

베체트병에서 항내피세포 항체에 의한
혈관 내피세포 활성화의 신호전달 경로

연세대학교 대학원

의 학 과

조 혼 정

베체트병에서 항내피세포 항체에 의한
혈관 내피세포 활성의 신호전달 경로

지도 이 광 훈 부교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

1999년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 혼 정

조흔정의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

1999년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 따뜻한 조언과 격려로 이끌어 주시고 자상한 지도와 지원을 아끼지 않으신 은사 이광훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 본 논문을 심사해 주시고, 많은 관심과 지원 및 교정의 노고로 격려해 주신 방동식 교수님, 미생물학 교실 김세종 교수님, 내과학 교실 이수곤 교수님, 약리학 교실 최재원 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 신호전달 경로와 RT-PCR 등의 여러 실험 과정에서 많은 관심으로 지도해 주시고 조언해 주신 임상의학 연구센터의 이원재 교수님, 신생아 포피를 제공해 주신 강남차병원 비뇨기과 김현주 과장님, 연구 진행에 많은 도움을 주신 연구실의 장남수, 김용식, 류지환 선생과 피부과학교실 여러분께도 감사의 말씀을 드립니다.

오늘이 있기까지 끝없는 보살핌과 기도로 후원해 주신 양가 부모님, 넓은 이해와 사랑으로 지켜주는 남편, 아들 성재와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다. 이 영광을 하나님께 드립니다.

저 자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구 대상	5
2. HDMEC의 분리 배양	6
3. HDMEC 표면 단백 및 44kDa 항원의 분리	6
4. HDMEC 표면 단백 및 44kDa 항원에 대한 IgM 항체 검출을 위한 효소 면역 표지법	7
5. 베체트병 환자의 혈청으로부터 IgM-AECA 분리	7
6. HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 조사	8
가. 효소 면역 표지법(ELISA)	8
나. 면역형광 유량 세포분석법(FACS)	8
7. TNF α 및 IL-1 α 의 생성 조사	8
가. HDMEC 배양 상청액에서 활성물질 조사	8
나. 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 ICAM-1 분자 발현 억제능 조사	8
다. TNF α 및 IL-1 α 에 대한 ELISA	8
라. TNF α 및 IL-1 α 에 대한 FACS	9
마. TNF α 및 IL-1 α mRNA 검출을 위한 역전사효소- 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)	9
(1) 총 RNA 분리	9
(2) First strand cDNA 합성	9
(3) TNF α 및 IL-1 α primer를 이용한 PCR	9

8. MAPK의 활성화 조사	10
가. ERK의 활성화 조사	10
나. JNK의 활성화 조사	10
다. P38의 활성화 조사	10
9. MEK 억제제(PD98059)에 의한 ICAM-1 분자 발현의 억제능 조사	10
10. 통계처리	11
III. 결 과	11
1. HDMEC 표면 단백질과 44kDa 항원에 대한 IgM 항체 양성을	11
2. IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 변화	11
3. IgM-AECA에 의한 TNF α 및 IL-1 α 의 생성	12
가. 활성화된 HDMEC 배양 상청액내의 활성물질	12
나. 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 ICAM-1 분자 발현 억제능	12
다. 활성화된 HDMEC 배양 상청액내 TNF α 및 IL-1 α 검출	14
라. HDMEC 표면 및 세포질의 TNF α 및 IL-1 α 발현	14
마. IgM-AECA에 의한 HDMEC TNF α 및 IL-1 α mRNA의 발현	14
4. MAPK 신호전달 과정	16
5. MEK 억제제(PD98059)를 이용한 ICAM-1 분자 발현의 억제능	17
IV. 고 찰	18
V. 결 론	21
참고문헌	22
영문요약	27

표 목 차

표 1. 베체트병 환자의 IgM-AECA 첨가후 배양한 HDMEC 상청액내 TNF α 및 IL-1 α 검출	14
표 2. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 대한 MEK 억제제(PD98059)의 효과	18

그림 목 차

그림 1. HDMEC 표면 단백질에 대한 IgM 항체 반응	11
그림 2. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 변화	12
그림 3. 활성화된 HDMEC의 배양 상청액에 의한 ICAM-1 분자 발현 변화	13
그림 4. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 미치는 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 효과	13
그림 5. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC 표면과 세포질의 TNF α 및 IL-1 α 발현에 대한 FACS 분석	15
그림 6. 베체트병 환자의 IgM-AECA 처리후 HDMEC의 TNF α 및 IL-1 α mRNA 검출을 위한 RT-PCR 소견	15
그림 7. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 MAPK 활성화 소견	16
그림 8. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의해 활성화된 HDMEC에서 관찰된 ERK1/2의 면역블롯 소견	16
그림 9. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 ERK1/2 활성화에 미치는 MEK 억제제(PD98059)의 효과	17
그림 10. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 대한 MEK 억제제(PD98059)의 효과	17

베체트병에서 항내피세포 항체에 의한 혈관 내피세포 활성의 신호전달 경로

베체트병은 다발성 만성 염증성 질환으로서 임상적, 병리조직학적 소견상 혈관염이 자주 관찰됨에 따라 병인에 혈관 내피세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 혈관 내피세포에서는 사이토카인을 비롯한 생물학적 반응 조절물질에 의해 intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), E-selectin 등의 세포유착 분자의 발현이 유도되어 여러 염증 세포와 혈관 내피세포와의 부착을 증대하여 조직 내에 염증 반응을 유발시킨다. 항내피세포 항체는 여러 자가면역 질환과 베체트병에서 관찰이 되는데, 베체트병에서 검출되는 항내피세포 항체는 내피세포의 44kDa 항원을 인지하는 IgM 항체임이 보고되었으며, 이 자가항체는 다른 자가면역 질환에서는 발견되지 않아 베체트병에 특이한 항체로 생각된다. Mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 성장 인자, 염증성 사이토카인, 자외선 등 여러 세포의 자극에 의해 활성화되는 신호전달 경로로 extracellular signal regulated kinase(ERK)1/2, c-Jun NH₂ terminal kinase(JNK), p38 cascade의 3가지 종류가 있다. 이들은 세포질의 다른 protein kinase를 활성화시키거나, 핵내로 이동하여 전사 인자에 영향을 줌으로서 세포의 성장, 분화, 염증, 아포토시스 등의 여러 과정을 조절하게 된다.

본 연구에서는 첫째, 베체트병 환자의 혈청으로부터 인체 진피 미세혈관 내피세포(human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC) 44kDa 항원에 대한 IgM 항체(IgM-antiendothelial cell antibody: IgM-AECA)로 HDMEC을 처리후 효소 면역 표지법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 면역형광 유량 세포분석법(fluorescence-activated cell sorting, FACS)을 이용하여 HDMEC 표면 ICAM-1 분자의 발현 변화를 관찰하고, 둘째, ICAM-1 분자 발현에 tumor necrosis factor α (TNF α)나 interleukin-1 α (IL-1 α)의 관여 가능성을 배제하기 위하여 이들의 생성 여부를 ELISA, FACS 및 역전사효소-중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction: RT-PCR)을 시행하여 알아보고자 하였으며 셋째, IgM-AECA에 의한 ICAM-1 분자 발현 과정에 MAPK 관여 여부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 베체트병 환자 54명 중 29명(53.7%)에서 HDMEC 표면 항원에 대한 IgM 항체가 관찰되었고, 그 중 23명(79.3%)에서 IgM-AECA가 양성이었다.
2. 베체트병 환자 8명 각각의 IgM-AECA로 HDMEC을 처리하여 이들 모두에서 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현이 증가되었다.

3. IgM-AECA 처리로 활성화된 HDMEC 배양 상청액에서 TNF α 및 IL-1 α 의 생성은 관찰되지 않았다.
4. 베체트병 환자 8명 각각의 IgM-AECA로 HDMEC을 처리후 모두에서 MAPK 중 ERK1/2의 활성화만이 관찰되었으며, 5분에 가장 강한 활성을 보였다.
5. ERK의 상위 효소인 MAPK/ERK kinase(MEK)에 대한 억제제(PD98059)를 사용하여 60 μ M의 농도에서 ERK1/2의 활성 및 ICAM-1 분자 발현의 억제를 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 TNF α 및 IL-1 α 의 생성으로 인한 자가분비 효과 없이 IgM-AECA가 직접적으로 HDMEC에 작용하여 ICAM-1 분자를 발현시키므로써 베체트병의 병인에 관여할 것으로 생각되며, 이 과정의 신호전달 경로로 ERK1/2가 관여할 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 베체트병, 혈관 내피세포 44kDa 항원, 항내피세포 항체, ICAM-1, MAPK, ERK1/2

베체트병에서 항내피세포 항체에 의한 혈관 내피세포 활성의 신호전달 경로

<지도 이 광 훈 부교수>

연세대학교 대학원 의학과

조 혼 정

I. 서 론

베체트병은 재발성 구강 및 외음부 궤양, 안질환, 피부병변(Ammann 등, 1985)과 함께 관절염, 혈관계(Hills, 1979; 민희원 등, 1986), 호흡기, 소화기 및 중추신경계(O'Duffy 및 Goldstein, 1976; 김형주 등, 1987)의 증상을 보이는 다발성 만성 염증성 질환이다. 전세계적으로 보고되고 있으나, 인종 및 지역적 차이를 보여, 지중해 연안 국가들, 중동, 극동지역 및 일본, 중국과 우리 나라에서 높은 발생률을 보인다(Bang 등, 1997).

병인은 아직 명확히 규명되지는 않았으나 점막세포에 대한 자가면역 항체 및 순환면역복합체의 존재(Lehner, 1969; Williams 및 Lehner, 1977; Levinsky 및 Lehner, 1978; Shimizu 등, 1979), 면역 형광검사시 항체 및 보체의 침착(Lehner, 1969; Reimer 등, 1983; 방동식 등, 1986)과 혈청내 면역글로블린 양의 변화(Lehner, 1972; 이은소 등, 1987) 등의 보고로부터, 자가 항체가 관련된 자가면역 기전이 본 질환의 발병에 관여할 것으로 생각된다. 또한 임상적으로 재발성 혈전 정맥염, 피부 혈관염 등의 소견이 자주 관찰되고, 병리조직학적으로 혈관 주위에 호중구 혹은 림프구와 단핵구의 침윤 및 내피세포의 부종이나 괴사, 부분적인 혈관강내 폐쇄가 관찰되며, 심한 경우 괴사성 혈관염 및 육아종성 혈관염이 동반되는 등 혈관 손상이 발병에 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 보고가 많다(Bang 등, 1987; Bang 등, 1988).

혈관 내피세포는 모든 혈관의 가장 내측에 단층으로 배열된 고도의 활동성 세포로서 백혈구 이동 및 복귀, 염증반응, 상처치유, 종양전이 및 혈관형성 등 다양한 생물학적 현상에 필수적인 역할을 한다(Pober 및 Cotran, 1990; Lee 등, 1992). 혈관 내피세포의 변화가 혈관염의 발생 기전에 중요한 역할을 할 것이라는 보고가 있으며(Savage 및 Cooke, 1993), 가와사키병에서 IgM 아형의 항내피세포 항체(Tizard 등, 1988)가 보고된 바 있고, 그 외에 베그너 육아종증(Savage 등, 1991), 다발성 동맥염(Ferraro 등, 1990) 등의 원발성 혈관염 질환, 전신성 홍반성 낭창(D'Cruz 등, 1991), 경피증(Penning 등, 1984), 류마치스성 관절염(Rosenbaum 등, 1988) 등의 속발성 혈관염 질환과 이식편 거부반응(Cerilli 등, 1977; Brasile 등, 1985), 혈전성 혈소판 감소성 자반(Burns 및 Zucker-Franklin, 1982), 다발성 경화증(Tanaka 등, 1987), 면역중개성 부갑상선 기능저하

증(Fattorossi 등, 1988) 등의 질환에서도 혈관 내피세포에 대한 항체가 검출되었다. 많은 연구에서 항내피세포 항체의 존재는 질환의 임상적 활성도와 상관관계가 있음을 보고하였는데, 전신성 홍반성 낭창 환자에서 항내피세포 항체 양성빈도는 질병의 활동성과 상관되는 것으로 보고하였다(D'Cruz 등, 1991).

베체트병에서도 혈관 내피세포에 대한 항체가 검출된 바 있으며(Aydintug 등, 1993; Cervera 등, 1994; Lee 등, 1999a; Lee 등, 1999b), 질병의 활성도나 혈관염의 증상과 상관성이 있었고(Aydintug 등, 1993), 본 연구자들은 종전 실험에서 이 항체가 면역블롯 검사상 인체 진피 미세혈관 내피세포(human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC) 표면의 44kDa 항원을 인지하는 IgM 항체임을 관찰하였다(이광훈 등, 1999; Lee 등, 1999a). 베체트병의 항내피세포 IgM 항체 양성 혈청은 HDMEC 표면의 44kDa의 항원을 인지한 반면, 전신성 홍반성 낭창 환자의 혈청은 81kDa의 단백질과 반응하였다(Lee 등, 1999a). 또한 진행성 전신성 경화증 환자에서 관찰되는 항내피세포 항체는 95kDa 및 100kDa의 항원과 반응하여(Alderuccio 등, 1986), 베체트병에서 관찰되는 44kDa 항원에 대한 IgM 항체는 베체트병의 특이한 자가항체로 생각된다(이광훈 등, 1999; Lee 등, 1999a).

전신성 혈관염이 동반된 환자의 혈청에 혈관 내피세포에 대한 항체가 존재하는 것은 혈관손상에 중요한 역할을 하리라고 생각되는데, 이러한 항체가 직접적으로 혈관의 손상에 관여하는지 혹은 혈관의 염증반응이 선행된 후 내피세포 항원이 표현되어 이차적으로 항체가 출현하는지에 대해서는 명확하지 않다. 자가항체에 의한 손상의 기전으로, 항체가 혈관 내피세포에 부착하면, 보체 혹은 세포독성 T림프구, 자연살세포 등 세포독성 작동세포 등을 통하거나, 내피세포 기능이나 표면 유착분자 발현을 활성화하여 혈관 내피세포에 손상을 줄 것으로 생각된다.

베체트병 환자의 점막 표피 병변내 혈관주위에는 CD4⁺ T림프구의 침착이 관찰되며(Chun 등, 1990), interleukin-1 α (IL-1 α), tumor necrosis factor α (TNF α) 등으로 혈관 내피세포를 전처치하면, intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), E-selectin과 같은 림프구 유착과 관련된 세포유착 분자가 발현되고 혈관 내피세포에 대한 림프구의 유착이 증가된다(Pober 및 Cotran, 1990). 최근 한 연구에서 경피증 환자의 혈청에서 분리한 항내피세포 항체를 배양한 혈관 내피세포에 첨가 후, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 분자의 발현 증가와 혈관 내피세포에 대한 염증세포의 유착도 증가를 관찰하고 이러한 효과는 항내피세포 항체에 의해 전달된 신호가 IL-1 α 의 생성을 유도하여 혈관 내피세포가 활성화됨에 의한 것으로 추정하였다(Carvalho 등, 1996). 즉, HDMEC 항원에 항내피세포 항체가 결합하게 되면, IL-1 α 의 자가분비 혹은 측분비 효과에 의해 유착 분자가 발현되어 림프구 유착이 증가하는 것으로 생각하였다. 그러나 이 연구의 결과는 TNF α 과 IL-1 α 에 대한 단클론항체를 이용한

억제실험의 결과로서만 추정하였을 뿐, 활성화된 혈관 내피세포의 배양추출물이나 혈관 내피세포에서 구체적인 $TNF\alpha$ 혹은 $IL-1\alpha$ 의 생성능을 제시하지 못하였다. 또한 *Borrelia burgdorferi*로 혈관 내피세포를 자극하여 E-selectin 분자가 발현되는 과정에는 IL-1 수용체 억제제나 $TNF\alpha$ 의 단클론항체를 단독 혹은 함께 처리하여도 억제되지 않는 점으로 이들 사이토카인의 생성 없이 균에 의해 직접적으로 내피세포의 E-selectin이 발현된다는 보고(Burns 등, 1997)도 있어 내피세포의 세포유착 분자의 발현 과정에 있어 사이토카인의 자가분비 효과에 대해서는 논란이 있다.

인체 신호 전달과정 중 mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 extracellular signal regulated kinase(ERK), c-Jun NH₂ terminal kinase(JNK), p38 cascades 등의 아형이 있으며, 이들은 인체 세포의 많은 신호전달에 관여한다(Paul 등, 1997; Sungden 및 Clerk, 1997; Kulmar 등, 1998). ERK cascade는 세포의 성장, 분화 등에 중요한 역할을 하며(Sungden 및 Clerk, 1997), JNK cascade는 세포의 스트레스성 자극, 사이토카인, 감염 등의 신호에 반응하여 c-Jun 전사 인자를 활성화시켜서 인체의 여러 조절 유전자의 표현에 관여한다(Paul 등, 1997). P38 cascade는 JNK cascade와 유사한 자극에 의해 활성화되지만 독립적인 신호 전달 체계를 갖추고 있고 인체의 여러 염증성 반응의 신호전달에 관여하며, $TNF\alpha$ 나 $IL-1\alpha$ 를 억제하는 사이토카인 억제성 항염증 약물의 표적임이 알려져 있다(Kulmar 등, 1998).

본 연구에서는 항내피세포 항체 양성인 베체트병 환자의 혈청에서 분리한 HDMEC 44kDa 항원에 대한 IgM 항체(IgM-antiendothelial cell antibody: IgM-AECA)로 배양한 HDMEC을 처리하여 ICAM-1 분자의 발현 변화에 미치는 영향을 알아보고, ICAM-1 분자의 발현 증가 과정에 HDMEC으로부터 $TNF\alpha$ 나 $IL-1\alpha$ 의 생성 여부와, 신호전달 경로로서 MAPK의 관여 여부를 조사하여, 베체트병의 발병 기전에서 IgM-AECA의 역할을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

International study group for Behcet's disease에서 제안한 진단 기준(International study group for Behcet's disease, 1990)에 따라 진단된 54명의 베체트병 환자와 구강이나 성기 궤양의 과거력이나 내과질환이 없는 11명의 정상인을 대상으로 하여 이들의 혈청을 배양한 HDMEC의 표면 단백질 및 44kDa 항원에 대한 IgM-효소 면역 표지법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 검사를 시행하여 44kDa 항원에 대한 IgM 항체가 강양성을 보인 베체트병 환자 8명을 실험군으로 선별하였다.

2. HDMEC의 분리 배양

신생아 포피로부터 종전의 방법에 따라 HDMEC을 분리하였다(Lee 등, 1992). 신생아 포피를 3mm 크기의 소절편으로 잘게 잘라 0.03% trypsin 및 1% ethylenediamine tetracetic acid(EDTA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 함유된 phosphate-buffered saline(PBS)으로 37°C에서 10분간 처리한 후 작은 칼날의 옆면을 이용하여 각각의 소절편을 눌러 절단면으로부터 미세혈관편이 빠져나오도록 하였다. Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 혼합한 35% Percoll용액을 원침관에 넣고 4°C, 30,000 xg에서 10분간 원침하여 밀도구배를 만든 다음 상단에 미세혈관편이 함유된 용액 1ml를 가한 후 400 xg로 실온에서 15분간 원침시켰다. 밀도 1.048g/ml 이하의 분획(원침시킨 후 나타나는 중간의 백색층)을 다른 원침관에 옮기고 HBSS로 채워 400 xg로 실온에서 10분간 다시 원침시킨 후 그 침전물을 미리 0.1% 젤라틴(Sigma)을 처리한 조직 배양용기에 넣고 human epidermal growth factor(hEGF), hydrocortisone acetate, bovine brain extract, dibutyryl cyclic AMP, glutamine, penicillin, gentamicin, amphotericin B, 2% fetal bovine serum이 함유된 endothelial basal medium(Clonetics Co., San Diego, CA, USA)을 사용하여 37°C, CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배양된 HDMEC에 20ng/ml의 TNF α (R&D Co., Minneapolis, AN, USA)를 처리하여 37°C, CO₂ 항온기에서 4시간 배양한 후 trypsin처리로 세포를 떼어낸 다음 항 E-selectin 단클론항체(Immunotech Co., Marseille, France)와 실온에서 30분간 반응시켰다. 발현된 E-selectin과 항 E-selectin 단클론항체 복합체에 Dynabeads M-450/goat anti-mouse IgG(Dynal Co., Oslo, Norway)를 결합시킨 후 자석(Dynal)을 이용하여 HDMEC만을 분리 정제하였다. 3-4 계대의 HDMEC을 실험에 사용하였다. 형태학적 검증은 역위상차현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 평가하였으며, von Willebrand's factor(vWF)의 발현은 면역형광검사로 평가하여 95% 이상 순수함을 확인하였다.

3. HDMEC 표면 단백질 및 44kDa 항원의 분리

HDMEC을 EDTA/bovine serum albumin(BSA)으로 분리, 수집한 후 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF, Sigma), 10mM NPGP, 1mM EDTA, 및 1% triton-X등이 함유된 완충액으로 얼음 속에서 30분간 반응시켜 용해시켰다. 4°C, 10,000 xg에서 30분간 원침시킨 후 상청액을 수집하여 HDMEC의 표면 단백을 분리하였고, 595nm의 UV-1601PC 분광광도계(Shimadzu Co., Tokyo, Japan)로 농도를 측정하였다.

이 표면 단백을 동량의 젤전기영동 시료 완충액과 혼합한 다음, 10% polyacrylamide 구배젤에 넣고, 60mA의 일정한 전류하에서 45-90분간 전기영동을 시행하였다. 젤을 분리하여 나이트로셀룰로스 용지에 전기영동적으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 나이트로셀룰로스 용지를 0.05% tween 20-PBS로 3회 세척한 후 3% BSA를 처리하여 비결합 부

위를 차단시켰다. HDMEC 표면 단백질에 대한 ELISA 검사(하기 4항)에서 양성반응을 보인 베체트병 환자의 활동기 혈청을 실온에서 2시간 반응시킨 후 tween 20-PBS로 세척하고 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM(Biosource International Co., Camarillo, CA, USA)을 2시간 반응시켰다. 다시 0.05% tween 20-PBS로 세척후 diaminobenzidine을 섞은 용액에 30% H₂O₂ 5μl를 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨다음 PBS로 세척하여 44kDa 항원에 대한 반응을 확인하였다. 분자량 표준 단백질 기준으로 44kDa에 해당하는 밴드를 잘라서 모은 후 전기영동 유출기(CBS Scientific Co., Del mar, CA, USA)로 분리하였다.

4. HDMEC 표면 단백질 및 44kDa 항원에 대한 IgM 항체 검출을 위한 효소 면역 표지법

바닥이 편평한 폴리스티렌 microtiter plate의 각 well에 carbonate 완충액(pH 9.6)으로 희석한 표면 단백질 2μg/ml을 50μl씩 넣은 후 4°C에서 18시간 방치시켰다. 0.05% tween 20-PBS 용액으로 3회 세척 후 비특이 반응을 억제하기 위하여 tween-PBS로 3회 세척하였다. 1:10으로 희석된 대조군 및 베체트병 환자 혈청 100μl씩을 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM 항체를 5% 송아지 신생아 혈청이 함유된 HBSS로 1:1,000 희석시킨 용액과 37°C에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척 후 상온의 암실에서 기질과 반응시켰다. 기질은 100mg의 tetramethylbenzidine을 10ml의 아세톤에 섞어 원액으로 만들었고, 사용직전 원액 100μl를 증류수 10ml에 넣고 30% 과산화수소 1μl를 넣고 잘 혼합한 다음 100μl씩을 각 well에 넣었다. 8N H₂SO₄ 25μl씩을 떨어뜨려 반응을 중지시키고, 효소 면역 표지법 판독기(Dynatech Lab. Inc., Alexandria, VA, USA)로 450nm에서 판독하여, 정상 대조군의 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 양성으로 판정하였다.

상기의 HDMEC 표면 단백질에 대한 IgM-ELISA 검사상 양성인 베체트병 환자의 혈청을 대상으로 HDMEC에서 분리한 44kDa 항원에 대한 IgM-ELISA 검사를 동일한 방법으로 시행하였다.

5. 베체트병 환자의 혈청으로부터 IgM-AECA 분리

베체트병 환자의 혈청 중 ELISA 검사상 IgM-AECA 항체가 강양성 반응을 보인 8명의 혈청을 사용하였다. 1.5 x 14cm 크기의 column에 PBS(pH 7.3)로 조정된 Ultrogel AcA 34를 채운 후 혈청 0.7ml를 유출시켜 분리된 4개의 분획을 260nm의 분광광도계(LKB, Stockholm, Sweden)를 이용한 그래프로 관찰하여, 제일 먼저 유출되는 IgM 분획을 각각 수집하였다.

6. HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 조사

가. 효소 면역 표지법(ELISA)

배양한 HDMEC을 배체트병 환자 8명 각각의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM으로 처리한 후 30분 후에 상청액을 수집하여 IgM-AECA 제거 배양액을 만들었다. HDMEC에 배체트병 환자의 IgM-AECA와 IgM-AECA 제거 배양액, 정상인의 IgM 등을 첨가한 다음 37°C에서 16시간 배양한 후 tween-PBS로 3회 세척하였다. 일차 항체로 항 ICAM-1 단클론항체(Immunotech Inc., Westbrook, ME, USA)를 사용하였고, 이차 항체로 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma)를 사용하여 상기 4항의 방법으로 ELISA를 시행한 후, ELISA 판독기(Dynatech Lab.)로 450nm에서 판독하였다.

나. 면역형광 유량 세포분석법(fluorescence-activated cell sorting: FACS)

배양한 HDMEC을 1:10으로 희석한 배체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM으로 처리한 다음 37°C에서 16시간 배양한 후 5mM EDTA와 1% BSA가 함유된 HBSS를 넣고 조직 배양판으로부터 세포를 수집하여 HBSS로 3회 세척 후 항체염색을 위해 각 시험관으로 분주하였다. 0.5% BSA가 함유된 PBS(BSA-PBS)로 적절히 희석한 항 ICAM-1 단클론항체를 각 시험관에 10 μ l씩 넣은 후 얼음 속에서 30분간 반응시키고, BSA-PBS로 3회 세척 후, BSA-PBS를 이용하여 1:20으로 희석한 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma)를 넣고 30분간 반응시켰다. BSA-PBS로 다시 3회 세척한 후 fluorescence activating cell sorter(FACStar, Becton-Dickinson, Lincoln, NJ, USA)를 이용하여 ICAM-1 분자의 발현 양상을 측정하였다. Propidium iodide(Sigma)로 죽은 세포를 처리하여 구별하였다.

7. TNF α 및 IL-1 α 의 생성 조사

가. HDMEC 배양 상청액에서 활성물질 조사

IgM-AECA 처리 16시간후 수집한 HDMEC 배양 상청액으로 새 배양판의 HDMEC을 처리한 후, 상기 6-가항과 같은 방법으로 ICAM-1 분자 발현을 조사하기 위한 ELISA를 시행하였다.

나. 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 ICAM-1 분자 발현 억제능 조사

배양한 HDMEC 단층에 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체를 첨가하여 1시간 배양하고 IgM-AECA를 첨가하여 16시간 배양한 후 ICAM-1 분자에 대한 ELISA를 시행하였다. 또한 IgM-AECA 단독에 의한 ICAM-1 분자 발현의 정도와 비교하여 억제 여부를 조사하였다.

다. TNF α 및 IL-1 α 에 대한 ELISA

6 well 배양판에 배체트병 환자의 IgM-AECA 및 정상 대조군의 IgM으로 각각 HDMEC을 16시간 처리한 후 Vivaspin 농축기(Vivascience Co., LN, UK)를 이용하여

배양액을 농축한 후 Quantikine[®] human IL-1 α 및 TNF α immunoassay kit(R&D)를 사용하여 ELISA를 시행하였다.

라. TNF α 및 IL-1 α 에 대한 FACS

베체트병 환자의 IgM-AECA 및 정상 대조군의 IgM을 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양한 HDMEC 단층에 5mM EDTA와 1% BSA가 함유된 HBSS를 넣고 조직 배양판으로부터 세포를 수집하여 HBSS로 3회 세척 후 항체염색을 위해 각 시험관으로 분주하였다. BSA-PBS로 적절히 희석한 후 일차 항체로 항 TNF α 단클론항체(R&D)와 항 IL-1 α 단클론항체(R&D)를, 이차 항체로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(Sigma)를 사용하여 상기의 방법으로 FACS를 시행하였다. 세포질 염색은 조직 배양판으로부터 세포를 수집한 후, 1:10으로 희석한 FACS permeabilizing 용액(Becton-Dickinson)을 500 μ l씩 첨가하여 상온의 암실에서 10분간 처리한 후 상기와 동일한 방법으로 시행하였다.

마. TNF α 및 IL-1 α mRNA 검출을 위한 역전사효소-중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)

(1) 총 RNA 분리: 베체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM을 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 각각 0, 6, 24시간 배양한 HDMEC을 trypsin 처리하여 배양판에서 떼어낸 후, QIAshredder[®](Qiagen Co., Hilden, Germany)와 RNeasy mini kit[®](Qiagen)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA의 농도는 260nm의 파장에서 UV-1601PC 분광광도계(Shimadzu)를 이용하여 측정하였다.

(2) First strand cDNA 합성: 분리한 총 RNA 2 μ g으로부터 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(AMV)(Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN, USA)과 GeneAmp PCR system 9600(Perkin elmer corp., Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. First strand cDNA의 생성 여부를 알기 위해 생성된 반응산물 10 μ l, Taq polymerase(Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 0.5U와 human beta actin primers(sense primer: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; antisense primer: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3')를 각각 20pmole씩 혼합하여 PCR을 시행하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600(Perkin elmer)을 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초를 23회 시행하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물 10 μ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 600bp의 밴드의 유무를 확인하였다.

(3) TNF α 및 IL-1 α primer를 이용한 PCR: TNF α 및 IL-1 α 의 primer로서 각각 human TNF α primer set for RT-PCR(Stratagene, LaJolla, LA, USA)과 human IL-1 α primer set for RT-PCR(Stratagene)을 이용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초를 35회 시행하고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 양성 대조군으로 10⁵개의 herpes simplex virus를 HDMEC에 처리한 후

함께 시행하였다. PCR 산물 10 μ l를 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 밴드 유무를 관찰하였다.

8. MAPK의 활성화 조사

가. ERK의 활성화 조사

베체트병 환자 8명의 IgM-AECA 및 정상 대조군의 IgM을 각각 1:10으로 희석하여, 24 well 배양판에서 배양한 HDMEC에 각각 0분, 5분, 15분, 30분, 1시간, 1시간 30분, 3시간의 다양한 시간으로 자극을 준 후, 상청액을 버리고 PBS 용액으로 1회 세척하였다. 각 well에 100 μ l의 SDS-PAGE 시료 완충액으로 처리하여 세포를 배양판으로부터 떼어낸 후, 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 열처리하였다. 준비된 시료들을 SDS-PAGE 시행후 면역블롯을 하였다. ERK는 활성화되면 Thr 202번과 Tyr 204번 잔기가 동시에 인산화되므로 일차 항체로서 ERK의 phospho-Tyr 204번 특이 항체(New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA)를 이용하였다. 블롯된 단백질을 1:1,000으로 희석한 일차 항체와 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응 후 0.02% tween 20이 함유된 TBS 용액으로 10분간 세척한 후, 비특이적인 결합을 억제하기 위해 5% 탈지유로 2시간 처리하였다. 0.02% tween 20 in TBS 용액으로 5분간 3회 세척 후, 이차 항체로서 peroxidase와 결합된 1:1,000 goat anti-mouse IgG로 상온에서 1시간 반응시킨 다음 0.02% tween 20이 함유된 TBS 용액으로 5분간 3회 세척하였다. Enhanced chemiluminescence 반응(Amersham Pharmacia Co., Buckinghamshire, England)으로 결과를 관찰하였다.

나. JNK의 활성화 조사

상기와 같은 방법으로 준비된 시료들을 SDS-PAGE 후 면역블롯을 하였다. JNK는 활성화되면 Thr 183번 잔기와 Tyr 185번 잔기의 인산화가 일어나게되므로 일차 항체로서 phospho-Thr 183번 잔기와 phospho-Tyr 185번 잔기를 특이적으로 인식하는 항체(New England Biolabs)를 이용하여 위의 방법으로 검사하였다.

다. P38의 활성화 조사

상기의 방법으로 준비된 시료들을 SDS-PAGE 후 면역블롯을 하였다. P38은 활성화되면 Thr 180번 잔기와 Tyr 182번 잔기의 인산화 과정이 일어나게되므로 일차 항체로서 phospho-Thr 180번 잔기와 phospho-Tyr 182번 잔기를 특이적으로 인식하는 항체(New England Biolabs)를 이용하여 위의 방법으로 조사하였다.

9. MEK 억제제(PD98059)에 의한 ICAM-1 분자 발현의 억제능 조사

ERK의 특이적 상위 kinase인 MAPK/ERK kinase(MEK) 억제제 PD98059(Calbiochem Co., Jolla, LA, USA)를 이용하여 ERK의 활성화 억제여부를 면역블롯으로 확인하였고, ICAM-1 분자 발현에 대한 ELISA를 시행하여 억제 유무를 관찰하였다. PD98059는

DMSO에 완전히 용해시킨 후 여러 농도로 희석하여 HDMEC을 IgM-AECA로 자극시키기 30분전에 전처치하였다.

10. 통계처리

본 실험의 측정수치는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계학적 분석은 비모수 검정법 중 윌콕슨 순위합 검정과 분산분석 및 unpaired Student's t-test로 검정하였으며, p값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. HDMEC 표면 단백질과 44kDa 항원에 대한 IgM 항체 양성을

HDMEC의 표면 단백질에 대한 IgM 항체를 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 정상 대조군 11명의 평균 광학밀도는 0.08 ± 0.02 인 반면, 베체트병 환자 54명의 평균 광학 밀도는 0.19 ± 0.11 의 값을 보여 정상 대조군에 비해 유의하게 높은 값을 나타내었고($P < 0.05$), 정상 대조군 11명의 광학밀도 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 양성으로 판정하였을 때 베체트병 환자 54명 중 29명(53.7%)에서 양성 반응을 나타내었다(그림 1). 이들 29명 중 23명(79.3%)에서 HDMEC 44kDa 항원에 대해서 양성 반응을 보였다.

2. IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 변화

음성 대조 항체를 처리하였을 때 0.05 ± 0.02 의 수치를 보였고, 자극을 주지 않은 상태에서 0.15 ± 0.03 의 수치를 나타내었다. 정상 대조군 5명의 IgM과 베체트병 환자 8명의

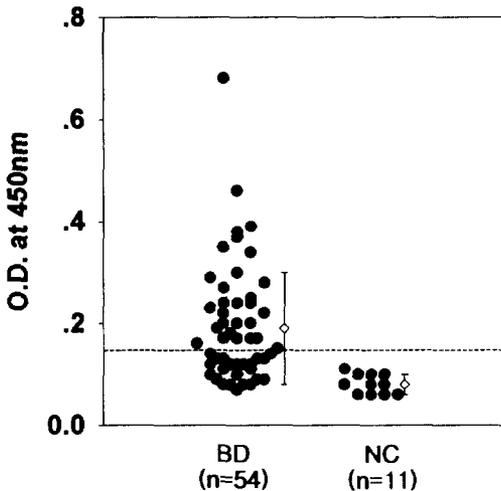


그림 1. HDMEC 표면 단백질에 대한 IgM 항체 반응. 정상 대조군과 베체트병 환자의 혈청으로부터 IgM 항체를 ELISA로 측정하였다. 각 혈청의 평균값을 점으로 표시하였고, 각 군의 평균±표준편차를 표시하였다. 정상 대조군 11명의 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 양성으로 판정할 때, 베체트병 환자 54명 중 29명(53.7%)에서 양성 반응을 나타내었다. BD: 베체트병 환자군, NC: 정상 대조군

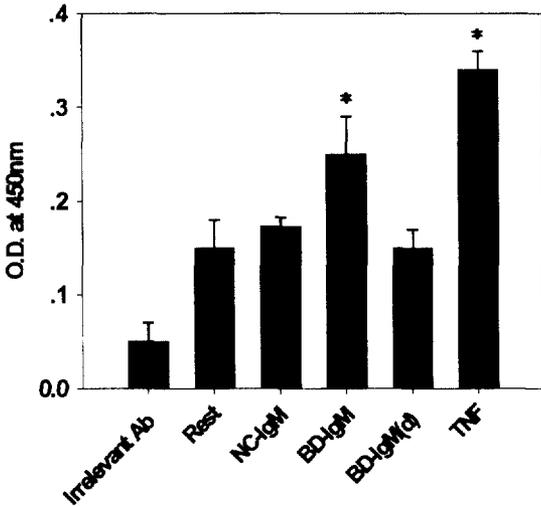


그림 2. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 변화. HDMEC 단층에 베체트병 환자의 IgM-AECA, IgM-AECA 제거 배양액, 정상 대조군의 IgM을 첨가하고 16시간 후에 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 정도를 ELISA로 측정하였다. 베체트병 환자의 IgM-AECA과 양성 대조군인 TNF α 로 처리하였을 때만 ICAM-1 분자의 발현이 증가됨을 관찰하였다. *: $p < 0.05$ (자극하지 않은 HDMEC과 비교), Irrelevant Ab: 음성 대조항체 처리군, Rest: 자극하지 않은 HDMEC, NC-IgM: 정상 대조군의 IgM 처리군, BD-IgM: 베체트병 환자의 IgM-AECA 처리군, BD-IgM(d): 베체트병 환자의 IgM-AECA 제거 배양액 처리군

IgM-AECA 제거 배양액으로 처리하였을 때 각각 0.17 ± 0.01 , 0.15 ± 0.02 로 처리전 상태와 차이가 없었으나, 베체트병 환자 8명의 IgM-AECA과 양성 대조군인 TNF α 로 처리하였을 때는 각각 0.25 ± 0.04 , 0.34 ± 0.02 로 ICAM-1 분자 발현이 통계적으로 유의하게 증가되어, ICAM-1 분자 발현을 증가시키는 인자가 IgM-AECA임을 알 수 있었다(그림 2). 정상 대조군의 IgM을 첨가시에는 5명 모두 ICAM-1 분자의 발현 변화를 보이지 않았으나, IgM-ELISA 검사상 강양성 반응을 보인 베체트병 환자 8명의 혈청에서 분리한 IgM-AECA 처리군에서는 모두 ICAM-1 분자의 발현이 증가되었다.

3. IgM-AECA에 의한 TNF α 및 IL-1 α 의 생성

가. 활성화된 HDMEC 배양 상청액내의 활성물질

IgM-AECA으로 HDMEC을 처리시 ICAM-1 분자 발현이 유의하게 증가된 반면, IgM-AECA로 HDMEC을 처리하여 16시간 후 수집한 배양 상청액으로 새 배양판의 HDMEC을 처리한 군에서는 자극하지 않은 HDMEC과 차이가 없어(그림 3), IgM-AECA로 HDMEC을 16시간 처리한 배양 상청액내에 ICAM-1 분자 발현을 증가시키는 활성인자가 없음을 시사하였다.

나. 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 ICAM-1 분자 발현 억제능

IgM-AECA와 함께 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체로 처리한 군에서 IgM-AECA 단독 처리군에 비해 ICAM-1 분자 발현에 큰 차이가 없어 이들 사이토카인에 대한 항체들이 ICAM-1 발현 증가에 대한 유의한 억제 효과가 없음을 관찰하였다(그림 4).

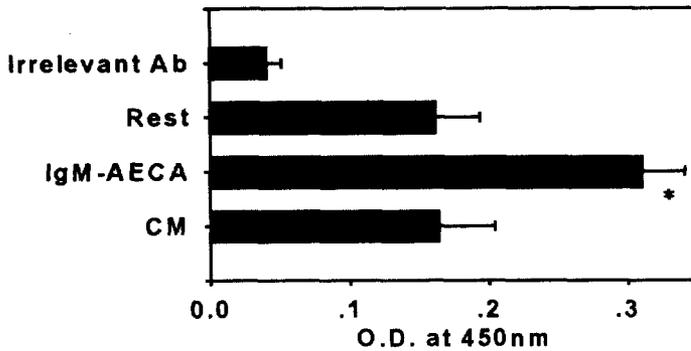


그림 3. 활성화된 HDMEC의 배양 상청액에 의한 ICAM-1 분자 발현 변화. IgM-AECA로 HDMEC을 처리후 16시간후에 수집한 배양 상청액으로 새 배양판의 HDMEC을 처리한 후 ICAM-1 분자에 대한 ELISA법으로 450nm에서 ICAM-1 분자의 발현 양상을 관찰하였다. IgM-AECA 처리시 ICAM-1 분자 발현이 유의하게 증가된 반면, 16시간후 수집한 배양 상청액을 처리시 자극하지 않은 HDMEC과 차이가 없음을 관찰하였다. *: $p < 0.05$ (자극하지 않은 HDMEC과 비교), Irrelevant Ab: 음성 대조 항체 처리군, Rest: 자극하지 않은 HDMEC, CM: IgM-AECA로 HDMEC을 처리 16시간 후에 수집한 배양 상청액으로 처리한 군

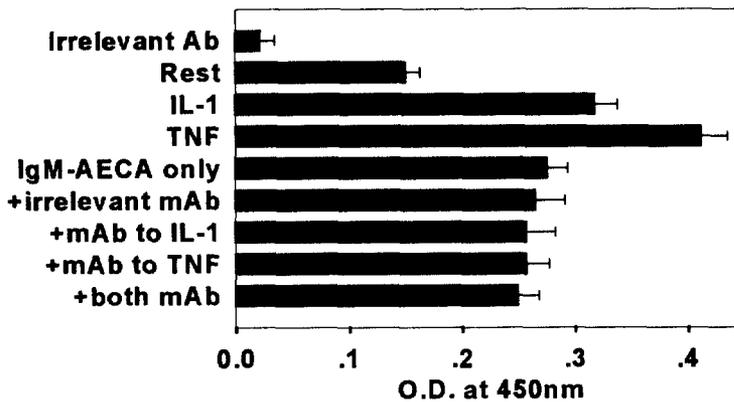


그림 4. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 미치는 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체의 효과. 배양한 HDMEC 단층에 항 TNF α 항체나 항 IL-1 α 항체를 첨가하고 1시간 배양한 후 IgM-AECA를 첨가하여 16시간 배양한 후 ELISA법으로 450nm에서 ICAM-1 분자의 발현 정도를 측정하였다. IgM-AECA와 항 TNF α 항체 및 항 IL-1 α 항체를 함께 첨가한 HDMEC에서 IgM-AECA 단독 처리군에 비해 ICAM-1 분자 발현에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

다. 활성화된 HDMEC 배양 상청액내 TNF α 및 IL-1 α 검출

6 well 배양판의 상청액을 농축시켜 시행한 TNF α ELISA 검사상 정상 대조군은 0.07 ± 0.001 , 실험군은 0.08 ± 0.002 이었고, IL-1 α 의 경우 정상 대조군은 0.09 ± 0.003 , 실험군은 0.09 ± 0.002 로 IgM-AECA로 활성화된 HDMEC 배양 상청액에서 TNF α 와 IL-1 α 를 검출할 수 없었다(표 1).

라. HDMEC 표면 및 세포질의 TNF α 및 IL-1 α 발현

통상적인 FACS상 베체트병 환자의 IgM-AECA 및 정상 대조군의 IgM 처리군 모두 HDMEC 표면 TNF α 및 IL-1 α 는 관찰되지 않았다. Permeabilizing 용액을 이용한 세포질 염색의 FACS 분석에서도 정상 대조군 및 실험군 모두에서 HDMEC의 세포질 내에서 TNF α 와 IL-1 α 는 관찰되지 않았다(그림 5).

마. IgM-AECA에 의한 HDMEC TNF α 및 IL-1 α mRNA의 발현

정상 대조군과 실험군 모두에서 600bp에 해당하는 Human beta actin 밴드를 관찰하여 cDNA가 잘 합성되었음을 확인하였다. TNF α 의 경우 355bp의 밴드가 정상 대조군과 실험군 모두에서 관찰되지 않았으며, IL-1 α 의 경우에는 564bp의 밴드가 정상 대조군과 실험군에서 모두 희미하게 관찰이 되었으나 양군간의 의미있는 차이는 없었고, HSV로 처리한 양성 대조군과 비교하여 뚜렷한 발현 소견을 관찰할 수가 없었다(그림 6).

표 1. 베체트병 환자의 IgM-AECA 첨가후 배양한 HDMEC 상청액내 TNF α 및 IL-1 α 검출¹

실험군	사이토카인 검출양 ²	
	TNF α	IL-1 α
베체트병 환자의 IgM-AECA 처리군(8) ³	0.08 ± 0.002	0.09 ± 0.002
정상 대조군의 IgM 처리군(5)	0.07 ± 0.001	0.09 ± 0.003

1: 배양한 HDMEC에 베체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM 항체를 첨가하여 16시간후 Vivaspin 농축기로 배양 상청액을 농축하여 TNF α 및 IL-1 α 의 광학밀도를 측정하였다.

2: 단위는 O.D. 450nm에서 측정한 광학밀도이고 그 값은 평균±표준편차로 나타내었다.

3: ()안의 숫자는 실험 대상의 수를 나타낸 것임.

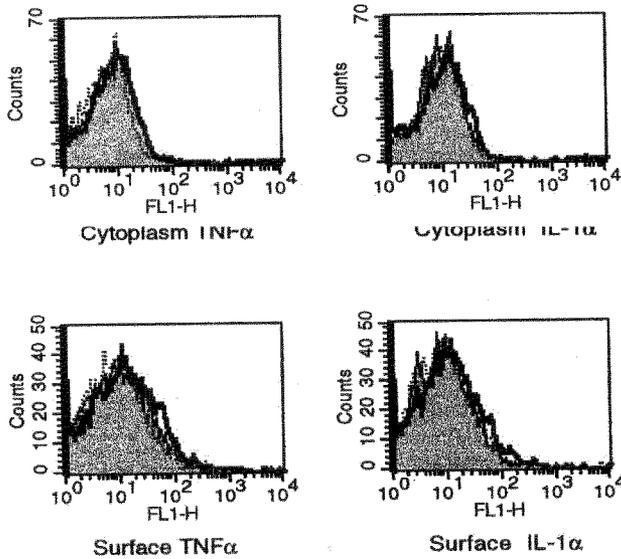


그림 5. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC 표면과 세포질의 TNF α 및 IL-1 α 발현에 대한 FACS 분석. 베체트병 환자의 IgM-AECA(실선)와 정상 대조군의 IgM(점선)으로 HDMEC을 처리 16시간 후에 HDMEC의 표면 및 세포질의 사이토카인에 대한 단클론항체를 반응시킨 후 FITC가 결합된 이차 항체와 결합시켜 FACStar로 분석하였다. IgM-AECA로 처리하지 않은 상태(회색 분획)와 두 군간의 차이가 없었다.

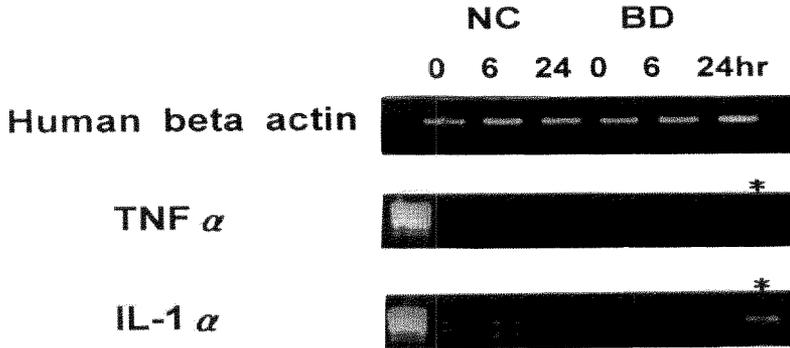


그림 6. 베체트병 환자의 IgM-AECA 처리후 HDMEC의 TNF α 및 IL-1 α mRNA 검출을 위한 RT-PCR 소견. 베체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM을 HDMEC에 첨가하고 0, 6, 24시간 후에 세포를 취하여 RNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후 human beta actin, TNF α 와 IL-1 α 에 대한 PCR을 시행하였다. Human beta actin은 정상 대조군과 실험군 모두에서 밴드가 관찰되었고, TNF α 의 mRNA는 정상 대조군과 실험군 모두 관찰되지 않았으며, IL-1 α 의 mRNA는 정상 대조군과 실험군에서 모두 희미하게 관찰되었으나 양군간의 의미있는 차이는 없었다. *: HDMEC에 HSV 처리한 군

4. MAPK 신호전달 과정

ICAM-1 분자를 발현시키는 베체트병 환자 8명의 IgM-AECA로 HDMEC을 자극한 후 44kDa의 분자량을 갖는 ERK1과 42kDa의 분자량을 갖는 ERK2가 쌍을 이룬 밴드로 관찰되었으나 JNK나 p38은 관찰되지 않았다(그림 7). ERK1/2는 5분에서 1시간 30분까지 관찰되었으며, 주로 5분, 15분, 30분에서 관찰되었고, 공통적으로 5분에서 최대치를 보이므로, 자가항체의 결합으로 시작되는 세포내 신호전달 과정의 초기에 관여함을 알 수 있었다(그림 8).

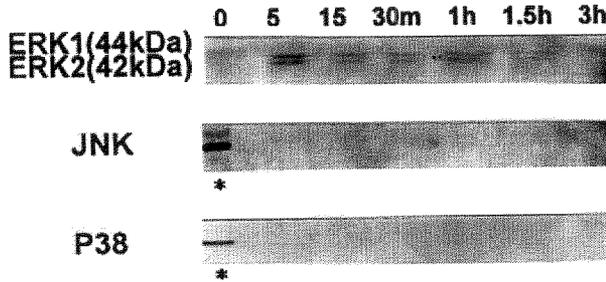


그림 7. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 MAPK 활성화 소견. 베체트병 환자의 IgM-AECA로 HDMEC을 처리한 후 3시간까지 다양한 시간대로 세포를 취하여 ERK, JNK, p38의 3가지 MAPK에 대한 면역블롯을 시행하였다. 44kDa의 분자량을 갖는 ERK1과 42kDa의 분자량을 갖는 ERK2가 쌍을 이룬 밴드로 5분에서 1시간 30분까지 관찰되나 JNK와 p38은 어느 시간대에서도 관찰되지 않았다. *: 양성 대조군

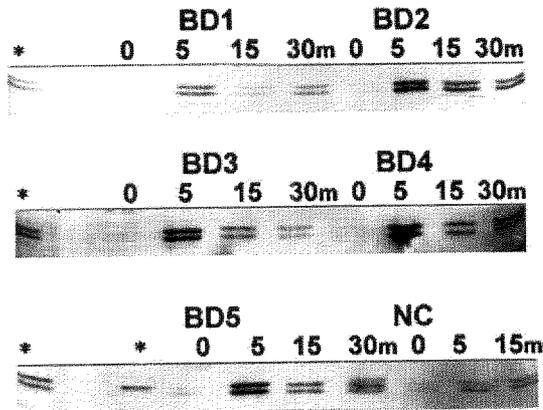


그림 8. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의해 활성화된 HDMEC에서 관찰된 ERK1/2의 면역블롯 소견. 5명의 베체트병 환자의 IgM-AECA로 HDMEC을 처리한 군에서 정상 대조군에 비해 의미있게 5분, 10분, 15분에서 양성으로 관찰되었고 모든 환자에서 공통적으로 5분에 최대치를 이루었다. *: 양성 대조군

5. MEK 억제제(PD98059)를 이용한 ICAM-1 분자 발현의 억제능

ERK의 활성 억제는 면역블롯을 이용하여 확인하였으며, MEK 억제제의 농도가 40 μ M에서 일부 억제되었고, 60 μ M에서 완전히 억제됨을 관찰하였다(그림 9).

ICAM-1 분자 발현 억제는 베체트병 환자 8명 중 2명에서 자극하지 않은 상태와 같은 수준으로 완전히 억제됨을 관찰하였고(그림 10), 나머지 6명에서는 50%의 억제가 관찰되었다(표 2).

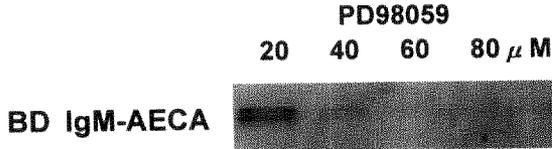


그림 9. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 ERK1/2 활성화에 미치는 MEK 억제제(PD98059)의 효과. ERK의 특이적 상위 kinase인 MEK에 대한 억제제를 사용하여 ICAM-1 분자 발현을 억제시키는 농도를 알아보기 위한 면역블롯을 시행하였다. MEK 억제제는 베체트병 환자의 IgM-AECA를 첨가하기 30분전에 전처치하였다. MEK 억제제의 농도가 40 μ M에서 밴드가 희미하게 관찰되었고, 60 μ M에서 완전히 소실됨을 관찰하였다.

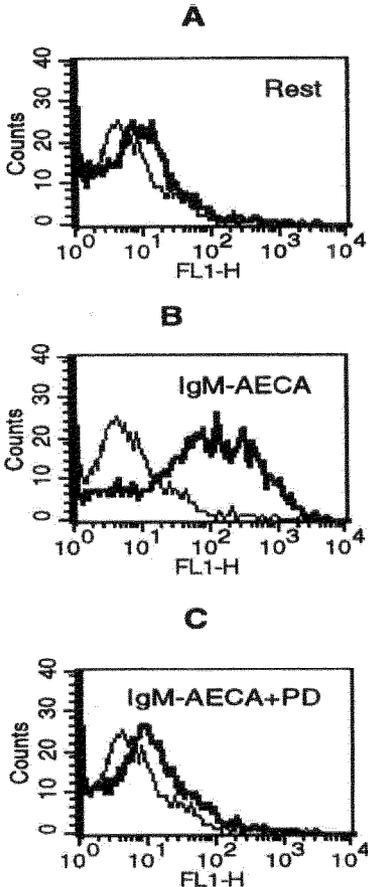


그림 10. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 대한 MEK 억제제(PD98059)의 효과. 미리 30분전에 MEK 억제제로 전처치한 HDMEC에 환자의 IgM-AECA를 첨가하여 6시간 후에 ICAM-1 분자 발현에 대한 FACS를 시행하였다. A: 음성 대조 항체 처리시보다(얇은 실선) 처리하지 않은 HDMEC(진한 실선)이 정상적으로 ICAM-1 분자의 발현이 조금 증가되어 있다. B: 베체트병 환자의 IgM-AECA를 첨가한 경우(진한 실선) HDMEC의 ICAM-1 분자 발현이 증가되며, C: MEK 억제제로 전처치하고 IgM-AECA 첨가시(진한 실선) HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가가 억제됨을 관찰하였다.

표 2. 베체트병 환자의 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 증가에 대한 MEK 억제제(PD98059)의 효과

실험군	ICAM-1 분자 발현 증가 ¹	MEK 억제제에 의한 억제 ⁴	
		100% 억제	50% 억제
베체트병 환자의 IgM-AECA 처리군(8) ²	8	2	6
정상 대조군 IgM 처리군(5)	0	-	-

- 1: 다양한 HDMEC에 베체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM을 첨가하여 16시간 후 ICAM-1 분자 발현에 대한 ELISA를 시행하여 각 군의 ICAM-1 분자 발현 증가를 보인 실험 대상의 수를 구하였다.
- 2: MEK 억제제로 30분전에 전처리한 HDMEC에 베체트병 환자의 IgM-AECA와 정상 대조군의 IgM을 첨가하여 6시간 후에 ICAM-1에 대한 ELISA를 시행하여 억제를 보인 실험 대상의 수를 구하였다.
- 3: ()안의 숫자는 실험 대상의 수를 나타낸 것임.

IV. 고찰

베체트병의 병인은 명확히 규명되지는 않았으나, 임상적으로 혈전정맥염이 환자의 30%에서 발생하고, 경결 홍반과 궤양 등 혈관의 손상을 자주 보여주며(Chajek 및 Fainaru, 1975), 조직학적으로도 보체 매개성 과민성 혈관염이나 림프구성 혈관염이 관찰되어(Slavin 및 deGroot, 1981; Bang 등, 1987; Jorizzo 등, 1988), 혈관의 손상이 조직의 염증을 일으켜 병인에 관여하리라고 추정된다(Jorizzo 등, 1984; Savage 및 Cooke, 1993; Ghate 및 Jorizzo, 1999). 염증 과정 중 여러 염증 세포가 주변 조직으로 이동하게 되는데, 이 과정에 필수적인 것이 혈관 내피세포와 염증 세포간의 유착 분자에 의한 부착이다. 내피 세포의 세포 유착 분자는 잘 알려져 있으며, 대표적인 것으로 면역글로불린군에 속하는 ICAM-1, VCAM-1과 selectin 세포유착 분자에 속하는 E-selectin이 있다. ICAM-1의 발현은 TNF α , IL-1 α , IFN- γ , LPS에 의하여 유도되며, 호중구나 림프구 등 대부분의 백혈구 세포에서 발현되는 lymphocyte function associated antigen-1(LFA-1) 유착 분자와 결합하고, VCAM-1도 역시 TNF α 나 IL-1 α 등의 염증성 사이토카인에 의해 발현이 유도되어 림프구의 very late activation antigen-4(VLA-4) 유착 분자와 결합하여 이들을 염증 부위로 유주시키게 된다(Wardlaw, 1997).

베체트병에서 관찰되는 항내피세포 항체는 44kDa의 항원을 인지하는 IgM 항체(IgM-AECA)임이 관찰되었는데, 이 44kDa의 항원은 인체진피 미세혈관 내피세포와 인체 제대정맥 내피세포에서는 발견이 되나, 편평세포나 섬유아세포, 흑색종 세포 등에서는 발견되지 않아 혈관 내피세포에 특이한 항원으로 생각된다(Lee 등, 1999a; Lee 등,

1999b). 또한 질환에 따라 항내피세포 항체의 인지하는 항원이 다르며, 베체트병에서 발견되는 44kDa 항원에 대한 항체는 전신성 홍반성 낭창 등에서는 발견이 되지 않아 베체트병에 특이한 항체로 추정된다(이광훈 등, 1999; Lee 등, 1999a).

본 연구에서 베체트병 환자 54명 중 29명인 53.7%에서 HDMEC의 표면 단백질에 대한 IgM 항체가 관찰되었고, 이들 29명 중 23명인 79.3%에서 IgM-AECA가 관찰되어 항내피세포 항체의 대부분이 44kDa 항원에 대한 항체임을 알 수 있었다. 본 실험에서는 HDMEC 배양판에 IgM-AECA를 첨가한 후 30분 후에 수집한 배양 상청액인 IgM-AECA 제거 배양액으로 44kDa 항원에 대한 ELISA를 시행한 결과 IgM-AECA 역가가 정상 대조군의 역가로 감소한 것을 확인하였다. 이 IgM-AECA 제거 배양 상청액으로 HDMEC 배양판에 처리한 군에서는 ICAM-1의 발현이 증가되지 않아 IgM-AECA가 직접적으로 HDMEC에서 ICAM-1의 발현을 유도시킴을 알 수 있었다.

Carvalho 등은 경피증 환자의 IgG 항내피세포 항체가 포함된 총 IgG 항체가 인체 제대정맥 내피세포의 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin과 같은 세포유착 분자의 발현을 증가시키고 림프구와의 유착을 증가시키는 기전으로 항내피세포 항체에 의한 내피세포 IL-1 α 의 생성 및 자가분비 효과를 추정하였으나 IL-1 α 를 검출하지는 못하였다(Carvalho 등, 1996). 현재까지 베체트병 환자의 항내피세포 항체에 의한 연구는 보고된 바가 없으며, TNF α 나 IL-1 α 는 혈관 내피세포의 세포유착 분자를 유도하는 대표적인 사이토카인이고, 특히 IL-1 α 는 염증 반응에서 내피세포에서 형성 및 분비되어 자가분비 효과를 보이는 사이토카인이므로 본 연구에서도 베체트병에서 발견되는 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 TNF α 나 IL-1 α 생성 가능성이 높다고 생각하였다. 그러나 본 연구에서 IgM-AECA로 처리한 후 16시간 후에 수집한 배양 상청액이 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현을 증가시키지 못하였고, 이들 사이토카인에 대한 단클론항체가 ICAM-1 분자 발현을 억제시키지 못함을 관찰하여 이들 사이토카인의 생성 증거를 찾을 수 없었다. 또한 보다 직접적인 방법으로서 IgM-AECA로 처리한 후 HDMEC 배양 상청액을 농축시켜 TNF α 및 IL-1 α 에 대한 ELISA를 시행하였고, HDMEC의 표면 및 세포질 염색을 이용한 FACS와 최종적으로 TNF α 및 IL-1 α 의 mRNA를 검출하기 위한 RT-PCR을 시행하여 이들 모두에서 음성을 보임으로서 이들 사이토카인의 자가분비 효과를 배제할 수 있었다. 이는 전체적인 연구의 흐름에도 부합되는 결과인데, IgM-AECA에 의한 ICAM-1 분자 발현의 유도는 ELISA 상에서 1시간부터 검출이 가능하며 4시간에 최대치의 80%에 이르고, 16시간에 최대치에 이르는 비교적 빠른 진행을 보여(Henninger 등, 1997; Lee 등, 1999b) IgM-AECA에 의한 자극이 유전자의 조절로 인한 사이토카인 생성 및 분비, 자가분비 효과로 ICAM-1 분자 발현이 유도된다고 설명하기에는 시간적으로 잘 맞지 않기 때문이다.

MAPK는 크게 3가지 군으로 나누는데, 이들은 세포막으로부터 자극을 세포내로 전달

하는 역할을 하며, 세포질내의 다른 protein kinase를 활성화시키거나, 핵 내로 이동하여 AP-1, c-myc, Elk-1, ATF-2와 같은 여러 전사 인자를 조절하여 유전자 수준에서 세포의 여러 단백질을 생성 및 조절하고, 궁극적으로 세포의 성장, 분화, 아포프토시스 등의 여러 과정에 관여하게 된다(Su 및 Karin, 1996; Petrazzuoli 및 Goldsmith, 1999). 비교적 경로가 잘 알려져 있는 ERK cascade의 경우, 성장 인자의 수용체 결합이나 항원의 T-세포 항원 수용체(TCR)와의 결합이 일어나게 되면, 세포막의 oncoprotein인 Ras가 활성화되고, 연쇄적으로 MAPKKK인 Raf의 활성화가 뒤따르게 되며, Raf가 MEK1/2를, MEK1/2가 ERK1/2를 인산화시킴으로써 활성화시킨다. 활성화된 ERK1/2는 핵 내의 전사인자인 Elk-1을 조절하게 된다(Su 및 Karin, 1996; Petrazzuoli 및 Goldsmith, 1999). ERK는 분자량에 따라 44kDa의 분자량을 갖는 ERK1과 42kDa의 분자량을 갖는 ERK2의 아형으로 나뉘는데, 이들은 각각 특이적으로 MEK1/2에 의해 활성화된다(Su 및 Karin, 1996). P38 cascade는 TNF α 및 IL-1을 억제하는 항염증 제제의 표적이 됨은 잘 알려져 있다(Su 및 Karin, 1996). 현재까지 알려진 바로는 단핵구에서 TNF α 및 IL-1의 생성과정에 p38 cascade가(Young 등, 1993), IL-3 mRNA 조절에 JNK, p38 cascade가 관여하고(Su 등, 1994), 인체 체대정맥 내피세포에서 TNF에 의한 VCAM-1 분자 발현 유도 과정과(Pietersma 등, 1997), lipopolysacchride와 TNF α 에 의한 인체 폐혈관 내피세포의 ICAM-1 분자 발현에 p38 cascade가 관여한다는 보고가(Tamura 등, 1998) 있었다. 또한 TNF α 및 IL-1 α 에 의한 인체 체대정맥 내피세포의 세포유착 분자의 발현에 protein tyrosine kinase가 관여한다는 보고는 있으나(May 등, 1996) 아직까지 항내피세포 항체에 의해 유도된 HDMEC ICAM-1 분자 발현의 신호전달 경로에 관한 보고는 없었다.

본 연구에서는 베체트병 환자 8명 각각의 IgM-AECA로 HDMEC을 처리하여, 모두에서 ICAM-1 분자의 발현이 증가됨을 확인하였고, 또한 MAPK 중에서 ERK만이 관여함을 관찰하였다. ERK의 활성화는 5분에서 1시간 30분까지 관찰되었는데, ERK1과 ERK2가 쌍을 이룬 밴드로 관찰이 되었고, 공통적으로 5분에서 가장 강한 활성도를 보여, IgM-AECA에 의한 자극이 초기에 직접적으로 ERK cascade를 활성화시킴을 시사하였다. IgM-AECA에 의한 ICAM-1 발현 유도과정에, TNF α 및 IL-1의 생성과정에 관여하는 p38의 활성화가 없이 ERK1/2만이 관여하는 사실은 본 연구에서 IgM-AECA로 처리한 HDMEC 배양 상청액에서 이들 사이토카인을 검출할 수 없었던 결과와도 부합한다 하겠다.

ERK의 상위 kinase인 MEK에 대한 억제제(PD98059)를 사용하여 60 μ M의 농도에서 ERK의 활성화가 완전히 억제됨을 관찰하였다. 이 MEK 억제제의 완전 억제 농도는 세포의 종류에 따라 다르며, 대개 10-100 μ M의 농도에서 억제가 된다고 한다. 이 MEK 억제제에 의한 ICAM-1 분자 발현의 억제 효과는 8명중 2명에서는 완전한 억제가 관찰되

있고, 6명에서는 50%정도의 억제에 관찰되었다. 이러한 억제 정도의 차이를 보이는 이유로 MEK 억제제가 수용성 배지에서 결정을 형성하는 특성과 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 HDMEC의 배지인 EBM에 MEK 억제제를 첨가할 경우 수직상 모양의 결정이 형성됨을 관찰하였는데, 이 결정들은 인체 AB 혈청을 첨가하거나, bovine serum albumin을 6.6mg/ml의 농도로 첨가하였을 때 감소하는 경향을 보였으나 완전히 결정 형성을 억제하지는 못하여 실제 실험에서 사용된 MEK 억제제의 농도가 일정치 않을 가능성이 있다. 또한 O'Rourke 등이 T 림프구의 세포유착 분자인 LFA-1의 발현에 ERK가 관여하지만, 억제 실험에서 MEK 활성화와 phosphatidylinositol 3-kinase 활성을 함께 억제하여야 완전히 LFA-1 발현이 억제되었다고 보고한 바와 마찬가지로 (O'Rourke 등, 1998) 본 실험의 HDMEC ICAM-1 발현 과정에 ERK 외에 다른 protein kinase 등이 관여할 가능성이 있다. 이상의 결과로 IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 과정에 ERK1/2가 관여함을 증명할 수 있었으며, IgM-AECA가 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 과정을 유도하여 염증을 유발하므로써 베체트병의 병인에 기여할 것으로 생각된다. 앞으로 44kDa 항원에 대한 성상을 밝히고, IgM-AECA가 생성되는 기전에 대한 연구 및 ERK cascade와 함께 활성화될 수 있는 다른 protein kinase의 유무 및 전사 인자에 대한 연구가 진행된다면 보다 더 베체트병의 병인에 대한 구체적인 접근이 가능하리라고 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 첫째, 베체트병 환자의 혈청으로부터 분리한 HDMEC 44kDa 항원에 대한 IgM 항체(IgM-AECA)로 HDMEC을 처리후 ELISA와 FACS를 이용하여 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현 변화를 관찰하고, 둘째, ICAM-1 분자 발현 과정에 TNF α 나 IL-1 α 의 생성 여부를 ELISA, FACS 및 RT-PCR을 시행하여 알아보려고 하였으며 셋째, IgM-AECA에 의하여 ICAM-1 분자 발현 과정에 MAPK 관여 여부를 관찰하고, IgM-AECA가 HDMEC에 미치는 영향을 분자적 수준에서 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 베체트병 환자 54명 중 29명(53.7%)에서 HDMEC 표면 단백질에 대한 IgM 항체에 대해 양성 반응을 보였으며, 그 중 23명(79.3%)에서 44kDa 항원에 대한 IgM 항체에 양성 반응을 보였다.
2. 베체트병 환자 8명에서 각각 분리한 IgM-AECA로 HDMEC을 처리하여 이들 모두가 HDMEC 표면 ICAM-1 분자의 발현을 증가시킴을 관찰하였다.
3. IgM-AECA 처리로 활성화된 HDMEC 배양 상청액에서 TNF α 및 IL-1 α 의 생성을 관찰할 수 없었다.

4. IgM-AECA에 의한 HDMEC의 ICAM-1 분자 발현에 관여하는 MAPK 활성화 조사를 위한 면역블롯 검사상 8명의 베체트병 환자 실험군 모두에서 MAPK 중 ERK1/2만 관여됨을 관찰하였다. ERK의 활성화는 HDMEC을 IgM-AECA으로 자극한 후 주로 5, 15, 30분에 관찰되었으며, 모든 환자에서 5분에 최대치에 이르는 것을 관찰하였다.
5. ERK의 상위 kinase인 MEK 억제제(PD98059)를 60 μ M의 농도로 전처치후 ERK1/2의 활성화 및 ICAM-1 분자 발현의 억제를 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 베체트병 환자에서 특이하게 검출되는 HDMEC 44kDa 항원에 대한 IgM 항체가 내피세포에 결합하면, TNF α 나 IL-1 α 의 생성을 거치지 않고, ERK1/2의 활성화에 의한 신호전달의 개시에 의해 ICAM-1과 같은 세포유착 분자를 발현시켜 염증 세포의 유주를 유도하므로써 베체트병의 혈관염 및 염증 유발에 관여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 김형주, 이승헌, 이성낙, 김승민: 신경 Behcet 증후군 7예의 임상적 고찰. *대한 피부과학회지* 25: 91-97, 1987
- 민희원, 조승연, 전상일, 방동식: 상대정맥 증후군을 동반한 Behcet씨 증후군 1예. *대한 내과학잡지* 30: 401-406, 1986
- 방동식, 황규광, 김덕현, 이성낙, 최인준: Behcet 증후군의 분류아형에 따른 체액면역에 관한 고찰. *대한 피부과학회지* 24: 499-505, 1986
- 이광훈, 차명수, 방동식, 최은선, 이성낙: 베체트병 환자의 혈청에서 인체 진피 미세혈관 내피세포 및 HMEC-1 세포의 표면 조항원을 이용한 항내피세포 항체 검출. *대한 피부연구학회지* 6: 35-45, 1999
- 이은소, 방동식, 이승헌, 이성낙: Behcet 증후군의 혈액내 림프구와 면역글로불린에 관한 연구. *대한 피부과학회지* 25: 734-744, 1987
- Alderuccio F, Barnett AJ, Campbell JH, Pedersen JS, Toh BH : Scl-95/100 : doublet of endothelial marker autoantigens in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 64:94-100, 1986
- Ammann AJ, Johnson A, Fyfe GA: Behcet's syndrome. *J Pediatrics* 107: 41-43, 1985
- Aydintug AO, Tokgoz G, D'Cruz DP, Gurler A, Cervera R, Duzgun N, Atmaca LS, Khamashta MA, Hughes GRV: Antibodies to endothelial cells in patients with Behcet's disease. *Clin Immunol Immunopathol* 67: 157-162, 1993

- Bang D, Honma T, Saito T, Nakagawa S, Ueki H, Lee S: The pathogenesis of vascular change in erythema nodosum-like lesions of Behcet's syndrome: An electron microscopic study. *Hum Pathol* 18: 1172-1179, 1987
- Bang D, Honma T, Saito T, Nakagawa S, Ueki H, Lee S: Ultrastructure of vascular changes in cutaneous manifestations of Behcet's syndrome. *Acta Derm Venereol(Stockh)* 68: 33-40, 1988
- Bang D, Yoon KH, Chung HG, Choi EH, Lee ES, Lee S: Epidemiological and clinical features of Behcet's disease in Korea. *Yonsei Med J* 38: 428-436, 1997
- Brasile L, Zerbe T, Rabin B, Clarke J, Abrams A, Cerilli J: Identification of the antibody to vascular endothelial cells in patients undergoing cardiac transplantation. *Transplantation* 40: 672-675, 1985
- Burns ER, Zucker-Franklin D: Pathologic effects of plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura on platelets and cultured vascular endothelial cells. *Blood* 60: 1030-1037, 1982
- Burns MJ, Sellati TJ, Teng EI, Furie MB: Production of interleukin-8 by cultured endothelial cells in response to *Borrelia burgdorferi* occurs independently of secreted IL-1 and tumor necrosis factor alpha and is required for subsequent transendothelial migration of neutrophils. *Infect Immun* 65: 1217-1222, 1997
- Carvalho D, Savage COS, Black CM, Pearson JD : IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 97: 111-119, 1996
- Cerilli J, Holliday JE, Fesperman DP, Folger MA: Antivascular endothelial cell antibody-its role in transplantation. *Surgery* 81: 132-138,1977
- Cervera R, Navarro M, Lopez-Soto A, Cid MC, Font J, Esparza J, Reverter JC, Monteagudo J, Ingelmo M, Urbano-Marquez A: Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. *Ann Rheum Dis* 53: 265-267, 1994
- Chajek T, Fainaru M: Behcet's disease: Report of 41 cases and a review of the medical literature. *Medicine* 54: 179-196, 1975
- Chun SI, Su WPD, Lee S: Histopathologic study of cutaneous lesions in Behcet's syndrome. *J Dermatol* 17: 333-341, 1990

- D'Cruz DP, Houssiqu FA, Ramirez G, Baguley E, McCutcheon J, Vianna J, Haga HJ, Swana GT, Khamashta MA, Taylor JC, Davies DR, Hughes GRV: Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker of nephritis and vasculitis. *Clin Exp Immunol* 85: 254-261, 1991
- Fattorossi A, Aurbach GD, Sakaguchi K, Cama A, Marx SJ, Streeten EA, Fitzpatrick LA, Brandi ML: Antiendothelial cell antibodies: Detection and characterization in sera from patients with autoimmune hypoparathyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4015-4019, 1988
- Ferraro G, Meroni PL, Tincani A, Sinico A, Barcellini W, Radice A, Gegorini G, Frolidi M, Borghi MO, Balestrieri G: Anti-endothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis. *Clin Exp Immunol* 79: 47-53, 1990
- Ghate JV, Jorizzo JL: Behcet's disease and complex aphthosis. *J Am Acad Dermatol* 40: 1-18, 1999
- Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN: Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158:1825-1832, 1997
- Hills EDG: Behcet's syndrome. *N Engl J Med* 301: 431-432, 1979
- International study group for Behcet's disease: Criteria for diagnosis of Behcet's disease. *Lancet* 335: 1078-1080, 1990
- Jorizzo JL, Hudson RD, Schmalstieg FC, Daniels JC, Apisarnthanarax P, Henry JC, Gonzalas EB, Ichikawa Y, Cavallo T: Behcet's syndrome: Immune regulation, circulating immune complexes, neutrophil migration, and colchicine therapy. *J Am Acad Dermatol* 10: 205-214, 1984
- Jorizzo JL, Solomon AR, Zanolli MD, Leshin B: Neutrophilic vascular reactions. *J Am Acad Dermatol* 19: 983-1005, 1988
- Kulmar A, Middleton A, Chambers TC, Mehta KD: Differential roles of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and p38(MAPK) in interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha-induced low density lipoprotein receptor expression in Hep G2 cells. *J Biol Chem* 273: 15742-15748, 1998
- Lee KH, Bang D, Choi ES, Chun WH, Lee ES, Lee SN: Detection of circulating antibodies to cultured human dermal microvascular endothelial cells and their relation with cytotoxicity to endothelial cells in patients with Behcet's disease. *Arch Dermatol Res* 291: 374-381, 1999a

- Lee KH, Chung HS, Bang D, Lee S: Behcet's disease sera containing antiendothelial cell antibodies promote adhesion of T lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J* 40: 152-158, 1999b
- Lee KH, Lawley TJ, Xu Y, Swerlick RA: VCAM-1-, ELAM-1-, and ICAM-1-independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 98: 79-85, 1992
- Lehner T: Characterization of mucosal antibodies in recent aphthous ulceration and Behcet's syndrome. *Arch Oral Biol* 14: 843-853, 1969
- Lehner T: Immunological aspects of recurrent oral ulcers. *Oral Surg* 33: 80-84, 1972
- Levinsky RJ, Lehner T: Circulating soluble immune complexes in recurrent oral ulceration and Behcet's syndrome. *Clin Exp Immunol* 32: 193-198, 1978
- May MJ, Wheeler-Jones CP, Pearson JD: Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecules expression by human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 118: 1761-1771, 1996
- O'Duffy JD, Goldstein NP: Neurologic involvement in seven patients with Behcet's disease. *Am J Med* 61: 170-176, 1976
- O'Rourke AM, Shao H, Kaye J: A role for p21ras/MAP kinase in TCR-mediated activation of LFA-1. *J Immunol* 161:5800-5803, 1998
- Paul A, Wilson S, Belham CM, Robinson CJ, Scott PH, Gould GW, Pelvin R: Stress-activated protein kinase: activation, regulation and function. *Cell Signal* 9: 403-410, 1997
- Penning CA, Cunningham J, French MAH, Harrison G, Rowell NR, Hughes P: Antibody-dependent cellular cytotoxicity of human vascular endothelium in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 58: 548-556, 1984
- Petrazzuoli M, Goldsmith LA: *Molecular Mechanisms of cell signalling*. In Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, eds. *Dermatology in general medicine*. New York, McGraw Hill, 1999, pp114-120
- Pietersma A, Tilly BC, Gaestel M, deJong N: P38 mitogen activated protein kinase regulated endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 44-48, 1997
- Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70: 427-451, 1990
- Reimer G, Luckner L, Hornstein OP: Direct immunofluorescence in recurrent aphthous ulcers and Behcet's disease. *Dermatologica* 167: 293-298, 1983

- Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byron MA, Pearson JD: Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 72: 450-456, 1988
- Savage COS, Cooke SP: The role of the endothelium in systemic vasculitis. *J Autoimmunity* 6: 237-249, 1993
- Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood CM, Pusey CD: Vascular damage in Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis: Presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol* 85: 14-19, 1991
- Shimizu T, Ehrlich CE, Inaba G, Hayashi K: Behcet's disease. *Semin Arthritis Rheum* 8: 223-260, 1979
- Slavin RE, deGroot WJ: Pathology of the lung in Behcet' disease: Case report and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 5: 779-788, 1981
- Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y: JNK is involved in signal transduction during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 77: 727-736, 1994
- Su B, Karin M: Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8: 402-411, 1996
- Sungden PH, Clerk A: Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascade through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 9: 337-351, 1997
- Tamura DY, Moore EE, Johnson JL, Zallen G, Aiboshi J, Silliman CC: P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. *Surgery* 124: 403-407, 1998
- Tanaka N, Tsukada N, Kon CS, Yanagisawa N: Antiendothelial cell antibodies and circulating immune complexes in sera of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 17: 49-59, 1987
- Tizard EJ, Baguley E, Hughes GRV, Dillon MJ: Antiendothelial cell antibodies detected by a cellular based ELISA in Kawasaki's disease. *Br J Rheumatol* 27(suppl): 189-192, 1988
- Wardlaw AJ: *Leucocyte adhesion in allergic inflammation*. In Kay AB, ed. *Allergy and allergic disease*. Malden, Blackwell Science, 1997, pp244-247
- Williams BD, Lehner T: Immune complexes in Behcet's syndrome and recurrent oral ulceration. *Br Med J* 1: 1387-1389, 1977
- Young P, McDonnell P, Dunnington D, Hand A, Laydon J, Lee J: Pyridinyl imidazoles inhibit IL-1 and TNF production at the protein level. *Agents Actions Suppl* 39: C67-C69, 1993

Abstract

Signal transduction pathway for activation of endothelial cells by antiendothelial cell antibodies in sera of patients with Behcet's disease

Heun-Jung Cho

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Kwang Hoon Lee)

Behcet's disease is a chronic multi-systemic inflammatory disease in which clinical and histologic features often demonstrate that vasculitis is one of the fundamental pathogenetic mechanisms. In the inflammatory process, endothelial cells express various cell adhesion molecules such as intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) and E-selectin, which enable circulating inflammatory cells to adhere to endothelial cells. Antiendothelial cell antibodies(AECA) have been detected in the sera of patients with Behcet's disease as well as in many autoimmune diseases showing vasculitis. The isotype of AECA from Behcet's disease is IgM, IgM-AECA, recognizing 44kDa antigen of human dermal microvascular endothelial cells(HDMEC). Mitogen-activated protein kinase(MAPK) cascades are a family of protein kinases activated by a wide spectrum of extracellular stimuli. There are at least three subtypes of MAPK cascades, including extracellular signal regulated kinase(ERK)1/2, c-Jun NH₂ terminal kinase(JNK), and p38 cascades, and they regulate various cellular processes such as cell growth, differentiation, inflammation and apoptosis.

In this study, we used enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and fluorescence-activated cell sorting(FACS) for detecting the induction of the ICAM-1 on HDMEC by IgM-AECA. ELISA, FACS and reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) were used to investigate whether tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 α (IL-1 α) are produced by HDMEC stimulated with IgM-AECA. We also examined whether MAPK is involved in the IgM-AECA-mediated signal transduction pathway in HDMEC. The following results were obtained:

1. Twenty-nine of 54(53.7%) sera of patients with Behcet's disease had IgM antibodies to the HDMEC surface antigen, and 23 of them(79.3%) had IgM-AECA.
2. All eight IgM-AECAs of Behcet's disease induced expression of the ICAM-1 on HDMEC.
3. Neither TNF α nor IL-1 α was detected by ELISA, FACS or RT-PCR in supernatants of activated HDMEC cultures.
4. All eight IgM-AECAs of Behcet's disease activated ERK1/2 in HDMEC, and showed peak activities at 5 minutes after stimulation of HDMEC with IgM-AECA.
5. Specific MAPK/ERK kinase(MEK) inhibitor PD98059 inhibited IgM-AECA-induced ERK1/2 activities and ICAM-1 expression on HDMEC at concentration of 60 μ M.

These results provide evidence that IgM-AECA can play a pathogenetic role in Behcet's disease by activating endothelial cells directly, not by production of TNF α or IL-1 α from the HDMEC. And as a signal transduction pathway, ERK 1/2 are involved in expression of the ICAM-1 on HDMEC stimulated with IgM-AECA.

Key Words: Behcet's disease, 44kDa antigen of endothelial cell, antiendothelial cell antibody, ICAM-1, MAPK, ERK1/2