

□ 원 저 □

천식과 호산구성 기관지염에서 CD4, CD8 림프구 침윤

고려대학교 의과대학 내과학교실¹, 병리학교실²

이상엽¹, 이승룡¹, 김제형¹, 신 철¹, 심재정¹, 강경호¹,
유세화¹, 인광호¹, 이지혜², 정운용², 김한겸²

=Abstract=

Submucosal CD4+ and CD8+ T Lymphocyte Infiltrations in Asthma and Eosinophilic Bronchitis

Sang Yeub Lee, M.D.¹, Sung Yong Lee, M.D.¹, Je Hyeong Kim, M.D.¹,
Chol Shin, M.D.¹, Jae Jeong Shim, M.D.¹, Kyung Ho Kang, M.D.¹,
Se Hwa Yoo, M.D.¹, Kwang Ho In, M.D.¹,
Woon Yong Jeong, M.D.², Ji Hye Lee, M.D.², Han Kyeom Kim, M.D.²

¹Pulmonary Division, Department of Internal Medicine, and Department of ²Pathology,
College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Asthma and eosinophilic bronchitis(EB) are eosinophilic inflammatory diseases of the airway. However, EB differs from asthma in that there is no variable airway obstruction or airway hyper-responsiveness. Pathologically, asthma is characterized by the accumulation of eosinophils and CD4+ T lymphocytes in the submucosa. A recent study showed that there was no significant difference between asthma and EB in terms of the submucosal eosinophil and T lymphocyte count. However, it is not known whether or not an infiltration of CD4+ and CD8+ T lymphocytes occurs in the airways of EB patients. The aim of this study was to identify the difference between the two conditions by measuring the submucosal CD4+ and CD8+ T lymphocyte count.

Methods : Immunohistochemical analysis of bronchial-biopsy specimens was performed in 17 subjects with asthma and 24 subjects with EB.

Results : The CD4+ T lymphocytes count in the asthma subjects and the EB subjects was similar (median, 58.6 vs 50.0 cells/mm², respectively; P=0.341). In contrast, the number of CD8+ T lymphocytes

Address for correspondence:

Kwang Ho In, M.D.

The Pulmonary Division, The Department of Internal Medicine, Korea University Anam Hospital
126-1, 5Ka, Anam Dong, Sungbuk Ku, Seoul, Korea, 136-075
Phone : 82-2-920-5316 Fax : 82-2-929-2045 E-mail : khin@ns.kumc.or.kr

in the EB subjects was higher than that in the asthma subjects (median, 46.7 vs 11.8 cells/mm², respectively; P=0.003).

Conclusion : The infiltration of submucosal CD8⁺ T lymphocytes may be associated with the pathophysiology of EB. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 55:459-466)

Key words : CD4⁺, CD8⁺, lymphocyte, asthma, eosinophilic bronchitis.

서 론

천식과 호산구성 기관지염은 기도의 호산구성 염증질환이다. 천식은 가역적인 기도폐쇄와 기관지 과민성이 특징이며, 병리학적으로는 기관지 점막하의 호산구와 CD4 림프구 침윤, 점액선 비대, 기저막 비후, 기관지 평활근 비대가 특징적이다. 호산구성 기관지염은 천식과 달리, 기도폐쇄와 기관지 과민성이 없으나, 병리학적으로는 천식과 유사한 기관지 점막하의 호산구와 림프구 침윤이 관찰된다¹. 호산구성 기관지염의 병인기전, 자연경과, 치료, 예후등은 명확히 밝혀져 있지 않다. 즉 호산구성 기관지염이 천식으로 진행되는지, 기도의 remodeling 이 발생하는지, 일부의 연구²에서처럼 만성 기도 폐쇄가 발생하는지, 천식처럼 장기적인 조절이 필요한지 등은 아직 밝혀져 있지 않다. 이에 저자들은 천식과 호산구성 기관지염에서 CD4, CD8 림프구 침윤의 정도를 비교하여, 호산구성 기관지염의 병인에 대한 이해에 도움을 주고자 한다.

대상 및 방법

1. 대 상

천식환자 17명과 호산구성 기관지염 환자 24명을 대상으로 하였다. 기관지 천식의 진단은, 미국 흉부학회(ATS)의 기준³에 합당한 임상소견이 있고, 첫째, 기관지 확장제를 흡입한 후 1초간 노력성 호기량(FEV₁)이 12% 이상, 둘째, 메타콜린 유발검사

에서 PC₂₀가 8mg/mL 이하, 셋째, 2주간 최대 호기유량(PEF)의 일중 변동율이 20% 이상 등, 이들 세가지 사항 중 적어도 한가지를 만족하면 천식으로 진단하였다.

호산구성 기관지염의 진단은, 지속적인 기침외에 다른 호흡기 증상이 없고, 가역적인 기도 폐쇄를 시사하는 증상이 없고, 정상 흉부 방사선 소견, 정상 폐기능 검사소견을 보이며, 2주간 최대 호기유량(PEF)의 일중 변동율이 20% 미만, 메타콜린 유발검사에서 PC₂₀가 25mg/mL 이상, 객담 또는 기관지 점막에서 호산구의 수가 3% 이상이면 호산구성 기관지염으로 진단하였다^{4,5}. 모든 환자들은 본 연구 전에 흡입 또는 경구 스테로이드 제제를 투여 받은 적이 없었으며, 비흡연가 또는 과거 흡연가(12 개월 이상, 5 갑-년 미만)였다. 천식 환자들은 필요한 경우 속효성 흡입 베타 항진제를 투여하였다.

2. 방 법

기관지 내시경검사는 시술 전 2% 리도카인 용액을 분무기를 통해 구강 내 분사(spray)하여 충분히 국소마취를 한 후, 맥박 산소 측정기를 이용해 환자의 심박수와 산소 포화도를 감시하면서 굴곡성 기관지경(model BF; 1T30, Tokyo, Japan)을 이용하여 우측 기관지의 제2, 제3 분지의 기관지 분기부(carina)에서 2~3편의 조직편을 얻었다.

면역조직화학 염색을 위하여 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀(paraffin)에 포매(embed-

Table 1. Clinical characteristics

	subjects with EB (n=24)	subjects with Asthma (n=17)
Age (yr)	43.8±13.1	47.6±13.6
Male sex (no)	11	12
FEV ₁ (% of predicted)	103.5±14.4	85.3±24.7
FEV ₁ /FVC (%)	83.9±6.6	74.2±13.5
Atopy (%)	21.4	50.0

ding) 시켰다. 파라핀에 포매된 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고 60℃의 항온기에 서 한시간동안 가온하고 통상의 방법으로 탈파라핀 한 후 각각 다른 농도의 알콜로 함수시켜 증류수로 수세하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소수를 사용하여 20분간 처리한 후 Tris 완충 용액(Tris 3.025g, NaCl 40g, 1M HCl 22ml in H₂O 5ℓ, pH 7.4)에 씻었다. 항원회복을 위해 citrate 완충용액(sodium citrate 14.7g, 1M HCl 27ml in H₂O 5ℓ, pH 6.0)을 압력솔에 적당히 채우고 가온하여 끓기 시작할 때 슬라이드를 넣고 압력이 최고 (103kPa)에 도달한 후 2분간 더 끓이고, 찬물에 담가 압력을 낮춘 후 슬라이드를 꺼내 Tris 완충용액에 담갔다. 그 후 비특이적 반응을 막기 위해 차단(blocking) 항체를 실온에서 30분간 반응시킨다. 그런 다음 1차 항체로 상온에서 16~20 시간동안 배양(incubation)하였다. 1차 항체는 다음과 같은 monoclonal mouse IgG 항체를 사용하였다: anti-CD4, anti-CD8 (Dako Ltd, High Wycombe, UK). 발색 반응을 위해 aminoethylcarbazole로 처리하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다. 음성 대조군은 일차 항체를 빼고 생리식염수를 이용하여 동일한 방법으로 염색하였다.

면역 염색된 세포의 수는 광학현미경(model BX 50 ; Olympus, Tokyo, Japan) 400배 시야에서 eyepiece graticule(eyepiece micrometer ; Olympus,

Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다⁴. 4개의 각기 다른 section에서 1mm² 면적의 상피세포하 점막당 세포의 수를 측정하였다⁴. 기저막의 두께는 컴퓨터 분석 소프트웨어(Scion Image, Version 4.0; Scion Corporation, Maryland, USA)를 사용하여 20군데를 측정하여 평균값을 계산하였다. 측정은 경험이 풍부하고 숙련된 병리의사가 시행하였고 환자에 대한 임상적 정보는 주어지지 않았다.

통계적 분석은 컴퓨터 소프트웨어 (SPSS, Version 10.0 ; SPSS Inc, Chicago, Ill, USA)를 사용하여 시행하였다. 세포의 수는 중위수와 범위 (median and range)로 표시하였고, 두 군간의 비교는 Mann-Whitney U test 시행하였다. 기저막의 두께는 평균값과 표준편차(mean±SD)로 표시하였고, 두 군간의 비교는 t-test를 시행하였다.

결 과

대상군의 특성은 Table 1과 같다.

CD4 림프구의 중위값(cells/mm²)은 호산구성 기관지염군에서는 58.6(34.6~92.5), 천식군에서는 50.0(19.98~7.3)이었다(Fig. 1). 두 군에서 CD4림프구의 수는 유의한 차이가 없었다(P=0.341, Fig. 4).

CD8 림프구의 중위값(cells/mm²)은 호산구성 기관지염군에서는 46.7(30.0~98.9), 천식군에서는 11.8(5.1~38.5)이었다(Fig. 2). CD8 림프구의 수는 두 군에서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(P=

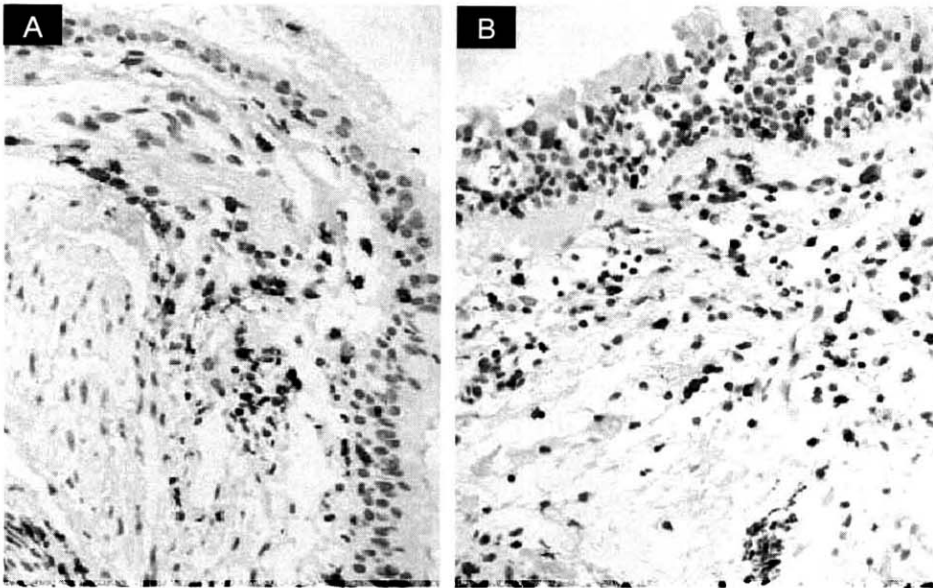


Fig. 1. Immunohistochemical staining of CD4+ T lymphocytes in endoscopic biopsies ($\times 400$).
(A) subjects with EB, (B) subjects with Asthma

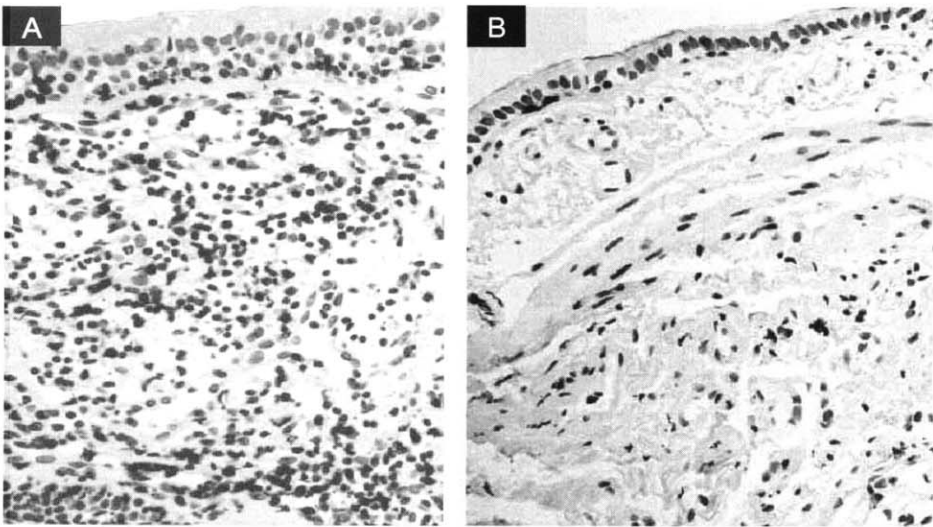


Fig. 2. Immunohistochemical staining of CD8+ T lymphocytes in endoscopic biopsies ($\times 400$).
(A) subjects with EB, (A) subjects with Asthma

0.003, Fig. 5). 호산구의 중위값(cells/mm²)은 호산구성 기관지염군, 천식군에서 각각 25.0(7.5~92.5), 58.0(26.0~112.5)로 유의한 차이가 없었다(P=0.219,

Fig. 3, Fig. 6). 기저막의 두께는 호산구성 기관지염군, 천식군에서 각각 평균 7.75 \pm 1.72, 8.31 \pm 2.05 (μ m)로 두 군에서 유의한 차이가 없었다(P=0.419,

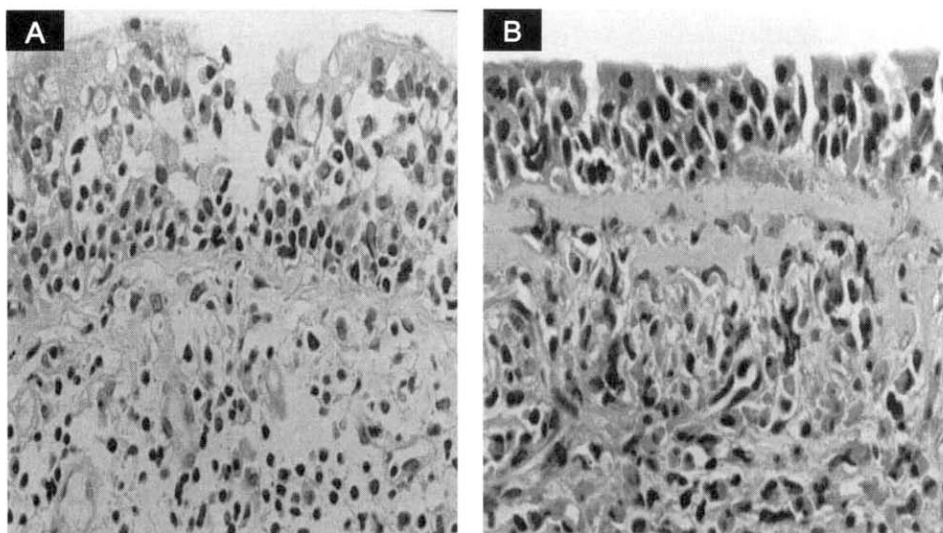


Fig. 3. H-E staining of eosinophils in endoscopic biopsies ($\times 400$).
(A) subjects with EB, (B) subjects with Asthma

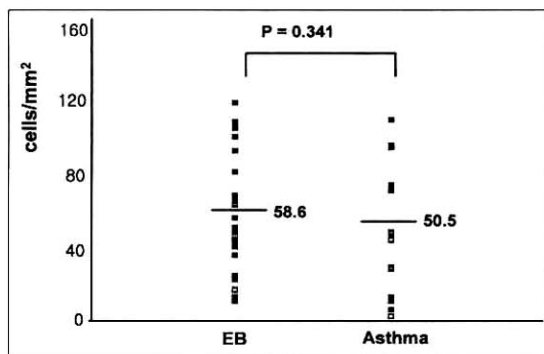


Fig. 4. Numbers of submucosal CD4+ T lymphocytes per square millimeter

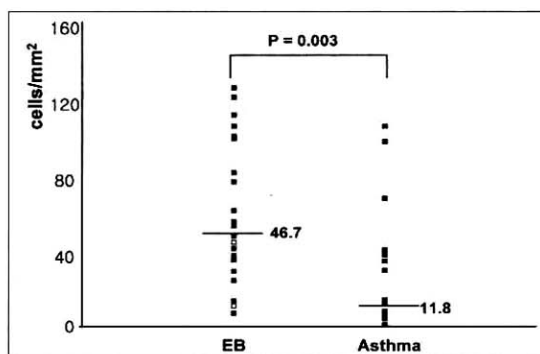


Fig. 5. Numbers of submucosal CD8+ T lymphocytes per square millimeter

Fig. 7)

이상의 결과를 Table 2에 요약하였다.

고 찰

호산구성 기관지염은 1989년 Gibson등⁶이 처음 제안한 질환으로, 현재는 만성 기침을 주소로 호흡기 전문의사를 찾는 환자의 10~15%를 차지할 정도

로 흔한 질환이다⁵. 중년기에 잘 발생하며, 스테로이드에 반응하는 지속적인 건성 기침 또는 소량의 점액성 객담을 동반하는 지속적인 기침이 특징적 증상이다⁵. 천명이나 호흡곤란, 가역적 기도폐쇄, 기관지 과민반응이 없고, 객담내 호산구 증가소견을 보이는 질환이다. 호산구성 기관지염과 천식은 기도의 호산구 침윤에 염증소견을 보인다는 점에서 동일하다¹. 또한 림프구의 침윤에도 차이가 없

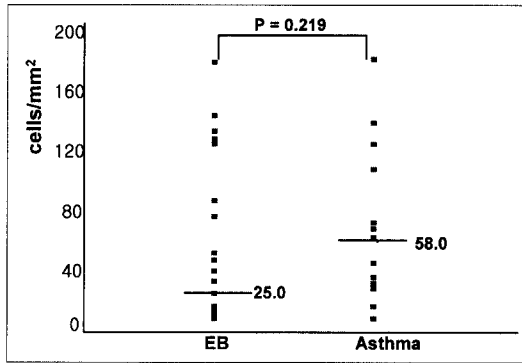


Fig 6. Number of submucosal eosinophils per square millimeter

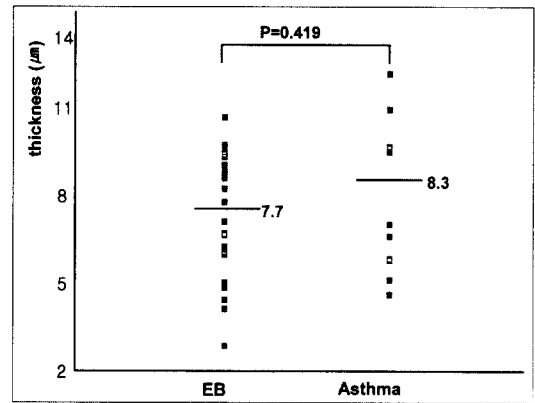


Fig 7. Thickness of basement membrane

다고 알려져 있다¹. 그러나 호산구성 기관지염은 천식과 달리 기관지 과민성과 가역적인 기도 폐쇄가 발생하지 않는다. 따라서 본 연구는 두 질환에서 림프구의 아형 중 CD4 림프구와 CD8 림프구를 비교 분석하여, 기도 염증 반응의 차이가 있는지를 밝히고자 하였다. 그 결과 두 질환에서 CD4 림프구 침윤에는 차이가 없었으나, CD8 림프구 침윤에서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 즉 호산구성 기관지염에서 천식에 비해 CD8 림프구 침윤이 증가되어 있었다.

CD8 림프구는 바이러스 감염의 빠른 회복에 관여하는 세포이다⁷. 만성 폐쇄성 폐질환에서 CD8 림프구의 침윤이 현저한데 그 기전은 반복된 바이러스 감염에 의하여 CD8 림프구가 과다하게 등록(recruitment)되고, 이것에 의해 폐장에 손상을 주

어⁸ 만성 폐쇄성 폐질환의 발생에 관여한다고 생각하고 있다. 따라서, 본 연구에서 호산구성 기관지염에서 CD8 림프구 침윤이 현저한 것은, 호산구성 기관지염의 발생 원인으로 바이러스 감염이 관여할 것으로 가정할 수 있을 것이다. 즉 CD8 림프구 등록에 어떤 바이러스성 자극(viral stimuli)이 관련이 있고, 이런 바이러스성 자극에 의해 CD8 림프구가 등록되고, 그것에 의하여 상피세포내 기침 수용체가 아급성 혹은 만성적인 염증상태에 의해 민감해진 상태로 있다가, 비특이적 외부 자극에 의해서도 기침이 발생하는 것이라고 생각할 수도 있을 것이다. 또는 CD8 림프구의 침윤 정도 차이에 의해서 질병의 표현형(phenotype)이 다른 것이라고 생각할 수도 있다. 즉 적은 수의 세포 침윤일 때는 좋은 쪽으로 바이러스 감염의 회복에 관여하

Table 2. Morphometric results

	EB	Asthma	p value
CD4*	58.6(34.6-92.5)	50.5(19.9-87.3)	0.341
CD8*	46.7(30.0-98.9)	11.8(5.1-38.5)	0.003
Eosinophil*	25.0(7.5-92.5)	58.0(26.0-112.5)	0.219
Basement membrane [†]	7.75 ± 1.72	8.31 ± 2.05	0.419

* cells per 1mm², Median (range), Mann-Whitney U test

[†] μm, Mean ± SD, t-test

고 많은 수의 세포 침윤일 때는 폐장에 손상을 주며⁸ 만성 폐쇄성 폐질환의 발생에 관여한다면, 호산구성 기관지염의 경우는 그 중간 정도의 세포 침윤에 해당될 수 있다고 생각할 수 있다.

결론적으로, 호산구성 기관지염과 천식에서 기도의 CD8 림프구 침윤의 정도의 유의한 차이가 관찰되었다. CD4 림프구와 호산구 침윤의 정도에는 차이가 없었다. CD8 림프구가 호산구성 기관지염의 병인기전과 천식과 다른 임상적 특징을 나타내는데 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

천식과 호산구성 기관지염은 기도의 호산구성 염증 질환이다. 그러나, 호산구성 기관지염은 천식과 달리 기도의 가역적인 폐쇄와 기도 과민반응이 관찰되지 않는다. 천식은 호산구와 CD4 림프구의 침윤이 특징인데, 최근 천식과 호산구성 기관지염에서 호산구와 림프구 침윤의 정도는 차이가 없는 것으로 보고되었다. 본 연구는 천식과 호산구성 기관지염에서 CD4, CD8 림프구 침윤의 정도를 비교하여 두 질환의 병인기전의 차이점을 밝히고자 한다.

방 법 :

천식환자 17명과 호산구성 기관지염 환자 24명을 대상으로 기관지 내시경하 점막 조직 생검을 시행하고, 기관지 조직에서 CD4, CD8 림프구에 대한 면역 조직화학 염색을 시행하여, 통계적으로 비교 분석하였다.

결 과 :

CD4 림프구의 중위값(cells/mm²)은 호산구성 기관지염군에서는 58.6(34.6~92.5), 천식군에서는 50.0(19.9~87.3)이었다. 두 군에서 CD4림프구의 수는 유의한 차이가 없었다(P=0.341). CD8 림프구의 중위값(cells/mm²)은 호산구성 기관지염군에서는 46.7

(30.0~98.9), 천식군에서는 11.8(5.1~38.5)이었다. CD8 림프구의 수는 두군에서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(P=0.003).

결 론 :

호산구성 기관지염에서 CD8 림프구의 침윤이 현저하며, CD8 림프구가 호산구성 기관지염의 병인기전과 천식과 다른 임상적 특징을 나타내는데 관여할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Hodge ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002;346:1699-705
2. Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, Pavord ID. Development of irreversible airway obstruction in a patient with eosinophilic bronchitis without asthma. *Eur Respir J* 1999;14:1228-30
3. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-44
4. Sang Yeub Lee, Jae Youn Cho, Jae Jeong Shim, Han Kyeom Kim, Kyung Ho Kang, Se Hwa Yoo, Kwang Ho In. Airway inflammation as an assessment of chronic nonproductive cough. *Chest* 2001;120:1114-20
5. Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, Pavord ID. Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:406-10
6. Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale

- EH, Horgreave FE. Chronic cough : Eosino-
philic bronchitis without asthma. *Lancet*
1989;1:1346-8
7. Ramsay A, Ruby J, Ramshaw I. A case for
cytokines as effector molecules in the reso-
lution of virus infection. *Immunol Today*
1993;14:155-7
8. Cannon MJ, Openshaw PJM, Askonas BA.
Cytotoxic T cell clear virus but augment
lung pathology in mice infected with respi-
ratory syncytial virus. *J Exp Med* 1988;
168:1163-8
-