

□ 원 저 □

기관지 천식 환자에서 천식 증상의 정도에 따른 β_2 교감신경 수용체의 유전자 다형성*

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실**

심재정, 김제형, 이승룡, 권영환, 이소라, 이상엽, 강세용, 강용구**
조재연, 인광호, 원남희**, 유세화, 강경호

= Abstract =

Genetic Polymorphisms of the β_2 -Adrenergic Receptor in the Severity of Bronchial Asthma

Jae Jeong Shim, M.D., Jei Hyung Kim, M.D., Seung Yong Lee, M.D.,
Young Hwan Kwan, M.D., So Ra Lee, M.D., Sang Youb Lee, M.D., Se Yong Kang, M.D.,
Yong Koo Kang, Ph.D.,** Jae Youn Cho, M.D., Kwang Ho In, M.D., Nam Hee Won, M.D.,**
Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

*Department of Internal Medicine, Pathology**, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

Background : Genetic and environmental factors are known to affect the incidence and severity of asthma. Stimulation of β_2 -Adrenergic Receptor (β_2 AR) results in smooth muscle relaxation, leading to decrease in resistance of airflow. The gene encoding the β_2 AR has recently been sequenced. The β_2 AR genotype at the polymorphic loci of codons 16, 27, 34, and 164 was known to cause changes in the amino acids. The relationships between the structure of the β_2 AR and its functions are being elucidated.

Purpose : The gene encoding the β_2 AR was carried out to assess the frequency of polymorphisms in bronchial asthma, to determine wheather these polymorphisms have any relation to the severity, or nocturnal symptoms in bronchial asthma.

Methods : The subjects studied were 103 patients with bronchial asthma, which consisted of 30 mild episodic, 32 mild persistent, 17 moderate, and 24 severe asthma patients. The polymorphisms of the β_2 AR gene were detected by mutated allele specific amplification (MASA) method at the codons 16, 27, 34, and 164.

Results : The most frequent polymorphism was arginine 16 to glycine. The other two polymorphisms, valine 34 to methionine and glutamine 27 to glutamic acid occurred in 11 and 6 patients respectively. The polymorphism of threonine 164 to isoleucine was not found in our enrolled patients. The homozygous polymorphism of β_2 AR

*이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

gene was found in only arginine 16 to glycine (12.6%). The heterozygous polymorphisms of β_2 AR gene were in arginine 16 to glycine, valine 34 to methionine, and glutamine 27 to glutamic acid, as 65.1%, 10.7%, and 5.8 % respectively in asthma patients. The presence of arginine 16 to glycine heterozygous or/and homozygous polymorphism was associated in severe asthma ($p=0.015$), but there was no association between the other three polymorphisms and the severity of asthma. The frequency of the β_2 AR gene polymorphisms was no relation in nocturnal asthma as compared with non-nocturnal asthma.

Conclusion : The arginine 16 to glycine polymorphism of the β_2 AR gene is the most frequently found in asthma patients and association with severe asthma. But there was no association between the polymorphism of the β_2 AR gene and nocturnal asthma.

Key words : Asthma, β_2 adrenergic receptor, Polymorphism

서 론

기관지 천식은 가역적인 기관지 수축과 기도 과민 반응을 갖는 기도의 염증성 질환으로 분류되고 유전적 요소와 환경적 요소가 관여하는 질환이다. 기관지 천식의 발병에는 여러 종류의 기전이 관여하는 것으로 알려져 있다. 기관지 천식의 발병기전에 Szentivanyi는 기관지 천식의 발병기전에 교감 신경 수용체의 기관지 수축-확장의 불균형으로 발생된다는 “ β adrenergic theory”가 관여하는 것으로 설명하였다¹⁾. β_2 교감신경이 기관지 천식의 발병 기전에 관여하는 것은 기관지 천식 환자에서 β_2 교감신경 수용체의 이상이 있어 기관지 천식의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾. Barnes등³⁾은 ovalbumin으로 감작된 기니픽의 천식 폐장에서 β_2 교감신경 수용체의 발현이 감소됨을 보고하였으며, 천식환자의 β_2 교감신경 유도체에 대한 기관지 확장효과가 감소되어 있고 기관지 근육세포에 β_2 교감신경 수용체가 감소되어 있는 것으로 보고하고 있다. 그러나 이러한 β_2 교감신경 수용체의 이상과 기관지 천식의 발병과 천식의 표현형 (phenotype)에 관여하는 기전은 확실하지 않다.

최근에는 β_2 교감신경 수용체 유전자가 증명되고, 유전자 염기서열도 밝혀졌다. β_2 교감신경 수용체 유전자는 염색체 5 q31~q32에 존재하는 intronless 유전자로 알려져 있다⁴⁾. 염색체 5 q31~q32를 ‘5q

cluster’라고 명명된 유전자에는 천식에 관계되는 혈청 IgE 등을 조절하는 유전자뿐만 아니라, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 및 granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)등의 유전자가 존재하고 B 림파구의 증식과 다른 세포의 성장에 작용하여 알레르기성 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 이러한 각종의 유전자는 서로 조절하는 것으로 알려져 있다. β_2 교감신경 수용체는 413 아미노산으로 구성되어 있으며 N-말단부는 세포막 외부에 있고 C-말단부는 세포막 내부에 걸쳐 있는데 7개의 소수성 집적 (hydrophobic cluster)은 세포막내에서 형성하고 있으며 6개의 loop를 형성하여 3개는 세포 내부로 향하고 3개는 세포 외부로 향하는 구조를 하고 있다⁶⁾. β_2 교감신경 수용체 유전자에는 여러 종류의 다형성 (polymorphism)이 존재하며, 천식 환자에서 β_2 교감신경 수용체 대표적인 다형성은 β_2 교감신경 수용체의 아미노산이 대치된 부분으로 Arg16-Gly, Gln27-Glu, Val34-Met 및 Thr164-Ile 등인 것으로 알려져 있다^{6~9)}. 지속적인 β_2 교감신경 유도체의 자극에 대하여 β_2 수용체는 세포표면으로부터 세포내의 전달과정이 둔화되어 점차 세포전달이 없어질 수도 있는 desensitization 또는 수용체의 수가 감소하는 downregulation이 존재하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 이러한 desensitization 또는 downregulation이 기관지 천식 환자의 기도에서도

작용하여 β_2 교감신경 유도체를 지속하여 사용하는 경우는 그 효과가 감소하는 것으로 알려져 있다^{11~13)}. 최근에는 천식환자에서 β_2 교감신경 수용체의 desensitization 또는 downregulation 뿐만 아니라 천식 표현형과 2 교감신경 수용체 유전자 다형성에 대한 연구가 이루어지고 있으나 아직 논란이 많은 실정이다^{14~17)}.

이에 본 연구는 기관지 천식환자에서 β_2 교감신경 수용체의 가장 흔한 16, 27, 34 및 164번째 아미노산에 해당하는 유전자의 다형성을 MASA (Mutated Allele Specific Amplification) 법¹⁸⁾으로 시행하여 각각의 다형성의 발생과 천식의 심한 정도와 야간 천식 증상에 연관이 있는가를 확인하였다.

대상 및 방법

1. 대상

대상 환자는 천식 환자 103명이었으며, 남자는 54명, 여자는 49명으로 평균 연령은 46.6세 (19~80세)였고 이환 기간은 4.7년이었다. 최소한 1년 이상의 진단을 받고 1종류 이상의 투약을 받았으며, 66명은 급성 천식의 악화로 응급처치나 입원한 경력이 있던 환자였다. 모든 대상 환자는 의무 기록지를 검토하여 천식의 정도와 투여 약제를 확인하였다. 환자의 천식 정도는 미국 국립 보건성(National Institutes of Health)의 기준에 의하여²⁴⁾, 천식 정도를 경증의 천식, 중등증 및 중증 천식으로 구분하였으며, 경증의 천식은 간헐적으로 증상이 발생하는 간헐적 경미한 천식과 지속적 경미한 천식으로 구분하였다. 대상 환자는 경미하고 간헐적 증상을 보인 30명, 지속적인 경미한 천식 환자는 32명으로 경미한 천식은 모두 62명이었으며, 중등증의 천식 증상은 17명이었고, 중증의 천식증상을 보인 환자는 24명이었다(Table 1). 이로써 경미한 천식과 중등증의 천식환자는 79명, 심한 천식환자는 24명이었다. 투여 약제는 β_2 교감신경 유도체로 필요시 사용하는 흡입제, 정기적으로 사용하

Table 1. Characteristics of enrolled patients

Age(year : mean \pm SD, range)	46.6 \pm 15.3 (19-80)
Sex(M/F)	54/49
Duration of symptoms.yr(\pm SD)	4.7 \pm 7.2
No. of patients with systemic steroid	39
No. of patients on severity of asthma(%)	
Episodic	30(29.1)
Mild persistent	32(31.1)
Moderate	17(16.5)
Severe	24(23.3)

는 흡입제, 또는 경구용 제제를 사용하였고, 스테로이드는 흡입제와 필요시 사용하는 경구용 제제를 사용하였다. 이외에도 methylxanthine제제, Azelastine 등의 경구용 제제를 사용하는 환자였다. 이중 1년중에 6개월 이상 전신적 스테로이드를 투여하는 환자는 39명이었으며, 투약 중에도 야간 발작이나 야간 기침이 발생되었던 환자는 44명이었다.

2. 방법

1) β_2 교감신경 수용체 다형성 (polymorphism)의 검색

① Chromosomal DNA 분리

전혈구로 부터 분리된 림파구 용액 100 μ l에 digestion buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 100mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) 500 μ l을 넣고, 10mg/ml proteinase K 5 μ l를 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 overnight하였고, phenol/chloroform으로 처리하여 단백질을 제거하였으며, 3M sodium acetate 50 μ l와 100% ethanol 1ml을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 15,000 rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하고 침전

Mutation	Forward primer	Reverse primer
16 amino acid	A : TCTTGCTGGCACCCAATA G : TCTTGCTGGCACCCAATG	CCAAAACCTCGCACCAGAA
27 amino acid	C : ACCACGACGTCACGCAGC G : ACCACGACGTCACGCAGG	CCAAAACCTCGCACCAGAA
34 amino acid	A : GGGACGAGGTGTGGGTGA G : GGGACGAGGTGTGGGTGG	CCAAAACCTCGCACCAGAA
164 amino acid	C : GATTGTGTCAGGCCTTAC T : GATTGTGTCAGGCCTTAT	GGACACGATGGAAGAGGC

물을 70% ethanol로 세척후 진공으로 말린 후 50 μ l의 증류수에 녹여 4℃에 보관하여 사용하였다.

② β_2 교감신경 수용체 다형성 (polymorphism)의 검색

MASA방법을 이용하여 β_2 교감신경 수용체 16번, 27번, 34번 및 164번째 아미노산의 다형성을 검색하였다. 각각의 β_2 교감신경 수용체 다형성의 검색은 다음과 같은 primer를 이용하였다.

Pre-mix Top(Bioneer사)에 분리한 chromosomal DNA 100ng, forward primer와 reverse primer를 각각 10pmol를 넣은후 증류수로 최종 20 μ l가 되도록 하여, 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction : PCR)을 시행하였다. PCR의 조건은 첫 번째 cycle은 95℃ 5분, 55℃ 30초, 72℃ 30초간이었으며, 40 cycle은 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초간이었다. 마지막 cycle은 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 5분간이었다. PCR로부터 얻은 생성물을 2% agarose에서 전기영동하여 다형성을 확인하였다(Fig. 1).

③ β_2 교감신경 수용체 다형성 (polymorphism)의 sequencing

16, 27, 및 34번째 아미노산의 다형성 (polymorphism)에 해당되는 DNA 서열을 확인하기 위해 forward primer(CCTGCTGAGGCGCCCCA)와

reverse primer (CCAAAACCTCGCACCAGAA)를 이용하여 PCR을 시행하였으며 164번째 아미노산의 변이에 해당하는 DNA 서열은 forward primer (TGGATCGCTACTTTGCCA)와 reverse primer (GGACACGATGGAAGAGGC)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR에서 얻은 생성물을 2% agarose 겔 전기영동으로 확인하였고 pT7Blue (Novagen) vector에 subcloning 하였다.

Sequencing kit (Amersham, USB)를 이용하여 다음과 같이 염기서열을 결정하였다.

pT7Blue vector에 subcloning한 plasmid 50ul (5ug)에 2N NaOH, 2mM EDTA 5ul를 넣고 37℃에서 30분간 ethanol precipitation 시켰다. 건조된 DNA pellet에 primer solution (1X sequenase buffer, universal T7 primer 0.1 pmol) 10ul에 resuspend 시켰다. alpha-35S-dATP (10mCi/ml) 0.5ul, diluted labeling mix 2ul, DTT 1ul, diluted sequenase 2ul를 넣고 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 중 3.5ul 씩을 dideoxynucleotide mix가 포함된 G, A, T, C 4개의 tube에 나누어 넣은 후 37도에서 10분간 반응시키고 stop solution 4ul를 넣었다. 7M urea-6% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 autograph하였다(Fig. 2).

2) 통계적 분석

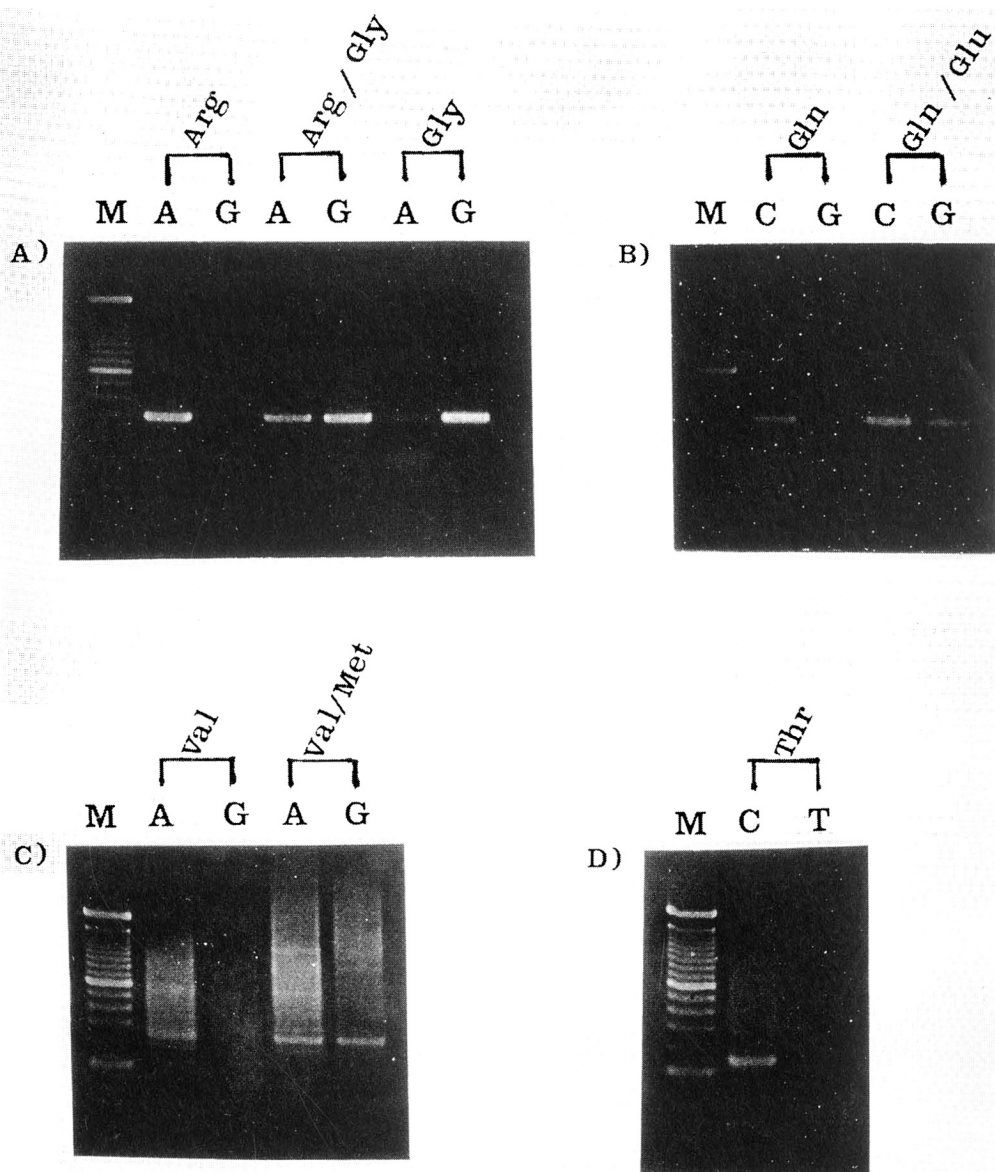


Fig. 1. Identification of β_2 -adrenergic receptor polymorphisms using MASA (Mutated Allele Specific Amplification). Photograph shows the technique applied to genomic DNA obtained from the blood of patients who were homozygous or heterozygous for 16(A), 27(B), 34 (C), and 167(D) amino acids.

β_2 교감신경 수용체 유전자의 다형성에 대한 천식의 심한 정도와 상관관계와 야간 천식의 연관성은 chi-square test로 확인하였고, 경증 및 중등증의 천식 환

자와 심한 천식에 따른 homozygous Arg16와 homozygous Gly16의 연관성은 Fisher exact로 확인하였다.

Fig. 2. Arrows in the sequencing gel show the presence of an adenine (A) at nucleic acid position 46 of β_2 -adrenergic receptor sequence, an adenine and guanine (G) in this position representing the homozygous for either Arg16 (patient A) or Gly16(patient B), or heterozygous (patient C).

결 과

1. β_2 교감신경 수용체 다형성 (polymorphism)

모든 대상 환자 103명에 대하여 16, 27, 34 및 164 번째의 아미노산에 대한 2 교감신경 수용체의 유전자 다형성 (polymorphism)을 MASA 법으로 검색하였다. 16번째 아미노산인 Arginine이 Glycine으로 변이가 발생할 수 있는 46번째 염기의 heterozygous 변이가 67명, homozygous 변이가 13명이었으며,

다형성이 없이 정상적인 경우는 23명으로 heterozygous 변이가 65.1%로 가장 많았다. 27번째 Glutamine이 Glutamate로 변이가 일어나는 79번째 염기의 변이는 heterozygous만 11명으로 10.7%이었으며, 34번째 Valine이 Methionine으로 변이를 일으키는 100번째 염기의 경우도 heterozygous만 6명으로 5.8%였다. 27번째와 34번째 아미노산의 다형성을 일으키는 homozygous 변이와 164번째 아미노산의 변이는 대상 환자 103명중에는 없었다(Table 2).

Table 2. Distribution of β_2 adrenergic receptor polymorphisms in asthmatic subjects

Designation	Mutated nucleic acid	Asthma(n=103)		
		Heterozygous(%)	Homozygous(%)	Non-mutated(%)
Arg16-Gly	46	67(65.1)	13(12.6)	23(22.3)
Gln27-Glu	79	11(10.7)	0	92(89.3)
Val34-Met	100	6(5.8)	0	97(94.2)
Thr164-Ile	491	0	0	103(100)

Table 3. Association between severity of asthma and distribution of β_2 AR polymorphisms

Amino acid	Genotype	Severity of Asthma(n=103)				p-value
		episodic (n=30)	mild persistent (n=32)	moderate (n=17)	severe (n=24)	
16	Homozygous Arg	9	7	4	3	0.150
	Heterozygous	18	23	12	14	
27	Homozygous Gly	3	2	1	7	—
	Homozygous Gln	27	29	15	21	
34	Heterozygous	3	3	2	3	—
	Homozygous Glu	0	0	0	0	
164	Homozygous Val	27	30	17	23	—
	Heterozygous	3	2	0	1	
	Homozygous Met	0	0	0	0	—
	Homozygous Thr	30	32	17	24	
	Heterozygous	0	0	0	0	—
	Homozygous Ile	0	0	0	0	

2. 천식의 정도에 따른 β_2 교감신경 수용체 다형성의 발생 빈도

천식 증상의 심한 정도를 간헐적인 경미한 천식, 지속적인 경미한 천식, 중등증 및 중증 천식으로 4단계로 구분하여 β_2 교감신경 수용체 다형성의 발생 빈도를 관찰하였다. 16번체의 아미노산에 대한 염기의 다형성은 heterozygous와 homozygous의 변이를 모두 포함하여 wild type과 천식의 심한 정도에 따른 연관성은 없었다($p=0.150$). 16번체의 아미노산의 wild type과 Glycine의 homozygous를 천식의 심한 정도

에 따른 연관성도 없었다($p=0.074$). 27번, 34번과 164번체의 아미노산에 대한 다형성은 homozygous 변이가 없어 통계 분석이 불가능하였으며, 27번과 34번체의 아미노산에 대한 heterozygous와 wild type에 대한 천식의 심한 정도에 따른 연관성도 없었다 (Table 3. $p=0.981, 0.545$).

그러나, 천식 증상의 심한 정도를 경증 및 중등증의 천식환자와 중증 천식 환자로 2구분하여 β_2 교감신경 수용체 다형성의 발생 빈도를 관찰하면 16번체 아미노산의 변이는 연관성이 있었으나 (Table 4), 27번, 34번 및 164번체의 아미노산의 다형성은 연관성이

Table 4. Association between severity of asthma and distribution of homozygous and heterozygous β_2 AR at 16 amino acid.

Genotype	Severity of asthma		p-value
	mild to moderate (n=79)	severe (n=24)	
Homozygous Arg	20	3	0.015
Heterozygous	53	14	
Homozygous Gly	6	7	
Homozygous Arg	20	3	0.018
Homozygous Gly	6	7	
Non-Homozygous Gly	73	17	
Homozygous Gly	6	7	0.015

Table 5. Association between patients with nocturnal symptoms and β_2 AR polymorphisms

Amino acid	Genotype	No. of patients with nocturnal symptoms		p-value
		(-) n=59	(+) n=44	
16	Homozygous Arg	15	8	0.680
	Heterozygous	37	30	
	Homozygous Gly	7	6	
27	Homozygous Gln	54	38	0.605
	Heterozygous	5	6	
	Homozygous Val	54	43	
34	Heterozygous	5	1	0.366
	Homozygous Thr	59	44	
164	Heterozygous	0	0	—

없었다. 천식 증상의 정도에 따른 16번째의 아미노산의 변이는 heterozygous나 homozygous에 대하여도 연관성이 있어 중증의 천식일수록 16번째의 유전자 변이가 많은 환자에서 발생됨을 알 수 있었다($p=0.015$). 천식이 심할수록 많은 환자에서 16번째 아미노산이 Arginine대신에 Glycine으로 변이를 일으켰으며($p=0.018$), 16번째 아미노산이 Arginine대신에 Glycine으로 변이를 일으킨 homozygous 환자에서는 wild type이나 heterogenous변이를 일으킨 경우보다도 중증인 천식 환자에서 많았다($p=0.015$,

Table 4).

3. 야간 천식 증상의 유무에 따른 β_2 교감신경 수용체 다형성

투약 중에도 야간 천식이 발생한 환자는 103명중에 44명이 있었으며, 나머지 59명은 야간 천식 증상이 없었다. 야간 천식 증상의 유무에 따른 β_2 교감신경 수용체 다형성은 16, 27, 34 및 164번째 아미노산의 핵산의 다형성과 연관성이 없었다(Table 5).

고 찰

기관지 천식에 있어서 β_2 교감신경 유도체는 기관지 평활근을 이완시켜서 기관지 확장의 효과가 첫째로 중요한 효과이다. β_2 교감신경 유도체가 β_2 교감신경 수용체에 작용하여 기관지 평활근 내의 G 단백질을 통하여 adenylyl cyclase 효소가 활성화하여 세포내에 cAMP의 농도가 증가되는 것으로 알려져 있다. cAMP는 protein kinase A를 활성화하여 근육세포의 긴장도를 유지하는 인산화(phosphorylation)에 작용하는 것으로 알려져 있다. β_2 교감신경 수용체가 활성화될 때에 G 단백을 통하지 않고 근육세포막에 존재하는 potassium 통로 (potassium channels)를 갖는 Gs에 직접 작용하여 cAMP를 활성화하는 경우도 최근에 밝혀져 있다¹⁹⁾. 기관지 천식에서 β_2 교감신경 유도체의 두 번째 중요한 작용은 기관지 과민반응에서 기관지 수축작용에 대한 보호작용을 하는 것이다¹⁰⁾. 이러한 기관지 수축작용에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 기도의 다른 세포에 작용하여 기관지 수축작용에 대한 보호작용을 할 것으로 추정하고 있다.

지속적인 β_2 교감신경 유도체의 자극에 대하여 세포표면으로 부터 세포내의 전달과정이 둔화되어 점차 세포전달이 없어질 수도 있는 desensitization 또는 수용체의 수가 감소하는 downregulation이 존재하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 이러한 desensitization 또는 downregulation이 기관지 천식 환자의 기도에서도 존재하여 β_2 교감신경 유도체를 지속하여 사용하는 경우는 그 효과가 감소하는 것으로 알려져 있다. 이러한 효과를 기관지 확장효과를 나타내는 β_2 교감신경 유도체의 tachyphylaxis라고 하는데 임상적으로 정도의 천식인 경우는 발견하기 어려우나 중증의 천식에서는 종종 발견되는 것으로 보고되고 있다. 또한 기도 과민 반응 역시 rebound로 증가하는 것으로 알려져 있다^{11~13)}. 최근에는 이러한 desensitization 또는 downregulation 등이 기도의 β_2 교감신경 수용체에 대한 다형성과 상관이 있는 것으로 보고되어 2 교감신

경 수용체의 다형성과 기도세포의 반응정도에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{14~17)}.

인간의 β_2 교감신경 수용체 유전자는 염색체 5번의 long arm에 존재하며, intronless gene으로 1200 base pairs로 구성되어 있다⁴⁾. β_2 교감신경 수용체 유전자는 염색체 5 q31~q32에 존재하고 1200 base pairs로 구성되어 있는 intronless 유전자이다. 염색체 5 q31~q32를 '5q cluster'라고 명명된 유전자에는 천식에 관계되는 혈청 IgE 등을 조절하는 유전자뿐만 아니라, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 및 granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) 등이 존재하고 B 림프구의 증식과 다른 세포의 성장에 작용하여 알레르기성 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

β_2 교감신경 수용체의 유전자 다형성은 일본에서 restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 방법으로 확인하여 천식의 심한 정도와 상관이 있는 것으로 보고하였다¹⁷⁾. Ban I 효소로 DNA를 절단했을 때, 2.1 kb를 가진 천식환자는 2.3 kb를 갖는 천식환자보다 흡입 salbutamol제제에 덜 반응하는 것으로 보고하였다. 이러한 다형성이 천식의 심한 정도와 상관이 있는지는 아직 논란이 많다. 즉 β_2 교감신경 수용체 유전자의 다형성이 천식의 표현형(phenotype)에 어떤 영향을 주는지는 확실하지 않다. Reihnsaus 등²⁰⁾은 β_2 교감신경 수용체에 9종류의 유전자 변이가 있는 것으로 보고하였다. 대부분의 유전자 변이는 아미노산이 변하지 않는 wild type의 변이를 일으키는 것으로 알려져 있지만, 16, 27, 34 및 164번째의 아미노산의 변이는 수용체 단백질의 아미노산이 다른 아미노산으로 대체되는 것으로 알려져 있다. 이러한 아미노산이 치환된 변이 중에 16, 27 및 34번째의 변이는 체내의 catecholamine이나 외부에서 투여하는 2 교감신경 유도체에 대한 반응 정도도 변화할 수 있는 변이로 밝혀지고 있다. 기관지 천식의 발병과 표현형에 대한 연구가 대표적으로 이루어지고 있는 변이는 16, 27, 34 및 164에서 아미노산이 치환된 변이이다. 16과 27번째의 변이는 보고자

에 따라서 다양하나, 비교적 흔한 것으로 알려져 있다. 천식 환자 중에 Arg 16에 대한 allele의 빈도는 35%와 Gly 16으로 변이가 된 allele의 빈도는 65%로 많은 것으로 알려져 있다. 또한 Gln 27과 Glu 27은 각각 55%, 45%로 두 번째로 많은 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. Reihnsaus등²⁰⁾은 Arg 16이 Gly 16으로 변이가 일어난 천식 환자는 53%, Gln 27이 Glu 27로 변이된 경우는 24%를 각각 보고하였다. 반면에 Val 34가 Met 34로 변이된 경우는 천식 환자 51명 중에 1명만이 heterozygous로 변이가 있었으며, Thr 164가 Ile 164로 변이가 된 환자는 없었다. 본 연구에서는 천식 환자 103명중에 Arg 16이 heterozygous 변이는 65.1%, homozygous 변이는 12.6%였다. Gln 27과 Val 34는 heterozygous 변이만이 10.7%, 5.8%를 각각 나타냈으나, Thr 164의 변이는 없었다. 따라서 본 연구의 결과는 다른 보고자와 비슷하였으나, Gln 27과 Val 34는 차이가 많았다.

16번째의 변이는 46번의 염기 A가 G로 mutation되어 아미노산이 arginine 16에서 glycine으로 대체된 경우로 임상적으로 심한 천식의 발병기전이나 천식의 표현형에도 관련이 있는 것으로 보고하고 있다. 최근의 연구에 의하면 16번째 아미노산이 glycine으로 대체된 경우는 β_2 교감신경 수용체의 밀도와 상관성이 있는 것으로 보고하여 수용체의 downregulation에 주로 작용하는 것으로 연구되고 있다²¹⁾. 또한 Turki등²²⁾에 의하면 16번째의 아미노산의 변이는 기관지 천식 환자의 야간발작에도 관여하는 것으로도 보고되었다. Reihnsaus등²⁰⁾의 보고에 의하면 천식 환자 중에 steroid 의존형이나 면역치료가 요구되는 중증의 천식 환자에서 Arg 16이 Gly 16으로 변이가 많음을 보고하여, Arg 16의 변이가 있는 경우는 천식의 정도가 보다 심함을 알 수 있었다. 본 연구에서도 천식의 정도를 4단계로 나누어 β_2 교감신경 수용체 변이의 분포를 확인한 바로는 의미가 없었으나, 심한 천식 (severe asthma)과 경미한 천식 및 중증의 천식을 비교하기 위하여 2구분으로 나누어 β_2

교감신경 수용체 변이의 분포를 확인한 결과 16번째 아미노산의 변이와는 의미 있는 결과를 얻었다. Arg 16의 변이가 heterozygous나 homozygous Gly 16에 상관없이 16번째 아미노산이 Gly으로 변이가 있는 환자에서 심한 천식이 의미 있게 많았다. 그러나 본 연구에서는 16, 27, 34 및 164번째의 아미노산의 변이와 야간천식의 발작이나 증상에는 모두 의미가 없었다. Green 등²¹⁾에 의하면 27 변이는 79번째 염기가 C에서 G로 mutation되어 glutamine(Gln)이 glutamate(Glu)로 대체되어 16 변이와 달리 2 교감신경 수용체 downregulation의 보호작용이 있는 것으로 알려져 있다. 배양기관지 근육세포에서도 β_2 교감신경 유도체의 자극에 의하여 수용체의 downregulation이 Glu 27인 경우는 Gln 27보다 덜 감소함을 보고하였다. 최근에는 경도나 중증도의 천식환자의 methacholine기관지 유발검사에서도 Glu 27인 경우는 Gln 27보다는 4배의 과민도가 감소되어 있음을 보고하여 비특이적 기도 과민반응에 관여하는 것으로 암시되고 있다²³⁾. 셋째로 많이 연구되고 있는 변이는 164번째의 아미노산인 Threonine이 Isoleucine으로 대체된 경우로 빈도는 약 1% 미만으로 보다 드문 것으로 알려져 있다. Ile 164는 수용체 결합력이 4배정도 약하게 반응하여 adenylyl cyclase의 활성이 감소되는 것으로 기관지 근육 배양에서 증명되었다. Gly 16은 기관지 천식 반응을 일으키는 반면에 Glu 27은 기관지 과민 반응이 덜하게 하는 상반되는 변이가 존재함을 알 수 있다¹⁶⁾. 이를 종합하면 Arg-Gly 16과 Gln-Glu 27 변이는 서로 linkage disequilibrium을 이루고 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 기관지 천식 환자에서 β_2 교감신경 수용체 다형성이 Arg 16, Gln 27 및 Val 34의 변이가 존재하고, Arg 16이 가장 많았으며, Thr 164는 없었다. Gly 16의 변이는 2 교감신경 수용체의 다형성은 심한 기관지 천식 환자에서 많이 존재함을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 야간 천식 발작이나 증상과 β_2 교감신경 수용체 다형성은 서로 상관이 없었다.

요 약

서 론 :

β_2 교감신경 수용체 유전자에는 여러 종류의 다형성 (polymorphism)가 존재하며, 천식 환자에서 β_2 교감신경 수용체의 대표적인 변이는 β_2 교감신경 수용체의 아미노산이 대치된 부분으로 Arg16-Gly, Gln27-Glu, Val34-Met 및 Thr164-Ile 등인 것으로 알려져 있다. 지속적인 β_2 교감신경 유도체의 자극에 대하여 세포표면으로 부터 세포내의 전달과정이 둔화되어 점차 세포전달이 없어질 수도 있는 desensitization 또는 수용체의 수가 감소하는 downregulation이 존재하는 것으로 알려져 있다. 천식환자에서 β_2 교감신경 수용체의 desensitization 또는 downregulation 뿐만 아니라 천식 표현형과 β_2 교감신경 수용체 유전자 다형성의 상관 관계에 대한 연구가 이루어지고 있으나 논란이 많다.

이에 본 연구는 기관지 천식환자에서 β_2 교감신경 수용체의 가장 흔한 16, 27, 34 및 164의 아미노산에 해당하는 유전자의 다형성을 MASA (Mutated Allele Specific Amplification) 법으로 시행하여 각각의 다형성의 발생 빈도와 천식의 심한 정도와 연관이 있는가를 확인하였다.

대상 및 방법 :

대상 환자는 천식 환자 103명이었으며, 이중 남자는 54명, 여자는 49명으로 평균 연령은 46.6세 (19~80세)였고 이환 기간은 4.7년이었다. 대상 환자는 경미하고 간헐적 증상을 보인 30명, 지속적인 경미한 천식 환자는 32명으로 경미한 천식은 모두 62명이었으며, 중등증의 천식 증상은 17명 및 중증의 천식증상을 보인 환자는 24명이었다. 이중 1년 중에 6개월 이상 전신적 스테로이드를 투여하는 환자는 39명이었으며, 투약 중에도 야간 발작이나 야간 기침이 발생되었던 환자는 44명이었다. 대상 환자로부터 10cc의 전혈구를 채취 하여 분리된 림프구에서 분리된 DNA를 이용하여 MASA 방법으로 β_2 교감신경 수용체 16번, 27번, 34번 및 164번째 아미노산의 다형성을 검

색하였고, 천식의 심한 정도 따른 β_2 교감신경 수용체 유전자의 다형성의 분포와 야간 천식의 발작이나 증상의 유무에 따른 β_2 교감신경 수용체 유전자의 다형성의 분포를 확인하였다.

결 과 :

16번째 Arginine이 Glycine으로 변이는 heterozygous 변이가 67명, homozygous 변이가 13명으로 heterozygous 변이가 65.1%로 가장 많았다. 27번째 Glutamine이 Glutamate로 변이는 heterozygous만 11명으로 10.7%였으며, 34번째 Valine이 Methionine으로 변이를 일으키는 100번째 핵산의 경우 heterozygous만 6명으로 5.8%였다. 27번째와 34번째 아미노산의 변이를 일으키는 homozygous 변이와 164번째 아미노산의 변이는 대상 환자 중에는 없었다. 천식 증상의 심한 정도를 경증 및 중등증, 중증으로 2구분하여 β_2 교감신경 수용체 다형성의 발생 빈도를 관찰한 결과 중증의 천식환자에서 16번째 아미노산의 변이의 빈도는 많았으나 ($p=0.015$), 27번, 34번 및 164번째의 아미노산의 변이는 천식 증상의 정도와는 연관성이 없었다. 야간 천식 증상의 유무에 따른 β_2 교감신경 수용체 다형성은 16, 27, 34 및 164번째 아미노산의 핵산의 변이와 연관성이 없었다.

결 론 :

이상의 결과로 기관지 천식 환자에서 β_2 교감신경 수용체 다형성은 Arg 16, Gln 27 및 Val 34의 변이가 존재하고, Arg 16이 가장 많았으며, Thr 164는 없었다. 기관지 천식 환자에서 증상이 심한 중증 천식은 β_2 교감신경 수용체의 다형성중 Arg 16의 변이는 중증 천식과 연관성이 있었다. 그러나 야간 천식 발작이나 증상과 β_2 교감신경 수용체 다형성은 서로 상관이 없었다.

참 고 문 헌

1. Szentivanyi : The β -adrenergic theory of the atopic anomaly in bronchial asthma. J Allergy 42 : 203-232, 1968

2. Reishaus E, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB : Mutations in the gene encoding for the β_2 adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8 : 334-339, 1993
3. Barnes PJ, Dollery CT, MacDermot J : Increased pulmonary β -adrenergic and β -adrennergic receptors in experimental asthma. *Nature* 285 : 569-571, 1980
4. Kobilka BK, Dison RA, Frielle HG, Dohlman MA, Bolanowski I, Sigal IS, Yang-Feng TL, Franke U, Caron MG, Lefkowitz RJ : cDNA for the human β_2 adrenergic receptor : a protein with multiple membrane spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet derived growth factor. *Proc natl Acad Sci USA* 84 : 46-50, 1987
5. Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CIM, Meyers DA, Levitt RC : Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 333 : 894-900, 1995
6. Liggett SB, Bouvier M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ, DeBlasi A : Substitution of an extracellular cysteine in the β_2 -adrenergic receptor enhances receptor phosphorylation and desensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 165 : 257-263, 1989
7. Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Hnatowich M : Coupling of a mutated form of the human β_2 -adrenergic receptor to G_i and G_s : requirements for multiple cytoplasmic domains in the coupling process. *J Biol Chem* 266 : 4816-4821, 1991
8. Strader CD, Sigal IS, Register RB, Candelore MR, Rands E, Dixon RAF : Identification of residues required for ligand binding to the β -adrenergic receptor *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 4384-4388, 1987
9. Fraser CM, Chung FZ, Wang CD, Venter JC : Site-directed mutagenesis of human β_2 -adrenergic receptors : substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc Natle Acad Sci USA* 85 : 5478-5482, 1988
10. Tattersfield AE : Tolerance to beta agonists. *Bull Eur Physiopathol Respir* 21 : 1-5s, 1985
11. Bai TR : Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. *Am Rev Respir Dis* 143 : 441-443, 1991
12. Whicker SD, Amour CI, Black JL : Responsiveness of bronchial smooth muscle from asthmatic patients to relaxant and contractile agonists. *Pulm Pharmacol* 1 : 25-31, 1988
13. Goldie RG, Spina D, Henry PJ, Lulich KM, Paterson JW : In vitro responsiveness of human asthmatic bronchus to carbacol, histamine, β -adrenoreceptor agonists and theophylline. *Br J Pharmacol* 22 : 669-676, 1986
14. Nelson HS : β adrenergic bronchodilators. *N Engl J Med* 333 : 499-506, 1995
15. Vathenan AS, Knox AJ, Hoggins BG, Britton JR, Tattersfield AE : Rebound increase in bronchial responsiveness after treatment with inhaled terbutaline. *Lancet* i : 554-558, 1988
16. Hall IP : β_2 adrenoceptor polymorphisms : are they clinically important? *Thorax* 51 : 351-353, 1996
17. Ohe M, Munakata M, Hizawa N, Itoh A, Doi I, Yamaguchi E, Homma Y, Kawakami Y : Beta₂ adnnergic receptor gene restriction fragmnet length polymorphism and bronchial asthma. *Thor-*

- ax 50 : 353-359, 1995
18. Takeda S, Ichii S, Nakamura Y : Detection of k-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum Mutat* 2 : 112-117, 1993
 19. Kume H, Hall Ip, Washabau RJ, Takagi K, Kotlikoof MI : Beta adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP dependent and independent mechanisms *J Clin Invest* 93 : 371-379, 1994
 20. Reihsaus M, Innis M, MacIntyre N, Liggett SB : Mutations in the gene encoding for the β_2 adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8 : 334-339, 1993
 21. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB : Influence of β_2 -adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 : 25-33, 1995
 22. Turki J, Pak J, Green SA, Martin RJ, Liggett SB : Genetic polymorphisms of the β_2 -adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma : Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest* 95 : 1635-1641, 1995
 23. Hall IP, Wheatley A, Wilding P, Liggett SB : Association of the Glu 27 β_2 adrenoreceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet* 345 : 1213-1234, 1995
 24. National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization. Global initiative for asthma. National institutes of health pub no 95-3659. Bethesda, MD. 1995
-