

## 특발성 저신장증 환자에서 IGF-I 프로모터 cytosine-adenine repeat 유전자 다형성의 분석

인제대학교 의과대학 소아과학교실

문재훈·정우영

= Abstract =

### Analysis of cytosine adenine repeat polymorphism of the IGF-I promoter gene in children with idiopathic short stature

Jae Hoon Moon, M.D. and Woo Yeong Chung, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Inje University, Busan, Korea

**Purpose :** A polymorphism in the IGF-I gene promoter region is known to be associated with serum IGF-I levels, birth weight, and body length, suggesting that IGF-I gene polymorphism might influence postnatal growth. The present study aimed to investigate the role of this polymorphic cytosine-adenine (CA) repeat of the IGF-I gene in children with idiopathic short stature.

**Methods :** The study involved 131 children (72 boys and 59 girls) diagnosed with idiopathic short stature, aged 7-15 years. Genomic DNA was extracted from anticoagulated peripheral whole blood. The primers were designed to cover the promoter region containing the polymorphic CA repeat. Data were analyzed using GeneMapper software. The correlations between age and serum IGF-I levels were analyzed using Spearman's correlation coefficient.

**Results :** The CA repeat sequences ranged from 15 to 22, with 19 CA repeats the most common with an allele frequency of 40.6%. Homozygous for 19 CA repeat was 13.0%, heterozygous for 19 CA repeat was 56.5%, and 19 CA non-carrier was 30.5%. The three different genotype groups showed no significant differences in height, body weight and body mass index, and serum IGF-I levels. The serum IGF-I level and age according to the IGF-I genotypes were significantly correlated in the entire group, 19 CA repeat carrier group, and the non-carrier group. The three groups also showed no significant differences in the first year responsiveness to GH treatment.

**Conclusion :** There were no significant different correlations between 19 CA repeat polymorphism and serum IGF-I levels according to genotype. Our results suggest that the IGF-I 19 CA repeat gene polymorphism is not functional in children with idiopathic short stature. (*Korean J Pediatr* 2009;52:356-363)

**Key Words :** Serum IGF-I level, 19 CA polymorphism, IGF-I gene, Growth hormone treatment response, Idiopathic short stature

### 서론

성장호르몬 결핍증이나 성장호르몬 insensitivity를 가진 환자의 일부에서 성장호르몬과 인슐린양 성장인자 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 유전자, 성장호르몬방출호르몬 수용체, 성장호르몬 수용체 유전자 등에 돌연변이가 존재한다는 사실이 밝혀졌다<sup>1-3)</sup>. 특발성 저신장증(idiopathic short stature, ISS)이

란 일반적으로 비성장호르몬 결핍에 의한 저신장증을 말하며 환자의 일부에서 혈중 성장호르몬 결합단백과 IGF-I 농도가 낮게 나타난다<sup>4,5)</sup>. Selva 등<sup>6)</sup>은 ISS 환자를 대상으로 한 연구에서 혈중 IGF-I 농도는 정상 범위 중 낮은 농도를 보였으며, IGF generation 검사 상 성장호르몬 투여 후 불량한 IGF-I 반응을 나타내었다고 보고하였다. 이런 연구결과들은 ISS의 경우 대부분의 환자들은 성장호르몬 결핍증이나 성장호르몬 insensitivity를 가진 환자들과는 현저하게 다른 임상적 그리고 생화학적 표현형을 나타내지만 일부 환자에서는 경미한 형태의 유전학적 이상을 가질 가능성을 암시해 주었다.

마우스를 이용한 실험에서 간에서 존재하는 IGF-I 유전자와 acid labile subunit 유전자를 제거하였을 때 길이 성장의 장애가 현저함을 보여 길이 성장에 있어서 혈중 IGF-I 농도의 중요성을 입증하였다<sup>7)</sup>. 또한 성장호르몬 수용체와 IGF-I이 모두 제거된

Received : 2 June 2008, Revised : 8 December 2008,

Accepted : 13 January 2009

Address for correspondence : Woo Yeong Chung, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Inje University, Busan Paik Hospital, Gaegeum-dong, Busanjin-gu, 614-713, Busan, Korea

Tel : +82.51-890-6280, Fax : +82.51-895-7785

Email : chungwy@hollian.net

마우스에서는 성장장애가 뚜렷하였으나 성장호르몬 수용체만 제거한 마우스에서는 성장장애가 적게 나타나서 성장에 미치는 혈중 IGF-I 농도의 중요성을 확인하였다<sup>8)</sup>. 혈중 IGF-I 농도는 민족과 개인에 따라 다양한 차이가 존재하는데, 유전적 요인의 중요성이 보고되어 있다. 쌍생아를 대상으로 한 일련의 연구들에서 비록 관련된 특정 부위를 밝혀내지는 못하였지만, 50-60% 정도는 유전적 요인에 의해 결정된다고 하였다<sup>9, 10)</sup>. IGF-I 유전자의 5' UTR 부위에 위치하는 프로모터의 구성요소들은 유전자 전사의 기본적인 활동에 영향을 줄 수 있다<sup>11, 12)</sup>. IGF-I 유전자 프로모터 부위에는 cytosine-adenine dinucleotide (CA repeat)이 반복되는 부위가 있으며, CA repeat 반복 횟수에 기인한 길이 차이에 의한 유전자 다형성이 존재한다는 사실이 밝혀졌다<sup>13)</sup>. IGF-I 전사 개시부위로부터 1 kb upstream에 위치하고 있어서 프로모터의 전사활동에 영향을 미칠 수 있을 것으로 간주되고 있으며, 이 유전자 다형성이 혈중 IGF-I의 농도에 영향을 미칠 수 있다는 주장이 제기되었다<sup>13-19)</sup>. ISS 환자에서 IGF-I 유전자 다형성이 어떤 역할을 하는지에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자들은 한국인 ISS 환자들을 대상으로 IGF-I 유전자 다형성의 종류와 빈도 그리고 유전자형을 조사하며, IGF-I 유전자형이 키, 체중, BMI 그리고 혈청 IGF-I의 농도에 미치는 영향을 분석하고, IGF-I 유전자형에 따른 혈청 IGF-I 농도와 상관관계를 조사하며, 유전자형에 따른 성장호르몬 치료 효과를 분석함으로써 IGF-I 유전자 다형성의 기능적 중요성과 역할을 규명하고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2003년 1월부터 2006년 6월까지 인제대 부산백병원 소아과에 성장에 관한 평가를 받기 위하여 내원한 환자들 중에서 신장계측에 의해 2007년에 제작된 한국 소아 발육 표준 신장표에 의거하여 나이와 성별에 따른 신장백분위수가 3백분위수 미만인 소아 및 청소년을 대상으로 하였다. 환자들은 모두 인슐린과 L-dopa를 이용한 성장호르몬 자극검사에서 혈중 성장호르몬 농도가 10 ng/mL 이상이었다. 또한 다른 종류의 내분비 질환을 동반한 경우, 터너 증후군과 같은 염색체 이상, 만성소모성 질환, 저출생아로 태어난 환자 및 기타 기질적인 병변을 가진 환자는 제외하였다. 유전자형에 따른 성장호르몬 치료 효과를 분석하기 위하여 최소한 6개월 이상 성장호르몬을 투여 받은 환자를 선별하였다. 성장호르몬 용량은 0.25-0.30 mg/kg/wk였으며 주 6회 피하주사로 투여하였다. 본 연구에 포함된 모든 소아 및 청소년을 대상으로 IGF-I 유전자 검사에 대한 인쇄된 서식의 동의를 받았으며, 부산백병원 기관윤리위원회(IRB)의 심의를 통과하였다. 최종적으로 연구에 포함된 인원은 131명 이었는데, 남아 72명, 여아 59명이었다. 성장호르몬 치료의 분석은 37명을 대상으로 실

시하였다. 연령의 분포는 7세부터 15세까지였다.

## 2. 방법

### 1) 신장의 계측

성장클리닉을 방문하여 체혈이 이루어진 날을 기준으로 신장을 측정하였다. 신장의 계측은 Harpenden 신장기(Holtan Ltd., Britain)를 이용하여 측정하였으며 3회를 측정하여 평균값을 구하였다.

### 2) 혈청 IGF-I의 측정

연구대상자로 채취된 혈액은 혈청을 분리한 후 -70℃ 온도에 저장하여(Ilshin co.) RIA방법을 이용하여 매뉴얼에 따라 통상적인 방법으로 혈중 IGF-I 농도를 측정하였다.

### 3) 전혈로부터 DNA 분리

대상 환자에서 얻어진 EDTA 첨가된 말초혈액(이하 전혈)에서 QIAamp DNA Blood Mini kit (Quiagen, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 먼저 1.5 mL 시험관에 20 µL QIAGEN Protease를 넣고 200 µL 전혈을 넣은 다음 200 µL 완충액 AL을 첨가한다. 15초간 vortex 한 후 56℃에서 10분간 반응시키고 잠깐 원심시킨 다음 동량의 에탄올을 넣고 잘 혼합한다. 제공된 수집관에 QIAamp spin column을 장착시키고 위의 준비된 검체를 조심스럽게 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심한다. 500 µL 완충액 AW1을 QIAamp spin column에 넣고 다시 8,000 rpm에서 1분간 원심한 다음 500 µL 완충액 AW2를 넣어 14,000 rpm에서 3분간 원심시킨다. QIAamp spin column을 1.5 mL 시험관에 옮기고 200 µL의 완충액 AE 또는 증류수를 넣고 56에서 1분간 반응시킨 다음 8,000 rpm에서 1분간 원심시켜 DNA를 회수한다.

### 4) IGF-1 유전자의 염기서열분석

IGF-1 유전자는 종합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭한다. 시발체의 염기서열은 forward primer가 5'-GCTAGCCAGCTGGTGTATT-3' 이고 reverse primer는 5'-ACCACTCTGGGAGAAGGGTA-3' 이며 시발체는 유전자 염기서열 947번에서 984번에 위치하는 CA repeat를 포함하는 promoter 부위를 선택적으로 증폭시키도록 설계한다. PCR 반응은 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µL dNTP, 각각 0.4 M forward primer 및 reverse primer, 5-10 ng의 DNA, Taq polymerase (Promega, USA) 1 unit로 총 용량이 50 µL 되게 혼합하여 사용한다. PCR 반응은 94℃, 5분간 초기 변성시킨 후 94℃, 30초간 변성, 63℃, 35초간 반응을 실시하고, 72℃에서 35초간 연장하는 반응을 총 30회 반복한 후 마지막에 72℃ 10분간 연장반응을 추가한다. 반응이 종료된 PCR 산물 5 µL에 6X gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol) 1 µL를 첨가하여 6% agarose gel에서 100 V, 30분간 전기영동하여 밴드를 관찰한다.

IGF-1 유전자의 CA repeats를 결정하기 위하여 ABI Prism 3100 DNA sequencer를 이용하여 DNA의 염기서열을 분석한다. PCR 증폭을 확인한 다음 나머지 PCR 산물을 전기영동한 다음

DNA 분절이 포함된 gel 조각을 잘라내어 1.5 mL 시험관에 옮긴다. Gel에서 DNA 분리는 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)를 사용한다. 200 mg agarose gel 조각에 3배 용량의 완충액 QG를 첨가하고 50°C 10분간 또는 gel이 완전히 녹을 때까지 방치하는데 gel이 완전히 녹으면 완충액과 비슷한 노란색으로 변한다. Gel과 동량의 isopropanol을 넣고 혼합한 다음 QIAquick column에 검체를 넣고 진공을 작동시키고 검체가 지나가면 중지하고 0.75 mL의 완충액 PE를 넣고 다시 진공을 반복 조작한다. QIAquick column을 1.5 mL 시험관에 옮겨 13,000 rpm에서 1분간 원심하여 완충액에 남아있는 에탄올을 제거한다. QIAquick column을 새 시험관에 옮기고 완충액 EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 또는 증류수를 50 µL 첨가하여 13,000 rpm에서 1분간 원심하여 DNA를 추출한다.

Gel에서 분리된 DNA를 주형으로 하여 ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 sequencing PCR을 실시한다. 총 20 µL를 기준으로 하여 5 X sequencing buffer 2 µL, Big Dye™ Terminator 1 µL, 1.6 pM forward primer 1 µL, 6 µL 이내의 적당한 DNA와 나머지를 H2O로 채워서 95에서 5분간 충분히 변성시킨 후 다시 96°C 10초간 변성, 50°C 5초간 결합, 60°C 4분간 연장하는 과정을 25회 반복한 후 끝으로 72°C 10분간 연장한다. 이와 같이 얻은 sequencing PCR 산물을 에탄올로 침전하여 건조한 다음 HiDi formamide를 10 µL 첨가하여 잘 녹이고 ABI Prism 3100 DNA sequencer를 이용하여 DNA의 염기서열을 분석한다. CA repeats가 반복되는 횟수를 확인하였다.

**5) IGF-1 유전자 CA repeats의 heterozygotes 분석**

Forward 시발체에 형광색소 FAM (PE applied Biosystems, USA)을 부착시키는 것을 제외하고는 위의 PCR 방법과 동일하게 PCR을 시행한다. PCR 산물을 전기 영동하여 그 밴드를 근거로 증류수에 적당한 배율로 희석한다. 10 µL의 HiDi Formamide와 0.5 µL의 500 LIZ size standard와 희석한 검체를 넣은 다음 95°C, 5분간 변성시키고 열음에 5분간 방치한다. Applied Biosystem 3730XL DNA analyzer로 전기영동을 실시하고 GeneMapper Software version 3.7를 이용하여 자료를 분석하여 heterozygotes 여부를 확인하였다.

**3. 통계적 분석**

혈청 IGF-I의 농도는 평균치 표준편차의 형태로 표기하였다. 각각의 유전자형에 따른 혈청 IGF-I 농도의 통계적인 유의성은 Student's t-test나 two-way ANOVA를 사용하여 분석하였다. 나이에 따른 혈청 IGF-I 농도의 변화와 유전자형 사이의 상관성은 Spearman 상관계수로 분석하였다. 모든 자료의 분석은 MediCalc (MediCalc Software, ver 9.6, Belgium) 프로그램을 이용하였으며, 통계적 검정의 유의수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

**결 과**

**1. IGF-I 프로모터 대립유전자의 분포와 유전자형**

IGF-I 유전자는 8가지 대립유전자가 관찰되었다(Table 1). 표에서 보는바와 같이 CA repeat 분포는 15부터 22까지였고, 19 repeat가 40.6%의 빈도로 가장 높았다. 다음으로는 21 repeat가 24.5%를 차지하였으며, 18 repeat는 16.2%였다. 유전자형은 19 CA repeat (192 bp allele) homozygote가 17명으로 13.0%, 19 CA repeat heterozygote가 74명으로 56.5%, 19 CA repeat non-carrier는 40명으로 30.5%를 차지하였다. 유전자형과 대립유전자의 분포는 Hardy-Weinberg Equilibrium을 따랐다.

**2. 유전자형에 따른 키, 체중, BMI 비교**

유전자형에 따른 키, 체중, BMI의 비교는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 키는 19 CA homozygote군 132.94±12.97 cm, 19 CA heterozygote군 132.53±12.82 cm 그리고 19 CA noncarrier군에서 130.96±10.31 cm로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). 체중은 19 CA homozygote군 30.37±8.89 kg, 19 CA heterozygote군 32.46±11.13 kg 그리고 19 CA non-carrier군에서 30.99±9.74 kg으로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). BMI는 19 CA homozygote군 16.87±2.72, 19 CA heterozygote군 17.97±3.01 그리고 19 CA noncarrier군에서 17.66±3.35로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ).

**3. 유전자형에 따른 혈중 IGF-I 농도의 비교**

유전자형에 따른 혈중 IGF-I 농도 변화는 Table 2와 같다. 표에서 보는바와 같이 혈중 IGF-I 농도는 19 CA homozygote군에서 423.20±132.70 ng/mL, 19 CA heterozygote군에서 473.75±185.01 ng/mL 그리고 19 CA noncarrier군에서 435.67±160.29 ng/mL로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ).

**Table 1.** Allele Distribution of the Insulin-like Growth Factor-I Promoter Gene Polymorphism in Children with Idiopathic Short Stature

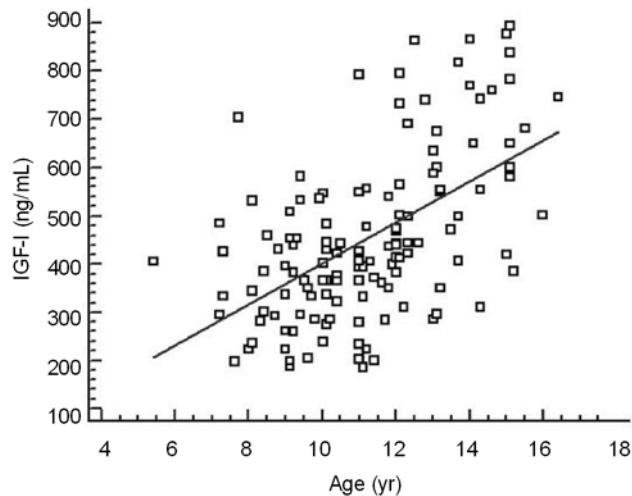
Allele length	Number of CA repeat	Male (n=72)	Female (n=59)	Total (n=131)
184bp	15	1 ( 0.7%)	0	1 ( 0.4%)
186bp	16	2 ( 1.4%)	0	2 ( 0.8%)
188bp	17	10 ( 7.0%)	6 ( 5.1%)	16 ( 6.2%)
190bp	18	22 (15.2%)	20 (16.9%)	42 (16.2%)
192bp	19	57 (39.6%)	51 (43.2%)	106 (40.6%)
194bp	20	11 ( 7.6%)	10 ( 8.5%)	21 ( 8.2%)
196bp	21	37 (25.7%)	27 (22.9%)	64 (24.5%)
198bp	22	4 ( 2.8%)	4 ( 3.4%)	8 ( 3.1%)

Abbreviations : IGF-I, insulin-like growth factor-I; CA, cytosine adenine

**Table 2.** Comparison of the Mean Height, Weight, Body Mass Index and Serum Insulin-like Growth Factor-I Levels according to Genotype in Children with Idiopathic Short Stature

	19 CA Homozygous (n=17)	19 CA Heterozygous (n=74)	s19 CA Noncarrier (n=40)
Age	11.40±2.32	11.24±2.41	11.17±1.84
Sex (M:F)	9:8	39:35	24:16
Height (cm)	132.94±12.97	132.53±12.82	130.96±10.31
Weight (kg)	30.37±8.89	32.46±11.13	30.99±9.74
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	16.87±2.72	17.97±3.01	17.66±3.35
IGF-I (ng/mL)	423.20±132.70	473.76±185.01	435.67±160.29

Abbreviations: CA, cytosine-adenine; BMI, body mass index; IGF-I, insulin-like growth factor I

**Fig. 1.** Correlation between serum IGF-I level and age in the whole entire study group ( $r=0.55$ ;  $P<0.001$ ).

#### 4. 유전자형과 나이에 따른 혈중 IGF-I 농도와 상관계 분석

전체 환자를 대상으로 분석한 나이에 따른 혈중 IGF-I 농도의 변화는, 성별에 관계없이 나이가 증가함에 따라 IGF-I 농도가 증가하는 유의한 양의 상관계수를 나타내었다( $r=0.55$ ;  $P<0.001$ ) (Fig. 1). 유전자형에 따른 혈중 IGF-I 농도와 상관계수를 분석해보면, 19 CA repeat carrier 군에서 성별에 관계없이 나이가 증가함에 따라 IGF-I 농도가 증가하는 유의한 양의 상관계수를 나타내었다(Fig. 2A) ( $r=0.62$ ;  $P<0.001$ ). 이를 다시 19 CA homozygote군( $r=0.74$ ;  $P<0.001$ )과 heterozygote군( $r=0.63$ ;  $P<0.001$ )으로 분류하여 상관계수를 분석하였을 때도 양군 모두에서 유의한 상관계수가 관찰되었다(Fig. 2B, 2C). 이러한 유의한 양의 상관계수는 19 CA noncarrier군에서도 동일하게 관찰되었다 (Fig. 2D) ( $r=0.43$ ;  $P=0.005$ ).

#### 5. 유전자형에 따른 첫 1년간의 성장호르몬 치료 효과의 분석

유전자형에 따른 첫 1년 동안의 성장호르몬 치료 효과는 Table 3과 같다. 표에서 보는 바와 같이 성장호르몬 치료 후 12개월로 환산한 성장속도는 19 CA homozygote군에서  $7.6\pm 3.4$  cm, 19

**Table 3.** First Year Response to Growth Hormone Treatment in Children with Idiopathic Short Stature grouped by Insulin-like Growth Factor-I Promoter Genotype

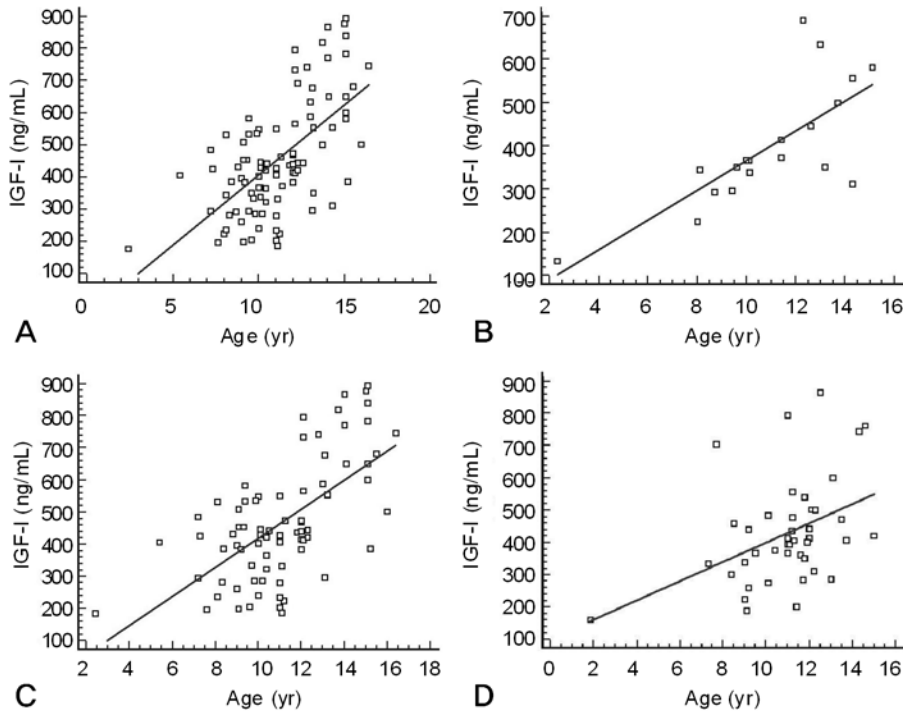
IGF-I genotype	19 CA Homozygote	19 CA Heterozygote	19 CA Noncarrier
Number	5	19	13
Gender (M/F)	2/3	8/11	4/9
Age (yr)	11.3±2.3	11.8±2.2	11.4±1.5
HtSDS (before)	-1.2±0.4	-1.2±0.4	-1.3±0.4
HtSDS (after)	-0.6±0.4	-0.7±0.6	-0.8±0.7
HtV (cm/yr)	7.6±3.4	7.9±2.6	7.7±2.8
Delta HtSDS	0.6±0.2	0.5±0.4	0.5±0.4

Abbreviations: IGF-I, insulin-like growth factor-I; CA, cytosine adenine dinucleotide; HtSDS (before), height standard deviation score before growth hormone treatment; HtSDS (after), height standard deviation score after 12 months growth hormone treatment; HtV, height velocity; delta HtSDS, difference between HtSDS (before) and HtSDS (after)

CA heterozygote군에서  $7.9\pm 2.6$  cm 그리고 19 CA noncarrier 군에서  $7.7\pm 2.8$  cm로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P>0.05$ ). 성장호르몬 치료 전후의 신장표준편차점수 차이도 19 CA homozygote군에서  $0.6\pm 0.2$ , 19 CA heterozygote군에서  $0.5\pm 0.4$  그리고 19 CA noncarrier군에서  $0.5\pm 0.4$ 로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P>0.05$ ).

## 고 찰

특발성 저신장증(idiopathic short stature, ISS) 환자들은 정상적인 혈중 성장호르몬 농도를 가지며 약물을 이용한 자극검사에서도 최고치가 10 ng/mL 이상으로 나타난다. 성장호르몬 결핍증을 정확하게 진단하는데 있어서 여전히 문제점을 가지고 있지만 성장호르몬의 생성과 분비에 관련된 분자생물학적 연구를 통해서 성장호르몬과 IGF-I 유전자, 성장호르몬방출호르몬 수용체, 성장호르몬 수용체 유전자 등에 다양한 종류의 결손이나 돌연변이가 원인들 중의 일부를 차지한다는 사실이 밝혀졌다<sup>1-3)</sup>. 또한 ISS 환자의 일부에서는 혈중 성장호르몬 농도는 정상이거나 오히려 높지만 혈중 IGF-I 농도는 낮으면서 성장호르몬 치료에도 좋지 않았던 반응을 나타낸 증례들에서 성장호르몬 partial



**Fig. 2.** Correlation between serum IGF-I level and age according to the IGF-I genotype in (A) 19 CA repeat carrier as a whole ( $r=0.62$ ;  $P<0.001$ ), (B) homozygous carriers of the 19 CA repeat ( $r=0.74$ ;  $P<0.001$ ), (C) heterozygous carriers of 19 CA repeat ( $r=0.63$ ;  $P<0.001$ ) and (D) 19 CA noncarrier ( $r=0.43$ ;  $P=0.005$ ).

insensitivity 가능성도 제기되었다<sup>4-6</sup>). 이런 관점에서 현재는 특발성으로 분류되고 있지만 일부 환자에서는 분자유전학적 이상을 가지고 있을 가능성에 대한 의문이 꾸준히 제기되어 왔다. IGF-I은 태아 및 소아에서 생리적인 성장에 관여할 뿐 아니라 세포 증식, 분화 그리고 프로그램화 되어 있는 세포의 소멸을 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>20</sup>). 성장호르몬은 성장판에 직접적으로 영향을 미치기도 하지만 주로 IGF-I을 통하여 성장판 내 연골세포의 증식, 비대 연골세포로의 분화, 간질 분비 등에 관여한다<sup>21</sup>).

ISS 환자의 경우 대부분에서 혈중 IGF-I 농도는 정상이다. 그러나 이를 분석하여보면 정상범위 안에서도 낮은 경우가 많으며, 일부 환자에서는 같은 성별과 연령군과 비교하였을 때 저하되어 있는 경우도 있다. 이런 현상을 바탕으로 성장호르몬 수용체의 결손이나 heterozygous 돌연변이, IGF-I 유전자 다형성에 기인한 혈중 성장호르몬 농도의 변화 등을 연구하여 왔다. Woods 등<sup>22</sup>)은 Laron 증후군을 가진 환자의 부모들 중 일부는 키가 매우 작으면서 성장호르몬 수용체 유전자가 obligate heterozygotes 인 점을 관찰하면서 성장호르몬 수용체 유전자의 어떤 종류의 heterozygote 돌연변이가 부분적인 성장호르몬 insensitivity를 유발하며 이것이 저신장증의 원인이 될 수 있다고 주장하였다. Goddard 등<sup>23</sup>)은 혈중 성장호르몬 농도는 정상이면서 혈중 성장호르몬 결합단백과 IGF-I 농도가 낮은 -2.5 신장표준점수를 가

진 ISS 환자를 대상으로 한 연구에서 14명 중 4명에서 성장호르몬 수용체의 heterozygous 돌연변이를 관찰하였음을 보고하였다. 지금까지 약 5% 정도의 ISS환자에서 10종 이상의 heterozygous GH 수용체 돌연변이가 보고되었지만 이 유전자의 실질적인 역할에 대해서는 일치되지 않은 보고가 있다<sup>23-27</sup>). 그러나 최근 Bonioli 등<sup>26</sup>)은 ISS 환자를 대상으로 실시한 성장호르몬 수용체 유전자의 heterozygous 돌연변이 연구에서 37명 환자 중 22명 그리고 정상대조군 50명 중 22명에서 다양한 종류의 돌연변이가 존재한다는 사실을 보고하면서 성장호르몬 수용체 유전자 돌연변이의 기능에 의문을 제기하였다. Hujeriat 등<sup>28</sup>)도 GH insensitivity의 임상적 생화학적 특성을 가진 ISS 환자 33명을 대상으로 한 연구에서 58%인 19명에서 GH 수용체의 돌연변이를 관찰하였음을 보고하면서 GH 수용체 염기서열의 변화는 저신장증의 원인과 무관하다고 주장하였다. 또한 엑손 3의 유전적 결손에 근거한 GH 수용체 다형성과 GH 치료의 반응성과 관련된 일치되지 않은 연구결과들도 보고되어 있다<sup>29-31</sup>). 이런 연구결과들은 ISS 환자의 저신장증의 원인적 규명에서 GH 수용체 유전자 이상의 관여 가능성을 희박하게 한다.

ISS 환자에서 IGF-I 유전자 다형성에 대한 연구는 아직 없다. IGF-I 유전자는 12번 염색체에 존재하며, 6개의 엑손과 2개의 프로모터로 구성되어 있으며 약 100 kilobase의 크기이다<sup>32</sup>). 비록 6개의 엑손으로 이루어져 있지만, 대부분의 IGF-I transcrip-

tion은 엑손 1에서 시작한다. IGF-I 유전자의 발현은 두개의 프로모터로부터의 transcription, alternative RNA splicing 그리고 differential RNA polyadenylation 등과 같은 복합적인 기전에 의해 조절된다<sup>11, 12</sup>. 성숙된(mature) IGF-I 펩타이드는 오직 엑손 3과 4에서만 coding된다<sup>33</sup>. 그리고 엑손 1의 5' untranslated region (UTR)의 개시부위가 프로모터 1의 transcription에 중요한 역할을 담당한다는 사실이 증명되었다<sup>34, 35</sup>. IGF-I 유전자의 5' UTR부위에 cytosine-adenine dinucleotide (CA) repeat가 반복되는 부위가 있으며, CA repeat 반복 횟수에 기인한 길이 차이에 의한 유전자 다형성이 존재하는데, 이 유전자 다형성이 혈중 IGF-I의 농도에 영향을 미칠 수 있다는 주장이 제기되었다<sup>13</sup>.

Vaessen 등<sup>13</sup>은 Rotterdam에 거주하는 900명을 대상으로 한 population-based 연구에서 19 CA noncarrier 군에서 야생형인 19 CA homozygous군에 비해 혈청 IGF-I 농도는 18%나 낮고, 평균 신장도 유의하게 작았음을 보고하면서 IGF-I 유전자 다형성이 혈중 IGF-I 농도에 중요한 조절 기능을 가진다고 주장하였다. Rosen 등<sup>14</sup>도 건강한 Caucasian 성인 116명을 대상으로 한 연구에서 19 CA homozygous군에서 noncarrier군에 비해 혈중 IGF-I 농도가 유의하게 낮았으나, 19 CA heterozygous군에서는 noncarrier군과 비교해서 혈청 IGF-I 농도는 별다른 차이가 없었다고 하였다. Johnston 등<sup>15</sup>은 저출생 체중아를 대상으로 실시한 연구에서 저출생 체중아군에서 혈중 IGF-I 농도는 정상대조군에 비해 유의하게 낮았는데, 이런 현상은 189 bp allele carrier 군에서 noncarrier 군에 비해 통계적으로 유의하게 현저하였다고 보고 하였다. 그러나 이들은 IGF-I 프로모터 CA repeat 유전자 다형성이 혈중 IGF-I 농도에 미치는 영향은 저출생 체중아군에서와는 달리 정상 대조군에서는 관찰되지 않았다고 하였다. Rietveld 등<sup>16</sup>은 Dutch 노인을 대상으로 한 연구에서, 19 CA homozygous군에서 noncarrier군에 비해 혈청 IGF-I 농도가 매우 유의하게 높았다고 보고하면서, 19 CA carrier 남자 군에서만 19 CA 보다 짧은 대립유전자를 가진 군에 비해 유의하게 키가 크다는 사실을 관찰하였음을 토대로 IGF-I 유전자 다형성의 역할이 성별에 따라 제한을 받을 수도 있음을 시사하였다. Allen 등<sup>17</sup>은 696명의 성인 남자를 대상으로 한 cross-sectional 연구에서 CA 19 repeat와 혈중 IGF-I 농도 사이에는 전혀 관련성이 없다고 하였다. Yu 등<sup>18</sup>도 53명의 여자 유방암 환자와 정상 대조군을 대상으로 한 연구에서 19 CA 대립유전자의 존재 여부와 혈중 IGF-I 농도 사이에는 아무런 연관이 없다고 하였다. Frayling 등<sup>10</sup>도 영국 민족을 대상으로 한 연구에서 19 CA noncarrier 군에서 혈청 IGF-I 농도가 19 CA homozygous군에 비해 오히려 높았다고 주장하면서, IGF-I 프로모터 유전자 다형성의 기능적인 역할에 대해 부정적인 의견을 제시하였다. 한국인 정상 소아 및 청소년을 대상으로 한 연구에서 IGF-I 유전자 다형성과 혈중 IGF-I 농도 사이에는 연관성이 없다는 사실이 밝혀졌다<sup>19</sup>.

본 연구에서는 IGF-I 유전자 다형성이 ISS 환자의 혈중 IGF-I 농도 그리고 GH 치료의 반응에 영향을 미칠 수 있을 가능성을 발견하지 못하였다. 이런 결과는 이미 한국인 소아 및 청소년을 대상으로 시행한 연구의 결과와 일치한다. 비록 연구에 포함된 연구대상군의 숫자가 유전자형에 따른 통계적인 분석에 아무런 영향을 미치지 않을 만큼 충분한 수를 확보하지 못했다는 제한성을 가질 수 있음을 고려하더라도 ISS 환자에서 IGF-I 유전자 다형성은 기능적 역할을 하지 못한다고 생각한다.

## 요 약

**목적** : 특발성 저신장증 환자에서 IGF-I 유전자 다형성의 역할에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다. 저자들은 한국인 특발성 저신장증 환자를 대상으로 IGF-I 프로모터 CA repeat 유전자 다형성에 대한 분석을 실시하였다.

**방법** : 신장 계측에 의해 2007년에 제작된 한국 소아 발육 표준 신장표에 의거하여 나이와 성별에 따른 신장백분위수가 3백분위수 미만인 131명을 대상으로 하였다. 성장호르몬 치료의 분석은 최소한 6개월 이상 성장호르몬 치료를 받은 37명을 대상으로 실시하였다. 유전자형의 분석은 유전자 염기서열분석을 통하여 실시하였다. CA repeat 횟수에 따른 대립유전자의 분포를 조사하였고, 이를 바탕으로 유전자형을 분석하였다. CA repeat의 heterozygous의 분석은 Gene Mapper software를 이용하였다. 혈청 IGF-I 농도는 RIA방법으로 측정하였다.

**결과** : 국인 특발성 저신장증 환자에서의 CA repeat의 분포는 15부터 22까지였으며, 19 repeat가 40.6%의 빈도로 가장 높았다. 유전자형에 따른 분포는 131명 중 17명(13.0%)이 19 CA repeat homozygous 였으며, 74명(56.5%)은 heterozygous, 40명(30.5%)은 19 CA repeat noncarrier 였다. 유전자형에 따른 키, 체중, BMI는 세군 모두에서 유의한 차이가 없었다. 유전자형에 따른 혈청 IGF-I 농도는 19 CA repeat noncarrier군에서  $435.67 \pm 160.29$  ng/mL로, 19 CA homozygous 군에서의  $435.60 \pm 131.51$  ng/mL, 19 CA heterozygous 군에서의  $473.76 \pm 185.01$  ng/mL과 유의한 차이가 없었다. 나이와 혈청 IGF-I 농도와의 상관관계를 분석한 결과 세군 모두에서 유의한 양의 상관관계를 보였다( $P < 0.01$ ). 유전자형에 따른 첫 1년 동안의 성장호르몬 치료 효과를 분석한 결과 성장호르몬 치료 후 12개월로 환산한 성장속도는 19 CA homozygote군에서  $7.6 \pm 3.4$  Cm, 19 CA heterozygote군에서  $7.9 \pm 2.6$  cm 그리고 19 CA noncarrier군에서  $7.7 \pm 2.8$  cm로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). 성장호르몬 치료 전후의 신장표준편차점수 차이도 19 CA homozygote군에서  $0.6 \pm 0.2$ , 19 CA heterozygote군에서  $0.5 \pm 0.4$  그리고 19 CA noncarrier군에서  $0.5 \pm 0.4$ 로 세군 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ).

**결론** : 특발성 저신장증 환자에서의 IGF-I 프로모터 CA repeat 유전자 다형성의 분포는 15부터 22까지였으며, 19 repeat

가 40.6%의 빈도로 가장 높았다. 키, 체중, BMI 그리고 혈중 IGF-I 농도는 유전자형에 따라 유의한 차이가 없었다. 유전자형에 관계없이 나이와 혈중 IGF-I 농도 사이에는 모든 군에서 유의한 양의 상관관계를 나타내었다. 유전자형에 따른 첫 1년간의 성장호르몬 치료 효과도 유전자형에 따라 유의한 차이가 없었다. 그러므로 특발성 저신장증 환자에서는 IGF-I 유전자 다형성은 기능적 역할을 하지 못한다고 생각한다.

References

- 1) Rosenfeld RG. The molecular basis of idiopathic short stature. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:3-5.
- 2) Attie KM. Genetic studies in idiopathic short stature. *Curr Opin Pediatr* 2000;12:400-4.
- 3) Lopez-Bermejo A, Buckway CK, Rosenfeld RG. Genetic defects of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:39-49.
- 4) Carlsson LM, Attie KM, Compton PG, Vitangcol RV, Merimee TJ. Reduced concentration of serum growth hormone-binding protein in children with idiopathic short stature. National Cooperative Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1325-30.
- 5) Mauras N, Carlsson LM, Murphy S, Merimee TJ. Growth hormone-binding protein levels: studies of children with short stature. *Metabolism* 1994;43:357-9.
- 6) Selva KA, Buckway CK, Sexton G, Pratt KL, Tjoeng E, Guevara-Aguirre J, et al. Reproducibility in patterns of IGF generation with special reference to idiopathic short stature. *Horm Res* 2003;60:237-46.
- 7) Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002;110:771-81.
- 8) Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor I in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 2001;229:141-62.
- 9) Arends N, Johnston L, Hokken-Koelega A, van Duijn C, de Ridder M, Savage M, et al. Polymorphism in the IGF-I gene: Clinical relevance for short children born small for gestational age (SGA). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2720-4.
- 10) Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy A, Holly J, Mitchell SM, Gloyn AL, et al. A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations. *Diabetes* 2002;51:2313-6.
- 11) Adamo ML. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression. Implications for normal and pathological growth. *Diabetes Rev* 1995;3:2-27.
- 12) Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991;5:3-18.
- 13) Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Wittteman JC, Testers L, Hofman A, et al. A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* 2001;50:637-42.
- 14) Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, et al. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2286-90.
- 15) Johnston LB, Dahlgren J, Leger J, Gelande L, Savage MO, Czernichow P, et al. Association between insulin-like growth factor I (IGF-I) polymorphisms, circulating IGF-I, and pre- and postnatal growth in two European small for gestational age populations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4805-10.
- 16) Rietveld I, Janssen JA, van Rossum EF, Houwing-Duistermaat JJ, Rivadeneira F, Hofman A, et al. A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but has no effect on the secular trend in body height. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:195-203.
- 17) Allen NE, Davey GK, Key TJ, Zhang S, Narod SA. Serum insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration in men is not associated with cytosine-adenosine repeat polymorphism of the IGF-I gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:319-20.
- 18) Yu H, Li BD, Smith M, Shi R, Berkel HJ, Kato I. Polymorphic CA repeats in the IGF-I gene and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;70:117-22.
- 19) Ko MJ, Hwang TG, Lee JN, Chung WY. Analysis of cytosine adenine(CA) repeat polymorphism of the IGF-I gene and influence on serum IGF-I levels in healthy children and adolescents. *Korean J Pediatr* 2006;49:1340-7.
- 20) Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996;76:1005-26.
- 21) Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatr Res* 2002;52:137-47.
- 22) Woods KA, Dastot F, Preece MA, Clark AJ, Postel-Vinay MC, Chatelain PG, et al. Phenotype: genotype relationships in growth hormone insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3529-35.
- 23) Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1093-8.
- 24) Clayton PE, Freeth JS, Norman MR. Congenital growth hormone insensitivity syndromes and their relevance to idiopathic short stature. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;50:275-83.
- 25) Sanchez J, Perera E, Baumbach L, Cleveland WW. Growth hormone receptor gene mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4079-83.
- 26) Bonioli E, Taro M, Rosa CL, Citana A, Bertorelli R, Morcaldi G, et al. Heterozygous mutations of growth hormone receptor gene in children with idiopathic short stature. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:405-10.
- 27) Sakurai T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Takakuwa S, Sumita R, et al. A novel heterozygous T5II mutation of growth hormone receptor is not associated with short stature. *Growth Horm IGF Res* 2002;12:411-7.
- 28) Hujeirat Y, Hess O, Shalev S, Tenenbaum-Rakover Y. Growth hormone receptor sequence changes do not play a

- role in determining height in children with idiopathic short stature. *Horm Res* 2006;65:210-6.
- 29) Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1076-80.
- 30) Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:659-64.
- 31) Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Clemente M, et al. The d3/fl-growth hormone (GH) receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 170 Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3281-6.
- 32) Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 1984;310:781-4.
- 33) Foyt HL, LeRoith D, Roberts CT Jr. Differential association of insulin-like growth factor I mRNA variants with polysomes in vivo. *J Biol Chem* 1991;266:7300-5.
- 34) Yang H, Adamo ML, Koval AP, McGuinness MC, Ben-Hur H, Yang Y, et al. Alternative leader sequences in insulin-like growth factor I mRNAs modulate translational efficiency and encode multiple signal peptides. *Mol Endocrinol* 1995;9:1380-95.
- 35) Mittanck DW, Kim SW, Rotwein P. Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I exon I. *Mol Cell Endocrinol* 1997;126:153-63.