

Thyroglobulin에 대한 단일클론 항체의 혈소판응집 저해 작용

손윤희 · 김철호¹ · 전병훈² · 남경수*

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 난치병한양방치료연구센터,
1: 동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Inhibition of Platelet Aggregation by Anti-thyroglobulin Monoclonal Antibodies

Yun Hee Shon, Cheorl Ho Kim¹, Byung Hun Jeon², Kyung Soo Nam*

Department of Pharmacology and Intractable Disease Research Center, College of Medicine, Dongguk University,
1: Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

We produced twelve monoclonal antibodies(mAbs) against thyroglobulin and characterized the binding profiles. Among them, three mAbs(TN-1, TN-2 and TN-3) were further characterized their binding specificities. TN-2 had a potent lupus anticoagulant activity and potentiated the anticoagulant effect of venom phospholipase A₂. The anticoagulant mechanism of TN-2 was elongation of the partial thromboplastin time and binding to phosphatidylserine which may have a pivot role in blood coagulation. And TN-2 was cross-reacted with ss-DNA and ds-DNA and had a characteristic of autoantibody. These results suggest that TN-2 may provide a useful tool for studying the correlation between autoimmune thyroiditis and its therapeutic effect

Key words : Platelet Aggregation, Anti-thyroglobulin Monoclonal Antibodies

서 론

만성갑상선염(Hashimoto disease)¹⁾뿐만 아니라 rheumatoid arthritis²⁾, 혈전성혈소판감소증자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura), SLE(systemic lupus erythematosus)³⁾ 등은 대표적인 자가면역질환(autoimmune diseases)으로 혈중자가항체(autoantibody) 혹은 세포성 자가항체(autoantibody)가 생성되어 이 항체가 조직에 결합하여 조직장해를 유발하는 매우 무서운 질환이다⁴⁾. 또한 이 질환은 생성된 자가항체가 혈액을 따라 순환하면서 어떤 조직에 가서 자가항원과 결합하여 침착되는가에 따라 뇌손상, 신장결손, 유산, 관절염 및 피부질환 등 다양한 병변을 나타내고 있으며 현재 임상 의 모든 분야에서 그 발생빈도가 점차 높아져 문제가 되는 실정이다^{5,6)}. 그러나 이 질환의 사회적 심각성 및 발생빈도증가에 비추어 볼 때 아직 발병원인 및 진단법과 함께 특이적인 치료에 대한 연구는 아직 미약한 실정이다. Thyroglobulin은 갑상선 상피세포내에 존재하는 단백질로 자가면역성 갑상선염의

경우 혈중 anti-thyroglobulin antibody 혹은 thyroglobulin의 농도가 증가하는 autoantigen으로 알려져 있다. 따라서 자가항원인 thyroglobulin에 대한 monoclonal antibody(mAb)를 제작하여 특성을 연구하고 이를 이용해서 갑상선염의 진단 및 치료에 응용하는 노력은 매우 중요한 일이다.

이전의 연구에서 갑상선기능저하증을 중심으로 한 자가면역질환의 치료에 미치는 복합생약처방의 효과를 규명하기 위한 연구의 일환으로 먼저 자가면역성 갑상선질환시 나타나는 anti-thyroglobulin mAbs를 제작하고 그 특성을 살펴보았다⁷⁾.

본 연구에서는 그 항체들 중 비교적 반응성이 강한 3클론(TN-1, TN-2 및 TN-3)을 대상으로 자가항체의 특징인 lupus anticoagulant 활성, DNA와의 결합성을 측정하고 anti-thyroglobulin mAbs의 항응고활성의 기전을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약

실험에 사용한 RPMI-1640, Crotalus atrox PLA₂, bovine serum albumin, thyroglobulin(bovine), dextrose, gelatin 및

* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 의과대학
· E-mail : namks@dongguk.ac.kr Tel : 054-770-2412
· 접수 : 2004/02/05 · 수정 : 2004/03/08 · 채택 : 2004/04/02

bicinchoninic acid protein kit은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 그리고 fetal bovine serum은 제일생명공학서비스(대구, 한국)에서 구입하였다. 그리고 기타 필요한 모든 시약은 특급제품을 사용하였다.

2. 항체의 정제

1) IgM의 경우

본 실험에 사용한 항체 TN-2(IgM)의 정제는 HPLC(Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 사용한 column으로는 TSK-GEL 4000SWXL의 gel-filtration column(Tosoh Co., Tokyo, Japan)을 사용하였으며 이때 유속 0.5 ml/min, 그리고 한 튜브당 0.25 ml의 용량씩 받았다. HPLC에 의한 정제과정은 4 °C cold chamber내에서 시행하였다.

2) IgG의 경우

Protein A-sepharose CL-4B(Pharmacia, Sweden) 건조분말 1 g을 50 ml의 결합완충액(3 M NaCl 100 mM glycine, pH 8.9)에 15분간 팽윤시킨 후, C10/10 column(Pharmacia)에 충전시킨다. 100 mM 구연산(pH 3.0) 완충액으로 비특이적으로 흡착된 물질을 제거한 후 다시 결합완충액으로 충분히 C10/10 column을 평형시킨 뒤, 복수 속의 TN-1 및 TN-2를 희석시켜 loading한다. 유속은 시간당 약 20 ml가 되도록 조정하여 사용하였으며 3M KSCN으로 항체를 용출시켜 정제하였다. 용출액을 UV spectrophotometer (Gilford, USA)로 측정된 뒤 즉시 1M Tris-HCl 완충액으로 중화시킨 다음 PBS로 투석하여 실험에 사용하였다.

3. DNA와의 교차반응성 조사

항원으로 사용한 DNA는 calf thymus DNA(5 µg/ml)와 calf thymus ssDNA(5 µg/ml)를 사용하였다. DNA와의 교차반응성은 ELISA법으로 행하였다¹²⁾. 각각의 DNA 5 µg을 96 well plate(Nunc. Inter Med. 사)에 4 °C에서 overnight로 흡착시키고 3 % BSA-PBS로 2시간 blocking하였다. Plate를 세척한 뒤 TN-2를 넣어 2시간 실온에서 반응시키고 다시 biotin화 된 anti-mouse Igs(G+M+A, Zymed Lab. San Francisco, CA)로 2시간 및 HRP(horse radish peroxidase)-streptavidin(Zymed Lab.)으로 1시간 각각 배양한 다음 o-phenyldiamine을 기질로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Human 혈액에 대한 항혈액응고활성의 측정

Anti-thyroglobulin mAbs의 항혈액응고활성은 APTT(activated partial thromboplastin time) assay법으로 시행하였다⁸⁾. 간단히 기술하면 정제한 20 µl의 각각의 anti-thyroglobulin mAbs를 신선하게 조제한 human plasma 80 µl와 혼합시켜 37 °C에서 5분간 preincubation시킨다. APTT시약(Wako Chemical Co., Osaka, Japan)을 1:8로 희석시키고 그 100 µl를 취하여 preincubation시킨 용액에 가한 다음 이를 다시 15분간 37 °C에서 배양한다. 응고시간은 25 mM CaCl₂ 100 µl를 넣은 후 측정을 시작한다.

5. Venom phospholipase A2에 의한 항혈액 응고작용에 미치는 영향

혈액응고 능력은 토끼(자성, New Zealand White)의 적혈구로부터 얻은 platelet-rich plasma(PRP)의 aggregation 정도를 spectrophotometer(Gilford, USA)를 사용하여 측정하였다⁹⁻¹⁰⁾. PRP의 조제는 먼저 채혈한 혈액을 폴리에틸렌 튜브에 옮겨 300 g로 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 PRP로 했다. PRP에 ACD(acid citrate dextrose, 구연산 65 mM, 구연산나트륨 85 mM, dextrose 2 %)를 1/5용량으로 가해 3,200 g로 10분간 상온에서 원심분리하여 침전액에 0.25 %의 gelatin을 함유한 Tris-Tyrode를 가하여 세포수 5 × 10⁸ cells/ml 현탁액을 만들었다. PRP(1 × 10⁶ cells/one cuvette)를 2 mM CaCl₂를 함유한 완충액으로 조제한 다음 spectrophotometer용 cuvette에 37 °C에서 5분 동안 Crotalus atrox PLA2 를 천천히 혼합하여 반응시켰다. 그 후 혈소판 응집은 660 nm에서 측정하였다.

6. 단백질 함량 측정

단백질 정량은 bicinchoninic acid protein kit를 사용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준 검량곡선을 구하고 그 양을 산출하였다.

결과 및 고찰

2번의 세포융합을 통해 thyroglobulin과 반응하는 단일클론 12개를 얻을 수 있었다⁷⁾. ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 결과 항원으로 사용한 thyroglobulin과 반응하는 3 클론(TN-1, TN-2 및 TN-3)을 얻었으며 이들 clone 모두 다 비교적 thyroglobulin과 높은 친화성을 가짐을 알 수 있었다.

따라서 TSK-GEL 4000SWXL의 gel-filtration column을 사용해서 HPLC로 정제한 TN-2(IgM)의 HPLC 정제 pattern과 protein A column을 사용하여 TN-1(IgG) 및 TN-2(IgG)를 정제한 그림을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

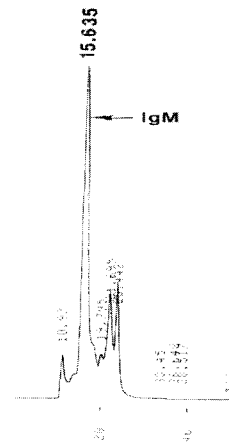


Fig. 1. The HPLC profile of TN-2(IgM) flow rate 0.5 ml/min, atten 9 0.25 ml/tube, chart speed 1

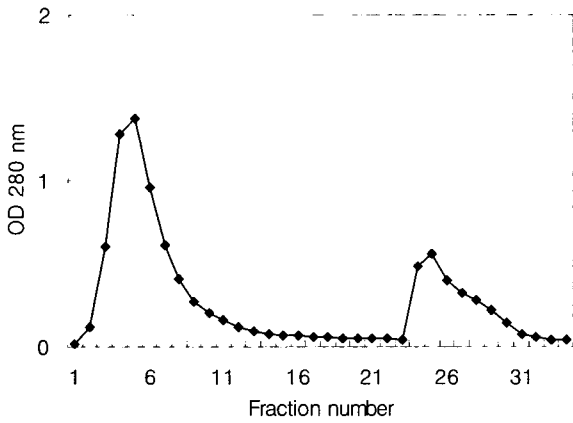


Fig. 2. Elution profile of TN-1(IgG) by Protein A column chromatography. The column was washed with the 3M NaCl 100mM glycine(pH 8.9) buffer(flow rate 24 ml/hr). The bounded mAb was eluted with 3M KSCN, and then the eluate immediately neutralized by addition of 1M Tris-HCl(pH 9.0).

또한 실험에 사용시 ELISA등에서 반응시간의 단축을 위해 NHS-biotin을 사용해서 TN-2(IgM)를 biotinylation 시켰다. Biotinylated anti-thyroglobulin mAb(biotinylated TN-2)의 활성을 확인한 후 이를 실험에 사용하였다. TN-2가 기존에 본 연구자가 확립한 anti-phosphatidylcholine mAb 및 anti-phosphatidylserine mAb와의 공동성 및 항원에 대한 반응 특이성을 알아보기 위해 single strand-DNA, double strand-DNA 및 다양한 전하를 가진 인지질에 대한 반응성에 대해서도 검토하였다. TN-2는 single strand(ss)-DNA, double strand(ds)-DNA와 교차반응성을 나타내었으며 반응성은 ss-DNA와의 결합성이 더욱 강하게 나타났다(Fig. 3).

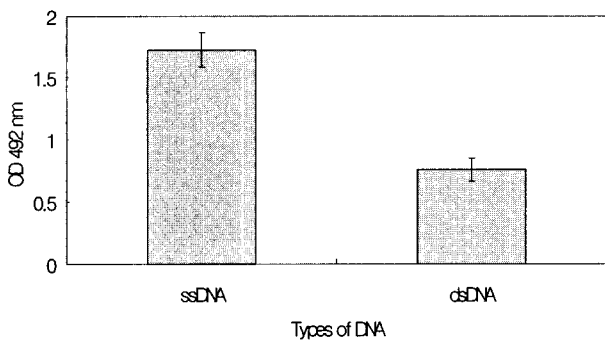


Fig. 3. Cross-reactivity of TN-2 with single and double strand DNA. Microtiter plate were coated with calf thymus dsDNA and calf thymus ssDNA for over night respectively. TN-2 was detected with biotinylated anti-mouse Igs and streptavidin-conjugated peroxidase. The detail experimental procedures were described in Materials and methods. Values are mean±SD (n=3).

또한 TN-2의 자가항체의 대표적인 특성인 lupus anticoagulant 활성을 알아보기 위해 APTT(activated partial thromboplastin time)법으로 확인한 결과 TN-2는 대표적인 anti-phosphatidylserine monoclonal antibody인 PS4A7(IgM)보다 강한 anticoagulant활성을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Elongation of APTT by anti-thyroglobulin mAbs. Each value represents the mean elongation of APTT of duplicate experiments.

Clones	% Elongation of APTT (Mean APTT is 55 seconds)
TN-1	25.3a
TN-2	32.1
TN-3	19.8
PS4A7 (anti-phosphatidylserine mAb)	22.1
JE-10 (anti-phosphatidylcholine mAb)	0.0

Venom PLA2에 의한 혈액응고저해 작용에 TN-2가 어떤 작용을 나타내는지를 알아보았다. *Crotalus atrox* PLA2는 투여한 양에 의존하여 혈액응고 저해(항혈액응고)활성을 나타내었다. 여기에 TN-2를 농도별로 전처리 한 결과 *Crotalus atrox* PLA2의 혈액응고 저해활성을 상승시킴을 알 수 있었다(Fig. 4). TN-2가 venom(*Crotalus atrox*) PLA2에 의한 anticoagulant 활성에 상승 효과를 나타내는 것으로 보아 혈액의 응고시스템과 관련된 인지질(phosphatidylserine)과의 결합성을 강하게 시사하고 있다. 또한 이전의 ELISA실험에서 phosphatidylserine(PS)과 교차반응성을 나타내는 것으로 보아 PS와의 결합성을 뒷받침하고 있으며, TN-2(IgM)의 anticoagulant 활성은 IgG인 TN-1과 TN-2보다 더욱 강하게 나타났다. 따라서 본 항체들은 자가면역질환환자에서 나타나는 자가항체의 특성과 유사한 성격을 가진 항체이며 이전에 본 연구자에 의해 제작된 항인지질항체와 유사한 반응 특이성을 갖는 자가항체임을 확인 할 수 있었다¹¹⁻¹³).

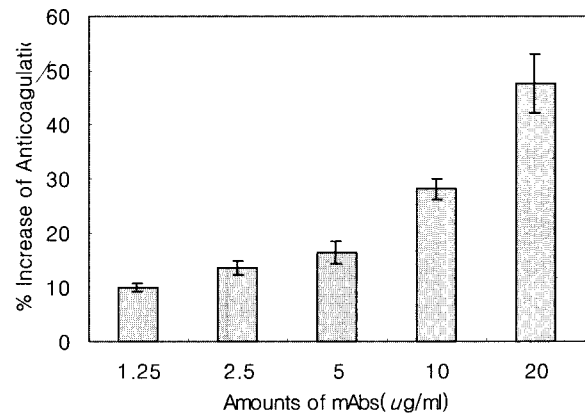


Fig. 4. Effects of TN-2 on the anticoagulant activities of venom PLA2. Anticoagulant potency of TN-2 was estimated aggregation degree of plate rich plasma(PRP) prepared from freshly collected rabbit blood. PRP was preincubated at 37°C for 3 min in the presence of 2 mM CaCl₂ with *Crotalus atrox* PLA2. All the reactions were carried out with gentle stirring. The detail experimental procedures were described in Materials and methods. Values are mean±SD (n=3).

한편 자가면역성 갑상선염의 치료법으로서 지금까지 본 연구실에서 연구하여 왔던 천연물(30여종)들 중 그 효과를 기준으로 새로운 감궁탕(감초, 흑두, 당귀, 천궁)약침액을 처방하였으며, 본 항체를 갑상선기능저하증의 동물모델(experimental autoimmune thyroiditis)에 투여한 결과 갑상선 기능저하증이 회

복됨을 알 수 있었다(data not shown). 따라서 자가면역성 갑상선염의 실험동물모델에 대한 효능이 확인되고 감공당약침액의 안전성 평가가 이루어진다면 더욱이 직접 자가면역성 갑상선기능저하증 환자에 적용하여 그 치료효과를 확인할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Nielsen, C.H., Hegedus, L. and Leslie, R.G. Autoantibodies in autoimmune thyroid disease promote immune complex formation with self antigens and increase B cell and CD4+ T cell proliferation in response to self antigens. *Eur. J. Immunol.* 34, 263-272, 2004.
- Hueber, W., Utz, P.J. and Robinson, W.H. Autoantibodies in early arthritis: advances in diagnosis and prognostication. *Clin. Exp. Rheumatol.* S21, S59-64, 2003.
- Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M.V., Scofield, R.H., Dennis, G.J., James, J.A. and Harley, J.B. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 349, 1526-1533, 2003.
- Shlomchik, M.J., A.H. Aucoin, D.S. Pisetsky and M.G. Weigert. 1987. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9150-9154, 1987.
- Oide, T., Tokuda, T., Yazaki, M., Watarai, M., Mitsunashi, S., Kaneko, K., Hashimoto, T., Ohara, S. and Ikeda, S. Anti-neuronal autoantibody in Hashimoto's encephalopathy: neuropathological, immunohistochemical, and biochemical analysis of two patients. *Neurol. Sci.* 217, 7-12, 2004.
- Harris, E.N., Asherson, R.A. and Hughes, G.R.V. Antiphospholipid antibodies-autoantibodies with a difference. *Ann. Rev. Med.* 39, 261-271, 1988.
- Nam, K.S., Shon, Y.H., Baek, S.W., Kim, C.H., Lim, J.K. and Hwang, C.W. Production and characterization of anti-thyroglobulin monoclonal antibodies, *Korean J. of Life Science* 12, 460-463, 2002.
- Alving, B.M., Baldwin, P.E., Richards, R.L. and Jackson, B.J. The dilute phospholipid APTT: a sensitive assay for verification of lupus anticoagulants. *Thromb. Haemostas.* 54, 709-712, 1985.
- Park, H.J., Rhee, M.H., Park, K.M., Nam, K.Y. and Park, K.H. : Anti-platelet function of the non-saponin fraction from Panax ginseng C.A. Mayer(Korean red ginseng). *Korean Biochem. J.* 26, 681, 1993.
- Bomalaski, J.S., Lawton, P. and Browning, J.L. : Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints. *J. Immunol.* 146, 3904, 1991.
- Igarashi, K., Umeda, M., Tokida, S., Nam, K.S. and Inoue, K. Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse. *Thrombosis Res.* 61, 135-148, 1991.
- Nam, K.S., Igarashi, K., Umeda, M. and Inoue, K. Production and characterization of monoclonal antibodies that specifically bind to phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1046, 89-96, 1990.
- Umeda, M., Igarashi, K., Nam, K.S. and Inoue, K. Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 143, 2273-2279, 1989.