

포르말린 고정 파라핀 포매된 유육종증 환자의 조직을 이용한 안지오텐신 전환 효소 유전자 다형성 검색

김태숙 · 홍희연 · 이인철¹

인하대학교 의과대학 병리학교실
¹울산대학교 의과대학 서울아산병원 병리과

접 수 : 2003년 3월 24일
게재승인 : 2003년 7월 7일

책임저자 : 김 태 숙
우 400-103 인천시 중구 신흥동 3가 7-241
정석빌딩 B동
인하대학교 의과대학 병리학교실
전화: 032-890-0943
Fax: 032-890-0944
E-mail: tskim@inha.ac.kr

*이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-003-F00026).

유육종증은 형태학적으로 비건락 괴사성 육아종의 형성을 특징으로 하는 전신 질환이다.¹ 이는 림프절, 폐, 피부, 안구 등을 침범하여 섬유화를 초래함으로써, 해당 장기의 기능 손실을 유발한다.² 특히 비건락 괴사성 육아종을 형성하는 주된 구성요소인 유상피세포가 안지오텐신 전환효소(angiotensin converting enzyme: ACE)를 합성 분비함으로써 유육종증 환자에서 안지오텐신 전환효소 수치가 증가한다는 점은 잘 알려졌다. 일반적으로 안지오텐신 전환효소는, 폐와 신장 혈관 내피세포 등에서 합성되어 혈류 역동학적 변화에 신속하게 반응하여 안지오텐신 II의 생성에 기여함으로써, 전신 혈압 조절 및 전해질 평형 유지에 기여한다. 이는 탐식세포, 섬유모세포 및 근위 신세뇨관 상피세포 등에서도 합성되는데, 이들 세포에서 생산되는 안지오텐신 전환효소는 이들 세포 주변의 국소적인 안지오텐신 II 생성에 기여하며, 염증 반응의 지속과 섬유화의 진행에도 기여한다.

An Analysis for Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphism in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues from Patients with Sarcoidosis

Tae Sook Kim, Hee Yeon Hong and Inchul Lee¹

Department of Pathology, Inha University College of Medicine, Incheon; ¹Department of Pathology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Sarcoidosis is a systemic disease characterized by nonnecrotizing granulomas involving the lung and hilar lymph nodes. Serum angiotensin converting enzyme (sACE) levels in patients with sarcoidosis have been implicated as an indicator of granuloma burden. Recently, it has been found that ACE gene insertion/deletion (ID) polymorphism affects sACE levels in healthy individuals. Moreover, reported sACE levels were highest in the deletion/deletion (DD) genotype. Previous studies to investigate the distribution of ACE genotypes according to ethnic groups have revealed various results and have caused controversy. **Methods :** Polymerase chain reactions were performed to determine the ACE genotypes in fifteen formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from patients with sarcoidosis. **Results :** The distribution of ACE gene (I/D) polymorphism in patients with sarcoidosis was significantly different from that in normal controls. The DD genotype was more frequent in patients with sarcoidosis than in the normal controls. The D allele frequency was also higher in patients with sarcoidosis than in the normal controls. The relative risk of sarcoidosis was higher in DD homozygotes. **Conclusions :** These results suggested the ACE gene I/D polymorphism may play an important role in the pathogenesis and progression of sarcoidosis.

Key Words : Sarcoidosis-Gene-Polymorphism-Angiotensin converting enzyme-Polymerase chain reaction

실제로 유육종증 환자에서 흔히 증가하는 혈청 안지오텐신 전환 효소 수치는 환자의 전신 비건락 괴사성 육아종의 양에 비례하며, 또한 유육종증의 활성도를 잘 반영한다는 점과, 폐 섬유화와 연관성이 있다는 점 때문에 장기적인 예후를 예측할 수 있는 유용한 지표로 활용되었다.³ 그러나 전신 육아종의 양이 비슷한 환자들 사이에서도 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 다양한 점, 유육종증 환자들 중 일부에서 육아종의 양과 무관하게 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 정상인 점 등이 보고되어,⁴ 육아종의 양 외에도 혈청 안지오텐신 전환효소 증가에 기여하는 다른 요인이 있으리라 추정하고 있다. 또한, 유육종증 환자에서 폐실질 섬유화가 이미 진행된 경우 오히려 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는 감소한다는 보고들이 있어,^{5,6} 이를 유육종증 환자에서 장기적인 예후 지표로 활용하기에는 많은 제한이 따른다는 점도 지적되었다.

최근 Rigat 등⁷에 의해, 안지오텐신 전환효소 유전자의 삽입/

결손 다형성(angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism)이 정상 성인에서 혈청 안지오텐신 전환효소 수치를 결정한다는 사실이 알려졌다. 즉, 이 유전자 16번째 intron 상에서 염기서열 일부(287 bp)가 삽입, 혹은 결손되었는지에 따라 삽입/삽입(insertion/insertion: II), 삽입/결손(insertion/deletion: ID) 및 결손/결손(deletion/deletion: DD) 등의 세가지 유전자형으로 나누었을 때, 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 II, ID, DD형 순서대로 높아졌다고 보고하였다. 또한 유육종증 환자가 DD 유전자형을 가진 경우, 진단 당시 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 의미 있게 높았다는 연구 결과들이 보고되어,⁸⁻¹⁰ 안지오텐신 전환효소 유전자 다형성이 유육종증의 발생 및 진행 과정에 기여하리라는 추측이 제시되었다. 또한 안지오텐신 전환효소 유전자 다형성 양상은 인종 및 지역 분포에 따라 다르다는 점이 알려졌는데, 유럽 및 미국 백인 정상 성인에서는 D allele의 상대 빈도가, 흑인과 동양인, 특히 일본인에서는 I allele의 상대 빈도가 높았다.¹¹ 이와 같이 이 유전자 D allele의 빈도가 높은 인종 및 지역에서 유육종증의 발생 빈도가 높다는 점은, 이 유전자 다형성이야말로 유육종증의 발생기전에 중요한 역할을 하리라는 점을 더욱 의심하게 한다. 드물게 보고된 바에 의하면 우리나라 정상 성인의 경우는 일본인과 마찬가지로 I allele의 상대 빈도가 높았다고 보고되었으나,⁹ 우리나라 유육종증 환자에서의 안지오텐신 유전자 다형성에 관한 연구는 아직 없다.

이에, 본 연구자들은 유육종증 환자에서 안지오텐신 전환효소 유전자의 다형성 양상을 검색하고 이를 정상 대조군과 비교함으로써, 안지오텐신 전환효소 유전자 다형성이 유육종증 발생 및 진행에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 알아내고자 하였다. 또한 유육종증 환자에서의 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 그 유전자

유형에 따라 달라지는지를 밝히고, 아울러 방사선학적 병기의 진행과 연관이 있는지를 알아내고자 하였다.

재료와 방법

연구 대상

1995년 1월부터 2000년 12월까지 아산재단 서울아산병원 병리과에서 유육종증이라 확진된 20세 이상의 성인 환자들 중, 정기적인 외래 추적 검사와 genomic DNA 추출이 가능했던 15예를 대상으로 하였다. 이들은 모두 종격동내시경 폐문 림프절 생검 또는 개흉 폐생검을 통해 비전락괴사성 육아종 소견을 근거로 하여 진단받았다(Fig. 1). 피부 및 포도막 침범 여부는 피부 생검 및 안과 검진을 통하여 확인하였다. 심장 침범이 있었던 증례는 사후에 부검을 시행하여 확인하였다. 진단 당시 환자들의 나이, 성별, 흡연력, 결핵 병력 및 가족력 및 주된 임상 증상 등을 검색하였다. 임상 증상 중 호흡곤란은 미국 흉부학회에서 제시하는 등급으로 분류하였고, 모든 환자에서 단순 흉부 X-선 소견, 흉부 고해상 전산화 단층 촬영(high resolution computed tomography: HRCT), 혈청 안지오텐신 전환효소 수치 및 혈청 칼슘 수치, 투베르쿨린 검사 결과 등을 임상 기록지를 통하여 조사하였다. 일부 환자는 스테로이드 치료를 받았는데, 그 기준은 다음과 같았다. 첫째, 심장, 중추 신경계, 눈 등 폐의 유육종증 침범의 증거가 있었던 경우, 둘째, 호흡곤란의 정도가 미국흉부학회 등급 3 이상으로 심했던 경우, 셋째, FVC, FEV₁, DL_{CO}가 정상 예측치의 70% 이하로 감소한 경우 등이었다. 환자들은 3개월마다 정기적으로 외래를 방문하였으며, 문진을 통해 임상 증상의 악

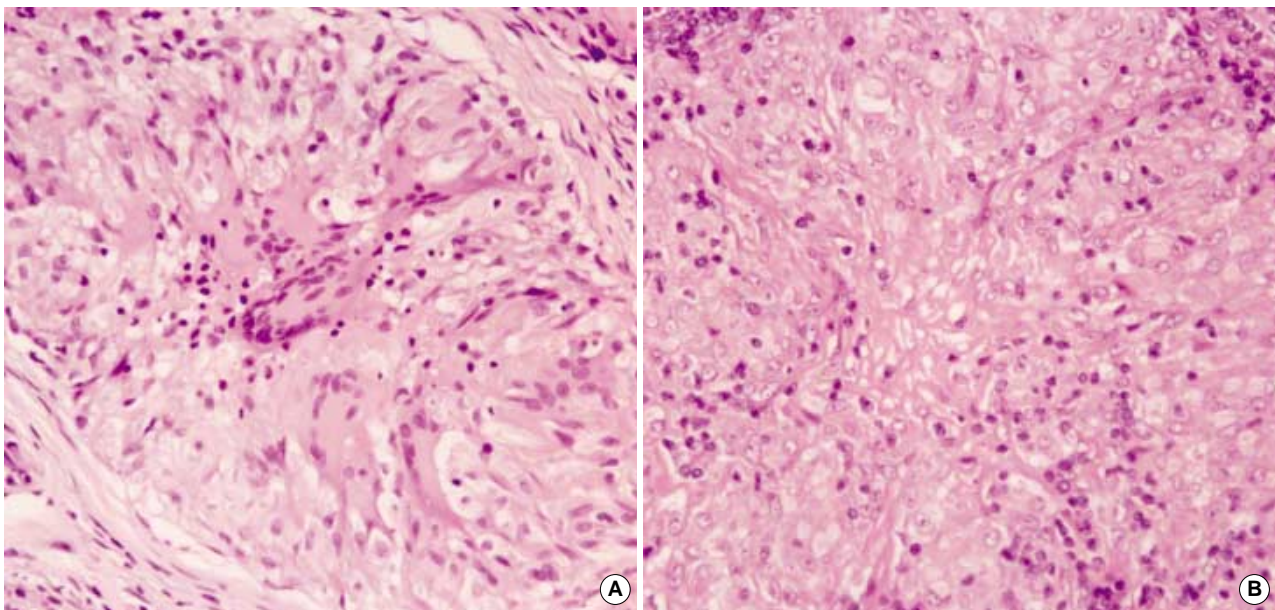


Fig. 1. (A) Characteristic pathologic features of sarcoid granulomas including mature epithelioid cells and multinucleated cells. (B) Note the intermingled fine collagenous deposition in the intervening stroma.

화여부, 단순 흉부 X-선 사진, 혈청 안지오펜신 전환효소 검사 혹은 폐기능 검사 등을 시행하였다.

Genomic DNA 분리 및 정제

4°C 10% 중성 포르말린 완충액에서 18시간 고정하고 파라핀 포매된 조직을 5 µm 두께로 박절하되, 조직의 단면적이 100 mm² 보다 작은 경우에는 총 100 µm, 100 mm² 보다 큰 경우에는 총 25 µm을 박절하였다. 이 때 탈파라핀 과정이 원활하게 진행되도록 하기 위하여 박절 조직 절편의 두께가 한 번에 5 µm를 넘지 않도록 하였다. 채취한 조직을 1.5 mL Eppendorf tube (EP tube)에 넣고, 크실렌 1 mL를 넣어 20-30회 급속 회전시켰다. 14,000 rpm으로 5분간 원심분리하되, 조직이 투명해질 때까지 반복하였다. 무수 에탄올 1 mL를 넣어 역시 14,000 rpm으로 5분간 원심분리하되 조직이 흰숄털처럼 보일 때까지 반복하였다. EP tube를 상온에서 뚜껑을 열어 두어 내용물에 포함된 에탄올이 증발하도록 하였다.¹³

포르말린 고정, 파라핀 포매 조직으로부터 채취된 각 조직세포들에서 genomic DNA를 추출해내기 위하여 다음에 기술된 방법에 따라 실험을 진행하였다.¹⁴ 단백질 분해 완충액[proteinase K in TE buffer: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Tween 20, 5 mM CaCl₂, 0.15 mg/mL PK, pH 8.0] 300 µL를 넣고 56°C에서 18시간 반응시켜 EP tube 내의 조직 절편에 포함된 세포 단백질이 충분히 분해되도록 하였다. 98°C에서 10분간 끓여 proteinase K를 완전히 불활성화시킨 후, 7,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 채취하여 분광광도계(UV Spectrophotometer)로 흡광도를 재어 DNA 농도를 측정한 후 -20°C에서 보관하였다.

Genomic DNA로부터 불순물과 단백질을 제거하기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다.¹⁵ 조직 단백질과 그 외 불순물이 포함된 genomic DNA에 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 용액을 1:1 부피가 되도록 넣은 후, 3-5회 정도 뒤집어 섞는다. 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 유기성 기저층과 수용성 상층을 분리하였다. 상층액을 새 EP tube로 옮긴 후, 상층액에 대하여 1/2 부피의 6 M ammonium acetate, 5/2배 부피 무수 에탄올을 넣어 수용성 층으로부터 DNA를 분리하였다. 2배 부피의 무수 에탄올을 넣고 -70°C에서 18시간 이상 보관하였다. 4°C에서 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 DNA 침전물을 관찰하였다. 차갑게 해둔 70% 에탄올을 넣어 14,000 rpm에서 5분간 원심분리함으로써 DNA 침전물의 표면을 씻어 냈다. 정제된 DNA의 일부를 채취하여 동량의 3차 증류수를 넣어 녹인 후, 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 DNA의 농도 및 총량을 계산하였다. 단, 파라핀 블록에 포함된 조직의 총 면적이 25 mm² 이하로 매우 작은 경우, 10 µm 두께 10장을 박절하여 총 100 µm 두께의 조직을 얻었다. 이 경우 유기 용매인 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 방법에 의한 DNA 분리 과정을 거치지

않고 다음 과정을 시행하였다.¹⁶ 즉, 용액의 1/2부피 6 M sodium acetate와 5/2배 부피의 무수 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 18시간 이상 방치한 후, 4°C에서 14,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. DNA 침전물이 관찰되면 70% 에탄올을 넣고 14,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 DNA 침전물의 표면을 씻어 내었다. 이후의 방법은 위와 동일하였다.

안지오펜신 전환효소 유전자 다형성 검색을 위한 연쇄 증합효소 반응

먼저, 이미 실험을 통해 잘 알려진 안지오펜신 전환효소 올리고뉴클레오타이드 시발체 쌍을 이용하여 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, USA)에서 연쇄 증합효소 반응을 시행하되 시발체 쌍의 염기 서열은 다음과 같았다.¹⁷

Sense primer: 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'

Antisense primer: 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'

염기서열의 분리를 유도하기 위해 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 다시 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 2분간 반응시키는 과정을 모두 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. 연쇄 증합효소 반응이 끝나면, 반응 산물의 일부를 채취하여 ethidium bromide가 섞인 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후, 490 혹은 190 bp 크기에 해당하는 DNA 띠를 관찰하였다(Fig. 2A). 이 때 결손 서열만이 관찰되는 경우, 삽입 서열의 존재하더라도 연쇄 증합효소 반응의 제한을 받아 삽입 서열에 해당하는 DNA 띠가 검출되지 않는 경우가 있으므로, 다음과 같이 삽입 서열의 존재를 검증하기 위한 이차 연쇄 증합효소 반응을 시행하였다. 이 때 시발체 쌍의 염기서열은 다음과 같았다.¹⁸

Sense primer: 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3'

Antisense primer: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'

이 때 반응 전 염기서열 분리를 위해 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 45초, 73°C에서 1분, 73°C에서 1분간 반응시키는 과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 73°C에서 10분간 더 반응시켰다. 두 번째 연쇄 증합효소 반응을 시행한 경우에는 앞서의 연쇄 증합효소 반응에서 미처 관찰할 수 없었던 삽입 서열인 335 bp의 DNA 띠가 관찰되는지를 확인하였다(Fig. 2B).

자료 분석 및 통계 처리

유육종증 환자군 및 정상 대조군에서의 안지오펜신 전환효소 유전자 유전자형의 빈도 분포 분석은 χ^2 -test 및 Fisher's exact test를, 유육종증 환자에서 세 가지 유전자형에 따른 혈청 안지오펜신 전환효소 수치 평균의 비교는 Kruskal-Wallis test를 이

용하였으며, 각 유전자형에 따른 방사선학적 병기의 비교는 χ^2 -test를 이용하였다. 각 변수는 평균±표준오차로 표기하였으며, p value가 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의하다고 간주하였다.

결 과

유육종증 환자군 및 대조군에서의 임상적 소견

유육종증 환자군의 평균 나이는 46 ± 24 세였으며, 남자가 4명, 여자가 11명이었다. 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는 59 ± 106 IU/L였다. 방사선학적 소견상 진단 당시 제 1병기가 9명, 제 2병기는 1명, 제 3병기는 4명, 제 4병기는 0명이었다. 그리고 3년간의 치료 혹은 추적 관찰 기간 중 병기의 진행이 발견된 예는 1명이었으며, 진단 당시의 병기가 지속된 예는 5명, 방사선학적 소견이 감소하거나 완전히 정상화된 예는 7명이었다. 같은 기간 중 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 증가하였던 예는 1명, 정상 범위 내로 감소한 예는 5명이었다. 진단 당시 폐문부 림프절과 폐 실질 외에 다른 장기의 침범이 관찰된 예는 모두 4명(눈 1명, 피부 1명, 심장 1명)이었으며, 이 중 치료 혹은 추적 관찰 기간 중 증상이 사라진 경우는 2명이었다. 정상 대조군으로는 직장 신

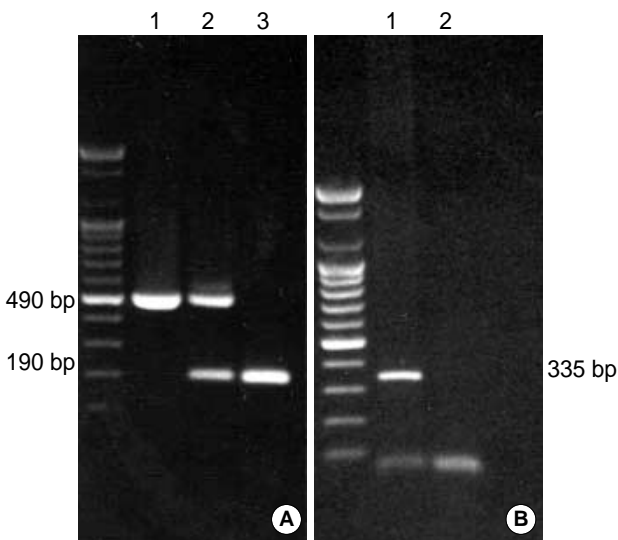


Fig. 2. Determination of angiotensin converting enzyme (ACE) I/D genotypes. (A) The left lane of each panel contains standard DNA markers. Panel A shows the results of representation that the upper band of 490 bp is the I allele and the lower band of 190 bp is the D allele. The ACE II genotype (lane 1) is shown as a single upper band, the ID genotype (lane 2) as double bands, and the DD genotype (lane 3) as a single lower band. (B) Panel B shows the results of confirmation that genotypes with only a D band were true homozygotes rather than mistyped ID heterozygotes due to preferential amplification of the D allele. The sample in lane 1 is a standard for ID (335 bp), followed by a sample in lane 2 identified as DD with the insertion-spanning primer which is previously misclassified as DD.

체 검사에 응한 20-40세의 정상 성인들에서 무작위 추출한 예를 대상으로 하였다(Table 1).

유육종증 환자군 및 대조군에서의 안지오텐신 전환효소 유전자 다형성 비교

유육종증 환자 15명의 안지오텐신 전환효소 유전자형은 II형 3명(20%), ID형 3명(20%), DD형 9명(60%)으로, 정상 대조군 [II형: 9명(45%), ID형: 8명(40%), DD형 3명(15%)]과 비교하였을 때 DD 유전자형의 빈도가 유의하게 높았다. 또한 D allele의 상대 빈도는 유육종증 환자군에서 0.70, 정상 대조군에서 0.35로 역시 의미 있게 높았다(Table 1).

유육종증 환자군에서 안지오텐신 전환효소 삽입/결손 유전자형에 따른 혈청 안지오텐신 전환효소 수치 및 방사선학적 병기 비교

유육종증 환자군에서 안지오텐신 전환효소 유전자형에 따른

Table 1. Clinical characteristics of the patients with sarcoidosis and normal controls

	Sarcoidosis	Normal Controls	p value
Number	15	20	
Age (years)	46.2 ± 24.6	29.9 ± 8.6	<0.05
Sex			
Male	4 [40.0 ± 41.8]	12 [31.3 ± 4.0]	<0.05
Female	11 [48.6 ± 15.6]	8 [27.6 ± 11.7]	<0.05
Extrapulmonary involvement			
Eyes	1	-	
Skin	2	-	
Others	1	-	
ACE genotype			
II	3 (20%)	9 (45%)	
ID	3 (20%)	8 (40%)	
DD	9 (60%)	3 (15%)	<0.05
Allele frequency			
I	0.70	0.65	<0.01
D	0.30	0.35	

I, insertion; D, deletion.

Table 2. The serum angiotensin converting enzyme (ACE) level and radiological stage are correlated with the ACE I/D polymorphism in patients with sarcoidosis

	ACE genotype			p value
	II	ID	DD	
Serum ACE levels (IU/L)	28.1 ± 17.4	66.0 ± 68.5	67.1 ± 126.5	<0.01
Radiological stage				
0-I	3	1	5	<0.01
II-III	0	3	3	
IV	0	0	0	

I, insertion; D, deletion.

혈청 안지오텐신 전환효소 수치는, II형에서 28 ± 17.4 IU/L, DD형에서 67.1 ± 126.5 IU/L로, DD형에서 높았으며 이는 통계학적으로 의미가 있었다(Table 2). 유육종증 환자군에서 진단 당시 방사선학적 병기는 D allele을 가진 환자에서 보다 진행하였다(Table 2).

고 찰

유육종증 환자의 50-60%에서 증가한다고 알려진 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는, 측정 당시의 유육종증의 활성도를 잘 반영하는 것으로 알려져 진단 및 질병의 경과 관찰을 위한 지표로서 활용되어 왔다.³ 그러나 유육종증 환자의 일부에서 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 증가하지 않는다는 점, 유육종증 외 결핵, 규폐증, 베릴륨증 등과 같은 비특이적 육아종성 염증성 질환 환자의 일부에서도 역시 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 증가한다는 점,^{19,20} 유육종증 환자의 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 방사선학적 병기에 비례하여 증가하지 않는다는 점 등으로,²¹ 혈청 안지오텐신 전환효소의 증가가 유육종증의 발생 및 진행에 직접 관여한다고 단정하기 어렵다. 실제로 본 연구에 포함된 증례에서도 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는 100 IU/L 이상으로 관찰되었으나, 방사선학적 소견상 폐문 림프절과 근위부 폐실질에 국한된 병변만을 관찰할 수 있었으며 3년 추적 결과 폐섬유화로의 진행은 관찰되지 않았다. 또한 본 연구에 포함된 유육종증 환자 7명에서는 질병 경과 중 혈청 안지오텐신 전환효소 수치 증가 없이 정상 범위를 유지하였다. 이렇게 유육종증 환자의 질병 진행 양상과 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 불일치하는 것은, 환자의 육아종성 병변의 유상피세포에서 합성·분비되는 안지오텐신 전환효소가 혈류 내로 충분히 반영되지 못하거나, 육아종 내 유상피세포에서 안지오텐신 전환효소 합성 과정 중 전사 단계에서 안지오텐신 전환효소 합성이 조절되기 때문이라는 의견이 제시되었다.¹¹

최근 안지오텐신 전환효소 삽입/결손형 유전자 다형성 유형이 혈청 안지오텐신 전환효소 수치에 직접적인 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되면서, 안지오텐신 전환효소 유전자 다형성과 유육종증의 발생, 진행 및 예후와의 연관성에 관한 연구들이 활발하게 진행되었다.²² 안지오텐신 전환효소 유전자는 17번 염색체 장완 23번째 분절에 위치하며(17q23), 26개 엑손과 25개 인트론을 합쳐 총 21 kb에 달한다. 특히 안지오텐신 전환효소 유전자의 16번째 인트론 상에 존재하는 287 bp 길이의 염기 서열은, 이 유전자의 핵내 전사 인자와의 결합을 방해하거나 전사 단계에서 mRNA 전구체 접합을 변형시킴으로써, 안지오텐신 전환효소의 합성을 억제하는 것으로 알려졌다.²³ 따라서 안지오텐신 전환효소 유전자 양측에서 이 부위의 결손이 있는 DD형을 가진 경우, 안지오텐신 전환효소 합성이 보다 효율적일 것으로 예측할 수 있다. 특히 Rigat 등⁷의 연구에 따르면, 정상 성인에서 안지오텐신

전환효소 유전자 DD형이 혈청 안지오텐신 전환효소 수치 증가에 50% 이상 기여하므로, 이 유전자의 다형성이야말로 같은 유육종증 환자에서의 혈청 안지오텐신 전환효소 수치 변동(intra-individual variation)이나, 유육종증 환자들 사이에서의 혈청 안지오텐신 전환효소 수치의 다양성(inter-individual variation)을 설명할 수 있는 중요한 지표라는 점을 보고하였다.^{7,24} 이 연구를 통해 우리나라 유육종증 환자에서도 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는 안지오텐신 전환효소 유전자형인 II, ID, DD의 순서에 따라 증가하며, 특히 D allele의 존재 시 현저하게 증가한다는 점을 알아냈다.

안지오텐신 전환효소 유전자형의 빈도는 인종 및 지역 분포에 따라 다른 양상을 보였는데, 정상적으로 구미 백인에서는 D allele의 상대 빈도가 0.6으로 높았으며, 동양인, 특히 일본인에서는 D allele의 상대 빈도가 0.35로 낮아서,² 이는 우리나라 정상 성인에서의 결과와 유사하였다.²⁵ 즉 구미 백인 정상 대조군에서 안지오텐신 전환효소 유전자 DD형의 빈도는 40% 내외로 높았던 반면, 일본인에서는 20% 내외였다. 이렇게 안지오텐신 전환효소 유전자유형이 인종에 따라 다른 비율을 갖는다는 점은, 유육종증의 발생 빈도가 인종에 따라 차이를 보인다는 점과 관련하여 주목할 만하다. 통계학적 연구에 따르면, 유육종증은 흑인에서 인구 10만명 당 35.5명으로 높고, 구미 백인과 일본인에서의 발생 빈도는 각각 10.9명 및 14명으로 보고되었는데,²⁶ 이는 모두 우리나라에 비하여 높다.¹² 흑인에서 안지오텐신 전환효소 유전자형을 조사한 바에 따르면, 연구자마다 결과가 달라서, 흑자는 동양인과 유사하게 II형이 많다는 보고²에서부터 백인에서처럼 DD형이 많다는 보고에 이르기까지 다양하다.²⁷ 그러나 대체적으로, 구미 백인에서처럼 상대적으로 안지오텐신 전환효소 유전자 DD형이 많은 경우 유육종증의 발생 빈도가 높으며, 반대로 동양인에서처럼 안지오텐신 전환효소 유전자 DD형의 상대 빈도가 낮은 경우 유육종증 발생 빈도가 낮다는 점을 지적하였다. 본 연구에서도 정상 대조군의 안지오텐신 전환효소 유전자 II, ID, DD형의 상대 빈도는 각각 45%, 40%, 15%로, 이전 우리나라의 연구 결과와 일치하였다. 반면 유육종증 환자에서의 안지오텐신 전환효소 유전자 II, ID, DD형의 상대 빈도는 20%, 20%, 60%로, 구미 백인은 물론 일본에 비해서도 DD형의 빈도가 높았다. 따라서 드물지만 DD형을 가진 사람에서 유육종증 발생 위험도는 증가한다고 추측할 수 있다. 안지오텐신 전환효소 DD형에서 유육종증 발생 위험도가 ID형 혹은 II형에서보다 높다고 보고한 여러 연구 결과들은 이를 잘 뒷받침한다.^{10,27,28}

유육종증 환자에서 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는, 본 연구 결과 DD형인 경우 67.1 ± 126.5 IU/L로, ID형 혹은 II형에서보다 의미 있게 높았다. 본 연구에서는 포함된 유육종증 환자들의 대부분이 안지오텐신 전환효소 유전자 DD형이었으며, 방사선학적 병기는 보다 진행하였다. 게다가 안지오텐신 전환효소 DD형을 가진 유육종증 환자에서는 혈청 안지오텐신 전환효소 수치가 높을 뿐 아니라, 방사선학적인 병기 역시 진행하였다는 연구 결과

들이 보고되었다.³² 그러나 안지오텐신 전환효소 유전자형과 유육종증의 예후와의 상관 관계는 인종에 따라 다른 양상을 보여서, 유육종증의 발생 빈도가 높다고 알려진 흑인에서 보다 심각한 증상으로 발현하는 반면, 서구 백인에서는 증상이 있거나 혹은 경미한 경우가 많았다.^{11,29,30} 실제로 안지오텐신 전환효소 유전자 II형의 유육종증 환자에서 오히려 방사선학적 소견이 진행하였다는 보고²⁷도 있어, 유육종증 환자에서의 안지오텐신 유전자형의 장기적인 임상적 의의에 관해서는 아직 확실치 않다.

이 연구 결과, 유육종증 환자에서 안지오텐신 전환효소 II, ID, DD 유전자형은 각각 20%, 20%, 60%으로, DD형의 빈도가 대조군에 비해 의미 있게 높았다. 유육종증 환자군에서 혈청 안지오텐신 전환효소 수치는 II, ID, DD형의 순서대로 증가하였으며, 이는 방사선학적 병기의 진행과도 비례하였다. 이러한 결과로 미루어, 유육종증의 발생 빈도가 낮은 우리나라 유육종증 환자에서 안지오텐신 전환효소 결손 유전자형은 유육종증의 발생 및 질병의 진행 과정에 중요한 역할을 담당한다고 생각한다.

참고문헌

- Gal AA, Koss MN. The pathology of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8: 445-51.
- McGrath DS, Foley PJ, Petrek M, *et al.* ACE gene I/D polymorphism and sarcoidosis pulmonary disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 197-201.
- Lieberman J. Elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med* 1975; 59: 365-72.
- Sharma OP, Alam S. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 1995; 1: 392-400.
- Ainslie GM, Benatar SR. Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis: sensitivity and specificity in diagnosis: Correlations with disease activity, duration, extra-thoracic involvement, radiographic type and therapy. *J Med* 1985; 55: 253-70.
- Finkel R, Teirstein AS, Levine R, Brown LK, Miller A. Pulmonary function tests, serum angiotensin converting enzyme levels, and clinical findings as prognostic indicators in sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 1986; 465: 665-71.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.
- Furuya K, Yamaguchi E, Itoh A, *et al.* Deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme (ACE) genes as a genetic risk factor for sarcoidosis. *Thorax* 1996; 51: 777-80.
- Arbustini E, Grasso M, Leo G, *et al.* Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 851-4.
- Tomita H, Ina Y, Sugiyura Y, *et al.* Polymorphism in the angiotensin converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 255-9.
- Rybicki BA, Major M, Popovich J Jr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: A 5 year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 234-41.
- Kim DS, Ahn JJ. Sarcoidosis in Korea. *Tuber Respir Dis* 2000; 49: 274-80.
- Cawkwell L, Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from a formalin-fixed, paraffin wax-embedded tissue section. *Mol Pathol* 2000; 53: 51-2.
- Diaz-Cano SJ, Brady SP. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 342-6.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: A reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol* 1997; 12: 595-601.
- Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) [dipeptidyl carboxypeptidase 1]. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1433.
- Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 120-1.
- Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 747-60.
- Romer FK. Angiotensin converting enzyme activity in sarcoidosis and other disorders. *Sarcoidosis* 1985; 2: 25-34.
- Pietinalho A, Tukiainen P, Haahtela T, Persson T, Selroos O. Early treatment of stage II sarcoidosis improves 5 year pulmonary function. *Chest* 2002; 121: 24-31.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, *et al.* Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I converting enzyme gene: Two alternative promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-83.
- Fogarty Y, Fraser CG, Browning MC. Intra- and inter-individual variation of serum angiotensin converting enzyme: Clinical implications. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 201-2.
- Hong SH, Kang BY, Park WH, Kim JQ, Lee CC. Genetic variation

- of the angiotensin converting enzyme gene: Increased frequency of the insertion allele in Koreans. *Clin Genet* 1997; 51: 35-8.
26. Hosoda Y, Sasagawa S, Yasuda N. Epidemiology of sarcoidosis: New frontiers to explore. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8: 424-8.
27. Maliarik M, Rybicki BA, Malvitz E, *et al.* Angiotensin converting enzyme gene polymorphsim and risk of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1566-70.
28. Pietinalho A, Furuya K, Yamaguchi E, Kawakami Y, Selroos O. The angiotensin converting enzyme DD gene is associated with poor prognosis in Finnish sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 1999; 13: 723-6.
29. Siltzbach LE, James DG, Neville E, *et al.* Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am J Med* 1974; 57: 847-52.
30. Edmondstone WM, Wilson AG. Sarcoidosis in Caucasians, Blacks, and Asians in London. *Br J Dis Chest* 1985; 79: 27-36.