

전신성홍반성루푸스에서 자가항체에 의한 호중구 세포자멸사의 증가

원동일 · 서장수 · 김현숙

경북대학교 의과대학 진단검사의학교실, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

Autoantibody-Induced Apoptosis of Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus Patients

Dong-Il Won, M.D., Jang Soo Suh, M.D., and Hyon-Suk Kim, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu; Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Background : In patients with systemic lupus erythematosus (SLE), serum factors play a role in the apoptosis and necrosis of neutrophils. We intended to verify that autoantibodies including anti-dsDNA antibody are one of the factors. We also investigated the potential usefulness of simultaneous flow cytometric measurement of cytotoxicity and autoantibody binding to neutrophils in SLE sera for evaluation of disease activity.

Methods : A total of 228 sera from 48 patients with lupus nephritis (LN), 19 patients with SLE without LN, 35 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 40 healthy males were studied. Whole blood from healthy males mixed with test sera was incubated. Autoantibody binding, apoptosis and necrosis of neutrophils were measured by flow cytometry using IgG-FITC and 7-aminoactinomycin D after a 20-hour incubation period or after adjustments of incubation conditions. The results were expressed as the test/healthy control ratio of measured values, and the correlations between these results and anti-dsDNA antibody levels were investigated.

Results : IgG mean fluorescence intensity (MFI) ratio was 1.0 ± 0.3 , 1.6 ± 1.6 , 2.0 ± 1.5 and 4.8 ± 7.5 in the healthy, RA, SLE and LN group, respectively, and showed a significant increase in the LN group when compared with the healthy group ($N=20$ in each group, $P<0.05$). Apoptosis & necrosis ratio was 1.0 ± 0.2 , 1.0 ± 0.5 , 1.6 ± 1.0 and 2.6 ± 1.9 in each of the above 4 groups, and showed a significant increase in the LN group when compared with the healthy ($P<0.005$) and RA group ($P<0.01$). By immunofluorescence microscopy, increased nuclear reactivities on neutrophils by autoantibody binding were observed in 12 (60%) of 20 LN sera. All three correlations between anti-dsDNA antibody level, apoptosis & necrosis ratio and IgG MFI ratio were significant ($P<0.0005$). Preincubation with DNA extracts decreased both IgG MFI ratio and apoptosis & necrosis ratio significantly ($N=25$, $P<0.05$).

Conclusions : Our findings confirm the previous reports of increased neutrophil apoptosis in the peripheral blood of patients with SLE. This study indicates that anti-dsDNA antibody or other antinuclear antibodies in sera are associated with an active increase in the apoptosis and necrosis of neutrophils as well as simple binding to neutrophils. This may suggest that autoantibodies increase the exposure of autoantigen DNA and exacerbate autoimmunity in the pathogenesis. Although further studies are needed, we suggest that measuring the cytotoxicity and autoantibody binding to neutrophils in SLE serum simultaneously by flow cytometry should be a useful test for evaluation of disease activity. (*Korean J Lab Med 2004; 24: 405-14*)

접 수 : 2004년 7월 19일

접수번호 : KJLM1776

수정본접수 : 2004년 10월 21일

교신저자 : 김 현 숙

우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134

연세의료원 진단검사의학과

전화 : 02-361-5863, Fax : 02-364-1583

E-mail : kimhs54@yumc.yonsei.ac.kr

Key Words : *lupus, Anti-dsDNA antibody, Autoantibody, Lupus nephritis, Neutrophil, Apoptosis, Necrosis*

서 론

말초혈액에서 순환중인 호중구는 수명이 수 시간밖에 되지 않으며, 이후 비장이나 간으로 들어가 세포자멸사(apoptosis)를 거쳐 죽게 된다. 세포자멸사가 일어난 호중구는 항호중구세포질항체(anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 연관 질환과 전신성 홍반성루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)같은 자가면역질환에서 면역원의 주요 공급원으로 알려져 있다[1]. 세포자멸사는 세포막 투과도의 증가와 세포막 지질의 변화 등 세포막에 다양한 변화를 일으킨다[2]. 호중구에서는 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 등의 시토킨(cytokine) 전처치없이 장시간 배양만으로 자발적인 세포자멸사가 유도되는데, 특히 세포막에 ANCA 항원이 표현되므로[1, 3, 4] 자멸사 호중구(apoptotic neutrophils)를 이용하여 세포내 항원에 대한 자가항체를 검출할 수 있다[5].

SLE에서 어떤 자가항체는 세포내로 침투하여 세포내 혹은 핵내 항원에 결합하여[6], 세포기능을 변화시키거나 세포자멸사에 대한 부신호(accessory signal)를 유발하여 세포자멸사를 유도한다고 한다[7]. 생리적인 자가항체는 자가반응성 림프구를 자멸사시켜서 면역관용을 유지하고 자가면역질환을 예방하는 역할을 한다[8]. 그러나 자가항체가 친화 성숙(affinity maturation)을 하게 되면 병원성 항체(antibody, Ab)로 작용하고[9], 세포자멸사를 항진시켜 세포자멸사 소체(apoptotic body)로부터 과도하게 자가항원이 노출되면 면역관용에 영구적인 손상을 초래한다. 즉, 다량의 nucleosome이 자가반응성 T 세포에 루푸스 특이 자가항원을 제공하면, 유전적 소인이 있는 사람의 경우 다클론성 B 세포 자극이 일어나고 항 dsDNA 항체를 포함한 자가항체가 형성되어 자가면역질환이 유도되어 지속된다[10].

SLE 환자의 말초혈액에서는 순환중인 호중구[10, 11], 림프구[12, 13], 단구[14]의 세포자멸사가 증가되어 있다고 보고되고 있다. 이는 단구의 청정 기능의 장애가 한 원인이며, 혈청내 요소가 단구의 포식작용을 저해하는 것으로 추측하였으나, 그 요소와 정확한 기전이 무엇인지 아직 불확실하다[15]. 또한 포식세포가 인식하는데 필요한 분자나 수용체가 결핍되어 포식작용에 장애가 생기는 기전도 제시되고 있는데 특히, 세포의 기질 분자에 대한 표면 수용체인 CD44의 표현이 호중구에 감소되어 대식세포의 인식 능력과 청정 기능에 지장을 준다는 최근 보고도 있다[16].

대식세포의 청정 기능의 장애가 혈구의 세포자멸사를 증가시킨다는 가설 외에, 자가항체가 직접 세포내로 침투하여 세포자멸사를 촉진시킨다는 가설도 있는데, 이런 작용을 하는 자가항체의 특이성으로는 항 dsDNA 항체[8, 9, 17], 항 RNP 항체[18], 항 SSB/La 항체[19] 등이 보고되고 있다.

SLE에서 자가항체와 루푸스신염(lupus nephritis, LN)의 관계를 설명하는 여러 가설이 있다. 일부 항 dsDNA 항체가 cardiolipin과 같은 다른 자가항원과 교차반응을 하듯이[20, 21] 자가항체가 조직 항원에 교차반응으로 직접 결합하여 면역 침전물을

형성할 수 있는데[22], 예를 들면 신장에서 자가항체가 사구체 기질과 기저막 항원뿐만 아니라 사구체 간질세포와 내피세포에 직접 결합하여 침착과 염증을 유발한다고 한다[23, 24]. 한편 nucleosome의 유리가 SLE의 유도와 신장 병변의 시작 모두에 중요하며[25], nucleosome이 anti-chromatin Ab와 복합체를 형성하여 heparan sulfate를 통하여 사구체 기저막에 부착하여 LN을 유발한다고 하였다[26]. 또한, nucleosome중 양전하인 histone 성분이 사구체 모세혈관 벽의 음전하 부위에 결합되면 이식 항원(planted antigen)으로 작용하여 여기에 순환중인 항 dsDNA 항체 혹은 anti-nucleosome Ab가 결합한다고 한다[25].

한편, SLE에서 호중구가 림프구나 단구보다 수적인 면이나 생존 기간 면에서 더 중요하다고 하였다[15]. 저자들은 자가면역질환 환자의 혈청과 정상인 호중구의 장시간 배양 실험을 통해 세포내 항원에 대한 ANA, ANCA 등의 자가항체의 반응을 조사한 바 있는데, SLE에 대한 민감도가 95%로 높았고 호중구에 대한 IgG-FITC의 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI) 분석에서 강양성군은 루푸스신염이 동반되어 있었으므로, MFI 정량 분석도 임상적으로 의의가 있었다. 이 실험 결과에 대한 설명으로 SLE 자가항체가 호중구의 세포자멸사를 촉진시키고 이런 호중구는 세포막 투과도가 증가하여 다시 세포내로 자가항체 투과와 결합이 더욱 증가하기 때문인 것으로 추측하였다[5].

본 연구에서는 SLE 환자에서 호중구에 대한 세포자멸사와 괴사 등 세포독성과 자가항체 결합의 증가가 혈청 성분에 의한 것인지 알아보기 위하여 1) SLE 혈청과 배양한 건강한 호중구의 세포자멸사 및 괴사가 건강한 혈청보다 증가하는지, 2) SLE 혈청에서 배양한 호중구에 자가항체 결합이 증가한다면 세포자멸사, 괴사와 관련이 있는지 알아보고, 3) 이런 현상의 이유로 혈청 요인, 특히 항 dsDNA 항체와 같은 자가항체의 역할을 증명하고자 하였다. 또한, 이와 더불어 질병 활성도를 평가하기 위한 검사로서 유세포분석법으로 SLE 혈청에서 호중구에 대한 세포독성과 자가항체 결합을 동시에 측정하는 것이 유용한지 그 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

경북대학교병원 류마티스내과에 내원한 루푸스신염 환자 48명(남:여 5:43, 28±9세), 루푸스신염이 없는 SLE 환자 19명(모두 여성, 31±10세), 질환 대조군으로서 류마티스관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자 35명(남:여 5:30, 42±21세) 및 건강 대조군으로서 수혈 경력이 없는 30대의 건강한 남성 40명(33±9세)에게서 얻은 총 228개의 혈청을 대상으로 하였다. SLE 환자 중 요 단백이 500 mg/일 이상이거나, 요시험지붕 검사에서 2회 이상 1+ 이상의 단백뇨가 있는 경우 루푸스신염군으로 분류하였다.

2. 방법

1) 전혈 배양

기질로 사용할 호중구는 따로 분리하지 않고, 대신 유세포분석시 호중구 표지자 항체가 결합된 세포만 수집(acquisition)하는 electronic gating 기법을 사용하였다. 시험하고자 하는 혈청 200 μ L를 Falcon 시험관에 넣고 antibiotic-antimycotic (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 1%를 첨가하였다. 기질 호중구로서 혈액형이 O형인 30대 건강 남성의 말초혈액을 heparin 시험관에 채혈하여 전혈을 10 μ L씩 분주하였다. Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) 이중 염색 실험에서는 dextran 침강법과 plasma-Percoll (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) discontinuous density-gradient centrifugation법으로 호중구만 분리하여 분주하였다. 이 혼합물을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양하였다. 매 일괄(batch) 실험마다 건강 대조로서 6명의 건강한 혈청을 함께 시험하였다.

2) 면역형광 염색

배양 후 전혈을 phosphate buffered saline 3 mL로 4회 세척하였다. 호중구 gating을 위한 항체로 CD13-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 혹은 CD45-RPE-Cy5 (Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하였다. 세포내 항원의 표현을 측정하기 위하여 호중구의 대표적인 세포내 항원인 MPO에 대한 항체 MPO-PE (Dako)를 사용하였다. 세포자멸사 및 괴사를 측정하기 위하여 Fas 수용체에 대한 항체인 CD95-FITC (Dako)와 핵산 염료인 7-aminoactinomycin D (7-AAD, Becton Dickinson)를 사용하였다. 세포자멸사 및 괴사가 일어난 세포는 세포막 변화로

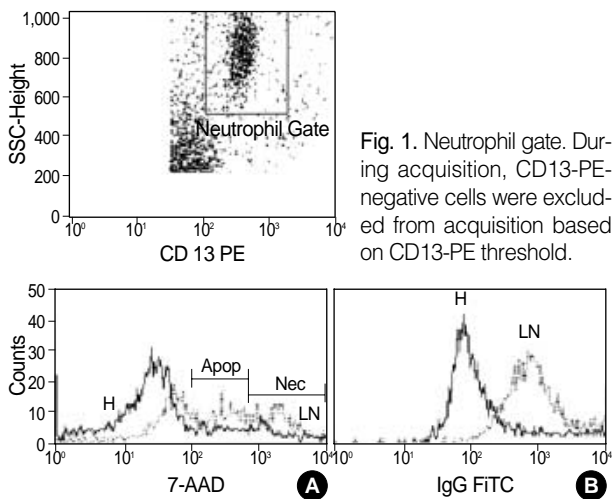


Fig. 3. The examples of fluorescence histogram: (A) 7-AAD, (B) IgG-FITC. Solid line represents a healthy case and dotted line a lupus nephritis case. In 7-AAD histogram Apop and Nec regions represent apoptotic and necrotic neutrophils, respectively. Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; H, healthy; LN, lupus nephritis.

7-AAD가 침투되어 핵에 염색이 되고, 그 형광은 유세포분석기 3번째 형광(fluorescence 3, FL3) 지표(channel)로 검출할 수 있다. 세포자멸사 및 괴사 측정을 위한 다른 방법으로, annexin V-FITC와 PI (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)로 이중 염색하였다. 자가항체의 결합을 측정하기 위하여 FITC-conjugated goat anti-human IgG [H+L, F(ab')₂ fragment] (Jackson Immuno-research Lab., West Grove, PA, USA)를 사용하였다. 시약 항체의 비특이결합을 평가하기 위하여 각 제조사별 isotype-matched irrelevant IgG를 사용하였다.

목적에 따라 시약 항체들을 형광이 중복되지 않도록 조합하여 세척한 전혈과 4°C에서 30분간 항온 후 1회 더 세척하고 7-AAD를 넣고 4°C에서 10분 항온 후 유세포분석기로 측정하였다. 적혈구를 용혈시키지 않는 비용혈전혈법(unlysed whole blood preparation)을 사용하였다.

3) 유세포분석(flow cytometry, FCM)

유세포분석기는 FACSCalibur를 사용하였고 Cellquest 프로그램 사용하여 수집 및 분석하였다. 검사 전 Calibrite bead와 Facscomp 프로그램으로 장비를 조정하였다(모두 Becton Dickinson). 수집시 관문(acquisition gate)의 역치(threshold)를 FL2 혹은 FL3으로 조정하여 CD13-PE 혹은 CD45-RPE-Cy5가 결합된 세포의 events만 수집하였다. Scatter plot과 CD13-PE/side scatter (SSC) plot 혹은 CD45-RPE-Cy5/SSC plot에서 호중구 영역으로 gating하여 각 검체 당 5,000 events를 수집하였다(Fig. 1).

수집 후 분석에서, 호중구에 대한 해당 시약 항체의 형광 히스

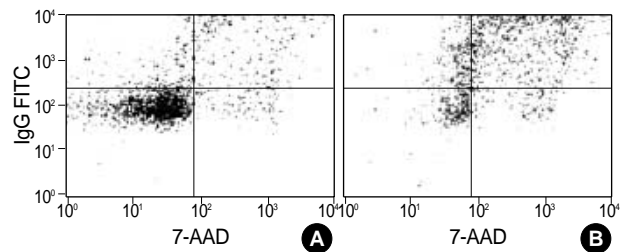


Fig. 2. The examples of 7-AAD/IgG-FITC plot: (A) a healthy case, (B) a lupus nephritis case. Abbreviation: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

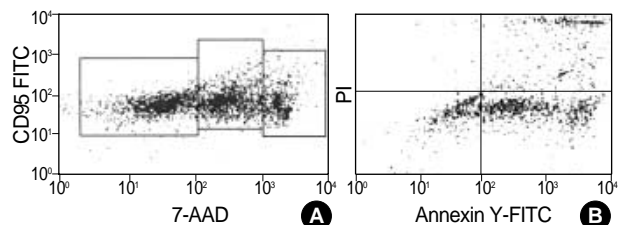


Fig. 4. A representative case of lupus nephritis. (A) 7-AAD/CD95-FITC plot. CD95 expression was similar in 3 groups. (B) Annexin V-FITC/PI plot. Annexin V⁺PI⁻ and annexin V⁺PI⁺ were regarded as apoptotic and necrotic, respectively. Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; PI, propidium iodide.

토그래피 정규분포에 가까운 경우 기하평균을, 그렇지 않은 경우 중간치(median)를 MFI로 하였다. 일괄 실험간에 기질 호중구의 변이에 따른 각 시약 항체의 반응성을 표준화하기 위해 평균형광강도 비(MFI ratio)를 사용하였는데, 이것은 시험 혈청의 MFI를 동시에 시험한 6개 건강 대조의 MFI 평균치로 나눈 값이다. 세포자멸사와 괴사에 대한 측정치를 표준화하기 위해, 마찬가지로 7-AAD 히스토그램에서 세포자멸사군과 괴사군의 합인 백분율에 대하여 시험 혈청의 값을 건강 대조의 값으로 나누어 세포자멸사와 괴사 비(apoptosis & necrosis ratio)를 구하였다. 자가항체의 결합과 세포자멸사와 괴사를 동시에 측정하기 위하여 IgG-FITC, CD13-PE 및 7-AAD로 삼색 염색 후 7-AAD/IgG-FITC plot에서 분석하였다(Fig. 2, 3).

7-AAD 히스토그램에서 호중구를 3개 군으로 나누었고, 7-AAD/CD95-FITC plot에서 세 군간 CD95 표현은 큰 차이가 없었지만(Fig. 4A), 7-AAD 반응이 가장 약한 군은 생존군, 중간 군은 세포자멸사군, 강한군은 괴사군으로 분류하였다. 세포자멸사와 괴사 측정을 위한 다른 방법으로, 순수 분리한 호중구에 대한 annexin V-FITC/PI plot에서 호중구의 세포자멸사(annexin V⁺PI⁻)와 괴사(annexin V⁺PI⁺)의 비율을 구하였다(Fig. 4B).

4) 차단 실험(blocking experiments)

혈청내 항 dsDNA 항체를 흡착 제거하기 위하여 LN 환자 혈청을 DNA 추출물로 전향온처리(preincubation)한 후 이 혈청의 호중구에 대한 반응을 측정하였다. Genomic DNA의 분리는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. Microcentrifuge 시험관에 건강인 전혈 300 μ L와 lysis 용액 1 mL를 가하여 적혈구를 용혈시키고 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 백혈구층만 남을 때까지 이 과정을 반

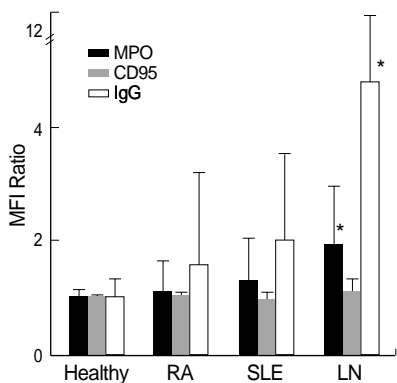


Fig. 5. The MPO, CD95 and IgG reactivity of healthy donor neutrophils incubated with the sera of 4 groups for 20 hours. Data are means \pm SD of 20 sera, respectively. See the material and methods for the MFI ratio. * P <0.05 versus healthy group. Abbreviations: RA, rheumatoid arthritis, SLE, systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis; MPO, myeloperoxidase; MFI, mean fluorescence intensity.

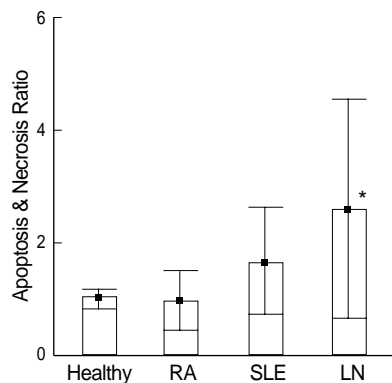


Fig. 6. Apoptosis & necrosis ratio detected by 7-aminoactinomycin D. Healthy donor neutrophils were incubated with the sera of 4 groups for 20 hours. Data are means \pm SD of 20 sera, respectively. See the material and methods for the apoptosis & necrosis ratio. * P <0.05 versus healthy group. Abbreviations: RA, rheumatoid arthritis, SLE, systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis.

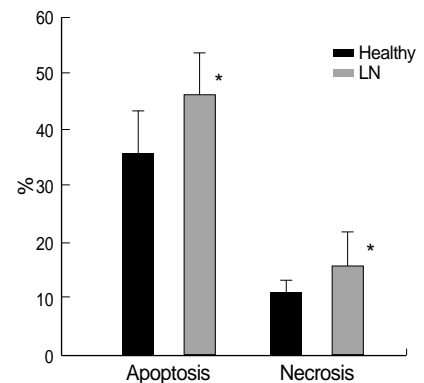


Fig. 7. Percentage of apoptosis and necrosis detected by annexin V and propidium iodide. Healthy donor neutrophils were incubated with healthy and LN sera for 20 hours. Data are means \pm SD of 10 sera, respectively. * P <0.05 versus healthy group. Abbreviation: LN, lupus nephritis.

복한 후 1 mL의 nucleic lysis 용액을 가한 후 1 mL의 단백질 침전 용액을 넣어 원심분리하여 단백질을 제거하였다. Isopropanol 1.5 mL를 첨가하여 DNA를 침전시키고 10,000 g에서 3분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 1 mL의 70% ethanol을 넣어 세척 후 건조시켰다. 분리된 DNA는 시험관당 약 5-15 μ g에 해당되며, 이 양은 대략 10 international units (IU) 가량의 항 dsDNA 항체를 중화할 수 있는 양이었다(자료 미제시). 분리된 DNA가 들어있는 시험관은 실험전까지 4°C에서 보관하였다. 이 시험관에 시험할 혈청 100 μ L를 가하고 37°C에서 1시간 동안 전향온처리하였다. 원심분리 후 상청액을 취하여 적당한 배지 양이 되도록 건강인 혈청 100 μ L와 혼합한 다음, 이후 마찬가지로 방법으로 호중구와 배양하였다. 전향온처리를 하지 않은 대조군으로 같은 검체의 LN 혈청 100 μ L를 건강인 혈청 100 μ L와 혼합하여 함께 시험하여 비교하였다.

5) 면역형광 현미경법(immunofluorescence microscopy, IFM)

상기와 같이 시험관내에서 배양한 전혈을 lysis 용액으로 적혈구를 용혈시키고 4회 세척하였다. IFM용 anti-human immunoglobulin-FITC (Sigma-Aldrich)로 염색하고 1회 세척 후 Shandon Cytospin 2 Cyto centrifuge (Thermo, Woburn, MA, USA)로 슬라이드에 백혈구 박막을 만들고 형광현미경으로 관찰하였다.

6) 항 dsDNA 항체 농도 측정

¹²⁵I-labelled dsDNA 추적자를 사용하는 Trinity anti-dsDNA Kit (Trinity Biotech, Bray, Ireland)를 사용하여 방사면역법으로 측정하였다. 추적자와 시험 혈청을 항온배양 후 면역글로불린이 결합된 추적자를 ammonium sulfate로 침전시켰다. 원심분리 후 상청액을 버리고 남아 있는 추적자의 양이 항 dsDNA 항체의

농도에 직접적으로 비례하는 원리를 이용하여 측정하였다.

7) 통계

자료는 평균±표준편차로 나타내었다. 여러 군간 비교에는 분산분석 다중비교(Scheffe's test)를, 두 군간 비교는 Mann-Whitney test를 사용하였으며, 쌍을 이룬 두 군의 비교시 Wilcoxon signed ranks test를 하였다. $P<0.05$ 이면 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 각 군 혈청과 20시간 배양한 건강인 호중구에서 각 표지자의 측정

1) MPO와 CD95의 표현 및 IgG 결합 측정

SLE와 LN 환자의 혈청의 호중구에 대한 영향을 조사하기 위하여, 네 군 즉, 건강인, RA, SLE 및 LN군으로부터 얻은 각 20

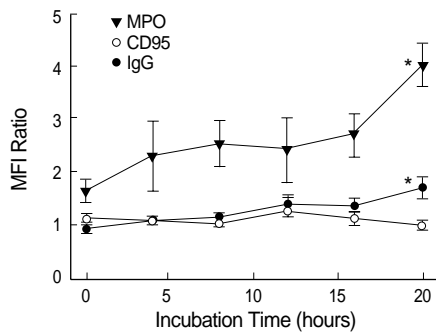


Fig. 8. The sequential changes of MPO, CD95 and IgG reactivity by lupus nephritis sera. Data are means ± SD of 5 sera. * $P<0.05$. Abbreviations: MPO, myeloperoxidase; MFI, mean fluorescence intensity.

혈청에서 건강인 호중구를 20시간 배양한 후 호중구의 MPO와 CD95의 표현과 IgG 결합에 대하여 측정하였다. 네 군에서 CD95 MFI ratio는 각각 1.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.1 , 1.1 ± 0.2 로 각 군간 유의한 차이를 발견할 수 없었다($P=0.15$). MPO MFI ratio는 각각 1.0 ± 0.1 , 1.1 ± 0.5 , 1.3 ± 0.7 , 1.9 ± 1.0 으로 LN군에서 건강인군에 비하여 유의하게 증가하였는데($P<0.01$), MPO 표현의 증가는 호중구 자멸사 증가로 인한 세포내 항원의 표현의 증가를 뜻한다. IgG MFI ratio는 각각 1.0 ± 0.3 , 1.6 ± 1.6 , 2.0 ± 1.5 , 4.8 ± 7.5 로 LN군에서 건강인군에 비하여 유의하게 증가하였는데($P<0.05$, Fig. 5), IgG-FITC 반응의 증가는 자가항체 결합의 증가를 뜻한다.

2) 7-AAD에 의한 세포자멸사와 괴사 측정

네 군의 각 20 혈청에서 apoptosis & necrosis ratio는 각각 1.0 ± 0.2 , 1.0 ± 0.5 , 1.6 ± 1.0 , 2.6 ± 1.9 로 LN군에서 건강인군($P<$

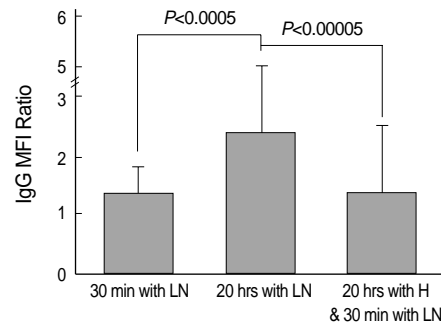


Fig. 9. The IgG-FITC reactivity according to 3 methods of incubation. The left bar is the case of incubation with LN sera for 30 minutes, the middle bar with LN sera for 20 hours and the right bar with healthy sera for 20 hours followed by with LN sera for 30 minutes. Significantly increased IgG MFI ratio was seen only in the middle bar. Data are means ± SD of 30 sera, respectively. Abbreviations: H, healthy; LN, lupus nephritis; MFI, mean fluorescence intensity.

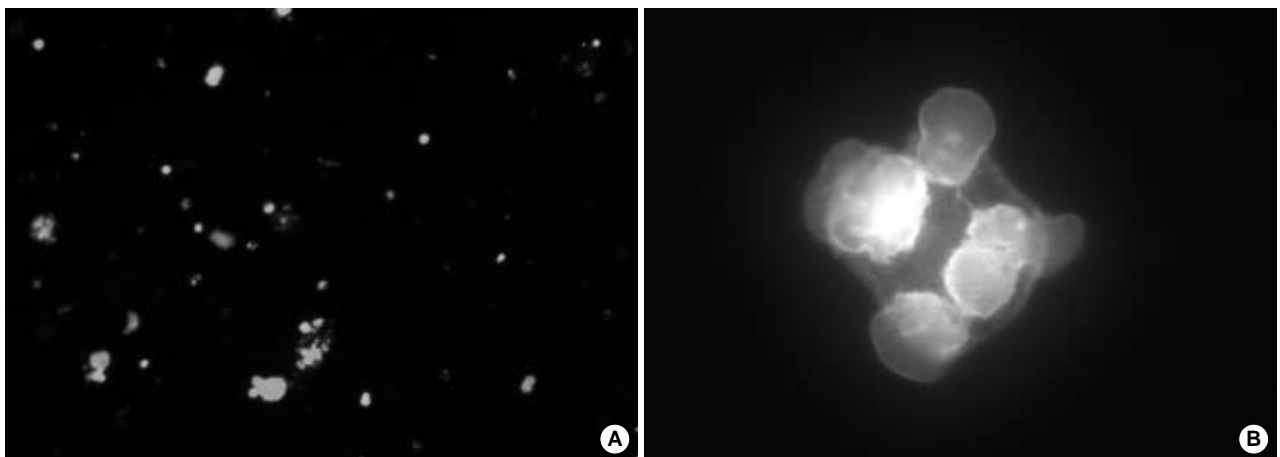


Fig. 10. Indirect immunofluorescence microscopy. IgG-FITC staining of neutrophils incubated with lupus nephritis serum for 20 hours. Increased nuclear reactivity was seen in 12/20 lupus nephritis sera. (A) $\times 100$, (B) $\times 1,000$.

0.005)과 RA군($P<0.01$)에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

3) Annexin V-FITC/PI 이중 염색에 의한 세포자멸사와 괴사 측정

CD95 표현에 대하여 네 군간 유의한 차이를 발견하지 못했으나, 건강인군과 LN군 각 10 혈청에 대한 annexin V/PI 이중 염색에서 호중구의 자멸사(annexin V⁺PI⁻) 백분율은 각각 36.3 ± 7.4 , 46.4 ± 7.8 ($P<0.05$)이었고, 괴사(annexin V⁺PI⁺) 백분율은 각각 10.9 ± 2.3 , 16.2 ± 5.9 ($P<0.05$)이었다. 즉, LN군에서 세포자멸사와 괴사 모두 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

2. LN 혈청과 배양한 건강인 호중구에서 배양 조건별 각 표지자의 측정

LN 혈청의 호중구에 대한 효과가 배양 조건의 변화에 따라 어떻게 변하는지 조사하였고, 또한 이 효과가 혈청내 특정 성분의 결핍 때문인지 혹은 과다 때문인지 추정하였다.

1) 배양 시간별 측정치의 변화

다섯 LN 혈청에서 호중구를 30분, 4시간, 8시간, 12시간, 16시간 및 20시간 배양 후 각 측정치의 변화를 조사하였다. MPO, IgG 결합에 대한 MFI ratio는 배양 시간과 유의한 양의 상관성(각각 $r=0.454$, $r=0.602$)이 있었으나(둘 다 $P<0.05$), CD95와 배양 시간의 상관성은 유의하지 않았다($r=0.143$, $P=0.611$, Fig. 8).

2) 단시간과 장시간 배양의 IgG MFI ratio 비교

30 LN 혈청에서 30분만 배양한 경우(1.4 ± 0.4)와 건강인 혈청과 20시간 배양한 후 다시 LN 혈청과 30분 배양한 경우(1.4 ± 1.1), 두 경우 모두 처음부터 LN 혈청과 20시간 배양한 경우(2.4 ± 2.6)에 비하여 IgG MFI ratio의 유의하게 감소하였다(각각 $P<0.0005$, $P<0.00005$, Fig. 9). 이 자료는 결과 1과 같은 LN 혈청의 호중구에 대한 작용은 호중구의 정상적인 자발적 세포자멸사(spontaneous apoptosis)를 통한 결과가 아니고, 능동적으로 촉진된 세포자멸사에 의한 결과이며, 세포자멸사 촉진을 위하여 LN 혈청과

정상인 호중구의 장시간 배양이 필요함을 말해준다.

3) LN 혈청 희석에 따른 IgG MFI의 변화

LN 혈청을 건강인 혈청으로 희석을 많이 할수록 IgG MFI가 감소하였다. 즉, 혈청 총량 중 LN 혈청이 차지하는 백분율(%LN)이 0, 10, 20, 30, 50, 70, 100%인 희석 혈청에 대하여 IgG MFI는 각각 161, 167, 211, 207, 256, 379, 352로 측정되어, 선형적으로 유의한 관련성이 있었다($IgG\ MFI=2.28\%LN+156$, $r=0.807$, $P<0.005$). LN 혈청의 병적 효과가 건강인 혈청의 보충으로 완전히 소멸되지 않고 희석만 되므로, 이 효과는 혈청내 특정 정상 성분의 과소 때문은 아닌 것으로 해석할 수 있다.

3. 호중구 자멸사와 항 dsDNA 항체와의 관계

LN 혈청에서 건강인 호중구를 장시간 배양시 세포자멸사, 괴사, 자가항체 결합을 증가시키는 원인 중 하나가 항 dsDNA 항체임을 증명하는 실험을 하였다.

1) 면역형광 현미경법(IFM)

LN 혈청에서 주로 핵 부위에 강한 형광이 관찰되는 호중구가 증가하였다(Fig. 10). 20 LN 혈청 중 12 혈청(60%)에서 건강인 혈청에 비하여 이런 호중구가 증가된 것으로 판정할 수 있었다. 이는 LN 혈청과 호중구의 배양에서 주로 핵 부위에 자가항체의 결합이 증가하였음을 뜻하므로, 그 자가항체의 주요 표적 항원이 핵내 항원임을 시사한다.

2) 항 dsDNA 항체 농도, apoptosis & necrosis ratio 및 IgG MFI ratio 상호간 상관성

SLE 및 LN 혈청에서 항 dsDNA 항체 농도와 apoptosis & necrosis ratio 간에 상관계수는 0.492이었고($P<0.00005$), 항 dsDNA 항체와 IgG MFI ratio 간에 상관계수는 0.344이었고($P<0.00005$), apoptosis & necrosis ratio와 IgG MFI ratio 간에 상관계수는 0.358이었다($P<0.0005$). 즉, 세 측정치간 세 관계 모두 유의한 상관성이 있었다(Fig. 11).

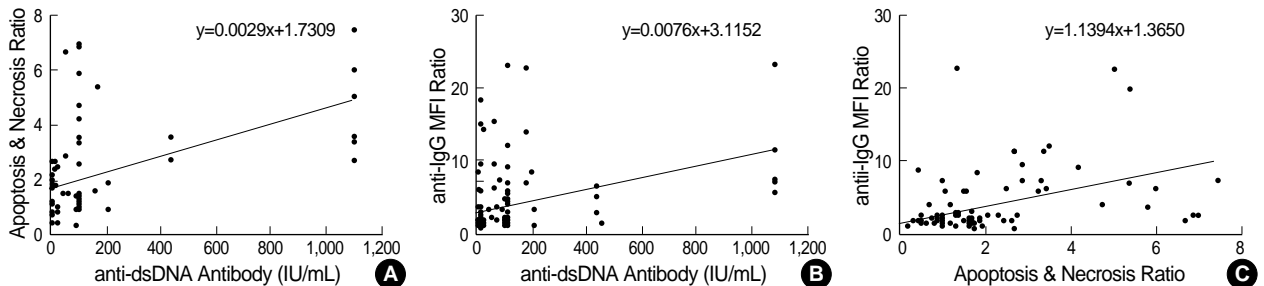


Fig. 11. The correlations among anti-dsDNA antibody level, apoptosis & necrosis ratio and IgG MFI ratio. (A) anti-dsDNA antibody level vs. apoptosis & necrosis ratio (N=70, mixed cases). (B) anti-dsDNA antibody level vs. IgG MFI ratio (N=140, mixed cases). (C) apoptosis & necrosis ratio vs. IgG MFI ratio (N=110, mixed cases). All three correlations among three measurements were significant ($P<0.0005$). Abbreviation: MFI, mean fluorescence intensity.

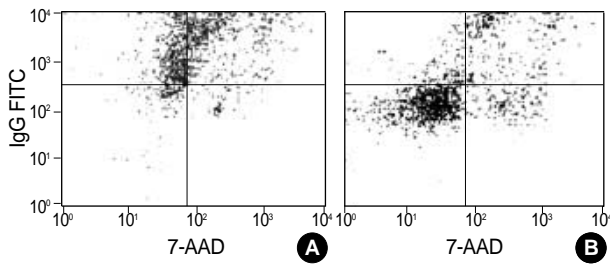


Fig. 12. A representative case of successful blocking of lupus nephritis serum by DNA extracts: (A) No preincubation (B) Preincubation with DNA extracts. Preincubation blocked apoptosis, necrosis and autoantibody binding of neutrophils prominently. Abbreviation: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D.

3) DNA 추출물에 의한 차단 효과

LN군 중 항 dsDNA 항체 농도가 비교적 높은(평균 149 IU/mL) 25개 혈청을 선택하여, 각 혈청에서 DNA 추출물로 전향온처리를 하지 않은 경우와 전향온처리를 한 경우를 서로 비교하였다(Fig. 12, 13).

Apoptosis & necrosis ratio는 전향온처리를 하지 않은 경우 평균 2.2±1.6에서 전향온처리를 한 경우 평균 1.4±0.7로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 각 혈청에서 전향온처리에 의하여 측정치가 70% 이하로 감소한 경우를 의미있는 것으로 본다면, apoptosis & necrosis ratio가 유의하게 감소한 경우는 12 혈청(48%)이었다.

IgG MFI ratio의 평균치도 전향온처리에 의하여 7.4±9.0에서 3.3±3.9로 유의하게 감소하였고(P<0.05), 측정치가 70% 이하로 감소한 경우는 10예(40%)이었다.

따라서 40-50%의 LN 혈청에서 DNA 추출물에 의하여 항 ds-DNA 항체가 흡착되어 자가항체 결합, 세포자멸사와 괴사가 감소하는 것으로 해석할 수 있었고, 이 경우 혈청 중 DNA에 특이성이 높은 자가항체가 항체 결합은 물론이고 세포자멸사, 괴사의 주 원인이었다는 것을 시사한다.

고 찰

본 연구의 주요 실험에서는 적혈구를 직접 용혈시키거나 분리하지 않았고, 또 전체 백혈구에서 호중구를 따로 분리하지 않는 비용혈전혈법을 사용하였다. 대신 호중구 표지자인 CD13을 사용하여 electronic gating을 사용하였는데, 이 방법은 용혈, 분리 과정중 발생하는 호중구의 활성화[4]를 방지하고 실험 술식을 단순화하여 안정된 결과를 얻을 수 있는 장점이 있었다.

호중구의 세포자멸사는 Fas 수용체에 의해 중재되는데, 호중구가 혈중 순환에서 제거되어 나오면 급격히 Fas를 표현하고[10], Fas ligation이 일어나면 세포 표면 전반에 phosphatidyl serine이 표현된다[27]. Yang 등[4]은 건강한 전혈을 24시간 배양 후 annexin V/PI 이중 염색을 통하여 호중구에서 세포자멸사가 유의

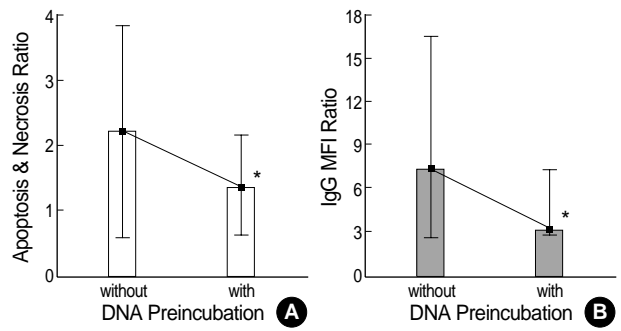


Fig. 13. The decrease of apoptosis & necrosis ratio (A) and IgG MFI ratio (B) by preincubation with DNA extracts. Data are means ± SD of 25 sera, respectively. *P<0.05 versus control.

하게 증가함을 보고하였고, Courtney 등[10]은 말초혈액에서 순환중인 호중구에 Fas 표현이 SLE군과 RA군에서 건강인에 비하여 유의하게 증가해 있었으나 SLE군과 RA군 사이에는 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 본 연구에서 LN 혈청에서 배양한 호중구에서 세포자멸사의 표지자인 CD95 (Fas)의 증가는 발견할 수 없었으며, CD95의 표현은 배양 12시간에 최고치를 보이다가 이후 감소하는 경향이 있었다(Fig. 8). 한편, 항 dsDNA 항체에 의한 세포자멸사에서 phosphatidyl serine 반전과 같은 표면의 변화를 검출하는 것은 가능하다, 이 과정이 세포내에서 유발되어 세포막 CD95 Fas/Fas 배위자 기전을 우회하여 일어나는 것으로 추측한 보고도 있고[7], 또 이 과정이 2차 괴사로 빠르게 진행되는 dysregulated apoptosis이라고 기술한 보고도 있다. 본 연구에서 annexin V/PI에 의한 세포자멸사 측정에서 건강인군과 LN군 간 유의한 차이를 보였으나, CD95 측정에서 유의한 차이를 보이지 않은 것은 이 때문으로 생각된다. 그러나 CD95 표현 증가를 관찰하지 못한 정확한 이유를 알려면 세포자멸사에 대한 다른 검출법을 추가한 연구가 도움이 될 것으로 생각된다.

SLE 치료 약제로 투여되는 glucocorticoids나 다른 면역억제제가 시험할 혈청 중에 잔존하는 경우 본 실험에서 어떤 영향을 미쳤는지는 조사하지 않았으나, glucocorticoids는 오히려 호중구 자멸사를 억제하며[28], Ren 등[15]의 보고에서도 이들 약제의 사용에 따른 세포자멸사 비율과 대식세포 포식작용에 유의한 차이를 발견하지 못하였다고 하였다. 또한, estradiol과 progesterone과 같은 성호르몬의 영향으로 여성에서 남성보다 말초혈액 호중구의 자멸사가 감소된다고 하는데[29], 본 연구에서 대부분 여성 환자로부터 얻은 루푸스 혈청에서 건강한 남성 혈청보다 기질 호중구의 자멸사 및 괴사가 유의하게 증가하였으므로, 질환 요인에 비하면 성별 요인은 무시할 수 있을 것으로 생각된다.

최적 배양 시간의 경우, 16-20시간대에 정상 혈청에 비하여 LN 혈청의 측정치 증가가 가장 컸고, 그 이후에는 측정치의 차이가 줄어드는 경향을 보였다(자료 미제시). 이는 배양을 과도하게 오래 하면 괴사가 일어난 세포의 비율이 증가하여 측정치의 분별력이 떨어지기 때문인 것으로 생각된다.

자발적인 세포자멸사가 일어난 호중구로 ANCA를 검출한 보

고[1]도 있다. 본 연구에서도 호중구의 자발적 자멸사 유도만으로 각 질환별 자가항체 결합 정도의 차이를 검출할 수 있는지 알아보기 위하여 20시간 정상 혈청으로 배양하여 자발적 세포자멸사가 일어난 호중구에 30분만 LN 혈청으로 배양하여 항체를 결합시키는 실험을 하였다. 이 경우 처음부터 LN 혈청과 20시간 배양한 경우보다 IgG MFI ratio의 감소가 유의하였다. 이 결과는 LN 혈청의 자가항체가 자발적으로 세포자멸사가 일어난 후의 호중구에 단순히 결합만 하는 것이 아니고, 호중구와 장시간 접촉을 통하여 능동적인 세포자멸사와 괴사를 유발하고 이런 호중구는 세포내 혹은 핵내 항원이 노출되어 다시 자가항체 결합이 증가됨을 말해준다.

호중구에 자멸사가 일어나면 MPO 같은 ANCA 항원이 세포막으로 이동하거나 세포외로 분비된다. 따라서 IFM법으로 ANCA를 검출할 때 자멸사 호중구를 이용하는 경우 세포 표면에서 형광이 관찰된다[1, 4]. SLE 환자, 특히 LN 환자에서 p-ANCA가 비교적 흔한 것으로 알려져 있으나[30], 본 연구의 20 LN 혈청의 IFM법 판독에서 세포 표면 혹은 세포질내의 형광이 두드러진 경우는 발견되지 않았다. 그 가능한 원인들로, 우선 ANCA 표준 검사 술식에서 호중구를 ethanol이나 formalin으로 고정하는데, 본 연구의 실험에서는 고정 과정이 없었으므로 MPO에 의한 세포질내 반응을 기대할 수 없었다. 또한 LN 혈청에서 장시간 배양으로 자발적이 아닌 dysregulated apoptosis가 일어나 MPO가 세포 표면에 표현되는 것이 감소하거나 세포외로 분비되었을 가능성이 있다. LN 혈청에서 주로 핵 부위에 형광이 강하게 관찰되는 호중구가 증가하였는데, 이는 호중구에 침투한 자가항체가 핵에 결합하였기 때문에 자가항체의 표적 항원이 세포질내 항원이 아닌 핵내 항원인 것으로 해석할 수 있었다.

DNA 추출물에 의한 차단 실험에서 시험할 혈청은 항 dsDNA 항체가 높은 혈청으로 선정하였는데(평균 149 IU/mL), DNA 전향온처리에 의하여 전체 25 LN 혈청의 평균 IgG MFI ratio와 apoptosis & necrosis ratio는 유의하게 감소하였고, 각 혈청에서 보면 약 반수에서 감소가 일어난 것으로 볼 수 있었으나, 일부 혈청에서는 차단 현상이 거의 일어나지 않았다. 그 이유로는, 시험관당 사용한 DNA 추출물 5-15 μ g은 약 10 IU의 항 dsDNA 항체를 흡착할 수 있는 양으로(자료 미제시), 계산상 100 μ L 혈청당 100 IU/mL 농도까지 완전히 흡착할 수 있으므로, 사용한 DNA의 양이 일부 혈청에서 부족하였던 것으로 생각된다. 그밖에, 항 dsDNA 항체 검사법에서 사용된 dsDNA와 본 연구에서 추출한 DNA의 항원성이 차이가 있거나, 전향온처리를 한 후에도 혈청 중 dsDNA 이외 histone, nucleosome 등에 대한 특이성을 가진 항체가 남아 있었을 가능성 등을 생각할 수 있을 것이다.

Fas뿐만 아니라 혈청 중 다른 여러 요인들도 호중구 자멸사를 조절한다. 이들은 주로 시토카인으로서, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-4, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 및 granulocyte colony-stimulating factor 등은 세포자멸사를 지연시키고, TNF α 는 세포자멸사를 유도한다. SLE에서 이들 시토카인의 혈청내 과다 혹은 부족이 호중구의 세포자멸사 및 이차 괴

사를 촉진시키거나, lectins, $\alpha_v\beta_3$ (vitronectin receptor), thrombospondin (TSP), CD36 (TSP receptor), phosphatidylserine receptors, scavenger receptors, CD14 (LPS receptor), ATP-binding cassette protein 1, 보체와 같은 인식 분자나 포식세포 수용체중 하나 이상이 결핍되거나 이상이 있어 자멸사 호중구에 대한 포식작용이 저하될 것으로 추측하였다[15].

항 dsDNA 항체가 세포에 직접 결합후 침투하여 장애를 초래하는 것에 대한 여러 보고가 있다. 즉, 사구체 내피세포[31]나, 혈관간세포[32]에 결합, 투과하여 세포자멸사 혹은 세포독성을 유발하며, 호중구에서 IL-8 유전자 표현을 상향조절하고 세포자멸사를 촉진한다고 한다[33]. 한편 항 dsDNA 항체 이외에도 anti-SSB/La Ab도 호중구에 결합 및 침투하여 세포자멸사 촉진, 포식작용 억제, IL-8 생산을 항진시킨다고 하였다[19]. 본 연구에서도 시험관내에서 LN 혈청내의 자가항체 특히 항 dsDNA 항체는 건강한 호중구의 세포자멸사와 괴사를 유발하고, 그렇게 되면 호중구 세포내 혹은 핵내 항원이 노출되므로 더욱 자가항체의 결합이 증가하여 IgG MFI ratio가 증가한 것으로 해석할 수 있었다. 한편 생체내에서도 이런 현상이 일어난다면, 자가항체가 표적 세포의 자멸사를 증가시켜 세포자멸사 소체나 nucleosome의 유리를 증가시키고 이것이 다시 면역원이 되어 자가면역성을 더욱 악화시킬 것이다. 따라서 SLE 환자가 질병 유발 요인에 노출된 후 이런 악순환이 반복되는 발병기전에 의하여 질병 활성도가 증가하는 것으로 추측할 수 있다.

Ren 등[15]은 SLE 환자에서 대식세포가 자멸사 호중구를 포식하는 능력이 저하되는데 이는 질병 활성도와 상관성을 가지며, SLE 혈청은 건강한 대식세포의 자멸사를 촉진시키고 자멸사 호중구의 제거를 하향조절하는 반면, 건강한 혈청은 SLE 대식세포의 자멸사 호중구의 포식을 증가시키나, SLE 환자 세포의 자체의 자멸사와 이차 괴사 증가를 막지 못하는 것을 관찰하고, 대식세포의 내재적 결합 같은 유전적 요인과 혈청 요인 모두 SLE에서 호중구 자멸사에 대한 조절 장애의 원인으로 추측하였다. 본 연구에서 SLE에서 질병 활성도에 관련하여 호중구의 세포자멸사와 괴사가 증가한다는 이전 보고[10, 11, 15]를 확인하였고, 이 현상이 이미 알려진 대식세포의 청정 기능 저하 기전[15, 16]에 더하여, 자가항체의 능동적 역할에 의한 세포자멸사와 괴사 기전도 있음을 증명하였다. 본 연구에서 이런 자가항체의 특이성 중 하나가 항 dsDNA 항체임을 DNA 추출물에 의한 차단 실험을 통하여 증명하였지만, 항 dsDNA 항체를 순수 정제하거나 단클론 항체를 이용하여 실험한다면 항 dsDNA 항체의 역할을 더 명확히 확인할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 다른 특이성의 항핵항체들도 세포자멸사와 괴사를 유발할 가능성이 있다. 실제로, 항 dsDNA 항체 이외에 anti-SSB/La Ab가 SLE에서 호중구의 기능장애와 호중구 감소증의 원인을 관찰하고 그밖에 ribosomal P, HLA 분자 등과 같은 다른 자가항원/자가항체 체계도 그 원인일 가능성을 추정 한 최근 보고[19]도 있으므로, 항 dsDNA 항체를 포함하여 각 특이성의 항핵항체별로 호중구에 대한 세포자멸사와 괴사의 역할을

조사하는 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한, 단구도 자가항체에 의한 세포자멸사와 괴사의 표적 세포가 되므로[14, 15] 인식 분자나 수용체 이상뿐만 아니라 자가항체도 대식세포 포식작용 장애의 원인이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 anti-IgG와 7-AAD를 이용한 호중구의 세포자멸사와 괴사, 자가항체 결합 동시 측정은 LN 관련 혹은 SLE 질병 활성도를 반영하는 검사로서 가능성을 보였는데, 그 근거로서, SLE 군과 달리 LN군이 건강인군과 비교하여 측정치의 상승이 유의하였고, LN 혈청 희석 실험에서도 희석에 따라 측정치가 유의하게 감소하였고, 이미 SLE 활성도를 반영하는 검사로 알려진 항 dsDNA 항체 농도와와의 상관성이 유의하였다. 그러나 이 검사가 SLE 질병 활성도를 평가하는데 유용하다는 것을 확인하려면 실제 SLE Activity Measure score와의 상관성 조사가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서 SLE 환자에서 말초혈액 호중구의 세포자멸사가 증가함을 확인하였고, 혈청 중의 항 dsDNA 항체 혹은 다른 항핵항체가 호중구에 단순히 결합할 뿐만 아니라 능동적으로 호중구의 자멸사와 괴사를 증가시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 자가항체가 자가항원인 DNA의 노출을 증가시켜 자가면역성을 다시 악화시키는 발병기전을 추정할 수 있게 한다. 추가 연구가 필요하겠지만, SLE 혈청에서 호중구에 대한 세포독성과 자가항체 결합을 유세포분석법으로 동시 측정하면 질병 활성도를 평가하는데 유용한 검사가 될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 전신성홍반성루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE) 환자에서는 혈청 성분에 의해 호중구에 대한 세포자멸사와 괴사가 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 그 성분 중 하나가 항 dsDNA 항체 등의 자가항체임을 증명하고, 또한 질병 활성도를 평가하기 위한 임상검사로서 SLE 혈청에서 호중구에 대한 세포독성과 자가항체 결합을 동시에 측정하는 검사법이 유용한지 그 가능성을 조사하였다.

방법 : 루푸스신염(lupus nephritis, LN) 환자 48명, LN이 없는 SLE 19명, 류마티스관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자 35명 및 건강한 남자 성인 40명으로부터 얻은 총 228개의 혈청을 대상으로 하였다. 시험할 혈청에 건강인의 전혈을 가하여 배양하였다. 20시간 배양 후 혹은 배양 조건을 변화시켜 호중구에 대한 자가항체 결합과 세포자멸사, 괴사에 대하여 IgG-FITC와 7-aminonactinomycin D를 사용하여 유세포분석법으로 측정하였고, 결과는 측정치의 시험/건강 대조 비(ratio)로써 나타내었다. 이 결과와 항 dsDNA 항체와의 관계를 조사하였다.

결과 : IgG 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI) 비(MFI ratio)는 건강인군, RA군, SLE군, LN군에서 각각 1.0 ± 0.3 , 1.6 ± 1.6 , 2.0 ± 1.5 , 4.8 ± 7.5 로서 루푸스신염군에서 건강인군

에 비하여 유의하게 증가하였다(각각 $N=20$, $P<0.05$). 네 군에서 세포자멸사와 괴사 비(apoptosis & necrosis ratio)는 각각 1.0 ± 0.2 , 1.0 ± 0.5 , 1.6 ± 1.0 , 2.6 ± 1.9 로서 루푸스신염군에서 건강인군($P<0.005$)과 류마티스관절염군($P<0.01$)에 비하여 유의하게 증가하였다. 루푸스신염 혈청 20개 중 12개 혈청(60%)에서 면역형광 현미경법으로 자가항체에 의한 호중구의 핵 부위 염색이 증가한 것으로 관찰되었다. 항 dsDNA 항체 농도, apoptosis & necrosis ratio 및 IgG MFI ratio 세 측정치에서 세 관계 모두 유의한 상관성이 있었다($P<0.0005$). 또한 DNA 추출물로 전향온처리(preincubation)하여 IgG MFI ratio와 apoptosis & necrosis ratio 모두 유의하게 감소하였다($N=25$, $P<0.05$).

결론 : 본 연구에서 SLE 환자의 말초혈액 호중구의 세포자멸사가 증가함을 확인하였고, 혈청내 항 dsDNA 항체 혹은 다른 항핵항체가 호중구에 단순히 결합할 뿐만 아니라 능동적으로 호중구의 자멸사와 괴사를 증가시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 자가항체가 자가항원인 DNA의 노출을 증가시켜 자가면역성을 다시 악화시키는 발병기전을 추정할 수 있게 한다. 추가 연구가 필요하겠지만, SLE 혈청의 호중구에 대한 세포독성과 자가항체 결합을 유세포분석법으로 동시에 측정하는 것은 질병 활성도를 평가하는데 유용한 검사가 될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

- Gilligan HM, Bredy B, Brady HR, Hebert MJ, Slayter HS, Xu Y, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J Exp Med* 1996; 184: 2231-41.
- Ormerod MG. Flow cytometry in the study of apoptosis. In: Ormerod MG, ed. *Flow cytometry 3rd ed.* New York: Oxford University Press; 2000: 235-47.
- Harper L, Ren Y, Savill J, Adu D, Savage CO. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce reactive oxygen-dependent dysregulation of primed neutrophil apoptosis and clearance by macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 211-20.
- Yang JJ, Tuttle RH, Hogan SL, Taylor JG, Phillips BD, Falk RJ, et al. Target antigens for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) are on the surface of primed and apoptotic but not unstimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 165-72.
- 원동일, 허운보, 서장수, 이원길, 김현숙. 장시간 항은 호중구에 대한 항체의 유세포분석에 의한 검출. *대한진단검사의학회지* 2003; 23: 336-44.
- Shmerling RH. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus--there before you know it. *N Engl J Med* 2003; 349: 1499-500.
- Ruiz-Arguelles A and Alarcon-Segovia D. Novel facts about an old marker: the LE cell. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2001; 235: 31-7.
- Alarcon-Segovia D, Llorente L, Ruiz-Arguelles A. The penetration

- of autoantibodies into cells may induce tolerance to self by apoptosis of autoreactive lymphocytes and cause autoimmune disease by dysregulation and/or cell damage. *J Autoimmun* 1996; 9: 295-300.
9. Ruiz-Arguelles A, Perez-romano B, Llorente L, Alarcon-Segovia D, Castellanos JM. Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. *J Autoimmun* 1998; 11: 547-56.
 10. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 309-14.
 11. McConnell JR, Crockard AD, Cairns AP, Bell AL. Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 653-60.
 12. Perniok A, Wedekind F, Herrmann M, Specker C, Schneider M. High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998; 7: 113-8.
 13. Courtney PA, Williamson K, Crockard AD, Bell AL. Apoptotic lymphocytes in SLE. *Lupus* 1998; 7: 498.
 14. Richardson BC, Yung RL, Johnson KJ, Rowse PE, Lalwani ND. Monocyte apoptosis in patients with active lupus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1432-4.
 15. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2888-97.
 16. Cairns AP, Crockard AD, McConnell JR, Courtney PA, Bell AL. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 950-5.
 17. Schmidt-Acevedo S, Perez-Romano B, Ruiz-Arguelles A. 'LE cells' result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by antinuclear antibodies. *J Autoimmun* 2000; 15: 15-20.
 18. Ma JA, Chapman GV, Chen SL, Penny R, Breit SN. Flow cytometry with crystal violet to detect intracytoplasmic fluorescence in viable human lymphocytes. Demonstration of antibody entering living cells. *J Immunol Methods* 1987; 104: 195-200.
 19. Hsieh SC, Yu HS, Lin WW, Sun KH, Tsai CY, Huang DF, et al. Anti-SSB/La is one of the antineutrophil autoantibodies responsible for neutropenia and functional impairment of polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 506-16.
 20. Courtney PA, Crockard AD, McMillan SA, Cairns AP, Bell AL. Apoptotic neutrophils and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 476.
 21. Lafer EM, Rauch J, Andrzejewski C Jr, Mudd D, Furie B, Furie B, et al. Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J Exp Med* 1981; 153: 897-909.
 22. Madaio MP. Lupus autoantibodies 101: one size does not fit all; however, specificity influences pathogenicity. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 396-7.
 23. D'Andrea DM, Coupaye-Gerard B, Kleyman TR, Foster MH, Madaio MP. Lupus autoantibodies interact directly with distinct glomerular and vascular cell surface antigens. *Kidney Int* 1996; 49: 1214-21.
 24. Raz E, Brezis M, Rosenmann E, Eilat D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 1989; 142: 3076-82.
 25. Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, van de Lagemaat R, Dijkman HB, Assmann KJ, et al. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 1994; 94: 568-77.
 26. Dieker JW, van der Vlag J, Berden JH. Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. *Lupus* 2002; 11: 856-64.
 27. Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 28753-6.
 28. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 1995; 154: 4719-25.
 29. Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood* 2003; 102: 2653-9.
 30. Chin HJ, Ahn C, Lim CS, Chung HK, Lee JG, Song YW, et al. Clinical implications of antineutrophil cytoplasmic antibody test in lupus nephritis. *Am J Nephrol* 2000; 20: 57-63.
 31. Lai KN, Leung JC, Lai KB, Lai CK. Effect of anti-DNA autoantibodies on the gene expression of interleukin 8, transforming growth factor-beta, and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Scand J Rheumatol* 1997; 26: 461-7.
 32. Tsai CY, Wu TH, Sun KH, Liao TS, Lin WM, Yu CL. Polyclonal IgG anti-dsDNA antibodies exert cytotoxic effect on cultured rat mesangial cells by binding to cell membrane and augmenting apoptosis. *Scand J Rheumatol* 1993; 22: 162-71.
 33. Hsieh SC, Sun KH, Tsai CY, Tsai YY, Tsai ST, Huang DF, et al. Monoclonal anti-double stranded DNA antibody is a leucocyte-binding protein to up-regulate interleukin-8 gene expression and elicit apoptosis of normal human polymorphonuclear neutrophils. *Rheumatology* 2001; 40: 851-8.