

호중구의 Respiratory Burst에 미치는 PLA2 및 PAF의 영향 : *In vitro*에서의 호중구의 산소기 생성 및 Apoptosis에 관한 연구

대구 효성 가톨릭대학교 의과대학 생리학교실, 임상병리학교실*

이영만, 김상경*, 박윤엽

= Abstract =

Effect of the Inhibition of PLA2 and PAF on the Neutrophilic Respiratory Burst and Apoptosis

Young Man Lee, M.D., Sang-gyung Kim*, M.D., Yoon-yub Park, M.D.

Department of Physiology and Clinical Pathology, School of Medicine
Taegu Catholic University, Taegu, Korea*

Background : Since the exact pathogenesis of sepsis-induced ARDS has not been elucidated, the mechanisms of enhanced neutrophilic respiratory burst were probed in endotoxin primed neutrophils associated with the roles of phospholipase A2 (PLA2), platelet activating factor (PAF) and apoptosis.

Methods : In isolated fresh human neutrophils, effects of the inhibition of PLA2 and PAF on the apoptosis were examined by the method of Annexin-FITC/dual PI flow cytometry. The roles of PLA2 and PAF on the neutrophilic respiratory burst were also examined by measuring oxidant generation in cytochrome-c reduction assay. Activities of the PLA2 and lysoPAF acetyltransferase (lysoPAF AT) of the neutrophils were determined to understand the effect of endotoxin on these enzymatic activities which may be related to the neutrophilic respiratory burst and apoptosis. In addition, the role roles of PLA2 and PAF in neutrophilic adhesion to bovine endothelial cells were examined *in vitro* by neutrophil adhesion assay. To investigate the effect of oxidants on pulmonary surfactant, cytochemical ultrastructural microscopy was performed. To inhibit

*본 연구는 1998년도 학술진흥재단(과학기술기초중점 연구; 1998-198E-025)의 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :

Young Man Lee, M.D.

Department of Physiology, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung
3056-6 Taemyung 4 Dong Namgu Taegu, Korea 705-034

Phone : 053-650-4472 Fax : 053-621-4106 E-mail : leeym@cuth.cataegu.ac.kr

PLA2 and PAF, non-specific PLA2 inhibitor mepacrine (100 nM) and WEB 2086 (100 nM) or ketotifen fumarate (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used respectively in all *in vitro* experimental sets. WEB 2086 is PAF receptor antagonist, and ketotifen fumarate is a lyso PAF AT inhibitor.

Results : The mepacrine treatment, provided after the endotoxin (ETX) treatment, resulted in increased apoptosis of neutrophils ($p < 0.001$) while treatments of WEB 2086 and ketotifen did not. The inhibition of PLA2 and PAF decreased ($p < 0.001$) production of oxidants from PMA-stimulated neutrophils. While endotoxin increased the PLA2 activity of neutrophils ($p < 0.01$), mepacrine suppressed ($p < 0.001$) the activity, provided after treatment of ETX. The lyso PAF acyltransferase activity (lyso PAF AT) increased ($p < 0.01$) after treatment of ETX. In contrast, mepacrine, WEB 2086 and ketotifen showed a tendency of decreasing the activity after treatment of ETX. The treatment of ETX increased ($p < 0.001$) neutrophil adhesion to endothelial cells, which was reversed by inhibition of PLA2 and PAF ($p < 0.001$). The binding of oxidants to pulmonary surfactant was identified histologically.

Conclusions : The enhanced neutrophilic respiratory burst by ETX plays a pivotal role in the pathogenesis of ARDS in terms of oxidative oxidative stress. Increased production of oxidants from neutrophils is mediated by the activations of PLA2 and lyso PAF AT. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 887-897)

Key words : ARDS, Neutrophilic respiratory burst, Apoptosis, PLA2, PAF.

서 론

폐혈중에 의한 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)에 대한 병인론(pathogenesis)이 SIRS(systemic inflammatory response syndrome)의 발병기전과 연관하여 이뤄지고 있다. ARDS시에 관찰되는 혈관내피세포의 손상이 폐부종을 유발한다는 사실은 잘 알려져 있지만 최근에는 이와 더불어 제1형 폐포세포 및 pulmonary surfactant system의 직접적인 손상도 급성 폐부종의 발현에 관계한다고 알려져 있다¹. 이러한 조직의 직접적인 손상의 원인은 산소기 및 proinflammatory cytokine의 복합적인 작용에 의한 것으로 보인다². 이중 호중구의 역할은 인체의 방어기전으로 작용할 뿐만 아니라 폐장조직에 짧은 시간내에 침윤하여 다량의 산소기 및 단백질해효소를 유리함으로써 주위 조직의 손상을 유발한다^{3,4}. 동시에 ARDS의 실험동물 모형에서 PLA2나 PAF의 작용억제가 급성 폐부종을 완화시킨다는 보고⁵⁻⁷들은 PLA2나 PAF가 호

중구의 산소기 생성을 증가시킴으로써 조직의 손상을 유발한다고 주장하고 있다. 특히 폐혈중에 의한 ARDS의 경우는 폐장내의 호중구의 침윤, 산소기 생성의 증가 및 PLA2, lysoPAF AT 활동도의 증가등이 관찰되고 있다⁸.

호중구에 의한 조직의 손상기전과 관련하여 생각할 때 ARDS시 조직에서의 이러한 변화는 당연히 호중구의 산소기의 생성과 관계가 있을 것으로 생각되지만 아직도 호중구의 기능에 영향을 미치는 요소들이 명확히 규명되지 않았다. Hybertson등⁹은 TNF는 폐장의 손상을 유발하지만 호중구의 침윤과는 관계가 없다고 하였고 또한 Koh등¹⁰도 cytokine induced neutrophil chemoattractant(CINC)같은 염증성 cytokine의 역할은 분명히 ARDS의 발병에 관여하지만 호중구의 침윤을 유발할 뿐이며 직접적인 호중구의 respiratory burst와는 관계가 없다고 하였다.

또한 폐혈중시 병발하는 ARDS의 경우 TNF 및 각종 염증성 cytokine들이 호중구의 apoptosis에 영향을 미치며 이러한 호중구의 apoptosis의 지연 또는

단축은 산소기의 형성 및 단백분해효소의 유리에 관여하여 조직의 손상에 관여한다고 한다¹¹.

이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 호중구에서의 산소기의 형성, apoptosis 및 혈관내피세포로의 유착(adhesion)에 미치는 PLA2 및 PAF의 역할, 산소기가 surfactant system에 미치는 영향에 대해 알아봄으로써 폐혈증에 의한 ARDS시의 병인론의 일부를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

사람의 혈액에서 분리된 호중구를 이용하여 내독소(*E.coli* endotoxin type 0127 ; B8, 20 µg/ml, Sigma, St. Louise, MO, USA) 및 phorbol myristate acetate(PMA 2.5 µg/ml, Sigma, St. Louise, MO, USA)를 가하여 반응시키고 이때 PLA2의 억제제인 mepacrine(100 nM, Sigma, St. Louise, MO, USA)¹², PAF의 remodelling에 관여하는 효소인 lysoPAF acetyltransferase(lyso PAF AT)의 억제제인 ketotifen fumarate(10 ng/ml, Sandoz Pharmaceutical CO, Swizland)¹³ 및 PAF receptor antagonist인 WEB 2086(100 nM, Boehringer-Ingelheim, Germany)¹⁴을 가하여 이때 호중구의 apoptosis, 산소기의 형성, PLA2, lysoPAF AT의 활성도를 측정하였다. 동시에 체중 300g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐에 100 µg의 내독소를 기도내 분무한 뒤 5시간 경과 후 폐장내 산소기가 생성되는 것을 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다.

호중구의 분리 :

호중구의 분리는 Haslett 등의 방법¹⁵에 따라 시행하였다. 즉 2개의 50 ml 주사기를 이용, 각각의 주사기에 건강한 사람의 혈액 30 ml를 뽑고 여기에 1.0 ml의 heparin(500 IU) 및 15 ml의 Hetastarch(Sigma, St. Louise, MO, USA)를 혼합한 뒤에 40분간 상온에서 세워둠으로써 백혈구가 함유된 혈장층을 분리하고 이 혈장을 74% 및 55% percoll gradient를 이

용하여 호중구만을 분리하였다. 그 뒤 분리된 호중구를 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 2번 세척한 뒤 호중구의 농도가 10⁷/ml가 되게 한 뒤 실험에 사용하였다.

호중구 apoptosis의 확인 :

내독소, PMA, mepacrine, ketotifen 및 WEB 2086이 호중구의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Annexin-FITC/propidium iodide 이중형광염색법을 이용한 유세포 분석을 시행하였다¹⁶. 즉 10⁶/ml의 호중구에 내독소(20 µg/ml), PMA(2.5 µg/ml), mepacrine(100 nM), ketotifen(10 µg/ml), WEB 2086(100 nM)을 첨가후 37°C의 항온수조에서 15분간 반응시켰다. 그 뒤 차가운 PBS 용액으로 2회 세척한 뒤 100 µl의 부유액에 Annexin-FITC 및 PI apoptosis kit(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 Annexin-FITC, PI용액을 각각 10 µl씩 첨가하여 상온의 암실에서 15분간 염색하였다. 이후 각 시료에 400 µl의 완충용액을 첨가한 뒤 유세포 분석기(Elite ESP, Miami, Florida, USA)를 이용하여 분석하였다. 유세포 분석은 dual color parameter protocol을 이용하였다. Dual color parameter histogram 상에는 annexin-FITC 만 양성인 세포를 apoptosis세포로 구하여 그 분획을 산정하였다.

Cytochrome-c reduction assay를 이용한 산소기 형성의 검사 :

분리된 호중구를 이용하여 내독소, PMA, mepacrine, ketotifen WEB 2086에 의한 산소기 형성을 cytochrome-c reduction assay를 이용하여 측정하였다. Cytochrome-c reduction assay는 Botha 등의 방법¹⁷에 따라 건강한 사람의 혈액에서 분리된 호중구(10⁶/ml)를 이용하여 PMA(2.5 µg/ml), 내독소(10 µg/ml)로 자극한 뒤 mepacrine(100 nM), ketotifen(10 µg/ml), WEB 2086(100 nM)을 각 시료에 가하여 이때의 산소기의 형성을 비교하였다.

호중구에서의 PLA2 활성도의 검사:

내독소가 호중구의 PLA2의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10^6 개의 호중구에 $10 \mu\text{g}$ 의 내독소를 가하여 15분간 37°C 의 항온수조에서 반응시켰다. 그 뒤 $20,000 \text{ rpm}$ 에서 3분간 원심분리하여 호중구를 분리하고 여기에 0.1 ml 의 0.2 mM DTT가 함유된 0.25 M sucrose 용액에 부유시킨 뒤 4°C 에서 10초간 sonication하여 호중구의 lysate를 분리하였다¹⁸. 이 lysate를 이용하여 Katsumata 등의 방법¹⁹에 따라 PLA2의 활성도를 측정하였다. 이때 PLA2의 기질로는 Palmitoyl-2(9,10(N)- ^3H)palmitoyl)-phosphatidylcholine (^3H -DPPC, Dupont NEN, Boston MT, USA)를 사용하였다. 반응은 호중구의 lysate와 $2 \mu\text{Ci}$ 의 ^3H -DPPC와 혼합후 37°C 의 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 $200 \mu\text{l}$ 의 20 mM EDTA로 반응을 중지시키고 acidic hexane을 이용하여 유리지방산을 분리한 뒤 beta scintillation spectroscopy를 시행하였다.

호중구에서의 lyso PAF acetyltransferase(lyso-PAF AT)의 측정:

내독소에 의한 호중구에서의 PAF의 생성을 알아보기 위하여 분리된 호중구($10^6/\text{ml}$)에서의 lysoPAF AT의 활성도를 측정하였다²⁰. 10^6 개의 호중구에 $20 \mu\text{g}$ 의 내독소와 혼합하고, 이때 mepacrine(100 nM), ketotifen fumarate($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), WEB 2086 (100 nM)을 각각 첨가하여 그 효과를 확인하였다. Ketotifen은 lysoPAF AT의 선택적인 억제제로서 PAF의 생성을 억제시킬 목적으로 사용하였다. 분리된 호중구를 내독소로 자극한 뒤 mepacrine, ketotifen, WEB 2086과 각각 혼합한 뒤 37°C 의 항온수조에서 15분간 반응시켰다. 그 뒤 $20,000 \text{ rpm}$ 에서 3분간 원심분리하여 호중구를 분리하고 분리된 호중구에 0.1 ml 의 0.1 mM 의 DTT가 함유된 0.25 M sucrose 용액과 혼합한 뒤 4°C 에서 10초간 sonication하여 호중구의 lysate를 얻었다. 이 lysate에 ^3H -acetyl co A($1 \mu\text{Ci}$)를 혼합한 뒤 37°C

의 항온수조에서 15분간 반응 시킨 뒤 Bligh와 Dyer법²¹으로 지질층을 분리하고 이때 10^6 개의 호중구에 의해 1분간 생성된 PAF의 양을 lysoPAF AT의 활성도로 표시하였다.

호중구의 혈관내피세포로의 유착(adhesion) 검사:

내독소에 의해 자극받은 호중구의 혈관내피세포로의 유착(adhesion)에 미치는 mepacrine, ketotifen, WEB2086의 효과를 알아보기 위하여 호중구 유착검사(neutrophil adhesion assay)를 시행하였다²². 배양된 소의 혈관내피세포에 ^51Cr ($2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$)을 함께시킨 뒤 내독소($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), mepacrine (100 nM), ketotifen($10 \mu\text{g}/\text{ml}$), WEB 2086 (100 nM)과 호중구(10^6 cells)를 배지에 첨가하여 37°C 항온에서 4시간 반응시켰다. 그 뒤 배양액을 수집하여 각 실험군에서의 방사능 활동도를 측정하였다. 즉 호중구의 유착에 의해 손상된 혈관내피세포에서 유리된 ^51Cr 의 방사능을 측정하여 호중구의 혈관내피세포 유착의 정도를 측정하였다.

미세조직학적 검사:

체중 300g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐 10마리의 기도 내로 생리적 식염수에 용해된 $100 \mu\text{g}$ 의 내독소를 분무주입(insufflation) 한 뒤 5시간 뒤에 CeCl_3 를 이용한 cytochemical ultrastructural microscopy를 시행하여 호중구에 의해 형성된 산소기 제2형 폐포세포의 lamellar body 및 폐포표면의 surfactant와 결합한 것을 관찰하였다. CeCl_3 를 이용한 조직내의 산소기의 확인은 CeCl_3 가 조직에서 생성된 과산화수소와 반응하여 생성되는 cerrous perhydroxide가 전자밀집과립(electron dense deposit)을 형성하는 것을 관찰하였다. CeCl_3 cytochemical ultrastructural microscopy를 시행하기 위하여서는 조직을 수집 후 CeCl_3 가 함유된 배지에 1시간 반응시킨 후 일반적인 전자현미경 제작법에 따라 block을 제작하였다. 조직내 cerrous perhydroxide 과립을 관찰하기 위하여 대조염색(counter stain)은 시행하

지 않았다.

통계학적 처리 :

모든 성적은 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 각 군간의 유의성의 검정은 ANOVA test 후 Student-Newman-Keuls test를 이용하여 p value가 0.05이하인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

분리된 호중구에서 내독소, 내독소 자극 후 PLA나 PAF를 억제 한 뒤 나타난 apoptosis 검사결과는 표 1과 같다. 대조군에 비해 내독소를 이용하여 자극한 군에서는 유의한 차이가 없었고 산소기의 효과를 보기 위하여 PMA를 이용하여 자극한 군에서도 차이가 없었다. 또한 내독소, PMA를 첨가하여 자극한 호중구에 ketotifen, WEB 2086을 첨가하여도 apoptosis의 유의한 차이는 없었다. 그러나 내독소 및 PMA로 자극한 호중구에 mepacrine을 투여한 군에서는 현저히 apoptosis가 증가 하였다(p<0.001).

표 2는 호중구에서의 산소기 형성에 미치는 mepacrine, ketotifen 및 WEB 2086의 효과를 나타내고 있다. 대조군에 비하여 PMA자극시 산소기의 형성

즉 cytochrome-c의 환원은 현저히 증가(p<0.001)하였고 이에 대하여 mepacrine은 PMA에 의한 산소기의 형성을 대조군 수준으로 감소시켰다(p<0.001). Ketotifen 및 WEB 2086 또한 산소기의 형성을 현저히(p<0.001)감소시켰으나 mepacrine의 효과와 비교시 그 강도는 낮았다.

호중구에서 내독소에 의한 PLA2의 활성도에 미치는 영향은 표 3과 같다. 대조군에 비해 내독소 처치군에서는 유의한(p<0.01) PLA2의 활동도의 증가를 보이고 있고 mepacrine은 이것을 효과적으로 억제하였다(p<0.001). 호중구에서의 PAF의 형성, 즉 lysoPAF의 remodelling에 관여하는 효소인 lyso-PAF AT에 미치는 내독소의 영향 및 내독소 투여후 PLA2 및 PAF를 억제 했을 때 나타나는 효과는 표 4와 같다. 내독소는 호중구에서의 lysoPAF AT의 활성도를 현저히 증가(p<0.01)시켰다. 그러나 PLA2의 억제제인 mepacrine, lyso PAF AT의 억제제인 ketotifen 및 PAF receptor antagonist인 WEB 2086은 ETX투여후 lyso PAF AT의 활성도를 감소시키는 경향을 보였다.

호중구의 혈관내피세포로의 유착에 미치는 효과는 표 5와 같다. 내독소는 호중구의 혈관내피세포로의 유착을 현저히 증가(p<0.001)시키고 mepacrine(p

Table 1. Percent changes in apoptosis after inhibition of PLA₂ and PAF in ETX and PMA stimulated neutrophils

	Sham (n=6)	PMA (n=6)	E (n=6)	PE (n=6)	PEM (n=6)	PEW (n=6)	PEK (n=6)
Apoptosis (%)	3.15 ± 0.754	1.50 ± 0.395	3.58 ± 1.476	2.15 ± 0.512	41.75 ± 8.421d	3.15 ± 1.944	1.18 ± 0.338

Data represent as mean ± S.E. The number of experiments are in the parentheses.

⁴p<0.001, PMA vs. PEM

PMA : phorbol myristate acetate (2.5 μg/10⁶ cells/ml)

E : *E-coli* endotoxin (10 μg/ml)

PE : PMA + endotoxin

PEM : PMA + endotoxin + mepacrine (100 nM)

PEW : PMA + endotoxin + web2086 (100 nM)

PEK : PMA + endotoxin + ketotifen fumarate (10 μg/ml)

Table 2. Changes in cytochrome-c reduction after PLA₂ and PAF inhibition in PMA stimulated human neutrophils

	Sham (n=7)	PMA (n=10)	PM (n=15)	PW (n=16)	PK (n=12)
Cytochrome-c reduction (nmole/10 ⁶ cells, cytochrome reduced)	4.60 ± 0.998	84.13 ± 4.554 ^a	3.27 ± 1.092 ^b	30.28 ± 5.006 ^c	19.71 ± 2.392 ^d

Data represent as mean ± S.E. The number of experiments are in the parentheses.

^ap < 0.001, sham vs. PMA

^bp < 0.001, PMA vs. PM

^cp < 0.001, PMA vs. PW

^dp < 0.001, PMA vs. PK

PMA : phorbol myristate acetate (2.5 µg/10⁶ cells/ml)

PM : PMA + mepacrine (100 nM)

PW : PMA + web2086 (100 nM)

PK : PMA + ketotifen fumarate (10 µg/ml)

Table 3. Effect of mepacrine on the PLA₂ activity in ETX stimulated human neutrophils

	Sham (n=7)	ETX (n=10)	ETX+Mepa (n=14)
PLA ₂ activity (mU/10 ⁶ cells)	0.23 ± 0.005	0.37 ± 0.026 ^a	0.21 ± 0.007 ^b

Data represent as mean ± S.E. The number of experiments are in the parentheses.

^ap < 0.01, sham vs. ETX

^bp < 0.001, ETX vs. ETX+mepa

ETX : *E-coli* endotoxin (10 µg/10⁶ cells/ml)

Mepa : mepacrine (100 nM)

Table 4. Effect of the inhibition of PLA₂ and PAF on the lysoPAF AT activity in ETX stimulated human neutrophils

	Sham (n=8)	ETX (n=7)	EM (n=5)	EW (n=6)	EK (n=6)
LysoPAF AT activity (PAF produced, pmol/10 ⁶ cells/min)	215.64 ± 9.828	432.09 ± 54.982 ^a	279.38 ± 29.787	343.97 ± 50.027	356.69 ± 69.216

Data represent as mean ± S.E. The number of experiments are in the parentheses.

^ap < 0.01, sham vs. ETX

ETX : *E-coli* endotoxin (20 µg/10⁶ cells/ml)

EM : ETX+mepacrine (100 nM)

EW : ETX+web2086 (100 nM)

EK : ETX+ketotifen fumarate (10 µg/ml)

Table 5. Effect of the inhibition of PLA₂ and PAF on neutrophil adhesion to bovine endothelial cells

	Sham (n=6)	ETX (n=5)	EM (n=6)	EW (n=6)	EK (n=6)
Neutrophil adhesion (%)	21.61 ± 2.302	48.38 ± 3.670 ^a	24.56 ± 5.236 ^b	23.11 ± 2.427 ^c	17.18 ± 1.476 ^d

Data represent as mean ± S.E. The number of experiments are in the parentheses.

^ap<0.001, sham vs. ETX

^bp<0.001, ETX vs. EM

^cp<0.001, ETX vs. EW

^dp<0.001, ETX vs. EK

ETX : *E-coli* endotoxin (10 µg/10⁶ cells/ml)

EM : ETX+mepacrine (100 nM)

EW : ETX+web2086 (100 nM)

EK : ETX+ketotifen fumarate (10 µg/ml)

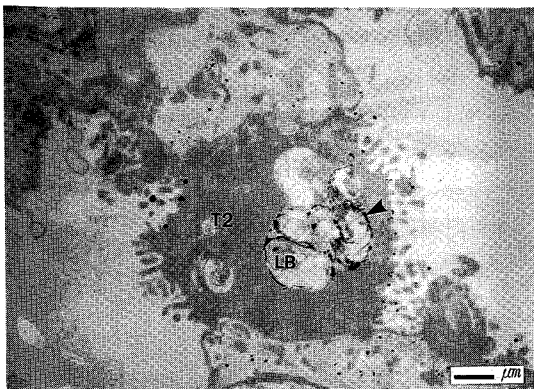


Fig. 1. Cytochemical ultrastructural findings of alveolar type II cells and oxidants generated by treatment of endotoxin. Electron dense deposits of cerrous perhydroxide bound to lamellar bodies (LB) of alveolar type II cells (T2) were identified (arrows). Hypertrophied and vacuolated lamellar bodies were also found, which signified oxidative injury of alveolar type II cells.

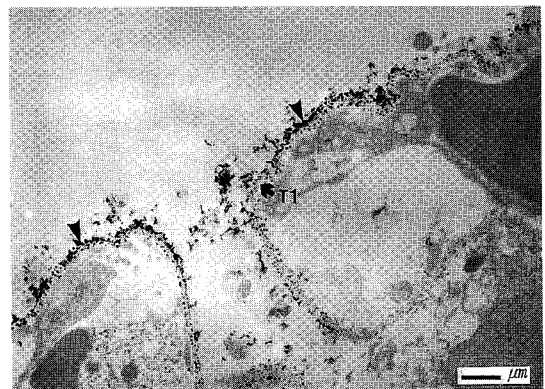


Fig. 2. Cytochemical ultrastructural finding of pulmonary surfactant in the lung after treatment of endotoxin. Electron dense deposits of cerrous perhydroxide (arrows) were bound to the pulmonary surfactant layer. The binding of oxidants to surfactant implies the peroxidation of the components of pulmonary surfactant. T1 : alveolar type I cell

<0.001), ketotifen(p<0.001), WEB 2086(p<0.001)모두 내독소에 의한 호중구의 혈관내피세포로의 유착을 감소시켰다. 형태학적으로는 제2형 폐포세포

내의 lamellar body의 비후 및 공포화(vacuolization)가 관찰되었고 특히 제2형 폐포세포내의 lamellar body와 제1형 폐포세포의 surfactant layer

에 cerrous perhydroxide의 전자밀집과립이 관찰되었다(Fig. 1&2).

고 찰

ARDS는 그 발병기전이 다양하여 아직도 그 병인론이 완전히 확립된 것은 아니지만 적어도 ARDS의 병인(etiology)이 무엇이든지 폐장내에 염증반응이 일어난다는 것은 알려져 있다. 그러나 문제는 이 염증반응에 대한 치료가 별로 효과적이지 못하다는데 있다. Corticosteroid를 비롯하여 COX 및 lipoxygenase의 억제제인 대부분의 항염증제는 그 효과가 미미하거나 불확실하여 임상적으로 그 용도가 한정되고 아직도 새로운 치료제가 요구된다²³⁻²⁵. ARDS가 조직내 산소기의 과다한 생성에 의한다는 Repine의 보고²⁶는 항산화제에 대한 많은 연구결과를 가져 왔으나 항산화제의 임상적 효과 또한 확실하지가 않다.

본 연구의 결과로 미루어 볼 때 호중구가 조직내의 어떤 원인에 의하여 apoptosis가 지연되거나 또는 호중구막의 NADPH oxidase의 활성화를 증가시키는 조건들은 호중구의 산소기생성을 증가시킴으로써 조직의 손상이 유발될 것으로 생각된다. 그 근거로는 첫째, 분리된 호중구를 이용하여 apoptosis를 검사한 결과 내독소에 의해서는 apoptosis의 증감을 관찰할 수 없었으나 흥미롭게도 mepacrine에 의해서 apoptosis가 현저히 증가하였다는 점이다. 다발성장기부 전증후군시 염증성 cytokine, 내독소, 또는 염증성 지질분자들이 호중구의 apoptosis를 지연시킴으로써 조직내 생존기간이 길어지고 조직에서의 산소기 유리도 증가하여 조직의 손상을 유발한다²⁷. 이러한 점을 감안한다면 mepacrine은 interleukin-1이나 기타 ARDS model에서 현저히 산소기를 감소시키는 효과가 있다는 점²⁸은 mepacrine에 의한 PLA2의 억제가 단순히 NADPH oxidase의 억제에만 관여하는 것이 아니라 염증성 지질분자의 생성을 감소시켜 apoptosis를 유발함으로써 산소기 생성의 감소를 가져 올지도 모른다고 생각된다. 둘째로는 PLA2 및

PAF억제에 따른 호중구에서의 산소기 생성의 감소이다. Mepacrine은 비특이적 PLA2억제제이면서 그 강도가 어느 약물보다 더 높다²⁹. Mepacrine이 보여주는 산소기 억제의 작용은 다른 보고들에서도 확인되었고^{12, 30, 31} 본 연구에서도 그 효과는 100%에 가깝다. PAF receptor의 억제나 lysoPAF AT의 억제에 의한 PAF remodelling의 감소 또한 호중구에서의 산소기 형성의 감소를 가져왔으나 mepacrine의 효과에는 미치지 못하고 있다. 최근 Dana등³²은 PLA2의 작용에 의해 생성되는 arachidonic acid가 호중구의 NADPH oxidase의 활성제 즉, 산소기 생성의 주된 원인이라고 주장하고 있으므로 PLA2의 억제가 산소기의 생성을 감소시키는 것으로 보인다. 그러나 같은 PLA2억제제라도 그 강도에는 차이가 있고 특히 corticosteroid같은 물질은 산소기의 형성에는 별 영향이 없는 것으로 미루어 PLA2의 억제제라도 산소기 생성에 관여하는 작용기전이 다르지 않나 생각된다³³. 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 mepacrine에 의한 호중구의 apoptosis의 증가는 산소기 생성을 감소시키는 기전의 일부라고 추정된다.

내독소에 의한 호중구에서의 산소기 생성의 기전은 아직 확실하지가 않으나 본 실험의 결과로 미루어 보면 적어도 호중구에서의 PLA2의 활성화는 PAF의 생성과 관계가 있는 듯하다. 즉 내독소는 호중구에서의 PLA2의 활성도를 증가시키고 이에 따른 lysoPAF의 증가는 remodelling의 과정을 거쳐서 PAF의 생성을 증가시킨다³⁴. Strahan³⁵은 PLA2활성도의 증가는 lysoPAF의 생성을 증가시키고 lysoPAF AT 활동도의 변화없이 lysoPAF의 remodelling이 일어난다고 보고하고 있으나 본 연구에서는 PLA2활성도의 증가에 따른 lysoPAF AT의 활성도의 증가가 관찰되었고 또한 mepacrine에 의한 PLA2의 억제는 lysoPAF AT의 활동도의 감소를 가져왔다.

내독소는 또한 호중구의 혈관내피세포로의 유착에도 관여하여 호중구가 조직내로 침윤하는데 관여하는데, 호중구의 유착은 PLA2나 PAF의 억제에 의하

여 효과적으로 억제되었다. 호중구의 혈관내피세포로의 유착에 관여하는 효소는 PLA2의 작용에 의한 염증성 지질분자, 산소기등에 의한다^{36,37}고 하였고 본 연구에서는 mepacrine, ketotifen 및 WEB 2086에 의하여 효과적으로 차단되었다. 이러한 결과들은 호중구가 산소기의 형성에 의한 조직의 손상, 특히 폐장의 경우 혈관내피세포의 손상에 직접적으로 관여함을 보여 주고 있다.

형태학적으로는 내독소는 호중구의 산소기 형성을 증가시키고 이때 생성된 산소기는 surfactant와 결합하여 surfactant의 주성분인 인지질의 peroxidation을 일으킬 가능성이 크다. 특히 surfactant의 주성분인 인지질은 PLA2의 기질로 작용하여 세포독성을 지닌 lysophosphatidylcholine 및 PAF를 형성하여 호중구의 화학주성물질로 작용한다³⁸.

결과적으로 ARDS시 내독소에 의한 호중구의 자극은 PLA2나 PAF의 생성을 매개로 하여 PLA2의 대사산물에 의해 호중구의 산소기 생성이 증가하거나 apoptosis가 억제되어 산소기 생성이 증가함으로써 조직의 손상 특히 혈관내피세포의 손상에 직접적으로 관여할 것으로 생각되고 이때 생성된 산소기는 제2형 폐포세포의 lamellar body나 폐포표면의 surfactant와 결합하여 surfactant의 기능을 저하시켜 폐부종을 일으키는데 관여할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

급성호흡부전증후군(ARDS)의 병인론을 호중구의 산소기 생성 및 apoptosis의 관점에서 PLA2 및 PAF의 역할과 연관하여 알아보았다. ARDS의 원인 중 산소기의 역할이 주로 염증성 cytokine 및 지질분자와 관련하여 연구되고 있는 점에 착안하여 내독소에 의한 PLA2, PAF의 작용 및 이에 따른 호중구의 혈관내피세포로의 유착, 산소기에 의한 pulmonary surfactant의 기능에 미치는 영향에 대해서도 알아보았다.

방 법 :

PMA로 자극된 호중구에서 PLA2 및 PAF의 억제에 따른 산소기 형성의 변화에 대해서도 알아보았으며 내독소에 의한 호중구에서의 PLA2활동도의 변화, lysoPAF remodelling에 미치는 PLA2 및 PAF의 억제에 효과에 대해서도 알아보았다. 또한 내독소 및 PMA에 의해 자극된 상태에서의 PLA2 및 PAF의 억제가 호중구의 apoptosis에 미치는 영향도 알아보았다. 호중구에 의한 조직의 손상은 혈관내피세포로의 호중구의 유착이 선행되어야 하므로 이러한 작용에 PLA2 및 PAF가 미치는 영향을 호중구 유착검사를 통하여 알아보았고 형태학적으로는 산소기와 pulmonary surfactant의 결합을 확인하였다.

결 론 :

ARDS시의 호중구의 역할은 PLA2 및 PAF의 작용에 의한 산소기 형성 및 염증성 지질분자의 생성을 통해 조직의 손상을 유발하는 듯하며 이때 PLA2의 억제는 호중구의 apoptosis의 증가 및 산소기의 생성을 감소시키고 또한 호중구의 혈관내피세포로의 유착을 감소시켰다. PAF의 억제는 호중구의 산소기 생성의 감소 및 호중구의 유착을 억제하여 조직의 손상을 감소시키는 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Putman E, van Golde LMG, Haagsman HP. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung* 1997;175:75-103.
2. Pittet JF, Mackersie RC, Martin JR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: Prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1187-205.
3. Jaeschke H, Smith W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997;61:647-53.
4. Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tis-

- sue injury and its modulation. *Intensive Care Med* 1995;21:277-85.
5. Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJW, Carl VS, Banerjee A. Gut phospholipase A2 mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1995; 268:G397-G403.
 6. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine AJ et al. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Physiol* 2000;L75-L80.
 7. Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE. Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1624-28.
 8. Lee YM, Kim T. PAF mediates acute lung injury via remodelling of lysoPAF in the lungs of rats given endotoxin intratracheally. *Korean J Physiol Pharmacol* 2000;4:219-26.
 9. Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Clarke JH, Lee YM, Repine JE. TNF mediates lung leak but not neutrophil accumulation, in lungs of rats given IL-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1972-76.
 10. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced lung leak in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:472-8.
 11. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-20.
 12. Foeldes-Felip E, Filep JG. Mepacrine inhibits fMLP-induced activation of human neutrophil granulocyte, leukotriene B4 formation and fMLP binding. *J Leukoc Biol* 1992;52:545-50.
 13. Ninio E, Jolly F. Transmembrane signalling and Paf acether biosynthesis. *Lipids* 1991;26:1034-37.
 14. Koltai M, Guinot P, Hosford D, Braquet PG. Platelet activating factor antagonists : Scientific background and possible clinical applications. *Adv in Pharmacol* 1994;28:81-167.
 15. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston Jr RB, Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentration of bacterial lipopolysaccharides. *Am J Pathol* 1985; 119:101-10.
 16. Martin SJ, Reutelingsperger CPM, Mc Gahan AJ, Rader JA, van Schie CAA, La Face DM et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine in a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimuli : inhibition of overexpression of *Bcl-2* and *Abl*. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
 17. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation state : therapeutic challenges. *Shock* 1995;3:537-66.
 18. Forehand JR, Johnston Jr RB, Bomalaski JS. Phospholipase A2 activity in human neutrophils : Stimulation by lipopolysaccharide and possible involvement in priming for an enhanced respiratory burst. *J Immunol* 1993;151:4918-25.
 19. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. Rapid assay for activity of phospholipase A2 using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1991;139:573-80.
 20. Bussolino F, Gremo F, Tetta C, Pescarmona GP, Camussi G. Production of platelet activating factor by chicken retina. *J Biol Chem* 1986;261: 16502-8.
 21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid

- extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.
22. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Dale-Piermattei D et al. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1992;89:3362-6.
23. Temmesfeld-Wollbrueck B, Walmrath D, Griminger F, Seeger W. Prevention and therapy of the adult respiratory distress syndrome. *Lung* 1995;173:139-64.
24. Johan Groeneveld AB. Treatment of increased microvascular permeability following inflammation. *Crit Care Med* 1999;27:23-4.
25. Jantz MA, Sahn SA. Corticosteroids in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1079-100.
26. Repine JE. Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1992;339:466-9.
27. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993;54:28-8.
28. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett Jr CC, Carl VS, Peterson VM. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 1996;131:24-30.
29. Blackwell GJ, Flower RJ. Inhibition of phospholipase. *Brit Med Bull* 1983;39:260-4.
30. Mikes PS, Polomski LL, Gee JBL. Mepacrine impairs neutrophil response after acute lung injury in rats. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:1464-70.
31. Shen C, Wang D, Chang M, Hsu K. Protective effect of mepacrine on hypoxia-reoxygenation-induced acute lung injury in rat. *J Appl Physiol* 1995;78:225-31.
32. Dana R, Leto TL, Levy R. Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998;273:441-5.
33. Canham EM, Shoemaker SA, Tate RM, Harada RN, McMurtry IF, Repine JE. Meparine but not methylprednisolone decreases acute edematous lung injury after injection of phorbol myristate acetate in rabbits. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:594-8.
34. Snyder F. Platelet activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular process. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254:231-49.
35. Strahan ME, Graham RM, Eccleston DS, Strum MJ, Taylor RR. Neutrophil platelet activating factor and acetyltransferase activity in clinical acute myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:102-6.
36. Bienvenu K, Granger DN. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Cells* 1993;19:279-89.
37. Minayama Y, Tozawa K, Kitamura M, Saito S, Ogawa J. Platelet activating factor mediates intracellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the non-hypoxic ischemia rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:150-7.
38. Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N et al. Generation of lysophospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 1998;102:1152-60.