

제주지역 동맥경화성 뇌경색 환자의 Toll-like receptor 4(TLR 4) 유전자의 다형성

이수현¹, 최재철², 이근화¹

¹제주대학교 의학전문대학원 미생물학교실, 환경보건센터(아토피피부염, 알레르기비염), ²신경과학교실

Abstract

Toll-like receptor 4 (TLR 4) polymorphisms in atherothrombotic ischemic stroke patients in Jeju

'Su-Hyun Lee, 'Jay-Chol Choi, 'Keun Hwa Lee

¹Department of Microbiology and Immunology, The Environmental Health Center(Atopic Dermatitis and Allergic Rhinitis), Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

The Toll-like receptor 4(TLR 4) polymorphism, which attenuates receptor signaling and diminishes the inflammatory response to gram-negative pathogens, is known to be associated with a decreased risk of carotid atherosclerosis. However, whether the TLR 4 polymorphism is also useful in evaluating the risk of atherothrombotic stroke is currently unknown. We investigated the association between the TLR 4 polymorphism and risk of atherothrombotic stroke using a case-control design. This study enrolled 48 stroke patients and the same number of age- and sex-matched controls. All of the subjects in this study underwent a structured interview and had their vascular risk factors assessed. With stroke patients 48 and 48 control group DNA used *tlr4* gene amplification and analyzed. stroke patients group and control group do not have TLR 4(Asp299Gly) polymorphism. (J Med Life Sci 2011;8:39-41)

Key Words : Ischemic stroke, Toll-like receptor 4, Polymorphisms

서론

뇌졸중은 성인 사망의 중요한 원인이며 전 세계적으로 매년 1500만 명 정도의 뇌졸중 환자가 발생하며 그 중 1/3은 사망하고 다른 1/3은 심각한 장애자로 남게 된다¹⁷). 뇌졸중은 많은 선진 국가들에서 암, 심장질환에 이어 3위의 사망원인을 차지하고 있으며 대부분의 개발도상국가에서는 두 번째로 높은 사망원인이며 우리나라의 경우에도 2004년 통계청의 자료에 의하면 뇌졸중은 악성 신생물에 이어 두 번째로 높은 사망원인을 차지하였고 순환기계 질환 중에서는 가장 흔한 사망원인이다¹¹). 뇌졸중의 알려진 위험인자로는 고혈압, 당뇨, 흡연, 심장질환 등이 있으며 이와 같은 위험인자들에 의해 전체 뇌졸중의 약 40-50% 정도가 발생한다고 알려져 있으며 나머지 반 수 정도의 환자들에서는 그 원인이 뚜렷하게 밝혀지지 않은 상태이다¹⁶). 원인 미상의 뇌졸중 환자들에서 유전적인 요인은 중요한 위치를 차지한다¹⁴). 대부분의 뇌졸중은 다양한 병태생리와 임상 증상을 보이는 복잡한 유전 질환이며 많은 유전자가 뇌졸중의 위험도를 증가시킬 수 있는

것으로 알려져 있다^{7, 13}).

죽상경화증은 허혈성 뇌졸중의 중요한 원인의 하나이고 뇌졸중 환자들의 대동맥, 목동맥, 두개내동맥에서 흔히 발견된다. 특히, 두개강내 동맥경화증은 미국, 유럽과 비교하여 아시아에서 흔히 발견되며 이 지역의 허혈성 뇌졸중의 중요한 원인이다^{11, 18}). 죽상경화증은 현재 만성적인 염증반응의 하나로 인식되며 이의 발생에는 만성 감염이 매우 중요하게 작용한다^{12, 15}). 선천면역계와 적응면역 모두가 죽상경화증병변의 시작, 진행, 플라크의 파열에 중요한 역할을 한다. 선천면역계는 피부, 점막과 같은 물리적인 장벽이외에도 병원체의 특징적인 구조적 특성을 인지하는 양식 인지 수용체(pattern recognition receptor)가 있다. 양식 인지 수용체 중에서 수지상세포(dendritic cell)와 큰포식세포(macrophage)에는 서로 다른 미생물의 특정부위를 인지하는 Toll 유사 수용체(Toll-like receptor, TLR)가 존재하며 현재 인간에서는 11종류가 존재하는 것으로 확인되었다³). *Chlamydia pneumoniae* 등의 세균이 TLR을 활성화하는 리간드(ligand)로 작용하며 *Chlamydia pneumoniae*, cytomegaloviruses, herpesviruses 등의 만성 감염이 죽상경화증의 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다^{5, 6}). TLR와 죽상경화증 사이의 관련성을 확인하기 위하여 최근 TLR을 코딩하는 많은 유전자의 돌연변이에 관한 분석 연구가 진행되었고 TLR 4의 Asp299Gly의 다형성의 경우 죽상경화증, 관상동맥질환의 위험이 감소되었다는 사실이 밝혀졌다^{4, 9}). 이에 본 연구에서는 제주대학교 병원을

Address for correspondence : Keun Hwa Lee
Department of Microbiology and Immunology, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : yomust7@jejunu.ac.kr

방문한 동맥경화성 뇌경색환자의 DNA을 이용하여 TLR 4 다형성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1) 시료

본 연구는 동맥경화성 뇌경색 환자 48명과 뇌졸중의 병력이 없는 대조군 48명을 대상으로 하는 환자-대조군 연구이고 환자군의 2010년 5월부터 2011년 4월까지 증상 발생 7일 이내에 본 병원을 방문하여 일과성 뇌허혈 발작을 포함한 급성 허혈성 뇌졸중으로 진단된 20세 이상의 환자들을 대상으로 한다. 대조군은 같은 기간 정기건강검진을 위해서 병원을 방문한 자들 또는 혈관 질환 이외의 질환으로(주로 정형외과 및 안과적 질환) 입원한 환자들 중에서 뇌졸중 환자군과 성별, 연령을 맞추어 선정하였다. 환자군과 대조군 모두 본 연구의 목적과 방법에 대한 설명을 듣고 연구 참여 및 유전자분석에 동의한 경우에만 포함 시켰다.

2) 환자 DNA 추출 및 분리

환자의 혈액 800 μ l에 멸균된 증류수 300 μ l과 phenol:chloroform: isopropylalcohol(50:49:1) 용액 400 μ l를 함께 부유시켜 mini beater로 1분간 혼합한다. 이 혼합액은 12000 rpm으로 15분간 원심분리하고 상층액 (850 μ l)을 새로운 tube에 옮긴 후, 850 μ l의 isopropylalcohol을 섞고, 다시 15000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 멸균된 증류수 100 μ l로 DNA를 회수하였다¹⁰⁾.

3) 중합효소연쇄반응에 의한 TLR4 유전자 증폭

본 연구에서 TLR 4 유전자를 증폭할 수 있는 forward primer(5' -TAGAGGGCCTGTGCAATTTGA-3')와 reverse primer(5' -CTAATTCTAAATGTTGCCATCC-3')을 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 2 단위의 Taq polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂을 포함하는 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Korea)을 이용하였다. DNA 2 μ l, primer TLR 4-F, TLR 4-R 각각 20 pmol 넣고, 증류수를 최종 부피가 22 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. 중합효소연쇄반응은 first denature 95 $^{\circ}$ C로 5분, 30 cycle로 denaturation 95 $^{\circ}$ C 30초, anealing 62 $^{\circ}$ C 45초 extention 72 $^{\circ}$ C 40초, final extention 72 $^{\circ}$ C 5분으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus). 중합효소연쇄반응 후, 1.5% agarose gel에 전기 영동하여 172 bp의 반응산물을 확인하였다¹⁰⁾.

4) 중합효소연쇄반응 산물의 정제

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

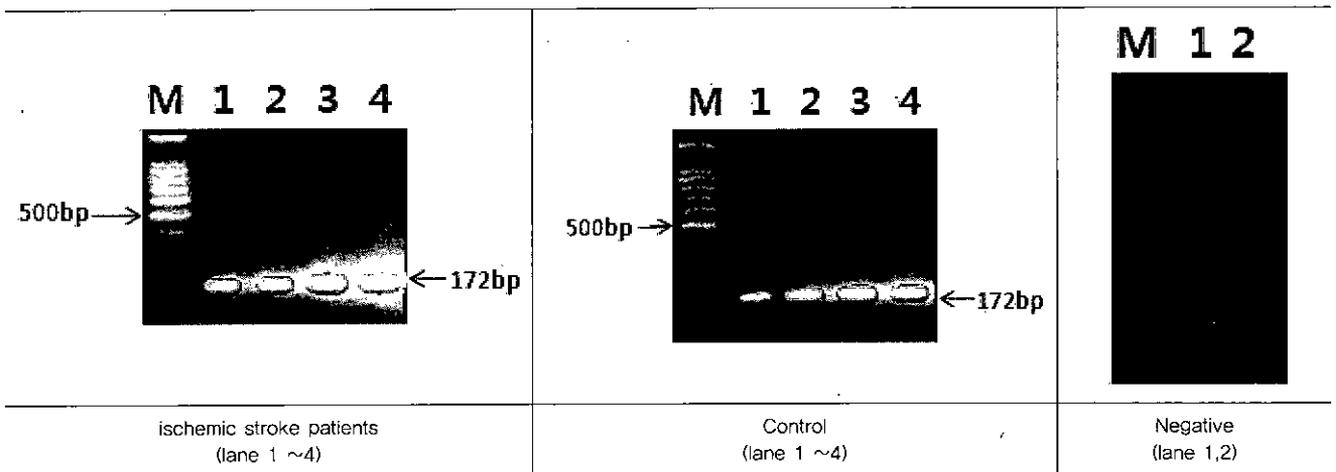


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of TLR 4 PCR products. [Lane M, molecular marker(100 bp ladder), DNA SIZE: 172 bp]. Size variation of TLR 4 gene shown by PCR, agarose gel electrophoresis of PCR - amplified stroke patients(lane 1 ~4), and control group(lane 1 ~4), and Negative(lane 1,2) is shown.

으로 1번, QF로 2번 세척한 후 45 $^{\circ}$ C에서 10분간 말린 후 TE buffer 20 μ l로 DNA을 회수하였다.

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 purification하고, 마지막으로 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer로 sequencing product running한 후 염기서열을 확인하였다.

결과 및 고찰

우리나라에서 뇌졸중은 악성 신생물에 이어 두 번째로 높은 사망원인을 차지하고 있으며 순환기계 질환 중에서는 가장 흔한 사망원인이다¹⁾. 그럼에도 불구하고 현재 뇌졸중의 급성기 치료는 정맥 내 혈전용해제 등으로 제한되어있는 상태이고 이차예방에 있어서도 위험인자의 조절 및 항혈전제의 사용만이 가능한 상태이다.

TLR는 선천면역계에 관여하는 수용체로서 외부에서 미생물이 침입한 경우에 미생물들이 공통적으로 가지고 있는 구조인 pathogen associated molecular patterns(PAMP)를 인식 한다^{2, 8)}.

인체에서 밝혀진 11개의 TLR 중에서 9개의 기능이 밝혀졌으며, 각각 고유한 리간드를 인식함으로써 면역반응의 초기 단계에서 중요한 역할을 한다. 이 중 그람 음성세균의 LPS 통로역할을 하는 TLR 4가 가장 많이 알려져 있는데, D299G(Asp299 Gly) 다형성(polymorphism)이 패혈증의 위험도를 증가시키며, 관상동맥경화증의 위험도는 감소시킨다^{4, 9)}.

선천면역계에 있어서 TLR은 현재 가장 중요한 수용체이고 류마치스 관절염, 천식, 전신홍반루푸스와 같은 면역관련질환과도 밀접한 연관성을 보였다. 그 결과 수년전부터 TLR억제제와 같은 질환의 치료제를 개발 중이다. 현재 TLR억제제의 심혈관계질환에 대한 임상연구는 현재까지 활발하게 진행되지 않은 단계이다.

이에 본 연구에서는 이런 보고들을 근거로 제주대학교 병원의 동맥경화성 뇌경색 환자의 DNA을 이용하여 제주지역 환자에서의 TLR 4 다형성에 대해 연구하였다.

연구 시료는 제주대학교 병원에서 전문의 진료소견에 따라 동맥경화성 뇌경색 환자 48명과 뇌졸중의 병력이 없는 대조군 48명에게 본 연구의 목적과 방법에 대해서 설명을 하고 연구 참여 및 유전자분석에 동의를 구한 후, 혈액을 채취 후 DNA를 추출하여 TLR 4 프라이머를 이용하여 PCR과 염기서열 분석법을 통하여 비교 하였다.

비교결과 환자군과 대조군 모두 TLR 4 (Asp299Gly) 다형성은 관찰되지 않았다(Table 1). 따라서 제주지역에서는 TLR 4 다형성이 뇌졸중환자에게 미치는 영향이 없다는 것을 알 수 있었다. 그러나 Chlamydia pneumoniae, cytomegaloviruses, herpesviruses 등의 만성 감염이 죽상경화증의 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있기 때문에^{5, 6)} 다른 TLR이 관련이 있을 수 있기 때문에 뇌졸중환자에서 다른 TLR의 유전자다형성에 대해서도 연구할 필요성이 있다.

Table 1. Toll-like receptor 4 (TLR 4) polymorphism (Asp299Gly) of ischemic stroke patients and control group.

TLR4 polymorphism	Ischemic stroke patients	Control
	n = 48 (%)	n = 48 (%)
Asp299Gly	0 / 48 (0%)	0 / 48 (0%)

Acknowledgements

Supported by a grant from the Jeju National University Medical Research Fund(2009)

참고 문헌

- 1) Annual mortality report. Korea National Statistical Office;2005.
- 2) Akira S. Mammalian. Toll-like receptors. *Curr Opin immunol* 2003;15: 5-11.
- 3) Akira, S., S. Uematsu, et al. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
- 4) Ameziane, N., T. Beillat, et al. Association of the Toll-Like Receptor 4 Gene Asp299Gly Polymorphism With Acute Coronary Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:e61-e64.
- 5) Chiu, B., E. Viira, et al. Chlamydia pneumoniae, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation.* 1997;96(7):2144-8.
- 6) Grayston, J. Background and Current Knowledge of Chlamydia pneumoniae and Atherosclerosis. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 3:S402-10.
- 7) Hassan, A. and H. S. Markus. Genetics and ischaemic stroke. *Brain.* 2000;123(Pt 9):1784-812.
- 8) Janeway CA Jr, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol.* 1998;10(5):349-50.
- 9) Kiechl, S., E. Lorenz, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and athero-genesis. *N Engl J Med* 2002; 347:185-192
- 10) Lee KH, Cho MJ, Yamaoka YKS, Kim BJ. Alanine-Threonine Polymorphism of Helicobacter pylori RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3518-24.
- 11) Li, H. and K. S. Wong. Racial distribution of intracranial and extracranial atherosclerosis. *J Clin Neurosci.* 2003;10(1):30-4.
- 12) Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;19-26:420(6917):868-74.
- 13) Meschia, J. F. Ischemic stroke as a complex genetic disorder. *Semin Neurol.* 2006;26(1):49-56.
- 14) Razvi, S. S. and I. Bone. Single gene disorders causing ischaemic stroke. *J Neurol.* 2006;253(6):685-700.
- 15) Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
- 16) Sacco, R. L., J. H. Ellenberg, et al. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Ann Neurol.* 1989;25(4):382-90.
- 17) WHO. The atlas of heart disease and stroke. Geneva, WHO:2004
- 18) Wong, K. S., Y. N. Huang, et al. Intracranial stenosis in Chinese patients with acute stroke. *Neurology.* 1998;50(3):812-3.