

BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자의 단핵구에서 Toll-like receptor 2의 발현

제주대학교 의학전문대학원 소아과학교실*, 제주대학교 의과연구소*·†

오 현 주* · 신 경 수*·†

= Abstract =

Toll-like receptor 2 expression on monocytes from patients with BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis

Hyun Joo Oh, M.D.* and Kyung-Sue Shin, M.D.*·†

Department of Pediatrics*, Cheju National University School of Medicine
Institute of Medical Science†, Cheju National University, Jeju, Korea

Purpose : Toll-like receptor 2 (TLR2) is critical in the immune response to mycobacterial infections. The purpose of this study was to analyze TLR2 surface expressions and TLR2-mediated tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) production in patients with BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis.

Methods : Peripheral monocytes were separated from 16 patients with BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis and 10 healthy controls using a magnet cell isolation kit. Monocytes (1×10^6 cells/well) were incubated with a constant amount of Pam₃CSK₄ (100 μ g/mL) for 24 hours. TLR2 surface expression on monocytes was analyzed by FACS analysis and TLR-2 mRNA expression was determined by RT-PCR. TLR2-mediated TNF- α and IL-6 production were measured by ELISA.

Results : In patients with BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis, low TLR2 expression on monocytes ($3.39 \pm 1.2\%$ versus $4.64 \pm 2.6\%$) together with significantly lower TLR2 mRNA expression than in the healthy controls was seen after Pam₃CSK₄ stimulation. TLR2-mediated TNF- α and IL-6 production in patients with BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis (TNF- α , 775.5 ± 60.8 pg/mL; IL-6, $4,645.8 \pm 583.9$ pg/mL) were also lesser than that in healthy controls (TNF- α , $1,098.5 \pm 94.3$ pg/mL; IL-6, $6,696.3 \pm 544.3$ pg/mL).

Conclusion : These findings suggest that low TLR2 expression on monocytes might be associated with increased susceptibility to BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis. (Korean J Pediatr 2009;52:667-673)

Key Words : *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gurin, BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis, Toll-like receptor 2, Polymorphism

서 론

BCG 접종 후 이상 반응은 국소 궤양 형성, 국소 림프절염이 가장 흔하며, 접종 방법이나 접종 기술, 백신의 균주나 백신의 용량, 접종 대상자의 연령이나 면역 상태에 따라 발생 빈도가 다르게 보고되고 있다¹⁾. 그러나 BCG 접종에 따른 국소 림프절염이

화농성 병변을 보이는 경우는 정확한 발생 빈도가 알려져 있지 않고, 1세 이하의 소아, 국소 림프절염의 크기와 발생 시기가 그 발생 빈도와 관련이 있다고 알려져 있다^{1,2)}.

미생물의 pathogen associated molecular pattern (PAMP) 을 인식하는 패턴인식수용체(pattern recognition receptors) 중의 하나인 Toll-like receptor (TLR)는 결핵균의 다양한 항원 성분을 인식하여 선천면역을 활성화시키고, 항원특이성 후천면역(acquired immunity)의 활성화에도 기여하여 숙주의 항결핵 방어면역의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁾. TLR 중에서는 TLR2와 TLR4가 결핵균의 다양한 항원 성분을 리간드(ligand)로 인식하여 항결핵 면역반응과 염증반응을 유도하는데 주요한 역할을 한다³⁻⁵⁾. 그러나 *Mycobacterium bovis* BCG의 경우 TLR2가 *M. bovis* BCG의 lipomannan 성분을 리간드로 인식하여 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 등의 염증성

Received : 5 December 2008, Revised : 6 February 2009

Accepted : 13 May 2009

Address for correspondence : Kyung-Sue Shin, M.D.

Department of Pediatrics, Cheju National University School of Medicine

66 Jejudaehakno, Jeju-si, Jeju-do 690-756, Korea

Tel : +82,64-754-3927, Fax : +82,64-702-2687

E-mail : kyungsue@jeju.ac.kr

This work was supported by research grant from Wyeth, 2004

사이토카인(cytokine)의 생성을 유도한다는 보고⁶⁾가 있으나 TLR2와 TLR4가 함께 결합된 동물모델의 경우에 *M. bovis* BCG의 감염에 취약하다는 보고⁵⁾도 있어 *M. bovis* BCG에 대한 면역반응에 어떤 종류의 TLR이 관여하는가에 대해서는 아직까지 확실하지 않다.

항결핵 방어면역의 초기 과정에서 TNF- α 와 interleukin-6(IL-6)의 역할은 동물실험과 결핵의 발병과정에서 다양하게 연구되어 보고되고 있다. TNF- α 는 단핵세포(mononuclear cells)에서 감염 초기에 생성되어 결핵성 육아종 형성과 Th 1 면역반응을 유도하며⁷⁾, IL-6는 결핵접종 후 초기에 생성되어 Th 1 면역반응을 유도하고, 항염증성 사이토카인인 IL-4 생성 세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 본 연구는 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염의 발병과정에서 *M. bovis* BCG에 대한 숙주 면역반응에서의 TLR2의 관련성을 알아보고자 화농성 림프절염 환자와 대조군의 단핵구에서 TLR2의 발현을 측정하였고, 단핵구를 TLR2 리간드로 자극한 후 항결핵 방어면역의 초기 과정에서 생성되는 TNF- α 와 IL-6의 생성을 측정하여 TLR2의 발현 정도를 간접적으로 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2002년 3월부터 2004년 2월까지 제주대학교병원 소아과로 내원한 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 22명중에서 16명을 대상으로 하였다. 화농성 림프절염의 진단 기준은 BCG 접종 후 발생한 크기가 2 cm 이상이며, 접종 부위와 동측 겨드랑이와 쇄골 상부 림프절염 경우⁹⁾, 그리고 파동이 촉지되거나 흡인이나 외과적 절개 시 화농이 관찰되는 경우로 하였다²⁾. 대조군 10명은 1세 이전에 건강 검진을 위해 제주대학교병원을 내원한 경우와 예정된 수술을 받기 위해서 내원한 환자로 한정하였고, 연구에 참여한 대조군과 환자군은 본인이나 보호자가 본 연구에 대한 내용에 대한 설명을 듣고 동의한 경우에만 포함하였다.

2. 방법

1) 단핵구의 분리와 자극

대조군과 환자군의 말초혈액에서 LymphoprepTM (AXIS-SHIELD, Oslo, Norway)을 이용하여 단핵세포를 분리하고, 단핵세포 1×10^8 cells/mL을 MagCollect^{*} Human CD14+ cell isolation kit (R&D system, Minneapolis, USA)을 이용하여 단핵구를 분리하였다. 분리한 단핵구(1×10^6 cells/mL)를 10% FBS, 2 mM glutamine, gentamycin 100 μ g/mL이 포함된 RPMI 1640 배양액에 부유시킨 뒤, TLR2 리간드인 *N*-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-propyl]-(*R*)-cysteiny1-(lysyl) 3-lysine (Pam₃CSK₄, from Akira' Lab, Osaka University)로 24시간 동안 자극하였다.

2) 유세포분석을 이용한 단핵구에서 TLR2의 발현 측정

대조군과 환자군의 단핵세포를 Pam₃CSK₄ (10 μ g/mL)로 6시간과 24시간 동안 자극한 후에 각각 세포를 분리하여 phycoerythrin이 부착된 항 CD14 단일항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)와 fluorescein isothiocyanate가 부착된 항 TLR2 단일항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 단핵세포에 반응시킨 후 유세포분석(Becton Dickison, San Jose, USA)을 하였다. 유세포분석 결과는 CELL QUEST (BD Immunocytometry Systems, San Jose, USA)를 이용하여 Mean Fluorescence Intensity (MFI) 값을 분석하였다.

3) 역전사중합효소반응에 의한 TLR2 mRNA 발현

Pam₃CSK₄로 6시간과 24시간 동안 자극한 단핵구를 Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA) 용액으로 total RNA를 추출하고, ImProm-IITM reverse transcription system (Promega, Madison, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 중합효소연쇄반응은 TLR2 시발체(5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3', 5'-TTGAAGTCTCCAGCTCCTG-3')와 GAPDH 시발체(5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 5'-GAAGATGGTGATGGATTTC-3')를 이용하여 94°C에서 30초간 변형반응, 58°C에서 30초간 결합반응, 72°C에서 30초간 신장반응을 25회 반복하였다. 중합효소반응 산물을 1% agarose gel에서 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색한 후, 자외선 하에서 densitometer를 이용하여 TLR2 mRNA 발현량을 측정하였다. TLR2 mRNA의 발현량은 GAPDH mRNA 발현량과의 상대적인 양으로 나타내었다.

4) 단핵구에서 TNF- α 와 IL-6 생성 측정

단핵구를 Pam₃CSK₄로 6시간과 24시간 동안 자극한 후에 각각 부유액을 채취하여 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, USA)를 이용하여 TNF- α , IL-6의 생성량을 측정하였다.

5) TLR2의 유전자다형체

환자군과 대조군의 말초 혈액에서 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였고, TLR2의 Arg677Trp 유전자다형체와 Arg753Gln 유전자다형체는 Folwaczny 등¹⁰⁾이 고안한 중합효소연쇄반응을 일부 변형하여 조사하였다. 중합효소연쇄반응은 각각의 시발체들(Arg677Trp sense primer, 5'-CCCCTCAAGTTGTGGCTTCATAAG-3'; anti-sense primer, 5'-AGTCCAGTTCATACTTGCACCAC-3', Arg753Gln sense primer, 5'-CATTCCCCAGCGCTTCTGCAAGCTCC-3'; anti-sense primer, 5'-GGAACCTAGGACTTTATCGCAGCTC-3')을 각각 이용하여 94°C에서 30초간 변형반응, 65°C에서 30초간 결합반응, 72°C에서 30초간 신장반응을 30회 반복하였다. 중합효소연쇄반응에 의한 산물 10 μ L에 Arg677Trp 유전자다형체의 경우에는 제한효소 Mwo I (Promega, Madison, WI) 2단위를 넣고 60°C에서 1시간 반응시키고, Arg753Gln 유전자다형체의 경우에는 제한 효소 Msp I (Promega, Madison, WI) 2단위를 넣고 37°C

에서 1시간 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기 영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 산물들의 크기를 확인하였다. Arg677Trp 유전자다형태의 경우에는 전기영동의 결과에서 152 base pairs (bp)의 크기의 산물이 있을 경우에는 thymine 대립유전자, 130 bp와 22 bp의 크기의 산물이 동시에 있을 경우에는 cytosine 대립유전자를 가진 것으로 해석하였다. Arg753Gln 유전자다형태의 경우에는 전기영동의 결과에서 129 bp의 크기의 산물이 있을 경우에는 adenine 대립유전자, 104 bp와 25 bp의 크기의 산물이 동시에 있을 경우에는 guanine 대립 유전자를 가진 것으로 해석하였다.

6) 통계

실험 결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 통계적 유의성은 SPSS (version 12.0 for Windows)의 student's t-test로 검정하였다. *P* 값이 0.05 이하를 보이는 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

1. BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자들의 특성

2002년 3월부터 2004년 2월까지 제주대학교병원 소아과로 내원한 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 22명중 남아가 13명, 여아가 9명이었다. 내원 당시 환자들의 연령은 3개월 이하가 6명(27%), 3개월에서 6개월 이하가 10명(46%), 6개월에서 12개월 이하가 6명(27%)으로 대부분(16명, 73%) 6개월 이내에 발견되어 내원하였다. 환아들 모두가 French주로 피내접종을 받았고, 18명(82%)이 보건소, 4명(18%)이 대학병원을 포함한 종합병

원에서 집중을 받았다. 집중 시기는 출생 후 4주에 20명(91%)이 집중받았고, 출생 후 6주와 8주에 각각 1명씩 집중받았다. 화농성 림프절염이 발생한 부위는 액와부가 19례(86%)로 가장 많았고, 쇄골 상부가 1(5%)례, 액와부와 쇄골 상부 두 부위에서 발생한 경우가 2례(9%)이었다. 내원 당시 자연 배농이 되고 있었던 경우가 2례(9%), 외과적 처치가 필요하여 외과적 처치를 받은 경우가 7례(32%)이었다.

2. Pam₃CSK₄ 자극에 의한 단핵구 표면의 TLR2의 발현

Pam₃CSK₄ 자극 후 CD14 양성인 단핵구 표면의 TLR2의 발현은 환자군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다(*P*<0.05) (Fig. 1). 6시간 자극 후 TLR2의 발현은 환자군에서 3.39±1.2%, 대조군에서 4.64±2.6%로 통계적으로 유의하게 환자군에서 감소하였고, 24시간 자극 후에도 TLR2의 발현은 환자군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다(환자군 3.78±0.8%, 대조군 4.81±1.1%).

3. 역전사중합효소반응에 의한 TLR2 mRNA 발현

Pam₃CSK₄로 자극한 6시간과 24시간 후 단핵구의 TLR2 mRNA 발현량은 대조군에서 환자군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다(*P*<0.05). 그러나 GAPDH mRNA의 발현량에 비해 TLR2 mRNA의 발현 정도가 미약하였다(Fig. 2).

4. 단핵구의 TNF- α 와 IL-6 생성

1) TNF- α

Pam₃CSK₄로 자극 6시간 후의 TNF- α 의 생성은 대조군(312.5±26.3 pg/mL)에서 환자군(225.1±36.9 pg/mL)에 비하여

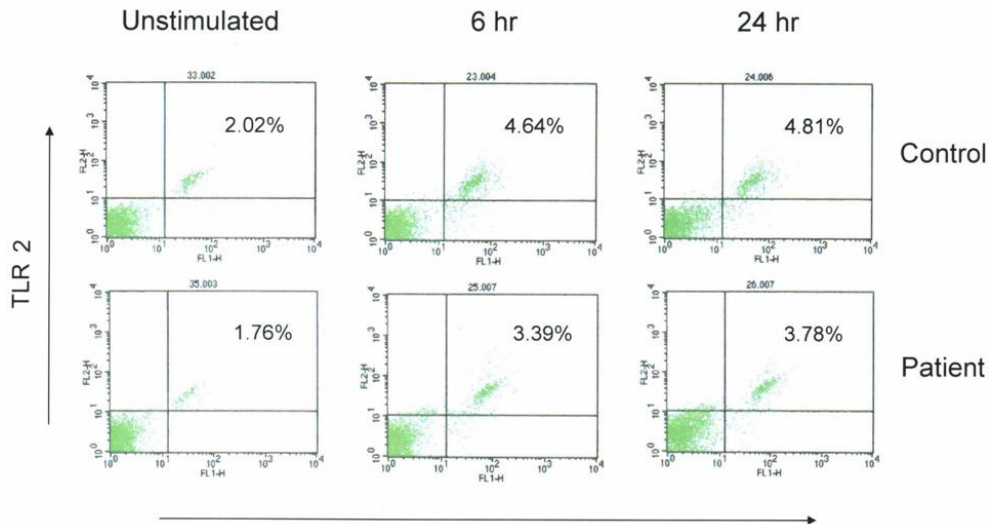


Fig. 1. Expression of surface CD14 and TLR2 marker on mononuclear cells stimulated by Pam₃CSK₄. Mononuclear cells (1×10^8 cells/well) were incubated with Pam₃CSK₄ (10 μ g/mL) for 24 hours and then analyzed for the expression of TLR2 in combination with CD14. Data are expressed as mean values of five independent experiments.

통계적으로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 24시간 자극 후 TNF- α 의 생성도 대조군($1,098.5 \pm 94.3$ pg/mL)에서 환자군(775.5 ± 60.8 pg/mL)에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였으며($P < 0.001$), 시간 경과에 따라 그 생성 정도가 증가하였다($P < 0.05$) (Fig. 3A).

2) IL-6

Pam₃CSK₄로 자극 6시간 후의 IL-6의 생성은 환자군 (1245.5 ± 253.7 pg/mL)에서 대조군($1,181.3 \pm 225.1$ pg/mL)에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 자극 24시간 후의

IL-6의 생성은 대조군($6,696.3 \pm 544.3$ pg/mL)에서 환자군 ($4,645.8 \pm 583.9$ pg/mL)보다 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 그리고 자극 시간 경과에 따라 그 생성 정도가 TNF- α 와 유사하게 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 3B).

5. TLR2의 Arg677Trp 유전자다형태와 Arg753Gln 유전자다형태

TLR2의 Arg677Trp 유전자다형태의 경우에 검사 대상 모두에서 thymine 대립유전자를 가진 Arg677Trp 유전자다형태가 발견되지 않았고, Arg753Gln 유전자다형태의 경우에도 adenine 대립유전자를 가진 Arg753Gln 유전자다형태가 발견되지 않았다.

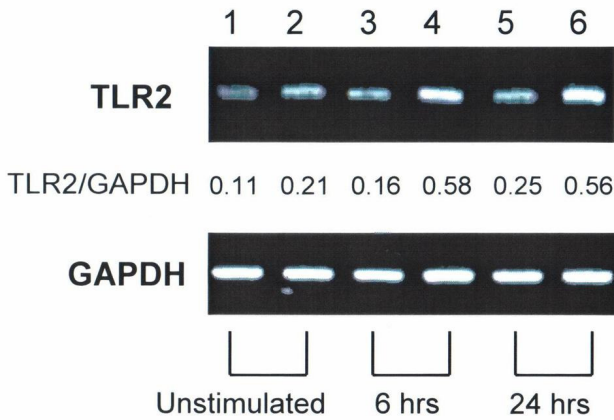


Fig. 2. Expression of TLR2 mRNA expression after Pam₃CSK₄ stimulation by RT-PCR. Monocytes (1×10^6 cells/well) were incubated with a constant amount of Pam₃CSK₄ ($10 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours. Expression of TLR2 mRNA was represented by relative quantitative comparing with expression of GAPDH mRNA.

고찰

BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염은 영아에서 발생 빈도가 높다고 알려져 있으나¹¹⁾, 그 원인은 잘 알려져 있지 않다. Teo 등²⁾은 영아가 연장아들에 비해 미숙한 면역력을 가지고 있고, 피부 진피층이 상대적으로 얇아 BCG 백신을 피내 주입하기가 기술적으로 힘들기 때문에 영아에서 발생 빈도가 높을 것이라고 하였다. 그러나 동일한 BCG 백신 균주에서도 다양한 유전적 변이들이 나타나고, 이러한 유전적 변이들로 인하여 숙주의 다양한 면역반응이 나타날 수도 있어 백신 균주와 연관된 인자들도 BCG 접종 후 이상반응의 발생과 무관하지 않다¹²⁾. 그리고 Na 등¹³⁾은 접종 균주에 따른 화농성 림프절염의 발생 빈도는 결핵협회 연구원이 생산한 French 1173 P2주 접종군에서 다른 균주 접종군에 비해 더 높았다고 보고하였고, Kim 등¹⁴⁾도 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자들 모두가 French주 접종자들이었다고 보고하여 BCG 균주의 종류와 화농성 림프절염의 발생과의

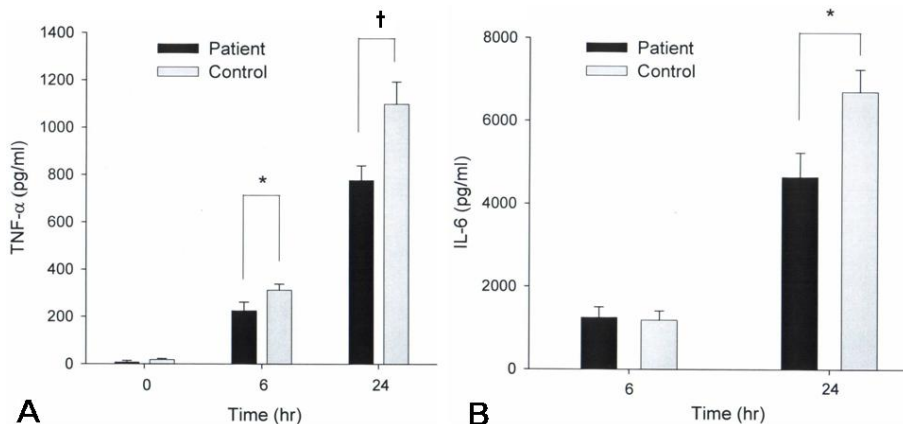


Fig. 3. TLR2-mediated TNF- α and IL-6 production in monocytes. Monocytes (1×10^6 cells/well) were incubated with Pam₃CSK₄ ($10 \mu\text{g/mL}$) for 24 hours and the supernatant was collected for determination of TLR2-mediated TNF- α (A) and IL-6 (B) production. TNF- α and IL-6 production were measured using ELISA kits (for which the mean minimum detectable dose of TNF- α was 1.6 pg/mL and the minimum detectable dose of IL-6 was < 0.7 pg/mL.) Results are expressed as mean values \pm standard deviation and are representative of two independent experiments.

관련성을 제시하였다. 본 연구에서도 2002년 3월부터 2004년 2월까지 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 22명 모두가 French주 접종자들이었다.

항결핵 면역반응의 초기 과정에서 TLR는 결핵균의 다양한 항원 성분을 리간드로 인식하여 면역반응과 염증반응을 유도한다. *M. bovis* BCG의 경우에는 TLR2가 *M. bovis* BCG의 lipomannan 성분을 리간드로 인식하여 TNF- α 등의 염증성 시토카인의 생성을 유도한다는 보고가 있으나⁶⁾ *M. bovis* BCG의 TLR 리간드에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 TLR2를 발현하는 주요 세포인 단핵구를 TLR2의 리간드로 알려져 있는 리포펩티드(lipo-peptide) 일종인 Pam3CSK4를 이용하여 직접 자극하여 TLR2의 발현 정도를 조사하였다. 본 연구와 유사한 방법으로 특정 질병의 발병과정에서 TLR2의 역할을 조사한 연구들은 그다지 많지 않으며, 그 결과들도 각각 다르게 보고하고 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. Hwang 등¹⁵⁾은 가와사끼병 환자에서 TLR2의 발현이 대조군에 비해 증가되어 있다고 보고하였고, Wikén 등¹⁶⁾은 사르코이드증(sarcoidosis) 환자에서 TLR2와 TLR4의 발현이 증가되어 있다고 보고하였다. 그러나 Han 등¹⁷⁾은 B형간염 e항체 양성자에서, Link 등¹⁸⁾은 폐혈증 환자에서 TLR2의 발현이 대조군에 비해 감소되어 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 화농성 림프절염 환자군에서 TLR2의 발현 정도가 통계적으로 유의하게 감소하였고, 항결핵 면역반응의 초기 과정의 주된 매개체로 알려져 있는 TNF- α 와 IL-6의 생성도 대조군에 비해 환자군에서 유의하게 감소하였다. 그러므로 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염의 발생이 TLR2 발현 감소와 연관되어 있고, *M. bovis* BCG의 리간드 인식에 TLR2가 관여함을 추정할 수 있다. 그러나 *M. bovis* BCG의 리간드 인식과정에서 어떤 종류의 TLR가 관여하는가에 대해서도 아직까지 확실하지 않다. Quesniaux 등¹⁹⁾은 설치류 대식세포의 *M. bovis* BCG에 대한 염증성 반응에는 TLR4가 아닌 TLR2만이 관여한다고 보고하였다. 그러나 Nicolle 등⁵⁾은 TLR2와 TLR4가 함께 결핍된 동물모델의 경우에 *M. bovis* BCG의 감염에 취약하다고 보고하였고, Gilleron 등²⁰⁾도 *M. bovis* BCG의 리간드 인식에는 TLR2와 TLR4가 모두 관여한다는 상반된 보고를 하였다. 그러므로 *M. bovis* BCG의 리간드 인식과정에서 TLR 역할에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

TLR의 발현 정도는 흡연, 환경 노출, 만성적인 감염상태 등에 의해서 영향을 받을 수 있고²¹⁾, 리간드의 직접적인 자극에 의하여 TLR의 발현 정도를 조사하는 경우에는 리간드의 자극에 의해서 TLR을 발현하는 세포의 표현형이 변할 수 있으며, 특정 리간드에 의해서 다른 종류의 TLR 발현이 영향을 받을 수도 있다^{18, 21, 22)}. Nomura 등²³⁾은 단핵구를 TLR4 리간드인 lipopolysaccharide (LPS)로 직접 자극을 준 후에 CD14 발현과 TLR4의 발현을 조사하였다. LPS 처리 전후에도 단핵구의 CD14 발현의 차이는 없었고, LPS 처리 후에 단핵구의 TLR4 발현이 감소하는 것은 LPS 내성과 관련이 있는 것으로 보고하였다. 그러나 Iwa-

hashi 등²⁴⁾은 리간드로 자극하지 않고 배양액만으로 배양을 하여도 단핵구의 TLR2와 TLR4 발현이 증가한다고 하였고, 이러한 결과는 단핵구의 배양용기에 대한 플라스틱 점착성(plastic adherence)과 관련이 있을 것이라 하였다^{18, 24, 25)}. Link 등¹⁸⁾은 TLR2의 리간드인 Pam₃CSK₄과 세포질의 패턴인식수용체인 nuclear oligomerization domain 2 (NOD2)의 리간드인 muramyl dipeptide (MDP)를 조합으로 자극하여 TLR4의 발현을 조사하였다. MDP로 자극하였을 때나 Pam₃CSK₄과 MDP로 동시에 자극하였을 때도 TLR4의 발현은 감소하여 특정 리간드에 의해 다른 종류의 TLR 발현이 영향을 받을 수도 있다고 보고하였다. 그러므로 TLR을 포함한 패턴인식수용체의 발현 조절에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

특정 질환에서 환자군과 건강대조군의 단핵구에서 TLR2 발현을 조사한 연구들¹⁵⁻¹⁸⁾의 보고에 따르면 TLR2의 발현은 약 10%에서 90%까지 다양하다. 일반적으로 단핵구에서 TLR2의 발현은 강한 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 본 연구는 환자군과 대조군의 말초혈액에서 단핵세포를 분리하고, TLR2와 CD14 단일항체를 이용하여 TLR2 발현을 조사하였다. 본 연구에서는 대상자들의 단핵세포 중에서 TLR2가 발현되는 단핵구(CD14 양성이면서 TLR2 양성인 세포)의 수가 다른 연구들의 결과에 비하여 적었다. 대상자들의 단핵세포 중에서 CD14 양성인 세포수가 상대적으로 적어 TLR2가 발현되는 단핵구가 적었던 것으로 생각되며, 본 연구에서 사용하였던 상업용 TLR2 단일항체의 민감도 또한 결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그리고 단핵구에서 실시간 중합효소 연쇄반응으로 TLR2 mRNA 발현 정도를 정량화하지 못한 점도 본 연구의 한계점으로 생각된다.

TLR 유전자다형태가 특정 질병 특히 미생물 감염에 대한 감수성과 연관이 있다는 보고들은 Underhill 등²⁶⁾이 마우스 TLR2 Pro681His 유전자다형태가 TLR2 신호전달경로의 저해작용을 한다고 처음으로 보고하였고, Kang 등²⁷⁾도 나병중나병 환자에서 TLR2 Arg677Trp 유전자다형태와 IL-12 생성 감소와 관련이 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 질병의 감수성과 관련이 있다고 보고된 TLR2 Arg677Trp 유전자다형태와 Arg753Gln 유전자다형태를 조사하였다. TLR2의 Arg677Trp 유전자다형태의 경우에 thymine 대립유전자를 가진 Arg753Trp 유전자다형태의 빈도는 보고자들에 따라 다르게 보고되고 있다. Schröder 등²⁸⁾은 서양인에서 발견되지 않았다고 보고하였으나 Ben-Ali 등²⁹⁾은 결핵 환자들에서 94%에서 발견되었다고 보고하였다. 그리고 Kang 등²⁷⁾도 한국의 나병 환자에서 대조군과 결핵나병 환자에서는 발견되지 않았지만 나병중나병 환자의 22%에서 thymine 대립유전자를 가진 Arg677Trp 유전자다형태가 발견되었고, thymine 대립유전자가 나병중나병의 질병감수성과 관련이 있다고 보고하였다. Arg753Gln 유전자다형태의 경우에도 Schröder 등²⁸⁾과 Lorenz 등³⁰⁾은 adenine 대립유전자를 가진 Arg753Gln 유전자다형태가 각각 2.7%와 14.6%로 다르게 보고하고 있다. 그러나 한국인에서는 Yoon 등³¹⁾이 154명의 균혈증 환자와 179명의 대

조균에서 thymine 대립유전자를 가진 Arg677Trp 유전자다형태와 adenine 대립유전자를 가진 Arg753Gln 유전자다형태가 발견되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서도 대상자 수가 통계적으로 의미 있게 크지 않았지만 TLR2의 thymine 대립유전자를 가진 Arg677Trp 유전자다형태와 adenine 대립유전자를 가진 Arg753Gln 유전자다형태가 발견되지 않았다. 이는 TLR2 유전자다형태가 연구 대상에 따른 인종적 차이나 대상 질환에 따른 차이가 있을 것으로 생각된다.

결론으로 본 연구에서 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염의 발생이 TLR2 발현 감소와 연관되어 있고, *M. bovis* BCG의 리간드 인식에 TLR2가 관여함을 추정할 수 있다.

요 약

목적 : TLR2는 숙주의 항결핵 방어면역의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 단핵구에서 TLR2의 발현과 TLR2 리간드 자극에 의한 TNF- α 와 IL-6의 생성을 조사하여 화농성 림프절염 발병과 TLR2의 연관성을 알아보려고 하였다.

방법 : BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 16명과 건강 대조군 10명의 말초 혈액에서 단핵구를 분리하고, TLR2 리간드인 Pam3CSK4로 자극한 후 유세포분석과 역전사중합효소반응을 이용하여 TLR2의 발현을 측정하였고, 자극 후 TNF- α 와 IL-6의 생성을 측정하여 TLR2의 발현 정도를 간접적으로 조사하였다.

결과 : BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자 단핵구의 TLR2 발현 정도($3.39 \pm 1.2\%$)는 대조군($4.64 \pm 2.6\%$)에 비하여 유의하게 감소하였고, 단핵구 자극에 의한 TNF- α 와 IL-6의 생성도 대조군(TNF- α , $1,098.5 \pm 94.3$ pg/mL; IL-6, $6,696.3 \pm 544.3$ pg/mL)에 비하여 환자군(TNF- α , 775.5 ± 60.8 pg/mL; IL-6, $4,645.8 \pm 583.9$ pg/mL)에서 유의하게 감소하였다. 그리고 자극 시간에 따른 TLR2 발현 정도와 TNF- α 와 IL-6의 생성 증가가 유사한 양상을 나타내었다.

결론 : 본 연구의 결과에서 BCG 접종 후 발생한 화농성 림프절염 환자군 단핵구의 TLR2 발현 감소가 연관되어 있고, *M. bovis* BCG의 리간드 인식에 TLR2가 관여함을 추정할 수 있다.

References

- 1) Baek HS, Chang JY, Moon SJ, Oh SH. Lymphadenitis following intradermal BCG vaccination. Korean J Pediatr 2006;49:46-50.
- 2) Teo S, Smeulders N, Shingadia DV. BCG vaccine-associated suppurative lymphadenitis. Vaccine 2005;23:2676-9.
- 3) Stenger S, Modlin RL. Control of Mycobacterium tuberculosis through mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 2002;14:452-7.

- 4) Heldwein KA, Liang MD, Andressen TK, Thomas KE, Marthy AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. J Leukoc Biol 2003;74:277-86.
- 5) Nicolle D, Fremond C, Pichon X, Bouchot A, Maillet I, Ryffel B, et al. Long-term control of Mycobacterium bovis BCG infection in the absence of Toll-like receptors: investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. Infect Immun 2004;72:6994-7004.
- 6) Gilleron M, Nigou J, Nicolle D, Quesniaux V, Puzo G. The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2. Chem Biol 2006;13:39-47.
- 7) Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. PNAS 1999;96:14459-63.
- 8) Leal IS, Florido M, Andersen P, Appelberg R. Interlukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine. Immunology 2001;103:375-81.
- 9) Singla A, Singh S, Goraya JS, Radhika S, Sharma M. The natural course of nonsuppurative Calmette-Guerin bacillus lymphadenitis. Pediatr Infect Dis J 2002;21:446-8.
- 10) Flowaczny M, Glas J, Torok HP, Limbersky O, Flowaczny C. Toll-like receptor 2 and 4 mutations in peiodontal disease. Clin Exp Immunol 2004;135:330-5.
- 11) Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, Dumitrescu N, Verron M, Couvet E. BCG complications. Estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. Adv Tuberc Res 1984;21:107-93.
- 12) Behr MA. BCG-different strains, different vaccines? Lancet Infect Dis 2002;2:86-92.
- 13) Na KH, Rim SS, Kim EY, Kim KS, Kim YW. Factors affecting clinical course of BCG lymphadenitis. Korean J Pediatr Infect Dis 2001;8:181-90.
- 14) Kim MS, Jo DS, Kang MK, Kim SJ, Kim JS. The effect of local rifampicin instillation on the treatment of suppurative BCG lymphadenitis. Korean J Pediatr 2006;49:40-5.
- 15) Hwang DH, Han JW, Choi KM, Shin KM, Kim DS. Expression of Toll-like receptor-2 on the peripheral monocytes in Kawasaki disease patients. Korean J Pediatr 2005;48:315-20.
- 16) Wikén M, Grunewald J, Eklund A, Wahlström J. Higher monocyte expression of TLR2 and TLR4, and enhanced pro-inflammatory synergy of TLR2 with NOD2 stimulation in Sarcoidosis. J Clin Immunol 2009;29:78-89.
- 17) Han YP, Li J, Wan YF, Kong LH, Cai J, Dong L, et al. The influence of hepatitis B e antigen on the expression of toll-like receptor 2 on peripheral monocytes [abstract]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2008;16:739A.
- 18) Link A, Selejan S, Maack C, Lenz M, Böhm M. Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock. Critical Care 2008; 12:R159
- 19) Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremmer L, Guerardel Y, Nigou J, et al. Toll-like receptor 2-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. J Immunol 2004; 172:4425-34.

- 20) Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gurin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* 2003;278:29880-9.
- 21) Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005;6:68
- 22) Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002;99:3427-31.
- 23) Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-9.
- 24) Iwahashi M, Tamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1457-67.
- 25) Krause SW, Kreutz M, Andreesen R. Differential effects of cell adherence on LPS-stimulated cytokine production by human monocytes and macrophages. *Immunobiology* 1996; 196:522-34.
- 26) Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401:811-5.
- 27) Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;31:53-8.
- 28) Schröder NWJ, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003;81:368-72.
- 29) Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:625-6.
- 30) Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 2000;68:6398-401.
- 31) Yoon HJ, Choi JY, Kim CO, Park YS, Kim MS, Kim YK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 and 2 polymorphism in Korean patients with bacteremia. *J Korean Med Sci* 2006;21: 979-82.