

특발성 염증성 근육병증에서 Toll-like Receptor의 발현

부산대학교 의과대학 내과학교실, 신경과학교실*, 의학연구소**, 부산의료원 내과***

김근태*** · 이준희 · 백승훈 · 이정욱 · 조미라 · 김주인** · 이선희 · 김대성* · 김성일

= Abstract =

The Expression of Toll-like Receptors in Idiopathic Inflammatory Myopathies

Geun-Tae Kim***, Jun-Hee Lee, Seung-Hoon Baek, Joung-Wook Lee, Mi-Ra Cho,
Ju-In Kim**, Sun-Hee Lee, Dae-Seong Kim*, Sung-Il Kim

Departments of Internal Medicine and Neurology, Research Institute**,
College of Medicine, Pusan National University,
Department of Internal Medicine, Pusan Medical Center***, Busan, Korea*

Objective: To investigate the expression of toll-like receptor (TLR)-2, 4 and 9 in idiopathic inflammatory myopathies (IIMs).

Methods: The expression of TLR-2, 4 and 9 was measured by real-time RT-PCR and immunohistochemical stain (IHS) from muscle tissues in patients with IIMs and controls.

Results: The expression levels of TLR-2, 4 and 9 in IIMs were significantly higher than controls. TLR-2, 4 and 9 were mainly expressed on sarcolemma of muscle fibers, perimysial vascular endothelium and infiltrating inflammatory cells in dermatomyositis, whereas, they were mainly expressed on sarcolemma of muscle fibers, destructed muscle fibers, and endomysial infiltrating inflammatory cells in polymyositis.

Conclusion: TLR-2, 4 and 9 were highly expressed in muscle tissue of IIMs. These results suggest that TLR-2, 4 and 9 play a role in pathogenesis of IIMs.

Key Words: Toll-like receptors, Idiopathic inflammatory myopathy

< 접수일 : 2007년 1월 24일, 심사통과일 : 2007년 3월 19일 >

※통신저자 : 김 성 일

부산시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교병원 류마티스내과

Tel : 051) 240-7928, Fax : 051) 254-3127, E-mail : ksimd@pusan.ac.kr

본 연구는 2004년 부산대학교 의학연구소 연구비와 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)지원으로 이루어졌음.

서 론

특발성 염증성 근육병증(idiopathic inflammatory myopathies, IIMs)은 근육 조직에 만성 염증세포가 침윤되어 근육의 만성 염증을 일으키며, 근육 조직 외에 폐, 심장, 관절 및 혈관 등에도 만성염증을 일으키는 전신성 만성 염증 질환이다. 병인은 명확하게 밝혀져 있지 않으나, 환자의 혈액에서 다양한 종류의 자가 항체들이 발현되고, 근육 조직에서 림프구 등의 면역세포의 침윤이 관찰되고, 부신피질 호르몬을 포함하는 면역억제제가 치료에 효과가 있는 점 등은 자가면역 기전이 발병에 주요한 역할을 함을 암시한다 (1).

Toll-like receptors (TLRs)는 항원인지세포(antigen-presenting cell)를 포함하는 선천면역(innate immunity) 세포에 발현되는 pattern-recognition receptor (PRR)로, 침입 미생물의 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)과 결합하여 항원인지세포를 활성화하여 주요한 염증 사이토카인 및 chemokine을 생성하는 유전자를 활성화시킨다 (2,3). 또한, 항원인지세포에서 T 림프구 활성화에 주요한 co-stimulatory molecule의 생성을 촉진시켜 T 림프구를 활성화시킴으로써 선천면역 및 적응면역(adaptive immunity)에서 주요한 역할을 한다. 그러므로, TLRs 활성화조절 장애는 선천면역 및 적응면역 조절장애를 유발하여 자가면역 발생이 유발될 수 있음을 암시하나 (4), 자가면역 질환의 발생에서 TLRs의 역할은 명확하게 밝혀진 것이 없다.

저자들은 IIMs 환자의 근육 조직에서 TLR-2, 4 및 9의 발현을 조사하여 TLRs의 발현과 IIMs의 연관성을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

1998년부터 2005년까지 류마티스내과를 방문하여 Bohan 및 Peter가 제안한 진단기준 (5,6)을 만족하는 다발근육염(polymyositis, PM) 및 피부근육염(dermatomyositis, DM) 환자 14명과 대조군 3명의 근육 조직을 대상으로 하였다. 대상 환자들은 사지 근육(bi-

ceps brachii, vastus lateralis, tibial anterior muscle)에서 근육 조직을 생검하여 즉시 액체질소에 냉동시켜 -80°C에서 저장하였으며, 근육 조직 검사 시 부신피질 호르몬이나 면역억제제는 사용하지 않은 상태였다. 대조군은 근염이 의심되어 근 생검을 시행하였으나 조직학적 검사상 특이소견이 없었던 조직을 대조군으로 사용하였다. 모든 환자 및 대조군에서 근 생검 조직을 이용한 연구에 동의하는 서명을 받았으며, 본 연구는 부산대학교병원 임상시험위원회의 승인을 받아서 진행하였다.

2. 근육 조직에서의 real time RT-PCR

근육 조직으로부터 TRIzol 용액(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 1 µg의 RNA가 들어있는 각각의 solution들을 65°C에서 15분간 가열한 후 reverse transcriptase가 포함된 mixture를 첨가하여, 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 99°C에서 5분, 4°C에서 5분 동안 반응시킴으로써 cDNA를 얻었다. 위 반응은 First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV] (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다. Real-time PCR은 LightCycler System Instrument (Roche Applied Science)를 이용하였다. Microcapillary tube에 LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science), cDNA template, β -actin 및 TLR-2, TLR-4, TLR-9, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 Interferon- γ (IFN- γ)의 각각의 시발체와 25 µM MgCl₂를 최종부피가 20 µl가 되게 섞은 후 95°C에서 10분간 pre-denaturation시킨 후 95°C에서 10초, 60°C에서 5초, 72°C에서 10초 동안 50회 증폭시켰다. TLR-2, 4, 9 및 TNF- α 와 IFN- γ 의 시발체는 Bioneer (Korea)에서 구입하였고 염기서열은 표 1과 같다. 각 주기마다 형광 신호를 모니터링하여 나타나는 threshold cycle (C_T)을 분석하여 대조군과 실험군 사이의 mRNA 양을 분석하였다.

3. 면역조직화학염색

동결조직을 OCT compound에 얹어 6 µm 두께로 잘라 충분히 건조시킨 다음 면역조직화학염색을 하기 위해 -20°C 아세톤에서 20분간 고정된 후 공기 중에 2시간 동안 건조시켰다. 조직절편을 PBS로 5분간 세척 후 0.3% hydrogen peroxide용액에서 20분간

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR

Primer	Stream	Sequence
β -actin	Sense	5'-AACACCCCAGCCATGTACG-3'
	Anti-sense	5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'
TLR-2	Sense	5'-CAATGATGCTGCCATTCTCAT-3'
	Anti-sense	5'-ATTATCTTCCGCAGCTTGCA-3'
TLR-4	Sense	5'-AGTTTCCTGCAATGGATCAAGG-3'
	Anti-sense	5'-CTGCTTATCTGAAGGTGTTGCAC-3'
TLR-9	Sense	5'-AGTCAATGGCTCCCAGTTCCT-3'
	Anti-sense	5'-CGTGAATGAGTGCTCGTGGTA-3'
TNF- α	Sense	5'-ACATACTGACCCACGGCTTC-3'
	Anti-sense	5'-GCACTCACCTCTTCCCTCTG-3'
INF- γ	Sense	5'-TCCCATGGGTTGTGTGTTTA-3'
	Anti-sense	5'-AAGCACCAGGCATGAAATCT-3'

Table 2. Characteristics of 14 patients with IIMs and the expression levels of TLR-2, 4, 9 and TNF- α , INF- γ

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Relative density of mRNA expression compared to controls				
				TLR-2/ β -actin	TLR-4/ β -actin	TLR-9/ β -actin	TNF- α / β -actin	INF- γ / β -actin
1	F	33	PM	16	48	11	10	587
2	F	59	PM	19	140	15	27	1,431
3	F	30	DM	25	164	6	4	278
4	M	55	DM	15	106	12	14	484
5	M	37	DM	48	61	5	5	273
6	M	22	PM	19	169	15	31	674
7	F	47	PM	16	149	10	8	382
8	M	58	DM	57	81	6	22	463
9	M	37	DM	13	153	37	17	885
10	M	39	DM	70	232	26	20	2,756
11	F	43	PM	50	228	35	24	1,825
12	F	8	DM	40	444	44	51	2,179
13	M	36	DM	36	108	5	3	334
14	F	66	DM	29	297	35	83	3,141
				32 \pm 18	170 \pm 105	19 \pm 14	23 \pm 22	121 \pm 978

F: female, M: male, DM: dermatomyositis, PM: polymyositis, INF- γ : interferon- γ , TNF- α : tumor necrosis factor- α , TLR: toll-like receptor

처리하였다. 면역조직화학염색은 Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA)를 사용하였다. 조직절편을 1.5% normal goat serum으로 30분간 protein blocking한 다음 1차 항체인 TLR-2 (sc-10739), TLR-4 (sc-10741), TLR-9 (sc-25468)와 4°C에서 14~16시간 동안 반응시켰다. 모든 1차 항체는

Santa Cruz Biotechnology (Inc, CA, USA)에서 구입하였다. 반응이 끝난 후 biotin이 결합한 2차 항체를 실온에서 30분 반응시킨 다음 ABC reagent를 실온에서 30분간 적용하였다. 각 단계별 세척은 0.05% Tween 20이 함유된 PBS를 사용하였다. 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, ST Louis, MO, USA)를 사용하여 발

색반응을 보았고 hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 최종적으로 봉입을 시행하였다.

4. 통계학적 분석

각 실험군 간 비교는 SPSS version 12를 이용하여 변수에 따라 분석하였으며, 유의성 판정은 p값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특성

대상 환자는 총 14명(PM 5명, DM 9명)이었으며, 평균 연령은 40.7±15.6세이며, 남녀 각 7명이었다(표 2).

2. 근육 조직에서의 TLR-2, 4, 9 및 TNF- α 및 IFN- γ 의 mRNA의 발현

1) TLR-2, 4 및 9 mRNA의 발현: TLR-2, 4, 9 발현은 대조군에 비하여 환자군에서 32±18, 170±105, 19±14배로 유의하게 증가되었으나(표 2), 환자군 중 PM 및 DM, 성별에 따른 유의한 발현의 차이는 없었다(표 3).

2) TNF- α 및 IFN- γ mRNA의 발현: TNF- α 와 IFN- γ 발현은 대조군에 비하여 환자군에서 23±22, 1,121±978배로 유의하게 증가되었으나(p<0.05, 표 2), 환자군 중 PM 및 DM, 성별에 따른 유의한 발현의 차이는 없었다(표 3).

3) TLR-2, 4 및 9 mRNA의 발현과 염증 사이토카인 mRNA 발현과의 상관관계: 근육 조직에서의 TLR-4 발현은 TNF- α (상관계수 0.7, p<0.01), IFN- γ (상관계수 0.8, p<0.01)의 발현, TLR-9의 발현은 TNF- α (상관계수 0.7, p<0.01), IFN- γ (상관계수 0.8, p<0.01)의 발현과 상관관계가 있었다.

3. 면역조직화학염색

TLR-2, 4 및 9는 대조군에서는 비특이적으로 미약하게 발현되었으며, PM에서는 근육섬유의 횡문근형질막(sarcolemma), 손상된 근육섬유 및 근육섬유막(endomysium)에 침윤된 염증세포에서 주로 발현되었으며, DM에서는 근육 섬유(muscle fiber)의 횡문근형질막(sarcolemma), 근육다발막(perimysium)에 존재하는 혈관내피세포와 침윤된 염증세포에서 주로 발현되었다(그림 1-3).

고 찰

본 연구는 IIMs 환자의 근육 조직에서 TLR-2, 4 및 9의 발현이 대조군에 비하여 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 TLR-2, 4 및 9의 발현 증가가 IIMs의 발생과 연관되고, TLRs 발현 증가에 의한 선천면역 활성이 IIMs의 병인과 연관됨을 암시한다.

선천면역 활성이 자가 면역 질환의 발생과 연관될 것으로 추측되나, 현재까지 이의 연관성 및 역할에 대하여 명확하게 밝혀진 것은 없다. 선천면역을 직접적으로 활성화시키고 이차적으로 T 및 B 림프구를 활성화시켜 후천면역을 활성화시키는 TLRs와 자가면역 류마티스 질환과의 연관에 대한 연구 결과는 다양하다. 유전자 다형성 연구에서 TLR-2 또는 4 유전자 다형성이 류마티스관절염 발생과의 연관성에 대한 연구는 보고자에 따라 상반되며 (7- 9), TLR-2, 4 및 9 유전자 다형성은 전신홍반루푸스 발생과 연관 없음이 보고되었다 (9,10). 그러나, 류마티스관절염에서 염증이 있는 활막에서 TLR-2 및 4 발현 증

Table 3. The expression of TLR-2, 4, 9 and TNF- α , IFN- γ according to disease (PM, DM) and sex (male, female)

	Disease		Sex	
	PM (n=5)	DM (n=9)	Male (n=7)	Female (n=7)
TLR-2/ β -actin	24±15	37±19	37±22	28±13
TLR-4/ β -actin	147±65	183±123	130±59	210±129
TLR-9/ β -actin	17±10	20±16	15±12	22±15
TNF- α / β -actin	20±10	24±26	16±10	30±28
IFN- γ / β -actin	980±617	1,199±1,160	839±870	1,403±1,063

F: female, M: male, DM: dermatomyositis, PM: polymyositis, IFN- γ : interferon- γ , TNF- α : tumor necrosis factor- α , TLR: toll-like receptor

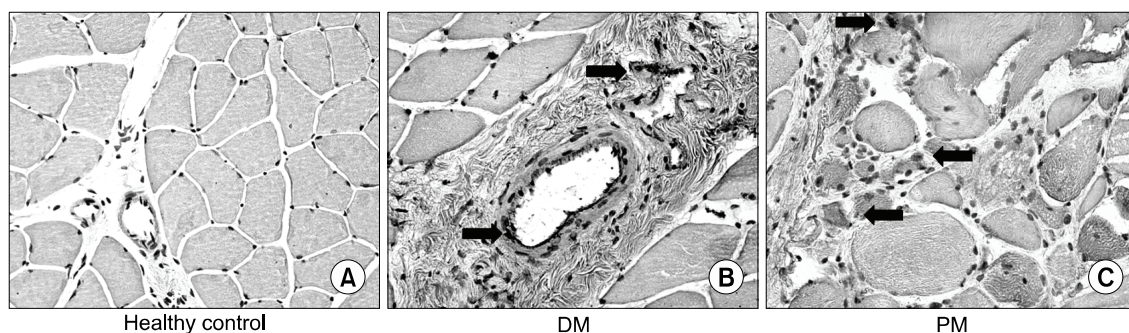


Fig. 1. Immunohistochemical stain of TLR-2 in muscle tissues from healthy control (A) & patients with IIMs (B, C). (B) In DM, TLR-2 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, perimysial vascular endothelium and infiltrating inflammatory cells (arrow). (C) In PM, TLR-2 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, destroyed muscle fibers, and endomysial infiltrating inflammatory cells (arrow). Magnification: $\times 200$.

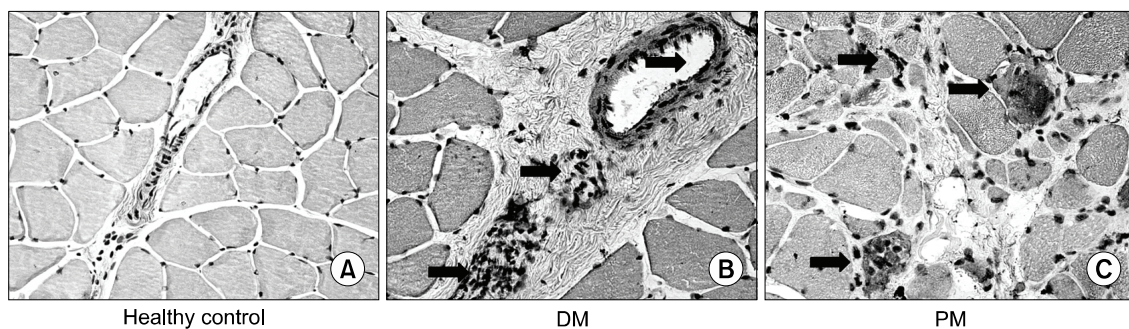


Fig. 2. Immunohistochemical detection of TLR-4 in muscle tissues from healthy control (A) & patients with IIMs (B, C). (B) In DM, TLR-4 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, perimysial vascular endothelium and infiltrating inflammatory cells (arrow). (C) In PM, TLR-4 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, destroyed muscle fibers, and endomysial infiltrating inflammatory cells (arrow). Magnification: $\times 200$.

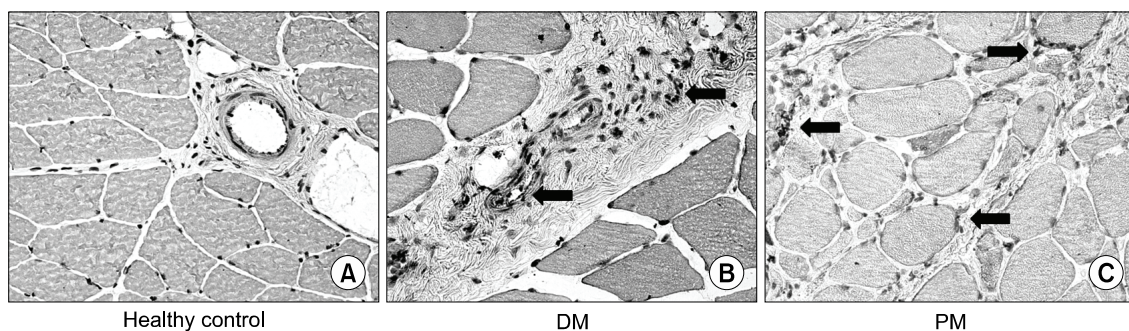


Fig. 3. Immunohistochemical detection of TLR-9 in muscle tissues from healthy control (A) & patients with IIMs (B, C). (B) In DM, TLR-9 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, perimysial vascular endothelium and infiltrating inflammatory cells (arrow). (C) In PM, TLR-9 is expressed by sarcolemma of muscle fibers, destroyed muscle fibers, and endomysial infiltrating inflammatory cells (arrow). Magnification: $\times 200$.

가와 말초혈액 단핵구에서 TLR-2 발현 증가가 보고되고 (11-13), 전신홍반루푸스 환자의 말초혈액의 B 림프구 및 형질 세포에서 TLR-9의 발현 증가가 보고된 것은 (14) TLRs 활성이 자가면역 질환의 병인과 연관됨을 암시한다. 현재까지 IIMs 환자에서 TLRs의 발현에 대한 보고는 없으며, 본 연구결과는 IIMs에서 TLRs의 발현을 조사한 최초의 보고라고 생각된다.

TLRs는 수지상세포 및 대식세포 등을 포함하는 항원인지세포(antigen-presenting cells, APCs), B 림프구 등에서 발현된다. 본 연구에서 면역화학조직염색에서 TLR-2, 4 및 9는 PM 및 DM에서 발현 양상이 상이하였다. PM에서 주로 근육 섬유의 횡문근형질막(sarcolemma), 손상된 근육 섬유 및 근육섬유막(endomysium)의 염증세포에서 발현되었으며, DM에서는 주로 근육 섬유의 횡문근형질막, 근육다발막(perimysium)의 염증세포 및 혈관내피세포에서 발현되었다. 이는 PM 및 DM의 병인 및 조직 소견이 다른 점과 연관된 것으로 생각된다. 즉, PM은 활성화된 CD8+ T 림프구가 MHC class I을 발현하는 근육 세포에 침윤하여 근육 세포를 파괴하며, DM은 보체의 활성화와 침착에 의하여 근육 혈관의 용해에 의한 근육 조직의 허혈로 인한 근육 조직의 파괴이므로 (15), DM에서 혈관 내피세포에서 TLR-2, 4 및 9의 발현증가된 것은 병리소견과 일치된다.

TLRs는 외인성 리간드 또는 내인성 리간드에 의하여 활성화된다. 각 TLRs는 특이적인 외인성 리간드에 의하여 활성화되며, TLR-2는 그람 음성균의 peptidoglycan과 마이코박테리움의 lipoarabinomannan, TLR-4는 그람 음성균의 lipopolysaccharide (LPS), TLR-9는 unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (ODN)에 의하여 활성화된다. 내인성 리간드로는 heat shock proteins, fibrinogen, hyaluronan 등은 TLR-4와 결합하여 TLR-4를 활성화시키며, 염증에 의한 괴사조직은 명확하게 밝혀지지 않은 리간드에 의하여 TLR-2를 활성화시키며, 염색질을 포함하는 면역복합체는 TLR-9 및 B 림프구 수용체를 활성화시킨다 (16-19). 본 연구 결과에서 IIMs에서 TLR-2, 4 및 9의 발현이 증가된 기전은 다음과 같이 추측될 수 있다. 첫째, 바이러스 감염 등이 IIMs 발생의 원인으로 알려져 있으며 이러한 미생물의 외인성 리간드에 의한 발현 증

가, 둘째, IIMs 환자의 혈청에 존재하는 자가항체에 의해 생성된 면역복합체에 의한 발현 증가, 셋째, 염증으로 인한 근육 조직의 파괴에 의한 괴사 물질에 의한 발현 증가, 넷째, 근육 조직에서 증가된 염증 사이토카인에 의한 발현의 증가이다. IFN- γ 및 TNF- α 는 IIMs 환자에서 발현이 증가됨이 확인되어 병인에 연관됨이 보고된다. IFN- γ 는 대식세포 및 CD4+ Th1 세포에서 생성되며 대식세포의 TLRs의 신호전달에 상승 작용을 일으키며 류마티스관절염 활막 조직에서 TLR-2 및 4의 발현을 IL-12 및 IL-18을 통하여 증가시키고 (12,20,21), 척추 관절증 환자에서 TNF 억제 치료는 TLR-2 및 4의 발현을 감소시키는 것으로 보고되었다 (22). 본 연구에서 IIMs 환자의 근육 조직에서 IFN- γ 및 TNF- α 의 발현은 유의하게 증가되어 있었으며, 특히 TLR-4 및 9 발현은 TNF- α 및 IFN- γ 의 발현과 유의한 상관관계가 있었다.

결론

본 연구는 IIMs 환자의 근육 조직에서 TLR-2, 4 및 9의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 자가면역 질환인 IIMs의 병인에 TLR-2, 4 및 9의 발현 증가가 병인에 연관됨을 암시한다.

REFERENCES

- 1) Kanneboyina N. Update on immunopathogenesis in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:461-8.
- 2) Anderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-7.
- 3) Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-9.
- 4) Elias T, Yehuda S. Toll-like receptors and their role in the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2004;37:183-8.
- 5) Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292:344-7.
- 6) Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-7.
- 7) Lee EY, Yim JJ, Lee HS, Lee YJ, Lee EB, Song YW.

- Dinucleotide repeat polymorphism in intron II of human Toll-like receptor 2 gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 2006;33: 211-5.
- 8) Kilding R, Akil M, Till S, Amos R, Winfield J, Iles MM, et al. A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:340-2.
 - 9) Sanches E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004; 63:54-7.
 - 10) Hur JW, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim SY, Bae SC. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005;65:266-70.
 - 11) Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 2003;162:1221-7.
 - 12) Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 2004;50:3856-65.
 - 13) Iwahashi M, Yamamura 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.
 - 14) Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertsias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, et al. Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum* 2006;54:3601-11.
 - 15) Briani C, Doria A, Sarzi-Puttini P, Dalakas MC. Update on idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006;39:161-70.
 - 16) Gaston JS. Heat shock proteins and arthritis-new readers start here. *Autoimmunity* 1997;26:33-42.
 - 17) Prakken BJ, van der Zee R, Anderton SM, van Kooten PJ, Kuis W, van Eden W. Peptide-induced nasal tolerance for a mycobacterial heat shock protein 60 T cell epitope in rats suppresses both adjuvant arthritis and nonmicrobially induced experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3284-9.
 - 18) Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001;166:7128-35.
 - 19) Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-7.
 - 20) 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- δ : a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2004;99:3427-31.
 - 21) Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN δ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 2006;211:511-24.
 - 22) Rycke LD, Vandooren B, Kruithof E, Keyser FD, Veys Em, Baeten D. Tumor necrosis factor α blockade treatment down-modulates the increased systemic and local expression of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:2146-58.