결핵 환자의 자연살해세포 매개 세포파괴능

가톨릭의과대학 내과학교실

문화식 · 김훈교 · 김호연 · 박성학 · 김춘추 · 김동집 · 변해원

= Abstract =

Natural Killer Cell Mediated Cytotoxicity in Tuberculosis Patients.

Hwa Sik Moon, M.D., Hoon Kyo Kim, M.D., Ho Youn Kim, M.D., Sung Hak Park, M.D.,
Choon Choo Kim, M.D., Dong Jip Kim, M.D., Hae Won Byun, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic Medical College, Seoul, Korea.

The tuberculosis is one of the diseases related with cellular immune reaction. Recently natural killer cells (NK cells) are highlighted as one of the cells related to immune surveillance.

In order to observe the relationship between tuberculosis and NK cell activity, authors studied natural killer cell mediated cytotoxicity (NKMC) in adult patients with active pulmonary tuberculosis (n=44) and healthy controls (n=11). The patients were divided into three groups according to the extent of disease, i.e., minimal (n=15), moderately advanced (n=16) and far advanced pulmonary tuberculosis (n=13).

Standard ^{51}Cr release assay was used for the assessment of NKMC between K562 cell line (target cells) and nonadherent peripheral blood mononuclear cells obtained from patients (effector cells).

The results were as follows :

- 1) In healthy controls, the mean NKMC was $42 \pm 7.1\%$ in effector/target cell, 50 : 1 and $21 \pm 4.0\%$ in 25 : 1.
- 2) In active pulmonary tuberculosis patients, the mean NKMC was $23 \pm 4.7\%$ in effector/target cell, 50 : 1 and $17 \pm 3.9\%$ in 25 : 1.
- 3) The mean NKMC of active pulmonary tuberculosis patients was significantly lower than that of controls in 50 : 1 and 25 : 1.
- 4) There was no significant difference in the mean values of NKMC among the minimal, moderately advanced and far advanced pulmonary tuberculosis patients in 50 : 1 and 25 : 1.

Depressed NKMC in tuberculosis patients suggests that NK cell is related to the cellular immune reaction of tuberculosis. It is not clear whether depressed NKMC in tuberculosis patients is directly related to cell mediated immune reaction in tuberculosis or sequela, and further study is necessary to understand our results.

* 이 논문의 요지는 1981년 11월 7일 대한결핵협회 제5차 결핵학술대회에서 발표하였음.

** 이 논문은 1981년도 가톨릭중앙의료원 학술연구 보조비로 이루어진 것임.

서 론

Koch의 결핵균 발견이후 결핵은 감염병중 세포성 면역반응이 관여하는 대표적 질환으로 많은 연구의 대상이 되었으며 결핵환자에서 세포성 면역능의 저하는 여러 보고자들에 의해 확인된 바 있다.

세포성 면역반응에 관여하는 세포계는 단핵구-대식구(monocyte-macrophage), 흉선의존 임파구(T세포), 항체의존성 세포파괴능(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)의 살해세포(killer cell, K세포) 및 자연살해세포 매개 세포파괴능(natural killer cell mediated cytotoxicity, NKMC)의 자연살해세포(natural killer cell, NK세포)로 알려져 있으므로 결핵환자의 세포성 면역능을 평가하기 위해서는 이들 세포계를 총괄하여 관찰하여야 한다.

최근 논의되고 있는 NK세포는 항원에 대한 감각이나 항체의 매개없이 직접 표적세포를 파괴하는 세포로서 숙주면역감시능 및 이식편에 대한 거부반응에 관여하는 세포로 알려져 있다^{1,2)}. 저자들은 결핵환자에 있어서, 세포성 면역반응에 관여하는 세포계중의 하나인 NK세포의 세포파괴능을 조사하여 몇가지 성적을 얻었기에 이를 일차 보고하고자 한다.

실험대상 및 방법

1) 대 상

1981년 6월부터 10월까지 가톨릭의대부속 성모병원과 성바오로병원에서 세균학적 검사방법에 의하여 활동성 폐결핵으로 확진된 환자 44예(중증 15명, 중등증 16명, 경증 13명, 남자 26명 및 여자 18명, 평균연령 42세)와 정상인 11명(남자 6명 및 여자 5명, 평균연령 37세)을 대상으로 하였다.

2) 실험방법

(1) 표적세포

Lozzio들³⁾이 만성 골수성 백혈병 환자의 늑막삼출액에서 얻은 K562 세포(김윤범 교수: Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, New York, USA로부터 분양받음)를 RPMI 1640-10% FCS(fetal calf serum)가 포함된 "complete media"에서 배양을 계속하며 필요시 사용하였다.

(2) 작동세포

대상자의 상완정맥에서 헤파린으로 처리된 주사기로 15ml를 채혈하여 이를 동량의 생리적 식염수로 희석한

후 Ficoll-Hypaque가 들어있는 시험관에 얹은 다음 20°C에서 원심분리한 후(400×g, 45분) 중간층을 채집하여 Hank's balanced salt solution(HBSS, PH7.2)으로 3회 세척한 다음 "adherent cell"을 제거하기 위해 "plastic tissue culture flask" (Falcon No. 3024)에서 1시간 이상 배양기에 방치하고 재수집하여 작동세포로 사용하였다.

(3) 세포파괴능 검사

Kim들⁴⁾의 표준방사능 ⁵¹Cr유리법을 저자들은 수정하여 사용하였다. 그 방법은 다음과 같다.

① K562세포를 배양액 0.2ml에 10⁷의 비율로 부유시킨 다음 방사능 sodium chromate(Na₂⁵¹CrO₄) 150μCi를 첨가하였다. ⁵¹Cr량을 증가하여 사용한 이유는 표적세포 1개당 1 cpm(counts per minute) 정도의 "tagging"을 위해서이다.

② 37°C에서 1시간 동안 방치한 다음 HBSS로 3회 세척한다.

③ 표적세포(10⁴)를 0.1ml의 비율로 배양액에 재부유시킨 후 이를 "round-bottom microplate" (Limbro Scientific No. 76-013-05, Hamdon, Conn, U.S.A.)에 작동세포의 비율을 정하여 (25×10⁴/0.1ml-50×10⁴/0.1ml) 각각 동량을 첨가한다.

④ 한개의 "well"의 배양액 총량은 0.2ml되게 하며 작동세포와 표적세포의 비율(E:T)은 25:1 및 50:1로 하였다. 작동세포수가 적을 경우 세포파괴능의 정도가 약하여 입상에 응용하기에는 차이가 적고 100:1 이상을 사용할 경우 채혈량이 많아야 하는 단점이 있었다.

⑤ "Microplate"를 3분간 흔들어(50×g) 작동세포와 표적세포가 잘 접촉되도록 한 다음 4시간 동안 배양기(5% CO₂와 95%의 습한 공기로 조절된)에 방치한다.

⑥ 4°C에서 15분간 이를 원심분리(200×g)한 후 상층액 0.1ml를 얻어 자동방사능 측정기로 측정하였다.

각 실험은 4배수(quadruplicate)로 실시하였으며 NKMC(%)는 다음과 같이 계산하였다.

% specific release =

$$\frac{\text{mean cpm of experimental release} - \text{mean cpm of spontaneous release}}{\text{mean cpm of maximal release} - \text{mean cpm of spontaneous release}} \times 100$$

최고유리(maximal release)는 전체방사능 흡수량의 90% 이상이었고 Triton-X-100 1%용액을 가하여 얻었다. 자연유리(spontaneous release)는 최고유리의 10% 이내였고 작동세포를 가하지 않고 배양액과 표적세포만 넣어 구하였다.

실험 성적

1. 정상인(11명)의 평균 NKMC는 작동세포의 비율이 25 : 1인 경우 $21 \pm 4.0\%$ 였고 50 : 1인 경우 $42 \pm 7.1\%$ 로 작동세포를 배가하였을 때 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$).

2. 폐결핵환자(44명)의 평균 NKMC는 25 : 1인 경우 $17 \pm 3.9\%$ 이었고 50 : 1인 경우 $23 \pm 4.7\%$ 로 작동세포를 배가하였을 때 역시 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$).

3. 정상대조군에 비해 폐결핵환자군의 NKMC는 현저한 감소를 보였다(25 : 1; $p < 0.01$, 50 : 1; $p < 0.01$).

Table 1. Comparison of NKMC in Tuberculosis Patients with Controls.

	No. of Cases	E/T ratio*	NKMC (%)**
Controls	11	25 : 1	21 ± 4.0
		50 : 1	42 ± 7.1
Tuberculosis Patients	44	25 : 1	17 ± 3.9
		50 : 1	23 ± 4.7

* Effector cell : Target Cell Ratio

** Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

Fig. 1. Comparison of NKMC in Tuberculosis Patients with Controls.

Table 2. Results of NKMC According to the Classification of Pulmonary Tuberculosis.

Classification	No. of Cases	E/T ratio*	NKMC (%)**
Far Advanced	15	25 : 1	17 ± 4.7
		50 : 1	23 ± 5.1
Moderately Advanced	16	25 : 1	17 ± 3.8
		50 : 1	23 ± 3.7
Minimal	13	25 : 1	17 ± 2.7
		50 : 1	23 ± 5.3

* Effector Cell : Target Cell Ratio

** Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

이상의 성적은 그림 1과 표 1에서와 같다.

4. 경증, 중등증 및 중증환자군의 평균 NKMC는 각각 25 : 1에서 17 ± 2.7 , 17 ± 3.8 , $17 \pm 4.7\%$ 이었고 50 : 1에서 23 ± 5.3 , 23 ± 3.7 , $23 \pm 5.1\%$ 로 결핵정도의 경증간에는 유의한 차이가 없었다(25 : 1; $p > 0.01$, 50 : 1; $p > 0.01$) (표 2).

고 찰

결핵균에 감염되면 숙주가 결핵균에 대하여 저항력을 갖게되어 대부분 자연치유가 되나 그들중 일부가 활동성 결핵으로 진전하는 것은 잘 알려진 사실이다. 이렇게 결핵균에 감염된 숙주중 일부만이 활동성 결핵으로 진전하는 이유는 불명하나 세포성 면역이 관여한다고 많은 학자들이 생각하고 있으며 결핵환자의 세포성면역상태를 평가하므로써 진단, 치료 및 예후판단에 응용하고자 많은 연구가 진행되고 있다⁵⁾.

결핵환자의 세포성 면역능을 평가하기 위하여 현재까지는 단핵구-대식구와 T세포가 많은 연구의 대상이 되었다. 결핵환자에서 T세포의 숫적감소와 기능저하는 여러 보고자들에 의하여 확인되었다^{6,7,8)}.

세포성 면역능의 저하요인으로 억제세포(suppressor cell)의 존재 가능성이 논의된 이후^{9,10)} IgG의 Fc수용체를 갖는 억제 T세포(suppressor T cell, Ts세포)의 관여가 보고되었으며^{11,12,13)} Wade^{14,15)}은 비특이 억제 세포로 작용하는 단핵구로부터의 억압인자(suppressor factor)가 Ts세포를 활성화한다고 발표하였다. 또한 억압인자로서 prostaglandin (PG)의 참여가 제시되었으며¹⁶⁾, 이는 단핵구 세포막 수용체의 활성화에 의해 생성되고 T세포 유약화반응을 억제한다고 하였다^{17,18)}. 최근 Kleihenz¹⁹⁾들은 결핵균 항원을 첨가하여 정상인의 단핵구와 임파구를 혼합배양한 결과, T세포의 기능저하를 관찰하였으며 이는 단핵구로부터 생성된 PG에 의

한 것이라고 주장하였다. 이상과 같이 결핵환자에서 단핵구-대식구와 T세포에 관한 연구는 광범위하게 진행되었다. 그러나 세포성 면역반응에 관여하는 세포계로는 단핵구-대식구와 T세포외에 K세포와 NK세포가 알려져 있으며 결핵환자의 세포성 면역상태를 평가하기 위해서는 이들 세포계를 총괄하여 연구하여야 한다.

최근 논의되고 있는 NK세포는 골수에서 생산되고 생쥐배아난황낭에서 10일경에 관찰되는 세포로 Fc수용체와 C₃수용체 (40%)를 보유하고 있다^{20,21}. 항원에 대한 감각이나 항체의 매개없이 표적세포를 직접 파괴한다는 점에서 K세포 및 T세포와 다르며 유리벽에 부착하지 않는 세포(nonadherent cell)라는 점에서 단핵구-대식구와 구별된다.^{22,23} 사람의 NK세포가 어느 세포계에 속하는지는 논란이 많으나 저온(4°C)에서 E-rosette형성능을 가진 점과 "nude-mice"의 NK세포에 Thy-1 항원이 있는 것으로 미루어 Pre-T세포계열로 추정되며 숙주 방어기전에서 최일선을 담당하고 있는 것으로 생각되어지고 있다^{24,25}.

NK세포가 종양면역 및 이식면역학적 측면에서는 많은 연구가 있었다^{1,2}, 세포성 면역반응이 관여하는 결핵과 NK세포와의 관계를 규명하고자 저자들을 활동성 결핵환자의 NKMC를 K562세포를 표적세포로 하여 표준 방사능유리검사법은 통해 실험하였다.

저자들의 성적에서 활동성 결핵환자의 NKMC는 대조군에 비해 현저한 감소를 보였으나, 결핵분류에 따른 경증, 중등증 및 중증 폐결핵환자군 상호간의 NKMC는 유의한 차가 관찰되지 않았다.

현재까지 NKMC감소요인에 대한 가설은 많고 정설은 확립되어 있지 않으나 Roder들²⁶은 NK세포내의 3',5'-adenosine monophosphate의 증가를 제시하였고 Brunda들²⁷은 실험동물에 PG투여후 NKMC의 저하를 관찰하였다. 또한 Tracey들²⁸은 실험동물에 BCG주입으로 활성화된 대식구로부터 유리되는 PGE₂에 의하여 NKMC가 저하되며 PG합성억제약을 투여시 증가된다고 하였다.

저자들은 본 실험을 통해 활동성 결핵환자에서 NK세포의 기능이 감소되어 있다는 사실을 알게 되었으나 결핵환자의 NKMC저하가 결핵발병의 원인이 되는지 혹은 결과인지 알 수 없으며 앞으로 이에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다. 저자들을 현재 항결핵제의 치료로 비활동성화한 결핵환자의 NKMC를 추시중이며 조속한 시일내에 이를 종합하여 보고하고자 한다.

결 론

K562세포를 표적세포로한 표준 방사능 ⁵¹Cr유리검 방법으로 활동성 결핵환자군(중증 15명, 중등증 16명, 경증 13명)과 정상대조군(11명)을 대상으로 NKMC를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상대조군의 NKMC는 작동세포와 표적세포의 비율 25 : 1 및 50 : 1로 실시하였던 바 양자간에 유의한 차가 있었다($p < 0.01$).
2. 활동성 폐결핵환자군의 NKMC도 작동세포를 배가 하였을때 NKMC가 현저히 증가되었다($p < 0.01$).
3. 활동성 폐결핵환자군의 NKMC는 작동세포와 표적세포의 비율에 관계없이 정상대조군에 비해 현저히 감소하였다(25 : 1; $p < 0.01$, 50 : 1; $p < 0.01$).
4. 폐결핵의 분류에 따른 환자군간의 NKMC는 작동세포와 표적세포의 비율에 관계없이 유의한 차가 없었다(25 : 1; $p > 0.01$, 50 : 1; $p > 0.01$).

※ 본 실험을 위해 수고해 주신 임상의학연구소 임상면역부 이현주양에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Lopez, C., Kirkpatrick, D., Sorell, M., O'Reilly... R.J. & Ching, C.: Association between pre-transplant natural killer and graft-versus-host disease after stem-cell transplantation. *Lancet*, 1103, 1979.
2. 김동집, 김춘추, 한치화, 박종원, 김훈교, 김호연, 김원일, 이연태: 암환자의 세포성 면역. II. 자연살해세포 매개 세포파괴능의 변동. *대한내과학회잡지*, 24:461-465, 1981.
3. Lozzio, C.B., Lozzio, B.B., Yang, W.K., Ichiki, A.T. & Bamberger, E.G.: Absence of thymus-derived lymphocyte markers in myelogenous leukemia (Ph⁺) cell line K-562. *Cancer Res.*, 36:4657, 1976.
4. Kim, Y.B., Huh, N.D., Koren, H.S. & Amos, D.B.: Natural killing(NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in specific pathogen-free (SPF) miniature swine and germfree piglets. *J. Immunol.*, 125:755, 1980.
5. 박성학: 결핵환자 임프구의 Purified Protein Derivatives 자극반응: 가톨릭의대논문집, 33:59, 19

6. 김정규 : 결핵환자의 말초혈액내의 T Cell. 가톨릭 의대논문집, 26:83, 1974.
7. 최응규, 변해원, 박태수, 김희숙 : 폐결핵환자에서의 Rosette-Forming Lymphocytes수에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환, 24:85, 1977.
8. 변해원, 박성학, 김동집 : 결핵환자의 임상적 변형과 면역반응에 관한 연구 : 대한 내과학회잡지, 22:18, 1979.
9. Ellner, J.J. : Suppressor adherent cells in human tuberculosis. J. Immunol., 121:2573, 1978.
10. Klimpel, G.R. & Henney, C.S. : BCG-induced suppressor cells. I. Demonstration of a macrophage-like suppressor cell that inhibits cytotoxic T cell generation in vitro. J. Immunol., 120:563, 1978.
11. Katz, P., Goldstein, R.A. & Fauci, A.S. : Immunoregulation in infection caused by mycobacterium tuberculosis; The presence of suppressor monocytes and the alteration of subpopulation of T lymphocytes. J. Infect. Dis., 140:12, 1979.
12. Nakamura, R.M. & Tokunaga, T. : Induction of suppressor T cells in delayed-type hypersensitivity to mycobacterium bovis BCG in low-responder mice. Infect. Immune., 28:331, 1980.
13. Tsuyugushi, I., Shiratsuchi, H., Teraoka, O. & Hirano, T. : Increase in T cells bearing IgG Fc receptors in peripheral blood of patients with tuberculosis by in vitro stimulation with purified protein derivatives. Am. Rev. Respir. Dis., 121:951, 1980.
14. Wade, A.A. Sher, R. & Rabson, A.R. : Production of a suppressor factor by human adherent cells treated with mycobacteria. J. Immunol., 125:1380, 1980.
15. Wade, A.A. & Rabson, A.R. : Production of a suppressor factor by adherent cells from mycobacterium tuberculosis-infected guinea-pigs. Clin. Exp. Immunol., 45:427, 1981.
16. Goodwin, J.S., Bankhurst, A.D. & Messner, R. P. : Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. J. Exp. Med., 146:1719, 1977.
17. Passwell, J.H., Dayer, J.M. & Merler, E. : Increased prostaglandin production by human monocytes after membrane receptor activation. J. Immunol., 123:115, 1979.
18. Ellner, J.J. & Spagnuolo, P.J. : Suppression of antigen and mitogen induced human T lymphocyte DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide : Mediation by monocyte activation and production of prostaglandin. J. Immunol., 123:2689, 1979.
19. Kleinhenz, M.E., Ellner, J.J., Spagnuolo, P.J. & Daniel, T.M. : Suppression of lymphocyte responses by tuberculosis plasma and mycobacterial arabinogalactan. J. Clin. Invest., 68:153, 1981.
20. Stutman, O., Paige, C.J. & Figarella, E.F. : Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. I. Strain and age distribution and target cell susceptibility. J. Immunol., 121:1819, 1978.
21. Dahl, C.A. : Natural cytotoxicity in the mouse embryo. I. Evidence for the presence of natural cytotoxic function in the yolk sac of the 10-day mouse embryo. J. Immunol., 125:1924, 1980.
22. Timonen, T., Ranki, A., Saksela, E. & Häyry, P. : Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. Cell. Immunol., 48:121, 1979.
23. Masucci, G., Poros, A., Seeley, J.K. & Klein, E. : In vitro generation of K562 killers in human T-lymphocyte subsets. Cell. Immunol., 52:247, 1980.
24. Kay, H.D., Bonnard, G.D., West, W.H. & Herberman, R.B. : A functional comparison of human Fc-receptor-bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol., 118:2058, 1977.
25. Mattes, M.J., Sharrow, S.O., Herberman, R.B. & Holden, H.T. : Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol., 123:2851, 1979.
26. Roder, J.C. & Klein, M. : Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. J. Immunol., 123:2785, 1979.

27. Brunda, M.J., Herberman, R.B. & Holden, H. T. : Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandin. J. Immunol., 124:2682, 1980.
28. Tracey, D.E. & Adkinson, N.F. : Prostaglandin synthesis inhibitors potentiate the BCG-induced augmentation of natural killer cell activity. J. Immunol., 125:136, 1980.
-