

## Canine juvenile cellulitis의 분자생물학적 검사

홍지현 · 전 진 · 장동우 · 이완규 · 양만표 · 모인필 · 나기정<sup>1</sup>

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

### Biomolecular Examination of Canine Juvenile Cellulitis

Ji-hyun Hong, Jjn Jun, Dong-woo Chang, Wan-kyu Lee, Mhan-pyo Yang, In-pil Mo and Ki-jeong Na<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine,  
Chungbuk National University, Cheong-ju, 361-763, Korea

**Abstract :** Canine juvenile cellulitis (CJC) is a well-recognized lymphocutaneous disease that is seen in young dogs. CJC seemed to be immunologic disorder and may have a hereditary aspect. Exact pathogenesis and cytokine regulation on the immune system of CJC are not clear. CJC was diagnosed in two puppies hospitalized in Veterinary Teaching Hospital of Chungbuk National University. To investigate the cytokine regulation on CJC, RT-PCR was performed with CJC affected dogs. RT-PCR 1 was performed with whole blood sample (CJC-B) and fine needle aspirates of the inguinal lymph node (CJC-LN) from case 1-dog, which included TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and  $\beta$ -actin. Blood sample from a normal dog (N-B) served for a negative control of RT-PCR 1 (case 1). IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 and IL-12 transcripts were not expressed in all sample. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were not transcribed from CJC-B but from CJC-LN. On RT-PCR 2 (case 2), submandibular lymph node aspirates were used and TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-1 $\beta$  were expressed. TNF- $\alpha$ , IL-10 and IFN- $\gamma$  were secreted from activated macrophages enhance the inflammation in tissue. These results imply that abnormally increased macrophages secrete TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the affected lymph nodes, which attract neutrophils and cause inflammation in CJC.

**Key words :** canine juvenile cellulitis, cytokine, RT-PCR

### 서 론

Canine juvenile cellulitis(CJC)는 4개월령 이하의 어린 강아지에서 발생하는 lymphocutaneous disease이다<sup>8</sup>. CJC의 원인에 대해서 잘 알려진 바는 없지만 조직학적인 특징과 면역억제요법에 반응하는 양상으로 보아 면역관련 질환으로 판단된다<sup>8</sup>. 단모종에서 다발하는 경향이 있으며 유전적 소인도 있는 것으로 알려져 있다. Lymphadenopathy가 특징적인 임상증상이고 식욕부진과 발열, 무기력이 동반되기도 한다. 이외에도 얼굴, 비경, 귀의 점막·피부 연결부에 부종, 구진, 농포, 가피가 형성되기도 한다. CJC가 면역관련 질환으로 알려져 있으나 그 발생 기전은 잘 알려져 있지 않다<sup>1,3,6,9</sup>.

본 연구에서는 CJC에 이환된 환견의 cytokine을 RT-PCR을 이용, 분석하여 CJC의 발생기전을 분자생물학적으로 밝혀보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험동물

**CJC 1.** 환견은 생후 70일령의 몸무게 1.6 kg인 수컷 Shih Tzu로 전신적인 림프절염, 외이염, 포피염, 안검 주위와

하악 부위에 염증, 부종과 탈모 등이 관찰되었다(Fig 1). CJC를 확진하기 위해 방사선 검사, 분변 검사, 세포학적 검사, 세균배양, 진균배양, 피부소파검사를 실시하였다.

**CJC 2.** 환견은 생후 18일령의 몸무게 0.5 kg인 암컷 Schnauzer로 두경부가 심하게 종창되어 있었으며 신체검사 상에서 하악 림프절과 귀밑샘 림프절이 양쪽 모두 종창된 것을 확인할 수 있었다(Fig 2). 하지만 피부 병변은 발견되지 않았다. 마찬가지로 CJC를 확진하기 위해 세포학적 검사, 세균배양, 진균배양, 피부소파검사를 실시하였다.



**Fig 1.** CJC-affected case 1 dog. Moist, erythematous papular lesions with alopecia on the muzzle and around the eyes.

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : sigol@cbnu.ac.kr



**Fig 2.** CJC-affected case 2 dog. Swollen submandibular and parotid lymph nodes of both sides.

#### RT-PCR

**재료.** RT-PCR 1은 정상 개 혈액, 증례 1 환견의 혈액과 알은살 림프절 시료를 가지고 mRNA를 추출한 다음, PCR을 실시하여 발현된 cytokine을 조사했다. RT-PCR 2에서는 증례 2의 하악림프절 흡인 시료를 가지고 PCR을 실시하였다.

**백혈구 분리.** 혈액에서 백혈구를 분리하기 위해 2000 rpm으로 10분간 원심분리하여 buffy coat층과 적혈구 상층액을 채취했다. 여기에 0.38% NH<sub>4</sub>Cl-Tris-base를 첨가하여 여분의 적혈구를 용혈시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 백혈구를 회수했다. 이를 한번 더 용혈시킨 후 PBS로 백혈구를 부유시켜, 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리는 방법으로 세척했다. 이렇게 해서 얻어진 cell pellet과 림프절 시료는 사용하기 전까지는 냉동 보관했다. 림프절 시료의 경우 별다른 세포분리 과정 없이 그대로 mRNA 추출에 이용했다.

**mRNA extraction.** Total RNA는 약 5×10<sup>6</sup>개의 세포에서 분리해내었다. 위에서 추출한 cell pellet에 TRIzol reagent(Invitrogen™, USA)를 1 ml 넣어 세포를 파괴시킨 후 chloroform 0.2 ml를 첨가하여 DNA와 RNA를 분리시켰다. RNA가 함유되어 있는 상층액을 채취한 다음 isopropyl alcohol 0.5 ml를 넣어 12000 g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet을 세척하기 위해 75% ethanol 1 ml를 첨가하여 7500 g로 5분간 4°C에서 원심분리하였다. 추출된 RNA는 DEPC treated water(RNase, DNase, Protease-free, Nacalai tesque, Tokyo, Japan)에 부유시켰다. 이것은 cDNA를 만들기 전까지 -20°C 이하에 저장하였다.

**cDNA making procedure.** cDNA는 SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™, USA)을 사용했으며 모든 과정은 제조회사의 프로토콜에 맞

게 실시하였다. 역전사 과정에는 mRNA suspension 2 µl, primer(Random Hexamer) 50 ng, SuperScript™ II RT 1 µl와 기타 구성성분(10 mM dNTP, 10X RT-buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT)을 사용하였으며 총 반응 부피는 20 µl였다. 그리고 cDNA 생성 과정 중에 RNase가 불필요하게 기능하는 것을 효과적으로 막기 위해 RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor를 sample 당 1 µl 첨가하였다. 역전사 반응은 denaturalization 65°C 5분, annealing 25°C 10분, cDNA synthesis 42°C 50분, termination 70°C 15분간 실시했다. 마지막으로 cDNA:RNA hybrid molecule로부터 RNA를 제거하기 위해 RNase H 1 µl를 첨가하여 37°C에서 20분간 배양했다.

**PCR.** PCR은 Taq DNA polymerase, recombinant (Invitrogen™, USA)를 이용하여 제조회사의 프로토콜에 따라 실시했다. 특정 cytokine에 해당하는 sense primer와 antisense primer(Table 1)는 각각 10 pmol씩을 사용하였으며 PCR tube 당 전체 volume은 50 µl였다. PCR은 PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Reaseach, USA)을 사용했다.

**Table 1.** Sequences of RT-PCR primers for cytokines and β-actin of a dog

Target sequence <sup>a</sup>	Nucleotide sequence of primers (5'-3')	Amplification product sizes (bp)
IL-1β	TGACCTGTTCTTTGAGGCTGA AAGCTCATGGAGAACACCACT	428
IL-2	GCTGGATTACAGTTGCTTTTG AGGTAATCCATTTGTTTCAG	319
IL-4	CCTCCCAACTGATTCCAACCTC GATTCATTCATAGAACAGGTC	316
IL-5	ACCTTGGCACTGCTCCTCCAC GACAGGTAGTCTAGGAAGTTG	266
IL-6	GAACTCCCTCTCCACAAGC TTCTIGTCAAGCAGGTCTCC	325
IL-8	CTTTCTGCAGCTCTCTGTGAA TGCACAACCTTTTGTACCAT	229
IL-10	GAGCTCCGAGCTGCCTTC GATGAAGATGTCAAACCTCACTC	374
IL-12	CTCAGCAGTTGGTTCATCTCC CACTGCCTTCCTGACACTCC	588
TNF-α	CCTCCAACCTAATCAGCCCTCT TCTCAGCGCTGAGTTCGATCA	438
IFN-γ	CATTCAAAGGAGCATGGATACC GACTCCTTTTCCGCTTCCTTAG	202
β-actin	ATGTGCAAGGCCGGCTTCG TTAATGTCACGCACGATTTC	598

a: Primer sequences refer to A. Grone et al., 1998 and C. Chamizo et al., 2001.

IL: interleukin, TNF: tumor necrosis factor, IFN: interferon.

PCR 반응 조건은 initial incubation 94°C 2분, melting 94°C 30초, annealing 53°C 30초( $\beta$ -actin, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12) 혹은 60°C 30초(IL-6)였으며 PCR cycle은 총 35번이었다. 모든 샘플은 72°C에서 7분간 마지막 extension을 거쳤다. 최종 PCR product는 4°C에서 보관하였다.

## 결 과

### 진단학적 검사

아래의 검사결과를 근거로 해서 CJC를 확진하고 RT-PCR의 재료로 사용하였다.

**방사선검사.** 턱관절(하악골-측두골) 부위에 non-invasive 연부 조직 밀도의 종창이 관찰되었다. 이것은 하악 부위의 lymphadenopathy로 추정되었다(CJC 1).

**분변 검사 및 피부 소파검사.** 분변 검사에서 충란이 발견되지 않았으며 피부 소파검사에서도 모낭충 등의 외부 기생충이 없었고, 곰팡이 균사나 포자도 관찰되지 않았다.

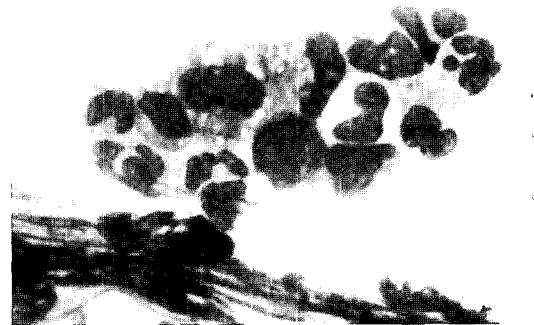
**세균배양 및 진균배양 검사.** 누관이 형성되어 있지 않은 림프절을 세침흡인하여 채취한 시료를 배양하였으며 세균과 진균은 확인되지 않았다.

**병변부 세포학적 검사.** 병변부 압착 도말 표본과 세침흡인 도말 표본을 통한 세포학적 검사에서는 퇴행성 호중구가 주종이었으며 세포질에 공포가 많은 대식세포가 관찰되었다(화농성 육아종성 염증; pyogranulomatous inflammation) (Fig 3). 세균은 발견되지 않았다.

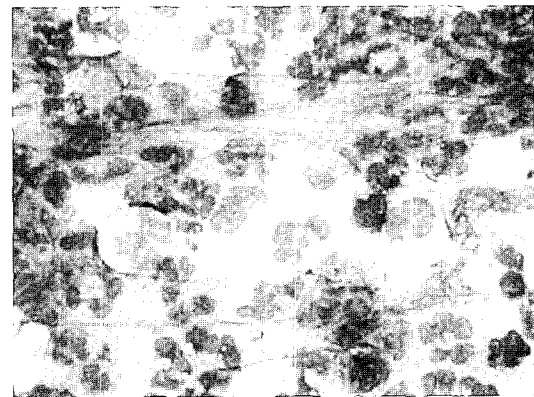
### RT-PCR

**RT-PCR 1.** 모든 샘플에서 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12은 발현되지 않았다. TNF- $\alpha$ (438 bp)와 IL-1 $\beta$ (428 bp)는 CJC에 걸린 환경의 알은살 림프절 샘플로부터 검출되었지만, 혈액에서는 발견되지 않았다.  $\beta$ -actin은 모든 세포에서 면역 상태에 상관없이 일정하게 발현되는 것으로 모든 샘플에서 나타났다(Fig 4).

**RT-PCR 2.** TNF- $\alpha$ (438 bp), IL-1 $\beta$ (428 bp), IFN- $\gamma$ (202 bp)와 IL-10(374 bp)가 발현되었으며 나머지 cytokine들은 검출되지 않았다(Fig 5).



CJC 1

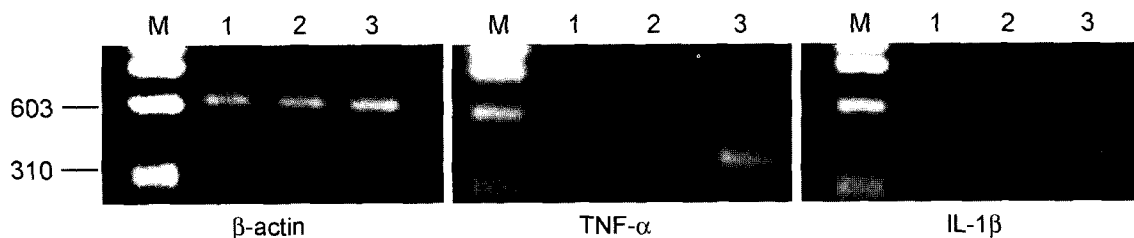


CJC 2

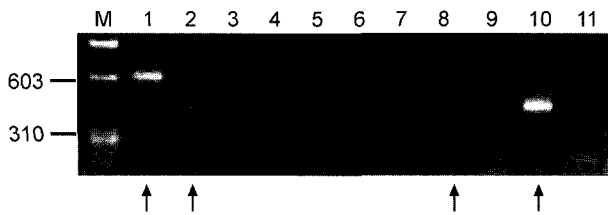
**Fig 3.** Fine needle aspiration biopsy at the affected lymph node. Many cells are macrophages, lymphocytes, and neutrophils. The majority cell is neutrophils in CJC lesion.

## 고 찰

CJC는 주로 3-6개월령의 어린 강아지에서 발생하는 특발성 피부질환으로 puppy stranglers, juvenile pyoderma, juvenile sterile granulomatous dermatitis and lymphadenitis, lymphadenitis apostermatosa라고 불리기도 했다<sup>5,9</sup>. 아직까지 그 정확한 발생원인이 밝혀지지 않았지만 환경의 피부조직검사 소견과 면역억제요법으로 치료되는 것으로 미루어 면역매개성 질환 중 하나로 추정되고 있다<sup>1,8</sup>. 주



**Fig 4.** Gel electrophoretic analysis of RT-PCR products derived from case 1.  $\beta$ -actin transcripts (598 bp) were present in RNA isolates from all sample. TNF- $\alpha$  transcripts (438 bp) and IL-1 $\beta$  transcripts (428 bp) were also present in RNA isolates from CJC-LN. Lanes: M: 100 bp ladder DNA marker (Ready-Load™  $\phi$ X174 DNA/Hae III Fragments, Invitrogen™, USA) 1: normal canine blood, 2: case 1 blood, 3: lymph-node aspirates of case 1



**Fig 5.** Gel electrophoretic analysis of RT-PCR 2 products derived from fine needle aspirates of the submandibular lymph node of CJC-affected case 2 dog. TNF- $\alpha$  transcripts (438 bp), IL-1 $\beta$  transcripts (428 bp), IL-10 transcripts (374 bp) and IFN- $\gamma$  transcripts (202 bp) were present in RNA isolates. The agarose gel (1.2%) was stained with ethidium bromide. Lanes: M = 100 bp ladder DNA marker. (Ready-Load™  $\phi$ X174 DNA/Hae III Fragments, Invitrogen™, USA) ranging from 1353 to 72 bp. 1:  $\beta$ -actin, 2: IL-1 $\beta$ , 3: IL-2, 4: IL-4, 5: IL-5, 6: IL-6, 7: IL-8, 8: IL-10, 9: IL-12, 10: TNF- $\alpha$ , 11: IFN- $\gamma$ .

로 Dachshund, Labrador and golden retriever, Pointer 새끼에서 다발하지만 어느 품종에서나 발생이 가능하다<sup>5,6,9</sup>. 대표적인 임상증상으로는 안검주변, 비경, 입술 부위에 수포, 농포, 화농성 삼출물, 세포염(cellulitis), 탈모, 가피가 형성되며 하악 림프절 종대가 특징적이다<sup>6,8</sup>. CJC를 진단하기 위해서는 피부조직검사, 병변부 세포학적 검사, 세균과 진균 검사를 실시하여 유사질환과 감별해야 한다<sup>10</sup>.

정상 개의 혈액, CJC 1의 혈액과 얇은살 림프절 생검 시료를 가지고 실시한 RT-PCR 1의 결과를 살펴보면, 모든 샘플에서 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 mRNA transcripts는 발현되지 않았으며, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  mRNA transcripts는 환경의 얇은살 림프절 샘플로부터 검출되었지만, 혈액에서는 발견되지 않았다. CJC 2의 림프절 흡인 시료를 가지고 실시한 RT-PCR 2의 결과에서는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 와 IL-10이 발현되었으며 나머지 cytokine들은 검출되지 않았다. CJC에 걸린 환경에서 lymphocyte blastogenesis가 억제된다는 보고가 있는데<sup>7,9,10</sup>, 림프구의 활성화와 증식에 필요한 IL-2, IL-4, IL-5가 발현되지 않은 것도 이와 관련이 있는 것으로 보인다. 그러므로 CJC가 병발되는 것은 림프구 활성화는 무관한 것으로 생각된다. 반면 두 증례의 검사 결과 동일하게 림프절의 시료로부터 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 확인되었는데, 이 cytokine들은 활성화된 대식세포에서 분비되는 것으로 림프절 내에 비정상적으로 증가해 있던 대식구들이 이 cytokine들을 분비하여 호중구를 염증 부위로 이주시킨 것으로 보인다<sup>7</sup>. 그리고 RT-PCR 2에서는 RT-PCR 1과는 달리 IFN- $\gamma$ 와 IL-10이 더 발현되었는데, IFN- $\gamma$ 는 대식구에 작용하여 cytokine의 분비를 더욱 항진시킨 것으로 생각되며, IL-10은 항진된 대식구의 활성을 자가 조절(auto-regulation)하기 위해 대식구에서 분비된 것으로 추측된다. 앞으로 CJC의 발생 기전을 밝히기 위해서는 어린 개체에서 한시적으로 림프절로 대식구를 유주시키고 비정상적으로 활성화시키는 요인과 그와 관련된 cytokine 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

CJC는 4개월령 이하의 강아지에서 lymphadenopathy와 안검주위, 비경, 상악, 입술주위 피부의 종창, 탈모, 구진, 가피형성과 화농성 삼출 및 농포 등의 피부병변을 주증으로 하는 질병이다. 하지만 피부병변이나 lymphadenopathy 둘 중 하나가 없다고 해서 CJC를 배제할 수는 없다. CJC를 진단하기 위해서는 피부소파검사를 실시하여 외부 기생충의 감염을 배제시켜야 하며 림프절, 농포와 같은 병변부에서 시료를 채취하여 세균배양을 실시해야 한다. 세포학적 검사에서는 미생물이 없는 육아종성 화농성 염증 소견을 보인다. CJC의 치료에는 prednisolone과 항생제를 병용하는 것이 가장 효과적이다. CJC의 발병기전을 알아보기 위해 실시한 RT-PCR의 결과를 종합하면 다음과 같다. (1) 두 증례 모두에서 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 mRNA transcripts는 발현되지 않았다. (2) 두 증례 모두에서 공통적으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 발현되었다. (3) 림프절에 대식구가 비정상적으로 증가되고, 여기서 분비된 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 로 인해 호중구가 유주되어 만성적으로 염증을 일으키는 것으로 판단된다.

## 참고 문헌

1. Chamizo C, Rubio JM, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 83: 191-202.
2. Hwang C-Y, Yoo J-H, Kang H-S, Youn H-Y, Han H-R. Two cases of Diagnosis and Treatment in Canine Juvenile cellulitis. *J Vet Clin* 2002; 19(4): 467-470.
3. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Leukocyte migration and inflammation. In: Kuby Immunology. 4th ed. USA: W.H. Freeman and Company. 2000: 383-390.
4. Grone A, Frisk AL, Baumgartner W. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 11-27.
5. Hopkins JD. Immune-mediated and inflammatory disease. In: *Veterinary pediatrics: Dogs and cats from birth to six months*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2001: 247-248.
6. Medleau L, Hnilica KA. Canine juvenile cellulitis. In: *Small animal Dermatology: A Color atlas and therapeutic guide*. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2001: 152-153.
7. Nesbitt GH, Ackerman LJ. Canine juvenile cellulitis. In: *Canine & Feline Dermatology*. 1st ed. New Jersey: Veterinary Learning System. 1998: 153-154.
8. Reimann KA, Evans MG, Chalifoux LV, Turner S, DeBoer DJ, King NW, Letvin NL. Clinicopathologic characterization of canine juvenile cellulitis. *Vet Pathol* 1989; 26: 499-504.
9. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Canine juvenile cellulitis. In: *Miller & Kirk's Small animal dermatology*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1995: 938-941.
10. White SD, Rosychuk RA, Stewart LJ, Cape L, Hughes BJ. Juvenile cellulitis in dogs: 15 cases (1979-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1609-1611.