

LPS에 의한 급성 폐손상에서 게르마늄에 의한 호중구 세포사와 큰포식세포의 포식능 증가

이 윤 정, 조 현 국¹, 전 경 희*

영남대학교 이과대학 생물학과, ¹경운대학교 안경광학과

The Increase of Apoptotic Neutrophils and Phagocytic Macrophage by Germanium in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide

Yoon Jeong Lee, Hyun Gug Cho¹ and Kyung Hee Jeune*

Department of Biology, Yeungnam University, Gyeongbuk 712-749, Korea

¹Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gyeongbuk 730-739, Korea

(Received October 14, 2008; Accepted December 17, 2008)

ABSTRACT

The essential factor of acute respiratory distress syndrome (ARDS), an acute lung injury accompanied commonly by sepsis syndrome is accumulation of neutrophils in lung tissue. The study attempted to confirm whether a lung injury would be decreased with the anti-inflammatory effect of germanium by the treated germanium prior to the development of ARDS and whether nitric oxide influence in suppressing a lung injury. Test groups were divided in the following structure for experiment; CON that has been administered with sodium chloride to airway, LPS administered with endotoxin for 5 hours in the same amount and 5 hours of endotoxin administered Ge+LPS following 1 hours of pre-treated germanium. The result of a test using experimental animals, infiltration of neutrophils ($p < 0.001$) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was significantly decreased, the structure of lung tissue was preserved relatively well, and much neutrophils with distinct positive were observed on tunel staining which showed increase of apoptotic neutrophils in the pre-treated germanium group compare to the endotoxin administrated group. In observation of ultrastructural changes of cell in BALF, phagocytic alveolar macrophage was increased in alveolar space, the nucleus of most engulfed neutrophils were condensed, and some apoptosis neutrophils appears to be DNA fragmentation and effacement of cellular organelles were found in intercellular matrix in the pre-treated germanium group. However, the nitric oxide showed increase in all the groups excluding CON, and the nitric oxide effect such as degranulation diminishing of mast cells and apoptosis increase of neutrophils in the pre-treated group only. The situation appears that there was change in internal environment of the experimental animal by the pre-treated germanium before the nitric oxide is produced and the anti-inflammatory effect activated the pre-processed germanium by nitric oxide which activated following the change. Therefore, the nitric oxide created from macrophage in accordance with the pre-treated germanium appears to influence in alleviating a lung injury. Accordingly, acute lung injury is alleviated by the anti-inflammatory effect of germanium such as inhibition of neutrophils migration,

* Correspondence should be addressed to Kyung Hee Jeune, Department of Biology, Yeungnam University, Gyeongbuk 712-749, Korea. Ph.: (053) 810-2375, Fax: (053) 810-4618, E-mail: khjeune@yu.ac.kr

induction of neutrophil apoptosis and increase of phagocytic function of phagocyte, and the nitric oxide produced from activated macrophage by germanium would influence in suppressing a lung injury.

Keywords : Acute lung injury, Germanium, Neutrophil, Apoptosis

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome: ARDS)은 다양한 원인에 의해 초래되는 급성 염증성 폐질환으로 Ashbaugh et al.(1967)에 의한 처음 보고에서 외상 및 패혈증의 선행 후 빈호흡과 동반된 호흡부전, 심한 저산소증, 양측 폐의 미만성 침윤이 동반되는 질환이고, 이는 투과성 폐부종의 증가 및 계면활성제의 감소로 인한 것이라고 추측되었다. 그러나 ARDS에 관한 연구가 수 십년간 계속되고 있지만 현재까지도 ARDS로 인한 사망률은 약 40~60%로 높게 나타나고 있다(Milberg et al., 1995; Zilberberg & Epstein, 1998). ARDS는 폐렴, 폐 좌상, 위 내용물의 흡입, 지방 색전, 연기나 독가스의 흡입, 패혈증, 쇼크성 장애, 심한 외상, 약물 과다, 급성 체장염 등의 다양한 원인에 의해 발생되며(Pepe et al., 1982; Fowler et al., 1983; Sloane et al., 1992; Doyle et al., 1995; Hudson et al., 1995), 국내 보고 자료에 의한 ARDS 발생 확률은 패혈증(55%), 폐렴(28%), 흡인성(16%), 외상(11.4%)순이었다(대한결핵 및 호흡기학회 급성호흡곤란증후군 전국 실태조사 소위원회, 1997). ARDS는 위 기술한 어떤 원인이든 폐포-모세혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 파괴로부터 기인하며, 이로 인해 폐포-모세혈관 장벽의 투과성이 증가되어 단백질이 풍부한 삼출액이 폐포 내로 다량 유입되어 폐부종이 발생하며(Ware & Matthay, 2000), 제II형 폐포세포의 손상으로 폐포 표면의 계면활성제(surfactant) 생성에 장애를 일으켜 호흡부전의 결과가 초래된다(Pittet et al., 1997). ARDS 발병 후 경과를 밝혀내기 위한 수단으로 기관지폐포세척술(bronchoalveolar lavage: BAL)을 시행했을 때, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)내에는 사이토카인, 반응성 산소기, 류코트리엔, 활성화 보체 등의 염증 매개 물질들이 증가하고, 정상 폐에서 5% 미만을 차지하는 호중구가 전체 세포의 80%를 차지할 정도로 증가한다(Baughman et al., 1996). 형태학적 소견 상에서도 ARDS 초기의 폐조직에서는 호중구의 침윤이 관찰되는데(Pittet et al., 1997) 폐조직으로의 호중구 이동은 호중구 화학주성인자, 사이토카인 등 폐의 호중구 유주인자에 의한 것이다(Smith et al., 1991). 자극을 받아 활성화된 호중구는 세포 밖으로 elastase, collagenase, myeloperoxidase (MPO)와 같은 단백질 분해효소, 아라키돈산 대사물(arachidonate), 활성산소기(reactive oxygen free radical) 등의 독성 물질을 분비하여 폐포-모세

혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 파괴를 포함하는 급성 폐손상을 유발시킨다(Tate & Repine, 1983). 호중구를 인위적으로 제거한 동물에 내독소나 종양괴사인자를 투여하면 폐손상이 감소한다는 보고(Heflin & Brigham, 1981; Flick et al., 1981; Stephens et al., 1988)로 폐조직의 호중구 침윤과 폐손상이 상응하는 관계임을 알 수 있다. 최근 Sibille & Reynolds(1990), Abraham(2003)은 내독소로 유도된 ARDS에서 폐손상을 일으키는 가장 중요한 인자가 바로 호중구라고 하였고 급성 폐손상에서 폐포장 큰포식세포가 폐로의 호중구 집결을 감소시켜 항염증 작용을 가진다는 보고(Beck-Schimmer et al., 2005)와 실험동물에 게르마늄을 투여하면 호중구의 세포사가 촉진되고, 폐포장 큰포식세포의 호중구 탐식능력을 증가시켜 내독소로 유도된 급성 폐손상이 감소한다는 보고(Cho, 2005)는 큰포식세포의 기능적 변화를 이용하여 폐손상의 가장 중요한 인자가 호중구임을 설명하고 있다. Cho(2005)의 보고에서 호중구의 세포사 유도물질로 사용된 유기 게르마늄 화합물 Ge-132는 각 세포에 충분한 산소를 공급해 줌으로써 세포의 활성을 촉진시키고(Levine & Kidd, 1986), 관절염과 간염 등에 대한 항염증작용(Sasaki et al., 1984; Dimartino et al., 1986), 큰포식세포와 자연살해세포의 기능을 활성화시키는 면역증강작용(Aso et al., 1985; Suzuki et al., 1986; Sung, 1997), 그리고 세포막의 지질과산화물을 방지하여 세포막의 산화적 손상을 감소시킬 수 있는 항산화 작용(Hiroshi et al., 1991; Yang, 2001)을 한다고 알려져 있다. 특히 게르마늄 투여에 의해 큰포식세포는 활성화되고(Suzuki et al., 1986), 활성화된 큰포식세포는 산화질소(Nitric oxide: NO)를 생성, 분비하게 되는데(Nagata, 1978; Artman & Seeley, 1979), 최근 폐손상에 대한 산화질소의 효과가 보고되어 임상적으로 산화질소의 흡입 치료가 연구, 이용되어지고 있다. 폐손상에서 외인성으로 산화질소를 흡입시키거나 L-arginine으로 내인성 산화질소 생성을 촉진시키면 실험동물의 폐에서 산화제에 의한 혈관 손상이 감소하고(Kavanagh et al., 1994; Darley-Usmar et al., 1995), 그람 음성균으로 유도한 돼지(Yorkshire swine) 패혈성 급성 폐손상 모델에서는 흡입된 산화질소에 의해 활성화된 호중구들의 폐포-모세혈관 장벽을 통한 폐 침윤이 저해됨으로써 폐포-모세혈관 장벽의 손상이 감소하며(Bloomfield et al., 1997), 내독소로 유발된 토끼의 급성 폐손상에서는 염증 세포의 활성산소기 생성과 염증전구사이토카인 생성이 감소되어 토끼의 급성 폐손상이 감소한다고 하였다(고 et al., 2001). 산화제 손상에서 산화질소가 보호작용을

하는 기전으로 철 매개 산화제 생성 억제에 따른 지질과산화 억제, 백혈구 유착과 활성화의 방해, 염증세포에 의한 산화제 생성 감소, 비만세포의 탈과립 차단, 세포독성 매개물질의 분비 억제, 세포내 cGMP 증진 등이 보고 되었다(Aoki et al., 1990; Clancy et al., 1992; Gaboury et al., 1993; Kubes, 1993; Kurose et al., 1994; Chang et al., 1996). 또한 산화질소는 세포사에 직·간접적으로 영향을 미치고 있음이 알려졌다(Dimmeler & Zeiher, 1997; Kim et al., 1999; Chung et al., 2001). 산화질소는 미토콘드리아 막에서 cytochrome c를 유리시키며(Kim et al., 1998; Umansky et al., 2001), DNA 손상 후 p53 유전자를 활성화시켜 세포사를 유도한다고 하였다(Kim et al., 1998; Lala & Chakraborty, 2001).

따라서 본 연구에서는 내독소로 유도된 급성 폐손상에서 게르마늄을 투여하면 폐 부종을 비롯한 급성 폐손상의 증상이 감소, 호중구의 세포사가 증가, 큰포식세포가 활성화, 큰포식세포에 의해 세포사된 호중구가 포식된다는 보고(Cho, 2005)를 바탕으로 ARDS 발병 전에 게르마늄을 투여했을 때 게르마늄에 의해 호중구의 세포사가 증가하는지, 활성화된 큰포식세포에 의해 세포사된 호중구가 탐식됨으로써 폐손상이 감소되는지, 그리고 폐손상 억제에 산화질소가 연관되어 있는지를 알아보려고 다음과 같은 실험을 수행하였다.

호중구의 세포사 증가, 큰포식세포의 활성화, 큰포식세포의 포식능 증가여부를 폐세척액 내 호중구 수 산정, 호중구의 세포사 관찰, 비만세포의 탈과립화 관찰, 큰포식세포의 세포사된 호중구의 탐식관찰, 산화질소(Nitric oxide: NO)의 정량, 그리고 유도성 산화효소 합성효소(inducible nitric oxide synthase: iNOS)의 발현정도 측정을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대한실험동물(Korea)로부터 구입한 후 1주간 적응 사육시킨 후 250~270 g의 외견상 건강한 동물들을 실험에 사용하였다. 게르마늄(Bis-carboxyethyl-germanium Sesquioxide anhyd. $\text{GeCH}_2\text{CH}_2(\text{COOH})_2\text{O}_3$, 99.8% up)은 weinstein chemicals, Inc. (USA), Enfluran(아리레인®)은 일성신약주식회사, 그리고 Xylazine은 Haver사(New York, NY, USA)에서 구입하였고, 그 외 내독소를 비롯한 모든 시약은 Sigma-Aldrich, Inc. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 내독소 및 게르마늄의 투여

실험군은 생리식염수를 기도로 투여한 대조군, 동량의 내

독소 투여군, 그리고 게르마늄을 전처리 한 내독소 투여군으로 나누었다. 급성 폐손상을 유발하기 위해 실험동물을 Enfluran으로 흡입마취 시킨 후 내독소(Lipopolysaccharide; *Escherichia coli*, 0127 : B8) 100 μg 을 0.5 mL의 생리식염수에 녹여 기도내로 분무하고 5시간 경과한 뒤 호흡곤란 증세로 급성 폐손상이 일어났음을 확인하였다. 게르마늄(26 mg/100 g)은 증류수에 녹여 복강으로 투여한 후 1시간 동안 방치하여 혈중 농도를 높인 다음 내독소를 기도내로 분무하였다.

3. 기관지폐세척액(Bronchoalveolar lavage Fluid: BALF) 내의 호중구 산정

호중구가 폐조직 내로 이동한 정도를 확인하기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 8.0 mL의 생리식염수로 기관지폐세척을 시행한 후 얻은 6.0 mL의 기관지폐세척액을 상온에서 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전층을 생리식염수 1 mL로 재부유시킨 다음 Tuerk 용액으로 염색한 뒤 hemocytometer를 이용해 백혈구를 산정하였다. 남은 백혈구 용액 중 200 μL 를 취하여 도말 표본 제작, Wright 염색한 후 전체 백혈구 중 호중구를 산정하여 백분율로 환산하고 기관지폐세척액 내 호중구의 수(millions/two lungs)를 계산하였다.

4. 광학현미경을 이용한 조직학적 관찰

1) 파라핀 블록 및 슬라이드 제작

내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 개흉술을 시행하여 폐를 적출하였다. 적출된 폐는 10% PBF (Phosphate Buffered (Neutral) Formalin)에 넣어 조직 내 공기를 제거, 고정된 후 흐르는 물에 수세하고, 알코올의 농도를 순차적으로 증가시켜 탈수시키고 xylene으로 여분의 알코올을 제거한 후 포매하였다. 제작된 블록을 박절기(Microtome, Model 45, Lipshaw)를 이용해 4~5 μm 두께로 박절하여 슬라이드를 제작하였다.

2) Hematoxylin-Eosin 염색

폐조직의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위하여 실시하였다. 박절한 절편을 Hematoxylin-Eosin으로 염색, 봉합하여 광학현미경(BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

3) Toluidine Blue 염색

폐조직 내 비만세포의 수적변화와 탈과립 정도를 관찰하기 위하여 실시하였다. 박절한 절편을 Toluidine Blue로 염색, 봉합하여 광학현미경(BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

현미경 배율을 $\times 40$ 로 고정된 다음 $\text{area/field}=1.92 \text{ mm}^2$ 내에서 전체 비만세포 중 탈과립된 비만세포의 비율을 계산하였다.

4) TUNEL 염색 (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling stain)

폐조직 내 호중구의 세포사 현상을 관찰하기 위하여 실시하였다. 박절된 절편은 Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, USA)를 이용하여 염색하였다. 즉 silanized slide에 부착시킨 절편을 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ proinase K로 처리한 후 3% hydrogen peroxide로 처리한 다음 equilibration buffer에 20분 동안 담근 후 TdT enzyme (Terminal deoxynucleotidyl Transferase)으로 37°C 에서 1시간 동안 충분한 습기를 유지하면서 incubation하였다. 이후 stop/wash buffer로 반응을 정지시키고 anti-digoxigenin-peroxidase로 충분한 습기를 유지하면서 37°C , 30분 동안 incubation한 후 0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색하였고, hematoxylin으로 대조염색하였다.

5. 기관지폐세척액 내 세포의 미세구조변화의 관찰

기관지폐세척액 내 호중구의 세포사와 큰포식세포의 포식능을 미세구조적으로 관찰하기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride ($60 \text{ mg}/\text{kg}$) 및 xylazine ($10 \text{ mg}/\text{kg}$)으로 실험동물을 마취하고 8.0 mL의 생리식염수로 기관지폐세척을 시행한 후 얻은 6.0 mL의 기관지폐세척액을 상온에서 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전물을 e-tube로 옮긴 후 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 20분간 전고정하였다. 4°C 의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척 후 1% osmium tetroxide에 15분간 후고정시키고 4°C 의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하였다. 그 후 알코올 농도를 증가시켜 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 epoxy resin을 침투시키고 포매하였다. 전과정은 원심분리 하에서 실시하였으며, 37°C 에서 12시간, 60°C 에서 48시간 동안 열중합시켜 블록을 제작하였다. 블록은 초박절편기 (Ultramicrotome, Reichert Supernova)를 이용해 60~80 nm로 초박절하였다. 그 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

6. 세포배양

한국세포주은행 (KCLB, Korean cell Line Bank)에서 분양 받은 큰포식세포주 (Raw 264.7 cell)는 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 그리고 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 온도 37°C , CO_2 농도 5%, 충분한 습도를 유지하면서 배양하였다.

7. MTT assay

게르마늄에 의한 세포독성 (IC_{50})을 측정하기 위해 실시하였다. 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 1 mL씩 분주한 후 24시간 부착, 안정화시킨 다음 게르마늄을 log값으로 농도를 결정하여 18시간 처리하였다. 처리 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ($5 \text{ mg}/\text{mL}$ in PBS) 용액 20 μL 를 첨가하고 3시간 동안 37°C , 5% CO_2 배양기에서 방치한 다음 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 넣어 30분간 실온 방치하여 세포들이 용해되면 이를 ELISA plate reader (microplate reader: Bio RAD Model 550) 570 nm에서 흡광도를 측정하고, 값을 계산한 후 IC_{50} 을 확인하였다.

8. 내독소 및 게르마늄의 처리

세포는 6-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후 부착, 안정화시킨 후 내독소를 배양배지에 희석하여 최종농도 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였다. 게르마늄은 각각 최종농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하고 게르마늄처리 15분 후 내독소를 18시간 동안 처리하였다.

9. 산화질소 (Nitric Oxide)의 정량

큰포식세포의 활성정도와 그에 따른 산화질소의 생성, 분비량을 확인하기 위하여 실시하였다. 세포 배양 여액을 이용하여 NO의 반응산물인 nitrite (NO_2^-)를 측정하는 방법으로 NO를 정량하였다. 처리한 세포의 배양여액 100 μL 를 동일한 부피의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)으로 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 이를 ELISA plate reader (microplate reader: Bio RAD Model 550) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite (NO_2^-)의 농도는 NaNO_3 를 이용하여 표준곡선을 만들고, 이와 비교하여 NO의 생성량을 μM 로 나타내었다.

10. Western blot 분석

유도성 산화질소 합성효소 (inducible nitric oxide synthase: iNOS)의 발현을 확인하기 위해 실시하였다. 처리한 세포를 차가운 phosphate buffered saline (PBS)에 씻고 scraper로 모은 후 세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin) 100 μL 에 부유시켜 lysis시킨 다음 5분간, 4°C , 12,000 rpm에서 원심분리하여 단백 추출물을 얻었다. Bradford solution을 사용해 단백질 농도를 spectrophotometer (Pharmacia LKB · Ultrospec III)로 측정하고 5분간 가열하여 denaturation시킨 후

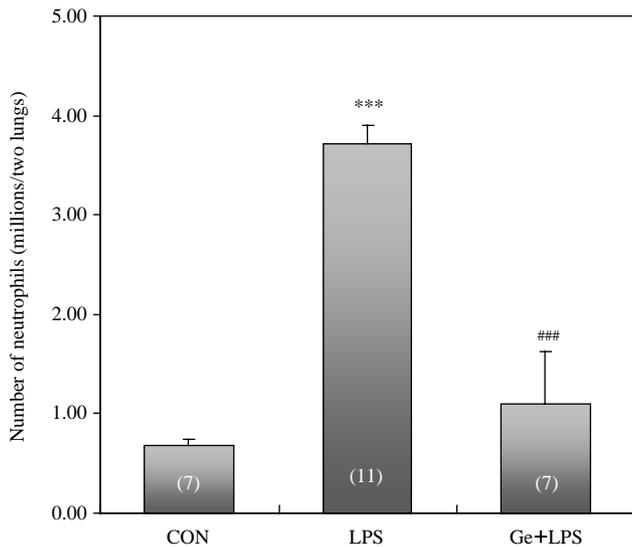


Fig. 1. The number of neutrophils in the BALF. Comparing with control rats, LPS-treated rats had significantly increased ($p < 0.001$) migration of neutrophils into alveolar lumen. In contrast, pretreatment group of germanium had significantly decreased ($p < 0.001$) number of neutrophils compared with that of LPS-treated rats.

- Each values are given as mean \pm S.E.
- The number of experiments is in the parentheses.
- *** $p < 0.001$: significantly different from CON.
- ### $p < 0.001$: significantly different from LPS.
- CON: Saline-treated control group.
- LPS: Lipopolysaccharide-treated group.
- Ge+LPS: Germanium was treated prior to Lipopolysaccharide.

SDS-PAGE로 전기영동하여 nitrocellulose에 transfer하였다. Transfer한 membrane을 Blocking solution (5% Skim milk, 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20)에서 30분 동안 흔들면서 incubation시킨 후 anti-iNOS antibody를 4시간 동안 실온에서 incubation하고 10분씩 3회 동안 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated된 2차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 같은 방법으로 세척하여 ECL solution (Amersham)으로 현상하여 결과를 확인하였다.

11. 통계처리

통계처리는 SPSS WIN 통계 프로그램 (Version 14.0, SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 95% 신뢰구간의 유의수준을 일원배치 분산분석 (ANOVA test)을 통해 검정하였다.

결 과

1. 기관지폐세척액 (Bronchoalveolar lavage Fluid: BALF) 내의 호중구 산정

기관지폐세척액 내 호중구의 수 (millions/two lungs)를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 내독소 투여군 (3.71 ± 0.192)은

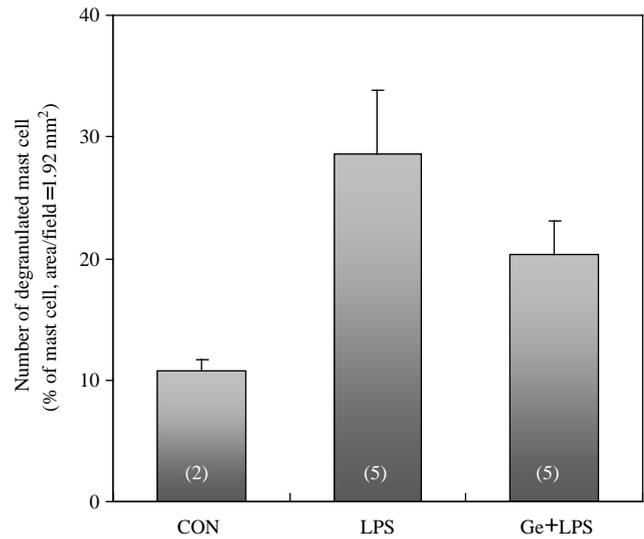


Fig. 2. The number of degenerated mast cells in the lung tissue. Comparing with control rats, LPS-treated rats showed increased degeneration of mast cells in the lung tissue. In contrast, pretreatment group of germanium had decreased number of degenerated mast cells compared with that of LPS-treated rats.

- Each values are given as mean \pm S.E.
- The number of experiments is in the parentheses.
- CON: Saline-treated control group.
- LPS: Lipopolysaccharide-treated group.
- Ge+LPS: Germanium was treated prior to Lipopolysaccharide.

대조군 (0.68 ± 0.060)에 비해 기관지폐세척액 내 호중구의 수가 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), 게르마늄 전처리군 (1.10 ± 0.522)은 내독소 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$).

2. 폐조직 내 탈과립된 비만세포의 산정

폐조직 내 탈과립된 비만세포의 수 (% of mast cell)를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 내독소 투여군 (28.64 ± 5.197)은 대조군 (10.80 ± 0.880)에 비해 폐조직 내 탈과립된 비만세포의 수가 증가하였고, 게르마늄 전처리군 (20.39 ± 2.671)은 내독소 투여군에 비해 감소하였다.

3. MTT assay

게르마늄에 의한 큰포식세포의 세포독성 (IC_{50})을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 18시간 동안 큰포식세포의 50%가 생존할 수 있는 게르마늄의 양 (IC_{50})은 $1,111 \mu\text{g}$ 으로 측정되었다.

4. 산화질소의 정량과 western blot 분석

산화질소 (Nitric oxide: NO)의 생성·분비량과 유도성 산화효소 합성효소 (inducible nitric oxide synthase: iNOS)의

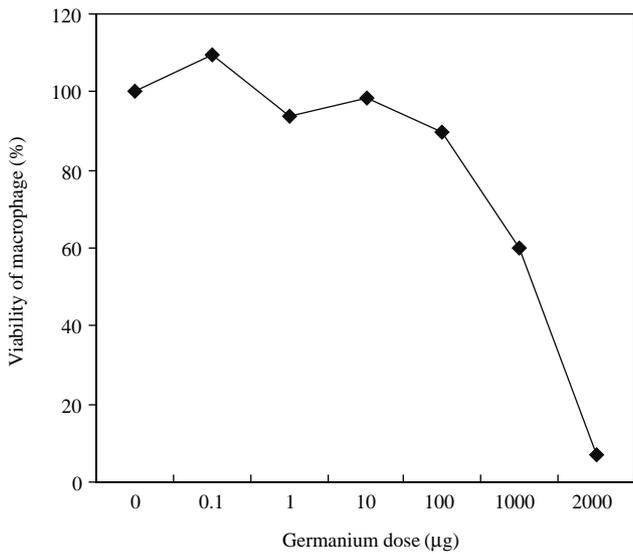


Fig. 3. Dose-dependant germanium induced cytotoxicity in Raw 264.7 cell (macrophage). Examination of cytotoxicity of germanium in Raw 264.7 cell by MTT assay indicated that IC₅₀ (viability of 50%) value is 1,111 µg of germanium.

· Each values are given as mean of three experiment.

발현정도를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 내독소 투여군 (16.40 ± 1.492)은 대조군 (0.24 ± 0.012)에 비해 NO와 iNOS의 발현정도가 증가하였고, 게르마늄 200 µg과 게르마늄 800 µg 전처리군 (17.82 ± 1.843, 17.14 ± 2.466)에서는 내독소 투여군에 비해 증가, 게르마늄 400 µg과 게르마늄 600 µg 전처리군 (15.10 ± 2.283, 12.83 ± 1.514)에서는 내독소 투여군에 비해 감소하였다. 내독소 처리군, 게르마늄의 투여량을 다르게 한 게르마늄 전처리군에서 NO량과 iNOS의 발현정도는 상응하는 양상을 보였다.

5. 광학현미경을 이용한 조직학적 관찰

1) Hematoxylin-Eosin 염색

대조군의 폐조직은 폐포 중격 (alveolar septa), 폐포강 (alveolar lumen) 그리고 모세혈관 등 모두 정상적인 구조를 가지고 있었고, 폐포강으로 삼출된 물질도 관찰되지 않았다 (Fig. 5). 내독소 투여군에서는 대부분의 폐포강이 소실되어 정상적인 조직 형태를 관찰할 수 없었고, 혈관 주위의 부종 (perivascular edema), 폐포강 내 출혈 (intrapulmonary hemorrhage)이 관찰되었다 (Fig. 6). 게르마늄 전처리군은 폐포강의 크기 대조군과 유사하게 관찰되고, 혈관 주위의 부종과 폐포강 내 출혈이 내독소 투여군에 비해 상당히 감소한 형태를 보였다 (Fig. 7).

2) TUNEL 염색 (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP Nick End Labelling stain)

대조군의 정상적인 폐조직 내에서는 세포사한 호중구를

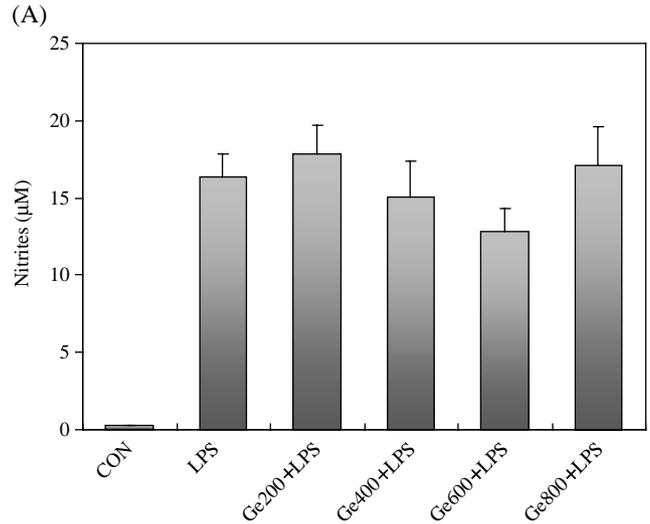


Fig. 4. Effect of germanium on nitrite production and iNOS expression in Raw 264.7 cells. Nitrite production in culture supernatant was determined (A). Expression of iNOS was determined by Western blot analysis (B). Treatment of Raw 264.7 cells with germanium prior to LPS stimulated iNOS expression and nitrite production. values are affected dosage of germanium.

- Each values are given as mean of three experiment ± S.E.
- LPS: Lipopolysaccharide-treated group.
- Ge200+LPS: Germanium 200 µg was treated prior to Lipopolysaccharide.
- Ge400+LPS: Germanium 400 µg was treated prior to Lipopolysaccharide.
- Ge600+LPS: Germanium 600 µg was treated prior to Lipopolysaccharide.
- Ge800+LPS: Germanium 800 µg was treated prior to Lipopolysaccharide.

관찰할 수 없었다 (Fig. 8). 내독소 투여군의 폐포강이 소실된 폐조직 내에서는 세포사한 호중구가 약간 관찰되었다 (Fig. 9). 게르마늄 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해서 TUNEL 염색에 대해 뚜렷한 양성반응을 보이는 호중구가 많이 관찰되었다 (Fig. 10).

3) Toluidine Blue 염색

대조군의 정상적인 폐조직 내에서는 비만세포를 관찰할 수 없었다 (Fig. 11). 내독소 투여군의 폐포강이 소실된 폐조직 내에서는 많은 수의 비만세포와 탈과립된 비만세포가 관찰되었다 (Fig. 12). 게르마늄 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해 비만세포의 수가 적게 관찰되었다 (Fig. 13).

6. 전자현미경을 이용한 기관지폐세척액 내 세포의 미세구조변화의 관찰

게르마늄 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해서 호중

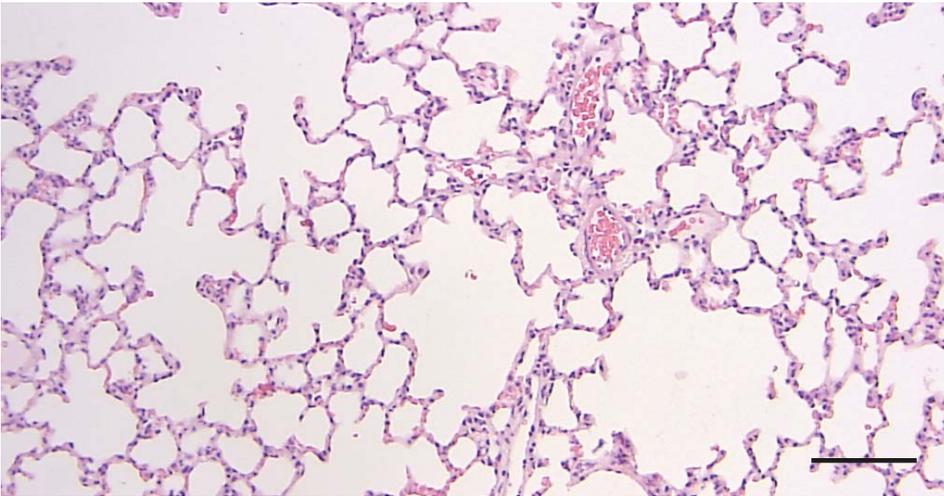


Fig. 5. Histopathologic changes of the lung in control rats stained with hematoxylin-eosin. In control rat's lung, the normal pulmonary architectures such as alveolar septa, alveolar lumen and capillaries were well preserved. The infiltration of inflammatory cells was not observed (scale bar=100 μ m).

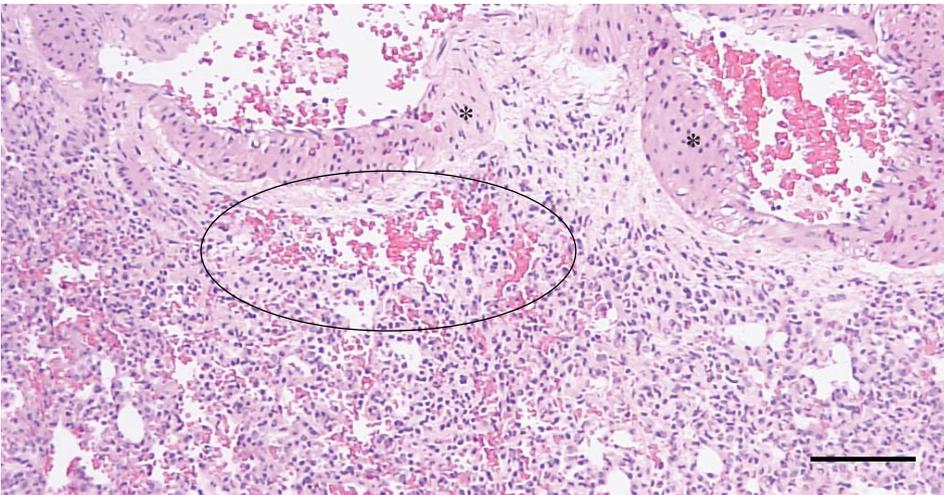


Fig. 6. Histopathologic changes of the lung in LPS-treated rats stained with hematoxylin-eosin. In LPS-treated rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were not preserved. Perivascular edema (*) and intrapulmonary hemorrhage (circle) were observed (scale bar=100 μ m).

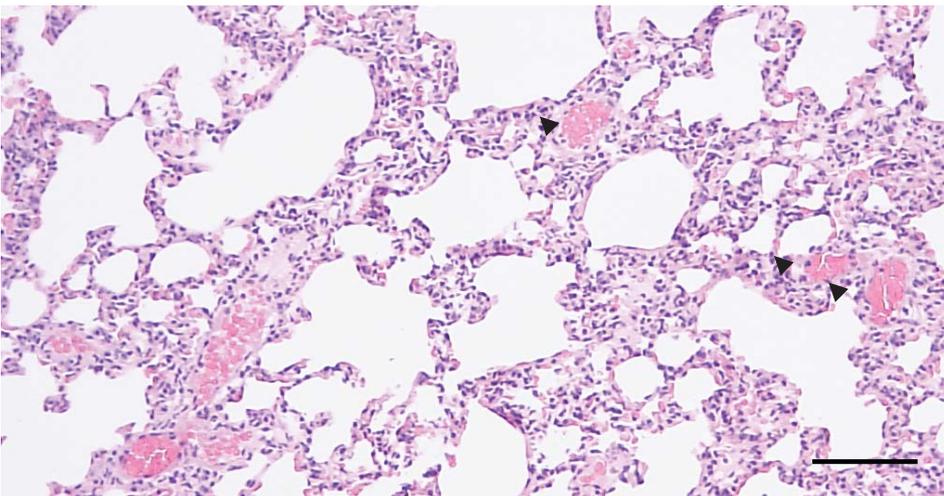


Fig. 7. Histopathologic changes of the lung in germanium-pretreated rats stained with hematoxylin-eosin. In germanium-pretreated rat's lung, alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved. Intrapulmonary hemorrhage (arrow head) was less prominent compared with the lungs of LPS-treated rat. Edema of alveolar epithelia were observed locally (scale bar=100 μ m).

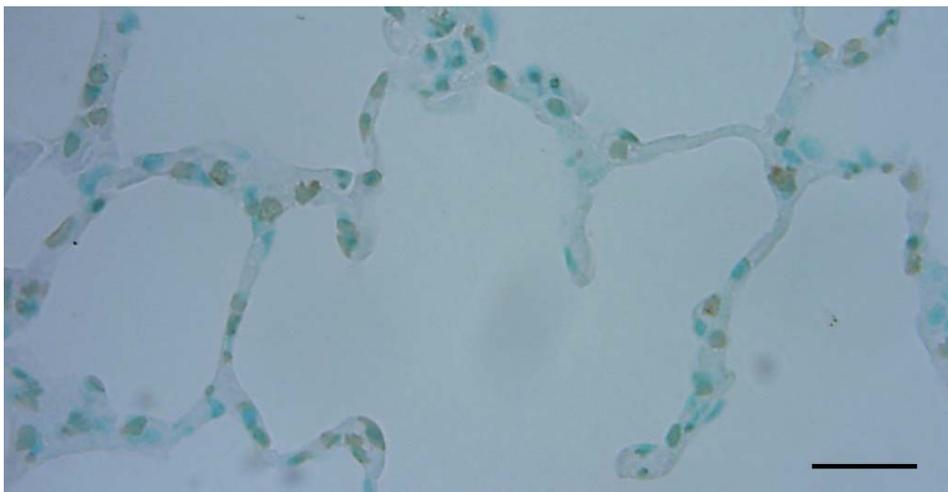


Fig. 8. Histopathologic changes of apoptotic neutrophils in the lung tissue of control rats stained with TUNEL method. In control rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were well preserved. The apoptotic neutrophils were not observed in the lung tissue (scale bar=25 μ m).

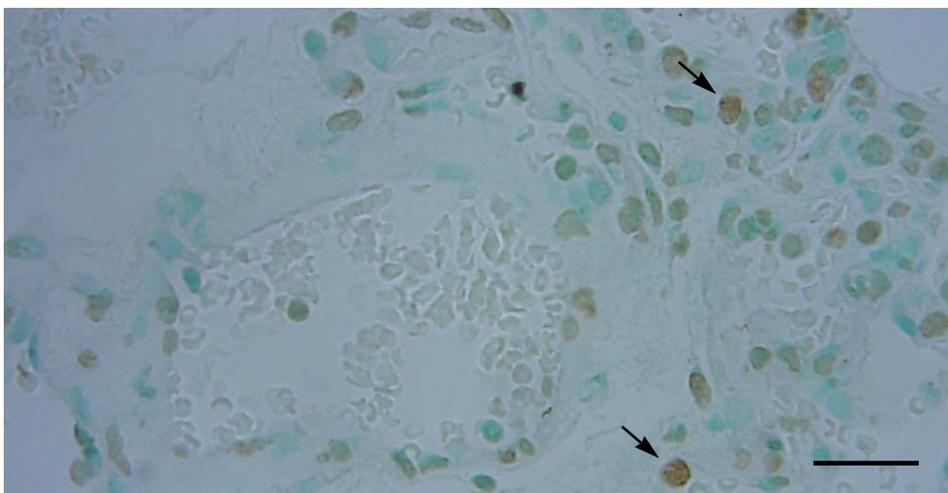


Fig. 9. Histopathologic changes of apoptotic neutrophils in the lung tissue of LPS-treated rats stained with TUNEL method. In LPS-treated rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were not preserved. A few apoptotic neutrophils (arrow) were observed in the lung tissue (scale bar=25 μ m).

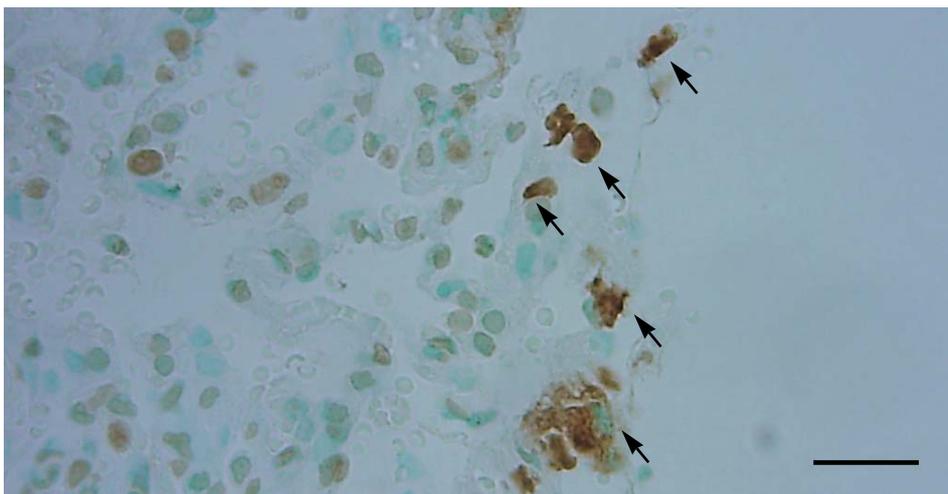


Fig. 10. Histopathologic changes of apoptotic neutrophils in the lung tissue of germanium-pretreated rats stained with TUNEL method. In germanium-pretreated rat's lung, alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved. Many of the apoptotic neutrophils (arrow) were observed in the lung tissue (scale bar=25 μ m).

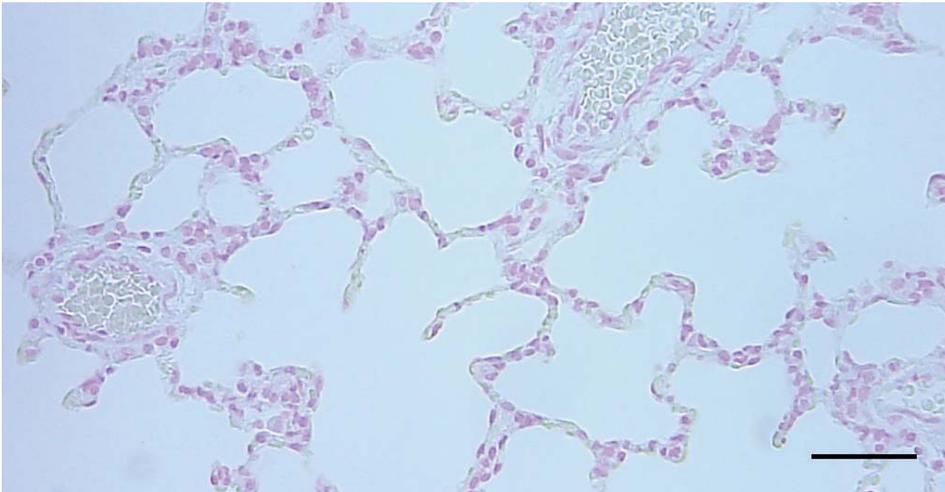


Fig. 11. Histopathologic changes of the mast cells in the lung tissue of control rats stained with Toluidine Blue. In control rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were well preserved. The mast cells were not observed in the lung tissue (scale bar=50 μ m).

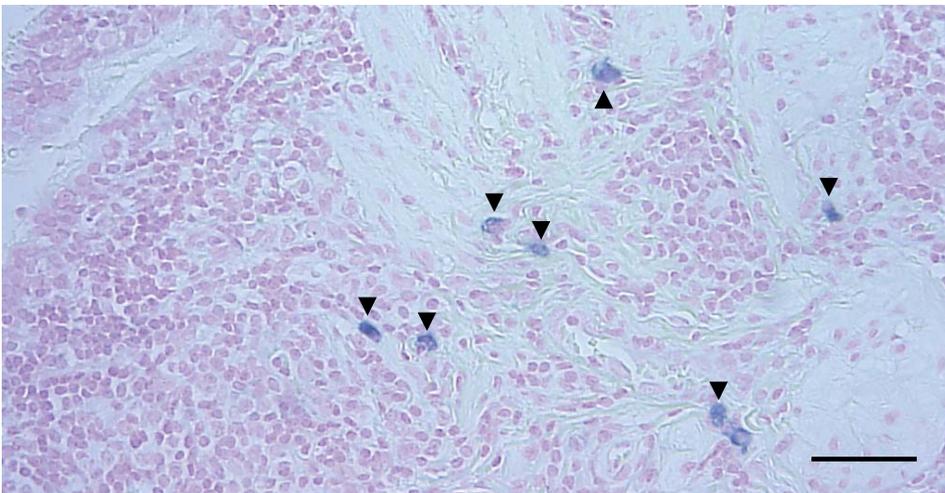


Fig. 12. Histopathologic changes of the mast cells in the lung tissue of LPS-treated rats stained with Toluidine Blue. In LPS-treated rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were not preserved. Many of the degranulated mast cells (arrow head) were observed in the lung tissue (scale bar=50 μ m).

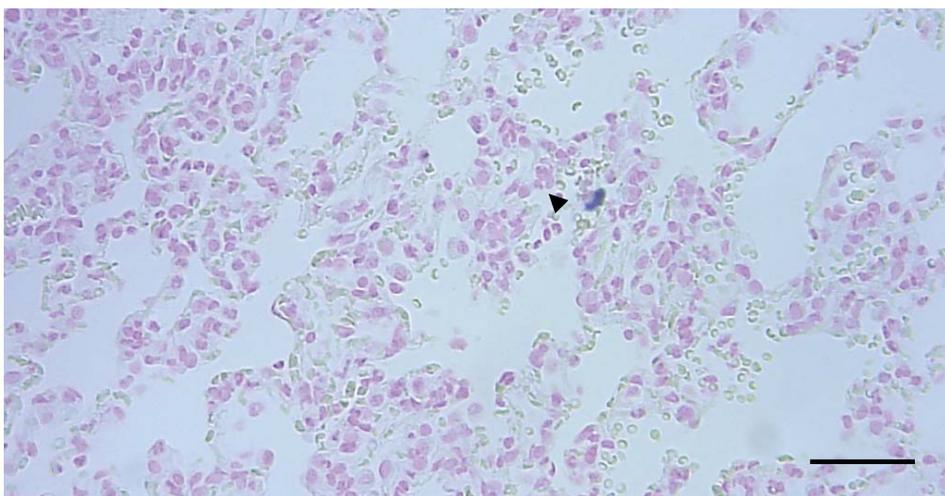


Fig. 13. Histopathologic changes of the mast cells in the lung tissue of germanium-pretreated rats stained with Toluidine Blue. In germanium-pretreated rat's lung, alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved. Edema of alveolar epithelia were observed locally. Only a few mast cells (arrow head) were observed in the lung tissue (scale bar =50 μ m).

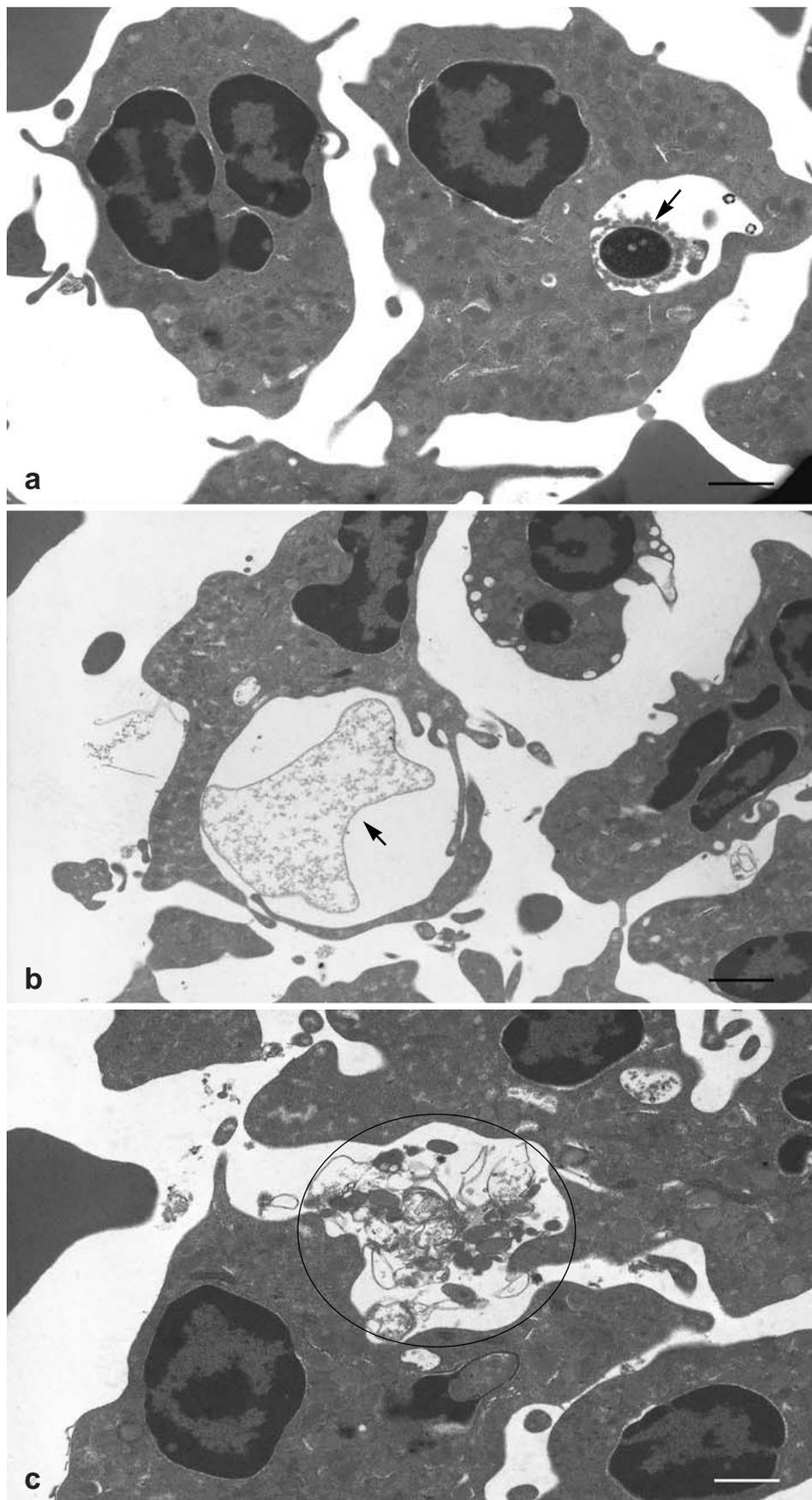


Fig. 14. Representative electron microscopic images from the BAL pellet in germanium-pretreated rats stained with Uranyl acetate and lead citrate. (a) Apoptotic neutrophils were engulfed by alveolar macrophage. Nucleus of apoptotic neutrophil (arrow) showed condensation (scale bar = 2 μ m). (b) Apoptotic neutrophils were engulfed by alveolar macrophage. Nucleus of apoptotic neutrophil (arrow) showed degradation (scale bar = 2.86 μ m). (c) Apoptotic neutrophils were observed with fragment of DNA and loss of cellular organelles in intercellular substance (circle) (scale bar = 2 μ m).

구를 탐식한 폐포강 큰포식세포들이 수적으로 증가되었고, 탐식된 호중구들은 대부분 핵이 응축된 모습으로 관찰되었으며 (Fig. 14a), 탐식된 호중구의 핵이 분해된 모습도 관찰되었다 (Fig. 14b). 그리고 DNA 분절과 세포소기관의 소실을 보이는 세포사한 호중구도 세포간질에서 발견되었다 (Fig. 14c).

고 찰

내독소로 유도된 ARDS에서 호중구는 폐손상을 일으키는 가장 중요한 인자로 알려져 있다 (Sibille & Reynolds, 1990; Abraham, 2003). 그리고 급성 폐손상에서 폐포강 큰포식세포가 폐로의 호중구 집결을 감소시키는 항염증 작용을 가지며 (Beck-Schimmer et al., 2005), 급성 폐손상이 유도된 실험동물에 게르마늄을 투여함으로써 호중구의 세포사는 촉진되고, 폐포강 큰포식세포의 세포사한 호중구 탐식능력이 증가되어 내독소로 유도된 급성 폐손상이 감소한다는 보고 (Cho, 2005)는 호중구에 대한 큰포식세포의 기능적 변화에 의해 내독소에 의한 염증현상이 경감될 수 있음을 시사하고 있다. 특히 게르마늄 투여에 의해 분비되는 인터루킨 등의 면역조절물질들과 큰포식세포와의 상호작용에 의해 큰포식세포는 활성화되고 (Suzuki et al., 1986), 활성화된 큰포식세포는 산화질소 (Nitric oxide: NO)를 생성, 분비하게 되는데 (Nagata, 1978; Artman & Seeley, 1979), 이러한 산화질소는 내독소로 유발된 토끼의 급성 폐손상에서 염증 세포의 활성화소기 생성과 염증전구사이토카인 생성을 감소시켜 급성 폐손상을 경감시키고 (Go et al., 2001), 산화제 손상에서는 지질과산화 억제, 백혈구 유착과 활성화의 방해, 염증세포에 의한 산화제 생성 감소, 비만세포의 탈과립 차단, 세포독성 매개물질의 분비를 억제시키는 보호작용의 기전을 가진다고 알려져 있다 (Aoki et al., 1990; Clancy et al., 1992; Gaboury et al., 1993; Kubes, 1993; Kurose et al., 1994; Chang et al., 1996). 또한 용량-의존적, 세포-특이적으로 (Dimmeler & Zeiher, 1997; Kim et al., 1999; Chung et al., 2001) 미토콘드리아 막에서 cytochrome c를 유리시키며 (Kim et al., 1998; Umansky et al., 2001), DNA 손상 후 p53 유전자를 활성화시켜 세포사를 유도하는 것으로도 알려져 있다 (Kim et al., 1998; Lala & Chakraborty, 2001).

본 실험에서는 폐조직 내에 축적된 호중구가 ARDS를 일으키는 가장 큰 원인으로 보고 게르마늄을 ARDS 발병 전에 투여했을 때 게르마늄에 의해 호중구의 세포사가 증가하는지, 활성화된 큰포식세포에 의해 세포사한 호중구가 탐식됨으로써 폐손상이 감소되는지, 그리고 폐손상 억제에 산화질소가 관여하는지 알아보았다.

게르마늄 전처리 후 내독소를 주입하여 급성 폐손상을

유도한 결과 기관지폐세척액 내 호중구의 침윤은 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$). Hematoxylin-Eosin 염색법으로 폐조직을 관찰한 결과에서는 게르마늄 전처리군에서 폐포강의 크기도 대조군과 유사하게 관찰되었고, 혈관 주위의 부종과 폐포강 내 출혈이 내독소 투여군에 비해 상당히 감소한 형태를 보여 게르마늄의 전처리에 의해 폐포-모세혈관 장벽의 손상이 감소함으로써 폐손상이 억제되었음을 알 수 있었다. 호중구의 세포사를 관찰한 결과, 게르마늄 전 처리군에서 내독소 투여군에 비해 Tunel 염색에 뚜렷한 양성반응을 보이는 호중구가 많이 관찰되어 호중구의 세포사가 증가되는 것으로 나타났으며 전자현미경을 이용한 기관지폐세척액 내 세포의 미세구조변화의 관찰에서도 게르마늄 전처리군에서는 호중구를 탐식한 폐포강 큰포식세포들이 수적으로 증가되었고, 탐식된 호중구들은 대부분 핵이 응축된 모습으로 관찰되어 세포사가 유도된 후 큰포식세포에 의해 포식되었음을 알 수 있었다. DNA 분절과 세포소기관의 소실을 보이는 세포사한 호중구도 세포간질에서 발견되어 게르마늄 전처리에 의해 호중구의 세포사가 유도된 것으로 확인하였다. 폐손상 억제에 산화질소가 관여하는지는 생체 내 실험에서 반감기가 짧고 체내에서 기체 혹은 용해된 상태로 존재하는 내인성 산화질소의 측정이 불가능하여 (Kam & Govender, 1995) 생체 외 실험에서 확인하였다. 큰포식세포의 산화질소 (Nitric oxide: NO)의 분비량과 유도성 산화효소 합성효소 (inducible nitric oxide synthase: iNOS)의 발현정도를 측정된 결과, 대조군과 게르마늄만 처리한 군 (No data)에서는 NO와 iNOS의 발현이 전혀 없어 게르마늄만으로는 큰포식세포를 활성화시키지 못함을 알 수 있었다. 그러나 내독소 투여군은 대조군에 비해 증가, 게르마늄 200 µg과 게르마늄 800 µg 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해 증가, 게르마늄 400 µg과 게르마늄 600 µg 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해 감소한 결과를 나타내어 이는 결과적으로 대조군을 제외한 모든 군에서 산화질소 증가현상을 보였다. 그러나 모든 실험군에서 산화질소가 증가하였음에도 불구하고 내독소 투여군과는 달리 게르마늄 전처리군에서만 비만세포의 탈과립화가 적어지고, 호중구의 세포사가 증가하는 등의 결과를 보인 이유는 게르마늄 전처리 후 분비된 산화질소만이 호중구의 세포사를 유도하는 등의 항염증 작용에 관여할 것이라 추측이 된다. 즉, 산화질소가 분비되기 전 게르마늄의 전처리에 의해 실험동물의 체내 환경의 변화가 야기되었고, 변화 후 작용한 산화질소에 의해 항염증 효과가 나타난 것으로 판단되어, 게르마늄의 전처리에 의해 큰포식세포로부터 생성된 산화질소가 폐손상을 완화시키는데 관여할 것이라 추측된다. 산화제 손상에 있어 산화질소가 그 손상을 악화 혹은 완화시킬지 여부에는 생성되는 산화제의 종류와 양, 산화질소의 생성정도, 산화제와 산화질소가 생성되는 해부학적 장소 및 세포의 특성, 조직

손상이 야기되는 주된 산화기전, 세포의 산화제나 산화질소 손상에 대한 감수성 등 복합적 요인이 서로 관계하고 있다 (Stamler et al., 1992; Lipton et al., 1993; Rubo et al., 1994)는 보고로 이 추측을 뒷받침할 수 있다.

이와 같은 실험결과로 볼 때, 호중구의 폐 침윤에 의한 폐포-모세혈관 장벽의 손상으로 초래되는 급성 폐손상에서 게르마늄의 항염증 작용, 즉 호중구의 유주현상 방해, 호중구의 세포사 유도 그리고 세포사한 호중구를 탐식하도록 큰포식세포의 탐식능을 증가시키는 효과로 호중구의 수가 감소되어 폐손상이 억제되었고, 게르마늄에 의해 활성화된 큰포식세포에서 분비되는 산화질소가 폐손상을 억제시키는 데 관여할 것으로 추측된다. 이러한 결과들은 급성 폐손상 환자의 치료를 위해 게르마늄을 임상적으로 적용하는데 있어 중요한 근거가 되는 자료라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Abraham E: Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31(4 Suppl) : S195-199, 2003.
- Aoki N, Johnson G 3rd, Lefer AM: Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am J Physiol* 258(2 Pt 1) : G275-281, 1990.
- Artman M, Seeley RJ: Nicotinamide adenine dinucleotide-splitting enzyme in normal, elicited and activated peritoneal macrophages of the mouse. *J Reticuloendothel Soc* 25(5) : 479-487, 1979.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 12; 2(7511) : 319-323, 1967.
- Aso H, Suzuki F, Yamaguchi T, Hayashi Y, Ebina T, Ishida N: Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol Immunol* 29(1) : 65-74, 1985.
- Baughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN: Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med* 154(1) : 76-81, 1996.
- Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC: Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res* 22; 6 : 61, 2005.
- Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, Fisher BJ, Blocher CR, Sholley M, Bunch T, Sugeran HJ, Fowler AA: Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 25(4) : 584-593, 1997.
- Chang J, Rao NV, Markewitz BA, Hoidal JR, Michael JR: Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial cell injury. *Am J Physiol* 270(6 Pt 1) : L931-940, 1996.
- Cho HG: Germanium increases alveolar macrophage engulfment of apoptotic neutrophils in acute lung injury induced by endotoxin. *Korean J. Electron Microscopy* 35(4) : 84-90, 2005.
- Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM: Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 20; 282(5) : 1075-1079, 2001.
- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 90(3) : 1116-1121, 1992.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B: Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 7; 369(2-3) : 131-135, 1995.
- Dimartino MJ, Lee JC, Badger AM, Muirhead KA, Mirabelli CK, Hanna N: Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J Pharmacol Exp Ther* 236(1) : 103-110, 1986.
- Dimmeler S, Zeiher AM: Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1(4) : 275-281, 1997.
- Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener-Kronish JP, Matthay MA: Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1) : 1818-1824, 1995.
- Flick MR, Perel A, Staub NC: Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. *Circ Res* 48(3) : 344-351, 1981.
- Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM: Adult respiratory distress syndrome : risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 98(5 Pt 1) : 593-597, 1983.
- Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P: Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 265(3 Pt 2) : H862-867, 1993.
- Heflin AC Jr, Brigham KL: Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* 68(5) : 1253-1260, 1981.
- Hiroshi S, Hiroyuki K, Norihiro K: Oral administration study of bis-carboxyethylgermanium sesquioxide in Senescence Accelerated mouse. An abstract of study conference of senescence accelerated mouse (8th) 43-44, 1991.
- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 151(2 Pt 1) : 293-301, 1995.
- Kam PC, Govender G: Nitric oxide: basic science and clinical applications. *Anaesthesia* 49(6) : 515-521, 1995.
- Kavanagh BP, Mouchawar A, Goldsmith J, Pearl RG: Effects of inhaled NO and inhibition of endogenous NO synthesis in oxidant-induced acute lung injury. *J Appl Physiol* 76(3) : 1324-1329, 1994.
- Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR: Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 19; 84(3) : 253-256, 1999.
- Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR: Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem* 20;

- 273(47) : 31437-31441, 1998.
- Kubes P: Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol* 265(6 Pt 2) : H1909-1915, 1993.
- Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN: Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 74(3) : 376-382, 1994.
- Lala PK, Chakraborty C: Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol* 2(3) : 149-156, 2001.
- Levine SA, Kidd PM: Oxygen-nutrition for super health. *J Orthomol Medicine* 1 : 145-148, 1986.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 12; 364(6438) : 626-632, 1993.
- Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD: Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. *JAMA* 25; 273(4) : 306-309, 1995.
- Nagata, T: Chronic intravenous toxicity study with carboxyethylgermanium sesquioxide in beagle dogs. *Pharmacometrics* 16 : 613-615, 1978.
- Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ: Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 144(1) : 124-130, 1982.
- Pittet JF, Mackerles RC, Martin TR, Matthay MA: Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 155(4) : 1187-1205, 1997.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 21; 269(42) : 26066-26075, 1994.
- Sasaki K, Ishikawa M, Monma K, Takayanagi G: Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on the acute inflammation and CCl₄-induced hepatic damage in mice. *Pharmacometrics* 27(6) : 1119-1131, 1984.
- Sibille Y, Reynolds HY: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141 (2) : 471-501, 1990.
- Sloane PJ, Gee MH, Gottlieb JE, Albertine KH, Peters SP, Burns JR, Machiedo G, Fish JE: A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome : Physiology and outcome. *Am Rev Respir Dis* 146(2) : 419-426, 1992.
- Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA: Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 72(1) : 65-72, 1991.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 18; 58(5090) : 1898-902, 1992.
- Stephens KE, Ishizaka A, Wu ZH, Larrick JW, Raffin TA: Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 138(5) : 1300-1307, 1988.
- Sung YK: Studies on the antitumor activities of organic germanium compounds and arsenic compounds. Department of pharmacy graduate school, Kyungshung University. 1997.
- Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB: Cooperation of lymphokine(s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Anticancer Res* 6(2) : 177-182, 1986.
- Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB: Macrophage involvement in the protective effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) against murine ascites tumors. *Int J Immunotherap* 11 : 239-245, 1986.
- Tate RM, Repine JE: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 128(3) : 552-559, 1983.
- Umansky V, Ratter F, Lampel S, Bucur M, Schirrmacher V, Ushmorov A: Inhibition of nitric-oxide-mediated apoptosis in Jurkat leukemia cells despite cytochrome c release. *Exp Cell Res* 1; 265(2) : 274-282, 2001.
- Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 4; 342(18) : 1334-1349, 2000.
- Yang MK: Study of possibility as antioxidant of Ge-132. *J Korean Beauty Society* 7(2) : 87-95, 2001.
- Zilberberg MD, Epstein SK: Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 157(4 Pt 1) : 1159-1164, 1998.
- 고윤석, 박 완, 임채만, 이지희: 내독소를 투여한 토끼의 급성 폐손상 모형에서 산화질소의 흡입이 활성산소기 및 염증전구사이토카인 생성에 미치는 영향. 대한결핵 및 호흡기학회, 추계 학술대회 초록집 93권, 2001. (Abstract)
- 대한 결핵 및 호흡기학회 급성호흡관증후군 전국 실태조사 소위원회: The National Survey of Acute Respiratory Distress Syndrome in Korea. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 44 : 25-43, 1997.

< 국문초록 >

주로 패혈증후군에 의해 동반되는 급성 폐손상인 급성호흡관란증후군(ARDS)의 가장 큰 원인은 폐조직 내에 축적된 호중구라 보고 게르마늄을 ARDS 발병 전에 투여했을 때 게르마늄의 항염증 효과로 폐손상이 감소되는지, 그리고 폐손상 억제에 산화질소가 관여하는지 확인하고자 하였다. 실험군은 생리식염수를 기도로 투여한 대조군(CON), 동량의 내독소 5시간 투여군(LPS), 그리고 게르마늄을 1시간 전처리 후 내독소 5시간 투여군(Ge+LPS)으로 나누어 실험하였다. 실험동물을 이용한 실험 결과 내독소의 주입으로 유도된 급성 폐손상에서 기관지폐세척액 내 호중구의 침윤은 게르마늄을 전처리함으로써 유의하게 감소하였다. 게르마늄 전처리군의 폐조직은 내독소 처리군에 비해 정상적으로 잘 보존된 편이었고, TUNEL 염색에 뚜렷한 양성반응을 보이는 호중구가 많이 관찰되어 호중구의 세포사가 증가된 것으로 나타났다. 기관지폐세척액 내 세포의 미세구조변화의 관찰에서도 게르마늄 전처리군에서는 내독소 투여군에 비해 호중

구를 탐식한 폐포강 큰포식세포들이 수적으로 증가되었고, 탐식된 호중구들은 대부분 핵이 응축된 모습이었으며, DNA 분절과 세포소기관의 소실을 보이는 세포사한 호중구도 세포간질에서 발견되었다. 그러나 산화질소는 대조군을 제외한 모든 군에서 증가현상을 보였지만 내독소 투여군과는 달리 게르마늄 전처리군에서만 비만세포의 탈과립화가 적어지고, 호중구의 세포사가 증가하는 등의 산화질소 효과가 나타났다. 이는 산화질소가 분비되기 전 게르마늄의 전처리에 의해 실험동물의 체내 환경의 변화가 야기되었고, 변화 후 작용한 산화질소에 의해 항염증 효과가 나타난 것으로 판단되어, 게르마늄의 전처리에 의해 큰포식세포

로부터 생성된 산화질소가 폐손상을 완화시키는 데 관여할 것이라 추측된다.

이와 같은 실험결과로 볼 때, 호중구의 폐 침윤에 의한 폐포-모세혈관 장벽의 손상으로 초래되는 급성 폐손상에서 게르마늄의 항염증 작용, 즉 호중구의 유주현상 방해, 호중구의 세포사 유도 그리고 세포사한 호중구를 탐식하도록 큰포식세포의 탐식능을 증가시키는 효과로 호중구의 수가 감소되어 폐손상이 억제되고, 게르마늄에 의해 활성화된 큰포식세포에서 분비되는 산화질소가 폐손상을 억제시키는 데 관여할 것으로 추측된다.