



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

작업 관련 증상이 발생한 제빵공에서의  
**Chitinase**의 역할

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

이 소 희

작업 관련 증상이 발생한 제빵공에서의  
**Chitinase**의 역할

지도교수 박 해 심

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2015년 6월

아 주 대 학 교 대 학 원

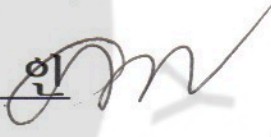
의학과/의학전공

이 소 희

이소희의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 해 심 인 

심사위원 남 동 호 인 

심사위원 예 영 민 인 

아주대학교 대학원

2015년 06월 19일

- 국문요약 -

## 작업 관련 증상이 발생한 제빵공에서의 Chitinase의 역할

메모 [y1]: 호흡기 증상?

제빵공에서 발생한 작업 관련 증상은 밀가루 알레르기원, 박테리아의 내독소, 진균 등으로 구성된 밀가루 분진을 흡입 후 유도되는 다양한 알레르기 반응에 의해 나타난다. 제빵공이 흡입하는 밀가루 분진에는 박테리아의 내독소, 진균이 포함되어 있고, 이들의 껍질에는 Chitin이 포함되어 있다. 따라서 이러한 Chitin 성분 흡입이 되면 면역세포로부터 Chitinase 생성이 증가하면서 유도되는 기도염증 반응이 제빵공 천식의 병인 기전에 관여하리라 추정하고 있지만, 아직 그 기전은 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 제빵공에서 밀가루 분진 노출 후 Chitinase 생성 증가가 작업 관련 증상 발생에 관여할 가능성을 탐색하였다.

성남의 한 제빵공장 직원 381명을 대상으로 하였고, 이들은 분진에 노출되지 않은 건강 대조군 106명과 비교하였다. 제빵공의 작업 관련 증상 유무를 판정하기 위해 설문지 조사를 시행하였고, 밀가루 항원에 감작 유무와 아토피 유무는 알레르기 피부단자시험과 혈청 밀가루 항원 특이 IgE치는 효소결합면역흡착측정법(ELISA)으로 측정하였다. 혈청내 Chitinase 측정과 함께 혈청내 TNF $\alpha$ , IL-18, MPO치도 ELISA 로 측정하였다. 또한 선천성 면역 반응과의 연관성을 관찰하기 위하여, 두 가지 Toll 유사 수용체 4 프로모터 단일 뉴클레오타이드 유전자 다형(-2027A>G, -1608T>C)에 대한 유전자형을 분석하였다.

혈청 Chitinase의 농도는 밀가루 분진에 노출된 제빵공에서 대조군보다 유의하게 높았다( $P=0.026$ ). 그러나 작업 관련 증상이나, 혈청 특이 IgE 유무에 따른 차이가 없었다. Toll 유사 수용체 4 -2027 AG/AA를 가진 군에서 -2027 GG

를 가진 군보다 혈청 Chitinase의 농도가 유의하게 높았고( $P = 0.021$ ), 또한 단상형 분석에서도 G 대립 유전자를 가진 군에서 혈청 Chitinase의 농도가 유의하게 높았다( $P = 0.021$ ). 혈청 Chitinase 치와 선천 면역 사이토카인인 IL-18 유의한 양의 상관관계가 있었으나( $P < 0.001$ ), 혈청 TNF $\alpha$ , myeloperoxidase (MPO) 치와는 유의한 상관성이 없었다.

본 연구에서는 혈청 Chitinase의 농도는 밀가루 분진 노출의 한 지표가 될 수 있고, Toll 유사 수용체 4의 유전자 다형에 따른 혈청 Chitinase의 농도의 관련성, 선천 면역 사이토카인과의 연관성을 확인하여, 제빵공 천식의 발생에 선천성 면역 반응이 관여할 가능성을 제시한다.

---

핵심어: Chitinase, TLR4, 선천 면역 반응, 제빵공 천식

## 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림차례 .....	v
표 차례 .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 연구대상 및 방법 .....	3
A. 연구 대상.....	3
B. 피부단자시험과 밀가루 항원에 대한 혈청 특이 항체 및 Chitinase 측정 .....	3
C. Toll 유사 수용체 4 단일 뉴클레오타이드 유전자 다형의 유전 형질 분석 .....	4
D. 혈중 TNF $\alpha$ , myeloperoxidase (MPO) 및 IL-18 치 측정 .....	5
E. 통계분석.....	5
III. 결과 .....	6
A. 연구대상의 특징.....	6
B. 혈청 Chitinase 농도와 작업 관련 증상 유무에 따른 혈청 Chitinase 농도 .....	7
C. Toll 유사수용체 4 유전자다형에 따른 혈청 Chitinase 농도 비교.....	9
D. 혈청 Chitinase 농도와 임상적 지표 및 면역학적 지표와의 관계 .....	10
IV. 고찰 .....	13

V. 결론 .....	17
참고문헌 .....	18
ABSTRACT .....	21





그림 차례

Fig. 1. Comparison of serum levels of Chitinase in unexposed healthy controls and occupationally exposed bakery workers(A) and those according to the presence of work-related symptoms(WRS,B). ..... 8

Fig. 2. Association of the serum Chitinase level with the *TLR4* -2027A>G polymorphism (A) and the haplotype HT1[AT] of *TLR4* -2027A>G and -1608T>C (B). ..... 10

Fig. 3. Correlations between serum Chitinase and IL-18 in bakery workers ..... 12

표 차례

Table 1. Clinical characteristics of the bakery workers.....	6
Table 2. Frequency of TLR4 gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in bakery workers .....	9
Table 3. Correlation between Chitinase with clinical and immunologic parameters in bakery workers .....	11

## I. 서론

직업 관련 호흡기 질환이란 작업장에서 발생하는 가스, 먼지, 가루를 흡입하여 발생하는 알레르기 질환으로 퇴근 후나 휴일에 호전되며, 근무 시 악화 되는 특징을 지닌다. 우리나라뿐 아니라 전 세계적으로도 산업화와 함께 직업 관련 호흡기 질환은 증가하고 있다 (Devenny et al., 2004; Ho, 2010). 직업성 천식은 작업 관련 호흡기 질환 중 가장 흔하며, 이 중 제빵공 천식은 최근 그 유병률이 증가하고 있어 중요성이 강조되고 있다 (Bakolis et al., 2012). 이러한 유병률 증가는 환경적 위험 요인에 대한 노출 증가와 관련되며 이런 환경적인 요인이 천식의 중요한 결정 요인이지만 유전적 영향도 매우 중요하다(Werner et al., 2003; Woo et al., 2003; Lee et al., 2008). 천식 관련 감수성 유전자(susceptibility gene) 발굴은 천식 유전체 관련 연구 등을 통해 분석되어 왔고(Lee et al., 2011b), 제빵공 천식은 환경적 요인과 유전적 요인의 상호 작용에 의해 발생한다.

21 세기 질병 연구는 각 환자의 유형에 맞는 적절한 진단과 치료가 시행되는 맞춤의학을 실현시키기 위해 유전자 환경간 상호작용의 기전을 밝히는 데에 노력하고 있다. 동일한 질병을 가진 환자들 간에도 환경적 요인이나 유전적 요인의 상호작용에 따라 질병발생의 기전이 다를 수 있으며, 그러한 요인들을 적절하게 반영하는 질병의 지표를 발굴하는 것이 맞춤의학을 구현하기 위해서 필요하다. 이러한 노력으로 제빵공 천식 발생에 Toll 유사 수용체 4,  $\beta 2$ -아드레날린성 수용체, IL-18, IL-4, IL-4 수용체 등의 유전자다형과의 연관성이 보고되었다(Cho et al., 2011; Kim et al., 2012; Hur et al., 2013).

메모 [y2]: References 추가

Toll 유사 수용체는 선천 면역의 pattern recognition receptor(PPR)의 과로 숙주의 미생물 방어에 중요한 기능을 한다 (Lee et al., 2011b). 그 중 Toll 유사 수용체 4는 선천 면역 세포인 대식세포, 비만세포, 기관지 상피세포의 표면수용체로 주로 지질 다당류로 이루어진 그람 음성균의 내독소와 cluster of differentiation 14(CD14), 지질 다당류 결합 단백질, MD-2 와 함께 결합하여 활성화 되며(von Scheele et al., 2010) 천식을 발생시키는 면역 시스템의 신호 전달 경로에 관여하여 다양한 증상을 나타낸다. 이전의 연구에서, Toll 유사 수용체 4의 -2027A>G 와 -1608T>C 의 2 가지 유전자형에 따라 제빵공의 동일한 밀가루 분진 노출이라는 환경적 요인 에서 작업 관련 증상의 발생 빈도의 차이가 밝혀졌다. 이는 제빵공 천식의 병인 기전에 선천 면역이 관여할 가능성을 제시하였다(Raby et al., 2002; Cho et al., 2011). 제빵공 천식은 밀가루 분진 흡입에 대한 다양한 면역 기전에 따라 나타나는 흔한 직업성 호흡기질환이다(Dykewicz, 2009; Vandenplas, 2011). 밀가루 분진은 밀가루뿐 아니라, 박테리아의 내독소, 진균 등으로 구성되어 있고, 이 중 박테리아의 내독소, 진균의 껍질은 Chitin 이라는 지질다당류로 구성되어있다(Ober and Chupp, 2009; Lee et al., 2011a). Chitinase 는 Chitin 에 결합하여 이를 분해하는 효소로 천식 등 알레르기 질환 및 염증질환에서 높게 측정된다. 대식세포, 중성구, 기관지 상피세포 등의 선천 면역 세포로부터 주로 생산되는 Chitinase 는 염증성 사이토카인을 유도하여 중성구, 호염기구, 호산구를 모집하고 세포의 염증, 세포 사멸 등을 조절하는 것으로 알려져 있다. Chitinase 의 선천면역과 관련된 복잡한 기전에 대한 연구는 선천 면역 관련 수용체의 유전자다형이 천식 등 알레르기 질환의 발생에 중요한 역할을 할 것을 시사한다(Recklies et al., 2005; Lee et al., 2009; Lee and Elias, 2010). 이에, 본 연구에서는 Chitinase 가 제빵공 천식의 증상 발생에 관여할 것이라

가정하여 Chitinase 와 작업 관련 증상의 연관성 및 Toll 유사 수용체 4 의 유전자다형과의 관련성을 연구하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### A. 연구대상

성남시의 한 제빵공장 직원 381 명을 대상으로 하였고 작업 관련 증상의 유무 판정을 위해 작업 관련 호흡기계 증상(콧물, 재채기, 코막힘, 코가려움, 기침, 가래, 숨가쁨, 천명음)과 작업과의 관련성을 평가하는 설문지조사를 시행하였다. 대조군으로는 노출력이 없는 건강한 성인 106 명을 등록하여 비교하였다. 심부전 등 만성질환이 있거나 면역반응에 영향을 줄 수 있는 전신 스테로이드 등의 약물 복용자는 제외하였다. 이 연구는 아주대병원의 임상연구심의위원회의 심의를 통과하였고, 모든 대상자는 연구 절차와 방법에 대해 설명을 듣고 유전자 연구 관련 동의서에 동의하였다 (AJIRB-GEN-SMP-13-108).

### B. 피부단자시험과 밀가루 알레르기원에 대한 혈청 특이 항체 및 Chitinase 치 측정

아토피 상태를 정의하기 위해 피부단자시험과 혈청 특이 IgE 를 측정하였다. 피부단자시험은 흔한 흡입항원(나무, 잔디, 쭉, 돼지풀 화분과 고양이털, 개털, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*) 및 밀가루 알레르기 유발항원 (달걀(Bencard),  $\beta$ -amylase (*Asperfillus spp.*; Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri), *Tyrophagus putrescentiae* (Alergopharma, Reinbek, Germany)에 대해 진행하였다.

Allergen/Histamine ratio  $\geq 3$  을 양성으로 보았다. 밀가루 알레르기원에 대한 혈청 특이 IgE 와 혈청 Chitinase 농도를 효소결합면역흡착 측정법(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, enzyme-linked immunospecific assay)을 이용해 측정하였다(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). 측정된 Chitinase 농도와 임상증상, 면역학적 지표와의 관련성을 평가하고, 또한 Toll 유사 수용체 4 유전자다형과의 관련성을 분석하였다.

### C. Toll 유사 수용체 4 단일 뉴클레오타이드 유전자 다형의 유전 형질 분석

게놈 DNA 는 혈액 검체를 이용하여 puregene DNA purification kit 로 제조자의 프로토콜에 따라 준비하였다(Qiagen, Germantown, Maryland). Toll 유사 수용체 4 유전자의 촉진제(promotor)부위의 직접 순서 결정(direct sequencing)에 따라 다음과 같은 2 가지의 유전자다형(polymorphism)을 찾았다. ; -2027A>G, -1608T>C. 이 2 가지 단일 뉴클레오타이드 다형의 유전자형을 분석하기 위해 SNaPshotddNTP primer extension 법을 이용하였다(Applied Biosystems, Foster City, California). Toll 유사 수용체 4 의 유전자다형을 찾아 핵산증폭을 위해 사용한 촉진제(primer)의 염기 서열(sequence)은 다음과 같다. -2027A>G 는, forward 5' -TCACAGCTTGGT TTTTGACA-3,reverse 5-TTGTAAGCTTTTAGGACAGTGTCT-3' , 그리고 extension 5' -CCTGATTTAAACAGGAATATTATG-3' ; -1608T>C 는,forward 5' -TACCA TTGCGTATCTTTATTTAATACA-3' , reverse 5' -AAATGGTGACAGGAGTT CTCATT-3' , and extension 5'-TTACAGACCAGAAAGTAATAATAAG-3'.

## D. 혈중 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), myeloperoxidase

### (MPO) 및 IL-18 치 측정

제빵공의 혈청 내 TNF- $\alpha$  (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA ), IL-18(MBL International Co., Watertown, MA, USA), MPO(Biocheck Inc., Forster City, CA, USA)의 농도는 각각 제조자의 프로토콜에 따라 효소결합면역흡착측정법(ELISA)으로 측정하였다.

### E. 통계분석

통계는 SPSS ver. 20.0 (SPSS software, Chicago, IL, USA)로 분석하였으며 대조군과 실험군의 연속변수에 대한 평가는 Student's t-test, 비연속변수에 대한 평가는 Chi-square test 법으로 시행하였다. 연속 변수들의 상관관계 분석에는 Pearson 상관분석으로 시행하였다. 통계적으로  $P$  값이 0.05 미만인 경우에 유의하다고 판단하였다.

### III. 결과

#### A. 연구대상의 특징

Table.1 은 제빵공 중 작업 관련 증상의 유부에 따른 군의 임상적인 특징을 요약하였다. 제빵공 381 명 중 65 명(17.06%)은 작업 관련 증상을 경험했다. 작업 관련 증상이 있는 군의 평균 나이는  $35 \pm 7.31$  세이고 이중 49.23%는 남자였다. 평균적으로 제빵공장에서  $3.85 \pm 3.10$  년을 근무하였다. 34 명(53.97%)은 아토피 상태였고 흡연자는 23 명(36.51%)이었다. 평균 폐기능은 FEV1  $3.12 \pm 0.70\%$  이었고 평균 총 IgE 치는  $241.87 \pm 283.65$  kU/L 이었다. 밀가루에 대한 혈청 특이 IgE 는 16 명(25%)에서 있었고 밀가루에 대한 피부단자시험 결과 양성인 대상은 5 명(7.81%)였다. 작업 관련 증상이 없는 군의 평균 나이는  $34.83 \pm 7.77$  세이고 이중 58.23%는 남자였다. 평균적으로 제빵공장에서  $4.00 \pm 3.58$  년을 근무하였다. 94 명(30.62%)은 아토피 상태였고 흡연자는 122 명(43.11%)이었다. 평균 폐기능은 FEV1  $3.20 \pm 0.75\%$  이었고 평균 총 IgE 치는  $224.52 \pm 448.18$  kU/L 이었다. 밀가루에 대한 혈청 특이 IgE 는 28 명(9%)에서 있었고 밀가루에 대한 피부단자시험 결과 양성인 대상은 0 명(0%)였다.

**Table.1. Clinical characteristics of the bakery workers(Mean±SD).**

	Work-related symptoms	
	Yes(n=65)	No(n=316)
Age(years)	$35 \pm 7.31$	$34.83 \pm 7.77$

**메모 [y3]:** Table 1을 작업 관련 증상이 있는 군과 없는 군간의 비교 테이블로 구성하는 것이 좋겠습니다.



Sex(male)	32(49.23%)	184(58.23%)
Working period(years)	3.85±3.10	4.00±3.58
Atopy status	34(53.97%)	94(30.62%)
Smoker	23(36.51%)	122(43.11%)
FEV1(%)	3.12±0.70	3.20±0.75
Total IgE(kU/L)	241.87±283.65	224.52±449.18
Presence of specific IgE to wheat flour	16(25%)	28(9%)
Positive response on skin prick test to wheat flour	5(7.81%)	0(0%)

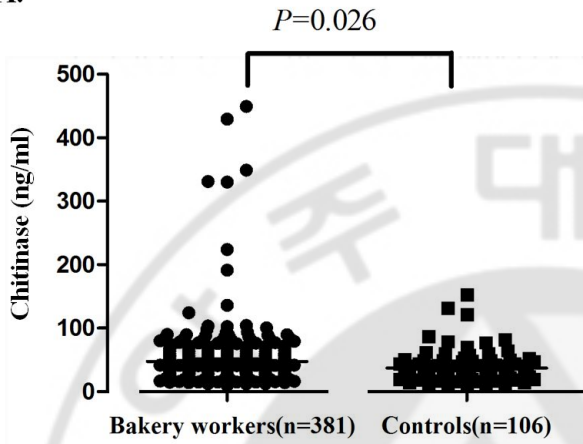
FEV1: forced expiratory volume in one second

## B. Chitinase 농도와 작업 관련 증상의 유무에 따른 혈청

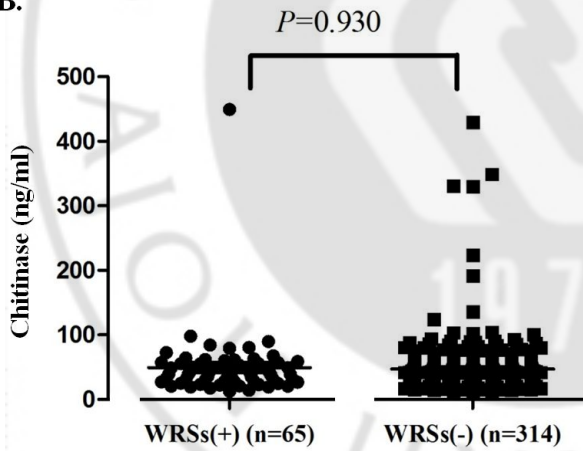
### Chitinase 농도-

제빵공 381 명의 평균 혈청 Chitinase 농도는  $47.74 \pm 45.21$ ng/ml 였고 대조군의 평균 혈청 Chitinase 농도는  $37.37 \pm 22.99$ ng/ml 였다( $P=0.026$ )(Fig. 1A). 작업 관련 증상이 있는 군의 혈청 Chitinase 농도는  $49.25 \pm 53.92$ ng/ml 였고 작업 관련 증상이 없는 군의 혈청 Chitinase 농도는  $47.42 \pm 43.29$ ng/ml 로 두 군간의 유의한 차이는 없었다( $P=0.930$ , Fig. 1B).

A.



B.



**Fig. 1.** Serum levels of Chitinase in unexposed healthy controls and occupationally exposed bakery workers (A) and comparison according to the presence of work-related symptoms(WRS). *P* values were obtained by independent Student's *t*-test.

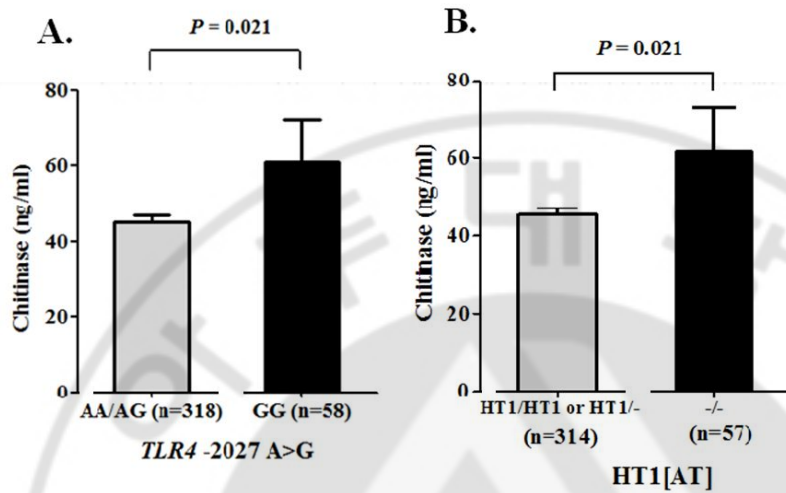
### C. Toll 유사수용체 4 유전자다형에 따른 혈청 Chitinase 농도

Table 2.는 제빵공의 단일 뉴클레오타이드 유전자다형 대립유전자의 빈도를 나타낸다. -2027GG 를 지닌 제빵공은 우성 대립 유전자(A)를 포함한 유전형 (-2027AA 또는 -2027AG)를 지닌 제빵공보다 혈청 Chitinase 농도가  $61.0 \pm 86.8\text{ng/ml}$  로 유의하게 높았다( $P=0.021$ ,Fig. 2A). 반면, -1608T>C 유전자형에 따라서는 혈청 Chitinase 농도 간의 유의한 차이는 없었다. 단상형 분석에서 단상형 1, HT1[AT]를 지니지 않은 제빵공의 혈청 Chitinase 농도가 HT1[AT]/HT1[AT]와 HT1[AT]/-군에 비해 유의하게 높았다 ( $P=0.021$ )(Fig..2B).

**Table 2. Frequency of TLR4 gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in bakery workers.**

SNP	Chromosome	Location	MAF	HWE (p value)
TLR4 -2027 A>G	6	Promoter	0.387	0.847
TLR4 -1608 T>C	6	Promoter	0.267	0.787

MAF, minor allele frequency; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium



**Fig.2. Association of the serum Chitinase level with the *TLR4* -2027A>G polymorphisms (A) and the haplotype HT1[AT] of *TLR4* -2027A>G and -1608T>C (B).** Generalized linear models adjusted for age and sex as covariates were applied. *P* values were calculated using the co-dominant, dominant and recessive models. Logistic regression analysis was applied to control age and sex as covariates.

#### D. 혈청 Chitinase 농도와 임상적 지표 및 면역학적 지표와의 관계

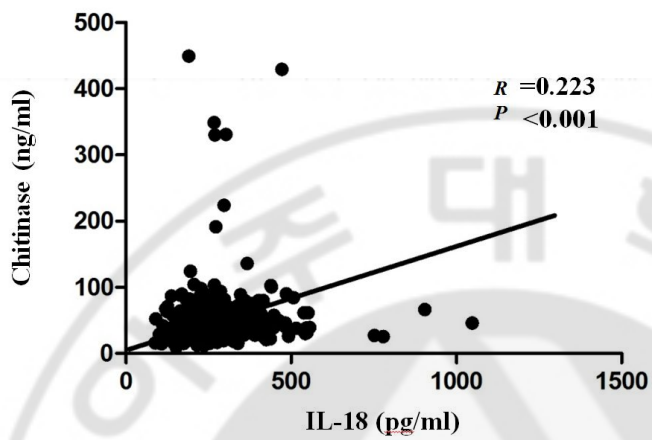
Table 3.은 혈청 Chitinase 농도와 다른 임상적 지표들과의 상관관계를 요약한 결과이다. 혈청 Chitinase 농도는 통계적으로 유의하게 근무기간과 양의 상관관계를 보였다. ( $R=0.117, P=0.030$ ). 그러나 총 IgE 농도와는 유의한 관계가 없었고 ( $R=0.018, P=0.732$ ) 혈청 TNF- $\alpha$  농도 ( $R=-0.015, P=0.769$ ) 및 MPO 농도 ( $R=-$

0.008,  $P=0.873$ ) 와도 유의한 상관관계가 없었다. 피부단자검사에서 A/H ratio 3 이상을 양성으로 판정하였을 때, 이에 따른 유의한 차이는 없었다 (Data 는 제시하지 않았다). 하지만 혈청 Chitinase 농도와 IL-18 농도는 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 나타내었다 ( $R=0.223$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 3).

**Table 3. Correlation between Chitinase with clinical and immunologic parameters in bakery workers .**

	Chitinase	
	R	P value
Working period (year)	0.117	0.030
Total IgE(KU/L)	0.018	0.732
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	-0.015	0.769
MPO (ng/ml)	-0.008	0.873

*P* values were obtained by Pearson' s correlation analysis. TNF-  $\alpha$ ; tumor necrosis factor-  $\alpha$  , MPO: myeloperoxidase.



**Fig.3. Correlations between Chitinase and IL-18 in sera of bakery workers. *P* value was obtained by Pearson' s correlation analysis.**

#### IV. 고찰

Chitinase, Chitinase like protein 은 선천 면역 인자인 포식세포(주로 중성구와 대식세포)에서 분비되고, 감염 병소, 염증 병소 및 조직 개형 병소에서 유도되어 항염증 역할 및 조직 개형에 관여한다고 알려져 있다(Vega and Kalkum, 2012). 특히 Chitinase, Chitinase like protein 은 천식, 낭성 섬유화증 및 만성 염증질환 등에서 높게 측정되어 생물학적 표지자로서의 가능성이 확인되었고, 대식세포의 선택적 활성화(M2)와 관련이 확인되었으나 아직 그 정확한 기전은 밝혀지지 않았다(Mack et al., 2015). 본 연구는 선천 면역과의 관련성이 밝혀진 제빵공 천식과 Chitinase 의 관계를 탐색하여 제빵공 천식의 발생 기전에서 Chitinase 의 역할을 밝히고, 혈청 Chitinase 치의 제빵공 천식 환자 예측을 위한 생물학적 표지자로서의 역할을 평가하였다.

제빵공 천식은 밀가루 분진에 포함된 밀가루 단백질, 계란, 견과류에 대한 혈청 특이 IgE 생성으로 발생하는 Th2 면역 반응뿐만 아니라, 진균의 세포벽을 구성하는 Chitin, 곡물의 껍질을 구성하는 지질다당류 등으로 인한 선천 면역 반응이 관여할 가능성이 있다(Ahangari et al., 2015; Kang et al., 2015; Mack et al., 2015).

Chitinase 는 Chitin 가수 분해 효소로, Gaucher 병, Crohn 병, 진균 감염, 천식, 갑각류 알레르기 등 다양한 염증질환 및 기타 과민 반응 질환의 혈청에서 높게 측정되어 (Shuhui et al., 2009; Tang et al., 2010; Vega and Kalkum, 2012) 최근 이들 질환의 생물학적 표지자로서의 역할이 대두되고 있다. 현재까지 사람에서 발견된 Chitinase 는 chitotriosidase (CHIT-1)와 acidic mammalian chitinase (AMCase)로서

CHIT-1 은 활성화된 대식세포로부터 발현되기 때문에 대식세포 자극의 표지자가 될 수 있고, 또한 선천 면역반응에 관여한다(Lee et al., 2009). 반면 AMCase 는 IL-13 을 유도하여 Th2 면역 반응을 유도하여 획득 면역반응에 관여한다(Shuhui et al., 2009). Chitinase 는 획득 면역 뿐 아니라 선천 면역에도 관여함을 알 수 있으나 아직 Chitinase 의 발현 과정에 대해 정확히 밝혀진 바는 없으며 pattern recognition receptor(PRR )로 Chitin 을 포함하는 항원을 인식하여 발현된다고 생각하고 있다(Lee et al., 2011a). PRR 중 하나가 Toll 유사 수용체 4 이다(Kaisho and Akira, 2006).

본 연구에서는 제빵공 천식과 Chitinase 의 관계를 탐색한 결과로 제빵공이 대조군에 비해 평균 혈청 Chitinase 농도가 유의하게 높았으나( $P=0.026$ ), 작업 관련 증상이 있는 군과 작업 관련 증상이 없는 군간에 혈청 Chitinase 농도는 유의한 차이가 없었다( $P=0.930$ ). 또한 이전의 연구에서 혈청 특이 IgE 와 아토피 여부는 밀가루 분진의 노출의 강도와 유의한 연관성이 없음을 확인하였다. 또한 본 연구에서 작업 관련 증상이 있는 사람들에서 밀가루에 대한 혈청 특이 IgE 는 16(25%)에서만 양성이었으며, 작업 관련 증상이 있는 사람들에서 혈청 특이 IgE 양성률이 100%가 아니었던 점과 특히 밀가루 분진에 대한 혈청 특이 IgG 치가 밀가루 분진에의 노출의 정도와 관련성이 보고 된 점 등으로 미루어 제빵공 천식에는 Th2 면역반응도 관여하지만 선천 면역 반응 등 다양한 면역 기전이 관여할 가능성을 제시하였다 (Hur et al., 2008). 본 연구에서 혈청 Chitinase 농도는 통계적으로 유의하게 근무기간과 양의 상관관계가 있어( $R=0.117, P=0.030$ ) 밀가루 분진에의 노출기간과의 연관성을 확인할 수 있었다. 즉, 본 연구를 통하여 혈청 Chitinase 농도는 작업 관련 증상의 생물학적 표지자는 될 수 없지만, 밀가루

**메모 [y4]:** 앞에서는 Th2와 선천면역이 복합적으로 작용할 것으로 판단했다고 기술했는데, 여기서는 Th2는 아니라고 단정하는 것은 모순이라고 생각합니다. 문장을 삭제하는 것이 좋을 것 같습니다.



분진에의 노출력을 대변할 수 있는 생물학적 표지자로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

Toll 유사 수용체 4는 주로 선천면역 반응을 일으키는 인자이다. Toll 유사 수용체 4의 유전형에 따라 질병의 표현형이 달라지는 연구가 밝혀지고 있다(Cook et al., 2004). 이전 연구에서 -2027AA/AG를 지닌 제빵공에 비해 -2027GG를 지닌 제빵공에서 작업 관련 하기도 증상의 발생 빈도가 낮았고 ( $P=0.007$ ) -1608TT/TC를 지닌 제빵공에 비해 -1608CC를 지닌 제빵공에서 작업 관련 하기도 증상의 발생 빈도가 낮았던( $P=0.021$ ) 관련성이 보고 되었고 단상형 분석에서 HT1[AT]에 비해 HT2[GC]를 지닌 군에서 작업 관련 하기도 증상의 발생 빈도가 낮았는데( $P=0.021$ ) 이는 Toll 유사 수용체 4 유전자 발현이 HT2[GC]와 연관 되어 있음을 나타내며 즉, Toll 유사 수용체 4의 유전자 다형과 제빵공 천식의 증상 발생 빈도의 관련성을 의미한다(Cho et al., 2011). 또한 여러 연구에서 Toll 유사 수용체 4의 유전자 다형에 따른 그람 음성균 감염 패혈증의 발생 빈도와 (Arbour et al.) 죽상 동맥경화증의 빈도의 관련성을 보고하였다 (Cook et al., 2004). 이는 유전적 접근을 통해 질병 발생의 정도를 예측하고, 조기 진단할 수 있는 생물학적 표지자가 될 수 있음을 의미한다. 본 연구에서 Toll 유사 수용체 4 -2027GG를 지닌 제빵공은 대립 유전자(A)를 포함한 유전형을(-2027AA 또는 -2027AG) 지닌 제빵공보다 혈청 Chitinase 농도가 높았고( $P=0.021$ ) 단상형 분석에서 단상형 1, HT1[AT]를 지니지 않은 제빵공의 혈청 Chitinase 농도가 HT1[AT]/HT1[AT]와 HT1[AT]/-군에 비해 유의하게 높았음( $P=0.021$ )을 통해 Chitinase와 Toll 유사수용체 4와의 연관성이 있음을 시사하였다.

지금까지 알려진 바로는 진균 감염의 숙주 면역 반응은 진균의 세포벽의  $\beta$ -glucan 이 dectin-1 같은 PRR 에 의해 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)로 인식되고 myeloid-differentiation-primary-response-gene-88-(MYD88-) 신호경로를 통해 염증 사이토카인을 유도하여 염증반응을 유도하는 것(Ober and Chupp, 2009)과 진균 세포벽의 또 다른 주요 구성 물질인 Chitin 이 PAMP 로 인식되어 선천 면역 세포로부터 Chitinase 를 생산하게 할 것이라는 것이며(Vega and Kalkum, 2012) 밀가루 분진에 포함된 Chitin 은 PRR 을 통해 PAMP 인식되어 중성구나 대식세포에서 Chitinase 를 분비할 것으로 생각된다.

Interleukine-18(IL-18)은 Toll 유사 수용체 2 와 함께 세균의 내독소 같은 지질다당류를 인식하여 MYD88-을 통해 선천 면역 반응을 조절하는 사이토카인으로 지질다당류의 양에 따라 발현되어 항감염 역할 또는 염증 반응을 일으켜 선천면역을 조절하는 역할을 한다. 즉, 밀가루 분진 내 박테리아의 내독소가 IL-18 의 발현을 유도할 수 있다. 또한, 제빵공에서의 IL-18 유전자형성에 따른 밀가루 단백질 감각 정도를 비교한 이전 연구에서 -137GG 를 제빵공에 비해 -137GC 또는 -137CC 를 지닌 제빵공에서 밀가루단백에 대한 피부단자시험 결과 양성 빈도가 높았고( $P=0.002$ ) HT3[ACC]를 지닌 제빵공에서 밀가루단백 피부반응 양성률이 높음을 확인한 바 있다( $P=0.005$ ). (Woo JG et al.,2003; (Kim et al., 2012). 본 연구에서는 IL-18 과 혈청 Chitinase 농도가 유의한 양의 상관관계를 보였다( $R=0.223, P<0.001$ ). 밀가루 분진에의 노출력이 있을 때 Chitinase 가 더 높게 검출되었고 Toll 유사 수용체 4 의 유전자 다형과 Chitinase 의 관련성을 확인하였으며 선천 면역 사이토카인 IL-18 과의

관련성을 확인함에 따라 제빵공 천식에서 Chitinase 는 Th2 면역반응보다는 선천 면역에 관여할 가능성을 시사한다.

그러나 본 연구의 한계는 단면적 연구이며, 본 연구결과에서 제빵공의 작업 관련 증상 유무를 설문지로 확인하는 시점과 혈액 검체 채취 당시의 증상이 일치하는 않는 점 등의 한계가 있어, 향후 추적 연구를 통하여 증상 발생과 노출을 중단한 후 증상 호전에 따른 혈청 Chitinase 농도를 비교하는 후속 연구가 필요하다.

## V.결론

본 연구를 통하여 저자들은 혈청 Chitinase 농도가 밀가루 분진의 노출력을 나타내는 생물학적 지표로서 사용 가능성을 시사하였다. 또한 혈청 Chitinase 농도와 Toll 유사수용체 4 다형성과 IL18 치와의 관련성을 관찰하여, 제빵공 천식의 병인 기전에 선천 면역과의 관련성을 관찰하여, 이는 추후 제빵공 천식의 병인 기전을 이해하는데 기여할 것이라 생각한다.

## 참고문헌

1. Ahangari F, Sood A, Ma B, Takyar S, Schuyler M, Qualls C, Dela Cruz CS, Chupp GL, Lee CG, Elias JA: Chitinase 3-like-1 regulates both visceral fat accumulation and asthma-like Th2 inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 191: 746-757, 2015
2. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25(2):187-91, 2000
3. Bakolis I, Doekes G, Heinrich J, Zock JP, Heederik D, Kogevinas M, Guerra S, Norback D, Ramasamy A, Nevalainen A, Svanes C, Chen CM, Verlato G, Olivieri M, Castro-Giner F, Jarvis D, Indoor Group of the E, Work Package 10 Group of H: Respiratory health and endotoxin: associations and modification by CD14/-260 genotype. *Eur Respir J* 39: 573-581, 2012
4. Cho HJ, Kim SH, Kim JH, Choi H, Son JK, Hur GY, Park HS: Effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms on work-related respiratory symptoms and sensitization to wheat flour in bakery workers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 107: 57-64, 2011
5. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA: Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 5: 975-979, 2004
6. Devenny A, Wassall H, Ninan T, Omran M, Khan SD, Russell G: Respiratory symptoms and atopy in children in Aberdeen: questionnaire studies of a defined school population repeated over 35 years. *BMJ* 329: 489-490, 2004
7. Dykewicz MS: Occupational asthma: current concepts in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 123: 519-528; quiz 529-530, 2009
8. Ho SM: Environmental epigenetics of asthma: an update. *J Allergy Clin Immunol* 126: 453-465, 2010
9. Hur GY, Koh DH, Kim HA, Park HJ, Ye YM, Kim KS, Park HS: Prevalence of work-related symptoms and serum-specific antibodies to wheat flour in exposed workers in the bakery industry. *Respir Med* 102: 548-555, 2008
10. Hur GY, Ye YM, Koh DH, Kim SH, Park HS: IL-4 Receptor alpha Polymorphisms May Be a Susceptible Factor for Work-Related Respiratory Symptoms

- in Bakery Workers. *Allergy Asthma Immunol Res* 5: 371-376, 2013
11. Kaisho T, Akira S: Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117: 979-987; quiz 988, 2006
  12. Kang M-J, Yoon CM, Nam M, Kim D-H, Choi J-M, Lee CG, Elias JA: Role of Chitinase 3-like-1 in IL-18-induced pulmonary Type-1, -2 and -17 inflammation, alveolar destruction and airway fibrosis in the murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 201513. Kim SH, Hur GY, Jin HJ, Choi H, Park H S: Effect of interleukin-18 gene polymorphisms on sensitization to wheat flour in bakery workers. *J Korean Med Sci* 27: 382-387, 2012
  14. Lee CC, Lin WY, Wan L, Tsai Y, Tsai CH, Huang CM, Chen CP, Tsai FJ: Association of interleukin-18 gene polymorphism with asthma in Chinese patients. *J Clin Lab Anal* 22: 39-44, 2008
  15. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, He CH, Takyar S, Elias JA: Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* 73: 479-501, 2011 a
  16. Lee CG, Elias JA: Role of breast regression protein-39/YKL-40 in asthma and allergic responses. *Allergy Asthma Immunol Res* 2: 20-27, 2010
  17. Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, Sohn MH, Cohn L, Homer RJ, Kozhich AA, Humbles A, Kearley J, Coyle A, Chupp G, Reed J, Flavell RA, Elias JA: Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 206: 1149-1166, 2009
  18. Lee SH, Park JS, Park CS: The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 3: 236-244, 2011b
  19. Mack I, Hector A, Ballbach M, Kohlhäufel J, Fuchs KJ, Weber A, Mall MA, Hartl D: The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. *Mol Cell Ped* 2: 3, 2015
  20. Ober C, Chupp GL: The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 401-408, 2009
  21. Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, Renaud Y, Faith J, Lemire M, Greenwood C, Weiland KM, Lange C, Palmer LJ, Lazarus R, Vercelli D, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez FD, Hudson TJ, Weiss ST: Polymorphisms i

- n toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1449-1456, 2002
22. Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM: Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem* 280: 41213-41221, 2005
  23. Shuhui L, Mok YK, Wong WS: Role of mammalian chitinases in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 149: 369-377, 2009
  24. Tang H, Fang Z, Sun Y, Li B, Shi Z, Chen J, Zhang T, Xiu Q: YKL-40 in asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E. *Eur Respir J* 35: 757-760, 2010
  25. Vandenplas O: Occupational asthma: etiologies and risk factors. *Allergy Asthma Immunol Res* 3: 157-167, 2011
  26. Vega K, Kalkum M: Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol* 2012: 920459, 2012
  27. von Scheele I, Larsson K, Palmberg L: Budesonide enhances Toll-like receptor 2 expression in activated bronchial epithelial cells. *Inhal Toxicol* 22: 493-499, 2010
  28. Werner M, Topp R, Wimmer K, Richter K, Bischof W, Wjst M, Heinrich J: TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112: 323-330, 2003
  29. Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Khurana Hershey GK: The -159 C→T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 112: 438-444, 2003

**-Abstract-**

**Role of Chitinase in the development of work-related symptoms in bakery workers**

So Hee Lee

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Hae-Sim Park)

**Background:** Bakery workers are exposed to flour allergens, bacterial endotoxins and fungus, which interact to induce allergic responses and respiratory symptoms. The work-related symptoms(WRSs) of bakery workers are more associated with innate immune responses rather than those of other occupational allergic diseases. We hypothesized that Chitinase included in wheat flour may involve in the development of WRSs in bakery workers.

**Objective:** We investigated the role of serum Chitinase level in association with TLR4 polymorphisms in a single cohort of bakery workers in this country.

**Methods:** A total of 381 exposed workers completed a questionnaire regarding WRSs. One hundred six unexposed healthy subjects were enrolled as controls. Skin prick tests to common inhalant and occupational allergens were done. Serum levels of Chitinase, TNFa, IL-18, MPO and serum specific IgE/IgG antibodies to wheat flour were measured by ELISA. The single-nucleotide polymorphisms of the TLR4 (-2027AG and -1608TC) were genotyped.

**Results:** Serum Chitinase levels were significantly higher in wheat flour-exposed bakery workers than in unexposed control group ( $P=0.026$ ), however, no significant differences were noted according to the presence of WRSs and serum specific IgE or IgG antibodies to wheat flour ( $P>0.05$ , respectively). The workers carrying TLR4 -2027 GG had significantly higher Chitinase levels than those with TLR4-2027 AG/AA ( $P=0.021$ ), moreover, haplotype analysis indicated that the workers with the haplotype 1, ht1 [AT], had significantly higher Chitinase level than those without it ( $P=0.021$ ). Significant correlations were found between serum Chitinase and IL-18 levels ( $P=0.021$ ), while no significant correlations were found with serum MPO levels.

**Conclusion:** These findings suggest that high serum Chitinase level may represent wheat flour exposure and may involve in innate immune response and WRS development in bakery workers.

Keywords : Chitinase, TLR4, innate immune response, bakery workers

