□원 저□

한국 신생아의 폐 표면 활성제 단백-A2(Human Surfactant Protein-A2) 유전자 대립형질의 분포와 빈도

순천향대학교 의과대학 소아과학교실, 한국과학기술원 생물과학과*, 경희대학교 의과대학 소아과학교실†

김년천 · 윤희철 · 석정수* · 고정호* · 유욱준* · 이인규 · 오명호 · 배종우†

Allele Distribution and Frequency of Human Surfactant Protein-A2 in Korean Neonates

Nyeon Cheon Kim, M.D., Hee Chul Yoon, M.D., Jung Su Suk*, Jung Ho Ko, Ph.D.*
Ook Joon Yoo, Ph.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 Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon,*
Department of Pediatrics†, Kyunghee University Hospital, Seoul, Korea

Purpose : We evaluated allele frequencies and distribution of surfactant protein A2(SP-A2) in Korean neonates in order to estimate the prevalence of RDS, to find out new SP-A alleles, and to establish new steroid therapy.
Methods : Genomic DNA was extracted from 71 neonates and served as a template in PCR for genotype analysis. SP-A gene-specific amplications and gene-specific allele determinations were performed using PCR-cRFLP methods.
Results : The distribution for the alleles of the SP-A2 gene in the study population was 1A, $1A^0$, $1A^1$, $1A^2$, $1A^3$, $1A^5$, $1A^6$, $1A^7$, $1A^8$, $1A^9$, $1A^{11}$, $1A^{12}$. The specific frequencies for the alleles of the SP-A2 gene in the study population were : 1A=11.3%, $1A^0$=38%, $1A^1$=12.7%, $1A^2$=9.2%, $1A^5$=15.5%, $1A^7$=2.9%, $1A^8$=4.9%, $1A^9$=2.2%, others=3.3%.
Conclusion : The frequency of $1A^0$ was higher than the other SP-A2 alleles in Korean neonates. This finding suggests that the prevalence of RDS in Korea may be low compared with other countries. However, this finding also suggests that Korean neonates have a high risk of infection. (J Korean Pediatr Soc 2003;46:340-344)

Key Words : Surfactant, SP-A2, 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 감소하였다[1]. 그러나, 아직도 RDS를 앓았던 신생아에서 여러 가지 후유증이 발생하는 문제점이 있다. 그러므로 지금처럼 치료에 국한된 방법 보다는 예방 및 조기 진단이 가능하면 RDS에 의한 사망률 및 합병증을 줄일 수 있다고 생각된다. 그러나, 국내외에는 예방적인 방법 및 조기 진단에 대한 참고 문헌이나 통계가 없는 실정이다.

미숙아 자체가 RDS의 가장 중요한 원인이다. 그러나 최근 쌍생아 연구와 유전학적 연구에서 RDS의 원인에 유전적인 원인도 관여한다는 논문이 있다[1, 2]. 특히 RDS와 폐 표면 활성제 단백 A(human surfactant protein-A, SP-A) 유전자 대립형질(alleles) 중 일부 대립형질은 RDS의 발생과 아주 밀접한 관계가 있어, 이와 같은 대립형질을 가진 신생아에서 RDS가 발생 될 가능성이 높은 것으로 되어 있다[3, 4]. 그러므로 미숙아 출생 전 혹은 출생 후 SP-A 유전자 대립형질을 밝힘으로서 RDS를 미리 예측 할 수 있을 것이라 여겨진다.

SP-A는 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 구성 중 단지 1%만을 차지하는 아주 적은 양의 단백질이지만, PS의 기능 및 생리적 작용에 많이 관여하고 있다. 특히 SP-A는 폐의 면역과 숙주 방어 기능에 아주 중요하게 작용하여 감염 등으로

접수 : 2002년 10월 30일, 승인 : 2002년 12월 12일
책임저자 : 오명호, 순천향의대 천안병원 소아과
Tel : 041)570-2160 Fax : 041)572-4996
E-mail : omh@schch.co.kr

부터 신생아를 보호하는 중요한 역할을 하고 있다[5]. 최근의 연구에 의하면 RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 기관지폐 이형성증(bronchopulmonary dysplasia, BPD)을 예방하기 위하여 사용되어지는 스테로이드에 대한 SP-A 유전자 대립 형질의 유전자 발현이 서로 달라, 스테로이드 사용 후 유전자 대립형질에 따라 SP-A의 생산이 억제 될 가능성이 제기 되고 있다. 그러므로 유전자 발현이 억제되는 유전자 대립형질을 갖고 있는 신생아에게 사용되는 스테로이드 용량 및 방법에 대한 많은 연구가 필요한 실정이다[6, 7]. 저자들은 이미 폐 표면 활성 단백-A1(surfactant protein A-1, SP-A1)에 대한 분포 및 빈도에 대한 연구 결과를 발표하였으며[8], 본 연구에서는 SP-A2의 유전자 대립형질의 한국분포 및 빈도를 밝혀, RDS 발생과 BPD로의 이행을 예측 할 수 있고, 스테로이드 치료에 새로운 지표로서 사용 될 수 있는 기초 자료로 이용하기 위해 본 연구를 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 인원

2002년 4월부터 2002년 6월까지 순천향대학교 천안병원, 경희대학교병원 신생아실에 입원한 정상 만삭 신생아 71명(남 : 녀= 35 : 36)을 대상으로 하였다.

2. DNA samples

전혈 0.5-3 mL를 제대혈로 채취하여 EDTA 용기에 넣고 -70℃에 보관하였다. Genomic DNA는 Puregene DNA Isolation Kit(Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 전혈에서 추출하였다. 이를 간단히 기술하면, 전혈 2 mL를 EDTA 용기에 담고 -70℃에서 냉동 보관 후 200 μL 1×SSC 버퍼 160 μL를 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층 액을 제거 후 1×SSC 버퍼 300 μL를 첨가하고 원심분리한 후, 각 침전물에 1.2M NaOAc 75 μL, 10% SDS 5 μL과 Proteinase K(20 mg/mL H_2O) 1 μL를 섞었다. 55℃ 항온수조에서 1시간 동안 방치한 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1) 100 μL를 첨가하여 30초 동안 섞고, 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관의 상층부를 조심스럽게 옮기고, chloroform 100 μL를 첨가 후 30초간 잘 흔들어 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관에 상층부를 조심스럽게 옮기고, 차가운 100% Ethanol(-20℃ 보관) 500 μL를 첨가하여 -20℃에 20분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 후 상층 액을 버리고 침전 된 침전물에 80% ethanol(4℃ 보관) 1 mL를 첨가 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층 액을 버리고 Speed-Vac에서 10분간 침전물을 건조 한 다음, 증류수 50 μL에 침전물을 녹이고 Genomic DNA를 55℃ 항온수조에서 1시간 동안 용해한 후 -20℃에 보관하였다. 추출된 DNA는 PCR반응을 위하여 50 ng/μL로 희석시켰다.

3. SP-A2 유전자의 유전자 분석

SP-A2의 유전자 분석은 DiAngelo 등[9]이 사용한 방법(PCR-cRFLP-based methodology)을 사용하였다(Fig. 1).

1) 중합효소 연쇄반응(polymerase-chain reaction : PCR) 증폭

SP-A2 유전자는 3.3 kb의 크기로서 전혈로부터 추출하였다. SP-A2은 유전자 특수 sense 시발체(gene specific sense

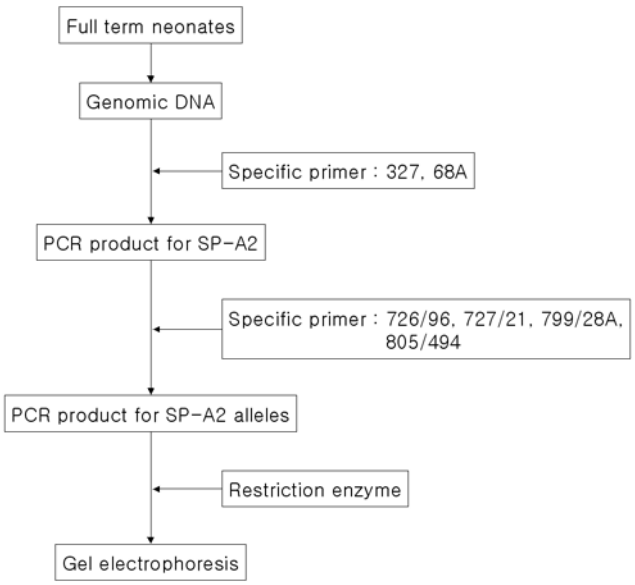

Fig. 1. Outline of genotyping of SP-A2 genes.

Table 1. Primers for cRFLP Analysis of SP-A2

SP-A2	Primer	Orientation	Sequence(5′-->3′)
	327	Sense	ATCACTGACTGTGAGAGGGT
	726	Sense	GCTGTGCCCTCTGGCCCTtA
	727	Sense	AGAGCGTGGAGAGAAGGGGcA
	799	Sense	CATAATGACAGTAGGAGAGAAG GTCTTCTC
	805	Sense	GGAGCCTGCAGGTCGGGGAAAA tcG
	28A	Antisense	ACCCTCAGTCAGGCCTACAT
	96	Antisense	TCCTTTGACACCATCTC
	21	Antisense	GGGTTTGTCTGATCCCCATC
	494	Antisense	TCAGAACTCACAGATGGTCA

Table 2. Converted Primers for cRFLP Analysis of SP-A2

SP-A2	Primers	Restriction enzyme
AC at aa 9	726/96	Tru 91
CG at aa 91	727/21	BbvI
CT at aa 140	799/28A	BfaI
AC at aa 223	805/494	α TaqI

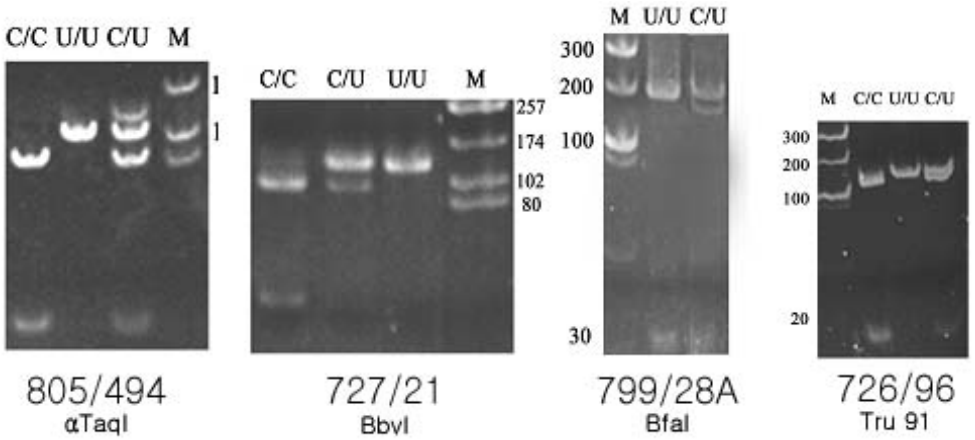

Fig. 2. Picture of restriction endonuclease analysis of SP-A2.

Table 3. SP-A2 Alleles as Determined by cRFLP at Designated Amino Acids

Alleles	Amino acid			
	aa 0	aa 91	aa 140	aa 223
1A	C	C	C	C
$1A^0$	A	G	C	C
$1A^1$	C	G	T	A
$1A^2$	C	G	C	C
$1A^3$	A	G	T	A
$1A^5$	C	C	T	C
$1A^6$	C	G	T	C
$1A^7$	A	C	T	C
$1A^8$	C	G	C	A
$1A^9$	A	G	T	C
$1A^{11}$	C	C	C	A
$1A^{12}$	A	C	C	C

primer)인 327과 antisense 시발체(gene specific antisense primer)인 68A로 증폭시켰다. PCR 증폭이 끝난 후 1% 아가로스 겔에서 SP-A2 유전자를 확인하였다.

2) 제한 효소 분석(restriction endonuclease analysis)

SP-A2 유전자의 대립 형질을 위해 증폭된 SP-A2 PCR 생성물을 시발체(primer) 726/96, 727/21, 799/28A, 805/494를 이용하여 2차로 증폭시킨 후 9, 91, 140, 223 위치의 뉴클레오티드를 선택적으로 자르는 제한 효소를 이용하여 자른 후 전기 영동하여 염기서열의 차이를 확인하였다(Table 1, 2)(Fig. 2).

결 과

아미노산 염기 서열의 차이에 의하여, 1A, $1A^0$, $1A^1$, $1A^2$, $1A^3$, $1A^5$, $1A^6$, $1A^7$, $1A^8$, $1A^9$, $1A^{11}$, $1A^{12}$ 등 12개의 대립형질이 발견되었다(Table 3). SP-A2 중 $1A^0$, $1A^5$가 38%, 15.5%의 분포를 보였으며, 1A, $1A^1$, $1A^2$가 각각 11.3%, 12.7%, 9.2%의 분포를 보였고, 이외에도 $1A^7$, $1A^8$, $1A^9$ 등의 대립형질이 1% 이상의 분포를 보였다(Fig. 3). SP-A2의 유전자 분석은 $1A^0 1A^5$, $1A^0 1A^2$, $1A 1A^1$, $1A^1 1A^8$ 등이 68.4% 이상의 빈도를 보였다(Fig. 4).

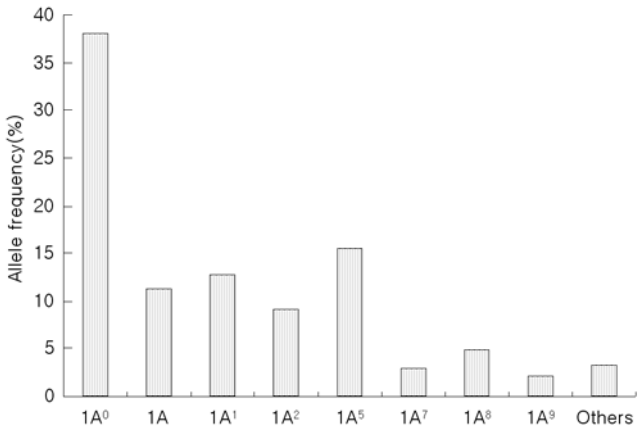

Fig. 3. Distribution and frequencies of SP-A2 alleles in Korean neonates.

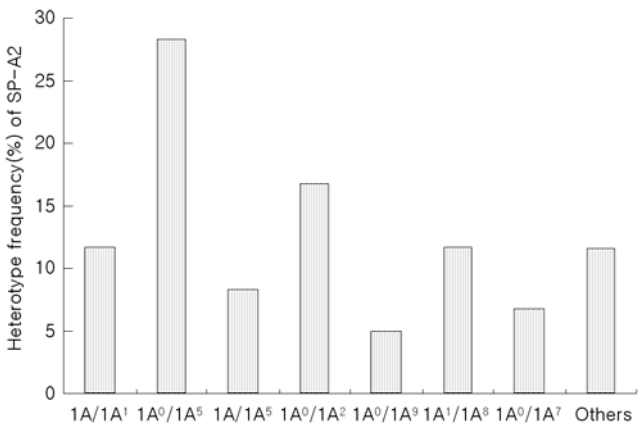

Fig. 4. Frequency of linkage of SP-A2 alleles in Korean neonates.

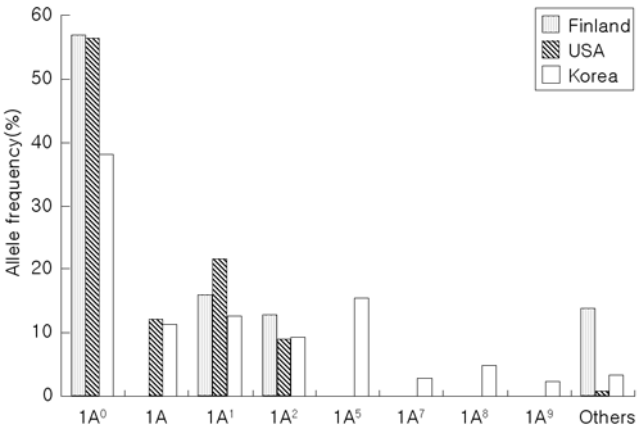

Fig. 5. Distribution and frequencies of SP-A2 alleles in Finland, USA and Korea[3, 4].

고 찰

SP-A1과 SP-A2, 두 유전자로 구성된 SP-A는 PS의 구성 중 1% 정도만을 차지하고 있으나 PS의 기능 및 생리적 작용에 많은 기여를 한다고 밝혀지면서 활발히 연구되어 지기 시작했다. 최근에는 acute phase reactant molecule과 유사한 구조 및 기능을 가진 것으로 연구되어져 폐의 숙주방어와 염증반응에 중요하게 관여하는 것으로 알려졌다[5]. RDS와의 관계에서는 RDS와 SP-A 유전자 대립형질(alleles) 중 일부 대립형질(Inducer : $6A^2$, $1A^0$, $6A^2/1A^0$, Protector : $6A^3$, $6A^4$, $1A^5$)이 RDS의 발생과 아주 밀접한 관계가 있어, 이와 같은 대립형질을 가진 신생아에서 RDS가 발생 될 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다[3, 4]. 그러므로 미숙아 출생 시 SP-A 유전자 대립형질을 밝힘으로서 RDS를 미리 예측 할 수 있으며, 양쪽 부모의 SP-A 유전자 대립형질을 알아 유전 조합을 알면 출생 전이라도 RDS의 발생 가능성을 예측 할 수 있다. 최근의 연구에 의하면, RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 BPD를 예방하기 위하여 신생아에게 사용되어지는 스테로이드에 대한 SP-A 유전자 대립 형질의 유전자 발현이 서로 다른 차이를 보였다. 이러한 유전자 사이의 반응의 차이는 일부 특정한 유전자 부위가 관여 할 것이라는 보고가 있다[6, 7]. 이와 같은 조절의 차이는 스테로이드 같은 약을 사용하였을 때 각 개인이 가지고 있는 유전자나 대립형질에 따라서 약에 대해 서로 다른 반응을 보일 수 있다. 즉, RDS나 BPD를 예방 할 목적으로 사용되어지는 스테로이드가 일부 SP-A1(6A, $6A^3$)과 SP-A2(1A) 유전자 대립형질의 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타나 이러한 대립형질을 가진 신생아는 스테로이드 사용 시 RDS나 BPD는 예방이 될 수 있어도 SP-A의 중요한 기능인 숙주 방어와 염증 반응에 필요한 충분한 농도의 SP-A가 생성되지 않아 폐혈증, 폐렴 등의 감염을 증가시킬 수 있다[10]. 그러므로 좀더 깊은 이해와 연구가 이루어져야 하며 각 개인의 유전자 대립형질에 따른 스테로이드 치료법에 대하여 활발한 논의가 이루어져야 한다. 따라서 우리나라의 SP-A1 및 SP-A2의 분포 및 빈도를 알고 있는 것이 중요하며, 빈도 및 분포에 의하여 출생에 따른 RDS의 예측을 할 수 있고 우리나라에 적합한 스테로이드 용량 및 치료법을 만들 수 있다.

SP-A2의 빈도와 분포가 알려진 미국과 핀란드의 경우 1A, $1A^0$, $1A^1$, $1A^2$, $1A^3$가 1% 이상의 분포와 빈도를 보였으나[3, 4] 우리나라에서는 다른 분포 및 빈도를 보였다(Fig. 5). $1A^0$의 빈도가 다른 대립형질에 비해 빈도가 높은 것은 두 나라와 같았으나 두 나라의 빈도에 비해서는 높지 않았으며, 우리나라에서는 특히 $1A^5$의 빈도가 높은 것을 볼 수 있었다. 이는 RDS와 연관이 있는 $1A^0$의 빈도가 두 나라에 비해 우리나라가 적고 RDS에 대해 보호체(protector)로 작용하는 $1A^5$의 빈도가 높은 것으로 보아 실질적으로도 우리나라에서 RDS의 발생률이 적을 것으로 생각된다. 저자들의 최근의 SP-A1에 대한 결과에서도 RDS에 보호체(protector)로 작용하는 $6A^3$의 빈도가 우리나라에서 월등히 높은 것으로 보아[8], SP-A2의 결과와 더불어 우리나라에서 RDS의 발생이 적을 것으로 생각되나 아직 RDS 발생률에 대한 통계가 없는 실정이므로 앞으로 연구되어져야 할 것이다. 우리나라에 많은 빈도를 보이는 1A는 다른 대립형질에 비해 스테로이드를 사용 할 때 유전자 발현에 많은 억제를 보여[6, 7] 신생아에서도 혈청 내에 충분한 양의 SP-A가 유지되기 힘들 것으로 생각되며, 감염에 노출 될 위험이 많을 것으로 추측되어 우리나라에서의 스테로이드 치료에 신중해야 하며 이에 대한 많은 연구가 필요하다.

결론적으로 우리나라에서는 RDS에 대해 유도체(inducer)로 작용하는 $1A^0$의 빈도가 높지 않고, 보호체로 작용하는 $1A^5$의 빈도가 높았으며, 혈청내의 SP-A 농도와의 관계 등이 더욱 연구되어져야 할 것이다.

요 약

목 적 : RDS 발생과 BPD로의 이행을 예측 할 수 있고, 스테로이드 치료에 새로운 지표로서 사용 될 수 있는 SP-A2의 유전자 대립형질의 한국분포 및 빈도를 밝히고 새로운 종류의 유전자 대립형질을 발견하기 위하여 본 연구를 하였다.

방 법 : 2002년 4월부터 2002년 6월까지 순천향대학교 천안병원과 경희대학교병원 신생아실에 입원한 정상 신생아 71명을 대상으로 하였다. SP-A2 유전자의 대립 형질을 위하여 시발체(primer) 726/96, 727/21, 799/28A, 805/494를 이용하여 증폭시킨 후 9, 91, 140, 223위치의 뉴클레오티드(nucleotide)를 알아보기 위하여 각 위치에 맞는 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여(PCR-cRFLP-based methodology) 자른 후 전기 영동하여 염기서열의 차이를 알아냈다.

결 과 : 아미노산 염기서열의 차이에 의하여, 1A, $1A^0$, $1A^1$, $1A^2$, $1A^3$, $1A^5$, $1A^6$, $1A^7$, $1A^8$, $1A^9$, $1A^{11}$, $1A^{12}$ 등의 12개의 대립형질이 발견되었으며, SP-A2 중 1A=11.3%, $1A^0$=38%, $1A^1$=

12.7%, $1A^2$=9.2%, $1A^5$=15.5%, $1A^7$=2.9%, $1A^8$=4.9%, $1A^9$=2.2%, others=3.3%의 분포를 보였다.

결 론 : RDS에 대해 보호체(protector)로 작용하는 $1A^5$의 빈도가 많은 것으로 보아 실질적으로도 우리나라에서 RDS의 발생률이 적을 것으로 생각된다. 스테로이드를 사용 할 때 유전자 발현에 많은 억제를 보이는 1A도 우리나라에서 많은 빈도를 보이므로 스테로이드 치료에 있어서 치료에 신중을 기해야겠다.

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) Myrianthopoulos NC, Churchill JA, Baszynski AJ. Respiratory distress syndrome in twins. Acta Genet Med Gemellol 1971;20:199-204.
3) Ramet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M. Association between the surfactant protein A gene locus and respiratory distress syndrome in Finnish population. Am J Hum Gen 2000;66:1569-79.
4) Floros J, Fan R, Matthews A, DiAngelo S, Luo J, Nielsen H, et al. Family -based transmission disequilibrium test (TDT) and case-control association studies reveal surfactant protein A(SP-A) susceptibility alleles for respiratory distress syndrome(RDS) and possible race differences. Clin Genet 2001;60:178-87.
5) Drickamer K. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure modif. Biochem Soc Trans 1989;17:13-5.
6) Hoover RR, Floros J. SP-A 3'UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. Differential allelic regulation. Am J Physiol 1999;276:L917-24.
7) Oh MH, Wang G, DiAngelo S, Floros J. Differential response of surfactant protein A genetic variants to dexamethasone treatment[abstract]. Pediatr Res 2001;49:1708A.
8) 이경신, 김영희, 석정수, 고정호, 유욱준, 이인규 등. 한국 신생아의 폐표면 활성제 단백 A-1 유전자 대립형질의 분포와 빈도. 소아과 2002;45:1497-502.
9) DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, et al. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. Dis Markers 1999;15:269-81.
10) 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.