

## 장액성 상피성 난소암에서 TLR-4의 발현

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 산부인과학교실

최철훈 · 이정원 · 최정주 · 김우영 · 김태중 · 이제호 · 김병기 · 배덕수

**목적** : 본 연구의 목적은 장액성 상피성난소암 조직에서 Toll-like receptor 4 (TLR-4)의 발현을 보고자 하였다.

**연구 방법** : 동결보존 된 9개의 정상난소 표본조직과 24개의 장액성 상피성난소암 표본조직에서 각각 TLR-4의 mRNA 발현을 정량적으로 분석하기 위해 real-time quantitative RT-PCR 방법을 사용하였다. 또한 각각 3개씩의 파라핀 조직절편을 이용하여 TLR-4 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

**결과** : 면역조직화학염색 결과 정상난소조직에서는 상피세포와 기질세포에서 각각 TLR-4 단백질이 발현되었으나, 난소암 조직에서는 발현되지 않았다. TLR-4 mRNA의 발현은 정상난소조직과 상피성 난소암조직 모두에서 관찰되었으나, 난소암조직에서 정상난소 조직에 비하여 유의하게 낮게 발현되었다( $p=0.0003$ ). 난소암 환자의 임상변수와 TLR4 mRNA의 발현 사이에는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 grade가 낮거나( $p=0.075$ ) 림프절 전이가 없는( $p=0.068$ ) 종양에서 TLR-4 mRNA의 발현이 더 증가하는 경향을 보였다.

**결론** : 장액성 상피성난소암조직에서 TLR-4 mRNA는 정상난소 조직에서보다 유의하게 낮은 발현을 보였고 난소암에서 TLR-4 signaling의 역할에 대한 추가연구가 필요할 것으로 보인다.

**중심단어** : Toll-like receptor 4, 장액성 상피성난소암

## 서 론

만성염증은 종양의 발생과 진행에 있어 중요한 환경인자의 하나로 인식되고 있다.<sup>1,2</sup> 대장의 만성염증성질환인 궤양대장염(ulcerative colitis) 환자에서 대장암의 발생위험은 10배에 이른다고 알려져 있다. 또한 만성간염이 간암의 위험인자라는 것은 잘 알려져 있고,<sup>3</sup> 난소에 염증성 환경을 유발하는 난소 자궁내막증 환자는 난소암에 이환될 가능성이 있다고 되어있다.<sup>4,6</sup> 이에 대한 기전으로 염증세포가 cytokine이나 chemokine을 생성함으로써 암을 유발하는 기전에 대해서는 점차 많이 알려지고 있다.<sup>1</sup>

적응면역(adaptive immune system)은 종양의 성장을 억제하지만, 선천면역(innate immune system)은 inflammation-dependent 기전으로 종양의 성장을 유도한다고 생각되어지고 있다.<sup>1,7</sup> 대식세포(macrophage)와 같은 선천면

역세포에 의해 세균 또는 바이러스의 생산물이 인지될 경우에 종양의 진행과 관련한 염증반응을 유도할 수 있다.<sup>3</sup> 하나의 예로 수술 후 세균감염이 일어난 경우에 종양의 성장이나 전이가 발생한다는 사실은 동물실험에서 관찰된 바 있다.<sup>3</sup>

Toll-like receptor (TLR)는 type I transmembrane signaling molecule로 선천면역을 담당하는 세포에서 주로 발현되어 있다. 이 세포에서 TLR은 미생물의 특이적인 구조를 인식해서 면역반응을 일으키는 신호를 전달한다. Toll은 원래 초파리의 발생과정에 관여하는 유전자로 처음 클로닝이 되었으나, 이후 여러 연구를 통하여 초파리의 선천면역반응에도 관여한다는 사실이 알려졌다.<sup>8</sup> 이런 새로운 연구결과를 바탕으로 포유류에서도 Toll과 유사성을 가지는 유전자를 찾게 되었고, 그 결과 1997년에 최초로 사람에서 TLR을 클로닝 하게 되었으며, 그 후 지금까지 총 13종류의 TLR유전자가 발견되어 TLR family를 이루고 있다.<sup>9</sup> TLR family에 속하는 분자는 일반적으로 extracellular region에 leucine-rich repeat (LRR) motif가 있고 IL-1 수용체와 비슷한 cytoplasmic domain이 존

논문접수일 : 2007년 5월 1일 채택일 : 2007년 5월 31일

교신저자 : 배덕수, 135-710 서울시 강남구 일원동 50

삼성서울병원 산부인과

전화 : (02) 3410-3511 • 전송 : (02) 3410-0630

E-mail : ds123.bae@samsung.com

제한한다. TLR은 extracellular domain을 통해서 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)을 인식하며 그 결과 선천면역세포에서 염증성 세포 활성화를 유도하게 된다.<sup>10</sup> TLR의 신호전달은 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)와 extracellular signal-regulated kinase (ERK)/c-Jun-NH<sub>2</sub>-kinase (JNK)/p38 등을 활성화시킴으로써 여러 면역과 관련된 단백질을 조절한다고 알려져 있다.<sup>11</sup>

TLR-4는 그람음성세균의 세포막에 발현되는 lipopolysaccharide (LPS)의 수용체로 작용하며,<sup>12</sup> LPS를 인지하면 MyD88과 NF- $\kappa$ B의 활성화를 통해서 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12와 같은 proinflammatory cytokine을 생산할 수 있다. 그람음성세균, LPS, TLRs, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 등과 염증과의 관계는 잘 규명되어있으나, TLR과 암과의 관련성은 아직은 확실히 규명되어 있지 않다.

TLR의 발현과 암과의 관련성에 대해서는 아직 많은 연구가 이루어지지 않았지만, 전립선암,<sup>13</sup> 위암,<sup>14</sup> 폐암,<sup>15</sup> 그리고 유방암에서<sup>16</sup> TLR의 발현에 대해 보고된 바 있다. Schmausser 등은 정상 위점막세포와는 달리 위암세포나 그 전구세포에서 TLR-4와 TLR-5의 발현이 증가되었다고 보고하였다.<sup>14</sup> Kelly 등은 처음으로 상피성 난소암에서 TLR-4의 발현을 보고하였고 난소암 세포가 선천면역세포와 비슷하게 proinflammatory cytokine을 생산하여 결과적으로 암세포의 성장과 생존에 도움을 받는다고 하였다.<sup>17</sup>

이에 저자들은 정상난소조직과 장액성 상피성난소암 조직에서 TLR-4의 발현을 비교하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구대상

Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)을 위해서 기관윤리위원회의 승인 후 얻어진 24개의 장액성 난소암의 동결보존 조직을 이용하였다. 실제 암세포의 분포를 확인하기 위해 H&E 염색을 시행하였으며, 8명(33.3%)에서 90% 이상, 7명(29.2%)에서 70% 이상, 5명(20.8%)에서 50% 이상, 그리고 4명(16.7%)에서는 30% 이상 암세포가 존재함을 확인하였다. 대조군으로는 양성 자궁질환으로 수술을 시행하는 중에 난소절제를 시행했던 환자로부터 얻어진 정상난소상피조직의 동결보존절편을 이용하였다(9개). 모든 조직은 삼성서울병원에서 수

술을 시행 받은 환자들로부터 얻었다.

난소암 환자의 병기는 각각 IIc가 1명(4%), IIb가 3명(12.5%), IIc가 17명(70.8%) 그리고 IV가 3명(12.5%)이었다. Grade 1-2는 4명(16.7%)이었고 3은 20명(83.3%)이었다.

### 2. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR, 정량 역전사 폴리메라아제 연쇄반응)

정상난소조직과 장액성 상피성난소암 환자에서 얻어진 표본 조직에서 각각 TLR-4의 mRNA 발현을 정량적으로 분석하기 위해 qRT-PCR 방법을 사용하였다. 먼저 표본조직으로부터 easy-spin<sup>TM</sup> [genomic DNA free] Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA가 배제된 RNA (total RNA)만을 추출하였다. 전체 RNA 농도는 NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE)를 이용하여 정제도를 확인하고 정량하였다. 4  $\mu$ g의 전체 RNA로부터 2.5  $\mu$ M의 random hexamer primers (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 200U의 Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA (complementary DNA)를 역전사 합성하였다.

TLR-4 mRNA의 발현 정도를 정량하기 위해 qRT-PCR 분석은 ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 이용한 TaqMan 방법으로 평가하였다.<sup>18</sup> TaqMan 방법은 기존 PCR방법에 사용된 primer 쌍에 probe가 추가된 3개의 탐침자(oligo)로 PCR을 수행하게 되어 발현정확도와 특이성이 높다. TLR-4 발현에 사용한 TaqMan 제품(Hs00152939, probe 5'-TGCTGGA-TTTATCCAGGTGTGAAAT-3', Applied Biosystems)은 TLR-4 (NM\_138554.2, exon 2-3,) 두 exon 연결부분에서 연쇄반응이 수행되어 genomic DNA의 증폭이 배제된다. 내재 대조(endogenous control) 유전자는 인간 GAPDH (4310884E, carboxyl-tetramethylrhodamine Probe, Applied Biosystems)를 사용하였다. 연쇄반응 시 최종부피는 20  $\mu$ l가 되도록 하였으며, 최종농도는 완충용액의 경우 1 $\times$  TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems)이고, cDNA의 경우 각 시료의 RNA 10 ng에서 역전사되도록 하였다. 연쇄반응 수행절차는 4°C에서 준비하여 50°C에서 2분 경과 후 AmpliTaq Gold 폴리머라제가 활성화되도록 95°C에서 10분 수행하였고, 이어서 95°C에서

15초, 60°C에서 1분을 40회 반복 수행하였다. 각 연쇄반응은 모든 조직시료를 대상으로 3회 반복 실험하였으며, 각 시료의 발현결과 비교분석은 제조사에서 권고한 표준 곡선분석법(standard curve method)을 사용하였다. TLR4 유전자의 발현양을 측정하기 위해 동일시료 cDNA를 사용하여 GAPDH 발현양을 측정하여 정량하였다.

### 3. 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 포르말린으로 고정된 파라핀 조직 절편을 이용한 avidin-biotin-complex peroxidase 방법(DakoCytomation, Denmark)을 이용하였다. 4 µm 두께의 조직절편을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드 유리에 올려놓고 37°C에서 밤사이 건조하였다. 이 절편들을 xylene에서 탈파라핀화시키고 graded 에탄올과 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 차례로 씻어내었다. 항체 결합의 정확성을 높이기 위해서 절편들을 마이크로파를 이용하여 20분간 citrate buffer (pH 6.0, S 2367; DakoCytomation, Denmark)로 전 처치하였다. 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 활성도는 3% 과산화수소에 15분간 처리하여 차단되었으며 단백차단용액에 10분간 전배양하였다. 절편들은 anti-TLR-4 antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 밤사이 4°C humid chamber에서 염색하였다. 슬라이드는 PBS에서 3회 세척 후 secondary biotinylated antibody와 함께 30분간 실온에서 배양하였다. 항원-항체 복합체는 avidin-biotin-peroxidase method로 검출하였으며 제조 프로토콜에 따라 색소 기질(Vectastain ABC-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)은 diaminobenzidine을 사용하였다. 조직 절편들은 hematoxylin으로 역 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 4. 통계학적 분석

통계 분석에는 SPSS 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다. qRT-PCR로 평가한 평균 TLR-4 발현의 비교를 위해 Wilcoxon Two-Sample Test를 이용하였다. 유의성 판정은 p값이 0.05 미만인 경우 통계적 의미가 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

대상환자들의 임상병리학적 특징은 Table 1과 같다.

적절한 종양감축술(optimal cytoreduction)이 가능했던 환자는 12명(50.0%)이었고 림프절 전이가 있었던 환자는 6명(25.0%)이었다. 모든 환자에서 수술 후 taxane과 platinum의 병합항암화학요법을 시행 받았으며 항암요법 후 영상의학적 검사와 종양표지검사로 평가한 완전 관해는 19명(79.2%)에서 관찰되었다. 치료 후 최소 12개월의 추적관찰을 할 수 있었던 19명 중 6명(31.6%)에서 12개월 이내에 재발이 발생하였다.

**Table 1. Clinicopathological characteristics and TLR4 mRNA expression of 24 patients with serous adenocarcinoma**

	No. of patients (%)	Mean value of mRNA expression (SD)	p value*
Median age, years (range)	49.5 (32~75)		
FIGO stage			
IIc	1 (4.2)	29.3	0.99
IIIb	3 (12.5)	64.8 (47.4)	
IIIc	17 (70.8)	52.7 (95.5)	
IV	3 (12.5)	59.3 (65.5)	
Histologic grade			
I-II/III	4 (16.7)	166.4 (171.9)	0.075
III/III	20 (83.3)	31.6 (24.0)	
Cytoreductive surgery			
Optimal	12 (50.0)	41.2 (31.9)	0.46
Suboptimal	10 (41.7)	69.7 (126.1)	
NA	2 (8.3)		
LN metastasis			
Present	6 (25.0)	15.4 (4.5)	0.068
Absent	5 (20.8)	42.9 (36.6)	
NA	13 (54.2)		
Response to adjuvant chemotherapy			
NED	19 (79.2)	43.2 (36.1)	0.53
Residual disease	3 (12.5)	145.0 (231.7)	
NA	2 (8.3)		
Disease-free interval			
> 12 months	13 (54.2)	61.8 (109.1)	0.86
≤ 12 months	6 (25.0)	53.2 (48.6)	
NA	5 (20.8)		

SD; standard deviation, NA; not available, NED; no evidence of disease

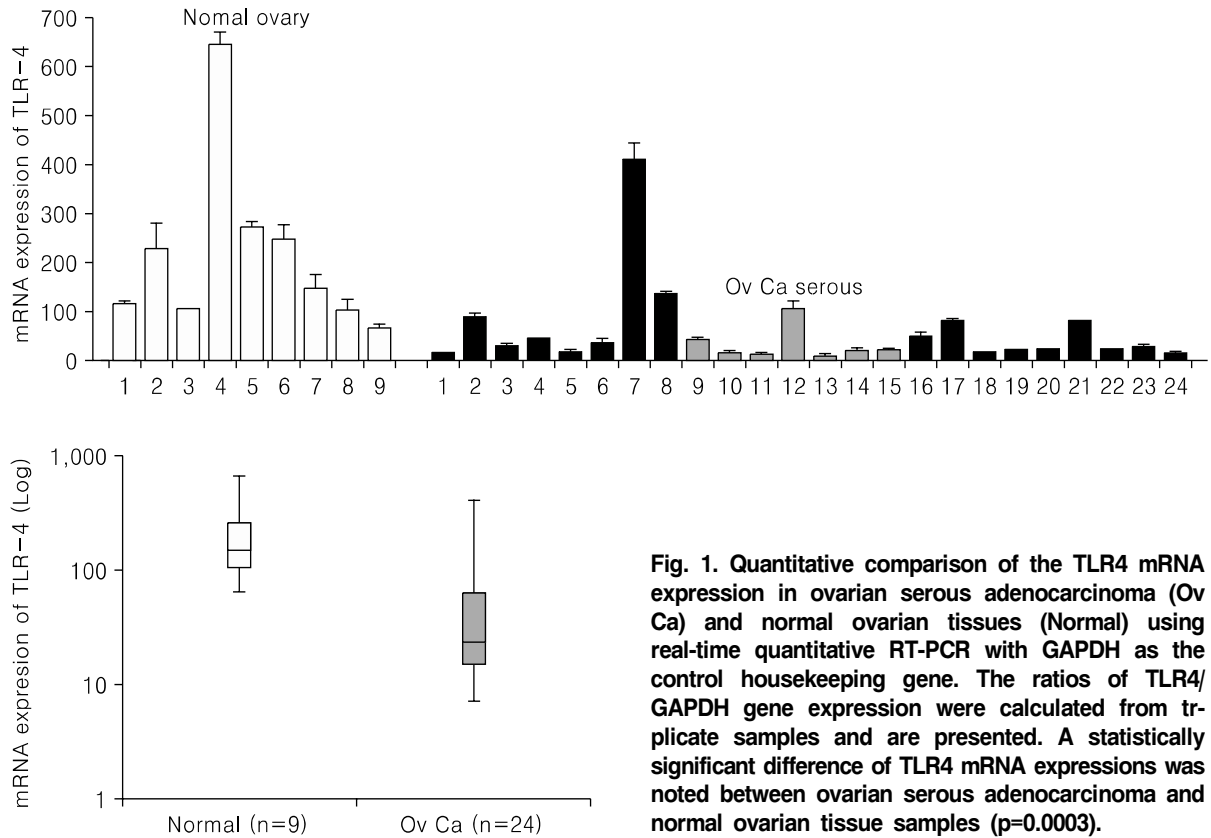
\*Wilcoxon two-sample test

### 1. qRT-PCR 결과

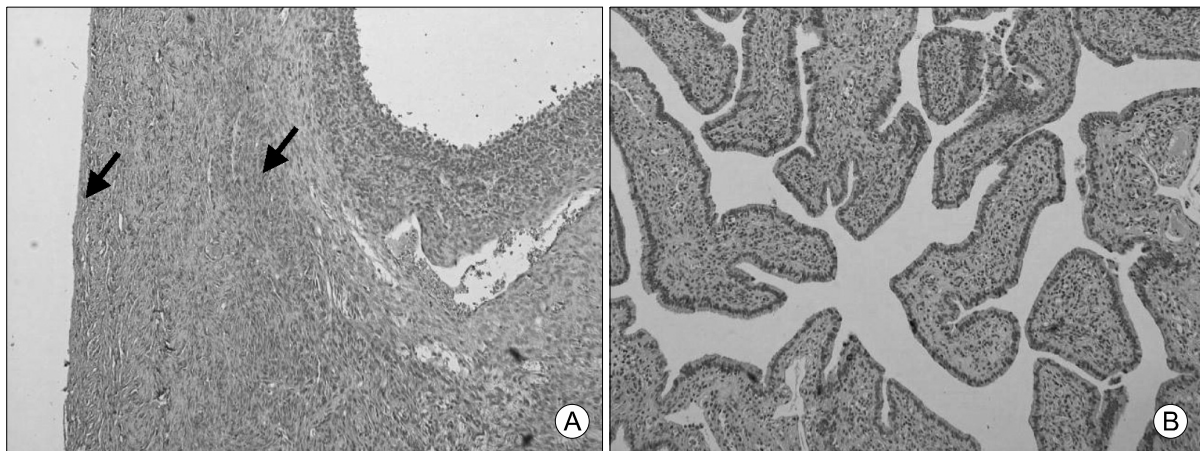
본 연구에서는 TLR-4 발현의 민감도를 높이기 위해 qRT-PCR 방법을 사용하였다. 정상난소조직과 상피성 난소암조직 모두에서 TLR-4 mRNA는 발현되는 것으로

관찰되었다(Fig. 1A). 그러나 장액성 난소암에서 정상난소 조직에 비하여 유의하게 낮게 발현되었다(Fig. 1B).

임상변수와 TLR-4 mRNA 발현 사이에는 유의한 상관관계를 보이지 않았다(Table 1). 그러나 grade가 낮거나



**Fig. 1.** Quantitative comparison of the TLR4 mRNA expression in ovarian serous adenocarcinoma (Ov Ca) and normal ovarian tissues (Normal) using real-time quantitative RT-PCR with GAPDH as the control housekeeping gene. The ratios of TLR4/GAPDH gene expression were calculated from triplicate samples and are presented. A statistically significant difference of TLR4 mRNA expressions was noted between ovarian serous adenocarcinoma and normal ovarian tissue samples ( $p=0.0003$ ).



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining of TLR4 in ovarian tissues. (A) Epithelium and stroma of the normal ovarian tissue showing positive immunostaining. (B) Serous ovarian adenocarcinoma showing no immunostaining (Original magnification,  $\times 100$ ).

( $p=0.075$ ) 림프절 전이가 없는( $p=0.068$ ) 종양에서 TLR-4 mRNA의 발현이 더 증가하는 경향을 보였다.

## 2. 면역조직화학염색 결과

각각 3개의 정상난소조직과 장액성 난소암 조직절편에서 면역조직화학염색을 시행하였다. 정상난소조직에서는 상피세포와 기질 세포에서 각각 TLR-4 단백질이 발현되었으나(2+: 1예, 3+: 2예), 난소암 조직에서는 발현되지 않았다(0: 2예, 1+: 1예) (Fig. 2).

## 고 찰

본 연구에서는 정상난소조직과 상피성 난소암조직 모두에서 TLR-4 mRNA가 발현되는 것으로 관찰되었으나, 상피성 난소암조직에서 정상난소조직에 비하여 유의하게 낮은 발현을 보였다. 난소암 환자의 임상변수와 TLR-4 mRNA 발현정도 사이에는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나, grade가 낮거나 림프절 전이가 없는 경우에 TLR-4 mRNA의 발현이 더 증가하는 경향을 보였다.

TLR은 proinflammatory cytokine을 발현하게 하는 가장 중요한 receptor pathway 중 하나이다.<sup>11</sup> 면역세포에서 발현되며 미생물이나 stress factor들에 반응하여 염증 반응을 시작하게 한다.<sup>19</sup> 비면역세포, 즉, 점막상피나 영양막세포(trophoblast cell)에서도 발현된다고 알려졌으며,<sup>20,21</sup> 면역세포에서와 같이 proinflammatory cytokine의 분비를 유발한다고 알려졌다.<sup>20</sup>

세균 또는 바이러스로 인한 염증 반응이 종양의 발생을 유발할 수 있다는 여러 증거들이 있다. 동물실험에 따르면 원발성 종양의 수술적 제거 후 dormant metastases의 빠른 성장이 발생할 수 있으며, LPS가 이러한 현상을 유발하는 매개가 될 수 있다고 보고된 바 있다.<sup>22</sup> 4T1 mouse mammary carcinoma cell을 주입한 BALB/c mice에서 LPS를 주사할 경우 폐전이가 증가한다고 하였다.<sup>23</sup> LPS는 TLR-4에 의해 인식되는데, TLR-4는 선천면역세포에서 발현된다. TLR-4와 LPS가 결합하게 되면 NF- $\kappa$ B의 활성화, cytokine/chemokine의 생산과 염증반응이 일어난다.<sup>24</sup>

Chemokine이 neoplastic process에 영향을 줄 수 있다고 잘 알려지고 있는데, 이는 백혈구를 동원하여 염증환경을 유발함으로써 뿐만 아니라, 주위의 기질세포나 암세

포에 직접 영향을 줌으로써이기도 한다고 보고된다.<sup>25</sup> 따라서 TLR-4를 통한 이러한 chemokine의 분비는 염증세포를 동원(recruit)할 뿐만 아니라 종양의 성장이나 진행을 유발할 수 있을 것이라고 하였다.

Kelly 등은 난소암 세포에서도 TLR-4의 발현이 증가되어 있고 선천면역세포와 비슷하게 proinflammatory cytokine을 생산하여 결과적으로 암세포의 성장과 생존에 도움을 받는다고 하였다.<sup>17</sup> 그러나 본 연구에서 기존의 보고와 상반되는 결과를 보인 이유는 정확하지 않지만, 아주 약간의 상피세포만 있는 정상난소 조직이 대조군으로 사용된 결과일 수도 있다. 정상 난소조직에서 TLR-4 mRNA가 발현된다는 보고가 있는데, 난소의 배란과정 중에 난포세포(cumulus)와 과립층 세포(granulosa cell)에서 TLR-4를 포함한 선천면역과 관련된 유전자의 발현이 증가되어 있고 배란에 중요한 역할을 한다고 하였고,<sup>26</sup> 또한 돼지와 쥐의 정상난소 조직에서 TLR-4의 발현이 증가된다고 보고된 바 있다.<sup>27,28</sup> 정상 난소조직으로 인한 bias를 배제하기 위해 난소암 조직을 암세포의 분포정도에 따라 두 군으로 나누어(80% 이상의 암세포가 존재하는 13조직과 80% 이하의 암세포가 존재하는 11조직) TLR-4 mRNA 발현정도를 비교하였을 때 각각의 평균 발현은 72.5와 32.2였다( $p=0.2$ ). 향후에 면역조직화학염색 등의 추가 연구가 좀더 정확한 정보를 제공할 수 있을 것으로 보인다.

또한 Kelly 등에 따르면 상피성 난소암세포에서 LPS 처치에 대한 반응은 서로 다른 양상을 보였는데, 이는 TLR의 세포 내 신호전달분자인 MyD88의 발현유무에 따른다고 하였다.<sup>17</sup> MyD88이 발현되는 경우에는, LPS 처리가 NF- $\kappa$ B의 nuclear localization, 세포성장 cytokine/chemokine의 생산을 증가시킨다고 하였다. MyD88의 발현이 없는 세포에서는 LPS 처리가 NF- $\kappa$ B의 nuclear translocation이나 세포성장을 유발하지 않았다. 그러나 TLR-4-MyD88 활성화 이후의 downstream 신호전달과정은 아직 밝혀지지 않았다. Kelly 등의 보고에 따르면 TLR-4 신호전달과정이 paclitaxel의 항암제 감수성에 영향을 줄 수 있다고 보고하였는데, MyD88+인 세포에 paclitaxel 처치를 했을 경우 LPS 처리에서와 같이 proinflammatory cytokine을 분비하였고, 암세포가 apoptosis에 빠지지 않았다. 반면에 MyD88-인 세포에서는 paclitaxel 처리 후 cytokine/chemokine 분비가 일어나지 않았고 apoptosis가

유발되는 결과를 보였다. 본 연구에서는 MyD88의 발현 여부는 확인하지 않았고 단지 TLR-4의 발현 정도와 무병생존기간과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

결론적으로 장액성 상피성난소암조직에서 TLR-4 mRNA는 발현되었으나, 정상난소조직에서보다는 유의하게 낮은 수치를 보였다. TLR-4 signaling이 종양의 성장과 paclitaxel 저항성과 관련된다는 기존의 보고와는 다른 결과이지만 난소암의 발생이나 paclitaxel 저항성과의 관계를 확인하기 위해서는 면역조직화학염색 등의 검사로 TLR-4와 MyD88의 발현을 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Balkwill F, Coussens LM. Cancer: An inflammatory link. *Nature* 2004; 431: 405-6.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Mending and malignancy. *Nature* 2004; 431: 402.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-7.
- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-99.
- Riman T, Nilsson S, Persson IR. Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 783-95.
- Sekizawa A, Amemiya S, Otsuka J, Saito H, Farina A, Okai T, et al. Malignant transformation of endometriosis: Application of laser microdissection for analysis of genetic alterations according to pathological changes. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 97-100.
- de Visser KE, Coussens LM. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1143-52.
- Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nusslein-Volhard C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 1991; 65: 725-35.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-44.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
- Sun J, Wiklund F, Zheng SL, Chang B, Balter K, Li L, et al. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 525-32.
- Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: An implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 179-85.
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, et al. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 2005; 6: 1.
- Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 437-47.
- Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3859-68.
- Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 546-56.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-45.
- Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol* 2004; 173: 4286-96.
- Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta* 2005; 26: 540-7.
- Pidgeon GP, Harmey JH, Kay E, Da Costa M, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br J Cancer* 1999; 81: 1311-7.
- Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch C, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer* 2002; 101: 415-22.
- Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105-8.
- Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 143-54.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robanya I, Richards JS. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: Novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3228-39.
- Alvarez B, Revilla C, Chamorro S, Lopez-Fraga M, Alonso F, Dominguez J, et al. Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4. *Dev Comp Immunol* 2006; 30: 345-55.
- Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cancino-Diaz JC. TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 904-10.

## Expression of TLR-4 in epithelial serous ovarian cancer

Chel Hun Choi, Jeong-Won Lee, Jung-Joo Choi, Woo Young Kim,  
Tae-Joong Kim, Je-Ho Lee, Byoung-Gie Kim, Duk-Soo Bae

*Department of Obstetrics & Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

---

**Objective :** This study was to determine the expression of Toll-like receptor 4 (TLR-4) in ovarian serous adenocarcinoma tissues.

**Methods :** TLR-4 expression was evaluated at the RNA level by real-time quantitative RT-PCR, in 24 fresh frozen ovarian serous adenocarcinoma tissues and 9 normal ovarian tissues. TLR-4 expression was also evaluated by immunohistochemistry (IHC) in each three ovarian carcinoma tissues and normal ovarian tissues.

**Results :** Positive immunoreactivity for TLR-4 was observed in the normal ovarian tissues but not in the ovarian carcinoma tissues. The staining was localized in the cytoplasm as well as on the cell surface. Real-time quantitative RT-PCR revealed that TLR-4 expression was significantly lower in tumors than in normal ovarian tissues ( $p=0.0003$ ). There were no significant correlations between clinical parameters and the expression level of TLR-4 mRNA in ovarian serous adenocarcinomas. However, tumors without LN metastasis ( $p=0.068$ ) and lower grade ( $p=0.075$ ) showed trends of higher TLR-4 mRNA expression.

**Conclusion :** TLR-4 expression was significantly lower in ovarian serous adenocarcinoma tissues than in normal ovarian tissues, and further studies on TLR-4 signaling pathway in ovarian carcinoma are needed.

**Key Words :** Toll-like receptor 4, Ovarian serous adenocarcinoma

---