

결핵환자에서 치료전후의 Th1과  
Th2 cytokine의 변화 및 상관관계

연세대학교 대학원

의 학 과

황 상 연

# 결핵환자에서 치료전후의 Th1과 Th2 cytokine의 변화 및 상관관계

지도교수 김 성 규 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

황 상 연

황상연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

## 감사의 글

이 논문의 시작 과정과 끝마무리까지 모든 과정에 세심한 검토와 지도를 아끼지 않으신 김성규 선생님과 조상래 선생님, 장준 선생님께 가장 먼저 감사의 인사를 드립니다. 또한 직접 이 실험을 진행해주신 미생물학 교실의 조성애 선생님과 이은희 선생님의 도움이 없었다면 이번 논문은 완성될 수 없었을 것입니다. 연구기간 동안 논문 작성과 자료를 정리하는데 많은 도움을 주신 김영삼 선생님께 특별한 감사의 인사를 드립니다. 그리고 본 연구의 취지에 동의를 하시고 소중한 혈액을 제공해 주신 여러 환자 분들과 의과대학 학생들에게도 감사를 드립니다. 마지막으로 저의 학업에 아낌없는 지원을 해주신 부모님께 감사를 드립니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	2
1. 결핵의 역학 .....	2
2. 결핵의 발병 기전 .....	2
3. 결핵의 감염과 관련된 cytokine .....	4
4. 전혈세포배양법(whole blood culture) .....	5
5. 연구의 필요성 .....	6
6. 연구 목적 .....	7
II. 대상 및 방법 .....	8
1. 연구 대상 .....	8
2. 연구 방법 .....	8
가. 연구대상자에 대한 조사 .....	8
나. 전혈세포배양법(whole blood culture) .....	9
다. 통계분석 .....	10
III. 결 과 .....	11
1. 연구 대상군의 특성 .....	11
2. 결핵환자와 결핵피부반응 양성군 및 음성군 사이의 cytokine 생산의 차이 .....	12
가. IFN- $\gamma$ .....	12
나. IL-12p40 .....	12
다. TNF- $\alpha$ .....	12

라. IL-10 .....	12
3. 결핵피부반응 양성군과 음성군 사이의 cytokine 생산의 차이 ..	13
가. IFN- $\gamma$ .....	B
나. IL-12p40 .....	13
다. TNF- $\alpha$ .....	B
라. IL-10 .....	13
4. 결핵환자와 결핵피부반응 양성군 사이의 cytokine 생산의 차이 ..	14
가. IFN- $\gamma$ .....	14
나. IL-12p40 .....	14
다. TNF- $\alpha$ .....	14
라. IL-10 .....	14
5. cytokine 생산 사이의 상관관계 .....	18
6. 치료 후 cytokine 생산의 변화 .....	20
IV. 고찰 .....	22
1. IFN- $\gamma$ .....	22
2. IL-12 .....	23
3. TNF- $\alpha$ .....	25
4. IL-10 .....	25
5. Th1과 Th2 activity 사이의 상관관계 .....	26
V. 결론 .....	29
참고문헌 .....	30
영문요약 .....	36

## 그림 차례

Figure 1. Correlations of Th1 and Th2 cytokine levels after each antigen stimulation .....	18
Figure 2. Correlation of between IFN- $\gamma$ and IL-10 (6 days) levels after PHA stimulation .....	19
Figure 3. Correlation of between TNF- $\alpha$ and IL-10 (1 day) levels after araLAM stimulation ..	19
Figure 4. Change of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-10 production after PHA stimulation .....	20
Figure 5. Change of IFN- $\gamma$ and IL-10 production after ConA stimulation .....	21
Figure 6. Change of IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ and IL-10 production after tuberculous antigen stimulation ..	21

## 표 차례

Table 1. Characteristics of Subjects .....	11
Table 2. IFN- $\gamma$ production after non-specific stimuli and tuberculous antigen .....	15
Table 3. IL-12(p40) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen .....	16
Table 4. TNF- $\alpha$ production after non-specific stimuli and tuberculous antigen .....	16
Table 5. IL-10 (1 day) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen .....	17
Table 6. IL-10 (6 days) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen .....	17

## 국문요약

### 결핵환자에서 치료전후의 Th1과 Th2 cytokine의 변화 및 상관관계

결핵은 아직도 전 세계적으로 문제가 되고 있는 전염성 질환으로 한 해 약 200만 명 정도가 결핵으로 인해 사망하고 있다. 화학요법의 도입과 새로운 항결핵제의 개발로 결핵으로 인한 사망이 감소하다가 최근에는 후천성면역결핍증의 증가와 다제내성결핵 환자의 증가로 결핵이 다시 증가하고 있어, 결핵의 발병 기전을 밝히고 백신개발을 위한 연구가 계속되고 있다.

결핵의 발병에 있어서 세포매개면역반응이 중요한 역할을 하고 있음이 이미 알려져 있는데, 이 중 Th1과 Th2 cytokine이 결핵의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다고 보고 되고 있다. 본 연구를 통해 결핵환자와 결핵피부반응 양성군과 음성군인 정상인에서 Th1 및 Th2 cell과 관련된 cytokine의 생산을 동시에 측정하고 그 상관관계를 분석하여 결핵균의 감염과 결핵의 발병에서 Th1과 Th2 cytokine의 역할을 규명하고, Th1과 Th2 cytokine의 균형이 실제로 결핵의 발병과 연관이 있는가를 알아보하고자 하였다.

본 연구를 시행하기 위해 전혈세포배양법을 사용하였는데 이는 결핵균의 특이항원에 대하여 이미 자극을 받은 단핵세포와 T세포가 특이 항원에 대해 cytokine을 분비하는 기능을 간접적으로 측정하는 방법으로 최근에 세포매개면역반응의 기전을 밝히고 결핵을 진단하는데 사용하고 있다.

본 연구의 결과에서 결핵피부반응 양성군인 정상인에서는 결핵균 항원의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되어 있고, 결핵환자에서는 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있었는데, 따라서 결핵균의 항원에 대한 IFN- $\gamma$  생산의 증감이 결핵의 발병과 관계가 있는 것을 알 수 있다. 결핵환자의 감염초기에는 IL-12와 TNF- $\alpha$ 의 생산이 증가하여 결핵균의 증식을 억제하는 것으로 생각된다. 그리고 치료가 진행되어가면서 TNF- $\alpha$ 와 IL-12의 생산이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서는 결핵균 항원의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ 와 IL-12 생산 사이에 상관관계가 관찰되지 않았고, Th2 cytokine인 IL-10의 생산과 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 생산 사이에는 양의 상관관계를 보였는데, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

---

**핵심되는 말:** 폐결핵, Th1 cytokine, Th2 cytokine

# 결핵환자에서 치료전후의 Th1과 Th2 cytokine의 변화 및 상관관계

<지도교수 김 성 규>

연세대학교 대학원 의학과

## 항 상 연

### I. 서 론

#### 1. 결핵의 역학

결핵은 아직도 전 세계적으로 문제가 되고 있는 전염성 질환으로 한 해 약 800만 명 정도가 새로 결핵에 감염되고 있고, 약 200만 명 정도가 결핵으로 인해 사망하고 있다. 현재 전 세계적으로 결핵균감염은 32%, 약 18억 명에 달하는 것으로 알려져 있다. 더욱이 최근에는 후천성면역결핍증의 증가와 다제내성결핵 환자의 증가로 인하여 결핵은 아직도 전 세계적으로 해결해야 할 중요한 질환으로 생각되어 지고 있다<sup>1</sup>. 우리나라 결핵환자의 유병률은 1965년에는 5.1%에서 1995년에는 1.0%로 꾸준히 감소하고 있으나, 아직도 결핵은 전염성 질환에 의한 전체 사망원인의 50% 이상을 차지하고 있고, 우리나라 질병사망 순위 10위를 벗어나지 못하고 있는 심각한 실정이다<sup>2</sup>.

#### 2. 결핵의 발병 기전

1882년 Robert Koch가 결핵균을 발견하기 이전에는 결핵이 같은 가족에

서 많이 발병하기 때문에 결핵이 유전과 환경적인 요인에 의해 발생하는 것으로 생각하였다. 그러나 결핵균을 발견한 이후에 결핵의 감염과 발병은 결핵균에 의한 것으로 생각하여 주로 새로운 항결핵제의 개발과 결핵환자 관리체계의 개발에 주력해왔다. 그러나 지난 100년간 여러 지역에서 인종에 따른 결핵의 발생률을 관찰한 결과 인종에 따라 결핵균 감염의 감수성에 차이가 있는 것으로 밝혀졌고, 결핵균에 감염된 사람 중 임상적으로 결핵이 되는 경우는 전체의 10%로 알려져 있어 결핵균의 감염에 있어 유전적인 요인이 관여할 것이라는 가설이 다시 제기되었다. 일반적으로 백인에 비해 흑인이 폐결핵이 더 잘 걸리고 더 심한 임상경과를 거치는 것으로 알려져 있다. 처음에는 이를 환경적인 요인의 차이로 설명하였으나 같은 요양시설에 거주하고 있는 결핵균 감염이 되지 않은 사람들을 대상으로 결핵균의 감염력을 비교한 결과 백인에 비해 흑인이 2배 잘 걸리는 것으로 나타났다, 쌍둥이를 이용한 연구를 통해서도 결핵의 감염에 있어서 유전적인 요인이 관여함이 알려졌다. 최근에는 다제내성결핵의 증가로 인해 결핵의 감염과 질병의 진행에 있어 세포매개면역 반응을 포함한 유전적 요인의 역할에 대한 관심이 증가하고 있다.

세포매개면역반응은 결핵균에 노출된 이후에 결핵균에 대한 감염을 지연시키고 결핵균이 몸속에서 퍼지는 것을 막는 작용을 말한다. 결핵균에 노출된 후 수 일 내지 수 주 내에 인체 내에서는 다양한 종류의 면역작용이 나타난다. 결핵균에 감염된 부위에 처음에는 호중구가 모이지만 결핵균을 죽이는 데는 큰 역할을 담당하지는 않는다. 결핵균에 대한 면역반응은 주로 대식세포와 림프구 두 가지 세포를 통해 이루어진다. 다른 박테리아를 죽이는데 중요한 역할을 하는 항체반응은 결핵균을 죽이는 데는 큰 역할을 하지 않는다. 수지상세포(dendritic cell)나 말초혈액의 단핵구세포(monocyte)같이 항원전달세포(antigen presenting cell : APC)가 결핵균을 탐식한 후 결핵균의 항원을 여러 가지 펩타이드(peptide) 형태로 세포 표면에 노출하게 된다. 이는 MHC(major histocompatibility) molecule과 결합한 후 T-림프구에 전달이 되고, T-림프구에서는 여러 종류의 cytokine이 분

비된다. 이 cytokine에 의해 다양한 종류의 세포가 활성화되어 결핵균의 번식과 전파를 막게 되는 것이다.

최근까지의 연구결과에 의하면 일부 T-림프구는 대식세포를 다시 활성화하여 세포 안의 결핵균을 죽이게 하는 반면, 다른 T-림프구는 결핵균을 번지게 할 가능성이 있는 대식세포 자체를 죽이는 작용을 한다고 알려져 있다<sup>3</sup>.

### 3. 결핵의 감염과 관련된 cytokine

CD4<sup>+</sup> T helper cell은 크게 Type 1 T-helper(Th1) activity와 Type 2 T-helper(Th2) activity로 나눈다. Th1 cell은 interleukin-2(IL-2), interleukin-12(IL-12)와 interferon-gamma(IFN- $\gamma$ )같은 cytokine을 통해 결핵균에 대한 면역작용을 증가시킨다고 알려져 있다. 반면 Th2 cell은 주로 interleukin-4(IL-4), interleukin-5(IL-5) 및 interleukin-10(IL-10) 등의 작용을 통해 대식세포가 interleukin-1(IL-1)을 분비하는 작용을 억제하므로 Th1과는 반대작용을 한다고 알려져 있다. Th1 cell에서 분비되는 cytokine 중 결핵균에 대한 세포매개면역반응에서 가장 중요한 역할을 하는 것은 IFN- $\gamma$ 이다. IFN- $\gamma$ 는 대부분 CD4<sup>+</sup> T-림프구로부터 만들어지지만 자연세포독성세포(natural killer cell : NK cell)나 CD8<sup>+</sup> T-림프구에서 만들어지기도 하고 소량이지만 B림프구에서도 만들어진다. IFN- $\gamma$ 의 형성을 자극하는 cytokine에는 IL-2와 IL-12가 있다. IFN- $\gamma$ 는 대식세포를 자극하여 MHC 수용체의 표현을 증가시키고, IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 형성을 증가시키며, CD4<sup>+</sup> 림프구가 Th1 기능을 하는 것을 도와준다. 또한 CD8<sup>+</sup> 림프구의 세포독성작용을 증가시키고 NK cell의 활성도를 증가시켜 세포독성작용을 증가시키고 IFN- $\gamma$ 를 더 많이 분비하게 한다. 최근의 여러 실험과 관찰 결과 IFN- $\gamma$  유전자의 결함이 있는 경우에는 결핵균에 감염된 이후에 결핵이 더 빨리 진행하는 것을 관찰하였다<sup>4</sup>. 이런 IFN- $\gamma$ 의 생성을 조절하는데 가장 중요한 역할을 하는 cytokine은 IL-12이다.

IL-12는 주로 단핵구와 대식세포에서 만들어진다. IL-12는 Th0 cell을 자극하여 IL-2를 만들고, Th1 cell을 자극하여 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 만든다. 그리고 Th2 cell의 작용을 억제하여 IL-4, IL-5 및 IL-10의 형성이 감소하게 된다. 이런 여러 가지 cytokine의 작용을 통해 T-림프구를 주로 CD4<sup>+</sup> Th1 cell로 분화하게 하고, CD4<sup>+</sup> Th1 cell과 NK cell에서 IFN- $\gamma$ 를 더 많이 만들어내게 자극한다. 최근 여러 연구결과를 보면 CD4<sup>+</sup> T-cell의 세포수가 1 $\mu$ L당 500개 미만이면서 다제내성결핵이 있는 환자는 IFN- $\gamma$ 와 IL-12에 대한 반응이 감소하는 것을 알 수 있었다<sup>5</sup>. 결핵균 감염당시 IL-12를 동시에 투여하면 결핵균에 대한 저항력이 증가하는데<sup>6</sup>, 이런 면역 증가 효과는 IFN- $\gamma$ 가 없으면 나타나지 않아 IL-12의 효과가 IFN- $\gamma$ 를 통해 나타나는 것을 알 수 있다.

한편 결핵환자에서 Th1 cell의 반응이 감소한 것은 IFN- $\gamma$ 의 생성을 감소시키는 cytokine의 생성이 증가하기 때문이라고 생각할 수 있는데, 주로 IL-10과 TGF- $\beta$ 는 CD4<sup>+</sup> cell과  $\gamma$   $\delta$  T-cell에 의한 IFN- $\gamma$ 의 형성을 억제하는 것으로 알려졌다<sup>7</sup>. 이 중 IL-10이 더 억제 효과가 큰 것으로 알려졌다. IL-10은 결핵균 감염 후 주로 대식세포와 T cell에서 만들어져 대식세포의 작용을 억제하여 IL-12의 생성을 억제하고, 결과적으로 IFN- $\gamma$ 의 생성을 억제한다. 또한 CD4<sup>+</sup> T cell의 반응을 직접적으로 억제하는 작용을 한다. TGF- $\beta$ 는 주로 단핵구에서 만들어져 CD4<sup>+</sup> 림프구의 작용을 억제하여 IL-2, IL-12 및 IFN- $\gamma$ 의 작용을 억제한다. 지금까지 IFN- $\gamma$ 의 생산을 촉진하는 Th1 cytokine과 이를 억제하는 Th2 cytokine간의 균형이 결핵균에 감염된 이후 결핵으로 진행하는데 중요한 요인이라고 알려졌다<sup>3</sup>.

#### 4. 전혈모세포배양법(whole blood culture)

결핵의 세포매개면역반응과 관련된 cytokine의 생산은 인체 내 혈액 중의 농도를 직접 측정하거나, 조직에서 cytokine과 관련된 m-RNA를 측정하여 알 수 있다. 그런데 혈액 내의 cytokine의 농도는 너무 낮아 측정할

수 없는 경우가 많고, 어떤 국소 부위의 자극에 대한 cytokine의 생산능력을 잘 반영하지 않을 수도 있다. 그래서 전혈에서 원하는 단핵구와 임파구와 같은 세포를 추출하여 이용하거나 배양된 세포주를 이용하여 cytokine의 생산을 측정하기도 한다. 그런데 세포를 분리하는 것이 어떤 실험실에서든 쉽게 할 수 있는 작업이 아니고 세포를 분리하는 것 자체가 자극에 되어 면역작용과 관련된 일부 세포가 활성화되는 경우도 있고, 원치 않게 같이 분리된 세포들로 인해 실험결과에 이상이 있을 수 있기 때문에 최근에는 세포를 분리하지 않고 전혈(whole blood)을 이용하여 시험관에서 배양한 후 항원을 투여하여 자극한 후 cytokine의 생산을 측정하는 방법을 많이 사용하고 있다. 단핵구를 자극하기 위해서는 주로 Lipopolysaccharide (LPS)를 사용하고 T-림프구를 자극하기 위해서는 주로 Phytohaemagglutinin (PHA)을 사용한다. 그 이외에 결핵균에 특이한 자극을 주기 위해서는 주로 *M. tuberculosis* culture filtrate protein(CFP) 혹은 tuberculin purified protein derivative(PPD)를 사용한다. 전혈구세포배양법(whole blood culture)을 이용하면 5배로 희석한 후 배양을 할 수 있기 때문에 한 환자에서 비교적 소량의 혈액(5 ml)을 채취하여도 여러 가지 항원의 자극에 대한 cytokine의 생산을 동시에 측정할 수 있는 장점이 있고, 비교적 정확한 수치를 보인다고 알려져 있다.

## 5. 연구의 필요성

현재까지 결핵에 있어 Th1 cell과 관련된 cytokine에 대한 연구는 비교적 많이 이루어 졌으나, Th2와 관련된 cytokine에 대한 연구는 많지 않고 이를 동시에 측정하여 상관관계를 비교한 연구는 더욱 적다. 결핵 감염과 결핵의 발병에 있어서 Th2 cell과 관련된 cytokine의 역할에 대해서는 아직까지 논란의 여지가 많다. 이번 연구를 통해 Th1 cell과 관련된 cytokine과 Th2 cell과 관련된 cytokine의 생산을 동시에 측정하여 결핵균의 감염과 결핵의 발병에서 Th1-type cytokine과 Th2-type cytokine의 역할을 규

명하고 Th1-type cytokine과 Th2-type cytokine의 상관관계를 분석함으로써 Th1과 Th2 cytokine의 균형이 실제로 결핵의 발병과 연관이 있는 것을 알아보고자 하였다.

## 6. 연구 목적

결핵환자에서 치료 전 진단 당시의 Th1, Th2 cytokine과 치료 종결 시의 Th1, Th2 cytokine의 생산을 전혈세포배양법을 이용하여 측정하고, 이를 각각 결핵균에 감염된 정상인(결핵피부반응 양성자)과 결핵균에 노출되지 않은 정상인(결핵피부반응 음성자)의 수치와 비교하여 다음과 같은 가설을 밝혀보고자 하였다.

첫째, 정상인에 비해 결핵환자에서 Th1 cytokine의 activity는 높고, Th2 cytokine의 activity는 낮을 것이다.

둘째, Th1 cytokine의 activity와 Th2 cytokine의 activity와 역상관계가 있을 것이다.

셋째, 결핵균에 감염된 정상인(결핵피부반응 양성자)과 결핵균에 노출되지 않은 정상인(결핵피부반응 음성자) 사이에 Th1 cytokine의 activity와 Th2 cytokine의 activity가 차이가 있을 것이다.

넷째, 결핵치료가 끝난 후에 Th1 cytokine의 activity가 감소할 것이다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

대조군을 결핵균에 감염된 정상인(결핵피부반응 양성자)과 결핵균에 노출되지 않은 정상인(결핵피부반응 음성자)으로 구분하였다. 환자군은 활동성폐결핵 및 결핵성흉막염 환자로 임상적으로 결핵에 합당하여 항결핵제를 복용하고 치료에 반응이 있는 사람을 환자군으로 정의하였다. 활동성폐결핵 환자는 객담의 결핵균 배양검사를 통해 결핵균이 증명되거나 흉부 방사선학적으로 결핵이 의심되며 임상적으로 결핵에 합당하여 결핵치료를 시작하여 결핵치료 후 완치된 사람으로 정의하였다. 결핵성흉막염 환자는 흉막액 조직검사 결과가 결핵성 육아종 혹은 건락성 괴사 등 결핵에 합당한 소견이 관찰된 사람, 흉막액의 항산균 도말검사, 결핵균 배양검사 결과 혹은 결핵균에 대한 polymerase chain reaction(PCR)검사 양성인 사람, 혹은 흉막액에 대한 adenosine deaminase(ADA)검사 결과가 40 U/Liter 이상이면서 항결핵제 투여에 의해 흉막액이 감소하는 환자로 정의하였다.

### 2. 연구 방법

#### 가. 연구대상자에 대한 조사

모든 연구 대상군에 대해 다음과 같은 사항을 조사하였다.

첫째, 진단 당시에 결핵 증상에 대한 설문 조사를 실시하고, 최근 2개월 이내에 결핵 피부반응검사를 한 적이 있는지와 상기도 감염을 포함하여 다른 종류의 감염이 있었는지를 확인하고, 최근 2개월 이내에 결핵 피부반응검사를 한 적이 있거나 말초혈액검사를 통해 다른 감염이 있는 경우에는 대상자에서 제외하였다.

둘째, 전혈세포배양을 위해 정맥혈 5.5 ml를 채혈하였다. 환자에게 연구의 필요성과 목적에 대해 설명하고 동의서를 받았다.

셋째, 기타 검사를 위한 채혈을 한 후 delayed type hypersensitivity 반응을 확인하기 위해 결핵 피부반응검사를 시행하였다.

넷째, 단순 흉부 X-선 촬영을 시행하여 결핵의 유무와 중증도를 확인하였다.

다섯째, 결핵환자에서는 객담 항산균 도말과 객담 결핵균 배양검사를 최대 3회까지 시행한 후 그 결과를 확인하였다.

#### 나. 전혈세포배양법(whole blood culture)

1) 각 연구대상자로부터 정맥혈 5.5 ml을 채혈한 후, heparin을 20 U/ml의 농도로 섞었다.

2) 채혈된 검체를 100 U/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin과 2 mM L-glutamine, 10% Fetal bovine serum이 함유된 sterile RPMI 1640 tissue culture medium으로 10배 희석하였다.

3) 채혈 후 2시간 이내에 96-well round-bottomed tissue culture plates의 각 well에 배양을 위해 결핵균과 관련된 특이항원인 Culture Filtrate Proteins(CFP), Purified Protein Derivatives(PPD), 85A M. tuberculosis proteins(Ag85), Early Secretory Antigen-6(ESAT-6), Non-mannose-capped lipoarabinomannan(araLAM), mannose-capped lipoarabinomannan(manLAM)과 비특이적 자극물질인 ConcanavalinA(ConA), Lipopolysaccharide(LPS), Phytohaemagglutinin(PHA)을 사용하고 대조군으로는 배양배지액만 20  $\mu$ L씩 주입한 후 여기에 10배로 희석한 검체를 각각 180  $\mu$ L씩 주입하여 총 200  $\mu$ L가 되게 하였다.

4) 배양을 위한 항원과 자극물질은 10  $\mu$ g/ml의 농도로 주입하고, ConA는 5  $\mu$ g/ml의 농도로 주입하였다. 각 항원은 3개의 well에 동일하게 주입하였다.

5) 5% CO<sub>2</sub> gas가 포함된 37° C incubator 상에서 배양을 한 후 1, 3, 6일째에 각 well에서 상층액 150 μL를 제거한 후, -20° C에 보관을 하였다.

6) 상층액의 IFN-γ, TNF-α, IL-12(p40), IL-10의 농도를 각 monoclonal antibody를 이용하여 ELISA법으로 측정하였다.

7) 각 cytokine의 농도는 3개 well의 농도의 평균값을 이용하였고, 자극을 가하지 않은 well에서의 각 cytokine의 농도를 뺀 값을 자극 후의 각 cytokine의 농도로 정의하였다. IFN-γ, IL-12(p40), TNF-α 의 농도는 각각 6일, 3일과 1일째에 상층액을 이용하여 측정하였고, IL-10은 1일과 6일째에 측정하였다.

#### 다. 통계분석

각 cytokine의 농도는 정규분포를 따르지 않고 심한 우측편향을 보여 중위수와 4분위수로 표시하였다. 두 군 간의 차이는 비모수검정법인 윌콕슨 순위합 검정을, 세 군 간의 차이는 크루스칼-왈리스 검정을 시행하여 비교하였다. 각 cytokine의 상관관계는 비모수검정법인 Spearman correlation 분석법을 이용해 분석하였다. 모든 통계분석은 SAS for windows version 8.0을 이용하여 분석하였다.

### III. 결 과

#### 1. 연구 대상군의 특성

총 62명을 대상으로 연구를 진행하였다. 그 중 정상 대조군은 22명으로 이 중 결핵피부반응검사 양성자 10명, 음성자 12명이었으며 결핵피부반응 양성자 중 3명에서 결핵 치료력이 있었다. 단순 흉부방사선 검사결과 모두 결핵을 의심할만한 병변은 없었다. 결핵환자는 총 40명으로 폐결핵만 있는 경우가 19명이었고, 결핵성흉막염과 폐결핵이 같이 있는 경우는 총 11명이었으며, 결핵성흉막염만 있는 경우가 10명이었다. 결핵피부반응검사 음성인 대조군 중 남자는 8명이었고, 결핵피부반응검사 양성인 대조군에서는 남자가 7명이었으며, 결핵환자 중에서 남자는 25명이었다. 평균연령은 결핵피부반응검사 음성인 대조군에서 23세이고, 결핵피부반응검사 양성인 대조군은 30세이었으며, 결핵환자는 평균 39세이었다(Table 1). 폐결핵 환자에서 객담검사를 시행한 경우는 26예로, 이 중 객담 항산균 도말검사 음성은 16명, 양성은 10명이었고, 객담결핵균 배양검사는 모두 양성이었다. 추적관찰 결과 폐결핵 환자에서 치료 후 2개월째까지 추적검사를 시행한 경우는 31명이었고, 치료 종결 6개월째까지 추적검사를 시행한 경우는 28명이었다.

Table 1. Characteristics of subjects

		Tuberculosis(40)	PPD(+)(10)	PPD(-)(12)
Age*		39.15±18.2	29.9±5.0	22.75±1.5
Sex §	Male	25	7	8
	Female	15	3	4
PPD skin test §	positive	19	10	0
	negative	4	0	12
	not tested	17	0	0
History of tuberculosis §		1	3	0

\* : Expressed as mean ± standard deviation.

§ : Expressed as number of each group.

## 2. 결핵 환자와 결핵피부반응 양성군 및 음성군 사이의 cytokine 생산의 차이

### 가. IFN- $\gamma$

결핵환자에서 PHA, ConA, CFP, PPD, Ag85A, ESAT-6에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 모두 결핵피부반응 양성군에 비해 저하되었고, 결핵피부반응 음성군과 비교한 결과 ConA, Ag85A에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산은 감소되어 있으나 PHA, CFP, PPD, ESAT-6에 대한 생산은 증가되어 있었다( $p$ -value <0.05) (Table 2).

### 나. IL-12(p40)

결핵환자에서 PHA와 ConA 그리고 araLAM에 대한 IL-12(p40)의 생산이 다른 두 대조군에 비해 모두 증가되었으며( $p$ -value <0.05), PPD에 대한 IL-12(p40)의 생산은 세 군 사이에 차이가 없었다(Table 3).

### 다. TNF- $\alpha$

결핵환자에서 LPS와 araLAM 그리고 manLAM에 대한 TNF- $\alpha$ 의 생산이 다른 두 정상 대조군에 비하여 모두 증가되고, 세 군 사이에 유의한 차이를 보였다( $p$ -value <0.05)(Table 4).

### 라. IL-10

PHA, ConA, Ag85A 및 LPS에 대한 IL-10의 생산은 세 군 사이에 유의한 차이를 보였으나( $p$ -value <0.05), CFP, PPD, ESAT-6에 대한 IL-10의 생산은 세 군 사이에 차이가 없었다(Table 5, Table 6).

### 3. 결핵피부반응 양성군과 음성군 사이의 cytokine 생산의 차이

#### 가. IFN- $\gamma$

결핵피부반응 양성군에서 PHA, CFP, PPD, ESAT-6에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 결핵피부반응 음성군에 비해 증가되었고, ConA, Ag85A에 대해서는 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

#### 나. IL-12(p40)

결핵피부반응 양성군과 음성군 사이에 PHA, ConA, PPD, araLAM에 대한 IL-12(p40)의 생산은 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3).

#### 다. TNF- $\alpha$

결핵피부반응 양성군에서 LPS, araLAM, manLAM에 대한 TNF- $\alpha$ 의 생산이 결핵피부반응 음성군에 비해 증가되었다(Table 4).

#### 라. IL-10

결핵피부반응 양성군에서 PHA 자극에 대한 IL-10의 생산이 결핵피부반응 음성군에 비해 증가되었으나, 다른 항원에 대해서는 두 군 간의 유의한 차이를 볼 수 없었다(Table 5, Table 6).

#### 4. 결핵환자와 결핵피부반응 양성군 사이의 cytokine 생산의 차이

##### 가. IFN- $\gamma$

결핵환자에서 ConA, CFP, PPD, Ag85A에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 결핵피부반응 양성군에 비해 감소되어 있었고, PHA, ESAT-6에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산은 두 군 간의 유의한 차이가 없었다(Table 2).

##### 나. IL-12(p40)

결핵환자에서 araLAM에 대한 IL-12(p40)의 생산은 결핵피부반응 양성군에 비해 증가되었으나, PHA, ConA, PPD에 대한 IL-12(p40)의 생산은 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3).

##### 다. TNF- $\alpha$

LPS, araLAM, manLAM에 대한 TNF- $\alpha$ 의 생산은 결핵환자와 결핵피부반응 양성군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

##### 라. IL-10

결핵환자에서 LPS에 대한 IL-10의 생산이 결핵피부반응 양성군에 비해 감소되었고, PHA, ConA, CFP, PPD, Ag85A, ESAT-6에 대한 IL-10의 생산은 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Table 5, Table 6).

Table 2. IFN- $\gamma$  production after non-specific stimuli and tuberculous antigen (pg/ml)

	PPD(-) control (N=12)	PPD(+) control (N=10)	Tuberculosis (N=40)
PHA	551.7 † (317.9 - 2652.2)	23044.6 † (13201.5 - 44233.6)	16049.2 (7162.7 - 43499.6)
ConA	14065.7 (10323.0 - 18612.5)	22350.8 § (14975.0 - 34501.7)	4327.4 § (1227.7 - 8809.8)
CFP	386.5 † (179.9 - 576.3)	5544.0 † § (3574.2 - 15464.7)	2836.2 § (856.7 - 6971.9)
PPD	656.6 † (180.4 - 1166.6)	9318.2 † § (4301.5 - 30257.8)	3322.6 § (1559.3 - 7497.5)
Ag85A	389.4 (172.1 - 498.3)	816.7 § (439.0 - 3089.2)	173.2 § (69.4 - 469.2)
ESAT-6	188.0 † (61.0 - 306.3)	1059.5 † (294.1 - 5358.8)	525.5 (159.2 - 1426.7)

All data are expressed as median and interquartile range ( 25 percentile - 75 percentile ).

N : number of study.

† :  $p$ -value <0.05 between PPD(-) and PPD(+).

§ :  $p$ -value <0.05 between PPD(+) and tuberculosis.

Table 3. IL-12(p40) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen (pg/ml)

	PPD(-) control (N=12)	PPD(+) control (N=10)	Tuberculosis (N=40)
PHA	21.0 (15.6 - 36.5)	46.9 (31.3 - 62.5)	62.5 (31.3 - 231.0)
ConA	88.1 (56.9 - 133.4)	85.0 (62.5 - 166.3)	201.0 (82.7 - 326.5)
PPD	83.5 (27.5 - 194.7)	63.1 (62.5 - 104.1)	64.8 (31.3 - 368.9)
araLAM	71.6 (33.5 - 125.3)	62.5 § (62.5 - 114.6)	255.1 § (69.5 - 682.5)

All data are expressed as median and interquartile range ( 25 percentile - 75 percentile ).

N : number of study.

§ :  $p$ -value <0.05 between PPD(+) and tuberculosis.

Table 4. TNF- $\alpha$  production after non-specific stimuli and tuberculous antigen (pg/ml)

	PPD(-) control (N=12)	PPD(+) control (N=10)	Tuberculosis (N=40)
LPS	356.9 † (172.8 - 912.7)	1354.3 † (1185.5 - 2235.2)	1999.2 (1083.7 - 2954.8)
araLAM	7.8 † (4.0 - 11.2)	344.9 † (239.9 - 770.2)	643.9 (260.2 - 1443.5)
manLAM	17.5 † (8.1 - 29.8)	245.8 † (153.5 - 441.4)	478.3 (178.6 - 1065.1)

All data are expressed as median and interquartile range ( 25 percentile - 75 percentile ).

N : number of study.

† :  $p$ -value <0.05 between PPD(-) and PPD(+).

Table 5. IL-10 (1 day) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen (pg/ml)

	PPD(-) control (N=12)	PPD(+) control (N=10)	Tuberculosis (N=40)
LPS	1003.6 (783.7 - 1193.7)	922.6 § (733.5 - 1031.8)	607.0 § (367.8 - 902.8)

All data are expressed as median and interquartile range ( 25 percentile - 75 percentile ).

N : number of study.

§ :  $p$ -value <0.05 between PPD(+) and tuberculosis.

Table 6. IL-10 (6 days) production after non-specific stimuli and tuberculous antigen (pg/ml)

	PPD(-) control (N=12)	PPD(+) control (N=10)	Tuberculosis (N=40)
PHA	33.1 † (15.9 - 49.5)	295.8 † (185.7 - 516.2)	178.1 (90.2 - 281.4)
ConA	64.3 (36.7 - 92.8)	41.2 (15.6 - 80.4)	15.6 (7.8 - 33.1)
CFP	54.0 (37.6 - 74.2)	42.5 (23.9 - 148.7)	72.3 (28.1 - 109.1)
PPD	14.6 (8.8 - 22.9)	20.2 (15.6 - 59.4)	34.1 (12.3 - 91.0)
Ag85A	293.5 (252.8 - 459.0)	378.5 (250.8 - 471.5)	196.6 (82.5 - 415.8)
ESAT-6	189.9 (151.4 - 244.4)	251.6 (185.5 - 392.4)	143.4 (78.8 - 231.8)

All data are expressed as median and interquartile range ( 25 percentile - 75 percentile ).

N : number of study.

†:  $p$ -value <0.05 between PPD(-) and PPD(+).

### 5. cytokine 생산 사이의 상관관계

PHA 자극에 대한 IFN- $\gamma$ 와 IL-10의 생산 사이에 유의한 양의 상관관계가 있었으나, 그 밖의 자극에 대한 cytokine의 생산 사이에는 유의한 상관관계가 없었다(Figure 1, Figure 2). LPS 자극에 대한 IL-12와 TNF- $\alpha$ 의 생산 사이에 유의한 양의 상관관계가 있었고, TNF- $\alpha$ 와 IL-10의 생산 사이에는 유의한 상관관계를 나타내었다(Figure 1, Figure 3).

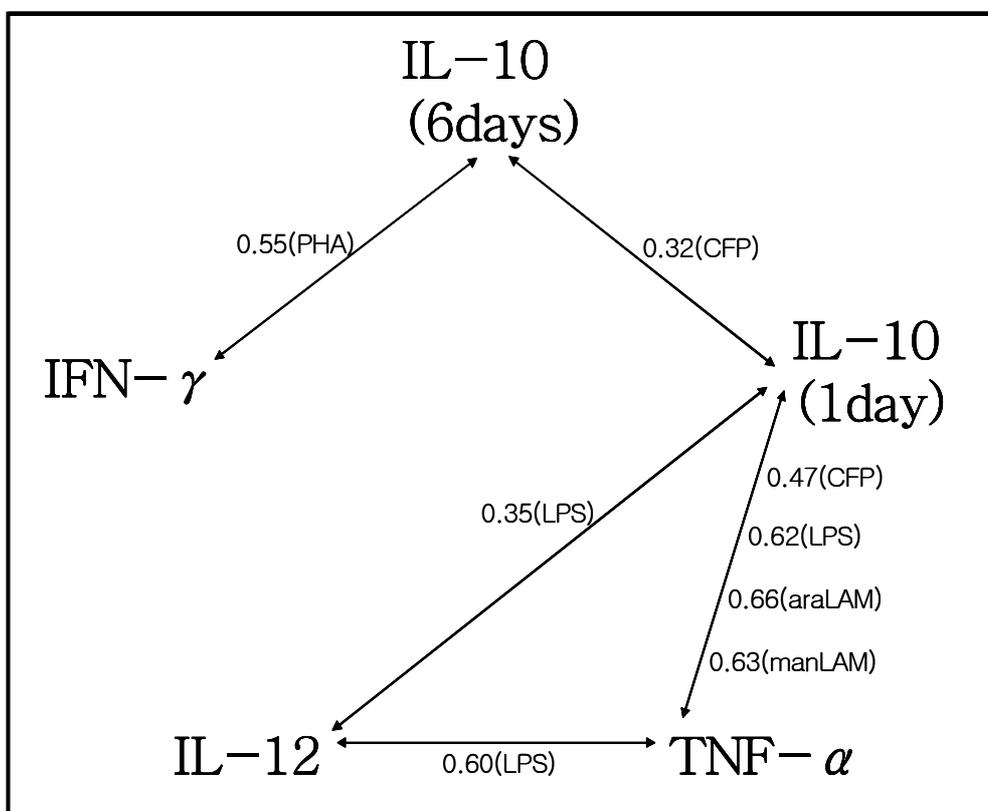


Figure 1. Correlations of Th1 and Th2 cytokine levels after each antigen stimulation.

Numerical value ; a coefficient of correlation.

( ) ; stimulated antigen.

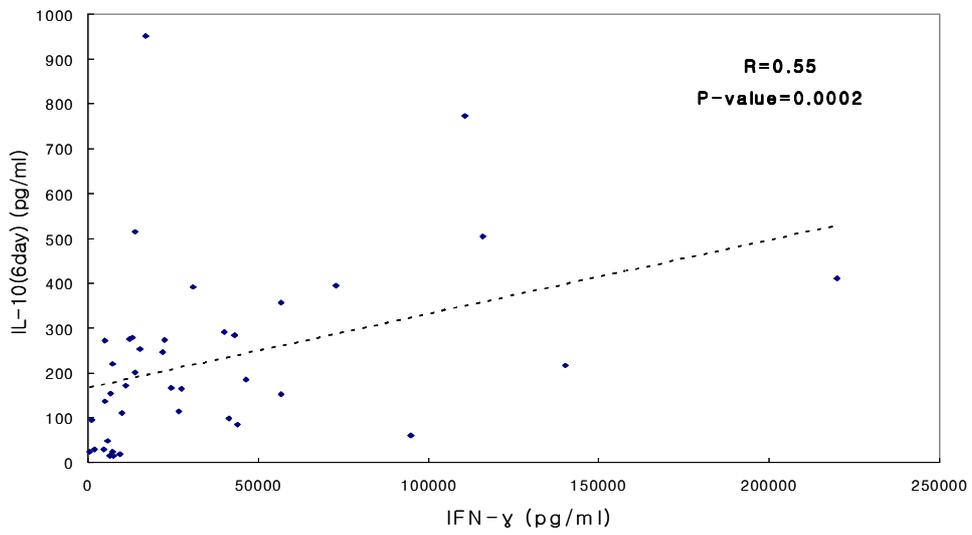


Figure 2. Correlation of between IFN- $\gamma$  and IL-10 (6 days) levels after PHA stimulation.

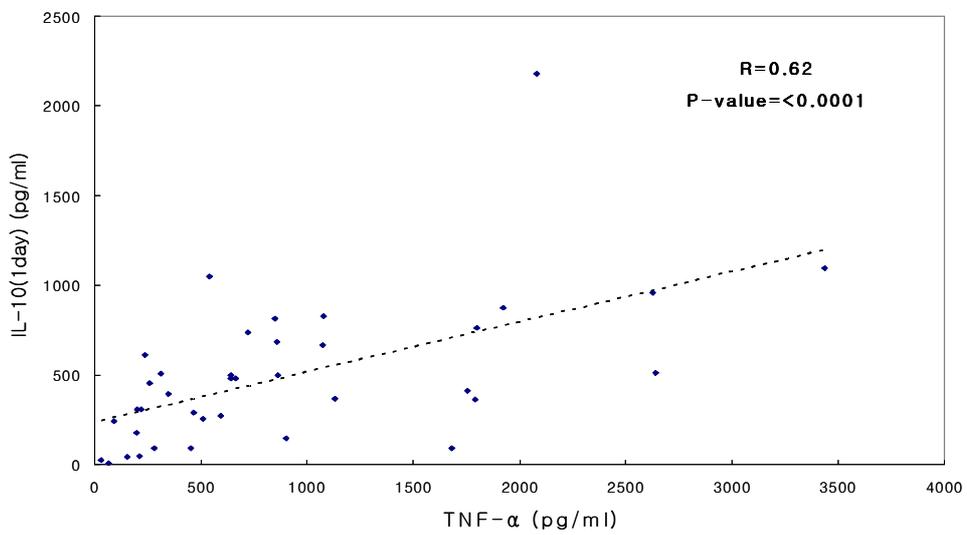


Figure 3. Correlation of between TNF- $\alpha$  and IL-10 (1 day) levels after araLAM stimulation.

## 6. 치료 후 cytokine 생산의 변화

결핵치료 전과 치료 시작 후 2개월 후 및 치료 종결 시점인 6개월째 각 cytokine의 생산의 차이를 비교하였다. PHA의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 증가하였으나, IL-12의 생산은 치료 후 감소하였다 (Figure 4). ConA의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 모두 증가하였다(Figure 5). 각 결핵항원의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 증가하였으나, TNF- $\alpha$ 와 IL-12의 생산은 치료 후 감소하였다 (Figure 6).

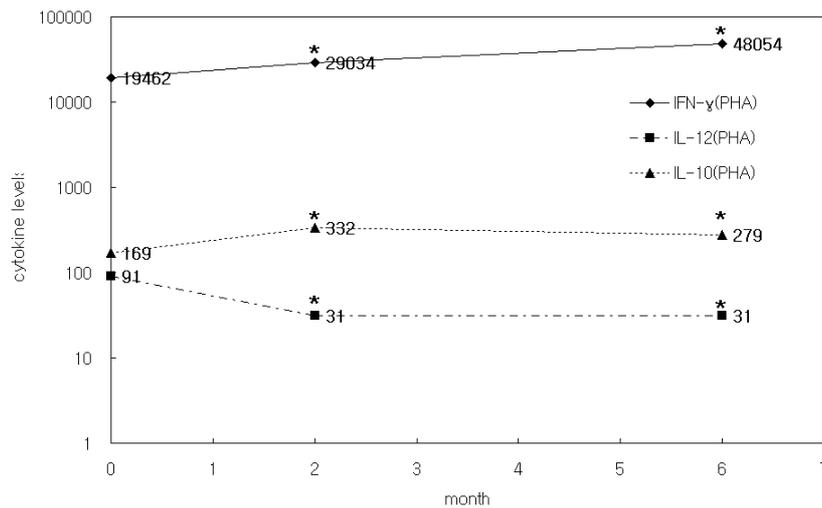


Figure 4. Change of IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-10 production after PHA stimulation. \* : p-value < 0.05.

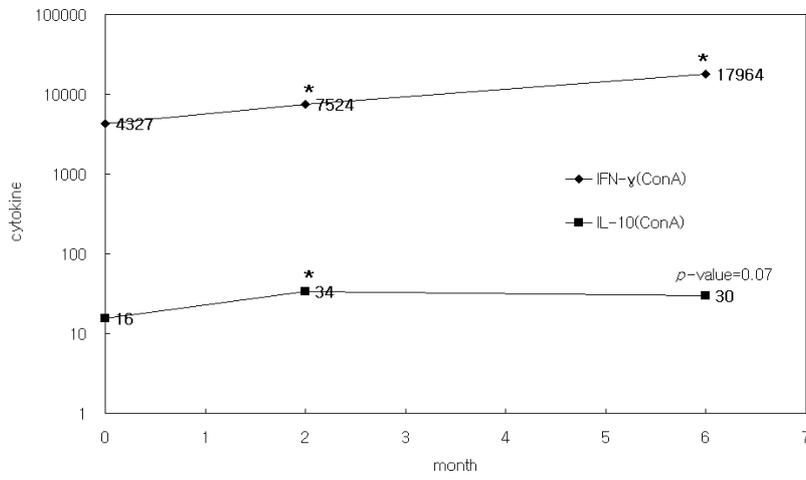


Figure 5. Change of IFN- $\gamma$  and IL-10 production after ConA stimulation. \* : p-value < 0.05.

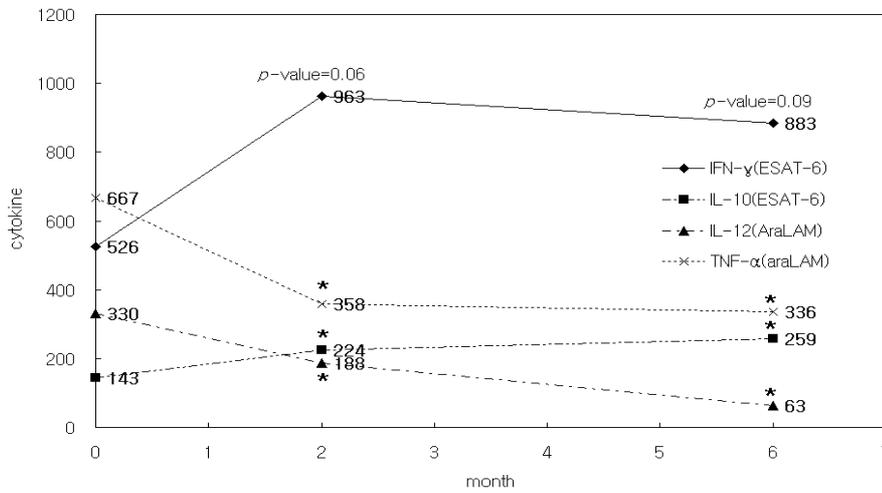


Figure 6. Change of IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  and IL-10 production after tuberculous antigen stimulation. \* : p-value < 0.05.

## IV. 고찰

### 1. IFN- $\gamma$

전혈세포배양법은 세포매개면역에 관련된 cytokine의 변화를 분석하는데 유용하게 이용될 수 있는 방법이다. 이전의 여러 연구에 의하면 전혈세포배양법도 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cells : PBMC)를 사용한 것과 같이 효과적으로 단핵구와 T 세포의 cytokine을 측정한다고 알려져 있다<sup>8</sup>.

Hussain등의 연구 결과에 의하면 정상인에 비해 결핵환자에서 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의하게 감소하였고, Th2 cytokine인 IL-10의 생산도 감소하였다. 그리고 PPD에 대한 결핵피부반응이 음성인 정상인에 비해서 폐외결핵환자에서 CFP와 PPD에 대한 T-cell의 반응이 현저히 감소하였다<sup>8</sup>. 본 연구에서도 결핵환자에서 항원에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 결핵피부반응 양성군에 비해 현저히 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 또한 결핵피부반응 음성군에서는 PHA, CFP, PPD, ESAT-6의 자극에 대해 결핵환자보다 IFN- $\gamma$ 의 생산이 더 낮게 생산됨을 알 수 있었다. 즉 결핵균에 노출되지 않은 경우에는 IFN- $\gamma$ 의 생산이 감소된 상태로 유지되고, 결핵균의 감염에 의해 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되어 결핵의 발병을 억제하는 것으로 생각되며, 어떤 과정이 먼저인지는 알 수 없으나 IFN- $\gamma$  생산의 감소와 결핵의 발병이 서로 연관되어 나타나는 것으로 추측해 볼 수 있다.

본 연구에서는 결핵환자와 결핵피부반응 양성군 사이에서 비특이적 항원인 ConA와 결핵 특이 항원인 CFP, PPD, Ag85A에 대하여 통계적으로 유의한 차이를 보여, 우리나라와 같이 bacille calmette-guerin(BCG) 예방 접종이 일반화 되어있고 결핵유행인 지역에서 결핵피부반응 양성의 해석에 있어 이러한 수치를 이용하면 결핵환자와 결핵피부반응 양성인 정상인을 구별하는데 전혈세포배양법이 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

결핵피부반응 양성군은 결핵피부반응 음성군에 비해 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증

가되어 있는데, 이는 결핵균에 노출이 된 후 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되어 결핵이 활성화 되지 않도록 하는 것으로 생각할 수 있을 것이다. 그 중에서도 비특이적 항원인 PHA와 결핵 특이 항원인 CFP, PPD 그리고 ESAT-6 항원에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 유의한 차이를 보여주고 있어, 이를 이용하면 결핵피부반응검사를 대신하여 전혈세포배양 검사가 더 간편하고 정확한 검사법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 BCG 접종이 시행된 집단에서 결핵환자와 대조군을 대상으로 전혈세포배양법을 이용한 연구가 시도되고 있고<sup>4</sup>, Inger등은 BCG 백신에는 없는 CFP와 ESAT-6 항원을 이용하여 결핵환자에 노출된 BCG 접종을 받지 않았던 접촉자의 결핵피부반응검사와 비교한 결과 94%의 일치율을 보였으며, BCG 접종을 받은 접촉자에서 비교해 본 결과 결핵피부반응검사보다 백신에 영향을 받지 않는 것으로 보고하였다<sup>10</sup>.

Al-Attiyah등이 시행한 연구에 의하면 결핵치료를 시작하기 전에는 PBMC를 이용하여 측정된 IFN- $\gamma$ 의 생산이 정상인에 비해 감소하였지만, 결핵치료를 하고 난 후 2개월째부터 IFN- $\gamma$ 의 생산이 상승하는 경향을 보이다가 치료 6개월 후에는 유의하게 상승하였다. 이는 아마도 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD4<sup>+</sup>임파구가 증식을 하기 때문이라고 설명하고 있다<sup>11</sup>. 본 연구에서도 IFN- $\gamma$ 의 생산이 치료 시작 전에는 결핵피부반응 양성군에 비해 감소하였다가 비특이적 자극인 PHA와 ConA에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 치료 후 2개월 후부터 유의하게 상승하였고, ESAT-6에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산 역시 치료 후 2개월부터 상승하는 경향을 보였다. 따라서 결핵환자에서 결핵 치료 전에는 IFN- $\gamma$ 의 생산이 억제되어 있다가 치료 후 상승이 되는 것으로 보아, IFN- $\gamma$  생산의 억제상태가 결핵의 발병과 관련이 있고 IFN- $\gamma$ 의 증가와 결핵의 치유과정이 서로 연관되어 있음을 알 수 있다.

## 2. IL-12

IL-12는 p35와 p40의 두개의 소단위(subunit)로 구성되어 있고<sup>12</sup>, 이

cytokine은 결핵균에 감염된 대식세포와 수지상세포에 의해 분비되어 Th1 cell의 반응을 자극하여 IFN- $\gamma$ 의 분비를 촉진하는 작용을 한다고 알려져 있다<sup>13</sup>. 이러한 단계를 통해 IL-12는 mycobacteria나 salmonella와 같은 세포내 병원체(intracellular pathogen)에 대한 숙주 방어 작용에 중요한 역할을 한다<sup>14</sup>. 실제로 쥐를 이용한 실험에서 IL-12 결핍이 있는 쥐에서 결핵에 더 잘 걸리는 것을 보였고<sup>15</sup>, IL-12p40이나 IL-12 수용체 유전자(receptor gene)의 변이가 있는 경우 IFN- $\gamma$ 의 생산이 감소되고 BCG 같은 백신이나 비결핵성 마이코박테리움에도 감염되기 쉽다는 보고가 있다<sup>13</sup>.

폐결핵 환자에서 PBMC를 결핵 항원을 이용하여 자극한 결과 IL-12와 IFN- $\gamma$ 의 분비능 사이에 상관관계가 있음이 밝혀졌고<sup>16</sup>, 결핵환자의 조직에서 IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ 와 CD8<sup>+</sup>임파구에서 분비되는 IL-12p40 mRNA 발현의 상관관계를 분석한 결과, 건락성 괴사가 있는 부위에서 IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ 의 발현이 서로 연관이 있음을 발견할 수 있었다<sup>17</sup>. 그러나 결핵 환자의 감염에 있어 IL-12의 역할에 대한 연구는 IFN- $\gamma$ 에 비해 많이 되어 있지 않다. 본 연구에서는 IFN- $\gamma$ 와는 달리 결핵환자에서 정상 대조군에 비하여 IL-12의 생산이 증가함을 관찰하였으며, 치료에 따라 유의하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 또 기존의 연구와는 달리 T임파구에서 IFN- $\gamma$ 의 분비를 자극한다고 알려진 IL-12의 농도와 IFN- $\gamma$ 의 농도 사이에 상관관계를 관찰할 수 없었다. 이는 IL-12가 결핵균을 포식한 대식세포에서 분비되기 때문에 결핵 발병 시기에 결핵균이 증식하면 대식세포도 증가하여 IL-12 생산이 증가하게 되고 치료가 되면서 결핵균이 줄고, 대식세포도 감소하기 때문에 IL-12의 생산이 감소하는 것으로 생각해 볼 수 있을 것이다.

본 연구에서는 araLAM 결핵 항원에 대한 IL-12의 생산이 결핵환자에서 결핵피부반응 양성군에 비해 유의하게 증가되어 있었다. 따라서 araLAM에 대한 IL-12p40의 생산과, 유의한 차이를 보였던 항원에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산을 측정함으로써 결핵피부반응 양성군과 결핵환자를 구별하고 치료반응을 평가하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

결핵피부반응 양성군과 결핵피부반응 음성군 사이에서는 IFN- $\gamma$ 와 달리 IL-12의 생산은 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 앞서 제시한 바와 같이 IL-12의 생산은 결핵균에 의해 활성화된 대식세포에 의해 생산이 된다는 것을 뒷받침할 수 있는 결과로 생각할 수 있을 것이다.

### 3. TNF- $\alpha$

결핵환자에서는 대식세포, 수지상세포 그리고 T임파구에서 TNF- $\alpha$ 의 생산을 촉진시킨다. 결핵에서 TNF- $\alpha$ 의 정확한 기전은 아직 명확하지 않다. 그러나 최근에 류마티스 관절염이나 크론병의 치료에 사용되는 TNF- $\alpha$  차단제를 투여 받은 환자에서 결핵이 생겼다는 보고가 있었다<sup>18</sup>. 그리고 체중 감소, 야간발한 그리고 조직괴사 등과 같은 결핵의 임상 증상에 관여할 것이라는 보고들이 있었고<sup>19,20</sup>, 비록 동물 실험이지만 육아종의 형성이나 질병의 억제에 있어 중요한 역할을 한다는 연구 결과도 있었다<sup>21,22</sup>. 본 연구에서는 IFN- $\gamma$ 와는 달리 결핵환자에서 TNF- $\alpha$ 의 생산이 증가함을 관찰하였으며, 치료에 따라 유의하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 여러 결핵항원 중 araLAM에 대한 TNF- $\alpha$ 의 생산이 결핵환자에서 유의하게 증가하고 치료 후 2개월과 6개월째 유의하게 감소하였다. 그리고 IL-12p40과 TNF- $\alpha$ 의 생산 사이에 유의한 상관관계가 있었고, 결핵피부반응 양성군이 결핵피부반응 음성군에 비해 TNF- $\alpha$ 의 생산이 유의하게 증가되어 있었는데, 이러한 결과를 통해 TNF- $\alpha$ 가 결핵균의 증식을 억제하는데 작용할 것으로 생각할 수 있다.

### 4. IL-10

IL-10은 일반적으로 anti-inflammatory cytokine으로 알려져 있다. IL-10은 주로 결핵균에 감염된 대식세포, T임파구에서 생산되어 대식세포를 비

활성화 시켜, IL-12의 생산을 억제시키고 결과적으로 IFN- $\gamma$ 의 생산을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한 IL-10은 직접적으로 CD4<sup>+</sup>T림프구의 반응을 억제하고, 결핵에 감염된 항원전달세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>13</sup>. 결핵환자에서 Th2 cytokine의 유전자 발현이 IFN- $\gamma$  보다는 감소되어 있지만 정상 대조군에 비해 증가되어 있었으며, 이는 결핵 환자에서 염증반응의 이차적 결과일 것이라는 연구 결과가 있었다<sup>23</sup>. 그러나 아직까지 결핵에 있어 IL-10의 정확한 작용 기전에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 사항이다. 본 연구에서는 결핵피부반응 양성군과 결핵환자 사이에 IL-10 생산에 있어 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 결핵환자에서 IL-10과 IFN- $\gamma$  사이에 유의한 양의 상관관계를 보였으며, 치료 시작 후에 IFN- $\gamma$ 와 같이 IL-10의 생산이 유의하게 증가함을 알 수 있었다.

## 5. Th1과 Th2 activity 사이의 상관관계

Th1과 Th2 activity의 상관관계에 대한 연구는 많이 이루어지지 않은 실정이다. 최근에 유럽에서는 아프리카 지역을 대상으로 Th1과 Th2 activity를 측정하여 비교한 연구가 발표되었다. 이 연구에서 Th1 activity로 plasma soluble lymphocyte activating gene-3(sLAG-3)을 측정하고, Th2 activity로는 IL-4와 관련된 plasma IgE, soluble CD30, 그리고 MDC/CCL-22를 측정하여 비교하였는데, 결핵 감염 초기에는 대조군에 비해 Th1 activity가 감소하고 Th2 activity는 증가하였으며, 치료 후 Th1 activity는 증가하고 Th2 activity는 감소하는 결과를 나타내었다<sup>24</sup>. 이 연구에서는 또한 치료반응이 좋지 않은 경우는 이러한 변화양상을 보이지 않아, Th1의 activity가 증가하고 Th2 activity가 감소하는 변화양상이 결핵 치유와 연관성을 가지고 있는 것으로 생각하고 있다. 이 연구에서 Th1/Th2의 비율이 높을수록 최근의 균감염을 시사하는 것으로 설명하고 있는데, 이는 결핵에 접촉하였으나 결핵이 발병하지 않은 정상군에서

ESAT-6항원에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 정상 대조군에 비하여 증가되어 있다는 연구 결과가 이미 보고 되어 있고<sup>25</sup>, 본 연구에서도 결핵피부반응 양성군에서 결핵피부반응 음성군에 비해 Th2 cytokine의 생산은 차이가 없으면서 Th1 cytokine의 생산이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

그러나 IFN- $\gamma$ 의 감소가 동시에 Th2 activity의 증가와 관련이 있는지는 아직도 논란의 여지가 있다. 어떤 연구에서는 결핵환자와 결핵피부반응 양성자와의 비교에서 Th2 cytokine의 mRNA 발현이 결핵환자에서 더 증가해 있었고 특히 Th2 cytokine의 증가 정도는 병의 심한 정도와 연관되어 있다는 보고를 하고 있다<sup>26</sup>. 또 다른 연구에서도 결핵환자에서 대조군에 비해 IL-4가 증가해 있으며 폐에 동공이 형성된 경우에는 동공이 없는 경우에 비해 IL-4의 생산이 증가되어 있었다<sup>27</sup>.

활동성 결핵에서 생산된 TGF- $\beta$ 와 IL-10은 병의 발병에서 IFN- $\gamma$ 의 하향조절(down regulation)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>13,28-30</sup>. Hirsch등은 결핵피부반응 양성자와 결핵환자를 대상으로 한 연구에서 PPD 항원 자극에 대해 결핵 환자에서 IFN- $\gamma$ 는 감소하였고 TGF- $\beta$ 는 증가하였으나, IL-10은 증가하지 않았다. 이들은 TGF- $\beta$ 의 작용을 강조하였는데 결핵환자에서 증가된 TGF- $\beta$ 가 IL-10의 수용체를 상향조절(up-regulation)하여 수용체의 민감도를 증가시켜 IL-10의 생산이 증가하지 않았을 것이라고 제시하고 있다<sup>28</sup>. 그 밖에 Th1과 Th2 activity를 설명하는 것으로 결핵환자나 실험모델을 이용한 연구에서 CD4<sup>+</sup>임파구의 세포자멸사(apoptosis)가 IFN- $\gamma$ 의 생산 저하에 역할을 한다는 결과가 있었다<sup>31,32</sup>. 이는 Th1 cell이 Th2 cell보다 세포자멸사에 훨씬 민감하기 때문에<sup>33</sup>, 활동성 결핵환자에서 Th2 activity가 높은 것은 파괴되는 Th1 cell의 수가 더 많기 때문일 것이라고 생각하는 것이다.

본 연구에서는 IFN- $\gamma$ 와 IL-10의 생산이 치료 시작 전에는 결핵피부반응 양성군에 비해 감소하였다가 치료 후에는 증가하였는데, 본 연구에서는 Th2 activity를 연구한 이전의 방법과는 다르게 전혈세포배양법을 이용하여 IL-10의 생산을 측정함으로써 이러한 실험 방법의 차이가 기존의 연

구와는 또 다른 결과를 나타낼 수 있을 것이라고 생각할 수 있을 것이다. 본 연구는 Th2 activity의 연구에 있어 이러한 전혈세포배양법을 이용하여 결과를 보여준 것에 의미가 있다고 생각되며 앞으로 이러한 차이에 대한 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다.

결핵치료 후 Th1 activity가 증가하면서 결핵피부반응 양성자와 같은 양상을 나타내고 Th1 activity의 부족은 치료 실패와 관련이 있으므로, 조기에 Th1 activity를 증가시켜서 결핵환자의 치유를 빠르게 하는 방법을 연구해 보는 것이 좋을 것으로 생각된다. 최근 들어 이러한 IFN- $\gamma$ 를 항결핵제와 병용 투여하여 다제내성결핵의 치료에 좋은 반응을 보였다는 보고를 한 예도 있었다<sup>34</sup>.

이처럼 결핵과 관련된 세포매개면역과정에 대한 연구를 통해 결핵의 진단과 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있는 방법을 찾을 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

결핵환자에서 전혈세포배양법을 통해 비특이적 자극과 여러 결핵 항원에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-12(p40), TNF- $\alpha$  및 IL-10의 생산을 측정하여 결핵피부반응 양성군, 결핵피부반응 음성군의 수치와 비교하고, 결핵 치료 전과 치료 후의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 결핵피부반응에 양성인 정상 대조군에 비해 결핵환자에서 비특이적 항원인 ConA와 결핵특이항원인 CFP, PPD, Ag85A에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 감소하였으나, IL-10의 생산은 차이가 없었다.

2. Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 Th2 cytokine인 IL-10 생산 사이에는 양의 상관관계를 보였다.

3. 결핵피부반응 양성자는 결핵피부반응 음성자에 비하여 비특이적 항원인 PHA와 결핵특이항원인 CFP, PPD, ESAT-6에 대한 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되어 있고, IL-10의 생산은 두 군 간에 유의한 차이가 없었다.

4. PHA의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 증가하였으나, IL-12의 생산은 치료 후 감소하였다. ConA의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 모두 증가하였다. 각 결핵항원의 자극에 대한 IFN- $\gamma$ , IL-10의 생산은 치료 후 증가하였으나, TNF- $\alpha$ 와 IL-12의 생산은 치료 후 감소하여 치료 후 Th1 cytokine의 activity가 회복되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 결핵균에 감염된 정상인에서는 IFN- $\gamma$ 의 생산이 증가되고, IFN- $\gamma$  생산의 감소와 결핵의 발병이 관계가 있는 것을 알 수 있으며, 결핵 초기에 IL-12, TNF- $\alpha$ 의 생산이 증가하여 결핵균의 증식을 억제하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 IFN- $\gamma$ 와 IL-12사이에 상관관계가 관찰되지 않았고, Th2 cytokine인 IL-10의 생산과 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 생산 사이에는 양의 상관관계를 보였는데, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282(7):677-686.
2. 보건복지부, 대한결핵협회. 제7차 전국결핵실태조사 결과, 서울: 보건복지부, 대한결핵협회, 1995.
3. Iseman MD. A Clinician's Guide to Tuberculosis. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS(Philadelphia): A Wolters Kluwer Company; 2000.
4. Cooper AM, Dalton DK, Steward TA, Griffin JP, Russel DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. J Exp Med 1993;178:2243-2247.
5. McDyer JF, Hackley MN, Walsh TE, Cook JL, Seder RA. Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis with Low CD4+ T Cell Counts Have Impaired Th1 Responses. J Immunol 1997;158:492-500.
6. Greinert U, Ernst M, Schlaak M, Entzian P. Interleukin-12 as successful adjuvant in tuberculosis treatment. Eur Respir J 2001;17:1049-1051.
7. Rojas RE, Balaji KN, Subramanian A, Boom WH. Regulation of Human CD4+  $\alpha\beta$  T-Cell-Receptor-Positive (TCR+) and  $\gamma\delta$  TCR+

- T-Cell Response to *Mycobacterium tuberculosis* by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Infect Immun* 1999;67:6461-6472.
8. Hussain R, Kaleem A, Shahid F, Dojki M, Jamil B, Mehmood H, et al. Cytokine profiles using whole-blood assays can discriminate between tuberculosis patients and healthy endemic controls in a BCG-vaccinated population. *J Immunol Methods* 2002;264(1-2):95-108.
  9. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(1):59-64.
  10. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(1):65-69.
  11. Al-Attiyah R, Mustafa AS, Abal AT, Madi NM, Andersen P. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon- responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. *Immunol Med Microbiol* 2003;38(3):249-256.
  12. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.

- Blood 1994;84:4008-4027.
13. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
  14. Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:205-210.
  15. Vowels BR, Cassin M, Vonderheid EC, Rook AH. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol* 1992;99(1):90.
  16. Song CH, Kim HJ, Park JK, Lim JH, Kim UO, Kim JS, et al. Depressed IL-12, but not IL-18 production in response to a 30- and 32-kDa mycobacterial antigen in patients with active pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2000;68:4477-4484.
  17. Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, et al. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology* 2002;105:325-335.
  18. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet* 1999;354:1932-1939.

19. Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987;62:229-234.
20. Tramontana JM, Utaipat U, Molloy A, et al. Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol Med* 1995;1:384-397.
21. Senaldi G, Yin S. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol* 1996;157:5022-5026.
22. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989;56:731-740.
23. Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000;181(1):385-389.
24. Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* 2002;32:1605-1613.

25. Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS, Wheeler JG, Lahai GP, Doherty MT, et al. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun* 2001;69(10):6554-6557.
26. Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000;181(1):385-389.
27. van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000;181(3):1194-1197.
28. Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, Dawood G, Shahid F, Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(8):3193-3198.
29. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, et al. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 1996;64(3):913-918.
30. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000;105(9):1317-1325.

31. Hirsch CS, Toossi Z, Vanham G, Johnson JL, Peters P, Okwera A, et al. Apoptosis and T cell hypo-responsiveness in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1999;179:945-953.
32. Das G, Vohra H, Saha B, Agrewala JN, Mishra GC. Apoptosis of Th1-like cells in experimental tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 1999;115(2):324-328.
33. Zhang X, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, et al. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997;185(10):1837-1849.
34. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- $\gamma$  via aerosol. *Lancet* 1997;349:1513-5.

## Abstract

### The change and correlation of Th1 and Th2 cytokines in patients with tuberculosis

Sang Yon Hwang

*Department of Medicine,  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor **Sung Kyu Kim**)

Tuberculosis(TB) is one of the leading infectious diseases in adults, causing about 2 million deaths annually. Research on interactions between host defense mechanisms and immunopathogenesis of TB is necessary because there is an urgent need for developing new vaccines and adjunctive immunotherapy. Most of all, the balance and interaction of Th1 and Th2 cytokines have been thought as playing an important role in the pathogenesis of TB.

In this study, therefore, we used whole blood culture method in order to evaluate Th1 and Th2 cytokine production in active TB patients, PPD+ and PPD- healthy controls. We investigated the productions of IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  and IL-10 in response to nonspecific mitogens and *M. tuberculosis* specific antigens. In addition, we monitored the changes of each cytokine production in TB patients during the course of therapeutic treatment.

As a result, we observed the production of IFN- $\gamma$  is decreased in TB patients compared to PPD+ healthy controls, suggesting that reduced IFN- $\gamma$  production is possibly related to the pathogenesis of TB. IL-12 and TNF- $\alpha$  productions, which trigger the innate immune responses in *M. tuberculosis* infected host macrophages, were induced at the beginning of chemotherapy and then decreased gradually throughout the therapeutic periods. Overall, our results indicate that the productions of IL-12 and IFN- $\gamma$  are not related in TB patients whereas the productions of IL-10 and IFN- $\gamma$  seem to be correlated.

---

**Key Words:** tuberculosis, Th1 cytokine, Th2 cytokine