

□ 연구보고 □

천식환자의 기도내 Cytokines 표현에 대한 연구

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 현암신장연구소^{*}

어수택^{*} · 정성환^{*} · 이상무 · 김현태 · 김용훈 · 박춘식^{*}

= Abstract =

The Expression of Cytokines in the Airways from Patients with Bronchial Asthma

Soo-taek Uh, M.D.,^{*} Seong Whan Jeong, M.D.,^{*} Sang Moo Lee, M.D.,
Hyeon Tae Kim, M.D., Yong Hoon Kim, M.D. and Choon Sik Park M.D.^{*}

Department of Internal Medicine, Hyonam Kidney Laboratory,^{*} College of Medicine,
Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea

Background: It has been well known that bronchial asthma is a chronic inflammatory disorder. The "activation" of lymphocytes has a significant role in the pathogenesis of bronchial asthma. Among these lymphocytes, TH2-like rather than TH1-like lymphocytes are activated in the bronchial tissues from patients with atopic bronchial asthma. However, the difference of cytokines expression is not well documented between the atopic normal subjects and atopic asthmatics.

Methods: Bronchial tissues were obtained from the twelve atopic and non-atopic asthmatics and twelve atopic and non-atopic healthy subjects for in situ hybridization of IL-2, IL-4, IL-5, and INF- γ . The probe of cytokines were tagged with digoxigenin by random priming method.

Results: The infiltration of many inflammatory cells on submucosa and denuded epithelium were observed in the bronchial tissue from patients with bronchial asthma. The RNase-treated bronchial tissues did not have the brown signal on the tissue, but, RNase-untreated bronchial tissues had the positive brown signal on the inflammatory cells under the basement membrane. The IL-2 positive signals were detected in 2 cases, IFN- γ in 1 case, IL-4 in 2 cases, IL-5 in 2 cases among 6 non-atopic healthy subjects. The atopic healthy subjects showed 1 case of positive signal of IL-2 and IFN- γ , but did not show any signals of IL-4 and IL-5. The positive signals of IL-2 were detected in 4 cases among 6 atopic and 6 non-atopic asthmatics, 2 cases and 1 case of IFN- γ respectively, 4 cases and 3 cases of IL-4 respectively, 4 cases and 3 cases of IL-5 respectively.

Conclusion: The lymphocytes were activated in the bronchus of asthmatics. Among lymphocytes, TH2-like lymphocytes may be involved in the pathogenesis of bronchial asthma. However, further study with immunohistochemical stain may be necessary for defining the source of cytokines, because of TH2-like lymphocytes were also activated in some atopic healthy subjects.

Key Words: Bronchial asthma, Hybridization, Lymphocytes, Cytokines

본 논문은 1993년도 대한결핵 및 호흡기학회 학술연구비의 지원으로 이루어 졌음.

서 론

기관지 천식은 기도의 만성 염증성 질환으로 밝혀지고 있다. 기관지 천식의 만성 염증 반응은 호산구, 대식세포, T-림프구등 여러 염증세포의 상호 작용 및 이들 염증 세포에서 분비되는 cytokines에 의해서 주로 야기된다¹⁾. 최근 만성 염증반응에 관계하는 여러 염증 세포 중 천식환자에서 림프구의 변화에 대해서 많은 연구가 이루어 졌다. 즉, 증상이 있는 기관지 천식환자의 말초 혈액내의 CD4 양성 림프구의 숫적 증가와 이들 림프구의 표면에 T-림프구 활성화의 지표인 interleukin-2 수용체 (CD25)의 증가가 관찰되며²⁾, 기관지 폐포세척액내에서도 활성화된 림프구에서 분비되는 가용성 interleukin-2 수용체가 증가되어 있었다³⁾. 그리고 아토피성 기관지 천식환자의 기관지 조직에서 면역조직 화학검사(immunohistochemistry)를 이용, T-림프구 활성화의 지표인 CD25 양성 림프구와 활성화된 호산구의 증가가 관찰되었다⁴⁾. 이러한 사실은 기관지 천식의 병인에 림프구의 "활성화"가 주요한 역할을 한다는 가설을 뒷바침 할 수 있다.

Murine T-세포 클론은 어떠한 cytokine이 분비되느냐에 따라 제 1형 T 조력 림프구(TH1)와 제 2형 T 조력 림프구(TH2)로 구별된다. TH1은 interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (INF- γ)를 주로 분비하며, 지연성 면역 반응에 관계하고, TH2는 IL-4, IL-5, IL-6 분비에 관여하여 B세포의 immunoglobulin 합성에 관계하게 된다⁵⁾. 최근에 사람에서도 TH1과 TH2가 증명되었으며, murine과 다른 점은 TH1에서도 적은 양이지만 IL-6가 분비된다는 점이다⁶⁾. 이들 lymphokines중 알레르기 반응에 주로 관여되는 것은 IL-3, IL-4, IL-5로서, IL-5는 호산구의 분화⁷⁾와 유지⁸⁾에 관계하며, IL-4는 IgE 합성에 관계한다⁹⁾. IL-3는 비만세포의 증식 및 분화를 유도한다¹⁰⁾. 따라서 IL-4와 IL-5는 기관지 천식의 병인에 주요한 역할을 하며, IL-4와 IL-5는 TH2 세포에서 분비되므로 기관지 천식환자의 기도내에서 TH2 세포의 활성화가 예측되고 있다. Kay 등은 아토피 기관지 천식환자의 기도 조직에서 in situ hybridization을 이용, 기도조직내 림프구의 IL-3, IL-4, IL-5와 gra-

nulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) m-RNA 가 주로 나타난다는 사실로 TH2 림프구의 활성화를 증명하였다¹¹⁾.

아토피 천식에서 천식 발생의 주요원인이 외부 항원에 특이하게 반응하는 면역항진 상태이나, 정상인에서도 약 30%에서 아토피가 나타나며¹²⁾, 아토피 정상인과 아토피 천식환자 사이에 차이점은 비교된 바 없다. 따라서 대조군으로 분류한 군에서도 아토피가 일부 차지할 수 있으며, 아토피성 천식 환자를 이용한 실험에서 대조군으로 정상 아토피군에 대한 분류가 빠져 있어^{13,14)}, 천식의 병인을 밝히기 위해서는 정상 아토피군이 반드시 포함되어야 한다고 사료된다.

저자들은 천식환자와 정상인을 아토피가 있는 군과 아토피가 없는 군으로 구분하여 기도내 림프구에서 분비되는 cytokine인 IL-2, IL-4, IL-5, INF- γ 의 발현양상을 비교하여 첫째, 비아토피성 정상인과 아토피 정상인 사이의 기도내 침윤된 림프구의 cytokine 발현의 차이를 밝혀 아토피가 기도내 미치는 영향을 관찰하고, 둘째, 아토피성 정상인과 아토피성 천식환자 사이의 기도내 침윤된 림프구의 cytokine를 측정하여 cytokine이 천식발현에 미치는 영향을 분석하며, 셋째, 아토피성 천식환자와 비아토피성 천식환자 사이의 기도내 침윤된 림프구의 cytokine를 측정하여 천식발생 원인에 따른 발병기전을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

최근 4주 이내에 천식의 증상(호흡곤란, 천명음, 기침)이 있는 아토피 혹은 비아토피 천식환자 각각 6명을 대상군으로 하였다. 천식 진단 기준은 American Thoracic Society의 진단 기준¹⁵⁾, 즉, histamine의 PC20이 8mg/ml 이하이면서 기도 협착이 가역적이며, 또한 흉부 X-선상 정상이며, 폐확산능의 장애가 없는 경우로 하였다. 아토피는 원인물질(allergen)에 폭포시 천식 증상이 악화되는 병력이 있으면서 한국에서 흔한 50종의 대기항원중 한가지 이상에서 양성의 즉시형 피부 반응을 보이며, 특히 IgE 치가 양성인 경우로 하였다. 비아토피는 즉시형 피부 반응검사상 음성인 경우

로 하였다⁶⁾.

정상 아토피군은 최근 4주 이내 호흡기 감염이 없고, 병력상 기관지 천식과 알레르기성 비염이 없으면서 한국에서 흔한 50종의 대기항원중 한가지 이상에서 양성 의 피부 반응을 보이면서, 특이 IgE 검사상 양성을 보인 6명으로 하였으며(아토피성 정상인), 정상 대조군으로는 최근 4주 이내에 호흡기 감염이 없으면서 비 흡연자인 건강한 의과대학생중 피부반응 음성인 6명으로 하였다.

모든 대상군, 정상 아토피군 및 대조군은 기관지 내시경 직전 spirometer (Fukuda-300, Japan)를 이용하여 FEV1, histamine의 PC20을 측정하였으며, 그들의 폐 기능 검사소견은 Table 1과 같다.

2. 방 법

실험에 사용되는 기구와 시약은 모두 0.1% diethyl-pyrocyanate (DEPC)방법으로 처리한 후 사용하였다.

1) 기관지 조직 검사

천식 환자의 기관지 내시경은 증상이 완화되고 기관지 내시경을 할 수 있을 정도의 폐기능이 회복된 후 시행되었으며, 내시경 24시간 전부터 aminophylline, β 2-agonist, steroid는 모두 투여 중단하였다. 전 처치는 atropine과 diazepam을 사용하고, bronchodilator를 2회만 흡입시켰다. 정상 아토피군과 정상 대조군은 약제 투여없이 전 처치만 하였다. 기관지 조직 검사는 두번째 및 세번째 분지의 carina에서 각각 3회 시행하였으

며, in situ hybridization을 위한 조직은 실험 때까지 OCT oil로 도포한 후 -70℃에서 보관하였다. 기관지 상피 세포를 관찰하기 위하여 일부의 조직은 formaline에 고정 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 확인 하였다.

2) 조직의 준비

기관지내시경을 이용해서 얻은 조직은 실험시 4 μ m의 두께로 cryosection 하여 poly-L-lysine으로 처리한 slide에 얹었다. 이를 30분간 4% paraformaldehyde in phosphate buffered solution(PBS)에서 고정한 후 -4℃에서 60% ethanol에 보관하였다.

3) 양성대조군의 준비

건강인으로부터 heparin으로 처리된 정맥혈을 채취하여 Ficoll-hypaque (비중, 1.077) 경사 원침법¹⁷⁾을 이용하여 말초 혈액 단핵구 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하여 PBS로 3회 세척하였다. 세척된 세포는 24 well-culture plate에 RPMI 1640과 함께 1×10^6 수로 넣고 concanavalin-A (10 μ g/ml)를 넣은 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양하였다. 배양된 세포는 1×10^6 개의 수로 cytopsin하여 5분간 공기에서 건조시킨 후, 4% paraformaldehyde로 고정시키고 실험때 까지 4℃에서 70% ethyl-alcohol에 보관하였다. 음성 대조세포는 concanavalin-A를 첨가하지 않은 세포를 사용하였다.

4) Probe의 제조

IL-4와 IL-5는 cDNA(ATCC사)를 이용하여 poly-

Table 1. Clinical Characteristics of Study Population

	Sex (M:F)	Age (years)	FEV1(%)	PC20*
Normal control ¹	6 : 0	24 ~ 25	88~110	ND
Atopy control ²	6 : 0	24 ~ 27	85~120	ND
Non-atopic bronchial asthma ³	5 : 1	25 ~ 55	65~90	0.05 ~ 3.0
Atopic bronchial asthma ⁴	4 : 2	22 ~ 40	63~85	0.1 ~ 2.5

* PC20 of histamine, expressed as mg/ml

1 Healthy medical students who had not respiratory symptoms since 4 weeks

2 Healthy medical students who have one or more positive reaction to immediate skin test among 48 common aeroallergens in Korea.

3 Asthmatics who show negative reaction to immediate skin test

4 Asthmatics who have one or more positive reaction to immediate skin test and specific IgE

merase chain reaction(PCR) 법¹⁸⁾으로 cytokine을 증폭시켰다. 즉, cDNA 0.06 μ g, primer쌍 각각 50 pmol, 2.5U Taq polymerase, 1.25mM dNTP, 25mM MgCl₂에 물을 추가하여 80 μ l로 만든 후, thermal reactor (Hybaid사, 영국)에서 95 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 과정을 35회 반복 시행하였다. 사용된 IL-4의 primers는 5'-AGGTAGAAGAAGAAACCCATAACAA-3'(antisense)와 3'-TTCTTTTCCTTCATATTTGAAGAA-G-5'(sense)이고, IL-5의 primers는 5'-GGCAA-CGCAGAACGTTTCA-3'(antisense)와 3'-GACGTC-ACTCTTACTCCCGG-5'(sense)였다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 IL-4는 493bp(Fig 1), IL-5는 501bp에서 단일 band를 확인하였다. DNA분리는 McDonnell 등¹⁹⁾의 방법으로 분리하였는데, 간략히 기술하면, DNA가 포함되어 있는 agarose gel을 최소한 작게 자

른후, dialysis bag에 넣고 2시간 전기영동(4~5V/cm)하여, dialysis bag내에 있는 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 sodium acetate, phenol-chloroform, ethanol을 이용하여 정제(purification)하고, spectrophotometer (Beckman사, 영국)로 DNA양을 측정하였다.

INF- γ 와 IL-2의 DNA 추출은 ATCC사의 cDNA를 제한효소(Biolabs사, 미국)로 처리하여 필요한 DNA를 얻었다. INF- γ 는 Hind III, ClaI, IL-2는 EcorI, BamHI을 사용하였으며, 제한 효소로 처리된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 INF- γ 는 1000 bp(Fig 2), IL-2는 987bp에서 band를 확인하고, 필요한 DNA가 포함되어 있는 gel을 절단하여 gene clean kit(GENECLEAN II^{TR}, BIO 101

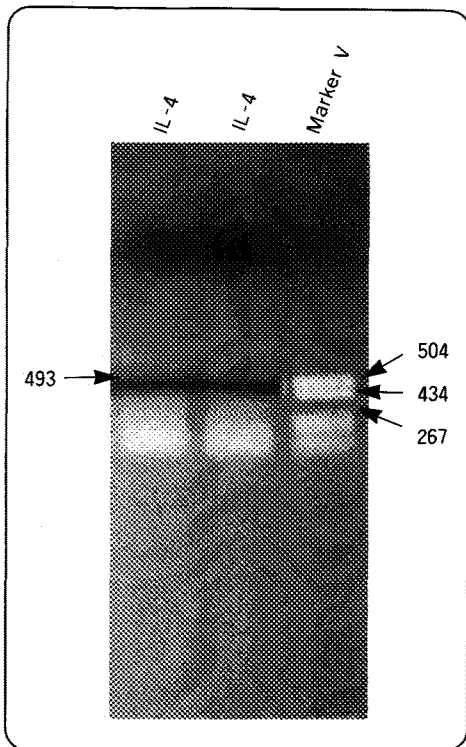


Fig. 1. The IL-4 PCR products, indicated by arrow at 493 bp, are dissected for purification of target DNA and random priming of digoxigenin.

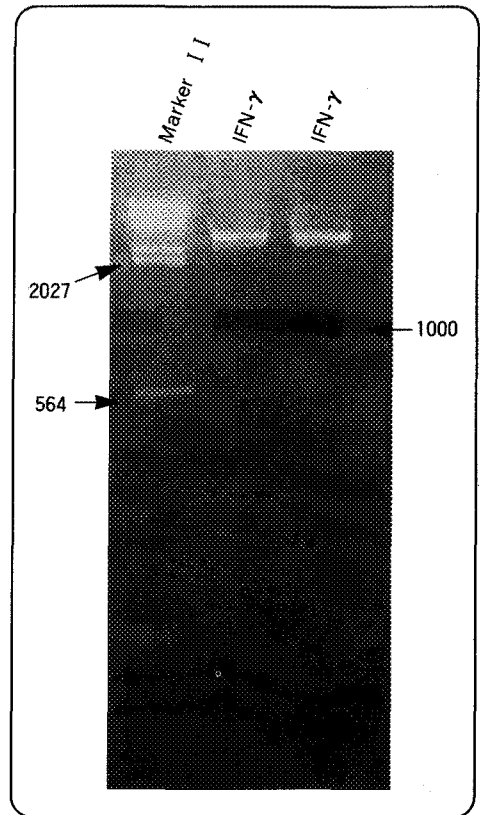


Fig. 2. The digested target DNA of INF- γ are indicated by arrows at 1000bp. The gel containing target DNA are dissected for purification of target DNA and random priming of digoxigenin.

사, 미크를 이용 DNA를 순수 분리하였다. 분리된 DNA의 양은 semi-quantitative method를 이용하였다²⁰⁾.

상기 방법으로 분리된 DNA는 random priming 방법으로 DIG DNA Labelling kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 digoxigenin-11-dUTP를 random labelling 시켰다²¹⁾. 간략히 기술하면, 25 ng의 DNA를 95°C에서 10분간 가열 후 얼음에서 급속히 냉각시킨 후, klenow enzyme, hexanucleotide mixture, dNTP를 첨가하여 37°C에서 12시간 잠복시켰다. Lithium chloride와 ethanol을 이용하여 DNA를 정제하였다.

Digoxigenin의 부착 정도의 확인은 1 ng부터 0.3pg의 digoxigenin-labelled DNA를 대조군으로 하여 nitrocellulose membrane에 DNA를 부착시키고 이어 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin antibody를 반응시킨 후 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphac)/NBT(nitroblue tetrazolium salt)를 이용 발색을 내어 갈색의 반응정도를 관찰하였다.

5) Hybridization²²⁾

70% ethanol에 보관되어 있는 slide를 물로 씻은 후, 20mM Tris, 2mM CaCl₂, proteinase K (5µg/ml)가 함유된 용액에 37°C에서 incubation하였다. 다시 slide를 물로 잘 씻은 후 70%, 80%, 100% ethanol에 각각 5분간 incubation후 건조시켰다. Negative control은 proteinase K 처리 후, 25µg/ml RNase A와 40U/ml RNase T1로 37°C, 30분간 incubation 시킨 후, ethanol로 건조시켰다. 건조된 slide는 probe, hybridization mixture, t-RNA(25µg/µl)로 혼합된 25µl를 조직위에 얹고, sigmacote로 닦은 cover glass로 얹어 37°C에서 overnight 시켰다. 다음날 실온에서 2×SSC로 1시간, 1×SSC로 1시간, 0.5×SSC로 37°C에서 30분간, 0.5×SSC로 실온에서 30분간 세척하였다. 이어 blocking solution으로 30분간 처리 후, alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin antibody로 처리하였다. slide는 물로 씻은 후 NBT 3.4µl, BCIP 3.5µl씩 분주하여 빛을 차단한 채 갈색의 반응이 나타날 때까지 기다렸다. 이후 hematoxylin 으로 대조염색하여 1,000 배의 광학현미경하에서 확인하였다. 양성의 판정 기준은 concanavalin-A로 처리한 양성대조군에서 갈색의 음영

이 나타나며, 아울러 RNase로 처리한 음성 대조군에서 갈색의 음영이 나타나지 않으면서, 실험 표본이 갈색의 음영을 나타낼 때로 정의하였다. RNase로 처리한 음성 대조군에서 갈색의 음영이 나타나는 경우는 그 실험은 폐기하였다.

결 과

1. 기관지조직 소견

정상대조군의 조직은 정상적인 상피세포를 유지하고 있었으나, 기관지 천식 환자의 기관지 조직은 상피세포의 탈락이 관찰되고 림프구를 포함한 다양한 염증 세포의 침윤이 기저막 하부에서 관찰되었다.

2. 대조 세포의 in Situ Hybridization

Con-A로 자극한 PBMC를 DIG-labelled IL-5로 hybridization 시켰을 때, 갈색의 음영(signal)이 cytoplasm에서 관찰되었고, Con-A로 자극하지 않은 PBMC의 경우에는 갈색의 음영이 거의 관찰되지 않았다. 또한 Con-A로 자극한 경우라도 hybridization시 RNase로 처리한 PBMC는 RNase로 처리하지 않은 대조군과는 달리 갈색의 음영이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3).

3. 기관지 조직에서의 Cytokines의 in Situ Hybridization

기관지 조직에서의 음성 대조군으로 RNase를 처리한 경우는 갈색의 음영이 관찰되지 않으나, RNase를 처리하지 않는 조직은 기저막 하부의 염증세포에서 갈색의 음영이 관찰되었다(Fig. 4). RNase로 처리한 경우에 갈색의 음영이 관찰되는 실험은 결과를 모두 인정하지 않았다.

정상 대조군 6예 중 IL-2는 2예, IFF-γ;1예, IL-4;2예, IL-5는 2예에서 각각 관찰되었고, 아토피 대조군은 IL-2;1예, IFN-γ;1예, IL-4와 IL-5는 한 예에서도 관찰되지 않았다(Table 2).

아토피성 기관지 천식군 6예에서 IL-2는 4예, IFN-γ;2예, IL-4;4예, IL-5는 4예에서 관찰되었으며, 증상이 있었던 4예에서는 IL-4와 IL-5 모두 표현됨을 알 수 있

었다. 비아토피성 기관지 천식군에서는 IL-2;4예, IFN- γ ;1예, IL-4;3예, IL-5;3예가 관찰되었으며, 증상이 있었던 5 예에서는 IL-2가 4예, IFN- γ ; 1예, IL-4가 3예, IL-5가 3예에서 관찰되었다(Table 3).

고 찰

본 실험에서 정상인의 기관지 조직내에서도 IL-2를 비롯한 일부의 cytokines이 표현되는 것은 기대하지 않은 소견이었다. 이 소견은 정상인의 기관지에서도 림프구가 활성화될 수 있다는 것을 의미하며, 이는 다른 연구자의 보고 즉, 정상인의 기관지 폐포세척액내에서 HLA-DR 양성 T 림프구가 증가되어 있으며²³⁾, 말초혈액보다 기관지 폐포세척액내에서 CD4, CD8 양성 T

림프구의 IL-2 수용체와 HLA-DR의 표현이 증가되어 있는 다른 보고²⁴⁾와 일치한다. 물론 본 실험에서는 기관지를 사용하였으며, 상기 인용된 실험은 기관지폐포 세포를 사용하였다는 차이는 있지만, 기관지폐포 세척 세포의 활성화는 간접적으로 기관지 조직내 림프구의 활성화를 예측할 수 있다고 생각된다.

일반적으로 in situ hybridization의 경우 ³⁵S 혹은 ³H 같은 방사선 동위원소를 사용하지만, 동위원소를 취급하는 데 따른 사용상의 제약과 결과를 얻기까지 많은 시간이 필요하다는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 최근에 방사선 동위원소와 비방사선 동위원소인 biotin을 부착시킨 probe로 in situ hybridization 한 결과를 비교하여 두 probe사이에 sensitivity(민감도)에 차이가 없

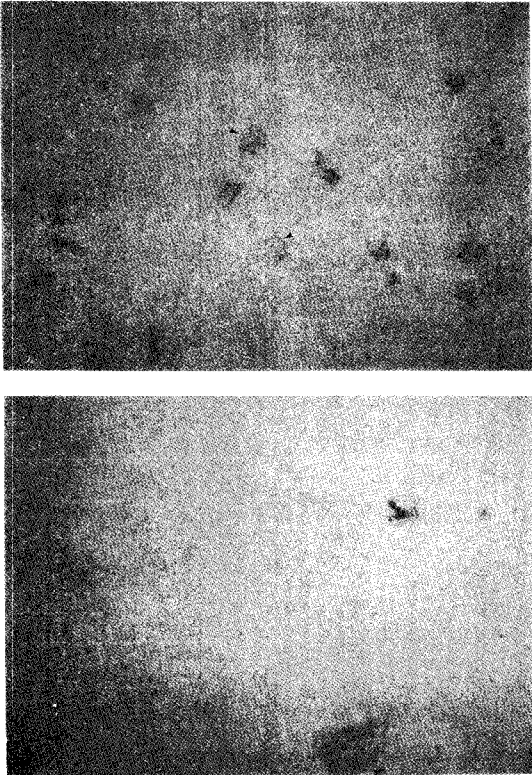


Fig. 3. The concanavalin-A stimulated-lymphocytes show positive signals of IL-5 (indicated by arrow heads) in upper figure, however, RNase-treated lymphocytes (negative control) do not have any positive signal of IL-5 in lower figure.

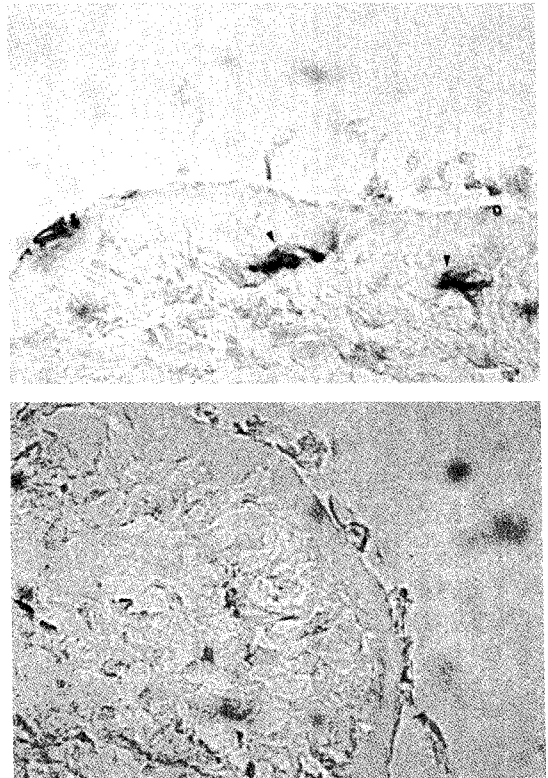


Fig. 4. The brown-colored positive signals(indicated by arrow heads) are detected under the basement membrane of bronchial tissue from patient with bronchial asthma(upper figure), however, there are no positive signal on the RNase-treated bronchial tissue from patient with bronchial asthma(lower figure).

Table 2. Expression of Cytokines in Healthy Subjects

Number	Age/Sex	Symptoms	PC20	IL-2	INF- γ	IL-4	IL-5
<u>Normal control</u>							
1	24/M	-	ND	+	+	+	-
2	25/M	-	ND	+	-	-	+
3	25/M	-	ND	-	-	+	-
4	24/M	-	ND	-	-	-	+
5	25/M	-	ND	-	-	-	-
6	25/M	-	ND	-	-	-	-
<u>Atopic control</u>							
1	27/M	-	ND	+	-	-	-
2	25/M	-	ND	-	+	-	-
3	25/M	-	ND	-	-	-	-
4	25/M	-	ND	-	-	-	-
5	25/M	-	ND	-	-	-	-
6	24/M	-	ND	-	-	-	-

Table 3. Expression of Cytokines in Patients with Bronchial Asthma

Number	Age/Sex	Symptoms	PC20	IL-2	INF- γ	IL-4	IL-5
<u>Non-Atopic bronchial asthma</u>							
1	30/M	+	0.05	+	+	+	+
2	51/M	+	3.0	-	-	+	+
3	37/M	+	2.1	+	-	+	+
4	35/F	+	1.2	+	-	-	-
5	55/M	+	2.5	+	-	-	-
6	25/M	-	0.09	-	-	-	-
<u>Atopic bronchial asthma</u>							
1	40/M	+	0.1	+	+	+	+
2	38/F	+	1.5	-	+	+	+
3	34/M	+	2.5	+	-	+	+
4	35/F	+	1.3	-	-	+	+
5	22/M	-	2.1	+	-	-	-
6	26/M	-	2.0	+	-	-	-

음을 보고하였고²⁵⁾, 또한 digoxigenin을 사용한 in situ hybridization이 보고되고 있다²⁶⁾. 따라서 저자들도 방사선 동위원소 대신 digoxigenin을 사용하였으며, 이는 in situ hybridization의 probe로서 충분하리라고 사료된다. 비방사선 동위원소로 probe로 사용하는 경우는

항상 비특이적인 signal(표식)이 문제가 되며, 저자들도 비특이적인 소견을 경험하였지만, 음성 대조군에서 비특이적 양성 소견이 나온 경우는 실험 표본에서도 양성 signal을 보이더라도 인정하지는 않았다.

현재까지 아토피와 비아토피 천식간의 원인적 차이

는 규명되어 있지 않지만, T 림프구 클론을 이용한 실험에서 아토피와 비아토피의 IgE 합성의 차이는 아토피 환자의 림프구에서 "변형된(aberrant)" IL-4의 증가에 의한다고 보고하였다²⁷⁾. 그리고 아토피 천식의 경우 말초혈액 및 기관지 폐포세척액내에서 IL-4, IL-5가 증가되어 있었으나, 비아토피 천식의 경우는 IL-2, IL-5가 증가되어 있었다¹⁶⁾. 이러한 사실은 아토피성 천식과 비아토피성 천식의 병인이 림프구의 기능적 차이에 의한 것임을 추정할 수 있었다. 본 실험에서는 아토피성 천식환자와 비 아토피성 천식 환자 사이의 cytokines의 발현 유무로 아토피가 천식에 미치는 영향을 간접적으로 평가하려고 하였으나, 두 군사이에 cytokines의 발현의 차이를 관찰할 수 없었으므로 아토피에 의한 영향은 무시될 수 있을 것으로 사료되지만, 실험 예수가 작아 단정짓기는 힘들 것으로 사료된다. 그리고 증상이 있었던 4예의 아토피성 천식환자에서 IL-4, IL-5가 전예에서 관찰되었던 반면, 증상이 있었던 5예의 비아토피성 천식 환자에서는 5예중 3예에서 발견되었던 사실은 다음의 여러가지를 시사하는 것이라 하겠다. 첫째, 대상환자군의 조합에 가능하면 아토피성 증상이 있는 군과 증상이 없는 군으로 나누어 연구가 필요하다는 것을 뒷바침하는 소견이며, 둘째, 증상이 있고나서 얼마만에 기관지 내시경을 시행하느냐 하는 것이다. 이는 cytokines의 m-RNA가 다른 단백질의 m-RNA보다 반감기가 짧아 불안한 상태이므로 항상 분해될 수 있다는 것이다. 따라서 실험에 앞서 각 cytokines의 측정에는 표준화된 방법이 필요할 것으로 사료된다. 즉, 언제 기관지 내시경을 하며, 그리고 언제 in situ hybridization을 할 것인가가 중요할 것으로 사료된다.

Probe의 제조법은 여러가지 방법이 있으나, 본 실험에서는 random priming법을 사용하였다. 왜냐하면 random priming으로 probe를 labelling 할 경우에는 DNA의 길이가 150bp이하인 경우는 그 효능이 떨어지는 것으로 보고되고 있지만²⁸⁾, 본 실험에서는 가장 짧은 probe가 493bp로 random priming에는 문제가 없을 것으로 사료된다.

본 실험에서는 cytokine의 분비 세포를 확인하지는 못하였지만, 추후 immunohistochemistry를 이용하여 림프구임을 확인한 세포에서 m-RNA의 in situ hybridization을 실시하는 것이 cytokine의 분비 세포가 어디 인지를 알 수 있을 것으로 사료된다.

dization을 실시하는 것이 cytokine의 분비 세포가 어디 인지를 알 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 기관지 천식환자의 기관지내의 림프구는 활성화되어 있고, 아토피성 기관지 천식환자의 병인에 TH2-like 림프구가 관여한다고 추측되지만, 일부 아토피성 정상인에서의 기관지에서도 TH2-like 림프구가 활성화되어 있다고 보아 추후 면역조직화학 염색을 이용한 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

연구배경: 기관지 천식은 기도의 만성 염증성 질환으로 밝혀지고 있으며, 기관지 천식의 병인에 림프구의 "활성화"가 주요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다. 이들 림프구중 TH1 림프구보다 TH2 림프구의 활성화가 아토피 천식환자의 기도에서 증명된 바 있다. 하지만, 아토피 정상인과 아토피 천식환자 사이의 cytokine 발현 차이는 잘 알려져 있지 않다.

방법: 아토피 혹은 비아토피 천식환자 각각 6명, 아토피성 정상인, 비아토피성 정상인 각각 6명을 대상으로 기관지 조직을 획득하여 동결절편으로 in situ hybridization을 시행하였다. 사용된 cytokine은 IL-4, IL-5, INF- γ 와 IL-2 였으며, probe의 제조는 random priming을 이용하여 digoxigenin을 부착시켜 사용하였다.

결과: 기관지 천식 환자의 기관지 조직은 상피세포의 탈락이 관찰되고 림프구를 포함한 다양한 염증 세포의 침윤이 기저막 하부에서 관찰되었다. 기관지 조직에서의 음성 대조군으로 RNase를 처리한 경우는 갈색의 음영이 관찰되지 않으나, RNase를 처리하지 않는 조직은 기저막 하부의 염증세포에서 갈색의 음영이 관찰되었다. 정상 대조군 6예 중 IL-2는 2예, INF- γ ;1예, IL-4;2예, IL-5는 2예에서 각각 관찰되었고, 아토피 대조군은 IL-2 1예, INF- γ ;1예, IL-4와 IL-5는 한 예에서도 관찰되지 않았다. 아토피성 기관지 천식군 6예에서 IL-2는 4예, INF- γ ; 2예, IL-4; 4예, IL-5는 4예에서 관찰되었으며, 비아토피성 기관지 천식군에서는 IL-2 4예, INF- γ ; 1예, IL-4; 3예, IL-5; 3예가 관찰되었다.

결론: 기관지 천식환자의 기관지내의 림프구는 활성화

화되어 있고, 아토피성 기관지 천식환자의 병인에 TH2-like 림프구가 관여할 것으로 추측되지만, 일부 아토피성 정상인에서의 기관지에서도 TH2-like 림프구가 활성화되어 있는 것으로 보아 추후 면역조직화학 염색을 이용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 실험에 많은 도움을 주신 순천향대학교 의과대학 내과학교실의 황승덕, 조성원, 한동철 교수님께 감사를 드리며, 끝으로 본 연구의 정상대조군으로 참가해주신 순천향대학교 의과대학생 여러분에게 진심으로 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) PJ Barnes: New aspects of asthma. *J Int Med* 231:453, 1992
- 2) Corrigan CJ, Kay AB: CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Am Rev Respir Dis* 141:970,1990
- 3) Park CS, Lee SM, Kim HT, Uh ST, Chung YT: Soluble IL-2 receptor in bronchoalveolar larafe fluid from patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 91:623,1993
- 4) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB: Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 142:1407,1990
- 5) Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145, 1989
- 6) Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, Van Lier RAW, Kapsenberg ML: Human atopenspecific types 1 and 2 helper cell clones. *J Immunol* 147:2942, 1991
- 7) Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ: Human interleukin-5(IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73:1504, 1989
- 8) Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA: Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 167:219, 1988
- 9) Del Prete G, Maggi E, Parronchi P: IL-4 is an essential co-factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and thier supe-matants. *J Immunol* 140:4193, 1988
- 10) Angus T: The cytokine handbook. Schrader JW. Interleukin-3. Academic press, San Diego, 1991
- 11) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB: Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326:298, 1992
- 12) 김진경, 김기업, 이상무, 김현태, 어수택, 정연태, 김용훈, 박춘식: 아토피에 있어서의 기관지 과민성. *대한내과학회 초록집* 133, 1992
- 13) Hasmid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Coliins JV, Jeffery PK, Quint DJ, Kay AB: Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 87:1541,1991
- 14) Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J: Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis* 145:918, 1992
- 15) American Thoracic Society: Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 136:225,1987
- 16) Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow J Jr: Allergic and nonallergic asrhmatics

- have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* **146**:109,1992
- 17) Boyüm A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scan J Clin Lab Invest* **21**:s97, 1968
 - 18) Saiki RK, Gelfand DH, Stottei S, Schari SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487, 1988
 - 19) McDonell MW, Simon MN, Studier FW: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **156**:274, 1977
 - 20) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning*, 2nd Ed., E.5, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 - 21) Kessler C, Holtke H-J, Sciblr R, Burg J, Muhlegger K: Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids: I. A novel DNA labelling and detection system based on digoxigenin:anti-digoxigenin ELISA principle(digoxigenin system). *Mol Gen Hoppe-Seyler* **371**: 917, 1990
 - 22) Patel NH, Goodman CS: DIG-labelled single-stranded DNA probes for in situ hybridization. In nonradioactive labelling and detection of biomolecules. Kessler C Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, 1992, pp 377-81
 - 23) Becker S, Harris DT, Koren HS: Characterization of normal human lung lymphocytes and interleukin-2-induced lung T cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **3**:441,1990
 - 24) Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K: Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* **88**: 395,1991
 - 25) Crum CP, Nuobo GJ, Friedman D, Silverstein SJ: A comparison of biotin and isotope labeled ribonucleic acid probes for in situ detection of HPV 16 ribonucleic acid in genital precancers. *Lab Invest* **58**:354, 1988
 - 26) Ostrow RS, Manias DA, Clark BA, Okagki T, Twigg LB, Faras AJ: Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinomas of the cervix by in situ hybridization. *Cancer Res* **47**:649, 1987
 - 27) Wierenga EA, Snoek M, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML: Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors. *Eur J Immunol* **20**:1519, 1990
 - 28) Nighorn A, Healy MJ, Davis RL: The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neurophil. *Neuron* **6**:455, 1991