

Perfluorocarbon이 기도 상피세포 Chemokine 발현에 미치는 영향에 관한 연구

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성서울병원 호흡기내과, 삼성생명과학연구소

서지영, 강경우, 박상준, 정만표, 김호중, 최동철, 이종헌, 권오정

= Abstract =

Perfluorocarbon Does Not Inhibit Chemokine Expression in Airway Epithelial Cells

Gee Young Suh, M.D., Kyeong Woo Kang, M.D., Sang Joon Park, M.D.,
Man Pyo Chung, M.D., Hojong Kim, M.D., Dong Chull Choi, M.D.,
Chong H Rhee, M.D., O Jung Kwon, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea*

Background : Liquid ventilation is associated with decreased inflammatory response in an injured lung. This study was performed to investigate if whether perfluorocarbon (PFC) can decrease chemokine expression in airway epithelial cells.

Methods : A549 cells were used for airway epithelial cells and perfluorodecalin for PFC. To expose cells to PFC, lower chamber of Transwell® plate was used. This study was performed in two parts. In the first part, we examined whether PFC could decrease chemokine expression in airway epithelial cells through inhibition of other inflammatory cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) were isolated and stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/mL) for 24 hours with or without exposure to PFC. Then A549 cells were stimulated with conditioned media (CM) containing the culture supernatants of PBMC. After 24 hours, the expressions of interleukin-8 (IL-8) and RANTES were measured. In the second part of the study, we studied

†본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업 HMP-97-M-2-0044의 보조로 이루어졌음.

Address for correspondence :

O Jung Kwon, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Samsung Medical Center
50 Ilwon Dong, Kangnam Ku, Seoul, Korea, 135-710

Phone : 82-2-3410-3421 Fax : 82-2-3410-3849 E-mail : ojkwon@smc.samsung.co.kr

whether PFC could directly suppress chemokine expression in airway epithelial cells. A549 cells were stimulated for 24 hours with interleukin-1 β and/or tumor necrosis factor- α with or without exposure to PFC, and then the chemokine expression was measured. Northern analysis was used to measure the mRNA expression, and ELISA was used for immunoreactive protein measurements in culture supernatant.

Results : 1. IL-8 and RANTES mRNA expression and immunoreactive protein production were increased significantly by CM from LPS-stimulated PBMC in A549 cells compared to with CM from unstimulated PBCM ($p < 0.05$), but exposure of PFC had no significant effect on either mRNA expression or immunoreactive protein expression. 2. IL-8 and RANTES mRNA expression and immunoreactive protein production were increased significantly by IL-1 β and TNF- α in A549 cells ($p < 0.05$), but exposure of PFC had no significant effect on neither either mRNA expression nor immunoreactive protein production.

Conclusion :

Decreased chemokine expression of airway epithelial cells may not be involved in decreased inflammatory response observed in liquid ventilation. Further studies on possible mechanisms of decreased inflammatory response are warranted. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 223-235)

Key words : Fluorocarbon, Cytokine, Liquid ventilation, Inflammation.

서 론

액체환기관 가스교환의 매체로 액체를 이용하는 환기 양식으로 대기압에서도 충분한 산소와 이산화탄소를 용해 시킬 수 있는 무색, 무취의 불활성인 액체인 perfluorocarbon(PFC)이 주로 사용된다¹. 액체환기는 전액체환기(total liquid ventilation)²와 "PFC와 연관된 가스교환"³이라고도 하는 부분액체환기(partial liquid ventilation)로 나눌 수 있으며 특히 부분액체환기는 액체환기의 장점을 가지면서도 기계환기기 외에 특수한 장비를 요하지 않고, 기존의 가스환기의 친숙함을 유지할 수 있어 앞으로 임상적용의 확대가 기대되는 새로운 환기법이다. 액체환기는 지금까지 여러 급성 폐손상 모델들에서 적용되어 가스환기에 비해 현저한 가스교환과 폐역학의 향상 및 폐손상의 감소 등이 보고 되고 있으며⁴⁻⁷ 신생아⁸, 소아⁹, 성인^{9,10}에서도 적용된 바 있다.

액체환기가 손상된 폐에 긍정적인 영향을 주는 기전으로는 여러 가지가 논의되고 있다. 우선 PFC는 밀도가 높고 표면장력이 낮아 특히 중력의 영향을 많이

받는 dependent 부위의 허탈된 폐의 개방을 가져와 환기에 참여 하도록(recruitment) 유도 할 수 있다^{11,12}. 두 번째로, PLV는 상대적으로 폐손상이 적은 배측(ventral) 폐단위의 관류를 증가시켜 환기-관류 불균형을 향상시킬 수 있다^{13,14}. 세번째 논의되고 있는 기전은 PFC의 직접적인 염증성 세포기능 억제를 포함한 액체환기의 항염증작용인데 아직 이에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

기도상피세포는 과거에 단순한 염증반응의 피동적 피해자의 역할에서 벗어나 최근에는 능동적으로 염증반응에 참여하고 이를 조절하는 기능이 강조되고 있는 세포이다. 실제로 기도상피세포는 cytokine을 생산, 분비할 수 있다고 보고 되었으며, 특히 chemokine으로 분류되는 interleukin-8, monocyte chemotactic protein(MCP-1), RANTES(Regulated on Activation, Normal T cell, Expressed and Secreted) 등도 생산할 수 있다. 기도상피세포에서 생성되는 chemokine들은 여러 급만성 염증성 반응에 참여함으로써 폐손상을 유발하거나 기존의 폐손상을 증폭시키는 데에 관여할 가능성이 있다. 따라서 PFC의 노출

이 기도상피세포의 chemokine의 발현을 감소시킬 수 있다면 PFC의 항염증작용을 확인함과 동시에 액체환기의 조기적용에 이론적 근거를 제공할 수 있겠으나 아직까지 이에 대한 보고는 없는 실정이어서 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 개요

본 실험에서 기도상피세포로는 제 2형 기도 상피세포의 성질을 갖는 A549 세포주를²¹ PFC으로는 perfluorodecalin(perfluoro-decahydronaphthalin, Fluka, Buchs, Swiss) 사용하였다. PFC가 기도 상피세포의 chemokine 발현에 미치는 영향은 크게 두 가지 경로로 올 수 있을 것이라고 가정하였다. 그 중 하나는 PFC가 다른 염증성 세포의 기능을 억제함으로써 기도상피세포의 chemokine 발현을 억제할 수 있을 것이라고 가정하였고, 또 하나의 가능성은 PFC가 기도상피세포의 기능을 직접적으로 억제할 수 있을 것이라고 가정하였다.

따라서 실험은 두 부분으로 나누어서 시행하였는데 일차적으로는 PFC가 말초혈액 단핵구층(peripheral blood mononuclear cell : PBMC)의 기능을 억제함으로써 A549세포의 chemokine 발현을 억제할 수 있는지를 관찰하기 위하여 PBMC를 분리하여 lipopolysaccharide(LPS)로 자극한 후, 그 배양상층액과 배양액을 혼합한 conditioned media(CM)로 A549세포를 자극하는 모델을 사용하였고²², PFC가 A549세포의 chemokine 발현을 직접적으로 억제할 수 있는지를 관찰하기 위해서 A549세포를 직접 종양 괴사인자(tumor necrosis factor- α : TNF- α)와 인터루킨-1 β (interleukin-1 β :IL-1 β)로 따로 혹은 동시에 자극하면서 PFC의 노출여부에 따른 chemokine 발현을 관찰하였다. PFC에 대한 노출은 Transwell® six-well culture plate(Corning Costa, Cambridge, MA)를 사용하여 시행하였는데 Trans-

well® plate는 세포배양시 구멍이 있는 막으로 upper chamber와 lower chamber가 분리가 되어 upper chamber에서 배양되고 있는 세포들이 lower chamber에 있는 배양액에 노출될 수 있도록 고안된 배양접시이다.

Chemokine 발현은 mRNA 수준에서는 Northern analysis로 단백질 수준에서는 ELISA로 면역반응성 단백질 생성 측정을 통해서 분석하였다.

2. 실험방법

(1) PBMC의 배양

최근 2주간 급성 호흡기계 증상이 없고 흉부 방사선 검사에서 정상이었던 정상 자원자의 상완에서 정맥혈 30 ml을 헤파린 300단위로 처리된 주사기로 채취하였다(n=6). 채취된 혈액을 동량의 RPMI 완전배지(2 mM L-glutamine, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 mg/ml)을 포함하는 RPMI 배지)와 혼합한 후, Ficoll-Hypaque용액(1.077 g/ml, Sigma, St Louis, Mo, USA)과 2 : 1 비율로 혼합하여, 400 G에서 30분간 원심분리 하였다. PBMC층을 Pasteur pipette으로 조심스럽게 분리하고 RPMI 완전배지로 세척하여 400 G에서 원심분리를 2회 실시 하였다. 분리된 PBMC 용액의 일부를 trypan blue로 염색하여 viability를 측정하였고 hemocytometer를 이용하여 세포농도를 측정하였다. Viability는 95% 이상이었으며 세포농도는 2×10^6 /ml가 되도록 RPMI 완전배지에 부유하였다.

PBMC(3×10^5 cells/well)를 Transwell® six-well culture plate의 upper chamber에서 온도 37 °C, 이산화탄소 농도 5%로 항온항습기에서 24시간 배양하였다. PBMC는 PFC노출과 LPS(10 μ g/ml) 자극 여부에 따라서 4군으로 나누었는데 24시간 동안 LPS 자극 없이 배양만 시행한 군(대조군), PFC에 노출하였던 군(PFC군), LPS로 자극을 한 군(LPS군), PFC에 노출시키면서 LPS로 자극한 군(LPS-PFC군)으로 나누었다. PFC의 노출은 per-

fluorodecalin 550 $\mu\ell$ 를 Transwell® plate의 lower chamber에 넣어서 하였는데, PFC는 물보다 비중이 높아 밑으로 가라 앉으며 수용액과는 섞이지 않고²³ 여러 cytokine은 PFC에 용해되지 않는다는 것이 알려져 있다²⁴. PFC의 양은 육안적으로 upper chamber의 밑면과 접촉을 할 수 있는 양으로 선택하였다. PFC의 포함여부와 관계없이 upper chamber에는 1.5 mL, lower chamber에는 2.6 mL의 RPMI배지를 배양에 사용하였다. 24시간이 지난 후 배양상층액을 채취하여 A549세포를 자극하는 데에 사용하였다.

(2) A549 세포의 배양 및 자극

A549 세포주는 ATCC로부터 구입하였으며, RPMI 완전배지에 10% fetal bovine serum(FBS)을 추가하여 35 mm 6well culture plate에서 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5%로 항온항습기에서 배양하였다. 세포가 자라 포화상태에 도달하면 실험에 사용하였다.

PBMC의 배양상층액을 RPMI완전배지에 1 : 2로 희석하여 CM을 만들어 이 것으로 A549 세포를 24 시간 동안 자극하면서 배양하였다. 어떤 CM으로 자극 하였는가에 따라 Control-CM군, PFC-CM군, LPS-CM군, LPS-PFC-CM으로 나누었으며 24시간 배양 후, 상층액은 IL-8, RANTES 면역반응성 단백질 측정을 위하여 -70°C에서 보관하고, 남아있는 A549 세포에서 총 RNA를 추출하였다.

(3) Transwell® plate에서의 A549세포 배양

PFC가 A549세포에서 cytokine에 의한 chemokine 발현을 직접 억제할 수 있는가를 살펴보기 위해서 A549 세포를 RPMI완전배지에 10% fetal bovine serum(FBS)을 추가하여 Transwell® six-well culture plate의 upper chamber에서 온도 37°C, 이산화탄소 농도 5%로 항온항습기에서 배양하였다. 세포가 자라 포화상태에 도달하면 실험에 사용하였는데, 배양된 A549세포를 무자극 대조군과 IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) 그리고 IL-1 β (10 ng/

ml) 및 TNF- α (10 ng/ml)로 동시에 자극한 군(각각 Control군, IL-1군, TNF군, IL-1-TNF군)으로 나누었고 각 자극 방법에 해당하는 PFC를 노출시킨 군을 두어(PFC군, IL-1-PFC군, TNF-PFC군, IL-1-TNF-PFC군), 총 8군으로 나누어 실험을 시행하였다(n=5). 24시간 동안의 배양이 끝나면 상층액은 IL-8, RANTES 면역반응성 단백질 측정을 위하여 -70°C에서 보관하고, 남아있는 A549 세포에서 총 RNA를 추출하였다.

(4) Northern analysis

Chomczynski와 Sacchi의 방법을 수정하여 모든 세포의 총 RNA를 분리하였다²⁵. 간략하게 설명하면, 4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5 % sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol 용액을 직접 배양접시에 넣어 배양접시에 있는 모든 세포를 녹인 후 용액을 microcentrifuge tube로 옮겼다. 여기에 pH 4.0의 sodium acetate를 추가하여 산성화시키고 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)로 2회 RNA를 추출하였다. Iso-propanol로 24시간 동안 -70°C에서 침전시킨후 원심분리하여 RNA를 얻은 후 75% ethanol로 세척하고 건조시켰다.

추출한 RNA를 RNase-free water에 용해시키고 formaldehyde를 포함한 1% denaturing agarose gel에 전기영동하였다. 이를 Hybond nylon filter에 blot하고 자외선에 4분간 노출시켜 고정하였다.

IL-8 cDNA probe는 미국 R.G. Crystal 박사 (NIH, Bethesda, MD)로부터 기증 받았으며, 제 1 exon의 PstI 위치부터 제 4 exon의 BamHI 위치까지를 포함하는 750 base pair 크기의 DNA이고, RANTES cDNA probe는 미국 T. J. Schall 박사 (Genentech Inc., San Francisco, CA)로부터 기증 받았으며, EcoRI 위치부터 ApaI 위치까지의 410 base pair 크기의 DNA이다. House-keeping gene 인 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) cDNA probe는 캐나다 T. R. Bai박사

(University of British Columbia, Vancouver, Canada)로부터 기증받았으며, 1272 base pair 크기의 PstI 위치사이의 DNA이다. 각각의 cDNA는 multi-prime DNA labelling system을 이용하여, ³²P로 random priming하여 10⁶ cpm/ml 농도로 사용하였다.

Prehybridization은 50% formamide, 5배 standard saline citrate (SSC), 0.1% sodium dodecyl sulphate(SDS), 5배 Denhardt's solution, 0.1% sodium pyrophosphate, 50mM tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 100 µg/ml salmon sperm DNA, 10⁶ cpm/ml의 labelling된 IL-8, 혹은 RANTES cDNA로 42°C에서 20시간 동안 시행하였다. 세척은 2배 SSC, 0.1% SDS로 실온에서 1회, 1배 SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 1회, 0.5배 SSC, 0.1% SDS로 42°C에서 1회, 0.1배 SSC, 0.1% SDS로 55°C에서 1회 실시하였다. 세척을 마친 nylon filter는 증감지(intensifying screen)가 있는 방사선 film에 -70°C에서 1-5일간 노출시키고, 방사선 film을 현상하였다.

대조실험을 위하여 nylon filter는 다시 50% formamide, 10mM sodium pyrophosphate로 65°C에서 1시간동안 씻은 후, 다시 GAPDH cDNA로 마찬가지로 Northern blot analysis를 시행하였다. 결과는 laser densitometry로 정량화하여 통계처리 하였다.

(5) Chemokine의 측정

Chemokine의 농도는 -70°C에서 보관되었던 상층액에서 ELISA kit(Quantikine, R&D Systems)를 이용하여 IL-8과 RANTES의 면역반응성 단백질 생성 정도를 측정하였다.

(6) 통계처리

배양액의 chemokine농도와 mRNA 발현의 정도는 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 paired Wilcoxon rank sum test를 시행하였고 mul-

iple comparison에 대한 보정은 시행하지 않았다. 각 군당 GAPDH발현 정도의 비교는 Kruskal-Wallis 검사로 시행하였다.

결 과

1. PBMC의 배양상층액으로 자극한 A549세포에서의 chemokine mRNA의 발현

A549세포를 PBMC 배양상층액을 포함한 CM으로 자극하였을 때 GAPDH mRNA 발현 정도는 각 군간 유의한 차이가 없었다(data not shown). IL-8/GAPDH mRNA 발현 비율로 나타낸 IL-8 mRNA 발현 정도가 LPS-CM군은 0.460±0.218로 Control-CM의 0.004±0.005보다 의미 있게 상승하였으나(p<0.05) PBMC의 PFC노출이 IL-8 mRNA 발현을 감소시키지는 않았다(Fig. 1&2). RANTES도 IL-8과 유사한 양상을 보여 LPS-CM군에서 RANTES/GAPDH mRNA 발현 비율이 LPS-CM군에서 1.346±1.008로 Control-CM군의 0.003±0.004보다 의미 있게 증가하였으나 PBMC의 PFC노출에 따른 유의한 차이는 발견되지 않았다(Fig. 1 &2).

2. PBMC의 배양상층액으로 자극한 A549세포에서의 chemokine 면역 반응성 단백질 생성

PBMC의 배양상층액이 포함된 CM로 A549세포를 자극하였을 때 LPS-CM군에서 IL-8 면역 반응성 단백질은 29.58±37.72 pg/ml로 Control-CM군의 1.02±0.47 pg/ml보다 유의하게 상승하였으나(p<0.05) PFC의 노출여부가 IL-8 단백질생성을 유의하게 감소시킬 수 없었다(Fig. 3). RANTES도 유사한 소견을 보여 LPS-CM군에서 3.21±0.84 pg/ml로 Control-CM군의 0.18±0.13 pg/ml보다 유의하게 상승하였으나(p<0.05) PFC에 노출이 RANTES를 유의하게 감소시키지 못하였다(Fig. 3).

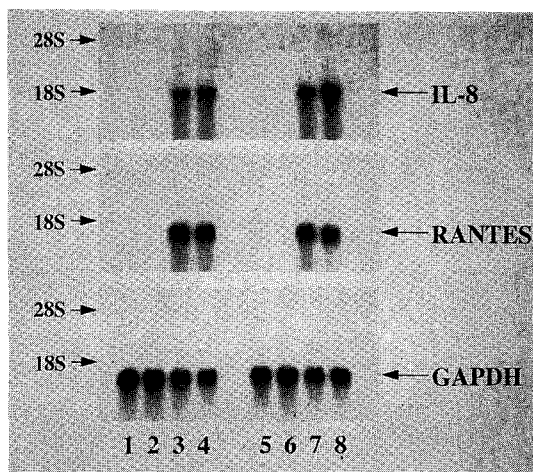


Fig. 1. Northern analysis of A549 cells stimulated with conditioned media(CM) containing culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC's). LPS:lipopoly-saccharde, PFC: perfluorocarbon. Lane 1, 5 Control-CM group, 2, 6 LPS-CM group, 3, 7 PFC-CM group, 4,8 LPS-PFC-CM group(See text for details of group designation). Chemokine mRNA expression in LPS-CM group increased, but exposure to PFC during LPS stimulation(LPS-PFC-CM group) had no significant effect.

3. A549 세포에서의 cytokine 자극에 의한 chemokine mRNA의 발현

각 군에서 GAPDH mRNA 발현의 유의한 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$). TNF- α 와 IL-1 β 모두 A549 세포에서 IL-8과 RANTES 유전자 발현의 증가를 가져왔으며($p < 0.05$, Fig. 4 & 5) 이 둘을 동시에 사용하였을 때 각각으로 자극하였을 때보다 유의한 유전자 발현의 증가가 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 4 & 5). 그러나 PFC 노출에 따른 chemokine 유전자 발현의 감소는 관찰되지 않았다.

4. A549 세포에서의 cytokine 자극에 의한 IL-8과 RANTES 면역반응성 단백질생성

mRNA 발현과 마찬가지로 TNF- α 와 IL-1 β 모두

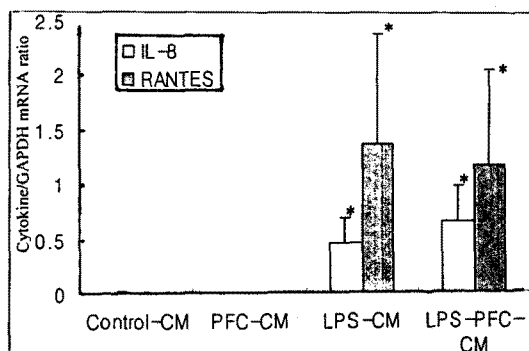


Fig. 2. Cytokine/GAPDH mRNA ratio for A549 cells stimulated with conditioned media(CM) containing culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells(PBMC's). LPS : lipopolysaccharde, PFC : perfluorocarbon(See text for details of group designation). As shown in Fig. 1, a significant increase in chemokine mRNA expression was observed in the LPS-CM group, but exposure to PFC during LPS stimulation(LPS-PFC-CM group) had no significant effect(* $p < 0.05$ vs. Control-CM group)($n = 6$).

A549 세포의 배양상층액에서 IL-8과 RANTES의 면역반응성 단백질의 생성을 증가시켰으며($p < 0.05$, Fig. 6), 동시에 자극하였을 때 각각으로 자극하였을 때보다 chemokine 단백질 생성의 유의한 증가가 관찰되었다($p < 0.05$, Fig. 6). 그러나 PFC 노출에 의한 면역반응성 단백질 생성의 감소는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구의 주요한 결과로는 1) 기도상피세포가 여러 자극에 의해 chemokine을 발현하여 염증반응에 능동적으로 참여한다는 것을 다시 한번 확인하였던 것과, 2) PFC는 기도상피세포의 chemokine 발현을 감소시킬 수 없었다는 것이다.

기도상피세포는 다양한 경로로 염증성 반응에 참여할 수 있다는 것이 알려져 있다. 기도상피세포는 담배연기나 LPS 등의 자극에 의해 여러 eicosanoid를 분비하며²⁶ 호중구를 화학주성 및 활성화 시키는 C-X-C

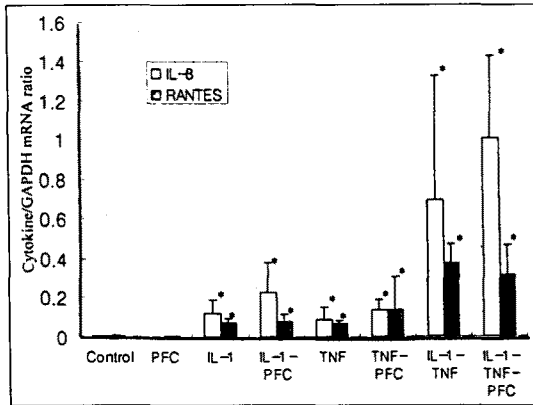


Fig. 3. Immunoreactive chemokine protein concentration in culture supernatants of A549 cells incubated with conditioned media(CM) containing culture supernatant of peripheral blood mononuclear cells(PBMC's). LPS:lipopolysaccharde, PFC : perfluorocarbon(See text for details of group designation). Significant increase in chemokine immunoreactive protein production was observed in the LPS-CM group, but exposure to PFC during LPS stimulation(LPS-PFC-CM group) had no significant effect(* $p < 0.05$ vs. Control-CM group)($n = 6$).

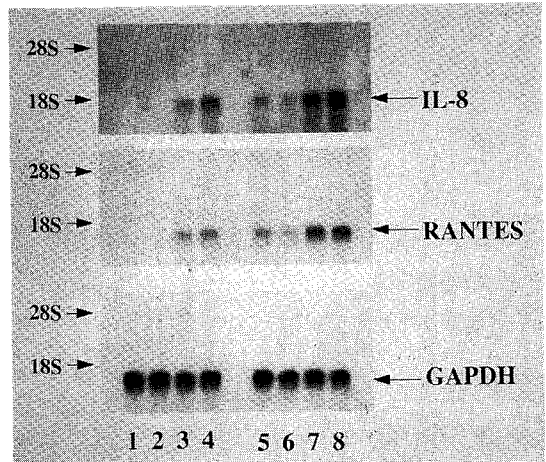


Fig. 4. Northern analysis of A549 cells stimulated with interleukin-1(IL-1, 10 ng/ml) and/or tumor necrosis factor-(TNF, 10 ng/ml) with or without exposure to perfluorocarbon(PFC). Lane 1 Control, Lane 2 PFC, Lane 3 IL-1, Lane 4 IL-1-PFC, Lane 5 TNF, Lane 6 TNF-PFC, Lane 7 IL-1-TNF, and Lane 8 IL-1-TNF-PFC group(See text for details of group designation). Increase in chemokine mRNA expression by cytokines was observed in A549 cells but significant difference) in the chemokine mRNA expression after exposure to PFC was not observed.

chemokine인 IL-8²⁰과 C-C chemokine인 RANTES를 분비할 수 있다¹⁸. 또한 기도상피세포에서 여러 자극에 의해 부착물질(adhesion molecule)²⁷이나 구조적적합항원의 발현이 증가되는 점²⁸, 기도상피세포의 분비물에 의해 염증성 세포들의 apoptosis가 늦춰진다는 점들도 기도상피세포가 염증반응에 능동적 역할을 한다는 것을 시사한다. 본 실험에서는 PBMC의 CM이나 cytokine으로 자극하였을 때 기도상피세포에서 chemokine의 분비가 증가된다는 것을 관찰할 수 있었다.

최근 액체환기의 한 기전으로 PFC자체의 항염증반응이 대두되어 관심을 끌고 있다. 액체환기를 시행한 동물들의 폐의 조직검사 소견은 가스환기만 시행하였던 동물들에 비해 폐손상 정도가 적고 특히 염증반응이 감소되어 있으면서^{30,31} 여러 동물모델에서 호중구의 침윤 감소가 보고되고 있으며³²⁻³⁵ 반응성 산소기에

의한 조직손상을 줄일 수 있다는 보고도 있다³⁶. 또한 부분액체환기를 시행한 비갈견의 기관지폐포세척액에서는 총 세포수의 감소와 더불어 호중구의 분율이 감소하며³² 부분액체환기를 시행한 사람들의 기관지폐포세척액에서 여러 염증성 사이토카인이 감소한다³⁷.

이런 액체환기에 의한 염증반응 감소의 기전으로는 여러 가지 가능성이 있다. 우선 액체환기의 “세척효과(lavage effect)”를 들 수 있다. PFC는 물보다 비중이 높기 때문에 폐포가 PFC로 채워짐에 따라 염증성 삼출액이 폐포에서 근위부의 기도로 떠오르게 되는데 이때 폐손상의 주 원인이 되는 여러 염증성 세포들과 매개물질들이 삼출액과 같이 제거되기 때문에, 폐손상이 실제로 진행되고 있는 폐포에서의 염증반응이 증강되는 것을 막을 수 있어 염증반응의 감소를 기대할 수 있을 것이다. 염증반응 감소의 또 하나의 기

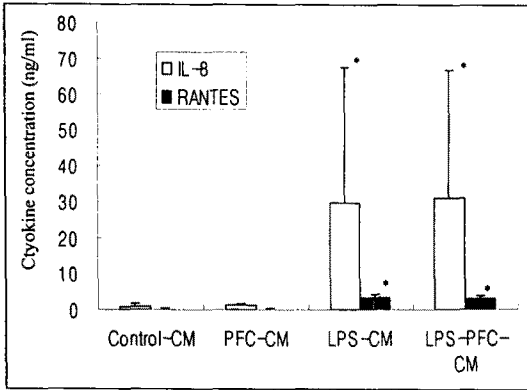


Fig. 5. Cytokine/GAPDH mRNA ratio for A549 cells stimulated with interleukin-1(IL-1, 10 ng/ml) and/or tumor necrosis factor-(TNF, 10 ng/ml) with or without exposure to perfluorocarbon (PFC)(See text for details of group designation). As shown in Fig. 4, significant increase in chemokine mRNA expression was observed after stimulation by cytokines, but exposure to PFC had no significant effect(* $p < 0.05$ vs. Control group) (n=5).

전은 기계환기기-유발 폐손상의 감소를 통한 염증반응 감소이다. 기계환기는 폐포의 과팽창과 허탈된 폐포의 반복적인 개방과 폐쇄에 의해 염증과 ARDS와 유사한 폐손상을 유발할 수 있다³⁹. 액체환기시 PFC는 표면장력을 낮추어 호흡기계의 유순도를 증가시켜 과팽창을 막을 수 있고 “액체 PEEP” 효과를 통하여 허탈된 폐포를 recruit시켜 기계환기기-유발 폐손상을 막아주는 역할을 할 수 있을 것이다^{12, 40}.

마지막으로 가능성 있는 기전은 본 연구의 초점이 되었던 PFC자체의 염증성 세포들의 기능억제를 통한 항 염증작용이다. PFC는 폐포 대식세포에서 반응성 산소기⁴¹, 반응성 질소 대사중간산물(reactive nitrogen intermediates)⁴², 염증성 cytokine²⁴ 등의 생성을 감소시킨다고 보고되어 있다. 또한 호중구의 화학주화와 활성화를 억제하고⁴³, 부착분자의 표현을 억제하여 내피세포에 부착되는 것을 억제할 수 있다는 보고도 있다⁴⁴.

그러나 본 연구에서는 PFC에 의한 기도 상피세포

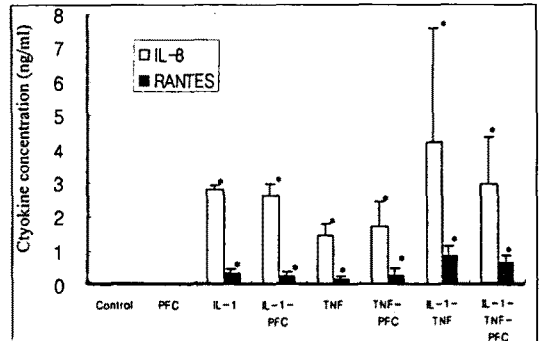


Fig. 6. Immunoreactive chemokine protein concentration in culture supernatants of A549 cells stimulated with interleukin-1(IL-1, 10 ng/ml) and/or tumor necrosis factor-(TNF, 10 ng/ml) with or without exposure to perfluorocarbon(PFC)(See text for details of group designation). Significant increase in chemokine immunoreactive proteins was observed after cytokine stimulation, but exposure of PFC had no significant effect(* $p < 0.05$ vs. Control group)(n=5).

의 chemokine 발현 억제는 관찰할 수 없어 액체환기시 보였던 염증반응의 감소가 이 기전을 통해 이루어질 가능성은 떨어진다고 생각된다. 본 연구에서는 LPS으로 자극한 PBMC의 CM으로 자극하는 모델을 사용하였는데 이는 LPS가 A549 세포에서 chemokine 발현을 직접 증가시킬 수 없으나 LPS의 자극에 의해 단핵구에서 생성되는 TNF- α 와 IL-1 β 에 의해 A549세포가 활성화 되어 chemokine의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있기 때문이다²². 본 연구의 결과는 비록 배양상층액에서 TNF- α 나 IL-1 β 의 농도를 측정하지 않았지만 PFC가 PBMC에서 이들 cytokine들의 발현을 억제하지 못하였음을 시사하고 있다. 이는 Thomassen등이 폐포대식세포에서 관찰하였던 PFC의 LPS에 의한 TNF- α 와 IL-1 β 분비 억제 효과와 상반되는 결과이다²⁴. 이런 차이점은 우선 사용되었던 perfluorocarbon의 차이에 의해 나타났을 가능성이 있다. Thomassen 등은 PFC로 perflubron을 사용하는데 비해서 본 실험에서는 perfluorodecalin을 사용하였는데 두 물질의 분자적 구조

의 차이에 의해 이런 상반된 결과가 나타났을 가능성이 있다. 또 하나의 가능성은 PFC를 노출하는 방법의 차이이다. Thomassen 등은 PFC에 대한 노출을 세포를 흔들면서 배양함으로써 시행하였는데 본 연구에서는 PFC를 세포의 한 쪽 면에서만 노출시켰다. 실제로 액체환기를 시행할 때에는 폐포 내에만 PFC가 존재하므로 Thomassen 등이 시행한 세포를 흔들어 배양하는 방법보다는 본 연구의 방법이 좀 더 *in vivo*의 환경을 더 잘 반영할 수 있다고 생각한다. 아직까지 PFC의 염증성 반응억제 보고들에도 그 기전에 대한 설명이 충분하지 못한 실정인데 일부 보고에서는 PFC가 물리적 장벽을 형성하여 proinflammatory 자극으로부터 염증성 세포를 보호하기 때문에 염증반응이 억제된다는 보고가 있다⁴⁶. 따라서 Thomassen 등이 보고한 cytokine 분비 억제는 PFC의 세포기능에 영향을 미친 것이 아니라 흔들어서 배양하는 도중 PFC가 물리적 장벽을 형성하여 생겼을 가능성을 완전히 배제할 수 없을 것으로 생각된다. 또 하나는 폐포대식세포와 단핵세포층의 차이이다. 단핵세포층에는 단핵구 뿐만 아니라 림프구가 포함 되어 있으며, 단핵구 자체도 폐포대식세포와 여러 cytokine 유전자 발현 조절이 틀리다는 것이 알려져 있다^{46,47}. 따라서 이런 구성 세포의 차이에 따라 두 연구의 결과가 상반되게 나왔을 가능성이 있다.

본 연구에서는 IL-8과 RANTES의 발현을 관찰하였는데 그 이유는 IL-8은 급성 염증반응을 RANTES는 만성 염증반응에 관여하는 대표적인 chemokine들이기 때문이다. 특히 IL-8은 급성 호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrom, ARDS)과 연관이 있어 기관지폐포 세척액 내 IL-8의 농도는 ARDS에후하고도 상관관계가 있는 것으로 알려져 있고⁴⁸, 소인이 있는 환자에서 ARDS로 진행되는 위험성과 관련이 있다는 보고도 있다.

결론적으로 기도 상피세포의 chemokine 발현 감소를 통한 항염증작용은 액체환기시 보이는 염증반응 감소에 큰 기여를 하지 않을 것으로 생각되며 추후 액체환기시 관찰되는 염증반응의 감소의 기전에 대한 연구

가 더 필요할 것으로 사료된다.

요 약

배 경 :

액체환기가 손상된 폐에 긍정적인 영향을 주는 한 기전으로 perfluorocarbon(PFC)이 기도상피세포에서 chemokine 발현을 억제할 수 있는지를 관찰하기 위해 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

기도 상피세포로는 A549세포주를, PFC로는 perfluorodecalin을, PFC의 노출은 Transwell® 배양접시의 lower chamber를 이용하여 시행하였다. PFC가 말초혈액 단핵구층(peripheral blood mononuclear cell : PBMC)의 기능을 억제해서 A549세포의 chemokine 발현을 억제할 수 있는지를 관찰하기 위하여 PBMC를 분리하여 Transwell® 접시에서 배양하면서 lipopolysaccharide(LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극과 PFC의 노출에 따라 균을 나누었으며 24시간 후 그 배양 상층액을 포함한 conditioned media(CM)으로 24시간 동안 A549세포를 자극한 후 chemokine 발현을 측정하였다.

또한 PFC가 직접 기도 상피세포의 기능을 억제할 수 있는지를 관찰하기 위해서 A549세포를 Transwell® 접시에서 배양하면서 interleukin-1 β (IL-1 β 10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml)로 각각 혹은 동시에 24시간동안 자극하면서 PFC노출여부에 따른 IL-8과 RANTES 발현 정도를 비교하였다.

Chemokine 발현은 IL-8과 RANTES의 단백질에 대한 ELISA와 mRNA는 Northern analysis를 통하여 분석하였다.

결 과 :

1. LPS로 자극한 PBMC의 배양상층액을 포함한 CM로 A549세포를 자극하였을 때 IL-8과 RANTES mRNA 발현과 면역반응성 단백질 생성이 의미 있게 상승하였으나($p < 0.05$) PFC노출여부에 따른 유의한 차이는 관찰할 수 없었다. 2. TNF- α 와 IL-1 β

모두 A549세포에서 IL-8과 RANTES mRNA자 발현과 면역반응성 단백 생성의 증가를 가져왔으나($p < 0.05$) PFC노출에 따른 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

결 론 :

기도 상피세포의 chemokine발현 감소를 통한 항염증 작용은 액체환기시 보이는 염증반응 감소에 큰 기여를 하지 않을 것으로 생각되며 추후 액체환기시 관찰되는 염증반응의 감소의 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Degraeuwe PL, Vos GD, Blanco CE. Perfluorochemical liquid ventilation : from the animal laboratory to the intensive care unit. *Int J Artif Organs* 1995;18:674-83
2. Modell JH, Newby EJ, Ruiz BC. Long-term survival of dogs after breathing oxygenated fluorocarbon liquid. *Fed Proc* 1970;29:1731-6
3. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancis M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med* 1991;19:712-22
4. Hernan LJ, Fuhrman BP, Kaiser RE, Penfil S, Foley C, Papo MC, et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange in normal and acid-injured large sheep. *Crit Care Med* 1996;24:475-81
5. Curtis SE, Peek JT, Kelly DR. Partial liquid breathing with perflubron improves arterial oxygenation in acute canine lung injury. *J Appl Physiol* 1993;75:2696-702
6. Hirschl RB, Parent A, Tooley R, McCracken M, Johnson K, Shaffer TH, et al. Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of

- respiratory failure. *Ann Surg* 1995;221:79-88
7. Tutuncu AS, Faithfull NS, Lachmann B. Intratracheal perfluorocarbon administration combined with mechanical ventilation in experimental respiratory distress syndrome: dose-dependent improvement of gas exchange. *Crit Care Med* 1993;21:962-9
8. Leach CL, Greenspan JS, Rubenstein SD, Shaffer TH, Wolfson MR, Jackson JC, et al. Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. The LiquiVent Study Group. *N Engl J Med* 1996;335:761-7
9. Hirschl RB, Pranikoff T, Gauger P, Schreiner RJ, Dechert R, Bartlett RH. Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates. *Lancet* 1995;346:1201-2
10. Hirschl RB, Pranikoff T, Wise C, Overbeck MC, Gauger P, Schreiner RJ, et al. Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome. *Jama* 1996;275:383-9
11. Tooley R, Hirschl RB, Parent A, Bartlett RH. Total liquid ventilation with perfluorocarbons increases pulmonary end-expiratory volume and compliance in the setting of lung atelectasis. *Crit Care Med* 1996;24:268-73
12. Gauger PG, Overbeck MC, Chambers SD, Cailipan CI, Hirschl RB. Partial liquid ventilation improves gas exchange and increases EELV in acute lung injury. *J Appl Physiol* 1998;84:1566-72
13. Doctor A, Ibla JC, Grenier BM, Zurakowski D, Ferretti ML, Thompson JE, et al. Pulmonary blood flow distribution during partial liq-

- uid ventilation. *J Appl Physiol* 1998;84:1540-50
14. Gauger PG, Overbeck MC, Koeppe RA, Shulkin BL, Hrycko JN, Weber ED, et al. Distribution of pulmonary blood flow and total lung water during partial liquid ventilation in acute lung injury. *Surgery* 1997;122:313-23
 15. Churchill L, Chilton FH, Resau JH, Bascom R, Hubbard WC, Proud D. Cyclooxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:449-59
 16. Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JPd, Toews GB, et al. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 1990;86:1945-53
 17. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1001-9
 18. Kwon OJ, Jose PJ, Robbins RA, Schall TJ, Williams TJ, Barnes PJ. Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:488-96
 19. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Baraniuk JN, Adcock IM, Chung KF, et al. Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells. *Immunology* 1994;81:389-94
 20. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Adcock IM, Mak JC, Robbins RR, et al. Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1994;267:L398-405
 21. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976;17:62-70
 22. 권오정, 김호중, 김정희, 김호철, 박정웅, 박상준, 정만표, 최동철, 이종헌: 결핵균 동성 여부에 따른 기도 상피세포의 Chemokine 발현에 관한 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 1997;44:729-41
 23. Wolfson MR, Greenspan JS, Shaffer TH. Liquid-assisted ventilation: an alternative respiratory modality. *Pediatr Pulmonol* 1998;26:42-63
 24. Thomassen MJ, Buhrow BS, Wiedemann HP: Perflubron decreases inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Crit Care Med* 1997;25:2045-47
 25. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9
 26. Koyama S, Rennard SI, Leikauf GD, Shoji S, Von Essen S, Claassen L, et al. Endotoxin stimulates bronchial epithelial cells to release chemotactic factors for neutrophils. A potential mechanism for neutrophil recruitment, cytotoxicity, and inhibition of proliferation in bronchial inflammation. *J Immunol* 1991;147:4293-301
 27. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J Immunol* 1988;141:1665-9
 28. Rossi GA, Sacco O, Balbi B, Oddera S, Mattioni

- T, Corte G, et al. Human ciliated bronchial epithelial cells : expression of the HLA-DR antigens and of the HLA-DR alpha gene, modulation of the HLA-DR antigens by gamma-interferon and antigen-presenting function in the mixed leukocyte reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3: 431-9
29. Xing Z, Ohtoshi T, Ralph P, Gauldie J, Jordana M : Human upper airway structural cell-derived cytokines support human peripheral blood monocyte survival : a potential mechanism for monocyte/macrophage accumulation in the tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:212-8
30. Quintel M, Heine M, Hirschl RB, Tillmanns R, Wessendorf V : Effects of partial liquid ventilation on lung injury in a model of acute respiratory failure : a histologic and morphometric analysis. *Crit Care Med* 1998;26:833-43
31. Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, Bing DR, Meyers PA, Connett JE, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques : gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997;25:1888-97
32. Suh GY, Chung MP, Park SJ, Park JW, Kim HC, Kim H, et al. Partial liquid ventilation with perfluorocarbon improves gas exchange and decreases inflammatory response in oleic acid-induced lung injury in beagles. *J Kor Med Sci* 1999;14:613-22
33. Younger JG, Taqi AS, Till GO, Hirschl RB. Partial liquid ventilation protects lung during resuscitation from shock. *J Appl Physiol* 1997; 83:1666-70
34. Colton DM, Till GO, Johnson KJ, Dean SB, Bartlett RH, Hirschl RB. Neutrophil accumulation is reduced during partial liquid ventilation. *Crit Care Med* 1998;26:1716-24
35. Rotta AT, Steinhorn DM : Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. *Crit Care Med* 1998;26:1707-15
36. Steinhorn DM, Papo MC, Rotta AT, Aljada A, Fuhrman BP, Dandona P. Liquid ventilation attenuates pulmonary oxidative damage. *J Crit Care* 1999;14:20-8
37. Croce MA, Fabian TC, Patton JH, Jr., Melton SM, Moore M, Trentham LL. Partial liquid ventilation decreases the inflammatory response in the alveolar environment of trauma patients. *J Trauma* 1998;45:273-80
38. Calderwood HW, Modell JH, Ruiz BC, Brogdon JE, Hood CI. Pulmonary lavage with liquid fluorocarbon in a model of pulmonary edema. *Anesthesiology* 1973;38:141-4
39. Dreyfuss D, Saumon G : Ventilator-induced lung injury : lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:294-323
40. Kelley KP : Partial liquid ventilation—turning back a PAGE on evolution. *Br J Anesth* 1997; 78:1-2
41. Smith TM, Steinhorn DM, Thusu K, Fuhrman BP, Dandona P. A liquid perfluorochemical decreases the in vitro production of reactive oxygen species by alveolar macrophages. *Crit Care Med* 1995;23:1533-9
42. Kornbrust ES, Neslund G, Flaim S. Perflubron (Liquivent) may attenuate nitric oxide-derived reactive intermediates in the setting of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155: A468
43. Rossman JE, Caty MG, Rich GA, Karaman-

- oukian HL, Azizkhan RG. Neutrophil activation and chemotaxis after in vitro treatment with perfluorocarbon. *J Pediatr Surg* 1996;31:1147-51
44. Kornbrust ES, Neslund G, Woods C, Flaim S. Perflubron(Liquivent) attenuates CAM expression and rate of neutrophil adhesion to activated endothelial cells in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:28A
45. Varani J, Hirschl RB, Dame M, Johnson K. Perfluorocarbon protects lung epithelial cells from neutrophil-mediated injury in an in vitro model of liquid ventilation therapy. *Shock* 1996; 6:339-44
46. Strieter RM, Remick DG, Lynch JPd, Genord M, Raiford C, Spengler R, et al. Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes : a cellular and molecular analysis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:57-63
47. 유철규, 서지영, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철. 단핵식세포에서 내독소에 의한 인터루킨-8 유전자 발현 조절기전에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1994;41:462-74
48. Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, Griffith D, Mauder RJ, Martin TR, et al. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:427-32
49. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993; 341:643-7