

혈중 대식세포 유주 저지 인자 측정을 위한 방사면역측정법

원자력의학원 싸이클로트론응용연구실¹, 핵의학과², 인하대학교 외과학교실³
이태섭¹ · 신석환³ · 송지인³ · 우광선¹ · 정위섭¹ · 최창운² · 임상무²

Radioimmunoassay for Determination of Serum Macrophage Migration Inhibitory Factor

Tae Sup Lee, Ph.D.¹, Seok Hwan Shin, M.D. & Ph.D.³, Jee In Song, B.S.³, Kwang Sun Woo, B.S.¹, Wee Sup Chung, B.S.¹, Chang Woon Choi, M.D. & Ph.D.², Sang Moo Lim, M.D. & Ph.D.²

Laboratory of Cyclotron Application¹, Department of Nuclear Medicine², Korea Institute of Radiological and Medical Science (KIRAMS), Seoul; Department of Surgery³, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Purpose: There has been a renewal of interest in Macrophage migration inhibitory factor (MIF), especially correlation in pathogenesis of sepsis by many infectious diseases and in regulation of host inflammatory and immune response. We developed immunoradiometric assay (IRMA) to determine serum human MIF concentration.

Materials and Methods: The IRMA system utilizes solid phase bound monoclonal anti-recombinant human MIF (rhMIF) antibody as a capture antibody, biotinylated polyclonal anti-rhMIF antibody as a detector antibody. We applied with rhMIF that concentration of standard solutions increased from 0 ng/ml to 100 ng/ml. We used ¹²⁵I-streptavidin (SA) as radiotracer to determination of rhMIF concentration. Streptavidin was labeled with ¹²⁵I by Chloramine-T method and ¹²⁵I-SA was purified by ultracentrifugation. ¹²⁵I-SA stability was evaluated by ITLC analysis at 4°C and room temperatures until 60days. To validate IRMA system for MIF, we experimented intra-assay and inter-assay coefficients of variation, recovery test and dilution test. **Results:** Radiolabeling yield of ¹²⁵I-SA was 87% and purified ¹²⁵I-SA retained above 99% radiochemical purity. ¹²⁵I-SA showed above 93% stability in 4°C until 60days that it is good for immunoradiometric assay as radiotracer. Plotted standard dose response curve showed that increased concentration of rhMIF linearly correlated (R²=0.99) with bound radioactivity of ¹²⁵I-SA. The highest intra- and inter-assay coefficients of variation were 5.5% and 7.6%, respectively. The average of recovery of MIF in samples was 102%. In dilution test, linear response curves were obtained (R²=0.97). **Conclusion:** Radioimmunoassay using ¹²⁵I-SA as radiotracer thought to be useful for the determination of serum MIF concentration, and further, its data will be used to evaluate the correlation between clinical significance and serum MIF concentration in patients with various inflammatory diseases. (Korean J Nucl Med 38(6):532-539, 2004)

Key Words: Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Radioimmunoassay, Streptavidin, Iodine-¹²⁵, Inflammatory diseases.

서 론

대식세포 유주 저지 인자(Macrophage migration inhibitory factor, MIF)는 최초의 T 세포 유래 사이토카인으로서, 시험관 내의 모세관으로부터 대식세포의 무작위적인 이동을 억제하며

지연형 과민반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.^{1,2)} 사람의 대식세포 유주 저지 인자의 cDNA는 활성화된 T 세포들에서 최초로 분리되었고, 이는 114개의 아미노산으로 구성되어 있으며 12.5 Kd의 분자량을 가진 물질임이 밝혀졌다.³⁾ 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.⁴⁻¹⁰⁾ 대식세포 유주 저지 인자는 글루코코르티코이드의 면역억제 기능과 항염증 작용에 대하여 정반대의 기능을 수행하는 특이적인 조절자로서 작용 한다.^{8,11)} 또한 대식세포 유주 저지 인자의 mRNA 발현은 수정체 세포의 분화에도 관련이 있으며, 섬유아세포의 성장을 자극하는 기능도 수행하는 것으로 나타났다. 대식세포 유주 저지 인자는 면역 반응 뿐만 아니라 세포의

• Received: 2004. 10. 26. • Accepted: 2004. 12. 7.

• Address for reprints: Sang Moo Lim, M.D. & Ph.D., Department of Nuclear Medicine, Korea Institutes of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), #215-4 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea

Tel: 82-2-970-1213, Fax: 82-2-970-1341

E-mail : smlim328@kcch.re.kr

* 본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발 중 · 장기 계획사업의 R1 이용 진료기술개발과제의 연구비 보조로 이루어졌음

증식과 분화에도 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다.

대식세포 유주 저지 인자는 시상하부 전엽 유래 호르몬으로서 광범위한 조절 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그람음성 세균의 내독소에 의한 쇼크에 대한 숙주반응과 그람양성 세균의 외독소에 의한 면역세포들의 활성화에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 이외에도 패혈성 쇼크, 류마티스성 관절염, 신장이식의 지연성 과민반응, 사구체신염, 성인성 호흡 곤란 증후군등의 면역 및 염증성 질환에도 중요한 매개자로 작용한다.^{4,12-19)} 또한 암의 형성 과정에도 관여하는 것으로 알려졌다.²⁰⁻²³⁾ 최근에 대식세포 유주 저지 인자를 이용한 치료 방법으로서 항-대식세포 유주 저지 인자 항체를 이용하여 패혈증과 류머티스성 관절염 그리고 종양 발생 등을 치료하고자 하는 전임상 연구도 보고 되었다.^{21,23,24)} 이와 같이 많은 염증성 질환 및 암 질환 등에서 MIF 농도가 증가하며, 염증의 정도에 비례하여 MIF 농도가 증가하는 경우도 흔히 있기 때문에, 혈청 MIF 농도의 측정은 많은 염증성 질환과 암의 진단, 치료, 예후 판정 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

현재 MIF 측정법은 각 연구자에 따라 다른데, 이는 사용되는 1차 항체가 다양하고 측정방법의 표준화가 아직 확립되지 않았기 때문이다.

본 연구에서는 여러 가지 염증성질환, 자가 면역 질환 그리고 유전성 면역 질환등 다양한 면역질환과 종양의 형성에 있어서의 중요한 기능을 수행하는 대식세포 유주 저지 인자의 농도를 측정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 제조함 사람 대식세포 유주 저지 인자에 대한 단클론 항체와 다클론 항체를 이용하여 사람 대식세포 유주 저지 인자를 항체 중첩 방법으로 포획하고, 비오틴과 방사성동위원소가 표지된 스트렙타비딘을 이용하여 검출함으로써 혈중 사람 대식세포 유주 저지 인자의 농도를 정확하고 민감하게 측정할 수 있는 방사면역측정법을 개발하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 항체의 비오틴화

방사면역측정법에서 검출항체로 사용하기 위한 항-대식세포 유주 저지 인자 다클론항체에 비오틴을 접합하기 위하여 50mM sodium bicarbonate 완충액 pH 8.5를 이용하여 Goat 항-대식세포 유주 저지 인자 다클론 항체를 1 mg/ml로 준비하였다. 10 mg/ml의 농도로 sulfo-NHS-LC-biotin(Pierce Co, USA)을 증류수에 녹인후 20 μ l를 취하여 1 ml의 항-대식세포 유주 저지 인자 다클론 항체가 든 반응용기에 넣고 4°C에서 5 시간 반응하였다. 반응하지 못한 비오틴을 제거하기 위하여, 10mM 인산염

완충용액 pH 7.4를 첨가하여 희석하고 Centricon-30을 이용하여 $\times 6,500$ rpm에서 30분 동안 원심분리를 3회 반복하여 비오틴을 제거하였다. 항체는 50 μ g/ml로 희석하여 -20°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

2. 스트렙타비딘의 ¹²⁵I 표지

스트렙타비딘을 50 mM 인산염 완충 용액 pH 7.5를 이용하여 1 mg/ml 용액이 되도록 희석하고 이중 20 μ g을 취하여 1.5 ml eppendorf 튜브에 넣고 여기에 0.1 N 수산화나트륨용액에 녹아 있는 방사성 동위원소인 Na¹²⁵I를 1 mCi (37 MBq)를 첨가한다. 산화제로서 Chloramine-T를 50 mM 인산염 완충 용액에 2.5 mg/ml이 되도록 녹이고 이를 250 μ g/100 μ l 첨가하여 실온에서 magnetic strrier가 첨가된 상태로 하여 5 분간 반응한다. 산화제를 중화하기 위하여 sodium metabisulfite를 50 mM 인산염 완충 용액에 2.5 mg/ml이 되도록 녹이고 이를 500 μ g/200 μ l 첨가하여 산화제를 중화함으로써 반응을 종결한다. ¹²⁵I의 표지반응의 확인은 Instant Thin Layer Chromatography (ITLC)방법을 이용하여 평가한다. 고정상을 ITLC-silica gel (ITLC-sg)를 사용하고 이동상으로는 acetone을 사용하였다.

표지된 ¹²⁵I-스트렙타비딘(streptavidin, SA)를 분리정제 하기 위하여 한외여과법을 수행하였다. 표지된 반응액을 분자량이 10,000인 구멍크기를 가진 Centricon YM-10에 넣고 $\times 2,500$ rpm으로 하여 20 분간 원심 분리하여 반응하지 않은 ¹²⁵I를 제거하였다. ¹²⁵I-SA를 얻기 위하여 다시 $\times 2,500$ rpm에서 10 분간 원심 분리하여 최종물질을 분리 정제하였다.

방사면역측정법의 방사성추적자로 사용하는데 필요한 표지화 합물의 안정성을 평가하기 위하여 방사면역측정에 사용되는 희석완충액인 0.1% 우혈청 알부민과 0.05 % Tween-20이 첨가된 20 mM Tris buffered saline pH 7.4를 이용하여 희석하고 4°C와 실온에 각각 방치하면서 60 일까지의 안정성을 평가하였다. 안정성의 평가는 고정상으로 ITLC-sg를 사용하고, 이동상은 acetone을 사용하여 전개하여 평가하였다.

3. 사람 대식세포 유주 저지 인자 표준용액 측정

사람 대식세포 유주 저지 인자를 측정하기 위한 방사면역측정법으로 다음과 같은 방법을 사용하였다(Fig. 1). 항-대식세포 유주 저지 인자 단클론 항체의 고정화는 항체를 10 mM 인산염 완충용액을 사용하였으며, 항체농도를 96 well plate에 well 당 200 ng이 되도록 하여 100 μ l를 넣어주고 실온에서 18-24 시간 방치하여 고정화를 실시하였다. 고정되지 않은 단클론 항체를 제거하기 위하여 0.05% Tween-20이 첨가된 인산염 완충용액 pH 7.4를 well당 200 μ l씩 첨가하고 5 분간 방치하여 세척하고 이를 3회 반

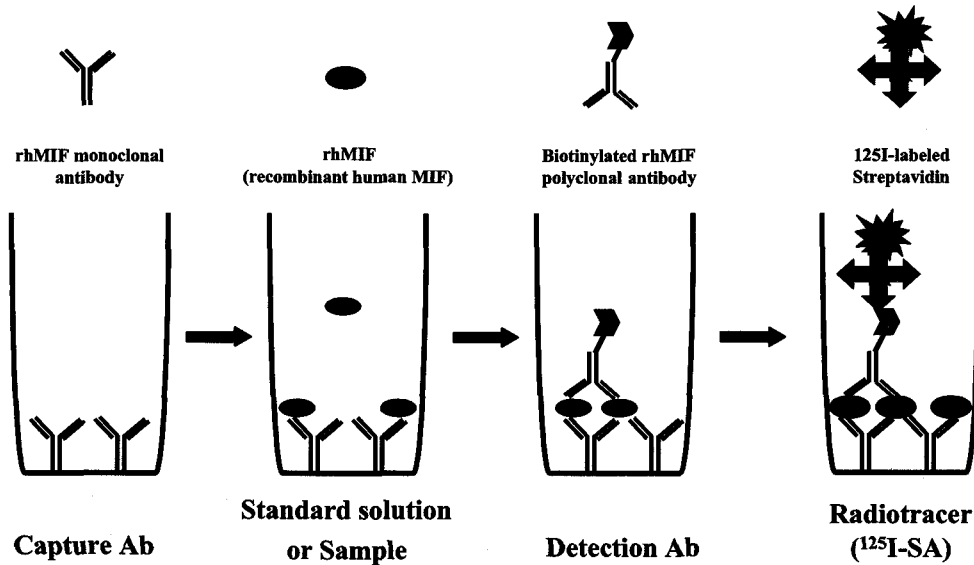


Fig. 1. The representative scheme of Macrophage migration inhibitory factor immunoradiometric assay (IRMA).

복 시행하였다.

항-대식세포 유주 저지 인자 단클론 항체가 결합하고 남은 well의 부분을 차단하기 위하여 1% 우혈청 알부민과 5% sucrose 그리고 0.05% sodium azide가 첨가된 인산염 완충용액을 well당 200 μ l씩 첨가하여 실온에서 2 시간 방치하였다. 고정화 되지 않은 물질들을 제거하기 위하여 0.05% Tween-20이 첨가된 인산염 완충용액을 well당 200 μ l씩 첨가하고 5 분간 방치하여 세척하고 이를 3 회 반복 시행하였다. 항체의 고정화와 blocking이 끝난 plate는 밀봉하여 4°C의 염화칼슘이 있는 진조대에서 보관하며 실험에 사용하였다.

표준투여 응답곡선을 작성하기 위하여 표준용액을 제조하였다. 표준용액의 희석에는 0.1% 우혈청 알부민과 0.05% Tween-20이 첨가된 20 mM Tris buffered saline pH 7.4를 사용하였으며 100 ng/ml부터 0 ng/ml까지 2 배수로 희석하여서 사용하였다. 각 표준용액의 농도는 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.125 ng/ml, 1.56 ng/ml, 0 ng/ml을 사용하였다. 표준용액을 각 well당 10 μ l씩 첨가하고 추가적으로 90 μ l의 0.1% 우 혈청 알부민과 0.05% Tween-20이 첨가된 20 mM Tris buffered saline pH 7.4을 사용하여 각각 100 μ l씩 첨가하였다. 이를 실온에서 dancor의 rpm를 분당 $\times 100$ 으로 하여 2 시간 반응하였다. 반응하지 않은 대식세포 유주 저지 인자를 제거하기 위하여 0.05% Tween-20이 첨가된 인산염완충용액(pH 7.4)를 well당 200 μ l씩 첨가하고 5 분간 방치하여 세척하고 이를 3 회 반복 시행하였다.

고정화된 항-대식세포 유주 저지 인자 단클론 항체에 결합된

대식세포 유주 저지 인자를 확인하고자 검출항체로서 대식세포 유주 저지 인자 다클론 항체를 사용하였다. 제조된 비오티나 항-대식세포 유주 저지 인자 다클론 항체를 0.1% 우 혈청 알부민과 0.05% Tween-20이 첨가된 20 mM Tris buffered saline pH 7.4 을 이용하여 well당 20 ng이 들어가도록 희석하여 이를 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 dancor의 rpm를 분당 $\times 100$ 으로하여 2 시간 반응하였다. 반응하지 않은 비오티나 항-대식세포 유주 저지 인자 다클론 항체를 제거하기 위하여 0.05 % Tween-20이 첨가된 인산염완충용액을 well당 200 μ l씩 첨가하고 5 분간 방치하여 세척하고 이를 3 회 반복 시행하였다.

제조된 125 I-스트렙타비딘을 0.1% 우 혈청 알부민과 0.05% Tween-20이 첨가된 20 mM Tris buffered saline pH 7.4을 이용하여 well당 20 ng (100,000 cpm)이 들어가도록 희석하여 이를 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 dancor의 rpm를 분당 $\times 100$ 으로하여 2 시간 반응하였다. 결합한 125 I-스트렙타비딘의 방사능을 측정하기 위하여 각각의 well을 감마카운터로 측정하고, 횡축을 대식세포 유주 저지 인자의 농도로 하고 종축을 결합 방사능으로 하여 표준투여응답곡선을 작성하였다.

4. 사람 대식세포 유주 저지 인자 방사면역측정법의 유효성 평가

대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법의 정확도를 확인하기 위하여 각기 농도가 다른 4가지의 시료를 동일한 plate에서 9 회 반복 측정하여 이의 변이계수(coefficient of variation: CV)를 측정하였으며, 2 가지의 시료에 대해서는 다른 plate에서

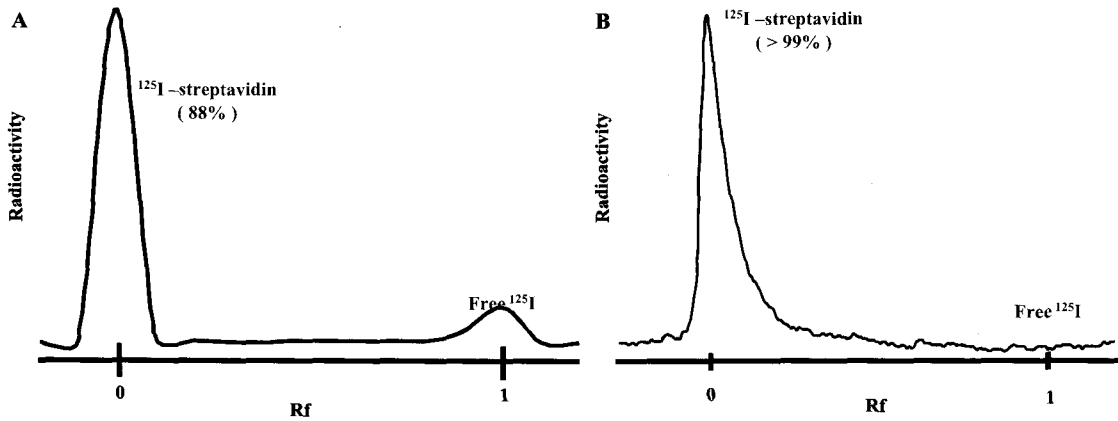


Fig. 2. The ITLC radiochromatograms of ¹²⁵I-streptavidin using TLC scanner. (A) Radiochromatogram of ¹²⁵I-streptavidin reaction mixture and (B) radiochromatogram of ¹²⁵I-streptavidin purified by ultracentrifugation. ITLC condition; mobile phase: acetone, solid phase: ITLC-sg (Gelman Science, Inc.).

측정한 값들 간의 변이계수(coefficient of variation: CV)를 측정하여 intra-assay와 inter-assay의 변이계수로서 정확도를 평가하였다.

사람 대식세포 유주 저지 인자 혈중 농도를 측정에 사용된 임상 시료는 인하대학교 외과에 내원한 환자의 시료를 사용하였다. 일정한 농도의 대식세포 유주 저지 인자를 가진 환자의 혈청에 각기 농도가 다른 대식세포 유주 저지 인자를 첨가하여 측정값이 재현되는 정도를 평가하였으며, 추가적으로 90 ng/ml의 농도를 가진 표준용액을 연속적으로 2 배수 희석한 경우에 측정치의 변화정도와 정확도를 평가하기 위해서 희석 배수에 따른 측정치의 변화를 확인하였다.

결 과

1. 스트렙타비딘의 ¹²⁵I 표지 및 안정성 평가

방사성추적자로서 ¹²⁵I-스트렙타비딘 표지 반응액 2 μl를 ITLC-sg에 점적하고 아세톤으로 전개한후에 감마선 스캐너에서 방사능을 측정하여 표지 수율을 나타내었다(Fig. 2A). ¹²⁵I-SA 표지반응의 표지수율은 88%인 것으로 확인되었다. 한외여과법으로 분리정제한 ¹²⁵I-SA의 방사화학적 순도를 평가하고자 분리정제된 ¹²⁵I-스트렙타비딘 2 μl를 ITLC-sg에 점적하고 아세톤으로 전개한 후에 감마선 스캐너에서 방사능을 측정하여 Fig. 2B에 나타내었다. 분리정제된 ¹²⁵I-스트렙타비딘의 방사화학적 순도는 99%인 것으로 확인되었다.

방사성 추적자로서 ¹²⁵I-스트렙타비딘의 안정성을 평가하기 위하여 분리 정제된 ¹²⁵I-스트렙타비딘을 각각 4°C와 실온에 보관하면서 60 일까지의 안정성을 평가하였다(Fig. 3). 횡축은 경과 시간을 일로 표시하고, 종축은 스트렙타비딘에 결합된 방사능을

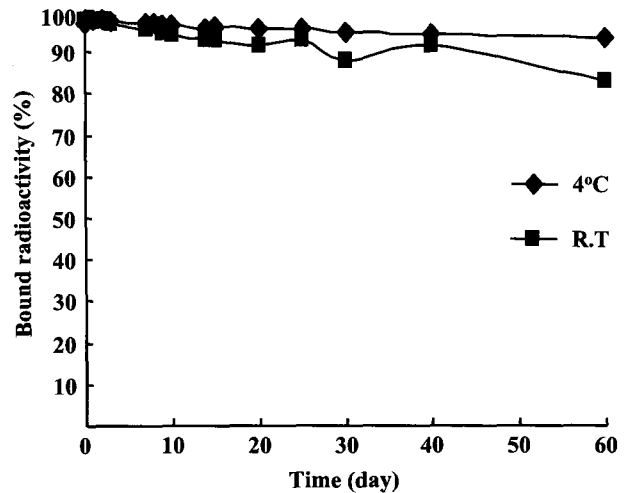


Fig. 3. Stability test of purified ¹²⁵I-streptavidin in 4°C and room temperature. Stability represented as percentage of streptavidin bound radioactivity determined by ITLC analysis during 60 days. Each point represents the average of duplicates.

로 하였다. 4°C에서는 30 일까지 95%의 안정성을 나타내었으며 60 일에서도 93%의 안정성을 나타내어서 방사성 추적자로서 4°C에서 보관하면서 30 일까지 안정적으로 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

2. 사람 대식세포 유주 저지 인자 표준용액 측정

대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법의 표준 투여 응답 곡선을 Fig. 4에 나타내었으며, 대식세포 유주 저지 인자 농도 증가에 따라서 결합하는 방사능의 양이 직선적인 상관관계를 나타내어서 상관계수가 0.99이었다. 이로서 혈중 대식세포 유주 저지 인자 측정을 위한 표준투여응답곡선으로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

Table 1. Precision test on radioimmunoassay for the determination of MIF concentrations in human serum

Sample	Assay (n)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)
Intra-assay†			
A	9	61.5±7.0	5.5
B	9	68.3±3.0	4.4
C	9	26.2±1.3	4.8
D	9	16.2±0.1	0.5
Inter-assay‡			
E	2	64.9±4.8	7.4
F	2	15.4±1.2	7.6

†The human MIF concentrations in the serum samples (n=9) were measured to determined precision within an assay. ‡The human MIF concentrations in the serum samples (n=2) were measured to determined precision between assays.

3. 사람 대식세포 유주 저지 인자 방사면역측정법의 유효성 평가

대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법의 정확도를 평가하기 위하여 intra-assay에서의 변이계수 측정 결과는 5.5%를 넘지 않았으며 inter-assay에서의 변이계수는 7.6%를 넘지 않는 것으로 확인되었다(Table. 1).

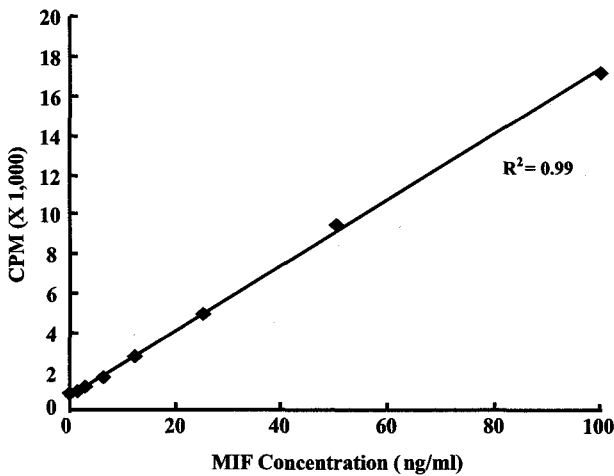


Fig. 4. Standard dose response curve of MIF by immunoradiometric assay system. The MIF concentrations of standard solution were 0 ng/ml, 1.56 ng/ml, 3.125 ng/ml, 6.25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml. Each point represents the average of triplicates.

대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법의 재현도 검사는 일정량의 대식세포 유주 저지 인자 농도를 가진 환자의 시료에 알려진 농도로 제조된 대식세포 유주 저지 인자 표준용액을 첨가하고 측정되는 대식세포 유주 저지 인자의 농도의 첨가량이 얼마나 재현되는지를 평가하였다. 재현도의 평균값은 102%인 것으로 나타났다(Table. 2).

대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법에서 시료회석에 따른 측정치의 변화를 측정하기 위하여 대식세포 유주 저지 인자 농도가 90 ng/ml인 시료를 2 배수로 희석하여서 측정값의 변화와 측정치의 정확도를 평가하여 나타내었다. 측정치의 상관관계는 0.97로서 측정치가 정확하게 측정될 수 있음을 확인하였다(Fig. 5).

고찰

대식세포 유주 저지 인자는 최초로 보고된 사이토카인으로서 대식세포의 유주를 저지하는 작용을 하는 것으로만 알려져 있다 가 최근에 들어 세균성 패혈증에 있어서 중요한 역할을 하는 것

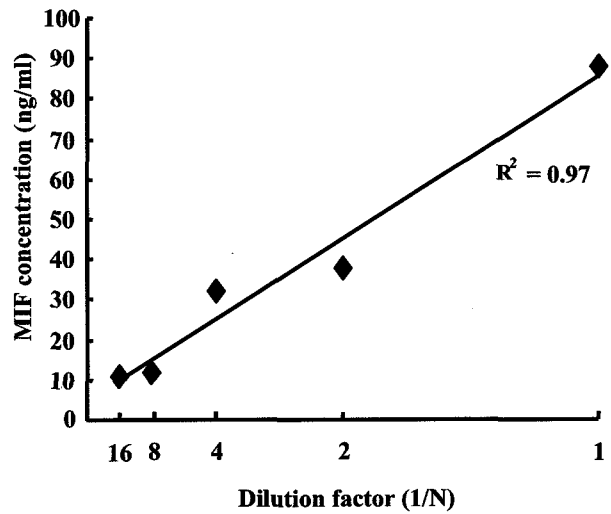


Fig. 5. Dose response line of MIF concentrations measured by immunoradiometric assay. Sample containing 90 ng/ml of MIF was serially 2-fold diluted with 20 mM Tris buffered saline with 0.1% BSA and 0.05% Tween-20. MIF concentrations in sample was assessed by immunoradiometric assay. Each point represents the average of triplicates.

Table 2. Recovery tests on the radioimmunoassay with recombinant human MIF concentrations added to human serum

Sample	Serum MIF (ng/ml)	MIF added (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Recovery (ng/ml)†	Recovery (%)
#26	0.365	6.25	7.38	7.02	112
	0.365	12.50	11.86	11.50	92

†Measurements represent the average of triplicates. †Percentage of recovery was obtained through dividing the values of recovery (measured MIF minus serum MIF) by those of MIF added.

으로 보고 되면서 관심의 대상이 되었고, 종양의 발생등과도 관련이 있는 것으로 알려지면서 많은 연구 결과가 보고 되고 있다. 대식세포 유주 저지 인자는 정상적으로 혈액 내에 일정 농도로 존재하며 추가적으로 시상하부 전엽과 다양한 외부자극에 의한 반응으로서 활성화된 단핵구 또는 대식세포에 의하여 분비된다. 대식세포 유주 저지 인자는 글루코코르티코이드들이 대식세포를 자극한 경우에도 분비되며, 글루코코르티코이드에 의하여 유도된 대식세포 유주 저지 인자의 분비는 dexamethasone ($\geq 10^{-8}M$)에 의하여 억제되는 양상을 보인다. 대식세포 유주 저지 인자는 일단 분비되고 난후에는 글루코코르티코이드에 의한 대식세포의 사이토카인 분비 억제를 상쇄하는 작용을 하는 것으로 보고 되었다.⁶⁾ 이러한 현상은 대식세포 유주 저지 인자와 글루코코르티코이드 두 가지 물질이 서로 상호 보완적으로 조절하는 방식을 통하여 사이토카인과 염증반응을 조절하는 것으로 생각된다.

대식세포 유주 저지 인자는 세균성 복막염을 가진 동물과 임상 환자의 복강 삼출액과 혈액 내에서 고농도로 존재함으로써 세균성 복막염에 의한 패혈 쇼크의 병인론에 있어 중심적인 역할을 하는 것으로 보고 되었다. Calandra 등은 세균성 복막염을 유발시킨 쥐에서 복강액 내의 대식세포 유주 저지 인자 농도가 증가하고 대식세포 유주 저지 인자 투여가 패혈성 쇼크를 악화시킨 반면, 항-대식세포 유주 저지 인자 항체 투여는 패혈증에 의한 사망률을 감소시킨다고 보고하였다.²⁴⁾ Bozza 등은 대식세포 유주 저지 인자 유전자를 파괴시킨 쥐에서 패혈성 쇼크와 사망에 대한 저항성이 생긴 것과 내독소에 의한 종양괴사인자, 인터루킨-1, 인터루킨-6 등의 생산이 감소한 것을 보고하였다.¹⁴⁾ 실험적으로 염증반응에서 중요한 역할을 하는 종양 괴사 인자-알파 가 knock-out된 마우스에서 세균성 복막염을 유도한 후에 항-대식세포 유주 저지 인자 항체를 처리함으로써 패혈증에 의한 생존율의 감소를 저해하는 효과가 밝혀졌다. 또한 정상 마우스에서도 항-대식세포 유주 저지 인자를 처리함으로써 세균성 복막염에 의한 생존율 감소를 저해하는 효과가 있음이 알려졌다. 현재까지 패혈증에 대한 수많은 치료법의 시도에도 불구하고 사망률의 감소가 이루어지지 않고 있는 만큼, MIF 활성을 조절하여 패혈증에 의한 과도한 염증반응과 사망률을 감소시키는 치료법은 가능성이 있을 것으로 기대된다. 종양에서는 종양세포의 성장에 관여하는 종양괴사 인자-베타, 혈소판 유래 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자 등의 자극에 의하여 대식세포 유주 저지 인자의 mRNA의 발현이 증가하였으며 대식세포 유주 저지 인자에 대한 anti-sense 플라스미드를 주입한 종양세포의 성장이 억제되는 것으로 나타났으며,²⁰⁾ 종양의 형성에 있어서 중요한 신혈관 생성 과정에 있어서도 작용하여 대식세포 유주 저지 인자에 대

한 항체를 처리 시에 신혈관생성의 감소 및 종양성장의 역제가 관찰되기도 하였다.^{21,23)} 대식세포 유주 저지 인자는 종양억제 유전자 산물인 p53의 기능도 억제함으로써 염증과 종양의 형성과의 연계가능성을 시사하기도 하였다.²²⁾

대식세포 유주 저지 인자는 생체내의 면역 조절의 중요한 매개자이며 종양의 형성과도 밀접한 관련이 있음이 보고 되어 이를 이용한 치료법의 개발이 가시화되고 있다. 따라서 임상에서 다양한 염증성 질환 및 종양에서의 관련성을 평가하기 위해서는 혈중에서 대식세포 유주 저지 인자의 농도를 정확하게 평가하는 것이 필요하며, 본 실험에서는 혈중 사람 대식세포 유주 저지 인자 측정을 위한 방법으로서 대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법을 확립하였다. 스트렙타비딘의 ¹²⁵I 표지 방법에서 표지 수율은 88%로서 비교적 높지 않았으나(Fig. 2), 한외여과법에 의하여 분리 정제된 ¹²⁵I-스트렙타비딘의 방사 화학적 순도가 99% 이상으로 나타나서 추가적으로 표지를 높이기 위한 실험은 수행하지 않았다. 사람 대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법을 이용하여 작성된 표준 투여 응답 곡선은 1.56 ng/ml부터 100 ng/ml까지의 대식세포 유주 저지 인자 농도 변화에 따라 직선적인 상관관계를 나타내었으며(Fig. 3), Mizue 등²⁵⁾의 연구 결과에서 정상인의 남자와 여자에서 혈중 대식세포 유주 저지 인자의 농도가 대략 5 ng/ml 으로 보고된 것을 감안하면 임상에서 혈청을 희석 없이 본 방사면역측정법을 이용하여 혈중 대식세포 유주 저지 인자 측정이 가능할 것으로 생각된다.

임상환자의 시료 중에서 심한 용혈 현상을 보인 경우에 대식세포 유주 저지 인자의 농도가 증가되었으며 이는 용혈 현상을 나타내는 질환의 경우 대식세포 유주 저지 인자에 의해서 용혈 현상이 유도된 것으로 생각된다. 정상 적혈구내에서도 미량의 대식세포 유주 저지 인자가 존재하며 혈액 시료의 채취 시에 용혈에 의한 측정치의 오차가 발생할 수 있으므로 임상에서 시료의 채취 시에 고려하여야 할 사항으로 여겨진다.²⁵⁾ 또한 혈중에 대식세포 유주 저지 인자는 sarcolectin이라는 알부민 유사 물질과 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 혈중에서 대식세포 유주 저지 인자의 파괴나 분해를 막는 역할을 하는 것으로 생각되며 대식세포 유주 저지 인자의 정확한 혈중 농도를 측정하기 위하여 이에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 본다.

사람 대식세포 유주 저지 인자에 대한 방사면역측정법의 유효성 평가로서 intra-assay, inter-assay, 재현도 및 희석 검사에 의하여 평가되었다. Intra-assay와 inter-assay에서 의 변이계수는 모두 10% 이하였으며(Table 1), 재현도와 희석에 따른 측정치의 정확도가 높은 것으로 확인되었다(Table 2, Fig. 4).

본 실험 결과로 볼 때 여러 가지 염증성 질환, 자가 면역 질환

그리고 유전성 면역 질환 등 다양한 면역질환에 있어서의 혈중 대식세포 유주 저지 인자의 농도의 변화를 측정할 수 있는 방사면역 측정법을 개발하였으며, 이로써 대식세포 유주 저지 인자 혈중 농도의 변화를 측정하여 질병의 예후 그리고 중증도와 대식세포 유주 저지 인자 농도간의 상관관계를 밝힐 수 있는 유용한 방법으로서 사용될 수 있으리라 생각된다. 또한 생체의 다양한 체액들에서 대식세포 유주 저지 인자의 농도 측정에 이용하여 여러 가지 질병에 있어서 대식세포 유주 저지 인자의 작용에 관한 연구에 있어 중요한 수단으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

목적: 사람 대식세포 유주 저지 인자는 많은 감염성 질환에 의한 패혈증의 병인론과 숙주의 염증 및 면역 반응의 조절에 중요한 역할은 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 사람의 혈중에서 대식세포 유주 저지 인자를 측정할 수 있는 방사면역 측정법을 개발하고자 하였다. **대상 및 방법:** 사람 대식세포 유주 저지 인자에 대한 단클론 항체를 포획항체로, 비오틴화된 다클론 항체를 검출 항체로 사용하였다. 사람 대식세포 유주 저지인자를 검출하기 위하여 스트렙타비딘에 ^{125}I 를 방사성추적자로 사용하고 재조합 사람 대식세포 유주저지인자를 이용하여 표준투여 응답곡선을 작성하였다. 스트렙타비딘에 ^{125}I 의 표지는 Chloramine-T법을 사용하고, 분리정제는 한외여과법을 사용하였다. ^{125}I -스트렙타비딘의 안정성을 60일까지 평가하였다. 표지수율과 안정성은 ITLC법을 사용하였다. 방사면역측정법의 유용성은 intra-와 inter-assay의 변이계수 측정, 재현도 및 회석 실험 등을 시행하였다. **결과:** ^{125}I -스트렙타비딘의 표지수율은 88%이었으며, 분리 정제된 ^{125}I -SA의 방사화학적 수율은 99%였다. ^{125}I -스트렙타비딘은 60일까지 93%의 안정성을 나타내어 방사면역측정의 방사성추적자로 사용하는데 적합하였다. 작성된 표준투여 응답곡선에서 재조합 사람 대식세포 유주 저지 인자의 농도와 결합된 ^{125}I -스트렙타비딘의 방사능 값은 높은 상관관계를 나타내었다 ($R^2=0.99$). 가장 높은 intra-와 inter-assay의 변이계수 값이 각각 5.5%와 7.6%로 나타났다. 시료 내에서 평균 recovery 측정값은 102%였다. 시료의 농도 회석에 따른 방사능의 측정치는 직선적인 상관관계를 나타내었다($R^2=0.97$). **결론:** 대식세포 유주 저지 인자의 농도 측정을 위하여 방사성추적자로 ^{125}I -스트렙타비딘을 이용한 방사면역측정법을 확립하였으며, 이 방법을 이용하여 다양한 염증성 질환을 가진 임상환자에서 대식세포 유주 저지 인자의 혈중 농도와 임상적 의의와의 상관관계를 규명하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

- Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966;153:80-2.
- 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* 1966;56:72-7.
- 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* 1989;86:7522-6.
- 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* 1994;179:1895-902.
- 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* 1997;92:131-7.
- Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7849-54.
- Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 2001;166:747-53.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995;377:68-71.
- Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, et al. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* 1996;137:5090-5.
- Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, et al. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4782-7.
- 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* 2001;123:309-14.
- Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993;365:756-9.
- 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* 1998;95:11383-8.
- Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 1999;189:341-6.
- 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* 1997;158:5514-7.
- Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 1999;42:1601-8.
- Lan HY, Yang N, Brown FG, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1998;66:1465-71.
- Lan HY, Bacher M, Yang N, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Metz C, et al. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 1997;185:1455-65.
- Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute

- respiratory distress syndrome. *Nat Med* 1997;3:320-3.
20. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998;4:707-14.
 21. 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* 1999; 5:181-91.
 22. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999;190:1375-82.
 23. Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, et al. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine* 2000;12:309-14.
 24. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, et al, Mannel D, Bucala R, Glauser MP. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000;6:164-70.
 25. Mizue Y, Nishihira J, Miyazaki T, Fujiwara S, Chida M, Nakamura K, et al. Quantitation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) using the one-step sandwich enzyme immunosorbent assay: elevated serum MIF concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of MIF in erythrocytes. *Int J Mol Med* 2000;5:397-403.