

□ 원 저 □

사람 폐포대식세포에서 내독소의 Priming 효과

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

정만표* · 유철규 · 김영환 · 한성구 · 심영수 · 한용철*

= Abstract =

Priming Effect of Endotoxin in Human Alveolar Macrophage

Man Pyo Chung, M.D.,* Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.*

*Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: Endotoxin or lipopolysaccharide(LPS) can prime phagocytic cells such as polymorphonuclear leukocytes, monocytes or animal peritoneal macrophages to generate increased amounts of secretory products such as oxygen free radicals and tumor necrosis factor, which play an important role in developing adult respiratory distress syndrome in gram negative sepsis. Human alveolar macrophages(HAM) are continuously exposed to various stimuli inhaled into the alveoli, and the response to LPS might be different in HAM. Therefore, we investigated the effect of LPS pre-exposure on HAM adhered to plastic surface and A549 cell(type II human alveolar epithelial cell line) monolayer.

Methods: HAM were isolated from bronchoalveolar lavage fluid from normal lung of the patients with localized lung cancer and esophageal cancer. LPS was exposed to HAM for 2hrs before or after adherence to plastic surface of 24-well Linbro plate and A549 cell monolayer. And then HAM was stimulated with PMA(phorbol myristate acetate) or fMLP(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). The amount of hydrogen peroxide(H₂O₂) production in the supernatant was measured on the principle of peroxidase-dependent oxidation of phenol red by hydrogen peroxide.

Results: LPS pre-exposure could not enhance H₂O₂ production in neither HAM adhered to plastic surface nor one to A549 cell monolayer. But LPS even in the absence of PMA or fMLP stimulation directly increased H₂O₂ release in HAM if added after the adherence to A549 cell monolayer.

Conclusion: Endotoxin does not prime HAM, but may directly activate HAM adhered to alveolar epithelial cells. Further investigation will be necessary.

Key Words: Human alveolar macrophage, Priming, Lipopolysaccharide

본 연구는 1994년도 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어 졌음.

*현재 삼성서울병원 호흡기내과 근무

서 론

세균의 내독소는 성인성 호흡곤란증후군을 비롯한 급성 폐손상을 일으키는 흔한 유발인자인데, 그 기전의 하나로 priming 효과가 중요하다고 알려져 있다^{1~3)}. Priming 효과란 그 자체의 자극만으로는 세포를 활성화시킬 수 없지만 뒤따르는 2차적 자극에 대한 세포반응이 훨씬 증폭되어 발현되는 현상을 말하며, 이런 현상으로 인하여 내독소에 노출되었던 백혈구는 다른 자극물질에 노출될 경우 각종 분해효소 및 유리산소기(oxygen free radical)를 비롯한 염증매개성 물질을 폭발적으로 분비하여 심한 조직파괴가 초래되는 것으로 추정하고 있다. Priming 효과는 내독소뿐만 아니라 인터페론 감마에서도⁴⁾, 나타나며 사람의 호중구⁵⁾와 단핵세포⁶⁾ 및 쥐의 복막대식세포³⁾ 등에서 관찰되었다.

사람의 폐포대식세포는 폐포내에서 가장 풍부한 식세포(phagocyte)이면서 폐포로 유입된 외부물질에 대하여 1차적으로 대응하는 세포로서 유리산소기, eicosanoids 등을 비롯한 독성물질을 분비하여 폐방어 및 폐질환의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다^{7~9)}. 그러나 무균상태의 혈액에 존재하는 호중구, 단핵세포 및 복막대식세포와는 달리 끊임없이 외부 환경에 노출될 수 밖에 없는 폐포대식세포에서도 내독소에 의해 priming 효과가 나타남으로써 폐손상을 유발하는 지에 대한 의문이 제기 될 뿐만 아니라, 동물의 폐포대식세포를 이용한 보고¹⁰⁾도 주로 생체내의 상황과는 상당히 다른 실험조건이어서 저자들은 사람의 폐포대식세포에서도 다른 백혈구에서 처럼 내독소에 의한 priming 효과가 있는지 먼저 알아보고 가능한 한 생체내 상황과 유사한 실험조건을 형성하여 priming 효과를 관찰하여 보았다.

대상 및 방법

1. 기관지폐포 세척

폐결핵을 비롯한 폐염증의 과거력이나 현증의 증거가 없고 기타 전신질환의 증거가 없으면서 수술 예정인 폐암이나 식도암과 같이 폐질환이 국소적이거나 없는

환자를 대상으로 하였다. 병변이 있는 반대편 폐에서 흉부 전산화단층촬영으로 이상이 없는 것으로 확인된 우중엽이나 좌폐설상엽에서 기관지폐포세척술(Bronchoalveolar lavage, 이하 BAL로 약함)을 시행하였고 37℃ 생리식염수를 1회에 50ml씩 주입하여 얻은 기관지폐포세척액의 총 회수량이 150~200cc가 되었을 때 시술을 중지하였다.

2. BAL 세포의 분리

기관지폐포세척액을 거어즈로 여과한 후 4℃, 400g 로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전되어 있는 세포층을 4℃ Hanks' Balanced Salt Solution without phenol red(GIBCO사, 이하 HBSS로 약함) 5 ml로 세척하고 다시 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 침전된 세포층을 penicillin(Sigma사) 100 U/ml, streptomycin(Sigma 사) 100 mg/ml, 10% 우태혈청(GIBCO 사, fetal bovine serum)이 포함된 RPMI1640 without phenol red(GIBCO사, 이하 RPMI 1640으로 약함)에 희석한 다음 hemocytometer를 이용하여 폐포대식세포가 1×10^6 /ml이 되도록 세포부유액(cell suspension)을 만들었다. 이 중 trypan blue 염색상 세포활성(viability)이 90% 이하인 폐포대식세포는 실험에 사용하지 않았다.

3. 폐포상피세포 단층(Cell Monolayer) 형성 및 폐포대식세포 부착

1×10^6 /ml의 폐포대식세포 부유액 1 ml을 24-well Linbro plate의 각 well에 분주하여 표면부착을 위해 2 시간 동안 놓아둔 다음, 부착되지 않은 BAL세포를 제거하기 위해 37℃ HBSS 1 ml로 2회 부드럽게 세척하여 플라스틱 표면에 부착된 폐포대식세포군으로 사용하였다.

폐포상피세포단층은 사람의 기관지폐포암 세포주로서 제 2형 폐포상피세포와 거의 유사한 기능을 가지고 있는¹¹⁾ A549세포(American Type Culture Collection)를 24-well Linbro plate의 각 well에 분주한 후 RPMI 1640 배양액으로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 18~24시간 배양하여 만들었고 37℃ HBSS 1 ml로 2회 세척한 후 1×10^6 개의 폐포대식세포를 2시간동안 부착시킨 다

음, 부착되지 않은 BAL세포를 제거하기 위해 37℃ HBSS 1 ml로 2회 부드럽게 세척하여 A549세포단층에 부착된 폐포대식세포군으로 사용하였다.

4. 내독소 전처리

1) 플라스틱표면 부착후 내독소 전처리

내독소는 Lipopolysaccharide(Sigma사, E. coli O111:B4) 500 ng/ml을 사용하였고 플라스틱 표면에 부착되어 있는 폐포대식세포를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간동안 노출시킨 후 37℃ HBSS 1 ml로 3회 부드럽게 세척하였다.

2) A549세포단층 부착전 내독소 전처리

A549세포단층에 부착되기 전 상태에서 폐포대식세포를 500 ng/ml의 내독소로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간동안 노출시킨 후 37℃ HBSS 1 ml로 3회 부드럽게 세척한 다음, 상기한 방법대로 A549세포단층에 부착시켰다.

3) A549세포단층 부착후 내독소 전처리

이미 A549세포단층에 부착되어 있는 폐포대식세포를 같은 농도의 내독소로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 2시간동안 노출시킨 후 37℃ HBSS 1 ml로 3회 부드럽게 세척하였다.

5. 폐포대식세포 자극 및 과산화수소 측정

세포배양 상층액에서 과산화수소량을 측정하는 방법은 peroxidase 존재하에서 phenol red가 과산화수소에 의해 산화되면 과산화수소의 양에 따라 일정하게 색깔이 변하는 원리를 이용하여 측정하였다^{12,13}. 간단히 기술하면, phenol red가 없는 HBSS에 horseradish peroxidase(Sigma 사) 8.5U/ml과 phenol red(Sigma 사) 0.28 nM을 포함한 혼합시약 1 ml을 만들어, 1×10⁶ 개의 폐포대식세포를 부착시킨 24-well Linbro plate의 각 well에 넣은 다음, 2시간 동안 폐포대식세포에서 분비된 과산화수소가 phenol red를 산화시켜 색깔 변화를 일으키면, 이를 spectrophotometer로 610 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 수치를 미리 만들어 놓은 과산화수소량-흡광도 표준곡선을 이용하여 nM/well

/2hours의 단위로 전환하여 표시하였다. 세포자극은 세포를 직접 자극할 수 있는 phorbol myristate acetate (Sigma 사, 이하 PMA로 약함)와 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(Sigma 사, 이하 fMLP로 약함)을 각각 100 ng/ml, 100 nM의 농도로 자극하였다.

모든 조건에서 폐포대식세포가 없는 플라스틱표면이나 A549세포단층으로만 이루어진 well에도 과산화수소를 측정하기 위한 혼합시약 1 ml을 넣고 2시간후 과산화수소량을 측정하여 기초값으로 정했지만, 실제로 분비된 과산화수소는 없었다. 결국 PMA나 fMLP 자극을 가하지 않은 무자극군, PMA로 자극한 PMA군, fMLP로 자극한 fMLP군을 내독소 전처리 유무에 따라 다시 분류하여 측정치를 얻어 비교하여 결과를 분석하였다.

6. 통계 처리

통계처리 프로그램인 Starview II Software를 이용하여 유의성 검정을 했고, 한 환자의 폐포대식세포를 내독소 전처리군과 무처리군으로, 다시 각각 기저군, PMA군, fMLP군으로 비교하기 위해 paired t-test를 시행하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적인 유의성이 있다고 인정하였다.

결 과

1. 기관지폐포세척액 총세포수 및 세포생존율

기관지폐포세척액의 폐포대식세포수는 $2.8 \pm 1.5 \times 10^7$ 이었고 세포활성도는 $93.7 \pm 2.4\%$ 이었다.

2. 내독소의 Priming 효과

1) 플라스틱표면에 부착된 폐포대식세포군(n=7)

내독소로 전처리하지 않은 폐포대식세포는 무자극군, PMA군, fMLP군에서 각각 9.48 ± 2.44 , 10.38 ± 2.34 , 10.28 ± 2.33 ng/well/2hours의 과산화수소 분비능을 보였고 내독소로 2시간 전처리한 폐포대식세포는 각각 9.56 ± 2.15 , 9.82 ± 1.80 , 11.31 ± 2.48 ng/well/2hours를 보여, 플라스틱표면에 부착시킨 폐포대식세포에서 내독소에 의한 priming효과는 없었다($p > 0.05$, Fig. 1).

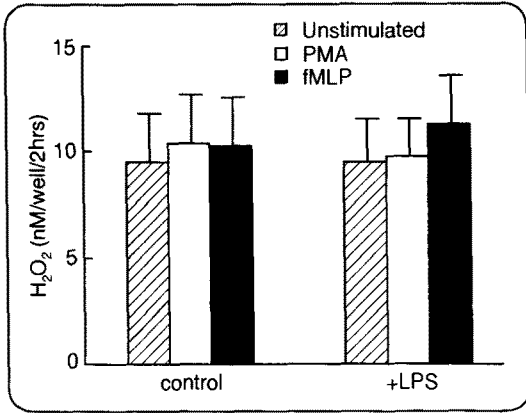


Fig. 1. Neither LPS-priming nor triggering was observed by stimuli with PMA or fMLP in AM adhered to polystyrene surface($p > 0.05$).

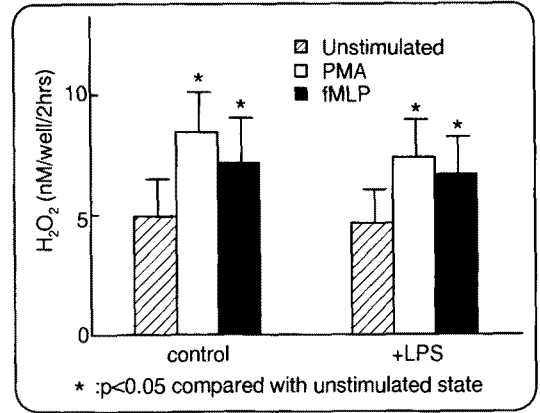


Fig. 2. LPS pre-exposure of AM before the adherence to A549 monolayer does not prime human AM($p > 0.05$).

2) 미리 전처리한 후 A549세포단층에 부착시킨 폐포대식세포군(n=7)

내독소로 전처리하지 않은 폐포대식세포는 무 자극군, PMA군, fMLP군에서 각각 4.82 ± 1.59 , 8.31 ± 1.67 , 7.06 ± 1.82 ng/well/2hours의 과산화수소 분비능을 보였고 내독소로 2시간 전처리한 폐포대식세포는 각각 4.44 ± 1.41 , 7.05 ± 1.64 , 6.32 ± 1.69 ng/well/2hours를 보여, PMA와 fMLP에 의한 분비능 증가는 관찰되었으나($p < 0.05$) 내독소에 의한 priming 효과는 없었다($p > 0.05$, Fig. 2).

3) A549세포단층에 부착시킨 후 내독소로 전처리한 폐포대식세포군(n=11)

내독소로 전처리하지 않은 폐포대식세포는 무 자극군, PMA군, fMLP군에서 각각 4.33 ± 1.04 , 7.94 ± 1.42 , 6.00 ± 1.22 ng/well/2hours의 과산화수소 분비능을 보였고 내독소로 2시간 전처리한 폐포대식세포는 각각 5.43 ± 1.19 , 7.56 ± 1.31 , 6.38 ± 1.19 ng/well/2hours를 보여, A549세포단층에 부착된 폐포대식세포에서도 내독소에 의한 priming 효과는 없었다($p > 0.05$, Fig. 3). 그러나 PMA나 fMLP로 자극하지 않은 무 자극군에서 내독소 전처리군이 전처리하지 않은 폐포대식세포에 비해 과산화수소 분비능의 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$, Fig. 3).

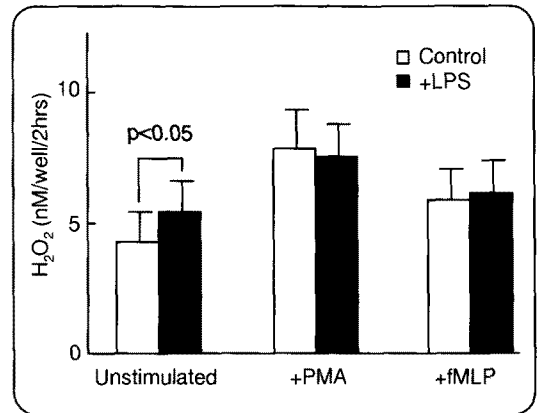


Fig. 3. LPS directly increases H₂O₂ release from human AM if added after the adherence to A549 cell monolayer($p < 0.05$).

고찰

본 연구는 사람의 폐포대식세포가 호중구나 단핵세포에서처럼 내독소에 의해 유리산소기 분비가 촉진되는 priming 효과가 있는지 알아보기 위한 연구로서, 결과는 priming되지 않는다는 것이다. 이런 차이는 사람의 폐포대식세포가 같은 식세포이면서도 호중구나 단핵세포와는 다른 성상이 있기 때문이라고 생각된다. 즉, 무균상태의 혈액내에 존재하는 호중구, 단핵세포와는 달리 폐포대식세포는 폐포내로 흡입되는 각종 입자

또는 세균에 계속 노출될 수 밖에 없는 환경속에 있으므로 추출된 폐포대식세포는 이미 primed state가 되어 있지 않나 추정된다. 더구나 폐포대식세포를 얻은 대상자가 모두 흡연자이거나 흡연경력이 있었기 때문에 더욱 미리 자극을 받았을 가능성이 많다고 생각된다.

사람의 폐포대식세포가 내독소에 의해 priming되는 지에 대하여 Suzuki 등¹⁴⁾이 보고한 바에 의하면, 흡연 여부에 상관없이 모두 내독소에 의해 priming되고 그 최적농도는 500 ng/ml이고 흡연자는 2시간, 비흡연자는 24시간 전 처치할 경우에 최대로 superoxide를 분비한다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 사람의 폐포대식세포가 내독소에 의해 priming되는 것이 아니라 생체 상황과 유사한 조건에서는 직접적으로 자극된다는 것을 보여주었다. 저자와는 달리 Suzuki 등¹⁴⁾은 폐포대식세포를 약 16시간동안 세포배양한 다음에 내독소로 전 처치하였는데 폐포대식세포가 플라스틱 표면에 부착되는 것 자체만으로도 활성화되어 유리산소기가 분비된다는 사실^{15,16)}로 미루어 볼 때, 16시간동안 부착상태로 배양된 폐포대식세포는 부착에 의해 이미 활성화가 되므로 내독소에 의한 priming효과를 관찰할 수 없을 것으로 추정된다. 저자도 12시간 이상 세포배양한 후에 실험을 해 보았으나 이미 모두 활성화되어 자극 자체가 의미가 없었고 세포활성도도 떨어져 더 이상 자극할 수 없었다. 따라서 플라스틱 표면부착에 의해 이미 활성화되어 있는 사람의 폐포대식세포에서는 더 이상 priming 또는 새로운 세포활성화는 기대할 수가 없었다고 생각된다. A549세포는 사람의 기관지폐포암 세포주로서 그 특성이 제 2형 폐포상피세포와 유사하여¹¹⁾, 생체내의 폐포와 비슷한 실험조건을 만들어 주기 위하여 이용하게 되었고 이런 상피세포와의 부착은 플라스틱 표면부착에 의한 세포활성화도 막을 수 있다고 보고되어¹⁷⁾, A549세포단층에 폐포대식세포를 부착시켜 내독소 전 처치를 시행하였으나 priming효과는 역시 관찰되지 않아 폐포대식세포는 표면부착에 의한 영향에 상관없이 내독소에 의해 priming되지 않을 것으로 추정되었다. 폐포대식세포의 대부분은 혈액내의 단핵세포가 혈관내피세포, 간질, 폐포상피세포 등을 거치면서 분화한 세포로 이루어져 있는데 이와 같은 이동 및 부착과정에서 세포의 성상이 많이 달라지는 것으로 알려져 있는데¹⁸⁾,

인터페론 감마에 의한 priming효과에서도 단핵세포와 폐포대식세포 사이에서 차이를 나타내어 폐포대식세포에서는 priming 효과가 관찰되지 않는다는 보고^{18,19)}가 있어 내독소에 의한 priming 효과도 마찬가지로 없을 가능성이 많다고 생각되었다. 1992년에 보고된 이 등²⁰⁾의 보고에서도 사람의 폐포대식세포에서는 사람의 단핵세포나 백서의 폐포대식세포와 달리 인터페론 감마에 의한 priming효과가 없었다고 보고하여 폐포대식세포는 개체, 외부자극의 종류나 개체의 면역상태에 따라 산소유리기를 분비하는 능력이 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

결과중에 특이한 것은 폐포상피세포와 부착한 폐포대식세포에서는 내독소가 PMA나 fMLP와 같이 직접적으로 과산화수소 분비능을 자극하는 효과를 보인다는 사실이다. 내독소의 이런 직접적인 자극효과로 인하여 PMA나 fMLP로 추가적인 자극을 할 경우에 더 이상 자극되지도 않는 것이 관찰되었다. 이는 실험에 사용된 사람의 폐포대식세포가 미리 내독소에 노출되지는 않았다는 사실을 시사하며 이로써 내독소에 의한 사람 폐포대식세포의 priming효과는 관찰되지 않는다는 것을 더욱 증명해주고 있다. 또한 실험조건상 달라진 요소는 오직 폐포상피세포에 부착시킨 것뿐이며 이는 인체내에서 폐포대식세포와 폐포상피세포는 폐포내에서 허족(pseudopod)에 의한 부착과 같은 유기적인 연관관계에 있기⁸⁾ 때문이라고 생각되며 이런 세포간의 부착에 의한 활성화에는 부착분자(adhesion molecule)가 관여하고 있다고 알려져 있어²¹⁾, 폐포상피세포에 폐포대식세포가 부착되면 세포 표면의 부착분자를 통해 세포활성화가 이루어지지 않나 추정되었다. 그 밖에 내독소에 의해 직접 과산화수소 분비가 자극된 이유로는 실험전에 이미 활성화된 폐포대식세포이었을 가능성이 있다고 추정된다. 특히 대상자가 모두 흡연경력이 있었고 비록 국한된 질환이지만 폐암이나 식도암을 가진 환자이기 때문에 이 질환이 폐포대식세포에 전혀 영향이 없으리라 보장할 수 없었으므로 이미 활성화 상태에 있던 폐포대식세포라는 것을 배제할 수는 없었다. 따라서 폐포상피세포와의 상호작용에 의해 내독소가 폐포대식세포를 직접 자극하는지에 대한 증명은 추후 보다 많은 대상자를 이용하여 추시해야 할 필요성이 있다고

생각된다.

이 연구에서는 폐포대식세포의 활성화지표로 유리산소기를 측정하였는데 그중에서도 과산화수소를 측정하는 이유는, 2개의 well에 담긴 폐포대식세포로 한 가지 측정치가 계산되고 세포외로 분비된 부분만 측정되는 superoxide에 비해 well 하나로 측정이 이루어지고 분비되지 않고 세포질내에서 만들어진 부분도 계속되는 과산화수소 측정¹³⁾이 본 연구와 같이 제한된 세포수로 실험을 하기에는 적당하였기 때문이다.

일반적으로 대식세포는 외부자극의 종류나 개체의 면역상태에 따라 산소유리기를 생산하는 능력이 달라지는 것으로 알려져 있다. Johnston 등²⁾은 쥐의 복강내 BCG 혹은 내독소를 주사후 얻은 복강대식세포를 opsonized zymosan이나 PMA로 자극할 경우 priming 효과를 증명하였고 활성화된 대식세포가 미생물 살균 효과 및 종양세포 살해능을 가진다는 것을 밝혔으며, Pabst 등³⁾은 체외에서 내독소 및 세균의 세포막성분인 muramyl dipeptide로 대식세포를 처리한 후 PMA로 자극하면 superoxide분비능이 정상 대식세포보다 최대 7배 정도까지 증가한다는 것을 보이고 이런 priming 효과는 내독소와 대식세포와의 접촉시간이 30분부터 약 72시간까지 유지되는 것을 밝혔다. 또한 내독소의 농도는 10^{-4} ug/ml부터 10 ug/ml까지 superoxide분비능이 증가하였고 1 ug/ml시 최대 priming 효과를 보였다. 본 연구에서는 내독소를 500 ng/ml로 2시간 전처리하였는데, 이는 Suzuki 등¹⁴⁾의 보고와 본 연구에서의 실험상 제일 적당하다고 생각하는 조건이었으며 실제로 내독소의 농도나 전처리 시간을 증감하여 추시한 바로도 결과의 차이는 없었고 폐포대식세포가 플라스틱표면에 부착되기 전후로 내독소 전처리를 해도 priming 효과는 없어 내독소의 농도나 전처리 시간으로 인한 영향은 없었던 것으로 생각되며 사용된 내독소의 차이, 동물 및 사람의 차이를 고려했을 때에도 반드시, Pabst 등³⁾의 조건을 따라야 할 필요는 없었다. 그러나 기관지 폐포세척액 자체가 멸균상태가 아니고 Limulus Amebocyte Assay를 시행하지 않아 내독소로 전처리하기 전에 세균에 이미 노출되어 결과가 상이하게 나왔을 가능성을 배제할 수는 없었다.

요 약

연구배경: 폐포대식세포가 내독소에 노출되면 이 후 자극에 의해 종양괴사인자, 활성산소 등 독성이 강한 분비물 방출이 더욱 촉진되어 성인성호흡곤란증후군과 같은 각종 폐질환이 초래되는 중요한 기전으로 이해되고 있다. 그러나 문헌에 보고된 내독소에 의한 이런 priming 효과는 다형핵백혈구, 단핵세포나 동물의 폐포대식세포를 대상으로 한 결과로서, 인체 폐포내에서의 폐포대식세포, 폐포상피세포 및 내독소의 상호작용을 밝히는 면에서는 한계가 있었다.

방법: 폐포상피세포에서 기원한 폐암세포주인 A549 세포를 24-well Linbro plate에 배양하여 세포단층을 형성한 후 기관지폐포세척술로 얻은 사람의 폐포대식세포(10^6 /ml)를 A549세포에 부착시켜 생체내와 유사한 환경을 만들어 실험을 시행하였다. 방법은 A549세포 부착 전후에 내독소(500 ng/ml)로 전처리한 다음 PMA, fMLP로 자극하여 방출된 과산화수소를 nM/well/2hrs 단위로 측정하여 대조군과 비교하였고 아울러 A549세포단층 없이 각 well에 직접 폐포대식세포단층을 형성한 후 동일하게 처리하였으며 결과는 다음과 같았다.

결과:

1) 24-well의 표면에 폐포대식세포단층을 형성한 후 내독소로 처리(n=7)한 경우, 대조군은 무자극군, PMA 자극군, fMLP자극군에서 각각 9.48 ± 2.44 , 10.38 ± 2.34 , 10.28 ± 2.33 nM/well/2hrs의 과산화수소 분비능을 보였고 내독소 전처리군은 각각 9.56 ± 2.15 , 9.82 ± 1.80 , 11.31 ± 2.48 nM/well/2hrs을 보여 내독소에 의한 priming 효과는 없었다.

2) 폐포대식세포를 미리 내독소로 처리한 후 A549세포단층에 부착(n=7)시킨 경우에는 대조군의 과산화수소 분비능은 무자극군 4.82 ± 1.59 , PMA 자극군 8.31 ± 1.67 , fMLP 자극군 7.06 ± 1.82 nM/well/2hrs이고 내독소 전처리군은 각각 4.44 ± 1.41 , 7.05 ± 1.64 , 6.32 ± 1.69 nM/well/2hrs로서 내독소에 의한 priming 효과는 없었다.

3) 폐포대식세포를 A549세포단층에 부착시킨 후 내

독소로 처치(n=11)하면 대조군은 무자극군, PMA 자극군, fMLP 자극군에서 각각 4.33 ± 1.04 , 7.94 ± 1.42 , 6.00 ± 1.22 nM/well/2hrs의 과산화수소를 분비하였고 내독소 전처치군은 각각 5.43 ± 1.19 , 7.56 ± 1.31 , 6.38 ± 1.19 nM/well/2hrs를 보여 A549세포 부착후에도 내독소의 priming 효과는 관찰되지 않았으나, PMA나 fMLP로 자극하지 않은 무자극군에서 내독소 전처치군이 대조군에 비해 과산화수소 분비의 유의한 증가를 보였다(p<0.05).

결론: 이상의 결과는 사람 폐포대식세포에서 내독소에 의한 priming 효과는 없으나 폐포상피세포와의 상호작용에 의해 내독소가 폐포대식세포를 직접 자극함을 시사하는 소견이며 향후 추사가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Nathan CF and Root RK: Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages; dependence on sequential activation and triggering. *J Exp Med* **146**:1648, 1977
- 2) Johnston RB Jr, Godzik CA, Cohn ZA: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* **148**:115, 1978
- 3) Pabst MJ, Johnston RB Jr: Increased production of superoxide anion by macrophage exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med* **151**:101, 1980
- 4) Nathan CF, Murray HW, Wieve ME, Rubin BY: Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**:670, 1983
- 5) Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB Jr: Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **160**:1656, 1984
- 6) Pabst MJ, Hedegaard HB, Johnston RB Jr: Cultured human monocytes require exposure to

- bacterial products to maintain an optimal oxygen radical response. *J Immunol* **128**:123, 1982
- 7) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harmon D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* **107**:526, 1987
- 8) Hocking WG, Golde DW: The pulmonary alveolar macrophage. I. *N Engl J Med* **301**:580, 1979
- 9) Hocking WG, Golde DW: The pulmonary alveolar macrophage. II. *N Engl J Med* **301**:639, 1979
- 10) Aderem AA, Cohen DS, Wright SD, Cohn ZA: Bacterial lipopolysaccharides prime macrophages for enhanced release of arachidonic acid metabolites. *J Exp Med* **164**:165, 1986
- 11) Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees 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, 1976
- 12) Homan-Muller J, Weening R, Ross D: Production of hydrogen peroxide by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med* **141**:198, 1975
- 13) Pick E: Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enz* **132**:407, 1986
- 14) Suzuki K, Yamamoto T, Sato A, Murayama T, Amitani R, Yamamoto K, Kuze F: Lipopolysaccharide primes human alveolar macrophages for enhanced release of superoxide and leukotriene B₄; self-limitations of the priming response with protein synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**:500, 1993
- 15) Williams AJ, Cole PJ: In vitro stimulation of alveolar macrophage metabolic activity by polystyrene in the absence of phagocytosis. *Br J Pathol* **62**:1, 1981
- 16) Merrill WW, Naegel GP, Matthay RA, Reynolds HY: Alveolar macrophage-derived chemotactic factor; kinetics of in vitro production and partial

- characterization. *J Clin Invest* **65**:268, 1980
- 17) McGowan SE, Heckman JG: Mechanisms of serum-enhanced adhesion of human alveolar macrophages to epithelial cells. *Lung* **169**:215, 1991
- 18) Kemmerich B, Rossing TH, Pennington JE: Comparative oxidative microbicidal activity of human blood monocytes and alveolar macrophages and activation by recombinant gamma interferon. *Am Rev Respir Dis* **136**:266, 1987
- 19) Papermaster-Bender G, Whitcomb ME, Sagone AL Jr: Characterization of the metabolic responses of the human alveolar macrophage. *J Reticuloendothel Soc* **28**:129, 1980
- 20) 김건열, 이계영, 현인규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철: 결핵균이 폐포대식 세포의 기능에 미치는 영향에 관한 연구, H37Ra 결핵균종에 의한 사람 및 폐포대식세포의 Superoxide 생성의 변화. *결핵 및 호흡기질환* **39**(6):526, 1992
- 21) Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**:425, 1990