

# *Mycoplasma pneumoniae* 폐렴과 관련된 폐 표면 활성제 단백질-A(Human Surfactant Protein-A) 유전자 대립 형질

순천향대학교 의과대학 소아과학교실, Protein Section, Laboratory of Metabolism(LM), National Cancer Institute(NCI), National Institute of Health(NIH)\*, 경희대학교 의과대학 소아과학교실†

김승수 · 이인규 · 고정호\* · 오명호 · 배종우†

## Human Surfactant Protein-A(SP-A) Gene Locus Associated with *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Korean Children

Seung Soo Kim, M.D., In Kyu Lee, M.D., Jung Ho Ko, Ph.D.\*  
Myung Ho Oh, M.D. and Chong Woo Bae, Ph.D.†

Department of Pediatrics, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, Korea  
Protein Section, Laboratory of Metabolism(LM), National Cancer Institute(NCI),  
National Institute of Health(NIH)\*, USA,  
Department of Pediatrics†, College of Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

**Purpose :** *Mycoplasma pneumoniae* is a leading cause of pneumonia and exacerbates other respiratory conditions such as asthma. Surfactant protein A(SP-A) is involved in surfactant physiology and surfactant structure, and plays a major role in innate host defense and inflammatory processes in the lung. In this study, SP-A mediated mycoplasma tidal activity. The candidate-gene approach was used to study the association between the SP-A gene locus and *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in the genetically homogeneous Korean population.

**Methods :** PCR-cRFLP-based methodology was used to detect SP-A genotype. The forty nine children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia were matched to 50 normal neonates.

**Results :** The specific frequencies for the alleles of the SP-A1 and SP-A2 gene in the study population were: 6A<sup>2</sup>=21 percent, 6A<sup>3</sup>=45 percent, 6A<sup>4</sup>=11 percent, 6A<sup>8</sup>=9 percent, 6A<sup>14</sup>=8 percent, 1A<sup>0</sup>=11.3 percent, 1A<sup>0</sup>=38 percent, 1A<sup>1</sup>=12.7 percent, 1A<sup>2</sup>=9.2 percent, 1A<sup>5</sup>=15.5 percent, 1A<sup>7</sup>=2.9 percent, 1A<sup>8</sup>=4.9 percent, 1A<sup>9</sup>=2.2 percent, others=3.3 percent. The frequencies of specific genotypes such as 1A<sup>2</sup> was higher than control group, significantly.

**Conclusion :** 1A<sup>2</sup> are susceptible factors for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. We conclude that the SP-A gene locus(1A<sup>2</sup>) is an important determinant for predisposition to *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. (Korean J Pediatr 2005;48:376-379)

**Key Words :** Surfactant, Pulmonary surfactant-associated protein A, *Mycoplasma pneumoniae*

### 서 론

폐 표면 활성제 단백질-A는 폐 표면 활성제의 구성 중 1% 정도만을 차지하고 있으나 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 기능 및 생리적 작용에 많은 기여를 한다고 밝혀지면서

활발히 연구되기 시작했다. 최근에는 급성기 반응물질(acute phase reactant molecule)과 유사한 구조 및 기능을 가진 것으로 연구되어져 폐의 숙주방어와 염증반응에 중요하게 관여하는 것으로 알려졌다<sup>1)</sup>. 특히, C-type lectin의 일종으로서 숙주면역에 관여하며<sup>2,3)</sup>, mannose binding protein과 보체 C1q 같이 작용하여 병원균이나 그에 상응하는 감염원에 노출되었을 때 숙주의 방어 능력을 향상시키는 기능을 가지고 있다. 최근의 연구<sup>4,5)</sup>에 의하면 *Mycoplasma pneumoniae*(*M. pneumoniae*)에 대해 human surfactant protein-A(SP-A)의 숙주 방어가 있다. *M. pneumoniae*는 학동기와 청소년기에 호흡기 감염을 일으키는 주된 병원체로<sup>6)</sup> 기관지 천식과 만성 폐쇄성 기관지염의 중요한 유

본 연구는 순천향대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음.

접수 : 2004년 10월 7일, 승인 : 2004년 12월 7일

책임저자 : 오명호, 순천향대 천안병원 소아과

Correspondence : Myung Ho Oh, M.D.

Tel : 041)570-2160 Fax : 041)572-4996

E-mail : omh@schch.co.kr

발 요인으로 보고되고 있으며<sup>7,8)</sup>, 세균성 폐렴이나 바이러스성 폐렴에 비하여 증합효소 연쇄반응법, 항체 검사 등을 이용한 진단이 용이하다. 본 연구에서는 학동기에 많은 감염을 보이며 진단이 용이하고, 기관지 천식의 중요한 인자로 작용하는 *M. pneumoniae* 폐렴균과 숙주 방어에 중요하게 작용하는 SP-A를 중심으로 폐렴균과 대조군의 SP-A 유전자 대립 형질을 비교하여 *M. pneumoniae* 폐렴에 관여하는 유전자 대립 형질을 밝히고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 인원

2003년 5월부터 2003년 10월까지 순천향대학교 천안병원 소아과에 진찰 소견과 방사선 소견상 폐렴으로 진단되어 입원한 환자 중, 최근 6개월간 폐렴의 병력이 없으며, *M. pneumoniae* 특이 항체 검사(Serodia-Myco II; Fujirebio, Japan)상 항체가 1:5,120 이상이거나, 회복기 항체가 4배 이상 증가된 환자 또는 *M. pneumoniae* PCR에서 양성인 49례를 대상으로 하였다. 순천향대학교 천안병원 신생아실에 입원한 정상 신생아 50명을 대조군으로 하여 아미노산 염기 서열의 차이에 의해 SP-A의 유전자형을 밝혔다.

### 2. DNA 추출

전혈 0.5-3 mL를 제대혈로 채취하여 EDTA 용기에 넣고 -70°C에 보관하였다. Genomic DNA는 Puregene DNA Isolation Kit(Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 전혈에서 추출하였다. 이를 간단히 기술하면, 전혈 2 mL를 EDTA 용기에 담고 -70°C에서 냉동 보관 후 200  $\mu$ L 1×SSC 버퍼 160  $\mu$ L를 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거 후 1×SSC 버퍼 300  $\mu$ L를 첨가하고 원심 분리한 후, 각 침전물에 1.2 M NaOAc 75  $\mu$ L, 10% SDS 5  $\mu$ L과 Proteinase K(20 mg/mL H<sub>2</sub>O) 1  $\mu$ L를 섞었다. 55°C 항온수조에서 1시간 동안 방치한 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1) 100  $\mu$ L를 첨가하여 30초 동안 섞고, 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관의 상층부를 조심스럽게 옮기고, chloroform 100  $\mu$ L를 첨가 후 30초간 잘 흔들어 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 새로운 1.5 mL 미세 원심 분리관에 상층부를 조심스럽게 옮기고, 차가운 100% Ethanol(-20°C 보관) 500  $\mu$ L를 첨가하여 -20°C에 20분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 2분간 원심 분리 후 상층액을 버리고 침전된 침전물에 80% ethanol(4°C 보관) 1 mL를 첨가 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리 하였다. 상층액을 버리고 Speed-Vac에서 10분간 침전물을 건조한 다음, 증류수 50  $\mu$ L에 침전물을 녹이고 Genomic DNA를 55°C 항온수조에서 1시간 동안 용해한 후 -20°C에 보관하였다. 추출된 DNA는 PCR 반응을 위하여 50 ng/ $\mu$ L로 희석시켰다.

### 3. SP-A 유전자의 유전자 분석(genotyping of SP-A genes)

SP-A의 유전자 분석은 DiAngelo 등<sup>9)</sup>이 사용한 PCR-cRFLP 방법을 사용하였다

#### 1) 증합효소 연쇄반응(polymerase-chain reaction, PCR) 증폭

SP-A1과 SP-A2 유전자는 3.3 kb의 크기로서 전혈로부터 추출하였다. SP-A1은 유전자 특수 sense 시발체(gene specific sense primer)인 326과 antisense 시발체(gene specific anti-sense primer)인 68A로, SP-A2는 유전자 특수 sense 시발체인 327과 antisense 시발체인 68A로 증폭시켰다. PCR 증폭이 끝난 후 1% 아가로스 겔(agarose gel)에서 SP-A1과 SP-A2 유전자를 확인하였다.

#### 2) 제한 효소 분석(restriction endonuclease analysis)

1) SP-A1 유전자의 대립 형질을 위해 증폭된 SP-A1 PCR 생성물을 시발체(primer) 765/787, 767/768, 788/21를 이용하여 2차로 증폭시킨 후 19, 50, 62, 133, 219 위치의 뉴클레오티드(nucleotide)를 선택적으로 자르는 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여(PCR-cRFLP-based methodology) 자른 후 전기영동하여 염기서열의 차이를 확인하였다.

2) SP-A2 유전자의 대립 형질을 위해 증폭된 SP-A2 PCR 생성물을 시발체 726/96, 727/21, 799/28A, 805/494를 이용하여 2차로 증폭시킨 후 9, 91, 140, 223 위치의 뉴클레오티드를 선택적으로 자르는 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여(PCR-cRFLP-based methodology) 각 위치를 자른 후 전기영동하여 염기서열의 차이를 확인하였다.

### 4. 통계 분석

유전자 대립 형질의 빈도의 비교에는 Chi-square test를 사용하였고, 폐렴균과 대조군간의 비교는 Fisher의 정확검증을 시행하였으며, odds ratio와 95% confidence interval은 Woolf(logit) 방법에 의하여 계산하였다. 통계처리는 SPSS(version 11.5)와 PHASE(version 2.0)를 이용하였고, 통계학적 유의 수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

*M. pneumoniae* 폐렴으로 진단된 49명의 폐렴균과 순천향대학교 천안병원 신생아실에 입원한 정상 신생아 50명의 대조군으로 구분하여 아미노산 염기 서열의 차이에 의해 SP-A의 유전자형을 밝혔다.

1. 대조군에서 SP-A1 중 6A<sup>3</sup> 44.5%, 6A<sup>2</sup> 28.7%, 6A<sup>4</sup> 21.8%, 6A 1.1%의 분포를 보였고, SP-A2 중 1A<sup>0</sup> 40.7%, 1A 13.1%, 1A<sup>5</sup> 11.4%, 1A<sup>2</sup> 10%, 1A<sup>1</sup> 9.3%의 분포를 보였다(Table 1).

2) 폐렴균의 SP-A1 유전자 대립 형질은 대조군과 비교하여

**Table 1.** Frequencies of SP-A Genotypes in Infants with *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia and Control

	<i>M. Pne.</i> *	Control	OR†(95%CI†)	P-value
SP-A1 genotype frequencies(%)				
6A	0	1.1		
6A <sup>2</sup>	36.9	28.7	1.45(0.87-2.41)	0.12
6A <sup>3</sup>	34.8	44.5	0.66(0.40-1.10)	0.09
6A <sup>4</sup>	16.3	21.8	0.66(0.35-1.31)	0.24
others	11.9	3.7		
SP-A2 genotype frequencies(%)				
1A	10.2	13.1	0.75(0.32-1.62)	0.45
1A <sup>0</sup>	26.5	40.7	0.53(0.30-0.89)	0.06
1A <sup>1</sup>	1.02	9.3	0.1(0-0.63)	0.08
1A <sup>2</sup>	52.0	10	9.77(5.43-17.62)	0.00
1A <sup>5</sup>	3.06	11.4	0.25(0.05-0.49)	0.08
others	7.1	15.5	0(0-0.49)	0.004

\**M. Pne.* : *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia, †OR : Odd ratios, †CI : Confidence intervals

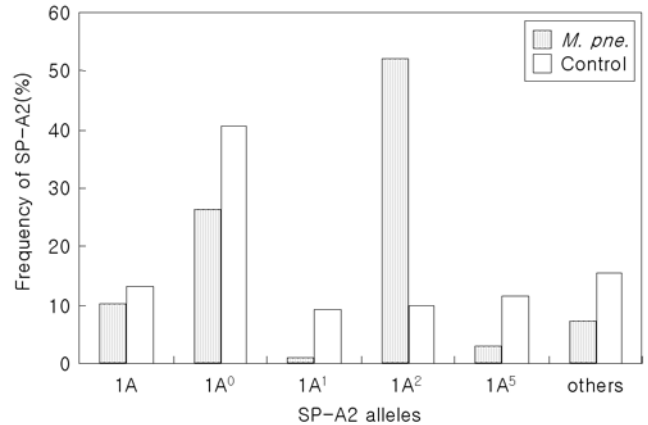
통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1).

3) 폐렴군의 SP-A2 유전자 대립 형질 중 1A<sup>0</sup>, 1A<sup>1</sup> 그리고 1A<sup>5</sup>는 대조군과 비교하여 낮은 빈도를 보였으나 통계적 의미는 없었으며, 1A<sup>2</sup>는 폐렴군에서 통계적으로 유의하게 높은 분포를 보였다(Table 1, Fig. 1).

## 고 찰

폐 표면 활성제 단백-A는 폐 표면 활성제의 구성 중 1% 정도만을 차지하고 있으나 폐 표면 활성제(pulmonary surfactant, PS)의 기능 및 생리적 작용에 많은 기여를 한다고 밝혀지면서 활발히 연구되기 시작했다. 최근에는 급성기 반응물질(acute phase reactant molecule)과 유사한 구조 및 기능을 가진 것으로 연구되어져 폐의 숙주방어와 염증반응에 중요하게 관여하는 것으로 알려졌다<sup>1)</sup>. *M. pneumoniae* 폐렴은 전체 폐렴의 30% 정도를 차지하고 있으며<sup>6)</sup>, 기관지 천식, 만성 폐쇄성 기관지염의 유발 요인으로 보고되고 있다<sup>7, 8)</sup>. *M. pneumoniae*에 대한 폐의 방어 기전은 확실히 밝혀지지는 않았으나, 최근의 연구 결과는 폐의 숙주 방어가 중요하게 작용하는 것으로 보고되고 있다<sup>10-13)</sup>. 저자들은 학동기에 많은 감염을 보이며 진단이 용이하고, 기관지 천식의 중요한 인자로 작용하는 *M. pneumoniae* 폐렴군과 숙주 방어에 중요하게 작용하는 SP-A를 중심으로 폐렴군과 대조군의 SP-A 유전자 대립 형질을 비교하여 *M. pneumoniae* 폐렴에 관여하는 유전자 대립 형질을 밝히고 진단의 유효성이 있는지를 밝히고자 본 연구를 시행하였다.

대조군의 정상 신생아의 SP-A1과 SP-A2의 대립 형질의 분포와 빈도는 저자들이 발표하였던 한국 정상 신생아의 결과와



**Fig. 1.** Distribution of the SP-A2 alleles in the *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and control(*M. pne.* : *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia).

같은 결과를 보였다<sup>14, 15)</sup>.

*M. pneumoniae* 폐렴군의 SP-A1 유전자 대립 형질은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다. *M. pneumoniae* 폐렴군의 SP-A2 유전자 대립 형질 중 1A<sup>0</sup>, 1A<sup>1</sup> 그리고 1A<sup>5</sup>는 대조군과 비교하여 높은 빈도를 보였으나 통계적 의미는 없었으며, 1A<sup>2</sup>는 *M. pneumoniae* 폐렴군에서 통계적으로 유의하게 높은 분포를 보였다(Table 1, Fig. 1). SP-A2 중 1A<sup>2</sup>는 9, 91, 140, 223번째 아미노산이 CGCC로 이루어진 대립 형질로 정상 신생아의 빈도와 분포가 알려진 핀란드와 미국의 경우 13%, 9%로 한국의 10%와 같은 빈도를 보였다<sup>16, 17)</sup>. 이와 같이 정상 분포에서 3국가 간에 비슷한 빈도를 보인 1A<sup>2</sup>가 *M. pneumoniae* 폐렴군에서 월등히 높은 빈도를 보인 것은 유전적으로 1A<sup>2</sup> 대립 형질을 갖고 있는 경우, *M. pneumoniae* 폐렴이 잘 발생할 수 있으며, 유발체로서 작용할 가능성이 높다는 것을 의미한다. 그러나 1A<sup>2</sup>는 신생아 호흡 곤란증후군(respiratory distress syndrom, RDS)에서는 보호체로 작용하여 1A<sup>2</sup>를 갖고 있는 신생아군에서는 RDS가 낮은 빈도로 발생하였다<sup>18)</sup>. 즉 1A<sup>2</sup>를 갖고 있는 경우 낮은 빈도의 RDS 발생을 보였으나 *M. pneumoniae* 폐렴은 높은 빈도의 발생을 보여 1A<sup>2</sup>가 RDS와는 반대로 *M. pneumoniae* 폐렴군에서는 위험인자로 작용할 가능성이 높다. 이는 앞으로 단백질의 정량, 정성분석 및 기능 검사를 통하여 폐렴의 병인과정이나 치료에 대한 1A<sup>2</sup> 대립 형질의 작용 및 역할이 연구되어야 할 것이다. 결론적으로 *M. pneumoniae* 폐렴에 대해 1A<sup>2</sup>는 유발 인자로 작용할 것으로 추정할 수 있으며, 1A<sup>2</sup>에 대한 단백질의 정량, 정성분석을 통하여 *M. pneumoniae*의 예방이나 치료에 어떻게 적용할 것인지 보다 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

**목적 :** 학동기에 많은 감염을 보이며 진단이 용이하고, 기관

지 천식의 중요한 인자로 작용하는 *M. pneumoniae* 폐렴군과 숙주 방어에 중요하게 작용하는 SP-A를 중심으로 폐렴군과 대조군의 SP-A 유전자 대립 형질을 비교하여 *M. pneumoniae* 폐렴에 관여하는 유전자 대립 형질을 밝히고자 본 연구를 시행하였다.

**방 법** : 2003년 5월부터 2003년 10월까지 순천향대학교 천안병원 소아과에 진찰 소견과 방사선 소견 상 폐렴으로 진단되어 입원한 환자 중, 최근 6개월간 폐렴의 병력이 없으며, *M. pneumoniae* 특이 항체 검사 상 항체가가 1:5,120 이상이거나, 회복기 항체가가 4배 이상 증가된 49례를 대상으로 하였으며, 순천향대학교 천안병원 신생아실에 입원한 정상 신생아 50명을 대조군으로 하여 아미노산 염기 서열의 차이에 의해 SP-A의 유전자형을 밝혔다.

**결 과 :**

1) 대조군에서 SP-A1 중 6A<sup>3</sup> 44.5%, 6A<sup>2</sup> 28.7%, 6A<sup>4</sup> 21.8%, 6A 1.1%의 분포를 보였고, SP-A2 중 1A<sup>0</sup> 40.7%, 1A 13.1%, 1A<sup>5</sup> 11.4%, 1A<sup>2</sup> 10%, 1A<sup>1</sup> 9.3%의 분포를 보였다.

2) 폐렴군의 SP-A1 유전자 대립 형질은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

3) 폐렴군의 SP-A2 유전자 대립 형질 중 1A<sup>0</sup>, 1A<sup>1</sup> 그리고 1A<sup>5</sup>는 대조군과 비교하여 낮은 빈도를 보였으나 통계적 의미는 없었으며, 1A<sup>2</sup>는 폐렴군에서 통계적으로 유의하게 높은 분포를 보였다.

**결 론** : *M. pneumoniae* 폐렴에 대해 1A<sup>2</sup>는 유발 인자로 작용할 것으로 추정할 수 있으며, 1A<sup>2</sup>에 대한 단백질의 정량, 정성 분석을 통하여 *M. pneumoniae*의 예방이나 치료에 어떻게 적용할 것인지 연구되어야 한다고 생각된다.

**References**

- 1) Drickamer K. Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure modif. *Biochem Soc Trans* 1989;17:13-5.
- 2) LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 1997;158:4336-40.
- 3) Phelps DS. Pulmonary surfactant modulation of host-defense function. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* 1995;5:221-9.
- 4) Hickman-Davis JM, Russell LJ, Zhu S, Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1998;274:L270-7.
- 5) Chiba H, Pattanajitvilai S, Mitsuzawa H, Kuroki Y, Evans A, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins A and D recognize lipid ligands on *Mycoplasma pneumoniae* and markedly augment the innate immune response to the or-

- ganism. *Chest* 2003;123(3 suppl):426s.
- 6) Krause DC, Taylor-Robinson D. Mycoplasmas which infect humans. In: Maniloff J, McElhaney RN, editors. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992:417-44.
- 7) Gil JC, Cedillo RC, Mayagoitia BG, Paz MD. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from asthmatic patients. *Ann Allergy* 1993;70:23-5.
- 8) Melbye H, Kongerud J, Vorland L. Reversible airflow limitation in adults with respiratory infection. *Eur Respir J* 1994;7:1239-45.
- 9) DiAngelo S, Lin Z, Wang G, Phillips S, Ramet M, Luo J, et al. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles. *Dis Markers* 1999;15:269-81.
- 10) Davis JK, Davidson MK, Schoeb TR, Lindsey JR. Decreased intrapulmonary killing of *Mycoplasma pulmonis* after short-term exposure to NO<sub>2</sub> is associated with damaged alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:406-11.
- 11) Evengard B, Sandstedt K, Bolske G, Feinstein R, Riesenfelt-Orn I, Smith CI. Intranasal inoculation of *Mycoplasma pulmonis* in mice with severe combined immunodeficiency (SCID) causes a wasting disease with grave arthritis. *Clin Exp Immunol* 1994;98:388-94.
- 12) Foy HM. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *Clin Infect Dis* 1993;17 Suppl 1:S37-46.
- 13) Lo SC. Mycoplasmas and AIDS. In: Maniloff J, McElhaney RN, editors. *mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992:525-45.
- 14) Lee KS, Kim YH, Suk JS, Ko JH, Yoo OJ, Lee IK, et al. Allele distribution and frequency of human surfactant protein-A1 in Korean neonates. *J Korean Pediatr Soc* 2002;45:1497-502.
- 15) Kim NC, Yoon HC, Suk JS, Ko JH, Yoo OJ, Lee IK, et al. Allele distribution and frequency of human surfactant protein-A2 in Korean neonates. *J Korean Pediatr Soc* 2003;46:340-4.
- 16) Ramet M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M. Association between the surfactant protein A(SP-A) gene locus and respiratory distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet* 2000;66:1569-79.
- 17) Floros J, Fan R, Matthews A, DiAngelo S, Luo J, Nielsen H, et al. Family-based transmission disequilibrium test (TDT) and case-control association studies reveal surfactant protein A(SP-A) susceptibility alleles for respiratory distress syndrome(RDS) and possible race differences. *Clin Genet* 2001;60:178-87.
- 18) Choe JH, Oh MH, Ko JH, Lee IK, Kim SY, Bae CW. Association between the human surfactant protein-A(SP-A) gene locus and respiratory distress syndrome in the Korean neonates. *Korean J Pediatr* 2004;47:735-9.