

루푸스 신염의 활동성 예측 척도로서 혈청 C1q-Circulating Immune Complexes의 유용성

계명대학교 의과대학 내과학교실¹, 건국대학교 의학전문대학원 류마티스내과학교실²,
가톨릭대학교 의과대학 류마티스내과학교실³

김주연¹ · 김상현¹ · 김해림² · 박성환³

= Abstract =

Clinical Significance of Serum C1q-Circulating Immune Complexes in Patients with Lupus Nephritis

Juyoun Kim¹, Sang-Hyon Kim¹, Hae-Rim Kim², Sung-Hwan Park³

*Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,
Keimyung University School of Medicine¹, Daegu, Konkuk University School
of Medicine², The Catholic University of Korea College of Medicine³, Seoul, Korea*

Objective: The purpose of this study was to evaluate whether serum C1q-circulating immune complexes (C1q-CIC) serve as a predictive marker for renal flares in patients with lupus nephritis.

Methods: Twenty-five patients with lupus nephritis and 24 healthy controls were enrolled. Patients with lupus nephritis had their serum C1q-CIC titers and other serologic parameters such as serum C3, C4, anti-dsDNA antibody, and erythrocyte sedimentation rate measured simultaneously. The systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI) was also checked.

Results: Serum C1q-CIC titers were higher in patients with lupus nephritis than in healthy controls (109.33±53.79 μ g/mL vs. 75.28±22.91 μ g/mL, $p=0.008$). A statistically significant association was found between serum C1q-CIC titers and C3 ($p=0.011$), C4 ($p=0.027$), and anti-dsDNA antibody ($p=0.014$). SLEDAI was also correlated with serum C1q-CIC titers ($p=0.022$).

Conclusion: Serum C1q-CIC appears to be related to renal disease activity in patients with lupus nephritis. These results suggest that serum C1q-CIC is a predictive marker for renal flares

<접수일 : 2010년 8월 25일, 수정일 : 2010년 11월 23일, 심사통과일 : 2010년 11월 26일>

※통신저자 : 김 상 현

대구시 중구 동산동 194

계명대학교 동산병원 류마티스내과

Tel : 053) 250-8038, Fax : 053) 250-7434, E-mail : mdkim9111@dsmc.or.kr

본 연구는 2008년도 계명대학교 비사(신진)연구기금으로 이루어졌음.

in patients with lupus nephritis.

Key Words: Lupus nephritis, C1q-Circulating Immune Complexes

서 론

전신홍반루푸스(이하 루푸스)는 자가 항원에 대한 면역반응으로 다양한 자가 항체를 나타내는 자가면역질환으로 피부, 신경계, 폐, 관절, 혈관계, 신장 등의 조직에 염증을 일으킨다. 루푸스의 신장 침범은 약 50%의 환자에서 발생되고 30%가 신부전으로 이행되어, 질환 발생 10년 내의 주요한 사망 원인이 되고 있다 (1,2). 그러므로, 루푸스 환자의 생존율을 높이기 위해서는 조기에 루푸스 신염의 발생을 예측하고 그 활성도를 평가하여 적절한 치료를 시행하는 것이 매우 중요하다. 일반적으로, 루푸스 환자의 질병 활성도는 감소된 혈청 보체(C3, C4) 수치와 증가된 항dsDNA항체의 역가와 연관성이 있다고 알려져 왔으나, 루푸스 신염의 활성도를 반영하는데 여러 가지 제한 점이 있다 (3,4). 최근에는 루푸스 신염의 발병과 활성도를 예측하기 위한 새로운 척도에 대한 필요성이 대두되었고, 이와 관련된 많은 연구가 진행되고 있다 (5-8). 저자들은 혈청 C1q-CIC 역가와 루푸스 신염의 활성도간의 관계를 알아보고, 루푸스 신염의 활성도 예측 인자로서의 C1q-CIC의 유용성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상환자

가톨릭대학교 서울성모병원 류마티스 내과에 내원한 루푸스 환자 중 루푸스 신염을 진단 받은 25명의 환자와 기저질환 및 병력이 없는 건강한 대조군 24명을 대상으로 하였다. 모든 환자는 1997년 재개정된 미국류마티스학회의 루푸스 분류기준에 따라 진단하였고 (9), 신장 조직 검사를 받은 환자에서는 WHO 분류법에 따라 분류하였으며, V형인 경우 세부 아형에 관계없이 모두 V형으로 분류하였다.

2. 임상검사와 결과의 정의

모든 환자를 대상 혈청 C1q-CIC, 적혈구침강속도(ESR), C3, C4, 항dsDNA항체, 일반 요검사와 요침사 현미경 검사, 24시간 요단백량(g/일) 등의 검사를 시행하였고 systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI)를 조사하였다 (10). 건강 대조군은 혈청 C1q-CIC를 측정하였다. 루푸스 신염은 단백뇨의 양이 하루 0.5 g을 초과하거나 3+ 이상의 지속성 단백뇨 혹은 세포성 원주가 검출되는 경우와 단백뇨와 혈뇨, 원주뇨 등의 요소견이 없더라도 신생검을 통해서 신장의 병변이 관찰된 경우로 정의하였다.

3. 혈청 C1q-CIC 측정

혈청내 C1q-CIC는 solid phase ELISA 방법(IBM, Immunobiological Laboratories)으로 측정하였다. 건강 대조군과 환자군 모두로부터 말초혈액을 채취하였고, 즉시 원심 분리를 시행한 후 혈청만을 분리하여, C1q-CIC 농도 측정 시까지 -20°C 냉동고에 보관하였다. 검사 전에 각 검체는 1 : 5로 희석하였고, wash buffer는 증류수나 탈이온수로 20배 희석하여 이용하였다. 분석을 시작하기 전에 충분한 양의 microwells을 선택하여 wash buffer (phosphate buffer, 0.02% Thimerosal)로 세척 후 건조 시켰다. Microtiter plate에 검체를 100 μL 씩 pipette으로 옮겨 놓은 후 실온(18~24도)에서 30분간 배양하였다. 그 다음 wash buffer로 세척 후 Enzyme conjugate (human anti-human-IgG conjugated with Horseradish peroxidase, 0.05% Proclin 300)를 도포하여 실온에서 15분간 반응 시키고 다시 한 번 wash buffer를 이용하여 세척하였다. Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution 100 μL 를 점적하였고 실온에서 15분간 발색반응을 시킨 후 TMB stop solution (0.26 M H_2SO_4) 50 μL 를 점적하여 반응을 중단시켰다. TMB stop solution 점적 15분 후 450 nm에서 흡광도(Optical density, OD)를 측정하였다. 이러한 과정을 통하여 얻어진 흡광도(OD)는 아래의 공식을 이용하여 C1q-CIC 농도($\mu\text{g/mL}$)로 변환하였다.

Concentration of Standard×Mean OD of Sample or Control

Mean OD of Standard

The Concentration of the Standard is 100 $\mu\text{g/mL}$

4. 통계분석

결과는 산술평균±평균의 표준오차(standard error of mean, SEM)로 표시하였고, 통계처리는 Windows 용 SPSS 12.0 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 건강 대조군과 환자군의 C1q-CIC 수치의 비교는 비모수적 검정 방법인 Mann-Whitney U test를, 루푸스 신염의 활성도를 나타내는 다른 변수들과 C1q-CIC와의 상관관계는 비모수적 통계 방법인 상관관계 분석법(Spearman's rho)을 사용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Table 1. Baseline clinical characteristics of the study patients

	Sex (female)	24 (96%)
Age		
Age at diagnosis of SLE		23.5±7.6 years
Age at diagnosis of lupus nephritis		36.6±10.0 years
Renal histology		
Patients undergo renal biopsy		17 (68%)
WHO classification		III : 2 (8%), IV : 9 (36%), V : 6 (24%)
Activity index		5.5
Chronicity index		3.5
Extrarenal involvement		
Malar rash		13 (52%)
Arthritis		12 (48%)
Leukopenia		9 (36%)
Hemolytic anemia		7 (28%)
Serositis		6 (24%)
Thrombocytopenia		6 (24%)
Central nervous system		5 (20%)
Pneumonitis		2 (8%)
Vasculitis		2 (8%)
Myocarditis		2 (8%)
Pulmonary hypertension		1 (4%)

결 과

1. 환자의 임상적 특성

총 25명의 환자 중 남자가 1명, 여자가 24명으로 환자의 96.0%가 여자였고, 루푸스 진단 당시의 평균 연령은 23.5±7.6세, 루푸스 신염 진단 당시의 평균 연령은 36.6±10.0세였다. 신장조직 검사를 한 경우가 17명(68.0%)이었고, 이들 중 WHO 분류법에서 III형이 2명(8.0%), IV형이 9명(36.0%), V형이 6명(24.0%)이었다. 조직 검사 activity index는 중앙값 5.5, chronicity index는 중앙값 3.5이었다. SLEDAI 점수는 중앙값 13이었다. 혈청 C3 65.4±32.4 mg/dL, C4는 평균 13.8±12.2 mg/dL로 감소되어 있었고, 항dsDNA 항체는 181.3±164.0 U/mL로 증가되어 있었다. 24시간 단백뇨 7.0±9.4 g/일이었으며, 요중 백혈구 수는 14.6±18.7/HPF, 요중 적혈구 수는 15.0±16.4/HPF였다. 신장의 증상으로는 피부증상(52%), 관절염(48%), 백혈구 감소증(36%), 용혈성 빈혈(28%), 늑막염(24%)과 혈소판 감소증(24%) 그리고 중추신경 증상(20%) 등이 있었다(표 1).

2. 대조군과 환자군의 C1q-CIC 비교

기저 질환 및 과거의 병력이 없는 24명을 건강 대조군으로 선정하였으며, 이들의 평균나이는 42.7±7.7세였고, 혈청 C1q-CIC는 75.28±22.91 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 환자군의 혈청 C1q-CIC는 109.33±53.79 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군에 비하여 유의하게 증가되어 있었다($p=0.008$) (그림 1).

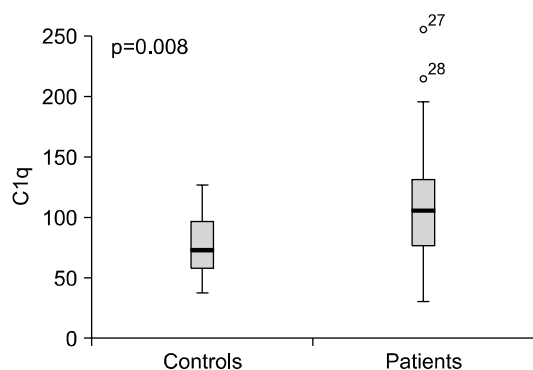


Fig. 1. Serum levels of C1q-circulating immune complexes (C1q-CIC) in healthy controls and patients with lupus nephritis ($p=0.008$).

3. 혈청 C1q-CIC와 혈청 C3, C4, 항dsDNA항체, SLEDAI의 상관관계

혈청 C1q-CIC와 혈청 C3 ($p=0.011$), C4 ($p=0.027$), 항dsDNA항체($p=0.014$)와 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다. 또한, SLEDAI ($p=0.022$)와 혈청 C1q-CIC 사이에서도 유의한 상관 관계를 관찰 할 수 있었다(그림 2). 하지만, 혈청 albumin, creatinine, ESR, 24시간 단백뇨, 요중 백혈구와 적혈구 수와는 통계

적으로 의미있는 상관관계가 없었다.

고 찰

루푸스는 자가면역 질환의 일종으로 자가항체의 부적절한 과잉 생산으로 인해 증가된 면역복합체가 전신의 장기에 축적되어 염증 반응을 일으키는 것이 중요한 병인이다 (11). 신장 침범은 루푸스 환자의

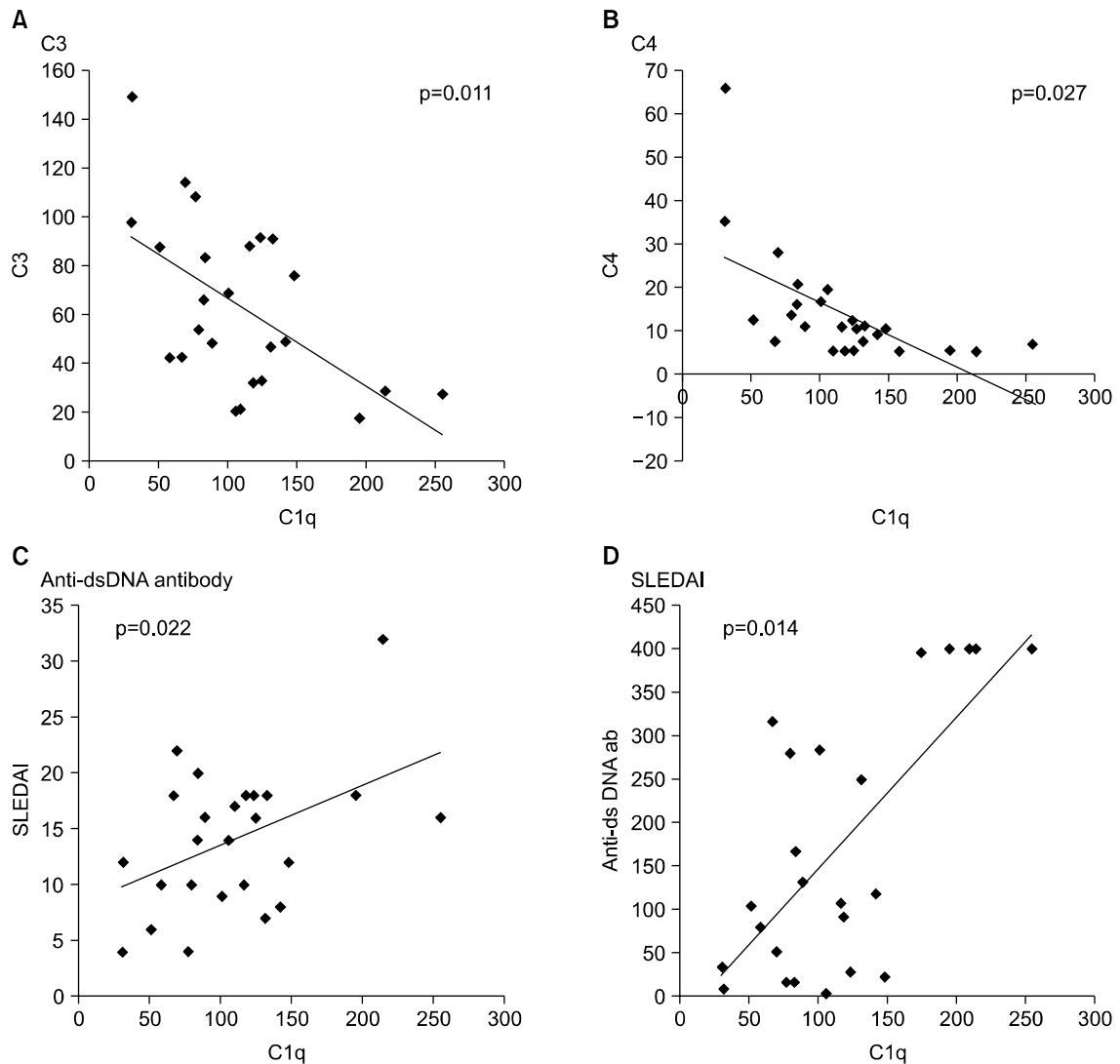


Fig. 2. Correlations between serum C1q-circulating immune complexes (C1q) level and C3 (A), C4 (B), anti-ds DNA antibody (C), and the systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI) (D) were observed in patients with lupus nephritis.

약 50% 이상에서 나타나며 30% 가량은 신부전으로 진행되는 심각한 합병증이다 (1,2). 그러므로, 루푸스의 질병 활성도를 정확히 평가하고, 루푸스 신염 발생을 조기에 예측하여 적절한 치료를 하는 것이 루푸스 환자의 생존에 예후에 중요하다. 여러 연구들에서 루푸스의 활성도와 혈청 보체(C3, C4)치의 감소 (3,12) 및 항dsDNA항체의 증가가 연관성이 있다고 알려져 있다 (13-15).

보체계는 병원체 인자를 초기 감염에 대한 효과적인 숙주 방어로 전환하는 중요한 기전 중의 하나이다. 보체는 혈장 단백질로 구성된 체계로, 직접적으로 병원체에 의해 활성화될 수 있고 또는 병원체 결합 항체에 의해 간접적으로 활성화되어 병원체의 표면에 연쇄반응을 일으켜 여러 가지 효과 기능들을 가진 활성화된 성분을 생산한다 (16). 보체의 활성화는 세 가지 경로를 통하여 이루어지는데, 병원체에 의해 직접적으로 유발되는 고전경로(classical pathway), 병원체 표면에 결합하는 항체에 의해 간접적으로 유발되는 MB (Mann-Binding)-Leptin 경로, 그리고 두 경로들에 대한 증폭고리를 또한 제공하는 대체경로(alternative pathway)이다. 이 중 고전경로는 보체 연쇄반응에 있어 첫 번째 단백질 C1q가 직접적으로 병원체 표면에 결합함으로써 시작될 수 있으며, 또한 적응면역반응 동안에 C1q가 항체 : 항원 복합체에 결합함으로써 활성화 될 수 있다. 그리하여 내재면역과 적응면역의 효과 기전 사이에 중요한 연결이 된다.

1984년에 루푸스 환자의 혈청에서 C1q에 대한 자가항체가 처음으로 발견되었고(17), 이후 Siegert 등의 연구에서 루푸스 신염에서 항C1q항체의 진단적 및 예후 평가에 있어서의 가치가 보고되었다 (16). Coremans 등은 루푸스의 신장 침범뿐만 아니라 다른 장기 침범의 경우에서도 항C1q항체의 증가를 볼 수 있었다고 하였다 (5). 또한, Moroni 등은 루푸스 신염에서 항C1q항체의 민감도와 특이도가 매우 높다고 보고하였다 (18). Mosca 등의 연구에서는 항C1q항체가 루푸스의 활성도와 신장 침범의 정도와 관계가 있으나 루푸스 신염의 재발 및 예후와는 명확한 연관성이 있지는 않았으며, 항dsDNA 항체의 양성 결과가 중증의 루푸스 신염이나 예후가 나쁜 경우에 한해서만 연관성이 있다고 하였다 (19).

최근에는 항C1q항체 이외에도 루푸스 신염의 활성도와 관계된 다른 자가 항체나 혈청학적 검사에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데, Sabbatini 등은 항 α -endolase항체가 신염을 동반한 전신성 자가면역 질환과의 연관성을 보고하였고, 신염의 예측 척도로 제안하였다 (20). Carvalho 등과 Papa 등은 루푸스 환자에서 항C1q항체와 항내피세포 항체(anti-endothelial cell antibody) 같은 자가항체가 측정되었고, 이는 루푸스의 신장 침범과 관계가 있다는 연구 결과를 보고했다 (21,22). 지금까지 루푸스 신염의 발생 및 활성도의 예측을 위한 지속적인 연구가 시행되어 왔다. 혈청 보체, 항dsDNA 항체 이외에도 항 α -endolase 항체, 항내피세포 항체나 항C1q항체 등의 자가 항체와 루푸스 신염과의 관련성이 있음이 보고되어왔고, 루푸스 신염의 발병과 예후의 예측 인자로의 유용성이 제기되어 왔다.

본 연구자들은 신염이 활성화되면서 염증에 대한 숙주 방어의 첫 번째 역할을 하는 혈청 C1q-CIC 수치도 루푸스 신염의 활성화 정도에 따라 비례하여 증가할 것이므로, 루푸스 신염의 활성 정도와 혈청 C1q-CIC와도 관계가 있을 것으로 가정하고 본 연구를 수행하였다. 본 연구를 통하여 루푸스 환자에서 정상인에 비해 혈청 C1q-CIC 값이 증가되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 고전적인 루푸스의 활동성의 표지자인 C3, C4, 항dsDNA항체 및 SLEDAI와도 혈청 C1q-CIC간에 의미있는 상관관계를 관찰하였다. 그러므로 혈청 C1q-CIC 수치가 루푸스 신염의 활성도를 간접적으로 대변 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 다른 표지자인 ESR, 24시간 단백뇨, 요중 백혈구/적혈구 수와는 유의한 상관관계를 관찰할 수가 없었다. 이는 조사 대상의 환자 수가 25명인 소규모 연구로 인해 루푸스 신염 발생의 다른 표지자들과의 상관관계를 정확히 규명할 수 없는 한계점이 있었으며, 신장 침범의 진행으로 나타나는 단백뇨나 세포성 원주 등의 요검사 소견이 나타나기 이전에 신장 조직 검사에서 신염의 조직 변화 소견으로 루푸스 신염을 진단한 환자들도 연구 대상으로 포함되어 있어 24시간 단백뇨나 요중 백혈구/적혈구 수와 혈청 C1q-CIC 수치와는 유의한 상관 관계를 보이지 않았을 것으로 생각된다. 또한, 루푸스 신염의 치료 후에 혈청 C1q-CIC의 추적 검사가 병행되

있더라면, 루푸스 활성도 평가의 척도로서의 유용성에 대해 혈청 C1q-CIC의 가치를 더할 수 있었을 것으로 사료된다.

그러므로, 혈청 C1q-CIC가 루푸스 신염의 진단 및 활성도 예측과 예후 평가를 위한 지표로 활용되기 위해서는 향후 더 많은 환자를 대상으로 보완 및 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

본 연구는 루푸스 환자 중 루푸스 신염이 진단된 경우에 혈청 C1q-CIC 수치의 루푸스 신염 활성도 예측 표지자로서의 유용성을 조사하였고, 혈청 C1q-CIC 수치가 루푸스 신염의 활성도를 평가할 수 있는 다른 검사 결과와의 상관관계를 분석하였다. 루푸스 신염 환자의 혈청 C1q-CIC 값은 정상인에 비해 현저한 증가 소견을 보임을 확인하였고, 루푸스의 활성도를 반영하는 혈청 표지자인 보체 및 항 dsDNA 항체뿐만 아니라 SLEDAI와의 유의한 상관관계를 관찰함으로써, 혈청 C1q-CIC 측정이 루푸스 신염의 예측 및 루푸스의 활성도 평가에 의의가 있음을 확인하였다. 하지만, 이 연구가 단일 기관 소규모 환자군을 대상으로 하였다는 점과 루푸스의 활성도 평가를 위해 시행한 몇몇 다른 검사와는 연관성이 없었다는 한계점을 고려하여 이를 보완할 지속적인 연구가 뒷받침된다면, 혈청 C1q-CIC의 임상적 적용이 가능하리라 생각된다.

참고문헌

- 1) Austin HA 3rd, Klippel JH, Balow JE, le Riche NG, Steinberg AD, Plotz PH, et al. Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N Engl J Med* 1986;314:614-9.
- 2) Steinberg AD, Steinberg SC. Long-term preservation of renal function in patients with lupus nephritis receiving treatment that includes cyclophosphamide versus those treated with prednisone only. *Arthritis Rheum* 1991;34:945-50.
- 3) Isenberg DA, Ravirajan CT, Rahman A, Kalsi J. The role of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. A review and introduction to an international workshop on DNA antibodies held in London, May 1996. *Lupus* 1997;6:290-304.
- 4) Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, Williams DG, Lessof MH, Chantler C, et al. Systemic lupus with nephritis: a long-term study. *Q J Med* 1979;48:1-24.
- 5) Coremans IE, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, van der Voort EA, Kater L, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis* 1995;26:595-601.
- 6) Houssiau FA, D'Cruz D, Vianna J, Hughes GR. Lupus nephritis: the significance of serological tests at the time of biopsy. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:345-9.
- 7) Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter JC, Montea-gudo J, Escolar G, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: Prevalence and clinical significance. *Lupus* 1997;6:521-6.
- 8) D'Cruz DP, Houssiau FA, Ramirez G, Baguley E, McCutcheon J, Vianna J, et al. Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1991;85:254-61.
- 9) Johnson DW. Mycophenolate mofetil for treatment of refractory lupus nephritis. *Intern Med J* 2001;31:312.
- 10) Karassa FB, Isenberg DA. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *N Engl J Med* 2001;344:382-3.
- 11) Adu D. The evidence base for the treatment of lupus nephritis in the new millennium. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1536-8.
- 12) Lloyd W, Schur PH. Immune complexes, complement and anti-DNA in exacerbation of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore)* 1981;60:208-17.
- 13) ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallemberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33:634-43.
- 14) Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N, Kohda S, Takeda T, et al. Significance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: Correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis* 1993;52:14-20.
- 15) Swaak AJ, Aarden LA, Statius van Eps LW, Feltkamp TE. Anti-DNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis*

- Rheum 1979;22:226-35.
- 16) Siegert CE, Kazatchkine MD, Sjöholm A, Würzner R, Loos M, Daha MR. Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic roles. Clin Exp Immunol 1999;116:4-8.
- 17) Uwatoko S, Aotsuka S, Okawa M, Egusa Y, Yokohari R, Aizawa C, et al. Characterization of C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol 1984;30:104-16.
- 18) Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, Quaglini S, Raschi E, Panzeri P, et al. Anti-C1q Antibodies May Help in Diagnosing a Renal Flare in Lupus Nephritis. Am J Kidney Dis 2001;37:490-8.
- 19) Mosca M, Chimenti D, Pratesi F, Baldini C, Anzilotti C, Bombardieri S, et al. Prevalence and Clinico-serological Correlations of anti- α -endolase, anti-C1q, and anti-dsDNA antibodies in patients with SLE. J Rheumatol 2006;33:695-7.
- 20) Sabbatini A, Dolcher MP, Marchini B, Chimenti D, Moscato S, Pratesi F, et al. Alpha-endolase is a renal-specific antigen associated with kidney involvement in mixed cryoglobulinemia. Clin Exp Rheumatol 1997;15:655-8.
- 21) Carvalho D, Savage CO, Isenberg D, Pearson JD. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. Arthritis Rheum 1999;42:631-40.
- 22) Papa ND, Raschi E, Moroni G, Panzeri P, Borghi MO, Ponticelli C, et al. Anti-endothelial cell IgG fractions from systemic lupus erythematosus patients bind to human endothelial cells and induce a pro-adhesive and a pro-inflammatory phenotype in vitro. Lupus 1999;8:423-9.