

□ 원 저 □

Platelet-activating Factor 기도내 투여 후 Surfactant Protein A, B 및 C의 유전자 발현에 관한 연구

한양대학교 의과대학 및 포천 중문 의과대학* 내과학교실

손장원*, 신동호, 박성수, 이정희

= Abstract =

Gene Expression of Surfactant Protein A, B and C in Platelet-activating Factor(PAF) Treated Rats

Jang Won Sohn, M.D.,* Dong Ho Shin, M.D., Sung Soo Park, M.D., Jung Hee Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University
and Pochon CHA University*, Seoul, Korea*

Background : Platelet-activating factor(PAF) might play an important role in the development of acute respiratory distress syndrome. Since PAF induced lung injury is similar to changes of acute respiratory distress syndrome, and abnormalities in surfactant function have been described in acute respiratory distress syndrome, the authors investigated the effects of PAF on the regulation of surfactant protein A, B and C mRNA accumulation.

Method : The effects of PAF on gene expression of surfactant protein A, B and C in 24 hours after intratracheal injection of PAF in rats. Surfactant protein A, B and C mRNAs were measured by filter hybridization.

Results : The accumulation of SP-A mRNA in PAF treated group was significantly decreased by 37.1% and 41.6%, respectively compared to the control group and the group treated with Lyso-PAF($p < 0.025$, $p < 0.01$). The accumulation of SP-B mRNA in PAF treated group was decreased by 18.7% and 32.2%, respectively compared to the control group and the group treated with Lyso-PAF but statistically not significant. The accumulation of SP-C mRNA in PAF treated group was significantly decreased by 30.7% and 38.5%, respectively compared to the control group and the group treated with Lyso-PAF($p < 0.01$, $p < 0.01$).

Conclusion : These findings represent a marked inhibitory effects of platelet-activating factor on surfactant proteins expression in vivo. This supports, in turn, platelet-activating factor might be related to pathogenesis of acute respiratory distress syndrome.

Key words : Gene expression, Surfactant proteins, Platelet-activating factor

서 론

Platelet-activating factor (PAF)는 염증반응의 중요한 매개체이며, 폐혈관의 투과성을 증가시키고, 급만성 폐동맥 고혈압을 유발시키며 leukotriene의 합성을 자극한다¹⁻²⁾. 또한 PAF는 호중구의 화학주성, 응집, 탈과립 및 유착과 leukotriene C₄, D₄ 및 superoxide anion의 생산에도 영향을 미친다³⁾. PAF를 토끼에 투여하면 기관지 폐포세척액내 호중구의 축적과 미세혈관의 투과성 증가가 관찰되며, 혈소판의 응집과 thromboxane A₂의 생산을 가져와 혈액 응고를 촉진시키고 폐혈관계에 미소색전을 가져와 폐손상 발생의 주요원인 중 하나로 작용한다³⁾. 이와같은 현상은 PAF를 흡입한 후에도 유사한 반응들이 관찰된다⁴⁾. 실험적으로 내독소를 투여하면 혈중 및 폐내 PAF치가 상승하고 급성 폐손상이 발생하였고 PAF길항제를 내독소 투여 전에 사용하였을 시 이러한 변화들이 약화되었다⁵⁾. 이와같이 PAF는 ARDS의 병인에 있어 중요한 매개체의 하나로 알려져 있다⁶⁾.

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)은 1967년 Ashbaugh와 Petty 등이 처음 보고할 당시 사망률이 58%이었고 현재도 50-80%의 높은 사망률을 보이고있다⁷⁾. ARDS 발생의 원인은 다양하고, 여러가지 기전에 의하여 관련된 폐손상이 초래된다. ARDS의 가장 뚜렷한 병리학적 특징은 미세혈관 투과성의 증가로 인한 폐포내 단백성분이 풍부한 부종현상이다⁸⁾. 이 결과 가스교환의 장애, 폐탄성의 소실 및 비십인성 부종의 결과를 초래한다. 호중구, 혈소판 및 보체, prostaglandin, leukotriene, thromboxane, interleukin-1, tumor necrosis factor들과 같은 체액 매개체들이 ARDS의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

ARDS에 있어서 surfactant의 역할은 복합적이지만 표면장력의 이상이 ARDS의 병태생리에 부분적으로 기여하여¹⁰⁾ 폐탄성의 감소, 그리고 환기와 관류사

이의 불균형을 심화시킨다. Surfactant system의 변화가 ARDS 폐손상의 일차적인 발병기전은 아니지만 그렇다고 해서 ARDS의 이차적 중요성으로만의 의미를 부여해서도 안된다. Surfactant system은 일차적이든 이차적이든간에 적절한 폐기능을 유지하는데 지극히 중요할 뿐만 아니라, 어떤 형태든 surfactant결핍이 폐의 병태생리학적 결과에 매우 지대한 영향을 미치기 때문이다¹¹⁾.

이에 저자 등은 ARDS의 중요한 매개체의 하나인 PAF를 쥐의 기도내로 투여 후 surfactant단백 A, B 및 C 유전자 발현에 대한 PAF의 영향을 관찰하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Sasco 회사로 부터 분양받은 300-400 gm의 Sprague-Dawley쥐 (Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응시킨 후 본 연구를 위해 사용하였다. Pentobarbital (0.2 ml/rat)로 마취하여 6마리의 정상 대조군은 동량의 bovine serum albumin 0.1% 용액(BSA) 0.1 ml을 주사한 후 24시간에 희생하였고, PAF 500 ng, Lyso-PAF 500 ng 0.1 ml을 각각 6마리의 쥐들에게 기도내로 투여 후 24시간에 각각 희생시켰다. 폐조직을 얻기 위해 pentobarbital로 마취시킨 후 폐를 일괄 채취하였다. Wet to dry weight (WDR)을 측정하기 위하여 한 쪽 폐의 2/3부위를 저울로 무게를 측정하였다. mRNA를 측정하기 위하여 500-750 mg의 폐조직을 10 ml의 solution D (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에 넣은 후 Tissumizer (Tekmar-Cincinnati, Ohio)의 high speed로 30-60초 동안 균질화하여 dry ice에 얼려서 -70℃의 냉동실에 보관하였다.

2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi¹²⁾의 방법에 의하여 총 RNA를 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500 μ l의 solution D에 pH 4.0인 50 μ l 2 M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)로 완충한 후 phenol 500 μ l을 가하였다. Vortex로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49:1인 용액 100 μ l을 가한 후 다시 진탕시켰다. 이 혼합물이 들어있는 Eppendorf tube를 15분 동안 얼음에 잠복시킨 후 10,000 G의 microfuge로 5분 동안 실온에서 원침하였다. 액상층(aqueous phase)을 micropipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간이상 -20°C 에 잠복시킨 후, 10,000G에서 5분동안 원침하였다. 상층액을 가만히 따른후 침전물을 150 μ l의 solution D에 녹인 후 -20°C 에 하룻밤 동안 동량의 isopropanol로 재침전 시켰다. 5분동안 10,000G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻었다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 1 mM EDTA(pH 8)로 resuspend 하였다. 분리한 RNA는 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질(quality)은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외 시켰다.

3. RNA Hybridization 검색

각각의 mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과 β -cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybridization 검색법으로 측정하였고¹³⁾, 쥐의 SP-A, SP-B와 SP-C 각각의 surfactant단백의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding

부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였고, anti-sense나 sense 복사체(transcript)를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 복사반응으로 부터 산출물은 linearized vector microgram(μ g)당 전체 길이가 20-30 μ g의 복사체였다.

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ng의 sense 복사체와 1 μ g의 RNA를 65°C 에서 10-15분 denature후 3장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 μ m in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.)에 10 x standard saline citrate (SCC)/50% formaldehyde을 20 μ l씩 가하였다. Filter들을 80°C 에서 2시간 구워낸 후 1 M sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)을 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5 cc양으로 56°C 에서 12-14 시간 50 cc Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 $4\times$ SCC, $1\times$ Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1mg/ml salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 cc 가한 후 특이 활성도가 5×10^6 cpm/ml인 ^{32}P 로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA probe로 56°C 에서 흔들면서 17-20시간 동안 hybridization하였다. 모든 filter는 실온에서 $2\times$ SCC, 0.2% SDS용액으로 3번, 65°C 에서 $0.1\times$ SCC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다. 특이 mRNA는 회귀방정식 (regression equation)을 사용하여 정상곡선(standard curve)으로 부터 산출하였다.

4. 성적 분석

통계학적 평가는 unpaired student's t-test로 정상 대조군과 각 군간의 mRNA 값 사이에서 평가하였다. Regression equation은 Epistat statistical package(CSCC Statistics Packages Archives, Clarion University, Pennsylvania, USA)로 부터 산출하였

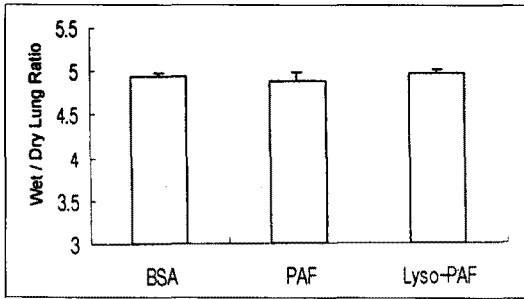


Fig. 1. Comparison of wet to dry lung ratio after BAS, PAF and Lyso-PAF administration.

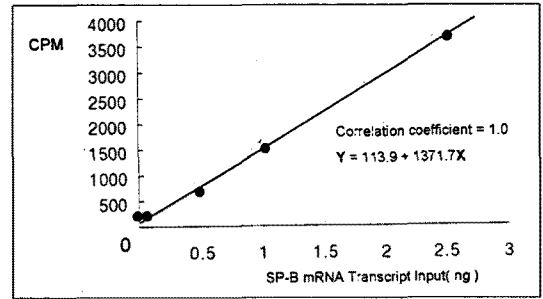


Fig. 3. Standard curve for SP-B mRNA transcript input.

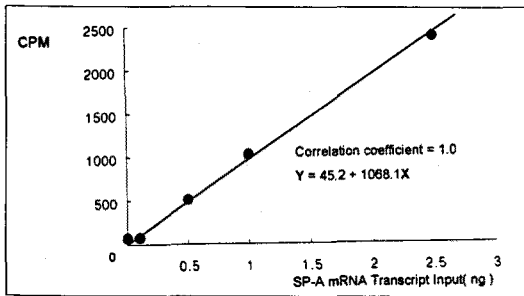


Fig. 2. Standard curve for SP-A mRNA transcript input.

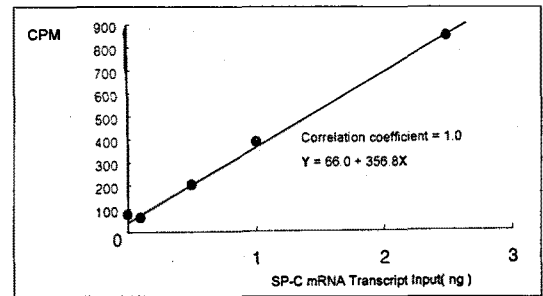


Fig. 4. Standard curve for SP-C mRNA transcript input.

다. Probability value는 0.05미만을 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 폐손상의 정도

Wet to dry weight ratio (WDR)는 PAF로 처치한 군이 4.89, 정상대조군 4.95 및 Lyso-PAF 투여군 4.96로 정상대조군과 PAF 처치군 사이에 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다(Fig. 1).

2. SP-A, B, C 각각에 대한 sense 복사체(transcripts)의 정상곡선

SP-A, B, C 각각의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5 ng에 대한 cpm과의 정상곡선 및 상관계수

(r)는 다음과 같다. SP-A에 대한 sense 복사체의 정상곡선은 $Y=45.2+1068.1 X$ ($X=SP-A$ mRNA 복사체, $Y=CPM$)이고 r계수는 1.0 이었다(Fig. 2). SP-B에 대한 sense 복사체의 정상곡선은 $Y=113.9+1371.7 X$ ($X=SP-B$ mRNA 복사체, $Y=CPM$)이고, r계수는 1.0 이었다(Fig. 3). SP-C에 대한 sense 복사체의 정상곡선은 $Y=66.0+356.8 X$ ($X=SP-C$ mRNA 복사체, $Y=CPM$)이고 r계수는 1.0 이었다(Fig. 4).

3. SP-A, B, C mRNA의 측정

SP-A mRNA 양은 PAF투여군에서 262.0 ± 83.5 cpm (0.203 ± 0.078 ng)으로 대조군의 416.8 ± 106.4 cpm (0.348 ± 0.099 ng) 및 Lyso-PAF투여군의 448.3 ± 103.1 cpm (0.377 ± 0.097 ng)에 비하여 각각 37.1% 및 41.6% 유의하게 감소하였으

Table 1. SP-A, B, C mRNA and beta-actin levels in bovine serum albumin(BSA), PAF and Lyso-PAF administration

	BSA	PAF	Lyso-PAF
SP-A mRNA	416.8 ± 106.4 cpm (0.348 ± 0.099 ng)	262.0 ± 83.5 cpm* (0.203 ± 0.078 ng)	448.3 ± 103.1 cpm (0.377 ± 0.097 ng)
SP-B mRNA	458.2 ± 61.8 cpm (0.251 ± 0.045 ng)	372.0 ± 84.8 cpm (0.189 ± 0.062 ng)	549.5 ± 171.1 cpm (0.318 ± 0.125 ng)
SP-C mRNA	2595.4 ± 348.5 cpm (7.085 ± 0.976 ng)	1797.8 ± 414.9 cpm* (4.851 ± 1.162 ng)	2924.5 ± 846.2 cpm (8.007 ± 2.370 ng)
beta-actin	193.8 ± 24.3 cpm	178.0 ± 24.5 cpm	190.0 ± 18.9 cpm

Mean ± SD

* : p < 0.05 compared to BSA and Lyso-PAF administration

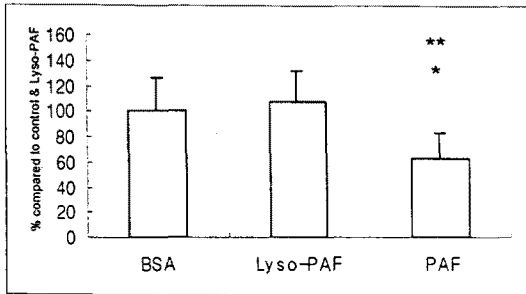


Fig. 5. SP-A mRNA accumulation after injection of BSA, Lyso-PAF and PAF.

* p < 0.025 compared to BSA

** p < 0.01 compared to Lyso-PAF

며(p < 0.025, p < 0.01)(Table 1, Fig. 5), SP-B mRNA 양은 PAF투여군에서 372.6 ± 84.8 cpm (0.189 ± 0.062 ng)으로 대조군의 458.2 ± 61.8 cpm (0.251 ± 0.045 ng) 및 Lyso-PAF투여군의 549.5 ± 171.1 cpm (0.318 ± 0.125 ng)에 비하여 각각 18.7% 및 32.2% 감소하였으나, 통계학적 유의한 차는 없었다(Table 1, Fig. 6). SP-C mRNA 양은 PAF투여군에서 1797.8 ± 414.9 cpm (4.851 ± 1.162 ng)으로 대조군의 2595.4 ± 348.5 cpm (7.085 ± 0.976 ng) 및 Lyso-PAF투여군의 2924.5 ± 846.2 cpm (8.007 ± 2.37 ng)에 비하여 각각 30.7%

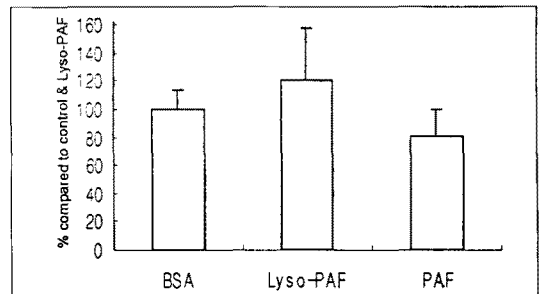


Fig. 6. SP-B mRNA accumulation after injection of BSA, Lyso-PAF and PAF.

및 38.5% 유의하게 감소되었다 (p < 0.01, p < 0.01) (Table 1, Fig. 7).

4. β-actin mRNA의 측정

정상대조군과 각 군간의 유의있는 변화는 없었고, β-actin mRNA의 측정은 일정하였다(Table 1, Fig. 8).

고 찰

PAF는 강력한 에테르 지질로 16개 또는 18개의 탄소를 함유한 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerophos-

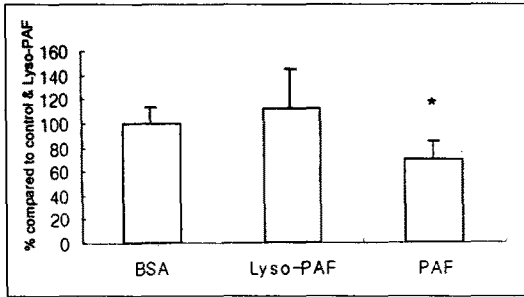


Fig. 7. SP-C mRNA accumulation after injection of BSA, Lyso-PAF and PAF.

* $p < 0.01$ compared to BSA and Lyso-PAF

phorylcholine 이며 내독소 속의 중요한 매개체로 알려져 있다¹⁴). 대식세포, 혈소판, 호중구, 호염기구 및 유양돌기세포들이 PAF를 분비 한다^{15,16}). PAF 투여가 전신적인 저혈압, 심박출량의 감소 및 폐혈관 투과성의 증가의 원인이 될 수 있다^{17,18}). 폐혈관 투과성을 증가시키는 기전은 내피간 간격이 넓어짐과 동시에 prostaglandin E₂ 또는 I₂에 의한 소동맥평활근의 이완으로 혈류의 증가가 일어나서 수분과 단백질이 혈관내강에서 바깥으로 새어 나가기 때문이다¹⁹). 내독소를 실험동물에 투여하였을 시 폐혈관 투과성의 증가로 인한 전신뿐 아니라 폐의 혈류동태상 변화, 백혈구 감소증, 대사성 산증, 급성 폐손상을 초래할 수 있다²⁰). 한 예로 폐혈관투과성의 변화를 반영하는 ¹²⁵I-albumin leak index가 내독소를 투여한 쥐에서 증가하여 급성 폐혈관의 손상과 일치되는 소견을 나타냈다²¹). 시험관 내와 생체내에서 내독소혈증의 현저한 양상은 폐내피세포 손상의 초래이며 이러한 손상받은 폐내피세포들은 PAF를 유리한다²¹). PAF길항제인 CV 3988이나 kadsurenone과 SRI 63-441을 사용하였을 시 내독소에 의한 폐혈관의 누출 및 저혈압을 방지할 수 있었고 생존기간도 연장할 수 있으며^{14,22}), 또한 쥐의 isolated perfused 폐의 수분함유량의 증가를 방지할 수 있었다²³). 이런 점으로 미루어 PAF는 내독소에 의한 폐손상의 발생에 중요한 매개체라 생각된다. PAF는 호중구를 자극하여 폐순환내 격리(seque-

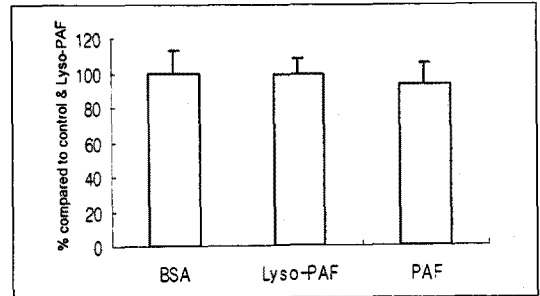


Fig. 8. Beta-actin mRNA accumulation after injection of BSA, Lyso-PAF and PAF.

steration) 되어 결과적으로 해독한 산소대사물들, 라이소솜의 내용물 및 다른 매개체들을 유리시켜 폐손상을 초래하며²⁴), 개의 기도내로 PAF를 직접 투여하였을 시 호중구 및 폐혈관의 투과성이 증가하여 PAF가 기도의 강력한 염증을 유발하는 자극제임을 증명하고 있다²⁵). 호중구가 증가하는 기전은 내피에 호중구의 직접 밀착을 증가시키거나²⁶), 폐 및 전신 혈관의 혈류 변화가 일어나 호중구를 증가하게끔 한다²⁷). 이와 같이 PAF는 ARDS의 병인에 중요한 매개체중 하나로 알려져 있다⁶).

Lyso-PAF는 1-O-alkyl-2-acyl-3-GPC의 중간대사물로 생물학적으로 PAF의 활성을 갖지 못한다. Lyso-PAF는 PAF의 전구물이며 동시에 분해대사물로서 PAF는 acetylhydrolase에 의하여 lyso-PAF로 수초내 분해된다²⁸).

본 연구에서 WDR은 PAF로 처치한 군이 4.89로 정상대조군 4.95 및 lyso-PAF 4.96에 비하여 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다(Fig. 1). 이는 폐의 WDR가 폐손상의 지표로 사용되지만²⁹), WDR의 변화없어도 광학 또는 전자현미경상 경미한 폐손상이 재현될 수 있다²⁹).

전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense 복사체를 이용한 정상곡선을 이용하여 얻을 수 있다(Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). 이와는 대조적으로 β -actin mRNA의 축적은 각 군에 있어서 항상 일정하였다(Fig. 8). 이와같이 cpm치가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고,

hybridization이 특이하다면 정상대조군 및 PAF로 처치한 군에서 filter당 cpm을 비교함으로써 상대량을 평가할 수 있다. 본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 예민하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 량의 RNA와 결합할 수 있다.

Surfactant는 폐방어기전에 영향을 미쳐서 첫째, SP-A와 대식세포간 상호작용이 적절한 대식세포 기능을 유지하는데 중요하다³⁰⁾. 둘째, 수많은 염증에 관여되는 매개체들을 적절히 조정하며³¹⁾ 셋째, surfactant 단백질 자체가 중요한 산화방지능이 있으며³²⁾ 넷째, 호기시 폐포밖으로 입자(불순물)들을 제거한다³³⁾. 이 중 어느하나에 장애가 있게 되면 ARDS의 병인에 중요한 영향을 미친다. ARDS에 있어서 surfactant 구성 성분중 표면활성 특성을 갖는 phosphatidylinositol 및 phosphatidylethanolamine같은 지질성분 및 surfactant의 도포(spreading)기능과 폐의 방어기전에 중요한 역할을 하는 surfactant단백에 변화가 초래된다³³⁾.

Surfactant 단백질중 SP-A는 당단백이며 환원형의 분자량이 28-36 kDa이며 전체 surfactant단백의 30-40%를 점하고³⁴⁾, SP-A의 기능은 tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. SP-A는 type II pneumocyte로부터 인지질의 흡수를 강화하고 type II pneumocyte로부터 surfactant의 분비를 조절하여 지질교체를 관장한다. 이와같이 SP-A는 surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다. 또한 양수내 저농도의 SP-A치는 폐의 미성숙 및 ARDS의 발생을 예측할 수 있다하였다³⁵⁾. 본 실험에서 SP-A mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 37.1% 및 41.6% 유의하게 감소하였던 바($p < 0.025$, $p < 0.01$), 이와같은 감소는 PAF기도내 투여로 폐의 미세혈관의 투과성 증가가 초래되고 혈장단백, 세포막지질 및 혈색소 등의 다양한 구성물의 부종을 가져와 결과

적으로 폐포내 존재하는 surfactant의 생물 물리학적 면에서 억제시키는 원인으로 인한 SP-A mRNA발현의 감소현상을 가져온 것으로 생각된다. SP-B는 배수성단백이며, 비환원형의 분자량은 18 kDa이고, SP-C는 배수성단백이며, 비환원형의 분자량은 5-8 kDa이다. SP-B와 SP-C는 surfactant의 신속한 film형성에 있어서 SP-A와 상호협동작용을 한다³³⁾. SP-B mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 18.7% 및 32.2% 감소하였으나, 통계학적 유의한 차는 없었고, SP-C mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 30.7% 및 38.5% 유의하게 감소되었던바 ($p < 0.01$, $p < 0.01$), 이러한 배수성 단백질들은 신속한 surfactant의 film형성에 있어 필수적이며, PAF투여로 인한 SP-B와 SP-C의 mRNA의 발현 억제로 인하여 surfactant의 불활성 현상이 이미 존재하는 폐손상을 악화시키는 방향으로 작용하고 결과적으로 폐포와 기도의 폐쇄를 야기시키는 악순환을 조장하였다고 해석된다. 이와같이 surfactant단백들은 surfactant의 물리학적 성상의 결정 및 대사 조절에 있어서 중요한 역할을 한다.

이상의 고찰 결과는 SP-A, B, C mRNA에 대한 PAF의 억제효과를 입증한 것으로 이와같은 surfactant단백들의 발현에 대한 PAF의 억제효과가 급성 호흡곤란증후군의 병인의 한요인으로 작용한다고 생각된다.

결론

Platelet Activating Factor(PAF)는 강력한 에테르 지질로 호중구, 혈소판, 대식세포, 내피세포, 호염기구들에 의하여 합성되며 그람음성 패혈증 및 내독소 속에 있어서 중요한 매개체로 알려져 있다. 또한 혈소판 응집, 호중구 활성화 및 평활근의 수축등의 생물학적 활성을 가지며 급성 호흡곤란 증후군의 병인에 관여하는 요소들 중 하나로 알려져 있다. 또한 생체내 특이 PAF수용체 길항제를 투여 시 내독소 속을 복귀 시키

고 내독소로 인한 폐손상을 악화 시킬 수 있다.

Surfactant는 급성 호흡곤란 증후군의 병태생리적 인면에 있어서 밀접한 관계를 가지며 surfactant 단백질은 surfactant의 물리학적 성상의 결정 및 대사를 결정하는데 있어서 중요한 역할을 한다.

PAF를 백서 기도내 투여후 surfactant단백 A, B 및 C의 유전자 발현양상을 filter hybridization방법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SP-A mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 37.1% 및 41.6% 유의하게 감소하였다($p < 0.025$, $p < 0.01$).

2. SP-B mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 18.7% 및 32.2% 감소하였으나, 통계학적 유의한 차는 없었다.

3. SP-C mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 30.7% 및 38.5% 유의하게 감소되었다 ($p < 0.01$, $p < 0.01$).

이상의 결과는 SP-A, B, C mRNA에 대한 PAF의 억제효과를 입증한 것으로 이와같은 surfactant 단백질의 발현에 대한 PAF의 억제효과가 급성 호흡곤란증후군의 병인의 한요인으로 작용한다고 생각된다.

요 약

연구배경 :

Platelet-activating factor (PAF)는 염증반응의 중요한 매개체이며, 폐혈관의 투과성을 증가시키고, 급만성 폐동맥 고혈압을 유발하며 leukotriene의 합성을 촉진시킨다. 또한 PAF는 호중구의 화학주성, 응집, 탈과립 및 유착과 leukotriene C_4 , D_4 및 superoxide anion의 생산에도 영향을 미친다. PAF는 혈소판의 응집과 thromboxane A_2 의 생산을 초래하여 혈액 응고를 촉진시키며 폐혈관계의 미소색전을 일으켜 폐 손상 발생의 주요원인 중 하나이다. 이와같은 현상은 PAF를 흡입후에도 유사한 반응들이 일어나는 것이 관찰된다. PAF는 급성 호흡곤란 증후군 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)의

병인에 중요한 매개체 중 하나로 알려져 있다.

Surfactant는 폐 방어기전에 영향을 미치는데 컷제, surfactant protein-A(SP-A)와 대식세포간 상호작용이 적절한 대식세포 기능 유지에 중요하다. 둘째, surfactant는 수많은 염증에 관여되는 매개체들을 적절히 조정하며 셋째, surfactant 단백질체가 중요한 산화방지능이 있으며 넷째, 호기시 폐포밖으로 외부에서 흡입된 각종 입자(불순물)들을 제거한다. 이 중 어느하나에 장애가 오면 ARDS의 병인에 중요한 영향을 미친다.

방 법 :

PAF를 백서 기도내 투여후 surfactant단백 A, B 및 C의 mRNA 발현 양상을 filter hybridization방법으로 조사하여 surfactant단백 A, B 및 C 유전자 발현에 대한 PAF의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

결 과 :

SP-A mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 37.1% 및 41.6% 유의하게 감소하였다($p < 0.025$, $p < 0.01$). SP-B mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 18.7% 및 32.2% 감소하였으나, 유의한 차는 없었다. SP-C mRNA양은 PAF투여군에서 대조군 및 Lyso-PAF투여군에 비하여 각각 30.7% 및 38.5% 유의하게 감소하였다($p < 0.01$, $p < 0.01$).

결 론 :

이상의 결과로 SP-A, B, C mRNA에 대한 PAF의 억제효과를 확인 하였으며 이와같은 surfactant 단백질의 발현에 대한 PAF의 억제효과가 급성 호흡곤란증후군의 병인의 한요인으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Voelkel NF, Worthen SC, Reeves JT, Henson PM, Murphy RC : Nonimmunological production

- of leukotrienes induced by platelet-activating factor. *Science* **218** : 286-288, 1982
2. Chang SW, Fedderson CO, Henson PM, Voelkel NF : Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* **79** : 1498-1509, 1987
 3. McManus LM, Deavers SI : Platelet activating factor in pulmonary pathobiology. *Clin Chest Med* **10** : 107-118, 1989
 4. Cuss FM, Dixon CM, Barnes PJ : Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* **2** : 189-192, 1986
 5. Lantz RC, Keller III GE, Burrell R : The role of platelet-activating factor in the pulmonary response to inhaled bacterial endotoxin. *Am Rev Respir Dis* **144** : 167-172, 1991
 6. Matsumoto K, Taki F, Kondoh Y, Taniguchi H, Takagi K : Platelet-activating factor in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **19** : 509-515, 1992
 7. 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 Intern Med* **98** : 593-597, 1983
 8. Petty TL : Acute respiratory distress syndrome : where did we start and where are we now ? *Semin Respir Crit Care Med* **15** : 243-249, 1994
 9. Spragg RG, Smith RM : Chap. 7, Biology of acute lung injury. In Crystal RG, West JB, Barnes PJ (Ed.) *The Lung*, Raven Press, New York, 1991
 10. MacIntyre NR : Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* **16** ; 47-52, 1995
 11. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkins ND : Characteristics of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock. *Am Rev Respir Dis* **115** : 531-536, 1977
 12. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** : 156-159, 1987
 13. Dyson NJ : Chapter 5, Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis, In Brown TA (Ed.) *Essential molecular biology (Vol. II)*, p 137, Oxford, Oxford University Press 1991
 14. Doebber TW, Wu MS, Robbins JC, Choy BM, Chang MN, Shen TY : Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats : studies with PAF-receptor antagonist kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun* **127** : 799-808, 1985
 15. Benveniste J : Platelet activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* **249** : 581-582, 1974
 16. Rylander R, Beijer L : Inhalation of endotoxin stimulates alveolar macrophage production of platelet-activating factor. *Am Rev Respir Dis* **135** : 83-86, 1987
 17. Bessin P, Bonnet J, Apffel D, Soulard C, Desgroux L, Pelas I, Benveniste J : Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs. *Eur J Pharmacol* **86** : 403-413, 1983
 18. Cox CP, Mojarad M, Attiah A, Said SI : Platelet-activating factor increases pulmonary vascular permeability in awake sheep. *Am Rev Respir Dis* **129** : A334, 1984
 19. Wedmore CV, Williams TJ : Control of vascular

- permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 289 : 646-650, 1981
20. Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Loyd JE, Lucht WD, Meyrick B, Newman JH, Niedermeyer ME, Ogletree ML, Sheller JR, Snapper JR : Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* 3 : 719-744, 1983
 21. Camussi G, Pawlowski I, Bussolino F, Caldwell PRB, Brentjens J, Andres G : Release of platelet activating factor in rabbits with antibody-mediated injury of the lung : the role of leukocytes and of pulmonary endothelial cells. *J Immunol* 131 : 1802-1807, 1983
 22. Terashita Z, Tsushima S, Yoshioka T, Nomura H, Inada Y, Nishikawa K : CV-3988, a specific antagonist of platelet activating factor (PAF). *Life Sci* 32 : 1975-1982, 1983
 23. Voelkel NF, Chang SW, Pfeffer KD, Worthen SG, McMurtry IF, Henson PM : PAF antagonist : different effects on platelets, neutrophils, guinea pig ileum and PAF-induced vasodilation in isolated rat lung. *Prostaglandins* 32 : 359-372, 1986
 24. Shaw JO, Pinckard RM, Ferrigni KS, McManus LM, Hanahan DJ : Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphoryl-choline (platelet activating factor). *J Immunol* 127 : 1250-1255, 1981
 25. Lien DC, Worthen GS, Henson PM, Bethel RA : Platelet-activating factor causes neutrophil accumulation and neutrophil-mediated increased vascular permeability in canine trachea. *Am Rev Respir Dis* 145 : 693-700, 1992
 26. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM : Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2204-2208, 1986
 27. Lien DC, Wagner WW Jr, Capen RL, Haslett C, Hanson WL, Hofmeister SE, Henson PM, Worthen GS : Physiological neutrophil sequestration in the lungs : visual evidence for localization in capillaries. *J Appl Physiol* 62 : 1236-1243, 1987
 28. Henson PM, Barnes PJ, Banks-Schlegel SP : Platelet-activating factor : role in pulmonary injury and dysfunction and blood abnormalities. *Am Rev Respir Dis* 145 : 726-731, 1992
 29. Cunningham AL, Hurley JV : Alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in the rat : a topographical and electron-microscope study. *J Pathol* 106 : 25-35, 1972
 30. van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM : Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defence mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2 : 91-98, 1990
 31. Sitrin RG, Ansfield MJ, Kaltreider HB : The effect of pulmonary surface active material on the generation and expression of murine B- and T-lymphocyte effector functions in vivo. *Exp Lung Res* 9 : 85-97, 1985
 32. Ghio AJ, Young SL, Piantadosi CA : Synthetic surfactant diminishes oxidant generation in vitro. (Abst.) *Am Rev Respir Dis* 147 : A362, 1993
 33. Lewis JF, Jobe AH : Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147 : 218-233, 1993
 34. Sueishi K, Benson BJ : Isolation of a major

apolipoprotein of canine and murine pulmonary surfactant : biochemical and immunochemical characteristics. *Biochim Biophys Acta* 665 : 442-453, 1981

35. Katyal SL, Amenta JS, Singh G, Silverman

JA : Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 148 : 48-53, 1984