황체, 난포, 자궁내막 혈관, 배아의 착상부위에 있어서 자궁내막의 혈관생성, 초기 임신의 배아 착상 및 태반 생성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Krüssel et al., 2003). 또한 난소의 혈관생성 시 초기 황체에 많이 발현되며 중기 황체에 감소되는 것으로 보고되어 있다 (Ferrera et al., 2003). VEGF 에서 여러 유전자 다형성들이 알려져 있으며, VEGF +405 G/C 유전자 다형성 (rs2010963, 5'-untranslated region)에서 C/C 유전자형이 다른 유전자형에 비해 VEGF 생산이 감소되는 것으로 보고되었다 (Watson et al., 2000). 이 VEGF 유전자 다형성과 반복 착상 실패에 대한 관련 연구로, 최근 Boudejenah 등은 VEGF +405 C/G 유전자 다형성 중 +405C/C 유전자형이 반복 착상 실패군 40 명에서 7 명(17.5%) 로 대조군 131 명 중 7 명(5.3%) 보다 유의하게 높았다고 보고하였다 (Boudjenah et al., 2012). 또 다른 유전자 다형성인 VEGF -1154 G/A 유전자 다형성 (rs1570360, promoter region)에서 A/A 유전자형이 반복 착상 실패군 70 명 중 13 명 (19%)으로 대조군 73 명 중 4 명 (5%)보다 더 높게 나타나서 유의하게 연관 되어 있는 것으로 보고가 되었다 (Goodman et al., 2009). 이 두 선행연구로 볼 때 VEGF 유전자 다형성의 반복 착상 실패에 미치는 영향에 대한 검증이 필요하다고 할 수 있으며, VEGF -460 C/T 유전자 다형성 (rs833061, promoter near region)은 아직 검증이 되어 있지 않아 이에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

3. COX-2

Prostaglandin (PG)은 착상 기간 동안 자궁내막 세포의 혈관 투과성을 증가시키며, 착상과 탈락막화 (decidualization)에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Chakraborty et al., 1993; Psychoyo et al., 1995; Kennedy et al., 2007). PG 생성이 안 되는 경우 착상이 일어나지 않게 되거나 지연되는 것이 알려져 있으며 여러 쥐 실험을 통해서 입증되어 있고 Prostacyclin (PGI₂), PGE₂ 가 중요한 PG 로 알려져 있다 (Lim et al., 1999; Song et al., 2002; Ye et al., 2005). COX 는 arachidonic acid 를 분해하는 PG 생성 유도 효소로서, COX-1 과 COX-2 가 있는데 이 중 COX-2 는 PGI₂, PGE₂ 를 생성하는 효소로서 착상에 있어서 중요한 역할을 한다 (Shah et al., 2005). COX-2 유전자 다형성 중 COX-2 -765 G/C 유전자 다형성 (rs20417)의 경우 C 대립유전자의 promoter activity 가 G 대립유전자에 비해 30% 감소된다고 알려져 있다 (Papafili et al., 2002; Kristinsson et al., 2009). 이 유전자는 염색체 1q25.2-q25.3 에 위치하고, 다형성에 대한 반복 착상 실패 여성에서 시행된 연구는 하나이며 칠레에서 시행되었고, COX-2 -765 G/C 유전자 다형성 중 -765C 대립유전자가 유의하게 반복 착상 실패 군 (106 명) 39%로 대조군 (80 명) 23%보다 높은 것으로 보고되었다 (Salazar et al., 2010). 이후 후속 연구가 없는 실정으로 이에 대한 검증이 필요하다고 할 수 있다.

4. PAI-1

착상 부위에서 영양막 (trophoblast)가 plasminogen으로부터 plasmin을 만들고 이는 plasminogen activator (PA) 및 PAI의 조절을 통해 이루어진다. Matrix metalloproteinase (MMP)는 plasmin에 의해 자극이 되며, PAI-1는 PA를 억제하며 섬유소용해 (fibrinolysis)를 억제한다. 저섬유소용해 (Hypofibrinolysis)는 영양막 침입 (trophoblastic invasion)을 제한하여 착상을 방해하는 것으로 알려져 있다 (Gris et al., 1997). PAI-1 유전자 다형성 중 잘 알려진 것은 PAI-1 4G/5G 유전자 다형성 (rs1799889)으로 염색체 7q21.3-q22에 위치하며 promoter 부위이다. PAI-1 유전자의 4G 대립유전자 동형접합성 (allele homozygosity)에서 PAI-1 유전자 전사 (transcription) 및 표현 (expression)이 증가되며 PAI-1 농도가 더 높은 것으로 알려져 있다 (Kathiresan et al., 2005; Huang et al., 2012). 따라서, PAI-1 4G 대립유전자가 섬유소용해의 down regulator로서 작용하여 MMP 생산 억제를 시키는 위험인자로 작용한다고 할 수 있다 (Goodman et al., 2009). PAI 4G/4G 유전자형이 반복 착상 실패군에서 유의하게 증가되어 있다고 보고된 것은 두 개의 선행연구가 있다. Goodman 등은 2006년에 PAI-1 4G/4G 유전자형이 반복착상 실패군에서 대조군에 비해 유의하게 많다고 하였고, Coulam 등도 2009년 같은 결과를 발표하였다 (Coulam et al., 2006; Goodman et al., 2009). 따라서, 우리나라에서도 이에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

5. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)

최근 한 연구결과에서 반복 착상 실패군에서 혈청 eNOS 가 반복 착상 성공 군에 비해서 높다고 알려졌다 (RoyChoudHury et al., 2015). eNOS 는 혈관 확장 효과를 나타내는 NO 생성의 중요한 효소이며 L-arginine 을 L-citrulline 으로 바꾸는 역할을 한다 (Moncada et al., 1991; Alderton et al., 2001). eNOS 는 황체기의 자궁내막 미세혈관 내피 세포에 발견에서 주로 발견되며 NO 는 착상과 자궁내막의 반응성 (receptivity) 등에 중요하다고 알려져 있고, eNOS 는 여러 동물 실험을 통해 착상에 필요하다고 알려져 있다 (Purcell et al., 1999; Chwalisz et al., 2000; Sengupta et al., 2005). eNOS 는 영양막에 특히 많이 분포되어 있는 것으로 보고되고 있어 착상에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다 (Ariel et al., 1998). 불임에 있어서의 연구는 원인불명의 불임 여성에서 eNOS 는 자궁내막의 상피내강 (luminal epithelium)에서 과다 발현되었다고 보고가 있다 (Najafi et al., 2012).

eNOS 유전자는 7q35-36 에 위치하고 유전자 다형성과 불임에 연구에서는 오직 한 개의 연구가 있으며 Karatas 등은 eNOS Glu298Asp 유전자 다형성 (rs1799983)에서 유의하게 원인불명의 불임 여성에서 GG 유전자형이 적게 나타난다고 하였다 (Karatas et al., 2014). 이 부위는 습관성 유산 환자에 대한 대규모 메타분석에서 유의하게 대조군에 비해 차이가 있다고 알려져 있다 (Su et al., 2001). 반복 착상 실패 군에서의 연구는 eNOS 유전자

다형성 연구가 아직 이루어진 바가 없어서 이에 대한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

6. 다른 후보 유전자들

그 이외에 Mucin-1 유전자 다형성 (Goulart et al., 2004; Dentillo et al., 2007), Mucin-4 유전자 다형성 (Koscinski et al., 2006), Progesterone 수용체 유전자 다형성 (Coulam et al., 2008), Leukemia inhibitory factor 유전자 다형성 (Steck et al., 2004) 등의 연구가 있으나, 모두 반복 착상 실패와는 유의한 관련성이 없는 것으로 알려져 있다.

지금까지 이루어진 반복 착상 실패 관련 유전자 다형성 연구들이 대개 소수의 대상 유전자 다형성의 연구로 외국에서 진행되어 있으며 또한 외국의 연구 대상 수는 10 여명에서 100 여명 정도로 비교적 적은 숫자를 대상으로 하고 있고 eNOS 유전자 다형성에 대한 연구는 없는 상태이다. 국내에는 이에 대한 연구가 전무할 정도로 우리나라 체외수정시술을 시행한 반복 착상 실패 군에 대한 유전자 다형성의 연관성에 대한 연구가 필요하며, 본 연구에서는 이에 대한 유전자들에 대한 연관성을 알아보고자 한다.

연구재료 및 방법

연구대상

환자군으로 시험관 아기 시술 후 반복 착상이 되지 않은 59명의 여성과 대조군으로 2회 이상의 출산을 한 100명의 여성을 대상으로 하였다. 반복 착상 실패는 이전 임신력이 없으며 4개 이상의 good quality cleavage embryo 혹은 2개 이상의 good quality blastocyst를 이식하였으나 serum hCG 검사가 음성인 경우로 하였다 (ILedo et al., 2014; Polanski et al., 2014). Good quality cleavage embryo는 6세포기 이상의 분할과 세포질내 분열(fragmentation) 없거나, 20% 미만인 경우를 포함하였다 (Gardner et al., 1999; Balaban et al., 2006; Yoon et al., 2011) (Table 1). Good quality blastocyst는 blastocele이 배아를 모두 채우거나 발달을 진행을 더하여 부화가 일어났으며 inner cell mass가 많고 trophectoderm이 knit epithelium을 이룬 상태를 포함하였다 (Gardner et al., 1999; Balaban et al., 2006) (Table 1). Maria fertility Institutional Review Board의 승인(2016003)을 받았으며, 환자군에서 ICSI 여부와 관계없이 포함하였으며 배우자 정자 검사, 초음파 검사, 나팔관 조영술 등을 통해 해부학적 이상이 없고 갑상선 기능에 이상이 없는 것을 확인하였다.

과배란 유도 및 체외수정시술

단기 요법의 경우 월경 주기 3 일에 질식 초음파 검사를 시행하여 성선 자극 호르몬을 투여하기 시작하고 우성 난포의 직경이 14 mm 이상이면 생식샘자극호르몬방출 호르몬(gonadotrophin-releasing hormone, GnRH) 길항제 (antagonist)를 투여하기 시작하며, 우성난포의 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3 개 이상 관찰되면 사람 융모성 성선자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG) 10,000 IU 혹은 recombinant hCG 를 주사하였다. 난자의 채취는 36 시간 후 질식 초음파 하에 시행하고 정상적으로 수정된 배아는 채취 후 2-5 일에 환자의 자궁강 내로 이식하였고 황체기 보강을 하였다. 임신의 확인은 난자채취 후 제 14 일에 혈중 β -hCG 농도를 확인하여 3mIU/ml 이상이고, 1 주일 후 실시한 추적 검사에서 혈중 β -hCG 의 상승을 보이며, 임신 제 5-6 주에 시행한 질식 초음파검사서 태낭을 관찰하는 경우를 임상적 임신으로 판정하였다.

장기요법의 경우 월경주기가 일정한 환자에서는 월경 주기 제 14 일 전후로 배란여부를 확인하여 다음 월경예정일 7-10 일 이전에 생식샘자극호르몬방출 호르몬 작용제 (GnRH agonist) 피하주사를 시작하고, 이후 진행 및 임신의 판정은 길항제요법과 동일한 절차에 의하여 진행하였다.

유전자 DNA 추출(Genomic DNA Extraction)

환자의 말초혈액에서 Wizard DNA purification kit (Promega, Madison, WI)를 사용하여 추출하였다.

p53 codon 72 tumor suppressor factor 유전자형

분석

Allelic discrimination은 ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 MGB-NFQ primer/probe Taqman assay를 사용하였다. 각각의 20ul PCR 반응은 18 pmol의 forward primer 5'-CCAGATGAAGCTCCCAGAATGC-3', 18 pmol의 reverse primer 5'-GCCGCCGGTGTAGGA-3', 4 pmol의 'G' 대립유전자 probe 5'(VIC)-TCCCCGCGTGGCC (NFQ)-3', 4 pmol의 'C' 대립유전자 probe 5'(FAM)-CTCCCCCGTGGCC (NFQ)-3', 10ul의 2X TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)와 25ng DNA을 담았다. PCR cycling 조건은 2분간 50°C, 10분 95°C, 40번의 15초 95°C, 1분간 60°C였다. 증류수가 negative PCR 대조군으로 사용되었다.

PAI-1 4G/5G 유전자형 분석

Allelic discrimination은 ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 MGB-NFQ primer/probe Taqman assay를 사용하였다. Allelic discrimination은 ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 MGB-NFQ

primer/probe Taqman assay를 사용하였다. 각각의 20ul PCR 반응은 18 pmol의 forward primer 5'-AGACAAGGTTG TTGACACAAGAGA -3', 18 pmol의 reverse primer 5'-GGCCGCCTCCGATGATAC-3', 4 pmol의 4G 대립유전자 probe 5'(VIC)-ACGGC TGA CTCCCCAC(NFQ)-3', 4 pmol의 5G 대립유전자 probe 5'(FAM)-CGGCTGAC TCCCCAC (NFQ)-3', 10ul의 2X TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)와 25ng DNA을 담았다. PCR cycling 조건은 2분간 50°C, 10분 95°C, 40번의 15초 95°C, 1분간 60°C였다. 증류수가 negative PCR 대조군으로 사용되었다.

COX-2 -765G/C 유전자형 분석

Genomic DNA의 증폭은 oligonucleotide primers: 5'-CCGCTTCCTTTGTC CATCAG-3' (forward), 5'-GGCTGTATATC TGCTCTATATGC-3' (reverse)를 사용하였다. 25ng genomic DNA를 1.5 mM MgCl₂, 200uM dNTP, 0.4 uM each primer, 1U of Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)와 섞었다. PCR cycling 조건은 denaturation step 5분 간 95°C, 증폭 35주기 30초간 95°C, 30초간 57°C, 30초간 72°C, 72도 10분간 extension이었다. PCR product은 1U의 제한효소 (restriction enzyme) Aci I (New England Biolabs, USA), 37°C overnight 기간으로 두고, 3% agarose gel 전기영동 (electrophoresis) 한 후 ethidium bromide 염색을 하였다. 188, 118 bp은 정상 G/G 동형접합체, 306, 188, 118

bp은 G/C 이형 접합체, 306 bp은 C/C 동형접합체였다.

VEGF + 405G/C, -460C/T, -1154G/A 유전자형 분석

1) VEGF + 405G/C 유전자 다형성

Genomic DNA의 증폭은 oligonucleotide primers: 5'-TTGCTTGCCATTCCCCACTTGA-3' (forward), 5'-CCGAAGC GAGAACAGCCCAGAA-3' (reverse)를 사용하였다. 25ng genomic DNA를 1.5 mM MgCl₂, 200uM dNTP, 0.4 uM each primer, 1U of Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)와 섞었다. PCR cycling 조건은 denaturation step 5분 간 95°C, 증폭 35주기 30초간 95°C, 30초간 58°C, 30초간 72°C, 72도 10분간 extension이었다. PCR product은 1U의 제한효소 BsmF I (New England Biolabs, USA), 65°C overnight 기간으로 두고, 2% agarose gel 전기영동을 한 후 ethidium bromide 염색을 하였다. 283, 186 bp은 정상 G/G 동형접합체, 469, 283, 186 bp은 G/C 이형접합체, 483 bp은 C/C 동형접합체였다.

2) VEGF -460C/T 유전자 다형성

Genomic DNA의 증폭은 oligonucleotide primers: 5'-TGTGCGTGTGGGGTTGAGCG-3'(forward), 5'-TACGTGCGGA CAGGGCCTGA-3'(reverse)를 사용하였다. 25ng genomic DNA를 1.5 mM MgCl₂, 200uM dNTP, 0.4 uM each primer, 1U of Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)와 섞었다. PCR cycling 조건은 denaturation step 5분 간 95°C, 증폭 35주기 30초간 95°C, 30초간

58°C, 30초간 72°C, 72도 10분간 extension이었다. PCR product은 2U의 제한효소 BstU I (New England Biolabs, USA), 60°C overnight 기간으로 두고, 3% agarose gel 전기영동 한 후 ethidium bromide 염색을 하였다. 155, 20 bp은 정상 C/C 합체, 175, 155, 20 bp은 C/T 이형접합체, 175 bp은 T/T 동형접합체였다.

3) VEGF -1154G/A 유전자 다형성

Genomic DNA의 증폭은 oligonucleotide primers: 5'-TCCTGCTCCCTCCTCGCCAATG-3' (forward), 5'-GGCGGGGA CAGGCGAGCATC-3' (reverse)를 사용하였다. 25ng genomic DNA를 1.5 mM MgCl₂, 200uM dNTP, 0.4 uM each primer, 1U of Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)와 섞었다. PCR cycling 조건은 denaturation step 5분 간 95°C, 증폭 35주기 30초간 95°C, 30초간 58°C, 30초간 72°C, 72도 10분간 extension이었다. PCR product은 2U의 제한효소 Mn1 I (New England Biolabs, USA), 60°C overnight 기간으로 두고, 3% agarose gel 전기영동 한 후 ethidium bromide 염색을 하였다. 154, 34, 22 bp은 정상 G/G 동형접합체, 206, 150, 34, 20 bp은 G/A 이형접합체, 206 bp은 A/A 동형접합체였다.

eNOS + 894G/T 유전자형 분석

Allelic discrimination은 ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 MGB-NFQ primer/probe Taqman assay를 사용하였다. Allelic

discrimination은 ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)의 MGB-NFQ primer/probe Taqman assay를 사용하였다. 각각의 20ul PCR 반응은 18 pmol의 forward primer 5'- GCTGCCCTGCTGCT - 3', 18 pmol의 reverse primer 5'- CACCCAGTCAATCCCTTTGGT - 3', 4 pmol의 G 대립유전자 probe 5'(VIC) - CCAGATGAG CCCCCA (NFQ) - 3', 4 pmol의 T 대립유전자 probe 5'(FAM) - CCCAGATGATCCCCCA (NFQ) - 3', 10ul의 2X TaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)와 25ng DNA을 담았다. PCR cycling 조건은 2분간 50°C, 10분 95°C, 40번의 15초 95°C, 1분간 60°C였다. 증류수가 negative PCR 대조군으로 사용되었다.

통계적 분석

Hardy-Weinberg distribution을 p53 codon 72 tumor suppressor factor, VEGF +405G/C, -460C/T, -1154G/A, PAI-1 4G/5G, COX-2 -765G/C, eNOS +894G/T 유전자 다형성에서 chi-square test, Fisher exact test, Monte Carlo test를 통해 확인하였다. 분석은 SPSS software (version 12.0, SPSS inc., Chicago, IL)를 사용하였으며 통계학적 의미는 $P < 0.05$ 으로 하였다. Haplotype 분석은 VEGF 유전자 다형성에서 환자군과 대조군에서 시행하였으며 haplotype과 linkage disequilibrium (LD)를 Haploview version 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>)

index.php) 을 사용하여 haplotype frequency, disequilibrium coefficient (r^2), standardized disequilibrium coefficient (D') 과 haplotype association를 구하였다.

연구결과

총 59명의 임신 반응이 없었던 반복 착상 실패 환자군과 100명의 출산력 2회 이상 있고 유산이 없었던 정상 대조군을 대상으로 하였다. 반복 착상 실패 환자군의 나이는 35.8 ± 3.8 세 (mean \pm SD) 였고, FSH 7.2 ± 2.2 mmIU, AMH 3.9 ± 3.3 pmol/l 였으며, 이전 시험관아기시술 시도 횟수는 4.3 ± 1.8 였다 (Table 2). 모든 반복 착상 실패 환자군은 4개 이상의 good quality embryo cleavage stage embryo 혹은 2개 이상의 good quality blastocyst를 이식을 받았다. 자궁내막증 수술력이 있는 환자는 2명 (3.5%) 였다. 대조군의 경우 모든 여성이 불임의 병력이 없었고 나이는 48.6 ± 7.6 세 (mean \pm SD) 였다.

1. p53 codon 72 Arg/Pro tumor suppressor factor

유전자 다형성

반복 착상 실패 환자군의 p53 codon Pro72 빈도는 36.4% 였으며 대조군은 31.5% 였다. Pro 72 codon의 유전자형 빈도 (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro)는 반복 착상 실패군과 대조군 간 차이가 없었다 (Table 3).

2. PAI 4G/5G 유전자 다형성

PAI 4G/5G 유전자 다형성은 반복 착상 실패 환자군과 대조군 사이의 4G 및 5G 대립유전자 빈도 (63.6 % vs 53.6%) 및 4G/4G

유전자형 빈도 (33.9 % vs 28.0%)의 유의한 차이가 보이지 않았다 (Table 3). 5G/5G 유전자형은 recessive model에서 반복 착상 환자군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 빈도가 낮았다 (P=0.023, OR 0.274, 95% CI 0.089-0.841) (Table 4).

3. COX -765 G/C 유전자 다형성

COX -765 G/C 유전자 다형성에서 G 대립유전자 및 C 대립유전자 빈도는 반복 착상 실패 환자 군과 대조군의 차이를 보였다 (Table 5). 반복 착상 실패 환자군과 대조군에서 CC 유전자형은 발견되지 않았다. C 대립유전자 빈도가 반복 착상 실패 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 높게 나왔고 (13.6% vs 3.0%, P<0.001, OR 5.072, 95% CI 1.926-13.358), G/C 유전자형은 반복 착상 실패 환자군 (27.1%)이 대조군 (6.0%)에 비해 높은 빈도를 보였다 (P<0.001, OR 5.829 95 CI 2.133-15.930).

4. VEGF +405 G/C, -460C/T, -1154 G/A 유전자 다형성

VEGF -460C/T 유전자 다형성에서 각각의 대립유전자 빈도는 반복 착상 실패 환자 군과 대조군의 차이를 보이지 않았으며 유전자형 빈도도 차이가 없었다. VEGF +405G/C 유전자 다형성에서 C/C 유전자형은 recessive model에서 반복 착상 실패 환자군에서 대조군에 비해 높은 빈도를 보였다 (P=0.047) (Table

6).

VEGF -1154 G/A 유전자 다형성에서 A 대립유전자 빈도가 반복 착상 실패 환자군에서 유의하게 대조군에 비해 높게 나타났다 (OR 1.908, 95% CI 1.112-3.275). Dominant model에서 반복 착상 실패 환자군과 대조군의 차이가 유의하게 높게 나타났다 (P=0.036) (Table 6).

Haplotype analysis에서 CTG, GTG, GCA, GCC haplotype이 유의한 차이를 보였다 (Table 6). VEGF +405G/-460T haplotype은 민감한 유전자형 (susceptible genotype) (P=0.0425)이었고 +405C/+460T haplotype은 보호 유전자형 (protective genotype) (P=0.0218)이었다. VEGF -460C/-1154G haplotype은 민감한 유전자형 (P=0.0071), -460C/-1154A haplotype은 보호 유전자형이었다 (P=0.151). VEGF +450/-1154 유전자 다형성은 유의한 haplotype이 보이지 않았다. VEGF +405/-460/-1154 polymorphism의 haplotype 중 CTG haplotype (P=0.0336)과 GCA haplotype (P=0.0270)이 보호 유전자형이었고 GTG haplotype (P=0.287)과 GCC haplotype (P=0.0255)이 민감한 유전자형이었다 (Table 7). 위 유전자 다형성에 대한 the disequilibrium coefficient (r^2), the standardized disequilibrium coefficient (D')은 Figure 1과 Table 8과 같았다.

자궁내막증이 있었던 환자 2명을 제외하고 시행한 분석에서는 VEGF +405 G/C 유전자 다형성은 각각의 유전자형과 대립유전자 빈도는 반복 착상 실패군과 대조군의 차이를 보이지 않았으며

Recessive model에서도 통계적인 유의성이 없었다 (P=0.065) (Table 9). VEGF -460 C/T 유전자형과 대립유전자의 분포는 다형성은 반복 착상 환자군과 대조군 간 통계적인 차이를 보이지 않았다. VEGF -1154 G/A 유전자 다형성은 A 대립유전자 빈도가 반복 착상 실패 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다 (OR 1.921, 95% CI 1.114-3.312). Dominant model에서 반복 착상 실패 환자군과 대조군의 차이가 유의하게 높게 나타났다 (P=0.038) (Table 9).

5. eNOS + 894 G/T 유전자 다형성

반복 착상 실패 환자군의 eNOS G 대립유전자 빈도는 89.0% 였으며 대조군은 93.0% 였다. eNOS + 894 G/T 유전형 빈도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 10). G/T 유전자형이 반복 착상 실패군에서 22.0%로 대조군 10.0%에 비해 차이를 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다.

6. 취약 유전자의 빈도

COX-2 -765 G/C 유전자형, VEGF + 405 C/C 유전자형, -1154 A/A 유전자형을 민감한 유전자형이라고 볼 때 반복 착상 실패군과 대조군의 빈도는 차이가 있었으며 민감한 유전자형의 빈도가 1개 이상인 경우가 반복 착상 실패군에서 유의하게 많았으며, Relative risk 5.053, 95% CI 2.480-10.334 이었다 (P<0.001) (Table 11).

PAI-1 5G/5G 유전자형을 가진 4명에서는 민감한 유전자 빈도는 1개를 가진 환자군이 1명이었고 3명은 민감한 유전자를 가지고 있지 않았다.

Table 1. Grading of cleavage embryo and blastocyst (Basak et al., 2006).

Cleavage stage	
Grade 1 embryo	no fragmentation with equal sized homogenous blastomeres
Grade 2 embryo	<20% fragmentation with equal or unequal sized homogenous blastomeres
Grade 3 embryo	20%–50% fragmentation with unequal sized blastomeres
Grade 4 embryo	>50% fragmentation with unequal sized blastomeres
Blastocyst	
1. Early blastocyst	the blastocoele is less than half the volume of the embryo
2. Blastocyst	the blastocoele is greater than or equal to half of the volume of the embryo
3. Full blastocyst	the blastocoele completely fills the embryo
4. Expanded blastocyst	blastocyst—the blastocoele volume is larger than that of the early embryo and the zona pellucida is thinning
5. Hatching blastocyst	the trophectoderm has started to herniate through zona pellucida
6. Hatched blastocyst	the blastocyst has completely escaped from the zona pellucida
Inner cell mass grading	
A	tightly packed, many cells
B	loosely grouped, several cells

C	very few cells
<hr/>	
Trophectoderm grading	
<hr/>	
A	many cells forming a tightly knit epithelium
B	few cells
C	very few cells forming a loose epithelium
<hr/>	

* Good quality embryo: Grade 1 or 2 cleavage embryo / >3AA blastocyst

Table 2. Clinical features in patients with repeated implantation failure.

Clinical variables	Patients (n=59)
Age (yrs)	35.8
BMI (kg/m ²)	21.6
AMH (pmol/L)	3.9
FSH (mIU/mL)	7.2
Number of Embryo transfer cycles (mean)	4.3
Etiology of infertility	
Endometriosis	2 (3.4%)
Male	2 (3.4%)
Tubal	3 (5.1%)
Unknown	52 (88.1%)

Table 3. Genotype and allele frequency for p53 codon 72 tumor suppressor factor polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls.

		RIF (n=59)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
p53 codon 72 tumor suppressor factor Arg/Pro genotype						
Genotype	Pro/Pro	6 (10.2%)	9 (9.0%)			0.562
frequency	Arg/Pro	31 (52.5%)	45 (45%)			
	Arg/Arg	22 (37.3%)	46 (46.0%)			
	Pro/Pro vs Arg/Pro+Arg/Arg (recessive model)			1.145	0.386-3.395	0.787
	Pro/Pro + Arg/Pro vs Arg/Arg (dominant model)			1.433	0.742-2.767	0.322
Allele	Pro	43 (36.4%)	63 (31.5%)	1.247	0.772-2.013	0.367

frequency	Arg	75 (63.6%)	137 (68.5%)
-----------	-----	------------	-------------

^a Chi-square test; OR, odds ratio; CI, confidence interval

RIF, repeated implantation failure

Table 4. Genotype and allele frequency for PAI-1 4G/5G polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls.

		RIF (n=59)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
PAI-1 4G/5G genotype						
Genotype	5G/5G	4 (6.8%)	21(21.0%)			0.059
frequency	4G/5G	35 (59.3%)	51 (51.0%)			
	4G/4G	20 (33.9%)	28 (28.0%)			
	5G/5G vs 4G/5G+4G/4G (recessive model)			0.274	0.089-0.841	0.023*
	5G/5G +4G/5G vs 4G/4G (dominant model)			0.758	0.379-1.517	0.434
Allele	5G	43 (36.4%)	93 (46.5%)	0.660	0.414-1.052	0.080
frequency	4G	75 (63.6%)	107 (53.5%)			

^aChi-square test and Fisher exact test; OR, odds ratio; CI, confidence interval

*- Statistically significant protective genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 5. Genotype and allele frequency for COX -765 G/C polymorphisms between patients with repeated implantation failure and controls.

		RIF (n=59)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
COX -765 G/C genotype						
Genotype	CC	0 (0%)	0 (0%)			
frequency	GC	16 (27.1%)	6 (6.0%)	5.829	2.133-15.930	<0.001 [#]
	GG	43 (72.9%)	94 (94.0%)			
Allele frequency	C	16 (13.6%)	6 (3.0%)	5.072	1.926-13.358	<0.001 [#]
	G	102 (86.4%)	194 (97.0%)			

^aChi-square test; OR, odds ratio; CI, confidence interval

[#] - Statistically significant susceptible genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 6. Genotype and allele frequency for VEGF +405 G/C, -460 C/T, and -1154 G/A polymorphisms between patients with repeated implantation failure and controls.

		RIF (n=59)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
VEGF +405 G/C genotype						
Genotype	CC	15 (25.4%)	13 (13.0%)			0.137
frequency	GC	27 (45.8%)	52 (52.0%)			
	GG	17 (28.8%)	35 (35.0%)			
	CC vs GC+GG (recessive model)			2.281	0.998-5.214	0.047
	CC +GC vs GG (dominant model)			1.330	0.662-2.672	0.422
Allele	C	57 (48.3%)	78 (39.0%)	1.462	0.923-2.314	0.105
frequency	G	61 (51.7%)	122 (61.0%)			
VEGF -460 C/T genotype						
Genotype	TT	32 (54.2%)	50 (50.0%)			0.766

frequency	CT	22 (37.3%)	43 (43.0%)			
	CC	5 (8.5%)	7 (7.0%)			
	TT vs CT+CC (recessive model)			1.185	0.622-2.259	0.606
	TT +TC vs CC (dominant model)			0.813	0.246-2.687	0.734
Allele	T	86 (72.9%)	143 (71.5%)	1.071	0.644-1.782	0.791
frequency	C	32 (27.1%)	57 (28.5%)			

VEGF -1154 G/A genotype

Genotype	AA	4 (6.8%)	1 (1.0%)			0.031
frequency	GA	26 (44.1%)	33 (33.0%)			
	GG	29 (49.2%)	66 (66.0%)			
	AA vs GA+GG (recessive model)			7.200	0.785-66.025	0.064
	AA +GA vs GG (dominant model)			2.008	1.041-3.874	0.036 [#]

Allele	A	34 (28.8%)	35 (17.5%)	1.908	1.112-3.275	0.018 [#]
frequency	G	84 (71.2%)	165 (82.5%)			

^aChi-square test; OR, odds ratio; CI, confidence interval

[#] - Statistically significant susceptible genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 7. Haplotype analysis of the VEGF +405G/C, -460 C/T, and -1154G/A gene polymorphisms between patients with repeated implantation failure and controls.

Polymorphisms	Haplotype	Frequency	Patient/control ratio	χ^2	<i>P</i> value ^a
+405/-460	GT	0.367	0.409/0.296	4.113	0.0425 [#]
	CT	0.353	0.306/0.433	5.265	0.0218 [#]
	GC	0.208	0.201/0.221	0.188	0.6648
	CC	0.071	0.084/0.005	1.311	0.2511
-460/-1154	TG	0.638	0.639/0.636	0.003	0.9569
	CG	0.145	0.186/0.076	7.255	0.0071 [#]
	CA	0.135	0.099/0.195	5.903	0.0151*
	TA	0.082	0.076/0.093	0.278	0.5977
+405/-1154	GG	0.410	0.474/0.302	9.154	0.0025
	GC	0.373	0.351/0.410	1.128	0.2882

+405/-460/-1154	GA	0.165	0.136/0.215	3.418	0.0645
	CA	0.052	0.039/0.073	1.690	0.1936
	CTG	0.322	0.279/0.394	4.515	0.0336*
	GTG	0.316	0.360/0.242	4.785	0.0287 [#]
	GCA	0.110	0.080/0.160	4.888	0.0270*
	GCG	0.097	0.118/0.063	2.550	0.1103
	GTA	0.052	0.052/0.052	0	0.9896
	GCC	0.048	0.068/0.013	4.990	0.0255 [#]
	CTA	0.030	0.024/0.041	0.738	0.3904
	CCA	0.025	0.019/0.035	0.801	0.3707

^aChi-square test. OR, odds ratio; CI, confidence interval

*- Statistically significant protective genotype; [#] - Statistically significant susceptible genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 8. Linkage disequilibrium between the markers of the VEGF gene in the controls

Genotype	+405	-460	-1154
+405	-	0.065	0.293
-460	0.003	-	0.315
-1154	0.012	0.053	-

D' above diagonal; r^2 below diagonal.

Figure 1. Linkage disequilibrium plot of the VEGF +405G/C, -460 C/T, and -1154 G/A gene polymorphisms.

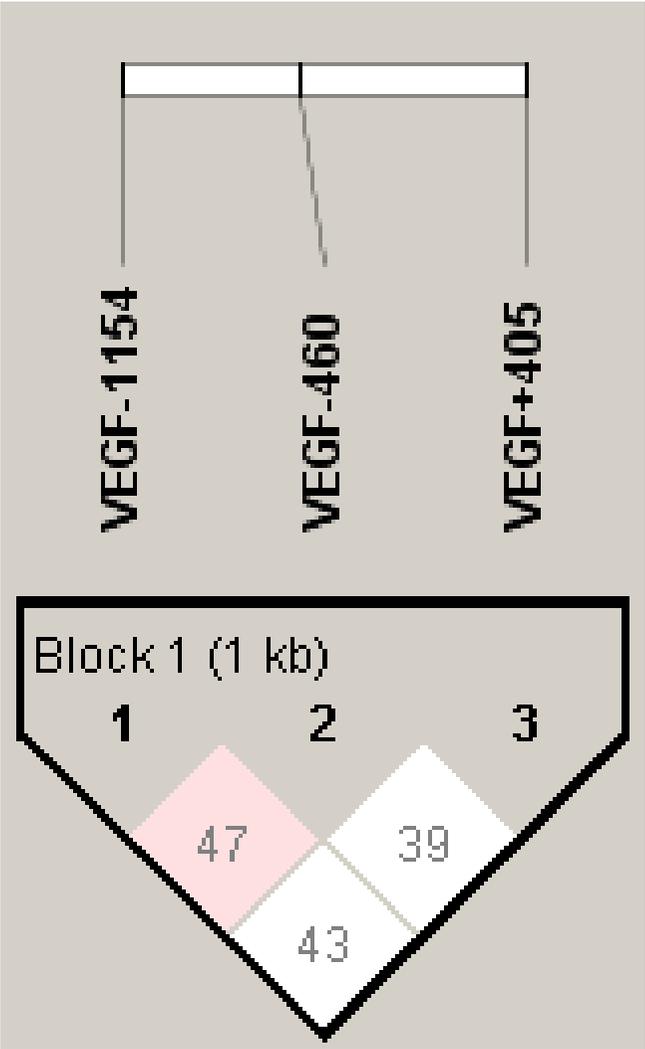


Table 9. Genotype and allele frequency for VEGF +405 G/C, -460 C/T, and -1154 G/A polymorphisms between patients with repeated implantation failure excluding endometriosis and controls.

		RIF (n=57)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
VEGF +405 G/C genotype						
Genotype	CC	14 (24.6%)	13 (13.0%)			0.181
frequency	GC	26 (45.6%)	52 (52.0%)			
	GG	17 (29.8%)	35 (35.0%)			
	CC vs GC+GG (recessive model)			2.179	0.942-5.04.	0.065
	CC +GC vs GG (dominant model)			1.267	0.629-2.553	0.508
Allele	C	54 (47.4%)	78 (39.0%)	1.408	0.885-2.240	0.149
frequency	G	60 (52.6%)	122 (61.0%)			
VEGF -460 C/T genotype						
Genotype	TT	31 (54.4%)	50 (50.0%)			0.733

frequency	CT	21 (36.8%)	43 (43.0%)			
	CC	5 (8.8%)	7 (7.0%)			
	TT vs CT+CC (recessive model)			0.861	0.463-1.601	0.636
	TT +TC vs CC (dominant model)			0.783	0.237-2.591	0.690
Allele	T	83 (72.8%)	143 (71.5%)	1.067	0.638-1.785	0.804
frequency	C	31 (27.2%)	57 (28.5%)			

VEGF -1154 G/A genotype

Genotype	AA	4 (7.0%)	1 (1.0%)			0.030
frequency	GA	25 (43.9%)	33 (33.0%)			
	GG	28 (49.1%)	66 (66.0%)			
	AA vs GA+GG (recessive model)			7.472	0.814-68.558	0.059
	AA +GA vs GG (dominant model)			2.011	1.035-3.905	0.038

Allele	A	33 (28.9%)	35 (17.5%)	1.921	1.114-3.312	0.018 [#]
frequency	G	81 (71.1%)	165 (82.5%)			

^aChi-square test; OR, odds ratio; CI, confidence interval

[#] - Statistically significant susceptible genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 10. Genotype and allele frequency for eNOS +894 G/T polymorphism between patients with repeated implantation failure and controls.

		RIF (n=59)	Control (n=100)	OR	95% CI	<i>P</i> value ^a
eNOS +894 G/T genotype						
Genotype	TT	0 (0%)	2 (2%)			0.062
frequency	GT	13 (22.0%)	10 (10.0%)			
	GG	46 (78.0%)	88 (88.0%)			
	TT vs GT+GG (recessive model)			1.020	0.992-1.049	0.530
	TT +GT vs GG (dominant model)			0.483	0.204-1.142	0.093
Allele	T	13 (11.0%)	14 (7.0%)	1.645	0.745-3.631	0.214
frequency	G	105 (89.0%)	186 (93.0%)			

^aChi-square test and Fisher exact test with monte carlo method.

- Statistically significant susceptible genotype

RIF, repeated implantation failure

Table 11. Distribution frequency of number of susceptible polymorphisms of COX-2 -765 G/C, VEGF, +405 G/C and -1154 G/A gene polymorphisms among women experiencing repeated implantation failure patients and controls.

Number of susceptible gene polymorphisms	RIF (n=59)	Control (n=100)	<i>P</i> value ^a
0	27 (45.8%)	81 (81.0%)	<0.001
1	29 (49.2%)	18 (18.0%)	
2	3 (5.0%)	1 (1.0%)	-

^aChi-square test

RIF, repeated implantation failure

고찰

본 연구는 한국 여성에서 체외수정기술에서 반복 착상 실패가 일어난 여성에서 착상에 관련된 것으로 알려진 유전자 다형성과 반복 착상 실패의 연관성을 본 첫 연구로서 의미가 있다고 할 수 있다. 이전 선행 연구에서 나온 유의하게 나온 모든 유전자를 분석하였고 한국 반복 착상 실패 환자군의 유의한 차이를 보이는 유전자 다형성을 고찰하였다. eNOS +894 G/T 유전자 다형성을 반복 착상 실패 환자에서 분석한 것은 아직 발표된 연구가 없으며 이에 의의가 있다고 할 수 있다. 반복 착상 실패 여성에서 대조군에 비해 COX-2 -765 C 대립유전자와 G/C 유전자형, VEGF +405 C/C 유전자형, VEGF -1154 A 대립유전자 및 A/A 유전자형이 높은 빈도를 보였고, PAI-1 5G/5G 유전자형은 유의하게 낮게 나타났다. p53 codon 72 tumor suppressor factor, VEGF -460, eNOS +894 G/T 유전자 다형성은 반복 착상 실패군과 대조군의 차이가 유의하게 나타나지 않았다.

p53 codon 72 tumor suppressor factor 유전자 다형성에 대한 보고에서 Iledo 등은 44명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형 (11.4%), Arg/Pro 유전자형 (47.7%), Arg/Arg 유전자형 (40.9%) 중 Pro/Pro 유전자형이 대조군에 비해 차이가 난다고 하였다 (Iledo et al., 2014). 이 연구에서의 대조군은 83명의 시험관아기기술의 남자 공여를 한 여성으로 하였으며, 대조군 83명의 유전형 빈도가 Pro/Pro 유전자형 5명 (6%),

Arg/Pro 유전자형 24명 (28.9%), Arg/Arg 유전자형 51명 (61.5%)로 나머지 3명 (3.6%)에 대한 기술이 없으며, 대조군의 출산력에 대한 기술이 되어 있지 않다. 출산력이 없는 경우 불임 등의 가능성이 있는 군이 포함되어 있을 가능성이 있으며, 기술이 되지 않은 대조군 3명의 유전자형 분포에 따라 통계적 유의성에 차이가 있을 수 있어 해석에 주의가 필요하다고 할 수 있다. 본 연구에서의 대조군은 정상 출산력이 2회 이상인 여성으로 하였고 유산 경험이 없는 여성으로 하여 선행 연구와 차이가 있다고 할 수 있다. Kay 등도 70명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형이 2회 이상 출산력이 있는 정상 대조군에 비해 많다고 하였으나 본 연구와는 다른 결과를 보이고 있다 (Kay et al., 2006). 이 연구의 대조군은 21명으로 적은 수이고 표에 기술이 21명이 아닌 20명으로 잘못 표기가 되어있으며, 유산력이 있는 여성이 대조군에 포함되어 있다. 통계분석 오류가 있으며 환자군 Arg 대립유전자와 Pro 대립유전자의 빈도가 70%, 30% 로 대조군의 81%, 19%으로 통계적 유의성이 있는 차이가 없으며 ($P=0.163$), 각각의 환자군과 대조군의 유전자형의 분포에서 차이가 없었다 (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro 47%, 46%, 7% VS 62%, 38%, 0%, $P=0.300$, Fisher's exact test with Monte Carlo method). 따라서 이에 대한 해석에 주의가 필요하다고 할 수 있다. Goodman 등은 70명의 반복 착상 실패 여성에서 Pro/Pro 유전자형이 2번 이상의 출산력이 있는 대조군 73명에 비해 유의하게 더 많다고 하였다

(Goodman et al., 2009). 이 연구에서의 반복 착상 실패군에서 23명 (35%) 정도로 추정되는 환자군에서 임신력이 있었으며, 10명 (15%)가 출산력이 있었다. 47명 정도가 임신력이 없는 사람들이었으며, 본 연구에서는 임신력이 없는 군이 59명으로 각각의 분포에서 유전자형의 차이를 보이지 않았고 (Table 3), 9명의 임신력이 있는 군을 포함한 반복 착상 실패 군을 추가로 분석하였을 때에도 각 유전자형의 차이가 없었다 (unpublished data). Goodman 등 (2009)의 연구는 임신력이 없는 사람들에 대한 분석이 따로 기재되어 있지 않아서 본 연구와 다른 점이 있다고 할 수 있다.

PAI-1 4G/5G 유전자 다형성에 관련된 연구로서, Goodman 등은 PAI-1 4G/4G 유전자형이 반복 착상 실패군에서 대조군에 비해 유의하게 많다고 하였고, Coulam 등도 PAI-1 4G/4G 유전자형이 반복 착상 실패군에서 대조군에 비해 많다고 하였다 (Coulam et al., 2006; Goodman et al., 2009;). 본 연구에서는 PAI-1 4G/4G 유전자형은 5G/5G 유전자형에 비해 반복 착상 실패군에서 높게 나왔으나 통계적 유의성은 없었고, recessive model ($P=0.023$)에서 5G/5G 유전자형의 빈도가 대조군과 차이가 있으며 이는 2개의 외국의 선행 연구의 결과와 비슷한 소견을 보이고 있다 (Coulam et al., 2006; Goodman et al., 2009). 위 결과로 볼 때 PAI-1 5G/5G 유전자형이 보호유전자형의 역할을 기대할 수 있다고 볼 수 있다.

COX-2 -765G/C 유전자 다형성은 Sp1 binding site에 위치하며 C

대립유전자의 promoter 활성도가 G 대립유전자에 비해 감소된다고 알려져 있다 (Papafili et al., 2002; Kristinsson et al., 2009). Salazar 등은 COX-2 -765 G/C 유전자 다형성에서 유전자형 분포가 유의하게 반복 착상 실패군과 대조군에서 차이가 나며 특히 C 대립유전자 빈도가 반복 착상 실패군에서 높다고 하였다 (OR 2.14, 95% CI 1.35-3.39) (Salazar et al., 2010). 본 연구에서는 이와 같은 결과를 보이고 있으며 (OR 5.072, 95% CI 1.926-13.358), G/C 유전자형이 반복 착상 실패군에서 높은 빈도를 보였다 (OR 5.829, 95% CI 2.133-15.930). 이는 COX-2 -765 G/C 유전자 다형성 C 대립유전자가 반복 착상 실패를 일으킬 수 있는 대립유전자일 가능성을 보여준다고 할 수 있다.

본 연구에서는 C/C 유전자형이 반복 착상 실패군과 대조군에서 모두 보이지 않았다. 일본과 중국의 Hapmap data에서도 C 대립유전자 빈도는 각각 5.7%, 6.7% 였으며 C/C 유전자형이 나오지 않았고 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=20417), 일본과 중국의 다른 연구에서의 대조군에서도 같은 결과를 보이고 있다 (Hanajima et al., 2001; Udeda et al., 2008; Furukada et al., 2009; Zheng et al., 2011). 이 연구들에서의 C 대립유전자 빈도는 2.3%-4.7%로 대조군은 148에서 1052 명을 대상으로 하였다. COX-2 -765 G/C 유전자 다형성에 관련하여 우리나라에서 시행된 선행 연구는 2개가 있으며 Shin 등은 100명의 대조군과 100명의 위암 환자군에서 C/C 유전자형이 나오지

않았음을 보고하였고, C 대립 유전자 빈도는 위암 환자군 9%, 대조군 10% 였다 (Shin et al., 2012). 자궁내막증 환자 268명과 대조군 242명의 대상으로 한 Kim 등의 연구에서 C/C 유전자형의 빈도는 자궁내막증 환자군 0.4%, 대조군 3.3%를 보고하였고 C/C 대립 유전자 빈도는 자궁내막증 환자군 1.9%, 대조군 15.9% 로 상이한 차이를 보였다 (Kim et al., 2012). 본 연구에서는 대조군의 C 대립유전자 빈도가 3% 로 일본과 중국의 타 연구들의 결과와 비슷하였다. 김 등의 연구는 복강경 검사에서 자궁내막증이 아닌 질환, 양성 난소 종양, 골반염, 자궁경부 상피내암, 자궁외임신, 부난관, 부난소, 골반통 등이 있는 군을 대조군으로 하였으며 이 중 자궁외임신이 13명이 포함되어 있고, C 대립유전자 빈도가 15.9%는 아시아의 연구에서 상대적으로 높은 편으로 해석에 주의를 요한다고 할 수 있다. 본 연구에서 포함된 2명의 자궁내막증 병력이 있는 반복 착상 실패군 환자는 유전자형이 모두 G/G 유전자형으로 이를 제외한 분석에서도 C 대립유전자 및 G/C 유전자형의 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.001$).

VEGF는 혈관생성에 중요한 역할을 하며 VEGF 유전자는 염색체 6p21.3에 위치하고 5'-untranslated region 에 있는 VEGF +405 G/C 유전자 다형성과 -460 C/T 유전자 다형성, promoter region에 있는 VEGF -1154 G/A 유전자 다형성 이외에도 여러 가지가 알려져 있다. VEGF +405 G/C 유전자 다형성에서 C/C 유전자형이 VEGF 생산이 적게

되며 dose dependent하다고 알려져 있다 (Watson et al., 2000). 또한 자궁내막증 (Kim et al., 2005)과 preeclampsia 등과의 연관성이 보고되어 있다. Boudjenah 등은 반복 착상 실패 군에서 VEGF +405 C/G 유전자 다형성에서 C/C 유전자형이 유의하게 높다고 하였고, 본 연구에서도 recessive model에서 C/C 유전자형이 차이를 보였다 (Boudjenah et al., 2012). 이 연구에서의 대조군은 체외수정시술로 10개 미만의 배아이식 후 출산한 여성들로서 본 연구와는 차이가 있으나 비슷한 결과를 보였다. Steven 등은 VEGF +405G/-460C haplotype이 VEGF +405C/-460T haplotype에 비해서 promoter activity 및 VEGF 발현이 증가 되어있다고 하였으나 (Steven et al., 2003), 본 연구에서는 C/G haplotype은 유의한 차이가 없었고, C/T haplotype이 반복 착상 실패 환자군에서 대조군에 비해 적게 나타났다 (Table 6). VEGF -1154 G/A 유전자 다형성의 예상되는 결합 부위가 myeloid zinc finger-1 (MZF1) 이며 이 MZF1 binding site가 -1154A의 경우 Pax2 or Sp1 binding site으로 치환된다고 예측되며 VEGF의 promoter 활성도와 발현의 변화가 있을 수 있다고 알려져 있다 (Jeon et al., 2011; Kim and Hong, 2017). VEGF 1154 G/A 유전자 다형성은 습관성 유산 (recurrent pregnancy loss)에서 잘 알려져 있으며 (Lee et al., 2010), VEGF -1154 G/A 유전자 다형성의 경우 A/A 유전자형이 low expression 유전자형이어서 VEGF 생산이 적기 때문에 영양막 침입 (cytotrophoblast invasion)이 적어져서 착상 실패로

이어진다고 알려져 있다 (Goodman et al., 2009). Goodman 등은 VEGF -1154 G/A 유전자 다형성에서 반복 착상 실패군에서 A/A 유전자형이 유의하게 높다고 하였고 (Goodman et al., 2009), 본 연구에서도 이와 같이 반복 착상 실패 환자 군에서 A 대립유전자 (OR 1.908 95% CI 1.112-3.275) 및 A/A 유전자형 (dominant model, OR 2.008, 95% CI 1.041-3.874)의 빈도가 높게 나타났다. 또한 haplotype analysis에서 +405/-460/-1154 haplotype 중 CTG, GTG, GCA, GCC haplotype이 환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보였다. 이는 VEGF -1154 G/A 유전자 다형성이 착상에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 뒷받침 한다고 볼 수 있다.

VEGF 유전자 다형성과 자궁내막증의 연관 개연성 (Kim et al., 2005)을 고려하여, 본 연구에 포함된 2명의 자궁내막증 병력 반복 착상 실패 환자를 제외한 추가 분석을 시행하였다 (Table 9). VEGF +405 G/C 유전자 다형성 분석에서 보였던 C/C 유전자형의 recessive model에서 보였던 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Table 9). 자궁내막증에서 VEGF C/C 유전자형이 높게 나타나는 것은 한국 자궁내막증 환자에서 보고가 되어있으며 (Kim et al., 2005), 본 연구에 포함되었던 반복 착상 실패 환자 2명의 해당 유전자형이 C/C 유전자형과 G/C 유전자형이었다. 실제 이러한 유전자형이 임신에 영향을 주는 지에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없다. Power analysis시 power는 0.74로 자궁내막증 병력이 있었던

2명이 포함된 경우 power는 0.80으로 차이가 있었다. 이는 환자의 숫자가 적은 영향으로 통계적인 유의성이 감소되었을 가능성이 있어 향후 추가적인 대규모 연구를 통한 분석이 필요하다고 사료된다. VEGF -460 C/T 유전자 다형성은 자궁내막증 여부와 관계없이, 반복 착상 실패군과 대조군 간 차이가 없게 나타났다 (Table 8, 9). VEGF -1154 G/A 유전자 다형성은 자궁내막증 병력이 있는 2명을 제외하고 한 분석에서 유의하게 유전자형의 차이가 있었다 (P=0.030). 자궁내막증이 있었던 반복 착상 실패 환자의 유전자형은 G/G, G/A 유전자형이었다. A/A 유전자형은 dominant model에서 유의하게 높게 나타났다 (OR 2.011 95% CI 1.035-3.905). A 대립유전자 빈도도 반복 착상 실패군에서 28.8%를 보여 대조군 17.5%에 비해 유의하게 높았다 (OR 1.921, 95% CI 1.114-3.312). Liu 등은 중국 자궁내막증 여성에서 VEGF -1154 G/A 유전자 다형성의 차이가 있으며 A 대립유전자 빈도가 자궁내막증 환자군에서 16.1%로 대조군 22.2%보다 낮다고 하였다 (Liu et al., 2009). 자궁내막증 병력을 포함한 분석과 자궁내막증을 제외한 분석에서 A/A 유전자형과 A 대립유전자 빈도의 차이가 본 연구에서는 자궁내막증 여부와 관계없이 유의하게 있었다.

eNOS +894 G/T 유전자 다형성은 Karatas 등의 연구에서 원인 불명의 불임 여성에서 G/G 유전자형 7.3%, G/T 유전자형 78.0% T/T 유전자형 6%으로 대조군의 37.5%, 55%, 7.5%와 유의한 차이를 보고하였으나

(Karatas et al., 2014), 본 연구에서는 반복 착상 실패군과 대조군의 통계적 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 10). 한국에서 타 질환에서 연구된 eNOS + 894 G/T 유전자 다형성 연구를 보면 심혈관 질환 (Kim et al., 2007), 습관성 유산 (Shin et al., 2010), 조기폐경 (Rah et al., 2013), 대장암 (Song et al., 2013) 등의 연구에서 보인 정상 대조군의 T/T 유전자형의 빈도가 0-0.4% 를 보이고 있고 이는 본 연구에서와 비슷한 소견을 보이고 있다. 본 연구에서는 G/T 유전자형이 22%로 대조군 10%에 비해 높았고, G/T 유전자형이 불임 여성에서 높은 것을 보이는 것은 Karatas의 연구와 비슷한 결과였으나, 통계적인 유의성이 없었다. Dominant model에서 반복 착상 실패군 22.0% 대조군 12.0%로 차이를 보였는데 통계적 의미를 보이지 않았다. 이는 적은 수의 환자군 때문에 power가 낮아서 생긴 것으로 사료되며 정확한 분석을 위해 향후 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

PAI-1 5G/5G 유전자형을 보호 유전자형으로 보고 이를 제외한 COX-2 -765 G/C 유전자형, VEGF + 405 C/C 유전자형, -1154 A/A 유전자형을 민감한 유전자형이라고 볼 때 1개 이상의 민감한 유전자형을 가진 빈도는 반복 착상 실패군에서 유의하게 높게 나타났으며 전체의 50% 이상을 차지하고 있었다 (Table 11). Goodman 등은 p53 tumor suppressor factor codon Pro72, PAI-1 4G/4G, VEGF -1154 A/A 유전자형들이 반복 착상 실패 환자들에서 1개 이상을 가진 경우가 유의하게 높다고 하였다

(Goodman et al., 2005). 본 연구에서는 이외의 기존의 차이가 있다고 알려진 모든 것을 포함하여 분석하였고, 한국 여성에서 반복 착상 실패군의 경우 이러한 민감한 유전자형이 미치는 영향을 고려해볼 수 있는 근거로서 의미가 있다고 할 수 있다.

본 연구의 제한점으로는 p53 codon 72 tumor suppressor factor 유전자 다형성 분석에서 Arg/Arg 유전자형이 반복 착상 실패군 37.3%, 대조군 46.0%로 차이가 보였으나 통계적인 차이는 없었으며 power analysis 0.373으로 낮은 power를 보였고, eNOS +894 G/T 유전자 다형성에서도 G/T 유전자형이 반복 착상 실패군 22.0%, 대조군 10.0%로 차이가 있었으나 통계적 의미는 나오지 않았으며, 0.489의 power를 보였다. 이는 비교적 적은 환자군 숫자로 인한 것으로 사료되며 향후 추가적인 반복 착상 실패 환자군의 동원을 통해 분석이 필요하다고 할 수 있다.

본 연구에서 한국 여성에서 체외수정에서 반복 착상 실패가 있는 경우 COX-2 -765 C 대립유전자와 G/C 유전자형, VEGF +405 C/C 유전자형, -1154 A 대립유전자와 A/A 유전자형, PAI-1 5G/5G 유전자형이 대조군과 유의한 차이를 보였고, 외국의 선행연구와 비슷한 결과를 보였다. p53 tumor suppressor 유전자 다형성과 eNOS +894 유전자 다형성은 본 연구에서는 체외수정시술 시 반복 착상 실패와 관련성이 보이지 않았으나 추가적인 대규모 연구를 통해 이를 재분석하는 것이 필요하다고 사료된다.

결론

COX-2 -465 G/C 유전자 다형성, PAI-1 4G/5G 유전자 다형성과 VEGF +405 G/C, -1154 G/A 유전자 다형성이 한국 여성에서 체외수정시술 시 반복 착상 실패와 연관되어 있을 가능성이 있다. p53 codon 72 tumor suppressor factor, eNOS +894G/T 유전자 다형성은 한국 반복착상 실패 여성에서 대조군과 차이를 보이지 않았으나 추가적인 연구를 통해 이에 대한 재분석이 필요하다고 사료된다.

참고문헌

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):593-615.

Ariel I, Hochberg A, Shochina M. Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in early gestation and in trophoblastic disease. *J Clin Pathol* 1998;51(6):427-31.

Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertil Steril* 2006;85(3):559-63.

Boudjenah R, Molina-Gomes D, Wainer R, de Mazancourt P, Selva J, Vialard F. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and its relationship with recurrent implantation failure in women in an IVF programme with ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(12):1415-20.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-9.

Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996;16(2):107-22.

Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 3:96-111.

Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure *Reprod Biomed Online*. 2006;12(3):322-7.

Coulam CB, Jeyendran RS, Roussev R. Association of progesterone receptor polymorphisms with recurrent implantation failure after in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2008;25(4):119-22.

Dentillo DB, Souza FR, Meola J, Vieira GS, Yazlle ME, Goulart LR, Martelli L. No evidence of association of MUC-1 genetic polymorphism with embryo implantation failure. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(6):793-7.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-42.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(66):669-76.

Furukado S, Sakaguchi M, Yamagami H, Yagita Y, Hoshi T, Abe Y, Hougaku H, Hori M, Sakoda S, Kitagawa K. Cyclo-oxygenase-2

-765G > C promoter variants are associated with lower carotid plaque echogenicity in Japanese. *Cerebrovasc Dis* 2009;27(1):91-8.

Gardner D, Schoolcraft W. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D, eds. *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999*. Carnforth, UK: Parthenon Publishing, 1999: 378-88.

Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB. P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2009;92(2):494-8.

Goulart LR, Vieira GS, Martelli L, Inácio J, Goulart IM, Franco JG Jr. Is MUC1 polymorphism associated with female infertility? *Reprod Biomed Online* 2004;8(4):477-82.

Gris JC, Ripart-Neveu S, Maugard C, Tailland ML, Brun S, Courtieu C, Biron C, Hoffet M, Hédon B, Marès P. Respective

evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* 1997;77(6):1096-103.

Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Saito T, Inoue M, Hirai T, Kato T, Ozeki J, Tajima K. Genotype Frequencies of Cyclooxygenase 2 (COX2) Rare Polymorphisms for Japanese with and without Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2001;2(1):57-62.

Huang J, Sabater-Lleal M, Asselbergs FW, Tregouet D, Shin SY, Ding J, Baumert J, Oudot-Mellakh T, Folkersen L, Johnson AD, Smith NL, Williams SM, Ikram MA, Kleber ME, Becker DM, Truong V, Mychaleckyj JC, Tang W, Yang Q, Sennblad B, Moore JH, Williams FM, Dehghan A, Silbernagel G, Schrijvers EM, Smith S, Karakas M, Tofler GH, Silveira A, Navis GJ, Lohman K, Chen MH, Peters A, Goel A, Hopewell JC, Chambers JC, Saleheen D, Lundmark P, Psaty BM, Strawbridge RJ, Boehm BO, Carter AM,

Meisinger C, Peden JF, Bis JC, McKnight B, Öhrvik J, Taylor K, Franzosi MG, Seedorf U, Collins R, Franco-Cereceda A, Syvänen AC, Goodall AH, Yanek LR, Cushman M, Müller-Nurasyid M, Folsom AR, Basu S, Matijevic N, van Gilst WH, Kooner JS, Hofman A, Danesh J, Clarke R, Meigs JB; DIAGRAM Consortium, Kathiresan S, Reilly MP; CARDIoGRAM Consortium, Klopp N, Harris TB, Winkelmann BR, Grant PJ, Hillege HL, Watkins H; C4D Consortium, Spector TD, Becker LC, Tracy RP, März W, Uitterlinden AG, Eriksson P, Cambien F; CARDIOGENICS Consortium, Morange PE, Koenig W, Soranzo N, van der Harst P, Liu Y, O'Donnell CJ, Hamsten A. Genome-wide association study for circulating levels of PAI-1 provides novel insights into its regulation. *Blood* 2012;120(24):4873-81.

Jeon YJ, Kim JH, Rah H, Kim SY, Yoon TK, Choi DH, Cha SH, Shim SH, Kim NK. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in spontaneously aborted fetuses. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(6):544-53.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(24):9761-6.

Karatas A, Eroz R, Bahadır A, Keskin F, Ozlu T, Ozyalvaçlı ME. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (promoter -786T/C, exon 894 G/T and intron G10T) in unexplained female infertility. *Gynecol Obstet Invest* 2014;77(2):89-93.

Kathiresan S, Gabriel SB, Yang Q, Lochner AL, Larson MG, Levy D, Tofler GH, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ. Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels. *Circulation* 2005;112(12):1728-35.

Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB. p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2006;13(4):492-6.

Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 2007;134(5):635-43.

Kim HY, Cho S, Choi YS, Yang HI, Lee KE, Seo SK, Lee BS. Cyclooxygenase-2 (COX -2) gene-765G/C polymorphism and advanced-stage endometriosis in Korean women. *Am J Reprod Immunol* 2012;68(3):238-43.

Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ, Kim S, Yang DH, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2007;119(5):579-85

Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20(10):2904-8.

Kim YR, Hong SH. Promoter polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene are associated with metabolic syndrome susceptibility in Koreans. *Biomed Rep* 2017;6(5):555-560.

Koscinski I, Viville S, Porchet N, Bernigaud A, Escande F, Defosse A, Buisine MP. MUC4 gene polymorphism and expression in women with implantation failure. *Hum Reprod* 2006;21(9):2238-45.

Kristinsson JO, van Westerveld P, te Morsche RH, Roelofs HM, Wobbes T, Witteman BJ, Tan AC, van Oijen MG, Jansen JB, Peters WH. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and the risk of esophageal adeno- or squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009;15(28):3493-7.

Krüssel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simón C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110 Suppl 1:S2-9.

Jang MJ, Jeon YJ, Kim JW, Chong SY, Hong SP, Oh D, Cho YK, Chung KW, Kim NK. Association of eNOS polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with colorectal cancer susceptibility in the Korean population. *Gene* 2013;512(2):275-81.

Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 2010;93(4):1244-7.

Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* 1999;13(12):1561-74.

Liu Q, Li Y, Zhao J, Sun DL, Duan YN, Wang N, Zhou RM, Kang S. Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. *Hum Reprod* 2009;24(10):2660-6.

Lledo B, Turienzo A, Ortiz JA, Morales R, Ten J, Llácer J, Bernabeu R. Negative effect of P72 polymorphism on p53 gene in IVF outcome in patients with repeated implantation failure and pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2014;31(2):169-72.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43(2):109-42.

Najafi T, Ghaffari Novin M, Pakravesh J, Foghi K, Fadayi F, Rahimi G. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in endometrial tissue of women with unexplained infertility. *Iran J Reprod Med* 2012;10(2):121-6.

Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1631-6.

Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004;108(2):196-9.

Psychoyos A, Nikas G, Gravanis A. The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 2:30-42.

Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod* 1999;5(5):467-75.

Rah H, Jeon YJ, Lee WS, Jung YW, Choi DH, Kwon H, Kim JH, Shin JE, Kim NK. Association of nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) with primary ovarian insufficiency in Korean women. *Maturitas* 2013;74(2):160-5.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of

tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14(1):34-44.

RoyChoudhury S, Singh A, Gupta NJ, Srivastava S, Joshi MV, Chakravarty B, Chaudhury K. Repeated implantation failure versus repeated implantation success: discrimination at a metabolomic level. *Hum Reprod* 2016;31(6):1265-74.

Salazar LA, Inostroza M, Jara C, Vega F, García R, Ciuffardi I, Guzmán N. Association of -765G>C polymorphism of the COX-2 gene with recurrent embryo implantation failure in Southern Chilean women. *Clin Chim Acta* 2010;411(21-22):1822-4.

Sengupta J, Dhawan L, Lalitkumar PG, Ghosh D. Nitric oxide in blastocyst implantation in the rhesus monkey. *Reproduction* 2005;130(3):321-32.

Shah BH, Catt KJ. Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(9):397-9.

Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, Shim SH, Choi DH, Kim NK. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152(1):64-7.

Shin WG, Kim HJ, Cho SJ, Kim HS, Kim KH, Jang MK, Lee JH, Kim HY. The COX-2-1195AA Genotype Is Associated with Diffuse-Type Gastric Cancer in Korea. *Gut Liver* 2012;6(3):321-7.

Song H, Lim H, Paria BC, Matsumoto H, Swift LL, Morrow J, Bonventre JV, Dey SK. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002;129(12):2879-89.

Steck T, Giess R, Suetterlin MW, Bolland M, Wiest S, Poehls UG, Dietl J. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of

implantation after IVF and embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;112(1):69-73.

Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003;63(4):812-6.

Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17(6):803-12.

Ueda N, Maehara Y, Tajima O, Tabata S, Wakabayashi K, Kono S. Genetic polymorphisms of cyclooxygenase-2 and colorectal adenoma risk: the Self Defense Forces Health Study. *Cancer Sci* 2008;99(3):576-81.

Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor

(VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12(8):1232-5.

Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005;435(7038):104-8.

Yoon J, Yoon HJ, Juhn KM, Ko JK, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Application of two different synthetic sequential media for the human IVF-ET program: a prospective, randomized, and comparative study. *Clin Exp Reprod Med* 2011;38(4):186-92.

Zheng J, Chen S, Jiang L, You Y, Wu D, Zhou Y. Functional genetic variations of cyclooxygenase-2 and susceptibility to acute myeloid leukemia in a Chinese population. *Eur J Haematol* 2011;87(6):486-93.