

## 소아 아토피피부염에서 Phospholipase D1의 SNP 발굴 및 연관성

한양대학교 의과대학 소아과학교실, 생화학교실\*

신수아 · 박신영\* · 조주환 · 한중수 · 오재원 · 이하백

=Abstract=

### Detection of SNP of Phospholipase D1 in Children with Atopic Dermatitis

Su-A Shin, M.D., Shin-Young Park, Ph.D.\*, Joo-Whan Cho, M.D.  
Joong-Soo Han, M.D., Jae-Won Oh, M.D. and Ha-Baik Lee, M.D.

*Department of Pediatrics, Biochemistry\*,  
Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** Phospholipase D (PLD) is a widely distributed enzyme that hydrolyzes phosphatidylcholine, a major phospholipids in the cell membrane, to form phosphatidic acid (PA) which acts by itself as a cellular messenger. PLD can also be transformed by PA phosphohydrolase into diacylglycerol (DAG), which is essential for the activation of protein kinase C (PKC). PLD has been shown to induce the proliferation of T cells and to activate by *Der p 1* in peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis. Single nucleotide polymorphism (SNP) has recently served as a key marker to discover the genetic mechanism of special chronic diseases.

**Methods :** One hundred eighteen children with atopic dermatitis were recruited, and graded as 23 mild (<25), 48 moderate (25-50) and 47 severe (>50) by measuring SCORAD index. Genomic DNA were purified from blood and made into PCR primers attaching GC-Clamp, and 26 exons of PLD were amplified by PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis).

**Results :** Polymorphism was found in four subjects. Of them, three PLD1 cSNP (Exon23: G2658A, T2664A, G2684A) were detected in exon 23 of 26 exons of PLD1. Four cases among 118 subjects had cSNP of G2658A (3.4%), two T2664A cases (1.7%), one G2684A case (0.8%). There were no significant correlations between IgE and detected cSNP.

**Conclusion :** Three PLD1 gene cSNPs (G2658A, T2664A, G2684A) were detected in the blood of children with atopic dermatitis. Among them, G2658A polymorphism seems to be correlated to the serum IgE level, but PLD1 cSNP does not appear to contribute to the pathogenic processing of atopic dermatitis. [*Pediatr Allergy Respir Dis(Korea) 2007;17:173-182*]

**Key Words :** Phospholipase D, Atopic dermatitis, Single nucleotide polymorphism

## 서 론

접수: 2007년 5월 17일, 승인: 2007년 8월 21일

\*박신영과 신수아는 제1저자로서 동등한 역할을 하였음.

책임저자: 오재원, 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 031)560-2254 Fax: 031)552-9493

E-mail: jaewonoh@hanyang.ac.kr

인간 유전체의 염기서열 지도가 완성된 이래로 현재 이를 이용한 질병의 진단, 예후 판정 및 치료법의 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 진행되고

있으며, 현재 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 분석 표식자로 활용하여 특정질병에 관여하는 유전자를 밝히는 연구가 많은 연구기관에서 수행되고 있다. SNP는 인간유전체내에 평균적으로 1 kb 간격으로 하나 이상 존재하고 총 3백 만개 이상의 SNP가 존재할 것으로 추정되고 있으며 이처럼 많은 수의 SNP가 인간유전체내에 존재하기 때문에 효율적인 분석 표식자로써 질병을 유발하는 유전자를 밝히는 데 활용되고 있다. 따라서 국내에서도 SNP를 이용한 한국인 고유의 유전자 특성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 상태이다.<sup>1)</sup>

아토피피부염은 심한 가려움증과 특징적인 피부 발진으로 진단하는 알레르기 질환으로서 기관지 천식, 알레르기 비염 및 안과적인 질환이 동반되어 나타난다.<sup>2)</sup> 최근 들어 산업이 발달하고 공해 문제가 심각한 사회적인 문제로 대두되면서 아토피피부염의 발생률은 점점 증가하고 있고, 성인이 되어서도 계속적으로 피부염을 가지고 있게 되면서 점차 심각한 질병으로써 인식되고 있다. 그러므로 아토피피부염의 발병인자를 규명하는 것은 아토피피부염의 예방과 치료에 매우 중요하다. 아토피피부염과 같은 알레르기 질환은 면역 계통의 수많은 요소들이 관여하며 유전적 소인과 더불어 후천적인 여러 가지 요인들에 따라 변화되는 면역학적인 불균형 상태에 의해 발생 하는 복잡한 다인성 유전질환이라고 판단되고 있다.<sup>3)</sup> 최근 들어 알레르기 질환에서 사이토카인(cytokine) 및 수용체 유전자들 조절 부위의 유전자 다형성에 대한 연구들이 많이 보고되고 있으나 이러한 연구들이 특정 변이만을 찾아내는 선별검사로 행해지고 있어 유전자의 전역에 걸쳐 분포하는 것으로 알려져 있는 질환 원인 유전자에서의 밝혀지지 않은 새로운 변이를 찾는 것이 불가능하다.<sup>4-6)</sup> 또한 특정 유전자 다형성은 인종간에 상당한 차이를 나타내므로 한국 소아에 유용한 유전자 다형성을 발굴하기 위해서는 서양인을 중심으로 발굴된 유전자 다형성을 한국 소아를 대상으로 선별검사하는 접근법

보다는 특정 유전자를 scanning하는 접근법을 통하여 한 유전자에 나타나는 모든 변이, 즉 알려지지 않은 새로운 변이를 찾아내는 방법이 더욱 유용할 것이라고 판단된다. 따라서 알레르기 질환에서의 면역반응유도 신호전달체계에 중요한 역할을 한다고 보고된 Phospholipase D (PLD)의 유전자 다형성 연구<sup>7, 8)</sup>와 접목을 시킨다면 아토피피부염에 대한 유전적인 영향과 환경적 요인과의 관련성을 이해하는 데 도움을 주게 될 것이다.

Phospholipase D (PLD, phosphatidylcholine phosphodiesterase)는 여러 형태의 생리학적 진행 과정에서 세포막에 존재하는 글리세롤 인지질(glycerophospholipid)의 terminal diester 결합을 가수분해하여 phosphatidic acid (PA)와 결합되어있던 head group을 분해시키는 효소이다.<sup>9)</sup>

<sup>10)</sup> PLD의 활성산물인 PA는 phospholipase A2 (PLA2)라는 효소에 의하여 lyso-PA로 바뀌거나 PA phosphohydrolase에 의하여 diacylglycerol (DAG)로 전환된다. 이러한 PLD는 세포에서 다양한 생리·생화학적 신호전달에 관여하고 있으며 세포 내에 널리 분포되어 있다. 현재까지 PLD는 세포 내 각종 면역반응 및 염증반응에 중요하게 작용한다고 보고되고 있으며 PLD의 활성은 면역계와 식세포의 표면 수용체에 의해 가장 두드러지게 활성화되고 T세포 및 B세포에 존재하는 항원 수용체들과 단핵구 및 비만세포에서도 활성화되는 것으로 보고되고 있다.<sup>10-12)</sup> 그리고 앞서 본 연구실에서는 사람의 T세포에서 *Der f 2*와 같은 알레르겐에 의하여 protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ )의 인산화를 거쳐 PLD가 활성화 되고 알레르겐 관련기전에서 중요한 역할을 한다는 것을 이미 보고한 바 있다.<sup>7, 8)</sup> 그러므로 알레르기 질환과 발생기전에 직접, 간접적으로 관련이 깊은 PLD의 유전자 다형성은 아토피피부염의 발병에 영향을 미칠 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 매우 미진한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 이 유전자의 다형성을 발굴하기 위해 Genomic DNA추출, primer의 구

측, 각 엑손(exon) 지역의 PCR 및 DGGE분석,<sup>13)</sup> PCR 산물을 이용한 염기서열 결정과 분석으로 확인하는 과정을 거치는 일련의 체계를 구축하고 유전자 다형성을 발굴 후 아토피피부염의 위험인자로 쓰여지는 임상적 지표들과의 관계를 밝혀 궁극적으로 아토피피부염 진단지표로서의 사용 가능성을 검토하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

아토피피부염 진단기준에 합당한 만 18세 이하의 환자 118명을 대상으로 하여 임상 기록을 작성하고 보호자의 동의를 얻은 후 검사를 시행하였다. (Table 1) 모든 아토피피부염 환아는 SCORAD 지수를 이용하여 중증도를 분류하였다. 다른 알레르기 질환이나 감염성 질환이 있는 경우는 대상에서 제외하였으며 각 대상들은 UniCap을 이용하여 혈청 IgE치를 측정하였다.

Table 1. The Characteristics of Subjects

Variables	Subjects	Controls
Age	6.16±3.2	5.50±2.1
Sex (M:F)	65:53	13:7
Serum IgE level (IU/mL)	213.5±158.7	63.5±58.6
Total Eosinophil Count (/mm <sup>3</sup> )	423.6±331.4	123.6±231.4

임상적 자료를 바탕으로 혈청 IgE치와 SNP의 상관 관련성 및 아토피피부염의 원인 유전자의 기능을 분석하였다. 건강 대조군 20명은 알레르기 병력과 선별검사에서 알레르기가 없는 정상으로 판명된 경우를 포함시키도록 하였다.

### 2. 방법

#### 1) Genomic DNA 분리

연구 대상에서 채취한 혈액으로부터 PUREGENE DNA Purification kit (Gentra, Minnesota, USA)를 이용해 total genomic DNA를 추출하였다. 먼저 연구대상자의 혈액을 EDTA가 포함된 시험관에 채취한 후 RBC lysis solution이 담긴 시험관에 옮겼다. 상온에서 5분간 반응 시킨 후, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 남아있는 pellet을 vortex 하였다. 여기에 cell lysis solution을 넣고 protein precipitation solution을 첨가한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. DNA가 포함된 상층액을 100% Isopropanol 이 담긴 시험관에 부은 후 DNA가 clump를 형성할 때까지 반응시켰다. 이후 2,000 rpm에서 3분간 원심분리 하고 DNA pellet을 확인 후 상층액을 버리고 70% 에탄올로 DNA pellet을 닦아내고 2,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 에탄올을 버리고 남은 pellet은 10-15분간 공기 중에서 말리고 DNA hybridization solution을 첨가하여 65℃에서 1시간 동안 또는 상온에서 overnight으로 rehydration 시켰다 추출한 DNA

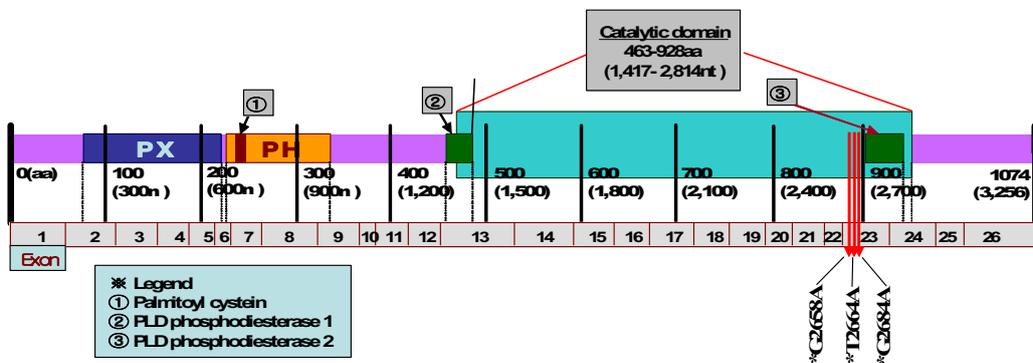


Fig. 1. Gene structure of PLD1 gene and variants containing SNPs found in this study.

의 양을 260 nm의 파장에서 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 측정하였다.

2) GC-Clamp가 부착된 PCR primer 제작

PLD1은 26개의 엑손(exon)이 존재하는데(Fig. 1), GenBank (accession number AF, NIH, USA)에 보고된 염기서열을 참고로 하여, 각 엑손에 대해서 primer를 설계할 때 엑손 sequence를 전부 포함하면서, fragment size가 약 200-300 bp가 되도록 설계 하였다. 그리고 primer 끝에 GC-rich 조각(GC-clamp)를 붙여주어 DNA 조각이 하나의 melting domain을 갖도록 함과 동시에 완전히 단일 나선으로 melting 되는 것을 막아줌으로써 primer design의 유연성(flexibility)을 높여주었다.

각 primer의 sequence는 Table 2에 정리하였다.

3) PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

PCR을 통해 PLD의 26개 exon 부위를 증폭 합성하여 확인한다. PCR의 조성은 DNA 1 μL, dNTP 0.8 μL, 10×buffer 1 μL, Taq 0.6 μL, Primer F 0.2 μL, R 0.2 μL, D.W 6.2 μL로 총 10 μL을 만들어 최적의 조건에서 PCR 반응을 시킨다. PCR 조건은 Table 3에 정리하였다.

각각의 PCR을 수행한 후에 1.5% agarose gel에서 PCR 생성물을 확인했다. 증폭된 각 PCR 생성물을 DGGE 방법을 사용하여 SNP를 검출하였고 실험 방법은 다음과 같다. 크기가 20 cm (W)

Table 2. List of Primers for Detection of SNPs in PLD1 Gene

Exon No	Direction	Sequences	Exon No	Direction	Sequences
1	Forward	5'-GCCCTTTGCTTTTACTGTC-3'	14	Forward	5'-CAITGCTTATGCGTGTCTTTT-3'
	Reverse	5'-CGCTCAGATCAICCGTCTTTAC-3'		Reverse	5'-GATAAATTC TAGTCAAGGCCA-3'
2	Forward	5'-AGTGTA TATCCCTTCTCTGC-3'	15	Forward	5'-GATCAGCTTTTCTTCCAGTTT-3'
	Reverse	5'-GAGTCCATAAACGCTCTGAC-3'		Reverse	5'-TAA GGGAGTTCTGCCACTTCA-3'
3	Forward	5'-ATG TATCACTGTAGGTACCAAG-3'	16	Forward	5'-ACTCACCTGAA CCA CAGTCT-3'
	Reverse	5'-AAATGGTTA CTTTCTAGTGGG-3'		Reverse	5'-AATA TACCACACCCACCA-3'
4	Forward	5'-GGTGTTCATTCCTGTGTGT-3'	17	Forward	5'-AGACTTTGCC CCAACACTGAA-3'
	Reverse	5'-CTTACTCTTCTACCAAGGAATT-3'		Reverse	5'-GATAAATCATGATAGCAACA TCC-3'
5	Forward	5'-GATCTCATCATTTGCTACTACTG-3'	18	Forward	5'-CACAAAGTAGGGA GAATGAATC-3'
	Reverse	5'-TGA CTAGTACTTACTGTGGCAT-3'		Reverse	5'-AAGGGAAGGCAGTTTCTACA-3'
6	Forward	5'-TGA ATTTGTTTTGCTTAAAG-3'	19	Forward	5'-CTGATGCTCTCTCA TTGCTAA-3'
	Reverse	5'-ATGGCATGCTGCTACGTTA-3'		Reverse	5'-AAGGGAAGGCAGTTTCTACA-3'
7	Forward	5'-TGTGGGAGGCTGTACGAG-3'	20	Forward	5'-CAGTATTGTTCTTACGTATA TTGC-3'
	Reverse	5'-GTA AACTAGCCCAAATACCC-3'		Reverse	5'-AATA CAAGAACATCTGCAGCGA-3'
8	Forward	5'-CTTACTTCTTACAGATGG-3'	21	Forward	5'-TGA ACTGCTTGGCTGTCATCTA-3'
	Reverse	5'-CCTTGAAGATTATCAATTCGG-3'		Reverse	5'-ATGATG CATGACCGAAA GCTCA-3'
9	Forward	5'-TGA GATAGAACAGAGTGAC-3'	22	Forward	5'-AGGATTAACCTACAGATCTGC-3'
	Reverse	5'-ATTAGA TGC TATGACTGCCTTG-3'		Reverse	5'-ATGATTACTGATA CCTCACCTTC-3'
10	Forward	5'-TGGAGACTCTAGGCCAGTGG-3'	23	Forward	5'-TG TACGTTTATTGAGCTTGGTCA-3'
	Reverse	5'-GTG TAA TTTCTTGAACAGCACTA-3'		Reverse	5'-TAA GTCAACTGGCAAGGAATA CA-3'
11	Forward	5'-CCTTTGCTTCTTA TGA CACA-3'	24	Forward	5'-GTTGTTTCTGCTCACTGTTTCT-3'
	Reverse	5'-AAGCA TTTCAGAGACAA CAGAC-3'		Reverse	5'-TGGAAATGCATCAGAGAGACAC-3'
12	Forward	5'-CGGTTTTCTCTGTGACAG-3'	25	Forward	5'-CAGTTACTCAATGTG GAGGTCA-3'
	Reverse	5'-ATCAAGATGAA CCTGAA TACC-3'		Reverse	5'-GAGGAGGG GAATACGTGAA CT-3'
13	Forward	5'-TTTCAGG GAGAACACAGACC-3'	26	Forward	5'-TAAAGGCCATGTGCTCGCTT-3'
	Reverse	5'-GGTTAAATA TACTTACTGCGGAGG-3'		Reverse	5'-TGG AAGTCTTTGAGCTGCCAA-3'

Table 3. PCR Conditions for Detection of SNPs in PLD1 Gene

Number	Action	PCR condition	Cycles
Exon 1-14, 18, 20	Denaturation	94°C 1 min	30
	Annealing	55°C 1 min	
	Polymerization	72°C 1 min	
	Hold	4°C Holding	
Exon 15-17, 19, 21-26	Denaturation	94°C 1 min	30
	Annealing	60°C 1 min	
	Polymerization	72°C 1 min	
	Hold	4°C Holding	

×20 cm (H) 인 2장의 유리판 사이에 두께 0.5 mm의 polyacrylamide gel을 제작하고 lane 당 5 mm의 폭으로 사용하였다. DGGE gel (50×TAE (BioRad:161-0773) 20 mL, 40% acrylamide/bis-acrylamide solution 37.5:1 (BioRad:161-0148)와 urea 336.34 g, 320 mL deionized formade, D.W 600 mL)의 농도는 70%로 만들어 사용하였다. DGGE gel running buffer는 1×TAE를 사용하고 유리판의 각각의 comb에 샘플을 부하하고 60°C에서 4시간 동안 전기영동(electrophoresis)하였다. 전기가 끝난 gel은 ethidium bromide로 염색해서 다형성을 검출했다. DGGE를 통해 선별한 SNP이 있는 부위를 PCR 증폭하여 sequencing으로 확인하였다. PCR-DGGE에 의해서 band shift를 보이는 PCR 생산물의 sample을 다시 PCR한 후 direct sequencing을 실시하고 염기배열의 변화를 확인하여 다형성을 선별하였다.

#### 4) 통계분석

통계적 검정은 SPSS (version 12.0)을 이용하였다. 발견된 SNP과 성별, IgE항체 농도와의 상관성을 비교할 때  $\chi^2$  검정(chi-square test)을 이용하였다. 각 위험인자간의 보정을 위해 logistic regression 분석을 하여 교차비(odds ratio)와 95% 신뢰구간(confidence interval)을 구하였다. P값은 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 임상양상

대상 환자 118명은 남아가 65명이고 여아가 53명 이었으며 SCORAD 지수로 분류한 결과 경증 47명(SCORAD 지수 <25), 중등증 48명(SCORAD 지수 25-50), 중증 23명(SCORAD 지수 >50)이었다. 각각의 환자의 혈액을 채취한 후 혈청 IgE치를 측정하고 또한 임상적 분석을 시행하였다. 검사 당시 연령의 중앙값은 6.16세이고 총 IgE 항체농도의 중앙값은 648.46 IU/L 이었고 평균치는 213.5±158.7 IU/L이었다(Table 1). 환자군에서 Unicap에서 class 1 이상의 양성을 보이는 알레르겐은 *D.f* (50.0%), *D.p*(48.3%), 계란 흰자(24.6%), 우유 (23.7%) 순으로 나타났다.(Table 4)

### 2. PLD1 cSNP의 검출

118명의 DNA 표본 중 DGGE 분석을 통해 4명의 표본에서 다형성을 발견하였으며,(Fig. 2) PLD1의 26개의 엑손 중 23 엑손에서 3개의 PLD1 cSNP (Exon23: G2658A, T2664A, G2684A)를 검출하였다.(Fig. 3) 발견된 각각의 cSNP 중 G2658A는 PLD1 엑손 상의 2658 위치가 Guanine에서 Adenine으로 치환되었으며, T2664A는 2664번 위치가 Thymine에서 Adenine으로, G2684A는 2684번 위치가 Guanine에서 Adenine으로 치환됨을 알 수 있었다. G2658A의 경우는 Cysteine876이 Tyrosine 876으로 치환시키고, T2664A의 경우는 Leucine 878이 Histidine878로 치환시키고, G2684A 경우는

**Table 4. Distribution of Common Allergens in Children with Atopic Dermatitis**

Class	D.p	D.f	Egg white	Milk	Wheat	Peanut	Soybean
Mild (n=47)	22 (38.6)	25 (53.2)	13 (27.7)	11 (23.4)	7 (14.9)	4 ( 8.5)	11 (23.4)
Moderate (n=48)	18 (31.6)	23 (47.9)	9 (18.8)	9 (18.8)	8 (16.7)	9 (18.8)	9 (18.8)
Severe (n=23)	17 (29.8)	11 (47.8)	7 (30.4)	8 (34.8)	5 (21.7)	4 (17.4)	6 (26.8)
Total (n=118)	57 (48.3)	59 (50.0)	29 (24.6)	28 (23.7)	26 (22.0)	17 (14.4)	26 (22.0)

Parenthesis express as percentage of allergen value of each class.

D.p : *Dermatophagoides pteronyssinus*, D.f : *Dermatophagoides farinae*

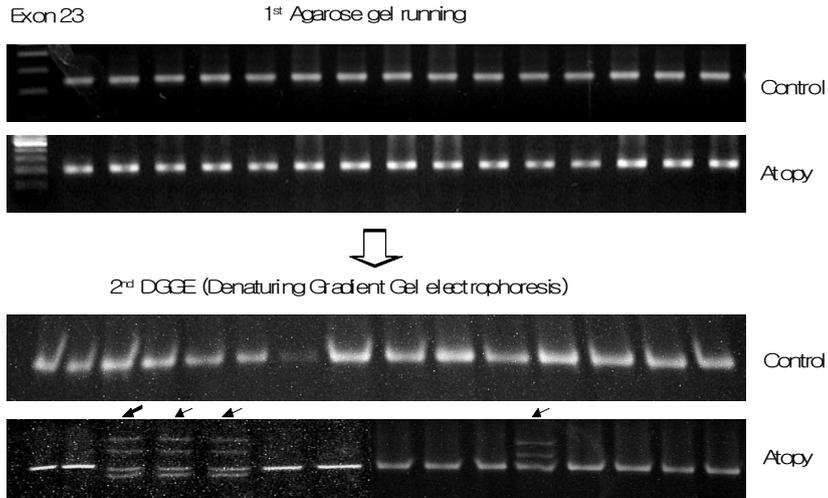


Fig. 2. PLD1 SNP discovery by DGGE.

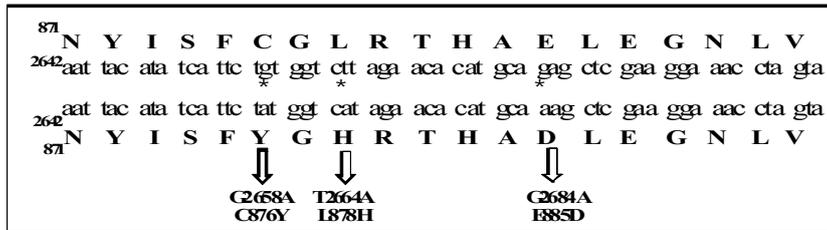


Fig. 3. Partial sequence of the exon23 of the PLD1 gene.

Glutamate885가 Asparagine885로 치환시켰다. (Table 5)

### 3. PLD1 cSNP의 빈도분석 및 임상지표와의 관계

각각의 cSNP 발생빈도는 전체 118명중 G2658A가 4예(3.4%), T2664A가 2예(1.7%), G2684A가 1예(0.8%)로 나타났다(Table 5). 발견된 3개의 cSNP 중 G2658A의 경우 4명의 환자 중 3명이 남아, 1명의 여아에서 나타났고 G2684A, T2664A는 모두 남아에서 발견되었다. 그러나 *P*값으로 유의성을 검정한 결과 *P*값이 0.05 이상으로 나타남으로써 성별은 총 발견된 3개의 cSNP의 발생빈도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 측정된 IgE의 농도는 200 IU/mL를 기준으로 두 단계로 나누어 비교하였으나, 발견된 cSNP과 IgE와의 유의성

Table 5. Summary of DGGE Analysis of PLD1 Gene in Atopy

Nucleotide position	Frequency (%)	Exon	Substitution
2658	3.4	23	TAT <sup>Tyr</sup> → TGT <sup>Cys</sup>
2664	1.7	23	CTT <sup>Leu</sup> → CAT <sup>His</sup>
2684	0.8	23	GAG <sup>Glu</sup> → AAG <sup>Asp</sup>

Table 6. Polymorphisms in PLD1 Gene and Clinical Variables in Atopy

Characteristics	Alleles		
	G2658A	T2664A	G2684A
Gender	0.415*	0.198	0.634
Total IgE	0.076	0.213	0.381

\*Values express *P* value

도 관찰할 수 없었다.(Table 6)

## 고 찰

아토피피부염은 소아기의 가장 흔한 염증성 피부 질환으로 유전적 소인과 함께 여러 환경 요인에 의한 항원 감작이 병의 경과에 상당한 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 최근에 발표된 논문들에 따르면 호흡기 감염과 관련된 전환성장인자(TGF)<sup>14</sup>, 면역 반응이나 사이토카인 발현과 관련된 IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 등에 존재하는 SNP가 질병을 유발하는데 영향을 미친다는 결과를 보여주고 있다.<sup>15-17</sup> 이처럼 다양한 아토피피부염과 관련된 특정 유전자에서 SNP를 찾아낸다면 아토피피부염 기전을 규명하는 학문적 가치가 있을뿐더러 환자 개개인의 유전자 진단 기준으로 즉각 응용될 수 있고 세분화된 유전자형과 치료효과와의 상관관계 분석에 응용되어, 환자 개개인에 대한 정확하고 신속한 임상치료 기준의 설정에 기여하게 될 것이다. 따라서 저자들은 아토피피부염 환자에서 유전적 소인 분석을 위한 PLD1 cSNP 분석을 시행하였으며 이를 위해 genomic DNA 추출, primer의 구축 각 엑손 지역의 PCR 및 DGGE 분석, 염기서열 결정으로 확인하는 과정을 거치는 일련의 검색 체계를 구축하였다.

PLD1은 여러 신호전달 물질과 사이토카인 등과 관여하여 알레르기 면역반응에 중요한 영향을 미치고 있으며 아토피피부염과 같은 알레르기 감수성 유전자로 유력하다. 본 연구실에서도 집먼지진드기 특이 항원에 감작된 알레르기 환자를 대상으로 알레르기 반응에 PLD가 관여하고 있음을 보고한 바 있으며<sup>7,8)</sup> 또한 다양한 세포에서 PLD 활성이 T 세포나 B 세포에서 항원수용체가 세포 신호전달을 하는 데 있어 중요한 조절물질로써 작용한다는 보고가 있다.<sup>18-20)</sup> 따라서 PLD1 유전자의 유전적 변이는 아토피피부염과 같은 질환에 영향을 미칠 것으로 생각된다. PLD1의 경우 DGGE 분석 방법으로 3개의 cSNP를 발굴하였다. 특히

엑손 23에서 3개의 cSNP (G2658A, T2664A, G2684A)를 발견하였고 이들의 functional polymorphism의 기능이 있는 지 알아보기 위하여 아토피피부염 환자군과 정상군에서 비교 분석 하였다. 각각의 A allele의 빈도에서 환자군과 정상군 간의 유의적 차이는 없었다(자료는 제시하지 않음). 이는 본 실험에 쓰여진 정상군(n=20)이 환자군(n=118) 보다 훨씬 적은 수였기 때문에 정확한 빈도분석을 하는 데 있어 무리가 있었기 때문이다. 하지만 발견된 3개의 각각의 cSNP 빈도 분포로 보아 앞으로 대상군으로 더 많은 환자를 확보하여 분석 한다면 유의성 있는 결과가 나올 것이라고 예상된다.

DGGE profile에 따라 임상지표를 비교해 보면 여아와 남아간의 구분에서는 유의적 차이가 없었다. 2004년 연구결과에 따르면 PLD1은 IgE 수용체 조절에 중요한 역할을 한다고 보고되었다.<sup>21)</sup> 본 연구에서도 이와 같은 상관성을 알아보기 위하여 총 IgE의 수치를 200 IU/L 이하를 기준으로 두 개의 군으로 구별하여 발견된 cSNP들과의 유의성을 알아보았다. 그 결과 3개의 cSNP (G2658A, T2664A, G2684A) 중 G2658A 다형성에서  $P=0.076$ 으로 총 IgE치와 관련하여 유의성 있는 결과를 확인할 수 없었고 이 A allele를 가지고 있는 환자들은 중앙값(648.45 IU/L)보다 훨씬 적은 수치의 63.67 IU/L를 나타냄을 알 수 있었다. 그 외 T2664A, G2684A의 A allele의 변이는 총 IgE치와는 관련 없음을 알 수 있었다. 2006년에 보고된 독일인 대상 연구에서는 CMA1의 다형성과 IgE와의 상관관계를 알아보았는데 CMA1 유전자가 발현되는 mast cells (MC)과 IgE의 수용체와는 밀접한 관련이 있음에도 불구하고 실제적으로 존재하는 CMA1의 다형성과 IgE의 수치와는 서로 유의성이 없음을 보고한 바 있다.<sup>22)</sup> 또한 2001년 덴마크에서의 연구결과에 따르면 아토피피부염과 관련이 깊은 유전자인 IL-4 수용체 유전자와 아토피피부염 발병과의 상관관계를 알아본 결과 기대와는 다르게 IL-4 수용체 유전자 SNP는 직접

적으로 아토피피부염의 발생과는 상관이 없음을 보고하였으며<sup>23)</sup> 2005년 German Multi center Atopy Study Group의 연구에서는 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하는 히스타민 대사를 조절하는 HNMT 유전자의 다형성과 기도과민반응과의 관련성을 알아본 결과 이 SNP는 독일 환아에게 나타나는 천식과 알레르기 과민반응에는 영향을 미치지 않는다는 결과를 발표하였다.<sup>24)</sup> 이와 같은 연구 결과들이 시사하고 있듯 일반적으로 아토피피부염과 같은 알레르기 질환과 밀접한 관련이 있을 것이라 제시되는 여러 유전자의 다형성은 실제적으로 질병을 유발하는데 있어서는 직접적 연관은 없을 수도 있을 것이라 생각된다. 아마도 아토피피부염의 발병은 주위 환경, 알레르겐과 항생제의 노출 정도 같은 후천적인 환경 요인들도 주된 원인이기 때문에 특정 유전자의 다형성만으로 아토피피부염의 발생을 예측하기에는 부족한 부분이 있다고 판단하는 바이다.

본 연구에서는 한국인 118명 아토피피부염 환아에서 3개의 PLD1 gene cSNP (G2658A, T2664A, G2684A)을 최초로 발견하였다. 그 중 G2658A 다형성은 IgE의 수치와 관련이 있을 것이라 판단되나 PLD1 cSNP이 직접적으로 아토피피부염의 발생에 기여하지는 않을 것으로 생각된다. 하지만 이 유전자들이 아직까지 확인되지 않은 다른 유전자들과 관련되어 병적인 상태를 유발할 것으로 예측되어 연관 유전자의 연구의 필요성을 제시하는 단서가 될 수 있음을 시사하는 바이다.

## 요 약

**목적** : Phospholipase D (PLD, phosphatidylcholine phosphodiesterase)는 여러 형태의 생리학적 진행 과정에서 세포막에 존재하는 글리세롤인지질(glycerophospholipid)의 terminal diester 결합을 가수분해하여 phosphatidic acid (PA)와 결합되어있던 head group을 분해시키는 효소이다. PLD 유전자의 다형성을 발굴하기 위해 Ge-

nomeric DNA추출, primer의 구축, 각 엑손(exon) 지역의 PCR 및 DGGE분석, PCR 산물을 이용한 염기서열 결정과 분석으로 확인하는 과정을 거치는 일련의 체계를 구축하고 유전자 다형성을 발굴 후 아토피피부염의 위험인자로 쓰여지는 임상적 지표들과의 관계를 밝혀 궁극적으로 아토피피부염 진단지표로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

**방법** : 아토피피부염 진단기준에 합당한 만 18세 이하의 환자 118명을 대상으로 하여 임상 기록을 작성하고 보호자의 동의를 얻은 후 검사를 시행하였다. 모든 아토피피부염 환아는 SCORAD 지수를 이용하여 중증도를 분류하였다. 채취한 혈액으로부터 PUREGENE DNA Purification kit (Gentra, Minnesota, USA)를 이용해 total genomic DNA를 추출하였다. PCR을 수행한 후에 1.5% agarose gel에서 PCR 생성물을 확인했다. 증폭된 각 PCR 생성물을 DGGE 방법을 사용하여 SNP를 검출하였다.

**결과** : 대상 환아를 SCORAD 지수로 분류한 결과 경증 47명(SCORAD 지수<25), 중등증 48명(SCORAD 지수 25-50), 중증 23명(SCORAD 지수>50)이었다. 118명의 DNA 표본 중 DGGE 분석을 통해 4명의 표본에서 다형성을 발견하였으며, PLD1의 26개의 엑손 중 23 엑손에서 3개의 PLD1 cSNP (Exon23: G2658A, T2664A, G2684A)를 검출하였다. 발견된 각각의 cSNP 중 G2658A는 PLD1 엑손 상의 2658위치가 Guanine에서 Adenine으로 치환되었으며, T2664A는 2664번 위치가 Thymine에서 Adenine으로, G2684A는 2684번 위치가 Guanine에서 Adenine으로 치환됨을 알 수 있었다.

**결론** : 118명 아토피피부염 환아에서 3개의 PLD1 gene cSNP (G2658A, T2664A, G2684A)을 최초로 발견하였다. 그 중 G2658A 다형성은 IgE의 수치와 관련이 있을 것이라 판단되나 PLD1 cSNP이 직접적으로 아토피피부염의 발생에 기여하지는 않을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Park HK, Oh SY, Yim EY, Shin ES, Kwon HS, Kim KM. Association Study between Asthma Severity and Single Nucleotide Polymorphisms of Fibroblast Growth Factor 2. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2004; 24:421-7.
- 2) Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *Med J Aust* 2005;182:298-304.
- 3) Arruda LK, Sole D, Baena-Cagnani CE, Naspitz CK. Risk factors for asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:153-9.
- 4) Vercelli D. Genetic polymorphism in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:609-13.
- 5) Hershey GK. Is it all in our genes? The "mitey" truth. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:392-4.
- 6) Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum IgE. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-83.
- 7) Oh JW, Kim JH, Lee KS, Han JS. Major house dust mite allergen, Der p 1, activates phospholipase D in human peripheral blood mononuclear cells from allergic patients: Involvement of protein kinase C. *Exp Mol Med* 2000;32:67-71.
- 8) Oh JW, Kim EY, Koo BS, Lee HB, Lee KS, Kim YS, et al. Der f 2 activates phospholipase D in human T lymphocytes from Dermatophagoides farinae specific allergic individuals: Involvement of protein kinase C- $\alpha$ . *Exp Mol Med* 2004;36:486-92.
- 9) Cummings R, Parinandi N, Wang L, Usatyuk P, Natarajan V. Phospholipase D/phosphatidic acid signal transduction: role and physiological significance in lung. *Mol Cell Biochem* 2002;235:99-109.
- 10) Melendez AJ, Allen JM. Phospholipase D and immune receptor signaling. *Semin Immunology* 2002;14:49-55.
- 11) Yasui K, Komiyama A. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase D in temporal activation of superoxide production in FMLP-stimulated human neutrophils. *Cell Biochem Funct* 2001;19:43-50.
- 12) Morgan CP, Sengelov H, Whatmore J, Borregaard N, Cockcroft S. ADP-ribosylation-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils. *Biochem J* 1997;325:581-5.
- 13) Hayes VM, Wu Y, Osinga J, Mulder IM, van der Vilies P, Elfferich P, et al. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1999;27:e29.
- 14) Li H, Romieu I, Wu H, Sienna-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Del Rio-Navarro BE, et al. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy. *Hum Genet* 2007;121:529-38.
- 15) Adjers K, Pessi T, Kariainen J, Huhtala H, Hurme M. Epistatic effect of IL1A and IL4RA genes on the risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:445-7.
- 16) Park LH, Kim LH, Choi YH, Lee JH, Rhim T, Lee YM, et al. Interleukin 3 (IL-3) polymorphisms associated with decreased risk of asthma and atopy. *J Hum Genet* 2004;49:517-27.
- 17) Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, et al. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:583-90.
- 18) Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-72.
- 19) Exton JH. Phospholipase D. *Ann N Y Acad Sci* 2000;905:61-8.
- 20) English D. Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signaling. *Cell Signal* 1996;8:341-7.

- 21) Hitomi T, Zhang J, Nicoletti LM, Grodzki AC, Jamur MC, Oliver C, et al. Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood* 2004; 104:4122-8.
- 22) Weidinger S, Rummeler L, Klopp N, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Fischer G, et al. Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy. *Allergy* 2005;60:1256-61.
- 23) Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Dahl R, Binderup HG, Kruse TA. No linkage and association of atopy to chromosome 16 including the interleukin-4 receptor gene. *Allergy* 2001;56:775-9.
- 24) Deindl P, Peri-Jerkan S, Deichmann K, Niggemann B, Lau S, Sommerfeld C, et al. No association of histamine-N-methyl transferase polymorphism with asthma or bronchial hyperresponsiveness in two German pediatric populations. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16: 40-2.