

## 염증성 장질환 환자에서 종양괴사인자: 알파의 유전적 다형과 임상상과의 연관성

울산대학교 의과대학 서울아산 소아청소년병원 소아청소년과

조민성 · 송승민 · 오석희 · 이연주 · 장주영 · 김경모

### Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Gene Polymorphisms in Korean Children with Inflammatory Bowel Disease

Min Sung Cho, M.D., Seung Min Song, M.D., Seak Hee Oh, M.D., Yeoun Joo Lee, M.D.,  
Ju Young Jang, M.D. and Kyung Mo Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Asan Medical Center Children's Hospital,  
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** The aim of this study was to investigate the existence of TNF- $\alpha$  polymorphisms in Korean children with Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC), as compared to healthy controls.

**Methods:** Blood samples were obtained from 40 patients with CD, 14 patients with UC, and 30 healthy controls. Genotyping for 5 TNF- $\alpha$  polymorphisms (G238A, G308A, C857T, C863A, and T1031C) was performed. The allele frequencies for the inflammatory bowel diseases, CD and UC, were measured in patients with these disease and in healthy controls, and these allele frequencies were compared between the 3 groups. We examined the significant association between polymorphism and disease phenotype, such as location, behavior, perianal disease, and pediatric Crohn's activity index (PCDAI) in CD.

**Results:** Based on our findings, the TNF- $\alpha$  allele frequencies of G238A, G308A, C857T, C863A, and T1031C were 3.3, 8.3, 16.7, 16.7, 21.7% in healthy control, 2.5%, 7.5%, 18.8%, 20.0%, 22.5% in CD, 7.1%, 7.1%, 7.1%, 21.4%, 28.6% in UC. They were no statistically significant differences between the 3 groups. There were no associations between genotypes and phenotypes in CD, except a statistically significant higher allele frequency of G238A in ileal type (L1) disease ( $p=0.010$ ).

**Conclusion:** Our results indicate that 5 TNF- $\alpha$  polymorphisms do not seem to be associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in Korean pediatric patients even though young patients were anticipated to have a stronger genetic affiliation for these diseases than adult patients. We think that further studies are needed to find those genes associated with susceptibility to CD and UC in Korean pediatric patients with inflammatory bowel disease. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 14: 269~278)

**Key Words:** Crohn's disease, TNF- $\alpha$ , Gene polymorphism, Ulcerative colitis

접수 : 2011년 8월 30일, 수정 : 2011년 9월 18일, 승인 : 2011년 9월 20일

책임저자 : 김경모, 138-736, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산대학교 서울아산 소아청소년병원 소아청소년과

Tel: 02-3010-3380, Fax: 02-473-3725, E-mail: kmkim@amc.seoul.kr

## 서 론

염증성 장질환은 원인 불명의 만성적인 염증을 일으키는 장질환으로, 크게 궤양성 대장염과 크론병으로 구분된다. 서구에서는 지난 50년간 꾸준히 증가하고 있고<sup>1,2)</sup>, 국내에서도 최근 소아와 성인 모두에서 발생 빈도가 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>. 이들 질환은 만성적으로 복통, 설사, 혈변 등을 초래하며 소아에서는 영양 실조, 성장 장애 및 사춘기 발현 지연 등의 중요한 문제를 초래한다<sup>3)</sup>.

염증성 장질환의 발생 원인은 아직 명확하지 않지만 유전적 감수성, 장 내 세균총 그리고 면역 매개에 의한 조직 손상 등의 다요인이 역할을 할 것이라고 추정한다. 가족 내에서 발병률이 높고 이란성 쌍생아에서 보다 일란성 쌍생아에서 유병률이 더 높으며 다양한 인종에서 유병률의 차이를 보이고 있어 유전적 소인의 가능성을 뒷받침해 주고 있다<sup>3,4)</sup>.

저자들은 유전적 소인에 대한 연구의 일환으로 NOD2 단백에 대한 연구를 시행한 바가 있으며, 이는 장관 상피 세포의 세포질 내로 세균이 유입될 때, 세균의 peptidoglycan을 인지하여, NF- $\kappa$ B를 통해 세균에 대한 면역반응을 매개하는 세포질 내 단백질로 이용된다. NOD2 유전자는 서구의 연구에서는 크론병과 관련이 있는 것으로 알려져 있으나<sup>5)</sup>, 저자들이 시행한 한국인 소아에서는 NOD2가 염증성 장질환과 연관이 없는 것으로 밝혀졌다<sup>6)</sup>.

염증성 장질환이 Th1과 Th2 면역 반응의 불균형을 특징으로 하고 이는 친염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b와 항염증성 사이토카인인 IL-10 사이의 부조화로 초래된다<sup>7,8)</sup>. 이에 TNF- $\alpha$ 와 IL-10이 중요한 유전자로 인식되고 있고 TNF- $\alpha$ 에 대한 단클론 항체가 단핵세포에서 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 생산을 억제함으로써 장의 염증을 줄여주기에 이것이 크론병의 치료에 사용되고 있다<sup>9)</sup>. TNF- $\alpha$  유전자는 6번 염색체의 단완의 HLA-B와 HLA-DR 사이의 주요 조직 적합성 복합체 내에 위치하고 있고 중양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재면역반응(innate immune response)에

폭넓게 관여하는 신호분자이다. 이 TNF- $\alpha$ 는 염증성 장질환 외에도 알츠하이머, 암, 우울증 등의 발생에 관여한다고 알려져 있다<sup>10)</sup>. 염증성 장질환과 TNF- $\alpha$  분비와 밀접한 관련이 있으며 크론병 환자의 점막에서의 생산이 증가되어 있으며<sup>3)</sup>, 이는 질병의 시작 시 TNF- $\alpha$ 가 먼저 생산이 되고 IL-1b가 증가되면서 서로 자극하여 IL-6을 증가시키게 된다<sup>11,12)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 크론병 환자의 소장 상피세포에서 항원 침입을 유도하여 질병의 시작과 진행에 Th1 사이토카인을 유도한다<sup>13,14)</sup>. 이러한 이유로 TNF- $\alpha$  유전자는 촉진자 위치에서 몇몇 단일 염기 다형성이 보고되었으며<sup>9,15~17)</sup>, 이러한 단일 염기 다형성이 TNF- $\alpha$  생산과 연관이 있으며<sup>18,19)</sup>, 염증성 장질환의 연관성 및 발현 양상과도 관계가 있다는 보고도 있다<sup>11,20)</sup>. 지금까지 잘 알려진 TNF- $\alpha$  유전자의 단일 염기 다형성 부위(single nucleotide polymorphic sites)는 -238, -376, -863, -1,031이고, TNF- $\alpha$  수용체의 단일 염기 다형성 부위는 -196, -1,466, -1,493, -1,663, -1,690이다<sup>21,22)</sup>.

이러한 연구 결과를 바탕으로 TNF- $\alpha$ 와 TNF 수용체의 단일염기 다형성과 크론병과의 연관성을 밝히려는 연구가 주로 성인을 대상으로 보고되어 왔다<sup>23)</sup>. 소아의 발현 양상, 발생 성비, 원인 등은 많은 연구에서 성인과 다른 양상을 보인다<sup>1)</sup>. 또한 크론병을 일으키는 원인 중 소아는 유전적 소인이 어른에 비해 강할 것으로 추측된다. 때문에 유전적 다형성에 관한 연구가 소아에서 필요한 이유가 된다. 소아 크론병의 IL-10, TNF- $\alpha$ 의 유전적 다형성을 분석한 연구가 외국에서는 있었지만<sup>24)</sup>, 한국 소아의 유전학적 소인에 대한 연구는 현재까지 없는 실정이었다.

이에 본 연구에서는 크론병을 진단받은 환자와 건강한 소아를 대상으로 염증 반응을 매개하는 TNF- $\alpha$  대립유전자형의 빈도와 단일염기 다형성의 비교를 통해 크론병의 발생과 관련된 유전적 요인을 찾고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1996년 1월부터 2008년 4월까지 서울아산병원 소아과에서 염증성 장질환으로 진단받고 외래 추적 관찰되고 있는 환자 중 유전자 검사가 가능하였던 환자 54명

을 대상으로 하였고 이상 소견을 보이지 않는 건강 대조군 30명을 대상으로 하였다. 환자의 부모로부터 연구에 관련하여 안내 및 동의서를 받았고 모든 환자들은 의무기록 분석을 통하여 다시 분류하였다. 본 연구는 본원 기관윤리심의위원회의 승인을 받았다.

## 2. 연구 방법

염증성 장질환의 진단은 임상적, 방사선과적, 내시경적 및 조직학적 기준을 기본으로 하였다<sup>25,26</sup>. 대변을 배양 검사, 조직학적인 검사 및 PCR을 이용하여 *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Camphylobacter*, *Clostridium difficile*의 세균성 장염, 원충성 장염 및 결핵을 배제하였다. Porto criteria<sup>25</sup>에 따라서 상부위장관 내시경, 대장 내시경, 및 방사선학적인 검사를 시행하여 침범 부위 및 동반 병변을 진단하였다. 크론병의 분포 및 양상과 궤양성 대장염의 분포는 Montereal classification<sup>27</sup>에 따라 정의하였다. 신환의 경우 크론병을 처음 진단 받을 때, 타원에서 치료를 받던 환자의 경우 전원시 환자의 병력, 헤마토크릿, 적혈구 침강속도, 알부민 등의 검사 소견과 진찰 소견을 토대로 소아 크론병 활동성을 점수화하여 질병의 중등도를 측정하였다<sup>28</sup>.

## 3. Genomic DNA의 추출, 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction) 증폭, PCR-SSCP 분석

Genomic DNA의 추출, 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction) 증폭, PCR-SSCP 분석은 기존의 장 등<sup>6</sup>의 분석 방법을 이용하였다. 대상 환자들의

혈액의 DNA를 추출하여 TNF- $\alpha$  -238, -308, -857, -863, -1,031 유전자형을 polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 법을 이용하여 확인하였고 다형성을 찾기 위하여 non-isotopic genomic PCR-SSCP analysis를 사용하여 시발체(primer) (Table 1)를 이용하여 다형성이 있는 부위를 증폭하였다. PCR은 200 ng의 genomic Dtemplate로 95°C (1분), 60°C (0.5분), 그리고 72°C (1분)에서 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>-containing reaction buffer (PCR buffer II, Perkin Elmer-Cetus)를 사용하여 38회(cycles)를 시행하였다. PCR 생성물 10  $\mu$ L를 ethidium bromide (0.5 g/ml of 1xTBE)에 염색된 2% 한천겔에 용해시켜 자외선하에서 증폭된 PCR 추출물을 사진촬영을 하였다. PCR 생성물 20  $\mu$ L를 5  $\mu$ L의 0.5 N NaOH, 10 mM EDTA 그리고 10  $\mu$ L의 denaturing loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 그리고 0.05% xylene cyanol)을 혼합하였다. 95°C에서 5분간 가열한 뒤 각각 미리 4°C로 냉각된 well에 재빨리 sample을 loading시키고 10% glycerol이 포함된 것과 되지 않은 두 개의 8% nondenaturing polyacrylamide겔을 동시에 running하여 이 두겔을 buffer-jacketed gell apparatus (DGGE-II; Aladin Enterprises, Inc., San Francisco, CA)에 다시 전기영동하였다. 460 볼트에서 4시간 전기영동한 후 겔을 ethidium bromide로 염색하여 정제된 주형을 얻었다<sup>29</sup>.

## 4. 통계 분석

크론병 환자와 정상 환자군에서 TNF- $\alpha$ 와 TNF 수용

Table 1. Oligonucleotide Primers Used for Genomic PCR (all sequences are listed 5' to 3')

Primer	Polymorphism	Sequences	Orientation
TNF-1	-238	TTCAGCCTCCAGGGTCCTAC	Sense
TNF-2		CCTTGGTGGAGAAACCCATG	Antisense
TNF-3	-238	CTCAGGACTCAACACAGCTT	Sense
TNF-4		CTTCTGGGCCACTGACTGAT	Antisense
TNF-5	-857	CGAGTATGGGGACCCCCACT	Sense
TNF-6		GAGTGAAATCACCCCGGGA	Antisense
TNF-7	-863	GAAGGAAAAGTCAGGGTCT	Sense
TNF-8		TACATGGCCCTGTCTTCGTT	Antisense
TNF-9	-1,031	GCTCAAAGGGAGCAAGAGCT	Sense
TNF-10		CTGTAACCCATTCCTCAGAG	Antisense

체 유전자 각 위치의 유전자 형과 대립유전자(allele)의 빈도를 구하였고 변종(mutant) 대립유전자를 가진 군과 갖지 않은 군으로 나누어 두 집단에서 연령, 침범 부위, 질병 활성도 등을 카이제곱 검사를 이용하여 분석하여 TNF- $\alpha$  유전자 다형성과 크론병 간의 상관관계를 알아보았다.

대조군과 크론병 환자 사이에 일관성을 비교하기 위해서 SNP Alyze software 5.0 Version (Dynacom, Yokohama, Japan)을 사용하여 Hardy-Weinberg equilibrium을 만족함을 확인하였다. 이들의 분석에는 SPSS 10.0 프로그램을 사용하였다. 양측검정의 유의수준은  $p < 0.05$ 를 통계적으로 의미 있는 것으로 하였다.

TNF- $\alpha$ 의 haplotype을 분석하기 위해 대조군과 환자 군에서의 haplotype 빈도를 각각 개별적으로 카이제곱 검사와 PLINK 2.05 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>)<sup>30)</sup>을 사용하여 순열 교정하였고 4.2 버전의 Haploview 프로그램을 이용하여 비교하였다(<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

**Table 2.** Characteristics of the Patients with CD, UC and Healthy Controls

	CD (N=40)	UC (N=14)	HC (N=30)
Age (yr) (mean $\pm$ SD)	11.9 $\pm$ 3.6	12.0 $\pm$ 3.2	8.6 $\pm$ 3.1
Male/Female	27/13	5/9	15/15
Location of disease			
L1 terminal ileum	3		
L2 colon	5		
L3 ileocolon	32		
L4 upper GI	16		
Behavior of disease			
B1 inflammatory	31		
B2 stricturing	3		
B3 penetrating	6		
Perianal lesion (+)/(-)	30/10		
PCDAI <30/ $\geq$ 30	14/26		
Extension of the disease			
Proctitis		3	
Left sided colitis		5	
Total colitis		6	

UC: ulcerative colitis, CD: Crohn's disease, HC: healthy Control, PCDAI: Pediatric Crohn's disease activity index.

## 결 과

### 1. 성별과 연령 분포

조사 대상 54명 중 크론병 환자는 총 40명(남 : 여 27 : 13, 평균 연령 11.9 $\pm$ 3.6세)이었으며 궤양성 대장염 환자는 총 14명(남 : 여 5 : 9 평균 연령 12.0 $\pm$ 3.2세), 대조군은 30명(남 : 여 15 : 15, 평균 연령 8.6 $\pm$ 3.1세)였다.

### 2. 염증성 장질환의 병변의 분포

40명의 크론병 환자의 분포는 회장 말단에 국한된 L1이 3명(7.5%), 대장에 국한된 L2가 5명(12.5%), 소장 과 대장에 모두 분포한 L3형이 32명(80%)으로 가장 빈도가 높았고 상부 위장관을 침범한 환자는 L4로 별도로 구분하였고 16명(40%)이었다. 누공이나 협착이 없

**Table 3.** Genotype and Allele Frequencies of Polymorphism in the TNF- $\alpha$  Gene

	Genotype			Allele frequency (%)	p-value
-238	GG	GA	AA		
Normal	28	2	0	3.3	
(N=30)					
IBD (N=54)	50	4	0	3.7	1
CD (N=40)	38	2	0	2.5	1
UC (N=14)	12	2	0	7.1	0.589
-308	GG	GA	AA		
Normal	25	5	0	8.3	
IBD	46	8	0	7.4	1
CD	34	6	0	7.5	1
UC	12	2	0	7.1	1
-857	CC	CT	TT		
Normal	21	8	1	16.7	
IBD	39	13	2	15.7	1
CD	27	11	2	18.8	1
UC	12	2	0	7.1	0.212
-863	CC	CA	AA		
Normal	23	4	3	16.7	
IBD	34	18	2	20.4	0.683
CD	26	12	2	20	0.832
UC	8	6	0	21.4	0.733
-1,031	TT	TC	CC		
Normal	21	5	4	21.7	
IBD	31	20	3	24.1	0.849
CD	24	14	2	22.5	1
UC	7	6	1	28.6	0.606

는 염증형 B1이 31명, 협착(B2)은 3명, 누공(B3)형은 6명이었고 항문 주위 누공이나 치루, 치열 등의 항문 주위 병변이 있었던 경우는 30명, 없었던 경우는 10명이었다. PCDAI (Pediatric Crohn disease activity index) 30 미만은 14명, 30 이상은 26명이었다(Table 2). 궤양성 대장염 14명의 분포는 직장염이 3명(21.4%), 좌측 대장염이 5명(35.7%), 전 대장염이 6명(42.8%)이었다.

### 3. 염증성 장질환과 대조군 사이의 TNF- $\alpha$ 대립유전자 단염기 다형성의 비교

본 연구에서 TNF- $\alpha$  유전자 -238, -308, -857, -863, -1,031 부위의 대립유전자형의 빈도는 크론병과 정상 대조군 사이에 전체 비교에서 총 대립유전자 전체 빈도수의 차이를 보이지 않았다(Table 3).

**Table 4.** Correlation Based on the Location and Genotype and Allele Frequencies of Polymorphism in the TNF- $\alpha$  Gene

Location	Genotype			Allele frequency (%)	$p$ -value
-238	GG	GA	AA		0.010
L1 (N=3)	2	1	0	16.7	
L2 (N=5)	4	1	0	10.0	
L3 (N=32)	32	0	0	0.0	
L4 (N=16)	16	0	0	0	
-308	GG	GA	AA		0.208
L1 (N=3)	3	0	0	0.0	
L2 (N=5)	3	2	0	20.0	
L3 (N=32)	28	4	0	6.3	
L4 (N=16)	15	1	0	3.1	
-857	CC	CT	TT		0.311
L1 (N=3)	3	0	0	0.0	
L2 (N=5)	2	2	1	40.0	
L3 (N=32)	22	9	1	17.2	
L4 (N=16)	10	6	0	18.8	
-863	CC	CA	AA		0.507
L1 (N=3)	2	1	0	16.7	
L2 (N=5)	5	0	0	10	
L3 (N=32)	19	11	2	23.4	
L4 (N=16)	7	6	0	23.1	
-1,031	TT	TC	CC		0.667
L1 (N=3)	1	2	0	33.3	
L2 (N=5)	4	1	0	10.0	
L3 (N=32)	24	14	2	28.1	
L4 (N=16)	11	5	0	15.6	

### 4. 크론병의 병변 위치에 따른 TNF- $\alpha$ 유전자 단염기 다형성의 비교

TNF- $\alpha$  -238 위치의 A 대립유전자가 있는 크론병 환자에서 소장 국한된 L1 16.7%, 대장에 국한된 L2 10.0%로  $p$ -value 0.010으로 의미 있는 분포 차이를 보이고 있었고 -308, -857, -863, -1,031 부위는 위치에 따른 대립유전자의 분포 차이는 보이지 않았다(Table 4). 이로써 -238은 L1 위치에 특이성을 나타내었다. 10세 이상과 10세 미만을 구분하여 대립유전자 다형성을 비교하여 보았을 때 연령에 따른 분포의 차이는 없었다.

### 5. 크론병의 발현양상에 따른 TNF- $\alpha$ 유전자 단염기 다형성의 비교

TNF- $\alpha$  유전자 -238, -308, -857, -863, -1,031 부위의 단염기 유전자 다형성과 발현 양상 사이에서는 차이를 보이지 않았다 (Table 5).

**Table 5.** Correlation Based on the Behavior and Genotype and Allele Frequencies of Polymorphism in the TNF- $\alpha$  Gene

Behavior	Genotype			Allele frequency (%)	$p$ -value
-238	GG	GA	AA		0.737
B1 (N=31)	29	2	0	3.2	
B2 (N=3)	3	0	0	0.0	
B3 (N=6)	6	0	0	0.0	
-308	GG	GA	AA		0.751
B1 (N=31)	26	5	0	8.1	
B2 (N=3)	3	0	0	0.0	
B3 (N=6)	5	1	0	8.3	
-857	CC	CT	TT		0.677
B1 (N=31)	22	7	2	17.7	
B2 (N=3)	2	1	0	16.7	
B3 (N=6)	3	3	0	25.0	
-863	CC	CA	AA		0.769
B1 (N=31)	21	8	2	19.4	
B2 (N=3)	2	1	0	16.7	
B3 (N=6)	3	3	0	25.0	
-1,031	TT	TC	CC		0.884
B1 (N=31)	19	10	2	22.6	
B2 (N=3)	2	1	0	16.7	
B3 (N=6)	3	3	0	25.0	

## 6. 크론병의 항문주위 병변의 유무에 따른 TNF- $\alpha$ 유전자 단염기 다형성의 비교

TNF- $\alpha$  유전자 -238, -308, -857, -863, -1,031 부위의 단염기 유전자 다형성과 항문주위 병변의 유무와의 관련성은 없었다(Table 6).

## 7. 소아 크론병 활동성의 차이에 따른 TNF- $\alpha$ 유전자 단염기 다형성의 비교

TNF- $\alpha$  -238, 308 위치에 A 대립유전자가 있는 환자에서 PCDAI  $\geq 30$ 이 3.8%, 13.5%으로 그렇지 않은 환자에 비해 활동성이 높았으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

-857, -863, -1,031 위치의 단염기 다형성에 따른

PCDAI의 차이 역시 보이지 않았다(Table 7).

## 8. 크론병과 대조군의 단상형 분석

크론 환자와 대조군의 5군데 위치의 TNF- $\alpha$  유전자 단염기를 조합하여 분석한 단상형(haplotype)은 Table 8에 제시되어 있다. 32개의 가능한 단상형 중에서 5개의 형태로 분석되었다. 단상형 A (TCCGG)는 대조군에서 52.5%, 크론병 환자군에서 56.67%로 모두에서 가장 빈도가 높았으며 정상 대조군과 단상형과의 차이는 보이지 않았다.

## 고 찰

크론병의 발병 원인 요소로 유전적인 요소, 면역 체

**Table 6.** Correlation Based on the Perianal Lesion and Genotype and Allele Frequencies of Polymorphism in the TNF- $\alpha$  Gene

Perianalr	Genotype			Allele frequency (%)	p-value
-238	GG	GA	AA		0.442
No (N=10)	9	1	0	5.0	
Yes (N=30)	29	1	0	1.7	
-308	GG	GA	AA		0.629
No (N=10)	8	2	0	10.0	
Yes (N=30)	26	4	0	6.7	
-857	CC	CT	TT		0.464
No (N=10)	6	4	0	20.0	
Yes (N=30)	21	7	2	18.3	
-863	CC	CA	AA		0.698
No (N=10)	7	3	0	15.0	
Yes (N=30)	19	9	2	21.7	
-1,031	TT	TC	CC		0.683
No (N=10)	6	4	0	20.0	
Yes (N=30)	18	10	2	23.3	

**Table 7.** Correlation Based on the PCDAI and Genotype and Allele Frequencies of Polymorphism in the TNF- $\alpha$  Gene

PCDAI	Genotype			Allele frequency (%)	p-value
-238	GG	GA	AA		0.539
<30 (N=14)	14	0	0	0	
$\geq 30$ (N=26)	24	2	0	3.8	
-308	GG	GA	AA		0.09
<30 (N=14)	14	0	0	0	
$\geq 30$ (N=26)	19	7	0	13.5	
-857	CC	CT	TT		0.086
<30 (N=14)	14	0	0	0	
$\geq 30$ (N=26)	22	2	2	11.5	
-863	CC	CA	AA		1
<30 (N=14)	8	6	0	21.4	
$\geq 30$ (N=26)	18	6	2	19.2	
-1,031	TT	TC	CC		1
<30 (N=14)	8	6	0	21.4	
$\geq 30$ (N=26)	16	8	2	23.1	

**Table 8.** TNF Haplotype Frequency Estimates in Controls and Crohn's Disease

Type	Haplotype*	Case (%)	Control (%)	$\chi^2$	p-value	Permutation p-value
A	T-C-C-G-G	52.5	56.67	0.060	0.807	1.000
B	C-A-C-G-G	20	15	0.252	0.616	1.000
C	T-C-T-G-G	18.75	16.67	0.101	0.750	1.000
D	T-C-C-A-G	6.25	6.67	0.033	0.856	1.000
E	C-C-C-G-A	2.5	5	0.086	0.770	1.000

\*The SNP positions within a haplotype are the following: -1,031C>T, -863C>A, -857C>T, -308G>A, -238G>A.

계 자체 문제, 항원, 환경적인 요소 등이 복합적인 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 TNF- $\alpha$  대립유전자의 빈도는 염증성 장질환 환자와 대조군 사이에서 차이가 없었다. 어른을 대상으로 한 이전의 연구들에서는 TNF- $\alpha$  -308A 대립유전자의 빈도가 크론병에서 유의하게 높았다는 연구결과도 있고<sup>31,32)</sup>, 활동성 염증성 장질환, 특히 크론병 환자에서 유의하게 낮게 관찰되었다는<sup>22)</sup> 서로 상반된 보고가 있었다. 이러한 차이를 설명할 수 있는 몇 가지 요소들을 생각할 수 있다. 연구 대상 환자들의 인종의 차이, 크론병의 표현형에 대한 정의의 차이, 그리고 아마도 환경적 요소들이 크론병의 활동 양상의 차이에 기여했을 것으로 생각한다. 이전 연구들이 어른을 대상으로 시행한 연구이기에 다른 환경적 요인의 영향이 컸을 것이라 생각하였으나 한국인 성인을 대상으로 하였던 연구에서<sup>21)</sup> TNF-308A 대립유전자의 빈도가 오히려 낮았다는 결과와 소아를 대상으로 한 우리의 연구에서도 차이가 없음과 또한 10세 미만의 연령을 대상으로 한 비교에서도 큰 차이를 보이지 않았음을 볼 때 한국인의 인종적인 특성상 TNF- $\alpha$  유전자 다형성의 빈도가 낮은 것은 아닌가 생각한다. 또한 소아에서 발현한 크론병 환자를 대상으로 한 연구의 특성상 대상군의 수가 적어서 통계적 유의성이 나오기는 힘든 한계점이 있었다.

한편 Wilson 등<sup>33)</sup> 일본인 환자를 대상으로 한 연구에서 TNF- $\alpha$  -1,021, -863, -857 다형성이 크론병에서 유의하게 증가되었으나 궤양성 대장염과는 상관관계가 없다는 연구결과를 보고한 바 있다. 이는 서구의 연구와는 달리 같은 종족을 대조군으로 선정하여 인종의 차이에 의한 비틀림(bias)을 제거할 수 있었고, 본 연구에서도 한국인을 대상으로 한 연구로서 인종의 차이에 의한 비틀림은 제거할 수 있었다. 그러나 염증성 장질환의 특성 자체가 이종의 질환으로 어떤 환자가 포함되었느냐에 따라서 결과가 상이하게 나타날 수 있다.

우리의 연구에서는 병변의 위치에 따른 TNF- $\alpha$  유전자 단염기 다형성의 비교에서 -238A 위치의 TNF- $\alpha$  대립유전자가 있는 크론병 환자에서 회장형에서 통계학적으로 유의하게 증가되어 있었고( $p=0.010$ ), -308A, -857T, -863A, -1,031C 부위는 위치에 따른 대립유전자의 차이는 보이지 않았다. 한국 성인을 대상으로 한 연구에서 -857T 위치의 유전자 다형성이 크론병에

서 의미 있게 차이를 보인다는 결과가 있었지만 소아를 대상으로 한 우리의 연구에서는 -857T 유전자 다형성의 차이는 보이지 않았다. 성인 연구에서는 위치에 따른 단염기 다형성의 비교는 없었다<sup>34)</sup>.

질환의 임상 양상에 따른 차이 및 항문주위 병변의 유무나 소아 크론병 활동성의 차이는 보이지 않았다. 그러나 이전의 다른 연구를 보면 Higuchi 등<sup>20)</sup> 연구에서는 TNF- $\alpha$  -308A와 -238A의 유전자 다형성이 크론병의 감수성과 질환형에 영향을 미친다고 보고하였다. Koss 등<sup>35)</sup>은 대조군과 비교하여 대장형 환자에서 TNF- $\alpha$  -308A 대립유전자의 빈도가 의미 있게 증가되어 있었다고 보고하였다. 또한, Sashio 등<sup>11)</sup>은 궤양성 대장염과 크론병 성인 환자의 대조군의 비교 연구에서 궤양성 대장염 환자에서 TNF- $\alpha$  308 G->A와 238 G->A 다형성이 더 많은 빈도로 관찰된다고 보고하였다. 그러나 Sykora 등<sup>36)</sup>은 궤양성 대장염 환자에서 TNF- $\alpha$  308 G->A 다형성과 질환의 범위 및 임상 양상의 차이와의 연관성을 증명하지 못하였다. 또한, Sykora 등<sup>36)</sup>은 크론병 환자를 염증형과 누공 또는 협착형의 2개의 군으로 분류하여 TNF- $\alpha$  308 G->A 다형성을 증명하였다. 염증형의 크론병 환자에서 TNF- $\alpha$  308 G->A 대립형의 빈도가 낮게 관찰되었고, 누공 또는 협착형의 크론병 환자에서는 의미있게 증가되어 있었다고 보고하였다. 흥미로운 것은 TNF- $\alpha$  308 G->A 다형성이 전반적인 크론병에 대한 감수성에 대한 영향보다는 크론병의 표현형에 대한 영향이 더 크다는 것을 보여주었다. 우리의 연구에서는 크론병에서 염증형은 31명, 협착은 3명, 누공형은 6명으로, 누공 또는 협착형의 환자와 TNF- $\alpha$  308 G->A 다형성의 관계를 밝히기에는 환자군의 수가 충분하지 않았다. 항문 주위 병변의 유무와 TNF- $\alpha$  대립유전자의 빈도의 차이는 김 등<sup>21)</sup>은 크론병 환자에서 누공의 유무, 병변위 위치, 항문주위 병변의 유무 등 질환의 임상 양상에 따른 TNF- $\alpha$  -308A 대립유전자의 빈도는 관찰할 수 없었으나, -238A 대립유전자의 경우 항문 주위 병변이 있는 크론병 환자에서 유의하게 높게 나타났다고 보고하였다.

Louis 등<sup>32)</sup> TNF- $\alpha$  다형성과 TNF- $\alpha$ 의 생성과의 관계가 약간의 상관 관계가 있을 수도 있으나, TNF유전자 이외의 다른 유전자나 환경적 요인이 영향을 미칠 수 있다고 보았다.

이런 상반된 연구결과를 통해 TNF- $\alpha$  유전자형과 염증성 장질환은 직접적인 상관관계가 있을 수도 있으나, 질환의 발현, 사이토카인의 생산이나 조절 등에는 TNF- $\alpha$  유전자에 인접한 다른 연관관계가 있는 유전자 및 환경적 요인 등 많은 변수들이 영향을 줄 수 있다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 크론병 환자와 대조군 사이에서 TNF- $\alpha$  대립유전자의 빈도는 차이가 없었다. 위치에 따른 관계에서는 TNF- $\alpha$  -238 위치의 단일 염기 치환이 회장형에서 의미있게 증가되어 있었지만 다른 부위에서는 의미있는 관계는 보이지 않았다. 그 밖에 발현 양상에 따른 TNF- $\alpha$  유전자 단염기 다형성 비교, 항문 주위 병변 및 소아 크론병 활동성과 TNF- $\alpha$  유전자 단염기 다형성 사이에서는 유의한 차이는 보이지 않았다. 이로써 크론병에 영향을 주는 인자는 유전적인 소인과 환경적인 소인, 인종적인 차이 및 또 다른 변수들의 복합적인 작용의 결과라고 생각된다.

## 요 약

**목 적:** 염증성 장질환의 유병률이 증가하고 있고 소아에서 유전적인 요인의 영향이 클 것으로 생각하여 소아를 대상으로 TNF- $\alpha$  유전자의 단일 염기 다형성에 대한 빈도를 비교하고 연관성을 알아보려고 하였다.

**방 법:** 1996년 1월부터 2008년 4월까지 서울아산병원 소아과에서 염증성 장질환을 진단받고 외래 추적 관찰 중인 환자 중 유전자 검사가 가능했던 54명과 건강한 대조군 30명을 대상으로 하였다. 염증성 장질환을 진단받은 환자는 Porto Criteria에 따라 침범부위와 병변을 구분하였고 Monterial Classification에 따라 분포를 진단하였다. 환자군과 대조군의 Genomic DNA를 추출하여 PCR 증폭하여 유전자형을 얻었다. TNF- $\alpha$ 의 각 위치의 유전자형과 대립 유전자의 빈도를 구하여 유전자 다형성과 크론병간의 상관관계를 알아보았다.

**결 과:** 조사대상 54명 중에 40명의 크론 환자에서 분포양상은 소장과 대장에 모두 분포한 L3이 80%로 가장 빈도가 높았고 누공이나 협착이 없는 염증형이 31명으로 가장 많았다. 항문 주위 병변이 있는 경우가 30명으로 75%를 보였다. 14명의 궤양성 대장염 환자의 경우는 전대장염형이 42.8%로 가장 많았다. TNF- $\alpha$  유전자

-238, -308, -857, -863, -1,031 부위의 대립 유전자의 빈도는 정상대조군과 환자군 사이에 차이를 보이지 않았다. TNF- $\alpha$  -238위치의 A대립 유전자 있는 크론병 환자에서 소장형과 대장형에 의미있는 분포차이를 보였으나 다른 부위에서는 차이를 보이지 않았다. 그밖에 발현양상 및 항문주위 병변의 유무, 소아크론병의 활동성의 차이에 따른 TNF- $\alpha$  유전자 단염기 다형성의 비교에서는 의미있는 차이를 보이지 않았다. 크론 환자와 대조군 사이에 단상형 분석에서도 차이는 보이지 않았다.

**결 론:** 본 연구는 단일 병원에서 소수의 환자를 대상으로 이루어진 연구로 한계가 있지만 소아에서 TNF- $\alpha$  유전자 단염기 다형성을 분석하고 비교하는 시도를 통하여 아직 명확히 밝혀져 있지 않는 크론병의 원인중 유전적인 인자의 영향에 대한 접근을 할 수 있었다. 우리의 연구에서 건강 대조군과 크론병 환자사이에 큰 빈도의 차이가 없었음을 통해 소아라도 크론병의 발생에 유전적인 인자만이 작용하기 보다는 환경적인 소인, 인종적인 차이 또다른 변수들의 복합적으로 작용한다고 생각한다. 따라서 앞으로도 크론병의 원인을 제시하기 위한 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kim BJ, Song SM, Kim KM, Lee YJ, Rhee KW, Jang JY, et al. Characteristics and trends in the incidence of inflammatory bowel disease in Korean children: a single-center experience. *Dig Dis Sci* 2010;55:989-95.
- 2) Song IS, Chang DK, Kim CY. Current status of Crohn's disease in Korea. *Korean J Med* 1998;55:158-68.
- 3) Dionne S, Hiscott J, D'Aqata I, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci* 1997;42:1557-66.
- 4) Tysk C, Linberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6.
- 5) Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R, et al. Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:885-913.



- 6) Jang JY, Song SM, Kim KM, Oh SH, Lee YJ, Rhee KW. Lack of common NOD2 mutations in Korean pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Pediatrics International* 2010;52:888-9.
- 7) Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:285-90.
- 8) van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, et al. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-35.
- 9) Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
- 10) Figueroa CC, Quera PR, Valenzuela EJ, Jensen BC. Inflammatory bowel disease: experience of two Chilean centers. *Rev Med Chil* 2005;133:1295-304.
- 11) Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002;53:1020-7.
- 12) Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. Spagnolo, The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 2002;9:211-23.
- 13) Söderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK, McKay DM, et al. Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Gut* 2004;53:1817-24.
- 14) Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D et al. A role for TNF- $\alpha$  and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82.
- 15) Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, Von Blomberg BM, Kostense PJ, et al. Secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and lymphotoxin  $\alpha$  in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43:456-63.
- 16) Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, et al. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996;103:391-6.
- 17) Heresbach D, Ababou A, Bourienne A, Alizadeh M, Quelvennec E, Pagenault M, et al. Polymorphism of the microsatellites and tumor necrosis factor genes in chronic inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21:555-61.
- 18) Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999;56:281-8.
- 19) Turner D, Grant SC, Yonan N, Sheldon S, Dyer PA, Sinnott PJ, et al. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 1997;64:776-9.
- 20) Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-12.
- 21) Kim TH, Kim BG, Shin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:377-86.
- 22) van Hogezaand RA, Verspaget HW. New therapies for inflammatory bowel disease: an update on chimeric anti-TNF  $\alpha$  antibodies and IL-10 therapy. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;223:105-7.
- 23) Mekinian A, Tamouza R, Pavy S, Gestermann N, Ittah M, Mariette X, et al. Functional study of TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. *European Cytokine Network* 2011;22:88.
- 24) Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnett D. IL-10 and TNF- $\alpha$  promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009;15:3776-82.
- 25) IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, H.a.N.E. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:1-7.
- 26) Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB, Dubinski MC, Glickman JN, Gold BD, et al. Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:653-74.
- 27) Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.
- 28) Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, et al. Development and validation of

- a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:439-47.
- 29) Wilson AG, Di Giovino FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
- 30) Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75.
- 31) Armstrong AM, Foulkes R, Jennings G, Gannon C, Kirk SJ, Gardiner KR. Tumour necrosis factor and inflammatory bowel disease. *Br J Surg* 1997;84:1051-8.
- 32) Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401-6.
- 33) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
- 34) Yang SK, Lee SG, Cho YK, Lim J, Lee I, Song K. Association of TNF-alpha/LTA polymorphisms with Crohn's disease in Koreans. *Cytokine* 2006;35:13-20.
- 35) Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1:185-90.
- 36) Šýkora J, Šubrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, et al. Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G--&A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:479-87.