

중증 기관지천식 환자의 말초단핵구에서 자연살해세포의 비율과 자연살해세포에서 interferon gamma의 생산

이화여자대학교 의과대학 내과, 이화여대 의과학연구소 면역학부, 미즈메디 병원*, 춘천의료원**

천은미 · 김미선 · 장윤희* · 박성숙** · 조영주

The production of interferon gamma by natural killer(NK) cells and proportion of NK cells in peripheral blood mononuclear cells in patients with severe bronchial asthma

Eun-Mi Chun, Mi-Sun Kim, Yoon-Hae Chang*, Sung-Sook Park** and Young-Joo Cho
Ewha Womans University College of Medicine, Ewha Womans Medical Research Center
Department of Internal Medicine, MizMedi Hospital*, Chuncheon Medical Center**

Background and objective : The natural killer (NK) cells which play an important role in defense immune system are supposed to be involved in the pathogenesis of bronchial asthma. The goal of this study is to analyze the role of NK cells in the pathogenesis of bronchial asthma by examining the proportion of NK cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and production of interferon gamma (IFN- γ) in NK cells between normal group and asthmatic group.

Methods : Ten patients with moderate to severe persistent asthma sensitive to house dust mite were enrolled as asthmatic group. PBMCs were activated by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and calcium ionophore for 18 hours. Surface CD3 and CD56 antigens with intracytoplasmic IFN- γ staining were performed simultaneously and the results were analyzed by three color flow cytometer.

Results : The percentage of CD56⁺ positive NK cells in PBMCs from asthma group was lower compared to control group ($15.4 \pm 3.9\%$ vs $19.8 \pm 4.5\%$). However, There was no significant difference of IFN- γ production in CD56⁺ NK cells between two groups ($30.3 \pm 3.9\%$ vs $25.9 \pm 5.8\%$, $p > 0.05$). IFN- γ producing CD3⁺ T cells were significantly higher in asthma group compared with normal control group ($36.3 \pm 1.8\%$ vs $28.4 \pm 5.7\%$, $p < 0.05$). The ratio of TNK cells expressing both CD56 and CD3 was not different between asthma group and control group ($4.7 \pm 1.4\%$ vs $5.9 \pm 1.8\%$, $p < 0.05$).

본 연구는 1997년 10월-1998년 9월 이화여자대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어 졌음. 1999년 한일 알레르기학회에서 대한천식 및 알레르기학회의 travel grant 지원으로 발표되었음.

통신저자 : 이대목동병원 내과 조영주

서울시 양천구 목동 911 (우 158-050)

e-mail : yjcho@mm.ewha.ac.kr

접수 : 2000년 2월 22일, 통과 : 2000년 4월 25일

Conclusion : The results suggest that aggravation of asthma symptoms in severe asthma may be caused partly by decrease in NK cells. The increased production of IFN- γ in asthma patients suggest that IFN- γ may function as inflammatory cytokine.

Key words : NK cells, Intracytoplasmic IFN- γ , severe asthma

서 론

기관지천식은 다양한 자극에 대한 기도과민성을 특징으로 하는 만성적인 알레르기 질환이다. 기관지천식 환자의 기도점막은 림프구와 호산구의 침착이 두드러지며^{1,2)} 이들 세포는 다양한 사이토카인을 분비하여 염증반응의 직접적인 매개체로 작용하고 있다. T 세포는 외부의 항원을 직접 인지하여 염증반응에 관여하며 T 세포의 특이 아형들이 호산구를 활성화시켜 천식을 유발하는 것으로 알려졌다³⁾. 알레르기환자는 CD4⁺ T 세포의 클론 중 Th1 보다는 Th2 클론이 우세하며 Th2 클론에서 생산되는 interleukin 4 (IL-4)는 B세포가 IgE를 생산하는 형질세포로의 전환을 유도하여 IgE 생산을 조절한다고 알려졌다⁴⁾. CD4⁺ T 세포를 Th1 혹은 Th2 클론으로 분화 성숙시키는 것은 초기 증식시에 노출되는 사이토카인들에 의해 결정된다. 즉 gamma interferon (IFN- γ)는 Th1 세포로의 분화를 유도하고 IL-4는 Th2 클론으로 분화를 유도한다는 의미로 세포클론의 형성시기에 주위의 어떠한 사이토카인이 얼마만큼 존재하는가가 중요한 인자가 됨을 알 수 있다^{5,6)}. 하지만 최근에는 기관지천식의 근간이 되는 알레르기염증 반응이 IgE에 의한 반응외에도 다양한 염증세포의 관여가 중요하며 IFN- γ 같은 염증에 관여하는 사이토카인이 기도의 염증반응에 관여한다는 보고도 있다^{7,8)}. 따라서 최근에는 CD4⁺ 세포 이외에 다양한 사이토카인을 생산해 내는 CD8⁺ 세포와 자연살해세포 (Natural killer cell: 이하 NK 세포)에 대한 관심이 높아지고 있다⁹⁾.

NK 세포는 주로 감염질환에서 MHC-비제한적 혹은 항체의존성 세포독성작용(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: 이하

ADCC)으로 표적세포를 살해하는 등의 방어기전에 중요한 역할을 한다¹⁰⁾. 이외에도 감염에 대한 T 세포 반응조절, 암세포의 파괴, 조혈작용 그리고 B 세포에 대한 면역글로불린의 합성조절에 대한 역할 등이 있다¹¹⁻¹³⁾ 이러한 다양한 기능들은 세포에서 생성되는 여러 사이토카인에 의하여 조절되고 있으며 NK 세포에서 생성되는 IFN- γ 는 Th1 혹은 Th2 면역반응의 결정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{14, 15)}. 사람의 NK 세포는 CD56과 CD16 표현형에 따라 두가지형으로 나눌 수 있다. 대부분의 말초혈액내의 NK 세포는 CD56을 낮게 발현하고 높은 CD16 (CD56^{dim} CD16^{bright})을 발현하며 강한 세포독성을 보이지만 사이토카인에 대한 증식반응은 매우 적다. 반면 CD56을 높게 발현하고 낮은 CD16 (CD56^{bright} CD16^{dim})을 발현하는 NK 세포는 말초 혈액내 10%내외로 비교적 낮은 세포독성을 보이지만 아주 강하게 IL-2나 IL-15 자극에 증식하는 특성이 있다¹⁶⁾. 알레르기 반응에서의 NK 세포의 역할은 고유의 세포독성에 의한 기보다는 IFN- γ 등의 사이토카인 생성에 의한 역할이 더 중요하다는 가설이 지배적이다. NK 세포는 주로 IFN- γ , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), GM-CSF, IL-5 등의 사이토카인을 생산하며 Th2 세포에서도 생성되는 GM-CSF는 IL-5와 함께 알레르기성 염증반응의 주요 세포인 호산구의 분화 및 성숙에 중요한 역할을 한다¹⁷⁾. 최근 마우스에서 제한적으로 성숙한 임파구 일부 분획 중 NK표지자와 T세포 표지자를 발현하는 세포가 발견되어 이들을 TNK 세포라 명명하였다¹⁸⁻¹⁹⁾. 이들의 기원은 전형적인 NK 세포와는 달리 흉선에서 기원한다고 생각되며 생체내와 생체외의 여러가지 자극에

대해 IL-4를 포함한 사이토카인을 생산하는 특징이 있다²⁰⁾. TNK세포는 주로 IL-4를 생성하여 Th2 세포계로의 분화 및 성숙을 유도하여 알레르기성 염증반응에서 주요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다.

본 연구는 기관지천식 등 알레르기성질환의 병인을 규명하고자 면역계의 방어 및 독성작용을 하면서 다양한 사이토카인을 생성하는 NK 세포의 역할을 밝히기 위해 고안되었다 이를 위해 일차적으로 비교적 기관지내 염증도가 증가된 중등도 이상의 기관지천식과 정상인에서 NK 세포 및 TNK 세포의 말초단핵구내의 비율과 세포표면 항원과 세포형질내 IFN- γ 동시측정을 통하여 이들 세포에서의 IFN- γ 의 발현정도를 비교 분석하였다.

연구대상 및 방법

A. 연구대상

이대목동병원에 기관지천식 발작으로 입원한 기왕력이 있는 환자로 한국의 기관지천식 치료지침서²¹⁾ 기준, 중등도 이상을 대상으로 하였다. 피부반응시험과 흉부 X-선 사진, 폐기능 검사를 시행하여 집먼지진드기 (Dermatophagoides pteronyssinus)에 히스타민대조 3⁺이상의 양성을 보이고, 흉부 X-선 사진 상 정상이며 외래 내원당시 증상이 호전되어 1초간 최대호기속도 (forced expiratory volume for one second: FEV₁)가 정상기대치의 75% 이상인 환자 10명을 대상으로 하였다. 채혈당시 기관지 확장제를 경구복용하거나 흡입하고 있었으며 고용량의 스테로이드 흡입제를 사용하고 있었다.

정상 대조군으로는 최근 6개월 이상 호흡기증세가 전혀 없었던 10명의 정상지원자를 대상으로 하였다. 기관지천식 환자군의 평균 연령은 30 $\pm$ 6세로 정상대조군의 29 $\pm$ 8세와 유의한 차이가 없었으며, 폐기능검사에서는 기관지천식 환자군의 FEV₁이 80.4 $\pm$ 15.2%, 정상군이 95.3 $\pm$ 10.2%로 역시 통계적인 유의성은 없었다. IgE

는 천식군은 265.5 $\pm$ 65.8 IU/ml, 정상대조군은 13.3 $\pm$ 9.5 IU/ml로 기관지천식 환자군에서 높았다 (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of subjects

	Age (year)	FEV ₁ (%)	IgE(IU/ml)
Asthma group	30 $\pm$ 6	80.4 $\pm$ 15.2	265.5 $\pm$ 65.8*
Control group	29 $\pm$ 8	95.3 $\pm$ 10.2	13.3 $\pm$ 9.5

* p < 0.05: statistical significance vs. control
FEV₁: forced expiratory volume for 1 second, % of predicted value for age and height

B. 연구방법

1. 혈액에서 말초단핵구(peripheral blood mononuclear cells) 분리 및 배양

Heparin으로 처리된 주사기로 채혈된 말초혈액을 Boyum에 의한 Ficoll-Hypaque 중층 원심법에 의하여 말초단핵구를 분리하였다²²⁾. 배양은 1 $\times$ 10⁶/ml의 농도로 RPMI 1640 media에 부유시켜 세포농도를 1 $\times$ 10⁶/ml로 조절하여 분리된 세포는 5%의 fetal calf serum (Gibco, USA), 50U/ml penicillin, 50 μ g/ml의 streptomycin과 1%(w/v)의 4.5mM L-glutamine이 보강된 IMDM배지 (Gibco, USA)에서 5% CO₂, 95% air의 배양기에서 배양하였다. 이때 polyclonal activator로 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Sigma, USA.)와 calcium ionophore: ionomycin (Sigma, USA)을 배양 시작시 첨가하였다. 배양 시작 2시간째에는 세포내에서 생성된 사이토카인이 유출되는 것을 막기 위하여 동시에 Pharmingen사 canada fix-perm kit에서 제공된 세포형질내 단백질이동억제제 (intracellular protein transport inhibitor)로 처리하였다.

2. Flow cytometry를 이용한 세포내 사이토카인 및 세포표면형 동시분석

가) 항체준비

염색완충액은 1%의 bovine serum albumin

(BSA)와 0.1%의 sodium azide를 첨가한 phosphate buffered solution (PBS) (Sigma, USA) 용액으로 하였다. 모든 항체들은 Pharmingen (Canada)사의 제품을 사용하였다. IFN- γ 는 fluorescein thiocyanate (FITC)가 접합된 항-IFN- γ 항체 (mouse IgG1)를 IL-4는 phycoerythrin (PE) 혹은 FITC가 접합된 항-IL-4 항체 (mouse IgG)를 사용하였다. 항-CD3 (mouse IgG2a'k) 항체, 항-CD56 항체 (mouse IgG)는 모두 cy-Chrome (Cy) 혹은 PE가 접합된 항체를 사용하였다. 음성대조를 위해서는 isotype인 mouse IgG 항체를 사용하였다.

나) 세포표면항원 및 세포형질내 사이토카인의 염색

세포표면 및 세포형질내 사이토카인은 삼중 염색을 하였으며 모든 반응은 microtiter wells (10^6 cells/well)에서 시행하였다. 세포표면항원의 염색을 위해서는 세포를 세정 후 50μ l의 Cy와 PE가 접합된 항 CD3, 항 CD56 항체를 넣어 5분간 상온에서 처리 후 2회 세척하였다. 세포 형질내 항원 (사이토카인)은 조 등²³⁾의 방법을 변형하여 Pharmingen사의 Fix-perm kit를 사용하여 시행하였다. 즉 세포표면의 염색이 끝난 후 세포들을 fix 용액을 첨가하여 15분간 상온에서 방치시켜 세포표면을 고정시킨 후 permeabilization 용액을 넣어 15분간 방치하여 세포의 투과성을 높이고 2회 세척하였다. 다음 FITC 나 PE가 결합된 IL-4 및 IFN- γ 항체 50μ l를 넣고 30분간 항온 정지시킨 후 2회 세척하였다.

다) Flow cytometry에 의한 분석

Flow cytometry는 FACSCaliber (Becton Dickinson, San Jose, CA) 기계를 사용하였다. 모든 실험은 1회의 분석에 20,000개의 세포를 Cell Fit program으로 세포의 획득 및 분석을 하였다. FITC, PE 혹은 Cy를 접합시킨 마우스 IgG로 염색한 음성대조를 기준으로 전체 림프구 중 각각 항원 및 사이토카인의 양성세포의 percentage로 비교하였다.

라) 통계 분석

실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차 (mean $\pm$ SD)로 표시하였고, Macintosh 의 Statview program을 이용하여 두 군과의 비교는 Student's t-test를 시행하였고 산출된 p 값이 0.05미만인 경우를 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

연구 결과

1. CD3⁺ 세포(T 세포)의 비율 및 사이토카인 발현

말초단핵구중 forward scatter와 side scatter 상 단구세포 (monocyte)를 제외하고 일반적인 림프구 보다 forward scatter 상 크기가 큰 세포까지 포함한 세포 중 T 세포의 비율은 환자군에서는 $68.3 \pm 5.9\%$ 로 정상대조군의 $76.8 \pm 7.3\%$ 와 차이가 없었다. 활성화 후 세포내 IFN- γ 를 생산하는 CD3⁺세포의 시간의 경과에 따른 발현의 변화를 보기 위하여 처음 3번의 실험은 배양 시작 후 6시간 간격으로 48시간까지 배양하여 각각의 배양시간대에 따른 발현을 분석하였는데 배양 12시간 이후부터 증가하기 시작하여 18시간에 가장 높은 발현률을 보여 다음의 실험은 배양 18시간에 세포를 획득하여 분석하였다 (Fig. 1).

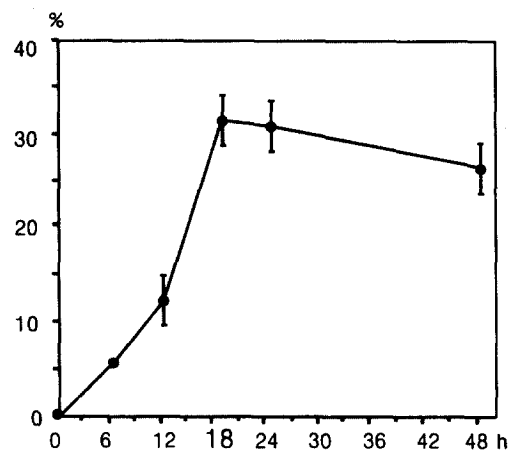


Fig. 1. Kinetics of induction of IFN- γ in CD3⁺ T cells after activation with TPA+calcium ionophore.

Values are mean $\pm$ SEM of three experiments

CD3를 발현하는 세포만 선택 (gating)하여 세포내 IFN- γ 가 양성인 비율을 분석한 결과 IFN- γ 를 생산하는 CD3⁺세포는 환자군에서 $36.3 \pm 1.8\%$ 로 정상대조군의 $28.4 \pm 5.7\%$ 에 비해 유의하게 증가되어 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

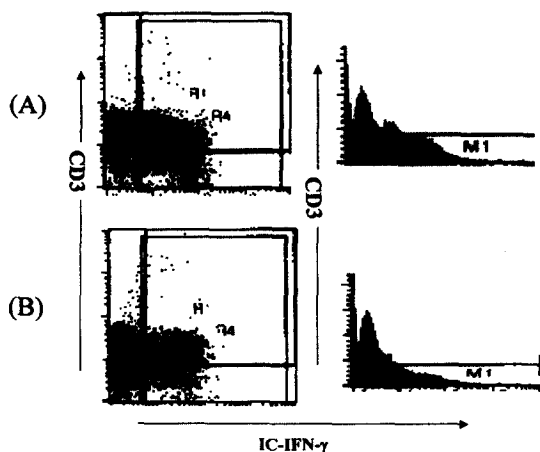


Fig. 2. Surface expression of CD3 and intracytoplasmic (IC) expression of IFN- γ on lymphocytes from bronchial asthma and normal control after activation. Contour plots represent fluorescence intensity of IC-IFN- γ and surface CD3.

R4 area indicate IC-IFN- γ expressing CD3⁺ T cells

Histograms represent IC expression of IFN- γ on CD3⁺ T cells.

(A) Bronchial asthma

(B) Normal control

2. NK 세포 및 TNK 세포의 비율 및 세포형질내 IFN- γ 발현

NK 세포 (CD56⁺)는 flow cytometer 상 CD56이 약하게 발현되는 세포 (CD56^{dim})와 높게 나타나는 세포 (CD56^{high})로 나타났으며 모든 NK 세포를 포함시키기 위하여 모두 양성으로 분석하였다. CD56⁺세포의 말초단핵구에서의 비율은 천식 환자군에서 $15.4 \pm 3.9\%$ 로 대조군의 $19.8 \pm 4.5\%$ 에 비해 낮게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 2). CD3와 CD56을 모두 발현하는 세포를 TNK 세포로 선택하여 그 비율을 분석한 결과

환자군과 대조군이 각각 $4.7 \pm 1.4\%$, $5.9 \pm 1.8\%$ 로 두 군간의 유의한 차이가 없었다 (Table 2). IFN- γ 를 생산하는 CD56⁺세포에서는 환자군과 대조군이 각각 $30.3 \pm 3.9\%$, $25.9 \pm 5.8\%$ 로 천식 환자 중 높은 비율로 발현되는 경우도 있었으나 두 군간의 평균치에는 유의한 차이는 발견되지 않았다 ($p = 0.06$, Table 3, Fig. 3). 세포내 IFN- γ 를 생산하는 TNK 세포는 환자군에서 $44.8 \pm 14.9\%$ 로 정상대조군의 $30.0 \pm 8.2\%$ 에 비해 유의하게 증가되어 있었다 ($p < 0.05$) (Table 3). 세포내 IL-4를 발현하는 세포는 1%이내로 적어 비교할 수 없었다.

Table 2. Composition of subsets of CD3⁺T cells, CD56⁺NK cells, and CD3⁺, CD56⁺ TNK cells among the peripheral lymphocytes and large lymphocytes.

	CD3 ⁺ (%)	CD56 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD56 ⁺ (%)
Asthma group	68.3 ± 5.9	$15.4 \pm 3.9^*$	4.7 ± 1.4
Control group	76.8 ± 7.8	19.8 ± 4.5	5.9 ± 1.8

* $p < 0.05$: statistical significance vs. control

Table 3. Expression of intracytoplasmic IFN- γ in CD3⁺, CD56⁺ and CD3⁺, CD56⁺ cells

	CD3 ⁺ (%)	CD56 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD56 ⁺ (%)
Asthma group	$36.3 \pm 1.8^*$	30.3 ± 3.9	$44.8 \pm 14.9^*$
Control group	28.4 ± 5.7	25.9 ± 5.8	30.3 ± 8.2

* $p < 0.05$: statistical significance vs. control
% of IFN- γ expressing cells (intracytoplasmic IFN- γ positive cells)

3. IFN- γ 생산 림프구의 분석

IFN- γ 를 생산하는 세포만을 선택하여 CD3와 CD56의 발현을 재분석한 결과 대부분은 CD3⁺ T세포였으며 (56%) 다음이 CD3와 CD56을 동시에 발현하는 TNK (19%) 세포로 IFN- γ 의 주요생산세포는 CD3⁺ 세포이지만, CD56만 발현하는 NK 세포보다는 CD56과 CD3를 동시에 발현하는 세포가 T 세포 다음으로 주요한 IFN- γ 생산세포였다 (Fig. 4).

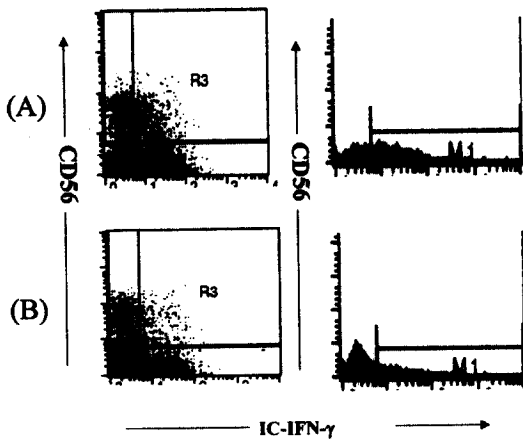


Fig. 3. Surface expression of CD56 and intracytoplasmic (IC) expression of IFN- γ on lymphocytes from bronchial asthma and normal control after activation.

Contour plots represent fluorescence intensity of IC-IFN- γ and surface CD56

R3 area indicate IC-IFN- γ expressing CD56⁺ NK cells

Histograms represent IC expression of IFN- γ on CD56⁺ NK cells.

(A) Bronchial asthma

(B) Normal controls

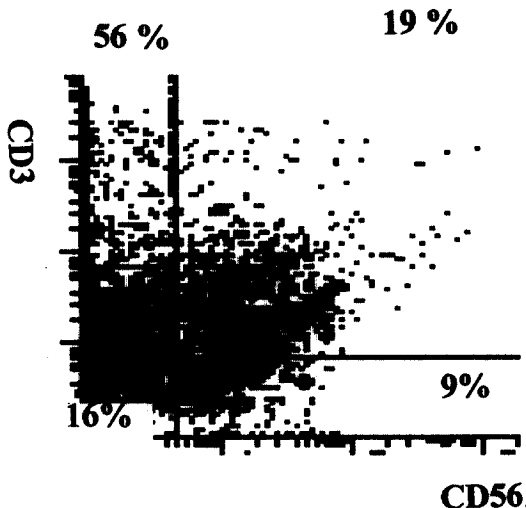


Fig. 4. Analysis of intracytoplasmic (IC)-IFN- γ expressing lymphocytes from bronchial asthma after activation. Contour plots represent fluorescence intensity of surface CD3 and surface CD56 from gated IC-IFN- γ positive cells

고 찰

기관지천식은 IgE를 중심으로 비만세포에서 분비된 화학매체의 작용과 만성적으로 진행되는 표적장기에서의 염증반응이 주요 기전인 대표적인 알레르기성 염증질환이다. 최근까지 CD4⁺ T 세포에 대한 연구에 많은 진전이 있었으나²⁴⁾, 복잡한 알레르기 염증반응과 다양한 사이토카인계통의 작용을 이해하는 데에는 CD4⁺ T세포의 작용만으로는 설명되지 않는 문제들이 남아있다. 따라서 면역계에서의 기능은 CD4⁺ 세포와 다르지만 많은 양의 사이토카인을 생산하는 자연살해세포(NK cell)와 CD8⁺ 세포에 대한 관심이 높아지고 있다^{9, 14, 25)}.

NK 세포는 강력한 세포 독성 능력이 있으며 항체에 덮힌 표적세포를 MHC-비제한적, 혹은 ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity)로 용해시켜 면역계의 방어기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 그외에도 바이러스나 감염질환에 대한 T 세포의 반응 조절, 조혈작용 등의 면역계에서의 다양한 기능들이 보고되고 있다¹⁶⁾. 이러한 다양한 기능들이 세포에서 생성되는 여러가지 사이토카인에 의해 조절되고 있으며 특히 NK 세포에서 생성되는 많은 양의 IFN- γ 는 Th1 혹은 Th2 면역반응결정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{14, 15)}. 또한 NK 세포 중 T 세포와 NK 세포의 표지자가 동시에 발현되는 TNK 세포의 존재가 발표된 이후 이들의 IgE 조절에서의 역할에 대해 연구가 활발해 지고 있다²⁰⁾. NK 세포는 골수전구세포에서 기원하며 다양한 사이토카인이 NK 세포의 분화 및 성숙에 관여한다고 알려져 있으며 IL-2, IL-15가 가장 강력한 일차적인 NK세포의 분열인자이다¹⁰⁾. 알레르기 반응에서의 NK 세포의 기능은 1980년 중반기에 일부 보고된 바 있다. Sin 등²⁶⁾은 알레르기성 천식 환자에서 면역억제 후 NK 세포 독성이 감소한다고 하여 알레르기 반응에서도 NK세포의 세포독성에 변화가 초래됨을 보여 주었지만 이후의 연구들은 이

를 뒷받침 해주진 못하였다. 따라서 알레르기 반응에서 NK 세포의 역할은 고유의 세포독성작용에 의한 역할보다는 IFN- γ 등의 사이토카인 생성에 의한 역할이 더 중요하다고 받아지고 있다. 이제까지 알려진 바에 의하면 알레르기반응의 주요 항체인 IgE 생산조절에는 CD4⁺ T 세포 클론 중 IFN- γ 를 주로 분비하는 Th1 클론과 IL-4를 주로 생산하는 Th2 클론의 불균형이 역할을 하며, 이러한 클론의 형성은 Th1 클론과 Th2 클론으로 분화하기전의 Th0 클론의 분화 및 성장과정에서 만나는 사이토카인에 따라 결정된다^{13, 27)}. 이러한 의미에서 많은 양의 사이토카인을 분비하는 NK 세포에 대해 주목할 필요가 있으며, 본 연구는 NK 세포의 알레르기염증 반응에서의 역할을 규명하고자 고안되었다. 실험결과 기관지천식환자의 말초혈액 림프구 중 CD56을 발현하는 NK 세포의 비율이 감소해 있었으나, NK 세포 중 IFN- γ 를 발현하는 NK 세포의 비율에는 변화가 없는 것이 관찰되었다. 즉 IFN- γ 를 생산하는 세포는 변화가 없고 전체로 보면 IFN- γ 를 생산하는 NK세포가 많다는 것인데 이는 IgE 조절에는 IL-4가 많이 생산되고, IFN- γ 가 적게 생산되는 것이 주요한 역할을 하지만, 기관지 천식의 만성화의 주요 기전인 알레르기성 염증반응에서는 IFN- γ 가 염증전구 사이토카인으로서의 역할을 한다는 것을 시사한다. 이에 대한 다른 연구 보고가 아직 없는 상태에서 확실하게 그 의의를 비교 검토할 수는 없지만 최근에 대두되고 있는 바이러스감염과 천식과의 관계에 대한 연구 등을 토대로 보면²⁸⁾, 본 실험에서 관찰된 천식 환자에서의 NK 세포의 감소는 기관지천식 환자에서 정상보다 빈번하게 나타나는 바이러스에 의한 감염과, 이로 인한 천식의 악화와 일맥 상통한다고 유추해 낼 수 있겠다. 또한 본 연구의 대상환자가 입원경력이 있는 중등도 이상의 환자로 폐기능이 호전되고 전신적인 스테로이드 사용을 중지한 상태라 하더라도 심한 천식발작이 없는 경증의 천식환자와

는 기관지내의 염증반응이나 인체의 사이토카인 생산 등의 면역반응에 차이가 있을 수 있다고 추측된다. NK 세포에서 생성되는 높은 농도의 IFN- γ 단독으로는 Th1 반응을 유도하는데 완전하지 못하며 IL-4의 생산억제가 동반되어 Th1으로의 분화가 유도된다고 하였다²⁸⁾. 이는 환자들의 T 세포에서도 IFN- γ 의 생산이 많은 것을 설명할 수 있는 결과로 본 실험에 참여한 환자들의 말초 림프구는 염증반응으로 인한 IFN- γ 의 증가의 환경으로 T 세포에서도 IFN- γ 생산하는 세포로 유도된 것이라 생각된다.

한편 T 세포 중 NK표지자를 발현하는 TNK 세포는 생체내, 생체외의 여러자극에 IL-4를 포함한 여러가지 사이토카인들을 생산하는 특징이 있다²⁰⁾. TNK 세포는 IL-4를 생성하여 Th2 세포계로의 분화 및 성숙을 유도하여 알레르기성 염증반응에서 주요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. NK 세포가 IFN- γ 를 생성하여 Th1 세포로의 분화를 유도하는 것과는 상반된 역할을 한다고 할 수 있다. 하지만 이런 TNK 세포가 알레르기 반응에서 어떠한 역할을 할 것인가에 대해서는 실제로 소수의 보고만 있을 뿐이며 그 동안의 TNK세포에 관한 연구는 주로 마우스 모델에서 시행되었으며 사람의 말초혈액에서도 5%이내의 소수의 세포들이 CD3와 NK 세포 표지자인 CD56을 공통으로 발현하는 것을 발견하였으나 마우스와 같은 기능을 할 것인지에 대해서는 아직 알려진 바는 없었다. 본 실험에서도 TNK 세포의 수가 적어 확실하게 알 수는 없지만 IFN- γ 를 생산하는 세포의 표면형을 분석해 보았을 때 TNK 세포가 CD3⁺ 세포 다음으로 중요한 분비세포라는 점은 알 수 있었다. 따라서 앞으로 NK 세포의 활성화 사이토카인인 IL-12나 IL-15 등으로 활성화시키면 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대 된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 중증의 기관지 천식환자의 말초단핵세포 중 NK 세포의 수의 감소가 관찰되었으나 이들에서의 IFN- γ 를 생

산하는 비율의 차이는 없어 IFN- γ 를 생산하지 않는 NK세포가 주로 감소하였을 가능성을 암시하였다. 이를 확인하기 위해서는 CD56과 CD16 을 서로 다른 형광염색체로 염색하고 동시에 IFN- γ 를 분석하는 것이 필요하리라 생각한다. 이 결과는 INF- γ 가 알레르기성 염증이 진행된 천식의 환자에서는 염증전구 사이토카인으로서 기능을 하는 것으로 추측된다. 또한 NK세포가 중등도 이상의 천식에서 감소했다는 점은 바이러스에 의한 감염에서 천식을 악화시키는 주요한 기전의 가능성을 시사하며 향후 환자의 상태 및 중등도에 따른 차이 및 천식의 악화 인자인 바이러스의 감염 후의 변화에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

결 론

중증의 기관지천식환자의 말초단핵구중 NK 세포의 비율이 정상인에 비하여 감소해 있었으나, 이들에게서 IFN- γ 를 생산하는 비율의 차이는 없어 IFN- γ 를 생산하지 않는 NK 세포가 주로 감소했을 가능성을 암시하였다. 이는 바이러스에 의한 감염에서 천식을 악화시키는 주요한 기전의 가능성과 IFN- γ 가 알레르기성 염증이 진행된 천식의 환자에서는 염증전구 사이토카인으로서 기능을 하는 것을 시사한다. 향후 환자의 상태 및 중등도에 따른 차이 및 천식의 악화 인자인 바이러스의 감염 후의 변화에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Knowles G et al: Identification of activated T Lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 141: 1407-13, 1990
- 2) Chung KF: Role of inflammation in the hyperreactivity of the airways in asthma. *Thorax* 41: 657-62, 1986
- 3) Wardlaw AJ, Kay AB: The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy* 42: 321-35, 1987
- 4) Kay AB: Lymphocytes in asthma. *Respir Med* 85: 87-90, 1991
- 5) Del Prete GF, Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P et al: Purified protein derivative of mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen of toxocaracanis expanded in vitro human T cells with stable and opposite profiles of cytokine production. *J Clin Invest* 88: 346-50, 1991
- 6) Bass H, Mosmann T, Strober S: Evidence for mouse Th1 and Th2 like helper T cells in vitro. Selective reduction of Th1 like cells after total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 170: 1495-51, 1989
- 7) Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K: T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 1: 190 1309-18, 1999
- 8) Hessel EM, Van Oosterhout AJ, Van Ark I, Van Esch B, Hofman G, Van Loveren H et al: Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon gamma and independent of eosinophil infiltration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 325-34, 1997
- 9) Korsgren M, Persson CG, Sundler F, Bjerke T, Hansson T, Chambers BJ et al: Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 189: 553-62, 1999
- 10) Roberston MJ, Ritz J: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421-38, 1990
- 11) Hackett J, Tut JM, Lipscomb M, Bennett M, Koo GC, Kumar V: Origin and

- differentiation of natural killer cells : Functional and morphologic studies of NK1.1+ cells. *J Immunol* 136: 3124-31, 1988
- 12) Garcia-Penarrubia P, Koster FT, Kelley RO, McDowell TD, Bankhurst AD: Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med* 169: 99-113, 1989
- 13) Snapper CM, Yamaguchi H, Moorman MA, Mond JJ: An in vitro model for T cell-independent induction of humoral immunity. A requirement for NK cells. *J Immunol* 152: 4884-92, 1994
- 14) Chan SH, Perussia BW, Kobayashi M, Pospisil MA, Young HA et al: Induction of interferon-gamma production by natural killer cell stimulatory factor. Characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173: 869-79, 1991
- 15) Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Booani N, Grabstein K et al: Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest* 96: 2578-82, 1995
- 16) Trinchieri G : Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47: 187-376, 1989
- 17) Gibso PG, Zlatic K, Scott J, Sewell W, Woolley K, Saltos N: Chronic cough resembles asthma with IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bronchoalveolar cells. *J Allergy Clin Immunol* 101: 320-26, 1998
- 18) Arase H, Arase N, Kobayashi Y, Nishimura Y, Yonehara S, Onoe K: Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha /beta+ thymocytes against a CD4+ CD8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J Exp Med* 180: 423-32, 1994
- 19) Arase H, Ono S, Arase N, Park SY, Wakahazaka K, Watanabe H et al: Developmental arrest of NK1.1+ T cell receptor (alpha-/beta+) T cells and expansion of NK1.1+ TCR gamma-/delta+ T cell development in CD3+-deficient mice. *J Exp Med* 82: 891-5, 1995
- 20) Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, HuLi J, Paul WE: Role of NK1.1+ cell in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 270: 1845-7, 1995
- 21) 한국의 기관지 천식 진단과 치료지침: 천식 및 알레르기 1998 별호, 339-90
- 22) Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest*, 97: s7, 1968
- 23) 조영주: 유세포분석법에 의한 마우스 흉선세포에서의 세포형질내 및 세포표면항원 동시측정법. *이화의대지* 18: 367-72, 1995
- 24) Kuhn R, Rajewsky K, Muller M: Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707-10, 1991
- 25) Croft M, Carter L, Swain SL, Dutton RW: Generation of polarized anti-specific CD8+ effector populations: reciprocal action of interleukin-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180: 1715-20, 1994
- 26) Sin B, Misirligil Z, Aybay C, Gurbuz L, Imir T: Effect of allergen specific immunotherapy on natural killer cell activity, IgE, IFN- gamma levels and clinical response in patients with allergic rhinitis and asthma. *Invest Allergol Clin Immunol* 6: 341-7, 1996
- 27) Coffman RL, Carty J: A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon gamma. *J Immunol* 136: 949-54, 1986

- 28) Romagnani S: Induction of Th1 and Th2 immune response? Immunol Today 13: responses: a key role for the natural 379-81, 1992