

□ 원 저 □

## 폐결핵환자의 치료 시점에 따른 말초혈액 단핵구의 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 분비능의 변화

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

임재준, 이상민, 이재호, 유철규, 이춘택, 정희순, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

### Change of IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ Producing Capacity in the Course of Chemotherapy in Patients with Pulmonary Tuberculosis

Jae-Joon Yim, M.D., Sang Min Lee, M.D., Jae Ho Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,  
Choon Taek Lee, M.D., Hee Soon Chung, M.D., Young Whan Kim, M.D.,  
Sung Koo Han, M.D., and Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University  
College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) play a critical role in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. The change of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  producing capacity in the course of antituberculous chemotherapy in patients with pulmonary tuberculosis was evaluated in this study.

**Method :** In 29 patients with pulmonary tuberculosis, phytohemagglutinin(PHA) or purified protein derivative (PPD) stimulated production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by peripheral blood mononuclear cells was quantified. Five patients were sampled before they underwent antituberculous treatment, 11 patients after 0-4 months, six after 4-completion and seven after treatment completion.

**Result :** There was no difference in PHA- or PPD- stimulated production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  between each group.

---

<sup>†</sup>이 연구는 1997년도 서울대학교 병원 일반연구비(04-97-002)지원에 의한 결과임.

Address for correspondence :

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University College of Medicine

28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea

Phone : 02-760-2856 Fax : 02-761-3356 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

**Conclusion :** No difference in PHA- or PPD- stimulated production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  between two groups could be identified according to their treatment with pulmonary tuberculosis. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 149-154)

**Key words :** Tuberculosis, Interferon-gamma, Tumor necrosis factor-alpha.

## 서 론

결핵에 대한 인체의 면역반응의 근간을 이루는 것은 대식세포가 결핵균을 탐식하여 사멸시키는 것이다. 이 과정에는 대식세포는 물론 T 림프구를 비롯한 여러 가지 세포들과 또 이들 세포에서 분비되는 여러 cytokine들이 관여한다. 그 중에서도 특히 Interferon-gamma(IFN- $\gamma$ )와 Tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )는 중추적인 역할을 한다고 알려져있다.

IFN- $\gamma$ 는 주로 CD4 T 림프구에서 분비되지만 CD8 T 림프구나 Natural killer 세포에서도 만들어 지는데 과산화수소와 산화질소의 생산 증가를 통해 대식세포의 항결핵 작용을 증강시킨다<sup>1,2</sup>. TNF- $\alpha$ 의 경우 폐포대식세포등의 대식세포에서 주로 분비되는데 대식세포의 항결핵작용의 강화와<sup>3</sup> 육아종형성에 관여한다고 받아들여지고 있다<sup>4</sup>.

결핵에 이환된 환자들의 경우 IFN- $\gamma$ 의 분비능이 정상인에서보다 감소되어있으며<sup>5</sup> TNF- $\alpha$ 의 경우는 결핵이 있는 경우 분비능이 증가되어있다고<sup>6,7</sup> 알려져 있지만 폐결핵 환자들에서 치료에 따라 이들의 분비능이 어떻게 변하는지에 대한 연구는 아직 부족한 형편이다. 저자들은 폐결핵 환자들을 치료 시기에 따라 분류하였을때 말초혈액단핵구의 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 분비능이 차이가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1999년 5월 이후 서울대학교병원 병실 및 외래에서

폐결핵으로 확진된 환자들 중 전형적인 임상소견을 보이는 29명의 환자들을 대상으로 하였다. 이 환자들은 모두 일차 항결핵제제를 사용하였으며 모든 약제에 감수성이 있는 결핵균에 의한 폐결핵에 이환되어 있었다. 총 29명의 환자 중 남자는 21명으로 남녀비는 2.6대 1이었고 연령의 중앙값은 39세였다. 폐결핵은 주로 객담 항산균 도말, 배양 검사로 진단하였다(Fig. 1). 환자들을 그 치료 시점에 따라 분류하여보면 치료 시작 전 환자 5명, 치료 시작 후 4개월 이내의 환자 11명, 4개월에서 치료 종결 전까지의 환자 6명, 치료 종결 후의 환자가 7명이었다.

### 2. 방 법

#### 1) 말초혈액단핵구의 분리 및 자극

환자의 말초혈액 12ml로부터 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA)를 이용하여 말초혈액단핵구를 분리하여 96개의 칸이 있는 세포배양용기에  $2.5 \times 10^5$ 개씩 분주하였고 배지는 RPMI에 10%의 자가혈청과 29.94mg/ml의 penicillin을 섞은 것을 사용하였다. 이들 중 일부에는

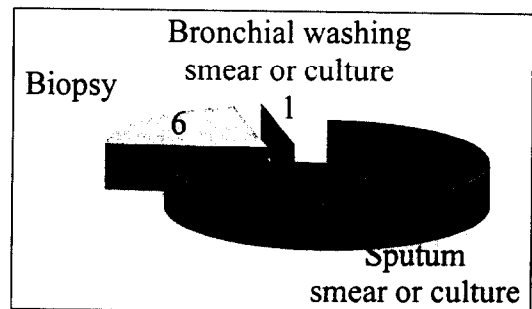


Fig. 1. Diagnostic methods of 29 patients with pulmonary tuberculosis.

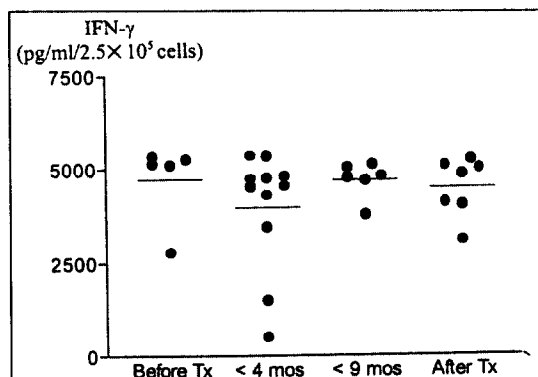


Fig. 2. Levels of IFN- $\gamma$  after stimulation by phytohemagglutinin. No difference was observed between (among the) four groups ( $p=0.55$ ).

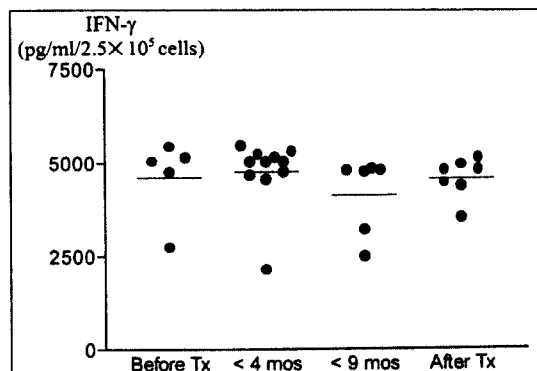


Fig. 3. Levels of IFN- $\gamma$  after stimulation by purified protein derivative. No difference was observed between (among the) four groups ( $p=0.65$ ).

phytohemagglutinin(PHA, Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA)를  $10\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 첨가하였고 다른 일부에는 purified protein derivative (PPD, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)를 역시  $10\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 넣어주었다. PHA를 첨가한 것들은 72시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 배양하였고 PPD를 넣어준 것들은 같은 조건에서 120시간 동안 배양한 후 상층액을 분리하여  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

## 2) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 측정

Coating 항체(Endogen, Boston, USA)와 detecting 항체(Endogen, Boston, USA)를 이용하여 ELISA 방법으로 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 측정하였다.

## 3) 통계분석

각군의 비교에는 ANOVA test를 사용하였으며  $p$ 값이 0.05이하인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결 과

### 1. IFN- $\gamma$ 의 분비능

PHA로 자극하였을 경우 IFN- $\gamma$ 의 분비능은 치료시작 전 환자군, 치료 시작 후 4개월 이내의 환자군, 4개월에서 치료 종결 전까지의 환자군, 치료 종결 후의 환자군에서 각각  $4713 \pm 1092\text{pg/ml}$ ,  $3971 \pm 1573\text{pg/ml}$ ,  $4676 \pm 473\text{pg/ml}$ ,  $4459 \pm 772\text{pg/ml}$ 로 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p=0.55$ , Fig. 2). 한편 PPD로 자극한 경우는 각각의 군에서  $4612 \pm 1083\text{pg/ml}$ ,  $4750 \pm 909\text{pg/ml}$ ,  $4125 \pm 1039\text{pg/ml}$ ,  $4553 \pm 534\text{pg/ml}$ 으로 역시 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p=0.60$ , Fig. 3).

### 2. TNF- $\alpha$ 의 분비능

PHA로 자극하였을 경우 TNF- $\alpha$ 의 분비능은 치료시작 전 환자군, 치료 시작 후 4개월 이내의 환자군, 4개월에서 치료 종결 전까지의 환자군, 치료 종결 후의 환자군에서 각각  $324 \pm 139\text{pg/ml}$ ,  $530 \pm 309\text{pg/ml}$ ,  $321 \pm 168\text{pg/ml}$ ,  $372 \pm 203\text{pg/ml}$ 로 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p=0.26$ , Fig. 4). 한편 PPD로 자극한 경우는 각각의 군에서  $360 \pm 385\text{pg/ml}$ ,  $411 \pm 338\text{pg/ml}$ ,  $204 \pm 136\text{pg/ml}$ ,  $179 \pm 87\text{pg/ml}$ 으로 역시 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p=0.27$ , Fig. 5).

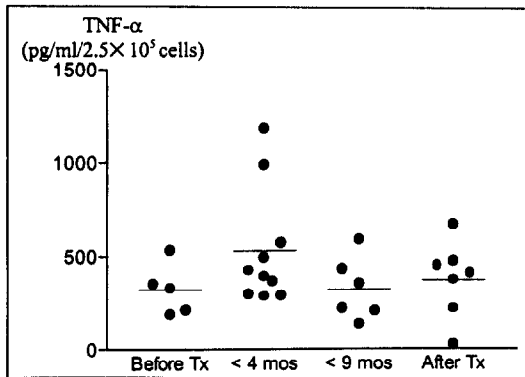


Fig. 4. Levels of TNF- $\alpha$  after stimulation by phytohemagglutinin. No difference was observed between (among the) four groups ( $p=0.26$ ).

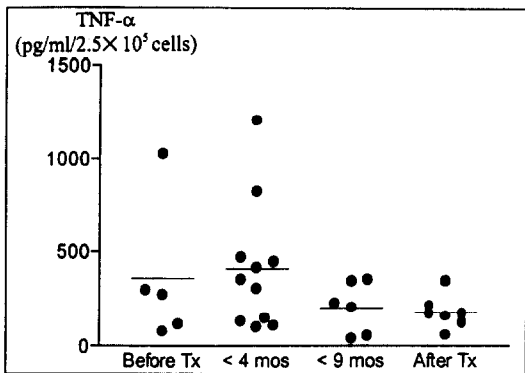


Fig. 5. Levels of TNF- $\alpha$  after stimulation by purified protein derivative. No difference was observed between (among the) four groups ( $p=0.27$ ).

## 고 찰

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 는 항결핵작용에서 중추적인 역할을 하는 cytokine으로 알려져있다. IFN- $\gamma$  혹은 IFN- $\gamma$  파괴시킨 쥐의 경우에는 *Mycobacterium bovis*에 의한 감염을 이겨낼 수 없다는 보고가 있었고<sup>8,9</sup> 비결핵성 항산균에 의한 전신 파종성 감염이 있는 환자들에서 IFN- $\gamma$  수용체 유전자의 점돌연변이에 의한 수용체 기능이상이 발견되기도 하여<sup>10</sup> 결핵에 대한 면역

반응에서의 그 중요성이 입증되었으며 본 교실에서도 전신적으로 결핵이 퍼져 결국 사망했던 한 환자에서 IFN- $\gamma$ 의 분비능의 저하와 수용체의 숫적 감소를 보고한바 있다<sup>11</sup>. TNF- $\alpha$ 의 경우에는 사람이나 쥐의 대식세포에 이를 첨가하면 이들 세포의 항결핵작용이 증강된다는 사실과<sup>3,12</sup> 항TNF 항체를 주입하면 육아종형성과 결핵균 제거에 지장을 초래한다는 보고가<sup>4</sup> 항결핵반응에서의 TNF- $\alpha$ 의 중요성을 입증한다고 할 수 있다.

IFN- $\gamma$ 의 경우 결핵으로 진단받은 일부의 환자에서 그 분비능이 감소해 있고<sup>5</sup> 항결핵화학요법을 시행함에 따라 그 분비능이 차차 회복된다는 보고는<sup>13,14</sup> 몇 차례 있었다. 그러나 TNF- $\alpha$ 의 경우는 폐결핵에 이환된 환자들에서 그 분비능이 정상인보다 증가되어있다는 것은 밝혀져있지만<sup>6,7</sup> 과연 이 증가된 분비능이 치료함에 따라 어떻게 변하는지는 아직까지 알려져있지 않다.

본 연구에서는 전형적인 폐결핵에 이환되어 치료를 받는 환자들을 그 치료 시점에 따라 분류하여 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비능의 차이를 비교하여 보았는데 치료 전과 치료하는 도중, 그리고 치료를 마친 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 결과를 얻었다. 하지만 폐결핵에 이환되기 전의 환자들의 분비능을 알 수 없기 때문에 이 결과는 두 가지로 해석할 수 있다. 첫째, 폐결핵에 이환되기 전보다 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비능이 저하된 상태가 적절한 치료에도 불구하고 장기적으로 회복이 되지 않았을 가능성과 둘째, 폐결핵에 이환되더라도 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비능이 저하되지 않는다고 해석할 수도 있다. 이 두가지 가설 중 어느 것이 맞는지는 추후 몇 년에 걸치니 장기적인 추적 관찰로서 확인할 수 있을 것이다. 또한 이번 연구는 동일한 환자의 분비능을 지속적으로 검사한 점이 아니라는 단점이 있으므로 치료와 관련된 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비능의 변화를 정확히 확인하려면 같은 환자를 대상으로 한 추적 관찰이 요구되는 상황이다. 특히 Zhang등의 연구에서도 확인할 수 있는 것처럼<sup>14</sup> IFN- $\gamma$ 의 분비능의 기저치는 사람마다 크게 달라 본 연구

대상이 된 환자들 중에서 IFN- $\gamma$ 의 기저치가 5pg/ml 이하로 전혀 측정이 안 되는 경우도 있지만 기저치가 2580pg/ml에 이르는 경우도 있어 서로 다른 환자들로 이루어진 군들의 값을 평균한다면 실제 차이를 회색시킬 수도 있을 것이며 이는 TNF- $\alpha$ 의 경우도 동일할 수 있다는 사실을 염두에 두어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구의 결과는 폐결핵의 치료시점에 따른 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 분비능의 차이를 확인할 수 없었다고 요약할 수 있다.

## 요 약

### 배 경 :

결핵에 대한 인체의 면역반응의 근간을 이루는 것은 대식세포가 결핵균을 탐식하여 사멸시키는 것이다. 이 과정에는 Interferon-gamma(IFN- $\gamma$ )와 Tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )가 중요한 역할을 한다. 저자들은 phytohemagglutinin(PHA) 혹은 purified protein derivative(PPD)에 의한 말초혈액 단핵구의 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 분비능이 폐결핵 환자들에서 치료함에 따라 어떻게 변화하는지를 살펴보고자 하였다.

### 방 법 :

폐결핵으로 확진되었고 전형적인 임상상을 보이는 치료시작 전 환자 5명, 치료시작 후 4개월이내의 환자 11명, 치료시작 후 4개월에서 9개월 사이의 환자 6명 그리고 치료를 종료한 환자 7명을 대상으로 하였다. 환자의 말초혈액 단핵구를 분리하여 PHA와 PPD로 자극한 후 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 측정하여 서로 비교하였다.

### 결 과 :

각 군간에 PHA와 PPD로 자극한 후 말초혈액 단핵구의 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 분비능은 차이가 없었다.

### 결 론 :

전형적인 임상상을 보이는 폐결핵환자에서 그 치료시점에 따른 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 분비능의 차이는 없었다.

## 참 고 문 헌

1. Flesch IE, Kaufmann SHE. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon activated bone marrow macrophage. *Infect Immun* 1991;59:3213-8
2. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophage. *J Exp Med* 1992;175:1111-22
3. Flesch IEA, Kaufmann SHE. Activation of tuberculostatic macrophage functions by  $\gamma$  interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1990;58:2675-77
4. Kindler V, Sappino A-P, Grau GE, Pignet PF, Vasalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989;56:731-40
5. Onwubalili JK, Scott GM, Robinson JA. Deficient immune interferon production in tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1985;59:405-13
6. Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimoto S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 1990;58:3286-92
7. Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S. Increase in tumor necrosis factor alpha-and interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991;59:3021-25
8. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. *Science* 1993;259:1739-42
9. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S,

- Aguet M et al. Mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor have profoundly altered responses to infection with bacillus Calmette-Gurin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993;178:1435-40
10. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M. A mutation in the interferon- $\gamma$ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335:1941-9
11. 이재철, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수. 난치성 결핵 환자의 단핵구에서의 IFN- $\gamma$  활성화 효과 및 IFN- $\gamma$  수용체의 숫적 변화에 대한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1999;47:304-10
12. Bermudez LEM, Young LS. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN- $\gamma$ , is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol* 1998;140:3006-13
13. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S et al. Depressed T-cell interferon- $\gamma$  responses in pulmonary tuberculosis: Analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 1999;180:2069-73
14. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;65:3231-4
-