

갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의
시토킨 발현과 말초혈액 단핵구의 인터페론
감마 생성에 관한 연구

계명대학교병원 동산의료원 내과학교실

조성래 · 박근용 · 전영준 · 송홍석
권기영 · 김윤년 · 한승범 · 이인규

경북대학교병원 혈의학교실*, 내과학교실**

이 규 보* · 이 재 태* · 김 보 완**

Analysis of Cytokine Gene Expression in Thyroid Aspirates and Peripheral Blood Mononuclear Cell and in vitro Production of Interferon-Gamma by Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture

Sung Rae Cho, M.D., Keun Yong Park, M.D., Young June Jeon, M.D., Hong Suk Song, M.D., Ki Young Kwon, M.D., Yun Nyun Kim, M.D., Seung Beom Han, M.D. and In Kyu Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Kyu Bo Lee, M.D.,* Jae Tae Lee, M.D.* and Bo Wan Kim, M.D.**

Department of Nuclear Medicine, Internal Medicine**,
Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea*

ABSTRACT

Cytokine production was studied in thyroid fine needle aspirates and peripheral blood and the production of interferon-gamma by peripheral blood mononuclear cell(PBMC) culture in response to interleukin-2(IL-2) stimulation was also studied from patients with hyperthyroidism, non toxic goiter, thyroid nodule. The expression of glycer aldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, interleukin-8(IL-8), platelet- derived growth factor-A(PDGF-A) and interferon-gamma(IFN- γ) chain was assessed by RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction) in fine needle aspirates of thyroid and peripheral blood mononuclear cell : the samples were obtained from 7 patients with hyperthyroidism, 6 patients with non toxic goiter, 7 patients with thyroid nodule. A dose of IL-2(25 U/ml) was utilized to induce IFN- γ production by PBMC from all patients.

The results were as follows:

- 1) In case of cytokine expression of fine-needle aspirates, GAPDH and IL-1 β , IL-8 were expressed highly but IFN- γ , IL-2 were not expressed in hyperthyroidism and non-toxic goiter, thyroid nodule. PDGF-A was expressed in hyperthyroidism and thyroid nodule but not in non toxic goiter.
- 2) In case of cytokine expression of PBMC, GAPDH, IL-1 β were expressed in hyperthyroidism and non toxic goiter, thyroid nodule and highly expressed after IL-2 stimulation than before. but PDGF-A was more expressed in non toxic goiter and thyroid nodule than hyperthyroidism. Also, IFN- γ was less expressed in thyroid nodule than hyperthyroidism and non toxic goiter.
- 3) The incremental increase in IFN- γ value in supernatants of PBMC culture was significantly higher in patients with non toxic goiter than that in PBMC from hyperthyroidism and thyroid nodule($p<0.05$).

Therefore it seems that the cytokine production was found in hyperthyroidism and non toxic goiter and thyroid nodule. There were variability in their distribution each other, in general, higher expressed in hyperthyroidism than non toxic goiter. And RT-PCR Method that employed should be sufficiently sensitive to permit the analysis of cytokine gene expression in fine needle aspiration biopsies from patients with thyroid disease (J Kor Soc Endocrinol 10:13~25, 1995).

Key Words: Cytokine Gene Expression, RT-PCR, Fine needle aspiration biopsy, Peripheral Blood Mononuclear Cell

서 론

자가면역성 갑상선 질환의 발생은 갑상선 자극호르몬 수용체(thyrotropin receptor)항체, 항 미소체(microsomal) 항체, 항 갑상선글로불린(thyroglobulin)항체 등의 존재와 밀접한 연관이 있고[1], 면역 조절에 관여하는 T임파구(immunoregulatory T lymphocyte)의 이상 [2,3]과 이때 생성되는 시토킨(cytokine)들이 이러한 항체 생성의 원인 인자중의 하나[4,5]로 알려지고 있다. 그러나 이러한 모든 시토킨들은 혈청내에 존재하는 억제 단백(inhibitory protein)이나 짧은 생물학적 반감기 등으로 그 측정이 힘들며[6], 특히 갑상선 조직내의 시토킨 분비는 측정하기가 더욱 곤란하였다.

그러나 최근 분자생물학적 기법을 이용한 면역학적 연구가 활발히 진행됨에 따라 1989년 Grubeck-Loebenstein 등[7]은 자가면역성 갑상선 질환의 갑상선 조직에서 slot blot analysis를 이용하여 시토킨 mRNA를

분석하여 보고하였고, Davies 등[8]은 수술시 얻은 갑상선 조직에서 역전사중합효소 연쇄반응법(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 이용하여 갑상선 내 침윤된 T세포의 수용체 유전자(receptor gene)를 연구하여 발표하였다. 1993년 같은 연구자들은 갑상선 세침 흡인 검사물을 얻은후 중합효소 연쇄반응법으로 침윤 T세포의 수용체 유전자를 조사하고 그연구 결과가 수술에서 얻은 갑상선 조직을 이용한 검사 결과와 유사함을 보고하였다[9].

저자는 갑상선 질환에서의 시토킨 발현의 정도를 알아 보기위해 갑상선 기능항진증(7명), 비중독성 갑상선 비대증(nontoxic goiter)(6명), 갑상선 결절(7명) 환자들에서 말초혈액 및 갑상선세침 흡인물을 얻은 다음, 최근까지 임상에서 많이 이용되고 있는 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 Glycer aldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), 인터루킨(Interleukin)-1 β , 인터루킨-2, 인터루킨-8, 인터페론 감마(Interferon- γ), Platelet derived growth factor-A(PDGF-A) 등의 시토

— 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토킨 발현과 말초혈액 단핵구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 —

킨 표현(cytokine expression)의 차이가 있는가를 조사하였다.

또한 Burman 등[10]이 유암종(carcinoid tumor) 환자에서 인터페론 감마를 투여한 후 자가면역성 갑상선 질환의 발생을 보고한 후로 인터페론 감마와 자가면역성 갑상선 질환의 발생에 대한 많은 연구가 있어왔으나 아직까지 정확한 기전이 밝혀지지 않은 상태다. 그러므로 저자는 자가면역성 갑상선 질환으로 알려진 그레이브스병을 포함하는 갑상선 기능항진증과 비중독성 갑상선 비대증 및 비자가면역성 질환이인 갑상선 결절 환자에서 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cell)를 분리하여 각기 다른 갑상선 질환을 가진 환자의 말초혈액 단핵구에 인터루킨-2 자극을 주었을 때, 인터페론 감마의 생성 정도에 차이가 있는가를 규명하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

대상으로는 치료 받은 적이 없는 갑상선 기능항진증 환자 7예, 하시모토 갑상선염 환자가 포함된 비중독성 갑상선비대증 환자 6예, 갑상선 결절 환자 7예로 하였다.

갑상선 기능항진증의 진단은 신경질, 다행, 피로감, 권태감, 체중감소, 식욕항진, 갑상선종 및 안구돌출 등의 임상 증상과 혈청 triiodothyronine(T_3) 및 thyroxine (T_4)치의 상승, 갑상선 자극호르몬(thyroid stimulating hormone, TSH)치의 저하, 99m Technetium을 이용한 갑상선 스캔상의 전반적인 미만성 섭취증가와 갑상선비대, 그리고 방사선 우소(^{131}I) 섭취율이 증가된 경우로 하였으며, 비중독성 갑상선비대증 환자는 갑상선 기능이 정상 혹은 저하된 상태이면서 갑상선 종대가 동반된 경우로 하였다. 갑상선 결절 환자는 정상의 갑상선 기능을 보이면서 갑상선 스캔에서 냉병소를 볼수 있는 경우로 하였다.

2. 방법

1) 갑상선기능검사 및 자가면역항체 측정

대상 환자 모두에서 시판되고 있는 방사면역 Kit를 사용하여 혈청 총 T_3 , T_4 (Quanticoat TM, Kallestad

Diagnostics Inc., Chaska, USA), 갑상선 자극호르몬(TSH RIABEAD II, ABBOTT Laboratories, North Chicago, USA), 항갑상선 글로불린(thyroglobulin, Tg) 항체(TGAb IRMA, BIOCODE s.a., BELGIUM.), 항미소체(microsomal) 항체(TMAB, BIOCODE s.a., BELGIUM), 갑상선 자극호르몬 수용체(TSH receptor) 항체(TRAb, RSR LIMITED, United Kingdom.)를 측정하였다.

2) 갑상선세침흡인 검사

대상자 모두의 갑상선에서 22 게이지 주사침을 이용하여 갑상선 세침흡인을 3회 실시하였으며, 첫 2번은 900 μ l RNA sol B(Cinna/Biotex Lab. INC, Houston, Texas, USA)용액이 든 미세 원심관에 넣어서 중합효소 연쇄반응을 위해 -70°C에 냉동보관하였고, 나머지 1회는 세포진 검사에 이용하였다. 그리고 갑상선 세침흡인 물내 말초혈액의 오염도를 줄이기 위해 세포진 검사 슬라이드 상에서 적혈구의 검출이 많은 경우는 대상에서 제외하였다.

3) 말초혈액에서의 임파구 분리

말초 정맥 혈관으로부터 10 ml의 혈액을 0.5 ml 헤파린 용액이 든 주사기에 채취하여 15 ml 유리튜브에 lymphoprep.(NYCOMED PHARMA AS Oslo, Norway)용액 2 ml를 넣고 그 상층부에 헤파린으로 처리된 말초혈액 5 ml를 조심스럽게 얹은 후, 밀도차 원심 분리(Density gradient centrifugation)를 이용하여 2,000 RPM/min에서 5분, 3,000 RPM/min에서 20분간 원심 분리후 말초혈액 단핵구를 분리한다. 10% Fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1,640 용액 1 ml당 1.5×10^6 개의 말초혈액 단핵구를 추출하여 recombinant human IL-2(Genzyme Co. Cambridge, USA)를 25 U 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우로 나누어 48시간 동안 CO₂ incubator(95% O₂, 5% CO₂)서 배양한다. 48시간 배양한 후 배양 상층액의 감마 인터페론은 Human interferon- γ ELISA kit인 Intertest- γ TM (Genzyme Co, Cambridge, U.K)와 WS 050 Well Scan Microplate Elisa Reader(DENLEY Co. USA)를 이용하여 측정하였으며 세포성분은 역전사 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다.

4) 종합효소 연쇄반응법과 전기 영동법

갑상선 세침흡인 검사물과 말초혈액 단핵구에서 guanidium thiocyanate와 phenol(RNA zol B. Cinna/ Biotex Laboratories, INC Houston Texas, USA)방법으로 세포성(cellular) RNA를 추출한다. 세포성 RNA 1 ug을 함유하고 있는 각 RNA 시료 3 ul와 Geneamp RNA PCR kit(PERKIN ELMER CETUS Co. Norwalk, USA)의 10×PCR buffer II(500 mM KCl/100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 2 ul, 25 mM의 MgCl₂ 4 ul, 20 U/ul의 RNase inhibitor 1 ul, 50 uM의 oligo(dT) 1 ul, 40 mM의 dNTP 8 ul, 50U/ul의 Molony murine leukemia virus reverse transcriptase 2.5 U/ul를 섞은 후 증발을 막기 위해 mineral oil(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 100ul 넣고 thermal cycler를 이용하여 42°C에서 15분간 배양 후, 99°C에서 5분간 가열하고, 5 °C에서 5분 동안 식혀 역전사 방법으로 대상성의 DNA (complementary DNA, c-DNA)를 만든다. 생성된 대상성의 DNA마다 GAPDH, 인터루킨-1β, 인터루킨-2, 인터루킨-8, 인터페론 감마, PDGF-A의 primer (Table 1)를 각각 1 ul씩 혼합한 후 5 U/ul의 Amplitag DNA polymerase 0.5 ul, 25 mM의 MgCl₂ 4 ul, 10×PCR buffer II 8 ul, 종류수 65.5 ul를 섞은 후 30초간 원심분리한다. Single Block system(ERICOMP INC. San

Diego, USA) thermal cycler를 이용하여 94°C에서 1분 간 1회, 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초로 35회 증폭시키고, 72°C에서 10분간 둔다. 종합효소 연쇄반응 산물 10 ul를 Gel loading buffer 3 ul와 섞은 다음 Ethidium Bromide가 함유된 4% Nuceive agarose gel에 loading 후 1×Tris Acetate- EDTA (TAE) buffer로 채워진 소형 전기영동기로 전기영동하여 UV trans-illuminator (302 nm 파장)와 폴라로이드 카메라로 사진 촬영하였다.

5) 통계처리 방법

통계처리는 PC-SAS Version 6.04 통계 프로그램을 이용하였고, 모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였다. 갑상선 기능검사치와 인터루킨-2 자극한 후의 감마 인터페론치의 각 군간의 차이는 비모수 검증법인 Kruskal-Wallis test를 시행하였고, 각 군에서의 인터루킨-2를 준 경우와 주지 않은 경우의 감마 인터페론 수치 비교는 비모수 검증법인 윌콕슨 부호 순위법(Wilcoxon rank sum test)을 이용하였다. 유의 수준은 0.05로 정하였다.

결 과

대상 환자들에서 연령 및 성별의 차이는 볼 수 없었

Table 1. Oligonucleotides of 5' Primers and 3' Primers of the GAPDH, IL-1β, IL-2, IL-8, IFN-γ, PDGF-A

mRNA species	Primers sequences	Size of PCR product. bp (cRNA)
GAPDH	(5')5'-GTCAT GAGCC CTTCC ACGAT-3' (3')5'-GAATC TACTG GCGTC TTCAC C-3'	250
IL-1β	(5')5'-ATGCC AGAAC TACCT AAGCT CGC-3' (3')5'-ACACA ATTG CATTG TGAAG TCAGT T-3'	802
IL-2	(5')5'-ATGTA CAGGA TGCAA CTCCT GTCTT-3' (3')5'-GTTAG TGTG AGATG ATGCT TTGAC-3'	458
IL-8	(5')5'-ATGAC TTCCA AGCTG GCCGT GGCT-3' (3')5'-TCTCA GCCCT CTTCA AAAAC TTCTC-3'	289
IFN-γ	(5')5'-ATGAA ATATA CAAGT TATAT CTTGG CTTT-3' (3')5'-GATGC TCTTC GACCT CGAAA CAGCA T-3'	494
PDGF-A	(5')5'-CCTGC CCATT CGGAG GAAGA G-3' (3')5'-TTGGC CACCT TGACG CTGCG-3'	301

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase IL: Interleukin

PDGF-A: platelet derived growth factor-A IFN-γ: Interferon gamma

— 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토킨 발현과 말초혈액 단백구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 —

으나 갑상선 기능검사치는 갑상선 기능항진증군에서 혈청 T₃치가 487.9±85.5 ng/dl, 혈청 T₄치가 20.8±1.9 ug/dl, 갑상선 자극호르몬치가 0.01±0.003 uIU/ml, 항갑상선글로불린 항체치가 48.9±27.7 IU/ml, 항미소체 항체치가 786.5±1732 IU/ml, 갑상선자극호르몬 수용체 항체치가 46.4±4.9%이었고, 비중독성 갑상선비대증에서는 혈청 T₃치가 155.5±10.3 ng/dl, 혈청 T₄치가 9.5±1.4 ug/dl, 갑상선 자극호르몬치가 9.89±8.8 uIU/ml, 항갑상선 글로불린 항체치가 163.4±79.6 IU/ml, 항미소체 항체치가 195±132.3 IU/ml이었으며 갑상선 결절 환자군에서는 혈청 T₃치가 145.0±4.7 ng/dl, 혈청 T₄치가 10.6±0.5 ug/dl, 혈청갑상선 자극호르몬치가 0.89±0.3 uIU/ml, 항갑상선 글로불린 항체치가 25.9±3.1 IU/ml, 항미소체 항체치가 24.5±0.8 IU/ml으로서 갑상선 기능항진증군의 혈청 T₃와 T₄치가 비중독성 갑

상선비대증과 갑상선 결절 환자군에 비해 유의하게 높았는데(p<0.05) 비해 혈청 갑상선 자극호르몬치는 유의하게 낮았다(p<0.05). 그리고 갑상선 결절 환자군보다 갑상선 기능항진증군과 비중독성 갑상선비대증군에서 항미소체 항체치는 다같이 증가되어 있었으나 항갑상선글로불린 항체치는 비중독성 갑상선비대증에서 매우 증가되어 있었지만 갑상선 기능항진증군과 갑상선 결절 환자군에서는 미미한 증가 소견만 보였다. 아울러 항갑상선 자극호르몬 수용체 항체치는 갑상선 기능항진증군에서만 증가되어 있었다(Table 2).

각 군의 환자들 사이에 갑상선 세침흡인검사에서 얻은 갑상선 조직의 시토킨 발현은 다소 개인적인 차이를 보였으며, GAPDH, 인터루킨-1β, 인터루킨-8은 세 군 모두에서 발현되었으나, PDGF-A는 갑상선 기능항진증군과 갑상선 결절 환자군에서만 표현되었고 비중독

Table 2. Patient's Characteristics

Groups	No	Sex (F/M)	Age(yr)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (mg/dl)	TSH (mIU/ml)	Antibodies		
							Tg(IU/ml)	TSH-R(%)	Microsomal IU/ml)
Hyper-thyroidism	7	6/1	39±6	487.9±85.5*	20.8±1.9*	0.01±0.003*	48.9±27.7	46.4±4.9	786.5±1732.2
Non toxic goiter	6	6/0	31±4	155.5±10.3*	9.5±1.4*	9.98±8.8*	163.4±79.6	Neg	195±132.3
Thyroid nodule	7	7/0	37±5	145.0±4.7*	10.6±0.5*	0.89±0.3*	25.9±3.1	Neg	24.5±0.8

Mean±SE * p < 0.05 Tg: Thyroglobulin TSH-R: TSH receptor

Table 3. Comparison of Cytokine Gene Expression in Thyroid Aspiration and Peripheral Blood Mononuclear cells from Patients with Hyperthyroidism, Non-Toxic Goiter, Thyroid Nodule

Groups	No	Thyroid aspirates						PBMC (pre-IL 2)					PBMC (post-IL 2)				
		GAPDH	IL-1β	PDGF-A	IFN-γ	IL-8	IL-2	GAPDH	IL-1β	PDGF-A	IFN-γ	IL-8	GAPDH	IL-1β	PDGF-A	IFN-γ	IL-8
Hyper-thyroidism	7	7/7	6/7	6/7	0/7	6/7	0/7	7/7	7/7	5/7	6/7	2/7	7/7	7/7	6/7	6/7	3/7
Non toxic goiter	6	6/6	6/6	0/6	0/6	5/6	0/6	6/6	6/6	5/6	6/6		6/6	6/6	5/6	6/6	
Thyroid nodule	7	7/7	6/7	7/7	0/7	7/7	0/7	7/7	7/7	7/7	1/7		7/7	7/7	7/7	1/7	

PBMC: peripheral blood mononuclear cell GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

IL-1β: Interleukin-1β PDGF-A: platelet derived growth factor-A IFN-γ: Interferon-gamma IL-8: Interleukin-8

성 갑상선비대증에서는 발현되지 않았다. 그리고 인터루킨-2와 인터페론 감마는 세 군 모두에서 표현되지 않았다. 말초혈액 단핵구의 시토kin 발현에서도 인터루킨-2를 자극하지 않은 경우보다 인터루킨-2를 자극한 경우에서 시토kin의 발현이 증가되었으며, GAPDH, 인터루킨-1 β , 인터페론 감마는 세 군 모두에서 강하게 발현되었으나, PDGF-A는 비중독성 갑상선비대증과 갑상선 결절 환자군보다 갑상선 기능항진증군에서 다소 미미하게 발현되었다(Table 3, Fig. 1~3).

그리고 말초혈액 단핵구 배양 상층액에서 감마 인터페론의 생성을 알 수 있었으며, 각 군에서의 인터루킨-2 자극 전의 기저 감마 인터페론 평균치는 각각 12.06 ± 0.31 pg/ml와 12.08 ± 0.95 pg/ml, 11.79 ± 0.48 pg/ml로 이들 간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 세군

에서 인터루킨-2를 자극한 후의 말초혈액 단핵구 배양 상층액에서 감마 인터페론을 측정한 결과 15.0 ± 1.61 pg/ml와 289.47 ± 107.0 pg/ml, 18.96 ± 6.08 pg/ml로 갑상선 기능항진증군과 갑상선 결절 환자군보다 비중독성 갑상선비대증군에서 감마 인터페론의 상승 폭이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 4).

고 칠

시토kin이 세포사이의 신호전달 역할을 하면서 면역반응에 있어 한가지 중요한 역할을 한다[4]는 사실이 알려져 있으나, 이러한 시토kin들은 생성된 병소에서 혈중으로 유리되는 양이 매우 적고, 혈중으로 유리된 시토kin들은 수용체와 결합하여 농도가 줄어들 뿐아니라, 일

Fig. 1. RT-PCR analysis of cytokine gene expression in thyroid aspirates.

- 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토킨 발현과 말초혈액 단백구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 -

Fig. 2. RT-PCR analysis of cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cell(before IL-2 stimulation).

Fig. 3. RT-PCR analysis of cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cell(after IL-2 stimulation).

시적으로 유리되거나 소량의 시토킨이 지속적으로 유리되는 경우 측정할 수가 없는 실정이다[6].

1988년에 Buchan 등[11]이 류마チ스 관절염 환자의

관절액내에 존재하는 T 세포의 분비 물질인 인터루킨 2 와 감마 인터페론을 대상성의 DNA 소식자(probe)를 이용하여 검출한 이후로 현재까지 여러가지 방법을 이

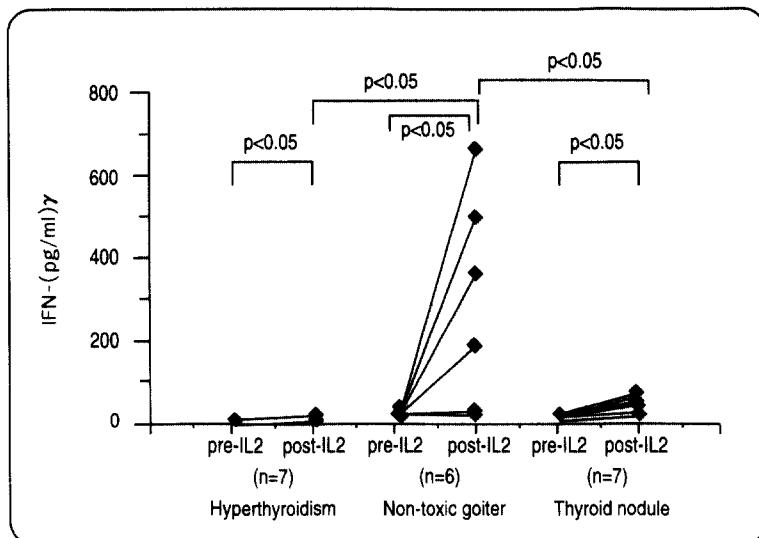


Fig. 4. Interferon-gamma(IFN- γ) production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in response to interleukin-2(IL-2) from patients with Hyperthyroidism, Non-toxic goiter, Thyroid nodule.

용한 시토킨의 표현에 대한 연구가 발표되었다.

세포성 면역 반응에서 시토킨 들이 갑상선의 자가면역 기전의 시작과 전개에 중요한 매개 역할을 할 것이라는 것은 인터페론 감마 치료후 자가면역성 갑상선 질환의 발생[10]과 인터루킨 2를 투여한 후 갑상선 기능 저하증의 발생을 보고한[12] 이후로 알려지기 시작하였다.

갑상선 조직의 시토킨 표현에 대한 연구는 1989년 Grubeck-Loebenstein 등[7]이 수술시 얻은 갑상선조직에서 slot blot analysis 방법으로 갑상선내 시토킨 생성을 보고하였고 Rutenfranz 등[13]은 갑상선 조직에서 In situ hybridization을 시행하여 시토킨 mRNA를 분석하였다. 그러나, slot blot analysis는 분석하려는 시토킨 mRNA의 양이 적을때는 시행하기 어려우므로 이러한 방법을 위해서는 수술에 의한 많은 조직이 필요하게 된다[14]. 그리고 In situ hybridization과 면역조직화학적방법[15]을 이용한 연구는 미량의 mRNA와 단백질 양의 상대적 비교가 어려웠다. 최근 분자생물학적 연구가 활발해지면서 mRNA의 분석에 기초를 둔 연구방법이 소개되었는데, 이러한 방법으로는 전사후(posttranscription)와 유전암호해독후(posttranslation) 조절기능

의 정도를 나타내지 못한다는 점에서 제한점이 있으나 작은 조직표본에서 합성되어지는 시토킨의 윤곽에 대한 유용한 정보를 얻을수 있다고한다. 그리고 유전자 발현을 조사하는 역전사 중합효소 연쇄반응법은 slot blot analysis보다 매우 민감하여 아주 작은 조직성분이나 mRNA만 있어도 검사가 가능하므로 생체내 매우 미량인 시토kin 표현의 분석에 유용하다[16]고 알려져 있으며, 최근 Watson 등[17]은 갑상선조직을 이용한 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 갑상선 여포세포 및 갑상선내 침윤 임파구의 시토킨 표현을 조사하여 보고하였다.

1991년 Davies 등은 수술시 얻은 자가면역성 갑상선 질환의 갑상선 조직에서 갑상선 내 침윤된 T세포의 수용체를 중합효소 연쇄반응법으로 조사하고, 1993년에는 갑상선 세침흡인 검사물을 대상으로 중합효소 연쇄반응법을 시행하여 T세포 수용체를 조사하여 유사한 결과를 보고한 바 있다[8,9]. 물론 앞서 언급한 바와 같이 갑상선 조직을 이용하여 시토kin 분석을 하면 보다 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되지만, 대부분의 자가면역성 갑상선질환자들이 항갑상선 약제를 복용하고 있으며 일정기간 약제를 복용한 후 수술을 시

– 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토킨 발현과 말초혈액 단백구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 –

행하므로 이들 약제 복용에 의한 시토킨 분비의 변화가 초래될 수 있으며[18,19], 수술 및 수술후 조직의 분리나 세포의 분리등 여러가지 시술 자체 또한 시토킨 분비의 변화를 초래할 수 있는 등의 이유로 수술후 얻은 조직이나 세포가 갑상선질환 초기의 시토킨 분비를 반영한다고는 보기힘들다. 그러므로 저자들은 갑상선 세침흡인물에서의 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 시토킨 분석방법을 사용하였고, 이러한 방법이 갑상선 질환의 시토kin 발현에 대한 보다 실제적인 결과를 얻을 수 있을것으로 생각된다.

갑상선 질환에서의 시토킨 발현에 대한 연구로 Grubeck-Loebenstein 등[7]은 자가면역질환인 그레이브스병환자군에서 갑상선내 임파구 침윤정도와 비례하여 인터페론 감마, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)- α , 인터루킨-1 α 와 인터루킨- β , 인터루킨-6, PDGF-A 사슬(chain)의 발현을 보고하였다. 그리고 비중독성 갑상선 비대증에서는 그레이브스병보다 시토킨 발현정도가 미약하지만, 인터루킨-6와 PDGF-A가 임파구 침윤이 적은 경우에서도 동일한 발현을 보였으며, 인터루킨-1 α 와 인터루킨-6은 정제된 갑상선 여포세포에서 강하게 발현된다고 하였다. Watson 등[17]은 그레이브스병의 조직내 임파구에서는 인터루킨-1 α 와 인터루킨- β , 인터루킨-6, 인터루킨-8, 인터루킨-10, 종양괴사인자- α 등은 6명 모두에서 표현되었으나 인터루킨-2, 인터페론 감마는 대상환자의 약 반수에서만 검출된다고 하였다. 그리고 인터루킨-1, 인터루킨-6, 인터루킨-8은 그레이브스병과 비중독성 갑상선비대증군에서 모두 발현된다 고하였다. 저자들의 연구에서는 갑상선 세침 흡인물을 이용한 시토kin 발현은 갑상선 기능항진증과 비중독성 갑상선비대증 및 갑상선결절군에서 GAPDH와 인터루킨 1 β , 인터루킨 8 등은 강하게 표현되었으나 감마 인터페론과 인터루킨 2는 표현되지 않았는데, Schuppert 등[20]은 그레이브스병에서 인터페론 감마가 전혀 표 현되지 않았다고 하였고 Grubeck 등[7]의 slot blot analysis와 Margolick[15]의 면역 조직학적 분석법에서는 대상환자의 약 절반정도에서 검출되었다는 상이한 결과를 보고하였다. 그리고 이러한 인터페론 감마의 발현이 일정하지 않은 이유로는 이전에 사용했던 항갑상선 제에 의해 억제되었거나 인터페론 감마의 발현이 이러

한 질환의 진행과정에 근본적인 역할을 수행하지 않을 것이라고 하였다[15,17]. 그리고 비중독성 갑상선비대증의 경우에서는 조직을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응법을 시행한 Watson 등의 결과와 일치하는 인터루킨-1 β , 인터루킨-6, 인터루킨-8의 발현을 나타내어 이러한 시토킨들은 임파구 뿐만 아니라 갑상선 여포세포에서도 생성된다[21,22]는 사실을 확인할 수 있었다. 그리고 PDGF-A는 갑상선 기능항진증과 갑상선 결절군에는 강하게 발현되었으나 비중독성 갑상선비대증에서는 발현되지 않았다. 갑상선 면역반응에 대한 PDGF-A의 정확한 역할에 대해서는 알려져 있지 않으나, PDGF-A가 혈소판 α -소포에 저장되며, 혈소판으로부터 배설되어 혈관 손상 부위의 결체조직세포에 유사 분열 물질로 작용한다[23]고 알려져 있어 자가면역 갑상선질환의 발생에 PDGF-A가 관여할 것으로 생각된다. 이러한 각 시토킨들의 생성정도는 자가면역 질환과 비자가면역 질환에서의 조직내 임파구 침윤정도에 관련되어 있다[7,13]고 하며 갑상선 여포세포에서도 [21,22] 일련의 시토킨을 생성하지만 주된 시토kin 생성의 주된 장소는 갑상선내 침윤 임파구[17]라고 알려져 있다.

자가면역 갑상선 질환의 발생에서 세포매개성 면역의 밀접한 연관성[1~3,24]이 알려진 아래로 정상 면역 반응에 필수적인 T임파구 성장인자인 인터루킨-2[25]에 대한 연구가 있어왔다. 또한 이 시토킨이 말초혈액 단백구의 감마 인터페론 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다[4]. 자가면역 질환에서의 인터루킨-2와 감마 인터페론에 대한 연구로는 Miyasaka 등[26]이 류마チ스관절염환자와 전신성홍반성낭창환자에서 말초혈액 임파구의 인터루킨-2 생성능력이 저하되어 있다고 보고한 이후, Tsokos 등[27]이 전신성 홍반성 낭창 환자에서의 말초혈액 단백구의 유사분열 물질인 인터루킨-2의 자극에 의한 감마 인터페론의 생성감소를 보고하였고, Iwatani 등[28]이 자가 면역 갑상선 질환자에서 유사분열 물질인 concanavalin A(con A)의 자극에 의한 말초 혈액 단백구의 감마 인터페론 생성 감소를 보고하여 이러한 전신적 자가면역질환에서 인터루킨-2와 인터페론 감마 생성의 장애는 T임파구의 기능장애를 시사하고 이것이 면역학적 병인기전으로 작용한다고 알

려져 왔다. 그리고 Eisenstein 등[29]은 갑상선 기능이 항진된 그레이브스병 환자에서 유사분열 물질의 자극에 의한 인터루킨-2의 생성 감소를 보고한 바 있다.

저자들의 연구에서도 인터루킨-2자극후의 말초혈액 단핵구 배양상층액의 감마 인터페론 생성은 갑상선 기능항진증군에서 비중독성 갑상선비대증군보다 유의하게 감소되어 있었다. 이러한 자가면역 질환인 갑상선 기능항진증군의 인터페론 감마의 생성감소는 류마チ스 관절염[30]이나 전신성 흥반성 낭창[27]의 경우에서와 유사하게 나타났다. 그러므로 이러한 말초혈액 단핵구의 인터루킨 2자극에 의한 인터페론 감마 생성 저하는 국소적인 자가면역 질환과 전신성 자가면역 질환에서 동일하게 관찰되는 비특이적인 현상으로 생각된다.

아직까지 이런 현상에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않고 있지만 최근에 Matsubayashi 등[31]은 갑상선 기능항진증의 그레이브스병의 경우 말초혈액 단핵구의 인터루킨-2자극에 의한 감마 인터페론 생성 감소는 주로 CD4 조력 T세포에 의해 일어나며, 가능한 기전으로 세가지 기전을 제시하였다. 그 중 첫 번째 기전으로는 그레이브스병에서의 감마 인터페론 생성 감소는 CD4 세포가 계속된 자극으로 말미암아 인터루킨 2의 자극에 대해 하향 조절되어 있을 수 있다고 설명하였고, 두 번째는 그레이브스병에서 CD4 세포의 인터루킨-2에 대한 수용체의 수적 감소 및 기능 저하를 들고 있는데, Emery 등[32]의 보고에 의하면 자가면역 질환인 활동성 류마チ스 관절염 환자의 유사분열 물질 자극전 임파구에는 정상 대조군과 비 활동성 환자에서보다 인터루킨-2수용체의 수가 증가되어 있으나, 유사분열 물질을 자극하게 되면 자극전 보다 수용체의 수도 감소할 뿐만 아니라 수용체의 고 친화력도 없어진다고 하였고, Keystone 등[33]은 류마チ스 관절염의 환자에서 혈청 및 활액내에서 수용성 인터루킨-2 수용체의 수가 증가하였음을 보고하였다. 이들 혈청내 혹은 세포 상층액의 인터루킨-2 수용체 증가는 세포성 인터루킨-2 수용체가 인터루킨-2와 결합하는 능력을 저하시킬 수 있다고 하겠다. 세 번째는 CD4 세포내의 인터루킨-2 정보 전환의 장애를 들 수 있다. 이 경우 Tsokos 등[27]이 전신성 흥반성 낭창에서 인터페론 감마의 생성 감소를 보고 하였는데, 말초혈액 단핵구 억제나 단핵구 표면의 인터

루킨-2 결합의 장애보다는 인터페론 감마 생성에 필요 한 인터루킨 2의 정보 전환(signal transduction)의 장애에 의한 것으로 설명하였다. 저자들의 말초혈액 단핵구의 역전사 중합효소 연쇄반응법의 결과와 배양상층액의 인터페론 감마 생성치의 비교에서도 갑상선 기능항진증군보다 비중독성 갑상선비대증군에서 증가된 소견을 보였다. 그리고 Sakatsume 등[34]은 인터루킨-2 자극에 의한 감마 인터페론의 생성 감소와는 달리 갑상선 미소체 항원 자극에 의한 자가면역 갑상선 질환에서의 인터페론 감마 생성의 증가를 보고하여, 비특이 항원에 의한 T세포의 반응과는 달리 특이 항원에 의해 감작된 T세포가 특이항원에 노출 될 때 일련의 시토킨을 분비하여 적절한 면역 반응을 수행할 수 있다고 설명하고 있어 향후 여기에 대한 보다 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료되며, 갑상선 질환에 관여하는 시토킨의 종류와 역할을 알기 위해 갑상선 조직을 얻기 힘든 상황에서는, 갑상선 세침흡인 검사법으로 조직을 얻은 후, 역전사중합효소 연쇄반응법을 이용하면 질환의 초기에 생체내의 시토킨 표현형을 조사할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

자가면역 갑상선질환과 비자가면역 갑상선질환에 여러가지 시토킨이 관여한다는 사실이 알려져 왔다. 저자들은 갑상선 기능항진증(7예), 비중독성 갑상선 비대증(6예), 갑상선 결절환자(7예)에서 갑상선세침흡인검사를 실시한 후 중합효소연쇄반응법을 이용하여 GAPDH, 인터루킨-1B, 인터루킨-2, 인터루킨-8, PDGF-A, 인터페론 감마등의 시토kin 발현을 조사하였으며, 아울러 이를 환자들의 말초혈액 단핵구를 분리한 후 배양시 인터루킨-2 (25 U/ml) 자극에 의한 배양상층액의 인터페론 감마의 생성 정도를 비교하였다.

1) 각 군의 환자들에서 갑상선세침흡인검사물의 시토kin 발현은 다소 개인적인 차이를 보였지만 GAPDH, 인터루킨-1B, 인터루킨-8은 세 군 모두에서 표현되었고, PDGF-A는 갑상선 기능항진증군과 갑상선 결절 환자군에서만 표현되었으나 비중독성 갑상선 비대증에서는 표현되지 않았다. 그리고 인터루킨-2와 인터페론 감마

— 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토킨 발현과 말초혈액 단핵구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 —

는 세 군 모두에서 발현되지 않았다.

2) 말초혈액 단핵구의 시토킨 발현에서도 인터루킨-2를 자극하지 않은 경우보다 인터루킨-2를 자극한 경우에서 시토킨의 발현이 증가되었으며, GAPDH, 인터루킨-1 β , 인터페론 감마는 세 군 모두에서 강하게 발현되었으나, PDGF-A는 비중독성 갑상선 비대증과 갑상선 결절 환자군 보다 갑상선 기능 항진증군에서 다소 미미하게 발현되었다.

3) 말초혈액 단핵구 배양 상층액에서 감마 인터페론의 생성을 알 수 있었으며, 각 군에서의 인터루킨-2 자극 전의 기저 감마 인터페론 평균치는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 세 군에서 인터루킨-2를 자극한 후의 감마 인터페론치의 상승폭은 갑상선 기능항진증군과 갑상선결절 환자군보다 비중독성 갑상선 비대증군에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 이상의 결과로 볼 때 갑상선 질환에 따른 갑상선세침흡인검사물에서의 시토킨 발현은 질환에 따른 차이뿐만 아니라 다소 개인적인 차이를 보였으나 갑상선 기능항진증군에서 비중독성 갑상선비대증보다 증가되었다. 그리고 말초혈액 단핵구에서의 PDGF-A 발현은 비중독성 갑상선 비대증군과 갑상선 결절군보다 갑상선 기능항진증군에서 다소 미미하게 표현 되었다. 그리고 갑상선세침흡인검사물을 이용한 중합효소 연쇄반응법은 갑상선질환의 시토킨 발현 연구에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Werner SC, Fierer JA: Cell mediated immunity in Graves' disease? *N Engl J Med* 287:1251-1236, 1972
2. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T: Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 12:1115-1118, 1983
3. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ, et al: Interferon gamma induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol* 61:265-273, 1985
4. Dinarello CA, James WM: Current concepts lymphokines. *N Eng J Med* 317:940-946, 1987
5. McLachlan SM, Taverne J, Atherton MC, Cooke A, et al: Cytokine, thyroid autoantibody synthesis and thyroid cell survival in culture. *Clin Exp Immunol* 79:175-181, 1990
6. Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Chantry D, Kassal H, Londei M: Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 α and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* 77:324-330, 1989
7. Davies TF, Martin A, Concepcion ES, Graves PN, Cohen L: Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cell in autoimmune thyroid disease. *N Engl J Med* 325:238-244, 1991
8. Davies TF, Concepcion ES, Ben-Nun A, Graves PN, Tarjan G: T-cell receptor V gene use in autoimmune thyroid disease: Direct assessment by thyroid aspiration. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 660-666, 1993
9. Burman Pia, Totterman TH: Thyroid autoimmunity in patients on long term therapy with Leukocyte-derived interferon. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1086-1090, 1986
10. Whicher JT, Evans W: Cytokine in disease. *Clin Chem* 36(7):1269-1281, 1990
11. Buchan G, Barrett K, Fujita T, Taniguchi T, Maini R, Feldmann M: Detection of activated T cell products in the rheumatoid joint using cDNA probes to interleukin-2(IL-2), IL-2 receptor and IFN-gamma. *Clin Exp Immunol* 71:295-301, 1988
12. Atkins MB, Mier JW, Parkinson DR, Gould JA, Berkman EM, Kaplan MM: Hypothyroidism treatment with interleukin-2 and Lymphokine-activated killer cells. *N Eng J Med* 318:1557- 1563, 1988
13. Rutenfranz I, Kruse A, Rink L, Wensel B, Arnholdt H, Kirchner H: In situ hybridization of the

- mRNA for interferon-gamma, interferon-alphaE, interferon-beta, interleukin-1beta, interleukin-6 and characterization of infiltrating cells in thyroid tissues. *J Immunol Meth* 148:233-242, 1992
14. Grubeck-Loebenstein B, Turner M, Pirich K, et al: CD4+ T cell clones from autoimmune thyroid tissue cannot classified according to their lymphokine production. *Scand J Immunol* 32:433-440, 1990
15. Margolick JB, Weetman AP, Burman KD: Immunohistochemical analysis of intrathyroidal lymphocytes in graves' disease: Evidence of activated T cells and production of interferon gamma. *Clin Immunol Immunopathol* 47:208-218, 1988
16. Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9717-9721, 1989
17. Watson PF, Picerill AP, Weetman AP: Analysis of cytokine gene expression in the Graves' disease and Multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 79:355-360, 1994
18. Volpe R: Immunoregulation in autoimmune thyroid disease. *N Eng J Med* 316:44-45, 1987
19. Strakosch CR, Wenzel BE, Row VV, Volpe R: Immunology of autoimmune thyroid disease. *N Eng J Med* 307:1499-1507, 1982
20. Schuppert F, Reiser M, Scheumann GFW, et al: Expression levels of the thyrotropin receptor gene in autoimmune thyroid disease: coregulation with parameters of thyroid function and inverse relation to major histocompatibility complex classes I and II. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1349-1356, 1993
21. Weetman AP, Bright-Thomas R, Freeman M: Regulation of interleukin 6 release by human thyrocyte. *Journal Endocrinology*, 127:357-361, 1990
22. Weetman AP, Bennett GL, Wong WLT: Thyroid follicular cells produce interleukin-8. *J Clin Endocrinol Metab* 75:328-330, 1990
23. Betsholtz C, Johansson A: cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320:695-699, 1986.
24. Hanafusa T, Pujo-Borrell R, Chiovalto L, Russell RCG, Donoach D, Bottazzo GF: Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: Relevance for autoimmunity. *Lancet* 12:1111-1115, 1983
25. Smith KA: Interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2:319-321, 1984
26. Miyasaka N, Nakamura T, Russell IJ, Talal N: Interleukin-2 deficiency in Reumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 31:109-117, 1984
27. Tsokos GC, Boumpas DT: Deficient gamma-interferon production in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 29:1210-1215, 1989
28. Iwatani Y, Gerstein HC, Iitaka M, Row VV, Volpe R: Thyrocyte HLA-DR expression and interferon-gamma production in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 63:695-708, 1986
29. Eisenstein Z, Engelsman Z, Weiss M: Production of and response to interleukin-2 in Graves' disease. *J Clin Immunol* 8:349-356, 1988
30. Combe B, Pope RM, Fischbach M, et al: Interleukin-2 in rheumatoid arthritis: production and response to interleukin-2 in reumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 59:520-528, 1985
31. Matsubayashi S, Akasu F, Kasuka Y, Snow K, Keystone E, Volpe R: In vitro production of interferon-gamma by peripheral blood from patients with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 82:63-68, 1990

– 조성래 외 10인: 갑상선세침흡인검사에 의한 갑상선 조직 및 말초혈액의 시토kin 발현과 말초혈액 단백구의 인터페론 감마 생성에 관한 연구 –

32. Emery Paul, Wood Nigel: *High-affinity interleukin-2 receptors on blood lymphocytes are decreased during active rheumatoid arthritis.* *Arthritis and Rheumatism* 31:1176-1181. 1988
33. Keystone EC, Snow KM: *Elevated soluble interleukin-2 receptor levels in the sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis.* *Arthritis and Rheumatism* 31:844-849, 1988
34. Sakatsume Y, Matsubayashi S, Kasuka Y, Iwatanani Y, Volpe R: *CD4 cells from autoimmune thyroid disease secrete interferon-gamma after stimulation by thyroid microsomal antigen; CD8 cells suppress this secretion.* *Ann Endocrinol* 50:140-145, 1989