

# 제주지역 알레르기 환자의 Toll-like receptor 4 (TLR 4) 유전자의 다형성

이수현, 최현, 이혜숙, 홍주연, 박지연, 김수영, 홍성철, 이근화

제주대학교 의학전문대학원 환경보건센터

## Abstract

### Toll-like receptor 4 (TLR 4) polymorphisms in allergic diseases patients in Jeju

Su-Hyun Lee, Hyun Choi, Hye-Sook Lee, Ju-yeon Hong, Ji-yeon Park, Su-Young Kim, Seong-Chul Hong, Keun-Hwa Lee

The Environmental Health Center Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

A study was conducted to the Toll-like receptor 4 (TLR 4) polymorphisms in allergic diseases patients in Jeju. This study based on "a TLR 4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children" (J Allergy Clin Immunol. 2004 Sep;114(3):561-7.).

With allergic subject 40 people registered in the Environmental Health Center Jeju National University School of Medicine (atopy dermatitis and allergic rhinitis, asthma) and 24 people control group DNA used gene amplification and base sequence analyzed.

The allergic subject and control group all TLR 4 (Asp299Gly) polymorphism were not visible. (J Med Life Sci 2010;7:18-21)

**Key Words :** Allergy, Toll-like receptor 4, Polymorphisms

## 서론

척추동물은 선천면역계와 적응면역계의 두 가지 면역체계를 보유하고 있다.

선천면역계 (innate immunity)는 병원체 감염 후, 신속하게 활성화 되어 작용할 수 있는 방어체계이며 여러 단계의 선천면역 체계에도 불구하고, 몇몇 병원체들은 선천면역계를 회피하여 체내로 침입할 수 있는데 이런 경우 두 번째 면역체계인 적응면역계(adaptive immunity)가 유도 된다<sup>1)</sup>.

척추동물은 다양한 미생물을 감지하여 빠르게 반응하기 위한 선천면역 전략을 진화 시켜 왔다. 이러한 미생물인지는 Toll-유사 수용체 (Toll-like receptors, TLRs) 및 NOD-유사 수용체 (NOD-like receptors, NLRs)와 같은 패턴인지 수용체 (Pattern recognition receptors, PRPs)를 통하여 수행 된다<sup>2)</sup>.

선천성 면역과 신호 전달 면에서 핵심적인 역할을 하는 TLR 중 가장 연구가 잘된 수용체는 Toll-like receptor 4 (TLR 4)이다.

TLR 4는 그람 음성 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS)를 인지하는 주요한 센서이며 또한 TLR 4는 자가 면역질환들의

발달과 연관되어 있고 선천성 면역의 비정상적인 활성화는 관절염, 염증성, 전신 홍반성 낭창관절염, 아테롬성 동맥 경화증 (Atherosclerosis), 천식과 국소빈혈 재관류 손상 (ischemia reperfusion injury)과 같은 염증 질환과 그람 음성 박테리아에 의한 패혈증과 같은 몇몇 질병들과 연관되어 있다<sup>3-5)</sup>.

본 연구에서는 제주대학교 의학전문대학원 환경보건센터에 등록된 알레르기 환자 (아토피 피부염, 알레르기성비염, 천식)의 DNA를 이용하여 2004년에 J Allergy Clin Immunol에 실린 Bo tcher et al.의 논문<sup>6)</sup>을 근거로 TLR 4 primer를 제작 하여 제주지역에서 알레르기 환자의 TLR 4 다형성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1) 시료

본 연구에 사용한 환자의 DNA는 제주대학교 의학전문대학원 환경보건센터의 알레르기 질환으로 등록되어있는 환자 40명과 대조군 24명에 대해서 사전 유전자 동의서(IRB 심의)를 통해 동의를 구한 후 채혈하여 TLR4 유전자의 다형성을 살펴보았다.

### 2) 환자 DNA 추출 및 분리

환자의 혈액 800 $\mu$ l에 멸균된 증류수 300 $\mu$ l과 phenol: chloroform: isopropylalcohol (50:49:1) 용액 400  $\mu$ l를 함께 부유시켜 mini beater로 1 분간 혼합한다. 이 혼합액은 12000

Address for correspondence : Keun-Hwa Lee  
The Environmental Health Center (Atopic Dermatitis and Allergic Rhinitis), Jeju National University School of Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : yomust7@jejunu.ac.kr

rpm으로 15분간 원심분리하고 상청액 (850  $\mu$ l)을 새로운 tube에 옮긴 후, 850  $\mu$ l의 isopropylalcohol을 섞고, 다시 15000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 멸균된 증류수 100  $\mu$ l로 DNA를 회수하였다<sup>7)</sup>.

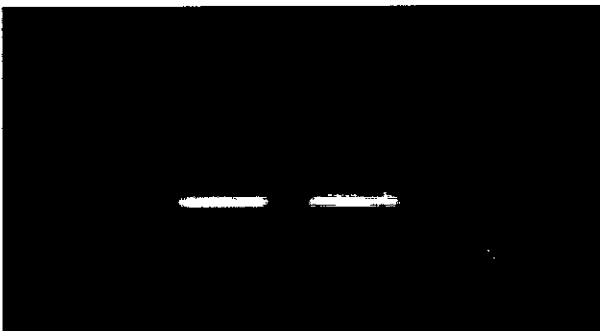
### 3) 중합효소연쇄반응에 의한 TLR4 유전자 증폭

본 연구에서 TLR 4 유전자를 증폭할 수 있는 forward primer (5'-TAGAGGGCCTGTGCAATTGA-3')와 reverse primer(5'-CTAATTCCTAAATGTTGCCATCC-3')을 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 2 단위의 Taq poly-merase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>을 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)을 이용하였다. DNA 2 $\mu$ l, primer TLR 4-F, TLR 4-R 각각 20 pmol 넣고, 증류수를 최종 부피가 22  $\mu$ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. 중합효소연쇄반응은 first denature 95 $^{\circ}$ C로 5분, 30 cycle로 denaturation 95 $^{\circ}$ C 30초, annealing 62 $^{\circ}$ C 45초 extension 72 $^{\circ}$ C 40초, final extension 72 $^{\circ}$ C 5분으로 수행하였다 (Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus). 중합효소연쇄반응 후, 1.5% agarose gel에 전기영동하여 172 bp의 반응산물을 확인하였다<sup>7)</sup>.

### 4) 중합효소연쇄반응 산물의 정제

1.5% gel에 전기영동 후, TLR 4 유전자 산물 부위 (Fig 1.)의 젤을 자른 다음 새로운 tube에 옮겨 DNA를 추출 및 분리하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex (Qiagen, Germany) system을 이용하였다. Gel solubilizing solution QX1 500  $\mu$ l을 gel을 포함한 tube에 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에 15분간 방치하여 gel을 완전히 녹였다. 그 후 gel bead를 10 $\mu$ l을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50 $^{\circ}$ C에 10분간 방치하였다. 그 사이 2분 간격으로 tube를 10초씩 vortex를 수행하여 bead가 골고루 퍼지도록 하였다. 이 후 QX1으로 1번, QF로 2번 세척한 후 45 $^{\circ}$ C에서 10분간 말린 후 TE buffer 20  $\mu$ l로 DNA를 회수하였다.

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of TLR4 PCR products [Lane M, molecular marker(100bp ladder), lane 1 and 2, allergic subject, Lane3 Negative. DNA SIZE: 172bp]



### 5) 자동염기서열 분석

ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1(Fluorescent dye terminators method)를 사용하여 sequencing reaction 한 다음, Millipore사 제품 Montage dye remove kit 사용하여 sequencing product purification 하고, 마지막으로 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer로 sequencing product running 한 후 염기서열을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

TLR는 선천면역계에 관여하는 수용체로서 외부에서 미생물이 침입한 경우에 미생물들이 공통적으로 가지고 있는 구조인 pathogen associated - molecular patterns (PAMP)를 인식한다<sup>8, 9)</sup>.

인체에서 밝혀진 11개의 TLR 중에서 9개의 기능이 밝혀졌으며, 각각 고유한 리간드 (ligand)를 인식함으로써 면역반응의 초기 단계에서 중요한 역할을 한다. 이 중에서 TLR-4는 그람 음성 세균의 세포벽인 LPS를 인식하고 TLR 2와 TLR 6는 세균 세포벽 성분 중에서 lipoprotein과 진균 세포벽 성분인 zymosan을 인식하며 TLR 3는 dsRNA 즉, 바이러스 감염 인식에 중요한 역할을 한다<sup>10-14)</sup>.

TLR 5는 세균의 편모를 인식하고 TLR 9는 세균의 DNA를 인식한다<sup>15)</sup>. TLR들은 여러 종류의 세포에 발현되어 있으며 세포의 종류마다 다양한 발현 양상을 보인다. 이 중 그람 음성세균의 LPS 통과역할을 하는 TLR 4가 가장 많이 알려져 있는데, D299G(Asp299Gly) 다형성 (polymorphism)이 폐혈종의 위험도를 증가시키며, 판상 동맥경화종의 위험도는 감소시킨다. 또한 세기관지염 (bronchiolitis)을 심하게 앓는 소아들도 TLR 4 다형성을 가지고 있다는 보고가 있으며, 이 보고에 따르면 TLR 4 다형성이 기관지 천식과 관련성이 없어 보이는 하지만 LPS가 강력한 T helper 1 cells (Th1) 유도 물질이기에 이와 관련되어 두 가지 서로 대립되는 결과들이 있다고 밝혀졌다.

TLR 4 수용체로 인식되는 병원체 독소의 하나인 LPS에 노출된 천식 환자는 증상이 심해진다는 것이다. 즉, TLR 4 자극이 기관지염증반응을 악화시킨다는 점이다. 이는 천식환자에서 알려진 농도보다는 LPS 양과 천식증상과의 상관관계가 높다는 점과 내독소를 흡입하면 기관지 수축이 일어난다는 연구결과가 뒷받침 한다. 이와 달리 소아에서는 내독소에 노출된 아이들이 아토피성 천식에 잘 걸리지 않는다는 보고가 있다. 이는 LPS가 천식 예방효과가 있다는 것을 보여 준다. 이런 모순된 결과는 TLR 4의 다형성이 기관지 천식과 연관은 없지만 기관지 과민도를 감소시키고 아토피 위험도를 증가시킨다는 다른 결과들을 볼 때 TLR 4 다형성이 기관지 천식과 연결고리가 있음을 보여 주는 보고였다<sup>17)</sup>.

또한 TLR 4는 면역반응을 매개하는 대식세포나 단핵세포 중성구들에 발현되며 이외에도 혈관내피세포와 같이 외부의 항원과 만날 수 있는 조직에서도 여러 종류의 TLR들과 함께

발현되어 있다<sup>8, 16)</sup>. 이렇게 특정 병원체를 받아들이는 수용체가 다르며 그 수용체의 다형성이 질병경과에 영향을 준다는 연구는 알레르기환자를 대상으로도 활발히 연구되고 있다. 2004년에 스웨덴에서 어린 아이들의 천식이 TLR 4와 관련성이 있다고 보고된 바 있다<sup>6)</sup>. 이 논문에서 TLR 4와 CD14 유전자의 다형성 (polymorphism)과 Peripheral blood mononuclear cell(PBMCs)의 LPS 반응성을 비교하여 아이들에 있는 일반 천식 그리고 알레르기성 비성결막염 (rhino conjunctivitis)의 존재를 조사하였고, 결과로 LPS 유도하는 IL-12 (p70) 감소와 IL-10 반응으로 보아 TLR 4 (Asp299Gly) 다형성이 일반 천식과 아토피성 천식에 연관되어 있다고 밝혔다.

이에 본 연구에서는 이런 보고들을 근거로 제주지역에서의 알레르기 환자의 TLR 4의 유전자의 다형성에 대해 연구하였다. 또한 천식뿐만 아니라 다른 알레르기질환에도 영향을 미치는지 알아보았다.

연구 시료는 제주대학교 병원에서 전문의 진료조건에 따라 제주대학교 의학전문대학원 환경보건센터에 등록된 알레르기 환자 40명(환자군)과 대조군으로 등록된 24명의 환자의 동의를 구하여 혈액에서 DNA를 추출하여 TLR 4 프라이머를 이용하여 PCR과 염기서열 분석법을 통하여 비교 하였다.

40명의 환자군들은 내과에서 11명, 피부과에서 18명, 이비인후과에서 7명, 소아 청소년과에서 1명이 진료를 통해서 환경보건센터에 등록되었으며, 알레르기성 비염 환자가 11명, 아토피 피부염 환자가 20명, 아토피 피부염과 알레르기성 비염, 천식 모두 있는 환자는 3명, 아토피 피부염과 알레르기성 비염만 있는 환자는 4명, 알레르기성 비염과 천식만 있는 환자 2명을 대상으로 하였다. 24명의 대조군은 건강검진을 위해 제주대학병원을 방문한 사람 중 설문지를 통해 알레르기 질환의 증상들과 피부 단자 검사에 음성을 보인 경우를 대상으로 하였다. (Table 1)

**Table 1.** Characteristics of patients and control group

Characteristics		allergic subject	Control
		n=40(%)	n=24(%)
Sex(F/ M)		17:23	13:11
Age	0-10	11(27.5)	5(21)
	10-19	18(45)	19(79)
	20-29	5(12.5)	-
	30-39	3(7.5)	-
	40-49	1(2.5)	-
	50~	2(5)	-
Medical treatment	Internal medicine	14(35)	-
	Dermatology	18(45)	-
	Orhinolaryngology	7(17.5)	-
	Pediatrics	1(2.5)	-
Diagnosis	Allergic rhinitis	11(27.5)	-
	AtopicDermatitis	20(50)	-
	Atopic Dermatitis ,Allergic rhinitis, Asthma	3(7.5)	-
	Atopic Dermatitis ,Allergic rhinitis	4 (10)	-
	Allergic rhinitis, Asthma	2 (5)	-

**Table 2.** Toll-like receptor 4 (TLR4) polymorphism (Asp299Gly) of allergic subject and control group

TLR4 polymorphism	allergic subject	Control
	n=40(%)	n=24
Asp299Gly	0/40(0%)	0/24(0%)

이번 연구결과, 환자군과 대조군 모두 TLR-4 (Asp299Gly) 다형성은 관찰 되지 않았다. (Table 2). 이와 비슷하게 2004년에 중국에서 다른 인종 인구간에 TLR-4 (Asp299Gly)의 다형성 비율을 조사한 결과 나병에 걸린 한국인에서 다형성이 보이긴 했으나 알레르기 질환과 관련된 보고는 없었으며 또한 이 논문에서는 서양(미국과 캐나다)인보다 동양 (중국과 일본)인에게서는 유전자

가 잘 관찰되지 않았다고 보고된 바 있다.<sup>18)</sup>

따라서 제주지역에서는 TLR-4 다형성이 알레르기 질환자에게 미치는 영향이 없다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이 연구는 아직 진행 중인 상황 이니 만큼, 좀 더 많은 환자군과 대조군의 시료가 필요하며, 배경이 된 논문들을 근거로 많은 천식 환자의 시료 확보가 필요하다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne : Textbook of Kuby Immunology 6E : 2008: 55-80
- 2) Young-Sang Koh: Pattern-recognition receptors and recognition of pathogens, The Journal of Medicine and Life Science . Vol. 6. No. 3(August), 2009
- 3) Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. Immunol Rev. 2008 Jun;223:271-83
- 4) Doreen M. Agnese, Jacqueline E. Calvano, Sae J. Hahn, Susette M. Coyle, Siobhan A. Corbett, Steve E. Calvano, et al. Human Toll-Like Receptor 4 Mutations but Not CD14 Polymorphisms Are Associated with an Increased Risk of Gram-Negative Infections. The Journal of Infectious Diseases 2002;186:1522-25
- 5) Christensen SR, Shlomchik MJ. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):11-23. Epub 2007 Feb 2.
- 6) Malin Fagera's Bo'ttcher, PhD, Mounira Hmani-Aifa, PhD, Anna Lindstro', MSc, Maria Christina Jenmalm, PhD, Xiao-Mei Mai, MD, Lennart Nilsson, PhD, MD et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. J Allergy Clin Immunol. 2004 Sep;114(3):561-7.
- 7) Lee KH, Cho MJ, Yamaoka YKS, Kim BJ. Polymorphism of Helicobacter pylori RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. J Clin Microbiol. 2004 Aug;42(8):3518-24.
- 8) Akira S. Mammalian. Toll-like receptors. Curr Opin immunol 15: 5-11, 2003.
- 9) Janeway CA Jr, Medzhitov R . Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. Semin Immunol 10: 349-350, 1998.
- 10) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, BelisleJT et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 285: 732-736, 1999.
- 11) Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem 274: 33419-33425, 1999.
- 12) Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: A link between Toll-like receptor, interferon and viruses. Microbiol Immunol 48:147-154, 2004.
- 13) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388: 394-397, 1997.
- 14) Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr Opin Immunol 11: 19-22, 1999.
- 15) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 21: 335-376, 2003.
- 16) Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol 168: 554-561, 2002.
- 17) Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. Nat Immunol 2004;5:975-9.
- 18) Jingqing Hang, Wei Zhou, Hongxi Zhang, Bixiong Sun, Helian Dai, Li Su, David C. Christiani. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population . Journal of Endotoxin Research, Vol. 10, No. 4, 2004