

# 건강인에서 NK세포 자극 후와 T세포 자극 후 분비된 Interferon-gamma 농도의 비교

## Comparison of Interferon-gamma Secretion by Stimulated NK Cells and T cells from Healthy Subjects

안규대<sup>1</sup> · 김경희<sup>1</sup> · 임현호<sup>1</sup> · 김민찬<sup>2</sup> · 이상엽<sup>3</sup>

Gyu-Dae An, M.D.<sup>1</sup>, Kyeong-Hee Kim, M.D.<sup>1</sup>, Hyeon-Ho Lim, M.D.<sup>1</sup>, Min-Chan Kim, M.D.<sup>2</sup>, Sang Yeob Lee, M.D.<sup>3</sup>

동아대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 외과학교실<sup>2</sup>, 내과학교실<sup>3</sup>

Departments of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Surgery<sup>2</sup>, and Rheumatology<sup>3</sup>, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) is an important cytokine produced by natural killer (NK) cells and T cells in response to various stimuli. The levels of IFN- $\gamma$  secreted after stimulation of NK cells using a recombinant cytokine is represented as one of functions of NK cells. Recently, a method for evaluating NK cell activity in whole blood samples was developed. The levels of IFN- $\gamma$  secreted after NK cell stimulation with PROMOCA<sup>TM</sup> (ATGen, Korea) and T cell stimulation with phytohemagglutinin (PHA) were compared using two different commercial kits: NK Vue Gold (ATGen, Korea) and QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Cellestis, Australia). Participants included 43 healthy individuals. Whole blood samples were incubated with either PROMOCA, a recombinant cytokine that specifically activates NK cells, or with PHA. IFN- $\gamma$  levels in the supernatants were measured by ELISA. The level of IFN- $\gamma$  by PROMOCA stimulation (PROMOCA IFN- $\gamma$ ) was more varied than that by stimulation with PHA (PHA IFN- $\gamma$ ) (median 1,544.4 pg/mL [range 193.7–2,530.9] vs. median 2,470.1 pg/mL [2,250.1–2,874.4]  $P=0.0001$ ). The median of PHA IFN- $\gamma$ /PROMOCA IFN- $\gamma$  ratio was 1.9 (1.1–12.4). There was a significant difference in levels of IFN- $\gamma$  secreted after stimulation with PROMOCA or PHA in the healthy population.

**Key Words:** Natural killer cells, Interferon-gamma, Phytohemagglutinin, ELISA, PROMOCA

Natural Killer (NK)세포는 림프구 아형의 하나로 사전 면역조치 (previous priming)가 없어도 악성세포나 바이러스에 감염된 세포를 죽일 수 있는 면역세포이다[1]. NK세포 활성도의 측정은 세포독성(cytotoxicity)의 측면을 평가하거나 싸이토카인 분비능력을 측정하는 방법들이 있다[2-5]. 최근에 전혈에서 세포 분리 과정 없이 NK세포 자극 후에 분비되는 interferon (IFN)- $\gamma$ 를 ELISA 방법으로

측정하여 활성도를 평가하는 간단한 방법이 개발되었다[6]. 이 검사는 PROMOCA<sup>TM</sup>라는 NK세포를 자극시킬 수 있는 재조합 싸이토카인이 코팅되어 있는 특수한 시험관을 사용한다. Phytohemagglutinin (PHA)는 red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)의 lectin으로 림프구를 자극하여 분열을 일으킬 수 있어서 mitogen으로 처음 발견되었다[7]. 뒤이어 PHA를 신선한 인체 백혈구와 함께 배양시키면 interferon-like antiviral activity가 관찰된다고 보고되었다[8]. PHA는 T cell receptor에 결합해서 resting T세포를 자극하여 IFN- $\gamma$ 를 분비할 수 있다[9, 10]. 이러한 점을 응용하여 interferon-gamma release assay (IGRA)에서는 불충분한 IFN- $\gamma$  분비를 감지할 수 있는 양성대조물질로 이용되어 왔다[11]. 본 연구는 건강인을 대상으로 NK세포 자극을 위해 PROMOCA가 사용되는 NK Vue Gold kit 검사 시에 추가로 양성대조물질의 역할로써 PHA가 들어있는 튜브를 사용하여 분비된 IFN- $\gamma$  양을 각각 비교해 보고자 하였다.

NK세포 활성도에 영향을 미칠 수 있는 약물 복용력이 없는 건강한 지원자 43명을 대상으로 하였다. PROMOCA 자극 후 분비된

**Corresponding author:** Kyeong-Hee Kim

Department of Laboratory Medicine, Dong-A University College of Medicine, Dong-A University Hospital, 26 Daeshingongwon-ro, Seo-gu, Busan 49202, Korea

Tel: +82-51-240-2850, Fax: +82-51-255-9366, E-mail: progreen@dau.ac.kr

Received: February 20, 2017

Revision received: June 7, 2017

Accepted: June 21, 2017

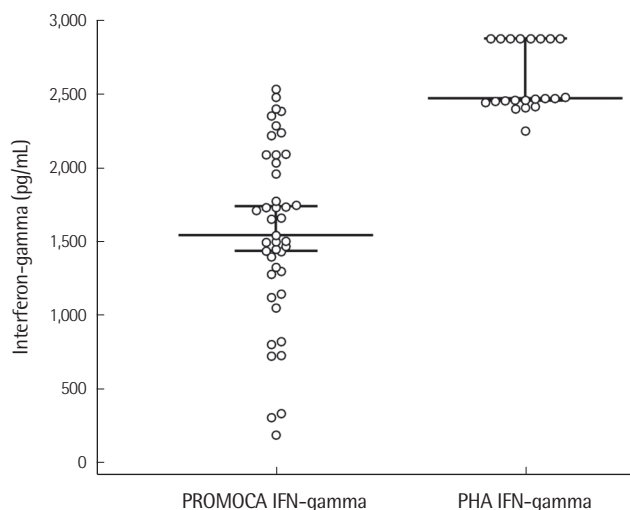
This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2018, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

IFN- $\gamma$ 는 NK Vue Gold kit (ATGen Co., Korea)를 이용하여 측정하였고, PHA 자극 후 분비된 IFN- $\gamma$ 는 QuantiFERON-TB Gold In-Tube kit (QFTGIT; Cellestis, Carnegie, Australia) 내의 PHA가 코팅되어 있는 mitogen 튜브를 사용하였다. 각각 전용 용기인 PROMOCA-Gold 튜브와 mitogen 튜브에 1 mL씩 채혈하고 혈액을 부드럽게 혼합하였다. 채혈 후 30분 이내에 37°C 배양기에 20–24시간 세워서 배양하였다. 배양 후 각각 상층액의 IFN- $\gamma$  농도 검사는 NK Vue Gold kit 내의 IFN- $\gamma$  측정 ELISA 키트를 동일하게 이용하였고, 제조사의 지침대로 시행하였다. ELISA 흡광도는 CODA microplate processor (Biorad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. IFN- $\gamma$ 값은 2,000 pg/mL, 500 pg/mL, 125 pg/mL, 0-blank로 희석한 4가지 표준액으로부터 표준곡선을 생성한 후 결과를 계산하여 얻었다. 음성대조물질과 양성대조물질이 모두 적정 범위 안에 있는 것을 확인하였다. 통계 분석은 MedCalc Software (ver.16.8, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하였다.

건강인군의 평균 연령은  $43.2 \pm 9.7$ 세(범위 25–65)이었고, 남녀 비율은 20:23이었다. PROMOCA 자극 후 IFN- $\gamma$  중앙값(범위)은 1,544.4 (193.7–2,530.9) pg/mL이었고, PHA 자극 후 IFN- $\gamma$  중앙값(범위)은 2,470.1 (2,250.1–2,874.4) pg/mL이었다. 두 중앙값은 통계적으로 유의한 차이를 보였으며( $P=0.0001$  by Mann-Whitney test), PROMOCA 자극 후 IFN- $\gamma$  수치의 분포는 매우 다양하였지만, PHA 자극 후 IFN- $\gamma$  수치는 좁은 범위 내에 있었다(Fig. 1). 모든 지원자에서 PHA 자극 후 IFN- $\gamma$  수치는 PROMOCA 자극 후 IFN- $\gamma$  수치보다 항상 높았으며 PHA IFN- $\gamma$ /PROMOCA IFN- $\gamma$ 의 중앙값(범위)은 1.9 (1.1–12.4)이었다. PROMOCA 자극 후 IFN- $\gamma$  양과 PHA 자극 후 IFN- $\gamma$  양은 양의 상관관계에 있었으나 통계적으로 유의하지는 않

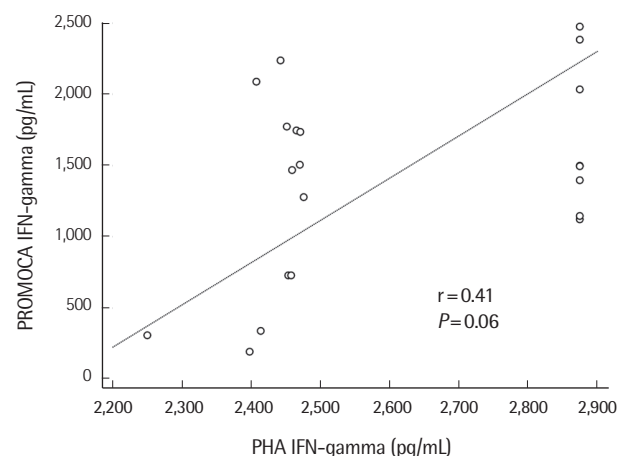


**Fig. 1.** Comparison of levels of IFN- $\gamma$  secretion between PROMOCA stimulation and PHA stimulation ( $P=0.0001$  by Mann-Whitney test). Horizontal bar indicates 95% confidence interval for the median.

았다( $r=0.41$ ,  $P=0.06$ ) (Fig. 2). PROMOCA 자극 후 IFN- $\gamma$  양은 남성 중앙값(범위)은 1,854.1 (823.0–2,476.6) pg/mL이었고, 여성 중앙값(범위)은 1,450.1 (193.7–2,530.9)로 차이가 관찰되었지만( $P=0.01$ ), PHA 자극 후 IFN- $\gamma$  양은 성별에 따른 차이가 없었다( $P=0.13$ ).

NK세포 활성도의 측정은 성숙된 NK세포의 기능에 따라서 다양하게 평가할 수 있다. 세포독성(cytotoxicity)의 측면을 평가하는 검사로는 전통적인 Chromium 51 release assay [2]와 flow cytometry-based NK cytotoxicity assay [3, 4]가 있다. NK세포의 싸이토카인 분비능력을 측정하는 검사로 CD107a degranulation assay [5], intracellular cytokine staining assay 등이 있다. 이러한 검사들은 방사선동위원소를 사용해야 하거나 전혈로부터 NK세포를 분리하여야 하는 단점이 있다. 본 연구에 이용된 NK Vue Gold kit 검사는 전혈을 배양한 후 ELISA 측정기를 이용하기 때문에 말초단핵구 분리나 K562세포주의 배양, 유세포분석과 같은 복잡한 과정을 피할 수 있어 사용이 편리한 장점이 있다.

결핵균 특이 IGRA 검사에서 관찰되는 미결정(Indeterminate) 결과는 대부분 PHA에 대한 부적절한 IFN- $\gamma$  분비로 인한 것으로 면역결핍 환자에서 빈번하게 관찰된다[12, 13]. CD4 T 림프구의 심한 감소를 가진 HIV-1 감염환자에서 indeterminate QuantiFERON-TB Gold In-Tube 검사 결과를 보이는 환자는 determinate 결과를 보인 환자보다 불량한 예후를 보인다는 연구 결과가 있었다[14]. 이처럼 PHA 자극 후 T 림프구에 의해 분비된 IFN- $\gamma$  수치를 측정하는 것은 T세포 기능의 전반적인 평가에 이용될 수 있다. 또한 IGRA와 유사하게 NK Vue Gold kit에 의한 NK세포 기능 검사의 양성대조 역할을 할 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구는 최초로 건강인에서 PROMOCA 자극과 PHA 자극 후 분비된 IFN- $\gamma$  수치의 차이를 비교한 것이다. 만약 건강인이 NK Vue Gold 검사를 PHA 자극과 함께 시행하였을 때 PHA 튜브에서 분비된 IFN- $\gamma$  수치가 감소



**Fig. 2.** Pearson correlation for levels of IFN- $\gamma$  secreted after PROMOCA stimulation and PHA stimulation.

되어 있다면 분석 전의 변동성(pre-analytic variability)을 의심해 볼 수 있을 것이다. IGRA 검사는 분석전의 변동성이 영향을 미치는 것으로 보고되어 있으며 NK Vue Gold 검사도 유사한 분석 형식을 가지기 때문이다[15]. IL-2, IL-12, IL-15의 조합에 의한 싸이토카인 자극으로 CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK세포에서 IFN- $\gamma$  생성이 유도된다는 보고가 있었다[16]. 단독 분리된 T세포, B세포, NK세포 및 단구를 PROMOCA와 함께 48시간 배양했을 때 NK세포 배양 상층액에서 의미 있게 높은 IFN- $\gamma$ 가 측정되어, PROMOCA 자극 후 분비되는 IFN- $\gamma$ 는 주로 NK세포 유래임을 알 수 있다[6]. 본 연구에서 PHA 자극 후 분비된 IFN- $\gamma$  수치에 비해 PROMOCA 자극 IFN- $\gamma$  수치는 개인 간의 차이가 매우 컸다. 이는 NK세포의 cytotoxic activity를 측정하였던 연구에서도 개인 간의 차이가 10%에서 90%까지 다양하게 관찰된 것과 일치하였다[17]. 또한 Lim 등의 연구에서 정상인 대조군 40명을 대상으로 NK Vue 검사를 시행하여 333–2,000 pg/mL의 결과를 보고한 것과 유사하다[18]. 다만 본 연구에서는 2,000 pg/mL 초과하는 값도 수치로 계산하여 상한 값이 차이가 난다. Hou 등은 IL-12로 자극한 말초단핵구 배양 상층액의 IFN- $\gamma$ 값은 평균 330.4 pg/mL (2.5th–97.5th percentile: 41.4–717.8)로 보고하였다[19]. 본 연구보다 낮은 농도의 IFN- $\gamma$ 를 보였는데, 전혈과 말초단핵구 배양의 차이, 자극에 이용된 싸이토카인 종류 및 농도나 IFN- $\gamma$  측정에 이용된 ELISA 키트의 차이 등으로 설명할 수 있겠다. Lim 등의 연구에서는 성별 간의 차이는 없었지만 본 연구에서는 남자가 높게 관찰되었다. 이는 적은 검체 수에서만 관찰한 것으로 성별 간 차이를 단정할 수 없으므로 더 많은 검체를 이용한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

NK세포 활성도가 암 발생 및 예후와 밀접한 관계를 보인다는 연구 발표들이 있다. 일반인 집단의 11년 추적 관찰 연구에서 전통적인 Chromium 51 release assay로 측정한 NK세포 활성도가 낮은 그룹에서 암 발생의 증가가 관찰되었다고 보고되었다[17]. 전립선암 환자에서 진행병기가 높아짐에 따라 NK세포 자극 IFN- $\gamma$  수치가 의미 있게 낮아진다고 보고되었다[20]. 또한 대장암 환자에서 건강인 대조군에 비해 NK세포 자극 IFN- $\gamma$  수치가 의미 있게 낮았다는 보고도 있다[6]. 최근에는 암 면역치료 영역에서 NK세포를 이용한 치료가 활발하게 진행되고 있다[21, 22]. 향후 암과 관련된 예후 추정이나 모니터링에 이러한 싸이토카인 자극을 이용한 면역세포의 기능적 검사들이 필요하게 될 것이다. 특히 본 연구에서 사용된 검사는 전혈을 이용하여 검사실에서 손쉽게 수행할 수 있는 장점이 있으며, PROMOCA를 이용하여 NK세포를 자극하는 것 외에도 PHA를 이용하여 T세포의 싸이토카인 분비 기능까지 추가적으로 평가하여 검사의 양성대조 역할까지 가능하였다. 이번 연구의 결과는 면역학적 검사의 기초 자료로 건강인 데이터를 제공하는 데 의의가 있다.

## REFERENCES

1. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-9.
2. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;4:181-96.
3. Jang YY, Cho D, Kim SK, Shin DJ, Park MH, Lee JJ, et al. An improved flow cytometry-based natural killer cytotoxicity assay involving calcein AM staining of effector cells. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42:42-9.
4. Yamashita M, Kitano S, Aikawa H, Kuchiba A, Hayashi M, Yamamoto N, et al. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flowcytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep* 2016;6:19772.
5. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004; 294:15-22.
6. Lee SB, Cha J, Kim IK, Yoon JC, Lee HJ, Park SW, et al. A high-throughput assay of NK cell activity in whole blood and its clinical application. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;445:584-90.
7. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960;20:462-6.
8. Wheelock EF. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965;149:310-1.
9. Chilson OP, Boylston AW, Crumpton MJ. Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J* 1984;3:3239-45.
10. Billiau A and Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:97-113.
11. Woo KS, Choi JL, Kim BR, Kim JE, Kim BG, Lee H, et al. Significance of interferon-gamma response to mitogen in serial QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay of routine laboratory practice. *Clin Chim Acta* 2014; 430:79-83.
12. Lange B, Vavra M, Kern WV, Wagner D. Indeterminate results of a tuberculosis-specific interferon gamma release assay in immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2010;35:1179-82.
13. Fabre V, Shoham S, Page KR, Shah M. High proportion of indeterminate QuantiFERON-TB Gold In-Tube results in an inpatient population is related to host factors and preanalytical steps. *Open Forum Infect Dis* 2014;1:ofu088.

14. Aichelburg MC, Tittes J, Breitenacker F, Reiberger T, Kohrgruber N, Rieger A. Prognostic value of indeterminate IFN- $\gamma$  release assay results in HIV-1 infection. *J Clin Microbiol* 2012;50:2767-9.
15. Banaei N, Gaur RL, Pai M. Interferon gamma release assays for latent tuberculosis: What are the sources of variability? *J Clin Microbiol* 2016; 54:845-50.
16. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:728-32.
17. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356:1795-9.
18. Lim YA, Kim SS, Cho SW, Cheong JY. Evaluation of the effectiveness of NK Vue Gold kit in patients with chronic hepatitis B. *J Lab Med Qual Assur* 2016;38:151-8.
19. Hou H, Mao L, Wang J, Liu W, Lu Y, Yu J, et al. Establishing the reference intervals of NK cell functions in healthy adults. *Hum Immunol* 2016;77:637-42.
20. Koo KC, Shim DH, Yang CM, Lee SB, Kim SM, Shin TY, et al. Reduction of the CD16(-)CD56bright NK cell subset precedes NK cell dysfunction in prostate cancer. *PLoS One* 2013;8:e78049.
21. Dahlberg CI, Sarhan D, Chrobok M, Duru AD, Alici E. Natural killer cell-based therapies targeting cancer: possible strategies to gain and sustain anti-tumor activity. *Front Immunol* 2015;6:605.
22. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 2016;17:1025-36.