

재조합결핵성분예방약을 접종받은 자원자들속에서 세포성면역활성의 변화

윤재성, 문성철, 최수성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 의학과과학기술을 발전시키는데서 중요한것은 보건사업에서 절박하게 나서고있는 과학기술적문제를 푸는데 힘을 집중하는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 81페이지)

우리는 유전자재조합기술을 리용하여 제조한 재조합결핵성분예방약을 접종받은 건강 자원자의 말초피단핵구(PBMCs)에서 T_H1 형사이토카인인 인터페론감마($IFN-\gamma$)와 인터로이킨-2 ($IL-2$) 및 염증성사이토카인인 $TNF-\alpha$ 의 농도를 측정하여 재조합결핵성분예방약의 세포성 면역효과[1, 3]를 평가하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

연구대상으로는 의학연구원 의학생물학연구소에서 개발한 재조합결핵성분예방약을 3회 접종받은 건강자원자 15명을 연구조로 하고 대조조는 재조합결핵성분예방약을 접종 받지 않은 건강자원자 15명으로 하였다.

사이토카인의 농도는 세포성면역에 관계하는 $IL-2$, $IFN-\gamma$ 와 $TNF-\alpha$ 의 농도를 효소면역 검사키트(《ELISA-Kit》)를 리용하여 측정하는 방법으로 결정하였다.

말초피단핵구(PBMCs)의 분리[2]는 퍼콜액(Percoll, 《Sigma》)을 리용하여 진행하였으며 PBMCs의 배양은 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 항온기에서 96공미량배양판으로 진행하였다.

사이토카인측정을 위한 시료준비는 다음과 같이 하였다.

무균적으로 헤파린이 들어있는 주사기로 정맥채혈한 혈액 2mL를 같은 체적의 퍼콜액이 들어있는 15mL 수지원침관에 조심히 넣고 15min동안 방치한다.

원침관을 $18\sim 25^{\circ}C$ 에서 3 000r/min의 속도로 15min동안 원심분리한다. 혼합액은 원심 분리관에서 모두 4개 층으로 갈라지는데 제일 웃층은 혈장이고 두번째 층은 흰막층 즉 단핵 세포층이고 세번째 층은 무색투명한 림파세포분리액이며 네번째 층은 적혈구층이다.

제일 웃층을 제거하고 두번째, 세번째 층을 빨아서 원심분리관에 넣고 5~10배의 CMF-PBS를 넣어 충분히 혼합한 다음 2 000r/min의 속도로 10min동안 원심분리한다. 상청액을 버리고 우와 같은 조작을 두번 반복한다.

상청액을 버리고 10% 자체혈장이 포함된 RPMI-1640배지에 세포들을 희석한 후 세포수를 측정하여 각이한 농도로 $100\mu L$ 씩 96공미량배양판에 분주한다.

3개의 구멍을 항원자극조로 하여 $30\mu L$ 의 재조합결핵항원(항원농도 $100\mu g/mL$)을 넣고 다른 3개의 구멍은 비자극조로 하여 $30\mu L$ 의 배지만 넣은 다음 $37^{\circ}C$ 5% CO_2 부란배양기에서 각이한 시간 배양하고 상청액을 취하여 $-20^{\circ}C$ 에 보관한다.

사이토카인측정은 ELISA키트의 설명서에 준하여 진행하였다.

먼저 해당 사이토카인의 표준시료를 리용하여 검량선을 작성하였다.

해당 사이토카인의 단클론항체로 감작된 미량반응판에 보관하였던 시료를 $100\mu L$ 씩

넣고 37°C에서 90min동안 반응시킨다.

세척액으로 반응물을 5회 세척한 다음 비오틴결합물희석액(30배)을 100 μ L씩 넣고 37°C에서 60min동안 반응시킨다.

반응물을 다시 세척액으로 5회 세척한 다음 아비딘결합효소표식항체희석액(30배)을 100 μ L씩 넣고 37°C에서 15min동안 반응시킨다.

세척액으로 5회 세척하고 효소기질액(TMB)을 넣은 다음 37°C의 어둡조건에서 15min 동안 반응시킨다. 반응정지액을 넣어 반응을 정지시키고 A_{450} 에서 흡광도를 측정한다.

세포성면역활성은 매 조에서 자극조와 비자극조사이의 사이토카인농도차를 Z점정하여 평가하였다.

결과 및 논의

1) PBMCs농도와 항원자극시간에 따르는 사이토카인의 농도변화

제조합결핵성분예방약이 사이토카인생성에 미치는 영향을 측정하기에 앞서 PBMCs 농도와 항원자극시간이 사이토카인생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

PBMCs농도에 따르는 IL-2의 농도변화 제조합결핵성분예방약을 접종받은 자원자들의 PBMCs를 96공미량배양판에 $(1.0\sim4.0)\times10^6$ 개/mL(구멍당 $(1.0\sim4.0)\times10^5$ 개)로 변화시키면서 분주하고 항원자극을 준 후 배양시간을 12~72h까지 변화시키면서 배양상청액으로부터 IL-2의 농도변화를 관찰하였다.(표 1)

표 1. PBMCs농도와 항원자극시간에 따르는 IL-2의 농도변화

세포농도 ($\times 10^6$ 개·mL $^{-1}$)	IL-2의 농도 (pg·mL $^{-1}$)					
	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1.0	5.574 \pm 0.40 ^{*,Δ}	8.23 \pm 0.37 $^{\Delta}$	6.54 \pm 0.34 $^{\Delta}$	5.61 \pm 0.27 ^{*,Δ}	2.97 \pm 0.73 ^{*,Δ}	2.28 \pm 0.20 ^{*,Δ}
2.0	7.57 \pm 0.41 [*]	11.03 \pm 0.51	9.34 \pm 0.70	8.01 \pm 0.56 [*]	5.77 \pm 0.56 [*]	4.48 \pm 0.04 [*]
4.0	7.71 \pm 0.35 [*]	11.16 \pm 0.58	9.47 \pm 0.78	8.14 \pm 0.62 [*]	5.91 \pm 0.51 [*]	4.62 \pm 0.07 [*]

n=5, * $p<0.05$ (배양 24h와 비교), Δ $p<0.05$ (세포농도 2.0×10^6 개/mL와 비교)

표 1에서 보는바와 같이 배양시간에 따르는 IL-2의 농도는 24h에 제일 높았으며 세포 농도의 변화를 보면 2.0×10^6 개/mL이상부터 변화가 없었다.

배양시간과 세포농도에 따르는 IFN- γ 의 농도변화 제조합결핵성분예방약을 접종받은 자원자들의 말초피단핵세포를 96공미량배양판에 세포농도를 $(1.0\sim4.0)\times10^6$ 개/mL로 변화시키면서 분주하고 항원자극을 준 후 배양시간을 36~96h까지 변화시키면서 배양상청액으로부터 IFN- γ 의 농도변화를 관찰하였다.(표 2)

표 2. 세포농도와 시간에 따르는 IFN- γ 의 농도변화

세포농도 ($\times 10^6$ 개·mL $^{-1}$)	IFN- γ 의 농도 (pg·mL $^{-1}$)					
	36h	48h	60h	72h	84h	96h
1.0	19.27 \pm 5.04 ^{*,Δ}	57.27 \pm 4.90 ^{*,Δ}	81.89 \pm 6.79 ^{*,Δ}	93.18 \pm 7.52 $^{\Delta}$	89.89 \pm 6.82 $^{\Delta}$	69.07 \pm 3.79 ^{*,Δ}
2.0	39.27 \pm 4.84 [*]	79.27 \pm 3.37 [*]	106.69 \pm 11.42 [*]	127.18 \pm 11.53	122.49 \pm 10.37	81.67 \pm 2.43 [*]
4.0	39.53 \pm 4.77 [*]	79.75 \pm 3.26 [*]	106.99 \pm 11.36 [*]	127.68 \pm 11.85	122.61 \pm 7.32	82.27 \pm 2.21 [*]

n=5, * $p<0.05$ (배양 72h와 비교), Δ $p<0.05$ (세포농도 2.0×10^6 개/mL와 비교)

표 2에서 보는바와 같이 배양시간에 따르는 IFN- γ 의 농도는 72h에 제일 높았으며 세포

농도의 변화를 보면 2.0×10^6 개/mL이상에서부터 변화가 없었다.

배양시간과 세포농도에 따르는 TNF- α 의 농도변화 제조합결핵성분예방약을 접종받은 자원자들의 말초피단핵세포를 96공미량배양판에 세포농도를 $(1.0 \sim 4.0) \times 10^6$ 개/mL로 변화시키면서 분주하고 항원자극을 준 후 배양시간을 36~96h까지 변화시키면서 배양상청액으로부터 TNF- α 의 농도변화를 관찰하였다.(표 3)

표 3. 세포농도와 시간에 따르는 TNF- α 의 농도변화

세포농도 ($\times 10^6$ 개·mL $^{-1}$)	TNF- α 농도 (pg·mL $^{-1}$)					
	36h	48h	60h	72h	84h	96h
1.0	83.07 $\pm 42.50^*, \Delta$	161.07 $\pm 45.30^*, \Delta$	305.68 $\pm 49.90^*, \Delta$	396.98 $\pm 47.19^\Delta$	409.69 $\pm 58.07^\Delta$	252.87 $\pm 66.54^*, \Delta$
2.0	133.27 $\pm 68.87^*$	333.27 $\pm 41.41^*$	402.69 $\pm 30.68^*$	457.28 ± 37.40	436.49 ± 23.63	245.67 $\pm 51.16^*$
4.0	177.73 $\pm 41.78^*$	363.15 $\pm 34.89^*$	406.99 $\pm 37.45^*$	463.68 ± 36.83	442.61 ± 30.12	242.27 $\pm 38.33^*$

$n=5$, * $p<0.05$ (배양 72h과 비교), Δ $p<0.05$ (세포농도 2.0×10^6 개/mL와 비교)

표 3에서 보는바와 같이 배양시간에 따르는 TNF- α 의 농도는 72h에 제일 높았으며 세포농도의 변화를 보면 2.0×10^6 개/mL이상에서부터 변화가 없었다.

실험결과에 기초하여 세포농도는 2.0×10^6 개/mL로, 배양시간은 IL-2인 경우 24h, IFN- γ 와 TNF- α 인 경우 72h로 정하였다.

2) 제조합결핵성분예방약이 IL-2생성에 미치는 영향

세포농도를 2.0×10^6 개/mL로, 배양시간은 24h로 하여 제조합결핵성분예방약이 IL-2생성에 미치는 영향을 관찰하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 제조합결핵성분예방약을 접종받은 사람들은 접종받지 않은 사람들에 비하여 IL-2농도가 유의성있게 높았다.

세포농도를 2.0×10^6 개/mL로, 배양시간은 72h로 하여 제조합결핵성분예방약이 IFN- γ 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.(그림 2)

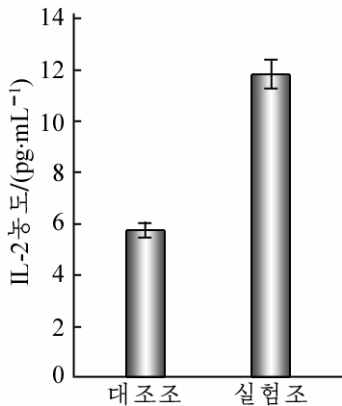


그림 1. 제조합결핵성분예방약이 IL-2생성에 미치는 영향($n=15$)

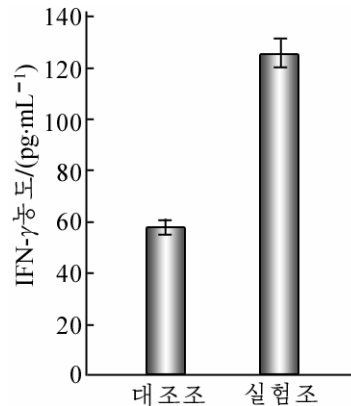


그림 2. 제조합결핵성분예방약이 IFN- γ 생성에 미치는 영향($n=15$)

그림 2에서 보는바와 같이 제조합결핵성분예방약을 접종받은 사람들은 접종받지 않은 사람들에 비하여 IFN- γ 농도가 유의성있게 높았다.

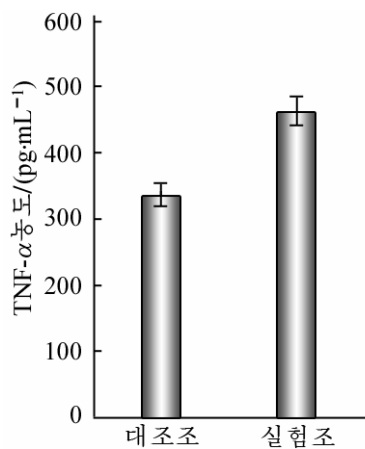


그림 3. 재조합결핵성분예방약이 TNF- α 생성에 미치는 영향($n=15$)

세포 농도를 2.0×10^6 개/mL로, 배양시간은 72h로 하여 재조합결핵성분예방약이 TNF- α 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 재조합결핵성분예방약을 접종받은 사람들은 접종받지 않은 사람들에 비하여 TNF- α 농도가 유의성있게 높았다.

실험결과들은 재조합결핵성분예방약이 인체에서 T_H1 형 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-2, 염증성사이토카인인 TNF- α 의 생성을 자극하여 인체의 세포성면역활성을 높인다는것을 보여준다.

맺는 말

재조합결핵성분예방약을 접종받은 사람들은 접종받지 않은 사람들에 비하여 세포성면역에 관계하는 사이토카인의 분비가 유의하게 높아졌다.

사이토카인측정때 배양세포의 농도는 2.0×10^6 개/mL로, 배양시간은 IL-2인 경우 24h, IFN- γ 와 TNF- α 인 경우 72h로 하는것이 합리적이였다.

참고 문헌

- [1] 苏昀 等; 现代医学, 31, 3, 156, 2004.
- [2] 范晓东 等; 中华泌尿外科杂志, 27, 2, 25, 2006.
- [3] 王利嫻 等; 湖南中医药大学学报, 36, 6, 532, 2016.

주체110(2021)년 4월 5일 원고접수

Change of Cellular Immunoactivity in Healthy Individuals Inoculated the Recombinant TB Vaccine

Yun Jae Song, Mun Song Chol and Choe Su Song

The recombinant TB vaccine increased the concentration of cytokines, IL-2, IL-2, IFN- γ and TNF- α , in healthy individuals inoculated the recombinant TB vaccine significantly.

Keywords: cytokine, MTT, vaccine