

백서의 급성폐손상에서 surfactant의 항염증작용과 호중구의 NK- κ B 활성과의 관계

중앙대학교 의과대학 내과학교실, 중앙대학교 의과대학 진단검사의학과교실*,
서울대학교 의과대학 내과학교실**

안창혁¹, 차영주¹, 이경희², 유철규², 이병준,
정도영, 이 훈, 신종욱, 김재열, 박인원, 최병휘

=Abstract=

The Relationship Between the NF- κ B Activity and Anti-inflammatory Action of Surfactant in the Acute Lung Injury of Rats

Chang Hyeok An, M.D., Young Joo Cha, M.D., Kyoung-Hee Lee²,
Chul-Gyu Yoo, M.D.², 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 and Department of Laboratory Medicine,
ChungAng University College of Medicine,
Department of Internal Medicine Seoul National University College of Medicine***

Background : The therapeutic effects of surfactants on acute lung injury derive not only from their recruiting action on collapsed alveoli but also from their anti-inflammatory action in the alveolar space. This study evaluated the anti-inflammatory action of a surfactant in an acute lung injury model of rats by

neutrophils were recollected from the BAL fluid and the NF- κ B activity of the neutrophilic nuclear protein was evaluated.

Methods : Male Sprague-Dawley rats weighing approximately 300 gram were divided into 3 groups, which consisted of 6 rats respectively. In the control group, normal saline(3ml/kg) was instilled into the trachea twice with 30 minute interval. In two other groups, acute lung injury was induced by the intra-tracheal instillation of LPS(5mg/kg). Thirty minutes later, either a surfactant(ST group; 30mg/kg)

[†] 본 논문은 2001학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

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, 140-757, Korea

Phone : 02-748-9812 Fax : 02-798-4745 E-mail : jykimmd@hananet.net

or normal saline(NT group: 3ml/kg) was instilled via the trachea. Twenty-four hours after the LPS instillation, the BAL fluid was retrieved to measure the WBC count and cytokine(IL-1 β and IL-6) levels. The neutrophils were isolated from the BAL fluid and the nuclear protein was extracted to evaluate the NF- κ B activity using a electrophoretic mobility shift assay(EMSA).

Results : The WBC count of the BAL fluid of the ST group($3,221 \pm 1,914 \times 10^3 / \mu l$) was higher than that of the control group($356 \pm 275 \times 10^3 / \mu l$)($p < 0.05$) and lower than that of the NT group($5,561 \pm 1,757 \times 10^3 / \mu l$)($p < 0.05$). The BAL fluid level of IL-1 β from the NT group($2,064 \pm 1,082 \text{pg/ml}$) was higher than those of the ST group($360 \pm 234 \text{pg/ml}$)($p < 0.05$) and the control group(0pg/ml)($p < 0.05$). The BAL fluid concentration of IL-6 from the NT group($3,621 \pm 567 \text{pg/ml}$) was also higher than those of the ST group($1,754 \pm 1,340 \text{pg/ml}$)($p < 0.05$) and control group($49 \pm 62 \text{pg/ml}$)($p < 0.05$). The NF- κ B activity of the neutrophilic nuclear protein in the ST group and NT group was similar.

Conclusions : The surfactant attenuates the alveolar inflammation in the acute lung injury of rats model. However, its anti-inflammatory action does no't appear to be mediated by the inhibition of NF- κ B activity. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:519-529)

Key words : Surfactant, IL-1 β , IL-6, Neutrophil, NF- κ B.

서 론

1967년 Ashbaugh 등¹이 보고한 이래로 급성호흡곤란증후군의 발생기전 및 병태생리에 대한 이해가 많이 증진되고, 급성호흡곤란증후군의 치료 성적 또한 그 기간 동안 꾸준히 개선되어온 것은 사실이다. 하지만 급성호흡곤란증후군은 아직도 치명률이 40% 정도를 보이는 심각한 질환 중의 하나이다. 급성호흡곤란증후군의 치료에 있어서 사람을 대상으로 한 대규모의 다기관 무작위 연구에서 환자의 생존을 개선시키는 것으로 현재까지 인정된 방법은 기계호흡 치료에서 소량의 일호흡량(low tidal volume)을 적용하는 것이 거의 유일하다고 할 수 있으며², 급성호흡곤란증후군의 중요한 원인 질환 중 하나인 중증 패혈증이나 패혈증성 쇼크의 예후를 개선시키는 방법으로는 조기목표지향 치료법(early goal directed therapy)³과 활성화된 C 단백질(activated protein C)를 이용하는 방법⁴ 정도에 불과한 실정이다. 따라서 급성호흡곤란증후군이나 그 원인질환의 치료 성적을 개선시킬 수 있는 새

로운 치료방법의 개발이 절실하다.

표면활성물질(surfactant)은 인지질과 단백질의 복합체로, 폐포의 표면장력을 감소시킴으로써 허탈된 폐포를 재환기시키는 작용이 있어서, 유아나 소아에서 발생한 호흡곤란증후군에서는 이미 유용성 입증된 중요한 치료법 중의 하나이다⁵. 그리고 표면활성물질의 이러한 성질을 급성호흡곤란증후군에서도 적용하고자 하는 노력으로, 표면활성물질을 단독으로 세척방식(lavage)⁶, 분무하는 방식⁷, 또는 기관지내시경을 이용하여 기관지분절에 주입하는 방식^{8,9}, 등으로 투여하거나, 다른 치료법들과 동반해서 부분액체환기법(partial liquid ventilation)¹⁰, 텍사메타존(dexamethasone)¹¹, C1 저해제(C1 inhibitor)¹², polyethylene glycol¹³, 그리고 nitric oxide¹⁴ 등과 함께 투여하는 다양한 시도가 있었다. 그 결과 표면활성물질의 투여는 급성호흡곤란증후군에서 산소화를 개선하거나, 폐역학지표들을 호전시키고, 폐포내의 염증을 감소시키며, 폐병리에서 폐손상을 줄이는 결과가 보고되었다. 그런데 표면활성물질의 투여는 아직까지 급성호흡곤란증후군

에서 환자의 예후를 개선시킨다는 보고는 없는 상태이다. 하지만 현재까지 급성호흡곤란증후군의 치료성적을 호전시킬 수 있는 마땅한 다른 대안이 없는 상태이고, 또한 투여 방법을 개선시켜서 표면활성물질이 손상된 폐포 내까지 효과적으로 도달하도록 한다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되기 때문에 표면활성물질에 대한 관심과 연구는 계속되고 있다.

급성호흡곤란증후군에서 표면활성물질의 치료 기전은 폐포의 허탈을 방지하는 물리적인 효과가 가장 중요하지만, 표면활성물질 자체의 항염증작용도 중요한 역할을 한다. 예를 들면, 표면활성물질은 호중구의 부착과 발생기산소(superoxide)의 발생을 감소시키고¹⁵, 대식세포로부터 전구염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비를 억제하며¹⁶, 호중구 과립의 분출(respiratory burst)을 억제하여 활성화 산소기의 분비를 감소시킨다¹⁷. 또한 표면활성물질 단백질 A와 D는 호중구의 세균탐식 능력을 촉진시키는 옵소닌 역할을 한다¹⁸. 그런데 현재까지 표면활성물질의 이러한 항염증효과와 염증/면역반응의 상호조절체계에서 중요한 역할을 하는 NF- κ B의 활성화의 관계에 대한 연구는 드문 실정이다. 이에 연구자들은 백서의 급성폐손상 모델에서 기도 내로 투여한 표면활성물질이 폐포 내의 염증을 감소시키는지 살펴보고, 만일 표면활성물질이 항염증작용을 보인다면, 이러한 작용이 급성폐손상에서 폐포 내의 염증의 발현 및 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 호중구의 NF- κ B 활성화의 억제를 통하여 이루어지는지를 알아보고자 다음과 같이 실험을 진행하였다.

대상 및 방법

1. 백서에서 급성폐손상의 유발

대상 동물은 동물 감염균이 없는(animal pathogen free) 체중 300g 내외인 수컷 백서를 이용하였고,

각 군에 6 마리씩 세 군으로 나누었다. 대조군은 3ml/kg의 생리식염수를 30 분 간격으로 2 회에 걸쳐 기관 내로 투여하였다. 비치료군은 기관 내로 내독소(LPS, E.coli 0114 B4, Sigma, USA)를 5mg/kg의 용량으로 투여하고, 30 분 후에 3ml/kg의 생리식염수를 기관 내로 투여하였다. 표면활성물질 투여군은 기관 내로 위와 같은 용량의 내독소를 투여하고, 30 분 후에 생리식염수에 녹인 표면활성물질(Surfacten, Tanabe, Japan)를 30mg/kg의 용량으로 기관 내로 투여하였다. 마취를 위해 기관 내로 약제를 투여하기 전에 25mg/ml의 펜토탈 소듐(pentothal sodium)을 2 ml/kg의 용량으로 복강 내로 주사하였다(Fig. 1).

2. 급성폐손상에서 치료 효과의 측정

1) 일실체용적변동기록기

백서에 급성폐손상을 유발하기 전과 유발한 24 시간 뒤에 동물용 일실체용적변동기록기(one chamber body plethysmography, All medicus Co, Korea)를 이용하여 폐역학을 측정하였고, 폐역학의 여러 지표들 중에서 기도저항을 대표하며, 급성폐손상에 의의가 있다고 보고된 enhanced pause (Penh)를 분석에 이용하였다.

2) 혈액채취 및 혈장분리

좌심실을 직접 천자하여 전혈(whole blood)을 1 ml 정도를 채취하고, 3,000 rpm에서 15°C 하에 10 분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며, 다음 측정 때까지 -70°C 하에 보관하였다.

3) 기관지폐포세척액 채취

백서의 목 중앙부위에서 기관절개술을 시행한 후에 생리식염수로 기관지폐포세척술을 두 차례에 걸쳐 시행하여 백서당 15 ml 내외의 기관지폐포세척액을 얻었다. 얻어진 기관지폐포세척액에서 1.5

Flow sheet of study design

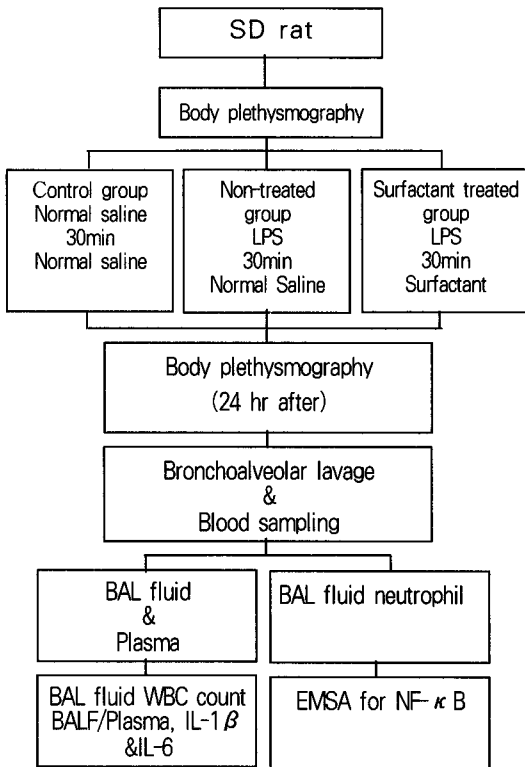


Fig. 1. Flow chart of the study

*SD rat: Sprague-Dawley rat
LPS; lipopolysaccharide
EMSA; electrophoretic mobility shift assay
BAL; bronchoalveolar lavage
BALF; bronchoalveolar lavage fluid

ml를 채취하여 15°C 하에서 10 분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻었으며, 향후 ELISA 측정때까지 -70°C 하에 보관하였다.

4) 기관지폐포세척액에서 백혈구 수 및 감별수 측정 위에서 얻어진 기관지폐포세척액에서 약 1 ml를 채취하여 자동세포분석기 (Sysmex SE-9000, Toa medical Co, Japan)를 이용하여 세포수와 세포분획을 측정하였다.

5) 혈장과 기관지폐포세척액에서 IL-1 β 와 IL-6 농도의 측정

2) 번에서 얻어진 혈장과 3) 번에서 얻어진 기관지 폐포세척액의 상층액에 대해서 ELISA 방법을 통해 IL-1 β 와 IL-6 농도를 측정하였다. ELISA kit는 Quantikine M-rat IL-1 β immunoassay와 Quantikine M-rat IL-6 immunoassay(R&D Systems, MN, USA)를 이용하였으며, 제작사의 지침에 따라 진행하였다.

3. 기관지폐포세척액에서 호중구의 분리 및 NK- κ B에 대한 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)의 시행

1) 기관지폐포세척액에서 호중구의 분리

기관지폐포세척액을 500 g로 원심분리하여 세포침전분획을 얻은 후 PBS로 부유하고, 10 ml의 Ficoll Hypaque(Sigma Co, USA)위에 중첩시켰다. 15분간 500 g로 상온에서 원심분리하여 buffy coat 층 아래에서 호중구 분획을 얻었다. Trypan blue로 세포생존율을 평가하였고 분리된 호중구의 순도와 생존율은 95% 이상이였다.

2) 호중구에서 핵단백질 (nuclear protein)의 분리 및 농도측정

Nu-CLEARTM EXTRACTION Kit(Sigma, USA)를 이용하여 핵단백질을 추출하였고, 얻어진 핵단백질은 분석에 이용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 핵단백질의 농도는 BECKMAN DL-600(Beckman Instrument Inc, USA)을 이용하여 Bradford method로 측정하였다.

3) NK- κ B에 대한 EMSA의 시행

A. EMSA gel 제작

EMSA 젤(gel)은 DW 29.5mL, 40% acrylamide

4mL, 2% bisacrylamide 1mL, 5X TBE 4mL, 80% glycerol 1.25mL, 10% APS 300 μ L, 그리고 20 μ L의 TEMED를 섞어서 만든 용액을 사용하였다.

B. Oligonucleotide probe를 γ - 32 P로 labeling

DW 4 μ L와 NF-kappaB oligonucleotide(175pmol, Promega, USA) 2 μ L, 10X kinase buffer(BioLabs Inc, USA) 1 μ L, 그리고 T4 kinase(BioLabs Inc, USA) 1 μ L를 radioisotope room(RI) 밖에서 혼합한 뒤 동위원소실에서 γ - 32 P isotope를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15 분간 배양하였다. 이후에 EDTA 1 μ L를 첨가하여 반응을 종료시키고 Tris-EDTA(TE) buffer 39 μ L를 넣어 총량이 50 μ L가 되도록 하였다. 이 용액을 Sephadex G-25 column(Intron, USA)을 통과시킨 뒤 걸러진 용액을 취하였다.

C. Protein-DNA binding reaction

5X binding buffer 2 μ L, probe 2 μ L를 섞고, 핵단백질의 총량이 10 μ g되는 양을 취하여 섞고 이어서 총량이 10 μ L가 되도록 DW를 섞은 loading 용액을 준비하였고, probe를 넣은 다음에 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. Supershift assay를 위하여 첫 번째 column에 들어가는 sample에 NF κ B p65(A)X antibody(Santa cruz, USA) 1 μ L와 NF κ B p50(NLS)X antibody (Santa cruz, USA) 1 μ L, 그리고 excess cold probe 2 μ L를 넣은 loading 용액을 따로 준비하였다.

D. Electrophoresis & autoradiography

젤을 15분간 pre-running 시킨 후에, sample을 loading한 후 200V로 2시간 running한 후에, 젤을 떼어내고 gel drier에서 1 시간 동안 건조시켰다. 이후에 4 $^{\circ}$ C에서 밤 동안 cassette안에 둔 후 Biomax film으로 현상하였다.

G. Densitometry

Biomax film에 나타난 band를 scanning을 통해 입력한 후에 Scion Image의 release beta 3b program을 이용하여 농도를 측정하였다.

4. 통계처리

모든 측정값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계처리는 SPSS for window(release 9.0)를 이용하였다. 세 군사이의 차이는 ANOVA test를 이용하였고, sub-hoc analysis는 Duncan과 Tukey method를 이용하여 검증하였다. 두 군 사이의 차이는 T-test를 시행하였고, 같은 군의 시간에 따른 비교는 paired T-test를 이용하였다. P-value가 0.05 미만인 경우에 통계적으로 의미있다고 판단하였다.

결 과

1. 각 군의 체중, 기본상태 및 24 시간 후의 Penh

체중(평균 \pm 표준편차)은 대조군은 293 \pm 23g, 표면활성물질 치료군은 302 \pm 4g, 그리고 비치료군은 285 \pm 8g으로 세 군 사이에 통계적으로 의미있는 차이는 관찰되지 않았다. 각 군에서의 기본상태와 24시간 후의 Penh값(평균 \pm 표준편차)은 대조군은 3.05 \pm 0.80, 2.79 \pm 0.92, 표면활성물질 치료군은 2.73 \pm 1.11, 2.68 \pm 0.69, 그리고 비치료군은 2.21 \pm 0.86, 3.55 \pm 1.93로서, 기본상태와 24 시간 후의 Penh 값 모두 세 군 사이에 의미있는 차이는 관찰되지 않았다 (Table 1).

2. 기관지폐포세척액의 총 백혈구수

기관지폐포세척액의 총 백혈구(평균 \pm 표준편차)는 대조군은 356 \pm 275x 10³/ μ l, 표면활성물질 치료군은 3,221 \pm 1914x10³/ μ l, 그리고 비치료군은 5,561

Table 1. The number, body weight, and Penh of the three groups

	Control group	ST group	NT group	p-value
Number	6	6	6	
Body weight(g)	293±23	302±4	285±8	> 0.05
Penhbasal	3.05±0.80	2.73±1.11	2.21±0.86	> 0.05
Penh24h	2.79±0.92	2.68±0.69	3.55±1.93	> 0.05

* ST group; surfactant-treated group

NT group; non-treated group

Penh; enhanced pause, parameter for an airway resistance

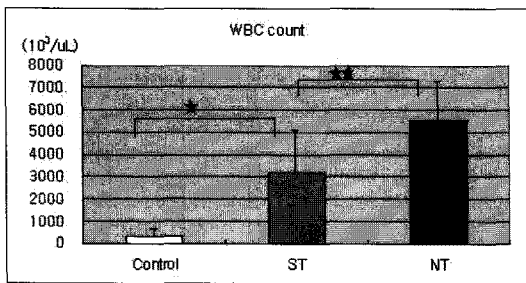


Fig. 2. WBC count of bronchoalveolar lavage fluid in the three groups.

*ST; surfactant-treated group

NT; non-treated group.

*★; p < 0.05 ★★; p < 0.05

±1,757x10³/μl였다. 통계적 분석에서 대조군보다 표면활성물질 치료군의 백혈구 수가 높았으며 (p<0.05), 표면활성물질 치료군보다 비치료군의 백혈구 수가 높았다(p<0.05)(Fig. 2).

3. 혈장과 기관지폐포세척액의 IL-1β 와 IL-6 농도

혈장의 IL-1β 농도(평균±표준편차)는 대조군은 0pg/ml, 표면활성물질 치료군은 3.85±9.4pg/ml, 그리고 비치료군은 13.1±26.2pg/ml로 세 군 사이에 의미있는 차이는 없었다. 기관지폐포세척액의 IL-1β 농도(평균±표준편차)는 대조군은 0pg/ml, 표면활성물질 치료군은 360±234pg/ml, 그리고 비치료군은 2,064±1,082pg/ml였다. 통계적 분석에서 비치료군의 기관지폐포세척액의 IL-1β 농도가 표면활성물질 치료군의 농도보다 높았고(p<0.05), 표면활성물질 치료군의 농도가 대조군보다 높았다 (p<0.05)(Fig. 3). 혈장의 IL-6 농도(평균±표준편차)는 대조군은 62±78pg/ml, 표면활성물질 치료군은 145±218pg/ml, 그리고 비치료군은 277±175pg/ml였다. 통계적으로 세 군 사이에 의미있는

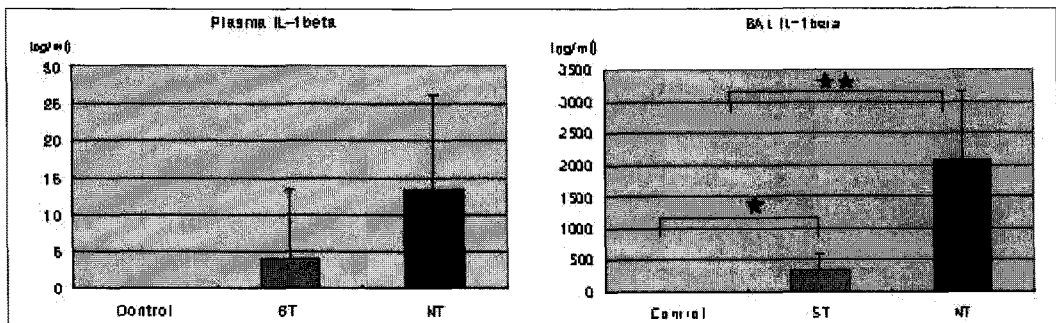


Fig. 3. IL-1β concentration of plasma and bronchoalveolar lavage fluid in the three groups.

*ST; surfactant-treated group NT; non-treated group

*★; p < 0.05 ★★; p < 0.05

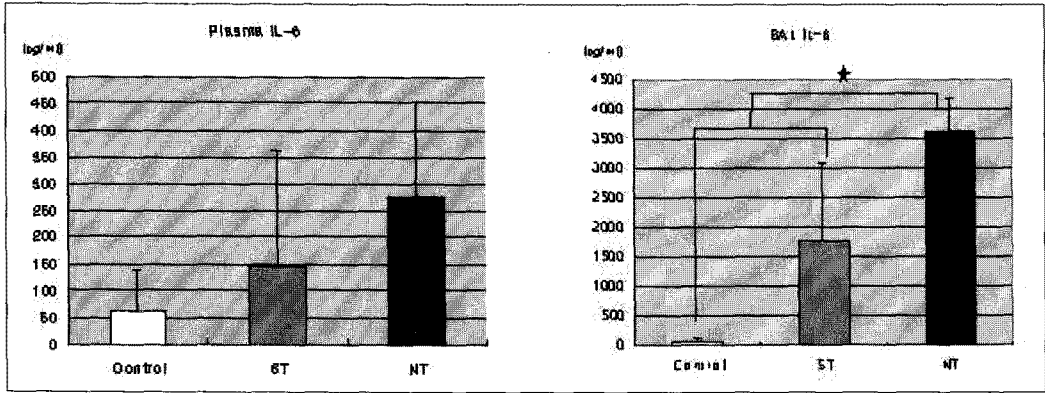


Fig. 4. IL-6 concentration of plasma and bronchoalveolar lavage fluid in the three groups.

*ST; surfactant-treated group

NT; non-treated group

*★; $p < 0.05$

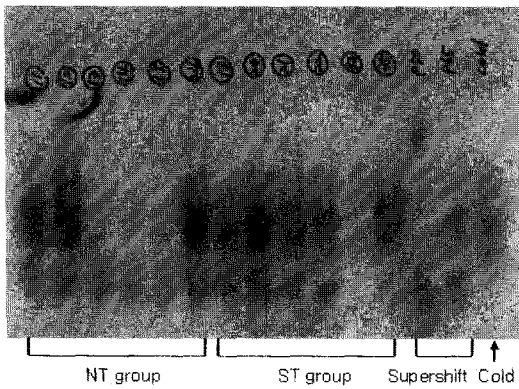


Fig. 5. Electrophoretic Mobility Shift Assay for NF- κ B in two groups.

*ST group; surfactant-treated group

NT group; non-treated group

차이는 관찰되지 않았다. 기관지폐포세척액의 IL-6 농도(평균±표준편차)는 대조군은 49 ± 62 pg/ml, 표면활성물질 치료군은 1754 ± 1340 pg/ml, 그리고 비치료군은 3621 ± 567 pg/ml였다. 통계적 분석에서 비치료군의 기관지폐포세척액의 IL-6 농도는 다른 두 군(대조군, 표면활성물질 치료군)의 농도보다 높았다 ($p < 0.05$)(Fig. 4).

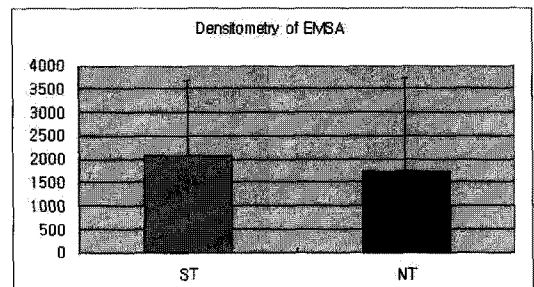


Fig. 6. The average value of densitometry in two groups.

*ST group; surfactant-treated group

NT group; non-treated group

4. 비치료군과 표면활성물질 치료군의 NF- κ B에 대한 EMSA 결과

비치료군과 표면활성물질 치료군의 기관지폐포세척액에서 분리한 호중구에서 핵단백질을 추출하였다. 추출한 핵단백질의 농도(평균±표준편차)는 $2.97 \pm 1.84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 였다. 각 백서당 핵단백질 $10 \mu\text{g}$ 을 정량하여 NF- κ B에 대한 EMSA를 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 5). 각

band에 대해 densitometry를 시행하였을 때, 표면활성물질 치료군은 $2,095 \pm 1,580$, 그리고 비치료군은 $1,743 \pm 1,997$ 로 두 군 사이에 의미있는 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 6).

고 찰

본 연구에서는 백서를 대상으로 기관 내로 내독소를 주입하여 급성폐손상을 유발한 후에 기관 내로 표면활성물질을 투여하였을 때, 기관지폐포세척액의 백혈구수와 염증성 cytokine인 IL-1 β 와 IL-6의 농도가 감소하여 표면활성물질의 기관 내 투여가 폐포 내의 염증을 감소시킴을 확인하였다. 하지만 표면활성물질의 이러한 항염증작용의 기전이 염증과정의 신호전달체계에서 중요한 역할을 수행하는 전사인자인 NF- κ B의 활성의 억제를 통해 이루어지는 않는 것으로 나타났다.

표면활성물질을 급성폐손상에서 치료적 목적으로 기관 내로 투여한 후에 폐포 내의 염증의 변화를 살펴보는 방법으로는, 기관지폐포세척액의 단백질 농도, 백혈구 수, 그리고 염증매개 사이토카인의 변화를 측정하거나, 또는 폐를 적출하여 병리학적으로 폐포 내의 염증세포의 침윤을 살펴보는 방법 등이 많이 이용된다. 본 교실의 연구를 포함하여 기존의 많은 연구에서, 표면활성물질의 투여가 산소화를 호전시키고, 기관지폐포세척액의 단백질 농도와 백혈구 수를 감소시키며, 폐 병리검사에서 폐포내의 염증을 감소시킨다는 보고가 있었다¹⁹⁻²¹. 그리고 본 연구에서 표면활성물질의 투여가 기관지폐포세척액의 IL-6의 농도를 감소시킨 것을 확인한 점은 특기할 만하다고 생각된다. IL-6는 급성폐손상의 심각한 정도를 잘 반영하는 염증성 사이토카인으로 급성폐손상이 심할수록 혈중 및 기관지폐포세척액의 농도가 증가하며²², 또한 IL-6의 혈중 농도가 높을수록 급성폐손상의 예후가 나빠진다고 알려져 있다²³. 그런데 연구자들이 현재까지

확인한 바로는 급성폐손상에 대해 표면활성물질을 투여하였을 때 기관지폐포세척액의 IL-6 농도가 감소한다는 사실을 보고한 연구는 드물며, 이러한 점에서 본 연구가 나름대로의 의의가 있다고 사료된다.

본 연구에서 아쉬운 점은 급성폐손상에서 표면활성물질의 기도 내 투여가 폐역학지표들을 개선시킨다는 다른 보고들이 있었음에도 불구하고¹⁰, 기도저항의 지표인 Penh가 표면활성물질 투여 후에도 의미있는 변화를 나타내지 않았다는 사실이다. 이는 아마도 대상 동물의 수가 너무 적었기 때문에 두 군 사이의 차이가 통계적으로 입증되지 않았을 가능성이 많으며, 향후에 더 많은 수를 대상으로 한다면 의미있는 결과를 도출할 수도 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구에서는 표면활성물질의 항염증효과의 기전을 밝히고자 기관지폐포세척액에서 분리한 호중구의 핵단백질을 추출하여 NF- κ B에 대한 EMSA를 시행하였는데, 기대했던 바와는 달리 표면활성물질의 투여가 호중구의 NF- κ B의 활성을 억제하지는 않았다. 표면활성물질의 항염증작용이 세포 내의 신호전달체계의 경로 중에서 어떤 물질에 영향을 미치는지에 대해서는 향후 추가의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점은 정해진 표면활성물질의 농도(30mg/kg)의 치료효과만을 살펴보았다는 사실이다. 상기한 표면활성물질의 효과를 보다 설득적으로 제시하려면, 표면활성물질의 농도 증가에 따라 항염증작용이 항진된다는 사실이 증명하여야 하며, 이는 연구들이 향후 해결하여야 할 과제일 것으로 생각된다.

이상의 사실을 정리하여 볼 때, 본 연구에서는 백서의 급성폐손상에서 기관 내로 투여한 표면활성물질의 항염증효과를 확인하였으나, 이 작용이 세포 내 신호전달체계에서 중요한 역할을 수행하는 전사인자인 NF- κ B의 활성과는 관계는 규명하지 못하였다. 본 연구가 급성폐손상의 치료에서 아

직 많은 기대를 모으고 있는 표면활성물질의 치료 효과와 기전 연구에 조금이나마 보탬이 되었으면 하는 바램이며, 앞으로 효과적인 치료법이 제한되어 있는 급성폐손상/급성호흡곤란증후군에서 획기적인 치료방법이 개발되어 많은 환자들이 혜택을 받을 수 있기를 기대하는 바이다.

요 약

연구배경 :

급성폐손상의 치료로 시도되는 표면활성물질의 효과는 허탈된 폐포를 재환기시키는 작용 외에 표면활성물질 자체가 가지고 있는 항염증작용이 중요한 기전으로 생각되고 있다. 본 연구에서는 백서의 급성폐손상 모델을 이용하여 기관 내로 표면활성물질을 투여하였을 때, 기관지폐포세척액의 백혈구수와, 염증매개 사이토카인인 IL-1 β 그리고 IL-6의 농도에 변화가 있는지를 살펴보고, surfactant의 항염증작용이 전사인자인 NF- κ B의 활성의 억제를 통하여 이루어지는지 여부를 Electrophoretic mobility shift assay(EMSA) 법으로 확인하였다.

방 법 :

대상동물은 300 g 내외의 수컷 백서를 이용하였으며, 대상동물을 각각 6 마리씩 세 군으로 나누었다. 대조군은 기관 내로 생리식염수(3ml/kg)를 30분 간격으로 투여하였다. 나머지 두 군은 기관 내로 내독소(5mg/kg)를 투여하여 급성폐손상을 유발하고, 30분 후에 표면활성물질 치료군은 surfactant(30mg/kg)을 그리고 비치료군은 생리식염수(3ml/kg)를 각각 기관 내로 투여하였다. 생리식염수나 내독소를 투여한 24시간 후에 기관지폐포세척술을 시행하였고, 기관지폐포세척액 내의 백혈구수와 IL-1 β 그리고 IL-6의 농도를 측정하였다. 또한 기관지폐포세척액에서 호중구를 분리하고 핵단백질을 추출하여 NF- κ B의 활성을 EMSA법으로 측정하였다.

결 과 :

대조군, 표면활성물질 치료군, 그리고 비치료군의 기관지폐포세척액의 백혈구 수는 각각 $356 \pm 275 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $3,221 \pm 1,914 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 그리고 $5,561 \pm 1,757 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 으로 비치료군의 백혈구 수가 가장 높았고, 다음으로 표면활성물질 치료군, 비치료군의 순서였다($p < 0.05$). 기관지폐포세척액의 IL-1 β 농도는 대조군은 0pg/ml, 표면활성물질 치료군은 $360 \pm 234\text{pg/ml}$, 그리고 비치료군은 $2,064 \pm 1,082\text{pg/ml}$ 로 대조군에 비해 표면활성물질 치료군이, 그리고 표면활성물질 치료군에 비해 비치료군의 IL-1 β 농도가 높았다($p < 0.05$). 기관지폐포세척액의 IL-6 농도는 대조군, 표면활성물질 치료군, 비치료군에서 각각 $49 \pm 62\text{pg/ml}$, $1,754 \pm 1,340\text{pg/ml}$, 그리고 $3,621 \pm 567\text{pg/ml}$ 으로 대조군에 비해 표면활성물질 치료군이, 그리고 표면활성물질 치료군에 비해 비치료군의 농도가 높았다($p < 0.05$). 표면활성물질 치료군과 비치료군 사이에서 호중구의 NF- κ B 활성화에는 차이가 없었다.

결 론 :

이상의 연구로 내독소의 기관 내 투여로 유발한 백서의 급성폐손상에서 기관 내로 투여한 표면활성물질은 기관지폐포세척액의 백혈구수와 염증매개 사이토카인인 IL-1 β 그리고 IL-6의 농도를 감소시켜 폐포 내의 염증을 감소시켰으며, 표면활성물질의 항염증작용은 NF- κ B의 활성의 억제를 통하여 이루어지지 않는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. Lancet 1967;2:319-23.
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. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Gommers D, Eijking EP, So KL, van't Veen A, Lachmann B. Bronchoalveolar lavage with a diluted surfactant suspension prior to surfactant instillation improves the effectiveness of surfactant therapy in experimental acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Intensive Care Med* 1998;24:494-500.
 7. Tashiro K, Yamada K, Konzaki T, Yamamoto K, Ohmura S, Kobayashi T, et al. Aerosolized surfactant therapy for endotoxin-induced experimental acute respiratory distress syndrome in rats. *Br J Anaesth* 2001;87:266-71.
 8. Gunther A, Schmidt R, Harodt J, Schmlh T, Walmrath D, Ruppert C, et al. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock : impact on biophysical and biochemical surfactant properties. *Eur Respir J* 2002;19:797-804.
 9. Pallua N, Warbanow K, Noah EM, Machens HG, Poets C, Bernhard W, et al. Intra-bronchial surfactant application in cases of inhalation injury: first results from patients with severe burns and ARDS. *Burns* 1998;24:197-206.
 10. Wolf S, Lohbrunner H, Busch T, Sterner-Kock A, Deja M, Sarrafzaddeh A, et al. Small dose of exogenous surfactant combined with partial liquid ventilation in experimental acute lung injury: effects on gas exchange, haemodynamics, lung mechanics, and lung pathology. *Br J Anaesth* 2001;87:593-601.
 11. Chen MC, Fang CL, Chang CH. Surfactant and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury. *Crit Care Med* 2001;29:2169-75.
 12. Vangerow B, Hafner D, Rueckoldt H, Marx G, Ott N, Leuwer M, et al. Effects of Cl inhibitor and r-SP-C surfactant on oxygenation and histology in rats with lavage-induced acute lung injury. *Intensive Care Med* 2001;27:1526-31.
 13. Lu KW, Taesch HW, Robertson B, Goerke J, Clements JA. Polyethylene glycol/surfactant mixtures improve lung function after HCl and endotoxin lung injuries. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1531-6.
 14. Zheng S, Zhang WY, Zhu LW, Lin K, Sun B. Surfactant and inhaled nitric oxide in rats alleviate acute lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion. *J Pediatr Surg* 2001;36:980-4.
 15. 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.
16. Arias-Diaz J, Garcia-Verdugo I, Casals C, Sanchez-Rico N, Vara E, Balibrea JL. Effect of surfactant protein A(SP-A) on the production of cytokines by human pulmonary macrophages. *Shock* 2000;14:300-6.
17. 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.
18. 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.
19. 강윤정, 박용범, 지현식, 최재철, 김재열, 박인원, et al. 기관내내독소 투여로 유발된 흰쥐의 급성폐손상에서 surfactant의 치료효과. *결핵 및 호흡기질환* 2000; 48:487-99.
20. Vazquez de Anda GF, Lachmann RA, Gomers D, Verbrugge SJ, Haitsma J, Lachmann B. Treatment of ventilator-induced lung injury with exogenous surfactant. *Intensive Care Med* 2001;27:559-65.
21. Frerking I, Gunther A, Saeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med* 2001;27:1699-717.
22. Simons RK, Junger WG, Loomis WH, Hoyt DB. Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment—role of circulating TNF-alpha and IL-beta?. *Shock* 1996;6:39-45.
23. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. *Chest* 1995;107:1062-73.