

탄광부 진폐증의 진행에 있어 TNF α 유전자 다형성의 역할

가톨릭대학교 예방의학교실 산업의학과

안병용 · 김경아 · 남혜윤 · 문제혁 · 정진숙 · 임 영

— Abstract —

The Role of TNF α Gene Promoter Polymorphism in the Development of Coal Workers' Pneumoconiosis

Byoung Yong Ahn, Kyoung Ah Kim, Hae Yun Nam, Je Hyeok Mun,
Jin Sook Jeoung, Young Lim

*Department of Occupational and Environmental Medicine,
Department of Preventive Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

Objectives : This study was performed in order to investigate the frequency of the TNF2 allele in patients with coal workers pneumoconiosis (CWP).

Methods : We compared the genotype distribution of TNF α gene promoter polymorphism between 80 CWP patients and 54 healthy controls.

Results : The results were as follows : 1. The rare allele TNF2 was significantly more frequent in CWP patients (20.6 %) than in controls (10.2 %). 2. The spontaneous or LPS-induced release of TNF α from the peripheral monocytes was slightly increased in the TNF2 group, but these values were not significantly different between groups. 3. In the CWP TNF2 group, the increase of LPS-induced TNF α release was significant in comparison with that of the controls.

Conclusions : From the above results, we suggest that the TNF2 allele is strongly associated with susceptibility to CWP development.

Key Words : TNF α , TNF α promoter, TNF2, Polymorphism, Pneumoconiosis

서 론

탄광부 진폐증은 탄분진이 폐장내에 침착되어 조직반응이 일어나 생긴 질병이며, 1954년 우리나라에서 가장 먼저 보고된 직업병이다. 진폐증의 발생에는 interleukin-1, leukotriene B₄, 그리고 tumor necrosis factor 등의 염증매개 물질이 관여하는 것으로 밝혀져 있으며, 이 중 tumor necrosis factor (TNF)는 진폐증의 발병과 진행에 관여하는 매우 중요한 사이토카인으로 알려져 있다(Borm et al., 1988; LaSalle et al., 1990; Schins & Borm, 1995). TNF 유전자의 promotor 내에는 특이적인 점변이가 나타나는 위치들이 있으며(Rink & Kirchner, 1996; Probert & Selmaj, 1997; Czaja et al., 1999, Berran et al., 2001), 이러한 유전자 변이들 중에 전사 시작 위치 상행에 있는 308 핵산의 유전자 다형성이 TNF 발현에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Wilson et al., 1993). TNF의 유전자 다형성은 2가지 형태의 대립유전자 형태로 나타나며, 흔하게 나타나는 대립유전자는 TNF1이고 드물게 나타나는 대립유전자는 TNF2이다. TNF2 대립유전자는 TNF의 일시적인 증가나 TNF의 생산 자극과 상당한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다(Wilson et al., 1997; Kroeger et al., 1997). 더 나아가, TNF2 유전자 다형성은 뇌 말라리아(McGuire et al., 1994), 류마치스성 관절염(Wilson et al., 1995), 폐혈증(Mira et al., 1999), 만성 기관지염(Huang et al., 1997)과 천식(Li Kam et al., 1999) 등의 질환발생과 연관성이 있는 것으로도 알려져 있다.

탄광부 진폐증의 임상적인 양상과 경과는 진폐의 병변에 따라 다양하게 나타나며, 폐장내에 존재하는 분진의 양이 많을수록 흉부 방사선 소견이 악화되는 것으로 알려져 있다(조규상, 1985). Jacobsen (1972)이 시행한 연구에 의하면, 2 mg/m³의 분진 농도에서 하루 8 시간씩 35 년간 일하면 1-2 %의 광부가 2형 이상의 진폐증에 이환되고 3.5 mg/m³에서는 3.5 %가 2형 이상의 진폐증에 이환된다고 한다. 우리나라 광부들을 대상으로 한 연구에 의하면, 탄광부 진폐증이 최초로 발생하기까지의 근무기간은 5-9 년이 17.6 %, 10-14 년이 16.7 %, 15-19 년이 10.6 %인 것으로 발표되었다(최병순, 1996). 이

처럼 분진에 폭로된 탄광부들 중에서 일부만이 진폐증으로 이환되는데, 작업환경 즉 분진농도나 근무기간이 진폐증 발생에 미치는 영향 외에 개인 감수성에 관한 관심이 최근 증가되고 있다. 특히 만성 폐질환과 연관이 있다고 알려져 있으며 규폐증 동물모델에서 단일클론항체로 진폐유발 효과가 입증된(Piquet et al., 1990) TNF는 진폐증 환자에서 민감한 생체지표로 이미 보고된 바 있다(Lim et al., 1998).

따라서 본 연구는 TNF promotor에서 유전자 다형성과 진폐증과의 연관성을 알아보기 위해 진폐증 환자군과 대조군의 TNF promotor 유전자 전사 시작 위치 상행에 있는 308 핵산에서 나타나는 유전자 다형성에 대하여 연구하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

탄광에 근무한 적이 있으며, 가톨릭대학교 성모병원을 방문한 80명의 진폐증 환자와 폐질환의 병력이 없는 종합검진 수진자 54명을 대조군으로 연구 대상을 선정하여 TNF 유전자 다형성을 분석 비교하였다. 진폐증 환자의 진폐유무는 흉부방사선 사진을 촬영하여 진단방사선과 전문의 1인과 산업의학과 전문의 1인이 판독하였다.

2. 연구 방법

1) NcoI Restriction Fragment Length

Polymorphism에 의한 TNF 유전자형 분석
 heparin으로 처리한 혈액 10 ml를 Histopaque (1077 Sigma, St. Louis, MO) 위에 층이 분리되지 않도록 주입하여 상온에서 500 × g로 원심분리하고 단핵세포층을 추출하여 phosphate buffered saline으로 세척하였다. 3 × 10⁶ 단핵세포에서 DNA isolation kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 남아있던 2 × 10⁶ 세포는 단핵구에서 분비되는 TNF의 농도를 측정하는데 사용하였다.

Polymerase chain reaction (PCR) 증폭을 통해 TNF promotor의 -308 핵산에서 일어나는 단염기쌍 유전자 다형성을 연구하기 위해, TNF promotor의 -331에서 14까지의 345 염기쌍 분절을 증

폭하였다. 100 ng genomic DNA에 각 primer 0.2 μ M (5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'와 5'-GAGCGTCTGCTGGCTGGGTG-3'), dNTP, 10 mM Tris, 1.5 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 그리고 Taq Polymerase가 각각 들어있는 50 μ l 반응 혼합물을 첨가하였다. 그리고 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 분, annealing 60 $^{\circ}$ C 1 분, extension 72 $^{\circ}$ C 1 분으로 30 회를 반복하여 증폭시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 처리하였다. 증폭을 한 PCR 생성물에서 남아있는 primer와 작은 핵산 조각들을 제거하기 위해 PCR purification kit을 사용하였으며, 이후 PCR 생성물은 NcoI 효소로 처리하고 6 % polyacrylamide gel로 전기영동시켜 ethidium bromide로 염색 후 최종 유전자형을 확인하였다.

유전자 변이가 존재하는 대립유전자에는 NcoI 인지부위가 존재하므로 TNF2는 325와 20 염기쌍의 두 분절로 갈라지며, TNF1은 이 효소에 의해 분해되지 않기 때문에 345 염기쌍, 즉 하나의 밴드로 나타나는 것을 확인하였다.

2) 말초 단핵구에서의 TNF 분비

진폐증 환자군의 단핵구에서 자발적으로 분비되는 TNF α 양과 내독소인 lipopolysaccharide (LPS; Sigma, St. Louis, MO)의 자극으로 분비되는 TNF α 양을 비교하였다. 24 well plate에 한 well 당 2 \times 10⁶ 개의 단핵구를 부유시킨 다음 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 환경의 배양기에서 배양하였다. 1시간 후 세포가 있는 배지를 세척하고 RPMI 배지로 갈아주었다.

18 시간동안 배양을 한 후 LPS(1 μ g/ml)를 주입하고 다시 24 시간동안 배양을 하였으며 부유층은 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 배양된 부유층의 TNF α 농도는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다(Kim et al., 1999).

3. 통계 분석

연속 변수들은 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며, 진폐증 환자군과 대조군의 나이와 흡연력은 student's t-test로, 대립유전자 빈도와 유전형 분포 빈도의 차이는 chi-square test로 비교 분석하였다. 진폐증 환자에서 TNF 유전자의 표현형에 따라 TNF1 군과 TNF2 군으로 나누었으며, heterozygote는 TNF2 군으로 분류하였다. 두 군간에 자발적 TNF α 생성능과 LPS 자극에 의한 TNF α 생성능이 차이가 있는지는 Scheffe's multiple comparison test로 분석하였으며, 통계 프로그램은 SPSS version 7.5 for PC를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 연구 대상자들의 인구학적 특징

진폐증 환자군으로 선정된 80명의 진폐증 환자군은 전부 전직광부로서 평균 분진 폭로력은 20.1 \pm 9.0 년이고 평균 나이는 61.8 \pm 8.1 세이며, 대조군 54 명의 평균나이는 44.4 \pm 9.1 세로 진폐증 환자군이 대조군에 비해 나이가 많았다(p<0.05). 진폐증 환자군과 대조군의 흡연상태는 빈도에 있어 유의한 차이가 있었으며(p=0.001), 특히 환자군에서 과거에

Table 1. General characteristics of the study subjects

	Control	Subjects with CWP
Number of subjects	54	80
Age(years)*	44.4 \pm 9.1	61.8 \pm 8.1
Smoking status*		
Current	36 (66.7)	11 (13.8)
Former	6 (11.1)	56 (70.0)
Never	12 (22.2)	13 (16.3)
Smoking(Pack-years)	21.4 \pm 18.7	25.1 \pm 15.9
Dust exposure duration (years)	-	20.1 \pm 9.0

*: p<0.05, (): %

Table 2. Genotypic distribution of the TNF promoter region in study subjects

Groups	TNF1/TNF1 N(%)	TNF1/TNF2 N(%)	TNF2/TNF2 N(%)	Total N
Control	43 (79.6)	11 (20.4)	0 (0.0)	54
CWP*	48 (60.0)	31 (38.8)	1 (1.3)	80

*: Significantly different from control by chi-square test($\chi^2=5.924$, $p=0.015$)

Table 3. Frequency of TNF1 and TNF2 allele in study subjects

Group	TNF1 %	TNF2 %
Control	89.8 (97/108)	10.2 (11/108)
CWP	79.4 (127/160)	20.6 (33/160)*

*: Significantly different from control by chi-square test($\chi^2=5.121$, $p=0.024$)

Table 4. Comparison of in vitro release of TNF α from monocytes between TNF1 and TNF2 in CWP

Group	Spontaneous (ng/ml)	LPS stimulated (ng/ml)
Control	36.0 \pm 5.8abe	51.3 \pm 17.2cde
TNF1	57.5 \pm 19.6a	64.6 \pm 21.5c
TNF2	60.7 \pm 15.8bf	68.9 \pm 14.4df

*: Means with same letters are significantly different at $p<0.05$ by Scheffe's multiple comparison test

흡연비율이 높았다. 흡연력은 진폐증 환자군과 대조군에서 각각 25.1 \pm 15.9와 21.4 \pm 18.7 pack-years로 유의한 차이는 없었다(Table 1).

2. 연구 대상자의 TNF α promoter 유전자형

TNF1 homozygote가 대조군과 진폐증 환자군에서 각각 43 명(79.6 %)과 48 명(60.0 %)으로 양군에서 가장 많은 빈도수를 보였으며, TNF2 homozygote는 진폐증 환자군에서 1명 있었다. Heterozygote는 진폐증 환자군에서 31 명(38.8 %)이었고, 대조군에서 11 명(20.4 %)이었다. TNF promoter 유전자형의 빈도는 두 군간에 유의한 차이를 보였다($p=0.015$)(Table 2).

3. 연구 대상자의 TNF1와 TNF2 allele 빈도

대조군과 진폐증 환자군에서 TNF1 대립유전자가 관찰된 경우가 각각 89.8 %와 79.4 %이었고, TNF2 대립유전자는 각각 10.2 %와 20.6 %이었다. TNF2 대립유전자가 관찰되는 경우는 진폐증

환자군에서 유의하게 높았다($p=0.024$)(Table 3).

4. TNF1/ TNF2에 따른 단핵구에서 분비되는 TNF α 의 비교

단핵구에서 자발적으로 분비되는 TNF α 의 농도는 대조군에서 36.0 \pm 5.8 ng/ml, 진폐증 환자 중 TNF1 군에서 57.5 \pm 19.6 ng/ml, 진폐증 환자 중 TNF2 군에서 60.7 \pm 15.8 ng/ml로 유의한 차이가 있었다. Scheffe의 다중비교에서 대조군에 비하여 TNF1 군과 TNF2 군 모두 TNF α 농도에 유의한 차이가 있었으나, TNF1 군과 TNF2 군 사이에 자발적으로 분비되는 TNF α 농도는 유의한 차이가 없었다.

LPS로 자극하였을 때 단핵구에서 분비되는 TNF α 의 농도는 대조군에서 51.3 ng/ml로 현저하게 증가하였다. 진폐증 TNF1 군에서는 자발적으로 분비되는 TNF α 농도와 LPS로 자극하였을 때 TNF α 농도에 유의한 차이가 없었다. 진폐증 TNF2 군에서는 자발적으로 분비되는 TNF α 농도와 LPS로 자극하였

을 때 TNF α 농도에 유의한 차이가 있었다($p=0.039$).

고 찰

분진에 폭로되면 대부분의 경우 폐에 염증이 유발되어 염증세포들이 폐포내로 유입되고 다양한 염증 매개물질들을 분비한다. 분진 폭로 후에 발생하는 폐포염의 정도와 염증세포들의 조성은 진폐증의 진행정도를 예측할 수 있는 평가기준이 된다(Kim et al., 1999). TNF α 는 분진-유도 폐염증 반응의 병태생리에 중심적인 사이토카인으로써 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Mira et al., 1999), 이전의 몇몇 연구들에서는 TNF α 발현형이 탄광부 진폐증의 발생과 진행에 관련이 있음을 보고하고 있다(LaSalle et al., 1990). TNF α 유전자의 발현은 사이토카인 단백질에 직접적으로 작용하므로 유전자 다형성은 사이토카인의 분비에 중요한 영향을 미칠 것으로 여겨진다. TNF α 유전자는 염색체 6p21.3의 HLA class II region에 존재하는 것으로 알려져 있으며(Czaja et al., 1999), TNF α 유전자 promotor의 163, -238, -308과 376 위치에서 4개의 특이한 점 변이가 발생한다고 알려져 있고, 이러한 점변이 위치 중에서, -308에서의 점변이가 TNF α 의 생산에 가장 관련이 있다고 알려져 있다(Probert & Selmaj, 1997).

본 연구는 탄광부 진폐증의 발생이 TNF α 유전자 다형성과 관련이 있는지를 알아보고자 하였으며, 그 결과 TNF α promotor의 드문형 TNF2 대립유전자 빈도가 탄광부 진폐증에서는 20.6 %였고, 대조군에서는 10.2 %로 TNF2의 유전자 다형성 빈도가 대조군에 비해 탄광부 진폐증 환자군에서 유의하게 높았고 이러한 결과는 TNF2의 유전자 다형성이 탄광부 진폐증의 발생에 위험인자가 될 수 있음을 암시하고 있다.

표 4에서 단핵구에서 자발적으로 분비되는 TNF α 농도는 대조군과 진폐증 환자군에서 유의한 차이를 보였다. 이는 진폐증 환자에서 폐에 침착된 분진이 폐장내에서 제거되지 못하고 계속적인 자극을 유발하는 것이 지속적인 단핵구의 TNF α 상승을 초래할 것으로 생각되며, 과거 흡연 경력도 영향을 미칠 것으로 생각된다. 진폐증 환자의 TNF α 유전자 다형성 중 TNF1 유전자를 가진 군과 TNF2 유전자를 가

진 군 사이에는 자발적으로 분비되는 TNF α 농도에 차이가 없었다. 유전자 활성화는 여러 가지 복합적인 요인에 의해서 활성화되며 진폐증 환자에서는 기존 질환으로 인하여 두 군 모두 단핵구에서의 TNF α 분비능이 활성화되어 있다는 보고가 있다(김경아 등, 1998).

단핵구를 LPS로 자극하였을 때 분비되는 TNF α 농도는 대조군과 진폐증 환자군에서 유의한 차이를 보였다. 특히 대조군에서는 단핵구에서 LPS로 자극하여 분비되는 TNF α 농도가 자발적으로 분비되는 TNF α 농도에 비하여 42 % 증가하였으며 이는 통계적으로 유의하였다. 진폐증 환자 중 TNF1 군에서는 단핵구에서 LPS로 자극하여 분비되는 TNF α 농도가 자발적으로 분비되는 TNF α 농도에 비하여 유의한 차이가 없었다. 진폐증 환자 중 TNF2 군에서는 단핵구에서 LPS로 자극하여 분비되는 TNF α 농도가 자연적으로 분비되는 TNF α 농도에 비하여 13.5 % 증가하였으며, 유의한 차이가 있었다. 대조군의 경우 LPS에 의한 자극이 TNF α 분비를 폭발적으로 증가시켰으나 진폐증 환자군에서는 대조군에 비하여 LPS 자극에 의한 TNF α 분비량의 증가폭이 적었고, TNF2 군에서만 유의한 증가가 있었다. 진폐증 환자에서는 과거에 침착된 분진에 의해 TNF α 의 분비능이 활성화되어 있어 LPS로 단핵구를 자극하여도 그 증가폭이 적었던 것으로 사료되며, 진폐증 환자 중 TNF2 군에서 LPS로 단핵구를 자극할 때 TNF α 의 분비가 유의한 증가를 보인 것과 진폐증의 발병과 진행에 영향을 미치는 개인적 감수성과의 연관성에 대해서는 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

유전자 활성화는 환경적인 영향이나 질병의 진행 상황에 따라 변화할 수 있다. Jacob 등(1990), Pociot 등(1993), 그리고 Schins와 Borm(1995)에 의하면 분진 등의 자극물질에 폭로될 경우 TNF α 유전자 발현이 증가하고 따라서 TNF α 의 분비가 증폭될 수 있다고 보고하고 있으며, 이는 본 연구가 현직 탄광부가 아닌 전직 탄광부만을 대상으로 하였으므로 이에 대한 보완 연구가 필요하다. 그리고 대조군 선정에 있어서 건강한 사람보다는 분진에 폭로되고 진폐증에 이환되지 않은 광부들을 대상으로 한 연구도 필요하며, 생애누적 노출량과 진폐 병형에 따른 연구도 필요할 것으로 여겨진다.

TNF2 대립유전자가 TNF α 의 발현증가를 유도하

는 이유는 아직 밝혀지지 않았다. 일부 연구자들은 308 유전자다형성이 전사인자의 결합이나 TNF α 유전자의 전사와 발현에 영향을 미칠 것으로 보고하고 있다(Kroeger et al., 1996). 또한 몇몇 연구들은 TNF locus과 HLA class 안에 광범위한 불안정한 연결구조가 있다고 보고하고 있으며(Li Kam et al., 1999; Czaja et al., 1999), Probert와 Selmaj 등(1997)은 TNF2 대립유전자가 HLA-DR2와 관련하여 전신성 루프성 홍반증 같은 일부 면역학적 질환과도 관계가 있다고 하였다.

이와는 대조적으로, 뇌 말라리아에 의한 신경장애와 패혈증 속 같이 외부 원인에 의해 생긴 질환들은 HLA 유전자 변형과 관계가 없는 것으로 알려져 있다. 탄광부 진폐증은 비특이적인 염증반응을 일으키는 탄분진의 흡입이 원인이 되는 질환이므로 HLA와 관계된 역할은 적을 것으로 사료되었다.

결과적으로, 본 연구는 -308 TNF2 대립유전자의 존재가 탄광부 진폐증 발생에 유전적인 요인으로 작용할 수 있음을 보여준다. 그러나 이러한 관계를 보다 명확히 알기 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 하며 이를 위하여 향후 초기 진폐증 환자에 대한 추적 조사가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : Tumor necrosis factor α (TNF α)는 진폐증의 발병과 진행에 관여하는 중요한 사이토카인이며, TNF α gene promotor의 다형성 유전자인 TNF2는 TNF α 의 생성증가와 기관지 폐포 염증의 악화에 관계가 있다고 알려져 있다. 본 연구는 TNF2 대립유전자의 빈도가 탄광부 진폐증의 발생과 관계가 있는지 알아보려고 하였다.

방 법 : 진폐증 환자 80명과 대조군 54명으로부터 얻은 혈액에서 단핵세포를 추출하여 Nco I에 의한 TNF α 유전자를 분석하여 유전자형 분포를 비교하였다.

결 과 : 진폐증 환자의 TNF2 대립유전자의 빈도는 대조군보다 유의하게 높았다(진폐증 환자군 20.6%, 대조군 10.2%). 그리고 진폐증 환자군을 TNF1 균과 TNF2(heterozygote 포함)군으로 나누어 단핵구에서 TNF α 가 자발적 또는 LPS 자극에 의해 분비되는 양을 측정한 결과, TNF2 군에서 분비량이 많았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

그러나 단핵구를 LPS로 자극하였을 때 TNF2 군에서 TNF α 분비가 유의하게 증가하였다.

결 론 : -308 TNF2 대립유전자의 존재가 탄광부 진폐증 발생에 유전적인 요인으로 작용할 수 있음을 보여준다. 그러나 이러한 관계를 보다 명확히 알기 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 하며 이를 위하여 향후 초기 진폐증 환자에 대한 추적 조사가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술 개발 사업의 지원으로 이루어 졌음.

참고문헌

- 김경아, 구정완, 임영 등. 제조업체 분진폭로 근로자들의 임상경과 및 폐기능(진폐증에 관한 생체지표 개발). 대한산업의학회지 1998;10(4):450-462.
- 조규상. 진폐증. 서울: 최신의학사, 1985.
- 최병순. 한국의 석탄광업에서 발생한 진폐증의 실태. 대한산업의학회지 1996; 8(1): 137-152.
- Berran Yucesoy, Val Vallyathan, Douglas P. Landsittel, Dan S. Sharp, Ainsley Weston et al. Association of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis. Toxicology and Applied Pharmacology 2001; 172:75-82.
- Borm PJA, Palmem N, Engelen JJM, Buurman WA. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor- α from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. Am Rev Respir Dis 1988;138:1589-94.
- Czaja AJ, Cookson S, Contantini PK, Clare M, Underhill JA, et al. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. Gastroenterology 1999;117:645-52.
- Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1997;156 :1436-1439.
- Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, et al. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor- α : Relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Proc

- Natl Acad Sci USA 1990;87:1233-7.
- Jacobsen M. Progression of coal workers' pneumoconiosis in Britain in relation to environmental conditions underground. In proceedings of Conference on Technical Measures of Dust Prevention and Suppression in Mines, Luxembourg October, 1972.
- Kim KA, Lim Y, Kim JH, Kim EK, Chang HS, et al. Potential biomarker of coal workers' pneumoconiosis. *Toxicol Let* 1999;108:297-302.
- Kroeger KM, Abraham LJ. Identification of an AP-2 element in the 323 to 285 region of the TNF-alpha gene. *Biochem Mol Biol Int* 1996;40:43-51.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The 308 tumor necrosis factor-promotor polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-9.
- LaSalle P, Gosset P, Aerts C, Fournier E, Lafitte JE, et al. Abnormal secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α by alveolar macrophages in coal workers' Pneumoconiosis: Comparison between simple pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. *Exp Lung Res* 1990;16:73-80.
- Li Kam, Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, et al. Association between 308 tumor necrosis factor promotor polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29:1204-8.
- Lim Y, Kim KA, Yun IG. The measurement of IL-1, IL-8, TNF for the diagnosis of pneumoconiosis. *Advances in the Prevention of Occupational Respiratory Disease* 1998; 845-8.
- McGuire W, AVS Hill, CEM Allsopp, BM Greenwood, D Kwjatkowski. Variation in the TNF α promotor region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994;371: 508-11.
- Mira JP, Cariou A, Crall F, Declaux C, Losser MR, et al. Association of TNF2, a TNF promotor polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 1999;282:561-8.
- Piquet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 1990;344:245-7.
- Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mlvig J, Worsaae H, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF α and TNF α by human mononuclear cells: A possible link to insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:224-31.
- Probert L, Selmaj K. TNF and related molecules: trends in neuroscience and clinical applications. *J Neuroimmunol* 1997;72:113-7.
- Rink L, Kirchner H. Recent progress in the tumor necrosis factor- α field. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:199-209.
- Shins RPF, Borm PJA. Epidemiological evaluation of monocyte TNF α release as an exposure and effect marker in pneumoconiosis. A five year follow up study among coal workers. *Occup Environ Med* 1995;52:441-50.
- Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor-promotor region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;177:557-60.
- Wilson AG, de Vries N, van der Putte LB, Duff GW. A tumor necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:601-3.
- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDewitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor promotor on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.