

# 조기 양막 파수에서 단핵구 CD14 수용체 유전자 중진자의 다형성에 대한 연구

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

임지은·김 탁·이낙우·오민정·설현주·민주영·여혜만·선홍갈·김해중

## Monocyte CD 14 gene promoter polymorphism in PROM

Ji E. Lim, M.D., Tak Kim, M.D., Nak W. Lee, M.D., Min J. Oh, M.D., Hyun J. Seol, M.D.,  
Joo Y. Min, M.D., Hye M Yeo, M.D., Hong G Sun, M.D., Hai J. Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology Korea University School of Medicine, Korea

**Objective:** According to previous studies, Monocyte CD14 promoter gene polymorphisms were related to excessive inflammatory reaction mediated by monocyte. So we attempted to evaluate whether polymorphisms of the Monocyte CD 14 receptor promoter gene are associated with the development of PROM

**Methods:** We genotyped the CD14-260C/T polymorphism using PCR in 23 members of PROM group (group 1), 32 members of labor group without PROM (group 2) and 49 members of control group who admitted our hospital for cesarean surgery (group 3).

**Results:** Frequencies of the C and T alleles were determined to be 39.1% and 60.9% respectively in group 1, 34.4% and 65.6% in group 2, 34.7% and 65.3% in group 3. There were no statistical significances ( $p=0.8474$ ). With regard to genotype, TT homozygote, CC homozygote and TC heterozygote were determined to be 21.7%, 0%, 78.3% respectively in group 1, 37.5%, 6.3%, 56.2% in group 2, 34.7%, 4.1% and 61.2% in group 3. There were no statistical significances between groups ( $p=0.4969$ )

**Conclusion:** There were no statistical significances between CD14 gene promoter polymorphisms and PROM. Relatively, small sample size and other many etiologic factors besides inflammation which can evoke PROM may influence our results.

**Key words:** PROM, Monocyte, CD14 receptor, Polymorphism

## 서 론

조기 양막 파수 (PROM)는 진통이 생기기 전에 양막이 먼저 파수가 되는 것을 의미하는 것으로 임신 전 기간 중 10-15%에서 발생하며 만삭산모에서는 90% 가까이에 서 발생하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2</sup> 조기 양막 파수의 원인에 대한 기존의 연구에 의하면 모체의 하부 생식기에

서의 상승 감염과 이에 대한 모체의 염증 반응이 주된 요인 중에 하나라고 하였으며,<sup>3</sup> 또한 조기 양막 파수 환자의 양수 내에서 다양한 염증 유발 cytokine이 증가됨이 보고된 바 있다.<sup>4</sup> 기존의 연구 결과에서와 같이 조기 양막 파수의 주된 요인 중 하나가 염증에 의한 것이라면 이런 염증에 대한 모체의 감수성, 즉 모체의 반응의 정도가 조기 양막 파수의 위험 인자가 되는지는 아직 알려진 바가 없다.

임신 중 모체의 면역체계는 일련의 변화를 겪게 되는 데 태아를 ‘남’으로 인식하지 않기 위해 적응면역체계

접수일 : 2005. 10. 13.  
주관책임자 : 김해중  
E-mail: haijkim@korea.ac.kr

(adaptive immunity)는 저하되는 반면 주변의 바이러스나 세균 등의 위협으로부터 모체를 보호하기 위해 자연면역체계 (innate immunity)는 항진된다.<sup>5</sup> 자연 면역체계를 담당하는 많은 세포 중 NK 세포는 저하되는 반면에 단핵구는 그 수가 증가할 뿐만 아니라 활성화 상태를 나타내는 세포 내의 ROS, 표면의 CD 14, CD 11b, CD 64 수용체 등이 증가한다고 알려져 있다. 이렇듯 임신 중 단핵구의 활성이 면역반응의 주된 역할을 담당한다고 알려져 있으나 그 정확한 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.<sup>6,7</sup>

단핵구는 세균이나 LPS (Lipopolysaccharide) 등의 항원과 CD14 수용체를 통하여 반응한다.<sup>8</sup> CD14 수용체는 세포를 통과하여 신호를 전달하는 부분이 결여되어 있어 LPS 등의 항원과 결합한 CD14 수용체는 Toll-like receptor (TL)4를 통하여 세포 내로 신호를 전달하게 된다.<sup>9</sup> 그 결과 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, Platelet-activating factor (PAF) 등의 다양한 염증 cytokine 등이 분비되게 된다. 기존의 실험에 의하면 항 CD14 항체로 처리를 하면 LPS와 접합된 적혈구를 단핵구가 인지하지 못하며 TNF- $\alpha$ 의 분비가 감소된다고 알려져 있으며<sup>10</sup> 인간의 CD14 수용체 유전자를 접합한 쥐는 LPS에 과감작되는 반면에 CD14 수용체가 결핍된 쥐는 LPS에 반응하지 않음이 알려져 있다.<sup>11</sup>

CD14 수용체를 관장하는 유전자는 5번 염색체의 다른 성장 인자나 수용체를 관장하는 부위에 인접하여 위치하고 있다.<sup>12</sup> 이 유전자는 3900개의 염기쌍으로 이루어져 있으며 2개의 exon을 포함하고 375개의 아미노산을 부호화하고 있다.<sup>13</sup> 이 CD 14 수용체 유전자의 증진자에 다형성이 있는 경우 증진자의 활성화에 영향을 준다고 알려져 있다.<sup>14</sup>

따라서 본 연구에서는 CD14 수용체 유전자의 증진자에 다형성이 있는 경우 모체의 과도한 염증반응으로 인해 조기 양막 파수가 더 쉽게 오는지 여부를 확인하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

2003년 10월부터 2005년 1월까지 고려대학교 안산병원을 내원한 환자 중 진통 없이 양막이 파수된 23명의 양막 파수군 (1군), 양막 파수없이 진통이 생겨 내원한 32명의 진통군 (2군) 그리고 계획된 제왕절개 수술을 받기 위해 만삭에 입원한 49명의 정상군 (3군)으로 구분하여 각각에서 -269C/T 유전자 다형성 여부를 PCR을 이용하여 검사하였다. 세 군은 모두 37주 이상의 만삭의 정상 산모로 구성되어 있었으며 자궁내 발육지연을 보이거나 양수 과소증, 양수 과다증 등의 산과적 문제를 보인 경우에는 연구에서 제외하였다.

### 1. CD14 수용체 -260C/T 유전자형 검사

DNA는 혈액내의 백혈구에서 기존의 kit를 이용하여 사용방법에 따라 추출하였다 (Gene All, General Biosystem, Korea). 추출된 DNA를 이용하여 CD14 유전자형을 검사하였는데, 기존의 알려진 data를 이용하여 PCR을 시행하였다.<sup>15</sup>

간략히 언급하면, 총 혼합물은 50  $\mu$ L (100-200 ng의 DNA, 5 U의 Taq DNA 중합효소 (polymerase), 50 pmol의 올리고핵산 시동체 (oligonucleotide primer), 200 nmol의 dNTP, 1.5 mmol의  $Mg^{2+}$ )였으며 CD14 수용체 유전자의 증진자 부위를 증폭하기 위한 시동체로 5-TAAGGCACTGAGGATCATCC-3과 5-GGCTTCACACTTGTGAATC-3이 사용되었다.

PCR은 총 40주기를 하였는데 94℃에서 30초간 변성 (denaturation)단계를 거쳐 60℃에서 45초간의 붙임 (annealing)단계, 72℃에서 1분간의 연장 (elongation)단계, 마지막으로 72℃에서 5분간의 확장 (extension)단계를 거쳤다. PCR은 Applied Biosystem Thermo-cycler를 이용하여 시행하였다.

그 결과 329 bp의 산물이 생성되었으며 37℃에서 4시간 동안 Hae III 효소로 처리하였다 (Takara). 그 후 2% agarose gel에서 ethidium bromide로 염색하여 분석하였다. T allele인 경우에는 효소로 잘라지지 않은 329 bp가 검출되었으며 C allele인 경우에는 효소로 잘라진 170 bp와 159 bp 두 개가 검출되었다.

## 통 계

각 군간의 차이가 있는지 알아보기 위해  $\chi^2$  test와 Fisher's exact test, SAS v 9.12를 이용하였으며  $p < 0.05$ 인 것을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

전술하였듯이 양막 파수군을 Group 1, 진통군을 Group 2, 정상군을 Group 3로 하였다.

각 군간에 산모의 평균 연령은 각각 28.32세, 31.28세, 30.08세였으며 임신 주수는 만삭 분만을 대상으로 하였으므로 각각 39.23주, 39.69주, 38.84주였다. 임신 횟수는 1.23회, 1.82회, 2.08회였으며, 신생아의 평균 체중은 각각 3328 g, 3286 g, 3507 g으로 각각의 변수는 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

각 군간에 CD14 수용체 유전자 증진자 C/T의 allele을 비교했을 때 조기 양막 파수 군에서는 C와 T allele이 각각 39.1%, 69.9%, 진통군에서는 34.4%, 65.6%, 대조군에서는 34.7%, 65.3%를 보여 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.8474$ ) (Table 2).

각 군간에 CD14 수용체 유전자 증진자 -260C/T 부위의 유전자형을 비교해 보았을 때 CC, CT, TT 유전자형

이 조기 양막 파수군에서는 각각 0%, 78.3%, 21.7%으로 나타났으며 진통군에서는 6.3%, 56.2%, 37.5%, 대조군에서는 4.1%, 61.2%, 34.7%로 나타났다. 이는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ( $p=0.4969$ ) (Table 3).

**Table 2.** CD14 promoter - 260C/T allele frequencies

	Group 1 (n=23)	Group 2 (n=32)	Group 3 (n=49)	p value
				0.8474*
C	18 (39.1%)	22 (34.4%)	34 (34.7%)	
T	28 (69.9%)	42 (65.6%)	64 (65.3%)	

Data was analyzed by  $\chi^2$  test(\*)

**Table 3.** CD14 promoter - 260C/T genotype frequencies

	Group 1 (n=23)	Group 2 (n=32)	Group 3 (n=49)	p value
CC	0 (0%)	2 (6.3%)	2 (4.1%)	0.4969*
CT	18 (78.3%)	40 (56.2%)	30 (61.2%)	
TT	5 (21.7%)	7 (37.5%)	17 (34.7%)	

Data was analyzed by  $\chi^2$  test(\*)

**Table 1.** Demographic characteristics

	Group 1 (n=23)	Group 2 (n=32)	Group 3 (n=49)	P value
Age (years)	28.32±4.98	31.28±2.12	30.08±3.02	0.64*
Gestational age (weeks)	39.23±1.19	39.69±2.34	38.84±1.31	0.50*
Parity	1.23±1.20	1.82±0.48	2.08±0.72	0.89*
Body weight (grams)	3328±350	3286±670	3507±850	0.42*

Data was expressed as mean±standard deviation.

Data was analyzed by  $\chi^2$  test(\*)

Group 1: 양막 파수군

Group 2: 진통군

Group 3: 정상군

## 고 찰

그간 단핵구 CD14 유전자 증진자의 다형성에 대해서는 주로 급성 심근경색, 동맥 경화증, 패혈증 등 단핵구가 활성화되는 질환에서 연구되어져 왔다. Hubacek 등의 연구에 의하면 CD14 유전자 증진자 부위에 C에서 T로 염기서열의 변환이 있을 경우, 즉 TT 유전자형을 보이는 경우 혈중의 TNF- $\alpha$  수치가 증가하며, 급성 심근경색의 위험인자가 된다고 하였다.<sup>16</sup> 일본에서 수행된 비슷한 연구에서도 역시 TT 유전자형은 급성 심근경색의 위험인자라고 하였다.<sup>17</sup> 또한 다른 연구에서는 TT 유전자형인 경우 같은 항원에 노출되어도 단핵구가 과감작되므로 패혈증의 위험인자가 된다고 하였다.<sup>18</sup> 이렇듯 단핵구 CD14 유전자 증진자 다형성은 단핵구가 항진되어 발생하는 질환의 발병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 뇌졸중이나 심근 경색, 결핵 환자들을 대상으로 한 다른 연구에서는 TT 유전자형과 질병의 발생에 연관이 없다는 보고도 있었는데<sup>19-21</sup> 이렇게 상이한 결과가 나온 데에는 인종이나 질병의 유병율, 연구에 포함된 대상군 등이 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다. 그러나 우리나라는 단일민족이므로 인종의 차이는 결과에 영향이 없었을 것으로 생각된다.

전술한 바와 같이 임신 중에는 단핵구를 위시한 자연 면역체계가 경하게 항진되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 과도한 염증 반응으로 발생할 수 있는 일련의 질환들, 즉 임신성 고혈압이나. 조기 양막 파수 등에서 단핵구 유전자 증진자 다형성과의 연관성은 아직 알려져 있지 않은 상태이다. 또한 우리나라에서는 아직 CD14 유전자 증진자의 다형성이 얼마나 되는지 TT 유전자형이 얼마나 차지하는지에 대한 연구는 없다.

따라서 본 논문에서는 이런 유전자의 다형성이 염증에 따른 산모의 개인적인 감수성의 차이, 즉 반응의 정도를 결정할 수 있는지 알아보고자 하였다. 즉 별다른 위험 요인이 없는 산모에서 비슷한 자극에 대해 과도한 염증 반응을 보이는 경우 양막 파수를 일으킬 수 있는 위험 인자가 되는지 확인하고자 하였다. 그리고 아직 진통이 시작이 되는 기전은 알려져 있지 않으나 염증과 연

관이 있을 수 있어 양수가 파막되지 않은 상태에서 진통이 시작된 군은 다른 군으로 분류하였다. 그러나 연구 결과 대조군과 양수 파막군, 진통군 사이에 통계적으로 유의한 유전자형의 차이는 보이지 않았다. 여기에는 몇 가지 이유가 있을 수 있는데 첫째로 염증과 조기 양막 파수의 상관성은 조산일수록 더 커진다는 점이다. 기존의 연구에서도 더 일찍 양수가 파막 될수록 양수에서의 균배양율이 증가한다고 하였는데<sup>22</sup> 본 연구에서는 만삭의 산모만을 대상으로 하였으므로 그 한계가 있을 수 있다. 둘째로 양막 파수에 관여하는 인자는 염증 외에도 다양한 요인이 있을 수 있는데 본 연구에서는 염증으로 인한 양막 파수가 어느 정도나 되는지 알 수 없었다. 이를 알아보기 위해서는 균배양 검사 결과나 혈청의 백혈구수치, CRP수치, 태반 조직 검사 등의 결과가 추가적으로 고려되어야 할 것이다. 셋째로 앞서 언급한 바와 같이 TT 유전자형을 보이는 경우 혈중의 TNF- $\alpha$  수치가 증가한다고 알려져 있는데,<sup>16</sup> 산모에서의 유전자형에 따른 혈중의 TNF- $\alpha$  수치, 그리고 이 수치와 조기 양막파수와 의 연관성 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 넷째로 비교적 연구의 표본수치가 적어 결과에 오차를 가져왔을 가능성이 있으므로 이런 여러 가지의 본 연구의 한계점을 고려하여 조산에서 발생한 조기 양막 파수와 염증의 관계 그리고 CD14 유전자 증진자의 다형성에 대해 좀 더 많은 산모를 대상으로 한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. British Medical Journal. Premature rupture of the membrane. Br Med J 1979; 1165-6.
2. Lanier LR, Scarbrough RW, Fillingim DW. Incidence of maternal and fetal complications associated with rupture of the membranes before onset of labour. J Obstet Gynecol 1965; 93: 398.
3. Romero R, Ghidini A, Mazon M, Behnke E. Microbial invasion of the amniotic cavity in premature rupture of membranes, Clin Obstet Gynecol 1991; 34: 769-78.
4. Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Munoz H, Tolosa J, Rojas I. Premature labor and intraamniotic infection Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology, Clin Perinatol 1995; 22: 281-342.
5. Sacks GP, Studena K, Sargent IL, Redman CWG An Innate view

- of human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 80-6.
6. Oian P, Omsjo I, Maltau JM, Osterud B. Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 511-7.
7. Berge LN, Ostensen M, Revhaug A. Phagocytic cell activity in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988; 67: 499-504.
8. Pugin J, Schrufer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharides-binding protein and soluble CD 14. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2744-8.
9. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky S. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-92.
10. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-3.
11. Ferrero E, Jiano D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, et al. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 2380-4.
12. Goyert SM, Ferrero E, Retting WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 1988; 239: 497-500.
13. Setoguchi M, Nasu N, Yoshida S, Higushi Y, Yamamoto S. Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1008: 213-22.
14. Zhang DE, Hetherington CJ, Tan S, Dziennis SE, Gonzales DA, Chen HM, et al. Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD 14. *J Biol Chem* 1994; 269: 11425-34.
15. Morange PE, Tired L, Saut N, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, et al. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. *Eur J Hum Genet* 2004; 1-9.
16. Hubacek JA, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Polene R. C(-260)→T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 3218-20.
17. Shimada K, Watanabe Y, Mokuno H, Iwama Y, Daida H, Wamaguchi H. Common polymorphism in the promoter of the CD 14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. *Am J Cardiol* 2000; 86: 682-4.
18. Gibot S, Cariou A, Drouet L, Rossignol M, Ripoll L. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 2002; 30: 969-73.
19. Koch W, Kastrati A, Mehili J, Beckerath N, Schomig A. CD14 gene -159C/T polymorphism is not associated with coronary artery disease and myocardial infarction. *Am Heart J* 2002; 143: 971-6.
20. Lichy C, Meiser H, Ginsbach CG, Buggle F, Dorfer C, Grau A. Lipopolysaccharide receptor CD14 polymorphism and risk of stroke in a South-German population. *J Neurol* 2002; 249: 821-3.
21. Pacheco E, Fonseca C, Montes C, Zabaleta J, Farcia LF, Arias MA. CD 14 gene promoter polymorphism in different clinical forms of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 207-13.
22. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 3.

---

「국문초록」

**목적:** 임신 중 단핵구 CD14 유전자 증진자의 -260위치에 C에서 T로 변이가 있을 때 단핵구가 더 쉽게 항진되어 과도한 염증반응을 유발한다고 알려져 있다. 따라서 단핵구 CD14 유전자 증진자 다형성이 조기양막파수의 발달에 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

**연구 방법:** 23명의 양막파수군 (1군), 32명의 양막파수 없이 진통이 생긴 군 (2군) 그리고 49명의 계획된 제왕절개 수술을 위해 만삭에 입원한 정상군 (1군)의 세 군으로 나누어 269 C/T 유전자 다형성 여부를 PCR을 이용하여 검사하였다.

**결과:** C와 T allele의 빈도는 1군에서는 39.1%, 60.9%, 2군에서는 34.4%, 65.6%, 3군에서는 34.7%, 65.3%로 간 군간의 통계적인 차이는 없었다 ( $p=0.8474$ ). 유전자형은 1군에서는 T homozygote가 21.7%, C homozygote가 0%, heterozygote가 78.3%, 2군에서는 각각 37.5%, 6.3%, 56.2%, 3군에서는 각각 34.7%, 4.1%, 61.2%로 각 군 간의 통계적인 유의성은 없었다 ( $p=0.4969$ ).

**결론:** 조기 양막파수가 일어난 경우 CD14 유전자 증진자 다형성의 차이를 알아보아 유전자의 변이여부에 따라 염증이 더 쉽게 일어나는지 그리고 조기 양막파수의 위험인자가 될 수 있는지 알아보려고 하였으나 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 본 연구의 표본 크기가 작고 다양한 원인이 양막 파수에 관여하기 때문이 아닌가 사료된다.

**중심단어 :** 조기 양막 파수, 단핵구, CD14 수용체, 유전자 다형성

---