

# Anti-cardiolipin 항체와 Cardiolipin의 결합에 미치는 $\beta_2$ -GP1의 영향

아주대학교 의과대학 의과학연구소 면역학연구소

강은영 · 장영주

## Effect of $\beta_2$ -GP1 on the Binding of Anti-cardiolipin Antibodies to Cardiolipin

Eun-Young Kang and Young-Ju Jang

Laboratory of Immunology, Institute for Medical Sciences, Ajou University Schools of Medicine, Suwon 443-721, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Anti-cardiolipin antibody (Anti-CL Ab) is one of the various anti-phospholipid antibodies (Anti-PL Abs) and found in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus (SLE), atherosclerosis, and other infectious diseases. While anti-PL Abs found in the sera of patients with infectious diseases bind directly to CL, binding of anti-PL Abs to CL circulating in the sera of patients with autoimmune diseases is mediated by  $\beta_2$ -glycoprotein 1 ( $\beta_2$ -GP1). The purpose of this study is to investigate the effect of  $\beta_2$ -GP1 on the antigen binding assay of anti-CL Abs present in the sera of patients with atherosclerosis, which has been known as one of autoimmune diseases. **Methods:** ELISA was performed with sera containing anti-CL Abs from three patients with atherosclerosis in the presence or absence of  $\beta_2$ -GP1 or FBS. **Results:** Reactivity of anti-CL Abs to CL was increased in the presence of  $\beta_2$ -GP1 or FBS in a dose dependent manner. **Conclusion:**  $\beta_2$ -GP1 or FBS could be used as co-factor in CL ELISA with anti-CL Abs present in the sera of patients with atherosclerosis. It is suggested that anti-CL Abs found in atherosclerosis patients are similar in terms of antigen binding property to those circulating in the patients with autoimmune diseases, not to infectious diseases. (*Immune Network* 2004;4(3):161-165)

**Key Words:** Anti-CL, anti-PL, atherosclerosis, co-factor,  $\beta_2$ -GP1, FBS

### 서 론

Anti-phospholipid (anti-PL) 항체에는 anti-cardiolipin (anti-CL) 항체와 lupus anticoagulant (LA) 항체 등이 있으며, 대표적인 자가면역 질환인 systemic lupus erythematosus (SLE)와 anti-PL syndrome (APS) 환자의 혈청에 높은 농도로 존재한다(1). Anti-PL 항체의 존재는 SLE 환자의 혈

소판 감소증(thrombocytopenia), 태아유산, 혈전증(thrombosis)과 central nervous system disorders 등과의 연관성이 보고되었으며, 특히 이 항체는 반복적인 태아유산이나 혈전증 환자의 혈청에서 빈번하게 발견된다(1).

최근에 자가면역증 환자 혈청에 있는 anti-CL 항체와 CL의 결합이 50 kD 혈청단백, 즉,  $\beta_2$ -glycoprotein 1 ( $\beta_2$ -GP1)에 의하여 매개되는데 반하여, 다양한 infectious diseases 환자의 혈청에 있는 anti-CL 항체는  $\beta_2$ -GP1이 없는 상태에서도 직접적으로 CL과 결합한다고 몇몇 연구팀에 의하여 보고되었다(1-3).  $\beta_2$ -GP1은 326개의 아미노산으로 이루어져 있고 음이온을 띠는 PL에 결합하여 ADP (adenosine diphosphate) 유도에 의한 혈소판의 응고와 intrinsic coagulation pathway의 활성화 및 혈소판의

책임저자 : 장영주, 아주대학교 의과대학 의과학연구소 면역학연구소

☎ 443-721, 수원시 영통구 원천동

Tel: 031-219-4516, Fax: 031-219-4503

E-mail: jangyj@ajou.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 인프라개발사업 (과제번호 : 02-PJ1-PG3-21203-0003)의 지원에 의하여 수행된 것임.

prothrombinase activity 등을 억제한다. Anti-CL 항체는  $\beta_2$ -GP1의 이러한 항응고(anti-thrombotic) 기능에 영향을 미칠 것이고 과응고상태(hypercoagulability)와 혈전증을 유도할 수 있다. Anti-PL 항체는 sequential PL affinity 크로마토그래피와 ion exchange 크로마토그래피에 의해 순수 분리될 수 있는데, 이 순수 분리된 항체는 blocking agent가 adult bovine serum 혹은 사람의 혈청을 포함하지 않으면 ELISA에서도 CL 항원에도 결합하지 않고 PL affinity column에도 결합하지 않는다고 알려졌다. 또한 이 연구자들은 anti-PL 항체가 CL과 결합 시 co-factor인  $\beta_2$ -GP1의 존재를 필요로 한다는 것을 보였다.

Anti-CL 항체는 SLE 외에도 동맥경화증 등 심혈관 질환 환자의 혈청에 존재하고, 이 질병들과의 연관성이 보고되어 왔다(4-8). 최근에 점진적이고 자연발생적 관상동맥심질환 동물 모델인 Apo-E 결핍(ApoE<sup>-/-</sup>) 생쥐에서 혈액 내의 산화된 CL에 대한 자가 항체의 농도가 동맥경화의 정도와 연관성이 있음이 밝혀졌다(9). 이는 anti-CL 항체가 관상동맥심질환을 표시하는 민감한 증거임을 시사한다. 최근의 연구 결과, CL에 대한 자가 항체는 심장과 동맥벽 세포막 표면의 PL에 교차반응을 하여 관상동맥심질환을 향상시키거나, 또는 혈액응고를 방해함으로써 죽상혈전(atherothrombosis)을 일으키고 이차적으로 심혈관 질환을 일으킬 수 있다고 보고되었다(10).

본 연구에서는 세 명의 동맥경화 환자 혈청에 존재하는 anti-CL 항체가 CL에 결합 시에 SLE와 APS 환자에서 발견되는 anti-CL의 경우와 같이  $\beta_2$ -GP1 혹은 혈청의 영향을 받는지를 분석하였다. 그 결과 co-factor인  $\beta_2$ -GP1과 혈청의 존재가 농도 의존적으로 CL-anti-CL 반응력을 증가시키는 역할을 관찰되었다.

## 재료 및 방법

**시약.** CL은 SIGMA-ALDRICH에서,  $\beta_2$ -GP1은 CALBIO CHEM에서, Fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone에서 구입하여 사용하였다.

**환자혈청 분리.** 아주대학교 의료원의 순환기내과에서 제공한 동맥경화환자 세 명의 혈액을 이용하였다. 환자 혈액을 4°C에서 밤새 세워놓은 뒤 1,000×g에서 15분 동안 원심분리를 하여 혈청을 얻은 후, 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

**Anti-CL ELISA.** CL을 100 % ethanol에 50 $\mu$ g/ml로 용해시킨 다음 세 개 (a, b, c)의 96 well plate (NUNC)의 각 well에 100 $\mu$ l씩 가하여 4°C에서 밤새 coating을 하였다. Ethanol을 evaporation 시킨 후  $\beta_2$ -GP1을 항원과 함께 coating 했을 때의 효과를 분석하기 위해 plate (b)에  $\beta_2$ -GP1을 phosphate-buffered saline (PBS)에 1, 2, 4 $\mu$ g/ml로 용해시켜 CL이 coating 되어 있는 well에 첨가하여 실온에서 2시간 incubation 하였다. coating이 끝난 plate를

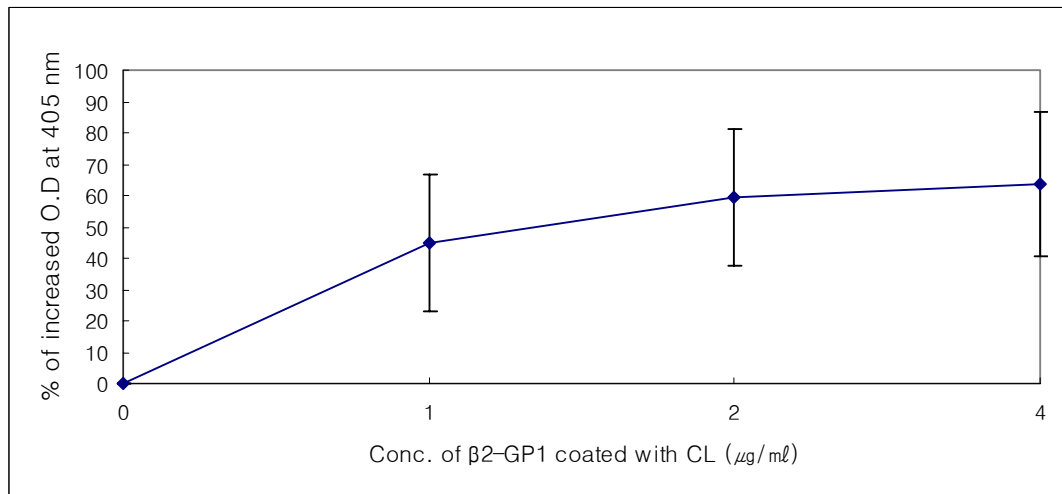
PBS로 1번 세척 후 PBS에 녹인 3 % skim milk를 200 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 blocking 하였다. 0.05 % tween 20이 첨가된 PBS (PBST)로 3번 세척하고 동맥경화 환자의 혈청을 plate (a)와 (b)에는 PBS에 녹인 3 % skim milk로 1 : 10으로 희석하여 50 $\mu$ l씩 첨가하였다.  $\beta_2$ -GP1을 환자혈청과 함께 섞어 coating된 CL에 첨가하는 경우의 효과를 분석하기 위해 1 : 5로 희석한 혈청과 2, 4, 8 $\mu$ g/ml 농도의 각  $\beta_2$ -GP1을 1 : 1로 섞어서 결과적으로 1 : 10으로 희석된 환자 혈청과 1, 2, 4 $\mu$ g/ml 농도의  $\beta_2$ -GP1이 되게 하여 CL이 coating된 plate (c)의 well에 50 $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 3번 세척을 하고 alkaline phosphatase (AP)가 결합된 anti-human IgG를 PBS에 녹인 3 % skim milk에 1 : 30,000으로 희석하여 50 $\mu$ l씩 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 PBST로 3번 세척하고 마지막은 TBS로 세척하였다. AP 기질 buffer (0.05 M Sodium carbonate, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8)에 p-Nitrophenyl phosphate tablets (SIGMA-ALDRICH)을 녹여 50 $\mu$ l씩 첨가하였다. 색변화를 관찰하여 자동 ELISA 측정기(BIO-TEK, ELX-808)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. FBS final 농도, 2.5 %에서 20 % 사이에 적절하게 첨가하여 시행하였다.

## 결과

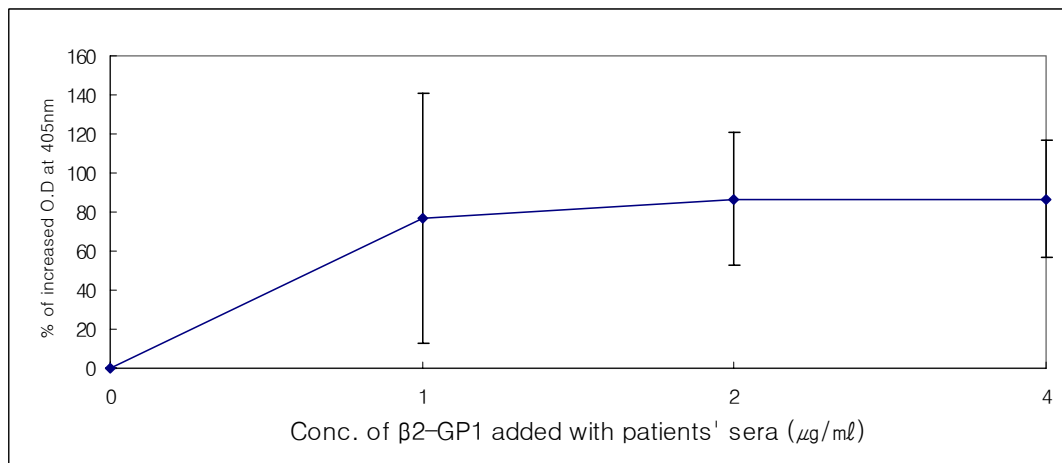
동맥경화환자 혈청 내에 존재하는 anti-CL 항체가 CL에 결합할 때  $\beta_2$ -GP1이 결합력을 증가시키는 co-factor로서 작용하는지, ELISA의 어느 단계에  $\beta_2$ -GP1을 첨가하는 것이 효과적인지를 test 하였다. 우선 CL을 coating 항원으로 사용하여 총 17명의 동맥경화 환자의 혈청 내에 존재하는 anti-CL 항체를 측정하기 위하여 ELISA를 수행하였다. 그 결과, 두 환자의 혈청에서는 비교적 높은 titer를 보였고 나머지 15명의 혈청에서는 titer가 거의 탐지되지 않았다.  $\beta_2$ -GP1이 anti-CL 항체와 CL의 결합력을 증가시킬 수 있는지의 영향을 확인하기 위하여 anti-CL의 titer가 높은 두 환자의 혈청과 titer가 낮은 환자의 혈청 하나를 무작위로 선택하였다. Fig. 1 A는 CL coating 후 1~4 $\mu$ g/ml의 농도로  $\beta_2$ -GP1을 coating한 조건에서 환자혈청을 반응시킨 것이다. 세 개 시료의 평균치를 보았을 때,  $\beta_2$ -GP1을 첨가하지 않았을 때의 결과에 비하여  $\beta_2$ -GP1을 4 $\mu$ g/ml 농도까지 첨가하였을 때 농도 의존적으로 CL과 anti-CL의 결합력을 증가시켰다. 세 시료 각각의 경우도 같은 경향을 보였다(data not shown).  $\beta_2$ -GP1이 첨가되지 않았을 때의 수치를 0으로 놓고 첨가 되었을 때의 CL과 anti-CL의 결합력 증가율을 %로 그림에서 나타내었다. 1 $\mu$ g/ml의  $\beta_2$ -GP1에서 44.9%, 2 $\mu$ g/ml에서 59.4 %, 4 $\mu$ g/ml에서 63.7%의 증가율을 보였다.

Fig. 1 B는  $\beta_2$ -GP1을 환자혈청과 함께 혼합한 후,

A



B



**Figure 1.** ELISA for the effect of  $\beta_2$ -GP1 on the binding of anti-CL to CL. Various concentrations of  $\beta_2$ -GP1 were added either at the step of coating CL (A) or adding patients' sera (B). Anti-human IgG antibody conjugated with AP were used as a secondary antibody. Absorbance at 405 nm was measured by ELISA reader. Data are mean  $\pm$  S. E. M. from three samples.

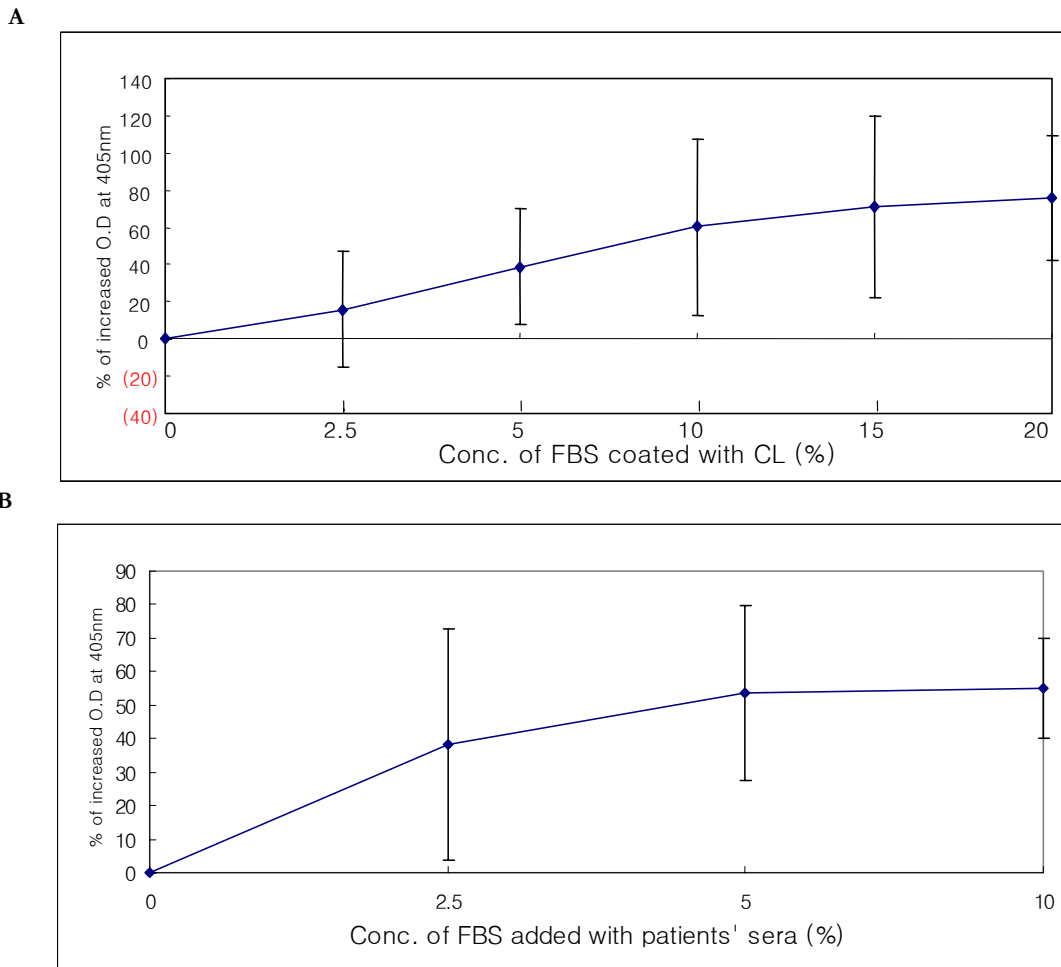
coating 된 CL에 반응시킨 결과로서, 이 경우도 4 $\mu\text{g/ml}$ 까지의  $\beta_2$ -GP1 첨가가 전반적으로 anti-CL과 CL의 결합력을 증가시켰으며, Fig. 1 A에서보다 더 높은 증가율을 보였다. 세 시료 각각의 경우도 같은 경향을 보였다(data not shown). 1 $\mu\text{g/ml}$ 의  $\beta_2$ -GP1에서 76.9 %, 2 $\mu\text{g/ml}$ 과 4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 86.8%의 증가율을 보였다.

또한, anti-CL과 CL 결합력에 미치는 혈청의 효과를 본 실험체계에서 검증하고자 하였다. 혈청의 재료로서 FBS를 사용하였다. CL과 함께 2.5~20%의 FBS를 coating하여 환자혈청을 반응시켜 본 결과, 20%의 FBS 농도까지 지속적으로 CL에 대한 anti-CL의 결합력이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2A). FBS의 농도 20%에서 76.1%의 증가율을 보였다. 또한, FBS를 2.5~10% 농도로, 환자혈청과 함께 혼합한 후, coating된 CL에 반응시킨 경우 (Fig. 2B)도 전반적으로 결합력 증가를 보였고 10%에서

최대치 결합력 증가율(55.2 %)을 보였다. Fig. 2A와 Fig. 2B에서도 평균치로 보여준 경향이 시료 각각의 경우에서 관찰되었다(data not shown).

## 고 찰

동맥경화증은 동맥 벽에 콜레스테롤이 축적됨으로써 유발되는 염증 반응으로 이 환자들에게서 많이 발견되는 CL은 염증 반응을 유발하고 지속시키는 주요 자가 항원 중의 하나이며, anti-CL 항체의 존재가 동맥경화증 유발에 깊은 연관성이 있다고 알려져 있다. 그런데, anti-PL 항체의 대표적인 예인 anti-CL 항체와 CL의 결합은 co-factor를 필요로 하며, 이 co-factor는 anti-coagulant 특성을 갖는  $\beta_2$ -GP1 혈장 단백질로 밝혀졌다(11). 흥미로운 점은  $\beta_2$ -GP1이 자가면역질환 혈청에 존재하는 anti-CL 항체와 coating된 CL 항원의 친화력을 RIA(radio



**Figure 2.** ELISA for the effect of FBS on the binding of anti-CL binding to CL. Various concentrations of FBS were added either at the step of coating CL (A) or adding patients' sera (B). Anti-human IgG antibody conjugated with AP were used as a secondary antibody. Absorbance at 405 nm was measured by ELISA reader. Data are mean±S. E. M. from three samples.

immuno assay)나 ELISA로 측정할 때 필요한 물질이라고 보고 (12) 된 반면, 감염환자 혈청에 존재하는 anti-CL 항체의 CL 항원과의 결합은  $\beta_2$ -GP1을 필요로 하지 않는다고 알려져 있다는 것이다.

본 연구에서는 동맥경화증 환자에서 발견되는 anti-CL 항체도 SLE 등의 자가면역질환 환자 혈청에 존재하는 항체의 경우와 같이  $\beta_2$ -GP1에 의하여 항원 결합력이 증가됨을 보였다. 또한, 이러한 효과는 FBS에서도 관찰되었다. 그러므로 동맥경화증 환자에서 발견되는 anti-CL 항체는 감염환자 혈청의 anti-CL 항체와는 항원 결합 특성에 있어서 다르며, 자가면역질환 환자에서 나타나는 항체와 유사한 성격을 갖는다고 제시할 수 있다. 어느 단계에서 co-factor를 첨가하는 것이 더 효과적인지를 본 실험 결과,  $\beta_2$ -GP1을 anti-CL 항체와 함께 혼합한 후, coating된 CL에 반응시키는 경우가 CL coating시 혼합한 경우보다 약간 더 반응효능을 증가시키는 것으로 나타

났다. FBS의 경우는 FBS를 anti-CL 항체와 함께 혼합한 후, coating된 CL에 반응시킨 경우보다 CL과 함께 FBS를 coating 한 후, 환자 혈청을 반응시키는 경우에 반응 효능이 더 뚜렷이 증가하였다.

본 연구에서는 CL과 anti-CL 항체간의 결합 시 co-factor의 존재에 따라 결합력이 향상된다는 것을 동맥경화 환자 혈청으로 보여주었을 뿐만 아니라, 잘 알려진 co-factor인 순수 분리된  $\beta_2$ -GP1을 대신하는 FBS의 효과도 동시에 보여 주었다. 이런 결과를 토대로 동맥경화 환자의 CL ELISA시 결합력을 증가시키기 위해서는 co-factor의 재료로서  $\beta_2$ -GP1 혹은 FBS를 사용하여 실험하는 것이 효과적이라고 제시할 수 있지만, 측정된 시료 수가 적어서 아직 명확한 결론을 내릴 수는 없다. 앞으로 더 많은 수의 시료와 다른 종류의 자가면역질환 환자의 혈청을 재료로 하여 같은 실험을 본 연구실에서 수행해 볼 계획이다.

## 참고문헌

1. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA: Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta_2$ -Glycoprotein I (apolipoprotein H). *PNAS* 87; 4120-4124, 1990
  2. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T: Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta_2$ -glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 179(2);457-462, 1994
  3. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GF:  $\beta_2$ -Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 37(10);1453-1461, 1994
  4. Wick G, Perschinka H, Millonig G: Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 22(12); 665-669, 2001
  5. Thiagarajan P: Atherosclerosis, autoimmunity, and systemic lupus erythematosus. *Circulation* 104(16);1876-1877, 2001
  6. Wick G, Perschinka H, Xu Q: Autoimmunity and atherosclerosis. *Am Heart J* 138(5 Pt 2);S444-449, 1999
  7. Vaarala O: Antiphospholipid antibodies and myocardial infarction. *Lupus* 7 Suppl 2;S132-134, 1998
  8. Nityanand S, Bergmark C, de Faire U, Swedenborg J, Holm G, Lefvert AK: Antibodies against endothelial cells and cardiolipin in young patients with peripheral atherosclerotic disease. *J Intern Med* 238(5);437-443, 1995
  9. Vaarala O: Autoantibodies to modified LDLs and other phospholipid-protein complexes as markers of cardiovascular diseases. *J Intern Med* 247(3);381-384, 2000
  10. Pratico D, Tangirala RK, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, FitzGerald GA: Circulating autoantibodies to oxidized cardiolipin correlate with isoprostane F(2 $\alpha$ )-VI levels and the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice: modulation by vitamin E. *Blood* 97(2);459-464, 2001
  11. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 66(6);629-632, 1991
  12. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T: Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 179(2);457-462, 1994
-