

□ 연구 보고 □

결핵균 독성 여부에 따른 기도 상피세포의 Chemokine 발현에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성생명과학연구소

권오정, 김호중, 김정희, 김호철, 서지영, 박정웅, 박상준, 정만표, 최동철, 이종헌

= Abstract =

The Difference in Chemokine Expression in Airway Epithelial Cells According to the Virulence of Tubercle Bacilli

O Jung Kwon, M.D., Hojoong Kim, M.D., Jung Hee Kim, M.D., Ho Cheol Kim, M.D.,
Gee Young Suh, M.D., Jeong Woong Park, M.D., Sang Joon Park, M.D.,
Man Pyo Chung, M.D., Dong Chull Choi, M.D., Chong H. Rhee, M.D.

*Department of Medicine, College of Medicine, Sungkyunkwan University
Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea*

Background : We have recently reported that airway epithelial cells can produce RANTES and IL-8 in response to the stimulation of tubercle bacilli suggesting a certain role of airway epithelial cells in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. The pathogenesis of tuberculosis is determined by several factors including phagocytosis, immunological response of host, and virulence of tubercle bacilli. Interestingly, there have been reports suggesting that difference in immunological response of host according to the virulence of tubercle bacilli may be related with the pathogenesis of tuberculosis. We, therefore, studied the expressions and productions of RANTES and IL-8 in airway epithelial cells in response to tubercle bacilli(H37Rv, virulent strain and H37Ra, avirulent strain), in order to elucidate the possible pathophysiology of pulmonary tuberculosis.

Methods : Peripheral blood monocytes were isolated from normal volunteers. Peripheral blood monocytes (PBM) were stimulated with LPS(10 μ g/ml), H37Rv, or H37Ra(5×10^5 bacilli/well) along with normal control for 24 hours. A549 cells were stimulated with supernatants of cultured PBM for 24 hours. ELISA kit was used for the measurement of TNF α and IL-1 β production in supernatants of cultured PBM and for the measurement of RANTES and IL-8 in supernatants of cultured A549 cells. Northern blot analysis was used for the measurement of RANTES and IL-8 mRNA expression in cultured A549 cells.

Results : TNF α and IL-1 β productions were increased in cultured PBM stimulated with LPS or tubercle bacilli(H37Rv or H37Ra) compared with the control. There was, however, no difference in TNF α and IL-1 β pro-

duction between cultured PBM stimulated with H37Rv and H37Ra. RANTES and IL-8 expressions and productions were also increased in cultured A549 cells stimulated with LPS or tubercle bacilli compared with the control. RANTES and IL-8 mRNA expressions were significantly increased in cultured A549 cells stimulated with H37Ra-conditioned media(CM) compared with A549 cells stimulated with H37Rv-CM ($p < 0.05$). However, there was no difference in RANTES and IL-8 productions between A549 cells stimulated with H37Rv-CM and H37Ra-CM.

Conclusion : Airway epithelial cells can produce the potent chemokines such as RANTES and IL-8, in response to the stimulation of tubercle bacilli. These results suggest that airway epithelial cells may play a certain role in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. However, the role of airway epithelial cells in the pathogenesis of tuberculosis according to the virulence of tubercle bacilli was not clear in this study.

Key words : Tuberculosis, Chemokine, Airway epithelial cells, Virulence

서 론

우리나라는 과거에 결핵왕국이라는 명예롭지 못한 별명을 가지고 있었으나 1960년대 이후 경제 발전에 의한 생활 여건의 향상과 체계적인 국가결핵관리 사업의 결과로 결핵유병률은 꾸준히 감소되어 왔다. 그러나 1995년도의 전국결핵실태조사 결과에 따르면 아직도 결핵유병률이 1.0%나 되고 균양성 폐결핵 유병률도 0.22%에 달하고 있어^{1,2)} 결핵에 관한 연구는 매우 중요하다고 하겠다.

결핵의 병인에 관한 연구는 주로 대식세포와 임파구에 초점이 맞추어 지고 있었으나 최근 Strieter등은 염증성 폐질환에서 기도상피세포(airway epithelial cell)도 여러가지의 cytokine을 분비함으로써 염증반응에 능동적으로 참여한다는 증거를 제시하였다³⁾. 기도상피세포는 기도나 폐포를 둘러싸고 있는 세포로서 인체와 외부 대기를 물리적으로 구분하는 차단체의 역할을 하며, 가스교환이 이루어지게 하고, 표면활성물질을 분비하여 폐포의 허탈을 방지하는 역할을 한다. 염증성 폐질환에서 기도상피세포는, 외부 대기의 병원체와 독성물질이 침범하는 최초의 세포이며, 염증세포의 동원이 일어나는 장소이고, 염증반응이 일어나서 손상을 당하는 피손상세포이기도 하다. 그러나 최근의 연구에서, 기도상피세포는 단순히 염증반응의 피동적

피해자가 아니며, 능동적으로 염증반응에 참여하고 이를 조절하는 기능을 가진 세포임이 밝혀지고 있다^{4,5)}. 실제로 여러가지 cytokine을 생산, 분비할 수 있다고 보고되었으며, 특히 chemokine으로 분류되는 IL-8, monocytes chemotatic protein(MCP-1), RANTES(Regulated on Activation, Normal T cell, Expressed and Secreted)등도 생산할 수 있다는 것이 밝혀졌다^{6~9)}.

최근 결핵균주(H37Rv) 자극에 의해 peripheral blood monocytes(PBM)에서 IL-1 β 와 TNF α 가 생성되고, 기도상피세포에서는 IL-8과 RANTES와 같은 chemokine이 생성된다는 사실을 밝힌 바 있다¹⁰⁾. 이와같은 사실은 기도상피세포가 IL-8과 RANTES와 같은 chemokine을 분비함으로써 결핵의 병인에 능동적으로 참여함을 시사한다고 하겠다.

기도상피세포에서 발현되는 chemokine들이 결핵의 병태생리에 관련한다면, 폐결핵을 일으키는 독성을 가진 균주인 H37Rv와 폐결핵을 일으키지 않는 균주인 H37Ra로 자극하였을 때 기도상피세포에서 분비되는 chemokine의 성상이 다를 것이라는 가정이 가능하다. 실제로 Roach 등의 연구에 의하면¹¹⁾ 독성을 가지고 있는 Erdman 균주와 독성을 가지고 있지 않는 H37Ra의 lipoarabinomannan(LAM)의 구조가 다르고, 이 LAM으로 대식세포를 자극하였을 때 H

H37Ra LAM은 대식세포에서 TNF α 를 생성시키지만 H37Rv LAM은 TNF α 를 생성시키지 못하고 이와같은 차이가 결핵균에 대한 생체의 방어기전을 설명한다고 보고하였다. 독성이 없는 H37Ra는 생체에서 면역 반응을 유도하여 TNF α 와 같은 cytokine을 분비함으로써 결핵균이 죽게 되어 생체에서 질병이 발생하지 않고, 독성이 있는 균주인 Erdman은 생체에서 면역 반응을 적절하게 유도하지 못하기 때문에 결핵균이 살아 남을 수 있어 생체에서 질병을 발생한다는 설명이 가능하다.

본 연구는 폐결핵의 병태생리에서 기도상피세포의 역할을 규명하고자, 독성이 있는 균주인 H37Rv와 독성이 없는 균주인 H37Ra를 사용하여 결핵균의 독성 여부에 따른 기도상피세포에서 분비되는 chemokine의 차이를 연구하고자 하였다. 특히 결핵균 감염에 따른 기도상피세포에서 분비되는 chemokine에 관한 연구는 매우 부족한 현실이므로 결핵의 병태생리를 이해하는데 중요한 자료가 될 것으로 기대되어 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 방법

결핵균의 감염에 의한 기도상피세포의 chemokine의 발현을 연구하기 위하여 제 2형 폐포상피세포의 성질을 갖는 A549 세포주를 선택하였다¹²⁾. 일차 배양된 인체 기도상피세포는 배양이 어렵고 얻을 수 있는 세포의 양이 많지 않아 일차로 쉽게 배양할 수 있는 A549 세포주를 이용하여 실험을 진행하였다.

결핵치료를 받은 적이 없고 흉부 방사선 사진이 정상인 정상인의 상완에서 채취한 말초혈액에서 말초혈액 대식세포(PBM)를 분리하여, sonicated H37Rv, H37Ra(5×10^6 bacilli, ATCC)로 자극하면서 24시간 동안 배양하였다. 이때 음성 대조군으로 PBM 배양시 아무 것도 처리하지 않은 군을 두었고, 양성 대조군으로는 PBM에서 TNF α 와 IL-1 β 의 발현을 증

가시키는 것으로 알려진 LPS($10 \mu\text{l/ml}$)로 자극한 군을 두었다. 또한 PBM에 대한 interferon gamma (IFN γ)의 영향을 평가하고자 PBM를 결핵균으로 자극하기 한 시간전에 IFN γ (10ng/ml , R & D)로 전처리 한 군과 IFN γ 전처리 없이 자극한 군을 두었다. 24시간 후 상층액을 채취하여 상층액의 일부는 -70°C 에서 보관하였고 이후 ELISA kit(R & D)를 이용하여 TNF α 와 IL-1 β 의 농도를 측정하였다.

배양된 PBM의 상층액(1 : 2 희석액)으로 배양된 A549 세포를 다시 자극하면서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후, 상층액은 IL-8, RANTES의 측정을 위하여 -70°C 에서 보관하고, 남아있는 A549 세포에서 tRNA를 추출하였다. 배양 상층액에서는 ELISA kit(R & D)를 이용하여 IL-8, RANTES의 농도를 측정하였고, 추출한 tRNA는 Northern blot analysis를 이용하여 IL-8, RANTES의 mRNA의 양을 측정 정량하였다.

2. 방법

(1) A549의 배양

A549 세포주는 ATCC로부터 구입하였으며, RPMI 배지에 10% fetal bovine serum(FBQ)을 추가하여 35mm 6 well culture plate에서 온도 37°C , 이산화탄소 농도 5%로 항온항습기에서 배양하였다. 세포가 자라 포화상태에 도달하면 실험에 사용하였고 PBM의 배양상층액으로 자극할 때에는 FBS은 사용하지 않았다.

(2) PBM의 배양

상완에서 정맥혈 50ml을 채취하여 헤파린 300단위와 혼합하고, 동량의 RPMI 완전배지와 혼합한 후, Ficoll-Hypaque용액(1.077 g/ml)과 2 : 1 비율로 혼합하여, 400G에서 30분간 원심분리하였다. 단핵구세포층(mononuclear cell layer)을 Pasteur pi-

pette으로 조심스럽게 분리하고 RPMI-FBS로 400 G에서 2회 더 세척하였다. 분리된 단핵구 용액의 일부를 trypan blue로 염색하여 viability를 측정하였고 hemocytometer를 이용하여 세포농도를 측정하였다. Viability는 95% 이상이었으며 세포농도는 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 가 되도록 RPMI-FBS에 부유하였다.

RPMI-FBS로 부유한 PBM를 35mm 6 well culture plate에 1ml씩 분주한 후, 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5%로 항온항습기에서 2시간 배양하여 PBM를 부착시켰다. 비부착세포를 37°C의 Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium (HBSS)로 2회 세척하여 제거하고 부착된 PBM를 실험에 사용하였다. 부착된 PBM을 H37Rv, H37Ra(5×10^5 bacilli/well), LPS($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 24시간 동안 자극하면서 배양하였고 이 때 아무것도 넣지 않은 정상 대조군을 두었다. 자극을 주기 한 시간전에 IFN γ (10ng/ml)로 전처리한 군과 IFN γ 전처리 없이 자극한 군을 두었다.

(3) 결핵균 부유액의 준비

Ogawa 배지에서 3주 동안 2차 배양된 결핵균(H37 Rv, H37Ra) 집락을 떼서 HBSS 10ml에 부유시킨 후, 400G로 10분간 원심분리하여 배지 성분을 제거하였다. 상층액을 30분간 음파처리(sonication)하여 결핵균을 균일하게 분포시킨 후 다시 원심분리하여 그 상층액을 사용하였다. 항산균 염색으로 세포농도를 측정하여 5×10^7 bacilli/ml의 농도가 되도록 RPMI로 희석하였고, $10 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 -70°C에서 보관하였다가 실험에 사용하였다.

(4) Northern blot analysis

Chomczynski와 Sacchi의 방법을 수정하여 세포의 tRNA를 분리하였다¹³⁾. 4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol 용액을 직접

culture plate에 넣어 세포를 녹인 후 용액을 eppendorf tube로 옮겼다. 여기에 pH 4.0의 sodium acetate를 추가하여 산성화시키고 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)로 2회 RNA를 추출하였다. Isopropanol로 24시간 동안 -70°C에서 침전시킨후 원심분리하여 RNA를 얻은 후 75% ethanol로 세척하고 건조시켰다.

추출한 RNA를 RNase-free water에 용해시키고 formaldehyde를 포함한 1% denaturing agarose gel에 전기영동하였다. 이를 Hybond nylon filter에 blot하고 자외선에 4분간 노출시켜 고정하였다.

IL-8 cDNA probe는 미국 R.G. Crystal 박사 (NIH, Bethesda, MD)로부터 기증받았으며, 제1 exon의 PstI 위치부터 제4 exon의 BamHI 위치까지를 포함하는 750 base pair 크기의 DNA이고, RANTES cDNA probe는 미국 T.J. Schall 박사 (Genentech Inc., San Francisco, CA)로부터 기증받았으며, EcoRI 위치부터 ApaI 위치까지의 410 base pair 크기의 DNA이다. House-keeping gene인 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) cDNA probe는 캐나다 T.R. Bai박사 (UBC, Vancouver, Canada)로부터 기증받았으며, 1272 base pair 크기의 PstI 위치사이의 DNA이다. 각각의 cDNA는 multi-prime DNA labelling system을 이용하여, ^{32}P 로 random priming하여 10^6 cpm/ml 농도로 사용하였다.

Prehybridization은 50% formamide, 5배 standard saline citrate (SSC), 0.1% sodium dodecyl sulphate(SDS), 5배 Denhardt's solution, 0.1% sodium pyrophosphate, 50mM tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA의 조건에서 시행하였고, hybridization은, 10^6 cpm/ml의 labelling된 IL-8, 혹은 RANTES cDNA로 42°C에서 20시간 동안 시행하였다. 세척은 2배 SSC, 0.1% SSDS로 실온에서 1회, 1배 SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 1회, 0.5배 SSC, 0.1% SSDS로 42°C에서 1회, 0.1배 SSC, 0.1% SDS로

55℃에서 1회 실시하였다. 세척을 마친 nylon filter는 방사선 film에 -70℃에서 1~5일간 노출시키고 방사선 film을 현상하였다. 대조실험을 위하여 nylon filter는 다시 50% formamide, 10mM sodium pyrophosphate로 65℃에서 1시간동안 세척한 후, 다시 GAPDH cDNA로 마찬가지로 방법으로 Northern blot analysis를 시행하였다. 결과는 laser densitometry로 정량화하여 통계처리 하였다.

(5) Chemokine의 측정

Chemokine의 농도는 -70℃에서 보관되었던 상층액에서 R & D사에서 구입한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 배양된 PBM의 상층액에서는 IL-1 β 와 TNF α 의 농도를 측정하였고, 배양된 A549의 상층액에서는 IL-8과 RANTES의 농도를 측정하였다.

결 과

1. 말초혈액 단핵세포에서의 TNF α 와 IL-1 β 의 생성

말초혈액 단핵세포를 LPS, H37Rv, 또는 H37Ra로 자극하였을 때 대조군에 비하여 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 유효하게 증가하였다. 독성이 없는 H37Ra로 자극하였을 때가 독성이 있는 H37Rv로 자극하였을 때보다 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 많았으나 통계적인 유의성은 없었다. INF γ 로 전처리하였을 때 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 전처리하지 않은 군에 비해 증가하였으나 H37Rv군과 H37Ra군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 결핵균으로 자극하였을 때 말초혈액 단핵세포에서의 TNF α 의 생성이 LPS로 자극한 군에 비해 의미있게 증가하였다 (Fig. 1).

2. A549 세포에서의 RANTES와 IL-8의 유전자 발현

결핵균이나 LPS로 자극한 말초혈액 단핵세포 배양액으로 A549 세포를 자극하였을 때 RANTES

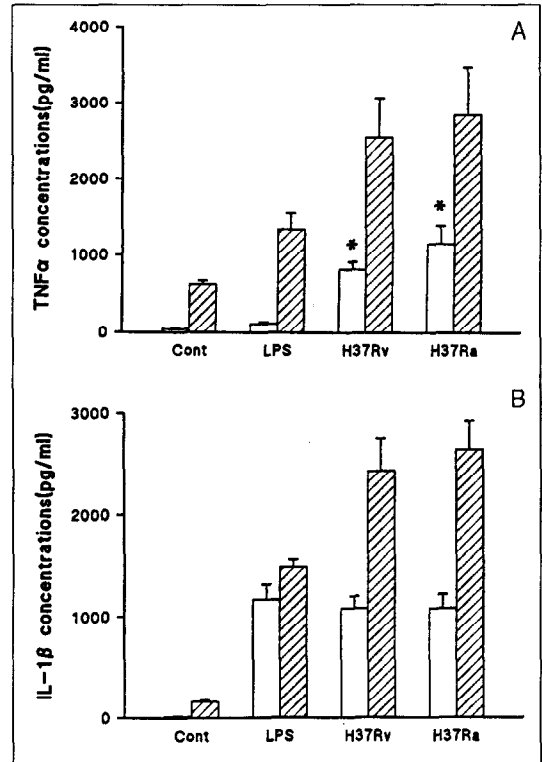


Fig. 1. TNF α and IL-1 β productions in cultured peripheral blood monocytes.

Panel A represents TNF α production and panel B represents IL-1 β production. TNF α and IL-1 β productions were increased in response to the stimulation of LPS, H37Rv, or H37Ra. TNF α and IL-1 β productions were greater in peripheral blood monocytes(PBM) stimulated with H37Ra than in PBM stimulated with H37Rv. This difference, however, was not statistically significant between two groups. Open bars represent the data in the absence of IFN γ and hatched bars represent the data in the presence of IFN γ .

*p<0.05, compared with LPS stimulation. (n=7)

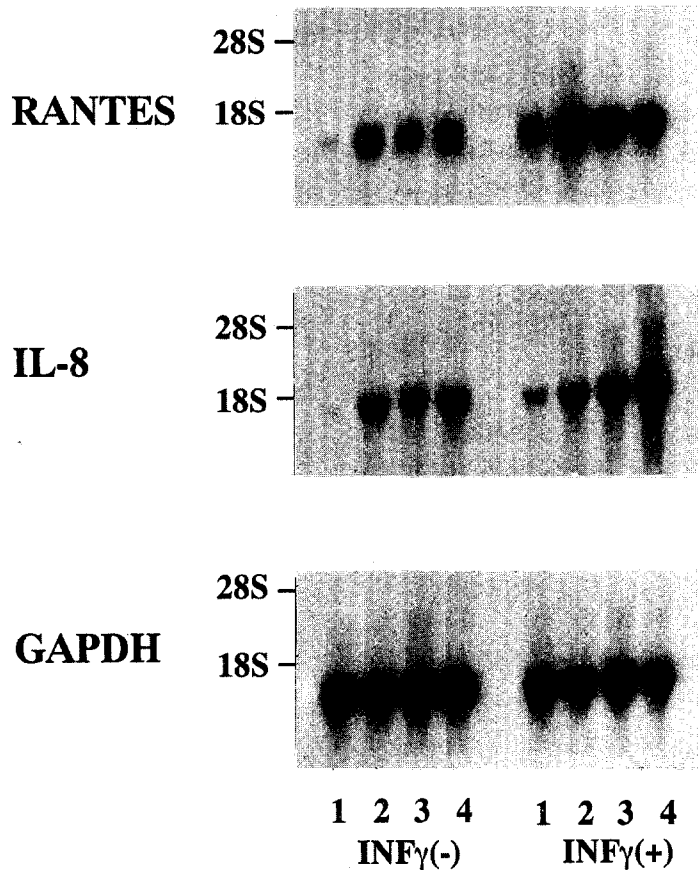


Fig. 2. A representative Northern blot analysis. Lane 1 represents control-conditioned media (CM), lane 2 represents LPS-CM, lane 3 represents H37Rv-CM, and lane 4 represents H37Ra-CM. RANTES and IL-8 mRNA expressions were increased in H37Ra groups compared with H37Rv groups. (n=7)

와 IL-8의 유전자 발현이 대조군에 비하여 의미있게 증가하였다($p < 0.001$). 또한 H37Ra 배양액으로 자극한 군에서 H37Rv 배양액으로 자극한 군에 비하여 RANTES와 IL-8의 유전자 발현이 의미있게 증가하였다 ($p < 0.05$, Fig. 2, 3). 그리고 IFN γ 로 전처치한 군에서 RANTES와 IL-8의 유전자 발현이 전처치하지 않은 군에 비하여 증가되었으나 그 양상에는 차이가 없었다.

3. A549 세포에서의 RANTES와 IL-8의 생성

A549 세포를 결핵균이나 LPS로 자극한 말초혈액 단핵세포 배양액으로 자극하였을 때 RANTES와 IL-8의 생성이 대조군에 비하여 의미있게 증가하였다. 그러나 유전자 발현과는 달리, H37Ra 배양액으로 자극한 군에서 H37Rv 배양액으로 자극한 군에 비하여 RANTES와 IL-8의 생성이 증가하였지만 통계적인

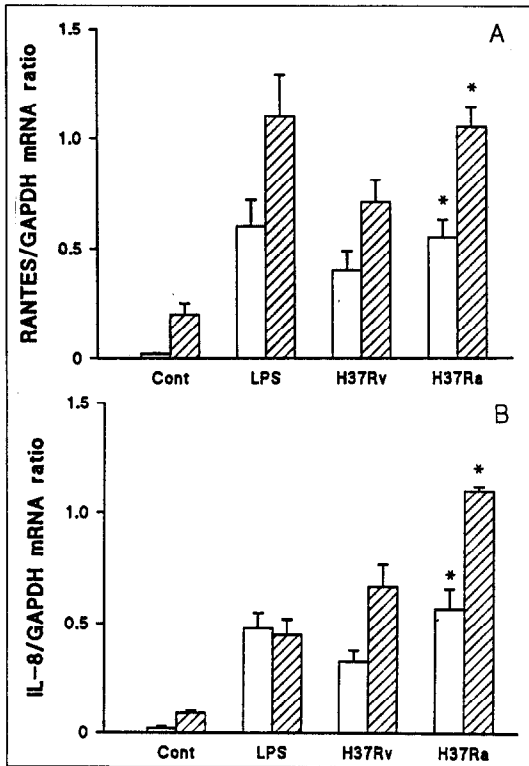


Fig. 3. RANTES and IL-8 mRNA expression in A549 cells.

Panel A shows RANTES mRNA expression and panel B shows IL-8 mRNA expression. Data are expressed as mean \pm SEM (n=7). RANTES and IL-8 mRNA expression were increased in A549 cells stimulated with H37Ra-conditioned media compared with H37Rv-conditioned media. Open bars represent the data in the absence of IFN and hatched bars represent the data in the presence of IFN.

* $p < 0.05$, compared with H37Rv

유의성은 없었다. 다만, IFN γ 로 전처리하지 않은 군에서는 H37Ra 배양액군에서 IL-8의 생성이 H37Rv 배양액군보다 의미있게 증가하였다. 유전자 발현과 마찬가지로 IFN γ 로 전처리 한 군에서 RANTES

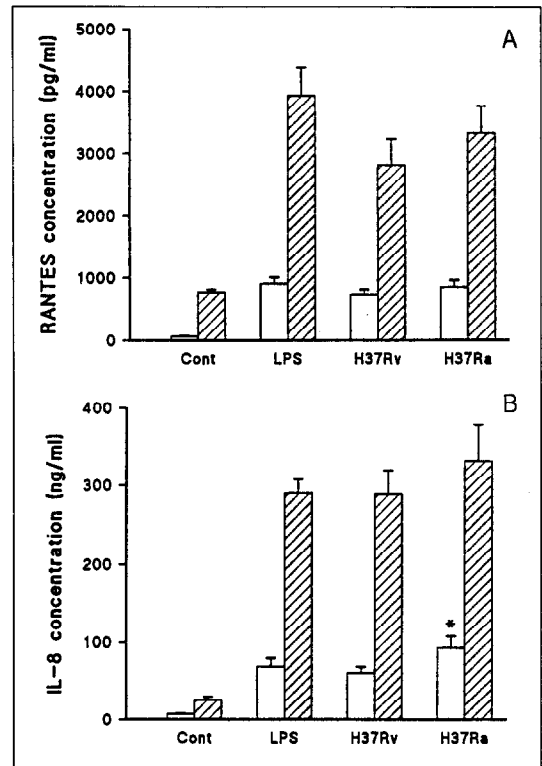


Fig. 4. RANTES and IL-8 production in A549 cells.

RANTES and IL-8 productions were increased in A549 cells stimulated with LPS-, H37Rv-, or H37Ra-conditioned media compared with control. IL-8 production was significantly greater in A549 cells stimulated with H37Ra conditioned media than in A549 cells stimulated with H37Rv conditioned media (* $p < 0.05$). RANTES and IL-8 productions were greater in A549 cells stimulated with conditioned media pretreated with IFN. However, there was no difference between H37Rv and H37Ra groups even in the presence of IFN. Open bars represent the data in the absence of IFN and hatched bars represent the data in the presence of IFN. (n=7)

와 IL-8의 생성이 전혀치하지 않은 군에 비하여 증가되었지만 그 양상에는 차이가 없었다 (Fig. 4).

고 찰

본 연구에서 말초혈액 단핵세포를 결핵균(H37Rv or H37Ra)이나 LPS로 자극하였을 때 말초혈액 단핵세포에서 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 대조군에 비해 의미있게 증가하였고(Fig. 1), 배양된 단핵세포의 상층액으로 다시 A549 세포를 자극하였을 때 A549 세포에서 RANTES와 IL-8의 유전자 발현과 생성이 대조군에 비하여 의미있게 증가하였다(Fig. 2, 3, 4). 말초혈액 단핵세포를 독성이 있는 균주인 H37Rv로 자극한 군과 독성이 없는 균주인 H37Ra로 자극한 군 사이에는 TNF α 와 IL-1 β 생성의 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 1). A549 세포를 말초혈액 단핵세포 배양액으로 자극하였을 때에는 RANTES와 IL-8의 유전자 발현이 H37Ra로 자극한 군에서 H37Rv로 자극한 군에 비해 의미있게 증가하였으나 그 차이는 크지 않았다(Fig. 2, 3). 그러나 유전자 발현과는 달리 A549 세포에서의 RANTES와 IL-8의 생성은 H37Ra로 자극한 군에서 증가하였지만 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 4). 이와 같은 사실로 보아 기도상피세포가 폐결핵에서 RANTES와 IL-8과 같은 강력한 chemokine을 분비하여 염증반응을 증폭시킴으로써 폐결핵의 병인에 능동적으로 참여함을 추정할 수 있었다. 그러나 결핵균의 독성 여부에 따른 기도상피세포에서의 chemokine 생성의 차이는 명확치 않았다.

본 연구에서 기도상피세포를 결핵균이나 LPS로 직접 자극하지 않고 우선 말초혈액 단핵세포를 자극하고 이 때 얻어진 배양액으로 기도상피세포를 자극하였는데, 이것은 결핵균이나 LPS로 기도상피세포를 직접 자극하여도 RANTES나 IL-8이 발현되지 않기 때문이었다^{6,10}. 실제로 인체에서 세균이나 결핵균이 폐를 침범하였을 때 기도상피세포가 이것에 대응하여 직접 chemokine을 생성하기보다는, 활성화된 폐포대식세포에서 생성된 TNF α 와 IL-1 β 와 같은 proinflam-

matory cytokine들이 기도상피세포를 paracrine fashion으로 자극하여 RANTES와 IL-8과 같은 chemokine을 생성하는 것으로 알려져 있기 때문에³ 본 연구에 사용된 모델이 의미가 있다고 생각된다. 다만 본 연구에서 폐포대식세포를 사용하지 않고 말초혈액 단핵세포를 사용하였는데, 이것은 정상인에서 폐포대식세포를 얻기가 어렵고 또한 정상인에서 얻어진 폐포대식세포도 사람에 따라 활성화된 정도가 매우 달라 일차로 말초혈액 단핵세포를 사용하였다.

Chemokine이란 염증세포에 강력한 화학주성을 갖는 세포매개물질들의 총칭으로서, 비슷한 분자구조를 갖는 약 8~10 킬로달톤 크기의 단백질이며, 현재까지 약 10여종이 밝혀져 있다^{14,16}. Chemokine은 그 생화학적 구조와 화학주성의 특성을 기준으로 2가지의 아과(subfamily)로 구분하는데 C-X-C 아과와 C-C 아과이다. Chemokine C-X-C 아과는 단백질구조의 첫 cysteine과 다음 cysteine 사이에 다른 아미노산(X)이 하나 삽입되어 있는 구조적 특징이 있다. 이러한 chemokine은 아과에 따라 화학주성의 차이를 보이는 특징이 있는데, IL-8을 포함하는 C-X-C 아과는 호중구에는 강력한 화학주성을 보이나 단핵구에는 화학주성을 보이지 않고, RANTES와 MCP-1을 포함하는 C-C 아과는 단핵구에는 강력한 화학주성을 보이나 호중구에는 화학주성을 보이지 않는다. 그외에도 chemokine은 임파구나 호산구, 호염기구에는 여러가지 상이한 작용을 나타낸다고 알려져 있는데, 예를 들면 RANTES는 기억세포(memory T-cell)에 화학주성을 가지며, IL-8은 T 임파구에도 화학주성을, RANTES와 MIP-1 α 는 호산구에 화학주성과 활성화를, MCP-1과 RANTES는 호염기구에서 히스타민 분비촉진을 한다는 사실이 보고되었다¹⁷. 그외에도 MIP-1 α 는 특정 골수 모세포에 강력한 억제 작용을 한다는 것이 알려지기도 했다¹⁸.

본 연구에서는 결핵균으로 자극한 것과 동시에 LPS로 자극하였는데, LPS로 자극한 것은 급성염증 질환을 대표하는 질환인 폐렴을 대표한다고도 볼 수 있다. 폐결핵이 만성염증질환이고 주로 대식세포와 임

파구가 관여하고, 폐렴은 급성염증질환이고 주로 호중구가 관여한다는 사실을 감안하면 본 연구에서 결핵균으로 자극한 군과 LPS로 자극한 군간에 발현되는 chemokine에 차이가 기대되었다. 그러나 기도상피세포에서 발현되는 RANTES와 IL-8이 결핵균으로 자극한 군과 LPS로 자극한 군간에 차이가 없었다. 이는 연구자들이 사용한 세포가 말초혈액 단핵세포였기 때문에 임파구가 포함되지 않아서 생체내 상황을 그대로 반영하지 못했다고 보인다. 그러나 결핵균과 LPS로 자극하였을 때 사람의 말초혈액 단핵세포에서 발현되는 IL-8과 MCP-1에 차이가 있다는 보고도 있어¹⁹⁾ 향후 RANTES와 IL-8 뿐 아니라 다른 chemokine 까지 연구에 포함시키면 생체내 상황을 보다 정확히 파악할 수 있을 것이다.

결핵균주의 독성여부에 따른 생체내 면역반응의 차이에 대해서는 최근 많은 보고가 있어 왔다. Erdman과 H37Ra LAM으로 쥐의 골수세포에서 분리한 대식세포를 자극하였을 때 $TNF\alpha$ 의 생성에 차이가 있고 $IFN\gamma$ 에 대한 반응에도 차이가 있다는 보고가 있다¹¹⁾. 또한 결핵균주의 독성에 따라서 쥐의 대식세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 생성에도 차이가 있다는 보고가 있다^{20, 21)}. iNOS는 nitric oxide(NO)를 생성시키고 oxygen radical과 반응하여 세균을 죽일 수 있는 reactive nitrogen intermediate(RNI)를 생성한다는 의미에서 결핵의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 그리고 iNOS는 $TNF\alpha$, IL-1 β 와 $IFN\gamma$ 과 같은 cytokine의 자극에 의해서 발현되므로, iNOS 생성의 차이는 결국은 염증세포에서 생성되는 cytokine의 차이로 볼 수 있으므로 본 연구의 가설과 부합함을 시사한다. 그러나 본 연구에서는 말초혈액 단핵세포에서 $TNF\alpha$ 와 IL-1 β 의 생성이 결핵균주의 독성여부에 따라 차이가 없었다.

A549 세포에서 RANTES와 IL-8의 유전자 발현은 H37Ra로 자극한 군에서 유의하게 증가하였으나 RANTES와 IL-8의 생성은 유의한 차이가 없었다. $IFN\gamma$ 로 전처리하지 않았을 때 IL-8의 생성이 H37

Ra로 자극한 군에서 유의하게 증가하였으나 IL-8의 농도에 따른 chemotactic activity를 감안하면 이 정도의 차이가 생체내에서 유의한 차이를 초래하리라 생각되지는 않는다. 지금까지 보고된 것과는 달리 결핵균주의 독성여부에 따라 차이가 나지 않았던 것은 지금까지의 실험은 주로 쥐의 대식세포를 대상으로 하였고 본 연구에서는 사람의 단핵세포를 이용하였기 때문이라고 추정된다. 또한 본 연구에서는 Erdman 대신 H37Rv를 사용하였고, 결핵균에서 추출한 LAM 대신에 결핵균으로 직접 자극하였던 점들이 영향을 미쳤을 것이라고 추정된다. 그리고 본 연구에서 대상으로 삼았던 정상인들이 대부분 병원에서 근무하는 의사들이어서 결핵균에 이미 많이 노출되었기 때문에, 엄밀한 의미에서 정상인이라 보기가 어렵고 개인에 따른 반응이 차이가 있어 결과를 의미있게 만들었을 가능성도 있다고 생각된다.

결핵균주의 독성여부뿐 아니라 결핵균에 대한 생체의 감수성 여부에 따라 chemokine 및 iNOS의 생성이 다르다는 보고들이 있어 흥미롭다. BCG-sensitive mice에서 분리한 대식세포와 BCG-resistant mice에서 분리한 대식세포간에 $IFN\gamma$ 에 대한 반응이 다르고, cytokine과 iNOS의 생성에 차이가 있다는 보고가 있다^{22, 23)}. BCG-sensitive mice와 BCG-resistant mice간의 감수성의 차이가 iNOS 보다는 natural resistance associated macrophage protein 때문이라는 보고도 있지만²⁴⁾, 감수성의 차이가 결국 대식세포에서 생성되는 cytokine의 적절성에 있다고 하는 부분은 염증세포에서 분비되는 cytokine이 결핵의 병태생리에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 결핵환자중에는 모든 항결핵제에 감수성이 있고 항결핵제를 꾸준히 복용하는데도 결핵이 악화되는 환자들을 임상에서 드물지 않게 보게 되는데 이런 환자들의 chemokine 생성능력을 본 실험에 사용된 실험 모델을 이용하여 연구해 보면 결핵의 병태생리를 이해하는데 도움이 될 것이다. 본 연구에서는 단순히 말초혈액 단핵세포를 사용하였는데, 사람의 단핵세포와 임파구를 같이 배양하는 방법을 사용하면 결핵환자와 정

상인간에 IFN γ 의 생성에 차이가 있다고 보고된 것이 있어²⁵⁾ 향후에는 말초혈액 단핵세포와 임파구를 같이 배양하는 방법을 사용하는 것이 생체내 상황을 좀더 근접하게 반영하리라 생각한다.

결론적으로 기도상피세포가 폐결핵에서 RANTES와 IL-8과 같은 강력한 chemokine을 분비하여 염증 반응을 증폭시킴으로써 폐결핵의 병인에 능동적으로 참여함을 추정할 수 있었다. 그러나 말초혈액 단핵세포에서의 TNF α 와 IL-1 β 의 생성은 결핵균주의 독성 여부에 따라 차이가 없었고, A549 세포에서도 RANTES와 IL-8의 유전자 발현은 H37Ra에서 유의하게 증가하였으나 RANTES와 IL-8의 생성은 유의한 차이가 없어 결핵균의 독성 여부가 균주에 따른 생체의 면역반응 즉 chemokine의 생성의 차이 때문이라는 본 연구의 가설을 증명할 수는 없었다. 폐결핵의 병인을 이와 같은 가설 하나로 설명하기는 불가능하고 좀 더 복합적인 이해와 연구가 필요할 것으로 사료되고, 생체반응을 실제와 보다 비슷하게 반영할 수 있는 실험모델을 사용하면 가설의 증명도 가능하리라 기대한다.

요 약

연구배경 :

저자들은 최근 결핵균의 자극에 의해 peripheral blood monocytes (PBM)에서 IL-1 β 와 TNF α 가 생성되고, 기도상피세포에서는 IL-8과 RANTES와 같은 chemokine이 생성된다는 사실을 밝힌 바 있다. 이와같은 사실은 기도상피세포가 IL-8과 RANTES와 같은 chemokine을 분비함으로써 결핵의 병인에 능동적으로 참여함을 시사한다고 하겠다.

기도상피세포에서 발현하는 chemokine들이 결핵의 병태생리에 관련한다면, 폐결핵을 일으키는 독성을 가진 균주인 H37Rv와 폐결핵을 일으키지 않는 균주인 H37Ra로 자극하였을 때 기도상피세포에서 분비되는 chemokine의 성상이 다를 것이라는 가정이 가능하다. 실제로 독성을 가지고 있는 Erdman 균주와 독성을 가지고 있지 않는 H37Ra의 lipoarabino-

mannan(LAM)의 구조가 다르고, 이 LAM으로 대식세포를 자극하였을 때 H37Ra LAM은 대식세포에서 TNF α 를 생성시키지만 H37Rv LAM은 TNF α 를 생성시키지 못하고 이와같은 차이가 결핵균에 대한 생체의 방어기전을 설명한다는 보고가 있다.

본 연구는 폐결핵의 병태생리에서 기도상피세포의 역할을 규명하고자, 독성이 있는 균주인 H37Rv와 독성이 없는 균주인 H37Ra를 사용하여 결핵균의 독성 여부에 따른 기도상피세포에서 분비되는 chemokine의 차이를 연구하고자 하였다.

방 법 :

정상인에서 채취한 말초혈액에서 말초혈액 단핵세포(PBM)를 분리하여, sonicated H37Rv, H37Ra(5×10^5 bacilli, ATCC) 또는 LPS($10 \mu\text{l/ml}$)로 자극하면서 24시간 동안 배양하였다. 또한 PBM에 대한 interferon gamma(IFN γ)의 영향을 평가하고자 PBM를 결핵균으로 자극하기 한 시간전에 IFN γ (10 ng/ml, R & D)로 전처리한 군과 IFN γ 전처리 없이 자극한 군을 두었다. 24시간후 상층액을 채취하여 상층액의 일부는 -70°C 에서 보관하였고 이후 ELISA kit(R & D)를 이용하여 TNF α 와 IL-1 β 의 농도를 측정하였다.

배양된 PBM의 상층액(1 : 2 희석액)으로 배양된 A549 세포를 다시 자극하면서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양후, 상층액은 IL-8, RANTES의 측정을 위하여 -70°C 에서 보관하고, 남아있는 A549 세포에서 tRNA를 추출하였다. 배양 상층액에서는 ELISA kit(R & D)를 이용하여 IL-8, RANTES의 농도를 측정하였고, 추출한 tRNA는 Northern blot analysis를 이용하여 IL-8, RANTES의 mRNA의 양을 측정 정량하였다.

결 과 :

말초혈액 단핵세포를 LPS, H37Rv, 또는 H37Ra로 자극하였을 때 대조군에 비하여 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 유효하게 증가하였다. 독성이 없는 H37Ra로 자극하였을 때 독성이 있는 H37Rv로 자극하였을 때보다 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 많았으나 통

계적인 유의성은 없었다. IFN γ 로 전처리하였을 때 TNF α 와 IL-1 β 의 생성이 전처리하지 않은 군에 비해 증가하였으나 H37Rv군과 H37Ra군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

A549 세포를 결핵균이나 LPS로 자극한 말초혈액 단핵세포 배양액으로 자극하였을 때, RANTES와 IL-8의 유전자 발현이 대조군에 비하여 의미있게 증가하였다($p < 0.001$). 또한 H37Ra 배양액으로 자극한 군에서 H37Rv 배양액으로 자극한 군에 비하여 RANTES와 IL-8의 유전자 발현이 의미있게 증가하였다 ($p < 0.05$).

A549 세포를 결핵균이나 LPS로 자극한 말초혈액 단핵세포 배양액으로 자극하였을 때 RANTES와 IL-8의 생성이 대조군에 비하여 의미있게 증가하였다. 그러나 유전자 발현과는 달리, H37Ra 배양액으로 자극한 군에서 H37Rv 배양액으로 자극한 군에 비하여 RANTES와 IL-8의 생성이 증가하였지만 통계적인 유의성은 없었다.

결 론 :

기도상피세포는 폐결핵에서 RANTES와 IL-8과 같은 강력한 chemokine을 분비하여 염증반응을 증폭시킴으로써 폐결핵의 병인에 능동적으로 참여함을 추정할 수 있었다. 그러나 말초혈액 단핵세포에서의 TNF α 와 IL-1 β 의 생성은 결핵균주의 독성여부에 따라 차이가 없었고, A549 세포에서도 RANTES와 IL-8의 유전자 발현은 H37Ra에서 유의하게 증가하였으나 RANTES와 IL-8의 생성은 유의한 차이가 없어 결핵균의 독성 여부가 균주에 따른 생체의 면역반응 즉 chemokine 생성의 차이 때문이라는 본 연구의 가설을 증명할 수는 없었다.

Acknowledgement

이 논문은 1996년도 대한 결핵 및 호흡기학회 학술연구비의 지원을 받았고, 부분적으로 삼성전자 부설 삼성생명과학연구소(C-95-007-3) 연구비의 지원을 받아 수행되었습.

참 고 문 헌

1. 한 용철 : 임상호흡기학, p165, 서울, 일조각, 1990
2. 보건복지부, 대한결핵협회 : 제7차 전국결핵실태조사 결과. p13, 서울, 1996
3. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Ill JL, Toews GB, Westwick J, Strieter RM : Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest.* 86 : 1945, 1990
4. Davies RJ, Devalia JL : Epithelial cells. *Br. Med. Bull.* 45 : 85, 1992
5. Churchill L, Chilton FH, Resau JH, Bascom R, Hubbard WC, Proud D : Cyclooxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis.* 140 : 449, 1989
6. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Baraniuk JN, Adcock IM, Chung KF, Barnes PJ : Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells. *Immunol.* 81 : 389, 1994
7. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Mak JCK, Robbins RA, Chung KF, Barnes PJ : Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression in pulmonary cultured human airway epithelial cells. *Am J. Physiol.* 267 : L398, 1994
8. Kwon OJ, Jose PJ, Robbins RA, Schall TJ, Williams TJ Barnes PJ : Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12 : 488, 1995
9. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S : Expression of potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage colony stimulating fac-

- tor, and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **89** : 1001, 1992
10. Kwon OJ, Kim JH, Au BT, Jose PJ, Kim HJ, Nhung MP, Rhee CH, Han YC : RANTES and IL-8 were expressed in airway epithelial cells in response to tubercle bacilli stimulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153** : A130, 1996
 11. Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM : Macrophage activation : Lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.* **150** : 1886, 1993
 12. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G : A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer.* **17** : 62, 1976
 13. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162** : 156, 1987
 14. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N : Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Ann Rev Immunol.* **9** : 617, 1991
 15. Schall TJ, Simpson NJ, Mak JY : Molecular cloning and expression of the murine RANTES cytokine : structural and functional conservation between mouse and Man. *Eur J Immunol.* **22** : 1477, 1992
 16. Schall TJ : Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine.* **3** : 165, 1991
 17. Alam R, Stafford S, Forsythe P : RANTES is a chemotactic and activation factor for human eosinophils. *J Immunol.* **150** : 3442, 1993
 18. Broxmeyer HE, Sherry V, Cooper S : Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J Immunol.* **150** : 3448, 1993
 19. Kasahara K, Tobe T, Yomita M, Mukaida N, Shao-Bo S, Matsushima K, Yoshida T, Sugihara S, Kobayashi Kazuo : Selective expression of monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 in human blood monocytes by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Inf. Dis.* **170** : 1238, 1994
 20. Roach TIA, Barton CH, Chatterjee D, Liew FY, Blackwell JM : Opposing effect of interferon-gamma on iNOS and interleukin-10 expression in lipopolysaccharide and mycobacterial lipoarabinomannan-stimulated macrophages. *Immunol.* **85** : 106, 1995
 21. Adams GW, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL : Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from *Mycobacterial* strains with different degree of virulence. *Infect. Immun.* **61** : 4173, 1993
 22. Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D : Nitrite production by macrophage derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN-gamma and infection with BCG. *Immunol.* **82** : 457, 1994
 23. Doi T, Ando M, Akaike T, Suga M, Sato K, Maeda H. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* **61** : 1980, 1993
 24. Brown DH, LaFuse W, Zwilling BS : Cytokine-mediated activation of macrophages from

Mycobacterium bovis BCG-resistant and -sensitive mice : Differential effect of corticosterone on antimycobacterial activity and expression of the *Bcg* gene(Candidate *Nramp*). *Infect. Immun.* 63 : 2983, 1995

25. Johnson BJ, McMurray DN : Cytokine gene expression by cultures of human lymphocytes with autologous *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect. Immun.* 62 : 1444, 1994