

Nitric Oxide 및 Sphingosine 1-phosphate가 말초 호흡 단위에 미치는 영향의 생체 내 분석: 백서의 급성 폐 손상 모델에서 생체 접촉 현미경을 이용한 연구

이재익* · 전상훈** · 성숙환** · 김주현***

The Effects of Nitric Oxide and Sphingosine 1-phosphate on the Pulmonary Microstructure in a Rat Model of Acute Lung Injury: An Intravital Videomicroscopic Approach

Jae-Ik Lee, M.D.*, Sanghoon Jheon, M.D.**, Sook-Whan Sung, M.D.**, Joo-Hyun Kim, M.D.***

Background: To evaluate the effects of inhaled nitric oxide (NO) and sphingosine 1-phosphate (S1P) as potential therapeutic agents of acute lung injury, we analyzed the morphology *in vivo* of the pulmonary microstructure using intravital videomicroscopy in a rat model of acute lung injury. **Material and Method:** Sprague Dawley rats were divided into five groups: a control group that underwent normal saline aspiration, an acute lung injury (ALI) group that underwent hydrochloric acid aspiration, and three treatment groups that underwent hydrochloric acid aspiration and were administered therapeutic agents- the S1P group, the NO group, and the S1P+NO group (n=7 per group). To quantify alveolar compliance and interstitial edema, the diameters of all measurable alveoli and interalveolar septa were averaged at one and two hours after aspiration. Alveolar compliance was determined according to diameter changes during the respiratory cycle and the change in tidal volume. **Result:** At two hours after aspiration, the mean alveolar compliance (% change) in the ALI group decreased significantly versus the control group of rats (respiratory cycle: 1.9% for the ALI group vs 6.5% for the control group, p=0.03; tidal volume: 3.2% for the ALI group vs 9.1% for the control group, p=0.003) and versus the NO group (tidal volume: 3.2% for the ALI group vs 16.9% for the NO group, p=0.001). At two hours after aspiration, the mean interalveolar septal thickness in the NO group tended to be smaller as compared to that in the ALI group (15.2 μ m for the ALI group vs 12.3 μ m for the NO group, p=0.06). S1P did not exert a significant effect on the pulmonary microstructure of the injured rat lung. **Conclusion:** Improved alveolar compliance and reduced interstitial edema, observed by intravital videomicroscopy, suggest that inhaled NO ameliorates lung injury.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:177-188)

- Key words:**
1. Acute respiratory distress syndrome (ARDS)
 2. Nitric oxide
 3. Alveolar cells
 4. Video technology

*가천의과대학고길병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Gachon University Gil Hospital

**서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine

***서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

†이 논문은 대한흉부외과학회 제37차 추계학술대회에서 구연되었음.

‡이 논문은 보건복지부 보건의료 진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A06-00043750).

논문접수일 : 2007년 11월 19일, 심사통과일 : 2008년 1월 5일

책임저자 : 전상훈 (463-802) 경기도 성남시 분당구 구미동 300번지, 분당서울대학교병원

(Tel) 031-787-7133, (Fax) 031-787-4050, E-mail: jheon@snuh.org

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 급성 폐 손상(acute lung injury, ALI)의 가장 심한 형태이다. 최근 ARDS의 원인과 병태 생리에 대한 정보가 상당히 축적 되었음에도 불구하고 그 사망률은 30~50%에 이른다[1].

Nitric oxide (NO)는 상당 기간 동안 ARDS 치료법의 하나로 임상에서 사용되어 왔다[2-5]. 낮은 농도로 흡입할 경우 폐혈관 평활근을 이완시켜 폐혈관 고혈압을 억제하며, 또한 환기가 잘 되는 구역의 폐 혈관을 선택적으로 확장시켜 혈류를 재분포 시키므로 환기-관류 불균형이 해소되어 산소 포화도를 증가시킨다. 이러한 작용을 통해 NO가 ARDS 환자의 치료에 도움을 주는 것으로 생각되나, 최근 ALI와 ARDS에 대한 NO의 치료 효과에 대한 대규모 무작위 임상 연구 결과, 사망률이나 인공호흡기 거치 기간 등의 개선을 입증하지 못해[2,6-10], 현재 확고한 치료법으로 자리 잡지는 못하였다. 그러나 NO는 회복이 안 되는 심한 저산소증으로 단기간의 생리적 개선이 생존에 필수적인 경우를 포함하여 여전히 임상에서 이용되고 있다. 또한 중성구 및 혈소판 응집 억제 작용이나 자유기 포식자(free radical scavenger)로서의 역할 등이 최근 밝혀져, 이러한 면역학적 특성이 ARDS 환자에게 도움을 주는 것으로 알려져 있다[2].

최근 폐 모세혈관의 장벽 기능(barrier function)을 향상시키는 물질로서 sphingosine 1-phosphate (S1P)에 대한 관심이 높아지고 있다. S1P는 혈소판을 포함한 다양한 세포에서 생성되는 생물학적으로 활성화된 지질로서 [11,12], 세포 외 리간드(extracellular ligand)로 작용하여 이전에는 내피 세포 분화 유전자(endothelial differentiation gene)로 불리었던 몇 개의 S1P 수용체와 결합한 후[13], 하향 신호 연쇄반응(downward signaling cascade)을 통해 세포 골격을 재배열하고 결과적으로 내피 세포 장벽을 강화시키는 역할을 한다[11]. 최근 일부 연구자들은 몇 건의 *in vitro* 실험을 바탕으로 시행한 *in vivo* 실험들을 통해, 동물 모델에서 S1P가 폐 부종과 염증을 현저히 감소시킴을 입증하여, ALI의 새로운 치료법으로서의 가능성을 보여주었다[14,15].

NO와 S1P에 대한 이상의 연구 결과들은 중요한 의의를 지닐 수 있으나, 연구에 이용된 기존의 간접적인 검증 방법들로 인해 그 의미가 반감된다. 이에 저자들은 재래식 기법들의 한계를 보충하고 폐 미세구조의 동적

변화를 생체 내에서 직접 관찰하기 위한 방법으로 생체 집측 현미경(intravital videomicroscopy)을 차용하였다.

저자들은 이 연구를 통해 질병 모델이 확립되어 있는 백서에서, 생체 집측 현미경을 이용하여 정상 폐 미세구조와 폐 손상 모델에서의 변화를 생체 내에서 직접 관찰하고, 급성 폐 손상을 유발한 후 NO, S1P 등의 잠재적 치료제를 투여하여 그 효과를 형태학적으로 정량화하고자 하였다. 또한 이를 통해 폐 손상 치료에 관한 실험 연구에 미세 구조 동적 변화의 생체 내 관찰이라는 새로운 방법론을 도입하여 향후 연구의 기초를 마련하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험 동물 준비

양호한 사육 조건에서 사육된 주령 10주(체중 300 g 전후)의 백서(Sprague-Dawley)에 Sodium pentobarbital (12.5 mg/kg)을 복강 내 투여하여 마취를 유도하였다. 기관 절개술 후 소동물 인공 호흡기(Model 683 Rodent ventilator; Harvard Apparatus, USA)를 사용하여 100% O₂, 분당 호흡수 60/분, 1회 환기량 10 mL/kg의 volume controlled mode로 기계 환기 시키며, 인공 호흡기의 흡기 튜브를 통하여 기도 내압(airway pressure, AWP)을 지속적으로 모니터 하였다. 24G 카테터를 좌측 경동맥에 위치시킨 후 동맥혈 가스 검사와 혈압(blood pressure, BP) 측정을 하였고, 약물과 수액 주입을 위해 우측 내경 정맥에 역시 24G 카테터를 위치시켰다. 폐 미세 구조의 관찰과 동시에 폐동맥압(pulmonary artery pressure, PAP)을 측정하는 것이 기술적으로 여의치 않아, PAP의 측정을 위해 각 군당 5마리씩의 실험 동물을 이용하여 별도로 실험하였다. 정중 흉골 절개 후 우심실을 통해 24G 카테터를 주 폐동맥에 삽입하여 PAP를 측정하였다.

2) 급성 폐 손상의 유도

기관 절개 튜브를 통하여 0.1 N HCl (Hydrochloric acid solution 0.1, Sigma-Aldrich Korea, Korea) 2 mL/kg를 투여하고, 관찰하고자 하는 좌측 폐에 손상이 충분히 유도될 수 있도록 실험 동물을 좌측 횡위위로 위치시켜 1시간 동안 기계 환기시켰다.

3) 연구 디자인

35마리의 실험 동물을 대조군, 폐 손상 대조군(ALI군),

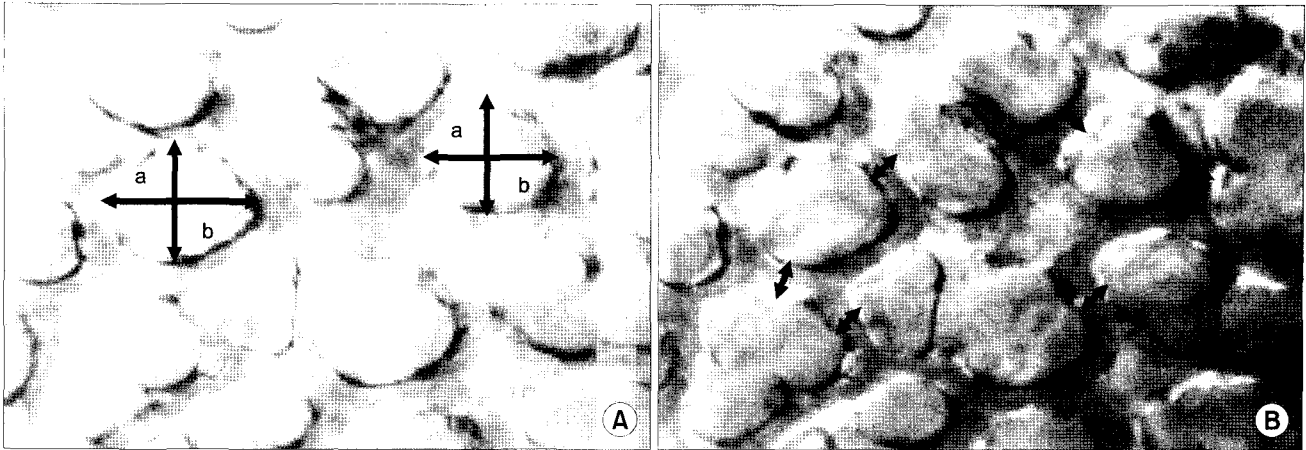


Fig. 1. Definitions of alveolar diameter and interalveolar septal thickness. (A) Alveolar diameter was defined as the mean value of the horizontal and vertical diameters $[(a+b)/2]$ measured in the end-inspiratory phase; and (B) interalveolar septal thickness was defined as the shortest distance between the alveoli in the end-expiratory phase.

폐 손상 후 치료군(SIP군, NO군, SIP+NO군 등, 모두 5개의 군으로 나누어 실험하였다. 대조군은 HCl대신 생리 식염수(2 mL/kg)를 흡입시켰으며(n=7), ALI군은 HCl을 흡입시켜 폐 손상을 유도하였다(n=7). SIP군은 폐 손상 유도과 동시에 SIP (85 μ g/mL at 1 mL/kg)를 정주하였고(n=7), NO군은 폐 손상 유도 30분 후부터 지속적으로 NO (20 ppm)을 흡입시켰으며(n=7), SIP+NO군은 폐 손상 유도, SIP 정주, NO 흡입을 모두 시행하였다(n=7). SIP군과 SIP+NO군을 제외한 모든 군에서 SIP 투여 시 혼합 사용된 용액(vehicle)의 영향을 대조하기(control) 위해 생리 식염수(1 mL/kg)를 폐 손상 유도과 동시에 정주하였다.

4) 생체 접촉 현미경을 통한 미세구조 변수의 정량화

실험 동물을 우측 횡와위로 자세 변경한 뒤, 호흡에 의한 움직임이 비교적 덜한 폐 상부를 관찰하기 위해 3번 늑간을 통한 좌측 소 개흉술을 시행하고, 개방창을 통하여 폐 표면을 생체 접촉 현미경(intravital pencil-lens probe charge-coupled device videomicroscope system, Nihon-Kohden, Japan)으로 관찰하였다. 생체 접촉 현미경의 렌즈를 폐포와 주위 모세혈관을 비롯한 미세구조의 영상이 선명하게 나타나는 곳에 고정하고, 관찰 시작 후 0분, 60분의(폐 손상 유도 후 60분, 120분의) 영상을 비디오 테이프에 녹화하였다. 차후 녹화된 영상에서 컴퓨터 분석 시스템(NIH Image 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD)을 이용하여 각 시간대별로 실험 동물 당 5개의 폐

포 직경과 10개의 폐포간 벽의 두께를 측정하였다. 이 측정 결과를 토대로 다음과 같은 미세구조 변수를 정량화 하였다.

(1) 폐포 직경(alveolar diameter): 관찰 가능한 모든 폐포들의 직경을 흡기 말에 측정하였다. 폐포 당 가로, 세로 직경의 길이를 측정한 후 평균을 구하여 그 폐포의 직경으로 하였다(Fig. 1A).

(2) 폐포간 벽 두께(interalveolar septal thickness): 간질성 부종의 발현을 보기 위해 관찰 가능한 모든 폐포간 벽의 두께를 측정하였다. 폐포간 벽의 두께는, 흡기 시에는 주변 폐포 팽창으로 인한 압박으로 폐포간 벽이 너무 작아져 측정하기가 용이하지 않았으므로, 호기 말의 폐포 간 최소 거리로 정의하였다(Fig. 1B).

(3) 호흡 주기에 따른 폐포 유순도(during the respiratory cycle): 기계적 환기 시 호흡 주기에 따른 동일 폐포의 직경 차이, 다시 말해 호기 말과 흡기 말의 직경 차이를 구하여 호기 말 직경에 대한 변화(% change)로 폐포 유순도를 계산하였다(Fig. 2A, 2B).

(4) 일회 호흡량의 변화에 따른 폐포 유순도(during the change in tidal volume): 과팽창 시의 폐포 유순도를 평가하기 위해, 일회 호흡량의 변화에 따른 유순도를 계산하였다. 흡기 말에 인공 호흡기의 호기 튜브를 클램핑하고 호흡기를 정지시킨 후, 호흡 회로(respiratory circuit)에 미리 연결해 둔 주사기로 1회 호흡량(10 mL/kg)의 공기를 추가로 주입하였다. 동일 폐포에서 공기 주입 전후의 직경 차이를 구하여 폐포 유순도를 구하였다(Fig. 2C,

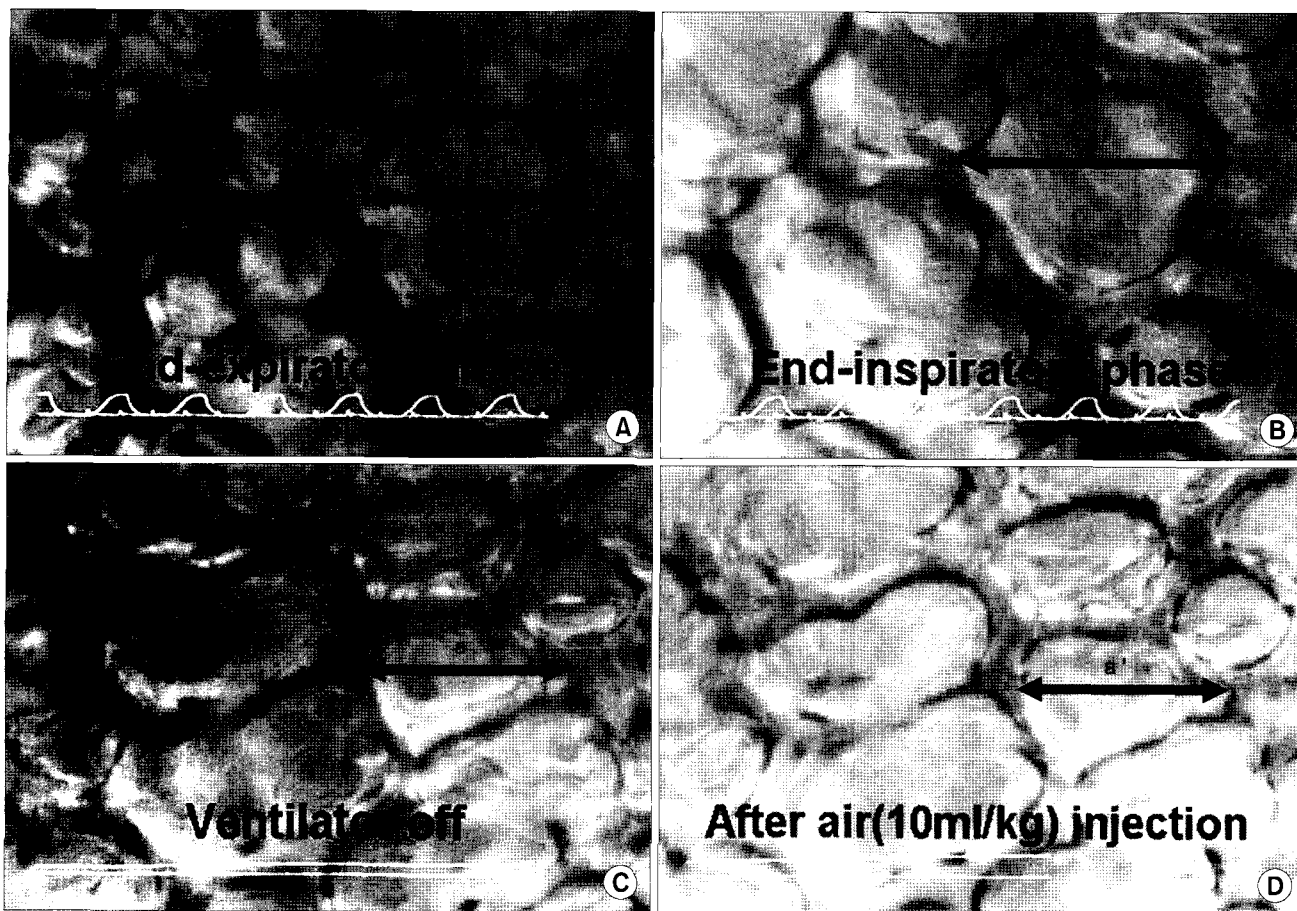


Fig. 2. Measurement of alveolar compliance. Alveolar compliance was calculated as the percentage increase of the same alveolar diameter ($[a'-a] \times 100/a$) from (A) the end-expiratory phase to (B) the end-inspiratory phase (during the respiratory cycle) and from (C) the ventilator-off state to (D) the state after infusion of an additional 10mL/kg of air (during the change in tidal volume).

2D).

5) 생리학적, 생화학적, 조직 병리학적 소견

형태학적 데이터를 뒷받침하기 위해, 실험 중 BP, AWP, PAP 등을 지속적으로 모니터하고, 폐 손상 유도 후 60분, 120분에 측정된 동맥혈 가스 검사 결과를 기록하였다. 실험 종료 시 기관 내 튜브를 통하여 각 실험 동물의 폐장에 8 cc의 생리 식염수를 주입하여 기관지 폐포 세척(Bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였다. 회수된 세척액을 이용하여 Brown 등[16]의 방법으로 세척액 내의 단백질 농도를 측정하였다. 좌측 폐를 적출한 후 백혈구 침윤의 정도를 파악하기 위해 Goldblum 등 [17]의 방법에 따라 폐장의 myeloperoxidase (MPO) activity를 측정하였다. 남은 폐 조직은 조직 병리학적 검사를 위해 포르말린에 고정하였고, hematoxylin and eosin

(H-E) 염색을 시행하였다.

6) 통계

통계적 분석은 개인 컴퓨터용 SPSS for windows (version 11.5)를 이용하여 시행하였다. 모든 변수는 평균±표준 오차로 기술하였고, 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 생리학적 변수와 미세구조 변수의 분석은 repeated-measures analysis of variance (ANOVA)를 이용하였고, 군 간의 비교는 Bonferroni post hoc tests를 적용하였다. 실험 종료 후 측정된 생화학적 변수의 분석에는 one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons을 이용하였다.

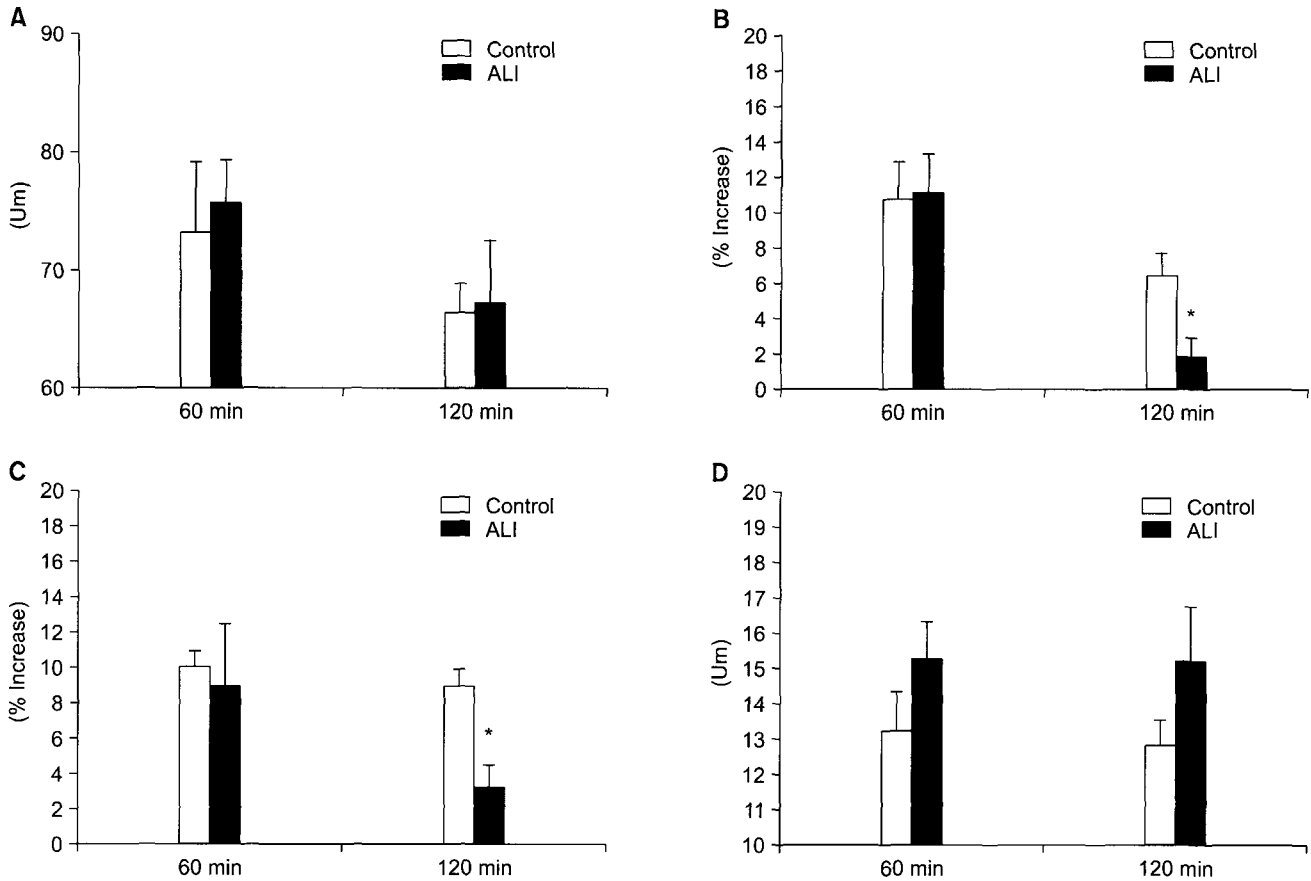


Fig. 3. Comparisons of microstructural parameters for control group and ALI group. Comparisons of (A) alveolar diameters, (B) alveolar compliance during the respiratory cycle, (C) alveolar compliance during the change in tidal volume, and (D) interalveolar septal thickness for the control group and the ALI group in a rat model of acute lung injury, 60 and 120 minutes after a challenge with normal saline or HCl ($n=7$ in each group), measured by intravital videomicroscopy. White bar, control group; black bar, ALI group. * $p<0.05$ compared with the control group.

결 과

1) 미세구조 변수(Microstructural parameters)

거의 모든 군에서 시간 경과에 따라 폐포 직경과 폐포 유순도가 감소하는 경향이 있었으나, 동일군에서 시간 경과에 따른 유의한 차이는 없었다.

(1) 대조군 vs ALI 군: 폐 손상 유도 120분 후에, ALI군의 호흡 주기에 따른 폐포 유순도($1.9\pm 1.3\%$)가 대조군($6.5\pm 1.1\%$)에 비해 유의하게 감소하였다($p=0.03$)(Fig. 3B). ALI군의 일회 호흡량의 변화에 따른 폐포 유순도($3.2\pm 1.4\%$) 역시 대조군($9.1\pm 1.0\%$)에 비해 유의하게 낮았다 ($p=0.003$)(Fig. 3C). 실험 전반에 걸쳐 ALI군의 폐포간 벽 두께가 대조군보다 두꺼웠으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3D).

(2) S1P 군: ALI군에 비해 폐포 유순도가 다소 증가하고, 폐포간 벽의 두께는 다소 감소된 소견을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4).

(3) NO 군: 폐 손상 유도 120분 후에, NO군의 일회 호흡량의 변화에 따른 폐포 유순도($16.9\pm 3.3\%$)는 대조군($9.1\pm 1.0\%$, $p=0.035$)과 ALI 군($3.2\pm 1.4\%$, $p=0.001$)에 비해 의미 있게 높았다(Fig. 5C). 폐 손상 유도 120분 후에, NO군의 폐포간 벽 두께($12.3\pm 0.5\ \mu\text{m}$)가 ALI 군($15.2\pm 1.5\ \mu\text{m}$)보다 작은 경향이 있었다($p=0.06$)(Fig. 5D).

(4) S1P+NO 군: 폐 손상 유도 120분 후에, S1P+NO군의 호흡 주기에 따른 폐포 유순도($13.6\pm 3.7\%$)가 ALI 군($1.9\pm 1.3\%$)에 비해 유의하게 증가하였다($p=0.018$)(Fig. 6B).

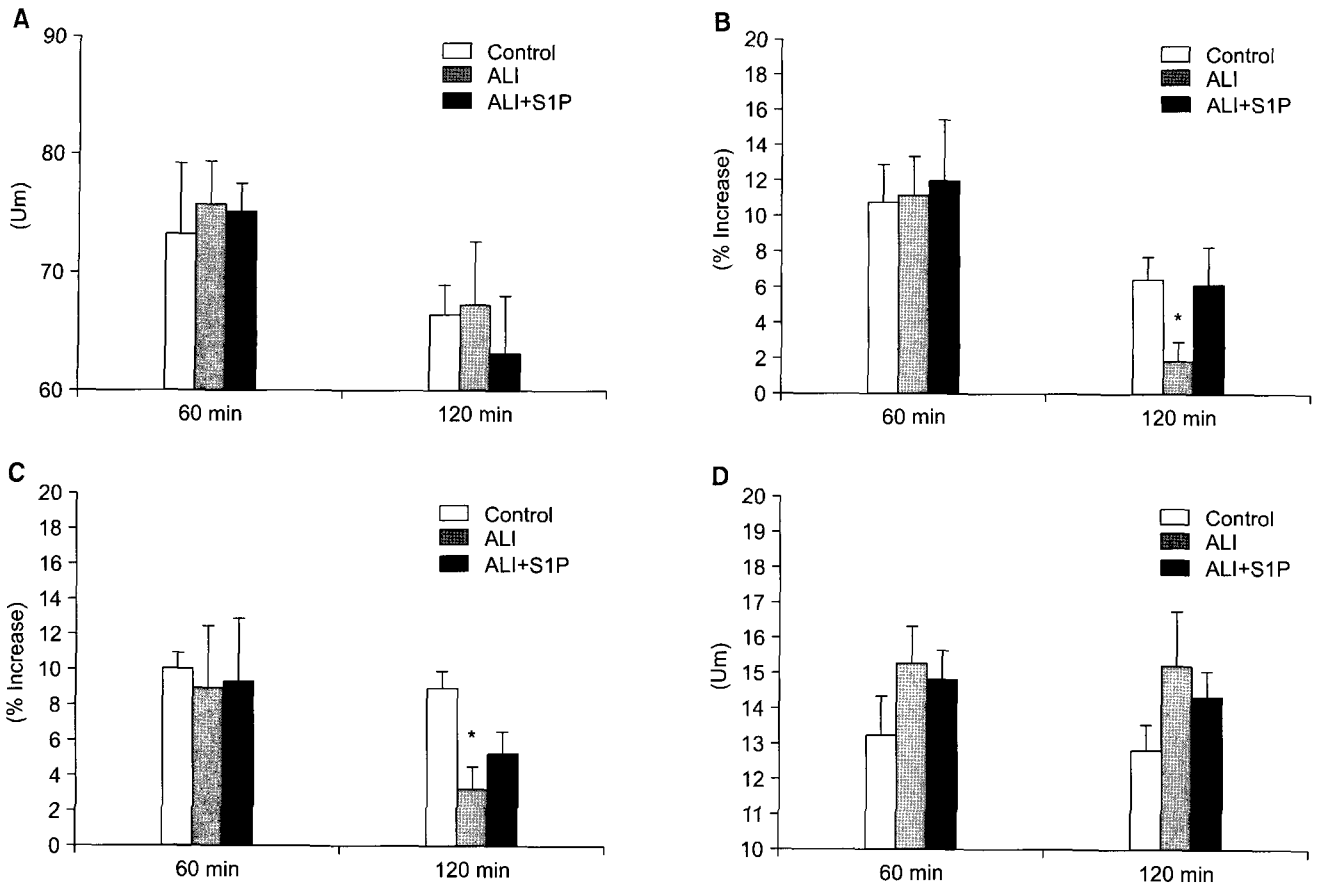


Fig. 4. Comparisons of microstructural parameters for S1P group and control/ALI group. Comparisons of (A) alveolar diameters, (B) alveolar compliance during the respiratory cycle, (C) alveolar compliance during the change in tidal volume, and (D) interalveolar septal thickness for the S1P group and the control/ALI group in a rat model of acute lung injury, 60 and 120 minutes after a challenge with normal saline or HCl (n=7 in each group), measured by intravital videomicroscopy. White bar, control group; black bar, ALI group; gray bar, S1P group. *p<0.05 compared with the control group.

2) 생리학, 생화학, 조직 병리학 소견

동일 군 내에서 시간 경과에 따른 생리학, 생화학 변수의 유의한 차이는 없었다(Table 1). ALI군의 수축기 PAP (수축기 BP)와 peak AWP가 대조군, NO군, S1P+NO군에 비해 유의하게 높았다. 대조군에 비해 ALI군과 다른 치료군들의 동맥혈 산소 분압(PaO₂)이 의미 있게 낮았으나, ALI군과 다른 치료군들 사이에는 유의한 차이가 없었다. 대조군의 BAL 단백 농도는 ALI군과 치료군들보다 유의하게 낮았으며, 치료군들의 MPO 활성도 (특히 NO군)는 ALI군에 비해 낮은 경향을 보였으나, 유의한 차이는 없었다.

포르말린에 고정된 폐 조직을 H-E 염색 후 광학 현미경으로 관찰한 결과, 대조군은 거의 정상 소견을 보였으

나(Fig. 7A), ALI군에서는 폐포 벽의 손상과 폐포관벽(alveolar duct wall)에서 심한 초산화(hyalinization)를 관찰할 수 있었다(Fig. 7B). 이러한 소견들이 S1P군에서는 다소 완화되었고(Fig. 7C), NO군과 S1P+NO군에서는 유의하게 감소하여 정상과 유사한 소견을 보였다(Fig. 7D, 7E).

고찰

ARDS의 병태 생리에 있어 핵심적인 특징은, 손상된 폐포-모세혈관 장벽을 통한 부종액의 폐포 내 유입으로 발생하는 폐부종이다. 이로 인해 발생한 저산소증과 폐유순도 감소 때문에 환자는 기계환기가 필요하게 되고, 장기간의 기계환기는 영양결핍, 병원성 감염, 다장기 부

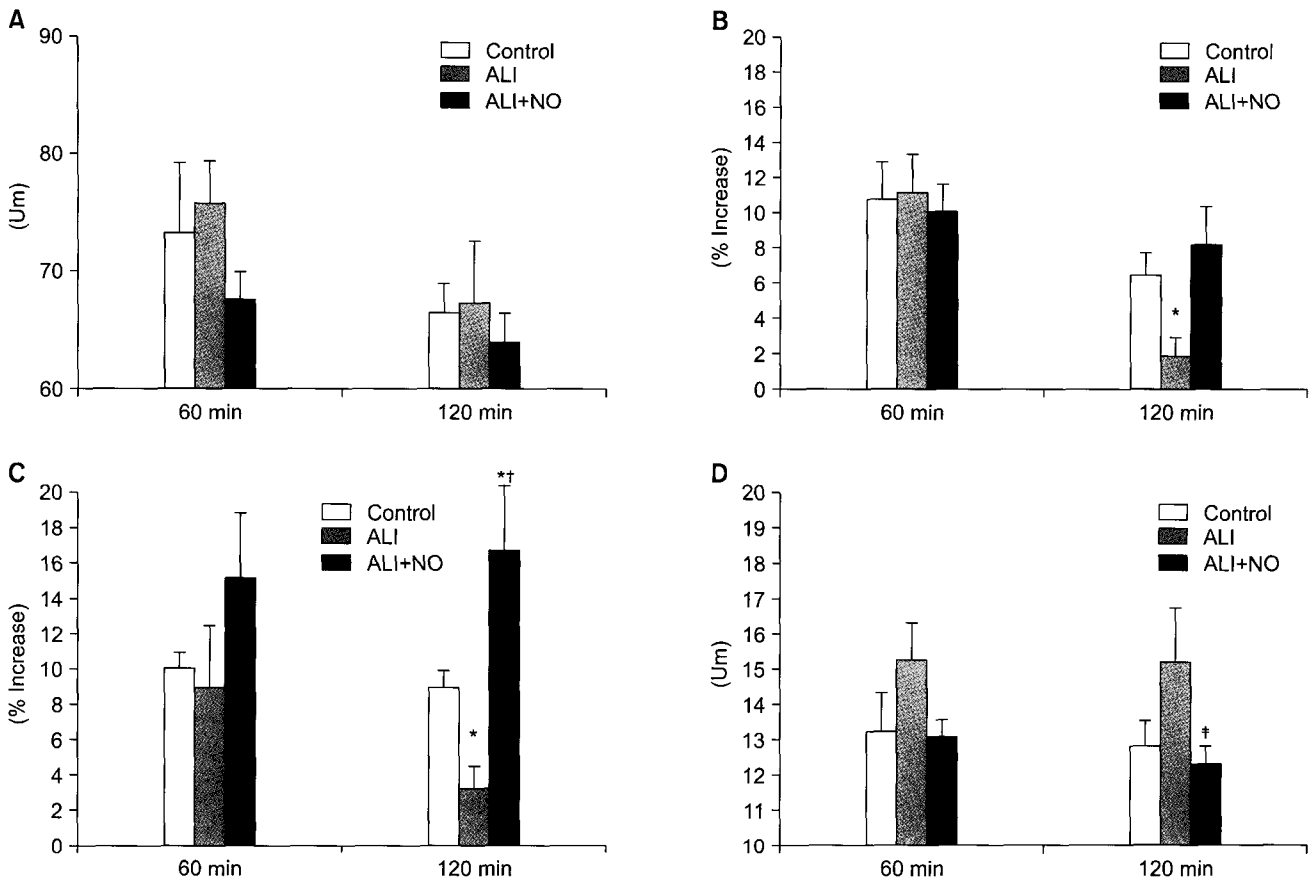


Fig. 5. Comparisons of microstructural parameters for NO group and control/ALI group. Comparisons of (A) alveolar diameters, (B) alveolar compliance during the respiratory cycle, (C) alveolar compliance during the change in tidal volume, and (D) interalveolar septal thickness for the NO group and the control/ALI group in a rat model of acute lung injury, 60 and 120 minutes after a challenge with normal saline or HCl (n=7 in each group), measured by intravital videomicroscopy. White bar, control group; black bar, ALI group; gray bar, NO group. *p<0.05 compared with the control group; †p<0.05 compared with the ALI group; ‡p=0.06 compared with the ALI group.

전 등을 초래한다[14]. 이처럼 발병 초기의 폐 미세구조의 이상이 ARDS의 모든 임상 증상과 경과를 초래하여, 병인에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 개개의 과정들은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이며, 특히 폐 미세구조의 이상에 관해서는 더욱 정보가 부족한 실정이다. 그 중요한 원인 중 하나는 현재 폐 미세구조를 평가하는데 사용되는 기법과 실험 모델의 한계 때문이라고 볼 수 있다.

이 연구에서는 폐 미세구조의 평가를 위해 생체 접촉 현미경과 HCl을 이용한 백서 폐 손상 모델을 이용하였다. 생체 접촉 현미경은 호흡 중 일어나는 동적 변화를 생체 내에서 계속적이고 직접적으로 관찰할 수 있으므로, 폐 미세구조를 평가하는데 가장 좋은 방법 중 하나이다[18]. 또한 폐 손상 유도 물질로 HCl을 사용하였는

데, 그 이유로는 위산의 흡인이 ARDS의 유발 인자 중 하나라는 사실과 기관 절개 튜브를 통하여 주입이 쉽고, 단 시간 내에 손상을 유도할 수 있다는 편의적인 측면 때문이었다. HCl 흡인에 의한 폐 손상의 양상은 전형적으로 1기와 2기를 거친다[19]. 흡인 후 1시간 이내의 손상은 폐포와 모세혈관에 대한 화학 물질의 직접적인 영향 때문이며, 4~6시간 후 2기의 변화는 주로 염증 반응 때문이다. 따라서 이 연구에서 생체 접촉 현미경으로 관찰한 소견은 주로 1기 폐 손상으로 볼 수 있다. 1기 손상의 중요한 특징은 상당량의 폐포 내 부종과 간질성 부종이며, 생체 접촉 현미경을 이용한 한 연구에서는 HCl 흡인 후 90분에 환기 가능한 폐포의 숫자가 가장 작았고, 폐포의 과팽창이 심하여 유순도가 감소함을 보고하였다[20]. 또한 저자들이 폐 손상 유도 후 60분과 120분

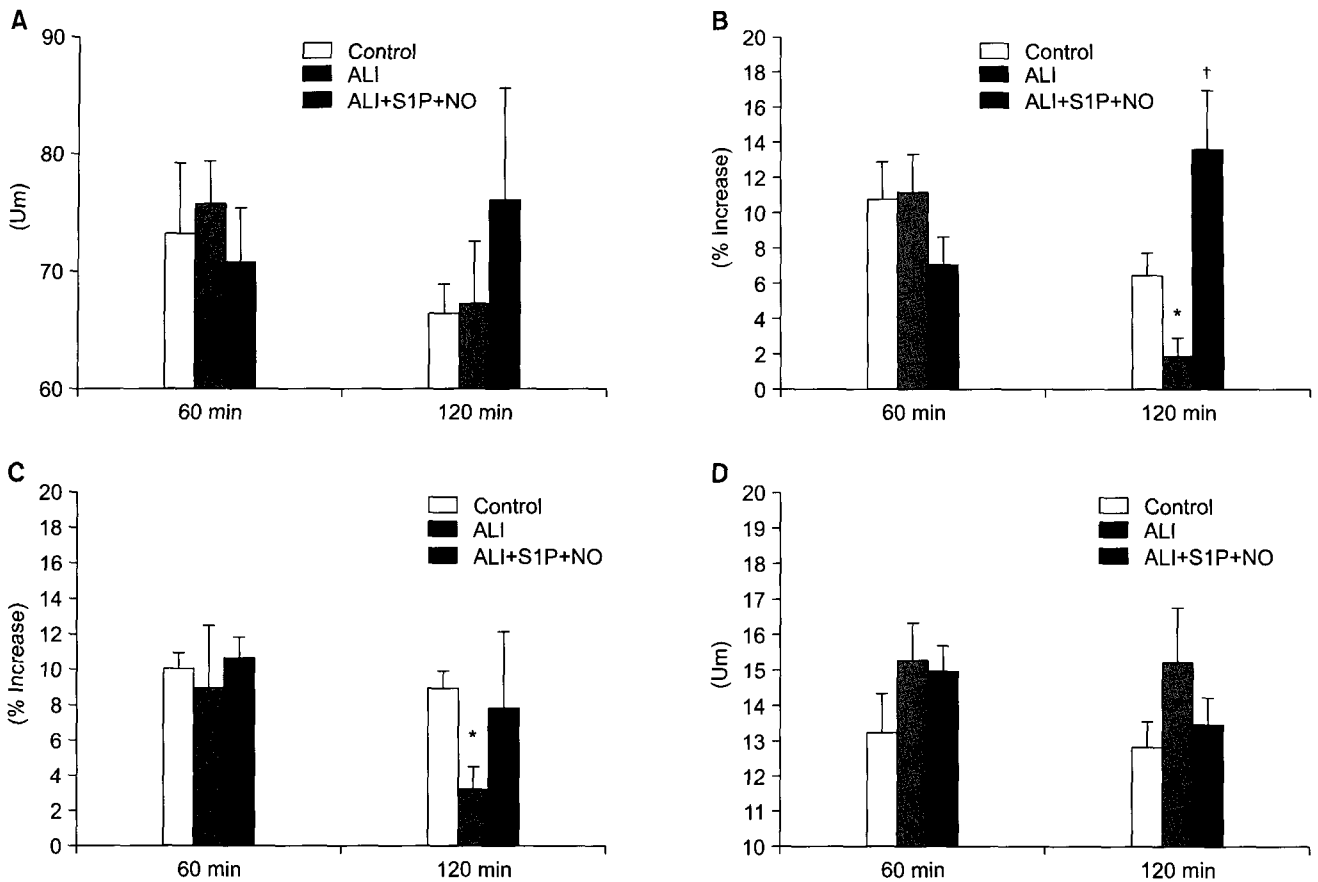


Fig. 6. Comparisons of microstructural parameters for S1P+NO group and control/ALI group. Comparisons of (A) alveolar diameters, (B) alveolar compliance during the respiratory cycle, (C) alveolar compliance during the change in tidal volume, and (D) interalveolar septal thickness for the S1P+NO group and the control/ALI group in a rat model of acute lung injury, 60 and 120 minutes after a challenge with normal saline or HCl (n=7 in each group), measured by intravital videomicroscopy. White bar, control group; black bar, ALI group; gray bar, S1P+NO group. *p<0.05 compared with the control group; †p<0.05 compared with the ALI group.

Table 1. Physiologic and biochemical parameters

		SBP (mmHg)	SPAP/SBP	PAWP (mmHg)	PaO ₂ (mmHg)	BAL protein (mg/mL)	MPO activity (U/ug)
60 min	Control	98.8±6.6	0.22±0.02	16.0±1.8	471.2±20.0		
	ALI	81.2±10.6	0.41±0.09*	23.8±2.1*	202.0±43.3*		
	S1P	90.6±9.1	0.26±0.02	18.8±1.7	296.9±44.4*		
	NO	85.5±6.5	0.25±0.02†	15.9±1.6†	232.8±51.4*		
	S1P+NO	92.7±7.2	0.23±0.03†	15.3±0.6†	217.1±44.8*		
120 min	Control	95.2±6.36	0.22±0.01	14.8±1.4	477.1±38.8	0.67±0.13	0.05±0.01
	ALI	73.7±4.6	0.47±0.09*	26.5±3.5*	109.9±21.7*	2.77±0.20*	0.94±0.23*
	S1P	70.8±7.5	0.30±0.04	22.6±2.0	248.4±45.6*	2.42±0.35*	0.55±0.05
	NO	71.8±6.64	0.24±0.03†	17.1±2.1†	220.0±48.1*	2.17±0.29*	0.38±0.11
	S1P+NO	74.2±7.6	0.26±0.03†	16.3±0.8†	163.5±33.2*	2.14±0.31*	0.46±0.19

Values are means±SE. ALI=acute lung injury; BAL=bronchoalveolar lavage; MPO= myeloperoxidase; NO=nitric oxide; PaO₂=arterial oxygen pressure; SBP=systolic blood pressure; PAWP=peak airway pressure; SPAP=systolic pulmonary artery pressure; S1P=sphingosine 1-phosphate; *p<0.05 compared with control group; †p<0.05 compared with ALI group.

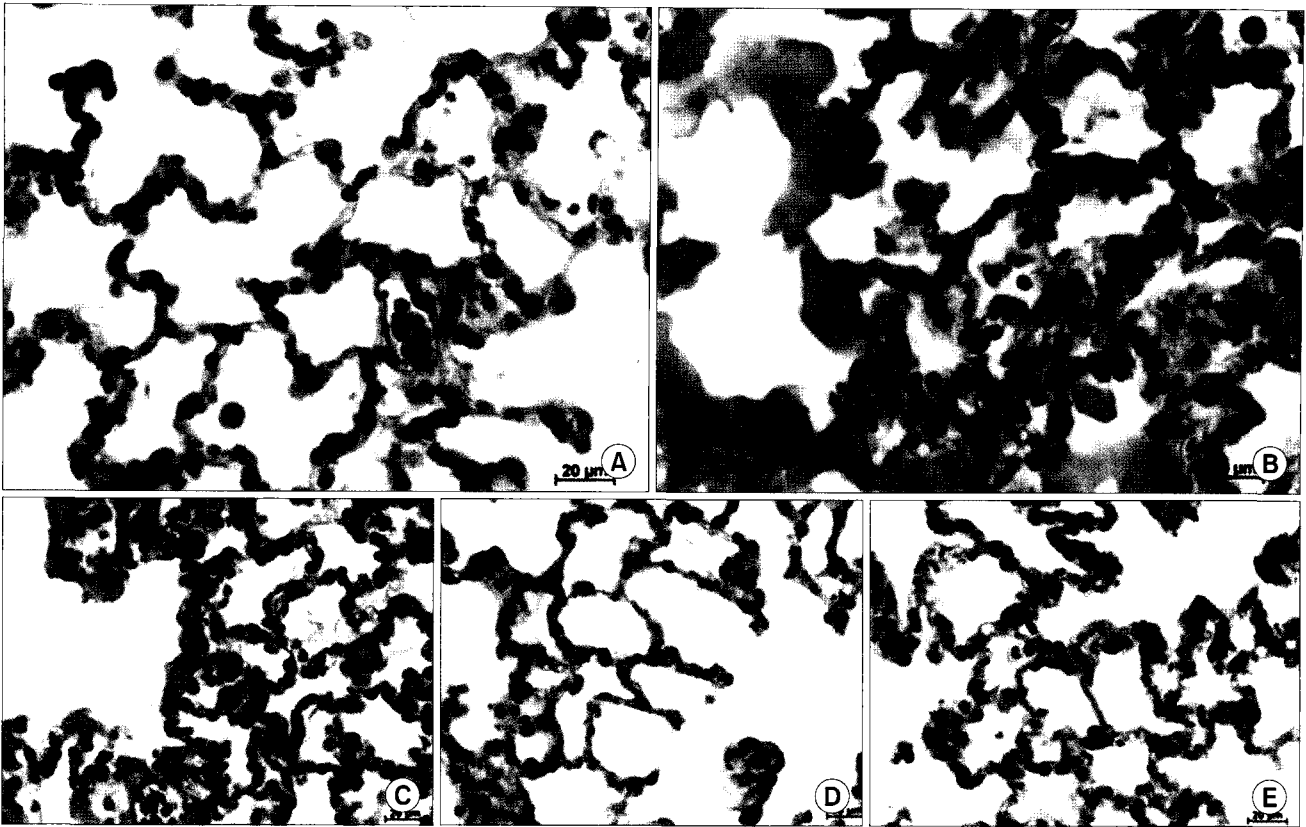


Fig. 7. Histopathologic assessment (hematoxylin and eosin stain, $\times 400$). Control group (A) exposed to intratracheal normal saline demonstrated a preserved lung parenchymal architecture, but ALI group (B) developed severe damage and prominent hyalinization in the alveoli and alveolar ducts. These findings were diminished slightly in the S1P group (C), and significantly in the NO group (D) and the S1P+NO group (E).

에 측정된 ALI군의 PaO_2 는 흡입 산소 농도(FiO_2) 100%의 인공 호흡기 세팅에서 각각 202 mmHg, 110 mmHg로서 급성 폐 손상 혹은 ARDS의 기준에 포함되었고, 실험 종료 후 조직 병리학적으로도 ALI군에서 폐포 벽과 폐포관 벽의 저명한 손상이 관찰되어, HCl 흡입 60~120분 후의 관찰은 손상에 의한 폐포 유순도와 간질성 부종의 정도를 평가하기에 적절한 시간으로 사료된다.

이 연구에서 ALI군의 폐포 유순도는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이러한 폐 미세구조의 형태학적 결과는 기존의 생리학적, 생화학적 지표와 조직 병리학적 소견과도 일치하는 것이었다. 폐 손상 후 시간의 경과에 따라 전체 폐 실질의 유순도가 감소함은 잘 알려져 있지만, 이것은 주로 동원(recruit) 가능한 전체 폐포의 숫자가 감소함으로써 생기는 현상이며, 개개의 폐포 유순도가 얼마나 감소하는가에 대해 참고할 만한 연구 결과는 없다. 이 연구에서는 개개의 폐포를 생체 내에서 실

시간으로 직접 관찰함으로써, 폐 손상 후 개개의 폐포 유순도도 유의하게 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. 그 기전으로는 폐 손상 후 발생하는 폐포 내 부종이나 폐 표면 활성제(surfactant)의 비 활성화 등 다양한 요인들이 영향을 미쳤을 것으로 추론할 수 있다.

저자들은 폐 손상 모델에 잠재적인 폐 손상 치료제를 투여했을 때, 폐 미세구조에서 일어나는 실시간 효과도 관찰하고자 하였고, 많은 치료법 가운데 현재 여러 가지 용도로 널리 쓰이고 있는 NO와 최근 일부 연구자들로부터 주목을 받고 있는 S1P를 채택하였다.

이 연구에서 NO군은 ALI군에 비해 폐포 유순도는 유의하게 높았고, 간질성 폐 부종은 감소한 소견을 보였다. 이러한 소견은 AWP, PAP 결과와 거의 정상 폐 조직에 가까운 NO군의 조직 병리학적 소견과 일치하는 것이었다. 이상의 결과를 볼 때 흡입된 NO가 단순히 저산소증을 개선하거나 폐혈관 고혈압을 교정하는 작용 외에도,

폐 부종이나 간질성 부종을 감소시키고 폐포 유순도를 향상시키는데도 일정한 역할을 하는 것으로 추론할 수 있다. 이 연구만으로는 그 기전을 명확히 밝히기 어려우나, NO의 항염증 작용(anti-inflammatory mechanism)이 큰 역할을 했으리라 생각한다. NO의 작용 기전에 관한 정보가 늘어남에 따라, NO가 기존에 알려진 작용 외에 다른 방식으로 급성 폐 손상의 치료에 도움을 주는 것이 확실해졌다[21]. 예를 들어 백혈구와 혈소판 응집을 억제함으로써 급성 폐 손상을 유발하는 사이토카인의 분비를 줄인다든지[22,23], 자유 라디칼 포식자(free radical scavenger)로서의 역할 등이 그것이다[24]. 이러한 면역학적 작용들이 직,간접적으로 폐포 유순도와 간질성 부종의 정도에 영향을 주었을 것으로 생각한다.

그러나 이 연구에서 SIP군의 결과는 NO군에 비해 다소 실망스러운 것이었다. 비록 SIP+NO군에서 ALI군에 비해 폐포 유순도가 증가하기는 하였으나, SIP와 NO의 상승 효과(synergistic effect)를 보이지 못하고, 그 양상이 NO군과 매우 유사하여 이것 또한 SIP의 영향이라고 보기는 힘들다. 이처럼 SIP의 효과가 타 연구[14,15]에서처럼 저명하지 않은 이유를 확실히 밝히는 것은 어려운 것으로 생각되나, 이번 연구와 기존의 타 연구들 사이의 차이점과 SIP와 관련된 최근의 몇 가지 논쟁점들로부터 그 가능성을 추론해 볼 수 있겠다. 우선 기존의 *in vivo* 연구들에서는 내독소나 인공 호흡기로 손상을 유도하였으며, 6~24시간 사이에 그 영향을 관찰하였으므로[14,15], HCl로 급격한 폐 손상을 유도하여 1~2시간 내의 급성기 변화를 관찰한 이 연구 결과와는 차이가 있을 수 있다고 사료된다. 또 다른 가능성으로는 SIP 수용체의 세포 특이 발현(cell type-specific expression)에 기인한 현상으로 해석할 수도 있다. 최근 보고들에 의하면 세포 종류에 따라 고유한 SIP 수용체들(SIP receptors₁₋₅, SIPR₁₋₅)을 발현함으로써, SIP 자극 시 세포 형태에 따라 다양한 반응을 보이는 것으로 알려지고 있다[25]. 대표적으로 폐 모세혈관 내피가 SIPR₁을 발현하는 반면 폐포 상피는 SIPR₃를 발현하므로, 기도를 통해 투여된 SIP는 제1형, 2형 폐포 상피 세포에서 발현되는 SIPR₃에 작용하여 tight junction을 개방시킴으로써 오히려 폐 부종을 유발한다는 보고가 있다[26]. 물론 이 연구에서는 SIP를 기도가 아닌 정맥을 통해 투여하여 SIPR₁를 통한 모세혈관 내피 세포 장벽 강화의 효과를 보고자 하였으나, 이미 손상된 일부 폐포-모세혈관 장벽을 통해 혈관 외로 누출된 상당량의 SIP가 폐포 상피 세포에서 발현되는 SIPR₃

에 작용하여 상피의 연속성(integrity)을 깨으로써, 폐 손상 완화 작용을 상쇄시켰을 가능성이 있다. 따라서 현 시점에서 SIP가 폐 손상의 진행을 억제하는 순기능만을 가지고 있다고 결론 내리기는 어렵다. 그러나 이 연구 결과, ALI군에 비해 SIP군에서 폐 손상의 정도가 다소 경미한 소견을 보인만큼(NO군만큼 저명하지는 않지만), SIP의 치료 효과에 대한 단정적인 결론은 보류해야 할 것으로 생각되며, 여전히 유망한 잠재적 폐 손상 치료제로서의 연구가 계속적으로 이루어져야 한다고 생각한다.

이 연구에는 그 방법론에 있어 몇 가지 제한점이 있다. 대조군을 포함한 거의 모든 군에서, 통계적인 유의성은 없었으나, 폐포 직경과 폐포 유순도가 시간 경과에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이 사실은 HCl 외에도 과산화증(100% 산소), 기계 환기 자체, 생체 접촉 현미경 렌즈에 의한 직접적이고 기계적인 손상 등 폐 손상을 유발할 수 있는 다른 요인들의 존재 가능성을 반영한다. 저자들은 실험 계획 단계에서, 실험 중 실험 동물이 저산소증으로 죽지 않게 함과 동시에 과산화증에 의한 폐 손상도 예방하기 위해 90% 산소를 투여할 계획이었다. 그러나 실험에 사용된 소동물용 인공 호흡기로는 섬세한 조작을 할 수 없어, 실험 동물에게 적절한 산소 농도와 호기 말 양압(positive end-expiratory pressure, PEEP), sigh breath, 적절한 습도 등을 적용할 수 없었다. 이런 제한점들이 HCl에 의해 유도된 손상을 어느 정도 더 악화시켰을 것이라 생각되나, 폐 손상 유도 후 관찰 기간이 2시간으로 매우 짧았던 점과 모든 군에 동일한 조건이 적용되었던 점 등을 고려할 때, 전체적인 연구 결과에 큰 영향을 미치지 않았을 것으로 생각한다.

결 론

저자들은 백서 모델에서 생체 접촉 현미경을 이용하여 정상 폐 미세구조와 폐 손상 유도 및 잠재적 치료제 투여 후 폐 미세구조의 변화를 효과적으로 생체 내에서 직접 관찰할 수 있었으며, 그 결과는 여러 혈액학적 변수들과 기존의 간접적인 방법들로 얻은 결과들과 일치하는 것이었다. 생체 접촉 현미경을 통해 관찰한 결과, NO는 폐포 유순도를 높이고 간질성 부종을 감소시키는 등 급성 폐 손상을 완화시킴을 확인할 수 있었고, SIP의 경우 추후 후속 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다. 이 연구는 비록 단기 실험 연구 결과이기는 하나 NO의 또 다른 폐 손상 억제 효과를 입증하였고, 폐 손상 치료

에 관한 실험 연구에 미세구조 동적 변화의 생체 내 관찰이라는 새로운 방법론을 도입하여 향후 연구의 기초를 마련했다는데 의의가 있다고 생각한다.

참 고 문 헌

- Crimi E, Slutsky AS. *Inflammation and the acute respiratory distress syndrome*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2004;18:477-92.
- Dellinger RP, Zimmerman JL, Taylor RW, et al. *Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial*. Crit Care Med 1998;26:15-23.
- Manktelow C, Bigatello LM, Hess D, Hurford WE. *Physiologic determinants of the response to inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome*. Anesthesiology 1997;87:297-307.
- Zapol WM, Hurford WE. *Inhaled nitric oxide in the adult respiratory distress syndrome and other lung diseases*. New Horiz 1993;1:638-50.
- Zapol WM, Hurford WE. *Inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome and other lung diseases*. Adv Pharmacol 1994;31:513-30.
- Dobyns EL, Cornfield DN, Anas NG, et al. *Multicenter randomized controlled trial of the effects of inhaled nitric oxide therapy on gas exchange in children with acute hypoxemic respiratory failure*. J Pediatr 1999;134:406-12.
- Lundin S, Mang H, Smithies M, Stenqvist O, Frostell C. *Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study The European Study Group of Inhaled Nitric Oxide*. Intensive Care Med 1999;25:911-9.
- Michael JR, Barton RG, Saffle JR, et al. *Inhaled nitric oxide versus conventional therapy: effect on oxygenation in ARDS*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1372-80.
- Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, et al. *Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group: Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial*. JAMA 2004;291:1603-9.
- Troncy E, Collet JP, Shapiro S, et al. *Inhaled nitric oxide in acute respiratory syndrome: a pilot randomized controlled study*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1483-8.
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, et al. *Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement*. J Clin Invest 2001;108:689-701.
- Schaphorst KL, Chiang E, Jacobs KN, et al. *Role of sphingosine 1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;285:L258-67.
- Bhattacharya J. *Lung injury: sphingosine 1-phosphate to the rescue*. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:928-9.
- McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, Sammani S, Simon BA, Garcia JG. *Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:987-93.
- Peng X, Hassoun PM, Sammani S, et al. *Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury*. Am J Respir Crit Care Med 2004;169:1245-51.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. *Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance*. Anal Biochem 1989;180:136-9.
- Goldblum SE, Wu KM, Jay M. *Lung myeloperoxidase as a measure of leukostasis in rabbits*. J Appl Physiol 1985;59:1978-85.
- Schneider P, Foitzik T, Kahrau S, Podufal A, Buhr HJ. *An experimental rat model for studying pulmonary microcirculation by in vivo videomicroscopy*. Microvasc Res 2001;62:421-34.
- Kennedy TP, Johnson KJ, Kunkel RG, Ward PA, Knight PR, Finch JS. *Acute acid aspiration lung injury in the rat: biphasic pathogenesis*. Anesth Analg 1989;69:87-92.
- Endo S, Sohara Y, Murayama F, Yamaguchi T, Hasegawa T, Kanai Y. *Real-time visualization of partial liquid ventilation in a model of acute lung injury*. Surgery 2003;133:207-15.
- Mathisen DJ, Kuo EY, Hahn C, et al. *Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome after pulmonary resection*. Ann Thorac Surg 1998;66:1894-902.
- Radomski MW, Moncada S. *The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function*. Adv Exp Med Biol 1993;344:251-64.
- Samama CM, Diaby M, Fellahi JL, et al. *Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome*. Anesthesiology 1995;83:56-65.
- Wink DA, Hanbauer I, Laval F, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB. *Nitric oxide protects against cytotoxic effects of reactive oxygen species*. Ann NY Acad Sci 1994;738:265-78.
- Brinkmann V, Baumruker T. *Pulmonary and vascular pharmacology of sphingosine 1-phosphate*. Curr Opin Pharmacol 2006;6:244-50.
- Gon Y, Wood MR, Kioussis WB, et al. *SIP3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by TNF*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:9270-5.

=국문 초록=

배경: 이 연구에서는 급성 폐 손상 백서 모델에 nitric oxide (NO)와 sphingosine 1-phosphate (S1P)를 투여한 후, 폐 미세구조의 변화를 생체 접촉 현미경(intravital videomicroscopy)으로 생체 내에서 직접 관찰하고 형태학적으로 분석하여, 급성 폐 손상 치료법으로서 이들의 효과를 평가하고자 하였다. 대상 및 방법: 백서(Sprague Dawley rat) 35마리를 5군으로 나누었다: 생리 식염수를 흡입시킨 대조군 (n=7), 0.1 N HCl을 흡입시켜 폐 손상을 유도한 폐 손상 대조군(ALI군, n=7), 폐 손상을 유도하고 치료제를 투여한 치료군(S1P군, n=7; NO군, n=7; S1P+NO군, n=7). 폐포 유순도와 간질성 부종의 정도를 평가하기 위해, 폐 손상 유도 후 60분과 120분에 측정 가능한 모든 폐포와 폐포간 벽의 두께를 생체 접촉 현미경으로 측정하였다. 폐포 유순도는 호흡 주기에 따른 폐포 직경 변화와 일회 호흡량의 변화에 따른 직경 변화로 평가하였다. 결과: 폐 손상 유도 120분 후에, ALI군의 폐포 유순도가 대조군(호흡 주기에 따른 변화: ALI군 1.9% vs 대조군 6.5%, $p=0.03$; 일회 호흡량에 따른 변화: ALI군 3.2% vs 대조군 9.1%, $p=0.003$)과 NO군(일회 호흡량에 따른 변화: ALI군 3.2% vs NO군 16.9%, $p=0.001$)에 비해 의미 있게 감소하였다. 폐 손상 유도 120분 후에, NO군의 폐포간 벽의 두께가 ALI군에 비해 작은 경향을 보였다(ALI군 $15.2\ \mu\text{m}$ vs NO군 $12.3\ \mu\text{m}$, $p=0.06$). S1P 단독으로는 폐포 유순도와 간질성 부종에 유의한 영향을 미치지 않았다. 결론: 백서 폐 손상 모델을 생체 접촉 현미경으로 관찰한 결과, NO는 폐포 유순도를 개선하고 간질성 부종을 감소시켜 폐 손상 정도를 완화시키는 것으로 사료된다.

- 중심 단어 : 1. 급성 호흡곤란 증후군
2. Nitric oxide
3. 폐포
4. 생체 접촉 현미경