

조산아 기관지폐이형성증의 발생에서 호산구 활성화 표지자

최선희,¹ 정성훈,¹ 이경석,² 배종우,³ 나영호¹

¹경희대학교 의과대학 소아청소년과학교실, ²한양대학교 의과대학 소아청소년과학교실, ³차의과대학 소아청소년과학교실

Eosinophil activation markers in blood and urine in preterms developing bronchopulmonary dysplasia

Sun-Hee Choi,¹ Sung-Hoon Chung,¹ Kyung-Suk Lee,² Chong-Woo Bae,³ Yeong-Ho Rha¹

¹Department of Pediatrics, Kyung Hee University School of Medicine, Seoul; ²Department of Pediatrics, Hanyang University School of Medicine, Seoul;

³Department of Pediatrics, CHA University School of Medicine, Pocheon, Korea

Purpose: Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) is not the only a marker for eosinophil activation, but also acts as an alarm protein. Very few studies have examined the potential role of eosinophils in the development of bronchopulmonary dysplasia (BPD). This study aims to address the roles of eosinophil and EDN in the early phase of BPD development.

Methods: Patients were preterm neonates with respiratory distress syndrome (RDS) born at 36 weeks of gestation or less. Blood and urine samples were collected to measure total eosinophil count in the blood, serum eosinophil cationic protein (ECP), serum EDN, and urinary EDN during the first week of life.

Results: Fifty-two preterms were recruited, of whom 43 infants were analyzed. Comparisons were made between the RDS (n = 16) and non-RDS groups (n = 27) and between the BPD (n = 6) and non-BPD groups (n = 26). There were no differences between RDS and non-RDS group in total eosinophil count, serum ECP, serum EDN, or urinary EDN, except when compared by gestational age, birth weight and prenatal dexamethasone use. Urinary EDN was increased significantly in the BPD group compared to the non-BPD group.

Conclusion: We demonstrated the roles of eosinophil and EDN in the development of BPD and suggest that urinary EDN may be utilized as a noninvasive factor predicting the development of BPD. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2022;10:40-44)

Keywords: Eosinophil-derived neurotoxin, Eosinophils, Bronchopulmonary dysplasia, Preterm

서 론

기관지폐이형성증(bronchopulmonary dysplasia, BPD)은 호흡 곤란증후군(respiratory distress syndrome, RDS)과 관련된 주산기 요인으로 인한 폐 발달장애 및 염증의 결과로 발생한다. RDS의 발병 기전은 계면활성제 결핍 외에 기도와 폐간질의 손상성 염증반응이 특징이다. 현재까지의 임상 연구는 산전 코르티코스테로이드의 사용이 BPD 위험이 있는 조산아의 임상 경과를 개선하였고 BPD가 있는 영유아의 기관(trachea) 검체 연구 결과는 산후 스테로이드

치료가 조산아의 폐, 특히 가스교환 기구의 발달을 확연하게 개선하고 염증세포 및 그 생산물을 감소시킬 수 있음을 보여주었다.^{1,3}

제대혈은 성인 말초혈액에 비해 호산구의 비중이 높고 조산아에서는 자주 호산구증가증을 보이는데,⁴⁻⁶ 이는 호산구 조절은 분만 중 상태보다 조산 및 그에 따른 출생 후 사건에 더 많은 영향을 받을 수 있음을 시사한다.⁶ 또한 호산구의 출생 초기의 선천면역 방어 및 염증과정과의 관련성을 제시하는 최근의 연구 결과도 이를 뒷받침하고 있다.⁷

BPD 병인은 호중구와 대식세포에 대하여 주로 연구되고 있으나

Correspondence to: Yeong-Ho Rha  <https://orcid.org/0000-0001-5593-5020>

Department of Pediatrics, Kyung Hee University School of Medicine, 23 Kyungheedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Korea

Tel: +82-2-958-8306, Fax: +82-2-958-8306, Email: yhrha@khu.ac.kr

• This work was supported by a grant from Kyung Hee University in 2008 (KHU-1564).

Received: December 28, 2021 Revised: January 18, 2022 Accepted: January 18, 2022

© 2022 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

호산구의 잠재적인 역할의 가능성에 대한 연구 결과들도 있다. 이들 연구는 RDS가 있는 영아를 정상 만삭아와 비교한 연구들로 기관 흡인물과 혈청에서 호산구 양이온 단백질(eosinophilic cationic protein, ECP) 농도의 증가를 보여주었고, BPD 발생의 초기 단계에서 말초혈액의 호산구의 증가를 보여주었다.⁸⁻¹⁰

호산구유래신경독소(eosinophil-derived neurotoxin, EDN)는 항균성 단백질이며 강력한 염증 유발인자로서¹¹ 호산구 활성화 및 호산구 관여 염증의 간접 지표 역할을 하는 호산구과립단백 중 하나로 소변의 EDN을 측정하는 것은 폐의 호산구 염증을 알아낼 수 있는 비침습적 도구이다.^{12,13}

호산구가 BPD의 초기 단계에서 관여하는 중요 염증세포라면 이를 조절하는 것은 예방적 가치가 있으며 호산구의 관여도를 측정하는 비침습적 표지자가 필요하다. 이 연구는 호산구가 BPD 발생의 초기 단계에서 관여하고 소변 내 EDN이 말초혈액 호산구 증가와 혈액 내 호산구과립단백처럼 BPD 발생의 초기 표지자가 될 수 있다고 가정하였다.

대상 및 방법

1. 대상 모집과 분류

2009년 3월부터 2010년 2월 사이에 강동 경희대학교 병원에서 출생한 임신 36주 이하의 조산아를 연구 대상으로 하였으며 전형적으로 모집하였다. 연구 대상은 출생 시 모집되어 병원에서 퇴원할 때까지 추적 관찰하였다. 선천기형, 분만 중 감염, 조기 발병 패혈증 또는 신생아 또는 주산기 폐렴과 같은 심각한 질병을 가진 신생아는 모집 대상에서 제외하거나 추적 관찰 기간 중에도 제외하였다.

환자가 호흡곤란을 보이고 계면활성제 보충 치료를 받은 경우 RDS가 있는 것으로 정의하였다(RDS군). 일시적인 빈호흡, 무호흡 또는 태변 착색 염색의 의심과 같은 호흡기 문제가 경미하거나 전혀 없는 조산아를 비교를 위해 대조군(non-RDS군)으로 하였다. 생후 28일째에도 산소 보충이 필요한 경우와 퇴원 당시 흉부 X-선 사진에서 특징적인 폐 이상 소견을 보인 경우에 BPD로 진단하였다.^{2,3} BPD가 발생하지 않은 non-RDS 미숙아를 non-BPD군으로 분류하였다.

모든 연구 대상에서 혈액 및 소변 검체를 수집하였고, 신생아 소변의 크레아티닌 수치는 산모의 농도를 반영하므로 출생 후 5일에서 7일 사이에 말초혈액 총호산구수(total eosinophil count, TEC), 혈청 ECP, 혈청 EDN 및 요 EDN을 측정했다.¹⁴ 혈액 검체는 일상적인 정맥 채혈 시간에 수집되었다.

2. 혈청 EDN 및 ECP 분석

정맥혈을 실온에서 1시간 동안 응고시킨 후 원심분리(1,000 g,

10분) 후 혈청을 -70°C에서 보관하였다. 혈액 ECP와 EDN은 각각 ECP 형광면역분석법(fluorescence immunoassay) (Pharmacia ECP UniCAP System FEIA; Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden) 과 ELISA 방법(Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden)을 사용하여 측정하였다.¹⁵

3. 요 EDN 분석

일교차의 영향을 피하기 위해 오전 9시에서 11시 사이에 점뇨(spot urine) 검체를 수집하였다. 소변 검체는 1,000 g에서 10분 동안 원심분리 후 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 요 EDN은 ELISA 방법을 사용하여 측정하였다.¹⁵

4. 통계 분석

RDS군과 non-RDS군 사이, 그리고 BPD군과 non-BPD군 사이의 혈액 TEC, 혈청 ECP, 혈청 EDN 및 요 EDN 농도를 비교하기 위해 Mann-Whitney *U*-test of variance와 Kruskal-Wallis test를 사용하였다. 성별, 텍사메타손 사용 등 명목 변수를 비교분석하기 위하여 Fisher exact test를 사용하였다. TEC, 혈청 ECP, EDN과 및 요 EDN 간의 상관 관계를 분석하기 위해 Spearman의 순위 상관 계수가 사용되었다. 통계 분석은 MedCalc ver. 20.023 (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium)를 사용하였다. *P* 값이 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

이 연구는 강동경희대학교 병원의 기관심사위원회의 승인을 받았다(KHNMC IRB No 2008-062).

결 과

52명의 신생아가 연구 대상으로 모집되었다. 이들 중 6명의 환자는 생후 첫 주 동안 심각한 질병(파종성 혈관 내 응고, 패혈증, 폐렴, 흡인)으로 연구에서 제외하였다. 부적절한 샘플 수집으로 3명의 환자가 추가 제외되어 최종적으로 43명의 환자가 이 연구에 포함되었다.

연구 대상 43명 중 16명은 보조 환기 및 계면활성제 요법이 필요했다. 전체 환자들 중 6명 환자에서 BPD가 발병했으며(BPD군) 5명은 RDS군에서 발생하였고, 1명은 텍사메타손이 산전에 투여된 non-RDS군으로 29주 조산이었다(Fig. 1). 전체 RDS군과 non-RDS군을 비교할 때 두 군 간에 출생 체중, 재태 연령과 산전 텍사메타손 사용에서 유의한 차이가 있었다(Table 1). RDS군과 non-RDS군의 호산구 지표를 분석하였다. 혈액 내 ECP와 EDN은 두 군 간의 유의한 차이는 없었다. TEC는 각각 310.0 (58.6-1,640.2), 240.7 (110.4-525.0)로 통계적으로 유의하지 않았고 요 EDN도 차이가 없었다(Table 1). 요 EDN 전체 환자들과 각 군별 환자들에서 말초혈액 TEC, 혈청 ECP, 혈청 EDN 및 요 EDN 사이의 상관관계를 분석하였으나

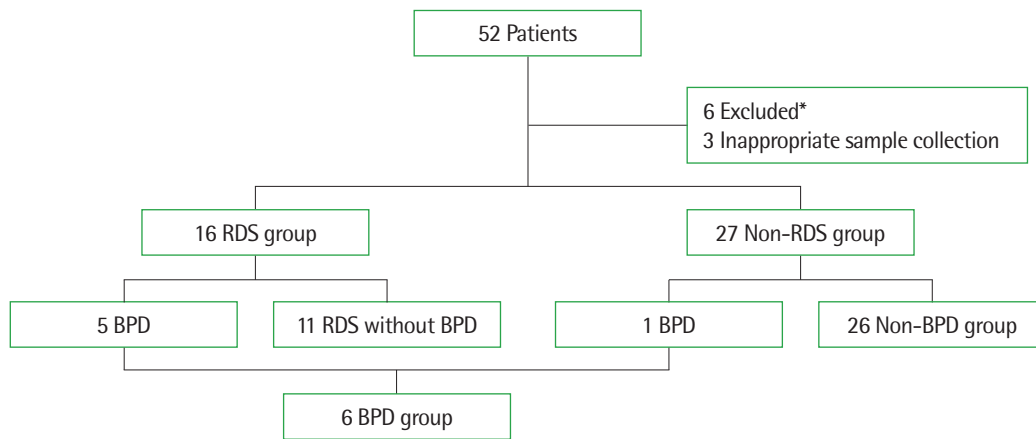


Fig. 1. The flowchart of patients included in this study. We excluded *patients who experienced serious illness (n=6; disseminated intravascular coagulation, sepsis, pneumonia, meconium aspiration) and those affected by inappropriate collection of samples (n=3) during the first week of life. RDS, respiratory distress syndrome; BPD, bronchopulmonary dysplasia.

Table 1. Clinical characteristics of the preterm infant in the study; comparison between neonates with RDS and non-RDS

Characteristic	RDS group (n=16)	Non-RDS group (n=27)	P-value
Birth weight (g)	1,576.6 ± 433.5	2,099.3 ± 409.0	0.001
Sex, male:female	10:6	16:11	0.547
Gestational age (wk)	30.5 ± 2.2	34.0 ± 1.9	0.001
Prenatal dexamethsone use	9 (56.2%)	5 (18.5%)	0.018
Serum ECP (µg/L)	5.8 (2.4–13.2)	8.2 (2.3–29.2)	0.457
Serum EDN (µg/L)	14.5 (5.0–42.5)	12.2 (5.2–28.6)	0.716
Urinary EDN (µg/mmol creatinine)	8.6 (4.0–18.2)	7.4 (3.5–15.7)	0.501
Blood TEC (/µL)	310.0 (58.6–1,640.2)	240.7 (110.4–525.0)	0.074

Values are presented as mean ± standard deviation (SD), number (%), or geographic mean (± 2 SD range). RDS, respiratory distress syndrome; ECP, eosinophil cationic protein; EDN, Eosinophil-derived neurotoxin; TEC, total eosinophil count.

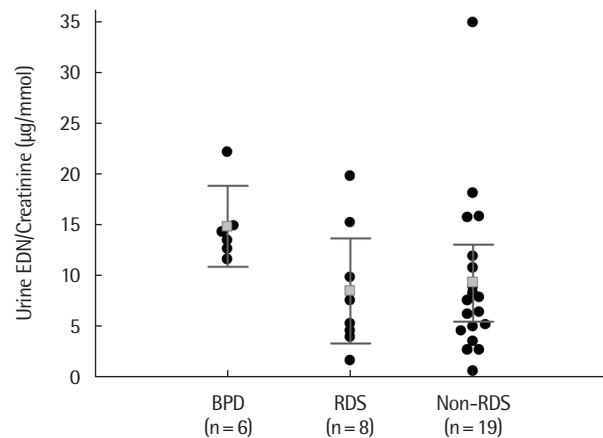


Fig. 2. Comparison of urinary EDN in preterm babies with BPD, with non-BPD RDS, and without RDS. EDN, eosinophil-derived neurotoxin; BPD, bronchopulmonary dysplasia; RDS, respiratory distress syndrome.

Table 2. The comparison of clinical characteristics and eosinophil activation markers in the BPD, RDS without BPD, non-BPD groups

Characteristic	BPD group (n=6)	RDS without BPD (n=11)	Non-BPD group (n=26)	P-value
Birth weight (g)	1,196.7 ± 230.0	1,747.8 ± 390.3	2,134.6 ± 372.7	0.001*
Sex, male:female	6:0	5:6	15:11	0.008*
Gestational age (wk)	31.1 ± 3.0	34.6 ± 2.3	36.9 ± 1.9	0.001*
Serum ECP (µg/L)	7.2 (3.3–15.8)	4.9 (2.3–10.4)	7.0 (3.7–13.3)	0.672
Serum EDN (µg/L)	13.9 (5.8–33.4)	14.3 (6.5–31.7)	12.3 (8.6–17.4)	0.837
Urinary EDN (µg/mmol creatinine)	14.9 (11.4–18.4)	6.6 (3.4–12.8)	6.8 (4.5–10.4)	0.072
Blood TEC (/µL)	575.6 (246.7–1,343.5)	458.8 (364.2–578.0)	194.8 (71.3–528.7)	0.409

Values are presented as mean ± standard deviation (SD) or geographic mean (± 2 SD range). BPD, bronchopulmonary dysplasia; RDS, respiratory distress syndrome; ECP, eosinophil cationic protein; EDN, Eosinophil-derived neurotoxin; TEC, total eosinophil count. *P<0.05, significant from RDS and non-BPD group.

통계적 유의성은 없었다.

BPD군, BPD가 발생하지 않은 RDS군과 non-BPD군의 세 군을

비교하였다. BPD군은 모두 남아였고 재태 연령과 출생 체중이 유의하게 낮았다. 호산구 활성화 표지자를 비교하였을 때 TEC, 혈청

ECP, 혈청 EDN은 유의한 차이가 없었다. 요 EDN은 BPD군에서 수치가 높았으나 통계적 의미는 없었다(Table 2, Fig. 2).

고 찰

이 연구에서는 조산아의 출생 초기 요 EDN이 BPD환자에서 비 BPD환자에서 비하여 유의한 차이가 없었다. 또한 혈액에서 측정된 TEC, ECP, EDN에서 유의한 차이를 발견할 수 없었으나 저자들의 연구는 다양한 폐 조건을 각 조산아들의 요 EDN 차이를 알아본 첫 번째 연구이다.

호산구증가증은 입원한 미숙아에서 흔하게 신생아시기에 발견된다.⁴ TEC의 증가는 다양한 양상은 조산아의 연령과 밀접한 관련성이 있다. TEC는 분만 중의 조건들보다는 이후에 그에 따른 출생 인자들에 더 영향을 받는 것으로 여겨진다.^{6,16} 많은 수의 조산아에서 출생 후 호산구증가증이 발생하지만 이러한 환자에서 호산구증가증의 역할과 중요성은 불분명하다. 호산구는 신생아 초기에는 생후 후기의 역할과는 다른 특별한 역할을 할 가능성이 있다. 연구에 따르면 제대혈은 성인의 말초혈액에 비해 더 성숙한 호산구를 함유하고 있으며 신생아는 출생 후 첫 몇 주 동안 호산구증가증을 나타내는 경향이 있다. 생후 초기 호산구는 전통적으로 관련된 박테리아 연관 펩티드에 대한 수용체 생성 및 이동과는 다른 기능을 다른 기능을 가질 것으로 추정하고 있다.^{5,7}

이 연구에서 TEC와 ECP, EDN는 RDS군에서 non-BPD군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이전의 다른 연구에서는 호산구 활성화의 수치는 산소요법 기간 및 호산구 증가와 양의 상관관계가 있고 상승된 혈청 또는 기관 ECP가 미숙아의 만성폐질환과 관련이 있다고 보고하였다.¹⁰ 또 다른 연구들은 호산구 증가와 호산구의 활성화가 RDS 발생 후 4주 이상 지속될 수 있다고 보고하였다.^{6,8,16} Yamamoto 등⁹은 생후 1주에서 4주 사이에 말초혈액 TEC와 기관 ECP가 BPD 환자에서 non-BPD 환자보다 더 높다고 보고했다. 또한 Raghavender와 Smith도⁸ 생후 첫 주 동안 BPD 조산아의 기관 흡인물의 ECP가 non-BPD 조산아 또는 만삭아 대조군보다 높게 나타났으며 생후 4주까지 계속 증가한다고 보고하였다. 다른 연구에서도 생후 4일에서 7일 사이에 측정된 호산구 증가는 BPD를 예측하는 데 있어서 좀 더 유의한 가치가 있었다.¹⁷

호흡기계의 염증반응은 BPD 발병의 핵심 요소이며 영아가 성장하는 몇 개월 동안 계속될 수 있다. 현재 BPD에 대한 표준 치료법은 없다. 코르티코스테로이드는 BPD의 염증 및 증상을 감소 또는 억제하는 것으로 가끔 보고되었으나 코르티코스테로이드에 대한 세포 기반 작용기전에 대한 확립된 근거는 없다.³ Brostrom 등¹⁰은 BPD군에서 TEC 및 호산구 활성화 표지자의 역가가 증가하였다가 스테로이드 치료 후에 감소하였다고 보고하였다. 다른 연구에서는 RDS 환자에서 서로 다른 전신 염증성 사이토카인이 증가했음에

도 불구하고, BPD가 발생하거나 BPD 관련 문제로 사망한 신생아에서 생후 첫날 혈청 eotaxin 및 TEC가 non-BPD 환자보다 유의하게 더 높았다고 하였으며 BPD 군에서 생후 첫 주 동안 TEC가 유의하게 더 높았다고 하였다.¹⁸ 우리 연구에서는 BPD군, BPD가 발생하지 않은 RDS군, non-BPD군 간에 TEC의 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

EDN은 'alamin'으로도 불리며 조직 손상 및 감염에 대한 선천 및 후천 면역반응을 증가시킨다.^{11,19} 정맥 검체가 처리되는 동안 혈청 ECP나 EDN은 말초혈액의 호산구에서 방출될 수 있는 것과는 대조적으로, 요 EDN은 상대적으로 낮은 양이온성으로 조직에 대한 결합이 낮아 손상된 조직에 배출되는 적절한 호산구성 표지자가 될 수 있다. 저자들은 RDS 및 BPD의 발병에서 폐 조직이 손상되면 신생아 폐의 호산구가 활성화되고 EDN이 방출되어 TEC나 ECP보다 폐염증을 반영하는 예민한 지표가 될 것이라고 가정하였으나 BPD의 초기 단계에서 호산구성 염증에 대한 유용한 지표가 될 수 있는 결과를 보여주지 못하였다. 이러한 결과는 분만 후 지속되는 만성폐질환에서 진행 중인 호산구성 염증의 상대적 기여도가 적을 수도 있을 것이다. 그러나 저자들의 연구에서 BPD군은 모두 산전에 덱사메타존을 사용하여 그 영향도 배제할 수 없다.

이 연구에는 몇 가지 제한점이 있다. 첫째, 생후 첫 주에만 호산구성 표지자를 측정하고 후속 측정을 시행하지 않아 호산구가 이후에 미치는 영향을 알 수 없었다. 둘째, 연구 대상자 수가 매우 적었다. 그리고 마지막으로 기관 흡인 샘플을 수집하지 않았다. 그러나 이 연구는 호산구증가증 및 호산구 활성화에 영향을 미치는 것으로 알려진 요인인 주산기 감염, 혈액 체제 수혈, 비경구 영양 및 패혈증과 관련된 환자들은 모집 대상에서 제외하여 이들의 영향을 최소화하였다는 장점이 있다. 또한 출생 후 소변의 크레아티닌은 산모의 크레아티닌 존재, 조기 패혈증 및 심장 문제를 포함한 여러 조건의 영향을 받을 수 있어 진단 정확도가 떨어질 수 있기 때문에 이 연구에서 요 EDN 검체 수집은 출생 후 5-7일에 시행되었기 때문에 소변 EDN 농도를 포함한 측정치의 정확도가 높다는 것도 장점이 될 수 있다.

이 연구 결과는 호산구 활성화와 관련된 다양한 혈액 지표들과 요 EDN의 BPD발생의 연관성은 밝히지 못하였다. 이러한 연관성의 규명을 위하여 대규모 환자 수와 호산구성 표지자의 연속 측정을 포함하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, Gaultier C, Geggel R, Greenough A, et al. Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:356-96.
- Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med* 2007;357:1946-55.

3. Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Abman S, et al. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 2006;117(3 Pt 2):S52-6.
4. Ehara A, Takeda Y, Kida T, Mizukami S, Hagsawa M, Yamada Y. Time-course changes of eosinophil counts in premature infants: no effects of medical manipulation, except erythropoietin treatment, on eosinophilia. *Pediatr Int* 2000;42:58-60.
5. Smith JB, Tabsh KM. Fetal neutrophils and eosinophils express normal levels of L-selectin. *Pediatr Res* 1993;34:253-7.
6. Juul SE, Haynes JW, McPherson RJ. Evaluation of eosinophilia in hospitalized preterm infants. *J Perinatol* 2005;25:182-8.
7. Moshfegh A, Lothian C, Hallden G, Marchini G, Lagercrantz H, Lundahl J. Neonatal eosinophils possess efficient Eotaxin/IL-5- and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced transmigration in vitro. *Pediatr Res* 2005;58:138-42.
8. Raghavender B, Smith JB. Eosinophil cationic protein in tracheal aspirates of preterm infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1997;130:944-7.
9. Yamamoto C, Kojima T, Hattori K, Nogi S, Imamura H, Tsubura A, et al. Eosinophilia in premature infants: correlation with chronic lung disease. *Acta Paediatr* 1996;85:1232-5.
10. Brostrom EB, Katz-Salamon M, Lundahl J, Hallden G, Winbladh B. Eosinophil activation in preterm infants with lung disease. *Acta Paediatr* 2007;96:23-8.
11. Rosenberg HF. Eosinophil-derived neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:135-40.
12. Wennergren G. Inflammatory mediators in blood and urine. *Paediatr Respir Rev* 2000;1:259-65.
13. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004;59:26-32.
14. Iacobelli S, Bonsante F, Ferdinus C, Labenne M, Gouyon JB. Factors affecting postnatal changes in serum creatinine in preterm infants with gestational age <32 weeks. *J Perinatol* 2009;29:232-6.
15. Koller DY. Sampling methods: urine/blood analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(2 Pt 2):S31-3.
16. Yen JM, Lin CH, Yang MM, Hou ST, Lin AH, Lin YJ. Eosinophilia in very low birth weight infants. *Pediatr Neonatol* 2010;51:116-23.
17. Yang JY, Cha J, Shim SY, Cho SJ, Park EA. The relationship between eosinophilia and bronchopulmonary dysplasia in premature infants at less than 34 weeks' gestation. *Korean J Pediatr* 2014;57:171-7.
18. Kandasamy J, Roane C, Szalai A, Ambalavanan N. Serum eotaxin-1 is increased in extremely-low-birth-weight infants with bronchopulmonary dysplasia or death. *Pediatr Res* 2015;78:498-504.
19. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 2008;205:79-90.