

遺傳的 分析法에 의한 四象體質의 研究

金民姬* · 金炅奭* · 池相垠* · 崔善美* · 趙東郁*

Study on Sasang Constitution by Genetic Analysis Using Four Short Tandem Repeat Loci

Kim Min-hee, Kim Kyung-seok, Chi Sang-en, Choi Sun-mi, Cho Dong-wuk

Korea Institute of Oriental Medicine, Chungarm Bldg. 129-11, Chungdam-dong, Kangnam-ku, Seoul,
135-100, Korea

This study was carried out for the objectification and clinical application of the Sasang Constitutional Medicine(四象醫學). So, the Taeum, Soyang, Soum groups were classified by diagnostic rules of Sasang constitution, and investigated by Amp-FLP method for genetic difference.

The Amp-FLP was one of the most frequently used human genetic analysis methods which adopts STR typing. In this study, 100 genomic DNA samples of Taeum, Soyang, Soum constitution group were analysed by Amp-FLP method.

Allele frequencies of four tetrameric short tandem repeat(STR) loci(TPOX, LPL, D21744, and D13S317) were determined in Taeum, Soyang, Soum groups. The heterozygosities and the polymorphism information content(PIC) values of four STR loci were 0.812 and 0.789 in D3S1744, 0.811 in D13S317, 0.466 and 0.417 in LPL, and 0.625 and 0.561 in TPOX, respectively. The allele distribution of four STR loci was statistically evaluated. It was found out that the allele distribution of four STR loci was not significantly different among different constitutions. But all loci were found to be highly polymorphic in Taeum, Soyang, Soum groups. It was found out in this study that Taeum, Soum groups are genetically more related each other than they are related to Soyang groups.

* 韓國韓醫學研究院

I. 서 론

사상의학은 동무 이제마 선생이 19세기 말경 그의 저서 『동의수세보원』과 『격치고』에서 제시한 새롭고 독창적인 체질의학으로, 사람의 체질적인 유형을 체격, 얼굴 생김새, 성격, 정서, 약물에 대한 반응 등을 종합적으로 보아서 태양인, 소양인, 태음인, 소음인의 4가지형으로 구분한다. 동무 이제마의 동의수세보원이 출간된 지 100여년이 지나면서 그 철학적 의의 및 임상적 활용 가치가 날로 고양되어 국내·외적으로 활발한 연구 활동이 이루어지고 있다. 또한, 사상의학은 각 체질의 생리와 병리, 진단 감별법 등에 일련의 특성이 있을 뿐 아니라 치료와 약물에 이르기까지 서로 연계를 갖고 이를 임상에 응용할 수 있는 새로운 방향을 제시하고 있다. 한편 사람의 모든 형질은 유전자의 정보에 따라 나타나는 것이며 사상의학에서 제시하는 체질적 속성 역시 유전자가 지닌 형질에 내재되어 있는 속성이라 할 수 있으므로, 사상의학을 다각도로 재조명해보는 작업의 일환으로 유전적 분석 방법을 이용하여 각각의 사상체질에 따라 유전적 상이성 및 상관성을 찾아보고 체질분류의 객관적인 기준을 마련하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 전년도에 이어 유전적 분석 연구에 많이 사용되는 유전자지문법(DNA fingerprinting)을 이용하여 유전학적인 면에서 검토하고 조사함으로써, 체질에 따른 상이성 및 상관성을 찾아보고 체질분류의 객관적인 기준을 마련하고자 하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR) 기술을 이용한 DNA의 증폭은 현재 다양한 방법으로 법의학 및 친자 감별에 이용되고 있다. Jeffrey와 Wilson(1985)에 의해 개인에 따라 인체 DNA의 Restriction Fragment Length Polymorphisms

(RFLP) 상이 다른 것을 발견한 이래, 많은 형태의 반복적인 DNA motif들이 많이 발견되었다(Nakamura et al., 1987; Weber and May, 1989; Edwards et al., 1992; Rocha et al., 1992; Hammond et al., 1994). 초기에는 RFLP법을 이용하여 인체 염색체 상에 존재하는 minisatellites의 다형성을 분석함으로써 법의학(forensic science)에 적용시켰으나(Krawetz et al., 1988) RFLP 방법은 시간이 오래 걸리고 방사성 동위원소를 사용해야 하는 위험성 및 상대적으로 많은 고분자량의 DNA가 요구되는 등의 제한점을 가지고 있다. 이러한 제한점은 DNA typing에 PCR을 이용한 DNA fragment의 증폭이 적용되면서 극복되었는데, 이는 인체 유전자의 intervening sequence내에 존재하는 tandem repeat의 길이 다형성을 분석하는 기법으로, 중합효소연쇄반응법인 PCR 기법을 이용하여 염색체상의 특정 tandem repeat sequence(반복염기서열)를 증폭시킬수 있는 primer로 DNA를 증폭시켜 유전적 다형성을 검출하는 방법이다. Human genome 내의 intron 부분에 널리 분포하고 있는 것으로 알려진 반복염기서열들은 유전자 감식의 marker로서 유용하며 그동안 여러 연구자들에 의해서 다양한 Variable Number of Tandem Repeat(VNTR)과 Short Tandem Repeat(STR)이 발견되고 이들의 유용성 검토 연구가 활발히 진행되어 왔다(James and Paula, 1989; Horn et al., 1989; Puers et al., 1993; Budowle et al., 1991, 1997). 일반적으로 VNTR은 16~70 bp의 repeating unit를 갖는 유전자이며, STR은 일반적으로 core sequence가 2~6 bp가 반복적으로 배열되어 있으며 인체 염색체에 자주 나타나는 것으로 알려져 있으며, di-nucleotide repeat는 포유 동물의 염색체에서

대략 50,000~100,000개 정도의 풍부한 빈도로 존재하고 있고, 특히 tri-nucleotide repeat나 tetra-nucleotide repeat의 STR은 전체 염색체에 걸쳐 매 300 kb에서 500 kb마다 분포되어 있는 것으로 추정되고 있다(Litt and Luty 1989). 인체 유전자의 다형성에 대한 연구는 집단유전학, 연관관계분석, 친자감별, 이민논쟁 및 법의학적으로 많이 사용되고 있고, 의학적으로는 골수의 이식이나, 특정 질환과 유전자와의 연관성 및 장기 이식에서 장기 공여 지원자의 예비 검사에도 이용되고 있다(Baird et al., 1986; Morris et al., 1989; Helmuth et al., 1990). 현재 세계적으로 많은 STR 및 VNTR marker들이 법의학적으로 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 각 체질을 유전학적인 면에서 검토하기 위해서 사상체질진단법에 의하여 분류된 태음인, 소양인, 소음인 그룹에 대해서 Amp-FLP법을 이용한 tetra-nucleotide repeat의 STR 중 4종의 locus(D3S1744, D13S317, LPL, TPOX)를 대상으로 allele distribution을 조사하고 Hardy-Weinberg Equilibrium 및 chi-square test를 실시하여 통계학적인 유의성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사상체질의 판별 및 혈액 샘플의 채취

사상체질의 판별은 경희의료원 동서종합건강진단 센터에 1996년 4월부터 7월과 1997년 7월부터 9월, 1998년 6월부터 9월까지 내원한 남녀를 대상으로 한국한의학연구원 사상의학팀과 경희대학교 한의과대학의 사상의학교실이 공동으로 수행하였다. 유전적 분석 연구에 사용된 혈액시료는 한국한의학

연구원의 사상의학팀과 경희대학교 한의과대학의 사상의학교실에서 실시한 체질 판별이 일치한 경우의 개인들로부터 각 2ml씩 채취하여 사용하였다.

2. 혈액으로부터 genome DNA의 분리

혈액 2ml에 4ml의 RBCL 완충용액(Red blood cell lysis buffer: 10mM Tris-Cl(pH 8.0), 10mM NaCl, 10mM MgCl₂)을 넣고 잘 섞은 다음 3,000rpm에서 10초간 원심분리하여 적혈구를 제거하고 침전물인 백혈구층을 분리하였다. 위의 과정을 한 차례 반복한 후, RBCL 대신에 3차 증류수를 넣어 백혈구층을 세척하였다. 백혈구 침전물에 lysis buffer(10mM Tris-Cl(pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 200µg/ml proteinase K) 1ml를 넣고, 56°C에서 30~40rpm으로 흔들어 주면서 3시간동안 방치하였다. 4ml의 phenol/water/chloroform 혼합물을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 4,000rpm에서 30초간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 여기에 2배 부피의 cold absolute ethanol을 넣어 잘 섞은 후, DNA의 침전이 생기는 것을 확인하였다. DNA 침전물을 유리 막대로 잘 걸어 1.5ml eppendorf centrifuge tube에 옮긴 다음 건조시켰다. 건조가 끝난 후 100~200µl의 3차 증류수에 DNA 침전물을 용해시켰다. 추출된 DNA는 Fluorometer(Hoefler Inc., DyNA Quant 200 model)를 사용하여 정량하였고 PCR 반응에 적합한 농도로 맞추기 위해, 일부를 희석하여 10ng/µl의 농도로 맞추어 PCR 반응의 template DNA로 사용하였다.

3. STR typing

본 연구에서는 STR 분석을 위하여 D3S1744, D13S317과 LPL 그리고 TPOX locus의 allele 분포를 조사하였다. Reaction mixture는 10ng의 blood DNA를 template로 사용하고 상업적으로 시판되는 STR typing kit(Promega Co.)를 사용하여 총 15 μ l의 reaction volume으로 아래와 같이 만들었으며, PCR cycle 조건은 각 primer의 특성에 따라 다르게 수행하였으며, Thermalcycler (Perkin Elmer model 2400)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 전기영동장치는 GIBCO BRL, Model SA32(32cm long)를 사용하였으며, gel composition과 running condition은 STR locus에 따라 다르게 수행하였고 running Buffer로는 0.5 \times Tris-Borate EDTA buffer를 사용하였다.

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Reaction mixture : total volume | 15 μ l |
| 10X STR buffer | 1.5 μ l |
| 10X primer pair | 1.5 μ l |
| dH ₂ O | 10.0 μ l |
| 0.5unit Taq DNA polymerase | 0.1 μ l |
| template DNA | 2.0 μ l |

각 STR locus별 PCR반응조건과 전기영동조건은 아래와 같다.

1) D3S1744

(1) PCR 반응

D3S1744의 증폭을 위하여 사용된 primer의 서열은 다음과 같다.

5'-TTTAAGCGGAAGGAAGTGTG-3'(forward)
5'-CTGGCCCCATCTCTCTAT-3'(reverse)

PCR 조건은 다음과 같다.

Cycle condition :
95 $^{\circ}$ C 3min preheating
94 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 1min,
72 $^{\circ}$ C 1min, 30cycles
72 $^{\circ}$ C 10min final
extension

(2) 전기영동

D3S1744의 전기영동은 다음과 같이 denaturing gel system을 사용하였다.

Gel : 7M Urea, 6% acrylamide:bis(19:1),
0.8mm thick
Running condition : 25W

2) D13S317

D13S317의 증폭을 위하여 사용된 primer의 서열은 다음과 같으며, PCR 조건 및 전기영동 조건은 D3S1744와 동일하였다.

5'-ACAGAAGTCTGGGATGTGGA-3'(forward)
5'-GCCCAAAAAGACAGACAGAA-3'(reverse)

3) LPL

(2) PCR 반응

LPL의 증폭을 위하여 사용된 primer의 서열은 다음과 같다

5'-ATCTGACCAAGGATAGTGGGATAT-3'(forward)
5'-CCTGGGTAAGTACTGAGCGAGACTGTGTC-3'(reverse)

PCR 조건은 다음과 같다.

Cycle condition :

96°C 2min preheating
94°C 1min, 60°C 1min, 70°C 1.5min,
10cycles
linked to 90°C 1min, 60°C 1min, 70°C 1.5min, 20cycles

polyacrylamide gel, 0.8mm thick
Running condition : 15mA

② 전기영동

LPL의 전기영동은 다음과 같이 discontinuous vertical gel system을 사용하였다.

Gel : 8%T, 5%C, 60mM Tris-borate
polyacrylamide gel,
1.0mm thick

Running condition : 15mA

4) TPOX

① PCR 반응

TPOX의 증폭을 위하여 사용된 primer의 서열은 다음과 같다

5'-CACTAGCACCCAGAACCGTC-3'(forward)
5'-CCTTGTCAGCGTTTATTTGCC-3'(reverse)

PCR 조건은 다음과 같다.

Cycle condition :
96°C 2min preheating
94°C 1min, 64°C 1min, 70°C 1.5min,
10cycles
linked to 90°C 1min, 64°C 1min, 70°C 1.5min, 20cycles

② 전기영동

TPOX의 전기영동은 다음과 같이 discontinuous vertical gel system을 사용하였다.

Gel : 7% T, 5% C, 42% UREA(w/v),
60mM Tris-borate

4. Silver staining

전기영동이 끝난 gel은 silver staining법으로 염색하여 DNA band를 관찰하였다. 즉, gel을 증류수로 세척한 후 1% 질산용액에서 5분 동안 산화시켰다. 그 다음, 증류수로 간단히 세척한 후, silver nitrate 용액(2g/ℓ)에서 20분간 흔들어 주면서 염색을 하였다. 다시 증류수로 1분간 세척한 후, 환원시약인 anhydrous sodium carbonate-formalin용액(30g/ℓ ~ 0.5ml/ℓ)에서 DNA band가 보일 때까지 흔들어 주었다. Band의 양상에 따라 10% acetic acid로 반응을 멈추고 증류수로 세척하였다. 반응이 끝난 gel은 3MM chromatography paper에 붙여 75°C에서 1시간 동안 gel dryer로 말려 보관하였다.

5. 통계분석 및 각 체질집단간의 상관관계 조사

통계분석

한국인 집단에 대해 STR locus에서 나타난 allele의 크기를 측정된 다음, 대립 유전자의 빈도(allele frequency)를 계산하였다. 각 집단별로 얻어진 allele frequency로부터 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected genotype frequency를 계산한 뒤, observed genotype frequency와의 비교를 통해 Chi-square test를 실시하였다. 또한 각 체질 집단에 대한 STR locus의 다양성을 조사하기 위하여 아래와 같은 공식으로 heterozygosity와 이형질성 정도(PIC : Polymorphism Information Content)

를 구하였다.

$$H = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right)$$

$$PIC \text{ value} = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} P_i^2 \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

또한, 네 종의 loci에 대해 한국인 집단과 기존에 밝혀져있는 American caucasians 및 Hispanic 집단(Budowle et al., 1997) 사이의 allele 빈도의 분포를 F검정(F-statistics)을 이용하여 비교하였다. 이상의 통계는 마이크로소프트 엑셀의 통계데이터 분석함수를 이용하여 수행하였다.

먼저, 각 체질집단에 대해 STR locus에서 나타난 allele의 크기를 측정한 다음, 대립 유전자의 빈도(allele frequency)를 계산하였다. 각 집단별로 얻어진 allele frequency로부터 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected genotype frequency를 계산한 뒤, observed genotype frequency와의 비교를 통해 chi-square test를 실시하였다. 또한 각 체질 집단에 대한 STR locus의 다양성을 조사하기 위하여 heterozygosity와 이형질성 정도(PIC: Polymorphism Information Content)를 구하였다. 또한 STR locus에 대한 각 집단의 allele빈도로부터 집단 간 pairwise comparison을 통해 genetic distance를 구하였다. 유전자 빈도로부터 genetic distance는 Phylip program package(Felsenstein, 1993)의 GENDIST program 중 Nei의 genetic distance(1972) 공식을 이용해 계산하였으며, 구해진 genetic distance는 각 체질집단의 상관관계를 구하기위해 이용되었다. 상관관계분석은 Phylip program package의 UPGMA method를 이용하여

조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 각 집단별 STR locus 분석 결과

본 연구에서는 태음인, 소양인, 소음인으로 분류된 각 그룹별 100인을 대상으로 4가지 STR locus(D3S1744, D13S317, LPL, TPOX)에 대한 STR typing을 실시하여 체질 그룹별 유전적 상관성을 조사하였다.

먼저 STR locus에 대한 allele의 분포, 각 집단별 연관성 및 상이성을 조사하였다. 4종의 STR locus에 대해 각 집단별로 나타난 allele의 수(N), 이형질성(Heterozygosity: H), 이형질성정도(PIC)를 계산하였으며, 이 결과를 Table 1에 나타내었다. 각 집단은 3개의 allele(LPL의 소음인)로부터 8개의 allele(D3S1744, D13S317)까지 다양한 수의 allele이 존재하였고, 전체 STR locus당 allele의 평균수는 소음인의 6.00에서 태음인 집단의 6.75까지 다양하였다. 또한 각 STR locus별로 다양한 Heterozygosity 값(0.423~0.836)과 PIC 값(0.377~0.815)을 보였는데, 이중 각 집단에 대해 LPL locus가 가장 낮은 Heterozygosity와 PIC값을 보였으며, D3S1744 locus가 가장 높은 값을 보였다. 따라서 STR locus 중, LPL locus를 제외한 나머지 3종의 STR locus는 변별력이 매우 높아 paternity test 및 forensic science에 좋은 marker로 사용될 수 있음을 시사해주고 있다. 또한, 세 집단의 평균 Heterozygosity와 PIC값은 거의 동일하였으며, 이중 소음인에서 가장 낮은 값을 보였다. 다음은 4종의 STR locus에 대한 allele의

(Table 1) Observed numbers of alleles(N), Heterozygosity(Het.), and Polymorphism Information Content(PIC) over 4 microsatellite loci in 3 Sasang constitutions.

| | Taeum | | | Soum | | | Soyang | | |
|---------|-------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | N | Het. | PIC | N | Het. | PIC | N | Het. | PIC |
| D3S1744 | 8 | 0.836 | 0.815 | 8 | 0.809 | 0.784 | 8 | 0.792 | 0.769 |
| D13S317 | 8 | 0.808 | 0.780 | 8 | 0.791 | 0.762 | 7 | 0.833 | 0.811 |
| LPL | 5 | 0.505 | 0.448 | 3 | 0.423 | 0.377 | 5 | 0.471 | 0.425 |
| TPOX | 6 | 0.626 | 0.564 | 5 | 0.627 | 0.556 | 5 | 0.623 | 0.563 |
| Mean | 6.75 | 0.690 | 0.650 | 6.00 | 0.660 | 0.610 | 6.25 | 0.670 | 0.640 |

분포와 통계분석결과를 나타내었다.

2. D3S1744

D3S1744 locus는 인간의 3번 염색체에 위치하며 TATC의 4bp(염기)를 기본 repeating unit로 하는 STR locus이다. 일반적으로 4bp의 repeating unit가 14번에서 22번 반복하는 것을 합쳐 총 9종의 allele가 존재하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 태음인, 소양인, 소음인으로 분류된 각 그룹별 100인을 대상으로 D3S1744에 대한 STR typing을 실시하여 체질 그룹별 유전적 상관성을 조사하였다. 다양성의 척도가 되는 PIC값을 볼 때, 태음인은 0.815, 소음인은 0.784, 소양인은 0.769로 나타나 매우 높은 PIC 값을 보였으며, 발견된 allele의 수는 8개였다. Table 2에는 태음인, 소양인, 소음인의 allele No.의 분포와 그 빈도를 표시하였다. Table 2에서 observed No.는 태음인, 소음인, 소음인 각 체질별 조사대상 100명에서 관찰된 D3S1744 locus의 repeat number의 분포를 나타낸 것이고, 빈도를 나타내는 frequency는 소수 셋째 자리에서 반올림한 % 값으로 나타내었다. 이후 모든 Table은

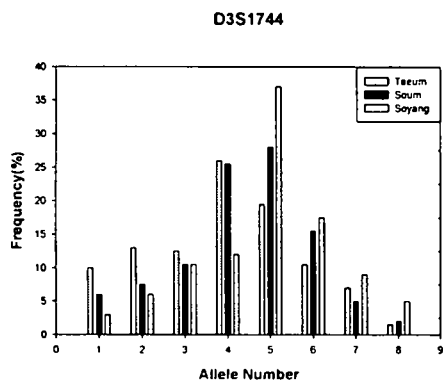
체질별로 조사된 각 locus에 대해서 위와 같은 방식으로 작성되었다. 그리고 체질별로 allele 간 상호비교를 용이하게 하기 위해 각 체질별 allele 분포의 빈도수를 막대그래프(histogram)로 나타내었다(Fig. 1). 여기에 나타난 바와 같이 태음인의 경우 allele No. 4(26.0%), 소음인은 allele No. 5(28.0%), 소양인은 allele No. 5(37.0%)에서 다수의 allele이 분포하는 것으로 나타났으며, 그 이외의 allele에서는 각 체질별로 비슷한 분포 양상을 보이는 것으로 나타났다(Table 2와 Fig. 1).

D3S1744 locus에서 각 집단이 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected genotype frequency를 계산하고, observed genotype frequency와의 비교를 통해 chi-square test를 행하여 유의성을 조사하였다. 그 결과, 각 체질집단(100명)의 p-value를 보면 태음인은 0.9949, 소음인은 0.6255, 소양인은 0.8366으로, $p < 0.01$ 에서 세 체질집단 모두 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하고 있음을 알 수 있었으며, 이 결과로부터 본 연구에서 추출된 표본집단은 random한 집단이며 random mating이 일어나는 집단임을 알 수 있다. 이러한 결과로 보아

<Table 2> D3S1744 allele distribution of Taeum, Soum, and Soyang group.

| allele* | Taeum(1-100) | | Soum(1-100) | | Soyang(1-100) | |
|---------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) |
| 1 | 20 | 10.0 | 12 | 6.0 | 6 | 3.0 |
| 2 | 26 | 13.0 | 15 | 7.5 | 12 | 6.0 |
| 3 | 25 | 12.5 | 21 | 10.5 | 21 | 10.5 |
| 4 | 52 | 26.0 | 51 | 25.5 | 24 | 12.0 |
| 5 | 39 | 19.5 | 56 | 28.0 | 74 | 37.0 |
| 6 | 21 | 10.5 | 31 | 15.5 | 35 | 17.5 |
| 7 | 14 | 7.0 | 10 | 5.0 | 18 | 9.0 |
| 8 | 3 | 1.5 | 4 | 2.0 | 10 | 5.0 |
| total | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 |

*The numbering of allele starts with the smallest allele size.
(2 Observed no. of allele/ 1 sample)



<Fig. 1> Relative allele frequency distributions of D3S1744 locus in Taeum, Soum, and Soyang group.

D3S1744의 경우는 각 집단별 특이성을 대변할 만한 유의적인 요소가 없는 것으로 사료되었다.

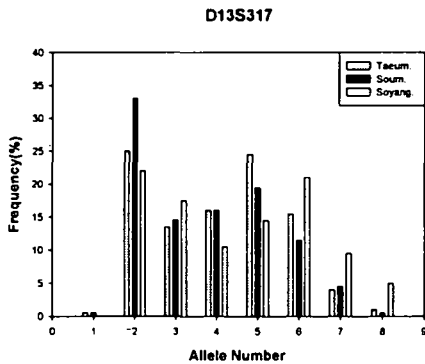
3. D13S317

D13S317 locus는 TATC 혹은 ATCT의 4bp(염기)를 기본 repeating unit로 하는 STR의 locus로서, 170~200bp의 size이고, 총 8종의 allele가 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 태음인, 소음인, 소양인으로 분류된 각 그룹별 100인을 대상으로 D13S317에 대한 STR typing을 실시하여 체질 그룹별 유전적 상관성을 조사하였다. 다양성의 척도가 되는 PIC값을 볼 때, 태음인은 0.780, 소음인은 0.762, 소양인은 0.811로 나타나 매우 높은 PIC값을 보였으며, 발견된 allele의 수는 7~8개였다. Table 3에는 태음인, 소양인, 소음인의 allele No.의 분포와 그 빈도를 표시하였고, Fig. 2에는 각 체질별 allele 분포의 빈도수를 막대그래프로 나타내었다. 여기에 나타난 바와 같이 태음인, 소음인, 소양

<Table 3> D13S317 allele distribution of Taeum, Soum, and Soyang group.

| allele | Taeum(1-100) | | Soum(1-100) | | Soyang(1-100) | |
|--------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) |
| 1 | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 | 0 | 0.0 |
| 2 | 50 | 25.0 | 66 | 33.0 | 44 | 22.0 |
| 3 | 27 | 13.5 | 29 | 14.5 | 35 | 17.5 |
| 4 | 32 | 16.0 | 32 | 16.0 | 21 | 10.5 |
| 5 | 49 | 24.5 | 39 | 19.5 | 29 | 14.5 |
| 6 | 31 | 15.5 | 23 | 11.5 | 42 | 21.0 |
| 7 | 8 | 4.0 | 9 | 4.5 | 19 | 9.5 |
| 8 | 2 | 1.0 | 1 | 0.5 | 10 | 5.0 |
| total | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 |

*The numbering of allele starts with the smallest allele size.
(2 Observed no. of allele/ 1 sample)



<Fig. 2> Relative allele frequency distributions of D13S317 locus in Taeum, Soum, Soyang group.

인의 allele의 분포는 allele No. 2에서 공통적으로 그 빈도가 높은 것으로 나타났으며, 또한 소양인 집단에서는 보이지 않는 allele(No. 1)이 발견되는 특징을 보였다. D13S317 locus에서 각 집단이 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected

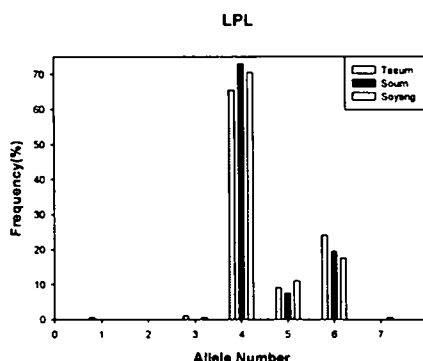
genotype frequency를 계산하고, observed genotype frequency와의 비교를 통해 chi-square test를 행하여 유의성을 조사하였다. 그 결과, 각 체질집단(100명)의 p-value를 보면 태음인은 0.5764, 소음인은 0.7635, 소양인은 0.7815로서, $p < 0.01$ 에서 세 집단 모두 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하고 있음을 알 수 있었으며, 이 결과로부터 본 연구에서 추출된 표본집단은 random한 집단이고 random mating이 일어나는 집단임을 알 수 있다. 이러한 결과로 보아 D13S317 locus 역시 각 집단별 특이성을 대변할 만한 유의적인 요소가 없는 것으로 사료되었다.

4. LPL

LPL locus는 1987년 처음으로 Heinzman 등에 의해서 존재가 밝혀진 이후 많은 사람들을 대상으로 법의학적인 측면에서 연구가 이루어져왔다. LPL locus는 8번 염색체 lipoprotein lipase gene의 intron 6에 위치하며 AAAT의 4bp(염기)를 기본 repeating unit로 하는 STR locus이다.

PCR은 repeating unit의 좌우측면에 있는 primer oligonucleotides를 이용하여 genomic DNA의 특정 sequence를 증폭하는데 사용되었다. 일반적으로 한국인 집단에서는 4bp의 repeating unit가 10번에서 12번 반복되는 것이 주를 이루는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 태음인, 소음인, 소양인으로 분류된 각 그룹별 100인에 대해서 LPL에 대한 STR typing을 실시하여 체질 그룹별 유전적 상관성을 조사하였다.

다양성의 척도가 되는 PIC값을 볼 때, 태음인은 0.448, 소음인은 0.377, 소양인은 0.425로 나타나, 낮은 PIC 값을 보였으며, 발견된 allele의 수는 3~5개였다. Table 4에는 태음인, 소음인, 소양인에 대한 LPL allele No.의 분포와 그 빈도를 표시하였다. 그리고 Fig. 3에는 각 체질별 allele 분포의 빈도수를 막대그래프로 나타내었다. Fig. 3와 Table 4에 나타난 바와 같이 LPL locus에서 태음인, 소음인, 소양인의 allele 분포는 allele No. 4에서 가장 높아 전체의 반 이상을 차지하고 있었으며, 소음인(73.0%), 소양인(69.5%), 태음인(65.5%)의 순으로 나타났다. 또한 소음인에서는 발



〈Fig. 3〉 Relative allele frequency distributions of LPL locus in Taeum, Soum, and Soyang group.

견되지 않은 allele(No. 3)과 태음인(No. 1)과 소양인(No. 7)에서만 발견되는 allele이 존재하였다.

LPL locus에서 각 집단이 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected genotype frequency를 계산하고, observed genotype frequency와의 비교를 통해 chi-square test를 행하여 유의성을 조사하였다.

〈Table 4〉 LPL allele distribution of Taeum, Soum, and Soyang group.

| allele | Taeum(1-100) | | Soum(1-100) | | Soyang(1-100) | |
|--------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) |
| 1 | 1 | 0.5 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| 3 | 2 | 1.0 | 0 | 0.0 | 1 | 0.5 |
| 4 | 131 | 65.5 | 146 | 73.0 | 141 | 70.5 |
| 5 | 18 | 9.0 | 15 | 7.5 | 22 | 11.0 |
| 6 | 48 | 24.0 | 39 | 19.5 | 35 | 17.5 |
| 7 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 1 | 0.5 |
| 8 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| total | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 |

*The numbering of allele starts with the smallest allele size.

(2 Observed no. of allele/ 1 sample)

그 결과, 각 체질집단(100명)의 p-value를 보면 태음인은 0.9997, 소음인은 0.5727, 그리고, 소양인은 0.9951로서, $p < 0.01$ 에서 세 집단 모두 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하고 있음을 알 수 있었으며, 이 결과로부터 본 연구에서 추출된 표본집단은 random한 집단이고 random mating이 일어나는 집단임을 알 수 있다. 이러한 결과로 보아 LPL locus 역시 각 집단별 특이성을 대변할 만한 유의적인 요소가 없는 것으로 사료되었다.

5. TPOX

TPOX locus는 2번 염색체의 human thyroid peroxidase gene의 intron에 위치는 것으로 밝혀졌으며, Anker등(1992) 여러 사람들에 의해서 다형질이 연구되어 왔다. TPOX locus는 기본적으로 AGAT의 tetra-nucleotide repeat로 이루어져 있

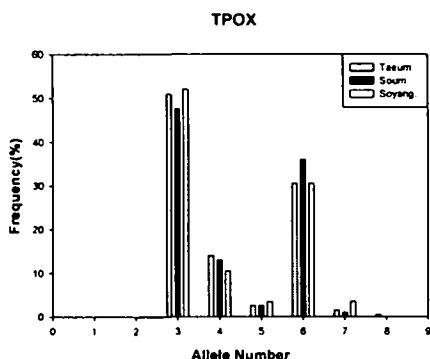
다. 일반적으로 TPOX는 allele의 크기가 299~323 bp에 걸쳐 존재하고 4bp의 core repeating unit가 6번 반복부터 13번 반복까지인 8종의 allele가 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 태음인, 소양인, 소음인으로 분류된 각 그룹별 100인에 대해서 TPOX에 대한 STR typing을 실시하여 체질 그룹별 유전적 상관성을 조사하였다.

다양성의 척도가 되는 PIC값을 볼 때, 태음인은 0.564, 소음인은 0.556, 소양인은 0.563으로 나타나, 비교적 높은 PIC 값을 보였으며, 발견된 allele의 수는 5~6개였다. Table 5에는 태음인, 소양인, 소음인에 대한 TPOX allele의 분포와 그 빈도를 표시하였다. 그리고 Fig. 4에는 각 체질별 allele 분포의 빈도수를 막대그래프로 나타내었다. Fig. 4과 Table 5에 나타난 바와 같이 각 체질별 allele 분포는 allele No. 3(47.0%이상)에서 가장 높은 빈도를 보였으며, 전체적으로 비슷한 양상을 보였다.

<Table 5> TPOX allele distribution of Taeum, Soum, and Soyang group.

| allele | Taeum(1-100) | | Soyang(1-100) | | Soum(1-100) | |
|--------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) | observed No. | frequency (%) |
| 1 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| 2 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| 3 | 102 | 51.0 | 95 | 47.5 | 104 | 52.0 |
| 4 | 28 | 14.0 | 26 | 13.0 | 21 | 10.5 |
| 5 | 5 | 2.5 | 5 | 2.5 | 7 | 3.5 |
| 6 | 61 | 30.5 | 72 | 36.0 | 61 | 30.5 |
| 7 | 3 | 1.5 | 2 | 1.0 | 7 | 3.5 |
| 8 | 1 | 0.5 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| total | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 | 200 | 100.0 |

*The numbering of allele starts with the smallest allele size.
(2 Observed no. of allele/ 1 sample)



〈Fig. 4〉 Relative allele frequency distributions of TPOX locus in Taeum, Soum, and Soyang group.

TPOX locus에서 각 집단이 random population에 적용되는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하는지 검정하기 위하여 Hardy-Weinberg Law에 따라 expected genotype frequency를 계산하고, observed genotype frequency와의 비교를 통해 chi-square test를 수행한 결과, 각 체질집단(100명)의 p-value를 보면 태음인은 0.9753, 소음인은 0.3871, 그리고 소양인은 0.6577로서, $p < 0.01$ 에서 세 집단 모두 Hardy-Weinberg Equilibrium을 만족하고 있음을 알 수 있었으며, 이 결과로부터 본 연구에서 추출된 표본집단은 random한 집단이고 random mating이 일어나는 집단임을 알 수 있다. 이러한 결과로 보아 TPOX locus 역시 각 집단별 특이성을 대변할 만한 유의적인 요소가 없는 것으로 나타났다.

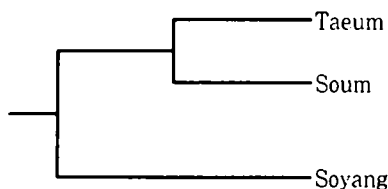
6. 각 체질집단간의 상관관계 조사

세 가지 체질집단에서 얻어진 각 STR locus 당

allele의 빈도로부터 사상체질 집단 사이의 상관관계를 조사하였다. 상관관계 분석을 위해 allele 빈도로부터 Nei(1972)의 공식에 따라 genetic distance를 구하고, 이를 근거로 dendrogram을 작성하였다. Table 6은 태음, 소음, 소양인 체질 집단 사이의 genetic distance를 나타낸 것이며, Fig. 5는 각 체질집단간의 상관관계를 dendrogram으로 나타낸 것이다. 이 결과로 볼 때, 소음인과 태음인 사이의 관계가 나머지 관계에 비해 더 가까운 상관관계를 가지고 있음을 알 수 있다. 각 체질 집단이 random한 집단으로부터 규정되었음을 추정해 볼 때, 매우 흥미있는 결과라 할 수 있다. 따라서, 더 많은 STR분석과 체질 관련 유전자로부터도 위와같은 상관관계를 유추해낸다면, 이는 향후 체질간의 상관관계 규명에 좋은 자료로 제시될 수 있을 것이다.

〈Table 6〉 Genetic distance between Taeum, Soum, and Soyang group.

| Population | Taeum | Soyang | Soum |
|------------|--------|--------|--------|
| Taeum | 0.0000 | 0.0399 | 0.0138 |
| Soyang | 0.0399 | 0.0000 | 0.0271 |
| Soum | 0.0138 | 0.0271 | 0.0000 |



〈Fig. 5〉 Dendrogram showing the genetic relationship among Taeum, Soum, and Soyang group from the allele frequencies of 4 STR loci.

IV. 결 론

본 연구는 사상체질진단법에 의해서 분류된 태음인, 소양인, 소음인 그룹에 대하여, 현재 유전적 분석 연구에 많이 사용되는 Amp-FLP법을 이용하여 기존의 tetra nucleotide repeat의 STR 중 4종의 locus(D3S1744, D13S317, LPL, TPOX)를 대상으로 allele distribution을 조사·분석하고 Hardy-Weinberg Equilibrium 및 chi-square test를 실시하여 통계학적인 유의성을 검토함으로써, 체질 그룹별 상이성 및 상관성을 찾아보고 사상의학의 객관화 및 그 임상활동에 관한 유용한 자료를 제공함을 목적으로 추진되었다.

세 체질집단에 대한 STR typing 결과, LPL locus를 제외한 나머지 STR locus는 각 집단에 대해서 높은 이형질성 정도(PIC)와 allele number를 보였다. PIC값이 그 집단의 다양성의 척도를 나타낸다고 볼 때, 이들 STR locus는 한국인 집단에 대한 forensic case나 paternity test에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 사료된다. 각 STR locus에서 세 집단에 대한 통계학적인 검정 결과, D13S317, D3S1744, LPL와 TPOX는 p-value <0.01에서 유의성있게 나타나지 않았으며, Hardy-weinberg equilibrium을 만족하고 있음을 나타내었으며, 이러한 결과로부터 본 연구에서 추출된 300명의 표본집단은 random한 집단이고, random mating이 일어나는 집단임을 알 수 있다. 이러한 결과로 보아 이들 4종의 STR locus는 각 체질별 집단의 특이성을 대변할 만한 유의적인 요소가 없다고 사료되었다.

한편, 이들 세 가지 체질집단에서 얻어진 각 STR locus 당 allele의 빈도로부터 사상체질 집단 사이의 상관관계를 조사한 결과, 소음인과 태음인 사이의 관계가 나머지 관계에 비해 더 가까운 상관

관계를 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서, 더 많은 STR 분석과 체질관련 유전자로부터도 위와 같은 상관관계를 유추해낸다면, 이는 향후 체질간의 상관관계 규명 및 판별이 어려운 체질의 규명에 좋은 자료로 제시될 수 있을 것이다.

본 연구에서 쓰인 4종의 locus(D3S1744, D13S317, LPL, TPOX)들은 실제로 유전정보를 가지고 있는 gene 부분이 아니고 intron 부분의 repetitive sequence이므로 이들 부분이 직접적으로 체질을 결정하는 유전형질과 관련이 있을 가능성은 없다. 하지만 많은 종류의 genetic disease에 대한 염색체 지도를 작성할 때 STR locus들이 좋은 marker로 사용되듯이, 체질을 결정짓는 유전형질의 염색체상의 위치를 밝히는데 있어서 STR locus들을 marker로 사용하는 것은 가능하다고 사료된다.

또한, 사상의학은 인간의 정신과 육체, 언행과 성격, 체형 등에 이르기까지 심신 양면에 있어서 다각도로 연구된 학문이므로, 이들과 연관된 gene들의 더 많은 수의 STR locus와 기능성 유전자들에 대한 분석을 실시하고 이들 중 각 체질그룹간의 유전적 동질성 및 상이성을 제시할 수 있는 locus 및 gene을 찾아내어 그들을 연계 지어 조합·분석한다면 사상체질판별에 유전적 기준을 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

Andrea G, Claudia D, et al., Ring chromosome 13 with loss of the region D13S317-D13S285 : Phenotypic overlap with XK syndrome, *American Journal of Medical Genetics*, 1997;72:319.

- Baird M, I Balazs and Giusti A. Allele frequency distribution of two polymorphic DNA sequences in three ethnic groups and its application to the determination of paternity. *Am. J. Hum. Genet.* 1986; 39: 489-501.
- Bostein JS, White RL, Skolnick M and Davis RW. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32:314-331
- Budowle B, JB Smerick, KM Keys and Moretti TR. United States population data on the multiplex short tandem repeat loci-HUMTHO1, TPOX, and CSF1PO-and the variable number tandem repeat locus D1S80. *J. Forensic Sci.* 1997;42:846-849.
- Budowle B, R Chakraborty, AM Giusti, AJ Eisenberg and RC Allen. Analysis of the variable number of tandem repeats locus D1S80 by the polymerase chain reaction followed by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 1991;48:137-144.
- Christina S, Thomas L, et al., German population data of three tetrameric short tandem repeat loci-D3S1744, D12S1090 and D18S849. *Forensic Science International.* 1998;91:103.
- Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:9677-9686.
- Edwards A, A Civitello, HA Hammon and CT Caskey. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991;49: 746-756.
- Edwards A, HA Hammon, L Jin, CT Caskey and R Chakraborty. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241-253.
- Hammond HA, L Jin, Y Zhong, CT Caskey and Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification application. *Am. J. Hum. Genet.* 1994;55:175-189.
- Helmuth R, N Fildesand and E Blake. HLA-DQ alpha allele and genotype frequencies in various human populations determined by using enzymatic amplification and oligo nucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet.* 1990;47:515-523.
- Horn TG, R Brenda and Katherine WK. Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:2140-2148.
- James LW and Paula EM. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989;44:388-396.
- Jeffrey AJ and V Wilson. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985;317:67-73.

- Jorquera H and B Budowle, Chilean Population Data on Ten PCR-based Loci. *J. Forensic Sci.* 1998;43:171-173.
- Krawetz SA, RA Bricker, RB Connor and GH Dixon, Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of bovine nuclear protein genes. *Theor. Appl. Genet.* 1988;75:402-410.
- Lee DH, Han JS, Lee WG, Lee SW and Rho HM, Quadruplex amplification of polymorphic STR loci in a Korean population. *Int. J. Legal. Med.* 1988;111:320-322.
- Li J, Peter AU, et al., Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. *Journal of Forensic Science*, 1996; 496.
- Litt M and JA Luty, A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1989;44:397-401.
- MK Wirtz, JR Samples, et al., Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997;60:296
- Morris JW, AI Sanda and J Glassberg, Biostatistical evaluation of evidence from continuous allele frequency distribution deoxyribonucleic acid(DNA) probes in reference to disputed paternity and identify. *J. Forensic Sci.* 1996;34:1311-1317.
- Nakamura Y, M Leppert, P O'Connell, R Wolff, T Holm, M Culver, C Martin, E Fujimoto, M Hoff, E Kumlin and R White, Variable number of tandem repeat(VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1989;235:1616-1622.
- Nei, M, Genetic distance between population. *Am. Nat.* 1972;106:283-292.
- Park SJ, Lee WG, Lee SW, Kim SH, Koo BS, Budowle B and Rho HM, Genetic variations at four tetrameric tandem repeat loci in Korean population. *J. Forensic Sci.* 1997;42:125-129.
- Puers C, AH Holly, J Li, CT Caskey and WS James, Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01(AATG)_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am. J. Hum. Genet.* 1993;53: 953-958.
- Rocha JL, JF Baker, JE Womack, JO Sanders and JF Taylor, Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattles. *J. Anim. Sci.* 1992;70: 3360-3370.
- Weber JL and PE May, Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 1989;44: 388-396.