

# 과산화수소에 의한 급성폐손상시 염증성 지질분자의 생성기전에 관한 연구

배 지 훈\* · 강 형 석\* · 이 섭\* · 전 상 훈\* · 안 옥 수\* · 권 오 춘\*

= Abstract =

## Hydrogen Peroxide Modulates Phospholipase A<sub>2</sub> Activity and Endogenous Oxidative Stress in the Free Radical Induced Acute Lung Injury

Chi Hoon Bae, M.D.\*, Hyung Seok Kang, M.D.\*, Sub Lee, M.D.\*,  
Sang Hoon Jheon, M.D.\*, Wook Su Ahn, M.D.\*, Oh Choon Kwon, M.D.\*

**Background:** In an attempt to investigate the role of oxidants in the activation of phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) and endogenous oxidative stress in the lung, acute inflammatory lung injury was induced by the instillation of hydrogen peroxide into the trachea of Sprague-Dawley rats. **Material and Method:** To prove the hypothesis that released oxidants from neutrophils activate the PLA<sub>2</sub> retrogradely, activities of PLA<sub>2</sub> and lysoplatelet activating factor acetyltransferase(lysoPAF AT) were assayed 5 hours after instillation of hydrogen peroxide. In addition, to confirm the impairing effects of the activation of PLA<sub>2</sub> associated with endogenous oxidative stress, lung weight/body weight ratio(Lx10<sup>-3</sup>/B), protein contents(mg/two lungs) in bronchoalveolar lavage(BAL) were measured. As neutrophilic respiratory burst has been known to play a pivotal role in the genesis of endogenous oxidative stress associated with acute inflammatory lung injury, BAL neutrophils counts and level of lung myeloperoxidase(MPO) were measured after hydrogen peroxide insult. Morphological and histochemical studies were also performed to identify the effect of the endogenous oxidative stress. **Result:** Five hours after hydrogen peroxide instillation, lungs showed marked infiltration of neutrophils and increased weight. Protein contents in BAL increased significantly compared to those of normal rats. PLA<sub>2</sub> activity was enhanced in the hydrogen peroxide instilled group. Interestingly, the accelerated production of platelet activating factor(PAF) was confirmed by the increased activity of lysoPAF AT in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> employed lung. Morphologically, light microscopic findings of lungs after instillation of hydrogen peroxide showed atelectasis and infiltration of inflammatory cells, which was thought to be caused by lipid mediators produced by PLA<sub>2</sub> activation. In cerium chloride cytochemical electron microscopy, dense deposits of cerrous perhydroxide were identified. In

---

\*대구 가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Catholic University of Daegu

†본 논문은 제 33차 추계학회에서 발표되었음

논문접수일 : 2002년 2월 28일 심사통과일 : 2002년 5월 4일

책임저자 : 권오춘(705-718) 대구광역시 남구 대명4동 3056-6, 대구 가톨릭의료원 흉부외과. (Tel) 053-650-4566, (Fax) 053-626-6963

E-mail : ockwon@cataegu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

contrast, no deposit of cerrous perhydroxide was found in the normal lung. **Conclusion:** As all these findings were consistent with the lung injury caused by neutrophilic oxidative stress, it is suggested that the activation of PLA<sub>2</sub> by oxidants might participate in the genesis of endogenous oxidative stress. Collectively, the positive feedback loop between oxidative stress and PLA<sub>2</sub> activation may participate in the pathogenesis of Adult Respiratory Distress Syndrome(ARDS).

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:343-9)

**Key Words:** 1. Phospholipase A  
2. Lung injuries  
3. Respiratory distress syndrome

## 서 론

급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)은 패혈증, 화상, 다발성 외상 등의 다양한 병인에 의해 발병하는 급성 염증성 폐질환이다. 최근 국내의 역학적인 조사에 의하면 그 사망률은 70%를 넘으며<sup>1)</sup> 이에 대한 치료는 주로 대증적인 요법에 그치며 특별한 치료법이 개발되어 있지 않다.

최근의 ARDS의 병인론(pathogenesis)에 관한 연구동향은 여러 가지 발병원인에도 불구하고 병리학적으로는 폐장내의 염증반응이 이러한 염증성 급성 폐부종의 원인이라고 생각되므로 폐장내의 염증반응의 기전에 대한 연구가 주로 이루어지고 있다. Abraham등<sup>2)</sup>은 패혈증 및 출혈성 shock에 의한 ARDS의 동물모델에서 주로 염증성 cytokine에 의한 혈관내피세포의 손상을 주장하고 있으며, 또한 Koh등<sup>3)</sup>은 염증성 cytokine에 의한 폐장 내의 염증반응은 호중구의 폐장내 침윤에 따른 respiratory burst에 의한 oxidative stress가 그 원인일 것으로 추정하고 있다.

산소기가 조직의 손상을 유발하는 기전은 주로 세포막 지질의 산화에 따른 lipid peroxide의 생성에 의한다고 보여지나 아직도 ARDS시에 나타나는 혈관내피세포의 손상이 산소기에 의한다는 주장에는 논란이 많다. 또 한가지의 이론은 내독소 및 염증성 cytokine에 의한 폐장의 손상이 염증성 지질분자의 대량생성에 의한 것이라는 주장이다. Lee등<sup>4)</sup>은 최근, ARDS의 동물모델에서 조직내의 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 활성화되면 이 때 생성되는 유리지방산의 일종인 arachidonic acid나 platelet activating factor(PAF)에 의해 호중구막의 reduced Nicotinamide Adenosine dinucleotide phosphate(NADPH) oxidase가 활성화됨으로써 산소기가 과량 생성되어 조직내의 superoxide dismutase(SOD)나 catalase가 이를 감당하지 못하여 조직의 손상이 유발된다고 주장하고 있다. 이러한 주장을 뒷

받침하는 근거로는 Abraham등<sup>3)</sup>, Lee등<sup>4)</sup>은 폐장내 호중구의 심한 침윤과 이에 따른 폐장내 산소기의 생성이 현저하다는 점을 들고 있다.

ARDS에 있어서의 PLA<sub>2</sub> 및 PAF의 역할은 호중구의 산소기 생성과 관련하여 생각할 때에 분명히 병인론에 관여한다고 생각된다. 즉 cytokine이나 내독소, intestinal ischemia/reperfusion(I/R)에 의해서 급성 폐손상이 유발되는 경우 폐장내에서의 PLA<sub>2</sub>의 활성도가 증가한다는 점 그리고 폐장내의 PAF의 함량이 증가하는 것 등으로 미루어 PLA<sub>2</sub>의 활성화는 ARDS의 직접적인 원인이라고 생각된다. 그러나 어떠한 원인에 의해 ARDS시 폐장 내의 PLA<sub>2</sub>가 활성화되는지는 확실히 밝혀져 있지 않다. Interleukin-1(IL-1), Tumor necrosis factor(TNF)에 의한 조직의 염증반응은 세포질내의 Protein Kinase C(PKC)의 활성화에 따른 PLA<sub>2</sub>의 활성화가 유력한 기전이라고 일부 보고되고 있다<sup>5)</sup>. 동시에 시험관내 실험에서는 산소기의 일종인 과산화수소가 2차 전령(secondary messenger)으로 작용하여 PLA<sub>2</sub>의 활성화에도 관여한다고 한다<sup>6)</sup>. 그러나 ARDS의 병인 중 Multiple Organ Failure(MOF) 같은 경우는 폐장에서 멀리 떨어진 장기의 염증성 변화가 어떻게 폐장 내의 PLA<sub>2</sub>를 활성화시키는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. Forehand등<sup>7)</sup>은 호중구에서 산소기가 생성되는 기전은 PLA<sub>2</sub>가 활성화됨으로써 유리지방산의 작용에 의해 NADPH oxidase가 활성화되어 산소기가 생성된다고 추정하고 있다.

이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 다음과 같은 가설을 세워 ARDS의 발병기전을 산소기, 호중구 및 염증성 지질분자와 관련하여 해석하려고 시도하였다.

즉 ARDS시에는 폐장내 염증반응이 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 의해 유도되고 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 의해 생성된 superoxide anion은 과산화수소를 형성한다. 동시에 과산화수소는 익으로 PLA<sub>2</sub>를 활성화시켜 염증성 지질분자 특히 PAF의 생성을 촉진한다. 또한 PAF는 호중구에서 NADPH oxidase를 활성화시킴으

로서 산소기의 생성을 증가시키고 활성화된 산소기는 다시 PLA<sub>2</sub>를 활성화시킨다. 즉 PLA<sub>2</sub>의 대사산물인 arachidonic acid 및 PAF에 의해 호중구에서 생성된 과산화수소가 역으로 PLA<sub>2</sub>를 활성화시키는 positive feedback loop를 형성한다.

따라서 본 연구에서는 과산화수소를 이용하여 급성 폐손상을 유발한 뒤 이때 폐장의 손상이 호중구의 폐장내 침윤, PLA<sub>2</sub>의 활성화, PAF의 생성과 관계가 있는지 또한 PLA<sub>2</sub>를 활성화시켜 급성염증성반응을 일으키는 주된 원인인자로서 과산화수소의 역할에 대해 알아보하고자 하였다.

### 대상 및 방법

#### 실험재료 :

실험동물은 체중 300g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 암, 수 구별 없이 사용하였다. 실험군으로는 기도내 생리적 식염수를 투여한 대조군과 기도내 과산화수소를 투여한 군으로 구분하였다.

PLA<sub>2</sub> 및 lysoPAF acetyltransferase (lysoPAF AT)를 측정하기 위하여 사용한 3H-dipalmitoylphosphatidylcholine 및 3H-acetyl coA는 NEN사(Boston, MA, USA)에서 구입하였고 나머지 시약들은 모두 Sigma사(Sigma, St. Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

#### 실험동물에서의 급성폐손상의 유발 :

흰쥐에서 급성 폐손상을 유발하기 위하여 과산화수소를 기도내로 직접 분무하였다. 즉 흰쥐를 enflurane으로 마취후 기도내에 26 gauge의 주사침을 삽입한 뒤 60mm의 과산화수소 0.5ml를 분무, 주입하였다. 과산화수소 주입 5시간 뒤에는 ketamine hydrochloride(100 mg/kg) 및 xylazine(20 mg/kg)으로 마취한 뒤 기관절제술을 시행하여 Harvard계 rodent ventilator에 연결하고 개흉술(thoracotomy)을 시행하였다. 그 뒤 폐동맥에 catheter를 삽입하고 perfusion pump(Millipore, USA)에 연결한 뒤 생리적 식염수로 폐장의 관류를 시행하여 폐장내의 혈액을 제거한 뒤 양측 폐장을 절제한 뒤 -70℃에 즉시 동결, 보관하였다.

#### 급성폐부종의 확인 :

과산화수소 투여 후 5시간 뒤에 급성 폐손상이 온 것을 확인하기 위하여 bronchoalveolar lavage(BAL)내의 단백질량을 측정하고 gravimetry도 시행하였다. 즉 각 실험동물에서의 폐장을 8.0ml의 생리적 식염수로 기관지 폐포세척을 시행하여 6.0ml정도의 폐세척액을 얻은 후 세포성분을 제거하고 상층액을 이용하여 단백질량을 Brown등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 측정하

였다. 또 실험동물을 마취한 뒤 체중을 재고, 양측 폐장을 적출 직후 무게를 측정하여 각 실험동물에서의 폐장의 무게/체중의 비(Lung weight×10<sup>3</sup>/Body weight ratio)를 산출하였다.

#### 폐장내 myeloperoxidase (MPO)의 측정 :

급성 폐손상이 유발된 폐장내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 Goldblum등의 방법<sup>9)</sup>에 따라 lung myeloperoxidase를 측정하였다. 즉 동결 보존된 좌측폐장을 녹인후 20mM potassium phosphate(pH 7.4)용액 4.0ml에서 분쇄한 뒤 40,000g에서 30분간 원심분리 하였다. 그후 상층액은 버리고 pellet을 다시 0.5% hexadecyltrimethylbromide(0.5% HTAB in 50mM potassium phosphate, pH 6.0)용액에 재부유시킨 뒤 90초간 sonication한 뒤 60℃의 수조에서 120분간 incubation하였다. 그 뒤 분쇄액 1.0ml를 취하여 40,000g에서 원심분리한 뒤 상층액을 0.0168g의 o-dianisidine이 함유된 과산화수소용액(0.0005 M)과 반응시킨 뒤 UV-spectrophotometer를 이용하여 enzyme kinetics를 파장 460nm에서 시행하여 MPO의 활성도를 측정하였다.

#### 폐장내 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)활성도의 측정 :

폐장내 PLA<sub>2</sub>의 활성도는 Katsumata등의 방법<sup>10)</sup>에 따라 시행하였다. 즉 동결보존된 우측폐장을 분쇄용액(0.25 M sucrose in 1 mM dithiothreitol) 4.0ml에서 분쇄한 뒤 90초간 4℃에서 sonication하였다. 이 조직의 lysate 0.1ml와 PLA<sub>2</sub> 반응 완충용액 (100 mM glycine, 2.5 mM deoxycholate, 10 g/L, BSA, 0.1 mM lecithin, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.75 mM ethanol) 880 μl와 2.0 μCi의 3H-Dipalmitoylphosphatidylcholine를 혼합한 뒤 37℃의 수조에서 60분간 반응시켰다. 그 뒤 5%의 Triton X-100가 함유된 200 mM EDTA-용액 0.2ml로 반응을 중지시킨 뒤 1g의 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 단백질을 침전시키고 여기에 5.0ml의 acidic hexane(hexane containing 0.5% glacial acetic acid)을 가하여 유리 지방산을 분리하였다. 유리지방산이 포함된 1.0ml의 hexane과 4.0ml의 scintillation cocktail용액을 혼합한 뒤 beta-scintillation spectroscopy를 시행하였다. PLA<sub>2</sub> 1 unit는 1분당 37℃에서 1 μmol의 유리지방산이 생성되는 것으로 정의하였다.

#### 폐장내 lysoPAF acetyltransferase (lysoPAF AT) 활성도의 측정 :

과산화수소에 의한 급성폐손상시 폐장내 PAF의 생성에 관여하는 효소인 lysoPAF AT의 활성도를 Bussolino등의 방법에 따라 측정하였다. 즉 -70℃에 동결보존된 우측 폐장을 분쇄 완충용액 (0.25 M sucrose in 1 mM DTT) 4.0ml에서 분쇄한 뒤 4℃에서 sonication하여 cell lysate를 얻었다. 이 lysate

**Table 1.** Changes in lung weight/body weight ratio  $\{L(\times 10^{-3})/B\}$  and protein contents (mg/two lungs) in BAL of rats given hydrogen peroxide intratracheally

	$L(\times 10^{-3})/B$	protein contents
Control	4.7±0.198(n=10)	2.60±0.171(n=9)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> instilled	6.6±0.285*(n=9)	6.95±0.543*(n <sup>#</sup> =10)

BAL:bronchoalveolar lavage

\* Values are given as mean±S.E.

# n indicates number of experiments.

p<0.01, control vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> instilled.

0.1ml를 1.0 µCi의 3H-acetyl coA가 함유된 HBSS완충용액(40 µM lyso PAF, 200 µM acetyl coA, 40 µg BSA) 0.8ml와 혼합한 후 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤 3.0ml의 chlorform-methanol 혼합액(1:2, v/v)를 가하여 반응을 중지시키고 Bligh와 Dyer의 법으로 지질을 추출한 뒤 4.0ml의 scintillation cocktail과 혼합한 뒤 PAF의 생성을 측정하였다. Lyso PAF AT의 활성도는 형성된 PAF의 양/min/g of wet lung으로 표시하였다.

폐장의 미세구조 및 세포화학적 방법에 의한 조직내 과산화수소의 관찰 :

**폐장의 미세구조적 관찰 :**

폐장의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 폐장조직을 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 밀폐된 용기에서 진공을 이용하여 조직 내 공기를 제거하였다. 전 고정이 끝난 조직은 1.0 M phosphate buffer(pH 7.4)로 수세한 뒤 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. Alcohol-propylene oxide계열로 순차적으로 증가하는 농도로 탈수하고 epoxy-resin에 포매하였다. 포매 된 조직을 열중합 시키고 60~70nm로 초박절편한 뒤 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 뒤 투과전자현미경(9H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

**세포화학적 관찰 :**

폐장내 형성된 또는 투여된 과산화수소를 관찰하기 위하여 Hobson등의 방법<sup>11)</sup>에 따라 폐조직을 적출 즉시 반응용액(2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 0.1 M Tris-maleate buffer-pH 7.5, 7% sucrose, 0.0002% Triton X-100)에 담그고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 조직을 세척 한 후 1% osmium tetroxide로 고정하고 탈수, 포매, 초박절편 후 uranyl citrate로만 염색하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

**통계처리 :**

모든 성적은 평균±표준오차로 표시하였고, 각 성적의 유의성은 non-paired, two-tailed Student's t-test로 검정하여 p <0.05

**Table 2.** Effects of hydrogen peroxide on pulmonary MPO activity (Units/g of wet lung) and numbers of neutrophils (millions/two lungs) in BAL of rats given hydrogen peroxide intratracheally

	MPO	neutrophils
Control	5.17±0.588(n=10)	0.36±0.006(n=8)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> instilled	20.74±2.180*(n=8)	1.62±0.387*(n <sup>#</sup> =9)

MPO : myeloperoxidase, BAL : bronchoalveolar lavage

\* Values are given as mean±S.E.

# n indicates number of experiments.

p<0.01, control vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> instilled.

**Table 3.** Comparison of PLA<sub>2</sub> activity(mU/g of wet lung) between control and hydrogen peroxide instilled lungs of rats

Control(n=12)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> instilled(n <sup>#</sup> =9)
12.3±0.419	19.3±0.73 <sup>†</sup>

PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>

\* Values are given as mean±S.E.

# n indicates number of experiments.

† p<0.01, control vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> instilled.

를 유의하다고 인정하였다.

**결 과**

과산화수소에 의한 급성 폐손상의 기전이 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 따른 호중구의 respiratory burst 및 염증성 지질 분자의 생성임을 알아보기 위한 실험의 결과는 다음과 같다.

급성 폐부종을 나타내는 지표로서의 lung weight( $\times 10^{-3}$ )/body weight ratio는 대조군에서 4.7±0.198이었으나 과산화수소 투여 후 5시간 후에는 6.6±0.285로 현저히 (p <0.01)증가하였다. 이 결과는 과산화투여 후 폐장내 수분의 저류가 생겼다는 것을 의미한다.

또한 폐장내 모세혈관의 혈관내피세포의 손상을 나타내는 지표인 BAL내의 단백질량도 대조군의 2.60±0.171(mg/two lungs)에서 과산화수소 투여군에서는 6.95±0.543(mg/two lungs)로 현저히 (p <0.01)증가하여 과산화수소에 의한 급성 폐손상이 일어났음을 확인하였다 (Table 1).

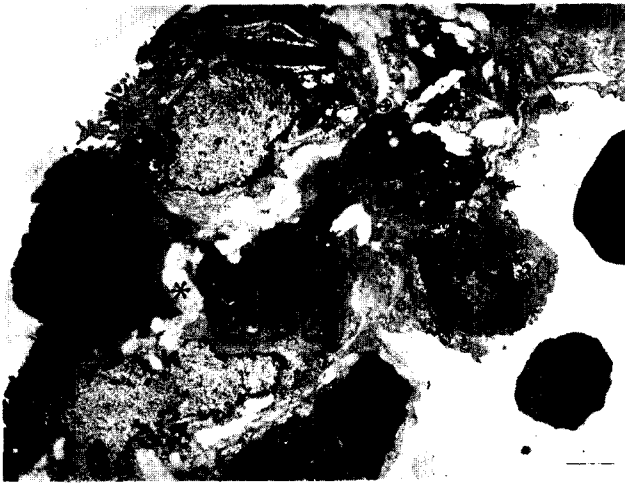
과산화수소 투여 후 폐장내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 시행한 MPO활성도의 측정결과 및 BAL내의 백혈구의 산정결과는 Table 2와 같다. MPO는 대조군의 5.17±0.588(U/g of wet lung)에서 과산화수소 투여군에서는 20.74±2.180(U/g of wet lung)으로 현저히 (p<0.01) 증가하였고 BAL 내의 호중구의 수도 0.36±0.006(million/two lungs)에서 1.62±0.387(millions/two lungs)로 유의하게(p<0.01) 증가하였다.

폐장내 PLA<sub>2</sub>의 활성도의 변화는 Table 3과 같다. 대조군에

**Table 4.** Comparison of lysoPAF AT activity (nmol PAF/min/g of wet lung) between control and hydrogen instilled lungs of rats

Control(n=12)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> instilled(n <sup>#</sup> =8)
83.0±10.76	117.8±8.13*

lysoPAF AT :lysoplatelet activating factor acetyltransferase  
\* Values are given as mean±S.E.  
# n indicates number of experiments.  
p<0.01, control vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> instilled.



**Fig. 1.** Electron microscopic findings of a lung tissue treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Infiltration of neutrophils with resultant edematous endothelial cells and interstium is shown. Lamella bodies are vacuolated and degenerated. bar indicates 2.0µm(TEM, ×10,200)

서는 12.3±0.419(mU/g of wet lung)이었으나 과산화수소 투여 후에는 19.3±0.73(mU/g of wet lung)으로 현저히 (p<0.01) 증가하여 과산화수소에 의한 PLA<sub>2</sub>의 활성화의 증가를 확인할 수 있었다.

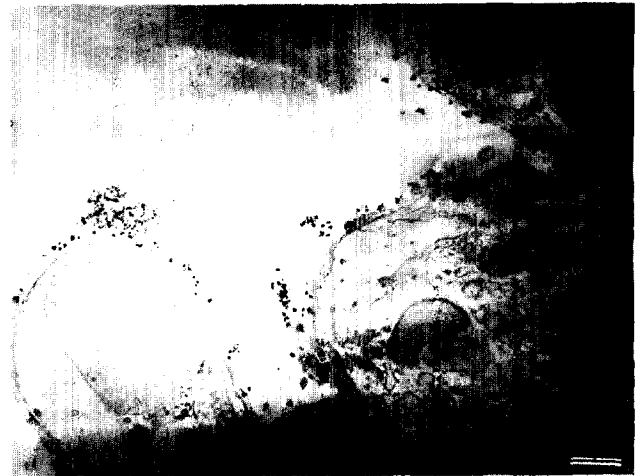
폐장내 과산화수소의 투여에 따른 lysoPAF AT의 활성도의 변화는 Table 4와 같다. 대조군에서의 lysoPAF AT의 활성도는 83.0±10.76(nmol PAF/min/g of wet lung)이었으나 과산화수소 투여 후에는 117.8±8.13(nmol PAF/min/g of wet lung)으로 증가하여 PAF의 remodelling이 증가함을 관찰할 수 있었다.

대조군에 비하여 과산화수소를 투여한 군(Fig. 1)에서는 제 1, 2형 폐포세포의 손상 및 호중구의 침윤이 관찰되었고, 혈관내피세포의 괴사 및 부종이 관찰되었다.

폐장내의 과산화수소의 침윤 및 생성을 알아보기 위해 시행한 세포 화학적인 관찰에서는 폐장의 전부분에 걸쳐서 과산화수소의 반응물인 cerrous perhydroxide의 침전이 현저히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 2)

## 고 찰

급성호흡곤란증후군(ARDS)의 병인론 중 산소기의 작용에



**Fig. 2.** Cytochemical electron microscopic findings of a lung tissue treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Deposits of cerrous perhydroxide are shown along the alveolar lining cells. bar indicates 2.0µm(TEM, ×10,000)

의한 조직손상의 기전은 주로 호중구의 침윤에 따른 respiratory burst에 의한 oxidative stress가 그 원인으로 생각되고 있다. 호중구는 인체의 유동적 방어체계를 구성하는 탐식세포이면서 동시에 과다한 조직내로의 침윤은 조직의 손상을 유발한다.

Repine<sup>12)</sup>은 이러한 호중구의 작용이 바로 ARDS의 주된 원인이라고 보고하고 있다. 호중구에서 생성되는 산소기는 주로 singlet oxygen이나 superoxide anion으로서 superoxide dismutase(SOD)의 작용에 의하여 과산화수소로 변환된다. 이러한 과다한 과산화수소의 생성은 Fenton 반응에 의해 유독한 hydroxyl radical을 형성할 것으로 생각되지만 과산화수소 자체도 조직의 손상에 관여한다. 본 연구에서는 ARDS의 동물 모델로서 기도내에 직접 과산화수소를 주입하여 폐손상을 유발하였는데 그 목적은 첫째, 산소기에 의한 직접적인 조직의 손상, 특히 혈관내피세포의 손상을 보기 위함이고 둘째는 산소기에 의해 조직내의 PLA<sub>2</sub>가 활성화되는 것을 관찰하는 것이 그 목적이었다. Dana 등<sup>13)</sup>은 호중구에서의 산소기의 생성은 호중구막에 존재하는 NADPH oxidase가 PLA<sub>2</sub>에 의해 분해된 인지질의 대사물 중 유리지방산, 그 중에서도 arachidonic acid에 의한다고 보고하고 있다.

이러한 이론은 호중구에서의 산소기의 생성원인이 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 의한다는 것을 의미한다. PLA<sub>2</sub>는 유리지방산 뿐만 아니라 PAF의 생성도 증가시킨다고 알려져 있으므로<sup>14)</sup> 결국 PLA<sub>2</sub>의 활성화는 PAF에 의한 산소기의 생성과 직접적인 관계가 있다고 생각된다. 그렇다면 ARDS에서 조직내 PLA<sub>2</sub>를 활성화시키는 원인은 무엇인가?

ARDS 환자의 폐세척액 내에는 IL-1이나 TNF같은 염증성 cytokine이 증가하는데, 이중 TNF나 IL-1은 PLA<sub>2</sub>를 직접 활

성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>. 즉 IL-1에 의한 폐장내 PLA<sub>2</sub>의 활성화도의 증가와 이에 따른 호중구의 침윤에 따라 폐장조직의 손상이 유발되고 이 때의 폐장조직의 손상은 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 따라 PAF가 증가하고 동시에 호중구에서의 산소기의 생성 증가에 따른 것으로 보고 있다. 이러한 결과들은 PLA<sub>2</sub>의 활성화가 조직에서의 산소기 형성을 증가시킨다는 것을 증명하는 것이지만 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 관여하는 직접적인 기전에 대해서는 확실히 알려져 있지 않다.

본 연구에서 보듯이 과산화수소는 폐장내의 PLA<sub>2</sub>를 활성화시키면서 동시에 호중구의 침윤의 증가, 폐세척액내의 호중구의 수를 증가시키며 동시에 조직내의 산소기의 생성증가를 유발하고 있다. 이러한 실험결과는 Boyer등<sup>16)</sup>의 실험결과와 일치하는 것으로서 과산화수소가 PLA<sub>2</sub>를 직접적으로 활성화시킨다는 것이다.

본 연구에서 보이는 과산화수소 투여 후 5시간 뒤에 폐부종이 유발되고 lung leak가 생성된 원인은 과산화수소 자체의 PLA<sub>2</sub> 활성화에 따른 유리지방산, LTB<sub>4</sub>, PAF 등의 염증성 지질분자의 생성증가가 그 원인이 아닌가 생각된다. LTB<sub>4</sub>나 PAF는 호중구의 강력한 화학주성을 유발하는 물질이고 이중에서도 특히 PAF는 호중구에 직접 작용, NADPH oxidase를 자극하여 산소기의 생성을 증가시킨다<sup>17)</sup>. 본 실험의 결과에서도 보듯이 과산화수소는 PAF의 생성에 관여하는 lysoPAFAT의 작용을 현저히 증가시킴을 볼 수 있다. PAF는 염증반응시 lysoPAF가 PAF로 변환되는 remodelling의 과정을 통해 합성된다. 본 실험에서는 과산화수소의 작용에 의해 PLA<sub>2</sub>가 활성화되고 이에 따른 lysophosphatide의 증가, 그중에서도 특히 lysoPAF의 증가가 PAF remodelling의 원인이 된 것으로 추정된다. 즉 과산화수소의 작용에 의해 PAF의 생성이 증가하였다고 볼 수 있다.

PLA<sub>2</sub>의 활성화에 따른 조직 손상의 원인은 본 실험의 결과로 미뤄보면 과산화수소의 직접적인 작용에 더하여 호중구의 침윤에 따른 산소기의 과도한 생성이 그 원인이 아닌가 생각된다. 이러한 추론의 또 다른 증거로는 폐장의 형태학적인 변화 및 세포화학적 연구를 통한 과산화수소의 생성을 들 수 있다.

과산화수소 투여 후 5시간 뒤에 투여한 과산화수소는 이미 그 기능을 상실한 시점에서 폐장은 무기폐 및 혈관내피세포의 손상, 호중구의 침윤 및 산소기의 조직 내 증가 등을 보였다. 특히 제2형 폐포세포는 산소기의 작용에 의해 lamellar body가 팽대되고 lamellar body의 공포화 현상을 보이는데, 본 연구에서도 이러한 현상들이 관찰되었다. Martensson등<sup>18)</sup> 및 Lee등<sup>19)</sup>은 폐장의 oxidative stress에 의한 손상은 ARDS시에 보이는 폐장조직의 미세구조 변화와 유사하며 특히 제2형 폐포세포의 변형, lamellar body 내의 surfactant의 고

갈을 보인다고 보고하고 있다.

본 연구에서 보이는 이러한 변화들은 결국 호중구에서 과다한 산소기가 생성되기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 토대로 다음과 같은 결론을 추론할 수 있다고 생각한다.

ARDS 시에 보이는 PLA<sub>2</sub>의 활성화는 초기에는 Suzuki등<sup>20)</sup>의 보고와 같이 xanthine oxidase에 의해 생성된 산소기에 의해 일어나거나 혹은 TNF나 IL-1과 같은 cytokine에 의해 일어난다. 이때 활성화된 PLA<sub>2</sub>는 탐식세포 특히 호중구의 화학주성을 유발하는 Leukotriene B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)나 PAF의 생성을 증가시킬 뿐만 아니라 동시에 호중구에서의 산소기의 생성도 증가시킨다. 동시에 생성된 산소기는 다시 역으로 PLA<sub>2</sub>를 활성화시키는 positive feedback loop를 형성함으로써 염증반응을 점점 강화시키는 것으로 생각된다. 이러한 과정은 결국 조직의 손상 특히 혈관내피세포의 손상을 유발하는 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구 결과를 토대로 다음과 같은 결론을 추론해 볼 수 있다. 호중구에 의해 생성된 과산화수소가 조직에서의 PLA<sub>2</sub>의 활성화를 일으키고 그로 인해 생성된 arachidonic acid 및 PAF가 호중구를 활성화시켜 조직의 oxidative stress가 일어난다는 것이다. 그러나 과산화수소에 의해 일어나는 PLA<sub>2</sub>의 활성화의 근본적인 기전은 밝혀지지 않았으므로 향후 연구되어야 할 과제로 남아있다.

## 참 고 문 헌

1. 대한결핵 및 호흡기학회 급성호흡곤란증후군 전국 실태조사 소위원회. 급성호흡곤란증후군의 전국실태조사보고. 결핵 및 호흡기질환 1997; 44: 25-43.
2. Abram E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. *Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage or endotoxemia-induced acute lung injury*. Am J Physiol (Lung Cellular Mol. Physiol) 2000; 279: 1137-45.
3. 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.
4. Lee YM, Park Y, Kim T, Cho HG, Lee YJ, Repine JE. *Effect of the inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> in generation of free radicals in intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury*. Korean J Physiol Pharmacol 1999; 3: 263-73.
5. Murakami M, Jonathan PA, Austen KF. *Cytokine regulation of mast cell protease phenotype and arachidonic acid metabolism*. Ann NY Acad Sci 1994; 744: 84-98.

6. Madesh M, Balasubramanian KA. *Activation of liver mitochondrial phospholipase A<sub>2</sub> by superoxide*. Arch Biochem Biophys 1997; 346: 187-92.
7. Forehand JR, Johnston RJ Jr, Bomalaski JS. *Phospholipase A<sub>2</sub> activity in human neutrophils. Stimulation by lipopolysaccharide and possible involvement in priming for an enhanced respiratory burst*. J Immunol 1993; 151: 4918-25.
8. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. *Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance*. Anal Biochem 1989; 180: 136-9.
9. Goldblum SE, Wu KM. *Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits*. J Appl Physiol 1985; 59: 1978-85.
10. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. *Rapid assay for activity of phospholipase A<sub>2</sub> using radioactive substrate*. Anal Biochem 1986; 154: 676-81.
11. Hobson J, Wright J, Churg A. *Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants*. Am J Pathol 1991;139:573-80.
12. Repine JE. *Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome*. Lancet 1992; 339: 466-9.
13. Dana R, Leto TL, Levy R. *Essential requirement of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> for activation of the phagocyte NADPH oxidase*. J Biol Chem 1995; 270: 26543-9.
14. Fujishima S, Aikawa N. *Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation*. Intensive Care Med 1995; 21: 277-85.
15. Pfeilschifter J, Leighton J, Pignat W, Maerki F, Vosberk K. *Cyclic AMP mimics, but does not mediate, interleukin-1 and tumor-necrosis-factor-stimulated phospholipase A<sub>2</sub> secretion from rat mesangial cells*. Biochem J 1991; 273: 199-204.
16. Boyer SC, Bannenberg GL, Nere EPA, Ryefeldt A, Moldeus P. *Evidence for the activation of the signal responsive phospholipase A<sub>2</sub> by exogenous hydrogen peroxide*. Biochem Pharmacol 1995; 50: 753-61.
17. Gay JC. *Priming of neutrophil oxidative responses by platelet-activating factor*. J Lipid Mediator 1990; 2: S161-75.
18. Martenson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PAM, Meister A. *Inhibition of glutathione synthesis in the new born rats : A model for endogenously produced oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 9360-4.
19. 이영만, 박윤엽, 고윤식. NNNMU로 유도된 급성 호흡곤란 증후군 흰쥐 폐장에서의 dexamethasone에 의한 PLA<sub>2</sub>, GGT의 활성도 및 형태학적인 변화. 결핵 및 호흡기질 환 1996;43:925-35.
20. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. *Oxidants as stimulators of signal transduction*. Free Radical Biol Med 1997; 22: 269-85.

=국문초록=

**배경:** 흰쥐의 기도에 과산화수소를 분무함으로써 급성 염증성 반응을 일으켜 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)와 endogenous oxidative stress에 산소기가 어떤 영향을 미치는지에 대해 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 호중구에 의해 유리된 산소기가 phospholipase A<sub>2</sub>를 다시 활성화시킨다는 가설을 증명하기 위해 phospholipase A<sub>2</sub>의 활성도와 lysoplatelet activating factor acetyltransferase(lysoPAF AT)를 과산화수소 분무 5시간 후에 측정하였다. 또한, PLA<sub>2</sub> 활성화에 따른 나쁜 영향에 대해 알아보기 위하여 폐 질량/체중의 비, bronchoalveolar lavage(BAL) 내의 단백 함량을 측정하였다. 폐장 내의 염증반응은 호중구의 폐장내 침윤에 따른 respiratory burst에 의한 oxidative stress가 그 원인일 것으로 추정되므로 BAL 내의 호중구 수와 myeloperoxidase(MPO)수치를 측정하였다. 또한 oxidative stress에 의한 영향을 확인하기 위하여 형태학적, 조직화학적 검사도 시행하였다. **결과:** 과산화수소를 투여하고 5시간 뒤에 폐장은 심한 호중구의 침윤 및 폐 질량의 증가를 볼 수 있었다. BAL 내의 단백 함량은 정상폐의 경우에서보다 훨씬 증가된 것을 볼 수 있었다. PLA<sub>2</sub>의 활성도 또한 증가되어 있었다. 흥미롭게도, 과산화수소를 투여한 폐에서 lysoPAF AT 활성도의 증가를 측정함으로써 platelet activating factor(PAF) 생성의 증가를 확인할 수 있었다. 형태학적으로, 광학현미경상 폐장의 무기폐 및 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있었다. 이것은 PLA<sub>2</sub>의 활성화에 따라 생성된 염증성 지질 분자에 의해 초래된 결과라고 생각되어진다. Cerium chloride 세포화학 전자 현미경상 많은 양의 cerous perhydroxide의 침윤을 관찰할 수 있었다. 반면 정상 폐장에서는 전혀 관찰되지 않았다. **결론:** 이상의 모든 결과들은 호중구에 의한 oxidative stress에 의한 폐장의 손상과 일치하므로 산소기에 의해 생성된 PLA<sub>2</sub>가 내인성 oxidative stress에 관여한다고 볼 수 있다. 결론적으로, oxidative stress와 PLA<sub>2</sub> 활성화 사이의 positive feedback loop이 호흡곤란증후군(Adult Respiratory Distress Syndrome, ARDS)의 병인에 관여한다고 볼 수 있다.

중심 단어: 1. 포스포리파제 A  
2. 폐손상  
3. 호흡곤란증후군