Effects of TLR4 Variants on Fasting Glucose Levels in a Korean Population

Gi Tae Kim¹, Jae Woong Sull^{1,2}, Sun Ha Jee³

¹Department of Senior Healthcare, General Graduate School, Eulji University, Seongnam, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam, Korea

³Department of Epidemiology and Health Promotion, Institute for Health Promotion, Graduate School of Public Health, Yonsei University, Seoul, Korea

한국인에서 TLR4 변이가 공복 시 혈당에 미치는 효과

김기태¹, 설재웅^{1,2}, 지선하³

¹을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과, ²을지대학교 보건과학대학 임상병리학과, ³연세대학교 보건대학원

Diabetes mellitus is associated with a variety of adverse health outcomes, including metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Recently, diabetes has been receiving increased scientific attention because of the rapid increase in the diabetic population. One of the features of type-2 diabetes mellitus is an elevated glucose level in blood. Fasting glucose level, which is the most basic test, is widely used as a diagnostic indicator of diabetes. Several previous studies reported that TLR4 expression is relatively high in the heart. However, few studies have investigated the association between TLR4 variants and fasting blood glucose to date. Thus, this study tested the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TLR4 gene and fasting glucose in the Korean population. A total of 994 subjects recruited from Seoul were used for the present study. When compared to fasting blood glucose, the TLR4 gene region was shown as a linkage disequilibrium owing to the relatively large gene range. This region also presented as several LD blocks. We found that specific SNPs in the TLR4 gene were associated with the mean fasting glucose ($p < 0.01$). The minor allele frequency of rs1329067 was 16.4%, and individuals with the AA genotype had a higher fasting blood glucose level than those with the GG genotype, suggesting that genetic variants in TLR4 influence glucose levels in Korean adults.

Key words: TLR4, Fasting blood glucose, Single nucleotide polymorphisms

Corresponding author: Jae Woong Sull
Department of Biomedical Laboratory Science,
College of Health Science, Eulji University, 553
Sansung-daero, Seongnam 13135, Korea
Tel: 82-31-740-7318
Fax: 82-31-740-7354
E-mail: jsull@eulji.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: July 20, 2017
Revised 1st: August 29, 2017
Revised 2nd: September 5, 2017
Revised 3rd: September 12, 2017
Revised 4th: September 20, 2017
Accepted: September 20, 2017

서 론

당뇨병은 흔한 신진 대사 질환으로 많은 사람들이 당뇨병으로 인한 조기사망의 위험에 빠질 수 있다. 특히, 제2형 당뇨병의 합병증은 인체에 다양한 질환을 일으키는 위험인자이다. 당뇨병의 조기 발견과 그에 따른 빠른 치료로 당뇨병을 지연시키거나 예방하는 것과 당뇨병 대상자의 진단도 중요시 되고 있다

[1,2]. TLR4 유전자는 비만과 관련이 있는 유전자로 알려져 있지만 당뇨병과도 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[3].

TLR4 유전자는 막 통과 단백질로 감염시 미생물 검출에 관여하며 숙주의 면역 방어에서 중요한 역할을 한다[4]. 포유류의 TLR4는 그람 음성균의 lipopolysaccharide를 인식하는 막관통 수용체다[5]. TLR4의 신호전달 경로의 활성화는 NF- κ B, AP-1, interferon regulatory factors 등의 여러 전사인자들 상

항 조절을 통해 사이토카인 생성을 유도한다[6].

TLR4 유전자는 비만인 사람과 제2형 당뇨병인 사람에게서 발현이 증가되었으며, 유리 지방산과 염증, 선천 면역계간 분자적 연결이라고 보고되고 있다[7,8]. TLR4 유전자의 단일염기다형성(SNP)이 제2형 당뇨병과 높은 체질량지수(BMI)와 관련이 있었으나 실제 연구 결과값이 명확하지 않았고, 초기 연구에서는 TLR4D299G/T399I와 당뇨병 유병률과의 관련을 확인하지 못했다고 하였다[9,10]. 그러나, 이후 연구에서 고밀도콜레스테롤 수치에 의존하는 TLR4D299G/T399I를 가진 남성백인이 제2형 당뇨병으로 진행할 위험이 더 높다고 보고하였다[11]. 그리고 제2형 당뇨병의 큰 특징 중 하나는 인슐린 분비 결함과 말초저항에 의해 고혈당이 된다고 보고되고 있다[12]. 고혈당의 지속적인 상태는 인체에 치명적이며, 혈당 조절은 당뇨병의 이환율과 사망률에 관련이 있다[13,14]. 본 연구에서는 TLR4 유전자의 단일염기다형성(SNP) 자료와 공복 시 혈당과의 관련성을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

연구 대상자는 2006년 1월부터 2007년 6월까지 서울지역 종합병원 건강검진센터에 방문하여 대사증후군 연구 사업에 참여한 6,622명 중 신체계측(키, 체중, 허리둘레, 혈압)과 혈액검사(아디포백틴, 고밀도콜레스테롤, 중성지방, 공복 시 혈당), 맥파전파속도, 문진(흡연)자료누락이 있는 대상자를 제외하고, 나머지 3,390명(남자 1,940명, 여자 1,450명)을 대상으로 하였습니다. 이 중 1,004명에 대하여 전장유전체 다형성 분석을 진행한 참여대상자들의 사전 동의를 구하였으며, 분석률이 낮거나 유전자 분석과 성별이 불일치한 10명을 제외하고 994명을 대상으로 하였다. 연구계획에 대하여 을지대학교 IRB (Institutional Review Board of Human Research at Eulji University)의 승인을 얻었다(IRB No: EUIRB2016-15).

2. 자료수집

구조화된 설문지를 이용하여 인구 사회학적 특성(나이, 성별, 가족력 등)과 흡연력, 음주력 등을 설문조사 하였다. 흡연력은 비흡연, 과거흡연, 현재흡연으로 구분하여 질문하였으며, 음주력은 현재 술을 안 마신다와 마신다로 구분하였다. 허리둘레는 줄자를 이용하여 장골과 마지막 늑골사이의 중간부위를 수평으로 측정하는 것을 원칙으로 하였으며, 정확한 위치를 가늠하기 어려운 경우는 배꼽 위 3 cm를 측정하였다. 키와 몸무게는 간단

한 옷만 입은 채 측정하였다. BMI는 체중(kg)/키(m²)으로 계산하였다. 수축기 혈압과 이완기 혈압 모두 15분 안정을 취한 후 측정하였다. 혈압에 대한 구분은 미국 JNC 7 (Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention) 기준에 따라서 수축기혈압, 이완기혈압이 각각 120/80 mmHg는 normal, 120-139/80-89는 prehypertension, 140-159/90-99는 Stage 1 hypertension, $\geq 160/\geq 100$ 은 Stage 2 hypertension으로 구분하였다.

3. 생화학적 검사

모든 대상자는 12시간 이상 금식 후에 혈액을 채취하여 원심 분리 후 영하 70도로 냉동시켰다. 대사증후군 지표인 공복 시 혈당과 총콜레스테롤, 중성지방, 고밀도콜레스테롤을 Hitachi-7600 자동생화학분석기(Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 연구 대상자들의 검사 결과를 연구 자료로 활용하였다.

4. 유전자 분석

Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 유전자 분석을 시행하였으며 quality control call rate (dynamic model algorithm)는 86% 이상을 나타내었고, X 염색체 상의 heterozygosity로 대상자 개개인의 성별을 정확하게 구별하였다. Genotype calling은 birdseed v2 algorithm을 통해 시행하였다. 표본의 분석률이 낮거나(<90%, MIND (missing rate per individual) >0.1 기준 적용), PLINK를 이용하여 identity-by-state (IBS) 산출식으로 전체 SNP를 분석하여 유전적으로 연관성을 가진 표본을 제외하였다.

5. 통계 분석

통계 프로그램은 plink 프로그램과 haploview 프로그램을 사용하였고 통계 분석과정에서 minor allele frequency (MAF) 5% 이하인 SNP들을 제외시켰다. 다중선형 회귀분석을 시행하였고 통제변수는 연령과 성별이었다. 다중선형회귀분석에서 공복 시 혈당과의 가장 높은 통계적 유의성을 보인 5개의 SNP를 선정하였다. 연구 대상자의 일반적 특성에 대한 분포 등 연속형 자료는 평균 (mean $\pm$ SD)으로 표시하였다. 또한, 모든 경우에서 2 tailed significance를 구하였고, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 연구대상자의 일반적인 특성

Table 1과 같이 전체 연구대상자는 994명이었다. 남자 561명(56.4%), 여자 433명(43.6%)이었고, 평균 연령은 41.5세이

Table 1. General characteristics of study population

Subjects (N)		994
Male gender (%)		56.4
		Mean±SD
Age, year		41.5±8.5
Waist circumference, cm		81.1±9.7
Body mass index, kg/m ²		23.7±3.1
Fasting blood sugar, mg/dL		93.8±16.4
Systolic blood pressure, mmHg		120.9±13.8
Diastolic blood pressure, mmHg		73.9±10.4
HDL cholesterol, mg/dL		54.2±12.9
LDL cholesterol, mg/dL		108.7±29.2
Triglyceride, mg/dL		118.1±93.4
		N (%)
Smoking status	Non	550 (55.3)
	EX	116 (16.7)
	Current	278 (28.0)
Alcohol drinking	Yes	754 (77.3)
Diabetes		52 (5.2)

Abbreviations: HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; SD, standard deviation.

었다. 또한, 체질량지수(body mass index, BMI)는 23.7 kg/m²이었으며, 공복 시 혈당은 93.8 mg/dL이었다. HDL 콜레스테롤의 경우 54.2 mg/dL이었다. 그 외에 다른 검사 결과들과 함께 대상자들의 일반적인 특성을 나타냈다. 당뇨병 여부에 대한 분석에서는 전체 대상자의 5.2%가 당뇨병이 있었다. 당뇨병에 대한 정의는 공복 시 혈당이 125 mg/dL를 초과하거나 당뇨병 치료를 받은 적이 있는 경우로 하였다.

2. 유전체 관련성 분석과 연관불균등(linkage disequilibrium, LD) 검사

Figure 1과 같이 TLR4 유전자의 단일염기다형성(SNP)중, rs1329067이 공복 시 혈당과 가장 높은 관련성을 보였다($p < 0.01$). 서울시 코호트 그룹(N=994)의 TLR4 유전자 부위에 따른 공복 시 혈당과 관련해서 연관불균등을 나타내었는데, 공복 시 혈당과 관련 크기는 p -value를 $-\log^{10}$ 의 값으로 하였다. 그리고, 선형 회귀 모델을 각 SNP에 사용 했으며, 연관불균등은 유전자의 범위가 매우 컸기 때문에 여러개의 LD 블록으로 나타났다.

3. 선형회귀분석에서의 공복 시 혈당과의 유전체 관련성 분석

Table 2와 같이 TLR4 유전자에서 공복 시 혈당과의 관련성에서 top 5인 단일염기다형성(SNP)을 나타낸다. rs1329067이

Figure 1. Plots of fasting blood glucose association and Linkage disequilibrium for the TLR4 gene region in Seoul City cohorts (N=994). (A) The upper panel shows the association magnitude ($-\log_{10}(p\text{-value})$) with fasting blood glucose. A linear regression model, including age and gender, was used for each individual SNP. The lower panel shows the TLR4 gene structure. (B) Linkage disequilibrium as measured by R^2 in TLR4 based on genotyping data from 994 subjects (White: $R^2=0$. Shades of gray: $0 < R^2 < 1$. Black: $R^2=1$).

Table 2. The 5 TLR4 SNPs most strongly associated with fasting blood glucose based on a linear regression model

SNP	Position	MAF	Effect* (mg/dL)	p-value
rs1329067	119462020	0.163968	2.756	0.00435
rs7853395	119781464	0.0356037	4.658	0.0144
rs2809420	119826846	0.0863273	2.903	0.02043
rs7020245	119452898	0.422032	-1.336	0.05801
rs1410201	120032590	0.451098	1.329	0.05968

*Estimated effect size (β) for the 5 most significant SNPs identified from Seoul City cohort (N=994) and associated p -value in multiple linear regression model considering age and sex under an additive model.

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency.

p -value 0.004로 통계적으로 가장 유의한 결과를 얻었다. rs1329067의 minor allele의 빈도는 16.4%이었다. 그 다음으로 높은 관련성을 보인 단일염기다형성(SNP)은 rs7853395이다($p=0.0144$). 또한, Table 3와 같이 유전자형에 따른 공복 시 혈당의 평균값을 나타내었으며, rs1329067의 경우에는 AA유전자형을 가진 사람이 GG유전자형을 가진 사람보다 공복 시 혈당이 더 높았다.

고 찰

본 연구에서는 제2형 당뇨병과 관련이 있는 TLR4 유전자에 대하여 염기서열다형성 지표와 공복 시 혈당과의 관련성을 확인하여 한국 일반 성인에서 TLR4가 당뇨병과 관련이 있음을 제안하였으며, 여러 선행 연구에서 TLR4 유전자와 TLR4 신호 경로가 비만과 인슐린 저항성에 미치는 영향을 밝혀내고 TLR4 유전자가 제2형 당뇨병 발병에 관련성이 있다고 알려져 있다[15-18]. 한 연구에서는 TLR4 유전자가 쥐를 대상으로 비만과 인슐린 저항성에 관련성이 있다고 보고하였다[15]. 그리고 TLR4 유전자는 고밀도콜레스테롤과 2-h plasma glucose 수치에서 유의성을 보이며 제2형 당뇨병과 관련성이 있으며, 비만과 과체중인 사람에서 TLR4 유전자의 관련성이 있다고 보고되었다[16,17]. 한편으로, TLR4의 SNP는 중국 인구에서 제2형 당뇨병과 관련성이 있다[18].

본 연구에서는 공복 시 혈당과 rs1329067이 가장 높은 관련성을 보였다. 나이와 성별만을 통제한 분석에서 SNP rs1329067은 선형회귀분석에서 p -value 0.004의 관련성을 가졌다. 나이, 성별 이외에 당뇨병 여부 변수를 함께 통제하여 분석을 하였을 때에는 선형회귀분석에서 p -value 0.008의 관련성을 가졌다. 단일염기다형성(SNP)인 rs1329067의 빈도는 다른 인구에서 다

Table 3. Mean of fasting glucose levels by genotypes of TLR4 SNP rs1329067

Mean of fasting glucose levels (SD)			F	p-value
A/A (N=18)	A/G (N=281)	G/G (N=676)		
97.8 (10.1)	96.0 (22.2)	92.9 (13.0)	3.96	0.019

Calculated by the analysis of variance (ANOVA).

르게 나타났다. A 대립유전자의 빈도는 유럽인에게서는 12.9%, 사하라사막계 아프리카인에서는 16.4%, 멕시코계 미국인에게서는 15%이었으며, 동아시아인에서는 베이징계 한족에서 19.8%, 일본인에게서 16.9%로 보고되었다[19]. 하지만 국내에서는 TLR4 유전자와 당뇨병에 대한 임상적인 연구가 많이 이루어지지 않았기 때문에 추가적인 연구가 많이 이루어져야 할 것으로 판단된다. 그리고 TLR4 유전자가 염증(inflammation)의 좋은 지표임을 감안할 때 향후 염증과 관련이 있는 다른 지표에 대한 추가 분석이 필요하다. 또한, 본 연구는 단면 연구(Cross section study)이고, 표본수가 크지 않으므로 인과 관계를 밝히는데 제한점이 있다. 또한, 통계 분석에서 다중검정(Multiple testing)을 통제하지 못한 한계가 있다. 따라서, 추후 다른 대규모 연구에서 확인이 필요하겠다.

요 약

당뇨병은 대사 증후군 및 심혈관 질환을 비롯한 다양한 건강상의 부작용과 관련이 있다. 또한 당뇨병의 증가로 사회 및 의학적 관심이 증가하고 있다. 제2형 당뇨병의 특징 중 하나는 혈당이 증가한다는 것이다. 공복 혈당치는 가장 기본적이고 널리 사용되는 당뇨병의 지표이다. TLR4 발현은 심장에서 비교적 높다. 그러나 공복 시 혈당과 TLR4의 관련성에 대한 연구가 있었다. 한국인에서 TLR4 유전자와 공복 시 혈당의 단일 염기 다형성(SNP)의 관련성을 알아 보았다. 서울시에서 총 994 명을 대상으로 TLR4 SNP를 이용한 연구를 실시했다. 공복 시 혈당과 관련하여 TLR4 유전자 영역은 연쇄 불균형으로 나타났으며 유전자의 범위가 매우 크기 때문에 여러 개의 LD 블록으로 보였다. TLR4 유전자의 SNP는 평균 공복 시 혈당과 관련이 있었다($p < 0.01$). 공복 시 혈당과 관련 크기는 p -value를 $-\log^{10}$ 의 값으로 하였다. rs1329067의 minor allele frequency는 16.4%였고 AA 유전자형을 가진 사람들은 GG 유전자형을 가진 사람들보다 공복 시 혈당이 높았다. 이 연구는 TLR4의 유전적 변이가 한국 성인의 혈당 수치에 영향을 미친다는 것을 암시한다.

Acknowledgements: This paper was supported by Eulji University in 2017 (EJRG-16-10-12) and the Ministry of Education (NRF-2015R1D1A1A01059651).

Funding: None

Conflict of interest: None

REFERENCES

1. Prasad-Reddy L, Isaacs D. A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond. *Drugs Context*. 2015;4:212283. doi:10.7573/dic.212283.
2. Kwon SY, Na YA. The cutoff value of HbA1c in predicting diabetes and impaired fasting glucose. *Korean J Clin Lab Sci*. 2017;49(2):114-120.
3. Li M, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp Mol Med*. 2012;44(4):260-7.
4. Trudler D, Farfara D, Frenkel D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm*. 2010;2010. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/497987>.
5. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, et al. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis*. 1998;24(3):340-355.
6. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nat rev Immunol*. 2013;13(6):453-460.
7. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-3025.
8. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes*. 2008;57(10):2595-2602.
9. Weyrich P, Staiger H, Stančáková A, Machicao F, Machann J, Schick F, et al. The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. *PLoS One*. 2010;5(11):e13980. doi:10.1371/journal.pone.0013980.
10. Illig T, Bongardt F, Schöpfer A, Holle R, Müller S, Rathmann W, et al. The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2003;52(11):2861-2867.
11. Kolz M, Baumert J, Müller M, Khuseynova N, Klopp N, Thorand B, et al. Association between variations in the TLR4 gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL-cholesterol. *BMC Med Genet*. 2008;9:9. doi:10.1186/1471-2350-9-9.
12. de Araújo MFM, Veras VS, de Freitas RWJF, de Paula MDL, de Araújo TM, Uchôa LRA, et al. The effect of flour from the rind of the yellow passion fruit on glycemic control of people with diabetes mellitus type 2: a randomized clinical trial. *J Diabetes Metab Disord*. 2017;16(4):18. doi:10.1186/s40200-017-0300-z.
13. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*. 2013;36(suppl1):11-66. <https://doi.org/10.2337/dc13-S011>.
14. Dom M, Calder A, Mat R. Clinical epidemiological characteristics of acute complications of diabetes in the emergency ward at Atizapan General Hospital. *Rev Fac Med*. 2013;56(2):25-36.
15. Al-Daghri NM, Clerici M, Al-Attas O, Forni D, Alokail MS, Alkharfy KM, et al. A nonsense polymorphism (R392X) in TLR5 protects from obesity but predisposes to diabetes. *J Immunol*. 2013;190(7):3716-3720.
16. Peng D, Jiang F, Zhang R, Tang S, Chen M, Yan J, et al. Association of Toll-like Receptor 4 Gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in the Chinese population. *J Diabetes*. 2015;7(4):485-492.
17. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm (Lond)*. 2012;9(1):48. doi:10.1186/1476-9255-9-48.
18. Jiang ZS, Wang SX, Jia HX, Wang J, Liu YT. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Inflammation*. 2013;36(1):251-257.
19. U.S. National Library of Medicine. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1329067 [Internet]. Rockville: National Center for Biotechnology information; 2013 [cited 2017 June 16]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1329067.