

원저

# 류마티스 관절염에 있어 종양괴사인자 다형성에 대한 연구

• 김경운, 이경민, 이봉효, 임성철, 정태영, 서정철  
 • 대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

## Study on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Gene Polymorphism in Rheumatoid Arthritis

Kim Kyung-un · Lee Kyung-min, Lee Bong-hyo, Lim Seong-chul, Jung Tae-young, Seo Jung-chul  
 Department of Acupuncture & Moxibustion,  
 College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objectives** Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) is a proinflammatory cytokine involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. This study was designed to investigate the relation between TNF- $\alpha$  gene polymorphism and rheumatoid arthritis in Korean population.

**Methods** This study was carried out on 103 rheumatoid arthritis patients who fulfilled the American College of Rheumatology 1987 revised criteria for rheumatoid arthritis and 208 healthy control subjects. Blood samples from all subjects were obtained for DNA extraction. The extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction(PCR). PCR products were visualized by 2% agarose gel electrophoresis. We investigated the genotyping of TNF- $\alpha$  by using Pyrosequencing.

**Results** The genotypes of TNF- $\alpha$  gene were GG, AG and AA. While the distribution of TNF- $\alpha$  polymorphism in control subjects was 92.31%, 7.21%, 0.48% respectively, in rheumatoid arthritis patients was 93.20%, 6.80%, 0.00%(GG, AG, AA). There was no statistical significant allelic frequency difference between control and rheumatoid arthritis groups.

**Conclusion** We concluded that there was no significant association between TNF- $\alpha$  gene polymorphism and rheumatoid arthritis. However, the findings of this study need to be confirmed in more patients and further studies.

**Key word** Rheumatoid Arthritis, TNF- $\alpha$ , Gene, Polymorphism

### 1. 서론

류마티스 관절염은 근골격계 질환 중 난치병의 하나로서 대칭되는 四肢 관절의 통증, 종창, 변형 및 기능상실 등을 주된 증상으로 하는 자가면역성 질환이다. 지역의 차이는 있으나 세계 인구의 약 1%가 발병하여 사회적, 경제적 및 개인적으로 삶의 질에 지대한 영향을 미치는 질병으로 인식되고 있다.<sup>1)</sup>

한의학적으로는 歷節風<sup>2)</sup>, 白虎歷節風<sup>3)</sup>, 痛風<sup>4)</sup>, 痺證<sup>5)</sup>, 類風濕性關節炎<sup>6)</sup> 등이 류마티스 관절염과 유사한 임상증상을 보여 이의 범주에 해당된다고 권 등<sup>7)</sup>이 보고하였으며, 원인을 살펴보면 眞陰虛弱精血虧虛<sup>8)</sup>, 三陰虛損<sup>9)</sup> 등 신체가 허약해진

틈을 타 風寒濕邪가 침입하거나 汗出後當風<sup>2)</sup>, 飲酒後當風<sup>2)</sup> 등으로 인하여 발생하며 치법으로는 去風, 散寒, 除濕, 化痰, 去瘀, 活血, 通絡, 滋補肝腎 한다.<sup>9)</sup>

류마티스 관절염은 아직까지 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나 염증성 사이토카인이 병리기전에 중요한 요소로 알려지고 있으며 특히 사이토카인들 중 Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )가 류마티스 관절염의 비정상적인 염증반응에 중심적 역할을 하고 있음이 여러 연구에 의해 증명되었다.<sup>10)</sup>

TNF- $\alpha$ 는 초기단계의 염증반응을 매개하는 단백질로 체내에서 염증반응 및 면역반응 등의 인체 방어 기전에 관여하는 대표적인 사이토카인이다.<sup>11)</sup> 그러나 TNF- $\alpha$ 의 증가는 비정상적인 염증 반응을 일으킬 수 있으며, TNF- $\alpha$ 가 류마티스 관절염 환자의 혈청, 활액, 활액막 조직에서 증가되어 있는 것

※ 교신저자 : 서정철, 경상북도 구미시 송정동 458-7번지 대구한의대학교 부속구미한방병원 침구과  
 Tel : (054)450-7707, Fax : (054)452-2219, E-mail : acumox@hanmail.net

이 보고되었고, 직접적으로 TNF- $\alpha$ 를 억제(중화)하였을 때 임상증상이 호전됨이 보고되는 등 최근 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>10,12-4)</sup>.

최근 TNF- $\alpha$ 의 유전자 다형성이 자궁경부암<sup>15)</sup>, 천식<sup>16)</sup>, 심부전<sup>17)</sup>, 진폐증<sup>18)</sup> 등과 같은 질환과 연관 있음이 보고되고 있고, 류마티스 관절염의 유전적 감수성 및 관절파괴의 진행속도와 의 관계를 밝히고자 하는 여러 연구가 이루어지고 있으나<sup>19-22)</sup> 국내에서는 이에 관련된 보고가 아직 미미한 상태이다.

이에 저자는 류마티스 관절염과 TNF- $\alpha$  유전자의 다형성의 연관성을 알아보기 위해 2002년 5월 1일부터 2005년 12월 31일까지 대구한의대학교 부속한방병원에 내원한 류마티스 관절염 환자와 건강 대조군을 대상으로 유전자형을 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상

#### 1) 대조군

대조군은 2002년 5월 1일부터 2005년 12월 31일까지 대구한의대학교 부속한방병원에 종합건강검진을 시행한 건강한 한국인 208명을 대상으로 하였다. 대조군은 환자군과 연령과 성별을 맞추어 선정하였다.

#### 2) 환자군

환자군은 2002년 5월 1일부터 2005년 12월 31일까지 대구한의대학교 부속한방병원에 류마티스 관절염으로 내원한 환자 103명을 대상으로 하였다. 모든 환자들은 American College of Rheumatology 진단기준<sup>23)</sup>과 전통적인 항 류마티스 약물치료를 적어도 3개월 이상 받은 진행 중인 상태를 만족하였다. 또한 만성 감염성질환, 종양, 다발성 경화증, 신장, 간장, 심장, 혈액학적 질환 등의 기왕력이 없는 환자로 제한하였다.

그리고 환자군은 모두 봉약침을 시술받았는데, 봉약침 1mg/ml의 용액을 만든 후, 121°C에서 20분간 autoclave에서 멸균하여 생리식염수에 0.3% 농도로 희석시킨 뒤에 염증상태의 관절 주위 특정 경혈에 피내로 자입하였다. 봉약침액은 한 혈위당 0.1ml씩으로 총 시술량이 1ml가 넘지 않도록 하였으며, 이전부터 복용 중인 일반적인 약물은 봉약침 치료중에 변화없이 허용되었다.

### 2. TNF- $\alpha$ 의 유전자형 확인

#### 1) DNA 분리

DNA는 피험자의 혈액샘플에 적당량의 용해용액(50mM Tris, 100mM EDTA, 0.5% SDS)과 proteinase K(10mg/ml)를 10-25 $\mu$ l 첨가한 후 55°C에서 용해시켰다. Phenol을 동량 가한 후 10,000g에서 3분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮기고 동량의 phenol/ chloroform(1:1)를 첨가하여 잘 혼합한 후 같은 방법으로 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겼다. Ethanol로 DNA를 침전, 세척, 건조하고 적당한 양의 3차 증류수나 TE(1mM Tris-HCl, 1mM EDTA) buffer에 용해시켰다. 또한 혈액에서 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, USA)나 고전적인 방법으로 genomic DNA를 분리하였다.

#### 2) PCR 증폭

DNA를 분리 정제한 후, template로 DNA를 100-250ng, primers는 10pmol로 TNF- $\alpha$  sense 5'-GCATCCTGTCTGG AAGTTAG-3', TNF- $\alpha$  antisense 5'-ACACAAGCATCAA GGATACC-3' 각 1 $\mu$ l, dNTP(2.50mM)를 1 $\mu$ l, Taq polymerase를 2units, 10X 완충액을 3-5 $\mu$ l, 탈이온수를 적당량 넣어 총 반응용액을 30-50 $\mu$ l로 하였다. PCR 자동화기계 Gene-Amp PCR System 9600(Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)에서 denaturation은 94°C에서 1분간, 94°C 1분, 62°C 1분, 72°C 1분을 35회 실시한 후 72°C에서 5분간 마무리 반응을 실시하였다<sup>24)</sup>.

#### 3) Pyrosequencing 반응을 위한 준비

Single-stranded DNA의 준비를 위해 antisense primer에 biotin을 붙였다. PCR 산물은 2%의 agarose gel로 전기영동하여 확인하고 PCR 산물에 streptavidin sepharose beads(Streptavidin Sepharose HP, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 표준 protocol(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)에 따라 부착하였다<sup>25)</sup>. Sequencing primer는 5'-CCATCCTCCTGCT-3'로 변이 위치에 가깝게 디자인하였다.

20 $\mu$ l의 biotinylated PCR 산물에 streptavidin-coated sepharose beads를 부착시킨 후 실온에서 10분간 방치한 후 이를 Millipore 96-well filter plate(Millipore, Bedford, MA)에 옮겼다. Bead는 well 안에 남기고 순수한 single-stranded DNA를 얻고 여러 다른 용액과 시약을 제거하기 위해 진공펌프를 이용하였다.

PCR strand는 50 $\mu$ l의 0.2M sodium hydroxide에 1분간 방치한 후 150 $\mu$ l의 10mM Tris-acetate(pH 7.6)에서 두 번 세척한 후 분리하였다. Bead는 0.35M sequencing primer IL4R seq와 IL-10 seq를 포함한 55 $\mu$ l의 4M acetic acid에서 다시 현탁한 후 45 $\mu$ l의 현탁액을 PSQ 96 plate(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)에 옮겼다<sup>25)</sup>.

4) Pyrosequencing 분석

샘플을 포함하고 있는 PSQ 96 plate는 sequencing primer가 annealing되게끔 80 $^{\circ}$ C에서 PSQ 96 Sample Prep Thermoplate (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 2분간 데웠다. 그 후 실온에서 5분간 방치 후 PSQ 96 Plate는 PSQ 96 instrument(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)의 chamber에 옮겼다<sup>27)</sup>. PSQ 96 SNP Reagent Kit(Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)의 cassette로부터 enzymes, substrates, nucleotides 등을 well로 분배하였다. 이 과정에서 nucleotide가 DNA strand에 합쳐질 때 나타나는 빛을 특수 카메라가 인식하여 자동으로 유전자의 단일염기유전자다형성(single nucleotide polymorphism(SNP))을 판독하였다<sup>28)</sup>.

3. 통계 처리

대조군과 환자군 사이에서 유전자형분포의 차이와 대립유전자(alleles) 빈도의 차이는  $\chi^2$ -test를 하였다. 성별의 비교는  $\chi^2$ -test를 이용하였고, 나이의 비교는 Student's t-test를 이용하였다. 각각의 경우 통계적 유의성은 p 값이 0.05 미만으로 하였다. 통계프로그램은 SAS statistical package(release 8.1, SAS Institute Inc., USA)를 이용하였다.

III. 결과

<Table 1> Clinical Characteristics of Rheumatoid Arthritis Patients and Controls

	Rheumatoid arthritis patients (n=103)	Controls (n=208)	p value
Male / Female	12 / 91	36 / 172	0.243
Age*	59.35 $\pm$ 6.19	59.48 $\pm$ 6.06	0.175

$\chi^2$ -test was used to compare sex between controls and rheumatoid arthritis patients. Age was compared by Student's t-test. \* mean  $\pm$  SD(year)

1. 대상자의 일반적인 특징

성별분포는 류마티스 관절염 환자군 103명 중 남자 12명, 여자 91명이었고, 대조군 208명 중에서 남자 36명, 여자 172명이었다. 평균 연령은 류마티스 관절염 환자군 59.35 $\pm$ 6.19세였고, 대조군은 59.48 $\pm$ 6.06세였다(Table 1).

2. Pyrosequencing 결과

Pyrosequencing은 DNA sequencing에 이용되기도 하는 SNP 분석방법으로 DNA가 합성되는 동안 방출되는 inorganic pyrophosphate(PPi)의 light 발현을 detect하는 방법으로 TNF- $\alpha$ -308 GA gene의 AA, GG 및 AG genotype의 결과는 다음과 같다(Figure 1, 2, 3).

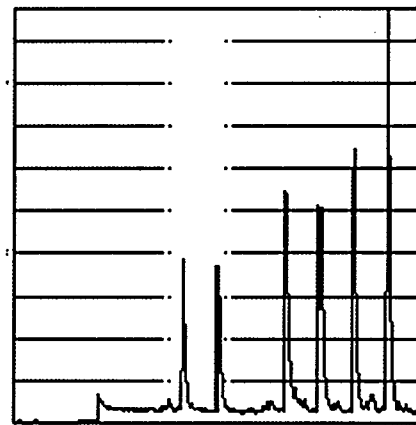


Figure 1. Pyrosequencing result of AA genotype of the TNF- $\alpha$ -308 gene

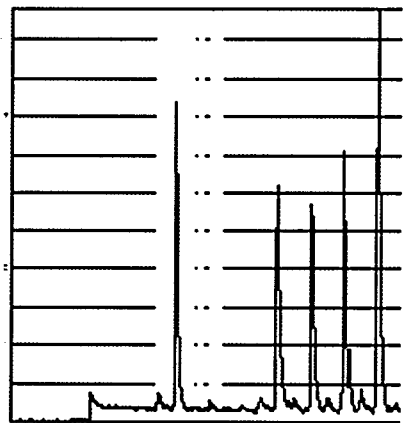


Figure 2. Pyrosequencing result of GG genotype of the TNF- $\alpha$ -308 gene

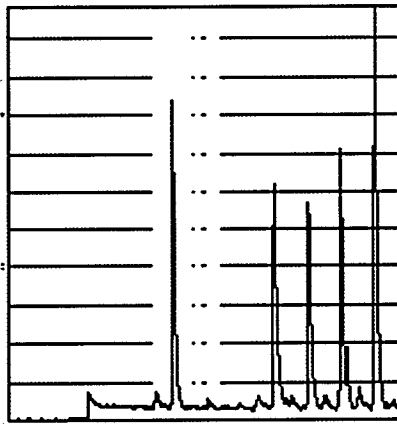


Figure 3. Pyrosequencing result of AG genotype of the TNF- $\alpha$  -308 gene

(Table 2) Frequencies of Polymorphism in TNF- $\alpha$  -308 Gene in Rheumatoid Arthritis Patients and Controls

	Genotype(%)			p value
	GG	AG	AA	
Rheumatoid arthritis patients (n=103)	96(93.20)	7(6.80)	0(0.00)	1.000
Controls(n=208)	192(92.31)	15(7.21)	1(0.48)	

$\chi^2$ -test was used to compare genotypes frequencies between rheumatoid arthritis patients and controls.

(Table 3) Allele Frequencies of Polymorphism in TNF- $\alpha$  -308 Gene in Rheumatoid Arthritis Patients and Controls

	Allele Frequency		p value
	G	A	
Rheumatoid arthritis patients (n=103)	199(96.60)	7(3.40)	0.826
Controls(n=208)	399(95.91)	17(4.09)	

$\chi^2$ -test was used to compare allele frequencies between rheumatoid arthritis patients and controls.

### 3. 유전자형 분포

류마티스 관절염 환자군과 대조군 사이에 TNF- $\alpha$  유전자형 분포는 GG, AG 및 AA형에서 류마티스 관절염 환자군은 각각 96명(93.20%), 7명(6.80%), 및 0명(0.00%)였고, 대조군은 각각 192명(92.31%), 15명(7.21%), 1명(0.48%) 등으로 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 유전자형 분포는 두 군간

에 유의한 차이는 없었다( $p=1.000$ , Table 2).

### 4. 대립 유전자 분포

류마티스 관절염 환자군과 대조군 사이에 대립 유전자 (allele) 빈도 분포는 TNF- $\alpha$ 의 대립 유전자인 G와 A에서 류마티스 관절염 환자군은 각각 96.60%와 3.40%였고, 대조군은 95.91%와 4.09%로 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 대립 유전자 분포는 두 군간에 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.826$ , Table 3).

## IV. 고찰

류마티스 관절염은 다양한 임상적 경과를 가지며, 여러 관절의 활액막을 주로 침범하여 대부분의 경우 점진적인 연골과 골의 파괴를 일으키는 자가면역성 만성염증성 질환이다<sup>29)</sup>. 발병원인에 대하여 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없으나, 최근 TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등의 사이토카인에 의해 활막염증이 발생하여 지속되는 것으로 알려지고 있으며<sup>30-1)</sup>, 이들 중 일부 사이토카인의 유전자 다형성이 류마티스 관절염의 유전적 감수성과 관련이 있거나 관절파괴의 진행 속도와 연관되어 있다는 보고들이 있다<sup>19-22,32-3)</sup>.

한의학에서 류머티스 관절염은 歷節風, 白虎歷節風, 痛風, 痺證, 類風濕性關節炎 등의 범주에 속하며<sup>7)</sup>, 그 원인을 <<黃帝內經 痺論>>에서 “風寒濕三氣雜之合而爲痺也”라 하여 風寒濕 外氣가 痺證의 중요한 원인이라고 언급하였고 <<經岳全書>>에서 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得而勝之而爲痺”라 하였고, <<金匱要略>>에서는 “歷節之痛 皆有汗出入水 或飲酒 汗出 當風所致”라고 하여 精氣虧虛한데 風寒濕邪가 침범해 발생하는 것으로 보고 去風除濕, 活血化瘀, 通經活絡, 補肝腎의 治法을 이용하였다<sup>9)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 초기단계의 염증반응을 매개하는 17kDa 크기의 단백질로 체내에서 염증반응 및 면역반응 등의 인체 방어 기전에 관여하는 대표적인 사이토카인이다<sup>11,35)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 감염의 확산을 막는 정상 면역 방어기전에 중요한 역할을 하고, 분비된 TNF- $\alpha$ 는 혈관 내피세포를 활성화하여 유착분자의 발현을 증가하고, nitric oxide의 분비를 촉진하여 혈관이완을 유발하며, 혈관의 투과성을 증가시킨다. 그 결과 염증세포, 면역글로불린 그리고 보체가 조직에 증가하게 되어 감염을 조절한다. 그러나 어떠한 원인에 의하여 TNF- $\alpha$ 의 생산이

부적절하게 증가되는 경우에는 여러 비정상적인 염증 반응을 일으킬 수 있고, 관절질환의 발현에 영향을 주게 되는데, 류마티스 관절염이나 통풍성 관절염, 감염성 관절염 등 좀 더 관절 침습적이고 진행성인 질환에서 관련성이 높은 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>. TNF- $\alpha$ 가 류마티스 관절염 환자의 혈청, 활액, 활액막 조직에서 증가되어 있었고, 직접적으로 TNF- $\alpha$ 를 억제(중화)하였을 때 임상증상이 호전되는 등의 보고가 있었으며, 실제 항 TNF- $\alpha$  약물이 류마티스 관절염의 새로운 치료제로 사용되고 있다<sup>10,12-4)</sup>.

TNF- $\alpha$ 에 대한 유전정보를 가진 인간의 TNF- $\alpha$  유전자는 염색체 6p21.3의 class III 영역에 위치한다<sup>37)</sup>. 각 개인간의 사이토카인 생산능에는 많은 차이가 있는데, 이러한 사이토카인 유전자 다형성에 의한 차이로 사람마다 염증 질환이나 자가면역질환 등에 대한 감수성이 다르게 되며, 정상인에서 있어 TNF- $\alpha$ 의 생산 정도 또한 개체마다 차이가 있다. 여러 연구 결과들은 TNF- $\alpha$  생산 정도의 차이가 TNF- $\alpha$  유전자의 유전적 다양성에 기인할 것이라는 가설을 뒷받침하고 있다<sup>38-9)</sup>. 특히, TNF- $\alpha$  유전자 promotor의 -308 부위의 점변이가 TNF- $\alpha$ 의 생산과 가장 관련이 많다고 알려져 있다<sup>40)</sup>.

최근 TNF- $\alpha$ 의 유전자 다형성이 자궁경부암<sup>15)</sup>, 천식<sup>16)</sup>, 심부전<sup>17)</sup>, 진폐증<sup>18)</sup> 등과 같은 질환과 연관 있음이 보고되고 있으며, 류마티스 관절염과의 관계에 대해서는 Fabris 등<sup>22)</sup>이 -238 GG 유전자형의 빈도와 중증 류마티스 관절염으로의 진행이 유관하다는 보고를 하였고, Brinkman 등<sup>20)</sup>이 -238 GA 유전자형이 방사선편적으로 진단하였을 때 경증의 류마티스 관절염과 유관하였고, -308 부위는 관계가 뚜렷하지 않다고 보고하였다. Yen 등<sup>19)</sup>은 대만인에 있어 TNF- $\alpha$ 의 유전자 다형성과 류마티스 관절염의 발현이 무관하다고 보고하였고, Rodriguez-Carreón 등<sup>21)</sup>은 멕시코인에서 -308부위의 대립유전자 A의 증가와 중증 류마티스 관절염으로 진행할 수 있는 감수성이 유관하다고 보고하였다. 그러나 국내에서는 이에 관련된 보고가 아직 미미한 상태이다.

본 연구에서는 류마티스 관절염 환자군과 대조군 사이에서 TNF- $\alpha$  promotor -308 부위의 유전자 다형성을 통하여 류마티스 관절염의 유전적인 요인에 관한 상관관계를 밝히고자 하였다. 류마티스 관절염 환자군 103명과 대조군 208명에서 TNF- $\alpha$  promotor -308부위의 유전자 다형성은 Pyrosequencing을 통해 살펴보았다. GG, AG, AA 유전자의 빈도는 류마티스 관절염 환자군에서 각각 96명(93.20%), 7명(6.80%), 및 0명(0.0%)였고, 대조군은 각각 192명(92.31%), 15명(7.21%), 1명(0.48%) 등으로 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 유전자형 분포는 두 군간에 유의한 차이

는 없었다( $p=1.000$ ). 또한 대립유전자 G, A의 빈도는 류마티스 관절염 환자군에서 각각 96.60%와 3.40%였고, 대조군은 95.91%와 4.09%로 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 대립 유전자 분포는 두 군간에 유의한 차이는 없는 것으로 ( $p=0.826$ ) 나타났다.

본 연구에서는 류마티스 관절염 환자군과 대조군 사이에 TNF- $\alpha$  promotor -308 부위의 유전자형 분포와 대립유전자 분포에는 유의한 차이가 없을 것을 시사하고 있다. 하지만, 환자 수가 적었으며 각 유전자 유형과 질병의 경중정도, 봉약침 치료에 대한 반응성 등의 연관을 조사하지 못한 것이 부족한 점이었다. 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사려된다.

## V. 결론

TNF- $\alpha$ 의 유전자 다형성이 류마티스 관절염의 발병과 관련이 있는지 알아보기 위해 대구한의대학교 부속한방병원에서 치료 받은 류마티스 관절염 환자군 103명과 건강한 대조군 208명을 대상으로 유전자형을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 유전자형 분포는 두 군간에 유의한 차이는 없었다.
2. 류마티스 관절염 환자군과 대조군의 대립 유전자 분포는 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

이상의 결과는 TNF- $\alpha$ 의 유전자 다형성이 류마티스 관절염의 발병과 관련성이 없을 것을 시사하고 있으나 향후 더 많은 수의 피험자를 대상으로 TNF- $\alpha$ 의 기타 변이 위치 뿐만 아니라 다른 유전자의 단일염기다형성에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사려된다.

## 參考文獻

1. 윤지희. Immune Responses in Rheumatoid Arthritis. 분자세포생물학뉴스. 2002;14(4):7-12.
2. 張仲景. 金匱要略. 서울:大星文化社. 1993:12-4, 30-9.
3. 金定濟. 診療要鑑. 서울:東洋醫學研究所. 1974:459-

- 60.
4. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:385-9.
  5. 권재식, 김기현, 김형태, 박응호, 서성훈. 痺證. 서울:정담. 1993: 29, 208-10, 214.
  6. 董燦明. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1986:554-69.
  7. 권영달, 송용선. 류마티스 관절염에 대한 동서의학적 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(2):373-96.
  8. 張介賓. 經岳全書. 北京:人民衛生出版社. 1991:248-55.
  9. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 台北:昭人出版社. 1974:19.
  10. Moreland LW. Inhibitors of tumor necrosis factor for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl. Rheumatol*. 1999;57:7-15.
  11. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440.
  12. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, Ettlinger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K, Widmer MB, Blosch CM. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor(p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*. 1997;337:141-7.
  13. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M, Burge DJ. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med*. 1999;340:253-9.
  14. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet*. 1999;354:1932-9.
  15. Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, Medeiros R. G-308A TNF- $\alpha$  polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(2):558-92.
  16. Gupta V, Sarin BC, Changotra H, Sehajpal PK. Association of G-308A TNF- $\alpha$  polymorphism with bronchial asthma in a North Indian population. *J Asthma*. 2005;42(10):839-41.
  17. Densem CG, Hutchinson IV, Yonan N, Brooks NH. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphism: a predisposing factor to non-ischaemic myocardial dysfunction? *Heart*. 2002;87:153-5.
  18. 안병용, 김경아, 남혜윤, 문제혁, 정진숙, 임영. 탄광부진폐증의 진행에 있어 TNF- $\alpha$  유전자 다형성의 역할. 대한산업의학회지. 2002;14(2):117-23.
  19. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Liu HW. Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol*. 2001;28(8):1788-92.
  20. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedveld FC, Verweij CL. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol*. 1997;36(5):516-21.
  21. Rodriguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Montes de Oca JV, Cardiel MH, Granados J, Vargas-Alarcon G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun*. 2005;24(1):63-8.
  22. Fabris M, Di Pe, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29:29-33.
  23. Amett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for

- the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315-24.
24. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274:1527-30.
  25. <http://www.pyrosequencing.com>
  26. Gruber JD, Colligan PB, Wolford JK. Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum Genet*. 2002;110:395-401.
  27. Pettersson M, Bylund M, Alderborn A. Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and pyrosequencing technology. *Genomics*. 2003;82:390-6.
  28. Pacey-Miller T, Henry R. Single-nucleotide polymorphism detection in plants using a single-stranded pyrosequencing protocol with a universal biotinylated primer. *Anal Biochem*. 2003;317:166-70.
  29. Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Nunez-Roldan A. Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet*. 2001;28(1):89-93.
  30. van der Borgh A, Geusens P, Raus J, Stinissen P. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;31:160-75.
  31. Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid arthritis: a molecular understanding. *Ann Intern Med*. 2002;136:908-22.
  32. Genevay S, di Giovine FS, Perneger TV, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, Guerne PA. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;47:303-9.
  33. Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. Interleukin-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001;28:1960-6.
  34. 王琦. 黄帝内经素问今释. 서울:成輔社. 1983:206, 209.
  35. Abboud HE. Growth factors in glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1993;43:252-67.
  36. Ribbens C, Andre B, Kaye O, Kaiser MJ, Bonnet V, de Groote D, Franchimont N, Malaise MG. Increased synovial fluid levels of interleukin-12, sCD25 and sTNF-R II /sTNF-R I ratio delineate a cytokine pattern characteristic of immune arthropathies. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11:669-76.
  37. Czaja AJ, Cookson S, Contantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphism associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1999;117:645-52.
  38. Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Sci USA*. 1990;87:1233-7.
  39. Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobson B, Odum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scan J Immunol*. 1998;28:599-606.
  40. Probert L, Selmaj K. TNF and related molecules: trends in neuroscience and clinical application. *J Neuroimmunol*. 1996;72:113-7.