



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

한국인 전신성 홍반성 루푸스에서
IL-6 유전자의 다형성

아주대학교 대학원

의학과

전자영

한국인 전신성 홍반성 루푸스에서
IL-6 유전자의 다형성

지도교수 서 창 희

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2008년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

전 자 영

전자영의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 서 창 희 인

심 사 위 원 박 해 심 인

심 사 위 원 박 선 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2007년 12월 21일

한국인 전신성 홍반성 루푸스에서 IL-6 유전자의 다형성

목적 : 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)는 만성적인 염증에 의해서 여러 조직 특히 피부, 관절, 혈액, 신장 등이 파괴되는 임상적 특성을 동반하고 면역학적 관용의 소실에 의해 다양한 자가 항체를 생성하는 비정상적인 면역반응이 유도되는 전신적인 자가 면역 질환이다. Interleukin-6 (IL-6)는 여러 가지 기능을 가지고 있는 사이토카인으로 염증 반응과 면역 반응을 매개하며, IL-6 유전자의 다형성은 만성염증과 자가 면역 질환에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 기존의 연구들은 거의 서양인을 대상으로 한 연구인데, 인종에 따라 유전자의 발병에서의 역할에 차이가 있을 수 있고, 한국인 전신성 홍반성 루푸스의 발병에 관여하는 유전자는 서양인과 다를 수 있으므로 한국인을 대상으로 한 유전자 연구가 매우 필요하다고 할 수 있겠다. 이에 본 연구자는 한국인 전신성 홍반성 루푸스에서 IL-6 유전자 다형성을 밝히고, IL-6 유전자의 발현이상이 전신성 홍반성 루푸스의 병인기전과 표현형에도 관여할 것이라는 가정하에 IL-6 유전자의 전사조절(promoter) 부위와 엑손2(exon2) 부위의 단일염기다형성 및 3' flanking region 의 variable number of tandem repeat (VNTR) 유전자형에 대하여 밝히고자 하였다.

재료 및 방법 : 아주대학교 병원 류마티스 내과에 내원한 151명의 전신성 홍반성 루푸스 환자와 대조군으로 류마티스 질환의 기왕력이 없는 151명의 정상인을 대상으로 연구를 수행하였으며, 이들로부터 전혈을 채취한 뒤 genomic DNA를 추출하였다. 전사조절 부위와 엑손2 부위는 약 1.4kb 크기의 IL-6 유전자를 중합효소연쇄반응을 이용하여 증폭하여 직접염기서열 분석을 통하여 다형성을 확인

하였고, 3' flanking region의 VNTR 유전자형은 중합효소연쇄반응을 실시한 후 genescan 분석을 통하여 확인하였으며, minor allele의 빈도가 최소 5% 이상인 것을 다형성으로 정의하였다. 또한 -276 A>C 다형성의 유전자형에 따른 전사조절 부위의 활성 정도를 비교하기 위해 promoter activity assay를 시행하였다.

결과 : IL-6 유전자의 전사조절 부위에서 -572 C>G, -373 A_nT_n, -276 A>C, -174 A>C 엑손2 부위에서 331 T>G, 334 A>T 등 총 6개의 유전자형을 결정하였고, 이 중 3개는 보고된 바 없는 새로운 다형성이었다. 탐색한 다형성의 유전자형을 결정하여 백인 그룹과의 minor allele 빈도를 조사해본 결과 모든 다형성에서 빈도의 차이를 보였다. 특히 한국인에서 -572 C>G의 다형성은 백인과 다르게 C가 major allele로 나타났고, -373 A_nT_n 다형성은 서양인에서 발견되었던 4가지 유전자형 중 -373 A₈T₁₂은 확인되지 않았고, 한국인에서는 -373 A₉T₁₁, -373 A₁₀T₁₀, -373 A₁₀T₁₁ 등의 3가지 유전자형이 확인되었으며, 외국인에서 가장 많이 보고되었던 -174 G>C는 minor allele이 5% 미만으로 다형성이 아님을 확인하였다. 또한 전신성 홍반성 루푸스와 정상 대조군 간의 빈도 차이를 분석한 결과 -276 A>C 다형성에서는 정상 대조군에 비해 루푸스 환자군에서 C 유전자형이 높게 나타났고, -373 A_nT_n 다형성에서는 -373 A₁₀T₁₁ 유전자형이 정상 대조군에 비해 높게 나타났다. 그리고 -373 A₁₀T₁₀ 유전자형을 가지지 않은 경우에(-373 A₉T₁₁ 또는 -373 A₁₀T₁₁) 루푸스의 위험도가 증가하였는데, 이것은 아마도 -373 A₁₀T₁₁이 포함되어 있기 때문이라 생각되며, -373 A₁₀T₁₁이 전신성 홍반성 루푸스와 관련이 높은 것으로 추측되어 진다. 이들 다형성과 루푸스의 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 -572 C>G 다형성은 anti-ds DNA의 빈도가 유의한 상관관계를 나타내었고, -276 A>C 다형성은 혈소판 감소증 (thrombocytopenia)과 유의한 상관관계를 나타내었다. 또한 3' flanking region의 VNTR 부위에서 genescan 분석을 실시함으로써 지금까지의 다른 연구 결과보다 다양한 15개의 alleles을 발견하였다. 특히 루푸스 환자군과 정상 대조군 간의 빈

도 차이를 살펴본 결과 VNTR I (642 bp)는 루푸스의 감수성을 증가시키나 VNTR N(599 bp)은 루푸스의 감수성을 감소시키는 것으로 추측되며, VNTR 부위의 다형성과 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 VNTR I 유전자형(642 bp)은 백혈구 감소증(leukopenia), 혈소판 감소증(thrombocytopenia), C-반응 단백질(C-reactive protein)과 통계적으로 유의한 차이를 보였고, VNTR G 유전자형(652 bp)은 림프구 감소증(lymphopenia)과 저보체혈증(hypocomplementemia)에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이 중 전신성 홍반성 루푸스와 정상 대조군 간의 빈도와 임상적 특징에서도 유의한 결과를 보였던 IL-6 유전자의 전사조절 부위에 존재하는 -276 A>C 다형성을 대상으로 Hep3B cell과 HeLa cell에서 promoter activity assay를 시행한 결과 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 전사조절 부위의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

결론 : 따라서 IL-6 유전자의 다형성의 종류와 빈도는 인종간의 차이가 분명히 존재하며, 한국인에서 IL-6 유전자의 다형성(-276 A>C, -373 A_nT_n, VNTR)은 전신성 홍반성 루푸스에서 질병의 표현형과 감수성에 연관이 있는 것으로 생각되어진다. 특히 한국인에서 IL-6 유전자의 -276 A>C 다형성은 IL-6 유전자의 발현을 조절하여 C 유전자형을 가지고 있을 때 IL-6 유전자의 발현이 증가되어 전신성 홍반성 루푸스로의 발병 가능성을 높이는 것으로 추측된다.

핵심어 : 전신성 홍반성 루푸스, interleukin-6 유전자, 단일염기다형성

차례

국문요약	i
차례	iv
그림차례	vi
표 차례	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
A. 대상 환자군의 선별과 genomic DNA 준비	5
1. 대상 환자군과 대조군	5
2. 환자군과 대조군으로부터 채혈	5
3. Genomic DNA 추출	5
B. IL-6 유전자의 단일염기다형성 탐색	6
1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 탐색	6
2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 탐색	6
C. IL-6 유전자의 단일염기다형성 유전자형 결정	7
1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 결정	7
2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 결정	8
D. -276 A>C 다형성에 대한 promoter reporter assay	8
1. IL-6 유전자의 전사조절 부위를 포함한 plasmid 제작	8
2. Competent cell에 transformation	11
3. 유전자의 삽입 확인	11
4. Plasmid DNA 추출	11

5. Transfection	12
6. Luciferase assay와 β -galactosidase assay	13
E. 통계분석	14
III. 결 과	15
A. 전신성 홍반성 루푸스 환자군과 정상 대조군의 임상적 특징	15
B. IL-6 유전자의 단일염기다형성 확인	17
1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 확인	17
2. IL-6 유전자의3' flanking region의 VNTR 유전자형 확인	18
C. IL-6 유전자의 단일염기다형성의 유전자형 결정	18
1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 결정	18
2. 3' flanking region의 VNTR 유전자형 결정	18
D. IL-6 유전자의 단일염기다형성의 유전자형과 임상적 특징과의 관계 ..	25
E. -276 A>C 다형성에서 각각의 유전자형에 따른 전사조절 부위 활성 비교	30
1. Hep3B cell에 transfection시킨 전사조절 부위의 활성	30
2. HeLa cell에 transfection시킨 전사조절 부위의 활성	31
IV. 고 찰	32
V. 결 론	37
참고문헌	39
영문요약	45

그림 차례

Fig. 1. pGL3-basic vector circle map and preparations of promoter reporter constructs	10
Fig. 2. Schematic representation of the IL-6 gene	17
Fig. 3. Effect of -276 A>C polymorphism on the transcription activity of human IL-6 gene promoter in Hep3B cells	30
Fig. 4. Effect of -276 A>C polymorphism on the transcription activity of human IL-6 gene promoter in HeLa cells	31

표 차례

Table 1. Clinical characteristics of the study subjects	16
Table 2. The genotype and allele frequencies of polymorphisms in the promoter region and exon2 region of IL-6 gene	20
Table 3. The genotype and allele frequencies of -373 A _n T _n polymorphism in the promoter region of IL-6 gene	21
Table 4. The allele frequencies of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene	22
Table 5. The genotype of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene ...	23
Table 6. The major genotype of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene	24
Table 7. Clinical characteristics according to the genotype of IL-6 gene in SLE	27
Table 8. Clinical characteristics according to the -373 A _n T _n genotype of IL-6 gen in SLE	28
Table 9. Clinical characteristics according to the VNTR genotype of IL-6 gene in SLE	29

I. 서 론

전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)는 만성적인 염증에 의해서 여러 조직 특히 피부, 관절, 혈액, 신장 등이 파괴되는 임상적 특성을 보이는 대표적인 자가면역질환이다. 즉, 면역학적 관용의 소실에 의해 다양한 자가 항체를 생성하는 비정상적인 면역반응이 유도되어 조직의 손상을 일으키는 질환이다(Schotte 등, 2001).

루푸스는 주로 20세에서 60세의 가임기 여성에서 발병하고, 이때 유병율은 남성보다 8-13배 정도 높으며, 백인보다는 동양인과 흑인에서의 빈도가 좀 더 높은 것으로 보고되고 있다(Lipsky, 2001).

루푸스의 정확한 원인 및 발병 기전은 아직 잘 밝혀지지 않는으나, 어떤 유전적 소인을 가지고 있는 사람에서 감염, 자외선, 호르몬, 약물 등의 환경적인 요인의 작용에 의해 비정상적으로 B 세포가 활성화되어, T 세포를 활성화시키고, interleukin-6 (IL-6)와 interleukin-10 (IL-10) 등의 사이토카인(cytokine)을 분비되고, 자가 항체가 생성되어, 혈중 면역 복합체를 형성하여 다양한 장기를 침범하여 임상증상이 나타나는 것으로 생각 되어지고 있다(Robson과 Walport, 2001; Marshall, 2002; Mok와 Lau, 2003).

루푸스의 원인으로 유전적인 요인을 살펴보면, 루푸스 환자의 10% 이내에서 환자의 가족이 루푸스를 이미 앓고 있거나 앞으로 발병할 가능성이 있는 것으로 알려져 있고, 루푸스가 일란성 쌍둥이에서 24%의 빈도로, 이란성 쌍둥이에서 2%의 빈도로 발생한다는 보고가 있다(Kotzin, 1996). 여러 인종에서의 루푸스 환자 연구를 보면 루푸스의 병인기전과 유전자의 alleles 사이에는 강한 상관관계가 있다는 보고가 있었고, 이러한 연구 결과들은 루푸스의 다유전자 유전을 뒷받침하고 있다(Linker-Israeli 등, 1999). 또한 특정 유전자가 이 질환을 유발 하는지는 아직 모두 밝혀지지 않는 않지만, 보체(complement) 유전자와 주 조직적합복합체

(major histocompatibility, MHC) 유전자와 같은 특이 유전자의 다형성 (polymorphism)이 루푸스에 대한 민감성을 증가시킨다는 많은 보고들은 루푸스의 발병에 있어서 유전적인 요인이 크게 작용한다는 것을 시사한다(Nath 등, 2004; Prokunia와 Alarcon-Riquelme, 2004; Tsao, 2004).

IL-6 유전자는 인간의 염색체 7p21 부위에 위치하며, 5개의 엑손(exon)과 4개의 인트론(intron)으로 구성되어 있다(Papassotiropoulos 등, 2001). IL-6는 주로 간세포에서 합성되며 IL-1, IL-2, TNF- α (tumor necrosis factor), 인터페론(interferons)에 의해 유도 되고, IL-4, IL-10, IL-13에 의해 억제된다(Tackey 등, 2004).

IL-6는 여러 가지 기능을 가지고 있는 사이토카인으로 염증 반응과 면역 반응을 매개하는 것으로 잘 알려져 있다(Zhai 등, 2001). IL-6의 중요한 생물학적 작용 중 하나는 B 림프구(B lymphocyte) 성숙의 마지막 단계를 자극 하는 것인데, IL-6의 영향 하에 B 림프구는 성숙한 형질 세포(plasma cell)로 분화되고, 면역 글로불린(immunoglobulin)을 분비한다(Cross JT와 Benton HP, 1999).

또한 IL-6는 IL-1 β 와 TNF- α 와 더불어 급성 반응 단백질 혈청 아밀로이드 A (serum amyloid A), C-반응단백(C-reactive protein, CRP), 알파원 안티트립신(α 1-antitrypsin), 섬유소원(fibrinogen), 합토클로불린(haptoglobin) 등을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Cha-Molstad 등, 2000; Agrawal 등, 2001; Hefler 등, 2005).

최근 발표된 여러 연구를 보면 루푸스에서 IL-6는 B 세포 과활성과 면역 병리학적으로 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 조직 손상에도 직접적인 관여를 하며, 루푸스 환자 혈청에서는 정상 대조군에 비해 IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ 수치는 높고, IL-2 수치는 낮은 것으로 보고되었다. 이때 혈청 IL-6의 수치는 SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index), 적혈구 침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), C-반응단백과 관련이 있으며, IL-10의 수치는 SLEDAI와 anti-ds DNA 수치와 관련이 있었다(Linker-Israeli 등, 1991;

Grondal 등, 2000; Chun 등, 2007).

IL-6 유전자의 다형성과 관련하여 현재 많은 질환과 관련한 연구가 진행되고 있으며, 그 중 여러 가지 질환에서 -174 G>C 다형성과 관련한 연구가 가장 많이 보고되고 있다.

독일인 루푸스 환자에서는 -174 G>C 다형성과 뺨의 발진(malar rash), 항 히스톤 항체(anti-histone antibodies)가 유의한 결과를 나타내었고(Schotte 등, 2001), 영국인 심혈관계 질환에서는 혈장 C-반응 단백질과 -174 G>C 다형성이 유의한 관계를 나타내었다(Vickers 등, 2002). 또한 영국인 소아 전신성 관절염에서 -174 G>C 다형성과 -373 A_nT_n에 관한 연구에서도 -174 G>C 다형성이 유의한 관계를 나타내었고(Ogilvie, 2003), 특히 또 다른 영국인 소아 전신성 관절염 연구에서는 -174 G>C 다형성에서 CC 유전자형이 질병 발달을 감소시키는데 도움이 된다고 보고되었다(Fishman 등, 1998). 반면 체코의 피부 T세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma) 환자에서는 -174 G>C 다형성과는 관련이 없지만, -596 G>A의 다형성과 관련이 있다고 보고되었다(Vasku 등, 2004).

IL-6 유전자에서 3' flanking region의 variable number of tandem repeat (VNTR) 유전자형에 대한 연구로는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 4가지의 allele을 발견한 연구(Bowcock 등, 1989)와 6가지의 allele을 발견한 연구(Murry 등, 1997), 그리고 genescan을 이용하여 9개의 allele을 발견한 연구(Crilly 등, 2001) 등이 있었다. 이러한 여러 연구 결과들은 IL-6 유전자의 다형성이 루푸스의 발병기전에 관여함을 시사한다.

그러나 기존의 연구들은 거의 서양인을 대상으로 한 연구인데, 인종에 따라 유전자의 발병에서의 역할에 차이가 있을 수 있고, 한국인 전신성 홍반성 루푸스의 발병에 관여하는 유전자는 서양인과 다를 수 있으므로 한국인을 대상으로 한 유전자 연구가 매우 필요하다고 할 수 있겠다.

따라서 본 연구의 목적은 한국인 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 IL-6 유전자의 다형성을 밝히고, IL-6 유전자의 발현이상이 루푸스의 병인기전과 표현형에

관여할 것이라는 가정 하에 IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위의 단일 염기다형성 및 3' flanking region의 VNTR 유전자형에 대하여 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 대상 환자군의 선별과 Genomic DNA 준비

1. 대상 환자군과 대조군

대상 환자군으로는 미국 류마티스 학회에서 1982년에 개정한 전신성 홍반성 루푸스의 진단기준에 최소한 4가지 이상 만족하는 한국인 전신성 홍반성 루푸스 환자 151명을 선별하여 환자의 임상적 특징을 표준화된 양식에 따라 파악하여 데이터베이스화하여 보관하고 있으며, 대조군으로 류마티스 질환의 기왕력이 없는 정상인 151명을 선별하였다.

2. 환자군과 대조군으로부터 채혈

대상 환자 및 정상 대조군들의 채혈은 연구 목적에 대한 설명 및 동의를 구한 후에 시행하였으며, 혈액을 채취하여 유전체 연구를 위한 전혈(whole blood)을 분리하여 -70°C 에 보관하였다.

3. Genomic DNA 추출

보관된 환자의 전혈로부터 PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 전혈 $300\mu\text{l}$ 에 $900\mu\text{l}$ 의 red blood cell (RBC) lysis solution를 첨가하여 적혈구를 제거하였고, $300\mu\text{l}$ 의 cell lysis solution을 사용하여 백혈구를 용해 시켰다. 이어서 $100\mu\text{l}$ 의 protein precipitation solution으로 단백질을 침전시켜 DNA가 녹아있는 상층액을 획득하였고, 여기에 $300\mu\text{l}$ 의 100% isopropanol로 DNA를 침전시켜 $300\mu\text{l}$ 의 70% ethanol로 세척하였다. 건조된 DNA pellet은 멸균한 3차 증류수로 녹여 -20°C 에 보관하였다.

B. IL-6 유전자의 단일염기다형성 탐색

1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 탐색

(A) Primer 디자인과 중합효소연쇄반응을 통한 증폭

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)에 보고 되어있는 IL-6 유전자의 염기 서열을 통해서 IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에 forward primer 1개와 reverse primer 1개를 디자인하였다.

Forward primer 1 : 5' CTCTGCAAGATGCCACAA 3'

Reverse primer 1 : 5' CCGTCGAGGATGTACCGA 3'

먼저 위의 primer를 사용하여 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 50명의 genomic DNA 시료를 대상으로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이 때 Tag polymerase (Solgent Co., Daejeon, Korea)을 사용하여 약 1.4kb를 증폭하였고, 중합효소연쇄반응 산물은 1% agarose를 사용하여 전기영동을 시행하였다. 이후 증폭된 IL-6 유전자의 전사조절 부위는 MEGA-spin Agarose Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)를 사용하여 회수하였다.

(B) 염기서열 분석

회수된 DNA 시료를 대상으로 직접염기서열분석(sequencing)을 시행하였다 (Bionics Co., Seoul, Korea). 분석에는 중합효소연쇄반응에 사용되었던 forward primer 1, reverse primer 1과 추가로 디자인한 reverse primer 2를 사용하였다.

Reverse primer 2 : 5' CCGTCGAGGATGTACCGA 3'

분석 결과는 Chromas (Technelysium, Tewantin, Australia) 프로그램으로 확인하였고, 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군의 염기서열 비교를 위해 MultAlin Interface Page (INRA, Toulouse, France) 프로그램을 사용하였으며, 대조서열로는 NCBI에 보고되어 있는 IL-6 유전자의 염기서열이 사용되었다.

2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 탐색

(A) Primer 디자인과 중합연쇄반응을 통한 증폭

NCBI에 보고되어 있는 IL-6 유전자의 염기 서열을 통해서 IL-6 유전자의 3' flanking region에 VNTR 부위를 포함 할 수 있도록 forward primer 1개와 reverse primer 1개를 디자인하였으며, genesacn 분석을 위하여 forward primer 에는 형광물질인 FAM (5-Fluorouracil, Adriamycin, Mitomycin-c)을 붙여 제작 하였다.

FAM labeled forward primer 2 : 5' GCAACTTTGAGTGTGTCACG 3'

Reverse primer 3 : 5' TGACGTGATGGATGCAACAC 3'

먼저 위의 primer를 사용하여 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 20명의 Genomic DNA 시료를 대상으로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이때 Tag polymerase (Solgent Co., Daejeon, Korea)을 사용하여 증폭하였고, 중합효소연쇄반응 산물은 1% agarose를 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

(B) IL-6 유전자의 VNTR 유전자형 분석

전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군의 중합효소연쇄반응 산물을 대상으로 genescan 분석을 시행하였다(Labgenomics Co., Seoul, Korea). 분석에는 ABI 3130XL (Applied Biosystems, CA)장비와 길이확인을 위한 표지자(marker)로 MapMar[®]1000 (BioVentures Inc., TN)이 사용되었다.

C. IL-6 유전자의 단일염기다형성 유전자형 결정

1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 결정

(A) IL-6 유전자의 다형성 확인

염기서열비교 결과 소수 대립유전자의 빈도가 최소 5% 이상인 DNA 서열을 단일염기다형성으로 규명하고, 과거에 전신성 홍반성 루푸스에서 보고 된 적이 있었던 다형성인지는 dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)을 이용하여 확인하였다.

(B) IL-6 유전자의 다형성 결정

SPSS v11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하여 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군간의 유의한 차이를 보인 다형성을 선별하고, 추가적으로 그룹 당 각각 101명을 대상으로 직접염기서열분석을 실시하여 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 151명의 유전자형을 결정하였다.

2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 결정

추가적으로 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 131명을 대상으로 genescan 분석을 실시하였고, 기존에 보고되었던 alleles과 직접염기서열분석을 시행하여 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 151명의 유전자형을 비교 결정 하였다.

D. -276 A>C 다형성에 대한 promoter activity assay

1. IL-6 유전자의 전사조절 부위를 포함한 plasmid 제작

(A) 유전자 재조합에 사용할 IL-6 유전자의 전사조절 부위 증폭

AA, CC 유전자형을 가진 사람의 DNA 시료를 준비하여 IL-6 유전자의 전사조절 부위의 498bp를 Ex Taq polymerase (Takara Bio Co., Shiga, Japan)을 사용하여 증폭하였다. 이때 사용한 primer는 pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI)의 multi cloning site의 Kpn I과 Xho I에 삽입할 것을 감안해 forward와 revers 에 각각 Kpn I 과 Xho I의 인지 부위를 포함하여 30 base로 디자인하였다.

Forward primer 3 : 5' CAATGGTACCGCGATGGAGTCAGAGGAAAC 3'

Revers primer 4 : 5' CAATCTCGAGCAGAATGAGCCTCAGACATC 3'

(B) -276 A>C 다형성의 각각의 유전자형을 TA cloning

pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI)에 삽입하기 이전에 각각의 유

전자형을 가진 사람의 DNA를 사용하여 pCR-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 일차적으로 cloning을 시행하였다. 증폭한 AT유전자형 포함 부위를 Topo-vector에 ligation시킨 후 DH5 α 대장균주인 heat shock용 competent cell에 transformation한다. 이를 20 μ l X-galactosidase (20mg/ml)가 고르게 분포되어있는 LB agar plate (ampicillin+)에 깔아서 37 $^{\circ}$ C에 16시간 배양하였다. 16시간 뒤에 흰 콜로니 10개를 선별하여 3ml의 LB broth (ampicillin+)에서 16시간 이상 배양하여 DNA-spinTM Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 획득하였다. 획득한 plasmid DNA는 TOPO vector에 특이적인 M13 forward(-20) primer로 직접염기서열분석을 실시하여 AA 유전자형과 CC 유전자형을 획득하였다.

(C) -276 A>C 다형성의 각각의 유전자형을 pGL3 basic vector에 삽입

앞서서 획득한 -276 다형성의 AA, CC 유전자형을 포함하는 IL-6 유전자의 전사조절 부위를 luciferase를 발현하는 pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI)에 삽입하기 위하여 vector와 함께 Kpn I과 Xho I (New England Biolabs Inc., Beverly, MA)으로 double digestion을 시행하였다. Enzyme digestion 이후 생성물은 MEGA-spinTM Agarose Gel Extraction Kit (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)를 사용하여 회수하였으며 각각의 유전자형을 포함한 IL-6 유전자의 전사조절 부위를 pGL3 basic vector에 ligation하기 위해 T4 ligase (New England Biolabs Inc., Beverly, MA)를 처리하여 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 이상 반응시켰다(Fig. 1).

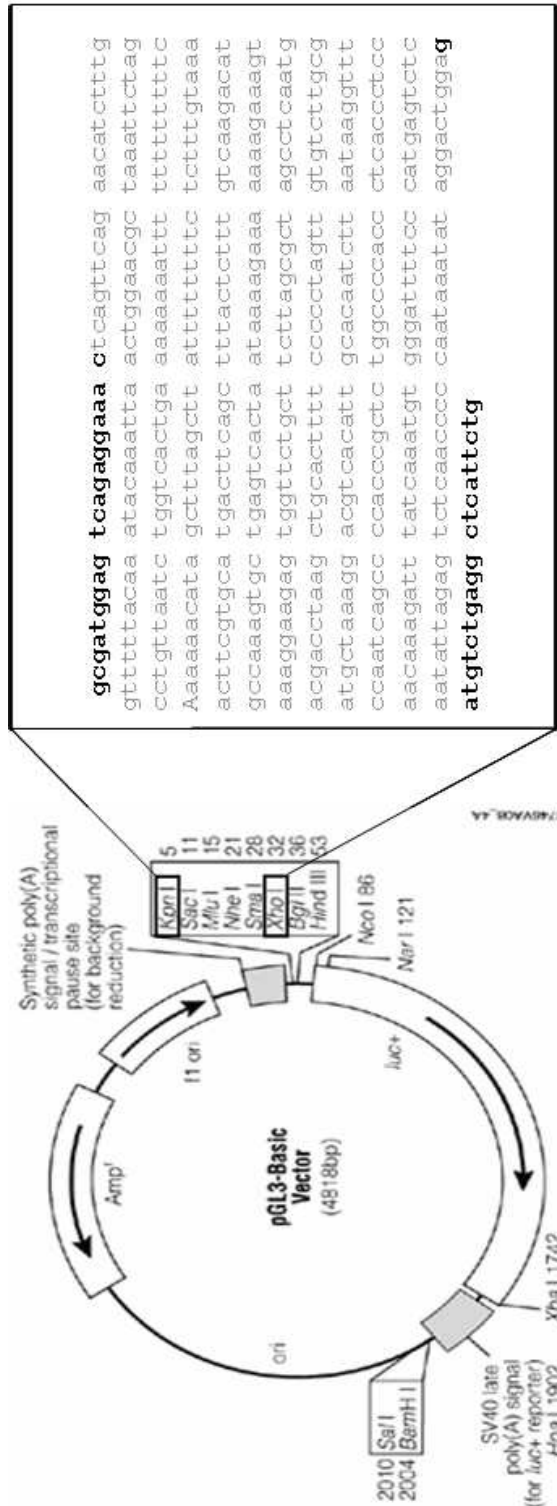


Fig. 1. pGL3-basic vector circle map and preparations of promoter reporter constructs. A reporter assay was performed in Hep3B cells transfected with luciferase reporter constructs. IL-6 gene promoter was separately subcloned into a Kpn I-Xho I site of pGL3-Basic luciferase reporter vector. Additional description: luc+, cDNA encoding themodified firefly luciferase; Ampr, gene conferring ampicillin resistance in E. coli ; fl ori, origin of replication derived from filamentous phage; ori, origin of replication in E. coli. Arrows within luc+ and the Ampr gene indicate the direction of transcription; the arrow in the fl ori indicates the direction of ssDNA strand synthesis.

2. Competent cell에 transformation

Ligation된 plasmid를 DH5 α 대장균주의 heat shock용 competent cell에 transformation 하였다. 100 μ l의 competent cell에 ligation된 plasmid를 넣고 얼음에서 30분 두었다가 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heat shock을 주었으며 다시 5분간 얼음 위에 둔다. 여기에 1ml의 LB broth (ampicillin+)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간가량 안정화시킨 뒤 LB agar plate에 고르게 분포시키고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 16시간 이상 배양하였다.

3. 유전자의 삽입 확인

배양된 콜로니들을 선별하여 IL-6 유전자의 전사조절 부위가 잘 삽입이 되었는지를 확인하였다. 먼저 콜로니를 300 μ l의 LB broth (ampicillin+)에 접종하여 3-5시간 배양한 후 이 배양액을 주형으로 하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. 이때 사용한 primer는 IL-6 유전자의 전사조절 부위의 증폭을 위해 사용하였던 forward primer와 reverse primer이고, Ex Taq polymerase (Takara Bio Co., Shiga, Japan)를 사용하였다. 결과는 1% agarose gel에 전기 영동하여 확인하였으며 500bp 부위에 하나의 밴드가 나타났을 경우 삽입이 되었다고 판단하였다. 또한 정확한 확인을 위하여 직접염기서열분석을 실시하였다.

4. Plasmid DNA 추출

삽입이 확인된 콜로니 배양액의 100 μ l를 3ml의 LB broth (ampicillin+)에 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에 8시간 배양하였으며, 이를 300ml의 LB broth (ampicillin+)에 1/1000 희석하여 접종한 뒤 다시 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 16시간 이상 배양하였다. 배양액은 QIAGEN plasmid Maxi Kits (QIAGEN Inc., Hilden, Germany)를 사용하여 plasmid DNA를 대량으로 획득하였다. 획득한 plasmid DNA는 1 μ g/ μ l로 희석하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

5. Transfection

(A) Hep3B cell 에 transfection

IL-6 유전자는 주로 간세포에서 발현이 되므로 hepatocellular carcinoma 세포주인 Hep3B cell (No.58064, KCLB)에 transfection을 시행하였다. 1×10^5 cell을 12-well culture dish에 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen, Grand Island, NY)를 포함한 RPMI 1640 medium (Invitrogen, Grand Island, NY)을 공급하여 16시간 이상 배양하였고, transfection reagent는 FuGENE6 (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 먼저 $1.5\mu\text{l}$ 의 FuGENE6 reagent를 $48.5\mu\text{l}$ serum-free RPMI 1640 medium에 희석시켜 상온에서 5분간 반응시키고, 여기에 $0.5\mu\text{g}$ 의 pSV- β -galactosidase reporter vector (Promega, Madison, WI)와 $0.5\mu\text{g}$ 의 plasmid DNA를 포함한 $50\mu\text{l}$ 의 serum-free RPMI 1640 medium을 첨가하여 잘 섞은 뒤 상온에서 15분간 반응시킨다. Transfection을 시행하기 전에 cell은 serum-free RPMI 1640 medium으로 2번 washing하여 잔존하는 FBS를 제거하고 1ml의 serum-free RPMI 1640 medium을 첨가 한 뒤에 DNA 혼합물을 cell에 골고루 뿌려준다. 그리고 5시간 뒤에 20%의 FBS를 포함한 RPMI 1640 medium을 2ml 첨가하여 transfection 이후 48시간 뒤에 cell을 용해시킨다.

(B) HeLa cell 에 Transfection

전신성 홍반성 루푸스는 전신적인 염증반응을 일으키는 질환이므로 IL-6 유전자가 주로 합성되는 간세포에서 뿐만 아니라 다른 세포에서도 발현을 할 것이라는 가정 하에 cervix cancer의 세포주인 HeLa cell (No.10002, KCLB)에서도 transfection을 시행하였다. 1×10^5 cell을 12-well culture dish에 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen, Grand Island, NY)를 포함한 DMEM medium (Hyclone, Logan, Utah)을 공급하여 16시간 이상 배양하였고, transfection reagent는 FuGENE6 (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 먼저 $1.5\mu\text{l}$ 의 FuGENE6를 $48.5\mu\text{l}$ serum-free DMEM medium에 희석시켜 상온에서 5분간 반

응시키고, 여기에 $0.5\mu\text{g}$ 의 pSV- β -galactosidase reporter vector (Promega, Madison, WI)와 $0.5\mu\text{g}$ 의 plasmid DNA를 포함한 $50\mu\text{l}$ 의 serum-free DMEM medium을 첨가하여 잘 섞은 뒤 상온에서 15분간 반응시킨다. Transfection을 시행하기 전에 cell은 serum-free DMEM medium으로 2번 washing하여 잔존하는 FBS를 제거하고 1ml 의 serum-free DMEM medium을 첨가 한 뒤에 DNA 혼합물을 cell에 골고루 뿌려준다. 그리고 5시간 뒤에 20%의 FBS를 포함한 DMEM medium을 2ml 첨가하여 transfection 이후 48시간 뒤에 cell을 용해시킨다.

6. Luciferase assay와 β -galactosidase assay

Promoter reporter assay는 Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI)를 사용하여 시행하였으며, transfection 효율의 차이는 β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega, Madison, WI)으로 정량하였다. 또한 β -galactosidase enzyme assay와 luciferase assay 모두 한 sample당 3well씩 3번 실험하였다.

실험 방법은 일단 48시간 배양한 cell을 1X phosphate buffered saline (PBS)로 2번 washing하였으며, 1X reporter lysis buffer (RLB)를 각 well당 $100\mu\text{l}$ 첨가하여 고르게 분포시킨 뒤 상온에서 15분간 반응시킨다. Cell lysate를 scrape하여 microcentrifuge tube에 옮긴 뒤 $12,000\text{rpm}$ 에서 30초간 상온에서 원심분리 하였고 그 상층액으로 실험을 진행하였다.

β -Galactosidase enzyme assay는 상층액 $30\mu\text{l}$ 를 $20\mu\text{l}$ 1X RLB와 섞어 96-well plate에 넣고, $50\mu\text{l}$ 의 assay 2X buffer를 첨가하여 적당한 노란색을 띠 때까지 37°C 에서 반응 시킨 후. 약 3시간 뒤에 $150\mu\text{l}$ 의 1M sodium carbonate를 첨가하여 반응을 중지시키고 420nm 에서 흡광도를 측정하였다.

Luciferase assay는 $20\mu\text{l}$ 의 상층액에 $100\mu\text{l}$ 의 luciferase assay reagent를 첨가하여 luminometer를 측정하였으며, luminometer 측정치는 β -galactosidase enzyme assay에서의 흡광도 값으로 정량하여 통계분석 시행하였다.

E. 통계 분석

단일염기다형성의 분석에서는 분석하고자 하는 모델이 유전되는 형태와 일치하는지가 중요하므로, major allele의 수에 regression 하여 major allele의 추가적인 효과를 보는 가정(codominant) 과 major allele이 minor allele에 우성하여 유전된다는 가정(dominant), 그리고 major allele이 minor allele의 열성으로 유전된다는 가정(recessive)등의 3가지 다른 분석 모델이 사용되었다. 우선 각각의 다형성을 이 3가지 모델로 전환하여, 실험군과 대조군 간의 유의성을 확인하기 위해 독립표본 t -test 를 시행하였으며, 실험군과 대조군 간의 나이와 성별 차이를 배제하기 위해 regression을 시행하였다.

또한 다형성의 유전자형에 따른 여러 가지 임상적 특징과 다형성의 dominant 모델을 사용하여 ANOVA test와 t -test를 시행하였다. Promoter reporter assay의 결과 역시 t -test를 시행하여 -276 A>C 단일염기다형성의 각 유전자형간의 유의한 차이를 확인하였으며, 평균값과 표준오차범위로 나타내었다.

연구 결과의 통계학적 분석은 SPSS v11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL) 프로그램을 사용하였고, p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결 과

A. 전신성 홍반성 루푸스 환자군과 정상 대조군의 임상적 특징

전신성 홍반성 루푸스의 환자군 151명의 평균 나이는 34.21세, 정상 대조군 151명의 평균 나이는 26.16세로 루푸스에서 더 높게 나타났고, 남녀 성비는 루푸스가 주로 여성에게서 주로 발병하는 질환이므로 남성 28명(18.5%)보다 여성 123명(81.5%)으로 여성의 비율이 더 높으며, 정상 대조군의 비율 또한 남성 34명(22.5%), 여성 117명(77.5%)으로 여성의 비율이 더 높았다. 또한 루푸스 환자군의 호소하는 증상 및 검사 소견에서 구강궤양(oral ulcer)은 72례(47.7%), 관절염(arthritis)은 102례(67.5%), 장막염(serositis)은 24례(15.9), 발진(rash)은 68례(45.0%), 신장염(nephritis)은 51례(33.8%), 백혈구 감소증(leukopenia)은 92례(60.9%), 림프구 감소증(lymphopenia)은 139례(92.1%), 혈소판 감소증(thrombocytopenia)은 37례(24.5%), anti-ds DNA는 108례(71.5%), 저보체혈증(hypocomplementemia)은 114례(75.5%), anticardiolipin 항체는 63례(41.7%), 주요 장기 침범(major organ involvement)는 69례(45.7%)이고, C-반응 단백질의 평균은 $0.063 \pm 0.121 \mu\text{g/dl}$ 이었다(Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of the study subjects

Characteristics	SLE N=151(%)	NC N=151(%)	SLE <i>vs.</i> NC <i>P</i> value
Age*	34.21 ± 12.35	26.16 ± 4.27	0.001
SEX* Male	28 (18.5%)	34 (22.5%)	0.393
Female	123 (81.5%)	117 (77.5%)	
Oral ulcer [§]	72 (47.7%)		
Arthritis [§]	102 (67.5%)		
Serositis [§]	24 (15.9%)		
Rash [§]	68 (45.0%)		
Nephritis [§]	51 (33.8%)		
Leukopenia [§]	92 (60.9%)		
Lymphopenia [§]	139 (92.1%)		
Thrombocytopenia [§]	37 (24.5%)		
Anti-ds DNA [§]	108 (71.5%)		
Hypocomplementemia [§]	114 (75.5%)		
Anticardiolipin Antibody [§]	63 (41.7%)		
Major organ involvement [§]	69 (45.7%)		
C-Reactive Protein*	0.063±0.121		

* This value was presented as means ± SD. § This value was presented as number of patients positive for feature or antibody.

B. IL-6 유전자의 단일염기다형성 확인

1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 확인

먼저 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 50명의 genomic DNA 시료를 대상으로 IL-6 유전자의 직접염기서열분석을 시행하여 NCBI에 보고되어 있는 염기서열과 다형성을 대조로 비교 분석한 결과 -572 C>G, -373 A_nT_n, -276 A>C, 331 T>G, 334 A>T 등 4개는 minor allele이 5% 이상으로 다형성임을 확인할 수 있었으나 -174 G>C는 minor allele이 5% 미만으로 한국인에서는 다형성이 아님을 확인하였다(Fig. 2).

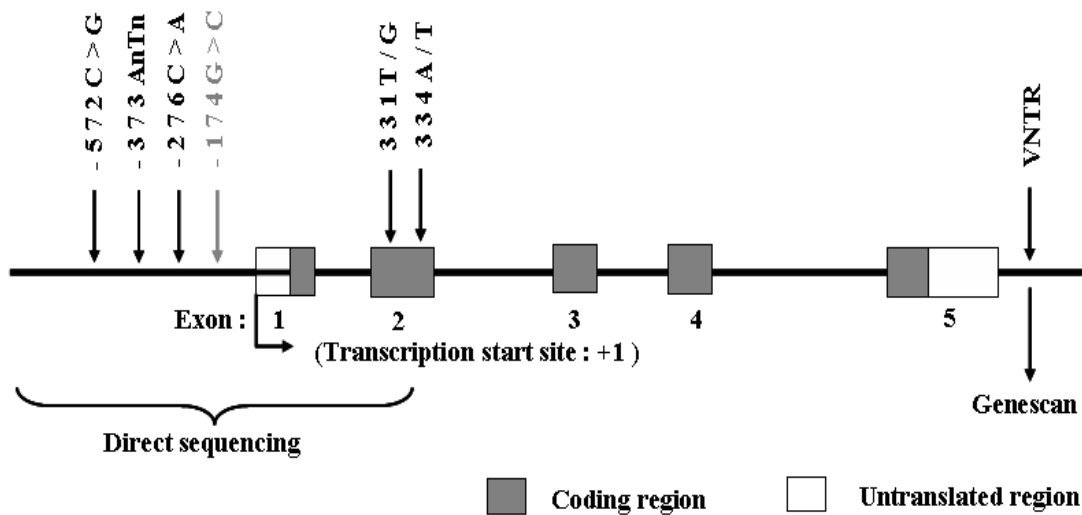


Fig. 2. Schematic representation of the IL-6 gene. IL-6 consist of five exons separated by a four introns Filled boxes denote translated regions; open boxes untranslated regions. Arrows mark the locations of SNPs within IL-6 locus. Location numbers are relative to the transcription site.

2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 확인

먼저 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 20명의 IL-6 유전자의 3' flanking region VNTR 부위의 중합효소연쇄반응 산물을 대상으로 genescan 분석을 시행한 결과 618bp, 642bp, 648bp, 652bp, 682bp 등 5개의 alleles을 확인할 수 있었다.

C. IL-6 유전자의 단일염기다형성의 유전자형 결정

1. IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 다형성의 유전자형 결정

IL-6 유전자에서 확인된 다형성의 유전자형을 결정하기 위해 추가적으로 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 101명의 직접염기서열분석을 실시하여 각각 151명의 유전자형을 결정하였다. 두 그룹간의 유의성을 보기위해서 SPSS로 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 성별과 나이의 차이를 배제하기 위한 regression을 실시한 결과 -276 A>C는 CC 유전자형이 루푸스 환자에서 높게 나타났다(p value 0.030), 334 A>T는 AA 유전자형이 루푸스 환자에서 낮게 나타났다(p value 0.005) (Table 2). 또한 -373 A_nT_n에서 -373 A₁₀T₁₀는 루푸스 환자에서 낮게 나타났으며(p value 0.038), -373 A₁₀T₁₁는 루푸스 환자에서 높은 빈도로 발견되었다(p value <0.001) (Table 3).

2. IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 결정

추가적으로 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 131명을 대상으로 genescan 분석을 실시한 결과 처음 발견되었던 618bp, 642bp, 648bp, 652bp, 682bp 이외에 568bp, 599bp, 609bp, 629bp, 634bp, 656bp, 692bp, 706bp, 748bp, 760bp alleles이 추가 확인되었고, 유전자형이 확인된 루푸스 환자와 정상 대조군 각각 151명의 alleles은 직접염기서열분석을 시행하여 재확인 하였으며, 이들 alleles은 각각 A, B, C, ... O로 명명 하였다(Table 4). 또한 genotype을 분석한 후 (Table 5) minor allele이 5% 이상인 VNTR G 유전자형(652bp), VNTR H 유전

자형(648bp), VNTR I 유전자형(642bp), VNTR L 유전자형(618bp), VNTR N 유전자형(599bp)을 대상으로 독립표본 t -test를 한 결과 루푸스 환자에서 VNTR II 유전자형의 가진 경우가 위험도가 증가하였으며($p < 0.001$), NN 유전자형을 가진 경우 위험도는 감소하였다($p = 0.004$)(Table 6).

Table 2. The genotype and allele frequencies of polymorphism in the promoter region and exon2 region of IL-6 gene

		SLE	NC	SLE vs. NC	
		(N=151)	(N=151)	<i>p</i> value	OR (95% CI)
-572 C>G	CC	74 (49.0%)	76 (50.3%)	co : 0.470	1.143 (0.795~1.643)
	CG	55 (36.4%)	61 (40.4%)	do : 0.334	1.211 (0.822~1.786)
	GG	14 (9.3%)	14 (9.3%)	re : 0.715	1.047 (0.817~1.343)
	q.	0.321	0.295	0.540	1.062 (0.878~1.282)
-276 A>C	AA	108 (71.5%)	104 (68.9%)	co : 0.325	1.229 (0.815~1.852)
	AC	28 (18.5%)	41 (27.2%)	do : 0.030	1.779 (1.057~2.994)
	CC	15 (9.9%)	6 (4.0%)	re : 0.945	1.008 (0.768~1.290)
	q.	0.199	0.175	0.226	1.148 (0.553~1.437)
331 T>G	TT	117 (77.5%)	125 (82.8%)	co : 0.220	1.473 (0.794~2.732)
	TG	34 (22.5%)	26 (17.2%)	NA	NA
	GG	0 (0%)	0 (0%)	re : 0.220	1.214 (0.891~1.653)
	q	0.113	0.086	0.248	1.188 (0.887~1.587)
334 A>T	AA	85 (56.3%)	115 (76.2%)	co : 0.005	2.188 (1.267~3.774)
	AT	65 (43.0%)	36 (23.8%)	do : 1.000	0
	TT	1 (0.7%)	0 (0%)	re : 0.005	1.478 (1.123~1.945)
	q.	0.222	0.119	0.011	1.374 (0.518~1.754)

Each *p* value was calculated with co-dominant(co), dominant(do), and recessive(re) models. Logistic regression analysis was applied to control for age and sex as covariable. OR: odds ratio CI: confidence interval, q.: minor allele frequency, NA: not applicable.

Table 3. The genotype and allele frequencies of -373 A_nT_n polymorphism in the promoter region of IL-6 gene

		SLE	NC	SLE vs. NC	
-373 A _n T _n		(N=151)	(N=151)	<i>p</i> value	OR (95% CI)
-373 A ₉ T ₁₁	A ₉ T ₁₁	21 (13.9%)	28 (18.6%)	0.116	0.577 (0.290~1.145)
	Other	130 (86.1%)	61 (40.4%)		
-373 A ₁₀ T ₁₀	A ₁₀ T ₁₀	82 (54.3%)	104 (68.9%)	0.038	0.579 (0.345~0.970)
	Other	69 (45.7%)	47 (31.1%)		
-373 A ₁₀ T ₁₁	A ₁₀ T ₁₁	48 (31.8%)	19 (12.6%)	<0.001	3.535 (1.839~6.794)
	Other	103 (68.2%)	132 (87.4%)		

Alleles identified by direct sequencing. Logistic regression analysis was applied to control for age and sex as covariable. OR: odds ratio, CI: confidence interval

Table 4. The allele frequencies of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene

Allele	Size(bp)	SLE (n=147)	NC (n=151)
A	760	1 (0.34%)	0 (0%)
B	748	0 (0%)	2 (0.66%)
C	706	2 (0.68%)	4 (1.32%)
D	692	0 (0%)	1 (0.33%)
E	682	2 (0.68%)	1 (0.33%)
F	656	0 (0%)	1 (0.33%)
G	652	12 (4.08%)	21 (6.93%)
H	648	220 (74.8%)	213 (70.29%)
I	642	26 (8.84%)	2 (0.66%)
J	634	1 (0.34%)	0 (0%)
K	629	1 (0.34%)	0 (0%)
L	618	21 (7.14%)	23 (7.59%)
M	609	1 (0.34%)	0 (0%)
N	599	7 (2.38%)	30 (9.9%)
O	568	0 (0%)	4 (1.32%)

Alleles identified by Genescan analysis and confirmed by direct sequencing.

Note that A,B,C,,, and O allele described here.

Table 5. The genotype of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene

Genotype	Size (bp)	SLE (n=147)	NC (n=151)
BB	748/748	0 (0%)	1 (0.66%)
CC	706/706	1 (0.68%)	1 (0.66%)
DF	692/656	0 (0%)	1 (0.66%)
GG	652/652	6 (4.08%)	9 (5.96%)
HA	648/760	1 (0.68%)	0 (0%)
HC	648/706	0 (0%)	2 (1.32%)
HE	648/682	2 (1.36%)	1 (0.66%)
HG	648/652	0 (0%)	2 (1.32%)
HH	648/648	98 (66.97%)	93 (61.59%)
HI	648/642	1 (0.68%)	1 (0.66%)
HL	648/618	21 (14.29%)	21 (13.91%)
II	642/642	12 (8.16%)	0 (0%)
IJ	642/634	1 (0.68%)	0 (0%)
IG	634/652	0 (0%)	1 (0.66%)
KG	629/652	1 (0.68%)	0 (0%)
LL	618/618	0 (0%)	1 (0.66%)
MN	609/599	1 (0.68%)	0 (0%)
NN	599/599	3 (2.04%)	13 (8.61%)
NO	599/568	0 (0%)	4 (0.66%)

Alleles identified by Genescan analysis and confirmed by direct sequencing.

Table 6. The major genotype of VNTR in the 3' flanking region of IL-6 gene

		SLE (n=147)	NC (n=151)	<i>p</i> value
VNTR G>X	GG	6 (4.1%)	9 (6.0%)	co : 0.331
	GX	1 (0.7%)	3 (2.0%)	do : 0.261
	XX	140 (95.2%)	139 (92.1%)	re : 0.458
VNTR H>X	HH	97 (66.0%)	93 (61.6%)	co : 0.387
	HX	25 (17.0%)	27 (17.9%)	do : 0.436
	XX	25 (17.0%)	31 (20.5%)	re : 0.430
VNTR I>X	II	12 (8.2%)	0 (0%)	co : 0.001
	IX	2 (1.4%)	2 (1.3%)	do : 0.002
	XX	133 (90.5%)	149 (98.7%)	re : <0.001
VNTR L>X	LL	0 (0%)	1 (0.7%)	co : 0.823
	LX	21 (14.3%)	21 (13.9%)	do : 0.944
	XX	126 (85.7%)	129 (85.4%)	re : 0.323
VNTR N>X	NN	3 (2.0%)	13 (8.6%)	co : 0.005
	NX	1 (0.7%)	4 (2.6%)	do : 0.004
	XX	143 (97.3%)	134 (88.7%)	re : 0.012

Each *p* value was calculated with co-dominant(co), dominant(do), and recessive(re) models. Logistic regression analysis was applied to control for age and sex as covariable. X: any other allele.

D. IL-6 유전자의 단일염기다형성의 유전자형과 임상적 특징과의 상관관계

전신성 홍반성 루푸스 환자에 있어서 IL-6 유전자의 단일염기다형성의 유전자형과 진단과 관련한 여러 임상적 특징과의 상관관계를 분석하여 다형성의 유전자형이 임상적으로 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다.

먼저 전신성 홍반성 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 나이와 성별 차이를 배제하기 위해 regression을 시행 하였다. 그 결과 IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위에서는 -572 C>G 다형성에서 anti-ds DNA의 빈도는 CG 혹은 CC 유전자형을 가지고 있을 때의 양성률 67.4%보다 GG 유전자형을 가지고 있을 때의 양성률 95.5%가 더 높게 나타났고, 이때 두 그룹간의 p value는 0.007으로 유의한 차이를 보였다.

-276 A>C 다형성에서 혈소판 감소증의 빈도는 AC 혹은 AA 유전자형을 가지고 있을 때 22.9%보다 CC 유전자형을 가지고 있을 때 57.1%가 더 높게 나타났고, 이때 두 그룹간의 p value는 0.006으로 유의한 차이를 보였다.

334 A>T 다형성에서는 여러 임상적 특징들과 특별한 상관관계를 보이지 않았다(Table 7).

-373 A_nT_n 다형성에서도 -373 A₉T₁₁, -373 A₁₀T₁₀, -373 A₁₀T₁₁ 모두 여러 임상적 특징들과 특별한 상관관계를 보이지 않았다(Table 8).

또한 IL-6 유전자의 3' flanking region의 VNTR 유전자형 중 VNTR I 유전자형(642bp)을 살펴보면 백혈구 감소증의 빈도는 VNTR I 유전자형을 가지고 있을 때가 85.7%로 가지고 있지 않을 때 58.6%보다 더 높게 나타났고, 이때 두 그룹간의 p value는 0.048로 유의한 차이를 보였다. 혈소판 감소증의 빈도는 VNTR I 유전자형을 가지고 있을 때가 50.0%로 가지고 있지 않을 때 21.8%보다 더 높게 나타났고, 이때 두 그룹간의 p value는 0.020으로 유의한 차이를 보였다. C-반응 단백질의 평균은 VNTR I 유전자형(642bp)을 가지고 있을 때가 $0.138 \pm 0.291 \mu\text{g}/\text{dl}$ 으로 가지고 있지 않을 때 $0.057 \pm 0.088 \mu\text{g}/\text{dl}$ 보다 더 높게 나타났고, 이때 두 그룹간의 p value는 0.019로 유의한 차이를 보였다.

VNTR G 유전자형(652bp)을 살펴보면 림프구 감소증의 빈도는 VNTR G 유전자형을 가지고 있을 때가 57.1%로 가지고 있지 않을 때 94.3%보다 더 낮게 나타났다, 이때 두 그룹간의 p value는 <0.001 으로 유의한 차이를 보였다. 저보체혈증의 빈도는 VNTR G 유전자형을 가지고 있을 때가 42.9%로 가지고 있지 않을 때 77.1%보다 더 낮게 나타났다, 이때 두 그룹간의 p value는 0.040으로 유의한 차이를 보였다(Table 9).

Table 7. Clinical characteristics according to the genotype of IL-6 gene in SLE patients.

Characteristics	-572 C>G			-276 A>C			334 A>T		
	GG n=22(14.6%)	CG,CC n=129(85.4%)	P value	CC n=15(9.9%)	AC,AA n=136(90.1%)	P value	TT n=1(0.7%)	AT,AA n=150(99.3%)	P value
Age*	35.10±9.40	35.25±12.49	0.956	32.50±13.51	35.55±11.85	0.371	41.00	35.18±12.05	0.141
Sex Male [§]	2(9.1%)	103(79.8%)	0.217	13(86.7%)	110(80.9%)	0.584	0(0%)	28(18.7%)	0.632
Female [§]	20(90.9%)	26(20.2%)		2(13.3%)	26(19.1%)		1(100.0%)	122(81.3%)	
Oral ulcer [§]	9(40.9%)	63(48.8%)	0.491	6(40.0%)	66(48.5%)	0.530	0(0%)	72(48.0%)	0.338
Arthritis [§]	14(63.6%)	88(68.2%)	0.671	11(73.3%)	91(66.9%)	0.614	1(100.0%)	101(67.3%)	0.487
Serositis [§]	3(13.6%)	21(16.3%)	0.754	4(26.7%)	20(14.7%)	0.229	0(0%)	24(16.0%)	0.663
Rash [§]	10(45.5%)	58(45.0%)	0.966	6(40.0%)	62(45.6%)	0.680	0(0%)	68(45.3%)	0.364
Nephritis [§]	5(22.7%)	46(35.7%)	0.236	5(9.8%)	46(90.2%)	0.970	0(0%)	51(34.0%)	0.474
Leukopenia [§]	13(59.1%)	79(61.2%)	0.849	12(80.0%)	80(58.8%)	0.111	1(100.0%)	91(60.7%)	0.422
Lymphopenia [§]	20(90.9%)	119(92.2%)	0.830	15(100.0%)	124(91.2%)	0.230	1(100%)	138(92.0%)	0.786
Thrombocytopenia [§]	4(18.2%)	33(25.6%)	0.456	8(53.3%)	29(21.3%)	0.006	1(100%)	36(24.0%)	0.078
Anti-ds DNA [§]	21(95.5%)	87(67.4%)	0.007	13(86.7%)	95(69.9%)	0.171	1(100%)	107(71.3%)	0.527
Hypocomplementemia [§]	14(63.6%)	100(77.5%)	0.162	12(80.0%)	102(75.0%)	0.669	1(100%)	113(75.3%)	0.568
Anticardiolipin Ab [§]	7(31.8%)	56(43.3%)	0.561	6(40.0%)	57(41.9%)	0.635	1(100%)	62(41.3%)	0.495
Major organ involvement [§]	8(36.4%)	61(47.3%)	0.342	10(66.7%)	59(43.4%)	0.086	0(0%)	69(46.0%)	0.357
C-Reactive Protein*	0.063±0.097	0.067±0.125	0.976	0.071±0.111	0.063±0.129	0.809	0.300	0.064±0.122	0.783

*This value was presented as means ± SD. [§]This value was presented as number of patients positive for feature or antibody. Value in bold indicate significant *p* value.

Table 8. Clinical characteristics according to the -373 AnTn genotype of IL-6 gene in SLE patients.

Characteristics	-373 A ₉ T ₁₁			-373 A ₁₀ T ₁₀			-373 A ₁₀ T ₁₁		
	A ₉ T ₁₁	Other	<i>p</i>	A ₁₀ T ₁₀	Other	<i>p</i>	A ₁₀ T ₁₁	Other	<i>p</i>
Age*	36.00±11.59	33.92±12.49	0.475	34.35±12.84	34.03±11.83	0.873	33.17±11.96	34.69±12.56	0.482
Sex Male [§]	3(14.3%)	25(19.2%)	0.588	12(14.6%)	16(23.2%)	0.178	13(27.1%)	15(14.6%)	0.065
Female [§]	18(85.7%)	105(80.8%)		70(85.4%)	53(76.8%)		35(72.9%)	88(85.4%)	
Oral ulcer [§]	10(47.6%)	62(47.7%)	0.995	41(50.0%)	31(44.9%)	0.534	21(43.8%)	51(49.5%)	0.509
Arthritis [§]	16(76.2%)	86(66.2%)	0.362	57(69.5%)	45(65.2%)	0.574	29(60.4%)	73(70.9%)	0.201
Serositis [§]	4(19.0%)	20(15.4%)	0.670	15(18.3%)	9(13.0%)	0.379	5(10.4%)	19(18.4%)	0.209
Rash [§]	7(33.3%)	61(46.9%)	0.245	42(51.2%)	26(37.7%)	0.096	19(39.6%)	49(47.6%)	0.358
Nephritis [§]	6(28.6%)	45(34.6%)	0.587	29(35.4%)	22(31.9%)	0.652	16(33.3%)	35(34.0%)	0.938
Leukopenia [§]	9(42.9%)	83(63.8%)	0.067	50(61.0%)	42(60.9%)	0.989	33(68.8%)	59(57.3%)	0.179
Lymphopenia [§]	19(90.5%)	120(92.3%)	0.773	76(92.7%)	63(91.3%)	0.755	44(91.7%)	95(92.2%)	0.905
Thrombocytopenia [§]	4(19.0%)	33(25.4%)	0.531	22(26.8%)	15(21.7%)	0.469	11(22.9%)	26(25.2%)	0.757
Anti-ds DNA [§]	15(71.4%)	93(71.5%)	0.992	55(67.1%)	53(76.8%)	0.187	38(79.2%)	70(68.0%)	0.155
Hypocomplementemia [§]	14(66.7%)	100(76.9%)	0.311	60(73.2%)	54(78.3%)	0.469	40(83.3%)	74(71.8%)	0.126
Anticardiolipin Ab [§]	6(28.6%)	57(43.8%)	0.111	36(43.9%)	27(39.1%)	0.402	21(43.8%)	42(40.8%)	0.939
Major organ involvement [§]	9(42.9%)	60(46.2%)	0.778	39(47.6%)	30(43.5%)	0.616	21(43.8%)	48(46.6%)	0.743
C-Reactive Protein*	0.055±0.083	0.065±0.127	0.740	0.067±0.140	0.060±0.096	0.740	0.062±0.102	0.064±0.130	0.914

*This value was presented as means ± SD. [§]This value was presented as number of patients positive for feature or antibody. Value in bold indicate significant *p* value.

Table 9. Clinical characteristics according to the VNTR genotype of IL-6 gene in SLE patients.

Characteristics	H<X		I>X		G>X		
	XX n=25(17.0%)	HX,HH n=122(83.0%)	XX n=133(90.5%)	IX,II n=14(9.5%)	XX n=140(95.2%)	GX,GG n=7(4.8%)	P value
Age*	35.24±12.42	34.03±11.81	34.04±12.19	36.14±14.84	34.05±12.06	38.00±19.15	0.414
Sex Female §	22(88.0%)	98(80.3%)	106(79.7%)	14(100%)	115(82.1%)	5(71.4%)	0.475
Male §	3(12.0%)	24(19.7%)	27(20.3%)	0(0%)	25(17.9%)	2(28.6%)	
Oral ulcer §	9(36.0%)	60(49.2%)	63(47.4%)	6(42.9%)	67(47.9%)	2(28.6%)	0.318
Arthritis §	16(64.0%)	82(67.2%)	91(68.4%)	7(50.0%)	93(66.4%)	5(71.4%)	0.784
Serositis §	4(16.0%)	19(15.6%)	20(15.0%)	3(21.4%)	23(16.4%)	0(0%)	0.243
Rash §	10(40.0%)	54(44.3%)	56(42.1%)	8(57.1%)	62(44.3%)	2(28.6%)	0.413
Nephritis §	7(28.0%)	42(34.4%)	44(33.1%)	5(35.7%)	47(33.6%)	2(28.6%)	0.784
Leukopenia §	19(76.0%)	71(58.2%)	78(58.6%)	12(85.7%)	87(62.1%)	3(42.9%)	0.307
Lymphopenia §	21(84.0%)	115(94.3%)	122(91.7%)	14(100%)	132(94.3%)	4(57.1%)	<0.001
Thrombocytopenia §	9(36.0%)	27(22.1%)	29(21.8%)	7(50.0%)	36(25.7%)	0(0%)	0.123
Anti-ds DNA §	16(64.0%)	88(72.1%)	95(71.4%)	9(64.3%)	100(71.4%)	4(57.1%)	0.417
Hypocomplementemia §	19(76.0%)	92(75.4%)	99(74.4%)	12(85.7%)	108(77.1%)	3(42.9%)	0.040
Anticardiolipin antibody §	9(36.0%)	53(43.4%)	57(42.9%)	5(35.7%)	59(42.1%)	3(42.9%)	0.868
Major organ involvement §	10(40.0%)	56(45.9%)	59(44.4%)	7(50.0%)	64(45.7%)	2(28.6%)	0.374
C-Reactive Protein*	0.094±0.220	0.059±0.091	0.199	0.057±0.088	0.138±0.291	0.066±0.125	0.019

*This value was presented as means ± SD. §This value was presented as number of patients positive for feature or antibody. Value in bold indicate significant *p* value.

E. -276 A>C 다형성에서 각각의 유전자형에 따른 전사조절 부위 활성 비교

1. Hep3B cell에 transfection시킨 전사조절 부위의 활성

-276 A>C 다형성의 유전자형에 따른 전사조절 부위의 활성을 조사하기 위해 IL-6유전자를 Hep3B cell에 transfection시킨 후 promoter reporter assay를 시행한 결과 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 약 4배정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

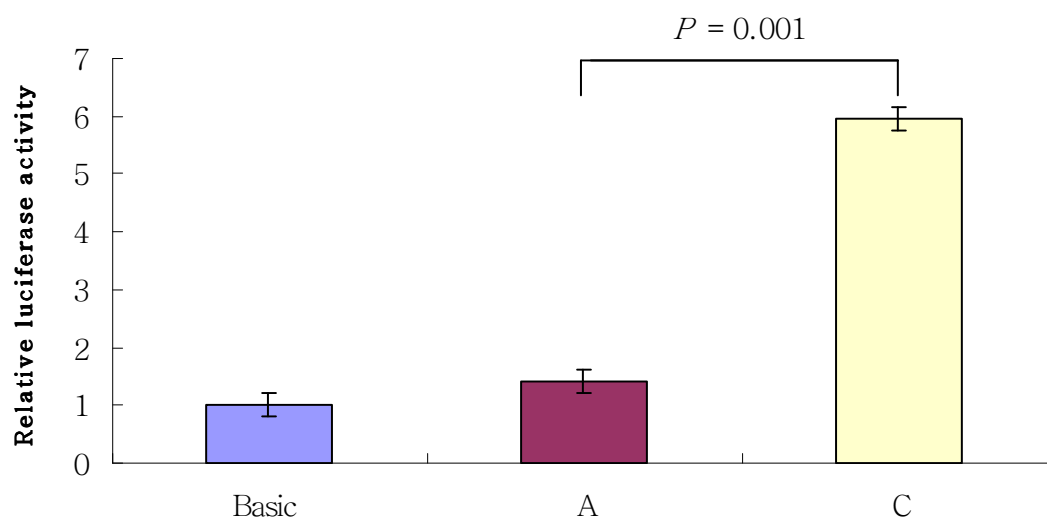


Fig. 3. Effect of -276 A>C polymorphism on the transcription activity of human IL-6 gene promoter in Hep3B cells. A reporter assay was performed in Hep3B cells transfected with luciferase reporter constructs. The relative luciferase activity is represented as the ratio to the activity of pGL3-basic. Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments. P value was determined by a paired t test.

2. HeLa cell에 transfection시킨 전사조절 부위의 활성화

-276 A>C 다형성의 유전자형에 따른 전사조절 부위의 활성을 조사하기 위해 IL-6유전자를 HeLa cell에 transfection시킨 후 promoter reporter assay를 시행한 결과 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 약 2배정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

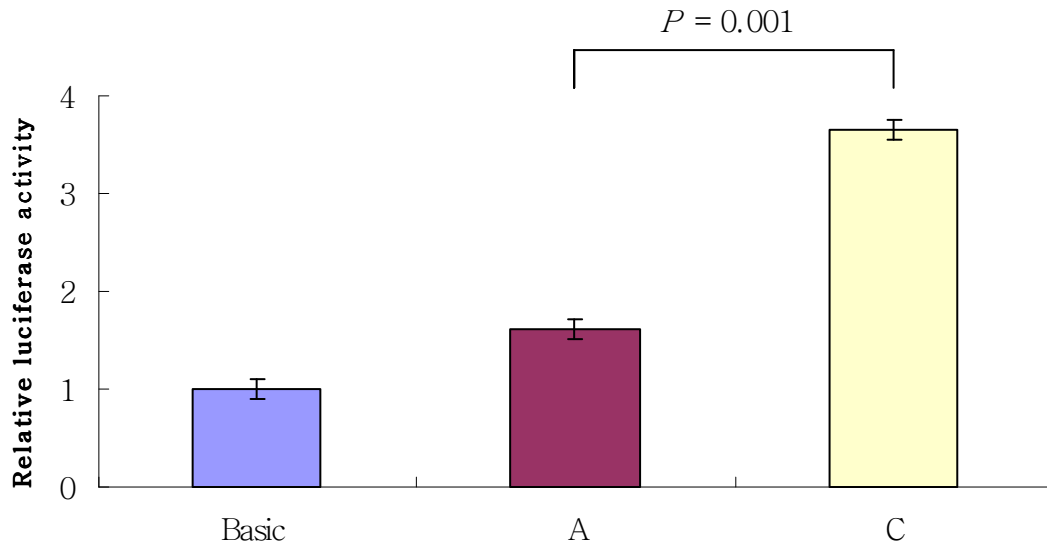


Fig. 4. Effect of -276 A>C polymorphism on the transcription activity of human IL-6 gene promoter in HeLa cells. A reporter assay was performed in HeLa cells transfected with luciferase reporter constructs. The relative luciferase activity is represented as the ratio to the activity of pGL3-basic. Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as mean \pm SEM for three independent experiments. *P* value was determined by a paired *t* test.

IV. 고 찰

단일염기다형성은 세포핵 속의 염색체가 갖고 있는 30억 개의 염기 서열 중 개개인의 편차를 나타내는 한개 또는 수십 개의 염기변이를 말한다. 이러한 염기서열의 변화가 인구의 약 1% 이상의 빈도로 나타나며, 이로 인해 인해 피부나 머리카락 색, 눈의 색, 키 등이 달라지는 등의 인종간의 차이나 개개인의 유전적 다양성이 발생하게 된다.

다형성은 질병에 대한 유전적 소양을 이해하는데도 도움이 되는데 질병의 발병원인과 감수성, 치료뿐만 아니라 유전자 진단을 가능하게 하여 질병의 예방에도 크게 기여할 것으로 생각되어 지고 있으며, 현재 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다.

단일염기다형성과 관련하여 가장 기대되는 분야 중 하나는 각 개인의 유전적 조성에 따라 개개인에게 보다 효율적인 치료를 적용하는 맞춤의학이라 할 수 있다. 현재 대부분의 치료와 약물은 평균적인 사람에게 맞추어져 있지만, 우리 인간은 약물 반응을 포함한 여러 가지 면에서 많은 차이를 가지고 있다. 즉, 같은 치료 방법이나 같은 약품에 의해서도 각기 다른 유전적 소양에 따라 그 효능이 다르게 나타내기도 한다는 것이다. 따라서 단일염기다형성에 대한 연구를 통하여 특정 기능을 가지는 유전자의 다형성을 밝히고, 유전자 정보가 밝혀진다면, 다형성의 기능을 응용한 신약개발이 가능하게 될 것이다. 이는 개개인에게 보다 효과적인 처방과 치료가 가능하도록 할 것이며, 이것이 단일염기다형성과 관련한 연구 인간 유전체 사업의 궁극적인 목적이기도 하다.

전신성 홍반성 루푸스는 대표적인 전신적인 자가 면역 질환이며, 현재까지 연구에 의하면 유전자가 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있으나, 구체적으로 어떠한 유전자가 어떠한 기전으로 발병에 관여하는 지에 대한 연구는 매우 드물다고 할 수 있다.

특히 기존의 연구들은 거의 서양인을 대상으로 한 연구인데, 인종에 따라 유전자의 발병에서의 역할에 차이가 있을 수 있고, 한국인 전신성 홍반성 루푸스의 발병에 관여하는 유전자는 서양인과 다를 수 있으므로 한국인을 대상으로 한 유전자 연구가 매우 필요하다고 할 수 있겠다.

만약 한국인에서 IL-6 유전자 다형성에 따른 발현 이상이 한국인 전신성 홍반성 루푸스의 병인기전에 중요한 역할을 할 것이라 가정한다면 IL-6 유전자의 다형성이 루푸스의 큰 위험요소로 작용 할 것으로 추측되며, 이에 본 연구자는 한국인 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위의 다형성 및 3' flanking region 의 VNTR 유전자의 다형성을 연구하였다.

먼저 전사조절 부위와 엑손2 부위에서 직접염기서열분석을 통하여 -572 C>G, -373 A_nT_n, -276 A>C, -174 G>C, 331 T>G, 334 A>T 등 6개의 다형성을 확인하였고, 이 중 -276 A>C, 331 T>G, 334 A>T의 다형성은 보고된 바 없는 다형성 이었다. 흥미로운 사실은 서양인에서 가장 많이 보고되었던 -174 G>C 다형성은 minor allele이 5% 미만으로 한국인에서는 다형성이 아니었고, -572 C>G 다형성은 백인과 다르게 C가 major allele로 나타났다는 것이다.

특히 이번 연구 결과에서 서양인과 달리 한국인 에서는 -174 G>C 다형성이 minor allele이 5% 미만으로 다형성이 아니라는 결과는 다른 한국인 면역글로불린A 신병증 환자(IgA nephropathy)에서의 연구와 만성 B형 간염 환자에서의 연구뿐만 아니라 일본인 여성 고혈압 환자에서의 연구와 중국인 탄광부 진폐증 환자(coal worker's pneumoconiosis)에서의 연구 등을 통해서도 볼 수 있으며, 이번 연구를 비롯하여 다른 여러 연구결과들을 통해서 한국인을 비롯한 동아시아인에서는 -174 G>C에서 minor allele이 거의 드물다는 사실이 증명 되고 있다 (Nakajima 등, 1999; Zhai 등, 2001; Lim 등, 2002; Park 등, 2003).

또한 -373 A_nT_n 다형성은 서양인에서 발견되었던 4가지 유전자형 중 -373 A₈T₁₂은 확인 되지 않았고, 한국인에서는 -373 A₉T₁₁, -373 A₁₀T₁₀, -373 A₁₀T₁₁ 등의 3가지 유전자형이 확인 되었다. -373 A_nT_n 분석결과 루푸스 환자군에서

-373 A₁₀T₁₁ 유전자형이 정상 대조군에 비해 높게 나타났다. 그리고 -373 A₁₀T₁₀ 유전자형을 가지지 않은 경우에(-373 A₉T₁₁ 또는 -373 A₁₀T₁₁) 루푸스의 위험도가 증가하였는데, 이것은 아마도 -373 A₁₀T₁₁이 포함되어 있기 때문이라 생각되며, -373 A₁₀T₁₁이 전신성 홍반성 루푸스와 관련이 높은 것으로 추측되어진다. 이러한 결과들은 인종간의 유전적 차이가 분명히 존재하며, 그에 따른 역할의 차이뿐만 아니라 질병의 위험도와도 관련이 있음을 보여준다.

IL-6 유전자의 전사조절 부위 및 엑손2 부위의 다형성들과 전신성 홍반성 루푸스의 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 -572 C>G 다형성에서는 anti-dsDNA의 빈도가 통계적으로 유의하게 나타났고, -276 A>C 다형성에서는 혈소판 감소증과 통계적으로 유의한 결과를 나타냈으며, 이를 통해 IL-6 유전자의 다형성이 전신성 홍반성 루푸스에서 질병의 표현형과도 관계가 있음을 확인 할 수 있었다.

또한 3' flanking region 의 VNTR 부위의 다형성은 그동안 연구에서 주로 쓰였던 방법인 중합효소연쇄반응대신 genescan 분석을 실시함으로써 중합효소연쇄반응을 이용하여 4가지의 allele을 발견한 연구(Bowcock 등, 1989)와 6가지의 allele을 발견한 연구(Murry 등, 1997), 그리고 genescan을 이용하여 9개의 allele을 발견한 연구(Crilly 등, 2001) 등의 지금까지의 다른 연구 결과에서 보다 가장 다양한 568bp, 599bp, 609bp, 617bp, 629bp, 634bp, 642bp, 648bp, 652bp, 656bp, 682bp, 692bp, 705bp, 748bp, 760bp 등 15개의 alleles을 발견하였고, genescan 분석을 통해 얻은 결과를 직접염기서열분석을 통하여 재확인함으로써 genescan 분석의 정확성 및 유효성을 확인 할 수 있었다.

특히 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 빈도 차이를 살펴본 결과 VNTR I (642 bp)는 루푸스의 감수성을 증가시키나 VNTR N(599 bp)은 루푸스의 감수성을 감소시키는 것으로 추측되며, VNTR 부위의 다형성과 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 VNTR I 유전자형은 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, C-반응 단백질과 통계적으로 유의한 차이를 보였고, VNTR G 유전자형(652 bp)은 림프구 감

소증과 저보체혈증에서 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다.

특히 genescan 분석을 통한 IL-6 유전자의 VNTR 부위의 다형성 연구는 외국에서 몇몇 연구만 보고 된 바 있고, 국내에서 보고 된 바 없기에 앞으로의 genescan 분석에 의한 IL-6 유전자의 VNTR 부위 다형성 연구에 있어 좋은 참고자료가 될 수 있을 것으로 생각 되어진다.

이후 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군간의 빈도와 임상적 특징에서도 유의한 결과를 보였던 IL-6 유전자의 전사조절 부위에 존재하는 -276 A>C의 다형성에서 각각의 유전자형에 따라 IL-6의 발현 양상에 차이가 있는지를 확인하기 위하여 promoter reporter assay를 실시하였고, 이때 IL-6가 주로 간세포에서 합성되는 점을 감안하여 hepatocellular carcinoma 세포주인 Hep3B cell (No.58064, KCLB)에서 transfection을 실시하였다. 그 결과 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 약 4배 정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었다.

또한 전신성 홍반성 루푸스는 전신적인 염증반응을 일으키는 질환이므로 IL-6를 주로 합성시키는 간세포에서 뿐만 아니라 다른 세포주에서도 발현을 할 것이라는 가정 하에 cervix cancer의 세포주인 HeLa cell (No.10002, KCLB)에서도 promoter reporter assay를 실시하여 보았고, 그 결과 -276 A>C의 다형성의 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 약 2배정도 전사조절 부위의 활성이 증가되어 나타난 것을 확인할 수 있었다.

이러한 연구결과는 다른 여러 연구 결과에서처럼 전신성 홍반성 루푸스에서 IL-6 유전자의 다형성 및 그 유전자형에 따라 질병의 활성에도 직접적인 영향을 미치며, IL-6가 염증을 일으키거나 조직 손상을 일으키는 데에도 기여하는 것을 추측할 수 있겠다. 특히 -276 A>C의 다형성에서 전신성 홍반성 루푸스 환자가 정상 대조군 보다 minor allele인 C 유전자 빈도가 높았고, promoter reporter

assay에서도 C 유전자형에서 활성이 높은 점을 미루어 보아 C 유전자형을 가지고 있을 때 전신성 홍반성 루푸스로의 발병 가능성이 높을 것으로 생각되어지며, -276 A>C 부위에 작용하는 전사조절인자(transcription factor)를 찾기 위해 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)를 이용한 결과 NF-E2, AP-1, GCN4, CdxA, cap, Pbx-1등이 확인되었고, 추가적으로 이들 가운데 어떤 전사조절인자가 작용하는지에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

이와 비슷하게 IL-6 유전자에서 전사조절 부위의 발현을 보기위한 다른 연구로 영국인 전신성 소아 관절염에서 -174 G>C 다형성에서 각각의 유전자형에 따라 IL-6의 발현 양상에 차이가 있는지를 확인하기 위하여 HeLa cell에서 promoter reporter assay를 실시한 결과 G 유전자형을 가진 promoter reporter construct가 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct 보다 높게 나타난 결과가 있었다(Fishman 등, 1998).

지금까지의 본 연구 결과를 바탕으로 전신성 홍반성 루푸스의 병태생리에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있으며, 전신성 홍반성 루푸스로 발병할 가능성이 있는 환자를 조기에 발견할 수 있는 검사방법의 개발뿐만 아니라 전신성 홍반성 루푸스의 치료제 개발 및 약물 반응과 관련된 약물 유전체 연구에 귀중한 기초 자료가 되리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구자는 전신성 홍반성 루푸스 환자와 그에 대한 대조군으로 류마티스 질환의 기왕력이 없는 정상인을 대상으로 IL-6 유전자의 전사조절 부위와 엑손2 부위의 탐색을 통해 6개의 다형성을 확인하였고, 이 중 3개의 다형성은 보고된 바 없는 다형성 이었다

탐색한 다형성의 유전자형을 결정하여 백인 그룹과의 minor allele 빈도를 조사해본 결과 모든 다형성에서 빈도 상 차이를 보였고, 이 중 -572 C>G의 다형성은 한국인에서는 백인과 다르게 C 유전자가 major allele로 나타났으며, -373 A_nT_n 다형성은 서양인에서 발견되었던 4가지 유전자형 중 -373 A₈T₁₂은 확인되지 않았고, -373 A₉T₁₁, -373 A₁₀T₁₀, -373 A₁₀T₁₁등의 3가지 유전자형이 확인되었으며, 외국인에서 가장 많이 보고되었던 -174 G>C는 minor allele이 5% 미만으로 다형성이 아님을 확인하였다.

특히 전신성 홍반성 루푸스 환자군과 정상 대조군 간의 빈도 차이를 살펴본 결과 -276 A>C 다형성의 C 유전자형을 가지고 있을 때, -373 A_nT_n 다형성의 -373 A₁₀T₁₁ 유전자형을 가지고 있을 때 전신성 홍반성 루푸스의 감수성을 증가시키는 것으로 추측되어지며, 이들 다형성과 루푸스와 관련한 임상적 특징과의 관계를 살펴본 결과 -572 C>G 다형성은 anti-ds DNA의 빈도가 유의한 상관관계를 보였고, -276 A>C 다형성은 혈소판감소증과 유의한 상관관계를 보였다.

또한 3' flanking region 의 VNTR 부위에서 genescan 분석을 실시함으로써 지금까지의 다른 연구 결과보다 다양한 15개의 alleles을 발견하였고, 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 빈도 차이로 보아 VNTR I유전자형(642 bp)은 루푸스의 감수성을 증가시키나 VNTR N(599 bp)은 루푸스의 감수성을 감소시키는 것으로 추측된다.

이 중 I 유전자형은 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, C-반응 단백질과 통계적으로

유의한 차이를 보였고, G 유전자형은 림프구 감소증과 저보체혈증에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다.

이 중 전신성 홍반성 루푸스 환자와 정상 대조군 간의 빈도와 임상적 특징에서도 유의한 결과를 보였던 IL-6 유전자의 전사조절 부위에 존재하는 -276 A>C 다형성을 대상으로 Hep3B cell과 HeLa cell에서 promoter activity assay를 시행한 결과 minor allele인 C 유전자형을 가진 promoter reporter construct에서 major allele인 A 유전자형을 가진 promoter reporter construct보다 전사조절 부위의 활성이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 IL-6 유전자의 다형성의 종류와 빈도는 인종간의 차이가 분명히 존재하며, 한국인에서 IL-6 유전자의 다형성(-276 A>C, -373 A_nT_n, VNTR)은 전신성 홍반성 루푸스에서 질병의 표현형과 감수성에 연관이 있는 것으로 생각되어진다. 특히 한국인에서 IL-6 유전자의 -276 A>C 다형성은 IL-6 유전자의 발현을 조절하는데 뿐만 아니라 C 유전자형을 가지고 있는 환자에서 전신성 홍반성 루푸스로의 발병 가능성이 높음을 확인하였다.

참고 문헌

1. Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I: Transactivation of C-reactive protein by IL-6 requires synergistic interaction of CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) and Rel p50. *J Immunol* 166: 2378-2384, 2001
2. Bartlett JM, Crilly A, Whie A, Madhok R: Modification of the Genescan 2500 fluorescent dhy standard for accurate product sizing. *Mol Biotechnol* 15: 185-189, 1999
3. Bowcock AM, Ray A, Erlich H, Sehgal PB: Rapid detection and sequencing of alleles in 3' flanking region of the interleukin-6 gene. *Nucleic Acids Res* 17: 6855-6864, 1989
4. Chun HY, Chung JW, Kim HA, Yun JM, Jeon JY, Ye YM, Kim SH, Park HS, Suh CH: Cytokine IL-6 and IL-10 as Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Immunol* 27: 461-466, 2007
5. Crilly A, Bartlett JM, Whie A, Stirling D, Capell H, Madhok R: Investigation of novel polymorphisms within the 3' region of the IL-6 gene in patients with rheumatoid arthritis using Genescan analysis. *Cytokine* 13: 109-112, 2001
6. Cross JT and Benton HP: The roles of interleukin-6 and interleukin-10 in

- B cell hyperactivity in systemic lupus erythematosus. *Inflamm res* 48: 255-261, 1999
7. Ferrari SL, Garnero P, Emond S, Montgomery H, Humphries SE, Greenspan SL: A functional polymorphic variant in the Interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women. *Arthritis Rheum* 44: 196-201, 2001
 8. Ferrari SL, Ahn-loung L, Garnero P, Humphries SE, Greenspan SL: Two polymorphisms regulating Interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of c-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol metab* 88: 255-259, 2003
 9. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect polymorphisms in the Interleukin-6(IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376, 1998
 10. Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L, Lundberg JR: Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 18: 565-570, 2000
 11. Koss K, Satsangi J, W디노 KI, Jewell DP: Is interleukin-6 important in inflammatory bowel disease? *Genes Immun* 1: 207-212, 2000
 12. Kotzin BL: Systemic lupus erythematosus. *Cell* 85: 303-306, 1996

13. Lim CS, Zheng S, Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, Lee JS, Chae DW: The -174 G to C polymorphism of interleukin-6 gene is very rare in Koreans. *Cytokine* 19: 52-54, 2002
14. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR: Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 147: 117-123, 1991
15. Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, Paul-Labrador M, Fischel-Ghodsian N, Fraser PA and Klinenberg JR: Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1: 45-52, 1999
16. Lipsky PE: Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2: 764-766, 2001
17. Marshall E: Lupus: Mysterious disease holds its secrets tight. *Science* 206: 689-691, 2002
18. Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56: 481-490, 2003
19. Murry RE, Mcguigan F, Grant SFA, Reid DM, Ralston SH: Polymorphisms of the Interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 21: 89-92, 1997

20. Nakajima T, Ota N, Yoshida H, Watannabe S, Suzuki T, Emi M: Allelic variants in the interleukin-6 gene and essential hypertension in Japanese women. *Genes Immun* 1:115-119, 1999
21. Nath SK, Kilpatrick J, Harley JB: Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Curr Opin Immunol* 6: 794-800, 2004
22. Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur AM, Glass DN, Woo P: The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children. *Arthritis Rheum* 48: 3202-3206, 2003
23. Papassotiropoulos A, Hock C, Nitsch RM: Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22: 863-871, 2001
24. Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD: Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol med* 35: 76-82, 2003
25. Prokunina L, Alarcon-Riquelme M: The genetic basis of systemic lupus erythematosus--knowledge of today and thoughts for tomorrow. *Hum Mol Genet* 1: 143-148, 2004
26. Robson MG, Walport MJ: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Allergy* 31: 678-685, 2001

27. Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, Domschke W and Gaubitz: Interleukin-6 promoter polymorphism (-174G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol* 40: 393-400, 2001
28. Shibata N, Ohnuma T, Takahashi T, Baba H, Ishizuka T, Ohtsuka M, Ueki A, Nagao M, Arai H: Effect of IL-6 polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Am J Med Genet* 114: 436-439, 2002
29. Suh CH, Chun HY, Ye YM, Park HS: Unresponsiveness of C-reactive protein in the non-infectious inflammation of systemic lupus erythematosus is associated with interleukin 6. *Clin Immunol* 119: 291-296, 2006
30. Suh CH, Jeong YS, Park HC, Lee CH, Lee J, Song CH, Lee WK, Park YB, Song J, Lee SKL: Risk factors for infection and role of C-reactive protein in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 19: 191-194, 2001
31. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG: Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13: 339-343, 2004
32. Terry CF, Loukaci V and Green FR: Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 275: 18138-18144, 2000
33. Tsao BP: Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr*

Opin Rheumatol 16: 513-521, 2004

34. Vasku JA, Vasku A, Goldbergova M, Vasku V: Heterozygote AG variant of -596 A/G IL-6 gene polymorphism is a marker for cutaneous T-cell lymphoma(CTCL). *Clin Immunol* 113: 256-260, 2004
35. Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B: Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 53:1029-1034, 2002
36. Zhai R, Liu G, Yang C, Huang C, Wu C, Christini DC: The G to C polymorphism at -174 of the interleukin-6 gene is rare a Southern Chinese population. *Pharmacogenetics* 11:699-701, 2001

Genetic Polymorphisms of Interleukin-6 in Systemic Lupus Erythematosus.

Ja-Young Jeon

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Chang-Hee Suh)

Backgrounds : Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by polyclonal B-cell activation and elevated production of pathogenic autoantibodies. Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that mediates inflammatory and immune responses, and IL-6 gene polymorphisms are known to play a part in chronic inflammatory and autoimmune disorders. We have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-6 gene, determined their frequency in Korean populations, and elucidated their difference between SLE patients and controls.

Materials and methods : Blood samples were collected from Korean SLE patients (n=151) and normal healthy controls (n=151) from the rheumatology clinic at the Ajou University Hospital. All of patients fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE. Genomic DNA

was extracted and approximately 1.4 kb-sized IL-6 genes located between promoter region and exon2 region were amplified by polymerase chain reaction (PCR). We identified possible polymorphisms in the IL-6 gene and that were genotyped by direct sequencing. Also IL-6 genes located variable number of tandem repeat (VNTR) of 3' flanking region were amplified by PCR and that were genotyped by Genescan analysis. The effect of -276 A>C polymorphism on the promoter activity was analyzed by luciferase reporter assay in Hep3B cell and HeLa cell. Statistical analyses were undertaken using SPSS ver.11.5 P values of <0.05 were considered to be significant.

Results : We have identified six SNPs (-572 C>G, -373 A_nT_n, -276 A>C, -174 A>C in the promoter region, and 331 T>G and 334 A>T in the exon2 region) including three novel SNPs (-276 A>C, 331 T>G and 334 A>T), in the IL-6 gene. There was significant difference in the -373 A₁₀T₁₁ polymorphism ($p<0.001$) -276 A>C polymorphism ($p=0.041$), 334 A>T polymorphism ($p=0.001$) between SLE and normal controls, and no association in other SNPs. Another interesting finding was that there was no C allele of -174 G>C polymorphisms in Koreans. Also genotype of -373 A_nT_n and major allele of -572 C>G was differentiated from other ethnic groups. The -572 C>G polymorphism was statistically significantly associated with anti-ds DNA ($p=0.007$). The -276 A>C polymorphism was statistically significantly associated with thrombocytopenia ($p=0.006$). We have identified fifteen size VNTR polymorphisms in the 3' flanking region. VNTR I (642 bp) allele was associated with susceptibility of SLE, however VNTR N (652 bp) decreased susceptibility of SLE. Also, VNTR I allele was statistically significantly associated with leukopenia ($p=0.048$), thrombocytopenia ($p=0.020$)

and C-reactive protein ($p=0.019$), and VNTR G allele was statistically significantly associated with lymphopenia ($p<0.001$) and hypocomplementemia ($p=0.040$). When the carrying of the -174 C, -373 A₁₀T₁₁ and VNTR I (642 bp) alleles were supposed that these alleles were significantly higher disease susceptibility of SLE. Promoter reporter construct carrying the -276 C allele displayed significantly higher promoter activity than that with the -276 A allele ($p<0.001$)

Conclusions : These data suggest that genetic polymorphisms within IL-6 gene may be associated with disease susceptibility and phenotype of SLE in Koreans. Specially -276 A>C polymorphism within IL-6 promoter region may involve in regulation of IL-6 expression.

Key words : Systemic lupus erythematosus, interleukin-6, single nucleotide polymorphism, variable number of tandem repeat