

결핵균이 폐포대식세포의 기능에 미치는 영향에 관한 연구*

— H37Ra 결핵균종에 의한 사람 및 백서 폐포대식세포의 Superoxide 생성의 변화 —

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

김건열 · 이계영 · 현인규** · 김영환
한성구 · 심영수 · 한용철

— Abstract —

The Effects of Mycobacterium Tuberculosis on Alveolar Macrophages

— The Alterations of Superoxide Production in both Human and Rat Alveolar Macrophages Exposed to Mycobacterium Tuberculosis H37Ra Strain —

Keon Youl Kim, M.D., Kye Young Lee, M.D., In Kyu Hyun, M.D., Young Whan Kim, M.D.
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

*Department of Internal Medicine & Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: The oxygen radicals released by alveolar macrophages contribute to killing of microorganisms including *M. tuberculosis*. Macrophages are "primed" for enhanced oxygen radical release by macrophage activator like IFN- γ and LPS, which do not themselves cause release of oxygen radicals. Actual production of oxygen radicals is "triggered" by phagocytosis or by exposure to chemical stimuli like PMA or FMLP. There has been debates about the priming effect of alveolar macrophages because they are exposed to usual environmental particles unlike blood monocytes. Therefore we examined priming effect of IFN- γ in human alveolar macrophages comparing with that in blood monocytes and rat alveolar macrophages. And we observed the alterations of superoxide production in both human and rat alveolar macrophages after exposure to *M. tuberculosis* H37Ra bacilli itself and its lysate.

Methods: Bronchoalveolar lavage fluid was processed to isolate alveolar macrophages by adherence and the adherent cells were removed by cold shock method. After exposure to *M. tuberculosis* H37Ra strain, alveolar macrophages were incubated for 24 hours with IFN- γ . The amount of superoxide production stimulated with PMA was measured by ferricytochrome C reduction method.

Results:

- 1) The priming effect in human alveolar macrophages was not observed even with high concentration of IFN- γ while it was observed in blood monocytes and rat alveolar macrophages.
- 2) Both human and rat alveolar macrophages exposed to avirulent H37Ra strain showed triggering of superoxide release and similar results were shown with the exposure to H37Ra lysate.

Conclusion: The priming effect in human alveolar macrophages is not observed because of its usual exposure to environmental particles and avirulent H37Ra strain does not inhibit the activation of alveolar macrophages.

Key Words: Tuberculosis, H37Ra, Macrophage, IFN- γ , Priming

*본 연구는 1991년도 교육부 한국학술진흥재단의 연구비 지원으로 이루어 졌음.

**현재 한림대학교 의과대학 한강성심병원 내과에 재직중임

서 론

폐포대식세포는 골수에서 생성된 단구세포로부터 기원하여 폐포면에 상주하는 세포로서 폐의 방어기전에 있어서 중요한 역할을 하며¹⁾, 결핵균에 대한 세포성 면역 반응에 있어서 중추적 역할을 담당하는 세포이다²⁻⁴⁾. 폐포대식세포의 결핵균에 대한 살해능은 크게 산소의존성 과정(oxygen dependent process)과 산소비의존성과정(oxygen independent process)으로 대별되는데⁵⁾, 산소의존성 과정은 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 반응성 산소대사물의 생성에 의한 결핵균 살해능을 말하며, 산소비의존성 과정은 대식세포의 phagosome과 가수분해효소를 함유한 lysosome의 융합에 의한 살균작용으로서 결핵성 육아종과 같은 산소 이용이 제한된 상황에서 결핵균의 증식 억제에 중요한 역할을 한다⁶⁾.

산소의존성 과정의 첫번째 단계는 세포막에 위치한 NADPH oxidase에 의한 촉매작용에 의해 산소가 NADPH 의존성 환원반응으로 superoxide를 생성하는 과정으로 시작된다⁷⁾. Superoxide는 체내에서 신속하게 dismutation 되며 또한 생물학적으로 중요한 물질인 아미노산 및 탄수화물등과의 반응이 느려 직접적인 살균력은 강하지 않으나 생성된 superoxide는 주로 hydrogen peroxide로 전환되고 반응성이 강한 hydroxyl radical 및 singlet oxygen의 전구체로 작용하여 반응성 산소대사물에 의한 결핵균 제거에 있어서 중요한 역할을 한다⁸⁾. 세포내에서 생성된 superoxide는 많은 양이 세포 밖으로 방출되어⁹⁾ 측정하기가 용이하고, 결핵균 중에서 virulent strain 일수록 superoxide에 대한 저항성이 높고 avirulent strain은 쉽게 superoxide에 의해 성장이 억제되며⁵⁾, 동물실험에서 BCG 투여후 결핵균 감염에 대한 저항성은 대식세포의 superoxide 생성과 비례한다는¹⁰⁾ 사실 등으로 보아 superoxide 측정으로 대식세포의 활성정도를 반영할 수 있다고 하겠다.

대식세포의 결핵균 살해능은 priming 혹은 활성화(activation)라는 상태에 의해 결정된다. 체외에서 priming 되거나 체내에서 활성화된 대식세포는 결핵균을 탐식하거나 PMA (phobol myrystate acetate) 또는 FMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) 등과 같은 화학적 자극에 반응하여 priming 되지 않거나 상

주하는(resident) 대식세포보다 훨씬 많은 산소반응성 대사물을 생성한다¹¹⁻¹³⁾. Priming 이라 함은 체외에서의 LPS(lipopolysaccharide)와 IFN- γ (interferon- γ)의 효과를 지칭하는 말로서 이와 같은 체외에서의 priming 효과라는 용어를 사용하는 이유는 체내감염시 나타나는 모든 효과가 체외에서 재현되지 않을 뿐만 아니라 체내에서의 활성화된 대식세포의 일부는 골수에서 유도되어 세포 계열이 분명한 세포로서 구성될 수 있기 때문이다¹⁴⁾. 대식세포를 체외에서 priming 시키는 물질들로서는 세균의 LPS, MDP (muramyl dipeptide), IFN- γ 등이 있으며^{15,16)}, 이러한 물질들은 자신이 직접적으로 superoxide 생성을 자극하지 않고 단지 직접적 자극에 반응하여 superoxide 생성을 증가시키도록 대식세포를 준비(prime)시킬 뿐이다. 따라서 대식세포의 산소 대사물의 생성은 체내에서는 활성화(activation)와 자극(stimulation), 체외에서는 priming과 triggering 등의 두단계로 조절된다고 할 수 있는데 이에 관련된 세포내 신호전달 물질 및 기전에 대해서는 확실히 밝혀지지 않았지만 여러 다른 활성화물질 및 자극물질로부터 arachidonate¹⁷⁾, calcium 과 calmodulin¹⁸⁾, protein kinase C¹⁹⁾, cyclic nucleotide-dependent kinases등²⁰⁾이 관여하는 것으로 알려져 있다.

이러한 대식세포의 활성화라는 관점에서 볼 때 결핵균이 미치는 영향에 대해서는 논란의 여지가 많아 결핵균의 세포벽 구성성분 중에서 sulfatide와 lipoarabomannan은 IFN- γ 과 PMA에 의한 대식세포 활성화를 억제하는 반면 muramyl dipeptide와 trehalose dimycolate 등은 대식세포 기능을 활성화 시킨다는 보고가 있어^{14,21)} 각각의 세포벽 구성성분이 대식세포 기능에 미치는 영향이 결핵균 감염시에 일어나는 전체적인 대식세포 기능변화에 어느정도 기여하는지 확실하지 않은 실정이다. 또한 폐포대식세포는 혈액단구세포나 다른 대식세포와는 달리 외부환경에 노출되어 있는 세포이므로 일상적인 외부 물질에 의해 자극을 받아 단구세포와는 달리 IFN- γ 에 의해 priming 효과를 나타내지 않는다는 보고도 있어²²⁾ 결핵균에 반응하는 폐포대식세포의 산소대사물 생성능의 변화에 대해서도 확실하지 않은 실정이다. 이에 저자들은 사람과 백서에서 기관지폐포 세척술을 통해 회수된 폐포대식세포에서 IFN- γ 에 의한 priming 효과를 비교하고 혈액단구세포에서의 priming 효과를 관찰했으며, 결핵균 H37Ra strain을 폐포대식

세포에 노출시켰을 때 superoxide 생성능의 변화를 조사하였기에 다음과 같이 보고하는 바이다.

실험재료 및 연구방법

1. 결핵균종 H37Ra 단일세포부유액

Ogawa 배지에서 3주간 2차 배양된 colony를 떼서 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution without calcium and magnesium) 10 ml에 부유시킨 후 400 G로 10분간 원심분리하여 배지성분을 제거하고 상층액을 -70°C에서 얼린 후 다시 녹여 30초간 sonication 하여 결핵균을 균일하게 분포시킨 후 항산균염색으로 세포농도를 조절하여 10^7 bacilli/ml의 농도로 희석하였다.

2. 결핵균종 H37Ra 분해질 (Lysate)

Ogawa 배지에서 3주간 2차배양된 H37Ra 균주를 100 mW/cm^2 의 용량으로 10분간 자외선 조사한 후 3분간 600 W로 ultrasonication 하여 결핵균을 파괴시키고, 비용성 세포막성분을 제거하기 위해 300,000 G에서 30분간 ultracentrifugation 시킨 후 상층액을 분리하여 단백질성분을 BCA protein assay로 측정하여 최종농도가 $1 \mu\text{g/ml}$ 가 되도록 조절하였다^{23,24}).

3. 기관지폐포 세척

폐결핵에 대한 과거력 및 현증의 증거가 없고 기타 전신질환의 증거가 없는 환자를 대상으로 우중엽 또는 좌폐상상분지에서 50 ml씩 4회 총 200 ml의 생리식염수로 기관지폐포세척술을 시행하였다.

백서는 생후 6주내지 8주된 체중 150내지 200 gram의 Sprague-Dawley Rat를 이용하였는데 Ketamin 25 mg 근육주사로 마취한 후 전경부에서 흉골 부위까지 피부절개하여 기관을 노출시킨 후 절개하여 cut-down tube (blue color)를 기관내로 삽입하고 절개부위 아래에서 절찰한 후 생리식염수 5 ml씩 주입하여 주사기로 세척액을 회수하는데 세척액 양이 50 ml될 때까지 반복하였다.

4. 폐포대식세포 분리

기관지폐포세척액을 거어즈로 여과한 후 4°C, 400 G로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전된 세포층을 5 ml HBSS로 세척하고 다시 원심분리 하는 과정을 2회 반복하였다. 침전된 세포층을 penicillin 10 U/ml,

10% fetal calf serum이 포함된 RPMI1640에 희석하여 hemocytometer로 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하고 trypan blue exclusion test로 세포의 생존율(viability)을 측정하였다. 이 세포용액을 55 mm Petri dish에 5 ml씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간동안 배양시켜 대식세포를 흡착시킨 후 상층액을 덜어내어 비흡착세포를 제거하고 흡착된 대식세포는 cold shock 방법으로 분리하였다. cold shock 방법은 4°C의 HBSS 5 ml를 Petri dish에 넣고 4°C에서 30분간 방치한 후 Pasteur pipette으로 부드럽게 흡입과 배출을 반복하여 흡착된 대식세포를 분리하는 방법을 사용하였다. 분리된 폐포대식세포 용액을 4°C, 400 G로 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 HBSS로 2회 반복하여 세척 및 원심분리한 후 RPMI로 5×10^5 cells/ml의 농도로 희석하여 trypan blue exclusion test로 생존율을 측정하였다.

5. 혈액단구세포 분리

상원에서 정맥혈 50 ml를 채취하여 heparin 300 unit와 혼합한 후 동량의 IMDM(Isocove's modified Dulbecco's media)으로 2:1로 희석한 후 비중 1.018 Ficoll-Hypaque과 2:1로 혼합하여 400 G에서 30분간 원심분리하여 단핵세포층을 Pasteur pipette으로 조심스럽게 분리하고 이렇게 얻은 단핵세포부유액을 IMDM으로 희석하여 세포농도가 1×10^6 cells/ml가 되도록 조절한 후 trypan blue exclusion test로 생존율을 확인하였다. 이후는 폐포대식세포와 마찬가지로 petri dish에 흡착시키고 cold shock 방법으로 흡착세포를 떼어내어 혈액단구세포를 분리하였다.

6. IFN- γ 전처치 및 폐포대식세포 배양

5×10^5 cells/ml의 농도로 조절된 세포부유액을 각각 1 ml씩 24 well Linbro plate에 분주하고 IFN- γ 전처치군은 각각 10 U/ml, 100 U/ml, 1,000 U/ml의 농도로 하여 24시간 노출시켜 priming 효과를 관찰하였고 H37Ra 결핵균중에 노출시킬 때는 사람 폐포대식세포와 혈액단구세포에서는 1,000 U/ml을 백서 폐포대식세포에서는 100 U/ml의 농도를 사용하였다. H37Ra 결핵균주는 폐포대식세포와의 비율이 1:1이 되도록 노출시켰고 분해질은 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 노출시켰다. 배양은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 시행하였다.

7. PMA 자극 및 Superoxide 측정

Superoxide의 측정은 superoxide dismutase (SOD) inhibitable ferricytochrome C reduction 방법을 사용하였다. 24시간 배양된 24 well Linbro plate를 HBSS 1 ml로 2회 세척하고 PMA 자극군과 대조군으로 구분한 후 PMA 자극군은 500 ng/ml의 농도로 자극하였다. 그리고 모든 well을 대상으로 80 μM의 ferricytochrome을 첨가하고 2 well을 1쌍으로 하여 SOD(+)군과 SOD(-)군으로 구분한 후 SOD(+)군은 10 μg/ml의 농도로 SOD를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 후 4°C에서 반응을 중단시키고 각 well의 상층액을 4°C, 1,000 G에서 5분간 원심분리하여 spectrophotometer로 550 nm 파장에서 흡광도를 측정 한 후 SOD 유무에 따른 흡광도의 차이를 extinction coefficient (21.0 × 10³ M⁻¹cm⁻¹)로 나누어 nmole/5 × 10⁵ cells/hr 단위로 superoxide 생성량을 측정하였다. 기저상태에서의 PMA 농도에 따른 superoxide 생성

Table 1. Total Cell Count and Cell Viability

	Human (n=14)	Rat (n=10)
Total cell count	26.4 ± 15.3 × 10 ⁶	11.8 ± 4.2 × 10 ⁶
Cell viability (%)		
– before 24hr incubation	93.8 ± 3.7	96.3 ± 3.2
– after 24hr incubation	84.3 ± 4.2	86.2 ± 4.5

량은 폐포대식세포를 분리한 후 24시간 배양없이 위에 기술한 방법으로 측정하였다.

8. 통계 처리

통계적 유의성(p value)의 검정은 SPSS-PC⁺를 이용하여 비모수 검정법인 Wilcoxon rank sum test 로서 시행하여 p value 0.05 이하에서 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 기관지폐포세척액 총세포수 및 세포생존율

기관지폐포세척액 총세포수는 사람에서 26.4 ± 15.3 × 10⁶, 백서에서 11.8 ± 4.2 × 10⁶로서 백서에서도 상당수의 세포를 획득하였다. 세포생존율은 사람과 백서 모두에서 24시간 배양후 약간 감소하였지만 각각 84.2 ± 4.2%와 86.2 ± 4.5%로서 유지되었다(Table 1).

2. 폐포대식세포에서 여러 농도의 PMA 자극에 의한 Superoxide 생성 변화

기저상태의 폐포대식세포에서 여러 농도의 PMA 자극에 따른 superoxide 생성능의 변화를 관찰한 결과는 기저상태에서 3.1 ± 1.1 nmole/5 × 10⁵ cells/hr(이하 단위 생략)이고 PMA 농도 0.5 g/ml에서 7.4 ± 2.2로 유의하게 증가하고 5.0 g/ml에서 최고치를 보이다가 10 g/ml에서는 오히려 감소하였다(Fig. 1).

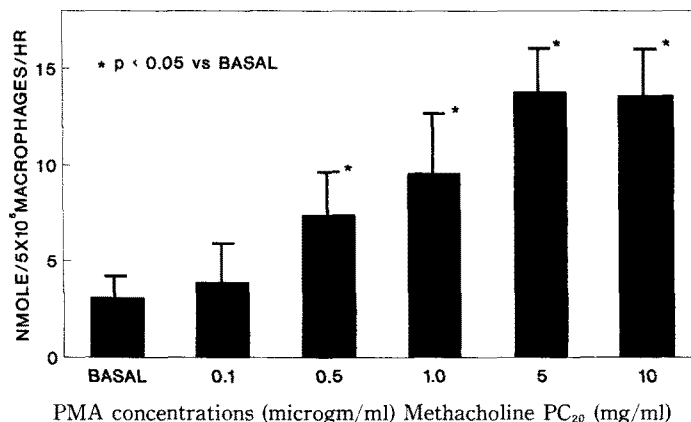


Fig. 1. PMA stimulated superoxide release of human alveolar macrophages.

3. IFN- γ 에 의한 Priming 효과

1) 사람 폐포대식세포

IFN- γ 농도를 각각 10 U/ml, 100 U/ml, 1,000 U/ml로 하여 전처치한 후 PMA 자극으로는 superoxide 생성의 뚜렷한 증가가 나타났지만 IFN- γ 에 의해서 superoxide 생성의 추가 증가가 나타나지 않았고 이러한 효과는 고농도(1,000 U/ml)에서도 관찰되지 않았다. 따라서 사람 폐포대식세포에서는 priming 효과를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

2) 사람 혈액단구세포

기저상태의 혈액단구세포의 superoxide 생성능은 폐포대식세포보다 낮아 1.9 ± 0.6 이었고 PMA 자극시 5.1 ± 1.1 로서 증가하였고, IFN- γ 1,000 U/ml로 전처치후 PMA 자극시는 7.2 ± 2.1 로서 유의한 추가 증가가

있어서 혈액단구세포에서는 priming 효과가 관찰되었다(Fig. 3).

3) 백서 폐포대식세포

사람 폐포대식세포와는 달리 IFN- γ 100 U/ml의 농도로 전처치 후 PMA 자극시 10.2 ± 2.2 로서 유의한 superoxide 생성의 추가 증가가 관찰되었다(기저상태 PMA 자극시 6.7 ± 1.6). 이러한 효과는 IFN- γ 1,000 U/ml 에서도 관찰되었지만 농도증가에 따르는 추가 상승은 관찰되지 않았다. 따라서 백서 대식세포에서는 IFN- γ 의 생리적 농도인 100 U/ml 에서도 priming 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

4. H37Ra 결핵균증 노출에 의한 Superoxide 생성의 변화

1) 사람 폐포대식세포

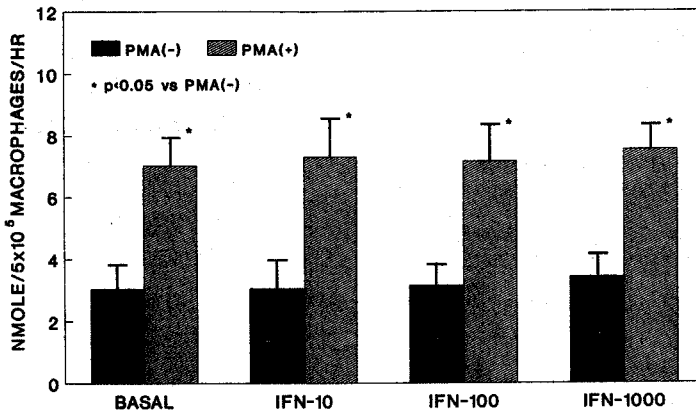
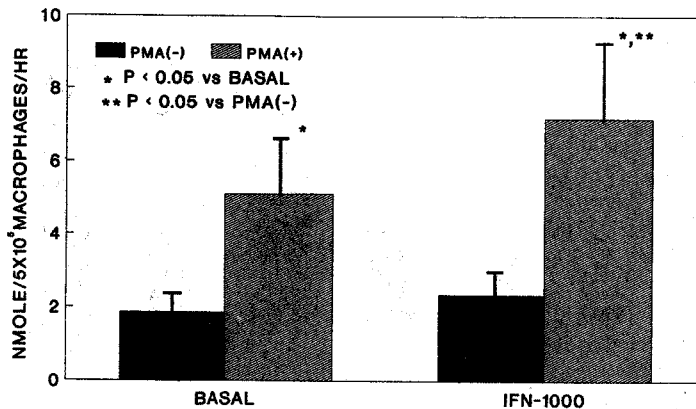


Fig. 2. Superoxide production of human AM with gamma-IFN treatment.



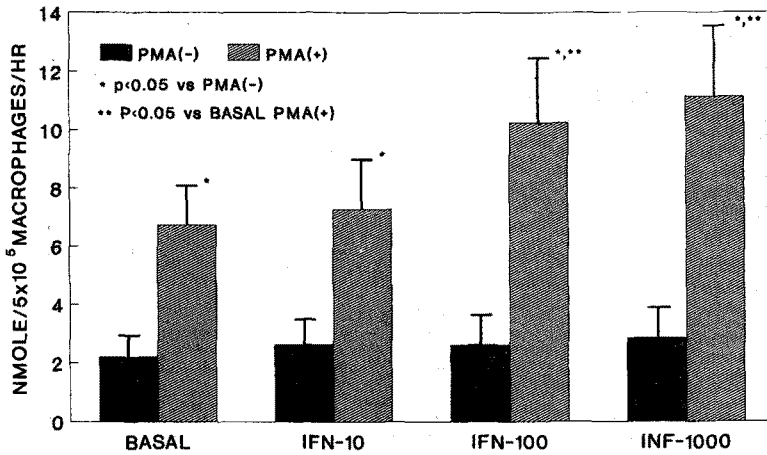


Fig. 4. Superoxide production of rat AM with gamma-IFN treatment.

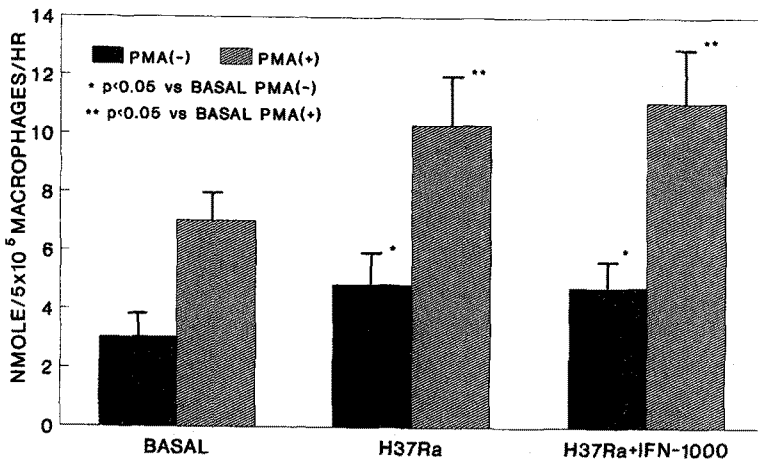


Fig. 5. Superoxide production of human AM exposed to H37Ra.

(1) H37Ra 결핵균

H37Ra 결핵균주에 노출시킨 것 만으로도 유의한 superoxide의 증가가 있었고 PMA 자극으로 더욱 뚜렷한 증가가 관찰되었지만 IFN- γ 전처치로는 추가 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

(2) H37Ra 결핵균 분해물

기저상태에 비해 유의한 superoxide 생성의 증가가 관찰되었지만 H37Ra 결핵균에서와 같이 PMA 자극으로 추가증가가 관찰되지는 않았다. 또한 IFN- γ 전처치로도 추가 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

2) 백서 폐포대식세포

사람 폐포대식세포에서의 마찬가지로 H37Ra 결핵균

노출로 superoxide 생성이 현저히 증가하였고 PMA 자극으로 더욱 뚜렷한 추가 증가를 나타내었으며 IFN- γ 전처치로도 역시 추가 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 7).

고 안

폐포대식세포와 혈액단구세포간에 IFN- γ 에 의한 priming 효과가 차이를 나타낸 결과는 같은 대식세포이지만 폐포대식세포가 외부 환경에 노출되어 있는 세포로서 일상적인 비특이적 자극에 의해 이미 어느 정도는 내인성으로 활성화되어 있기 때문이라 추측된다. Paper-master-Bender 등²⁵⁾은 정상인에서의 혈액단구세포와

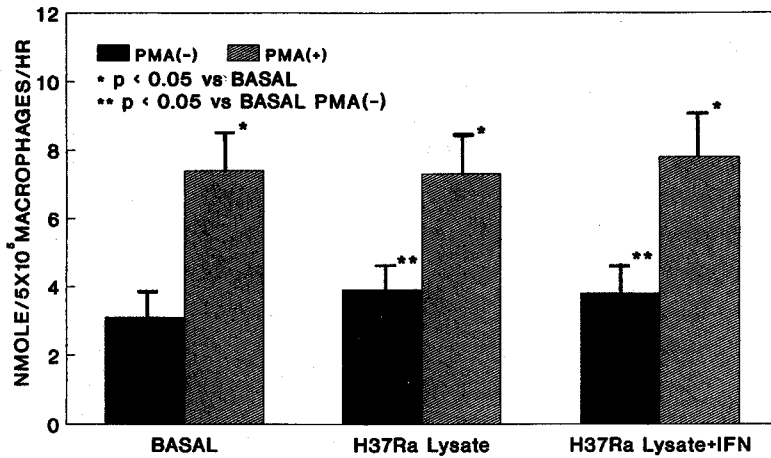


Fig. 6. Superoxide production of human AM exposed to h37Ra lysate.

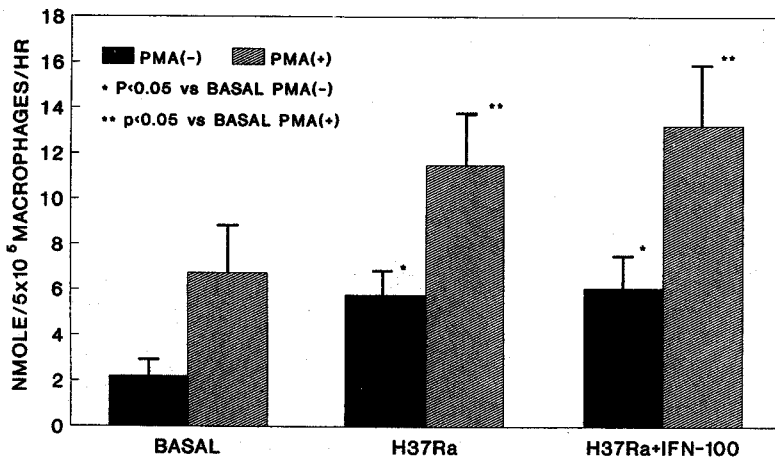


Fig. 7. Superoxide production of rat AM exposed to H37Ra.

폐포대식세포에서 chemoluminescence assay로 비교한 결과 폐포대식세포가 혈액단구세포보다 증가된 산화활성도를 보인다고 보고하고 있고 Kemmerich등²⁶⁾도 비슷한 결과를 보고하고 있으며 IFN- γ 에 의한 priming 효과에 있어서 혈액단구세포와 폐포대식세포 사이에서 차이를 나타내어 폐포대식세포에서는 priming 효과가 관찰되지 않는다고 보고하고 있다. 그러나 강력한 triggering 제제인 PMA에 반응하여 생성되는 산소반응성 대사물의 총용량은 각 세포 유형에 따라서 차이를 보이고 있지 않아 각 세포가 상주하는 환경의 차이외에는 다른 변수가 있으리라고는 생각되지 않는다. 본 연구에서 사용한 백서는 동일 조건에서 성장하고 연령이 낮

아 외부환경에 대한 노출의 변수가 적을 것으로 생각되는 바 백서의 폐포대식세포를 이용하여 superoxide를 측정된 결과 priming 효과를 관찰할 수 있었던 것은 이러한 점을 뒷바침하는 사실이라 하겠다. 그러나 폐에 상주하는 단구세포 계열의 대식세포는 균일 세포 집단이 아니고, 여러 다른 조상세포에서 기원하여 분화된 특성이 다른 세포들의 집합체이므로 기관지폐포세척을 통해 회수된 폐포대식세포는 폐포대식세포를 대표할 수 없다는 점과 조직내에 고착되어 있어서 세척되지 않는 폐포대식세포와는 면역학적, 대사적, 기능적 차이를 보인다는 사실을 상기해 볼 때 기관지폐포세척술을 통해 얻어진 폐포대식세포를 이용해 체외에서 실험한 결과가 실제

체내에서의 효과를 반영할 수 있는지에 대해서는 확실하지 않다고 생각된다. 실제로 Drath에 의하면²⁷⁾ 쥐에서 폐세척을 시행한 후 폐조직을 분쇄한 균등질에서 분리한 폐포대식세포에서는 BCG에 반응하여 superoxide 생성이 증가할 뿐만 아니라 종양살상능력도 증가하는 소견을 보인다고 보고하고 있다.

결핵 환자의 단구세포에서 화학주성능이 감소되고²⁸⁾, 임파구에서 PPD에 의한 임파구형성이 감소되며²⁹⁾, 단구세포내의 면역관련 항원의 표현율이 감소된다는³⁰⁾ 점등으로 보아 현중 결핵환자에서 말초혈액 단구세포와 폐포대식세포의 기능저하가 나타난다는 사실은 여러 연구자들의 보고에 의해 알려진 사실이다. 이러한 결핵환자에서 대식세포의 기능 저하는 결핵균의 독력 인자(virulent factor)와 관련이 있고, 중요한 독력 인자로서는 결핵균 세포벽의 당지질 성분인 lipoarabinomannan과 sulfatide 등이 알려져 있는데 당지질 성분은 결핵균과 대식세포 사이에 소수성 벽을 형성하여 대식세포 내에서 균이 분해되는 것을 방지하고²⁸⁾ IFN- γ 에 의한 대식세포 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 그 기전으로서 확실히 밝혀진 바는 없지만 적어도 NADPH oxidase enzyme system을 직접 억제하지는 않는 것으로 생각되며 아마도 IFN- γ 에 의한 대식세포 내에서의 신호전달 과정을 차단 시키는 것으로 생각된다. 그러나 결핵균 세포벽의 다른 성분들 중에서 muramyl dipeptide와 trehalose dimycolate 등은 오히려 대식세포를 활성화 시키는 것으로 알려져 있어 체내 감염시 결핵균 자체가 대식세포 기능저하에 어느 정도 기여하는지는 확실하지 않다.

본 연구에서 결핵균종 H37Ra의 생균을 폐포대식세포에 노출시킨 결과 사람과 백서에서 공히 triggering 하는 효과를 나타내었는데 이러한 결과를 이해하는 데에는 몇가지 고려되어야 될 사항이 있다고 생각된다. 우선 H37Ra 균종이 독력 균종이 아니라 비독력 균종이라는 사실인데, 독력 균종일수록 결핵균의 중요한 독력 인자인 lipoarabinomannan과 sulfatide가 세포벽 구성성분 중에서 차지하는 비율이 높고 이에 의해 대식세포의 활성화가 억제된다는 점에서 볼 때, 상대적으로 독력인자의 구성비율이 낮은 비독력 H37Ra 균종은 muramyl dipeptide 등과 같은 대식세포를 활성화 시키는 인자들의 효과로 인해 superoxide 생성이 증가되었다고 생각된다. Mycobacterium avium-intracellulare com-

plex의 경우 독력의 차이에 의해 군락의 형태학적 변이를 보이는데 Michelin-Norris 등에 의하면³¹⁾ 사람 단구세포가 독력의 차이를 보이는 각 균종에 반응하여 생성하는 IL-1 α , IL-1 β , IL-6 등과 같은 cytokine의 분비에 차이를 보인다고 하므로 비독력 균종인 H37Ra를 이용한 본 연구결과는 독력 유무에 따르는 균종간의 차이에서 기인하는 것이라 하겠다. 그리고 폐포대식세포를 분리하는 방법상의 문제점을 제기할 수 있는데 본 연구에서 대식세포가 plastic dish에 부착하는 성질을 이용하여 분리한 과정 자체가 판정하기에는 약간의 오류가 개입될 가능성이 있다고 생각된다. 다음으로는 배양기간의 문제인데 결핵은 만성 염증성 질환이라는 점에서 본 연구에서 사용된 24시간이라는 시간적인 제한점으로 인해 결핵균이 대식세포에 미치는 영향이 충분히 반영되었는지에 대해서는 확실하지 않다고 생각된다. 뿐만 아니라 식균작용 자체가 세포내의 산화반응을 유발하는 과정이므로 결핵균 노출후 24시간 배양으로는 이러한 효과에 의한 영향을 받았다는 가능성을 배제하지 못한다고 생각된다. 마지막으로는 세균오염에 관한 문제를 들 수 있는데 세균성 lipopolysaccharide(LPS)는 널리 알려진 대식세포 활성물질이다. 처리과정 중에 충분한 세척이 시행되지만 기관지폐포세척액 자체가 멸균 체액이 아니고 실험실 조건에 의해 LPS가 오염되었을 가능성을 전혀 배제하지 못하는데 이를 위해서는 모든 시약에 대한 Limulus Amebocyte lysate assay가 필요한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이를 시행하지 못했는데 대신 모든 시약 및 기관지폐포세척액에 polymyxin B를 첨가하여 실험한 결과 첨가하지 않았을 때와 비교하여 차이가 없었던 것으로 미루어 보아 LPS의 오염은 없었던 것으로 판단되었다. Ding등³²⁾에 의하면 미량의 세균성 lipopolysaccharide는 IFN- γ 또는 TNF- α 등에 의한 활성화 과정을 오히려 방해하여 산소반응성 대사물 생성에 장애를 나타낼 수 있다고 보고하고 있어서 LPS에 의한 오염은 그 농도에 따라 그 영향에 차이를 보이는 것으로 생각된다. 그람 음성 패혈증시 혈액에서 발견되는 LPS의 농도는 0.5에서 1 ng/ml 정도로³³⁾ 알려져 있는 반면 정상인의 생리적 조건 하에서도 장관벽을 통과하여 문맥으로 도입되는 미량의 LPS가 확인된다는 보고도 있으며³⁴⁾ 이 때 영향받는 대식세포는 간의 Kupffer 세포로 알려져 있고 LPS의 농도는 10 pg/ml 정도로서 Limulus Amebocyte lysate assay의 측정 역치와

유사하다. 따라서 세균오염의 문제는 본 실험에서 완전히 배제된 것은 아니므로 결과를 해석하는데 변수로 작용할 가능성이 있다고 생각된다.

비독력 H37Ra 균종을 이용 본 실험에서 대식세포의 활성화가 억제되는 결과를 나타내지 않은 점으로 볼 때 결핵균종 간에 대식세포에 미치는 효과에는 차이가 있다고 생각되며, H37Rv와 같은 독력균종을 이용하고 배양 시간을 증가시켜 만성 감염에 의한 효과를 관찰하는 등의 추후 연구가 필요하리라고 생각된다.

요 약

연구배경: 산소반응성 대사물에 의한 결핵균 살해능은 대식세포의 활성화 상태에 의해 좌우되는데 체외에서의 이러한 효과를 priming이라 한다. priming 효과를 유도하는 물질에는 IFN- γ 와 LPS가 대표적인 물질인데 이들 자체가 superoxide와 같은 산소반응성 물질의 생성을 증가시키지는 않지만 식균작용이나 PMA와 같은 화학적 물질에 반응하여 증강된 산소반응성 물질의 생성을 유도한다. 혈액단구세포와는 달리 폐포대식세포는 일상적인 외부환경에 노출되어 있기 때문에 priming 효과에 대한 논란이 있고 결핵균 세포벽의 각 성분이 대식세포의 활성화에 상반되는 결과를 보인다는 보고들이 있어 본 연구에서는 사람의 폐포대식세포와 혈액단구세포, 그리고 백서의 폐포대식세포에서 IFN- γ 에 의한 priming 효과를 비교 관찰하였고 결핵균종 H37Ra 균종이 폐포대식세포에 노출되었을 때 나타나는 superoxide의 생성능의 변화를 비교하여 보았다.

방법: 사람과 백서에서 얻은 기관지폐포세척액을 Petri dish에 부착시키고 cold shock 방법으로 부착된 대식세포를 분리하여 24시간 IFN- γ 로 전처리한 후의 priming 효과와 H37Ra 결핵균종을 노출시켰을 시의 superoxide의 생성능을 ferricytochrome reduction 방법으로 측정하여 비교하였다.

결과:

1) 사람 폐포대식세포에서는 고농도의 IFN- γ 전처리로도 priming 효과가 관찰되지 않은 반면 혈액단구세포와 백서 폐포대식세포에서는 priming 효과를 관찰할 수 있었다.

2) 폐포대식세포를 비독력 결핵균종인 H37Ra 생균에 노출시킨 결과 사람과 백서 공히 triggering 효과를

나타내었고 그 분해물에 의한 노출 역시 유사한 결과를 나타내었다.

결론: 사람의 폐포대식세포는 다른 대식세포와는 달리 일상적인 외부환경에 노출되어 있으므로 priming 효과가 관찰되지 않았으며 비독력 결핵균종인 H37Ra에 의해서는 폐포대식세포의 활성화를 억제하는 효과를 관찰할 수 없었다.

REFERENCES

- 1) Johnson JD, Hand WL, King NL, Hughes CG: Activation of alveolar macrophages after lower respiratory infection. *J Immunol* 115:80, 1975
- 2) Mackaness GB: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J Exp Med* 129:973, 1969
- 3) Chaparas DB: Survival of intracellular bacteria inside macrophages. *Ann Immunol. (Paris)* 1320:151, 1981
- 4) Babior BM: Oxidants from phagocytes: Agents of defence and destruction. *Blood* 64:959, 1984
- 5) Qui PG: Perturbation of the normal mechanisms of intraleukocytic killing of bacteria. *J Infect Dis* 148: 189, 1983
- 6) Chandler PJ, Allison MJ, Margolis G, Gerszten E: The effects of intermittent hyperbaric oxygen therapy on the development of tuberculosis in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 91:855, 1965
- 7) Cohen HJ, Chovaniec ME, Davis WA: Activation of the guinea pig granulocyte NAD (P) H-dependent superoxide generating enzyme: Localization in a plasma membrane enriched particle and kinetics of activation. *Blood* 55:355, 1980
- 8) 이회성: Superoxide 독성작용. *대한내과학회잡지* 36: 451, 1989
- 9) Homan-Muller JWT, Weening RS, Roos D: Production of hydrogen peroxide by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* 85:198, 1975
- 10) Jackett PS, Andrew PW, Aber VR, Lowrie DB: Hydrogen peroxide and superoxide release by alveolar macrophages from normal and BCG-vaccinated guinea-pigs after intravenous challenge with mycobacterium tuberculosis. *Br J Exp Pathol* 62:419, 1981
- 11) Gangadharam PRJ, Edward CK: Release of superoxide anion from resident and activated mouse

- peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis* **130**:834, 1984
- 12) Nathan CF, Root RK: Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: Dependence on sequential activation and triggering. *J Exp Med* **146**:1648, 1977
 - 13) Johnston RB, Godzik CA, Cohn ZA: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* **151**:101, 1980
 - 14) Pabst MJ, Gross JM, Brozna JP, Goren MB: Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**:634, 1988
 - 15) Pabst MJ, Johnston RB. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med* **151**:101, 1980
 - 16) Nathan CF, Murray HW, Wieve ME, Rubin BY: Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**:670, 1983
 - 17) Badwey JA, Gurnutte JT, Karnovsky ML: cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J Biol Chem* **256**:12640, 1981
 - 18) Cheung WY: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**:19, 1980
 - 19) Mcpail LC, Clayton CC, Snyderman R: A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: Activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science* **224**:622, 1984
 - 20) Hatch GE, Nichols WK, Hill HR: Cyclic nucleotide changes in human neutrophils induced by chemoattractants and chemotactic modulators. *J Immunol* **119**:450, 1977
 - 21) Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL: *Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma-interferon mediated activation of macrophage*. *Infect & Immunol* **56**:1232, 1988
 - 22) Kemmerich B, Rossing TH, Pennington JE: Comparative Oxidative Microbial Activity of Human Blood Monocytes and Alveolar Macrophages and Activation by Recombinant Gamma Interferon. *Am Rev Respir Dis* **136**:266, 1987
 - 23) Kulkarni S, Hattikudur S, Kamat RS: Cell mediated immunity cross-reactions of mycobacteria: Polymorphism of target bacterial antigens. *Clin Exp Immunol* **63**:111, 1986
 - 24) Gulle H, Schoel B, Kaufmann HE: Direct blotting with viable cells of protein mixtures separated by two-dimensional gel electrophoresis. *J Immunol Method* **133**:253, 1990
 - 25) Papermaster-Bender G, Whitcomb ME, Sagone AL Jr: Characterization of the metabolic responses of the human pulmonary alveolar macrophage. *J Reticuloendothel Soc* **28**:129, 1980
 - 26) Kemmerich B, Rossing TH, Pennington JE: Comparative oxidative microbial activity of human blood monocytes and alveolar macrophages and activation by recombinant gamma interferon. *Am Rev Respir dis* **136**:266, 1987
 - 27) Drath DB: Enhanced superoxide release and tumoricidal activity by a postlavage, in situ pulmonary macrophage population in response to activation by *Mycobacterium bovis* BCG exposure. *Infect Immun* **49**:72, 1985
 - 28) Cambell PB: Defective leukotaxis in monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **139**:409, 1979
 - 29) 김대수, 김완동, 임상복, 정연태, 우준희, 김용훈, 박춘식, 이희발: 결핵환자에서 T 세포매개성 면역의 변화, 결핵 및 호흡기질환 **36**:11, 1989
 - 30) Edwards D, Kirkpatrick CH: The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* **134**:1062, 1986
 - 31) Michelini-Norris MB, Blanchard DK, Pearson CA, Djeu JY: Differential release of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , and IL-6 from normal human monocytes stimulated with a virulent and avirulent isogenic variant of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *J Infect Dis* **165**:702, 1992
 - 32) Dig AH, Nathan AF: Trace levels of bacterial lipopolysaccharide prevent interferon- γ or tumor necrosis factor- α from enhancing mouse peritoneal macrophage respiratory burst capacity. *J Immunol* **139**:1971, 1987
 - 33) Levin J, Poore TE, Zauber NP, Oser RS: Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med* **283**:1313, 1970
 - 34) Mathison JC, Ulevitch RJ: The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* **123**:2133, 1979