□원저 : 임상□

장기간 천식 관해 청소년에서 지속되는 기관지 과민성과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과의 연관성 분석

서울대학교 의과대학 소아과학교실

강 희·고 영 률

Analysis of the association between bronchial hyperresponsiveness and genetic polymorphism of β_2-adrenoceptor in adolescents with long-term asthma remission

Hee Kang, M.D. and Young Yull Koh, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Purpose : We hypothesized that the persisting bronchial hyperresponsiveness (BHR) of adolescents with asthma remission may be controlled mainly by genetic factors, and the BHR of symptomatic asthma by airway inflammation. β_2-adrenoceptor gene is considered to be a candidate gene in the development of BHR. Thus, β_2-adrenoceptor gene polymorphism may be associated with the BHR of adolescents with asthma remission, but not with the BHR of symptomatic asthma. To evaluate this hypothesis, β_2-adrenoceptor gene polymorphism at 2 sites (Arg16-Gly, Gln27-Glu) were examined.

Methods : Two hundred two adolescents with BHR (PC_{20}<18 mg/mL) and long term remission (neither asthma-related symptoms nor medication during the previous 2 years) of their asthma (remission group), 182 adolescents with symptomatic asthma (symptomatic group), and 200 healthy adolescents (control group) were studied. Asthma phenotypes were determined using methacholine bronchial provocation test and skin prick test. Genotypes of β_2-adrenoceptor polymorphism were evaluated by PCR-based methods.

Results : Gly/Gly allele and Gly16-Gln27 haplotype were more prevalent in the remission group than in the control group (P=0.01, P=0.02), although there was no difference between the symptomatic group and the control group. In the remission group, there was significant difference in geometric mean of PC_{20} among the 3 groups subdivided by the number of Gly16-Gln27 haplotype, showing that the Gly16-Gln27 haplotype was positively associated with BHR. However, no association was found between Gly16-Gln27 haplotype and BHR in the symptomatic group.

Conclusion : This study demonstrates that β_2-adrenoceptor polymorphism at amino acid 16 and 27 was associated with BHR persisting in adolescents with asthma remission. **(Korean J Pediatr 2007;50:556-564)**

Key Words : Asthma, Bronchial hyperresponsiveness, β_2-adrenoceptor, Polymorphism, Clinical remission, Adolescent

서 론

천식 환자는 비특이적 자극에 대하여 정상인에 비해 과민한 기도 수축 반응을 보이는데, 이러한 기관지 과민성(bronchial hyperresponsiveness, BHR)은 천식의 특징적인 병태생리이다. 천식의 발생에는 환경적인 인자가 중요한 영향을 끼친다고 알려져 있지만 유전적인 인자도 강하게 작용하는 것으로 밝혀졌으며[1], 천식의 중요한 중간 표현형인 BHR도 여러 연구들에서 그 유전성이 증명되었다[2]. 최근 밝혀진 천식을 유발하는 후보 유전자(candidate gene)들 중, 유전자의 위치나 기능을 고려할 때 β_2-아드레날린 수용체 유전자가 BHR과의 연관성을 설명할 수 있는 중요한 후보 유전자로 알려져 있다[1, 3].

접수 : 2007년 3월 13일, 승인 : 2007년 5월 20일
이 논문은 2004년도 삼아학술상 연구비에 의하여 연구되었음.
책임저자 : 고영률, 서울대학교 의과대학 소아과학교실
Correspondence : Young Yull Koh, M.D.
Tel : 02)2072-3631 Fax : 02)747-5130
E-mail : kohyy@plaza.snu.ac.kr

β_2-아드레날린 수용체 유전자의 단백질 합성 부위에는 9개의 single nucleotide polymorphism(SNP)이 존재하며, 대표적인 다형으로는 β_2-아드레날린 수용체 유전자의 아미노산이 대치되어 있는 부분으로 Arg16-Gly, Gln27-Glu, Val34-Met 및 Thr164-Ile이 알려져 있으며 이 중 16번, 27번 유전자 다형이 나타나는 빈도가 상대적으로 높다[4]. β_2-아드레날린 수용체 유전자는 기도 수축의 억제 정도를 통하여 BHR에 간접적으로 관여한다고 알려져 있으며, 실제로 β_2-기관지 확장제에 대한 반응은 BHR과 밀접한 상관관계를 보인다[5]. β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR의 상관관계를 분석한 연구들을 살펴보면, 초기 연구에서는 Gly16이 BHR의 증가와 관련이 있고[6], Glu27은 BHR의 감소와 관련이 있다고 보고되었으며[7, 8], Gly16-Gln27 일배체형과 BHR과의 연관성도 보고되었다[9]. 그러나 일부 연구들에서는 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR 사이에 연관성이 없다고 보고되었다[10, 11]. 이렇게 상반된 연구결과가 나오게 된 것은 인종간의 차이 때문일 수도 있지만 표현형 분류 기준의 차이, 즉, BHR을 가진 연구대상 선택 기준의 차이 때문일 가능성도 있다[6, 7, 9].

소아 천식 환자의 60-70%는 청소년기를 지나면서 임상증상이 사라지는 관해(clinical remission)를 경험하게 된다[12]. 현증 천식 환자에게서 BHR이 천식의 중한 정도를 반영하는 것으로 밝혀졌기 때문에[13] 청소년기의 천식 관해 상태에서는 BHR 또한 소멸될 것이라고 추측해 볼 수 있지만, 실제로는 관해 상태에서도 BHR이 지속되는 비율이 상당하다[14]. 임상적으로 관해가 된 천식 환자에게서 지속되는 BHR의 기전에 대해서 아직 명확하게 밝혀지지 않은 실정이지만 최근에 청소년기 천식 관해 상태에서 지속되는 BHR에서는 현증 천식 환자에서의 BHR과는 달리 흡입용 스테로이드의 사용에 의해 BHR이 호전되지 않는 현상이 보고되었다[15]. 이는 청소년 천식 관해 상태의 BHR에서 기도 염증의 존재에 의문을 제기할 수 있는 소견이므로, 기도 염증 이외에 BHR을 일으킬 수 있는 다른 요인, 즉, 기도 개형(airway remodeling)이나 유전적 소인 등을 그 원인으로 생각해 볼 수 있다[16]. 또한 최근 청소년기 천식 관해 상태에서 그 청소년의 부모가 BHR을 가지고 있는 경우 BHR의 빈도 및 기관지 반응도가 높다는 사실이 보고되었는데[17], 이들의 BHR은 말초혈액의 호산구와 혈청 호산구 양이온 단백과는 연관성이 없는 것으로 나타났다[18]. 그렇다면 이러한 결과는 청소년기 천식 관해 상태에서 지속되는 BHR의 경우는 기도 염증을 반영하는 부분이 미약하고 상대적으로 유전적 성향을 반영하는 부분이 강력함을 시사한다. 따라서 BHR과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과의 연관성은, 기도 염증이 내재되어 있는 현증 천식 환자에서보다는 기도 염증이 미약하고 유전적 성향이 강한 청소년기 천식 관해 상태의 천식 환자에게서 보다 극명하게 드러나리라고 추론해 볼 수 있다.

이에 BHR이 지속되는 천식 관해 상태의 청소년과 현증 천식 청소년과 정상군 사이에 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 빈도 차이와 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR과의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

서울대학교 병원의 소아과 외래를 2000년 2월부터 2004년 2월 사이에 방문한 만 13-17세의 천식 환자 중 임상적으로 장기간 관해되었으나 BHR이 지속되는 환자(천식 관해군)와 현증을 보이는 환자(현증 천식군)를 대상으로 하였다. 천식의 진단은 만성기침, 호흡곤란, 천명 등의 특징적인 증상과 함께 가역적인 기도 폐쇄의 병력을 기준으로 하였다. 장기간 관해는 적어도 최근 2년 이상 호흡 곤란, 천명 등의 천식에 합당한 증상이 없고 천식 증상 조절을 위해 약제가 전혀 필요하지 않은 경우로 정의하였다. 현증은 최근 1년 내에 상기한 증상을 최소한 3차례 이상 보였던 경우로 하였고, 치료는 필요시 기관지 확장제를 투여하거나 기관지 확장제와 흡입성 스테로이드를 병합 투여하고 있는 중이었다.

이들 대상군에서 폐기능 검사와 메타콜린 기관지 유발검사를 시행하여 FEV_1이 추정 정상치[19]의 70% 이상이며, 메타콜린 기관지 유발검사에서 FEV_1의 20% 감소를 유발하는 메타콜린 농도(PC_{20})가 18 mg/mL 이하인[20] 경우만을 선택하였다. 이들 환자군, 즉, 천식 관해군과 현증 천식군 중에서 연구 시행 전 6주 내에 상기도나 하기도 바이러스 감염이 있는 경우는 제외하였으며 다른 질환이 합병되어 있는 경우 또한 제외하였다. 이들을 대상으로 피부단자시험을 하였으며, 총 IgE 측정과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 분석을 위해 혈액을 채취하였다.

이와는 별도로 정상 청소년을 모집하여 정상군(control)으로 선정하였고 기관지 유발검사를 시행하여 PC_{20}이 18 mg/mL 이상이고 만성 호흡기 증상이 없음을 확인하였다. 이들에서 또한 피부단자시험을 하였으며, 총 IgE 측정과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 분석을 위해 혈액을 채취하였다. 모든 대상군에게서 검사 시행 전 보호자로부터 동의를 받았다.

2. 피부단자시험

피부단자시험은 흔한 흡입항원(Allergo-Pharma, Reinbek, Germany)인 집먼지진드기 항원(*Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae*) 2종, 동물 비듬 항원(cat, dog) 2종, 곰팡이 항원(*Aspergillus, Alternaria*) 2종, 화분 항원(oak, alder, rye grass, ragweed, mugwort) 5종, 그리고 바퀴 항원(cockroach) 1종 총 12종으로 시행하였고, 양성대조액으로는 히스타민(Allergo-Pharma, Reinbek, Germany), 음성대조액으로는 생리 식염액을 사용하였다. 전박부 내측에 항원 용액을 점적한 후 26번 주사침을 사용하여 단자를 시행하였으며 단자 시행 후 15분 후에 판독하였다. 팽진의 장경과 단경을 측정하여 평균 팽진의 크기(mm)를 결과로 사용하였고 각 항원에 대한 양

성 여부는 팽진이 3 mm 이상이면서 양성 대조군보다 큰 경우를 양성으로 판정하였다. 아토피는 피부단자시험에서 12개의 흔한 흡입 항원 중에 1개 이상 양성 상태로 규정하였다.

3. 폐기능 검사 및 메타콜린 기관지 유발검사

폐기능 검사는 microspirometer(Microspiro HI-298, Chest, Japan)로 측정하였고 각 시점에서 3회 시행한 FEV_1의 최대치를 사용하였다. 메타콜린 기관지 유발검사는 Chai 등[21]에 의해 기술된 방법을 변형하여 시행하였다. 간단히 기술하면 메타콜린을 완충 식염수에 녹여 각 농도(0.075, 0.15, 0.3, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25 mg/mL)로 희석하였고, 0.6초 동안 열리도록 조정된 solenoid 발브가 장착된 Rosenthal-French dosimeter를 통해 20 psi의 가압 공기를 전달받아 DeVilbiss 646 분무기(nebulizer)를 이용하여 각 농도의 메타콜린을 흡입하였다. 각 대상자는 완충식염수를 흡기용적(inspiratory capacity)으로 5회 흡입 후 점차 증가된 농도의 메타콜린을 흡입하여 FEV_1이 완충 식염수 유발 FEV_1치의 20% 이상 저하되거나, 20% 이상 저하되지 않는 경우는 메타콜린의 최고 농도에 도달할 때까지 흡입하였다. FEV_1은 각 농도 흡입 후 60-90초 후에 측정하였고 이 수치가 완충 생리 식염수 흡입 후 수치보다 20% 이상 감소할 때까지 농도를 증가시켜 용량 반응 곡선에서 2개 전후 시점을 연결하여 보간법(interpolation)에 의해 계산된 PC_{20}을 구하였다.

4. β_2-아드레날린 수용체의 유전형 판정

1) Genomic DNA 추출

Genomic DNA는 말초 혈액에서 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega Corp., Madison, WI, USA)을 사용하여 추출하였다. 그 과정을 기술하면 다음과 같다. 900 μL의 cell lysis solution이 들어있는 1.5 mL 튜브에 전혈 300 μL를 넣고, 적혈구가 깨지도록 상온에서 10분간 5-6회 섞어주었다. 상온, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액은 버린 후, vortex mixer로 백혈구의 pellet이 남겨진 상층액에 다시 현탁시켰다. 여기에 300 μL의 nuclei lysis solution을 가하고 pipet으로 5-6회 혼합하여 백혈구가 깨지도록 하였으며, 100 μL의 protein precipitation solution을 가하고 20초간 강하게 vortex함으로써, 함유되어 있는 단백질이 침전되어 제거되도록 하였다. 상온, 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 단백질 침전을 제거하고, 상층액은 300 μL의 isopropanol을 함유하는 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 담았다. DNA가닥이 보일 때까지 섞어준 후, 상온, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액은 버렸다. 70% ethanol을 300 μL 가하여 DNA pellet을 세척하고, 상온, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액은 버린 후, 상온에서 15분 정도 건조시켰다. 50-100 μL의 DNA rehydration solution을 가하고, DNA가 충분히 녹을 수 있도록 4℃에서 1일간 보관한 후, 다음 실험이 진행될 때까지 -20℃에서 보관하였다.

2) β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형 분석

과거 Kim 등[3]이 보고한 방법과 동일하게 실시하였다. 16번과 27번 아미노산 부위를 포함하고 있는 β_2-아드레날린 수용체의 유전자부위를 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction: PCR)으로 증폭한 후 16번 유전형의 돌연변이는 allele specific PCR 법으로, 27번 유전형의 돌연변이는 PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)법으로 각각 분석하였다. 16번과 27번 아미노산의 유전형 판정 시 이형접합자(heterozygote)가 관찰되는 경우에는 allele-specific PCR의 결과물에 Ita1 제한효소(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)로 소화시키는 RFLP법으로 확인하였다(Fig. 1). PCR 반응에 사용한 모든 primer(Table 1)는 Oligo Primer Analysis Software(Molecular Biology Insights, Inc., MN, USA)로 디자인하였다.

방법을 살펴보면 16번과 27번 아미노산의 다형 부위를 포함하고 있는 219 bp β_2-아드레날린 수용체의 유전자부위를 specific primer(BAR-SS1/BAR-SS2)를 이용하여 PCR방법으로 먼저 증폭하였다. PCR은 추출한 DNA 5 μL와 각각 10 pM의 primer, 2.5 mM dNTP 혼합액 4 μL, $MgCl_2$가 들어있는

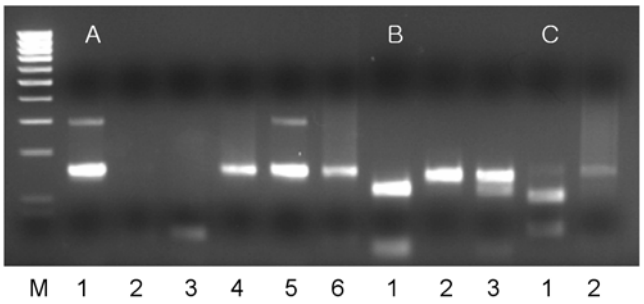

Fig. 1. Allele-specific PCR and *Ita*1 PCR-restriction fragment length polymorphism for the determination of β_2-adrenoceptor alleles and haplotypes at amino acid 16 and 27. A) lanes 1 and 2: Arg16Arg; lanes 3 and 4: Gly16Gly; lanes 5 and 6: Arg16Gly. B) lane 1: Gln27Gln; lane 2: Glu27Glu; lane 3: Gln27Glu. C) lane 1: Arg16/Gln27; lane 2: Gly16/Glu27.

Table 1. Primers used in This Study

Primer name	Sequence
BAR-SS1	5′-AGC CAG TGC GCT TAC CTG CCA GAC T-3′
BAR-SS2	5′-GCT CGA ACT TGG CAA TGG CTG TGA-3′
BAR16-1A	5′-CTT CTT GCT GGC ACC CTA TA-3′
BAR16-2A	5′-CTT CTT GCT GGC ACC CTA TG-3′
BAR16-R2	5′-GGC AAT GGC TGT GAT GAC C-3′
BAR27-S1	5′-GCC ATG CGC CGG ACC ACG AC-3′
BAR27-S2	5′-CGC TCG AAC TTG GCA ATG GCT GTG A-3′

10xbuffer 5 μL, Taq polymerase 2.5 unit(Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany), 증류수를 혼합하였고, GeneAmp 2400 thermal cycler(Perkin Elmer, CT, USA)에 튜브를 넣고 95℃ 2분으로 초기 denaturation하였고 95℃ 40초, 60℃ 40초, 72℃ 40초로 35회 반응시킨 후 마지막 extension은 72℃에서 5분간 시행하였다. 219 bp 크기의 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함되어 있는 2% agarose gel에서 확인하였다.

16번 아미노산의 변화를 일으키는 46번 염기의 유전형을 평가하기 위하여 다음과 같이 allele-specific PCR을 시행하였다. PCR반응은 1:1,000 또는 1:10,000으로 희석된 primary PCR산물 5 μL을 주형으로 사용하였다. BAR16-1A(upstream for Arg16) 또는 BAR16-2A(upstream for Gly16)의 allele-specific primer와 BAR16-R2(downstream)를 이용하였고 각각의 cycle은 95℃ 30초, 62℃ 50초, 72℃ 30초로 30회 시행하였다. 151 bp 크기의 PCR 산물을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 확인하였다(Fig. 1A).

27번 아미노산의 변화를 일으키는 79번 염기의 유전형은 PCR-RFLP법으로 판정하였으며 PCR반응은 1:1,000 또는 1:10,000으로 희석된 primary PCR산물 5 μL을 주형으로 사용하였다. BAR27-S1(upstream)과 BAR27-S2(downstream)의 primer를 이용하여 95℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃ 30초로 30회 시행하였다. 2% agarose gel에서 139 bp 크기의 PCR 산물을 확인하였고, 이 PCR 산물 12 μL에 Ita1 제한효소 1.5 unit, 10x buffer 2 μL 및 증류수를 첨가하여 총 20 μL로 한 후, 밤새 배양하여 2% agarose gel에서 절단유무를 확인하였다(Fig. 1B).

상기 과정에서 16번과 27번 아미노산의 유전형 판정시 이형접합자가 관찰되는 경우에는 allele-specific PCR의 결과물에 Ita1 제한효소를 첨가하여 16번과 27번 일배체형을 결정하였다(Fig. 1C).

연구대상 중 20명의 샘플을 무작위로 추출하여 직접 염기서열을 결정하고, 상기의 결과와 같은 46번과 79번 염기부위의 다형을 확인하였다.

5. 분 석

표본 수 산정은 chi square approximation 방법으로, α error는 0.05, β error는 0.2로 하여 이형 배정인 경우의 공식을 적용하였다.

$$N=\{Z_\alpha\sqrt{2P(1-P)}+Z_\beta\sqrt{[P_1(1-P_1)+P_2(1-P_2)]}\}^2/d^2$$

P_1=일반 대상의 기대 빈도

P_2=본 연구대상의 기대 빈도

$P=(P_1+P_2)/2$, d=예상되는 차이=0.15

기존의 연구에서 일반 대상의 기대 빈도는 Hong 등[22]의 소아를 대상으로 한 연구의 유전자형, 일배체형의 빈도를 사용하였고, 예상되는 차이는 D'Amato 등[9]의 연구 결과를 근거로 하였다. 가장 큰 표본수가 169명이 산출되어 본 연구에서는 각 군의 대상 수를 180명 이상으로 설정하였다.

통계 처리는 SPSS(version 11.0)을 이용하였으며, 세 군 사이의 평균치 비교에는 analysis of variance(ANOVA) 법을 이용하였고, 두 군 사이의 평균치 비교에는 unpaired t-test를 이용하였다. 천식 관해군, 현증 천식군, 정상군에서의 16번, 27번 아미노산의 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형을 유전자형, 대립 유전자, 일배체형의 빈도로서 linear by linear association을 이용하여 경향성을 분석하였다. 각 군에 대한 비교로는 chi-square test를 이용하였다. 모든 통계에서 P값이 0.05 이하인 경우 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 연구 대상군의 특성

천식 관해군 202명, 현증 천식군 182명, 정상군 200명의 평균 연령은 각각 15.0±1.6, 14.7±1.6, 14.8±1.4세로 차이가 없었으며, 남녀의 비율도 각각 148/54, 125/57, 138/62로 세 군에서 차이가 없었다. 천식 관해군과 현증 천식군 간에 총 IgE, 아토피 유무, 기저 FEV_1 기대치의 백분율 차이는 관찰되지 않았으나 두 군과 정상군 간에는 총 IgE와 아토피 유무, 기저 FEV_1 기대치의 백분율 차이가 관찰되었다. 천식 관해군의 PC_{20} 값은 현증 천식군의 것보다 의미 있게 높았다(Table 2).

2. β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 빈도

천식 관해군, 현증 천식군, 정상군 모두에게서 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 16번 아미노산과 27번 아미노산의 대립유전자, 일배체형을 분석하였다. Arg16Arg/Gln27Gln, Arg16Gly/Gln27Gln, Arg16Gly/Gln27Glu, Gly16Gly/Gln27Gln, Gly16Gly/Gln27Glu, Gly16Gly/Glu27Glu 빈도는 각각 천식 관해군에서 22.3%, 48.5%, 5.0%, 17.8%, 5.0%, 1.5%, 현증 천식군에서 23.6%, 51.1%, 7.1%, 12.6%, 4.4%, 1.1%, 정상군에서 27.0%, 46.5%, 11.0%, 11.9%, 2.5%, 1.0%로서 Arg16Gly/Gln27Gln, Arg16Arg/Gln27Gln, Gly16Gly/Gln27Gln, Arg16Gly/Gln27Glu, Gly16Gly/Gln27Glu, Gly16Gly/Glu27Glu 순으로 나타났다.

Gly16 대립유전자의 빈도는 천식 관해군, 현증 천식군, 정상군에서 각각 51.0%, 47.3%, 43.7%로 감소하는 경향이 관찰되었다(P=0.04, linear by linear association). Glu27 대립유전자의 빈도는 천식 관해군, 현증 천식군, 정상군에서 각각 6.4%, 6.9%, 7.7%로서 세 군간에 유의한 차이나 경향성은 보이지 않았다(Table 3). 16번 아미노산의 Arg 동형접합자(homozygote), Arg/Gly 이형접합자, Gly 동형접합자의 빈도는 각각 천식 관해군에서 22.3%, 53.5%, 24.2%, 현증 천식군에서 23.6%, 58.3%, 18.1%, 정상군에서 27.0%, 58.5%, 14.5%로서 세 군간에 유의한 경향성이 관찰되었다(P=0.03, linear by linear association). 세

Table 2. Clinical Characteristics of Subject Groups

Characteristics	Remission group with BHR*	Symptomatic group	Control group
No. of subjects	202	182	200
Age (yr)	15.0±1.6	14.7±1.6	14.8±1.4
Sex (M/F)	148/54	125/57	138/62
Serum IgE (IU/mL)†	287.2 (82.3-1002.6)§	296.7 (79.7-1104.5)§	107.7 (31.5-369.0)
Atopy‡, n (%)	166 (82.2)§	141 (77.5)§	106 (53.0)
FEV_1 (% Predicted)	94.6±10.1§	92.6±10.8§	98.9±12.3
PC_{20} (mg/mL)†	3.80 (1.40-10.40)‖	1.47(0.43-5.02)	-

Data are presented as mean±SD or No. unless otherwise indicated.
*PC_{20}<18 mg/mL
†Geometric mean (range of 1SD)
‡Atopy is defined as a positive skin test result to one or more of 12 common inhalant allergens.
§P<0.05, compared to control group; ‖P<0.05, compared to symptomatic group

군간에 Arg 동형접합자, Arg/Gly 이형접합자, Gly 동형접합자의 빈도 경향성을 각각 분석한 결과, Arg 동형접합자와 Arg/Gly 이형접합자에서는 빈도 경향성이 나타나지 않았으나 Gly 동형접합자의 빈도는 정상군, 현증 천식군, 천식 관해군 순으로 증가하는 경향이 관찰되었다(P=0.01, linear by linear association)(Table 3). 유의한 경향성을 보인 Gly 동형접합자에 대하여 각 군 사이에서 빈도 차이를 분석한 결과, 현증 천식군과 정상군 사이에서는 차이가 없었지만 천식 관해군과 정상군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.01, chi-square test)(Fig. 2).

Arg16-Gln27, Gly16-Gln27, Gly16-Glu27 일배체형의 빈도는 천식 관해군에서 49.0%, 44.6%, 6.4%, 현증 천식군에서 52.7%, 40.4%, 6.9%, 정상군에서 55.7%, 36.5%, 7.8%로 나타나 세 군에서 모두 Arg16-Gln27, Gly16-Gln27, Gly16-Glu27의 순으로 나타났고, Arg16-Glu27형은 한 례도 없어 16번과 27번의 다형 사이에 연쇄 불균형(linkage disequilibrium)이 관찰되었다. 세 군간에 Arg16-Gln27, Gly16-Gln27, Gly16-Glu27 일배체형의 빈도 경향성을 각각 분석한 결과, Arg16-Gln27와 Gly16-Glu27 일배체형에서는 빈도 경향성이 나타나지 않았으나 Gly16-Gln27 일배체형 빈도는 정상군, 현증 천식군, 천식 관해군 순으로 증가하는 경향이 관찰되었다(P=0.02, linear by linear association)(Table 4). 유의한 경향성을 보인 Gly16-Gln27 일배체형에 대하여 각 군 사이에서 빈도 차이를 분석한 결과, 현증 천식군과 정상군 사이에서는 차이가 없었지만 천식 관해군과 정상군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.02, chi-square test)(Fig. 3).

3. β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 천식 표현형과의 연관성

천식 관해군과 현증 천식군에서, Gly16-Gln27 일배체형을 가지고 있지 않는 경우, 한 개 가지고 있는 경우, 두 개 가지고 있는 경우의 PC_{20}과 총 IgE 기하 평균값을 비교 분석하였다. 천식 관해군에서, Gly16-Gln27 일배체형을 가지고 있지 않는 경우, 한 개 가지고 있는 경우, 두 개 가지고 있는 경우의 PC_{20} 기하 평균값이 각각 4.20, 4.15, 2.46 mg/mL로 나타났다. 이처럼 천식 관

Table 3. Distribution of β_2-Adrenoceptor Gene Frequency in Subject Groups

Genotypes and alleles	Remission group with BHR (n=202)	Symptomatic group (n=182)	Control group (n=200)	P value
Position 16				
Arg/Arg	45 (22.3%)	43 (23.6%)	54 (27.0%)	NS
Arg/Gly	108 (53.5%)	106 (58.3%)	117 (58.5%)	NS
Gly/Gly	49 (24.2%)	33 (18.1%)	29 (14.5%)	0.01
Arg allele*	198 (49.0%)	192 (52.7%)	225 (56.3%)	
Gly allele*	206 (51.0%)	172 (47.3%)	175 (43.7%)	0.04
Position 27				
Gln/Gln	179 (88.6%)	159 (87.4%)	171 (85.5%)	NS
Gln/Glu	20 (9.9%)	21 (11.5%)	27 (13.5%)	NS
Glu/Glu	3 (1.5%)	2 (1.1%)	2 (1.0%)	NS
Gln allele*	378 (93.6%)	339 (93.1%)	369 (92.3%)	
Glu allele*	26 (6.4%)	25 (6.9%)	31 (7.7%)	NS

*Counts represent actual number of alleles and not subjects.
NS, Not significant

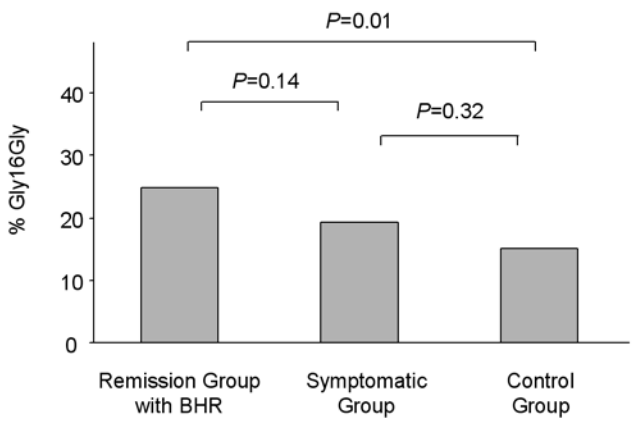

Fig. 2. Frequency of homozygous Gly at amino acid 16. Increased homozygous Gly was observed in adolescents with asthma remission and persisting BHR in comparison with the control group.

Table 4. Haplotype Frequency of β_2-Adrenoceptor Gene in Subject Groups

Haplotypes	Remission group with BHR (n=202)	Symptomatic group (n=182)	Control group (n=200)	*P* value
Arg16-Gln27	198 (49.0%)	192 (52.7%)	223 (55.7%)	NS
Gly16-Gln27	180 (44.6%)	147 (40.4%)	146 (36.5%)	0.02
Gly16-Glu27	26 (6.4%)	25 (6.9%)	31 (7.8%)	NS

Counts represent actual number of haplotypes and not subjects. NS, Not significant

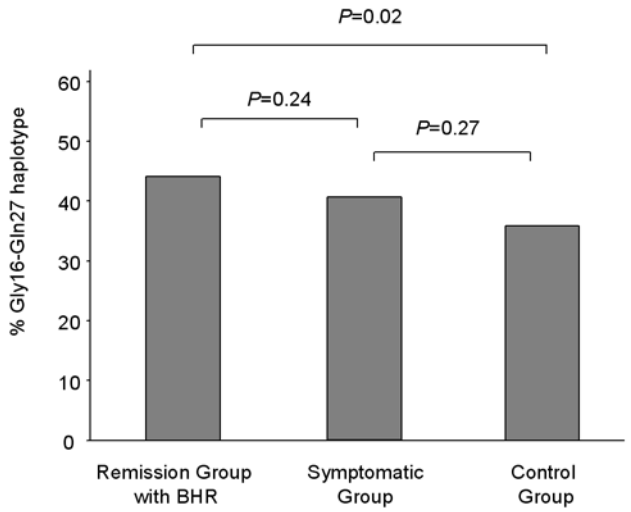

Fig. 3. Frequency of Gly16-Gln27 haplotype. Increased Gly16-Gln27 haplotype was observed in adolescents with asthma remission and persisting BHR in comparison with the control group.

해군에서는 Gly16-Gln27 일배체형의 수가 증가함에 따라 PC_{20} 기하 평균값도 유의한 차이를 보임으로써(P=0.02, ANOVA) Gly16-Gln27 일배체형과 PC_{20}사이의 연관성이 관찰되었으나 현증 천식군에서는 이러한 연관성이 관찰되지 않았다. 총 IgE 기하 평균값의 차이는 두 군에서 모두 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구는 그간 논란이 되어온 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR 사이의 연관성에 관하여 주목할 만한 결과를 제시해 주고 있다. 본 연구 결과, Gly16 대립유전자와 Gly16-Gln27 일배체형 빈도가 현증 천식군과 정상군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았지만 천식 관해 후 BHR이 지속되는 청소년에서는 그 빈도가 정상군 보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 천식 관해된 청소년에게서 지속되는 BHR이 Gly16 대립유전자와 Gly16-Gln27 일배체형과 연관 있음을 보여주는 것으로서, Gly16 대립유전자와 Gly16-Gln27 일배체형이 BHR 및 천식의 중증도와 연관 있음을 증명한 이전의 연구 결과들[6, 9, 23]을 지지한다.

Gly16과 BHR 증가와의 연관성이 보고되었고[6], Glu27 동형접합자와 기관지 반응도 감소와의 연관성이 보고되었다[7]. Gly16-Gln27 일배체형과 지속적인 BHR 및 중증 천식과의 연관성이 보고되었으며[9], 독일인들을 대상으로 한 연구에서는 Gly16-Gln27-The164형이 BHR을 완화시키는 것으로 나타났다고 보고되었다[24]. 한편, β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR과의 연관성을 찾지 못한 연구결과들도 있는데[10, 11], 한 연구에서는 Arg16 동형접합자 유전형이 폐기능 저하와는 상관관계가 있지만, 유전자 다형이 BHR과는 상관관계가 없는 것으로 나타났다[11]. 또한 일반인과 천식 환자를 대상으로 한 국내 연구들에서도 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR 사이에는 연관성이 없는 것으로 나타났다[3, 22].

이렇게 상반된 연구 결과가 나오게 된 원인으로는 '인종간의 차이', '천식 표현형의 상호 관계 및 천식 표현형 분류 기준의 모호함' 등이 검토될 수 있다[24-26].

β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형 중 대표적인 다형인 16번과 27번 대립유전자의 빈도는 인종간에 차이가 있으며[9, 23, 27] 지역이나 민족에 따라 유전자 다형과 천식의 표현형의 연관성도 다소 차이를 보인다고[25] 보고되었다. 본 연구에서 정상군에서의 대립유전자의 빈도는 Gly16과 Gln27이 각각 43.7%, 92.3%, 일배체형의 경우 Arg16-Gln27, Gly16-Gln27, Gly16-Glu27이 각각 55.7%, 36.5%, 7.8%이었다. 이는 서양인에 비하여 Gly16, Glu27, Gly16-Glu27의 빈도가 낮은 것으로서[9, 23, 27] 외국에서 조사한 아시아 인종이나 국내의 다른 연구들과 비슷한 분포를 보여준 것이었다[3, 23, 26]. 또한 16번 아미노산의 대립유전자에서 Arg/Gly 이형접합자 변이의 빈도(58.5%)가 야생형이나 동형접합자 변이형보다 높게 나타났으며, 27번 아미노산의 대립유전자에서는 야생형의 빈도(85.5%)가 가장 높게 나타났다. 이는 27번 아미노산의 대립유전자에서 이형접합자 변이형이 우세한 서양인과는 차이가 있는 결과로서[8, 11, 27] 국내의 다른 연구들[3, 22]과 비슷한 빈도 분포를 보여주는 결과이다. 이와 같이 본 연구는 국내의 다른 연구들과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 빈도 분포가 다르지 않기 때문에 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR 및 천식과의 연관성에 관한 본 연구와 국내 다른 연구들과의 차이를 위에서 살펴본 인종간 차이로 설명할 수 없다.

따라서 이렇게 서로 다른 국내외 연구 결과들은 결국 '천식 표현형간의 상호 관계와 분류 기준의 모호함'에 기인한 것으로 판단된다. 천식의 발생에 유전적 소인이 관여한다는 것은 잘 알려져 있지만 이 질환의 유전방식(inheritance pattern)은 단순유전질환(single gene disorder)과 같은 전형적인 멘델의 법칙을 따르지는 않는다. 즉, 천식은 질병의 발생에 여러 개의 유전자가 관여하고, 개체에 따라서 그 조합이 다를 수도 있으며, 원인 항원에의 노출, 대기오염, 바이러스 감염 등 여러 가지 환경인자가 표현형의 발현에 관여하는 복합 유전 질환(multicomplex genetic disorder)이라고 할 수 있다[28]. 천식의 다양한 표현형, 환경적인 효과, 유전자 이질성 등은 천식의 유전에 대한 연구를 더

욱 복잡하게 만들고 있다[29]. 이와 같이 천식은 BHR뿐만 아니라 알레르기 표현형 등이 복합적으로 작용하여 생기는 질환이기 때문에 유전자 연구를 함에 있어 천식 환자들의 특정한 표현형을 명료하게 추출하기란 어려운 일이다. D'Amato 등[9]은 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR과의 연관성에 대한 연구에서 BHR의 진단 기준을 매우 엄격하게 설정함으로써 검사시기에 따른 개인적인 변동을 최소화하고자 노력하였다. 뿐만 아니라 이들은 아토피의 영향을 최대한 배제함으로써 BHR에서 순수히 유전적인 부분과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형에 대한 연관성을 살펴보고자 하였다. 이와 같이 BHR과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형의 연관성을 규명하기 위해서는, 연구대상이 되는 BHR의 진단 기준이 중요한데, 특히 BHR 중에서 유전적인 영향을 더 많이 받은 대상을 추출하는 것이 중요하다고 생각된다. 다시 말하면, 다인자성 질환의 유전학적 연구에 있어서 연구대상을 세분화하는 것은 하나의 유전자가 질병이나 중간 표현형에 미치는 영향을 평가하는데 효과적이다.

그렇다면 본 연구에서 Gly16 대립유전자와 Gly16-Gln27 일배체형의 빈도가 천식 관해 후 BHR이 지속되는 청소년에서는 정상군보다 유의하게 높았지만 현증 천식군과 정상군 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않은 것은, 현증 천식군의 BHR 중에는 유전적인 요인뿐만 아니라 환경적인 요인의 영향을 받는 알레르기 염증으로 인한 BHR이 상당수 포함되어 있기 때문이라고 생각된다. 반면 천식 관해군의 BHR은 알레르기 염증보다는 유전적인 요인으로 인한 것이 대다수일 것이므로 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과의 연관성이 밝혀졌다고 할 수 있다. 즉, 본 연구 결과는 과거의 연구들에서 천식 관해군의 BHR이 현증 천식 환자의 BHR과 달리 흡입용 스테로이드에 의하여 호전되지 않은 결과[15]와 천식 관해군의 BHR과 말초혈액의 호산구, 혈청 호산구 양이온 단백과는 연관성이 없는 결과[18]를 잘 설명해 줄 수 있다.

실제로 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 BHR의 정량적 척도인 PC_{20}과 연관성이 있는지 분석한 결과 천식 관해군에서 Gly16-Gln27 일배체형 수가 증가함에 따라 PC_{20} 기하 평균값에 유의한 차이가 나타나는 것을 발견하였으며 Gly16-Gln27 동형접합자에서 가장 낮은 PC_{20} 기하 평균값을 보임을 관찰하였다. 이러한 결과는 Gly16-Gln27 일배체형 동형접합자가 BHR과 가장 큰 연관성을 가진다는 것을 시사하는 것이며, 이는 β_2-아드레날린 수용체 유전형에 따른 내인성 아드레날린에 대한 수용체의 수적 하향조절과 관련이 있을 것으로 생각된다[30]. 또한 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 작용제 유도 cAMP 반응(agonist induced cAMP response)의 탈감작(desensitization)과의 관련성에 관한 최근의 연구 결과, 즉 Gly16-Gln27 일배체형을 가지고 있는 경우 작용제 유도 후 β_2-아드레날린 수용체 탈감작이 가장 민감하게 나타났다는 연구 결과[31]도 본 연구 결과에 대한 설명이 될 수 있겠다. 한편, 현증 천식군에서는 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형에 따라 PC_{20} 기하 평균값이 차이가 나지 않았는데 이러한 현상은 현증 천식군의 BHR은 천식 관해군의 BHR과 달리 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과의 연관성으로 설명하기 힘들다고 하겠다.

또한 본 연구에서 16번 변이와 BHR과의 연관성은 증명이 된 반면 27번 변이와 BHR과의 연관성은 증명이 되지 않았는데, 이는 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 천식 중증도나 야간 천식과의 연관성에 대한 연구 결과들과 흡사하다[4, 32]. 다른 한 연구에서도 Gly16 대립유전자에서 Arg16 대립유전자보다 기관지 확장제에 대한 반응도가 감소되어 있었으나 27번 변이에서는 차이가 없었다고 보고되었다[27]. Chinese hamster fibroblast를 이용한 연구 결과에서 Gly16-Gln27과 Gly16-Glu27형이 Arg16-Gln27형 보다 작용제 촉진 수용체 감소(agonist promoted receptor downregulation)가 더 크게 나타났으며 Gly16-Gln27과 Gly16-Glu27형에서는 같은 정도였다[33]. 이러한 결과들이 시사하는 바는 16번 변이가 수용체 감소에 미치는 영향이 27번 변이보다 강하다는 것이다. 본 연구가 27번 변이에서 BHR과의 연관성을 밝힐 수 없었던 원인에 대한 다른 해석으로 16번과 27번과의 강한 연쇄 불균형을 들 수 있다. 본 연구에서도 다른 연구 결과와 같이 Arg16-Glu27 일배체형이 한 예도 없어 Arg16은 Gln27과 강한 연쇄 불균형이 있음이 관찰되었다[3, 9, 22].

β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과 총 IgE 사이의 연관성을 조사한 결과, 천식 관해군과 현증 천식군에서 모두 연관성이 관찰되지 않았다. 이는 Dewar 등[34]의 연구 결과를 제외한 국내외 연구 결과들[3, 8, 11, 22, 35]과 동일한 결과이다. Dewar 등[34]은 본 연구 결과와는 달리 천식 가족에서 Gln27은 총 IgE의 증가와 연관성이 있다고 보고하였으나, 이는 대상군의 차이나 아토피의 유전학적인 이질성에 기인하는 것이거나, 동일한 염색체 5q31-33 영역에 위치하는 아토피 반응에 관여하는 IL-4 사이토카인 등의 유전자군과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 사이의 연쇄불균형 효과 때문에 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형이 아토피 지표와 관련성이 있는 것처럼 나온 것으로 생각된다[34, 35].

본 연구는 천식을 가진 청소년과 천식이 관해된 청소년을 대상으로 한 단면 연구이므로 본 연구 결과를 성인 천식이나 소아천식 등의 다른 집단이나 다른 연구 디자인에 적용할 수는 없지만, 본 연구에서 BHR과 β_2-아드레날린 수용체 유전자 다형과의 연관성이 밝혀짐으로써 BHR의 후보 유전자로서 β_2-아드레날린 수용체 유전자의 중요성을 보여주었다. 또한 표현형 분류 기준 설정에 있어서도 천식의 중요한 중간 표현형인 BHR의 유전적 측면과 비유전적 측면의 이질성을 간접적으로 입증함으로써 천식의 유전자 연관성 연구에 있어서 표현형 분류 기준 설정의 중요성을 재차 확인시켜 주었다. 본 연구에서는 16번, 27번 유전자형 이외의 다른 SNP에 대한 정보가 없지만, 본 연구에서 조사하지 않은 34번과 164번 유전형의 변이는 극히 희박하다고 알려져 있으므로[4] 이들 변이는 본 연구의 통계적 의의에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

결론적으로 β_2-아드레날린 수용체 유전자가 BHR을 유발하

는 유전자적 배경을 가지면서 천식 질병을 조절하는 역할을 하고 있음을 시사함과 아울러 천식의 유전자 연관성을 연구함에 있어 천식의 중간 표현형 분류 기준 설정 방법이 중요함을 보여준 것으로서 그 의의가 크다.

요 약

목 적 : 본 연구에서는 현증 천식 환자의 BHR에는 기도 염증이 중요한 요인으로 작용하기 때문에 β_2-아드레날린 수용체 유전자와의 연관성이 나타나지 않지만, 청소년기 천식 관해 상태에서 지속되는 BHR에는 상대적으로 유전적인 영향이 강하기 때문에 β_2-아드레날린 수용체 유전자와의 연관성이 나타날 것이라는 가설을 세우고, 이를 검증해 보고자 하였다.

방 법 : 장기간 천식 관해 상태(최근 2년간 천식 증상이 없고 치료가 필요 없었던 경우)에서 BHR이 지속되는 청소년 202명(천식 관해군), 현증 천식 청소년 182명(현증 천식군), 정상군 200명을 대상으로, 메타콜린 기관지 유발검사와 피부단자시험을 시행하였으며 혈청 총 IgE를 측정하였다. β_2-아드레날린 수용체 유전자의 일배체형 분석을 위해 아미노산 16번과 27번을 포함하고 있는 β_2-아드레날린 수용체 유전자 부위를 polymerase chain reaction(PCR)으로 증폭한 뒤, 16번 유전형은 allele specific PCR, 27번 유전형은 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법으로 분석하였다.

결 과 : Gly 동형접합자(homozygote)의 빈도는 정상군에서 14.5%, 현증 천식군에서 18.1%, 천식 관해군에서 24.2%로 증가하는 경향이 관찰되었으며(P=0.01), 현증 천식군과 정상군 사이에서는 차이가 없었지만 천식 관해군과 정상군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.01). Gly16-Gln27 일배체형 빈도는 정상군에서 36.5%, 현증 천식군에서 40.4%, 천식 관해군에서 44.6%로 증가하는 경향이 관찰되었으며(P=0.02), 현증 천식군과 정상군 사이에서는 차이가 없었지만 천식 관해군과 정상군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.02). 천식 관해군에서 Gly16-Gln27 일배체형의 수가 증가함에 따라 PC_{20} 기하 평균값이 유의한 차이를 보임으로써(P=0.02) Gly16-Gln27 일배체형과 PC_{20} 사이의 연관성이 관찰되었으나 현증 천식군에서는 이러한 연관성이 관찰되지 않았다.

결 론 : β_2-아드레날린 수용체 유전자가 BHR을 유발하는 유전자적 배경을 가지면서 천식 질병을 조절하는 역할을 하고 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1) Sandford A, Weir T, Pare P. The genetics of asthma. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:1749-65.
2) Longo G, Strinati R, Poli F, Fumi F. Genetic factors in nonspecific bronchial hyperreactivity. Am J Dis Child 1987; 141:331-4.
3) Kim SH, Oh SY, Oh HB, Son SW, Chang YS, Kim YK, et al. Association between β_2-adrenoreceptor polymorphism and asthma phenotypes in the general population. J Asthma Allergy Clin Immunol 2001;21:1152-60.
4) Reihsaus 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 1993;8:334-9.
5) Enright PL, Lebowitz MD, Cockroft DW. Physiologic measures: pulmonary function tests. Asthma outcome. Am J Respir Crit Care Med 1994;149(2 Suppl):9S-18S.
6) Fowler SJ, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and β_2-receptor genotype. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1318-22.
7) Hall IP, Wheatley A, Wilding P, Liggett SB. Association of Glu 27 β_2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. Lancet 1995;345:1213-4.
8) Ramsay CE, Hayden CM, Tiller KJ, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN. Polymorphisms in the β_2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness. Clin Exp Allergy 1999;29:1195-203.
9) D'Amato M, Vitiani LR, Petrelli G, Ferrigno L, di Pietro A, Trezza R, et al. Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with β_2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. A population study. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:1968-73.
10) Emala CW, McQuitty CK, Eleff SM, Hopkins-Price P, Lawyer C, Hoh J, et al. Asthma, allergy, and airway hyperresponsiveness are not linked to the β_2-adrenoceptor gene. Chest 2002;121:722-31.
11) Summerhill E, Leavitt SA, Gidley H, Parry R, Solway J, Ober C. β_2-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:599-602.
12) von Mutius E. Progression of allergy and asthma through childhood to adolescence. Thorax 1996;51 Suppl 1:3-6.
13) Murray AB, Ferguson AC, Morrison B. Airway responsiveness to histamine as a test for overall severity of asthma in children. J Allergy Clin Immunol 1981;68:119-24.
14) Boulet LP, Turcotte H, Brochu A. Persistence of airway obstruction and hyperresponsiveness in subjects with asthma remission. Chest 1994;105:1024-31.
15) Koh YY, Sun YH, Lim HS, Kim CK, Hong SJ. Effect of inhaled budesonide on bronchial hyperresponsiveness in adolescents with clinical remission of asthma. Chest 2001; 120:1140-6.
16) Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Factors associated with bronchial hyperresponsiveness in Australian adults and children. Eur Respir J 1992;5:921-9.
17) Koh YY, Kang EK, Kang H, Yoo Y, Park Y, Kim CK. Bronchial hyperresponsiveness in adolescents with long-term asthma remission: importance of a family history of bronchial hyperresponsiveness. Chest 2003;124:819-25.
18) Koh YY, Kang H, Nah KM, Kim CK. Absence of asso-

ciation of peripheral blood eosinophilia or increased eosinophil cationic protein with bronchial hyperresponsiveness during asthma remission. Ann Allergy Asthma Immunol 2003;91:297-302.
19) Yoon KA, Lim HS, Koh YY, Kim H. Normal predicted values of pulmonary function tests in Korean school aged children. J Korean Pediatr Soc 1993;36:25-37.
20) Prieto L, Berto JM, Gutierrez V. Airway responsiveness to methacholine and risk of asthma in patients with allergic rhinitis. Ann Allergy 1994;72:534-9.
21) Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, Rosenthal RR, Sheffer AL, et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. J Allergy Clin Immunol 1975; 56:323-7.
22) Hong SJ, Kim BS, Kim JH, Oh HB, Lee MS, Choi SO, et al. β_2-adrenoceptor polymorphisms between asthmatic and normal children in Korea. Pediatr Allergy Respir Dis (Korea) 2002;12:253-62.
23) Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, et al. β_2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:787-91.
24) Ulbrecht M, Hergeth MT, Wjst M, Heinrich J, Bickeboller H, Wichmann HE, et al. Association of β_2-adrenoreceptor variants with bronchial hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:469-74.
25) Choudhry S, Ung N, Avila PC, Ziv E, Nazario S, Casal J, et al. Pharmacogenetic differences in response to albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with asthma. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:563-70.
26) Gao JM, Lin YG, Qiu CC, Liu YW, Ma Y, Liu Y. β_2-adrenergic receptor gene polymorphism in Chinese Northern asthmatics. Chin Med Sci J 2004;19:164-9.
27) Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S, Erickson R. Association between genetic polymorphisms of the β_2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. J Clin Invest 1997;100:3184-8.
28) Martinez FD. Complexities of the genetics of asthma. Am J Respir Crit Care Med 1997;156(4 Suppl):117S-22S.
29) Rigoli L, Salpietro DC, Lavalle R, Cafiero G, Zuccarello D, Barberi I. Allelic association of gene markers on chromosome 11q in Italian families with atopy. Acta Paediatr 2000; 89:1056-61.
30) Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggette SB. Influence of β_2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;13:25-33.
31) Oostendorp J, Postma DS, Volders H, Jongepier H, Kauffman HF, Boezen HM, et al. Differential desensitization of homozygous haplotypes of the β_2-adrenergic receptor in lymphocytes. Am J Respir Crit Care Med 2005;172: 322-8.
32) 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 1995;95:1635-41.
33) Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human β_2-adrenergic receptor impart distinct agonist promoted regulatory properties. Biochemistry 1994;33:9414-9.
34) Dewar JC, Wilkinson J, Wheatley A, Thomas NS, Doull I, Morton N, et al. The glutamine 27 β_2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families. J Allergy Clin Immunol 1997;100:261-5.
35) Deichmann KA, Schmidt A, Heinzmann A, Kruse S, Forster J, Kuehr J. Association studies on β_2-adrenoceptor polymorphisms and enhanced IgE responsiveness in an atopic population. Clin Exp Allergy 1999;29:794-9.