Tumor Necrosis Factor 유전자 다형성을 이용한 한국인 알레르기비염환자에서의 감수성에 대한 연구

원광대학교 의과대학 이비인후과교실,[1] 해부학교실,[2] 면역질환 유전체연구센터[3]
이재훈[1] · 최태욱[1] · 이정헌[1] · 정하민[1] · 민정열[2,3] · 김정중[2,3]

A Study of Susceptibility between Allergic Rhinitis and Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphism Study in Korean

Jae Hoon Lee, MD[1], Tae Wook Choi, MD[1], Jung Hun Lee, MD[1], Ha Min Jeong, MD[1], Jung Youl Min, MS[2,3] and Jeong Joong Kim, PhD[2,3]

[1]Department of Otolaryngology, [2]Anatomy and [3]Genomic Research Center for Immune Disorder, Institute of Wonkwang Medical Science, College of medicine, Wonkwang University, School of medicine, Iksan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Tumor necrosis factor-α (TNF-α) is recognized as a proinflammatory host alert cytokine that is synthesized early during inflammation, and elevations of this cytokine have been reported in patients with allergic rhinitis. The TNF-α gene is located on chromosome 6p within the class III region of the major histocompatibility complex. The most widely studied polymorphism within the TNF-α gene involves a guanine (G)/adenine (A) substitution at position −308. We therefore tested whether TNF-α −308G/A polymorphism are associated with allergic rhinitis in a Korean population. **Subjects and Method** : Blood samples for genetic analysis were obtained from 191 individuals with allergic rhinitis and from 192 healthy subjects without atopic diseases. Polymerase chain reaction-based assay for TNF-α −308G/A was used for genotyping. Serum total IgE levels were determined by using the immunoassay. Eosinophil values were determined by eosinophil numbers per total cell numbers per μl. **Results** : There were no differences in the frequencies of the genotypes and alleles of TNF-α −308G/A in the controls and patients ($p>0.05$). Blood eosinophil count and total serum IgE levels were not statistically different in the genotypes of TNF-α −308G/A in allergic rhinitis ($p>0.05$). **Conclusion** : We thought that the TNF-α −308G/A polymorphism is unlikely to be an important marker for predisposition to allergic rhinitis. A further study involving a larger Korean population might be in need. **(Korean J Otolaryngol 2005;48:1107-10)**

KEY WORDS : Tumor necrosis factor-alpha · Allergic rhinitis · Korean · Polymorphism.

서 론

알레르기비염을 비롯한 아토피성 질환들은 염증 매개체와 사이토카인의 분비로 인해 야기되는 염증반응으로 알려져 있다. Tumor necrosis factor(TNF) - α는 알레르기 염증반응에서 조기에 합성되는 전염증 사이토카인으로 알레르기비염환자에서 증가되고,[1)] 동물실험에서 알레르기 항원 감작 후 혈청 TNF - α 단백질이 증가된다.[2)] IgE에 의해 매개된 알레르기 반응 동안 TNF - α는 비만세포와 대식세포에서 분비되어 세포접착분자의 발현을 증가시키고, 알레르기 항원에 대응하여 백혈구를 표적장기로의 이동을 촉진하고, eotaxin의 발현을 증가시키고, IL - 5 분비를 증가시킨다.[3)] TNF - α 유전자는 6번 염색체의 major histocompatibility complex(MHC)의 class III내에 위치하고 있으며, Wilson 등[4)]에 의해 TNF - α 유전자 염기서열의 promoter - 308 위치에서 guanine에서 adenine(- 308G/A)으로 치환되는 유전자 다형성이 처음 보고 되었다. TNF - α - 308G/A 유전자 다형성은 TNF - α의 전사활동이 증가되어 TNF - α의 생성이 증가됨에 따라 알레르기 반응이 촉진되며,[5)] B cell line의 실험에서도 TNF - α 308A 대립인자는 308G 대립인자보다 전사활동이 증가된다.[6)]

TNF - α - 308G/A 유전자 다형성은 주로 천식환자[7 - 16)]

논문접수일 : 2005년 2월 22일 / 심사완료일 : 2005년 5월 23일
교신저자 : 이재훈, 570 - 711 전북 익산시 신용동 344 - 2
원광대학교 의과대학 이비인후과교실
전화 : (063) 850 - 1310 · 전송 : (063) 841 - 6556
E - mail : coolnose@wmc.wonkwang.ac.kr

를 대상으로 하였으며 외국문헌 및 국내문헌을 살펴본 결과 알레르기 질환중 하나인 알레르기비염환자를 대상으로 한 보고는 아직까지 찾아볼 수 없었다. 이에 저자들은 한국인 알레르기비염환자를 대상으로 TNF-α -308G/A 유전자 다형성과의 감수성여부를 알아보고자 하였다. 또한, 한국인 알레르기비염환자의 -308G/A 유전자 다형성 유형에 따라 호산구 수 및 총 혈청 IgE사이의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

실험군은 2003년 10월부터 2004년 5월까지 알레르기비염의 증상으로 본원 이비인후과를 방문하여 피부반응검사에서 알레르기비염으로 확진된 191명을 대상으로 하였다. 대조군은 건강 검진을 위해 본 병원을 방문한 192명을 대상으로 하였고 설문지를 통해 알레르기 질환의 증상들과 피부단자 검사에 음성을 보인 경우로 하였다. 평균 연령은 대조군에서 26.5±9.6세, 실험군에서 25.1±11.3세로 통계학적 차이가 없었으며, 남녀성비는 대조군은 남 : 여=129 : 63, 실험군은 남 : 여=117 : 74으로 통계학적 차이가 없었다.

방 법

TNF 유전자형 분석은 Miller 등[17]의 방법으로 말초 혈액에서 분리된 유핵 세포로 부터 genomic DNA를 추출하기 위하여 유핵 세포를 3% dextran이 들어있는 생리 식염수로 분리하였다. 남아 있는 적혈구는 0.2% 저장식염수를 이용하여 용혈시켜 제거하고 얻어진 백혈구를 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)로 처리한 후 phenol, chloroform 및 isopropanol을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 그리고 다음과 같은 PCR 방법으로 TNF 유전자형을 확인하였다. 백혈구로부터 추출된 genomic DNA를 template로 하였으며, PCR primer(Bioneer, Daejon, Korea)는 forward primer ; 5 '-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', reverse primer ; 5 '-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3 '을 주문제작하여 사용하였다. PCR 반응 혼합물은 genomic DNA 100 ng, primer 각각 0.5 μM씩, dNTP 혼합체 150 μM, $MgCl_2$ 1.5 mM, Tris-HCl 20 mM(pH 8.4), Taq polymerase(GENET Bio, Cheonan , Korea) 1.5 unit를 섞어 총 용량을 20 μl로 하였다. PCR 반응은 초기 denaturation 95℃ 5분 반응 후 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초를 35회 반복한 후 마지막 75℃에서 5분간 extension하여 증폭시켰다(MJ Research, USA). 증폭된 PCR 산물은 NcoI(New England Biolab Inc., Beverly, MA, USA) 제한효소로 처리하고 3% agarose gel에서 전기영동시켜 ethidium bromide로 염색하여 제한 절편 양상을 확인하고 최종 유전자형을 확인하였다. 말초 혈액 호산구 수는 μl 당 전체 세포수 중 호산구 수로 측정되었으며, 정상 수치 범위는 40~500개/μl이었다. 혈청 IgE 수치는 electrochemiluminescence immunoassay(E170, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에 의해 측정되었으며 정상 수치 범위는 0~100 IU/ml 이었다.

통계처리

환자군과 대조군의 TNF 유전자 다형성 분포 차이의 평가는 χ^2를 사용하였다. 환자군에서 유전자 다형성 유형에 따른 혈액내 호산구와 총 Ig E 수치는 통계분석에서 정규성을 보이지 못해 비모수 검정인 Mann-Whitney test를 통해 분석하였으며 통계 처리는 SPSS program version 10(SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A.)를 이용하였다.

결 과

TNF-α -308G/A 유전자 다형성 유형

TNFα의 유전자 다형성은 3가지 유형(G/G, G/A, A/A)을 보였다. 동형의 야생(homozygous wild)형 G/G는 PCR 산물인 107 bp DNA가 NcoI 제한효소에 의해 87과 20 bp 분절로 나눠지고, 이형(heterozygote)형인 G/A의 DNA는 107, 87, 그리고 20 bp의 분절을 보였다(Fig. 1).

TNF-α -308G/A 유전자 다형성 유형 분포

환자군에서 TNF-α 유전자형은 G/G형이 83.25%, G/A

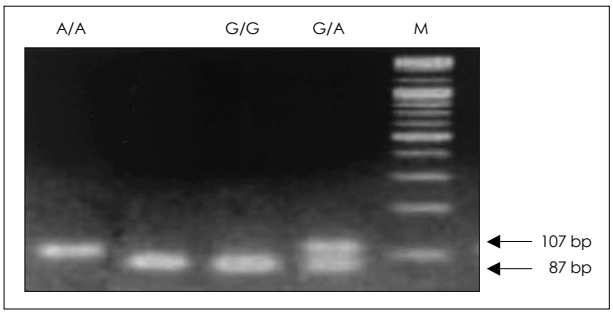

Fig. 1. Genotyping of TNF-α -308G/A polymorphism. Lane M, 100bp ladder ; Lane G/G, homozygous wild type ; Lane G/A, heterozygotes Lane A/A, homozygote mutant type. The amplified alleles were analyzed on 3.0% agarose gel. The alleles were visualized by ethidium bromide staining. NcoI digests the 107bp DNA segment from G/G homozygous individuals into 87 and 20 bp fragments. DNA from G/A heterozygous individuals shows the expected fragments at 107, 87, and 20bp (20 bp : invisible in this figure).

Table 1. Distribution of genotypes and alleles for TNF-α -308G/A polymorphism in allergic rhinitis

	Control (n=192)	Allergic rhinitis (n=191)	p value
Genotypes			
G/G	164 (85.42%)	159 (83.25%)	
G/A	26 (13.54%)	29 (15.18%)	0.80
A/A	2 (1.04%)	3 (1.57%)	
Alleles			
G	354 (92.19%)	347 (90.84%)	0.59
A	30 (7.81%)	35 (9.16%)	

Table 2. Blood eosinophil counts and serum total IgE levels among the genotypes of TNF-α -308G/A polymorphism in allergic rhinitis

Position	Genotypes	Eosinophil (μl) n	p	IgE (IU/ml) n	p
TNF-α -308G/A	G/G	123	0.305	76	0.378
	G/A or A/A	21		11	

Normal value (eosinophil) : 40 - 500/μl, Normal value (IgE) : 0 - 100 IU/ml

형이 15.18%, A/A형이 1.57%였고, 대조군에서는 G/G형이 85.42%, G/A형이 13.54%, A/A형이 1.04%로 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 두 군의 A 대립인자의 비교에서 환자군은 A 대립인자가 9.16%로 대조군의 7.81%에 비해 증가된 소견을 보였으나 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1).

환자군에서 유전자 다형성 유형에 따른 호산구 수와 총 IgE 수치의 비교

환자군의 3명에서만 동형 돌연변이형(A/A)으로 밝혀져 단독적으로 통계처리하기는 어려워 환자군을 야생형(G/G)과 돌연변이형(G/A 혹은 A/A)의 두가지 유전자 다형성 유형으로 나누어 그에 따른 호산구 수와 총 IgE 수치를 비교분석한 결과 유의한 차이가 보이지 않았다(Table 2).

고 찰

알레르기 질환은 유전적인 인자를 포함한 다인자성 질환으로 알려져 있다. 알레르기 질환에 많은 유전자들이 관여할 수 있으며 이러한 유전자들은 다양한 환경적인 요인에 의해 조절될 수 있다. 유전적 인자와 환경적 인자들에 의해 알레르기 질환은 유전적 이질성과 다양한 임상적 특성을 가질 수 있다.

최근 알레르기 질환에서 사이토카인들 중 특히 Th_2 형의 사이토카인에 대한 유전자 다형성에 대한 관심이 많아지고 있다. 그에 대한 이유로 알레르기 질환에서 Th_2 형 사이토카인의 발현 수준이 증가되는 것과 관계되어 있는데 Th_2 형 사이토카인의 유전자 유형에 따라 항원을 비롯한 다양한 환경적인 인자에 의해 사이토카인의 발현 수준이 조절될 수 있기 때문이다. 개인에 따른 사이토카인 유전자 유형에 따라 면역 질환에서의 감수성에 예측 가능할 수도 있다. 이런 관점에서 최근에 알레르기 질환에서 사이토카인 수용체, 접착분자등을 포함한 면역조절물질에 대한 유전자 다형성에 대한 연구들도 왕성하게 이루어지고 있다.

TNF-α는 26 kDa membrane-bound 단백질로 TNF-α 전환효소인 metalloproteinase 유사 효소에 의해 수용성의 17 kDa로 분할된다.[3] TNF-α 전환효소는 ADAM 17로 알려져 있으며 metalloproteinase-3의 tissue inhibitor에 의해 억제된다.[18] TNF-α의 과생성은 크론즈 질환(Crohn 's disease)과 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환을 야기하며, 말라리아, 그람 음성 패혈증과 Jarish Herxheimer 반응에도 관여한다.[3] 항TNF-α 약제의 기전에 따른 치료약제는 TNF-α mRNA 전사억제제(pentoxifylline, phosphodiesterase inhibitors), TNF-α 분비억제제(compound A802715), TNF-α mRNA 분해촉진제(thalidomide), TNF 단백질 해독억제제(tetravalent guanylhydrazones) 및 metalloproteinase 억제제 등이 있으며 크론즈 질환과 류마티스 관절염의 임상적 치료에는 좋은 효과를 보였으며 이런 약제들이 천식을 비롯한 알레르기 질환들에서는 아직까지 잘 시도되지 않았다.[3] 가장 효과적인 항염증제로 알려진 스테로이드는 TNF-α 생성을 억제하는 것으로 알려져 있으나 스테로이드의 고용량 사용에 따른 부작용 발생과 알레르기 질환에서의 TNF-α 생성억제의 적절용량 및 기간 등에 추가적인 연구가 필요하다.[3]

알레르기 질환에서 TNF-α -308G/A 유전자 다형성의 연구들이 대부분 천식환자를 대상으로 보고되어 왔으며, 이런 연구결과들은 서로 상이한 결과를 보였다. 서양인에 대한 보고를 살펴보면, 5개의 연구[7-11]에서 -308A 대립인자 혹은 -308 유전자형과의 연관성이 있음을 보고한 반면, 2개의 연구[12][13]에서는 연관성이 없었다. 동양인의 경우에서는 1개의 연구[14]에서는 연관성이 있음을 보고하였으나 다른 1개의 연구[15]에서는 연관성이 없음을 보고하였다. Albuquerque 등[16]은 서양어린이천식환자에서 오히려 -308G 대립인자와 연관성이 있다고 보고하였다.

TNF-α -308G/A 유전자 다형성이 천식환자에서는 활발하게 연구되어 온 반면,[7-16] 알레르기비염환자에서는 거의 보고되지 않았다. 본 연구가 알레르기비염환자를 대상으로 한 첫 연구로, 연구결과 한국인 알레르기비염환자와 TNF-α -308G/A 유전자 다형성의 유전자형 및 대립인자와의 연관성이 없었다. 또한 총 IgE와 호산구 수와도 연

관성이 없었다. 따라서 TNF-α -308G/A 유전자 다형성이 한국인 알레르기비염 발생에 대한 감수성을 영향을 주지 않을 것으로 저자들은 해석하였다. 다양한 인종에 따라 알레르기 질환의 감수성 유전자의 대립인자가 다를 수 있고, 인종과 지역에 따라 노출된 항원에 의한 환경적인 요건이 다양할 수 있다. 이러한 점들이 알레르기 질환의 병태생리에서 유전적 이질성을 반영할 수 있다.

TNF-α -308A 대립인자는 인종에 따라 다양할 수 있는데 정상 대조군의 비교에서 서양인은 0.217~0.23, 흑인에서는 0.099, 동양인(일본인)에서 0.017로 동양인에서 서양인보다 매우 낮은 빈도를 보였다.[20] 본 연구에서의 TNF-α -308A 대립인자가 정상 대조군에서 0.078, 환자군에서는 0.091로 같은 동양의 일본인보다는 높은 빈도를 보였으나 서양인보다는 낮은 빈도를 보여 다양한 인종에 따른 유전자 다형성 연구가 필요함을 암시한다.

앞으로의 연구에서 TNF-α와 lymphotoxin α 유전자(TNF-β)는 major histocompatibility complex의 class III 내의 염색체 6번에 같이 존재하면서 많은 생물학적 특성을 공유하고 있어[14] lymphotoxin α 유전자 다형성의 추가적인 연구를 통해 알레르기 질환에서의 두 가지 유전자의 상호작용 및 상승작용에 대해 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구의 결과로 보아, 한국인 알레르기비염환자와 TNF-α -308G/A 유전자 다형성과 연관성은 없었지만 한국인을 대상으로 본 연구에서 TNF-α -308A 대립인자가 서양인에 비해 낮은 빈도를 보여 보다 더 정확한 분석을 위해서는 더 많은 환자를 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : Tumor necrosis factor-alpha · 알레르기비염 · 한국인 · 유전자 다형성.

REFERENCES

1) Riccio AM, Tosca MA, Cosentino C, Pallestrini E, Ameli F, Canonica GW, *et al. Cytokine pattern in allergic and non-allergic chronic rhinosinusitis in asthmatic children. Clin Exp Allergy 2002;32:422-6.*
2) Ayoub M, Lallouette P, Sutterlin BW, Bessler WG, Huber M, Mittenbuhler K. *Modulation of the Th1/Th2 bias by an immunoglobulin histamine complex in the ovalbumin allergy mouse model. Int Immunopharmacol 2003;3:523-39.*
3) Thomas PS. *Tumour necrosis factor-α: The role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunol Cell Biol 2001;79:132-40.*
4) Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. *Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by Ncol restriction of PCR product. Hum Mol Genet 1992;1:353.*
5) Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, Von Blomberg BM, Kostense PJ, *et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphism in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. Scand J Immunol 1996;43:456-63.*
6) Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bistch A, Weber F, *et al. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-α (TNF-α) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-α production. Neurosci Lett 1996;215:75-8.*
7) Campbell DA, Li Kam Wa E, Britton J, Holgate ST, Markham AF, Morrison JF. *Polymorphism at the tumour necrosis factor locus and asthma. Monogr Allergy 1996;33:125-37.*
8) Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, *et al. Prevalence of tumour necrosis factor-α and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. Am J Respir Crit Med 1999;160:278-82.*
9) Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. *Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphisms in TNF alpha gene regulation. J Inflamm 1996;46:32-41.*
10) Pociot F, Wilson AG, Neruup J, Duff GW. *No independent association between a tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. Eur J Immunol 1993;23:3050-3.*
11) Moffatt MF, James A, Ryan G, Musk AW, Cookson WO. *Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample. Thorax 1999;54:757-61.*
12) Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescollderungg L, *et al. Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. Clin Exp Allergy 1999;29:27-30.*
13) Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. *Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor α-308 polymorphism gene. Eur Respir J 2000;16:604-8.*
14) Wang TN, Chen WY, Wang TH, Chen CJ, Huang LY, Ko YC. *Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: Tumour necrosis factor-α -308 and lymphotoxin-α-Ncol in Taiwan's children. Clin Exp Allergy 2004;34:184-8.*
15) Tan EC, Lee BW, Tay AW, Chew FT, Tay AH. *Asthma and TNF variants in Chinese and Malays. Allergy 1999;54:402-3.*
16) Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, *et al. Association of polymorphism within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. Clin Exp Allergy 1998;28:578-84.*
17) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16:1215.*
18) Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, *et al. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. FEBS Lett 1998;435:39-44.*
19) Davidson A, Diamond B. *Autoimmune diseases. N Engl J Med 2001;345:340-50.*
20) Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. *Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-α, interleukin-10, interferon-2 genes in a north European caucasoid group from the UK. Eur J Immunogenet 2000;27:241-9.*