

Staphylococcus aureus를 이용한 주정중독환자 백혈구의 Phagocytic Plaque 형성력

성희경* · 서병배¹ · 김용호²

인제대학교 상계백병원 임상병리과, ¹인제대학교 부산백병원 임상병리과

²인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

주정중독환자에서 초기 비특이적 면역력의 주된 반응인 백혈구 탐식작용을 이용하여 이들 환자들의 건강관리를 용이하게 할 수 있는지를 알아 보기 위하여 백혈구 탐식 작용력을 측정 하고자 실시하였고, 연구대상은 주정중독 의존형으로 진단된 남자 95 명, 여자 3 명과 대조군으로서는 건강한 현혈자 32 명을 대상으로 실시하였다. 또한 주정중독환자의 건강상태를 확인하기 위하여 백혈구수, 혈색소, 적혈구 평균용적, 혈청 단백질 전기영동, 림프구 아형 분리 및 림파구 유약화 시험도 실시하였다. 분석결과에서 혈색소와 적혈구 평균용적은 대조군에 비하여 신, 장기 입원 환자군에서 유의 할만한 차이를 보였으며($P<0.05$), 총 T와 B 림프구는 감소하였고, $T_{\text{Helper}}/ T_{\text{Suppressor}}$ 비율은 $1.6\pm0.8\%$ 로 증가하였다. 특히 신, 장기입원 주정중독자의 *Staphylococcus aureus* Cowan I을 사용한 백혈구의 phagocytic plaque 형성력에서도 대조군에 비하여 현저하게 저하되었고, 이제까지 보고된 바 없는 특이한 strange body, 사슬상 탐식현상을 관찰 할 수 있었다. 따라서 *Staphylococcus aureus* Cowan I을 사용한 백혈구의 phagocytic plaque 형성 시험은 특별한 기구가 없이 간단하게 이용 가능하여 주정중독환자의 초기 면역력 측정에 매우 유용한 방법임을 알 수 있었다.

Key words □ alcoholism, phagocytic plaque, *Staphylococcus aureus*

주정중독증에 있어서 주정대사의 특성은 효소인 알코올 탈수소효소(alcohol dehydrogenase)에 의하여 촉매가 되면, 알코올은 cofactor인 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)로 이송되어 acetaldehyde로 전환되어진다. 일반적으로 알코올은 섭취된 후 약 10% 미만은 대사과정을 거치지 않고 바로 땀, 소변, 호흡 작용을 통하여 배출되며, 나머지는 간에서 알코올 탈수소 효소나 산화 시스템에 의해 분해되어 배출된다(4). 그러나 심한 주정중독 시에는 체내 축적이 증가되어 주정 자체 또는 이의 대사 부산물인 acetaldehyde와 수소의 직접적인 작용에 의해서 질병이 유발되어진다(4,12,23).

주정중독환자에 대한 진단방법으로는 생물학적 방법, 심리학적 방법, 기타 다변적인 방법에 의하여 진단되어진다(8,12). 생물학적 방법으로는 혈당, gamma glutamyl transferase (γ -GTP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 측정 및 총 단백질, 혈청 단백질 전기영동법과 총 콜레스테롤(TC), triglyceride (TG), 적혈구 평균용적(MCV) 등이 이용되어지고 있다(1,6,10,23).

한편, 주정중독은 면역계의 기능 저하를 초래할 수 있으며, 면역계의 기능 저하는 여러 가지의 질병에 감염되기 쉽게 된다. 주정중독자에 대하여 면역기능 특히 초기 면역반응인 비 특이적인

면역기능은 주정중독환자의 건강관리 지표상 매우 중요하다고 생각할 수 있다. 지금까지 발표된 비 특이 면역계에 대한 측정 방법들은 보체, 분리시킨 백혈구의 탐식작용, 라이소자임을 이용한 측정법과 같이 생체 내 활성물질 및 옥소닌 작용 등을 각각 분리시켜 활성을 측정하는 방법들이 대부분이다.

생물체의 반응 특히 초기 면역계 중심 반응인 탐식작용은 초기 면역반응에 관여하고 있는 여러 가지 인자들의 협동작용의 여부에 따라서 그 결과가 크게 달라지게 된다. 그러나 주정중독환자의 초기 면역반응에 관여하는 여러 가지 인자들이 포함된 생체내 순환혈액을 이용하여 측정 보고된 식균작용에 대하여는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 *Staphylococcus aureus* Cowan I을 사용하여 초기 비 특이 면역계에 관여하는 여러 가지 인자가 모두 포함된 자연적인 조건에서 미생물에 대한 주정중독환자 백혈구의 탐식능력을 측정할 수 있는 방법을 개발하고, 이를 이용하여 주정중독환자의 초기 면역 반응력 측정을 위한 유용한 방법인지를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

대상

부산, 경남지역의 2 개 종합병원에 입원하였던 주정중독환자를 대상으로 하여 신경정신과 전문의가 주정중독 의존형이라고 진

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 02-950-1242, 1235, Fax: 02-950-1244

E-mail: Hkseong02@yahoo.co.kr

단한 98 명의 환자를 대상으로 실시하였다. 실험군 중 처음 입원 후 1 주일 이내의 군을 신환자군으로 하였고, 입원 후 2 주일 이상인 환자를 장기환자군으로 설정하였다. 대조군(non-alcoholism)은 헌혈자 판정에 필요한 이화학적 검사와 진찰 등에 적합 판정을 받은 건강한 헌혈자를 대상으로 하였다.

균주

본 실험에 사용된 균주는 일본자해회 의과대 제 2 미생물학 교실에서 분양 받은 *Staphylococcus aureus* Cowan I 균주를 사용하였다.

장비 및 기구

유세포 측정기는 FACScan flow cytometry (Becton Dickinson Co., Cockeysville, USA)를 사용하였고, 세포를 회수하기 위하여 cell harvester (Flow Lab., USA)를 이용하였으며, 방사성 동위원소를 측정하기 위한 β -scintillation counter는 TRI-CARB^R 4000 (Packard, USA)를 이용하여 counts per minutes (cpm) 단위로 방사선을 측정하였다. 혈청 단백질 전기영동에는 Cliniscan- 2 (Helena, USA), 자동 혈액분석기는 Sysmax-NE 8000 (DOA, Japan), 자동 생화학 분석기는 biochemical auto analyzer Au 5200 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다. Phagocytic-plaque 형성 시험은 조직배양용 평판(Roskilde, Denmark), 96-well U-plate (Corning Co., USA)를, cell harvester용 여과지는 microfiltration paper (TiterketTM, USA)를, 전기영동에는 cellulose acetate plate (Titan III plate, Helena)를 사용하였다.

시약

균주 배양용 배지는 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Detroit, USA) 림프구 아형 분석에 사용된 시약은 simultest kit 즉, 총 T- 세포 검색에는 simultest anti-Leu 4 fluorescence isothiocyanate (FITC, CD3)와 anti-Leu 12 phycoerythrin (PE, CD19), 조력/유발 T세포와 억제/상해 T 세포 검색에는 simultest anti-Leu 3 FITC (CD4)와 anti-Leu 8a PE (CD8)를 사용(Becton Dickinson Co.) 하였다. 림프구 자극 시험에는 Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, Gibco, Gaithersburg, USA), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), Ficoll-Hypaque (F-H, Pharmacia, Uppsala, Sweden), 0.4% Trypan blue (Gibco), PHA-M type (Gibco), Methyl-[³H] thymidine (250 ci/mmol Amersham, Piscataway, USA), Scintillation fluide (Insta-gel^{XF}, Parkard)를 이용하였다. 혈청 단백질 전기영동에는 Cellulose acetate plate 염색 시약으로는 Ponceau-S (Helena) 등을 사용하였다. 자동 혈액분석기, 생화학 분석은 자동분석기 전용 시약을 이용하였다.

백혈구 phagocytic-plaque 형성력 시험

본 연구에서 백혈구의 phagocytic-plaque 형성력 시험은 *S. aureus* Cowan I 균주를 BHI 한천 평판배지에서 37°C, 5% CO₂

배양기에서 15 시간 동안 배양하였다. *S. aureus* Cowan I 균주를 100°C에서 중탕을 실시한 후 세균 배양액내 세균수를 1×10⁹ CFU/ml로 조정하였다. 조직배양용 평판접시에 균주 부유액 2 ml를 중첩시켜 실온에서 1 시간 동안 방치하여 균주의 박충을 형성시켰다. 그 다음에 평판에 형성된 균주의 박충이 파괴되지 않도록 상층 부유액을 조심스럽게 제거하였다. 헤파린(300 unit/ml)으로 처리된 정맥혈 약 1.5 ml를 평판에 첨가한 후 37°C, 30 분 동안 탐식 시켰다. 배양 후 생리 식염수로 혈액을 제거한 다음 건조시켜 메탄올로 고정하고, 최종적으로 Giemsa 염색을 하여 현미경으로 검경(×100)하였다(16,20,21).

유세포 분석기를 이용한 말초혈액의 림프구 아형 검색

헤파린으로 처리된 말초혈액의 림프구 아형을 검색하기 위하여 simultest kit인 단클론 항체를 사용하였다. 총 T세포와 총 B 세포는 CD3, CD19를 사용하였다. 조력/유발 T세포와 억제/상해 T세포는 CD4와 CD8을 이용하였다. 림프구를 얻기 위하여 Simultest LeucogateTM을 사용하였다. 모든 검체는 분석시 isotypic negative control (Simultest control)을 함께 사용하였다. 이중 면역 형광법은 FITC 또는 PE가 부착된 단클론 항체 20 μ l를 실온에서 15 분 동안 반응시켰다. 적혈구 용해액을 2 ml를 첨가시키고 잘 혼합해서 실온과 암소에서 10 분간 방치한 다음 300×g에서 5 분간 원심침전을 시킨 후 상층액을 버리고, 다시 2-3 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)을 넣고, 250×g에서 5 분간 원심침전을 실시하여 상층액을 제거한 후 즉시 유세포 분석기로 검색하였다.

Phytohemagglutinin 자극 시험

1. Ficoll - Hypaque 림프구 분리

헤파린으로 처리된 정맥혈액 20 ml를 동량의 RPMI 1640으로 희석하여 밀도원심 구배법으로 분리하였다(19,20). 희석된 혈액을 400×g에서 30 분간 원심침전을 시킨 다음 혈장과 F-H 사이의 단핵구층을 Pasteur pipette로 채취하여 15 ml 시험관에 옮겨 넣은 후 RPMI 1640으로 세포를 잘 부유 시켰다. 800×g에서 10 분간 원심침전을 실시한 후 5% FBS RPMI 1640배지로 세정하였으며 동일한 조작을 3회 반복하였다. 최종 세포 부유액 농도가 1×10⁶ cells/ml가 되도록 하였으며, 세포의 생존률 검사는 0.4% trypan blue를 사용하여 측정하였다.

2. Methyl-[³H] thymidine uptake 시험

정맥혈의 단핵구 세포 증식률의 측정에 관한 시험 과정은 세포수를 적절하게 조정된 부유액을 200 μ l씩 96-well U-plate에 각각 12 well에 분주한 다음에 1-3번과 7-9번에는 PHA를 첨가시키지 않고, 4-6번과 10-12번에는 PHA를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다. 세포를 회수하기 16-18 시간 전에 methyl-[³H] thymidine 1 μ Ci/10 μ l를 첨가하고, 세포는 cell harvester에 의해 세포 회수용 여과지를 사용하여 회수하였다. 여과지를 건조시킨 다음에 polyethylene vial에 옮기고 insta-gel^{XF}를 10 ml씩 첨가하여, β -counter로 cpm을 측정하였다.

혈청단백질 전기영동 분포

Cellulose acetate plate를 이용한 전기영동용 완충용액에 20 분 동안 평판을 담가둔 다음, 전기 영동조 양편 수조에 완충액을 100 ml씩 채우고, 혈청을 10 μ l를 준비한 다음 상기 완충액에 담가 두었던 cellulose acetate plate를 꺼내어 여과지를 이용해서 습기를 제거하고, 혈청을 충분히 문힌 후 평판에 도포하였다. 혈청을 도포시킨 방향을 음극으로 하여 양극 쪽으로 이동하도록 해서 도포시킨 평판을 전기 영동조에 올려놓았다. 전원을 공급하고 180 Volt로 15 분 동안 전기영동시킨 다음 영동이 완료되면 Ponceau-S 염색액으로 6 분간 염색 후 5% 초산으로 탈색하였다. 탈색된 평판을 메탄올 용액에 담구어 탈색시킨 다음, 투명화제로 5 분간 처리 후 56-60°C에서 건조시켜 Cliniscan-2를 이용하여 파장 520 nm에서 흡광도를 측정하여 그 분획을 백분율로 나타내었다(5).

결 과

주정중독환자의 성별 및 연령 분포

주정중독환자는 98 명 중 남자가 95 명(96.9%)이었고, 여자는 3 명(3.1%)이었으며, 신환자군은 50 명(51.0%) 중 여자가 3 명으

Table 1. Sex distribution of alcoholics

	unit: person (%)		
	New patients	Old patients	Total(%)
Male	47	48	95(96.9)
Female	3	—	3(3.1)
Total	50(51.1)	48(49.0)	98(100)

Table 2. The age at hospitalization, age started to drinking and duration of drinking

	unit : person (%)		
Age (years)	Age at hospitalization	Age started to drinking	Duration of drinking(%)
10-14		5(5.1)	4(4.1)
15-19		41(41.8)	13(13.3)
20-24		33(33.7)	16(16.3)
25-29	5(5.1)	13(13.3)	30(30.6)
30-34	9(9.2)	2(2.0)	16(16.3)
35-39	20(20.4)	1(1.2)	14(14.3)
40-44	29(29.6)	1(1.2)	4(4.1)
45-49	12(12.2)		1(1.0)
50-54	14(14.3)		
55-59	5(5.1)		
60-64	2(2.0)		
65-69	2(2.0)	1(1.2)	
Other		1(1.2)	
Total	98(100)	98(100)	98(100)

로 조사되었고, 장기환자군으로는 모두 48 명(49.0%)이 남성이었다(Table 1). 처음 입원시 연령 분포는 Table 2와 같으며, 가장 낮은 연령군은 25-29 세로 5.1%를 차지하였으며, 가장 높은 연령군은 65-69 세가 2.0%였다. 이중 40-44 세는 29.6%로 가장 많았으며, 그 다음에는 35-39 세로 20.4%로 나타났다. 음주를 처음 시작한 연령 중 가장 낮은 연령은 10-14 세로서 5.1%이었고, 음주기간이 가장 높은 연령군은 10 세에서 24 세 이하의 연령군이었으며 이는 전체의 80.6%를 차지하였다. 음주를 처음 시작한 이래 음주기간은 25-29 년이 30.6%로 가장 높았으며, 가장 짧은 음주기간은 10-14 년으로 4.1%이었으며, 20 년 이상 지속된 사람들은 82.6%를 차지하였으며(Table 2), 이는 주정중독환자의 대부분을 차지하였다.

혈액학적 분석 결과

여러 가지 분석 항목 중 생체 방어 기전과 관계가 있는 백혈구수(WBC)와 빈혈 및 산소운반 능력을 측정하기 위한 혈색소(Hb)와 주정중독 판정에 이용되어지는 적혈구 평균용적(MCV)을 측정하여 본 결과는 Table 2와 같았다. 즉 대조군의 평균 백혈구수는 $7.7 \pm 1.2 \times 10^9/l$ 이었으며, 신환자군에서는 $7.9 \pm 5.4 \times 10^9/l$, 장기환자군에서는 $8.2 \pm 2.4 \times 10^9/l$ 이었다. 혈색소의 측정값은 대조군에는 $15.1 \pm 1.0 g/dl$ 이며, 신환자군에서는 $13.1 \pm 1.4 g/dl$, 장기환자군에서는 $14.8 \pm 1.9 g/dl$ 로 나타났다. 적혈구 평균 용적은 대조군에서 $86.4 \pm 3.2 fl$, 신환자군에서는 $97.6 \pm 7.0 fl$, 장기환자군에서는 $98.6 \pm 7.0 fl$ 로 나타났다(Table 3).

혈청 단백질 전기영동상의 결과

주정중독환자의 혈청내 단백질의 이상을 파악하고 이를 이용한 면역력을 확인하기 위하여 혈청 단백질의 변화를 전기영동상으로 관찰한 결과를 나타내었다. 알부민은 대조군에서는 $58.8 \pm 4.5\%$, 신환자군에서는 $59.8 \pm 12.9\%$ 이며, 장기환자군에서는 $59.8 \pm 12.9\%$ 이다. α_1 -글로블린은 대조군에서 $1.5 \pm 0.6\%$, 신, 장기환자군에서는 각각 $2.3 \pm 0.9\%$, $2.5 \pm 0.9\%$ 로 나타났으며, α_2 -글로블린은 대조군에서 $9.5 \pm 2.1\%$ 이었고, 신환자군은 $10.0 \pm 2.5\%$, 장기환자군은 $8.9 \pm 3.4\%$ 으로 나타났다. β -글로블린의 대조군은 $12.2 \pm 2.1\%$, 신환자군은 $13.9 \pm 3.8\%$, 장기환자군은 $12.4 \pm 3.3\%$ 이며, γ -글로블린은 대조군에서는 $16.9 \pm 2.8\%$, 신, 장기환자군은 각각 $15.8 \pm 5.7\%$, $15.6 \pm 7.3\%$ 로 나타났으며, 알부민과 글로블린의 비율은 대조군에서 $1.3 \pm 0.3\%$ 이었으며, 신환자군에서는 $1.6 \pm 0.8\%$, 장기환자군은 $1.9 \pm 1.3\%$ 로 나타났다(Table 4).

Table 3. Hematologic test results

Group	WBC($\times 10^9/l$)	Hb(g/dl)	MCV(fl)
Control group	7.7 ± 1.2	15.1 ± 1.0	86.3 ± 3.2
New patients	7.9 ± 5.4	$13.1 \pm 1.4^*$	$97.6 \pm 8.6^*$
Old patients	8.2 ± 2.4	$14.8 \pm 1.9^*$	$98.6 \pm 7.0^*$

WBC: white blood cell, Hb: hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume of red cell, *P<0.05.

Table 4. Serum protein electrophoresis analysis

Group	unit: %					
	Albumin	α_1 -globulin	α_2 -globulin	β -globulin	γ -globulin	A/G
Control group	58.8±4.5	1.5±0.6	9.5±2.1	12.2±2.1	16.9±2.8	1.3±0.3
New patients	58.4±9.9	2.3±0.9*	10.0±2.5*	13.9±3.8	15.8±5.7	1.6±1.8*
Old patients	59.81±2.9	2.5±0.9	8.9±3.4	12.4±3.3	15.6±7.3	1.3±1.3

A/G: albumin/globulin ratio, *P<0.05.

Table 5. Flow cytometric analysis of cell surface markers

Group	Subtypes (%)				
	CD3	CD19	CD4	CD8	CD4/CD8
Control group	69.9±9.2	16.2±4.1	41.9±9.9	35.7±7.8	1.3±0.5
New patients	63.91±3.0*	10.4±6.0*	42.3±9.9*	30.9±9.3*	1.6±0.8*
Old patients	64.8±8.2	15.6±6.1	38.2±6.7	30.4±6.6	1.4±0.5*

*P<0.05.

Table 6. *In vitro* proliferative responses to the mitogen PHA on T-lymphocytes

Group	Phytohemagglutinin (cpm)
Control group	29.91±4.5
New patients	19.4±8.5*
Old patients	20.31±5.9*

*P<0.05.

림프구 아형 검색 결과

말초 혈액의 림프구 아형은 CD3, CD19, CD4, CD8의 T, B 세포 비율을 조사 한 결과 전체 T세포(CD3)는 대조군은 69.9 ± 9.2%이며, 신환자군에서는 63.9 ± 13.0%, 장기환자군에서는 64.8 ± 6.6%이었다. CD19의 전체 B세포는 대조군에서 16.2 ± 4.1%, 신환자군, 장기환자군은 각각 10.4 ± 6.0%, 15.6 ± 6.1%으로 나타났다. CD4에서는 대조군은 41.9 ± 9.9%, 신환자군 42.3 ± 9.9%, 장기환자군 38.2 ± 6.7%이었고, CD8에서는 대조군은 36.7 ± 7.8%, 신환자군, 장기환자군은 각각 30.9 ± 9.3%, 30.4 ± 6.6%으로 나타났다. CD4/CD8의 비율은 대조군에서 1.3 ± 0.5%, 신환자군에서는 1.6 ± 0.8%, 장기환자군은 1.4 ± 0.5%로 나타났다(Table 5).

Phytohemagglutinin 시험 결과

주정이 체내에 축적하게 되면 여러 가지 이상적인 면역현상이 발생하게 되며 이들 반응 중의 하나인 항체형성 반응에 대하여 장애가 일어나게 된다. 따라서 마이토젠에 대한 T-림프구의 활성화 및 세포성 면역력을 간접적으로 측정하기 위하여 PHA를 사용하였다. PHA시험시 각각의 세포 생존율은 99.8%이었으며, 시험 결과, 대조군은 29.9 ± 14.5 cpm이었고, 신환자군은 19.4 ± 8.5 cpm, 장기환자군은 20.3 ± 15.9 cpm로 나타났다(Table 6).

주정중독환자 백혈구에 대한 phagocytic plaque의 특성

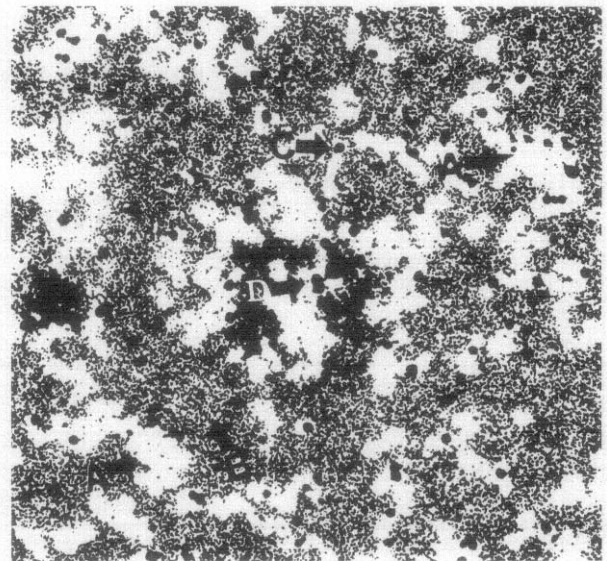


Fig. 1. Phagocytic-plaques by formed by leukocytes from a healthy blood donor. Dark dot-like bodies (arrow A) were seen on large phagocytic plaques; B marks represent bacterial thin monolayers; C marks present nonphagocytic leukocytes; D marks show elongated plaques, indicating active motility and phagocytes formed by leukocytes; This photograph shows large numbers of phagocytic-plaques formed by heat killed parental *Staphylococcus aureus* Cowan I strain; magnification ×100.

Fig. 1, 2, 3상의 미세한 작은 점들은 탐식되지 않은 세균충들이며, 흰색으로 보이는 빈 공간은 식균작용에 의해서 탐식되어진 면적 즉 phagocytic plaque가 형성된 모습이다. Phagocytic plaque가 형성된 내부의 가장자리에 큰 반점모양은 탐식한 백혈구이다. 미세한 작은 점들 속에 비교적 큰 반점들은 식균을 하지 않은 백혈구이다. 대조군 Fig. 1에 형성된 plaque의 형태는 백혈구 1 개당 면적에 비하여 약 2-3 배 가량 넓게 식균되었으며,

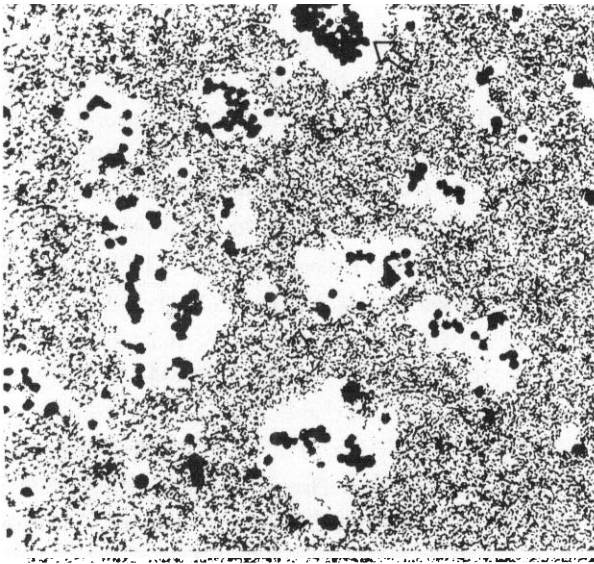


Fig. 2. Phagocytic-plaques on Staphylococcal monolayer formed by leukocytes from newly hospitalized alcoholic; magnification $\times 100$. This picture shows decreased plaques formed by leukocytes as compared to normal healthy donors (Fig. 1) and phagocytized areas of plaques with round and small shapes (arrow, \blacktriangleleft) indicate low phagocytic activity but show strange bodies and chain shaped phagocytic-plaques (arrow, \blacktriangleleft).

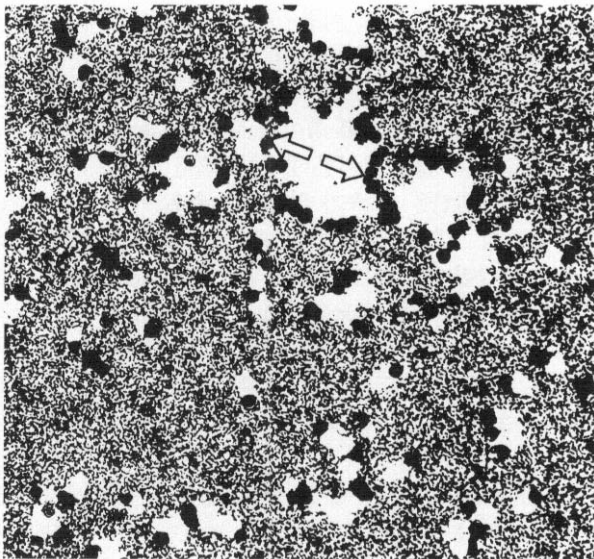


Fig. 3. Phagocytic-plaques on Staphylococcal monolayer formed by leukocytes from an old hospital alcoholic; magnification $\times 100$. This picture shows large size of phagocytic-plaques (\blacktriangleleft \blacktriangleright) formed by leukocytes; also show poor phagocytized areas on the bacterial thin layers with small and round shapes (\blacktriangleleft).

식균작용시에 백혈구의 형태가 사슬형, strange상 같은 형태는 관찰되지 않았다. 신환자군에서는 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 대부분이 정상 백혈구의 탐식범위에 비해서 작게 탐식되어 면적이 작게 형성되었으며 phagocytic plaque 형성력이 감소되었다. 또한 plaque의 형성에서 백혈구가 사슬형성, strange모양을 이루고 있

는 모습들이 관찰되었으며, 식균작용 후에 백혈구가 phagocytic plaque 주변에서 내부로 모여드는 현상들이 관찰되었다(Fig. 2).

장기환자군에서는 phagocytic plaque의 특징은 여러 개의 백혈구가 커다란 plaque를 형성하였고 탐식한 백혈구는 plaque 주변에 모여 있는 형태를 보여 주고 있다. Fig. 3에서 나타난 것은 신환자군처럼 백혈구들이 사슬모양으로 나열된 형태를 관찰할 수가 있었다.

Phagocytic plaque 형성력 시험 결과

모든 검체는 100배 대물렌즈에서 촬영한 사진에 나타난 전체 면적에서 식균 면적을 계산하여 평균값을 구하였다. 각각의 사진 5매 사이의 오차 허용 한계는 10% 이내로 계산되었다. 대조군의 phagocytic plaque 형성력은 25.1%이었으며, 신환자군에서는 17.0%, 장기환자군에서는 20.2%로 나타났다. Phagocytic plaque 형성력 시험에서 신환자군과 장기환자군 사이의 유의성은 적으나, 신환자군보다 장기환자군에서의 plaque 형성력은 비교적 높은 것으로 나타났으며, 대조군에 비하여 신, 장기환자군들은 모두 낮은 것으로 나타났다. 백혈구 1 개당의 평균 식균작용의 plaque 형성 비율은 대조군에서 21%를 형성하였고, 신환자군에서는 10.6%, 장기환자군에서는 10.8%를 형성하였다 (Table 7).

주정중독환자에서의 비 전형적인 phagocytic plaque 형

식균 phagocytic-plaque 형성시 그 형태는 strange형과 사슬형의 두가지 형태가 있는데 대조군의 경우 이 두가지 형태는 모두 관찰되지 않았고, 신환자군에서는 사슬형이 18 명, strange plaque형이 22 명으로 관찰되었으며, 장기환자군에서는 사슬형이 21 명, strange plaque형이 8 명으로 관찰되었다(Table 8).

Table 7. A percentages of phagocytic plaque formation

Group	Phagocytic plaque	unit: %	
		one WBC phagocytic plaque	
Control group	25.1 \pm 12.9	21.7 \pm 13.2	
New patients	17.0 \pm 7.9*	10.7 \pm 4.3*	
Old patients	20.2 \pm 9.5*	10.9 \pm 2.8	

*P<0.05.

Table 8. Formation of strange body

Group	unit: No. of case		
	Strange (-)	Strange (+)	Strange (+2)
Control group	32	—	—
New patients	7	18	22
Old patients	19	21	8

Strange (-): Absence of unusual plaques, Strange (+): Presence of unusual plaques, Strange (+2): Showed large numbers of unusual bodies.

고 찰

주정중독증의 진단에는 생물학적 방법, 심리학적 방법, 기타 다변적인 방법 등이 있으며(3), 권정화(2), Salaspuro 등(20)의 적혈구 평균 용적, γ -GTP, AST, ALT 등을 복합적으로 검사를 실시하여 주정에 대하여 진단하고자 하는 경우 77%가 진단이 가능하다고 하였다. 본 연구에서 혈청 단백질의 전기 영동상은 대조군, 장기환자군 각각 7.5 ± 0.9 mg/dl, 7.6 ± 0.5 mg/dl로써 유의한 차이는 없으나, 신환자군에서는 6.9 ± 0.7 mg/dl로써 유의하였다. 알부민, 각각의 면역 글로블린은 신환자군과 대조군에서 유의한 차이를 보였으며, 이는 정봉주 등(7)의 결과와 일치하였다(Table 6). 한편 주정중독환자에서의 MCV치의 증가빈도는 높다고 보고하였으며(15), 본 연구에서 주정중독환자의 MCV는 신환군 97.6 ± 8.6 fl, 장기환자군 98.6 ± 7.0 fl, 대조군은 86.3 ± 3.2 fl로써 신, 장기환자군에서의 MCV치의 증가와 신환자군에서는 γ -GTP, MCV를 이용하여 주정중독을 진단을 할 수 있다고 보고한 권정화, Salaspuro 등(20)과 일치하였고, 또한 주정은 간기능의 장애 유무와는 상관관계가 적다고 보고한 Chalmers 등(9)과도 일치하였다(Table 3). 주정의 과남용에 따른 항체생성, 세포성 면역반응 등과 같은 여러 가지의 면역 기능의 이상이 초래됨은 잘 알려진 사항들이며(9), 세포성 면역반응 측정법인 표준 림프구 혼합 세포배양 반응을 이용한 PHA법에서는 주정중독환자의 생체내 면역 억제 정도를 알아보기 위하여 측정해본 결과 대조군 29.9 ± 14.2 cpm, 장기환자군 20.3 ± 15.9 cpm, 그리고 신환자군은 19.4 ± 8.5 cpm으로서 대조군, 장기환자군 및 신환자군의 순으로 낮았으며, 이는 주정이 강력한 면역 억제제로써 작용하여 PHA, concanavaline-A, CD3 등에 대하여 T-림프구의 증식을 억제한다고 보고한 Kaplan 등(14)의 결과와 일치하였다. T-helper세포는 대조군에서 $41.9 \pm 9.9\%$, 신환자군 $42.3 \pm 9.9\%$, 그리고 장기환자군 $38.2 \pm 6.7\%$ 로써 알코올에 축적된 T-림프구의 PHA에 대한 mitogenesis는 대체적으로 감소하나 T-helper세포는 유의하게 증가된다고 한 Watson 등(24)의 결과와 일치하였다. 한편 T-suppressor세포는 대조군에서 35.7 ± 7.8 , 신, 장기환자군에서는 각각 $30.9 \pm 9.3\%$, $30.4 \pm 6.6\%$ 로써(Table 5), 알코올 대사의 초기 대사물인 acetaldehyde에 의하여 T-suppressor 세포의 50%가 억제된다고 보고한 Prabhala와 Watson (18)의 결과와 일치하였고, 총 T-림프구와 T-suppressor 세포의 백분율은 감소한다고 한 Watson 등(24)의 결과와 일치하였다. 주정중독환자의 phagocytic-plaque 형성력은 대조군에서 $25.1 \pm 12.9\%$, 신환자군 $17.0 \pm 7.9\%$, 장기환자군은 $20.2 \pm 9.5\%$ 로써 대조군에 비하여 신환자군은 유의하게 억제되어 있었으며, 신환자군에 비하여 장기환자군의 억제력은 다소 낮았다(Table 8). 또한 phagocytic-plaque를 형성한 백혈구 세포 중 한개의 평균 식균면적은 대조군 $21.7 \pm 13.2\%$, 신환자군 $10.7 \pm 4.9\%$, 장기환자군은 $10.9 \pm 2.8\%$ 로써 실험군인 신, 장기알코올 중독군이 대조군에 비하여 현저하게 저하되었으며, 이는 알코올의 축적으로 인하여 T-세포의 PHA에 대한 마이토제네시스는 대체로 감소한다는 Watson 등(24)의 결과와 일치하였고, 또한 T-helper세포는 대조군에서는 $41.9 \pm 9.9\%$, 신환자군 42.3

$\pm 9.9\%$, 장기환자군에서 $38.2 \pm 6.7\%$ 로써 노출된 T-helper세포는 유의하게 증가한다고 보고한 Watson 등(24)의 결과와 일치하였으며, 본 연구에서는 장기 환자군에서는 총 T-림프구가 감소하였고(Table 6), Prabhala와 Watson(18)은 T-suppressor세포는 알코올 대사의 처음 대사물인 acetaldehyde에 의하여 50% 억제된다고 하였으며, 본 실험 결과에서도 대조군에서 $35.7 \pm 7.8\%$, 신, 장기환자군에서 각각 $30.9 \pm 9.3\%$, $30.4 \pm 6.6\%$ 에서 감소하였다(Table 6). 총 T 림프구, T-suppressor세포의 백분율은 감소하여, Prabhala와 Watson (18) 및 Watson 등(24)의 결과와 일치함을 보였다. 전체 B세포의 분포는 대조군에서 $16.2 \pm 4.1\%$ 이며, 신환자군에서는 $10.4 \pm 6.0\%$ 로써 주정에 의하여 세포성 면역이 억제되어 감소되었고, 장기 환자군은 $15.6 \pm 6.1\%$ 이며 이는 주정의 노출로 인하여 감소되는 것을 간접적으로 확인한 결과 Kaplan 등(14)의 결과가 일치하였다. Phagocytic plaque 형성력 시험에서 주정중독환자의 식균작용을 Robert (19)와 Gluckman과 MacGregor 등(11)은 백혈구 식균능력을 정상이라고 보고한 결과와 상반된 결과를 얻었으며, 알코올 섭취가 면역억제 시험에 영향을 미친다고 보고한 Prabhala와 Watson (18) 및 Watson 등(24)의 보고와 본 연구의 결과와는 잘 일치하였다. 대조군이나 지금까지 보고된 다른 질병들과는 다르게 주정중독자의 백혈구는 사슬이나 Masuda 등과 같은 strange체를 형성하였으며(16,21,22), 특히 신환자군에서는 phagocytic plaque 형성시 plaque의 주변에서 안으로 백혈구들이 모여드는 형태를 볼 수 있었고, 장기환자군에서는 plaque를 형성할 때 탐식 후 백혈구가 plaque의 가장자리 부분에 모여드는 현상을 관찰 할 수 있었으며 신, 장기환자군에서 형성된 특이한 사슬 및 strange plaque는 지금까지 보고되지 않은 특이한 형태이었으나 형성된 이유에 대해서는 정확한 원인을 알 수가 없으므로 추후 이에 대한 추가 연구가 필요 할 것으로 본다. 주정중독자는 영양불량, 면역 기능저하 등이 예상된다는 많은 보고가 있었지만, Robert 등(19)의 연구에서 주정중독자 및 알코올에 노출시킨 백혈구의 탐식작용이 정상이었다고 보고된 것에 반하여 본 연구에서는 신환자, 장기환자 모두 건강한 대조군에 비하여 백혈구의 탐식력은 현저하게 저하되었다. 따라서 주정중독자의 비특이적 면역 반응인 백혈구 탐식력은 저하되었다고 볼 수 있으며 이는 다른 연구자들의 탐식작용에 관련된 혈액 중의 각 성분들을 각각 분리시켜 그들의 기능을 측정하는 과정에서 큰 변화를 보이지 않은 반면에 본 연구에서는 비특이 면역계에 관여하는 각종 성분들이 모두 포함된 자연 상태인 전혈중의 백혈구 및 육소닌같은 인자들의 협동작용에 의하여 병원성 미생물인 *Staphylococcus aureus* Cowan I 균주를 탐식하게 됨에 따른 phagocytic-plaque 형성이라고 생각된다. 한편 생체내 모든 반응은 모든 성분들이 상호관련성을 가지고 조직적으로 반응이 일어나게 되고 이러한 상태에서 측정된 결과가 생체내의 관련조건을 가장 잘 반영한다는 점에서 보면 본 연구방법이 다른 어떤 탐식력 측정 방법보다도 생체내의 상태를 그대로 잘 반영할 수 있다고 생각된다.

따라서 본 방법은 주정중독자 백혈구 탐식력을 측정할 수 있는 방법으로서 우수한 방법이라고 생각되며, 초기 면역반응

력을 측정하여 이들 환자의 건강관리를 위하여 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 권석운, 박성호, 나덕렬. 1992. 알코올 중독 환자에서의 평균 적혈구 용적에 관한 고찰. 임상병리학회지. 12(3), 299-303.
- 권정화, Michael Chang. 1988. 알코올의 이화학적소견에 대한 약물남용의 영향. 신경정신의학. 27(6), 1097-1102.
- 김경빈, 한광수, 이정국. 1991. 한국형 알코올 중독 선별검사 제작을 위한 예비연구(III). 신경정신의학. 30(3), 569-581.
- 박재갑. 1993. 소화기. 인간생명과학, 서울대학교출판사. pp. 390-461.
- 서덕규. 1982. 혈청 단백 분획상. 대학서림. pp. 50-52.
- 이한기. 1985. Ethanol이 생체 blood glucose 및 epinephrine 농도에 미치는 영향. 최신의학. 28(8), 995-1001.
- 정봉주, 박제민, 김명정. 1994. 주정 중독 환자에서 Fluoxetine이 혈중 알콜 농도와 음주효과에 미치는 영향. 신경정신의학. 33(1), 256-265.
- Athens, G. 1990. The original and leader in microtesting, HLA Technical workshop. One Lambda Inco, UCLA, pp11-14.
- Chalmers, D.M., A.J. Levi, and I. Chanarin. 1979. Mean cell volume in a working population: the effect of age, smoking, alcohol and oral contraception. Br. J. Haematol. 43(4), 631-636.
- Chick, J., N. Kreitman, and M. Plant. 1981. Mean cell volume and gamma-glutamyl-transpeptidase as markers of drinking in working men. Lancet 6, 1249-1251.
- Gluckman S.J. and R.R. MacGregor. 1978. Effect of acute alcohol intoxication on granulocyte mobilization and kinetics. Blood. 52(3), 551-559.
- Hay, F.C. 1989. Practical Immunology. Backwell Scientific Publications pp. 154-157.
- Jerrells, T.R., C.A. Marietta, M.J. Eckardt, E. Majchrowicz, and F.F. Weight. 1986. Effect of ethanol administration on parameters of immunocompetency in rats. J. Leukoc. Biol. 39(5), 499-510.
- Kaplan, D.R. 1986. A novel mechanism of immuno suppression mediated by ethanol. Cell. Immunol. 102(1), 1-9.
- Kilbridge, T.M. and P. Heller. 1969. Determinants of erythrocyte size in chronic liver disease. Blood. 34(6), 739-746.
- Masuda, S. 1990. The applicability of biological characteristics of Staphylococcus aureus organism for some experimental systems. Jikeikai med. J. 15, 385-392.
- Mendenhall, C.L., C.J. Grossman and G.A. Roselle. 1989. Phytohemagglutinin skin test responses to evaluate in vivo cellular immune function in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 190(1), 117-120.
- Parbhalla, R.H. and R.R. Watson. 1990. Effects of various alcohols applied in vitro on human lymphocyte and AIDS. New York, Alan R. Liss, Inc. pp155-163.
- Robert, G., B.R. Ayton and Petere. 1970. Effect of alcohol and various disease on leukocyte mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. Eng. J. med. 282(3), 123-129.
- Salaspuro, M. 1986. Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking. Alcohol. Clin. Exp. Res. 10(6 Suppl), 5s-12s.
- Seki, K., M. Murai and J. Sakurada. 1988. A unusual pattern in phagocytic activity of leukocyte from a patient with Behcet's disease on streptococcal monolayer. Jikeikai med.J. 135, 291-295.
- Seki, K., M. Mrai, J. Sakurada, A. Shirahige, N. Kobayashi, S.M. Hwang, and S. Masuda. 1989. A simple method for observation of phagocytosis on bacterial thin-layer. Microbiol. Immunol. 33, 81-85.
- Unger, K.W. and D. Johnson Jr. 1974. Red blood cell mean corpuscular volume: a potential indicator of alcohol usage in a working population. Am. J. Med. Sci. 267, 281-289.
- Watson, R.R., J.C. Jackson and B. Hartmann, R. Sampliner, D. Mobley, and C. Eskelson. 1985. Cellular immune functions, endorphins, and alcohol consumption in males. Alcohol. Clin. Exp. Res. 9, 248-254.

(Received: August 1, 2002/Accepted: September 2, 2002)

ABSTRACT: A Characteristics of Phagocytic Plaque on *Staphylococcus aureus* Layer Formed by Leukocytes of the Alcoholics

Hee Kyung Seong, Byoung Bae Seo¹, and Yong Ho Kim² (Department of Clinical pathology, Sanggye Paik Hospital, Inje University, Seoul 139-707, Korea. ¹Department of Clinical pathology, Busan Paik Hospital, Busan 614-735, Korea, ²Department of Medical laboratory science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

This study was conducted to develop a method for direct determination of phagocytic activities in human circulatory systems and to measure the phagocytic activities in human leukocytes from the alcoholics, since phagocytic activity was considered to be very important in human immune mechanism at early stage for the health care of the alcoholics. The subjects for this study were 130 among which 95 males and 3 females were diagnosed as alcoholism and 32 was healthy blood donors. A thin layer of heat-killed *Staphylococcus aureus* Cowan I was placed on a plastic dish and reacted with whole blood to measure the phagocytic plaque formation by human leukocytes. In order to determine the health conditions of the subjects, some clinical laboratory tests, such as white blood cell counts, hemoglobin contents (Hgb), mean corpuscular volume of red blood cells (MCV), serum electrophoresis, B and T-lymphocytes, T-lymphocyte subtypes and phytohemagglutination test were also implemented. Compared to the non-alcoholism, new and old alcoholic inpatients showed statistically significant differences on levels of Hgb and MCV ($p < 0.05$), but showed that T and B-lymphocyte numbers decreased and Helper T cell/Suppressor T cell ratio ($1.6 \pm 0.8\%$) increased. Compared to non-alcoholism, phagocytic plaque activities of leukocytes from alcoholic patients decreased significantly and an unusual pattern in phagocytic plaque was observed, showing a strange body and chain shaped phagocytosis. Based upon these results, it is concluded that a phagocytic-plaques of *Staphylococcus aureus* Cowan I by leukocytes was very simple and useful method for the early immunological determination of phagocytic activities in alcoholic patients without requiring any special equipments.