

결핵성 흉막염 환자에서 *NRAMP1* 유전자 다형성에 대한 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실

김제형, 김병규, 정기환, 이상엽, 박상면, 이신형,
신철, 조재연, 심재정, 인광호, 유세화, 강경호

= Abstract =

Correlation Between Primary Tuberculous Pleurisy and *NRAMP1* Genetic Polymorphism

Je Hyeong Kim, M.D., Byung Gyu Kim, M.D., Ki Hwan Jung, M.D.,
Sang Myun Park, M.D., Sang Youb Lee, M.D., Sin Hyung Lee, M.D.,
Cheol Sin, M.D., Jae Youn Cho, M.D., Jae Jeong Shim, M.D.,
Kwang Ho In, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

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

Background : The phagolysosomal function of alveolar macrophage against *M. tuberculosis* infection is influenced by *Nramp1*, which is encoded by the *NRAMP1* gene. There are several genetic polymorphisms in *NRAMP1*, and these polymorphisms affect the innate host resistance through the defect in production and function of *Nramp1*. To investigate this relationship, the *NRAMP1* genetic polymorphism in patients with primary tuberculous pleurisy was determined.

Methods : Fifty-six primary tuberculous pleurisy patient, who were diagnosed by pleural biopsy, were designated to the pleurisy group and 45 healthy adults were designated to the healthy control group. Three genetic polymorphisms of *NRAMP1*, such as a single point mutation in intron 4(469+14G/C, INT4), a nonconservative single-base substitution at codon 543 that changes aspartic acid to asparagine(D543N) and a TGTG deletion in the 3' untranslated region(1729+55del4, 3'UTR), were determined. Polymerase chain reac-

Address for correspondence :

Kyung-Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Korea University Guro Hospital.

80, Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, Korea

Phone : 02-818-6638 Fax : 02-865-9670 E-mail : kkhchest@kumc.or.kr

tion(PCR) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) were used. Results : The frequencies of mutant genotypes of INT4 and 3'UTR were significantly high in pleurisy group($p=0.001$, $p=0.023$). But the frequencies of D543N were not significantly different between the two groups($p=0.079$). The odds ratios, which are a comparison with wild genotype for determining mutant genotypes, were 8.022(95% confidence interval=2.422~26.572) for INT4 and 5.733(95% confidence interval=1.137~28.916) for 3'UTR ; these were statistically significant. But the ratio for D543N was not significant. In the combined analysis of the INT4 and 3'UTR polymorphisms, the odds ratios were 6.000(95% confidence interval=1.461~24.640) for GC/++ genotype and 14.000(95% confidence interval=1.610~121.754) for GC/+del when compared with GG/++ homozygotes ; these were statistically significant.

Conclusion : Among the NRAMP1 genetic polymorphisms, a single point mutation in intron 4(469+14G/C, INT4) and a TGTG deletion in the 3' untranslated region(1729+55del4, 3'UTR) were closely related to the primary tuberculous pleurisy. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 155-165)

Key words : tuberculosis, tuberculous pleurisy, Nrampl, NRAMP1 genetic polymorphism.

서 론

Mycobacterium tuberculosis(*M. tuberculosis*)로 인한 결핵은 세계적으로 가장 흔한 감염 질환 중의 하나로, 대략 전 세계 인구의 1/3 정도가 이환되어 있으며, 매년 약 800만 명 내지 1200만 명 정도의 활동성 결핵 환자가 발생하고, 이 중 300만 명 정도가 사망한다¹. 우리나라의 경우, 1995년 실시된 제7차 전국 결핵 실태조사에 의하면 지난 30년 간 꾸준한 감소 추세에 있기는 하지만, 인구 100,000명 당 활동성 결핵 환자가 1,032명으로 높게 보고된 바 있다².

결핵균에 감염되었더라도 전혀 임상증상이 없는 경우가 대부분이며, 약 10%에서만 임상 증상을 동반한 현증 감염이 발생하므로, 결핵균 자체의 독력 이외에, 결핵균에 대한 숙주 반응이 임상 증상의 발현에 주요한 역할을 할 것이라는 임상적인 추론과 그 증거들이 보고된 바 있다³. 이러한 숙주 반응은 결핵에 대한 선천적 내성과 BCG(bacille Calmette-Guérin) 접종과 같은 획득 면역으로 결정되며, 이 중 선천적 내성은 결핵균에 대한 감수성을 결정하는 유전적 요인으로, 이에 기여하는 유전자 및 단백질 등의 발현에 대

한 연구는 결핵균에 대한 인체 방어기전을 이해하고, 결핵을 예방하고 치료하는 데 있어서 유용한 정보를 제공할 것으로 인식되고 있다. 실제로 백서를 이용한 동물 실험에서 *M. tuberculosis*를 포함하는 몇몇 세포 내 병원체에 대한 감수성 및 내성은 1번 염색체에 존재하는 *Bcg* 유전자에 의해 조절되는 것으로 밝혀졌다⁴⁻⁶. 이 유전자에는 각각 감수성과 내성을 결정짓는 *Bcg**와 *Bcg'*의 두 가지 표현형이 존재하고 감염 초기에 숙주내 균 성장을 통제하는 것으로 보고된 바 있으며⁷, *M. tuberculosis* 뿐 아니라 *M. avium complex*⁸, *M. lepraemurium*⁹, *Leishmania donovani*¹⁰, *Salmonella typhimurium*¹¹ 등과 같은 세포 내 병원체에 대한 초기 감염에도 관여한다고 알려져 있다. 이후 Vidal 등¹²은 *Bcg*에 대한 후보 유전자를 유전자 클로닝(cloning) 방법을 이용하여 분리하고, *Nrampl* (Natural resistance associated macrophage protein 1)으로 명명하였으며, 이 유전자로부터 합성되는 *Nrampl* 단백질의 기능에 이상이 있는 경우 *mycobacteria*와 같은 세포내 병원균에 대한 감수성이 증가하는 것으로 보고하였다³. 한편 Cellier 등¹³은 인간의 염색체 2q35에서 16개의 엑손(axon)으로 구성된, 백서 *Nrampl* 유전자와 상동

체인, *NRAMP1* 유전자를 밝혀 냈으며, 그간의 여러 연구들에 의하면, 이 유전자에는 약 8가지의 유전자 다형성(genetic polymorphism)이 존재하는 것으로 알려졌으며, 그 중 인트론 4번 부위의 G/C 점돌연변이(469+14G/C), 543번 코돈의 Asp → Asn 으로의 변이 및 3' 비해독 영역(untranslated region)의 TGTG 결손(1729+55del4) 등이 존재하고 이러한 다형성은, 이 유전자에 의해 합성되는 *Nramp1* 단백질의 합성 또는 기능에 이상을 초래하여 결핵균에 대한 감수성을 증가시킨다고 알려져 있으며¹⁴, 실제로 서아프리카 지역의 폐결핵 환자에서 이와 같은 관련성이 보고된 바 있다¹⁵.

본 연구에서는 일차 감염으로 추정되는 결핵성 흉막염 환자 및 결핵균에 노출되었을 것으로 판단되나 결핵이 발병하지 않은 건강한 성인들을 대상으로, *NRAMP1* 유전자 다형성의 빈도를 조사함으로써, *NRAMP1* 유전자 다형성이 결핵균의 일차 감염과 이에 따른 현증 감염의 발생 빈도에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1998년 3월부터 1999년 8월까지 고려대학교 구로병원 내과에 내원하여 흉막 조직검사를 통해 확진된 결핵성 흉막염 환자 중 결핵의 과거력이 없고 흉부 방사선 사진 상 흉수 이외의 다른 병변이 없는 환자들을 대상으로 하였다. 이 환자들 중 당뇨병, 만성 간질환, 알코올 중독, 위절제술, 영양 불량, 임신, 악성 종양, 면역억제제 투여의 기왕력, 규폐증, 장기 이식, 후천성면역저하 증후군 등 숙주의 후천적 면역력의 변화 또는 결핵 발병에 영향을 줄 수 있는 질환이 있는 경우를 제외한 56명을 결핵성 흉막염군(pleurisy group)으로 정의하였다. 그리고 결핵 환자의 가족 및 의료인으로서 적어도 3개월 이전에 결핵 환자와 밀접하게 접촉한 과거력이 있으나 결핵 감염의 기왕력이

없고 흉부 방사선 사진상 정상인 45명을 건강 대조군(healthy control group)으로 하였다.

2. Genomic DNA의 추출

대상 환자의 상완 정맥에서 전혈 6ml를 헤파린(heparin)을 함유한 시험관에 채혈하여 실온에서 4000 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층의 연막(buffy coat) 200 μ l를 취하여 1.5ml 튜브에 넣은 후, High Pure PCR Template Preparation Kit® (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

3. *NRAMP1* 유전자 다형성의 확인

NRAMP1 유전자 다형성의 결정은, 추출된 DNA에 대해서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 그 후 중합효소 연쇄반응-제한효소 절단 길이 다형성(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)을 이용하여 결정하였다. 각각의 다형성을 인트론 4의 G/C 점돌연변이(469+14G/C)는 INT4로, 543번 코돈의 G(Asp)에서 A(Asn)로의 변이는 D543N으로, 3' 비해독 영역(untranslated region)의 TGTG 결손(1729+55del4)은 3'UTR로 명명하였다¹⁵.

(1) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

각각의 유전자 부위를 증폭하는데 사용한 시발체(primer)는 INT4는 5'-CTC TGG CTG AAG GCT CTC C-3'와 5'-TGT GCT ATC AGT TGA GCC TC-3', D543N 및 3'UTR은 5'-GCA TCT CCC CAA TTC ATG GT-3'와 5'-AAC TGT CCC ACT CTA TCC TG-3'이었다(Bioneer, Korea). 중합효소 연쇄반응에 사용된 용액의 조성은 총 20 μ l의 용액 내에 DNA 2 μ l, primer 10pM,

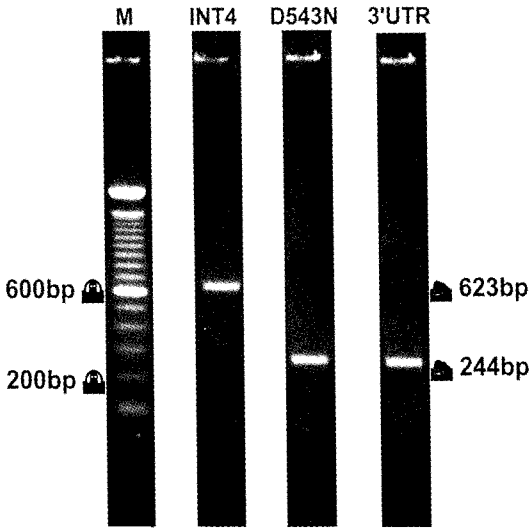


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products.

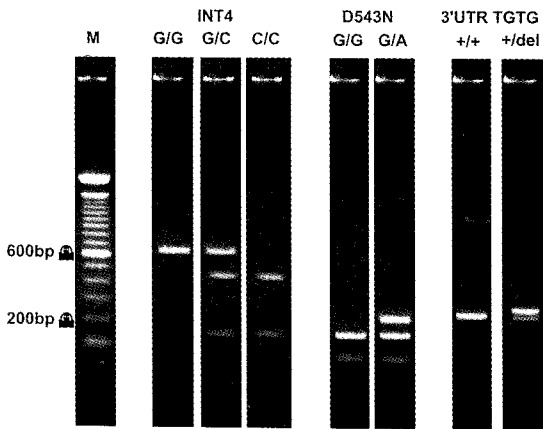


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-RFLP products.

Taq DNA polymerase 1U, dNTP 250 μ M, Tris-HCl(pH 9.0) 10mM, KCl 40mM, MgCl₂ 1.5mM을 사용하였다(AccuPower™ PCR Premix, Bioneer, Korea). PCR은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus, USA)을 이용하여, INT4의 경우는 94℃에서 5분 간 반응시킨 후 변성반응은 94℃에서 1분, 결합반응은 56℃에서 1분, 연장반응은 72℃에서 1분씩 반복적으로 35 회전을 시행한 후

72℃에서 7분 반응시키고 4℃에서 보관하였다. D543N 및 3'UTR은 결합반응만 55℃에서 1분으로 하고 기타 조건은 INT4의 경우와 동일하였다.

PCR 과정이 끝난 후, 반응물은 2% 한천 겔 (agarose gel) 내에서 전기영동(electrophoresis)을 시행하여 ethidium bromide 염색 후, INT4에 대해서는 623 염기쌍 (base pair, bp)의 DNA 분절을, D543N 및 3'UTR에 대해서는 244 bp의 분절을 자외선 조사기(ULTRA · LUM-U. V. DNA Analysis Transilluminator SL-20, Seolin Scientific Corp., Korea) 상에서 확인하였다(Fig. 1).

(2) 중합효소 연쇄반응-제한효소 절단 길이 다형성 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

각 유전자 다형성의 위치에서 야생형(wild type)과 변이형(mutant type)의 염기서열을 인지하기 위하여 PCR-RFLP 법을 이용하였다. 각각의 다형성 여부 확인을 위한 제한 효소로는 INT4의 경우 *Apa* I (GGGCC▼C)을 사용하여 G → C 변이형의 경우 455bp와 169bp의 2 band를 확인하였고, D543N의 경우는 *Ava* II (G▼GWCC)를 사용하여 대립 형질 G(Asp)는 126bp, 79bp 및 39bp의 3 band에서, A(Asn)는 201bp와 39bp의 2 band를 확인하였다. 그리고 3'UTR에 대해서는 *Fok* I{GGATG(9/13)}을 사용하여 대립 형질 TGTG+에 대해서는 211bp와 33bp, del에 대해서는 240bp의 분절을 확인하였다(Fig. 2).

각각의 PCR-RFLP 반응에 사용된 용액의 조성은 *Apa* I의 경우는 *Apa* I 2 μ l, buffer{100mM Tris-HCl(pH 7.5), 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol} 2 μ l, substrate DNA 4 μ l, sterilized distilled water 12 μ l 였고, *Ava* II의 경우는 *Ava* II 1 μ l, buffer{100mM Tris-HCl(pH 7.5), 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 500mM NaCl} 2 μ l, substrate DNA 8 μ l, sterilized distilled water 9 μ l, *Fok* I의 경우는 *Fok* I 1 μ l, buffer{100mM

Tris-HCl(pH 7.5), 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 500mM NaCl} 2 μl, substrate DNA 4 μl, sterilized distilled water 13 μl 의 조건으로, 37°C에서 8시간 이상 반응시킨 후, stop-mix로 반응을 종료시키고 2% 한천 겔에서 전기 영동하여 분절의 크기를 확인하였다.

3. 통계처리

INT4, D543N 및 3'UTR의 3가지 다형성에서 결핵성 흉막염군, 건강 대조군 각각에 대하여 야생형과 변이형의 빈도의 차이는 카이제곱 검정(chi-square test)을 통해 분석하였고, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 또한 결핵성

흉막염 환자가 변이형 유전자형일 확률을 건강 대조군과의 교차비(odds ratio)를 구하여 고찰하였고, 각각의 유전자 다형성간의 결합 분석(combined analysis)을 시행하여 역시 교차비를 구하였다. 모든 통계적 계산은 SPSS for Windows 9.0으로 하였다.

결 과

대상 환자의 평균 연령은 결핵성 흉막염군, 건강 대조군 각각 39 ± 2.73세, 30.4 ± 1.45세 였고, 남녀의 비는 각각 38 : 18 및 27 : 19 이었으며, 건강 대조군 45명중 결핵 환자의 가족은 26명, 의료인은 19명이었다.

결핵성 흉막염군과 건강 대조군에서의 *NRAMP1*

Table 1. Comparison of *NRAMP1* polymorphisms between tuberculous pleurisy group and healthy normal control group

Polymorphism	Pleurisy	Healthy control	p-value	Odds ratio* (95% CI**)
	no. of subjects			
INT4	n= 41 (%)	n= 45 (%)		
G/G	23(56.1%)	41(91.1%)	0.001	8.022 (2.422-26.572)
G/C	16(39.0%)	4(8.9%)		
C/C	2(4.9%)	0(0%)		
D543N	n= 37 (%)	n= 45 (%)		
G/G	31(83.8%)	43(95.6%)	0.079	4.161 (0.787-22.008)
G/A	6(16.2%)	2(4.4%)		
A/A	0(0%)	0(0%)		
3'UTR	n= 38 (%)	n= 45 (%)		
TGTG+/+	30(78.9%)	43(95.6%)	0.023	5.733 (1.137-28.916)
TGTG+/del	8(21.1%)	2(4.4%)		
del/del	0(0%)	0(0%)		

* The odds ratios are represent comparison with wild genotype for mutant genotypes.

** Confidence interval.

Table 2. Combined analysis of *NRAMP1* INT4 and 3'UTR variants

INT4/3'UTR Genotype	Pleurisy no. of subjects	Healthy control no. of subjects	Odds ratio* (95% CI**)	p=value
GG/++	20	40	1.0	
GC/++	9	3	6.000 (1.461-24.640)	0.009
GC/+del	7	1	14.000 (1.610-121.754)	0.005

* Odds ratios are for comparisons with the GG/++ genotype.

** Confidence interval.

유전자 다형성의 빈도는 *NRAMP1* 유전자의 INT4 다형성의 경우 흉막염군에서 G/G : G/C : C/C = 56.1% : 39.0% : 4.9%, 건강 대조군에서는 91.1% : 8.9% : 0% 으로 결핵성 흉막염군에서 변이형의 빈도가 유의하게 높았으며(p=0.001), 3'UTR의 경우 흉막염군에서 TGTG+/+ : TGTG+/del : del/del = 78.9% : 21.1% : 0%, 건강 대조군에서는 95.6% : 4.4% : 0%로 역시 유의하게 변이형의 빈도가 높았다(p=0.023). 그러나 D543N의 경우는 흉막염군에서 G/G : G/A : A/A = 83.8% : 16.2% : 0%, 건강 대조군에서 95.6% : 4.4% : 0%로 양군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.079) (Table 1).

또한 야생형 유전자형과 이형 및 동형 접합체 변이형 유전자형을 비교한 교차비 (odds ratio)는, INT4의 경우 8.022(95% 신뢰구간=2.422~26.572), 3'UTR의 경우는 5.733(95% 신뢰구간=1.137~28.916)으로 결핵성 흉막염 환자가 변이형의 유전자형일 확률이 건강 대조군에 비해 각각 8.022배, 5.733배 높았으며 이러한 관련성은 통계적으로 유의하였다. 그러나 D543N의 경우는 교차비가 4.161(95% 신뢰구간=0.787~22.008)이었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 1).

INT4와 3'UTR 유전자 다형성을 결합하여 분석 (combined analysis)한 결과, GG/++ 유전자형과 비교하였을 때, GC/++의 경우 교차비가 6.000

(95% 신뢰구간=1.461~24.640), GC/+del의 경우는 14.000(95% 신뢰구간=1.610~121.754)으로 결핵성 흉막염 환자가 INT4 C 대립 형질을 포함할 확률과 INT4 C 대립 형질과 3'UTR del 대립 형질을 모두 포함할 확률이 각각 6배, 14배 높았으며 이러한 관련성은 통계적으로 유의하였다(Table 2).

고 안

결핵성 흉막염은 흉막강 내의 결핵균 단백질에 대한 지연형 과민반응으로¹⁷, 일차 감염 후 6내지 12주 정도에 흉막 주위에 존재하는 폐실질 병변의 파열로 인하여 흉막강 내부로 결핵균이 침입함으로써 발생하는 경우가 가장 흔하다¹⁸. 최근 인구가 고령화되면서 나이가 많은 환자들에서 재활성 결핵과 동반되어 발생하는 경우도 보고된 바 있지만^{19,20}, Arriero 등²¹과 Valdés 등²²은 나이가 젊고, 알코올 중독의 병력이나 체중 감소가 없으면서, 객담 결핵균 도말 및 배양검사 음성이고, 흉부 방사선 사진 상 폐실질에 음영 증가가 없으며, 투베르쿨린 피부반응검사 음성인 경우 일차 결핵에 의한 흉막염의 가능성이 높다고 보고하여, 본 연구의 대상 환자들도 대부분 일차 결핵에 의한 흉막염의 가능성이 높을 것으로 사료된다.

M. tuberculosis 감염에 대한 초기 방어는 폐포에 존재하는 대식 세포 (alveolar macrophage)들에 의하여 이루어진다. 일단 결핵균이 호흡기를 통해서 감

염되면, 대식 세포의 표면에 존재하는 보체(complement), 만노스(mannose), 표면 활성 단백(surfactant protein), scavenger 수용체(receptor)들을 통해서 대식세포와 결핵균이 결합하고, phagosome-lysosome 결합체를 형성한 후 활성 산소종(reactive oxygen species) 및 활성 질소종(reactive nitrogen species)의 생성과 아포프토시스(apoptosis) 등의 기전으로 결핵균의 활동을 방해하거나 사멸시킨다고 알려져 있다³. 이상과 같은 대식 세포의 기능에 이상이 발생하면, 결핵균에 대한 선천적 감수성이 증가되는데, 그간의 연구들에 의하면 결핵균에 대하여 선천적으로 감수성 및 내성을 갖는 백서로부터 얻은 대식 세포에서 선천적인 아포프토시스²³ 또는 항원 표현 능력(antigen presenting ability)²⁴의 차이가 보고된 바 있다.

최근 특히 주목받고 있는 결핵균에 대한 숙주의 방어 기전에 관한 연구는, 탐식 작용(phagocytosis) 후 phagosome-lysosome이 성숙될 때 주요한 역할을 하는 *Nramp1* 단백질로, 그 합성과 기능에 영향을 미치는 유전자 단계에서의 이상에 관심이 집중되고 있다²⁵.

Nramp1 단백질은 약 60kD 정도의 분자량을 가진 소수성 단백질로, *NRAMP1* 유전자로부터 만들어지며, 12개의 경막 영역(transmembrane domain)과 당화 세포의 고리(glycosylated extracellular loop)가 존재한다¹². 동물을 이용한 in vitro 및 in vivo 연구에 의하면, 대식 세포의 초기 활성화 과정에서 중요하고 다양한 영향을 나타내어, CXC chemokine KC 및 interleukin-1 β (IL-1 β), inducible nitric oxide synthase(iNOS), MHC class II molecules, tumor necrosis factor α (TNF α), nitric oxide(NO) release, L-arginine flux, oxidative burst 그리고 항암, 항균 작용을 조절하고²⁶, 또한 대식 세포의 막 운반 과정(membrane transport processes)에 있어서 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 작용 중 특히 주요한 기능 중의 하나는 감염 초기에 대식 세포 세포질 내의 아질산염(nitrite)을 보다 산성인

phagolysosome으로 이동시켜 산화 질소(nitric oxide)를 생성하는 것으로, 이 기능에 이상이 발생하면 mycobacteria와 같은 세포내 병원균에 대한 감수성이 증가하게 된다. 또 다른 중요한 기능은 막 운반 과정에 관계된 것으로, 일단 phagolysosome이 생성되면 phagolysosome 내의 미생물은 여러 가지 대사 효소를 분비하는 데, 이 과정에서 2가 양이온(divalent cations)은 이 효소들의 보조 인자(cofactor)로서 필수적이다. 구체적으로 미생물에서 발생된 superoxide dismutase(SOD)는 활성 산소종 및 질소종을 중화하여 대식구내의 균을 보호하는 효소로, 이 효소가 작용하기 위해서는 Mn²⁺와 같은 2가 양이온이 필수적인 보조 인자로서 작용한다²⁷. 그러나 *Nramp1* 단백질은 phagolysosome 내부로부터 Mn²⁺와 같은 2가 양이온을 제거하여 결핵균이 활성 산소종 및 질소종에 계속 노출되게 함으로써 결핵균 사멸에 중요한 역할을 하고 또한 초기 중성적인 phagolysosome에 직접 또는 간접적으로 영향을 미쳐 phagolysosome을 고도의 살균성을 갖도록 성숙시킨다^{28, 29}.

Nramp1 단백을 합성하는 인간의 *NRAMP1* 유전자의 다형성은 현재까지 8가지 정도가 보고되고 있다¹⁴. 그 간의 결핵균의 감염과 이에 따른 결핵의 발병과 유전자 다형성의 상관 관계에 대한 임상 연구들을 살펴보면, 1997년 Shaw 등³⁰과 1998년 Blackwell 등³¹은 브라질의 가족 집단을 대상으로 행한 대규모의 유전학적 역학 연구에서, *NRAMP1* 유전자가 결핵의 발병에 영향을 주는 주된 후보 유전자는 아닌 것으로 보고하였고, 1998년 Huang 등³²도 역시 결핵균과 유사한 *Mycobacterium avium-intracellulare*에 의한 폐 질환에서 *NRAMP1* 유전자 다형성과 이 균에 의한 감염증의 발생에 연관성이 없다고 주장하였다. 그러나 서아프리카 지역의 폐결핵 환자를 대상으로 시행한 최근의 연구에서는, 촉진자(promotor) 부위의 (CA)_n microsatellite 반복의 수 변화{5'(CA)_n}, 4번 인트론의 G/C 치환(469+14G/C, INT4), 543번 코돈의 aspartic acid에서 asparagine으로의 변이(D543N), 3' 비해독지역

(untranslated region)의 TGTG 결손(1729+55del4, 3'UTR) 등의 다형성들이 건강 대조군에 비하여 결핵 환자군에서 의미 있게 높은 빈도로 나타남을 관찰함으로써, 이들 유전자 다형성과 결핵에 대한 선천적 감수성과의 밀접한 상관 관계를 보고한 바 있어¹⁵, 아직까지 *NRAMP1* 유전자 다형성과 결핵 발병간의 임상적인 상호 관계는 명확치 않다. 이 같은 상황에서 결핵의 호발 지역인 우리나라에서, *NRAMP1* 유전자 다형성과 결핵의 발병간의 관계를 고찰하는 것은 결핵의 발병에 대한 선천적 방어 기전을 연구하는 데 있어서 의미가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 INT4와 3'UTR 부위의 다형성은 건강인에 비하여 결핵성 흉막염 환자에서 유의하게 높았으며 동형 접합체 변이형이 관찰된 INT4 부위는 동형 및 이형 접합체 변이형을 합하여 변이형 군으로 하여 비교하였을 때도 동일한 결과를 얻었다($p < 0.01$). D543N 다형성은 통계적 유의성은 없었지만 결핵성 흉막염 환자에서 변이형이 더 많은 경향을 나타내었다. 야생형 유전자형과 이형 및 동형 접합체 변이형 유전자형을 비교한 교차비(odds ratio)는 INT4와 3'UTR의 경우는, 결핵성 흉막염 환자가 변이형의 유전자형일 확률이 건강 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났으나, D543N의 경우는 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 INT4와 3'UTR 유전자 다형성의 결합 분석 결과에 의하면, 결핵성 흉막염 환자가 이 두 가지 유전자 다형성의 변이형 유전자형을 포함할 확률이 통계적으로 유의하게 높았다. 결론적으로 이 연구에서 INT4와 3'UTR 부위의 *NRAMP1* 유전자에 다형성이 있는 경우, 폐포에 침입한 결핵균을 대식 세포가 효율적으로 박멸하지 못함으로써, 폐실질 내에 결핵 병변이 생성되고, 이 병변이 파열되어 늑막강 내로 결핵균이 침범하여 결핵 단백질에 대한 지연형 과민 반응이 일어나 결국 흉막염이 초래되는 것으로 사료되며, D543N 다형성의 경우는 그 빈도와 질환과의 관련성은 통계학적으로는 유의하지 않았다. 또한 본 연구에서 D543N 과 3'UTR 부위는 동형 접합체 변이형이 한 명도 관찰되지 않았고 INT4 부위에서도

결핵성 흉막염 환자군에서 2명으로 소수만이 관찰되어 동형 접합체 변이형이 결핵 발병에 미친 영향력에 관해서는 잘 설명 할 수 없다. 그러나 백서의 경우 결핵균 내성 대립 형질인 *Nrampl*^{D69}가 우성이라고 알려져 있지만³³, Bellamy 등¹⁵은 인간에서는 결핵 감수성 대립 형질(susceptible allele)이 우성으로, 이형 접합체 변이형에서도 감수성의 표현형으로 발현된다고 보고하여, 본 연구의 이형 접합체 변이형의 빈도를 결핵 발병의 감수성과 연관짓는 것에 큰 무리는 없을 것으로 사료된다.

이 연구는 국가 결핵 관리 사업에 힘입어 급격히 감소하고 있기는 하지만, 아직까지도 결핵의 호발 국가인 우리나라에서 행해진, 결핵의 선천적 내성에 *NRAMP1* 유전자 다형성이 미치는 영향에 대한 첫 번째 연구이다. 그러나 본 연구의 제약점으로는 대상 환자 및 대조군의 숫자가 적어 *NRAMP1* 유전자의 다형성과 질병과의 상호 관련성을 충분히 고찰하기에는 미진하였다. 그리고 대조군의 선정에 있어서 결핵균에 노출되었을 것으로 추정되거나 건강한 사람들을 대상으로 하여, 이 유전자 다형성과 결핵에 대한 내성과의 관계를 고찰할 수는 있었으나, 우리나라 정상 인구에서 *NRAMP1* 유전자 다형성의 빈도를 조사하고, 이를 이미 보고된 서양인과 아시아인에서의 빈도와 비교, 분석하여 그 의미를 밝히지는 못하였다. 또한 현재까지 보고된 8가지 정도의 다형성 중, 특히 중요하다고 알려진 전사 시작 부위(transcription start site)보다 5' 지역에 위치하는 촉진자 부위의 GT microsatellite 다형성²⁶ 등을 제외한 3가지 다형성만을 고찰하여, 전반적인 *NRAMP1* 유전자 다형성의 영향을 고찰하지 못했다.

이에 향후 결핵에 대한 선천적 방어 기전과 *NRAMP1* 유전자 다형성의 관계에 대한 연구는, 일차적으로 우리나라 정상 인구에서 *NRAMP1* 유전자 다형성의 빈도 및 분포에 대한 연구를 기반으로, 더 많은 수의 결핵 질환자를 대상으로 하여 전체적인 유전자 다형성과 결핵 발병과의 관계를 규명하기 위한 연구 및 더 나아가 대규모 가족 집단을 포함한 유전학

적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

Nramp1 단백질은 *NRAMP1* 유전자에 의하여 합성되며, 이 유전자의 다형성은 결핵균에 대한 숙주의 선천적 내성을 감소시킨다. 본 연구에서는 일차 감염에 의한 결핵성 흉막염 환자에서 *NRAMP1* 유전자 다형성과 결핵의 일차 감염과의 관계를 고찰하였다.

방 법 :

특별한 병력 없이 흉막 조직 검사를 통해 진단된 56명의 결핵성 흉막염군과 건강한 45명의 건강 대조군을 대상으로 인트론 4의 G/C 점돌연변이(469+14G/C, INT4), 543번 코돈의 aspartic acid(Asp)에서 asparagine(Asn)으로의 변이(D543N), 및 3' 비해독 영역의 TGTG 결손(1729+55del4, 3'UTR) 등의 *NRAMP1* 유전자 다형성의 빈도를 중합효소 연쇄반응기법(PCR)과 중합효소 연쇄반응-제한효소 절단 길이 다형성(PCR-RFLP)을 이용하여 조사하였다.

결 과 :

흉막염군과 건강 대조군에서의 *NRAMP1* 유전자 다형성의 빈도는, INT4 와 3'UTR 다형성의 경우 흉막염군에서 변이형의 빈도가 유의하게 높았으나($p=0.001$, $p=0.023$), D543N의 경우는 양군에서 유의한 차이가 없었다($p=0.079$). 야생형과 변이형 유전자형의 교차비(odds ratio)는, INT4, 3'UTR의 경우 흉막염 환자가 변이형의 유전자형일 확률이 건강 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높았으나, D543N의 경우는 유의하지 않았다. INT4와 3'UTR의 결합 분석(combined analysis) 결과, 흉막염 환자가 INT4 C 대립 형질을 포함할 확률과 INT4 C 대립 형질과 3'UTR del 대립 형질을 모두 포함할 확률이 통계적으로 유의하게 높았다.

결 론 :

결핵성 흉막염 환자에서, 결핵 이환과 *NRAMP1* 유

전자 다형성 중 INT4와 3'UTR과는 유의한 상관 관계가 있었으나, D543N과는 유의성이 없었으며, 흉막염 환자가 변이형 유전자형일 확률도 INT4 및 3'UTR의 경우 통계적으로 유의하게 높았으나, D543N의 경우는 높지 않았다. INT4와 3'UTR의 결합 분석 결과, 흉막염 환자가 INT4 C 대립 형질을 포함할 확률과 INT4 C와 3'UTR del 대립 형질을 모두 포함할 확률이 통계적으로 유의하게 높았다.

참 고 문 헌

1. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis : morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995; 273:220-6
2. Hong YP, Kim SJ, Lew WJ, Lee EK, Han YC. The seventh nationwide tuberculosis prevalence survey in Korea, 1995. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2(1):27-36
3. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:679-91.
4. Schurr E, Buschman E, Malo D, Gros P, Skamene E. Immunogenetics of mycobacterial infections : mouse-human homologies. J Infect Dis 1990;161:634-41.
5. Plant JE, Glynn A. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. J Infect Dis 1976;133:72-8.
6. Blackwell JM, Roach TI, Atkinson SE, Ajoka JW, Barton CH, Shaw M-A. Genetic regulation of macrophage priming/activation : the *Lsh* gene story. Immunol Lett 1991;30(2):241-8.
7. Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. J Immunol 1981;127:2417-23.
8. Goto Y, Buschman E, Skamene E. Regulation of

- host resistance to *Mycobacterium intracellulare* in vivo and in vitro by the *Bcg* gene. *Immunogenetics* 1989;30:218-21.
9. Skamene E, Gros P, Forget A, Patel PJ, Nesbitt MN. Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in the mouse. *Immunogenetics* 1984;19:117-24.
 10. Crocker PR, Blackwell JM, Bradley DJ. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect Immun* 1984;43:1033-40.
 11. Linsser CR, Swanson RN, O'Brein AD. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: Expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J Immunol* 1983;131:3006-13.
 12. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 1993;73:469-85.
 13. Cellier BM, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 1994;180:1741-52.
 14. Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, Sanchez FO, Cellier M, Paradise AJ, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K, Schurr E. Identification of polymorphism and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet* 1995;56:845-53.
 15. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KPWJ, Whittle HC, Hill AVS. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in west africans. *N Engl J Med* 1998;338:640-4.
 16. Blackwell JM. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (*Nramp1*), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today* 1996;2:205-11
 17. Sancho JF. Pleural tuberculosis: incidence, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Curr Op Pul Med* 1996;2:327-34.
 18. Stead WW, Eichenholz, Staus H-K. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1955;71:473-502.
 19. Epstein DM, Kline LR, Albelda SM, Miller WT. Tuberculous pleural effusion. *Chest* 1987;91:106-9
 20. Mougdil H, Sridhar G, Leitch AG. Reactivation disease: the commonest form of tuberculosis pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991. *Respir Med* 1994;88:301-4.
 21. Arriero JM, Romero S, Hernández L, Candela A, Martin C, Gil J, Fernández C. Tuberculous pleurisy with or without radiographic evidence of pulmonary disease. Is there any difference? *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2(6):513-7.
 22. Valdés L, Álvarez D, José ES, Penela P, Valle JM, García-Pazos JM, Suárez J, Pose A. Tuberculous pleurisy. *Arch Intern Med* 1998;158:2017-21.
 23. Rojas M, Barrera F, Puzo G, Garcia LF. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages. *J Immunol* 1997;159:1352-61.
 24. Xu DL, Goto Y, Endo F, Amoako KK, Shinjo T. The effect of *Bcg* gene on antigen presentation of spleen adherent cells and peritoneal macrophages

- from *Mycobacterium bovis* BCG-infected *Bcg*⁺ and *Bcg*⁻ mice. *Veterinary Microbiol* 1997;59:67-78.
25. Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites : The *Nramp1* protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997; 185:717-30.
26. Blackwell JM, Searle S. Genetic regulation of macrophage activation : understanding the function of *Nramp1* (= *Ity/Lsh/Bcg*). *Immun Letter* 1999;65:73-80
27. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5105-10.
28. Govoni G, Gros P. Macrophage *NRAMP1* and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm res* 1998;47:277-84.
29. Deretic V, Fratti RA. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Biol* 1999;31(6):1603-9.
30. Shaw MA, Collins A, Peacock CS, Miller EN, Black GF, Sibthorpe D, Lins-Lainson Z, Shaw JJ, Ramos F, Silveira F, Blackwell JM. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control : linkage study of the candidate gene *NRAMP1* and *TNFA*. *Tubercle and Lung Dis* 1997;78(1):35-45.
31. Blackwell JM. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens : a study of multigene families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Int J Parasitol* 1998;28:21-8.
32. Huang JH, Oefner PJ, Adi V, Ratnam K, Ruoss SJ, Trako E, Kao PN. Analyses of the *NRAMP1* and *IFN- γ R1* genes in women with *Mycobacterium avium-intracellulare* pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:377-81
33. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics : *Nramp1* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Ann Rev Med* 1998;49:275-87.