

기관지천식환자에서 다형핵구의 과산화 음이온 생성능이 폐포세포 손상에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

김 영 균 · 박 성 학

= Abstract =

The Effect of Superoxide Anion Production by PMN on Pneumocyte Injury in Patients with Bronchial Asthma

Young Kyoon Kim, M.D.* and Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background : Bronchial asthma has been known as an inflammatory disease. There have been many evidences that polymorphonuclear leukocytes (PMN) might play an important role in the pathogenesis of asthma. Although many investigators suggested that pneumocyte injury by PMN-derived oxygen radicals may contribute to the pathogenesis of asthma, there has been few report for a direct evidence of oxygen radicals-mediated pneumocyte injury in bronchial asthma. Furthermore the exact mechanism of oxygen radicals-mediated pneumocyte injury is still controversy. This study was designed to establish a direct *in vitro* evidence and its clinical significance of pneumocyte injury by PMN-derived superoxide anion in bronchial asthma and to elucidate the main mechanism of superoxide anion-mediated pneumocyte injury.

Methods : 12 stable asthmatics and 5 healthy volunteers were participated in this study. PMN was separated from peripheral venous blood samples by using dextran sedimentation and Ficoll-Hypaque density gradient separation method. Superoxide anion productions by PMN and plasma SOD activities were measured by spectrophotometric assay using the principle of SOD inhibitable cytochrome c reduction. PMN-mediated pneumocyte injuries were measured by ⁵¹Cr-release assay using A549 pneumocytes and were expressed as percent lysis and percent detachment.

Results :

- 1) PMN from asthmatics produced more amount of superoxide anion compared to PMN from normal subjects (6.65 ± 0.58 vs 2.81 ± 0.95 nmol/ 1×10^6 cells, $p < 0.05$), and showed an inverse correlation with FEV₁ ($R = -0.63$, $p < 0.05$), but no correlation with PC₂₀ histamine in asthmatics.
- 2) Plasma SOD activities were decreased in asthmatics compared to normal subjects but not significant, and showed a positive correlation with FEV₁ ($R = 0.63$, $p < 0.05$) but no correlation with PC₂₀ histamine in asthmatics.
- 3) There were a positive correlation between plasma SOD activity and superoxide anion production by PMN in normal subjects ($R = 0.88$, $p < 0.05$) but not in asthmatics.
- 4) PMN-mediated pneumocyte injury was predominantly expressed as cell detachment rather than

*본 연구는 1992년도 결핵 및 호흡기학회 연구비 보조로 이루어 졌으며, 본 논문의 내용은 1993년도 결핵 및 호흡기학회 춘계학술대회에서 지정 연구과제로 발표 되었음.

cell lysis in both groups, and PMN from asthmatics showed more potent cytotoxic effect on A549 pneumocytes compared to PMN from normal subjects. PMN-mediated detachment rather than lysis of A549 pneumocytes was significantly inhibited by *in vitro* SOD but not by diluted serum.

5) PMN-mediated detachment rather than lysis of A549 pneumocytes showed a good correlation with superoxide anion production by PMN ($R=0.90$ in normal subjects, $R=0.82$ in asthmatics, $p < 0.05$) but no correlation with plasma SOD activity. PMN-mediated pneumocyte injuries were not correlated with FEV_1 or PC_{20} histamine in asthmatics.

6) There were no significant differences in PMN-mediated pneumocyte injuries between allergic and nonallergic asthmatics.

Conclusion : Our results suggest that pneumocyte injury by PMN-derived superoxide anion may partially contribute to the pathogenesis of asthma and that cell detachment rather than cell lysis may be the mechanism of superoxide anion-mediated pneumocyte injury.

Key Words: PMN, Superoxide, Pneumocyte injury, Asthma

서 론

다형핵구는 호흡기를 침범하는 미생물이나 이물질 등을 파괴 또는 탐식함으로써, 이들로부터 폐조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 한편, 방어기전을 수행하는 과정에서 발생하는 독성 산화물들이나 다양한 단백분해 효소들에 의해 오히려 기도 상피세포 및 폐포세포의 손상을 초래할 수도 있다¹⁾. 다형핵구에 의한 독성 산화물의 생성 혹은 단백분해 효소의 분비는 다형핵구를 활성화시키는 어떠한 자극에 의해서도 일어날 수 있으며, 실제로 이러한 다형핵구의 작용이 폐기종, 성인형 호흡부전 증후군, 간질성 폐질환 등의 여러 폐질환의 병태생리에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁻⁴⁾. 한편 기관지천식의 병태생리에 있어서도, 최근에는 호산구나 호중구 등의 다형핵구들에 의한 일련의 "염증반응"이 중요한 기전으로 작용한다는 학설이 대두되고 있다⁵⁾. 염증반응에 의한 기전은 만성 기관지천식의 병태생리를 설명하는데 많은 도움을 주고 있으나, 실제로 염증세포들 각각의 기능 및 상호작용에 대해서는 아직 불확실한 점이 많으며, 현재도 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다. 한편 기관지천식환자의 다형핵구는 정상인과는 달리 활성화되어 있어서, 염증매개물질 분비능이나 독성 산화물 생성능이 높다고 알려져 있으며, 이러한 염증 매개물질 및 독성 산화물들에 의해 기도 및 폐조직손상이 야기되어 기관지 과민반응이 나타나는 것으로 추측되고 있다⁶⁾. 이 중에서도 특히 독성 산화물들의 역할에 관한 보고들이 많이 있었으나, 실제 기관지 천식환자의 다형핵구를 가지고 이를 확인한 실질적인 증거가 부족할 뿐 아니라, 독성산화

물들이 어떠한 기전으로 기도 혹은 폐조직손상을 유발시키는지에 대해서도 아직 불확실한 실정이다. 이에 저자들은 기관지천식환자들의 다형핵구에 의해 발생하는 과산화 음이온(superoxide anion)이 실제로 폐포세포 손상에 직접적인 영향을 미치는지 여부와 만약 직접적인 영향을 미친다면 주로 어떤 기전으로 폐포세포 손상을 초래하는지를 관찰함으로써, 다형핵구와 관련된 기관지천식의 병태생리를 이해하는데 도움을 주고자 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

FEV_1 이 예측치의 70% 이상되는 기관지천식환자 12명(남자 10명, 여자 2명, 평균연령 41.3세)과 건강한 비흡연자 5명(남자 3명, 여자 2명, 평균연령 24.5세)을 대상으로 하였다. 최근 2주 이내에 부신피질호르몬 등의 항염제를 사용한적이 있거나, 호흡기 감염등이 있었던 환자 및 흡연한 적이 있는 환자들은 대상에서 제외시켰다.

2. 방 법

1) 다형핵구 분리

Heparin 처리한 말초정맥혈 40ml로부터 dextran 침강법 및 Ficoll-Hypaque 밀도차 분리법을 사용하여 분리하였다⁶⁾. 세포들의 생존능(viability)은 trypan blue exclusion 검사상 95% 이상이었다.

2) 다형핵구의 과산화 음이온 생성능 측정

과산화 음이온이 cytochrome c를 환원시켜 나타나는

발색반응을 이용하여 측정하였다⁷⁾. 요약하면, 위에서 분리한 다형핵구 현탁액 (1.25×10^6 cells/ml) 0.8 ml 씩을 두개의 Effendorf tube에 각각 넣고, 그중 한 tube에는 superoxide dismutase (SOD) 30 $\mu\text{g/ml}$ 를, 나머지 한 tube에는 Hank's balanced salt solution (HBSS)를 각각 첨가하여 37°C 수액조에서 3분간 배양한 후, 각 tube에 phorbol myristate acetate (PMA) 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 와 cytochrome c 3 mg/ml를 넣고 다시 37°C 수액조에서 20분간 배양하였다. 다음에는 각 tube를 6500 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 각 tube의 상층액만을 취하여 1 ml cuvette에 담아서 분광측정기로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다형핵구의 과산화 음이온 생성능은 [(각 sample의 흡광도 - SOD를 첨가한 blank의 흡광도) $\times 21.1$].의 공식에 의해 $\text{nmol}/1 \times 10^6$ cells로 표시하였다 (21.1은 cytochrome c의 extinction coefficient에 해당함).

3) 혈장 SOD 활성도 측정

McCord 등의 방법을 다소 변형하여 측정하였다⁸⁾. 요약하면 우선 0.1 mM EDTA를 함유하는 50 mM Xanthine 0.3 ml, 0.1 mM cytochrome c 0.3 ml를 혼합하여 표준시약을 만들었다. 그다음 상기 표준시약에 xanthine oxidase를 첨가하여 분광측정기로 550 nm에서 scanning하였을 때 흡광도의 증가율이 분당 0.02가 되도록 xanthine oxidase의 희석배수를 정하였다. 다음에는 상기 표준시약에 100배 희석된 각 대상자들의 혈장 1.0 ml와 희석된 xanthine oxidase 0.1 ml를 첨가하여 분광측정기로 550 nm에서 3분간 scanning하여 흡광도의 증가율을 관찰하였다. 혈장 SOD 활성도는 cytochrome c 환원을 50%까지 억제시키는 효소의 양을 1 unit로 하여 units/mg protein으로 환산하였다. 혈장내 단백질 농도는 Pierce사의 Coomassie Plus Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다.

4) 폐포세포 준비

American Type Tissue Culture Collection으로부터 구입한 human A549 폐포세포를 MEM (minimal essential medium)으로 배양하여, 96 well microtiter plate에 well당 세포수가 1×10^5 이 되도록 분주한 후, 5% CO₂/Air incubator에서 37°C로 overnight incubation하였다. 그다음 well당 2 μCi 의 sodium [⁵¹Cr] chromate를 첨가하고 5% CO₂/Air incubator에서 37°C로 다시 overnight incubation한 후, MEM으로 3

회 세척하여 얻은 ⁵¹Cr-labeled A549 폐포세포를 표적 세포로 이용하였다.

5) 폐포세포 손상의 측정

⁵¹Cr-labeled A549 폐포세포가 부착되어 있는 96 well중 test well에는 작동세포와 표적세포의 비가 1:1이 되도록 다형핵구 현탁액 (1×10^5 /well)을 분주하고, control well에는 다형핵구대신 MEM을, maximum release well에는 다형핵구대신 1% Triton-X 100을 각각 분주하였으며, test well은 다시 MEM 전처치군, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ PMA 전처치군, 25 $\mu\text{g/ml}$ SOD 전처치군, 5% serum 전처치군으로 각각 나누어 관찰하였다. 각각의 경우 최종 용적은 well당 200 μl 가 되도록 조절하였다. 다음에는 폐포세포의 용해정도 (% lysis)를 측정하기 위해, 각 plate들을 5% CO₂/Air incubator에서 37°C로 3시간 배양한 후, 2000 rpm 10분간 원심분리하여 그 상층액 100 μl 씩을 test tube에 옮겨담아서 gamma counter로 gamma emission을 측정하였다. 이때 폐포세포 용해정도는 [(cpm Test - cpm Control)] / [(cpm Maximum - cpm Control)] $\times 100$ 으로 계산하였다. 다음에는 폐포세포 탈락정도 (% detachment)를 측정하기 위해 각 plate들을 MEM으로 3회 다시 세척하고, 마지막까지 부착되어 있는 A549 폐포세포들을 1% Triton-X 100으로 완전히 용해시켜서, 그 용해액 100 μl 씩을 test tube에 옮겨담아서 폐포세포 용해 측정때와 마찬가지로 gamma emission을 측정하였다. 이때 폐포세포 탈락정도는 [(cpm retained in Control - cpm retained in Test) / cpm retained in Control] $\times 100$ 으로 계산하였다. 측정은 sample당 3회를 동시에 시행하여 그 평균값을 자료로 택하였다.

6) 분석 및 통계

우선 정상인과 기관지천식환자간에 다형핵구의 과산화 음이온 생성능, 혈장 SOD 활성도 및 폐포세포 손상 정도의 차이가 있는지를 관찰한 후, 각 대상군에서 이들 상호간의 상관관계는 어떤 차이를 나타내는지를 관찰하였다. 또한 다형핵구에 의한 폐포세포 손상을 세포용해와 세포탈락 두가지 측면에서 관찰하여 어떤 형태의 손상이 더 많이 나타나는지를 비교하였으며, 이들 각각에 대해 기관지천식환자들의 폐기능 및 기관지과민반응과는 어떤 상관관계를 가지는지에 대해서도 관찰하였다. 다음에는 다형핵구에 의한 폐포세포 손상이 SOD나 혈장에 의해서는 어떤 영향을 받는지를 관찰하였다. 각 경

Table 1. Clinical Profiles of Asthmatics

Case No.	Sex/Age	Skin Test	FEV1	FVC	FEV1/FVC	PC20H	IgE	TEC
1	F/16	DP, DF, HD	77	82	89	6.2	450	308
2	M/25	DP, DF, HD	77	95	80	0.07	600	187
3	M/23	DP, DF, HD	91	83	110	1.9	700	429
4	M/19	DP, DF, HD	97	99	120	6.9	600	330
5	M/65	DP, DF, HD	78	71	82	3.5	900	154
6	M/20	HD	96	92	106	2.8	500	160
7	M/62	N	77	70	83	4.7	220	187
8	M/59	N	76	73	84	8.2	90	220
9	F/58	N	66	73	89	7.8	200	275
10	M/60	N	75	85	87	9.8	44	143
11	M/67	N	92	96	104	5.4	330	275
12	M/22	N	99	88	92	1.3	250	33

DP = D. Pteronyssinus, DF = D. Farinae, HD = House Dust, N = Negative, PC20H = Provocation Concentration of Histamine (mg/ml), TEC = Total Eosinophil Count (/ml), IgE : IU/ml, FEV1, FVC, FEV1/FVC : % of Predicted Value.

Table 2. Comparison of Superoxide Anion Production by PMN and Plasma SOD Activity between Normals and Asthmatics

	Superoxide Anion Production by PMN	Plasma SOD Activity
Normals	2.81 ± 0.95	5.12 ± 1.23
Asthmatics	*6.65 ± 0.58	2.85 ± 0.58
Allergic	5.87 ± 1.92	3.26 ± 1.01
Non-allergic	7.43 ± 2.44	2.44 ± 0.66

Data : Mean ± SEM.

Superoxide anion : nmol/1x10⁶ PMNs.

SOD : units/mg protein.

* p < 0.05 compared to normals.

우에 대한 통계적 의의는 paired 혹은 unpaired Student's *t*-test로 검정하여 P값 0.05 이하를 유의수준으로 하였다.

결 과

1) 기관지천식환자중 6명은 알레르기 피부반응 검사에서 집먼저 진드기 및 집먼저에 대해 한가지 이상 양성을 나타냈으며, 나머지 6명은 음성이었다. 임상적으로 알레르기성 천식 환자와 비알레르기성 천식환자는 폐기

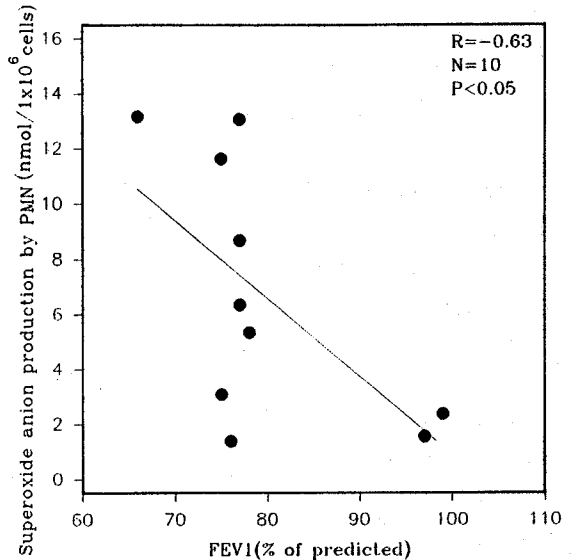


Fig. 1. Correlation between superoxide anion production by PMN and FEV₁ in asthmatics.

하, 비특이성 기관지과민반응 및 혈중 호산구수에는 차이가 없었으며, 혈청 IgE는 알레르기성 천식환자군에서 다소 높은 분포를 보였다(Table 1).

2) 다형핵구의 과산화 음이온 생성능은 정상군 (2.81 ± 0.95 nmol/1x10⁶ cells)에 비해 천식환자군 (6.65 ± 0.58 nmol/1x10⁶ cells)에서 현저히 높았으

며 ($p < 0.05$, Table 2), 각 환자의 FEV₁과는 역상관관계를 보였으나 ($R = -0.63$, $p < 0.05$, Fig. 1) PC₂₀ histamine과는 상관관계가 없었다.

3) 혈장 SOD 활성도는 천식환자군이 정상군에 비해 다소 감소되어 있는 경향을 보였으나 통계적 의미는 없

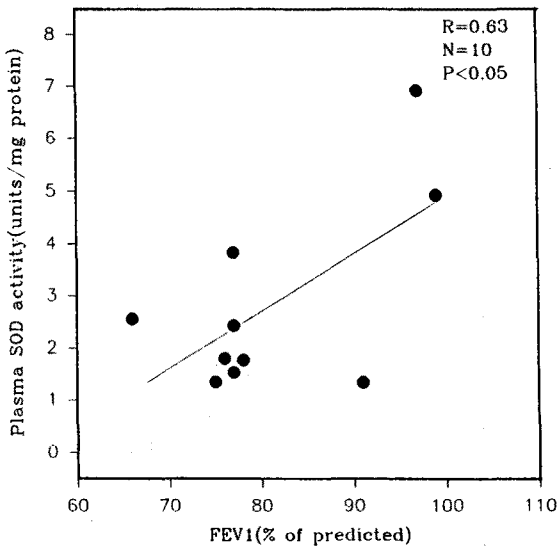


Fig. 2. Correlation between plasma SOD activity and FEV₁ in asthmatics.

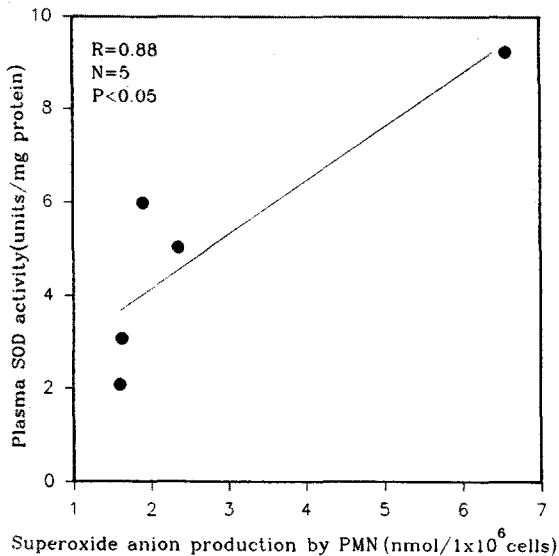


Fig. 3. Correlation between superoxide anion production by PMN and plasma SOD activity in normals.

었으며 (Table 2), 각 환자의 FEV₁과는 직상관관계를 보였으나 ($R = 0.63$, $p < 0.05$, Fig. 2) PC₂₀ histamine과는 상관관계가 없었다.

4) 정상군에서는 혈장 SOD 활성도와 다형핵구의 과산화음이온 생성능간에 의미있는 상관관계를 보였으나 ($R = 0.88$, $p < 0.05$, Fig. 3), 천식환자군에서는 상관관계가 없었다 (Fig. 4).

5) 두군 모두에서 실험조건에 상관없이 다형핵구에 의한 A549 폐포세포의 손상형태가 세포용해 (A549 lysis) 보다는 세포탈락 (A549 detachment)이 더욱 현저한 경향을 보였으며, SOD로 전처치한 경우의 A549 lysis와 혈청으로 전처치한 경우의 A549 detachment만을 제외하고는 모두 천식환자군에서 높은 경향을 보였다. 또한 두군 모두에서 SOD 전처치에 의해 A549 detachment는 현저하게 억제되었으나 A549 lysis는 억제되지 않았으며, 두가지 모두가 혈청 전처치에 의해서 억제되지 않았다 (Table 3).

6) 두군 모두에서 다형핵구의 과산화 음이온 생성능과 A549 detachment와는 유의한 상관관계가 있었으나 (정상군: $R = 0.90$, 환자군: $R = 0.82$, $p < 0.05$, Fig. 5, Fig. 6), A549 lysis와는 별로 상관관계가 없었으며, 혈장 SOD 활성도는 두가지 모두와 상관관계를 보이지 않았다. 또한 천식환자군에서 A549 lysis나

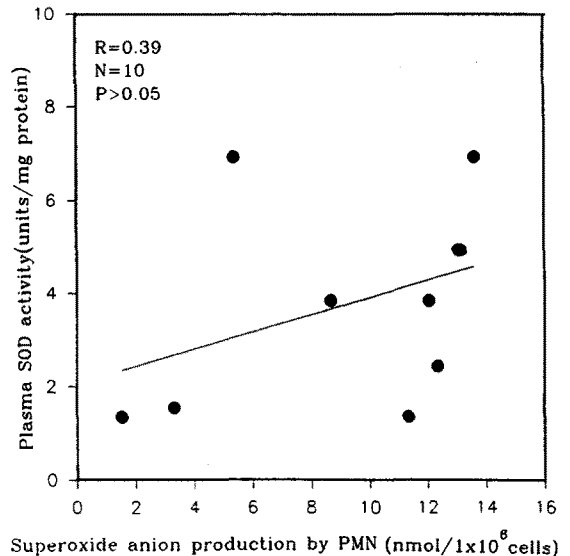


Fig. 4. Correlation between superoxide anion production by PMN and plasma SOD activity in asthmatics.

Table 3. Comparison of PMN-Mediated Pneumocyte Injury in Each Experimental Condition between Normals and Asthmatics

Condition	Normals		Asthmatics	
	% Lysis	% Detach	% Lysis	% Detach
MEM only	4.79 ± 2.49	22.41 ± 2.18	7.21 ± 0.91	25.60 ± 3.22
PMA only	8.48 ± 1.86	25.95 ± 1.63	9.21 ± 1.26	29.57 ± 2.90
SOD + PMA	8.12 ± 2.94	*19.35 ± 2.25	8.10 ± 1.63	*21.01 ± 2.15
NHS + PMA	10.09 ± 3.46	26.02 ± 2.03	8.69 ± 1.81	24.31 ± 2.78

Data : Mean ± SEM.

Target cell (A549 pneumocytes) : Effector cells (PMN) = 1 : 1 (1×10^5 cells).

MEM : Media, PMA : 1.0 $\mu\text{g/ml}$ SOD : 25 $\mu\text{g/ml}$, NHS : 5% human serum, Incubation Time : 3 hours.

* $p < 0.05$ compared to MEM only and PMA only.

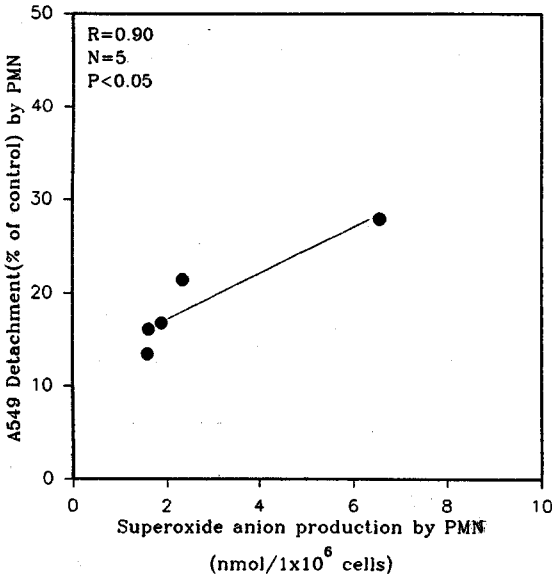


Fig. 5. Correlation between A549 detachment and superoxide anion production by PMN in normals.

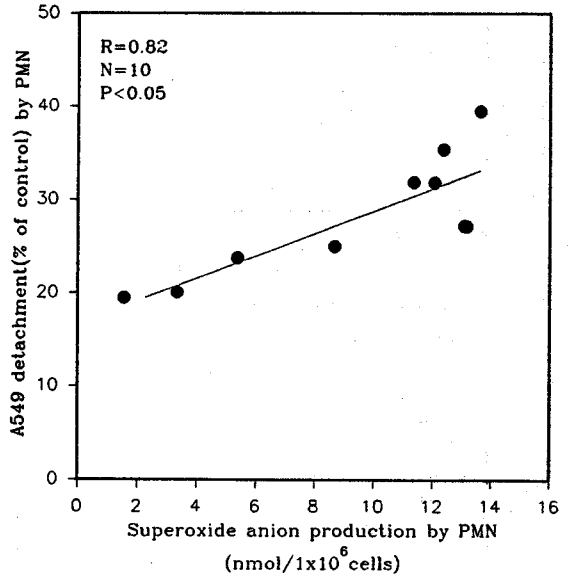


Fig. 6. Correlation between superoxide anion production and A549 detachment by PMN in asthmatics.

A549 detachment은 각 환자의 FEV₁ 또는 PC₂₀ histamine과는 의미있는 상관관계를 보이지 않았다.

7) 다형핵구에 의한 폐포손상의 양상에 있어서 알레르기성 천식환자군과 비알레르기성 천식환자군 사이의 의미있는 차이는 발견할 수 없었다 (Table 4).

고 찰

기관지천식은 매우 복잡한 병인에 의해 발생하는 일종

의 염증성 질환으로 알려져 있다. 따라서 호산구나 호중구 등의 다형핵구들이 기관지천식의 병태생리에 매우 중요한 역할을 하며, 이들 다형핵구에 의한 기도 및 폐조직손상이 가장 중요한 병인으로 여겨지고 있다⁵⁾. 다형핵구가 폐조직손상에 중요한 역할을 한다는 증거로는, 약물치치료 말초혈액내 백혈구를 소멸시킨 동물에서의 실험적 폐부종이 유발되지 않으며, 혈관 내피세포 혹은 폐포세포를 다형핵구와 함께 배양하면 혈관 내피세포 혹은 폐포세포가 손상된다는 보고등을 들 수 있다^{4,9-13)}.

Table 4. Comparison of PMN-Mediated Pneumocyte Injury in Each Experimental Condition between Allergic and Non-Allergic Asthmatics

Condition	Allergic Asthmatics		Non-allergic Asthmatics	
	% Lysis	% Detach	% Lysis	% Detach
MEM only	6.95 ± 1.42	27.91 ± 1.17	6.64 ± 1.71	25.02 ± 2.11
PMA only	9.70 ± 2.08	28.55 ± 2.42	7.89 ± 2.14	27.91 ± 3.51
SOD + PMA	9.94 ± 2.98	*22.76 ± 1.05	6.10 ± 1.35	*21.84 ± 1.01
NHS + PMA	10.11 ± 3.35	26.30 ± 3.60	7.10 ± 1.68	25.72 ± 5.42

Data : Mean ± SEM.

Target cell (A549 pneumocytes) : Effector cells (PMN) = 1 : 1 (1×10⁵ cells).

MEM : Media, PMA : 1.0 µg/ml SOD : 25 µg/ml, NHS : 5% human serum, Incubation Time : 3 hours.

* p < 0.05 compared to MEM or PMA only.

그러나 중전의 연구등에서 사용한 다형핵구는 대개가 동물들의 다형핵구였거나 정상인의 다형핵구였다. 이에 반해 본 연구는 다형핵구에 의한 폐포세포 손상정도가 기관지천식환자의 다형핵구와 정상인의 다형핵구간에 어떤 차이를 보이는지 관찰하였다는 점에서 우선 의미가 있다고 생각된다. 그 결과 기관지천식환자의 다형핵구는 정상인의 다형핵구에 비해 전반적으로 폐포세포에 대한 세포독성작용이 더욱 강한 경향을 보였는데, 이는 다형핵구에 의한 기도 및 폐조직 손상이 기관지천식의 병인에 부분적으로 관여할 것이라는 간접적인 소견으로 생각된다. 다형핵구가 폐포손상을 일으키는 주된 기전에 대해서는 아직 논란이 있으나 크게 두가지 기전으로 설명되고 있는데, 그중 하나는 독성산화물 매개성 세포독성작용이고 다른 하나는 과립단백 매개성 세포독성작용이다. 이 두가지 기전중 어떤 기전이 더 중요한 기전인지에 대해서는 아직 불확실한데, 과거에는 주로 독성산화물 매개성 세포독성작용이 중요시 되었으나 최근에는 과립단백 매개성 세포독성작용이 더 중요한 기전으로 작용한다는 보고들이 나오고 있다¹⁴⁾. 하지만 최근 과립단백 매개성 세포독성작용 역시 독성산화물에 의해 더욱 상승된다는 보고가 있었고¹⁴⁾, 본 연구에서도 다형핵구에 의한 폐포세포 손상이 SOD에 의해서는 억제되지만 혈청에 의해서는 그다지 억제되지 않았던 점으로 보아, 아직은 독성산화물 매개성 세포독성작용이 폐포세포 손상의 주된 기전이 아닌가 추측된다. 더구나 기관지천식환자에서 과립단백 매개성 세포독성작용에 대해서는 아직 동물실험 및 임상연구가 거의 없는데 비해, 독성산화물 매개성 세포독성작용에 대해서는 이를 뒷받침하는 동

물실험 및 임상연구가 최근까지 나오고 있다¹⁵⁾. 특히 기관지천식의 경우에는 다형핵구의 폐조직에 대한 독성산화물 매개성 세포독성작용이 실제 임상소견과도 상호관련성이 있는 것으로 알려져 있다. 이를 뒷받침하는 증거로는 알레르기성 기관지천식환자들에게 알레르겐 기관지유발검사를 시행하면, 후기 천식반응시 기관지 폐포세포액내에 다형핵구수가 증가할 뿐아니라, 유발검사 후의 기관지폐포세척액내 세포들이 유발검사전의 기관지폐포세척액내 세포들에 비해 독성산화물 생성능이 현저히 증가되어 있다는 보고가 있으며¹⁶⁾, 야간에 천식증상이 심해지는 환자들은 그렇지 않은 환자에 비해 기관지 폐포세포액내 세포들의 과산화음이온 생성능이 증가되어 있을 뿐아니라, 야간 천식발작시의 기관지폐포세포액내 세포들이 정상시의 기관지폐포세척액내 세포들에 비해 과산화 음이온 생성능이 현저하게 증가되어 있다는 보고등을 들수 있다¹⁷⁾. 또한 저자들도 알레르기성 기관지천식환자들에게 알레르겐 기관지유발검사를 시행하였을때 후기천식반응 전후로 말초혈액 다형핵구에 의한 과산화음이온 생성능 및 폐포세포 손상정도가 현저히 증가됨을 관찰한 바 있으며¹⁸⁻¹⁹⁾. 본 연구에서도 기관지천식환자들의 다형핵구는 정상인에 비해 과산화음이온 생성능이 현저하게 높았을뿐 아니라, 과산화음이온 생성능은 환자의 폐기능(FEV₁)과 역상관관계를 나타냈으며 폐포세포 손상정도와는 직상관관계를 보여 주었다. 이러한 연구결과들은 다형핵구로부터 생성되는 과산화 음이온에 의한 기도 및 폐조직 손상이 기관지천식의 병인과 밀접한 관련이 있음을 시사하는 소견들이라 할 수 있겠다. 본 연구에서 또 한가지 흥미로웠던 점은,

정상인에서는 다형핵구에 의한 과산화 음이온 생성이 증가함에 따라 이에 대한 방어기전인 혈장 SOD 활성화도 증가되는 직상관관계를 나타냈으나 기관지천식환자에서는 이러한 상관관계가 부족했을 뿐 아니라, 혈장 SOD 활성화도가 다형핵구에 의한 폐포세포 손상 정도와는 상관관계를 보이지 않았음에도 불구하고 혈장 SOD가 높았던 환자들 폐기능이 좋았다는 점이다. 이는 곧 독성산화물에 대한 항산화 방어기전의 적절한 활성화 여부가 기관지천식환자들의 폐기능 변화와 밀접한 관련이 있을 뿐 아니라, 이에 대한 불균형이 기관지천식의 병인에 부분적으로 관여할 가능성을 시사하는 소견으로 생각된다.

독성산화물들이 폐포세포 손상을 일으키는 정확한 기전에 대해서는 아직 불확실하지만, 주로 폐포세포의 세포막 지질성분을 산화시켜 세포막을 파괴시키는 lipid peroxidation 기전이 가장 중요한 것으로 알려져 있다^{20~21}). 따라서 독성산화물 매개성 세포독성작용에 대한 현재까지의 연구들은 세포용해 (cell lysis) 현상만을 주로 관찰하였다. 하지만 폐포세포는 평상시에도 지속적으로 다량의 산소에 노출되어 있으므로, 상대적으로 산소 노출량이 적은 혈관 내피세포 등에 비해 독성산화물에 대한 내성이 강하며, 특히 제2형 폐포세포는 이러한 내성이 제1형 폐포세포에 비해 더욱 강한 것으로 알려져 있다¹³). 그런데 본 연구에서 사용한 A549 폐포세포는 사람의 폐포세포암 (alveolar cell carcinoma) 으로부터 유래된 세포로서, 형태학적 및 기능적으로 제2형 폐포세포 (type II pneumocyte) 와 유사한 특성을 지니는 세포이다²²). 따라서 독성산화물에 의한 폐포세포 손상기전을 직접적인 세포용해 현상만으로는 설명이 부족하며, 그외의 다른 기전이 함께 작용할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 다형핵구에 의한 폐포세포 손상을 세포용해과 세포탈락 (cell detachment) 두가지 측면에서 관찰해본 결과, 정상인 및 기관지천식환자 모두에서 세포탈락이 세포용해보다 더 현저하였을 뿐 아니라, 다형핵구의 과산화 음이온 생성능과의 상관관계도 세포탈락이 더 의미있는 상관관계를 보였다. 이러한 결과들은 적어도 폐포세포에 대해서만은 독성산화물들의 세포독성작용이 세포용해보다는 주로 세포탈락의 형태로 나타난다는 것을 의미한다. 다형핵구로부터 생성된 과산화 음이온이 폐포세포 탈락을 일으키는 정확한 기전에 대해서는 연구가 더 필요하겠지만, 현재까지 알려진 바에 의하면 아마도 독성산화물들이 폐포세포내로 침투하여 핵산

이나 단백질합성등의 폐포세포 기능을 억제시키거나, 세포외기질 (extracellular matrix) 을 형성하는 collagen 혹은 hyaluronic acid 등의 변형을 초래하여 나타나는 현상으로 추측된다^{20~21}).

한편 기관지천식은 유발원인에 따라 크게 알레르기성 천식과 비알레르기성 천식으로 구분되는데, 이들 각각은 천식을 유발하는 기전 또한 다소 다른 것으로 알려져 있다. 그러나 알레르기성 천식환자와 비알레르기성 천식환자의 다형핵구가 각각 폐포세포에 미치는 세포독성작용이 어떤 차이를 보이는지에 대한 연구는 현재까지 없었던 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 알레르기성 환자와 비알레르기성 환자간에 각 임상양상 및 폐포세포에 대한 다형핵구의 세포독성작용의 양상에 따라 어떤 차이를 보이는지 관찰해 보았는데, 그 결과 알레르기성 환자들은 임상적으로 혈청 IgE만 비알레르기성 환자에 비해 다소 높은 경향을 보였을 뿐 폐기능, PC₂₀, histamine 및 말초혈액 호산구수등에는 차이를 보이지 않았으며, 폐포세포에 대한 다형핵구의 세포독성작용의 양상에도 의미있는 차이는 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 기관지천식의 원인과 천식유발기전이 서로 다르다 할지라도, 다형핵구에 의한 기도 및 폐조직 손상은 모든 기관지천식의 공통적인 병인으로 작용할 수도 있다는 것을 간접적으로 시사하는 소견이라 생각된다.

이상의 연구결과, 다형핵구로부터 생성되는 과산화 음이온에 의한 기도 및 폐조직 손상이 기관지천식의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 과산화 음이온은 주로 폐포세포의 탈락을 유발하여 폐포세포 손상을 초래하는 것으로 추측된다. 따라서 향후에는 기관지폐포세척액내의 다형핵구들에 대해서도 같은 연구를 하여 말초혈액 다형핵구와 어떤 차이를 보이는지 관찰해 볼 필요가 있을 것으로 생각되며, 과산화 음이온에 의한 폐포세포 탈락의 정확한 기전을 규명하기 위한 연구도 진행되어야 할 것으로 생각되는 바이다.

요 약

연구배경 : 기관지천식은 일종의 염증성 질환으로서 다형핵구가 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 다형핵구로부터 생성되는 독성산화물들은 기도 및 폐조직 손상을 야기시켜 기관지천식의 병인에 기여하는 것으로 알려져 있으나, 이에 대한 실질적인

증거가 아직 부족할 뿐 아니라 이들이 폐조직손상을 일으키는 기전 또한 불분명하다. 이에 저자들은 기관지천식환자들의 다형핵구로부터 생성되는 과산화 음이온이 실제로 폐포세포손상에 중요한 역할을 하는지 여부와 과산화 음이온이 폐포세포 손상을 일으키는 기전을 보다 명확히 하고자 본 연구를 시작하였다.

방법: 임상적으로 안정된 12명의 기관지천식환자와 5명의 정상인들을 대상으로 하였으며, 말초혈액 다형핵구는 말초혈액으로부터 dextran 침강법 및 Ficoll-Hypaque 밀도차 분리법을 이용하여 분리하였다. 다형핵구의 과산화 음이온 생성능 및 혈장 SOD 활성도는, 과산화 음이온이 cytochrome c를 환원시켜 나타나는 발색반응을 이용하여 분광측정법으로 측정하였으며, 다형핵구의 A549 폐포세포에 대한 세포독성작용은 ^{51}Cr release assay로 측정하였으며, A549 lysis 및 A549 detachment 두가지 측면에서 관찰하였다.

결과

1) 다형핵구의 과산화 음이온 생성능은 천식환자군이 정상군에 비해 현저히 높았으며 (2.81 ± 0.95 대 $6.65 \pm 0.58 \text{ mmol}/1 \times 10^6 \text{ cells}$, $p < 0.05$), 각 환자의 FEV_1 과는 역상관관계를 보였으나 ($R = -0.63$, $p < 0.05$), PC_{20} histamine과는 상관관계가 없었다.

2) 혈장 SOD 활성도는 천식환자군이 정상군에 비해 다소 감소되어 있는 경향을 보였으나 통계학적 의미는 없었으며, 각 환자의 FEV_1 과는 상관관계를 보였으나 ($R = 0.63$, $p < 0.05$) PC_{20} histamine과는 상관관계가 없었다.

3) 정상군에서는 혈장 SOD 활성도와 다형핵구의 과산화음이온 생성능간에 의미있는 상관관계를 보였으나 ($R = 0.88$, $p < 0.05$), 천식환자군에서는 상관관계가 없었다.

4) 두군 모두에서 다형핵구에 의한 A549 폐포세포의 손상형태가 lysis 보다는 detachment가 더욱 현저한 경향을 보였으며, 두가지 모두 천식환자군에서 다소 높은 경향을 보였다. 또한 두군 모두에서 SOD 전처치에 의해 A549 detachment는 현저하게 억제되었으나 A549 lysis는 억제되지 않았으며, 두가지 모두가 혈청 전처치에 의해서는 억제되지 않았다.

5) 두군 모두에서 다형핵구의 과산화 음이온 생성능과 A549 detachment와는 유의한 상관관계가 있었으나(정상군 : $R = 0.90$, 환자군 : $R = 0.82$), A549 lysis

와는 별로 상관관계가 없었으며, 혈장 SOD 활성도는 두가지 모두와 상관관계를 보이지 않았다. 또한 천식환자군에서 A549 lysis나 A549 detachment는 환자의 FEV_1 도는 PC_{20} histamine과는 의미있는 상관관계를 보이지 않았다.

6) 다형핵구에 의한 폐포세포손상의 양상에 있어서 알레르기성 천식환자와 비알레르기성 천식환자 사이에는 의미있는 차이가 없었다.

결론: 이상의 연구결과 다형핵구로부터 생성되는 과산화 음이온에 의한 기도 및 폐조직 손상이 기관지천식의 병인에 부분적으로 영향을 미칠 것으로 생각되며, 과산화 음이온은 주로 폐포세포의 탈락을 야기시킴으로써 폐포세포 손상을 일으키는 것으로 추측된다.

REFERENCES

- 1) Ayars GH, Altman AC, Rosen H, Doyle T: The injurious effect of neutrophils on pneumocytes *in vitro*. Am Rev Respir Dis 130:964-973, 1984
- 2) 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 123:521-523, 1981
- 3) Suttorp N, Simon LM: Lung cell oxidant injury: Enhancement of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity in lung cells exposed to sustained *in vitro* hyperoxia. J Clin Invest 70:342-350, 1982
- 4) Shasby DM, VanBenhtuysen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurty IF, 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 125:443-447, 1982
- 5) Borish L: The inflammatory theory of asthma. Immunol Invest 16:501-532, 1987
- 6) Böyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):77-89, 1968
- 7) Absolom DR: Basic methods for the study of phagocytosis. In Methods in Enzymology, ed Colowick SP and Kaplan NO, Vol 132, p151-152, Orlando Florida, Academic Press Inc, 1986
- 8) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase.

- Enzymatic function for erythrocytin (hemocuprein) J Biol Chem **244**:6049-6055, 1969
- 9) Harlan JM, Killen PD, Harker LA, Striker GE: Neutrophil-mediated endothelial injury in vitro. Mechanisms of cell detachment. J Clin Invest **68**: 1394-1403, 1981
 - 10) Varani J, Fligel SEG, Till GO, Kunkel RG, Ryan US, Ward PA: Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils. Possible involvement of hydroxyl radical. Lab Invest **53**:656-663, 1985
 - 11) Johnson KJ, Fantone III JC, Kaplan J, Ward PA: In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. J Clin Invest **67**:983-993, 1981
 - 12) Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A: Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. J Clin Invest **68**: 714-721, 1981
 - 13) Simon RH, DeHart PD, Todd RF III: Neutrophil-induced injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells. J Clin Invest **78**:1375-1386, 1986
 - 14) Okrent DG, Lichenstein AK, Ganz T: Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. Am Rev Respir Dis **141**:179-185, 1990
 - 15) Katsumata U, Miura M, Ichinose M, Kimura K, Takahashi T, Inoue H, Takishima T: Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. Am Rev Respir Dis **141**:1158-1161, 1990
 - 16) Calhoun WJ, Bush RK, Salisbury SM, Stevens CA: Enhanced reactive oxygen species metabolism of airspace cells and airway inflammation follow antigen challenge in human asthma. J Allergy Clin Immunol **86**:306-313, 1990
 - 17) 김영균, 김관형, 한기돈, 문화식, 송정섭, 박성학 : 기관지천식환자에서 알레르겐 기관지유발검사후 말초 혈액 다형핵구에 의한 superoxide anion 생성능 및 혈장 superoxide dismutase 활성도의 변화. 대한내과학회 추계학술대회 초록집 382, 1990
 - 18) Kim KH, Song JS, Park SH: Polymorphonuclear leukocytes-mediated pneumocyte injury after allergen inhalation challenge in bronchial asthma (Abstract). Am Rev Respir Dis **143**(Suppl):A432, 1991
 - 19) Frank L, Massaro D: Oxygen toxicity. Am J Med **69**:117-126, 1980
 - 20) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease. Free radicals and tissue injury. Lab Invest **47**:412-426, 1982
 - 21) Jarjour NN, Busse WW, Calhoun WJ: Enhanced production of oxygen radical in nocturnal asthma. Am Rev Respir Dis **146**:905-911, 1992
 - 22) Lieber M, Smith B, Szaka A, Nelson-Ress W, Todaro G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer **17**:62-70, 1976