

## 아스피린 유발성 천식 환자에서 leukotriene C<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>) 합성효소 유전자 다형에 관한 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학 교실\*, 아주대학교 의과대학 알레르기-면역내과<sup>1</sup>,  
연세대학교 의과대학 알레르기 내과<sup>2</sup>

조재연·이상엽·한선애\*·유세화·김선신<sup>1</sup>·박해심<sup>1</sup>·박중원<sup>2</sup>·홍천수<sup>2</sup>·인광호

### Leukotriene C<sub>4</sub> synthase promoter polymorphism in aspirin-induced asthma

Jae Youn Cho, Sang Yeub Lee, Seon Ae Han\*, Se Hwa Yoo, Sun-Sin Kim<sup>1</sup>, Hae-Sim Park<sup>1</sup>,  
Jung Won Park<sup>2</sup>, Chein Soo Hong<sup>2</sup>, and Kwang Ho In

*Department of Internal Medicine, Department of Pathology, College of Medicine, Korea University.  
Department of Allergy and Clinical Immunology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea<sup>1</sup>,  
Division of Allergy, Department of Internal Medicine, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea<sup>2</sup>*

**Background :** Aspirin/NSAIDs can release cysteinyl-leukotriene (cys-LTs) into airways and precipitate asthmatic symptoms in aspirin-induced asthma (AIA). It has been reported that there is profound overexpression of LTC<sub>4</sub> synthase in their bronchial mucosa, compared to aspirin-tolerant asthma.

**Objective :** We observed whether genetic polymorphism of LTC<sub>4</sub> synthase may be predisposed to LTC<sub>4</sub> synthase overexpression in AIA.

**Subject and method :** Forty-four AIA patients having positive responses on lysin aspirin bronchoprovocation tests and 47 non-aspirin induced asthma (non-AIA) patients having negative challenges and 32 healthy controls were enrolled. The genotypes of the promoter LTC<sub>4</sub> synthase gene (A<sub>44</sub>C transversion) were determined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (RFLP) method.

**Results :** LTC<sub>4</sub> synthase promoter polymorphism (A<sub>44</sub>C transversion) was not significantly different between non-AIA and AIA patients (p>0.05).

**Conclusion :** These findings suggest that genetic polymorphism of LTC<sub>4</sub> synthase promoter may not be predisposed to LTC<sub>4</sub> synthase overexpression in AIA.

**Key words :** LTC<sub>4</sub> synthase, polymorphism, aspirin induced asthma

### 시 론

아스피린 유발성 천식은 성인 천식 환자의 10-44% 에서 발생하는데, 이들은 대부분 비부비동염이나 비염을 동반하며, 비교적 심한 천식 증

상을 나타낸다.<sup>1-3)</sup> 발병기전은 아직 완벽하게 알려져 있지 않지만, 아스피린과 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) 투여시 cyclooxygenase 가 차단되면서 prostaglandin의

본 연구는 1998년도 고려대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

통신저자: 고려의대 내과 인광호

접수: 99년 1월 25일, 통과: 99년 5월 27일

생성이 저해되고 이에 따라 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)가 감소하고 상대적으로 leukotrienes의 생성을 증가시켜 천식 발작이 발생된다고 알려져 있다.<sup>6)</sup> 그러나 이러한 연구결과만으로는 비(非)아스피린 유발성 천식 환자에서는 어떠한 기전으로 NSAIDs 투여 후에도 cysteinyl leukotrienes가 증가하지 않는지를 설명할 수 없다. 또한 아스피린 유발성 천식 환자에서 NSAIDs를 투여하지 않아도 소변 내 leukotriene E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>)가 만성적으로 증가되어 있으며,<sup>7-12)</sup> 이에 대한 설명으로, 최근 Sampson 등<sup>13)</sup>과 Cowburn 등<sup>14)</sup>은 아스피린 유발성 천식 환자의 기관지 점막에서 leukotriene의 생성 효소인 LTC<sub>4</sub> 합성효소의 표현이 유의하게 증가되어 있음을 보고하였다.

유전적 요인에 관한 연구의 하나로 Sanak 등<sup>15)</sup>이 LTC<sub>4</sub> 합성효소 유전자 다형에 대한 연구에서 아스피린 유발성 천식과 LTC<sub>4</sub> 합성효소 promoter 유전자 다형과 관련성이 있다고 보고하였으나, 이에 대한 국내 연구 보고는 없다. 이에 연구자들은 아스피린 유발성 천식의 병인 기전에 대한 연구의 일환으로, 아스피린 기관지 유발시험 상 양성 반응을 보인 천식 환자군과, 대조군으로 음성 반응을 보인 천식환자군에서 LTC<sub>4</sub> 합성효소 유전자 다형과 관련성을 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

천식의 정의는 특징적인 임상증상이 있으면서 기관지확장제 투여 후 FEV<sub>1</sub>치가 15%이상 증가하거나, 메타콜린 기관지유발시험상 PC<sub>20</sub>치가 25mg/ml 이하를 나타낸 경우로 하였다. 아스피린 과민성 유무를 확인하기 위해 91명의 천식 환자들을 lysine-아스피린 기관지 유발시험 결과에 따라 아스피린 유발성 천식군(44명)과 비아스피린 유발성 천식군(47명)으로 나누었다.

대상 환자들의 임상적 특성은 Table 1과 같이 두 군간 연령 및 성별에는 차이가 없었으나 아토피는 비아스피린 유발성 천식군에서 많았다.

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with aspirin induced asthma (AIA) and non-aspirin induced asthma (non-AIA)

	AIA	ATA
No.	44	47
Sex (M:F)	17:27	17:30
Age (Yrs)	44.5 (13-68)	45.8 (21-70)
Atopy	10/44	21/47

## 2. 방법

### 1) 아스피린 기관지 유발시험

Lysine-아스피린 기관지유발시험은 박 등<sup>5)</sup>이 보고한 방법에 따라 lysine-아스피린을 11.25mg/ml부터 360mg/ml농도까지 흡입시켜 FEV<sub>1</sub>치가 기저치에 비해 20%이상 감소할 때 양성 반응으로 간주하였다. 후기 반응 유무를 관찰하기 위해 흡입 후 7시간까지 폐기능을 관찰하였다. 비아스피린 유발성 천식 환자에서는 Lysine-아스피린 최대농도에서도 FEV<sub>1</sub>치가 20%이상 감소하지 않았다. 아토피 유무는 55종의 흡입 항원을 이용한 피부단자시험에서 1가지 이상 혼한 흡입 항원 (*D. farinae*, *D. pteronyssinus*, 바퀴벌레 등)에 대해 A/H비가 1이상인 경우로 정하였다.

### 2) Genomic DNA의 추출

대상 환자들은 모두 증상이 안정된 상태에서 혈액을 채취하였으며 상완정맥에서 채혈한 전혈 6ml를 EDTA를 함유한 시험관에 담아 잘 흔든 뒤 상온에서 PBS로 균형을 맞춘 뒤 4000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 원심분리후 buffy coat층 내의 단핵구 200 $\mu$ l를 취하여 1.5ml 튜브에 넣은 후 protein kinase K를 함유한 용액에서 70°C에서 20분간 반응시킨 후 끝난 검체에 동량의 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시킨 뒤 13000rpm에서 1분간 원심분리하여 Qiagen사의 DNA spin column을 사용하여 DNA를 추출하였고 RNAse가 없는 증류수에 녹여 -20°C에서 보관하였다. 모든 검체에 대하여 spectrophotometer를 이용하여 DNA 농도를 측정하였다.<sup>16)</sup>

### 3) A- $\mu$ C 전환을 포함한 295bp의 중합효소 연쇄반응

LTC<sub>4</sub> 합성효소 promoter부위의 유전자다형을 관찰하기 위해, Sanak 등의 연구에서 아스피린 과민성 천식환자에서 관련된 것으로 보고한 LTC<sub>4</sub> 합성효소 대립인자 (allele)에서 전환된 A- $\mu$ C를 포함한 부위의 염기배열에서 고안한 primer를 사용하여 중합효소 연쇄반응기법을 이용하였다.<sup>15)</sup> 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer의 염기배열은 각각 sense primer 5'-TCC ATT CTG AAG CCA AAG GC-3' 및 anti-sense primer 5'-GGA GAC CGC CTC ACC ACT T-3' 이었다. 중합효소 연쇄반응에 사용된 용액의 조성은 총 25 $\mu$ l의 용액내에 DNA 0.1 $\mu$ g, 10pM primer, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 10mM Tris-Hcl (pH 8.3)과 3U 의 Taq polymerase (BM, Germany)를 사용하였으며, 94°C에서 5분간 변성시킨 뒤 각각 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초의 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 확장 (extension)시켰다.

### 4) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의한 유전자 다형의 확인

중합효소반응의 산물 (20ul)을 모아 제한효소인 MspI 효소 (3ul/60U), 10X buffer 3ul, H<sub>2</sub>O 4ul 총 30ul를 37°C에서 반응시킨 후 8% acrylamide gel에서 전기영동시켰으며, 100bp와  $\Phi$ x 174 RF DNA/Hae III를 표지자로 사용하였다. wild 형은 180bp, 115bp의 2개의 띠가 보였고, 이중 접합체는 180bp, 115bp, 83bp의 3개의 띠가 관찰되었으며 동종 접합체는 180bp, 83bp의 2개의 띠가 관찰되어 이러한 결과를 바탕으로 각각의 유전자형을 결정하였다 (Fig. 1).

### 5) 통계처리

실험 결과 얻은 자료의 통계처리는 SPSS통계 프로그램 (SPSS win 7.0)을 사용하여 Chi-square test를 시행하여, p값이 0.05미만이면 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

**Fig. 1.** LTC<sub>4</sub> synthase polymorphism. Wild type shows two bands composed of 180bp, 115bp (1,3,4,5, 7,8,9,10). Mutant heterozygote shows three bands composed of 180bp, 115bp, 83bp (9,11,12). Mutant homozygote shows two bands composed of 180bp, 83bp (2).

## 결 과

LTC<sub>4</sub> 합성효소 promoter 유전자다형은 정상 대조군 32명에서 wild 형이 21명 (66%), 이중 접합체형이 10명 (31%), 동종 접합체형은 1명 (3%)이었다. 비아스피린 유발성 천식 환자 47명중에 wild형이 37명 (79%), 이중 접합체형 9명 (19%), 동종 접합체형이 1명 (2%)였다. 아스피린 유발성 천식군 44명중에는 wild형이 32명 (73%), 이중 접합체형이 12명 (27%), 동종 접합체형은 없었다 (Table 2).

## 고 찰

아스피린 유발성 천식 환자에서 천식증상 악화 시 cysteinyl leukotriene의 생성의 증가가 관찰된바 있으며,<sup>6)</sup> 최근 이러한 cysteinyl leukotriene의 생성조절에 대한 연구에 초점이 모아지고 있다. Cysteinyl leukotriene 생성에 관여하는 사이토카인에는 IL-3가 알려져 있으며 이는 쥐의 비만세포에서 분비되어 5-lipoxygenase (5LO)/LTC<sub>4</sub> 합성효소의 경로를 조절한다고 보고되었다.<sup>17)</sup> 또한 cysteinyl leukotriene의 생성에 관여하는 효소와 단백질은 5-lipoxygenase activating protein (5FLAP), 5LO, LTC<sub>4</sub> 합성효소가 있으며 이들중 LTC<sub>4</sub> 합성효소가 cys-leukotriene 생성의 종말효소로서 중요한 역할을 한다고 알려져있다.<sup>18)</sup> LTC<sub>4</sub> 합성효소는 아스피

린 유발성 천식 환자의 기관지점막에서 과발현되었고, 특히 호산구가 점막에 많이 침윤되어 있었으며, 이들 중에서 LTC<sub>4</sub> 합성효소를 많이 표현하고 있다고 보고되었다.<sup>13,14)</sup> Cowburn 등<sup>14)</sup>은 아스피린 유발성 천식 환자의 기관지점막에서 LTC<sub>4</sub> 합성효소는 과발현되었으나 다른 관련효소인 5LO, 5FLAP, cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase 등의 표현은 차이가 없었고 기관지폐포세척액내 기저 cys-leukotriene 치는 LTC<sub>4</sub> 합성효소 발현세포수와 비례하였다고 보고하였다. 이들의 연구에서 아스피린 유발성 천식에서는 LTC<sub>4</sub> 합성효소 발현 세포수가 증가하고 이는 결국 cysteinyl leukotriene의 생성을 증가시킴으로써 천식 발작을 유발하였다고 설명할 수 있었다. 최근 이러한 LTC<sub>4</sub> 합성효소 발현 세포의 증가를 LTC<sub>4</sub> 합성효소 유전자 다형으로 설명하려는 시도가 있었다. LTC<sub>4</sub> 합성효소 유전자에 대한 연구는 Penrose 등<sup>19)</sup>이 주로 시도하였는데 1996년 이 유전자의 구조, 유전자 배열, 5q35에서의 위치 등에 대하여 발표되어 있다. 이 유전자의 아미노산 구조는 5 FLAP 와 31%의 전체 아미노산의 동질성을 지니고 있고 5개의 엑손과 4개의 인트론을 지니는 총 길이 2.52 kilobase pairs 이다. LTC<sub>4</sub> 합성효소는 염색체 5q35에 위치해 있고 여기에는 천식 등의 알레르기성 염증에 관여하는 세포들을 관장하는 수용체, 싸이토카인 등의 유전자들이 함께 존재하고 있다.<sup>20)</sup> Sanak 등<sup>15)</sup>은 아스피린 유발성 천식 환자에서

LTC<sub>4</sub> 합성효소 promoter 유전자 다형이 대조군에 비해서 증가되어 있음을 보고하여 유전자 다형과의 관련성을 주장하였다.

본 연구자들은 아스피린 유발성 천식환자에서 LTC<sub>4</sub> 합성효소의 만성적인 과발현과 유전자 다형을 연관지을 수 있다는 가정하에 연구를 시작하였다. Sanak 등<sup>15)</sup>의 연구에서 밝혀진대로 -444 유전자 위치의 A에서 C로의 치환(A/C-444)를 MspI 효소로 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법으로 밝혀보고자 하였다. 그러나 본 연구의 결과 건강 대조군, 비아스피린 유발성 천식군, 아스피린 유발성 천식군 모두에서 C-<sup>444</sup> 대립인자가 0.19, 0.12, 0.14로 차이가 없었다. 이러한 결과는 Sanak 등<sup>15)</sup>의 연구에서는 아스피린 유발성 천식환자에서 C-<sup>444</sup> 대립인자가 0.436으로 대조군과 현저한 차이가 있었다. 그러나 건강 대조군에서 C-<sup>444</sup> 대립인자 빈도는 두 연구에서 0.19, 0.226으로 차이가 없어 이를 민족간의 유전자 다형 차이로 설명할 수 없었다. 이러한 연구 결과를 토대로 안정된 상태에서 아스피린 유발성 천식 환자의 기관지점막에서 LTC<sub>4</sub> 합성효소의 만성적인 과표현에 C-<sup>444</sup> 대립인자 외에 다른 유전자 다형의 존재를 가정할 수 있겠으며, 효소의 유전자 다형 외에 다른 조절인자가 작용할 수 있다고 가정할 수 있겠다. LTC<sub>4</sub> 합성효소의 발현 증가는 호산구 분화 및 이동에 관여하는 싸이토카인인 IL-5등이 활성화되어 조직 내에 많은 수의 LTC<sub>4</sub> 합성효소 양성 호산구가 침착하게 되었을 가능성이 있다. 또 다른 기

**Table 2.** Genotypes of LTC<sub>4</sub> synthase in patients with non-aspirin induced asthma (non-AIA), aspirin-induced asthma (AIA) and healthy controls

	No.	Genotype		Allele	
		wild	heterozygote	homozygote	C- <sup>444</sup>
Non-AIA	47	37 (79%)	9 (19%)	1 (2%)	0.12
AIA	44	32 (73%)	12 (27%)	0	0.14
Healthy Controls	32	21 (66%)	10 (31%)	1 (3%)	0.19

p > 0.05 compared groups to genotypes by Chi-square test

전 중에 하나는 아스피린에 의해 cyclooxygenase가 차단되면서 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>의 생성이 줄어들어 이로 인한 cys-leukotriene의 억제효과가 상대적으로 떨어지고 PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>의 기관지수축효과가 강화되면서 발작이 진행될 수도 있다.<sup>12,21)</sup> 이러한 설명은 실제 대상 환자들에서 유전자 다형 검사와 기관지점막 조직검사를 시행하여 각 효소발현(5 LO, 5FLAP, LTC<sub>4</sub> 합성효소, COX1,2)과의 관련성, 염증 반응에 동원된 호산구 및, 비만세포 LTC<sub>4</sub> 합성효소 활성도, 실제 cys-leukotriene과, prostaglandin치 등과의 관련성을 규명해 보면 명확한 답을 얻을 수 있으리라 생각된다. 또한 유전자 다형을 밝히기 위해서는 더 많은 수의 환자를 대상으로 하는 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 LTC<sub>4</sub> 합성효소 유전자 다형과 아스피린 유발성 천식과 관련성을 관찰할 수 없었다.

## 참고문헌

- 1) Weber RW, Hoffman M, Raine DA, Nelson HS : Incidence of bronchoconstriction due to aspirin, azo dyes, non-azo dyes, and preservatives in a population of perennial asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 64:32-7, 1979
- 2) Picado C, Castillo JA, Montserrat JM, Agusti-Vidal A : Aspirin intolerance : A precipitating factor of life-threatening attacks of asthma requiring mechanical ventilation. *Eur Respir J* 2:127-9, 1989
- 3) Marquette CH, Saulnier F, Leroy O, Wallaert B, Chopin C, Demarq JM, et al. : Long term prognosis of near fatal asthma. 6-year follow-up study of 145 asthmatic patients who underwent mechanical ventilation for a near-fatal attack of asthma. *Am Rev Respir*

*Dis* 146:78-81, 1992

- 4) Kowalski ML : Aspirin-sensitive rhinosinusitis/asthma syndrome-pathophysiology and management. *ACI Inter* 8:49-56, 1996
- 5) 박해심, 김윤정, 김희연, 남동호, 윤윤보 : 아스피린-과민성 천식 : Lysine-aspirin 기관지유발 시험의 진단적 유용성. *알레르기* 17:171-9, 1997
- 6) Sestini PL, Armetti L, Gambro G, Pieroni MG, Refini RM, Sala A et al. : Inhaled PGE<sub>2</sub> prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE<sub>4</sub> excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:572-5, 1996
- 7) Christie PE., Tagari P, Ford Hutchinson AW, Chalessson S, Chee P, Arm JP, et al. : Urinary LTE<sub>4</sub> concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 143:1025-9, 1991
- 8) Kumulin M, Dahlen B, Bjorck T, Zetterstorm O, Granstrom E, Dahlen SE : Urinary excretion of LTE<sub>4</sub> and 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, LTD<sub>4</sub> and histamine in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 146:96-103, 1992
- 9) Smith CM, Hawksworth RJ, Thien FC, Christie PE, Lee TH : Urinary leukotriene E<sub>4</sub> in bronchial asthma. *Eur Respir J* 5:693-9, 1992
- 10) Sladek K, Dworski R, Soja J, Sheller JR, Nizankowska E, Oates JA, et al. : Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients after aspirin challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 149:940-6, 1994
- 11) Sladek K, Szczeklik A : Cysteinyl leukotriene overproduction and mast cell activation in aspirin-provoked bronchospasm in asthma. *Eur Respir J* 6:391-9, 1993
- 12) Szczeklik A, Sladek K, Dworski R, Nizankowska E, Soja J, Sheller JR, et al. : Bronchi-

- al in aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1608-14, 1996
- 13) Sampson AP, Cowburn AS, Sladek K, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, et al. : Profound overexpression of leukotriene C<sub>4</sub> synthase in bronchial biopsies from aspirin intolerant asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 113:355-7, 1997
- 14) Cowburn AS, Sladek K, Soja J, Adamek L, Nizankowska E, Szczeklik A, et al. : Overexpression of leukotriene C<sub>4</sub> synthase in bronchial biopsies from patients with aspirin-intolerant asthma. *J Clin Invest* 101:834-46, 1998
- 15) Sanak M, Simon H-U, Szczeklik A : Leukotriene C<sub>4</sub> synthase promoter polymorphism and risk of aspirin induced asthma. *Lancet* 350:1599-600, 1997
- 16) Sambrook KJ, Fritsch EF, Manatis T: Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA, molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. p9.14-21, Cold Spring Harbor ab. Press, New York, 1987
- 17) Murakami M, Austen KF, Bingham III CO, Friend DS, Penrose JF, Arm JP : Interleukin-3 regulates development of the 5-lipoxygenase/leukotriene C<sub>4</sub> synthase pathway in mouse mast cells *J Biol Chem* 270:22653-6, 1995
- 18) Lam BK, Owen Jr WF, Austen KF, Soberman RJ : The identification of a distinct export step following the biosynthesis of leukotriene C<sub>4</sub> by human eosinophils. *J Biol Chem* 264:12885-9, 1995
- 19) Penrose JF, Spector J, Bladasaro M, Xu K, Boyce J, Arm JP et al. : Molecular cloning of the gene for human leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *J Biol Chem* 271:11356-61, 1996
- 20) Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen F : Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C<sub>4</sub> synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A<sub>4</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7663-7, 1994
- 21) Picado C, Ramis I, Rosello J, Prat JM, Bulbena O, Plaza V et al. : Release of peptide leukotriene into nasal secretions after local instillation of aspirin in aspirin-sensitive asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 145:65-9, 1992