

한국 소아 1형 당뇨병에서 종양괴사인자 및 림프독소- α 유전자 다형성

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실*

서진순 · 박소영 · 정민호 · 서병규 · 김태규* · 이병철

Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin- α Gene Polymorphism in Korean Children with Type 1 Diabetes

Jin Soon Suh, M.D., So Young Park, Min Ho Jung, M.D.
Byung Kyu Suh, M.D., Tae Gyu Kim, M.D.* and Byung Churl Lee, M.D.

Department of Pediatrics, Department of Microbiology and Immunology*,
College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : Recently, it was reported that tumor necrosis factor(TNF) and lymphotoxin- α (LT- α) gene regions might be a susceptible loci to type 1 diabetes in Japanese. The purpose of this study was to investigate the association of TNF and LT- α gene polymorphisms with disease susceptibility in Korean children with type 1 diabetes.

Methods : Forty-nine Korean children with type 1 diabetes(29 girls and 20 boys) and 94 healthy Koreans were investigated in this study. Genotyping for -857T/C polymorphism in the TNF promoter region and LT- α gene polymorphism were performed by PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism). TNF promoter -1031C/T polymorphism was detected by allele-specific PCR.

Results : The distribution of the -857T/C and -1031C/T genotype in the TNF promoter region was not different between diabetic children and the controls. The frequency of TT genotype in the distribution of TNF -1031C/T polymorphism in diabetic children with diabetic ketoacidosis(DKA) at diagnosis was significantly lower than those without DKA($P<0.05$). No significant difference in the distribution of LT- α gene polymorphism was observed between diabetic children and the controls. There was no association between clinical characteristics of type 1 diabetes and LT- α gene polymorphisms.

Conclusion : These results suggest that TNF promoter -857T/C and LT- α gene polymorphisms are not associated with susceptibility to type 1 diabetes in Korean children. TNF promoter -1031C/T polymorphism might be related to clinical manifestations(DKA) of type 1 diabetes. (**Korean J Pediatr 2005;48:871-876**)

Key Words : Type 1 diabetes, Gene, Polymorphism, Tumor necrosis factor, Lymphotoxin- α

서론

1형 당뇨병은 장기-특이적인 자가면역 질환으로 췌도내 림프구의 침윤 소견과 혈청내 췌장 특이적인 자가항체의 검출을 특징으로 한다¹⁾. 1형 당뇨병의 자가면역 병인에 여러 가지 유전적 호발 인자 또는 기여 인자들이 영향을 미치는 것으로 알려지고

있는데, 후보 유전자 분석을 통해서 HLA 복합체와 인슐린 유전자의 5'부위의 variable number of tandem repeat(VNTR)이 감수성 유전자로 확인되고 있다²⁾. 한편 최근 연구에서는 micro-satellite marker locus D2S152(IDDM7)³⁾, 세포독성 T 림프구 항원-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4)⁴⁾, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)와 lymphotoxin- α (LT- α)⁵⁾, 비타민 D 수용체⁶⁾의 유전자가 1형 당뇨병의 발병과 관련이 있다고 보고되고 있다.

TNF와 LT- α 유전자는 HLA class III 영역 내에 존재하는데, HLA class III 영역은 염색체 6p21.3 상에서 HLA-B 유전자좌와 class II HLA-DR 유전자좌 사이에 위치한다. HLA

접수 : 2005년 3월 2일, 승인 : 2005년 4월 25일
책임저자 : 이병철, 가톨릭대학교 의과대학 성모병원 소아과
Correspondence : Byung Churl Lee, M.D.
Tel : 02)3779-1138 Fax : 02)783-2589
E-mail : byungcl@catholic.ac.kr

class III 영역에는 다양한 유전자군들이 포함되어 있는데, 이들 유전자 가운데 상당수는 면역 체계의 구성 요소로 작용하며, 다형성(polymorphism)을 보인다. 이 영역의 다형성에 대한 연구에서 TNF 유전자의 다형성이 진진성홍반루프스, Guillain-Barre 증후군, 1형 당뇨병 등과 같은 자가면역 질환과 관련이 있음이 밝혀졌다⁷⁻¹⁰. 그러나 TNF와 LT- α 가 1형 당뇨병의 발병기전에 중요한 역할을 할 가능성이 있지만, 주조직적합복합체(MHC) 내 유전자들간의 연관불균형(linkage disequilibrium) 때문에 이들 유전자 영역과 질병과의 연관성에 대해서 아직 확실한 결론을 내릴 수 없는 단계이다. 한편 최근에 TNF 유전자 내 -1031, -863, -857 위치에 새로운 promotor 다형성이 발견되었고, 이들이 전사 단계에서 TNF 생성의 조절에 관여한다는 사실이 알려지고 있다¹¹⁻¹³.

이에 저자들은 한국 소아에게 발생한 1형 당뇨병에서 TNF promotor -857T/C와 -1031C/T 및 LT- α 유전자 다형성이 질병 감수성에 미치는 영향을 평가하고, 1형 당뇨병의 임상적 특성과 이들 유전자 다형성 사이에 어떠한 관련성이 있는지를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

가톨릭대학교 성모병원 소아과의 외래와 병동에서 소아기(15세 이전)에 1형 당뇨병으로 진단받은 환자를 대상으로 하였다. 모든 환자들에게 연구 참여에 대한 정보를 제공한 후 서면 동의서를 받았다. 1형 당뇨병의 진단은 1999년에 제안된 세계보건기구의 기준¹⁴에 부합하는 혈당 기준과 임상 증상, 절대적인 인슐린 의존성, 췌장특이적인 자가항체를 근거로 하였다. 당뇨병성 케톤산혈증은 발병 시 대사성 산증과 케톤뇨증/케톤혈증이 동시에 존재하는 것으로 판정하였다. 환자들의 진단 시 성장속도는 Tanner stage에 의하여 평가하였다. 환자들의 병력과 의무 기록을 조사하여 발병 연령, 발병 시 사춘기 유무, 당뇨병성 케톤산혈증 유무, 자가면역성 갑상선 질환의 동반 유무 등의 임상적 특징들을 기술, 분류하였다. 환자들의 진단 시 혈청 인슐린, C-peptide, 진단 시부터 추적 기간 중의 HbA_{1c}를 확인, 조사하였다.

연구에 포함된 환자들은 총 49명(여자 29명, 남자 20명)이었으며, 이들의 진단 시 연령은 9.5 ± 3.2 세, 유병 기간은 4.2 ± 3.7 년이었다(Table 1).

정상 대조군은 자가면역 질환, 연체조직 질환, 내분비 질환, 당불내증의 병력이 없는 건강한 성인 94명으로 하였다. 정상 대조군의 경우 진단받지 않은 자가면역 질환을 배제하기 위하여 항 TPO 항체와 glutamic acid decarboxylase(GAD) 자가항체를 측정하여 모두 음성인 경우만을 정상 대조군에 포함시켰다.

2. 혈청 검사

혈청 인슐린과 C-peptide의 측정은 방사면역측정법(radioim-

unoassay, RIA)을 이용하였다. HbA_{1c}의 측정은 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography)를 이용하였다. 항 TPO 항체는 RIAZENco TPO Ab kit(Zentech, Angleur, Belgium)를 이용하여 competitive RIA 방법으로 측정하였으며, 30 U/mL 미만을 음성으로 판정하였다. GAD 자가항체는 RSR's GAD autoantibody assay kit(RSR Limited, Cardiff, UK)를 이용하여 효소면역침전법(enzymatic immunoprecipitation assay)으로 측정하였으며, 1.45 U/mL 미만을 음성으로 판정하였다.

3. DNA 추출

환자와 정상 대조군의 혈액 5-10 mL를 채취하여 항응고제(EDTA)가 들어있는 용기에 담은 후, 2,500 rpm으로 10분간 원심하여 혈장을 제거하였다. 백혈구 연층(buffy coat)을 취하여 Wizard DNA purification(Promega, Maison, USA)를 이용하여 DNA를 추출한 후 분광광도계로 정량하였다. 이후 -70°C에 보관하였다.

4. TNF promotor -857T/C와 LT- α 유전자 다형성 분석

TNF promotor -857T/C, LT- α 유전자 다형성의 분석에는 PCR-RFLP법을 이용하였다. DNA 시료 2 μ L에 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 50 mM MgCl₂), 2 mM dNTP, left-right primer 100 ng, Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), D/W를 섞은 혼합액 총 20 μ L를 증폭시켰다. 사용한 primer는 다음과 같았다.

TNF promotor -857T/C

forward 5'-AAATCGAGTATGGGGACCCCCGTTAA-3'

reverse 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'

LT- α

forwar 5'-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3'

reverse 5'-AGAGCTGGTGGGGACATGTCTG-3'

증폭한 DNA는 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 45분 동안 전기영동하여 확인하고 증폭한 시료 8 μ L를 각각 HincII, NcoI 제한효소(Boehringer, Mannheim, Germany)를 사용하여 처리한 후, TNF promotor -857은 6% polyacrylamide gel에서 1시간 동안 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 확인하고, LT- α 는 ethidium bromide가 포

Table 1. Profiles of Subjects

Age at onset(years)	9.5 \pm 3.2
Sex(female/male)	29/20
Duration of disease(years)	4.2 \pm 3.7
Birth weight(kg)	3.3 \pm 0.4
Laboratory data at diagnosis	
HbA _{1c} (%)	12.3 \pm 2.5
C-peptide(serum)(μ g/dL)	0.6 \pm 0.6
C-peptide(24 hr urine)(μ g/day)	10.3 \pm 10.4

함된 1.5% agarose gel에서 45분 동안 전기영동하여 결과를 확인하였다.

5. TNF promotor -1031 다형성 분석

Allele-specific PCR을 이용하여 분석하고, allele variant substitution base에 상보적인 마지막 핵산으로 구성된 primer를 이용하였다. -1031C/T 다형성 분석에 이용된 -1031C 대립 유전자와 -1031T 대립유전자의 해당 primer는 각각 다음과 같았다.

-1031C
 forward 5'-AAAGGAGAAGCTGAGAAGAT-3'
 reverse 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'
 -1031T
 forward 5'-AAAGGAGAAGCTGAGAAGAC-3'
 reverse 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'

비특이적인 산물을 감소시키기 위하여 AmpliTaq Gold polymerase를 이용하였다. PCR 조건에서 annealing 시 온도는 62℃로 하였다. PCR 산물은 2% agarose 겔에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하고 자외선 노출시킨 후 사진을 찍었다. 정해진 길이(298 bp)의 PCR 산물이 존재하는지에 따라 대립유전자를 결정하였다.

6. 자료 분석

측정값들은 평균±표준편차로 표시하였다. 환자군과 정상 대조군 사이에, 그리고 환자군 내의 임상적 특성이 다른 군 사이에 비교는 two-tailed Fisher's exact test를 이용하였다. 교차비(odds ratio, OR)는 Woolf법을 이용하여 계산하고, 변수가 0을 포함하는 경우에는 Haldane's modification법을 적용하였다. 전체적으로 비교 대상의 수에 따라 교정하지 않은 P value를 사용하고, P<0.05인 경우를 통계적으로 유의한 경우로 삼았다.

결 과

1. TNF promotor -857T/C 유전자 다형성 분석

TNF promotor -857T/C 유전자 다형성의 유전자형과 대립 유전자 빈도는 환자군과 정상 대조군 사이에서 유의한 차이가 없었다(Table 2). 또 환자들을 임상 특성에 따라 아군(subgroup)으로 나누어 발병 연령(임의로 7세 이전과 7세 이후로 분류함), 진단 시 성성속도, 진단 시 당뇨병성 케톤산혈증의 유무에 따라 유전자 다형성에 차이가 나는지를 평가하였는데, TNF promotor -857T/C 유전자 다형성의 분포는 임상적 특성에 따라 유의한 차이가 없었으며, 정상 대조군과 비교해서도 차이가 없었다.

2. TNF promotor -1031C/T 유전자 다형성 분석

TNF promotor -1031C/T 유전자 다형성의 유전자형과 대립

유전자 빈도는 환자군과 정상 대조군 사이에서 유의한 차이가 없었다(Table 3). 진단 시 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자들에서 TT 유전자형의 빈도는 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현하지 않은 환자들에 비해 유의하게 낮았다(46.2% vs 76.2%, OR=0.268, P<0.05)(Table 3). 그러나 이 환자들의 T 대립유전자 빈도는 나머지 환자들과 비교하여 낮았으나 유의한 차이는 아니었다. 한편 발병 연령, 진단 시 성성속 상태에 따라 나눈 환자들 아군간에 TNF promotor -1031 유전자 다형성의 분포는 유의한 차이가 없었다.

3. LT-α 유전자 다형성 분석

LT-α 유전자 다형성의 유전자형과 대립유전자 빈도는 환자군과 정상 대조군 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4). 또 이 유전자 다형성의 분포는 임상적 특성에 따라 차이가

Table 2. Distribution of TNF Promoter -857T/C Polymorphism in Type 1 Diabetic Children and the Control Subjects

	n	Genotype(%)			Allele(%)	
		TT	TC	CC	T	C
Type 1 diabetes	49	2.0	30.6	67.3	17.3	82.7
Onset age						
<7 years	10	0.0	20.0	80.0	10.0	90.0
≥7 years	39	2.6	33.3	64.1	19.2	80.8
Puberty at diagnosis						
prepubertal	33	0.0	34.3	65.7	17.1	82.9
in puberty	16	7.1	21.4	71.4	17.9	82.1
DKA at diagnosis						
(+)	26	0.0	25.9	74.1	13.0	87.0
(-)	23	4.5	36.4	59.1	22.7	77.3
Controls	94	3.9	24.5	71.6	16.2	83.8

DKA : diabetic ketoacidosis

Table 3. Distribution of TNF Promoter -1031C/T Polymorphism in Type 1 Diabetic Children and the Control Subjects

	n	Genotype(%)			Allele(%)	
		CC	CT	TT	C	T
Type 1 diabetes	49	0	40.4	59.6	20.2	79.8
Onset age						
<7 years	10	0	55.6	44.4	27.8	72.2
≥7 years	39	0	36.8	63.2	17.9	82.1
Puberty at diagnosis						
prepubertal	33	0	36.4	63.6	18.2	81.8
in puberty	16	0	50.0	50.0	25.0	75.0
DKA at diagnosis						
(+)	26	0	53.8	46.2*	26.9	73.1
(-)	23	0	23.8	76.2	11.9	88.1
Controls	94	2.1	30.2	67.7	17.2	82.8

*P<0.05, OR=0.268(95% CI 0.076-0.950) vs patients without DKA at diagnosis

DKA : diabetic ketoacidosis

Table 4. Distribution of Lymphotoxin- α Polymorphism in Type 1 Diabetic Children and the Control Subjects

	n	Genotype(%)			Allele(%)	
		AA	AG	GG	A	G
Type 1 diabetes	49	33.3	46.7	20.0	56.7	43.3
Onset age						
<7 years	10	28.6	71.4	0	64.2	35.7
≥7 years	39	34.2	42.1	23.7	55.2	44.7
Puberty at diagnosis						
prepubertal	33	32.3	45.2	22.6	54.8	45.2
in puberty	16	35.7	50.0	14.3	60.7	39.3
DKA at diagnosis						
(+)	26	29.2	62.5	8.3	60.4	39.6
(-)	23	38.1	28.6	33.3	52.4	47.6
Controls	94	27.7	54.3	18.1	54.8	45.2

DKA : diabetic ketoacidosis

없었으며, 정상 대조군과 비교해서도 차이가 없었다.

고 찰

HLA class III 영역은 사람의 유전체(genome) 가운데 가장 많은 유전자가 모여 있는 영역 가운데 하나로서, 다른 유전체 영역과 비교하여 10배 정도 많은 유전자들이 존재한다고 한다. 또 이 영역에는 보체 연쇄증폭반응(cascade)단백, 열충격단백(heat shock proteins), TNF, LT- α , allograft inflammatory factor-1(AIF-1)과 같은 면역 및 염증 반응에 관련된 많은 유전자가 포함되어 있다¹⁵⁾. MHC의 HLA DR/DQ 유전자좌 이외의 1형 당뇨병의 감수성 유전자좌로서 class III 영역, 특히 TNF 주변 영역이 추정되고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

여러 가지 자가면역 질환에서 TNF 표지자들의 다양한 변이들이 다양한 질병들에서 관련되어 있음이 알려져 왔지만^{16, 17)}, 아직까지 어떤 것이 진정한 인자인지에 대해서는 명확히 규명되고 있지 않고 있다. TNF -308G 대립유전자의 경우 백인에서는 많은 자가면역 질환의 감수성을 증가시키는 유전적 인자로서 보고되고 있으나 이 대립유전자의 빈도는 동양인에서 매우 낮다.

최근 Nishimura 등¹⁸⁾은 일본인 1형 당뇨병 환자에서 TNF promoter의 -857T, -1031C, 그리고 LT- α *A 대립유전자의 빈도가 유의하게 높음을 보고하고 있다. 현재 -857T와 -1031C의 promoter activity에 대해서는 연구들마다 약간의 차이가 있게 보고되고 있지만^{12, 13)}, 대체로 이 두 대립유전자는 모두 TNF의 생성을 증가시키는 인자라고 한다¹¹⁾. 이로 미루어 일본인 1형 당뇨병의 발생은 TNF 분비가 증가되어 있는 것과 관련이 있음을 알 수 있다.

그러나 한국인의 소아기 발생 1형 당뇨병을 대상으로 한 저자의 연구에서는 TNF promoter -857C/T와 -1031T/C 유전자 다형성이 질병감수성과 관련이 없음을 보여 Nishimura 등¹⁸⁾의 성적과는 달랐다. 1형 당뇨병의 감수성에 대한 HLA DR 및 DQ

유전자는 일본인과 한국인에서 유사한 유전학적 특성을 보인다¹⁹⁾. 본 연구에서 조사된 한국 정상 대조군에서 TNF promoter의 -857T의 빈도는 16.2%로 일본 대조군의 17.3%와 거의 차이가 없었고, -1031C의 경우도 17.2%로서 일본 대조군의 12.8%와 유사한 양상을 보였다. 한편, 환자군의 경우는 -857T의 빈도가 한국인에서 17.3%, 일본인에서 27.0%로서 상당한 차이를 보였고, -1031C의 빈도는 한국인에서 20.2%, 일본인에서 21.7%로 유사한 양상을 보였다. 그러므로 한국인과 일본인 정상 인구 집단에서는 TNF promoter의 유전학적 특성이 유사하며, 두 인구 집단의 1형 당뇨병 환자들에서는 TNF promoter 유전자 다형성에 따라 유전학적 특성에 차이가 남을 알 수 있다. 그러나 이들 유전자 다형성의 질병감수성에 대한 영향이 실제로 인종간에 다르게 발현되는지, 또는 대상 환자 수와 관련된 기술적 차이에 의한 결과인지에 대해서는 더 많은 환자와 정상인을 대상으로 한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 1형 당뇨병 환자 가운데 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자들과 TNF promoter -1031C/T 다형성 분포는 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현하지 않은 환자들과 비교하여 차이를 보였다. 1형 당뇨병으로 처음 진단된 당시 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자들에서는 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현하지 않은 환자들과 비교하여 더 높은 혈청 TNF의 상승이 관찰되며²⁰⁾, 진단 시 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자에서 진단 후 추적 평가 시 혈청 C-peptide 농도가 더 낮고, 인슐린 투여 요구량이 더 많으며, 완해율이 더 낮은 양상을 보인다는 사실²¹⁾은 이들 환자에서 임상 발현 후 베타 세포의 회복 능력이 감소된 것을 의미한다. 또 Jackson 등²²⁾은 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자들에서 케토세로항체(ICA)의 역가가 더 높다고 하였다. 이러한 사실로 미루어 본 연구의 성적은 TNF promoter -1031C/T 다형성이 β -세포 손상의 속도, 면역학적인 반응의 강도 등과 관련되어 1형 당뇨병의 임상 발현 양상에 영향을 미치는 유전적 인자일 가능성을 제시한다고 할 수 있다.

한편, LT- α 의 생성 증가는 G 대립유전자와 관련이 있고^{23, 24)}, 또 동물 모델의 연구에서 LT- α 를 포함한 proinflammatory cytokines의 발현이 β -세포 손상 인슐린염과 관련되어 있음이 보고되고 있다⁵⁾. 이러한 연구 성적들에 비해 일본인 1형 당뇨병 환자에서 LT- α *A의 빈도가 높게 관찰되었다는 Nishimura 등¹⁸⁾의 성적은 상반된 소견이며, 1형 당뇨병의 발생 기전을 설명하는 데 잘 부합되지 않는다. 본 연구에서 정상 한국인의 LT- α 다형성 분포는 일본 정상인과 비교하여 차이가 없었고, 한국인에서 이 유전자 다형성과 1형 당뇨병의 발생과의 관련성은 찾을 수 없었다. 이러한 결과는 LT- α 다형성이 최소한 보편적인 1형 당뇨병 감수성 유전자로서의 가능성이 낮음을 시사한다 하겠다.

Whichelow 등²⁵⁾은 1형 당뇨병 환자와 정상인에서 LT- α 분비와 LT- α 유전자 다형성의 관계가 서로 상반되게 작용하는데 LT- α 분비 양은 유전자 다형성 자체에 의해 영향을 받는 것이

아니라 확장된 HLA 일배체형(haplotype)에 영향을 받는다는 가설을 제시하고 있다. LT- α 다형성은 LT- α 단백질의 아미노산 26번 위치에 해당하는 다른 다형성과 관련되어 있는 것으로 알려지고 있다²³⁾. 이 단일 아미노산의 교체가 생물학적 활성도에 영향을 미치는지는 아직 밝혀지지 않았지만, 1형 당뇨병의 발생과 관련이 있을 것으로 생각된다¹⁸⁾.

TNF의 수용체인 TNFR1과 TNFR2는 TNF와 LT- α 를 감지한다. TNF의 생물학적 반응은 대부분 TNFR1에 의해 이루어지고, TNFR2는 TNF를 중화하는 TNF antagonist 기능과 세포 표면에서 TNF와 TNFR1의 상호작용을 강화시키는 TNF agonist 기능을 동시에 갖고 있다고 한다^{26, 27)}. Nishimura 등¹⁸⁾은 TNFR1 유전자의 promoter 영역의 -383C 대립유전자 빈도가 1형 당뇨병 환자들에서 증가되어 있는데, 이 대립유전자와 TNFR1 유전자의 발현 증가가 서로 관련되어 있다고 하였다. 이러한 소견은 특정한 유형의 당뇨병 환자에서는 수용성 TNFR1의 혈장 농도가 상승되어 있음을 보고한 Bullo 등²⁸⁾과 Fernandez-Real 등²⁹⁾의 성적과 일치하는데, 이로 미루어 TNF가 β -세포 손상 및 당뇨병의 출현을 가속화하는 인자로서 작용한다는 사실을 알 수 있다.

그러나 현재 MHC 내에 있는 유전자들간에 연관불균형에 대한 완전한 결론이 아직 없어 TNF 및 LT- α 유전자 다형성과 1형 당뇨병의 관련성에 대한 연구도 논란의 여지가 많은 상태이다. 실제로 HLA-DRB1*0405와 -857T 대립유전자, 그리고 HLA-DRB1*09와 -1031C 대립유전자 사이의 연관성이 보고되고 있다. Hamaguchi 등³⁰⁾은 일본인에서 TNF promoter 다형성과 1형 당뇨병과의 관련성을 보고하면서, 이는 감수성 HLA class I 및 class II 대립유전자와의 연관불균형에 의한 이차적인 결과라고 하였다. 그러므로 1형 당뇨병과 TNF promoter 다형성간의 독립적인 관련성을 규명하는 노력이 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

한국 소아 1형 당뇨병에서 TNF promoter -857T/C, -1031C/T 및 LT- α 유전자 다형성을 관찰한 저자의 성적에서 이들 다형성이 질병감수성과 관련이 없음을 알 수 있었으나, TNF promoter -1031C/T 다형성은 당뇨병성 케톤산혈증과 같은 1형 당뇨병의 특정 임상 양상에 영향을 미칠 수 있는 유전 인자임을 알 수 있었다. 그러나 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 이들 유전자들은 물론 TNF 수용체 유전자에 관한 연구를 병행하는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목적 : 한국 소아 1형 당뇨병에서 TNF promoter -857T/C와 -1031C/T 및 LT- α 유전자 다형성과 질병감수성과의 관련성을 평가하고자 하였다.

방법 : 1형 당뇨병으로 진단 받은 소아 49명(여아 29명, 남아 20명)과 정상 대조군 94명의 혈액을 채취하여 DNA를 추출하였

다. 추출한 DNA에 대하여 allele-specific PCR법을 이용하여 TNF promoter -1031C/T 다형성을, PCR-RFLP법을 이용하여 TNF promoter -857T/C, LT- α 유전자 다형성을 분석하였다.

결과 : 환자군과 대조군 사이에서 TNF promoter -857T/C, -1031C/T 다형성의 분포는 차이가 없었다. 환자들의 임상적 특징에 따라 아군(subgroup)으로 분류하였을 때, 진단 시 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현한 환자들에서 TNF promoter -1031C/T 다형성의 TT 유전자형의 빈도가 당뇨병성 케톤산혈증으로 발현하지 않은 환자들과 비교하여 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 다른 임상적 특성들과 이들 유전자 다형성 사이에는 관련성이 없었다. 또 환자와 대조군 사이에 LT- α 유전자 다형성의 분포는 차이가 없었으며, 임상적 특성과의 관련성도 없었다.

결론 : 이 연구를 통하여 TNF promoter -857T/C, LT- α 유전자 다형성이 한국 소아에서 1형 당뇨병의 질병감수성과 관련이 없음을 알 수 있었다. 그러나 TNF promoter -1031C/T 다형성은 당뇨병성 케톤산혈증과 같은 1형 당뇨병의 특정 임상 양상에 영향을 미칠 수 있는 유전적 인자로 생각된다.

References

- 1) Todd JA. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. Immunology Today 1990;11:122-9.
- 2) Hashimoto L, Habita L, Beressi JP. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. Nature 1994;371:161-4.
- 3) Copeman JB, Cucca F, Hearne CM. Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene(DDM7) to chromosome 2q31-33. Nat Genet 1995;9:80-5.
- 4) Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ. Insulin-dependent diabetes mellitus(IDDM) is associated with CTLA4 polymorphism in multiple ethnic groups. Hum Mol Genet 1997;6:1275-82.
- 5) Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev 1998;14:129-51.
- 6) Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. Clin Endocrinol Metab 2003;88:3137-40.
- 7) Monos DS, Kamoun M, Udalova IA, Csanky E, Cizman B, Turetskaya RL, et al. Genetic polymorphism of the human tumor necrosis factor region in insulin-dependent diabetes mellitus. Linkage disequilibrium of TNFab microsatellite alleles with HLA haplotypes. Hum Immunol 1995 ;44:70-9.
- 8) Hanifi Moghaddam P, de Knijf P, Roep BO, Van der Auwera B, Naipal A, Gorus F, et al. Genetic structure of IDDM1. Two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility or protection. Diabetes 1998;47:263-9.
- 9) Lie BA, Todd JA, Pociot F, Nerup J, Akselsen HE, Joner G, et al. The predisposition to type 1 diabetes linked to the human leukocyte antigen complex includes at least one non-class II gene. Am J Hum Genet 1999;64:793-800.

- 10) Obayashi H, Nakamura N, Fukui M, Tegoshi H, Fujii M, Ogata M, et al. Influence of TNF microsatellite polymorphisms(TNF α) on age-at-onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Immunol* 1999;60:974-8.
- 11) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphisms of the 5-flanking region of the human tumor necrosis factor(TNF)-gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-12.
- 12) Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-gene promoter. *Tissue Antigens* 1998;52:359-67.
- 13) Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, et al. A common functional polymorphism(C-A substitution at position 863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum Mol Genet* 1999;8:1443-9.
- 14) World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complication. Report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
- 15) Gruen JR, Weissman SM. Evolving view of the major histocompatibility complex. *Blood* 1997;90:4252-65.
- 16) Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1233-7.
- 17) Ma JJ, Nishimura M, Mine H, Kuroki S, Nukina M, Ohta M, et al. Genetic contribution of the tumor necrosis factor region in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 1998;44: 815-8.
- 18) Nishimura M, Obayashi H, Mizuta I, Hara H, Adachi T, Ohta M, et al. TNF, TNF receptor type 1, and allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in Japanese patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2003;64:302-9.
- 19) Kawabata Y, Ikegami H, Kawaguchi Y, Fujisawa T, Shintani M, Ono M, et al. Asian-specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:545-51.
- 20) Ozer G, Teker Z, Cetiner S, Yilmaz M, Topaloglu AK, Oneli-Mungan N, et al. Serum IL-1, IL-2, TNF alpha and INF gamma levels of patients with type 1 diabetes mellitus and their siblings. *Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16:203-10.
- 21) Komulainen J, Lounamaa R, Knip M, Kaprio EA, Akerblom HK. Ketoacidosis at the diagnosis of type 1(insulin dependent) diabetes mellitus in related to poor residual beta cell function. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Arch Dis Child* 1996;75:410-5.
- 22) Jackson W, Hofman PL, Robinson EM, Elliot RB, Pilcher CC, Cutfield WS. The changing presentation of children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2001;2:154-9.
- 23) Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor(TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173:209-19.
- 24) Weissensteiner T, Lanchbury JS. TNFB polymorphisms characterize three lineages of TNF region microsatellite haplotypes. *Immunogenet* 1997;47:6-16.
- 25) Whichelow CE, Hitman GA, Raafat I, Bottazzo GF, Sachs JA. The effect of TNF*B gene polymorphism on TNF- α and - β secretion levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and healthy controls. *Eur J Immunogenet* 1996;23:425-35.
- 26) Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing : the 75-kDa tumor necrosis factors(TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 1993;268:18542-8.
- 27) Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 1998;160:943-52.
- 28) Bullo M, Garcia-Lorda P, Salas-Salvado J. Plasma soluble tumor necrosis factor alpha receptors and leptin levels in normal-weight and obese women: effect of adiposity and diabetes. *Eur J Endocrinol* 2002;146:325-31.
- 29) Fernandez-Real J-M, Lainez B, Vendrell J, Rigla M, Castro A, Penarroja G, et al. Shedding of TNF α receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E952-9.
- 30) Hamaguchi K, Kimura A, Seki N, Higuchi T, Yasunaga S, Takahashi M, et al. Analysis of tumor necrosis factor- α promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-B and -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. *Tissue Antigens* 2000;55:10-6.