

□ 원 저 □

Interferon- γ 가 사람 폐포대식세포의 결핵균 탐식과 활성화에 미치는 영향*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 폐연구소

박재석**, 김재열, 이귀래***, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

The Effect of IFN- γ on the Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* and Activation of Human Pulmonary Alveolar Macrophage

Jae Seuk Park, M.D., ** Jae Yeal Kim, M.D., Gwi Lae Lee, M.D., **Chul Gyu Yoo, M.D.,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

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

Background : IFN- γ is known to activate mononuclear phagocytes and to mediate host defense mechanism against some intracellular microorganisms, but little is known about anti-mycobacterial activity and mechanism of IFN- γ in human. In this study, we investigated the role of IFN- γ in the pathogenesis of tuberculosis by observing the effect of IFN- γ on the phagocytosis of *M.tuberculosis*(MTB) and on the production of TNF- α by human pulmonary alveolar macrophage.

Method : Pulmonary alveolar macrophage(PAM) were prepared with adhesion purification method from bronchoalveolar lavage fluid obtained from 8 persons without active lung lesion and cultured(1×10^6 cells/ml) with MTB(3×10^7 bacteria/ml) with or without IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml) and autologous serum(10 %). After 2 hours, the percentage of PAM-phagocytosed MTB was counted after AFB staining(modified Kynion method). TNF- α production by PAM stimulated by IFN- γ (300U/ml), MTB(1×10^6 bacteria/ml) and LPS(0.5ug/ml) for 24hours was measured in culture supernatant using ELISA method. The degree of phagocytosis of MTB by PAM stimulated with IFN- γ (300U/ml) and LPS(0.5ug/ml) for 24hours was also investigated.

Results : IFN- γ did not influence the phagocytosis of MTB by PAM(percentage of PAM-phagocytosed

*본 연구는 1996년도 보건 의료기술 연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임

**현 주소는 단국대학교 의과대학 내과학교실

***현 주소는 보훈병원 내과

MTB : control : 22.1 ± 4.9 , IFN- γ : 20.3 ± 5.3) and did not increase TNF- α production by PAM(control : 21 ± 38 pg/ml, IFN- γ : 87 ± 106 pg/ml), and the degree of phagocytosis of MTB by PAM pre-stimulated with IFN- γ for 24 hours, was not increased (control : 24.5 ± 9.5 , IFN- γ : 23.4 ± 10.1).

Conclusion : IFN- γ does not influence on the phagocytosis of MTB and TNF- α production by PAM.

Key words : IFN- γ , Phagocytosis, TNF- α , Mycobacterium tuberculosis

서 론

최근들어 강력한 항결핵 약제의 출현과, 적극적인 결핵관리로 결핵 환자가 현저히 감소하였으나, 제7차 전국결핵실태조사 결과에 따르면, 1995년 현재 활동성 폐결핵 환자가 전체 인구의 1.0% (42만 9천명)로 아직도 우리나라의 결핵 유행율은 구미 선진국에 비해 매우 높은 수준을 유지하고 있다¹⁾. 그리고 대부분의 결핵 환자는 약물치료에 잘 반응하지만 적절한 약물치료에도 불구하고 균 음전에 실패하는 경우를 임상에서 종종 경험하게 되며 이들 환자의 치료에 있어서 큰 어려움을 겪고 있다. 최근 면역학의 발달과 결핵의 발병 기전에 대해 일부 알려짐에 따라²⁾, 이들 난치성 결핵 환자들에 대해 항 결핵 약물치료와 더불어 숙주의 방어기전을 증강시켜주는 면역치료(immunotherapy)에 관한 관심이 늘어나고 있다^{3,4)}. IFN- γ 는 활성화된 T-임파구와 natural killer cell에서 분비되어^{5,6)}, 단핵식세포를 자극하여 활성화시키는 대표적인 cytokine으로 Legionella⁷⁾, Leishmania⁸⁾등과 같은 세포내 병원균(intracellular pathogen)에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다. 그래서 이들과 같은 세포내 병원균인 결핵균에 대한 IFN- γ 의 역할에 대한 연구가 많이 진행되었으며 실제 임상에서 비결핵성 항산균(nontuberculous mycobacteria)에 감염된 환자에 대해서 IFN- γ 를 투여하여 효과를 보았다는 보고도 있다^{9,10)}. 그러나 쥐의 대식세포(murine macrophage)에서는 IFN- γ 가 항결핵 효과가 있는 것이 증명되었지만³⁾, 사람 대식세포에서의 IFN- γ 의 항 결핵 효과에 대해서는 아직도 논란이 많다. 심지어 결핵균의 증식을 억제한다는 연구

결과와^{11,12)}, 결핵균의 증식을 촉진시킨다는¹³⁾ 서로 상반된 연구 결과도 나와 있는 실정이다.

결핵의 발병기전을 보면 작은 비말핵(droplet)의 형태로 흡기시 기도를 통해 들어온 결핵균은 감염 초기에 폐포대식세포에 탐식되며 이어서 T-임파구와 단핵식세포를 주축으로 하는 세포매개성 면역기전을 주축으로 하는 숙주의 방어기전에 의해 결핵균이 억제되는데, 결핵균의 독성이 강하거나 숙주의 방어기전에 장애가 있을 경우 결핵균이 증식하여 임상적으로 문제가 되는 병으로 진행하게 된다. 그러므로 결핵의 발병 기전은 크게 대식세포에 의한 탐식 단계와 탐식 후의 단계로 나누어 볼 수 있다. 지금까지 알려진 바에 의하면 단핵식세포에 의한 결핵균의 탐식은 신선 혈청(fresh serum)의 존재하에서 항진되는데, 혈청속에 존재하는 보체(complement)와 결합한 결핵균이 단핵식세포의 보체수용체(complement receptor 3 or 4)와 결합하여 탐식되게된다(opsonic phagocytosis)¹⁴⁾. 그러나 결핵감염의 초기의 경우, 폐포에 염증이 없고, 이 경우 폐포액(bronchoalveolar fluid)에는 보체에 의한 탐식을 증가시킬 만큼 많은 양의 serum opsonin이 존재하지 않으므로 폐포대식세포에 의한 결핵균 탐식에 있어서 보체이외의 다른 기전(non-opsonic phagocytosis)에 의한 것으로 생각되고 있지만 그 자세한 기전은 아직 알려져 있지 않으며¹⁵⁾, 폐포대식세포에 의한 결핵균의 탐식에 미치는 IFN- γ 의 역할에 대해서도 알려진 바가 없다.

결핵의 발병기전의 두 번째 단계인 대식세포에 의한 결핵균의 탐식 후의 단계는 T-임파구와 단핵식세포를 주축으로 하는 숙주의 방어기전과 결핵균의 독성에 의해 결정되는데, TNF- α 는 활성화된 단핵식세포에서

분비되며 결핵균의 증식을 억제하며¹⁵⁾, 결절(tubercle)의 형성에 관여하는 등¹⁷⁾, 결핵에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있으며 단핵식세포의 항결핵 활성화의 지표로 널리 사용되고 있다. 이에 저자들은 IFN- γ 가 결핵균에 대한 숙주의 방어기전을 증강시키는지 알아보기 위해 결핵의 발병기전의 첫 번째 단계인 폐포대식세포의 결핵균 탐식에 IFN- γ 가 어떤 영향을 미치는지 알아보고, 발병기전의 두 번째 단계인 대식세포의 항 결핵 활성화에 IFN- γ 가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 폐포대식세포를 IFN- γ 로 자극하여 폐포대식세포에서의 TNF- α 분비 정도를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 결핵균

임상검체에서 얻은 약제 감수성 결핵균을 0.05% Tween 80이 들어있는 Middlebrook broth media에 담고 37°C 회전판(rotating plate)위에서 1주간 계대배양하여 얻은 결핵균 부유액을 glass bead로 1분간 vortexing 한 후 15분간 실온에 방치하여 결핵균 덩어리를 가라앉히고 상층액 1/2를 얻어서 water bath에서 80°C에서 20분간 가열하여 살균한 후 분주하여 -70°C 냉장고에 보관하였다. 부유액 속의 결핵균의 농도를 계산하기 위해 가온 살균 직전의 결핵균 부유액의 일부를 생리식염수를 이용해서 10배씩 희석하여 각각을 Middlebrook 7H10 agar plate에서 3주간 배양한 후 colony count를 하여 부유액 속의 결핵균 농도를 계산하였다. 그리고 실험 직전에 결핵균 부유액을 원심분리하여 결핵균 덩어리를 얻고 결핵균 농도에 맞게 RPMI를 첨가하고 ultrasonic cell disruptor로 새로운 결핵균 부유액을 만들어 실험을 하였다.

2. 폐포대식세포의 분리

흉부 방사선 소견상 활동성 폐질환이 없는 8명의 사람에 대해서 구강과 인후부의 미생물에 의한 기관지폐포세척액의 오염을 방지하기 위해 1% povidone iodine으로 gargling한 후 구강을 통해 기관지 내시경을 시행하였다. 기관지내시경을 통해 protected balloon tipped catheter를 우중엽 기관지에 고정시키고 37°C로 미리 가온해 둔 생리식염수를 50ml 씩 주사기를 통해 주입한 뒤 흡인하기를 반복하여 총 100ml의 기관지폐포세척액을 얻어서 두 겹의 거즈에 거른 후 400g로 20분간 원심분리하여 침전된 세포층을 RPMI 1640으로 세척한 후 trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 폐포대식세포의 숫자를 세어서 폐포대식세포의 농도가 1×10^6 cells/ml이 되도록 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, penicillin (100U/ml), streptomycin(100ug/ml)이 첨가되어 있는 RPMI 1640으로 재부유액을 만들어 200ul씩 plastic material이 coating된 chamber slide (Nunc)에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 배양하여 폐포대식세포를 바닥에 부착시키고 RPMI 1640으로 3번 세척하여 상층액과 비흡착세포들을 제거하고 폐포대식세포만 분리하였다.

3. 폐포대식세포의 결핵균 탐식

-70°C 냉장고에 보관하였던 결핵균 부유액을 녹인 후 원심분리하여 Middlebrook broth media를 제거하고 얻은 결핵균 덩어리(pellet)를 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin이 첨가되어 있는 RPMI 1640으로 결핵균의 농도가 3×10^7 bacteria/ml이 되도록 재부유액을 만든 후 ultrasonic cell disruptor로 결핵균 덩어리를 분산시켜서 폐포대식세포가 부착되어 있는

chamber slide에 200ul씩 첨가하고 배양액에 각각 IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml), 그리고 기관지 폐포세척술을 시행한 사람의 정맥혈에서 분리한 혈청 (autologous serum : 10%)을 첨가하여 2시간 배양 후 RPMI 1640으로 3번 세척하여 상층액과 탐식되지 않은 결핵균을 제거하고, chamber slide를 modified Kynion method로 항산성염색을 하여 1000배 유침하에서 결핵균을 탐식한 폐포대식세포의 숫자를 세었다(Fig. 1).

4. 폐포대식세포의 TNF- α 생산

폐포대식세포가 부착되어있는 chamber slide에 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin이 첨가되어 있는 RPMI 1640을 200ul씩 첨가하여 배양하면서 배양액에 IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml), 결핵균(1×10^6 /ml)을 각각 첨가하여 24시간 배양 후 상층액을 원심분리하여 얻은 순수 배양액을 -70°C 에 보관하였다가 ELISA kit(R&D system)를 이용하여 배양액에서의 TNF- α 농도를 측정하였다.

5. IFN- γ 로 자극된 폐포대식세포의 결핵균 탐식능

폐포 대식세포가 부착되어있는 chamber slide에 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin이 첨가되어 있는 RPMI 1640을 200ul씩 첨가하여 배양하면서 배양액에 IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml)를 각각 첨가하여 24시간 배양한 후 RPMI1640으로 3번 세척하여 남아있는 IFN- γ , LPS를 제거한 후 결핵균 부유액(농도 : 3×10^7 bacteria/ml)을 200ul씩 첨가하여 2시간 배양후 RPMI 1640으로 3번 세척하여 상층액과 탐식되지 않은 결핵균을 제거하고, chamber slide를 modified Kynion method로 항산성염색을 하여 1000배 유침하에서 결핵균을 탐식한 폐포대식세포의 숫자를 세었다.

6. 통계 처리

통계학적인 유의성은 Wilcoxon signed rank test로 시행하였다.

결 과

1. IFN- γ 가 폐포대식세포의 결핵균 탐식에 미치는 영향

결핵균을 탐식한 폐포대식세포는 대조군의 경우 22.1 ± 4.9 (평균 \pm 표준편차), IFN- γ 로 자극군의 경우 20.3 ± 5.3 , LPS 자극군의 경우, 22.8 ± 4.8 , 자가혈청 첨가군의 경우 34.9 ± 4.0 로 자가혈청 첨가군에서는 대조군에 비해 유의하게 많았으나($p < 0.01$), IFN- γ 와 LPS자극군에서는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2).

Fig. 1. PAM phagocytosed MTB(after AFB staining).

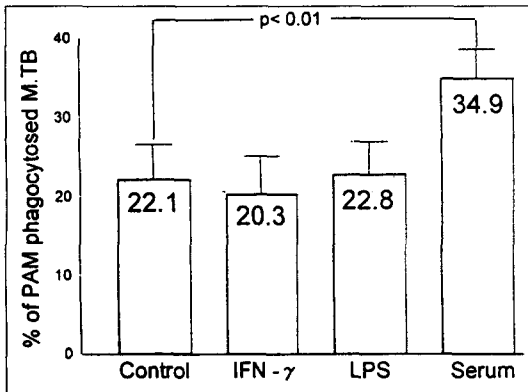


Fig. 2. Effect of IFN- γ , LPS and autologous serum on the phagocytosis of M. TB by PAM(n=8, mean \pm SD).

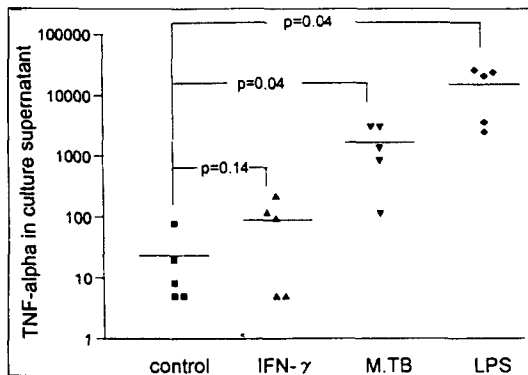


Fig. 3. TNF- α production(pg/ml) by PAM after 24hr stimulation of IFN- γ m M. TB, LPS (n=5).

2. IFN- γ 로 자극된 폐포대식세포의 TNF- α 분비능

폐포대식세포를 24시간 배양 후 상층액에서 측정된 TNF- α 의 농도는 대조군의 경우 21 ± 38 (평균 \pm 표준편차), IFN- γ 자극군의 경우 87 ± 106 , 결핵균 자극군의 경우 1665 ± 1495 , LPS로 자극군의 경우 13108 ± 10999 로 결핵균과 LPS자극군에서는 폐포대식세포의 TNF- α 분비능은 대조군에 비해 유의하게 높았으나($p < 0.05$), IFN- γ 자극군에서는 차이가

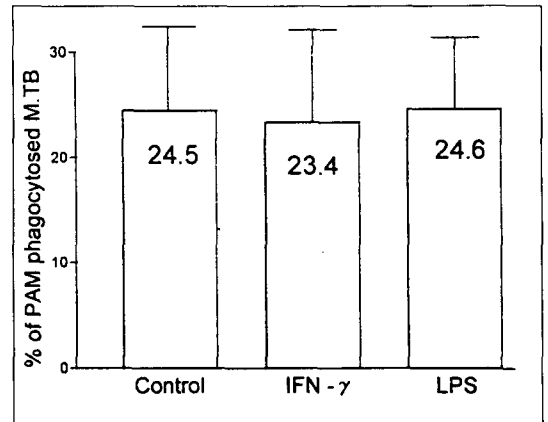


Fig. 4. Phagocytosis of M. TB by PAM after 24hr stimulation with IFN- γ and LPS(n=8, mean \pm SD).

없었다(Fig. 3).

3. IFN- γ 로 자극된 폐포대식세포의 결핵균 탐식

IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml)로 24시간 자극한 폐포대식세포의 결핵균 탐식율은 대조군의 경우 24.5 ± 9.5 (평균 \pm 표준편차), IFN- γ 자극군의 경우 $23.4 \pm 10\%$, LPS 자극군의 경우 $24.6 \pm 8.2\%$ 로 IFN- γ 자극군과 LPS자극군 모두에서 폐포대식세포의 결핵균 탐식율은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 4).

고 찰

IFN- γ 는 T-임파구와 natural killer cell에서 분비되는 glycoprotein으로, 외부에서 유입된 여러 종류의 항원이 major histocompatibility class I 또는 class II 항원과 같이 T-임파구를 자극하여 IFN- γ 의 분비를 증가시키는 것으로 알려져있다. IFN- γ 는 1965년 항바이러스 효과(antiviral activity)가 있다고 밝혀진 이래¹⁸⁾, 면역반응과 염증반응의 거의 모든 과정에 관여하는 중요한 cytokine으로 알려져 있다. 그러므로 IFN- γ 를 투여하여 숙주의 면역학적 방어기전을

증강시키려는 시도가 여러 영역에서 시도되어 왔는데, chronic granulomatous disease 환자에게 IFN- γ 를 투여하여 감염병의 빈도와 중증도를 감소시켰으며¹⁹⁾, visceral leishmaniasis 환자에게 IFN- γ 를 투여하여 임상적 호전을 가져왔었다²⁰⁾. 항 결핵 약물치료에 실패한 난치성 결핵환자의 경우 결핵균에 대한 숙주의 면역기전에 장애가 있을 것으로 생각되어²¹⁾ vitamin D₃를 포함한 여러 가지 방법으로 숙주의 면역기능을 향진시키려는 시도가 있었는데^{3,4)} 이 중에서 IFN- γ 가 면역치료제로 가장 널리 연구되어 왔었다. 사람에게 있어서 결핵의 발병기전을 보면, 결핵균은 작은 비말핵(droplet)의 형태로 흡기시 기도를 통해 들어와서 폐포에 도달하게 되고 이어서 폐포대식세포에 탐식되므로 폐포대식세포는 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에 있어 최선봉을 담당한다고 볼 수 있다. 그러나 결핵균이 이들 대식세포에 인지되어 탐식되는 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 지금까지 알려진 바에 의하면 단핵식세포에 의한 결핵균의 탐식은 신선 혈청(fresh serum)의 존재하에서 향진되며, 이 기전에는 혈청속에 존재하는 보체(complement)에 의해 매개되는데 결핵균과 결합한 보체가 단핵식세포의 보체수용체(complement receptor 3 or 4)와 결합하여 탐식되게된다. 본 연구에서도 자가혈청(autologous serum)이 사람 폐포대식세포에 의한 결핵균의 탐식을 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 자가혈청이 없을 경우에도 어느정도의 결핵균이 탐식되는 것으로 보아 폐포대식세포에 의한 결핵균 탐식에 있어서 보체이외의 다른 기전(non-opsonic phagocytosis)에 의한 것으로 생각되며 실제 결핵감염의 초기의 경우, 폐포에 염증이 없고, 이 경우 폐포액(bronchoalveolar fluid)에는 보체에 의한 opsonic phagocytosis를 증가시킬 만큼 많은 양의 serum opsonin이 존재하지 않으므로 non-opsonic phagocytosis가 더 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 non-opsonic phagocytosis는 opsonic phagocytosis보다 약하며 백서의 대식세포를 이용한 실험에서 결핵균의 non-opsonic 탐식에 적어도 대식세포의 보

체수용체3(complement receptor 3)내에 있는 epitope가 관여한다고 보고는 있지만¹⁵⁾, 아직도 자세한 기전은 알려져 있지 않다. 폐포대식세포에 의한 결핵균의 non-opsonic phagocytosis를 관찰한 본 연구에서 IFN- γ 는 폐포대식세포에 의한 결핵균의 non-opsonic phagocytosis에 영향을 미치지 않았으며, IFN- γ 로 24 시간 자극한 폐포대식세포 또한 자극하지 않은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 4). 대식세포의 강력한 활성화 물질로 알려진 LPS(lipopolysaccharide)로 동시에 시행한 실험에서 또한 폐포대식세포의 결핵균 탐식에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러므로 IFN- γ 의 항 결핵 효과는 결핵의 발병기전에 있어서 첫 번째 단계인 폐포대식세포에 의한 결핵균의 탐식단계보다는 탐식후의 단계에 관여할 것으로 생각된다. TNF- α 는 결핵균을 포함한 여러 종류의 병원균(세균, 기생충, 바이러스)의 자극에 의해 활성화된 단핵식세포에서 분비되는 강력한 cytokine으로 숙주의 면역반응에 관여하여 병원균의 증식을 억제하여 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하지만, 악액질(cachexia), 내독소성 쇼크(endotoxic shock)과 같이 이들 병원균에 감염의 증상을 일으키는 pro-inflammatory, endogenous pyrogen으로도 작용한다. TNF- α 는 특히 결핵균의 증식을 억제하며, 결절(tubercle)의 형성에 관여하며, 단핵식세포를 결핵균이나 결핵균의 세포벽의 구성성분인 Lipoarabinomannan(LAM)으로 자극하였을 때 TNF- α 분비를 증가시키고 TNF- α mRNA 또한 증가시키는 것으로 알려져 있으며²¹⁾, 결핵환자에서 결핵 병변이 있는 부위에 기관지폐포세척술을 시행했을 경우 정상인에 비해 TNF- α 농도가 높게 나오는 것이 알려져있어²²⁾, 결핵에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하며 단핵식세포의 항결핵 활성화의 지표로도 널리 사용되고 있다. 본 연구에서도 결핵균으로 폐포대식세포를 자극했을 경우 TNF- α 의 분비는 대조군보다 많았으나 그람 음성 세균의 구성성분인 LPS로 자극했을 경우 보다는 낮은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 현상은 결핵균의 감염에 있어서 그람 음성 세균에 의한 감염에

비해 pro-inflammatory, endogenous pyrogen으로도 작용하는 TNF- α 의 분비가 적어서 염증반응이 적게 일어나며, 면역반응이 약하게 일어나 결핵균이 잘 제거되지 않는 것을 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 IFN- γ 로 자극하였을 경우 대조군에 비해 TNF- α 의 분비를 유의하게 증가시키지 못하였다. 이러한 결과는 IFN- γ 자체는 대식세포의 TNF- α 생산을 촉진하지 않고 LPS에 의한 TNF- α 의 생산을 촉진한다고 다른 연구자들의 보고^{15, 23, 24)}와 일치하였다. 그리고 그 기전으로는 IFN- γ 가 TNF- α gene의 전사(transcription)를 촉진시키거나 TNF- α mRNA를 안정화시키기 때문이라는 의견들도 제시되었다^{24, 25)}. 그리고 IFN- γ 는 또한 여러 종류의 세포에서 TNF- α 수용체의 발현(expression)을 촉진시키는 것으로 알려져있다^{26, 27)}. 이전의 몇 개의 실험에서 IFN- γ 단독으로도 단핵식세포의 TNF- α 분비능을 증가시킨다는 보고들도 있었으나²⁸⁾, 그것은 단핵식세포 배양액에 존재하는 소량의 LPS 때문으로 생각된다²⁹⁾. 그러므로 임상에서 결핵감염에 있어서 그람 음성 세균과의 동시 감염이 없을 경우 IFN- γ 를 투여한다 하더라도 대식세포에서 TNF- α 의 분비 증가를 통한 항 결핵 효과를 가져오지 못할 것으로 생각된다. Rose 등⁴⁾의 보고에 의하면 사람 폐포대식세포를 IFN- γ 로 자극하였을 때 Mycobacterium avium complex(MAC)의 증식을 억제하지 못하였으나 macrophage colony-stimulating factor와 IFN- γ 로 동시에 자극했을 때 MAC의 증식을 현저하게 억제하였으며 anti-TNF- α antibody를 첨가하여도 증식 억제 효과를 상쇄하지 못하였다. 그러므로 IFN- γ 가 항 결핵 효과가 있다면 아마도 대식세포에 의한 TNF- α 의 분비의 증가와는 무관할 것으로 생각된다. 사람에 있어서는 IFN- γ 의 항 결핵 효과의 기전에 대해서 잘 알려져 있지 않지만 쥐의 대식세포(murine macrophage)에서는 IFN- γ 의 항결핵 효과와 기전은 비교적 잘 알려져 있는데, Denis 등³⁾은 쥐의 대식세포를 IFN- γ 로 자극하였을 때 강력하게 결핵균의 증식을 억제하였으며 이 정도는 대식세포의 reactive nitrogen intermediate의 분비

의 증가와 관련이 있는 것을 관찰하고 reactive nitrogen intermediate가 쥐의 대식세포의 항 결핵 기전의 중요한 mediator 중의 하나일 것이라고 주장하였다. 그러나 사람의 대식세포를 IFN- γ 로 자극하였을 경우 reactive nitrogen intermediate의 분비가 증가하지 않는 것이 밝혀졌다. 그러므로 사람과 쥐의 대식세포에 대한 IFN- γ 가 항 결핵 기전이 다를 것으로 생각된다. 그러므로 IFN- γ 를 항 결핵 치료에 이용하기 위해서는 결핵의 발병기전과 IFN- γ 의 항 결핵기전에 대해서 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

연구배경 :

IFN- γ 는 단핵식세포를 활성화시키며 여러 종류의 세포내 세균에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다. 그러나 사람에 있어서 IFN- γ 의 항 결핵 효과와 작용기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 결핵의 발병기전에서 IFN- γ 의 역할을 알아보기 위해 폐포대식세포의 결핵균 탐식과 TNF- α 생산에 IFN- γ 가 미치는 영향을 알아보았다.

방 법 :

활동성 폐질환이 없는 8명의 사람에게서 얻은 기관지 폐포세척액에서 폐포대식세포를 표면흡착법으로 분리하여 결핵균과 같이 배양하면서(1×10^6 cells/ml, 3×10^7 bacteria/ml) 배양액에 IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml), 자가혈청(10%)을 첨가하여 2시간 배양 후 항산성 염색(modified Kinyon method)을 하여 결핵균을 탐식한 폐포대식세포를 관찰하였다. 그리고 폐포대식세포배양액에 IFN- γ (300U/ml), MTB(1×10^6 bacteria/ml) and LPS(0.5ug/ml)를 각각 첨가하여 24시간 배양 후 상층액에서 TNF- α 의 농도를 ELISA method로 측정하였다. 그리고 IFN- γ (300U/ml), LPS(0.5ug/ml)로 24시간 자극한 폐포대식세포의 결핵균 탐식율도 관찰하였다.

결 과 :

IFN- γ 는 폐포대식세포의 결핵균 탐식율을 증가시키지 않았으며(percentage of PAM-phagocytosed MTB : control : 22.1 ± 4.9 , IFN- γ : 20.3 ± 5.3), 폐포대식세포를 24시간 자극하였을 때 폐포대식세포의 TNF- α 의 생산을 증가시키지 않았다(control : 21 ± 38 pg/ml, IFN- γ : 87 ± 106 pg/ml). 그리고 IFN- γ 로 24시간 전처치한 폐포대식세포의 결핵균 탐식율 또한 증가하지 않았다(control : 24.5 ± 9.5 , IFN- γ : 23.4 ± 10.1).

결 론 :

IFN- γ 는 폐포대식세포의 결핵균 탐식과 TNF- α 생산에 영향을 미치지 않는다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부, 대한결핵협회 : 제 7차 전국결핵실태조사 결과, 1995
2. Newport MJ, Huxley CM, Huston S : A mutation in the interferon- λ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *NEJM* 335 : 1941, 1996
3. Denis M : Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol* 132 : 150, 1991
4. Rose RM, Fuglestad JM, Remington L : Growth inhibition of *Mycobacterium avium* complex in human alveolar macrophage by the combination of recombinant macrophage colony stimulating factor and interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4 : 248, 1991
5. Schreiber RD, Celada A : Molecular characterization of interferon gamma as a macrophage activating factor. *Lymphokines* 11 : 87, 1985
6. Wherry JC, Schreiber RD, Unanue ER : Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice : Roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect Immun* 59 : 1709, 1991
7. Bhardwaj N, Nash T, Horwitz M : Interferon gamma activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Immunol* 137 : 2662, 1986
8. Murray H, Rubin B, Rothermel C : Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes : Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest* 72 : 1506, 1983
9. Chatte C, Panteix G, Perrin-Fayolle M : Aerosolized interferon-gamma for *Mycobacterium avium*-complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 52 : 1094, 1995
10. Holland SM, Einsenstein EM, Kuhns DB : Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. *NEJM* 330 : 1348, 1994
11. Banerjee DK, Sharp AK, Lowrie DB : The effect of gamma-interferon during *Mycobacterium bovis*(BCG) infection in athymic and euthymic mice. *Microbiol Pathogen* 1 : 221, 1986
12. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM : Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene-depleted mice. *J Exp Med* 178 : 2243, 1993
13. Douvas GS, Looker DL, Vatter AE : Interferon- λ activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances duplication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immunol* 50 : 1, 1985
14. Schlesinger LS : Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150 : 2920, 1993

15. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA, Goeddel DV : Effect of interleukin 2, interferon gamma, and nitrogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol* 135 : 2492, 1985
16. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA : Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 152 : 743, 1994
17. Kindler V, Sappino AP, Grau-GE, Piguët PF, Vassalli P : The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56 : 731, 1989
18. Wheelock EF : Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149 : 310, 1965
19. The international chronic granulomatous disease cooperative study group : A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *NEJM* 324 : 509, 1991
20. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS : Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *NEJM* 322 : 16, 1990
21. Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, Guillemin B, Rom WN : Mechanisms of stimulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J Clin Invest* 91 : 2076, 1993
22. Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN : Increased release of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis.
23. Collart MA, Belin D, Vassalli JD, de Kossodo S, Vassalli P : Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short lived repressors. *J Exp Med* 164 : 2113, 1986
24. Koerner TJ, Adams DO, Hamilton TA : Regulation of tumor necrosis factor expression : Interferon gamma enhances the accumulation of mRNA for tumor necrosis factor induced by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 109 : 437, 1987
25. Luedke CE, Cerami A : Interferon gamma overcomes glucocorticoid suppression of cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis by murine macrophages. *J Clin Invest* 86 : 1234, 1990
26. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE : Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 318 : 665, 1985
27. Ruggiero V, Tavernier J, Fiers W, Baglioni C : Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma. *J Immunol* 136 : 2445, 1986
28. Geertisma MF, Teeuw WL, Nibbering PH : Pulmonary surfactant inhibits activation of human monocytes by recombinant interferon-gamma. *Immunol* 82 : 450, 1994
29. Farrar MA, Schreiber RD : The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11 : 571, 1993