

천식과 아토피피부염 환자에서 *D. farinae* 특이 IgE 결합 양상의 차이

¹연세대학교 의과대학, ²내과학교실 알레르기내과, ³알레르기연구소

김규리¹ · 김민환¹ · 최수영^{2,3} · 이용원^{1,2,3} · 박중원^{1,2,3} · 홍천수^{1,2,3}

Differences of *Dermatophagoides farinae* Specific IgE Binding Patterns between Asthmatics and Atopic Dermatitis Patients

Gyu Ri Kim¹, Min-Hwan Kim¹, Soo Young Choi^{2,3}, Yong Won Lee^{1,2,3}, Jung-Won Park^{1,2,3} and Chein-Soo Hong^{1,2,3}

³Division of Allergy and Immunology, ²Department of Internal Medicine, Institute of Allergy, ¹Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) has various isoallergens. However, allergenic differences between bronchial asthmatics (BA) and atopic dermatitis (AD) patients have not yet been fully evaluated.

Objective: To investigate the differences in *D. farinae* specific IgE between BA and AD patients sensitized to *D. farinae*.

Method: 5 BA and 5 AD patients sensitized to *D. farinae* were measured in this study. *D. farinae*-specific IgE was evaluated by 1-dimensional (1-D) and 2-dimensional (2-D) SDS-PAGE, and IgE immunoblotting. N-terminal sequencing was performed for the identification of the allergens.

Result: 2-D IgE immunoblot revealed the 7 allergens with 14 kDa at pI 5.5 to 6.5. These allergens were found in 4 BA and 2 AD patients. Another allergen with 25 kDa at pI 7.8 was found only in 4 BA patients. This allergen was regarded as triosephosphate isomerase by N-terminal sequencing.

Conclusion: 7 allergens with 14 kDa at pI 5.5 to 6.5 and 1 allergen with 25 kDa at pI 7.8 were identified more frequently in BA than in AD patients. The 25 kDa allergen was regarded as triosephosphate isomerase, and it might be associated with the development of asthma. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2008;28:199-204)

Key words: *Dermatophagoides farinae*, Allergens, Asthma, Atopic dermatitis, Triosephosphate isomerase

서 론

집먼지진드기는 기관지 천식, 알레르기 비염, 아토피 피부염의 주요한 발병 원인 중 하나이며, 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 가장 중요한 알레르겐으로 알려져 있다.^{1,2)} 집먼지진드기에서 가장 중요한 종은 *Dermatophagoides pteronyssinus*와 *Dermatophagoides farinae*이며 이 중 우리나라에서는 *D. farinae*가 우점종으로 알려져 있다.³⁾ 교차면역영동검사에 의하면 집먼지진드기에 53가지의 항원이 존재하는데, 그 중 30종류 이상의 다른 단백질이 집먼지진드기에 알레르기를 가진 사람에게서 IgE 항체를 생성하는 알레르겐임이 입증되었고, 이

중 19종의 단백질이 분리되어 그 특성이 규명되었다.^{3,4)} 이들 중 group 1, 2 알레르겐이 주 알레르겐으로 확인되었으며 집먼지 속에 높은 농도로 검출된다.⁴⁻⁷⁾

Group 1과 2 집먼지진드기 알레르겐은 *Der p* 1 및 *Der p* 2에서 보고된 것과 같이, 동일한 group이면서도 여러 아미노산에 변화를 가져오는 다형성이 있으며 이런 *Der p* 2의 isoallergen들은 서로 다른 IgE 결합 양상을 가지고 있음이 알려져 있다.⁸⁻¹⁰⁾ Isoallergen은 SDS-PAGE만을 시행하였을 때는 서로 구분이 어렵지만 SDS-PAGE 및 Isoelectric focusing을 병합한 2차원 전기영동을 시행하였을 때는 10개 이상의 다른 allergen으로 구분될 수 있는 것으로 밝혀졌다.¹¹⁾ 하지만, 이러한 결과가 임상적으로 어떤 의미가 있는 지, 그리고 각 질환에서 원인되는 알레르겐에 차이가 있는지에 대해서는 연구가 충분하지 않은 실정이다.

본 연구에서는 *D. farinae* 항원을 이차원 전기영동을 이용하여 분리한 후, 천식과 아토피피부염 환자 두 군의 혈청으로 IgE immunoblotting을 시행하여 두 군에서 감작된 집먼지진드기 특이 알레르겐에 차이가 있는지 관찰하고, N 말단 아미노산 서열(N-terminal sequence) 분석으로 이들 알레르겐을 동정

본 연구는 2006년도 연세대학교 의과대학 학생연구비의 지원으로 이루어졌음.

책임저자 : 홍천수, 서울시 서대문구 성산로 250

연세대학교 의과대학 내과학교실, 우: 120-752

Tel: 02) 2228-1930, Fax: 02) 393-6884

E-mail: cshong@yuhs.ac

투고일: 2008년 4월 25일, 심사일: 2008년 5월 19일

게재확정일: 2008년 7월 7일

하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2005년 7월부터 2005년 10월까지 연세의료원 세브란스병원 알레르기-천식 클리닉에 내원하여 기관지 천식으로 진단된 환자 5명과 아토피피부염 아토피피부염군으로 진단된 환자 5명을 선정하였다. 이들은 알레르기 피부단자시험에서 *D. farinae*에 양성 소견(팽진 크기가 음성 대조군보다 3 mm 이상)을 보이고 특히 IgE CAP test에서 *D. farinae* 알레르겐에 100 kU/L 이상이었다. 이들의 혈청과 *D. farinae* 알레르겐에 100 kU/L 이상의 반응을 보인 환자 10명의 혼합혈청을 -70°C에 냉동 보관하였고, 이를 실험에 사용하였다(Table 1). 아토피피부염 환자군에서 6번 환자는 3군 스테로이드제(중등도 강한 것), 7, 9, 10번 환자는 5군 스테로이드제(약한 것), 8번 환자는 1군 스테로이드제(가장 강한 것)를 도포하는 중증도에 해당되었다. 통계적 분석은 환자군별 대상으로 연령, 총 IgE 수치 간 Mann Whitney U test을 시행하여 SPSS (version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다(Table 2).

2. 집먼지진드기 조항원 제조

항원 제조를 위해 건조된 *D. farinae*를 ethylether로 탈 지방화시킨 후 4°C에서 1 : 50 w/v phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)을 이용하여 72시간 동안 추출하였다. 이를 1시간 동안 10,000×g로 원심 분리하여 상층액을 모은 후 삼투막(Spectra/Por® 3 dialysis membrane; Spectrum Laboratories, Inc., CA, USA)으로 72시간 동안 4°C에서 PBS를 이용하여 투석하였다. 투석 후 추출액을 다시 4°C에서 10,000×g로 1시간 동안 원심 분리하고 그 상층액을 동결 건조하여 조항원 분말을 만든 후 -20°C에서 냉동 보관한 후 사용하였다.

3. SDS-PAGE 전기영동 및 IgE immunoblotting

D. farinae 조항원 분말을 loading 완충용액(60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 녹이고 끓는 물에 5분 동안 반응시켰다. 5% 및 13.5% SDS gel에서 각각 50 V 30분, 150 V 2시간 동안 전기영동(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)을 실시하였다. 그 후 gel을 nitrocellulose 막(pore size 0.45 μm, Amersham, Buckinghamshire, UK)에 200 V, 400 mA에서 1시간 30분간 전이시킨 다음 이를 4 mm 간격으로 절단한 후, 5% (w/v)

Table 1. Patient characteristics

No.	Sex	Age	Diagnosis	Total IgE (kU/L)	CAP-sIgE class (kU/L)	
					<i>D. pteronyssinus</i>	<i>D. farinae</i>
1	M	8	Bronchial asthma	425	> 100	> 100
2	M	7	Bronchial asthma	1,122	> 100	> 100
3	M	10	Bronchial asthma	2,376	> 100	> 100
4	F	5	Bronchial asthma	912	> 100	> 100
5	F	34	Bronchial asthma	2,082	60.2	> 100
6	M	14	Atopic dermatitis	1,094	> 100	> 100
7	F	19	Atopic dermatitis	1,672	> 100	> 100
8	F	9	Atopic dermatitis	1,423	> 100	> 100
9	F	9	Atopic dermatitis	2,863	> 100	> 100
10	M	30	Atopic dermatitis	578	25.9	> 100

Table 2. Demographics of 10 atopic patients

Characteristic	Total patients	Bronchial asthma group	Atopic dermatitis group	P-value*
Sex	Male=5, Female=5	M/F=3/2	M/F=2/3	
Age (year)				
Mean±SD (Range)	14.5±10.1 (5~34)	12.8±12.0 (10~34)	16.2±8.8 (9~30)	0.310
Total IgE (kU/L)				
Mean±SD (Range)	1,455±791 (425~2,863)	1,383±818.9 (425~2,376)	1,526±852 (578~2,863)	0.841
CAP-specific IgE to Dp, Df positivity		100%		

*P-values between bronchial asthma group and atopic dermatitis group were based on Mann-Whitney U test.

skim milk-PBS-T 용액에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백질 결합을 차단하였다. 다시 PBS-T용액으로 막을 세척한 후, 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS로 5 : 1로 희석된 환자의 혈청을 상온에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 다시 PBS-T로 세척한 뒤, alkaline phosphatase가 결합된 1 : 1,000 희석된 goat 항 human IgE (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이를 세척한 후 nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate (NBT/BCIP; Promega, Madison, WI, USA)로 발색하였다.

4. Isoelectric focusing 및 SDS-PAGE 전기영동과 IgE immunoblotting

냉동 보관한 *D. farinae* 조항원 분말을 200 µg/100µL로 증류수에 녹여 Ready Prep 2-D Clean-up Kit (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하여 불순물을 제거하였다. 이후 이 액체상태의 *D. farinae*에 2-D 재수화 완충용액(rehydration buffer; 8 M urea, 4% CHAPS, Bromophenol)에 0.2% ampholyte, DTT를 녹인 용액을 반응시켰다. IPG (Immobilized pH gradient gel) 스트립(7 cm, pH 5-8, linear; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 위 용액을 넣고 drystrip cover oil로 덮은 후, 20°C로 계속 유지시킨 상태에서, 50 V에서 12시간 동안 재수화시켰다. 그 후 50 µA/strip 전류 아래, 100 V에서 30분, 250 V에서 30분, 500 V에서 30분, 1000 V에서 1시간, 4000 V에서 8000 volt-hours로 Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Cambridge, U.S.A)을 이용하여 등전점 전기영동을 하였다. 이후 스트립을 SDS 평형 완충용액(6 M urea, 2% SDS, 50% (v/v) glycerol, 1.5 M Tris/HCl, 0.05 M gel buffer (pH 8.8))에 DTT를 넣고 20분 동안 반응시킨 후, SDS 평형 완충용액에 iodoacetamide를 녹인 후 스트립을 20분 동안 다시 반응시켰다. 위 스트립을 13.5% SDS-PAGE gel (40% acrylamide, TrisCl (pH 8.8) 1.5 M, 10% SDS, 10% AP, TEMED) 위에 넣고, agarose sealing 용액(SDS 전기영동 완충용액, 0.5% (w/v) agarose, bromophenol blue)를 넣어 고정시킨 후, 150 V, 50 mA로 1시간 50분간 전기영동(Small mighty, Hoeffler, San Francisco, CA, USA)을 실시하였다. 전기영동이 끝난 SDS-PAGE gel을 1차원 immunoblotting과 같은 방법으로, nitrocellulose 막에 전이시킨 후 희석한 환자 혈청(1 : 5)을 반응시킨 후 1 : 1,000 항 IgE (Sigma)와 결합시키고 NBT/BCIP 발색반응을 하였다.

5. Membrane spot N 말단 아미노산 서열 분석 및 확인

천식 환자와 아토피피부염 환자의 IgE immunoblotting에서 차이가 나는 알레르겐을 확인하기 위해 위와 같은 방법으로 *D. farinae* 알레르겐을 2차원 SDS-PAGE로 분리한 후 PVDF 막

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 전이시키고 염색(Coomassie Brilliant R250), 탈색(methanol)을 과정을 거쳤다. PVDF 막의 연구하고자 하는 알레르겐만을 잘라 고려대학교 부속 한국기초과학연구소에 N 말단 아미노산 서열 분석을 의뢰했다. 분석된 아미노산 서열은 NCBI의 The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) database에서 검색하였다.

결 과

1. 1차원 및 2차원 전기영동

D. farinae 알레르겐을 각각 1차원과 2차원으로 전기영동하고 Coomassie brilliant R250 염색한 결과, 1차원 전기영동에서 여러 개의 단백질 띠가 나타났으며, 이중 14 kDa 부분에서 *Der f 2* 알레르겐으로 생각되는 진한 띠들이 나타났다(Fig. 1A). 다시 2차원 전기영동하였을 때, pI 5.0에서 8.0 사이의 알레르겐으로 분리되어 나타났으며, 이는 1차원 전기영동에서 보였던 띠가 pI 값에 따라 2차원에서 여러 알레르겐들로 분리되어 비슷한 분자량을 갖는 *Der f 2*의 isoallergen들이 분리된 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 1B).

2. IgE Immunoblotting

아토피환자의 혼합혈청을 가지고 2차원 immunoblotting을 시행하였을 때 14 kDa 부분의 단백질 7개가 나타났다. 또한, 25 kDa 부분의 다른 단백질 1개도 관찰되었다. 1차원 SDS-

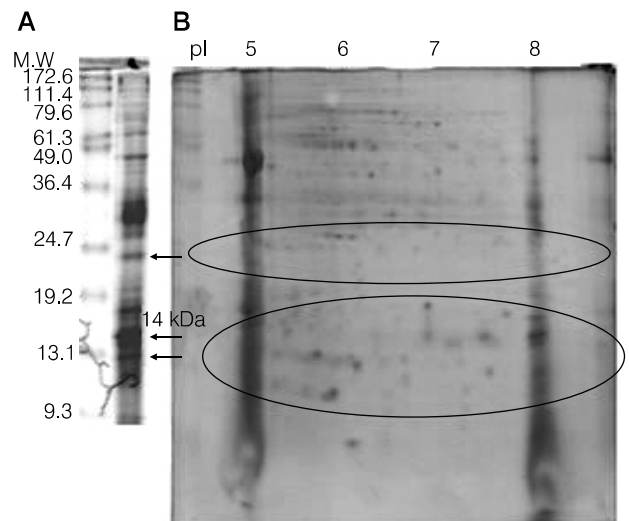


Fig. 1. 1-dimensional (A) & 2-dimensional (B) SDS-PAGE with *D. farinae*. *D. farinae* extracts and protein marker were separated by 1-D 13.5% SDS-PAGE and visualized by Coomassie Brilliant R250 (A). *D. farinae* extracts were separated on the IPG pH 5-8 strip and separated under 13.5% separation gel. Allergen isoforms were visualized by Coomassie Brilliant R250 (B).

PAGE gel에서 나타났던 진한 띠가 2차원 immunoblotting 상에서는 각각 알레르겐으로 분리되었으며 IgE binding을 나타냈다(Fig. 2). 아토피피부염 및 천식환자 각각 5명씩 총 10명의

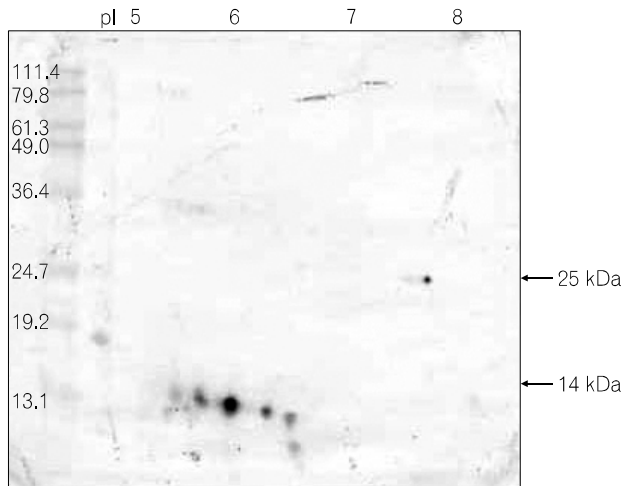


Fig. 2. 2-dimensional immunoblot with pooled serum with *D. farinae*. *D. farinae* extracts were separated by 2-D electrophoresis, blotted onto nitrocellulose and incubated with pooled serum from mite allergic patients. Bound IgE antibodies were detected with alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE and visualized by nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate.

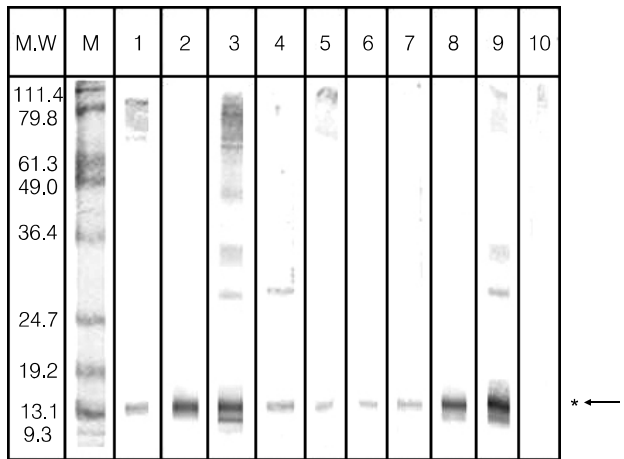


Fig. 3. 1-dimensional IgE immunoblotting analysis to *Dermatophagoides farinae*. Western blotting using patient sera after SDS-PAGE separation of *D. farinae* mite crude extract. *D. farinae* mite extracts and protein marker were separated under 13.5% separation gel. Sera were obtained from 5 bronchial asthmatic (lane 1~5) and 5 atopic dermatitis (lane 6~10) patients sensitized with *D. farinae*. Bound IgE antibodies were detected with alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE. Immunoblots were visualized by nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate. *Arrow indicates *Der f 2* allergen at molecular weight of 14 kDa.

개별 혈청으로 1차원 immunoblotting을 시행하였다. 천식 환자군과 아토피피부염 환자군 모두 *D. farinae*의 group 2의 14 kDa 부근의 띠가 강하게 나타났으며 그 밖에 다른 띠를 보인 경우도 있었다(Fig. 3). Blotting 양상에서 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다.

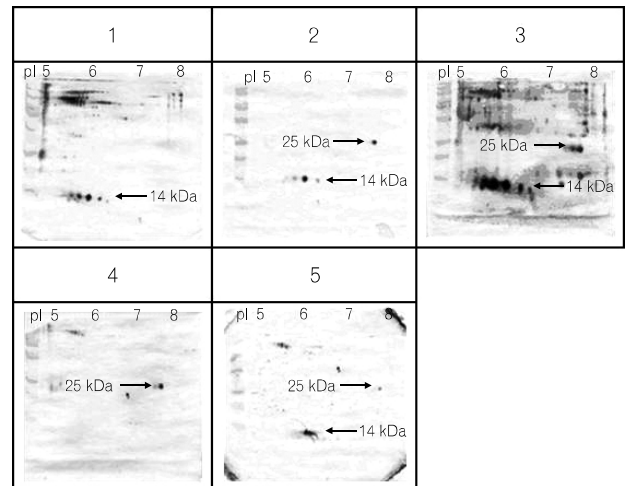


Fig. 4. 2-dimensional IgE immunoblot analysis in bronchial asthma patient group. *D. farinae* extracts were separated by 2-dimensional SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with sera from bronchial asthmatic patients with reactivity to *D. farinae*. Bound IgE antibodies were detected with alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE and visualized by nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate.

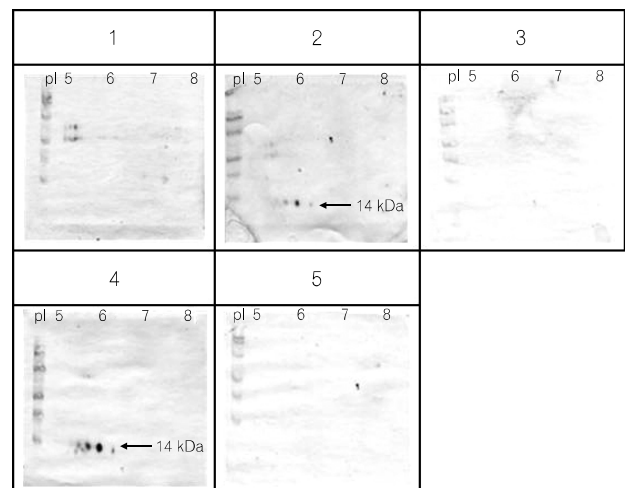


Fig. 5. 2-dimensional IgE immunoblot analysis in atopic dermatitis patient group. *D. farinae* extracts were separated by 2-dimensional SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membranes and incubated with sera from atopic dermatitis patients with reactivity to *D. farinae*. Bound IgE antibodies were detected with alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE and visualized by nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate.

2차원 immunoblotting을 시행하였을 때 10명의 환자 중 천식 환자군에서 4명(Fig. 4), 아토피피부염 환자군에서 2명(Fig. 5), 총 6명의 환자에서 14 kDa 부위의 알레르겐이 관찰되었고 이는 *Der f 2* 알레르겐으로 생각되었다.¹²⁾ 환자마다 14 kDa의 각 알레르겐의 blotting 양상에는 차이가 없고 모두 한꺼번에 IgE에 결합되어서 이 결과에서는 *Der f 2* isoallergen 간의 IgE 결합의 유의한 차이가 없었다. 25 kDa의 알레르겐에 대해서는 천식 환자군에서는 4명에서 특이 IgE가 검출되었지만 아토피피부염 환자군에서는 검출되지 않았다.

3. N-말단 아미노산 서열 분석 및 단백질 규명

D. farinae 알레르겐을 2차원 전기영동 후 PVDF 막에 전기이동시켜 Coomassie Brilliant R250 염색한 알레르겐 중에서 14 kDa의 두 알레르겐과 25 kDa의 한 알레르겐에 대한 N-말단 아미노산 서열 분석 결과, 14 kDa의 두 알레르겐은 시료 양이 많지 않아 분석이 되지 않았으며 25 kDa 부분은 GRKF-FVGNGKMNNG의 N-말단 아미노산 서열을 가진 것으로 분석되었다. 이 서열을 이용하여 NCBI의 The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) database에서 유사한 단백질을 검색하였을 때, triosephosphate isomerase에 가장 가까웠으며, 알려진 131개의 *D. farinae*의 단백질 중에는 의미있게 유사한 단백질이 없었다.

고 찰

천식과 아토피피부염은 모두 집먼지진드기 특이 IgE와 연관되어 일어날 수 있지만, 같은 IgE 매개 과민성을 가지더라도 왜 각각 다른 기관에서 병변을 일으키는 지에 대해서는 알려진 바가 부족하다. 최근 집먼지진드기의 알레르겐들은 아미노산 서열의 변화양상에 따라 항원 결정기의 3차원 구조가 다른 여러 isoallergen을 가지고 있으며 이들은 IgE 결합이나 T cell 반응에서 차이를 가지고 있음이 알려져 있다.^{8,9,13-16)} Park 등에 따르면, *Der p 2*의 cDNA에 7개의 다른 isoform이 존재하고 9군데의 변형 가능한 아미노산이 있으며, 환자마다 isoallergen에 감작되어 있는 정도와 isoallergen에 따라 생성되는 특이 IgE에 차이가 있음이 나타났다.⁹⁾ 본 연구에서는 천식과 아토피피부염 환자에서 집먼지진드기 특이 IgE 결합 양상에 차이가 관찰되는지 조사하기 위해, *D. farinae* 조항원 추출물에 대해 1차원 및 2차원 전기영동을 시행한 후, 두 환자 군의 혈청을 이용하여 immunoblot을 실시하였다. 1차원 immunoblot에서는 기존 연구 결과들과 같이, 14 kDa의 알레르겐이 공통적으로 나타났으며, 그 밖에 개인에 따라 다른 분자량의 알레르겐이 나타났다. 이런 알레르겐은 group 2를 제외한 다른 group의 알레르겐으로 생각된다. 이는 환자

마다 감작되어 있는 집먼지진드기 알레르겐에 차이가 있음을 시사하지만, 천식 환자군과 아토피피부염 환자군을 비교하였을 때 유의한 차이는 없었다. 2차원 전기영동에서는 1차원에서 구분되지 않던 띠들이 다른 알레르겐으로 구분되었으며, 2차원 IgE immunoblotting에서 각 알레르겐들이 IgE 결합능력이 있음이 밝혀졌다. 특히 이번 실험에서 나타난 pI 5.5~6.5 범위의 14 kDa의 7개의 알레르겐들은 *Der f 2*의 isoallergen들로 추정된다.¹¹⁾ Jeong 등에 따르면, 한국의 *Der f 2*의 cDNA에는 7개의 다른 isoform들이 있고, 한국 *Der f 2*의 주요 isoform의 형태는 특히 100번째 아미노산의 리신에서 글루탐산으로의 변형에서 비롯되어 서로 다른 allergenicity와 항체 결합 정도를 나타내는 것으로 밝혀졌다.¹⁷⁾ 본 연구에서 *Der f 2*는 7개의 isoform으로 분리될 수 있음이 확인되었고 이들의 IgE 결합 양상은 각 환자마다 다르게 나타날 수 있음이 확인되었다. 또한, Coomassie Brilliant 염색과 2차원 immunoblot에서 나타난 7개의 isoallergen의 크기와 농도가 다르게 나타나 isoform 간의 IgE 결합 양상과 결합 정도의 차이가 있음을 시사했다. 알레르겐의 IgE 결합은 2차원 immunoblot 결과에서는 천식 환자군에서 좀 더 강하게 나타나는 경향을 보이긴 했으나 이것만으로 질병 군을 구분하는 것은 어려웠다. 그리고 25 kDa 부근의 알레르겐은 전체 10명의 환자 중 4명의 천식 환자에게서만 나타났다. 따라서 이번 연구에 의하면 천식과 아토피피부염 환자에서 2차원 immunoblot으로는 IgE 결합 양상에는 전체적으로 분명한 구별이 어렵긴 하지만, 천식 환자군에게서 25 kDa 부근의 알레르겐이 보이는 것으로 나타났다. 하지만 환자마다 IgE 결합 양상에 차이가 있었고, 연구 대상군이 10명으로 작았기 때문에 이런 결론은 추후 심화연구를 통해 확인될 필요성이 있다.

Weghofer 등에 따르면, *D. pteromyssinus* 알레르겐의 2차원 immunoblot 결과 이미 알려진 알레르겐 외에도 14~15 kDa의 산성 pI 부근과 20~75 kDa의 pI 4.5~9.0 사이에 IgE 결합 부위가 있음이 확인되었다.¹⁸⁾ 본 연구에서 또 혼합 혈청과 천식 환자군의 immunoblot에서 나타난 25 kDa, pI 7.8의 알레르겐은 triosephosphate isomerase (TPI)에 가장 유사하였으나, 기존에 등록된 *D. farinae*의 131개의 단백질 중에는 일치하는 것이 없었다. TPI는 *H. vulgare*에서 밀 알레르겐으로 보고 된 적 있으나,¹⁹⁾ 집먼지진드기에서는 알레르겐으로서의 역할은 알려져 있지 않다. TPI의 isoform 형태가 집먼지진드기에도 존재할 것으로 생각되며 본 실험 결과에 따르면 알레르기 환자에서 IgE와 결합함이 밝혀졌다. 이는 *D. pteromyssinus*에서 뿐만 아니라 *D. farinae*에서도 알려지지 않은 알레르겐이 존재하며, 본 실험에서 밝혀진 TPI로 추정되는 단백질도 그 중 하나로 생각된다. 그리고 이번 실험 결과에 따르면 TPI로 추정되는

알레르겐이 천식환자와 아토피환자군 10명 중 천식 환자 4명에서만 나타나, TPI가 천식 유발에 관련이 있을 것으로 추정된다. 그러나 이번 연구는 14개의 N-말단 아미노산 서열만을 분석한 결과이고, 연구 대상군 크기가 작다는 점에서 이런 추정은 한계점을 가진다. 따라서 이번 실험에서 나타난 25 kDa 단백질이 알레르겐으로 작용하며 천식 발생과 연관이 있는 지 여부를 규명하기 위해 단백질체 분석학적 접근이나 집먼지 진드기의 cDNA를 이용한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서 *D. farinae* 조항원 추출물로 시행한 2차원 IgE immunoblotting에서 천식 환자 5명 중 4명과 아토피피부염 환자 5명 중 2명에서 pI 5.5에서 6.5 사이의 14 kDa에서 7개의 알레르겐이 관찰되었으며, 이는 *Der f 2* 알레르겐의 isoallergen으로 생각되었다. 또한 천식 환자군 5명 중 4명에서 pI 7.8의 25 kDa 부근에서 IgE 결합 알레르겐이 나타났으나 아토피피부염 환자군에서는 나타나지 않았으며, 이 알레르겐을 N-말단 아미노산 서열 분석을 하였을 때 triosephosphate isomerase로 추정되었다. 이는 천식 발생과 연관되었을 가능성이 있어 향후 이에 대한 심화 연구가 필요하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TA. Mite faeces are a major source of house dust mite allergens. *Nature* 1981;289:592-3
- 2) Platts-Mills TA, Chapman MD. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:755-75
- 3) Hong CS, Kim K-E: Bronchial asthma, the Korean academy of asthma, allergy and clinical immunology: asthma and allergic diseases. 1st ed. p 237-256, Koonja Publishing Inc., Seoul, 2002
- 4) Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:1-18
- 5) Lind P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:753-61
- 6) van der Zee JS, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Skin tests and histamine release with P1-depleted *Dermatophagoides pteronyssinus* body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:884-96
- 7) Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TA. Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der f II* and *Der p II*) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *Allergy Clin Immunol* 1989;83:1055-67
- 8) Hales BJ, Hazell LA, Smith W, Thomas WR. Genetic variation of *Der p 2* allergens: effects on T cell responses and immunoglobulin E binding. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1461-7
- 9) Park JW, Kim KS, Jin HS, Kim CW, Kang DB, Choi SY, et al. *Der p 2* isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1042-7
- 10) Nishiyama C, Yuuki T, Usui Y, Iwamoto N, Okumura Y, Okudaira H. Effects of amino acid variations in recombinant *Der f II* on its human IgE and mouse IgG recognition. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:62-9
- 11) Chua KY, Huang CH, Shen HD, Thomas WR. Analysis of sequence polymorphism of a major mite allergen, *Der p 2*. *Clin Exp Allergy* 1996;26:829-37
- 12) Mao JL, Mayer CE, Peltre G, Desvaux, David B, Weyer A, et al. Mapping of *Dermatophagoides farinae* mite allergens by two-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:631-6
- 13) van Ree R. Isoallergens: aclinically relevant phenomenon or just a product of cloning? *Clin Exp Allergy* 2002;32:975-8
- 14) O'Hehir RE, Verhoef A, Panagiotopoulou E, Keswani S, Hayball JD, Thomas WR, et al. Analysis of human T cell responses to the group II allergen of *Dermatophagoides* species: localization of major antigenic sites. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:105-13.
- 15) O'Brien RM, Thomas WR, Nicholson I, Lamb JR, Tait BD. An immunogenetic analysis of the T-cell recognition of the major house dust mite allergen *Der p 2*: identification of high- and low-responder HLA-DQ alleles and localization of T-cell epitopes. *Immunology* 1995;86:176-82
- 16) Takai T, Akagawa-Chihara M, Yokota T, Okumura Y. Reactivities of mutants of a major house dust mite allergen *Der f 2* to mouse anti-*Der f 2* monoclonal antibodies analyzed by immunoblotting. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:694-7
- 17) Jeong KY, Jin HS, Oh SH, Hong CS, Lee IY, Ree HI, et al. Monoclonal antibodies to recombinant *Der f 2* and development of a two-site ELISA sensitive to major *Der f 2* isoallergen in Korea. *Allergy* 2002;57:29-34
- 18) Weghofer M, Thomas WR, Pittner G, Horak F, Valenta R, Vrtala S. Comparison of purified *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1384-91
- 19) Sander I, Flagge A, Merget R, Halder TM, Meyer HE, Baur X. Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:907-13