

흰쥐에서 고농도 산소 흡입에 의한 급성 폐손상 시 호중구성 산화성 스트레스의 역할

대구가톨릭대학교 의과대학교 ¹해부학교실, ²생리학교실

문용석¹, 김지혜², 이영만²

Presumptive Role of Neutrophilic Oxidative Stress in Oxygen-induced Acute Lung Injury in Rats

Yongsuck Moon, Ph.D.¹, Jihye Kim², Young Man Lee, M.D.²

Departments of ¹Anatomy, ²Physiology, Catholic University of Daegu, School of Medicine, Daegu, Korea

Background: This study examined the role of neutrophilic oxidative stress in an O₂-induced acute lung injury (ALI).

Methods: For 48 h, experimental rats were exposed to pure oxygen (normobaric hyperoxia) in a plastic cage. Forty-eight hours after O₂ breathing, the rats were sacrificed and the parameters for ALI associated with neutrophilic oxidative stress were assessed

Results: Normobaric pure oxygen induced ALI, which was quite similar to ARDS. The O₂-induced neutrophilic oxidative stress was identified by confirming of the increase in lung myeloperoxidase, BAL neutrophils, malondialdehyde (MDA), cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) activity in the lung, histological changes and BAL cytospin morphology.

Conclusion: In part, ALI-caused by oxygen is affected by neutrophils especially by the generation of free radicals. (*Tuberc Respir Dis 2008;65:464-470*)

Key Words: Acute lung injury, O₂ toxicity, Neutrophils

서 론

산소는 호흡기 질환, 호흡부전, 심부전이 동반된 환자의 치료, 마취수술 후 여러 중환자의 치료 등에 필수적으로 사용되고 있다¹. 그러나 고농도 산소를 장기간 흡입 시에는 산소독에 의해 조직 손상이 유발됨으로써 심각한 문제를 초래한다. 즉 고농도의 산소는 물리적으로는 폐활량의 감소, 유순도의 감소, 운동 시 동맥산소분압의 감소, 확산 능력의 감소를 일으키고 조직학적으로는 폐의 상피세포를 손상시키고, 폐포 내 출혈과 폐부종을 일으키며, 초자막을 축적시킨다. 또한 surfactant를 비활성화시키고 간질조직의 부종을 초래하여 결국에는 무기폐에 이르게 한다².

산소에 의한 이러한 독작용은 주로 폐장 내의 산소기의 생성에 따른 조직의 변성이 그 원인으로 알려지고 있으나³, 산소기 생성의 기전은 명확히 알려져 있지 않고 이때 유발되는 조직의 손상 기전도 명확하지 않다. 산소의 흡입으로 세포 내의 respiratory chain이 작동 시, 부산물로서 생성되는 산소기는 과량이 생성되더라도 사립체에 의해 거의 흡수, 처리된다(vacuum effect of mitochondria)⁴. 이러한 점에서는 고농도 산소에 의한 산소독이 단순히 산소가 과량 공급되는 것이 산소독의 유일한 기전으로 보기에는 어려운 점이 있다. 다만, 급성 폐손상의 일종인 급성호흡곤란증후군에서 병인에 따른 조직 손상의 부분적인 기전이 산소기의 생성에 의한 손상이 그 원인이라고 본다⁵. 이때의 산소기 생성의 주된 원인은 호중구의 respiratory burst라고 하므로 산소에 의한 폐장의 손상 역시 간접적으로는 호중구의 폐장 내 침윤에 따른 산화성 스트레스가 그 원인일 가능성이 있다. 즉, 산소독성은 조직에서 직접 생성되는 산소기의 작용에 의해 조직의 손상을 유발하거나 호중구를 비롯한 탐식구의 침윤에 따른 조직의 손상이 그 원인이거나 이 두 가지 모두의 기전에 의해서도 조직의

Address for correspondence: Young Man Lee, M.D.
Department of Physiology, Catholic University of Daegu,
School of Medicine, 3056-6, Daemyeong 4-dong, Nam-gu,
Daegu 705-718, Korea
Phone: 82-53-650-4472, Fax: 82-53-621-4106
E-mail: leeym@cu.ac.kr
Received: Sep. 23, 2008
Accepted: Nov. 10, 2008

손상이 유발될 수도 있다.

본 연구에서는 고농도의 산소를 실험동물에게 일정시간 호흡 시 나타나는 급성폐손상의 기전이 과연 호중구의 기능, 특히 호중구의 산소기의 생성과 관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 체중 280 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐 수컷을 사용하였다. 실험동물에게는 실험 기간 내내 충분한 물 및 먹이를 공급하였다.

2. 100% 산소흡입에 따른 급성 폐손상의 유도

실험군은 대조군 즉 대기($FiO_2=0.2$, normoxia)를 흡입한 군 및 실험 cage 내에서 100%산소($FiO_2=1.0$, hyperoxia)를 흡입한 군으로 구분하였다. 100% 산소를 흰쥐에게 흡입시키기 위하여 plastic cage를 100% O_2 tank에 연결하고 산소탱크에서 나오는 산소는 소다석회를 통과시켜 이산화탄소를 제거하였다. Plastic cage 내에서는 1기압의 압력을 유지하기 위하여 cage 내의 압력이 1기압 이상이 되면 산소가 배출되도록 one-way valve를 설치하였다. 실험동물에 공급되는 순수한 산소($FiO_2=1.0$)는 가슴장치를 통과시키고 분당 2.0 L의 유속으로 48시간을 공급하였다.

3. 폐장의 무게/체중의 비(L/B ratio)의 계산

폐장의 무게/체중의 비(lung weight/body weight ratio, L/B ratio)는 급성 폐부종의 유용한 지표로 사용될 수 있다. 즉 대조군의 L/B ratio와 실험군의 L/B ratio를 비교 시 L/B ratio의 증가는 급성 폐부종이 일어났음을 시사한다. L/B ratio를 계산하기 위하여 대조군 및 100% 산소를 호흡한 흰쥐를 xylazine (6 mg/kg) 및 엔프루란으로 마취한 뒤 기도를 절개하여 Harvard Rodent Ventilator에 연결한 뒤 개흉술을 시행하였다. 개흉술 후에 좌측 및 우측 폐장을 절제하여 무게를 측정하고 이를 이용 L/B ratio를 계산하였다.

4. 폐 세척액 내의 단백질량의 측정 및 백혈구 수의 산정

산소에 의한 폐손상으로 혈관 내 단백질이 폐포강 내로 이동(alveolar flooding)을 평가하기 위하여 기관지 폐포

세척(brochoalveolar lavage, BAL)을 시행 후 폐포세척액 내의 단백질량을 측정하였다. 흰쥐에 xylazine을 경정맥으로 주사하여 치사시킨 직후에 기관 절개를 시행하고 polyethylene tube를 기도 내로 삽입하였다. 8.0 ml의 생리적 식염수를 이용 주입 흡입하는 과정을 3회 시행하여 약 6.0 ml의 폐세척액을 얻었다. 상온에서 이 용액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포성분을 가라앉히고 상등액을 이용, Brown 등⁶의 방법에 따라 단백질량을 측정하였다.

또한 원심분리 후의 침전층에 0.1 ml의 생리적 식염수를 첨가하여 재부유 시킨 후 이 부유액내의 백혈구의 수를 hemocytometer를 이용하여 산정하였다. 폐포세척액 내의 백혈구의 증가는 백혈구의 폐장 내 침윤으로 인한 백혈구의 폐포강으로의 이동을 의미하며 특히 호중구에 의한 조직 손상의 지표로 사용된다.

5. Lung MPO의 측정

100% 산소를 48시간 호흡 후에 폐장 내 호중구침윤의 정도를 측정하기 위하여 Goldblum 등⁷의 방법에 따라 폐장 내 myeloperoxidase (MPO)의 활성도를 측정하였다. MPO는 호중구 세포질 내에 존재하는 효소로서 조직 내의 호중구의 침윤이 증가하면 그 활동도가 증가하므로 호중구 침윤의 정도를 정량적으로 평가할 때 그 활동도를 측정한다. 즉 실험동물을 xylazine (6 mg/kg) 및 엔프루란으로 마취시킨 후 기관지를 절개하여 Harvard Rodent Ventilator에 연결하고 개흉술을 시행하였다. 그 후 우심실에 1,000 IU의 헤파린을 주입한 뒤 폐동맥에 삽관하여 Masterflex perfusion pump를 이용하여 생리적 식염수를 관류시켜 폐장 내 혈액을 제거하였다. 좌, 우측 폐장을 절제 후 무게를 측정한 뒤 액체 질소에 담겨 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 $-70^{\circ}C$ 에서 냉동 보관하였다. MPO의 측정은 좌측 폐장을 조직 분쇄기(Polytron, Switzerland)를 이용하여 4.0 ml, pH 7.4의 20 mM 인산칼륨완충용액 내에서 18,000 rpm, $4^{\circ}C$ 에서 30분간 원심분리 후 상등액은 버렸다. 그 위 침전층(pellet)을 다시 4.0 ml 50 mM 인산완충용액(pH 6.0)에 재부유시키고, $4^{\circ}C$ 에서 Vibracell (Sonics & Materials Inc, USA)를 이용하여 초음파 처리하여 세포막을 파열시켰다. 그 후 균질액을 $60^{\circ}C$ 항온 수조에서 120분간 처리하여 단백질해효소를 불활성시키고 12,000 rpm으로 원심분리 후 상등액은 o-dianisidine이 함유된 500 μ m 과산화수소용액과 반응시켜 파장 460 nm에서 분광비색계를 이용하여 MPO의 활성도

를 측정하였다.

6. 폐장 내 malondialdehyde (MDA)의 측정

MDA는 과산화지질의 일종으로 조직에서의 산화성 스트레스 시에 증가한다. 100% 산소를 48시간 호흡시킨 흰 쥐 폐장 내에서 과산화지질의 일종인 malondialdehyde (MDA)를 Carraway 등⁸의 방법에 따라 정량하였다. 좌측 폐장을 4.0 ml pH 6.0의 50 mM 인산완충용액을 첨가하여 갈았다. 그 후 18,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리한 뒤 상등액을 분리하고 0.2 ml의 상등액을 유리관에 넣은 뒤, 0.2 ml의 3.5% sodium dodecyl sulfate와 100% 빙초산 0.13 ml를 첨가하였다. 그 뒤 1 N NaOH 용액으로 pH를 3.5로 맞춘 뒤 5.0 ml의 0.6% thiobarbituric acid (TBA)를 첨가 후 끓는 물에서 30분간 반응시켰다. 그 후 ice box에서 냉각시킨 후 1.5 ml의 n-butanol : pyridine (15 : 1, v/v)을 첨가하고 30초간 vortex를 이용하여 진탕한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 525 nm에서 비색 정량하였다. 이때 비색정량용 표준곡선의 작성은 1 mM tetraethoxypropane 용액을 이용하였다.

7. 폐장의 cPLA₂ 활성도의 측정

PLA₂는 호중구성 산화성 스트레스시에 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화시키는 염증성 지질분자의 생성에 결정적인 역할을 한다. 이 중 세포질 내의 PLA₂의 일종인 cytosolic PLA₂ (cPLA₂)는 호중구성 산화성 스트레스시에 그 활동도가 증가한다. 고농도 산소에 의한 폐장의 cPLA₂의 변화를 알아보기 위하여 Katsumata 등⁹의 방법에 따라 적출된 폐장의 cPLA₂의 활성도를 측정하였다. 즉, 동결된 폐장을 녹인 후 Tris-base완충용액(0.1% Triton-100, 0.15 mM KCl, 10 mM Tris-base, 10 mM EDTA-pH 7.4, 1 mM DTT, 50 μg/ml PMSF, 3 μg/ml leupeptin)을 사용하여 분비형 PLA₂를 억제하였다. cPLA₂ 1.0 unit는 1분당 유리 지방산 1 μmol이 생성되는 것으로 정의하였다.

8. 형태학적 관찰

100% 산소에 의한 급성 폐손상을 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. 100% 산소로 48시간을 호흡시킨 후 xy-lazine 및 엔프루란으로 마취 후 치사시키고 기관을 절개하여 10% 인산완충포프탈린액(phosphate buffered formalin, PBF)을 기도 내로 주입한 뒤 기도를 절찰하였다.

그 후 폐장을 적출하여 무작위로 폐장을 잘라내어 10% PBF 용액에 담근 뒤 폐장 내의 공기를 제거하여 계속 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 세척, 탈수의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 Reichert-Jung Microtome 2040으로 박 절한 뒤 hematoxyline-eosin 용액으로 염색 후 검경하였다.

9. 통계처리

모든 성적은 평균±표준오차로 나타내었다. 성적의 유의성의 검정은 Student's t-test를 이용하였고 이때 p < 0.01을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. L/B ratio

급성폐부종의 지표인 L/B ratio는 대조군에서는 7.24±0.56이었고 100% 산소군에서는 11.37±0.49로서 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내어(p < 0.001)(Table 1), 100% 산소 호흡 이후에 상당한 폐부종이 있었음을 확인할 수 있었다.

2. 폐세척액 내 단백질 함량

폐장 내 모세혈관의 손상에 따른 alveolar flooding을 나타내는 지표인 폐세척액 내 단백질의 함량(O.D at 562 nm)은 대조군에서 0.29±0.02, 100% 산소군에서는 1.04±0.18로서 100% 산소군에서 현저히(p < 0.001) 증가하였

Table 1. Comparison of parameters denoting acute inflammatory edema in the lung due to hyperoxia

	Normoxia (ambient air) (FiO ₂ =0.21)	Hyperoxia (FiO ₂ =1.0)
L/B ratio	7.24±0.56 (n=8)	11.37±0.49* (n=17)
BAL protein content (O.D. at 562 nm)	0.29±0.02 (n=9)	1.04±0.18* (n=16)
BAL WBC (millions/ml of BAL)	7.4±1.1 (n=8)	21.5±1.7* (n=15)
Lung MPO (U/g of lung)	3.60±0.31 (n=9)	16.79±2.00* (n=15)

Values are given as mean±SD.

n indicates number of experiments.

L/B: (lung weight/body weight) × 10³; BAL: bronchoalveolar lavage; MPO: myeloperoxidase; O.D.: optical density.

*p < 0.001, Normoxia vs Hyperoxia.

다(Table 1).

3. BALF 내의 백혈구의 수

BALF 내의 백혈구의 수(million/ml of BALF)는 100% 산소군에서는 21.5 ± 1.7 로서 대조군 7.4 ± 1.1 에 비해 월등히($p < 0.001$) 증가하였다(Table 1). 이를 통해 100% 산소가 폐장의 모세혈관을 손상시켜 다량의 단백질이 폐장 내로 유출되고, 다수의 염증세포가 유입됨을 확인할 수 있었다.

4. Lung MPO

폐장 내 호중구의 침윤의 정도를 나타내는 lung MPO (U/g of lung)는 대조군의 3.60 ± 0.31 에 비해 100% 산소군에서는 16.79 ± 2.00 로서 현저히($p < 0.001$) 증가하였다

Table 2. Lung MDA content (nmol/g of lung) and cPLA₂ activity (mU/g of lung) after 48 h hyperoxia

	Normoxia (ambient air) (FIO ₂ =0.21)	Hyperoxia (FIO ₂ =1.0)
MDA	4.42 ± 0.10 (n=5)	$5.34 \pm 0.11^*$ (n=9)
cPLA ₂	10.23 ± 2.73 (n=12)	$98.87 \pm 13.68^*$ (n=7)

Values are given as mean±SD.
n indicates number of experiments.
MDA: malondialdehyde; cPLA₂: cytosolic phospholipase A₂.
* $p < 0.001$, Normoxia vs Hyperoxia.

(Table 1).

5. MDA 함량

100% 산소에 의한 폐장의 손상을 산화성 스트레스와 연관시켜 알아보기 위한 과산화지질의 증가는 Table 2에서 보듯이 대조군의 MDA함량 4.42 ± 0.10 (nmol/g of lung)에 비해 100% 산소군에서는 5.34 ± 0.11 로 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였다. 이는 100% 산소가 폐장 내에 다수의 산소기를 형성하여 폐장의 손상에 직, 간접적으로 영향을 미쳤음을 시사한다.

6. Lung cPLA₂ 활성도

폐장에서의 cPLA₂의 활성도(mU/g of lung)는 대기 호흡군에서는 10.23 ± 2.73 , 100% 산소를 호흡한 군에서는 98.87 ± 13.68 이었다(Table 2). 산소에 의한 cPLA₂ 활동도의 증가는 산소기의 역할로 추정되며 이에 따른 염증성 지질분자의 생성이 폐장 내 호중구의 침윤을 유도했을 것으로 생각된다.

7. 형태학적 검사

1) BAL cytopin의 검경: 호중구를 산정하기 위해 시행한 BALF pellet의 cytopsin 후의 Wright stain의 검경 결과는 단핵구만 관찰되는 대조군(Figure 1A)에 비해 100% 산소군에서는 단핵구와 함께 상당한 수의 호중구가 관찰되었다(Figure 1B).

2) 광학현미경을 이용한 형태학적 검사에서는 대조군과

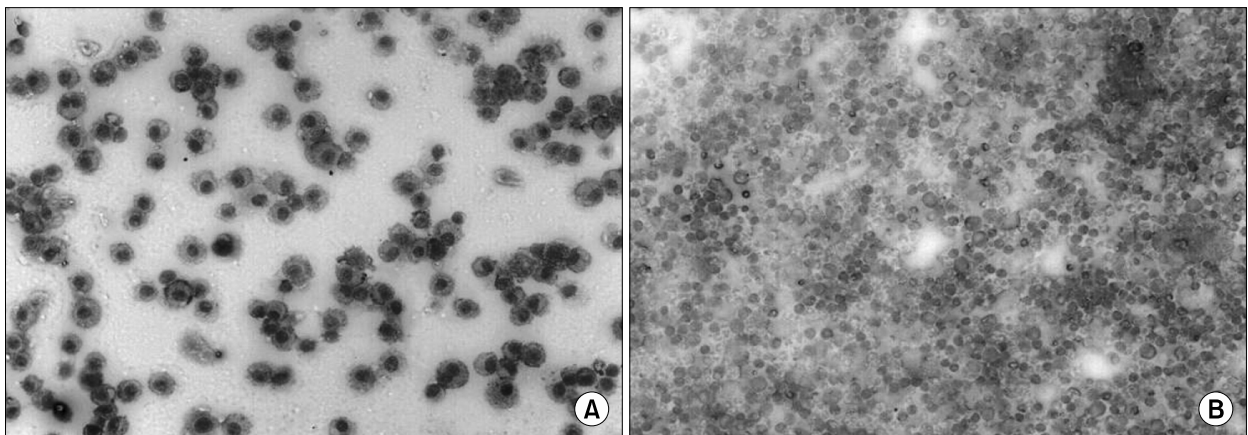


Figure 1. (A) The representative photograph of BALF cytopsin of rat given ambient air. Almost all of the cells are monocytes (Wright's stain, $\times 100$). (B) The representative photograph of BALF cytopsin of rats given 100% O₂ for 48 h. The intermingling of monocytes and neutrophils is noted. Neutrophils are much more abundant than monocytes (Wright's stain, $\times 40$).

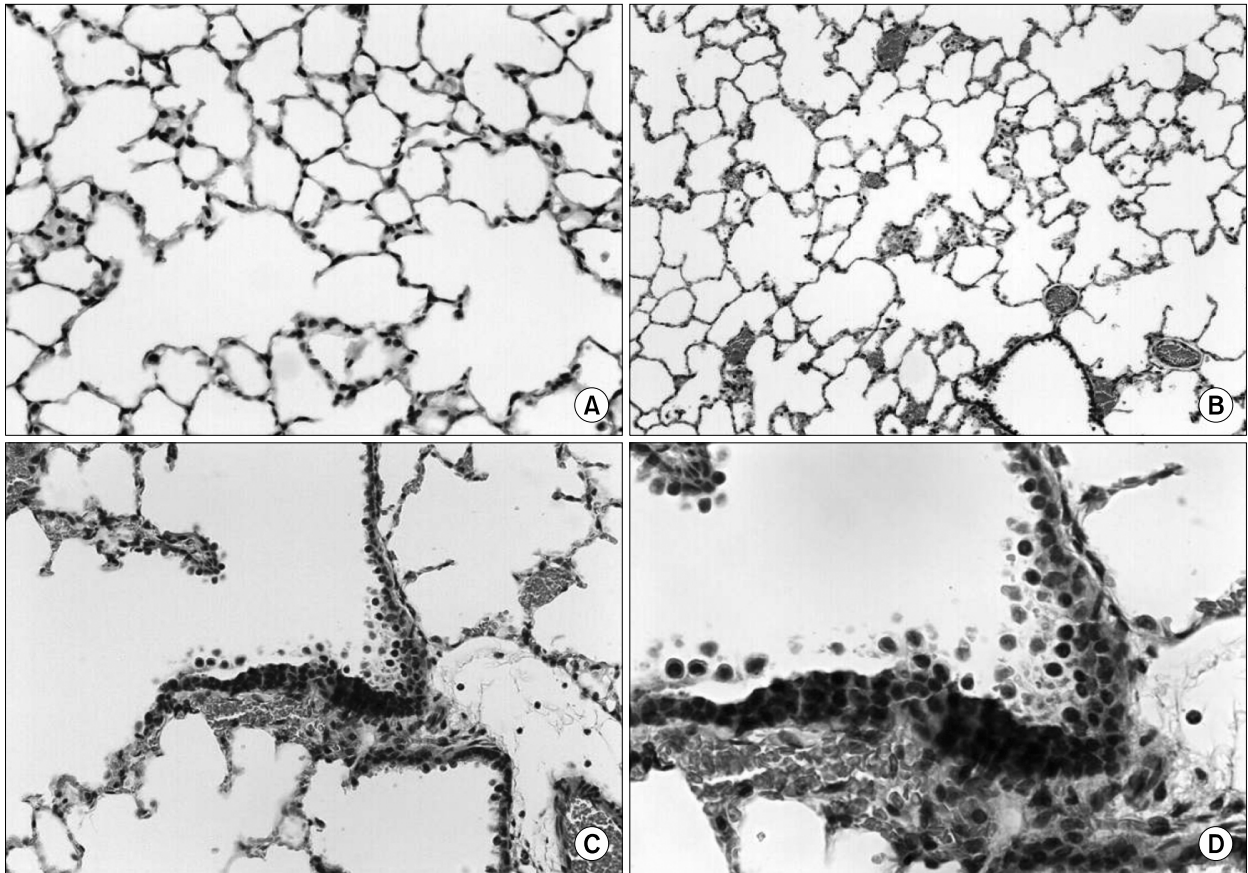


Figure 2. (A) The normal histological finding of the lung of rat given ambient air. Patent alveoli and thin, normal alveolar septa are noted (H&E stain, $\times 100$). (B) The histological finding of the lung given 100% O₂ for 48 h, Diffuse hemorrhage is noted. Intraalveolar hemorrhage, migrated phagocytes and hyaline membranes are shown (H&E stain, $\times 40$). (C) The photograph of the migration of phagocytes from vascular lumen into alveolar lumen in the lung of rats given 100% O₂ for 48 h. Phagocytes including neutrophils are trapped in the perivascular cuff (below right) and phagocytes are migrating into alveolar lumen from adjacent vessel. Extravasation of the red blood cells are noted also (H&E stain, $\times 100$). (D) The magnification of Figure C. Note the migration of phagocytes from vessel into alveolar lumen. Neutrophils are moving into the alveolar lumen by a diapedesis and red blood cells are migrating into the alveolar lumen also (H&E stain, $\times 400$).

비교 시 100% 산소군에서 심한 염증소견을 보였다. 특징적으로 100% 산소를 흡인한 흰쥐의 폐포강 내의 출혈, 혈관에서의 간질 쪽으로의 탐식구의 이동이 관찰되었으며 손상된 폐포세포 및 혈관세포주위로 호중구의 이동이 관찰되었다. 탐식구는 다양한 종류, 즉 임파구, 단핵구 및 호중구의가 관찰되었는데, 100% 산소공급 48시간 후에는 특히 호중구의 폐포강 내로의 이동이 확인되었다(Figure 2).

고찰

산소 치료는 호흡기 질환 환자에게 유용하게 사용되는

치료법이지만 때로는 고농도의 산소가 산소독을 유발함으로써 폐장에 심각한 손상을 가져온다. 산소독은 생체 내에서 항산화 효소계인 SOD, catalase 등의 작용과 항산체제를 구성하는 인자들의 방어기전의 균형을 깨짐으로써 발생한다는 이론¹⁰이 가장 유력하게 평가되고 있으며, 호중구와 같은 염증 세포들에 의한 손상 이론¹¹도 보고되고 있다.

본 연구에서 100% O₂ (FiO₂=1.0)를 48시간 호흡시킨 흰쥐에서 L/B ratio가 현저히 증가하고, 부검 상 흉강 내의 여출액이 빈번히 관찰되어 심한 폐부종 및 심낭여출(pericardial effusion)이 유발되었음을 확인할 수 있었다.

또한 폐장 내, 늑막강, 흉강 내의 여출액의 단백 농도가 현저히 증가하였는데, 이는 모세혈관의 혈관내피세포의 손상에 의한 것으로 생각된다.

100% 산소에 의한 조직 손상이 산소기에 의한 것이라는 증거는 폐장 조직의 MDA 함량이 증가한 것으로 알 수 있다. TBARS (thiobarbituric acid reaction species)의 일종인 MDA는 산소기의 작용에 의해 생성되는 과산화지질의 일종으로 조직에서는 검출이 어렵고, 심한 산화성 스트레스가 있는 조직에서는 미량이 증가할 뿐이다¹². 따라서 본 실험 결과에서 보이는 MDA의 증가는 폐장 내에 산소기가 세포막의 손상을 일으켰음을 의미한다. 즉, 이러한 MDA의 증가는 L/B ratio의 증가, BALF 내 단백질량의 증가들과 관계가 있다. 형태학적으로 100% 산소를 공급한 경우에서 모세혈관 주위의 부종(perivascular cuffing) 및 전반적인 출혈 등이 그 증거이다. 조직의 손상이 관찰 되는 부위에는 적혈구의 폐포강 내로의 이동 및 특징적으로 탐식구 특히 호중구의 이동이 관찰되었다.

48시간 동안 100% 산소를 공급하여 호흡한 흰쥐의 평균 사망률은 40~45% 정도(data not shown)로서 상당히 높은 치사율을 보였는데 이는 급성 폐손상의 정도가 상당히 심했다는 것을 시사한다. 흥미로운 것은 100% 산소의 공급 시간이 48시간에 근접한 35시간 중에는 치사율이 0%에 가까워 같은 농도의 산소농도라도 노출 시간이 급성 폐손상의 중요한 요소로 생각되었고 호중구의 폐장 내 침윤의 시기와 높은 사망률의 발생시기는 거의 일치하였다. 100%의 산소는 E-selectin의 발현을 억제하고 따라서 호중구의 조직 내 이동 또는 축적을 억제한다는 보고¹³도 있지만 본 실험에서는 BALF 내의 백혈구의 수는 대조군 (FiO₂=0.2)에 비해 월등히 증가하였으며, 폐장 내 호중구의 침윤의 정도를 나타내는 MPO의 활성화도 또한 대조군에 비해 증가함을 확인할 수 있었다. 동시에 BALF 내의 백혈구의 구성을 cytospin 후 슬라이드를 검경한 결과에서도 많은 호중구가 관찰되었다. 이는 100% 산소에 노출된 이후 폐장 내에 호중구가 축적되었다는 보고와 일치하는 것이다¹⁴. 또한 Shasby 등¹⁵은 neutrophil을 고갈시킨 이후 고농도 산소에 폭로된 쥐에서 산소독이 예방된다고 하였다.

Hybertson 등¹⁶은 ARDS 시에 보이는 폐부종은 주로 염증성 사이토카인의 작용에 따른 호중구의 침윤 및 이에 의한 산소기 형성이 조직의 주원인이라고 하였으며, ARDS의 병인론을 연구한 많은 보고^{17,18}들에서는 주로 흰쥐를 이용한 ARDS model에서 호중구의 침윤의 증가와

더불어 급성 폐손상이 나타나기 시작하고, 호중구의 침윤의 감소는 alveolar flooding의 감소를 동반한다고 하였다. Lee 등¹⁹은 이러한 결과들을 근거로 호중구가 ARDS나 ALI 시에 혈관내피세포의 손상과 직접적인 관계가 있다고 주장하고 있으며, 본 실험에서 BALF 내의 호중구 증가의 양상은 위에서 언급한 급성폐손상의 과정과 유사한 소견을 보이고 있다. 본 실험의 결과를 근거로 우리는 산소독에 의한 폐장의 손상이 호중구의 유입시간과 관계가 있다고 보고 싶다. 즉 Guidot²⁰는 산소에 의해 사립체에서 생성되는 산소기의 대부분은 세포질 내에 존재하다가 항산화효소에 의해 무독화되거나 사립체로 흡수 처리된다고 한다. 고농도의 산소에 의하여 사망률이 증가하는 시기는 48시간 정도, 그 이전의 사망률은 현저히 낮고 호중구의 침윤도 미미하다. 이러한 사실은 산소독은 호중구에 의해 매개될 가능성이 크다는 사실을 시사한다. 즉 고농도의 산소가 폐 내부로 염증세포 특히 호중구의 유입을 자극하고 축적된 호중구가 산소기를 생산하여 폐세포 손상에 관여하는 듯하다.

조직 내의 산화성 스트레스 또는 산소기 생성의 증가는 본 실험의 결과에서도 보듯이 조직 내 과산화수소 농도의 증가가 PLA₂의 활성화²¹, Haber-Weiss 반응에 따른 중독한 hydroxyl radical (OH·)을 형성하여 조직의 손상을 유발하는데, 이때 과산화수소의 생성 증가에 따른 PLA₂의 활성화는 산소독의 말기에 보이는 현상으로 호중구의 침윤 및 호중구성 산화성 스트레스의 원인이 될 수도 있을 것이다. 48시간 후의 폐장의 cPLA₂의 활성화도의 증가는 산소기의 생성에 의한 것으로 보고, PLA₂의 활성화에 따라 호중구의 침윤이 더 심해진 것으로 생각한다.

이러한 사실들을 종합해 볼 때, 산소독에 의한 폐장 조직의 손상은 1차적으로 산소 자체에 의해 과도한 산소기가 생성됨으로써 발생하고, 호중구의 침윤은 이러한 산소 자체의 독작용에 따르는 이차적 현상이거나 ALI의 말기에 올 수 있는 현상으로, 축적된 호중구가 폐장 조직의 손상을 배가 시키지 않았나 짐작된다.

안전한 농도라고 알려진 40~50%의 산소도 과량으로 장시간 주어지면 올 수 있는 산소독은 산소기 생성 자체를 억제하는 것이 가장 적절한 예방이라고 보지만 이에 대한 연구는 앞으로 계속 이뤄져야만 해결될 것으로 보인다.

요 약

연구배경: 산소독에 의한 급성 폐손상에 대한 기전은

아직 확실히 알려져 있지 않다. 급성호흡곤란증후군에서 보이는 호중구의 산소기 생성에 따른 조직의 손상이 산소 독에 의한 손상에서도 관여하는지를 확인하고자 하였다.

방 법: Plastic cage 내의 기압을 1기압으로 고정하고 흰쥐에게 순수한 산소를 48시간 호흡시킨 후 호중구가 폐장 내로 침윤함으로써 나타나는 급성 폐손상을 생화학적인 지표 및 형태학적인 관찰 등을 통하여 검사하였다.

결 과: 흰쥐에게 순수한 산소를 48시간 호흡하게 한 경우 폐부종, 호중구의 침윤, 폐장 내 MDA 및 cPLA₂ 활동도의 증가가 관찰되었고, 형태학적으로도 탐식구 특히 호중구의 침윤에 따른 폐장의 손상이 관찰되었다.

결 론: 산소독에 의한 급성폐손상의 기전은 고농도의 산소에 의한 산소기 생성이 그 원인으로 생각 되지만 산소기의 작용기전은 부분적으로 cPLA₂활성도 증가에 의한 호중구의 조직 내 침윤에 따른 이차적 산소기 형성이 그 원인으로 생각되며 시간이 경과할수록 호중구에 폐장 내 침윤에 따른 손상이 더 심해질 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hay WW Jr, Bell EF. Oxygen therapy, oxygen toxicity, and STOP-ROP trial. *Pediatrics* 2000;105:424-5.
2. Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:123-43.
3. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J* 1998;11:745-57.
4. Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelson SK, Wright RM, et al. Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a non-enzymatic mechanism. *J Clin Invest* 1995;96:1131-6.
5. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-49.
6. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 1989;180:136-9.
7. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 1985;59:1978-85.
8. Carraway MS, Piantadosi CA, Jenkinson CP, Huang YC. Differential expression of arginase and iNOS in the lung in sepsis. *Exp Lung Res* 1998;24:253-68.
9. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS. A rapid assay for activity of phospholipase A2 using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1986;154:676-81.
10. Capellier G, Maupoil V, Boussat S, Laurent E, Neidhardt A. Oxygen toxicity and tolerance. *Minerva Anesthesiol* 1999;65:388-92.
11. Torbati D, Tan GH, Smith S, Frazier KS, Gelvez J, Fakioglu H, et al. Multiple-organ effect of normobaric hyperoxia in neonatal rats. *J Crit Care* 2006;21:85-93.
12. Roman K, Vladimíra M, Alexander C. Highly specific, simple and rapid method for the determination of malondialdehyde in blood using high-performance liquid chromatography. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1032-5.
13. Sukhotnik I, Coran AG, Greenblatt R, Brod V, Mogilner J, Shiloni E, et al. Effect of 100% oxygen on E-selectin expression, recruitment of neutrophils and enterocyte apoptosis following intestinal ischemia-reperfusion in a rat. *Pediatr Surg Int* 2008;24:29-35.
14. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B, et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231:235-40.
15. Shasby DM, Fox RB, Harada RN, Repine JE. Reduction of the edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J Appl Physiol* 1982;52:1237-44.
16. Hybertson BM, Lee YM, Repine JE. Phagocytes and acute lung injury: dual roles for interleukin-1. *Ann N Y Acad Sci* 1997;832:266-73.
17. Lin Y, Jamieson D. Role of neutrophils in hyperbaric and normobaric oxygen toxicity. *Pathophysiology* 1995;2:9-16.
18. Prudhomme JB, Ware LB. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: mechanisms and potential new therapies. *Drug Discov Today Dis Mech* 2004;1:123-8.
19. Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE. Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1624-8.
20. Guidot DM. Endotoxin treatment increases lung mitochondrial scavenging of extramitochondrial superoxide in hyperoxia-exposed rats. *Arch Biochem Biophys* 1996;326:266-70.
21. Boyer CS, Bannenberg GL, Neve EP, Ryrfeldt A, Moldéus P. Evidence for the activation of the signal-responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1995;50:753-61.