

Dystrophinopathy 환자에서
임상적, 면역조직화학적 및
웨스턴 블롯 분석

연세대학교 대학원

의학과

나상준

Dystrophinopathy 환자에서
임상적, 면역조직화학적 및
웨스턴 블롯 분석

지도교수 최영철

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월

연세대학교 대학원

의학과

나상준

나상준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 인

심사위원 인

심사위원 인

연세대학교 대학원

2007년 12월

감사의 글

논문의 시작부터 완성까지 지도해 주신 최영철 교수님과 많은 조언을 주신 문재호 교수님, 김원주 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 실험의 진행에 큰 도움을 준 이은영 연구원과 신경과 의국원들에게도 감사를 전합니다.

마지막으로 항상 저를 위해 기도하시는 부모님, 사랑하는 동생 및 소중한 아내와 논문 완성의 기쁨을 같이하고 싶습니다.

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구 대상	5
2. 연구 방법	5
가. Multiplex polymerase chain reaction	5
나. 근육생검 및 면역조직화학 염색	5
다. 웨스턴 블롯	6
3. 자료 분석	7
III. 결과	9
1. 환자의 임상적 양상	9
2. 근육생검 및 면역조직화학 염색의 분석	11
3. Multiplex polymerase chain reaction 분석	16
4. 웨스턴 블롯 분석	16
IV. 고찰	20
V. 결론	30
참고문헌	31
영문요약	38

그림 차례

Figure 1. Muscle biopsy findings in patient with dystrophinopathy	14
Figure 2. The immunohistochemical staining of muscle specimen for dystrophin	15
Figure 3. The distribution of exon deletion by multiplex PCR for dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) (black; DMD, gray; BMD)	18
Figure 4. Western blot analysis of muscle dystrophin with antibodies directed against COOH-terminal, mid-rod domain, and NH ₂ -terminal epitopes	19

표 차례

Table 1. Clinical characteristics of 24 patients with dystrophinopathy	10
Table 2. Histopathologic findings of muscle biopsy in 24 patients with dystrophinopathy	13
Table 3. Comparison with clinical characteristics among patients with complete negative, incomplete/partial, and near normal dystrophin staining	22
Table 4. Immunohistochemistry and exon deletion patterns in 24 patients with dystrophinopathy	24
Table 5. Immunohistochemistry and western blot in 24 patients with dystrophinopathy	26

<국문 요약>

Dystrophinopathy 환자에서 임상적, 면역조직화학적 및 웨스턴 블롯 분석

목적: Dystrophinopathy의 진단방법으로 널리 사용되고 있는 다중중합효소연쇄반응(Multiplex PCR)은 디스트로핀 유전자의 exon 결손을 확인하여 진단하는 것이다. Multiplex PCR을 이용하여 유전자 결손을 분석한 대부분의 연구에서는 약 65%의 디스트로핀 유전자 결손이 보고 되고 있다. 나머지 점 돌연변이, 미세결손, 중복 등에 의한 약 35%의 경우 정확한 진단을 위해서는 디스트로핀 단백질 발현을 직접 확인하는 웨스턴 블롯이나 면역조직화학검사가 반드시 필요하다. 본 연구는 dystrophinopathy로 진단된 환자에서 면역조직화학 염색에 의한 디스트로핀 단백질 발현 및 웨스턴 블롯 결과를 분석하여 임상적 특징과의 연관 관계를 알아보았다.

방법: 2003년 9월부터 2005년 2월까지 영동세브란스 병원에서 ENMC(Europian NeuroMuscular Center) 에서 제시한 Duchenne 및 Becker 근이영양증(DMD/BMD)의 임상기준을 만족하는 환자로서 근육생검 소견상 근이영양증의 소견을 보이고 면역조직화학 염색에서 디스트로핀 염색의 이상 소견을 보였던 24명을 대상으로 하였다. 이들 모두에서 디스트로핀 유전자 (Multiplex PCR)검사와 웨스턴 블롯

을 시행하였다.

결과: 면역조직화학염색을 한 24명중 15명(62.5%)에서는 DYS1(중간 막대 도메인 부위), DYS2(카르복시 말단부위), DYS3(아미노 말단부위) 에서 모두 디스트로핀이 완전히 발현되지 않았으며 임상적으로는 대부분 DMD 양상을 보였고, 디스트로핀 염색에 불완전하거나 부분적으로 발현한 8명(33.3%)중에 임상적으로 BMD인 환자들이 다수 포함되어 있었다. 또한 DYS1, DYS2, DYS3 모두에서 거의 정상으로 발현된 1명에서는 임상적으로 BMD 소견을 보였다. 웨스턴 블롯을 시행한 24명중 15명(62.5%)에서는 DYS1, DYS2, DYS3 모두에서 디스트로핀 밴드가 관찰되지 않았으며 임상적으로는 대부분 DMD 양상을 보였고, 세 도메인 중 감소된 양의 밴드가 관찰된 9명(37.5%)중에 임상적으로 BMD인 환자들이 대부분이었고 감소된 양과 임상적인 중증도와는 상관관계가 없었다.

결론: 면역조직화학염색과 웨스턴 블롯은 모두 dystrophinopathy 진단에 중요한 도구이지만 검사결과와 임상적인 표현형이 항상 일치하지는 않았다. 면역조직화학 염색에서 거의 정상으로 발현된 BMD 환자의 경우 다른 근이양증과 감별이 불가능하기 때문에 웨스턴 블롯을 병행하는 것이 확진에 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

핵심되는 말: Dystrophinopathy, 면역조직화학염색, 웨스턴 블롯

Dystrophinopathy 환자에서 임상적, 면역조직화학적 및 웨스턴 블롯 분석

<지도교수 최영철>

연세대학교 대학원 의학과

나상준

I. 서론

Duchenne 및 Becker 근이양증(이하 DMD/BMD)은 진행성 근력저하를 보이며 성염색체 열성으로 유전되는 근육 질환이다. 1987-1988년에^{1,2} 근 막에 존재하는 디스트로핀(dystrophin) 유전자와 디스트로핀 단백질이 발견되어 이 유전자 결손으로 디스트로핀 단백질이 완전 또는 부분손실 되어 근섬유의 괴사 및 재생을 보이면서 근력저하가 나타나는 근육병으로 밝혀져 DMD/BMD를 dystrophinopathy 또는 dystrophin-deficient muscular dystrophy라고 한다.³ 이러한 dystrophinopathy의 임상 표현형은 대부분 DMD/BMD로 발현되나 이외에도 DMD/BMD의 중간형, 그리고 낮은 발생률이지만 증상이 발현된 여자 유전자 보유자, 성 연관 심근병증(X-linked cardiomyopathy)등

으로 발견되기도 한다. 발병률은 DMD의 경우 출생한 남아 약 3300명당 1명 정도로 매우 높아 유전성 근육질환의 약 90%를 차지한다.⁴ 디스트로핀 유전자의 변이는 결손(deletion)이 가장 흔하여 전체 환자의 55~65%에 달한다.^{5,6} 결손부위가 mRNA의 translational reading frame을 이동시킬 경우(out of-frame deletion) 전사가 조기에 종식하게 되며 디스트로핀 단백질이 형성되지 않아 증상이 심한 DMD형이 발견되게 된다.⁷ 그러나 결손이 있더라도 reading frame이 보존될 경우(in-frame deletion)에는 분자량이 작거나, 비정상적인 단백질이 생성되어 DMD에 비해 증상이 경미한 BMD형이 발견하게 된다. 과거에는 근육생검에 의한 병리학적 소견과 임상적인 소견에 의해 진단할 수 밖에 없었으나 최근에는 유전자 검사(multiplex polymerase chain reaction)등에 의해서 비교적 용이하게 확진 할 수 있게 되었다. 그러나 대부분의 연구에서 65% 정도의 디스트로핀 유전자 결손율이 보고되고 있으므로 정확한 진단을 위해서는 디스트로핀 단백질발현을 직접 확인하는 웨스턴 블롯 이나 면역조직화학염색이 반드시 필요하다. 이에 본 연구는 dystrophinopathy로 진단된 환자에서 면역조직화학 염색에 의한 디스트로핀 단백질 발현 및 웨스턴 블롯 결과를 분석하여 임상적 특징과의 연관 관계를 연구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

2003년 9월부터 2005년 2월까지 영동세브란스 병원에서 ENMC(European NeuroMuscular Center)⁸ 에서 제시한 DMD/BMD의 임상기준을 만족하는 환자로서 근육생검 소견상 근이양증의 소견을 보이고 면역조직화학 염색에서 디스트로핀 염색의 이상 소견을 보였던 24명을 대상으로 한다. 이들 모두에서 디스트로핀 유전자 (multiplex polymerase chain reaction)검사와 웨스턴 블롯을 시행하였다.

2. 연구 방법

가. Multiplex polymerase chain reaction

환자의 말초혈액에서 페놀추출 (phenol extraction) 방법에 의해 genomic DNA를 추출한 후 1990년 Chamberlian 등⁹이 개발한 9종의 시발체 (exon 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51)와 1990년 Beggs 등¹⁰이 개발한 10종(exon 3, 6, 13, 43, 47, 49, 50, 52, 60, muscle specific promotor)의 시발체를 합성하여 Multiplex PCR법으로 결손 부위를 검사하였다.¹¹

나. 근육생검 및 면역조직화학 염색

24명의 환자에서 삼각근 내측 원위부 또는 일부에서는 비복근에서 근

육생검을 시행하였고 동결시킨 후 (frozen), 10 μ m 두께 연속 절편을 hematoxylin & Eosin (H&E), modified Gomori Trichrome, NADPH-TR, ATPase PH 4.3/4.6/9.4 등으로 염색하였다. 면역조직화학염색은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 24명에게서 얻은 근조직을 10 μ m 두께 연속 절편으로 잘라 아세톤으로 4°C에서 10분간 고정시키고 0.05 mol/L Tris-buffered saline (pH 7.5)으로 15분간 세척한 후 2% bovine serum albumin과 5% goat serum을 함유한 blocking solution에 30분간 incubation시켰다. 이후 절편은 각각 dystrophin (NCL-DYS 1, NCL-DYS 2, NCL-DYS 3, 1:100 dilution, Novocastra)의 단클론 IgG 항체 (monoclonal IgG)와 함께 하루 동안 4°C 환경하에서 incubation시켰다. Incubation한 절편을 Tris-buffered saline으로 30분간 세척 후 peroxidase로 접합(conjugated)된 goat anti-mouse IgG를 사용하여 diaminobenzidine (DAB)-peroxidase 반응 (Vector Laboratories, CA., USA.)을 유도하여 염색 여부를 관찰하였다.¹²

다. 웨스턴 블롯

냉동 보관된 근육생검 조직을 10~20 μ m로 절편하였다. 10장의 조직편에 SDS-sample Buffer(0.125 M Tris-HCL, pH 6.8, 5% β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue)

50~100 μm 를 넣은 후 조직이 완전히 분해될 때까지 초음파 분쇄한 후 분해된 시료를 95°C에서 5분간 변성 시켰다. 각 시료에 대한 근육 단백질을 정량화하기 위하여 6% polyacrylamide gel에 각 시료 2 μL 를 SDS-PAGE하였다. 전기영동 후 gel을 Coomasside Blue로 염색하고, 220 kD 위치의 myosin heavy chain의 단백질 양을 densitometer로 측정하여 근육 단백질의 양을 정량화하였다. Myosin 단백질의 양을 일정하게 맞춘 후 다시 6% polyacrylamide gel에 SDS-PAGE하고 Mightly small transphor unit(Hoeffer, USA)를 이용하여 nitrocellulose membrane에 blotting하였다. TBS-T(Tris buffer saline, 0.1%(v/v) Tween 20)에 1:200으로 희석된 1차 항체에 membrane를 넣고 교반기 위에서 4°C로 하룻밤 동안 반응시킨다. 1차 항체는 면역조직화학 염색법에서 이용한 세가지 항 디스트로핀 항체를 이용하였다. 상온에서 15분간 TBS-T로 3회 membrane를 세척한 후 디스트로핀 검출은 MouseExtrAvidin Peroxidase staining kit (Sigma, USA)를 이용하여 관찰 하였다.

3. 자료 분석

발병시 연령, 내원시 주증상, 가족력, 비복근의 가성비대 유무, 심전도, 혈청 creatine kinase(CK) 수치, 인지기능 등을 검사하였다. 환자의 인지기능에 대한 평가는 한국교육개발원

개인지능검사(Korean Educational Developmental Institute Wechsler Intelligence Scale for Children: KEDI-WISC)를 사용하였고 5세 이상 14세 미만의 검사 가능한 8명에서 시행하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 환자의 임상적 양상

대상 환자 24명 모두 남자였고 내원시 평균 연령은 8.3세(범위, 1-25세), 증상이 처음 발견된 연령은 평균 4.7 ± 2.1 세(범위, 2-9세)였다. 첫 증상은 waddling gait와 같은 이상보행 18명(75.0%), 일어서기 힘들거나 계단을 오르기 힘든 경우 등의 하지 근력저하를 보이는 경우가 4명(16.7%), 혈액검사에서 간 효소의 상승이 우연히 발견된 경우가 2명(8.3%)으로 주로 하지의 근력저하를 보인 경우가 전체의 90% 이상을 차지하였다. 전체 24명중 7명(29%)에서 가족력이 있었다. 비복근의 가성비대는 21명(87.5%)에서 있었으며, 혈청 CK는 평균 14,144 (범위, 181-38,200; 정상치, 35-232) IU/L였다. 심전도를 시행한 16명중 정상은 10명(62.5%), 우심실 비대 3명(18.8%), 우측 다발 가지 차단(right bundle branch block) 1명(6.3%), 좌심실 비대 1명(6.3%), 동빈맥 (sinus tachycardia) 1명(6.3%) 등이었다. 인지기능 평가를 시행한 8예에서 평균 intelligence quotient (IQ)는 81.0이었으며 평균 이하 (below average)를 보인 경우는 전체 8명중 3명(37.5%)이었고, 69점 이하의 지능저하가 2명(25.0%)에서 보였다(Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of 24 patients with dystrophinopathy

Patient No.	Sex /age	Age of onset (yrs)	Onset Sx	Distribution of muscle weakness						EKG	Cognitive dysfunction	Calf muscle hypertrophy	Serum CK level(IU/L)	F/Hx
				Face	Neck	U/Ex		L/Ex						
						prox.	distal	prox.	distal					
1	M/8	3	G	5	5	4	4+	4+	5	WNL	IQ 91	+	18580	+
2	M/6	1	I	5	5	4	4+	4	4+	ND	ND	+	38200	+
3	M/6	2	R	5	5	5	5	4+	5	ND	IQ 96	+	9355	-
4	M/7	2	R	5	5	5	5	4+	5	ND	IQ 93	+	19370	-
5	M/14	9	R	5	5	5-	5	5-	5	LVH	ND	+	5384	-
6	M/21	7	G	5	5	4+	4+	4	4	RBBB	ND	-	181	-
7	M/3	3	R	5	5	5	5	4+	5	ND	ND	+	12684	-
8	M/4	2	G	5	5	3+	4	3+	4	ST	ND	+	14966	-
9	M/9	8	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	ND	+	7810	-
10	M/4	1	G	5	5	4	4+	4	4+	ND	ND	+	29870	-
11	M/11	7	G	5	4+	4	4+	4	4+	ND	IQ 82	+	6363	-
12	M/9	7	G	5	5	4	4	4	4	WNL	ND	+	13720	-
13	M/7	5	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	ND	+	6473	+
14	M/5	4	G	5	5	4	5	4	5	RVH	ND	+	14686	-
15	M/25	5	G	5	5	4	5	4	5	ND	ND	+	1699	+
16	M/15	4	G	5	5	4+	4+	4	4+	WNL	ND	-	457	-
17	M/2	1	I	5	5	4+	5	4+	5	ND	ND	+	8836	-
18	M/6	4	G	5	5	4	4	4	4	RVH	ND	+	16680	-
19	M/6	3	G	5	5	4+	4+	4+	4+	WNL	ND	+	28300	-
20	M/8	7	G	5	5	4	4+	4	4+	RVH	IQ 81	+	14989	-
21	M/6	5	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	IQ 59	-	22000	+
22	M/5	4	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	IQ 67	+	16857	+
23	M/4	2	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	ND	+	17380	-
24	M/7	6	G	5	5	4	4+	4	4+	WNL	IQ 79	+	14634	+

R; difficulty in rising from the floor, G; waddling gait or frequent fall, ND; not done, WNL; within normal limit,

I; incidental, RVH; right ventricular hypertrophy, LVH; left ventricular hypertrophy, ST; sinus tachycardia,

U/Ex; upper extremities, L/Ex; lower extremities, prox.; proximal

2. 근육생검 및 면역조직화학 염색의 분석

근육생검을 시행한 24명 대부분에서 근이영양증의 특징적인 소견인 다양한 근섬유 크기, 근섬유의 괴사 및 재생, 근세포 내부의 핵, 간질의 섬유화 등이 관찰 되었다 (Figure 1, Table 2). 디스트로핀 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행한 24명 중, 15명(62.5%)에서 DYS1,2,3 (중간 막대 부위, 카르복시 말단부위, 아미노 말단부위)에서 모두 디스트로핀이 완전히 발현되지 않았으며, 8명(33.3%)에서 세 부위에서 모두 약하게 발현되었거나(감소된 발현) 또는, 하나 또는 두 개 부위에서 발현이 전혀 안되거나 약하게 발현되고 나머지에서는 정상으로 발현되었다(부분적으로 감소된 발현). 나머지 1명에서는 거의 정상으로 발현되었다.

감소된/부분적으로 감소된 발현을 보인 8명중 2명에서 DYS3는 정상 발현되었으나 DYS1, DYS2는 부분적으로 발현되었다. 1명에서는 DYS1, DYS2가 부분적으로 발현되었고 DYS3는 완전히 발현되지 않았다. 1명에서는 DYS3가 부분적으로 발현되었고 DYS1, DYS2는 완전히 발현되지 않았다. 1명에서는 DYS1, DYS3가 부분적으로 발현되었고 DYS2는 정상 발현하였다. 1명에서는 DYS3 는 완전히 발현되지 않았고, DYS1은 부분 발현되었고 DYS2는 정상 발현하였다. 1명에서는 DYS2 는 완전히 발현되지 않았고, DYS3은 부분

발현되었고 DYS1는 정상 발현하였다. 2명에서는 DYS1, DYS 2, DYS 3 모두에서 부분적으로 발현되었다. (Figure 2).

Table 2. Histopathologic findings of muscle biopsy in 24 patients with dystrophinopathy

Muscle fiber	
Small angulated	0 (0%)
Atrophic	6/24 (25%)
Hypertrophic fibers	18/24 (75%)
Internal nuclei	20/24 (83%)
Degeneration	
Necrosis	22/24 (92%)
Phagocytosis	19/24 (79%)
Regeneration fiber	22/24 (92%)
Cellular response	
Inflammatory	5/24 (21%)
Fibrosis	20/24 (83%)
Architectual change	
Target fiber	0
Targetoid fiber	0
Moth-eaten fiber	0
Ring fiber	0

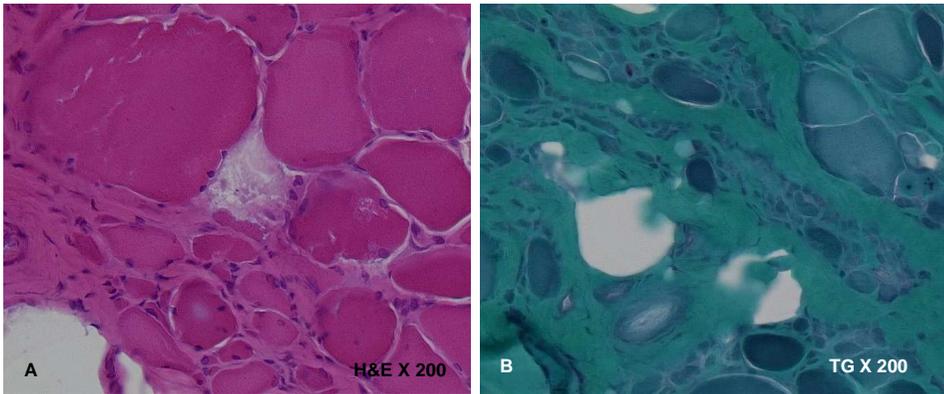


Figure 1. Muscle biopsy findings in patient with dystrophinopathy Hematoxylin-Eosin(A) and modified Gomori Trichrome stain (B) in dystrophinopathy shows fiber size variation, increased internal nuclei, degenerating fibers, and regenerating fibers.

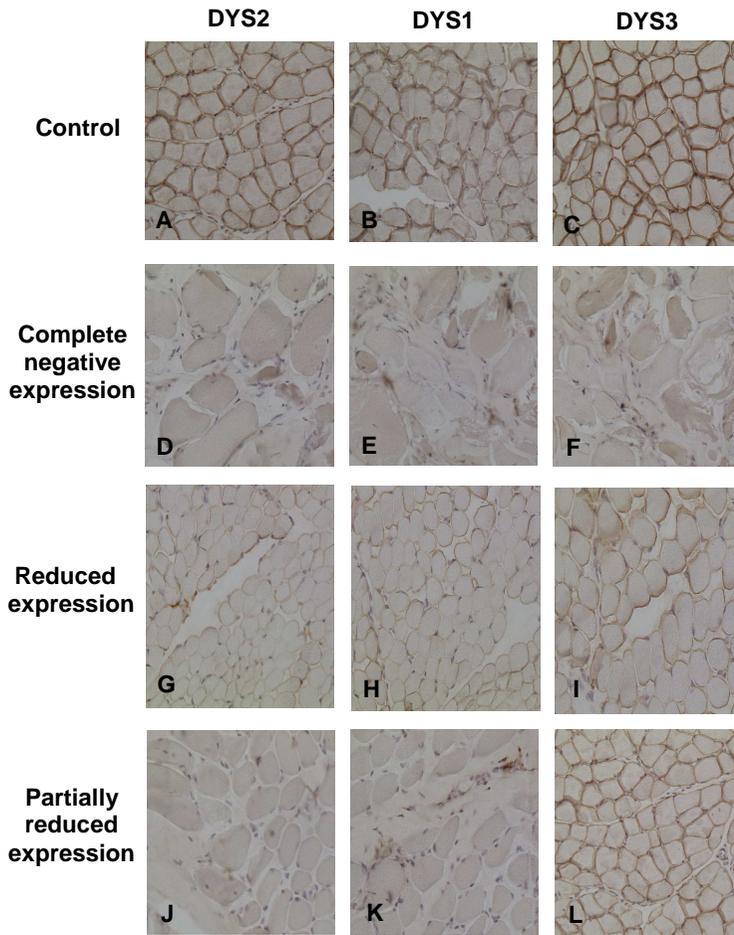


Figure 2. The immunohistochemical staining of muscle specimen for dystrophin. Normal immunoreactivity against DYS1 (B), DYS2 (A), and DYS3 (C) were noted in normal control. However, complete negative immunoreactivity against DYS1 (E), DYS2 (D), DYS3 (F) and reduced/partially reduced immunoreactivity against DYS1 (H), DYS2 (G), DYS3 (I)/DYS1 (K), DYS2 (J), DYS3 (L) were noted in dystrophinopathy.

3. Multiplex polymerase chain reaction 분석

Multiplex PCR을 이용한 24명의 유전자 분석결과는 Figure 3과 같다. 13명(54%)에서 결손이 발견되었고 이중 8명(62%)은 다빈도 결손부위로 알려진 exon 44와 exon 55 사이에서 결손이 발견되었다. Exon 45의 결손이 각각 7명(54%)으로 가장 흔했고 다음으로 흔한 부위는 exon 47로 6명(46%)에서 발견되었다. 결손이 확인된 모든 환자에서 exon 6, 43, 44, 52 및 60의 결손은 보이지 않았다 (Figure 3).

4. 웨스턴 블롯 분석

디스트로피노페씨 환자 24명에 대한 디스트로핀 아미노 말단부위와 카르복시 말단부위 및 중간 막대 부위에 대한 웨스턴 블롯팅 결과, 15명 (66.7%)에서 세 부위 모두에서 밴드가 관찰되지 않았으며 9명(33.3%)에서는 부분적으로 감소된 양의 밴드가 관찰되었다. 9명중 3명에서 아미노 말단부위, 카르복시 말단부위 및 중간 막대 부위에서 감소된 양의 밴드가 관찰되었다. 2명에서 아미노 말단부위와 중간 막대 부위에서 감소된 양의 밴드가 관찰되었고 카르복시 말단부위에서 밴드가 관찰되지 않았다. 2명에서 카르복시 말단부위와 중간 막대 부위에서 감소된 양의 밴드가 관찰되었고 아미노 말단부위에서 밴드가 관찰되지 않았다. 2명에서 아미노

말단부위에서만 감소된 양의 밴드가 관찰되었으며 카르복시 말단부위와 중간 막대 부위에서는 밴드가 관찰되지 않았다 (Figure 4).

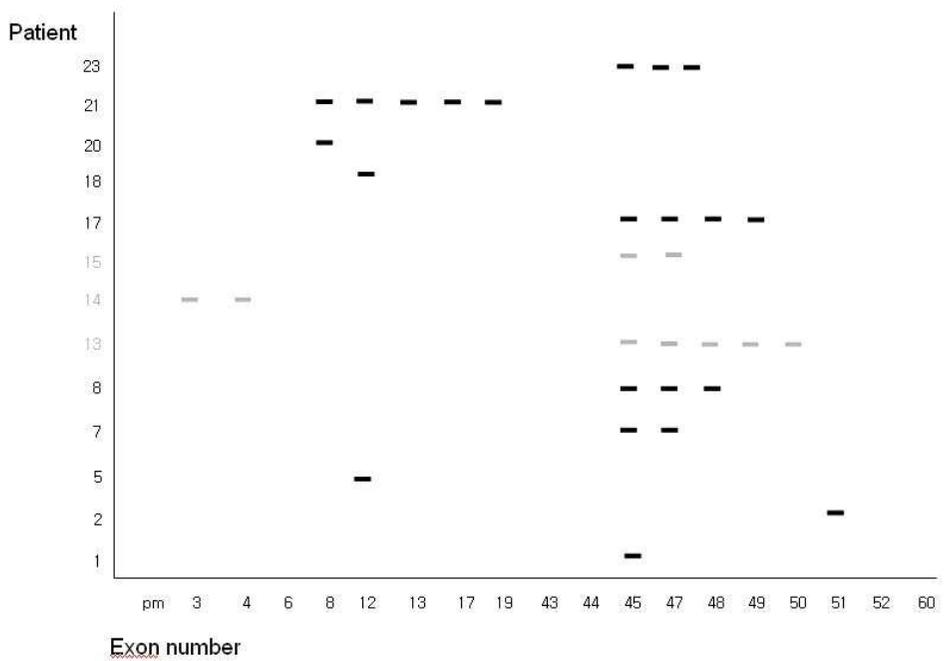


Figure 3. The distribution of exon deletion by multiplex PCR for dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) (black; DMD, gray; BMD)

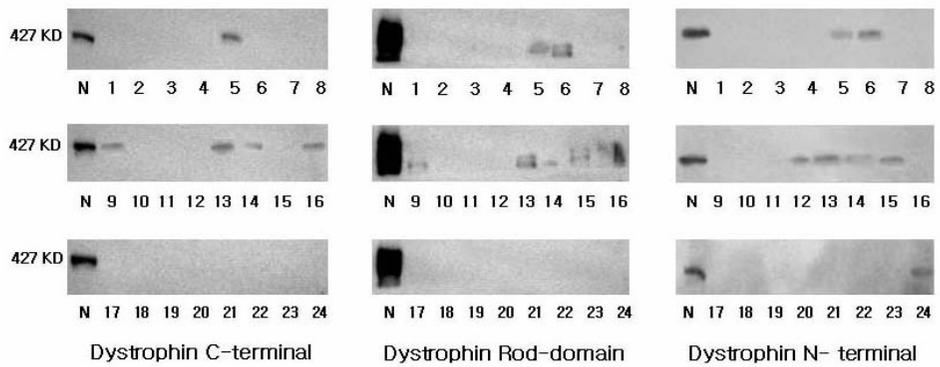


Figure 4. Western blot analysis of muscle dystrophin with antibodies directed against COOH-terminal, mid-rod domain, and NH₂-terminal epitopes.

IV. 고찰

디스트로핀 유전자는 약 240만 bp이며 79개의 exon으로 이루어져 있으며 X 염색체의 약 1%를 차지한다.^{6,13} 이 유전자는 디스트로핀 단백을 코드하는데 이 단백질은 근 세포막을 유지하는 중요한 역할을 하고 있다. 디스트로핀 단백질은 근육세포내 횡문근형질막하(subsarcolemma) 부위에 존재하는 400,000 달톤 크기의 단백질으로써 3685개의 아미노산으로 이루어져 있으며 아미노 말단부위(amino terminal domain), 중간 막대 부위(mid rod domain), 시스틴이 풍부한 부위(cystein-rich domain) 및 카르복시 말단부위(carboxy terminal domain)으로 구성된다. 이 유전자의 결손 및 변이로 단백질이 소실되면 근섬유 막의 안정성에 장애를 일으켜 근섬유의 괴사 및 재생을 통해서 혈중 CK증가되고, 괴사가 더 진행하면 근력저하가 생겨 상하지 근 위축 및 보행장애가 심해지고, 호흡장애로 사망하게 된다.¹⁴ 최근에는 디스트로핀 단백질의 근육세포막에서 발현 유무 및 정도를 웨스턴 블럿이나 면역조직화학 염색 등을 이용하여 직접 확인하는 방법과 multiplex PCR을 이용하여 디스트로핀 유전자 결손을 확인하는 방법이 보편화되어 비교적 용이하게 진단을 할 수 있게 되었다. 면역조직화학염색을 한 24명중 15명(62.5%)에서는 DYS1(중간 막대 부위), DYS2(카르복시 말단부위), DYS3(아미노 말단부위) 에서 모두 디스트

로핀이 완전히 발현되지 않았으며 임상적으로는 대부분 DMD 양상을 보였고, 디스트로핀 염색에 불완전하거나 부분적으로 발현한 8명 (33.3%)중에 임상적으로 BMD인 환자들이 다수 포함되어 있었다. 또한 DYS1, DYS2, DYS3 모두에서 거의 정상으로 발현된 1명에서는 임상적으로 BMD 소견을 보였다 (Table 3).

Table 3. Comparison with clinical characteristics among patients with complete negative, incomplete/partial, and near normal dystrophin staining

Patient number (%)	CN staining, n=15 (62.5%)	IP staining, n=8 (33.3%)	Near NL staining, n=1 (4.2%)	Total, n=24 (100%)
Mean age of onset (range, yrs)	43.7 (2-7)	5.3 (4-8)	9	4.6 (2-9)
Mean CK level (range, IU/L)	18295 (6363-38200)	7457 (181-14686)	5384	14144 (181-38200)
Hypertrophy of calf muscle	14/15 (93.3%)	6/8 (75.0%)	0	21/24 (87.5%)
Exon deletion (multiplex PCR)	9/15 (60.0%)	3/8 (37.5%)	exon 12	13/24 (54.2%)

CN: complete negative, IP: incomplete/partial, CK: creatine kinase, NL: normal

BMD에서 가장 흔하게 보이는 면역조직화학염색소견은 근섬유간에 디스트로핀 발현이 과도한 변이성(excessive variability)을 보이는 것으로서 전체 BMD 환자의 80% 정도가 이 범주에 든다고 하고, 모든 근섬유에서 디스트로핀 발현이 중등도로 감소되는 경우가 그 다음으로 흔하며, 일부환자에서는 거의 정상적으로 발현되는데 이런 경우는 증상도 비교적 경하다고 한다. 본 연구에서 디스트로핀 염색에 불완전/부분적으로 발현한 8명 환자의 면역조직화학염색을 고찰해보면, 2명에서는 서로 다른 3개의 부위 모두에서 디스트로핀 발현의 과도한 변이성을 보였고 6명에서는 한가지나 두 가지 부위에서 심한 이상 소견을 보이고 나머지 부위에서는 정상 발현을 보였다. 이는 이전에 Morandi 등이 보고한 BMD 환자의 경우 면역조직화학 염색을 했을 때 보이는 두 가지 양상의 검사 소견과 비슷한 소견이 관찰되었다. 또한 이 보고에서는 세 부위에서 전반적으로 발현이 감소된 경우가 더 중한 임상형을 보인다고 하였으며 본 연구에서도 추적관찰을 요하겠지만 이와 같은 소견을 보였다.¹⁵ 또한 이 8명중 카르복시 말단부위에 발현 감소가 있는 경우가 더 심한 임상양상을 보이는 경향이 있었다 (Table 1, 4).

Table 4. Immunohistochemistry and exon deletion patterns in 24 patients with dystrophinopathy

Patient No.	Sex/age	Age of onset (yrs)	Dystrophin staining			Exon deletion
			C-terminal	Rod-domain	N-terminal	
1	M/8	3	CN	CN	CN	45
2	M/6	1	CN	CN	CN	51
3	M/6	2	CN	CN	CN	no
4	M/7	2	CN	CN	CN	no
5	M/14	9	Near NL	Near NL	Near NL	12
6	M/21	7	NL	IP	IP	no
7	M/3	3	CN	CN	CN	45,47
8	M/4	2	CN	CN	CN	45,47,48
9	M/9	8	IP	IP	CN	no
10	M/4	1	CN	CN	CN	no
11	M/11	7	CN	CN	CN	no
12	M/9	7	CN	CN	IP	no
13	M/7	5	IP	IP	IP	45,47,48,49,50
14	M/5	4	IP	IP	IP	3,4
15	M/25	5	NL	IP	IP	45,47
16	M/15	4	NL	IP	CN	no
17	M/2	1	CN	CN	CN	45,47,48,49
18	M/6	4	CN	CN	CN	12
19	M/6	3	CN	CN	CN	no
20	M/8	7	CN	CN	CN	8
21	M/6	5	CN	CN	CN	8,12,13,17,19
22	M/5	4	CN	CN	CN	no
23	M/4	2	CN	CN	CN	45,47,48
24	M/7	6	CN	NL	IP	no

CN; complete negative, IP; incomplete/partial, NL; normal, I; incidental

웨스턴 블랏을 시행한 24명중 15명(62.5%)에서는 중간 막대 부위, 카르복시 말단부위, 아미노 말단부위 모두에서 디스트로핀 밴드가 관찰되지 않았으며 임상적으로는 대부분 DMD 양상을 보였고, 세 도메인 중 감소된 양의 밴드가 관찰된 9명(37.5%)중에 임상적으로 BMD인 환자들이 대부분이었고 감소된 양과 임상적인 중증도와는 상관관계가 없었다 (Table 1, 5). DMD의 경우 대부분의 근섬유에서 디스트로핀의 발현이 소실되거나 현저히 감소되므로 면역조직화학염색만으로 진단이 가능하지만 BMD의 경우 모든 근섬유에서 디스트로핀 발현이 감소된 경우부터 거의 정상으로 발현되는 경우까지 다양하게 분포하므로 면역조직화학염색만으로는 다른 근이영양증과 감별이 불가능한 경우가 있다.¹⁶ 이러한 이유로 BMD에서는 웨스턴 블랏을 병행해야만 다른 종류의 근이영양증과 확실하게 감별할 수가 있다. 본 연구에서도 5번 환자의 경우처럼 임상적으로 BMD이며 multiplex PCR에 의해 exon 12 결손이 확인되었고 면역조직화학염색에서 거의 정상으로 발현된 환자에서 웨스턴 블랏을 시행한 결과 모든 부위에서 적은 양의 감소된 밴드가 관찰되었다. 이 1 예를 제외하고는 다른 환자에게서는 면역조직화학염색과 웨스턴 블랏 결과가 거의 동일하게 관찰되었다 (Table 5).

Table 5. Immunohistochemistry and western blot in 24 patients with dystrophinopathy

Patient No.	Sex/age	Age of onset (yrs)	Dystrophin staining			Western blot		
			C-terminal	Rod-domain	N-terminal	C-terminal	Rod-domain	N-terminal
1	M/8	3	CN	CN	CN	No	No	No
2	M/6	1	CN	CN	CN	No	No	No
3	M/6	2	CN	CN	CN	No	No	No
4	M/7	2	CN	CN	CN	No	No	No
5	M/14	9	Near NL	Near NL	Near NL	Faint	Faint	Faint
6	M/21	7	NL	IP	IP	No	Faint	Faint
7	M/3	3	CN	CN	CN	No	No	No
8	M/4	2	CN	CN	CN	No	No	No
9	M/9	8	IP	IP	CN	Faint	Faint	No
10	M/4	1	CN	CN	CN	No	No	No
11	M/11	7	CN	CN	CN	No	No	No
12	M/9	7	CN	CN	IP	No	No	Faint
13	M/7	5	IP	IP	IP	Faint	Faint	Faint
14	M/5	4	IP	IP	IP	Faint	Faint	Faint
15	M/25	5	NL	IP	IP	No	Faint	Faint
16	M/15	4	NL	IP	CN	Faint	Faint	No
17	M/2	1	CN	CN	CN	No	No	No
18	M/6	4	CN	CN	CN	No	No	No
19	M/6	3	CN	CN	CN	No	No	No
20	M/8	7	CN	CN	CN	No	No	No
21	M/6	5	CN	CN	CN	No	No	No
22	M/5	4	CN	CN	CN	No	No	No
23	M/4	2	CN	CN	CN	No	No	No
24	M/7	6	CN	NL	IP	No	No	Faint

CN; complete negative, IP; incomplete/partial, NL; normal, I; incidental, No; no band, Faint; faint band

Multiplex PCR을 이용한 유전자 결손 분석에서 24명의 DMD/BMD 환자 중 13명(54.2%)에서 유전자 결손을 보였다. 중국에서는 약 62%,¹⁷ 이스라엘에서는 약 37%,¹⁸ 일본에서는 약 40%¹⁹ 등 대부분의 연구에서는 약 65%의 디스트로핀 유전자 결손율이 보고 되고 있다.^{6,20,21} 나머지 점 돌연변이, 미세결손, 중복 등에 의한 약 35%의 경우 정확한 진단을 위해서는 디스트로핀 단백 발현을 직접 확인하는 웨스턴 블롯이나 면역조직화학 검사가 반드시 필요하다. 디스트로핀 유전자 결손은 두 곳의 “hot spot”이 있는데, 5′ 끝부분에서 500 kb이 내에 위치한 최초 20개의 exon부위와 첫번째 exon으로부터 약 1,200 kb위치인 exon 44번과 exon 55번 사이에 있다. 이중에서도 1,200 kb위치인 유전자 중간 부위에서 결손 빈도가 가장 높다고 보고 되고 있다.²² 본 연구에서 디스트로핀 유전자 결손을 보인 13명중 8명에서 다빈도 결손부위로 알려진 exon 44와 exon 55 사이에서 결손이 발견되었으며 이는 이전에 보고된 결과와 일치한다.^{17,23} 또한 최근 국내에서 35명의 환자를 대상으로 19개의 시발체를 사용하여 20명 (57%)의 환자에서 유전자 결손을 확인되었고 exon 45와 exon 52 사이에서 가장 많은 결손이 있었음을 보고한 것과 유사하다.²⁴

아미노 말단부위 및 카르복시 말단부위에서의 디스트로핀 유전자 결손이 중간 막대 부위에서 일어나는 결손보다 임상적으로 더 심한

표현형을 보인다는 보고가 있었지만²⁵ 이러한 범칙에 항상 일치하지 않는다.²⁶⁻²⁸ 또한 동일한 exon 결손을 보이는 환자들에게서도 임상적으로 그 표현형의 중증도가 다양하게 나타나기 때문에 dystrophinopathy의 임상표현형을 결정하는 요인으로 exon 결손 부위 뿐만 아니라 다른 요인이 있을 것으로 추론된다.²⁷

Dystrophinopathy 환자에서 디스트로핀 유전자의 결손 양상 즉 결손의 부위, 결손의 개수 등과 임상적 소견의 중증도와는 유의한 상관관계가 없다는 연구가^{29,30} 있었고 본 연구에서도 이와 비슷한 경향을 보였다(Table 1,4). 디스트로핀 단백질에 대한 면역조직화학 염색과 multiplex PCR에 의한 디스트로핀 유전자 결손 사이의 관계를 고찰해보면 디스트로핀 염색에서 완전히 발현되지 않은 15명중 10명(66.7%), 감소된/부분적으로 감소된 발현을 보인 8명중 3명(37.5%), 거의 정상으로 발현된 1명에서 exon 결손이 확인되었다. 또한 디스트로핀 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 했을 때 완전히 발현되지 않은 경우가 감소된/부분적으로 감소된 발현을 보인 경우보다 exon 결손이 빈번한 경향이 있었다. 또한 결손의 위치는 두 경우 모두 “hot spot”부위인 exon 44와 exon 55 사이에서 대부분의 결손이 일어나는 것으로 확인되었다. 인지기능 평가를 시행한 8예에서 IQ가 69 이하인 정신지체가 2명 (25%)이었고 이는 약 30%에서 정신지체가

동반된다는 이전 보고와 비슷하다.³¹ 정신지체를 보인 2명중 1명은 exon 45와47, 한 명은 exon 51 결손이 있었고 이는 exon 44-55의 결손이 있는 경우 지능저하의 확률이 높다는 이전 보고와 일치하였다.³² Dystrophinopathy 환자에서 정신지체의 기전은, 디스트로핀이 배아기에 신경관에 표현되어 신경형성, 신경세포이주, 세포분화등에 관여하고, 성숙 두뇌에서는 신경접합부위의 원위부 막과 관련되어 신경전도의 통합에 참여하는 기능을 갖는 것과 연관하여 해석되고 있다.³³ 본 연구에서 저자들은 면역조직화학염색은 웨스턴 블롯에 비해 검사 소요 시간이 덜하고 경제적이며 단백질 조직 내 분포를 알 수 있는 장점이 있고, 한편 면역조직화학 염색에서 거의 정상으로 발현될 수도 있는 BMD 환자의 경우 다른 근이영양증과 감별이 불가능하기 때문에 western blot을 병행하는 것이 확진에 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

디스트로핀 단백질이 소실된 경우 DMD, 부분 결손된 경우 BMD로 발현 되지만 어떤 경우에는 디스트로핀 단백질이 완전 소실되었어도 증상이 경미한 BMD로 표현되기도 하고, 불완전 발현되더라도 DMD으로 표현되기 때문에 디스트로핀 면역염색이나 웨스턴 블롯 결과만으로 임상 표현형을 완전하게 구분하기 어렵다. 따라서 디스트로핀 유전자의 변이가 in-frame 인지 out-frame 인지가 중요하고, 또한 디스트로핀의 발현량(amount), 이 단백질의 질(quality), 이 단백질의 근섬유의 전반적인 분포의 정도(evenness), 이차적인 utrophin 단백질의 발현증가 정도 및 유전자 변이의 exon부위 등도 중요한 요인으로 작용할 것이다. 그러므로 dystrophinopathy 진단을 위해 디스트로핀 단백질에 대한 면역조직화학적염색 검사법과 웨스턴 블롯이 진단에 있어서 중요하지만 임상 표현형과 항상 일치하는 것은 아니다. 또한 multiplex PCR에 의한 디스트로핀 유전자 결손율은 약 65% 정도이고 나머지 30-40%는 이 방법으로 확진 할 수 없기 때문에 multiplex PCR을 대체할 수 있는 조금 더 정확하고, 용이한 유전자 검사법이 향후 개발되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Hoffman EP, Monaco AP, Feener CC, Kunkel LM.
Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans. *Science* 1987;238:347-50.
2. Arahata K, Ishiura S, Ishiguro T, Tsukahara T, Suhara Y, Eguchi C, et al. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 1988;333:861-3.
3. Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* 1996;6:25-35.
4. Smith SA, Swaiman KF. Muscular dystrophies. In: Swaiman KF, Ashwal S, editors. *Pediatric neurology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby Inc; 1999. p. 1235-56.
5. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989;45:498-506.
6. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, et al. Topography of the

Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989;45:835-47.

7. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-5.
8. Bakker E, Jennekens FG, de Visser M, Wintzen AR. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies. In: Emery AE, editor. *Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders*. 2nd ed. London: Royal Society of Medicine Press; 1997. p.1-4.
9. Chamberlain JS, Pearlman JA, Muzny DM, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ , editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press; 1990. p.272-81.
10. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-8.

11. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990;85:613-9.
12. Oh SH, Kang SW, Lee JG, Na SJ, Kim TS, Choi YC. Clinical and pathological characteristics of four Korean patients with Limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *J Korean Med Sci* 2004;19:447-52.
13. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993;16:536-8.
14. Engel AG, Yamamoto M, Fishbeck KH. Dystrophinopathies. In: Engel AG, Franzini-Amstrong C, editors. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Inc; 1994. p.1130-87.
15. Morandi L, Mora M, Confalonieri V, Barresi R, Di Blasi C, Brugnoli R, et al. Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* 1995;132:146-55.
16. Nicholson LV, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin

expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1990;80:239–50.

17. Yuge L, Liu Hut L, Bingdi X. Detection of gene deletions in Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using cDNA probes and the polymerase chain reaction method. *Life Sci* 1999;65:863–9.
18. Shomrat R, Gluck E, Legum C, Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Am J Med Genet* 1994;49:369–73.
19. Kitoh Y, Matsuo M, Nishio H, Takumi T, Nakajima T, Masumura T, et al. Amplification of ten deletion-rich exons of the dystrophin gene by polymerase chain reaction shows deletions in 36 of 90 Japanese families with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1992;42:453–7.
20. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected

individuals. *Cell* 1987;50:509-17.

21. Hodgson SV, Bobrow M. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 1989;45:719-44.
22. Imoto N, Arinami T, Hamano K, Matsumura K, Yamada H, Hamaguchi H, et al. Topographic pattern of the rearrangement of the dystrophin gene in Japanese Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1993;92:533-6.
23. Baranzini SE, Giliberto F, Herrera M, Bernath V, Barreiro C, Garcia Erro M, et al. Deletion patterns in Argentine patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurol Res* 1998;20:409-14.
24. Na SJ, Kang SW, Kim WJ, Kim TS, Choi YC. Clinical, Immunohistochemical, and Genetic Analysis in Dystrophinopathy. *J Korean Neurol Assoc* 2004;22:508-15.
25. Bies RD, Caskey CT, Fenwick R. An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest* 1992;90:666-72.
26. Hoffman EP, Garcia CA, Chamberlain JS, Angelini C, Lupski

- JR, Fenwick R. Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1991;30:605-10.
27. Gangopadhyay SB, Sherratt TG, Heckmatt JZ, Dubowitz V, Miller G, Shokeir M, et al. Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992;51:562-70.
28. Helliwell TR, Ellis JM, Mountford RC, Appleton RE, Morris GE. A truncated dystrophin lacking the C-terminal domains is localized at the muscle membrane. *Am J Hum Genet* 1992;50:508-14.
29. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991;49:54-67.
30. Arikawa E, Hoffman EP, Kaido M, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. The frequency of patients with dystrophin abnormalities in a limb-girdle patient population. *Neurology* 1991;41:1491-6.

31. Prosser EJ, Murphy EG, Thompson MW. Intelligence and the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 1969;44:221-30.
32. Hodgson SV, Abbs S, Clark S, Manzur A, Heckmatt JZ, Dubowitz V, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy, with special reference to mental ability. *Neuromuscul Disord* 1992;2:269-76.
33. Mehler MF. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Rev* 2000;32:277-307.

Abstract

Clinical, Immunohistochemical and Western blot Analysis
in Dystrophinopathy

Sang-Jun Na

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young-Chul Choi)

Objectives: Dystrophin deficient muscular dystrophies (dystrophinopathies) are the most common form of muscular dystrophy with variable clinical phenotypes from the severe Duchenne to the milder Becker forms (DMD/BMD). Western blot and immunohistochemistry (IHC) for dystrophin, exon deletion analysis by multiplex polymerase chain reaction (PCR) are important diagnostic tools. We investigated the relationship between the clinical characteristics, IHC for dystrophin, and western blot in patients with dystrophinopathy. **Methods:** We reviewed the clinical and laboratory findings of 24 male patients diagnosed as DMD and BMD. Genomic DNA of the 24 patient was analyzed by multiplex PCR using 19 primer sets of dystrophin gene. IHC for dystrophin of

tissue of muscle biopsy and western blot were performed in all cases. **Results:** The mean age of symptom onset in 24 patients was 4.6 years [range, 2–9 years]. In IHC for dystrophin, 15 out of 24 (62.5%) patients showed complete loss (C-, Rod-, N terminal) in mostly clinically DMD, and 8 of 24 (33.3%) patients showed incomplete loss in mostly clinically BMD. One of 24 (4%) patients showed normal finding in immunohistochemical staining for dystrophin and clinically BMD pattern. In western blot for dystrophin (C-, Rod-, N terminal), 15 out of 24 (62.5%) patients showed negative bands in all 3 domains in mostly clinically DMD, and 9 of 24 (37.5%) patients showed faint band in mostly clinically BMD. **Conclusions:** Western blot and IHC for dystrophin are important diagnostic tools. However, the result of study was not always correlated with clinical symptom and sign. Western blot is useful to differentiate BMD patient with normal finding in IHC for dystrophin from other muscular dystrophy.

Key Words: Dystrophinopathy, Immunohistochemistry, Western blot