

체외순환에서 전염증성 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현 특성에 대한 연구

유재현*·조은경**·박정규**·강신광*
나명훈*·임승평*·이영*

= Abstract =

Cardiopulmonary Bypass-induced Gene Expressions of Proinflammatory Cytokines and Chemokines

Jae Hyoen Yu, M.D.*, Eun Kyeong Jo, M.D.**, Jeong Kyu Park, M.D.**, Shin Kwang Kang, M.D.*,
Myung Hoon Na, M.D.*, Seung Pyung Lim, M.D.*, Young Lee, M.D.*

Background: Cardiopulmonary bypass(CPB) induces the productions of several inflammatory mediators that may be implicated in postoperative organ dysfunction, a problem to which the pediatric population is particularly prone. The purpose of this study was to determine if gene expressions of proinflammatory cytokines and chemokines were activated in plasma subjected to pediatric patients who underwent CPB for congenital heart diseases. **Material and Method:** Blood was taken from the radial artery of eighteen pediatric patients after induction of anesthesia(baseline), immediately after CPB(0 hour), 2 hours, 24 hours, and 48 hours after CPB. The mRNA expressions of interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8(IL-8), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-15(IL-15), and Interferon- γ (INF- γ) were evaluated with semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). IL-6 protein levels were measured in six patients by using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Result:** Systemic IL-6 mRNA and protein increased from baseline to a peak at 0 hour(239.5 pg/ml; p=0.01 versus baseline) and sustained at 2 hours before declining at 24 hours(82.7 pg/ml; p<0.05 versus 0hour). In IL-8 mRNA, there was a similar pattern but the increase was smaller than that of IL-6. IL-1 α and IL-1 β mRNA expressions peaked later(2 hours) from baseline, and declined by 48 hours. TNF- α levels peaked at 24 hours, and declined by 48hours. There were no significant differences between before and after bypass were seen in IL-15 mRNA production. INF- γ levels gradually decreased during the course of time. **Conclusion:** Gene expressions of IL-6, IL-8, IL-1 α , IL- β and TNF- α were changed significantly in plasma of pediatric patients who underwent CPB for congenital heart disease. IL-15 showed a different proinflammatory

*충남대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon, Korea

**충남대학교 의과대학 미생물학교실

Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon, Korea

논문접수일 : 2001년 11월 6일 심사통과일 : 2002년 1월 7일

† 위 연구는 1997년도 충남대학교병원(소형공동연구과제) 임상연구비에 의해 수행되었음.

‡ 논문의 요지는 1998년 제 30차 흉부외과 추계학술대회 시 구연하였음.

책임저자 : 이영(301-721) 대전광역시 중구 대사동 640, 충남대학교 의과대학 흉부외과학교실. (Tel) 042-220-7375, (Fax)042-220-7373

E-mail: y_lee@hanbat.chungnam.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

response, and reverse responses were shown in IFN- γ mRNA expression. These may result in high concentrations of proinflammatory cytokines and chemokines in the blood after CPB, contributing to the tissue injury.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:118-26)

Key words: 1. Cardiopulmonary bypass
2. Cytokines
3. Inflammatory mediators

서론

체외순환(cardiopulmonary bypass)을 이용하는 개심술 시 각종 사이토카인을 분비하는 백혈구와 내피세포에 의해 전신적인 염증 반응이 일어난다고 알려져 있다¹⁾. 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1) 및 IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)이 심장 수술시 전신적으로 유리되며 전신적인 염증반응 및 허혈 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)에 의한 심근장애의 병인에 직접적인 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있다²⁾. TNF- α 는 이러한 염증반응의 초기 매개자로서 잘 알려져 있으며³⁾, IL-1 β 의 생성을 자극한다고 한다⁴⁾. IL-1 β 는 IL-6의 합성을 촉진한다고 하며⁵⁾, IL-6와 IL-8 같은 전염증성 사이토카인은, 특히 중성구 및 산화질소 의존성 조직 손상을 일으켜 직접 심근 수축을 저하시키는 것으로 알려져 있다^{6,7)}.

개심술 후 발생하는 합병증은 혈액응고장애, 말초혈관 투과성의 증가, 발열 및 다양한 기관의 기능 부전 등이 있으며 이는 심장 수술 후 현저하게 변화하는 면역 기능의 장애에 의한 것으로 생각하고 있다⁸⁾. 특히 혈청 IL-6의 변화는 예후에 밀접한 관련이 있다고 하며 임상적으로 매우 심각한 상태의 환자일수록 IL-6 생산이 높았다는 보고도 있다⁹⁾. 또한 패혈성 속 환자는 전신적으로 다량의 사이토카인을 분비하며 높은 치사율과 연관되어 보고되었다¹⁰⁾.

동물실험에서도 TNF- α 및 IL-1이 재관류 손상에 의한 심근경색 유발에 중요한 인자로 보고되었으며 TNF- α 와 IL-1을 동시에 억제한 결과 생존율이 크게 향상되었다고 한다¹¹⁾.

본 연구는 개심술을 시행한 18 명의 소아 환자에서 체외순환 전, 체외순환 직후, 2, 24 및 48 시간 후에 말초혈액 단핵구를 수집하여 전염증성 사이토카인인 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , 및 IL-15과, T 세포에서 주로 분비하는 염증성 사이토카인인 인터페론-감마(inteferon- γ , IFN- γ) mRNA 발현을 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)에 의하여 반정량적으로 측정하였다.

또한 IL-6의 단백질 생성을 효소결합 면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 측정하였다.

대상 및 방법

A. 실험대상

대상 환자는 1997년 12월부터 1998년 8월까지 충남대학교 병원 흉부외과에서 개심술을 시행한 18명의 소아 환자를 대상으로 하였다. 평균 연령은 14개월(1~48개월)이었고 평균 체중은 9 kg(3.6~15.6 kg)였다(Table 1). 통상적인 전신마취 하에 기관 삽관 후 중심정맥선과 말초동맥카테터를 설치하였다. 체외순환은 비박동성 롤러 펌프(nonpulsatile roller pump)

Table 1. Patient characteristics

Diagnosis	
ASD	2
ASD with VSD	2
AVSD	1
VSD	7
VSD with PS	2
TOF	2
TAPVR	1
pulmonary vein stenosis	1
Age	14 months(1-48 months)
Body weight(kg)	9 kg(3.6-15.6 kg)
CPB time(min)	127 min(41-326 min)
ACC time(min)	68 min(14-126 min)

ASD, atrial septal defect; VSD, ventricular septal defect; AVSD, atrioventricular septal defect; PS, pulmonary stenosis; TOF, tetralogy of Fallot; TAPVR, total anomalous pulmonary venous return; CPB, cardiopulmonary bypass; ACC, aortic cross clamp

를 이용하였고 산화기는 중공 막형 산화기(hollow fiber membrane oxygenator, Minimax, Medtronic, USA) 및 열교환기를 사용하였다. 충전액은 정질액과 혈액을 혼합하여 적혈구 용적률을 0.20 내지 0.23으로 유지하였고 동맥선 내 여과기(arterial line filter)를 사용하였다. 관류지수는 2.0-2.5 L/min/m²를 유지하고 심도 및 중증도 저체온에서 수술을 시행하였다. 심정지액은 혈성 심정지액을 대동맥 근을 통하여 주입하였다.

모든 환자에서 체외순환 전, 체외순환 직후, 2, 24 및 48 시간 후 말초혈액 단핵구를 수집하여 사이토카인 유전자 발현 실험을 실시하였다.

B. 실험방법

1. 말초혈액 단핵구의 준비

헤파린(중외제약, 25,000 IU)을 전처치한 주사기로 5 ml의 동맥혈을 채혈하여 Histopaque(Sigma 1077, density 1.007) 위에 중첩한 후 1,500 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 상층의 혈청과 중간층의 단핵세포를 각각 수거하였다. 혈청은 사이토카인 양을 측정하기 위해 -70 °C에 보관하였으며 단핵세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 1,200 rpm에서 10 분간씩 3 회 세척하였다. 최종적으로 총 RNA를 취하기 위해 변성 용액에 부유하여 -70 °C에 보관하였다.

2. 단핵구로부터 총 RNA의 분리

단핵구에서 총 RNA 분리는 RNeasy kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 세포를 냉 PBS로 3 회 세척한 후 1 × 10⁷의 세포당 0.5 ml의 변성 용액을 가하고 무균 18G 바늘을 가진 5cc 주사기로 반복 혼합하여 세포를 완전히 용해

하였다. 1/10용량의 2 M sodium acetate와 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol 용액을 가하여 잘 혼합하고 얼음 위에 15 분간 방치한 후 4°C, 10,000 g에서 20 분간 원심하였다. 상청액을 모아 새 튜브에 넣고 동량의 isopropanol을 가하고 -20°C에서 30 분 이상 반응시킨 후 다시 4°C, 10,000 g에서 20 분간 원심하여 얻은 RNA pellet에 다시 변성 용액 0.5 ml를 가하여 용해시키고 동량의 isopropanol을 가한 후 -20 °C에서 30 분 이상 반응시켰다. 4°C, 10,000 g에서 20분간 재 원심한 후 얻은 RNA pellet에 냉 75% ethanol 1ml를 가하여 세척한 후 상청액을 버리고 4°C, 10,000 g에서 15 분간 원심하였다. RNA pellet을 진공 건조기로 건조시킨 다음 50 µl의 RNase free water에 용해시킨 후 260 nm에서 RNA 농도를 결정하여 -20°C에 냉동 보관한 후 역전사 중합효소연쇄반응 시에 해빙하여 사용하였다.

3. RT-PCR에 의한 사이토카인 유전자 발현 분석

사이토카인 유전자 발현에 이용한 시발체 세트는 바이오니아(Bioneer, Chungju, Korea; PAGE 정제)에 주문 합성하여 사용하였다(Table 2).

총 RNA는 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 이어서 중합효소연쇄반응에 의하여 DNA를 증폭하였다. RT-PCR은 각각의 조건에서 2.5 µg의 total RNA를 이용하였다. RNA 시료를 65°C에서 5 분간 가열하여 변성시키고 얼음에 담가 급랭시킨 후 4 µl의 10x RT buffer (0.5 M Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M MgCl₂), 4 µl의 10x dNTP (2.5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)을 가하고 20 µM의 oligo-dT15 와 44 U의 RNase inhibitor(Poscochem R&D center, Kyonggi-do, korea) 및 10 U의 역전사효소(Poscochem R&D center)를 가하

Table 2. Oligonucleotide primers and PCR product sizes for cytokine cDNAs

mRNA	Sense primer	antisense primer	Size of PCR products(bp)
IFN-γ	5' TGG CTT TTC AGC TCT GCA TCG 3'	5' TCG ACC TCG AAA CAG CAT CTG 3'	465
IL-6	5' ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC5' 3'	GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G 3'	628
IL-8	5' GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA 3'	5' GAA TTC TCA GCC CTC TTC AA 3'	248
TNF-α	5' CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG 3'	5' CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG 3'	325
IL-1β	5' AAA CAG ATG AAG TGC TCC TTC5' 3'	TGG AGA ACA CCA CTT GTT GCT CCA 3'	391
IL-1α	5' GTC TCT GAA TCA GAA ATC CTT CT5' 3'	CAT GTC AAA TTT CAC TGC TTC ATC 3'	421
IL-15	5' CAA GTT ATT TCA CTT GAG TCC GGA5' 3'	TTC TAA GAG TTC ATC TGA TCC AAG G 3'	357
β-actin	5' TCA TGC CAT CCT GCG TCT GGA CCT5' 3'	CCG GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG 3'	582

고 총 반응액이 40 μ l가 되도록 증류수를 가한 후 42°C에서 1 시간 반응하여 cDNA를 얻었다. cDNA 산물은 99°C에서 5 분간 가열하여 역전사효소를 불활성화시킨 다음 얼음에 담가 급랭하였다. 그 후 IL-12 p40 및 p35는 cDNA 산물 중 5 μ l, 그 외의 사이토카인에 대한 은 생성된 cDNA 산물 중 2.5 μ l 씩 취하여 다음과 같은 동일한 조건에서 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 즉 5 μ l의 10x PCR buffer (0.1 Tris-Cl pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl₂), 5 μ l의 10x dNTP, 20 μ M의 3'-primer 및 5'-primer, 1 U Taq DNA polymerase(Bioneer)를 각 튜브에 첨가하여 총 반응액이 50 μ l 되도록 증류수를 가하였다. 중합효소연쇄반응은 DNA thermal cycler(Biometra Inc., Tampa, Florida, USA)를 사용하여 35 회의 cDNA 증폭반응을 실시하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 변성은 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 2분, extension은 72°C에서 1 분간 시행하였다.

4. 전기영동에 의한 중합연쇄반응 산물의 검색

중합효소연쇄반응이 끝난 후, 18 μ l의 증폭된 중합효소연쇄반응 산물을 취하여 10x gel loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/50% glycerol)와 잘 섞은 다음 1 μ g/ml의 ethidium bromide이 포함된 2% agarose gel 상에 Tris-Acetate-EDTA(TAE) buffer 하에서 전기영동하였으며 이동한 DNA band의 위치를 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator) 상에서 관찰하였다.

5. IL-6의 효소결합 면역측정법(ELISA)

IL-6에 대한 효소결합 면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)는 Pharmingen 사의 human ELISA kit를 이용하였다. 0.1M sodium bicarbonate buffer(pH 9.6)에 2.5-10 μ g/ml의 항체 농도로 준비된 항 사이토카인 IgG를 well 당 50~100 μ l 씩 분주하여 37°C에서 2시간 배양하여 96 well micro-ELISA plates에 coating하였다. 그 후 well의 남은 부분에 1% BSA-PBS용액 150-200 μ l 씩 첨가하여 최소한 20분 이상 방치하여 비특이적인 결합을 차단시켰다. Plate는 사용하기까지 철저히 봉하여 4°C에 보관하였다.

ELISA Plate에 남아있는 항 사이토카인 IgG 혹은 차단 버퍼를 제거한 후 well을 0.05% Tween 20-PBS로 3~4회 세척하였다. 최종 세척 후 일련의 농도로 희석되어 있는 cytokine standard 및 시료를 well 당 100 μ l 씩 첨가하며 37°C에서 1시간 이상 배양하였다. 이때 2배수 혹은 3배수로 시행하여 실험 오차를 최대한 방지하였다. Plate를 0.05% Tween 20-PBS로 4회 세척 후 1% BSA-PBS에 용해된 horseradish peroxidase 가 결합된 이차 항 사이토카인 IgG(enzyme-linked second anti-cytokine IgG)를 well 당 100 μ l 씩 분주하여 37°C에서 1

시간 더 반응하였다. Plate를 다시 0.05% Tween 20-PBS로 4회 세척 후 horseradish peroxidase 기질인 orthophenylenediamine(OPD)를 1 mg/ml로 citrate-phosphate buffer에 용해하여 well에 첨가함으로써 기질 반응하였다. 발색 반응은 암실에서 하였으며 기질효소반응은 1M H₂SO₄를 첨가하여 종결하였다. 발색 정도는 492 nm파장에서 ELISA reader (Molecular device, USA)로 측정하였다.

6. 통계학적 처리

결과는 Student's t-test에 의해 검증하였으며 p value가 0.05 이하를 유의한 결과로 판단하였다. 그러나 유의하지 않다고 판단되는 경우에는 통계 처리 결과를 나타내지 않았다.

결 과

본 연구는 개심술을 시행한 18 명의 소아 환자에서 체외순환 전, 체외순환 직후, 2, 24 및 48 시간 후의 말초혈액 단핵구로부터 총 RNA를 분리하여 전염증성 사이토카인인 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , 및 IL-15과, T 세포에서 주로 분비되는 염증성 사이토카인인 IFN- γ mRNA 발현을 RT-PCR에 의하여 조사하였다. 동일한 총 RNA 표본으로부터 RT-PCR을 시행하여 mRNA 발현을 조사하였으며 agarose gel 상에서의 전기영동 및 densitometry에 의한 발현분석 결과를 나타내었다.

1. IL-6 및 IL-8 mRNA 발현(Fig. 1)

IL-6 유전자 발현강도는 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 평균 2.7 배 상승되어 나타났으며 2시간 후부터 점차 감소하여 체외순환 24시간 후에는 체외순환 전과 비슷한 수준으로 감소하였다. IL-8 유전자 발현 양상도 IL-6의 경우와 매우 유사하였다. 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 약 1.7 배 가량 증가된 발현을 나타내었고, IL-6에 비해 유전자 감소의 폭이 둔화되는 양상이었다. 따라서 체외순환 48시간 후에도 유전자 발현의 강도는 체외순환 전에 비해 증가되어 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

2. IL-1 α 및 IL-1 β mRNA 발현(Fig. 2)

IL-1 α 유전자 발현강도는 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 평균 1.8배 증가하였으며 체외순환 2시간 후에 4.1배까지 증가하였다. 체외순환 24시간 후에 약간 감소하였고 48시간 후에는 체외순환 직후와 비슷한 수준으로 감소하였다. IL-1 β 유전자 발현 양상도 IL-1 α 의 경우와 매우 유사하였다. 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 약 1.7배 가량 증가된 발현을 나타내었으며 체외순환 2시간 후에 발현이 가장 높았고(2.1

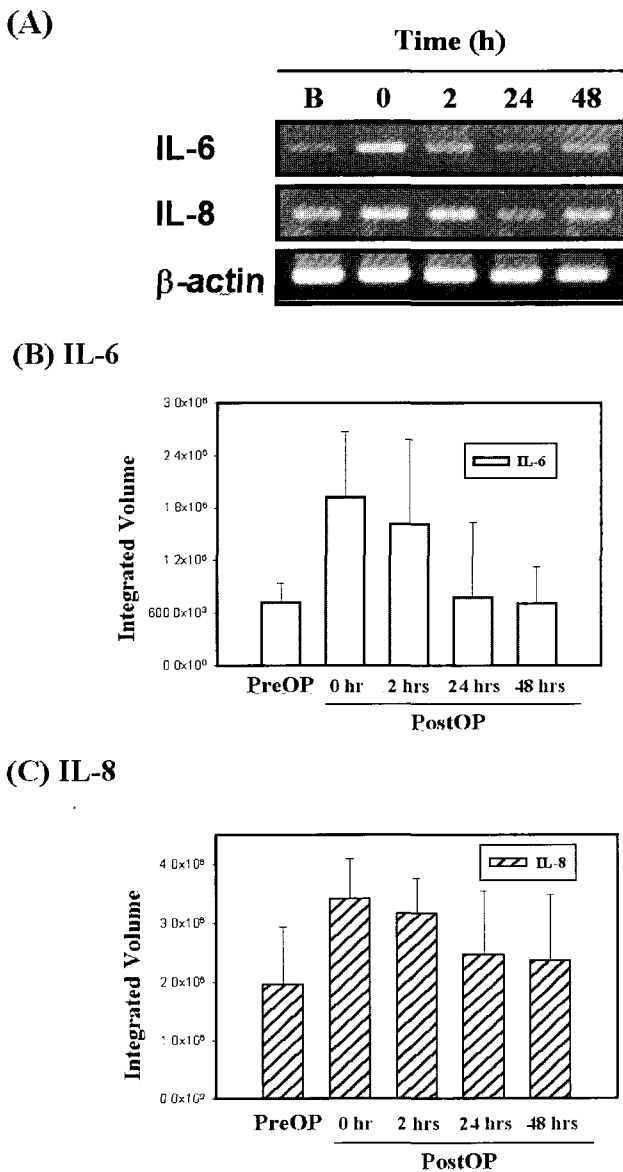


Fig. 1. IL-6 and IL-8 mRNA expressions by PBMC from patients undergoing open heart surgery. PBMC were isolated from patients and examined for mRNA expression of IL-6, IL-8, and β -actin by RT-PCR. The sizes of PCR products were shown in Table 1. Panel A shows the representative result of cytokine profiles of a patient. Panel B, and C show the densitometric analysis of RT-PCR products from subjects. B, baseline cytokine levels at pre-operation.

배), 이후 점차 감소하여 체외순환 48시간 후에는 체외순환 전의 약 1.4배로 감소하였다.

3. TNF- α 및 IL-15 mRNA 발현(Fig. 3)

TNF- α mRNA 발현은 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 약 1.3배 증가하였으며 이후 점차 증가하여 체외순환 24시

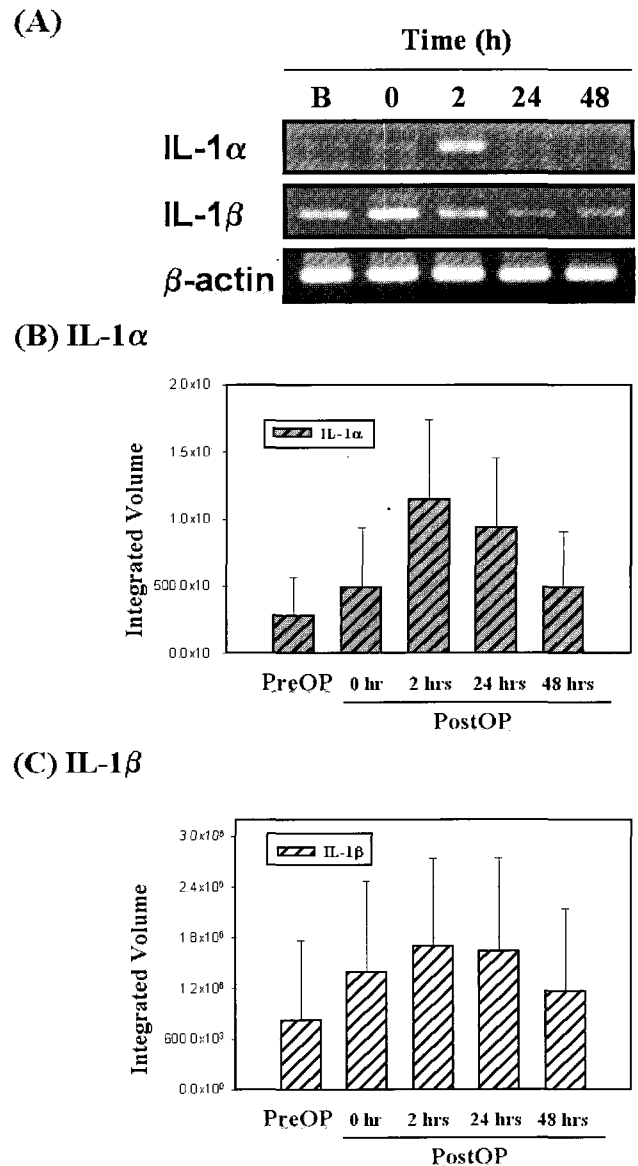


Fig. 2. IL-1 α and IL-1 β mRNA expressions by PBMC from patients undergoing open heart surgery. PBMC were isolated from patients and examined for mRNA expression of IL-1 α , IL-1 β , and β -actin by RT-PCR. The sizes of PCR products were shown in Table 1. Panel A shows the representative result of cytokine profiles of a patient. Panel B, and C show the densitometric analysis of RT-PCR products from subjects. B, baseline cytokine levels at pre-operation.

간 후에 가장 증가된 양상을 나타내었다. 그러나 48시간 후에는 급격히 감소하여 체외순환 직후와 비슷한 유전자 발현 강도를 관찰할 수 있었다. IL-15 mRNA는 체외순환 전에도 매우 강한 발현이 관찰되었으며 수술 경과와 관계없이 발현 양상이 비슷하였다.

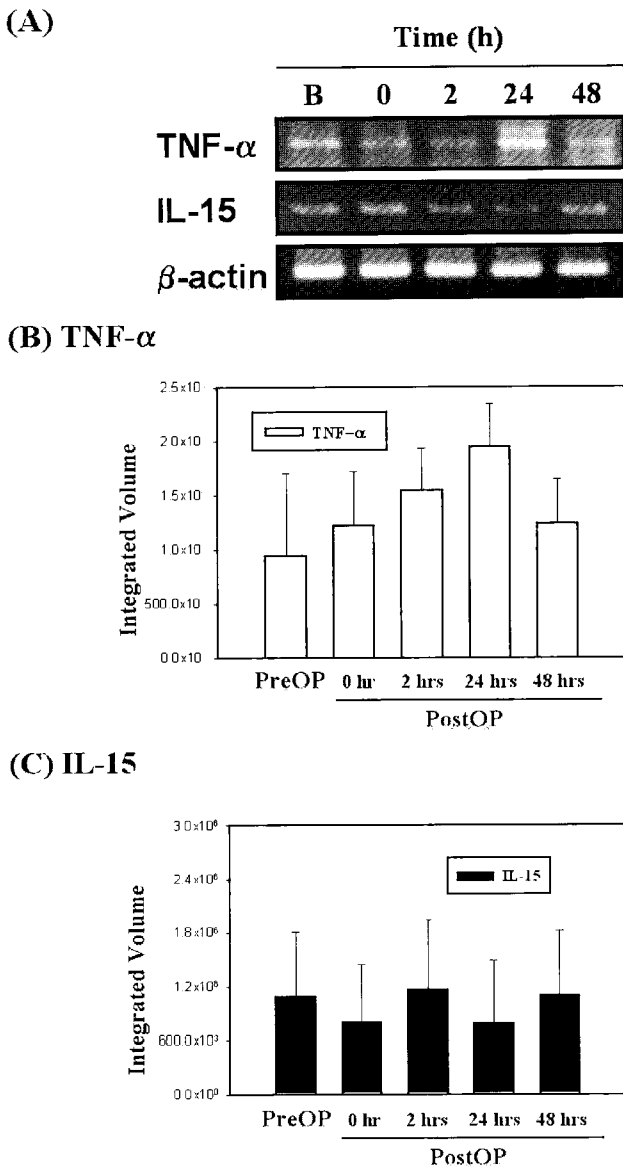


Fig. 3. TNF- α and IL-15 mRNA expressions by PBMC from patients undergoing open heart surgery. PBMC were isolated from patients and examined for mRNA expression of TNF- α , IL-15, and β -actin by RT-PCR. The sizes of PCR products were shown in Table 1. Panel A shows the representative result of cytokine profiles of a patient. Panel B, and C show the densitometric analysis of RT-PCR products from subjects. B, baseline cytokine levels at pre-operation.

4. IFN- γ mRNA 발현(Fig. 4)

IFN- γ mRNA 발현은 체외순환 전에 매우 미약한 PCR 발현 밴드를 관찰할 수 있었으나 체외순환 이후 발현이 오히려 감소하여 체외순환 2시간 이후부터는 거의 유전자 발현이 관찰되지 않았다.

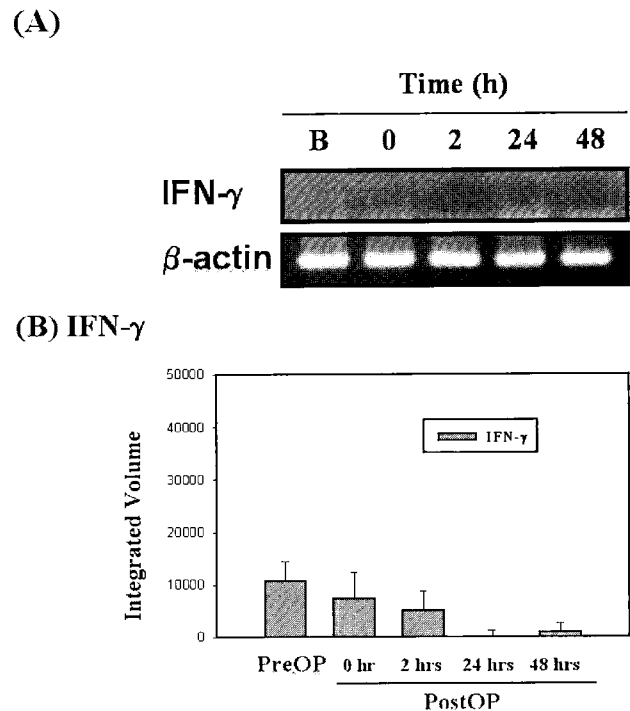


Fig. 4. IFN- γ mRNA expression by PBMC from patients undergoing open heart surgery. PBMC were isolated from patients and examined for mRNA expression of IFN- γ , and β -actin by RT-PCR. The sizes of PCR products were shown in Table 1. Panel A shows the representative result of cytokine profiles of a patient. Panel B shows the densitometric analysis of RT-PCR products from subjects. B, baseline cytokine levels at pre-operation.

5. IL-6 ELISA 결과(Fig. 5)

IL-6의 단백질 생성을 ELISA에 의해 측정하였다. 체외순환 직전 평균 93.8 pg/ml의 IL-6를 생성하였으며 체외순환 직후 239.5 pg/ml로 약 2.6배 가량 증가하였다($p < 0.05$). 체외순환 2시간 후 IL-6의 양은 182.4 pg/ml로 약간 감소하였으며 수술 24시간 후에는 체외순환 전과 같은 수준으로 감소하여 IL-6 mRNA 발현 양상과 거의 일치하였다.

고 찰

본 연구는 개심술을 시행한 소아 환자에서 재판류 손상과 관련이 있을 것으로 생각되는 각종 사이토카인과 케모카인의 증감을 조사하고자 하였다. 가장 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 IL-6의 생성이 체외순환 직후부터 증가하였으며 체외순환 2시간 이후부터 감소하였다. 체외순환 이후 시간이 경과함에 따라 IL-1 α 및 β , 그리고 TNF- α 의 생성도 연이어

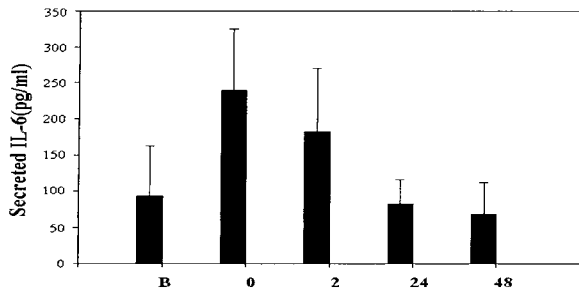


Fig. 5. IL-6 production by PBMC from patients undergoing open heart surgery. Serum were prepared from radial artery blood from patients at induction (baseline), 0 hour(last clamp off), 2, 24, and 48 hours. The cytokine concentrations were measured using ELISA. Values are the mean \pm SD of triplicate supernatant samples.

증가되었다. 그러나 IL-15의 발현은 변화가 없었으며 IFN- γ 유전자의 발현은 오히려 감소되었다.

심장수술 시 마취, 수술 스트레스 및 체외순환 등은 세포 및 체액성 면역반응을 모두 증가시키는 급성 전신성 염증반응을 유발한다. 이러한 반응이 과도하게 일어난 경우 오히려 면역세포들의 억제, 보체계 및 응고계의 자극, 사이토카인 분비 및 내피세포의 손상으로 이어지게 된다¹². 특히 기관마다 축적되는 염증세포들은 기관의 기능적 손상 등 병리현상 유발에 가장 중요한 기능을 하는 것으로 생각된다¹³.

사이토카인들은 주로 단핵구, 대식세포, 림프구 및 내피세포에서 분비되어 방어작용 혹은 병리 작용을 유발할 것으로 생각한다. 이는 각 사이토카인의 농도, 수용체 발현 및 작용하는 세포의 형태와 다른 사이토카인과의 상호작용 등에 의해 정밀하게 조절될 것이다¹⁴. 기본적으로 사이토카인은 국소적으로 분비되어 작용하는 것으로 알려져 있으나, 심장수술과 같이 광범위한 자극이 있는 경우에는 말초혈액으로 흘러나와 보체계와 응고계를 광범위하게 활성화함으로써 기관 기능에 악영향을 초래할 수도 있다¹⁵.

사이토카인은 주로 복잡한 네트워크 형태로 상호작용하며 기능적으로 전염증성 및 항염증성 사이토카인으로 구분될 수 있다. 심장수술과 관련되어 가장 중요한 전염증성 사이토카인들은 TNF- α , IL-6, IL-8이며 항염증성 사이토카인들은 IL-10이다. TNF- α 는 백혈구와 내피세포 간의 상호작용에 매우 중요한 역할을 하며 혈관 내피세포에 부착된 다형핵중성구(polymorphonuclear neutrophils; PMNs)로부터 superoxide나 H₂O₂와 같은 산소 라디칼들을 유리하는 데 작용한다. 체외순환 후 TNF- α 의 반응에 대한 보고는 아직도 서로 다른 주장이 있다. 일부 연구자들은 대동맥 차단과 체외순환 후 TNF- α

가 매우 유의하게 상승되었다고 보고한 반면¹⁶, 일부 연구에서는 오히려 TNF- α 의 상승이 전혀 관찰되지 않았다고 한다¹⁷. 다른 연구에서는 TNF- α 가 체외순환 전에는 관찰되었으나 체외순환 이후 별다른 변화가 없었다고 한다¹⁴. 그러나 동물 실험에서 소량의 TNF- α 를 투여하였을 때 심근 기능이 크게 감소되었다고 하여¹⁷, 사람에서도 매우 소량의 TNF- α 에 의해 심근기능 저하가 유발될 것으로 생각된다.

IL-6는 임상 경과의 훌륭한 지표가 된다고 보고되어 예후 판정에 중요한 역할을 할 것으로 생각한다¹⁸. 또한 IL-6는 조직 손상의 정도와 매우 관련이 깊다고 생각되며¹⁹, 정상적으로 IL-6는 건강인의 말초혈액에서 발견되지 않으나 일부 선천성 심장질환을 갖는 소아들에서 수술 전에도 IL-6의 생성이 있는 것으로 보고된 바 있다¹⁴. 일반적으로 IL-6의 혈청치는 체외순환 도중과 이후에 증가되었다고 하며 IL-6 상승률은 대동맥 차단 시간과 매우 관련이 깊다고 한다²⁰. 그러나 아직도 체외순환 수기나 수술 혹은 양자 모두가 IL-6 상승에 어떻게 기여하는지에 대한 보고는 거의 전무한 실정이다.

IL-8은 강력한 화학주성인자로서 동물실험에서 IL-8을 주입한 결과 백혈구의 침윤에 의한 강력한 폐 손상이 유발되었다고 한다²¹. 개심술을 시행 받은 소아에서 초기 IL-8의 상승이 수술 후 몇 시간 이내에 보고된 바 있으며 IL-8의 혈청치는 허혈/재관류 손상의 기간과 매우 관련이 깊다고 한다²⁰.

개심술을 시행한 환자에서 전염증성 사이토카인의 유리는, 특히 소아에서 매우 많은 변화가 관찰된다고 한다²⁰. 본 연구에서도 대부분의 환자 대상이 소아였기 때문에 각 개인별로 많은 차이점을 관찰할 수 있었으나 IL-6와 IL-8이 모두 수술 도중에 급격히 상승된다는 것을 알 수 있었다.

IFN- γ 는 주로 세포독성 및 전염증성 사이토카인과 연관되어 보고되었으나²² 본 연구에서는 오히려 체외순환 후 감소되는 양상이었다. 심장 수술과 관련된 IFN- γ 에 대한 보고는 거의 없는 실정이나 본 연구 결과 IFN- γ 는 직접 심장 수술과 관련되어 초기에 유리되지 않음을 알 수 있다. 주로 IFN- γ 의 생성은 내피세포가 아니라 자연살세포 혹은 T 세포에 의하며²³ 따라서 이들 세포는 체외순환에 의한 전염증성 사이토카인 분비에 직접적인 역할을 하지 않을 것으로 생각한다. IL-15도 TNF- α , type I IFNs, 및 케모카인 등과 함께 자연살세포를 활성화하며 intercellular adhesion molecules(ICAMs), CD48, 및 CD58 등 세포 부착에 관련된 각종 부수분자의 활성화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다²⁴. 본 연구결과 IL-15는 체외순환과 관련되어 증감이 뚜렷하지 않았던 사이토카인으로, 체외순환에 의한 조직 손상과 특별한 연관성이 없을 것으로 생각한다. 본 연구에서 주로 사용한 역전사효소 중합효소연쇄반응(RT-PCR)은 세포내에서 발현된 mRNA를 분석하는데 가장 강력한 도구로서 전통적인 Northern blot이나 in

situ hybridization보다 민감도가 1,000-10,000 배정도 높아서 극소량의 세포내 mRNA까지도 검출할 수 있다²⁵⁾. 이러한 특성 때문에 최근에는 조직과 세포, 심지어 슬라이드 표본에서 역동적인 사이토카인 mRNA 발현양상 등을 연구하는데 많이 이용되고 있다.

향후 연구를 통하여 전염증성 사이토카인을 억제하는 항염증성 사이토카인들에 대한 면밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각한다. 특히 IL-10과 IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)가 체외순환을 수반하는 수술과 관련되어 가장 중요한 항염증 작용을 하는 것으로 보고되었다²⁶⁾. C-reactive protein(CRP)도 백혈구의 화학주성을 조절하는 항염증 기능을 갖는 급성기 단백질 중의 하나로 알려져 있다²⁷⁾.

개심술을 시행한 환자에서 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인들 간의 균형과 상호 조절은 환자의 전신적 염증반응에 의한 예후에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

이상의 연구를 종합하면 IL-6, IL-8, IL-1a 및 TNF- α 등 주요 전염증성 사이토카인과 케모카인들이 체외순환과 관련된 직간접적인 면역반응으로 인한 기관 손상에 밀접한 관련이 있을 것으로 생각한다.

결론

허혈/재관류 손상과 관련이 있을 것으로 생각되는 각종 사이토카인과 케모카인의 증감을 조사하고자 충남대학교병원 흉부외과에서 개심술을 시행한 소아환자 18 명의 체외순환 전, 체외순환 직후, 2, 24 및 48 시간 후의 말초혈액 단핵구를 수집하여 IL-1a, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-15 및 IFN- γ mRNA 발현을 역전사효소 중합효소연쇄반응에 의하여 반정량적으로 측정하였다. 체외순환 전에 비해 체외순환 직후 IL-6 및 IL-8 유전자 발현강도는 상승되어 나타났으며 2 시간 이후부터 점차 감소되는 양상이었다. IL-1a, IL-1 β 및 TNF- α 의 발현 역시 체외순환 직후 증가되었으며 IL-1a와 IL-1 β 는 2 시간, TNF- α 는 체외순환 24 시간 후에 가장 강한 발현을 나타내었다. 반면 IL-15의 경우는 체외순환 전후 유의한 차이는 없었고 IFN- γ mRNA의 발현은 체외순환 전에 비해 오히려 약화되거나 일부 환자의 경우 발현이 관찰되지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 IL-6, IL-1, TNF- α 등 주요 전염증성 사이토카인 및 IL-8과 같은 일부 케모카인이 체외순환과 관련된 직간접적인 면역반응과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각한다.

참고 문헌

1. Asimakopoulos G. *Mechanisms of the systemic inflammatory*

response. *Perfusion* 1999;14:269-77.

2. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, et al. *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function*. *Crit Care Med* 1999; 27:1309-18.

3. Udelsman R, Holbrook NJ. *Endocrine and molecular responses to surgical stress*. *Curr Probl Surg* 1994;31: 653-720.

4. Vassalli P. *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-52.

5. Zhang Y, Lin JX, Yip YK, Vilcek J. *Stimulation of interleukin-6 mRNA levels by tumor necrosis factor and interleukin-1*. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:548-49.

6. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. *Neutrophil activating protein 1/interleukine 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD 18 on human neutrophils*. *J Exp Med* 1990;171:1155-62.

7. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. *Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide*. *Science* 1992;257:387-89.

8. Sawa Y, Shimazaki Y, Kadoba K, et al. *Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:29-35.

9. Torpy DJ, Bornstein SR, Chrousos GP. *Leptin and interleukin-6 in sepsis*. *Horm Metab Res* 1998;30:726-9.

10. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. *Septic shock: pathogenesis*. *Lancet* 1991;338:732-6.

11. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. *The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine*. *J Surg Res* 2001;99: 134-41.

12. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-57.

13. Feinberg H, Rosenbaum DS, Levitsky S, Silverman NA, Kohler J, LeBreton G. *Platelet deposition after surgically induced myocardial ischemia*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:815-22.

14. Brix-Christensen V. *The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children*. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:671-9.

15. Doughty LA, Kaplan SS, Carcillo JA. *Inflammatory cytokine and nitric oxide responses in pediatric sepsis and organ failure*. *Crit Care Med* 1996;24:1137-43.

16. Finn A, Naik S, Klein N. *Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:234-41.

17. Hansen PR, Svendsen JH, Hoyer S, Kharazmi A, Bendtzen K, Haunsø S. *Tumor necrosis factor-alpha increases myocardial microvascular transport in vivo*. *Am*

- J Physiol 1994;266:60-7.
18. Hauser GJ, Ben-Ari J, Colvin MP, et al. *Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlated with postoperative morbidity.* Intensive Care Med 1998;24:481-86.
 19. Oka Y, Murata A, Nishijima J, et al. *Circulating interleukin 6 as useful marker for predicting postoperative complications.* Cytokine 1992;4:298-304.
 20. Behr D, Hernvann A, Pouard P, Spizzi I, Leca F, Vouhe P, Ekindjian O. *Interleukin-6 and C-reactive protein during pediatric cardiopulmonary bypass.* Clin Chem 1995; 41:467-9.
 21. Rot A. *Chemotactic potency of recombinant human neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) for polymorphonuclear leukocytes of different species.* Cytokine 1991;3:21-7.
 22. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. *IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide.* J Immunol 1999;163:5278-86.
 23. Scharton TM, Scott P. *Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice.* J Exp Med 1993;178:567-77.
 24. Lanier, Lewis L. *Turning On Natural Killer Cells.* J Exp Med 2000;191:1259-62.
 25. Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, Poiesz BJ. *Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification.* Nucl Acids Res 1988;16:4165-70.
 26. Duval ELIM, Kavelaars A, Veenhuizen L, van Vught AJ, van de Wal HJCM, Heijnen CJ. *Pro- and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children.* Eur J Pediatr 1999;158:387-93.
 27. Zhong W, Zen Q, Tebo J, Schoottmann K, Coggeshall M, Mortensen RF. *Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling.* J Immunol 1998;161:2533-40.

=국문초록=

배경: 체외순환에 의해 생성되는 염증매개체는 소아 환자에서 술 후 다기관 기능부전과 연관이 있다. 본 연구에서는 선천성 심장질환 소아 환자에서 체외순환에 의한 전염증성 사이토카인과 케모카인의 유전자 발현 특성에 대해 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 개심술을 시행한 18명의 소아 환자의 요골 동맥에서 마취유도 후(기준치), 체외순환 직후(0시간), 체외순환 2시간 후, 24시간 후, 48시간 후에 혈액을 채취하였다. 모든 환자에서 인터루킨-1알파, 인터루킨-1베타, 인터루킨-6, 인터루킨-8, 종양괴사인자알파, 인터루킨-15, 인터페론-감마의 mRNA의 유전자 발현 정도를 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응으로 측정하였다. 6명의 환자에서 인터루킨-6 단백질은 효소결합면역흡착검사로 측정하였다. **결과:** 전신적인 인터루킨-6 mRNA와 단백질은 체외순환 직후(0시간)에 최고치(239.5pg/ml, 기준치 대비 p=0.01)였고, 체외순환 2시간 후까지 유지하다가 체외순환 24시간 후에 감소하였다(82.7pg/ml, 0시간 대비 p<0.05). 인터루킨-8 mRNA 발현은 인터루킨-6 mRNA와 비슷한 양상을 보였으나 최고치는 인터루킨-6보다 낮은 값을 보였다. 인터루킨-1알파와 인터루킨-1베타 mRNA의 발현은 체외순환 2시간 후에 최고치를 나타내었고 체외순환 48시간 후에 감소하였다. 종양괴사인자알파는 체외순환 24시간 후에 최고치를 나타내었고 체외순환 48시간 후에 감소하였다. 인터루킨-15 mRNA 발현은 체외순환 전후와 비교하여 유의한 변화가 없었다. 인터페론-감마는 시간이 지남에 따라 감소하였다. **결론:** 선천성 심장질환으로 개심술을 시행한 소아환자의 혈청 내 인터루킨-6, 인터루킨-8, 인터루킨-1알파, 인터루킨-베타, 종양괴사인자알파의 유전자 발현은 체외순환 전후로 유의한 변화를 보였다. 인터루킨-15는 유의한 변화가 없었고 인터페론-감마는 반대 양상의 변화를 보였다. 체외순환 후 전염증성 사이토카인과 케모카인의 높은 혈중 농도는 술 후 조직 손상과 연관되리라 생각한다.

- 중심 단어 :** 1. 체외순환
2. 사이토카인
3. 염증매개체