

내독소에 의한 돼지의 급성 폐손상에서 Cyclooxygenase 대사물의 역할에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

유철규 · 정기호 · 최형석 · 이혁표 · 김영환
한성구 · 심영수 · 김건열 · 한용철

= Abstract =

The Role of Cyclooxygenase Metabolites in the Pathogenetic Mechanism of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Domestic Pigs

Chul-Gyu Yoo, M.D., Ki Ho Jeong, M.D., Hyung Seok Choi, M.D., Hyuk Pyo Lee, M.D.
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.
Keun-Youl Kim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

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

Background: It has been suggested that the cyclooxygenase metabolites play an important role in changes of early hemodynamic parameters in the endotoxin-induced acute lung injury. But there have been many debates about their role in the late increase of alveolar-capillary permeability, and it is not known whether they act directly or indirectly through oxygen free radicals which have been known to be produced during the metabolic processes of cyclooxygenase pathway. So we performed this study to identify the pathogenetic role of cyclooxygenase metabolites in the endotoxin-induced acute lung injury in domestic pigs.

Method: We infused endotoxin into 8 domestic pigs; endotoxin only (n=3), and pretreatment with indomethacin (n=5). We observed the sequential changes in hemodynamic parameters, the concentration of plasma oxidized glutathione (GSSG) in pulmonary arterial and venous blood, and albumin content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Results:

1) While cardiac output decreased, mean pulmonary arterial pressure, pulmonary vascular resistance, and alveolar-arterial oxygen difference increased over phase 1 (0-2hr) and phase 2 (2-4.5hr) by endotoxin, indomethacin attenuated the decrease in cardiac output during phase 1 and increase in mean pulmonary arterial pressure, pulmonary vascular resistance, and alveolar-arterial oxygen difference during both phases.

2) The increase in plasma GSSG content during phase 2 was not attenuated by indomethacin.

3) The content of BALF albumin was significantly lower in indomethacin groups than that of endotoxin group.

Conclusion: These results suggest that it is likely that cyclooxygenase metabolites have an effect on endotoxin-induced acute lung injury during both phases probably through direct action.

Key Words: Endotoxin, Cyclooxygenase metabolites, Acute lung injury, Pigs

성인호흡곤란증후군은 심장질환이 아닌 다양한 원인에 의해 발생하는 급성 폐부종의 일종으로 처음 보고된 지 20여년이 지난 지금도 50%이상의 높은 사망율을 보이고 있다^{1,2)}. 특이적 치료법의 개발에 앞서 급성 폐손상의 기전이 규명되어야 하는데 아직도 확실하게 밝혀져 있지 못한 실정이다. 내독소를 양 또는 돼지에게 투여하면 성인호흡곤란증후군과 비슷한 병태생리학적 변화가 관찰되어 급성 폐손상의 기전에 관한 연구에는 내독소 투여를 이용한 동물모델이 많이 사용되고 있다. 이때 폐혈관의 반응양상에 따라 두 phase로 나눌 수 있다. 즉 심한 폐동맥압의 상승이 주로 관찰되는 초기(phase 1: 0-2 hr)와 폐포-모세혈관 투과성의 증가가 주로 관찰되는 후기(phase 2: 2-4.5 hr)로 나눌 수 있다^{3,4)}. 현재 급성 폐손상의 기전에는 여러 염증세포에서 분비되는 염증매개성 물질이 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 대표적으로 많이 알려져 있는 염증세포로는 호중구를 들 수 있는데⁵⁻¹⁰⁾ 호중구로부터 분비되는 단백 분해효소(proteases), arachidonate 대사물, 산소의 독성 환원 물질(toxic reduced species of oxygen)인 산소기(reactive oxygen free radical) 등이 중요한 염증매개성 물질로 알려져 있다. 내독소 투여시 혈장과 폐의 림프관에 cyclooxygenase 대사물과 lipoxigenase 대사물이 모두 증가하고^{11,12)}, cyclooxygenase 차단제로 초기의 혈력학적 변화가 완화되어 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전에서 cyclooxygenase 대사물의 역할이 중요시 되고 있다¹²⁻¹⁵⁾. 그러나 cyclooxygenase 억제약물이 내독소 투여시 후기에 관찰되는 폐혈관 투과성 증가에 미치는 효과에 대해서는 논란이 있는 실정이고^{13,16,17)} cyclooxygenase 대사과정에서 관여하는 peroxidase에 의해서 산소기가 생성된다고 알려져 있어^{18,19)} cyclooxygenase 대사물이 직접 폐손상을 일으키는 지 또는 대사과정에서 생성되는 산소기를 통해 간접적으로 관여하는 지는 확실히 규명되어 있지 않은 상태이다.

이에 저자들은 내독소에 의한 급성 폐손상에서 cyclooxygenase 대사물의 역할을 알아보고 성인호흡곤란증후군의 치료에 있어서 cyclooxygenase 차단제의 이용가능성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

1. 실험 동물

실험동물은 성에 관계없이 10-14주된 체중 20 kg 내외의 집돼지를 서울대학교 병원 동물실험실에서 구입했고, 먹이와 물은 자유로이 먹을 수 있도록 공급하였다. 외견상 이상이 없었으며 실험직전에 동맥혈가스분석을 시행해 동맥혈산소분압이 80 mmHg 이상이고 동맥혈이산화탄소분압이 45 mmHg 이하인 동물만을 실험에 사용하였다.

2. 실험군

모두 8마리의 집돼지를 무작위로 2개의 실험군중 한군에 배정하였다. 제 1군(내독소 투여군; 3마리)은 *Escherichia coli* 055-B5(Sigma Chemical) 내독소 5 µg/Kg를 1시간동안 정맥내로 점적하고 그 후 3.5시간동안은 2 µg/Kg/hour의 속도로 투여하였다. 제 2군(indomethacin 전처치군; 5마리)은 sodium carbonate에 녹인 indomethacin 5 mg/Kg를 내독소 투여 30분전에 정맥내에 투여하고 이후 3 mg/Kg/hour의 속도로 실험종료시까지 점적하였고 내독소는 제 1군에서와 같이 투여하였다.

3. 실험동물의 준비

Kg당 15 mg의 ketamine을 근육주사해 잠재운 후 25 mg/Kg의 pentobarbital sodium으로 마취를 유도하고 실험기간동안 5 mg/Kg/hour의 속도로 점적하여 마취상태를 유지시켰다. 기관절개술로 기관내에 튜브를 삽관한 후 Bear II 인공호흡기를 이용해 실내공기로 기계호흡을 시켰다. 이때 호흡수는 분당 14~18회, 호흡량(tidal volume)은 15 ml/Kg로 조정하였다. Atropine 0.5 mg을 주사해 기도내의 분비물생성을 억제하였으며 필요에 따라 간헐적으로 흡입 카테타로 분비물을 제거하였다. 또한 pancuronium bromide 2 mg을 정맥주사하여 자기호흡을 억제시켰고, 이 후 자기호흡이 관찰될때마다 1 mg을 간헐적으로 주사하였다. 양쪽 외경정맥(external jugular vein)을 박리해 왼쪽에는 polyethylene 관을 삽입하여 약제투여의 경로로 사용하였고, 반대쪽에는 5-F triple-lumen Swan-Ganz 카테타(Edward Laboratories, USA)를 삽입해 카테타의 끝이 폐동

맥에 위치하여 풍선을 팽창시키면 폐모세혈관쇄기압 (pulmonary capillary wedge pressure)이 기록되고 풍선의 공기를 제거하면 폐동맥압이 측정되도록 조절하였다. 좌측 총 경동맥(common carotid artery)에도 polyethylene 관을 삽입하였는데 이것과 Swan-Ganz 카테타는 각각 압력변환기 (pressure transducer)에 연결하여 전신동맥압과 폐동맥압 및 폐모세혈관쇄기압을 측정하는데 사용하였다. 간헐적으로 heparin이 섞인 생리 식염수를 주입하여 혈액응고로 카테타가 막히지 않도록 하였다. 두 압력변환기는 모두 좌심방 높이에서의 압력이 0이 되도록 조절하였다. 위의 준비과정이 완료되고 1 시간동안 실험동물을 안정시킨 후 실험을 진행했는데 실험기간동안 5% 포도당이 생리 식염수를 7.5 ml/min의 속도로 점적하였다.

4. 혈력학적 지표의 측정

내독소 투여한 때를 0시간으로 하여 평균 전신동맥압, 평균 폐동맥압, 평균 폐모세혈관쇄기압과 심박출량을 30분 간격으로 측정하였다. 압력의 측정은 압력변환기에 Swan-Ganz 카테타와 polyethylene 관을 연결하고 multichannel oscillographic recorder (Electronics for Medicine Inc., USA)를 이용해 측정하였다. 심박출량은 cardiac output computer (Edward Laboratories, USA)로 열희석법 (thermodilution method)으로 매 30분마다 측정하였는데 5번을 측정해 최고치와 최저치를 제외한 나머지 세 측정치의 평균을 사용해 측정에 따른 오차를 줄였다. 체중에 따른 심박출량의 오차를 줄이기 위해 심박출량을 체중으로 나눈 것을 심계수로 정의하였다. 이상의 측정치들로부터 다음 공식에 의해 폐혈관저항을 구했다.

Pulmonary vascular resistance (PVR)

$$= (P_{pa} - P_{paw}) / CO$$

P_{pa} ; mean pulmonary arterial pressure

P_{paw} ; mean pulmonary capillary wedge pressure

CO; cardiac output

5. 동맥혈가스분석과 일반혈액검사

30분 간격으로 동맥혈을 채취해 AVL 995 Automatic Blood Gas System (AVL Biomedical Inc., USA)을 이용해 pH, 이산화탄소분압, 산소분압을 측정하였다. 이로부터 폐포동맥간산소분압차를 다음 공식에

의해 구했다.

$$AaDO_2 = (760 - VP) \times FiO_2 - PaCO_2 / 0.8 - PaO_2$$

AaDO₂; alveolar arterial oxygen difference
VP; vapor pressure (about 47)

FiO₂; oxygen concentration of inspired air (0.21)

또한 매 30분 간격으로 EDTA가 들어있는 용기에 혈액을 채취하여 Sysmex CC-780 (TOA사, 일본)으로 적혈구용적, 혈소판, 총백혈구를 측정하였다.

6. Glutathione의 측정

1시간 간격으로 전신동맥혈과 폐동맥혈을 채취해 각각 혈장내의 전체 glutathione (GSH/GSSG) 농도와 산화 glutathione (GSSG)의 농도를 Sies 등²⁰⁾의 방법으로 측정하였다. 자발적인 산화반응에 의해 환원 glutathione (GSH)이 GSSG로 자동산화되는 것을 막기 위해 가능한 한 혈액을 채취한 즉시 glutathione의 농도를 측정하였다.

1) GSH/GSSG의 측정

채취한 혈액 3 ml에 HClO₄와 EDTA를 섞어 각각의 농도가 2 M과 4 mM이 되도록 만든 용액 3 ml를 섞어 혈액내의 단백질성분을 응고시켰다. 5000 g의 속도로 5분간 4°C에서 원심분리하여 밑에 가라앉은 단백질성분을 제거하고 상청액 1 ml을 2 M KOH와 0.3 N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) 용액으로 pH 7.4로 중화시켰다. pH를 7.0으로 맞추는 0.1 M의 potassium phosphate 완충용액에 EDTA를 첨가해 최종농도가 1 mM이 되도록 조절한 용액 1 ml, 검체 100 μl, 0.5% sodium bicarbonate에 녹여 최종농도를 4 mg/ml로 맞추는 NADPH 50 μl, 0.5% sodium bicarbonate에 용해시킨 1.5 mg/ml의 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 20 μl와 0.1 M potassium phosphate 완충용액으로 6 unit/ml로 희석시킨 glutathione reductase 20 μl를 25°C에서 혼합해 분광비색계 (spectrophotometer)로 412 nm에서 1분 간격으로 15분간 흡광도의 변화를 기록하였다. 이때 검체대신 3차 증류수 100 μl를 넣은 용액을 blank로 사용하였다. 15분간의 흡광도 변화곡선의 기울기를 이용해 표준농도곡선 (standard curve)에서 농도를 구했다.

2) GSSG의 측정

혈액 3 ml와 동량의 2 M HClO₄와 4 mM EDTA를 섞어 5000 g의 속도로 5분간 4°C에서 원심분리한 후 밑

에 가라앉은 단백질을 제거했다. 상청액 1 ml에 N-ethylmaleimide(NEM)의 최종농도가 50 mM이 되도록 NEM을 첨가해 GSH와 NEM을 결합시켜 GSH의 자동산화반응을 억제시켰다. 2 M KOH와 0.3 M MOPS 용액으로 pH를 6.2로 조정후 GSSG의 측정에 영향을 미칠 수 있는 GSH와 결합하고 남은 NEM을 QAE-25 sephadex가 담긴 유리관을 통과시켜 제거하였다. QAE-25 sephadex 유리관은 pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액으로 부풀린 후 유리섬유(glass wool)를 다져 넣은 Pasteur pipet에 gel 1 ml를 부어서 만들었다. pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액 10 ml로 유리관을 씻어내고 NEM이 첨가된 검체 2 ml를 유리관의 위쪽에 조심스럽게 주입한 후 다시 pH 6.2의 0.01 M potassium phosphate 완충용액을 유리관에 부어 GSH와 결합하지 않은 NEM을 씻어내었다. 유리관으로부터 용액이 나오지 않는 것을 확인하고 pH 6.2의 0.25 M potassium phosphate 완충용액 4 ml를 부어 GSSG를 얻었다. column에서 받은 용액을 2 M KOH와 0.3 M MOPS로 pH를 7.2로 조정하였다. pH를 7.0으로 맞춘 0.1 M의 potassium phosphate 완충용액에 EDTA를 첨가해 최종농도가 1 mM이 되도록 조절된 용액 1 ml, 검체 100 μ l, 0.5% sodium bicarbonate에 녹여 최종농도를 4 mg/ml로 맞춘 NADPH 50 μ l, 0.5% sodium bicarbonate에 용해시킨 1.5 mg/ml의 DTNB 20 μ l와 0.1 M potassium phosphate 완충용액으로 6 unit/ml로 희석시킨 glutathione reductase 20 μ l를 25°C에서 혼합한 후 분광비색계로 412 nm에서 흡광도의 변화를 1분간격으로 15분간 측정하였다. GSH/GSSG의 측정에서와 같이 기울기로부터 농도를 구했다.

7. 기관지폐포세척액과 혈청 알부민농도의 측정

내독소를 투여하고 4.5시간이 경과한 후 실험동물을 pentobarbital sodium으로 희생시켰다. 흉골을 절개해 양측 흉벽을 제거한 후 심장과 폐를 체외로 적출하였다. 16-F Foley 카테타를 폐의 하엽에 삽입하고 양측에서 생리식염수 20 ml로 기관지폐포세척술을 시행하였다. 기관지폐포세척액을 2000 g의 속도로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 알부민 측정 kit(Sigma Chemical, USA)을 이용해 bromocresol green으로 착색시켜 분광비색계로 628 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 공식으

로 혈청과 기관지폐포세척액의 알부민 농도를 구했다.

$$\text{BALF albumin} = (A_{\text{sample}}/A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard}}$$

BALF albumin: albumin content in BAL fluid

A_{sample} : absorbance of sample

A_{standard} : absorbance of standard albumin solution

C_{standard} : concentration of standard albumin solution

기관지폐포세척액내의 알부민농도와 혈청 알부민농도의 비를 구해 폐포와 모세혈관 사이의 투과성계수(permeability index)로 사용하였다.

$$\text{PI} = \text{BALF albumin} / \text{Serum albumin}$$

PI: permeability index

Serum albumin: albumin content in serum

8. 유의성 검정

SPSSPC+통계 package를 이용해 유의성 검정을 시행했는데, 시간별로 각각 기저치와의 차이를 구한 후 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test로 두 군을 비교하였고 각군내의 시간경과에 따른 기저치와의 비교에는 Wilcoxon Matched-pairs Signed-ranks Test를 사용했다.

결 과

1. 전신동맥압

내독소를 투여하고 약 1시간이 경과한 후부터 전신동맥압은 감소하기 시작했고 이후 실험기간동안 계속 기저치보다 유의하게 낮은 상태가 유지되었으며($p < 0.05$), 두 군간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(data not shown).

2. 심계수

심계수는 내독소 투여 30분 후 기저치에 비해 일시적으로 유의하게 감소했고($p < 0.05$) 그 후 회복돼 phase 1에서는 기저치와 유의한 차이를 보이지 않았지만($p < 0.05$) phase 2에서는 기저치에 비해 유의하게 점차 감소했다($p < 0.05$). Indomethacin 전처치군에서는 내독소 투여 30분 후의 심계수 감소만이 유의하게 완화되었다($p < 0.05$) (Fig. 1).

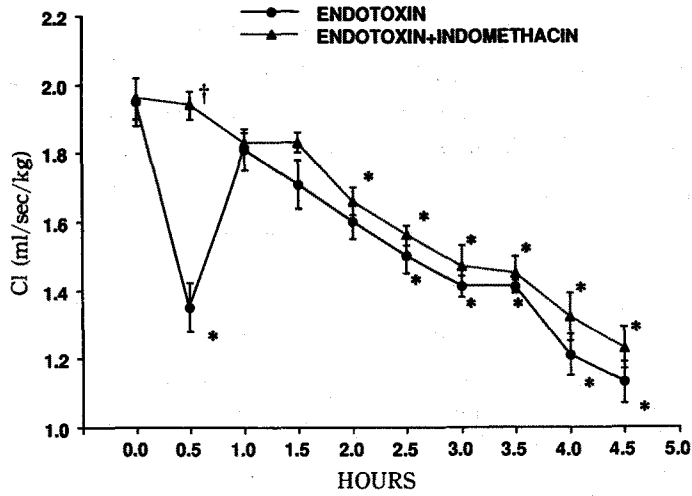


Fig. 1. Effects of endotoxin alone and endotoxin+indomethacin on cardiac index (CI). Values are means±SE. *p<0.05 compared with baseline. †p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

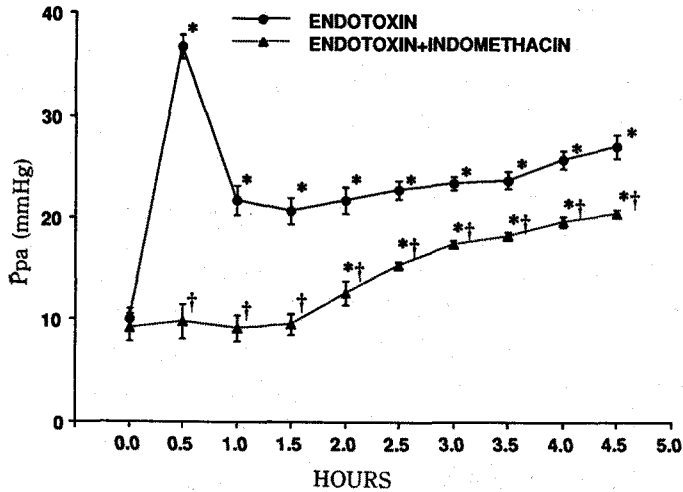


Fig. 2. Effects of endotoxin alone and endotoxin+indomethacin on mean pulmonary artery pressures (Ppa). Values are means±SE. *p<0.05 compared with baseline. †p<0.05 compared with endotoxin at respective time.

3. 평균 폐동맥압

내독소 투여 후 평균 폐동맥압은 급격히 증가해 30분 후 최고치를 보였고 실험기간 동안 기저치보다 계속 유

의하게 높았다($p < 0.05$). Indomethacin으로 전처치한 군의 평균 폐동맥압은 실험기간동안 내독소투여군에 비해 유의하게 낮게 유지되었지만($p < 0.05$), phase 2에 서는 기저치에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$)

(Fig. 2).

4. 평균 폐모세혈관쇄기압

내독소투여군에서는 평균 폐모세혈관쇄기압이 30분 후 급격히 증가했다가 다시 원상으로 회복되는 양상을

보였는데 indomethacin 전처치군에서는 이런 변화가 관찰되지 않았다. 이 후에는 기저치 및 두 군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았다(data not shown).

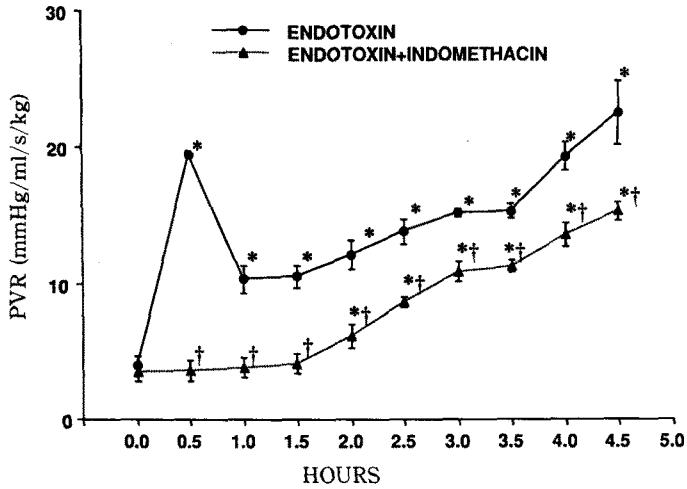


Fig. 3. Effects of endotoxin alone and endotoxin+indomethacin on pulmonary vascular resistance (PVR).

Values are means \pm SE.

*p < 0.05 compared with baseline.

†p < 0.05 compared with endotoxin at respective time.

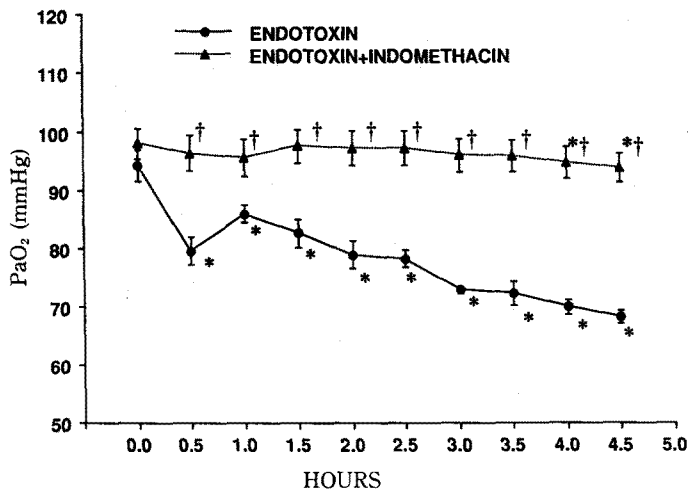


Fig. 4. Effects of endotoxin alone and endotoxin+indomethacin on arterial oxygen tension (PaO₂).

Values are means \pm SE.

*p < 0.05 compared with baseline.

†p < 0.05 compared with endotoxin at respective time.

5. 폐혈관저항

내독소 투여군에서 폐혈관저항은 30분 후 일시적으로 증가했다가 약간 감소한 후 phase 2에 다시 증가하는 양상을 보였다. Indomethacin으로 전치치한 군에서는 실험기간동안 내독소투여군에 비해 폐혈관저항이 유의하게 낮았지만($p < 0.05$), phase 2에서는 기저치에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$) (Fig. 3).

6. 동맥혈산소분압

동맥혈산소분압은 내독소 투여 30분만에 감소했다가 약간 증가한 후 다시 지속적으로 감소하는 양상을 보였는데 실험기간동안 기저치와 비교해 유의하게 낮은 상태가 유지됐다($p < 0.05$). Indomethacin 전치치군에서는 내독소투여군에 비해 동맥혈산소분압이 실험기간동안 유의하게 높게 유지되었다($p < 0.05$) (Fig. 4).

7. 동맥혈이산화탄소분압

동맥혈이산화탄소분압은 실험기간내내 두 군간의 유의한 차이가 관찰되지 않았고 기저치에 비해서도 유의한 차이를 보이지 않았다(data not shown).

8. 폐포동맥간산소분압차

내독소 투여군 폐포동맥간산소분압차는 30분에 증가했다가 1시간에 약간 감소한 후 다시 지속적으로 증가하는 양상을 보였는데 실험기간동안 기저치에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$). Indomethacin으로 전치치한 군에서는 3.5시간 이후에는 폐포동맥간산소분압차가 기저치보다 높았지만($p < 0.05$), 내독소 투여군에 비해서는 실험기간동안 유의하게 낮게 유지되었다($p < 0.05$) (Fig. 5).

9. 말초혈액내 백혈구수

두 군 모두에서 말초혈액내 백혈구수는 급격히 감소되어 30분 후부터 기저치와 비교해 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$), 1시간에는 기저치의 1/3수준까지 저하되었고 이후에는 큰 변화없이 유지되었으며 두 군간의 유의한 차이도 관찰되지 않았다(data not shown).

10. 말초혈액내 혈소판수

두 군 모두에서 말초혈액내혈소판수는 시간이 경과하면서 지속적으로 감소하는 양상을 보였는데 1시간 후부터 기저치와 비교해 유의한 차이를 보였고($p < 0.05$),

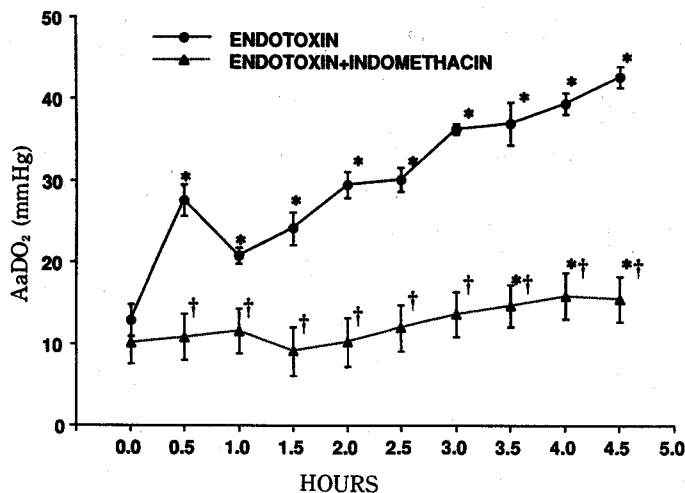


Fig. 5. Effects of endotoxin alone and endotoxin+indomethacin on the room air alveolar-arterial O₂ gradient (AaDO₂). Values are means±SE. * $p < 0.05$ compared with baseline. † $p < 0.05$ compared with endotoxin at respective time.

두 군간에는 유의한 차이가 없었다(data shown).

11. 혈장내 GSH/GSSG

두 군 모두에서 혈장내 GSH/GSSG는 시간이 경과하면서 증가하는 양상을 보였으나 기저치와 통계적으로 유

의한 차이는 보이지 않았고($p < 0.05$), 두 군간에도 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p < 0.05$) (Fig. 6).

12. 혈장내 GSSG

내독소 투여군과 indomethacin 전처치군의 혈장내

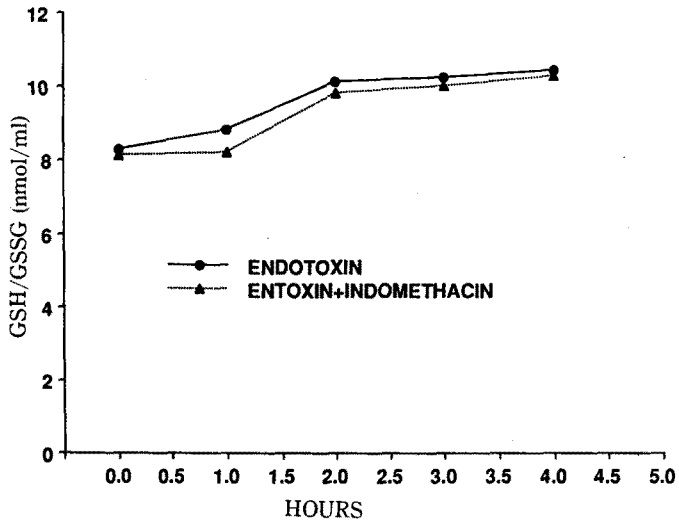


Fig. 6. Changes of plasma total glutathione (GSH/GSSG) in endotoxin- and endotoxin+indomethacin-treated pigs. Values are means. $p > 0.05$ between groups at respective time.

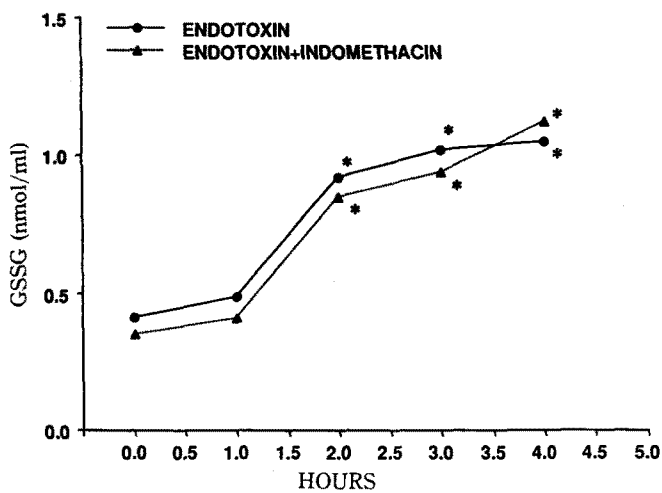


Fig. 7. Changes of plasma oxidized glutathione (GSSG) in endotoxin- and endotoxin+indomethacin-treated pigs. Values are means. * $p < 0.05$ compared with baseline. $p > 0.05$ between groups at respective time.

GSSG는 phase 2에서 기저치에 비해 유의하게 증가하였고($p < 0.05$) 이 두 구간에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 7).

13. GSSG와 GSH/GSSG의 비

내독소 투여군과 indomethacin 전처치군에서는

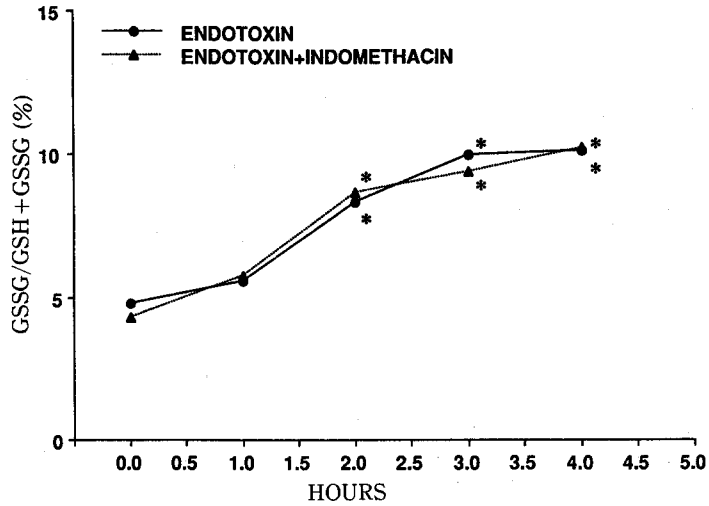


Fig. 8. Changes of plasma oxidized glutathione-to-total glutathione ratio (GSSG/GSH+GSSG) in endotoxin- and endotoxin+indomethacin-treated pigs. Values are means. * $p < 0.05$ compared with baseline. $p > 0.05$ between groups at respective time.

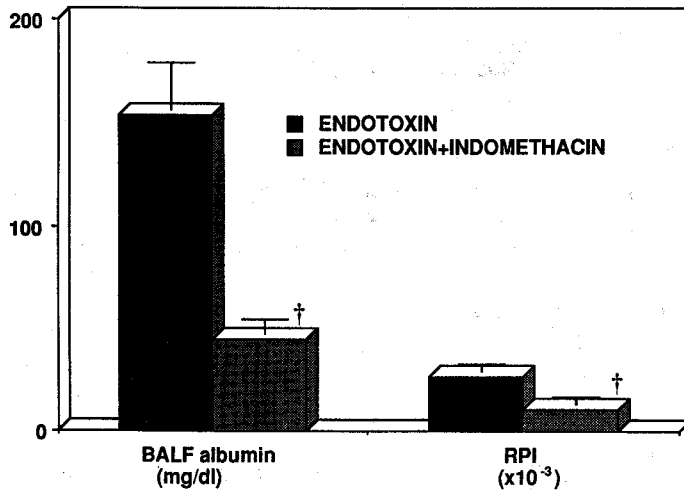


Fig. 9. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) albumin content (left) and relative permeability index (RPI) (right) in endotoxin- and endotoxin+indomethacin-treated pigs. Values are means+SE. † $p < 0.05$ compared with endotoxin.

phase 2에서 기저치에 비해 유의하게 증가되었고($p < 0.05$) 이 두 구간에는 유의한 차이가 없었다($p < 0.05$) (Fig. 8).

14. 기관지폐포세척액의 알부민 농도와 투과성계수

기관지폐포세척액의 알부민농도와 폐포와 모세혈관사이의 투과성계수는 내독소투여군에 비해 indomethacin 전처치군에서 유의하게 낮았다($p < 0.05$) (Fig. 9).

고 안

내독소 투여시 혈장과 폐의 림프내에 cyclooxygenase 대사물과 lipoxigenase 대사물이 모두 증가하는데, 폐림프에서의 농도가 혈장에서의 농도보다 훨씬 높아 이들은 폐조직 자체 또는 폐에 축적된 세포로부터 생성된 것으로 생각되어^{11,12)} arachidonate 대사물이 내독소에 의한 급성 폐손상에 관여함을 시사하고 있다. 또한 이들의 농도변화는 내독소 투여 후 시간 경과에 따라 폐림프내에서 각기 다른 양상을 보여 thromboxane A₂ (이하 TXA₂로 약함)는 폐혈관의 저항이 가장 많이 증가하고 기도저항과 폐 유순에 가장 큰 변화를 보이는 1 시간 후에 최고 농도를 유지하며, prostacyclin은 그보다 약간 늦게 폐동맥압이 감소하기 시작하고 기도저항과 폐 유순도의 호전이 관찰되기 시작할때 최고 농도를 보이고 lipoxigenase 대사물인 5-hydroxyeicosatetraenoic acid(이하 HETE로 약함)와 12-HETE는 폐혈관의 투과성이 증가하는 후기에 가장 높은 농도를 나타내 각 단계에서의 원인 물질일 가능성을 간접적으로 시사하고 있다¹¹⁾. 그러나 arachidonate 대사물이 폐손상의 결과 이차적으로 증가했을 가능성도 완전히 배제할 수 없어 이것만으로 급성 폐손상의 원인이 arachidonate 대사물이라고 결론짓기는 곤란하다.

내독소에 의한 폐손상에 arachidonate 대사물이 관여하리라는 사실은 cyclooxygenase와 lipoxigenase를 억제하는 약물의 효과로도 추정이 가능하다. 오래전에 개발된 cyclooxygenase를 억제하는 약제를 이용해 cyclooxygenase 대사물의 급성 폐손상에의 역할에 관한 연구는 비교적 많이 알려져 있다. 이들 약제는 내독소 투여시 초기에 관찰되는 기도저항의 증가, 폐 유순도의 감소, 폐동맥압의 상승 및 저산소혈증을 완화시키며¹²⁻¹⁵⁾ 여러 cyclooxygenase 대사물 중 TXA₂가 가장

강력한 폐혈관 수축작용을 보이고, 폐림프에서 최고 농도를 보이는 시기가 폐동맥압 상승의 최고시기와 일치해 TXA₂가 초기 폐동맥압 상승의 원인 물질일 가능성이 크고, 이같은 추정은 TXA₂의 합성만을 선택적으로 억제하는 물질이 초기의 폐동맥압 상승을 완화시킨다는 점에서 뒷받침된다^{21,22)}. 그러나 내독소투여 후기의 폐동맥압 상승에는 cyclooxygenase 억제약물이 큰 효과를 보이지 않는 반면에 lipoxigenase 대사물인 leukotriene(이하 LT로 약함)의 종말장기 수용체 길항제(end-organ receptor antagonist)로는 후기의 폐동맥압 상승이 완화되어, 후기의 폐동맥압 상승에는 LT이 관여하리라 생각되고 있다¹⁵⁾. 본 연구의 결과는 이와 약간 상이하여 indomethacin 전처치로 심계수와 지표들의 변화가 초기와 후기 모두에서 유의하게 완화되어 cyclooxygenase 대사물이 두 phase에 관여할 가능성을 시사해 주고 있다. 그러나 indomethacin 전처치로 위 지표들의 변화가 기저치와 같은 정도로 완전히 완화되지 않아 cyclooxygenase 대사물외의 다른 물질이 동시에 관여할 가능성도 배제할 수는 없다. 본 연구에서 indomethacin 단독 투여 및 indomethacin을 용해시키는데 사용된 sodium carbonate가 미치는 영향을 관찰하지 않았는데 다른 연구에 의하면 큰 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다^{16,23)}.

본 실험에서 내독소투여군에서 관찰된 전신동맥압의 감소는 indomethacin 전처치로 완화되지 않아 내독소의 말초혈관에 대한 직접적인 효과가거나 또는 cyclooxygenase 대사물이 아닌 다른 물질을 통한 작용일 것으로 생각되고 말초혈액내 백혈구와 혈소판의 감소도 indomethacin에 의해 영향을 받지 않아 cyclooxygenase 대사물은 백혈구와 혈소판의 이동에 관여하지 않을 것으로 생각된다.

한편 cyclooxygenase 억제약물이 내독소 투여시 후기에 관찰되는 폐혈관 투과성 증가에 미치는 효과에 대해서는 논란이 있다. Snapper 등에 의하면 cyclooxygenase 억제약물인 meclofenamate와 ibuprofen에 의해 초기의 림프유량 증가와 림프와 혈청간 단백질량의 감소가 완화되나 이는 약물이 폐포세혈관수압 증가를 완화시키는 효과에 의해 이차적으로 나타나는 현상이며, 후기의 림프와 혈청간 단백질량의 증가를 완화시키지 못해 후기의 폐혈관 투과성 증가에는 영향을 미치지 못한다고 하였으나¹³⁾, Gnidec과 Olson 등은 투과성 증가의

완화가 관찰되었다고 보고하였다^{16,17}). 본 연구에서는 indomethacin 전처치로 폐혈관 투과성 증가의 완화가 관찰되었는데 실험동물의 차이에서 기인할 가능성과 함께 투과성 지표에 따른 차이일 가능성도 있을 것으로 생각된다.

cyclooxygenase 억제약물로 흔히 사용되는 ibuprofen이 쥐에서 호중구성 폐포염의 완화를 가져오려면 cyclooxygenase를 억제하는 보통용량보다 훨씬 많은 용량이 필요하므로 ibuprofen이 염증반응에 미치는 영향은 cyclooxygenase 차단효과가 아닌 다른 약리작용에 의한 가능성도 제시되고 있고²⁴) cyclooxygenase 대사과정에 관여하는 peroxidase에 의해서 산소기가 생성된다고 알려져 있어^{18,19}) cyclooxygenase 대사물이 직접 폐손상을 일으키는지 또는 대사과정에서 생성되는 산소기에 의해 간접적으로 관여하는지는 확실히 규명되어 있지 않은 상태이다. 본 연구의 결과로는 indomethacin이 산소기에 의한 산화반응에 영향을 미치지 않아 대사과정에서 생성되는 산소기를 통한 간접작용에 의해서라기 보다는 cyclooxygenase 대사물이 직접 급성 폐손상의 기전에 관여하리라 판단된다.

부신피질호르몬제도 세포막으로부터 arachidonate의 유리를 억제해서 arachidonate의 대사에 영향을 미칠 수가 있다. 과거의 보고에 의하면 methylprednisolone이 초기의 폐동맥압 상승에는 효과가 없고 폐혈관의 투과성 증가에만 예방효과가 있다고 하였으나²⁵), 최근의 연구에 의하면 dexamethasone이 초기와 후기 모두에 예방효과를 보인다고 한다¹⁶). 그러나 부신피질호르몬제는 체내에서 arachidonate 대사에 미치는 영향외에 여러 약리작용을 보일 수 있어 부신피질호르몬제를 이용한 연구의 결과를 해석하는데는 세심한 주의를 요한다.

한편 lipoxigenase 대사물의 역할에 관한 연구는 측정방법의 어려움 및 억제약물의 부족으로 인하여 큰 진전을 보이지 못했다. 내독소에 의한 급성 폐손상의 후기에 LTA₄, B₄, C₄, D₄, E₄ 등 lipoxigenase 대사물이 증가하는 사실로부터 이것이 폐혈관의 투과성 증가에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있으며 이는 hamster cheek pouch 모델에서 LTC₄, D₄가 소동맥 수축과 소정맥의 투과성 증가를 일으키고, 정제된 slow reacting substance of anaphylaxis(SRS-A)가 기니피그 피부조직에서 혈관의 투과성 증가를 가져온다는 사실로 뒷받침된다^{26,27}). 또한 LTB₄는 내독소에 의한 급성 폐손상

시 폐림프에서 고농도로 존재함이 밝혀져 있고 동시에 호중구에 대한 강력한 주화작용도 있으므로 LTB₄가 호중구를 폐조직으로 이동시켜 호중구에서 분비되는 염증 매개성 물질을 통해 간접적으로 폐손상에 관여할 가능성도 있다^{28,29}). 최근에 lipoxigenase 억제약물이 개발됨에 따라 이를 이용한 실험이 진행되고 있는데 여기에서도 lipoxigenase 대사물의 역할이 강조되고 있지만, 억제약물의 특이성이 낮아 lipoxigenase 억제효과가 아닌 다른 작용으로 폐손상이 완화될 가능성도 배제할 수는 없다³⁰⁻³³). 향후 lipoxigenase 대사물의 역할에 관한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : 내독소 투여시 혈장과 폐의 림프내에 cyclooxygenase 대사물과 lipoxigenase 대사물이 모두 증가하고, cyclooxygenase 차단제로 초기의 혈액학적 변화가 완화되어 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전에서 cyclooxygenase 대사물의 역할이 중요시 되고 있다. 그러나 cyclooxygenase 억제약물이 내독소 투여시 후기에 관찰되는 폐혈관 투과성 증가에 미치는 효과에 대해서는 논란이 있는 실정이고 cyclooxygenase 대사과정에 관여하는 peroxidase에 의해서 산소기가 생성된다고 알려져 있어 cyclooxygenase 대사물이 직접 폐손상을 일으키는지 또는 대사과정에서 생성되는 산소기를 통해 간접적으로 관여 하는지는 확실히 규명되어 있지 않은 상태이다. 저자들은 cyclooxygenase 대사물이 내독소에 의한 급성 폐손상의 기전에 직접적 또는 간접적으로 관여하는지를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

방법 : 총 8마리의 집돼지를 내독소 투여군(n=3)과 indomethacin 전처치 후 내독소를 투여한 군(n=5)으로 나누어 시간 경과에 따른 혈액학적 지표의 변화, 혈장내 산화 glutathione(GSSG) 및 기관지폐포세척액내의 알부민 농도를 측정하여 indomethacin 전처치가 내독소에 의한 급성 폐손상에 미치는 영향을 관찰하였다.

결과 :

1) 내독소 투여 후 phase 1(0-2 hr)과 phase 2(2-4.5 hr)에 걸쳐서 심박출량은 감소되고 평균 폐동맥압, 폐혈관저항, 폐포동맥간산소분압차는 증가되었으며 indomethacin 전처치로 두 phase의 변화가 모두 완화되었다.

2) phase 2에서 내독소에 의해 GSSG가 기저치에 비해 유의하게 증가했는데 indomethacin 전처치로는 완화되지 않았다.

3) 기관지폐포세척액내 알부민농도와 투과성지표는 내독소 투여군에 비해 indomethacin 전처치군에서 유의하게 낮았다.

결론 : 이상의 결과로 내독소에 의한 폐지의 급성 폐손상에는 cyclooxygenase 대사물이 초기와 후기 모두에 관여할 것으로 생각되고 indomethacin이 산소기에 의한 산화반응에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 산소기를 통한 간접작용보다는 cyclooxygenase 대사물이 직접 병인론적 기전에 관여할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Stevens JH, Raffin TA: Adult respiratory distress syndrome 1: etiology and mechanisms. *Postgrad Med J* 60:305, 1984
- 2) Modig J: Adult respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Acta Chir Scand* 152:241, 1986
- 3) Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Loyd JE, Lucht WD, Meyrick BO: Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* 3:719, 1983
- 4) Meyrick B, Brigham KL: Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep: structure: Function relationships. *Lab Invest* 48:458, 1983
- 5) Brigham KL, Woolverton WC, Blake LH, Blake LH, Staub NC: Increased sheep lung vascular permeability caused by Pseudomonas bacteremia. *J Clin Invest* 54:792, 1974
- 6) Brigham KL, Bowers RE, Haynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by Escherichia coli endotoxin. *Circ Res* 45:292, 1979
- 7) Johnson A, Malik AB: Effect of granulocytopenia on extravascular lung water content after microembolization. *Am Rev Respir Dis* 122:561, 1980
- 8) Flick MR, Perel A, Staub NC: Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. *Circ Res* 48: 344, 1981
- 9) Heflin AC, Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68:

- 1253, 1981
- 10) Shaby DM, Fox RB, Harada RN, Repine JE: Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J Appl Physiol* 52:1237, 1982
- 11) Brigham KL: Metabolites of arachidonic acid in experimental lung vascular injury. *Fed Proc* 44:43, 1985
- 12) Ogletree ML, Begley CJ, King GA, Brigham KL: Influence of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents on the accumulation of arachidonic acid metabolites in plasma and lung lymph after endotoxemia in awake sheep: measurements of prostacyclin and thromboxane metabolites and 12-HETE. *Am Rev Respir Dis* 133:55, 1986
- 13) Snapper JR, Hutchison AA, Ogletree ML, Brigham KL: Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanesthetized sheep. *J Clin Invest* 72:63, 1983
- 14) Begley CJ, Ogletree ML, Meyrick BO, Brigham KL: Modification of pulmonary responses to endotoxemia in awake sheep by steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Am Rev Respir Dis* 130: 1140, 1984
- 15) Ahmed T, Wasserman MA, Muccitelli R, Tucker S, Gazeroglu H, Harchette B: Endotoxin-induced changes in pulmonary hemodynamics and respiratory mechanics: Role of lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Am Rev Respir Dis* 134:1149, 1986
- 16) Olson NC, Brown TT Jr, Anderson DL: Dexamethasone and indomethacin modify endotoxin-induced respiratory failure in pigs. *J Appl Physiol* 58:274, 1985
- 17) Gnidec AG, Sibbald WJ, Cheung H, Metz CA: Ibuprofen reduces the progression of permeability edema in an animal model of hyperdynamic sepsis. *J Appl Physiol* 65:1024, 1988
- 18) Egan RW, Gale PH, Kuehl FA: Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase. *J Biol Chem* 254:3295, 1979
- 19) Kuehl FA, Egan RW: Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science Wash. DC* 210:978, 1980
- 20) Sies H, Akerboom TPM: Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues, In Packer L (Ed.) *methods in enzymology*. Vol 105., p 445 Orlando Academic Press 1984

- 21) Winn R, Harlan J, Nadir B, Harker L, Hildebrandt J: Thromboxane A₂ mediates lung vasoconstriction but not permeability after endotoxin. *J Clin Invest* **72**:911, 1983
- 22) Kubo K, Kobayashi T: Effects of OKY-046, a selectivethromboxane synthetase inhibitor, on endotoxin-induced lung injury in unanesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* **132**:494, 1985
- 23) Olson NC, Anderson DL, Grizzle MK: Dimethylthiourea attenuates endotoxin-induced acute respiratory failure in pigs. *J Appl Physiol* **63**:2426, 1987
- 24) Rinaldo JE, Pennock B: Effects of ibuprofen on endotoxin-induced alveolitis: Biphasic dose response and dissociation between inflammation and hypoxemia. *Am J Med Sci* **291**:29, 1986
- 25) Brigham KL, Bowers RE, McKeen CR: Methylprednisolone prevention of increased lung vascular permeability acused by prudomonas bacteremia. *J Clin Invest* **67**:1103, 1981
- 26) Williams T, Piper P: The action of chemically pure SRS-A on the microcirculation in vivo. *Prostaglandins* **19**:779, 1980
- 27) Peck MJ, Piper PJ, Williams TJ: The effect of leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea pig skin. *Prostaglandins* **21**:315, 1981
- 28) Fujimoto K, Kobayashi T: The role of leukotriene B₄ in endotoxin-induced lung injury in unanesthetized sheep. *Respir Physiol* **71**:259, 1988
- 29) Olson NC, Dobrowsky RT, Fleisher LN: Dexamethasone blocks increased leukotriene B₄ production during endotoxin-induced lung injury. *J Appl Physiol* **64**:2100, 1988
- 30) Burghuber OC, Strife RJ, Zirrolli J, Henson PM, Henson JE, Mathias MM, Reeves JT, Murphy RC, Voelkel NF: Leukotriene inhibitors attenuate rat lung injury induced by hydrogen peroxide. *Am Rev Respir Dis* **131**:778, 1985
- 31) Cook JA, Wise WC, Halushka PV: Protectiv effect of a selective leukotriene antagonist in endotoxemia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **235**:470, 1985
- 32) Pacitti N, Bryson SE, McKechnie K, Rodger IW, Parratt JR: Leukotriene antagonist FPL 57231 prevents the acute pulmonary effects of *Escherichia coli* endotoxin in cats. *Cir Shock* **21**:155, 1987
- 33) Coggeshall JW, Christman BW, Lefferts PL, Serafin WE, Blair IA, Butterfield MJ, Snapper JR: Effect of inhibition of 5-lipoxygenase metabolism of arachidonic acid on response to endotoxemia in sheep. *J Appl Physiol* **65**:1351, 1988