대한피부과학회지 2008;46(5):611～618 □ 원 저 □

# 베체트병에서 MIF 발현에 대한 연구

아주대학교 의과대학 피부과학교실, 성신여자대학교 생물학과[1], 연세대학교 의과대학 피부과학교실[2]

인성일 · 백진아[1] · 박경숙[1] · 방동식[2] · 이은소

## Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Behçet's Disease

**Sung-Il In, M.D., Jin-Ah Baek, M.S.[1], Kyung Sook Park, Ph.D.[1], Dongsik Bang, M.D., Ph.D.[2], Eun-So Lee, M.D., Ph.D.**

*Department of Dermatology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Department of Biology, Sungshin Women's University[1], Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine[2], Seoul, Korea*

**Background:** Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a unique protein, participating in inflammation, immune response, and cell growth. Previous reports showed that MIF-polymorphisms are associated with an increased risk for various inflammatory diseases.
**Objective:** This study was designed to investigate the effect of MIF polymorphisms on Behçet's disease (BD).
**Methods:** A total of 362 patients with BD and 290 healthy controls were genotyped. We also performed RT-PCR analysis, ELISA, and immunohistochemical stain for MIF.
**Results:** We could not find statistically significant differences in the genotype frequencies of the *MIF-794[CATT]$_{5-8}$* repeat polymorphism or *MIF-173 G>C* polymorphism between BD patients and controls. Immunohistochemical analysis showed that MIF protein was diffusely distributed throughout epidermis and subcutaneous fat tissue from the skin lesions of patients with BD and erythema nodosum.
**Conclusion:** Contrary to earlier reports, serum MIF levels were decreased in patients with BD, and the prescence of polymorphisms in the MIF promoter region was not associated with disease susceptibility. Nevertheless, MIF may play a role in cutaneous inflammation in BD. **(Korean J Dermatol 2008;46(5):611～618)**

**Key Words:** Behçet's disease, Macrophage migration inhibitory factor

## 서 론

대식세포 유주 저지 인자(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)는 최초의 T 세포 유래 사이토카인으로서, 염증반응과 면역반응, 세포의 증식과 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다. 1966년에 Bloom과 Bennett[1]은 주로 T 림프구로부터 MIF가 발현됨을 발견하였다. MIF는 면역계 세포와 말초 조직의 비면역계 세포 모두에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 대식세포 기능의 조절과 림프구 면역 그리고 내분비 기능의 조절 등에서 중요한 기능을 가진다[2-5]. MIF는 글루코코르티코이드의 면역억제 기능과 항염증 작용에 대하여 정반대의 기능을 수행하는 특이적인 조절자로서 작용한다[6]. 이외에도 패혈성 쇼크, 류마티스성 관절염, 신장이식의 지연성 과민반응, 사구체신염, 성인성 호흡곤란 증후군 등의 면역 및 염증성 질환에도 중요한 매개자로 작용한다[4,7-14]. 피부질환에 있어 MIF는 여러 자가면역성 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 전신성 경화증에서 MIF의 혈청 농도가 높은 것으로 보고되었고[15], 아토피성 피부염과 건선에서도 MIF가 혈청과 병변 부위 피부 조직에서 높게 발현되는 것이 보고되었다[16,17].

MIF의 유전자는 22번 염색체(22q11.2)에 위치하고 있다. MIF의 유전자 다형성(genetic polymorphism)은 -173에 위치한 단일염기돌연변이(*MIF-173 G>C*)와 -794에 위치한 *CATT$_{5-8}$* tetranucleotide repeat element의 다형성이 보고되었으며[18], 이러한 유전자 다형성에 따른 임상형의 차이가 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 궤양결장염, 알쯔하이

<접수: 2008년 1월 23일>
*본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원으로 이루어졌음(No. R01-2004-000-10731-0).
교신저자: 이은소
주소: 443-721 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지
아주대학교 의과대학 피부과학교실
전화: 031)219-5190, Fax: 031)219-5189
E-mail: esl@ajou.ac.kr

머병, 신증후군 등 여러 질환 및 아토피, 건선, 중증 원형탈모증 등의 피부 질환에서 밝혀진 바 있다[19-26].

베체트병은 구강궤양, 외음부 궤양, 포도막염 등의 세 가지 증상이 특징적인 만성 염증성 질환이다. 이 병은 점막 및 피부, 눈, 심장, 혈관, 신장, 위장, 신경이 침범될 수 있는 임상적 특징을 가진 매우 다양하고 복합적인 질환으로 인식되어 있으며, 호전과 악화의 재발성 질병 양상을 갖는 것이 특징이다. 베체트병의 병인은 아직까지 확실히 밝혀지지 않았지만 선천면역과 적응면역이 모두 관여하며 염증유발성 사이토카인과 Th1형 사이토카인이 활성화되고 부착분자나 염증유발성 사이토카인에 대한 유전변이와 같은 면역이상으로 더 강력한 중성구 및 T세포 반응을 유발한다고 알려져 있다[27]. 또한 전사인자의 세포 내 신호이상으로 외부자극에 대한 염증반응에 대한 역치를 떨어뜨린다. 적응면역도 중요한 역할을 하며 외부(연쇄구균, 초항원) 및 내부항원(열 충격 단백질, 장기 특이 단백질)에 작용하여 조직 T 세포 침착을 유발한다[27]. 베체트병의 면역학적 병인에 널리 알려진 가설에 따르면 여러 가지 항원에 대한 T세포의 과민반응과 이에 따른 단핵구의 활성화로 인터루킨 12의 생성을 유발하고 이 사이토카인이 Th1 반응을 자극한다. 또한 비정상적인 T세포 활성화로 인해 인터루킨 8, 인터루킨 17, 감마인터페론과 종양괴사인자와 같은 사이토카인에 의해 중성구가 활성화된다[28]. 베체트병과 관련하여, 베체트병 환자의 혈청내 MIF의 발현이 증가되어있다는 보고들이 있어왔다[29,30].

이전 연구들에서 MIF와 지연형 면역반응의 관계가 밝혀진 바 있으며, 현재 선천면역계에서 중요한 역할을 하는것으로 생각되고 있다. 단핵구와 대식세포에는 다량의 preformed MIF가 존재하며 lipopolysaccharide (LPS), 글루코코르티코이드, 그람양성 외독소, 염증유발성 사이토카인(TNF-$\alpha$, IFN-$\gamma$), 기타 매개인자들의 자극에 의해 분비된다. MIF는 측분비(paracrine)와 자가분비(autocrine) 기전으로 작용하며 세포를 활성화시키고 염증유발성 사이토카인을 분비하도록 한다. 또한 글루코코르티코이드의 효과에 반대되는 작용을 하며, 대식세포의 식세포작용과 리슈만편모충과 같은 세포내병원체의 사멸을 증진시키고, 지연형 면역반응에서 대식세포의 축적에 관여하는 것으로 알려져 있다[31]. MIF는 적응면역에서도 중요한 조절인자로 작용한다. T 세포에서의 MIF-mRNA 생성의 유도와, 항 CD3 항체 또는 초항원에 의한 자극으로 MIF 단백질이 분비되는 것으로 알려져 있으며, T 세포에서 생성된 MIF가 항 CD3 단클론 항체(mAb)에 의해 중화되어 항 CD3와 초항원에 의해 유도되는 인터루킨2의 분비를 막는 것으로 알려져 있다. 또한 MIF는 T 세포의 증식을 40～60% 정도 감소시키는 것으로 알려져 있다. In vivo에서 항 MIF 치료가 T 세포의 증식을 줄이고 항원특이 면역글로불린G의 생산을 감소시키는 것으로 알려졌으며, 이는 T 세포의 초회항원자극(priming)에 MIF가 작용하는 것으로 생각된다[31].

본 연구에서는 베체트병에서 MIF의 유전자 다형성에 따른 임상형의 변화와 함께, 각각의 유전자형에 따른 MIF 발현의 차이를 mRNA 수준에서 RT-PCR을 통해, 단백질 수준에서 ELISA와 면역조직화학염색을 통해 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

2005년 9월 이후 아주대학교병원 피부과와 연세대학교 신촌세브란스병원에 내원하여 International Study Group for Behçet's Disease에서 1990년에 발표한 진단기준[32] 또는 1987년 일본 베체트병 연구회의 진단기준[33]을 만족하는 베체트병 환자 427명을 대상으로 하였다. 정상 대조군은 2005년 6월부터 2005년 10월에 경기도 광주시 보건소에서 실시한 비만 프로그램에 참여한 정상인 중 자발적으로 본 연구에 참여의사를 밝힌 사람들 중 베체트병 환자로 진단된 1명을 제외한 306명을 대상으로 말초혈액을 확보하였으며, 이들 중 290명에 대해 실험을 진행하였다(Table 1). 본 연구는 아주대학교병원 의학연구윤리심의위원회(Institutional Review Board)의 심의와 승인을 받았다(IRB-05-080).

### 2. 연구방법

#### 1) 유전자형 분석

베체트병 환자 362명과 대조군 290명의 말초혈액 단핵구에서 Genomic DNA를 QIAamp Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. MIF의 *MIF-173G>C* 유전자 다형성은 forward primer 5'-ACTAAGAAAGACC-CGAGGC-3', reverse primer 5'-GGGGCACGTTGGTGTTT-

Table 1. Demographic characteristics of BD patients and normal control

| Clinical feature | Total (%) | Male (%) | Female (%) |
|---|---|---|---|
| BD patient | 427 | 167 (39.1) | 260 (60.9) |
| Age (years) | 10～65 | 12～57 | 10～65 |
| Major symptoms | | | |
| Oral ulcer | 387 (90.6) | 155 (36.3) | 232 (54.3) |
| Skin lesion | 239 (56) | 104 (24.4) | 135 (31.6) |
| Genital ulcer | 234 (54.8) | 74 (17.3) | 160 (37.5) |
| Ocular lesion | 83 (19.4) | 44 (10.3) | 39 (9.1) |
| Minor symptoms | | | |
| Arthritis | 95 (22.2) | 34 (8.0) | 61 (14.3) |
| Large vessel involvement | 7 (1.6) | 6 (1.4) | 1 (0.2) |
| Gatrointestinal involvement | 27 (6.3) | 8 (1.9) | 19 (4.4) |
| Central nervous system involvement | 10 (2.3) | 5 (1.2) | 5 (1.2) |
| Normal control group | 290 | 42 (14.5) | 248 (85.5) |
| Age (years) | 22～67 | 23～53 | 22～67 |

AC-3' (Bioneer, Korea)와 제한효소 *Alu* I (New England Biolabs, Beverly, MA)을 사용하여 중합효소연쇄반응-제한효소 절편 길이 다형성(PCR-RFLP) 방법으로 분석하였다[21,22]. 증폭된 DNA는 8% polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 ethidium bromide로 염색하였다. *MIF-794(CATT)$_{5-8}$* tetranucleotide repeat element 다형성은 primer; forward 5'-TTGCACCTATCAGAGACC-3', reverse 5'-TCCACTAATGGTAAACTCG-3' (Bioneer, Korea)로 증폭하여, 증폭된 DNA에 denaturing solution (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue)을 넣고 변성(95°C, 15분)하여 6 M urea gel에서 전기영동 후 silver 염색하였다.

#### 2) 역전사-중합효소 증폭반응(RT-PCR)

역전사-중합효소 증폭반응에는 87명의 베체트병 환자와 50명의 대조군의 혈액을 사용하였으며, 대조군은 유전자 다형성의 비율에 따라 무작위로 선정하였다. 말초혈액 단핵구를 추출하여 cells-to-cDNA kit (Ambion, Austin, TX)를 이용해 RNA추출과 cDNA합성을 하였고, 역전사에는 다음의 primer를 사용하였다: forward primer 5'-TCCTTCTGCCATCATGCCGA-3'; reverse primer 5'-TGCGGCTCTTAGGCGAAGGT-3' (Bioneer, Korea). 증폭된 DNA solution은 2% agarose gel에서 전기영동(100 V, 20분)하였고, ethidium bromide로 염색하였다.

#### 3) ELISA

유전자 다형성 분석을 시행한 환자 중 무작위로 60명을 선정하고, 환자군의 성별, 연령 구성을 고려하여 정상 대조군 55명을 선정하여 ELISA를 시행하였다. −70°C에 냉동 보관되었던 환자의 혈청을 실온에서 30분간 서서히 녹인 후 MIF의 농도를 ELISA kit (DMF00, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN)으로 측정하였다. MIF의 양을 측정하기위해 anti-human MIF antibody가 부착된 96-well plate에 혈청을 넣고 2시간 배양 후 완충액으로 4번 세척하였다. HRP conjugated antibody를 더한 후 실온에서 1시간 배양시키고 kit에 준비된 기질을 넣고 실온에서 30분간 배양시켰다. kit에 포함된 반응 중지액을 넣고 450 nm 자외선에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 13명의 베체트병 환자와 6명의 결절홍반 환자, 2명의 건선환자, 백반증 환자 4명의 다리부위에서 시행한 정상 피부조직 검체를 대상으로 하여 시행하였으며, 베체트병 환자의 경우 피부조직은 결절홍반양 병변으로부터 채취하였다. 면역조직화학 염색은 단클론 항체 mouse anti-human MIF (1 : 100, AF-289-PB, R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 시행하였다. 염색법은 ABC (Avidin-Biotin Complex) 기법을 참고하여 시행하였다. 조직을 파라핀에 고정하여 block을 만든 후 5 $\mu$m 두께로 절편한 후 특수 coating된 슬라이드에 붙인 뒤 실온에서 overnight incubation하였다. 절편이 있는 유리 슬라이드를 70°C hot chamber에서 20분간 incubate한 다음 xylene으로 탈파라핀화 시켰다. 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 10분간 microwave하여 epitope retrieval 과정을 거친 후 20분간 실온에서 서서히 식혔다. 실온에서 내인성 과산화효소의 활성을 저지하기 위해 3% $H_2O_2$ in methanol에 15분간 반응시킨 다음 protein blocking agent (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA)로 실온에서 30분간 block시켰다. 일차항체는 0.1% Tween 20 in PBS에서 희석하여 1 $\mu$g/ml 농도로 만들어 조직에 첨가하고 4°C에서 overnight 하였다. Biotinylated anti-mouse, goat secondary antibody (1 : 200, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA)를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 streptavidin peroxidase를 첨가해 실온에서 15분간 반응시켰다. AEC (87-8153, Zymed, South San Francisco, CA)로 적정시간 정색반응 시킨 후 Mayer's hematoxyilin으로 대조 염색하였다. 음성대조군은 일차항체를 넣지 않은 0.1% Tween 20 in PBS을 넣어 음성소견을 확인하고, isotype matched immunoglubulin으로 CD14 goat polyclonal antibody (AF982, R&D Systems, Minneapolis, MN)을 사용하여 특이적인 반응인지를 확인하였다.

### 3. 통계분석

Hardy-Weinberg equilibrium, Lewontin's D' (|D'|)과 linkage disequilibrium (LD) coefficient $r^2$은 R program version 2.2.0 (http://cran.r-project.org)을 이용하여 분석하였다. 환자와 대조군의 *MIF* 일배체형 분석은 PHASE program version 2.0.1을 사용하였고, 환자와 대조군의 유전자형과 대립유전자 그리고 일배체형의 빈도 비교는 SAS version 8.1 (SAS Institute, Cary, NC)의 $X^2$ 또는 Fisher exact test를 사용하였다[34]. 환자와 대조군에서 유전자형 간의 ELISA 값 차이는 SPSS (SPSS for Windows, ver. 11.0; SPSS, Chicago, IL)의 two-sided unpaired student's *t*-test와 one-way ANOVA test를 사용하여 분석하였다. 통계학적 유의 값은 $p<0.05$일 때 유의하다고 보았다.

## 결 과

### 1. 유전자형 분석

환자군과 대조군 사이에 MIF의 유전자 다형성의 빈도에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2).

### 2. RT-PCR

MIF의 유전자 다형성을 확인한 153명의 환자와 290명의 대조군을 대상으로하여 cDNA library에서 $\beta$-actin 발현이 확인된 환자 87명과 대조군 50명을 선별하였다. 이들을 대상으로 시행한 RT-PCR 결과, 환자들이나 정상대조군에서 MIF mRNA의 발현을 확인할 수 없었다.

### 3. ELISA

베체트병 환자에서 혈청 내의 MIF 발현정도를 ELISA를 통해 측정하였을 때(2.94±2.44 ng/ml), 정상대조군(5.45±5.45 ng/ml)에 비해 통계학적으로 유의하게 낮게 나타났다

Table 2. Genotype frequencies of *MIF* promoter in BD patients and normal control

| Polymorphism | | BD n=362 (%) | Control n=290 (%) |
|---|---|---|---|
| *MIF-173 G>C* | | | |
| | *G/*G | 224 (61.9) | 178 (61.4) |
| | *G/*C | 116 (32.0) | 99 (34.1) |
| | *C/*C | 22 (6.1) | 13 (4.5) |
| | *MIF-173 *G* | 0.779 | |
| *MIF-794 (CATT)$_{5-8}$* | | | |
| | *5/*5 | 78 (21.5) | 51 (17.6) |
| | *5/*6 | 120 (33.1) | 95 (32.8) |
| | *5/*7 | 49 (13.5) | 43 (14.8) |
| | *5/*8 | 4 (1.1) | 0 (0) |
| | *6/*6 | 63 (17.4) | 55 (19.0) |
| | *6/*7 | 38 (10.5) | 37 (12.8) |
| | *6/*8 | 1 (0.3) | 3 (1.0) |
| | *7/*7 | 9 (2.6) | 4 (1.4) |
| | *7/*8 | 0 (0.0) | 2 (0.7) |
| | *MIF-794 *5* | 0.454 | |
| | *MIF-794 *6* | 0.394 | |
| | *MIF-794 *7* | 0.145 | |
| | *MIF-794 *8* | 0.007 | |

Table 3. Serum concentration of MIF in BD patients and normal control

| | BD mean±SD (n) | Controls mean±SD (n) | *p* |
|---|---|---|---|
| MIF (ng/ml) | 2.94±2.44 (60) | 5.45±5.45 (55) | 0.002 |

(Table 3). 또한 환자군내에서도 스테로이드 치료를 받는 환자군(1.96±1.24 ng/ml)이 다른 환자군(3.30±2.67 ng/ml)에 비해 통계학적으로 유의하게 낮게 나타났으며(Table 4), 스테로이드 치료를 받지 않은 환자군 만을 정상대조군과 비교하였을 때도 정상에 비해 환자군에서 MIF의 발현 정도가 낮았다(Table 5). 그러나 유전자 다형성에 따른 혈청 내의 MIF 발현 정도를 비교해 본 결과, *MIF-173 G>C*, *MIF-794 (CATT)$_{5-8}$* 모두 혈청 내의 MIF 발현 정도에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 6).

### 4. 면역조직화학염색

피부 조직에 발현된 MIF를 면역조직화학염색으로 확인한 결과, 13명의 베체트병 환자 모두에서 표피의 각질세포와 염증세포, 피하지방층의 염증세포들의 세포질에 MIF의 발현이 심하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 베체트병과 비슷한 양상의 조직학적 소견을 보이는 원발성 결절홍반 환자의 피부조직을 같은 방법으로 염색하였을 때도 6명의 원발성 결절홍반 환자들 모두에서 동일하게 나타남을 알 수 있었다. 기존의 연구에서 밝혀진 바와 같이 건선환자에서도 표피층에 MIF의 발현이 나타나는 것을 확인할 수 있었으나, 건선환자에서는 피하지방층에서는 MIF가 발현되지 않았다. 백반증 환자의 정상 피부조직에서는 표피에서 기저층에만 약하게 MIF가 발현되었다(Fig. 1).

Table 4. Serum concentration of MIF in BD patients under steroid therapy and under no steroid therapy

| | Patients under steroid therapy mean±SD (n) | Patients under no steroid therapy mean±SD (n) | *p* |
|---|---|---|---|
| MIF (ng/ml) | 1.96±1.24 (16) | 3.30±2.67 (44) | 0.01 |

Table 5. Serum concentration of MIF in BD patients under no steroid therapy and normal control

| | BD mean±SD (n) | Controls mean±SD (n) | *p* |
|---|---|---|---|
| MIF (ng/ml) | 3.30±2.67 (44) | 5.45±5.45 (55) | 0.019 |

Table 6. Serum concentration of the MIF in BD patients & control according to the polymorphisms

| Polymorphisms | | BD mean±SD (n) | Controls mean±SD (n) |
|---|---|---|---|
| *MIF-173 G>C* *MIF-794 (CATT)$_{5-8}$* | *G/*G | 3.05±2.84 (36) | 4.98±4.51 (34) |
| | *G/*C | 2.60±1.70 (18) | 6.59±7.40 (17) |
| | *C/*C | 3.28±1.76 (6) | 4.54±2.95 (4) |
| | *5/*5 | 4.21±4.00 (13) | 6.42±4.97 (10) |
| | *5/*6 | 2.32±1.57 (20) | 7.42±8.59 (16) |
| | *5/*7 | 3.04±1.91 (7) | 4.67±3.08 (10) |
| | *5/*8 | 3.89 (1) | (0) |
| | *6/*6 | 2.48±1.60 (8) | 3.62±1.33 (9) |
| | *6/*7 | 2.61±2.21 (7) | 3.11±1.61 (6) |
| | *6/*8 | (0) | 1.97 (1) |
| | *7/*7 | 3.07±2.26 (3) | 8.43 (1) |
| | *7/*8 | (0) | 4.45 (1) |

## 고 찰

이전의 건강인을 대상으로 혈청내 MIF 단백질 발현을 측정한 연구에서 *MIF-173*C* allele이 있는 경우 유의하게 MIF의 양이 높게 나타난 것으로 밝혀졌으며, 이는 *MIF-173*C* allele이 있는 사람의 경우 MIF 단백질의 생산량이 더 많음을 시사한다[35]. 상피 세포주에서는 G 다형성이 MIF 발현과

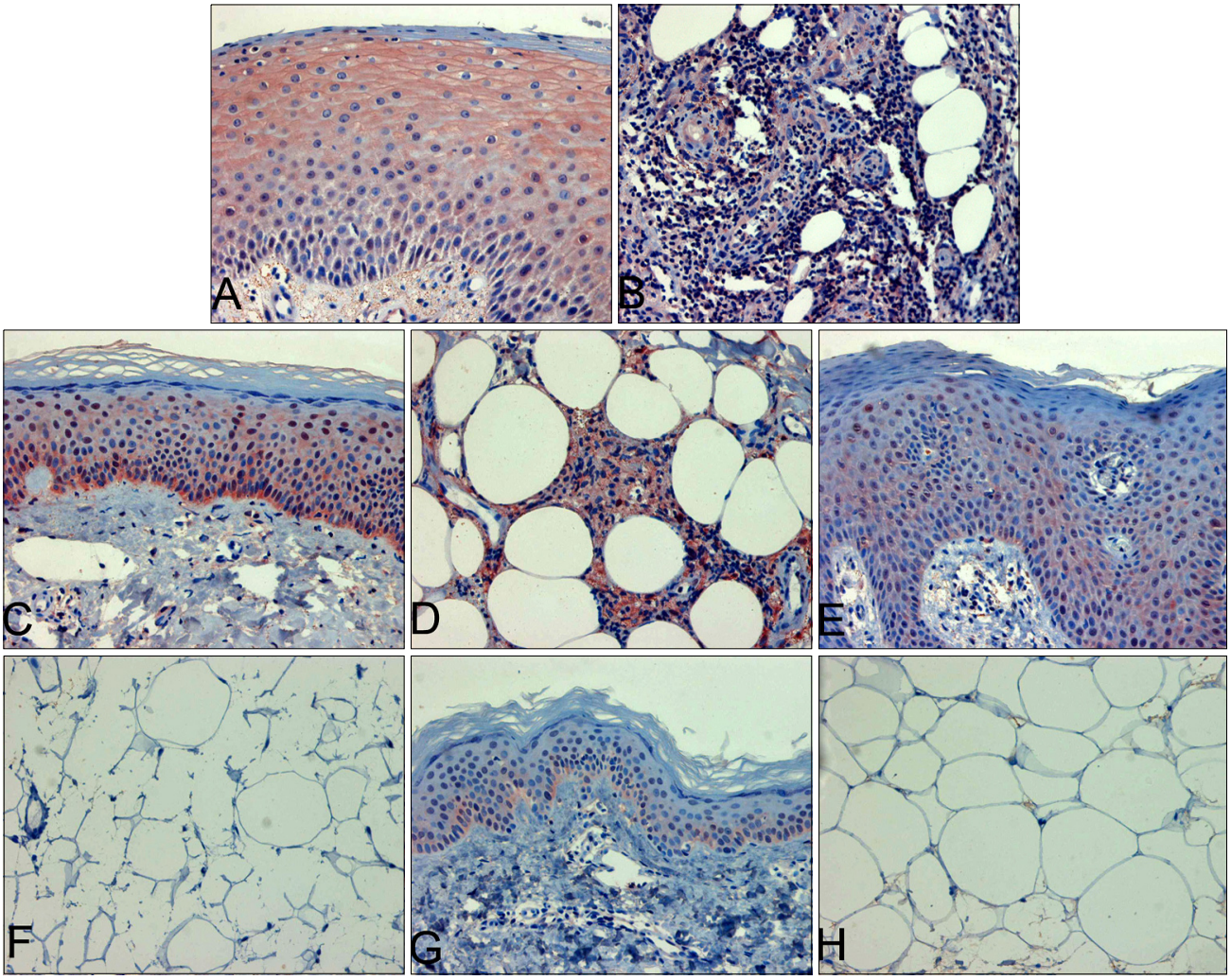


**Fig. 1.** Immunohistochemical staining for MIF (×200). (A) Behçet's disease, epidermis, (B) Behçet's disease, subcutaneous tissue, (C) Erythema nodosum, epidermis, (D) Erythema nodosum, subcutaneous tissue, (E) Psoriasis, epidermis, (F) Psoriasis, subcutaneous tissue, (G) Normal, epidermis, (H) Normal, subcutaneous tissue

관련이 있는 것으로 나타났으나, *MIF-173*C*를 가진 T 림프아구 세포주에서는 기저상태에서 MIF 발현이 증가되어 있는 상반된 결과를 나타냈다. 이러한 발현의 차이는 MIF-173 element와 전사인자의 상호작용의 차이에 의한 것으로 생각된다[35].

이전 보고들에서 *MIF-173 G>C* 다형성이 신증후군, 궤양성 대장염, 유육종증, 원형탈모, 아토피피부염, 류마티스성 관절염 등과 관련되어 있고, *MIF-794* $[CATT]_{5\text{-}8}$ 다형성은 건선, 아토피피부염과 각각 관련이 있는 것으로 밝혀진 바 있다[19-26]. 그러나 한국인을 대상으로 한 본 연구에서는 베체트병과 *MIF* 유전자의 두 유전자 다형성과의 유의한 연관을 찾을 수가 없었다. 또한 환자군에서나 대조군 모두에서 mRNA 발현을 확인할 수 없었다. 동일한 primer를 사용하여 건선환자를 대상으로 시행한 다른 연구의 경우[36], 건선환자와 정상대조군 모두에서 MIF RNA의 발현을 보였다. 그러나 본 연구에서 사용한 RT-PCR 기법의 한계로 인해 T 세포내에 존재하는 MIF가 검출되지 않았을 가능성도 배제할 수는 없다.

MIF 단백질은 베체트병 환자의 혈청과[29], 신경베체트병 환자에서 뇌척수액 내에서[30,37] 증가되어 있다는 보고가 있었고, 이를 바탕으로 MIF 단백질의 발현 정도가 베체트병의 질병활성도와 관련이 있을 수 있다는 주장이 있었다[29]. 혈청내 MIF 양은 질병의 심한 정도와 대체로 비례하는 것으로 알려져 있다. 다양한 종류의 포도막염을 대상으로 한 연구에서 Kitaichi 등[30]은 베체트병 환자의 혈청 내 MIF가 증가되어 있음을 밝힌바 있다. 이러한 포도막염 환자들에서는 광범위하고 심한 혈관염으로 인한 혈관 내피세포의 손상이 일어나므로, 혈청내 MIF는 망막 혈관의 내피세포

에서 기원한 것으로 생각할 수 있다[30]. 또한 혈관염은 신경베체트병의 주된 병리적 원인이므로 신경베체트병 환자의 뇌척수액에서도 MIF 농도가 증가될 것으로 예상할 수 있다. 신경베체트병 환자의 뇌척수액내 MIF 농도가 뇌척수액내의 세포 수와 연관되어 있어, MIF 농도가 혈관내피세포 이외에도 T 세포나 대식세포와도 연관이 있을 수 있다[37]. 또한 MIF는 자연세포독성세포(NK cell)의 기능을 저하시켜 포도막염 환자의 안후부 체액에서 일어나는 면역반응을 조절하는 것으로 알려져 있다[38]. 그러나 기존 보고들과는 상반되게 본 연구에서는 베체트병 환자의 혈청내 MIF가 낮게 나타났다. 원인이 되는 기전은 정확히 알 수 없으나, 이전의 보고들에서 글루코코르티코이드와 MIF간의 관련성이 밝혀진 바 있으며, 글루코코르티코이드의 농도에 따라 MIF의 발현이 다르게 나타난다는 보고도 있었다. 다른 사이토카인들과는 달리 MIF는 이중적으로 글루코코르티코이드에 의해 조절되는데, 고농도의 글루코코르티코이드에 의해서는 억제되고 저농도에서는 유도된다[6,20,39]. 본 연구에서 ELISA를 시행한 환자들 중 최근 1개월 이내에 스테로이드를 투여받은 환자는 16명이었으며, 이들에서 MIF가 다른 환자들에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다. 이러한 결과로 볼 때 스테로이드의 사용이 MIF의 발현에 영향을 주었을 것으로 생각할 수 있으나, 대부분의 환자에서 스테로이드 이외에 다른 약물을 함께 투약한 점에 비추어 다른 약물에 의해 영향을 받았을 가능성도 배제할 수는 없다. 또한 본 연구에 참여한 환자 60명 중 35명이 포도막염이 있었으며 4명의 환자에서 신경학적 증상이 있었으나, 이들 각각의 환자군과 다른 환자군 사이에 혈청내 MIF는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 Kitaichi 등[30]이 포도막염 환자를 대상으로 시행한 기존 연구결과와는 다른 점인데, Kitaichi 등의 연구에서는 최초 내원 시 환자를 대상으로 하여, 스테로이드나 다른 면역 억제제를 복용하지 않은 상태에서 시행한 연구로서, 약물에 의한 MIF 발현의 변화를 배제할 수 있었을 것으로 생각한다. 본 연구에서는 앞서 밝힌 바와 같이 약물에 의한 영향으로 인해 기존 연구와는 다른 결과를 보였을 것으로 생각한다. 또한 신경베체트병 환자의 뇌척수액에서 시행한 Niino 등[37]의 연구는, MIF를 발현하는 세포들이 맥락얼기, 뇌실막세포, 뇌하수체 등의 뇌에 있는 세포들로 생각되고, 혈액뇌장벽에 의해 뇌척수액내의 MIF가 말초혈액에까지 영향을 미치기 어려울 것으로 생각되어, 혈청내의 MIF 발현에는 큰 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

MIF 단백질은 피부에서 각질형성세포와 내피세포에서 발현되는 것으로 알려져 있으며[40], 활성화된 T 세포나 단핵구, 대식세포 등의 염증세포에 의해서도[4] 발현되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 기존에 알려진 바와 같이, 베체트병 환자의 표피의 각질세포와 염증세포, 피하지방층의 염증세포들의 세포질에서 MIF의 발현을 확인할 수 있었으며, 원발성 결절홍반 환자에서도 동일한 양상의 발현을 보였다. 이는 베체트병 환자의 피부조직검사가 결절홍반양 병변에서 이루어졌으므로 원발성 결절홍반 환자에서와 같은 소견을 보였을 것으로 생각한다. 건선 환자에서는 병변의 조직학적인 변화가 표피에 주로 나타나므로, 기존 연구[17,36]에서와 같이 MIF가 표피에만 국한된 분포를 보인 것으로 생각한다. MIF는 정상인에서도 각질형성세포의 세포질에서 발현되는 것으로 알려져 있으며[40], 본 연구에서도, 알려진 바와 마찬가지로 표피의 각질형성세포에서 기저층을 중심으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나 발현의 정도는 베체트병 환자나 결절홍반, 건선 등에서 보다는 약하게 나타났다.

## 결 론

본 연구에서 *MIF* 유전자의 *-173*에 위치한 C allele 또는 *-794 CATT* 다형성이 베체트병과 관련되어 있다는 증거는 확인할 수 없었다. 그러나 혈청내 MIF 단백질이 베체트병 환자에서 정상인보다 감소되어 있음을 확인할 수 있었으며, 스테로이드 치료를 받는 환자에서 통계학적으로 유의하게 더 감소해 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 베체트병 환자의 피부병변에서 MIF 단백질의 발현이 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 바탕으로 in vitro 실험에서와 마찬가지로 in vivo 실험에서도 스테로이드가 MIF의 발현에 영향을 미침을 알 수 있었고, 베체트병에서 피부증상 발현에 MIF가 관련이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 스테로이드 치료를 받지 않은 환자군도 정상인보다 낮은 혈청내 MIF 발현을 보여, 향후 MIF를 조절하는 인자들과 MIF에 의해 조절되는 여러 인자들에 대한 다양한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 또한 MIF 외에도, 베체트병과 선천면역에 관련된 여러 다른 유전자들과의 관련성에 대한 연구도 필요할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌


1. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science 1966; 153:80-82
2. Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. J Immunol 2001;166:747-753
3. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:7849-7854
4. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 1994;179:1895-1902
5. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, et al. Insulin secretion is regulated by the

glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:4782-4787
6. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. Nature 1995;377:68-71
7. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. Nature 1993;365:756-759
8. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. J Exp Med 1999;189:341-346
9. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:11383-11388
10. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. Nat Med 1997;3:320-323
11. Lan HY, Bacher M, Yang N, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Metz C, et al. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. J Exp Med 1997;185:1455-1465
12. Lan HY, Yang N, Brown FG, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in human renal allograft rejection. Transplantation 1998;66:1465-1471
13. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. Arthritis Rheum 1999;42:1601-1608
14. Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. J Immunol 1997;158:5514-5517
15. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganelli S, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2003;62:460-464
16. Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, Mizue Y, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. Biochem Biophys Res Commun 1997;240:173-178
17. Shimizu T, Nishihira J, Mizue Y, Nakamura H, Abe R, Watanabe H, et al. High macrophage migration inhibitory factor (MIF) serum levels associated with extended psoriasis. J Invest Dermatol 2001;116:989-990
18. Radstake TR, Sweep FC, Welsing P, Franke B, Vermeulen SH, Geurts-Moespot A, et al. Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum 2005;52:3020-3029
19. Amoli MM, Donn RP, Thomson W, Hajeer AH, Garcia-Porrua C, Lueiro M, et al. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with sarcoidosis in biopsy proven erythema nodosum. J Rheumatol 2002;29:1671-1673
20. Berdeli A, Mir S, Ozkayin N, Serdaroglu E, Tabel Y, Cura A. Association of macrophage migration inhibitory factor -173C allele polymorphism with steroid resistance in children with nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol 2005;20:1566-1571
21. Donn RP, Plant D, Jury F, Richards HL, Worthington J, Ray DW, et al. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. J Invest Dermatol 2004;123:484-487
22. Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:1782-1785
23. Flex A, Pola R, Serricchio M, Gaetani E, Proia AS, Di Giorgio A, et al. Polymorphisms of the macrophage inhibitory factor and C-reactive protein genes in subjects with Alzheimer's dementia. Dement Geriatr Cogn Disord 2004;18:261-264
24. Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M. Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:1014-1018
25. Nohara H, Okayama N, Inoue N, Koike Y, Fujimura K, Suehiro Y, et al. Association of the -173 G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis. J Gastroenterol 2004;39:242-246
26. Shimizu T, Hizawa N, Honda A, Zhao Y, Abe R, Watanabe H, et al. Promoter region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is strong risk factor for young onset of extensive alopecia areata. Genes Immun 2005;6:285-289
27. Direskeneli H. Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. Ann Rheum Dis 2001;60:996-1002
28. Hirohata S, Kikuchi H. Behcet's disease. Arthritis Res Ther 2003;5:139-146
29. Kim S, Kim S, Kim H, Park M, Yoon C, Kim W, et al. Elevated serum levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with Behcet's disease. J Korean

Rheum Assoc 2004;11:205-211
30. Kitaichi N, Kotake S, Sasamoto Y, Namba K, Matsuda A, Ogasawara K, et al. Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:247-250
31. Denkinger CM, Metz C, Fingerle-Rowson G, Denkinger MD, Forsthuber T. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2004;52:389-400
32. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. Lancet 1990;335:1078-1080
33. Mizushima Y, Inaba G, Mimura Y, Ohno S. Diagnostic criteria for Behcet's disease in 1987, and guideline for treating Behcet's disease. Saishin Igaku 1988;43:391-393
34. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. Am J Hum Genet 2003;73:1162-1169
35. Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, Zeggini E, Lunt M, et al. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum 2002;46:2402-2409
36. Steinhoff M, Meinhardt A, Steinhoff A, Gemsa D, Bucala R, Bacher M. Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. Br J Dermatol 1999;141:1061-1066
37. Niino M, Ogata A, Kikuchi S, Tashiro K, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and neuro-Behcet's disease. J Neurol Sci 2000;179:127-131
38. Taguchi C, Sugita S, Tagawa Y, Nishihira J, Mochizuki M. Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis. Br J Ophthalmol 2001;85:1367-1371
39. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. Clin Exp Immunol 2001;123:309-314
40. Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immmunohistochemical localization. FEBS Lett 1996;381:199-202