Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 53, No. 4, Oct, 2002

□ 원 저 □

기관내 내독소 투여로 유도한 백서의 급성 폐손상 모델에서 surfactant가 호중구의 아포토시스에 미치는 영향

중앙대학교 의과대학 내과학교실

유지훈, 이병준, 정도영, 이상훈, 신종욱, 김재열, 박인원, 최병휘

=Abstract=

The Effects of Surfactant on Neutrophil Apoptosis in Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury in Rat

Ji Hoon Yoo, M.D., ByoungJun Lee, M.D., DoYoung Jeong, M.D., SangHoon Lee, M.D., JongWook Shin, M.D., Jae-Yeol Kim, M.D., InWon Park, M.D., ByoungWhui Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, ChungAng University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : The therapeutic effects of surfactant on acute lung injury derive not only from its recruiting action on collapsed alveoli but also from its anti-inflammatory effects. Pro-apoptotic action on alveolar neutrophils represents one of the important anti-inflammatory mechanisms of surfactant. In the present study, we evaluated the effects of surfactant on the apoptosis of human peripheral and rat alveolar neutrophils.

Methods : In the (Ed- the article is not definitely needed but it helps to separate the two prepositions 'in') *in vitro* study, human neutrophils were collected from healthy volunteers. An equal number of neutrophils (1×10^6) (Ed-confirm) was treated with LPS (10, 100, 1000ng/ml), surfactant (10, 100, 1000μg /ml), or a combination of LPS (1000ng/ml) and surfactant (10, 100, 1000μg/ml). After incubation for 24 hours, the apoptosis of neutrophils was evaluated by Annexin V method. In the *in vivo* study, induction of acute lung injury in SD rats by intra-tracheal instillation of LPS (5mg/kg) was followed by intra-tracheal administration of either surfactant (30mg/kg) or normal saline (5ml/kg). Twenty-four hours after LPS instillation, alveolar neutrophils were collected and the apoptotic rate was evaluated by Annexin V method. In addition, changes of the respiratory mechanics of rats (respiratory rate, tidal

Address for correspondence
Jae-Yeol Kim M.D.
Department of Internal Medicine, ChungAng University College of Medicine
65-207 Hankang ro 3 ga YongSan gu Seoul Korea 140-757
Phone : 02-748-9812 Fax : 02-798-4745 E-mail : jykimmd@hananet.net

volume, and airway resistance) were evaluated with one chamber body plethysmography before, and 23 hours after, LPS instillation.

Results : In the *in vitro* study, LPS treatment decreased the apoptosis of human peripheral blood neutrophils (control; 47.4±5.0%, LPS 10ng/ml; 30.6±10.8%, LPS 100ng/ml; 27.5±9.5%, LPS 1000ng/ml; 24.4±7.7%). The combination of low to moderate doses of surfactant with LPS promoted apoptosis (LPS 1000ng/ml + Surf 10μg/ml; 36.6±11.3%, LPS 1000ng/ml + Surf 100μg/ml; 41.3±11.2%). The high dose of surfactant (1000μg/ml) decreased apoptosis (24.4±7.7%) and augmented the anti-apoptotic effect of LPS (LPS 1000ng/ml + Surf 1000μg/ml; 19.8±5.4%). In the *in vivo* study, the apoptotic rate of alveolar neutrophils of surfactant-treated rats was higher than that of normal saline-treated rats (6.03±3.36% vs. 2.95±0.58%). The airway resistance (represented by Penh) of surfactant-treated rats was lower than that of normal saline-treated rats at 23 hours after LPS injury (2.64±0.69 vs. 4.51±2.24, $p<0.05$).

Conclusions : Surfactant promotes the apoptosis of human peripheral blood and rat alveolar neutrophils. Pro-apoptotic action on neutrophils represents one of the important anti-inflammatory mechanisms of surfactant. **(Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:409-419)**

Key words: Surfactant, Acute lung injury, Neutrophil, Apoptosis, Rat.

서 론

1967년 Ashbaugh와 Petty에 의한 보고 이후에 급성 호흡곤란증후군의 예후는 많이 호전되었으나 아직도 40% 이상의 치명율을 보이는 심각한 질환이다[1]. 현재까지 급성 호흡곤란 증후군의 예후를 호전시키려는 많은 치료적 시도들이 있었으나 아직까지 사망률을 감소시키는 것으로 확인된 치료 방법은 저용적의 기계환기(low tidal volume ventilation)[2]와 activated protein C 치료법[3] 정도에 불과한 실정이다.

표면활성물질(surfactant)은 인지질과 단백질의 복합체로 폐포의 표면장력을 감소시켜 폐포의 허탈을 방지한다. 실제로 표면활성물질은 소아형 호흡곤란증후군의 치료제로 많이 이용되고 있다[4-6]. 그리고 동물이나 사람의 급성폐손상에서 폐포의 염증을 감소시키고, 가스교환 및 혈역학적 호전을 유발하지만[7,8], 아직 사망률을 감소시키는 확실한 증거는 없다. 하지만 표면활성물질을 보다 효과적으로 허탈된 폐포까지 전달한다면 치료효과를 높일 수 있기 때문에 표면활성물질을 치료에 이용하려는 노력은 계속되고 있다.

급성호흡곤란증후군에서 표면활성물질의 치료 기전은 폐포허탈을 방지하는 물리적인 효과가 가장 중요하지만, 표면활성물질 자체의 항염증효과도 중요한 역할을 한다. 예를 들면, 표면활성물질은 대식세포로부터 proinflammatory cytokine의 분비를 억제하며[9], 호중구의 respiratory burst oxidase를 억제하여 활성화 산소기의 분비를 감소시킨다[10]. 또한 표면활성물질 단백 A와 D는 호중구의 세균탐식 능력을 촉진시키는 옵소닌 역할을 한다[11]. 그리고 표면활성물질이 폐포대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 산화질소의 생산을 저해하고[12], 또는 호중구의 부착을 억제한다는 보고들이 있다[13]. 그런데 흥미로운 사실은 표면활성물질이 호중구의 아포토시스를 촉진시킴으로써 항염증효과를 보일 수 있다는 사실이다[14]. 이에 본 연구에서는 표면활성물질

이 급성호흡곤란 증후군에서 호중구의 apoptosis를 촉진시킴으로서 항염증효과를 나타낸다는 가설 하에 다음과 같이 연구하였다.

대상 및 방법

I. *In vitro* study

1. 말초 혈액에서의 호중구 분리 및 배양

건강한 자원자의 혈액을 헤파린 주사기로 채혈한 뒤, 채혈된 혈액에 5% 덱스트란 용액(Sigma, USA)을 섞어서 혼합하고 30분간 적혈구를 침강시켰다. 상층의 혈장을 동량의 Ficoll(Sigma USA)층에 중첩시키고 1,450 rpm으로 15 분간 원심분리를 하여 호중구의 세포분획을 얻었다. 남은 적혈구는 1.8% 식염수로 용혈시키고, 동량의 증류수를 섞은 뒤, 두 차례 PBS로 세척하여 호중구를 분리하였다. Tryphan blue로 세포생존율 평가하였고, 분리된 호중구의 순도와 생존율은 모두 98% 이상이었다.

2. LPS를 이용한 호중구의 자극

위에서 분리된 호중구를 각각 $1x10^6$ 개씩 분주하여 RPMI 1640(GibcoBRL, USA)의 배지에 자가혈장과 함께 배양하였다. 대조군은 아무런 자극 없이 24 시간동안 배양하였다. 한 군은 E.coli 0114:B4의 LPS(Sigma, USA)를 10, 100, 그리고 1000ng/ml의 농도로 투여하였다. 다른 군은 Surfacten(Natural bovine surfactant, Fujisawa & Tanabe, Japan)을 10, 100, 그리고 1000μg/ml의 농도로 투여하였다. 나머지 군은 LPS 1000 ng/ml와 Surfacten(10, 100, 1000μg/ml)으로 동시에 투여하였다(Fig. 1). 각 실험은 3 회 이상 반복하여 평균치를 취하였다.

3. Annexin V-FITC apoptosis detection

호중구의 apoptosis는 Annexin V/FITC Kit

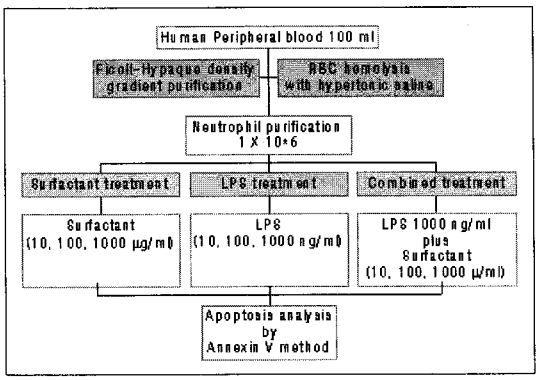


Fig. 1. Flow sheet of *in vitro* study.

(Bender MedSystems, Vienna, Austria)을 이용하여 측정하였다. 과정을 살펴보면, 배양된 세포를 원심분리한 뒤 2 차례 PBS로 washing하여 세포 침전 분획을 얻고, 여기에 500μl의 binding buffer로 세포 분획을 푼 후, 5μl의 annexin V FITC로 10 분간 실온에서 반응시키고, propidium iodide로 대비 염색하여 flow cytometry로 분석을 시행하였다. Annexin V 양성 propidium iodide 음성인 경우를 apoptosis 분획으로 판정하여 백분율로 표시하였다.

II. *In vivo* study

1. 대상동물의 종류 및 준비

체중 270-330g의 APF(animal pathogen free) 수컷 Sprague-Dawley rat을 실험 1 주일 전에 전달받아 안정시킨 후 연구에 이용하였다.

2. 동물용 체용적 변동기록기를 이용한 폐역학의 측정

기관 내로 LPS를 투여하기 전과 LPS 투여 23시간 후에 체용적 변동기록기(one-chamber body plethysmography: All medicus, Seoul, Korea)로 각각 20 분 정도 폐역학지표들을 측정하였다. 마취는 2% xylazine hydrochloride 0.2ml를 복강 내로 주사하

였다. 여러 지표들 중에 호흡수, 흡기유량, 그리고 enhanced pause(이하 Penh)를 측정 분석하였다. Penh는 한 주기의 호흡을 최대호기유량(peak expiratory flow)과 최대흡기유량(peak inspiratroy flow)의 비와 전반기호기량(former expiratory volume)에 비례하는 무차원의 수로 표시되며, 기도저항과 상관관계가 좋은 것으로 알려져 있다.

3. 급성폐손상의 유도 및 치료제 투여

흰쥐 5 마리를 한 군으로 하여 2개의 실험군으로 나누었다. 25mg/ml의 pentothal sodium(2mg/kg)을 복강 내로 주사하여 흰쥐를 마취시키고, 20 gauge angiocath tube로 기도에 삽관 후에, 대조군(group 1)은 기관 내로 2.5 mg/kg의 내독소를 2ml/kg의 용량으로 투여한 뒤 30분 후에 생리식염수(2 ml/kg)를 기관 내로 투여하였다. 표면활성물질군(group 2)은 기관 내로 같은 용량의 LPS를 투여한 뒤, 30 분 후에 15mg/ml의 표면활성물질(2ml/kg)을 투여하였다. 약물 주입 후 흰쥐의 폐에 고루 퍼지게 하기 위해 흰쥐를 여러 방향으로 조심스럽게 흔들었다. 이후에는 흰쥐의 머리쪽을 약 45°의 경사면에 30 분간 놓아서 약물이 주로 폐하부로 흘러 들어가게 하였다(Fig. 2).

4. 기관지 폐포세척술 시행 및 세척액에서 호중구 분리

동맥혈액 채취 후에 흰쥐의 목 앞쪽을 절개하여 기관을 노출시키고, 기관연골윤을 가로로 절개한 뒤 16 gauge의 angiocath tube를 넣어서 37 ℃로 데워진 생리식염수로 기관지폐포세척술을 시행하였다. 주사기에 3-way stopcock을 연결한 뒤 위쪽에 연결한 튜브의 10 cm 정도에 도달할 때까지 생리식염수를 주입해서 동일한 정도로 기관지폐포세척술이 시행되도록 조절하였다. 기관지 폐포세척액의 일부는 세포수 측정에 이용하였고 나머지는 호중구를 분리하는데 이용하였다.

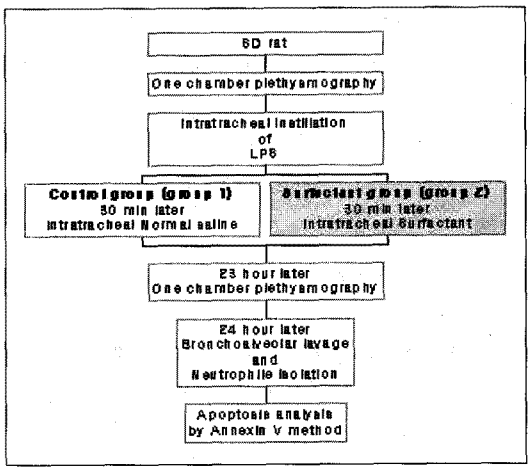


Fig. 2. Flow sheet of in vivo study.

5. 기관지폐포세척액의 호중구 apoptosis 평가

흰쥐의 기관지폐포세척액에서 분리한 호중구의 apoptosis는 사람의 말초혈액 호중구의 경우에서와 마찬가지로 Annexin V/FITC FACS analysis를 이용하여 평가하였다.

III. 통계처리

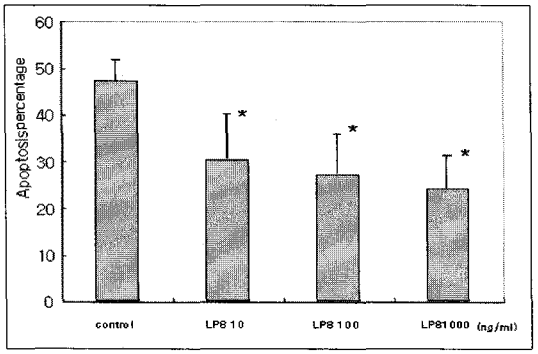
통계처리는 SPSS for window(release 9.0)을 이용하였다. 두 군 사이의 비교는 t-test를, 그리고 세 군 사이의 비교는 ANOVA test를 이용하였다. 세 군 사이에 통계적으로 의미있는 차이가 있는 경우에는 Duncan과 Tukey 방법을 이용하여 post hoc analysis를 시행하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에 통계적으로 의미 있다고 판정하였다.

결 과

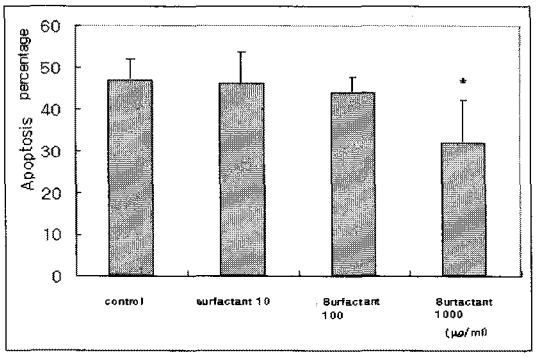
I. *In vitro* test

1. LPS가 사람 말초혈액 호중구의 아포토시스에 미치는 영향

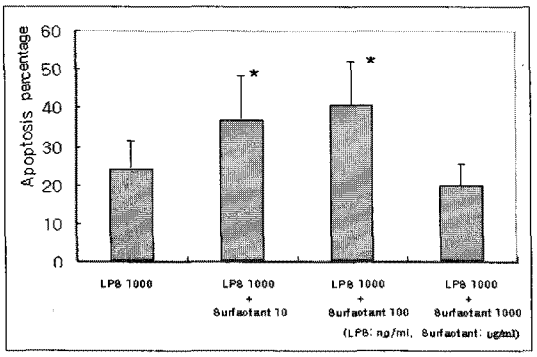
LPS를 10, 100, 그리고 1000ng/ml으로 농도를 올



(A)



(B)



(C)

Fig. 3. Percentage of apoptotic neutrophils after 24-hour incubation with or without LPS (10, 100, 1000ng/ml)(A), surfactant (10, 100, 1000μg/ml)(B), or a combination of LPS (1000ng/ml) and surfactant (10, 100, 1000μg/ml)(C). *: $p<0.05$.

리면서 투여하고, 24 시간 후에 측정한 호중구의 아포토시스 백분율(평균±표준편차)은 각각 30.63±10.87, 27.57±9.47, 그리고 24.41±7.65%로 대조군(47.41±4.96%)보다 유의하게 낮았다($p<0.05$). LPS 농도의 증가에 따라 호중구의 apoptosis가 더욱 감소하는 경향을 보였지만 통계적 의미는 없었다(Fig. 3A).

2. 표면활성물질이 사람 말초혈액 호중구의 아포토시스에 미치는 영향

표면활성물질을 각각 10, 100, 그리고 1000μg/ml로 농도를 올리면서 투여하고, 24 시간 후에 측정한 호중구의 아포토시스 백분율(평균±표준편차)은 46.27±7.49, 44.11±3.50, 그리고 32.01±10.13%였다. 대조군(47.41±4.96%)과 surfactant 10, 100μg/ml 투여군 사이에는 차이가 없었고, 1000μg/ml 투여군은 대조군에 비해 호중구의 apoptosis가 낮았다($p<0.05$)(Fig. 3B).

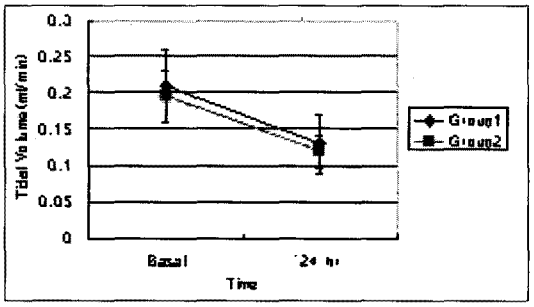
3. LPS와 표면활성물질의 동시 투여가 호중구의 아포토시스에 미치는 영향

LPS 1000ng/ml와 표면활성물질(10, 100, 그리고 1000μg/ml)을 혼합하여 투여하고 24 시간 후에 측정한 호중구의 아포토시스 백분율(평균±표준편차)은 36.60±11.31, 41.35±11.20, 그리고 19.85±5.39%였다. LPS를 1000ng/ml만 투여한 경우(24.40±7.65%)에 비해 표면활성물질 10, 그리고 100μg/ml에서는 호중구의 아포토시스가 촉진되었다($p<0.05$). 반면에 표면활성물질 1000μg/ml의 경우는 호중구의 아포토시스가 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(Fig. 3C).

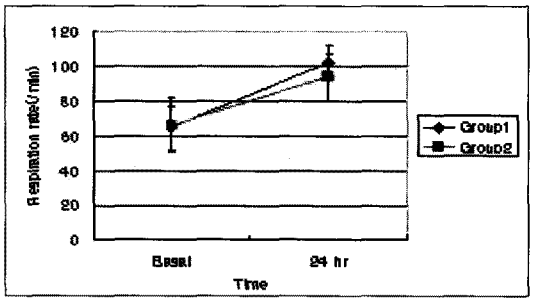
II. *In vivo test*

1. 두 군의 체중 및 기본 상태에서 호흡수, 흡기유량 및 Penh 비교

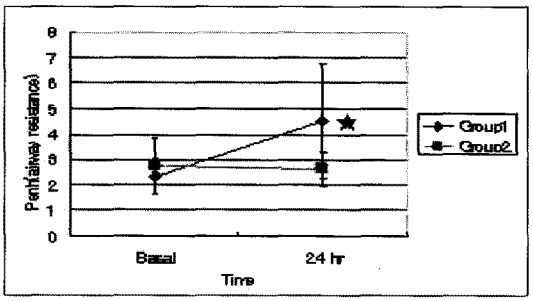
대조군(group 1)의 체중은 288±13.28g, 그리고 표



(A)



(B)



(C)

Fig. 4. Tidal volume (A), respiration rate (B), and Penh (C) of control (group 1) and surfactant (group 2) groups at basal state and 23 hours after intra-tracheal (Ed-the unhyphenated form is OK, but you have already used the hyphenated version above and it is better to use that consistently) instillation of LPS (5mg/kg). Penh is the enhanced pause which represents the airway resistance.

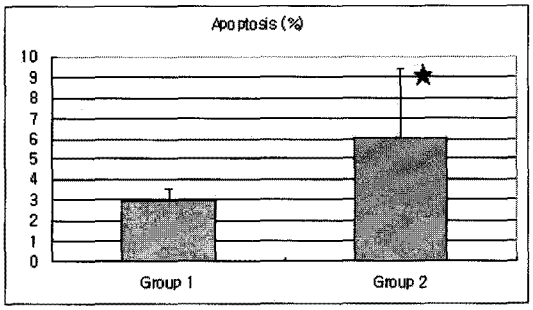


Fig. 5. Percentage of apoptosis of neutrophils from bronchoalveolar lavage fluid of rat at 24 hours after intra-tracheal instillation of LPS (5mg/kg). Thirty minutes after LPS instillation, group 1 was instilled with normal saline (2ml/kg) and group 2 with surfactant (30mg/kg), via the trachea. LPS. *: $p<0.05$

면활성물질군(group 2)은 303±7.98g으로 표면활성물질군의 체중이 약간 많았다($p<0.05$). 약제 투여 전의 호흡수는 group 1은 64.18±12.25/min, 그리고 group 2는 65.85±15.30/min이고, 흡기유량은 각각 0.21±0.014, 0.19±0.035 ml, 그리고 Penh은 각각 2.33±0.70, 2.76±1.095였으며, 두 군 사이에 차이는 없었다.

2. 내독소 투여 23 시간 후 호흡수, 흡기유량 및 Penh의 변화

LPS 투여 23 시간 뒤의 호흡수는 group 1은 102±9.3/min, 그리고 group 2는 93±13으로, 두 군 모두 LPS 투여 후 유의하게 호흡수가 증가되었으며, 두 군 사이에 차이는 없었다. 흡기유량은 group 1은 0.13±0.04 ml이고, group 2는 0.12±0.02ml였다. 두 군 모두 LPS 투여 후에 흡기유량이 감소하였으나, 두 군 사이에 차이는 없었다. Penh는 group 1은 4.51±2.20, 그리고 group 2는 2.64±0.69로 group 1의 기도저항이 group 2보다 높았다($p<0.05$)(Fig. 4).

3. 기관지폐포세척액의 세포수 및 세포분획

두 군의 기관지폐포세척액의 백혈구수는 group 1은 $3.873\times10^3/\mu\ell$, 그리고 group 2는 $4.327\times10^3/\mu\ell$로 두 군간에 차이는 없었다. 두 군 모두에서 백혈구의 95% 이상은 호중구였다.

4. 기관지폐포세척액에서 분리한 호중구의 아포토시스

내독소 투여 24 시간 뒤에 측정한 호중구의 아포토시스 백분율은 group 1은 2.95±0.58%이고, group 2는 6.03±3.36%로 group 2에서 통계적으로 유의하게 높았다($p<0.05$)(Fig. 5).

고 찰

급성호흡곤란증후군의 치료에 시도된 항염증 치료제들은 내독소에 대한 단클론성항체[15], 스테로이드[16], cyclooxygenase inhibitor[17], prostaglandin E1/E2[18], N-acetylcystein[19], anti TNF-α[20] 등이 있으나 현재까지 환자의 생존율을 유의하게 개선시킨다는 보고는 없었다.

급성 호흡곤란 증후군에서 표면활성물질은 동물모델이나[21,22], 소수의 환자를 대상으로 한 연구에서[23,24] 저산소증을 교정하고, 호기말 양압의 감소 효과는 있으나 생존률은 개선되지 않았다[25]. 하지만 표면활성물질은 여러 종류이고, 또한 투여방법도 다양하므로 치료에 이용하려는 연구는 현재도 계속되고 있다.

그 동안 표면활성물질의 치료효과는 주로 허탈된 폐포의 재환기 작용에 관심이 집중되었다. 하지만 표면활성물질의 항염증효과와 그 기전에 대한 연구도 꾸준히 계속되어 왔다. 그 일환으로 본 연구에서는 흰쥐의 급성폐손상에서 표면활성물질이 폐포내 염증을 감소시키는지, 그리고 호중구의 아포토시스를 촉진시키는지를 살펴보았다. 호중구는 급성폐손상에서 폐포내 염증에 중요한 역할을 하기 때문에 선택하였고, 폐포내 호중구의 아포토시스를 항진시키면 세포내 염증도 함께 감소시킬 것으로 기대하였다.

결과적으로 사람 말초혈액 호중구를 이용한 생체외 연구에서 LPS 투여는 호중구의 아포토시스를 감소시켰고, LPS의 용량이 증가함에 따라 아포토시스가 억제되는 경향을 보였다. 이는 기존의 보고와 일치하는 결과이다. LPS가 호중구의 아포토시스를 억제하는 기전에 대해 현재까지 알려진 바로는 LPS가 미토콘드리아의 막을 안정화시키고, caspase-3의 활성도를 저하시켜 호중구의 아포토시스를 저해한다는 것[26]과 survival protein인 Bcl-2 family인 Mcl-2 발현의 증가와 연관이 있다는 것[27] 등의 보고가 있다.

본 연구에서는 표면활성물질만 투여했을 때는 호중구의 아포토시스에 아무런 영향을 미치지 않았고, 고농도의 표면활성물질은 오히려 호중구의 아포토시스를 억제하였다. 그런데 LPS와 표면활성물질을 함께 투여하였을 때 10μg/ml, 100μg/ml의 농도에서는 LPS에 의해 억제되었던 호중구의 아포토시스가 촉진되었다. 다만 1000μg/ml이 농도는 역시 호중구의 아포토시스를 억제하는 경향을 보였는데, 이와 같은 결과는 annexin V가 고농도의 표면활성물질에 포함되어 있는 phosphatidylserine과 경쟁적으로 반응하여 아포토시스 세포에 덜 붙었거나, 현탁한 표면활성물질과 호중구 세포 검체를 유세포 분석기가 분석하는 과정의 오차를 유발되었을 것으로 추측된다.

백서를 이용한 생체내 실험에서도 표면활성물질군에서 기관지폐포세척액 내의 호중구 아포토시스가 촉진되고, 또한 기도저항(Penh)도 함께 감소하였다(Fig. 4). 따라서 급성폐손상에서 기관 내로 투여된 표면활성물질이 호중구의 아포토시스를 촉진함으로써 폐포내 염증을 감소시키고, 또한 기도 내 분비물을 감소시켜 기도 저항을 감소시켰을 것으로 판단된다.

표면활성물질이 호중구의 아포토시스를 촉진하는 기전을 살펴보면, 첫째로 LPS는 호중구의 활성화를 직접 억제한다. 표면활성물질의 구성 단백질 중 하나인 SP-A는 LPS가 호중구에 결합하는 것을 억제하므로 LPS에 의한 아포토시스 지연을 회복시킬 가능성이 있다[28]. 둘째로 표면활성물질은 활성화된 대식세포로부터 TNF-α, IL-1β, macrophage inhibitory protein-1α, monocyte chemoattractant protein-1과 같은 염증성 사이토카인의 분비를 억제한다[9]. 염증성 사이토카인은 호중구의 화학 주성과 아포토시스를 억제하므로 표면활성물질 투여가 호중구의 아포토시스를 촉진할 수 있다. 마지막으로 아포토시스에 관여하는 death signal, survival protein, protein kinase 등이 signal transduction에 직접 영향을 미칠 수 있으나 확인되지는 않았다.

결론적으로 본 연구에서는 표면활성물질이 급성호흡곤란증후군에서 중요한 염증 세포인 호중구의 아포토시스를 촉진함을 확인하였으며, 이 작용이 표면활성물질이 항염증 기전 중 하나일 가능성을 제시하였다. 표면활성물질에 대한 이러한 조명이 급성호흡곤란증후군에 대한 가능성 있는 치료 방법으로 계속 탐구되는 계기가 되기를 기대한다.

요 약

연구배경 :

급성폐손상에서 표면활성물질의 치료효과는 허탈된 폐포를 재환기시키는 작용 외에 표면활성물질이 지닌 항염증효과도 기여하는 것으로 알려져있다. 표면활성물질의 항염증효과의 기전에 호중구의 아포토시스를 촉진하는 작용이 관련되어 있을 가능성이 있다. 본 연구에서는 사람의 말초혈액 호중구와 LPS로 급성폐손상을 유발한 흰쥐의 폐포내 호중구의 아포토시스에 대하여 표면활성물질이 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

방 법 :

생체외 실험에서는 자원자의 혈액에서 호중구를 분리하여 같은 수의 호중구 (1×10^6)에 LPS(10, 100, 1000ng/ml), surfactant(10, 100, 1000μg/ml), 그리고 LPS(1000ng/ml)와 표면활성물질(10, 100, 1000μg/ml)을 혼합하여 투여하였다. 24 시간 배양한 후에 호중구의 아포토시스를 Annexin V 방법을 이용하여 분석하였다. 생체내 실험에서는 백서의 기관 내로 LPS(5mg/kg)를 투여하여 급성폐손상을 유발한 후에, 한 군은 표면활성물질(30mg/kg)을 다른 군은 생리식염수(5ml/kg)를 30 분 후에 기관 내로 투여하였다. LPS 투여 24 시간 후에 기관지폐포세척술을 시행하여 기관지폐포세척액을 얻었으며, 여기에서 호중구를 분리하여 Annexin V 방법으로 아포토시스를 측정하였다. 또한 LPS 투여 전과 23 시간 후에 one chamber body plethysmography를 이용하여 호흡역학(일호흡량, 호흡수, Penh)의 변화를 측정하였다.

결 과 :

생체외 실험에서 LPS 투여는 사람 말초혈액 호중구의 아포토시스를 억제하였다(대조군; 47.4±5.0%, LPS 10ng/ml; 30.6±10.9%, LPS 100ng/ml; 27.5±9.5%, LPS 1000ng/ml; 24.4±7.7%). 낮은 농도의 표면활성물질 투여는 LPS 투여에 의해 억제되었던 호중구의 아포토시스를 촉진시켰다(LPS 1000ng/ml+Surf 10μg/m l; 36.6±11.3%, LPS 1000 ng/ml+Surf 100μg/m l; 41.3±11.2%). 높은 농도의 표면활성물질(1,000μg/ml) 투여는 그 자체도 호중구의 아포토시스를 억제할 뿐만 아니라(24.4±7.7%) LPS의 항아포토시스 작용을 촉진하였다(LPS 1000ng/ml+Surf 1000μg/ml; 19.8±5.4%). 생체내 실험에서 표면활성물질 투여는 생리식염수 투여에 비해서 급성폐손상을 받은 쥐에서 기관지폐포세척액의 호중구의 아포토시스를 촉진하였다(6.03±3.36% vs 2.95±0.58%). 표면활성물질을 투여한 백서는 생리식염수를 투여한 백서에 비해

LPS 자극 후 23 시간에 측정한 기도저항(Penh)이 낮았다(2.64±0.69 vs 4.51±2.24, $p<0.05$).

결 론 :

이상의 결과로 표면활성물질은 사람의 말초혈액 호중구와 급성폐손상을 받은 백서의 기관지폐포세척액 내의 호중구의 아포토시스를 촉진하며, 이런 효과가 표면활성물질의 항염증효과의 기전 중 하나일 것으로 추측된다.

감사의 글

이 논문은 "2000년 방원신진연구비" 지원에 의해 이루어진 것임.

This paper is supported by "2000 BangWon Research Fund for the Young Scientist".

참 고 문 헌

1. Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) : 1983-1993. JAMA 1995;273:306-9
2. The acute respiratory distress syndrome network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 2000;342:1301-8
3. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. N Engl J Med 2001;344:699-709
4. Horbar JD, Soll RF, Schachinger H, Kewitz G, Versmold HT, Lindner W, et al. A European multicenter randomized controlled trial of single dose surfactant therapy for idiopathic respiratory distress syndrome. Eur J Pediatr 1990;149:416-23
5. Edberg KE, Ekstrom-Jodal B, Hallman M, Hjalmarson O, Sandberg K, Silberberg A. Immediate effects on lung function of instilled human surfactant in mechanically ventilated newborn infants with IRDS. Acta Paediatr Scand 1990;79:750-5
6. Hermon MM, Golej J, Burda G, Boigner H, Stoll E, Vergesslich K, et al. Surfactant therapy in infants and children: three years experience in a pediatric intensive care unit. Shock 2002;17:247-51
7. Walmrath D, Grimminger F, Pappert D, Knothe C, Obertacke U, Benzing A, et al. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on gas exchange and haemodynamics. Eur Respir J 2002;19:805-10
8. Wu Y, Singer M, Thouron F, Alaoui-El-Azher M, Touqui L. Effect of surfactant on pulmonary expression of type IIA PLA(2) in an animal model of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;282:L743-50
9. Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F, et al. Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by Candida albicans in human alveolar macrophages and monocytes. J Immunol 1999;163:4495-502
10. Ahuja A, Oh N, Chao W, Spragg RG, Smith RM. Inhibition of the human neutrophil

respiratory burst by native and synthetic surfactant. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14:496-503

11. Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. Am J Physiol 1998;274:L958-69
12. Miles PR, Bowman L, Rao KM, Baatz JE, Huffman L. Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages. Am J Physiol 1999; 276:L186-96
13. Suwabe A, Itasaka M, Suzuki H, Ito M, Takahashi K. Inhibitory effect of rat alveolar type II cells on production of superoxide by neutrophils. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi 1996;34:1208-15
14. Suwabe A, Otake K, Yakuwa N, Suzuki H, Ito M, Tomoike H, et al. Artificial surfactant (Surfactant TA) modulates adherence and superoxide production of neutrophils. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1890-9
15. Greenman RL, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, et al. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group. JAMA 1991; 266:1097-102
16. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA. Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome. Chest 1987;92:1032-6
17. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. N Engl J Med 1997;336:912-8
18. Abraham E, Baughman R, Fletcher E, Heard S, Lamberti J, Levy H, et al. Liposomal prostaglandin E1 (TLC C-53) in acute respiratory distress syndrome : a controlled, randomized, double-blind, multicenter clinical trial. TLC C-53 ARDS Study Group. Crit Care Med 1999;27:1478-85
19. Domenighetti G, Suter PM, Schaller MD, Ritz R, Perret C. Treatment with N-acetylcysteine during acute respiratory distress syndrome : a randomized, double-blind, placebocontrolled clinical study. J Crit Care 1997; 12:177-82
20. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. N Engl J Med 1996;334:1697-702
21. Lutz C, Carney D, Finck C, Picone A, Gatto LA, Paskanik A, et al. Aerosolized surfactant improves pulmonary function in endotoxin-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:840-5
22. Nieman GF, Gatto LA, Paskanik AM, Yang B, Fluck R, Picone A. Surfactant replacement in the treatment of sepsis-induced adult respiratory distress syndrome in pigs. Crit Care Med 1996;24:1025-33
23. Walmrath D, Gunther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, et

al. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:57-62

24. Wiswell TE, Smith RM, Katz LB, Mastroianni L, Wong DY, Willms D, et al. Bronchopulmonary segmental lavage with Surfaxin (KL(4)-surfactant) for acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1188-95
25. Spragg RG. (2000) Surfactant replacement therapy. Clin Chest Med. 21:531-541
26. Watson RW, O'Neill A, Brannigen AE, Coffey R, Marshall JC, Brady HR, et al. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. FEBS Lett 1999;453:67-71
27. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. Blood 1998;92:2495-502
28. van Golde LM. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. Biol Neonate 67 Suppl 1995;1:2-17