

제 2형 당뇨병 환자에서 Tumor Necrosis Factor- α 유전자 -308과 -238의 다형성 분석

김혜련 · 이미경 · 박애자

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

The -308 and -238 Polymorphisms of the TNF- α Promoter Gene in Type 2 Diabetes Mellitus

Hye Ryoun Kim, M.D., Mi Kyung Lee, M.D., and Ae Ja Park, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Recently, two G→A polymorphisms at positions -308 and -238, in the promoter of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene, have been identified. These variants have been linked to estimates of insulin resistance and obesity in different ethnic groups. The objective of the present study was to investigate whether these genetic variants of TNF- α were associated with features of the insulin resistance in two study populations comprising type 2 diabetic patients and healthy control subjects.

Methods : We analyzed the polymorphisms of TNF- α gene in 198 type 2 diabetes mellitus (DM) patients and 169 healthy control subjects. We used five primers and two separate polymerase chain reaction (PCR) to detect the TNF- α polymorphism by the multiplex amplification refractory mutation system (ARMS) technique.

Results : No statistically significant difference in the -308A and -238A allele frequencies was found between patients with type 2 DM and normal controls.

Conclusions : Our study does not support a major role of the nucleotide -308 or -238 substitutions of the TNF- α gene in the pathogenesis of insulin resistance. (*Korean J Lab Med* 2006;26:58-63)

Key Words : Type 2 DM, Tumor necrosis factor- α , Polymorphism, Amplification refractory mutation system

서 론

제 2형 당뇨병의 잘 알려진 위험 요소로는 인슐린 내성, 고인슐린혈증, 비만, 고혈압과 당뇨병에 대한 가족력 등이 있다[1]. 이중 인슐린 내성은 제 2형 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환과 고지질혈증 등 만성질환의 병태생리학에 중요한 요소이다[2, 3]. 인슐린 내성의 병인은 아직 명확하지는 않으나 유전적, 환경적 요인 모두

와 관계가 있다[3, 4].

최근 연구에 의하면 cytokine의 일종인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 아직 그 역할이 분명히 밝혀지지는 않았지만 주로 단구와 대식 세포에서 생산되며, 비만과 연관된 인슐린 내성과 당뇨병에서 중요한 역할을 담당한다고 한다[5]. TNF- α 는 insulin-sensitive glucose transporters (GLUT4) 유전자의 전사적 활성도를 감소시키고 근육과 지방 조직에서 인슐린 수용체의 tyrosine kinase의 활성도를 억제하여 인슐린 내성을 증가시킨다[6]. 또한 TNF- α 의 mRNA의 증가가 인슐린 내성의 유도에 잠정적인 역할을 한다는 보고가 있다[7].

TNF- α 의 혈중 농도가 당뇨병 환자에서 당뇨병성 신증 발생에 관여하며 특히 당뇨병 환자의 뇨중 TNF- α 농도가 높은 경우 단백뇨 발생이 의미있게 증가되어 있었다[8, 9].

접 수 : 2005년 5월 24일 접수번호 : KJLM1858
수정본접수 : 2005년 12월 28일
게재승인일 : 2006년 2월 6일
교 신 저 자 : 이 미 경
우 140-757 서울시 용산구 한강로 3가 65-207
중앙대학교 용산병원 진단검사의학과
전화 : 02-748-9837, Fax : 02-797-3471
E-mail : cpworld@cau.ac.kr

TNF- α 유전자는 class III major histocompatibility complex (MHC)에 위치하여 있으며 몇 가지의 유전자 다형성에 관한 연구가 시도되었다. 특히 Wilson 등이 TNF- α 유전자의 촉진자(promoter) 부위에 해당하는 nucleotide position -308에서의 다형성을 발견하였고, 이 부위에서 guanine (G)이 adenine (A)으로 치환되는 것에 따라 *TNF1*과 *TNF2*로 구별하였다[10, 11]. -308A 대립유전자는 전사적 활성도가 높아 TNF- α 의 생산도 증가시키고, 여러 감염질환, 자가면역질환 및 면역 매개성 질환과도 의미있는 관련을 보이는 것으로 보고되고 있다[12, 13]. 또한 nucleotide position -238에서 G→A로 치환된 -238A 대립유전자도 만성 B형 간염 및 인슐린 내성과 관련이 있다고 보고는 있으나 -238A 대립유전자가 전사적 활성도에 미치는 영향에 대해서는 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다[14-16].

제 2형 당뇨병 환자와 TNF- α 유전자의 촉진자에서 나타나는 유전자 다형성에 관한 보고를 살펴보면, Fermanader-Real 등은 TNF- α 의 유전자 다형성이 인슐린 내성과 연관이 있다고 보고했으나 그 외에 연관이 없다는 보고도 다수 있었다[17, 18]. 또한 각 인종에 따른 유전자 다형성의 출현 빈도도 여러 나라에서 보고되었다[19, 20].

이에 저자들은 제 2형 당뇨병 환자에서 TNF- α 의 유전자 다형성을 조사함으로써 질환과 유전자 다형성의 관련 여부를 알아보고, 제 2형 당뇨병과 정상 대조군에서의 TNF- α 유전자 다형성의 출현 빈도를 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

중앙대학교부속 필동병원 내과에 내원한, 식이요법이나 경구혈당강화제로 조절 중인 제 2형 당뇨병 환자 198명을 대상으로 하였다. 대조군은 필동병원에 근무하는 직원과 건강진단센터를 방문한 사람 중 공복시 혈당이 100 mg/dL 이하이고 당뇨병의 과거력이 없는 지원자 169명을 대상으로 하였다.

2. 방법

1) DNA 추출

EDTA가 항응고제로 들어있는 전혈 500 μ L를 lysis buffer (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton-X 100)를 이용하여[21] 혼합과 원심분리(13,000 rpm에서 30초, 3회 반복)한 후, proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 포함한 완충액(10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 mg/mL gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20)을 첨가하여 55°C에서 1시간 반응시키고, proteinase K를 변성시키기 위해 95°C에서 10분간 처리하여 template DNA

를 얻었다.

2) TNF- α -308과 -238에서의 G→A 다형성 검사

TNF- α -308과 -238에서의 G→A 다형성은 다중(multiplex) amplification refractory mutation system (ARMS) 방법으로 시행하였다. ARMS 방법은 시발체의 3'-end가 template DNA의 염기서열과 mismatch가 되면 polymerase chain reaction (PCR) 시 시발체가 연장(extension)되지 않는 것을 이용한 방법으로[22], 본 연구에서는 신속하고 간편한 검사를 위하여 한 검체당 2개의 PCR tube가 사용되도록 고안한 다중 ARMS 방법을 사용하였다.

즉 1개의 상류시발체(common primer, CP), TNF- α -308에서의 G→A 다형성을 확인하기 위한 2종류의 하류시발체(-308G/-308A)와 -238에서의 G→A 다형성을 확인하기 위한 2종류의 하류시발체(-238G/-238A)를 각각 사용하였으며, 4종류의 하류시발체는 G 혹은 A를 시발체의 3'-end가 되도록 제작된 것이다 (Table 1). 또한 시발체의 특이도를 높이기 위하여 3'-end로부터 2번째 염기인 G를 T로 치환하였다[22]. ARMS 방법에 의한 검사의 신뢰도를 높이기 위한 내부 양성대조(internal positive control, IPC)로 α 1-antitrypsin 유전자의 exon 3 부위를 증폭하는 시발체(IPC-1, IPC-2)도 동시에 사용하였다[23].

PCR은 한 검체당 2개의 PCR tube를 사용하였는데, A tube에는 하류시발체로 -308G와 -238A를, 상류시발체로 CP를 첨가하였고, B tube에는 -308A, -238G, CP를 첨가하였다. 각 대립유전자에 대한 PCR 특이산물은 -308G/-308A 또는 -238G/-238A가 CP와 반응하여 각각 140 bp와 210 bp의 증폭산물로 구별되고, 360 bp의 내부 양성대조 산물도 동시에 증폭된다. PCR 반응액은 ARMS 시발체 각각 10 pM, 내부 양성대조 시발체 5 pM, dNTP 250 μ M, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Taq DNA polymerase 1U, DMSO 5%에 추출 DNA 1 μ L를 첨가하여 총 20 μ L로 만들었다. PCR 반응은 자동온도조절기(OmniGene, Hybaid Co., England)를 이용하여 95°C에서 4분간 predenaturation 시킨 후, 95°C에서 45초, 66°C에서 45초 및 72°C에서 45초씩 35회 증폭하고 마지막으로 72°C에

Table 1. Primers used for multiplex ARMS

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')*
-308G	ACCCTGGAGGCTGAACCCCGTCTC
-308A	ACCCTGGAGGCTGAACCCCGTCTT
-238G	CACACTCCCCATCCTCCCTGCTTC
-238A	CACACTCCCCATCCTCCCTGCTTT
CP	GCCCCTCCCAGTTCTAGTTCTATC
IPC-1 [†]	CCCACCTTCCCCTCTCTCCAGGCAAATGGG
IPC-2 [†]	GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG

*, The 3' penultimate nucleotide (underlined above) was mismatched to enhance specificity of the primers; [†], The internal control primers spanning a 360 bp fragment of exon 3 of the α 1-antitrypsin gene.

Abbreviations: CP, common primer; IPC, internal positive control; ARMS, amplification refractory mutation system.

서 5분 동안 연장반응 시켰다. 각각의 증폭산물은 2% agarose gel 에서 100 V로 20분간 전기영동한 후, 투조기(transilluminator)에서 증폭산물을 확인하였다.

SAS (version 9.1)을 이용하여 환자군과 대조군에 따른 유전자형과 대립유전자의 빈도는 “proc freq”을 사용하여 chi-square 분석으로 비교하였고, 승산비(OR, Odds Ratio)와 95% 신뢰구간(CI)은 “proc genmod”를 사용하였다. SAS/Genetics의 “proc allele”에서 최대우도(maximum likelihood estimation) 방법을 사용하여, TNF- α -308과 -238의 연관불균형 측도(linkage disequilibrium measure)인 Lewontin's $|D'|$ 을 계산하였고 연관불균형 여부에 대한 카이제곱 검정을 실시하였다. 모든 통계적 검정은 유의수준 5% 하에서 실시하였다.

결 과

신속하고 간편한 검사를 위하여 한 검체당 2개의 PCR tube를

Table 2. Genotypes and alleles frequencies of TNF- α -308 and -238 in NIDDM and normal controls

	NIDDM patients (n=198)	Normal controls (n=169)	P	OR (95% CI)
TNF- α -308 Genotype				
GG	174 (0.88)	141 (0.83)	$\chi^2=1.48$	
GA	24 (0.12)	28 (0.17)	$P=0.223$	1.44 (0.80-2.59)
AA	0	0		
Allele				
G	372 (0.94)	310 (0.92)	$\chi^2=1.37$	
A	24 (0.06)	28 (0.08)	$P=0.242$	1.40 (0.80-2.46)
TNF- α -238 Genotype				
GG	177 (0.89)	152 (0.90)	$\chi^2=0.03$	
GA	21 (0.11)	17 (0.10)	$P=0.864$	0.94 (0.48-1.85)
AA	0	0		
Allele				
G	375 (0.95)	321 (0.95)	$\chi^2=0.03$	
A	21 (0.05)	17 (0.05)	$P=0.868$	0.95 (0.49-1.82)

Abbreviations: TNF, tumor necrosis factor; NIDDM, non insulin dependent diabetes mellitus; OR, odds ratio; RR, relative risk.

Table 3. Genotype and allele frequencies of TNF- α -308 with normal controls in Korea

	this study (n=169)	Lee et al.[24] (n=120)		Yea et al.[25] (n=113)		Pae et al.[26] (n=125)	
Genotype							
GG	141 (0.83)	103 (0.86)	$\chi^2=0.31$	106 (0.94)	$\chi^2=6.70$	107 (0.86)	$\chi^2=0.26$
GA	28 (0.17)	17 (0.14)	$P=0.579$	7 (0.06)	$P=0.010$	18 (0.14)	$P=0.613$
AA	0	0		0		0	
Allele							
G	310 (0.92)	223 (0.93)	$\chi^2=0.28$	219 (0.97)	$\chi^2=6.26$	232 (0.93)	$\chi^2=0.23$
A	28 (0.08)	17 (0.07)	$P=0.596$	7 (0.03)	$P=0.012$	18 (0.07)	$P=0.629$

사용하도록 고안된 다중 ARMS 방법으로 TNF- α -308과 -238에서의 G→A 다형성을 확인할 수 있었다.

TNF- α -308 부위에서의 유전자형은 제 2형 당뇨병 환자에서 -308G/G가 174명(0.88), -308G/A가 24명(0.12)이었으며, 정상 대조군에서는 -308G/G가 141명(0.83), -308G/A가 28명(0.17)으로 제 2형 당뇨병 환자와 정상 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다($P=0.223$, $\chi^2=1.48$, OR 1.44, 95% CI 0.80-2.59)(Table 2). 본 실험에서 -308G/G와 -308G/A 유전자형은 한국인 정상 대조군에서 각각 0.83과 0.17로서, 다른 국내 두 개의 보고와는 유의한 차이가 없었고 Yea 등의 보고와는 유의한 차이가 있었다($P=0.010$, $\chi^2=6.70$)(Table 3)[24-26]. 또한 TNF- α -238 부위에서의 유전자형도 제 2형 당뇨병 환자에서 -238G/G가 177명(0.89), -238G/A가 21명(0.11)이었고, 정상 대조군에서는 각각 152명(0.90)과 17명(0.10)으로 제 2형 당뇨병 환자와 정상 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다($P=0.864$, $\chi^2=0.03$, OR 0.94, 95% CI 0.48-1.85)(Table 2). TNF- α -308 부위에서의 일배체형(haplotype) 분석 결과 제 2형 당뇨병 환자에서 G가 372명(0.94), A가 24명(0.06)이었으며, 정상 대조군에서는 G가 310명(0.92), A가 28명(0.08)으로 제 2형 당뇨병 환자와 정상 대조군 사이에 유의한 차이가 없었고($P=0.242$, $\chi^2=1.37$, OR 1.40, 95% CI 0.80-2.46). 또한 TNF- α -238 부위에서의 일배체형 분석에서도 제 2형 당뇨병 환자에서 G가 375명(0.95), A가 21명(0.05)이고, 정상 대조군에서는 G가 321명(0.95), A가 17명(0.05)으로 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다($P=0.868$, $\chi^2=0.03$, OR 0.95, 95% CI 0.49-1.82)(Table 2). 이때 각 군에서의 유전자형 분포는 Hardy-Weinberg equilibrium에 의한 기대치와 유의한 차이가 없었다(www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/).

TNF- α -308과 -238 사이의 연관불균형 측도인 Lewontin's $|D'|$ 값은 1로 나타났으나 카이제곱 검정 결과 두 유전자 사이의 연관성은 찾아 볼 수 없었다($P=0.216$, $\chi^2=1.53$).

고 찰

초창기의 TNF- α 는 염증과 면역조절 작용에 관여하는 인자로 알려졌다. 그 후 비만과 관련된 인슐린 내성의 병태생리에 중

요한 역할도 하는 것으로 알려졌다. 골격근과 지방조직에 있는 TNF- α mRNA 치는 신체 비만 지수, 인슐린혈증과 깊은 상관이 있으며, 또한 TNF- α mRNA 치가 낮은 쥐가 야생쥐보다 인슐린 내성이 적다는 연구도 있었다[7, 27]. 이런 연구들은 TNF- α 가 인슐린 작용에 장애를 일으키며 기전은 근위 인슐린 신호체계의 손상에 의한 것으로 생각된다[6]. 그러나 아직은 분자 기전과 TNF- α 유전자 부위중 어느 부위가 인슐린 내성과 관계된 TNF- α 표현에 영향을 주는 지에 대하여는 분명하게 알려져 있지 않다. 최근에 TNF- α 유전자의 촉진부에 위치한 두 개의 nucleotide 다형성이 주목을 받고 있는데, 이는 nucleotide -308과 -238에서의 G→A 치환에 의한 다형성이다. -308A 변형이 TNF- α 유전자의 전사적 활성도를 증가시켰다는 실험적인 결과가 있고, 임상적으로도 이 변형이 비만과 인슐린 내성과 관계가 있다는 것을 보여주는 보고들이 있다[11, 17, 28]. -238의 다형성은 아직 시험적으로 표현에 관하여 증명된 것은 없으나 이 변형의 위치가 구조적합복합체 class II genes의 촉진부 조절 부위에 있는 putative Y box에 위치하고 TNF- α 의 억제유전자가 -254와 -230 사이에 있는 것으로 보아 이 변형도 유전자의 전사적 활성도에 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 최근의 -238의 변형이 인슐린 감도를 증가시키는 데 관여한다는 연구도 있었다[15, 29].

TNF- α 유전자의 촉진자 부위와 제 2형 당뇨병 환자 사이의 연관성은 아직 논쟁의 여지가 있고 다른 인종의 다형성이 다른 역할을 할 수도 있다는 인종적인 차이도 있다고 생각된다. 본 연구에서는 -308과 -238 다형성의 유전형이 정상 대조군과 제 2형 당뇨병 환자군 사이에 유의한 차이가 없었고 대립유전자 빈도(allele frequency)에서도 차이를 찾아 볼 수 없었다. 이는 -308G/A는 제 2형 당뇨병의 유병률에 관여하지 않고 정상 대조군과 유사하다는 국외 보고와 일치하는 결과이다[18, 19]. 이러한 보고에도 불구하고 -308A/A는 TNF- α 의 분비를 증가시키고 이는 인슐린 수용체의 전달을 감소시켜 당 전달체의 전위를 감소시킴으로서 인슐린 내성을 일으킨다는 보고도 있다[30]. 그러나 본 연구의 경우 -308A/A의 유전형은 단 한 건도 보이지 않았고 이는 한국인에서의 다른 보고들과 일치하는 결과이다[24-26]. -308A/A 유전형의 빈도가 타이완(0.0118)이나 일본(0.017), 중국(홍콩)(0.09), 프랑스(0.16), 독일(0.18)보다 낮게 나타난 결과에 비추어 보면 좀 더 많은 연구 대상으로 실험을 하여야 알 수 있겠으나 한국인은 타이완과 일본보다도 낮은 -308A/A 빈도를 나타낼 것으로 예상된다[19, 20, 31, 32]. 위의 결과는 인슐린 내성이 제 2형 당뇨병의 중요한 위험 요소임을 고려할 때 이 유전형이 당뇨의 발생에 직접적인 영향을 주지 않는다고 생각할 수 있다. Day 등은 -238A/A 유전형이 인슐린 내성이 생길 가능성이 적다고 보고했고[15], Clausell 등은 -238A/A 유전형이 지방 대사에 영향을 주어 high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 치가 낮아진다고도 보고했다[33]. 위의 보고들은 -238A/A 다형성이 당뇨를 발생시키는 민감도에 영향을 주지는 않으나 동맥경화와 심장 혈관병과 같은 합병증을 예견할 수 있다고 주장했다[31]. 그러나

본 연구에서는 -238A/A 유전형도 관찰되지 않았다.

또한, 본 실험에서 정상 대조군에는 발견하지 못한 -308G/A와 -238G/A가 함께 보이는 경우가 제 2형 당뇨병 환자에서 2명 관찰되었다. 이는 통계적인 의미를 부여할 수는 없으나 두 다형성이 상호 작용을 하여 질환의 병태생리에 영향을 미칠 수도 있어 좀 더 많은 수를 대상으로 하여 연구하여 볼 필요가 있다고 생각된다.

결론적으로 TNF- α 의 혈중치는 인슐린 내성과 당뇨 합병증과 깊은 관계가 증명되었으나 본 연구에서의 -308, -238 다형성은 한국인 제 2형 당뇨병 환자에서 의미 있는 차이를 발견할 수 없었다. 그러므로 -308, -238 다형성이 제 2형 당뇨병의 병태생리에는 직접적으로 관여하지는 않으나, -308A/A와 -238A/A는 동맥경화와 같은 당뇨 합병증의 유병률에는 영향을 미칠 가능성이 있으므로 더욱 많은 수의 대상을 가지고 연구해볼 필요가 있다고 생각된다.

요 약

배경 : 최근 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 촉진자 부위에 있는 두 개의 유전자 다형성이 발견되었고 이는 nucleotide position -308과 -238에서의 G→A 변이이다. 이러한 유전자 다형성과 인슐린 내성, 비만의 상관성이 여러 인종에서 연구되었다. 이에 본 연구에서는 제 2형 당뇨병 환자와 정상 대조군을 대상으로 TNF- α 유전자의 촉진자 부위에서의 다형성이 제 2형 당뇨병의 병태생리에 관여하는지 알아보려고 하였다.

방법 : 제 2형 당뇨병 환자 198명과 정상 건강대조군은 169명을 대상으로 하였다. TNF- α -308과 -238에서의 G→A 다형성은 한 겹때당 2개의 PCR tube가 사용되도록 고안한 다중 amplification refractory mutation system (ARMS) 방법을 사용하였다.

결과 : TNF- α 유전자내의 -308A 대립유전자와 -238A 대립유전자의 빈도는 제 2형 당뇨병 환자와 정상 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다.

결론 : TNF- α 유전자의 촉진자 부위에서의 다형성이 제 2형 당뇨병 환자의 병인에 관여하는지를 연구하기 위하여 시도된, TNF- α 유전자내 -308과 -238에서의 다형성 분석은 제 2형 당뇨병과 의미있는 연관성을 보이지 않았다.

참고문헌

1. Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. Annu Rev Med 1996;47:509-31.
2. Rewers M and Hamman RF. Risk factors for non-insulin dependent diabetes mellitus. In: Harris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reider GE, Bennett PH, eds. Diabetes in America, 2nd ed. National

- Diabetes Data Group. Bethesda: U.S. Government Printing Office; NIH Publication. 1995;1468:179-220.
3. DeFronzo RA and Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.
4. Moller DE, Bjorbaek C, Vidal-Puig A. Candidate genes for insulin resistance. *Diabetes Care* 1996;19:394-400.
5. Hotamisligil GS and Spiegelman BM. TNF- α and the insulin resistance of obesity. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. *Diabetes Mellitus*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996;554-60.
6. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin-receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997;272:971-6.
7. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95:2111-9.
8. Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism* 2003;52:605-8.
9. Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2003;42:53-61.
10. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
11. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
12. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999;282:561-8.
13. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:129-34.
14. Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenefelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor- α (TNF- α) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:579-82.
15. Day CP, Grove J, Daly AK, Stewart MW, Avery PJ, Walker M. Tumor necrosis factor- α gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia* 1998;41:430-4.
16. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1997;26:143-6.
17. Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernandez-Castaner M, Vendrell J, et al. The TNF- α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 1997;46:1468-72.
18. Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, Hansen T, Borch-Johnsen K, Pedersen O. The -238 and -308G->A polymorphisms of the tumor necrosis factor- α gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1731-4.
19. Lee SC, Pu YB, Thomas GN, Lee ZS, Tomlinson B, Cockram CS, et al. Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism in the metabolic syndrome. *Metabolism* 2000;49:1021-4.
20. Hoffstedt J, Eriksson P, Hellstrom L, Rossner S, Ryden M, Arner P. Excessive fat accumulation is associated with the TNF alpha-308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia* 2000;43:117-20.
21. Buffone GJ and Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985;31:164-5.
22. Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of apolipoprotein E genotypes by the Amplification Refractory Mutation System. *Clin Chem* 1991;37:241-4.
23. Newton CR, Kalsheker N, Graham A, Powell S, Gammack A, Riley J, et al. Diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucleic Acids Res* 1988;16:8233-43.
24. Lee JY, Kim HY, Kim KH, Kim SM, Jang MK, Park JY, et al. Association of polymorphism of *IL-10* and *TNF-A* genes with gastric cancer in Korea. *Cancer Lett* 2005;225:207-14.
25. Yea SS, Yang YI, Jang WH, Lee YI, Bae HS, Paik KH. Association between TNF- α promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. *J Clin Pathol* 2001;54:703-6.
26. Pae CU, Lee KU, Han H, Serretti A, Jun TY. Tumor necrosis factor alpha gene-G308A polymorphism associated with bipolar I disorder in the Korean population. *Psychiatry Res* 2004;125:65-8.
27. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997;389:610-4.
28. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Im-*

- munol 1997;34:391-9.
29. D'Alfonso S and Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. Immunogenetics 1994; 39:150-4.
30. Winkler G, Salamon F, Salamon D, Speer G, Simon K, Cseh K. Elevated serum tumour necrosis factor- α levels can contribute to the insulin resistance in type II (non-insulin dependent) diabetes and in obesity. Diabetologia 1998;41:860-1.
31. Shiau MY, Wu CY, Huang CN, Hu SW, Lin SJ, Chang YH. TNF- α polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in Taiwanese patients. Tissue Antigens 2003;61:393-7.
32. Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, matsumoto H, Niiya F, et al. Polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 1999;54:194-7.
33. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha in diabetic macrovasculopathy. Cardiovasc Pathol 1999;8:145-51.