

베체트병 환자에서 혈청 항 인체 α -enolase 항체의 *Streptococcus sanguis*에 대한 교차반응

이주희¹ · 오문호¹ · 이홍탁² · 장재용¹ · 방동식¹ · 이광훈¹

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학연구소¹, 충북대학교 의과대학 피부과학교실²

The Cross-reactivity of Anti Human α -enolase Antibody in the Sera of Behcet's Disease Patients to *Streptococcus sanguis* Antigen

Ju Hee Lee¹, Wen Hao Wu¹, Hong Tak Lee², Jae Yong Chang¹, Dongsik Bang¹, and Kwang Hoon Lee¹

¹Department of Dermatology and Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea,

²Department of Dermatology, Chungbuk National University, College of Medicine, Cheongju, Korea

Behcet's disease is a chronic inflammatory disease with unknown etiology. Association with anti-endothelial cell antibody (AECA) has been explored since vascular involvements such as vasculitis, thrombo-phlebitis, or thrombosis can be observed in Behcet's disease. Also, AECA was detected in the sera of Behcet's disease patients. Our previous experiment identified α -enolase as the target protein of AECA in the sera of Behcet's disease patients by proteomics technique. *Streptococcus* and autoimmune reaction to oral mucosal antigen have been suggested as the causes of oral ulceration in Behcet's disease. This study tried to elucidate the association between *Streptococcus sanguis* (or *Streptococcus sanguinis*) antigen and anti α -enolase antibody (AAEA). Forty two patients with Behcet's disease diagnosed at the Behcet's Disease Special Clinic in Severance Hospital and ten healthy individuals were included in this study. Reaction between anti human α -enolase antibody purified from the sera of the patients and *Streptococcus sanguis* cell wall antigen were measured by ELISA. Analysis revealed that absorbance in Behcet's disease patient group was stronger than that in normal control group with statistical significance. Sera from the patients with strong reaction to α -enolase also showed strong reaction to *Streptococcus sanguis* antigen. Moreover, AAEA used as positive control also showed strong reaction to *Streptococcus sanguis* antigen. Further 2-D analysis of *Streptococcus sanguis* protein revealed streptococcal α -enolase as the target protein of AAEA. Therefore, we suggest the possibility of cross-reactivity of anti human α -enolase antibody to *Streptococcus sanguis* antigen.

Key words : Behcet's disease, crossreactivity, α -enolase, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sanguinis*

서 론

베체트병은 재발성 구강 및 외음부 궤양, 안질환, 피부병

변과 함께 관절염, 혈관계, 소화기, 및 중추신경계의 증상을 보이는 다발성 만성 염증성 질환이다¹⁻³. 베체트병은 전 세계적으로 보고되고 있으나, 인종 및 지역적 차이를 보여, 지

중해 연안 국가들, 중동, 극동지역 및 일본, 중국과 우리나라 등 고대 실크로드와 연관된 지역에서 높은 발생률을 보인다⁴.

병인은 아직 명확히 규명되지는 않았으나 점막세포에 대한 자가면역항체 및 순환면역복합체의 존재⁵⁻⁸, 면역형광 검사 시 항체 및 보체의 침착^{9,10}과 혈청 내 면역글로불린 양의 변화 등^{11,12} 자가항체가 관련된 자가면역 기전이 본 질환의 발병에 관여할 것으로 생각된다. 또한 임상적으로 재발성 혈전 정맥염, 피부혈관염 등의 소견이 자주 관찰되고, 병리조직학적으로 혈관 주위에 호중구 혹은 림프구와 단핵구의 침윤 및 내피세포의 부종이나 괴사, 부분적인 혈관강 내 폐쇄가 관찰되며 심한 경우 괴사성 혈관염 및 육아종성 혈관염이 동반되는 등 혈관 손상이 발병에 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 보고가 많다¹³⁻¹⁵.

혈관내피세포는 모든 혈관의 가장 내측에 단층으로 배열된 고도의 활동성 세포로서 백혈구 이동 및 복귀, 염증반응, 상처치유, 종양전이 및 혈관 형성 등 다양한 생물학적 현상에 필수적인 역할을 한다^{16,17}. 혈관내피세포의 손상은 여러 가지 질병을 유발하는 것으로 알려져 있는데, 가와사키병¹⁸, 다발성 동맥염¹⁹, 베그너 육아종증²⁰, 경피증²¹ 등에서 혈관내피세포에 대한 혈청 항내피세포 항체가 검출되었으며 이들의 존재는 질환의 임상적 활성도와 상관관계가 있음이 보고되었다.

베체트병에서 혈관내피세포에 대한 항체가 검출된 바 있으며²²⁻²⁵, 이는 질병의 활성도나 혈관염의 증상과 상관성이 있었고²² 종전의 연구에서 항체와 결합하는 항원이 인체 진피 미세혈관 내피세포(human dermal microvascular endothelial cells: HDMEC) 표면의 47kD 단백인 α-enolase임을 보고하였다²⁶.

Enolase는 2-phospho-D-glycerate의 가수분해 반응에 참여하는 효소로서 1943년에 Lohman과 Mayerhof가 근육에서 추출하였다²⁷. Enolase는 3가지 아형으로 나뉘는데 그중 α-enolase는 세포표면 단백으로서 여러가지 조직세포 및 미생물에서 검출되었다²⁸⁻³⁰. 근래에 α-enolase는 *streptococci*와 *pneumococci*에서의 발현, 진균 알레르기질환에서 알레르겐적 작용, 자가면역질환인 혈관염, 전신성 홍반성 낭창, 자가면역성 간염 등 여러 가지 질환에 관여하는 것으로 나타나 다기능 단백질로서 질병에서의 작용이 본래 작용인 효소 작용을 능가하는 것으로 알려져 있다^{27,31}.

연쇄상구균이 베체트병의 병인에 관여한다는 증거로, 베체트병 환자에서 연쇄상구균에서 기인한 편도선염과 충치가 많고, 치과 치료 후 증상이 잘 발생되며, 베체트병과 재발성 아프타 구내염 환자의 림프구가 연쇄상구균 항원에 감작되

어 있고, 베체트병 환자와 재발성 아프타 구내염 환자의 병변에서 연쇄상구균성 항원이 존재하며, 연쇄상구균 항원에 대해 피부단자 검사상 과민성을 보이고, 항원 주입시 베체트병의 증상이 유발되는 점 등이 있다³²⁻³⁵. 이처럼 베체트병의 가장 흔한 증상인 구강궤양의 원인으로 연쇄상구균이나 이들과 구강점막항원과의 교차반응이 제시되었으며, 특히 *Streptococcus (S.) sanguis* (or *sanguinis*), *S. pyogenes*, *S. faecalis*, *S. salvaris* 등이 베체트병과 연관성이 있음이 보고되었다³³. 연쇄상구균 중 *S. sanguis*와의 연관성이 많은 것으로 보고되고 있는데, 베체트병 환자의 병변에서 *S. sanguis*가 검출되었고 구강 상재균 중 *S. sanguis*의 비율이 증가되어 있으며, 베체트병 환자의 혈청에서 이에 대한 IgA 및 IgG 항체가 증가되어 있다^{36,37}. 또한 *S. sanguis*는 혈청 IgA 분해효소를 분비하며 미생물과 분해효소에 대한 IgA 역자가 증가되어 있다³⁸. *S. sanguis* 항원이 베체트병 환자의 밀초혈액 단핵세포에서 전염증성 사이토카인을 생성시킨다는 보고도 있었다³⁹. 병변의 *S. sanguis* 항원이 구강점막항원과 교차반응을 일으켜 구강궤양이 나타난다는 보고에서는 미생물과 인체 65 kD heat shock protein (HSP) 간에 상동성이 있기 때문으로 풀이하기도 하였다³⁶. 일본의 Kaneko 등⁴⁰은 특히 점막과 피부의 베체트병 증상이 연쇄상구균 감염에 대한 과민반응과 관련이 있고, 이 반응은 밀초혈액 단핵세포에서 생산되는 전염증성 사이토카인에 의하여 유발되므로 환자에게 minocycline을 투여하면 세균에 대한 항생제 효과뿐만 아니라 사이토카인을 직접 억제하는 효과에 의해 증상의 재발이 늦춰진다고 보고하였다. 이러한 결과로부터 *S. sanguis*가 베체트병의 진행에 중요한 작용을 미칠 것으로 예상된다.

베체트병의 병태생리학적 기전에 α-enolase 및 *S. sanguis*가 관련되어 있음이 알려져 있으므로 이들 둘 사이의 교차반응성을 알아본다면 베체트병의 병인을 밝히는데 도움을 주며 이를 통하여 베체트병의 기전 확립 및 새로운 치료법 개발에 기여할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 첫째, 효소면역표지법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), 면역형광색법, western blot을 이용하여 베체트병 환자의 혈청 내 항 α-enolase 항체(anti-α-enolase antibody: AAEA)와 *S. sanguis* 항원과의 반응을 관찰하였으며, 둘째, 프로테오믹스 기법을 이용하여 AAEA와 반응하는 *S. sanguis* 항원을 동정하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

국제적 진단분류법(International Study Group for Behcet's

Disease, 1990)에 따라 진단된 42명의 베체트병 환자와 피부질환 및 다른 자가면역질환을 동반하지 않은 정상 성인 10명에서 혈액을 채취하여 시험관에 끓긴 후, 실온에서 6시간 이상 방치하여 응고시킨 다음 $250 \times g$ 로 10분간 원침하여 혈청을 분리한 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에 동결 보관하였다.

2. 연구방법

1) *S. sanguis* 배양

*S. sanguis*는 KCTC (Korea Collection for Type Culture) strain 3284, 3290, 3291, 3299, 3731, 3305 등 6균주와 ATCC (American Type Culture Collection) 49295, 49297 2가지 균주를 사용하였다. 균주를 agar plate에 접종하여 24시간 배양한 다음, 접락을 확인한 후 이를 brain heart infusion 배지에 끓겨 37°C 에서 48시간 배양하였다.

2) *S. sanguis* 항원 준비

48시간 배양된 *S. sanguis*를 원심분리기로 분리하여 5% 포르말린에 넣어 비활성화시킨 다음 이를 lysis buffer에 넣어 분쇄 시켰다.

3) HDMEC의 배양

혈관내피세포로 HDMEC (Cambrex, Walkersville, MA, U.S.A.)를 구입하여 사용하였다. HDMEC을 준비하여 0.1% 젤라틴을 처리한 조직배양 용기에서 human epidermal growth factor, hydrocortisone acetate, VEGF, human fibroblast growth factor-B, gentamicin, amphotericin B, 5% fetal bovine serum, R3-insulin growth factor-1, ascorbic acid가 함유된 microvascular endothelial cell medium-2 (Cambrex, Walkersville, MA, U.S.A.)을 사용하여 37°C , CO_2 항온기에서 배양하였다.

4) 재조합 인체 α -enolase 생산

배양한 HDMEC에서 TRIzol reagent (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA $10 \mu\text{g}$ 으로부터 Super-script II Preamplification system (Invitrogen Life Technology, Paisley, UK)을 이용하여 first strand cDNA를 합성한 후 얻은 first strand cDNA에 dNTP, MgCl_2 , 완충액을 적정농도가 되도록 넣고 primer와 DNA polymerase를 넣은 후 94°C 에서 denaturation 2분, 55°C 에서 annealing 1분, 72°C 에서 extension 2분 cycle을 40회 시행하여 double strand cDNA를

합성하였다. PCR시 사용한 primer는 앞에서 밝혀진 단백의 염기서열을 포함하며 PCR 산물을 발현 벡터인 pGEX-4T-1에 subcloning 하기 위하여 *Bam* HI과 *Xho* I의 제한효소에 의해 절단되는 염기 서열을 양쪽 말단에 넣어 만들었으며 각각의 염기서열은 5'-PCR primer (5'-CAGTTGGATCCTCT ATTCTCAAGATCCATGCCA-3'), 3'-PCR primer (5'-ATCC TCGAGT TACTTGGCCAAGGGGTTCTGAAGTTCTG-3')이었다.

PCR로 증폭된 double strand DNA 산물을 agarose 젤로 분리하여 DNA를 얻은 후 재조합된 plasmid DNA를 *Escherichia coli* DH5 α cell에 삽입하여 형질전환을 일으킨 후 ampicillin (50 g/ml)이 첨가된 LB agar plate에서 16시간 배양하여 cDNA를 subcloning하였다.

위에서 확인된 형질 전환된 *E. coli*를 LB broth 배지에서 다량 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.45 - 0.55가 되도록 배양한 후 1 mM IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 25°C 에서 약 16시간 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 원심 분리를 통하여 균을 모은 후 proteinase (1 M leupeptin, 0.1 M aprotinin, 1 mM NaVO₄, 1 mM PMSF)를 포함한 PBS를 배양액의 1/100 volume 정도 넣은 후 얼음 위에서 250 W로 20분간 sonication하여 균을 파쇄하였다. Triton X-100을 최종농도 1%가 되게 넣은 후 단백질이 잘 녹도록 30분간 부드럽게 잘 섞어주었다. 4°C 에서 10분간 13,000 rpm으로 원심 분리하면 상층액에는 원하는 단백과 28 kDa의 glutathion-S-transferase (GST)가 합쳐진 단백이 존재하므로 70 μl Glutathion-Sepharose 4B beads에 넣고 12시간 부드럽게 섞어주어 beads에 잘 흡착되도록 하였다. 원심 분리하여 bead만 분리한 후 PBS로 2회 세척한 다음, 앞에서 사용한 proteinase를 포함한 PBS로 세척하였다. Elution buffer를 70 μl 넣은 후 실온에서 30분간 잘 섞어주어 bead에 붙어있던 단백이 분리되도록 하였다. 원심분리하여 상층액을 수집하여 단백질을 정량하였다. 위에서 얻은 Glutathion-Sepharose 4B beads 흡착 단백에 GST-fusion 단백 100 g당 1 unit에 해당하는 thrombin protease (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 첨가하여 α -enolase만 순수 분리하였다. 순수분리한 α -enolase를 젤 전기영동하여 확인 후 사용하였다.

5) 베체트병 환자의 혈청에서 AAEA IgM 확인

(1) ELISA

베체트병 환자의 혈청 중 AAEA가 포함된 혈청을 선별하기 위하여 ELISA를 시행하였다. 바닥이 편평한 폴리스티렌 microtiter plate의 각 well에 분리정제한 α -enolase를 250 ng

씩 넣었다. 0.05% PBS-Tween 20 (PBST) 용액으로 비특이 반응을 억제하기 위하여 3회 세척하였다. Hannks' balanced salt solution (HBSS), divalent cations (Irvine Scientific), 과 1% bovine serum albumin (BSA)에서 1:50으로 희석된 대조군 및 베체트병 환자 혈청 100 µl씩을 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척한 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM (IgM-ELISA)을 5% 송아지 신생아 혈청이 함유된 HBSS로 1:1,000 희석시킨 용액과 37°C에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척 후 상온의 암실에서 기질과 반응시켰다. 기질은 100 mg의 tetrathymethylbenzidine을 10 ml의 아세톤에 섞어 원액으로 만들어 사용직 전 원액 100 µl를 중류수 10 ml에 넣고 30% 과산화수소 1 µl를 넣고 잘 혼합한 다음 100 µl씩을 각 well에 넣었다. 8 N H₂SO₄ 25 µl씩을 떨어뜨려 반응을 중지시키고, ELISA reader (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA)로 450 nm에서 판독하였다.

(2) 베체트병 환자의 AAEA 양성 혈청에서 항내피세포 IgM 분리

IgM-ELISA에서 강양성 반응을 보인 베체트병 환자의 혈청을 사용하였다. 1.5 × 14 cm 크기의 column에 PBS (pH 7.3)로 조정된 Ultrogel AcA 34를 채운 후 혈청 0.7 ml를 통과시켜 처음부터 4개의 분획을 수집하여 베체트병 환자의 혈청에서 AAEA가 함유된 IgM을 분리하였다.

6) 베체트병 환자 AAEA의 *S. sanguis* protein에 대한 교차 반응

(1) ELISA

바닥이 평평한 microtiter plate의 각 well에 carbonate 완충액 (PH 9.6)으로 희석한 α-enolase와 *S. sanguis* 단백을 250 ng/well씩 넣은 후 4°C에서 18시간 방치시켰다. 0.05% PBS-Tween 20 (PBST) 용액으로 비특이 반응을 억제하기 위하여 3회 세척하였다. 1:20으로 희석된 대조군 및 베체트병 환자 AAEA 양성 혈청 100 µl를 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM 항체를 5% bovine fetal serum이 함유된 PBS로 1:1000 희석시킨 용액과 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBS로 3회 세척 후 상온의 암실에서 기질과 반응시켰다. 4N HCl를 25 µl 떨어뜨려 반응을 중지시키고 효소 면역 표지법 판독기로 450 nm에서 판독하였다.

(2) 면역형광현미경 검사

Silane coating 슬라이드에 *S. sanguis*를 도말한 다음 실온에서 건조시킨 후 methanol에 10분간 고정시킨 다음 정상대조군 및 베체트병 환자 AAEA 양성 혈청을 상온의 암실에

서 30분간 반응시키고 나서 FITC-goat anti human IgM 2차 항체와 실온에서 30분간 반응시켜 형광현미경으로 관찰하였다.

(3) 젤 전기영동 및 면역블롯

준비된 *S. sanguis*단백과 재조합 α-enolase를 동량의 젤 전기영동 시료 완충액과 혼합한 다음, 10% polyacrylamide 젤에 넣고, 60 mA의 일정한 전류하에서 45-90분간 전기영동을 시행하였다. 젤을 분리하여 나이트로셀룰로스 용지에 전기영동적으로 전이시켰다. Blotting된 나이트로셀룰로스 용지를 0.05% T-PBS로 3회 세척한 후 3% BSA를 작용시켜 비결합 부위를 차단시켰다. 상기의 ELISA검사에서 양성반응을 보인 대조군 및 베체트병 환자의 활동기 혈청에서 분리한 IgM을 실온에서 2시간 반응시킨 후 T-PBS로 세척하고 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM과 2시간 반응시켰다. 다시 T-PBS로 세척 후 diaminobenzidine을 섞은 용액에 30% H₂O₂ 5 µl을 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하여 관찰하였다.

7) 베체트병 환자 혈청 내 AAEA와 반응하는 *S. sanguis* 항원 단백질 동정

(1) 이차원 전기영동

S. sanguis 49297단백에 대한 이차원 전기영동을 시행하였다. 단백을 pH 8.0, 1 M Tris, 0.3% dithiothreitol, 1 mM PMSF가 함유된 용해완충액 30 µl와 섞은 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 여기에 7 M urea, 2 M thiourea, 2 mM tributyl phosphine (TBP), 4% CHAPS, 0.5% carrier ampholytes, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye가 함유된 multiple chaotrope 용액 400 µl을 넣고 sonicator를 사용하여 단백을 잘 깨 후 endonulease 150 U/ml을 넣어서 실내온도에서 25분 방치한 다음 이 시료를 20°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 수집하였다. 준비한 시료를 18 cm의 pH 3-10 linear immobilized gradient (IPG) strip (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 24시간 흡수시킨 후 IPG-phor를 이용하여 총 100000 vhr로 등전화시켰다. 이차원 전기영동을 하기 전에 스트립을 동질 완충액에서 25분간 동질화(equilibration)시키고 10-16% gradient polyacrylamide gel에 agarose embedding 용액으로 고정시킨 후 3 mA/gel로 2시간 전시행한 후 15 mA/gel로 단백을 분리하였다. 이차원 전기영동을 실시한 젤은 comassie brilliant blue G-250염색 방법을 이용하여 스팟을 가시화하였다.

(2) MALDI-MS 분석

S. sanguis 단백을 이차원 전기영동하여 얻은 젤에서 베체트병 환자 혈청과 goat anti human α-enolase antibody와 동시

에 반응하는 스팟을 찾은 다음, 스팟을 잘라내어 e-tube에 옮겼다. Methanol로 염색액을 제거한 후 100 mM ammonium bicarbonate (ABC)/50% acetonitrile (ACN)에서 완전히 제거하였다. 100% ACN으로 2회 이상 완전히 탈수한 후 speedvac evaporator에서 완전히 건조시킨 다음 0.1g sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA)을 함유한 25 mM ABC에 넣고 37°C에서 16시간 반응시켰다. 50% ACN/0.1% trifluoroacetic acid (TFA)로 추출하여 speedvac evaporator에서 완전히 건조시킨 후 MALDI TOF-MS (Micromass, Manchester, UK)를 이용하여 질량 스펙트럼 및 팹타이드 지문을 얻은 후 ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>) 등의 프로그램을 이용하여 검색하여 단백을 동정하였다.

결과

1. 베체트병 환자의 혈청에서 AAEA의 검출빈도

재조합 α -enolase에 대한 IgM-ELISA 검사에서 정상 대조군의 광밀도(optical density) 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 AAEA 양성으로 판정하였을 때, 42명의 베체트병 환자의 혈청 중 20명(47%)에서 AAEA 양성이었다 (Table 1).

2. α -enolase와 *S. sanguis*에 대한 교차 반응 관찰

1) α -enolase와 *S. sanguis* 단백에 대한 정상 대조군과 베체트병 환자의 혈청 IgM항체 반응도 관찰

α -enolase와 *S. sanguis* 항원에 대한 베체트병 환자 AAEA의 반응 정도를 ELISA법을 이용하여 측정한 결과, 20명의 AAEA 양성 베체트병 환자의 혈청 IgM은 정상 대조군의 혈청 IgM에 비해 모두 α -enolase에 대하여 유의하게 높은 광밀도를 나타내었다. 정상 대조군의 혈청은 α -enolase나 *S. sanguis* 모든 균주와 반응하지 않았으며 AAEA 양성 베체트병 환자의 혈청은 균주에 따라 반응도의 차이를 보였다. ATCC 49297에 대하여 모든 AAEA 양성 베체트병 환자의 혈청이 양성반응을 나타내었고, 베체트병 환자의 AAEA와의 반응도는 KCTC 3284 (85%), ATCC 49295 (80%), KCTC

3291 (75%), KCTC 3290 (75%), KCTC 3299 (55%), KCTC 3731 (45%), KCTC 3305 (40%) 순으로 나타났다. 가장 반응도가 높은 균주는 ATCC 49297로 관찰되어 진행되는 실험에 이 균주를 사용하였다 (Fig. 1).

2) *S. sanguis*에 대한 면역 형광 염색 결과

베체트병 환자 혈청 중 α -enolase와 *S. sanguis*에 대한 ELISA 검사에서 흡광도가 가장 높은 혈청을 선택하여 *S. sanguis*와 반응을 시킨 후 이차 항체로 발색시켰다. 면역 형광 염색법으로 관찰한 결과, *S. sanguis*에 대해 대조군의 혈청은 모든 균주와 반응하지 않은 반면 베체트병 환자의 AAEA는 8가지 균주에 대해 모두 높은 양성반응을 나타내었다 (Fig. 2).

3) α -enolase와 *S. sanguis* 단백과 베체트병 환자 AAEA의 반응에 대한 western blot소견

베체트병 환자의 혈청에서 분리한 AAEA 항체 및 goat anti-human α -enolase 항체는 *S. sanguis*의 45-50 kDa의 항원과 반응을 보인 반면 정상 대조군의 혈청과는 반응을 보이지 않았다. 또한 베체트병 환자의 AAEA 및 goat anti-human α -enolase 항체는 재조합 α -enolase에 대해서도 같은 분자량

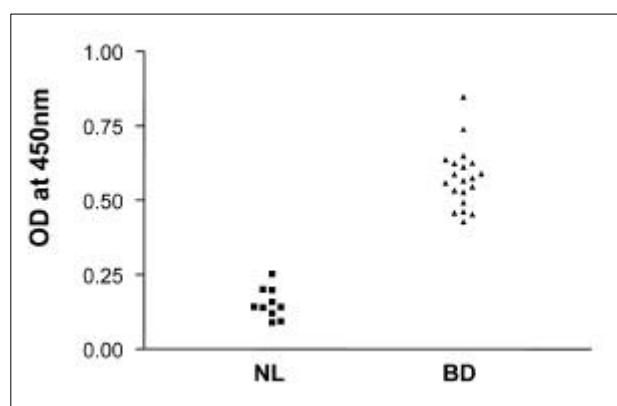


Fig. 1. The reaction of IgM of normal control group and the AAEA of BD patients to *S. sanguis* (ATCC 49297) antigen. The serum IgM of all AAEA-positive BD patients showed a significantly higher optical density than control group.

Table 1. The Reactivity of the Sera of Normal Control and AAEA Positive BD Patients to α -enolase and *S. sanguis* Antigen (NC: normal control, BD: Behcet's disease patients)

Group	Positive No. (% positive)									
	Alpha enolase	ATCC 49297	ATCC 49295	KCTC 3284	KCTC 3291	KCTC 3290	KCTC 3299	KCTC 3731	KCTC 3305	
NL n=10	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
BD n=20	20(100)	20(100)	16(80)	17(85)	15(75)	15(75)	11(55)	9(45)	9(45)	

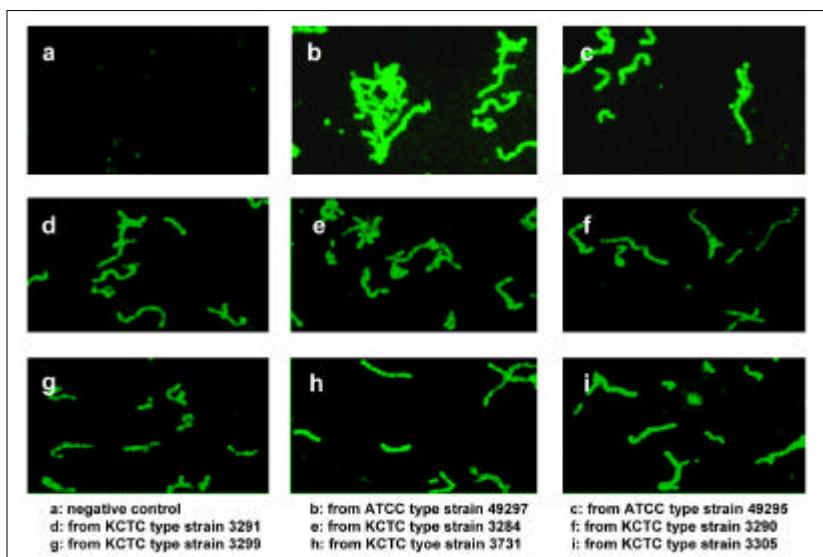


Fig. 2. The result of immunofluorescence microscopic examination of the reaction of AAEA of BD patients against *S. sanguis*. The serum of control group did not react with all bacteria (a) whereas AAEA of Behcet's disease patients showed a high positive response to all 8 bacterial strains (b-i).

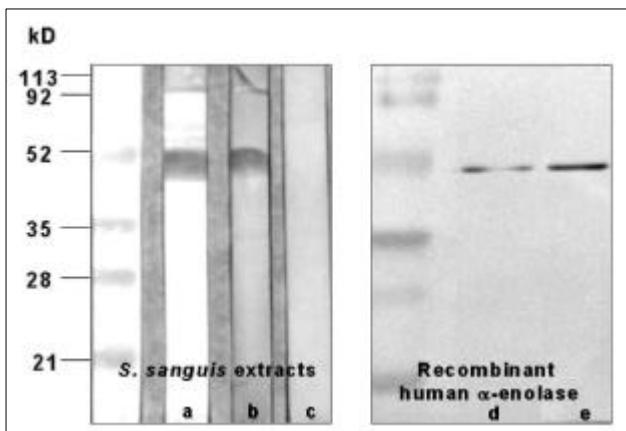


Fig. 3. The result of the immunoblot against α -enolase and *S. sanguis* antigen of AAEA of BD patients and the serum of normal control group. AAEA of BD patients and goat anti-human α -enolase antibody react with a protein with the molecular weight identical to α -enolase and *S. sanguis*.

의 단백과 반응하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

3. 베체트병 환자 혈청 내 AAEA와 반응하는 *S. sanguis* 단백질의 동정

1) 이차원 전기영동 및 면역 블롯 소견

S. sanguis 항원을 이차원 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane에 옮겨 베체트병 환자 혈청의 AAEA 및 goat anti-human α -enolase 항체와 반응시킨 결과, 모든 젤에서 동일한 분자량 및 등전점을 보이는 단백질 스팟이 관찰되었다 (Fig. 4).

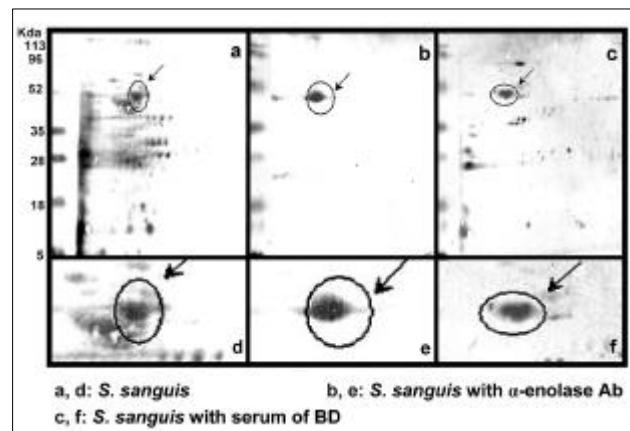


Fig. 4. The result of the two-dimensional electrophoresis of *S. sanguis* Treated with *S. sanguis* total protein (a and d), AAEA of BD patients (b and e), or goat anti-human α -enolase antibody (c and f), all reacted with a protein spot with the same molecular weight and pl location.

2) 질량 분석기를 통한 단백질 동정 결과

젤에서 표적 단백질 스팟을 잘라낸 후 트립신으로 분해하여 질량 분석기를 통하여 펩타이드 지문을 얻어 정보 검색을 한 결과, 베체트병 환자 혈청 AAEA와 반응한 *S. sanguis*의 단백질은 streptococcus의 α -enolase로 동정되었다 (Fig. 5).

고 찰

베체트병의 병인은 명확히 규명되지는 않았으나, 임상적으로 혈전증맥염이 환자의 30%에서 발생하고, 경결 홍반과

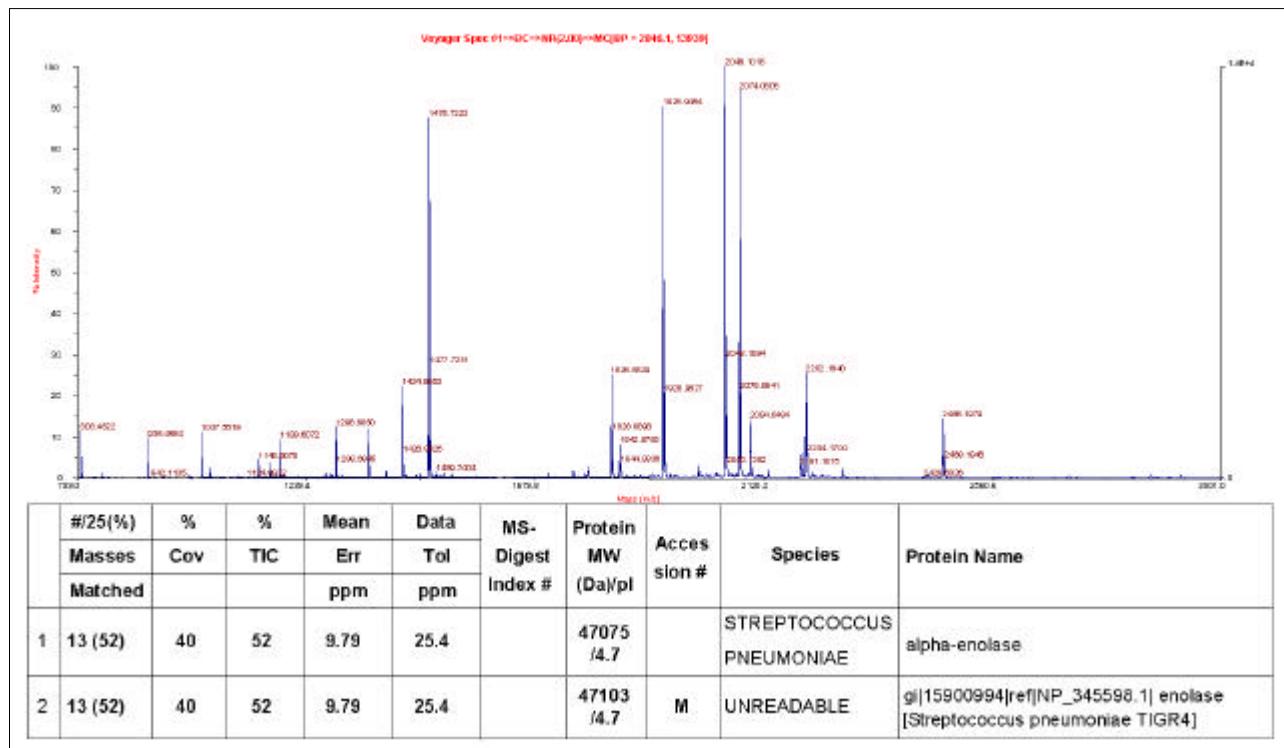


Fig. 5. By applying the peptide fingerprint of the protein obtained by mass spectrometry, the data were searched, and it was identified as *S. pneumoniae* alpha enolase with 40% of sequence coverage.

궤양 등 혈관의 손상이 동반되며, 조직학적으로도 보체 매개성 과민성 혈관염이나 림프구성 혈관염이 관찰되어, 혈관의 손상이 조직의 염증을 일으켜 병인에 관여하리라고 추정된다.

혈관내피세포에 대한 항체는 여러 가지 염증성 질환에서 보고된 바가 있다. 류마티스 관절염에서는 혈관염 증상이 완화 시 혈관내피세포에 대한 항체가 감소되는 반면 전신성 흉반성 낭창에서는 신장손상과 혈관염이 발생할 때 높은 농도의 항내피세포 항체가 발견되어 신장 손상의 척도로 사용되고 있다^{42,43}. 미세혈관 내피세포는 대혈관 내피세포와는 다른 특정된 항원을 갖고 있다^{44,45}. 베체트병에서 혈관염은 주로 미세혈관과 작은 혈관에 집중되는 양상을 보여준다^{13,14}. 또한 혈관내피세포 항체 양성반응을 보이는 베체트병 환자에서 혈관내피세포 항체 음성반응을 보이는 환자에 비해 혈관염 증상과 혈전증상을 보이는 확률이 뚜렷이 높은 것으로 보고되고 있다²².

종전의 연구에서 항내피세포 항체와 반응하는 혈관내피세포 항원이 α -enolase임이 밝혀졌다²⁶. α -enolase는 포도당분해효소로서 포유동물에서 90% 이상의 동원성을 갖고 있으며, 2-phosphoglycerate를 phosphoenolpyruvate로 가수분해시키는 효소로서 세포질 내에 많이 존재하고 있다^{27,31}. 그러

나 세포에 일정한 염증성 자극을 주었을 때 α -enolase는 세포 표면에 표현되는 작용이 있고 그 정확한 기전에 대해서는 아직 알려져 있지 않으며 plasminogen의 수용체로서 작용이 보고된 바가 있다²⁷. α -enolase의 세포 표면으로의 이동 및 plasminogen과의 반응은 질병의 시작 및 진행 과정에서 중요한 역할을 하리라 사료된다.

베체트병의 가장 흔한 증상인 구강궤양의 원인으로 연쇄구균이나 이들과 구강점막항원과의 교차반응이 제시된 바가 있는데 *S. sanguis*는 혈청 IgA 분해효소를 분비하며 CD8+ gamma delta+ T세포의 증식을 자극하는 작용이 있다는 것이 보고되었다^{38,46}. 본 연구에서는 베체트병에서 또 하나의 중요한 병인으로 제시된 *S. sanguis*과 α -enolase와의 연관성을 살펴보았다. 본 연구에서 AAEA가 검출된 베체트병 환자 20명의 모든 IgM 항체가 균주에 따라 45 - 100%에서 *S. sanguis*와 반응함을 관찰할 수 있었다. 특히 베체트병 환자의 구강궤양 병변에서 분리된 ATCC strain인 49297와 49295에서 각각 100%, 80%의 양성률로 균원이 불확실한 KCTC 균주에 비해 강한 양성반응을 보여 AAEA의 *S. sanguis*에 대한 교차반응이 베체트병과 상관성이 있음을 시사하였다.

최근 연쇄구균의 표면에 α -enolase가 표현됨이 밝혀져 연

쇄구균에 의한 자가면역질환 유발에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다³⁰. 급성 류마티스 열 환자의 혈청에는 연쇄구균과 인간의 α -enolase 모두에 반응하는 항체가 증가되어 있으며⁴⁷ 호중구 표면에 있는 α -enolase에 결합하여 세균의 탐식을 방해하는 역할을 한다. 또한 호중구의 α -enolase는 세포증식 자극에 의해 그 발현이 증가되어 항원 증가에 따른 항체 증가에 의해 자기 관용(self tolerance)이 깨지고 그 결과 옵소닌 작용과 세포 파괴가 증가하고 세균과 호중구에 대한 면역반응이 급격히 증가하게 된다. 또한 증가된 항체에 의해 여러 장기에서 면역반응을 일으킨다고 보고하고 있다. *S. sanguis*는 이외에도 뇌농양, 관절염, 등의 여러 가지 질환에 관여하는 것으로 알려져 있는데 특히, 베체트병 환자와 가와사끼병(Kawasaki) 환자에서 *S. sanguis*가 병인에 관여하는 것으로 알려져 균주를 검출하여 분석한 결과 DNA homology가 존재하는 것으로 보고된 바 있다⁴⁸⁻⁵³. 세균으로서 *S. sanguis*는 그 표면이나 내부에 많은 항원들을 갖고 있는데 베체트병 환자에서는 *S. sanguis*에 대한 항체에 대한 보고만 있고 그에 대응한 항원에 대한 보고는 없었다. 본 연구의 결과, *S. sanguis*의 특이항원이 *S. sanguis* α -enolase일 가능성이 제시되었고, 따라서 혈관내피세포와 *S. sanguis*의 α -enolase에 대한 베체트병 환자 혈청 AAEA의 교차반응이 베체트병의 기전과 연관될 수 있음을 제시하였다.

이를 검증하기 위하여 본 실험에서는 human α -enolase와 *S. sanguis* 단백을 western blot 기법을 이용하여 베체트병 환자 AAEA와 각각 반응시켜 보았다. 결과적으로 동일한 항체에 의해 동시에 반응하는 45kD와 50kD 사이의 동일한 단백질 대를 관찰할 수 있었다. 이 단백질의 동정을 위해 프로테오믹스 기법을 사용하였다. 프로테오믹스는 이차원 전기영동을 이용하여 단백을 분석하고 이를 여러 가지 분석방법들을 이용하여 단백을 감정하는 일련의 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로테옴 지도는 matrix-assisted laser-desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석할 수 있다. 본 연구에서 이차원 면역블로상 등 전점 pH 4.0에서 7.0 사이에 44 kDa-50 kD에 해당하는 단백스팟이 베체트병 환자의 AAEA 양성 혈청과 반응함을 관찰하였다. 잘라낸 단백 스팟의 질량분석기를 통한 펩타이드 지문에 대한 정보검색 결과 *S. pneumoniae* alpha enolase와 40% 이상의 높은 서열 적용(sequence coverage) 범위를 보여 AAEA와 반응하는 단백이 최종적으로 *Streptococcus* α -enolase임을 확인하였다. 이러한 결과는 *S. sanguis*의 α -enolase가 *S. pneumoniae*의 α -enolase와 상동성을 갖고 있음을 시사하지만 아직 *S. sanguis*의 α -enolase에서 DNA sequence

가 밝혀져 있지 않다. 이전의 보고에서 *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. pyogenes* 등에서 enolase의 단백 서열이 비교되었으며 90% 이상의 상동성을 나타내었다⁵⁴. *Streptococcus*의 species간에는 90% 이상의 높은 상동성이 존재하지만 *Streptococcus* 외의 타 균종의 enolase와 비교시 *Staphylococcus*와는 79.5%, *E. coli*와는 56%의 상동성이 보고되고 있다²⁷. 하지만, Human α -enolase와 group A streptococcus, *Staphylococcus*, *E. coli* 등의 enolase 간에 42-47.9%의 비슷한 상동성을 보여²⁷ 베체트병 환자 혈청 AAEA와 교차반응하는 HDMEC의 human α -enolase와 여러 균종의 α -enolase 간에 얼마만큼 상동성을 갖고 있는지, 또 반응하는 부위의 동원성은 얼마나 되는지 알아보기 위한 각각에 대한 아미노산 서열 분석에 대한 연구가 필요하겠다.

본 연구는 베체트병에서 혈관내피세포의 손상에 있어 AAEA의 human α -enolase와 *S. sanguis* enolase에 대한 교차반응의 역할에 관한 새로운 자료를 제시하였으며, 이 결과는 베체트병의 병인을 밝히는데 도움을 줄 것으로 생각한다. 향후 다른 *Streptococcus* species 및 타 균종과의 교차 반응 여부 및 교차 반응에 따른 정확한 면역기전에 대해서 구체적이고 광범위한 연구가 더 필요할 것으로 사료되며 또한, 생체내 실험을 통해 AAEA, *S. sanguis* α -enolase와 human α -enolase의 역할을 밝힌다면 이를 통하여 베체트병의 기전 확립 및 새로운 치료법 개발에 기여할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- James DG. *Behcet's syndrome*. N Engl J Med 1979;301:431-2
- O'Duffy JD, Goldstein NP. *Neurologic involvement in seven patients with Behcet's disease*. Am J Med 1976;61:170-6
- Lehner T, Barnes CG. *Criteria for diagnosis and classification of Behcet's syndrome*. In: Lehner T, Barnes CG, eds. *Behcet's syndrome*. Academic Press Inc, London, 1979, 1-9
- Al-Otaibi LM, Porter SR, Poate TW. *Behcet's disease: a review*. J Dent Res. 2005;84:209-22
- Lehner T. *Characterization of mucosal antibodies in recurrent aphthous ulceration and Behcet's syndrome*. Arch Oral Biol 1969;14:843-53
- Williams BD, Lehner T. *Immune complexes in Behcet's syndrome and recurrent oral ulceration*. Br Med J 1977;1:1387-9
- Levinsky RJ, Lehner T. *Circulating soluble immune complexes in recurrent oral ulceration and Behcet's syndrome*. Clin Exp Immunol 1978;32:193-8
- Shimizu T, Ehrlich GE, Inaba G, Hayashi K. *Behcet's disease*. Semin Arthritis Rheum 1979;8:223-60
- Reimer G, Luckner L, Hornstein OP. *Direct immunofluorescence in recurrent aphthous ulcers and Behcet's disease*.

- Dermatologica 1983;167:293-8
10. 방동식, 황규광, 김덕현, 이성낙, 최인준. Behcet's 증후군의 분류아형에 따른 체액면역에 관한 고찰. 대한피부과학회지 1986;24:499-505
 11. Lehner T. Immunological aspects of recurrent oral ulcers. Oral Surg 1972;33:80-4
 12. 이은소, 방동식, 이승현, 이성낙. Behcet's 증후군의 혈액내 림프구와 면역글로불린에 관한 연구. 대한피부과학회지 1987;25: 734-44
 13. 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) 1988;68:33-40
 14. 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 1987;18:1172-9
 15. Chun SI, Su WPD, Lee S, Rodgers RS III. Erythema nodosum-like lesions in Behcet's syndrome: a histopathologic study of 30 cases. J Cutan Pathol. 1989;16:259-65
 16. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. Physiol Rev 1990;70:427-51
 17. 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 1992;98:79-85
 18. Tizard EJ, Baguley E, Hughes GR, Dillon MJ. Antiendothelial cell antibodies detected by a cellular based ELISA in Kawasaki disease. Arch Dis Child. 1991;66:189-92
 19. Ferraro G, Meroni PL, Tincani A, et al. Anti-endothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis. Clin Exp Immunol 1990;79:47-53
 20. Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood CM, Pusey CD Pearson JD. 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 1991;85:14-9
 21. 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 1984;57:548-56
 22. Aydingtug AO, Tokgoz G, D'Cruz DP, et al. Antibodies to endothelial cells in patients with Behcet's disease. Clin Immunol Immunopathol 1993;67:157-62
 23. Cervera R, Navarro M, Lopez-Soto A, et al. Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. Ann Rheum Dis 1994;53:265-7
 24. Lee KH, Bang D, Choi ES, Chun WH, Lee ES, Lee SN. Presence of circulating antibodies to a disease-specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells in patients with Behcet's disease. Arch Dermatol Res 1999;291:374-81
 25. 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 1999;40:152-8
 26. Lee KH, Chung HS, Kim HS, et al. Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behcet's disease. Arthritis Rheum 2003;48: 2025-35
 27. Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci 2001;58:902-20
 28. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of α -enolases as a candidate plasminogen receptor. Biochemistry 1991;30:1682-91
 29. Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S. Plasminogen binds specifically to α -enolase on rat neuronal plasma membrane. J Neurochem 1994;63:2048-57
 30. Pancholi V, Fischetti VA. α -Enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein of the surface of pathogenic streptococci. J Biol Chem 1998;273:14503-15
 31. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for α -enolase in systemic autoimmune disorders. J Rheumatol 2000;27:109-15
 32. Mizushima Y, Matsuda T, Hoshi K, Ohno S. Induction of Behcet's disease symptoms after dental treatment and streptococcal antigen skin test. J Rheumatol 1988;15:1029-30
 33. Mizushima Y, Hoshi K, Matsuda T, et al. Skin hypersensitivity to streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigens in Behcet's disease-a multicenter study. The Behcet's Disease Research Committee of Japan. J Rheumatol 1989;16:506-11
 34. Tojo M, Yanagihori H, Zheng X, et al. Detection of microbial DNA in skin lesions from patients with Behcet's disease. Adv Exp Med Biol 2003;528:185-90
 35. Hirohata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal-related antigens stimulate production of IL6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behcet's disease. Cell Immunol 1992;140:410-9
 36. 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 Behcet's syndrome. Infect Immun 1991;59:1434-41
 37. Isogai E, Ohno S, Kotake S, et al. Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behcet's disease and its corre-

- lation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora.* Arch Oral Biol. 1990;35:43-8
38. Yokota K, Oguma K. *IgA protease produced by *Streptococcus sanguis* and antibody production against IgA protease in patients with Behcet's disease.* Microbiol Immunol 1997;41: 925-31
39. Lee KH, Kim HS, Kaneko F, Bang D. *Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Streptococcus sanguis* antigen in patients with Behcet's disease.* Adv Exp Med Biol. 2003;528:255-60
40. Kaneko F, Oyama N, Nishibu A. *Streptococcal infection in the pathogenesis of Behcet's disease and clinical effects of minocycline on the disease symptoms.* Yonsei Med J 1997; 38:444-54
41. Kanof ME. *Purification of T cell subpopulation.* In Coligan JE, Kruisbeek AM, Margalies DH, et al. eds. *Current protocols in immunology.* New York, John Wiley and Sons, 1991;731-5
42. D'Cruz DP, Houssiau FA, Ramirez G, et al. *Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis.* Clin Exp Immunol 1991; 85:254-61
43. Heurkens AH, Hiemstra PS, Lafeber GJ, Daha MR, Breedveld FC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis.* Clin Exp Immunol 1989;78:7-12,42
44. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures.* J Cell Biol 1988;107:1589-98
45. Swerlick RA, Lee KH, Li SJ, Caughmann SW, Lawley TJ. *Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells.* J Immunol 1992;149: 698-705
46. Nishida T, Hirayama K, Nakamura S, Ohno S. *Proliferative response of CD8+ gamma delta+ T cells to *Streptococcus sanguis* in patients with Behcet's disease.* Ocul Immunol Inflamm 1998;6:139-44
47. Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, et al. *Presence of auto-antibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 2002;46:1196-201
48. Fontan PA, Pancholi V, Nociari MM, Fischetti VA. *Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae.* J Infect Dis 2000;182:1712-21,45
49. Dhawan B, Lyngdoh V, Mehta VS, Chaudhry R. *Brain abscess due to *Streptococcus sanguis*.* Neurol India 2003;51:131-2
50. Costalonga M, Hodges JS, Herzberg MC. *Streptococcus sanguis modulates type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.* J Immunol 2002;169:2189-95
51. Kerrigan SW, Douglas I, Wray A, et al. *A role for glycoprotein Ib in *Streptococcus sanguis*-induced platelet aggregation.* Blood 2002;100:509-16
52. Shinomiya N, Takeda T, Kuratsui T, et al. *Variant *Streptococcus sanguis* as an etiologic agent of Kawasaki disease.* Prog Clin Biol Res 1987;250:571-2
53. Yokota K, Hayashi S, Araki Y, Isogai E, Kotake S, Yoshikawa K, Fujii N, Hirai Y, Oguma K. *Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease.* Microbiol Immunol. 1995;39:729-32
54. Veiga-Malta I, Duarte M, Dinis M, Tavares D, Videira A, Ferreira P. *Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein.* Cell Microbiol 2004;6:79-88