

## Wpływ obecności polimorfizmów w genie dla TNF- $\alpha$ na zapadalność i przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów

*Influence of tumor necrosis factor- $\alpha$  gen polymorphisms on susceptibility to, and severity of rheumatoid arthritis*

**Anna Kozakiewicz**

Pracownia Antygenów Zgodności Tkankowej Zakładu Patofizjologii i Immunologii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. Eleonory Reicher w Warszawie, kierownik Zakładu prof. dr hab. biol. Włodzimierz Maśliński, dyrektor Instytutu prof. dr hab. med. Sławomir Maśliński

**Słowa kluczowe:** reumatoidalne zapalenie stawów, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), polimorfizm.

**Key words:** rheumatoid arthritis, tumor necrosis factor  $\alpha$ , polymorphism.

### Streszczenie

Przedstawiono pracę opisującą badania, którymi objęto populację europejską (Holandia, Szwecja, Włochy, Anglia, Hiszpania), tajwańską i chilijską. Przebadano polimorfizm w regionie regulatorowym 5' odpowiedzialnym za transkrypcję genu TNF- $\alpha$  w pozycjach -163G/A, -238G/A, -244G/A, -308G/A, -376G/A, -857C/T, -863C/A, w intronie w pozycji +489G/A i w regionie 5' niepodlegającym translacji +70 (wbudowanie cytozyny). Szczególną uwagę zwrócono na polimorfizm TNF- $\alpha$  w pozycjach -238, -376, -308 i +489. Stwierdzono występowanie silnego niezrównoważenia sprzężeń w pozycjach -238 i -376. W większości ośrodków badawczych stwierdzono powiązanie zapadalności i łagodniejszego przebiegu RZS w stosunku do polimorfizmu w pozycjach -238G/A i -308G/A. Przedstawione doniesienia nie pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie powiązania pozostałych badanych polimorfizmów genu TNF- $\alpha$  z zapadalnością i przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów w żadnej z badanych populacji. Na podstawie przedstawionych prac rozwiązanie tego problemu nie jest możliwe. Materiał ten wydaje się zachęcający i może stanowić podstawę do dalszych rozszerzonych badań obejmujących inne współdziałające geny.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, układową chorobą zapalną tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym, w etiologii której mają znaczenie zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe

### Summary

Review of clinical data of European, Taiwan and Chilean population based on publications was done. Until now a total of nine single nucleotide polymorphisms (SNP) were identified. One of which is located in the first intron at position +489, one at position +70 in the 5' untranslated region (UTR) and seven in the 5' regulatory region, a region involved in the regulation of TNF gene transcription at position -163G/A, -238G/A, -244G/A, -308G/A, -376G/A, -857C/T, -863C/A. The polymorphisms at position -238, -376, -308 and +489 were studied with particular attention. The polymorphisms at position -238 and -376 were found to be in strong linkage disequilibrium. In presented data no associations between the TNF- $\alpha$  gen polymorphisms and susceptibility to, or severity of, RA could be demonstrated in tested populations.

[1]. Zmiany patologiczne typowe dla RZS objawiają się przerostem i przewlekłym stanem zapalnym błony maziowej z naciekiem przez fagocyty jednojądrowe, limfocyty, komórki plazmatyczne i neutrofile oraz następują-

---

### Adres do korespondencji:

mgr biol. Anna Kozakiewicz, Zakład Patofizjologii i Immunologii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa

Praca wpłynęła: 8.07.2004 r.

ca destrukcją chrząstki stawowej i kości [24]. U chorych na RZS antygeny głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy II HLA-DR4 występują dużo częściej niż w ogólnej populacji. Reumatoidalne zapalenie stawów wykazuje powiązanie z obecnością szeregu aminokwasów w pozycjach 70–74 podtypu DRβ1. Około 30% genetycznie uwarunkowanej podatności na RZS jest związane z występowaniem tych alleli. Częstość występowania alleli HLA-DR2 jest obniżona [11, 21].

W patogenezie RZS kluczową rolę pełni czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), cytokina o właściwościach prozapalnych, katabolicznych i immunostymulujących [3, 22]. U pacjentów z RZS obserwuje się podwyższony poziom TNF- $\alpha$  w płynie stawowym i w komórkach błony maziowej [23]. TNF- $\alpha$  produkowany jest przede wszystkim przez monocyty, makrofagi i limfocyty T. Wytwarzanie i uwalnianie TNF- $\alpha$  stymuluje IFN- $\gamma$ , IL-15, a także sam TNF- $\alpha$  [2]. Potwierdzeniem kluczowej roli TNF- $\alpha$  w RZS są sukcesy, jakie przyniosła terapia anty-TNF- $\alpha$ , która u części chorych zatrzymuje procesy destrukcyjne stawów. Zablokowanie możliwości potężniejszej walki z chorobą [15, 20]. Za czynnik potencjalnie predysponujący do rozwoju RZS uważa się gen dla TNF- $\alpha$ , który zlokalizowany jest na chromosomie 6, w regionie antygenów głównego układu zgodności tkankowej klasy III, pomiędzy genami HLA-B a HLA-DR.

Zidentyfikowano 10 polimorfizmów, polegających na zamianie jednego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism* – SNP) w obrębie genu dla TNF- $\alpha$ . Jeden z nich znajduje się w pierwszym intronie w pozycji +489 (zamiana guaniny na adeninę), następny w pozycji +70 (wbudowanie cytozyny) w regionie 5' niepodlegającym translacji (*untranslated region* – UTR) i 8 polimorfizmów w regionie regulatorowym 5', który jest odpowiedzialny za transkrypcję genu TNF. Dotyczy to pozycji -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -376G/A, -308G/A, -244G/A, -238G/A i 163G/A [5, 8, 12, 26]. Polimorfizmy znajdują się w bardzo ważnej części genu, odpowiedzialnej za regulację jego transkrypcji. Pojedyncza zmiana w tym regionie ma poważny wpływ na poziom ekspresji TNF- $\alpha$  [18].

Znaczenie, jakie ma TNF- $\alpha$  w patogenezie RZS, odkrycie polimorfizmów w genie dla TNF- $\alpha$  oraz fakt podwyższonego poziomu TNF- $\alpha$  u chorych skłoniło do postawienia pytania, czy któryś z polimorfizmów genu TNF- $\alpha$  ma wpływ na przebieg choroby. Odpowiedź pozwoliłaby z jednej strony na podjęcie odpowiednio wcześniej agresywnej terapii, a z drugiej mogłaby posłużyć jako wartościowe badanie prognostyczne, pozwalające przewidywać dynamikę i przebieg choroby.

Prowadząc badania na różnych populacjach, można próbować poszukiwać powiązań pomiędzy podatnością i przebiegiem RZS z występowaniem określonego poli-

morfizmu genu dla TNF- $\alpha$ . Przegląd literatury wskazuje, że przeprowadzono wiele takich badań. Jednakże uzyskane wyniki nie są jednoznaczne. Może to wynikać zarówno z liczebności badanych grup, kryteriów klinicznych, jak i różnic występujących w populacjach, które były badane.

Brinkman i wsp. [4] badali powiązania polimorfizmów w pozycjach -376, -308, -238, -163 i +70 jako miejscach wpływających na inicjację transkrypcji z podatnością i ciężkością przebiegu RZS. Badania prowadzono w Holandii na 283 chorych na RZS w ciągu pierwszych 3 lat choroby i na 166 zdrowych dawcach krwi. Badano jeden parametr – liczbę nadżerek w stawie ręki. Nie stwierdzono związku między podatnością lub przebiegiem choroby a polimorfizmami -308, -376 i +70 TNF- $\alpha$ . U pacjentów z genotypem -238GA rzadziej występowały nadżerki powierzchni stawowych w obrazie radiologicznym rąk, mniejsza liczba stawów wykazywała nadżerki, stwierdzono brak guzków podskórnych w porównaniu z pacjentami o genotypie -238GG. Związek polimorfizmu -238 ze zmianami radiograficznymi był niezależny od obecności antygeny HLA-DR4. Z tych badań wyciągnięto wnioski, że genotyp -238GG TNF- $\alpha$  stanowi czynnik genetyczny przyczyniający się do powstawania nadżerek wykrywanych radiologicznie u pacjentów chorych na RZS. Następne badania prowadzono na grupie 101 pacjentów przez 12 lat [14]. Badano 2 parametry: radiologicznie uwidaczniane nadżerki w stawach rąk i stóp na początku choroby i w czasie 3, 6, 12 lat trwania choroby oraz obecność genotypu -238 TNF. Ponadto oceniano, jaki wpływ ma ten polimorfizm na indukcję produkcji TNF- $\alpha$ . Badania na liniach komórkowych monocytów i limfocytów z użyciem krótkotrwałych transfekcji wykazały, że pacjenci z genotypem TNF -238GA wykazywali mniejsze uszkodzenia stawów niż pacjenci -238GG. Uzyskane wyniki ponownie były niezależne od obecności antygeny HLA-DR4. Ponadto TNF -238A wykazywał niezrównoważenie sprzężeń z polimorfizmem w pozycji -376. Badania *in vitro* nie wykazały, żeby sam polimorfizm TNF -238A ani w kombinacji z TNF -376 miał wpływ na aktywację transkrypcji. Autorzy sugerują, że te polimorfizmy mogą odgrywać rolę jako markery dla innych polimorfizmów w genie TNF lub sąsiednich genach, które mogą wpływać na przebieg choroby.

Fabris i wsp., badając populację włoską sprawdzali, czy obecność polimorfizmu -238 i +489 TNF- $\alpha$  jest różna u chorych z łagodnym i ostrym reumatoidalnym zapaleniem stawów [10]. Badaniem objęto 163 pacjentów, w tym 66 z ostrym przebiegiem RZS i 67 zdrowych dawców krwi. Wszyscy pacjenci z ostrym przebiegiem choroby mieli genotyp -238GG. Genotyp -238AG był nieobecny u pacjentów z ostrym przebiegiem RZS, u pacjentów z łagodną formą choroby i w grupie kontrolnej występo-

wał z podobną częstotliwością. Natomiast genotyp +489AA występował częściej u zdrowych dawców krwi niż wśród chorych na RZS, co może świadczyć o jego roli ochronnej przed ciężkim przebiegiem choroby. Inne badania, przeprowadzone na 56 pacjentach z ostrym RZS, 44 z łagodnym RZS i 45 zdrowych dawcach krwi, potwierdziły te doniesienia [9]. U pacjentów z ostrym przebiegiem choroby, którzy nie zareagowali na terapię metotreksatem, występował genotyp TNF -238GG. Allel +498 powiązany jest z wcześniejszym początkiem choroby, długim czasem jej trwania i większą opornością na konwencjonalną terapię. W przeciwieństwie do polimorfizmu TNF -238, którego związek z przebiegiem RZS jest określony, występowanie polimorfizmu +498 nie zostało tak jednoznacznie i do końca określone u pacjentów z ostrym i łagodnym przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów.

Badania przeprowadzone przez Low i wsp. na dwóch populacjach europejskich: 238 pacjentach i 217 zdrowych osobach z północnej Anglii oraz 179 pacjentach i 145 zdrowych osobach z Hiszpanii (Galicji) nie potwierdziły powiązania polimorfizmu TNF +489A z występowaniem i przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów [17]. W obu populacjach stwierdzono silny związek między występowaniem RZS a obecnością determinantów antygenowych, kodujących cząsteczki HLA-DR B1\*01, \*0401, \*0404, \*0405, \*0408, \*10. Nie stwierdzono związku występowania allelu TNF +489A z obecnością nadżerek, wykrywanych metodami radiologicznymi, guzków reumatycznych i czynnika reumatoidalnego. Uzyskane wyniki nie potwierdzają doniesień o roli polimorfizmu TNF +489 w podatności na zachorowanie i przebieg choroby.

Do innych wniosków doszli van Krugten i wsp. w pracy przeprowadzonej na populacji holenderskiej [24]. Analizowano związek między polimorfizmem w genie dla TNF w pozycji +489 a podatnością i przebiegiem RZS. Przebadano częstość występowania alleli A i G w pozycji +489 w grupie 293 chorych na RZS i 138 zdrowych dawców. Sprawdzano także liczbę nadżerek w stawach rąk i stóp. U pacjentów z genotypem +489GA obserwowano zdecydowanie mniejszą liczbę nadżerek w stawach w porównaniu z pacjentami +489GG. Wyniki te zostały potwierdzone u 112 pacjentów, którzy byli objęci badaniami przez 12 lat. Przebieg choroby nie zależał od innych czynników, takich jak czynnik reumatoidalny czy HLA-DR4. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że polimorfizm TNF +489 odgrywa istotną rolę w rozwoju i przebiegu RZS.

Analiza polimorfizmu genu TNF w pozycji -308 także nie dała jednoznacznych rezultatów. W badaniach przeprowadzonych przez Yen i wsp. na populacji tajwańskiej – 97 chorych oraz 97 zdrowych dawcach krwi (grupa kontrolna) – sprawdzano, czy polimorfizm w pozycjach -238,

**Tabela I.** Zbiorcze zestawienie wyników z prezentowanych prac

Polimorfizm TNF pacjenta	Wpływ na przebieg RZS	Piśmiennictwo
+70	↔	4
-163G/A	↔	4
-238G/A	↓	4, 9, 10, 14
-238G/A	↔	27
-308G/A	↔	4
-308G/A	↓	6, 7, 16, 27
-244G/A	↔	27
-376G/A	↔	4, 27
+489G/A	↓	10, 24
+489G/A	↔	9, 17
-857C/T	↔	27
-863C/A	↔	27

↔ brak wpływu na przebieg RZS

↓ łagodniejszy przebieg RZS u osób z danym polimorfizmem

-244, -308, -376, -857 i -863 wpływa na przebieg RZS. Tylko polimorfizm w pozycji -308 miał wpływ na kliniczny przebieg choroby. Fenotyp TNF -308A może zatem pełnić rolę czynnika zabezpieczającego przed rozwojem choroby. Dotyczy to tylko tych pacjentów, u których nie występuje antygen HLA-DR4 [27]. W innych badaniach populacji tajwańskiej nie potwierdzono tych doniesień. Lo i wsp., analizując polimorfizm TNF -308A/G u 106 chorych na RZS w porównaniu z 253 osobami zdrowymi, nie stwierdzili zależności między występowaniem polimorfizmu w genie TNF- $\alpha$  w pozycji -308 a przebiegiem choroby [16].

Badania populacji chilijskiej potwierdzają poprzednie doniesienie. Cuenca i wsp. badali 92 chorych na RZS i 42 zdrowych dawców krwi [6]. W badanej grupie polimorfizm TNF -308G/A występował odpowiednio u 22% chorych na RZS i 10% zdrowych. Wprawdzie wyniki stosunku prawdopodobieństwa (OR=2,8) wskazywały na związek między obecnością polimorfizmu a chorobą, ale były one na granicy znamienności statystycznej ( $p=0,051$ ).

W badaniach przeprowadzonych na populacji północnej Szwecji (Cvetovic i wsp.) uzyskano wyniki zgodne z tymi, które były opublikowane przez Yena [7]. Badano 154 chorych na RZS i 324 zdrowych dawców krwi jako grupę kontrolną. W porównaniu z grupą kontrolną częstość występowania allelu -308G była większa, a allelu -308AA mniejsza u pacjentów z RZS. Zaobserwowa-

no silny związek między obecnością allelu -308G a chorobą. Zastąpienie guaniny adeniną w pozycji -308 może obniżyć ciężkość przebiegu RZS, a nawet stanowić rodzaj czynnika zabezpieczającego przed chorobą.

Wyniki prezentowane w przedstawionych pracach i zaprezentowane sumarycznie w tab. I wykazują wiele sprzeczności. Nie można jednoznacznie powiązać polimorfizmów w genie TNF- $\alpha$  z podatnością na zachorowanie i przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów. Ze szczególną uwagą badano polimorfizmy genu TNF- $\alpha$  w pozycjach +489, -376, -308 i -238. Stwierdzono występowanie silnego niezrównoważenia sprzężeń w pozycji -238 i -376 [19], słabe sprzężenie stwierdzono w pozycjach -238 i -308 [13]. Polimorfizm w genie może mieć wpływ na produkcję TNF i w rezultacie rozregulowywać prawidłową dystrybucję cytokin, co może prowadzić do patologii i stanu choroby. Gen dla TNF znajduje się na chromosomie 6 w obszarze antygenów zgodności tkankowej, między cząsteczkami klasy I i II. Ten obszar genu jest wysoce polimorficzny. Wiele chorób o podłożu autoimmunologicznym, w tym RZS, ma związek z obecnością cząsteczek MHC. Dodatkowo wysoki polimorfizm genu, częste występowanie niezrównoważenia sprzężeń, powiązanie chorób z obecnością cząsteczek MHC mogą być związane z bliskim sąsiedztwem innego genu, który może mieć związek z chorobą. Badania prowadzone na różnych populacjach, dotyczące różnych pozycji, w których dochodzi do zamiany jednego nukleotydu w genie dla TNF- $\alpha$ , próbują znaleźć odpowiedź na pytanie, czy polimorfizm w genie dla TNF- $\alpha$  ma wpływ na podatność na zachorowanie i przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów.

Przedstawione doniesienia nie pozwalają jednoznacznie potwierdzić związku między polimorfizmami w genie TNF- $\alpha$  a zapadalnością i przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów. W wielu ośrodkach badawczych potwierdzono łagodniejszy przebieg RZS u pacjentów, u których występował polimorfizm -238G/A i -308G/A. W przypadku pozostałych polimorfizmów genu TNF- $\alpha$  nie można obserwować wpływu na zapadalność czy przebieg choroby. Nawet badania w obrębie jednej populacji nie dały jednoznacznych wyników. Na podstawie dostępnych materiałów rozwiązanie tego problemu jest na razie niemożliwe. Konieczne jest rozszerzenie badań i objęcie nimi innych genów, np. genu dla czynnika jądrowego- $\kappa$ B (NF $\kappa$ -B), który reguluje transkrypcję genu TNF- $\alpha$  czy genu SAPK-2 (*stress-activated protein kinase-2*), który koduje kinazę biorącą udział w produkcji cytokin. Nie wiadomo, czy mutacje w tych genach i ich produkty nie mają wpływu na ekspresję innych genów dla cytokin, w tym dla TNF- $\alpha$ , i tym samym nie mają wpływu na powstanie i przebieg RZS.

## Piśmiennictwo

1. Albani S, Carson DA, Roudier J. Genetic and environmental factors in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 729.
2. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151.
3. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF-alpha a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 656.
4. Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, et al. Tumor necrosis factor? gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol* 1997; 36: 516.
5. Brinkman BM, Kaijzel EL, Huizinga TW, et al. Detection of a novel C-insertion polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene. *Hum Genet* 1995; 6: 493.
6. Cuenca J, Cuchacovich M, Perez C, et al.: The -308 polymorphism in the tumor necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytokine activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Reumatology* 2003; 42: 308.
7. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, et al. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1 beta, and IL1Ra genes. *J Rheumatol* 2002; 29: 212.
8. D'Alfonso S, Momigliano Richardi P. A polymorphic variation in putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150.
9. Fabris M, Di Poi E, Sacco S, et al. [TNF-alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF-alpha agents: preliminary results]. *Reumatismo* 2002; 54: 19.
10. Fabris M, Di Poli E, D'Elia A, et al. TNF- $\alpha$  gen polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 29.
11. Gregersen PK, Silver J, Winchester R. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205.
12. Hamann A, Mantzoros C, Vidal-Puig A, et al. Genetic variability in the TNF- $\gamma$  promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM). *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 833.
13. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis (TNF) alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 51: 605.
14. Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, et al. Functional analysis of human tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998; 4: 724.
15. Kim J, Weisman M. When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know? *Arthritis Rheum* 2000; 43: 473.
16. Lo SF, Huang CM, Wu MC, et al. Lack of association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in central Taiwan. *Rheumatol Int* 2003; 23: 151.
17. Low AS, Gonzales-Gay MA, Akil M, et al. TNF+489 polymorphism does not contribute to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20 (6): 829.

18. Matsuda M, Sakamoto N, Fukamaki Y.  $\delta$ -Thalassemia caused by disruption of the site for an erythroid-specific transcription factor, GATA-1, in the  $\delta$ -globin gene promoter. *Blood* 1992; 80: 1347.
19. May MJ, Gosh S. Signal transduction through NF $\kappa$ -B. *Immunol Today* 1998; 19: 80.
20. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) -Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997; 337: 141.
21. Ollier W, Tomson W. Population genetics of rheumatoid arthritis. *Reum Dis Clin North Am* 1992; 18: 741.
22. Picarella DF, Kratz A, Li C, et al. Transgenic TNF-alpha production in pancreatic islets to insulinitis, not diabetes: distinct patterns of inflammation in TNF-alpha and TNF-beta transgenic mice. *J Immunol* 1993; 150: 4136.
23. Saxne T, Palladino MA, Heinegard D, et al. Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  but not tumor necrosis factor  $\beta$  in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1989; 31: 1041.
24. Van Krugten MV, Huizinga TW, Kaijzel EL, et al. Association of the +489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 1999; 1 (2): 91.
25. Weyand C, Goronzy J. The molecular basic of rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1997; 75: 772.
26. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557.
27. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, et al. Tumor necrosis factor polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol* 2001; 28 (8): 1788.