

한국 신생아의 폐 표면 활성제 단백-A1 (Human Surfactant Protein-A1) 유전자 대립형질의 분포와 빈도

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

이경신 · 김영희 · 석정수* · 고정호* · 유욱준* · 이인규 · 오명호 · 배종우†

Allele Distribution and Frequency of Human Surfactant Protein-A1 in Korean Neonates

Kyung Shin Lee, M.D., Young Hee Kim, 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, College of Medicine, Soonchunhyang University, Chonan,
Department of Biological Sciences*, Korea Advanced Institute of
Science and Technology, Daejeon,
Department of Pediatrics†, College of Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea*

Purpose: We evaluated allele frequencies and distribution of surfactant protein A1(SP-A1) in Korean neonates in order to estimate prevalence of RDS to find out new SP-A alleles, and to establish new steroid therapy.

Methods: Genomic DNA was extracted from 100 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-RFLP methods.

Results: The distribution for the alleles of the SP-A1 gene in the study population were 6A, 6A², 6A³, 6A⁴, 6A⁸, 6A⁹, 6A¹⁰, 6A¹¹, 6A¹², 6A¹³, 6A¹⁴, 6A¹⁵, 6A¹⁶, 6A¹⁷, 6A¹⁸, 6A²⁰. The specific frequencies for the alleles of the SP-A1 gene in the study population were: 6A²=21%, 6A³=45%, 6A⁴=11%, 6A⁸=9%, 6A¹⁴=8%.

Conclusion: The frequency of 6A³ was higher than the other SP-A1 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 2002;45:1497-1502)

Key Words: Surfactant, SP-A1, SP-A1 alleles, RDS, Steroid

서 론

접수 : 2002년 8월 9일, 승인 : 2002년 9월 17일
책임저자 : 오명호, 순천향의대 천안병원 소아과
Tel : 041)570-2160 Fax : 041)572-4996
E-mail : omh@schch.co.kr

미숙아, 그 자체가 성별, 종족과 더불어 신생아 호흡
곤란 증후군(respiratory distress syndrome, RDS)

의 가장 중요한 원인이다. 그러나, 최근의 쌍생아 연구나 유전학적 연구에서는 RDS의 원인에 유전적인 원인도 관여한다는 것을 강하게 암시하고 있다^{1, 2)}. 결론적으로 RDS의 원인의 하나로 유전적인 요인을 생각 할 수 있다. 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 있다. SP-A는 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 구성 중 단지 1%만을 차지하는 아주 적은 양의 단백질이지만, SF의 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 있다⁵⁾. 최근의 연구에 의하면, RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 BPD를 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 억제 되는 유전자 대립형질을 갖고 있는 신생아에게 지금 같이 일률적으로 적용되어지는 스테로이드 용량 및 방법은 재고되어야 할 것이다^{6, 7)}. 그러므로 본 연구에서는 SP-A1의 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 1월부터 2002년 4월까지 순천향대학교 천안병원, 경희대학교병원 신생아실에 입원한 정상 만삭 신생아 100명을 대상으로 하였다(Table 1).

2. DNA samples

전혈 0.5-3 mL를 제대혈로 채취하여 EDTA 용기에 넣고 -70℃에 보관하였다. Genomic DNA는 Puregene DNA Isolation Kit(Gentra Systems)를 사용

하여 전혈에서 추출하였다. 간단히 설명하면, 전 혈액 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 μL 첨가하고 원심 분리한 후, 각 침전물(pellet)에 1.2M NaOAc 75 μL, 10% SDS 5 μL과 proteinase K(20 mg/mL H₂O) 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 원심분리 하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관(microcentrifuge tube)의 상층부를 조심스럽게 옮기고, chloroform 100 μL 첨가 후 30초간 잘 흔들어 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관(microcentrifuge tube)에 상층부를 조심스럽게 옮기고, 차가운 100% ethanol(-20℃보관) 500 μL 첨가하여 -20℃에 20분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 후 상층 액을 버리고 침전 된 침전물(pellet)에 80% ethanol(4℃ 보관) 1 mL 첨가 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층 액을 버리고 Speed-Vac에서 10분간 침전물(pellet)을 건조 한 다음, 증류수 50 μL에 침전물

Table 1. Characteristics of Newborn Subjects

	Male	Female
Gestational age(wks)	39.2±0.9	39.4±1.1
Body wt(kg)	3.3±0.5	3.2±0.3
Number	49	51

wks : weeks

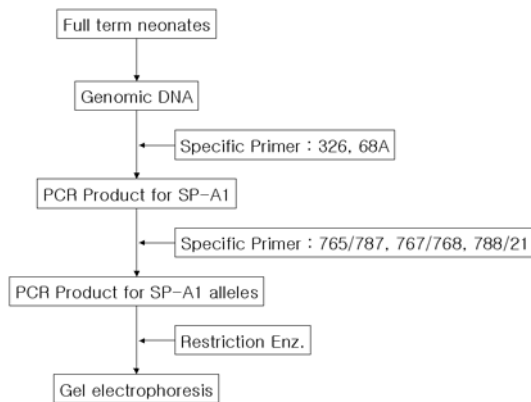


Fig. 1. Outline of genotyping of SP-A1 genes.

Table 2. Primers for cRFLP Analysis of SP-A1

SP-A1	Primer	Orientation	Sequence(5'-->3')
	326	Sense	ACTCCATGACTGACCACCTT
	68A	Antisense	TGCCACAGAGACCTCAGAGT
	765	Antisense	AGGGCCAGGGTCTCCTcTGA
	787	Sense	ACCTCATCTTGATGTCAGCCTCTGGTGCaG
	767	Sense	TCTGCAGGGCTCCATAATGc
	768	Antisense	CACACACTGCTCTTTTCCtC
	788	Sense	TTTTCTCTGCAGGCCCCATGGGTgC
	21	Antisense	GGGTTTGTCTGATCCCCATC

(pellet)을 녹이고 genomic DNA를 55℃ 항온수조에 서 1시간 동안 용해한 후 -20℃에 보관하였다. 추출된 DNA는 PCR 반응을 위하여 50 ng/ μ L로 희석시켰다.

3. SP-A1 유전자의 유전자 분석(genotyping of SP-A1 genes)

SP-A1의 유전자 분석(genotyping)은 DiAngelo 등⁸⁾이 사용한 방법(PCR-cRFLP-based methodology)을 사용하였다(Fig. 1).

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

SP-A1 유전자는 3.3 kb의 크기로서 전 혈로부터 추출하였다. SP-A1은 유전자 특수 sense 시발체(gene specific sense primer)인 326과 antisense 시발체(gene specific antisense primer)인 68A로 증폭시켰다. PCR 증폭이 끝난 후 1% 아가로스 젤(agarose gel)에서 SP-A1 유전자를 확인하였다.

2) 제한 효소 분석(restriction endonuclease analysis)

SP-A1 유전자의 대립 형질을 위해 증폭된 SP-A1 PCR 생성물을 시발체(primer) 765/787, 767/768, 788/21를 이용하여 2차로 증폭시킨 후 19, 50, 62, 133, 219 위치의 뉴클레오티드(nucleotide)를 선택적으로 자르는 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여(PCR-cRFLP-based methodology) 자른 후 전기영동 하여 염기서열의 차이를 확인하였다(Table 2, 3)(Fig. 2).

결 과

아미노산 염기 서열의 차이에 의하여, 6A, 6A², 6A³, 6A⁴, 6A⁸, 6A⁹, 6A¹⁰, 6A¹¹, 6A¹², 6A¹³, 6A¹⁴,

Table 3. Converted Primers for cRFLP Analysis of SP-A1

SP-A1	Primers	Restriction enzyme
CT at aa 19	765/787	BbvI
CG at aa 50	765/787	DdeI
AG at aa 62	788/21	HhaI
AG at aa 133	767/768	MspI
CT at aa 219	767/768	α TaqI

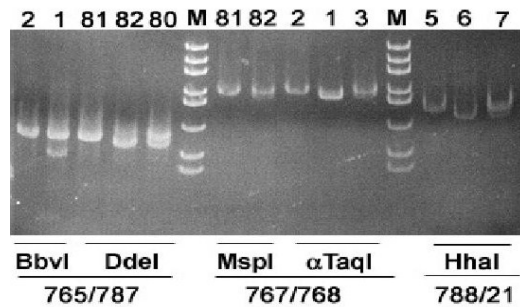


Fig. 2. Picture of restriction endonuclease analysis of SP-A1.

6A¹⁵, 6A¹⁶, 6A¹⁷, 6A¹⁸, 6A²⁰ 등 16개의 대립형질이 발견되었다(Table 4). SP-A1 중 6A³, 6A²가 45%, 21%의 분포를 보였으며, 6A⁴, 6A⁸, 6A¹⁴가 각각 1% 이상의 분포를 보였고, 6A, 6A⁹, 6A¹⁰, 6A¹¹, 6A¹², 6A¹³, 6A¹⁵, 6A¹⁶, 6A¹⁷, 6A¹⁸, 6A²⁰ 등의 대립형질도 전체 6%의 분포를 보였다(Table 5)(Fig. 3). SP-A1의 Genotype은 6A²6A³, 6A³6A⁴, 6A³6A³, 6A²6A⁴ 등이 88% 이상의 빈도를 보였다(Table 6)(Fig. 4).

고 찰

폐 표면 활성제 단백-A는 폐 표면 활성제의 구성 중 1% 정도만을 차지하고 있으나 PS의 기능 및 생리적 작용에 많은 기여를 한다고 밝혀지면서 활발히

Table 4. SP-A1 Alleles as Determined by cRFLP at Designated Amino Acids

Alleles	Aminoacid				
	aa19	aa50	aa62	aa133	aa213
6A	C	C	G	G	C
6A ²	T	G	A	A	C
6A ³	T	C	A	A	C
6A ⁴	T	C	G	A	T
6A ⁸	T	C	A	A	T
6A ⁹	T	C	G	G	T
6A ¹⁰	C	C	G	A	C
6A ¹¹	C	C	A	A	C
6A ¹²	T	G	A	A	T
6A ¹³	T	G	G	A	C
6A ¹⁴	T	C	G	A	C
6A ¹⁵	C	G	G	A	C
6A ¹⁶	T	C	A	G	C
6A ¹⁷	C	C	A	G	C
6A ¹⁸	T	G	G	A	T
6A ²⁰	T	C	G	A	C

Table 5. Distribution and Frequencies of SP-A1 Alleles in Korean Neonates : n=200 Alleles

SP-A1 allele	Allele frequency(%)
6A ²	21
6A ³	45
6A ⁴	11
6A ⁸	9
6A ¹⁴	8
Others	6

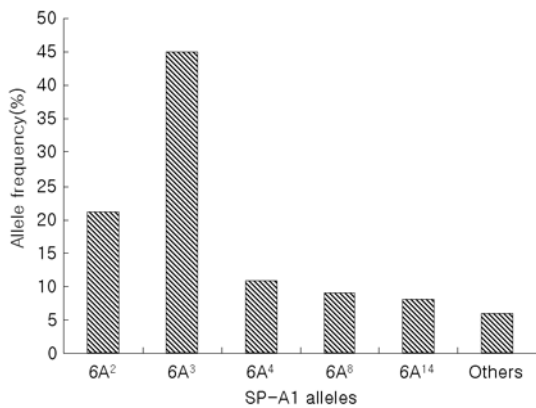


Fig. 3. Distribution and frequencies of SP-A1 alleles in Korean neonates.

연구되어 지기 시작했다. 최근에는 acute phase reactant molecule과 유사한 구조 및 기능을 가진 것으로

Table 6. Frequency of Linkage of SP-A1 Alleles : n=100

Genotype	Frequency(%)
6A ² 6A ³	32
6A ³ 6A ⁴	24
6A ³ 6A ³	21
6A ² 6A ⁴	11
Others	12

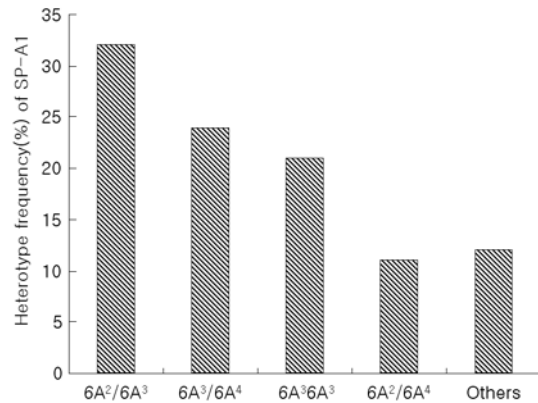


Fig. 4. Frequency of linkage of SP-A1 alleles.

Table 7. Distribution and Frequencies of SP-A1 Alleles in Finland, USA and Korea^{3,4)}

SP-A1 allele	Allele frequency(%)		
	Finland	USA	Korea
6A		9.30	
6A ²	60	54.40	21
6A ³	28	27.75	45
6A ⁴	9	8.50	11
6A ⁸			9
6A ¹⁴			8
Others	3	0.05	6

연구되어져 폐의 숙주방어와 염증반응에 중요하게 관여하는 것으로 알려졌다⁵⁾. RDS와의 관계에서는 RDS와 SP-A 유전자 대립형질(alleles) 중 일부 대립형질(inducer : 6A², 1A⁰, 6A²/1A⁰, protector : 6A³, 1A⁵)이 RDS의 발생과 아주 밀접한 관계가 있어, 이와 같은 대립형질을 가진 신생아에서 RDS가 발생 될 가능성이 높은 것으로 되어 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 RDS

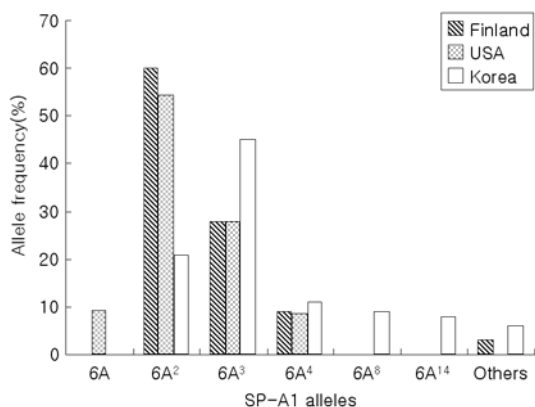


Fig. 5. Distribution and frequencies of SP-A1 alleles in Finland, USA and Korea^{3,4}.

의 발생 가능성을 예측할 수 있다. 최근의 연구에 의하면, RDS 예방으로서 산전에 산모에게 투여되거나 BPD를 예방하기 위하여 신생아에게 사용되어지는 스테로이드에 대한 SP-A 유전자 대립형질의 유전자 발현이 서로 다른 차이를 보인다. 이러한 유전자 사이의 반응의 차이는 일부 특정한 유전자 부위가 관여할 것이라는 보고가 있다^{6,7}. 이와 같은 조절의 차이는 스테로이드 같은 약을 사용하였을 때 각 개인이 가지고 있는 유전자나 대립형질에 따라서 약에 대해서도 다른 반응을 보일 수 있음을 의미한다. 즉, RDS나 BPD를 예방할 목적으로 사용되어지는 스테로이드가 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 유지할 수 없으므로 RDS나 BPD는 예방이 될 수는 있어도 SP-A의 중요한 기능인 숙주 방어와 염증 반응이 억제되어 폐혈증, 폐렴 등의 감염을 증가시킬 수 있다⁹. 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 대립형질의 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-A1의 빈도와 분포가 알려진 미국과 핀란드의 경우 6A, 6A², 6A³, 6A⁴가 1% 이상의 분포 및 빈도를 보였으나^{3,4} 우리나라에서는 다른 빈도를 보였다고 (Table 7)(Fig. 5). 두 나라에서 6A²의 빈도가 월등히

많은 것과 비교하여 우리나라에서는 6A³의 빈도가 많은 것을 볼 수 있었다. 이는 RDS와 연관이 있는 6A²의 빈도가 두 나라에 비해 우리나라가 월등히 적고 RDS에 대해 보호체(protector)로 작용하는 6A³의 빈도가 많은 것으로 보아 실질적으로도 우리나라에서 RDS의 발생률이 적을 것으로 생각된다. 그러나, 아직 우리나라에는 RDS 발생률에 대한 통계가 없는 실정 이므로 앞으로 연구되어야 할 것이다. 우리나라에 많은 빈도를 보이는 6A³는 다른 대립형질에 비해 스테로이드를 사용할 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 치료도 많은 연구가 있어야겠다.

결론적으로 우리나라에서는 RDS에 대한 보호체 (protector)로 작용하는 6A³의 빈도가 높았으며, SP-A2의 분포 및 빈도, 스테로이드 반응 여부에 대해 더욱 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

목적 : RDS 발생과 BPD로의 이행을 예측 할 수 있고, 스테로이드 치료에 새로운 지표로서 사용 될 수 있는 SP-A1의 유전자 대립형질의 한국분포 및 빈도를 밝히고 새로운 종류의 유전자 대립형질을 발견하기 위하여 본 연구를 하였다.

방법 : 2002년 1월부터 2002년 4월까지 순천향대학교 천안병원, 경희대학교병원 신생아실에 입원한 정상 신생아 100명을 대상으로 하여, SP-A1 유전자의 대립형질을 위해 시발체(primer) 765/787, 767/768, 788/21를 이용하여 증폭 시킨 후 19, 50, 62, 133, 219 위치의 nucleotide를 알아보기 위하여 각 위치에 맞는 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여 (PCR-cRFLP-based methodology) 자른 후 전기영동 하여 염기서열의 차이를 알아냈다.

결과 : 아미노산 염기 서열의 차이에 의하여, 6A, 6A², 6A³, 6A⁴, 6A⁸, 6A⁹, 6A¹⁰, 6A¹¹, 6A¹², 6A¹³, 6A¹⁴, 6A¹⁵, 6A¹⁶, 6A¹⁷, 6A¹⁸, 6A²⁰ 등의 16개의 대립형질이 발견되었으며, SP-A1 중 6A³ 45%, 6A² 21%의 분포를 보였고, 6A⁴, 6A⁸, 6A¹⁴도 1% 이상의 분포를 보였다. 이외에도 6A, 6A⁹, 6A¹⁰, 6A¹¹, 6A¹², 6A¹³, 6A¹⁵, 6A¹⁶, 6A¹⁷, 6A¹⁸, 6A²⁰의 대립형질이 6%

의 분포를 보였으며, SP-A1의 Genotype은 $6A^26A^3$, $6A^36A^4$, $6A^36A^3$, $6A^26A^4$ 등이 88% 이상의 빈도를 보였다.

결론: RDS에 대해 보호체(protector)로 작용하는 $6A^3$ 의 빈도가 많은 것으로 보아 실질적으로도 우리나라에서 RDS의 발생률이 적을 것으로 생각된다. 그러나 우리나라에 많은 빈도를 보이는 $6A^3$ 는 다른 대립형질에 비해 스테로이드를 사용 할 때 유전자 발현에 많은 억제를 보여 숙주 반응에 중요하게 작용하는 SP-A의 혈청 내 농도가 적을 것으로 추측되어, 감염에 노출 될 위험이 많으므로 우리나라에서는 스테로이드 치료에 있어서 많은 연구가 있어야겠다.

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) Myriantopoulos 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, and 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. *Pediatr Res* 2001;49:1708.
- 8) DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo K, 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.
- 9) LeVine AM, Kurak KE, Wright JR, Watford WT, Bruno MD, Ross GF, et al. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phago cytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:279-86.