

□ 원 저 □

시간별 내독소 정맥주입으로 유발된 급성폐손상의 변화양상에 대한 고찰

순천향대학교 의과대학 내과학교실

문승혁, 오제호, 박성우, 남궁은경, 기신영, 임건일,
정성환, 김현태, 어수택, 김용훈, 박춘식, 진병원

= Abstract =

Time Course Change of Phagocytes and Proinflammatory Activities in BALF in Endotoxin-induced Acute Lung Injury

Seung Hyug Moon, M.D., Je Ho Oh, M.D., Sung Woo Park, M.D., Eun Kyung Nam Gung, M.D.,
Shin Young Ki, M.D., Gun Il Im, M.D., Sung Whan Jung, M.D., Hyeon Tae Kim' Soo, M.D.,
Tack Uh, M.D., Yong Hoon Kim, M.D., Choon Sik Park, M.D., Byung Weon Jin, M.D.

Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University, Collage of Medicine, Chonan, Korea

Background : Severe acute lung injury (ALI), also known as the adult respiratory distress syndrome (ARDS), is a heterogenous nature of dynamic and explosive clinical synrome that exacts a mortality of approximately 50%. Endotoxin (ETX) is an abundant component of the outer membrane of gram-negative bacteria capable of inducing severe lung injury in gram-negative sepsis and gram-negative bacterial pneumonia, which are among the most common predisposing causes of ARDS. The influx of PMNs into airway tissue is a pathological hallmark of LPS-induced lung injury. And there is a substantial evidence suggesting that cytokines are important mediators of lung injury in gram-negative sepsis. However, the kinetics of phagocytes and cytokines by an exact time sequence and their respective pathogenic importance remain to be elucidated. This study was performed to investigate the role of phagocytes and proinflammatory cytokines in ETX-induced ALI through a time course of changes in the concentration of protein, TNF α and IL-6, and counts of total and its differential cells in BALF. The consecutive histologic findings were also evaluated.

Method : The experimental animals, healthy male Sprague-Dawley, weighted 200 ± 50 g, were divided into control- and ALI- group. ALI was induced by an intravenous administration of ETX, 5mg/kg. Above mentioned all parameters were examined at 0(control), 3, 6, 24, 72 h after administration of ETX. TNF α and IL-6 conc. in BALF were measured by a bioassay.

Results : The protein concentration and total leukocyte count (TC) in BALF was significantly increased at 3h compared to controls ($p < 0.05$). The protein conc. was significantly elavated during observation period, but TC was significantly decreased at 72h ($p < 0.05$ vs. 24h). There was a close relationship between TC and pro-

tein conc. in BALF($r = 0.65, p < 0.001$). The PMN and monocyte count was well correlated with TC in BALF, and the correlation of PMN($r = 0.97, p < 0.001$) appeared to be more meaningful than that of monocyte($r = 0.61, p < 0.001$). There was also a significant correlation between protein conc. and PMN or monocyte count in BALF(PMN vs. monocyte : $r = 0.55, p < 0.005$ vs. $r = 0.64, p < 0.001$). The count of monocyte was significantly elevated during observation period though a meaningful reduction of PMN count in BALF at 72h, this observation suggested that monocyte may, at least, participate in the process of lung injury steadily. In this study, there was no relationship between IL-6 and TNF α conc., and TNF α but not IL-6 was correlated with TC($r = 0.61, p < 0.05$) and monocyte($r = 0.67, p < 0.05$) in BALF only at 3, 6h after ETX introduced. In particular, the IL-6 conc. increased earlier and rapidly peaked than TNF α conc. in BALF. In histologic findings, the cell counts of lung slices were increased from 3 to 72h($p < 0.001$ vs. NC). Alveolar wall-thickness was increased from 6 to 24h($p < 0.001$ vs. NC). There was a significant correlation between the cell counts of lung slices and alveolar wall-thickness($r = 0.61, p < 0.001$). This result suggested that the cellular infiltrations might be followed by the alterations of interstitium, and the edematous change of alveolar wall might be most rapidly recovered to its normal condition in the process of repair.

Conclusion : We concluded that although the role of PMN is partly certain in ETX-induced ALI, it is somewhat inadequate to its known major impact on ALI. Alveolar macrophage and/or non-immune cells such as pulmonary endothelial or epithelial cells, may be more importantly contributed to the initiation and perpetual progression of ETX-induced ALI. The IL-6 in ETX-induced ALI was independent to TNF α , measured by a bioassay in BALF. The early rise in IL-6 in BALF implies multiple origins of the IL-6.

Key words : Endotoxin, ALI, monocytes, PMNs, IL-6, TNF, BALF.

서 론

성인형호흡곤란증후군(Adult Respiratory Distress Syndrome ; ARDS)으로 불리는 중증의 급성폐손상은 현재까지도 50%이상의 사망율을 보이는 이형성의 임상증후군¹⁾이다. 내독소혈증이나 그람음성균 폐렴등에서 내독소(리포다당질)는 폐포대식세포 및 순환호중구를 활성화시키고 특히 호중구의 폐장내 침윤을 특징으로 하는 급성 폐손상을 유발²⁾시켜 성인형호흡곤란증후군으로 진행시킨다³⁾. 폐장에서의 급성 염증 반응은 활성화된 폐포 대식세포, 호중구, 폐장내 내피세포 및 상피세포들에서 분비된 염증 매개물, 유리 산소기 및 유리된 cytokines등에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 내독소 유발 급성 폐손상에서 내독소 자극이 폐장내 염증세포들을 활성화시키고, 활

성화된 효과기세포들에서 cytokines 발현이 유발되며 생성 및 유리된 cytokines등은 자소 및 측분비적 (autocrine and/or paracrine)으로 염증세포 및 폐장내 다른 기질세포들에 영향을 주어 급성 폐손상을 가져오는 것으로 설명하고 있다. 급성 폐손상시 유리되는 proinflammatory cytokine인 interleukin 1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor alpha(TNF α)를 생체에 주입하여 폐혈성의 저혈압 쇼크를 일으키거나 기관지를 통해 폐장내로 직접 주입하면 내독소 유발 급성 폐손상과 동일한 병리현상이 일어난다^{5,6)}. TNF α 와 IL-1은 상승적으로 작용하며 이들 cytokines가 효과세포의 활성화를 포함한 염증세포-내피세포간에 유착능을 증가시키고 미세혈관 투과성을 증가시켜 비심인성 폐삼출을 일으키게 된다. 특히 활성화된 호중구 산화물 분비능의 증폭이 급성 폐손상의 중요한 병

태생리로 설명된다. 급성기 단백 유도물로 알려져 있는 interleukin 6(IL-6)는 폐장내 다양한 세포들로부터 분비되어 조직손상에 따른 염증반응에 관여하는 proinflammatory cytokine의 하나로서 특히 국소 염증부에서 항염증작용을 할 것으로 추정되고 있다^{8,9}). 이러한 현상들은 proinflammatory cytokines가 내독소에 의한 급성폐손상의 주요 매개물임을 보여준다. 순환호중구의 폐장내로의 유입(emmigration) 및 격리(sequestration)는 성인형 호흡곤란증후군의 가장 큰 병리적 특징의 하나로서 폐생검¹⁰ 및 기관지 폐포세척술¹¹ 결과들에서 밝혀져있으며, 활성화된 호중구가 급성 폐손상 진행 과정의 중심적 염증세포로 설명되고 있다^{12,13}).

폐장, 혈액등에서 전염증활성도(proinflammatory activity)의 평가인자나 질병 예후인자로서 시행되고 있는 cytokine 측정은 면역학적 방법이나 생체측정법이 널리 이용되고 있다. 혈장 및 기관지폐포세척등의 생체액내에는 cytokine 억제인자나 단백분해효소 등의 활성억제 요소가 같이 있게됨으로 면역학적 측정으로 실제 생체 활성도가 정확히 반영될 수 없을 것이라는 제안이 보고된 바 있다¹⁴).

저자들은 실험 백서에서 아치사량의 내독소 정맥내 주입으로 유발된 급성폐손상에서 시간에 따른 기관지 폐포세척액내 염증세포들의 동태를 분석하여보고 동시에 폐조직 변화를 관찰하여 이들 염증세포들이 폐손상에 미치는 역할을 보고자 하였다. 동시에 기관지폐포세척 전염증활성도의 변화를 proinflammatory cytokines의 생체측정을 이용하여 관찰하므로써 이들이 폐장내 투과성에 미치는 영향 및 기관지폐포세척액내 염증세포들과의 관련성을 보고자 하였다

방 법

1. 실험 동물군

체중 250 ± 50 g의 건강체인 웅성 Sparague-

Dawley를 사용하여 치사량미만의 내독소를 정맥내로 주입하였다. 실험 동물군은 내독소를 주입하지 않은 정상 대조군과 급성 폐손상군은 내독소 주입 시간에 따라 각각 3, 6, 24, 72 시간군으로 정하였다.

2. 급성 폐손상 유발

실험백서의 복강내로 마취량의 phenthol sodium, 40mg/kg를 주입하여 마취시킨후 isoprophyl alcohol로 꼬리를 소독한 후 endotoxin-free water에 용해시킨 Lipopolysaccharide(LPS)(E. coli Serotype 055:B5; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 5mg/kg의 용량으로 Pyrogen-free phosphate buffered saline(PBS)(Sigma Chemical Co.)에 희석하여, 희석된 총량을 균일하게 400μ l로 하여 백서의 미부정맥을 통하여 주입하였다.

3. 기관지폐포세척술 시행

각군에서 백서의 복강내로 치사량의 phenthol sodium, 70mg/kg를 주입하여 희생시킨후 백서의 전경부를 신전시켜 isoprophyl alcohol로 소독한 후 무균적으로 기관 절개를 시행하여 polyethylene catheter (PE40)를 기관지내에 고정 위치시킨 후 EDTA 3 mM이 함유된 phosphate buffered saline을 일회 23 ml/kg의 양으로 총 6차례에 걸쳐 기관지 폐포 세척술을 시행하였다. 적절한 세포의 회수를 위해 각 세척술시 1분간 부드럽게 흡파 마사지를 시행하였다. 모든 기관지 폐포 세척액은 즉시 얼음위에 놓고(chilling), 1과 2회차의 기관지 폐포 세척액은 단백질의 측정 및 cytokines의 측정을 위해서 남은 회차와 각각 분류하였다. 정상대조군은 내독소 및 매개물의 정맥내 주입 없이 바로 치사량의 phenthol sodium, 70mg/kg를 복강내로 투입, 희생시킨 후 전술한 바와 같이 동일하게 기관지 폐포 세척술을 시행, 처리하였다.

4. 기관지폐포세척액의 처리 및 세포의 분석

1과 2회차 기관지 폐포 세척액을 모아 1000rpm으로 10분간 원심분리시킨 후 상층액 3ml을 따내어 단백질 및 cytokines의 측정을 위해 -20°C 에 냉동 보관한 후 측정조건을 같게 할 목적으로 단백질 및 cytokine을 한번에 측정하였다. 남은 3, 4, 5, 6 회차의 기관지 폐포 세척액은 잘 흔들은 후(vortexing) 0.4ml을 따내 Cytospin(SHANDON Co.)을 이용하여 850rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 DIFF-QUICK(modified Giemsa)염색하여 광학현미경 400배 시야에서 300개의 세포를 세어 분획세포수를 산출하였다. 전체 세포수는 얻어진 전체 기관지 폐포 세척액을 잘 흔들은 후(vortexing) 10ml을 따내어 1000rpm에서 15분간 원심 분리시킨 후 얻어진 침전 세포 잔재(cell pellet)을 1ml 남은 상태에서 재부유(resuspension)시킨 후 coulter count로 산출하였다. 분획 산출된 단핵구 및 호중구의 백분율을 전체세포수에 곱하여 단핵구와 호중구의 절대수를 산출하였다.

5. 기관지폐포세척 단백질농도의 측정

단백측정 kit(SIGMA DIAGNOSTICSR)를 이용하여 측정되었다. 검체는 Brilliant blue G.로 착색, 반응시켜 595nm에서 분광 비색계로 흡광도를 측정하여 다음과 같이 기관지 폐포 세척액의 단백질 농도를 얻었다.

$$\text{BALF Protein conc. (mg/dl)} = (A_{\text{TEST}}/A_{\text{standard}}) \times 30$$

A : absorbance

6. 기관지폐포세척 cytokine의 측정

TNF α 의 측정

Actinomycin D로 처리된 TNF-감수성 세포인 murine L929 섬유모세포를 이용하여 측정하였다. 100

μl 의 섬유모세포 상층액(suspension)이 첨가된 L929세포를 4×10^5 의 농도로 96 well flat-bottomed microplate에 분주하여 37°C , 6% CO_2 항온배양기에서 overnight 배양한 후 medium을 흡인하여 각well에 $50\mu\text{l}$ supplemented Eagles Minimum Essential Medium(EMEM)을 첨가하였다. medium control에는 $50\mu\text{l}$ EMEM을 추가하고 그외는 기관지폐포세척액을 원액으로 부터 1:15624까지 5배씩 희석하여 $50\mu\text{l}$ 씩 각well에 추가하고, $50\mu\text{l}$ actinomycin D를 첨가한 후 37°C , 6% CO_2 항온배양기에서 18시간동안 혼합배양하였다. 각well에서 상층액을 흡인한 후 $200\mu\text{l}$ 0.9% saline으로 한차례 세척, 흡인 후 $50\mu\text{l}$ 0.05% Crystal Violet in 20% ethanol을 첨가하여 실온에서 10분간 염색한 후 cold tap water로 세척하여 overnight dry한 후 염색된 각well에 $100\mu\text{l}$ 100% methanol로 염색을 제거한 후 분광측정기를 이용하여 595nm에서 각well의 흡광도를 측정하였다. maximal control 평균치의 50%에 최대로 근접되는 A595를 L929 cells 50%의 용해로 간주하였으며 sample의 U/ml로의 산출은 50% 용해를 보인 최대 희석의 역수로 곱하여 계산되었다.

Interleukin 6의 측정

IL-6의존성 세포인 B9세포(murine hybridoma cell line)를 이용하여 측정하였다. B9세포는 10% FCS와 2.0 U/ml의 IL-6(Genzyme, Cambridge, MA)가 포함된 RPMI 완전배지에서 배양하여 이용하였다. B9세포를 5% FCS가 함유된 RPMI 완전배지에 5×10^4 의 농도로 96well flat-bottomed microplate에서 3well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 기관지폐포세척액을 원액으로 부터 1:15624까지 5배씩 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 혼합배양하였다. 37°C , 5% CO_2 항온배양기에서 92시간 배양 후 각 well에 $10\mu\text{l}$ 의 tetrazolium salt MTT[3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide]를 추가하여 4시간 더 배양하였다. $25\mu\text{l}$ 의 acid sodiumdodecyl sulphate를 각 well에 첨가한 후 약 1시간동안 실온에

Table 1. Time course change of protein conc., counts of total and its differential cells in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)

BAL	NC	3H	6H	24H	72H
NO	5	5	6	5	5
Protein	10.76	33.03*	73.68**	93.00**	84.35**
conc.(mg/dl)	±0.75	±11.81	±8.65	±4.74	±3.11
Total cell	0.52	1.30*	2.27*	10.92**	4.68*
count(×10 ⁵ /ml)	±0.06	±0.10	±0.45	±2.14	±1.57
Monocyte	0.49	1.23*	1.79*	2.93*	2.27*
count(×10 ⁵ /ml)	±0.05	±0.11	±0.40	±0.75	±0.42
PMN	0.01	0.05*	0.44*	8.04**	2.36*
count(×10 ⁵ /ml)	±0.00	±0.00	±0.19	±1.95	±1.78
Monocyte	94.14	94.30	80.02	28.14*	68.00
%	±0.40	±1.48	±6.10	±8.28	±14.63
PMN	2.34	3.70*	16.60*	71.84**	31.00*
%	±0.08	±0.54	±5.38	±8.28	±14.73

*p < 0.05 vs. NC ; **p < 0.05 vs. 3H

방치한 후 분광측정기를 이용하여 흡광도를 측정하여 B9세포의 증식정도를 측정하였다. 표준시약으로서 재조합 형태의 IL-6를 여러 농도로 만들어 B9세포의 증식을 유도하며 IL-6 1U는 B9세포를 최대로 증식 시킨 광학 밀도의 반값에 해당되는 광학 밀도로 계산하였다.

7. 조직 병리 소견의 검색

기관지 폐포 세척술을 시행하지 않은 각군에서 실험 백서를 치사량의 phentotal sodium, 70mg/kg를 주입하여 희생시킨 후 회복하여 인위적으로 폐허탈을 유발한 후 조심스럽게 폐를 적출하여 10% Formalin에 고정시킨 후 paraffin block하여 hematoxylin eosin (HE)염색을 시행하였다. 각 시간군의 조직 slide에서 간질 및 폐포내로의 염증세포의 결집(recruitment) 및 삼출 정도, 폐포벽 및 그의 간질조직의 두께등을 관찰하였다. 염증세포의 결집정도는 절편(section)을 무작위로 선택하여 반량적으로(semiquantitively)

평가하였다. 광학현미경 ×300 배율하에 IBM IMAGE PRO를 사용하여 무작위로 선택된 10개의 시야에서 전체 염증 세포를 세었고 동시에 폐포벽 두께를 측정하였다.

유의성 검정

STATISTICA 통계 package를 이용하여 유의성을 검증하였으며 평균 ± 표준오차로 결과를 나타내었고 시간별 각군의 실험결과치 비교에는 비모수 검정방법인 Kruskal-Wallis one-way ANOVA by ranks를 사용하여 유의한 차이를 보인 항목에서 Mann-Whitney U test를 시행하여 p < 0.05 이하인 경우 통계상의 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 기관지폐포세척 단백질 농도 측정

정상 대조군(n = 5)에서의 기관지폐포세척액 단백질

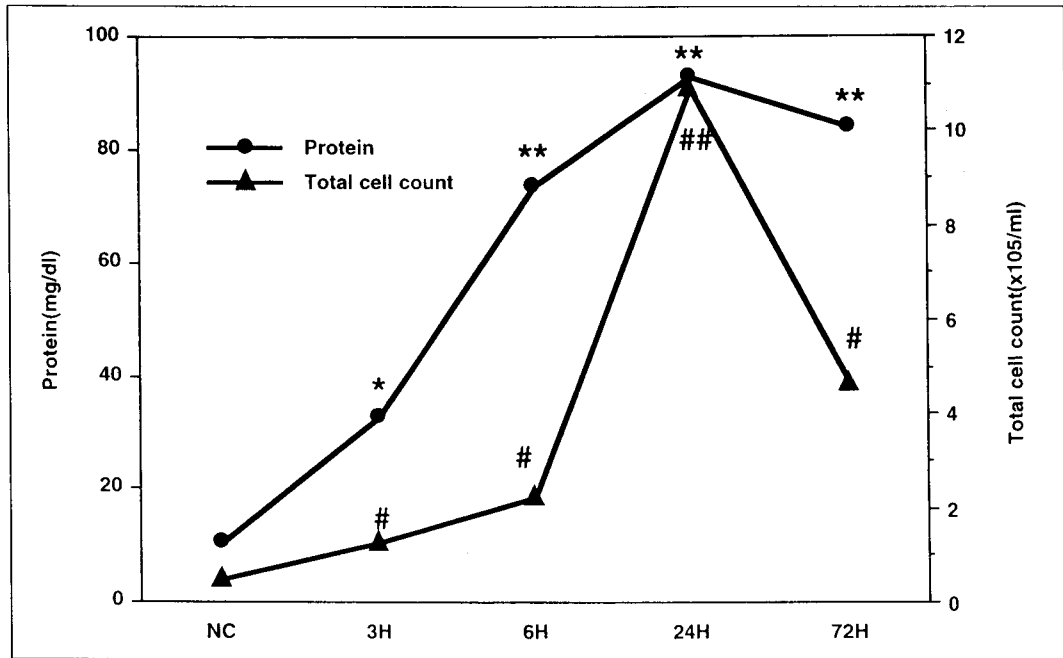


Fig. 1. Time response curve of protein conc. and total cell counts in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)
 *#p < 0.05vs. NC ; **##p < 0.05vs. 3H

농도는 10.76 ± 0.75 mg/dl 이었으며 급성 폐손상 각 군별로는 3시간군(n = 5) 33.03 ± 11.81 , 6시간군(n = 6) 73.68 ± 6.65 , 24시간군(n = 5) 93.00 ± 4.74 , 72시간군(n = 5) 84.35 ± 3.11 mg/dl 이었다. 기관지폐포세척 단백 농도는 급성폐손상 각군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(p < 0.05). 각군별로는 6, 24, 72시간군에서 3시간군에 비해 유의하게 증가되었는 결과를 보였다(p < 0.05) (Table 1, Fig. 1).

2. 기관지폐포세척 호중구 및 단핵구 동태

정상대조군에서의 기관지 폐포 세척 총 백혈구수는 $0.52 \pm 0.06 \times 10^5$ /ml 이었고 단핵구 및 호중구 각각의 백분율은 $94.14 \pm 0.40\%$ 및 $2.34 \pm 0.08\%$ 였다. 3시간군의 총 백혈구수, 단핵구 및 호중구의 백분율은 각각 1.30 ± 0.10 , 94.30 ± 1.48 , $3.70 \pm 0.$

54 , 6시간군 각각 2.27 ± 0.45 , 80.02 ± 6.10 , 16.60 ± 5.38 , 24시간군 각각 10.92 ± 2.14 , 28.14 ± 8.28 , 71.84 ± 8.28 , 72시간군에서는 각각 $4.68 \pm 1.57 \times 10^5$ /ml, $68.00 \pm 14.63\%$, $31.00 \pm 14.73\%$ 이었다(Table 1). 기관지폐포세척 총 백혈구수는 각 시간군에서 정상대조군에 비해 유의하게 증가되었다(p < 0.05). 24시간군에서 6시간군에 비해 유의하게 증가된 소견을 보였다(p < 0.01). 72시간군에서는 24시간군에 비해 총 백혈구수가 유의하게 감소됨을 보였으나(p < 0.05) 6시간군과 비교하여 통계학적 유의성은 없었고, 3시간군에 비해서는 유의하게 증가되어 있었다(p < 0.05)(Fig. 1). 기관지폐포세척 단핵구 백분율은 24시간군에서만 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(p < 0.05). 호중구 백분율은 각 시간군에서 정상대조군에 비해 유의하게 증가되었으며(p < 0.05), 24시간군은 6시간군에 비해 유의하게 증가되었으며(p < 0.01) 24시간군과 72시간군

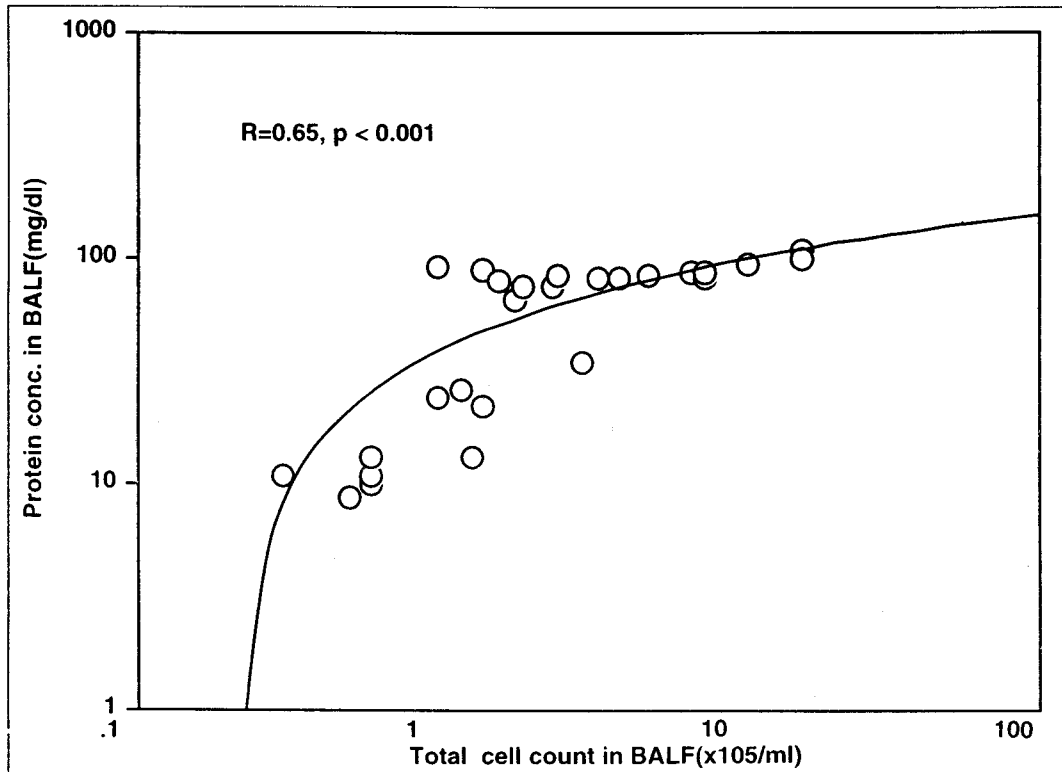


Fig. 2. The logarithmic relationship between total cell count and protein conc. in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)

간에는 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 3). 각군에서의 단핵구 및 호중구 절대수는 정상대조군에서 각각 $0.49 \pm 0.05 \times 10^5/\text{ml}$ 및 $0.01 \pm 0.00 \times 10^5/\text{ml}$, 3시간군 각각 1.23 ± 0.11 및 $0.05 \pm 0.00 \times 10^5/\text{ml}$, 6시간군 각각 1.79 ± 0.40 및 0.44 ± 0.19 , 24시간군 각각 2.93 ± 0.75 및 8.04 ± 1.95 , 72시간군에서는 각각 $2.27 \pm 0.42 \times 10^5/\text{ml}$ 및 $2.36 \pm 1.78 \times 10^5/\text{ml}$ 이었다(Table 1). 기관지폐포세척 단핵구수는 각군에서 정상대조군에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$). 호중구수는 각군에서 정상대조군에 비해 유의하게 증가되었고($p < 0.05$) 24시간군에서 6시간군에 비해 유의하게 증가되다가($p < 0.01$), 72시간군에서 유의하게 감소되었다($p < 0.05$). 72시간군에서 3시간군에 비해 역시 유의하게 증가되는 결과를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 4).

3. 기관지폐포세척 단백질 농도, 총 백혈구수 및 분획 세포 상호간의 관계

기관지폐포세척 총 백혈구수와 단백질 농도는 각각 3시간에 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 72시간에 총 백혈구수의 유의한 감소에도($p < 0.05$) 불구하고 단백질 농도는 계속 증가되었는 소견을 보였다. 기관지폐포세척 총 백혈구수와 단백질 농도와의 유의한 상관관계를 나타내었다($r = 0.65, p < 0.001$)(Fig. 2). 기관지폐포세척 백혈구 동태의 가장 큰 특징은 다형 백혈구의 증가가 두드러진 소견이었다. 총 백혈구수와 호중구 및 단핵구수 간에는 유의한 상관관계를 보였으며($r = 0.97, p < 0.001$; $r = 0.61, p < 0.001$), 단백질 농도와 호중구 및 단핵구수 간에도 유의한 상관관계

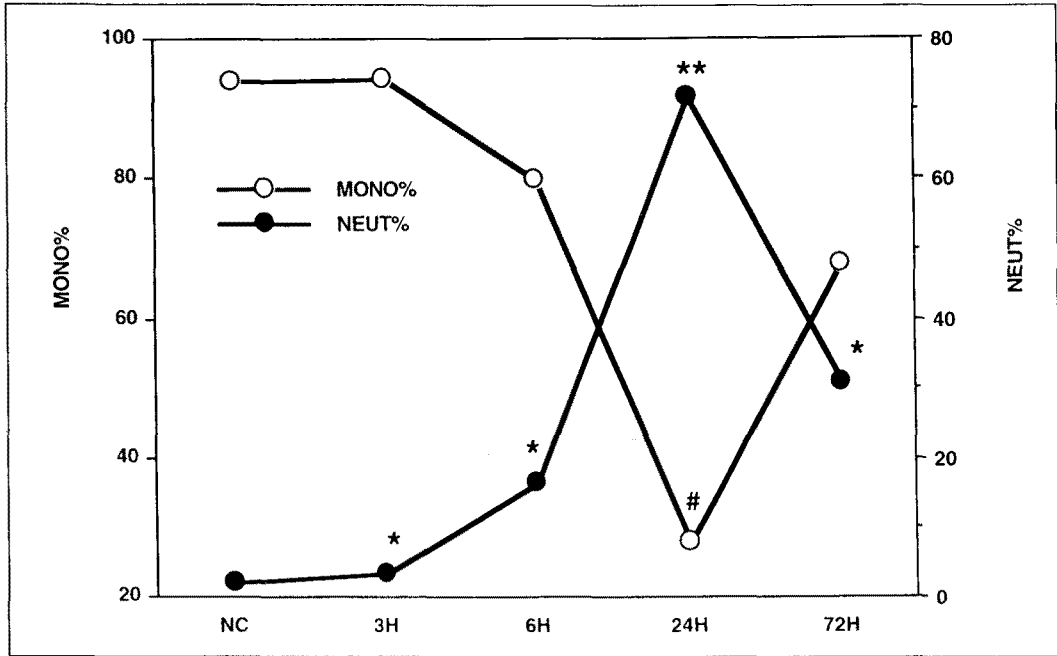


Fig. 3. The time response curve of differential cell percentage in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)

*#p < 0.05 vs. NC ; **p < 0.05 vs. 3H

를 보였다($r = 0.55, p < 0.005$; $r = 0.64, p < 0.001$)(Fig. 5). 기관지폐포세척 단핵구는 관찰기간 동안 계속 유의한 증가를 보였으나 호중구는 72시간에 의미있는 감소를 보여 폐손상 과정에서 단핵구는 지속적인 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과로 보아 백혈구로 유발된 폐삼출이 백혈구 세포의 동태에 전적으로는 영향을 받지않고 진행되고 있음을 고려해볼 수 있을 것으로 사료되었다.

4. 기관지폐포세척 TNF α 와 IL-6의 등태

기관지폐포세척 TNF α 및 IL-6의 농도는 정상대조군에서 각각 0.06 ± 0.06 U/ml($n = 5$) 및 0.45 ± 0.23 U/ml ($n = 5$)이었다. 3시간군은 각각 3.05 ± 1.51 ($n = 7$) 및 184.56 ± 49.49 ($n = 7$)이었고 6시간군 각각 31.15 ± 14.30 ($n = 6$) 및 125.22 ± 42.65 ($n = 6$), 24시간군 각각 3.71 ± 1.36

($n = 5$) 및 72.14 ± 42.65 U/ml ($n = 5$), 72시간군에서는 각각 1.71 ± 0.99 U/ml ($n = 5$) 및 4.04 ± 2.61 U/ml ($n = 5$)이었다(Table 2). 기관지폐포세척 TNF α 는 모든군에서 정상대조군과 유의성이 인정되었으며($p < 0.005$) 6시간군은 최고 평균치를 보이면서 3시간군에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$). 24시간군에서 6시간군에 비해 유의하게 감소된 결과를 보였다($p < 0.05$). 기관지폐포세척 IL-6는 3시간군에서 정상대조군에 비해 유의하게 증가되어($p < 0.005$) 최고 평균치를 보였으며 72시간에서 유의하게 감소된 결과를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 6). 기관지폐포세척 TNF α 와 IL-6간에는 연관성은 관찰되지 않았다. 특히 3 및 6시간군까지의 초기 관찰기간중 TNF α 와 총백혈구수 및 단핵구수 각각에서 유의한 상관관계를 보였다($r = 0.61, p < 0.05$; $r = 0.67, p < 0.05$)(Fig. 7). 본연구에서는 IL-6가 TNF α 보다 조기에 최고치에 도달한 것으로

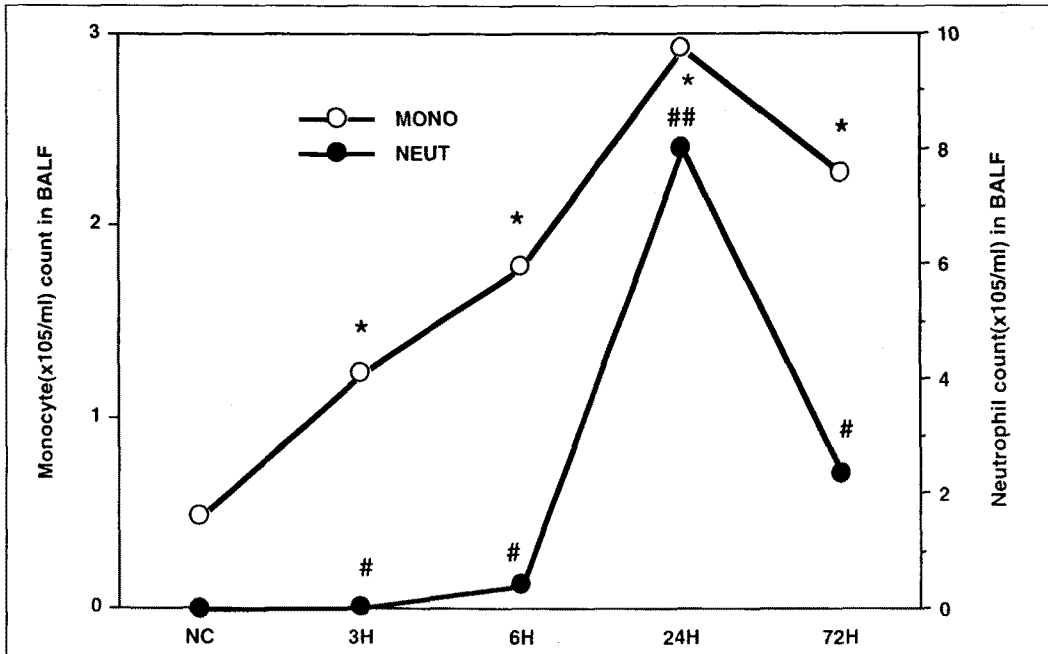


Fig. 4. Time response curve of monocyte and neutrophil counts in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)
 *#p < 0.05 vs. NC ; ##p < 0.05 vs. 3H

보아 IL-6의 분비가 TNF α 의 특별한 영향을 받지 않았을 것으로 고려하였다. 폐장내 IL-6는 폐손상군에서 24시간까지 유의한 농도로 유지되는 결과를 보였으며 3시간에 최고치에 도달한 결과로 보아 초기 IL-6의 기원은 전적으로 활성화된 백혈구에서 분비되었다기 보다는 폐장의 내피 및 상피세포등에서 많은 부분이 분비되었을 가능성을 시사할 것으로 사료되었다. TNF α 는 관찰기간 초기에만 유입된 총백혈구 및 특히 단핵구수와 유의한 상관관계를 보여 폐손상에 미치는 직접적인 TNF α 의 역할은 초기에 관여될 것으로 생각되며 관찰기간동안 진행 및 유지된 폐장내로의 의미 있는 세포유입은 TNF α 외의 다른 물질로 설명되어야 함을 시사하는 것으로 사료되었다.

5. 조직 소견의 검색

정상대조군에서의 염증세포수는 34.80 ± 2.22 였고

폐포벽 두께는 $10.85 \pm 1.07m$, 3시간군 각각 117.10 ± 7.87 , 10.44 ± 0.89 , 6시간군 각각 229.50 ± 12.66 , 28.99 ± 3.29 24시간군 각각 279.90 ± 1.55 , 56.94 ± 14.89 , 72시간군에서는 각각 248.00 ± 20.15 , $17.51 \pm 1.04m$ 이었다(Table 3). 무작위로 선정된 조직 절편 slide 관찰결과 염증 세포수는 3시간군에서 유의하게 증가하여($p < 0.001$) 24시간군에서 최고평균치를 보이다가 감소하는 경향을 보였으나 6시간군과 24 및 72시간군간에는 통계적 유의성은 없었다. 폐포벽 두께의 경우 6시간군에서 유의하게 증가하여($p < 0.001$) 24시간군에서 최고평균치를 보였으며 72시간군에서 유의하게 감소되는($p < 0.005$) 결과를 보였다. 72시간군은 6시간군에 비해서는 유의하게 감소되어 있는($p < 0.01$) 결과를 보였다(Fig. 8). 염증세포수와 폐포벽 두께는 상호간에 유의한 상관관계를 보였다($r = 0.61$, $p < 0.001$). 이상의 결과로 보아 폐장내 염증세포의 증가와 폐포벽

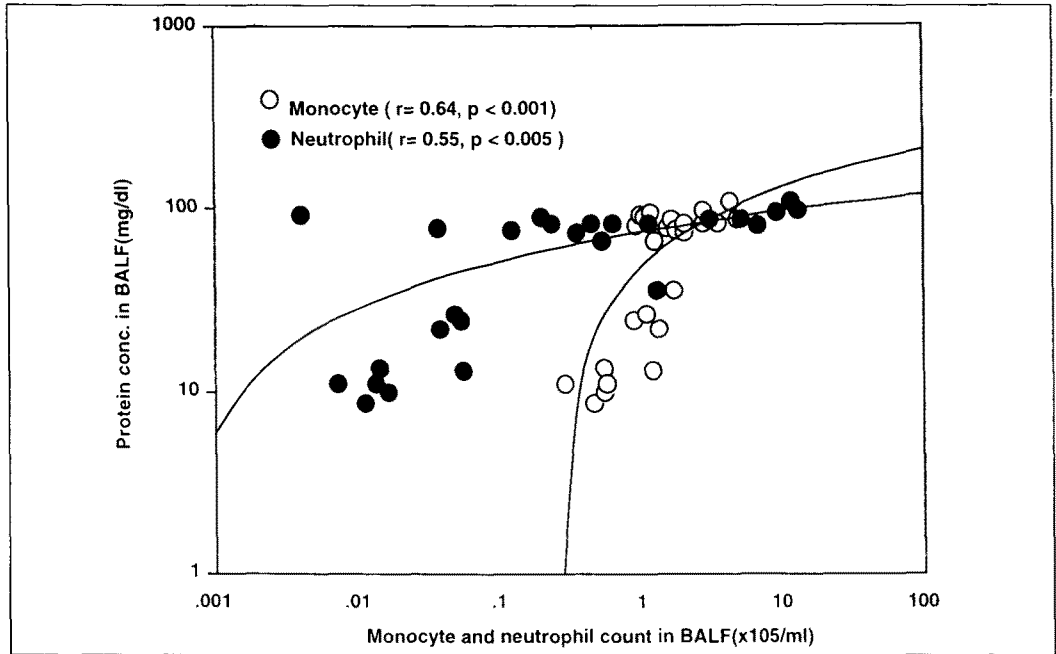


Fig. 5. The logarithmic relationship between protein conc. and monocyte and neutrophil count in BALF after i.v. administration of endotoxin

Table 2. Time course change of TNF α and IL-6 conc. in BALF after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)

BAL	NC	3H	6H	24H	72H
NO	5	7	6	5	5
TNF α	0.06	3.05*	31.15**	3.71*	1.71*
(U/ml)	± 0.06	± 1.51	± 14.30	± 1.36	± 0.99
IL-6	0.45	184.56*	125.22*	72.14*	4.04#
(U/ml)	± 0.23	± 49.49	± 42.65	± 42.65	± 2.61

*p < 0.05 vs. NC ; **p < 0.05vs. 3H ; p < 0.05 vs. 24H

조직양의 증가와는 연관성이 있을 것으로 사료된다. 특히 정상대조군과 3시간군과의 비교에서 염증세포의 유의한 증가(p < 0.001)만이 관찰되어 초기 급성 폐손상시에 간질조직의 양적 변화보다는 염증 세포의 유입이 주된 현상으로 보인다. 한편 72시간군에서는 폐포벽 조직양이 유의하게 감소된(p < 0.005) 결과를

보여 폐조직의 치유 및 재생과정에서 폐포벽의 부종이 가장 먼저 감소됨을 시사할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 모든 인자에서 정상대조군과는 유의성이 인정되므로 관찰시간인 72시간내에는 정상대조군 정도에 도달하는 재생과정은 일어나지 않는 것으로 보인다.

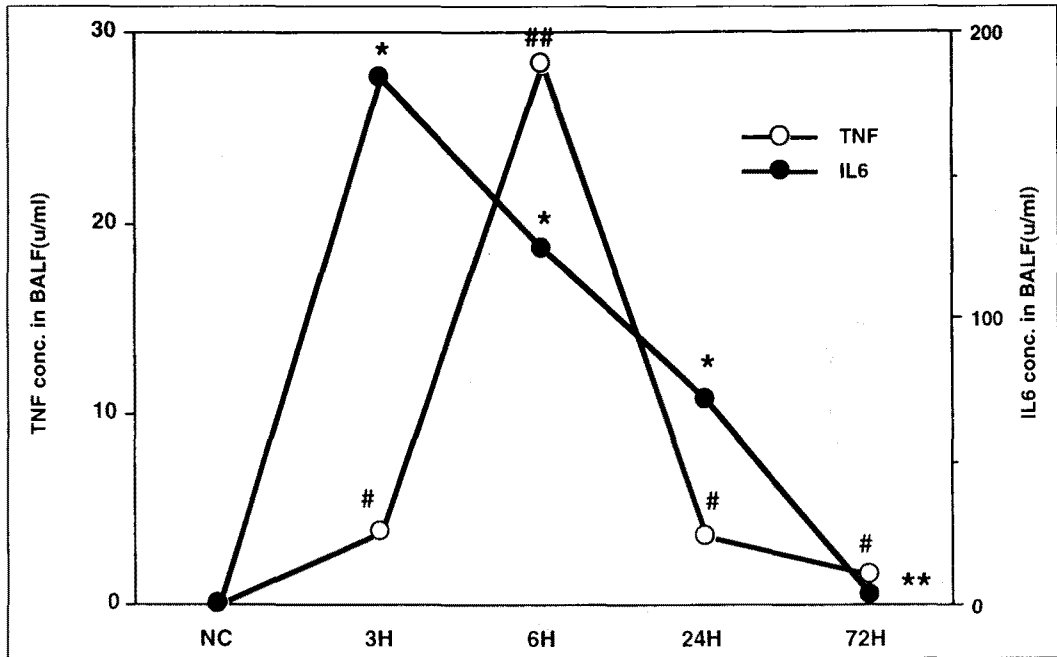


Fig. 6. Time response curve of TNF alpha and IL-6 conc. in BALF after i.v. administration of endotoxin

*#p < 0.05 vs. NC ; **p < 0.05 vs. 24H

##p < 0.05 vs. 3H

고찰

내독소는 내독소결합단백(LBP-lipopoly- saccharide binding protein)으로 알려진 혈청 인자와 결합하여 작용한다. 이는 내독소의 증폭된 작용기전 설명에 주요한 현상으로¹⁵⁾ 내독소 단독으로인한 폐포대식세포의 자극보다 폐포대식세포내 cytokine의 생성을 빠르게 일어나게 한다. 내독소로 자극된 내피세포에서 생성된 IL-1, TNF α 등은 내피세포의 단백질합성능 증가에 의한 것으로 설명되고 있다¹⁶⁾. 내독소와 반응하는 여러 표적세포(target cells) 표면에서 다양한 유착분자들이 발견되고 있으며¹⁷⁾ 특히 단핵-대식세포에서 내독소에 대한 반응은 주로 CD14 의존성으로 알려져 있다. CD14는 55kD의 glycosylphosphatidylinositol로 고정된 세포 막단백질로 내독소-내독소결합단백 복합체의 수용체로¹⁸⁾ 작용하며, 내독소결합

단백의 폐포대식세포에 대한 효과가 항CD14단클론항체인 28C5에 의해 억제됨이 관찰됨으로써 내독소-내독소결합단백 복합체의 작용발현에 CD14가 중요한 역할을 하는 것으로 알려지게 되었다¹⁵⁾. 폐장내 대식세포에서 CD14의 존재가 규명되고 폐포대식세포 및 단핵구에서 단백질분해과정 및 phosphatidylinositol 특이 phospholipase C등에 의해 분리(shedding)된 sCD14가 폐장내 sCD14의 일부 기원임이 제안되어 이로인해 CD14가 표현되지 않는 폐장내 다른 기질세포에서도 내독소에 대한 증강된 반응을 설명하고 있다¹⁹⁾. 내독소결합단백이나 CD14등을 포함한 혈청인자들은 내독소 유발 내피손상을 증강시키고²⁰⁾ 표적세포의 cytokine 및 유착분자(adhesion molecule)의 증폭된 발현에 기여되는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 중증 급성 폐손상환자의 혈청과 기관지폐포세척액내에서 내독소결합단백 및 sCD14의 의미있는 증가가 관찰되었

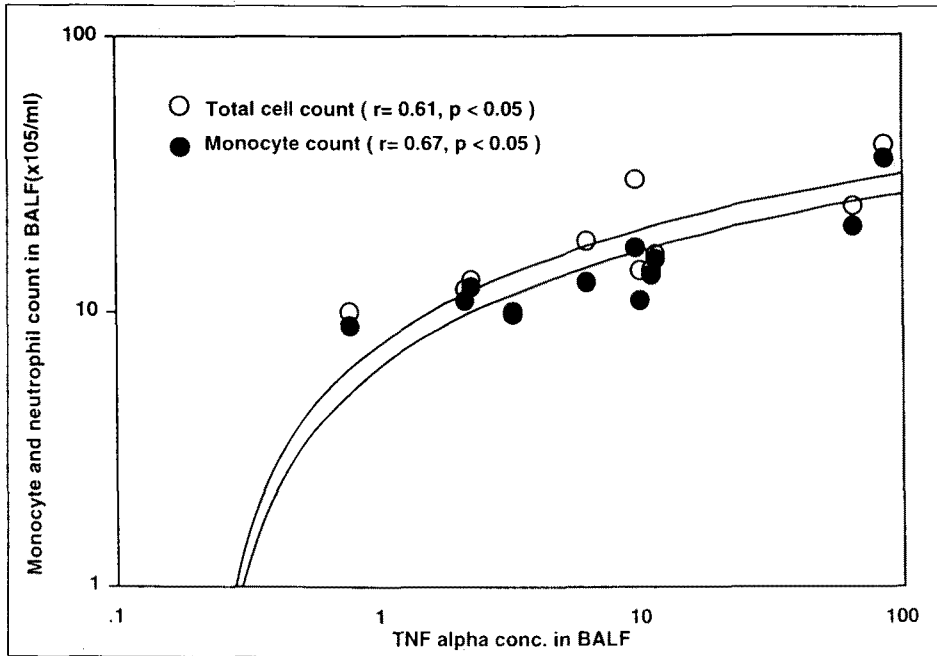


Fig. 7. The logarithmic relation ship between the TNF alpha conc. and monocyta and total cell counts in BALF at 3-, 6h after i.v. administration of endotoxin

Table 3. The quantitation of the infiltrating inflammatory cells, thickness of alveolar wall according to the time after i.v. administration of endotoxin(5mg/kg)

TISSUE	NC	3H	6H	24H	72H
Count ¹	4.80	117.10*	229.50*	279.90*	248.00*
	±2.22	±7.87	±12.66	±21.55	±20.15
Thickness (mm)	10.85	10.44	28.99	56.94*	17.51#
	±1.07	±0.89	±3.29	±14.89	±1.04

¹The count was calculated by the examination of ten fields, selected randomly, under ×300 LM via IBM IMAGE PRO program.

*p < 0.001 vs. NC ; #p < 0.005 vs. 24H

으며 이는 기관지폐포세척 단백질량과 의미있는 상관관계를 보인 바 있다²²⁾. 내독소결합단백은 폐장내보다는 간에서 주로 생성²³⁾되므로 기관지폐포세척액내 내독소결합단백의 증가는 폐장내 내피 및 상피세포등의 투과성이 증가됨으로써 일어나는 것으로 생각되고 있다. 본연구결과에서 관찰기간동안 계속된 기관지폐포세척

액내 유의한 비특이단백량의 증가도 폐장내 세포의 투과성의 변동 및 이로인한 내독소 결합단백 및 일부 sCD14의 폐장내로의 유입과 유관할 것으로 생각된다. 내독소결합단백 및 sCD14의 폐장내 증가는 비교적 적은 내독소의 양에도 폐장내 세포등에 대한 내독소의 효과를 수백배 증폭시키는 역할을 하게된다.

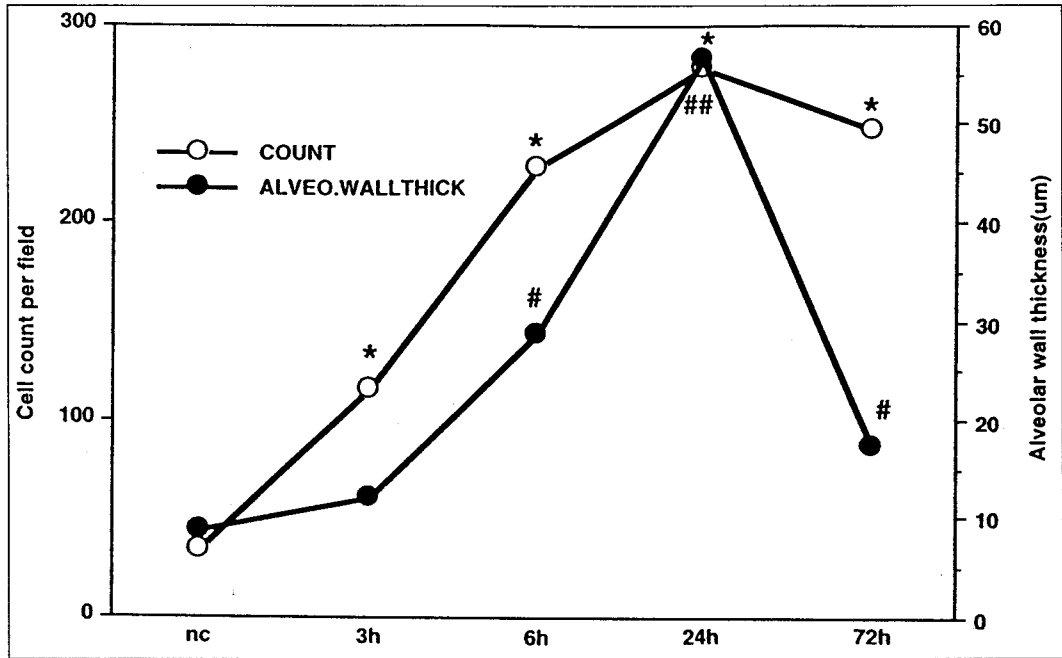


Fig. 8. Time course change of histologic finding such as alveolar wall thickness and inflammatory cell counts under $\times 300\text{LM}$ after i.v. administration of endotoxin
 *#p < 0.001 vs. NC ; ##p < 0.005 vs. 24H

폐장내 LPS-LBP-CD14계의 조절을 통해 내독소에 대한 폐장내 생체 반응등을 경감시킬 수 있을 것으로 생각되고 있다.

호중구, 단핵구 및 폐포대식세포는 폐장내 생체방어 기전에 주요한 식세포로서 특히 내독소분비-그람음성균 감염시 활성화된 순환 호중구 및 단핵구의 폐장내 유입이 개체 방어기능 강화에 중요한 역할을 하게 된다²⁴. 내독소 자극으로 인한 호중구 및 단핵구의 막변형성의 감소와 함께 Thromboxane A2등의 염증매개체등에 의한 폐혈관수축으로 일어난 폐혈류의 불균형에 일부 기인되어 호중구 및 단핵구의 급격한 폐장내 결집이 일어나게되고 활성화된 동원 식세포와 폐장내 내독소로 자극된 내피세포간의 유착 분자(adhesion molecule)발현이 상승적으로 증강되면서 결과적으로 감염소 주위 내막으로 활성화된 식세포의 고착 및 누출(diapedesis)이 증가하게 되어 급성 염증반응이 일어나게 된다. 호중구 및 단핵구표면에 발현된 유착분

자는 내독소유발-내피세포간 이동에 중요한 역할을 하여 특히 유착분자의 하나인 CD11b/CD18은 식세포등의 막유연성(flexibility)에 결정적인 영향을 미치며 생체의 실험에서 항CD18항체로 단핵구의 내피세포간 이동의 감소가 관찰된 바 있다²⁵. 단핵구 및 폐포대식세포는 IL-8를 분비하며 호중구 표면내 유착분자의 발현이 IL-8에 의해 촉진되고, 호중구와 내피세포간 유착정도가 항IL-8항체로 억제됨이 보고된 바 있다²⁶. 단핵구는 호중구에 비해 세포골격의 변형성이 상대적으로 적어 폐-미세혈관계내에 잔류되는 경향이 많으며 이러한 연변추향계(marginated pool)가 내독소혈중시 폐장내 폐포대식세포를 포함한 단핵구의 급격한 증가를 가져온다²⁷. 단핵구는 호중구에 비해 효율적인 효과세포(effector cell)로 IL-1, IL-6, IL-8, TNF α 등의 cytokine을 비롯하여 lysozyme, collagenase, eicosanoids, poteinase inhibitor, fibronectin등을 분비함으로써 폐장내 개체방어시 직

접적인 식세포로서의 역할외에 중요한 역할을 수행하게 된다²⁸⁾. 또한 폐포대식세포를 포함한 이들 단핵구는 폐손상후에 염증조직의 재생과정에 관여할 것으로 생각되고 있다^{29, 30)}. 내독소 유발 급성 폐손상시 활성화된 호중구에서 분비되는 유리산소기가 폐손상에 기여하여 폐손상의 대개가 호중구 의존성이 주장되고 있으나 항호중구항체로 유발시킨 호중구 결핍군에서 내독소로 유발된 급성 폐손상이 특별한 영향을 받지 않음이 관찰되었고^{31, 32)} 임상례에서도 호중구 결핍환자군에서 성인형 호흡곤란증후군이 발생됨이 잘 알려져 있다³³⁾. 본실험결과 기관지폐포세척 호중구 최고평균치와 기관지폐포세척 단백질도 최고평균치 관찰시간이 일치되는 결과를 보여 호중구가 급성 폐손상에 중요하게 기여될 것으로 생각되었으나 호중구의 계속되는 유의한 증가에도 단백질 증가의 부가적인 효과는 보이지 않았으며, 또한 호중구의 유의한 감소 발생에도 단백질은 계속적인 증가를 보여 폐손상의 증감을 호중구만으로 설명하기는 미비할 것으로 생각된다. 기관지폐포세척 단백질 양태는 관찰기간동안 호중구의 유의한 감소에도 계속적으로 증가되어 단핵구가 급성 폐손상의 초기화 및 진행에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 또한 폐손상의 일부 재생과정에 기여될 것으로 생각된다.

TNF α 는 폐혈증을 설명하는 주된 매개물로서 폐혈증에서의 TNF α 의 역할은 항TNF α 항체로 전처치된 내독소 주입 토끼에서 생존을 개선을 통해 입증된 바 있다³⁴⁾. 이러한 TNF α 는 내피세포 및 식세포들을 활성화시키는 전염증활성의 역할을 가져 다른 cytokine이나 급성염증으로 산출된 염증매개물등과 상승적인 효과를 이루면서 광범위한 조직손상을 일으킨다. TNF α 는 자극된 세포에서 IL-1의 생성성을 유도하기도 하며, 비교적 낮은 농도의 유리 IL-1과 상승적으로 작용하여 조직의 치명도(lethality)를 증가시킨다³⁵⁾. IL-1과 더불어 단핵구에서 분비된 r-interferon도 이러한 TNF α 의 생리효과를 증폭시키게 된다³⁶⁾. 그러나 폐혈증환자에서 항TNF α 항체 주입의 임상시험결과 생존율의 유의한 개선은 보고되지 못하였으나

이는 폐혈증을 개체인자에 따라 다르게 해석, 치료되어야 함을 시사하는 바이다³⁷⁾. 내독소를 실험쥐 기도 내로 주입시켜 유발된 급성폐손상에서 TNF α , Macrophage Inflammatory Protein-2, IL-1, IL-6등의 cytokines가 발현되며 이는 유입된 호중구 및 단핵구에서 분비될 것으로 설명된 바 있다³⁸⁾. 이러한 폐손상에서 호중구 유착분자인 CD11a 항체로 처치한 경우 호중구의 폐장내 유입을 32%에서 방지하였으며 내피세포 유착분자인 ICAM-1 항체로 전처치시 66%에서 호중구 유입을 막을 수 있었으며 역시 CD18 항체로 폐장내로의 호중구 유입을 방지하였으나 동시에 측정된 기관지폐포세척액내 TNF α 치의 변동은 없어 폐장내 TNF α 가 폐포대식세포에서 주로 비롯될 것이라고 하였다³⁹⁾. 체외실험에서는 G-CSF로 자극된 호중구가 내독소로 자극된 단핵구의 TNF α 분비능을 감소시켰음이 보고되었다⁴⁰⁾. 인체에서 발생한 내독소혈증 초기에 혈청내 TNF α 와 IL-6는 단조성(monophasic)으로 증가되며 동시에 tissue plasminogen activator, von willebrand factor 등의 증가도 관찰되어 내피세포의 활성화와 일치됨이 밝혀진 바 있다⁴¹⁾. 내독소혈증에서 혈중 TNF α 는 IL-6 유리보다 선행되는 것으로 알려져 있으며,⁴²⁾ 정맥내 내독소 주입은 기관지에 미치는 영향이 적어 기관지폐포세척액내에 cytokines이 발견되지 않았다는 결과도 있으나⁴³⁾ 본실험에서는 아치사량의 내독소혈증을 유발하여 기관지폐포세척액내에서 cytokines가 검출될 수 있었던 것으로 생각되었다. 폐혈증후군에서의 IL-6는 TNF α 나 다른 cytokine 등의 표식자(surrogator)로 알려져 있다⁴⁴⁾. IL-6치와 성인형 호흡곤란증후군의 발생과의 연관성을 밝히지는 못하였으나 폐혈증 환자에서 혈청내 IL-6농도가 높을수록 사망율은 증가하며 TNF α 농도치는 예후와는 관계가 없는 것으로 보고된 바 있다⁴⁵⁾. 특히 24시간이내에 IL-6치가 감소하지 않는 것이 예후판정에 보다 신뢰되는 지표로 설명되고 있다⁴⁶⁾. 국소적인 항염증작용을 갖는 IL-6를 고려하면 이의 계속적인 상승은 급성 염증이 지속되고 있음을 나타낸다고 볼 수 있으며 본연구에서 기관지폐포세

척 IL-6는 72시간에 유의한 감소를 보였다. IL-6는 대식세포로 하여금 T-세포를 방해하는 TGF β 등의 억제인자를 내거나 대식세포의 nitric oxide 생성능을 감소시킬 수 있으며⁴⁷⁾ 또한 호중구의 초기자극화에 IL-6가 혈소판 활성화인자(PAF)와 상승적으로 작용하여 다발성 장기손상 발생에 기여할 수 있다고 하였다(48). 또한 항IL-6항체로 전처치한 내독소유발 급성폐손상 동물군에서 생존율의 개선이 보고된 바 있어³⁸⁾ 급성폐손상에서의 IL-6의 정확한 역할에 대해서는 모르는 바가 많다. 본연구결과 기관지폐포세척 IL-6는 관찰기간 24시간까지 유의한 증가가 계속되다가 72시간군에서 기저치로 환원되는 소견을 보였다. 유발된 패혈증후군 말초혈액에서 IL-6가 2시간째에 유의하게 증가되어 4시간에 최고치를 나타내다 24시간내에 기저치로 환원된다는 보고⁴⁹⁾ 등과 비교하여 본 연구에서 폐장내 IL-6는 24시간까지도 유의한 농도가 유지됨이 관찰되어 폐장내에서 IL-6의 분비가 지속되고 있음을 나타낸다고 볼 수 있다. 연구결과 폐장내 IL-6가 3, 6시간에 최고 천정치를 보여 초기 IL-6의 기원은 일부 혈청에서 유래되어 폐장내로 구획화(compartmentalization)된 외에도 상당부분 폐장 기원으로 생각된다. 폐장내 기원은 활성화된 백혈구 및 호중구가 24시간에 최고평균치를 보였던 결과로 보아 폐포대식세포 및 다른 기질세포 즉 내피 및 상피 세포등에서 주로 분비되었음을 시사하는 것으로 생각되었다. 초기 3시간군에서의 TNF α 의 IL-6에 비해 낮았던 검출정도는 TNF α 의 활성도가 국소적으로 비활성화되었거나, TNF α 가 성인형 호흡곤란증후군 환자의 기관지 폐포세척액내에서 생체활성도가 IL-1 β 와는 다르게 현저히 떨어져 있음이 관찰된 사실로 미루어 폐포대식세포에서 IL-1 β 와는 다른 조절계에 의한다는 가설로 일부 설명할 수 있을 것으로 생각된다.^{50, 51)} 본연구결과 기관지폐포세척 IL-6와 TNF α 상호간에 유의한 상관성은 없었다. TNF α 는 관찰기간 초기에만 유입된 폐장내 총백혈구 및 특히 단핵구수와 유의한 상관관계를 보여 폐손상에 미치는 직접적인 TNF α 의 역할은 폐손상 초기에 관여되는 것으로

생각된다. 관찰기간동안 진행 및 유지된 폐장내로의 의미있는 세포유입은 TNF α 등으로 자극받아 활성화된 세포들에서 분비된 염증매개물 및 chemokine등의 영향으로 이루어짐을 보여준다.^{52, 53)}

요약하여 내독소 유발 급성 폐손상의 초기 손상에 폐포대식세포, 폐장내 기질세포들의 활성화 와 더불어 이들 세포에서 분비되는 proinflammatory cytokines가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

그람음성균 외세포벽 구성체의 일부인 리포다당질(lipopolysaccharide)로 구성된 내독소는 그람 음성균 유발 감염으로 발생한 염증 반응을 설명하는 주요 소이다. 내독소(리포다당질)는 특히 호중구의 조직내 침윤을 특징으로 하는 급성 폐손상을 조장하며, 이러한 폐손상 발생 기전의 하나로서 내독소 자극에 의한 폐장내 효과세포(effector cells)의 cytokines 발현이 알려져 있다. 이때 유리된 cytokines은 다시 염증세포 및 폐장내 기질세포등에 영향을 주어 급성 폐손상이 초래되는 것으로 설명되어지고 있다. 저자들은 실험백서에서 아치사랑의 내독소를 정맥내 주입한 후 유발된 급성 폐손상에서 내독소 주입후 시간에 따른 폐손상의 변화를 관찰하고 이들 염증세포가 폐손상에 미치는 영향을 보고자 하였다.

방 법 :

체중 200g내외의 건강한 백서의 미부 정맥을 통하여 내독소를 5mg/kg 용량으로 주입후 각각 0, 3, 6, 24, 72시간째 기관지폐포세척술을 시행하여 총 세포수 및 분획 세포수를 산출하고, 총 단백질 및 TNF α 와 IL-6 측정과 동시에 조직소견의 검색을 자기 비교, 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

결 과 :

기관지폐포세척 총 백혈구수와 단백질 농도는 각각 3시간에 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 72시간에 총 백혈구수의 유의한 감소에도($p < 0.05$) 불구하고 단

백농도는 계속 증가되었는 소견을 보였다. 기관지폐포 세척 총 백혈구수와 단백 농도와는 유의한 상관관계를 나타내었다($r = 0.65, p < 0.001$). 기관지폐포세척 총 백혈구수와 호중구 및 단핵구수 간에는 유의한 상관관계를 보였으며($r = 0.97, p < 0.001; r = 0.61, p < 0.001$), 단백농도와 호중구 및 단핵구수 간에도 유의한 상관관계를 보였다($r = 0.55, p < 0.005; r = 0.64, p < 0.001$). 기관지폐포세척 단핵구는 관찰기간동안 계속 유의한 증가를 보였으나 호중구는 72시간에 의미있는 감소를 보여 폐손상 과정에서 단핵구는 지속적인 역할을 할 것으로 생각되었다. IL-6와 TNF 농도는 3 및 6시간째에 각각 최대치를 보였으며 24 및 72시간군과 비교하여 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$). 이들 상호간에 관련성은 없었으며, 특히 급성 폐손상 3 및 6시간군까지의 초기 관찰 기간중 TNF α 와 총 백혈구수 및 단핵구수 각각에서 유의한 상관관계를 보였다($r = 0.61, p < 0.05; r = 0.67, p < 0.05$). 조직 소견의 검색 결과 폐장내 침윤 염증 세포수와 폐포벽 두께 정도와는 유의한 상관성이 관찰되었다($r = 0.61, p < 0.000$). 3시간에는 단지 염증 세포의 침윤만이 유의한 증가를 보여($p < 0.001$) 폐손상 초기에는 염증 세포의 침윤이 간질 조직의 변화를 선행하는 것으로 사료되었으며, 72시간에서는 폐포벽의 두께만이 유의하게 감소된 결과($p < 0.005$)를 보여 폐손상후 재생 과정중 폐포벽의 부종이 가장 먼저 감소되는 것으로 사료되었다.

결 론 :

내독소 유발 급성 폐손상에서 (1) 호중구는 주된 염증 세포로 작용하나 단핵구/폐포대식세포 및 폐장내 비면역세포등이 폐손상의 발생 및 진행에 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다. (2) 기관지폐포세척 IL-6는 TNF α 와 비종속 관계를 보였고 조기에 최대치를 보여, 특히 IL-6 분비는 폐장내 다양한 세포에서 유래 될 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. William A. Marinelli, David H. Ingbar : Diagnosis and management of acute lung injury. *Clinics In Chest Medicine*. **15** : 517, 1994
2. Morrison, D., R. Ulevitch : The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am. J. Pathol.* **93** : 527-617, 1978
3. Brigham, K.L., B. Meyrick : Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141** : 765~788, 1986
4. Rinaldo, J.E., J. W. Cristman. : Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* **11** : 621~632, 1990
5. Becker S., Develin RB., Haskill JS : Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin-1 by human alveolar macrophages. *J Leuk Biol.* **45** : 348~355, 1989
6. Thomas R. Ulich., Luke R. Waston : The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am. J. Pathol.* **138** : 1485~1495, 1991
7. Hirano T., Akira S., Taga T., Kishimoto T : Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* **11** : 443, 1990
8. Gauldie J., Richards D., H. Baumann : Interferon beta2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 7251~7255, 1987
9. Aderka D., J. Le., J. Vilcek : IL-6 inhibits lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor

- production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J. Immunol.* **143**: 3517~3523, 1989
10. Bachofen, M., E. R. Weibel: Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinics Chest Med.* **3**: 35~36, 1982
 11. Rinaldo, J.E: Mediation of ARDS by leukocytes: clinical evidence and implications for therapy. *Chest* **89**: 590~593, 1986
 12. Heflin AC., Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest.* **68**: 1253~1260, 1981
 13. Stephens, K. E., A. Ishizaka, Z: Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**: 1300~1307, 1988
 14. Jerome Pugin, Thomas R. Martin.: Proinflammatory Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluids from Patients with ARDS, a Prominent Role for Interleukin-1 *AM J RESPIR CRIT CARE MED* **153**: 1850~6, 1996
 15. Martin TR., Mathison JS., Tobias PS: Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* **90**: 2209~2219, 1992
 16. Pohlman TH., Harlan JM: Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol.* **119**: 41~52, 1989
 17. Hakkert BC., Kuijpers TW., Leewenberg JFM., Roos D: Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood* **78**: 2721~2726, 1991
 18. Wright SD., Ramos RA., Detmers PA: Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* **174**: 342~347, 1991
 19. BAZIL v., Strominger JL: Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* **147**: 1567~1574, 1991
 20. Meyrick B., Hoover R., Jones MR., Berry LC., Brigham KL: In vitro effects of endotoxin on bovine and sheep lung microvascular and pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol.* **138**: 165~174, 1989
 21. Von Asmuth EJ., Ceska M., Burrman WA: LPS and cytokine induced endothelial cell IL-6 release and ELAM-1 expression; involvement of serum. *Eur Cytokine Netw.* **2**: 291~297, 1991
 22. Rubenfeld GD., Steinberg KP., Maunder RJ: Lipopolysaccharide binding protein is elevated in bronchoalveolar lavage fluid in patients with ARDS. *Am Rev Respir Dis.* **147**: A618, 1993
 23. Ramadori G., Tobias PS., Ulevitch RJ: Biosynthesis of lipopolysaccharide binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* **58**: 89~94, 1990
 24. Reynolds HY: Lung host defenses: a status report. *Chest* **75**: S39~S42.0, 1979
 25. Hakkert BC., Roos D. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine activated endothelial cells. *Blood* **78**: 2721~2726, 1989
 26. Huber AR., Kunkel SL., Todd RF., Weiss SJ: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-88. *Science.* **254**: 99~102, 1991

27. Ohgami M., Hogg JC : Late effects of endotoxin on the accumulation and function of monocytes in rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis.* **146** : 190~195, 1992
28. Nathan CF : Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* **79** : 319~326, 1987
29. Rappolee DA., Mark D., Banda MJ., Werb Z : Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo ; analysis by mRNA phenotyping. *Science* **241** : 708~712, 1988
30. Sibille Y., Merrill WW., Naegel GP., Care SB., Cooper JAD., Reynolds HY : Human alveolar cells release in vitro a factor(s) which inhibits neutrophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1** : 407~416, 1989
31. Basadre JO., Singh H., Herdon DN : Effect of antibody-mediated neutropenia on the cardiopulmonary response to endotoxemia. *J Surg Res.* **45** : 266~275, 1988
32. Winn R., Harlan J : Neutrophil depletion does not prevent lung edema after endotoxin infusion in goats. *J Appl Physiol.* **62** : 116~121, 1987
33. Laufe MD., Simon RH., Flint A., Keller JB : Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am J Med.* **80** : 1022~1026, 1986
34. Mathison JC., E. Wolfson., RJ Ulevitch : Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide induced injury in rabbits. *J Clin Invest.* **81** : 1925~1937, 1988
35. Waage A., T. Espevik : Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor- α / cachectin in mice. *J. Exp. Med.* **167** : 1987, 1988
36. Calandra T., Grau GE : Prognostic value of tumor necrosis factor-cachectin, interleukin-1, interferon alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis.* **161** : 982~987, 1990
37. Bone. R.C. : Why Sepsis Trials Fail. *JAMA.* **276**, **7** : 565, 1996
38. H. Fletcher Starnes JR., John S. Abrams: Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal E. Coli infection and lethal tumor necrosis factor- α challenge in mice. *J Immunol.* **145** : 4185~4191, 1990
39. Winson W. Tang., Thomas R. Ulich : Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. IX. Contribution of CD11a/ICAM-1 to neutrophil emigration. *Am J Physiol.* **269** : L653~L659, 1995
40. Takeshi Terashima., Kenzo Soejima., Minoru Kanazawa : Neutrophil activated by granulocyte colony-stimulating factor suppress tumor necrosis factor- α release from monocytes stimulated by endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **13** : 69~73, 1995
41. Sam R. Sharar., Robert K. Winn., John M. Harlan : Endotoxin and the lung. **77** : 229~250, 1995
42. Spinaz, G.A., S. Cammisuli. : Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J. Infect. Dis.* **163** : 89~95, 1991
43. Boujoukos, A.J., A.F. Suffrendini. : Compartmentalization of the acute cytokine response in human after intravenous endotoxin administration. *N. Engl. J. Med.* **173** : 1021~1024, 1993
44. Helle M., De groot ER-Interleukin-6 is involved in interleukin-1 induced activities. *Eur J Immunol.* **18** : 957~959, 1988
45. Charles J. Fisher., Jerald C. Sandoff : Influence

- of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Critical Care Medicine*. **21** : 318~327, 1993
46. J5 Study group treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with the E.Coli J5 : A prospective double blind study. *J Infect Dis* **165** : 695~701, 1992
47. Tiao G, Rafferty J, Ogle CK : Detrimental effect of nitric oxide synthetase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of TNF and IL-6. *Surgery*. **116** : 332~338, 1994
48. Biffl WL, Moore EE, Moore FA : Interleukin-6 potentiates neutrophil priming with platelet-activating factor. *Arch Surg*. **129** : 1131~1136, 1994
49. Fisher C J., Opal SM., Dhainaut J-F : Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med*. **21** : 318~327, 1993
50. Takasuka, N.T., Tokunaga, K.S. Akagawa. : Pre-exposure of macrophages to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor- α but not of IL-1 β mRNA. *J.Immunol*. **146** : 3824~3830, 1991
51. Meduri, G.U., S. Headly. : Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over-time. *Chest* **107** : 1062~1073, 1995
52. Shall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goddel DV. : Selective attraction of monocytes and T-lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347** : 669, 1990
53. Matsushima K, Oppenheim JJ. : Interleukin 8 and MCAF : Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* **1** : 2, 1989