

임신 중 고혈압 질환을 가진 한국 여성에서 Factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 G20210A 변이 빈도

동국대학교 의과대학 산부인과학교실*, 함춘여성클리닉†, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실‡

박현수* · 김건우† · 박찬욱‡ · 박중신‡ · 전종관‡ · 신희철‡

Genotype distribution of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Korean women with hypertensive diseases in pregnancy

Hyun Soo Park, MD*, Kun Woo Kim, MD†, Chan-Wook Park, MD‡,
Joong Shin Park, MD‡, Jong Kwan Jun, MD‡, Hee Chul Syn, MD‡

The Department of Obstetrics and Gynecology, Dongguk University College of Medicine, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, Korea, Hamchoon Women's Clinic†, Seoul, Korea, Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University College of Medicine‡, Seoul, Korea*

Objectives: To evaluate genotype distribution of prothrombin gene G20210A mutation and factor V Leiden mutation in Korean women with hypertensive diseases in pregnancy.

Methods: One hundred and seventy-five pregnant women with hypertensive diseases in pregnancies were included in this study during the period of October 1998 and July 2001. Review of the medical records was done retrospectively. Venous blood was collected and DNA was extracted. Genotyping for factor V Leiden mutation and prothrombin gene G20210A mutation was done by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods.

Results: All subjects were homozygous for wild type allele. Factor V Leiden mutation and prothrombin gene G20210A mutation were not found in any of the study population.

Conclusions: Factor V Leiden mutation and prothrombin gene G20210A mutation are unlikely to be associated with the hypertensive diseases in Korean women.

Key words: Hypertensive diseases, Pregnancy, Factor V Leiden mutation, Prothrombin gene G20210A mutation

임신 중 고혈압 질환은 임신 중 혈압이 상승하는 질환을 총칭하는 것으로 그 중 대표적인 자간전증은 임신 이전에 정상 혈압을 유지하였던 임신부에서 임신 20주 이후에 발생하는, 단백뇨를 동반한 수축기 혈압 140

mmHg 이상 혹은 이완기 혈압 90 mmHg 이상의 혈압 상승이 있을 때 진단하며, 전체 임신의 약 6~8%에서 발병하고 산모와 신생아 유병률과 사망률의 주요한 원인이 다.¹ 자간전증의 원인은 잘 밝혀지지 않은 상태로 비정상적 영양세포 침투, 나선동맥의 태반침투 장애, 면역학적 원인, 혈관내피세포의 활성화, 영양학적 인자, 유전적 인자 등이 원인으로 제시되었다.² 유전적 원인을 밝혀내려는 노력으로 많은 감수성 유전자들이 발견되었고 그

접수일 : 2009. 1. 23.

주관책임자 : 전종관

E-mail : jhs0927@snu.ac.kr

* 이 연구는 서울대학교병원 일반연구비 04-2002-033-0의 지원으로 이루어진 것임.

중 유전성 혈전성향증 (hereditary thrombophilia)에 대해 많은 연구가 진행되었다.

혈전성향증은 혈전색전증의 선형인자로 알려져 있으며³ 선천적 질병으로 안티트롬빈 III 결핍, C 단백 결핍, S 단백 결핍, 고호모시스테인혈증 등이 있으며 후천적 원인으로 항인지질항체증후군이 있다. 선천적 원인에 의한 혈전성향증으로 알려진 단일염기다형성으로는 factor V 유전자의 G1691A 변이,⁴ MTHFR 유전자의 C677T 다형성,³ 프로트롬빈 유전자의 G20210A 변이⁵ 등으로 이들 단일염기다형성은 주로 정맥의 혈전증을 일으키는 응고항진증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Dekker 등이 1995년 중증, 조발형 자간전증과 혈전성 질환과의 관련성을 제시한 후 많은 연구자들이 불량한 임신결과를 나타내는 여성에서 선천성 혈전성향증 (factor V Leiden, MTHFR, 프로트롬빈 유전자)의 단일염기다형성의 빈도가 증가되어 있음을 보고하였다.^{6,9} 하지만 factor V Leiden G1691A 변이, 프로트롬빈 G20210A 변이, MTHFR C677T 단일염기다형성과 자간전증의 발생과 관련이 없다는 연구도 보고되어 이들 단일염기다형성이 실제로 감수성 유전자 (susceptible gene)로서 역할을 하는지에 대하여 의문을 던지고 있다.¹⁰⁻¹³

이들 혈전성 경향과 관련된 단일염기다형성의 빈도가 인종에 따라 다르다는 것이 이전 연구에서 자간전증과 관계를 확인한 연구에서 다양한 결과를 보인 원인 중 하나라고 생각된다. 따라서 우리는 자간전증을 포함한 임신 중 고혈압 질환을 가진 한국인 임신부에서 factor V Leiden G1691A 유전자 변이와 프로트롬빈 유전자 G20210A 유전자 변이의 빈도를 조사하여 이 유전자들이 한국인 임신부에서의 자간전증을 포함한 임신 중 고혈압 질환의 발생에 미치는 영향을 확인하고자 연구를 시작하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

1998년 10월부터 2001년 7월까지 임신 중 발견된 고혈압으로 입원한 산모들 중 175명을 대상으로 하였다. 임

신 중 고혈압 질환의 진단은 다음과 같은 기준을 적용하였다.¹ 1) 임신성 고혈압 (gestational hypertension): 임신 20 주 이후에 처음 발견한 수축기 혈압 140 mmHg/이완기 혈압 90 mmHg 이상을 보이며 단백뇨가 동반되지 않는 경우. 2) 자간전증 (preeclampsia): 1)의 기준에 더하여 단백뇨를 보이는 경우로 단백뇨는 24시간 요단백 300 mg 이상으로 정의하였다. 3) 만성고혈압 (chronic hypertension): 임신 전 혹은 임신 20주 이전에 진단된 수축기 혈압 140 mmHg/이완기 혈압 90 mmHg 이상의 고혈압으로 임신 영양세포종양 (gestational trophoblastic disease)에 의하지 않은 경우로 하였다. 4) 만성 고혈압에 합병된 자간전증 (superimposed preeclampsia on chronic hypertension): 3)의 경우로 임신 20주 이후에 처음 24시간 요단백 300 mg 이상의 단백뇨를 동반한 경우로 정의하였다. 산모의 의무기록을 통하여 대상군의 인구학적 정보와 병력, 과거력, 혈압과 각종 검사 결과, 산과적 결과를 수집하였다.

2. 검체의 채취 및 처리, DNA의 추출

산모의 혈액을 입원 시 정맥으로부터 채취하였고 혈액응고를 막기 위하여 EDTA가 코팅된 튜브에 채취한 뒤 원심분리 후 침전물을 분리하여 DNA를 채취하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 실험 시 검체를 상온에서 녹인 후 Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)을 사용하여 제조자의 protocol에 따라 DNA를 추출하였다.

3. 중합효소 연쇄반응

Factor V Leiden mutation (G1691A)을 조사하기 위하여 활성화된 C 단백 (activated protein C)이 쪼개지는 부분에 해당하는 147 bp의 염기서열에 대해 기존에 발표된 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다.¹⁴ 각각의 실험에 사용된 길잡이의 염기서열은 Table 1과 같다. 중합효소연쇄반응의 산물을 제한효소 *Mnl* I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)으로 절단하여 대립인자가 1691G 일 경우 122 bp, 22 bp의 절편을, 1691A일 경우 85 bp, 37 bp,

25 bp의 절편을 확인할 수 있다. 프로트롬빈 G20210A 염기다형성의 경우 역시 기존에 발표된 방법을 사용하여 유전자를 증폭시킨 후 *Hind* III를 사용하여 절단하였다.¹⁵ 앞길잡이는 돌연변이일 경우 새로운 *Hind* III 효소의 절단위치를 만들기 위해 G→A (별표) 불일치를 갖도록 하였다. PCR 산물의 크기는 506 bp이며 프로트롬빈 유전자의 대립인자가 20210G일 경우 406 bp, 100 bp의 절편이 확인되며 20210A변이형의 경우 383 bp, 100 bp, 23 bp의 절편이 확인된다.

4. 통계적 분석

연속변수의 군 간 비교에는 일원배치 분산분석 (ANOVA)을 사용하였으며 비율의 비교에는 카이제곱검정 (chi-square)을 사용하였다. 통계적 분석에는 SPSS ver. 12.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

연구 대상은 총 175명으로 임신성 고혈압이 44명, 자간전증이 108명, 만성 고혈압이 10명, 만성 고혈압에 합병된 자간전증이 13명으로 총 175명으로 이루어져 있으며 각 군의 임상적 특성은 Table 2에 나타나 있다. 임신부의 나이는 만성고혈압에 합병된 자간전증군에서 다른 군들과 의미 있는 차이를 보였다 (Tukey 사후분석, data not shown). 미분만부의 비율에서는 각 군에서 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 분만 직전의 수축기 혈압은 자간전증이 합병된 경우에서 더 높게 나타났으며 신생아 체중의 분포도 비슷한 양상을 나타내었다.

Factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 G20210A 변이에 대한 PCR-RFLP결과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. 대상군 모두에서 Fig. 1에서 보이는 것과 같이 제한효소 절편이 122 bp와 25 bp로 나타나 1691G 대립형질을 알 수 있었다. 1691A 대립형질은 동형접합자 (homozygote), 이형접합자 (heterozygote) 모두 나타나지 않았다. 프로트롬빈 G20210A 변이에 대한 실험에서도 비슷한 결과를 나타

Table 1. Primer sequences for each single nucleotide polymorphism

Primer sequences			
Factor V Leiden G1691A	Forward	5'	-CATGAGAGACATCGCCTCTG-3'
	Reverse	5'	-GACCTAACATGTTCTAGCCAGAAG-3'
Prothrombin G20210A	Forward	5'	-ATAGCACTGGGAGCATTGAA*GC -3'
	Reverse	5'	-GCACAGACGGCTGTTCTCTT-3'

Table 2. Characteristics of the study subjects

	Gestational hypertension	Preeclampsia	Chronic hypertension	Superimposed preeclampsia	<i>p</i>
n	44	108	10	13	
Age (yr)	30.1±4.1	31.2±4.1	33.1±5.0	37.1±5.4	<0.01
Nullipara (%)	27 (61.4)	73 (68.2)	8 (80.0)	4 (30.8)	NS
GAD	38.3±5.2	36.3±3.6	39.0±1.7	34.3±3.3	<0.01
SBP (mmHg)	140±14	155±18	146±11	164±24	<0.01
Severity (%)	4 (9.1)	82 (76.6)	2 (20.0)	11 (84.6)	<0.01
Birth weight (gm)	3,085±650	2,446±982	3,173±619	2,252±1,136	<0.01

GAD: gestational age at delivery, SBP: systolic blood pressure, NS: not significant.

Comparison was made with ANOVA for age, SBP, birth weight and with chi-square test for nullipara, severity.

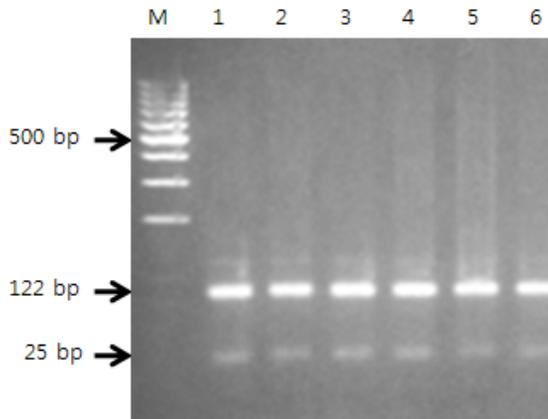


Fig. 1. PCR-RFLP analysis for Factor V Leiden G1691A polymorphism
Examples of a pattern of the 147 bp products digested with *Mnl* I. G1691 allele showed restriction fragments of 122 and 25 bps. There was no A1691 allele that will show 85, 37 and 25 bps restriction fragments. M represents a 100 bp ladder size marker.

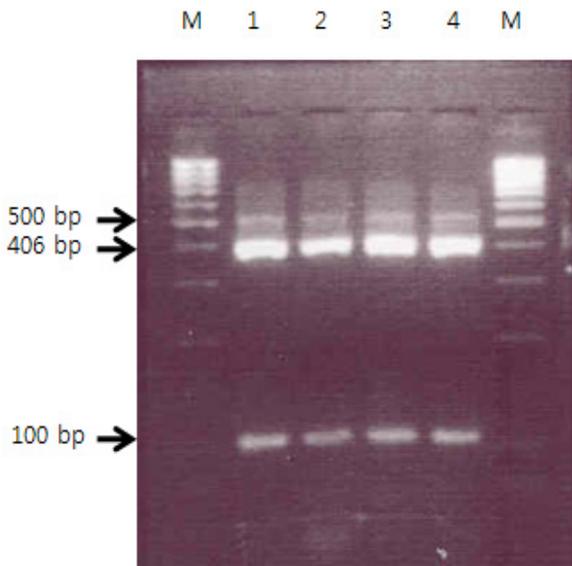


Fig. 2. PCR-RFLP analysis for prothrombin G20210A polymorphism
Examples of a pattern of the 506 bp products digested with *Hind* III. G20210 allele showed restriction fragments of 406 and 100 bps. There was no A1691 allele that will show 383, 100 and 23 bps restriction fragments. M represents a 100 bp ladder size marker.

내었는데 제한효소 절편이 406 bp, 100 bp 두 가지 띠로만 보여서 대상군 모두에서 20210G 대립형질을 나타냄

을 알 수 있었다 (Fig. 2).

고 찰

본 연구는 자간전증을 동반한 여성에서 factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 G20210A 변이가 나타나지 않았다는 것을 보여주고 있다. 각 군에 따라 대상군의 수가 적은 경우도 있지만 이러한 결과는 자간전증 뿐만 아니라 임신성 고혈압, 만성 고혈압, 만성 고혈압에 중첩된 자간전증을 가진 산모 모두에서 나타나는 것을 알 수 있다.

국내의 타 연구 결과도 이와 비슷한데, 자간전증을 가진 여성 113명을 대상으로 한 지 등의 결과에서도 실험군, 대조군 모두에서 factor V Leiden 변이는 보이지 않았고 임신성 고혈압을 가진 여성 121명을 대상으로 한 연구에서도 역시 실험군, 대조군 모두에서 factor V Leiden 변이는 보이지 않았다.^{16,17} 이는 국내에서 시행된 대부분의 연구에서 비슷한데 심부정맥혈전증, 심혈관질환, 중증 자간전증, 정맥 궤양, 허혈성 뇌혈관질환 등의 연구에서 factor V Leiden 변이는 실험군과 대조군 모두에서 한 예도 발견되지 않았다.¹⁸⁻²² 국내에서 발표된 프로트롬빈 G20210A 변이에 대한 연구는 상대적으로 많지 않으나 김 등과 송 등은 프로트롬빈 G20210A 변이를 발견하지 못하였다고 보고하였다.^{18,23} 일본과 중국에서도 비슷한 결과를 보이고 있다.^{24,25}

단일염기다형성의 인종적인 차이는 이미 많은 연구에서 보고되었으며 인종에 따른 질병의 감수성의 정도를 말해준다고 할 수 있다. factor V Leiden 대립형질은 주로 유럽계 인종에서 나타나는 것으로 알려져 있으며 미국 다인종을 대상으로 한 연구에서는 히스패닉에서 상대적으로 높은 빈도를 보였다.²⁶ 이러한 차이를 고려하여 factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 G20210A 변이가 임신 중 고혈압 질환의 발생에 미치는 영향을 평가해 볼 수 있을 것이다. 이와 같은 단일염기다형성의 빈도에 있어 인종적인 차이가 크에도 불구하고 자간전증을 포함한 임신 중 고혈압 질환의 빈도는 대부분의 나라에서 비슷하게 나타난다는 점을 보면 임신 중 고혈압 질환의 발생에 있어 선천성 혈전경향증이 미치는 영향은 그리 높지

않을 것으로 생각된다. 이는 서론에서 서술한 바와 같이 시간이 흐를수록 서로 상충되는 결과가 많이 나타나는 사실을 통해 뒷받침된다.

본 연구의 단점으로는 첫째 factor V Leiden변이와 프로트롬빈 G20210A변이의 양성 대조군을 구하지 못하여 본 연구에서 시행된 실험방법에 문제가 없었는지 정확하게 확인할 수 없다는 것, 둘째 질병군과 함께 대조군에 대한 실험을 진행하지 않았다는 점을 들 수 있을 것이다. 하지만 본 실험에서 보인 PCR-RFLP의 결과가 참고문헌에서 보인 것과 다르지 않았다는 점, 본 연구의 최종적 연구 결과가 국내의 다른 연구 결과와 차이가 없었다는 점을 고려할 때 실험의 결과에 큰 영향을 미치지 않을 것이라는 것을 유추할 수 있다. 물론 중합효소연쇄 반응의 산물을 직접적인 염기서열분석을 시행하여 분석할 수도 있었을 것이다.

결론적으로 임신 중 고혈압 질환을 동반한 한국여성에서 factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 G20210A 변이는 발견되지 않았으며 이들 단일염기다형성은 한국 여성에서의 임신 중 고혈압 질환의 발생과 관련이 없을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-22.
2. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 181-92.
3. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
4. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 1994; 24: 139-51.
5. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
6. Dekker GA, de Vries JJ, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1042-8.
7. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V

Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 902-5.

8. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Cappucci G, Paladini D, Martinelli P, et al. Factor V Leiden, C>T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1052-4.
9. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 9-13.
10. Currie L, Peek M, McNiven M, Prosser I, Mansour J, Ridgway J. Is there an increased maternal-infant prevalence of Factor V Leiden in association with severe pre-eclampsia? *BJOG* 2002; 109: 191-6.
11. D'Elia AV, Driul L, Giacomello R, Colaone R, Fabbro D, Di Leonardo C, et al. Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2002; 53: 84-7.
12. Livingston JC, Barton JR, Park V, Haddad B, Phillips O, Sibai BM. Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 153-7.
13. Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, et al. Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia in Japanese women. *Am J Med Genet* 2000; 93: 122-5.
14. Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol* 1994; 88: 219-22.
15. Danneberg J, Abbes AP, Bruggeman BJ, Engel H, Gerrits J, Martens A. Reliable genotyping of the G-20210-A mutation of coagulation factor II (prothrombin). *Clin Chem* 1998; 44: 349-51.
16. Ji IW, Park YJ, Jeong EH, Kim HS, Jang BW, Park YK. Angiotensinogen, Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase and Factor V Gene Variants among Korean Women with Preeclampsia, as Risk Factors. *Korean J Obstet Gynecol*. 2004; 47: 60-7.
17. Cho YK, Ko JK, Lee CM, Choi H, Kim BR, Lee HK. Factor V Leiden mutation in Korean women with pregnancy-induced hypertension. *Korean J Obstet Gynecol*. 2005; 48: 857-66.
18. Song EK, Seon JK, Park SJ, Kim YJ, Park YH. Gene Polymorphism Analysis Related to the Development of Deep Vein Thrombosis. *J Korean Orthop Assoc* 2008; 43: 766-74.
19. Cho EY, Ryu HJ, Bae SJ, Kim S, Lee JE, Ko YG, et al. Prothrombin T165M and the Factor V R485K Polymorphism are Associated with an Increase Risk of Coronary Artery Disease in Koreans. *Korean Circ J* 2005; 35: 429-35.
20. Lee JL, Lee SG, Lee JJ, Lee HH, Chung JK, Choi KY, et al. Study on the Factor V Leiden Mutation in Pregnant Women and Relationship with Preeclampsia Severe Form. *Korean J Perinatol* 2002; 13: 406-12.
21. Kim JW, Kim SY, Lee CJ, Kim SR. A Study of Prevalence of Activated Protein C Resistance and Leiden Mutation among Korean Patients with Venous Ulcers. *Korean J Dermatol* 2002; 40: 1203-11.

22. Byun SJ, Lee TG, Lee JW, Chang DI, Chung KC. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden Mutation in Patients with Arterial Ischemic Stroke. J Korean Neurol Assoc 2000; 18: 390-3.

23. Kim HJ, Yang SE, Kim TW, Seo EJ, Lee JH, Yoo B, et al. Inherited Risk Factors for Venous Thrombosis: A Single Institution Experience. Korean J Hematol 2001; 36: 71-8.

24. Ro A, Hara M, Takada A. The factor V Leiden mutation and the prothrombin G20210A mutation was not found in Japanese patients with pulmonary thromboembolism. Thromb Haemost 1999; 82: 1769.

25. Jun ZJ, Ping T, Lei Y, Li L, Ming SY, Jing W. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Chinese patients with deep venous thrombosis and pulmonary embolism. Clin Lab Haematol 2006; 28: 111-6.

26. Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. Am J Med Genet 1997; 73: 334-6.

「국문초록」

목적: 임신 중 고혈압 질환에 이환된 한국여성에서의 factor V Leiden 변이와 프로트롬빈 유전자 G20210A 변이의 유전형 빈도를 알아보고자 하였다.

연구방법: 1998년 10월부터 2001년 7월 사이에 서울대학교병원을 방문한 산모들 중 자간전증을 포함한 임신 중 고혈압 질환에 이환된 175명의 여성을 대상으로 산모들의 특성을 조사하였고 혈액 샘플을 채취하였다. 채취한 혈액 샘플에서 DNA를 추출하였고 모든 DNA에 대해 프로트롬빈 유전자 G20210A 변이와 factor V Leiden 변이에 대한 유전형을 조사하였다. 유전형의 측정에는 PCR-RFLP (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism)방법을 사용하였다.

결과: 총 175명의 대상에서 프로트롬빈 유전자 G20210A 변이와 factor V Leiden 변이가 발견된 경우는 없었다.

결론: 프로트롬빈 유전자 G20210A 변이와 factor V Leiden 변이는 한국 여성에서의 임신 중 고혈압 질환의 발생에 관련이 없을 것으로 생각된다.

중심 단어: 고혈압 질환, 임신, Factor V Leiden 변이, 프로트롬빈 유전자 G20210A 변이