베체트병 환자에서 말초혈액 단핵세포의 *Streptococcus sanguis* 항원에 대한 사이토카인 생성

연세대학교 대학원

의 학 과

김 형 섭

베체트병 환자에서 말초혈액 단핵세포의 *Streptococcus sanguis* 항원에 대한 사이토카인 생성

지도 방 동 식 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 형 섭

김형섭의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 모든 방면에 끊임없는 격려와 세심한 배려로 지도해 주신 은사 방동식 교수님께 깊은 감사를 드리며, 또한 많은 관심과 조언으로 격려해 주신 이광훈 교수님과 최인홍 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한, 연구 진행에 많은 도움을 주신 임상의학 연구센터의 장남수 선생께도 깊은 감사를 드립니다.

끝으로 무한한 사랑과 관심으로 곁에서 지켜봐 주신 가족들에게 감사와 이 기쁨을 드립니다.

저 자 씀

목 차

국문 요약 1

Ⅰ. 서 론 3

Ⅱ. 재료 및 방법 6

1. 연구 대상 6
2. 말초혈액 단핵세포 분리 6
3. *Streptococcus sanguis* 항원 준비 6
4. 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포에 *S. sanguis* 항원의 전처치 7
5. ELISA에 의한 사이토카인 분비량 측정 7

Ⅲ. 결 과 8

1. 베체트병 환자의 임상양상 및 혈액학적 검사 소견 8
2. *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 사이토카인 생성능 8
3. 질병활성도에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능 8
4. 자극시간에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능 9

5. 베체트병 환자의 임상양상과 IFN-γ 생성능의 상관성 9

Ⅳ. 고 찰 15

Ⅴ. 결 론 19

참고 문헌 21

영문 요약 26

표 목 차

표 1. 일본 베체트병 연구회의 베체트병 활성도 기준 10
표 2. 베체트병 환자의 임상양상과 적혈구 침강속도, C반응 단백 및 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능 11

그 림 목 차

그림 1. *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 사이토카인 생성능 12
그림 2. 자극 농도에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능 13
그림 3. 자극 시간에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능..... 14

국문요약

베체트병 환자에서 말초혈액 단핵 세포의 *Streptococcus sanguis* 항원에 대한 사이토카인 생성

베체트병은 재발성 구강 및 외음부 궤양, 포도막염과 같은 안질환, 피부병변과 함께 관절염, 혈관계, 호흡기, 소화기 및 중추신경계의 증상을 보이는 다발성 만성 염증성 질환으로 아직까지 확실한 병인이 알려져 있지 않다. 그 중 많은 연구들을 통해 연쇄상구균이 베체트병의 병인에 관여한다는 학설이 제시되고 있다. 특히 *S. sanguis*와의 연관성이 많은 것으로 보고되고 있는데 *S. sanguis* 항원이 T 세포를 자극하여 사이토카인 생성에 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 건강한 성인과 활성기, 비활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 분리하여 *S. sanguis* 비활성 전균 항원과 함께 배양한 후 상품화된 효소결합 면역 흡착검사 kit를 이용하여 각각의 배양 상청액에서 interleukin (IL) -4와 interferon (IFN) -γ 생성정도를 측정 비교하였다.

정상 대조군과 활성기 베체트병 환자의 IL-4와 IFN-γ 생성능을 비교한 결과 IL-4 생성능은 두 군간의 차이를 보이지 않았으나 IFN-γ 생성능은 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 생성된 IFN-γ 양은 활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포에서 정상 대조군과 비활성기 베체트병 환자와 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 즉 단핵세포의 배양 시간이 경과할수록 차이를 보이고, 시간 경과 후 활성기 베체트병 환자의 말초 혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성은 정상과 비활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 자극할 수 없는 농도에서도 증가하여 활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포는 *S. sanguis*에 과민면역반응을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 베체트병의 임상증상 발현기간과 IFN-γ 생성능은 양의 상관관계 (positive correlation) 가 있으며 적혈구 침강속도나 C반응 단백보다 더 높은 상관관계를 나타

내었다.

본 연구를 통해 베체트병에서 말초혈액 단핵구의 *S. sanguis* 항원에 대한 IFN-γ 생성능은 질병활성도와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었으며 활성도 측정 및 치료 효과 판정에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 베체트병, *Streptococcus sanguis*, interferon-γ

베체트병 환자에서 말초혈액 단핵 세포의 *Streptococcus sanguis* 항원에 대한 사이토카인 생성

<지도 **방 동 식** 교수>
연세대학교 대학원 의학과
김 형 섭

Ⅰ. 서 론

베체트병은 재발성 구강 및 외음부 궤양, 포도막염과 같은 안질환, 피부병변과 함께 관절염, 혈관계, 호흡기, 소화기 및 중추신경계의 증상을 보이는 다발성 만성 염증성 질환으로 Hulusi Beh□ t가 1937 년에 처음 기술하였다.[1] 베체트병은 지중해 연안 및 동아시아에 높은 발생 빈도를 보이며,[2,3] 국내에서도 베체트병 환자의 수가 점차 증가되는 것으로 보고되고 있다.[4]

베체트병은 아직까지 확실한 병인이 알려져 있지 않으며 유전학적 관련설, 바이러스설, 연쇄상구균설, 열 충격 단백질 설, γδT 세포 이상설, 사이토카인 및 케모카인 이상설, 혈관 내피세포 이상설이 중요하게 생각되고 있다. 연쇄상구균이 베체트병의 병인에 관여한다는 증거로 베체트병 환자에서 연쇄상구균에서 기인한 편도선염과 충치가 많고,[5] 치과 치료 후 증상이 잘 발생되며,[6] 베체트병과 재발성 아프타 구내염 환자의 림프구가 연쇄상구균 항원에 감작되어 있고,[7] 베체트병 환자와 재발성 아프타 구내염 환자의 병변에서 연쇄상구균성 항원이 존재하며,[8] 연쇄상구균 항원에 대해 피부 단자 검사상 과민성을 보이고, 항원 주입시 베체트병의 증상이 유발되는 등[9]이 있다. 특히 연쇄상구균 중 *S. sanguis*와의 연관성이 많은 것으로 보고되고 있는데 베체트병 환자의 구강 상재균 중 *S. sanguis*의 비율이 증가되어 있고[10] 베체트병 환자의 혈청에 *S. sanguis*에 대한 IgA, IgG 항체가 증가되어 있으며[11] *S. sanguis* 항원이 γδT

세포를 자극하여 interleukin (IL) -6의 생성과 IL-2 및 interferon (IFN) -γ의 mRNA 생성을 증가시키고,[12-14] *S. sanguis*의 항원이 구강점막 항원과 교차반응을 보여 구강 궤양이 나타나는데 이는 세균과 인간의 65 kDa 열 충격 단백질 사이에 공통된 구조를 가지고 있기 때문이라 보고되어 있다.[11,15,16]

베체트병의 진단은 주로 임상소견으로 설정한 진단기준에 의존하며 여러 장기에 병변을 나타내므로 내원 당시의 상태나 치료에 대한 반응을 평가하기 위하여는 질병 활성도를 전체적으로 나타낼 수 있는 수치가 필요하다. 현재는 임상적인 병력만을 기준으로 활성도를 평가하는 방법이 주로 사용되고 있으나 좀더 객관적인 실험실 검사를 찾기 위한 시도가 있어왔다. 적혈구 침강속도의 증가, C반응 단백의 증가, 백혈구 증가 등의 지표가 제시되었으나 여러 장기에 동시에 광범위한 병변이 생겼을 경우에만 증가를 나타내는 경우가 많고 주된 병변인 점막이나 안병변보다는 결절 홍반이나 정맥염, 관절염이 있을 때 더 많이 상승되므로 새로운 실험실 지표가 필요하다.[17] 면역학적 검사 지표로는 혈청내 면역글로불린의 증가,[18] 순환 면역복합체의 증가,[19] 구강 점막 항원에 대한 항체의 증가,[20] 다형백혈구에서 유리산소기의 유리증가[21] 등이 보고되었고, 최근에는 혈청내 IL-2, 8, 12와 가용성 IL-2 수용체, 가용성 tumor necrosis factor (TNF) 수용체-75, superoxide dismutase가 활성도와 관련이 있는 것으로 제시되었다.[22-25] 하지만 혈청내 사이토카인 양에 대한 논란이 많고 베체트병이 아닌 다른 질환에서도 증가를 보이며 질병활성도에 따라 말초혈액 단핵세포의 사이토카인 생성에 변화를 보이는 것[25]으로 나타나 베체트병 특이반응에 따른 실험실 평가가 필요하게 되었다. 연쇄상구균에 의해 T 세포가 증식하고[14] 베체트병 특이 열충격 단백질 유래 펩타이드가 γδT 세포의 증식을 유도하며 이것이 질병활성도와 관련이 있는 것으로 보고되어,[26,27] 질병활성도에 따라 *S. sanguis* 항원에 대한 반응에 차이가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 베체트병 환자로부터 말초혈액 단핵세포를 분리하여 *S. sanguis* 항원을 처치하여 배양한 후 배양상청액에서 효소면역표지법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 을 이용하여 사이토카인을 측정함으

로써 베체트병 환자의 질병활성도에 따라 생성되는 사이토카인의 종류와 그 변화를 관찰하여 베체트병의 질병활성도 판정을 위한 객관적 검사로 유용한지를 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 베체트병 특수크리닉에 내원하여 국제적 진단 분류법 (International study group for Beh□ t disease, 1990)[28] 및 일본의 베체트병 연구위원회에서 제시한 진단기준 (Beh□ t disease research committee of Japan, 1988)[29] 에 따라 진단된 베체트병 환자를 일본 베체트병 연구회에서 제시한 질환 활성기준[30] (Beh□ t disease research committee of Japan, 1994, 표 1) 에 의해 분류한 활성형 4 명과 비활성형 8 명을 대상으로 하였다. 또한 피부질환 및 다른 자가 면역질환을 동반하지 않은 정상 성인 4 명을 정상 대조군으로 하였다. 각 환자로부터 적혈구 침강속도, C반응 단백 검사를 시행하였으며 과거력 및 치료 병력을 의무기록을 통해 조사하였다. 베체트병 및 정상 대조군 환자에서 heparin을 처리한 tube에 20 ㎖의 혈액을 채취하였다.

2. 말초혈액 단핵세포 분리

베체트병 및 정상 대조군 환자의 혈액을 채취하여 Ficoll hypaque 밀도구배법을 이용하여 말초혈액 단핵세포를 분리하였다. Heparin으로 처리한 혈액으로부터 상온의 Ficoll hypaque용액 (Organon Technik Corp., Durham, NC, USA) 에서 2,800 rpm로 20 분간 원심분리한 후 말초혈액 단핵세포들을 분리하였다. 차가운 0.5 % BSA-PBS로 3 회 세척한 후 혈구계로 세포수를 측정하였다.

3. *Streptococcus sanguis* 항원 준비

S. sanguis 항원은 일본 후쿠시마 의대의 Fumio Kaneko 교수로부터 제공받았다. 베체트병 환자의 구강내에서 분리한 *S. sanguis* strain 113-20을 brain-heart infusion broth에 접종하여 37 °C 혐기성 환경 (N_2:70%, H_2:15%)에서 24 시간 배양

하였다. PBS로 세척한 후 0.5% formalin용액에 4 °C에서 3 일간 방치하여 비활성화하였고 PBS로 세척하여 PBS에 2 ㎎/㎖농도로 용해하여 –20 °C에서 보관하였다.

4. 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포에 *S. sanguis* 항원의 전처치

바닥이 편평한 96 well 조직 배양 용기에 well 당 10^6 개의 밀도로 말초 혈액 단핵세포를 넣고 24 시간 배양한 후 0.1, 1, 10 ㎍/㎖ 농도의 *S. sanguis* 비활성 전균 항원과 함께 37 °C, 5% CO_2 항습항온기에서 0, 6, 72 시간 배양하였다. 배양 배지는 100 U/ml penicillin G, 10 ㎍/㎖ streptomycin, 0.3 ㎎/㎖ L-glutamine, 10% 우태아 혈청 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 이 함유된 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 를 사용하여 총 1 ㎖로 만들었다. 배양 후 각 well의 배양상청액을 원심분리하여 –20 °C에 보관하였다.

5. ELISA에 의한 사이토카인 분비량 측정

IL-4, IFN-γ ELISA kit (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA) 으로 사이토카인양을 측정하였다. –20 °C에 보관하였던 상청액을 실온에서 녹인 다음, BSA phosphate buffer (Cistron, Pine Brook, NJ, USA) 에 5 배 희석하여 96 well plate에 검체 하나당 3 well씩 각각 50 ㎕ 씩 분주하였다. Stock 표준용액을 각 well에 50 ㎕씩 분주하고 준비된 biotinylated antibody reagent 50 ㎕가하고 실온에서 2 시간 반응시켰다. Washing buffer로 3 회 세척한 후 희석된 streptoavidin-HSP concentrate를 각 well에 100 ㎕ 넣고 실온에서 30 분간 반응시킨 다음 3 회 세척하였다. 기질로서 100 ㎕의 tetramethylbenzidine을 가한 후 암실에서 30 분간 반응시킨 후 각 well에 stop solution 100 ㎕를 가하여 반응을 중지시켰다. 발색정도는 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 판정하였다.

III. 결 과

1. 베체트병 환자의 임상양상 및 혈액학적 검사 소견

베체트병 환자군은 남자 3 명, 여자 9 명으로 총 12 명의 평균연령은 36 세 (26-44) 였고, 나타난 증상은 외음부 궤양 2 명, 결절 홍반양 발진 5 명, 정맥염 1 명, 포도막염 2 명, 소화기계 궤양 1 명, 무증상 3 명이었다. 일본 베체트병 학회에서 제시한 질환 활성기준에 의해 임상증상과 C반응 단백이 상승한 활성형은 4 명이었고 각각 소화기계 궤양, 외음부 궤양, 결절 홍반양 발진을 나타내었다 (표 2).

2. *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 사이토카인 생성능

10 μg/㎖로 72 시간 항원 자극 후에 정상 대조군과 활성기 베체트병 환자의 IL-4와 IFN-γ 생성능을 비교한 결과 IL-4 생성에는 두 군간의 차이를 보이지 않았으나 IFN-γ 생성은 베체트병 환자군에서 높았으며 이는 통계학적으로 유의하였다 ($p<0.01$) (그림 1).

3. 질병활성도에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능

항원 자극 72 시간 후에 각 항원농도에서 활성기 베체트병 환자의 말초혈액단핵세포에서 정상 대조군과 비활성기 베체트병 환자와 비교하여 통계학적으로 유의하게 IFN-γ 생성이 증가하였으며 이는 0.1 μg/㎖에서도 나타났다 ($p<0.01$) (그림 2).

4. 자극시간에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능

항원 처치 전에는 세 군의 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능에는 차이를 보이지 않으나 10 ㎍/㎖로 72 시간 항원자극을 하였을 경우 활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포는 정상 대조군과 비활성기 베체트병 환자보다 통계학적으로 유의하게 IFN-γ 생성이 증가하였고, 6 시간 항원자극을 하였을 경우에도 통계학적으로 유의하지는 않을지라도 정상인과 비활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포보다 IFN-γ 생성이 증가하였다. 정상인과 비활성기 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성간에는 유의한 차이를 보이지 않았다 (그림 3).

5. 베체트병 환자의 임상양상과 IFN-γ 생성능의 상관성

베체트병 환자의 임상증상과 IFN-γ 생성능과의 상관관계를 보면 임상증상의 종류와 IFN-γ 생성능에는 상관관계가 없으나 임상증상의 발현기간과 IFN-γ 생성능은 양의 상관관계가 있었다 (Spearman's coefficient 0.894, $P<0.01$). 기존에 활성도를 반영한다고 보고된 적혈구 침강속도과 C반응 단백도 임상증상의 발현기간에 따라 증가하나 IFN-γ 생성능보다는 상관관계가 떨어진다 (Spearman's coefficient 적혈구 침강속도 0.671, C반응 단백 0.732). 임상증상을 2 주 기준으로 나누어 비모수 검정인 two-sample Kolmogrov-Smirnov test으로 비교해보면 적혈구 침강속도과 C반응 단백은 두 군간의 차이를 보이지 않으나 ($p=0.4$, 0.116) IFN-γ 생성능은 두 군간 차이를 보여 ($p=0.023$) IFN-γ 생성능 증가가 임상증상이 2 주 이상 진행되었을 때 의미있게 상승함을 알 수 있었다.

표 1. 일본 베체트병 연구회의 베체트병 활성도 기준[28]

활성기 베체트병

다음의 염증성 증상이나 증후가 적어도 하나 이상 있어야 하며 검사실 결과가 만족되는 경우

(1) 증상 이나 증후 : 포도막염, 결절 홍반, 피하 혈전 정맥염, 월경과 관련없는 성기 궤양, 활성기 관절염, 활성기 소화기 궤양, 진행형 신경 침범, 진행형 혈관 침범, 부고환염

(2) 검사실 결과 : C반응 단백의 상승, 척수액 이상, 소화기 내시경 소견 이상 등

비활성기 베체트병

위 기준에 맞지 않은 질병상태

---

* 구강궤양과 모낭염은 질병활성도와 관련없어 활성기 기준에 넣지 않음.

표 2. 베체트병 환자의 임상양상, 적혈구 침강속도, C반응 단백 및 말초혈액 단핵세포의 IFN -γ 생성능

환자	성별	나이	증상	발현기간	적혈구 침강속도 (㎜/hr)	C반응 단백 (㎎/dℓ)	IFN -γ (pg/mℓ)
1	여	43	식도 궤양	4주	47	1.65	1963.9
2	여	30	성기 궤양	4주	45	1.24	872.4
3	여	26	결절 홍반	4주	36	1.20	1347.7
4	여	37	결절 홍반	3주	35	0.90	712.5
5	남	37	결절 홍반	3일	30	0.70	107.5
6	여	34	증상 없음	0	5	0.35	6.5
7	남	44	포도막염	3주	2	0.31	461.4
8	남	38	결절 홍반	1주	5	0.19	42.2
9	여	37	성기 궤양	10일	35	0.13	184.7
10	여	31	증상 없음	0	21	0.10	9.0
11	여	39	증상 없음	0	16	0.10	15.5
12	여	31	포도막염	2주	20	0.10	54.2

* 환자 1번에서 4번은 활성형, 환자 5번에서 12번은 비활성형 베체트병 환자이다.

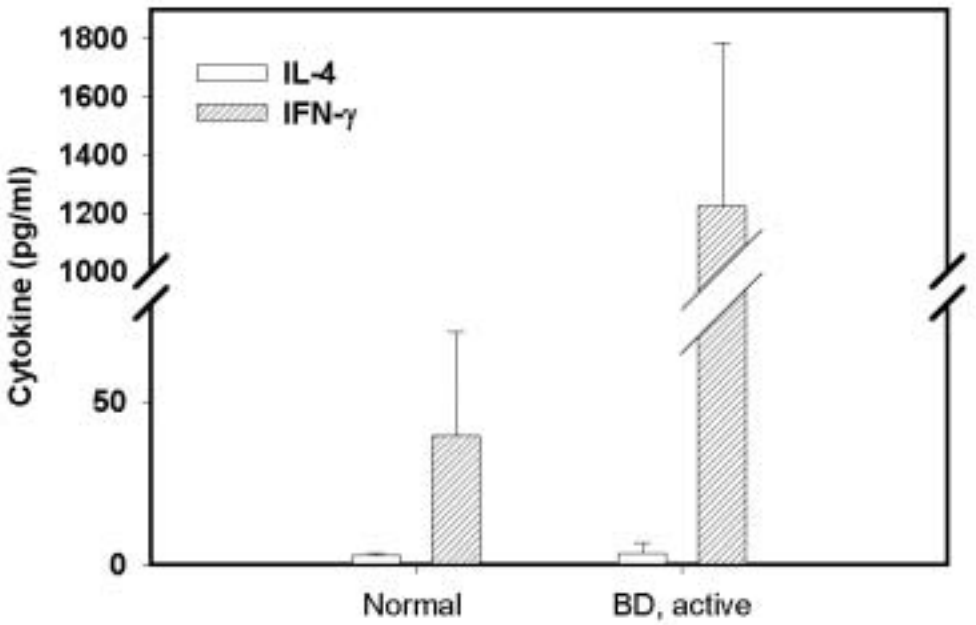

그림 1. *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 사이토카인 생성능. 정상인과 활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 *S. sanguis* 전균 항원으로 자극하고 72 시간 후 상청액을 수집하여 IL-4, IFN-γ 양을 측정하였다.

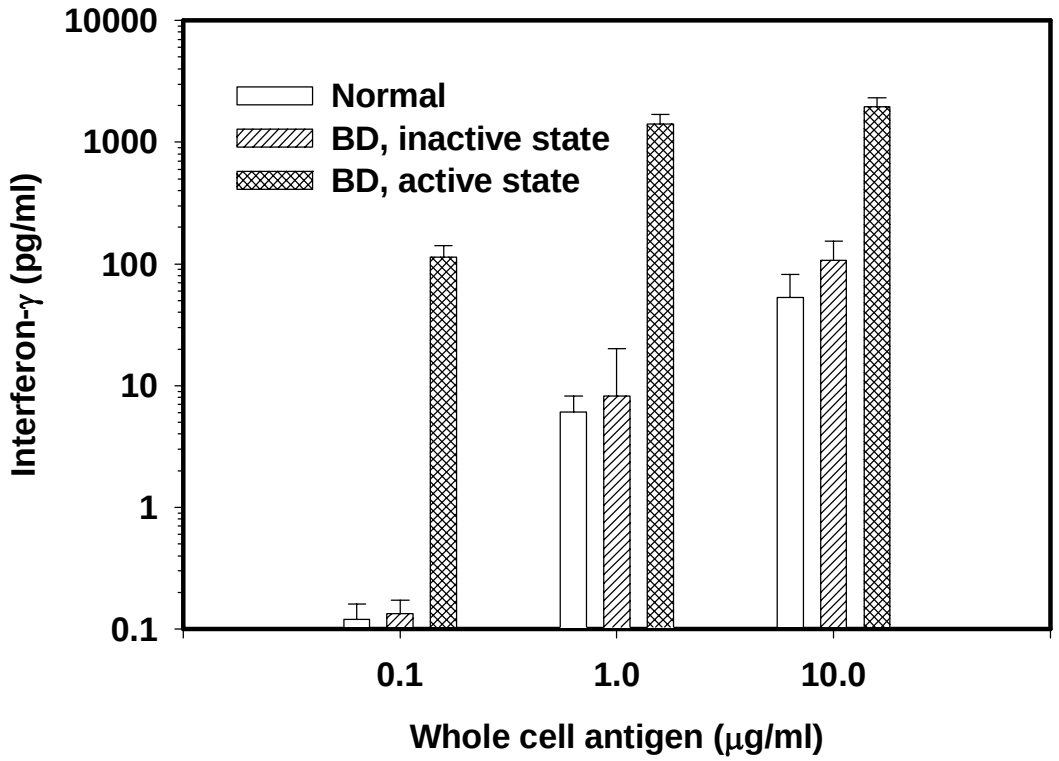

그림 2. 자극 농도에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능. 정상인과 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 *S. sanguis* 전균 항원 0.1 μg/㎖, 1 μg/㎖, 10 μg/㎖ 로 자극하고 72 시간 후 상청액을 수집하여 IFN-γ 양을 측정하였다.

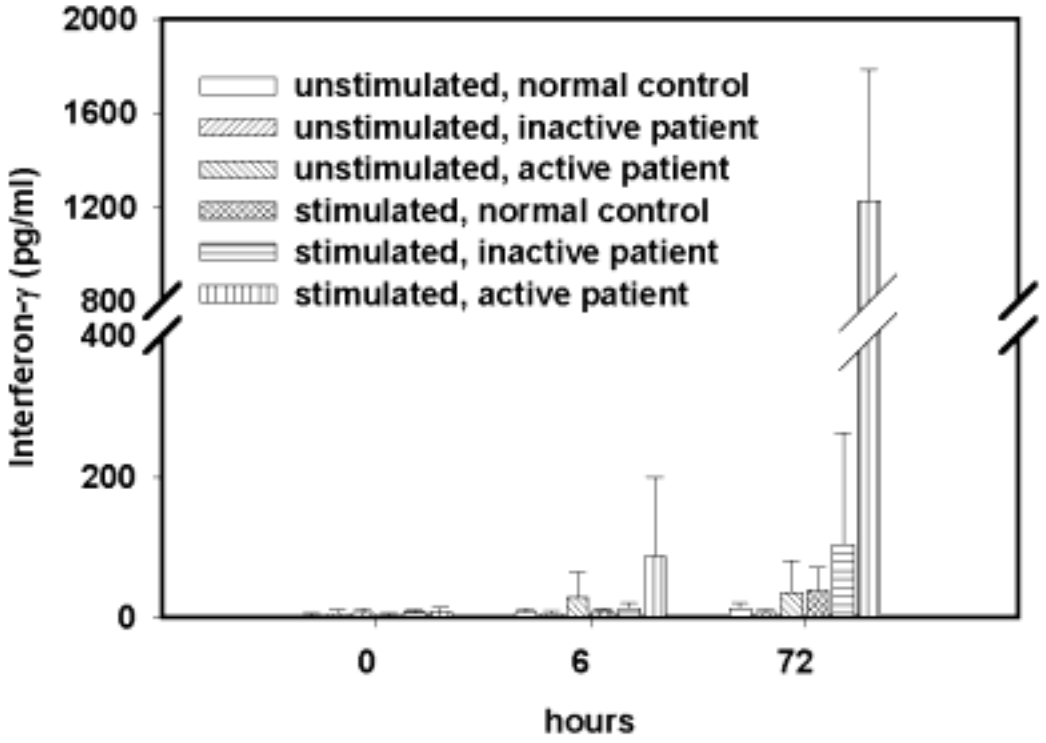

그림 3. 자극 시간에 따른 *S. sanguis* 전균 항원에 의한 베체트병 환자 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성능. 정상인과 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 *S. sanguis* 전균 항원 10 μg/mℓ로 자극하고 0, 6, 72 시간 후 상청액을 수집하여 IFN-γ 양을 측정하였다.

Ⅳ. 고 찰

현재까지 베체트병의 병인으로 제시된 여러 가지 가설을 종합하여 보면 어떠한 세균 또는 바이러스에 의하여 상피세포에서 열 충격 단백질과 MICA 세포 자극 반응 유전자가 활성화되어 유전적 소인을 가진 사람에서 사이토카인과 케모카인의 cascade를 유발하고 이에 선천적 면역반응이 자극되어 과민 면역 반응이 나타나고 여러 가지 염증성 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다.[31] 세균이나 바이러스에서 유래된 열충격단백질 65, 70은 MICA에 의해서 γδT세포에 제공되어 γδT 세포를 증식시키고 IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ, TNF-α 같은 주로 T_H1형의 전염증성 사이토카인과 β-케모카인, RANTES, MIP-1α,β의 분비를 증가시킨다. 이런 사이토카인과 케모카인의 증가에 의해 혈관 투과성의 증가, 백혈구의 침윤, 혈전증이 유발되며 급성기 단백인 C 반응단백, factor B, C9가 증가한다. γδT세포는 정상적으로 소화기계와 여성 생식기부위에 많이 존재하며 혈액 T세포의 약 10%정도 차지하나 베체트병 환자에서는 혈액, 소화기계, 여성 생식기 부위뿐만 아니라 다른 부위에서도 γδT세포가 증가되어 있어 초기 구강 및 성기궤양에서 점차 전신적으로 염증성 병변이 나타날 가능성이 높다. 하지만 병의 활성도 및 진행에 따라 어떠한 사이토카인이나 케모카인이 중요한 역할을 할 것인지에 대해서는 아직 규명된 바 없고, 최근 T_H1/T_H2 세포반응 조절 인자가 주로 연구되는 대상이다.

T_H1/T_H2 세포반응 조절인자에 대한 연구로 활성도에 따른 혈청내 존재하는 사이토카인의 양을 측정하는 방법[22-25, 32]과 말초혈액 단핵세포를 원인으로 의심되는 항원이나 다클론 활성인자를 이용하여 자극시킨 후 분비하는 사이토카인의 양을 측정하는 방법,[33-36] 그리고 동물에게 원인으로 알려진 세균이나 바이러스를 주입하고 림프조직내 사이토카인을 측정하는 방법[37]이 주로 다루어져 왔다. 활성도에 따른 혈청내 사이토카인에 대해서는 혈청내 IL-2, 8, 12와 가용성 IL-2 수용체, 가용성 TNF 수용체-75, superoxide dismutase가 활성도와 관련이 있는 것으로 제시되었다.[22-25]

하지만 보고마다 많은 차이를 보이고 최근 IL-1, 4, 6, 8, 10, 12, TNF-α, IFN-γ를 동시에 측정한 보고도 기존 연구와 차이점을 보여 신뢰하기 힘들다.[32]

베체트병을 가진 동물에게 원인으로 알려진 세균이나 바이러스를 주입하고 조직 내 사이토카인을 측정하는 방법은 현재 *Herpes simplex* virus[37]와 열 충격 단백를 이용한 베체트병 동물 모델[38-40]이 있고 다른 항원은 아직 개발중인 단계로 좀더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

원인으로 의심되는 항원이나 다클론 활성인자를 이용하여 말초혈액 단핵세포를 자극시킨 후 분비되는 사이토카인의 양을 측정하는 방법은 대체적으로 T_H1 사이토카인의 분비량 차이와 항원의 농도와의 상관성을 보고하였다. T_H1과 T_H2의 조절인자로 IFN-γ[33]가 제일 먼저 제시되었는데 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 CD3와 CD40에 대한 단클론항체로 자극하였을 때 T_H1과 T_H2의 혼합반응으로 IFN-γ가 사이토카인 종류를 결정한다는 보고가 있었다. 여기서 IFN-γ는 IL-2의 주요 분비세포인 T 세포에 영향을 주기 전에 대식세포와 자연살세포를 활성화시켜 IL-12의 생성을 증가시키며 IL-12가 T_H0세포를 T_H1쪽으로 유도할 것이라 하였다. 하지만 T_H2 사이토카인인 IL-4, 10, 13이 증가하고 자극 후 48 시간에 상청액을 수집하여 분석한 결과로 아직 CD3와 CD40에 대한 단클론항체로 자극하였을 때 T_H1과 T_H2의 극성화와 사이토카인의 분비시간에 어떠한 영향을 줄 지에 대해 밝혀진 바 없어 논란의 여지가 있다. 또한 IL-12[34]가 조절인자로 제시되었는데 혈청 내 IL-12와 말초혈액 단핵세포를 phytohemagglutinin (PHA) 으로 자극하여 IL-2, 4, IFN-γ 양을 측정하여 활성도에 따라 분석하였으며 그 결과 IL-12는 질병의 진행 및 IFN-γ의 수치와 같이 증가되며 이는 대식세포나 수지상세포 같은 항원전달세포에서 IL-12가 생성되어 T_H1쪽으로 극성화를 유발하며 T 세포는 IL-12에 의해 종속적으로 증식한다고 보고하였다. IL-12가 T세포 수용체와 Fas를 자극하여 T세포 죽음을 억제하며 활성화된 T_H1세포와 단핵세포의 생존을 증가시켜 활성화 유도 세포죽음을 억제하고 염증반응을 유지시킨다고 하였다. 하지만 이 실험 역시 PHA에 의한 T세포 자극이 베체트병에서 일어나는 T세포 자극과 유사한지에 대하여서는 논란의 여지가 있다. PHA은

IL-4, 10의 생성을 유도하는데 더 효과적이라고 알려져 있으며 IFN-γ와 TNF-α의 생성을 유도하는 데에는 phorbol mysitrate acetate (PMA) 과 ionomycin을 조합하는 것이 더 효과적이라고 알려져 있기 때문이다.[35] 베체트병의 병인으로 알려진 항원으로 말초혈액 단핵세포를 자극하여 분비되는 사이토카인의 양을 측정한 보고로는 *S. sanguis* 관련 항원, *Escherichia coli* 관련 항원, *Staphylococcus aureaus* Cowan I 관련 항원, 포도구균성 장독소를 이용한 보고가 있고 포도구균성 장독소를 이용한 보고에서는 정상인과 류마티스 관절염 환자와 달리 베체트병 환자는 극히 적은 독소 농도에서도 자극되어 T_H1 사이토카인인 IFN-γ를 분비하며 CD3분자와 관련없이 T세포 수용체 β사슬과 연관된다고 하였다.[36] 하지만 활성도가 아닌 정상인 및 질병 대조군과 베체트병 환자군을 비교한 것이어서 질병활성도에 대한 분석은 어렵다. 본 실험에서는 *S. sanguis* 관련 항원으로 자극하였을 때 질병활성도에 따른 말초혈액 단핵세포의 IFN-γ 생성을 정상인과 비교한 연구로 비활성시기에는 정상 대조군과 통계학적으로 차이를 보이지 않는 IFN-γ 생성을 보이나 활성기에는 적은 농도에서도 IFN-γ 생성을 보이고 시간이 경과할수록 점차 그 양의 차이가 증가하는 것으로 보아 활성기에서 항원에 대한 과민성이 증가되어 있는 것으로 생각된다.

기존의 연구에서 말초혈액 단핵세포에 항원 자극 후 동일 시점에서 T_H1과 T_H2 사이토카인의 분비량 차이를 보는 연구였으나, 이러한 실험에는 문제가 있다고 생각된다. 주로 T_H1 사이토카인인 IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α는 항원 자극 후 초기 3 일에 분비되는 사이토카인이고, T_H2 사이토카인인 IL-4, 5, 10은 항원 자극 4 일 이후부터 분비된다는 보고가 있고[41-42] 또한 IFN-γ 생성으로 인하여 시간이 지남에 따라 자가조절로 인하여 T_H2 사이토카인의 증가를 이룬 것인지. T_H2 사이토카인의 분비가 T_H1보다 세포내 생성이 늦어 나중에 분비되는지에 대해 알 수 없다. 따라서 T_H2 사이토카인에 대한 연구가 좀 더 신중해야 할 것이며 본 연구에서도 T_H2 사이토카인 분비에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

기존의 활성도를 반영한다고 알려진 적혈구 침강속도와 C반응 단백과 IFN-γ 생성능과의 관계 분석은 적혈구 침강속도나 C반응단백보다 IFN-γ 생성능이 환자의 임

상증상 발현 기간과 더욱 양의 상관관계가 있으며 특히 2 주이상 진행된 경우 2 주 미만보다 증가량이 많아 Chamberlain[43]이 제시한 환자 증상으로만 구성한 베체트병 활성도 평가에서 증상을 2 주로 구분하여 점수화하는 것에 대한 뒷받침하는 자료로 사용될 수 있다고 생각된다.

Ⅴ. 결　론

본 연구에서는 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 베체트병 특수크리닉에 내원하여 국제적 진단 분류법 및 일본의 베체트병 연구위원회에서 제시한 진단기준에 따라 진단된 베체트병 환자를 일본 베체트병학회에서 제시한 질환 활성기준에 의해 분류한 활성형 4 명과 비활성형 8 명, 그리고 정상 대조군 4 명을 대상으로 질병 활성도에 따른 말초혈액 단핵세포의 *S. sanguis* 항원에 대한 IL-4, IFN-γ 생성능을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 대조군과 활성기 베체트병 환자의 IL-4와 IFN-γ 생성능을 비교한 결과 IL-4 생성능은 두 군간의 차이를 보이지 않았으나 IFN-γ 생성능은 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.
2. 항원을 0.1 μg/mℓ, 1 μg/mℓ, 10 μg/mℓ 농도로 자극하고 72 시간 후에 상청액을 수집하여 측정한 IFN-γ 생성능은 활성기 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포에서 정상 대조군과 비활성기의 베체트병 환자와 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 이는 정상과 비활성기의 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포를 자극할 수 없는 농도인 0.1 μg/mℓ에서도 나타났다.
3. 항원을 10 μg/mℓ로 자극하고 0, 6, 72 시간 후에 상청액을 수집하여 측정한 IFN-γ은 항원자극이 없을 경우 세 군이 차이를 보이지 않으나 72 시간 항원자극을 하였을 경우 활성기 베체트병 환자의 말초혈액단핵세포에서 정상 대조군과 비활성기 베체트병 환자보다 통계학적으로 유의하게 많은 IFN-γ 생성을 보였고, 6 시간 항원자극을 하였을 경우에도 통계학적으로 유의하지는 않지만 정상인과 비활성기의 베체트병 환자의 말초혈액 단핵세포보다 많은 IFN-γ 생성을 보였다.
4. 베체트병의 임상증상 발현기간과 IFN-γ 생성능은 양의 상관관계가 있으며 이는 적혈구 침강속도나 C반응 단백보다 더 높은 상관관계를 보인다.

본 연구를 통해 베체트병에서 말초혈액 단핵구의 *S. sanguis* 항원에 대한 IFN-γ

생성능은 질병활성도와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었으며 앞으로 활성도 측정 및 치료 효과 판정에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Beh□ t H. Uber rezidivierende aphthose durch ein Virus verursachte Geschwure am Mund, am Auge, und an den Genitalen. Derm Wschr 1937;105:1952. cited from ref. 4.
2. Lehner T. Oral ulceration and Beh□ t's syndrome. Gut 1977;18:491-511.
3. Lehner T, Barnes CG. Criteria for diagnosis and classification of Beh□ t's syndrome. In: Lehner T, Barnes CG, editors. Behçet's syndrome. London: Academic Press; 1979. p1-9.
4. Bang D, Yoon KH, Chung HG, Choi EH, Lee ES, Lee S. Epidemiological and clinical features of Beh□ t's disease in Korea. Yonsei Med J 1997;38:428-36.
5. Aoki K, Ohno S. Studies on the constitution and past history of patients with Beh□ t's disease. Acta Soc Ophthalmol Jpn 1972;76:1608-12.
6. Mizushima Y, Matsuda T, Hoshi K, Ohno S. Induction of Beh□ t's disease symptoms following dental treatment and streptococcal antigen skin test. J Rheumatol 1988;15:1029-30.
7. Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu Y, Miura Y. Immunological studies on aphthous ulcer and erythema nodosum-like eruptions in Beh□ t's disease. Br J Dermatol 1985;113:303-12.
8. Donatsky O. Comparison of cellular and humoral immunity against streptococcal and adult human oral mucosa antigens in relation to exacerbation of recurrent aphthous stomatitis. Acta Pathol Microbiol Scand 1976;84:270-82.
9. The Beh□ t's Disease Research Committee of Japan. Skin hypersensitivity to Streptococcus antigens and the induction of symptoms by the antigens in Beh□ t's disease-A multicenter study. J Rheumatol 1989;15:506-11.

10. Takeuchi Y, Watanabe J, Nogawa T, Kimura K, Yui I, Shinohara T, et al. High incidence of isolation of two specific strains of *Streptococcus sanguis* from tooth plaques among the patients with MCLS. J Infect Dis 1987;61:1141-8.
11. Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T. Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Beh□ t's syndrome. Infect Immun 1991;59:1434-41.
12. Hirohata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal-related antigens stimulate production of IL-6 and IFN-γ by T cells from patients with Beh□ t's disease. Cell Immunol 1992;140:410-9.
13. Mochizuki M, Suzuki N, Takeno M, Nagafuchi H, Harada T, Kaneoka H, et al. Fine antigen specificity of human gamma delta T cell lines (V gamma 9+) established by repetitive stimulation with a serotype (KTH-1) of a gram-positive bacterium, *Streptococcus sanguis*. Eur J Immunol 1994;24:1536-43.
14. Shimizu T, Katsuta Y, Oshima Y. Immunological studies on Beh□ t's syndrome. Ann Rheum Dis 1965;24:494-500.
15. Graykowski EA, Barile MF, Lee WB, Stanley HR Jr. Recurrent aphthous stomatitis. Clinical, therapeutic, histopathologic, and hypersensitivity aspects. J Am Med Assoc 1996;196:637-44.
16. Hamzaoui K, Kahan A, Ayed K, Hamza M. Cytotoxic T cells against herpes simplex virus in Beh□ t's disease. Clin Exp immunol 1990;81:390-5.
17. Muftuoglu AU, Yazici H, Yurdakul S, Tuzun Y, Pazarli H, Gungen G, et al. Beh□ t's disease. Relation of serum C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates to disease activity. Int J Dermatol 1986;25:235-9.

18. Scully C, Boyle P, Yap PL. Immunoglobulins G, M, A, D and E in Beh□ t's syndrome. Clin Chim Acta 1982;120:237-42.
19. Gupta RC, O'Duffy JD, McDuffie FC, Meurer M, Jordon RE. Circulating immune complexes in active Beh□ t's disease. Clin Exp Immunol 1978;34:213-8.
20. Klok AM, de Vries J, Rothova A, Zaal MJ, Schweitzer CM, Bos JD, et al. Antibodies against ocular and oral antigens in Beh□ t's disease associated with uveitis. Curr Eye Res 1989;8:957-62.
21. Niwa Y, Miyake S, Sakane T, Shingu M, Yokoyama M. Auto-oxidative damage in Beh□ t's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. Clin Exp Immunol 1982;49:247-55.
22. Katsantonis J, Adler Y, Orfanos CE, Zouboulis CC. Adamantiades-Beh□ t's disease: serum IL-8 is a more reliable marker for disease activity than C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate. Dermatology 2000;201:37-9.
23. Turan B, Gallati H, Erdi H, Gurler A, Michel BA, Villiger PM. Systemic levels of the T cell regulatory cytokines IL-10 and IL-12 in Behcet's disease; soluble TNFR-75 as a biological marker of disease activity. J Rheumatol 1997;24:128-32.
24. Wang LM, Kitteringham N, Mineshita S, Wang JZ, Nomura Y, Koike Y, et al. The demonstration of serum interleukin-8 and superoxide dismutase in Adamantiades-Beh□ t's disease. Arch Dermatol Res 1997;289:444-7.
25. Alpsoy E, Cayirli C, Er H, Yilmaz E. The levels of plasma interleukin-2 and soluble interleukin-2R in Beh□ t's disease: a marker of disease activity. J Dermatol 1998;25:513-6.

26. Hasan A, Fortune F, Wilson A, Warr K, Shinnick T, Mizushima Y, et al. Role of gamma delta T cells in pathogenesis and diagnosis of Beh□ t's disease. Lancet 1996;347:789-94.
27. Hasan A, Childerstone A, Pervin K, Shinnick T, Mizushima Y, Van der Zee R, et al. Recognition of a unique peptide epitope of the mycobacterial and human heat shock protein 65-60 antigen by T cells of patients with recurrent oral ulcers. Clin Exp Immunol 1995;99:392-7.
28. International study group for Beh□ t's disease. Criteria for diagnosis of Beh□ t's disease. Lancet 1990;335:1078.
29. Mizushima Y, Inaba G, Mimura Y, Ohno S. Diagnostic criteria for Beh□ t's disease in 1987, and guideline for treating Beh□ t's disease. Shishin Igaku 1988;43:391-3.
30. Yamashita N, Kaneok H, Kaneko S, Takeno M, Oneda K, Koizumi H, et al. Role of γδ T lymphocytes in the development of Beh□ t's disease. Clin Exp Immunol 1997;107:241-7.
31. Lehner T. Immnuhopathogenesis of Beh□ t's disease. Proceedings of the 9th international conference on Beh□ t's disease, Seoul, 2000. p3-18.
32. Ben Ahmed M, Houman MH, Louzir H, Ben Gorbel I, Miled M, Dellagi K. Cytokines in Beh□ t's disease. Proceedings of the 9th international conference on Beh□ t's disease, Seoul, 2000. p149-53.
33. Raziuddin S, al-Dalaan A, Bahabri S, Sirai AK, al-Sedaiy S. Divergent cytokine production profile in Behcet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern. J Rheumatol 1998;25:329-33.
34. Frassanito MA, Dammacco R, Cafforio P, Dammaco F. Th1 polarization of the immune response in Behcet's disease: a putative pathogenetic role of interleukin-12. Arthritis Rheum 1999;42:1967-74.

35. Freysdottir J, Lau SH, Fortune F. γδ T cells in Beh□ t's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS). Clin Exp Immunol 1999;118:451-7.
36. Hirohata S, Hashimoto T. Abnormal T cell responses to bacterial superantigens in Beh□ t's disease (BD). Clin Exp Immunol 1998;112:317-24.
37. Sohn S, Lee ES, Bang D, Lee S. Beh□ t's disease-like symptoms induced by the Herpes simplex virus in ICR mice. Eur J Dermatol 1998;8:21-3.
38. Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T, et al. Heat shock protein peptides reactive in patients with Beh□ t's disease are uveitogenic in Lewis rats. Clin Exp Immunol 1994;97:226-31.
39. Uchio E, Stanford M, Hasan A, Satoh S, Ohno S, Shinnick T, et al. HSP-derived peptides inducing uveitis and IgG and IgA antibodies. Exp Eye Res 1998;67:719-27.
40. Hu W, Hasan A, Wilson A, Stanford MR, Li-Yang Y, Todryk S, et al. Experimental mucosal induction of uveitis with the 60-kDa heat shock protein-derived peptide 336-351. Eur J Immunol 1998;28:2444-55.
41. Assenmacher M, Lohning M, Scheffold A, Manz RA, Schmitz J, Radbruch A. Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. Eur J Immunol 1998;28(5):1534-43.
42. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. J Med Virol 1999;59:335-40.
43. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silma AJ. Beh□ t's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. Rheum 1999;38:728-33.

Abstract

Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus sanguis* antigen in patients with Behçet's disease

Hyoung Sup Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dongsik Bang)

Behçet's disease is a syndrome of unknown etiology consisting of recurrent oral and genital aphthous ulcerations, ocular manifestations such as uveitis, cutaneous involvements and other inflammatory responses encompassing all systems of the body including cardiovascular, respiratory, gastrointestinal and central nervous system. The streptococcal influence on Behçet's disease might well be emphasized, especially with regard to the *S. sanguis* antigen, which stimulates T cells to alter the cytokine production. Somehow, the specific cytokine species produced in this reaction still remains controversial.

In this study, we have investigated the production of cytokines IL-4, IFN-γ in cultured supernatant after incubating inactivated *S. sanguis* whole cell antigens with peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy controls, and patients in both active and inactive stages of the disease. We made use of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit to measure the respective concentrations of these cytokines. The production of IFN-γ

was significantly increased in patients with active Behçet's disease as compared with healty controls or the patients with inactive disease after 72 hrs, whereas there was no significant increase of IL-4. Taking time course into consideration, IFN-γ production increased with time starting 6 hrs after the incubation with the antigen and the reaction was also dose-dependent with respect to the amount of antigen. At some point IFN-γ production in patients with active disease rose in response to a very low concentration which had failed to bring out any response from healthy controls and patient with inactive disease, suggesting the hypersensitivity reaction to *S. sanguis* antigens by the peripheral blood monocytes in patient with active disease.

The duration since the onset of the symptoms and the amount of IFN-γ production showed evidences of positive correlation that was stronger than with erythrocyte sedimentation rate or C-reactive protein.

We conclude that IFN-γ production in patients with active Behçet's disease differ in response to stimulation with *S. sanguis* antigen from that of healthy controls and inactive states, and therefore may be utilized to determine the disease activity and to evaluate the efficacy of therapeutic modalities.

Key Words : Behçet's disease, *Streptococcus sanguis*, interferon-γ