

덱사메타손 처치에 따른 폐 표면 활성 단백질-A 유전자 변이의 반응의 차이점에 관한 연구

순천향대학교 의과대학 소아과학교실, 경희대학교 의과대학 소아과학교실*

김을순 · 이인규 · 오명호 · 배종우*

Differential Response of Surfactant Protein-A Genetic Variants to Dexamethasone Treatment

Eul Soon Kim, M.D., In Kyu Lee, M.D., Myung Ho Oh, M.D. and Chong Woo Bae, M.D.*

Department of Pediatrics, Soonchunhyang University Hospital, Chonan,
Department of Pediatrics*, Kyunghee University Hospital, Seoul, Korea

Purpose : Surfactant protein A(SP-A) is involved in surfactant physiology and structure, and plays a major role in innate host defense and inflammatory processes in the lung. Steroid therapy is widely used for mothers who threaten to deliver prematurely and also used commonly in the management of preterm infants with chronic lung disease. Two SP-A genes(SP-A1, SP-A2) and several alleles have been characterized for each SP-A gene in human. Preliminary evidence indicates that differences may exist among alleles in response to Dexamethasone(Dexa) and that the SP-A 3'UTR plays a role in this process. We studied whether 3'UTR-mediated differences exist among the most frequently found SP-A alleles in response to Dexa.

Methods : Constructs containing the 3'UTR from eight different SP-A alleles were made using luciferase as a the reporter gene. These constructs were driven by the SV40 promotor and were transfected along with a transfection control vector in H441 cells that express SP-A. The activity of the reporter gene in the presence or absence of Dexa(100 nM) treatment was measured. All the experiments for the eight SP-A alleles studied, were performed in triplicate and repeated five times. The results were normalized to the transfection control.

Results : Expression of alleles of 6A3, 6A, 1A were significantly decreased in response to Dexa.

Conclusion : Three UTR mediated differences exist among human SP-A variants both in the basal expression and in response to Dexa. These genotype-dependent differences may point to a need for a careful consideration of individual use of steroid treatment in the prematurely born infant. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:335-339)

Key Words : Surfactant, Surfactant protein-A(SP-A), SP-A1 alleles, SP-A2 alleles, RDS, Steroid

서 론

신생아 호흡 곤란 증후군(respiratory distress syndrome, RDS)은 신생아 사망의 중요한 원인이다. 최근에는 산전 스테로이드의 사용과 상품화된 폐 표면 활성제의 개발로 사망률이 현저히 감소하였다¹⁾. 그러나, 아직도 RDS를 앓았던 신생아에서 여러 가지 후유증이 발생하는 문제점이 있다. 그러므로 지금의 치료에 국한된 방법 보다는 예방 및 조기 진단이 되면 RDS에

의한 사망률 및 합병증을 줄일 수 있다고 생각된다.

폐 표면 활성 단백질-A(surfactant protein-A, SP-A)는 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 기능 및 구조를 향상시키는 역할 이외에, C-type lectin의 일종으로서 숙주면역에 관여하는 것으로 알려졌다^{2, 3)}. Mannose binding protein과 보체 C1q 같이 작용하여 병원균이나 그에 상응하는 감염원에 노출되었을 때 숙주의 방어 능력을 향상시키는 기능을 가지고 있다. 이와 같은 기능을 갖고 있는 SP-A는 여러 종류의 물질과 호르몬에 의해 조절된다. 이중 흔히 사용되는 글루코코르티코이드(glucocorticoid, GC)는 인간의 폐에 대해서 항염증(anti-inflammatory) 효과와 폐 발육(lung-maturational properties)에 관여한다. 특히 GC는 폐 샘암종(lung adenocarcinoma) 종류인 H441

접수 : 2002년 9월 13일, 승인 : 2002년 11월 1일
책임저자 : 오명호, 순천향의대 천안병원 소아과
Tel : 041)570-2160 Fax : 041)572-4996
E-mail : omh@schch.co.kr

cell에서는 단지 SP-A 유전자 발현을 억제시키는 효과만을 가지고 있다^{4,5)}. 산전 산모나 미숙아에 많이 사용되어지는 합성 GC인 덤사메타손(dexamethasone, Dexa)은 인간 태아 폐 세포 (human fetal lung explants)에서는 SP-A 유전자 발현을 시간 과 용량 의존성(time and dose dependent)에 의해 감소시킨다. 최근의 연구에 의하면 이러한 유전자 사이의 반응의 차이는 일부 유전자 부위 즉, 3'UTR 부위가 관여 할 것이라는 보고가 있다^{6,7)}. 이와 같은 차이의 의미는 스테로이드 같은 약을 사용하였을 때 각 개인이 가지고 있는 SP-A 유전자나 대립형질에 따라서 약에 대한 서로 다른 반응을 보일 수 있음을 의미한다. 그러므로 각 개인의 유전자 대립형질에 따른 스테로이드 치료법에 대한 보다 많은 연구가 필요하다.

저자들은 Dexa 처치 시 일정하게 유전자 발현을 억제시키는 효과를 보이는 H441 cell line을 이용하여 가장 많은 빈도를 보이는 8가지 SP-A 대립형질에 덤사메타손 처치를 하여 유전자 발현의 차이가 3'UTR에 의하여 이루어지는지를 규명하고, 각 유전자 대립형질 사이에 반응 차이가 있는지를 알아보기 위해 본 연구를 하였다.

대상 및 방법

1. 벡터 구조(Vector construction)

SP-A 각 구조(constructs)는 8개의 SP-A 대립형질의 3'UTR을 포함하였다. Luciferase 리포터 구조물(Luciferase reporter construct)은 pGL3 luciferase 리포터 벡터(pGL3 luciferase reporter vector, Promega, Medison, WI, USA)와 SP-A의 3'UTR의 중합효소 연쇄반응(polymerase-chain reaction : PCR) 생성물과의 결합(ligation)으로 만들었다(Fig. 1). 모든 시발체(primer)들은 Xba1 효소의 특수 효소인지 부위(specific enzyme recognition site)를 포함하고 있었다. Xba1 효소인지 부위를 포함한 PCR 생성물은 표준 DNA 결합 방법(standard DNA ligation procedure)을 이용하여 pGL3 벡터(vector)의 Xba1 효소 위치에 삽입되었다. 만들어진 벡터는 E. coli(strain XL1 Blue)에 형질도입(transformation) 되었으며, 올바른 방향으로 벡터에 삽입되었는지를 보기 위하여 Hind III 절단 효소로 잘라서 확인하였다.

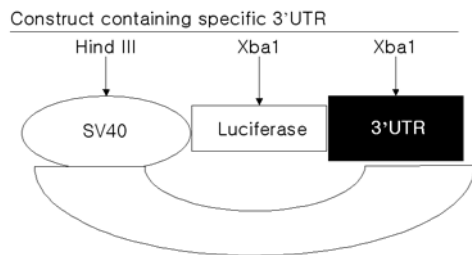


Fig. 1. Construct of 8 SP-A alleles.

2. 형질도입 방법의 전반적 개요(outline of transfection protocol)

SP-A의 각 부위를 포함하고 있는 구조(construct)는 H441 세포에 형질도입 되었다. 이들 구조는 SV40 promotor와 리포터 유전자로서, luciferase를 갖고 있는 벡터(vector)에 의해 형질도입 되었으며, 비교 리포터 유전자로서 β -Galactosidase(β -Gal)를 포함하고 있는 벡터도 같이 형질도입(co-transfection) 되었다. 이 β -Gal 구조물은 형질도입의 효과를 보기 위한 비교 수치로 이용되었으며 luciferase의 활성도(activity)는 β -Gal과의 비율로 표시하였다(Fig. 2).

1) 형질도입과 Dexa 처치에 대한 전반적 개요

형질도입에 필요한 DNA는 Quiagen plasmid Maxiprep kit (Quiagen, Hilden, Germany)의 실험방법에 따라 정제하였다. 형질도입 4시간 전에 RPMI-1640+10% FBS 배지 용액을 신선한 RPMI-1640 배지 용액으로 교환 한 후 1 μ g의 DNA(pGL3 Luciferase/SP-A 1 or SP-A 2 constructs)를 0.05 μ g의 β -Gal control 벡터와 함께 혼합하여 6 μ L의 PLUS reagent와 4 μ L의 Lipofectamine reagents(Gibco life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하였다. 이 혼합물에 200 μ L의 RPMI-1640 배지 용액을 첨가하고, 계산되어진 일정량의 RPMI-1640/DNA 혼합물(precipitate)을 NCI-H441 세포에 투여하였다. 4시간 후 RPMI-1649+10% FBS가 첨가 된 배지액으로 교환하였으며, 20시간 동안 세포를 배양 한 후, Dexa 치료 12시간 전에 10% FBS가 제거 된 배지용액으로 교환 후 배양하였다(Fig. 3).

2) Luciferase 측정

Luciferase 활성도는 형질도입 36시간 후에 Dexa 처치를 하고 15시간 동안 배양 한 후 측정하였다. Luciferase 측정을 위하여 배지 용액을 제거하고 충분한 양의 phosphate buffered saline(PBS)를 넣었다. 500 μ L의 reporter lysis buffer(RBL)를 각 배지에 첨가한 후, 배지 판을 orbital shaker에 놓고 15분 동안 RLB가 배지 판의 전체를 덮을 수 있도록 흔들어 주었다. 배지안의 침전물을 각각의 tube에 모아서 넣고 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였

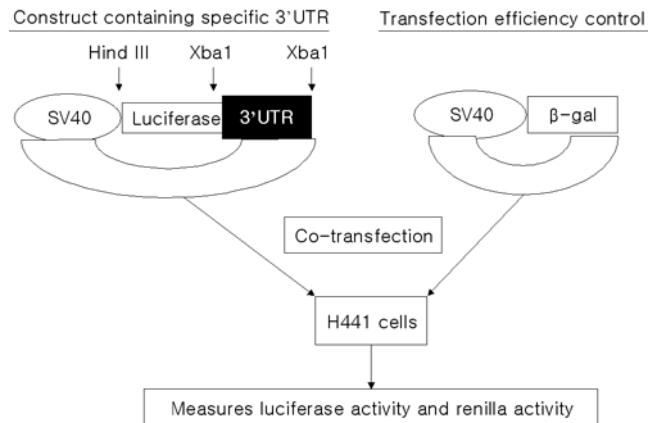


Fig. 2. Outline of the transfection protocol of SP-A.

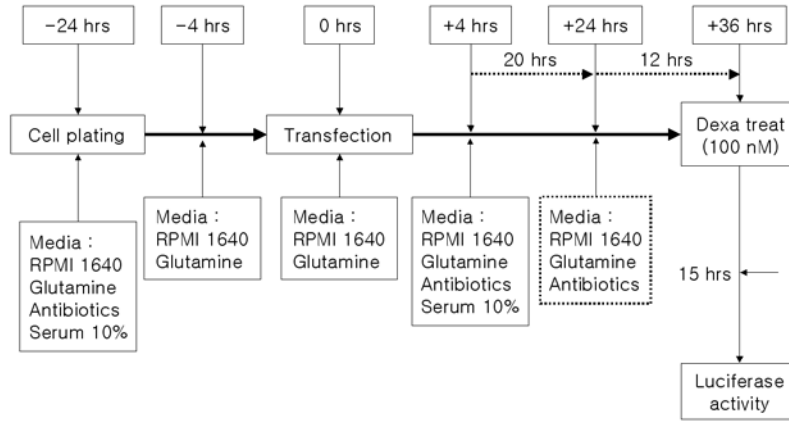


Fig. 3. Diagram of the overall culture conditions used for the transfection protocol of SP-A.

			% Dexa/Con Luciferase activity
SV40	Luciferase	6A 3'UTR	70.0±4.0*
SV40	Luciferase	6A2 3'UTR	81.6±1.4
SV40	Luciferase	6A3 3'UTR	70.1±1.6*
SV40	Luciferase	6A4 3'UTR	77.5±6.6
SV40	Luciferase	1A 3'UTR	69.7±3.1*
SV40	Luciferase	1A0 3'UTR	84.3±4.2
SV40	Luciferase	1A1 3'UTR	89.4±5.4
SV40	Luciferase	1A2 3'UTR	75.5±2.6
SV40	Luciferase	pGL3	102±0.4

Fig. 4. Differences in response to dexamethasone among 3'UTRs of SP-A genes ($P < 0.05$ compared with pGL3 and SP-A genes).

으며, 측정 시 37°C의 warm bath에서 녹이고 luciferase와 β -Gal의 활성도를 측정하였다. 100 μ L의 luciferase assay reagent II(LAR II)를 배지 수만큼의 luminometer tube에 넣고, 냉각 후 녹인 20 μ L의 침전물을 이 tube에 첨가한 후 3번 정도 잘 섞고 luciferase의 활성도를 측정하였다.

3) β -galactosidase 측정(β -galactosidase assay)

냉각 후 녹여진 침전물을 100 μ L 취하여 50 μ L의 1×RLB와 섞은 후 150 μ L의 2×buffer를 첨가하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 이후 노란색으로 침전물의 색깔 변화가 있으면 1M sodium carbonate 500 μ L를 첨가하여 섞은 후 즉시 β -Gal의 활성도를 측정하였다. 모든 과정은 삼중으로 5회 측정하였다. 통계 분석은 SPSS(Ver. 10) 프로그램을 이용하여 Student t-test, ANOVA test 등을 하였으며, 통계학적 유의 수준은 P -value < 0.05으로 하였다.

결 과

Dexa 처치 후에 8개의 SP-A 대립형질의 luciferase 활성이 감소되었으며, 특히 6A, 6A³, 1A 대립형질의 유전자 luciferase 활성이 다른 나머지 대립형질에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$ by ANOVA)(Fig. 4).

고 찰

SP-A는 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 구성 중 단지 1%만을 차지하는 아주 적은 양의 단백질이지만, PS의 기능 및 생리적 작용에 많은 관여를 하고 있다. 특히, SP-A는 폐의 면역과 숙주 방어 기능에 아주 중요하게 작용하여 감염 등으로부터 신생아를 보호하는 중요한 역할을 하고 있다⁸⁾. 최근의 연구에 의하면, RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 만성 폐 형성 이형증(bronchopulmonary dysplasia, BPD)을 예방하기 위하여 사용되어지는 스테로이드에 대한 SP-A 유전자 대립형질간의 유전자 발현이 서로 달라, 스테로이드 사용 후 유전자 대립형질에 따라 SP-A의 생산이 억제 될 가능성이 제기 되고 있으며, 유전자 발현이 억제되는 유전자 대립형질을 갖고 있는 신생아에게 지금같이 일률적으로 적용되어지는 스테로이드 용량 및 방법은 재고되어야 할 것이다^{6, 9)}.

SP-A는 여러 종류의 물질과 호르몬에 의해 조절된다. SP-A를 증가시키는 물질로는 사이토카인, growth factors, 산소, 인슐린, TNF- α , GC 등이 있으며¹⁰⁻¹⁴⁾, 특히 GC는 인간의 폐에 대해서 항염증 효과와 폐발육에 관여한다. SP-A 유전자 발현에 대한 GC의 효과는 전사(transcription)와 전사후(post-transcription)를 포함하여 매우 복잡하게 이루어진다^{4, 15, 16)}. 인간 태아 폐 세포에서 GC는 낮은 농도(10 nM)에서는 SP-A mRNA level을 증가시키나 높은 농도(100 nM)에서는 SP-A mRNA

level을 억제시키는 효과를 보인다^{15, 17-19}). 반면에 폐 샘암종 (lung adenocarcinoma) 계열 인 H441 세포에서는 단지 SP-A 유전자 발현을 억제시키는 효과만을 가지고 있다^{4, 5}). 합성 GC인 Dexa도 SP-A 유전자 발현을 시간과 용량 의존성(time and dose dependent)에 의해 감소시킨다. 이러한 암 세포군과 태아 폐 세포 사이에 차이가 나는 원인은 확실히 알 수 없으나 Dexa에 대한 각 유전자의 반응의 차이가 있는 것은 확실하다. 특히 GC를 비롯하여 Dexa로 치료한 경우 SP-A 및 SP-A 유전자 대립형질 사이에 유전자 발현의 차이를 보인다^{6, 7, 20-23}). 최근의 연구에 의하면 이러한 유전자 사이의 반응의 차이는 일부 유전자 부위 즉, 3'UTR 부위가 관여 할 것이라는 보고가 있다^{6, 7, 9}). 이와 같은 조절의 차이는 스테로이드 같은 약을 사용하였을 때 각 개인이 가지고 있는 유전자나 대립형질에 따라서 약에 대한 서로 다른 반응을 보일 수 있다. 최근의 Dexa 효과에 대한 연구는 2가지 유전자 대립 형질로만 실험을 하였으므로⁶) 저자들은, 1% 이상의 빈도를 보이는 8가지의 대표적인 SP-A1과 SP-A2 유전자 대립형질의 3'UTR을 가지고 실험을 하였다. Dexa 처치 후에 8개의 SP-A 대립형질의 luciferase 활성이 감소되었으나, 6A, 6A³, 1A 대립형질의 유전자 luciferase 활성의 감소가 다른 나머지 대립형질에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이 결과는 3'UTR이 Dexa 처치 시 유전자 발현이 억제되는 기전에 관여할 것이라는 것을 확인 할 수 있으며, 6A, 6A³, 1A 유전자 대립 형질에서는 Dexa 처치 후에 SP-A 생산이 억제될 수 있음을 암시하고 있다. 즉, Dexa는 RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 BPD를 예방하기 위하여 빈번히 사용되는데, 일부 SP-A1(6A, 6A³)과 SP-A2(1A) 유전자 대립형질의 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타나 이러한 대립형질을 가진 신생아는 SP-A의 혈중 농도를 충분히 유지 할 수 없으므로 RDS나 BPD는 예방이 될 수는 있어도 SP-A의 중요한 기능인 숙주 방어와 염증 반응이 억제되어 패혈증, 폐렴 등의 감염을 증가시킬 수 있다²⁴). 그러므로 좀더 깊은 이해와 연구가 이루어져야 하며 각 개인의 유전자 대립형질에 따른 스테로이드 치료법에 대하여 활발한 논의가 이루어져야 한다. 그러나, 저자들의 연구는 in vitro에서 이루어진 결과이므로 in vivo에서의 Dexa 연구가 이루어져야 하며, SP-A를 조절하는 Dexa 이외의 다른 물질에 대해서도 조절 부위와 유전자 대립형질간의 유전자 발현의 차이에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

목적 : 폐 표면 활성제 단백질-A는 폐 표면 활성제의 생리작용과 구조에 관여하며, 폐의 숙주방어와 염증반응에 주된 역할을 하고 있다. 스테로이드 치료는 미숙아의 분만이 예측되는 산모에 대해서 미숙아의 급성 호흡곤란 증후군 등을 예방할 목적으로, 또는 미숙아의 만성 폐질환을 예방하기 위하여 널리 사용되고 있다. 현재까지 인간에서 두 가지의 SP-A 유전자 및 여러 종류

의 대립형질이 밝혀져 있고, 텍사메타손 치료에 서로 다른 반응을 보이고 있으며, SP-A 3'UTR이 관여 할 가능성이 있다는 연구가 발표되었다. 저자들은 가장 많은 빈도를 보이는 8가지 SP-A 대립형질에서 텍사메타손 처치에 대하여 서로 다른 반응이 3'UTR에 의하여 이루어지는지를 규명하고자 연구를 하였다.

방법 : 리포터 유전자로서 luciferase를 사용하여 8종류의 SP-A 대립형질의 3'UTR을 포함하는 구성체를 만들었다. 이 구성체들은 SV40 promotor에 의하여 조절되었으며, SP-A를 생산하는 H441 세포내로 형질도입 되었다. 텍사메타손 처치 후 리포터 유전자의 활성도를 측정하였으며, 대조군에 따라 표준화 되었다.

결과 : 텍사메타손 처치 시 6A³, 6A, 1A 대립 유전자에서 리포터 유전자의 활성 반응이 유의하게 감소하였다.

결론 : SP-A 유전자 변이 중 텍사메타손 처치에 대한 유전자 표현 반응이 서로 다르다는 사실은 스테로이드 치료 시 미숙아의 개개의 SP-A 유전자 변이에 따라 고려하여 사용해야 함이 타당할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Lankenau HM. A genetic and statistical study of the respiratory distress syndrome. *Eur J Pediatr* 1976;123:167-77.
- 2) LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997;158:4336-40.
- 3) Phelps DS. Pulmonary surfactant modulation of host-defense function. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* 1995;5:221-9.
- 4) Boggaram V, Smith ME, Mendelson CR. Posttranscriptional regulation of surfactant protein-A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1991;5:414-23.
- 5) O'Reilly MA, Gazdar AF, Morris RE, Whitsett JA. Differential effects of glucocorticoids on expression of surfactant proteins in a human lung adenocarcinoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1988;970:194-204.
- 6) Hoover RR, Floros J. SP-A 3'UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. *Am J Physiol* 1999;276:L917-24.
- 7) Hoover PR, Thomas KH, Floros J. Glucocorticoid inhibition of human SP-A1 promotor activity in MCI-H441 cells. *Biochem J* 1999;340:69-76.
- 8) Drickamer K. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure modif. *Biochem Soc Trans* 1989;17:13-5.
- 9) Oh MH, Wang G, DiAngelo S, Floros J. Differential response of surfactant protein A genetic variants to dexamethasone treatment. *Pediatr Res* 2001;49:1708A.
- 10) Ballard PL, Liley HG, Gonzales LW, Odom MW, Ammann AJ, Benson B, et al. Interferon-gamma and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:137-43.
- 11) Dulkerian SJ, Gonzales LW, Ning Y, Ballard PL. Regula-

- tion of surfactant protein D in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:781-6.
- 12) Wispe JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman RB, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 1990;86:1954-60.
 - 13) Whisett JA, Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C. Differential effects of epidermal growth factor and transforming factor-B on synthesis of Mr=35,000 surfactant-associated protein in fetal lung. *J Biol Chem* 1987;262:7908-13.
 - 14) Acarregu MJ, Synder JM, Mendelson CR. Oxygen modulates the differentiation of human fetal lung in vitro and its responsiveness to cAMP. *Am J Physiol* 1993;264:L465-74.
 - 15) Iannuzzi DM, Ertsey R, Ballard PL. Biphasic glucocorticoid regulation of pulmonary SP-A: characterization of inhibitory process. *Am J Physiol* 1993;264:L236-44.
 - 16) Planer BC, Ning Y, Kumar SA, Ballard PL. Transcriptional regulation surfactant protein SP-A and SP-B by phorbol ester. *Biochim Biophys Acta* 1997;1353:171-9.
 - 17) Ballard PL, Hawgood S, Liley H, Wellenstein G, Gonzales LW, Benson B, et al. Regulation of pulmonary surfactant apoprotein SP28-36 gene in fetal human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:9527-31.
 - 18) Decowski SA, Snyder JM. The combined effects of insulin and cortisol on surfactant protein mRNA levels. *Pediatr Res* 1995;38:513-21.
 - 19) Liley HG, White RT, Benson BJ, Ballard PL. Glucocorticoids both stimulate and inhibit production of pulmonary surfactant protein A in fetal human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;85:9096-100.
 - 20) Karinch AM, Deiter G, Ballard PL, Floros J. Regulation of expression of human SP-A1 and SP-A2 genes in fetal lung explant culture. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398:192-202.
 - 21) Kumar AR, Snyder JM. Differential regulation of SP-A1 and SP-A2 genes by camp, glucocorticoids, and insulin. *Am J Physiol* 1998;274:L177-85.
 - 22) McCormick SM, Mendelson CR. Human SP-A1 and A2 genes are differentially regulated during development and by cAMP and glucocorticoids. *Am J Physiol* 1994;266:L367-74.
 - 23) Scavo LM, Ertsey R, Gao BQ. Human surfactant proteins A1 and A2 are differentially regulated during development and by soluble factors. *Am J Physiol* 1998;275:L653-69.
 - 24) LeVine AM, Kurak KE, Wright JR, Watford WT, Bruno MD, Ross GF, et al. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:279-86.
-