



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

베체트병에서 대식세포 유주 저지
인자 발현에 대한 연구

아주대학교 대학원

의학과

인성일

베체트병에서 대식세포 유주 저지
인자 발현에 대한 연구

지도교수 이은소

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아주대학교 대학원

의학과

인성일

인성일의 의학 석사학위 논문을
인준함.

심사위원장 이 은 소 인

심사위원 박 경 숙 인

심사위원 손 성 향 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006 년 12 월 21 일

- 국문요약 -

베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자 발현에 대한 연구

목적: 대식세포 유주 저지 인자(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)는 최초의 T 세포 유래 사이토카인으로서, 시험관 내의 모세관 (capillary tubes *in vitro*)으로부터 대식세포의 무작위적인 이동을 억제하며 지연형 과민반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성(genetic polymorphism)에 따른 임상형의 차이는 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 궤양결장염(ulcerative colitis), 알쯔하이머병, 신증후군 등 여러 질환에서 밝혀진 바 있으며 피부 질환에서는 아토피, 건선, 중증 원형 탈모증 등에서 밝혀진 바 있다. 베체트병은 구강궤양, 외음부 궤양, 포도막염 등의 세가지 증상이 특징적인 만성 염증성 질환이다. 이 병은 점막 및 피부, 눈, 심장, 혈관, 신장, 위장 그리고 신경이 침범될 수 있는 임상적 특징을 가진 매우 다양하고 복합적인 질환으로 인식되어 있으며, 호전과 악화의 재발성 질병 양상을 갖는 것이 특징이다. 베체트병의 병인은 아직까지 확실히 밝혀지지 않았지만 선천면역과 적응면역이 모두 관여하며 염증유발성 사이토카인과 Th1 형 사이토카인이 활성화되고 부착분자나 염증유발성 사이토카인에 대한

유전변이와 같은 면역이상으로 더 강력한 중성구 및 T 세포 반응을 유발한다고 알려져 있다. 또한 전사인자의 세포 내 신호이상으로 외부자극에 대한 염증반응에 대한 역치를 떨어뜨린다. 적응면역도 중요한 역할을 하며 외부(연쇄구균, 초항원) 및 내부항원(열 충격 단백질, 장기 특이 단백질)에 작용하여 조직 T 세포 침착을 유발한다. 베체트병의 면역학적 병인에 널리 알려진 가설에 따르면, 여러 가지 항원에 대한 T 세포의 과민반응과 이에 따른 단백질의 활성화로 인터루킨 12의 생성을 유발하고 이 사이토카인이 Th1 반응을 자극한다. 또한 비정상적인 T 세포 활성화로 인해 인터루킨 8, 인터루킨 17, 감마인터페론과 종양괴사인자와 같은 사이토카인에 의해 중성구가 활성화된다. 베체트병 환자에서도 포도막염이 있는 환자의 경우 대식세포 유주 저지 인자의 혈청내 발현이 높다는 보고가 있고, 신경베체트병 환자에서 뇌척수액 내의 대식세포 유주 저지 인자 발현이 높다는 연구 보고가 있다.

본 연구에서는 베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성에 따른 임상형의 변화와 함께, 각각의 유전자형에 따른 대식세포 유주 저지 인자 발현의 차이를 mRNA 수준에서 RT-PCR 을 통해, 단백질 수준에서 ELISA 와 면역조직화학염색을 통해 확인하고자 하였다.

대상 및 방법: 2002 년 9 월 이후 아주대학교 병원 피부과에 내원하여 International Study Group for Behçet's Disease 에서 1990 년에 발표한 진단기준과 1987 년 일본 베체트병 연구회의 진단기준을 동시에 만족하여 베체트병으로 확진한 환자 427 명을 대상으로 하여 말초혈액을 얻었다. 정상 대조군은 2005 년 6 월부터 2005 년 10 월에 경기도 광주시 보건소에서 실시한 비만프로그램에 참여한 정상인 중 자발적으로 본 연구에 참여의사를 밝힌 307 명을 대상으로 말초혈액을 확보하였다. 면역조직화학염색에서는 상기 실험군중 13 명의 환자 피부의 결절홍반 부위에서 조직을 얻고, 아주대병원 피부과에서 조직검사를 시행한 건선 환자 2 명과 원발성 결절홍반 환자 6 명을 대조군으로 이용하였다. 환자와 대조군의 말초혈액에서 단핵구를 분리하여 cells-to-cDNA II kit (Ambion, Austin, TX)를 이용해 RNA 추출과 cDNA 를 동시에 합성한 후 대식세포 유주 저지 인자 mRNA 에 대한 RT-PCR 을 시행하였고, 혈청 내 대식세포 유주 저지 인자 농도는 ELISA kit (DMF00, Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN)으로 측정하였다. 면역조직화학 검사는 monoclonal mouse antihuman MIF antibody (AF-289-PB, R&D Systems, Minneapolis, MN)을 이용하여 시행하였다.

결 과: 베체트병 환자와 정상인의 혈액에서 mRNA 를 분리하여 RT-PCR 을 시행한 결과 mRNA 의 발현은 확인 할 수 없었다. 혈청내의

대식세포 유주 저지 인자 발현을 ELISA 를 통해 측정한 결과 정상인에 비해 환자군에서 통계학적으로 유의하게 감소하였음을 확인할 수 있었으나 유전자형의 변화에 따른 차이는 없었다. 환자 피부 조직에서 대식세포 유주 저지 인자의 발현을 면역조직화학염색으로 확인한 결과, 표피층과 피하지방층에서 대식세포 유주 저지 인자의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 원발성 결절홍반 환자에서도 동일하게 나타났다. 건선환자에서도 표피층에 대식세포 유주 저지 인자의 발현이 나타나는 것을 확인할 수 있었으나, 건선환자에서는 피하지방층에서 대식세포 유주 저지 인자가 발현되지 않았다.

결 론: 이전의 보고와는 다르게 베체트병 환자에서 혈청 내 MIF 의 농도는 감소되어 있었으나, 베체트병 환자의 피부조직에서 MIF 가 증가되어 발현되었으므로 베체트병에서 피부증상 발현에 MIF 가 관련이 있는 것으로 생각한다.

핵심되는 말: Behcet's disease, Macrophage migration inhibitory factor (MIF)

차 례

국문요약.....	i
차례.....	v
그림차례.....	vii
표차례.....	viii
I. 서론.....	1
II. 연구대상 및 방법.....	4
A. 연구대상.....	4
B. 방법.....	6
1. 말초혈액 단핵구 분리.....	6
2. 역전사-중합효소 증폭반응 (RT-PCR)	6
3. ELISA.....	8
4. 면역조직화학염색.....	8
III. 결과.....	10
A. 역전사-중합효소 증폭반응 결과.....	10
B. ELISA 결과.....	11
C. 면역조직화학염색 결과.....	13
IV. 고찰.....	14
V. 결론.....	15

참고문헌.....	16
ABSTRACT.....	22

그림 차례

Fig. 1. Polymerase chain reaction amplification primer set	7
Fig. 2. Expression of MIF mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	10
Fig. 3. Serum concentration of MIF in Behcet's disease patients & Controls	11
Fig. 4. Immunohistochemical staining for MIF	13

표 차례

Table 1. Demographic characteristics of patients with Behcet's disease and frequency of clinical symptoms.....	5
Table 2. Demographic characteristics of control group.....	5
Table 3. Polymerase chain reaction amplification primer sets.....	7
Table 4. Serum concentration of the MIF in Behcet's disease patients & control.....	12
Table 5. Serum concentration of the MIF in Behcet's disease patients & control according to the polymorphisms.....	13

I. 서론

대식세포 유주 저지 인자(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)는 최초의 T 세포 유래 사이토카인으로서, 시험관 내의 모세관(capillary tubes *in vitro*)으로부터 대식세포의 무작위적인 이동을 억제하며 지연형 과민반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다(Bloom 와 Bennett, 1966; David, 1966). 사람의 대식세포 유주 저지 인자의 cDNA 는 활성화된 T 세포들 에서 최초로 분리되었고, 이는 114 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 12.5 kDa 의 분자량을 가진 물질임이 밝혀졌다(Weiser 등, 1989). 대식세포 유주 저지 인자는 면역계 세포와 말초 조직의 비면역계 세포 모두에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 대식세포 기능의 조절과 림프구 면역 그리고 내분비 기능의 조절 등에서 중요한 기능을 가진다(Calandra 등, 1994; Calandra 등, 1995; Bacher 등, 1996; Meinhardt 등, 1996; Onodera 등, 1997; Waeber 등, 1997; Abe 등, 2001). 대식세포 유주 저지 인자는 글루코코르티코이드의 면역억제 기능과 항염증 작용에 대하여 정반대의 기능을 수행하는 특이적인 조절자로서 작용한다 (Calandra 등, 1995; Santos 등, 2001). 그람음성 세균의 내독소에 의한 쇼크에 대한 숙주반응과 그람양성 세균의 외독소에 의한 면역세포들의 활성화에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌으며, 이외에도 패혈성 쇼크, 류마티스성 관절염, 신장이식의 지연성 과민반응, 사구체신염, 성인성 호흡 곤란 증후군등의 면역 및 염증성 질환에도 중요한 매개자로 작용한다 (Bernhagen 등, 1993; Calandra 등, 1994; Donnelly 등, 1997; Lan 등, 1997; Mikulowska 등, 1997; Calandra 등, 1998; Lan 등, 1998; Bozza 등, 1999; Leech 등, 1999). 면역과

관련된 기능 이외에도 대식세포 유주 저지 인자는 시상하부 전엽 유래 호르몬으로서 광범위한 조절 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 대식세포 유주 저지 인자의 mRNA 발현은 수정체 세포의 분화에도 관련이 있으며, 섬유아세포의 성장을 자극하는 기능도 수행하는 것으로 나타났다. 세포의 증식과 분화에도 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 또한 암의 형성 과정에도 관여하는 것으로 알려졌다 (Takahashi 등, 1998; Chesney 등, 1999; Hudson 등, 1999; Calandra 등, 2000; Ogawa 등, 2000).

피부질환에 있어 대식세포 유주 저지 인자는 여러 자가면역성 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 전신성 경화증에서 대식세포 유주 저지 인자의 혈청 농도가 높은 것으로 보고 되었고(Hoi 등, 2003; Selvi 등, 2003), 아토피 피부염과 건선에서도 대식세포 유주 저지 인자가 혈청과 병변 부위 피부 조직에서 높게 발현되는 것이 보고되었다(Shimizu 등, 1996; Shimizu 등, 1997; Shimizu 등, 2001). 최근 대식세포 유주 저지 인자를 이용한 치료 방법으로 항-대식세포 유주 저지 인자 항체를 이용하여 패혈증과 류마티스성 관절염 그리고 종양 발생 등을 치료하고자 하는 전임상 연구도 보고 되었다(Chesney 등, 1999; Calandra 등, 2000; Ogawa 등, 2000).

대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성(genetic polymorphism)에 따른 임상형의 차이는 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 궤양결장염 (ulcerative colitis), 알쯔하이머병, 신증후군 등 여러 질환에서 밝혀진 바 있으며 피부 질환에서는 아토피 피부염, 건선, 중증 원형 탈모증 등에서 밝혀진 바 있다(Donn 등, 2001; Amoli 등, 2002; Donn 등, 2004; Flex 등, 2004; Hizawa 등, 2004; Nohara 등, 2004; Berdeli 등, 2005; Shimizu 등, 2005).

베체트병은 구강궤양, 외음부 궤양, 포도막염 등의 세가지 징후가 특징적인 만성 염증성 질환이다. 이 병은 점막 및 피부, 눈, 심장, 혈관, 신장, 위장 그리고 신경이 침범될 수 있는 임상적 특징을 가진 매우 다양하고 복합적인 질환으로 인식되어 있으며, 호전과 악화의 재발성 질병 양상을 갖는 것이 특징이다(Saylan, 2001). 베체트병의 병인은 아직까지 확실히 밝혀지지 않았지만 선천면역과 적응면역이 모두 관여하며 염증유발성 시토카인과 Th1 형 사이토카인이 활성화되고 부착분자나 염증유발성 사이토카인에 대한 유전변이와 같은 면역이상으로 더 강력한 중성구 및 T 세포 반응을 유발한다고 알려져 있다. 또한 전사인자의 세포 내 신호이상으로 외부자극에 대한 염증반응에 대한 역치를 떨어뜨린다. 적응면역도 중요한 역할을 하며 외부(연쇄구균, 초항원) 및 내부항원(열 충격 단백질, 장기 특이 단백질)에 작용하여 조직 T 세포 침착을 유발한다(Direskeneli, 2001). 베체트병의 면역학적 병인에 널리 알려진 가설에 따르면 여러 가지 항원에 대한 T 세포의 과민반응과 이에 따른 단핵구의 활성화로 인터루킨 12 의 생성을 유발하고 이 사이토카인이 Th1 반응을 자극한다. 또한 비정상적인 T 세포 활성화로 인해 인터루킨 8, 인터루킨 17, 감마인터페론과 종양괴사인자와 같은 사이토카인에 의해 중성구가 활성화된다(Hirohata 와 Kikuchi, 2003).

베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 역할에 관한 이전 보고에서 혈청 MIF 농도가 베체트병 환자에서 증가되어 있으며, 질병의 활성도와 연관이 있다고 알려진 바 있다(김성동 등, 2004).

본 연구에서는 베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성에 따른 임상형의 변화와 함께, 각각의 유전자형에 따른 대식세포 유주 저지 인자

발현의 차이를 mRNA 수준에서 RT-PCR 을 통해, 단백질 수준에서 ELISA 와 면역조직화학염색을 통해 확인하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

A. 연구대상

2005 년 9 월 이후 아주대학교 병원 피부과에 내원하여 International Study Group for Behçet's Disease 에서 1990 년에 발표한 진단기준과 1987 년 일본 베체트병 연구회의 진단기준을 동시에 만족하여 베체트병으로 확진한 환자 427 명을 대상으로 하였다. 이들 중 말초혈액이 확보된 162 명의 환자를 대상으로 하여 대식세포 유주 저지 인자에 대한 유전자 다형성을 확인하였고, DNA 검체가 유전자 다형성 확인에 부적절한 9 명을 제외하고 153 명에 대해 실험을 진행하였다. 정상 대조군은 2005 년 6 월부터 2005 년 10 월에 경기도 광주시 보건소에서 실시한 비만 프로그램에 참여한 정상인 중 자발적으로 본 연구에 참여의사를 밝힌 사람들 307 명을 대상으로 말초혈액을 확보하였다. 이들 중 개인정보 확인이 불가능한 4 명과 가족으로 확인된 4 명, 혈액검체가 불충분한 9 명을 제외하고 290 명에 대해 실험을 진행하였다. 면역조직화학염색에서는 상기 실험군중 13 명의 환자 피부의 결절성 홍반 부위에서 조직을 얻고, 아주대병원 피부과에서 조직검사를 시행한 건선 환자 2 명과 원발성 결절홍반 환자 6 명을 대조군으로 이용하였다.

Table 1. Demographic characteristics of patients with Behcet's Disease and frequency of clinical symptoms

Clinical feature	Total (%)	Male (%)	Female (%)
BD patient	153(100)	72(47.1)	81(52.9)
Age (years)	19–55	20–55	19–53
Major symptoms			
Oral ulcer	144 (94.1)	67 (43.7)	77 (50.3)
Genital ulcer	101 (66.0)	43 (28.1)	58 (37.9)
Skin lesion	109 (71.2)	53 (34.6)	56 (36.6)
Ocular lesion	52 (34.0)	30 (19.6)	22 (14.4)
Minor symptoms			
Arthritis	30 (19.6)	13 (8.5)	17 (11.1)
Large vessel involvement	2 (1.3)	1 (0.7)	1 (0.7)
Gastrointestinal involvement	5 (3.3)	5 (3.3)	5 (3.3)
Central nervous system involvement	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 2. Demographic characteristics of control group

	Total (%)	Male (%)	Female (%)
Control Group	290	42 (14.5)	248 (85.5)
Age (years)	22–67	23–53	22–67

B. 방법

1. 말초혈액 단핵구 분리

환자의 혈액을 EDTA 처리된 tube 에 옮긴 뒤 말초혈액 단핵구 (PBMC)를 분리하였다. EDTA 을 포함한 혈액을 RBC lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2-7.4, 36°C)에 5 분간 방치한 후 2000 rpm 에서 10 분간 원심하였다. 상층액을 제거한 후 다시 RBC lysis buffer 에 cell 을 풀어주어 원심분리 하였고, 분리된 cell 을 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 2 회 세척한 후 RNA 를 분리하였다.

2. 역전사-중합효소 증폭반응 (RT-PCR)

역전사-중합효소 증폭반응은 다음과 같이 실시하였다. 환자에서 말초혈액 단핵구를 추출하여 cells-to-cDNA kit (Ambion, Austin, TX)를 이용해 RNA 추출과 cDNA 를 동시에 합성하였고, positive control(β -actin) 로 확인한 뒤 대식세포 유주 저지 인자 primer 를 붙여 cycler 에서 반응시켰다 (94°C 30 초, 55°C 30 초, 72°C 30 초, 30 회 증폭). 증폭된 DNA solution 은 2% agarose gel 에서 전기영동 (100V, 20 분)하였고, ethidium bromide 로 염색한 다음 UV 로 관찰하였다. 본 실험에서 사용한 대식세포 유주 저지 인자 primer 는 Steinhoff 등이 건선환자를 대상으로 한 연구에서 사용한 내용을 참고하였으며, Table 3 과 같다(Steinhoff 등, 1999).

Table 3. Sequences of polymerase chain reaction(PCR) amplification primer set

Gene		Sequence (5'-3')
<i>MIF</i>	sense	TCCTTCTGCCATCATGCCGA
	antisense	TGCGGCTCTTAGGCGAAGGT

```

1 ctgcaggaac caatacccat aggcattttg tataaatggg ccatggggcc tcccagctgg
61 aggcggctg gtgccacgag ggtcccacag gcatgggtgt ccttcctata tcacatggcc
121 tteactgaga ctgggtatag gattgcacct atcagagacc aaggacagga cctccctgga
181 aactctgag gacctggcct gtgatccagt tgcctcctg tctctctct gctatgcat
241 ggcttatctt ctctccacca ttcattcatt catcattca ttcagcagta ttagtcaatg
301 tctcttgata tgcctggacc ctgctatgat gtcctccagt ttaccattag tggaaaagac
361 atttaagaaa ttcaccaagg gctctatgag aggcataca cgggggacct gactagggtg
421 tggcttccct gaggagctga agttgcccag agcccagag aaggggacct gacacgctt
481 gaaccactga acctgctctg gacctgcctt ccttcctctg gtgctctcca gcatcctatc
541 ctctttaaag agcagggtt cagggagttt cctcggatgg tgatctcgag gggcagctcc
601 cctctcaact gccgcatgac taccgccccc catctcaaac acacaagctc acgcatgggg
661 gactggagcc cttgagaca tctggcccaa agacagagag tacaggggct cagtgctgct
721 agtggaaatg actgggcttc atctctggaa gggtaaaggg ccatcttccg ggttcaccgc
781 cgcataccca cccccggacc agcgcctcct ggcgactaac atcggtgact tagtgaaggg
841 actaagaaag acccgaggcg aggcgggaac aggcgatctt ctaggcgcca agtggagaac
901 aggtggagc ggtgcggcgg gcttagcggc ggttgctgga ggaacgggag ggtcgcaca
961 gggctcctgc ctgccccggg cgagccgagg caggcgggta cttccccact cggggcggag
1021 ccgcagcttc gggggggcgg ggcttggcgc cggcgggtggc gtcacaaaag gcggggaccac
1081 agtgggtccc gagaagtcag gcactgacct cagcggcggc cgcggggcgt gcgtctgtgc
1141 ctctgcggcg gtctcctgc cctctctgcca tcatgcccga gtctatcgt aacaccaacg
1201 tgccccggcg ctccgtgccc gacgggttcc tctccgagct caccacagag ctggcgcagg
1261 ccaccggcaa gccccccag gtttgccggg aggggacagg aagagggggg tgcccacggg
1321 acgaggggtt ccgcgctggg agctggggag gcgactcctg aacggagctg gggggcgggg
1381 cggggggag aggggtgctc gggcccgaag tggactctg gggcccgaag aggtcgtgg
1441 ggcgggctga ccgcccctt tctcgcagt acatcgoggt gcactggtc ccggaccagc
1501 tcatggcctt cggcggctcc agcagaccgt gcgctctctg cagcctgcac agcatcggca
1561 agatcggcgg cgcgcagaac cgtctctaca gcaagctgct gtgcccggct ctggccgagc
1621 gcctgcgcac cagccccgac aggtacgcgg agtcgaggag gggcggggga ggggcggcgg
1681 cgcgcggcca gggccgggac tgagccacc gctgagtcgg gctcctccc cccgagggt
1741 ctacatcaac tattacgaca tgaacgggac caatgtgggc tggacaact ctagctctgc
1801 ctaagagccg cagggaccca cgtgtgctgc gctggctcca cccgggaacc cgcgcagcgc
1861 tgtgttctag gcccggccac cccaaccttc tgggggggag aaataaacgg ttagagact
1921 aggagtgctt cgggttctct tggcttggcg gaggaaatgg tgcagagccg ggacattggg
1981 gaggcaggtc gggaaacggt gttggggcgg ggggtcaggg ccgggttgc ctctcgaaac
2041 ctgctgtctg ggaacccttt tgtccagcct gtcctccta cgtcctaac agaggagccc
2101 cagtgctctt ccattctatg ggtacggaag ggtgaggag aagttggcac tctgcctgg
2161 gctgcag

```

Fig. 1. Sequences of polymerase chain reaction(PCR) amplification primer set

3. ELISA

-70°C에 냉동 보관되었던 환자의 serum 을 실온에서 30 분간 서서히 녹인 후 대식세포 유주 저지 인자의 농도를 ELISA kit (DMF00, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, MN)으로 측정하였다. 대식세포 유주 저지 인자의 양을 측정하기 위해 anti-human MIF antibody 가 부착된 96-well plate 에 serum 을 넣고 2 시간 배양 후 완충액으로 4 번 세척하였다. HRP conjugated antibody 를 더한 후 실온에서 1 시간 배양시키고 kit 에 준비된 기질을 넣고 실온에서 30 분간 배양시켰다. kit 에 포함된 반응 중지액을 넣고 450 nm 자외선에서 각 well 의 흡광도를 측정하였다.

4. 면역조직화학염색

면역조직화학 검사는 monoclonal mouse antihuman MIF antibody (AF-289-PB, R&D Systems, Minneapolis, MN)을 이용하여 시행하였다. 실험방법은 ABC (Avidin-Biotin Complex) techniques 을 참고하여 시행하였다. 조직을 파라핀에 고정하여 block 을 만든 후 5 μ m 두께로 잘라 특수 coating 된 슬라이드에 붙인 뒤 실온에서 overnight incubation 하였다. 절편이 있는 유리 슬라이드를 70°C hot chamber 에서 20 분간 incubate 한 다음 xylene 으로 탈파라핀화 시켰다. 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 10 분간 microwave 하여 Epitope Retrieval 과정을 거친 후 20 분간 실온에서 서서히 식혔다. 실온에서 내인성 과산화효소의 활성을 저지하기 위해 3% H₂O₂ in methanol 에 15 분간 반응시킨 다음 protein blocking agent (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA)로 실온에서 30 분간 block 시켰다. Primary antibody 는 0.1%

Tween 20 in PBS 에서 희석하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 만들어 조직에 첨가하고 4°C에서 overnight 하였다. Primary antibody 를 가한 후 Biotinylated anti-mouse, goat secondary antibody (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA)를 가하여 실온에서 1 시간 반응시킨 후 streptavidin peroxidase 를 첨가해 실온에서 15 분간 반응시켰다. AEC (87-8153, Zymed, South San Francisco, CA)로 적정시간 정색반응 시킨 후 Mayer's hematoxylin 으로 대조 염색하였다. Negative control 은 primary antibody 를 넣지 않은 0.1% Tween 20 in PBS 을 넣어 음성소견을 확인하고, isotype matched immunoglobulin 으로 CD14 goat polyclonal antibody (AF982, R&D Systems, Minneapolis, MN)을 사용하여 특이적인 반응인지를 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

A. RT-PCR

대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성을 확인한 153 명의 환자와 290 명의 대조군 중에서 cDNA library 에서 β -actin 발현이 확인된 환자 87 명과 대조군 50 명을 선별하였다. 이들을 대상으로 대식세포 유주 저지 인자 mRNA 발현의 차이를 RT-PCR 로 확인한 결과, 환자들이나 정상대조군에서 대식세포 유주 저지 인자 mRNA 의 발현을 확인할 수 없었다.

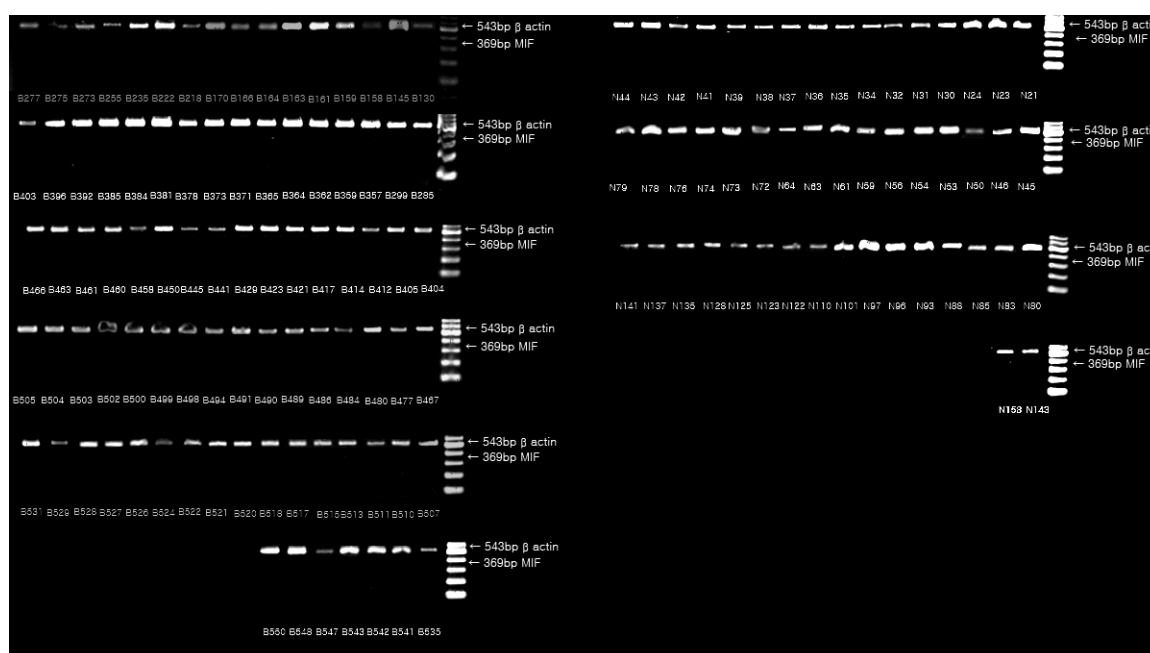


Fig. 2. Expression of MIF mRNA in PBMCs. left column: BD patients; right column: Control

B. ELISA

유전자 다형성 분석을 시행한 환자 중 무작위로 60 명을 선정하고, 환자군의 성별, 연령 구성을 고려하여 정상 대조군 55 명을 선정하여 ELISA 를 시행하였다. 베체트병 환자에서 혈청 내의 대식세포 유주 저지 인자 발현정도를 ELISA 를 통해 측정하였을 때 정상대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다($p=0.002$) (Fig. 3, Table 4). 유전자 다형성에 따른 혈청 내의 대식세포 유주 저지 인자 발현정도를 비교해 본 결과, 유전자 다형성 인 *MIF -173 G>C*, *MIF-794 (CATT)₅₋₈* 사이에는 모두 혈청 내의 대식세포 유주 저지 인자 발현 정도에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 5).

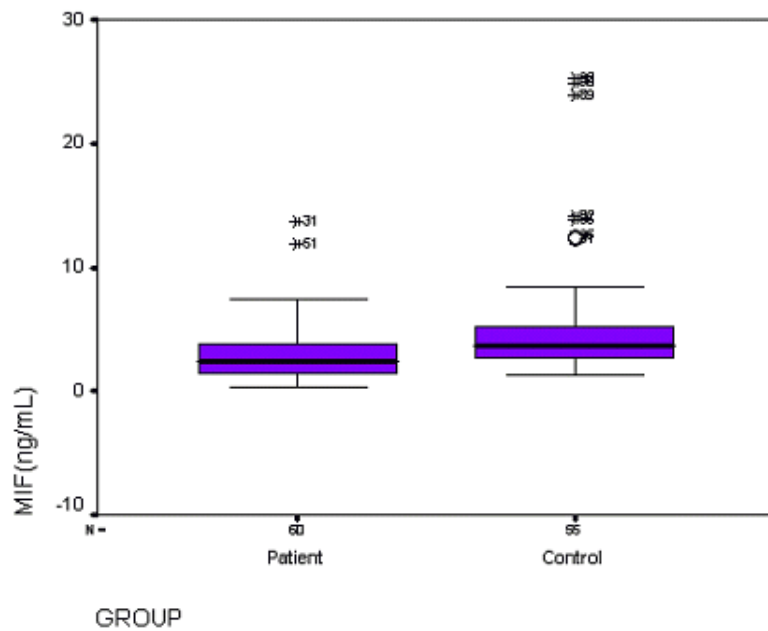


Fig. 3. Serum concentration of the MIF in BD patients & Control

Table 4. Serum concentration of the MIF in BD patients & control

	BD mean \pm SD (n)	Controls mean \pm SD (n)	p
MIF (ng/mL)	2.94 \pm 2.44 (60)	5.45 \pm 5.45 (55)	0.002

Table 5. Serum concentration of the MIF in BD patients & control according to the polymorphisms

Polymorphisms	BD		Controls	
		mean \pm SD (n)		mean \pm SD (n)
<i>MIF -173 G>C</i>	<i>*G/*G</i>	3.05 \pm 2.84 (36)		4.98 \pm 4.51 (34)
	<i>*G/*C</i>	2.60 \pm 1.70 (18)		6.59 \pm 7.40 (17)
	<i>*C/*C</i>	3.28 \pm 1.76 (6)		4.54 \pm 2.95 (4)
<i>MIF-794(CATT)₅₋₈</i>	<i>5,5</i>	4.21 \pm 4.00 (13)		6.42 \pm 4.97 (10)
	<i>5,6</i>	2.32 \pm 1.57 (20)		7.42 \pm 8.59 (16)
	<i>5,7</i>	3.04 \pm 1.91 (7)		4.67 \pm 3.08 (10)
	<i>5,8</i>	3.89 (1)		(0)
	<i>6,6</i>	2.48 \pm 1.60 (8)		3.62 \pm 1.33 (9)
	<i>6,7</i>	2.61 \pm 2.21 (7)		3.11 \pm 1.61 (6)
	<i>6,8</i>	(0)		1.97 (1)
	<i>7,7</i>	3.07 \pm 2.26 (3)		8.43 (1)
	<i>7,8</i>	(0)		4.45 (1)

C. 면역조직화학염색

환자 피부 조직에서 대식세포 유주 저지 인자의 발현을 면역조직화학염색으로 확인한 결과, 13 명의 베체트병 환자 모두에서 표피층과 피하지방층에 대식세포 유주 저지 인자의 발현이 심하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 베체트병과 비슷한 양상의 조직학적 소견을 보이는 원발성 결절홍반 환자의 피부조직을 같은 방법으로 염색하였을 때도 6 명의 원발성 결절홍반 환자들 모두에서 동일하게 나타남을 알 수 있었다. 기존의 연구에서 밝혀진 바와 같이 건선환자에서도 표피층에 대식세포 유주 저지 인자의 발현이 나타나는 것을 확인할 수 있었으나, 건선환자에서 피하지방층에서는 대식세포 유주 저지 인자가 발현되지 않았다(Fig. 4).

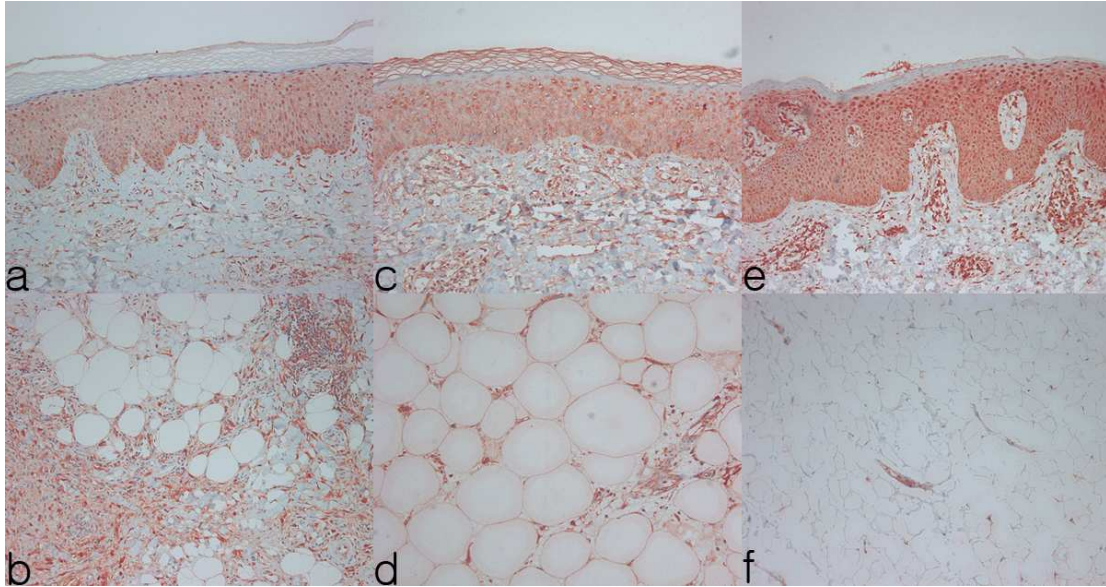


Fig. 4. Immunohistochemical staining for MIF (x200). a:Behcet's disease, epidermis; b:Behcet's disease, subcutaneous tissue ; c: erythema nodosum, epidermis; d: erythema nodosum, subcutaneous tissue; e: psoriasis, epidermis; f: psoriasis, subcutaneous tissue

IV. 고찰

베체트병의 면역학적 병인에 널리 알려진 가설에 따르면, 여러 가지 항원에 대한 T 세포의 과민반응과 이에 따른 단백질의 활성화로 인터루킨 12의 생성을 유발하고 이 사이토카인이 Th1 반응을 자극한다. 또한 비정상적인 T 세포 활성화로 인해 인터루킨 8, 인터루킨 17, 감마인터페론과 종양괴사인자와 같은 사이토카인에 의해 중성구가 활성화된다(Hirohata 와 Kikuchi, 2003).

대식세포 유주 저지 인자는 여러 가지 염증유발성 사이토카인인 종양괴사인자, 인터루킨 1, 인터루킨 6, 인터루킨 8 등의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있고, 대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성에 따른 임상형의 차이는 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 궤양결장염, 알츠하이머병, 신증후군, 아토피 피부염, 건선, 중증 원형 탈모증 등에서 밝혀진 바 있다. 또한 베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 역할에 관한 이전 보고에서 혈청 MIF농도가 베체트병 환자에서 증가되어 있으며, 질병의 활성도와 연관이 있다고 알려진 바 있어(김성동 등, 2004), 베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 발현 정도와 함께 유전자 다형성에 따른 차이를 알아보는 것이 베체트병의 병인에 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 베체트병에서 대식세포 유주 저지 인자의 유전자 다형성에 따른 임상형의 변화와 함께, 각각의 유전자형에 따른 대식세포 유주 저지 인자 발현의 차이를 mRNA 수준에서 RT-PCR을 통해, 단백질 수준에서 ELISA와 면역조직화학염색을 통해 확인하고자 하였다.

대식세포 유주 저지 인자 promotor region에 대한 유전자 다형성과

베체트병의 발현 간에 통계적으로 유의한 연관성은 발견할 수 없었다. 베체트병 환자에서 MIF mRNA 발현과 관련하여, 환자군에서나 대조군 모두에서 mRNA 발현을 확인할 수 없었다. 환자 혈청 내 대식세포 유주 저지 인자의 농도 감소는 이전 보고들 과는 상반된 점으로, 대부분의 환자에서 치료가 진행중인 점을 감안할 때, 질병의 상태가 비활성인 상태에서 채혈이 이루어져 대식세포 유주 저지 인자의 혈청 내 농도가 감소된 것으로 생각한다. 이전의 보고들에서 글루코코르티코이드와 대식세포 유주 저지 인자간의 관련성이 밝혀진 바 있으며, 글루코코르티코이드의 농도에 따라 대식세포 유주 저지 인자의 발현이 다르게 나타난다는 보고도 있었다. 이는 면역반응 조절과 관련된 다른 약물들도 대식세포 유주 저지 인자의 발현에 영향을 미칠 수 있음을 시사하는 점으로, 베체트병에서 MIF를 분비하는 세포 및 조절인자와 치료약물과의 상호작용에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

이전의 보고와는 다르게 베체트병 환자에서 혈청 내 대식세포 유주 저지 인자의 농도는 감소되어 있었으나, 베체트병 환자의 피부조직에서 대식세포 유주 저지 인자가 증가되어 발현되었으므로 베체트병에서 피부증상 발현에는 대식세포 유주 저지 인자가 관련이 있는 것으로 생각한다. 향후, 대식세포 유주 저지 인자를 조절하는 인자들과, 대식세포 유주 저지 인자에 의해 조절되는 여러 인자들에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 또한 대식세포 유주 저지 인자 외에도, 베체트병과 선천면역에 관련된 여러 다른 유전자들과의 관련성에 대한 연구도 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. 김성동, 김상현, 김해림, 박미경, 윤종현, 김완욱, 이상현, 박성환, 조철수, 김호연: 베체트병 환자에서 혈청 대식세포 유주 억제 인자 (Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF)의 상승. *대한류마티스학회지* 11: 205-211, 2004
2. Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN: Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 166: 747-53, 2001
3. Amoli MM, Donn RP, Thomson W, Hajeer AH, Garcia-Porrua C, Lueiro M, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA: Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with sarcoidosis in biopsy proven erythema nodosum. *J Rheumatol* 29: 1671-3, 2002
4. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R: An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7849-54, 1996
5. Berdeli A, Mir S, Ozkayin N, Serdaroglu E, Tabel Y, Cura A: Association of macrophage migration inhibitory factor -173C allele polymorphism with steroid resistance in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 20: 1566-71, 2005
6. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365: 756-9, 1993

7. Bloom BR, Bennett B: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153: 80–2, 1966
8. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR: Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189: 341–6, 1999
9. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68–71, 1995
10. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R: The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895–902, 1994
11. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP: Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6: 164–70, 2000
12. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11383–8, 1998
13. Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R: An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma.

Mol Med 5: 181–91, 1999

14. David JR: Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56: 72–7, 1966
15. Direskeneli H: Behcet's disease: infectious aetiology, new autoantigens, and HLA-B51. *Ann Rheum Dis* 60: 996–1002, 2001
16. Donn RP, Plant D, Jury F, Richards HL, Worthington J, Ray DW, Griffiths CE: Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 123: 484–7, 2004
17. Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W: A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 1782–5, 2001
18. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R: Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* 3: 320–3, 1997
19. Flex A, Pola R, Serricchio M, Gaetani E, Proia AS, Di Giorgio A, Papaleo P, Bernabei R, Pola P: Polymorphisms of the macrophage inhibitory factor and C-reactive protein genes in subjects with Alzheimer's dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18: 261–4, 2004
20. Hirohata S, Kikuchi H: Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 5: 139–46, 2003

21. Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M: Functional polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 1014–8, 2004
22. Hoi AY, Morand EF, Leech M: Is macrophage migration inhibitory factor a therapeutic target in systemic lupus erythematosus? *Immunol Cell Biol* 81: 367–73, 2003
23. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH: A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190: 1375–82, 1999
24. Lan HY, Bacher M, Yang N, Mu W, Nikolic–Paterson DJ, Metz C, Meinhardt A, Bucala R, Atkins RC: The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 185: 1455–65, 1997
25. Lan HY, Yang N, Brown FG, Isbel NM, Nikolic–Paterson DJ, Mu W, Metz CN, Bacher M, Atkins RC, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor expression in human renal allograft rejection. *Transplantation* 66: 1465–71, 1998
26. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF: Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 42: 1601–8, 1999
27. Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, de Kretser DM, Bucala R: Macrophage migration

- inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 137: 5090–5, 1996
28. Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R: Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol* 158: 5514–7, 1997
 29. Nohara H, Okayama N, Inoue N, Koike Y, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Higaki S, Yanai H, Yoshida T, Hibi T, Okita K, Hinoda Y: Association of the –173 G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 39: 242–6, 2004
 30. Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, Todo S: An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* 12: 309–14, 2000
 31. Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Takagi M, Nishihira J: Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* 92: 131–7, 1997
 32. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF: Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 123: 309–14, 2001
 33. Saylan T (2001). Life story of Behcet. In Behcet's Disease (ed. Lee S, Bang D, Lee ES and Sohn S), Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

34. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganeli S, Romagnoli R, Ietta F, Paulesu L, Miracco C, Cintorino M, Marcolongo R: Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 62: 460–4, 2003
35. Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, Mizue Y, Nishihira J: Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 173–8, 1997
36. Shimizu T, Hizawa N, Honda A, Zhao Y, Abe R, Watanabe H, Nishihira J, Nishimura M, Shimizu H: Promoter region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is strong risk factor for young onset of extensive alopecia areata. *Genes Immun* 6: 285–9, 2005
37. Shimizu T, Nishihira J, Mizue Y, Nakamura H, Abe R, Watanabe H, Ohkawara A, Shimizu H: High macrophage migration inhibitory factor (MIF) serum levels associated with extended psoriasis. *J Invest Dermatol* 116: 989–90, 2001
38. Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W: Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett* 381: 199–202, 1996
39. Steinhoff M, Meinhardt A, Steinhoff A, Gemsa D, Bucala R, Bacher M: Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. *Br J Dermatol* 141: 1061–6, 1999
40. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima

T, Une Y, Todo S: Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 4: 707–14, 1998

41. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R: Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4782–7, 1997
42. Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR: Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7522–6, 1989

- ABSTRACT -

Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Behçet's disease

Sung-II In

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Eun-So Lee)

Purpose: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a unique protein, participating in inflammation, immune response, and cell growth. Previous reports showed that MIF-173 G>C polymorphism or the MIF-794 [CATT]₅₋₈ polymorphism and haplotypes containing these variants were associated with an increased risk for various inflammatory diseases such as psoriasis, sarcoidosis, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis, atopic dermatitis, Behçet's disease with uveitis, and neuro-Behçet's disease.

Materials and Methods: To elucidate the influence of polymorphisms of MIF on Behçet's disease, 153 patients with Behçet's disease and 290 healthy controls were genotyped. We also performed RT-PCR analysis, ELISA, and immunohistochemical

stain for MIF. The mRNAs of 83 Behçet's disease patients and 50 controls were used for RT-PCR. ELISA was performed for 60 Behçet's disease patients and 55 controls. Immunohistochemical stain was performed for 13 Behçet's disease patients, 2 psoriasis patient, and 6 erythema nodosum patients.

Results: We found no statistically significant differences in the genotype frequencies of the MIF-794[CATT]₅₋₈ repeat polymorphism or MIF-173 G>C polymorphism between the Behçet's disease patients group and the control. MIF mRNA was not detected either in Behçet's disease patients nor in the control. Serum level of MIF , measured by ELISA, was decreased in Behçet's disease patients group compared to the normal control. Immunohistochemical analysis showed that MIF protein was present in skin lesions from patients with Behçet's disease and erythema nodosum. MIF protein was diffusely distributed throughout epidermis and subcutaneous fat, whereas in psoriasis patients, MIF protein was distributed only in epidermis.

Conclusion: Contrary to previous reports, serum levels of MIF were decreased in patients with Behçet's disease and polymorphisms in the MIF promoter region was not associated with disease susceptibility. However, MIF may play a role in cutaneous inflammation in Behçet's disease.

Key Words: Behcet's disease, Macrophage migration inhibitory factor