RFLP와 DHPLC를 이용한 베체트병 환자에서 Interleukin-6 유전자 다형성의 분석

박상범 · 남윤형 · 이재식 · 강 원 · 장원철*
단국대학교 첨단과학부 화학과 및 기초과학연구소
(2005. 12. 26 접수)

Analysis of Interleukin-6 Gene Polymorphisms in Behcet's Disease Using RFLP and DHPLC

Sang-Bum Park, Youn-Hyoung Nam, Jae-Sik Lee, Won Kang, and Won-Cheoul Jang*
Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute,
Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea
(Received December 26, 2005)

요 약. 베체트병은 혈관염이 특징적인 질환으로 구강궤양, 음부궤양, 안구염증과 관절, 피부, 중추신경계, 위장관 등 여러 장기를 침범할 수 있는 만성 염증성 질환이다. 베체트병의 발병원인이나 기전에 대해 확실히 밝혀지지는 않았으나 유전적인 소인이 있는 사람에서 감염 등 환경적인 요인이 면역 반응에 이상을 일으켜 질병의 여러 증상이 발현된다. 주요조직복합체 (major histocompatibility complex, MHC)와 non-MHC gene 등 다양한 유전자들이 베체트병의 병인으로 관여한다. 이 연구에서는 IL-6의 유전적 다형성이 한국인 베체트병의 감수성에 관여하는지를 확인하였다. 유전자 다형성은 VNTR (variable number of tandem repeat), RFLP (restriction fragment length polymorphism), DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 방법을 이용하여 확인하였다. 실험 결과, 베체트 환자와 대조군에서 IL-6_{prom}의 유전적 다형성은 관련성이 없었지만 IL-6_{vntr}에서는 유전형과 대립형질의 빈도가 다르게 나타났다. IL-6_{vntr}*C 대립유전자가 한국인 베체트병과 연관성이 높게 나타났다. 이런 결과를 확인하기 위해 앞으로 여러 집단과 다른 유전자의 연구가 필요하다.

주제어: BD(behcet's disease), IL-6, DHPLC, RFLP, VNTR

ABSTRACT. Behcet's disease (BD) is a systemic vasculitis characterized by recurrent oral and genital ulcers, and ocular inflammation, and which may involve the joints, skin, central nervous system and gastrointestinal tract. Although the exact pathogenesis for BD is not completely understood, it has been suggested that the disease is triggered in genetically susceptible individuals by environmental factors, such as microbial agents. It is noted that multiple genes, including MHC (major histocompatibility complex) and non-MHC genes, are implicated in the pathogenesis of BD. This study tries to determine whether IL-6 gene polymorphisms are associated with susceptibility to Behcet's disease in Koreans. Gene polymorphisms were typed by VNTR (variable number of tandem repeat), RFLP (restriction fragment length polymorphism), DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography). There were no evidences for genetic association conferred by the IL-6_{prom} polymorphism. However, significant differences in the IL-6_{vntr} genotype and allele frequencies were found between patients with BD and controls. The IL-6_{vntr}*C allele appeared to be an additional susceptibility gene to Korean BD. Further studies in other populations and gene are required to confirm these results.

Keywords: BD(behcet's disease), IL-6, DHPLC, RFLP, VNTR

서 론

베체트병은 구강 궤양, 음부 궤양, 및 안구 증상 외에도 피부, 혈관, 위장관, 중추신경계, 심장 및 폐 등 여러 장기를 침범할 수 있는 만성 염증성 질환으로 매우 다양하고 복합적인 질환으로 인식되어 있다.^{1,2} 정확한 발병 원인이나 기전은 밝혀지지 않았으나 오래 전부터 유전적인 소인이 있는 환자에서 환경적인 요인이 가세하여 면역 반응을 활성화 시키고 결과적으로 여러 임상 증상이 유발된다고 추정되고 있다. 베체트병은 여러 유전자가 질병의 발생에 관여할 것으로 여겨지며 그 중에서도 가장 긴밀한 유전적인 연관성을 보여주는 유전자는 HLA-B51로서 이는 우리나라를 포함한 옛 Silk Road에 인접한 나라에 발생하는 환자에 중요한 유전인자로 알려져 있다. 일본의 Ohno는 베체트병을 실크로드 병(Silk Road disease)이라고 명명하였다. 우리나라 환자에서는 약 50% 가량에서 HLA-B51이 양성이다. 그러나 터키의 Glu 등은 HLA-B51을 포함한 HLA-B locus가 베체트병의 발생에 기여하는 정도가 20% 이하라고 보고하였고 HLA-B51 이외의 다른 MHC 유전인자나 non-MHC 유전인자가 질병의 발생에 관여함을 암시하였다.⁵⁻¹⁰ 최근에는 endothelial nitric oxide synthases gene polymorphism (eNOS), intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms (ICAM) 및 IL-1 gene cluster polymorphisms 등과 같이 MHC 유전자가 위치하는 6번 염색체 이외의 다른 염색체에 존재하는 유전인자의 변이도 베체트병의 발생에 기여함이 보고되고 있다.¹¹⁻¹²

우리나라에서는 제대로 된 유병률은 아직 보고가 없는데 류마티스 내과에 내원한 환자수를 보면 10만명당 50-100명 정도의 환자가 있으리라고 추정할 수 있다. 우리 나라 베체트병 환자는 중동 지역에서 발생하는 환자의 임상적 특징과 차이가 있다. 질병이 30대 초반에 발병하고 여자가 남자보다 1.5-2배 가량 많다. 또한 폐설지 반응은 30-40% 가량에서 양성이며, 위장관 궤양의 발생 빈도가 15-20% 정도로 비교적 흔하지만 안구나 중요한 혈관을 침범하는 환자는 적은 것으로 알려져 있다.¹³ 7p21에 위치한 interleukin (IL) 6 유전자는 염증반응과 면역반응의 중요한 조절자이고, 또한 IL-6 유전자 다형성이 여러 만성 염증성 질환 및 자가 면역 질환과 연관성이

있다고 알려져 있으며, 활동기 베체트병 환자의 혈액 및 뇌척수액에서 IL-6가 증가되어 있고 IL-6 mRNA 발현도 증가되어 있다고 보고되고 있다. 따라서 이 연구에서는 한국인 베체트병에서 IL-6vnr (variable number of tandem repeat polymorphisms in the 3' flanking region of the IL6 gene)와 IL-6prom (single nucleotide polymorphism at -174G/C in the IL6 gene promoter)의 연관성을 분석해 보았다. 이러한 연관성이 HLA-B51 양성인 환자와 음성인 환자에서 IL-6의 유전자 다형성의 역할을 규명하여, 베체트병의 심한 증상의 발생에 각 유전자들이 기여하는지를 알아보았다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 단국대학교 류마티스 내과에서 international study group의 진단기준을 만족하는 89명의 베체트병 환자와 나이와 남녀비가 일치하는 123명의 건강 대조군을 대상으로 하였다.

시약 및 기기

시약

혈액에서 genomic DNA 추출시 사용한 AccuPrep™ Genomic Extraction Kit, Taq. polymerase, PCR 산물 정제 시 사용한 AccuPrep™ PCR Purification Kit, RFLP 할 때 사용한 제한 효소인 SfaNI는 Bioneer의 제품을 이용하였다. 전기영동 시 사용한 agarose는 QA-Agarose™ (Q-bio gene)을 이용하였고, DHPLC의 이동상으로 사용한 triethylammonium acetate (TEAA)는 Transgenomic사에서, acetonitrile (ACN)은 Merck사에서 구입해 사용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2700 (Perkin-Elmer, USA)를 사용하였고, PCR의 확인은 Agaro Power™ (Bioneer) 전기영동장치로 확인하였다. DHPLC는 WAVE® SYSTEM(Transgenomic, USA)를 사용하였다.

실험 방법

베체트 환자와 정상인 혈액에서 genomic DNA를 추출하여, IL-6 유전자를 PCR 방법으로 증폭한 후

IL-6 $prom$ 는 RFLP와 DHPLC 방법을 이용하여 분석하였고 IL-6 vnt 는 NuSieve agarose gel에서 돌연변이를 확인하였다.

혈액에서 genomic DNA의 추출

AccuPrep™ Genomic Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 추출한 DNA의 농도는 25 ng/ μ l로 일정하게 맞추어 PCR에 사용하고 장기간 보존하기 위해서 -20 °C에 저장해 두었다.

Analysis of IL-6 $prom$ and IL-6 vnt

중합효소연쇄반응(PCR). Forward primer 5'-GAGCCA-GAACACAGAAGAAC-3'와 reverse primer 5'-CAGAATGAGCCTCAGACATC-3'을 이용하여 IL-6 $prom$ 의 PCR 산물을 얻었고 forward primer와 5'-GCAACTTTGAGTGTGTCACG-3' reverse primer 5'-TGACGTGATGGATGCAACAC-3'을 이용하여 IL-6 vnt 의 PCR 산물을 각각 25 μ l의 PCR 반응 용액을 0.2 mL PCR 반응 튜브에 넣은 후, DNA thermal cycler (Applied Biosystems, USA, GeneAmp® PCR System 2700, USA)를 이용해서 DNA를 증폭시켰다. 그런 다음 바이오니아의 AccuPrep™ PCR Purification Kit와 DNA PrepMate™ Kit를 사용하여 PCR product를 정제하였다.

RFLP 분석. IL-6 $prom$ 의 PCR 산물을 제한 효소 SfaNI(Bioneer, Korea)를 이용하여 분석하였고 제한 부위는 5' g'gacc 3'이며 반응은 GeneAmp® PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 0.2 mL 반응 튜브에 RFLP 반응 용액 10 μ l을 넣고 제한 효소 반응 온도인 37 °C에서 3시간, 제한 효소가 비활성되는 온도인 65 °C에서 20분 동안 반응시켜 PCR 산물을 절단하였다. 그런 다음 2%(w/v) 아가로스 겔을 이용하여 Mupid- α (Advance, Japan) 전기영동장치로 RFLP 산물을 분석하였다.

RFLP-size based DHPLC 방법에 의한 분석. IL-6 $prom$ 의 PCR 산물을 정제 과정을 거치지 않고 곧바로 RFLP 한 후 크기에 기초한 DHPLC 방법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. 컬럼의 재현성과 완충 용액 이동상의 상태를 확인하기 위해 size standard (Trangenomic, USA)를 5 μ l씩 3번 주입하여 분석하였다. 이 후 RFLP 산물을 컬럼 오븐 온도 50 °C에서 이동상의 속도를 0.75 mL/min로 하여 5 μ l 주입해 WAVEMAKER™ software에 의해 정해진 gradient 조건으로 분석하였고 UV 검출기로 260 nm에서 검출하였다.

Double strand based DHPLC를 이용한 돌연변이 분석. IL-6 $prom$ 의 PCR 산물을 95 °C에서 10분 동안 변성시킨 후에 상온에서 45분 동안 천천히 식혀서 이형집합체를 형성 시킨 후에, 컬럼 오븐의 온도를 58 °C로 맞추고 시료를 5 μ l 주입하여 260 nm에서 유전자형을 판별하였다.

NuSieve agarose gel electrophoresis. IL-6 vnt 의 PCR 산물은 3%(w/v) NuSieve agarose gel (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, Me, USA)을 이용하여 Mupid- α (Advance, Japan) 전기 영동장치로 PCR 산물을 분석하였다. NuSieve agarose를 사용하면 작은 크기 차이의 단편도 전기영동상에서 구분이 가능하였다.

통계분석. 검사 결과들을 SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 chi-square 법 또는 t-test로 검증하고, 각 allele이 베체트병의 발생에 얼마나 기여하는지 odds ratio와 95% confidence interval을 구하였다. 또한 p 값을 구하고 필요한 경우 p 값에 검사를 시행한 allele들의 수를 곱하여 corrected $p(p_{corr})$ 을 계산하여, 이 값들이 0.05 이하인 경우 통계적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

Analysis of IL-6 $prom$

RFLP 분석

IL-6 $prom$ 를 PCR 한 후, SfaNI 제한 효소를 이용하여 RFLP 방법으로 분석한 후 아가로스 전기영동법으로 확인하였다. Fig. 1에서 lane 1은 DNA molecular weight marker이고, lane 2는 제한 효소 처리를 하지 않은 568 bp PCR 산물이다. Lane 3은 G/C genotype으로 568 bp, 379 bp, 189 bp의 3개의 밴드로 분석되었고, lane 4는 G/G genotype으로 379 bp, 189 bp의 2개의 PCR 밴드가 관찰되었다.

Size based DHPLC 분석

RFLP 처리한 PCR 산물을 정제 과정을 거치지 않고 변성시키지 않은 상태로 DHPLC로 분석하였다. 컬럼의 온도는 50 °C를 유지해 PCR 산물이 이중나선 형태로 크기에 따라 분리 되도록 하였다. 분석 결과, Fig. 2에서와 같이 G/C genotype은 RFLP의 결과와 같이 3개의 피크로 나타났고, G/G genotype은 2개의 피크로 분석되었다.

Fig. 1. Analysis of a single nucleotide polymorphism at -174 (G/C) in the IL-6 gene promoter. Three DNA fragments are shown after digestion with SfaNI: lane 1, size marker; lane 2, undigested 568 bp PCR product; lane 3, G/C genotype; lane 4, G/G genotype.

Double strand based DHPLC 분석

RFLP 처리한 PCR 산물을 정제 과정을 거치지 않고 95 °C에서 10분 동안 변성시킨 후 천천히 45분 동안 상온에서 이형집합체를 형성시킨 후 DHPLC로 분석하였다. 컬럼의 온도는 58 °C를 유지해 DNA의 이중나선이 부분적으로 풀린 형태를 유지해 다형성을 검출하였다. 분석 결과 Fig. 3에서와 같이 G/C genotype은 3개의 피크로 나타났고, G/G genotype은 단일 피크의 형태로 검출되었다.

Analysis of IL-6vnt

IL-6vnt에서는 760 bp (allele A), 680 bp (allele B), 640 bp (allele C), 610 bp (allele D)의 4개의 대립형질이 존재한다. NuSieve agarose 전기영동을 이용하여 대립형질의 빈도를 확인하였다(Fig. 4). 분석 결과 정상인 샘플에서는 AB, 2 (1.6%); BB, 117 (95.1%); BC, 3 (2.4%); CC, 1 (0.8%)로 확인되었고, 배제된 환

Fig. 2. Elution profiles of RFLP analysis of the G to C transition located at the -174G/C of IL-6prom gene: a) undigested, b) G/C genotype, c) G/G genotype.

Fig. 3. Chromatograms produced DHPLC analysis of wild-type and mutant-type in IL-6prom.

자 샘플에서는 BB, 77 (86.5%); BC, 12 (13.5%)로 나타났다. AB type과 CC type은 매우 빈도가 낮았고 정상인 샘플에서만 관찰되었다. 또한 BB type과 BC type이 98.6%로 높은 빈도를 차지하였다. 최종적으로 베체트 환자에서 BC genotype과 C allele가 정상 샘플보다 높은 빈도로 나타났다(Table 2).

결론

베체트병 환자 샘플 89개와 건강한 정상인의 샘플 123 개에서 DNA를 추출하여 PCR 하였다. IL-6prom과 IL-6vntnr, HLA-B51 gene과 유전형을 RFLP방법과 DHPLC방법으로 분석하였다. 그 결과 IL-6prom과 베체트병은 유전적 연관성이 없었지만, IL-6vntnr은 베체

Fig. 4. PCR genotyping of a variable number of tandem repeat polymorphism in the 3' flanking region of the IL-6 gene. Lane 1 is for size marker, and lane 2 to 10 represents the genotype BB, BB, BC, BB, BB, BB, AB, BB, and CC, respectively.

Table 2. Genotype and allele frequencies of the IL-6vntnr polymorphisms in the Behcet's group and controls

	Controls No (%)	Behcet's group No (%)
Genotype		
BB	117 (97.5)	77 (86.5)
BC	3 (2.5)	12 (13.5) [†]
Allele		
B	239 (98.0)	166 (93.3)
C	5 (2.0)	12 (6.7) [‡]

[†] $P=0.005$ ($P_{\text{corr}}=0.01$) and [‡] $P=0.022$ ($P_{\text{corr}}=0.044$) for comparisons of the IL-6vntnr between Behcet's group and controls.

트병 환자 그룹에서 남성과 여성에서 차이점을 가지고 있었고 (BB: 남성, 45.5% vs. 여성, 54.5%; BC: 남성, 8.3% vs. 여성, 91.7%; $P=0.024$, $P_{\text{corr}}=0.048$) HLA-

Table 1. Association between Behcet's disease (BD) and the IL-6vntnr polymorphism after stratification of the subjects according to the results of HLA-B51 testing

	HLA-B51 negativity		HLA-B51 positivity	
	Control No (%)	BD No (%)	Control No (%)	BD No (%)
Genotype				
BB	103 (97.2)	33 (82.5)	14 (100)	44 (89.8)
BC	3 (2.8)	7 (17.5) [*]	0	5 (10.2) [†]
Allele				
B	211 (97.7)	73 (91.3)	28 (100)	93 (94.9)
C	5 (2.3)	7 (8.8) ^{**}	0	5 (5.1) [‡]

^{*} $P=0.005$ ($P_{\text{corr}}=0.01$) and ^{**} $P=0.02$ ($P_{\text{corr}}=0.04$) for comparison between Behcet's group and controls in the HLA-B51-negative subjects [†] $P=0.578$ and [‡] $P=0.586$ for comparison between Behcet's group and controls in the HLA-B51-positive subjects.

Table 3. Haplotype analysis between the IL-6prom and the IL-6vnt* polymorphisms using the EII program

	Haplotype frequency in control subjects	Haplotype frequency in Behcet's group	<i>p</i> *	OR
IL-6prom*G/IL-6vnt*B	0.5067	0.4552	0.296	0.8
IL-6prom*G/IL-6vnt*C	0.0098	0.0673	0.001	7.3
IL-6prom*C/IL-6vnt*B	0.4726	0.4774	0.92	1.0
IL-6prom*C/IL-6vnt*C	0.0108	0.0002	0.17	0.02

**P* values were estimated between subjects with and without each haplotype.

B51 음성인 군에서 부분적으로 차이를 나타냈다(Table 1). 또한 베체트 환자에서 IL-6vnt*C (OR 3.5) 대립형질과 IL-6prom*G/IL-6vnt*C haplotype (OR 7.3)이 높은 빈도로 나타났다(Table 3).

베체트병의 병인에 여러 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 MHC 유전자 외에도 non-MHC 유전자와 베체트병과의 연관성에 대한 많은 연구가 진행되고 있고, 국내에서도 혈관내피 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 유전자 다형성, IL-18 유전자 다형성, SLC11A1 유전자 다형성 및 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 유전자 다형성 등 non-MHC 유전자들이 베체트병의 감수성에 영향을 준다는 연구들이 보고되었다. 최근에 영국에서 보고된 연구에서 TNF 유전자의 촉진체(promoter)에 위치한 TNF-1031C 대립유전자가 HLA-B51과 무관한 베체트병의 위험 인자임을 보고하였고, 국내에서는 Lee 등이 TNFα-308 G/A, TNFβ+252 G/A 및 TNFR2 196 R/M에 관한 연구에서 베체트병과의 연관성이 없는 것으로 보고하였다. 베체트병의 좀 더 정확한 병인을 밝히기 위해 앞으로 IL6vnt*과 다른 유전자들과의 상관 관계를 비교 분석하거나 여러 민족 집단과 다른 위치의 MHC 유전자 및 non-MHC 유전자의 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

이 연구는 2004학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

인용문헌

- Verity, D. H.; Marr, J. E.; Ohno, S.; Wallace, G. R.; Stanford MR. *Tissue Antigens*, 1999, 5421, 3-20.

- Bowcock, A. M.; Kidd, J. R.; Lathrop, G. M.; Daneshvar L.; May LT; Ray A, et al. *Genomics*, 1988, 3, 8-16.
- Xing, Z.; Gaudie, J.; Cox, G.; Baumann, H.; Jordana, M.; Lei, X. F., et al. *J Clin Invest*, 1998, 101, 311-20.
- Fishman, D.; Faulds, G.; Jeffery, R.; Mohamed-Ali, V.; Yudkin, J. S.; Humphries, S., et al. *J Clin Invest*, 1998, 102, 1369-76.
- Ogilvie, E. M.; Fife, M. S.; Thompson, S. D.; Twine, N.; Tsoras, M.; Moroldo, M., et al. *Arthritis Rheum*, 2003, 48, 3202-6.
- Murray, R. E.; McGuigan, F.; Grant, S. F.; Reid, D. M.; Ralston, S. H., *Bone*, 1997, 21, 89-92.
- Linker-Israeli, M.; Wallace, D. J.; Prehn, J.; Michael, D.; Honda, M.; Taylor, K. D., et al. *Genes Immun*, 1999, 1, 45-52.
- Bagli, M.; Papassotiropoulos, A.; Knapp, M.; Jessen, F.; Luise, R. M.; Maier, W., et al. *Neurosci Lett*, 2000, 283, 109-12.
- Georges, J. L.; Loukaci, V.; Poirier, O.; Evans, A.; Luc, G.; Arveiler, D., et al. *J Mol Med*, 2001, 79, 300-5.
- Rauramaa, R.; Vaisanen, S. B.; Luong, L. A.; Schmidt-Trucksass, A.; Penttila, I. M.; Bouchard, C., et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 2657-62.
- Yamakawa, Y.; Sugita, Y.; Nagatani, T.; Takahashi, S.; Yamakawa, T.; Tanaka, S., et al. *J Dermatol Sci*, 1996, 11, 189-95.
- Hirohata, S.; Oka, H.; Mizushima, Y., *Cell Immunol*, 1992, 140, 410-9.
- Chang, H. K.; Cheon, K. S., *J Korean Med Sci*, 2002, 17, 371-4.