

## 한국인에서 알파 1-항트립신의 유전형

경북대학교 의과대학 내과학교실<sup>1</sup>, 경북대학교병원 호흡기센터<sup>2</sup>

박재용<sup>1,2</sup>, 최진은<sup>2</sup>, 차승익<sup>1</sup>, 배낙천<sup>1</sup>

채포희<sup>1</sup>, 이재욱<sup>1</sup>, 강영모<sup>1</sup>, 김창호<sup>1,2</sup>, 정태훈<sup>1,2</sup>

= Abstract =

### Prevalence of $\alpha_1$ -Antitrypsin Genotypes in Koreans

Jae Yong Park, M.D.<sup>1,2</sup>, Jin Eun Choi, M.S.<sup>2</sup>, Seung Ick Cha, M.D.<sup>1</sup>,  
Nack Cheon Bae, M.D.<sup>1</sup>, Po Hee Chae, M.D.<sup>1</sup>, Jae Yook Lee, M.D.<sup>1</sup>,  
Young Mo Kang, M.D.<sup>1</sup>, Chang Ho Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Tae Hoon Jung, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University,

<sup>2</sup>Respiratory Center, Kyungpook National University Hospital, Taegu, Korea

**Background :** Alpha-1-antitrypsin (A1AT) deficiency is the only established genetic risk factor for emphysema. This study was undertaken to investigate the prevalence of the genotypes of A1AT genotypes in healthy Koreans.

**Method :** The study population consisted of 380 Healthy Koreans enrolled at the Health Promotion Center in Kyungpook National University Hospital. The polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) for detecting the A1AT variants M1(Ala), M1(Val), M2, S and Z were used.

**Results :** The genotypes of subjects were as follows : M1(Val)/M1(Val), 254(66.8%) ; M1(Val)/M2, 105(27.6%) ; M2/M2, 19 (5.0%) ; and M1(Val)/M1(Ala), 2 (0.5%). There was no case with 'deficiency' alleles such as S and Z found in this study.

**Conclusion :** These results suggest that A1AT deficient alleles are either extremely rare or not present in Koreans. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2001, 50 : 229-235)

**Key words :**  $\alpha_1$ -antitrypsin, genotypes, Korean.

**Address for correspondence :**

Jae Yong Park, M.D.

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyungpook

National University, Samduk 2Ga 50, Taegu, 700-712, Korea

Phone : 053-420-5536 Fax : 053-426-2046 E-mail : jaeyong@kyungpook.ac.kr

## 서 론

폐기종은 폐포벽의 파괴에 의한 폐 탄성도의 소실로 서서히 진행되는 비가역적 기류 폐쇄가 일어나는 질환이다<sup>1</sup>. 대부분의 폐기종이 흡연에 의해 초래되지만 흡연자의 10-20%에서만 폐기종이 발생하는데 이와 같이 흡연자의 단지 일부에서 폐기종이 발생하는 현상은 개체의 유전적 소인이 폐기종의 발생을 결정하는 주요 인자임을 시사한다<sup>2</sup>.

폐기종의 발생과 관련이 있는 유전적인 요소 가운데 가장 잘 밝혀진 인자는 anti-protease인  $\alpha_1$ -antitrypsin (A1AT)의 결핍으로 폐기종의 1-2%가 A1AT의 결핍으로 인해 발생된다<sup>1</sup>.

A1AT는 394개의 아미노산으로 구성된 분자량이 54 KD인 당단백질로 neutrophil elastase와 proteinase 3 등을 억제하는 주요 serine proteinase inhibitor ("serpin")이다<sup>3-5</sup>. A1AT 유전자는 14q31-32.3에 위치하는데 A1AT 유전자좌에는 100개 이상의 대립유전자(이하 allele)이 존재한다<sup>6</sup>. 이들 가운데 Z allele과 S allele은 A1AT 결핍을 초래하는 대표적인 이형으로 알려져 있다<sup>7-9</sup>.

A1AT 결핍 alleles은 백인들에서 흔히 발견되는데, 특히 북유럽인에서 그 빈도가 높으며 흑인과 동양인에서는 매우 드물다<sup>10</sup>. 그러나 아직 한국인의 A1AT 유전자형은 알려져 있지 않다. 저자들은 정상 한국인에서 A1AT 유전자형을 조사하고자 A1AT의 정상 alleles인 M1(Ala), M1(Val), M2와 A1AT 결핍을 초래하는 S 및 Z allele의 빈도를 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1998년 1월부터 2000년 5월까지 경북대학교병원 건강검진센터를 방문한 사람들 가운데 문진, 흉부단순촬영, 폐기능검사 등을 통하여 만성폐쇄성폐질환 및 기

관지천식이 없는 정상인 380명을 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

대상자의 림프구에서 proteinase K와 phenol/chloroform방법으로 DNA를 추출한 후 A1AT 유전자형은 Rieger 등<sup>11</sup>과 Lucotte 등<sup>12</sup>과 같이 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)과 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)를 시행하여 조사하였다.

A1AT exon III의 M1형과 exon II의 M2형을 조사하기 위한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다. PCR조성은 dNTP 4mM, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase 1unit(TaKaRa R001A, Japan), 각 primer 10pmol, template 2 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ l)로 총 20 $\mu$ l로 하였다. PCR은 Perkin-Elmer thermal cycler (GeneAmp PCR system 9600)로 94 $^{\circ}$ C 5분, 35회 반복의 94 $^{\circ}$ C 30초, 67 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 30초, 다시 72 $^{\circ}$ C 10분으로 수행하였다. M1의 360 bp PCR 산물 5 $\mu$ l에 제한효소 BstE II (New England Biolab) 5unit를 처리하여 총 20 $\mu$ l로 60 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰으며, M2의 경우에는 PCR 산물은 462bp이며, 제한효소 Rsa I 5unit를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 제한효소처리결과는 2.5% agarose gel에서 전기영동한 후 자외선 하에서 확인하였다. Exon III의 213번 codon이 valine(Val, GTG)인 경우에는 360bp PCR 산물을 BstE II로 처리할 경우 228bp, 83bp와 49bp로 절단되며, 213번 codon이 alanine (Ala, GCG)인 경우는 311bp와 49bp의 band가 관찰된다. Exon II의 101번 codon이 arginine (Arg)인 경우에는 462bp의 PCR 산물을 Rsa I으로 처리할 경우 383bp와 79bp로 절단되고, 101번 codon이 histidine (His)로 치환된 경우는 절단되지 않아서 462bp band가 관찰된다.

A1AT exon III의 S이형과 exon V의 Z이형을

Table 1. Primer sequences used in this study

	Primer sequences	Product size (bp)
M1	5'-CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG-3'	360
	5'-GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG-3'	
M2	5'-GCAGGACAATGCCGTCTTCTGTCTC-3'	462
	5'-CCACTAGCTTCAGGCCCTCGCTGAG-3'	
S	5'-TGAGGGGAAACTACAGCACCTCG-3'	121
	5'-AGGTGTGGGCAGCTTCTTGGTCA-3'	
Z	5'-ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3'	179
	5'-TTGGGTGGGATTCACTTTTC-3'	

Table 2. The subjects characteristics of subjects (n=380)

Sex (M/F)	265 : 115
Age (yrs)	60.5 $\pm$ 9.38
Smoking status	
Smoker	234 (61.6%)
Exsmoker	40 (10.5%)
Nonsmoker	106 (27.9%)

조사하기 위해서 사용된 primer는 Table 1과 같다. 이들 두 가지 primer를 동시에 증폭하기 위한 PCR은 dNTP 4mM, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCL, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase 1 unit (TaKaRa R001A, Japan), 각 primer 8pmol, template 2  $\mu$ l (100ng/ $\mu$ l)로 총 20  $\mu$ l로 94°C 5분, 35회 반복의 94°C 30초, 55°C 20초, 72°C 30초, 다시 72°C 10분으로 수행하였다. PCR 산물 5  $\mu$ l에 제한효소 Taq I (New England Biolab.) 10unit를 처리하여 총 20  $\mu$ l로 65°C에서 16시간 반응시켰다. 제한효소처리결과는 8% acrylamide gel에서 전기영동 후에 자외선 하에서 확인하였다. S이형은 128bp의 PCR 산물을 Taq I으로 처리한 경우 절단되지 않는데 비해 M형은 절단되어 100bp의 band가 나타나며, Z이형은 179bp의 PCR 산물을 제한효소로 처리할 경우 절단되지 않지만 M형은 절

Table 3. Genotypes of  $\alpha_1$ -antitrypsin genotypes

Genetic variant	Numbers (%)
M1(Val)/M1(Val)	254 (66.8)
M1(Val)/M2	105 (27.6)
M2/M2	19 (5.0)
M1(Val)/M1(Ala)	2 (0.5)

단되어 157bp의 band가 관찰된다.

통계적 분석은 Chi-square test를 사용하였고 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

대상자는 남자 265명, 여자 115명이었으며 이들의 평균연령은 61세 ( $\pm$  9.4)였다. 흡연력은 흡연자가 61.6%, 금연자가 10.5%, 그리고 비흡연자가 27.9%였다 (Table 2). 대상자 380명에서 확인된 유전자형은 4가지로 S allele과 Z allele은 없었다 (Fig. 1).

A1AT 유전자형의 빈도는 M1(Val)/M1(Val)형이 254예 (66.8%)로 가장 많았으며 M1(Val)/M2형 105예 (27.6%), M2/M2형 19예 (5.0%), 그리고 M1(Val)/M1(Ala)형 2예 (0.5%) 순이었다 (Table 2). 연령, 성별, 흡연력에 따른 유전자형의 분포도는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2).

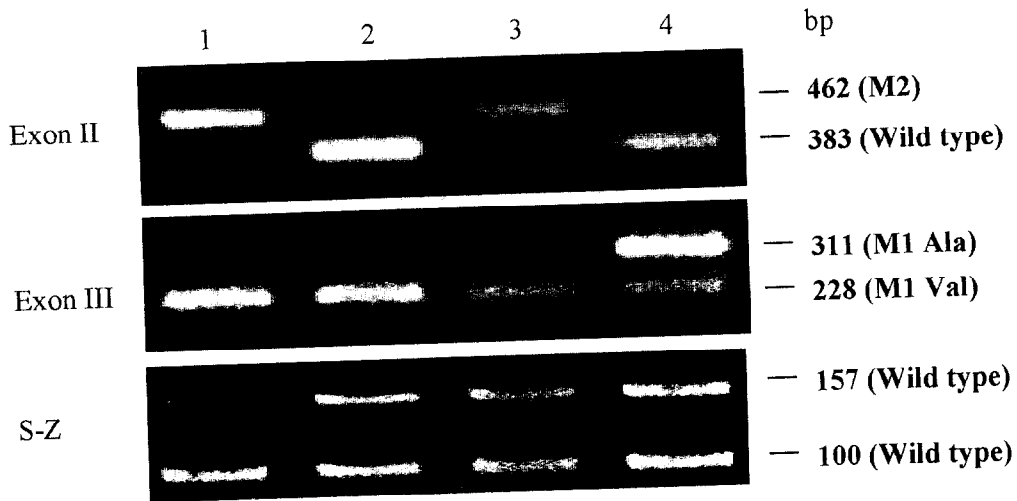


Fig. 1. Representative figure of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin genotypes.  
Lane 1, M2/M2; lane 2, M1(Val)/Val; lane 3, M1(Val)/M2; lane 4, M1(Val)/M1(Ala).

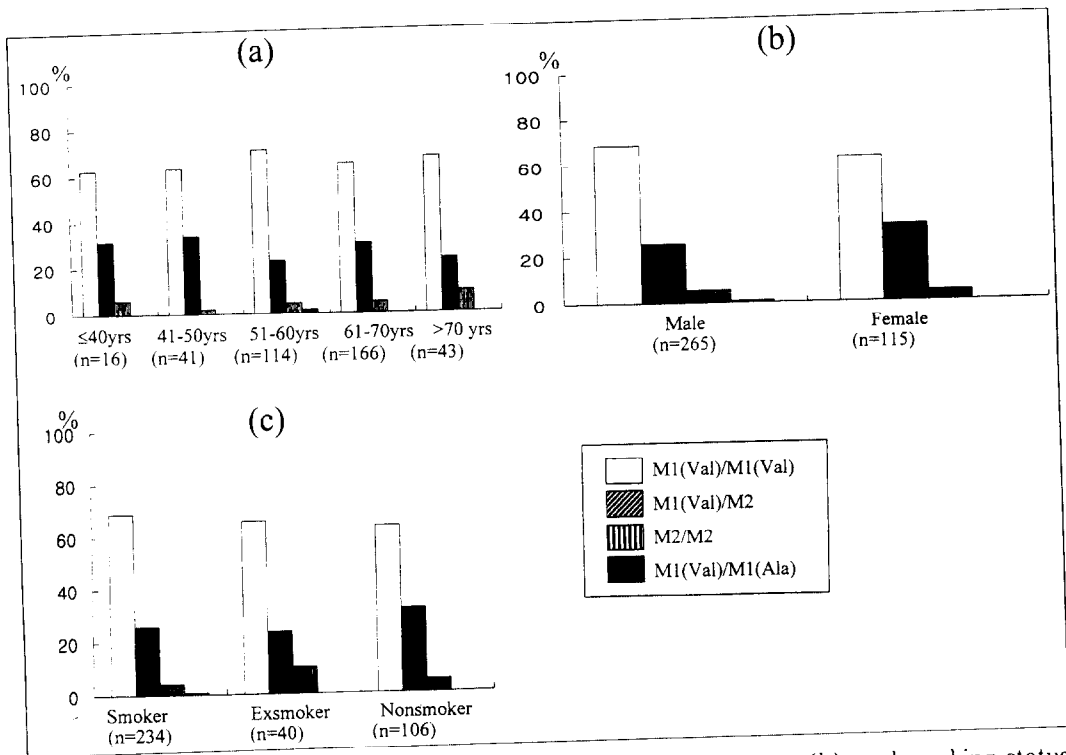


Fig. 2. Distribution of genetic variants of  $\alpha_1$ -antitrypsin by age(a), sex(b), and smoking status

## 고 찰

A1AT는 간세포와 단핵세포(monocyte)에서 생성되는 당단백질로 antithrombin III,  $\alpha_2$ -antiplasmin, C-1 esterase inhibitor 등과 함께 "serpin" family에 속한다<sup>3-5,13</sup>. A1AT는 neutrophil elastase 외에도 trypsin, chymotrypsin, cathepsin G, plasmin 등과 같은 여러 가지 단백분해효소를 억제하기 때문에  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor로도 명명되기도 한다<sup>14</sup>. A1AT는 단백분해효소를 억제하는 작용이 외에도 감염이나 조직 손상시에 증가되어 neutrophil protease를 불활성화시키는 acute phase reactant로서 작용하며, 여러 가지 면역반응에도 관여한다<sup>15,16</sup>. A1AT가 결핍된 경우는 폐기종과 간경변증의 위험도가 높을 뿐 아니라 최근의 연구들에 의하면 A1AT는 천식, 만성기관지염의 발생에도 관여한다고 한다<sup>14,17</sup>.

A1AT의 alleles은 isoelectric focusing (IEF)상 A1AT 단백질의 위치에 따라 명명하는데 양극에서 가장 가까운 곳에 위치할 경우 A로, 가장 먼 곳에 위치하는 경우는 Z로 명명한다<sup>17</sup>. 지금까지 100가지 이상의 A1AT alleles이 밝혀진 바 있는데 이들은 정상 alleles과 risk alleles로 구분되며, risk alleles은 A1AT의 혈중 농도가 정상보다 낮은 '결핍 alleles', A1AT의 혈중 농도가 0인 'null alleles', 그리고 neutrophil elastase를 억제하는 원래의 기능과는 다른 기능을 가진 A1AT를 coding하는 'altered functional alleles'로 세분된다<sup>10,14,17</sup>. 지금까지 밝혀진 alleles 가운데 90-95%가 정상 alleles에 속하며 M으로 명명되는데 M1(Ala<sup>213</sup>), M1(Val<sup>213</sup>), M2, M3, M4와 M5가 백인에서는 정상 alleles의 95%를 차지한다<sup>10</sup>. M1(Val) allele은 M1(Ala) allele의 codon 213번 아미노산인 Ala(GCG)이 Val(GTG)으로 대체된 변이가 있는 경우이며, M3 allele은 M1(val) allele의 codon 376번 아미노산인 glutamate(Glu, GAA)가 aspartate(GAC)로 대체된 변이가 있는 경우다. M2 allele은 M3 allele의 codon 101번 아미노산인 Arg(CGT)이 His(CAT)으로 대체된 것

이다<sup>10</sup>.

'결핍 alleles' 가운데 가장 흔한 것은 Z allele과 S allele이다. Z allele은 M1(Ala) allele의 codon 342번 아미노산인 Glu가 A→G 전이(transition)에 의해 lysine(Lys)으로 대체된 것이다. 음전하의 Glu<sup>342</sup>가 양전하의 Lys<sup>342</sup>으로 대체되면 Glu<sup>342</sup>-Lys<sup>290</sup>의 salt-bridge가 소실되어 단백질의 구조(configuration)가 변화되는데 이로 인해 단백질이 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)내에 축적되어 A1AT의 분비가 감소되며 단백질의 구조 변화로 인해 분비된 A1AT의 neutrophil elastase 억제기능도 감소된다<sup>18</sup>. S allele은 M1(Val) allele의 codon 264번 아미노산인 Glu가 T→A 전환(transversion)에 의해 Val으로 대체된 것이다. 이와 같은 변이에 의해 생성된 단백질은 Glu<sup>264</sup>-Lys<sup>387</sup>의 salt-bridge 소실로 인해 단백질이 불안정하여 세포내에서 쉽게 파괴되어 분비가 감소된다<sup>19</sup>.

정상인에서 A1AT는 매일 2g 이상 생성되며 반감기는 4-5일이다<sup>10,18</sup>. 정상 혈중 농도는 20-48 $\mu$ M이며, 단백분해작용으로부터 폐조직을 적절히 보호하기 위해서는 최소한 정상 농도의 35% 이상이 되어야 한다<sup>17,18</sup>. ZZ 표현형(phenotype)을 갖는 경우 A1AT 농도는 정상 혈중 농도의 10-15%인 2-5  $\mu$ M이며, A1AT 결핍으로 인한 폐기종의 95% 이상이 ZZ 표현형을 갖는 경우다. SS 표현형은 A1AT가 정상인의 60% 수준인 13-19 $\mu$ M로 폐기종의 위험도가 높지 않으며, MZ 표현형도 정상의 60% 수준으로 폐기종의 위험도가 높지 않다<sup>2,17,18</sup>. SZ 표현형인 경우는 A1AT의 혈중 농도가 6-11 $\mu$ M이며 약 10%는 역치(threshold level)인 정상치의 35% 미만으로 폐기종 위험도가 높다. 그러나 기류폐쇄의 정도는 ZZ 표현형보다 낮으며, 비흡연자에서는 폐기종의 위험도가 높지 않다<sup>20,21</sup>.

A1AT 유전자형의 분포는 인종에 따라 많은 차이를 보인다. 정상 alleles의 빈도는 서양인의 경우 M1(Ala)이 20-23%, M1(Val) 44-49%, M3 14-19%, M2 10-11%, M4가 1-5%로 보고된 바 있다<sup>17</sup>.

본 연구에서 한국인의 경우는 M1(Val)이 80.9%, M1(Ala) 0.3%와 M2가 18.8%로 서양인에 비해 M1(Val)과 M2의 빈도가 높고 이와는 대조적으로 M1(Ala)의 빈도는 낮아 서양인과는 차이가 있었다. Z allele의 빈도는 북유럽인의 경우 4-5%, 남유럽인은 1-2%이며, S allele의 빈도는 북유럽인의 10%, 남유럽인의 5%으로, 유럽인의 10%는 Z 혹은 S allele을 갖는데 비해 동양인과 흑인에서는 이러한 결핍 allele을 갖는 경우가 매우 드물다<sup>10, 21, 22</sup>. 본 연구에서도 380명 가운데 Z allele 혹은 S allele을 갖는 예는 없었다. 비록 대상인의 수가 많지 않아 Z 혹은 S allele이 한국인에서도 존재할 가능성은 있으나 Z allele은 M1(Ala) allele의 변이로 초래되기 때문에 M1(Ala) allele의 빈도가 0.3%인 한국인에서는 Z allele이 있을 가능성은 거의 없는 것 같다. 그러나 S allele은 M1(Val) allele의 변이형이기 때문에 M1(Val) allele의 빈도가 높은 한국인에서는 S allele을 있을 가능성은 있다.

정상 한국인에서는 A1AT의 결핍을 초래하는 Z allele 혹은 S allele은 없었다. 이와 같은 결과는 한국인의 경우 A1AT 결핍 이외의 다른 유전적 요소가 폐기종의 발병에 관여하리라고 예측된다.

## 요 약

### 연구배경 :

폐기종은 대개 흡연의 결과로 생기나 1-2%에서는  $\alpha_1$ -antitrypsin (A1AT)의 유전적 결핍으로 인해 발병한다. A1AT의 유전적 이형에 대한 연구는 주로 서구인을 대상으로 한 것으로 저자들은 정상 한국인에서 A1AT의 유전형(genotype)을 알아보고자 하였다.

### 방 법 :

1998년 1월부터 2000년 5월까지 경북대학교병원 건강검진센터 방문자 가운데 문진, 흉부단순촬영, 폐기능검사 등을 통하여 만성폐쇄성폐질환 및 천식등이 없는 정상인 380명을 대상으로 하였다. A1AT의 M1(Ala), M1(Val), M2, S, Z alleles에 대한 중합효소

연쇄반응(PCR) 및 restriction fragment length polymorphism (RFLP)를 시행하였다.

### 결 과 :

A1AT 유전형의 빈도는 M1(Val)/M1(Val)형이 254예 (66.8%)로 가장 많았으며 M1(Val)/M2형 105예(27.6%), M2/M2형 19예 (5.0%), 그리고 M1(Val)/M1(Ala)형 2예 (0.5%) 순 이었다. 연령, 성별, 흡연력에 따른 유전자형의 분포도는 유의한 차이가 없었다.

### 결 론 :

한국인에서는 A1AT 결핍과 관련이 있는 유전형을 갖는 사람은 없거나 매우 드물 것으로 생각된다. 따라서 한국인에서는 A1AT 결핍 외의 다른 유전적 요소가 폐기종의 발병에 관여할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Mahadeva R, Lomas DA. Genetics and respiratory disease. 2. Alpha1-antitrypsin deficiency, cirrhosis and emphysema. Thorax 1998;53:501-5.
2. Barnes PJ. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1999;54:245-52.
3. Loberman H, Tokuoka R, Diesenhofer J, Huber R. Human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications : molecular model and preliminary analysis of the implications for function. J Mol Biol 1984;177:531-56.
4. Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of  $\alpha_1$ -antitrypsin for structure and function of serpins. Biochemistry 1989; 28:8951-66.
5. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors : structure, function, and regulation. J Biol Chem 1994;269: 15957-60.

6. WHO.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency : memorandum from a WHO meeting [Review]. Bull World Health Org 1997;75:397-415.
7. Crystal RG.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency, emphysema and liver disease. J Clin Invest 1990;85:1343-52.
8. Owen MC, Carrell RW. Alpha-1-antitrypsin: molecular abnormality of S variant. BMJ 1976;1: 130-1.
9. Yoshida A, Lieberman J, Gaidulis L, Ewing C. Molecular abnormality of human alpha1-antitrypsin variant (Pi-ZZ) associated with plasma activity deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:1324-8.
10. Crystal RG. The  $\alpha_1$ -antitrypsin gene and its deficiency states. TIG 1989;5:411-7.
11. Rieger S, Riemer H, Mannhalter C. Multiplex PCR assay for the detection of genetic variants of  $\alpha_1$ -antitrypsin. Clin Chem 1999;45:688-90.
12. Lucotte G, Sesboue R. Polymerase chain reaction detection of S and Z alpha-1-antitrypsin variants by duplex PCR assay. Mol Cellular Probes 1999; 13:389-91.
13. Hunt L, Dayhoff M. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin III, and alpha-1-proteinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 1980;95:864-71.
14. Blank CA, Brantly M. Clinical features and molecular characteristics of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. Ann Allergy 1994;72:105-21.
15. Dowton SB, Colten HR. Acute phase reactants in inflammation and infection. Sem Hematol 1988; 25:84-90.
16. Ades EW, Hinson A, Chapuis-Cellier C, Arnemann P. Modulation of the immune response by plasma proteinase inhibitors. Scand J Immunol 1982;15: 109-13.
17. Crystal RG, Brantly ML, Hubbard RC, Curiel DT, States DJ, Holmes MD. The alpha1-antitrypsin gene and its mutations : clinical consequences and strategies for therapy. Chest 1989;95:196-208.
18. Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. Am J Med 1988;84:13-31.
19. Curiel DT, Chytil A, Courtney M, Crystal RG. Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264-Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. J Biol Chem 1989; 264:10477-86.
20. Kalsheker N, Morgan J. The  $\alpha_1$ -antitrypsin gene and chronic lung disease. Thorax 1990;48:759-64.
21. Turino GM, Baker AF, Brantly ML, Cohen AB, Connelly RP, Crystal RG, Eden E, Schluchter MD, Stoller JK. Clinical features of individuals with PI'SZ phenotype of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1718-25.
22. Carrell RW. Alpha 1-antitrypsin: molecular pathology, leukocytes, and tissue damage. J Clin Invest 1986;78:1427-31.