

결핵균 항원 자극에 의한 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA 발현

단국대학교 의과대학 내과학교실

박재석, 김운섭, 지영구, 이계영

IFN- γ mRNA Expression in Tuberculous Pleural Lymphocytes After *in vitro* Stimulation with *M. tuberculosis* Antigens

Jae Seuk Park, M.D., Youn Seup Kim, M.D., Young Koo Jee, M.D., Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine, Chonan, Korea

Background : IFN- γ is the main effector mediator of the host immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Evaluating the IFN- γ gene expression in response to *M. tuberculosis* antigens may help in elucidating the host defense mechanism against *M. tuberculosis* and in the development of a vaccine.

Methods : The IFN- γ mRNA expression in the lymphocytes obtained from pleural effusions from tuberculous pleurisy patients (TB-PLC) after *in vitro* stimulation with whole cell *M. tuberculosis*(H37Rv), purified protein derivatives(PPD), man-lipoarabinamman (man-LAM), ara-LAM and Antigen 85B(Ag85B) were evaluated. The degree of IFN- γ mRNA expression was determined by a semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Results : *M. tuberculosis* induced the expression of IFN- γ mRNA in the TB-PLC in time and dose dependent manners. The PPD and Ag85B induced high levels of IFN- γ mRNA expression in the TB-PLC. However, man-LAM inhibited IFN- γ mRNA expression in the TB-PLC, while ara-LAM did not.

Conclusion : IFN- γ mRNA expression in TB-PLC is stimulated by PPD and Ag85B, but inhibited by man-LAM. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:25-31)

Key words : Interferon-gamma, Tuberculosis, PPD, Ag85B, LAM.

서 론

결핵 퇴치를 위한 범 세계적인 노력에도 불구하고, 아직도 전 세계 인구의 1/3 이 결핵균에 감염되어 있고, 매년 8 백만명의 새로운 결핵환자가 발생하고 있다¹. 우리나라의 경우 최근 들어 결핵환자가 많이 감소했다고 하나 1995년도 현재 결핵의 유병율이 1.0%에 달해 가장 심각하게 해결해야 할 국민 보건 문제의 하나로 남아있다². 결핵의 예방과 효과적인 치료방법의 개발을 위해서는 결핵의 발병기전에 대한 이해가 필수적이지만 아직도 결핵균의 독성기전과 숙주의 면역학적 방어기전에 대해 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

본연구는 2002년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 이루어졌음.

Address for correspondence : Kye Young Lee, M.D.
Department of Internal Medicine, Dankook University
College of Medicine 16-5, Anseo-dong Chonan,
330-715, Korea
Phone : 041-550-3916 Fax : 041-556-3256
E-mail : kyleemd@dankook.ac.kr
Received : Feb. 18. 2003.
Accepted : May. 27. 2004.

결핵균에 대한 인체의 방어기전에는 대식세포와 T 림프구를 주축으로 하는 세포매개성 면역반응이 핵심적인 역할을 한다. Interferon- γ (IFN- γ)는 활성화된 T 림프구에서 분비되는 사이토카인으로 대식세포의 결핵균 살균작용을 유도하여 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에서 중추적인 역할을 한다³. IFN- γ 유전자의 결손을 보이는 마우스에 결핵균을 감염시키면 결핵균이 미만성으로 급속히 증식하며 높은 조기 사망률을 보였다⁴. IFN- γ 수용체 유전자의 점 돌연변이를 보이는 아이에게 약독화시킨 BCG로 예방접종을 하였을 때 미만성의 *M. bovis* 감염증을 보이며 항결핵 약물치료를 시행했음에도 불구하고 높은 사망률을 보였다⁵. 또한 항결핵 약물치료를 반응하지 않는 다제 내성 폐결핵환자에 대해 에어로졸로 IFN- γ 를 투여하였을 때 임상소견 및 방사선 소견의 호전을 보였다⁶. 그러므로 결핵 병변에서 IFN- γ 의 분비기전을 규명하는 것은 결핵균에 대한 숙주의 방어기전을 이해하고 백신을 포함한 새로운 결핵 치료 방법의 개발에 중요한 기초자료가 될 수 있을 것이다.

결핵성 홍막염은 홍강에 국한된 결핵 병변으로 결핵성 홍막염 환자의 홍수에서 IFN- γ 가 증가되어 있는 것은 잘 알려져 있다^{7,8}.

결핵성 홍수에 림프구들이 증가되어 있으며 이들이 IFN- γ 를 생산하는 것 또한 잘 알려져 있다⁹. 그러므로 결핵균의 항원들이 결핵성 홍수 림프구의 IFN- γ 분비에 어떤 영향을 미치는지 규명하는 것은 의미 있는 일이라 하겠다.

결핵균에서 추출한 저분자(low molecular weight) 단백질의 혼합체인 purified protein derivatives(PPD)는 결핵균에 대한 인체의 면역반응을 연구하는데 널리 사용되어 왔다¹⁰. 결핵균 배양액에서 분리한 단백질인 Antigen 85B(Ag85B)는 대표적인 면역증강 물질로 알려져 왔는데, Ag85B를 전사하는 DNA(plasmid)로 마우스를 백신 처치한 후 결핵균을 감염시켰을 때 강력한 세포매개성 면역반응을 유도하면서 결핵균을 억제하였다¹¹.

Lipoarabinomannan(LAM)은 결핵균 세포벽에 부착되어 있는 glycolipid로서 결핵균의 대표적인 독성 인자(virulence factor)로 알려져 왔는데 비독성의 신속 증식 항산균에서 분리한 LAM(ara-LAM)과 결핵균에서 분리한 LAM(man-LAM)으로 단핵식세포를 자극하였을 때 man-LAM이 ara-LAM으로 자극한 경우 보다 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1(IL-1)의 분비양이 적었다¹²⁻¹⁴. 이는 독성 결핵균이 man-LAM을 통하여 생체에서 면역반응을 적절하게 유도하지 못하게 함으로서 숙주에서 결핵균이 살아 남게 하는 독성기전으로 생각된다. 그러나 이들 결핵균의 각 항원들이 결핵 병변에서 림프구의 IFN- γ 분비에 미치는 영향에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 결핵 병변에서 증가되어 있는 IFN- γ 의 분비에 결핵균 항원들이 미치는 영향을 알아보기 위해 결핵성 홍막염 환자의 홍수에서 분리한 림프구들을 결핵균의 각종 항원들로 자극한 후 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현 정도를 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction:RT-PCR)으로 정량화하여 비교하였다

대상 및 방법

1. 재료 및 시약

DMEM, TRIzol, oligo dT들은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, Taq DNA polymerase는 TaKaRa(TaKaRa Shiga, Japan)에서 구입하였다. 자외선으로 살균한 결핵균(H37Rv), man-LAM, ara-LAM은 미국 Colorado state university의 결핵연구소에서 기증 받았고(TB Research material and vaccine testing contract NIH, NIAID NO 1A1-75320), PPD는 Statens Seruminstitut(Denmark)에서 구입하였고, Ag85B는 충남대학교 의과대학 미생물학교실 조은경 교수로부터 기증 받았다.

2. 홍수 림프구의 분리

결핵성 홍수 림프구는 2001년 10월부터 2002년 5월까지 단국대학교 병원에 결핵성 홍막염으로 입원한 12명의 환자들의 홍수에서 분리하였다. 결핵성 홍막염의 진단은 임상증상 및 흉부 방사선 소견상 결핵성 홍막염에 합당한 소견을 보이며, 홍수와 홍막조직에서 결핵균이 검출되거나, 홍막생검에서 육아종성 병변이 관찰되고, 홍수 검사상 림프구가 50% 이상인 삼출액의 소견을 보이고, adenosine deaminase(ADA)가 40 U/L 이상이고 carcinoembryonic antigen(CEA)이 10 ng/ml 이하인 경우로 하였다. 홍강 천자하여 얻은 홍수를 두 겹의 멸균 거즈로 거른 후에 10 분간 원심분리하여 세포 덩어리를 얻고, 이를 phosphate buffered saline(PBS)로 2 번 세척한 후 10% fetal bovine serum(FBS), 2 mM glutamine, 100 ng/ml penicillin, 그리고 100 ng/ml streptomycin을 포함한 DMEM 배지(complete media:CM)에 재부유액을 만들고 Histopaque-1077이 들어있는 50 ml 플라스틱 튜브에 중첩시킨 후 원심분리하여 단핵세포층을 얻었다. 단핵세포들을 PBS로 세척한 후CM로 재부유액을 만들어 배양접시에서 37°C, 5% CO₂ 상태로 4 시간 배양하여 대식세포들을 바닥에 부착시켰다. 바닥에 부착되지 않은 림프

구들을 얻어서 PBS로 세척한 후 CM에 1×10^7 cells/ml의 농도로 부유액을 만든 뒤에 24-well 배양접시에 1 ml씩 첨가하여 배양하였다.

3. 결핵균 항원의 림프구 자극

림프구 배양액에 결핵균(H37Rv), PPD, Ag85B, ara-LAM, man-LAM을 정해진 농도대로 각각 첨가하여 배양하면서 정해진 시간에 림프구에서 RNA를 분리하여 IFN- γ mRNA에 대한 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 대조군으로는 항원으로 자극하지 않은 림프구를 이용하였다.

4. RT-PCR을 이용한 IFN- γ mRNA 발현 분석

정해진 시점에서 림프구 배양액을 원심분리하여 얻은 림프구 덩어리에 TRIzol 첨가하여 총 RNA를 얻었다. RNA를 oligo dT priming 한 후 0.1 M DTT, 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP), 10 U Rnase inhibitor, 그리고 5×10^4 strand buffer를 이용해 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 얻어진 cDNA를 비활성화 시킨 후에 10 \times PCR buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 15 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTP, 0.25 U Taq DNA polymerase, IFN- γ 3' and 5' primer 100 pmol과 섞은 후에 DNA thermal cycler(Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 20 cycle(denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min)을 시행하였다. PCR 생산물을 ethidium bromide를 포함한 1.0% (wt/vol) agarose gel에서 전기영동을 시행하였다. Gel 사진은 Gel Doc 위에서 Photoshop software(Adobe system, Inc. USA)을 이용한 Hewlett Packard Scanject로 스캔을 시행하였다. 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 전사정도가 항상 일정한 β -actin에 대한 PCR을 동시에 시행하였다. IFN- γ 와 β -actin primer의 염기서열은 다음과 같다. IFN- γ sense : 5'-CCAGAGCATCAA AAGAGTGTG-3', antisense: 5'-CTAGTTGGCCCTGAGATAAAG-3, β -actin sense : 5'-CGTGA-

CATTAAGGAGAAGCTG-3', antisense : 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3'.

결 과

1. 결핵균 자극에 의한 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현

결핵성 흉수 림프구 배양액에 결핵균(H37Rv)을 3 μ g/ml 농도로 첨가하여 배양했을 때 림프구의 IFN- γ mRNA 발현은 자극 2 시간 후부터 나타나기 시작하여 24 시간까지 지속적으로 높은 수준을 유지하였다(Fig. 1A). 결핵성 흉수 림프구를 4시간 동안 결핵균(H37Rv)으로 자극하였을 때 결핵균의 용량이 증가할수록 IFN- γ mRNA의 발현이 증가하였다(Fig. 1B). 이는 결핵균이 결핵균 특이 림프구의 IFN- γ mRNA 발현을 증가시키는 것을 보여준다.

2. 결핵균 항원의 종류에 따른 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현

결핵성 흉수 림프구 배양액에 ara-LAM(1 μ g/ml), man-LAM(1 μ g/ml), PPD(1 μ g/ml), Ag85B(1 μ g/ml)을 첨가하여 4 시간 배양 후 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현정도를 비교하였을 때 PPD와 Ag85B로 자극

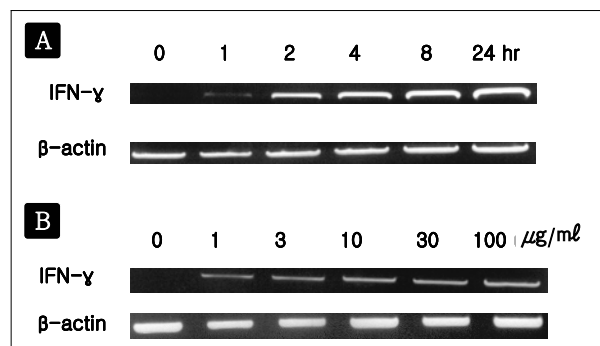


Figure 1. A. IFN- γ mRNA expression in lymphocytes obtained from tuberculous pleural effusion after *M. tuberculosis*(H37Rv) stimulation(3 μ g/ml) over 24 hr. B. IFN- γ mRNA expression in lymphocytes after 4 hr stimulation with increasing concentrations of *M. tuberculosis*. Results shown are from two independent experiments, which yielded similar results.

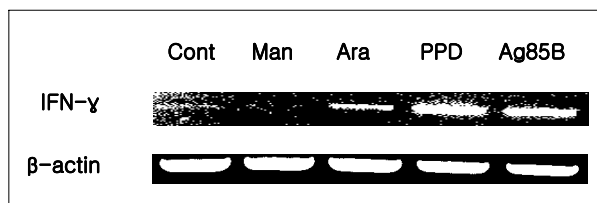


Figure 2. IFN- γ mRNA expression in lymphocytes obtained from tuberculous pleural effusions after stimulation with man-LAM (Man) 1 μ g/ml, ara-LAM (Ara) 1 μ g/ml, PPD 1 μ g/ml and Ag85B 1 μ g/ml over 4 hr. Results shown are from two independent experiments, which yielded similar results.

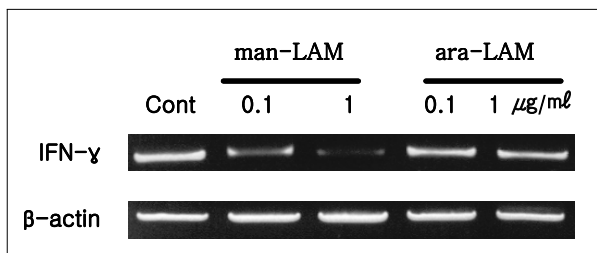


Figure 3. IFN- γ mRNA expression in lymphocytes obtained from tuberculous pleural effusion after 4 hr stimulation with increasing doses of man-LAM and ara-LAM. Results shown are from two independent experiments, which yielded similar results.

받은 림프구에서는 IFN- γ mRNA의 발현이 증가했으나, man-LAM으로 자극 받은 림프구에서는 IFN- γ mRNA의 발현이 오히려 감소하였다(Fig. 2).

3. LAM의 자극에 의한 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현

림프구를 자극하는 LAM의 종류에 따른 IFN- γ mRNA의 발현 억제 정도를 LAM의 농도에 따라 분석하였다. Man-LAM의 경우 man-LAM의 농도가 증가함에 따라 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현이 감소하였고, ara-LAM의 경우 ara-LAM의 농도의 증가에 따른 IFN- γ mRNA의 발현 억제가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

결핵성 흉막염은 항결핵 약물 치료를 하지 않아도 많은 경우에서 회복되는 것으로 보아 결핵균에 대한

적절한 방어적 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 왔으며 결핵균에 대한 숙주의 면역학적 방어기전을 이해하는 좋은 모델로 이용되어 왔다^{15, 16}. 결핵성 흉막염에서 흉강 내에 결핵균이 침범하게 되면 말초혈액에서 흉강으로 결핵균 특이 림프구들이 이동하여 분화 증식을 하게 되며⁹ 이들 림프구들이 분비하는 IFN- γ 가 결핵균을 탐식한 대식세포를 자극하여 항균작용을 일으키게 된다. 결핵성 흉수에서 IFN- γ 가 증가되어 있으며, 결핵성 흉수에서 얻은 림프구들이 결핵균의 자극을 받으면 IFN- γ 를 분비하는 것은 잘 알려져 있다^{8,17}. 본 연구에서도 결핵성 흉막염 환자의 흉수에서 분리한 림프구들을 결핵균(H37Rv)으로 자극했을 때 IFN- γ mRNA의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 그러므로 결핵균을 구성하고 있는 여러 항원 중에서 임파구의 IFN- γ 를 가장 잘 자극하는 항원을 찾아보는 것은 이를 이용한 면역치료 및 백신의 개발에 큰 도움이 될 것이다.

결핵균에서 추출한 저분자 단백질의 혼합체인 PPD는 결핵균에 대한 인체의 면역반응을 연구하는데 널리 사용되어 왔다¹⁰. 폐결핵 병변에서 얻은 기관지 폐포세척액 세포들을 PPD로 자극하였을 때 IFN- γ 를 분비하는 세포의 숫자가 증가하였다¹⁸. PPD는 또한 결핵성 흉막염 환자의 흉수에서 분리한 세포들의 IFN- γ 의 생산을 유도하였으며, 같은 환자의 말초혈액 단핵구들을 PPD로 자극했을 경우 보다 더 많은 양의 IFN- γ 를 생산하였다¹⁰. 본 연구에서도 PPD의 자극으로 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현이 증가하였다. 그러나 PPD는 수많은 결핵균 항원의 집합체이므로 PPD에 포함된 어떤 항원이 IFN- γ 의 생산을 자극하는 지는 알 수가 없다는 한계가 있다.

결핵균에서 분비되는 단백질 항원들이 숙주의 결핵균에 대한 방어적 면역반응을 유도하는 것은 잘 알려져 있다¹⁹. 결핵균 배양액에서 분리한 단백질들 중에서 Ag85 복합물(complex)이 가장 많은 부분을 차지하는데, 이는 Ag85A, Ag85B, 그리고 Ag85C의 3가지 단백질로 이루어진 분자량 30-32kDa의 단백질 군으로²⁰, 결핵균에 대한 방어적 면역반응을 유도하는 대표적인 결핵항원으로 관심을 받아왔다. 마우스를 Ag85B를 전사하는 DNA (plasmid)로 백신 처치한 후 결핵균을 감

염시켰을 때 강력한 세포매개성 면역반응을 유도하면서 결핵균을 억제하였다¹¹. Ag85 복합물을 과발현하는 recombinant BCG로 기니픽을 백신 처치 하였을 때 결핵균에 대한 면역반응이 더 강하게 일어났다²¹. 그러나 Ag85B이 결핵균에 대한 숙주의 방어기전을 항진시키는 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 폐 결핵 병변에서 얻은 기관지 폐포세척액 세포들을 Ag85 복합체로 자극하였을 때 IFN- γ 를 분비하는 세포의 숫자가 증가하였다¹⁸. 본 연구에서 Ag85B의 자극으로 결핵병변에서 분리한 림프구에서 IFN- γ mRNA의 발현이 증가하였는데 이는 Ag85B의 면역강화기전 중의 하나가 결핵 병변에서 결핵균 특이 림프구의 IFN- γ 분비를 증가시키는 것으로 사료된다.

LAM은 phosphatidylinositol moiety로 구성된 복합 분자로서 항산균 세포벽의 mannose core에 부착되어 있다¹². LAM의 arabinofuranosyl 결 가지의 끝부분이 항산균의 종에 따라 서로 다른 양상을 보이는데, 독성인 결핵균의 경우 mannose residue들이 모자모양으로 덮고 있으며(man-LAM), 비독성의 신속 증식 항산균의 경우 mannose residue가 없다(ara-LAM)¹³. LAM의 이와 같은 구조적인 차이가 man-LAM과 ara-LAM의 뚜렷한 생물학적인 활성의 차이를 설명하는 것으로 알려져 있다. Man-LAM에 비해 ara-LAM이 대식세포를 더 강력하게 자극하는데 단핵세포를 LAM으로 자극하였을 때 ara-LAM이 man-LAM보다 더 많은 양의 TNF- α 와 IL-1을 분비하였다¹⁴. LAM은 또한 CD4⁺ T 림프구의 항원 유도성 증식을 억제하며²², phytohemagglutinin과 phorbol esters로 자극된 Jurkat T 세포의 interleukin-2, -3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA의 발현을 억제하였다²³. 림프구의 IFN- γ 분비에 미치는 LAM의 역할에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않는데 Barnes 등은²⁴ 결핵성 흉수 단핵세포들을 결핵균에서 분리한 LAM으로 자극하였을 때 IFN- γ 분비가 증가하지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서도 man-LAM이 결핵성 흉수에서 분리한 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현을 억제하였지만 ara-LAM은 억제하지 않는 것을 증명하였는데, 이는 LAM이 결핵균의 독성인자라는 다른 연구 결과들과 일치하는 소견이다. 그러므로 독성 결핵균의

man-LAM이 숙주의 IFN- γ 분비를 억제하여 항결핵 기전을 차단함으로써 독성 결핵균이 숙주내에서 생존할 수 있게 되어 증식하면서 병을 일으키는 것으로 설명할 수 있다. Man-LAM이 IFN- γ mRNA 발현을 억제하는 기전에 대해서는 아직 알려져 있지 않는데, LAM이 항원자극에 의한 CD4⁺ T 림프구의 증식반응을 억제하는 것이 한 기전일 가능성이 제시되고 있으나 이에 대한 더 연구가 필요할 것으로 생각된다²².

본 연구의 결과 결핵병변에서 결핵균 특이 T 림프구의 IFN- γ 유전자의 발현에서 결핵균의 항원 중에서 PPD와 Ag85B는 IFN- γ mRNA의 발현을 항진시키고 man-LAM은 억제시키는 서로 상반된 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 앞으로 이들 항원이 IFN- γ mRNA의 발현을 항진 또는 억제시키는 기전을 밝히는 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

IFN- γ 는 결핵균에 대한 숙주의 면역학적 방어기전에서 핵심적인 역할을 한다. 그러므로 결핵균 항원들이 IFN- γ 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보는 것은 결핵균에 대한 숙주의 방어기전을 밝히고 이를 이용한 백신의 개발에 이용될 수 있을 것이다.

방 법 :

결핵성 흉막염 환자의 흉수에서 얻은 림프구 배양액에 결핵균(H37Rv), PPD, Ag85B, man-LAM, ara-LAM을 첨가하여 자극한 후 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현 정도를 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 비교하였다.

결 과 :

- 1) 결핵균(H37Rv)이 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현을 증가시켰다.
- 2) 결핵균 항원 중 PPD와 Ag85B는 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현을 증가시켰지만 man-LAM은 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현을 억제시켰다.
- 3) LAM 중에서 man-LAM은 용량이 증가함에 따라 결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현의 억

제 정도가 증가하였지만 ara-LAM의 경우 이와 같은 현상이 관찰되지 않았다.

결 론 :

결핵성 흉수 림프구의 IFN- γ mRNA의 발현은 PPD와 Ag85B의 자극에 의해 항진되지만 man-LAM의 자극에 의해서는 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Fatkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Schwenk A, Wenzel R. The return of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:136-46.
2. Ministry of Health and Welfare, Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory diseases. The 7th Nationwide Survey for Tuberculosis. p 13, Seoul, 1996
3. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
4. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon- γ gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178:2243-7.
5. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:321-33.
6. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 1997;349:1513-5.
7. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, Iwahashi N, Nakano T, Hada T, et al. Local production and localization of transforming growth factor- β in tuberculous pleurisy. *Clin Exp Immunol* 1993;92:32-8.
8. Kim MH, Kim SJ, Park YK, Kim SC, Lee SY, Kim YK, et al. The levels of interferon-gamma, interleukin-2 receptor, interleukin-6, interleukin-10 in malignant effusion, tuberculous effusion, parapneumonic effusion, and lung empyema. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2000;49:568-75.
9. Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4⁺ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1989;142:1114-9.
10. Ribera E, Espanol T, Martinez-Vasquez JM, Ocana I, Encabo G. Lymphocyte proliferation and gamma-interferon production after in vitro stimulation with PPD. Difference between tuberculous and non tuberculous pleurisy in patients with positive tuberculih skin test. *Chest* 1990;97:1381-5.
11. Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of the *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999;67:1702-7.
12. Hunter SW, Brennan PJ. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 1990;265:9272-9.
13. Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ, Chatterjee D. Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J Biol Chem* 1995;270: 12380-9.
14. Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996;64:399-405.
15. Stead WW, Einchenholz A, Stauss HK. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. *Am Rev Tuberc* 1955;71:473-502.
16. Arruda S, Chalhoub M, Cardoso S, Barral-Netto M. Cell-mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. *Acta Tropica* 1998;71:1-15.
17. Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 1993;61:3482-9.
18. Schwander SK, Torres M, Sada E, Carranza C, Ramos E, Tary-Lehmann M, et al. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1998;178:1434-45.
19. Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994;62:2536-44.
20. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992;56:648-61.
21. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853-8.
22. Moreno C, Mehlert A, Lamb J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 1988;74:206-10.
23. Chujor CS, Kuhn B, Schwerer B, Bernheimer H, Levis

WR, Bevec D. Specific inhibition of mRNA accumulation for lymphokines in human T cell line Jurkat by mycobacterial lipoarabinomannan antigen. Clin Exp Immunol 1992;87:398-403.

24. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. J Immunol 1990;145:149-54.