

Lamivudine 치료를 받은 만성 B형
간염 환자군에서의 사이토카인
발현 양상

연세대학교 대학원
의학과
박윤희

Lamivudine 치료를 받은 만성 B형
간염 환자군에서의 사이토카인
발현 양상

지도 김 현 숙 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 대학원

의학과

박윤희

박윤희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2006년 6월 일

감사의 글

언제나 많은 관심과 가르침을 주신 김현숙 교수님께 감사드립니다. 또한, 진료와 교육·연구에 바쁘신 중에도 많은 조언과 도움을 주신 한광협 교수님과 이봉기 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 끝으로 제게 힘이 되어주는 부모님께 감사의 마음을 전합니다.

저자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구대상	5
2. 사이토카인의 측정	6
3. 검체의 안정성 검사	6
4. 참고치 설정	7
5. 통계	8
III. 결과	8
1. 환자와 대조군의 임상적 특징	8
2. 검체의 보관 상태에 따른 안정성	8
3. 환자군과 대조군의 혈청 사이토카인 결과	9
4. HBeAg+/HBeAb+ 결과와 혈청 내 사이토카인의 농도	9
5. 동일 환자의 Lamivudine 치료 경과에 따른 사이토카인 결과	12
6. 임상적 지표와 사이토카인 농도간의 회귀 분석	14
IV. 고찰	15
V. 결론	18
참고문헌	20

영문요약 23

그림 차례

그림 1. 만성 B형간염 환자의 Lamivudine 치료 후 관해된 군과 재발된 군의 혈청 사이토카인 농도의 변화	11
그림 2. 동일 환자의 치료에 따른 연속적 사이토카인 결과	13
그림 3. HBV-DNA와 IL-10 간의 상관성	14
그림 4. 동일 환자의 치료에 따른 ALT와 HBV-DNA의 변화	18

표 차례

표 1. 대상군과 대조군의 임상적 특징	5
표 2. 사이토카인의 참고치 (pg/mL)	7
표 3. 검체 보관상태에 따른 사이토카인 결과 .	10
표 4. 만성 B형간염 환자 중 HBeAg ⁺ 와 HBeAb ⁺ 군에서 임상 지표와 사이토카인의 농도	12
표 5. 임상적 지표와 사이토카인 농도간의 상관성	14

국문요약

Lamivudine 치료를 받은 만성 B형 간염 환자군에서의 사이토카인 발현 양상

만성 B형간염 환자에서 임상적 증상의 발병기전에는 사이토카인이 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 임상 양상과 병의 진행 상태가 사이토카인의 농도와 순서적으로 관련이 있다는 연구는 이루어진 바 있으나, 치료제에 대한 환자의 반응과 사이토카인 농도 간의 상관성은 거의 연구되지 않았다. 본 연구에서는 만성 B형 간염 환자에서 흔히 사용하는 치료제인 Lamivudine의 치료 반응에 따른 사이토카인의 발현 양상과의 관계를 알아 보기 위해 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), INF- γ , TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), MCP1 (Macrophage/Monocyte Chemotactic Protein 1), EGF (Epidermal Growth Factor) 등 12종의 혈청 내 사이토카인 농도를 측정하였다.

만성 B형간염 환자 27명에서 얻은 59검체와 20명의 정상 대조군의 혈액 검체를 대상으로 하였으며, 환자군은 투약 전, 치료 중, 관해 기간 그리고 Lamivudine 약제내성 재발군 등 4군으로 나누었다. 혈청 내 사이토카인 측정은 CCD (Charge Coupled Device)가 단백질 칩의 신호를 측정하여 사이토카인을 정량하는 방법을 이용하였다(Randox, Antrim, UK).

환자군에서 건강 대조군 보다 모든 사이토카인의 결과가 높게 나타났다. 특히, 약제에 대한 내성으로 간염의 재발상태를 보이는 환자군에서 치료 중이거나 관해 유지군에서 보다 IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α 가 유의하게 높았다. 동일 환자의 각 치료 경과 시기에 따른 검체에서의 혈청 내 사이토카인 결과도 각 군간의 비교에서와 비슷한 결과를 보였다. 즉, 혈청 내 사이토카인 농도는 각 환자의 치료 상태를 잘 반영하는 것으로 나타났으며, 앞으로 만성 간염 환자에

서 치료약제의 반응을 monitoring하는 데에 사이토카인 측정결과가 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

핵심 되는 말: 사이토카인, B형간염, hepatitis B virus (HBV), 단백질 칩

Lamivudine 치료를 받은 만성 B형 간염 환자군에서의 사이토카인 발현 양상

<지도교수 김현숙>

연세대학교 대학원 의학과

박윤희

I. 서론

B형간염 바이러스(Hepatitis B Virus)는 만성 감염을 일으키는 인자로서, 감염된 환자는 무증상부터 간경변증, 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)에 이르는 다양한 임상 양상을 나타낸다. HBV는 세포 용해성 바이러스가 아니기 때문에 감염으로 인해 발생하는 병리의 대부분은 바이러스의 산물에 대한 숙주의 면역 반응에 의한 것으로 알려져 있다¹⁻³. 면역반응을 매개하는 사이토카인은 림프구(lymphocyte), 대식세포(macrophage), 가지세포(dendritic cell) 등 다양한 종류의 세포에서 생산되며, 만성 B형 간염의 발병기전에 있어 중추적인 역할을 한다고 보고되어 있다^{1, 4}. HBV에 감염된 간의 염증반응은 IFN- γ (Interferon- γ)와 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)와 같은 사이토카인에 의해서 유발되고, 바이러스의 제거도 또한 이와 같은 사이토카인에 의해서 일어난다^{1, 5-9}. 간의 섬유화는 TGF- β (Transforming growth factor- β)와 같은 사이토카인에 의해 유발되고 촉진된다고 한다^{10, 11}.

또한, 간세포암의 발생과 확장에도 여러 가지 사이토카인이 관여된 면역성의 이상이 수반되어 발생된다고 보고되어 있다¹²⁻¹⁷. 이와 같이 사이토카인은 질병의 병태생리에 있어 중요한 역할을 하며, 임상 양상이나 병의 진행 상태와 사이토카인의 농도가 순서적으로 관련이 있는지에 대한 연구도 이루어지고 있다^{18, 19}. 하지만 만성 B형 간염 환자에서 치료제와 연관되어 투약 전, 관해 기간, 내성이 발생하여 재발에 이르는 동안의 사이토카인 발현양상에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), INF- γ , TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha), MCP1 (Macrophage/Monocyte Chemotactic Protein 1), EGF (Epidermal Growth Factor) 등 12종의 사이토카인 농도를 동시에 측정하여, Lamivudine 치료경과와의 연관성을 살펴보기위해 Lamivudine의 치료 경과중인 만성 B형 간염 환자로부터 얻은 혈액을 대상으로 혈청 내 사이토카인 농도를 측정하였으며, 그 결과를 환자들의 치료 경과에 따라 각 군으로 나누어 비교하였다. 또한 사이토카인은 채취와 보관 상태가 농도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어²⁰ 각 보관 환경이 사이토카인의 농도에 미치는 영향을 알아보았다.

표 1. 대상군과 대조군의 임상적 특징

	대조군 (n=20)	Lamivudine 치료전(n=10)	Lamivudine 치료중(n=6)	관해 (n=22)	재발 (n=20)
나이 (years)	40±8	35±6	36±7	36±9	43±11
성별(남/여)	12/8	10/0	4/2	17/5	16/4
ALT (IU/L)	21±8	185±145	45±21	23±11	183±121*
HBeAg/Anti-HBe	-	10/0	5/1	0/15	17/3
HBV-DNA (pg/mL)	-	647±651	56±137	0±0	529±710*

모든 결과는 mean±standard deviation (S.D.)로 표시함.

ALT: alanine aminotransferase (reference range: <46 IU/L).

* $p < 0.05$ (ANOVA).

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

만성 B형간염 환자 중 2003년 4월부터 2006년 2월까지 Lamivudine 치료를 받았던 환자들을 대상으로 사전동의를 얻어 Lamivudine 치료전, 치료도중, 관해상태, 약제 내성으로 인한 재발의 단계에서 총 27명의 환자로부터 채혈하였으며, 각 환자로부터 기간 간격을 두어 연속적으로 2번에서 4번의 검체를 채취하였다. 만성 B형간염의 진단과 관해, 재발은 혈청 내 HBsAg, HBeAg, ALT (alanine aminotransferase), HBV-DNA (pg/mL), anti-HBe 검사 결과를 바탕으로 임상외과가 판단하였다. 대조군은 환자군의 나이, 성별 등을 고려하여 혈액학적 검사 및 임상화학과 면역 혈청 검사상 정상인 건강검진 환자들 중에서 선택하였으며, 특히 HBsAg, anti-HBc, anti-HCV등 간염 바이러스 지표가 음성인 사람을 선택하였다(표 1).

2. 사이토카인의 측정

정맥혈을 채취하여 2시간 이내에 혈청을 분리하였고 사이토카인을 당일 측정할 수 없는 경우에는 검체를 즉시 냉동하였다. 단백질 칩 기술을 이용한 Evidence Investigator (Randox, Antrim, UK)장비를 이용하여 혈청 내 사이토카인(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, INF- γ , TNF- α , MCP1, EGF) 12종의 농도를 측정하였으며, 시약 및 장비 제조사의 지시서에 따라 검사를 실시하였다. 실험 시작 전에 냉동된 혈청 검체를 실온에 두어 해동시킨 후 잘 섞어서 실험에 사용하였으며, 9개의 단백질 칩으로 구성된 carrier는 15분 정도 실온에 두어 포장을 제거하였을 때 칩에 물기가 생기지 않도록 하여 사용하였다. 각 단백질 칩 표면에는 측정하고자 하는 12가지의 사이토카인에 대한 단클론항체가 부착되어 있으며, assay diluent 200 μ L씩을 각 칩이 담긴 well에 분주한 후 여기에 혈청 100 μ L를 첨가하였다. 이 칩을 37 $^{\circ}$ C, 370 rpm 으로 맞추어 놓은 Thermo shaker에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척액으로 6회 세척을 시행한 후, 효소 표지 항체를 포함하는 conjugate액 300 μ L를 각 well에 분주하고 다시 같은 조건으로 1시간 동안 반응시킨 후, 6회 세척하였다. 루미놀(luminol)과 과산화효소(peroxidase)를 1:1로 혼합한 기질용 시약 250 μ L를 각 칩에 분주하고 빛을 차단한 상태로 2분간 두었다가 Evidence Investigator 장비 내로 carrier를 넣으면 CCD 카메라가 칩의 신호를 인지하여 영상을 저장하게 되고 컴퓨터 프로그램을 이용하여 사이토카인 농도를 정량하여 그 결과를 판독하였다.

3. 검체의 안정성 검사

채혈 후 냉동 보관한 검체의 안정성을 검사하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 건강 대조군 동일인의 동일 검체 7개씩을 대상으로 가능한 빨리 혈청을 분리하여 얻은 신선한 혈청과 냉장, 냉동, 냉동 후 냉장하였다가 다시 냉동 보관한 검체로 나누어 각 군에서의 사이토카인들의 농도를 측정하여

표 2. 사이토카인의 참고치 (pg/mL)

	mean±SD	95% upper limit
IL-1 α	0.10±0.41	0.91
IL-1 β	1.42±4.33	9.91
IL-2	1.83±4.19	10.04
IL-4	0.69±1.52	3.67
IL-6	3.15±9.31	21.40
IL-8	160.45±352.05	630.50
IL-10	0.11±0.29	0.67
VEGF	198.75±172.69	421.96
IFN- γ	0.45±1.48	3.36
MCP1	296.68±116.48	524.97
EGF	111.92±87.06	282.56
TNF- α	5.05±14.18	7.28

n=110명

결과를 비교하였다. 분리한 혈청은 200 μL씩 나누어 신선 검체로 즉시 검사를 시행하였고 냉장 검체는 5일간 냉장 후 검사를 시행하였으며, 나머지 검체들은 즉시 영하 80℃에 냉동 보관하였다. 그 중 한 군은 냉동 다음날 꺼내 실온에 8시간 방치하였다가 다시 냉동하여 5일째에 검사를 실시하였다.

4. 참고치 설정

각 연령별 남녀별로 임의선정한 건강한 대조군 110명을 대상으로 혈청 내 사이토카인 12 종의 농도를 측정하였다. Analyse-it for Microsoft Excel (Analyse-It Software, Ltd., Leeds, UK)을 이용하여 95% 신뢰구간의 상한치를 참고치로 정하였다(표 2).

5. 통계

모든 자료는 mean±standard deviation (S.D.)로 표시하였다. 환자군과 대조군의 임상적 지표간의 차이는 각 군 간 분산의 일방향성 분석(ANOVA)을 이용하여 분석하였다. 환자군 간, 환자군과 대조군 간의 사이토카인 농도치의 관계는 Student's *t*-test, paired *t*-test, ANOVA, chi-square test를 이용하여 분석하였다. 임상적 지표와 사이토카인 농도치와의 상관성을 보기 위해 회귀분석을 시행하였다. 통계 프로그램은 Analyse-it for Microsoft Excel 을 사용하였다. 유의 수준 95% ($p < 0.05$)를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

III. 결과

1. 환자와 대조군의 임상적 특징

환자군은 Lamivudine의 치료 경과에 따라 Lamivudine 치료전, 치료도중, 관해유지, 그리고 약제내성 재발군으로 나누었다. 분산분석 결과 ALT와 HBV-DNA는 각 군간에 유의한 차이를 보였으며($p < 0.0001$, $p = 0.0012$, by ANOVA), 나이는 각 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$, by ANOVA). 각 군간의 카이제곱 검정 결과 성별과 HBeAg⁺/HBeAb⁺ 결과도 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$, chi-square test, 표 1).

2. 검체의 보관 상태에 따른 안정성

실험에 사용한 각 검체의 보관 상태가 사이토카인 결과에 유의한 영향을 주는지 알아보기 위하여 채혈 후 가능한 빨리 혈청을 분리하여 얻은 신선한 혈청과 냉장, 냉동, 냉동 후 냉장하였다가 다시 냉동 보관한 동일인으로부터 얻은 혈청 간 사이토카인의 결과를 비교하였다. 검체 보관상태에 따른 각 군간

사이토카인 결과는 분산분석에서는 유의한 차이가 없었으며($p>0.05$, by ANOVA), 신선혈청의 사이토카인 결과와 각 군간의 사이토카인 결과의 paired t-test에서는 VEGF, MCP1에서 냉장보관한 검체와 냉동과 냉장을 반복한 검체의 p-value 0.05이하로 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다(표 3).

3. 환자군과 대조군의 혈청 사이토카인 결과

그림 1에서와 같이 환자군의 혈청 사이토카인 농도는 건강한 대조군보다 높은 농도를 보였다(건강한 대조군, TNF- α : $1.83\pm 1.00\text{pg/mL}$; IL-6: $0.52\pm 0.69\text{pg/mL}$; IL-8: $4.07\pm 2.00\text{pg/mL}$; IL-10: $0.28\pm 0.47\text{pg/mL}$). TNF- α 의 농도는 관해 유지군과 비교하여 약제내성 재발군에서 더욱 증가하는 경향을 나타냈다(관해 유지군: $1.91\pm 2.06\text{pg/mL}$, 약제내성 재발군: $102.81\pm 80.47\text{pg/mL}$). Lamivudine으로 치료중이거나 치료 후 관해 유지군과 약제내성 재발군간의 TNF- α 농도는 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p=0.0012$). IL-6의 농도는 관해 유지군과 비교하여 약제내성 재발군에서 유의하게 증가하였다(관해 유지군: $1.54\pm 1.82\text{pg/mL}$, 약제내성 재발군: $349.46\pm 337.81\text{pg/mL}$; $p=0.0061$). IL-8도 관해 유지군($8.99\pm 7.25\text{pg/mL}$)에 비해 약제내성 재발군($1241.63\pm 1221.83\text{pg/mL}$)이 유의하게 증가한 결과를 보였다($p=0.0016$). IL-10의 경우 농도는 TNF- α , IL-6, IL-8과 유사한 양상을 보이지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다(관해 유지군: $0.76\pm 0.60\text{pg/mL}$, 약제내성 재발군: $3.55\pm 4.85\text{pg/mL}$; $p=0.16$). 관해 유지군과 약제내성 재발군 간의 농도의 차이가 크지 않아 통계적인 유의성이 없는 것으로 생각되었다(그림 1).

4. HBeAg+/anti-HBe+와 혈청 내 사이토카인의 농도

HBeAg+/anti-HBe+의 상태에 따른 혈청 내 사이토카인의 농도와 임상적 지표를 분석하기 위해 환자군을 HBeAg+/anti-HBe+군으로 나누었다. 각 군의

표 3. 검체 보관상태에 따른 사이토카인 결과

	신선혈청	냉동 보관	p-value*	냉장 보관	p-value†	냉동과 냉장 반복	p-value‡	전체 p-value§
IL-2	2.35±0.60	2.01±0.44	0.49	1.73±0.35	0.40	1.03±0.46	0.14	0.06
IL-4	2.01±1.03	2.25±2.25	0.93	0.37±0.37	0.20	0.29±0.29	0.17	0.64
IL-6	0.52±0.28	0.47±0.21	0.56	0.31±0.18	0.15	0.43±0.19	0.45	1.00
IL-8	4.07±0.82	4.02±0.76	0.90	3.13±0.51	0.06	3.35±0.63	0.08	0.89
IL-10	0.28±0.19	0.27±0.18	0.96	0.0±0.0	0.20	0.0±0.0	0.20	0.09
VEGF	234.35±72.40	214.75±68.42	0.05	192.32±64.02	0.01	222.85±64.26	0.50	1.00
INF-γ	2.62±1.81	1.82±1.82	0.73	0.85±0.55	0.26	0.0±0.0	0.21	0.41
TNF-α	1.83±0.41	1.77±0.44	0.90	2.84±2.15	0.66	1.48±0.30	0.52	0.52
IL-1α	0.23±0.08	0.28±0.06	0.41	0.13±0.08	0.27	0.23±0.08	0.96	0.79
IL-1β	0.43±0.27	0.74±0.54	0.51	0.38±0.24	0.86	0.45±0.29	0.97	0.69
MCP1	225.69±16.78	210.97±11.69	0.09	195.10±13.51	0.00	197.17±15.18	0.00	0.57
EGF	40.09±11.70	39.09±11.04	0.54	38.53±9.99	0.52	37.72±10.24	0.44	1.00

모든 결과는 mean±standard deviation (S.D.)로 표현함

*신선혈청과 냉동보관 검체의 paired t-test

†신선혈청과 냉장보관 검체의 paired t-test

‡신선혈청과 냉동과 냉장 반복 검체의 paired t-test

§ANOVA

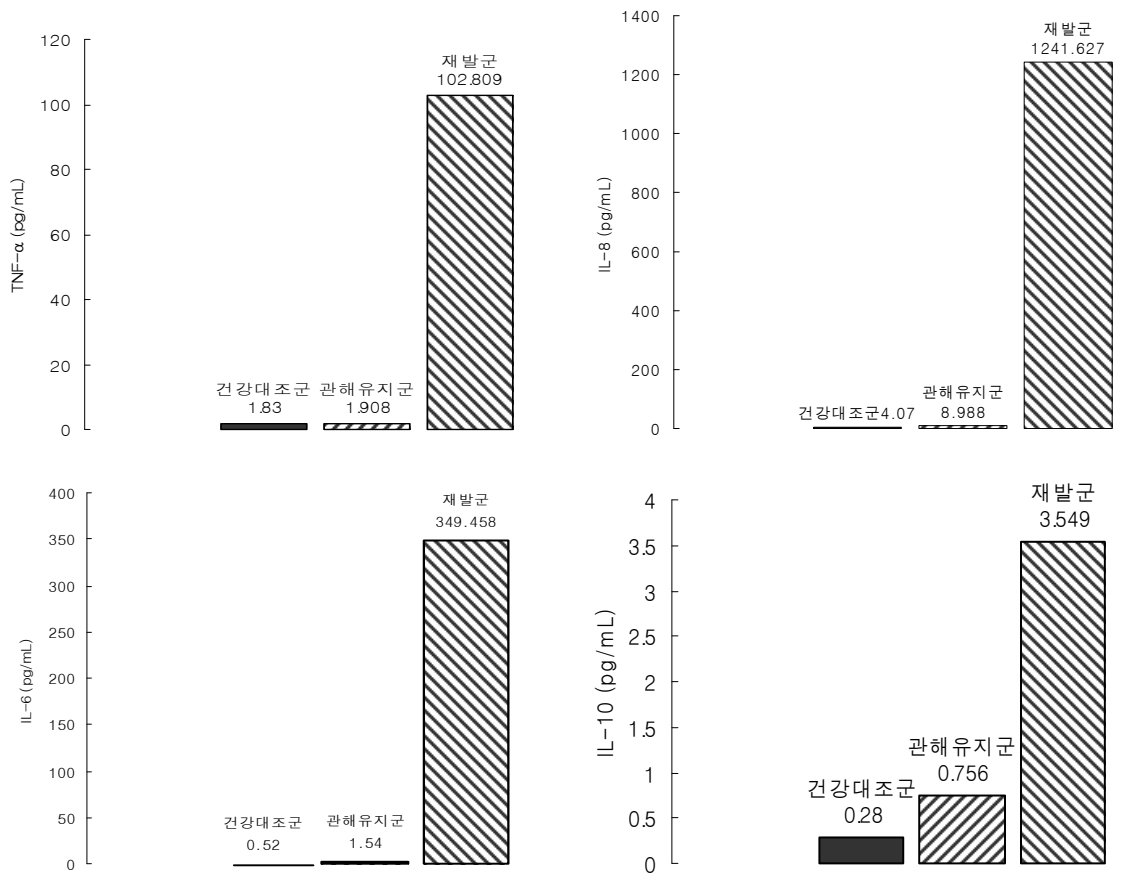


그림 1. 만성 B형간염 환자의 Lamivudine 치료 후 관해 유지군과 억제내성 재발군의 혈청 사이토카인 농도의 변화.

표 4. 만성 B 형간염 환자 중 HBeAg+와 anti-HBe+ 군에서 임상 지표와 사이토카인의 농도

parameters	HBeAg+ (n=32)	anti-HBe+ (n=19)	p-Value
나이(years)	39±10	36±10	0.2041
ALT (IU/L)	160.6±122.9	51.5±93.5	0.0016
HBV-DNA (pg/mL)	504.2±666.9	65.5±265.2	0.0087
TNF-α (pg/mL)	28.8±58.5	17.9±56.6	0.5167
IL-6 (pg/mL)	84.6±193.6	68.5±198.3	0.7773
IL-8 (pg/mL)	259.7±543.1	420.9±930.4	0.4368
IL-10 (pg/mL)	0.75±0.9	0.85±3.3	0.8756

모든 결과는 mean±standard deviation (S.D.)로 표현함

ALT: alanine aminotransferase (reference range: <46 IU/L).

나이는 차이가 없었다. 하지만, HBeAg+ 군에서 ALT와 HBV-DNA 결과는 anti-HBe+ 군에 비해 유의하게 높았다($p=0.0016$, $p=0.0087$). 혈청 내 사이토카인의 농도는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(표 4).

5. 동일 환자의 Lamivudine 치료 경과에 따른 사이토카인 결과

동일한 환자가 관해 상태에서 Lamivudine 내성의 상태로 이환된 경우 그 환자들의 혈청 내 사이토카인 농도를 측정하고 변화를 분석하였다(그림 2). 그림 1에 비해 제한된 환자 수이지만 그림 1과 비슷한 경향을 나타냈다. 즉, 관해 상태를 유지하다가 내성이 유발되면 TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10이 증가하는 결과를 보였다.

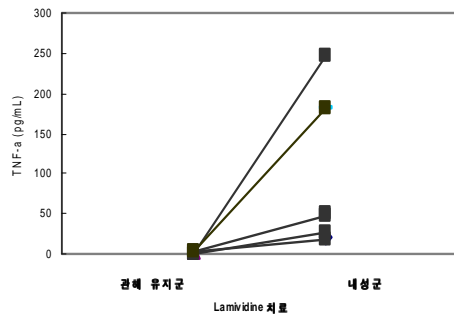
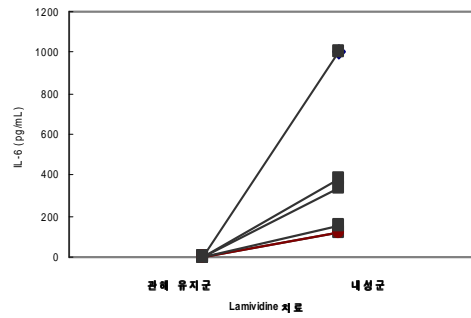
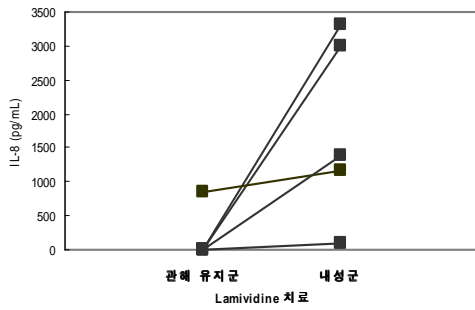
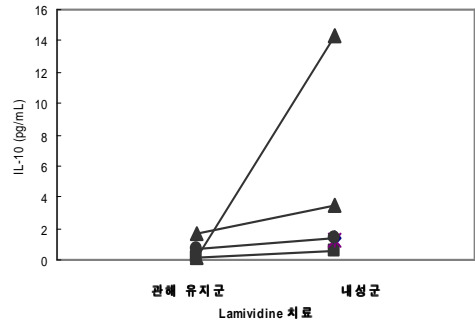
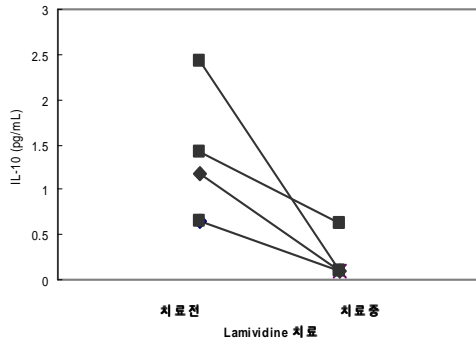


그림 2. 동일 환자의 치료에 따른 연속적 사이토카인 결과.

표 5. 임상적 지표와 사이토카인 농도간의 상관성

	r	p-Value
ALT vs. IL-4	0.35	0.0058
ALT vs. IL-10	0.34	0.0072
ALT vs. IFN- γ	0.3	0.0214
HBV-DNA vs. TNF- α	0.26	0.0079
HBV-DNA vs. IL-6	0.2	0.0329
HBV-DNA vs. IL-8	0.28	0.0031
HBV-DNA vs. IL-10	0.39	<0.0001

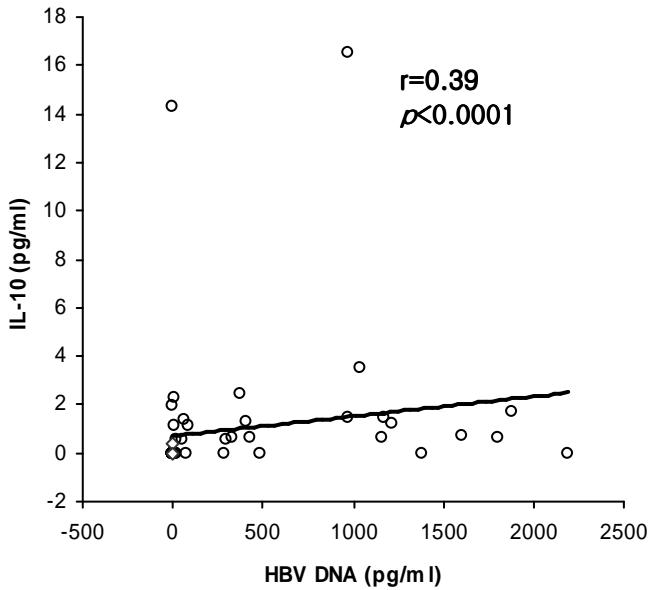


그림 3. HBV-DNA와 IL-10 간의 상관성.

6. 임상적 지표와 사이토카인 농도간의 회귀 분석

사이토카인 분포 양상이 환자 군별로 다르다는 것은 개개인의 사이토카인 생성은 각기 다른 요인에 의해 영향을 받는다는 것을 의미한다고 가정하였다.

그래서, 임상적 지표들과 사이토카인 농도간의 관계를 분석하기 위하여 ALT, HBV-DNA, HBeAg과 같은 검사 결과를 이용하여 회귀분석을 시행하였다. 모든 환자들에 대한 분석 결과 ALT와 IL-4, IL-10, INF- γ 가 유의한 상관관계가 있었다($r=0.35$, $p=0.0058$; $r=0.34$, $p=0.0072$; $r=0.30$, $p=0.0214$, 표 5, 그림 3). HBV-DNA는 TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10와 유의한 상관관계가 관찰되었다($r=0.26$, $p=0.0079$; $r=0.20$, $p=0.0329$; $r=0.28$, $p=0.0031$; $r=0.39$, $p<0.0001$; 표 5). 이 분석 결과는 IL-10의 혈청내 농도가 간의 염증 정도, 바이러스의 양과 관련이 있는 것으로 생각되었다.

IV. 고찰

B형간염 바이러스에 의한 간의 염증은 면역매개성으로 발생하며, 획득면역과 선천면역 둘 다 HBV 감염의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다¹⁻³. 본 연구에서는 사이토카인의 면역 반응에의 역할을 분석하고 치료약제의 내성과의 연관성을 알아보고자, 만성 B형간염 환자군에서 혈청 내 12종의 사이토카인의 농도를 동시에 측정하였다. 혈청 내 INF- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , VEGF, MCP1, EGF의 농도를 측정할 수 있었고, IL-1 α 와 IL-1 β , IL-2는 환자의 혈청에서 거의 측정되지 않았다. 일부 보고에서는 IL-2를 측정할 수 있었다고 하였으며, IL-10을 거의 측정하기 어려웠다고 하였다.²¹ 이 실험과는 모순된 결과를 보이는데 그러한 차이는 측정하는 방법의 민감도가 다르다는 것이 원인으로 생각되지만, 앞으로 더 연구되어야 할 부분으로 판단된다.

사이토카인은 검체 채취 이후에도 여러 세포들에 의해 생성이 되며, 세포의 수용체에 결합하고 파괴되는 과정을 거치게 된다. 따라서 이러한 영향을 최소화하기 위해 검체 채취 후 5시간 이내에 검사를 시행하는 것이 권장되고

있지만 현실적인 어려움이 있어 보관 후에 한꺼번에 측정을 하게 된다. 보관을 하게 될 경우 오염되지 않은 용기에 혈액을 채취해야 하며, 최대한 빠른 시간내에 원심분리 후 영하 80℃에 냉동보관하며, 냉동과 해동을 반복하는 것은 반드시 피해야 한다고 권장되고 있다.²⁰ 실제로 이러한 보관 상태가 사이토카인의 결과에 어느정도 영향을 미치는지 검체의 보관 상태에 따른 사이토카인의 안정성을 보기위한 실험을 시행하였다. 건강한 대조군을 대상으로 하였기 때문에 생각되지만 최소 측정 범위 이하의 농도를 보이는 경우가 여럿 있어서 VEGF, MCP1, EGF 이외에는 분석의 어려움이 있었다. 또한, 분산분석으로는 유의한 차이는 없었지만 신선혈청의 사이토카인 결과와 비교하여 paired t-test를 시행한 결과 VEGF와 MCP1에서 냉장보관된 경우와 냉장과 냉동을 반복하였던 검체의 경우 사이토카인 결과가 통계적으로 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 따라서 즉시 검사를 시행하기 어려운 경우에는 혈청을 실온이나 냉장 상태로 오래두지 말고 신속하게 영하 80℃에 냉동 보관해야 할 것으로 판단된다.

만성 B형간염 환자에서 Lamivudine 으로 6개월 이상 치료할 경우 심지어 12주 이내에도 내성이 발생하는 것으로 보고되어 있다.²² 이 실험에서 Lamivudine 치료의 경과에 따라 혈청 내 사이토카인의 농도는 달라졌으며 이러한 변화 양상은 각 군별로 독특한 것으로 생각된다(그림 1). 같은 환자가 각기 다른 치료 경과를 보인 경우 사이토카인의 연속적인 결과의 분석은 치료 경과에 따라 각 군에서 보인 결과와 비슷하였다(그림 2). 이와같은 결과는 Lamivudine 치료의 경과에 따른 각 군 간의 분석이 개개 환자에서의 변화를 잘 반영하는 것을 의미한다. 또한 사이토카인의 농도는 염증, 바이러스의 부하, 바이러스 항원 부하 등 여러가지 요인들에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다(표 4, 표 5). 억제내성 재발군에서 유의한 증가를 보였던 IL-6는 체내 염증반응 시 열을 발생하게 하는 내인성 발열원이며 IL-8는 호중구의 활성화를 촉진시키는 역할을 TNF- α 는 IL-6와 같은 다른 염증관련 사이토카인의 생성을

촉진하고 염증과 관련된 백혈구를 활성화시키는 등^{20, 24} 유의하게 증가되었던 사이토카인들은 모두 염증과 관련되어 있어 억제내성 재발군의 경우 바이러스 부하 등에 의한 염증으로 인해 사이토카인의 생성이 증가된 것으로 생각되었다. 그와 함께 각 치료경과에 따른 대상군 별로 사이토카인의 농도 변화와 연관된 요인이 다르다는 것을 알 수 있었다(표 5). 예를 들어, IL-10은 모든 환자에서 ALT, HBV-DNA와 높은 상관성을 보였다. 하지만 IL-4와 INF- γ 는 ALT와만 상관성을 보였고, TNF- α , IL-6, IL-8은 바이러스 부하와만 상관성을 나타냈다. IL-10이 간의 염증과 HBV-DNA 부하와 관련이 있다는 보고는 다수 있었지만^{22, 25-26}, 이러한 상관성에 대한 실제적인 이유를 설명하는 것은 현재로서는 어려운 상황이다. 아마도 알려져 있지 않은 요인에 의해 조절이 되는 간접적인 연관성일 것으로 생각된다. 그렇지만, 질병의 진행 단계별로, 약제의 치료 단계별로 각기 변화하는 요소들과 사이토카인의 발현양상 변화를 알아보면 발병기전을 이해하고 내성 발생의 예측을 위해서 유용할 것으로 생각된다. 예를들어, 그러한 연구들은 만성간염의 상태에서 간경화, 간세포암으로의 진행을 예측하거나, Lamivudine 등의 약물 치료 시 관해상태를 유지하다가 내성의 발생으로 간염이 재발되는 예측 자료로 이용될 수 있을 것이다. 또한, 동일 환자에서 관해를 유지하다가 내성을 나타내는 시기에 HBV-DNA의 양은 증가하지만 ALT의 경우에는 현저한 증가를 나타내지 않았다(그림 4). 사이토카인의 발현이 생화학적 지표인 ALT 보다는 먼저 내성과 관련하여 이상을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 사이토카인의 발현양상 변화를 이용하여 내성의 예측을 할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서 Lamivudine 치료로 관해 유지군에서 보다 억제내성 재발군에서 여러 사이토카인의 농도가 증가되었으며, 특히 TNF- α , IL-6, IL-8 치의 유의한 증가를 보였다($p=0.0012$, $p=0.0061$, $p=0.0016$). 그리고 관해 유지군 중 3명의 환자(6검체)에서 이 사이토카인 농도의 유의한 증가가 관찰되었다. 현재 이 환자들의 마지막 검사 시기가 아직 2개월이 지나지 않아 추적검사를 실시하지 못했지만 앞으로 추적

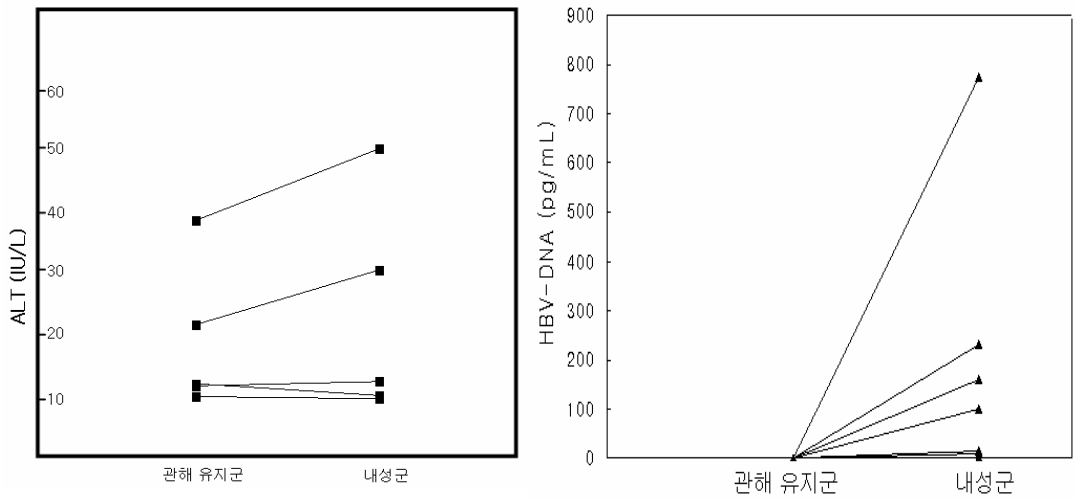


그림 4. 동일 환자의 치료에 따른 ALT와 HBV-DNA의 변화.

관찰을 통해 사이토카인 결과치를 Lamivudine 내성의 예측인자로 이용할 수 있을지 짐작할 수 있을 것이다. 물론 향후 지속적인 연구가 더 필요할 것으로 생각되며, 간 생검 등을 통해 직접 간의 상태와 사이토카인의 결과치들을 비교할 수 있다면 더욱 명확한 연관성을 판단할 수 있을 것이다.

이 연구 결과, 만성 B형간염 환자군에서 혈청 내 사이토카인들의 농도가 바이러스 항원 표지자를 비롯한, 인체의 염증반응이나 바이러스 부하, Lamivudine의 치료 상태 등 여러 임상적 지표를 잘 반영한다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 혈청 사이토카인 프로파일 농도 분석은 질병의 병인을 이해하는 데 도움이 될 뿐 아니라, Lamivudine 등의 치료 약제에 대한 효과 및 내성 예측에 유용한 역할을 할 수 있을 것으로 생각되었다. 즉, 앞으로 더 연구를 진행하여 치료 효과 및 내성 예측의 표지자로서의 가능성도 기대된다.

V. 결론

본 연구에서는 만성 B형 간염환자군에서 혈청 내 12종의 사이토카인의 농도

를 동시에 측정하여 사이토카인의 발현양상을 알아보려고 하였다. 환자군의 혈청 사이토카인 농도는 건강한 대조군보다 높은 농도를 보였다. 약제의 내성으로 감염의 재발상태를 보이는 환자군에서 치료중이거나 관해를 유지하는 환자군에서 보다 IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α 가 유의하게 높은 결과를 보였다. 각 치료 경과 시기에 검체를 채취하였던 동일환자의 혈청 내 사이토카인 결과도 각 군간의 비교에서와 같은 결과를 보였다. 혈청 내 사이토카인 농도는 각 환자의 치료 상태를 잘 반영하는 것으로 나타났으며, 앞으로 만성 감염 환자에서 치료약제의 반응을 monitoring하는 데에 사이토카인 측정결과가 유용하게 사용될 수 있을것으로 사료된다.

참고문헌

1. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
2. Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 1655-1665.
3. Penna A, Del Prete G, Cavalli A, Bertolotti A, D'Elios MM, Sorrentino R, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997; 25: 1022-1027.
4. Bertolotti A, D'Elios MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 112: 193-199.
5. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993; 178: 1541-1554.
6. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3764-3768.
7. Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12398-12402.
8. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36.
9. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829.
10. Wells RG. The role of matrix stiffness in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S158-161.

11. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 1100.
12. Hirofuji H, Kakumu S, Fuji A, Ohtani Y, Murase K, Tahara H. Natural killer and activated killer activities in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma: evidence for a decreased lymphokine-induced activity of effector cells. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 348-356.
13. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 1994; 73: 2275-2279.
14. Rossmann W, Schulte-Hermann R. Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 430-436.
15. Okumoto K, Hattori E, Tamura K, Kiso S, Watanabe H, Saito K, et al. Possible contribution of circulating transforming growth factor-beta1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2004; 24: 21-28.
16. Lee WC, Chiang YJ, Wang HC, Wang MR, Lia SR, Chen MF. Functional impairment of dendritic cells caused by murine hepatocellular carcinoma. *J Clin Immunol* 2004; 24: 145-154.
17. Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SI, Park JH. Expression pattern of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. *Yonsei Med J* 2002; 43: 657-664.
18. Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, Tanabe J, Ito H, Ohashi T, et al. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2006; 34: 214-221.
19. Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, Demirbag K, Yalniz M. Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3260-3263.
20. Rosa MS, Pinto AM. Cytokines. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Thietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th ed. St. Louis:Elsevier saunders, 2006:645-744.
21. Song LH, Binh VQ, Dinh N, Kun FJ, Bock TC, Kremsner PG, et al. Serum cytokine profiles associated with clinical presentation in Vietnamese infected with hepatitis B virus.

J Clin Virol 2003; 28: 93-103.

22. Hyodo N, Tajimi M, Ugajin T, Nakamura I, Imawari M. Frequencies of interferon-gamma and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. Hepatol Res 2003; 27: 109-116.

23. Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS, Lee JS, Kim JH, et al. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short-term lamivudine therapy in South Korea. J Hepatol 2001; 35: 92-98.

24. 이봉기. Sepsis와 Cytokine. 대한구급의학회지 1994; 9: 113-117.

25. Bozkaya H, Bozdayi M, Turkyilmaz R, Sarioglu M, Cetinkaya H, Cinar K, et al. Circulating IL-2, IL-10 and TNF-alpha in chronic hepatitis B: their relations to HBeAg status and the activity of liver disease. Hepatogastroenterology 2000; 47: 1675-1679.

26. Hyodo N, Nakamura I, Imawari M. Hepatitis B core antigen stimulates interleukin-10 secretion by both T cells and monocytes from peripheral blood of patients with chronic hepatitis B virus infection. Clin Exp Immunol 2004; 135: 462-466.

Abstract

Serum Cytokine Expression Pattern according to the Response of Lamivudine Therapy in Chronic Hepatitis B

Younhee Park

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyon-Suk Kim)

Cytokines are known to play pivotal roles in the pathogenesis of chronic Hepatitis B virus (HBV) infection. The association between the cytokine profiles and the sequence of the disease phases or clinical factors has been studied in detail so far. However, the relationship between cytokines and treatment response of drugs for chronic hepatitis B is not clearly defined yet.

In the present study, we measured the serum cytokine levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), INF- γ , TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha), MCP1 (Macrophage/Monocyte Chemotactic Protein 1), and EGF (Epidermal Growth Factor) to elucidate the cytokine expression pattern according to the patients' response to Lamivudine, one of the most common therapeutic agents for chronic hepatitis B.

Fifty-nine specimens from twenty-seven patients with chronic HBV infection and 110 specimens from healthy individuals were tested by 12 kinds of cytokine profile. The patients were classified into four groups: patients before treatment, patients with ongoing treatment, patients maintaining remission, and patients with recurrence due to resistance against Lamivudine. A newly developed protein chip analyzer, Evidence Investigator (Randox, Antrim, UK) was used to quantify serum cytokines.

All 12 kinds of cytokine values were higher in the patient groups than in the healthy control group. Especially, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α were elevated in patients with recurrence due to resistance against Lamivudine compared to patients maintaining remission and patients with ongoing treatment. Serial analyses for the cytokine values in the same patients showed similar tendencies.

In summary, serum cytokine values well reflected the pathological differences of the individual treatment phases, and may become useful indices in monitoring the treatment response of chronic hepatitis B virus infection.

Key words: cytokines, chronic hepatitis B, hepatitis B virus (HBV), protein chip array