

만성폐쇄성폐질환에서 ACE 유전자 다형성과 기관지 과민성의 연관성

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실¹, 건양대학교 의과대학 내과학교실², 전북대학교 의과대학 내과학교실³, 임상의학연구소
김승수¹, 최유진², 박성주³, 이흥범³, 이용철³, 이양근³

Polymorphisms of Angiotensin-converting Enzyme Gene Associated in Patients with COPD with or without Bronchial Hyperresponsiveness

Seung Soo Kim, MD.¹, Eu Gene Choi, MD.², Seoung Ju Park, MD.³, Heung Bum Lee, MD.³, Yong Chul Lee, MD.³, Yang Keun Rhee, MD.³

Department of Internal Medicine¹, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Department of Internal Medicine², College of Medicine, Konyang University, Department of Internal Medicine³, Medical School and Research Institute of Clinical Medicine, Chonbuk National University

Background : An insertion-deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene has been shown to be associated with enzyme activity levels of ACE. Reported results that have been mutually contradictory about asthmatic hypersensitivity and occurrence according to ACE gene insertion (I)/deletion (D) polymorphism. Also, the involvement of the ACE genes as the genetic basis of bronchial asthma is currently controversy. We investigated whether there was any association between polymorphisms of the ACE genes and airway hyper-responsiveness in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Methods : A total of 100 patients with COPD were enrolled in this study. The ACE genotypes were determined in all subjects by polymerase chain reaction. Pulmonary function test including bronchodilator response (BDR), methacholine bronchial provocation test (MBPT) were done in those patients. Airway hyper-responsiveness include any findings of positive BDR or MBPT.

Results : In COPD patients, the ACE genotype distribution did not differ significantly among groups of patients with severities of COPD, and with or without airway hyper-responsiveness.

Conclusions : These results suggest that polymorphisms of the ACE gene may not be associated with airway hyper-responsiveness, development and severity of COPD. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 58:25-30)

Key words : Angiotensins, Enzymes, Polymorphism, COPD

서 론

만성폐쇄성폐질환(COPD)은 기도환기 장애가 치료에 의해 완전히 개선되지 않고 점진적으로 악화하는 질환으로 만성기관지염(chronic bronchitis), 폐기종(emphysema) 외에도 기관지 천식(bronchial asthma)과 같은 요소들을 포함하고 있다¹. 임상에서는 이러한 요소들이 함께 나타나는 경우도 있어 각각의 질환을 감별하는 데에 실제로 어려움이 있다. 현재까지도 천

식과 COPD의 병인에 대해서 논란이 많은 실정이고, 치료에 있어서 지속적인 스테로이드 흡입제 사용에 대해서도 논란이 있다.

기관지 천식은 COPD에 비해 치료에 의해 극적인 기류 장애 회복을 나타내는 질환으로, 병태생리 및 치료에 대한 연구에 있어 많은 발전을 이루고 있다. 천식의 다양한 원인 중 유전적인 요인에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있으며, 특히 병인과 밀접한 관계를 가지는 유전자를 밝혀내고자 노력 중이다. 그 중 하나로 ACE gene (안지오텐신 전환효소 유전자)이 있는데, 이에 의해 생산되는 ACE (안지오텐신 전환효소)는 기도 염증반응을 일으키는 물질로 알려진 bradykinin과 substance P를 불활성화시켜 기도 내의 염증반응을 감소시키는 역할을 한다. 또한, ACE는 안지오텐신 I을 안지오텐신 II로 전환하는 작용이 있는데, 안지오텐신 II는 직접 기관지 평활근을 수축시키는 작

Address for correspondence : **Heung-Bum Lee, MD, PhD**
Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Medical School and Research Institute of Clinical Medicine, Keum-Am Dong, Jeonju, Jeonbuk, 561-712, Korea
Phone : +82-63-250-1660 Fax : +82-63-254-1609
E-mail : lhbmnd@chonbuk.ac.kr
Received : Sep. 22. 2004
Accepted : Nov. 4. 2004

용이 있다. 이와 같은 사실을 바탕으로 ACE가 기관지 천식의 기도 수축 및 기도 과민성과 관계가 있을 것이라고 생각되고 있다². 그러나 아직까지는 기관지천식 환자에서 ACE 농도의 증가 및 감소 여부에 대해서 확실치 않고, 증상의 발현에 있어서 ACE가 어떤 영향을 미치는지에 대해서도 확실히 보고된 바가 없는 실정이며 ACE의 혈중농도에 관여될 것으로 생각되는 ACE 유전자 insertion(I)/deletion(D) 다형성 또한 보고자에 따라 천식의 기도 과민성 발생에 대해 상반된 결과를 보고하고 있다³⁻⁸. 그러나 천식에서는 많은 연구 보고가 이루어지고 있지만, COPD 환자에서 동반된 기도 과민성에 있어서의 ACE 유전자 다형성에 대해서는 특이할 만한 연구 보고가 없는 실정이다.

이에 이 연구에서는 ACE 유전자 다형성이 COPD 환자에서 천식 요소의 동반 여부와 연관성이 있는지 알아보기 위해 COPD 환자의 천식 요소 중 기도 과민성 유무에 따라 ACE 유전자형의 분포 및 증증도에 따른 ACE 유전자형의 차이를 비교해보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

대상 환자군은 2002년 6월부터 2003년 8월까지 COPD 의심하에 본원에 입원한 환자 중 ATS (American Thoracic society) 지침에 따른 COPD 진단기준을 만족하는 100명을 대상으로 하였으며, 이 중 1) 속효성 β_2 항진제 흡입 후 15% 이상이면서 200 ml 이상의 FEV₁의 호전, 2) 최대호기유속 측정상 일중 변동율이 20% 이상의 극적인 호전, 3) 메타콜린 기도과민검사(MBPT)상 PC₂₀ 값이 8 mg/ml이하인 경우의 세가지 조건 중 한 가지 이상을 만족하는 환자군을 기도과민성이 있다고 판정하여 천식 요소를 가진 COPD 군으로 분류하였다. 또한, COPD의 임상적 단계(clinical stage)는 2003 GOLD 지침에 따라 FEV₁을 기준으로 1단계부터 4단계까지로 분류하였다⁹. 연구는 전북대학교 임상시험위원회의 승인과 동의를 취득하였고 각 환자들에게 충분한 정보를 제공하였으며 서면 동

의를 받았다.

2. 방 법

DNA의 추출은 DNaid II kit (Genotech corp., Daejeon, KOREA)을 사용하였으며, 말초혈액 0.2 ml의 백혈구에서 DNA를 추출한 후 각 DNA의 농도는 spectrophotometer로 260 nm(λ)에서 측정하였다.

ACE 유전자의 insertion/deletion (I/D) 유전자 다형성은 ACE 유전자의 intron 16에 위치한 287 bp의 존재 유무를 multiplex polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 결정하였다. PCR 반응 용액은 Primer suspension & storage buffer에 녹인 ACE PrimerMix 용액 (Genotech corp., Daejeon, KOREA) 2 μ l와 Taq DNA polymerase 1 μ l(2 U), 5 mM의 dNTP 1 μ l, 10x reaction buffer 2 μ l가 혼합된 PCR master mix 용액, 8-MOP 12 μ l, 그리고 genomic DNA 200 ng 등 총 20 μ l로 조성하였다.

Thermocycler (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 predenaturation을 94°C에서 10분간 시행한 다음, denaturation은 94°C에서 40초, primer annealing은 65°C

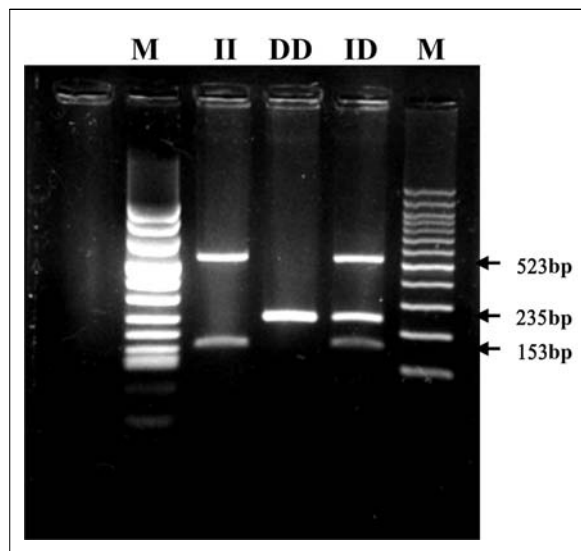


Figure 1. PCR products show three genotypes of ACE gene in 2% agarose gel electrophoresis. DD type shows one band at 235 bp, II type shows two bands at 523 bp and 153 bp, and ID type shows three bands at 523 bp, 235 bp, and 153 bp (DNA fragment sizes, in bases, are indicated by numbers on right). M: size markers.

에서 40초, 그리고 확장(extension)은 72°C에서 40초의 과정을 30회 시행하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 확장을 시행한 후 종료하였다. Sense primers의 염기서열은 5'-CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT GC-3'과 5'-GAT TAC AGG CGT GAT ACA GTC ACT TTT -3', antisense primer의 염기서열은 5'-GCC ATC ACA TTC GTC AGA TCT GGT AG-3'이었다.

PCR이 끝난 후 10-15분간 ultraviolet (UV) trans-illuminator를 조사하여 PCR 생성물을 불활성화시켰으며, PCR 생성물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel (NuSieve 4:1 Agarose, FMC BioProducts, USA)에서 전기영동한 후 분석하였다. 523 bp, 235 bp 및 153 bp의 세 개의 PCR 생성물이 관찰되면 ID heterozygote, 523 bp와 153 bp의 두 개의 PCR 생성물이 관찰되면 II homozygote, 그리고 235 bp 한 개의 PCR 생성물이 관찰되면 DD homozygote로 판정하였다(Fig. 1).

3. 통계처리

통계적 분석은 SPSS (Version 10.0, SPSS Inc, USA)를 이용하였으며 모든 측정치는 평균과 표준편

차 (mean±standard deviation)로 표기하였다. 그룹간 기본적인 특성들에 대한 통계적 검증에서 성비는 χ^2 test를 사용하였고 나이, FEV₁, FEV₁/FVC의 평균 치비교는 Mann-Whitney U test를 사용하였다. 기관지 과민성에 따른 COPD 환자의 ACE 유전자형의 빈도와 stage에 따른 유전자형 빈도는 χ^2 test로 검증하였다. 모든 통계검정은 $p < 0.05$ 를 유의 수준으로 하였다.

결 과

대상 환자 100명 중 기도 과민성을 가진 COPD 군은 49명이었고, 기관지 과민성이 없는 COPD 군은 51명이었다. 두 군의 연령, 성별, 폐기능 검사의 기도 폐쇄 정도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1).

기도 과민성을 동반한 군과 동반하지 않은 군으로 나누어 ACE 유전자의 다형성을 분석해 본 결과, 두 군 모두에서 DD 유전자형이 제일 낮은 비율(18.4%와 17.6%)을 나타내었고, 제일 높은 비율을 보인 유전자형의 경우 기도 과민성을 가진 군에서는 II형(42.9%), 기도 과민성이 없는 군에서는 ID형(47.1%)으로 차이를 보였다(Table 2). 하지만, 유전자형의 분포에 있어 두 군 간에 통계적인 차이를 보여주지는 못했다($P=$

Table 1. Demographics of COPD patients with/without bronchial hyperresponsiveness.

	COPD without BHR (n=51)	COPD with BHR (n=49)	P value
Sex (M/F)	41/10	44/5	0.188
Age (year)*	70.4±10.7	67.6±10.6	0.108
FEV ₁ (pred. %)*	55.8±24.0	63.5±21.8	0.106
FEV ₁ /FVC (pred. %)*	56.4±9.4	56.1±10.2	0.964

BHR: bronchial hyperresponsiveness.

*Data are presented as mean ± standard deviation.

Table 2. Frequencies of genotypes of polymorphisms of ACE gene in COPD patients with/without bronchial hyperresponsiveness.

Genotype	COPD without BHR (n=51)	COPD with BHR (n=49)
DD	9 (17.6%)	9 (18.4%)
ID	24 (47.1%)	19 (38.8%)
II	18 (35.3%)	21 (42.9%)

BHR: bronchial hyperresponsiveness.

$\chi^2=0.772$ (d.f.=2, $P=0.591$)

Table 3. Frequencies of genotypes of polymorphisms of ACE gene in COPD patients with bronchial hyperresponsiveness by clinical stage.

Stage	ACE polymorphism (Genotype)		
	DD (n=9)	ID (n=19)	II (n=21)
1	3 (30.0%)	1 (10.0%)	6 (60.0%)
2	2 (8.0%)	12 (48.0%)	11 (44.0%)
3	4 (28.6%)	6 (42.9%)	4 (28.6%)
4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

$\chi^2=7.098$ (d.f.=4, P=0.131)

0.591).

기관지 과민반응을 보인 군을 COPD 임상적 단계에 따라 분류해 보았을 때, 1단계에 해당하는 환자가 10명, 2단계가 33명, 3단계가 14명으로 각각 분류되었고, 4단계에 해당하는 환자는 없었다(Table 3). 가장 높은 비율을 보인 유전자형을 단계별로 보면, 1단계 환자의 경우 II형(60.0%), 2단계 환자의 경우 ID형(48.8%), 3단계 환자의 경우 ID형(42.9%)으로 차이를 보였다. 그러나 유전자형의 분포에 있어 임상적 단계에 따른 통계학적 차이는 없었다 (P=0.131).

고 찰

이 연구에서 연구자들은 COPD 환자에서 천식 요소 중 기관지 과민성의 여부에 따른 ACE 유전자 다형성의 차이를 알아보고자 하였다. 연구 결과에서 나타난 바와 같이 COPD 환자에 있어 기관지 과민성의 동반 여부는 유전자형의 분포에 있어 통계적인 차이를 보여주지 못했다. 이러한 결과는 기관지 천식 환자를 대상으로 하여 ACE 유전자 다형성의 연구를 시행하였을 때 정상 대조군과 천식 환자군에서 유전형 차이를 보여주지 못했던 것과 유사한 결과다⁵⁻⁸. 또한, 환자의 COPD 중증도에 따른 ACE 유전자의 분포에 있어서도 기관지 천식을 대상으로 하였던 예전의 천식에서의 연구결과와 유사하게 기도 폐쇄 정도는 ACE 유전자 다형성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 결과에서 자료를 제시하지는 않았지만 COPD 환자 군에서 기관지 천식의 임상표현형으로 생각되는 혈청 IgE (Immunoglobulin E),

알레르기 피부반응 검사 등을 기준으로 COPD군을 나누어 ACE 유전자 다형성을 알아보았을 때에도 두 군 간의 ACE 유전자 다형성 차이는 나타나지 않았다.

여러 호흡기 질환에서 혈청 내 ACE 활성을 비교한 연구가 많이 진행되고 있으며, ACE isozyme이 질환마다 다르고, COPD에서는 더욱 높은 활성을 보이는 ACE isozyme을 주로 가지고 있을 것이라는 주장이 있다¹⁰. COPD와 연관된 ACE 유전자의 다형성에 관한 이전의 연구를 보면, 이러한 다형성이 우심방 비대증이나 폐 고혈압과 관련이 없다는 보고가 있다^{11,12}. 이러한 연구들의 결과와 COPD 환자에서 기관지천식 요소 유무가 ACE 유전자 다형성에 영향을 미치지 못한다는 본 연구의 결과들을 종합해보면 COPD 병태 생리적 특성과 합병증 유발에 있어 ACE 유전자 다형성이 기여하는 바는 적을 것으로 생각된다. 다만, ACE 유전자 다형성이 전신적으로나 국소적인 ACE 활성 정도에 영향을 주고 이로 인해 운동 등에 의한 저산소 환경에서 운동능력과 저산소증에 대한 장기적인 적응에 있어 차이를 보여주는 보고가 지속적으로 되고 있다^{13,14}. 따라서, ACE 억제제를 사용하거나 유전적 다형성에 의한 차이에 의해서 장기적으로 ACE 활성을 낮게 유지하는 것이 COPD 같은 만성 폐질환에서 환자에게 어떠한 영향을 미칠지에 대해서는 더욱 많은 연구가 필요할 것이다¹⁵.

이 연구는 소규모의 COPD 환자를 대상으로 하였다는 것과 대상선택에 있어 지역적인 요소를 배제하지 못하고 3차 병원에 입원한 환자를 대상으로 하였다는 제한점을 가지지만, ACE 유전자 다형성에 따른 차

이가 COPD 환자들에서 나타나는 기관지 과민성 등의 천식 요소의 발현과 연관이 없음을 시사하는 결과를 보여주었다.

요 약

목 적 :

ACE 유전자 다형성에 따라 폐를 포함한 여러 조직에서 ACE 활성 및 농도 등에 차이를 나타내고 이러한 차이가 COPD 등의 만성 호흡기 질환에서 질환의 발생 및 임상 표현형의 차이를 유발할 것으로 추정되어지고 있다. 따라서 이 연구는 ACE 유전자 다형성이 COPD 환자들에게서 동반될 수 있는 기도 과민반응 등의 기관지 천식 요소의 발현 유무와 연관성이 있는지 알아보고자 하였다.

방 법 :

100명의 COPD 환자들을 대상으로 기도 과민성의 동반 유무에 따라 두 군으로 분류하였고, PCR 방법을 통하여 ACE 유전자형을 검사하여 두 군 간의 차이를 알아보았다.

결 과 :

COPD 환자에서 기도 과민반응 유무에 따른 ACE 유전자형의 분포에 차이는 없었고, COPD의 임상적 단계에 따른 각 군 간의 의미 있는 차이도 보이지 않았다.

결 론 :

이러한 연구 결과는 ACE 유전자 다형성에 따른 차이가 COPD 환자들에게서 나타나는 기도 과민성 등의 천식 요소의 발현과 연관이 없음을 시사하는 소견이라 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S77-121.
2. Millar EA, Angus RM, Hulks G, Morton JJ, Connell JM, Thomson NC. Activity of the renin-angiotensin system in acute severe asthma and the effect of angiotensin II on lung function. *Thorax* 1994;49:492-5.
3. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
4. Holla L, Vasku A, Znojil V, Siskova L, Vacha J. Association of 3 gene polymorphisms with atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:702-8.
5. Benessiano J, Crestani B, Mestari F, Klouche W, Neukirch F, Hachein-Bey S, et al. High frequency of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:53-7.
6. Lee YC, Cheon KT, Lee HB, Kim W, Rhee YK, Kim DS. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with asthma. *Allergy* 2000;55:959-63.
7. Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, et al. Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:278-82.
8. Nakahama H, Obata K, Nakajima T, Nakamura H, Kitada O, Sugita M, et al. Renin-angiotensin system component gene polymorphism in Japanese bronchial asthma patients. *J Asthma* 1999;36:187-93.
9. Fabbri LM, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 2003;22:1-2.
10. Brice EA, Friedlander W, Bateman ED, Kirsch RE. Serum angiotensin-converting enzyme activity, concentration, and specific activity in granulomatous interstitial lung disease, tuberculosis, and COPD. *Chest* 1995;107:706-10.
11. van Suylen RJ, Wouters EF, Pennings HJ, Cheriex EC, van Pol PE, Ambergen AW, et al. The DD genotype of the angiotensin converting enzyme gene is negatively associated with right ventricular hypertrophy in male patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1791-5.
12. Yildiz P, Oflaz H, Cine N, Erginel-Unaltuna N, Erzenin F, Yilmaz V. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase enzyme associated with pulmonary hypertension in patients with COPD. *Respir Med* 2003;97:1282-8.
13. Kanazawa H, Okamoto T, Hirata K, Yoshikawa J. Deletion polymorphisms in the angiotensin converting enzyme gene are associated with pulmonary hyper-

- tension evoked by exercise challenge in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1235-8.
14. Kanazawa H, Otsuka T, Hirata K, Yoshikawa J. Association between the angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and tissue oxygenation during exercise in patients with COPD. *Chest* 2002;121:697-701.
15. Forth R, Montgomery H. ACE in COPD: a therapeutic target? *Thorax* 2003;58:556-8.
-