

아토피피부염 환자에서 난백에 대한 IgG western blotting 분석

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과학교실
신미용 · 이광신 · 손대열 · 남승연 · 함세창 · 안강모 · 강이석 · 이상일

Egg white-specific IgG western blotting in children with atopic dermatitis

Mee-Yong Shin, Kwang-Shin Lee, Dae-Yul Son, Seung-Yeon Nam,
Se-Chang Ham, Kang-Mo Ahn, I-Seok Kang and Sang-Il Lee
*Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University,
School of Medicine, Seoul, Korea*

Background and objective : Specific IgE to food allergen is associated with atopic dermatitis, but it does not always show good clinical correlation. It has been suggested that IgG may be partly involved in allergen-induced reaction. This study was designed to investigate the clinical significance of specific IgG antibody to egg white (EW) in atopic dermatitis patients who showed improvement with egg elimination diet.

Method : Eleven atopic dermatitis patients who responded to egg elimination diet were selected. They were classified into two groups: group I(n=5) with positive specific IgE to EW and group II(n=6) with normal levels of serum specific IgE. Two volunteers with no allergic diseases were enrolled in the control group. EW-specific IgG western blotting was performed with patient's serum and purified protein extracted from EW.

Results : IgG western blotting to EW in group I showed bands at 51.8 kD in two patients and bands at 35 kD in the others. In group II, two showed bands at 51.8 kD, and diffuse bands at 35 kD~51.8 kD were found in four patients. There were no bands in the control group.

Conclusion : Regardless of the presence of specific IgE, specific IgG to EW was detected by western blotting in patients with egg-associated atopic dermatitis, suggesting that specific IgG may play a role in the pathogenesis of atopic dermatitis. (J Asthma Allergy Clin Immunol 20: 627-632, 2000)

Key words : IgG, western blotting, egg white, atopic dermatitis

본 연구는 성균관대학교 의과대학의 연구비 지원을 받아서 이루어졌음.

통신저자 : 성균관대 삼성서울병원 소아과 이상일

서울시 강남구 일원동 50 (우 135-710)

e-mail : silee@smc.samsung.co.kr

접수 : 2000년 5월 9일, 통과 : 2000년 7월 19일

서 론

아토피피부염에서 식품 항원은 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 피부염의 시작은 흔히 음식물의 섭취와 관련되어 나타난다. 우리나라에서는 계란, 우유 등이 아토피피부염과 관련된 주요 원인 항원이며 특히 2세 미만의 소아에서는 난백이 혈청 특이 IgE 검사상 가장 흔한 원인 항원으로 알려져 있다¹⁾. 아토피피부염의 원인이 되는 식품 항원을 찾아내기 위해서는 병력상 의심이 되는 식품에 대해 제거식을 시행하여 피부염의 호전 유무를 관찰함으로써 가능하지만 가장 진단적 의의가 있는 검사는 이중맹검유발검사이다. 이중맹검유발검사는 식품 알레르기에 관한 한 결과의 신뢰도가 높기는 하지만 검사 방법이 간단하지 않고 아나필락시스 등의 부작용이 나타날 위험성이 있다. 따라서 소아 아토피피부염 환자에서 원인 식품 항원을 찾아내는 데는 주로 병력 청취와 혈청 특이 IgE 검사가 이용되고 있다²⁾. 혈청 특이 IgE 검사도 특이성은 높으나 민감성이 낮아서 병력상 특정 식품에 의해 증상이 악화되거나 제거식에 의해 호전을 보인 경우에도 혈청 특이 IgE 검사에서는 정상으로 나타나는 경우가 많기 때문에 원인이 되는 식품 항원을 증명하는 데는 어려움이 있다.

아토피피부염이 식품 항원에 의해 유발되는 기전은 아직 확실하지 않으나 IgE에 의하여 매개된다는 설 이외에, 최근 IgG가 아토피 피부염을 포함한 알레르기 질환의 병인에 관여한다는 주장도 제기되고 있다. 이같은 주장은 알레르기 피부시험 및 특이 IgE 검사상 가장 높은 비율을 차지하는 원인 항원으로 알려진 난백을 비롯한 식품에 대한 IgG 항체가가 비아토피 환자보다 아토피 환자에서 높다는 사실에서 뒷받침되고 있다³⁾.

이에 본 연구에서는 병력상 계란과 관계가 있는 아토피피부염 환자에서 난백에 대한 IgG western blotting을 시행하여 이것을 혈청 난백 특이 IgE 검사 결과와 비교함으로써, 아토피피

부염 환자에서 IgG western blotting의 진단적 의의를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

계란에 의해 피부염의 증상이 악화되거나 계란 제거 식이에 의해 호전된 병력을 가진 아토피피부염 환자 11명을 대상으로 하였다. 이 중 난백에 대한 혈청 특이 IgE (Pharmacia CAP) 검사상 양성(>0.70 U/mL)을 보인 5명은 I군으로 하고, 음성(< 0.70 U/mL)을 보인 6명을 II군으로 하여 두 군을 비교하였다. 평균 나이는 I군이 26.2±15.5 개월, II군이 32±7.1 개월이었고 혈청 총 IgE의 평균치는 I군이 471.2±147.5 U/mL, II군이 83.9±75.7 U/mL로서 두 군간에 차이를 보였다(Table 1). 대조군은 알레르기 질환의 병력이 없으며 계란에 대한 피부단자시험이 음성인 성인 2명으로 하였다. 대조군에서는 혈청 난백 특이 IgE 검사와 혈청 총 IgE 검사를 시행하지 않았다.

2. 방 법

1) 난백 단백 분리 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)

계란에서 직접 난백 항원을 분리한 다음에 0.5N H₂SO₄로 pH 3.5에서 고정한 후 동량의 10% trichloroacetic acid를 첨가한 뒤 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리 후 상층액을 증류수로 중성화 회석하여 동결 건조시켰다. SDS-PAGE에는 12.5% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였다. 난백 단백 추출물을 dithiothreitol이 포함된 sample buffer와 섞어 5분 동안 100°C로 가열 처리한 후 0.5cm당 20μg으로 loading하고 100V에서 45분 동안 전기영동을 시행하였다. 이를 commassi blue로 염색하여 항원 성분의 분자량을 확인하였다.

2) IgG western blotting

SDS-PAGE(0.5cm당 10 μ g)상에서 분리된 단백질을 Nitrocellulose membrane으로 100V에서 90분 동안 이동시킨 후 nitrocellulose membrane을 5% skim milk로 상온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 1:10000으로 희석한 환자의 혈청을 18시간동안 상온에서 반응시킨 뒤 TTBS 용액으로 3회 세척하였다. 1:10000으로 희석한 anti-human IgG(Amersham)로 1시간 동안 반응시킨 뒤 3번 세척한 후 1:10000으로 희석한 ECL kit(Amersham)를 1분 동안 반응시킨 뒤 발색 반응을 확인하였다.

결 과

1. SDS-PAGE 분석

난백 SDS-PAGE 분석상 45kD 부위에서 나타나는 굵은 단백질 분획이 ovalbumin, 35kD 부위에서 약하게 나타나는 단백질 분획이 ovomucoid로 생각되는 단백질이고 77kD에서 얇고 선명한 띠로 관찰되는 것이 ovotransferrin으로 추정되는 단백질로서 이들은 lysozyme과 함께 난백을 구성하는 주요 항원들이다(Fig. 1).

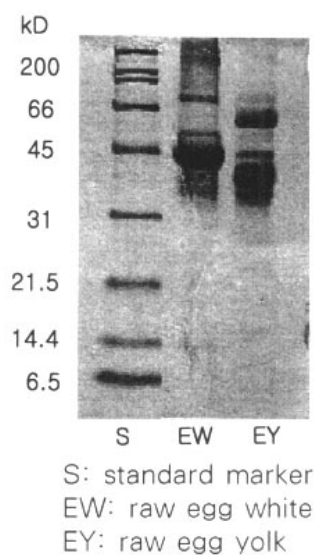


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of raw egg

2. 난백에 대한 IgG western blotting

계란에 의해 증상이 나타나거나 계란 제거 식이에 의해 증상이 호전된 병력을 가진 대상 환자 11명 중 난백에 대한 혈청 특이 IgE 검사상 양성을 보인 I군과 음성을 보인 II군 모두에서 난백에 대한 IgG western blotting 검사상 난백

Table 1. Clinical details of subjects included in this study

	Patient	Sex	Age(mo)	Total IgE(U/mL)	EW*-specific IgE(U/mL)
Group I	1	M	38	457	0.88
	2	M	30	595	7.77
	3	M	43	572	1.21
	4	M	11	226	3.62
	5	F	9	506	14.3
Mean $\pm$ SD			26.2 $\pm$ 15.5	471.2 $\pm$ 147.5	5.5 $\pm$ 5.6
Group II	6	F	34	103	0.00
	7	F	21	26.8	0.00
	8	M	36	208	0.00
	9	F	29	29.8	0.00
	10	M	30	124	0.00
	11	F	42	12.3	0.00
Mean $\pm$ SD			32 $\pm$ 7.1	83.9 $\pm$ 57.5	0.00

EW* : Egg white

항원에 대한 단백질이 관찰되었다. I 군 중 2명은 ovalbumin으로 추정되는 단백질이 분자량 51.8kD 부위에서 확인되었으며(patient 1, 4). 3명은 ovomucoid로 추정되는 단백질이 분자량 35kD 부위에서 확인되었다(patient 2, 3, 5). 난백에 대한 혈청 특이 IgE 검사상 음성을 보였던 II 군에서도 2명은 분자량 51.8kD 부위에서 단백질이 확인되었고(patient 6, 9). 나머지 4명은 분자량 35kD에서 51.8kD를 거치는 넓은 단백질이 관찰되었다(patient 7, 8, 10, 11). 반면에 아토피피부염을 포함한 알레르기 질환의 과거력이 없는 대조군에서는 난백에 대한 IgG western blotting 검사에서 단백질이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

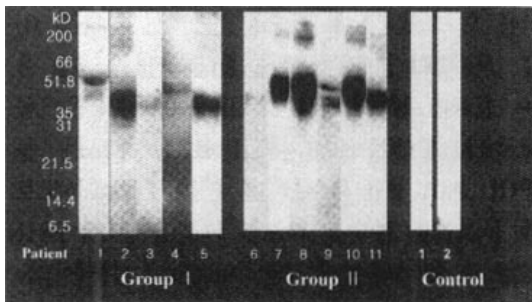


Fig. 2. Results of EW-specific IgG western blotting. EW: Egg white

고 찰

식품 항원은 아토피피부염의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 진단적 의의가 높은 이중맹검유발검사는 시행하기 용이하지 않아 병력상 의심되는 식품은 피부단자시험이나 항원 특이 IgE검사를 시행하고 있다. 그러나 피부단자시험은 영유아에서는 시행하기가 쉽지 않고 피부염이 심한 경우에는 시행이 불가능하다는 단점이 있으며¹⁾, 혈청 항원 특이 IgE 검사 또한 특이도는 높은 반면에 예민도가 낮아서 특정 식품에 의해 아토피피부염의 증상이 나타나거나 제거식에 의해 호전된 병력이 있는 경우에도 혈청 특이 IgE 검사에서는 정상으로 나타나는 경

우가 많다.

Rowntree 등⁵⁾은 부모중 한명이 아토피가 있는 92명의 환아를 대상으로 RAST를 통해 식품과 흡입 항원에 대한 IgE 항체가를 측정하고 anti- gen binding radioimmunoassay로 식품 특이 IgG 항체가를 측정하여 비교하였다. 이 연구에서 난백 특이 IgE 항체는 생후 12개월경에 약 30%에서 존재하였고 이 시기에 최고치를 나타내었으며 2세경에 대부분 나타나서 2세 이후 농도가 감소하는 양상을 보인 반면에, 식품 특이 IgG 항체는 생후 3개월 때 대부분의 환자에서 관찰되었으며 5세때 최고치에 도달한 후 점차 감소하였다. 이처럼 식품에 대한 IgG 항체가 식품이나 흡입 항원에 대한 IgE 항체보다 먼저 출현한다는 보고들이 있고, 특히 난백과 오렌지, 밀과 쌀의 혼합물에 대한 초기 IgG 항체의 상승은 가족력상 알레르기 질환의 발생 위험성이 높은 무증상 환자에서 난백과 우유 및 개와 고양이같은 흡입 항원에 의한 IgE 매개성 알레르기 질환의 발생을 예측하는데 도움을 줄 수 있다는 보고도 있다¹¹⁾. IgG의 이러한 관련성 때문에 식품 항원이 아토피피부염을 유발하는 기전으로는 IgE 매개성이라는 설 외에도 IgG, 특히 총 IgG의 4% 정도 차지하고 있는 IgG4가 아토피 피부염을 포함한 알레르기 질환의 발생에 관련한다는 보고가 있으며^{6,8)}, 아마도 이러한 작용은 IgG4가 말초 호염구를 자극하여 히스타민의 분비를 유도함으로써 이루어지는 것 같다¹¹⁾. 다른 보고에 의하면 식품 항원에 대한 IgG 중에서도 IgG4 보다는 항원 특이 항체의 대부분을 차지하는 IgG1 항체가의 상승이 집먼지진드기에 대한 IgE 항체의 생성을 예측하는데 더 유용하다고 하였다¹²⁾. 반면, IgG4가 오히려 IgE 매개성 수동 피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis)를 차단하기도 하고¹³⁾, IgG4 항체가 존재하더라도 IgE 항체가 없는 경우에는 대부분 피부 반응 검사에 음성이고 무증상인 것으로 나타났다는 보고도 있으며¹⁴⁾, 면역치료 후 임상 증상의 호전과

함께 IgG4가 증가하면서 IgE에 의한 감작 반응을 억제하는 것으로 알려져 있어서^{12,13} 실제 아토피 피부염에서 IgG4의 역할에 관해서는 아직 논란의 여지가 많은 것으로 생각된다.

난백은 난황보다 항원성이 강하고 피부시험, 혈청 특이 IgE 검사 및 이중맹검유발시험에서 아토피피부염의 원인이 되는 주요 식품 항원으로 알려져 있다^{11,15}. 난백은 약 20종의 당단백으로 구성되어 있고 이중 ovalbumin, ovomucoid, ovotransferrin, lysozyme이 4가지 주요 항원으로 알려져 있으며 ovalbumin이 약 50%를 차지하고 있다. Ovomucoid는 약 10% 정도 차지하고 있지만 난백 알레르기를 일으키는 주요 원인 항원으로 알려져 있다¹⁶. 실제로 난백에 대한 IgG 항체는 난백에 노출된 경우에는 모두에서 존재할 수 있다. 하지만 Sampson¹⁷에 따르면 난백에 알레르기가 있는 환자에서는 변성되지 않은(native) ovomucoid와 열처리를 통해 변성된(denatured) ovomucoid 모두에 대한 IgG 항체가 존재하지만, 난백에 알레르기가 없는 환자나 알레르기 질환이 없는 대조군에서는 변성이 안된 ovomucoid에 대한 IgG항체는 존재하는 반면에 변성된 ovomucoid에 대한 IgG항체는 존재하지 않다고 보고하였고, 이러한 차이는 두 그룹간의 식품에 대한 항원 처리 과정의 정성적 차이에 의한 것으로 추정하였다. Sampson의 이러한 보고는 변성된 식품 항원에 대한 IgG western blotting이 아토피피부염 환자의 원인적 진단에 이용될 수 있음을 추측할 수 있게 하였다. 본 연구에서는 시판되고 있는 난백 항원을 이용하는 대신에 직접 계란으로부터 추출한 난백 항원을 이용하였으며 난백 항원을 끓는 물에 넣어 변성시키는 과정을 거친 후 IgG western blotting을 시행하였다. 계란 섭취에 의해 증상이 나타나거나 계란 제거식에 의해 증상이 호전된 병력을 가진 아토피피부염 환자의 경우에는 난백 특이 IgE 검사상 음성을 보인 경우(II군)에도 난백에 대한 IgG western blotting검사에서 단백띠가 확

인된 반면에, 알레르기 질환의 병력이 없는 대조군에서는 단백띠가 관찰되지 않았다. 이것은 식품 항원에 대한 IgG western blotting이 아토피 피부염 환자에서 원인 항원을 확인하고 찾아내는데 유용한 방법의 하나로 이용될 수있음을 시사한다고 하겠다.

본 연구에서는 대상 환자 및 대조군의 수가 적었기 때문에 좀더 많은 수의 환아를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각되며, IgG 중에서도 IgG4가 알레르기 질환의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 앞으로 IgG4 western blotting을 시행하여 비교해 본다면 도움이 될 것이다.

결 론

계란 제거식에 의해 증상이 호전되었던 병력을 가진 아토피피부염 환자에서는 난백 특이 IgE 증가 유무와 관계없이 IgG western blotting상 난백 항원에 대한 단백띠를 관찰할 수 있었던 반면, 비아토피성 대조군에서는 단백띠가 관찰되지 않았다. 따라서 IgG western blotting이 아토피피부염 환자에서 원인이 되는 식품 항원을 찾아내는데 유용한 방법의 하나로 이용될 수 있다고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) 김정희, 정세우, 임대현, 손병관, 손진아, 이상일 등 : 소아 아토피성 피부염의 식품, 집먼지진드기 항원 연관성, 알레르기 17: 165-70, 1997
- 2) Leung DY, Hanifin JM, Charlesworth EN, Li JT, Bernstein IL, Berger WE et al : Disease management of atopic dermatitis: a practice parameter. Ann Allergy Asthma Immunol 79: 197-211, 1997
- 3) Eysink PE, De Jong MH, Bindels PJ, Scharp-Van Der Linden VT, De Groot CJ, Stapel SO et al : Relation between IgG antibodies to foods and IgE anti-

- bodies to milk, egg, cat, dog and/or mite in a cross-sectional study. Clin Exp Allergy 29: 604-10, 1999
- 4) Pastorello EA: Skin tests for diagnosis of IgE-mediated allergy. Allergy 48: s57-62, 1993
- 5) Rowntree S, Cogswell JJ, Platts-Mills TA, Mitchell EB : Development of IgE and IgG antibodies to food and inhalant allergens in children at risk of allergic disease. Arch Dis Child 60: 727-35, 1985
- 6) Aalbers RC, van der Gaag R, van Leeuwen J: Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. J Immunol 130: 722-6, 1983
- 7) Merrett J, Barnetson RS, Burr ML, Merrett TG : Total and specific IgG4 antibody levels in atopic eczema. Clin Exp Immunol 56: 645-52, 1984
- 8) Calkhoven PG, Aalbers M, Kashte VL, Schilte PP, Yntema JL, Griffioen RW et al : Relationship between IgG1 and IgG4 antibodies to foods and the development of IgE antibodies to inhalant allergens II. Increased levels of IgG antibodies to foods in children who subsequently develop IgE antibodies to inhalant allergens. Clin Exp Allergy 21: 99-107, 1991
- 9) Fagan DL, Slaughter CA, Capra JD, Sullivan TS : Monoclonal antibodies to immunoglobulin G4 induce histamine release from human basophils in vitro. J Allergy Clin Immunol 70: 388-404, 1982
- 10) Van Toorenenbergen AW, Aalberse RC : Allergen-specific IgE and IgG4 antibody levels in sera and the capacity of these sera to sensitize basophil leucocytes in vitro. Clin Allergy 12: 451-8, 1982
- 11) Stanworth DR, Smith AK : Inhibitions of reagin-mediated PCA reactions in baboons by the human IgG4 subclass. Clin Allergy 3: 37-41, 1973
- 12) Tasi LC, Tang RB, Hung MW, Chang ZN : Changes in the levels of house dust mite-specific IgG4 during immunotherapy in asthmatic children. Clin Exp Allergy 21: 367-72, 1991
- 13) Gurka G, Rockline R : Immunologic response during allergen-specific immunotherapy for respiratory allergy. Ann Allergy 61: 239-45, 1988
- 14) Sampson HA, Mccaskill CC : Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. J Pediatr 107: 669-75, 1985
- 15) Bock SA, Atkins FM : Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. J Pediatr 117: 561-7, 1990
- 16) Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K et al : Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. J Allergy Clin Immunol 100: 171-6, 1997
- 17) Sampson HA : Legumes, eggs, and milk. Allergy 53(suppl 46): 38-43, 1998