

## 매독균 47 kDa 항원에 의한 치료전 매독 환자의 세포성 면역반응 유도

충남대학교 의과대학 미생물학교실, 연세대학교 의과대학 피부과학교실<sup>1</sup>,  
건양대학교 의과대학 미생물학교실<sup>2</sup>

조은경\* · 이민걸<sup>1</sup> · 이정복<sup>1</sup> · 박정규 · 김화중 · 남현희 · 민둘레  
임재현 · 송영자 · 백태현<sup>2</sup>

=Abstract=

### Cell-mediated Immune Responses in Syphilitic Patients after *In vitro* Stimulation with the 47 kDa Antigen of *Treponema pallidum*

Eun-Kyeong Jo, Min-Geol Lee<sup>1</sup>, Jung-Bock Lee<sup>1</sup>, Jeong-Kyu Park, Hwa-Jung Kim, Hyun-Hee Nam, Dullei Min, Jae-Hyun Lim, Young-Ja Song and Tae-Hyun Paik<sup>2</sup>

Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon, Korea; Department of Dermatology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea<sup>1</sup>; Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Nonsan, Chungnam, Korea<sup>2</sup>

Present study was aimed to investigate the immunological activities of the 47 kDa glycoprotein antigen from *Treponema pallidum* and conducted on 24 patients with syphilis, (early, late, spontaneously healed, congenital and treated patients) and on 17 normal healthy controls. Two opposite lymphoproliferative manifestations to the 47 kDa antigen were observed in syphilis patients by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay. Ten responders (stimulation index [SI] >4) showed a 3-fold-higher proliferation than the nonresponders, and four of those responders were spontaneously healed patients. Furthermore, analysis by flow cytometry indicated a preferential expansion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by the 47 kDa antigen in the spontaneously healed syphilis patients. Stimulation of PBMCs of spontaneously healed syphilis patients with the 47 kDa antigen for greater than 72 hrs resulted in progressive augmentation of IFN- $\gamma$ , IL-2R $\alpha$  and IL-2 mRNA measured by RT-PCR, but considerably reduced IL-4 and IL-10 mRNA expression. However, patients with late latent syphilis exhibited more increased IL-4 and IL-10 mRNA expressions in response to the 47 kDa antigen than spontaneously healed syphilis group. In contrast to other groups, when cultured with the 47 kDa antigen very low IFN- $\gamma$ , IL-2R $\alpha$  and IL-2 mRNA expressions were shown in early syphilis group. These data suggest that the Th1-predominant cellular responses induced by the 47 kDa antigen may be involved in the clinical outcome of syphilis and provide the immunologic basis for further functional studies regarding the role of the 47 kDa in the immunopathogenesis of syphilis. *Korean J. Immunol.* 20, 2: 153~162, 1998

**Key Words:** 47 kDa antigen, Peripheral blood T lymphocytes, Flow cytometry, Th1/Th2 cytokine gene expression, Cytokine gene expression, *Treponema pallidum*

### 서 론

매독균은 세포의 기생균임에도 불구하고 T 림프구에 의한 대식세포 활성화가 방어면역 형성에 매우 중요한 부분을 담당할 것으로 생각되고 있다<sup>1~3</sup>. 실제로 치료받지 않은 매독 중 약 3분의 1 가량은 자연치유되며 이는 강력한 지연형과민반응의 유도와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다<sup>4</sup>. 그리고 사람면역결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus) 감염 혹은 영양실조 상태에서 세포성 면

역이 저하되는 경우에는 매독 임상증상도 보다 악화되어 나타나며 발병 위험이 현저히 증가한다<sup>5~7</sup>. 또한 합체 형성이 상대적으로 강하게 유도되면서 지연형과민반응이 미약할 경우 제 3기 매독으로 악화될 가능성이 높다고 한다<sup>4</sup>. 그러므로 매독 병인 및 발병 양상은 특히 매독항원에 감작되어 선택적으로 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 림프구를 비롯한 여러 아형의 T 세포 및 이들이 분비하는 각종 cytokine들이 관여된 세포성 면역반응에 의해 주도된다고 볼 수 있다<sup>5,8~10</sup>.

특히 Th1 세포에서 주로 분비되는 IFN- $\gamma$ 와 IL-2 등의

\* Reprint request to: Eun-Kyeong Jo, Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-131, Korea. Tel: 042-580-8241, Fax: 042-585-3686, E-mail: hayoungj@hanbat.chungnam.ac.kr

본 연구는 1997년도 보건의료기술연구개발사업 연구비 (HMP-97-M-2-0018)에 의하여 연구되었음

cytokine은 대식세포 활성화에 중심 역할을 하며<sup>11)</sup> Th1과 Th2 세포는 동일한 시조세포에서 유래하고 기능상 서로 길항적으로 조절되므로<sup>12)</sup> 특정한 항원 자극에 의하여 Th1 림프구 아형이 우세하게 증폭되어 클론 확장이 일어날 수 있는지의 여부는 매독 방어면역에 중요한 요건이 된다. 또한 항원특이 T 림프구 클론 증식이 일어나기 위해서는 림프구 증식인자인 IL-2에 높은 친화력을 가진 IL-2 수용기의  $\alpha$  아단위 (IL-2R $\alpha$ ) 발현 증가가 필수적이다<sup>13,14)</sup>. 반면 주로 Th2 반응이 유도되는 경우 IL-4, IL-10 등의 cytokine이 증가되어 체액성 면역반응이 주로 유도되며 IFN- $\gamma$  및 IL-2의 유전자 전사반응을 저해하고 Th1 림프구 및 대식세포의 활성을 억제함으로써 총체적으로 세포성 면역반응이 억제되어 매독의 만성적 또는 점진적 악화에 영향을 줄 것으로 생각된다<sup>12,15~17)</sup>.

이러한 매독의 임상기별 면역반응은 매독균의 각종 항원 성분들에 의해 다양하게 유도될 것으로 생각되며 47, 34, 15, 37 및 24 kDa 등 일부 매독균체 특이 단백질항원과 지질단백항원 성분들이 동정되어 아미노산 염기서열 등 성상이 알려진 바 있으나 이에 대한 세포성 면역반응에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다<sup>18)</sup>. 그중 매독균의 주요 표면항원으로 알려져 있는 47 kDa 지질단백항원 (Tpp47)에 대한 항체는 *in vitro*에서 매독균의 중화 혹은 고정능이 강하고 매독 방어면역에 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각되며<sup>18~21)</sup> 최근 47 kDa 항원의 항원결정기를 분석하여 보고한 결과에 의하면<sup>22)</sup> fibronectin 및 collagen 성분과 일치하는 항원결정기가 많아 인체내에서 면역원성이 매우 강한 항원으로 알려져 있다.

본 연구는 47 kDa 항원 자극 후 매독 환자의 단핵구 증식능과 Th1 및 Th2 cytokine 발현능을 평가하여 47 kDa 항원에 의해 유도되는 매독 임상기별 세포성 면역반응을 조사하고자 하였다. 건강군 및 치료전 각 임상기별 매독 환자의 말초혈액 단핵구를 *in vitro*에서 각각 6시간, 3일 및 5일간 자극한 후 ① 항원특이 단핵구 증식능 ② 유세포 측정 (flow cytometry)에 의한 림프구 아형 분석 및 ③ IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4 및 IL-10 mRNA의 역동적인 발현양상을 역전사효소 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)에 의하여 반정량적으로 관찰한 후 47 kDa 항원의 면역학적 유용성, 특히 세포성 면역능을 검토하여 몇가지 기초자료를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험대상

건강군은 Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) 검사상 음성인 17명을 대상으로 하였다. 대상 환자는 1997년 4월부터 1998년 2월까지 연세의료원 피부과에 통원치료 중인 매독 환자를 대상으로 하였으며 매독 환자군은 다음과 같은 다섯 군으로 분류하였다. 조기매독군 (early syphilis)은 병력상 발병 2년 이내의 환자 3명이었으며 임상 분류상 제 2기 매독 2명, 조기잠복매독 1명이었으

며 만기매독군 (late syphilis)은 병력상 발병 2년 이후의 환자 6명을 대상으로 하였으며 만기매독군은 임상 분류상 신경매독 (neurosyphilis) 1명과 만기잠복매독 (late latent syphilis) 5명이었다. 또한 자연치유매독군 (spontaneously healed syphilis)은 임상적으로 만기매독군 중 매독증상이 없으면서 매독혈청검사인 19S IgM-FTA검사상 음성반응을 보인 8명을 대상으로 하였다. 그 외 선천매독군 (congenital syphilis)은 만기선천매독 환자 4명을, 치료종결군 (treated syphilis)은 치료가 종결된 매독 환자 3명을 대상으로 하였다. 대상인의 성별, 연령 및 환자군의 경우 VDRL, fluorescent Treponemal antibody absorption (FTA-ABS) 검사, *T. pallidum* hemagglutination assay (TPHA) 및 19S IgM-FTA 검사 결과는 Table 1과 같다.

### 2. 실험방법

#### 1) 매독균 47 kDa 항원

단핵구 자극 실험 및 아형분석에 이용된 매독균 47 kDa 항원은 Biomira Diagnostics Inc. (Ontario, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 말초혈액 단핵구의 준비

공혈자로부터 heparin (중의약품, 25,000 IU)을 전혀 첨가하지 않고 20 ml의 정맥혈을 채혈하여 Histopaque (Sigma 1077, density 1.007) separation 방법으로 분리한 후 최종적으로 10% fetal bovine serum (GIBCO), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)와 2-mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$ M, Biorad)이 첨가된 RPMI 1640 배지 (RPMI 1640 완전배양액)에 부유하여 trypan blue 염색으로 살아있는 세포수를 산정하였다.

#### 3) 말초혈액 단핵구에 대한 47 kDa 항원 자극 및 배양

말초혈액 단핵구를 세포수  $5 \times 10^5$ /ml로 조정하여 24 well culture dish에 각각 1 ml씩 분주하고 매독균 47 kDa 항원 각각 1.0  $\mu$ g/ml가 포함된 RPMI 1640 완전배양액을 가하여 0, 6시간, 3일 및 5일 배양 후 역전사효소 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)에 의한 cytokine mRNA 발현분석에 이용하였다. 단핵구 증식실험 및 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4 및 IL-10 유전자 발현의 양성대조로 사용한 phytohemagglutinin (PHA, Sigma)의 농도는 5  $\mu$ g/ml의 농도로 자극하였다.

#### 4) 단핵구 증식 실험

대식세포가 포함된 말초혈액 단핵구를 96-well U microtiter plate (Costar, USA)에  $5.0 \times 10^4$ /well 되도록 분주하여 위에서 기술한 조건 하에서 5일간 배양하였다. 배양 종료 18시간 전에  $^3$ H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 1  $\mu$ Ci/well씩 pulse한 후 multiple cell harvester (Skatron, Norway)로 harvest하여 liquid scintillation counter (Becton & Dickinson, USA)로  $^3$ H-thymidine incorporation을 측정하였다. 단핵구 증식의 표시는 counts per minute (cpm) 또는 자극지수 (stimulation index, SI)로 표현하였다.

5) 역전사효소 중합효소연쇄반응 (RT-PCR)에 의한 cytokine mRNA의 발현 분석

말초혈액 단핵구를 매독균 47 kDa 항원으로 자극한 후

Table 1. Profile of study groups

Clinical stage	Name	Age	Sex	Titers of serologic tests for syphilis			
				VDRL	FTA-ABS	TPHA	19S(IgM)-FTA
Secondary	LHJ	42	M	16	R	5,120	15
	KDE	22	F	4	R	5,120	15
Early latent Neurosyphilis	KMH	61	M	64	R	5,120	20
	JCY	76	F	128	R	5,120	20
Late latent	YCS	50	M	1	R	1,280	5
	YCA	33	F	1	R	2,560	5
	CH	25	M	4	R	2,560	10
Spontaneously healed	PJY	22	M	1	R	1,280	5
	CDS	51	F	NR*	R	1,280	10
	KJS	57	M	NR	R	1,280	NR
	YKJ	53	F	1	R	1,280	NR
	CSY	33	M	1	R	5,120	NR
	JYH	26	F	NR	R	2,560	NR
	KYH	29	M	NR	R	320	NR
	CEC	32	M	NR	R	320	NR
	YJH	52	M	NR	R	640	NR
	KHS	45	F	1	R	1,280	NR
Late congenital	LSH	26	M	NR	R	2,560	NR
	ODH	30	M	1	R	2,560	NR
	LHY	27	F	1	R	1,280	NR
	NJY	30	F	2	R	5,120	5
Treated	PSK	49	M	NR	R	320	NR
	LMK	29	F	1	R	640	NR
	YSN	39	M	4	R	5,120	NR

\*NR: means non-reactive

Table 2. Oligonucleotide primers and PCR product sizes for cytokine cDNAs

mRNA	Sense primer	Antisense primer	Size of PCR products (bp)
IFN- $\gamma$	5' TGGCTTTTCAGCTCTGCATCG 3'	5' TCGACCTCGAAACAGCATCTG 3'	465
IL-2	5' GAATGGAATTAATAATTACAGAATCCC 3'	5' TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG 3'	229
IL-2R $\alpha$	5' CTCACGTTTCATCATGGTGCCT 3'	5' GGTCTCCATTTACCTGTGCA 3'	552
IL-4	5' CTCACAGAGCAGAAGACTCT GGCACCGAG 3'	5' CACAGGACAGGAATTCAAGC CCGCCAGGCC 3'	255
IL-10	5' AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACA TCAAGGCG 3'	5' AGCTATCCCAGAGCCCCAGAT CCGATTTTGG 3'	328
$\beta$ -actin	5' TCATGCCATCCTGCGTCTGGACCT 3'	5' CCGGACTCATCGTACTCCTGCTTG 3'	582

RNAgent kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 RNA를 분리한 후 RT-PCR은 2.5  $\mu$ g의 총 RNA를 이용하였으며 20  $\mu$ M의 oligo-dT<sub>15</sub>와 44 U의 RNase inhibitor 및 10 U의 reverse transcriptase가 포함된 RT mix를 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하여 cDNA를 얻었다. 연구 대상 cytokine의 primer 염기서열과 PCR 산물의 크기는 Table 2에 나타내었으며 중합효소연쇄반응에 사용된 oligonucleotide primer들은 바이오니아 (Bioneer, 청원군, 충북; PAGE 정제)에 주문합성하여 사용하였다.

생성된 각각의 cDNA 산물 5  $\mu$ l씩 취하여 PCR을 시행하였으며 IL-2 및 IL-4 유전자에 대한 PCR 조건은 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 57 $^{\circ}$ C에서 2분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 반응하였으며 IFN- $\gamma$ , IL-2R $\alpha$ , IL-10 및  $\beta$ -actin의 경우는 annealing을 60 $^{\circ}$ C에서 2분간 시행하였고 cDNA 증폭반응을 30회 실시하였다. RT-PCR에 의하여 증폭된 DNA 밴드는 PCR이 끝난 후 1  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel 상에 전기영동하여 관찰하였다.

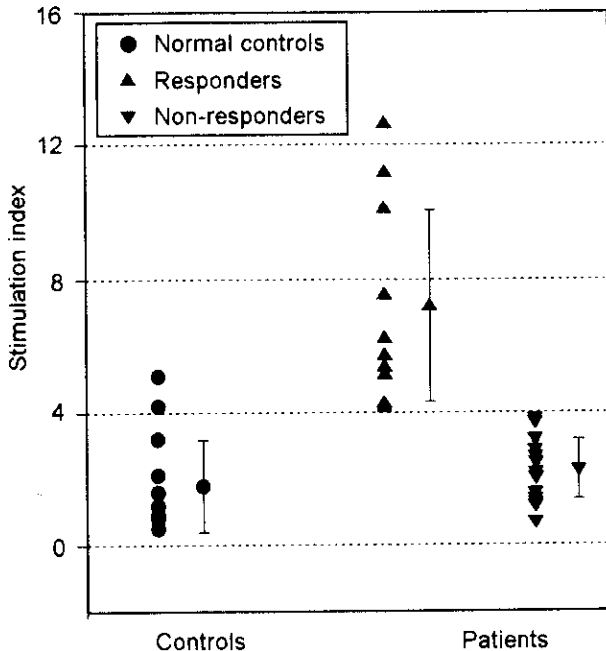


Fig. 1. Proliferative responses of PBMCs to the 47 kDa antigen of *Treponema pallidum* in healthy controls and syphilis patients. PBMCs were stimulated with the 47 kDa antigens at a 1  $\mu$ /ml of concentration for 5 days. Proliferative responses were assessed by a [ $^3$ H]-thymidine incorporation. The results are expressed as the mean counts per minute  $\pm$  the standard error of triplicate cultures. Experimental details are as described in the Materials and Methods.

#### 6) Oligonucleotide probe의 labelling과 Southern blot hybridization

RT-PCR에 의하여 증폭된 IFN- $\gamma$  및 IL-4의 DNA 밴드는 oligonucleotide probe을 이용한 Southern hybridization으로 확인하였으며 IFN- $\gamma$  specific probe은 5' GGC AGT AAC AGC CAA GAG AAC CCA AAA CGA TGC AGA GCT G 3'를, IL-4 specific probe은 5' CTC GGT GCT CAG AGT CTT CTG CTC T 3'을 주문제작한 후 digoxigenin-11-dUTP/dATP를 이용한 3'-tailing 방법을 시행하였다. Blotting은 전기영동이 끝난 agarose gel을 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Boehringer Mannheim)에 18시간 동안 시행한 다음 254  $\lambda$ 의 단파 UV에 노출시켜 DNA를 membrane에 crosslink한 후 Southern hybridization은 DIG system (Boehringer Mannheim)을 사용하였다.

#### 7) 통계학적 처리

단핵구 증식실험 결과는 분산분석에 의해 검증하였으며 p 값이 0.05 이하를 보이는 경우 유의한 결과로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 47 kDa 항원에 의한 말초혈액 단핵구 증식 효과

매독균 47 kDa 항원에 의한 세포 증식능을 Fig. 1에

Fig. 2. Expression of CD4 and CD8 molecules of T lymphocytes after stimulation of the 47 kDa antigen of *Treponema pallidum* in healthy controls and syphilis patients. PBMCs from healthy controls and syphilis patients were stimulated for 5 days with 1  $\mu$ g/ml of the 47 kDa antigen of *T. pallidum* prior to being assessed for the expression of CD4 and CD8 molecules by flow cytometry and expressed as the percentage increase. Experimental details are as described in the Materials and Methods.

나타내었다. 건강군 17명 중 2명의 경우 자극지수 4.1과 5.0으로 일부 증식반응을 나타내는 경우를 제외하면 모든 경우에서 전혀 증식반응을 관찰할 수 없었다. 환자군의 경우 자극지수 4.0 이상의 반응자와 4.0 미만의 무반응자로 크게 구분되었는데 대상 환자 중 14명 (58.3%)은 47 kDa 항원에 증식반응을 나타내지 못하는 무반응군 (SI <4)이었으며 이들의 평균 증식지수는 2.3이었다. 단핵구 증식 반응자 10명 (41.7%)의 평균 증식지수는 7.2이었으며 각 임상기별로 자연치유매독군이 4명, 만기잠복매독과 만기선천성매독이 각각 2명 및 제 2기 매독과 치료종결군 매독 환자가 각각 1명이었다.

### 2. 47 kDa 항원 자극에 의한 CD4 $^+$ 및 CD8 $^+$ T 림프구 비율 변화

말초혈액 단핵구를 분리한 다음 각각 자극 전의 기저상태와 매독균 47 kDa 1  $\mu$ g/ml의 농도에서 5일간 자극 후 CD3 분자를 발현하는 총 T 림프구에 대한 CD4 $^+$  T 림프구 및 CD8 $^+$  T 림프구 비율 변화를 구한 유세포측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

기저상태에서 건강군 및 환자군의 평균 CD4 $^+$ /CD8 $^+$  T 림프구의 비율은 1.2 및 1.1로 유의한 차이가 없었다. 47 kDa 항원 자극 5일에 건강군의 경우 CD4 $^+$  및 CD8 $^+$  T 림프구의 비율은 35.0% 및 17.0%로 CD4 $^+$ /CD8 $^+$  비율은 2.1이었으며 환자군의 경우 자연치유매독군의 CD4 $^+$  및 CD8 $^+$  T 림프구의 비율이 73.0% 및 15.4%로 CD4 $^+$ /CD8 $^+$  비율은 4.7이었으며 건강군 및 다른 환자군에 비해 유하게 증가된 양상이었다. 조기매독군, 만기매독군 및 치료

**Fig. 3.** Expression of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4 and IL-10 mRNA by PBMCs of healthy volunteers stimulated with the 47 kDa antigen. PBMCs were isolated from 3 different healthy volunteers and examined for mRNA expression for IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4, IL-10 and  $\beta$ -actin by RT-PCR. Equivalent quantities of RNA were used since similar amounts of  $\beta$ -actin were expressed by each PBMC within a given experiment. Lane 1, PHA or PMA stimulation for 16 hrs (positive control); lane 2, freshly isolated PBMC; lane 3-5, the 47 kDa antigen stimulation for 6, 72 and 120 hrs, respectively.

종결균의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율은 각각 2.3, 2.5 및 2.9이었고 환자군 중 만기선천성매독균의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율이 가장 낮아 1.2로 나타났다.

### 3. 47 kDa 항원 자극에 의한 건강인 말초혈액 단핵구의 Th1/Th2 cytokine mRNA 발현

건강인 공혈자 3명으로부터 분리한 말초혈액 단핵구에 47 kDa 항원을 1  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하여 각각 6시간, 3일 및 5일간 자극한 다음 각 배양세포로부터 총 RNA를 분리하여 47 kDa 항원에 의하여 유도된 Th1/Th2 cytokine mRNA 발현을 RT-PCR에 의하여 측정하였다. IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4, IL-10 및  $\beta$ -actin mRNA 발현을 RT-PCR에 의해 조사하였으며 cytokine mRNA 발현 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

#### 1) IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R mRNA 발현

말초혈액 단핵구를 PHA로 16시간 자극 후 시행한 RT-PCR 산물을 IFN- $\gamma$  mRNA 발현의 양성대조로 사용하였던 바, 뚜렷한 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R $\alpha$  cDNA의 PCR 증폭밴드를 관찰할 수 있었다. 그러나 IFN- $\gamma$  mRNA의 경우 항원 자극 6시간 및 3일에는 발현이 매우 미약하거나 관찰되지 않았으며 자극 5일에는 발현이 전혀 관찰되지 않았다. IL-2의 경우 47 kDa 항원자극 후 6 시간에 비교적 분명한 IL-2 mRNA 발현이 관찰되었으나 자극 후 3일 및 5일로 자극 시간이 길어질수록 점점 발현강도가 감소되는 양상이었다. 또한 IL-2R $\alpha$ 의 경우 항원 자극 후 6시간에 비교적 뚜렷한 mRNA 발현 밴드를 관찰할 수 있었으나 발현 밴드의 강도는 3일을 전후로 다시 약하여 항원 자극 5일에는 매우 희미하거나 관찰되지 않았다.

#### 2) IL-4 및 IL-10 mRNA 발현

말초혈액 단핵구를 PHA로 16시간 자극 후 시행한 RT-

PCR 산물을 IL-4와 IL-10 mRNA 발현의 양성대조로 사용하였던 바, 뚜렷한 IL-4 및 IL-10 cDNA의 PCR 증폭밴드를 관찰할 수 있었다. IL-4 mRNA의 경우 항원 자극 6시간에 비교적 분명한 IL-4 mRNA 발현이 관찰되었으나 자극 후 3일 및 5일로 자극 시간이 길어질수록 점점 발현강도가 감소되는 양상이었다. 항원 자극 6시간에 양성대조 수준의 강하고 뚜렷한 IL-10 mRNA 발현 밴드를 관찰할 수 있었으며 항원 자극 3일 이후 발현 강도가 감소되어 자극 5일에는 전혀 관찰되지 않았다.

### 4. 47 kDa 항원 자극에 의한 매독 환자 말초혈액 단핵구의 Th1/Th2 cytokine mRNA 발현

각 군별 대상 환자로부터 분리한 말초혈액 단핵구에 47 kDa 항원을 1  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하여 각각 6시간, 3일 및 5일간 자극한 다음 각 배양세포로부터 총 RNA를 분리하여 47 kDa 항원에 의하여 유도된 Th1/Th2 cytokine mRNA 발현을 RT-PCR에 의하여 측정하였다. 각각 동일한 총 RNA 표본으로부터 RT-PCR을 시행하여 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4, IL-10 및  $\beta$ -actin mRNA 발현을 RT-PCR에 의해 조사하였으며 cytokine mRNA 발현 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

#### 1) 조기매독균의 cytokine mRNA 발현 양상

조기매독균 중 제 2기 매독의 경우 47 kDa 항원 자극 후 시간별 IFN- $\gamma$  mRNA 발현이 매우 감소되거나 거의 관찰되지 않았으며 IL-2의 경우 항원 자극 6시간 이후 발현강도가 매우 약화되어 나타나거나 관찰되지 않았다. 또한 IL-2R $\alpha$  mRNA의 경우도 항원 자극 후 6시간부터 5일 까지 발현이 매우 감소된 양상이었으며 항원 자극 5일에는 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현을 관찰할 수 없었다. 또한 항원 자극에 의해 전혀 IL-2R $\alpha$  mRNA를 발현하지 않는 경우도 있었다. 한편 조기매독균 중 조기잠복매독 환자의 경우 항원 자극 5일에 비교적 분명한 IFN- $\gamma$  및 IL-4 mRNA 발현을 동시에 관찰할 수 있었다 (결과는 그림으로 제시하지 않음).

반면 IL-4 mRNA 발현의 경우 항원 자극 후 6 시간에 뚜렷한 IL-4 mRNA 발현이 관찰되었으며 발현강도는 자극 후 3일 및 5일에 약간 감소된 경향이었으나 비교적 분명한 IL-4 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. IL-10 mRNA 발현의 경우 항원 자극 전부터 328 bp에 해당하는 IL-10 PCR 산물이 관찰되었으며 이는 항원 자극 5일까지 지속적으로 관찰되었다. 전반적으로 조기매독균은 만기잠복매독균과 자연치유매독균에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현이 매우 감소된 양상이었으며 건강군에 비해 증가된 IL-4 및 IL-10 mRNA 발현 양상을 나타내었다.

#### 2) 만기잠복매독균의 cytokine mRNA 발현 양상

만기잠복매독균은 47 kDa 항원 자극 6시간에 비교적 명확한 IFN- $\gamma$  mRNA 발현이 관찰되었으며 자극 3일 및 5일에는 발현강도가 감소되거나 매우 약화되는 양상이었다. IL-2R $\alpha$  mRNA의 경우 항원 자극 전에는 발현이 관찰되지 않았으나 47 kDa 항원 자극 6시간에 매우 미약한

**Fig. 4.** Expression of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4 and IL-10 mRNA by PBMC in syphilis patients. PBMCs were isolated from untreated syphilis patients and stimulated with the 47 kDa antigen for 6 hrs, 3 and 5 days. These were examined for mRNA expression for IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4, IL-10 and  $\beta$ -actin by RT-PCR. Equivalent quantities of RNA were used since similar amounts of  $\beta$ -actin were expressed by each PBMC within a given experiment. Lane 1, PHA or PMA stimulation for 16 hrs (positive control); lane 2, freshly isolated PBMC; lane 3-5, the 47 kDa antigen stimulation for 6, 72 and 120 hrs, respectively; ES, early syphilis; LL, late latent syphilis; SH, spontaneously healed syphilis.

**Fig. 5.** Southern blot of IFN- $\gamma$  and IL-4 cDNA after *in vitro* stimulation with the 47 kDa antigen. Following reverse transcription, a PCR with primers specific for IFN- $\gamma$  or IL-4 was performed. The PCR products was electrophoresed on a 2% agarose gel and hybridized with digoxigenin-labelled probe.

수준의 mRNA 발현이 관찰되었으며 항원 자극 5일에는 발현강도가 매우 약화되거나 관찰되지 않았다. IL-2의 경우 항원 자극 전과 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 뚜렷한 발현 밴드가 관찰되었으며 자극 3일 및 5일에도 비교적 강한 IL-2 mRNA 발현이 관찰되었고 이러한 발현 양상은 특히 각 환자의 단핵구 증식반응과 강하게 일치하였다.

반면 IL-4 mRNA 발현의 경우 항원 자극 전과 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 뚜렷한 IL-4 mRNA 발현이 관찰되었으며 발현강도는 자극 후 3일 및 5일에도 거의 대등한 정도이거나 약간 감소된 경향이었다. IL-10 mRNA 발현의 경우 항원 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 매우 강한 IL-10 mRNA 발현이 관찰되었으나 항원 자극 후 3일에는 발현강도가 급속히 감소되어 항원 자극 5일에는 매우 미약한 발현 양상을 나타내었다. 만기잠복매독군은 자연치유매독군에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ 와 IL-2 R $\alpha$  mRNA 발현이 감소된 양상이었으나 일부 환자에서는 강한 IL-2 mRNA 발현이 관찰되었고 Th2 cytokine인 IL-4

mRNA 발현은 증가된 경향이었으며 IL-10 mRNA 발현은 항원 자극 초기에 강하게 유도되는 경향이었다.

### 3) 자연치유매독군의 cytokine mRNA 발현 양상

자연치유매독군은 47 kDa 항원 자극 전 및 자극 후 6시간에 매우 뚜렷한 IFN- $\gamma$  mRNA 발현이 관찰되었으며 자극 3일 및 5일로 자극 시간이 길어질수록 발현강도가 점차 증가되는 양상이었다. IL-2R $\alpha$  mRNA의 경우 항원 자극 전에는 발현이 관찰되지 않았으나 47 kDa 항원 자극 6시간에 양성대조와 대등한 수준의 매우 강한 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현이 관찰되었으며 항원 자극 5일에도 뚜렷한 발현이 관찰되었다. IL-2의 경우 항원 자극 전과 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 뚜렷한 발현 밴드가 관찰되었으며 자극 3일 및 5일에도 강한 IL-2 mRNA 발현이 관찰되었고 이러한 발현 양상은 특히 각 환자의 단핵구 증식반응과 강하게 일치하였다.

반면 IL-4 mRNA 발현의 경우 항원 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 뚜렷한 IL-4 mRNA 발현이 관찰되었으나 발현강도는 자극 후 3일에 급속히 감소되어 자극 후 5일

에는 매우 약화되어 있거나 거의 관찰되지 않았다. IL-10 mRNA 발현의 경우도 항원 자극 후 6시간에 양성대조 수준의 매우 강한 IL-10 mRNA 발현이 관찰되었으나 항원 자극 후 3일에는 발현강도가 급속히 감소되어 항원 자극 5일에는 매우 미약한 발현 양상을 나타내거나 관찰되지 않았다. 자연치유매독군은 조기매독군과 만기잠복매독군에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ , IL-2R $\alpha$  및 IL-2와 같은 Th1 cytokine mRNA 발현이 매우 증가되어 있었으나 Th2 cytokine인 IL-4 및 IL-10 mRNA 발현은 항원 자극 후 매우 감소된 경향을 나타내었다.

#### 4) Southern blot hybridization에 의한 IFN- $\gamma$ 및 IL-4 mRNA의 RT-PCR 증폭밴드 확인

매독균 47 kDa 항원에 의하여 유도된 IFN- $\gamma$  및 IL-4 mRNA 발현을 digoxigenin labelled probe를 이용한 Southern hybridization으로 확인하였다 (Fig. 5). IFN- $\gamma$  및 IL-4 mRNA의 RT-PCR 증폭밴드와 일치하여 증폭된 IFN- $\gamma$  및 IL-4 cDNA의 chemiluminescent signal을 관찰할 수 있었으며 건강군의 경우 agarose gel 상에서 관찰할 수 없었던 자극 전, 자극 후 6시간 및 3일의 비교적 분명한 IFN- $\gamma$  mRNA 발현 증감을 chemiluminescent signal에 의해 관찰할 수 있었다. 그러나 조기매독군의 경우 agarose gel 상에서 관찰할 수 없었던 IFN- $\gamma$  mRNA 발현은 Southern hybridization에 의해서도 확인되지 않았다. Southern hybridization 결과는 agarose gel 상의 전기영동 결과와 일치하여 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$  mRNA 발현은 건강군과 조기매독군이 만기잠복매독군과 자연치유매독군에 비해 감소된 양상이었고 IL-4 mRNA 발현은 환자군 중 만기잠복매독군이 시간별 항원 자극에 의해 매우 증가된 양상이었다.

## 고 찰

매독 감염 후 효과적인 세포성 면역반응의 유도는 매독의 임상 증상 및 예후와 직접적인 연관성이 있을 것으로 생각되고 있다.<sup>5,8~10,17)</sup> 매독병변 부위에 대식세포 침윤이 일어난 후 곧 매독균 수의 감소가 관찰되었으며 치유된 병변 부위에서는 매독항원을 처리한 대식세포들이 다수 존재하였고 *in vitro* 실험에서 대식세포가 매독균을 탐식하여 사멸하였다는 보고들은 대식세포 활성화에 의한 적절한 세포성 면역반응의 유도가 감염조직에서 매독균 제거에 매우 중요하리라는 사실을 뒷받침하고 있다.<sup>2,3)</sup>

본 실험에서는 매독균 감염시에 다양한 매독 항원에 의해 주로 CD4<sup>+</sup> T 림프구에서 분비되어 대식세포 활성화에 의한 매독 방어면역 유도에 총체적으로 영향을 줄 것으로 생각되는 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 IL-2, 그리고 IL-2에 의한 T 세포클론 증식과 활성화에 필수적인 역할을 하는 IL-2R $\alpha$ 의 발현 및 이를 길항적으로 조절하는 Th2 cytokine인 IL-4 및 IL-10의 역동적인 발현 양상을 조사하고자 하였다. 건강인 말초혈액 단핵구에 대한 47 kDa 항원 자극 후 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R $\alpha$  mRNA의 경우 항원 자극 5일에는 발현이

매우 미약하거나 전혀 관찰되지 않아 항원특이 세포클론의 증식이 없었으며 이는 항원 자극 5일 후에도 증식지수가 낮았던 증식실험 결과와도 일치하였다. 또한 IL-4와 IL-10의 경우도 항원 자극 5일에 발현강도가 감소되어 있어서 특정 Th2 세포클론의 증식도 관찰할 수 없었다. 대상 건강인 17명 중 2명 (11.8%)의 경우에서 자극지수 4.0 이상의 약간 증가된 양상을 관찰할 수 있었으나 이 경우에도 뚜렷한 Th1 cytokine 유전자 발현은 나타나지 않았으며 47 kDa 항원 결정기 중 조직 내 fibronectin 혹은 collagen에 교차반응하는 항원 결정기에 대해 이미 잠작되어 있는 세포들의 비특이적인 반응일 것으로 생각되었다.

환자군 중 자연치유매독군은 건강군, 조기매독군 및 만기잠복매독군에 비해 항원 자극 후 단핵구 증식반응, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율 및 시간 별 IFN- $\gamma$  및 IL-2와 같은 Th1 cytokine mRNA 발현이 매우 증가되어 있었으며 T 세포클론의 활성을 나타내는 IL-2R $\alpha$ 의 발현 또한 매우 뚜렷하였고 Th2 cytokine인 IL-4 및 IL-10 mRNA 발현은 항원 자극 후 매우 감소된 경향을 나타내어 Th1 세포클론의 증식을 예측할 수 있었다. 만기잠복매독군은 자연치유매독군에 비해 항원 자극 후 시간 별 Th1 cytokine과 IL-2R mRNA 발현은 감소된 양상이었으나 일부 환자에서는 강한 IL-2 mRNA 발현이 관찰되었고 이는 단핵구 증식반응의 증감과 일치하였다. 만기잠복군은 특징적으로 Th2 cytokine인 IL-4 mRNA 발현이 증가되어 있었으며 IL-10 mRNA 발현은 항원 자극 초기에 강하게 유도되는 경향이였다. 현재 만기잠복매독군과 자연치유군은 임상적으로 증상이 나타나지 않으므로 감별진단이 매우 어렵고 단지 혈청검사상 IgM 역가가 5.0 이상으로 증가되어 있는 것으로 구분하고 있다. 본 실험 결과 자연치유군은 47 kDa 항원에 의해 강한 Th1 cytokine의 발현과 Th2 cytokine의 발현 감소를 나타내었으며 이는 상대적으로 Th1 cytokine 발현능이 약하고 IL-4 유전자 발현이 강한 만기잠복매독군에 비해 뚜렷한 감별점이 될 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 자연치유매독군 및 만기잠복매독군에 대한 치료종결군의 비교는 이루어지지 않았으나 매독 병인 및 면역기전에 대한 규명을 위해 향후 대상 환자들에 대한 보다 광범위한 연구가 이루어져야 하겠다.

매독 감염 후 약 3분의 1 가량은 자연치유로, 다른 3분의 1은 임상 증상이나 징후 없이 매독혈청 검사에만 양성을 나타내는 잠복매독으로, 또다른 3분의 1은 점진적으로 악화되어 제 3기 매독으로 진행되는 특징적인 질환 진행 양상이 보고되어 있다.<sup>4)</sup> 이 때 매독의 자연치유는 강한 지연형과민반응의 유도와, 잠복매독은 중간 정도의 지연형과민반응과, 또한 임상적 악화는 상대적으로 약한 세포성 면역반응과 항체형성 증가와 매우 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각되고 있다. 이는 세포내 기생균인 나균 감염의 경우 지연형과민반응 유도와 항체 생성에 의해 결핵양 (tuberculoid), 중간군 (borderline) 및 나종 (lepromatous) 나로 대별되는 것과 같이 매독에서도 세포매개 면역반응이 질환의 치료 혹은 악화에 주요한 영향을 미칠 것이라고 하며<sup>1~4)</sup> 따라서 CD4<sup>+</sup> T 세포가 기능적으로 Th1 아형으로

우세하게 분화되는 것은 매독 방어면역에 가장 중요한 부분 중 하나로 생각된다. 본 실험 결과 매독균 47 kDa 항원에 의한 자연치유매독균에서의 강한 IFN- $\gamma$  mRNA의 발현은 대식세포 활성화 및 지연형과민반응의 유발에 결정적으로 기여할 것으로 기대된다.

만기잠복매독균이 자연치유균에 비해 IgM 역가가 증가되어 있는 구분점에 비추어 볼 때 본 실험 결과상 IL-4 유전자 발현의 증가로 유도되는 항원특이 Th2 세포와 B 세포의 분화 증식이 주요한 역할을 할 것으로 생각된다. 항원 감작된 T 림프구에서 분비되는 IL-2는 이미 IL-1 등의 cytokine에 의해 활성화된 B 세포를 자극하여 세포분열주기의 S phase로 진행되도록 함으로써 B 세포 증식과 분화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그러나 B 림프구가 항체 생산 기능을 하는 형질세포로 최종 분화하기 위해서는 IL-4와 IL-5 등 cytokine의 도움이 반드시 수반되어야 한다. IL-4는 주로 활성화된 Th2 세포에서 분비되며 B 세포의 증식과 분화를 촉진하고 활성화 B 세포의 표면에 MHC class II 분자의 발현을 증가시키고 동시에 IgM과 IgD를 갖는 B 세포가 IgG1 혹은 IgE 등으로 중쇄전환 (heavy chain class-switching)을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.

본 실험 결과 초기매독균은 환자군 중 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현과 단핵구 증식반응이 가장 감소된 양상이었으며 건강군에 비해 약간 증가된 IL-4 및 IL-10 mRNA 발현 양상을 나타내었다. 이는 매독과 같은 만성감염증인 결핵 발병 당시에 종종 관찰되는 면역부전 상태<sup>24)</sup>, 즉 피루브산산 지연형 과민반응의 억제, 림프구 수나 비율의 감소, 특히 항원에 대한 증식능력의 결핍 및 cytokine 생성 이상, 특히 Th1 세포 증식과 기능 부전에서 비롯되는 면역반응의 조절 이상 현상<sup>25)</sup>과도 매우 유사한 결과라고 생각된다. 또한 최근 이러한 결핵환자의 말초혈액림프구에서 관찰된 Th1 반응의 감소는 성공적인 항결핵제 치료 후 전환되었다는 보고<sup>26)</sup>가 있어서 매독의 경우에도 향후 추후관찰을 통한 초기매독균의 세포성 면역반응의 추이에 대한 연구가 계속된다면 매독 병인 규명에 도움이 될 것으로 생각된다.

본 실험에서 초기매독균은 47 kDa 항원 자극 6시간부터 5일까지 다른 군에 비해 일관성 있게 IL-10 mRNA를 발현하였는데 IL-10은 Th1 cytokine 발현을 down-regulation 하는 대표적인 cytokine으로 알려져 있으며 대식세포 및 Th2 세포에서 주로 분비되며<sup>11,12,27)</sup> TGF- $\beta$ 와 함께 면역억제성 cytokine으로 T 림프구 증식을 억제하며 IFN- $\gamma$  생성을 감소시킨다고 한다<sup>11,12)</sup>. 특히 IL-4와 상승적으로 작용하여 대식세포의 사균 작용을 저해하고 NO 생성을 억제하였다고 한다<sup>28-30)</sup>. 초기매독균에서 관찰되는 IL-10의 발현은 IL-4와 함께 Th1 반응 억제와 항체 생성에 기여할 것으로 생각되며 이러한 결과는 Th1 반응의 저하와 Th2 cytokine의 상승 요인이 매독 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

이상을 종합해 볼 때 매독균 47 kDa 항원은 자연치유매독균에서 말초혈액 단핵구 증식능과 CD4<sup>+</sup> T 림프구의 발현비율의 증가 및 강한 Th1 cytokine 발현을 유도하였

던 반면 만기잠복매독균과 초기매독균에서 자연치유매독균과 차별화된 증식능 및 Th1/Th2 cytokine 발현 양상을 나타내어 치료전 매독 환자의 세포성 면역반응의 특성을 반영하며 향후 매독 예방 및 병인 규명을 위한 연구용 항원으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론

Th1 세포 활성화는 대식세포 활성화 및 지연형과민반응에 의한 매독방어면역에 있어서 중심 역할을 하며 궁극적으로 매독의 임상적 호전 혹은 악화에 밀접한 연관성을 가질 것으로 생각되고 있다. 본 연구는 매독균 47 kDa 항원에 의해 유도되는 매독의 각 임상기별 Th1 및 Th2 cytokine 발현 양상을 조사하여 47 kDa 항원에 의한 세포성 면역반응의 특성을 규명하고자 치료전 매독환자 24명의 말초혈액 단핵구를 47 kDa 항원으로 in vitro에서 각각 6시간, 3일 및 5일간 자극한 후 ① 항원특이 단핵구 증식능 ② 유세포측정에 의한 림프구 아형 분석 및 ③ IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4 및 IL-10 mRNA의 역동적인 발현 양상을 역전사효소 증합효소연쇄반응 (RT-PCR)에 의하여 반정량적으로 관찰하여 건강군 17명과 비교 분석하였다.

단핵구 증식결과 건강군은 88.2%에서 증식반응을 나타내지 않았으며 진단 초기 매독환자 중 14명 (58.3%)은 47 kDa 항원에 증식반응을 나타내지 못하는 무반응군 (Stimulation index [SI] <4)이었으며 이들의 평균 증식지수는 2.3이었다. 단핵구 증식반응자 10명 (41.7%)의 평균 증식지수는 7.2이었으며 각 임상기별로 자연치유균이 4명, 만기잠복매독과 만기선천성매독이 각각 2명 및 제 2기 매독과 치료된 매독 환자가 각각 1명이었다. 또한 47 kDa 항원 자극에 의한 건강군의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율은 2.1이었으며 환자군 중 자연치유매독균의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 비율은 4.7이었으며 건강군 및 다른 환자군에 비해 유의하게 증가된 양상이었다.

자연치유매독균은 초기매독균과 만기잠복매독균에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$  및 IL-2와 같은 Th1 cytokine 및 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현이 매우 증가되어 있었으나 Th2 cytokine인 IL-4 및 IL-10 mRNA 발현은 항원 자극 후 매우 감소된 경향을 나타내었다. 만기잠복매독균은 자연치유매독균에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ 와 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현이 감소된 양상이었으나 IL-4 mRNA 발현은 증가된 경향이었으며 초기매독균은 만기잠복매독균과 자연치유매독균에 비해 항원 자극 후 시간 별 IFN- $\gamma$ , IL-2 및 IL-2R $\alpha$  mRNA 발현이 매우 감소된 양상이었다.

이상의 결과로 매독균 47 kDa 항원은 자연치유매독균의 말초혈액 단핵구 증식능과 CD4<sup>+</sup> T 림프구의 발현비율 증가 및 강한 Th1 cytokine 발현을 유도하였던 반면 만기잠복매독균과 초기매독균에서 자연치유균과 차별화된 증식능 및 Th1/Th2 cytokine 발현 양상을 나타내었다. 따라서 치료전 매독 환자의 세포성 면역반응의 특성을 반영하며 향후 매독 예방 및 병인 규명을 위한 연구용 항원으로



사용할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Sell S, Hsu P-L: Delayed hypersensitivity, immune deviation, antigen processing and T-cell subset selection in syphilis pathogenesis and vaccine design. *Immunol Today* 14: 576-582, 1993.
- 2) Lukehart SA, Baker-Zander SA, Lloyd RM, Sell S: Effects of cortisone administration on host-parasite relationship in early experimental syphilis. *J Immunol*, 127: 1361-1368, 1981.
- 3) Baker-Zander SA, Lukehart SA: Macrophage-mediated killing of opsonized *Treponema pallidum*. *J Infect Dis* 165: 69-74, 1992.
- 4) Sell S, Norris SJ: The biology, pathology and immunology of syphilis. *Int Rev Exp Pathol* 24: 203-276, 1983.
- 5) Schell R, Marker D: Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection (1983), Marcel Dekker, New York, U.S.A.
- 6) Berry CD, Hooton TM, Collier AC: Neurologic relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in a patient with HIV infection. *N Engl J Med* 316: 1587-1589, 1987.
- 7) Johns DR, Tierney M, Felsenstein D: Alternation in the natural history of neurosyphilis by concurrent infections with human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 316: 1569-1572, 1987.
- 8) Muscher DM, Baughn RE: Syphilis, in "Immunological Diseases" 3rd Ed., eds. Samter M (1978), Brown, Boston, U.S.A.
- 9) Baseman JE, Hayes EC: Molecular characterization of receptor binding proteins and immunogens of virulent *Treponema pallidum*. *J Exp Med* 151: 573-586, 1980.
- 10) Freidman PS, Turk JL: The role of cell-mediated immune mechanisms in syphilis in Ethiopia. *Clin Exp Immunol* 31: 59-65, 1978.
- 11) Barnes PF, Modlin RL, Ellner JJ: T-cell responses and cytokines, in "Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control" eds. Bloom BR, p417-435 (1994), ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- 12) Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S: Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148: 2142-2147, 1992.
- 13) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Interleukin-2, in "Cellular and Molecular Immunology" 3rd Ed., eds. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, p266-267 (1997), W.B. Saunders Company, U.S.A.
- 14) Smith KA: The interleukin 2 receptor. *Adv Immunol* 42: 165-179, 1988.
- 15) Bloom BR, Fine PEM: The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis, in "Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control" eds. Bloom BR, p 418-423 (1994), ASM Press, Washington D.C., U.S.A.
- 16) Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM: Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis: evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72, 1989.
- 17) Voorhis WCV, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA: Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. *J Infect Dis* 173: 491-495, 1996.
- 18) Borenstein LA, Radolf JD, Fehniger TE: Immunization of rabbits with recombinant *Treponema pallidum* surface antigen 4D alters the course of experimental syphilis. *J Immunol* 140: 2415-2421, 1988.
- 19) Radolf JD, Norgard MV, Schulz WW: Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2051-2055, 1989.
- 20) Hsu PL, Qin MD, Norris S, Sell S: Isolation and characterization of recombinant *Escherichia coli* clones secreting a 24-kilodalton antigen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 56: 1135-1143, 1988.
- 21) Champion CI, Miller JN, Borenstein LA, Lovett MA, Blanco DR: Immunization with *Treponema pallidum* endoflagella alters the course of experimental rabbit syphilis. *Infect Immun* 58: 3158-3161, 1990.
- 22) Baughn RE, Jiang Aibo, Abraham R, Ottmers V, Musher DM: Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif on the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin. *J Immunol* 157: 720-731, 1996.
- 23) Georges Kohler: The response of B cells to antigen, in "Immunology. An Introduction". 4th Ed., eds. Tizard IR, p 192-214 (1995), W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A.
- 24) Ellner JJ: Regulation of the human cellular immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. The mechanism of selective depression of the response to PPD. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 66: 129-132, 1991.
- 25) Moreno C, Rees AJ: Striking the right balance: the

- role of cytokines in mycobacterial disease. Clin Exp Immunol 94: 1-3, 1993.
- 26) Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF: T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 63: 3231-3234, 1995.
- 27) Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modilin RL: Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. J Immunol 150: 5501-5510, 1993.
- 28) Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by the reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J Exp Med 175: 1111-1122, 1992.
- 29) Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. J Immunol 148: 1792-1796, 1992.
- 30) Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL: IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. J Immunol 148: 3578-3582, 1992.
-