

베체트병 환자의 혈청에서 인체 진피 미세혈관 내피세포 및 HMEC-1 세포의 표면 조항원을 이용한 항내피세포 항체 검출

이광훈^{1,2} · 차명수¹ · 방동식¹ · 최은선³ · 이성낙⁴

연세대학교 의과대학 피부과학교실¹, 면역질환 연구소², 포천중문의과대학 피부과학교실³,
아주대학교 의과대학 피부과학교실⁴

Detection of Antiendothelial Cell Antibodies in Sera of Patients with Behcet's Disease Utilizing Crude Surface Antigens from Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and HMEC-1

Kwang Hoon Lee^{1,2}, Myung Soo Cha¹, Dongsik Bang¹, Un Sun Choi³, and Sungnack Lee⁴

Departments of Dermatology¹ and Institute for Immunology and Immunological Disease²,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Pochun CHA Medical School³, Sungnam,
Ajou University School of Medicine⁴, Suwon, Korea

In this study, we detected circulating antibodies to crude surface antigens isolated from cultured human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) and HMEC-1 in the sera of Behcet's disease. Also, we evaluated the usefulness of isolated crude surface antigens from HDMEC and HMEC-1 as an antigen for the detection of antiendothelial cell antibody in sera from patients with Behcet's disease. IgM antibody reacted with the HDMEC surface protein in 63.2% of sera from patients with Behcet's disease. In systemic lupus erythematosus (SLE), both IgG (52.5%) and IgM antibodies (72.5%) reacted with endothelial cell surface proteins. The same results were obtained in enzyme-linked immunosorbent assay using HMEC-1 surface protein as an antigen. IgM antibody levels were elevated in sera of patients with Behcet's disease showing reactive circulating immune complex. The percentage of thrombophlebitis was higher in the IgM-positive group compared to the IgM-negative group. Behcet's disease serum containing anti-endothelial cell IgM antibody reacted with the 44kDa protein of both HDMEC and HMEC-1 in Western blotting. In dot blotting using the 44kDa HDMEC surface protein, IgM-positive sera of SLE patients and normal controls did not react with the protein, but only IgM-positive sera from Behcet's disease patients reacted with the protein. The results indicate that anti-endothelial cell IgM antibodies reacted with the surface protein isolated from cultured HDMEC in the sera of patients with Behcet's disease, and these antibodies may be disease-specific antibodies for Behcet's disease. In addition, these results show that the crude surface antigens isolated from cultured HDMEC and HMEC-1 can be utilized for the detection of antiendothelial cell antibodies in Behcet's disease.

Key words : Behcet's disease, Human dermal microvascular endothelial cell, Antiendothelial cell antibodies, HMEC-1 antigen

\ 본 연구는 1997년도 보건의료기술연구개발사업 (#HMP-97-M-2-0041)의 지원에 의해 이루어진 것임.

저자연락처 : 이 광 훈, (120-752) 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 피부과학교실, Tel (02) 361-5720 / Fax (02) 393-9157

서 론

베체트병은 임상 증상으로서 재발성 혈전 정맥염, 혈전, 피부 혈관염 등이 자주 관찰되고¹, 병리조직학적으로도 혈관 주위에 림프구와 단핵구의 침윤 및 내피세포의 부종이나 괴사, 부분적인 혈관강내 폐쇄가 관찰되며, 심한 경우에는 괴사성 혈관염 및 육아종성 혈관염이 동반되기도 하는 등 혈관 손상이 발병에 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 보고가 많다^{2,3}.

가와사키병⁴, 베그너 육아종증⁵과 다발성 동맥염⁶ 등의 원발성 혈관염 질환과 전신성 홍반성 낭창⁷, 경피증^{8,9}, 류마チ스성 관절염^{10,11} 등의 속발성 혈관염 질환에서 혈관 내피세포에 대한 순환항체가 검출되었다. 베체트병에서도 혈관 내피세포에 대한 순환항체(antiendothelial cell antibody: AECA)가 검출된 바 있다¹². 이들 AECA의 병인적 역할에 대해서는 아직도 확실한 정설이 없으나, 직접 또는 간접적으로 혈관 내피세포에 손상을 유발하여 혈관염의 발병에 관여할 것으로 시사되어 왔다.

본 연구자들은 신생아 포피로부터 percoll density gradient centrifugation으로 분리 배양한 인체 진피 미세혈관 내피세포(human dermal microvascular endothelial cells:HDMEC)를 이용하여 효소면역 표지법(enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA)으로 베체트병 환자에서 배양한 살아있는 HDMEC 단층에 대한 AECA를 검출한 바 있다¹³. 그러나 배양한 HDMEC 단층을 이용한 ELISA검사를 임상적으로 이용하는 데에는 기술적으로 몇 가지 어려운 점이 있다. 즉 분리 배양하여 ELISA검사에 적합한 상태의 HDMEC 단층을 만드는 데에는 적어도 2주 이상의 시일이 걸려 필요할 때마다 빠른 시일 내에 검사를 시행하는 것이 불가능하다. 또한 ELISA 배양판의 각 well에 동일한 수의 세포를 넣어 배양할지라도, 세포가 융합되는데 약 2일 정도가 소요되고, ELISA검사를 시행하는 과정에 단층의 일부세포가 떨어져 나감으로써 well간 세포 수의 오차가 생길 가능성이 높다.

본 연구와 같이 많은 양의 세포가 필요한 실험에서는 기존 방법으로 분리 배양한 HDMEC를 사용하는데 생물학적 및 기술적으로 문제점이 있다. 즉 분리 및 배양 경비가 너무 많이 소요되며, 한 개의 신생아 포피 조직만으로는 분리되는 세포의 수가 너무 적기 때문에 여러 개의 포피로부터 동시에 분리 배양하는 관계로 그에 따른 개체간의 차이 등을 배제하기 어렵고, 한번 분리한 HDMEC은 보통 4-5세대까지만 사용할 수 있기 때문에 한번 분리 배양한 세포를 이용할 수 있는 실험의 수나 방법, 범위가 매우 제한적일 수밖에 없다. 최근 immortalized HDMEC인 HMEC-1이 만

들어져¹⁴ 특성 규명 결과 E-selectin분자 발현을 제외하고 세포유착분자 발현 및 기타 성상에서 HDMEC과 유사하고 CD 36과 neural cell adhesion molecule이 발현되지 않는 점에서 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)와 유사한 것으로 알려져 있다¹⁵.

본 연구에서는 배양한 HDMEC으로부터 표면 조항원(crude antigen)들을 분리한 후 항원으로 사용하여 베체트병 환자의 혈청으로 ELISA검사를 시행하고, 베체트병 환자의 혈청내 HDMEC 표면 조항원에 대한 AECA의 검출률을 관찰하여 AECA검출에 있어 분리 조항원을 사용한 검사법의 유용성을 조사하고자 하였다. 또한 HMEC-1을 공여 받아 같은 방법으로 베체트병 환자의 혈청내 AECA 검출에 사용하여 AECA 연구에 HMEC-1의 활용성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

연세대학교 세브란스병원 베체트병 특수 진료실에 내원하여 베체트병으로 진단된 환자 중에서 내원당시 최근 2개월 이내에 아무런 치료를 받지 않았고, 구강 궤양, 외음부 궤양, 안질환 또는 피부병변 등과 같은 활동기 병변이 있는 환자를 International Stard Group의 진단분류법(1990)¹⁶에 따라 재발성 구강 궤양을 가지며, 재발성 외음부 궤양, 안질환, 피부병변, pathergy 검사 양성 중 두 가지 이상의 증상을 가진 환자 114명을 대상으로 하였다. 질병 대조군은 다른 자가면역 질환으로 전신성 홍반성 낭창 환자 40명, 류마チ스성 관절염 환자 10명, 경피증 환자 3명, 강직성 척추염 환자 2명, 헤노호-쉔라인 자반 환자 1명 등 56명과 전신성 혈관염 소견을 보이지 않는 1기 및 2기 매독과 아토피 피부염 환자 등을 포함한 환자 87명, 그리고 정상 대조군으로 피부 질환 및 다른 자가 면역 질환을 동반하지 않은 정상 성인 75명을 대상으로 하였다.

베체트병 및 다른 대조군 환자로부터 일반 말초혈액검사를 비롯하여 면역 복합체, 항핵항체 등 혈액 검사를 시행하였으며, 임상적 병력은 의무 기록을 통하여 조사하였다.

2. 혈청 수집

실험군 및 대조군 환자에서 10 ml의 혈액을 채취하여 15 ml의 시험관에 옮긴 후, 상온에서 6시간 이상 방치하여 응고시키고 250×g로 10분간 원침하여 혈청을 분리한 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 동결 보관하였다.

3. 미세혈관 내피세포의 분리 배양

신생아 포피로부터 종전의 방법에 따라 HDMEC을 분리하였다^{19,20}. 신생아 포피를 3 mm크기의 소절편으로 잘게 잘라 0.03% trypsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 및 1% ethylenediamine tetracetic acid (EDTA, Sigma) 가 함유된 phosphate-buffered saline(PBS)으로 37°C에서 10분간 처리한 후 scalpel blade 옆면을 이용하여 각각의 소절편을 눌러 절단면으로부터 미세혈관편이 빠져 나오도록 하였다. Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 혼합한 35% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) 용액을 원침판에 넣고 4°C, 30,000×g에서 10분간 원침하여 밀도구배를 만든 다음, 상단에 미세혈관편이 함유된 용액 1ml을 가한 후 400×g로 실온에서 15분간 원침시켰다. 밀도 1.048g/ml 이하의 분획(원침시킨 후 나타나는 중간의 백색층)을 다른 원침판에 옮기고 HBSS로 채워 400×g로 실온에서 15분간 다시 원침시킨 후, 침전물을 미리 gelatin (Sigma)을 처리한 조직 배양용기에 넣고 1ng/ml epidermal growth factor (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA), 1μg/ml hydrocortisone acetate (Sigma), 5×10⁻⁵ M dibutyryl cyclic AMP (Sigma), 2×10⁻⁹ M glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 250 μg/ml amphotericin B(Sigma), 30% 인체 AB혈청이 함유된 endothelial basal media (Clonetics Corp.)로 37°C, CO₂ 항온기에서 배양하였다. 2-6개대의 HDMEC을 실험에 사용하였다.

HMEC-1(an immortalized human microvascular endothelial cell line)¹⁶을 Ades 박사(Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA) 및 Lawley 교수(Emory University, Atlanta, GA, USA)로부터 공여받아 10% fetal bovine serum이 함유된 MCDB-131 media(Sigma)로 37°C, CO₂ 항온기에서 배양하였다.

4. 미세혈관 내피세포 표면단백 분리

배양배지판을 넣거나 혹은 interleukin 1 (IL-1) α (100U/ml × 24시간), tumor necrosis factor (TNF) α (100U/ml × 24시간), interferon (IFN)- γ (500U/ml × 48 시간) 등을 첨가한 다음 배양한 HDMEC과 HMEC-1을 EDTA/BSA로 분리 수집한 후 1mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (Sigma), 10mM NPGP (Sigma), 1mM EDTA (Sigma) 및 1% Triton-X (Sigma) 등이 함유된 용해 완충액으로 얼음속에서 30분간 반응시켜 용해시켰다. 4°C, 10,000×g에서 30분간 원침시킨 후 상청액을 수집하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

5. 순환 항체 검출을 위한 효소 면역표지법

바다이 편평한 폴리스티렌 microtiter plate의 각 well에 carbonate 완충액 (pH 9.6)으로 희석한 HDMEC 항원 2μg/ml을 50μl씩 넣은 후 4°C에서 18시간 방치시켰다. 0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) 용액으로 3회 세척 후 비특이 반응을 억제하기 위하여 T-PBS로 3회 세척하였다. 적절하게 희석된 대조군 및 베체트병 환자 혈청 100μl씩을 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. HBSS로 3회 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma) 및 peroxidase-conjugated goat anti-human IgM (Sigma)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 100mg의 tetramethylbenzidine (Sigma)을 10 ml의 아세톤에 섞어 원액으로 만들며, 사용 직전 원액 100 μl를 증류수 10 ml에 넣고 30% 과산화수소 1μl를 넣어 잘 혼합한 다음 100 μl 씩을 각 well에 넣었다. 8N H₂SO₄ 25 μl 씩을 떨어뜨려 반응을 중지시키고, ELISA reader (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA, USA)로 450 nm에서 판독하였다.

6. 젤 전기영동 및 Western 블롯법

배양한 HDMEC과 HMEC-1을 EDTA/BSA로 분리 수집한 후 1 mM PMSF (Sigma), 10 mM NPGP (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma) 및 1% Triton-X (Sigma) 등이 함유된 완충액으로 얼음속에서 30분간 반응시켜 용해시켰다. 4°C, 10,000×g에서 30분간 원침시킨 후 상청액을 수집하여 동량의 젤 전기영동 시료 완충액과 혼합한 다음, 10% polyacrylamide 구배젤에 넣고, 60mA의 일정한 전류하에서 45-90분간 전기영동을 시행하였다. 젤을 분리하여 나이트로셀룰로스 용지에 전기영동적으로 전이시켰다. 블롯된 나이트로셀룰로스 용지를 T-PBS로 3회 세척한 후 3% BSA를 적용시켜 비결합 부위를 차단시켰다. 상기의 대조군 및 ELISA 검사에서 양성반응을 보인 베체트병 환자의 활동기 혈청을 실온에서 2시간 반응시킨 후 T-PBS로 세척하고 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma) 및 IgM (Sigma)과 2시간 반응시켰다. 다시 T-PBS로 세척 후 diaminobenzidine(Sigma)을 섞은 용액에 30% H₂O₂ 5 ml을 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하여 관찰하였다.

7. 미세혈관 내피세포 44kDa 단백의 분리 정제

HDMEC과 HMEC-1을 EDTA/BSA로 분리 수집한 후 1 mM PMSF (Sigma), 10 mM NPGP (Sigma), 1 mM EDTA

(Sigma) 및 1% Triton-X (Sigma) 등이 함유된 완충액으로 얼음속에서 30분간 반응시켜 용해시켰다. 4°C, 10,000×g에서 30분간 원침시킨 후 상청액을 수집하여 동량의 젤 전기영동 시료 완충액과 혼합한 다음, 10% polyacrylamide 구배 젤에 넣고, 60mA의 일정한 전류하에서 45-90분간 전기영동을 시행하였다. 분자량 표준 단백질 기준으로 44kDa에 해당하는 band를 잘라 수집한 다음, 잘게 잘라, 전기영동 유출기 (electro-eluter concentrator) (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA)에 넣어 단백질을 분리하였다²¹.

8. 44kDa 단백에 대한 dot 블로트법

상기 방법으로 분리한 44kDa에 해당하는 혈관 내피세포 표면 단백을 완충액과 혼합한 다음 7 µg/µl 농도의 혼합액을 나이트로셀룰로스 용지에 직경 5 mm 크기로 3 µl 접적 후 건조시켰다. 접적된 나이트로셀룰로스 용지를 원형으로 잘라 바닥이 평평한 폴리스티렌 배양 용기의 각 well에 넣고 T-PBS로 3회 세척한 후 3% BSA를 적용시켜 비결합 부위를 차단시켰다. 대조군과 상기의 ELISA 검사에서 양성반응을 보인 베체트병 환자의 활동기 혈청을 실온에서 2시간 반응시킨 후 T-PBS로 세척하고 peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma)과 2시간 동안 반응시켰다. 다시 T-PBS로 세척 후 diaminobenzidine (Sigma)을 섞은 용액에 30% H₂O₂ 5 ml을 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 PBS로 세척하여 관찰하였다.

9. 통계처리

본 실험의 측정수치는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계학적 분석은 분산분석, unpaired 및 paired groups에 대한 Student's t-test와 비모수 검정법인 Kruskal-Wallis H test로 검정하였으며, p값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 미세혈관 내피세포의 표면 단백에 대한 IgG 항체 반응

배양한 HDMEC의 표면 단백에 대한 IgG 항체를 IgG-ELISA법을 이용하여 측정하였다. 정상 대조군 75명의 광학밀도는 0.094±0.042이었는데, 질병 대조군 87명의 혈청에서 광학밀도는 0.105±0.032으로 정상 대조군에 비해 큰 차이가 없었으나, 베체트병 환자 114명에서는 0.217±0.259, 전신성 홍반성 낭창 환자 40명에서는 0.330±0.251, 류마チ스성 관절염 환자 10명에서는 0.273±0.227, 기타 혈관염 질환 환자 6명에서는 0.355±0.331로 IgG 항체기는 대조군

에 비해 유의하게 높았다.

정상 대조군 75명의 광학밀도 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 양성으로 판정하였을 때 질병 대조군 87명 중 양성반응을 나타낸 경우는 없었으나, 베체트병 환자 114명 중 31명 (27.2%), 전신성 홍반성 낭창 환자 40명 중 21명 (52.5%), 류마チ스성 관절염 환자 10명 중 5명(50.0%), 기타 혈관염 질환 환자로 경피증 환자 3명 중 1명, 강직성 척추염 환자 2명 중 2명, 헤노호-쉔라인 자반 환자 1명 중 0명 등 6명 중 3명 (50.0%)에서 양성반응을 나타내어 정상 대조군 및 질병 대조군에 비해 유의하게 높았다 (Fig. 1, Table 1). Simian virus 40-immortalized HDMEC인 HMEC-1을 이용한 IgG-ELISA 검사에서도 HDMEC를 이용한 실험 결과와 기본적으로 동일한 검사 소견을 나타내었다.

2. 미세혈관 내피세포의 표면단백에 대한 IgM 항체 반응

HDMEC 표면단백에 대한 IgM 항체를 측정하기 위한 IgM-ELISA 검사상 대부분의 다른 자가면역 질환 환자에서 IgM 항체가 정상 대조군에 비해 높게 나타났다. 정상 대조군 75명의 혈청에서 IgM 항체에 대한 광학밀도는 0.086

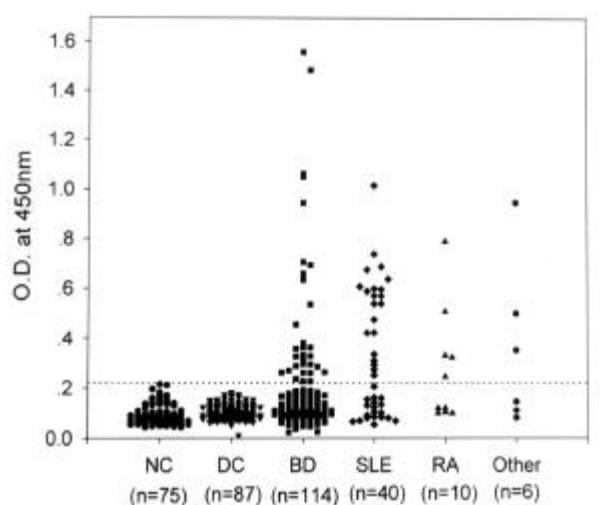


Fig. 1. IgG antibody activity to crude surface antigens of cultured HDMEC in serum of patients with Behcet's disease. Isolated HDMEC surface antigens were incubated with sera from patients with normal control (NC), disease control (DC), Behcet's disease (BD), systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), and others. The IgM antibody activity was measured with an ELISA and each dot is the mean result of an individual serum performed in quadruplicate. The horizontal dotted line represents the level of the mean OD plus three times the SD for the normal controls.

Table 1. Frequency of AECA in normal individuals and patients with Behcet's disease and other diseases

Group	n	AECA positive(%)		
		IgG	IgM	IgG+IgM
Normal control	75	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Disease control	87	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Behcet's disease	114	31 (27.2)	72 (63.2)	18 (15.7)
SLE	40	21 (52.5)	29 (72.5)	17 (42.5)
Rheumatoid arthritis	10	5 (50.0)	6 (60.0)	2 (20.0)
Others	6	3 (50.0)	4 (66.7)	2 (33.3)
Scleroderma	3	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0)
Ankylosing spondylitis	2	2 (100.0)	2 (100.0)	2 (100.0)
HSP	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

AECA : antiendothelial cell antibody, SLE : systemic lupus erythematosus, HSP: Henoch-Schoenlein purpura

± 0.040 , 질병 대조군 87명에서 광학 밀도는 0.103 ± 0.043 이었는데 비해 베체트병 환자 114명에서는 0.271 ± 0.129 , 전신성 홍반성 낭창 환자 40명에서는 0.338 ± 0.156 , 류마チ스성 관절염 환자 10명에서는 0.267 ± 0.096 , 기타 혈관염 질환 환자 6명에서는 0.299 ± 0.235 로 대조군에 비해 유의하게 높았다.

정상 대조군 75명의 광학밀도 평균치에 표준편차 3배수를 더한 값 이상을 IgM 항체가의 양성으로 판정하였다. 베체트병 환자 114명 중 IgM 항체 양성 환자는 72명 (63.2%)으로 정상 대조군 및 질병 대조군에 비해 유의하게 높았다. 전신성 홍반성 낭창 환자는 29명 (72.5%), 류마チ스성 관절염 환자는 6명 (60.0%), 기타 혈관염 질환 환자는 4명 (66.7%)에서 양성반응을 나타내었다 (Fig. 2, Table 1). IgG 항체와 IgM 항체 모두 양성을 보인 혈청수는 주로 전신성 홍반성 낭창 환자 (42.5%)와 기타 혈관염 질환 중 강직성 척추염 환자 (100.0%)에서 비교적 높게 나타났다 (Table 1). HMEC-1을 이용한 IgM-ELISA 검사에서도 HDMEC을 이용한 실험결과와 기본적으로 동일한 검사소견을 나타내었다.

3. 항내피세포 반응에서 싸이토카인의 효과

IgG-ELISA검사상 IL-1 α ($100 \text{ U/ml} \times 24\text{시간}$)과 TNF α ($100 \text{ U/ml} \times 24\text{시간}$), IFN- γ ($500 \text{ U/ml} \times 48\text{시간}$)를 처리한 후 정상 대조군, 질병 대조군 및 베체트병 환자 실험군 혈청 모두에서 BRM 처리전에 비해 IgG항체가의 유의한 변화를 관찰할 수 없었다 (Table 2). IgM-ELISA 검사상 IFN-

γ 처치전의 HDMEC에서 시행한 각군의 평균 광학밀도에 비교하여 IFN- γ 처치 후 평균값이 높았으나 통계학적으로

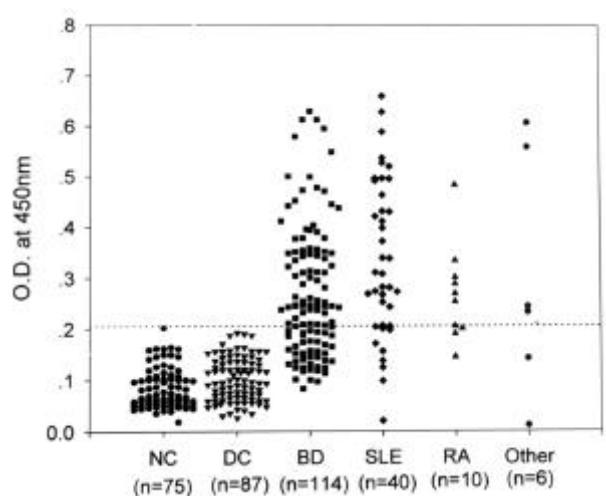


Fig. 2. IgM antibody activity to crude surface antigens of cultured HDMEC in serum of patients with Behcet's disease. Isolated HDMEC surface antigens were incubated with sera from patients with normal control (NC), disease control (DC), Behcet's disease (BD), systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), and others. The IgM antibody activity were measured with an ELISA and each dot is the mean result of an individual serum performed in quadruplicate. The horizontal dotted line represents the level of the mean OD plus three times the SD for the normal controls.

Table 2. IgG antibody activity to cultured unstimulated or cytokine-stimulated HDMEC in serum of patients with Behcet's disease

Group	No. of sera	Optical density at 450nm			
		Unstimulated	IL-1 α	TNF α	IFN- γ
NC	10	0.083 \pm 0.031	0.088 \pm 0.024	0.094 \pm 0.052	0.086 \pm 0.047
DC	10	0.099 \pm 0.014	0.093 \pm 0.02	0.097 \pm 0.041	0.089 \pm 0.032
BD	10	0.184 \pm 0.108	0.195 \pm 0.152	0.186 \pm 0.141	0.206 \pm 0.108

HDMEC were stimulated with IL-1 α 100 U/ml for 24 hours, TNF α 100 U/ml for 24 hours or IFN- γ 500 U/ml for 48 hours and isolated HDMEC surface antigens were incubated with sera from patients with Behcet's disease (BD), disease controls(DC), or normal controls (NC). The IgG-antibody activity was measured with an ELISA and expressed as the mean \pm SD in optical density of the mean values of duplicate sample determined at 1:10 dilution of sera.

Table 3. IgM antibody activity to cultured unstimulated or cytokine-stimulated HDMEC in serum of patients with Behcet's disease

Group	No. of sera	Optical density at 450nm			
		Unstimulated	IL-1 α	TNF α	IFN- γ
NC	10	0.089 \pm 0.041	0.091 \pm 0.038	0.093 \pm 0.027	0.096 \pm 0.043
DC	10	0.094 \pm 0.063	0.087 \pm 0.710	0.096 \pm 0.052	0.099 \pm 0.038
BD	10	0.204 \pm 0.149	0.214 \pm 0.132	0.220 \pm 0.129	0.258 \pm 0.144

HDMEC were stimulated with IL-1 α 100 U/ml for 24 hours, TNF α 100 U/ml for 24 hours or IFN- γ 500 U/ml for 48 hours and isolated HDMEC surface antigens were incubated with sera from patients with Behcet's disease (BD), disease controls (DC), or normal controls (NC). The IgM-antibody activity was measured with an ELISA and expressed as the mean \pm SD in optical density of the mean values of duplicate sample determined at 1:10 dilution of sera.

유의한 차이를 보이지는 않았다. IL-1 α (100 U/ml \times 24시간) 및 TNF α (100 U/ml \times 24시간) 처리 후에는 처리 전에 비해 베체트병 환자의 혈청에서 광학밀도에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Table 3).

4. HDMEC에 대한 순환항체와 다른 자가항체 및 면역복합체와의 상관관계

베체트병 환자 114명 중 혈중 면역복합체는 52명에서 양성으로 나타났으며, 이들 면역복합체 양성 환자 중에 IgG 순환항체 양성은 15명(28.8%)이었고 IgM 순환항체 양성은 29명(55.8%)으로 면역복합체 양성 환자에서 IgM 순환항체가 높게 검출되어 상관성이 있음을 보여주었다.

5. 베체트병에서 HDMEC에 대한 IgM 항체와 임상양상과의 상관관계

HDMEC의 표면단백에 대한 IgM 항체 음성을 보인 환자군과 양성을 보인 환자군 간에 성비와 연령 분포에 큰 차이는 없었으며, 평균 유병기간은 항체 음성을 보인 환자군에서는 10.4년, 양성을 보인 환자군에서는 8.2년이었다. 임상양상 중 구강 궤양, 외음부 궤양 및 안질환의 발생 빈도는 두 환자군 사이에 큰 차이는 없었으나 피부병변과 관절증상은 IgM 항체 음성을 보인 환자군에서 빈도가 약간 높았고, 혈전정맥염의 발생 빈도는 항체 음성인 환자군에서는 0%이었으나, 양성인 환자군에서는 18.1%이었다(Table 4).

Table 4. A comparison of clinical features and AECA-positive and AECA-negative Behçet's disease patients

	IgM negative (n=42)	IgM positive (n=72)
Male/female	13/29	23/49
Mean age (year)	41.3	39.8
Age ranges (year)	25-62	23-55
Mean disease duration (year)	10.4	8.2
Clinical features (No. of patients)		
Oral ulcer	42 (100.0)*	72 (100.0)
Genital ulcer	37 (88.0)	61 (84.7)
Skin lesions	40 (95.2)	68 (94.4)
Eye lesions	10 (23.8)	20 (27.8)
Joint symptoms	5 (11.9)	8 (11.1)
Thrombophlebitis	0 (0)	13 (18.1)

*: %

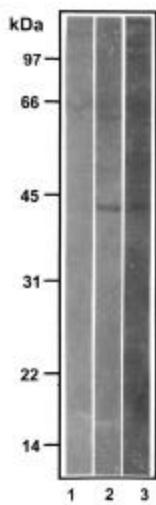


Fig. 3. Immunoblots of HDMEC and HMEC-1 for sera from patients with Behçet's disease showing IgM antibody reactivity to HDMEC antigen in ELISA test. HDMEC lysates (lane 1,2) and HMEC-1 lysates (lane 3) were probed with sera of normal healthy control (lane 1), Behçet's disease patient (lane 2,3).

6. Western 블롯 검사에서 미세혈관 내피세포에 대한 순환항체의 반응양상

정상인의 혈청을 반응시킨 경우 특이한 단백질대를 관찰

할 수 없었으나 IgM 항체 양성을 보인 베체트병 환자의 혈청은 Fig. 3의 2번 lane에서 보여주는 바와 같이 44 kDa의 HDMEC 표면단백과 반응하였다. HMEC-1(3번 lane)을 이용한 검사에서도 HDMEC을 이용한 실험결과와 동일한 검사소견을 나타내었다(Fig. 3).

7. 44kDa HDMEC 표면단백에 대한 dot 블롯 검사 반응양상

Western 블롯 검사상 IgM 항체 양성을 보인 베체트병 환자의 혈청과 반응을 한 44kDa의 혈관 내피세포 표면단백이 베체트병에서만 특이적으로 반응하는 표면단백인지를 알아보기 위하여 시행한 dot 블롯 검사상 정상 대조군과 IgG 혹은 IgM 항체 양성을 보인 전신성 홍반성 낭창 환자는 모두 음성 소견이었으나 IgM 항체 양성을 보인 베체트병 환자의 혈청은 모두 양성 반응을 나타내었고, IgG 항체 양성을 보인 베체트병 환자의 혈청은 2명에서만 미약한 반응을 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

혈관 내피세포는 혈관의 가장 내측에 위치하는 해부학적 특성으로 인하여 혈관강내의 염증세포나 각종 단백질, 면역 글로불린과 일차적으로 접해있음으로 염증반응과 면역반응의 조절에 필수적인 역할을 한다^{22,23}. 혈관염을 보이는 여러

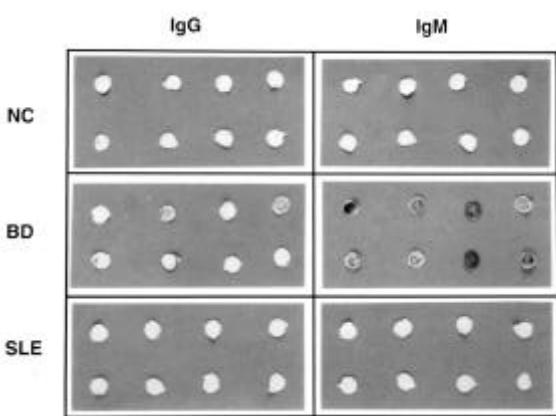


Fig. 4. Dot blots of 44kDa Ag of HDMEC for sera from normal controls(NC), patients with Behcet's disease(BD) and systemic lupus erythematosus (SLE) showing IgG and IgM antibody reactivity to HDMEC antigen in ELISA test.

질환에서 내피세포나 모세혈관벽을 구성하는 성분의 구조 변화, 성분변화, 또는 극성변화 등이 발병기전에 중요한 역할을 할 수 있다.

최근 베체트병 환자의 피부병변을 중심으로한 일련의 초미세구조 연구들은 혈관 내피세포의 퇴행변화를 잘 보여주고 있다^{3,24}. 퇴행변화를 보이는 내피세포들은 세포의 위축, 핵 염색질의 농축 및 세포질내 공포와 같은 미세구조의 변화를 보이며, 더 진행시 혈관 내피세포의 조직파편들이 혈관 내외로 떨어져 나와 혈관 주위의 림프구와 반응하거나 혈관 주위 세포에 의해 탐식되기도 하며, 혈관강내의 혈전 형성에 관여함을 보이기도 한다.

항내피세포 항체는 마우스 신장 기질을 이용한 간접 면역형광법에 의해 교원성 질환, 만성 폐결핵, 신장 동종이식 환자의 혈청에서 처음 검출되었다²⁵. 그 이후 배양한 인체 혈관 내피세포를 이용한 간접 면역형광법으로 신장 동종이식 환자의 혈청에서 IgG 아형의 항내피세포 항체를 검출하였고²⁶, 인체 혈관 내피세포를 이용하여 ELISA법에 의해 내피세포에 대한 순환항체를 검출하는 방법은 Hashemi 등에 의해 시도된 이후 이 분야에 대한 연구의 주종을 이루고 있다²⁷.

많은 연구자들이 여러 교원성 질환 및 전신성 혈관염 환자에서 항내피세포 항체의 존재를 증명하였다. ELISA법을 이용하여 전신성 홍반성 낭창 환자의 74%, 경피증 환자의 30%, 류마チ스성 관절염 환자의 28%에서 IgG 아형의 항내

피세포 항체를 검출한 바 있으며¹⁰, 가와사키병 환자에서 IgM 아형의 항체를⁴, 소아의 급성 용혈성 요독증후군 환자의 혈청에서 IgG와 IgM 아형의 내피세포에 대한 순환항체를 보고한 바 있다²⁸. 베그너 육아종증과 다발성 동맥염 환자들을 대상으로 한 연구에서는 환자의 59%에서 IgG 항체, 68%에서 IgM 항체가 검출되었으며, HUVEC을 TNF α , IL-1 α , IFN- γ 로 전처리 후 혈관 내피세포에 대한 항체의 반응이 증가하였다⁵. 본 실험에서도 베체트병 이외에 대조군으로 선정한 전신성 홍반성 낭창, 류마チ스성 관절염, 경피증, 강직성 척추염 환자들의 혈청에서 IgG 및 IgM 항체가 검출되었다.

각종 혈관염의 병인을 규명하기 위해 시도된 혈관 내피세포의 배양은 분리배양의 까다로움 때문에 HUVEC 또는 동물의 혈관을 이용한 경우가 대부분이며 본 연구에서처럼 HDMEC을 이용한 경우는 극히 적다. 특정조직의 미세혈관으로부터 유래된 내피세포는 대혈관 내피세포와 많은 차이가 있음이 알려지고 있다^{13,14,20}. 즉, 대혈관 내피세포에 비해 미세혈관 내피세포는 시험관내 배양시에 필요한 영양조건이 훨씬 까다롭고, 시험관내에서 모세혈관양으로 형태학적 분화가 빠르게 일어나며, 두 내피세포 간에 분비되는 prostaglandin의 종류에 차이가 있고, 세포 유착분자의 종류나 발현정도가 다르다. 따라서, 베체트병이나 전신성 홍반성 낭창과 같이 미세혈관이나 소혈관을 주로 침범하는 혈관염 질환의 연구에는 HDMEC을 이용하는 것이 이상적이다.

베체트병에서 항내피세포 항체에 관한 연구로서는 베체트병 환자 혈청의 18.1%에서 배양한 HUVEC 단층에 대한 항체를 검출하였다는 보고가 있으며¹² 이 항체들은 단층의 혈관 내피세포에 대해 세포독성을 나타내지는 않았으나, 항체의 존재가 질병의 활성도 및 혈전성 증상과 밀접한 상관관계가 있다고 기술하였다. 다른 보고에 의하면 베체트병 환자를 대상으로 단층의 HUVEC과 지방조직의 미세혈관 내피세포를 이용한 ELISA 검사상 HUVEC에 대한 항체는 26%에서, 미세혈관 내피세포에 대한 항체는 43%에서 검출하고 대혈관의 내피세포를 이용하는 것보다는 미세혈관 내피세포를 이용하는 것이 항내피세포 항체의 검출률이 높다고 하였다²⁹.

본 연구자들도 배양한 HDMEC단층을 이용하여 베체트병 환자의 혈청에서 항내피세포 항체를 검출하기 위한 ELISA 검사를 시행한 결과 40 명중 8 명(20%)에서 IgM 항체를 판찰하였다. 그러나 배양한 살아있는 HDMEC 단층을 이용하여 ELISA검사를 시행하는 과정에서 결과의 동질성이나 재현성의 획득에 몇 가지 문제점이 있을 수 있음을 알게되었

다. 즉 배양판의 각 well에 동일한 수의 세포를 넣어도 2일 후 융합된 세포의 수에 약간의 오차가 있을 수 있고, 배양한 세포의 신선도, 계대배양 횟수 등에 따라 세척과정에서 떨어져 나오는 세포의 수가 불규칙하여 well 간에 또는 배양판간에 반응하는 항원의 양에 오차가 있을 가능성이 많음을 알게되었다. HDMEC과 HMEC-1의 표면 조항원을 이용한 본 실험에서는 베체트병 환자에서 IgG 항체 27.2%와 IgM 항체 63.2%의 양성을 얻어 배양한 HDMEC 단층을 사용하였을 때에 비해 감수성이 높음을 보여주었다. 또한 동일한 양의 항원을 정량 측정하여 각 well에 고정한 관계로 세척 과정에서 발생하는 well 간의 오차를 극소화 할 수 있었으며 계대횟수에 대한 오차도 줄일 수 있었고 또한 항원을 다량 분리한 다음에는 장시간 냉장보관이 가능하여 검사시마다 즉시 사용할 수 있는 장점이 있었다. 본 연구에서 또한 IgM 항체 양성률이 더 높게 나와 HDMEC 표면단백에 반응하는 항체가 IgG 보다는 IgM 임을 알 수 있었다. 베체트병 환자의 병변부위로부터 시행한 직접 면역형광 검사상 혈관벽, 특히 소정맥벽에 주로 IgM 아형의 면역글로불린이 침착하는 것으로 보고된 바 있어^{30,31} 본 연구의 결과는 이러한 소견과 잘 부합된다고 할 수 있으며, 이러한 결과들은 베체트병에서 관찰되는 혈관염의 병인에 IgM 아형의 면역글로불린이 중요한 역할을 하리라고 시사하고 있다.

본 연구에서 향후 베체트병을 비롯한 혈관염 질환에서 혈관 내피세포에 대한 항체 검출, 항체 특성 규명 등의 실험에 HDMEC 대신 HMEC-1을 사용할 수 있는지 알아보기 위해 HDMEC과 HMEC-1 간의 항원성의 동질성에 대해 분석하였다. HMEC-1은 E-selectin 분자 발현을 제외하고 세포 유착분자 발현 및 기타 성상에서 HDMEC과 유사하고 CD 36과 neural cell adhesion molecule이 발현되지 않는 점에서 HUVEC과 유사한 것으로 알려져 있다¹⁷. 본 실험에서 혈관 내피세포에 대한 순환항체의 검출빈도나, 반응양성이 HMEC-1과 HDMEC 간에 차이가 없음을 보여 주어 HMEC-1을 본 연구와 유사한 실험목적을 가진 연구에 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 항내피세포 항체 검출을 위한 연구에 HMEC-1을 활용할 경우 검사시간의 단축, 검사비의 절감뿐 아니라 분리 배양한 HDMEC을 사용할 때 발생할 수 있는 개체간의 항원성 차이를 배제할 수 있다는 큰 이점이 있을 것으로 생각된다.

베체트병의 병인에 면역 복합체가 중요한 역할을 할 것으로 제시된 바 있다³². 또한 항핵항체가 내피세포와 반응할 수 있기 때문에³³ 항핵항체를 비롯한 다른 자가항체의 존재와 항내피세포와의 연관성을 생각할 수 있다. 대부분의 연구에서 항 내피세포 항체는 면역복합체나 항핵항체와는 연

관성이 없다고 기술되고 있지만^{11,34}, 본 연구에서는 베체트 병 환자에서 IgM 순환항체가 면역복합체와 약간의 연관성이 있었다. 이 연관성에 대해서는 추후 면역복합체를 polyethylene glycol로 침전시킨 후 내피세포에 대한 순환항체 가에 변화가 있는지를 관찰하여 확인할 필요가 있다.

Western 블롯 검사상 베체트병 환자의 IgM 항 내피세포 항체는 미세혈관 내피세포 표면의 44kDa 단백을 인지하였으며, 이는 이전의 보고와 일치하였다¹⁵. 44kDa 표면단백을 이용한 dot 블롯 검사상 베체트병 환자의 혈청만 양성으로 반응하는 것으로 보아 44 kDa 단백에 대한 IgM 항체는 베체트병에 비교적 특이성이 있음을 시사하고 있다.

전신성 혈관염이 동반된 환자의 혈청에 혈관 내피세포에 대한 순환항체가 존재하는 것은 혈관 손상에 중요한 역할을 하리라고 생각되어진다. 그러나 이러한 항체의 검출이 직접적으로 혈관의 손상에 관여하는지 혹은 혈관에 어떠한 염증반응이 있은 후 내피세포에 항원이 표현되어 이차적으로 항체가 출현했는지에 대해 아직 정확히 밝혀진 바는 없다. 그러나 보체 매개 순환 면역복합체에 의해 혈관 손상이 발생하는 본태성 혼합 한랭글로불린혈증 환자의 혈청에서는 항 내피세포 항체가 검출되지 않는 것으로 보아³⁵ 혈관 손상에 의해 이차적으로 내피세포에 대한 항체가 발생한 것은 아닌 것으로 생각되어진다. 전신성 홍반성 낭창 환자에서 검출된 항 내피세포 항체는 HUVEC에 대해 보체 중개성 세포독성이나 항체의존성 세포중개성 세포독성을 나타내지는 않았지만¹⁰, 일부 경피증 환자와 베그너 육아종증 환자에서 항 내피세포 항체에 의한 항체의존성 세포중개성 세포독성이 보고된 바 있다^{5,8}. 한편 가와사키병에서 IgM 아형의 항 내피세포 항체가 싸이토카인으로 전처치한 내피세포에 세포독성을 나타낸 것으로 보아⁴ 정상 내피세포는 이를 항 내피세포 항체에 의해 손상을 받지 않지만, 싸이토카인과 같은 생물학적 반응 조절물질이 함께 작용하여 세포 독성을 나타낼 수도 있다고 판단된다.

혈관염 질환에서 항 내피세포 항체의 존재와 임상양상과의 연관성에 대해 일부 보고에서 기술한 바 있다. 류마チ스 성 관절염 환자에서는 동반된 혈관염의 증상이 호전되면서 항 내피세포 항체의 수치가 감소하는 경향을 보였고¹¹, 전신성 홍반성 낭창 환자에서는 혈관 내피세포에 대한 높은 항체 역기가 활동성 신장 병변 및 혈관염과 밀접하게 동반되어 신장 침범을 예전하는 표식으로 이용할 수 있다고 보고되었으며⁷, 베체트병에서는 항 내피세포 항체가 양성인 환자군에서 활동성 안질환과 급성 혈전증의 발생 빈도가 음성인 환자군에 비해 의미 있게 높았고, 적혈구침강속도도 항체 양성인 환자군에서 높게 나타났다는 보고가 있었다.

^{12,29}. 본 연구에서는 항 내피세포 항체가 양성인 환자군에서 안질환의 빈도가 의미 있게 높지는 않았지만, 항체 음성인 환자군에 비해 혈전 정맥염과 동반된 경우가 현저히 많았다. 앞으로 항체 양성인 베체트병 환자군에서 임상 증상의 호전이나 악화에 따라 항 내피세포 항체의 수치에 변화가 있는지에 대해 계속적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 베체트병 환자의 활동기 혈청내에 배양한 HDMEC 표면항원과 반응하는 항 혈관 내피세포 IgM 항체가 존재함을 알수 있었으며, 이 IgM 항체는 베체트병의 특이항체일 가능성을 시사한다. 또한 배양한 HDMEC으로부터 분리한 표면 조항원과 immortalized HDMEC인 HMEC-1을 베체트병에서 항 내피세포 항체의 검출을 위한 연구에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Arbesfeld SJ, Kurban AK. Behcet's disease. *New perspectives on an enigmatic syndrome*. J Am Acad Dermatol 1988;19: 767-79
- Honma T, Bang D, Saito T, et al. *Ultrastructure of lymphocyte-mediated fat-cell lysis in erythema nodosum-like lesions of Behcet's syndrome*. Arch Dermatol 1987;123: 1650-4
- Bang D, Honma T, Saito T, et al. *Ultrastructure of vascular changes in cutaneous manifestations of Behcet's disease*. Acta Derm Venereol (Stockh) 1988;68:33-40
- Leung DYM, Collins T, Lapierre LA, Geha RS, Pober JS. *Immunoglobulin M antibodies present in the acute phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated by gamma interferon*. J Clin Invest 1986;77: 1428-35
- 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 1991;85:14-9
- 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
- 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
- Penning CA, Cunningham J, French MAH, et al. *Antibody-dependent cellular cytotoxicity of human vascular endothelium in systemic sclerosis*. Clin Exp Immunol 1984;58: 548-56
- Alderuccio F, Barnett AJ, Campbell JH, Psdersen JS, Toh BH. *Scl-95/100: doublet of endothelial marker autoantigens in progressive systemic sclerosis*. Clin Exp Immunol 1986;64: 94-100
- Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, et al. *Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases*. Clin Exp Immunol 1988;72: 450-456
- Heurkens AHM, Hiemstra PS, Lafeber GJM, Daha MR, Breedveld FC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis*. Clin Exp Immunol 1989;78:7-12
- Aydintug 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
- Davison PM, Bensch K, Karasek MA. *Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture*. J Invest Dermatol 1980;75: 316-21
- 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
- Lee KH, Choi ES, Bang D. *Anti-endothelial cell antibodies and vascular injury in patients with Behcet's disease(abstract)*. J Invest Dermatol 1995;104:646
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol 1992;99: 683-90
- Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, et al. *Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line(HMEC-1)*. J Invest Dermatol 1994;102:833-7
- International study group for Behcet's disease. *Criteria for diagnosis of Behcet's disease*. Lancet 1990;335:1078-80
- 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
- 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
- Hunkapiller MW, Lujan E, Ostrander F, Hood LE. *Isolation of microgram quantities of protein from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis*. Methods Enzymol 1983;91: 227-36
- Clark RAF, Dellapelle P, Monseau E, et al. *Blood vessel*

- fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary in growth during wound healing.* J Invest Dermatol 1982;79:269-76
23. Pober J. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Am J Pathol 1988;133:426-33
 24. Bang D, Honma T, Saito T, et al. *The pathogenesis of vascular changes in erythema nodosum-like lesions of Behcet's syndrome: An electron microscopic study.* Hum Pathol 1987;18:1172-9
 25. Lindqvist RJ, Osterland CM. *Human antibodies to vascular endothelium.* Clin Exp Immunol 1971;9:753-60
 26. Cerilli J, Holliday JE, Fesperman DP, Folger MR. *Antivascular endothelial cell antibody-its role in transplantation.* Surgery 1977;81:132-8
 27. Hashemi S, Smith CD, Izaguirre CA. *Anti-endothelial cell antibodies: Detection and characterization using a cellular enzyme-linked immunosorbent assay.* J Lab Clin Med 1987;109:434-40
 28. Leung DYM, Moake JL, Havens PL, Kim M, Pober JS. *Lytic anti-endothelial cell antibodies in haemolytic-uraemic syndrome.* Lancet 1988;2:183-6
 29. 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
 30. Williams BD, Lehner T. *Immune complexes in Behcet's syndrome and recurrent oral ulceration.* Br Med J 1977; 1:1387-9
 31. Cornelis F, Sigal-Nahum M, Gaulier A, Bleichner G, Sigal S. *Behcet's disease with severe cutaneous necrotizing vasculitis: response to plasma exchange-report a case.* J Am Acad Dermatol 1987;21:576-9
 32. Lehner T, Almeida JD, Levinsky RJ. *Damaged membrane fragments and immune complexes in the blood of patients with Behcet's syndrome.* Clin Exp Immunol 1978;34:206-12
 33. Horneland M, Rekvig OP, Jorgensen L, Hannestad K. *Cultured human endothelial cells display an antigen that is recognized by certain human anti-chromatin autoantibodies.* Clin Exp Immunol 1983;54:373-7
 34. Baguley E, Hughes GRV. *Antiendothelial cell antibodies.* J Rheumatol(suppl) 1989;16:716-7
 35. Karter L, Schuurman HJ. *Immunobiology and clinical aspects of cryoglobulinemia.* Plasma Ther 1981;2:83-8