

정상인과 아토피피부염 환자 혈청의 프로테옴 지도 비교

이주희 · 이효연 · 이광훈

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학 연구소

The Comparison of Proteome Maps between Sera of Patients with Atopic Dermatitis and Normal Controls

Ju Hee Lee, Hyo Youn Lee, and Kwang Hoon Lee

Department of Dermatology, Cutaneous Biology Research Institute,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Atopic dermatitis is the most common chronic inflammatory skin disease that occurs in children and sustains to adults with increasing incidence. However, we have diagnostic and therapeutic difficulties because of the wide range in symptomatology and the fluctuating course as well as unknown pathophysiology. Proteomics, based on the protein measurement by two-dimensional gel electrophoresis followed by the protein identification and characterization by mass spectrometry, is a new emerging field for understanding cell physiology and pathophysiology of diseases. We acquired the proteome maps of the sera from atopic dermatitis patients and normal controls by isoelectric focusing in 3-10 non-linear immobilized pH gradients strips and two-dimensional electrophoresis, and compared them. We also compared the patients' sera according to the symptom severity and the disease activities. Quantitative differences in protein expressions between gel groups could be found and many increased or decreased spots due to protein changes were found to be statistically significant. We detected that 7 spots were changed in the sera of patients with atopic dermatitis in comparing with the sera of normal controls. Compared to the patients with mild symptom of atopic dermatitis, the patients with severe symptom showed 5 protein spots decreased. And 4 protein spots were increased in the sera of inactive disease status in comparing with the sera of active status. The changes in many protein spots were statistically significant in the comparison of the sera of patients with atopic dermatitis and normal controls. Proteomics in atopic dermatitis would be helpful in diagnosing the disease and evaluating the disease activity.

Key words : Atopic dermatitis, Proteomics, Two-dimensional electrophoresis

서 론

아토피피부염 (atopic dermatitis)은 심한 소양증과 특징적

인 피부 소견을 보이는 만성, 재발성, 염증성 질환으로 유소아기에 약 9-12%에서 발생한다¹. 최근들어 사회의 공업화, 산업화에 따른 환경 오염, 생활 습관의 변화, 유전적 영향 등

에 의해 점차 증가되는 추세에 있다².

아토피피부염은 외부 항원 및 혈청 IgE 증가와 상관된 외인성 (extrinsic) 아토피피부염과 이들 인자와 관련이 없는 내인성 (intrinsic) 아토피피부염으로 나뉘는데, 각각의 병인은 서로 다를 것으로 추측되나, 모두 유전적 소인, 면역학적 이상, 환경적 요인 등의 다양한 인자가 복합되어 작용한다³. 아토피피부염의 발병기전으로 유전적 소인, Th1/Th2 세포간의 불균형, 랑게르란스 세포의 활성 증가, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 사이토카인 체계 이상, prostaglandin 대사 장애, 각질 세포의 내인적 이상, 호산구의 세포고사(apoptosis) 저연, 표피 지방 대사의 장애, 침면지진드기 항원, staphylococcal superantigen 등이 관련되어 있음이 밝혀져 있으나, 정확한 발병 기전은 아직 알려지지 않았다⁴⁻⁸.

알레르겐이 아토피피부염의 발병에 중요한 역할을 한다는 측면에서 혈청 IgE치 측정, 호산구수 측정, 알레르겐 특이 IgE 측정 등의 검사가 외인성 아토피피부염의 진단에 도움을 줄 수 있으나 내인성 아토피피부염에서는 이들 검사가 유용하지 않다⁹⁻¹¹.

따라서, 임상 양상을 종합한 진단 기준에 의해 아토피피부염을 진단하게 되는데, 환자 개개인에서 호발 부위나 증상의 정도와 종류가 매우 다양하고, 질병의 이환 기간에도 증상이 계속 재발과 호전을 반복하며, 다양한 유발 인자가 존재하므로 확실한 진단이 쉽지 않다.

또한, 아토피피부염의 질병의 활성도 및 치료 효과의 판정을 위한 지표로서 혈청 IgE¹², 가용성 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)¹³, E-selectin^{13,14}, eosinophil cationic protein¹⁵, 가용성 IL-2 수용체¹⁶, 혈중 호산구치¹⁷, thrombospondin¹⁸, eosinophil derived neurotoxin¹⁹ 등이 연관되어 있다는 보고들이 있었으나, 질병의 중등도나 활성도와 어느 정도 연관성이 있는지에 대해서는 아직 논란이 많다.

또한, 아토피피부염의 치료로서 유발 요인 제거, 보습, 적절한 스테로이드 치료, interferon- γ , 면역 클로불린, phosphodiesterase 억제제, 광선 치료, 및 cyclosporin A, tacrolimus (FK506), ascomycin과 같은 면역 조절제가 사용되고 있으나, 정확한 병인이 밝혀져 있지 않으므로 근치적인 치료는 아직 불가능하다²⁰⁻²¹.

최근 인간 게놈 서열 해독(human genome sequencing projects)이 완성되어 감에 따라 이제는 인간 유전체의 기능을 분석하는 기능적 유전체 시대(functional genomic era)를 맞이하고 있다. 이에 따라 유전자의 기능을 밝히는 데에 가장 적합한 프로테오믹스(proteomics)가 급부상하고 있다.

Wilkins²² 등은 1995년 프로테오믹스를 ‘생물학적 변화를 규명하기 위해 단백을 이용하여 유전자의 발현을 양적으로

측정하는 학문’이라고 정의하였다. 1995년 최초의 살아있는 생물체에 대한 전체 계놈이 밝혀진 이후 유전자 정보가 다양한 질환의 진단이나 병인 규명에 도움을 줄 것이라 생각했으나 유전자의 기능을 알아내는 데에는 부족하여 mRNA을 분석하는 트랜스크립토믹스(transcriptomics)와 단백을 분석하는 프로테오믹스가 함께 요구되었다²³. 또한, mRNA가 단백을 통해 기능을 하기 이전에 수많은 전사 후 변형이 일어나므로 트랜스크립토믹스만으로는 개체의 생물학적 기능이나 단백의 위치, 활성 정도를 알 수 없어 프로테옴(proteome)-각각의 계놈에 의해 코드화되는 단백-을 분석하는 여러가지 방법들이 개발되게 되었다²⁴.

프로테오믹스는 이차원 전기영동(two-dimensional electrophoresis (2-DE))를 이용하여 단백을 분석하고 이를 여러가지 분석 도구들을 이용하여 단백을 감정하는 일련의 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로테옴 지도는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석할 수 있다²⁵⁻²⁶. 이차원 전기영동은 25년 전 O'Farrell²⁶에 의해 처음 기술된 방법으로 단백 혼합물을 등전점(isoelectric point)과 분자량에 의해 분리하여 단백을 양적과 질적으로 동시에 분석하는 기술이다. 최근에는 고해상도 이차원 polyacrylamide gel 전기영동(high resolution 2D-PAGE)이 단백의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 전기영동의 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석을 하고 이러한 전기영동의 결과에서 자동적으로 단백을 규명하는 새로운 방법들이 소개되고 있다²⁷. 이러한 프로테오믹스는 특정한 질환에 의해 단백이 세포 내에서 변형되는 과정을 알 수 있어 치료 약물의 새로운 표적을 규명하고, 조기 진단의 생화학적 표지자(biomarker)를 발견하며, 치료의 효과 및 독성을 파악하고, 환자 개개인에 특이한 치료를 가능하게 한다.

다양한 병인과 증상을 보이는 아토피피부염에서 아토피피부염의 중등도나 활성도를 나타내는 지표를 결정하는 것은 진단뿐만이 아니라, 적절한 치료 방법의 선정과 치료 효과의 평가 및 치료 종결 시점의 판정에 중요하리라 생각된다. 따라서, 환자의 상태에 따라 채집이 가능한 환자의 혈청을 대상으로 프로테오믹스 기법을 이용하여 질병의 이환과 진행의 각 과정에서 표현되는 단백에 대한 분석을 시행하는 것은 아토피피부염의 정확한 병인의 이해 및 진단, 치료를 위해 도움이 될 것으로 생각한다.

본 연구에서는 정상인과 아토피피부염 환자의 혈청에서 이차원 전기영동을 이용한 프로테옴 지도를 얻어 정상인 및 질병 활성도에 따른 단백 스폿의 차이를 분석함으로써 아토

피피부염에 특이한 단백을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 알레르기 특수 진료소 및 피부과에 내원하여 임상적으로 Hanifin 및 Rajka²⁸의 기준에 의해 아토피피부염으로 진단된 17명의 환자들을 대상으로 하였으며, Rajka 및 Langeland²⁹의 기준으로 내원 당시의 증상과 임상적 경과에 따라 활성도를 경도(mild), 중등도(moderate), 중도(severe)로 분류하였다. 이들 17명 중 7명에서는 임상적으로 증상이 중등도 또는 중도의 활성화된 상태(active group)에서의 혈청과 치료 후 이러한 증상이 거의 소실된 이후의 비활성화 상태(inactive group)의 혈청을 비교하였다. 아토피피부염 및 다른 알레르기성 질환의 과거력이나 가족력을 동반하지 않고 임상적으로 아토피피부염의 증거가 없는 정상인 10명을 정상 대조군으로 하였다.

아토피피부염 환자로부터 일반 말초혈액검사, 혈청 총 IgE치, 호산구수, *Dermatophagoides pteronyssinus* (d1)와 *Dermatophagoides farinae* (d2)에 대한 radioallergosorbent assay (RAST) 등을 시행하였으며, 과거력 및 치료 병력을 의무 기록을 통해 조사하였다. 아토피피부염 및 정상 대조군 환자에서 10 ml의 혈액을 채취하여 15 ml의 시험관에 옮긴 후, 상온에서 6시간 이상 방치하여 응고시키고 250 × g으로 10분간 원침하여 혈청을 분리한 후, 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 동결 보관하였다.

2. 시료 용해 및 재수화(rehydration)

수집한 혈청 중 2.5 μl를 pH 8.0의 1M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiothreitol이 함유된 용해완충액 50 μl와 섞은 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체시료를 7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine, 4% 3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 1.0% carrier ampholyte, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye 등이 함유된 젤 전기영동 시료 완충액 400 μl로 희석한 후, 20°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 수집하였다. 재수화 tray에 젤 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 400 μl을 넣고, 18 cm의 pH3-10 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham Phamarcia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24시간 방치하여 재수화 시켰다.

3. 이차원 전기영동

재수화시킨 IPG strip은 IPG-phor (Amersham Phamarcia Biotech)를 이용하여 저전압으로부터 고전압에서 적절한 시간 처리하여 등전화(isoelectric focusing:IEF)시켰다. IEF 후에 IPG strip은 3.6 g의 urea, 2% SDS, 5M Tris 2 ml, 50% glycerol 4 ml, 25% acrylamide 1 ml, 200 mM MTBP 250 μl가 함유된 동질 완충액에서 25분간 동질화(equilibration) 시켰다.

Polyacrylamide gel 제작을 위하여 1.875M Tris buffer가 함유된 9% 완충액 40 ml와 40% stock acrylamide 45 ml, 증류수 115 ml를 혼합하고, 16% buffer 40 ml, 40% stock acrylamide 80 ml, 50% glycerol 80 ml를 혼합하였다. 이렇게 제작된 9 - 16% gradient polyacrylamide gel (21 cm × 21 cm × 1.5 mm)에 0.5% agarose, 0.001% bromophenol blue dye가 함유된 agarose 완충액을 넣고 IPG strip을 embedding시킨 후에 24.8 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS가 포함된 cathode running buffer를 넣었다. SDS-PAGE는 3 mA/gel의 전류로 2시간 prerun한 후, 15 mA/gel의 일정한 전류하에서 전기영동을 시행하였다.

4. Silver stains

전기영동을 시행한 polyacrylamide gel을 modified silver stain 방법을 이용하여 염색하였다. 먼저, acetic acid 50 ml, methanol 200 ml, 증류수 250 ml로 15분씩 두 번 고정시킨 후, methanol 150 ml, 5% sodium thiosulfate 20 ml, sodium acetate 34 g, 증류수 330 ml로 30분간 감작시켰다. 10분간 3번 세척한 후, 2.5% silver nitrate 50 ml와 증류수 450 ml를 가한 다음, 다시 1분씩 두 번 세척하였다. 세척한 gel을 sodium carbonate 12.5 g, formaldehyde 200 μl, 증류수 500 ml로 발색시키고, EDTA 7.3g, 증류수 500 ml로 발색을 중단시킨 후, 증류수 500 ml로 5분씩 세 번 세척하였다.

5. 프로테옴 지도의 비교 분석

염색이 끝난 후 정상 대조군과 아토피피부염 환자 혈청의 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD, Munich, Germany)를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. PDQuest (BIO-RAD)를 사용하여 단백 스폷을 양적으로 측정하여 각 군의 프로테옴 지도를 얻었다.

정상 대조군과 아토피피부염 환자군, 그리고 아토피피부염 환자 증상의 중증도와 활성도에 따라 비교한 후, Student's t-test를 이용하여 통계학적으로 의미 있게 증가하거나,

Table 1. Clinical Symptom and Laboratory Findings in the Patients with Atopic Dermatitis

Patient	Sex/Age	Duration (year)	Severity	Total IgE (U/ml)	Eosinophil count ($10^3 \mu\text{l}$)	RAST d1/d2
1	M/14	10	moderate	116	2	4/4
2	M/15	10	severe	941	7.6	4/4
3	M/24	15	moderate	588	ND	0/2
4	F/23	13	severe	2800	3.5	4/4
5	M/8	4	severe	904	5	1/2
6	M/9	1	moderate	446	5.7	4/4
7	M/19	14	severe	3000	7.4	4/4
8	F/6	5	severe	266	10	3/4
9	M/9	9	severe	3000	14.4	4/4
10	M/20	15	severe	584	3.1	0/0
11	F/5	3	moderate	552	17.8	ND
12	F/16	8	moderate	1469	4.3	4/4
13	F/7	5	moderate	1110	9.4	4/4
14	F/19	10	moderate	466	2.2	4/4
15	F/8	5	mild	176	3	3/3
16	F/6	3	mild	183	1.9	ND
17	M/19	2	mild	240	7.9	3/3

ND: Not Done

감소한 단백 성분의 등전점 (pI)과 분자량 (molecular weight, M.W.)을 비교, 분석하였다. $p_{\text{값}}$ 이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 아토피피부염 환자의 임상양상 및 혈액학적 검사 소견

아토피피부염 환자군은 남자 9명, 여자 8명으로 총 17명의 평균연령은 12세였고, 평균 유병기간은 7년이었다. 활성도에 따른 분류로는 경도 3명, 중등도 7명으로 중도 7명이었으며, 환자들의 평균 total IgE 수치는 805 U/ml였다. 평균 호산구수는 $7.4 \times 10^3 \mu\text{l}$ 로 검사를 시행한 16명 모두에서 증가되어 있었으며, 10명의 환자에서 d1, d2에 대한 RAST에

서 3+이상의 강양성 반응을 보였다(Table 1). 증상이 활성화된 상태와 불활성 상태에서의 혈청을 비교한 환자의 평균 유병기간은 16년이었으며 치료 전 평균 total IgE 수치는 1256 U/ml, 치료 후에는 1202 U/ml로 큰 차이는 없었다. 이들 군에서 평균 호산구수는 $5.2 \times 10^3 \mu\text{l}$ 였고, 5명에서는 집먼지진드기에 대한 탈감작 치료를, 2명에서는 cyclosporine으로 치료하였으며, 평균 치료 기간은 13개월이었다 (Table 2).

2. 아토피피부염 환자와 정상 대조군의 혈청에서 시행한 이차원 전기영동 결과 비교

아토피피부염 환자의 혈청을 이용하여 이차원 전기영동을 시행한 후 PDQuest의 Student's t-test로 분석한 결과, 총

7개의 스폿이 정상 대조군에 비해 의미 있게 증가 또는 감소되었으며 (Fig. 1, 2), 특히 138.2 kDa의 분자량과 5.58의 등전점을 갖는 스폿과 79.3 kDa의 분자량과 5.43의 등전점을

갖는 스폿은 17명의 환자 중 16명 (94.1%)에서 감소하는 소견을 보였다 (Fig. 3). 이외에도 분자량 61.6 kDa과 5.53의 등전점을 갖는 스폿이 15명에서 감소하였고, 분자량 45.8

Table 2. Laboratory Findings of Patients with Atopic Dermatitis According to the Disease Severity

Pt.	Severity	Tx	Duration of Tx (months)	Total IgE (U/ml)		RAST d1/d2	
				Pre-Tx	Post-Tx	Pre-Tx	Post-Tx
1	M	D	10	116	114	4/4	3/3
2	S	D	17	941	1486	4/4	4/4
3	M	C	3	588	661	0/2	ND
4	S	D	4	2800	2570	4/4	4/4
5	S	D	17	904	898	1/2	3/4
6	M	D	17	446	149	4/4	3/4
7	S	C	22	3000	2600	4/4	ND

Tx: Treatment, M: Moderate, S: Severe, D: Desensitization to house dust mite,

C: Cyclosporine, ND: Not Done

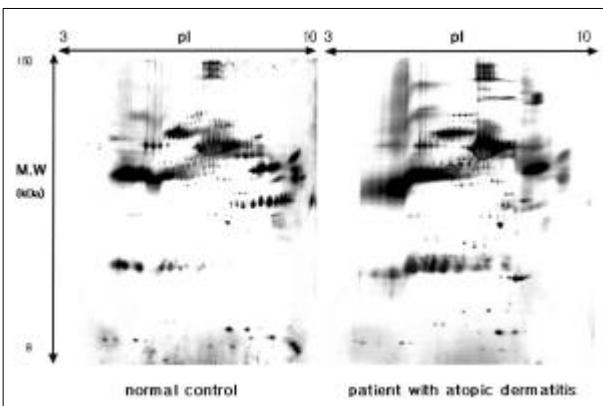


Fig. 1. The result of two-dimensional electrophoresis of sera of AD patients and normal controls.

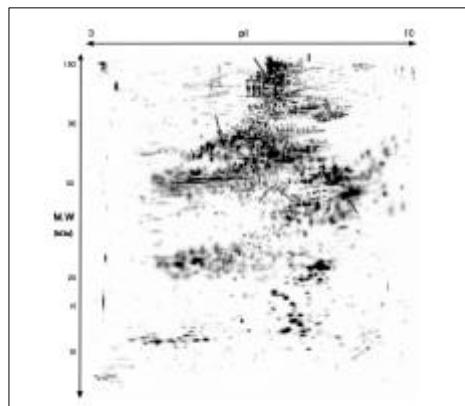


Fig. 2. Large gel two-dimensional electrophoresis of serum of AD patients. Total of 7 spots were changed in the sera of patients with AD compared to that of normal controls ($p=0.05$). Spots increased in AD patients are marked with red arrows and spots decreased in AD patients are marked with blue arrows.

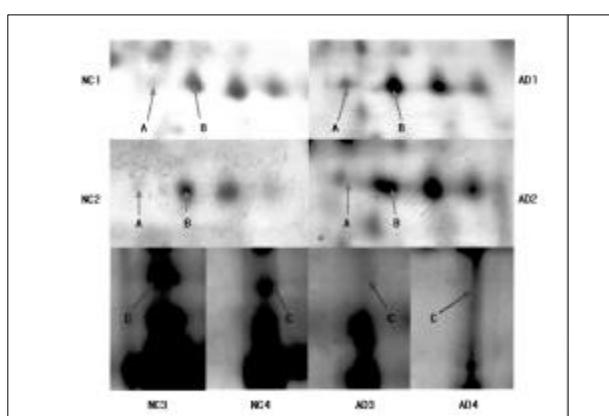


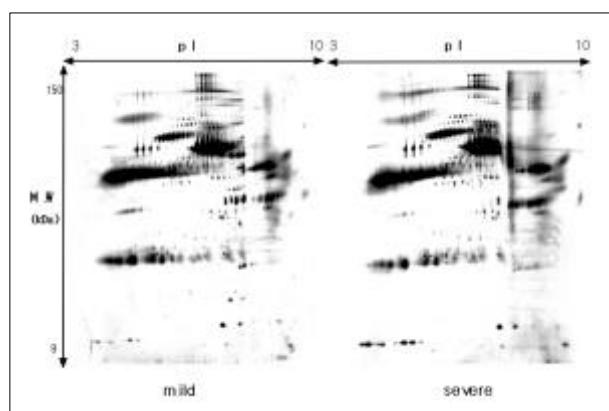
Fig. 3. Comparison of the different spots in two-dimensional electrophoresis of AD patients and normal controls. Protein spot with 5.64 isoelectric point and 48.3 kDa molecular weight (A) and spot with 5.78 isoelectric point and 48.5 kDa molecular weight (B) are increased in sera from patients with atopic dermatitis. Spot with 5.58 isoelectric point and 138.2 kDa molecular weight (C) is decrease in patients with atopic dermatitis compare to normal controls. (NC: normal control, AD: atopic dermatitis, $p=0.05$)

Table 3. Comparison of Two-dimensional Electrophoresis of Sera of AD Patients and Normal Controls

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)	No. of the Patients (%)	Spot Changes
1	138.2	5.58	16 (94.1)	decreased
2	79.3	5.43	16 (94.1)	decreased
3	61.6	5.53	15 (88.2)	decreased
4	45.8	6.81	12 (70.6)	decreased
5	62.2	5.47	11 (64.7)	increased
6	48.3	5.64	14 (82.4)	increased
7	48.5	5.78	13 (76.5)	increased

Table 4. Comparison of Two-dimensional Electrophoresis of Sera of AD Patients According to the Symptom Severity

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)	No. of the Patients (%)	Spot Changes
13	121.1	5.88	4 (57.1)	increased
14	82.5	6.06	5 (71.4)	increased
15	82.3	5.98	5 (71.4)	increased
16	75.8	5.34	4 (57.1)	increased

**Fig. 4.** The result of two-dimensional electrophoresis of sera of AD patients according to the symptom severity

kDa과 6.81의 등전점을 갖는 스폿이 12명에서 감소하였다.

가장 현저하게 증가한 스폿은 분자량 48.3 kDa과 5.64의 등전점을 갖는 스폿으로 14명 (82.4%)에서 증가를 보였으며, 분자량 48.5 kDa과 5.78의 등전점을 갖는 스폿도 13명 (76.5%)에서 증가하였다. 그리고, 62.2 kDa의 분자량과 5.47의 등전점을 가지는 스폿도 11명에서 증가하였다 (Table 3).

3. 아토피피부염 환자 증상의 중증도에 따른 이차원 전기영동 결과 비교

아토피피부염의 증상이 심한 환자 7명과 증상이 경미한 환자 3명의 혈청을 이용한 이차원 전기영동을 시행한 결과, 모두 5개의 스폿에서 변화를 보였으며 (Fig. 4, 5), 분자량 143 kDa, 등전점 5.76인 스폿, 분자량이 67.5 kDa이면서 6.08의 등전점을 가지는 스폿, 그리고 분자량 66.2 kDa과 등전점 5.68인 스폿은 심한 증상을 가진 7명 중 6명에서 모두 감소하였다 (Fig. 6). 그 외에 분자량 78.1 kDa과 5.24의 등전점을 가지는 스폿과 76.7 kDa의 분자량과 5.26의 등전점을 가지는 스폿도 증상이 경한 군에 비해 심한 군에서 감소하는 소견을 보였다 (Table 4).

4. 아토피피부염 환자 증상의 활성도에 따른 이차원 전기영동 결과 비교

아토피피부염 환자의 활성도에 따른 이차원 전기영동한 데이터를 비교한 결과, 증상이 심하게 나타날 때의 활성화된 상태보다 치료 후 증상이 소실된 상태에서 4개의 스폿이 의

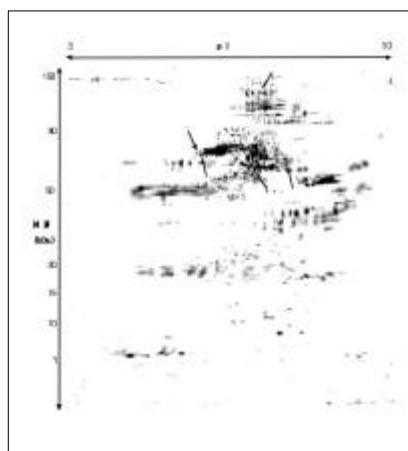


Fig. 5. Comparison of large gel two-dimensional electrophoresis of serum of AD patients according to symptom severity. Total 5 spot changes were observed. All 5 spots were decreased in the sera of AD patients with severe symptoms compared to that of patients with mild symptoms ($p=0.05$).

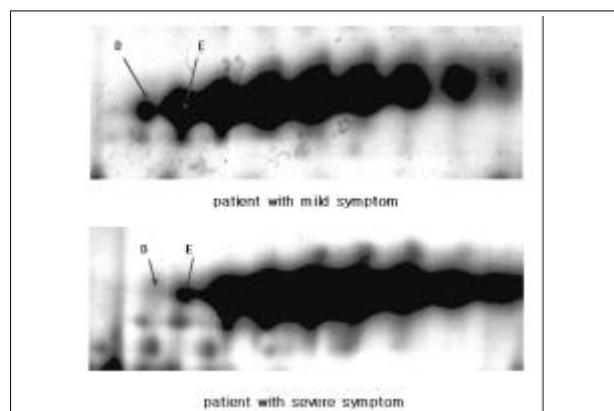


Fig. 6. Comparison of the different spots in two-dimensional electrophoresis according to the symptom severity. Protein spot with 5.24 isoelectric point and 78.1 kDa molecular weight (D) and spot with 5.26 isoelectric point and 76.7 kDa molecular weight (E) in patients with mild symptom are decreased in sera from patients with severe symptom ($p=0.05$).

Table 5. Comparison of Two-dimensional Electrophoresis of Sera of AD Patients According to the Disease Activity

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)	No. of the Patients (%)	Spot Changes
13	121.1	5.88	4 (57.1)	increased
14	82.5	6.06	5 (71.4)	increased
15	82.3	5.98	5 (71.4)	increased
16	75.8	5.34	4 (57.1)	increased

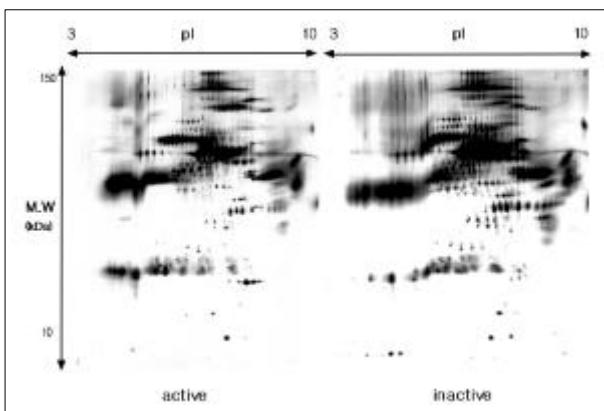


Fig. 7. The result of two-dimensional electrophoresis of sera of AD patients according to the disease activity.

미 있게 증가되었다 (Fig. 7, 8). 모두 7명의 환자에서 치료 전, 후를 비교하였는데 분자량 82.5 kDa, 등전점 6.06인 스폿과 분자량 82.3 kDa, 등전점 5.98인 스폿은 그 중 5명에서 증가하였다 (Fig. 9). 또한 121.1 kDa의 분자량과 5.88의 등

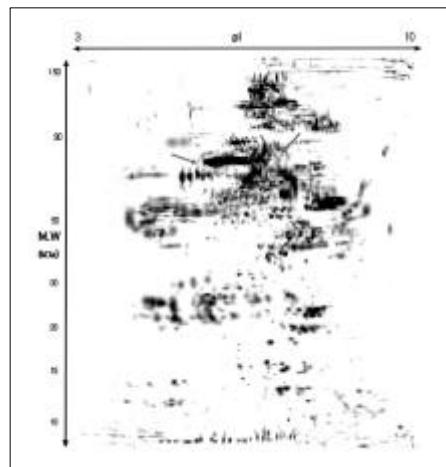


Fig. 8. Comparison of large gel two-dimensional electrophoresis of sera of AD patients according to the disease activity. Four increased spots were observed in the sera of inactive AD patients compared with that of active AD patients ($p=0.05$).

전점을 가지는 스폿 및 분자량 75.8 kDa과 등전점 5.34를 가

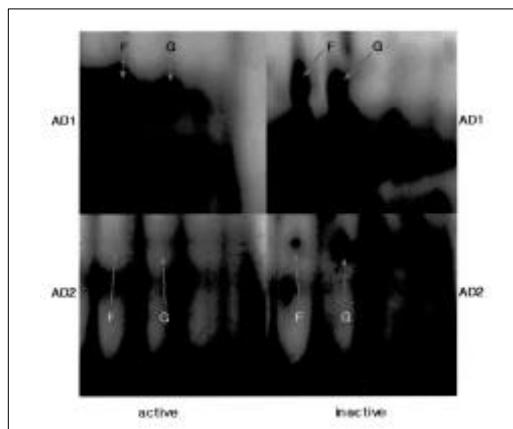


Fig. 9. Comparison of the different spots in two-dimensional electrophoresis according to the symptom activity. Protein spot with 5.98 isoelectric point and 82.3 kDa molecular weight (F) and spot with 6.06 isoelectric point and 82.5 kDa molecular weight (G) in patients with active state are increased in sera from patients with inactive state ($p=0.05$).

지는 스폿도 4명에서 증가하였다 (Table 5).

고 찰

아토피피부염은 주로 유소아기에 발생하여 성인기까지 지속되는 만성 질환으로 매우 흔하게 발생되나, 아직 뚜렷한 병인이 알려져 있지 않다. 또한, 아토피피부염 환자에서 가족력이 흔하고, 몇몇 유전학적 연구에서 유전학적인 병인이 관계한다는 것은 잘 알려진 사실이나, 유전 양식이나, 원인 유전자는 밝혀지지 않았고, 이 외에도 알레르기나 면역학적 측면에서 T 림프구 중 Th1과 Th2 세포의 불균형, 비만세포의 작용, IgE-매개 자연과민 반응, 여러 항원에 대한 감작 등 많은 가설이 보고되었다^{3,8}.

유전자와 단백의 이해에 대한 새로운 방법으로 프로테오믹스가 최근 대두되고 있으며, 이를 이용하여 여러 질환의 병인 규명과 진단, 치료에 유용한 생화학적 표지자를 알 수 있게 되었다³⁰. 아토피피부염의 연구에서 아직 프로테오믹스가 적용된 바가 없으며, 따라서 본 연구에서는 고해상도 이차원 전기영동을 통해 얻은 프로테옴 지도를 이용하여 아토피피부염의 진단, 활성도 측정 및 치료에 유용한 스폿을 찾아내고자 하였다.

최근 프로테오믹스 발달로 인간의 혈장, 뇌척수액, 양수, 소변 등의 체액과 심장, 신장, 간장, 태반 등의 조직과 적혈구, 혈소판, 대장의 표피세포, 각질형성세포, 섬유아세포 등의 여러 세포에 대한 표준 지도들이 공개되었다³¹. 이러한 표준 지도를 기준으로 대장암, 골수암, 림프종, 유방암, 방광암 등 여러 질환의 조직 프로테옴 지도가 작성되었다. 본 연

구의 이차원 전기영동에는 시료로 환자와 정상 대조군의 혈청을 이용하였는데, 1998년 혈청 성분에 대한 프로테옴 지도가 공개되었으나³² 이는 쥐의 혈청에서 시행한 것으로 인간의 지도와는 상당한 차이가 있을 것으로 생각되며, 알레르기 질환 및 아토피피부염의 과거력과 가족력이 없는 대조군과 비교하기 위해 기존의 공개된 혈청 프로테옴 지도 자료를 이용하지 않았다. 앞으로 정상인의 혈청에서 얻은 신뢰할 수 있는 프로테옴 지도의 작성이 아토피피부염 뿐만 아니라, 다른 다양한 질환과의 비교에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서의 혈청의 전기영동 결과, 혈장의 전기영동에서 다수 관찰되는 알부민과 면역글로불린이 역시 관찰되었으며, 정상 대조군의 전기영동 결과와 비교하여 볼 때 7개의 스폿이 유의하게 변화되었다. 이 중 94.1%에서 감소된 등전점 5.43, 분자량 79.3 kDa의 스폿은 같은 등전점과 74 kDa 이상의 분자량을 가지는 hemopexin (β -1 B-glycoprotein)와 유사한 스폿으로 생각되어지며, 확인을 위해 mass spectrometry 등으로 단백의 분리 후 정확한 검증이 필요하리라 사료된다. 또한, 아토피피부염 환자의 88.2%에서 감소를 보였던 등전점 5.53과 분자량 61.6 kDa의 스폿은 immunoglobulin heavy chain alpha에 해당하였으며, 이는 4개의 뚜렷한 유전자에서 코드화되며 간경화, 만성 염증, IgA myeloma, 항체 결핍 증후군 (antibody-deficiency syndrome), ataxia telangiectasia에서 증가 또는 감소될 수 있으나³³, 아토피피부염에서는 보고된 바가 없다.

병인과 관련되는 단백의 변화정도는 질병의 증상의 정도와 치료유무에 따라 양적인 수치가 변할 수 있으므로 이를 알아보기 위해 증상과 치료 전후의 활성도에 따른 혈청의 변화를 비교하였는데, 아토피피부염의 증상에 따른 프로테옴 지도 비교에서 85.7%에서 감소를 보였던 등전점 5.68과 분자량 66.2 kDa을 가지는 스폿은 알부민의 일부로 생각되며, 혈청 알부민이 간경화, 신장염, 심한 화상, 염증 반응에서 감소되는 것으로 보아 본 연구의 결과는 만성 염증의 결과에 의한 것으로 추측할 수 있다. 또한, 아토피피부염 환자의 활성도에 따른 결과 비교에서 질환이 비활성화될 때 등전점 5.98과 분자량 82.3 kDa의 스폿이 71.4%에서 증가를 보였는데, 이 단백은 immunoglobulin heavy chain mu에 해당하는 스폿이었으며, 이 단백 역시 간염 등의 간질환, 감염 질환, Waldenstrom's macroglobulinemia, IgA myeloma에서 감소 또는 증가될 수 있다. Baskin³⁴ 등은 아토피피부염에서 immunoglobulin heavy chain mu에서 직접 또는 다른 과정을 거쳐 IgE로 isotype switching이 일어난다는 것을 polymerase chain reaction의 방법을 이용하여 규명한 바가 있으며, 본 연

구에서의 면역 글로불린이 변화한 것으로 보아 아토피피부염의 병인에 면역 글로불린의 isotype switching이 관여할 것으로 추정된다.

환자들의 과거력, 혈액검사, 치료병력과 이차원 전기영동의 결과와 연관시켜 볼 때 특정 혈액검사 소견이나 치료의 방법, 기간에 따른 차이는 보이지 않았으나, 천식이 동반된 환자 한 명에서 치료 전후의 스폿 변화가 현저하였는데, 다른 아토피질환의 과거력이 동반되는 경우에 대한 연구가 필요하겠다.

아토피피부염의 진단과 활성도 평가에 있어서의 이 스폿들의 유용성을 더 정확하게 알아보기 위해서는 더 많은 환자들에서 전기영동 결과와 임상 증상을 연관시키는 것이 필요하겠고, 아토피피부염 이외의 다른 염증성 질환들과의 비교도 필요할 것으로 생각된다. 이 외에 유의하게 변화를 보인 다른 스폿들은 아직 성분이나 이름이 알려지지 않은 스폿들로 앞으로 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 또는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 등의 방법을 이용한 단백의 정확한 동정과, 나아가서 SWISS-PROT (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland) 등을 이용한 단백의 기능, 구성, 변형, 서열 등 특성의 파악이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Kristal L, Klein PA. *Atopic dermatitis in infants and children*. Ped Dermatol 2000;47:877-95
- Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C. *Changes in the reported prevalence of childhood eczema since 1938-45 war*. Lancet 1984;2:1255-7
- Wollenberg SK, Oppel T, Beiber T. *Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms*. Clin Dermatol 2000;25:530-4
- Kevin DC. *Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy*. J Invest Dermatol 1994;102:128-37
- Coleman R, Trembath RC, Harper JI. *Genetic studies of atopy and atopic dermatitis*. Br J Dermatol 1997;136:1-5
- Schaefer L, Kragballe K. *Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis*. J Invest Dermatol 1991;96:10-5
- Abeck D, Mempel M. *Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications*. Br J Dermatol 1998;139:13-6
- Leung DYM, Sorter NA. *Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol 2001; 44:s1-12
- Hoffman DR, Yamamoto FY, Geller B. *Specific IgE antibodies in atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol 1975;55: 256-67
- Dahl MV. *Flare factors and atopic dermatitis; the role of allergy*. J Dermatol Sci 1990;1:311-8
- Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson S, Ownby DR. *Quantitative IgE antibody assays in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol 2000;105:1077-84
- Hill DJ, Sporik R, Thorburn J, Hosking CS. *The association of atopic dermatitis in infancy with IgE food sensitization*. J Pediatr 2000;137:475-9
- Wakita H, Sakamoto T, Tokura Y, Takigawa M. *E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as critical adhesion molecules for infiltration of T lymphocytes and eosinophils in atopic dermatitis*. J Cutan Pathol 1994;21:33-9
- Wolkerstorfer A, Laan MP, Savelkoul HF, et al. *Soluble E-selectin, other markers of inflammation and disease severity in children with atopic dermatitis*. Br J Dermatol 1998;138: 431-5
- Paganelli R, Fanales-Belasio E, Carmini D. *Serum eosinophil cationic protein in patients with atopic dermatitis*. Arch Allergy Appl Immunol 1991;96:175-8
- Kagi MK, Joller-Jermelka H, Wuthrich B. *Correlation of eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis*. Dermatology 1992;185:88-92
- Kapp A. *The role of eosinophil in the pathogenesis of atopic dermatitis: eosinophil granule proteins as markers of disease activity*. Allergy 1993;48:1-5
- Huang SW, Kao KJ. *Use of thrombospondin level to predict the clinical course of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity or skin infection*. J Dermatol Sci 1996;11:59-63
- Taniuchi S, Chihara J, Kojima T, Yamamoto A, Sasai M, Kobayashi Y. *Serum eosinophil derived neurotoxin may reflect more strongly disease severity in childhood atopic dermatitis than eosinophil cationic protein*. J Dermatol Sci 2001;26:79-82
- Friedmann PS, Tan BB, Musaba E, Strickland I. *Pathogenesis and management of atopic dermatitis*. Clin Exp Allergy 1995; 25:799-806
- Hanifin JM, Toftte SJ. *Update on therapy of atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol 1999;104:s123-5
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev 1995;13:19-50
- Fleishmann RD, Adams MD, White O. *Whole genome random sequencing and assembly of Haemophilus-influenzae*. Science 1995;269:496-512
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD. *From proteins to pro-*

- teomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Bio Technology 1996; 14:61-5
25. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present, and future. Electrophoresis 1996; 17:443-53
26. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250:4007-21
27. Gevaert K, Vanderkerckhove J. Protein identification methods in proteomics. Electrophoresis 2000;21:1145-54
28. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Dermatol Venereol (Stockh) 1980;92:s44-7
29. Rajka G, Langeland T. Grading of the severity of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol (Stockh) 1989;144:13-4
30. Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium drug discovery and development. J Pharmacol Toxicol Methods 2000;44:291-300
31. Sanchez JC, Appel RD, Golaz O, et al. Inside SWISS-2D PAGE database. Electrophoresis 1995;16:1131-51
32. Haynes P, Miller I, Gemeiner M, et al. Proteins of rat serum I: Establishing a reference 2-DE map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Electrophoresis 1998;19:1484-92
33. Sorenson RU, Moore C. Antibody deficiency syndromes. Pediatr Clin North Am 2000;47:1225-52
34. Baskin B, Islam KB, Evengard B, Emtestam L, Smith CI. Direct and sequential switching from mu to epsilon in patients with Schistosoma mansoni infection and atopic dermatitis. Eur J Immunol 1997;27:130-5