

## 폐결핵 환자의 폐포 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 분비에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 내과학교실

천 선 희

= Abstract =

### Spontaneous and Stimulated Release of the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 of Alveolar Macrophages in the Patients with Pulmonary Tuberculosis

Seon Hee Cheon, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

The aim of this study was to evaluate spontaneous and LPS stimulated proinflammatory cytokines and chemokine release of alveolar macrophages in the patients with pulmonary tuberculosis and healthy individuals, as a control. Alveolar macrophages recovered from bronchoalveolar lavage fluids were cultured with or without LPS 0.1, 1, or 10  $\mu$ g/ml for 24 and 48 hours in 37C, 5% CO<sub>2</sub>. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 amount were evaluated using ELISA kit from the supernatants. There were a significant increase in the spontaneous 24 hours release of TNF- $\alpha$  and IL-6 from the involved segments of tuberculosis patients compared with uninvolved segments and normal control. There were also increasing trends of release of them after LPS stimulation in involved segments, but not significant. IL-1 $\beta$  and IL-8 were not evaluated from the involved segments of tuberculosis and there were not significant differences of them between uninvolved segments of tuberculosis and normal control. It is concluded that cytokine release of alveolar macrophages in the pulmonary tuberculosis was markedly increased, and it was localized to the alveolar macrophages from the involved segments. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 942-952)

Key words : Tuberculosis, Cytokine, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8.

### 서론

인체에 결핵균(*mycobacterium tuberculosis*)이 감염되면 대부분의 결핵균은 작은 육아종(*granuloma*) 내에 휴지기(*dormancy*) 상태로 존재하여 면역체제

로부터 감지되지 않은채 남아있을 수 있다. 이러한 사람의 대부분에서는 숙주의 면역반응과 결핵균주 사이에 지속적이지만 불안정한 평형상태가 형성되는데 이 평형이 유지되는한 질환으로 발생되지 않으나 감염된 사람의 약 5%에서는 어느시기에 면역체제의 약화

로 인하여 평형상태가 깨어지며 결핵균이 재활성화되어 결핵이란 질환으로 이환되게 된다. 만일 숙주가 효과적인 면역반응을 일으킨다면 결핵감염은 tubercle을 형성하며 조절될 것이다<sup>1,2)</sup>. 따라서 결핵균에 감염된 사람의 세포-매개성 면역반응(cell-mediated immune reaction)이 중요하나 아직까지 대표적인 세포내 감염질환인 결핵에 대한 숙주의 방어기전 및 면역반응이 정확히 이해되고 있지 못하다.

세포-매개성 면역반응의 효과기세포(effector cell)로 단핵성 식세포(mononuclear phagocyte)의 기능이 중요한데 면역반응은 여러가지 interleukin을 포함한 interferon- $\gamma$ 의 자극에 의하여 발생될 수 있으며 세포간의 상호작용이나 식균작용에서 여러가지 cytokine이 분비되고 매개역할을 한다. 결핵균에 대한 숙주의 반응에서 cytokine은 육아종 형성, 건락성 괴사(caseation necrosis), 및 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity reaction)에 중요한 역할을 한다<sup>1-3)</sup>.

본 연구에서는 활동성 폐결핵 환자의 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid)에서 얻어진 폐포 대식세포(alveolar macrophage)에서 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (이하 TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (이하 IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (이하 IL-6)와 chemokine인 interleukin-8 (이하 IL-8)의 자발 및 LPS 자극 후의 분비를 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

활동성 폐결핵 환자 10예와 특별한 질환의 기왕력 및 증상이 없는 정상 대조군 5예를 대상으로 하였으며, 폐결핵 환자는 모두 객담이나 기관지폐포 세척액 AFB 도말 혹은 배양 양성이었으며 기관지폐포 세척술은 항결핵제 투여전에 시행하였다.

대조군과 폐결핵 환자 모두 우중엽이나 설상엽에서 기관지폐포 세척술이 시행되었으며, 폐결핵 환자 2예

는 우중엽에 침윤성 음영이 있는 결핵성 폐렴이었으며, 1예는 미만성 간질성 폐렴 양상으로 발병되어 이 3예를 이환된 병변에서 기관지폐포 세척술이 시행된 것으로 분류하였다.

### 2. 기관지폐포 세척세포의 분리

기관지폐포 세척술은 고식적인 방법으로 시행하였는데<sup>4)</sup> 기관지내시경을 3-4 분절 기관지에 wedging 시키고 37 $^{\circ}$ C로 데운 무균 생리식염수 50CC로 4-5회 세척하였다. 회수된 용액은 세장의 무균 거즈를 통해 점액을 걸러낸 후 흡입 용량을 측정하고 1500rpm에서 10분간 원침하여 세포를 침전시키고, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), glutamine 2 mM을 함유한 RPMI 1640 배양액으로 1000 rpm에서 10분간 2회 원침세척한 후 hemocytometer로 총 세포수를 측정하고, trypan blue로 viability를 검사하였다. 세포수를 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml로 맞추어 후 200  $\mu$ l 취하여 cytocentrifuge 시켜 슬라이드에 도말 건조한 후 Wright 염색법을 시행하여 구성세포를 측정하였다.

### 3. 폐포대식세포의 배양

RPMI 1640 배양액에 폐포 대식세포가 ml당 1 $\times$ 10<sup>6</sup>개가 되도록 희석하여 24 well culture plate에 심어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 2시간 배양 후 두번 세척하여 부착하지 않은 세포를 제거하고 폐포 대식세포만 남게하였다. 다음 RPMI 1640 배양액을 동량 가하고, LPS 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml를 첨가하거나 첨가하지 않고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 및 48시간 배양한 후 상층액을 걷어 8000 rpm에서 10분간 원침시켜 측정시 까지 -70 $^{\circ}$ C에 냉동시켰다.

### 4. Cytokine 분비의 측정

Endogen사의 ELISA kit를 사용하여 측정하였는데, 간단히 기술하면 냉동된 상층액을 실온에서 녹인 후

**Table 1.** Findings of bronchoalveolar lavage fluid in control and patients with tuberculosis

	Control(n=5)	Tuberculosis(n=10)
Age (year)	28 ± 9	43 ± 14
Rec (%)	57 ± 12.0	52 ± 15.4
TCC (×10 <sup>3</sup> /ml)	135 ± 69.0	214 ± 128.8
MQ (%)	90 ± 5.0	85 ± 10.9
Lym (%)	10 ± 5.0	13 ± 10.1
Neut (%)	0	2 ± 2.4

**Table 2.** 24hours spontaneous release of cytokines of alveolar macrophages

	Control(n=5)	Tbc-Nonlesion(n=7)	Tbc-Lesion(n=3)
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	125 ± 109.7	127 ± 135.6	1149 ± 805.5*
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	13.4 ± 11.1	9.7 ± 1.8	
IL-6 (ng/ml)	0.91 ± 0.58	1.10 ± 1.38	20.6 ± 16.12*
IL-8 (ng/ml)	212 ± 135.9	257 ± 167.9	

\*p<0.05 when compared to other groups

human TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 각각에 대한 murine monoclonal antibody로 coating된 rigid flat-bottom microtiter plate에 넣어서 배양 후 well을 닦아내고, 같은 cytokine에 대한 horseradish peroxidase conjugated antibody를 더하여 다시 배양한 후 well을 세척하였다. Horseradish peroxidase substrate를 첨가하여 spectrophotometry로 A<sub>550</sub>에서 색광도를 측정하였다.

## 5. 통계분석

통계처리는 SPSS 통계처리 프로그램을 이용하여 ANOVA와 student's t-test를 사용하였으며, p<0.05인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 해석하였다.

## 결 과

### 1. 기관지폐포 세척액 결과

기관지폐포 세척액 회수율은 대조군과 활동성 폐결핵

군 각각 57 ± 12.0%, 52 ± 15.4%, 전세포량은 각각 135 ± 69.0(×10<sup>3</sup>/ml), 214 ± 128.8 (×10<sup>3</sup>/ml)로 유의한 차이가 없었다. 세포분획은 대조군은 대식세포 90 ± 5.0%, 림프구 10 ± 5.0%, 활동성 폐결핵군은 대식세포 85 ± 10.9%, 림프구 13 ± 10.1%, 호중구 2 ± 2.4%로 두군간에 특별한 차이는 없었다.(Table 1)

### 2. Cytokine의 24시간 자발적 분비

TNF- $\alpha$ 의 24시간 동안 자발적 분비는 대조군이 125 ± 109.7 pg/ml, 폐결핵 비병변 127 ± 135.6 pg/ml, 병변 1149 ± 805.5 pg/ml, IL-6의 24시간 동안 자발적 분비는 대조군이 0.91 ± 0.58 ng/ml, 폐결핵 비병변 1.10 ± 1.38 ng/ml, 병변 20.6 ± 16.12 ng/ml로 대조군과 폐결핵 비병변은 대식세포의 24시간 자발적 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 분비능에 차이가 없었으나 이환된 폐결핵 병변에서 얻어진 대식세포의 분비능은 통계적으로도 유의한 현저한 증가를 보였다(p<0.05).

IL-1 $\beta$ 와 IL-8의 24시간 자발적 분비능은 폐결핵 병변의 대식세포에서는 측정되지 않았으며, 대조군과

**Table 3.** 48 Hours release of cytokines of alveolar macrophages after LPS 10  $\mu$ g/ml stimulation

	Control(n=5)	Tbc-Nonlesion(n=7)	Tbc-Lesion(n=3)
TNF- $\alpha$ (ng/ml)	27 $\pm$ 18.9	39 $\pm$ 27.3	57 $\pm$ 46.2
IL-1 $\beta$ (ng/ml)	3.4 $\pm$ 1.95	3.0 $\pm$ 1.90	
IL-6 (ng/ml)	195 $\pm$ 59.8	225 $\pm$ 67.1	283 $\pm$ 36.3
IL-8 (ng/ml)	2586 $\pm$ 912	3708 $\pm$ 658	

\*p<0.05 when compared to other groups

폐결핵 비병변에서 IL-1 $\beta$ 는 각각 13.4  $\pm$  11.1 pg/ml, 9.7  $\pm$  1.8 pg/ml, IL-8은 각각 212  $\pm$  135.9 ng/ml, 257  $\pm$  167.9 ng/ml로 차이가 없었다.(Table 2)

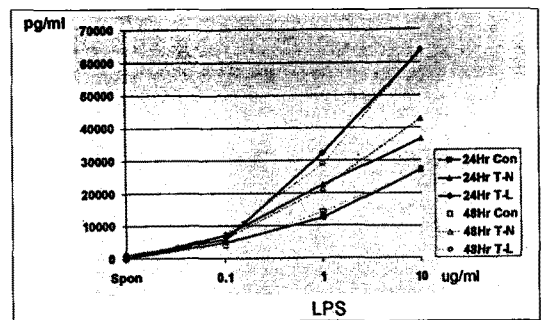
### 3. Cytokine의 최대자극(LPS 10 $\mu$ g/ml) 후 48시간 분비

TNF- $\alpha$ 의 LPS 10  $\mu$ g/ml 자극 후 48시간 분비는 대조군이 27  $\pm$  18.9 ng/ml, 폐결핵 비병변 39  $\pm$  27.3 ng/ml, 병변 57  $\pm$  46.2 ng/ml, IL-6의 최대자극 후 48시간 분비는 대조군이 195  $\pm$  59.8 ng/ml, 폐결핵 비병변 225  $\pm$  67.1 ng/ml, 병변 283  $\pm$  36.3 ng/ml로 대조군과 폐결핵 비병변은 대식세포의 최대자극 후 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 48시간 분비능에 차이를 보이지 않았으며 병변에서 얻어진 대식세포는 경미한 분비의 증가를 보였다.

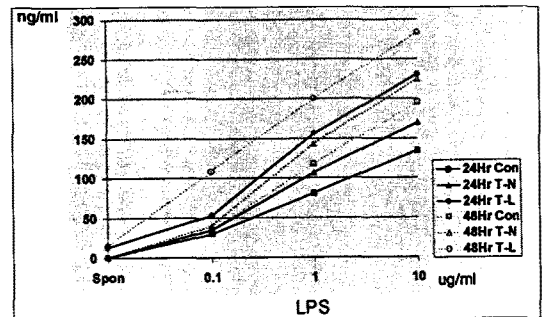
IL-1 $\beta$ 와 IL-8의 LPS 10  $\mu$ g/ml 자극 후 48시간 분비능도 폐결핵 병변의 대식세포에서는 측정되지 않았으며, 대조군과 폐결핵 비병변에서 IL-1 $\beta$ 는 각각 3.4  $\pm$  1.95 ng/ml, 3.0  $\pm$  1.90 ng/ml, IL-8은 각각 2586  $\pm$  912 ng/ml, 3708  $\pm$  658 ng/ml로 차이가 없었다.(Table 3)

### 4. Cytokine의 분비곡선

기관지폐포 세척액에서 얻어진 폐포 대식세포를 자발적으로, LPS 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml로 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 24시간과 48시간 분비능을 관찰하였다.(Fig 1, 2, 3 & 4)



**Fig. 1.** Spontaneous and stimulated release of TNF- $\alpha$  of alveolar macrophages from control(n=5), Tbc-nonLesion(n=5) and lesion(n=2).



**Fig. 2.** Spontaneous and stimulated release of IL-6 of alveolar macrophages from control(n=5), Tbc-nonLesion(n=5) and lesion(n=2).

TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비는 대조군에 비하여 폐결핵 비병변에서, 비병변에 비하여 병변에서 현저하게 증가하는 경향을 보였으며, IL-8은 대조군에 비하여 폐결핵 비병변에서 분비가 증가하는 경향을 보였으나 IL-1 $\beta$ 은 대조군 및 폐결핵 비병변에서 얻어진 대식세포의 분비능에 큰 차이가 없었다.

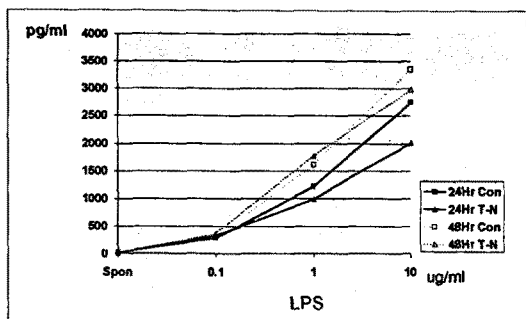


Fig. 3. Spontaneous and stimulated release of IL-1 $\beta$  of alveolar macrophages from control(n=5). and Tbc-nonLesion(n=5).

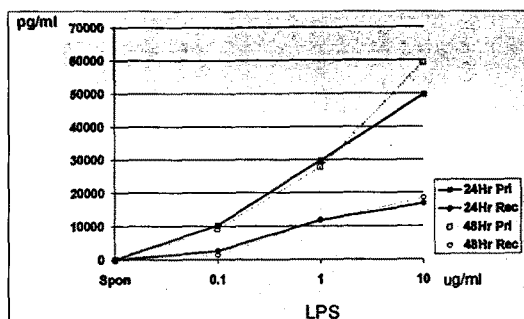


Fig. 5. Release of TNF- $\alpha$  of alveolar macrophages from nonLesion in primary(n=3) and recurrent(n=2) tuberculosis.

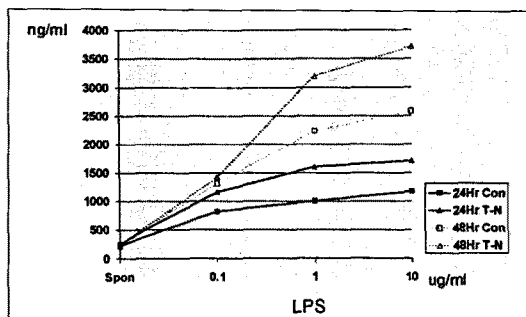


Fig. 4. Spontaneous and stimulated release of IL-8 of alveolar macrophages from control(n=5). and Tbc-nonLesion(n=5).

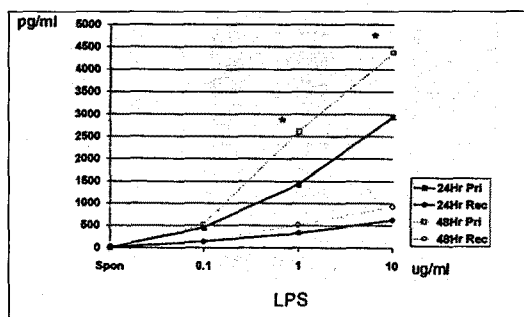


Fig. 6. Release of IL-1 $\beta$  of alveolar macrophages from nonLesion in primary(n=3) and recurrent(n=2) tuberculosis.

TNF- $\alpha$ 는 처음 24시간에 대부분이 분비되어 48시간 분비량과 큰 차이가 없었으나 IL-6, IL-1 $\beta$  및 IL-8은 24시간에서 48시간 까지 시간이 경과할 수록 분비량이 점차 증가하였다.

TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 는 LPS를 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml 증가시킬 수록 자발적 분비에 비하여 현저하게 분비가 증가되었으나 IL-8은 LPS 1  $\mu$ g/ml로 증가시킬때 까지 분비가 증가되다가 그 이후 고평부(plateau)를 형성하였다.

### 5. 초치료와 재발환자에서 cytokine의 분비

폐결핵 비병변(n=5)에서 얻어진 폐포 대식세포의 분비능을 초치료(n=3)와 재발(n=2)로 나누어 비

교 하였을때 IL-6와 IL-8은 차이를 보이지 않았으나 (data not shown) TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 재발에 비하여 초치료 환자에서 대식세포의 분비능이 현저히 증가되어 있었으며, IL-1 $\beta$ 의 경우 LPS 1  $\mu$ g/ml과 10  $\mu$ g/ml로 자극하였을때 48시간 분비량이 초치료 환자에서 재발환자에 비하여 통계적으로도 유의한 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). (Fig 5 & 6)

### 고 찰

대식세포는 결핵균에 대한 숙주의 면역 방어작용을 담당하는 주 세포이며, 대식세포에서 분비되는 cytokine은 결핵감염시 발생하는 여러가지 병리적인 증상, 특히 육아종 형성, 건락성 괴사 및 지연형 과민반응을 발생

시키는 데 중요한 역할을 한다<sup>1-3</sup>). 폐결핵 환자에서 주로 대식세포에서 분비되는 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (이하 TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (이하 IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (이하 IL-6) 및 chemokine인 interleukin-8 (이하 IL-8) 은 인체에서 방어적일 수도 있고 해로울 수도 있는 반응을 일으키며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6는 급성반응으로 발열, 권태, 오한, 야간발한 및 체중감소를 일으키는 원인으로 생각된다<sup>5-8</sup>).

TNF- $\alpha$ 는 화학주성 물질을 자극하여 허부 호흡기 계로 염증세포를 유입시켜서 육아종을 형성하고, 대식세포 표면에 ICAM-1과 같은 부착물질을 증가시키고 세포분화와 식균작용을 촉진시킨다<sup>9-11</sup>). 특히 *Listeria monocytogenes*나 *M. bovis* BCG로 감염된 쥐에서 항 TNF- $\alpha$  항체를 주입시 육아종 형성이 억제되며 결과적으로 균이 현저하게 증식되는 것으로 보아 TNF- $\alpha$ 가 통성 세포내 감염균(facultative intracellular organism)의 감염에 대한 방어작용에 필수적인 역할을 함을 알 수 있다<sup>12-13</sup>). 또한 주변조직의 괴사와 공동형성 및 흔히 유발되는 악액질(cachexia)과 관련이 있다<sup>7,14</sup>). IL-1 $\beta$ 는 임파구에 화학주성 물질로 작용하며 CD4<sup>+</sup> 조력림프구를 활성화시켜 증식시키고 IFN- $\gamma$ 를 분비시키며, 또한 상처치유효과(wound healing effect)가 있고 procoagulant activity를 야기시키며 섬유아세포(fibroblast)의 증식을 자극하고 혈관내피세포(endothelial cell)를 활성화시켜 백혈구(leukocyte)의 부착을 일으킨다<sup>15-18</sup>). Kunkel 등<sup>19</sup>에 의하면 IL-1 $\beta$ 는 초기 shistosomia 감염시 육아종 형성에 관여하는 주요 cytokine으로 염증세포의 초기 유입과 활성화에 더욱 중요한 역할을 하고 TNF- $\alpha$ 는 지속적으로 육아종을 성숙시키는 작용을 한다고 하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 실험적으로 단핵세포나 대식세포 계열에서 LPS의 자극에 의하여 분비되며, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*와 같은 다양한 감염균에 의하여서도 분비되는데, mycobacteria는 LPS를 함유하고 있지 않으나 세포벽에 LPS와 많은 생리화학적 요소를 공유하는 LAM

(lipoarabinomannan)이라는 lipid glycoprotein 복합체를 함유하고 있다<sup>5,20</sup>). IL-6는 B-cell의 성장과 분화를 촉진하는 물질로 결핵감염시 고글로브린혈증(hyperglobulinemia)을 매개할 수 있다<sup>21</sup>). 비교적 최근에 발견된 chemokine의 일종인 IL-8은 호중구, T-림프구, 호염기구에 대한 화학주성 물질로 작용하여 염증세포를 활성화시키고 육아종을 형성하며 폐조직을 파괴시킬 수 있다<sup>22-24</sup>). IL-8은 급성과 만성 염증을 모두 매개 할 수 있는데 Larsen 등<sup>23</sup>에 의하면 비성숙 단핵구일 수록 더욱 많은 양의 IL-8을 분비하여 이 cytokine이 육아종 형성의 초기단계에 아주 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. IL-8은 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor)처럼 맥관형성(angiogenesis)을 유도하며 heparin에 결합할 수 있어서 TNF- $\alpha$ 와 마찬가지로 결핵병변의 육아종과 공동 주변에서 보여지는 치유과정에 관여한다<sup>25-26</sup>). LPS와 TNF- $\alpha$ , IL-1이 IL-8을 분비시키는데 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 인체에서 결핵감염 초기에 autocrine regulatory loop으로 상호 작용을 하므로 폐결핵 환자의 대식세포에 항 TNF- $\alpha$  항체나 더하여 항 IL-1 $\alpha$  혹은 항 IL-1 $\beta$ 에 대한 항체로 처리하면 IL-8의 분비가 억제될 수 있다<sup>25</sup>).

세포내 감염으로 결핵감염의 특징은 첫째, 단핵성 식세포 내에서 결핵균 생존기능으로 균주가 항체반응을 피할 수 있는 반면에 단핵성 식세포에 의하여 단백질을 processing 및 presentation 시키고 둘째, T-림프구가 중추적인 역할을 담당하고 셋째, 조직에서의 반응으로 육아종을 형성하고 넷째, 질환이 만성으로 이행되는 것이다<sup>2</sup>). 즉 긴 잠복기를 가진 휴면상태(dormant infection)와 만성경과가 특징이라고 할 수 있다. 이러한 과정에서 면역반응의 효과기세포로 단핵성 식세포의 기능이 중요하며 효과기능으로는 reactive oxygen intermediates(ROI) 및 reactive nitrogen intermediates(RNI)의 분비, 세포내 iron 이용의 제한, phagosome-lysosome fusion등을 들 수 있다<sup>2</sup>). 이러한 일련의 과정들은 여러가지 interleukin을 포함한 interferon- $\gamma$ 의 자극에 의하여

발생될 수 있으며 또한 세포간의 상호작용 및 식균작용에서 여러가지 cytokine이 분비되고 관련이 된다. 결핵을 예방하고 치료하기 위한 새로운 방법을 모색하기 위해서는 인체에서 일어나는 숙주 반응을 확실하게 이해하기 위하여 cytokine network에 초점이 맞추어져야 하고 폐결핵 환자의 염증이 발생한 부위에서 얻어진 활성화된 대식세포에 의한 cytokine의 분비가 가장 직접적인 정보라고 할 수 있다.

폐결핵 환자를 대상으로 말초혈액 단핵구를 이용한 실험에서 1990년 Takashima 등<sup>27)</sup>은 급성 폐결핵 환자의 말초혈액 단핵구는 LPS로 자극시 건강인 보다 TNF- $\alpha$ 의 분비가 현저히 증가하였으나 만성 치료 불응성 결핵의 경우에는 오히려 분비가 감소하였다고 보고하였다. 1991년 Ogawa 등<sup>28)</sup>은 폐결핵 환자의 경우 LPS나 MDP로 자극시 TNF- $\alpha$ , IL-6의 분비가 정상인 보다 현저히 증가하였고 항 TNF- $\alpha$  항체나 항 IL-6 항체로 전처리 시에는 분비가 급격히 감소하였으며, 정상인에서는 PPD 양성인 경우 PPD 음성인 경우 보다 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비가 증가된다고 하였다. 1993년 Schauf 등<sup>6)</sup>은 정상인의 말초혈액 단핵구에서는 cytokine m-RNA가 발현되지 않았으나 폐결핵 환자의 단핵구에서는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8의 m-RNA가 전 예에서 발현되었고 일부에서 IL-6와 IFN- $\gamma$ 의 m-RNA가 발현되었다고 보고하여 인체가 결핵균에 감염된 경우 말초혈액 단핵구가 활성화되어 cytokine의 분비능이 증가되어 있음을 시사하였다.

본 연구에서는 폐결핵환자의 기관지폐포 세척액에서 얻어진 폐포 대식세포의 자발적 및 LPS 자극 후 cytokine의 분비능을 연구한 결과, 24시간 자발적 분비는 TNF- $\alpha$ 의 경우 이환된 병변이  $1149 \pm 805.5$  pg/ml로 대조군  $125 \pm 109.7$  pg/ml, 비병변  $127 \pm 135.6$  pg/ml에 비하여 유의하게 현저한 증가를 보였으며, IL-6의 경우 이환된 병변이  $20.6 \pm 16.12$  ng/ml로 대조군  $0.91 \pm 0.58$  ng/ml, 비병변  $1.10 \pm 1.38$  ng/ml에 비하여 역시 유의하게 현저한 증가를 보였다. IL-1 $\beta$ 와 IL-8의 24시간 자발적 분비능은 폐결핵 병변의 대식세포에서는 측정되지 못하였으며 대조

군과 비병변에서 얻어진 대식세포에서는 특별한 차이가 없었다. 따라서 폐결핵 환자의 폐포 대식세포의 cytokine 분비능은 폐결핵 환자에서도 직접 폐의 결핵에 이환된 부위에서 얻어진 폐포 대식세포에서 정상인에 비하여 현저히 증가되어 있었으나 폐의 좌측이나 우측 즉 감염된 쪽의 폐라고 하더라도 직접 이환되지 않은 분절에서 얻어진 폐포 대식세포의 분비능은 정상인과 비교하여 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Table 2). 1996년 Law 등<sup>29)</sup>은 폐결핵의 이환된 부위에서 얻어진 기관지폐포 세척세포의 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 24시간 자발적 분비가 대조군, 폐결핵 비병변과 속립성결핵 환자에 비하여 유의하게 증가되어 이러한 cytokine이 결핵감염시 직접적으로 육아종 형성에 관여하여 결핵균을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. 특히 같은 환자를 대상으로 직접 이환된 병변과 비병변에서 각각 얻어진 기관지폐포 세척액 세포의 cytokine 분비능을 비교하여 병변에서 얻어진 세포의 분비능이 비병변과 비교하여 현저하게 증가되었으며 비병변의 경우 대조군과의 차이가 없어 본 연구에서의와 마찬가지로 proinflammatory cytokine의 분비능이 국소적으로 폐의 직접 이환된 부위의 세포에서 증가되어 있음을 보여주었다. 또한 1995년 Zhang 등<sup>25)</sup>은 폐포 대식세포의 자발 및 자극 후 IL-8 분비 및 발현은 정상인에 비하여 폐결핵 환자에서 현저하다고 하였다. 본 연구에서 세포의 생존에 영향을 주지 않는 상태에서 최대자극이라고 생각되는 LPS  $10 \mu\text{g/ml}$ 로 48시간 동안 자극한 후의 분비능은 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 경우 결핵의 이환된 병변에서 얻어진 폐포 대식세포가 대조군이나 비병변에 비하여 분비능이 증가된 경향은 보였으나 자발적 분비능이 10-20배 증가된 것과 같은 큰 차이는 보이지 않았으며, IL-1 $\beta$ 와 IL-8은 병변에서 얻어진 대식세포에서는 측정이 되지 못하였고 대조군과 비병변은 큰 차이가 없었다(Table 3). 그 이유로는 결핵의 이환된 병변의 폐포 대식세포가 정상인이나 비병변의 대식세포에 비하여 현저히 활성화 되어 cytokine의 자발적 분비가 10-20배 증가되어 있으나 LPS 자극후에는 각

각의 세포에서 최대로 분비되어 그 차이가 적어지는 것이 아닌가 생각된다.

Cytokine의 분비곡선을 살펴보면 TNF- $\alpha$ 의 분비는 대부분이 처음 24시간에 분비되었으나 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 분비량은 48시간 까지 점차 증가되었으며, TNF- $\alpha$ , IL-1 및 IL-6는 자발적 분비에 비하여 LPS를 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml로 증가시킬 수록 분비가 증가되었으나 IL-8은 LPS 1  $\mu$ g/ml시 분비가 고평부를 이루었다(Fig 1, 2, 3 & 4).

엷수가 적으나 폐결핵 병변에서 얻어진 폐포 대식세포의 cytokine 분비능을 초치료 환자(3예)와 재치료 환자(2예)로 나누어 비교하여 보았을때 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 분비는 재발환자에 비하여 초치료 환자에서 현저하게 증가되었으며, 특히 LPS 1  $\mu$ g/ml과 10  $\mu$ g/ml로 자극한 IL-1 $\beta$ 의 48시간 분비는 통계적으로 유의하게 초치료 환자에서 증가되어 있었다(Fig 5 & 6). 그러나 IL-6와 IL-8의 분비능은 초치료와 재치료 환자에서 특별한 차이가 없었다. 본 결과로 미루어 보아 대식세포에서 분비되는 cytokine 중에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 가 특히 결핵의 초감염시 균에 대한 방어작용에 중요한 역할을 하지 않을까 생각되며, 이환된 병변에서 얻어진 폐포 대식세포에서의 연구가 다시 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서의 문제점은 폐결핵 병변에서 얻어진 대식세포의 실험엷수가 3예로 적으며 결과의 SD(standard deviation) 값이 큰데 그 이유로는 처음 실험을 고안할때 폐결핵 환자에서의 기관지폐포 세척술을 반드시 이환된 병변에서 시행하는 것으로 예정하지 않았으며 고식적으로 우중엽 및 설상엽에서 시행하였었다. 이환된 병변에서 기관지세척술이 시행된 3예의 경우, 2예는 우중엽의 결핵성 폐렴이었으며 1예가 미만성으로 폐 전체에 퍼진 간질성 폐렴 양상의 결핵이었다. SD값이 큰 이유는 3예중 미만성 간질성 폐렴 양상인 결핵의 cytokine 분비량이 작았기 때문인데 아마도 속립성 결핵의 경우 cytokine 분비가 작은 이유와 같지 않나 생각된다. Law 등<sup>29)</sup>의 연구에서 속립성 결핵에서 얻어진 기관지폐포 세척세포에서는 cytokine의

24시간 자발적 분비의 증가가 없었는데 그 원인은 혈성전과가 되는 속립성 결핵의 경우 폐포부위는 이환되지 않아 기관지폐포 세척에서 세포를 얻는 것이 의미가 없거나, 이러한 환자는 결핵균 감염시 정상적인 cytokine 분비가 이루어지지 않아 이것이 결핵의 혈성전과의 원인이되거나, 혹은 IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )와 같은 suppressive cytokine이 증가되어 있을 가능성 등을 시사하였다. 따라서 본 연구에서 미만성 간질성 폐렴 양상의 결핵을 제외한다면 이환된 결핵 병변에서 얻어진 cytokine 분비량의 값이 더욱 커지고 SD는 작아질 수 있다.

결론적으로 폐결핵 환자의 폐포 대식세포의 cytokine 분비능은 정상 대조군에 비하여 현저하게 증가되어 있었으나 이는 폐의 직접 이환된 부위의 폐포 대식세포에 국한되었다. 폐결핵은 주로 폐첨부나 상엽, 또는 하엽의 상분절에 잘 이환되므로 이 부위에서 기관지폐포 세척술을 시행하는 것은 우중엽이나 설상엽에 비하여 용이하지 않거나 회수율이 떨어지는 경우가 있지만 결핵에 의하여 활성화된 폐포 대식세포를 얻기 위하여서는 반드시 직접 이환된 부위에서 기관지폐포 세척술을 시행하는 것이 중요하다고 생각된다. 우리나라에서는 외국에 비하여 기관지결핵, 속립성 결핵, 결핵성 임파선염등이 흔하여 이러한 결핵을 대상으로 대식세포의 cytokine 분비능을 연구하는 것이 결핵에 대한 숙주의 면역반응을 밝히고 치료하는데 크게 도움을 줄 것으로 생각한다.

## 요 약

### 연구배경 :

결핵균(m. tuberculosis) 감염에 대한 숙주의 방어기능에서 세포-매개성 면역반응이 중요하며, 항 결핵반응은 주로 T-림프구와 대식세포에 의하여 매개된다. 결핵균이 대식세포에 탐식되면 특징적인 cytokine이 분비되며 이 cytokine이 잠재적인 면역조절반응과 결핵감염시 여러가지 임상증상을 나타내는데 관여하고,



특히 육아종 형성, 건락성 괴사, 및 지연형 과민반응에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 활동성 폐결핵 환자의 기관지폐포 세척액에서 대식세포에서 분비되는 대표적인 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6와 interleukin-8의 자발 및 LPS 자극 후의 분비를 관찰하고자 하였다.

#### 방 법 :

폐결핵 환자 10예와 대조군 5예를 대상으로 기관지폐포 세척술을 시행하여 폐포 대식세포를 분리한 후 RPMI 1640 배양액에 폐포 대식세포가 ml당  $1 \times 10^6$  개가 되도록 희석하여 LPS 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하거나 첨가하지 않고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 및 48시간 배양한 후 상층액에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6와 IL-8의 분비를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

#### 결 과 :

폐포 대식세포에서 측정된 24시간 자발적 TNF- $\alpha$ 의 분비는 이환된 병변 1149  $\pm$  805.5 pg/ml, 대조군 125  $\pm$  109.7 pg/ml, 비병변 127  $\pm$  135.6 pg/ml, IL-6의 분비는 이환된 병변이 20.6  $\pm$  16.12 ng/ml, 대조군 0.91  $\pm$  0.58 ng/ml, 비병변 1.10  $\pm$  1.38 ng/ml로 병변에서 유의하게 현저한 증가를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

폐포 대식세포에서 LPS 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 48시간 동안 자극한 후의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 분비능은 결핵의 이환된 병변에서 대조군이나 비병변에 비하여 증가된 경향을 보였다.

IL-1 $\beta$ 와 IL-8의 24시간 자발적 분비능 및 LPS 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 48시간 동안 자극한 후의 분비능은 결핵 병변의 대식세포에서는 측정되지 못하였으며, 대조군과 비병변에서 얻어진 대식세포에서는 특별한 차이가 없었다.

TNF- $\alpha$ 의 분비는 대부분이 처음 24시간에 분비되었으나 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 분비는 48시간까지 점차 증가되었다.

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6는 자발적 분비에 비하여 LPS를 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시

킬 수록 분비가 증가되었으나 IL-8은 LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  시 분비가 고평부를 이루었다.

결핵 비병변에서 얻어진 폐포 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  분비능은 초치료 환자에서 재발환자에 비하여 현저하게 증가되었으나 IL-6와 IL-8의 분비능은 초치료와 재치료 환자에서 큰 차이가 없었다.

#### 결 론 :

폐결핵 환자의 폐포 대식세포의 cytokine 분비능은 정상 대조군에 비하여 현저하게 증가되어 있었으나 이는 직접 이환된 부위의 폐포 대식세포에 국한되었다. 또한 폐포 대식세포에서 분비되는 proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 가 특히 결핵의 초감염시균에 대한 방어작용에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Edwards D, Kirkpatrick CH ; State of Art ; The immunology of mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis 134 : 1062, 1986
- 2) Kaufmann SHE : Immunity to intracellular bacteria. Annu Rev Immunol 11 : 129, 1993
3. Schluger NW, Rom WN : State of art ; The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 157 : 679, 1998
4. 천선희, 김성규 : 기관지폐포 세척액 검사의 임상적 응용. 37 : 363, 1990
5. Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M, Brennan PJ, Modlin RL : Cytokine production induced by mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. J Immunol 149 : 541, 1992
6. Schauf V, Rom WN, Smith KA, Sampaio EP, Meyn PA, Tramontana JM, Cohn ZA, Kaplan G : Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. J Infect Dis 168 : 1056, 1993

7. Le J, Vilcek J: Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56 : 234, 1987
8. Ellner JJ, Wallis RS: Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev Infect Dis* 11 : S455, 1989
9. Denis M: Modulation of mycobacterium avium growth in vivo by cytokines: involvement of tumor necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. *Clin exp Immunol* 83 : 466, 1991
10. Lopez Ramirez GM, Rom WN, Ciotoli C, Talbot A, Martinuk F, Cronstein B, Reibman J: Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. *Infect Immun* 62 : 2515, 1994
11. Hirsch CS, Ellner JJ, Russel DG, Rich EA: Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated growth inhibition of mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. *J Immunol* 152 : 743, 1994
12. Desiderio JV, Kiener PA, Lin PF, Warr GA: Protection of mice against listeria monocytogenes infection by recombinant human tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 57 : 1615, 1989
13. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piquet PF, Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56 : 731, 1989
14. Cerami A: Inflammatory cytokines. *Clin Immun and Immunopathol* 62 : S3, 1992
15. Hunninghake GW, Monick MD, Dinarello CA: Interleukin-1 is a chemotactic factor for human T-lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 135 : 66, 1987
16. Hanson DF, Murphy PA: Demonstration of interleukin-1 activity is apparently homogeneous specimens of the p15 form of rabbit endogeneous pyrogen. *Infect Immun* 45 : 483, 1984
17. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin-1: a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128 : 2177, 1982
18. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler MS, Cotran RS, Gimbrone MA: Interleukin-1 induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelium. *J Exp Med* 160 : 629, 1984
19. Kunkel SL, Chensue SW, Strieter RM, Lynch JP, Remick DG: Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1 : 439, 1989
20. Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM: Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect Immun* 60 : 1249, 1992
21. Hirano T, Akira S, Taga T: Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 11 : 443, 1990
22. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84 : 1045, 1989
23. Larsen CA, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243 : 1464, 1989
24. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, VanEpps D: Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activating protein-1. *J Immunol* 144 : 1323, 1990
25. Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibman J, Rom WN: Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to mycobacterium tuberculosis and its

- components. *J Clin Invest* 95 : 586, 1995
26. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM : Interleukin-8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. *Science* 258 : 1798, 1992
27. Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimoto S : Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 58 : 3286, 1990
28. Ogawa T, Uchida H, Kusumoto Y, Mori Y, Yamamura Y, Hamada S : Increase in tumor necrosis factor alpha- and interleukin-6-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells from subjects infected with mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 59 : 3021, 1991
29. Law K, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K, Chi C, Rom WN : Increased release of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 153 : 799, 1996