폐결핵 환자에서 중성백혈구 화학 주성에 대한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실

장 준·김 준 명·김 세 규·장 상 호
홍 천 수·김 성 규·이 원 영

= Abstract =

Study on the Neutrophil Chemotaxis in Active Pulmonary Tuberculosis Patients

Joon Chang, M.D., June Myeong Kim, M.D., Se Kyu Kim, M.D., Sang Ho Jang, M.D.

Chein Soo Hong, M.D., Sung Kyu Kim, M.D. and Won Young Lee, M.D.

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

Neutrophils are often seen first at sites of granulomatous inflammation such as in tuberculous exudates. There was a report which supported the hypothesis that neutrophils might initiate inflammatory responses to tubercle bacilli by releasing chemotaxins which attracted monocytes. Neutrophil chemotaxis is inhibited by *Mycobacterium tuberculosis*, which seems to be a kind of microbial defenses against phagocytes.

We measured neutrophil chemotaxis activity in 33 active pulmonary tuberculosis patients and 19 normal healthy controls by the modified Boyden chamber method with cellulose nitrate membrane micropore filter and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-Met-Leu-Phe) as a chemoattractant. The neutrophil chemotaxis activity was evaluated by the leading front method; the neutrophil chemotaxis index (NCI) represented the measured distance of active migration divided by the one of random migration.

The mean NCI (mean $\pm$ SD) was 1.45 ± 0.221 in active pulmonary tuberculosis ($n=33$), which was significantly decreased than that of control ($n=19$) 1.78 ± 0.446 ($p<0.005$). The mean NCI was 1.52 ± 0.226 , 1.42 ± 0.210 , and 1.28 ± 0.181 in the minimal ($n=15$), moderately ($n=15$) and far advanced ($n=3$) pulmonary tuberculosis patients. The mean NCI was 1.43 ± 0.233 , 1.45 ± 0.171 , and 1.48 ± 0.274 in the sputum AFB bacilli smear/culture positive ($n=13$), smear negative/culture positive ($n=11$), and smear/culture negative ($n=9$) patients.

In conclusion we observed that neutrophil chemotaxis activity was decreased in the active pulmonary tuberculosis patients, and the tendency of the more impaired neutrophil chemotaxis in the more extensive disease patients.

서 론

중성 백혈구 화학주성(neutrophil chemotaxis)의 장

에는 중증의 재발성 감염 및 여러 항생제에 내성을 보이는 난치성 감염과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 임상적으로 포도상구균, 대장균, 녹농균, 장티브스균, 진균 등에 의한 감염과 유관한 것으로 되어 있다¹⁾. 아울러 활동성 결핵 환자에서도 중성 백혈구 화학주성이 감소되어 있을 수 있음이 시사되었다²⁾.

최근 Antony 등³⁾은 중성 백혈구가 결핵성 삼출병변에 최초로 출현하는 세포이면서 강력한 염증 매개물질을 방

*본 논문의 요지는 1989년 제69차 대한결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표 되었음.

*본 논문은 1989년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 일부 보조로 이루어 졌음.

출할 수 있으므로 중성 백혈구가 화학주성 물질을 분리하여 단핵구를 유도함으로써 결핵균에 대한 염증반응을 시발시킬지 모른다는 가설하에 실험을 진행하여 이를 지지하는 결과를 얻었다.

본 연구는 결핵균에 대한 염증반응을 시발시키는데 중요한 중성 백혈구 자체의 화학주성을 결핵 환자에서 측정함으로써 이의 결함과 결핵 발병과의 연관 가능성을 밝히는 노력의 일환으로 시행되었다. 아울러 종래의 Suarez-Saro등²⁾의 보고에서는 1955년 개발된 skin window방법을 사용하였는데, 중성백혈구 화학주성 검사법중 가장 보편화된 Boyden's chamber method를 채택하여 결핵 환자에서 과연 중성백혈구 화학주성의 결함이 있는지 여부를 규명코자 하였다^{4~7)}.

대상 및 방법

1. 대 상

1988년 9월부터 1989년 10월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 활동성 폐결핵으로 진단받은 16~68세(평균연령 31.0세)의 남자 17명, 여자 16명 등 총 33명 및 정상건강 대조군 19명을 대상으로 하였다. 활동성 폐결핵 33명중 9명은 객담 항산균 도말 및 배양 음성이나 임상증상, 흉부 방사선 촬영, 치료반응으로 활동성 폐결핵 진단을 하였다.

2. 방 법

활동성 폐결핵으로 확진된 치료전 환자와 정상건강 대조군에서 10 ml의 말초혈액을 heparin처리 주사기로 채취하여 60분간 5% dextran-sedimentation후 Ficoll-Hypaque으로 원심분리해서 중성백혈구를 분리한다. 중성백혈구 세포를 pH 7.2로 맞춘 complete buffer용액에 4×10^6 개/ml로 맞춘다. Boyden chemotaxis chamber의 하부 compartment에 active migration을 위한 chemoattractant로서 10^{-7} M formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-Met-Leu-Phe)이 함유된 complete buffer용액 200 μ l를 1 well에 넣고, control로서 complete buffer용액 200 μ l를 다른 well에 채운다. 하부 compartment위에 3 μ m pore size의 cellulose nitrate membrane filter를 놓고 상부 compartment에 준비된 중성백혈구 suspension 200 μ l를 채운다. 5% 이산화탄소 incubator에서 섭씨 37도로 30분간

incubate한 후 chamber를 꺼내어 상부 compartment를 분리하고 filter를 꺼낸다. Filter를 4% formalin에 10분간 고정시키고 증류수로 세척한후 hematoxylin으로 10분간 염색한 후 증류수로 세척한다. 실내에서 하루 방치한 후 현미경하에서 filter의 starting line으로부터 leading front line까지의 거리를 측정하여 화학주성 지수를 아래와 같이 구하였다.

Chemotactic index

$$= \frac{\text{Active migration (in chemoattractant)}}{\text{Random migration (in control)}}$$

폐결핵환자군을 경증, 중등증 및 중증, 객담 항산균 도말 및 배양결과에 따라 분류한 후 이를 Student t-test로 대조군과 비교검정하였다. 말초혈액 백혈구수, 중성백혈구수 및 백분율 등과 중성백혈구 화학주성 지수와의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 이용하였다.

결 과

중성백혈구 화학주성 지수가 활동성 폐결핵군(N=33)에서 1.45 ± 0.221 로 대조군(N=19)의 1.78 ± 0.466 에 비하여 유의하게 낮았다($P < 0.005$). 폐결핵의 병변 정도에 따라 분류하였을 경우 경증(n=15)에서 1.52 ± 0.226 , 중등증(n=15)에서 1.42 ± 0.210 , 중증(n=3)에서 1.28 ± 0.181 로 병변이 심할수록 낮은 경향이었으나 각군간 차이에 통계적 유의성은 없었다. 경증과 중등증의 경우 대조군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Table 1, Fig. 1).

객담 항산균 검사에 따라 분류하였을 경우 도말 및 배

Table 1. Neutrophil Chemotactic Index of Tuberculous Patients and Control according to the Extent of Disease

Neutrophil chemotactic index		
Pulmonary Tuberculosis	(n=33)	$1.45 \pm 0.221^{**}$
Minimal	(n=15)	$1.52 \pm 0.226^*$
Moderately advanced	(n=15)	$1.42 \pm 0.210^*$
Far advanced	(n= 3)	1.28 ± 0.181
Control	(n=19)	1.78 ± 0.466

Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

* $P < 0.05$ when compared to the control

** $P < 0.005$ when compared to the control

Fig. 1. Neutrophil Chemotactic Index of Tuberculous Patients and Control according to the Extent of Disease

*P<0.05 when compared to the control

**P<0.005 when compared to the control

Table 2. Neutrophil Chemotactic Index of Tuberculous Patients and Control According to the AFB Status

Neutrophil chemotactic index		
Pulmonary tuberculosis	(n=33)	1.45 ± 0.221**
Smear (+)/Culture (+)	(n=13)	1.43 ± 0.233*
Smear(-)/Culture (+)	(n=11)	1.45 ± 0.171*
Smear(-)/Culture (-)	(n= 9)	1.48 ± 0.274
Control	(n=19)	1.78 ± 0.466

Values are expressed as mean ± S.D.

* P < 0.05 when compared to the control

** P < 0.005 when compared to the control

양 모두 양성(n=13)에서 1.43 ± 0.233 , 도말음성 및 배양 양성(n=11)에서 1.45 ± 0.171 으로 각각 대조군에 비하여 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 도말 및 배양 음성(n=9)에서 1.48 ± 0.274 로 대조군에 비하여 낮은 경향이었으나 통계적 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

Fig. 2. Neutrophil Chemotactic Index of Tuberculous Patients and Control according to the AFB Status

말초혈액 백혈구수, 중성 백혈구수 및 백분율 등과 중성 백혈구 화학주성 지수와의 사이에 상관관계는 관찰되지 않았다.

고 안

초감염 결핵병변에서 보면 처음에는 주로 중성 백혈구가 일차 방어선이지만 곧 대식세포(macrophage)가 대신하게 된다^{8,9)}. 이와 같은 자연 방어기전으로 대부분의 감염균을 충분히 제거할 수 있다. 결핵균과 같은 세포내 기생세균에 대한 특이면역방어는 주로 세포성 면역반응에 의하여 이루어진다. 결핵의 세포성 면역반응에 있어서 대식세포, T-임파구 특히 조력세포(helper cell) 등의 역할이 중요하다^{9,10)}.

결핵과 기타의 만성 염증성 질환의 육아종(granuloma) 병변에 특징적으로 관찰되는 대식세포는 순환혈액

단핵구(monocyte)에서 기원하리라 추정되지만¹¹⁾, 그 세포들이 모여드는 기전은 불분명하였다¹²⁾. 예를 들면 T-임파구에서 유래된 화학주성 인자가 결핵감염 병소에 단핵구를 유도하고 국한시킨다고 추정되었지만, 육아종성 염증 병변에서의 임파구 유래 화학주성 활성도와 대식세포 집적간에는 연관관계가 성립되지 않았다¹³⁾. 이러한 이론적 배경과 중성 백혈구가 결핵성 삼출(exudate)의 최초 세포이면서 강력한 염증 매개물질을 분비할 수 있다는 이유로, Antony등³⁾은 중성 백혈구가 단핵구를 유인하는 화학주성물질을 분비하여 결핵균에 대한 염증반응을 시발시킬 것이라는 가설하에 실험을 진행해서 이 가설을 지지하는 결과를 도출하였다. 따라서 결핵균에 대한 염증반응의 시발에 중성 백혈구가 상당한 역할을 수행할 가능성이 있다고 추정된다.

식균세포(phagocyte)에 대한 미생물의 방어기전은 다양하다. 세균이 화학주성을 자극하지 못하게 하거나 세균과의 부착(attachment) 혹은 탐식(ingestion)을 교묘하게 방해함으로써 중성 백혈구를 회피할 수 있다. 결핵균은 그 자체에 식균세포의 화학주성 및 탈과립현상(degranulation)을 억제하는 특성이 있음이 알려져 있다¹⁴⁾. 따라서 결핵의 초기병변 형성에 중요한 역할을 담당할 수 있는 중성 백혈구가 결핵균에 의하여 그 화학주성이 억제될 가능성도 있다. 그러나 현재까지 결핵환자의 말초혈액 중성 백혈구의 화학주성은 제대로 연구된 바 없다. Suarez-Saro등²⁾이 결핵환자에서 백혈구 화학주성이 감소된 경향임을 보고한 바 있으나 이들은 40명의 환자를 대상으로 그 병변 정도, 객담항산균 성적등에 따라 분류를 세분하지 않았다. 또한 그들이 사용한 skin window법은 반정량적(semiquantitative)이기는 하나 진정한 의미의 화학주성은 아닐 수 있으며 검사후 3~4 시간에 출현한 세포가 모두 중성 백혈구는 아니라는 등의 제한점이 있다¹⁵⁾.

Gatner와 Anderson¹⁶⁾이 Boyden chamber를 이용하여 10명의 결핵환자중 8명에서, 내독소(endotoxin)로 활성화된 자가(autologous) 및 정상 혈청에 대한 중성 백혈구 화학주성의 장애를 보고하면서, 이러한 화학주성 결함이 in vitro 실험상 ascorbate, levamisole, metoprolol, propranolol등에 의해서 교정되었다고 한다. 그리고 폐결핵 환자에서 total hemolytic complement, C3, C4등 보체 측정에서는 대조군과 차이가 없었다고 한다.

Campbell¹⁷⁾은 치료않은 20예의 폐결핵환자에서 19예가 단핵구 화학주성의 결함을 보였으며, 이 결함이 항결핵치료로 호전되었다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 중성 백혈구 화학주성 검사법 중 가장 보편화된 Boyden's chamber method를 사용하여 33명의 폐결핵 환자를 대상으로 중성 백혈구 화학주성을 측정하였다. 정상 대조군에 비하여 활동성 폐결핵 전체군, 경증군, 중등증군에서 중성 백혈구 화학주성지수가 유의하게 낮았으며, 중증군에서 현저히 낮았으나 대상이 3예라서 통계적 유의성이 관찰되지 않았다고 판단된다. 그리고 병의 정도가 진행될 수록 중성 백혈구 화학주성지수가 낮은 경향을 관찰하였으나 각군간 차이의 통계적 유의성이 입증되지 않았는데 이에 대해서는 보다 많은 예를 대상으로 추후 연구를 계속하여 평가하고자 한다. 객담항산균 검사 결과에 따라 분류시 도말 및 배양 음성군, 배양 단독 양성군, 도말 및 배양 양성군 순으로 중성 백혈구 화학주성지수가 점차 낮아지는 경향을 관찰할 수 있었으나 각군간에 유의한 차이는 없어서 역시 추후 관찰하고자 한다.

중성 백혈구 화학주성의 결함은 중성 백혈구 자체의 결함없이 보체계(complement system)이상으로 유전적 결핍(C3, C5 결핍), 보체생산 부족(간경변, kwashiorkor, 조산아), 과이화반응(hypercatabolism), 보체과다소실(중증 화상)등이 있을 수 있다. 당뇨병 특히 소아형 당뇨병, 다중합체 IgA (polymeric IgA), 순환 면역복합체 증가(류마티오이드관절염, 전신성 홍반성 낭창, 아급성 세균성 심내막염), 소아형 치주염(juvenile periodontitis), Hodgkin씨 병, 유육종증(sarcoidosis), 나병 등에서도 중성 백혈구 화학주성이 감소한다. 알코올, 스테로이드, 테트라사이클린, amphotericin B등의 약물에 의해서 생체의 실험으로 화학주성 억제가 입증되었다. 그리고 Chediak-Higashi씨 증후, lazy leukocyte syndrome등의 중성 백혈구 결함에서도 화학주성이 감소된다^{1,18~21)}.

본 연구에서 활동성 폐결핵 환자의 경우 중성 백혈구 화학주성의 감소가 관찰되었는데, 이것이 결핵발병의 선행요건인지 결핵에 속박하는 이차적 변화인지를 규명하기 위해서는 혈청 단백질, 보체, 순환 면역복합체등의 측정, 결핵 치료후 화학주성의 회복여부, 치유 및 재발과의 관련, 비활동성 폐결핵 환자에서의 측정, 영양 섭취상태등을 포괄적으로 검토하여야 하리라고 생각된다.

결 론

결핵성 삼출 병변에서 중요한 역할을 하는 중성 백혈구의 화학주성이 결핵균에 의하여 억제될 수 있고 중성 백혈구 화학주성 결함이 결핵 발병과 연관될 수 있으므로, 활동성 폐결핵환자에서 중성 백혈구 화학주성을 측정하여 정상 대조군보다 유의하게 중성 백혈구 화학주성이 감소함을 관찰하였으며 이는 병의 진행정도가 심할수록 감소되는 경향이었다. 이러한 현상이 결핵 발병의 선행요건인지 속발되는 이차적 변화인지 여부와 임상적 의미에 대하여서는 포괄적인 추후 연구가 필요하다.

REFERENCES

- 1) Densen P, Mandell GL: Granulocytic phagocytes. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds.) Principles and practice of infectious diseases. 2nd Ed., p57-72, New York, John Wiley and Son, 1985
- 2) Suarez-Saro JM, Laguna-Martinez R, Callol-Sanchez L, Caro-de-Miguel C, Gomez-de-Terrenos-Sanchez FJ: Behavior of leukocyte chemotaxis in various clinicoimmunological situations. *Allergol Immunopathol (Madr)* **13**:187-192, 1985
- 3) Antony VB, Sahn SA, Antony AC, Repine JE: Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest* **76**:1514-1521, 1985
- 4) Bignold, LP: Measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Immunol Methods* **108**:1-18, 1988
- 5) Valerius, NH: Chemotaxis of neutrophil granulocytes. *Dan Med Bull* **31**:458-474, 1984
- 6) Boyden, SV: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* **115**:453-466, 1962
- 7) Wilkinson, PC: Locomotion and chemotaxis of leukocytes. In Weir, DM (Ed.) Handbook of experimental immunology. Volume 2. Cellular immunology. 4th Ed., p51.1-51.16, Oxford, Blackwell Scientific publications, 1986
- 8) Montgomery LG, Lemon WS: The cellular reaction of the pleura to infection with mycobacteria tuberculosis. *J Thoracic Surg* **2**:429-439, 1933
- 9) 김상재, 김성진: 제 2장 결핵의 미생물학. 결핵, p11-63, 서울, 대한결핵협회, 대한결핵학회 1984
- 10) 김주덕: 결핵의 면역. 결핵 및 호흡기질환 **29**:73-80, 1982
- 11) Adams DO: The granulomatous inflammatory response. *Am J Pathol* **84**:164-191, 1976
- 12) Spector WG: The granulomatous inflammatory exudate. *Inv Rev Exp Pathol* **8**:1-55, 1969
- 13) Jungi TW, McGregor DD: Dissociation of macrophage accumulation and local chemotactic activity in delayed inflammation sites. *Cell Immunol* **47**:274-284, 1979
- 14) Densen P, Mandell GL: Phagocyte strategy vs. microbial tactics. *Rev Infect Dis* **2**:817, 1980
- 15) Bellanti JA, Peters SM: Diagnostic applications of immunology. In Bellanti JA (Ed) Immunology III, 3rd Ed., p558-569, Philadelphia, W B Saunders 1985
- 16) Gatner EM, Anderson R: An in vitro assessment of cellular and humoral immune function in pulmonary tuberculosis: correlation of defective neutrophil motility by ascorbate, levamisole, metoprolol and propranolol. *Clin Exp Immunol* **40**:327-336, 1980
- 17) Campbell PB: Defective Leukotaxis in monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **139**:409-417, 1979
- 18) Galin JJ: Disorders of phagocyte chemotaxis. *Ann Intern Med* **92**:520-538, 1980
- 19) Galin JJ: Abnormal phagocyte chemotaxis: Pathophysiology, clinical manifestations, and management of patients. *Rev Infect Dis* **3**:1196-1220, 1981
- 20) Quie PG, Cates KL: Clinical conditions associated with defective PMN leukocyte chemotaxis. *Am J Pathol* **88**:711-725, 1977
- 21) Ward PA: Leukotaxis and leukotactic disorders. *Am J Pathol* **77**:520-538, 1974