

장의 재관류로 유도된 급성폐손상에서의 Doxycyclin의 효과

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실, 내과학교실*

이영만, 권성철, 이상채*

=Abstract=

Effect of Doxycycline on the Acute Lung Injury Induced by Gut Ischemia/Reperfusion

Young Man Lee, M.D., Sung Chul Kwon, M.D., Sang Chae Lee, M.D.*

Department of Physiology, Internal Medicine* Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

Background : Phospholipase A₂ (PLA₂) has been known to be involved in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) including ARDS. Since doxycycline has the property of inhibiting secretory group II PLA₂, the therapeutic effect of doxycycline hyclate was investigated for gut ischemia/reperfusion (I/R)-induced ALI in Sprague-Dawley rats.

Methods : ALI was induced in Sprague-Dawley rats by clamping of the superior mesenteric artery for 60 min, followed by 120 min of reperfusion. To confirm the pathogenetic mechanisms of this ALI associated with neutrophilic oxidative stress, we measured bronchoalveolar lavage (BAL) protein content and lung MPO, and performed cyto-chemical electron microscopy for detection of free radicals, assay of PLA₂ activity and cytochrome-c reduction assay.

Results : In gut I/R-induced ALI rats, protein leakage, pulmonary neutrophil accumulation, free radical production and lung PLA₂ activity were all increased. These effects were reversed by doxycycline hyclate.

Conclusion : Doxycycline appears to be effective in ameliorating the gut I/R-induced ALI by inhibiting PLA₂, thereby decreasing the production of free radicals from neutrophils. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:532-541)

Key words : ALI, Neutrophils, Oxidative stress, Doxycyclin.

Address for correspondence:

Sang Chae Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University of Daegu, School of Medicine
3056-4 DaeMyung 4 Dong, Nam Gu, Daegu, 705-718, Korea.

Phone : 053-650-4039 Fax : 053-622-2072 E-mail : sclee@cataegu.ac.kr

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 화상, 익수, 다발성외상, 폐혈증 등의 다양한 원인에 발병하는 폐장의 염증성 폐질환이다¹. 현재까지 다양한 연구를 통해 그 병인론이 상당히 규명되었으나 원인에 따른 정확한 병인론이 확립되어있지 않고 따라서 적절한 치료법이 개발되지 않았다. ARDS의 병인중 장의 재관류에 의한 병인론은 최근에 이르러 산화성스트레스와 연관하여 다양하게 연구되었는데² 그 중 Koike 등³은 phospholipase A₂ (PLA₂)의 작용에 따른 호중구성 산화성 스트레스가 중요한 원인이라고 주장하고 있다. 폐장에서의 산화성 스트레스의 원인이 PLA₂외에도 XO에 의한것이라는 주장도 있으나⁴ XO든지 PLA₂든지 장의 재관류에 따른 급성폐손상의 발생은 산화성스트레스와 연관이 있다고 생각된다.

폐장의 염증성 폐부중에 관여하는 PLA₂의 역할은 주로 염증성 지질분자의 과량 생성⁵이 그 원인이며 이중 몇가지의 염증성 지질분자는 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화시켜 산소기를 생성, 유리한다. 최근에 이르러 호중구막의 NADPH oxidase의 활성화에 따른 산소기의 과량 생성에 따른 산화성 스트레스는 분명히 PLA₂의 활성화가 관계한다고 보지만 어떤 종류의 PLA₂가 주된 원인인지는 확실히 밝혀지지 않았다⁶. 분비형 PLA₂-I(sPLA₂-I) 및 분비형 PLA₂-II(sPLA₂-II)가 ARDS의 발병과 관계가 있다고 알려져 있으나⁷ 장의 재관류에 따른 급성폐손상에 관여하는 PLA₂는 분자량이 14500 dalton 정도의 분비형 group II PLA₂라는 주장도 있다⁸. 한편 doxycyclin이나 minocyclin은 분비형 PLA₂를 선택적으로 억제하여 항염증작용이 있다고 한다⁹. 이에 착안하여 본 연구에서는 doxycyclin을 이용하여 분비형 PLA₂를 억제하고 장의 허혈-재관류에 의한 급성폐손상에

어떤 효과가 있는지를 알아보려고 하였고 특히 분비형 PLA₂의 억제에 따른 호중구에 의한 산화성 스트레스에 어떤 영향을 미치는지를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 시약 및 실험동물

Enflurane(아리레인[®])은 일성신약주식회사, xylazine은 Haver사 (New York, NY, USA), PLA₂의 활성도 검사를 위해 사용한 palmitoyl-2 (9,10(N)-³H) plamitoyl)-phosphatidylcholine(³H-DPPC)은 NEN life science product (Boston, MA, USA)에서 구입하였고 그 위의 모든 시약은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험동물은 체중 300 g 내외의 *Sprague-Dawley*종 흰쥐, 수컷을 사용하였다.

2. 흰쥐에서의 급성폐손상의 유도

장의 허혈-재관류에 의한 급성폐손상을 유발하기 위하여 체중 300 g 내외의 *Sprague-Dawley*종 흰쥐에 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 복강으로 주사하여 마취한 후 개복술을 시행하여 상장간동맥 (superior mesenteric artery)을 bulldog clamp로 60분간 clamp 하였다. 그후 clamp를 풀고 120분간 재관류를 시켜 급성 폐손상을 유발하였다. 분비형 PLA₂의 억제제인 doxycyclin은 상장간동맥 Clamp 60분전에 doxycyclin hyclate (10mg/kg)를 복강내로 주사하였다. 그후 폐장을 적출하기 위하여 흰쥐를 Harvard제 (Harvard Apparatus, UK) rodent-ventilator에 연결한 후 개흉술을 시행하고 polyethylene catheter를 폐동맥에 삽관한 뒤 Masterflex perfusion pump (Cole-Parmer, USA)에 연결한 뒤

생리적 식염수로 관류하여 폐장내 혈액을 제거한 뒤 적출하였다. 적출된 폐장은 무게를 측정한 후 즉시 액체질소에 담근 뒤 -70°C 에 냉동보관 하였다.

3. 폐세척액내의 단백질량의 측정

장의 재관류 후 급성폐부종이 유발된 것을 확인하기 위하여 폐세척액내의 단백질량을 측정하였다. 즉 상장간동맥 재관류 120분 후에 흰쥐에 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6.0 mg/kg)을 경정맥을 통해 주사하여 치사시킨 후 기관절개술을 시행하여 삼관후 8.0ml의 생리적 식염수를 이용하여 폐세척을 시행하였다. 이때 얻어진 6.0ml의 폐세척액은 즉시 2,000 rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 이용하여 Brown등의 방법¹⁰에 따라 단백질을 정량하였다.

4. 폐장내 myeloperoxidase (MPO) 활성도의 측정

장의 재관류후 나타나는 급성 폐부종이 호중구의 침윤에 따른 respiratory burst와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 폐장내 MPO의 활성도를 Goldblum등의 방법¹¹에 따라 측정하였다. 즉 동결보존된 폐장을 20 mM potassium phosphate용액 (pH 7.4) 4.0ml에 담근 다음 Polytron (Swizland)분쇄기로 균질하게 분쇄하였다. 그 뒤 40,000 g, 4°C 에서 30분간 원심분리후 상등액은 버리고 침전층은 0.5% hexadecyl tetramethyl ammonium bromide가 함유된 50 mM potassium phosphate 용액 (pH 6.0)에 재부유 시켰다. 이 용액을 90초간 sonication(Vibracell, USA) 한 뒤, 60°C 항온수조에서 120분간 incubation하였다. 그 뒤 조직분쇄액 1.0ml를 12,000 rpm, 상온에서 2분간 원심분리한 뒤 상

층액 0.1ml를 분리하여 *o*-dianisidine 0.0168 g이 함유된 5×10^{-4} M의 과산화수소 2.9ml와 반응시켜 파장 460 nm에서 enzyme kinetics를 시행하였다. 즉 시간의 경과에 따른 흡광도 (dA/dt)를 측정하여 이를 폐장의 무게로 나누고 여기에 13.5를 곱하여 MPO (U/g of wet lung)의 활성도를 구하였다.

5. 호중구에 있어서의 산소기 생성의 검사

호중구에서 생성되는 산소기 형성에 미치는 doxycyclin hyclate의 영향을 알아보기 위하여 인체의 혈액에서 호중구를 분리하고 이 분리된 호중구를 이용하여 NADPH oxidase의 활성도를 검사하였다.

1) 호중구의 분리 :

호중구에서 생성되는 산소기 특히 superoxide anion (O_2^-)의 생성에 doxycyclin hyclate가 미치는 영향을 알아보기 위해 Hasletts등¹²의 방법에 따라 인체의 혈액으로부터 호중구를 분리하였다. 2개의 50ml 주사기에 15ml 씩의 Pentaspan (제일약품주식회사)과 1.0ml의 heparin (1000 U)을 혼합한 뒤 정맥에서 30ml의 혈액을 뽑아 혼합한 뒤 주사기를 수직으로 세워 40분간 방치하여 혈장층이 분리되도록 하였다. 그 뒤 혈장층을 분리하고 55%, 74% 등장성 percoll 용액을 이용하여 상온, 1,500 rpm에서 20분간 비중차 원심분리 (gradient centrifugation)를 시행하였다. 원심분리 후 55%와 74% percoll 경계에 모인 호중구층만을 분리하고 이 호중구를 생리적식염수에 혼합한 뒤 1,000 rpm에서 원심분리하여 생리적식염수로 2회 세척한 뒤 산소기 생성검사에 사용하였다.

2) 호중구에 있어서의 산소기 생성의 검사 :

분리된 호중구를 이용하여 Botha등¹³의 방법에 따라 doxycyclin이 호중구에서의 산소기 생성에 미

치는 영향을 검사하였다. 즉 2×10^6 개의 호중구가 든 HBSS용액에 10% normal pooled serum을 가하고 여기에 phorbol myristate acetate(PMA)가 400 nM이 되도록 첨가하여 호중구에서의 respiratory burst를 유발하였다. Doxycyclin의 효과를 보기 위해서는 PMA 첨가후 10 nmol의 doxycyclin을 첨가하고 37°C의 수조에서 15분간 incubation후 파장 550 nm에서 비색정량하였다.

6. 전자현미경을 이용한 폐장내 과산화수소 형성의 관찰

장의 재관류후 유발되는 급성폐손상에서 폐장내 산소기의 역할을 알아보기 위하여 폐장내 과산화수소의 생성을 검사하였다. 즉 Karnovsky등의 방법¹⁴을 변형하여 폐장조직을 담귀 반응시킬 용액내에 NADPH를 제외하고 cerium chloride를 첨가하여 폐장조직내의 과산화수소의 생성을 검사하였다. 즉 cytochemical electron microscopy를 시행하기 위하여 폐장조직을 적출 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고 30분간 37°C에서 반응시켰다. 이 과정은 조직내의 과산화수소가 cerium chloride와 반응하여 cerrous perhydroxide를 형성하는 과정이다. 반응이 끝난 조직을 0.1 M Tris-maleate buffer (pH 7.4)와 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 차례로 수세한 후 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)로 고정시켰다. 고정이 끝난 조직을 sodium cacodylate buffer로 수세하고 alcohol-propylene oxide 계열로 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시킨 다음 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 뒤 ultramicrotome (Recher-Supernova)을 이용하여 60-70 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl

acetate로 염색한 뒤 투과전자현미경으로 관찰하였다. 관찰시의 contrast 및 해상도를 높이기 위하여 counter stain은 시행하지 않았다.

7. 폐장의 phospholipase A₂ 활성도의 측정

내장의 재관류 후 doxycyclin이 폐장의 phospholipase A₂ (PLA₂)의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Katsumata 등의 방법¹⁵에 따라 PLA₂의 활성도를 측정하였다. 즉 -70°C로 동결보존된 폐장을 1 mM의 DTT가 함유된 0.25 M sucrose용액 4.0ml에 녹인 후 Polytron homogenizer (Swizland)로 분쇄하였다. 분쇄 후 즉시 얼음 위에서 60초간 Vibra cell (Sonics & Materials, USA)을 이용하여 sonication하여 cell lysate를 얻었고 이 중 0.1ml를 PLA₂ 활성도 검사에 사용하였다. 즉 0.1ml의 cell lysate는 900 μ l의 2.0 μ Ci의 ³H-dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)이 함유된 완충용액 (100 mM glycine, 10 g/l BSA, 2.5 mM deoxycholate, 0.1 mM lecithin, 20 mM CaCl₂, 1.75 mM ethanol, pH 9.0)과 혼합하여 37°C의 수조에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤 1g의 Na₂SO₄를 가하여 단백질을 침전시키고 5.0ml의 0.1%의 빙초산이 함유된 acidic hexane을 가하여 혼합한 뒤 hexane층을 분리하고 이 중 1.0ml를 3.0ml의 scintillation cocktail과 혼합한 뒤 β -scintillation spectrometry를 시행하였다. PLA₂의 표준시료로는 *Crotalus adamanteus* PLA₂ 0.01 unit를 매번 실험에 사용하였고 PLA₂ 1.0 unit는 1분당 유리지방산 1 μ mol이 생성되는 것으로 정의하였다.

8. 통계처리

모든 성적은 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 유의성의 검정은 Student-Newman-Keul test를 이용

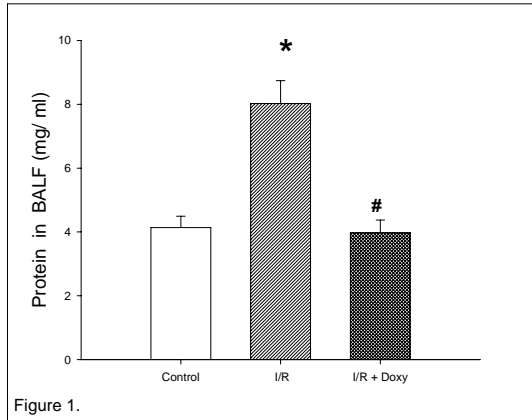


Figure 1. Comparison of protein content(mg/ml) in BAL. Gut I/R had increased protein content($p < 0.001$) compared with that of BAL of control rats. In contrast, Doxycycline decreased($p < 0.001$) protein content in the BAL of gut I/R rats. Values are given as mean \pm S.E. Values in parentheses indicate the number of experiments. I/R : gut ischemia/reperfusion Doxy : Doxycycline hyclate * $p < 0.001$, Control vs. I/R # $p < 0.001$, I/R vs. I/R+Doxy

하여 검정하였고 $p < 0.05$ 를 유의하다고 인정하였다.

결 과

장의 허혈후 재관류에 따른 급성폐손상시 doxycyclin의 효과를 폐장의 산화성 스트레스와 연관하여 알아본 본 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 폐세척액내의 단백질량

장의 재관류 후 폐세척액 내의 단백질량은 1.00 ± 0.10 (mg/ml)으로서 대조군의 0.50 ± 0.04 에 비해 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였다. 이것은 장의 재관류에 의하여 폐장 내 모세혈관의 혈관내피세포의

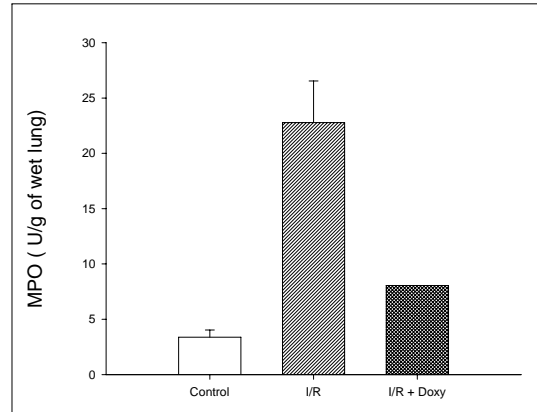


Fig. 2. Change in lung MPO activity(U/g of wet lung). Lung MPO increased significantly ($p < 0.001$) after gut I/R, whereas doxycycline decreased lung MPO($p < 0.001$) in gut I/R rats. Values are given as mean \pm S.E. Values in parentheses indicate the number of experiments. I/R : gut ischemia/reperfusion Doxy : Doxycycline * $p < 0.001$, Control vs. I/R # $p < 0.001$, I/R vs. I/R+Doxy

손상에 따른 혈중 단백질이 폐포 및 간질쪽으로 이동한 것을 의미한다. 이에 비해 clamp전 doxycyclin을 투여후 장의 재관류를 시행한 군에서는 폐세척액내의 단백질량이 0.49 ± 0.05 로 현저히($p < 0.001$) 감소하여 doxycyclin에 의해 폐장의 손상이 감소됨을 시사하였다(Fig. 1).

2. 폐장내 MPO 활성도의 측정결과

장의 재관류후 폐장의 손상이 호중구의 침윤과 관계가 있는지를 알아보기 위하여 폐장내 MPO의 활성도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

대조군에 있어서의 폐장 내 MPO의 활성도는 3.37 ± 0.67 (U/g of wet lung)이었으나 장의 재관류 후에는 22.78 ± 3.76 으로 유의하게($p < 0.001$) 증가하

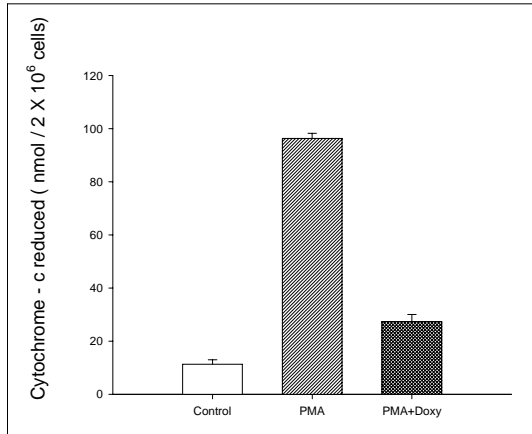


Fig. 3. Effect of doxycycline on the generation of free radicals from isolated human neutrophils. Comparing with unstimulated neutrophils, PMA-stimulated neutrophils generated more free radicals which resulted in the increased ($p < 0.001$) reduction of cytochrome-c. Doxycycline decreased ($p < 0.001$) the generation of free radicals from PMA-stimulated neutrophils.
 PMA : phorbol myristate acetate
 Doxy : Doxycycline
 Values in parentheses indicate the number of experiments.
 * $p < 0.001$, Control vs. PMA
 # $p < 0.001$, PMA vs. PMA+Doxy

였고 상장간동맥 clamp전 doxycyclin을 투여한 군에서는 장의 재관류후 8.06 ± 1.13 으로서 재관류군에 비해 유의한($p < 0.001$) 감소를 보였다. 이러한 결과는 장의 재관류에 의해 폐장 내의 호중구의 침윤이 증가하며 doxycyclin은 이러한 호중구의 침윤을 감소시킴을 보여주고 있다.

3. 호중구에서의 산소기 생성의 측정

호중구의 respiratory burst에 따른 산소기 생성에 미치는 doxycyclin의 효과를 알아보기 위해 cytochrome-c 환원검사를 시행한 결과는 Fig. 3과 같

다. 분리된 호중구에서 PMA를 가한 경우 대조군의 11.32 ± 1.71 (nmol/ 2×10^6 cells)에 비해 96.32 ± 1.89 로서 현저한($p < 0.001$) 증가를 보였으나 PMA 첨가후 doxycyclin을 처리한 군에서는 27.40 ± 2.64 로서 유의한($p < 0.001$) 감소를 보여 doxycyclin이 호중구에서의 산소기 생성을 억제함을 알 수 있었다.

4. 폐장에서의 산소기 생성의 확인

CeCl₃ cytochemical electron microscopy를 이용하여 폐장내 과산화수소의 생성을 검사하였다(Fig. 4).

대조군에서는 과산화수소와 cerium chloride의 반응물질인 cerrous perhydroxide의 과립이 거의 보이지 않았으나(Fig. 4-a) 장의 재관류후에는 cerrous perhydroxide의 과립이 현저히 증가하였고 특히 제2형 폐포세포막을 따라 다량으로 관찰되었다(Fig. 4-b). 상장간동맥 clamp전 doxycyclin을 투여한 군에서는 장의 재관류후에도 Fig. 4-c에서 보듯이 cerrous perhydroxide의 과립이 현저히 감소하여 doxycyclin이 폐장내 산소기의 생성을 억제함을 알 수 있었다.

5. 폐장의 PLA₂ 활성도의 검사

대조군의 폐장의 PLA₂ 활성도는 3.71 ± 0.63 (mU/g of wet lung)이었으나 장의 재관류 한 군에서는 37.86 ± 5.40 으로 증가($p < 0.001$)하였고 doxycyclin을 투여후 재관류를 시행한 군에서는 9.13 ± 1.19 로서 재관류군에 비해 유의하게($p < 0.001$) 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

장의 허혈-재관류에 따른 급성폐손상 특히 ARDS

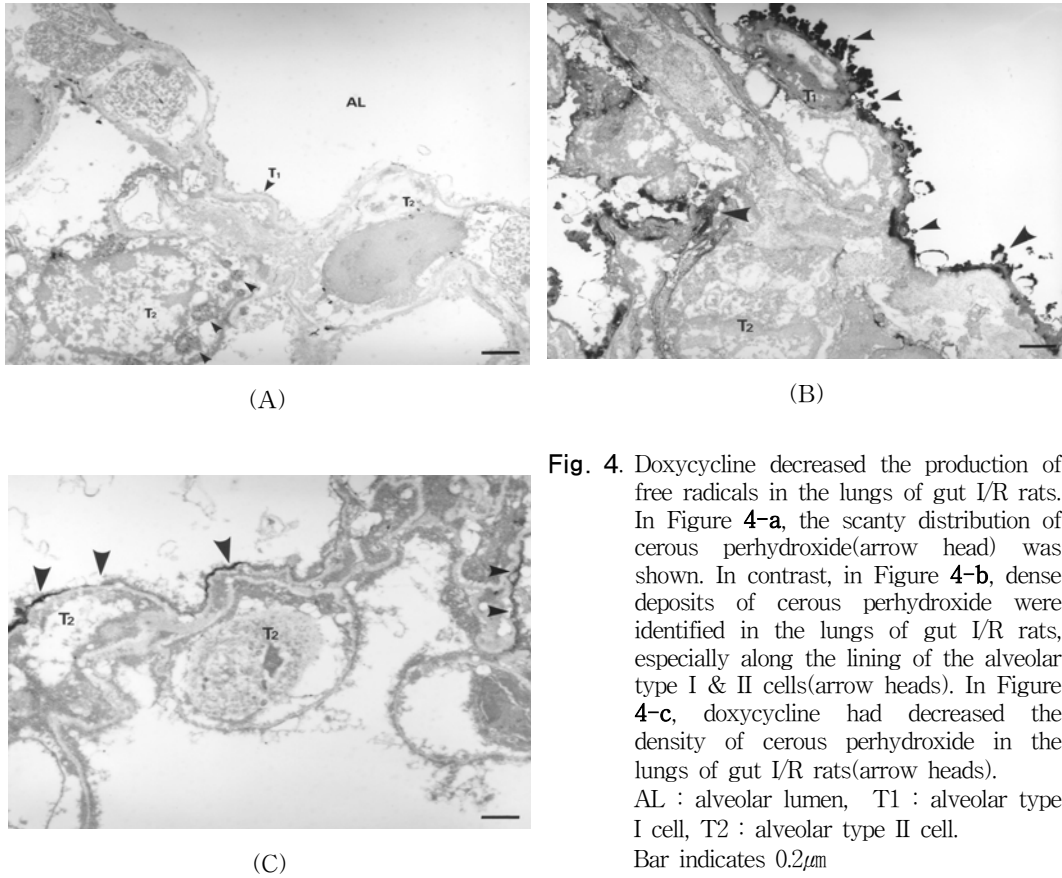


Fig. 4. Doxycycline decreased the production of free radicals in the lungs of gut I/R rats. In Figure 4-a, the scanty distribution of cerous perhydroxide(arrow head) was shown. In contrast, in Figure 4-b, dense deposits of cerous perhydroxide were identified in the lungs of gut I/R rats, especially along the lining of the alveolar type I & II cells(arrow heads). In Figure 4-c, doxycycline had decreased the density of cerous perhydroxide in the lungs of gut I/R rats(arrow heads). AL : alveolar lumen, T1 : alveolar type I cell, T2 : alveolar type II cell. Bar indicates 0.2µm

는 PLA₂의 활성화와 관계가 있다. 본 연구의 결과에서도 보듯이 장의 재관류 120분 뒤에는 폐세척액내의 단백질량이 현저히 증가하고 있다. 이러한 폐세척액내의 단백질량의 증가는 혈관내피세포의 손상을 의미하는 것으로 이것은 호중구의 침윤, PLA₂의 활성화 및 이에 따른 호중구에서의 산소기 생성이 그 원인 것으로 생각된다. 그 근거로는 폐장내 MPO 활성도의 증가, PLA₂ 활성도의 증가 및 세포화학적 방법으로 확인한 과산화수소의 증가를 들 수 있다. 호중구의 침윤에 따른 조직손상의 기전은 잘 알려져 있지만¹⁶ 급성폐손상에서의 호중구의 역할은 최근까지도 명확하지가 않다. Repine등¹⁷은 호중구에서의 과다한 산소기의 유리가 ARDS의 중요한 병인론을 차지한다고 보고하

고 있고 특히 Nilsson등¹⁸은 장의 허혈-재관류에 따른 급성폐손상은 XO의 작용에 따른 호중구에서의 산소기 생성이 중요한 원인이라고 하였다. 침윤한 호중구에서의 산소기의 생성은 PLA₂의 활성화와 관계가 있다. 즉 respiratory burst를 유발한 호중구에 PLA₂ 억제제를 가하면 산소기의 생성이 억제된다는 점¹⁹을 통해서도 PLA₂가 호중구에서의 산소기 생성에 관여한다는 점을 알 수 있으며 특히 Dana 등²⁰은 PLA₂의 활성화에 의해 생성되는 아라키돈산은 호중구막의 NADPH oxidase를 직접 활성화하여 산소기를 생성한다고 하였다.

본 연구에서는 장에서의 재관류가 폐장에서의 PLA₂ 활성도의 증가하는 원인을 제시하지 않았으나 Lee 등²¹은 장에서의 재관류는 장조직, 혈장 및

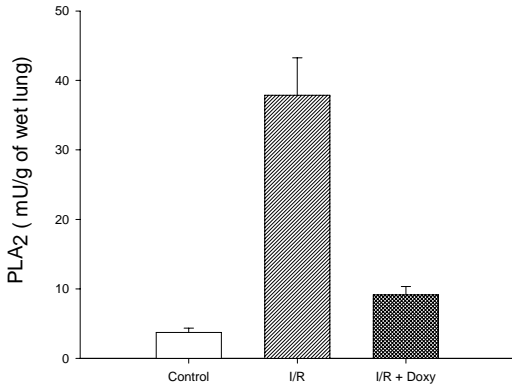


Fig. 5. Effect of doxycycline on the PLA₂ activity in the lung. After gut I/R, PLA₂ activity (mU/g of wet lung) increased significantly ($p < 0.001$) compared with that of the lungs of control rats. In contrast, doxycycline decreased ($p < 0.001$) PLA₂ activity in the lungs of gut I/R rats.

I/R : gut ischemia/reperfusion

Doxy : Doxycycline

Values in parentheses indicate the number of experiments.

* $p < 0.001$, Control vs. I/R

$p < 0.001$, I/R vs. I/R+Doxy

폐장에서의 platelet activating factor의 농도를 증가시키며 또한 폐장조직에서의 PLA₂의 활성도가 증가한다고 보고하고 있다. PAF는 동시에 PLA₂를 활성화시키는 것이 알려져 있어서²² 장의 재관류로 생성된 PAF가 일종의 체액성인자로 작용할 가능성도 있다.

호중구에서의 산소기 생성에 관여하는 PLA₂는 분자량에 따라 cytosolic형과 분비형으로 구분되는데 이중 분비형 중에서도 groupII 형은 급성폐손상에 관여함이 알려져 있다²³. Pruzanski등⁹은 doxycyclin이 이 groupII PLA₂의 억제제로 작용함으로써 항염증 작용을 나타낸다고 하였다.

본 연구결과에서도 보듯이 doxycyclin은 폐장의 PLA₂의 활성도를 감소시키고 그에 따른 호중구

침윤의 감소 및 호중구에서의 산소기생성의 감소, 조직에서의 과산화수소의 감소를 유도함으로써 조직에서의 산화성 스트레스를 감소시키고 있다. Flavonoid중 rutin은 groupII PLA₂의 선택적 억제제로 알려져 있고²⁴ 장의 재관류에 의해 발생하는 급성폐손상 경감의 효과가 있다. 또한 Koike등²⁵은 groupII PLA₂억제제를 이용하여 장의 재관류에 따른 급성폐손상의 감소효과를 제시하고 있다. 이러한 연구결과들은 groupII PLA₂억제제인 doxycyclin의 효과를 확인한 본 실험의 결과와 일치하는 것이어서 흥미롭다.

장의 재관류후에 발생하는 급성폐손상에는 PLA₂외에도 다른 인자가 관여하므로 PLA₂의 억제제로만으로는 급성폐손상의 완전한 치료를 기대할 수 없다고 생각되지만 아직까지 ARDS에 대한 적절한 치료제가 개발되어 있지 않다는점, 그리고 결과에서 보듯이 doxycyclin이 PLA₂를 억제하여 급성폐손상이 감소한다는 점을 감안할 때 doxycyclin이 어떤 기전에 의해 PLA₂를 억제하는지를 연구하면 ARDS의 치료제로도 사용될 가능성이 있지 않나 사료된다.

요 약

연구배경 :

장의 재관류로 발생하는 급성폐손상에서 group II PLA₂의 억제제로 알려진 doxycyclin의 치료효과와 그 작용기전을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다. 특히 장의 재관류에 의한 급성폐손상이 호중구에 의한 산화성 스트레스에 의하며 이 과정에서 group II PLA₂가 관여한다는 사실에 근거하여 doxycyclin의 산화성 스트레스억제를 확인하는 것이 본 연구의 목적이었다.

방 법 :

체중 300g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐에서 상장간막동맥을 60분간 clamp한 뒤 120분간의 재관

류를 시키면 급성폐손상이 유도된다. 이때 호중구에 의한 산화성스트레스가 유발되고 여기에 PLA₂가 관여하는 것을 관찰하기 위해 lung leak, lung MPO 활성도, CeCl₃ cytochemical electron microscopy, cytochrome-c reduction assay 및 lung PLA₂ 활성도를 측정하였다. 또한 doxycyclin의 효과를 확인하기 위하여 doxycyclin hyclate(10mg/kg)를 복강내 주사한 뒤 위에서 언급한 모든 parameter를 측정, 비교하였다.

결 과 :

장의 재관류로 유도된 급성폐손상에서 doxycyclin은 폐손상을 감소시켰는데 이것은 doxycyclin에 의한 lung MPO, 산소기생성, lung PLA₂ 활동도의 감소에 의한 것으로 생각되었다.

결 론 :

장의 재관류로 유도된 급성폐손상은 호중구에서 생성되는 산소기, 특히 PLA₂의 활성화에 의해 생성된 산소기에 의한 것으로 생각되며 이때 doxycyclin은 PLA₂를 억제하여 산화성 스트레스를 감소시킴으로써 폐손상의 감소를 가져오는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Donnelly SC, Robertson C. Trauma, inflammatory cells and ARDS. Arch Emerg Med 1993;10:108-111.
2. Viejo A, Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. Am J Crit Care 2002;11:543-55.
3. 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:G397-403.

4. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophils sequestration after intestinal ischemia/reperfusion. Am J physiol 1992;263:L394-L401.
5. Anderson BO, Moore EE, Banerjee A. Phospholipase A₂ regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure. J Surg Res 1994;56:199-205.
6. Matthay MA. Conference summary : Acute lung injury. Chest 1999;116:119S-26S.
7. Tsukahara Y, Morisaki T, Horita Y, Torisu M, Tanaka M. Phospholipase A₂ mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis. Ann Surg 1999;299:385-92.
8. Ljungman AG, Christer T, Lindahl M. Endotoxin stimulates the expression of groupII PLA₂ in rat lungs in vivo and in isolated perfused lungs. Am J Physiol 1996; 270:L752-76.
9. Pruzanski W, Greenwald RA, Streat IP, Laliberte F, Stefanski E, Vadas P. Inhibition of enzymatic activity of phospholipase A₂ by minocyclin and doxycyclin. Biochem Pharmacol 1992;44:1165-70.
10. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid : elimination of interfering substance. Anal Biochem 1989;102:1152-60.
11. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. J Appl Physiol 1985;59:1978-85.
12. 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.
13. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Post injury neutrophil priming and activation state : therapeutic challenges. *Shock* 1995;3:537-66.
 14. Karnovsky MJ. Robert Feulgen Lecture 1994. Cytochemistry and reactive oxygen species : a retrospective. *Histochemistry* 1994;102:15-27.
 15. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. Rapid assay for activity of phospholipase A₂ using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1986;154:676-81.
 16. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76.
 17. Repine JE. Interleukin-1 mediated acute lung injury. *Environ Health Perspec* 1994;102(suppl 10):75-8.
 18. Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Berger HG et al. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994;106:629-36.
 19. 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;155:1624-8.
 20. Dana R, Leto TL, Levy R. Essential requirement of cytosolic PLA₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998;273:441-5.
 21. Lee YM, Park Y. PAF contributes to intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury through neutrophilic oxidative stress. *Korean J Physiol Pharmacol* 1999;3:405-14.
 22. 권영식, 이영만. Platelet-activating factor에 의한 급성폐손상에서 호중구 에 의한 산화성스트레스에 관여하는 phospholipase A₂ 활성도의 변화. Unpublished Date
 23. 전상훈, 김 근, 이상철, 이종태, 김성은, 이영만. 장의 허혈-재관류로 유도 된 급성폐손상에서 산화성스트레스에 관여하는 groupII phospholipase A₂ 의 역할. *대한흉부외과학회지* 2002;35:501-10.
 24. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors : Importance of their structure for selective inhibition of groupII phospholipase A₂. *inflammation* 1997;21:347-56.
 25. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. group IIA phospholipase A₂ mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 2000;232:90-7.