

□ 원 저 □

치료실패 폐결핵 환자의 세포성면역반응에 관한 연구[†]

충남대학교 의과대학 미생물학교실, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실¹,
건양대학교 의과대학 미생물학교실²

박정규, 박장서, 김화중, 조은경, 민들레, 임재현, 서지원¹, 백태현²

= Abstract =

Evaluation of the Cell-Mediated Immunity in Treatment Failure Pulmonary Tuberculosis

Jeong Kyu Park, M.D., Jang Seo Park, M.D., Hwa Jung Kim, M.D.,
Eun Gyeong Jo, M.D., Dullei Min, B.S., Jae Hyun Lim, B.S.,
Ji Won Suhr, M.D.,¹ Tae Hyun Paik, M.D.²

Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon, Korea,

Department of Internal Medicine, Catholic University, Taejeon, Korea¹,

Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Nonsan, Chungnam, Korea².

Background : Ineffective cell-mediated immune response in human tuberculosis is associated with a depressed Th1 cytokine response and reduced production of IFN- γ . Most persons infected with *Mycobacterium tuberculosis* are healthy tuberculin reactors with protective immunity, but a minority with ineffective immunity develop extensive pulmonary tuberculosis. The cell-mediated immune response is an important aspect of host resistance to mycobacterial infection and is believed to be tightly regulated by a balance between Th1 cytokines including IFN- γ , IL-12, IL-18, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and Th2 counterparts such as IL-4, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).

Methods : Proliferation and mRNA expression of IFN- γ , RANTES and MCP-1 by RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in response to in vitro stimulation with mycobacterial antigens were compared in pulmonary tuberculosis patients with cured and treatment failure and in tuberculin-positive and tuberculin-negative healthy subjects.

Results : Defective proliferative responsiveness to aqueous TSP antigen was involved with treatment failure tuberculosis patients. Aqueous TSP antigen-induced IFN- γ and RANTES mRNA expression was decreased in treatment failure tuberculosis patients compared with healthy tuberculin reactors and cured tuberculosis pa-

[†]본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(기초의학 BM 97-192)에 의하여 연구되었음.

tients (23.1% versus 90.0% for IFN- γ and 46.2% versus 70.0% versus 46.2% for RANTES). The frequency of MCP-1 mRNA expression to aqueous TSP antigen in treatment failure tuberculosis patients was greater than in healthy tuberculin reactors and cured tuberculosis patients (76.9% versus 40.0%).

Conclusion : The increasing expression of MCP-1 mRNA in response to aqueous TSP antigen might be predicted to favor Th2 responses and restricted Th1 responses in treatment failure of pulmonary tuberculosis. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 13-25)

Key words : Pulmonary tuberculosis, IFN- γ , Monocyte chemoattractant protein-1

서 론

우리나라는 다제병합요법과 국가의 결핵관리 사업으로 결핵환자가 감소하고 있지만, 우리와 비슷한 경제수준의 외국에 비하여 아직도 관리 대상환자가 많다. 또한 결핵으로 인한 사망율도 인구 10 만명당 9.6 (96년)으로 대만의 9.4(87년), 말레이시아의 5.4 (80년), 일본의 2.5(94년)등에 비하여 높아 결핵은 여전히 우리나라의 주요 사망원인이다. 이와 같은 결과는 부적절한 처방, 환자의 불규칙한 투약과 중단 등으로 약제내성결핵균이 발생하여 전염원으로 계속 존재하기 때문이다^{1,2)}. 그러므로 적극적인 치료법의 개발이 시급히 요청되고 있으나, 탁월한 화학요법제의 개발이 되지 못하고 있는 현 시점에서는 항결핵제의 치료효과를 상승시킬 수 있는 보조치료요법의 개발이 요구된다. 결핵의 보호면역(protective immunity)은 전적으로 세포성면역반응에 의존적이다. 그러므로 결핵감염의 감수성을 조절하는 숙주의 면역학적 요소를 발견하여 탁월한 보호면역을 유도할 수 있는 면역치료법의 개발은 성공적인 결핵치료를 위하여 매우 중요한 연구과제 중의 하나이다³⁾.

결핵은 대식세포와 T 림프구가 주로 관여하는 세포성면역에 의하여 발생하는 대표적인 질환이다. 특히 Th1 또는 Th2 림프구 기능에 의하여 이루어지는 면역반응의 결과에 따라 결핵균에 대한 감수성 또는 저항성이 결정된다. 결핵환자들은 결핵항원에 대하여 세포성면역은 감소되어 있고 체액성면역은 증가되어 있으며, IL-10 또는 TGF- β 생산 증가에 의하여 IL-

12와 IFN- γ 의 생산이 억제되어 Th1 림프구의 기능이 억제되어 있다고 한다^{4,5)}. 그러므로 항결핵약제 치료에 실패한 환자는 이러한 부적절한 면역반응을 적절한 Th1 반응의 보호면역반응으로 전환시킬 수 있는 면역치료가 요구된다.

결핵의 세포성면역반응에서 T 림프구는 보호면역반응의 조절역할을 하며, T 림프구에서 생산되는 IFN- γ 의하여 활성화된 대식세포는 작동세포의 역할을 한다. Transgenic mice를 이용한 실험에서도 IFN- γ 가 결핵균 감염에 대한 저항에 매우 중요한 역할을 하며, 인체감염에서도 분명히 중요한 역할을 한다고 한다⁶⁾. CC chemokine으로 분류되는 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein (MIP-1), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) 등은 림프조직 및 감염부위로 단핵구 및 항원특이 T 세포들을 동원할 뿐 아니라 모여든 T 세포 활성화에도 필수적으로 작용함으로써 결핵방어면역 구축에 매우 중요한 역할을 한다^{7,8)}.

Chemokine은 항원특이 Th1 또는 Th2 클론들의 증식조절 뿐만아니라 항원제시세포를 활성화시키는 것으로 밝혀지고 있어서 결핵면역에서 다양하고 중요한 역할을 한다고 알려져 있다⁹⁾. RANTES는 IFN- γ 를 생산하는 Th1 세포에서 생산되며 지연형과민반응에서 발현되고, MCP-1은 대식세포에서 생산되어 IL-4의 생산을 촉진하고 대식세포의 IL-12 생산을 억제하여 Th2 반응과 관련되어있다고 한다^{9,10)}.

폐결핵은 임상경과에 따라 결핵균항원에 특이하게

IFN- γ 발현에 차이가 다양하게 관찰된다. 결핵신환에서 IFN- γ 의 발현이 없다가 치료 중에 대부분의 환자는 IFN- γ 가 발현되지만 일부환자는 치료 후에도 발현이 되지 않으며, 특히 치료실패 환자에서는 IFN- γ 의 발현비율이 매우 낮았다고 한다¹¹⁾. 폐결핵의 이와 같은 면역병리 현상은 결핵균 단백질항원에 특이적이며, T 림프구에서 생산되는 IL-2, IFN- γ 및 RANTES와 항원제시세포에서 생산되는 IL-10, IL-12, TGF- β , TNF- α 및 MCP-1 등의 상호작용에 의하여 조절된다고 생각된다.

최근 충남의대 미생물학교실에서는 결핵균체로부터 Triton X-100을 이용하여 균체단백항원(Triton X-100 solubilized protein, TSP)을 분리하여 PPD 양성반응 건강인의 말초혈액 단핵구에 대한 Th1 반응 유도항원임을 확인하였다. 그러나 일부 치료실패 환자군에서 림프구 증식반응의 감소와 IFN- γ 발현의 감소되어 관찰되었다¹²⁻¹⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 TSP 항원 중에 포함된 면역억제 성분으로 알려진 lipoarabinomannan, lipomannan 및 phosphatidylinositol mannosides 등을 Triton X-114 phase separation 방법으로 제거한 수용성 TSP 항원을 개발하여 치료실패 환자의 면역병리 연구에 이용하고자 하였다. 건강인, 폐결핵으로 진단되어 단기치료지침에 의하여 균음전화된 치료반응 환자 및 치료실패 환자의 말초혈액 단핵구를 대상으로 각 연구대상 집단간의 PPD 항원과 수용성 TSP 항원에 의한 세포면역반응의 특징을 비교 관찰하고자 하였다. 즉, Th1 반응과 Th2 반응에 각각 관계가 있는 IFN- γ 및 RANTES와 MCP-1 발현을 조사하여 치료실패 환자의 면역병리 현상을 이해하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

대상 폐결핵환자는 대학병원에 내원하여 엑스선 사진촬영, 도말검사 및/혹은 배양검사 양성 등으로 진단

된 환자로 하였다. 이 환자들은 6개월 단기요법치료를 받았으며 당뇨병, 종양 혹은 면역억제제치료를 받는 환자는 대상에서 제외되었다. 소정의 치료종결시 또는 종결 1개월 이전에 최소 1회 이상 도말음성 이면서 추적관찰이 가능하였던 10명의 환자를 치유자로 판정하였다. 치유자의 말초혈액단핵의 분리는 치료 후 2개월에 분리한 단핵구를 대상으로 하였다. 치료실패 환자는 치료 시작후 1년 혹은 그 이후에도 계속 도말 양성 혹은 배양검사 양성인 환자 13명을 대상으로 하였다¹⁶⁾.

건강군은 엑스선 사진촬영으로 정상인 대학생을 대상으로 하였으며 PPD 피부반응검사를 실시하여 PPD 양성자는 경결의 크기가 15mm 이상, 음성자는 5mm 이하인 대상자 각각 5명으로 하였다.

2. 방 법

1) 결핵균 배양과 항원

① 수용성 TSP 항원의 제조

Mycobacterium tuberculosis H37Rv를 Sauton's medium에서 37°C, 6주간 표면배양한 후 균체를 수집하여 균체 100 gr당 멸균 PBS를 200 ml씩 가하여 2회 세척한 후에 1 mM phenylsulfonylfluoride (PMSF)가 포함된 1% Triton X-100 용액 (1% Triton X-100/PMSF)을 200 ml 가하고 shaking incubator에서 37°C, 16시간 진탕배양하였다. 진탕 배양한 후 결핵균체로부터 TSP 항원액을 분리하기 위하여 10,000 rpm (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed, Du Pont Instruments, USA), 1시간 원심분리한 후 Triton X-100에 의해 추출되는 상층액을 취하였다. 추출된 상층액은 0.22 μ m membrane filter로 여과필균하고 이어서 ultrafiltration으로 10배정도 농축한 다음 PBS로 투석하여 10-80% 황산암모늄 염석분획을 취하였다. 10-80% 황산암모늄 염석분획은 다시 PBS로 투석한 후 Triton-X 114 phase separation 방법¹⁷⁾을 이용하여 수용성 분획(aqueous phase)과 계면활성 분획(detergent

phase)으로 분리하였다. 이 중 수용성 분획만을 취하여 단백질 농도를 측정 후 여과멸균하여 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

② PPD 항원

피부반응검사 및 T 림프구 자극실험의 PPD 항원은 Denmark의 "Statens Seruminstitut"에서 구입한 표준 PPD 항원을 사용하였다. 피부반응 검사에는 5 TU/ 0.1 μ l의 Tuberculin PPD RT 23을, in vitro test에는 1 μ g/ml의 Tuberculin PPD를 각각 사용하였다.

2) 말초혈액 단핵구의 준비

공혈자로부터 heparin(중의제약, 25,000 IU)으로 전처치한 주사기로 20 ml의 정맥혈을 채혈하여 Histopaque (Sigma 1077, density 1.007) 20 ml 위에 조심스럽게 중첩한 후 1,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 중간층의 단핵세포를 수거하여 RPMI 1640 (GIBCO 430-1800) 기초 배양액으로 1,200 rpm에서 10분간씩 3회 세척하였다. 최종적으로 10 % fetal bovine serum (GIBCO)이 첨가된 RPMI 1640 배지(RPMI 1640 완전배양액)에 부유하여 trypan blue 염색으로 살아있는 세포수를 측정한 후 1×10^6 /ml이 되도록 조정하였다.

3) 말초혈액 단핵구에 대한 결핵항원 자극 및 배양

말초혈액 단핵구를 세포수 1×10^6 /ml로 조정하여 24 well culture dish에 각각 1 ml씩 분주하고 PPD, TSP 항원 각각 1 μ g/ml가 포함된 RPMI 1640 완전배양액을 가하여 5일 배양 후 역전사효소 중합효소 연쇄반응에 의한 cytokine mRNA 발현분석에 이용하였다. 단핵구 증식실험 및 IFN- γ , MCP-1, RANTES 유전자 발현의 양성대조로 사용한 phytohemagglutinin (PHA, Sigma)는 5 μ g/ml의 농도로 자극하였다.

4) 단핵구 증식 실험

말초혈액 단핵구를 96-well U microtiter plate(Co-

star, USA)에 3.0×10^4 /well 되도록 분주하여 위에서 기술한 조건하에서 5일간 배양하였다. 배양 종료 18시간 전에 3 H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 1 μ Ci/well 씩 pulse한 후 multiple cell harvester (Skatron, Norway)로 harvest하여 liquid scintillation counter (Beckman, USA)로 3 H-thymidine incorporation을 측정하였다. 림프구 증식 실험은 3배수 (triplicate)로 실시하고 림프구 증식의 표시는 counts per minute (cpm) 또는 자극지수 (stimulation index, SI)로 표현하였다. 자극지수는 항원 혹은 PHA 자극 후 림프구의 평균 cpm을 무자극 대조 림프구의 평균 cpm으로 나눈 값으로 산출하였다.

5) 역전사효소 중합효소연쇄반응(RT-PCR)에 의한 cytokine mRNA의 발현 분석

Total RNA를 이용한 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 이어서 PCR에 의하여 DNA를 증폭하였다. 말초혈액 단핵구를 결핵균 단백질 항원으로 자극한 후 RNeasy kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, RT-PCR은 각각의 조건에서 10 μ g의 총 RNA를 이용하였다. 먼저 RNA 시료를 65℃에서 5분간 가열하여 denaturation시키고 얼음에 담가 냉각시킨 후 4 μ l의 10x RT buffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M MgCl₂), 4 μ l의 10x dNTP (2.5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)을 가하고 20 μ M의 oligo-dT₁₅, 5U의 AMV reverse transcriptase (Poscochem R&D center, Korea)와 총 반응액이 40 μ l가 되도록 증류수를 가한 후 42℃에서 1시간 반응하여 cDNA를 합성하였다.

cDNA 산물은 99℃에서 5분간 가열하여 역전사효소를 불활성화시킨 다음 얼음에 담가 냉각하였다. 그 후 cDNA 산물 중 각각 1 μ l씩 취하여 다음과 같은 동일한 조건에서 PCR을 시행하였다. 5 μ l의 10x PCR buffer (0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl₂), 5 μ l의 10x dNTP, 20 μ M의 3'

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR product sizes for cytokine cDNAs

Gene	Primer	Size(bp)
IFN- γ	5' TGG CTT TTC AGC TCT GCA TCG 3'	465
	5' TCG ACC TCG AAA CAG CAT CTG 3'	
β -actin	5' TCA TGC CAT CCT GCG TCT GGA CCT 3'	524
	5' TCA TGC CAT CCT GCG TCT GGA CCT 3'	
MCP-1	5' CCA ATT CTC AAA CTG AAG CTC GCA C 3'	373
	5' CTT AGC TGC AGA TTC TTG GGT TGT G 3'	
RANTES	5' ACC ACA CCC TGC TTT GCC TAC ATT GCC 3'	162
	5' CTC CCG AAC CCA TTT CTT CTC TGG GTT GGC 3'	

-primer 및 5' -primer, 1 U Taq DNA polymerase 를 각 tube에 첨가하여 총 반응액이 50 μ l 되도록 증류수를 가하였다. 연구 대상 cytokine의 primer 염기서열과 PCR 산물의 크기는 Table 1에 나타내었으며 중합효소연쇄반응에 사용된 oligonucleotide primer들은 바이오니아에서 PAGE 정제급을 주문 합성하여 사용하였다. PCR은 DNA thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 35회의 cDNA 증폭반응을 실시하였다. 모든 유전자에 대한 PCR 조건은 동일하게 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 1분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 반응시켰다. PCR이 끝난 후, 9 μ l의 증폭된 PCR산물을 취하여 10x gel loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/50% glycerol)와 잘 섞은 다음 1 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel 상에 Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer하에서 전기영동 하였으며 이동한 DNA 밴드의 위치를 자외선 투사기 상에서 관찰하였다.

6) 통계학적 처리

단핵구 증식실험 결과는 분산분석에 의해 검증하였으며 p 값이 0.05 이하를 보이는 경우 유의한 결과로 판단하였다. 단핵구에서의 cytokine 발현은 전체 대상 환자에 대한 발현환자의 %로 나타내었다.

결 과

1. 수용성 TSP 항원에 의한 말초혈액단핵구의 증식 효과

PPD, 수용성 TSP 항원 및 PHA 각각 1.0 μ g/ml 및 5.0 μ g/ml 로 건강군, 치유된 폐결핵환자 및 치료실패 폐결핵환자로부터 분리한 말초혈액 단핵구를 5일 동안 자극하여 3 H-thymidine incorporation 방법으로 증식능을 관찰하였다(Table 2, Fig. 1). 이 실험에서 적용한 항원의 농도는 예비실험으로 각각 결정되었다. PPD 피부반응 검사에서 음성이었던 건강군을 PPD 항원으로 자극한 경우 자극지수가 0.9에서 3.8 이었으며, TSP 항원에서는 0.5부터 2.1이었다. PHA로 자극한 경우는 1.1에서 87.4로 차이가 많았다. PPD 피부반응 검사에서 양성이었던 건강군을 PPD 항원으로 자극한 경우 자극지수가 4.4에서 28.9이었으며, TSP 항원에서는 4.9부터 27.2이었다. PHA로 자극한 경우는 7.9에서 69.7 이었다. 이 실험결과와 Young D 등의 보고를 참고하여 자극지수 4 이상을 유의한 증식반응 양성자로 결정하였다¹⁸⁾. 그러므로 PPD 피부반응 검사에서 양성이었던 건강군은 모두 PPD 및 TSP 항원에 의한 증식반응 양성자이었으며, PPD 피부반응 검사에서 음성이었던 건강군은 모두 증식반응 음성자로 판정되었다. 치유된 환

Table 2. Proliferative response of PBMCs to PPD or TSP antigen in healthy subjects, cured and treatment failure of pulmonary tuberculosis

Stimuli \ Subject	Healthy control		Pulmonary tuberculosis	
	PPD(+) N=5(%)	PPD(-) N=5(%)	Cured N=10(%)	Tx failure N=13(%)
PPD	5(100)	0	7(70.0)	4(30.8)*
TSP	5(100)	0	7(70.0)	2(15.4)*
PHA	5(100)	3(60.0)	9(90.0)	11(84.6)

The stimulation index of >4 was considered a positive response. Results are expressed as numbers of positive subjects (%). * $P<0.05$ compared with cured.

Table 3. The frequency of IFN- γ mRNA expression in PBMCs stimulated with PPD or TSP antigens for 5 days

Stimuli \ Subject	Healthy control		Pulmonary tuberculosis	
	PPD(+) N=5(%)	PPD(-) N=5(%)	Cured N=10(%)	Tx failure N=13(%)
PPD	5(100)	3(60.0)	9(90.0)	3(23.1)*
TSP	4(80.0)	4(80.0)	9(90.0)	3(23.1)*
PHA	5(100)	5(100)	10(100)	6(46.2)

*Data are expressed as the number of subject with mRNA expression(%).

* $P<0.05$ compared with cured.

자는 PPD 및 TSP 항원에 10명중 7명(70.0%)이 유의한 증식반응을 보였으며, PHA로 자극한 경우는 10명중 9명이 증식반응 양성자이었다. 치료실패 환자는 PPD 항원에 13명중 4명(30.8%)이, TSP 항원에 의하여 13명중 2명(15.4%)만이 양성반응을 보였으나 PHA에 대한 증식반응은 84.6%로 치료실패 환자는 결핵균 단백항원에만 증식반응이 현저히 감소되어 있었다.

2. 수용성 TSP 항원에 의한 말초혈액단핵구의 IFN- γ mRNA의 발현

PPD, 수용성 TSP 항원 및 PHA 각각 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 건강군, 치유된 폐결핵환자 및 치료실패 폐결핵 환자로부터 분리한 말초혈액 단핵구

를 5일 동안 자극한 후에 total RNA를 분리하여 IFN- γ mRNA의 발현 정도를 RT-PCR 방법으로 조사하였다(Table 3, Fig. 1). 수용성 TSP 항원과 PPD 항원을 비교하였으며, 면역반응을 확인하기 위하여 PHA로 16시간 동안 자극하여 양성 대조군으로 이용하였다. PPD 피부반응 양성인 건강인들이나 치유된 폐결핵환자는 수용성 TSP 또는 PPD항원에 의하여 80% 이상 IFN- γ mRNA의 발현 빈도를 보였다. 그러나 치료실패 환자는 23.1%의 발현빈도만이 관찰되었다. PPD 피부반응 양성 및 음성 건강인과 치유된 환자 등 모두는 PHA에 의하여 IFN- γ mRNA가 발현되었으나 치료실패 폐결핵환자는 PHA에 의하여 46.2%만 발현이 유도되었다. PPD 또는 TSP 항원은 치료실패환자의 IFN- γ mRNA 발현 유도에 차이가 관찰되지 않았다.

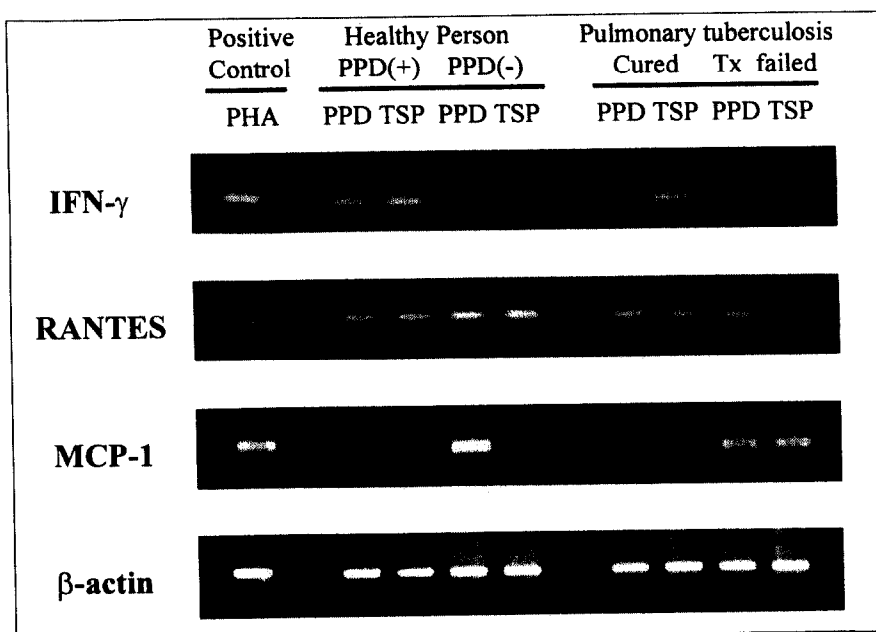


Fig. 1. Cytokine mRNA expression in PBMCs from tuberculosis patients and healthy controls. PBMCs were cultured with PPD or TSP antigen of *Mycobacterium tuberculosis* for 5 days. PBMCs were stimulated with PHA for 48 hours as a positive control. mRNA expression for IFN- γ , RANTES, MCP-1 and β -actin was determined by RT-PCR. Expression of β -actin was shown as a loading control. Tx failure means a treatment failure tuberculosis patients.

3. 수용성 TSP 항원에 의한 말초혈액단핵구의 chemokine mRNA의 발현

1) 수용성 TSP 항원 자극에 의한 RANTES mRNA의 발현

정상 건강인 및 치유된 환자의 말초혈액단핵구는 PHA 자극에 의하여 RANTES mRNA가 각각 100%와 90%로 발현되었다. 그러나 치료실패환자는 69.2%로 낮은 발현 빈도를 보였다(Table 4, Fig. 1). PPD와 수용성 TSP 항원의 RANTES mRNA 발현 유도 능력을 비교하여 보면, PPD로 자극한 경우에는 치유된 환자와 치료실패 환자에서의 발현빈도가 각각 80%와 76.9%로 차이를 보이지 않았으나 수용성 TSP는 치유된 환자 70%에 비하여 치료실패 환자의 발현빈도가 46.2%로 현저하게 감소되었다.

치료실패 폐결핵 환자에서 수용성 TSP 항원은 RANTES mRNA 발현빈도 감소경향이 IFN- γ mRNA 발현 빈도 감소와 유사하였다.

2) 수용성 TSP 항원 자극에 의한 MCP-1 mRNA의 발현

IFN- γ mRNA의 경우와 동일한 방법으로 PPD 또는 수용성 TSP 항원으로 말초혈액 림프구를 5일 동안 자극한 후에 MCP-1 mRNA의 발현 정도의 변화를 조사하였다(Table 5, Fig. 1). 양성 대조군으로 사용한 PHA 자극에 의하여 PPD 피부반응 양성 및 음성 건강인과 치유된 환자는 80%에서 100%의 발현빈도를 보였으나 치료실패 환자는 53.8%의 낮은 발현 빈도를 보였다. PPD 피부반응 양성 건강인과 치유된 폐결핵 환자는 PPD 또는 TSP에 의하여 30내지 40

Table 4. The frequency of RANTES gene expression in PBMCs stimulated with PPD or TSP antigens for 5 days

Stimuli \ Subject	Healthy control		Pulmonary tuberculosis	
	PPD(+) N=5(%)	PPD(-) N=5(%)	Cured N=10(%)	Tx failure N=13(%)
PPD	5(100)	4(80.0)	8(80.0)	10(76.9)
TSP	4(80.0)	5(100)	7(70.0)	6(46.2)*
PHA	5(100)	5(100)	9(90.0)	9(69.2)

*Data are expressed as the number of subject with mRNA expression(%).

* $P < 0.05$ compared with cured.

Table 5. The frequency of MCP-1 gene expression in PBMCs stimulated with PPD or TSP antigens for 5 days

Stimuli \ Subject	Healthy control		Pulmonary tuberculosis	
	PPD(+) N=5(%)	PPD(-) N=5(%)	Cured N=10(%)	Tx failure N=13(%)
PPD	2(40.0)	3(60.0)	3(30.0)	10(76.9)*
TSP	2(40.0)	2(40.0)	4(40.0)	10(76.9)*
PHA	4(80.0)	5(100)	9(90.0)	7(53.8)

*Data are expressed as the number of subject with mRNA expression(%).

* $P < 0.05$ compared with cured.

%의 낮은 발현 빈도를 보였다. 그러나 치료실패 환자는 PPD 또는 수용성 TSP 항원에 의하여 발현빈도가 각각 76.9%로 현저하게 증가하여 정상인이나 치유된 환자보다도 많은 대상이 MCP-1 mRNA를 발현하고 있었다. PPD와 수용성 TSP를 비교해 볼 때, 항원간의 MCP-1 mRNA 발현유도 정도에는 차이가 없었다.

고 찰

치료실패 폐결핵 환자는 PPD 피부반응 양성 건강인 또는 치유된 폐결핵 환자에 비하여 세포성면역반응에 어떠한 특성이 있는지를 PPD 또는 수용성 TSP 항원으로 말초혈액단핵구의 증식반응 및 IFN- γ mRNA 발현 빈도로 조사하였다. PPD 피부반응 양

성 건강인 모두는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 자극지수 4 이상의 유의한 증식반응을 보였으나 PPD 음성 건강인 모두는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 자극지수 4 미만의 증식반응을 보였다. 치유된 환자는 80%의 증식반응을 보였으나 치료실패 환자는 PPD에 의하여 30.8%, TSP 항원에 의하여 15.4%만이 자극지수 4 이상의 유의한 증식반응을 보였다. 치유된 환자의 IFN- γ mRNA 발현빈도는 90.0%이었으나 치료실패 환자는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 23.1%만이 유도되었다. 그러므로 치유된 환자는 PPD 또는 수용성 TSP 항원에 대한 세포성면역반응이 잘 유도되었으나 치료실패 환자는 지속적으로 세포성면역반응이 억제되어 관찰되었다. Jo 등¹²⁾의 보고에서도 결핵균 30 kDa 항원 자극에 의하여 자극지수 4 이상의 유의한 증식반응을 보인 경우가 치유

된 환자는 33.3% 이고, 치료실패 환자는 22.2% 이었다. 또한 이들 환자에서 30 kDa 항원에 의한 IFN- γ mRNA 발현 빈도는 치유된 환자에서 100% 이었으나, 치료실패 환자는 55.6%에서만 유도되었다고 한다. 외국의 연구결과에서도 PPD 피부반응 양성 건강인의 말초혈액 단핵구는 30 kDa 항원에 95% 이상이 증식반응을 보이고 IFN- γ mRNA 발현과 생산이 동반되었으나 폐결핵 환자는 50% 정도에서만 증식반응을 보이고 IFN- γ mRNA 발현이나 생산은 관찰할 수 없었다고 한다^{11, 19-22}). IFN- γ mRNA를 발현하는 환자의 말초혈액단핵구는 IFN- γ 를 생산하였으며, RT-PCR에서 음성인 환자는 IFN- γ 의 생산이 관찰되지 않아 IFN- γ mRNA 발현과 생산과는 상관관계가 있다고 한다¹¹). 본 실험 결과 및 외국의 보고에서와 같이 치료실패 환자는 결핵균 단백질항원에 대한 증식반응 및 IFN- γ mRNA 발현 등이 매우 낮아 세포성면역반응에 장애가 있음이 관찰되었다.

항결핵제 치료의 실패는 폐결핵으로 진행되는 괴사형(necrotizing pattern)에서 비괴사성 결핵균 사균기능(nonnecrotizing bactericidal function)에서 요구되는 최적의 면역반응으로 변환(convert)되지 못하기 때문이다²³). 결핵의 면역학적 현상이 매우 복잡하고 다양하여 괴사형에서 보호면역으로의 이행을 특정지우기는 매우 어려운 문제로 생각된다. 그러나 최근에는 세포성면역반응을 사이토카인들의 상호관계 분석에 의하여 면역학적 효과를 구분할 수 있으므로 위의 상반되는 두가지 형을 이해할 수 있게 되었다.

결핵균과 같은 세포내 병원균에 대한 보호면역반응은 대식세포와 T 림프구의 상호관계에 의하여 이루어진다. CD4+ T 림프구는 기능적으로 Th1과 Th2 세포로 대별되며 사이토카인 생산능, costimulatory factor 요구도 및 항원제시세포가 다르다²⁴). Th1 세포는 IL-2, IFN- γ 및 lymphotoxin과 같은 사이토카인을 주로 생산하여 세포성 면역과 지연형 과민반응을 증강시키며 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10 등과 같이 B세포 분화와 증식에 작용해서 체액성면역반응을 증가시키는 사이토카인들을 주로 생산한다.

Th1과 Th2 세포는 서로 길항적으로 조절하는 기능을 갖고 있다. 즉 Th1에 의하여 생산되는 IFN- γ 는 Th2 세포증식을 억제한다. Th2에 의하여 생산되는 IL-10은 Th1 세포의 사이토카인 생산을 억제하고, IL-4는 Th1 세포의 증식을 억제한다²⁵). 따라서 어떤 아형의 T 세포가 확장되느냐에 따라서 방어능력이 크게 좌우되게 된다.

기관지폐포 세척액의 세포 구성을 보면 80 내지 90%가 대식세포이며, 10%가 림프구인데 B 림프구에 비하여 T 림프구가 월등히 많다고 한다. 결핵균이 기도를 통하여 폐포에 이르면 폐포대식세포가 이를 탐식하고, 일부는 주변 림프절에 전달된다. 결핵균에 감염된 대식세포는 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 α , RANTES 및 MCP-1 등을 만들어 염증성 탐식구들을 병소로 불러 모으거나, T 림프구들을 활성화 시킨다. IL-12는 선택적으로 Th1 세포의 활성을 유도하는 데 핵심적인 역할을 담당한다. 특히 TNF- α 는 육아종병소를 만들고 유지하게하는 사이토카인으로 알려져있다. 활성화된 Th1 림프구는 IFN- γ 를 생산하여 TNF- α 와 함께 대식세포의 사균능력을 증가시킨다. 육아종 병소에서 결핵균이 제거되거나 균의 활동이 정지되면 병소는 소실되는 것이 건강인에서 볼수 있는 보호면역반응이다. 그러나 이과정에서 TNF- α 가 과잉생산 되거나 Th2 면역반응이 우세하게되면 보호면역반응이 억제되고, 육아종병소가 괴사형으로 진행된다고 한다²⁶). Chemokine은 항원 특이 Th1 또는 Th2 클론들의 증식조절 뿐만아니라 항원제시세포를 활성화시키는 것으로 밝혀지고 있어서 결핵면역에서 다양하고 중요한 역할을 한다고 한다¹¹). RANTES는 IFN- γ 를 생산하는 Th1 세포에서 생산되며 지연형과민반응에서 발현된다고 한다⁹). MCP-1은 대식세포에서 생산되어 IL-4의 생산을 촉진하고 대식세포의 IL-12 생산을 억제하여 Th2 반응과 관련되어있다고 한다¹⁰).

PPD 양성 건강인의 말초혈액단핵구를 PPD, TSP 또는 PHA로 자극하면 RANTES가 모두 발현되었다. 치료실패 환자, PPD 피부반응 음성 및 치유된

환자를 PPD로 발현을 유도한 경우 각각 76.9%, 80.0%로 대장간에 차이가 없었다. 그러나 TSP 항원으로 유도하면 건강 대조군 및 치유된 환자에 비하여 치료실패 환자는 46.2%로 발현빈도가 유의하게 감소되었으며, PHA로 자극한 경우에서도 치료실패 환자는 69.2%로 감소되는 등 IFN- γ mRNA 발현 빈도 감소와 경향이 유사하였다. 지연형과민반응에서 RANTES가 발현되며 이 단백질은 CD4 T 세포와 대식세포를 불러모아 지연형과민반응의 특성을 보이게 한다. Th1 클론은 MIP-1과 RANTES를 생산하며, RANTES mRNA 발현 정도와 생산은 정비례한다고 한다. 그러므로 치료실패 환자는 Th1 반응이 감소되어 있음을 알 수 있었다.

MCP-1 transgenic mice에서 과도한 혈중 MCP-1은 Th2 반응을 도와주며, *Listeria monocytogenes*와 *Mycobacterium tuberculosis*의 사균기능이 있는 Th1 반응을 억제한다고 한다²⁷. 본 실험결과에서도 치료실패 환자는 MCP-1의 발현빈도가 치유된 환자에 비하여 유의하게 증가되었다. 치료실패 환자에 있어서 PHA 자극의 53.8% 보다는 PPD 또는 TSP로 자극한 경우에 발현빈도가 각각 76.9%로 높았다. 그러나 PPD 양성 건강인 및 치유된 환자는 PPD 또는 TSP로 유도한 결과 40%이었으며 PHA로 유도한 경우는 각각 80%와 90%로 결핵균 항원에서 낮은 발현 빈도를 보여 치료실패 환자와 상반되는 결과를 보였다. 최근 외국의 연구결과에서도 2개월 이상 치료한 환자의 말초혈액 단백질을 열처리한 *Mycobacterium tuberculosis*로 자극하여 MCP-1 mRNA 발현빈도를 관찰한 보고에 의하면 실험대상 환자 10명 모두에서 발현되고 PPD 양성 건강인 5명중 2명만 발현되어 MCP-1의 발현이 활동성 폐결핵과 관련이 있다고 하였다²⁸. 마우스 골수유래 대식세포에서 MCP-1 유전자 발현의 증가와 MCP-1 생산의 증가와 정비례한다고 한다²⁹. 그러므로 MCP-1과 폐결핵의 치료실패와 관련이 있다고 생각된다. 구슬에 PPD를 입혀 마우스의 폐육아종성 염증을 발생시킨 실험에서 육아종성 염증의 대식세포는 MCP-1

을 생산하였으며 Th2 반응이 현저히 증가하였다고 한다¹⁰. 이 실험에서 anti-IFN- γ 로 처리하여 IFN- γ 가 결핍되면 Th2 반응이 증가하고 MCP-1의 생산도 증가하였다고 한다. 또한 IL-4를 결핍시키면 반대의 결과가 관찰되었다고 한다. 이 반응에서 MCP-1은 직접적으로 T 림프구의 IL-4 생산을 촉진하며 대식세포의 IL-12 합성을 억제한다고 한다. 그러므로 MCP-1은 Th2 활성화와 관계가 있다고 한다.

본 연구는 치료실패 환자의 말초혈액단핵구를 PPD 또는 수용성 TSP 항원으로 결핵의 보호면역과 관계가 있는 Th1 반응과 결핵의 감수성과 관계가 있다고 알려진 Th2 반응을 IFN- γ , RANTES 및 MCP-1 mRNA 발현빈도를 각각 관찰하였다. 치료실패 환자는 PPD 피부반응 양성 건강인 및 치유된환자에 비하여 말초혈액단핵구의 증식능, IFN- γ 및 RANTES mRNA 발현빈도가 현저히 감소되어 Th1 반응이 억제되어 있었다. 반면에 MCP-1 mRNA의 발현빈도는 현저히 증가되어 Th2 반응의 증가로 결핵균 사균능력이 치료실패 환자는 감소되어 있다고 생각된다.

요 약

연구배경 :

결핵은 대식세포와 T 림프구가 주로 관여하는 세포성 면역에 의하여 발생하는 대표적인 질환이다. 특히 Th1 또는 Th2 림프구 기능에 의하여 이루어지는 면역반응의 결과에 따라 결핵균에 대한 감수성 또는 저항성이 결정된다. 본 연구는 치료실패 폐결핵환자의 말초혈액단핵구를 PPD 또는 수용성 TSP 항원으로 결핵의 보호면역과 관계가 있는 Th1 반응과 결핵의 감수성과 관계가 있다고 알려진 Th2 반응을 관찰하였다.

방 법 :

수용성 TSP 항원과 대조항원인 PPD 항원으로 건강인, 폐결핵으로 진단되어 단기치료지침에 의하여 균음전화된 치료반응 환자 및 치료실패 환자의 말초혈액단핵구를 대상으로 단핵구 증식반응과 Th1 반응 및

Th2 반응과 각각 관계가 있는 IFN- γ 및 RANTES와 MCP-1 mRNA 발현 빈도를 역전사효소 증합효소연쇄반응으로 조사하였다.

결 과 :

PPD 피부반응 양성 건강인 모두는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 자극지수 4 이상의 유의한 증식반응을 보였으나 PPD 음성 건강인 모두는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 자극지수 4 미만의 증식반응을 보였다. 치유된 환자는 80%의 증식반응을 보였으나 치료실패 환자는 PPD에 의하여 30.8% 그리고 TSP 항원에 의하여 15.4% 만이 자극지수 4 이상의 유의한 증식반응을 보였다. 치유된 환자의 IFN- γ mRNA 발현빈도는 90.0% 이었으나 치료실패 환자는 PPD 또는 TSP 항원에 의하여 23.1% 만이 유도되었다. PPD 양성 건강인의 말초혈액단핵구를 PPD, TSP 또는 PHA로 자극하면 RANTES가 모두 발현되었다. 치료실패 환자, PPD 피부반응 음성 및 치유된 환자를 PPD로 발현을 유도한 경우 각각 76.9%, 80.0%로 대상간에 차이가 없었다. 그러나 TSP 항원으로 유도하면 건강 대조군 및 치유된 환자에 비하여 치료실패 환자는 46.2%로 발현빈도가 유의하게 감소되었다. 또한 PHA로 자극한 경우에서도 치료실패 환자는 69.2%로 감소하여 IFN- γ mRNA 발현을 감소 경향과 유사하였다. 치료실패 환자는 MCP-1의 발현빈도가 치유된 환자에 비하여 유의하게 증가되었다. 치료실패 환자에 있어서 PHA 자극의 53.8% 보다는 PPD 또는 TSP로 자극한 경우에 발현빈도가 각각 76.9%로 높았다. 그러나 PPD 양성 건강인 및 치유된 환자는 PPD 또는 TSP로 유도한 결과 40%이었으며 PHA로 유도한 경우는 각각 80%와 90%로 결핵균 항원에서 낮은 발현 빈도를 보여 치료실패 환자와 상반되는 결과를 보였다.

결 론 :

치료실패 환자는 PPD 피부반응 양성 건강인 및 치유된 환자에 비하여 말초혈액단핵구의 증식능, IFN- γ 및 RANTES mRNA 발현빈도가 현저히 감소되어 Th1 반응이 억제되어 있었다. 반면에 MCP-1

mRNA의 발현빈도는 현저히 증가되어 Th2 반응의 증가로 결핵균 사균 능력이 치료실패 환자는 감소되어 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부, 대한결핵협회 : 제7차 전국결핵실태조사결과보고. 1995
2. 이양근 : 결핵의 통산 치료에서의 문제점. 결핵 및 호흡기 질환 45 : 22, 1998
3. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF : T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63 : 3231, 1995
4. Sanchez FO, Rodriguez JL, Agudelo G, Garcia LF : Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect Immun* 62 : 5673, 1994
5. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y and Barnes PF : Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 64 : 913, 1996
6. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM : Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178 : 2243, 1993
7. Murphy WJ, Tian ZG, Asai O, Funakoshi S, Rotter P, Henry M, Strieter RM, Kunkel SL, Longo DL, Taub DD : Chemokines and T lymphocyte activation : II. Facilitation of human T cell trafficking in severe combined immunodeficiency mice. *J Immunol* 156 : 2104, 1996
8. Taub DD, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ : Chemokines, T lymphocyte activation : I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *J*

- Immunol* 156 : 2095, 1996
9. Schrum S, Probst P, Fleischen B, Zipfel FP : Synthesis of the CC-chemokines MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J Immunol* 157 : 3598, 1996
 10. Chensue WS, Warmington SK, ruth HJ, Sanghi PS, Linclon P, Kunkel SL : Role of monocyte chemokine attractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (Schistosomal) antigen-induced granuloma formation. *J Immunol* 157 : 4602, 1996
 11. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E : Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66 : 176, 1998
 12. Jo E, Park J, Kim H, Pyun K, Paik T : Isolation and immunologic characterization of the surface protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Korean Soc Microbiol* 31 : 281, 1996
 13. 조은경, 조인혜, 임재현, 김화중, 박정규, 백태현 : 결핵성 림프절염 단핵구에 대한 결핵균 TSP 항원의 Th1 싸이토카인 유전자 발현능. *대한미생물학회지* 33 : 15, 1998
 14. 박정규, 김광호, 조은경, 임재현, 민들레, 송영자, 김화중, 백태현 : 결핵균 30 kDa 항원과 Triton X-100 solubilized protein 항원에 의한 대장암 주변 림프절 단핵구의 활성화. *대한미생물학회지* 33 : 139, 1998
 15. 박정규, 조은경, 임재현, 김화중, 박정규, 백태현 : 결핵균체 TSP 항원의 대식세포 활성화기전. *대한면역학회지* 20 : 141, 1998
 16. 대한 결핵 및 호흡기 학회, 폐결핵 진료의 기준, Vol 44(6), 1997
 17. Young D, Kent L, Rees A, Lamb j, Ivary J : Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 54 : 177, 1991
 18. Bordier C : Phase separation of intergral membrane proteins in the Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256 : 1604, 1981
 19. Havlir DV, Wallis RS, Boom WH, Daniel TM, Chervenak K, Ellner JJ : Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect Immun* 59 : 665, 1991
 20. Launois P, DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, Cartel JL, Sarthou JL, Van Vooren JP, Huygen K : T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun* 62(9) : 3679, 1994
 21. Silver RF, Wallis RS, Ellner JJ : Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa alpha antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J Immunol* 154(9) : 4665, 1995
 22. Roche PW, Triccas JA, Avery DT, Fifis T, Billman-Jacobe H, Britton WJ : Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 170(5) : 1326, 1994
 23. Rook GAW : The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 50 : 259, 1996
 24. Street NE, Mosmann TR : Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 5 : 171, 1991
 25. Maggi, E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinini MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S : Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148 :

- 2142, 1992
26. Kaufmann SHE : Immunity to intracellular bacteria, In fundamental immunology, 3rd Ed., Eds William E. Paul, p1251 1993, Raven Press, Ltd, New York
27. Rutledge JB, Rayburn H, Roseberg R, North JR, Gladue PR, Coless LC, Rollins JB : High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increase their susceptibility to intracellular pathogens. *J Immunol* 155 : 4838, 1995
28. Lin Y, Gong J, Zhang M, Xue W, Barnes FP : Production of monocyte chemoattractant protein 1 on tuberculosis patients. *Infect Immun* 66 : 2319, 1998
29. Rhoadas ER, Cooper AM, Orme IM : Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63 : 3871, 1995
-