

## 백서의 패혈증 모델에서 시간에 따른 폐조직에서의 Inducible Nitric Oxide Synthase 발현

서울대학교 의과대학 응급의학교실, 경상대학교병원 응급의학과<sup>1</sup>, 서울대학교 의과대학 외과학교실<sup>2</sup>

김중희 · 김성춘<sup>1</sup> · 권운용 · 서길준 · 윤여규<sup>2</sup>

— Abstract —

### Time Course of Inducible NOS Expression of Lung Tissue during Sepsis in a Rat Model

Joong Hee Kim, M.D., Seong Chun Kim, M.D.<sup>1</sup>, Woon Yong Kwon, M.D.,  
Gil Joon Suh, M.D., and Yeo Kyu Youn, M.D.<sup>2</sup>

*Department of Emergency Medicine, Seoul National University College of Medicine,  
Department of Emergency Medicine, Gyeongsang National University Hospital',  
Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine<sup>2</sup>*

**Purpose:** Many studies on the time course of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression have been performed in the LPS (Lipopolysaccharide)-induced endotoxemic model, but there have been few experimental approaches to continuous peritonitis-induced sepsis model. We conducted this study to establish basic data for future sepsis-related research by investigating the time course of iNOS gene expression and the relationship with the production of inflammatory mediators in the early sepsis model induced by cecal ligation and puncture (CLP).

**Methods:** Male Sprague-Dawley rats were operated on by using the CLP method to induce of peritonitis; and then, they were sacrificed and samples of blood and lung tissues were obtained at various times (1,2,3,6,9 and 12 h after CLP). We observed the expression of iNOS mRNA from lung tissues and measured the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  from the blood.

**Results:** iNOS mRNA began to be expressed at 3 h and was maintained until 12 h after CLP. The nitric oxide concentration was increased significantly at 6 h, reached its peak level at 9 h, and maintained a plateau until 12 h after CLP. TNF- $\alpha$  began to be detected at 3 h, increased gradually, and decreased steeply from 9 h after CLP. IL-1 $\beta$  showed its peak level at 6 h after CLP, and tended to decrease without significance.

**Conclusion:** We observed that the iNOS gene was expressed later in peritonitis-induced sepsis than in LPS-induced sepsis. Nitric oxide and key inflammatory mediators were also expressed later in peritonitis-induced sepsis than in LPS-induced sepsis. (J Korean Soc Traumatol 2008;21:120-127)

**Key Words:** Nitric oxide synthase, Inflammation mediators, Sepsis, Peritonitis

\* Address for Correspondence : **Seong Chun Kim, M.D.**

Department of Emergency Medicine Gyeongsang National University Hospital  
90 Chilam-dong, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 660-702, Republic of Korea  
Tel : 82-55-750-8831, Fax : 82-55-757-0514, E-mail : gsimem@medimail.co.kr

접수일: 2008년 10월 16일, 심사일: 2008년 12월 8일, 수정일: 2008년 12월 11일, 승인일: 2008년 12월 15일

## 1. 서 론

패혈증이란 미생물 감염에 대한 전신적 염증반응(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)을 말한다.(1) 그 임상 현상으로 수액치료에 반응하지 않는 패혈증 쇼크와 ARDS (adult respiratory distress syndrome), 급성신부전 및 간 손상과 같은 주요 장기의 기능 부전이 가장 중요한 문제가 된다. 패혈증의 직접적 사망원인의 대부분을 차지하는 패혈증 쇼크(septic shock)와 다발성 장기 부전(MODS, multiple organ dysfunction syndrome)의 기전으로 조직 내의 미세혈액순환의 이상이 중요한 위치를 차지하며, 연구에 의하면 혈관의 긴장도 유지 및 미세혈액순환의 유지에 혈관내피세포-유래 이완인자(EDRF, endothelial derived relaxation factor), 즉 산화질소(NO, nitric oxide)가 필수적인 역할을 한다고 알려져 있다.(2)

1985년에 Stuehr와 Marletta 등(3)이 포유동물의 대식세포(macrophage)가 체내에서 세균의 lipopolysaccharide에 반응하여 NO를 생산한다는 것을 증명 한 후로, NO의 역할과 작용들에 대해서 수많은 연구들이 이루어졌다. NO는 세포 내와 세포외에서 중요한 신호전달 물질로서, 심혈관계, 신경계, 그리고 면역계통에서 다양한 생리적 및 병태생리학적 기전들을 조절한다. 즉, 신경전달물질(neurotransmitter)과 유사한 매개물질로서의 역할을 하여 혈관의 긴장도를 조절하고, 면역계통에서 중요한 방어 인자로서 작용한다. 반면에, 자유 산소 라디칼( $\text{NO}\cdot$ )로서 작용하여 염증성 질환의 병리적인 과정에서 세포독성을 나타낸다.(4-6) NO는 저분자량의 막-투과성 기체이며, 세포내의 산화질소 합성효소(NOS: nitric oxide synthase)에 의해 아미노산 L-arginine과 산소 분자가 L-citrulline과 NO로 전환되는 과정에서 생성된다.(4,7,8) NOS에는 적어도 3가지 이상의 동종형(isoform)들이 존재하는 것으로 알려져 있는데, eNOS (endothelial NOS, NOS I), iNOS (inducible NOS, NOS II)와 nNOS (neuronal NOS, NOS III)이다. 이 중에서 eNOS와 nNOS는 체질성 NOS(cNOS: constitutional NOS)라고 불리며, 휴지기 세포에서 항상 존재하다가 칼슘과 칼모듈린(calmodulin)에 의해 활성화된다. 신호전달물질의 요구에 따라 NO는 cNOS에 의해 낮은 농도로 합성되며, 수용성 guanylate cyclase의 헴 철(heme iron)과 결합하여 2차 메신저인 cGMP를 만들어 여러 가지 매개물질들을 조절함으로써 세포내 칼슘 농도를 떨어뜨려 결국 평활근의 이완을 일으키고 혈소판이 응집하여 혈관벽에 부착되는 것을 방해한다.(9,10) iNOS는 휴지기 세포에는 존재하지 않으며, 세균 감염이나 LPS와 같은 생산물과 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )와 같은 cytokine들에 의해 혈관내피세포(endothelium), 간세포(hepatocyte), 단핵세포(monocyte), 비만세포(mast

cell), 대식세포(macrophage)와 평활근 등에서 유도되어 세포내 칼슘 농도와 무관하게 NO를 과량으로 생산하게 된다.(4,11) 반면에 IL-4, IL-8, IL-10, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dexamethasone, actinomycin D, cycloheximide 등은 NO 생성을 억제한다고 알려져 있다.(12-15) 패혈증에서 iNOS에 의해 과량 생산된 NO는 세포를 보호하기도 하지만 주로는 자기 세포를 파괴하는 작용을 하므로, 원하지 않는 NO의 생산을 차단하는 것이 패혈증 치료법의 한가지로 부각되었다. 그리하여, 최근 iNOS의 발현을 억제하는 물질들에 대한 다양한 연구들이 최근 폭발적으로 쏟아져 나오고 있다.

시간 경과에 따른 iNOS gene과 cytokine의 발현 양상과 주요 장기별 차이점에 대한 연구들은 지금까지 많이 이루어져 왔다. Liu 등은 lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia 모델에서 iNOS mRNA는 LPS 투여 후 20-40분 만에 발현이 시작되고 4-8시간에 최고조에 달하여 plateau를 이루고, 이후 점차 감소하여 24시간이 경과하면 거의 발현되지 않는 것으로 보고하였다.(16) Lin 등은 LPS 투여 후 1시간 내에 TNF- $\alpha$ 와 IL- $1\beta$ 의 농도가 peak에 도달하고, iNOS mRNA의 발현은 심장, 폐, 비장에서 1시간 후 발현되기 시작하여 3시간 후에 최고조에 도달한다고 보고하였다. 그리고 간에서는 1시간 후 발현되기 시작하여 6시간 후에 최고조에 도달하며, 모든 장기에서 24시간 후에는 기저치까지 감소한다고 보고하였다.(17)

패혈증에 대한 동물실험 모델에는 여러 가지가 있으나, 주로 LPS를 투여하는 모델과 CLP 모델이 가장 많이 이용된다. Remick 등은 상기한 2가지 모델에서 사망률과 염증성 반응을 비교하였는데, LPS 모델에서는 사람의 패혈증과는 다른 cytokine profile을 보여주므로 cytokine과 연관된 면역치료에 대한 연구에서 다소 문제가 될 수 있음을 경고하고 있다.(18) Okamoto 등(19)은 cecal ligation and puncture (CLP) 방법으로 유발된 패혈증에 합병된 acute lung injury 모델에서 iNOS mRNA가 12시간부터 42시간까지 발현된다고 보고하였으나, 12시간 이전의 초기 패혈증 상태의 발현 양상에 대해서는 연구된 바가 드물다. CLP 모델에서 iNOS expression이 시간 경과에 따라 장기별로 어떤 차이점이 있는 지에 대해 밝혀진 바가 거의 없는 실정이다. 앞서 언급 하였던 Okamoto 등(19)의 연구를 비롯한 몇 개의 연구들에서도 초기 패혈증이라고 여겨지는 10시간 이내의 시간 경과에 따른 iNOS 발현에 대해서는 자료를 찾아볼 수 없었다. Kan 등(20)은 LPS 모델에서, 폐조직은 다른 조직에 비해 iNOS 유전자 발현이 뚜렷하고 LPS 투여 후 4시간 만에 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 발현을 확인할 수 있었다고 기술하였다. 이를 근거로 초기 패혈증 상태에서 iNOS 발현 양상을 확인하기 위한 가장 적절한 조직으로 폐조직을 선택하여 본 연구를 계획하였다.

본 연구를 통해 CLP 방법에 의한 패혈증 모델, 특히 초기 패혈증에서의 시간 경과에 따른 폐조직에서의 iNOS mRNA의 발현 및 혈청에서의 NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 혈중 농도를 평가함으로써 향후 패혈증과 관련된 다양한 실험적 연구들에 기초적인 자료를 제공하고자 하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 실험동물

#### 1) 실험군

실험과 관련된 모든 프로토콜(protocol)은 서울대학교 실험동물 자원관리원의 동물실험위원회로부터 승인을 받은 후 서울대학교 의과대학 동물실험실에서 시행되었다. 실험 동물로는 체중 250~300 g의 Sprague-Dawley 백서 수컷을 사용하였다. 백서들을 대조군과 복막염을 유발한 실험군으로 나누었다. 실험군은 CLP 시행 후 1 시간, 2 시간, 3 시간, 6 시간, 9 시간, 그리고 12 시간의 6 소군으로 다시 나누었으며, 각 군은 6 마리로 구성하였다. 실험군은 실험 1 주전에 사육실에서 일반사료와 물을 먹이면서 12 시간마다 밝고 어둡게 조명을 반복하여 주위 환경에 적응시킨 후, 실험 8 시간 전부터 물만 주며 금식시켰다.(21)

#### 2) 실험동물에 대한 처치

대조군은 아무런 수술이나 처치를 하지 않았다. 실험군은 다음의 방법으로 인위적으로 복막염을 조장하였다. Ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg을 복강 내 투여하여 마취시킨 후, 복벽을 10% povidone 용액으로 소독한 다음, 복벽을 2 cm 정중 절개하고 혈관이 손상되지 않도록 주의하면서 맹장을 꺼내어 회장맹장 관막 직하부에서 맹장의 25%를 3-O silk로 결찰하였다. 맹장의 장간막이 없는 쪽 표면에 18-gauge 주사기 바늘로 두 차례 관통시키고 손으로 짜서 천공된 부위를 통해 분변이 흘러 나오도록 한 후, 다시 맹장을 복강내에 위치시키고 복벽의 근육층과 피부층을 봉합하였다. 피하로 50 cc/kg의 생리식염수를 주사하고 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.

#### 3) 검체 채취

CLP 12시간 및 24시간 후 ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg를 복강 내 투여하여 마취시킨 후 흉부를 절개하여 심장(heart)에서 혈액을 채취하며 폐(lung) 조직을 적출하였다. 채취된 혈액은 즉시 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후에 혈장만 분리하여 -70°C에 보관하였으며, 적출한 조직은 4°C 생리식염수로 철저히 세척한 후, 액체 질소에 담가 급냉시킨 후 -70°C에서 보관하였다.

실험 종료 시점은 각 시간 군의 적출 시점에 따라 결정되었다. 1시간 군은 CLP 1시간 후에 종료되며, 12시간 군은 CLP 12시간 후에 종료되었다. 적출 시 ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg을 복강 내에 투여하여 마취시키고, 흉부 및 복부를 절개하자마자 심장에서 혈액을 채취하고 폐조직을 적출하였다. 채취된 혈액은 즉시 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후에 혈청만 분리하여 -70°C에 보관하였으며, 적출한 조직은 철저히 세척하고 액체질소에 담가 급냉시킨 후 -70°C에서 보관하였다.

### 2. 결과 측정

#### 1) 혈중 NO 측정

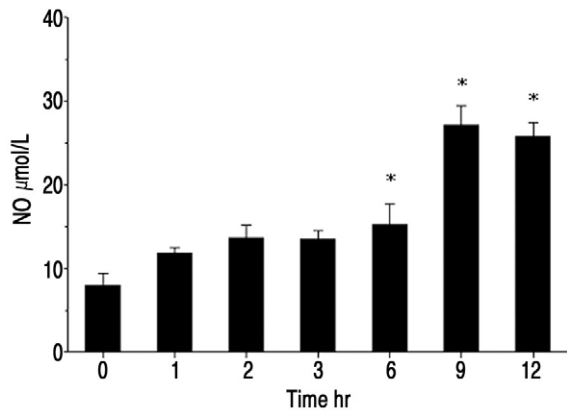
액체 용액상태에서 NO는 저절로 nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)와 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 이온으로 변하며, 생체 내에서는 이들이 가장 안정된 NO 산물이다. 본 연구에서는 nitrate와 nitrite를 포함한 산화질소의 농도를 측정하기 위하여 Greiss reagent를 사용하는 kit를 이용하였다. 혈중 NO의 농도는  $\mu$ mol/L로 표시하였다.

#### 2) iNOS mRNA 발현 측정

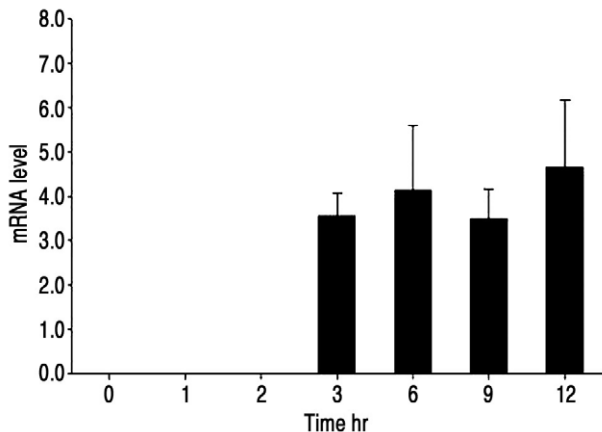
상업용 kit (TRI Reagent, Molecular Research Center, Inc, USA)를 사용하여 절제된 조직 100 mg에서 RNA를 추출한 뒤, 분광광도계 (Beckman, USA)를 사용하여 260 nm에서 추출된 RNA의 농도를 측정하였다. 추출된 RNA 중 100 ng을 역전사하여 first strand complementary DNA (cDNA)를 만들었다. 역전사에 필요한 반응 혼합물은 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 2.5 mM Random Hexmer (Promega, USA), 1 U/ $\mu$ l ribonuclease inhibitor (Promega, USA), 및 Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (GibcoBRL, USA)으로 만들었다. cDNA를 합성한 후에 rat iNOS와 rat glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 대한 PCR (PCT-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA)을 시행하였다. PCR을 위한 반응 혼합물은 2 mol of primer, 2.5 U/ $\mu$ l Taq polymerase (Takara, Japan), 0.8 mM of dNTP, and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 등으로 만들었다.

PCR은 초기 94 °C에서 3분간 denaturation 후 30 cycle을 시행하며, 각 cycle은 94°C에서 1분간 denaturation 후 58°C에서 1.5분간 annealing을 하고 72°C에서 10분간 elongation 시켰다. 백서의 iNOS cDNA 합성에 필요한 oligonucleotide primer는 5' -CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' (sense)와 5' -GGGTGTCAGAGTCTTGTGCCTTTGG-3' (antisense)이고, 백서의 GAPDH cDNA를 위한 oligonucleotide primer는 5' -TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (sense)와 5' -AGATCCACAACGGATACATT-3' (anti-

sense)이다. Housekeeping gene GAPDH의 발현을 control로 하며 GAPDH band가 없는 RNA는 제외시켰다. 증폭된 PCR product는 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide가 포함된 1.5 % agarose gel에서 전기영동 시킨 후에 자외선으로 검사하였다. iNOS와 GAPDH gene PCR products의 크기는 각각 497 bp와 309 bp로 하였다. 겔 사진촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Korea)를 사용하여 스캐닝 하였다. iNOS와 GAPDH cDNA의 band density는 imaging densitometer (BIO-RAD, USA)로 측정하였다.



**Fig. 1.** Time course of plasma NO production of peritonitis-induced sepsis in conscious rats at various time points before (0 h) and after CLP. NO concentration began to increase significantly at 6 h, reached peak level at 9 h, and maintain plateau till 12 h after CLP (\* $p < 0.05$  vs. 0 h).



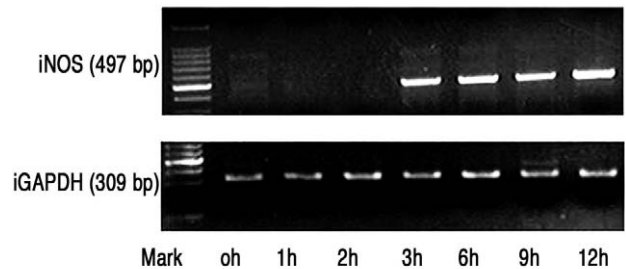
**Fig. 3.** Semiquantitation of iNOS mRNA expression levels in lung tissue of rats during peritonitis-induced sepsis. Results were presented as the iNOS/GAPDH ratio at various time points before (0 h) and after CLP. iNOS mRNA began to be expressed at 3 h and maintained till 12 h after CLP. But, there was no statistically significant difference compared with 0 h.

### 3) 혈중 cytokine 농도 측정

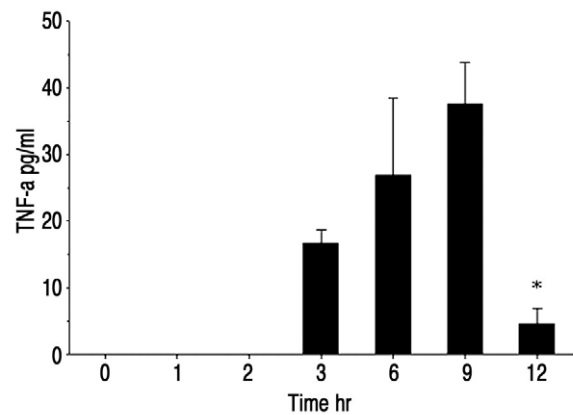
Rat용 ELISA kit (R and D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 혈중 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 농도를 측정하였다. 측정 한계치보다 낮아서 측정이 되지 않는 경우에 N (not detectable)으로 표시하였다.

### 3. 통계 분석

각 측정치의 값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었고, 시간 군별로 통계적 차이를 확인하기 위해 일원배치 분산분석을 실시하였고, 사후검정을 위해 Turkey's test를 이용하였다. 유의검정 수준은  $p < 0.05$ 로 하였다. 통계 프로그램으로는 SPSS Ver. 12.0 for Windows를 이용하였다.



**Fig. 2.** Gel photograph of PCR-amplified iNOS and GAPDH cDNA derived from iNOS and GAPDH mRNA. The PCR product fragments of iNOS and GAPDH mRNA are 497 and 309 bp, respectively.



**Fig. 4.** Time course of plasma TNF- $\alpha$  production of peritonitis-induced sepsis in conscious rats at various time points before (0 h) and after CLP. TNF- $\alpha$  began to be detected at 3 h, increased gradually, and decreased steeply from 9 h after CLP. But, a statistically significant difference exists only between 9 h and 12 h groups (\* $p < 0.05$  vs. 9 h).

### III. 결 과

#### 1. 혈중 NO 농도

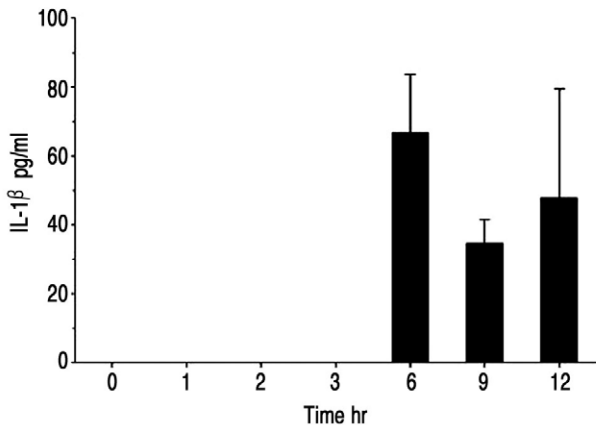
CLP를 시행하지 않은 0시간에서의 기저치는  $8.0 \pm 3.4 \mu\text{mol/L}$ 였고, CLP 후 시간이 경과할수록 서서히 증가하기 시작하였다. 하지만,  $15.4 \pm 6.0 \mu\text{mol/L}$ 로 측정된 CLP 후 6시간에서부터 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다. CLP 후 9시간에  $27.2 \pm 5.4 \mu\text{mol/L}$ 로 최고조에 달하였으며 CLP 후 12시간까지  $25.8 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$ 로 plateau를 보이는 양상이었다(Fig. 1).

#### 2. 폐조직의 iNOS 유전자 발현

폐조직에서의 iNOS 유전자 발현은 CLP 후 3시간에서 측정되기 시작하였다. 이후 발현되는 정도는 완만하게 증가하는 경향을 나타내었으나, 통계적으로 유의한 차이를 보여주지는 않았다(Fig. 2, 3).

#### 3. 혈중 cytokine 농도

혈중 TNF- $\alpha$ 는 CLP 후 3시간에서 측정되기 시작하여 9시간에  $37.6 \pm 15.3 \text{ pg/ml}$ 로 최고조에 달하였다. 이후 12시간째에  $4.7 \pm 5.0 \text{ pg/ml}$ 까지 감소하는 양상을 보였다. IL-1 $\beta$ 는 CLP 후 6시간에서 가장 높은 수치인  $66.8 \pm 41.4 \text{ pg/ml}$ 로 측정되기 시작하였으며, 이후 9시간과 12시간에서 서서히 감소하는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 4, 5).



**Fig. 5.** Time course of plasma IL-1 $\beta$  production of peritonitis-induced sepsis in conscious rats at various time points before (0 h) and after CLP. IL-1 $\beta$  showed peak level at 6 h after CLP, and tended to decrease from then. But there was no statistical significance.

#### 4. 선도표의 도출

시간에 따른 폐조직의 iNOS 유전자 발현 및 혈중에서의 NO와 주요 cytokine production의 발현 양상을 각 측정치들의 평균±표준편차 값으로부터 선도표를 도출하여 표시하였다(Table 1) (Fig. 6).

### IV. 고 찰

맹장을 결찰한 후 바늘로 천공시켜 복막염을 유발하는 것은 용이하고 널리 알려진 패혈증 모델들 중의 하나이다. 이러한 CLP (cecal ligation and puncture) 방법은 Wichterman 등(21)이 1980년에 개발하여 표준화한 것으로, 18 gauge 바늘로 2회 천공시켜 복막염을 유발하는 쉽고 값싼 방법이다. 이 논문에 따르면 CLP 시행 후 약 10시간이 지나면 혈액배양에서 polymicrobial bacteremia를 확인할 수 있다고 하며, 이 시간을 기준으로 hyperdynamic한 초기 패혈증과 hypodynamic한 후기 패혈증으로 나눌 수 있다고 주장하였다. 이후 CLP 방법은 패혈증 연구에 있어서 LPS 투여와 함께 가장 많이 이용되는 실험 방법으로 정착되었다. LPS 투여는 재현성이 높다는 장점이 있으나, 사람의 패혈증과 달리 초기에 심박출량이 일반적으로 감소하고 전신혈관저항이 정상 혹은 증가하는 hypodynamic한 현상을 보인다는 단점을 가지고 있다. 반면, CLP 방법은 바늘의 굵기, 천공의 횟수, 그리고 시술자에 따라 septic challenge의 정도가 현저하게 달라질 수 있다는 단점이 있다. 특히, Otero-Anton 등(22)은 천공에 사용되는 바늘의 굵기가 증가할수록 endotoxemia의 정도, TNF- $\alpha$  혈중 농도, 및 사망률이 상승한다고 보고하였고, Maier 등(23)은 CLP 방법보다는 colon ascendens stent peritonitis (CASP) 방법이 오히려 광범위하고 지속적인 복막염을 유발하는데 더 유리하다는 의견을 제시하였다. 결국, 이러한 단점을 극복하기 위해서는 개체수를 상당히 늘리거나 septic challenge의 변화가 최소화될 수 있도록 하는 노력이 선행되어야 한다.(24) 본 실험에서는 CLP 방법의 단점을 최소화시키기 위하여 표준화된 protocol에 따라 오직 한 사람의 시술자에 의해 수술을 시행하였고, 통계적으로 의미 있는 결과를 도출할 수 있다고 알려져 있는 개체수를 대상으로 하였다.

본 실험에서 iNOS 유전자 발현은 CLP 시행 후 3시간에서 처음으로 관측이 되었는데, 이는 Farley 등(25)의 연구보다 적어도 1시간 정도가 빨리 발현됨을 보여준 결과이다. 3시간 이후 발현된 iNOS mRNA는 Okamoto 등(19)의 연구 결과에서 보였듯이 12시간까지 유지되었다. 기존의 많은 LPS 투여에 의한 endotoxemia 모델과는 상이한 결과이다. NO의 합성은 6시간에서 통계적으로 유의하게 증가

하기 시작하였는데, iNOS 유전자의 발현이 시작되는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. iNOS 유전자 발현은 패혈증에서 cytokine에 의해 유도된다고 알려져 있다.(7) TNF- $\alpha$ 는 CLP 시행 후 3시간에서 측정되기 시작하여 급격하게 상승하고, IL-1 $\beta$ 는 CLP 시행 후 6시간에 가장 높게 측정되기 시작하여 9시간과 12시간에서 서서히 감소하는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. Villa 등(26)은 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 CLP 시행 후 각각 2시간과 4시간째에 최고치에 달했다는 실험 결과를 보고하였는데, 이는 체중 30 g 미만의 mouse를 사용함으로써 본 실험 결과와의 차이점이 발생했을 것이라고 생각된다.

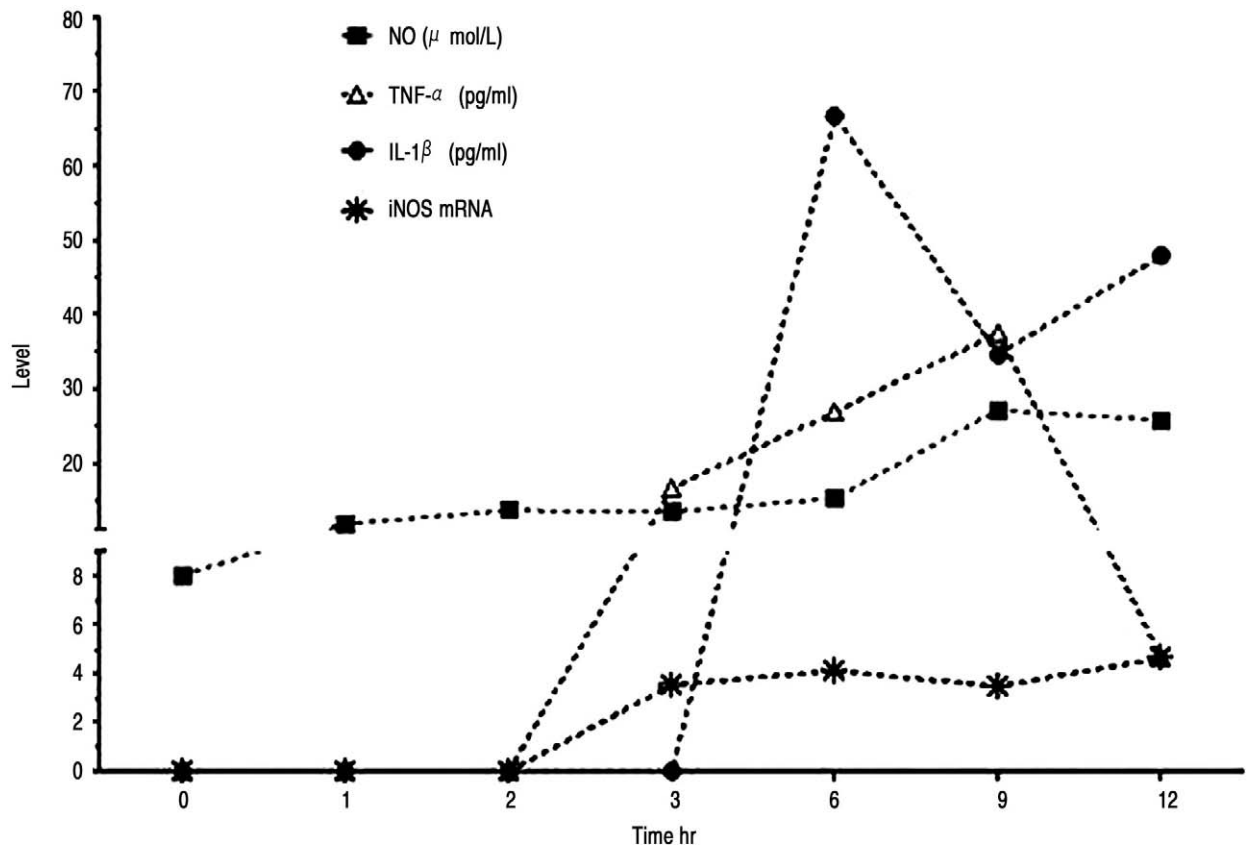
서론에서 언급했듯이 패혈증에서는 cytokine들이 먼저 유도되어 NO를 과량으로 생산한다고 하였는데, 본 실험에서는 iNOS mRNA 유전자 발현이 TNF- $\alpha$  혈중 농도와 같은 3시간째에 관찰되기 시작하였다. 하지만 유전자 단계에서는 TNF- $\alpha$  유전자가 먼저 발현되었을 것으로 추정할 수 있다. Overhaus 등(27)은 21-gauge 바늘로 1회 천공시킨 CLP 모델에서 소장과 대장의 IL-1 $\beta$  유전자 발현을 RT-PCR 기법으로 관찰한 결과, 대장과 소장에서 각각 3시간과 6시간째에 최고치로 측정되었다고 보고하였다. 결론적으로, TNF- $\alpha$ 가 IL-1 $\beta$ 보다 먼저 생성되기 시작하여 IL-1 $\beta$ 의 생성과 iNOS 유전자 발현을 유도하지 않을까 유추해

**Table 1.** Effects of sepsis on the levels of selected key cytokines and NO of the blood, and iNOS/GAPDH ratio in lung tissues of the rats

Time after CaLP	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h	9 h	12 h
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	N	N	N	16.8 $\pm$ 2.3	26.9 $\pm$ 23.2	37.6 $\pm$ 15.3	4.7 $\pm$ 5.0 <sup>†</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	N	N	N	N	66.8 $\pm$ 41.4	34.7 $\pm$ 16.8	48.0 $\pm$ 44.6
iNOS/GAPDH ratio	N	N	N	3.6 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 3.3	3.5 $\pm$ 1.6	4.7 $\pm$ 3.7
NO ( $\mu$ mol/L)	8.0 $\pm$ 3.4	11.9 $\pm$ 1.5	13.7 $\pm$ 3.5	13.6 $\pm$ 2.3	15.4 $\pm$ 6.0*	27.2 $\pm$ 5.4*	25.8 $\pm$ 3.9*

Values are means  $\pm$  SD.

N: not detectable, \*:  $P < 0.05$  vs. 0 h, <sup>†</sup>:  $P < 0.05$  vs. 9 h.



**Fig. 6.** Time course of changes in mean levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, and iNOS/GAPDH ratio in conscious rats at various time points before (0 h) and after CLP.

볼 수 있겠다. Helmer 등(28,29)은 LPS 모델에서 ketamine과 xylazine을 마취제로 사용하였을 때 TNF- $\alpha$ 와 iNOS mRNA 발현이 약화된다고 보고하였다. 본 실험에서도 CLP 시행과 장기 적출을 위해 ketamine과 xylazine을 혼합하여 사용하였는데, 향후 CLP 모델에서 이러한 약제가 cytokine과 iNOS mRNA의 발현에 어떤 영향을 미치는지에 관한 연구가 추가적으로 필요할 것이다.

본 연구의 제한점은 첫째, CLP 시행 후 3시간과 6시간 사이의 변화를 관찰하지 못했다는 점이다. iNOS 유전자 발현으로 인한 혈청 NO 합성 증가가 이 시기에 이루어졌던 것으로 보이나, CLP 시행 후 4시간과 5시간을 대상으로 하는 실험이 없었기에 iNOS 유전자 발현으로부터 NO 합성까지 소요되는 시간에 대해서 정확하게 판단할 수가 없었다. 또한, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현 양상 역시 이 시기에 변화를 보였으나 정확한 발현 시기에 대한 평가를 할 수 없었다. 따라서, CLP 시행 4시간 및 5시간 후 조직 및 혈액 채취를 통해 추가적인 연구가 필요할 것이다. 둘째, 폐 조직에서만 iNOS 유전자 발현을 측정했다는 점이다. Lin 등(17)은 LPS 모델에서 5가지 주요 장기(심장, 폐, 간, 콩팥, 비장)들의 시간에 따른 iNOS 발현 양상에 대해 연구하였는데, 폐조직 보다는 비장에서 더욱 현저하게 발현되는 결과를 나타내었다. 일반적으로 패혈증 상태에서 acute lung injury가 가장 빠르게 나타나는 임상현상으로 여겨지고 있지만, CLP 모델에서 주요 장기별로 iNOS 유전자 발현 양상을 비교분석하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 셋째, iNOS enzyme 활성을 직접 측정하지 않은 점이다. iNOS 유전자 발현 및 혈중 NO의 측정을 통해 간접적으로 발현 시기를 추정할 수 있으나, 직접 enzyme 활성을 측정함으로써 둘 사이의 시간에 따른 상호관계를 직접적으로 확인할 수 있을 것이다. 이를 위해 3시간에서 6시간 사이의 iNOS enzyme 활성을 측정하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

마지막으로, 12시간 이후의 변화를 확인하지 못한 점이다. LPS 모델과는 달리 CLP 모델에서는 지속적인 자극이 가해지므로, 12시간 이후에도 NO 및 cytokine의 발현이 지속적일 것으로 추정되나 본 연구에서는 확인할 수 없었다. 최소 24시간 또는 48시간까지의 추가적인 연구가 필요할 것이다. 위와 같은 제한점에도 불구하고 생리적으로 사람의 패혈증에 보다 유사한 CLP 모델에서, 초기 패혈증 시 iNOS mRNA 발현 양상과 혈청 NO 및 cytokine들의 혈중 농도를 시간 경과에 따라 측정한 최초의 연구로서 의의가 있을 것이다. 본 연구 결과를 바탕으로 측정 대상 물질에 따른 적절한 동물 희생 시점을 결정함으로써 불필요한 동물의 희생을 줄이고, 최적의 측정 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

## V. 결 론

복막염에 의한 패혈증 모델에서는 LPS 투여로 인한 패혈증 모델에서 보다 iNOS 유전자의 발현이 다소 늦게 나타나서 지속적으로 유지되는 양상임을 확인할 수 있었다. NO와 주요 염증성 매개물질들도 이와 비슷한 양상을 나타내었으며, iNOS 유전자 발현 후 혈청 NO 증가까지 3시간이 소요되었다. 이는 CLP 모델에서는 적어도 3~6시간이 경과하여야 의미 있는 생화학적 변화가 시작됨을 시사하는 결과이다.

## REFERENCES

- 1) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992;101:1644-55.
- 2) Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet 1994;343:1199-206.
- 3) Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:7738-42.
- 4) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2001;357:593-615.
- 5) Dawn B, Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. Ann N Y Acad Sci 2002;962:18-41.
- 6) Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest 1991;21:361-74
- 7) Tintinalli JE, Kelon GD, Stapczynski JS. Emergency Medicine. A comprehensive study guide, 6th ed. New York: McGraw Hill; 2003. p. 231-242.
- 8) Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 2004;75:639-53.
- 9) Ignarro LJ. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. Biochem Soc Trans 1992;20:465-9.
- 10) Chiang TM, Woo-Rasberry V, Cole F. Role of platelet endothelial form of nitric oxide synthase in collagen-platelet interaction: regulation by phosphorylation. Biochim Biophys Acta 2002;1592:169-74.
- 11) Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends Biochem Sci 1997;22:477-81.
- 12) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 1992;6:3051-64.

- 13) Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54:171-8.
- 14) Luss H, Nussler NC, Beger HG, Nussler AK. Expression and detection of inducible nitric oxide synthase in experimental models of inflammation. *Methods* 1996;10:51-60.
- 15) Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:1203-13.
- 16) Liu SF, Barnes PJ, Evans TW. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat in vivo. *Crit Care Med* 1997;25:512-8.
- 17) Lin NT, Yang FL, Lee RP, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: The time course in conscious and septic rats. *Life Sci* 2006;78:1038-43.
- 18) Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000;13:110-116.
- 19) Okamoto I, Abe M, Shibata K, Shimizu N, Sakata N, Katsuragi T, Tanaka K. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic lung injury produced by cecal ligation and puncture. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:716-22.
- 20) Kan W, Zhao KS, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, Qin Q, Huang X, Wang S. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: Role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock* 2004;21:281-7.
- 21) Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201.
- 22) Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF. Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: Influence of the puncture size on mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 2001;33:77-79.
- 23) Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: Two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004;21:505-511.
- 24) Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-196.
- 25) Farley KS, Wang LF, Razavi HM, Law C, Rohan M, McCormack DG, Mehta S. Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L1164-L1172.
- 26) Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W and van Tits LJ. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diag Lab Immunol* 1995;2:549-53.
- 27) Overhaus M, Togel S, Pezzone MA, Bauer AJ. Mechanisms of polymicrobial sepsis-induced ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G685-G694.
- 28) Helmer KS, Cui Y, Chang L, Dewan A, Mercer DW. Effects of ketamine/xylazine on expression of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, and cyclo-oxygenase-2 in rat gastric mucosa during endotoxemia. *Shock* 2003;20:63-69.
- 29) Helmer KS, Cui Y, Dewan A, Mercer DW. Ketamine/Xylazine attenuates LPS-induced iNOS expression in various rat tissue. *J Surg Res* 2003;112:70-78.