

전신성홍반성낭창 환자에서 혈청내 sFas 및 sFas Ligand 측정

신정원 · 김현숙 · 송정식* · 이수곤*

연세대학교 의과대학 임상병리과학교실, 내과학교실*

Determinations of Soluble Fas and Soluble Fas Ligand in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Jeong Won Shin, M.D., Hyon-Suk Kim, M.D., Jeongsik Song, M.D.*, and Soo Kon Lee, M.D.*

Departments of Clinical Pathology and Internal Medicine*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The Fas/Fas ligand (FasL) system plays an important role in apoptosis by involvement in various immunologic functions, especially the removal of autoreactive and activated T-cells. sFas is a variant of the Fas receptor molecule, which lacks the transmembrane domain by alternative splicing of Fas mRNA and has an inhibitory effect in apoptosis by inhibition of the Fas/FasL pathway. sFasL is a covered form of FasL by metalloproteinase and is increased in various malignant and autoimmune diseases. In this study, we investigated the expression of sFas and sFasL in systemic lupus erythematosus (SLE) and evaluated their usefulness as markers of disease activity.

Methods : The concentration of sFas and sFasL in sera from 43 patients with SLE, 17 with rheumatoid arthritis (RA) and 15 normal healthy persons were measured using sFas (S) ELISA Kit and sFas Ligand ELISA Kit (MBL Co., LTD., Nagoya, Japan), respectively. Twenty of 43 SLE sera were paired samples of 10 patients obtained on admission and discharge.

Results : The concentration of sFas in SLE (3.12 ± 2.28 ng/mL) was significantly higher than in RA (2.23 ± 0.37 ng/mL) and in the normal control (2.12 ± 0.33 ng/mL). In particular, the concentration of sFas in sera on admission (4.35 ± 3.68 ng/mL) was significantly higher than in the sera on discharge (2.89 ± 0.66 ng/mL), but, the concentration of sFasL among the 3 groups was not statistically different.

Conclusions : These results suggest that apoptosis is involved in the pathogenesis of SLE and sFas might be a useful marker as a predictor of disease activity. Further study on the correlation between sFas and other disease activity markers, such as CRP, CH50, CD4 cell count and autoantibody titer is needed. Also, the evaluation of sFas as a predictor of disease progression on follow-up studies of these patients is needed. (*Korean J Clin Pathol* 1999; 19: 234-8)

Key words : Apoptosis, sFas, sFas ligand, Systemic lupus erythematosus (SLE)

서 론

Fas/APO-1/CD95 및 Fas ligand (FasL)는 여러 가지 면역

접 수 : 1998년 10월 12일

접수번호 : KJCP1228

수정본접수 : 1998년 11월 9일

교신저자 : 김 현 숙

우 135-720 서울시 강남구 도곡동 146-92

영동세브란스병원 임상병리과

전화 : 02-3497-3531, Fax : 02-3462-9483

기능과 조절에 관여하여 apoptosis에 중요한 역할을 하며, 특히 자가반응성 T 세포 및 활성화된 T 세포의 제거에 관여한다[1-3].

Soluble Fas (sFas)는 Fas 유전자의 alternative splicing에 의해 transmembrane domain을 포함하는 21개의 아미노산이 제거된 형태로서, Fas-FasL 결합의 억제인자로 작용함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[4-6]. 또한 soluble FasL (sFasL)는 세포 표면의 FasL가 metalloproteinase에 의해 혈청으로 유리된 형태로서, 여러 악성 종양과 자가면역질환에서

증가하여 조직 손상을 매개하는 것으로 보고되어 있다[7-9].

본 연구에서는 자가면역질환 중 특히 apoptosis가 발병 이전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosus, SLE) 환자 혈청에서 sFas 및 sFasL의 발현 양상을 살펴보고, 질병 활성도 예측에 있어서의 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

American College of Rheumatology (ACR)의 개정기준[10]에 따라 SLE로 진단된 환자의 혈청 43 검체와 역시 ACR revised criteria[11]를 만족하는 류마티스관절염 (rheumatoid arthritis, RA) 환자 혈청 17 검체 및 정상 건강인 15명의 혈청을 대상으로 하였다. SLE 환자 검체 중 20 검체는 10명의 환자의 입원시와 퇴원시에 얻은 쌍검체였다.

2. 방법

1) sFas 측정

sFas (S) ELISA Kit (MBL Co., LTD., Nagoya, Japan)를 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 시행하였다. 검사 방법을 간단히 요약하면, 다클론성 항 Fas 항체가 coating되어 있는 microplate well에 검체 희석액으로 5배 희석한 환자 혈청 150 μ L를 넣고 실온에서 60분간 반응시킨 후, peroxidase가 conjugation 되어 있는 단클론성 항 Fas 항체 100 μ L를 넣고 역시 실온에서 60분간 반응시켰으며, 여기에 기질액 100 μ L를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 반응정지액 100 μ L를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사시 8가지 농도(2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0 ng/mL)의 표준 물질을 함께 시행하여 표준 곡선을 구하였으며, 이를 이용하여 환자 혈청 내의 sFas 농도를 계산하였다.

2) sFasL 측정

sFas Ligand ELISA Kit (MBL Co., LTD., Nagoya, Japan)을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. 즉, 단클론성 항

Fas ligand 항체가 coating되어 있는 microplate well에 희석액으로 2배 희석한 환자 혈청 100 μ L를 넣고 실온에서 60분간 반응시킨 후, peroxidase가 conjugation 되어 있는 단클론성 항 Fas ligand 항체 100 μ L를 넣고 역시 실온에서 60분간 반응시켰으며, 여기에 기질액 100 μ L를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 반응 정지액 100 μ L를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사시 7가지 농도(5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0 ng/mL)의 표준 물질을 함께 시행하여 표준 곡선을 구하였으며, 이를 이용하여 환자 혈청 내의 sFasL 농도를 계산하였다.

3. 통계 분석

SLE와 RA 및 정상 대조군 간의 sFas와 sFasL 값 비교를 위해 t-test를 이용하였으며, $P < 0.05$ 를 통계학적 유의수준으로 하였다.

결 과

1. 각 군 간의 sFas 값 비교

sFas값 (Mean \pm SD)은 SLE 환자군에서 3.12 \pm 2.28 ng/mL로 RA 환자군의 2.23 \pm 0.37 ng/mL나 정상 대조군의 2.12 \pm 0.33 ng/mL보다 유의하게 증가되어 있었으며, 특히 10명의 환자에서 얻은 입원시와 퇴원시의 쌍검체를 비교해 본 결과 입원시 혈청의 sFas가 4.35 \pm 3.68 ng/mL로 퇴원시의 2.89 \pm 0.66 ng/mL 보다

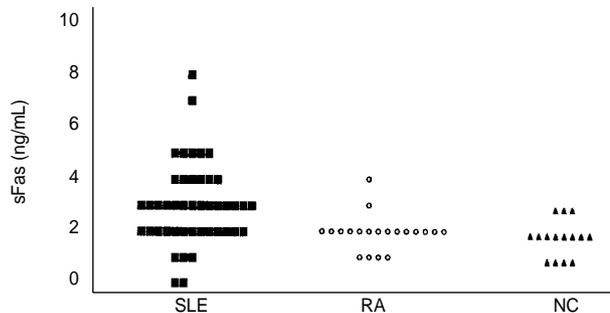


Fig. 1 The distributions of serum sFas in SLE, RA and normal controls.

Table 1. Serum levels of sFas and sFasL in systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA) and normal controls (NC)

	SLE		RA	NC
	on admission	on discharge		
sFas	4.35 \pm 3.68* ng/mL	2.89 \pm 0.66 ng/mL	2.23 \pm 0.37 ng/mL	2.12 \pm 0.33 ng/mL
sFasL	0.42 \pm 0.01 ng/mL	0.43 \pm 0.00 ng/mL	0.39 \pm 0.05 ng/mL	0.46 \pm 0.00 ng/mL

* mean \pm SD.

유의하게 높은 값을 보였다. 각 군에서의 sFas 분포는 Fig. 1과 같다. RA와 정상 대조군 간에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1).

2. 각 군 간의 sFasL 값 비교

sFasL 값(Mean±SD)은 SLE 환자군에서 0.42 ± 0.01 ng/mL, RA에서 0.39 ± 0.05 ng/mL, 그리고 정상 대조군에서는 0.46 ± 0.00 ng/mL로 각 군 간에 유의한 차이가 없었으며, SLE 환자 중 입원시와 퇴원시 검체 간에도 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

고 찰

Apoptosis란 염색질의 응축 현상(chromatin condensation)과 DNA strand의 분절 및 apoptotic body 형성 등을 특징으로 하는 능동적인 세포 사멸 현상을 말하며, 1972년 Kerr에 의해 처음 기술된 후 여러 가지 질환의 발병 기전 및 경과에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다[12].

Fas/APO-1/CD95는 tumor necrosis factor (TNF)/nerve growth factor receptor family에 속하는 45 kDa의 I형 막단백으로서 흉선이나 간, 난소, 폐 등의 다양한 조직에서 발견되며[7, 13-14], 항 Fas 항체나 FasL와 결합함으로써 apoptosis를 유발한다[15-17]. Fas 분자의 soluble form인 sFas는 Fas mRNA의 alternative splicing에 의해 Fas cDNA의 700 base pair (bp)에서 762 bp까지 63개의 염기 서열이 제거된 형태로서 제거된 염기 서열 중에 Fas 유전자의 transmembrane domain이 포함되기 때문에 secreted, soluble form으로 발견되며, Fas-FasL 결합 시 억제 인자로 작용한다[4, 6, 18]. 따라서 sFas는 특히 SLE 등의 자가면역질환에서 증가하여 자가반응성 T 세포의 apoptosis를 억제함으로써 이 질환의 발병 기전에 중요한 역할을 하며[4, 6], SLE의 질병활성지수(disease activity index)[19]와도 유의한 상관성이 있는 것으로 알려져 있다[20-22]. 그러나, Goel 등[23]은 SLE와 RA 등 자가면역질환 환자들에서의 sFas 값은 정상 대조군과 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, 항 dsDNA 항체나 CH50, erythrocyte sedimentation rate (ESR) 및 rheumatoid factor (RF) 등 질병활성도를 반영하는 다른 검사종목과도 상관성이 없었다고 보고하였으며, Knipping 등[24]의 연구에서도 SLE와 juvenile rheumatoid arthritis (JRA) 환자 혈청의 sFas 값이 정상 대조군과 통계학적으로 차이가 없었다.

본 연구에서는 SLE 환자 혈청에서의 sFas 값이 RA나 정상 대조군에서보다 유의하게 증가되어 있었고, 특히 SLE 환자의 입원시와 퇴원시 쌍검체 비교에서 입원시의 값이 퇴원시보다 유의하게 증가되어 있어 sFas가 질병 활성도 예측에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다.

FasL는 TNF family에 속하는 40 kDa의 II형 막단백이며[13, 15, 25], sFasL는 metalloproteinase-like enzyme에 의해 FasL가 전환된 26 kDa의 단백질로 natural killer cell lymphoma나 large granular lymphocytic leukemia 등에서 증가되어 apoptosis에 의한 조직 손상을 매개하는 것으로 알려져 있다[8, 26, 27]. Nozawa 등[22]은 sFas가 증가되어 있는 SLE와 RA 환자에서 역시 sFasL도 증가되어 있었다고 보고하였으며, 이에 따라 sFasL도 sFas와 마찬가지로 Fas-FasL 매개성 apoptosis를 downregulation하는 억제 인자로 간주하였다.

그러나, 본 연구에서의 sFasL 값은 SLE와 RA, 그리고 정상 대조군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 없어 sFas에 비해 자가면역질환의 질병 활성도 예측 인자로서의 유용성은 떨어지는 것으로 생각되었다. 한편 sFasL 값이 SLE나 RA, 그리고 정상 대조군 모두에서 표준물질 중 가장 낮은 농도인 0.15625 ng/mL보다 낮았기 때문에 측정이 다소 부정확했을 가능성을 배제할 수 없었고, 따라서 표준 곡선의 범위 조정 등을 포함한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 결론적으로, SLE 환자에서 sFas는 RA나 정상 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있어 이 질환의 발병 기전에 apoptosis가 관여함을 시사하였으며, SLE의 질병 활성도를 예측하고 치료 효과를 판정하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되었다. 앞으로 sFas와 함께 SLE의 질병 활성도를 반영할 수 있는 C-반응성단백(C-reactive protein, CRP)과 CH50 등 보체 활성도 및 CD4 양성 세포수, 그리고 다른 자가 항체와의 상관성 등에 관한 연구가 더 필요할 것으로 생각되었고, 이런 환자들의 추적 관찰을 통해 sFas의 예후 판정 인자로서의 유용성도 함께 검토되어야 할 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : Fas 및 FasL는 여러 가지 면역 기능과 조절에 관여하여 apoptosis에 중요한 역할을 하며, 특히 자가반응성 T 세포 및 활성화된 T 세포의 제거에 관여한다. sFas는 Fas 유전자의 alternative splicing에 의해 transmembrane domain을 포함하는 21개의 아미노산이 제거된 형태로서, Fas-FasL 결합시 억제인자로 작용하여 apoptosis를 억제하며, sFasL는 세포 표면의 FasL가 metalloproteinase에 의해 유리된 형태로서 여러 악성 질환 및 자가면역질환에서 증가되는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 SLE 환자 혈청에서 sFas 및 sFasL의 발현 양상을 살펴보고, 질병 활성도 예측에 있어서의 유용성을 평가하고자 하였다.

방법 : SLE 환자 혈청 43 검체, RA 17 검체 및 정상인 15명의 혈청을 대상으로 하였다. SLE 환자중 20 검체는 10명의 환자의 입원시와 퇴원시에 얻은 쌍검체였다. sFas와 sFasL 측정은 각각 sFas (S) ELISA Kit와 sFas Ligand ELISA Kit (MBL Co., LTD., Nagoya, Japan)를 이용하였다. 각 군 간의 sFas와 sFasL 값 비교를 위해서는 t-test를 이용하였다.

결과 : sFas는 SLE 환자군에서 3.12 ± 2.28 ng/mL로 RA 환자군의 2.23 ± 0.37 ng/mL이나 정상대조군의 2.12 ± 0.33 ng/mL보다 유의하게 증가되어 있었으며, 특히 입원시 혈청의 sFas는 4.35 ± 3.68 ng/mL로 퇴원시의 2.89 ± 0.66 ng/mL보다 유의하게 높은 값을 보였다. sFasL의 경우 SLE에서 0.42 ± 0.01 ng/mL, RA에서 0.39 ± 0.05 ng/mL, 정상대조군에서 0.46 ± 0.00 ng/mL로 각 구간에서 유의한 차이가 없었다.

결론 : sFas는 SLE 환자에서 유의하게 증가되어 있어 이 질환의 발병 기전에 apoptosis가 관여함을 시사하였다. 또한 입원시 sFas 값이 퇴원시보다 증가되어 있어 sFas가 SLE의 질병 활성도를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되었다. 앞으로 sFas와 함께 SLE의 질병 활성도를 반영할 수 있는 CRP와 CH50 및 CD4 양성 세포수, 그리고 다른 자가 항체와의 상관성 등에 관한 연구가 더 필요할 것으로 생각되었으며, 이런 환자들의 추적 관찰을 통해 sFas의 예후 판정 인자로서의 유용성도 검토되어야 할 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Suzuki N, Ichino M, Mihara S, Kaneko S, Sakane T. *Inhibition of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1998; 41: 344-53.*
- Ettinger R, Panka DJ, Wang JK, Stanger BZ, Ju ST, Marshak RA. *Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. J Immunol 1995; 154: 4302-8.*
- Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, et al. *Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4930-4.*
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science 1994; 263: 1759-62.*
- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB. *Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1995; 38: 1735-7.*
- Jodo S, Kobayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, et al. *Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. Clin Exp Immunol 1997; 107: 89-95.*
- Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, et al. *Fas ligand in human serum. Nat Med 1996; 2: 317-22.*
- Tanaka M, Takashi S, Takahashi T, Nagata S. *Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. EMBO J 1995; 14: 1129-35.*
- Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, et al. *Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Arthritis Rheum 1998; 41: 657-62.*
- Tan EM, Cohen AS, Fries JP, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271-7.*
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988; 31: 37-43.*
- Berke G. *The Fas-based mechanism of lymphocytotoxicity. Human Immunol 1997; 54: 1-7.*
- Nagata S and Golstein P. *The Fas death factor. Science 1995; 267: 1449-56.*
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. Cell 1994; 76: 959-62.*
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. *Molecular cloning and expression of the Fas ligand: A novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993; 75: 1169-78.*
- Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzoku S, Moller P, Falk W, et al. *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 1989; 245: 301-5.*
- Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. *A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989; 148: 1274-9.*
- Lee SH, Kim SY, Lee JY, Shin MS, Dong SM, Na EY, et al. *Detection of soluble Fas mRNA using in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. Lab Invest 1998; 78: 453-9.*
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE: *Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. Arthritis Rheum 1992; 35: 630-40.*
- Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. *Elevated soluble fas production in SLE correlates with HLA status not with disease activity. Lupus 1997; 6: 717-22.*
- Tokano Y, Miyake S, Kayagaki N, Nozawa K, Morimoto S, Azuma M, et al. *Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Immunol 1996; 16: 261-5.*
- Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hashimoto H, et al. *Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. Arthritis Rheum 1997; 40: 1126-9.*
- Goel N, Ulrich DT, Clair EW, Fleming JA, Lynch DH, Seldin MF. *Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. Arthritis Rheum 1995; 38: 1738-43.*
- Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon

- KB. *Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 1995; 38: 1735-7.
25. Gruss HJ and Dower S. *Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphoma. Blood* 1995; 85: 3378-404.
26. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF. *A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor-alpha from cells. Nature* 1997; 385: 729-33.
27. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ. *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor necrosis factor-alpha. Nature* 1997; 385: 733-6.