

□ 원 저 □

폐렴경과 중 순환 호중구의 Respiratory Burst 활성화도 변화

한림대학교 내과학교실, 임상병리학교실*

이재명 · 이종민 · 김동규 · 최정은 · 모은경 · 박명재 · 이명구 · 현인규 · 정기석 · 박찬정*

= Abstract =

Longitudinal flowcytometric measurement of respiratory burst activity of neutrophils in patients with pneumonia

Jae Myung Lee, M.D., Jong Min Lee, M.D., Dong Gyu Kim, M.D., Jeong Eun Choi, M.D., Eun Kyung Mo, M.D., Myung Jae Park, M.D., Myung Goo Lee, M.D., In Gyu Hyun, M.D., Ki-Suck Jung, M.D. and Chan Jeoung Park, M.D.*

Department of Internal Medicine and Clinical Pathology*, College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea

Background : Recognition and ingestion of opsonized microorganisms by neutrophils induces the burst of oxidative metabolic activity. Products of the respiratory burst activity provide powerful oxygen dependent killing mechanism. Measurement of respiratory burst activity has been a major indicator of the functional capacity of neutrophils. We determined the respiratory burst activity of neutrophils in patients with pneumonia and observed the changes during the clinical course of pneumonia.

Methods : The EDTA blood was drawn from 24 normal controls and same numbers of pneumonia patients. The respiratory burst activity(with the production of H_2O_2 which changes nonfluorescent DCF-DA to green fluorescent DCF) in the non-stimulated state and the stimulated state with fMLP and PMA of neutrophils was measured by flowcytometry at day 1, 3, 5, 7 and 9 of admission.

Results : The respiratory burst activity of neutrophils was mildly increased by stimulation with fMLP. But there was no statistical significance between normal control and patients with pneumonia. The respiratory burst activity of neutrophils was markedly increased by stimulation with PMA in both groups. There was a significant difference in response to PMA between normal control and patients with pneumonia. The production of hydrogen peroxide from neutrophils was decreased during early course of pneumonia and it was recuperated gradually to normal level in 9 days.

Conclusion : Hydrogen peroxide production from neutrophils was suppressed during early course of pneumonia and restored after treatment. It is suggested that the production of oxygen radical in response to PMA stimulation from each neutrophils is decreased rather than increased during the early course of pneumonia.

Key Words : Pneumonia, Respiratory Burst Activity, Neutrophils, Flowcytometry

서 론

말초혈액내 백혈구의 60%를 차지하는 호중구는 세균 및 진균 감염시 일차 방어기전으로 염증 부위에 모여 세균 및 진균을 탐식하고 이때 활성화된 호중구는 산화물을 생성하고 이와 함께 탈과립된 효소 등에 의해서 살균작용이 이루어진다. 1980년대 이후 Respiratory burst에 의하여 생성된 산화물이 감염에서의 살균 작용 외에, 염증반응의 중추 역할을 하는 물질로서 조직손상¹⁾, 약물대사, 노화, 발암과정²⁾에 관여하여 각종 질환에 있어 병인과 연관이 있을 것으로 알려지고 있다.

식균된 미생물이 호중구에 의해 인식되거나 탐식되면 respiratory burst가 유도된다. 이러한 respiratory burst는 phorbol myristate acetate(PMA)와 같은 가용성 매개체, C5a와 같은 주화인자(chemotactic factor), N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(fMLP), concanavalin A 등에 의해 야기될 수 있는데 이는 NADPH로부터 산소로 전자를 전달하는 촉매인 NADPH oxidase를 자극함으로써 가능하다. 이렇게 하여 과산화 음이온(superoxide anion)이 생성되고 NADPH 생성에 의해 hexose monophosphate shunt(HMPS)가 활성화된다. 과산화 음이온으로부터 여러 가지 활성화된 산화물이 생성되는데 여기에는 과산화수소(hydrogen peroxide), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 과산화수소

라디칼(hydroperoxyl radical)과 singlet oxygen등이 속한다. 호중구의 탈과립(degranulation)과 연관되어 respiratory burst의 산물은 강력한 산소의존성 살균작용(oxygen-dependent killing mechanisms)을 가능하게 한다. 그러므로 respiratory burst 활성도를 측정하는 것은 호중구의 살균력을 알 수 있는 중요한 지표가 될 수 있다.

본 연구는 폐렴환자와 정상인의 정맥혈에서 호중구의 respiratory burst 활성도를 유세포분석기로 측정하여 폐렴환자의 respiratory burst 활성도를 측정하고 폐렴의 임상경과에 따른 respiratory burst 활성도의 변화를 관찰하여 폐렴의 경과에 있어 호중구의 산화물 생성능력과 임상 경과와의 관계를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대상

한림대학교 의료원 강동성심병원에 내원하여 폐렴으로 진단된 24명의 환자와 건강한 성인 24명을 대상으로 하였다. 폐렴환자의 평균연령은 53.2 ± 19.3 세였으며 남자가 14명, 여자가 10명이었다. 폐렴은 38.3℃이상의 발열, 기관내에 화농성객담의 존재, 정맥혈에 대한 일반혈액검사에서 백혈구 증가 및 백분율의 좌측편위의 소견, 흉부 X선 촬영상 새로운 음영의 출현, 치료에 대한 반응여부를 참고로 하여 진단하였다. 진단 당시 당

노병이나 결핵이 동반된 환자는 제외하였다.

2. 방법

1) 호중구의 respiratory burst 측정

폐렴환자와 정상인에서 정맥혈을 채혈하였고 채혈 2시간내에 검사를 시행하였으며 매검사마다 환자와 정상인의 검체를 같이 검사하여 결과를 비교하였다. 폐렴환자는 입원 1일, 3일, 5일, 7일, 9일에 채혈하여 측정하였다. EDTA병에 채취한 전혈 700 μ L에 100mM DCF-DA(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, Eastman Kodak Inc., Rochester, NY, USA) 14 μ L을 가하고 vortex mixer로 혼합한 후 은박지로 싸서 수평 진탕을 하면서(shaking water bath, Heto Inc., Gydevang, Denmark) 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 보온한 후 sodium azide 10 μ L을 가하여 혼합한 후 100 μ L씩 시험관에 분주하였다.

여기에 PBS(phosphate buffered saline) 또는 호중구 자극제를 각 시험관별로 10 μ L씩 가하고 vortex mixer로 혼합한 후 은박지로 싸서 수평 진탕하면서 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 보온한 후 냉장온도의 용혈시약(lysing solution, Becton Dickinson Co., CA, USA) 2ml를 가하였다. 이때 보온 시간 15분을 정확히 지키기 위하여 호중구 자극제와 용혈시약을 15초간격으로 각 시험관에 분주하였다.

호중구 자극제로는 fMLP(dimethyl sulfoxide로 용해, 최종 농도가 10-6M이 되도록 PBS로 희석, Sigma Co., St. Louis, USA)와 PMA(dimethyl sulfoxide로 용해, 최종 농도가 300ng/mL가 되도록 PBS로 희석, Sigma Co., St. Louis, USA)를 사용하였다. 호중구 응집을 막기 위하여 PMA를 가한 시험관에는 100mM EDTA 10 μ L을 PMA와 동시에 가하였다.

용혈시약을 가하고 vortex mixer로 혼합후 빛을 차단한 상태로 실온에서 5분간 보온한 다음, 원

심분리(1500rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분)하여 상청액을 제거하였다. 여기에 냉장온도의 PBS 2ml를 가하여 혼합한 후 원심분리하여 상청액을 제거함으로써 호중구를 한번 세척한 다음 1% paraformaldehyde 1mL를 가하고 vortex mixer로 혼합한 후 20분간 냉장고에 두어 고정시켜서 유세포분석기(FACScan, Becton Dickinson Co., CA, USA)로 측정하였다.

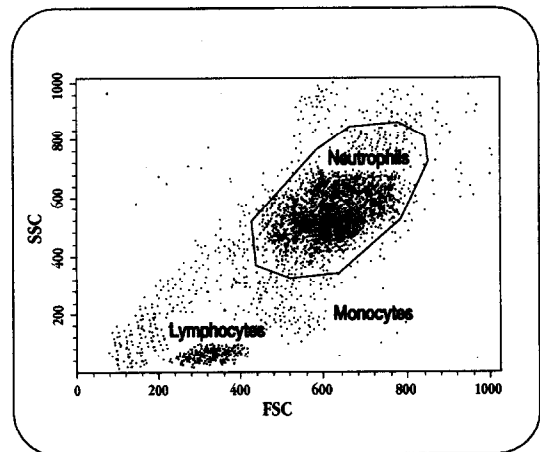
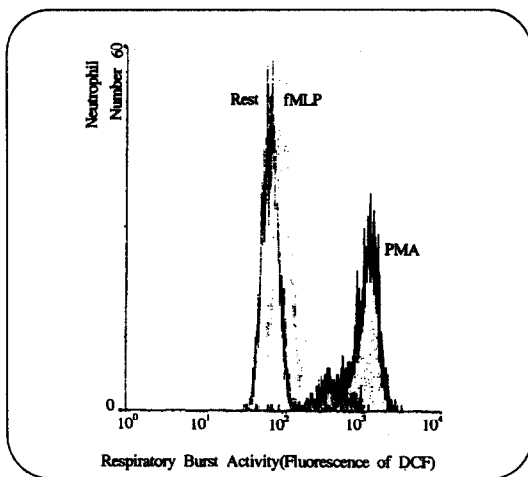


Fig. 1. Gating of neutrophils by flowcytometry.

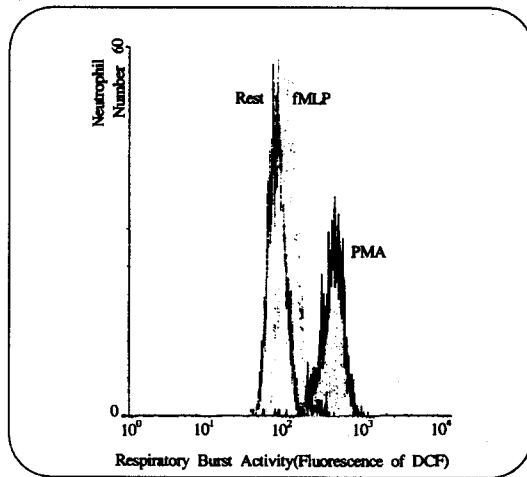
유세포분석은 LYSIS II software를 사용하였으며 FL1을 600으로 조절한 상태에서 10,000개 세포를 측정하였고, 분석은 dot plot(X축 : FSC, Y축 : SSC)에서 호중구를 gating하여(Fig. 1) histogram(X축 : FL1, Y축 : 세포 수, Fig. 2)을 얻었으며 이의 분석표에서 호중구 개개의 평균 녹색형광량(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)을 구하였다. 또한 폐렴환자와 정상인 호중구의 respiratory burst 활성도를 비교하기 위하여 동시에 실시한 결과로 다음과 같이 비율을 계산하였다.

호중구 respiratory burst 활성도 비율 =

$$\frac{\text{폐렴환자호중구의녹색형광량}}{\text{자극하지않은정상인호중구의녹색형광량}}$$

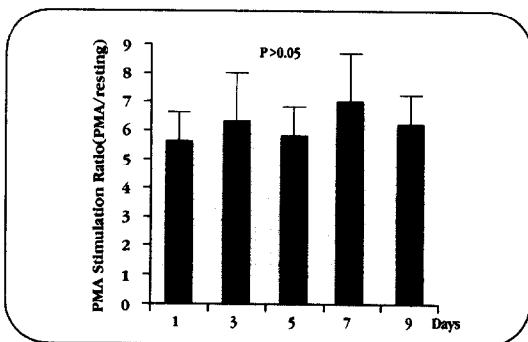


Normal control
2-A

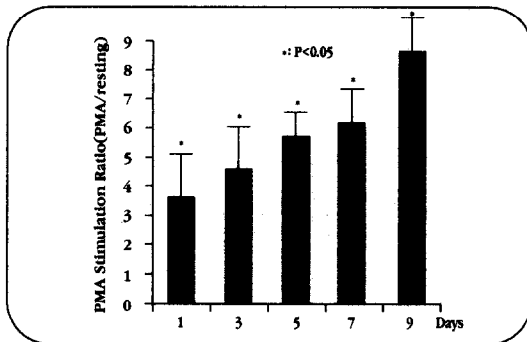


Pneumonia
2-B

Fig. 2. The respiratory burst activity of neutrophils in patients with pneumonia was decreased(2-B) compared with that of normal controls(2-A).

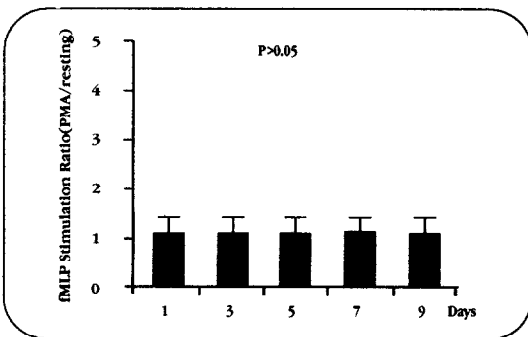


Normal Control

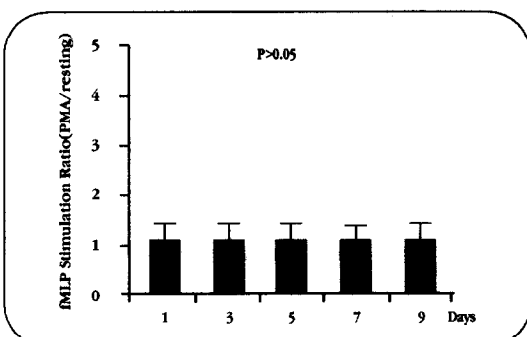


Pneumonia

3 - A



Normal Control



Pneumonia

3 - B

Fig. 3. The hydrogen peroxide production after PMA(3-A) and fMLP(3-B) stimulation in patients with pneumonia normal controls

2) 통계처리

통계 프로그램 SAS(version 7.0)를 이용하였다. 정상인 호중구의 respiratory burst 활성도(DCF 녹색형광량) 및 폐렴환자와 정상인 호중구의 respiratory burst 활성도 비율의 평균과 표준편차를 구하였고, 폐렴환자의 호중구 respiratory burst 활성도 비율과 정상인 호중구의 respiratory burst 활성도 비율의 차이로 t-test를 사용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

24명의 환자 중 그람양성구균에 의한 폐렴이 5예(*Streptococcus pneumoniae* 폐렴 4예등)였고 그람 음성간균에 의한 폐렴이 7예(*Hemophilus influenza* 폐렴 3예등)였다(Table 1.)

Table 1. The etiologic agents identified in patients with pneumonia.

Gram-positive bacilli	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> :	4
<i>Staphylococcus aureus</i> :	1
Gram-negative bacilli	
<i>Haemophilus influenzae</i> :	3
<i>Pseudomonas maltophilia</i> :	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	1
<i>Escherichia coli</i> :	1
<i>Enterobacter cloacae</i> :	1
Undetermined : 12	

호중구의 respiratory burst 활성도를 호중구 각각의 평균 형광량으로 표시한바, 정상인과 폐렴환자 호중구의 평균 respiratory burst 활성도(FL1의 mean fluorescence channel)는 Table 2와 같다.

정상인 호중구는 Fig. 2-A에 나타난 것과 같이

강력한 비생리적 자극제인 PMA에 대해서는 통계학적으로 의미있는 높은 활성도를 나타냈다. 그러나 폐렴환자의 호중구는 Fig. 2-B에 나타난 것과 같이 PMA에 자극은 되었으나 정상인 호중구보다 활성도가 덜 증가하였다($p < 0.01$).

폐렴 초기에 호중구의 respiratory burst 활성도는 의미있게 감소하였으며 입원 9일째에 정상 수준으로 회복되었다. 호중구의 생리적 자극제인 fMLP로 자극한 결과 내원 1일째 기저치와 비교하여 1.1이었던 것이 내원 9일째 1.0으로 비슷하게 측정되었다. 그러나 비특이적 자극제인 PMA로 자극한 결과 1일째 3.4에서 9일째 8.4로 과산화수소 생성능이 회복되었다. 대조군에서는 fMLP에서 1일째 1.0에서 1.1로 비슷하였고 PMA도 1일째 1.0에서 9일째 6.1로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

고 찰

정상 호중구의 respiratory burst는 세포표면 수용체가 세균, 면역복합체 또는 합성 peptide 등에 의하여 자극을 받거나 protein kinase C가 PMA, diacylglycerol, free fatty acid 등에 의해서 직접 활성화되면 세포막의 NADPH oxidase가 활성화되어 NADPH로 부터 전자가 산소(O_2)로 이동하여 superoxide(O_2^-)를 생성한다. 이때 생성된 O_2^- 는 매우 불안정하여 저절로 또는 superoxide dismutase의 촉매작용을 받아 80%가 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)와 O_2 로 바뀐다³⁾.

본 연구에 사용한 호중구의 respiratory burst 활성도 측정법은, EDTA 전혈에 비형광성 DCF-DA를 가하여 혈구내로 흡수시킨 후 호중구의 생리적 자극제인 fMLP와 비생리적 자극제인 PMA로 자극하여 호중구내에서 respiratory burst가 발생시

Table 2. The hydrogen peroxide production of neutrophils after stimulation with fMLP and PMA.

Date	fMLP stimulation ratio(fMLP/resting)		PMA stimulation ratio(PMA/resting)	
	Normal (n=24)	Patients with pneumonia (n=24)	Normal (n=24)	Patients with pneumonia (n=24)
1	1.10±0.06	1.08±0.6	5.6±1.1	3.2±1.8
3	1.10±0.05	1.10±0.5	6.8±1.4	4.3±1.6
5	1.07±0.5	1.10±0.5	5.8±1.2	5.5±0.8
7	1.11±0.6	1.11±0.5	7.0±2.4	6.0±1.4
9	1.12±0.5	1.10±0.6	6.3±1.2	8.2±1.4

켜 산화물을 생성하는 것으로 이 중 H_2O_2 가 DCF-DA를 DCF로 환원시켜 녹색 형광을 내고 이를 유세포분석기가 호중구 개개의 녹색형광으로 측정하는 것이다^{4,5)}. 이 방법은 superoxide dismutase(SOD)-억제 cytochrome C 환원검사나 luminol-의존성 화학발광측정법(luminol-dependent chemiluminescence, LDCL)법과는 달리 호중구를 분리하지 않아 호중구 분리과정에서 야기되는 호중구 활성화를 막을 수 있으며 측정시간을 줄일 수 있고 호중구 개개의 활성도가 측정되는 장점이 있다. 단 유세포 분석기 FL1 600으로 검사할 때 매번 측정시 mean fluorescence channel이 일정하지 않으므로 매검사마다 정상 건강인을 같이 측정하여 환자 검사 결과의 비정상 유무를 판별하여야 하는 단점이 있다.

검사결과에서 나타난 것처럼 폐렴의 초기에 호중구의 respiratory burst 활성도는 의미있게 감소하였다가 임상 경과가 호전됨에 따라 정상치로 회복되었다. 이러한 결과는 내원 당시 폐렴환자의 호중구가 이미 최대한으로 자극된 상태여서 PMA등의 자극제에 대한 반응 정도가 둔화 되었

기 때문일 가능성이 있고, 또 다른 이유로는 호중구의 생성이 증가하면서 fMLP나 PMA등의 자극제에 대한 반응도가 미성숙한 호중구(young neutrophils)의 분포가 상대적으로 증가하기 때문으로 추정할 수 있다. 그러나 박⁵⁾등에 의하면 미성숙한 호중구가 오히려 fMLP, PMA등에 자극이 증가된다고 보고하고 있어 미성숙한 호중구 증가가 respiratory burst 활성도를 둔화시켰다고 보기는 어려울 것으로 사료된다. 그 외에 세균분비물(endotoxin, lipid A등)이나 감염으로 증가된 protease가 NADPH oxidase를 손상시켰거나 또는 cytokine 분비가 저하되어 면역결핍상태를 초래하여 respiratory burst activity가 감소되었을 가능성도 있다. 그러므로 폐렴 환자 호중구의 respiratory burst 활성도 감소는 폐렴 초기 둔화된 반응도 및 폐렴에 의한 제반효과가 임상경과가 호전됨에 따라 정상치로 회복되었을 것으로 추정되나 이에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

그러나 호중구의 respiratory burst 활성도는 흡연과 같은 비감염성 인자로도 변화를 나타내는

것으로 알려져 있다^{6,8)}. 송 등⁹⁾에 의한 국내의 보고를 보면 흡연자의 호중구에서 산화물 생성이 증가되고 PMA로 자극했을 때 그 반응도가 둔화되었다는 보고가 있었다. 감염성 질환에서도 감염균의 종류에 따라 그 반응도가 서로 다르게 나타나는 것으로 보고되고 있는데 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*¹⁰⁾, *Yersinia* 등에 의한 감염에서는 오히려 호중구의 respiratory burst 활성도가 증가하는 것으로 보고되었다. 그러나 이와는 반대로 *Streptococcus pneumoniae*¹¹⁾, *Legionella pneumophila*, *Actinobacillus*, *Salmonella typhi*, *Hemophilus influenza*, *Hemophilus somnus*¹²⁾ 및 패혈증으로 인한 저혈압¹³⁾ 등에서는 호중구의 respiratory burst 활성도가 감소하는 것으로 알려져 있다. 이처럼 아직 확인되지 않은 여러 종류의 자극에 대해 호중구의 반응도 다양하게 나타나는 것으로 사료된다.

결론적으로 폐렴 치료전 산화물 생성이 저하된 것은 감염 초기 여러 세포로부터 유리된 염증반응의 매개체들에 의해 호중구가 활성화되어 이미 상당량의 산화물이 생성된 이후 측정이 되었거나 감염자체에 의해 호중구에서의 산화물 생성이 억제되었기 때문으로 사료된다. 앞으로 폐렴의 군주 각각에 따른 respiratory burst 활성도를 측정하고 호중구의 산화물 억제를 담당하는 물질을 규명하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : 말초혈액내 백혈구의 약 60%를 차지하는 호중구는 세균 및 진균 감염시 일차 방어 기전으로 염증부위에 모여 세균 및 진균을 탐식하고 이때 활성화된 호중구는 산화물을 생성하고 이와 함께 탈파립된 효소 등에 의해서 살균작용

이 이루어진다. Respiratory burst에 의하여 생성된 산화물은 감염에서의 살균 작용 외에, 염증반응의 중추 역할을 하는 물질로서 조직손상, 약물대사, 노화, 발암과정에 관여하여 각종 질환과의 연관성을 제시하고 있다. 본 연구는 폐렴환자에 있어서 폐렴의 경과 중에 중요한 역할을 하는 호중구로부터 산화물의 생성능력을 보기 위해 Respiratory burst 활성도를 측정하였다.

방법 : 건강인 24명과 폐렴으로 진단된 24명의 환자를 대상으로 혈액내 호중구의 respiratory burst 활성도를 입원 1일, 3일, 5일, 7일, 9일째에 자극하지 않은 상태 및 fMLP(formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine)와 PMA(phorbol myristate acetate)로 자극한 상태에서 DCF-DA를 이용한 유세포분석법으로 측정하였다.

결과 : 정상인 호중구는 생리적 자극제인 fMLP에 대해 통계학적으로 의미는 없지만 약간 높은 활성도를 보였고 비생리적 자극제인 PMA에 대해서는 통계학적으로 의미있는 높은 활성도를 나타냈다. 그러나 폐렴환자의 호중구는 PMA에 자극은 되었으나 정상인 호중구보다 활성도가 덜 증가하였다($p < 0.01$).

호중구의 respiratory burst 활성도를 폐렴과 정상인에서 비교할 때, 자극 전에는 양군간에 차이가 없었고 fMLP로 자극한 경우에도 의미있는 차이는 없었다. 그러나 PMA로 자극한 경우 내원 1일부터 10일까지 폐렴환자는 정상인에 비해 자극에 대한 respiratory burst 활성도의 증가폭이 통계적으로 의미있게 폐렴 초기에 저하되었다가 치료가 진행됨에 따라 정상화되는 양상을 보였다.

결론 : 폐렴으로 진단된 환자의 치료과정 중 혈중 호중구로부터의 과산화수소 생성능은 항생제 투여전에는 감소된 상태였으며 이후 치료 개시와 함께 점차 증가하여 9일째에는 정상인 수준으로 회복되었다.

참 고 문 헌

- 1) Gadek JE : Adverse effects of neutrophils on the lung. *Am J Med* 29(Suppl 6) : 27S, 1992
- 2) Proctor PH, Reynolds ES : Free radicals and diseases in man. *Physiol Chem Phys* 16 : 175-182, 1984
- 3) 박찬정, 강경령, 조현찬, 박성우, 임성희 : 유세포분석법에 의한 당뇨병환자 호중구의 Respiratory Burst 활성도 측정. *대한임상병리학회지* 14(2) : 203-209, 1994
- 4) Hirabayashi Y, Taniuchi S, Kobayashi Y : A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. *J Immunol Methods* 82 : 253-260, 1985
- 5) 박찬정, Kaplan SS : 유식세포분석기에 의한 성인 혈액과 신생아 제대혈액의 호중구 표면 neutral endopeptidase 또는 aminopeptidase와 respiratory burst 활성도 측정. *대한혈액학회지* 27 : 89-95, 1992
- 6) Joos GF, Pauwels RA : The in vivo effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am Rev Respir Dis* 148 : 922-928, 1993
- 7) Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LLB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL : CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad ci* 88(23) : 1066-1073, 1991
- 8) Nadel JA : Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur Respir J* 4(6) : 745-751, 1991
- 9) 송정섭, 김영균, 김관형 : 장기간 흡연한 폐기종 환자 호중구에서의 superoxide(O₂⁻)분비. *대한내과학회잡지* 36(4) : 453-459, 1989
- 10) Riber U, Espersen F, Skinhoj P, Kharazmi A : Induction of oxidative burst response in human neutrophils by adherent Staphylococci. Comparison between Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. *APMIS* 101(1) : 55-60, 1993
- 11) Perry FE, Elson CJ, Mitchell TJ, Andrew PW, Catterall JR : Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by Streptococcus pneumoniae. *Thorax* 49 : 676-682, 1994
- 12) Pfeifer CG, Campos M, Beskorwayne T, Babiuk LA, Potter AA : Effect of Hemophilus somnus on phagocytosis and hydrogen peroxide production by bovine Polymorphonuclear leukocytes. *Microb Pathog* 13(3) : 191-195, 1992
- 13) Vespasiano MC, Lewandoski JR, Zimmerman JJ : Longitudinal analysis of neutrophil superoxide-anion generation in patients with septic shock. *Crit Care Med* 21(5) : 666-671, 1993