

Tumor Necrosis Factor- α 로 유도되는 백서의 급성 폐손상에 열충격반응이 미치는 효과

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과, 생화학교실*, 아산생명과학연구소*²

고윤석, 임채만, 김미정*², 조원경, 정병오, 송규영*, 이상도, 김우성, 김동순, 김원동

= Abstract =

The Effect of Heat Shock Response on the Tumor Necrosis Factor- α -induced Acute Lung Injury in Rats

Younsuck Koh, M.D., Chae Man Lim, M.D., Mi Jung Kim, BSc, *² Won Kyung Cho, M.D.,
Byung O Jeoung, M.D., Kyuyoung Song, Ph.D., * Tae Sun Shim, M.D., Sang Do Lee, M.D.,
Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D.

Departments of Internal Medicine and Biochemistry, Asan Medical Center,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Institute for Life Science**

Background : Heat-treated cells are known to be protected from lysis by TNF, which is considered to play a central role in the pathogenesis of sepsis-induced acute lung injury. The objective of the study was to investigate the effect of heat shock response by heat-pretreatment on the acute lung injury of the rats induced by intratracheally administered TNF- α .

Methods : We intratracheally instilled either saline or TNF (R&D, 500ng) with and without heat pretreatment in Sprague-Dawley rats weighing 250~350 g. The heated rats were raised their rectal temperature to 41 °C and was maintained thereafter for 13 minutes at 18 h before intratracheal administration of saline or TNF. After 5 h of intratracheal treatment, lung leak, lung myeloperoxidase activity (MPO) and heat shock proteins were measured in rats. Lung leak index was defined as counts per minute of I¹²⁵ in the right lung divided by counts per minutes of I¹²⁵ in 1.0 ml of blood. All data are expressed as means \pm SE.

Results : There is no difference in acute lung leak index (0.099 ± 0.024 vs 0.123 ± 0.005) among the rats given saline intratracheally with and without heat pretreatment, but MPO activity showed a decreased tendency in heat-pretreated rats (4.58 ± 0.79 U/g) compared with heat-unpretreated rats (7.32 ± 0.97 U/g) ($P=0.064$).

*본 연구는 1996년 아산생명과학연구소의 연구비 보조에 의해 이루어 졌음.

*본 연구의 요지는 1996년 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표되었음.

Rats administered TNF intratracheally with heat-pretreatment had decreased lung leak index (0.137 ± 0.012) and lung MPO activity (5.51 ± 1.04 U/g) compared with those of heat-unpretreated and TNF-administered rats (0.186 ± 0.016 , 14.34 ± 1.22 U/g) ($P < 0.05$ in each). There were no significant difference of lung leak index and MPO activity between TNF-treated rats with heat-pretreatment and saline-treated rats with and without heat-pretreatment.

Conclusion : The heat shock response attenuated neutrophil recruitment and acute lung leak induced by intratracheal instillation of TNF-in rats.

Key words : Acute respiratory distress syndrome, Acute lung leak, Tumor necrosis factor- α Heat shock protein 70, Neutrophil

서 론

열충격단백(Heat shock protein, HSP)은 세포들이 스트레스에 반응하여 세포내 다른 폴리펩티드(polypeptide)들의 생성보다 우선적으로 생성되는 단백질로서 열, 저산소증, 운동, 포도당 결핍 혹은 바이러스 감염 등과 같은 스트레스에 의해 유도된다¹⁾. 이러한 HSP는 스트레스에 의한 비가역적인 손상으로부터 세포내 구성 성분을 보호하여 스트레스동안 세포들의 생존이 가능케하며, 회복기에 세포의 정상적인 기능 회복을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이중 HSP 70계는 열로 유도되는 HSPs의 대표적인 물질로서 단백질의 조합, 주름형성 및 분해 등과 같은 세포의 정상적인 과정에 중요한역할을 하는 것으로 알려져 있다^{3~5)}.

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 1967년 처음 보고된 이래 집중호흡치료의 여러가지 발전에도 불구하고 그 치사율은 60% 이상을 상회하며⁶⁾ 특히 ARDS의 발생원인이 패혈증인 경우는 신체에 심한 스트레스를 초래하며 그 사망율이 90% 이상으로 보고되어 있다. 패혈증 병발 기전에 관여하는 여러 매개물질 중 중심 역할을 하는 것으로 여겨지는 TNF(tumor necrosis factor- α)는 동물에 전신적 혹은 폐장내 국소적으로 투여하면 급성 폐손상을 유발하며 ARDS 환자의 기관지 폐

포액^{7,8)} 및 혈청^{7,9,10)}에서도 TNF의 농도가 증가되는 것이 보고되어 있어 패혈증에 연관된 ARDS의 발생 기전에도 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 이와같이 패혈증이나 이에 합병된 ARDS 환자들은 신체적으로 심한 스트레스에 노출된 상태일 뿐만아니라 대개 고열을 동반하는 경우가 많아 이런 상태의 환자들에 신체적 방어기전으로서 HSP 70계가 관여될 가능성이 매우 클 것으로 사료된다. 생체외 실험을 통해서 HSP는 TNF에 의한 세포의 파괴를 억제하는 것으로 알려져 있으나^{11,12)}, 생체 실험을 통한 TNF로부터 유도되는 세포손상에 대한 HSP의 역할에 대한 연구결과는 아직 보고되지 않았다.

본 연구는 Sprague-Dawley rat의 기도내 TNF를 주입하여 유도되는 급성폐손상의 정도가 열의 전처치에 의해 감소되는 지를 관찰하고 열 전처치에 따른 폐 조직내 HSP70 계의 생성 여부를 관찰 함으로써 TNF에 의한 폐손상에 있어 HSP 70계의 역할을 추정하고자 하였다.

연구 방법

1. 사용 동물

몸무게 250~350 g인 species pathogen free Sprague-Dawley rat

2. 실험방법

가) 열 전처치: 기도내로 생리식염수나 TNF를 주기 18시간 전에 쥐의 복강내로 pentobarbital (35mg/kg)를 주입하여 마취시킨 후 미리 덥혀 둔 보육기에 쥐를 넣어 직장으로 측정된 체온이 41°C가 되도록 하였다(temperature probe, Omron Co, Tokyo, Japan). 체온을 41°C에서 13분간 유지한 후 쥐를 보육기에서 꺼낸 후 회복사육장(recovery cage)에 넣어 2시간 동안 관찰 한 후 완전히 회복되면 다음 실험때까지 활동하도록 하였다.

나) 기도내 약물 투여: Enflurane을 기도로 흡입 시켜 마취시킨 뒤 기도를 노출 시킨 후 기도 천자를 하여 TNF(500ng/0.5mL)를 투여하고 이어서 약물이 폐에 잘 퍼지도록 3CC의 공기를 주입한 뒤 곧 깨워서 다음 실험때까지 쥐가 활동하도록 하였다. 대조군은 생리식염수 0.5mL를 기도내로 동일한 방법으로 투여하였다. 기도내 약물 투여 후 4시간 30분 뒤 ketamine(90mg/kg)과 xylazine(7mg/kg)을 복강내 투여하여 마취를 유도한 후 필요한 처치를 시행하였다.

다) 폐의 축출 및 폐 모세혈관의 단백질 누출 정도: 기도내로 TNF를 투여후 4시간 30분이 경과한 뒤 마취를 시행하고, I²⁵가 부착된 bovine serum albumin(BSA) 1.0 Ci를 쥐의 정맥내에 주입 후 16-gauge stub adaptor tube를 주기관지에 삽입시켰다. I²⁵ BSA 주입후 20분이 경과한 뒤 쥐를 인공호흡기(Harvard small animal ventilator, Harvard Apparatus Limited, Kent, England)에 연결하고 개복 및 개흉술을 시행한뒤 우심실을 통하여 헤파린 200단위를 주입하였다. 주입후 30분이 경과되면 phosphate-buffered saline(PBS)으로서 폐를 관류시키고 이어서 양측폐와 심장을 함께 떼어낸뒤 우측 폐로 I²⁵의 크기를 측정하고 좌측폐로 myeloperoxidase(MPO)나 HSP 단백질의 발현 정도를 측정하였다. 폐 단백질유출 지표는 우측폐내 I²⁵의 분당 측정량 대비 1mL의 혈중내 I²⁵의 분당 측정량의 비율로 정의하였

다.

라) 정상 Sprague-Dawley 백서에 열 전처치 후 시간 별 폐장내 HSP 72 단백질 발현 정도: 열 전처치 후 폐장내 HSP 72 단백질 발현 정도를 비교하기 위하여 웨스턴분석(Western analysis)¹³⁾를 시행하였다. 열 전처치 하지 않은 백서와 열 전처치 직후, 1시간, 5시간 및 18시간 후에 각 1마리씩 백서의 폐를 추출하였고 치료군 대조군 각각 1마리씩 생리식염수 혹은 TNF 투여 5시간 뒤에 또한 폐를 추출하였다. 추출한 폐는 액화질소에 얼린 뒤 -70°C 냉동고에 검사를 시행할 때까지 보관하였다. 검체를 녹여서 sodium dodecyl-sulfate-glycerol 완충액과 함께 잘게 분쇄한 뒤 Bio-Rad assay reagent (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 사용하여 칼로리측정반응(calorimetric reaction)으로 단백질농도를 측정하기 위한 단백질 분석을 한 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel의 각 줄마다 100µg의 총 단백질을 부하시켰다. 단백질은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로서 분리시킨 후 nitrocellulose에 옮기고 일차 항체로 HSP 70 rabbit polyclonal antibody를 표지하였다. 그 후 이차 항체인 alkaline phosphatase가 붙은 goat, antirabbit immunoglobulin(Parmingen, San Diego, CA, USA)을 표지한 후 NBT/BCIP(Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)를 기질로 하여 발색시켰다.

마) 폐조직내 호중구 침윤정도 비교: 폐 조직내 호중구의 침윤 정도는, 폐장내 MPO(myeloperoxidase)를 측정하여 관찰하였다. 상기 기술한 시술로서 얻은 좌측 폐를 추출 후 즉시 -70°C에 MPO 측정시까지 얼려두었다. MPO 측정시는 검체를 녹인 후 조직분쇄기(tissue homogenizer)로 4mL의 phosphate buffer와 함께 분쇄시킨 후 4°C에서 30,000 x g로 30분간 원심분리하였다(Sorvall RC-5B refrigerated centrifuge). Pellet를 얻으면 이를 다시 4mL의 phosphate buffer와 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide로서 잘 섞은후 다시

90초 동안 sonification시켰다. 잘게 부서진 검체는 조직내 존재하는 MPO inhibitor를 불활성화 시키기 위해 60°C에서 2시간 동안 보온시킨 뒤 O-dianisidine을 이용한 분광광도법(spectrometry)으로서 MPO의 활성도를 측정하였다.

3. 통계 처리

각 수치는 평균(±표준오차)로 표기하였다. 통계 분석은 PC-SAS Program (PC-SAS, version 6.04, SAS Institute, Cary, N.C., USA)을 이용하여 두 군 사이의 비교는 비모수검정법인 Mann-Whitney U 검정으로, 3군 이상의 비교는 일원분산분석을 시행한 후 대조군과 치료군 사이의 다중비교는 Dunnett법으로 검증하였다. 단백질누출 지표와 MPO 활성도와의 상관성에 대한 분석은 자료를 로그값으로 전환시킨 후 선형 상관관계수 값을 구하였다. P값은 0.05 미만을 의미하는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 정상 Sprague-Dawley 백서에 생리식염수를 투여한 군(대조군)에 열 전처치가 미친 효과

대조군에서 폐 혈관 내피세포의 투과성을 반영하는 단백질 누출지표는 열 전처치 시행군(10마리, 0.099 ± 0.024)과 시행하지 않은 군(4마리, 0.123 ± 0.005) 사이에 차이가 없었다. 폐내 호중구의 침윤 정도를 반영하는 MPO 활성도는 열 전처치 시행군(4마리, 4.58 ± 0.79 U/gm)이 시행하지 않은 군(5마리, 7.32 ± 0.97 U/gm)에 비해 낮은 경향을 보였다($P=0.064$) (Fig. 1 및 2).

2. 정상 Sprague-Dawley 백서에 TNF를 기관내로 투여한 군(치료군)에 열 전처치가 미친 효과

치료군에서 단백질 누출지표는 열 전처치 시행시(13마

리, 0.137 ± 0.012) 시행하지 않은 군(12마리, 0.186 ± 0.015)에 비해 감소되었다($P<0.05$). 또한 MPO 활성도도 열 전처치 시행군(13마리, 7.01 ± 0.89 U/gm)이 시행하지 않은 군(12마리, 14.11 ± 1.08 U/gm)에 비해 낮았다($P<0.05$). 열 전처치한 치료군과 대조군 사이에서는 급성 단백 누출지표 및 MPO 활성도의 차이가 없었다(Fig. 1 및 2).

3. 단백질 누출치와 MPO 활성도의 상관관계

MPO 활성도가 증가될수록 단백질 누출도 증가되었다($r=0.564$, $P<0.005$).

4. 열 전처치 후 시간 경과에 따른 폐장내 HSP 72 단백질 발현의 정도

열 전처치 하지 않은 백서에 비해 열 전처치한 백서의 폐 조직내 HSP 72 단백질 발현은 열 충격 후 18시간 및 23시간 뒤에도 증가되어 나타났다(Fig. 3, 4).

고 찰

본 연구에서 백서에 열을 전처치하면 TNF- α 로 유도되는 급성 폐손상이 경감되었으며 이러한 결과는 발열 전처치군에서 phospholipase A₂를 기도내 주입하여 유도되는 급성 폐손상의 정도가 경감된 현상과 유사하였다¹³⁾. 본 실험 모형에서 열 충격반응에 의해 유도된 열충격단백(heat shock protein, HSP)이 TNF로 유도되는 폐손상을 감소시켰을 것으로 추정되는 데, 이는 TNF 투여직전 열 충격으로 폐 조직내 HSP 단백질 발현이 증가된 백서에서 급성 폐손상이 감소되었고, 생체의 실험에서 HSP는 TNF에 의한 세포의 파괴를 억제하는 것으로 알려져 있기 때문이다^{11,12)}. HSP는 세포들이 열, 저산소증, 운동, 포도당 결핍 혹은 바이러스 감염 등의 스트레스에 반응하여 세포내 다른 폴리펩티드(polypeptide)들보다 우선적으로 생성되어¹⁾ 스트레스에 의한 비가역적인 손상으로 부터

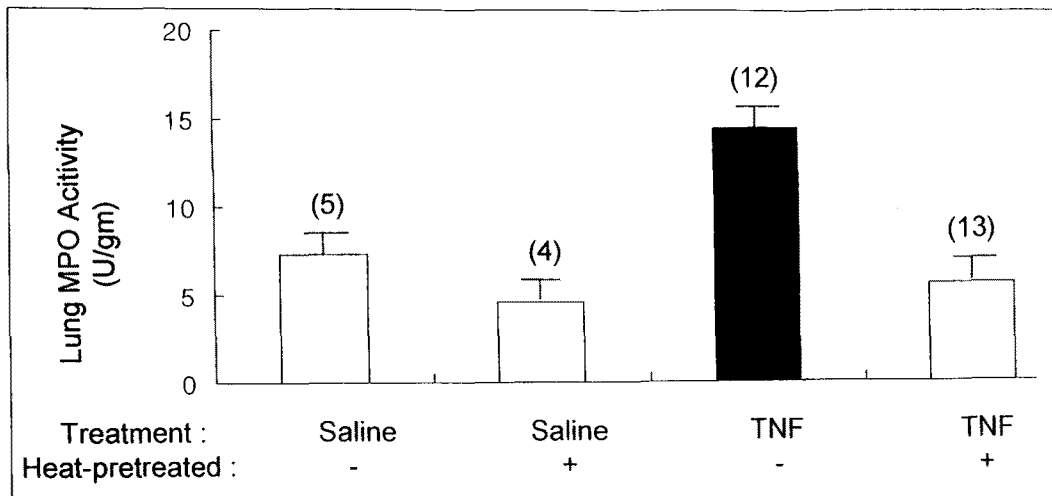


Fig. 1. Effect of heat-pretreatment on lung leak. Heat-pretreatment decreased ($*p < 0.05$) lung leak index in rats administered TNF (500ng) intratracheally compared with TNF-administered rats without heat-pretreatment. There is no difference in acute lung leak among the rats given saline intratracheally with and without heat-pretreatment. Each value is the mean \pm SEM, the number of determinations is shown in parenthesis.

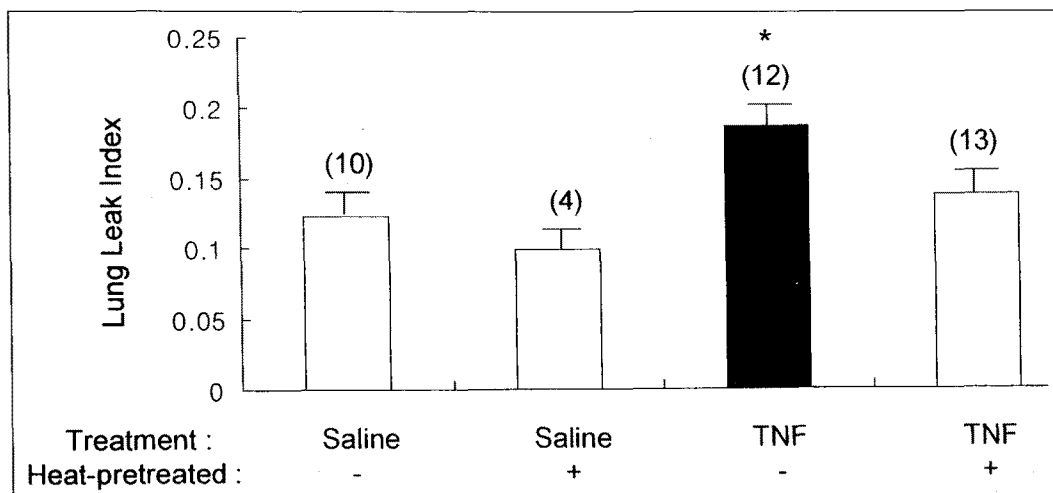


Fig. 2. Effect of heat-pretreatment on lung myeloperoxidase (MPO) activity. Rats administered TNF (500ng) intratracheally with heat-pretreatment had decreased ($*p < 0.05$) lung MPO activity compared with TNF-treated rats without heat-pretreatment. There is a decreased tendency ($p = 0.064$) of MPO activity in saline-administered rats with heat-pretreatment compared with saline-administered rats without heat-pretreatment. Each value is the mean \pm SEM, the number of determinations is shown in parenthesis.

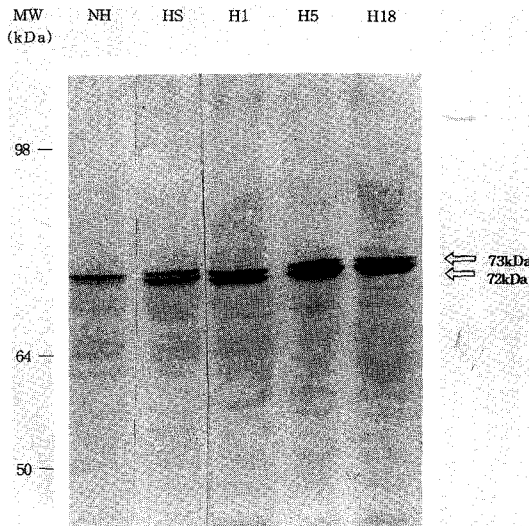


Fig. 3. Identification of heat shock protein(HSP) 72 in rats' lung depending on time sequence after whole body hyperthermia to a rectal temperature of 41°C. HSP-72 was identified in one animal from each time sequence by Western immunoblotting. MW, molecular weight ; NH, nonheated ; HS, heat-pretreated rats 18 h prior to saline administration intratracheally ; H1, 1 h after whole body hyperthermia ; H5, 5 h after whole body hyperthermia ; H18, 18 h after whole body hyperthermia.

세포의 주요 구성 물질들을 보호하고, 스트레스동안 세포들의 생존이 가능케하며, 회복기에 세포의 정상적인 기능 회복이 되도록 유도하는 것으로 알려져 있다²⁾. 본 연구에서 발열 후 폐 조직내 HSP 70계인 72 단백질이 증가되었는데, HSP 70계는 열로 유도되는 HSP의 대표적인 물질로서 단백질의 조합과 분해 등과 같은 세포의 정상적인 과정 및 손상된 단백질들의 변성을 방지하고 다른 단백질과 단백질 상호작용에 있어 보호자(chaperon)적 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 사람의 HSP 70 관련 유전자는 6, 14, 21번 및 밝혀지지 않은 적어도 하나 이상의 다른 염색체상

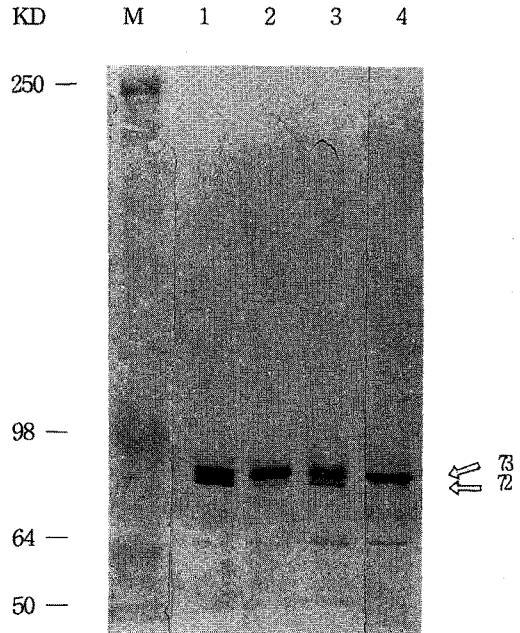


Fig. 4. Identification of heat shock protein(HSP) 72 in rats' lung treated intratracheally by saline or TNF at 23 h after whole body hyperthermia to a rectal temperature of 41°C. HSP-72 was identified in one animal from each group by Western immunoblotting. KD ; kilodalton, M : marker, Lane 1 : Saline with heat-pretreatment, Lane 2 : Saline without heat-pretreatment, Lane 3 : TNF with heat-pretreatment, Lane 4 : TNF without heat-pretreatment.

에 존재하는 것으로 사료된다¹⁴⁾.

본 연구에서 TNF로 유도되는 급성 폐손상 모형을 사용하였는데 이는 TNF가 패혈증 병발 기전에 관여하는 여러 매개물질 중 중심된 역할을 하는 것으로 간주되고 있기 때문이었다. TNF의 폐장내 국소적 투여 후 폐에 나타나는 손상에 관한 연구는 Ulich등이 기관지내로 TNF 투여 12시간후 폐포액내 호중구가 증가된다고 보고한 바 있으며¹⁵⁾ 본 저자의 연구에서도 TNF를 기도내 투여 5시간 후 폐모세혈관의 투과성이

증가되고 폐포액내 및 폐조직내 호중구의 침윤이 증가되어 관찰되었다¹⁶⁾. 이와같이 동물실험결과에서 전신적 혹은 폐장내 국소적으로 투여된 TNF에 의해 급성 폐손상이 관찰될 뿐만 아니라 ARDS 환자의 기관지 폐포액^{7,8)} 및 혈청^{7,9,10)}에서도 TNF의 농도가 증가되는 것이 보고되어 있어 TNF는 패혈증 병발 기전 뿐만 아니라 ARDS의 병발 기전에도 TNF가 중요한 역할을 할 것으로 사료되고 있다. 열 충격후 18시간 뒤에 TNF를 기도내에 주입하였는데 이는 열 충격후 12~18시간 뒤에 폐내 열충격단백이 가장 많이 증가되기 때문이었다¹³⁾.

본 연구의 결과에서 단백질출의 정도와 MPO 활성화도가 양의 상관 관계가 있어 열 전치 후 TNF로 유도된 단백질출의 감소는 열 충격에 따른 폐 조직내 호중구 침윤의 감소와 연관되었을 가능성이 있다. 이러한 추론은 TNF가 호중구를 활성화시키고¹⁷⁾ 내피-백혈구 유착분자들의 표현을 증가시켜¹⁸⁾ 호중구의 혈관내피세포에 대한 유착성¹⁹⁾ 내피성활성항원(endothelial activation antigen)을 유도하여 혈관내피세포의 염증작용²⁰⁾ 및 호중구의 superoxide 생성능력을 항진시키는 점들로서 뒷받침된다²¹⁾. 또한, 기니피크와 백서의 정맥내에 TNF를 주입후 관찰되는 폐 모세혈관의 투과성 증가와 저혈압의 발생 등의^{22,23)} 현상들이 호중구를 결핍시킨 기니피크에 TNF를 투여하는 그 폐손상의 정도가 경감되기 때문이다²⁴⁾.

본 연구의 임상적 의미는 발생하면 그 사망율이 90%에 이르는 패혈증에 의한 ARDS의 병태 생리에서 HSP 70계의 역할에 대한 추정을 하고자 하는 것이었다. 패혈증이나 이에 합병된 ARDS 환자들은 신체적으로 심한 스트레스에 노출된 상태일 뿐만아니라 대개 고열을 동반하는 경우가 많아 이런상태의 환자들에서 신체적 방어기전으로서 HSP 70계가 관여할 가능성이 매우 클 것으로 사료된다. 실제 패혈증에 노출된 후 체온의 저하가 나타나는 환자들 발열상태를 나타내는 환자들에 비해 사망률이 큰 것으로 보고되어 있어 이런 가설을 간접적으로 뒷받침하고 있다²⁵⁾. 만약 발열 상태가 HSP 70계의 생성등을 통하여 패혈증과

같이 과대사작용이 나타나는 환자에서 생존을 위한 방어적인 기전으로 작용한다면 이는 매우 중요한 임상적 의미를 갖는다. 왜냐하면 발열자체는 조직의 대사를 항진시키게 됨으로 더 많은 산소가 조직에 필요하게 되고 이에따라 조직내 산소공급에 제한이 초래되는 패혈증의 경우에선 발열자체로 중요 기관에 상대적 산소공급의 저하를 초래할 가능성이 있어 인체에 나쁘게 작용할 수 있다는 관점도 있기 때문이다.

패혈증과 HSP와의 연관성에 대해서는 몇가지 보고들이 있었다^{26,27)}. 백서를 보육기에 넣어 직장에서 측정된 체온이 41°C가 되도록 한뒤 15분간 41~42°C의 상태로 두었다가(발열 전처치군) 복막염을 유발하면 발열전처치군에서 발열전처치 않은 군(대조군)에 비해 복막염 유도후 18시간 및 7일째 사망률이 각각 0% 대 25% 및 21% 대 69% 로서 현저히 낮았는데, 이는 발열 전처치군은 발열유도후 6~24시간 이내에 폐와 심장내 HSP 70이 최대 증가를 보인 점을 보아 백서에서 HSP가 패혈증으로 부터 보호 작용을 할 가능성이 큰 것을 시사하였다²⁷⁾. 그러나 본 연구의 경우에서 처럼 발열전처치에 의해 HSP의 폐내 표현이 증가되었다고 하여도 HSP의 증가만이 TNF에 의한 폐 손상을 경감시켰다고 단정할 수는 없다. 왜냐하면 급성 폐손상의 병리기전에 oxygen free radical 체계는 매우 중요한 기전 중의 하나인데, 백서에 발열처치를 하면 Cu, Zn superoxide dismutase와 같은 항산화제(antioxidants)도 함께 증가될 수 있기 때문이다²⁸⁾. 또한 발열은 glucocorticoid 대사에 변화를 유도하며²⁹⁾, 장 표피세포의 내독소에 대한 투과성을 증가 시켜 이로인해 오히려 항염증 매개물들의 생성을 유도하여 방어적 기전으로 작용할 수도 있다^{30,31)}. 그러므로 패혈증이나 TNF로부터 유도되는 세포손상에 대한 HSP의 역할에 대한 직접적인 상관성을 규명하기 위해서는 HSP 70의 생성에 장애가 있는 Sprague-Dawley transgenic mice에 열 전처치 후 기도로 TNF를 주입한 후 TNF에 의해 유도되는 급성 폐손상의 정도를 HSP의 생성에 장애가 없는 정상 Sprague-Dawley mice에서의 그 변화의 크기와 비

교하는 실험적 접근 등이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

패혈증이나 이에 합병된 급성호흡곤란증후군 환자들은 고열을 동반하는 경우가 많다. 발열은 조직의 대사를 항진시키므로 조직내 산소공급에 제한이 초래되는 패혈증 환자들에서 발열이 동반되는 경우 열을 동반하지 않는 경우보다 중요기관의 산소공급이 상대적으로 저하될 가능성이 있다. 반면, 발열상태는 조직내 열충격단백질(heat shock protein, HSP)의 생성을 유도하여 패혈증에 의한 비가역적인 손상으로부터 세포들을 보호함으로써 생체의 방어기전에 유리하게 작용할 수도 있어 패혈증 혹은 이에 합병된 급성 폐손상 환자들의 발열에 대한 임상적 의미는 아직 규명되어 있지 않았다. 본 연구는 열을 전처치 하였거나 하지 않은 Sprague-Dawley rat의 기도내 TNF를 주입한 후 TNF에 의해 유도되는 급성 폐손상의 정도를 비교함으로써 열이 급성 폐손상에 미치는 효과를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법 :

급성 폐손상의 지표로는 백서의 우측폐내 I¹²⁵의 분당 측정량 대비 1mL의 혈중내 I¹²⁵의 분당 측정량의 비율로 정의한 단백누출지표와 백혈구의 조직내 침윤 정도를 반영하는 myeloperoxidase(MPO)의 활성도를 측정하였다. 결과는 평균(±표준오차)로 표기하였다.

결 과 :

백서의 기도내 생리식염수를 주입한 백서들은 열을 전처치 하였거나 하지 않은 경우 두 군사이의 단백 누출 지표는 각각 0.099(±0.024) 및 0.123(±0.005)로서 차이가 없었으며 MPO도 4.58(±0.79 U/gm) 및 7.32(±0.97 U/gm)로서 열을 전처치 할 경우 다소 감소되는 경향(P=0.064)를 보였으나 차이가 없었다.

백서의 기도내 TNF- α 를 주입한 치료군에서 열 전처치한 백서군은 단백누출지표 0.137(±0.012) 및

MPO 7.01(±0.89 U/gm)로서 열 전처치 않은 백서군 단백누출지표 0.186(±0.015) 및 MPO 14.11(±1.08 U/gm)에 비해 낮았으며(각 P<0.05) 정상군과는 차이가 없었다.

MPO 활성도가 증가될수록 단백 누출도 증가되었다(r=0.564, P<0.005).

열 전처치 하지 않은 백서에 비해 열 전처치한 백서의 폐 조직내 HSP 72 단백질의 발현은 열 충격 후 18시간 및 23시간 뒤에도 증가되어 나타났다.

결 론 :

백서에 열을 전처치 할 경우 TNF- α 로 유도되는 급성 폐손상이 경감되므로 발열이 백서의 방어기전에 유리하게 작용한 것으로 사료되었다.

감사의 글

Western analysis 실험시 사용된 일차 항체로 HSP 70 rabbit polyclonal antibody를 제공해 주시고 실험과정에 많은 조언과 격려를 해주신 서울의대 생화학 교실 서정선교수님께 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Villar J, Mullen JBM, Slutsky AS : Stress proteins, disease and survival. *Intensive Care World* 10 : 140, 1993
2. Nover L : Heat shock response of eukaryotic cells. Berlin : Springer-Verlag, 1984
3. Lindquist S, Craig EA : The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22 : 631, 1988
4. Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ : Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP 70. *Science* 242 : 433, 1988
5. Gething MJ, Sambrook J : Protein folding in the cell. *Nature* 355 : 33, 1992
6. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN,

- Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM : Adult respiratory distress syndrome : Risk with common predispositions. *Ann Int Med* 98 : 593, 1983
7. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA : Tumor necrosis factor levles in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 144 : 268, 1991
 8. Millar AB, Foley NM, Singer M, Johnson NM, Meager A, Rock GAW : Tumor necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 23 : 712, 1989
 9. Marks JM, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF : Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. Mortality rate, incidence of respiratory distress syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 141 : 94, 1990
 10. Parson PE, Moore FA, Moore EE, Ikle DN, Henson PM, Worthen GS : Studies on the role of tumor necrosis factor in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 146 : 694, 1992
 11. Gromgowski S, Yagi J, Janeway CA Jr : Elevated temperature regulates tumor necrosis factor-mediated immune killing. *Eur J Immunol* 19 : 1709, 1989
 12. Kusher DI, Ware CF, Gooding LR : Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor. *J Immunol* 145 : 2925, 1990
 13. Villar J, Edelson JD, Post M, Mullen JBM, Slutsky AS : Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 147 : 177, 1993
 14. Harrison GS, Drabkin HA, Kao F, Hartz J, Hart IM, Chu EH, Wu BJ, Morimoto RI : Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein hsp 70. *Somatic Cell Mol Genet* 13 : 119, 1987
 15. Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, del Castillo J : The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. 1. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 138 : 1485, 1991
 16. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Repine JE : Tumor necrosis factor induced acute lung leake in rats : less than with interlewein-1. *Inflammation* 20 : 461, 1996
 17. Berkow BL, Wang D, Larrick JW, Dodson RW, Howard TH : Enhancement of neutrophil superoxide production by pre-incubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol* 139 : 3783, 1987
 18. Heyers TM, Gee M, Andreadis NA : Cellular interactions in the multiple organ injury syndrome. *Am Rev Respir Dis* 135 : 952, 1987
 19. Gamble JR, Harlan JM, Klebonoff SJ, Vandos MA : Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 8667, 1985
 20. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA Jr : Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 136 : 1680, 1986
 21. Larrick JW, Graham D, Toy K, Lin LS, Senyk

- G, Fendly BM : Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 69 : 640, 1987
22. Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA : Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 137 : 1364, 1988
 23. Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW : Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. *Arch Surg* 124 : 1400, 1989
 24. Stephens KE, Ishizaka A, Wu Z, Larrick JW, Raffin TA : Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 138 : 1300, 1988
 25. Styrk B, Sugerman B : Antipyresis and fever. *Arch Intern Med* 150 : 1589, 1990
 26. Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, Taulien J, Perdrizet G, Karl I : Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am J Physiol* 265(6 Pt 2) : R1447, 1993
 27. Villar J, Ribeiro SP, Mullen BM, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS : Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 22 : 914, 1994
 28. Hass MA, Massaro D : Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J Biol Chem* 263 : 776, 1988
 29. Alexandrova M, Farkas P : Stress-induced changes of glucocorticoid receptor in rat liver. *J Steroid Biochem* 42 : 493, 1992
 30. Frank L, Summerville J, Massaro D : Protection from oxygen toxicity with endotoxin. *J Clin Invest* 65 : 1104, 1980
 31. Carter EA, Gonnella A, Tomkins RG : Increased transcellular permeability of rat small intestine after thermal injury. *Burns* 18 : 117, 1992