

유전자 재조합 Granulocyte-Colony Stimulating Factor가 당뇨병성 족부 감염 환자 호중구의 기능에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 감염내과, 서울대학교 의과대학 내과학교실*
을지의과대학 소아과학교실†

백경란 · 김성민 · 송재훈 · 오명돈* · 최강원* · 손동우†

Effects of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor on Neutrophil Functions in Diabetic Patients with Foot Infections

Kyong Ran Peck, M.D., Sungmin Kim, M.D., Jae-Hoon Song, M.D.
Myoung-don Oh, M.D.*, Kangwon Choe, M.D.* and Dong Woo Son, M.D.†

Division of Infectious Diseases, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine,
Division of Infectious Diseases*, Seoul National University College of Medicine and
Department of Pediatric†, Eulji University School of Medicine, Seoul, Korea

Background : Treatment of diabetic foot infection remains difficult, due partly to defective neutrophil functions. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil counts in peripheral blood and enhances neutrophil functions in healthy peoples and patients with hematologic diseases. We performed this study to evaluate neutrophil functions in diabetic patients with foot infections and the effect of rhG-CSF on neutrophil functions *in vitro*.

Methods : Twelve patients with diabetic foot infections and 12 normal volunteers were enrolled. Venous blood was collected in heparin-containing tubes, and neutrophils were isolated immediately. The isolated neutrophils were incubated with rhG-CSF (50 ng/mL) for 20 minutes. Assays of superoxide anion production of neutrophils were based on the reduction of ferricytochrome C. Assays of phagocytosis by neutrophils were done using *Staphylococcus aureus* and the weighted phagocytic index (WPI) was calculated by

counting the number of phagocytosing neutrophils on the slides.

Results : Superoxide anion production of neutrophils in diabetic patients was 4.7 (unit : nmol/2 × 10⁵ cells/30 min), which was significantly lower than that of controls (7.6) ($P < 0.05$). rhG-CSF increased the superoxide anion production of neutrophils to 9.8 in diabetic patients and to 15.6 in the controls ($P < 0.05$). WPI in diabetic patients was 0.77, which was not significantly different from that of the controls (0.69). WPI was increased significantly by rhG-CSF in diabetic patients (0.88) and in controls (0.79).

Conclusion : rhG-CSF enhanced neutrophil functions *in vitro*, which were evaluated by superoxide anion production and phagocytosis in diabetic patients with foot infections. These results suggest that rhG-CSF can be useful in the treatment of diabetic foot infections. (Korean J Infect Dis 32:83~92, 2000)

Key Words : Diabetes mellitus, Neutrophil, G-CSF

서 론

접수 : 2000년 1월 24일, 승인 : 2000년 2월 24일
교신저자 : 백경란, 성균관의대 삼성서울병원 감염내과
Tel : 02)3410-0329, Fax : 02)3410-3849
E-mail : krpeck@smc.samsung.co.kr

당뇨병 환자의 25%가 경험한다고 하는 당뇨병성 족부 감염은¹⁾ 중증인 경우 치료에 잘 반응하지 않아서 장기간 입원과 족부 및 하지 절단술 등이 필요한 경우가 많고, 전체 당

노병 환자의 12%가 절단술을 받는다고 한다^{2,3)}. 따라서 당뇨병성 족부 감염의 성공적인 치료는 현대 의학의 중요한 과제 중의 하나이다. 당뇨병 환자들에서 백혈구 기능을 포함하여 인체의 방어 기능이 저하되어 있기 때문에 감염의 빈도와 중증도가 증가하는 것으로 생각되고 있다. 당뇨병 환자에서 호중구의 주화성, 탐식 작용, superoxide anion(O_2^- ; 이하 superoxide로 약함)의 생성, 살균 작용 등이 감소되어 있다는 것이 여러 연구에서 보고되었다⁴⁻⁶⁾. 호중구는 침입한 미생물에 대한 첫 번째 방어 기능을 담당하게 되므로, 백혈구의 탐식 작용이 저하되어 있으면 감염의 위험도가 증가하게 된다.

G-CSF는 말초 혈액에서 호중구 숫자를 증가시킬 뿐 아니라⁷⁾ 성숙 호중구의 기능도 증강시키는 작용을 한다. 여러 연구를 통하여 G-CSF가 정상인, 후천성 면역 결핍증 환자, 악성 종양 환자, 자가 골수 이식을 받은 환자 등에서 호중구의 탐식작용, superoxide의 생성 등 respiratory burst, 세균에 대한 살균 작용, 세포 표면 수용체의 발현을 촉진시킨다는 것이 보고되었다⁸⁻¹¹⁾.

G-CSF가 호중구의 기능을 증강시키는 작용을 이용하면, 백혈구 감소증이 없는 감염 환자에서도 rhG-CSF가 임상적으로 유용할 것이라는 가정 아래, 여러 동물 모델에서 많은 연구가 되어 왔으며¹²⁻²⁰⁾, rhG-CSF의 투여가 생존율을 높인다는 긍정적인 결과들을 보이고 있다. 사람에서는 신생아 감염증과 폐렴 환자에게 안전하게 투여하였다는 보고가 있다²¹⁻²³⁾.

당뇨병 환자에서도 rhG-CSF가 호중구의 기능 중, myeloperoxidase의 활성도와 superoxide의 생성을 호전시킨다는 보고가 있으나^{24, 25)}, 호중구의 탐식 작용 등, 다른 기능에 미치는 영향에 대한 연구는 시행되지 않았고, 더욱이 감염증이 있는 당뇨병 환자를 대상으로 한 연구는 거의 없다. 이에 저자들은 당뇨병성 족부 감염 환자의 치료에 있어서 rhG-CSF의 임상적 유용성을 평가하고자, 급성 감염기에 호중구의 기능을 정상 대조군의 호중구의 기능과 비교 평가하고, 각각의 경우에 rhG-CSF가 당뇨병 환자에서 분리한 호중구의 기능에 미치는 영향에 대한 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 대 상

당뇨병성 족부 감염으로 진단받고 병원에 입원한 환자 12명을 대상으로 하였다. 최근 4주 이내에 면역 억제제 투여를 받았던 환자, 악성 종양 환자, 간경화 환자, 임산부, 패

혈증 환자는 대상에서 제외하였다. 치료 후 감염이 호전되고 ESR이 정상으로 된 후 추적 검사가 가능하였던 환자에서는 같은 실험을 반복하여 치료 전후의 결과를 비교하였다. 정상 대조군으로 질병이 없고, 복용 중인 약물이 없는 16세 이상의 자원자 12명을 대상으로 하였다. 당뇨병 대조군으로 당뇨병을 앓은 병력이 10년 이상이고 감염성 합병증이 없는 환자 12명을 대상으로 하였다. 최근 4주 이내에 면역 억제제 투여를 받았던 환자, 악성 종양 환자, 간경화 환자, 임산부, 패혈증 환자는 역시 대상에서 제외하였다.

2. 호중구의 분리

당뇨병 환자 및 정상 대조군에서 헤파린 주사기를 이용하여 정맥혈 15 mL을 채취하였다. 혈액을 4.5% dextran (0.9% 식염수)과 3:1의 비율로 섞어서 37℃에서 적혈구를 침강시켰다. 백혈구가 풍부한 혈장을 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2, 4℃)로 2배로 희석하여 lymphoprepTM (Nycomed Pharma. Density 1.077)에 중첩시킨 후 4℃, 400 g에서 20분간 원심분리하였다. 호중구가 풍부한 침전물을 취하여 PBS (4℃ 보관)로 세척하고, 4℃, 250 g에서 8분간 원심분리하였다. 남아 있는 적혈구는 7.2 mL의 차가운 PBS를 섞어서 30초간 용혈시켰다. 용혈과정을 멈추기 위해 10× PBS 0.8 mL을 첨가하였다. 잘 섞어서 250 g, 4℃에서 8분간 원심분리하였다. 분리한 호중구는 PBS로 두 번 세척하고, 10%의 불활성화된 fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 PBS에 2×10^6 /mL로 맞추었다. 호중구의 생존도는 trypan blue 염색법으로 확인하여 95% 정도로 하고, 순수도는 Giemsa 염색을 하여서 95% 이상이 되도록 하였다.

3. 호중구의 rhG-CSF 처리

분리한 호중구 2×10^6 /mL를 rhG-CSF 50 ng/ml (PBS)에 37℃, 20분간 처리한 후 호중구의 기능을 평가하여, rhG-CSF 처리를 하지 않은 호중구(control로 PBS만 섞은 것)의 기능과 비교하였다. G-CSF는 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포에서 생산한 유전자 재조합 사람 G-CSF (Neutrogin[®], Lenograstim)을 사용하였다.

4. 호중구의 기능 평가

1) Superoxide의 생성²⁶⁾

최종 농도 160 μ M의 ferricytochrome C와 FMLP 1 μ M을 4℃에서 섞어 cytochrome 반응 혼합액을 만들었다. Control 용액은 이 반응 혼합액에 SOD (superoxide dismutase)를 300 unit/mL이 되도록 섞었다. 반응 혼합액 100 μ L

를 96-well tissue culture plate의 well에 넣었다(같은 조건의 반응 혼합액을 3개씩 반응시켰다). rhG-CSF를 전처리하거나 처리하지 않은 cell을 각 well에 100 μ L씩 넣었다. 37°C 배양기에서 3, 15, 30, 60분 동안 incubation한 후에 ELISA로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 예비실험에서 120분 동안 incubation한 후에 측정한 흡광도는 60분의 결과와 유사하여 본 실험에서는 60분까지만 측정하였다. 흡광도 평균치를 구하여 well당 생산된 superoxide의 양을 계산하였다.

2) 탐식작용(Phagocytosis)^{11, 27)}

Staphylococcus aureus ATCC 29213을 Mueller-Hinton broth에 풀어 37°C 배양기에서 약 2시간 동안 배양하였다. Log phase에 도달한 균을 PBS (pH 7.2)로 3회 세척하고 (12,000rpm, 2분), PBS에 1×10^8 cfu/mL이 되도록 부유시켰다. *S. aureus*를 정상 사람 혈청으로(50% vol/vol) 37°C에서 30분간 옵소닌시켰다. 이후 2번 세척하고, PBS 0.5 mL에 다시 부유시켰다. PBS 1 mL에 부유시킨 10^6 개의 다형핵 백혈구와 옵소닌 처리한 *S. aureus*를 1:10의 세포 수 비율로 섞어서 37°C에서 30분간 배양했다. 차가운 N-ethylmaleimide (0.2 mM; Sigma) 0.2 mL (PBS 용액)를 첨가하여 더 이상의 탐식 작용을 막았다. 탐식이 안 된 *S. aureus*를 용혈시키기 위해 lysostaphin (최종 농도 20 units/mL; Sigma)을 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액을 얼음물에 담가서 식힌 후에 슬라이드에 세포원심분리하여 modified Wright's-Giemsa (Diff-Quick; Diagnostic Systems) 방법으로 염색하였다. 탐식작용은 직접 현미경으로 관찰하여 측정하였다. 백혈구 내 탐식된 세균의 수가 0, 1~10, 11~20, 21~30, 30개 이상인 백혈구의 수를 셈하여서, 백혈구수 각각에 0, 1, 2, 3, 4를 곱한 수치를 더한 후에 관찰한 총 백혈구의 수로 나누어서 탐식 가중치(Weighted phagocytic index; 이하 WPI로 약함)를 구하였다.

3) 표면 항원(수용체)의 발현²⁸⁾

백혈구 10^6 /mL과 항 CD64- FITC 항체 10 μ L를 얼음 내에서 30분간 반응시켰다. Dulbecco's modified PBS로 2번 세척하고 PBS 1 mL에 부유시켜서 flow cytometer로 분석하였다.

5. 자료 처리 및 분석

Superoxide 생성량은 각 환자 및 정상인에서 3번 반복 실험한 수치의 평균을 구한 후에 각 대상군의 수치의 평균과 standard error of mean을 구하여 나타내었다. Superoxide 생성량의 두 군 사이의 비교 또는 각 군에서 rhG-CSF 처리 전후의 비교는 반복 측정 ANOVA(repeated measure

ANOVA)로 통계적 유의성을 검정하였다.

WPI와 CD64 수용체 발현은 각 대상군의 수치의 평균과 standard error of mean을 구하여 나타내었다. 두 군 사이의 비교 또는 각 군에서 rhG-CSF 처리 전후의 비교는 paired t-test로 통계적 유의성을 검정하였다.

양측 검정으로 하여 P value가 0.05 이하이면 유의한 것으로 하였다.

결 과

당뇨병성 족부 감염이 있는 환자 12명 중, 여자 환자 6명, 남자 환자 6명이었고, 연령의 중앙값은 62세(37~76세)이었다. 당뇨병을 앓은 기간의 중앙값은 11.0년이었고, 6명은 인슐린으로, 3명은 경구혈당강하제로 조절을 하고 있었고, 3명은 치료를 받지 않고 있었다.

입원 당시 공복시 혈당의 중앙값은 185 mg/dL이었고, HbA_{1c}의 중앙값은 9.3% (6.9~13.7%)이었다. 모두 당뇨병성 족부 감염이 있었고, 8명(66.7%)은 골수염이 동반되었으며, 나머지 4명은 연조직 감염만 있었다(Table 1). 골수염이 동반되었던 8명 중 5명은 절단술을 시행받았고, 2명은 괴사 조직 제거수술을 받았으며, 1명은 수술을 거부하였다. 연조직 감염만 있던 환자 4명 중 2명은 괴사조직제거수술을 받았고, 2명은 수술을 시행하지 않았다. 정상 대조군 12명의 연령 중앙값은 41세(27~63세)이었다. 당뇨병 대조군 12명의 연령 중앙값은 57세이었고, 당뇨병을 앓은 기간의 중앙값은 10년이었던.

Superoxide의 생성은 당뇨병성 족부 감염 환자에서는 1.1 ± 0.26 nmol/ 2×10^5 cells/3 min (mean \pm SEM), 정상 대조군에서는 3.9 ± 0.86 nmol/ 2×10^5 cells/3 min으로 당뇨병성

Table 1. Demographic Data of the Patients with Diabetic Foot Infections on Study Entry

Sex, F/M (number)	6/6
Age, median (range)	62 (37~76) years
Duration of DM (median)	11.0 years
Control of DM (number)	
With insulin	6
With oral hypoglycemic agents	3
None	3
Fasting blood sugar (median)	185 mg/dL
HbA _{1c} (median)	9.3%
Category of infection	
osteomyelitis (number)	8
soft tissue infection (number)	4

족부 감염 환자에서 통계적으로 유의하게($P<0.05$) 감소되어 있었다. 15, 30, 60분 동안 생성된 superoxide는 당뇨병성 족부 감염 환자에서 3.1 ± 0.47 nmol/ 2×10^5 cells/15 min, 4.7 ± 0.81 nmol/ 2×10^5 cells/30 min, 7.7 ± 1.06 nmol/ 2×10^5 cells/60 min이었고, 정상 대조군에서는 4.6 ± 0.81 nmol/ 2×10^5 cells/15 min, 7.6 ± 1.47 nmol/ 2×10^5 cells/30 min, 12.0 ± 1.96 nmol/ 2×10^5 cells/60 min으로 당뇨병성 족부 감염 환자에서

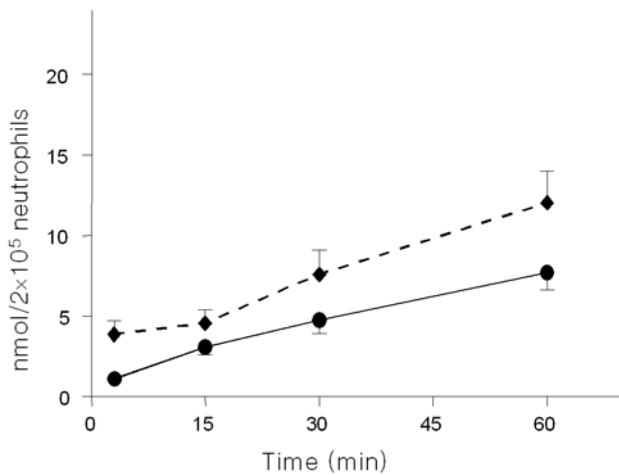


Figure 1. Superoxide anion production of neutrophils in patients with diabetic foot infections and normal controls. Superoxide anion production was significantly lower in diabetic patients (●) than in controls (◆) ($P<0.05$). Data are expressed as mean (nmol/ 2×10^5 cells) at each time. Vertical bars denote standard errors.

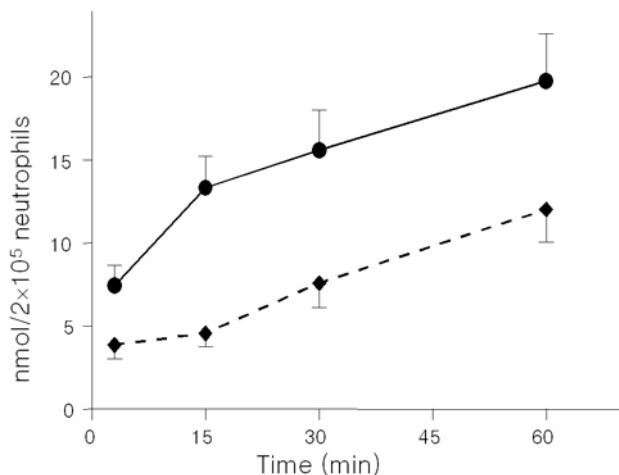


Figure 2. The effect of rhG-CSF on the superoxide anion production of neutrophils in normal controls. The production of superoxide anion increased significantly ($P<0.05$) after the treatment of rhG-CSF (●, solid line) than before the treatment (◆, dashed line). Results are expressed as mean (nmol/ 2×10^5 cells) at each time. Vertical bars denote standard errors.

superoxide의 생성은 통계적으로 유의하게 감소되어 있었다 ($P<0.05$) (Figure 1).

정상 대조군의 호중구를 rhG-CSF를 처리한 후에 측정된 superoxide의 생성량은 7.5 ± 1.23 nmol/ 2×10^5 cells/3 min, 13.3 ± 1.91 nmol/ 2×10^5 cells/15 min, 15.6 ± 2.40 nmol/ 2×10^5 cells/30 min, 19.8 ± 2.86 nmol/ 2×10^5 cells/60 min으로, rhG-CSF로 처리를 하지 않은 경우에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다(Figure 2). 당뇨병성 족부 감염 환자에서도 호중구를 rhG-CSF로 처리한 후에 측정된 superoxide의 생성량은 1.9 ± 0.52 nmol/ 2×10^5 cells/3 min, 8.3 ± 1.64 nmol/ 2×10^5 cells/15 min, 9.8 ± 1.88 nmol/ 2×10^5 cells/30 min, 12.1 ± 2.23 nmol/ 2×10^5 cells/60 min으로 rhG-CSF를 처리하지 않은 경우에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Figure 3).

감염이 없는 당뇨병 대조군과 정상 대조군의 superoxide 생성량의 비교는 Figure 4와 같다. 감염이 없는 당뇨병 환자에서도 정상인에 비하여 superoxide의 생성은 유의하게 감소되어 있었다.

호중구의 탐식가중치(Weighted Phagocytic Index; 이하 WPI로 약함)는 당뇨병성 족부 감염 환자에서 0.77이었고, 정상 대조군에서 0.69이었다. 당뇨병성 족부 감염 환자의 WPI가 정상 대조군에 비하여 높은 경향이었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 호중구를 rhG-CSF로 처리한 후에는 당뇨병성 족부 감염 환자에서 0.88, 정상 대조군에서 0.79로,

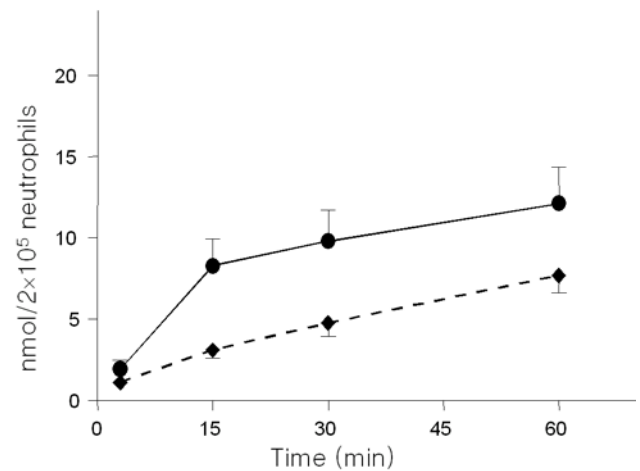


Figure 3. The effect of rhG-CSF on the superoxide anion production of neutrophils in diabetic patients with foot infections. The production of superoxide anion increased significantly ($P<0.05$) after the treatment of rhG-CSF (●, solid line) than before the treatment (◆, dashed line). Results are expressed as mean (nmol/ 2×10^5 cells) at each time. Vertical bars denote standard errors.

두 군 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다($P<0.05$). 당뇨병 대조군의 WPI는 0.67로 당뇨병성 족부 감염 환자에 비해 감소되어 있었고, 정상 대조군과 유사한 수치를 보였다(Figure 5). rhG-CSF를 처리한 후에는 0.81로 증가하였다. 족부 감염이 완치되고 ESR이 정상으로 된 후 추적 검사가 가능하였던 5명의 환자에서 감염 급성기와 완치 후의 WPI

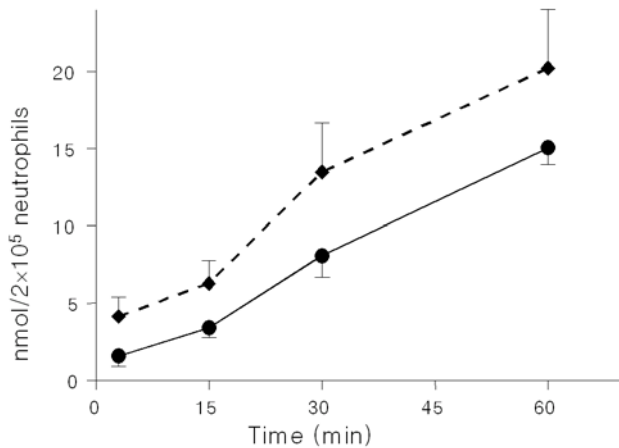


Figure 4. Superoxide anion production of neutrophils in diabetic patients without infection and normal controls. Superoxide anion production was significantly lower in diabetic patients (●) than in controls (◆) ($P<0.05$). Data are expressed as mean (nmol/2×10⁵ cells) at each time. Vertical bars denote standard errors.

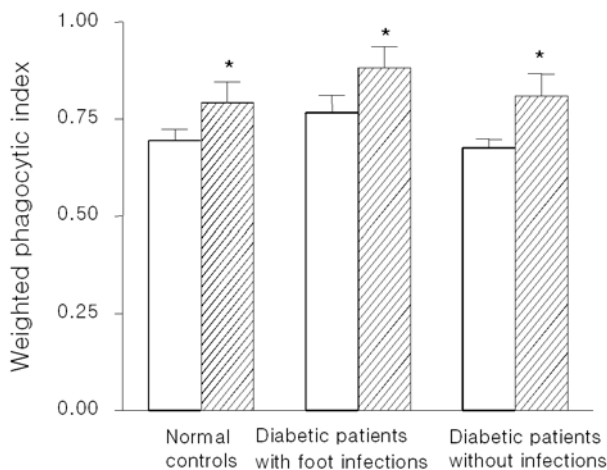


Figure 5. The effect of rhG-CSF on the phagocytic activity of neutrophils in normal controls, diabetic patients with foot infections, and diabetic patients without infections. Phagocytic activity of untreated neutrophils(open bar) is compared with that of rhG-CSF-treated neutrophils (hatched bar). rhG-CSF enhanced phagocytic activity of neutrophils significantly in each group ($*P<0.05$). There was no significant difference in the phagocytic activity of untreated neutrophils between the patient groups. Results are expressed as the mean weighted phagocytic index (+SEM).

는 Figure 6과 같다. 감염 급성기에 비하여 감염 치료 후에 WPI는 감소하는 경향을 보였다($P=0.2$).

호중구의 CD64의 발현은 당뇨병성 족부 감염 환자에서 평균 형광비(mean fluorescence ratio)가 5.4, 정상 대조군에서 4.5이었고, 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 호중구를 rhG-CSF를 처리한 후에 CD64의 발현은 당뇨병성 족부 감염 환자에서 5.2, 정상 대조군에서 4.4로, 처리 전후에 유의한 차이가 없었다. 감염이 없는 당뇨병 대조군의 CD64의 발현은 2.4이었고, rhG-CSF로 처리한 후에는 2.7이었다(Figure 7).

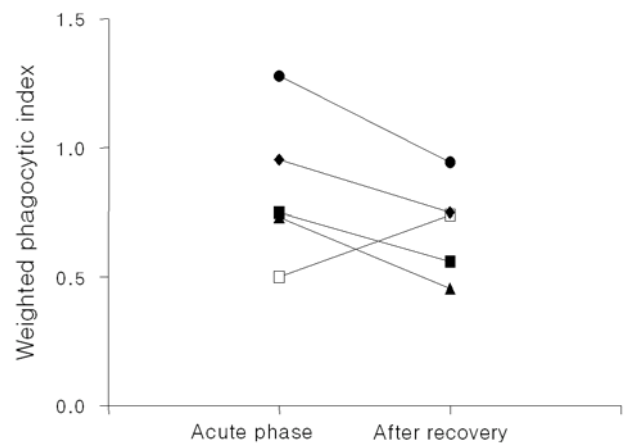


Figure 6. Changes in phagocytic activity of neutrophils in diabetic patients with foot infections. Bacterial phagocytosis decreased after the resolution of infection compared with that at the acute phase ($P=0.2$).

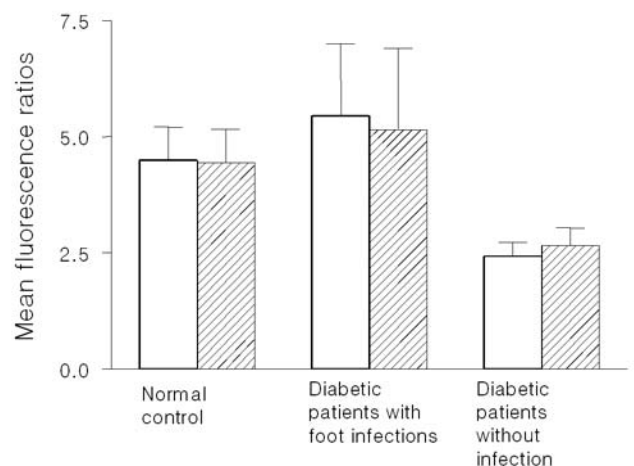


Figure 7. The effect of rhG-CSF on CD64 expression of neutrophils (mean fluorescence ratios). There was no significant difference in CD64 expression of neutrophils between the patient groups; before (open bar) and after (hatched bar) the treatment of rhG-CSF in each group.

고 찰

당뇨병 환자들에서 당뇨병성 족부 감염은 빈번하게 발생하는 중요한 감염성 합병증이다. 특히, 중증 감염의 경우 치료에 잘 반응하지 않아서 장기간 입원 치료가 필요하고, 내과적 치료에 호전을 보이지 않는 경우 족부 및 하지 절단술 등, 수술 요법이 필요한 경우가 많다^{2, 3)}. 따라서 당뇨병성 족부 감염의 성공적인 치료는 현대 의학의 중요한 과제 중의 하나이다. 당뇨병 환자들에서 백혈구 기능을 포함하여 인체의 방어 기능이 저하되어 있기 때문에 감염의 빈도와 중증도가 증가하는 것으로 생각되고 있다.

당뇨병 환자에서 호중구의 기능이 감소되어 있다는 것이 여러 연구에서 보고된 바 있다^{4, 6)}. 그러나 대부분이 감염이 없는 인슐린 의존형 또는 인슐린 비의존형 당뇨병 환자를 대상으로 한 연구들이었고, 감염병이 동반된 당뇨병 환자를 대상으로 한 연구는 Gough 등의 보고가 있었다²⁴⁾. Gough 등은 당뇨병성 족부 감염 환자에서 호중구의 superoxide 생성을 측정하였는데, 정상인에서와 비교하여 의미있게 감소되어 있었다($P < 0.0001$). 본 연구에서도 시간별로 측정된 호중구의 superoxide 생성이 감염이 없는 당뇨병 환자에서 정상인에 비하여 감소되어 있어 기존의 연구들과 일치하는 결과를 보였고, 당뇨병성 족부 감염 환자에서도 정상인에 비하여 유의하게 감소되어 있었다. Figure 1과 Figure 4에서 당뇨병 환자에서 superoxide의 생성이 정상인에 비하여 지연된 것처럼 보일 수도 있으나, 60분 이후에는 플라토를 보여 지연된 것이 아니고 감소되어 있었다. 즉, 당뇨병 환자에서 감염의 유무와는 상관 없이 호중구의 superoxide의 생성이 정상인에 비하여 감소되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 당뇨병성 족부 감염 환자의 호중구가 황색 포도상 구균을 탐식하는 기능은 정상인에 비하여 차이가 없었다. 당뇨병 환자에서 호중구의 탐식 기능을 정상인의 그것과 비교한 연구는 연구 재료 및 방법에 따라 다소 상이하여 당뇨병 환자와 정상인 사이에 차이가 없다는 보고도 있고, 당뇨병 환자에서 정상인에 비하여 감소되어 있다는 보고도 있다. Davidson 등⁵⁾은 당뇨병 환자에서 분리한 호중구가 *Candida guilliermondii*를 탐식하는 기능이 정상인의 호중구에 비하여 저하되어 있고, 정상인의 호중구를 포도당 용액에 전처리하면 탐식기능이 저하되는 현상을 보이므로 당뇨병 환자에서 호중구의 기능이 저하되는 이유를 고혈당에 의한 것이라고 생각하였다. Marhoffer 등^{4, 29)}은 혈당이 잘 조절되지 않는(HbA_{1C} 12.1% & 11.4%) 당뇨병 환자의 호중

구가 황색 포도상구균을 탐식하는 기능이 정상인에 비하여 감소되어 있다고 보고하였다. 반면 Dziatkowiak 등³⁰⁾은 소아 당뇨병 환자에서 호중구가 황색 포도상구균을 탐식하는 기능은 정상 소아와 차이가 없었고, 세포내 살균작용은 당뇨병 환자에서 저하되어 있다고 하였다. Delamaire 등³¹⁾은 당뇨병 환자(HbA_{1C} 9.9%)의 호중구가 latex bead를 탐식하는 기능은 정상인과 차이가 없다고 하였다. 본 연구의 결과도 후자의 결과와 일치하여 당뇨병 환자의 호중구의 탐식 기능은 정상인과 차이가 없었다. 통계적으로 유의하지는 않았으나 오히려 당뇨병성 족부 감염 환자에서 정상인에 비하여 높은 경향을 보인 것은 다른 연구들과는 달리 감염이 동반된 당뇨병 환자를 대상으로 하였기 때문으로 추정할 수도 있다. 감염에 의하여 인체 내에서 호중구가 활성화 되어 정상인의 호중구에 비하여 높은 탐식 기능을 보일 수도 있을 것이다. 본 연구에서도 실제로 감염이 없는 당뇨병 환자에서는 탐식가중치가 정상 대조군의 그것과 유사한 수치를 보였다. Simms 등³²⁾은 급성 세균 감염이 있는 20명의 환자에서 호중구와 단핵구의 탐식 기능을 측정하였다. 호중구가 IgG로 코팅된 적혈구를 탐식하는 기능이 정상인에 비하여 세균 감염 환자에서 유의하게 증가되어 있었고 감염 질환이 치유되어 가면서 증가되어 있던 탐식 기능이 정상인과 유사한 수치로 감소하는 양상을 보였고, 감염 질환이 있는 환자에서 방어 기전으로서 호중구의 탐식 기능이 증가된다고 하였다. 본 연구에서도 족부 감염이 호전된 후 추적 검사가 가능하였던 환자 5명에서 치료 후에 탐식 기능이 감소하는 경향을 보여서 Simms 등의 연구 결과와 일치하였다.

감염 질환이 있는 당뇨병 환자에서 호중구의 탐식 기능이 정상인과 차이가 없다 하더라도, superoxide 생성 등, 탐식 후 살균 기능이 감소되어 있다면 당뇨병 환자의 호중구는 감염병을 효과적으로 조절하는 기능이 저하되어 있다고 할 수 있을 것이다.

탐식세포의 표면에 존재하여 탐식 기능과 연관된 IgG의 Fc 수용체 중 CD64 (Fc γ RI)는 대개는 단핵세포에서 발현되고 호중구에서는 10% 내외로 발현이 되는 것으로 알려져 있지만, 당뇨병 환자, 특히 감염병이 동반된 당뇨병 환자에서 호중구의 CD64 발현에 대한 연구 보고는 없다. 본 연구에서 호중구의 CD64 발현은 당뇨병성 족부 감염 환자와 정상인 사이에 통계학적으로 의미있는 차이는 없으나, 당뇨병성 족부 감염 환자에서 증가되어 있어서 호중구의 탐식 기능이 당뇨병성 족부 감염 환자에서 증가되어 있는 것을 부분적으로 설명할 수 있는 것으로 생각된다. 감염이 없는 당뇨병 환자에서는 호중구의 CD64 발현이 당뇨병성 족부 감

염 환자에 비해서 감소되어 있었다. 급성 세균 감염을 동반한 환자에서 호중구의 CD64 발현이 증가되어 있었다는 Simms 등³²⁾의 보고와 일치하는 결과로서, 당뇨 환자에서도 감염 질환이 있을 때 호중구에서 CD64의 발현이 증가하는 것으로 생각된다.

G-CSF는 말초 혈액에서 호중구 수의 증가를 유발할 뿐 아니라⁷⁾ 성숙 호중구의 기능을 증진시키는 작용을 하는 것이 잘 알려져 있다. G-CSF는 정상인⁹⁻¹¹⁾에서 호중구의 기능을 증강시키고, 호중구의 기능이 감소되어 있는 주기성 호중구 감소증 환자³³⁾, 후천성 면역 결핍증 환자¹¹⁾, 악성 종양 환자 등⁸⁾에서 호중구의 탐식 작용, respiratory burst (superoxide 생성, chemiluminescence), 세균 살균 작용 등을 호전시킨다. G-CSF가 호중구의 기능을 증강시키는 작용이 있으므로, 백혈구 감소증이 없는 감염병 환자에게 항균제 치료에 보조적으로 G-CSF를 투여하면 감염병의 회복을 촉진시킬 수 있을 것이라는 가정 아래, 여러 가지 질병 동물 모델에서 많은 연구가 되고 있는데, 그 결과들은 rhG-CSF 치료가 효과적이라고 보고되고 있다. 당뇨병 환자에서도 호중구를 분리하여 rhG-CSF로 처리하였을 때, myeloperoxidase의 활성도와 chemiluminescence가 호전되어 호중구의 respiratory burst activity를 호전시켰다²⁵⁾. Gough 등²⁴⁾은 당뇨병성 족부 감염 환자에게 항생제 외에 직접 rhG-CSF를 투여하였다. rhG-CSF를 투여한 후에 분리한 호중구의 superoxide 생성은 유의하게 호전되었다($P < 0.0001$). 본 연구에서도 당뇨병성 족부 감염 환자에서 감소되어 있던 호중구의 superoxide 생성이 정상인의 수치 이상으로 호전되어 rhG-CSF가 시험관내 실험에서 호중구의 respiratory burst activity를 증가시켰다는 다른 연구 결과들과 일치하였다. 또한 정상인의 호중구도 rhG-CSF로 처리하면 기존의 연구 결과와 같이 superoxide의 생성이 증가하였다.

당뇨병 환자에서 G-CSF가 호중구의 탐식 기능에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없다. 정상인과 후천성 면역 결핍 환자를 대상으로 한 연구에서는 호중구를 분리하여 시험관내에서 rhG-CSF로 10분간 처리하였을 때 호중구의 세균 탐식 기능과 세균 살균 기능이 유의하게 증가하였다¹¹⁾. Turzanski 등³⁴⁾은 정상인에게 rhG-CSF를 5일간 투여한 후에 호중구의 respiratory burst activity (chemiluminescence 방법으로 측정)와 탐식 기능이 증강되었고, 호중구의 표면 항원인 CD64의 발현이 유의하게 증가하였으며, rhG-CSF의 용량과 비례하여 기능 증강 효과가 있다고 하였다. 즉, rhG-CSF는 시험관내에서 뿐만 아니라 체내에 직접 주입하였을 때도 정상이거나 저하되어 있는 호중구의 탐식 기능을 증가시켰다.

본 연구에서도 당뇨병 환자의 탐식 기능이 정상인에 비해 저하 되어 있지는 않았으나 rhG-CSF가 시험관내 실험에서 정상인과 당뇨병 환자 모두에서 호중구의 탐식 기능을 증가시켰다.

G-CSF가 호중구 표면의 CD64 발현에 미치는 영향에 대해서는 여러 논문에서 보고된 바 있다. 호중구를 시험관내에서 12시간 내지 72시간 동안 rhG-CSF로 처리하면 CD64 발현이 2~3배 증가되었다³⁵⁻³⁷⁾. 인체 내에 직접 주사한 경우에는 발현의 증가율이 훨씬 현저하게 나타난다³⁷⁻³⁹⁾. 그 이유로는 G-CSF가 성숙 호중구의 표면에서 발현을 증가시키기도 하지만³⁶⁾, 골수에서 생성되는 단계의 미성숙 호중구에 작용을 하여 CD64가 발현이 되는 성숙 호중구의 생성과 배출을 촉진시키기 때문에³⁷⁾ 인체 내에서 그 효과가 더욱 큰 것이라고 생각한다. 본 연구는 시험관내 효과에 대한 실험으로 CD64의 발현을 증가시키지는 않았다. 다른 연구와 달리 시험관내 실험에서 rhG-CSF가 호중구의 CD64의 발현을 증가시키지 않은 이유는 본 연구에서는 rhG-CSF의 작용 시간이 20분으로 짧았기 때문으로 생각된다. 즉, rhG-CSF가 시험관내에서 효과를 나타내어 CD64의 발현을 증가시키려면 더 긴 시간이 필요할 것으로 추정된다. 20분 동안에 호중구의 CD64 발현을 증가시키지는 않았으나, 탐식 기능은 증가시키는 것으로 보아서 초기에는 CD64의 발현 외에 친화력(affinity)의 증가 등 다른 작용에 의하여 탐식 기능을 증가시키고, 시간이 길어지면 CD64의 발현을 증가시켜서 탐식 기능의 증가 효과도 더욱 증대될 것으로 생각된다. 또한 인체 내에서는 CD64 발현의 증가 외에 여러 가지 cytokine과의 복잡한 상호 작용에 의하여 호중구의 탐식 기능에 영향을 미칠 것이다.

요약하면, 본 연구에서 당뇨병 환자의 호중구는 superoxide 생성이 감소되어 있고, 탐식 기능은 정상인과 차이가 없었으며, 시험관 내에서 rhG-CSF에 의해 감소 되어 있던 superoxide 생성과 탐식 기능이 증가되었다. 당뇨병 환자에서는 정도의 차이는 있으나 일반적으로 호중구의 기능이 감소되어 있으며, 시험관내에서 rhG-CSF는 이렇게 감소된 호중구의 기능을 호전시키는 효과가 있는 것이다. 본 연구의 결과로부터 당뇨병 환자의 감염병이 항생제 치료 등의 고전적인 치료에 반응을 하지 않는 경우, rhG-CSF를 보조적으로 투여하여 호중구의 살균 작용 등의 기능을 증강시킴으로써 감염병의 치료를 개선시키는 효과가 있을 가능성이 있다. 또한, 당뇨병 환자의 경우 중증 감염에 대한 호중구의 증가 반응이 감소되어 있는 것이 알려져 있는데³⁾, rhG-CSF를 감염이 동반된 당뇨병 환자에게 투여하면 호중구 기능의 증가

외에 호중구의 수적 증가 반응도 호전되어 감염병 치료에 더욱 효과적일 수도 있다. 그러나, G-CSF는 싸이토카인의 한가지이므로 인체에 투여하였을 때에는 호중구의 기능을 증가시키는 긍정적인 효과 외에 2차적으로 다른 싸이토카인을 활성화시키는 등의 작용에 의하여 원하지 않는 부작용을 초래할 수도 있다. G-CSF를 정상인에게 투여하였을 때, 골통증 등의 경한 부작용 외에 심각한 부작용은 없었으나, 감염병이 동반된 환자에서는 또 다른 결과를 초래할 가능성도 있다. Gough 등²⁴⁾의 연구에서 당뇨병성 족부 감염 환자에게 투여하였을 때에 심각한 부작용은 없었으나, 대상 환자에서 패혈증 환자는 제외되었고, 31명의 환자 중 20명(60%)에서 골수염이 동반되었으나, 위약군에서도 15명 중 4명만이 수술이 필요하였던 것으로 보아 대상군의 당뇨병성 족부 감염 정도가 경미하였던 것으로 생각된다. 즉, 감염 정도가 더 심하고, 이미 싸이토카인이 많이 분비되어 있는 패혈증 환자에서는 rhG-CSF를 투여하였을 때는 다른 효과가 나타날 수도 있을 것이다.

rhG-CSF를 당뇨병성 족부 감염을 비롯한 감염병의 치료에 보조적으로 이용할 수 있는지에 대한 결론을 위해서는 중증의 감염병, 난치성 감염병이 있는 환자를 대상으로 *in vivo* 연구가 필요하다. 당뇨병성 족부 감염 환자에서도 골수염이 매우 심하여 수술이 필요한 환자에서 실제로 수술의 횟수와 사지 절단을 얼마나 감소시킬 수 있는 효과가 있는지에 대한 전향적 연구가 필요하다. 또한, rhG-CSF가 호중구의 기능을 증강시키는 작용 기전이 아직 잘 밝혀져 있지 않으므로, 이에 대한 연구도 진행되어야겠다.

요 약

목 적 : 당뇨병 환자에서 호중구의 기능이 저하되어 있고, G-CSF는 성숙 호중구의 기능을 증진시키는 작용을 하는 것이 보고된 바 있다. 당뇨병성 족부 감염 환자에게 rhG-CSF를 투여하면 부가적 치료효과가 있을 것인지를 평가하기 위해, rhG-CSF가 *in vitro*에서 당뇨병성 족부 감염 환자에서 분리한 호중구의 superoxide생성 및 탐식 기능에 미치는 효과에 대한 연구를 시행하였다.

방 법 : 12명의 당뇨병성 족부 감염 환자와 12명의 정상인을 대상으로 정맥혈을 채취하여 호중구를 분리한 후에 *in vitro*에서 rhG-CSF (50ng/mL)로 20분간 처리하였다. rhG-CSF로 처리하기 전의 호중구와 처리한 호중구로 superoxide생성과 탐식 기능을 측정하였다.

결 과 : Superoxide의 생성은 당뇨병성 족부 감염 환자에

서는 4.7 (nmol/2×10⁵ cells/30 min)로, 정상 대조군(7.6)에 비하여 통계적으로 유의하게($P<0.05$) 감소되어 있었다. 호중구를 rhG-CSF로 처리한 후에 superoxide의 생성량은 당뇨병성 족부 감염 환자에서 9.8, 정상 대조군에서 15.6으로 rhG-CSF로 처리를 하지 않은 경우에 비하여 모두 유의하게 증가하였다. 호중구의 탐식가중치(Weighted Phagocytic Index)는 당뇨병성 족부 감염 환자에서 0.77, 정상 대조군에서 0.69로 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 호중구를 rhG-CSF로 처리한 후에는 당뇨병성 족부 감염 환자에서 0.88, 정상 대조군에서 0.79로, 두 군 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다.

결 론 : 당뇨병 환자에서는 호중구의 탐식 기능은 정상 대조군과 차이가 없었으나, superoxide의 생성은 유의하게 감소되어 있었고, 시험관 내에서 rhG-CSF가 superoxide생성 및 탐식 기능을 증가시키므로, rhG-CSF가 당뇨병 환자의 감염병 치료에 보조적인 치료제로서 유용할 가능성을 시사하며, 향후 임상적 효과에 대하여는 *in vivo* 연구가 필요하다.

감사의 글

연구에 많은 조언을 주신 정문현 선생님과 연구에 협조하여 주신 이해숙 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Fox HR, Karchmer AW : Management of diabetic foot infections, including the use of home intravenous antibiotic therapy. *Clin Podiatr Med Surg* 13:671-682, 1996
- 2) Bridges RM, Jr, Deitch EA : Diabetic foot infections. Pathophysiology and treatment. *Surg Clin North Am* 74:537-555, 1994
- 3) West N : Systemic antimicrobial treatment of foot infections in diabetic patients. *Am J Health Syst Pharm* 52:1199-1207, 1995
- 4) Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K : Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 15:256-260, 1992
- 5) Davidson NJ, Sowden JM, Fletcher J : Defective phagocytosis in insulin controlled diabetics : Evidence for a reaction between glucose and opsonising proteins. *J Clin Pathol* 37:783-786, 1984
- 6) Sato N, Shimizu H, Suwa K, Shimomura Y, Kobayashi I, Mori M : MPO activity and generation of

- active O₂ species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Care* 15:1050-1052, 1992
- 7) Welte K, Bonilla MA, Gillio AP, Boone TC, Potter GK, Gabrilove JL, et al.: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide-treated primates. *J Exp Med* 165:941-948, 1987
- 8) Lindemann A, Herrmann F, Oster W, Haffner G, Meyenburg W, Souza LM, et al.: Hematologic effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignancy. *Blood* 74:2644-2651, 1989
- 9) Ogle JD, Noel JG, Sramkoski RM, Ogle CK, Alexander JW: The effects of cytokines, platelet activating factor, and arachidonate metabolites on C3b receptor (CR1, CD35) expression and phagocytosis by neutrophils. *Cytokine* 2:447-455, 1990
- 10) Gadish M, Kletter Y, Flidel O, Nagler A, Slavin S, Fabian I: Effects of recombinant human granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors on neutrophil function following autologous bone marrow transplantation. *Leuk Res* 15:1175-1182, 1991
- 11) Roilides E, Walsh TJ, Pizzo PA, Rubin M: Granulocyte colony-stimulating factor enhances the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. *J Infect Dis* 163:579-583, 1991
- 12) Cairo MS, Mauss D, Kommareddy S, Norris K, van de Ven C, Modanlou H: Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of group B streptococcal sepsis in neonatal rats. *Pediatr Res* 27:612-616, 1990
- 13) Cairo MS, Plunkett JM, Mauss D, Van de ven C: Seven-day administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor to newborn rats: modulation of neonatal neutrophilia, myelopoiesis, and group B *Streptococcus* sepsis. *Blood* 76:1788-1794, 1990
- 14) Abraham E, Stevens P: Effects of granulocyte colony-stimulating factor in modifying mortality from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia after hemorrhage. *Crit Care Med* 20:1127-1133, 1992
- 15) Hebert JC, O'Reilly M, Gamelli RL: Protective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor against pneumococcal infections in splenectomized mice. *Arch Surg* 125:1075-1078, 1990
- 16) Nelson S, Summer W, Bagby G, Nakamura C, Stewart L, Lipscomb G, et al.: Granulocyte colony-stimulating factor enhances pulmonary host defenses in normal and ethanol-treated rats. *J Infect Dis* 164:901-906, 1991
- 17) Mooney DP, Gamelli RL, O'Reilly M, Hebert JC: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Arch Surg* 123:1353-1357, 1988
- 18) O'Reilly M, Silver GM, Greenhalgh DG, Gamelli RL, Davis JH, Hebert JC: Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. *J Trauma* 33:679-682, 1992
- 19) Toda H, Murata A, Oka Y, Uda K, Tanaka N, Ohashi I, et al.: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on sepsis-induced organ injury in rats. *Blood* 83:2893-2898, 1994
- 20) Yasuda H, Ajiki Y, Shimozato T, Kasahara M, Kawada H, Iwata M, et al.: Therapeutic efficacy of granulocyte colony-stimulating factor alone and in combination with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *Infect Immun* 58:2502-2509, 1990
- 21) 손동우: 투여용량에 따른 rhG-CSF의 호중구 감소증이 합병된 신생아 패혈증 치료 효과. *법의학술논문집* 제2호 95-111, 1998
- 22) deBoisblanc BP, Mason CM, Andresen J, Logan E, Bear MB, Johnson S, et al.: Phase 1 safety trial of Filgrastim (r-metHuG-CSF) in non-neutropenic patients with severe community-acquired pneumonia. *Respir Med* 91:387-394, 1997
- 23) Gillan ER, Christensen RD, Suen Y, Ellis R, van de Ven C, Cairo MS: A randomized, placebo-controlled trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration in newborn infants with presumed sepsis: significant induction of peripheral and bone marrow neutrophilia. *Blood* 84:1427-1433, 1994
- 24) Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster AV, Philpott-Howard J, Edmonds ME: Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection [see comments]. *Lancet* 350:855-859, 1997
- 25) Sato N, Kashima K, Tanaka Y, Shimizu H, Mori M: Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes* 46:133-137, 1997
- 26) Pick E, Mizel D: Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 46:211-226, 1981
- 27) Fleischmann J, Golde DW, Weisbart RH, Gasson JC: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 68:708-711, 1986

- 28) Hoglund M, Hakansson L, Venge P: *Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers.* Eur J Haematol 58:195-202, 1997
- 29) Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K: *Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus.* Diabetes Res Clin Pract 19:183-188, 1993
- 30) Dziatkowiak H, Kowalska M, Denys A: *Phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetic children.* Diabetes 31:1041-1043, 1982
- 31) Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B: *Impaired leucocyte functions in diabetic patients.* Diabet Med 14:29-34, 1997
- 32) Simms HH, Frank MM, Quinn TC, Holland S, Gaither TA: *Studies on phagocytosis in patients with acute bacterial infections.* J Clin Invest 83:252-260, 1989
- 33) Hammond WPt, Price TH, Souza LM, Dale DC: *Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor.* N Engl J Med 320:1306-1311, 1989
- 34) Turzanski J, Crouch SP, Fletcher J, Hunter A: *Ex vivo neutrophil function in response to three different doses of glycosylated rHuG-CSF (Lenograstim).* Br J Haematol 96:46-54, 1997
- 35) Murea S, Fruehauf S, Zeller WJ, Haas R: *Granulocytes harvested following G-CSF-enhanced leukocyte recovery retain their functional capacity during in vitro culture for 72 hours.* J Hematother 5:351-357, 1996
- 36) Gericke GH, Ericson SG, Pan L, Mills LE, Guyre PM, Ely P: *Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).* J Leukoc Biol 57:455-461, 1995
- 37) Kerst JM, van de Winkel JG, Evans AH, de Haas M, Slaper-Cortenbach IC, de Wit TP, et al.: *Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells.* Blood 81:1457-1464, 1993
- 38) Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, Rodger E, Price TH: *Neutrophil transfusions: Kinetics and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone.* Transfusion 38:713-721, 1998
- 39) Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, et al.: *Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.* Blood 78:885-889, 1991