

패혈증에서 Heat Shock Protein 70의 과도발현이 Inducible Nitric Oxide Synthase의 발현에 미치는 효과

전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 서울대학교 의과대학 응급의학교실*
서울대학교 의과대학 외과학교실†

이용근 · 신호근 · 권운용* · 서길준* · 윤여규†

— Abstract —

Effect of Heat Shock Protein 70 on Inducible Nitric Oxide Synthase during Sepsis in Rats

Yong Keun Lee, D.D.S., Hyo-Keun Shin, D.D.S., Woon Yong Kwon, M.D.*,
Gil Joon Suh, M.D.*, and Yeo Kyu Youn, M.D.†

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chonbuk National University

*Department of Emergency Medicine, Seoul National University College of Medicine**

Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine†

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of overexpression of heat shock protein 70 (HSP70) on the expression of inducible nitric oxide synthase and on the concentration of nitric oxide and to determine the mechanism for the relationship between HSP70 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in sepsis.

Methods: Experiments were performed on male Sprague-Dawley rats, and sepsis was induced by using cecal ligation and puncture (CLP). Glutamine (GLN) or saline was administered 1 h after initiation of sepsis. We acquired serum and lung tissues from the rats 12 h or 24 h after initiation of sepsis. We analyzed the concentration of nitric oxide, the expression of HSP70 in the lung, and the gene expression of iNOS in the lung.

Results: In CLP+GLN, glutamine given after initiation of sepsis enhanced the expression of HSP70 in the lung at 12 h (CLP+GLN vs. CLP: 47.19 ± 10.04 vs. 33.22 ± 8.28 , $p = 0.025$) and 24 h (CLP+GLN vs. CLP: 47.06 ± 10.60 vs. 31.90 ± 4.83 , $p = 0.004$). In CLP+GLN, glutamine attenuated the expression of iNOS mRNA in the lung at 12 h (CLP+GLN vs. CLP: 4167.17 ± 951.59 vs. 5513.73 ± 1051.60 , $p = 0.025$) and 24 h (CLP+GLN vs. CLP: $9,437.65 \pm 2,521.07$ vs. $18,740.27 \pm 8,241.20$, $p = 0.016$) and reduced the concentration of nitric oxide in serum at 12 h (CLP+GLN vs. CLP: 0.86 ± 0.48 vs. $3.82 \pm 2.53 \mu\text{mol/L}$, $p = 0.016$) and 24 h (CLP+GLN vs. CLP: 0.39 ± 0.25 vs. $1.85 \pm 1.70 \mu\text{mol/L}$, $p = 0.025$).

Conclusion: The overexpression of HSP70 induced by the administration of glutamine in sepsis attenuated the gene expression of iNOS and reduced the concentration of nitric oxide. (J Korean Soc Traumatol 2008;21:59-65)

Key Words: Heat shock protein 70, Inducible nitric oxide synthase, Nitric oxide, Sepsis

* Address for Correspondence : **Hyo Keun Shin, D.D.S., Ph.D**

Department of Oral and Maxillofacial Surgery School of Dentistry, Chonbuk National University

664-14, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju, 560-756, Korea

Tel : 82-63-250-2014, Fax : 82-63-250-2089, E-mail : hkshin@chonbuk.ac.kr

접수일: 2008년 5월 22일, 심사일: 2008년 5월 29일, 수정일: 2008년 6월 4일, 승인일: 2008년 6월 8일

I. 서 론

패혈증은 전신성 염증반응 증후군을 조절하지 못하여 발생하는 병적 상태를 의미하며 많은 경우에 다발성 장기 부전에 이르게 되어 여러 연구에서 중환자실 사망 원인 중 1위로 보고되고 있다.(1) 기존의 많은 연구에도 불구하고 지난 수십 년간 패혈증 환자의 사망률은 30% 내외에서 유지되고 있으며 의미 있는 향상을 보이지 못하고 있다.(2) 임상적으로 패혈증은 대사 장애, 조직 기능 저하, 관류 장애 등을 유발하며 이로 인해 전신적인 조직 관류 장애가 나타나 결국 다발성 장기 부전에 빠지게 되며 조직 관류 장애의 주요 원인은 에너지 공급의 장애로 알려져 있다. 패혈증 상황에서는 적절한 산소 공급에도 불구하고 미토콘드리아에서의 산소 이용이 감소하게 되어 ATP의 적절한 생산이 이루어지지 않아 세포 저산소증에 빠지게 되며 많은 외인성, 내인성 매개 물질들이 이러한 세포의 기능 장애에 관여하게 된다.(3) 특히 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 활성화와 이로부터 유발된 산화질소 (nitric oxide: NO)의 유리 물질과 산소 유리기들은 미토콘드리아의 기능 장애의 중요한 원인으로 고려되고 있다.(4) 기존의 여러 연구에서 이들 치료방법의 임상 적용 시 임상 양상의 호전은 일시적으로 나타나지만 복합적인 염증반응 과정 자체를 회복시키거나 조직관류를 개선하지 못하고 다발성 장기부전이 진행하여 획기적인 생존율의 향상을 보이지 못하는 것으로 보고되고 있으며,(5) 이의 극복을 위한 여러 시도들이 이루어지고 있다. 그 중 패혈증, 특히 수액요법과 승압제에 반응하지 않는 후기 패혈증의 병태생리에서 iNOS의 과도한 발현과 이로 인한 NO의 증가의 중요성은 매우 잘 알려져 왔다.(6) NO는 다양한 생물학적 활성도를 지닌 지질친화성 가스로서 조직이 허혈성 상태에 있는 경우 합성이 증가한다. NO의 현재까지 알려진 작용으로는 첫째, guanylyl cyclase를 자극하여 세포내의 cyclic GMP (cGMP)를 증가시켜 혈관 평활근을 이완시켜 혈압을 감소시키며, 둘째, 신경세포의 N-methyl D-aspartate (NMDA) 수용체를 자극하여 신경전달물질로 작용하며, 셋째, 산소유리기 등과 반응하여 살균작용 및 세포독성 작용을 나타내며, 염증반응에 관여하여 항염증작용을 하거나 염증반응을 촉진하는 이중적인 작용을 한다.(7) 혈중 NO의 증가를 억제하기 위해 iNOS의 길항제 개발 등 이를 막기 위한 여러 방법들이 시도되고 있으며, 동물 실험에서는 많은 효과를 보았으나, 임상실험에서는 모두 실패한 상태이다.(8)

1962년부터 heat shock response (HSR)라고 불리는 자기 방어 현상(self-protective phenomenon)이 연구되어 갑작스런 열 자극(heat stress)이 생체 내에서 일단의 단백질 발현을 유발함을 알게 되었고 이들을 heat shock protein

(HSP)이라고 부르게 되었다.(9) HSP는 정상 상황에서도 존재하고 있으나 스트레스 상황에서 합성이 증가되며 HSP의 증가는 치명적일 수 있는 추가 스트레스에 대한 세포의 내성을 증가시키는 것으로 밝혀지고 있다.(10, 11) 내독소 투여 또는 cecal ligation and puncture (CLP)등을 통해 유발된 백서의 패혈증 모델을 대상으로 한 기존 여러 연구에서는 패혈증 유발 수 시간 전의 가온요법(heat shock treatment) 또는 geranylgeranylacetone (GGA)의 경구 투여를 통해 HSP 중 하나인 HSP70의 발현을 증가시킬 경우 생존율이 향상되며 NO, TNF- α , IL-1, 6 등의 염증성 매개물질의 발현 및 활성이 저하됨을 보고하였다.(2, 12-15) 그러나 이들 연구는 HSP70과 NO의 현상에 대한 관찰일 뿐 상호 관계와 영향에 대한 기전을 밝히지는 못하고 있다. 만일 HSP70과 iNOS의 상호 관계를 알 수 있다면, 패혈증의 치료에서 iNOS의 활성을 억제하기 위한 주 치료 목표를 정하는 데 도움이 될 수 있을 것이며 만약 HSP70이 iNOS를 억제한다면 HSP70의 과도 발현이 패혈증 환자의 주 치료 목표가 될 수 있을 것이다. 따라서 저자들은 백서의 패혈증 모델에서 패혈증 유발 후 glutamine (GLN)의 투여를 통해 HSP70이 과도하게 발현되었을 때 iNOS의 발현이 감소되며 이를 통해 HSO70의 과도 발현이 iNOS의 발현을 억제하여 혈중 NO의 증가를 억제한다는 가설 하에 본 연구를 시행하였다.

본 연구는 패혈증 발생 후 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 발현 및 혈중 NO의 농도에 미치는 영향을 확인함으로써 후기 패혈증의 다양한 병태 생리 중에서 HSP70과 iNOS와의 상관관계를 밝히며 이를 통해 임상에서 패혈증 환자의 예후에 큰 영향을 미치는 iNOS의 발현을 억제하기 위한 치료의 방법으로 HSP70의 과도 발현의 유도를 임상에 적용할 수 있는 기틀을 마련하고자 시행되었다.

II. 대상 및 방법

1. 실험동물

1) 실험군

서울대학교 의과대학 동물실험실에서 280~330 그램의 병원균이 없는 스프라그-다울리 (Sprague-Dawley)종의 수컷 쥐를 분양 받아 사용하였다. 실험 동물군은 2주 이상 사료와 물을 주며 12시간마다 밝고 어둡게 주위 조명을 반복하여 주위 환경에 적응시킨 후 실험 6시간 전부터 물만 주며 금식시켰다. 실험군은 다음과 같이 분류하여 각각의 처치를 시행하였으며, 각 군은 6마리씩으로 하였다.

① Sham operated 군 (SHAM): ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg를 복강 내 투여(intraperitoneal inject)하여 마취시켰다. 2 cm 복벽 절개 후 cecum을 빼낸 후 아무

런 처치도 시행하지 않고 복강 내로 다시 집어넣었다. 복벽 근육 및 피부 층을 봉합한 후 피하로 20 ml/kg의 생리식염수를 투여하였다. 1시간 후 glutamine과 동량의 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.

② Cecal ligation and puncture 군 (CLP): 동일한 방법으로 마취시킨 후 2cm 복벽 절개 후 cecum을 빼내어 ileocecal valve 직하방에서 25%의 cecum을 결찰하였으며, 18 gauge 바늘로 두 차례 관통한 후 대변이 복강 내로 나오도록 처치하였다. 복벽 근육 및 피부 층을 봉합한 후 피하로 20 ml/kg의 생리식염수를 투여하였다. 1시간 후 glutamine과 동량의 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.

③ CLP with glutamine 투여군 (CLP+GLN): 동일한 방법으로 마취시킨 후 cecal ligation and puncture를 시행하였으며 1시간 후 glutamine 0.75 g/kg를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.

2) 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 -7°C에서 보관하였다.

2. 결과 측정

1) 조직에서의 HSP70 발현 측정

Yang 등(16)과 Sumioka 등(17)이 제시한 방법에 따라 Western blot을 사용하여 측정하였다. 냉동된 각 조직 100mg을 1.5ml의 완충용액에 넣은 후 잘게 간 후 5분간 끓인다. 22 gauze의 바늘에 3회 통과시켜 DNA를 잘게 분리하여 -80°C에 보관하였다. 12.5% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하여 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA)에 전기적으로 부착시켜 50 µg의 단백질을 추출하였다. 비특이적 반응 부위를 제거한 후 rabbit anti-HSP70 polyclonal antibody (1:1000 dilution)과 함께 2시간 동안 배양하였다. 깨끗하게 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) (1:2000 dilution)과 함께 1

시간 동안 배양하였다. Western blot을 사용하여 추출된 단백질 막의 항체 반응 부위를 확인하였다. 겔 사진 촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Korea)를 사용하여 스캐닝하였다.

2) iNOS mRNA 발현 측정

상업용 kit (TRI Reagent, Molecular Research Center, Inc, USA)를 사용하여 절제된 폐조직 100 mg에서 RNA를 추출한 뒤, 분광광도계 (Beckman, USA)를 사용하여 260 nm에서 추출된 RNA의 농도를 측정하였다.(18) 추출된 RNA 중 100 ng을 역전사하여 first strand complementary DNA (cDNA)를 만들었다. 역전사에 필요한 반응혼합물은 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 2.5 mM Random Hexmer (Promega, USA), 1 U/µl ribonuclease inhibitor (Promega, USA), and Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (GibcoBRL, USA) 등으로 만들었다. cDNA를 합성한 후에 rat iNOS and rat glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 대한 PCR (PCT-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA)을 시행하였다. PCR을 위한 반응혼합물은 2 pmol of primer, 2.5 U/µl Taq polymerase (Takara, Japan), 0.8 mM of dNTP, and 1.5 mM MgCl₂ 등으로 만들었다. PCR은 초기 94°C에서 3분간 denaturation 후 30 cycle을 시행하였으며, 각 cycle은 94°C에서 1분간 denaturation 후 58°C에서 1.5분간 annealing을 하고 72°C에서 10분간 elongation하였다. 백서의 iNOS cDNA 합성에 필요한 oligonucleotide primers 5'-CCCTTCC-GAAGTTTCTGGCAGCAGG-3' (sense)와 5'-GGC-TGTCAGAGCCTTGTGCCTTTGG-3' (antisense)이고, 백서의 GAPDH cDNA를 위한 oligonucleotide primer는 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (sense)와 5'-AGATC-CACAACGGATACATT-3' (antisense)이다. Housekeeping gene GAPDH의 발현을 control로 하며, GAPDH band가 없는 RNA는 제외시켰다. 증폭된 PCR products는 0.5 µg/ml ethidium bromidewere가 포함된 1.5% agarose gels에서 전기영동 시킨 후에 자외선으로 검사하였다. iNOS and GAPDH gene PCR products의 크기는 각각 498 bp and 309 bp로 한다. 겔 사진촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Korea)를 사용해서 스캐닝하였다. iNOS와 GAPDH 유전자 발현의 band density는 imaging densitometer (BIO-RAD, USA)를 사용하여 측정하였다.

3) 혈중 산화질소 측정

액체 용액상태 하에서는 산화질소는 저질로 nitrate (NO₃⁻)와 nitrite (NO₂⁻) 이온으로 변하는데 생체 내에서는 이들이 가장 안정된 산화질소 산물이다. 본 연구에서는 nitrate와 nitrite를 합한 산화질소의 농도를 측정하였으며,

이 방법은 Greiss reagent를 사용하는 kit로 구성되어 있다.(19) 본 방법에서는 nitrate와 nitrite의 농도를 구분하지 않았다.(20) 혈중 산화질소의 농도는 $\mu\text{mol/L}$ 로 표시하였다.

3. 통계 분석

자료분석은 SPSS for Windows 11.0 package를 이용한 비모수적 통계분석법을 사용하였다. 세 군의 비교는 Kruskal-Wallis test를, 각 구간 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하여 분석하였다. 각 측정치의 값은 평균 \pm 표준편차로 표시하고 유의검정 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 폐조직의 HSP70의 발현

CLP 12시간 후 적출하였을 때 CLP+GLN 군에서 폐조직의 HSP70의 발현이 CLP만 시행한 군보다 유의하게 높게 측정되었다(3.82 ± 2.53 vs. 0.86 ± 0.48 , $p=0.016$) (Fig. 1A). CLP 24시간 후 적출하였을 때에도 CLP+GLN 군에서 폐조직의 HSP70의 발현이 CLP만 시행한 군보다 유의하게 높게 측정되었다(CLP+GLN vs. CLP: 1.85 ± 1.70 vs. 0.39 ± 0.25 , $p=0.025$) (Fig. 1B).

2. 폐조직의 iNOS mRNA의 발현

CLP 12시간 후 적출하였을 때 CLP만 시행한 군에서 폐조직의 iNOS mRNA의 발현이 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다(CLP vs. CLP+GLN: 5513.73 ± 1051.60 vs. 4167.17 ± 951.59 , $p=0.025$) (Fig. 2A). CLP 24시간 후 적출하였을 때에도 CLP만 시행한 군에서 폐조직의 iNOS mRNA의 발현이 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다(CLP vs. CLP+GLN: $18,740.27 \pm 8,241.20$ vs. $9,437.65 \pm 2,521.07$, $p=0.016$) (Fig. 2B).

3. 혈중 산화질소 농도

CLP 12시간 후 채혈하였을 때 CLP만 시행한 군에서 혈중 산화질소의 농도가 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다(CLP vs. CLP+GLN: 47.19 ± 10.04 vs. $33.22 \pm 8.28 \mu\text{mol/L}$, $p=0.025$) (Fig. 3A). CLP 24시간 후 채혈하였을 때에도 CLP만 시행한 군에서 혈중 산화질소의 농도가 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다(CLP vs. CLP+GLN: 47.06 ± 10.60 vs. $31.90 \pm 4.83 \mu\text{mol/L}$, $p=0.004$) (Fig. 3B).

IV. 고 찰

HSP70의 폐혈증에서의 역할 및 이의 임상적 적용 가능성에 대해서는 아직 확실하게 정립되고 있지 못한 상태이

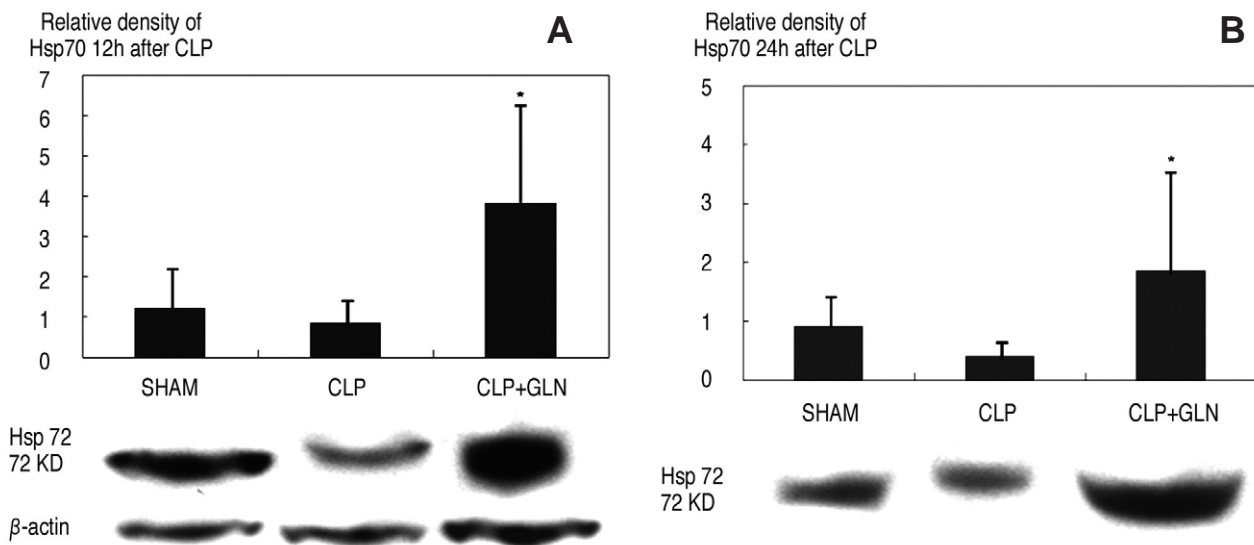


Fig. 1. HSP70 in lung 12 h (A) and 24 h (B) after CLP. The lung expression of HSP70 was significantly higher in CLP+GLN than in CLP at 12 h ($p=0.016$) and 24 h ($p=0.025$).

* Significantly different compared with SHAM and CLP.

SHAM: sham operated group, CLP: cecal ligation and puncture group, CLP+GLN: cecal ligation and puncture with glutamine administration group

다. 세계적으로도 패혈증에 대한 HSP70의 예방적 효과에 대한 연구만 시행되어 왔으며 실제 임상 상황에 적용될 수 있는 방법은 아직 개발되지 못하고 있다. Heat shock, geranylgeranylacetone 등의 전처치를 통해서서는 생존 향상 및 예후의 호전을 가져올 수 있으나 오히려 패혈증 유발 후 heat shock treatment를 가했을 경우에는 HSP70의 감소 및 예후의 악화를 보고하고 있어 이를 heat shock paradox 라고 보고하고 있다.(21) 다만 패혈증 유발 후 glutamine의

투여 등 간접적으로 HSP70이 과도 발현된 치료 효과에 대한 결과는 보고되고 있다.(22) 또한 glutamine의 투여는 iNOS mRNA, NF- κ B의 발현 및 활성의 억제와 관련된 것으로 보고되고 있다.(22) 그러나 패혈증 유발 후 glutamine 투여 시 발생하는 HSP70과 iNOS의 변화에 대한 직접적인 상호관계 및 기전에 관한 연구는 거의 이루어진 바 없으며 지금까지의 결과들을 통해 HSP70이 iNOS를 억제하지 않을까 하는 정도의 가설만 제시되고 있다. 본 연구에서는

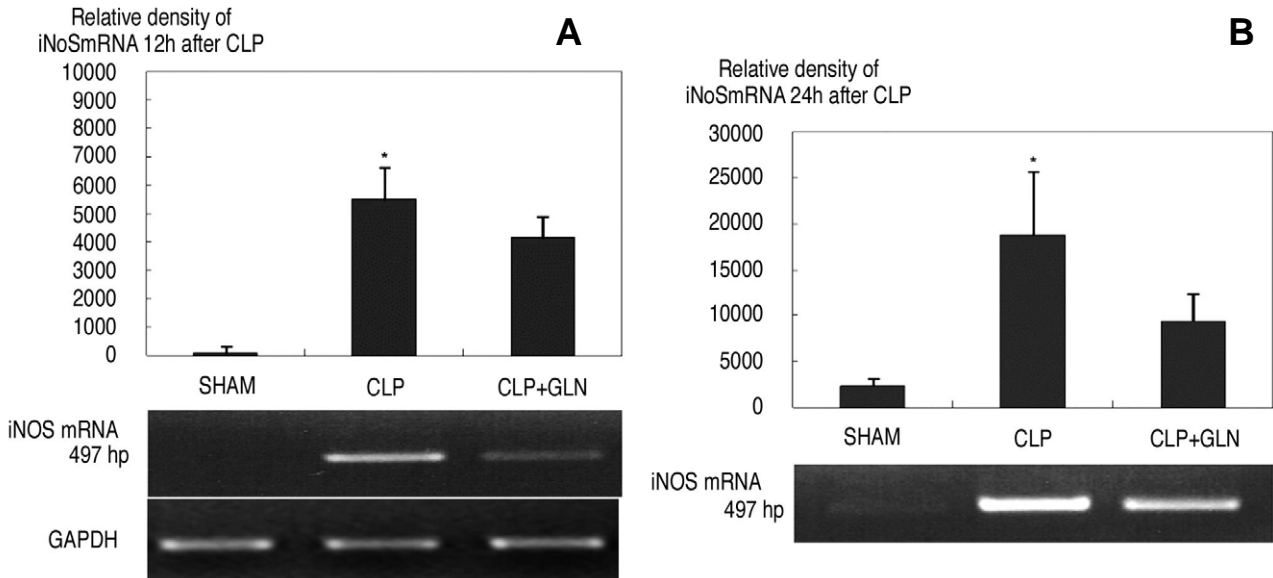


Fig. 2. iNOS mRNA in lung 12 h (A) and 24 h (B) after CLP. The lung expression of iNOS mRNA was significantly lower in CLP+GLN than in CLP at 12 h ($p=0.025$) and 24 h ($p=0.016$).

* Significantly different compared with SHAM and CLP+GLN.

SHAM: sham operated group, CLP: cecal ligation and puncture group, CLP+GLN: cecal ligation and puncture with glutamine administration group

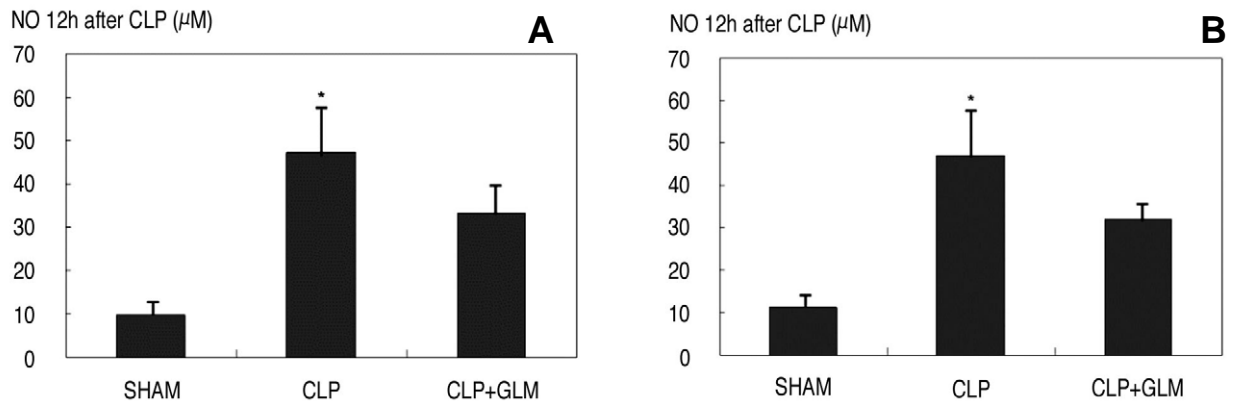


Fig. 3. Serum NO concentration 12 h (Fig. 3a) and 24 h (Fig. 3b) after CLP. The serum NO concentration was significantly lower in CLP+GLN than in CLP at 12 h ($p = 0.025$) and 24 h ($p = 0.004$).

* Significantly different compared with SHAM and CLP+GLN.

SHAM: sham operated group, CLP: cecal ligation and puncture group, CLP+GLN: cecal ligation and puncture with glutamine administration group

HSP70, iNOS mRNA, NO간의 직접적인 상호 관계를 확인하여 이를 통해 패혈증 발생 후 glutamine을 투여하여 유발된 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 gene expression을 억제함으로써 iNOS의 합성을 억제하고 이를 통해 혈중 NO의 농도가 저하되어 패혈증의 임상 양상을 호전시킬 수 있음을 보여주고자 하였다.

본 연구에서는 기존 연구를 참고하여 glutamine을 복강 내 투여하여 HSP70의 과도 발현을 유도하였으며 glutamine은 alanyl-glutamine을 투여하였다. Alanyl-glutamine은 용매에 잘 녹고 열에 안정적이며 임상적으로도 사용 중인 glutamine 제제이며 투여 15분 내에 완전히 분해되는 것으로 알려져 있으며, alanine은 HSP70의 발현에 유의한 영향을 미치지 않다고 보고되고 있어 본 연구에 적합한 제제로 선택하였다.(22) 투여 용량은 복강 내 투여 시 0.25 g/kg부터 1.5 g/kg까지 보고되고 있으며 본 연구에서는 0.75 g/kg의 용량을 투여하였다.(22) 전 처치를 시행한 기존 연구들에서 가온요법은 패혈증 유발 18~24시간 전, GGA의 경구 투여는 내독소 투여 8~16시간 전에 시행되었으며 HSP70 유전자의 발현은 내독소 투여 후 5시간이 경과되어야 확인할 수 있음이 보고되었다. 조직에서 HSP70의 발현은 최소 6시간이 지나면 증가하는 것으로 알려져 있고, 패혈증 유발 후 24시간까지 관찰한 연구가 대부분이며,(2,12,14,15) 특히 본 연구와 동일한 CLP 모델에서 패혈증 유발 후 glutamine의 투여를 통해 간접적으로 HSP70의 발현 효과에 대한 보고에서는 CLP 24시간 후 혈액 및 조직을 채취하여 측정을 시행하였다.(22) 또한 본 연구와 동일한 CLP모델에서 패혈증 유발 후 glutamine의 투여를 통해 iNOS, NF- κ B의 발현을 관찰한 보고에서는 CLP 후 6시간에 혈액 및 조직을 채취하여 측정을 시행하였다. 따라서 본 연구에서는 CLP를 통한 패혈증 유발 후 12시간 및 24시간 후의 발현 및 활성을 평가하였다.

연구 결과 cecal ligation and puncture를 시행하고 glutamine을 투여한 군에서 cecal ligation and puncture만 시행한 군에 비해 HSP70이 과도 발현되었으며 iNOS mRNA의 발현이 억제되며 그 결과 혈중 산화질소의 농도가 감소하였다. 결과에서 언급하지는 않았으나 12시간 군과 24시간 군을 비교하였을 때 12시간 군에서 HSP70의 발현이 상대적으로 높은 경향을 보였으며 iNOS mRNA의 발현 및 혈중 산화질소의 농도 역시 12시간 군에서 24시간 군보다 상대적으로 낮은 경향을 보임을 확인하였다. 이를 통해 HSP70의 발현 정도와 iNOS mRNA의 발현 및 이로 인한 혈중 산화질소 농도의 감소 정도의 관련성 역시 추측해 볼 수 있을 것이다. 또한, 조직 내에서 HSP70이 가장 많이 발현되는 시간은 기존 연구들에서 패혈증 유도 후 8-24시간으로 보고되고 있으며 폐조직에서는 다른 장기에 비해 HSP70의 발현 정도가 빨리 감소하여 8~16시간에 가장 많

이 발현됨이 보고되어 이는 본 연구 결과에 부합되는 소견으로 볼 수 있다.(12)

본 연구의 제한점은 첫째, 여러 장기에서 HSP70 및 iNOS mRNA의 측정이 시행되지 못했다는 점이다. 여러 기존 연구에서 폐조직에서의 HSP 및 iNOS의 측정을 통해 패혈증의 예후를 평가하였으므로,(22-25) 본 연구 결과를 통해 HSP70, iNOS mRNA, NO의 상관관계를 설명할 수는 있으나 심장, 신장, 간 등의 조직에서의 HSP 및 iNOS의 측정을 통해 각 장기에 따른 발현 양상의 차이로 인하여 혈중 산화질소에 미치는 영향을 확인할 수는 없었다.(12) 둘째, HSP70 inhibitor를 투여하여 glutamine 투여하여 HSP70의 발현을 억제한 후 iNOS mRNA 및 NO의 발현을 확인하지 못한 점이다. Quercetin은 HSP70의 발현을 억제하는 물질로 알려져 있으며 HSP70의 효과에 대한 기전을 규명하는 많은 연구에서 사용되고 있다.(12, 15) 본 연구에 대한 추가 연구로써 quercetin을 투여하여 glutamine투여로 유발되는 HSP70의 발현을 억제하였을 때 iNOS mRNA 및 NO의 발현이 억제됨을 확인한다면 본 연구를 통해 보여준 상관관계를 더욱 확실히 증명할 수 있을 것이다. 셋째, iNOS mRNA의 발현으로 인한 iNOS의 활성도를 직접 측정하지 못한 점이다. 혈중 NO의 증가를 통해 iNOS mRNA의 발현으로 iNOS가 활성화되었음을 간접적으로 보여주었으나 직접 iNOS의 활성도를 측정할 수 있다면 본 연구의 결과를 더욱 확실히 증명할 수 있을 것이다. 이러한 제한점을 극복하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 cecal ligation and puncture를 적용한 백서의 패혈증 모델에서 glutamine을 투여하여 HSP70의 과도 발현을 유발하였을 때 iNOS mRNA의 발현이 감소하였으며 혈중 산화질소의 농도가 감소하였다. 패혈증에서 HSP70의 과도 발현은 iNOS의 gene expression을 억제함으로써 혈중 산화질소의 증가를 억제하여 예후 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. Crit Care Med 2003; 31(3):946-55.
- 2) Dong HP, Chen HW, Hsu C, Chiu HY, Lin LC, Yang RC. Previous heat shock treatment attenuates lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of platelets in rats. Shock 2005; 24(3):239-44.
- 3) Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. Chest 2003; 124: 1103-15.

- 4) Cohen RI, Wilson D, Liu SF. Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3', 5' (cyclic) phosphate-dependent and independent pathways. *Crit Care Med* 2006; 34(1): 173-81.
- 5) Cariou A, Vinsonneau C, Dhainaut JF. Adjuvant therapies in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32(11 suppl): 562-70.
- 6) Thiemermann C, Szabo C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamics decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 267-71.
- 7) Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 857-90.
- 8) Watson D, Grover R, Anzueto A, Lorente J, Smithies M, Bellomo R, Guntupalli K, Grossman S, Donaldson J, Le Gall JR: Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med*. 2004 Jan; 32(1): 13-20.
- 9) Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophyllia*. *Experientia* 1962; 18: 571-3.
- 10) Tandara AA, Kloeters O, Kim I, Mogford JE, Mustoe TA. Age Effect on HSP70: Decreased resistance to ischemic and oxidative stress in HDF. *Journal of Surgical Research* 2005; 9(19): 1-8.
- 11) Sigal LH. Heat shock proteins/ Chaperonins. *J Clin Rheumatol* 2002; 8: 174-80.
- 12) Nakada J, Matura T, Okazaki N, Nishida T, Togawa A, Minami Y, Inagaki Y, Ito H, Yamada K, Ishibe Y. Oral administration of geranylgeranylacetone improves survival rate in a rat endotoxin shock model: administration timing and heat shock protein 70 induction. *Shock* 2005; 24(5): 482-7.
- 13) Chan JY, Ou CC, Wang LL, Chan SH. Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla. *Circulation* 2004; 110: 3560-6.
- 14) Chen HW, Hsu C, Lu TS, Wang SJ, Yang RC. Heat shock pretreatment prevent cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. *Shock* 2003; 20(3): 274-9.
- 15) Masuda Y, Sumita S, Fujimura N, Namiki A. Geranylgeranylacetone attenuates septic diaphragm dysfunction by induction of heat shock protein 70. *Crit Care Med* 2003; 31(11): 2585-91.
- 16) Yang SL, Jing SH, Chen SS, Chen TJ, Yang RC. The effect of hyperthermic treatment on electroencephalographic recovery after interruption of respiration in rats. *Exp Brain Res* 1994; 99: 431-4.
- 17) Sumioka I, Matura T, Kai M, Yamada K. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci* 2004; 74: 2551-61.
- 18) Park HS, Lee CH, Jung SG, Suh GJ, Jung SE, Youn YK. The effect of methylene blue on inducible nitric-oxide synthase in a rat model of acute lung injury induced by paraquat. *J Korean Soc Traumatol* 2005; 18(1): 53-63.
- 19) Kim K, Suh GJ, Youn YK, Kang YJ, Kim MA, Cho SK, Shin HK. The effect of hypothermia on lung inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Korean Soc Traumatol* 2006; 19(1): 14-20.
- 20) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- 21) Su F, Nguyen ND, Wang Z, Cai Y, Rogiers P, Vincent JL. Fever control in septic shock: beneficial or harmful? *Shock* 2005; 23(6): 516-20.
- 22) Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: Role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med* 2005; 33: 1206-13.
- 23) Kim do J, Park SH, Sheen MR, Jeon US, Kim SW, Koh ES, Woo SK. Comparison of experimental lung injury from acute renal failure with injury due to sepsis. *Respiration* 2006; 73(6): 815-24.
- 24) Torres-Duenas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: effects of the inhibition of nitric oxides production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock* 2006; 25(3): 267-76.
- 25) Sanli A, Onen A, Sarioglu S, Sis B, Guneli E, Gokcen B, Karapolat S, Acikel U. Glutamine administration enhances the healing of lung parenchymal injuries and reduces and reduces air leakage in rats. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210(3): 239-45.