

## 내독소혈증 유발 급성폐손상에서 폐장내 Proinflammatory Cytokines 발현에 관한 고찰†

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 미생물학교실\*

문승혁, 김용훈, 박춘식, 이신제\*

= Abstract =

### The Lung Expression of Proinflammatory Cytokines, TNF- $\alpha$ and Interleukin 6, in Early Periods of Endotoxemia

Seung Hyug Moon, M.D., Yong Hoon Kim, M.D., Choon Sik Park, M.D., Shin Je Lee, M.D.\*

*Department of Internal Medicine, Microbiology\*, Soonchunhyang University, Collage of Medicine, Chunan, Korea*

**Background :** The immediate host response to LPS is the production of proinflammatory cytokines that act as intercellular mediators in inflammatory reactions, including acute lung injury. These "early response" cytokines transmit signals from recognition cells to target or effector cells. This host response is further amplified by the expression of leukocyte chemoattractants, growth factors, and adhesion molecules, resulting in an array of proinflammatory events. This experiment was performed to define the lung origin of proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL 6 in early periods of endotoxin induced acute lung injury (ALI).

**Method :** The healthy male Sprague-Dawley, weighted 150 - 250g, were divided into saline control (NC) and endotoxemia-induced ALI (ETX-), and leukopenic endotoxemia-induced ALI (CPA-ETX-Group) which was induced by cyclophosphamide, 70 mg/kg i.p. injection. Acute lung injury was evoked by LPS, 5 mg/kg, intravenously administered. Bronchoalveolar lavage was performed at 0, 3, 6 h after LPS-treated to estimate the influx of phagocytes and concentration of total protein, and cytokines as TNF- $\alpha$  and IL 6 by a bioassay using MTT method. We also examined the localization of TNF- $\alpha$  and IL 6 protein in endotoxemia-challenged lung tissue by immunohistochemical stain (IH).

**Results :** The total cell, macrophage and PMN count in BALF were elevated in ETX group compared to NC ( $p < 0.05$ ). In CPA-ETX group, total cell and macrophage count in BALF were not changed compared to NC, but PMN count was markedly reduced and it took part in less than 0.1 % of total BAL cells ( $p < 0.01$ ). The protein concentration in BALF were significantly increased in ETX and CPA-ETX group compared to NC ( $p < 0.05$ ), but there was significant difference between ETX- and CPA-ETX group only at 6 h ( $p < 0.05$ ). This

† 본 연구는 1996년도 순천향대학교 기초지원연구비 보조로 진행되었음

observation suggested that even if PMNs are involved in the pathogenesis of acute lung injury, their role cannot be viewed as essential. The concentration of TNF- $\alpha$  and IL 6 in BALF was significantly increased in the ETX- and CPA-ETX group compared to NC. There was no difference between ETX- and CPA-ETX group. In IH, anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL 6 antibody was strongly localized at interstitial monocytes and alveolar macrophages in endotoxemia-challenged lung tissue. From above point of view, activated alveolar macrophage/monocyte considered as a prominent source of proinflammatory cytokines in endotoxemia-challenged lung injury.

**Conclusion :** The prominent source of proinflammatory cytokines in early periods of endotoxemia-induced lung injury will be the activated resident macrophages like an alveolar macrophage and interstitial monocytes. The pulmonary macrophage/monocyte will impact the initiation and continuance of lung injury without PMNs' s certain inflammatory role, particularly in endotoxemia-induced acute lung injury. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 46 : 553-564)

**Key words :** Acute lung injury, Proinflammatory cytokines, Alveolar macrophage/monocyte.

## 서 론

내독소는 그람음성균의 외막을 구성하는 리포다당질로서 그람음성균으로 인한 생체 염증반응을 설명하는 주요소이다. 그람음성균 패혈증이나 폐렴은 중독한 폐손상을 유발하여 이는 급성호흡곤란증후군 발생의 가장 흔한 선행요인으로 간주되고 있다<sup>1)</sup>. 내독소유발 급성폐손상의 특징적인 병리현상으로 폐조직의 호중구 침윤 및 미세혈관계내의 호중구 격리 등을 관찰할 수 있다. 내독소분비-그람음성균으로 자극된 순환호중구의 폐장내 유입은 감염에 대한 개체방어기능 강화에 중요한 역할을 하게된다<sup>1)</sup>. 급성호흡곤란증후군 환자에서 기관지폐포세척액내 많은 수의 호중구가 관찰되어오고 활성화된 호중구에서 분비되는 효소들의 기관지폐포세척 측정정도와 급성호흡곤란증후군의 임상적 심각도간에 일치되는 결과를 보이고 있으며<sup>2,3)</sup> 호중구 결핍 실험동물군 혹은 항CD18 이나 항ICAM-1 으로 전치치한 실험동물군에서 관찰된 내독소유발 급성폐손상에서 순환호중구의 폐장내 유입이나 호중구의 미세혈관계 격리현상이 감소하였고<sup>4)</sup> 동시에 폐손상정도가 경감되는 결과를 보였다<sup>5)</sup>. 이와같이 활성화된 호중구는 급성폐손상의 염증성 특징에 중심적인 역할을 할 것으로 설명되고 있다<sup>5,6)</sup>.

내독소자극은 폐장의 염증세포, 간염성 세포 및 순

환식세포들을 활성화시키고 활성화된 표적세포들에서 cytokines 발현이 유발되며 생성 및 유리된 cytokines가 자소/측분비적으로 작용하여 폐장의 면역세포나 기질세포들의 활성화를 증폭시켜 결과적으로 이들 세포간의 유착능이 강화되고 식세포 누출이 일어나며 증가된 투과성으로 인한 비심인성 폐삼출을 일으켜 급성 폐손상을 유발하게 된다<sup>7,8,9)</sup>. TNF- $\alpha$ 나 IL-1은 주로 대식세포에서 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine으로 그람음성균으로 유발된 패혈증에서 발생하는 폐손상을 설명할 수 있는 매개물로 해석되고 있다<sup>10)</sup>. TNF- $\alpha$ 의 폐장내 주입으로 내독소유발 폐손상과 동일한 병리현상을 관찰하였고 또한 생체 주입시 패혈성 저혈압이 관찰되므로서 TNF- $\alpha$ 는 IL-1과 더불어 폐손상이나 패혈증의 주된 매개물로 알려지게 되었다<sup>8,9)</sup>. 또 다른 proinflammatory cytokine 으로서 IL-6 는 이러한 염증성 cytokines의 표식자 (surrogator)나 적분자 (integrator)로서 설명되고 있다<sup>11,12,13)</sup>.

내독소유발 급성폐손상에서 폐장에 발현되는 proinflammatory cytokine 기원세포로서 활성화된 잔류 대식세포 및 단핵구 외에 폐조직으로 유입된 동원 호중구의 역할이 중요하게 인식되고 있으며<sup>14)</sup> 이외에도 최근 폐장내 간염성세포등에서도 발현되고 있는 것으로 밝혀지고 있다<sup>15,16)</sup>.

저자들은 실험 백서에서 내독소를 정맥내 주입하여 유발시킨 급성폐손상에서 proinflammatory cytokines 으로서 TNF- $\alpha$  및 IL-6 폐장내 기원의 주된 세포(들)를 규명하고자 하였다. 우선 세포독성 약물 투여로 대부분의 말초혈액내 호중구를 제거시킨 내독소군과 대조-내독소군간의 기관지폐포세척 proinflammatory cytokines 의 생물학적 측정 농도를 비교하여 proinflammatory cytokine 분비에 기여하는 호중구 역할을 평가하여보고 대조-내독소군 폐조직에서 proinflammatory cytokines 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 폐장내 이들 cytokine 기원 세포들의 기여도를 반량적으로 평가하여 보았다.

## 방 법

### 1. 실험 동물

체중  $250 \pm 50$ g의 건강체인 웅성 Sprague-Dawley를 정상 대조군 (Normal Control Saline Group)과 내독소유발 급성폐손상군으로 분류하였으며 급성폐손상군은 백혈구결핍 내독소군 (CPA-ETX Group)과 대조-내독소군 (ETX Group)으로 하였다. 실험백서를 phentotal sodium 으로 마취한 후 생리식염수 0.4ml (control) 혹은 동량의 생리식염수에 용해시킨 LPS (055 : B5 E. coli, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5mg/kg를 백서 미부정맥으로 주사한 후 각각 0 및 3, 6시간에 희생시켰다. 백혈구결핍 내독소군은 cyclophosphamide, 7mg/kg 를 복강내 주입하여 5일째에 LPS를 같은 방법으로 주입하여 3, 6시간에 각각 희생시켰다.

각군에서 기관지폐포세척술을 전술한 바와 같이 시행하여 처리했으며<sup>17)</sup> 기관지폐포세척 세포의 총백혈구수 산출은 coulter count 법으로 하였고 분획세포수 산출은 DIFF-QUICK (modified Giemsa)-염색 cytopsin을 사용하여 각각 얻어졌다. 기관지폐포세척 총단백량은 단백질 측정 kit(SIGMA DIAGNOS-

TICS<sup>®</sup>)를 이용하여 brilliant blue G.로 착색시켜 분광비색계로 595nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

### 2. 기관지폐포세척 cytokine의 측정

cytokine의 측정은 정상 대조군과 내독소유발 급성폐손상군 3, 6시간째에 다음과 같은 생물학적 방법으로 각각 측정하였다. 상기 시간대 결정은 저자들이 이전에 시행하였던 내독소혈증 유발 급성폐손상 실험에서<sup>17)</sup> 내독소 투여후 6시간째에 기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  및 IL 6가 최대치에 도달한 결과를 고려하여 정하였다.

#### (1) TNF- $\alpha$ 측정

actinomycin D로 처리된 TNF- $\alpha$  감수성 세포인 murine L929 섬유모세포를 이용하여 측정하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 섬유모세포 상층액 (suspension)이 첨가된 L929 세포를  $4 \times 10^5$ 의 농도로 96 well flat-bottomed microplate에 분주하여  $37^\circ\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  항온 배양기에서 overnight 배양한 후 medium을 흡인하여 각 well에  $50 \mu\text{l}$  supplemented Eagles Minimum Essential Medium (EMEM)을 첨가하였다. medium control에는  $50 \mu\text{l}$  EMEM을 추가하고 그 외는 기관지폐포세척액을 원액으로 부터 1 : 15624 까지 5배씩 희석하여  $50 \mu\text{l}$  씩 각 well에 추가하고,  $50 \mu\text{l}$  actinomycin D를 첨가한 후  $37^\circ\text{C}$ , 6%  $\text{CO}_2$  항온배양기에서 18시간동안 혼합배양하였다. 각 well에서 상층액을 흡인한 후  $200 \mu\text{l}$  0.9% saline 으로 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 dry 한 후 염색된 각 well에  $100 \mu\text{l}$  100% methanol로 염색을 제거한 후 분광측정기를 이용하여 595nm에서 각 well의 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.

## (2) Interleukin 6 측정

IL-6 의존성 세포인 B9세포(murine hybridoma cell line) 를 이용하여 측정하였다. B9 세포는 10% FCS와 2.0 U/ml의 IL-6 (Genzyme, Cambridge, MA)가 포함된 RPMI 완전배지에서 배양하여 이용하였다. B9 세포를 5% FCS가 함유된 RPMI 완전 배지에  $5 \times 10^4$ 의 농도로 96 well flat-bottomed microplate에서 3 well에  $100 \mu\text{l}$  씩 분주하여 기관지폐포세척액을 원액으로 부터 1 : 15624까지 5배씩 희석하여  $100 \mu\text{l}$  씩 혼합배양하였다.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  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 방치한 후 분광측정기를 이용하여 흡광도를 측정하여 B9 세포의 증식정도를 측정하였다. 표준시약으로서 재조합 형태의 IL-6를 여러 농도로 만들어 B9 세포의 증식을 유도하며 IL-6 1U는 B9세포를 최대로 증식시킨 광학 밀도의 반값에 해당되는 광학 밀도로 계산하였다.

## 3. 면역조직화학염색

기관지폐포세척술을 시행하지 않은 정상대조군 및 대조-내독소군에서 3시간 및 6시간제에 각각 면역조직화학염색을 시행하였다. 정상대조군 및 내독소 정맥내 주입후 각각 3시간 (n=5) 및 6시간 (n=5)에서 폐를 조심스럽게 적출하여 얻어진 폐를 중성 formalin에 고정시키고 파라핀 블록 후 우폐하엽부로 추정되는 부위에서  $4 \mu\text{m}$  두께로 박절하여 5mm 간격으로 각각 3개의 절편을 얻어 면역조직화학 염색을 시행하였다. 우선 박절된 절편을  $58^\circ\text{C}$  항온기에 1시간 처리후 xyline으로 탈파라핀 후 합수과정을 거치고 얻어진 조직을 증류수에 10분간 수세한 후 내인성 peroxidase의 활성을 막기위해 3% hydrogen peroxide와 methyl alcohol에 30분간 반응시킨다. 비특

이 결합을 방지하기 위하여 goat 5% 정상혈청 (Signet Kit Blocking Reagent Normal Serum)으로 30분간 처리후 도포한 혈청을 털어내고 조직을 일차 항체로 충분히 도포한 후 실온에서 40분간 반응시켰다. 일차항체는 각각 polyclonal rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$  (SEROTEC Co.), 및 monoclonal mouse anti-human IL-6 (GENZYME Co.) 혈청을 1 : 100의 농도로 희석하여 사용하였다. PBS (pH 6.0)로 3분씩 3회 수세후 각각 이차항체 (Signet Kit)인 biotinylated goat anti-rabbit IgG과 biotinylated rabbit anti-mouse IgG로 30분간 반응시킨 후 다시 PBS로 3분씩 3회 수세후 Streptavidin이 부착된 peroxidase (Signet Kit)로 반응시키고 다시 PBS로 3분씩 3회 수세한 후 색소원으로는 3-3'-Diaminobezidin tetrachloride을 사용하여 어두운 곳에서 10분간 발색시켰다. Hematoxyline으로 대조 염색후 grade alcohol을 거쳐 탈수하고 봉입한 후 광학현미경으로 검경하였다. 검경시 갈색 침착 관찰은 특이 항원의 존재를 의미하였다. 모든 과정은 실온에서 시행되었다.

## 4. 유의성 검정

STATISTICA 4.1 통계 프로그램을 이용하여 유의성을 검증하였으며 평균  $\pm$  표준오차로 결과를 나타내었고 시간별 각군의 실험결과치 비교에는 비모수 검정 방법인 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. Cyclophosphamide (CPA) 복강내 투여 5일후 말초혈액 백혈구수

CPA로 처리한 백혈구결핍군 (n=10) 에서 투여 5

Table 1. Brochoalveolar lavage characteristics in each group

| Characteristics            | NC             | ETX-3h           | ETX-6h           | CPA-ETX-3h      | CPA-ETX-6h      |
|----------------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| n                          | 5              | 5                | 6                | 5               | 5               |
| Total WBC( $\times 10^4$ ) | 5.2 $\pm$ 0.6  | 13.0 $\pm$ 1.0*  | 23.0 $\pm$ 4.5*  | 3.0 $\pm$ 0.3   | 4.5 $\pm$ 0.6   |
| Macrophage                 | 4.9 $\pm$ 0.5  | 12.3 $\pm$ 1.1*  | 17.9 $\pm$ 4.0*  | 3.0 $\pm$ 0.1   | 4.5 $\pm$ 0.1   |
| %                          | 94.1 $\pm$ 0.4 | 94.3 $\pm$ 1.5   | 80.0 $\pm$ 6.1   | 99.7 $\pm$ 0.2  | 99.7 $\pm$ 0.2  |
| PMN                        | 0.1 $\pm$ 0.0  | 0.5 $\pm$ 0.0*   | 4.4 $\pm$ 1.9*   | 0.03 $\pm$ 0.0# | 0.04 $\pm$ 0.0# |
| %                          | 2.3 $\pm$ 0.1  | 3.7 $\pm$ 0.5*   | 16.6 $\pm$ 5.4*  | 0.09 $\pm$ 0.0# | 0.09 $\pm$ 0.0# |
| Protein(mg/dl)             | 10.8 $\pm$ 0.8 | 33.0 $\pm$ 11.8* | 73.7 $\pm$ 8.7** | 28.1 $\pm$ 4.3  | 30.6 $\pm$ 5.2* |

\*p<0.05 vs NC ; #p<0.05 vs ETX & NC ; \*\*p<0.05 vs ETX-3h & CPA-6h

일체 총백혈구수는 6,830 $\pm$ 612에서 395 $\pm$ 88/mm<sup>3</sup>으로 (p<0.005), 호중구는 2,405 $\pm$ 275에서 88 $\pm$ 20/mm<sup>3</sup>으로 각각 약 95% 씩 감소하였다 (p<0.005).

## 2. 기관지폐포세척 세포 및 단백질 측정결과

정상대조군에 비해 대조-내독소군에서 기관지폐포세척 총백혈구수는 3, 6시간째에 각각 유의한 증가를 보였으나 (p<0.01), 백혈구결핍 내독소군과는 차이가 없었다. 대조-내독소군은 정상대조군에 비해 기관지폐포세척 단핵구 및 호중구수가 3, 6시간째에 각각 유의하게 증가하였으며 (p<0.05) 특히 호중구 분획율의 유의한 증가를 동반하였다 (p<0.05). 백혈구결핍 내독소군은 정상대조군에 비해 3, 6시간째에 각각 기관지폐포세척 호중구수 및 호중구분획율의 유의한 감소를 보였으나 (p<0.05) 기관지폐포세척 단핵구수 및 단핵구 분획율에서는 양군간에 차이가 없었다. 따라서 백혈구결핍 내독소군에서 나타나는 기관지폐포세척 단핵구는 대부분이 잔류성 폐포대식세포 (resident alveolar macrophage) 로 사료되었다. 기관지폐포세척 총단백량은 내독소군에서 3, 6시간째에 각각 정상대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며 (p<0.05) 내독소군간에는 6시간째에 대조-내독소군에서 백혈구결핍 내독소군에 비해 유의하게 높았다 (p<0.05)(Table 1.). 이러한 결과는 초회항원자극된

(priming) 순환호중구나 단핵구의 폐장내 동원이 없어도 내독소로 활성화된 잔류 폐포대식세포에 의해서 폐손상이 유발될 수 있음을 설명한다. 동시에 저자들이 이전에 시행하였던 기관지내 내독소주입으로 유발된 급성폐손상에서<sup>18)</sup> 본 실험의 내독소혈증 유발 폐손상과 비교하여 평균 5배의 기관지폐포세척 호중구 증가로 평균 2배정도의 기관지폐포세척 총단백량 증가를 관찰하였던 결과를 고려하면 연속하여 폐장으로 동원된 호중구의 활성화가 잔류 폐포대식세포/단핵구의 활성화로 유발된 폐손상에 상승 혹은 부가적으로 기여하는 것으로 사료되었다. 이와같이 순환호중구의 폐장내 동원은 내독소혈증 유발 급성폐손상 발생에 반드시 요구되는 필수조건은 아닐 것으로 해석하였다.

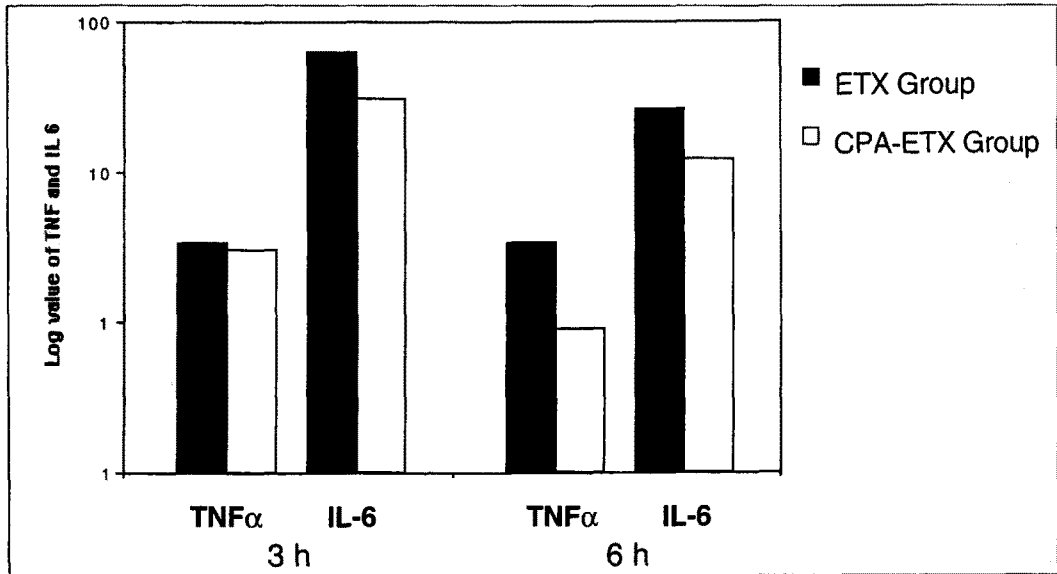
## 3. 기관지폐포세척 cytokine의 동태

기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  및 IL-6 의 농도는 정상대조군에서 각각 0.06 $\pm$ 0.06 U/ml (n=5) 및 0.45 $\pm$ 0.23 U/ml (n=5)이었다. 대조-내독소군에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 3시간째에 각각 3.53 $\pm$ 1.39 (n=6) 및 146.40 $\pm$ 34.01 (n=6)으로 상승하였고 (p<0.05) 6시간째에는 각각 4.22 $\pm$ 1.38 (n=6) 및 77.75 $\pm$ 27.98 U/ml (n=6)으로 상승하였다 (p<0.05), 백혈구결핍 내독소군에서는 3시간째에 각각 3.06 $\pm$ 1.38 (n=6) 및 102.02 $\pm$ 72.95 (n=6)으로 상승하였고 (p<0.05) 6시간째에는 각각 1.53 $\pm$ 0.57

**Table 2.** Bronchoalveolar lavage concentration of cytokines in each group

| Characteristics | NC          | ETX-3h          | ETX-6h         | CPA-ETX-3h      | CPA-ETX-6h     |
|-----------------|-------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| n               | 5           | 6               | 6              | 6               | 6              |
| TNF(u/ml)       | 0.06 ± 0.06 | 3.53 ± 1.39*    | 4.22 ± 1.38*   | 3.06 ± 1.38*    | 1.53 ± 0.57*   |
| IL 6            | 0.45 ± 0.23 | 146.30 ± 34.01* | 77.75 ± 27.98* | 102.02 ± 72.95* | 32.26 ± 20.98* |

\*p<0.05 vs NC



**Fig. 1.** Comparison of TNF- $\alpha$  and IL-6 in BAL fluid between ETX- and CPA-ETX-group.

(n=6) 및  $32.26 \pm 20.98$  U/ml (n=6)으로 상승하였다(p<0.05)(Table 2.). 백혈구결핍 내독소균과 대조-내독소균간에 내독소 투여후 3, 6시간째의 기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  및 IL-6 측정량의 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Table 2)(Fig. 1). 이상의 결과는 내독소혈증으로 유발된 급성폐손상의 초기에 기관지폐포세척에서 검출되는 proinflammatory cytokines 의 기원은 폐장으로 동원된 순환 호중구보다는 활성화된 잔류 폐포대식세포/단핵구나 혹은 폐장내 간엽성세포들에서 주로 분비되었음을 시사하는 것으로 해석되었다.

#### 4. 면역조직화학염색에 의한 TNF- $\alpha$ 단백질 및 IL-6 단백질의 폐장내 발현

생리식염수로 처리한 백서의 폐조직에서는 TNF- $\alpha$  및 IL-6 단백질이 폐장내 세포들에서 특별히 검출되지 않았으며 내독소 정맥 주입 3시간 및 6시간후의 폐조직에서는 TNF- $\alpha$  및 IL-6가 폐포대식세포와 기관지 및 혈관주위 간질조직내의 단핵구들에서 강하게 염색되는 소견을 관찰할 수 있었으나 미세혈관계 혹은 간질조직등에서 보이는 호중구들에서는 면역염색소견이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 단핵구는 호중구에 비해

– Lung expression of proinflammatory cytokines –

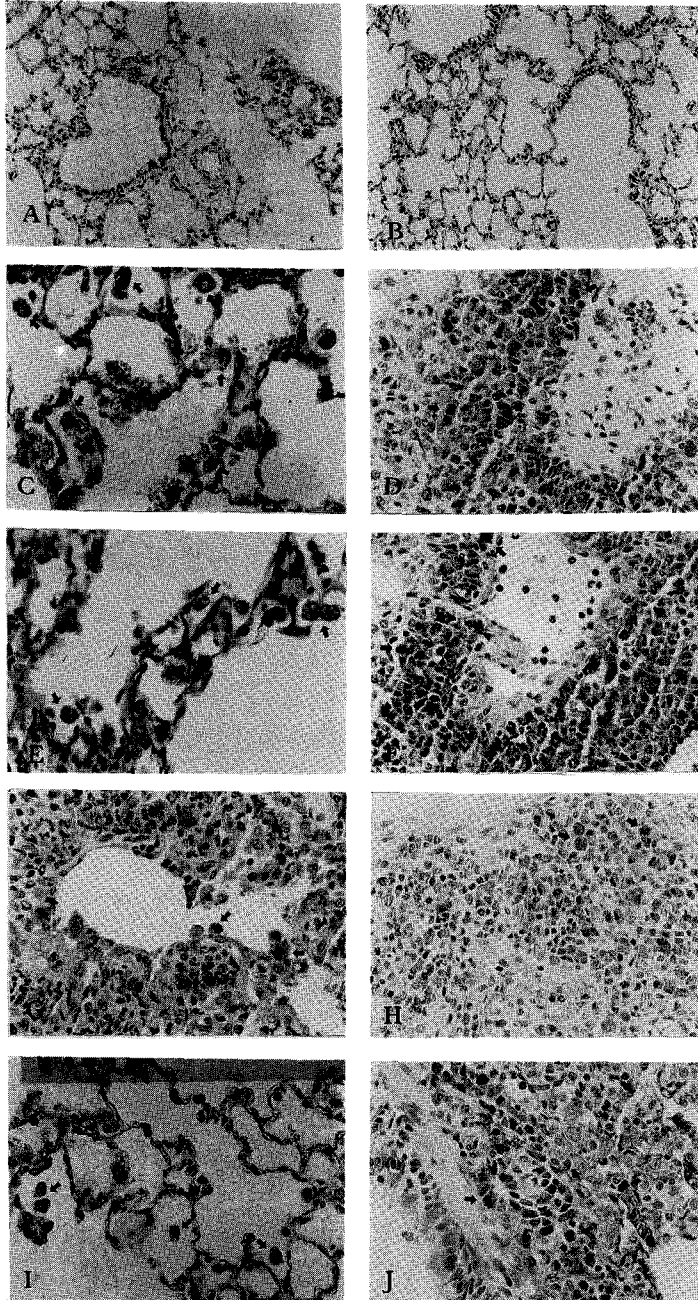


사진. Localization of IL-6 and TNF- $\alpha$  protein in the saline-treated lung tissue by monoclonal mouse anti-human IL-6 and polyclonal rabbit anti-mouse TNF- $\alpha$  in immunohistochemical (IH) stain (A to IL-6 : B to TNF- $\alpha$ ). IH localization of IL-6 at 3 h (C, D) and 6 h (E, F) ; TNF- $\alpha$  at 3 h (G, H) and 6 h (I, J) after i.v. administration of endotoxin, 5mg/kg. Arrows indicate alveolar macrophages and interstitial macrophages within the tissue near bronchioles or vessels.

내독소에 대한 예민도가 높고<sup>19)</sup> 또한 세포골격 변형성이 호중구에 비해 상대적으로 적어<sup>20)</sup> 폐-미세혈관계에 쉽게 잔류되는 경향을 가지므로 본 실험에서 관찰되는 활성화된 단핵구의 기원을 일부 설명할 수 있을 것으로 사료하였다. 이와같은 결과들에서 내독소혈증으로 유발된 급성폐손상의 초기 기간에 기관지폐포 세척에서 검출되는 proinflammatory cytokines의 기원은 활성화된 호중구보다는 주로 활성화된 폐포대식세포/단핵구들에서 분비되고 있음을 시사하는 것으로 사료하였다.

## 고 찰

고밀도 지질단백 (HDL)과 결합된 내독소는 생물학적으로 불활성화된 상태로 인지되어 대식세포를 자극할 수 없으나 급성염증반응의 결과로 간에서 생성되는 것으로 알려진 내독소결합단백 (LBP)과 합쳐지면 염증세포에 대한 내독소 영향이 수백배 증폭된다<sup>21, 22, 24)</sup>. 이는 숙주가 체내에서 세균의 존재를 초기에 인지할 수 있도록 하는 중요한 현상이다. 내독소-LBP 복합체의 작용발현에는 55kD, glycosylphosphatidylinositol으로 고정된 세포 막단백질인 CD14 수용체가 중요한 역할을 하며<sup>24)</sup> 대식세포에서 CD14의 존재가 규명된 바 있다. 폐포대식세포 및 단핵구에서 단백질분해과정 혹은 phosphatidylinositol-특이 phospholipase C 등에 의해 떨어져 나온 sCD14의 존재는 CD14 수용체가 표현되지 않는 세포들에서 발현되는 내독소에 대한 증강된 반응을 설명할 수 있다<sup>25)</sup>. 이러한 복합체-수용체 결합은 표적세포내 cytokine 및 유착분자 (adhesion molecule)의 증폭된 발현 및 분비에 기여하게 된다<sup>26)</sup>. 자극된 단핵구/대식세포는 IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  등을 생성하고 이러한 cytokine이 다른 대식세포나 면역세포, 폐장내 간엽성세포들을 자극하여 화학주성인자 (chemoattractant), 성장인자 (growth factor), 유착분자 등의 발현이 증폭되면서 전염증단계가 정렬하게 된다.

TNF- $\alpha$ 는 myristoylated type II-막 관련

26kDa 분자로서 기능적인 측면에서 IL-1과 유사한 cytokine으로 주로 대식세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다<sup>27, 28)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 자극된 표적세포들에서 IL-8 발현을 유도하여 호중구에 대한 화학주성을 증강시키며, 초기항원자극된 순환 호중구의 내피세포-유착능을 증가시키고 동시에 동원된 호중구의 경-내피세포간 이동을 촉진시킨다. 또한 직접적으로 호중구에 작용하여 유리산소기 발생이나 호중구의 탈과립현상을 증가시켜 염증반응을 일으킬 수 있으며 자극된 호중구에서 IL-8, IL-6, IL-1- $\beta$  등의 발현을 유도하기도 한다. 이와같이 TNF- $\alpha$ 는 호중구의 초기항원자극이나 염증부로의 동원 및 활성화에 추축적인 역할을 한다<sup>29, 30)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 직접적으로 내피세포<sup>31, 32)</sup> 및 상피세포의<sup>28)</sup> 삼출성을 증가시킬 수 있으며 내피세포 및 상피세포의 유착분자 발현을 유도한다<sup>33)</sup>. TNF- $\alpha$ 로 자극된 표적세포들에서 IL-1의 합성능이 증가하고 결과적으로 분비된 IL-1과 상승적으로 작용하여 조직의 염증성 치명도를 높일 수 있으며<sup>34)</sup>, IL-1과 더불어 단핵구에서 분비되는-interferon도 TNF- $\alpha$ 의 생리효과를 증폭시키는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>. IL-6는 proinflammatory cytokine으로서 TNF- $\alpha$ 나 IL-1과 증폭되는 기능을 갖고 있으며 간 급성단백 유도체의 역할을 포함하여 흉선세포 증식 및 T-세포를 활성화시키고 B-세포 성장인자로도 알려져 있다<sup>36)</sup>. 내독소자극으로 생성된 TNF- $\alpha$ 나 IL-1을 길항하는 역할도 있는 것으로 알려져 있어 염증과정에서의 IL-6 역할은 아직 명확히 규명되지 않았다<sup>12, 13, 37)</sup>.

내독소유발 급성폐손상에서 TNF- $\alpha$ , MIP-2, IL-1- $\beta$ , IL-6 등의 proinflammatory cytokines의 주 세포기원은 폐포대식세포나 혹은 유입된 호중구 및 단핵구에서 분비될 것으로 설명되고 있다<sup>8, 9, 10)</sup>. 특히 기도내 내독소주입으로 유발된 폐손상 관찰결과 TNF- $\alpha$  mRNA가 호중구에서 다량 검출되며 대식세포에 비해 오랜동안 지속되는 결과를 보여 지속적인 TNF- $\alpha$  생성에 호중구 역할이 중요할 것으로 생각되고 있다<sup>14)</sup>. 한편 내독소유발 급성 폐손상에서 유착분자인 CD11a나 ICAM-1 혹은 CD18 항체등으로 순환호



중구 동원을 30에서 70% 감소시켜도 기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  값의 변동은 없었으므로 폐장내 TNF- $\alpha$ 의 주기원은 폐포대식세포에서 비롯될 것이라는 의견이 있었으며<sup>4)</sup> 대식세포의 자극으로 폐장내에 동원된 호중구에서 분비되는 acyloxyacyl hydrolase는 내독소를 deacylated 시켜 내독소 활성도를 저하시킬 수 있고<sup>38)</sup> in vitro에서 G-CSF로 자극된 호중구는 내독소로 자극된 단핵구의 TNF- $\alpha$  분비능을 감소시킬 수 있음이 보고된 바 있다<sup>39)</sup>. 본실험에서 기관지폐포세척 cytokine 측정정도는 cyclophosphamide 전처치로 기관지폐포세척 호중구가 약 70에서 90% 감소하였고 기관지폐포세척 단핵구가 70에서 85% 감소함에도 불구하고 대조-내독소군과 차이가 없었다. 이는 폐장내에서 검출되는 proinflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$ 나 IL-6의 주된 기원세포는 내독소로 활성화된 폐포대식세포 등의 잔류 대식세포(resident macrophage)일 것으로 추정되었으며 대조-내독소군 3, 6시간째에 시행된 면역조직화학염색 결과 TNF- $\alpha$  단백질 및 IL-6 단백질이 폐포대식세포/간질대식세포에서 강하게 염색되어 내독소혈증 유발 급성폐손상의 초기에는 proinflammatory cytokine의 주기원 세포가 활성화된 폐포대식세포/단핵구세포임을 확인할 수 있었다. 폐포대식세포는 단핵구에 비해 TNF- $\alpha$  분비능이 강한 것으로 알려져 있으며 간질대식세포는 폐포대식세포의 전구세포일 것이라고 생각되고 있다. 저자들이 예비실험으로 시행하였던 기관지내 내독소주입 폐손상군 6시간째의 면역조직화학염색결과에서는 proinflammatory cytokine 단백질발현이 기관지주위 간질조직 및 미세혈관계 등에 침윤된 호중구에서 주로 관찰되어 이는 Xing 등의<sup>14)</sup> 실험결과와 동일하였다. 따라서 내독소유발 폐손상군에서 내독소의 폐장내 도달경로에 의해 proinflammatory cytokine 단백질발현 기원세포에 차이가 있을 것으로 사료된다. 즉, 내독소로 인한 폐조직의 자극정도가 강할수록 호중구 유입이 증가되며 시간경과에 따라 동원된 호중구가 TNF- $\alpha$ 의 주된 기원이 될 것으로 생각되며 이러한 결과로 폐장내에 지속적인 순환호중구의 유

입 및 동원이 가능할 것으로 추정된다. 이와같이 활성화된 폐포대식세포 등의 잔류 대식세포가 TNF- $\alpha$ 나 IL-6 등의 proinflammatory cytokine을 주로 분비하여 연속되는 호중구 반응에 방어쇠적인 역할을 할 수 있고 동시에 연속적인 순환호중구의 동원 없이도 단독적으로 급성폐손상을 유발시킬 수 있을 것으로 사료하였다. 이러한 현상의 관찰은 항호중구항체유발 호중구결핍 내독소군에서 급성폐손상 발생에 특별한 차이가 없었고<sup>40)</sup>, 호중구 결핍환자에서 역시 중증의 급성폐손상이 발생되는<sup>42)</sup> 기전을 일부 설명할 수 있을 것이다.

요약하여 내독소혈증 유발 급성 폐손상의 초기 손상에 중요한 역할을 하는 proinflammatory cytokine의 주된 기원세포는 활성화된 폐포대식세포/단핵구세포들일 것으로 사료되며 이들 세포가 내독소혈증 유발 급성폐손상 발생에 주도적인 역할을 할 것으로 사료된다

## 요 약

### 연구배경 :

LPS에 대한 숙주의 초기반응은 proinflammatory cytokines의 분비이다. 이러한 “초기 반응” cytokines는 인지세포에서 표적세포 등에 신호를 전달하여 다른 대식세포를 포함한 면역세포, 폐장내 간엽성 세포들을 자극하여 화학주성인자, 성장인자, 유착분자 등의 발현을 증폭시키게 되면서 전염증단계가 정열하게 된다. 내독소유발 급성폐손상에서 폐장내 proinflammatory cytokine 기원 세포들은 활성화된 대식세포/단핵구 외에 폐조직으로 유입된 동원 호중구의 역할이 중요하게 인식되고 있으며 이외에도 간엽성 세포들에서도 발현되고 있는 것으로 밝혀지고 있다. 저자들은 실험 백서에서 내독소를 정맥내 주입하여 유발시킨 급성폐손상에서 proinflammatory cytokines인 TNF- $\alpha$  및 IL-6 기원의 주된 세포(들)를 규명해 보고자 하였다.

### 방 법 :

체중  $250 \pm 50$ g의 건강체인 웅성 Sprague-

Dawley를 정상 대조군 (Normal Control Saline Group)과 내독소유발 급성폐손상군으로 분류하였으며 급성폐손상군은 백혈구결핍 내독소군 (CPA-ETX Group)과 대조-내독소군 (ETX Group)으로 하였다. 실험백서를 phentotal sodium 으로 마취한 후 생리식염수 0.4ml (control) 혹은 동량의 생리식염수에 용해시킨 LPS (055 : B5 E. coli, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5mg/kg를 백서 미부정맥으로 주사한 후 각각 0 및 3, 6시간에 희생시켰다. 백혈구결핍 내독소군은 cyclophosphamide, 7mg/kg를 복강내 주입하여 5일째에 LPS를 같은 방법으로 주입하여 3, 6시간에 각각 희생시켰다. 각군에서 기관지폐포세척술을 전술한 바와 같이 시행하여 총백혈구수, 분획세포수 및 총단백량을 산출하였고 기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  및 IL 6를 생물학적 방법으로 각각 측정하여 비교하였다. 동시에 기관지폐포세척술을 하지 않은 정상대조군 및 대조-내독소군에서 TNF- $\alpha$  및 IL 6 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

#### 결 과 :

기관지폐포세척 세포 및 단백질 측정 결과 정상대조군에 비해 대조-내독소군에서 기관지폐포세척 총백혈구수는 3, 6시간째에 각각 유의한 증가를 보였으나( $p < 0.01$ ), 백혈구결핍 내독소군과는 차이가 없었다. 대조-내독소군은 정상대조군에 비해 기관지폐포세척 단핵구 및 호중구수가 3, 6시간째에 각각 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ) 특히 호중구 분획율의 유의한 증가를 동반하였다( $p < 0.05$ ). 백혈구결핍 내독소군은 정상대조군에 비해 3, 6시간째에 각각 기관지폐포세척 호중구수 및 호중구분획율의 유의한 감소를 보였으나( $p < 0.05$ ) 기관지폐포세척 단핵구수 및 단핵구 분획율에서는 양군간에 차이가 없었다. 기관지폐포세척 총단백량은 내독소군에서 3, 6시간째에 각각 정상대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ) 내독소군간에는 6시간째에 대조-내독소군에서 백혈구결핍 내독소군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 기관지폐포세척 TNF- $\alpha$  및 IL-6 의 농도는 정상대조

군에서 각각  $0.06 \pm 0.06$  U/ml( $n=5$ ) 및  $0.45 \pm 0.23$  U/ml( $n=5$ ) 이었다. 내독소군에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 정상대조군에 비해 유의하게 상승되었으며( $p < 0.05$ ), 백혈구결핍 내독소군과 대조-내독소군간에 차이는 없었다. 면역조직화학염색결과 내독소 정맥 주입 3시간 및 6시간후의 폐조직에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6 단백질이 폐포대식세포와 간질대식세포들에서 강하게 염색되는 소견을 관찰할 수 있었다.

#### 결 론 :

내독소혈증 유발 급성 폐손상의 초기 손상에 중요한 역할을 하는 proinflammatory cytokine의 주된 기원세포는 활성화된 폐포대식세포/단핵구세포들일 것으로 사료되며 이들 세포가 내독소혈증 유발 급성폐손상 발생에 주도적인 역할을 할 것으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

1. Brigham KL, Meyrick B : Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133 : 913-927, 1986
2. Gade JE : Adverse effects of neutrophils on the lung. *Am J Med* 92 : 27S-31S, 1992
3. Sherman MP, Ganz T : Host defense in pulmonary alveoli. *Ann Rev Physiol* 54 : 331-350, 1992
4. Winson W.T, 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
5. Stephens KE, Ishizaka A, Raffin TA : Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 138 : 1300-1307, 1988
6. Heflin AC., Brigham KL : Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68 : 1253-1260, 1981
7. Rinaldo, J.E, J. W. Cristman. : Mechanisms and

- mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* 11 : 621-632, 1990
8. 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
  9. Thomas R. Ulich., Luke R. Waston : The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am. J. Pathol.* 138 : 1485-1495, 1991
  10. 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
  11. Spinas, G.A., S. Cammisuli. : Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis* 163 : 89-95, 1991
  12. Helle M., De groot ER : Interleukin-6 is involved in interleukin-1 induced activities. *Eur J Immunol.* 18 : 957-959, 1988
  13. Biffl WL, Moore EE, Moore FA : Interleukin-6 potentiates neutrophil priming with platelet-activating factor. *Arch Surg.* 129 : 1131-1136, 1994
  14. Zhou Xing, J. Gaudie : Polymorphonuclear Leukocytes as a Significant Source of Tumor Necrosis Factor—in Endotoxin-Challenged Lung Tissue. *AJP* 143 : 1009-1015
  15. Cromwell O, Q. Hamid, A.B. Kay : Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumor necrosis factor alpha. *Immunology* 77 : 330-337, 1992
  16. Spriggs, E. Sariban, D. Kufe : Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J. Clin. Invest.* 81 : 455-460, 1988
  17. 문승혁, 오제호 등 : 시간별 내독소 정맥주입으로 유발된 급성폐손상의 변화양상에 대한 고찰. *결핵 및 호흡기질환* 44 : 360-378, 1997
  18. 김용훈, 문승혁 등 : 내독소에 의한 급성폐손상에서 Protein Kinase C 의 역할. *결핵 및 호흡기질환* 44 : 349-359, 1997
  19. Duff GW, Atkins E : The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen : comparison with *Limulus* amoebocyte lysate gelation. *J Immunol Methods* 52 : 323-331, 1982
  20. 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
  21. 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
  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. Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT : Relationship between soluble CD 14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155 : 937-944, 1997
  25. BAZIL v., Strominger JL : Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol* 147 : 1567-1574,

- 1991
26. 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
  27. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR : Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 318 : 1481-1486, 1988
  28. X.Y. Li, K. Donaldson, D. Brown, W. MacNee : The role of tumor necrosis factor in increased airspace permeability in acute lung inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13 : 185-195, 1995
  29. Warren JS, K.J. Johnson, P.A. Ward : Tumor necrosis factor participates in the pathogenesis of acute immune complex alveolitis in the rat. *J. Clin. Invest.* 84 : 1873-1882, 1989
  30. Morzycki W, A.C. Issekutz : Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha induced polymorphonuclear leukocyte-endothelial cell adhesion and transendothelial migration in vitro : the effect of apical versus basal monolayer stimulation. *Immunol. Leu.* 25 : 331-340, 1990
  31. Horvath. C.J, T.J. Ferro, A.B. Malik : Recombinant tumor necrosis factor increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85 : 9219-9223, 1988
  32. Brett J, H. Grelach, G. Godman, D. Stern : Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J. Exp. Med.* 172 : 1977-1991, 1989
  33. M.L Yu, A.H. Limper : *Pneumocystis carinii* induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-mediated mechanism. *Am J Physiol* 17 : L1103-L1111, 1997
  34. Waage A., T. Espevik : Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor- / cachectin in mice. *J. Exp. Med.* 167 : 1987, 1988
  35. 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
  36. Akira S, Hirano T, Kishimoto T : Biology of multifunctional cytokines : IL 6 and related molecules(IL 1 and TNF). *FASEB J* 4 : 2860-2867, 1990
  37. H. Fletcher Starnes JR., John S. Abrams : Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *E. Coli* infection and lethal tumor necrosis factor-challenge in mice. *J Immunol.* 145 : 4185-4191, 1990
  38. Munford RS, Hall CL : Detoxification of bacterial lipopolysaccharides(endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 234 : 203-205, 1986
  39. Takeshi Terashima., Kenzo Soejima., Minoru Kanazawa : Neutrophil activated by granulocyte colony-stimulating factor suppress tumor necrosis factor- release from monocytes stimulated by endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13 : 69-73, 1995
  40. Winn R., Harlan J : Neutrophil depletion does not prevent lung edema after endotoxin infusion in goats. *J Appl Physiol.* 62 : 116-121, 1987
  41. Laufe MD., Simon RH, Flint A., Keller JB : Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am J Med.* 80 : 1022-1026, 1986