

□ 원 저 □

# 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에서 Hydroxyl Radical의 병인론적 역할에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실

심 영 수 · 유 철 규 · 김 영 환  
한 성 구 · 김 건 열 · 한 용 철

— Abstract —

## The Role of Hydroxyl Radical in the Pathogenetic Mechanism of Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Rats

Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.  
Sung Koo Han, 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:** Although there have been many studies on the pathogenetic mechanism of acute lung injury, it is still elusive. Recently interests have been focused on the role of oxygen free radicals. But the effect of hydroxyl radical on the neutrophil mobilization and the alveolar-capillary permeability is not clear especially in the endotoxin-induced acute lung injury model of rats. This investigation was performed to evaluate the pathogenetic role of hydroxyl radical on the neutrophil accumulation into the lung and the increased alveolar-capillary permeability in the endotoxin-induced acute lung injury in rats.

**Method:** Fifty rats were divided into four groups: vehicle control group (n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), endotoxin-treated group (n=10, 6hrs; n=10, 24hrs), Dimethylthiourea (DMTU)-pretreated group (n=10, 6hrs), and deferoxamine (DFX)-pretreated group (n=10, 6hrs). Thirty minutes before sacrifice, <sup>125</sup>I-tagged bovine serum albumin was injected. Six and twenty four hours after endotoxin injection, the rats were sacrificed, and the radioactivity of lung tissue and peripheral blood was counted. Permeability index was defined as the ratio of radioactivity between lung tissue and peripheral blood. Another set of rats (n=52) were divided into the same four groups as before [vehicle control group (n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), endotoxin-treated group (n=7, 6hrs; n=8, 24hrs), DMTU-pretreated group (n=6, 6hrs; n=9, 24hrs), and DFX-pretreated group (n=5, 6hrs; n=7, 24hrs)], and were sacrificed 6 and 24 hours after endotoxin injection. In these rats, cell profile of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid was evaluated, and the pathologic examination of lung tissue was performed.

**Results:**

1) Increased alveolar-capillary permeability was observed 6 hours after endotoxin injection, which was normalized after 24 hours, and this increase was attenuated by pretreatment with DMTU and DFX.

2) Neutrophil sequestration into the lung was observed 24 hours after endotoxin administration, but this was not influenced by DMTU and DFX pretreatment.

**Conclusion:** These results suggest that hydroxyl radical would not be involved in the sequestration of neutrophils into the lung, but plays an important role in the increase of alveolar-capillary permeability in the endotoxin-induced acute lung injury in rats.

**Key Words:** Endotoxin, Hydroxyl radical, Acute lung injury, Rats

본 논문은 1989년도 서울대학교병원 대단위 연구비의 보조로 이루어 졌음.

## 서 론

인구의 연령이 고령화되고 체내의 면역기능을 저하시키는 약물이 임상에서 많이 사용됨에 따라 과거에 비해 감염환자가 늘고있는 추세이다. 감염의 가장 큰 합병증인 폐혈증에 의한 성인호흡곤란증후군은 임상에서 흔히 관찰되는 질환중의 하나지만, 많은 연구에도 불구하고 아직도 병인론적 기전에 관한 지식이 일천해서 특이적 치료법이 없고 높은 사망율을 보이고 있다. 따라서 급성 폐손상의 기전을 밝혀 특이적 치료법을 개발하는 것은 시급한 과제라 하겠다.

급성 폐손상 환자의 부검시 폐에서 많은 호중구의 침윤이 관찰되고<sup>1,2)</sup>, 기관지폐포 세척액에서도 호중구와 호중구의 과립내에 존재하는 엘라스타제가 발견되어<sup>3-5)</sup> 급성 폐손상의 병인론적 기전에서 호중구의 역할이 큰 주목을 받게 되었다. 그러나 생체내 실험에서 호중구의 고갈이 급성 폐손상에 미치는 영향에 관해서는 이론이 있고<sup>6-8)</sup> 호중구 고갈에 사용된 약제의 특이성, 즉 폐조직 손상의 방어에 관여하는 인자에 영향을 끼칠 가능성과 호중구 고갈의 정도 및 실험도중 지속적으로 호중구의 고갈상태가 유지되었는가에 따라 크게 변할 수 있어서 그 결과가 반드시 호중구의 고갈에 의한 것이라고 결론짓는 데는 논란의 여지가 있다. 여러 인자가 실험결과에 영향을 미칠 수 있는 생체내 실험의 단점을 극복하기 위해 격리순환폐모델(isolated perfused lung model)을 이용한 연구에서는 비특이적으로 호중구를 활성화시키는 phorbol myristate acetate(이하 PMA로 약함)를 호중구와 같이 투여한 경우에는 폐부종이 관찰되지만 호중구나 PMA를 각각 단독으로 투여한 경우에는 폐부종이 관찰되지 않아서 급성 폐손상에서 PMA 자극에 의해 호중구로부터 분비된 염증매개성 물질의 역할이 강조되고 있다<sup>9)</sup>.

호중구는 외부 자극에 의해 여러 종류의 염증매개성 물질을 분비하는데 최근에 호중구에서 분비되는 산소기가 큰 주목을 끌고 있다. 산소기에는 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등이 있다<sup>10)</sup>. 격리순환폐모델에서 xanthine oxidase와 glucose oxidase 반응에 의해 생성된 산소기에 의한 폐부종이 항산화제로 완화되고, 활성화된 호중구에서 산소기의 생성이 dimethylthiourea(이하 DMTU로 약

함)에 의해 억제된다는 사실은 산소기가 폐부종의 원인 물질임을 시사하는 결과이다<sup>11,12)</sup>.

임상에서 흔히 관찰되는 성인호흡곤란증후군의 가장 많은 원인은 Gram 음성균에 의한 폐혈증인데<sup>13,14)</sup>, 이때도 호중구가 초기에 폐에 축적되고, 호중구 고갈로 폐부종의 완화가 관찰되며<sup>15)</sup>, 항산화제로 폐혈증에 의한 혈력학적 변화와 폐부종이 완화되어<sup>16-18)</sup> 폐혈증에 의한 급성 폐손상에서도 호중구에서 분비된 산소기가 중요한 병인론적 역할을 할 것으로 생각된다. 여러 종류의 산소기중 어느 것이 폐혈증에 의한 급성 폐손상의 기전에서 주된 역할을 하는 지에 관한 연구에 의하면 superoxide dismutase(이하 SOD로 약함) 전처치로 폐포-모세혈관 투과성이 악화되고 catalase 전처치로 완화되는데 SOD가 superoxide로부터 hydrogen peroxide의 형성을 촉진하는 사실을 감안하면 superoxide 자체보다는 hydrogen peroxide가 급성 폐손상에 관여하는 주된 산소기일 것으로 생각된다<sup>17,18)</sup>. 반면에 산소기중 다른 물질과 가장 강력한 반응을 보이는 것으로 알려져 있는 hydroxyl radical이 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 미치는 효과에 대해서는 이론이 있는 실정이고 호중구의 이동에 미치는 역할에 관해서는 알려져 있지 않은 실정이다<sup>19,20)</sup>. 이에 저자들은 백서에서 내독소투여 후 시간경과에 따른 폐조직의 호중구 침윤과 폐포-모세혈관 투과성의 변화를 관찰하고 hydroxyl radical 탐식제인 DMTU와 hydroxyl radical 형성에 중요한 역할을 하는 철분배제인 deferoxamine(이하 DFX로 약함) 전처치가 이에 미치는 영향을 관찰하여 hydroxyl radical이 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에서 호중구의 이동과 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물

실험동물은 생후 10-12주된 350g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 백서를 서울대학교 실험동물 사육장에서 구입해 사용했으며 먹이와 물은 자유로이 먹을 수 있도록 공급하였다. 먹이는 삼양배합사료를 사용했고, 외견상 이상이 없고 폐절제시 육안적으로 폐렴의 소견이 없는 백서만을 실험에 사용하였다.

## 2. 실험군

총 102마리의 백서를 대조군, 내독소투여군, DMTU 전처치군과 DFX 전처치군으로 나누었다. 대조군은 생리식염수 1ml를 꼬리정맥에 주사하고 1시간이 경과한 후 생리식염수 1ml를 복강내로 투여하였고, 내독소투여군은 1ml의 생리식염수를 정맥내로 주사하고 1시간 후에 *Escherichia coli* (serotype 055B5, Sigma Chemical Co.) 2.5 mg/kg를 1ml의 생리식염수에 녹여 복강내로 투여하였다. DMTU 전처치군은 생리식염수에 녹인 DMTU 1ml를 정맥내로 주사하고 1시간 후에 2.5 mg/kg의 내독소를 복강내로 투여하였으며 DFX 전처치군은 10 mg의 DFX를 12시간 간격으로 5일간 근육주사하고 6일째에 내독소를 투여하였다. 이 중 50마리의 백서는 폐포모세혈관 사이의 투과성을 관찰하는데 사용하였고 [대조군 (n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), 내독소투여군 (n=10, 6hrs; n=10, 24hrs), DMTU 전처치군 (n=10, 6hrs)과 DFX 전처치군 (n=10, 6hrs)] 나머지 52마리는 말초혈액과 기관지폐포세척액의 구성세포와 폐의 병리조직학적 소견을 관찰하는데 사용하였다 [대조군 (n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), 내독소투여군 (n=7, 6hrs; n=8, 24hrs), DMTU 전처치군 (n=6, 6hrs; n=9, 24hrs)과 DFX 전처치군 (n=5, 6hrs; n=7, 24hrs)]. 모든 군에서 약물을 투여한 후부터 희생시킬 때까지는 자유로이 활동하도록 하였다.

## 3. 폐포모세혈관 사이의 투과성 측정

희생하기 30분전에 0.01 M의 phosphate 완충용액에 1.5  $\mu$ Ci/ml로 희석한  $^{125}$ I을 붙인 bovine serum albumin 0.5 ml (0.75  $\mu$ Ci)를 꼬리 정맥에 주사하였다. 내독소를 투여하고 6시간과 24시간이 경과한 후 백서를 pentobarbital sodium으로 희생시킨 후 폐장을 적출하여 폐조직과 말초혈액 1ml의 방사능을 측정하여 이들의 비율 폐포-모세혈관 투과성의 지표로 사용하였다.

## 4. 기관지폐포세척액내 구성세포의 관찰

한쪽 주기관지를 결찰한 후 한번에 5 ml씩 모두 7회에 걸쳐 반대쪽 폐에서 기관지폐포세척술을 시행하였다. 회수된 기관지폐포세척액을 두 점의 거즈에 걸러서 점액을 제거한 후 일부로 Neubauer chamber에서 전체 세포수를 측정하였다. 4°C에서 450 g의 속도로 10분간 2

회 원심분리한 후 밑에 가라앉은 세포를 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 풀어준 뒤 일부를 취해 phosphate buffered solution (PBS)으로 희석한 후 Neubauer chamber로 세포수가  $1.0 \times 10^6$ /ml이 되도록 조절했다. 200  $\mu$ l를 슬라이드에 넣어 cytocentrifuge로 도말 건조시킨 후 Giemsa 염색을 시행하고 이를 광학현미경으로  $\times 1000$  시야에서 임의로 1000개의 세포를 세어 구성세포의 비율을 계산하였다.

## 5. 병리조직학적 검사

기관지폐포세척술시 결찰하였던 한쪽 주기관지를 통해 10% buffered formaldehyde를 폐가 전폐용량이 될 정도로 넣어 2-3일간 고정시킨 후 폐문근처에서 얇게 자른 절편을 가지고 Hematoxylin & Eosin 염색을 하였다. 광학현미경으로 폐포중격의 비후, 폐포내의 부종액 유무등을 모든 시야에서 관찰하고 임의로 선택한 10개의 high power field ( $\times 250$ )에서 폐간질과 폐포내의 호중구수를 세었다.

## 6. 유의성 검정

SPSSPC+통계 package를 이용해 유의성 검정을 시행했는데, 시간별로 군 전체의 비교에는 비모수검정법 중 Kruskal-Wallis one-way ANOVA by ranks를 사용했고 유의한 차이가 있었던 항목만 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test로 2군간의 유의성을 검정하였다.

## 결 론

### 1. 폐포-모세혈관 투과성

내독소를 투여하고 6시간이 경과한 후 폐포-모세혈관 투과성은 대조군에 비해 유의하게 증가하였고 ( $p < 0.05$ ) 24시간이 경과한 후에는 대조군 수준으로 회복되었다. DMTU와 DFX 전처치군에서는 내독소 투여 6시간 후의 폐포-모세혈관 투과성이 내독소 투여군에 비해 유의하게 완화되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

### 2. 말초혈액 백혈구 및 호중구

모든 군에서 6시간 후의 말초혈액 전체 백혈구수와 호중구의 수는 차이를 보이지 않았고 ( $p > 0.05$ ) (Table 1), 24시간 후에는 대조군에 비해 내독소 투여군,

DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군에서 전체 백혈구수와 호중구의 수가 모두 유의하게 증가되었으나 ( $p < 0.05$ ) 내독소 투여군, DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군 사이의 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ( $p > 0.05$ ) (Table 2).

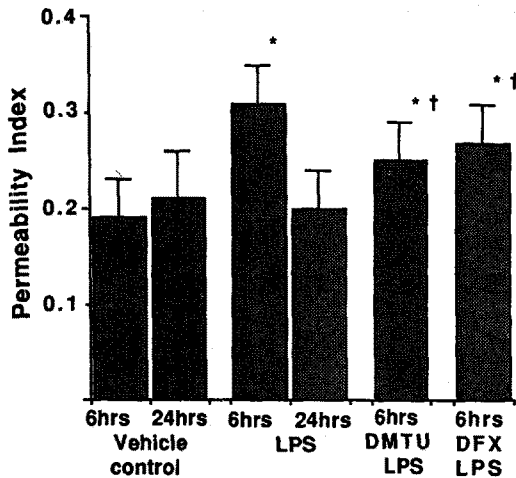


Fig. 1. The permeability index after endotoxin with or without pretreatment with DMTU and DFX.

- \* :  $p < 0.05$  compared to vehicle control group.
- † :  $p < 0.05$  compared to endotoxin-treated group 6hrs after endotoxin injection.

Table 1. Comparison of Total Leukocyte (WBC) and Neutrophil Counts (PMN) in Peripheral Blood Between Groups After 6 Hours

Groups	WBC ( $\times 10^3$ )	%PMN	PMN ( $\times 10^5$ )
Control, 6h	14.23 $\pm 3.21$	17.23 $\pm 9.87$	2.67 $\pm 1.52$
LPS, 6h	15.92 $\pm 4.21$	14.31 $\pm 8.10$	2.65 $\pm 1.67$
LPS+DMTU, 6h	14.31 $\pm 2.31$	15.11 $\pm 7.60$	2.79 $\pm 1.59$
LPS+DFX, 6h	14.89 $\pm 3.48$	16.24 $\pm 8.85$	2.53 $\pm 1.69$

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

Values are means  $\pm$  SD.

$p > 0.05$  between groups by Kruskal-Wallis one-way ANOVA

### 3. 기관지폐포세척액의 구성세포

모든 군에서 6시간 후 기관지폐포세척액의 전체 세포수, 호중구의 수와 폐포내 대식세포의 수는 차이가 없었고 ( $p > 0.05$ ) (Table 3) 24시간 후의 전체 세포수에도 차이가 없었지만 ( $p > 0.05$ ), 24시간 후의 호중구수는 대조군에 비해 내독소 투여군, DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군에서 유의하게 증가했고 ( $p < 0.05$ ) 폐포내 대식세포의 수는 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 내독소

Table 2. Comparison of Total Leukocyte (WBC) and Neutrophil Counts (PMN) in Peripheral Blood Between Groups After 24 Hours

Groups	WBC ( $\times 10^3$ )	%PMN	PMN ( $\times 10^5$ )
Control, 24h	16.36 $\pm 4.32$	19.20 $\pm 10.83$	2.94 $\pm 1.35$
LPS, 24h	24.66 $\pm 3.69^*$	66.75 $\pm 10.50^*$	16.51 $\pm 3.85^*$
LPS+DMTU, 24h	24.77 $\pm 9.98^*$	63.22 $\pm 16.15^{\dagger}$	15.82 $\pm 6.98^{\dagger}$
LPS+DFX, 24h	23.12 $\pm 7.65^*$	65.23 $\pm 14.28^{\dagger}$	15.64 $\pm 5.92^{\dagger}$

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

Values are means  $\pm$  SD.

\* :  $p < 0.05$  compared with control group

† :  $p > 0.05$  compared with LPS group

Table 3. Cell Profile of Bronchoalveolar Lavage Fluid, 6 Hours

Groups	Total ( $\times 10^6$ )	PMN ( $\times 10^6$ )	PAM ( $\times 10^6$ )
Control, 6h	7.85 $\pm 2.89$	0.29 $\pm 0.21$	5.92 $\pm 1.34$
LPS, 6h	6.92 $\pm 2.89$	0.49 $\pm 0.23$	6.31 $\pm 1.65$
LPS+DMTU, 6h	8.11 $\pm 3.13$	0.34 $\pm 0.17$	5.85 $\pm 1.58$
LPS+DFX, 6h	7.92 $\pm 2.92$	0.30 $\pm 0.16$	5.53 $\pm 1.52$

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

Values are means  $\pm$  SD

$p > 0.05$  between groups by Kruskal-Wallis one-way ANOVA

투여군, DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군간의 호중구와 폐포내 대식세포수의 차이는 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ) (Table 4).

**Table 4. Cell Profile of Bronchoalveolar Lavage Fluid, 24 Hours**

Groups	Total (x10 <sup>6</sup> )	PMN (x10 <sup>6</sup> )	PAM (x10 <sup>6</sup> )
Control, 24h	8.60 ± 2.30	0.38 ± 0.16	6.28 ± 1.39
LPS, 24h	8.00 ± 3.32	5.71 ± 1.85*	1.72 ± 0.67*
LPS+DMTU, 24h	8.00 ± 3.69	5.57 ± 1.29*†	1.90 ± 0.74*†
LPS+DFX, 24h	8.40 ± 3.98	4.86 ± 1.32*†	2.34 ± 0.92*†

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

Values are means ± SD

\* :  $p < 0.05$  compared with control group

† :  $p > 0.05$  compared with LPS group

#### 4. 병리조직학적 소견

6시간과 24시간 후의 병리조직학적 소견상 모든 군에서 폐포중격의 비후와 폐포내의 부종액은 관찰되지 않았다. 모든 군에서 6시간 후의 폐간질과 폐포내의 호중구 침윤은 차이를 보이지 않았으나( $p > 0.05$ ), 24시간 후에는 대조군에 비해 내독소 투여군, DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군에서 호중구의 침윤이 유의하게 증가했고( $p < 0.05$ ) 내독소 투여군, DMTU 전처치군 및 DFX 전처치군간의 차이는 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ) (Table 5, 6) (Fig. 2~5).

#### 고 찰

성인호흡곤란증후군은 심장질환이 아닌 다양한 원인에 의해 발생하는 급성 폐부종의 일종으로 처음 보고된 지 20여년이 지난 지금도 50% 이상의 높은 사망율을 보이고 있다<sup>21,22</sup>. 고식적 치료법의 비약적인 발전에도 불구하고 특이적 치료법이 없어 아직도 높은 사망율을 유

**Table 5. Histologic Evaluation of Lungs After 6 Hours**

Group	Structural Alterations		PMN Infiltration	
	Septal Thickening	Alveolar Edema	No. in Lung Parenchyma	No. in Airspace
Control, 6h	0/5	0/5	5.8 ± 1.9	1.8 ± 0.6
LPS, 6h	0/7	0/7	8.6 ± 2.7	2.4 ± 0.6
LPS + DMTU, 6h	0/6	0/6	8.2 ± 2.4	2.1 ± 0.5
LPS + DFX, 6h	0/5	0/5	7.9 ± 2.1	1.9 ± 0.4

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

$p > 0.05$  between groups by Kruskal-Wallis one-way ANOVA

DMTU : dimethylthiourea

Values are means ± SD

**Table 6. Histologic Evaluation of Lungs After 24 Hours**

Groups	Structural Alterations		PMN Infiltration	
	Septal Thickening	Alveolar Edema	No. in Lung Parenchyma	No. in Airspace
Control, 24h	0/5	0/5	6.8 ± 2.1	2.0 ± 0.7
LPS, 24h	0/7	0/7	135.2 ± 35.0*	35.9 ± 16.1*
LPS + DMTU, 24h	0/9	0/9	115.6 ± 43.5*†	25.7 ± 20.2*†
LPS + DFX, 24h	0/7	0/7	124.5 ± 39.8*†	29.4 ± 18.7*†

LPS : lipopolysaccharide of *E. coli* 055B5

DMTU : dimethylthiourea

DFX : deferoxamine

\* :  $p < 0.05$  compared with control group

DMTU : dimethylthiourea

Values are means ± SD

† :  $p > 0.05$  compared with LPS group

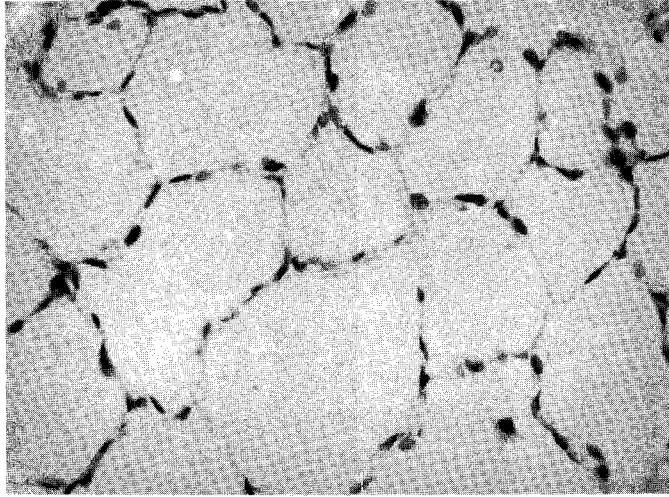


Fig. 2. Pathologic finding of lung tissue 6 hours after endotoxin injection. Septal thickening, alveolar edema, and neutrophil infiltration were not observed.

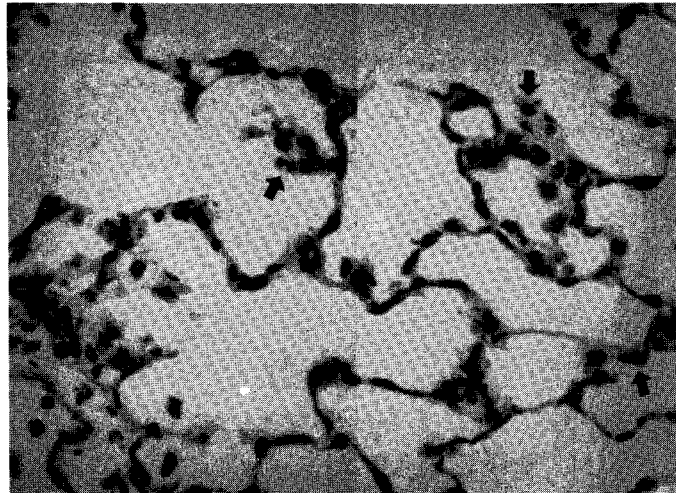
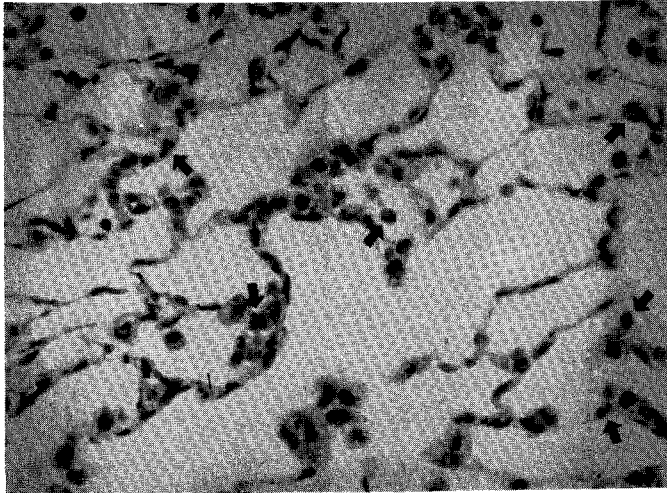


Fig. 3. Pathologic finding of lung tissue 24 hours after endotoxin injection. Septal thickening, and alveolar edema were not observed. Arrows show the neutrophils which are infiltrated into the alveolar space and the interstitium.

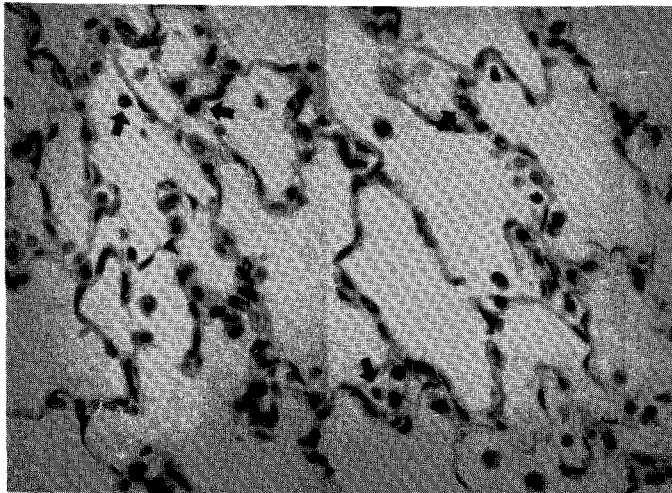
지하고 있는 것은 투과성 증가의 기전이 자세히 밝혀져 있지 않기 때문이며, 현재 이에 관한 많은 연구가 진행 중이나 아직도 결론을 내리기에는 미흡한 실정이다.

급성 폐손상의 기전에 관한 생체내 실험의 대부분은 Staub가 처음 고안한 양의 폐-림프 누공 모델 (sheep lung lymph fistula model)<sup>23)</sup>을 이용하였는데<sup>24-26)</sup>, 이 모델에서는 큰 혈력학적 변화가 없는 상태에서 림프유량

과 림프와 혈청내 단백질 양 비의 증가는 폐혈관의 투과성 증가를 반영하여 지속적으로 폐의 체액균형 상태와 투과성의 변화를 관찰할 수 있는 장점이 있다. 양외에 많이 이용된 대표적인 동물로는 돼지를 들 수 있다<sup>27)</sup>. 이들은 몸체가 커서 직접 흉관에 카테타를 삽입해서 혈력학적 지표들을 측정할 수 있는 장점이 있으나, 가격이 비싸고 다루기가 어렵다는 문제점이 있다. 또한 양과 돼지는 백



**Fig. 4.** Pathologic finding of lung tissue of DMTU-pretreated group 24 hours after endotoxin injection. Septal thickening, and alveolar edema were not observed. Arrows show the neutrophils which are infiltrated into the alveolar space and the interstitium.



**Fig. 5.** Pathologic finding of lung tissue of DFX-pretreated group 24 hours after endotoxin injection. Septal thickening, and alveolar edema were not observed. Arrows show the neutrophils which are infiltrated into the alveolar space and the interstitium.

서, 마우스, 원숭이, 개, 토끼 등과는 달리 소량의 내독소에도 민감한 반응을 보이는데, 이런 차이에 대해 정확히 알려져 있지는 않지만 근년에 밝혀진 폐혈관내 대식세포(pulmonary intravascular macrophage)의 유무와 관련이 있을 것으로 생각된다. 즉, 내독소에 민감한

반응을 보이는 돼지, 양, 염소, 고양이 등에서는 폐혈관내 대식세포가 관찰되지 않아 외부에서 체내로 들어간 내독소에 의해 폐혈관내 대식세포에서 여러 종류의 염증매개성 물질이 분비되어 급성 폐손상이 생기는 것으로 생각되고 있다<sup>28)</sup>. 그러나 인체에서 폐혈관내 대식세포

가 존재하는지에 대해서는 아직 확실히 밝혀져 있지 않아서 양, 돼지 등 내독소에 민감한 반응을 보이는 동물에서의 실험결과를 인체에 그대로 적용하는데는 문제점이 있다고 하겠다. 따라서 폐혈관내 대식세포가 없고 값싸며 다루기 수월한 백서에서 내독소에 의한 급성 폐손상이 어떠한 양상으로 나타나며 이때 관여하는 기전을 밝히는 것은 매우 중요할 것으로 생각되어 본 연구에서는 백서를 실험동물로 사용하였다.

본 연구에서는 양과 돼지를 이용한 실험에서 통상 사용하는 것보다 훨씬 다량의 내독소를 사용했는데 이는 앞서 언급한 실험동물간의 내독소에 대한 예민도의 차이를 감안한 것이다.

심장질환에 의한 폐부종이 폐모세혈관압의 상승에 기인하는 것과는 달리 성인호흡곤란증후군에서는 폐모세혈관 투과성의 증가가 폐부종의 주된 원인이라고 알려져 있다. 내독소를 투여하고 4~6시간 후에 폐포-모세혈관 투과성이 증가한다는 보고와<sup>29,30)</sup>, 저자들의 예비실험에서 24시간 이후에는 모든 지표들이 정상화되어 (Data not shown) 본 연구에서는 내독소를 투여하고 6시간과 24시간 후에만 폐포-모세혈관 투과성을 측정하였다. hydroxyl radical 탐식제인 DMTU와 hydroxyl radical 형성에 중요한 역할을 하는 철분제거제인 DFX 전처치로 모두 6시간 후의 폐포-모세혈관 투과성의 증가가 유의하게 완화된 것은 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 hydroxyl radical이 관여하는 증거라 하겠다. DMTU와 DFX의 단독투여로는 폐포-모세혈관 투과성이 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Data not shown).

본 연구에서는 말초혈액내 전체백혈구수와 호중구의 수가 24시간이 경과한 후에 증가했는데, Chang 등의 보고에서는 전체 백혈구수는 변화가 없었고 호중구의 수만 증가해<sup>29)</sup> 본 연구의 결과와 약간의 차이를 보이고 있다. 본 연구와 Chang 등의 연구에서 관찰된 백서에서의 말초혈액내 호중구 증가는 내독소를 투여하고 수시간 이내에 호중구의 감소가 관찰되는 양과 돼지를 대상으로 한 실험결과와는 차이를 보이고 있다<sup>16,24,25)</sup>. 이것은 실험동물에 따른 차이인지 확실치는 않지만 본 연구에서 DMTU가 백혈구와 호중구수의 변화에 영향을 미치지 않는 것은 다른 연구결과와 일치한다<sup>19,20)</sup>.

본 연구에서는 내독소 투여만으로 24시간 후 기관지폐포세척액에서 호중구가 의미있게 증가하고 병리조직학적 소견에서도 폐간질과 폐포내에 호중구의 침윤이 관찰

되었으나 Webster 등의 연구에 의하면 C5a, cobra venom factor 또는 zymosan으로 활성화시킨 혈장 (zymosan-activated plasma)만으로는 토끼의 기관지폐포세척액내에서 호중구가 증가되지 않았고, 기관지내의 추가 자극이 있을 때에만 호중구의 증가가 관찰되어 본 연구와 차이를 보여주고 있다<sup>31)</sup>. 이것은 실험동물에 의한 차이일 가능성도 완전해 배제할 수는 없으나, 본 연구에서 사용한 내독소에 기인할 가능성이 클 것으로 생각된다. 백서에 내독소를 투여하면 폐조직에서 3일 후에도 내독소가 관찰되는데 비특이적 호중구 활성화 물질과는 달리 내독소는 혈액내의 고비중지단백 (high-density lipoprotein)과 결합해서 장기간 혈중에 존재하는 특성을 가지고 있어<sup>32)</sup> 다른 호중구 활성화 물질보다 지속적으로 작용하기 때문에 추가자극이 없이도 폐조직으로 호중구의 이동을 가져올 수 있을 것으로 생각된다<sup>32,33)</sup>. 호중구가 폐포로 이동되는 기전은 첫째, 내독소가 호중구를 활성화시켜 호중구자체의 이동력을 증가시키거나 둘째, 내독소에 의해 혈중에서 생성된 활성화된 보체, 특히 C5a가 투과력이 높아 폐포내로 축적되었거나<sup>34)</sup> 셋째, 내독소에 의해 활성화된 폐포내 대식세포로부터 분비된 호중구에 대한 주화인자에 의해 호중구가 폐포내로 이동되는 세가지로 요약할 수 있다<sup>35~38)</sup>. 본 연구의 결과로는 DMTU와 DFX으로 전처치한 군에서 내독소 투여군에 비해 호중구의 침윤이 완화되지 않아 hydroxyl radical은 호중구에 대한 주화작용이 있지만 생체내에서는 여러 종류의 주화인자가 동시에 작용하기 때문에 DMTU와 DFX 전처치만으로는 호중구의 이동이 차단되지 않았을 가능성도 배제할 수는 없다.

양 등의 동물을 대상으로 한 연구에서는 내독소 투여 후 수시간만에 폐조직으로 호중구의 침윤과 함께 혈력학적 지표의 변화와 폐부종이 관찰되어<sup>24,39~41)</sup> 급성 폐손상의 병인론에서 폐조직으로 이동된 호중구가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 그러나 본 연구에 의하면 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에서 폐포-모세혈관 투과성의 증가와 폐조직으로의 호중구 침윤은 시간적인 차이를 보이고 있다. 즉, 호중구가 폐조직으로 이동되기 전에 폐포-모세혈관 투과성의 증가가 관찰되고 호중구의 침윤이 관찰된 때에는 폐포-모세혈관 투과성이 정상화되어 폐조직으로 이동된 호중구가 폐포-모세혈관 투과성 증가에 큰 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. 내독소는 폐포내 대식세포에서 산소기를 포함한 여러 종류



의 염증매개성 물질을 분비시키고 혈관내피세포에서도 산소기의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있어<sup>42-44)</sup> 본 연구에서 폐포-모세혈관 투과성의 증가와 폐조직으로의 호중구 침윤이 시간적인 차이를 보이는 것은, 본 연구의 결과만으로 결론을 지을 수는 없지만, 백서에서는 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 호중구에서 분비된 산소기보다는 폐포내대식세포와 혈관내피세포에서 분비되는 산소기가 주로 관여할 것으로 생각된다. 이러한 차이가 실험동물의 차이에 기인하는 것인지 또는 밝혀지지 않은 다른 기전이 있는 것인지를 규명하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경** : 급성 폐손상의 기전에 관한 연구는 많이 진행되어 있으나 아직 확실한 결론을 내리기에는 미흡한 실정이다. 최근에 산소기의 병인론적 역할에 관한 관심이 고조되고 있으나 이것도 아직 확실히 규명되지 못한 실정이고 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에 관해서는 경험이 일천한 상태이다. 이에 저자들은 백서에서 내독소투여 후 시간경과에 따른 폐포내 호중구 침윤과 폐포-모세혈관 투과성의 변화를 관찰하고 hydroxyl radical 탐식제인 DMTU와 hydroxyl radical 형성에 중요한 역할을 하는 철분제거제인 DFX 전처치가 이에 미치는 영향을 관찰하여 hydroxyl radical이 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에서 호중구의 이동과 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

**방법** : 50마리의 백서를 대조군(n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), 내독소투여군(n=10, 6hrs; n=10 24hrs), DMTU 전처치군(n=10, 6hrs)과 DFX 전처치군(n=10, 6hrs)으로 나누어 희생하기 30분전에 <sup>125</sup>I을 붙인 bovine serum albumin을 꼬리 정맥에 주사하였다. 내독소를 투여하고 6시간과 24시간이 경과한 후 백서를 희생시켜서 폐조직과 말초혈액 1 ml의 방사능을 측정하여 이 둘의 비를 폐포-모세혈관 투과성의 지표로 사용하였다. 다른 52마리의 백서를 위와 같이 4개의 군으로 나누어 [대조군(n=5, 6hrs; n=5, 24hrs), 내독소투여군(n=7, 6hrs; n=8, 24hrs), DMTU 전처치군(n=6, 6hrs; n=9, 24hrs)과 DFX 전처치군(n=5, 6hrs; n=7, 24hrs)] 내독소를 투여하고 6시간과 24시간이 경과한

후 희생시켜 말초혈액과 기관지폐포세척액의 구성세포와 폐의 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

**결과** : 내독소를 투여하고 6시간이 경과한 후 폐포-모세혈관 투과성이 증가되었다가 24시간이 경과한 후 정상 대조군 수준으로 회복되는 양상을 보였는데 6시간만에 증가된 폐포-모세혈관 투과성 증가는 DMTU와 DFX 전처치로 유의하게 완화되었다. 폐조직으로의 호중구 침윤은 내독소를 투여하고 24시간이 경과한 후 관찰되었는데 이는 DMTU와 DFX 전처치로 완화되지 않았다.

**결론** : 이상의 결과로 내독소에 의한 백서의 급성 폐손상에서 hydroxyl radical은 호중구의 이동에는 관여하지 않을 것으로 생각되며 주로 폐포-모세혈관 투과성 증가에 관여할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Ratliff NB, Wilson JW, Mikat E, Hackel DB, Graham TC: The lung in hemorrhagic shock IV. The role of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Am J Pathol* 65:325, 1971
- 2) Bachofen M, Weibel ER: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116:589, 1977
- 3) Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* 304:192, 1981
- 4) Fowler AA, Walchak S, Giclas PC, Henson PH, Hyers TM: Characterization of antiproteinase activity in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 81(suppl):50S, 1982
- 5) McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, Cochrane CG: Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 69:543, 1982
- 6) Johnson A, Malik AB: Effect of granulocytopenia on extravascular lung water content after microembolization. *Am Rev Respir Dis* 122:561, 1980
- 7) Shasby 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
- 8) Raj JU, Hazinski TA, Bland RD: Oxygen-induced lung microvascular injury in neutropenic rabbits

- and lambs. *J Appl Physiol* 58:921, 1985
- 9) Shasby DM, VanBenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurtry I, Repine JE: Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 125:443, 1982
  - 10) Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 16:397, 1982
  - 11) Tate RM, VanBenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE: Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 126:802, 1982
  - 12) Fox RB: Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. *J Clin Invest* 74:1456, 1984
  - 13) Rinaldo JE, Rogers R: Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 306: 900, 1982
  - 14) Newman JH: Sepsis and pulmonary edema. *Clin Chest Med* 6:371, 1985
  - 15) Heflin AC, Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68:1253, 1981
  - 16) Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL: Effects of N-acetylcystein on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J Clin Invest* 73:1772, 1984
  - 17) Traber DL, Adams T Jr, Sziebert L, Stein M, Traber L: Potentiation of lung vascular responses to endotoxin by superoxide dismutase. *J Appl Physiol* 58:1005, 1985
  - 18) Olson NC, Grizzle MK, Anderson DL: Effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase and catalase on endotoxemia in pigs. *J Appl Physiol* 63:1526, 1987
  - 19) Olson NC, Anderson MK, Grizzle MK: Dimethylthiourea attenuates endotoxin-induced acute respiratory failure in pigs. *J Appl Physiol* 63:2426, 1987
  - 20) Wong C, Fox R, Demling RH: Effect of hydroxyl radical scavenging on endotoxin-induced lung injury. *Surgery* 97:300, 1985
  - 21) Stevens JH, Rafflin AA: Adult respiratory distress syndrome: etiology and mechanisms. *Postgrad Med J* 60:305, 1984
  - 22) Modig J: Adult respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Acta Chir Scand* 152:241, 1986
  - 23) Staub N, Bland R, Brigham K, Demling R, Erdmann J, Wooverton W: Preparation of chronic lung lymph fistulas in sheep. *J Surg Res* 19:315, 1975
  - 24) Brigham KL, Bowers RE, Hynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by E. coli endotoxin. *Cir Res* 45:292, 1979
  - 25) Demling RH, Lalonde C, Jin L, Ryan P, Fox R: Endotoxemia causes increased lung tissue lipid peroxidation in unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* 60:2094, 1986
  - 26) Milligan SA, Hoefel JM, Goldstein IM, Flick MR: Effect of catalase on endotoxin-induced acute lung injury in unanesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* 137:420, 1988
  - 27) Olson NC, Brown TT Jr, Anderson L: Dexamethasone and indomethacin modify endotoxin-induced respiratory failure in pigs. *J Appl Physiol* 58:274, 1985
  - 28) Dehring DJ, Wismar BL: Chapter 5, Animal models of sepsis, In Staub NC (Ed.) *The pulmonary intravascular macrophage*, p 79, Mount Kisco, NY, Futura Publishing Company, Inc. 1989
  - 29) Chang JC, Lesser M: Quantitation of leukocytes in bronchoalveolar lavage samples from rats after intravascular injection of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 129:72, 1984
  - 30) Rinaldo JE, Dauber JH, Christman J, Rogers RM: Neutrophil alveolitis following endotoxemia: enhancement by previous exposure to hyperoxia. *Am Rev Respir Dis* 130:1065, 1984
  - 31) Webster RO, Larsen GL, Mitchell BC, Goins AJ, Henson PM: Absence of inflammatory lung injury in rabbits challenged intravascularly with complement-derived chemotactic factors. *Am Rev Respir Dis* 125:335, 1982
  - 32) Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB: New function for high density lipoproteins; their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest* 64:1516, 1979
  - 33) Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C: Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Pathol* 63:56, 1982
  - 34) Larsen GL, McCarthy K, Webster RO, Henson J,

- Henson PM: A differential effect of C5a and C5a des arg in the induction of pulmonary inflammation. *Am J Pathol* **100**:179, 1980
- 35) Kazmierowski JA, Gallin JI, Reynolds HY: Mechanism for the inflammatory response in primate lungs: demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **59**:273, 1977
  - 36) Hunninghake GW, Gallin JI, Fauci AS: Immunologic reactivity of the lung: The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* **117**: 15, 1978
  - 37) Harada RN, Bowman CM, Fox RB, Repine JE: Alveolar macrophage secretions: inhibitors of inflammation in pulmonary oxygen toxicity. *Chest* **81**(Suppl):52S, 1982
  - 38) Fox RB, Hoidal JR, Brown DM, Repine JE: Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes. *Am Rev Respir Dis* **123**:521, 1981
  - 39) Goodman ML, Way BA, Irwin JW: The inflammatory response to endotoxin. *J Pathol* **128**:7, 1979
  - 40) McCaffree DR, Gray BA, Pennock BE, Coalson J, Bridges C, Taylor FB, Rogers RM: Role of pulmonary edema in the acute pulmonary response to sepsis. *J Appl Physiol* **50**:1198, 1981
  - 41) Esbenshade AM, Newman JH, Lamis PM, Jolles H, Brigham KL: Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol* **53**:967, 1982
  - 42) Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, Gajdusek CM, Schwartz SM, Striker GE: Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest* **48**:269, 1983
  - 43) Brigham KL, Meyrick BO: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* **133**:913, 1986
  - 44) Meyrick BO, Ryan US, Brigham KL: Direct effect of *E. coli* endotoxin on structure and the endothelial layer of intimal implants. *Am J Pathol* **122**:140, 1986