Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 45, No. 1, Feb, 1998

□원 저□

기관지 천식환자에서 CD62L의 발현 및 싸이토카인의 변화

연세대학교 원주의과대학 내과학교실

송광선, 이원연, 홍애라, 김희선, 용석중, 신계철

= Abstract =

Activity of Cytokines and Expression of CD62L in Patients with Bronchial Asthma

Kwang Seon Song, M.D., Won Yeon Lee, M.D., Ae Ra Hong, M.D., Hee Sun Kim, M.D., Suk Joong Yong, M.D., Kye Chul Shin, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background : The CD4+ T-helper cells comprise functionally distinct subsets of Th1 and Th2 cells that are distinguished on the basis of differential cytokines production. Th1 cells secrete interferon-γ, lymphotoxin, interleukin-2. Th2 cells produce interleukin-4, interleukin-5, interleukin-10. A previous study shown that Th2 cells and their cytokines increased in patients with atopic asthma. We compared cytokines(IL-4, IFN-γ) activity and subpopulation of T-lymphocytes in peripheral blood from atopic asthmatics versus non-asthmatics.

Method : Fifteen patients with atopic asthma(nine men, six women), twelve patients with chronic bronchitis (six men, six women), five healthy persons(three men, two women) were studied. Activity of IL-4, IFN-γ and T-cell subpopulation in peripheral blood were estimated.

Results : Patients had a median age of 55yr. The mean activity of IL-4 of asthmatics was significantly increased(control 0.75±1.1pmol/L, atopic asthmatics 3.50±0.75pmol/L, chronic bronchitis 2.01±1.2pmol/L), but IFN-γ was not significantly increased. In the T lymphocyte subsets the percent of CD62L+ T-lymphocytes of asthmatics was not significantly increased(control 16.7±16.4 %, atopic asthmatics 24.8±23.6 %, chronic bronchitis 17.0±16.9 %).

Conclusion : In this study elevated production of IL-4 was observed in atopic asthmatics. CD62L+ T-lymphocytes was not increased in atopic asthma.

Key words : Atopic asthma, CD62L(L-selectin), Interleukin-4

서 론

기관지 천식은 기도의 회복가능한 수축이 증상의 주 원인이며 이러한 기도 수축의 기전은 주로 외부 항원에 대한 IgE 매개성 과민반응으로 일어나게 된다. 기관지 천식은 그 원인에 따라 외인성(extrinsic 또는 allergic)과 내인성(intrinsic 또는 nonallergic)으로 분류되며 외인성 천식은 원인 항원이 존재하고 계절에 따라 증상의 기복을 보이는 경우가 많고 피부 반응검사가 양성이며 특정 항원에 대한 특이 IgE가 증가되어 있다. 천식에서 T 림프구는 면역반응의 조절과 조화에 중요한 역할을 하며, T 림프구의 활성과 매개체의 분비는 비알레르기성 질환과 다르다[1,2]. T 림프구의 활성은 세포표면에 interleukin-2 receptor(이하 IL-2R로 함), human leukocyte antigen(HLA)-DR, very late activation antigen(VLA－1) 등의 표현으로 알 수 있다[3,4]. T 림프구에는 TH1세포와 TH2세포 등이 있으며 이들 모두 interleukin-3(IL-3)와 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)를 분비하고, TH1세포는 지연형 과민반응에 관여하며 interleukin 2(이하 IL-2로 함), interferon-γ(이하 IFN-γ로 함)를 분비하고, TH2세포는 interleukin 4(이하 IL-4로 함), interleukin 5(이하 IL-5로 함)를 분비하여 IgE 생산에 관여한다[5,13]. 외인성 천식은 TH2세포에 의한 매개체의 증가가 주요 원인중 하나임이 밝혀지고 있다[6].

이에 연구자 등은 증상악화로 내원한 외인성 기관지 천식 환자와 만성기관지염 환자 사이에 T 림프구 아형의 변화와 싸이토카인(cytokine)들의 변화에 차이가 있는지 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

기관지 천식으로 치료중인 환자 중에서 천식악화로 내원한 외인성 천식 15예와 만성기관지염 환자 12예, 그리고 정상인 5예를 대상으로 하였다. 외인성 천식은 항원에 노출시 특징적인 임상증세가 있거나 천식환자중 피부반응검사상 양성이고 전체 또는 특이 IgE의 증가가 있는 경우로 하였다. 대상 환자는 림프구나 세포매개체의 변화를 유도할 수 있는 요인을 배제하기 위하여 다른 폐질환이나 합병증 그리고 감염이 없는 경우로 하고, 내원전 경구용 스테로이드를 사용하던 환자는 제외하였다.

2. 방법

환자의 병력과 임상소견, 피부반응검사, 그리고 특이 IgE 측정을 시행하고 기존의 기도가역성검사 또는 메타콜린 유발검사의 결과를 확인하였다. 내원후에도 치료중 폐기능 검사기기(TS II-RAM : Erich Yaeger, Germany)를 이용하여 기도폐쇄의 변화를 확인하였다.

T 림프구 아형 및 혈청 화학 매개체의 측정 : 내원후 혈액을 분리하여, T 세포 림프구 아형은 전혈 100ul를 실온에서 15분 보관한 뒤 Ficoll Hypaque를 이용하지 않고 lysed whole blood method[7]로 2ml 의 용해 용액(diethylene glycol, formaldehyde)을 넣어 약 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 3ml의 버퍼용액(phosphate buffered saline)을 넣고 다시 원심분리후 얻은 세포들을 CD4, CD8, CD25(IL-2R), CD19, CD16, anti HLA-DR 그리고 type 2 helper T cell의 표지자로 알려진 CD62L (Marseille, France)[16]를 이용하여 flow cytometer (FACscan^R,Becton & Dickinson Co.)로 분석하였다. IL-4, IFN-γ의 측정방법은 내원후 6시간 이내에 채취한 혈청을 －70℃에 보관하였다가 Quantikine IL-4, IFN-γ (Cytokine-ELISA kit : R & D systems, Minneapolis, USA)를 이용하여 단일항체를 확인하는 Sandwich ELISA 검사법을 사용하였다.

통계처리 및 자료분석 : SPSS 통계 프로그램에 의

한 자료분석과 비모수검정을 이용하였다.

결 과

1. 대상 환자 및 호산구수와 혈청 IgE

대상 환자의 중간 연령은 54세이며(19세~87세), 남녀는 18 : 14예 이었다. 알레르겐은 집먼지진드기가 12예, 화분 알레르겐이 8예, 곰팡이 1예 등이었고 이중에는 2개 이상의 중복 알레르겐을 가진 환자가 6예 있었다.

전체 백혈구수중 말초혈액내 호산구수는 기관지 천식환자 6.2±5.7% 이었고, 만성기관지염 환자는 2.5±2.9% 으로 기관지 천식환자에서 증가되어 있었다(p=0.04). 혈청내 총 IgE는 기관지 천식환자 675±409 IU/ml 만성기관지염 환자는 164±227 IU/ml 으로 기관지 천식환자에서 증가되어 있었다(p=0.02).

2. T 림프구 아형 및 CD62L의 비교

말초혈액내 림프구중 총 T 세포 백분율은 기관지 천식환자에서 64±22%였고, 만성기관지염 환자 57±28%, 정상인에서 56±36%이었고, 이중 CD4+ T 림프구는 기관지천식환자에서 40±7.2% 만성기관지염 환자 43±19.8%, 정상인에서 41±14% 로 기관지 천식환자와 다른 군간에 의미있는 차이는 없었다(p=0.49, p=0.75)(Fig. 1). CD4+/CD8+ T 림

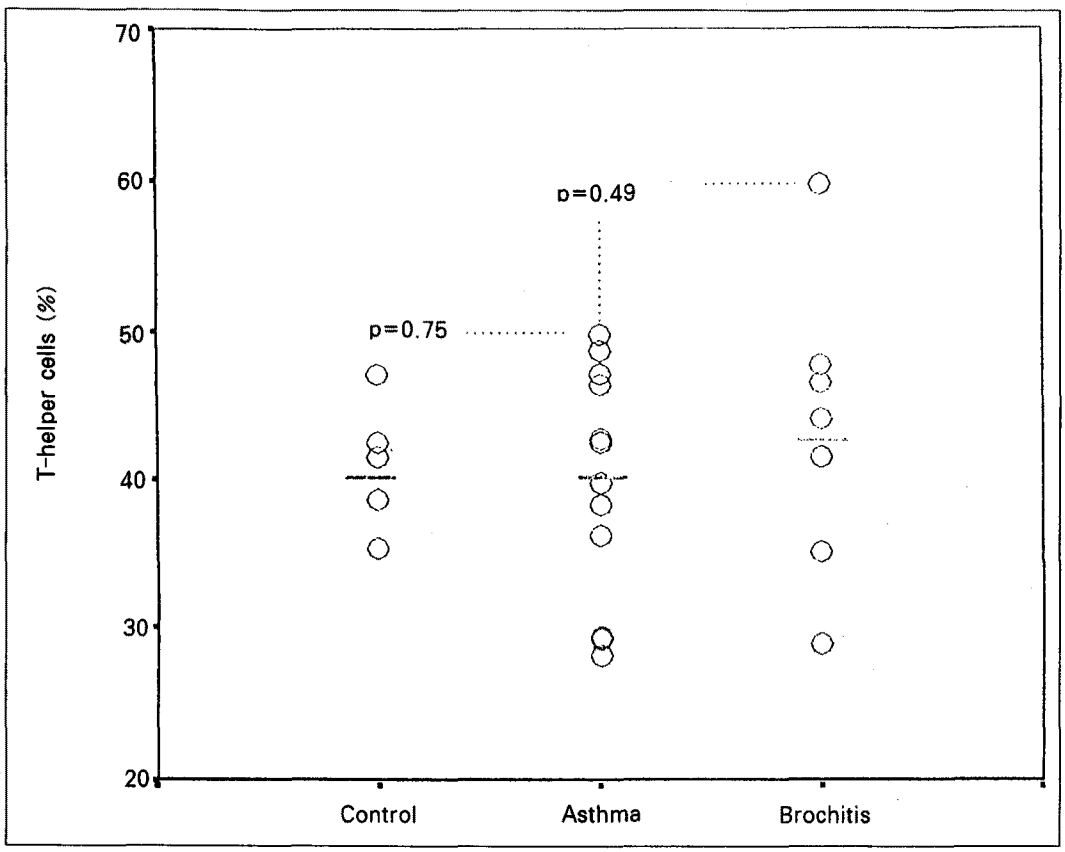

Fig. 1. T-helper cells(%) in various groups.

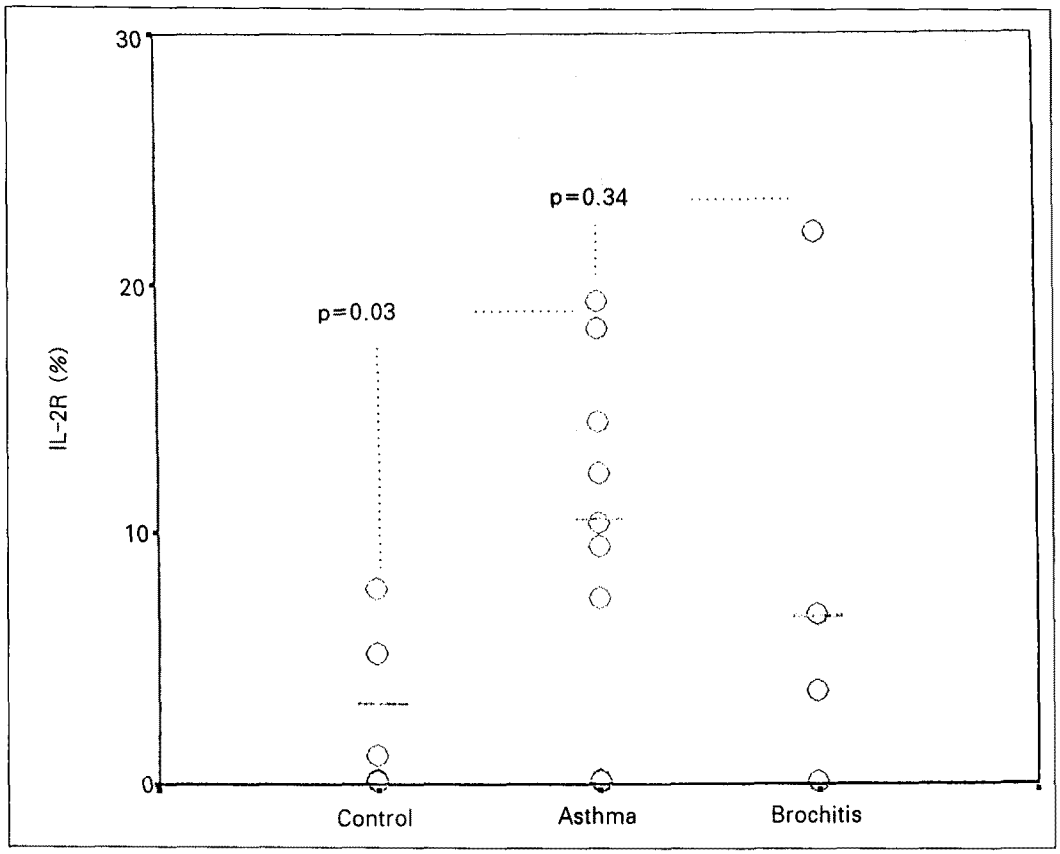

Fig. 2. Interleukin-2 receptor positive T-cells.

프구비는 기관지천식환자에서 1.65±0.6% 만성기관지염 환자 1.46±1.38%, 정상인에서 1.44±0.27%로 기관지 천식환자와 다른 군간에 의미있는 차이는 없었다(p=0.12, p=0.37). T 림프구중 CD25양성(Interleukin 2 receptor) T 림프구는 기관지천식환자에서 11±6.6% 만성기관지염 환자 8.2±9.6%, 정상인에서 2.9±3.4%로 기관지 천식환자에서 만성기관지염 환자군에 비하여 차이는 없었으나(p=0.34) 정상인보다 증가되어 있었고(p=0.03), 만성기관지염 환자에서도 증가는 되어 있었으나 통계적 의의는 없었다(p=0.12)(Fig. 2).

T 림프구중 CD62L(L-selectin) 양성 T 림프구의 세포 백분율은 기관지천식환자(n=7)에서 24.8±23.6%였고, 만성기관지염 환자(n=5) 17.0±16.9%, 정상인(n=5) 16.7±16.4%으로 기관지천식환자와 다른 군간에 의미있는 차이는 없었다(p=0.32, p=0.22)(Fig. 3).

3. IL-4 및 IFN-γ의 비교

혈청 IL-4의 활성도는 기관지천식환자에서 3.6±0.9pg/ml 만성기관지염 환자 2.0±1.2pg/ml, 정상인에서 0.7±1.1pg/ml로 기관지 천식환자에서 만성기관지염 환자군에 비하여 증가되어 있었으며(p=0.02) 정상인보다 증가되어 있었다(p=0.006)(Fig. 4).

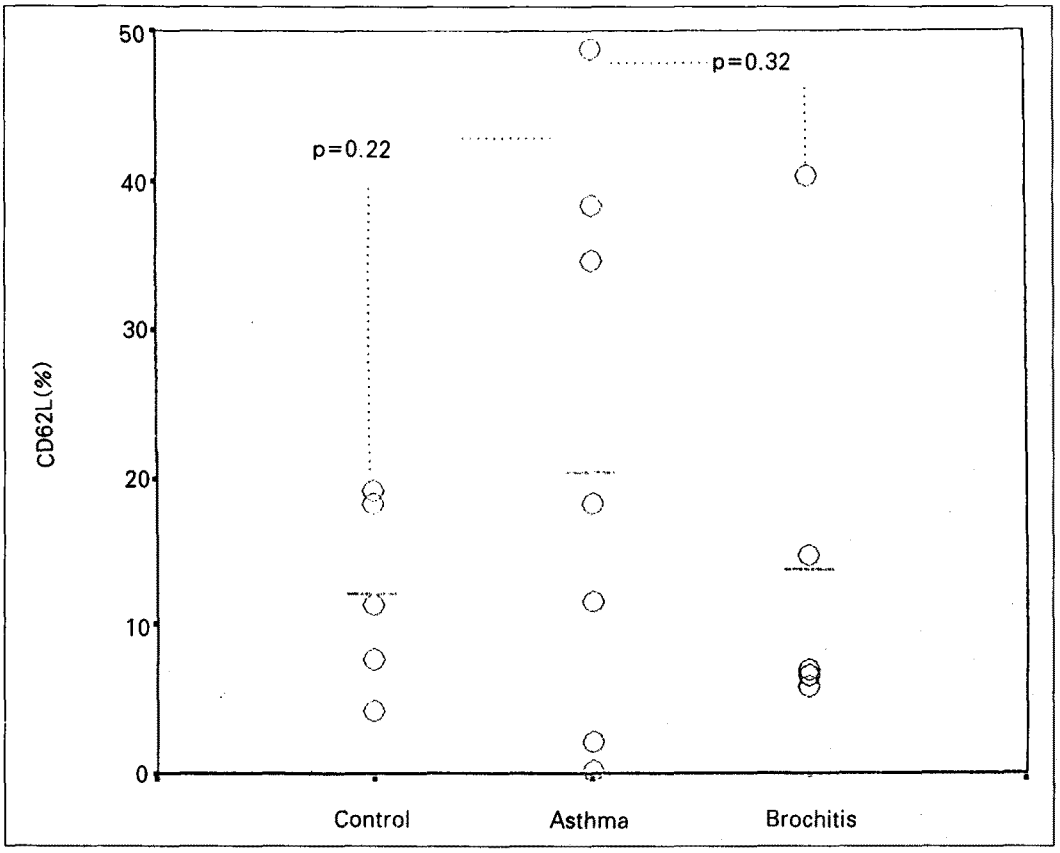

Fig. 3. CD62L positive T-helper celss.

혈청 IFN-γ의 활성도는 기관지천식환자에서 3.0±4.2pg/ml 만성기관지염 환자 2.5±2.6pg/ml, 정상인에서 0.4±0.3pg/ml 로 기관지 천식환자에서 만성기관지염 환자군에 비하여 증가되지 않았었으며(p=0.95) 정상인보다는 증가되어 있었다(p=0.01) (Fig. 5).

고 찰

기관지 천식의 염증반응에서 호산구나 비반세포 만큼이나 림프구의 역할이 중요함이 알려지고 림프구에 의해 유리된 세포매개체로 이차적인 염증세포의 병변내로 유입이 일어남이 중요한 면역 반응이라고 알려졌다[1,2].

T 림프구의 활성은 혈액이나 기도점막 그리고 기관지 폐포 세척액내에서 확인할 수 있다. 천식환자에서 천식 악화시에 혈액내 활성화된 T 림프구의 증가를 볼 수 있다[3,4]. 주로 CD4 양성 T 림프구의 증가가 예상되며 CD4+/CD8+ 림프구 비가 증가된다[9~12]. Gerblich 등[10]은 기관지천식환자에서 알레르겐에 의한 기관지수축 유발후 말초혈액내 림프구 아형의 변화를 관찰하였다. 그는 알레르겐 투여시 일시적인 조력 T 림프구의 감소가 있으며 이는 말초혈액내 CD4+ 세포가 혈액내에서 폐로 이동하기 때문이라고 설명하였다. CD4+/CD8+ 림프구 비율의 변화에 대해서는 CD4 양성세포의 증가가 원인이라는 보고와 CD8

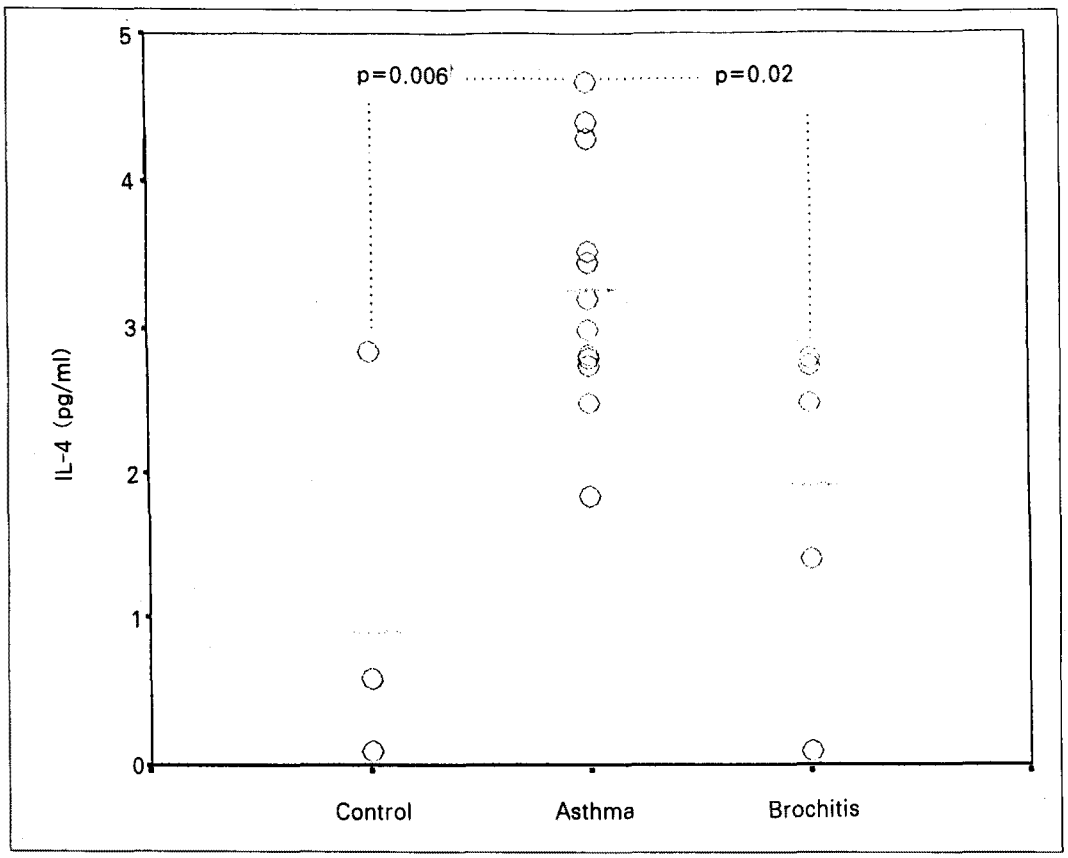

Fig. 4. Interleukin-4 activity in various groups.

양성세포의 감소에 의한 상대적인 증가라는 보고가 있다[8]. 본 연구에서는 각 군간의 CD4 양성 T 림프구수 및 CD4+/CD8+ 림프구 비의 의미있는 차이는 없었다. 실험동물에서 조력 T 림프구중에는 TH1 세포와 TH2 세포가 있음이 알려졌고[5,13] 이후에 인체에서 이들을 구별하기 위해 많은 지표들이 이용되었으며[14,15] Kanegane 등[16]은 L-selectin(CD62L)을 이용한 TH2 세포의 감별을 보고한 바 있다. 이에따라 시행한 본 연구에서 기관지천식환자에서 그 백분율의 증가를 관찰을 하였으나 유의한 증가가 없었다. 이는 Kanegane 등[16]이 시행한 건강인에서의 측정과 이들 천식환자들에서의 L-selectin의 발현의 차이 때문으로 생각된다.

다른 면역성 질환과 같이 기관지천식에서 림프구의 활성은 화학매개체의 분비증가로 나타나는데 IL-3, IL-5, GM-CSF 등은 호산구의 병변내로의 이동과 활성화를 유도하여 천식의 발병기전에 관여하며 다핵구와 림프구같은 염증세포들은 IL-4, IL-5, IFN-γ을 분비하여 B 림프구를 자극하고 IgE 생산을 증가시킨다[17~19]. 이중 외인성 천식은 TH2세포의 증가와 활성화에 의한 매개체의 증가가 주요 원인이다. 이들 세포는 주로 IL-4, IL-5를 분비한다. Tang 등[20]은 외인성 천식환자에서 계절에 따른 IL-2, IL-4, IL-5를 측정하여 IL-2, IL-4는 알레르겐의 노출에 의한 CD4 양성세포의 활성과 관계가 있으며 IL-5는 호산구증가 등 임상양상과 정도와 관계가 있다고 하였다.

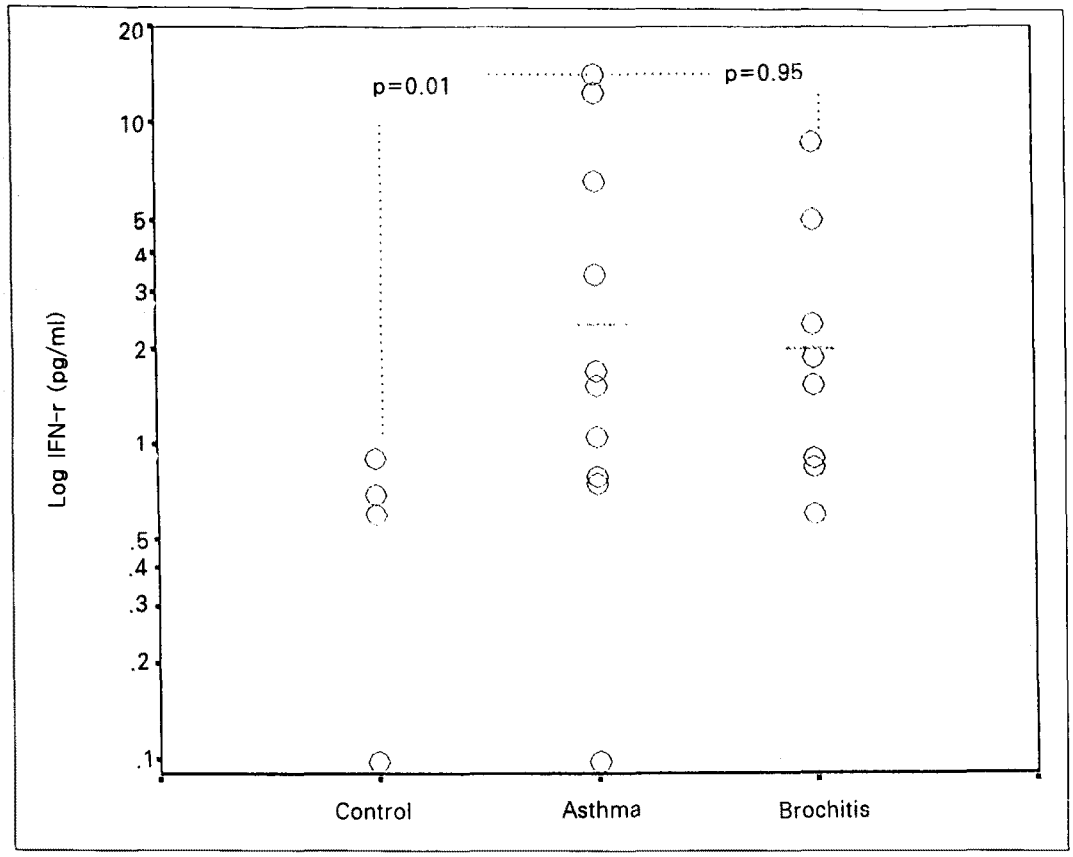

Fig. 5. Interferon-r activity in various groups.

Walker 등[6]은 외인성 천식환자에서 말초혈액과 기관지폐포세척액내의 IL-2R 양성세포의 증가와 IL-4, IL-5의 증가를 관찰하였고 내인성 천식환자에서는 IL-2, IL-5의 증가를 관찰하였다. Corrigan과 Kay[3]는 급성 천식악화시에 CD4양성 T 림프구의 증가가 있으며 수용성 IL-2R, IFN-γ의 증가를 보고하고 치료로 임상소견이 호전됨에 따라 이들이 감소한다고 하였다. IL-2는 T 림프구의 증식과 관련된 세포매개체로 만성 기관지염 환자보다 기관지천식환자에서 특히 천식악화시에 IL-2증가가 보고[3]된 바 있으나 본 연구에서는 차이를 관찰할 수 없었다. 본 연구에서 기관지천식환자에서 IL-4의 증가는 확인이 되었으나 IFN-γ의 증가는 관찰할 수 없었다. 이는 아마도 내원당시 배재가 어려웠던 바이러스 감염등 세포매개체 유리에 영향을 줄 수 있는 천식악화의 외부적인 요인 때문으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

외인성 천식은 TH2세포에 의한 매개체의 증가가 주요 원인중 하나임이 밝혀지고 있다. 연구자 등은 증상악화로 내원한 기관지천식 환자와 만성기관지염 환자 사이에 T 림프구 아형의 변화와 싸이토카인(cytokine)들의 변화에 차이가 있는지 연구하고자 하였다.

방 법 : 기관지 천식으로 치료중인 환자 중에서 천식 악화로 내원한 외인성 천식 15예와 만성기관지염 환자 12예, 그리고 정상인 5예를 대상으로 하였다. 환자의 병력과 임상소견, 피부반응검사, 그리고 특이 IgE 측정을 시행하고 단일항체인 CD62L를 이용하여 flow cytometer로 림프구아형을 분석하고 ELISA kit(Quantikine IL-4, IFN-γ)를 이용하여 IL-4, IFN-γ을 측정하였다.

결 과 :

CD4+ T 림프구는 기관지천식환자에서 40±7.2% 만성기관지염 환자 43±19.8%, 정상인에서 41±14 % 로 기관지 천식환자와 다른 군간에 의미있는 차이는 없었다($p=0.49$, $p=0.75$). CD62L(L-selectin) 양성 T 림프구의 세포 백분율은 기관지천식환자(n=7)에서 24.8±23.6%였고, 만성기관지염 환자(n=5) 17.0±16.9 %, 정상인(n=5) 16.7±16.4 % 으로 기관지천식환자와 다른 군간에 의미있는 차이는 없었다($p=0.32$, $p=0.22$). 혈청 IL-4의 활성도는 기관지천식환자에서 3.6±0.9pg/ml 만성기관지염 환자 2.0±1.2pg/ml, 정상인에서 0.7±1.1pg/ml로 기관지 천식환자에서 만성기관지염 환자군에 비하여 증가되어 있었으며($p=0.02$) 정상인보다 증가되어 있었다($p=0.006$)(Fig. 4). 혈청 IFN-γ의 활성도는 증가되지 않았다.

결 론 :

결론적으로 CD62L 양성 T 림프구의 세포 백분율은 기관지천식환자에서 증가되어 있지 않았으며 혈청 IL-4의 활성도는 기관지천식환자에서 증가되어 있었다.

참 고 문 헌

1. National heart lung and blood institute : Guidelines for the diagnosis and management of asthma. J Allergy Clin Immunol 88(3) : 425, 1991
2. Barnes PJ : Asthma. British medical bulletin 48 (1) : 23, 1992
3. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB : T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Lancet 1 : 1129, 1988
4. Corrigan CJ, Kay AB : CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. Am Rev Respir Dis 141 : 970, 1990
5. Paul WE, Seder RA : Lymphocyte responses and cytolines. Cell 76 : 241, 1994
6. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC : Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis 146 : 109, 1992
7. Renzi P, Ginns LC : Analysis of T cell subsets in normal adults. J Immunol Methods 98 : 53, 1987
8. Schugler M, Gerblich A, Urda G : Atopic asthma T lymphocyte subpopulation. Clin Allergy 14 : 131, 1985
9. Gratziou C, Carroll M, Montefort S, Teran L, Howarth PH, Holgate ST : Inflammatory and T-cell profile of asthmatic airways 6 hours after local allergen provocation. Am J Respir Crit Care Med 153 : 515, 1996
10. Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler : Changes in T-lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. N Engl J Med 310 : 1349, 1984
11. Azzawi M, Bradley B, Jeffrey PK : Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchioles biopsies in stable atopic asthma. Am Rev Respir Dis 142 : 1407, 1990
12. Gonzalez MC, Diaz P, Galleguilos FR, Ancic P, Cromwell O, Kay AB : Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar helper and suppressor cells in asthma. Relative increase in OKT8 cells

in single early responders compared with those in late-phase responders. Am Rev Respir Dis **136** : 600, 1987

13. Romagnani S : Introduction of TH1 and TH2 response : a key role for the natural immune response?. Immunol Today **13** : 379, 1992
14. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Santoni Rugiu R, Carli M, Ricci M, Romagnani S : Reciprocal regulatory role of IFN -γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol **148** : 2142, 1992
15. Parronchi P, Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Prete GF, Romagnani S : IL-4 and IFNs exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by TH1 or TH2 human T cell clones, J Immunol **149** : 2977, 1993
16. Kanegane H, Kasahara Y, Niida Y, Yachie A, Sugii S, Takatsu K, Taniguchi N, Miyawaki T : Expression of L-selectin(CD62L) discriminates Th1- and Th2- like cytokine-producing memory CD4+ T cells. Immunology **87** : 186, 1996
17. Hamid O, Azzawi M, Moqbel R : Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. J Clin Invest **87** : 1541, 1991
18. Collins PD, Scott DM, Barnes PJ : Time course of interleukin-6 and tumor necrosis factor-a increase in serum following inhalation of swine dust. Am Rev Respir Dis **153** : 147, 1996
19. Bradding P, Roberts JA,Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Hollgate ST : Interleukin-4,-5,-6 and tumor necrosis factor-a in normal and asthmatic airways : evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. Am J Respir Cell Mol Biol **10** : 471, 1994
20. Tang C, Rolland JM, Ward C, Bish R, Thien F, Walters EH : Seasonal comparison of cytokine profiles in atopic asthmatics and atopic non-asthmatics. Am J Respir Crit Care Med **154** : 1615, 1996