

LPS에 의한 급성 폐손상에서 게르마늄에 의한 폐포-모세혈관 장벽의 변화

이윤정, 조현국¹, 신건호, 전경희*
영남대학교 이과대학 생물학과, ¹경운대학교 안경광학과

The Change of Alveolar-capillary Barrier by Germanium in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide

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

Department of Biology, Yeungnam University, Gyeongbuk 712-749, Korea
¹Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gyeongbuk 730-739, Korea
(Received January 15, 2009; Accepted March 11, 2009)

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS), also known as an acute inflammatory lung disease is developed by various factors that is originated from the destruction of alveolar-capillary barrier, and neutrophils plays an important role in the destruction. The study intended to confirm, the anti-inflammatory effect of germanium, whether a lung injury has been mitigated with the reduction of injury in alveolar-capillary barrier resulting from inhibition of neutrophils migration in lung tissue. Test groups were divided in saline administered CON, 5 hours of endotoxin administered LPS and 5 hours of endotoxin administered Ge+LPS following 1 hours of pre-processed germanium. 100 µg endotoxin was melted in 0.5 mL saline and sprayed into airway and 26 mg germanium per 100 g weight was administered into abdominal cavity.

The endotoxin group which induced an acute lung injury with administered endotoxin showed dramatic increase of pulmonary edema ($p < 0.001$), protein contents in bronchoalveolar lavage fluid, BALF ($p < 0.05$) and neutrophils of infiltration in BALF ($p < 0.001$) comparing with a control group, while a pre-treated germanium group showed significant decrease in all categories comparing to the endotoxin administered group. In the result of a microscopic observation, the structure of alveolar-capillary barrier which is constructed with basal lamina, alveolar type I cells and endothelial cell were preserved of the pre-treated germanium group relatively well compare to the endotoxin administered group. And the construction of lamellar body, microvilli and basal lamina of alveolar type II cells were also preserved relatively well. Hence, germanium activates as an anti-inflammatory mediator in other words, it interfered neutrophils migration into lung tissue, thereby reduced injury of alveolar-capillary barrier from toxic substances of activated neutrophils. Consequently, the study has determined that the acute lung injury induced by endotoxin has been decreased by the pre-treated germanium.

Keywords : Acute lung injury, Germanium, Alveolar-capillary barrier

* Correspondence should be addressed to Dr. 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

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)은 다양한 원인으로 초래되는 급성 염증성 폐질환으로써 1967년 Ashbaugh 등에 의해 처음으로 보고되었다. 이로부터 ARDS에 관한 연구가 수 십년간 계속되고, 호흡부전을 치료하는 치료법이 많이 개선되어 처음 보고한 당시의 사망률(40~90%)보다 감소추세에 있기는 하지만 현재 까지도 ARDS로 인한 사망률은 약 40~60%로 높게 나타나고 있다(Milberg et al., 1995; Zilberberg & Epstein, 1998). ARDS는 폐렴, 위 내용물의 흡입, 폐 좌상, 지방 색전, 연기나 독가스의 흡입과 같은 직접적인 원인과 패혈증, 쇼크성 장애, 심한 외상, 약물 과다, 급성 췌장염 등의 간접적 원인에 의해 발생된다(Pepe et al., 1982; Fowler et al., 1983; Sloane et al., 1992; Doyle et al., 1995; Hudson et al., 1995). 이 원인들 중 패혈증후군이 있는 환자에서 ARDS가 발생할 확률이 아주 높게 나타나며(Pepe et al., 1982; Fowler et al., 1983) ARDS 환자의 후기 사망이 대부분 패혈증후군에서 기인한다(Montgomery et al., 1985)는 보고에 따라 실험동물에 내독소(endotoxin)인 Lipopolysaccharide를 주입하면 사람에서의 패혈증과 유사한 징후를 보이므로 내독소가 투여된 실험동물은 ARDS 모델로 이용되어지고 있다(Vadas et al., 1993).

ARDS는 위 기술한 직·간접적인 원인에 의해 발생하지만 어떤 원인인든 모세혈관 내피세포와 폐포 상피세포(Alveolar Type I Cell, Alveolar Type II Cell)로 구성된 폐포-모세혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 파괴로부터 기인한다고 볼 수 있으며, 이 손상으로 인해 폐포-모세혈관 장벽의 투과성이 증가되어 단백질이 풍부한 삼출액이 폐포 내로 다량 유입되어 폐부종이 발생하게 되고(Ware and Matthay, 2000), 전체 폐포 표면의 약 10%를 차지하는 제II형 폐포세포의 손상으로 폐포 표면의 계면활성제(surfactant) 생성에 장애를 일으켜 호흡부전의 결과가 초래된다(pittet et al., 1997). 이러한 ARDS의 경과나 예후를 예측할 수 있는 생화학적 지표나 세포 소견을 밝혀내기 위한 수단으로 기관지폐포세척술(bronchoalveolar lavage : BAL)이 이용되는데, ARDS에서 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid : BALF)내에는 생화학적 지표인 사이토카인, 반응성 산소기, 류코트리엔, 활성화 보체 등 염증 매개 물질들이 증가하고, 정상 폐에서 5% 미만을 차지하는 호중구가 전체 세포의 80%를 차지할 정도로 증가한다(Baughman et al., 1996). 특히 자극을 받아 활성화된 호중구는 세포외로 elastase, collagenase, myeloperoxidase (MPO)와 같은 단백질 분해효소(proteases), 아라키돈산 대사물(arachidonate), 활성산소기(reactive oxygen free radical) 등의 독성 물질을 분비할 수

있으며 정상 폐조직이 독성 물질에 노출될 때 폐포-모세혈관 장벽(alveolar-capillary barrier)의 파괴를 포함하는 급성 폐손상이 초래될 수도 있다(Tate & Repine, 1983). 최근 보고에서도 Sibille와 Reynolds (1990), Abraham (2003)은 내독소로 유도된 ARDS에서 폐손상을 일으키는 가장 중요한 인자가 바로 호중구라고 하였다. 그리고 실험동물에 게르마늄을 투여함으로써 호중구의 세포사를 촉진시키고, 폐포강 큰포식세포의 호중구 탐식능력을 증가시키면 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 세포사를 유도한 물질로 사용된 유기 게르마늄 화합물 Ge-132는 수용성 물질로 체내에서 쉽게 흡수되며 생리활성 작용이 매우 강력한 물질로 알려져 있다(Asai, 1976a, b). 여러 보고에 따르면 게르마늄은 관절염과 간염 등에 대한 항염증작용(Sasaki et al., 1984; Dimartino et al., 1986), 큰포식세포와 자연살해세포의 기능을 활성화시키는 면역강화작용(Aso et al., 1985; Suzuki et al., 1986; Sung, 1997), 그리고 세포막의 지질과산화방지를 하여 세포막의 산화적 손상을 감소시킬 수 있는 항산화 작용(Hiroshi et al., 1991; Yang, 2001)을 한다.

따라서 본 연구에서는 내독소로 유도된 급성 폐손상에서 게르마늄을 투여하면 호중구의 세포사가 증가된다는 보고(Cho, 2005)를 바탕으로, ARDS가 발병하기 전에 투여한 게르마늄에 의해 폐포-모세혈관 장벽의 손상이 억제되어 폐손상이 경감되는지 알아보고자 다음과 같은 실험을 수행하였다. 게르마늄에 의한 폐포-모세혈관 장벽 손상의 감소 여부를 lung weight/body weight ratio, 기관지폐세척액 내 단백질 함량 측정, 기관지폐세척액 내 호중구 수 산정, 폐조직 내 Myeloperoxidase (MPO) 활성화도 측정, 그리고 폐조직의 형태적 관찰을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대한실험동물(Korea)로부터 구입한 후 1주간 적응 사육시킨 후 250~270g의 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 내독소 투여군, 그리고 게르마늄을 전처리 한 내독소 투여군으로 나누었다.

급성 폐손상을 유발하기 위해 실험동물을 Enfluran으로 흡입마취 시킨 후 내독소(Lipopolysaccharide; *Escherichia coli*, 0127 : B8) 100 µg을 0.5 mL의 생리식염수에 녹여 기도로 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 기도로 분무하였다.

3. 게르마늄 투여량의 독성여부 확인

실험동물에 투여하는 게르마늄의 양적 독성여부를 확인하기 위하여 실시하였다. 게르마늄(26 mg/100 g)을 증류수에 녹여 복강으로 투여한 후 6시간 그리고 7일 동안 방치한 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 경정맥으로 주사하여 실험동물을 마취시켜 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 다음 30분간 실온에 방치시킨 후 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 자동생화학 분석기(Hitachi-747, Japan)를 사용하여 간 기능을 확인하기 위해 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase)를, 신장 기능을 확인하기 위해 BUN (Blood urea nitrogen), 크레아티닌 (creatinine) 수치를 측정하였다.

4. 폐 무게 측정

폐 부종의 정도를 확인하기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 좌측 폐를 적출한 다음 무게를 측정하였다. 폐의 무게는 lung weight \times 10³/body weight ratio로 나타내었다.

5. 기관지폐세척액 (Bronchoalveolar lavage Fluid : BALF)

내의 단백질 함량 측정

혈관내피세포의 손상정도를 알아보기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 경정맥으로 주사하여 실험동물을 마취시켜 기관절개술을 시행하고 8.0 mL의 생리식염수로 기관지폐세척 (Bronchoalveolar lavage)을 시행하였다. 이 때 얻어진 6.0 mL의 기관지폐세척액 (Bronchoalveolar lavage Fluid : BALF)을 1,500 rpm으로 상온에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 단백질 측정 kit (Sigma Diagnostica)를 이용

하여 brilliant blue G.로 착색시켜 spectrophotometer (Pharmacia LKB · Ultrospec III)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 이미 만들어진 표준 값에 준하여 농도 값 (mg/two lung)을 계산하였다.

6. 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 Turk 용액으로 염색한 뒤 hemocytometer를 이용해 백혈구를 산정하였다. 남은 백혈구 용액 중 200 µL를 취하여 도말 표본 제작, Wright 염색한 후 전체 백혈구 중 호중구를 산정하여 백분율로 환산하고 기관지폐세척액 내 호중구의 수 (millions/two lungs)를 계산하였다.

7. 폐조직 내 Myeloperoxidase (MPO) 활성도 측정

폐조직 내 호중구를 비롯한 면역세포의 침윤을 확인하기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 좌측 폐를 적출하여 4 mL potassium phosphate buffer (20 mM, pH 7.4)에 담겨 polytron homogenizer (swizland)로 균등마쇄하고 18,000 \times g (Beckman, USA)로 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 침전층에 0.5% hexadecyl tetramethyl ammonium bromide (HTAB)가 함유된 potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) 용액을 4.0 mL씩 첨가한 후 4°C에서 90초간 Vibracell (Sonics & Materials Inc. USA)로 초음파 처리한 뒤 균질액을 60°C에서 120분간 반응시키고 1.0 mL을 취하여 실온에서 12,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상층액 0.1 mL을 0.168 g의 o-dianisidine 이 함유된 2.9 mL 과산화수소용액 (500 µM)과 반응시켜 spectrophotometer (Pharmacia LKB · Ultrospec III)로 460 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 때 구한 dA/dt의 수치에 13.5를 곱한 값을 폐의 무게로 나누어 MPO의 활성도 (U/g of wet lung)를 계산하였다.

8. 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) 또는 Bouin 용액에 넣어 조직 내 공기를 제거, 고정한 후 흐르는 물에 수세하고, 알코올의 농도를 순차적으로 증가시켜 탈수시키고 xylene으로 여분의 알코올을 제거한 후 포매하였다. 제작된 블록을 박절기 (Microtome, Model 45, Lipshaw)를 이용해 박절하여 슬라이드를 제작하였다.

2) Hematoxylin-Eosin 염색

폐조직의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위하여 실시하였다. 4~5 µm 두께로 박절한 절편을 Hematoxylin-Eosin으로 염색, 봉합하여 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

3) PAM 염색 (periodic acid methenamine stain)

폐조직 내 기저막의 변화양상을 관찰하기 위하여 실시하였다. 2 µm 두께로 박절한 절편을 PAM 염색 (0.5% periodic acid로 산화, methenamine silver 용액으로 반응, 0.2% Gold chloride로 조색, 2% sodium thiosulfate로 정착)을 하고 Hematoxylin-Eosin으로 후염색, 봉합하여 광학현미경 (BH-2, Olympus)으로 관찰하였다.

9. 전자현미경을 이용한 폐조직의 미세구조변화의 관찰

폐조직의 형태학적인 변화를 미세구조적으로 관찰하기 위하여 실시하였다. 내독소 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (10 mg/kg)으로 실험동물을 마취하고 개흉술을 시행하여 폐를 적출하였다. 적출 후 공기가 제거된 폐는 세절하여 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 2~4시간 전고정시키고, 4°C의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척 후 1% osmium tetroxide에 90분간 후고정시킨 다음 4°C의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 세척하였다. 그 후 알코올 농도를 증가시켜 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 epoxy resin을 침투시키고 포매하여 37°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 동안 열중합시켜 블록을 제작하였다. 블록은 초박절편기 (Ultramicrotome, Reichert Supernova)를 이용해 1 µm로 semisection한 다음 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰부위를 선정한 후 60~80 nm로 초박절하였다. 그 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하고 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

10. 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.

Table 1. Toxicity test of Germanium

Items	Reference	6 hours		7 days	
		CON (N=3)	+Ge (N=3)	CON (N=3)	+Ge (N=3)
GOT	7~84 (IU/L)	91±15.48	63±14.6	87±10.73	85±9.27
GPT	4~125 (IU/L)	38±2.0	20±3.2	43±4.2	21±1.8
BUN	6.8~29.6 (mg/dl)	13±3.6	14±3.9	9±1.7	18±4.1
Cre	0.4~1.5 (mg/dl)	0.9±0.11	0.7±0.03	0.8±0.12	0.6±0.04

Each values are given as mean ± S.E.. The number of experiments is in the parentheses. +Ge : Germanium-treated group; GOT : Glutamic Oxalacetic Transaminase; GPT : Glutamic Pyruvic Transaminase; BUN : Blood Urea Nitrogen; Cre : Creatinine.

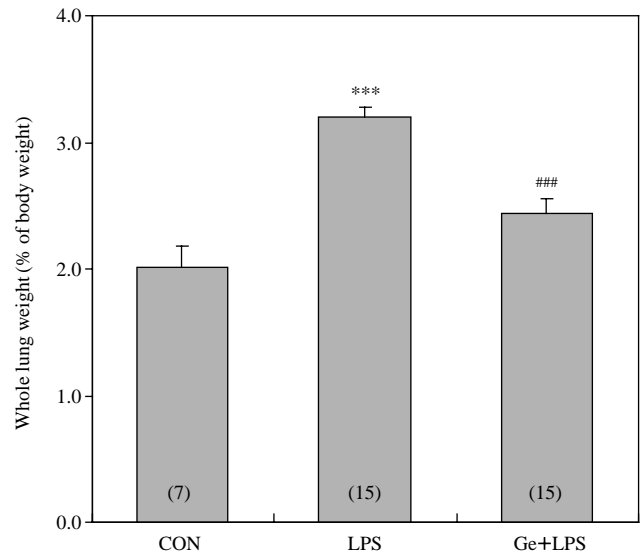


Fig. 1. Changes of lung weight/body weight ratio. Comparing with control rats, LPS-treated rats had significantly increased lung weight/body weight ($p < 0.001$). In contrast, pretreatment group of germanium had significantly decreased ($p < 0.001$) lung weight/body weight compared with that of LPS-treated rats. Each values are given as mean ± 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.

결 과

1. 게르마늄 투여량의 독성 확인

실험동물에 투여하는 게르마늄의 양적 독성여부를 확인한 결과를 Table 1에 표시하였다. 간 기능이상을 확인하기 위해 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase)를, 신장 기능이상을 확인하기 위해 BUN (Blood urea nitrogen), 크레아티닌 (creatinine) 수치를 측정한 결과 GOT 항목에서 게르마늄 6시간 처리군을 제외

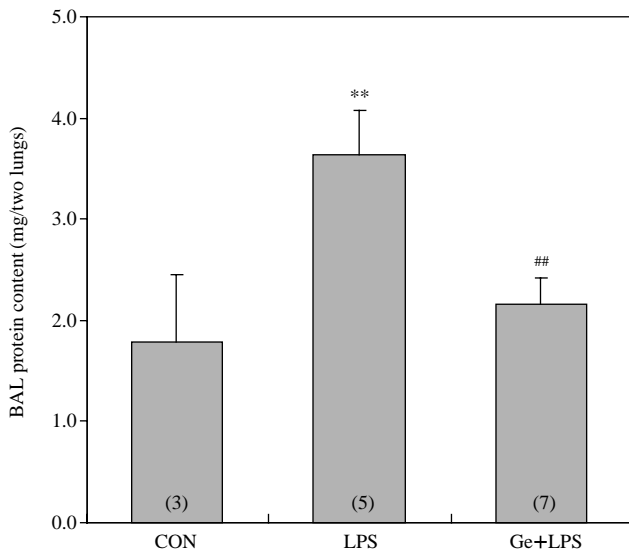


Fig. 2. Changes of total protein levels in BALF. Comparing with control rats, LPS-treated rats had increased ($p < 0.05$) lung leak denoted by the protein content (mg/two lungs) in BALF. In contrast, pretreatment group of germanium had decreased ($p < 0.05$) the lung leak denoted by the decreased content of BAL protein in LPS-treated rats. Each values are given as mean \pm S.E.. The number of experiments is in the parentheses. ** $p < 0.05$: significantly different from CON; ## $p < 0.05$: significantly different from LPS; CON : Saline-treated Control group; LPS : Lipopolysaccharide-treated group; Ge+LPS : germanium was treated prior to Lipopolysaccharide.

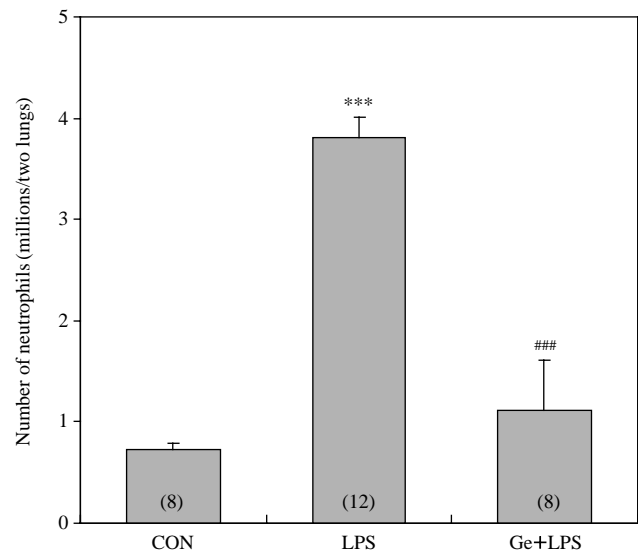


Fig. 3. The number of neutrophils in the BALF. Comparing with control rats, LPS-treated rats showed significantly increased ($p < 0.001$) migration of neutrophils into alveolar lumen. In contrast, pretreatment group of germanium had significantly decreased ($p < 0.001$) number of neutrophils compared 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.

한 모든 군이 정상수치보다 약간 높게 나타났으나, 대부분의 항목에서 대조군과 실험군이 정상수치를 나타내었다.

2. 폐 무게 측정

폐 부종의 정도를 확인하기 위하여 폐의 무게 (lung weight $\times 10^3$ /body weight ratio)를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 내독소 투여군 (3.19 ± 0.085)은 대조군 (2.01 ± 0.166)에 비해 폐의 무게가 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), 게르마늄 전처리군 (2.44 ± 0.113)은 내독소 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$).

3. 기관지폐세척액 (Bronchoalveolar lavage Fluid : BALF) 내의 단백질 함량 측정

기관지폐세척액 내 단백질 함량 (mg/two lungs)을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 내독소 투여군 (3.64 ± 0.433)은 대조군 (1.78 ± 0.669)에 비해 기관지폐세척액 내 단백질 함량이 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$), 게르마늄 전처리군 (2.17 ± 0.258)은 내독소 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$).

4. 기관지폐세척액 (Bronchoalveolar lavage Fluid : BALF) 내의 호중구의 산정

기관지폐세척액 내 호중구의 수 (millions/two lungs)를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 내독소 투여군 (3.81 ± 0.190)은 대조군 (0.73 ± 0.064)에 비해 기관지폐세척액 내 호중구의 수가 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), 게르마늄 전처리군 (1.11 ± 0.502)은 내독소 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$).

5. 폐조직 내 Myeloperoxidase (MPO) 활성도 측정

폐조직 내 MPO의 활성도 (U/g of wet lung)를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 내독소 투여군 (23.89 ± 0.830)은 대조군 (3.04 ± 0.683)에 비해 폐조직 내 MPO의 활성도가 유의하게 증가하였고 ($p < 0.001$), 게르마늄 전처리군 (26.68 ± 0.776)도 내독소 투여군에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$).

6. 광학현미경을 이용한 조직학적 관찰

1) Hematoxylin-Eosin 염색

대조군의 폐조직은 폐포 중격 (alveolar septa), 폐포강 (alveolar lumen) 그리고 모세혈관 등 모두 정상적인 구조를 가

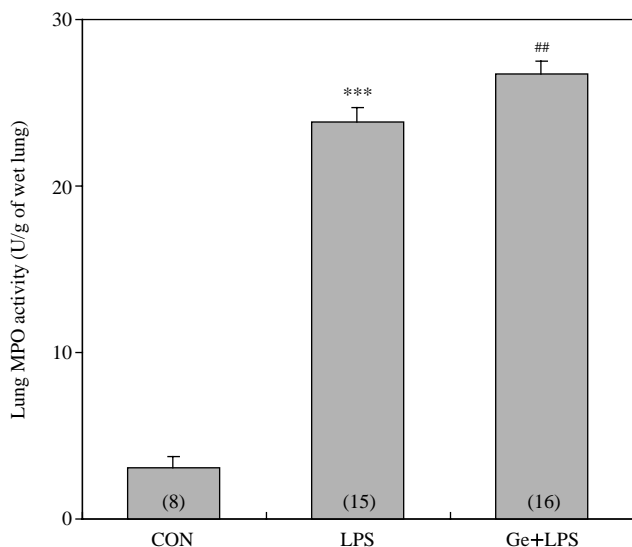


Fig. 4. Changes of myeloperoxidase (MPO) activity in the lung tissue. Comparing with control rats, LPS-treated rats had significantly increased ($p < 0.001$) MPO activity. In the same manner, pretreatment group of germanium had increased ($p < 0.05$) MPO activity compared with that of LPS-treated rats. Each values are given as mean \pm S.E.. The number of experiments is in the parentheses. *** $p < 0.001$: significantly different from CON; ## $p < 0.05$: significantly different from LPS; CON: Saline-treated Control group; LPS: Lipopolysaccharide-treated group; Ge+LPS: Germanium was treated prior to Lipopolysaccharide.

지고 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 크기도 대조군과 유사하게 관찰되고, 혈관 주위의 부종과 폐포강 내 출혈이 내독소 투여군에 비해 상당히 감소한 형태를 보였다 (Fig. 7).

2) PAM 염색 (periodic acid methenamine stain)

대조군의 정상적인 폐조직 내 기저막은 폐포 중격 또는 모세혈관 가장자리 주변에서 아주 뚜렷한 양성 반응을 보였다 (Fig. 8). 내독소 투여군의 폐포강이 소실된 폐조직 내에서는 양성반응을 거의 볼 수 없었으며, 국소적인 부분에서만 양성반응을 보였다 (Fig. 9). 게르마늄 전처리군은 대조군과 유사하게 폐포 중격 또는 모세혈관 가장자리 주변에서 양성 반응을 보였다 (Fig. 10).

7. 전자현미경을 이용한 폐조직의 미세구조변화의 관찰

대조군의 폐조직은 내피세포, 제I형 폐포세포, 기저판으로 구성된 폐포-모세혈관 장벽이 정상적으로 보존되어 있었고 (Fig. 11a), 제II형 폐포세포 내 lamellar body와 제II형 폐포

세포 가장자리의 미세융모도 정상적으로 관찰되었다. 폐포강은 뚜렷하고 깨끗하게 보였다 (Fig. 11b).

내독소 투여군에서 내피세포, 제I형 폐포세포, 기저판으로 구성된 폐포-모세혈관 장벽은 부종에 의해 손상을 받은 모습으로 관찰되었고, 손상 부위의 기저판 구조는 뚜렷하지 않았으며, 폐포 세포 내 큰 공포도 관찰되었다 (Fig. 12a). 부종현상이 관찰되는 제I형 폐포세포 내에는 세포막의 수포현상 (blebbing)이 나타났다 (Fig. 12b). 혈관 내에서는 인접 세포막에 부착된 호중구 집단과 유주되고 있는 호중구가 관찰되었다 (Fig. 12c). 제II형 폐포세포는 큰 공포를 형성함과 동시에 괴사현상이 관찰되었다 (Fig. 12d).

게르마늄 전처리군은 내피세포, 제I형 폐포세포, 기저판으로 구성된 폐포-모세혈관 장벽의 구조가 비교적 잘 보존된 상태로 관찰되었고, 제I형 폐포세포와 세포간질의 부종현상은 내독소 투여군에 비해 그 정도가 두드러지게 감소하였다 (Fig. 13a). 제II형 폐포세포의 Lamellar body와 미세융모 그리고 기저판의 구조도 비교적 정상적으로 관찰되었다 (Fig. 13b).

고 찰

주로 폐혈증후군에 동반되는 (Montgomery et al., 1985) ARDS는 폐포-모세혈관 장벽의 파괴로부터 기인하여 이 상상으로 인해 폐포-모세혈관 장벽의 투과성이 증가되고 단백질 성분이 풍부한 삼출액이 폐포 내로 다량 유입되어 폐부종이 발생하게 되며 (Ware & Matthay, 2000), 폐포 상피세포 중 하나인 제II형 폐포세포의 손상으로 폐포 표면의 계면활성제 생성에 장애를 일으켜 호흡부전의 결과가 초래되는 질환이다 (pittet et al., 1997). ARDS가 유도된 실험동물에게서 얻어진 기관지폐포세척액 내에는 사이토카인, 반응성 산소기, 류코트리엔, 활성화 보체 등 염증 매개 물질들과 급성 염증세포인 호중구가 전체 세포의 80%를 차지할 정도로 증가하며 (Baughman et al., 1996), 현미경적 소견 상에서는 호중구 유주인자에 의해 폐조직 내로 이동한 호중구의 침윤 또한 관찰되는데 (Smith et al., 1991; pittet et al., 1997), 활성화된 호중구에서 분비된 여러 종류의 단백질 분해효소와 아라키돈산 대사물, 활성산소기 등에 의해 폐포-모세혈관 장벽의 손상이 초래되고, 이로 인해 폐부종을 비롯한 호흡부전 현상이 일어나게 된다 (Tate & Repine, 1983).

본 실험에서는 항염증물질 (Sasaki et al., 1984; Dimartino et al., 1986)로도 알려진 게르마늄을 ARDS 발병 전에 투여함으로써 폐포강 내로의 호중구 유주를 억제하여 폐포-모세혈관 장벽의 손상을 완화시킬 수 있을지 알아보았다.

실험에 앞서 생체에 독성이 미치지 않는 유기 게르마늄의 적정 투여량을 알아보기 위해 사람의 일반적인 게르마

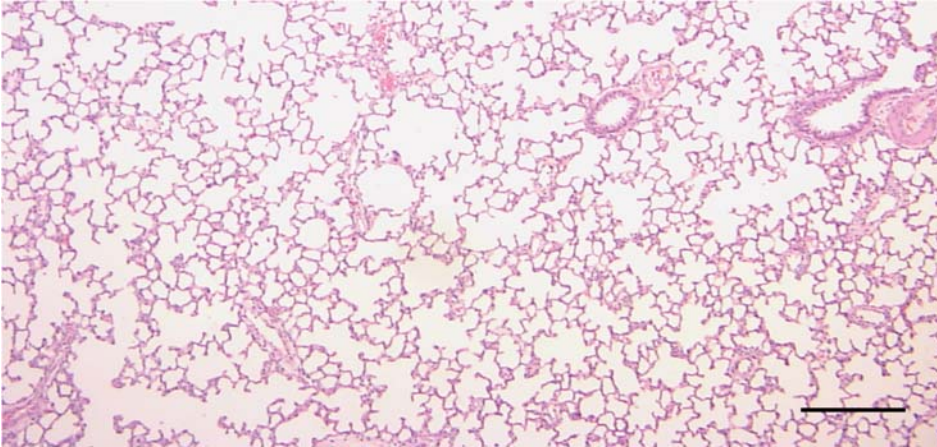


Fig. 5. Light microscopic findings of the lung in control rats stained with hematoxylin-eosin. In control rat's lung, the normal pulmonary architectures such as alveolar septa, alveolar lumen and capillaries were well preserved (scale bar=250 μ m).

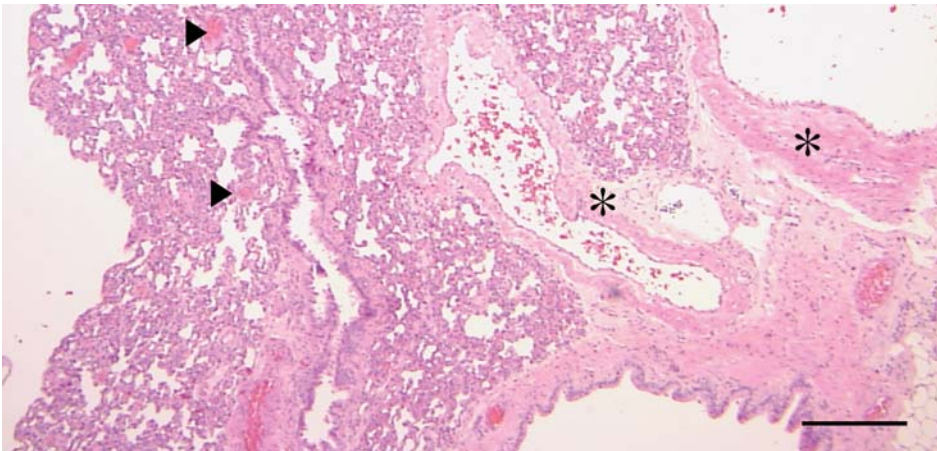


Fig. 6. Histopathologic changes of the lung in LPS-treated rats stained with hematoxylin-eosin. In LPS-treated rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were not preserved. Perivascular edema (*) and intrapulmonary hemorrhage (arrow head) were observed (scale bar=250 μ m).

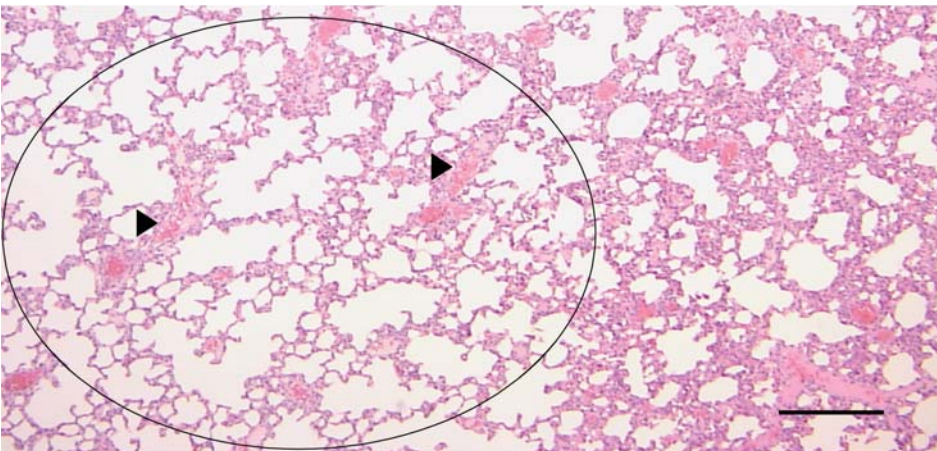


Fig. 7. Histopathologic changes of the lung in germanium-pretreated rats stained with hematoxylin-eosin. In germanium-pretreated rat's lung, alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved (circle). Intrapulmonary hemorrhage (arrow head) was less prominent compared with the lungs of LPS-treated rat. Edema of alveolar epithelia were observed locally (scale bar=250 μ m).

높 섭취량을 실험동물의 체중비로 환산하여 투여한 후 게르마늄의 양적 독성을 확인하였다. 간 기능 이상을 확인하기 위해 GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase)를, 신장 기능 이상을 확인하기 위해 BUN (Blood urea nitrogen), 크레아티닌 (creatinine) 수치를

측정한 결과 GOT 항목에서 게르마늄 6시간 처리군을 제외한 모든 군이 정상수치보다 약간 높게 나타났으나, 대부분의 항목에서 대조군과 실험군이 정상수치를 나타내어 실험동물에 투여한 게르마늄은 양적으로 전혀 독성이 없다고 판단되었다.

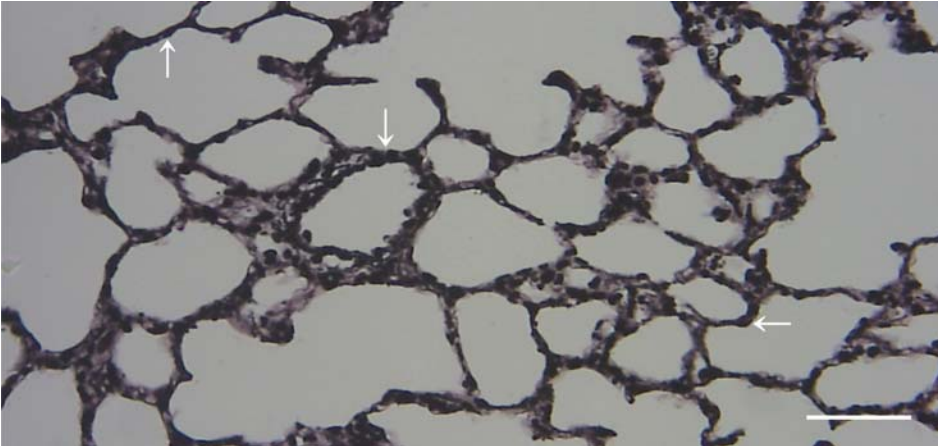


Fig. 8. Histologic findings of basement membrane in the lung tissue of control rats stained with periodic acid methenamine (PAM). In control rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were well preserved. Thin black lines of basement membranes (arrow) were well shown clearly (scale bar=50 μ m).

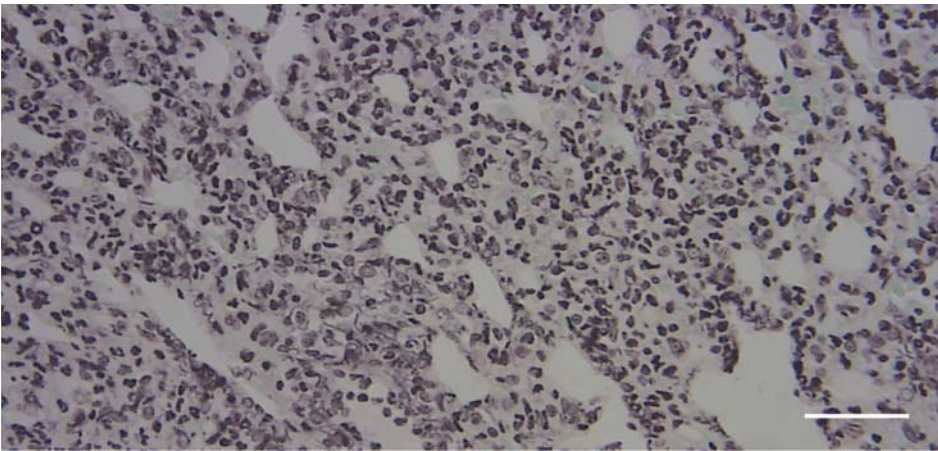


Fig. 9. Histopathologic changes of basement membrane in the lung tissue of LPS-treated rats stained with periodic acid methenamine (PAM). In LPS-treated rat's lung, the pulmonary architectures such as alveolar septa and alveolar lumen were not preserved. Thin black lines of basement membranes were not shown (scale bar=50 μ m).

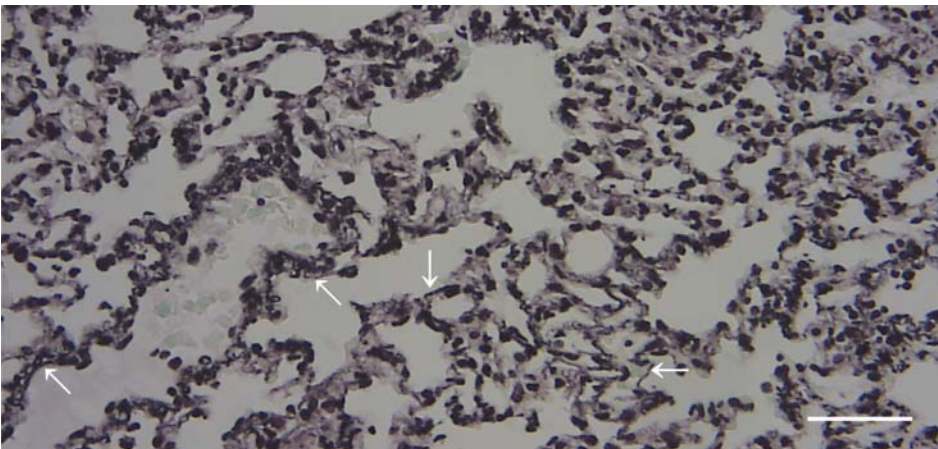


Fig. 10. Histopathologic changes of basement membrane in the lung tissue of germanium-pretreated rats stained with periodic acid methenamine (PAM). In germanium-pretreated rat's lung, alveolar septa and alveolar lumen were relatively well preserved. Thin black lines of basement membranes (arrow) were well shown partially (scale bar=50 μ m).

본 실험 결과 내독소의 주입으로 유도된 급성 폐손상에서 폐부종과 기관지폐세척액 내 단백질 함량, 호중구의 침윤은 게르마늄을 전처리함으로써 유의하게 감소하였다. 이것은 내독소로 유도된 호중구의 폐포강 내 유주현상이 게르마늄의 작용으로 억제되어 폐포-모세혈관 장벽의 손상이

감소된 것으로 사료된다. 그러나 폐조직 내 Myeloperoxidase (MPO) 활성도는 오히려 내독소 투여군보다 게르마늄 전처리군에서 약간 높게 나타났는데, 이것은 폐조직 내 MPO 활성도가 폐포강 내로 이주한 호중구뿐만 아니라 혈관 내에 존재하는 호중구도 포함되어 측정되었기 때문인 것으로 추

측된다. Goldblum et al. (1985), Martin et al. (1989)은 혈관 내에 존재하는 호중구는 일시적으로 폐에 축적되어 폐손상에는 관여하지 않는다고 하였으므로 게르마늄 전처리군에서 MPO의 활성도 증가는 폐손상과 무관하다고 판단된다. 그리고 광학현미경, 전자현미경을 이용한 미세구조의 변화 관찰은 게르마늄의 전처리에 의해 폐포-모세혈관 장벽의 손상이 감소함으로써 폐손상이 완화됨을 형태적으로 보여주었다. 내독소 투여군에서는 대부분의 폐포강이 소실, 혈관주위의 부종, 폐포강 내 출혈, 기저막 소실 등으로 심각한 무기폐 현상이 초래되었음을 확인할 수 있었고, 제I형 폐포세포의 수포현상(blebbing)과 폐포 충격의 파괴 및 부종, 폐포-모세혈관 장벽의 부종, 그리고 제II형 폐포세포의 괴사현상으로 폐포-모세혈관 장벽의 파괴와 계면활성제의 생성장애에 의해 호흡부전이 일어났음을 충분히 알 수 있었다. 이에 반해 게르마늄 전처리군에서는 내피세포, 제I형 폐포세포, 기저판으로 구성된 폐포-모세혈관 장벽의 구조가 비교적 잘 보존되어 내독소 투여군에 비해 부종현상의 정도가 두드러지게 감소하였으며, 제II형 폐포세포의 Lamellar body와 미세용모 그리고 기저판의 구조도 비교적 정상적으로 보존되어 게르마늄의 효과로 폐손상이 감소하였다고 판단되었다.

그러므로 게르마늄은 항염증물질로 작용하여 호중구의 폐조직 내로의 유주현상을 방해하여 활성화된 호중구의 독성물질로 인한 폐포-모세혈관의 손상을 감소시켜 내독소로 유도된 폐손상은 게르마늄의 전처리에 의해 억제되었다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Abraham E: Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 31(4 Suppl) : S195-199, 2003.
- Asai K: Miracle cure organic germanium. Japan Pub. Inc, pp. 17-25, 1976a.
- Asai K: On the medical properties of germanium. ASAI germanium Research Institute, Tokyo, Japan, pp. 1-6, 1976b.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Goldblum SE, Wu KM, Jay M: Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 59(6) : 1978-1985, 1985.
- 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), pp. 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.
- Martin TR, Pistoresse BP, Chi EY, Goodman RB, Matthay MA: Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J Clin Invest* 84(5) : 1609-1619, 1989.
- 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.
- Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD: Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132(3) : 485-489, 1985.
- 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, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA: Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 155(4) : 1187-205, 1997.
- Sasaki K, Ishikawa M, Monma K, Takanayaki 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.
- Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA: Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 72(1) : 65-72, 1991.
- 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) : 419-26, 1992.

- 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.
- Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W: Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J Lipid Mediat* 8(1) : 1-30, 1993.
- 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.

< 국문 초록 >

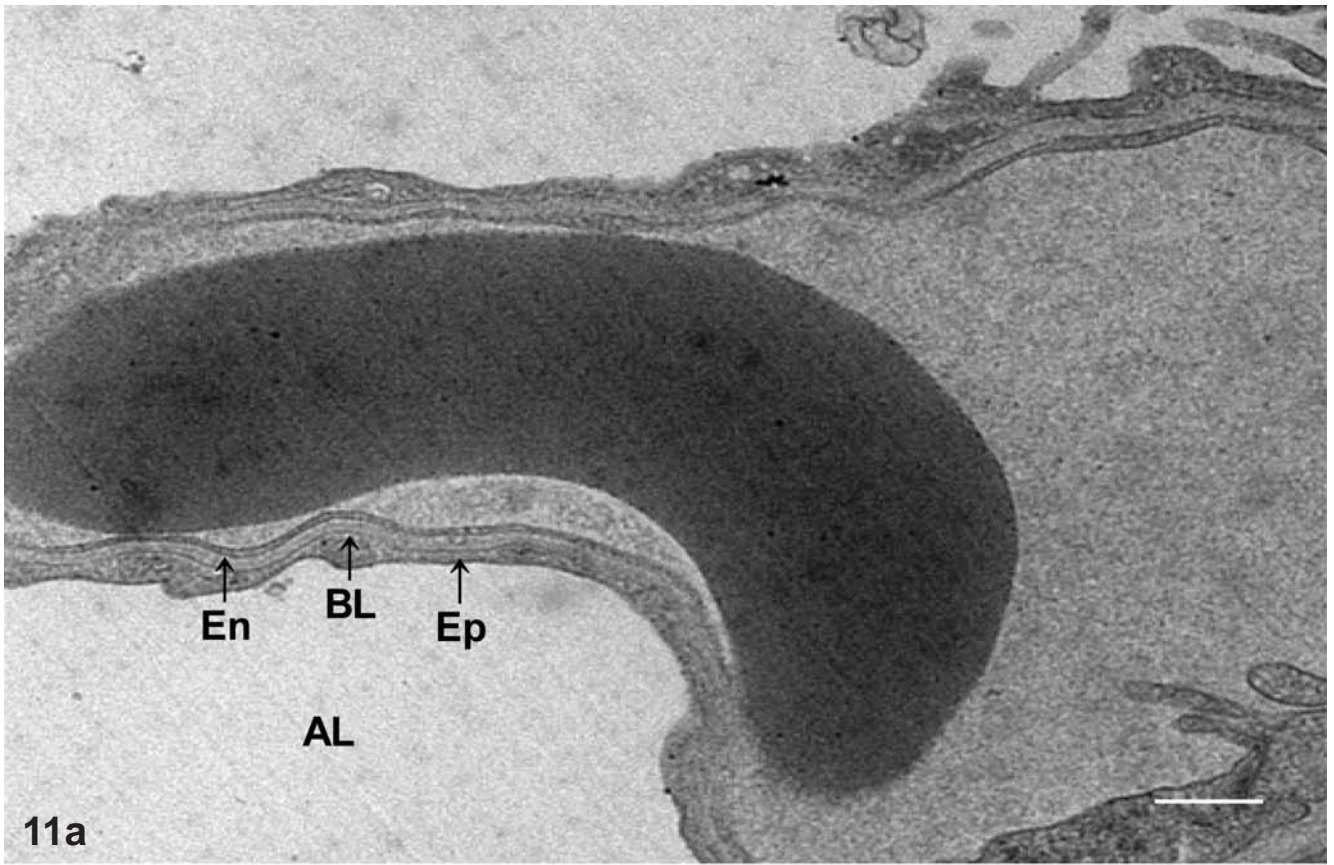
급성호흡곤란증후군은 다양한 원인에 의해 발생하는 급성 염증성 폐질환으로써 폐포-모세혈관 장벽의 파괴로부터 기인하며 파괴 기전에 호중구가 중요한 역할을 담당한다. 이에 대한 게르마늄의 항염증 효과 즉, 호중구의 폐조직 내 유주 억제로 인한 폐포-모세혈관의 손상의 감소로 폐손상이 경감되는지를 확인하고자 하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 대조군(CON), 내독소 5시간 투여군(LPS), 그리고 게르마늄 1시간 전처리 후 내독소 5시간 투여군(Ge+LPS)으로 나누었으며, 내독소는 100 µg을 0.5 mL 생리식염수에 녹여 기도내로 분무하고, 게르마늄은 체중 100 g당 26 mg을 복강으로 투여하였다. 내독소의 주입으로 급성 폐손상을 유도시킨 내독소 투여군에서는 대조군과 비교하여 폐부종($p < 0.001$), 기관지폐세척액 내 단백질 함량($p < 0.05$), 호중구의 침윤($p < 0.001$)이 현저히 증가하였으나 게르마늄을 전처리한 군은 내독소 투여군과 비교하여 모든 항목에서 유의하게 감소하였다. 현미경을 통한 관찰 결과에서도 게르마늄 전처리군은 내독소 투여군에 비해 내피세포, 제I형 폐포세포, 기저판으로 구성된 폐포-혈관장벽의 구조가 비교적 잘 보존되었고, 제II형 폐포세포의 Lamellar body와 미세용모 그리고 기저판의 구조도 비교적 정상적으로 보존된 상태로 나타났다. 그러므로 게르마늄은 항염증물질로 작용, 즉 호중구의 폐조직 내로의 유주현상을 방해하여 활성화된 호중구의 독성물질로 인한 폐포-모세혈관의 손상을 감소시킬 수 있었으므로 결과적으로 내독소로 유도된 폐손상은 게르마늄의 전처리에 의해 억제되었다고 판단된다.

FIGURE LEGENDS

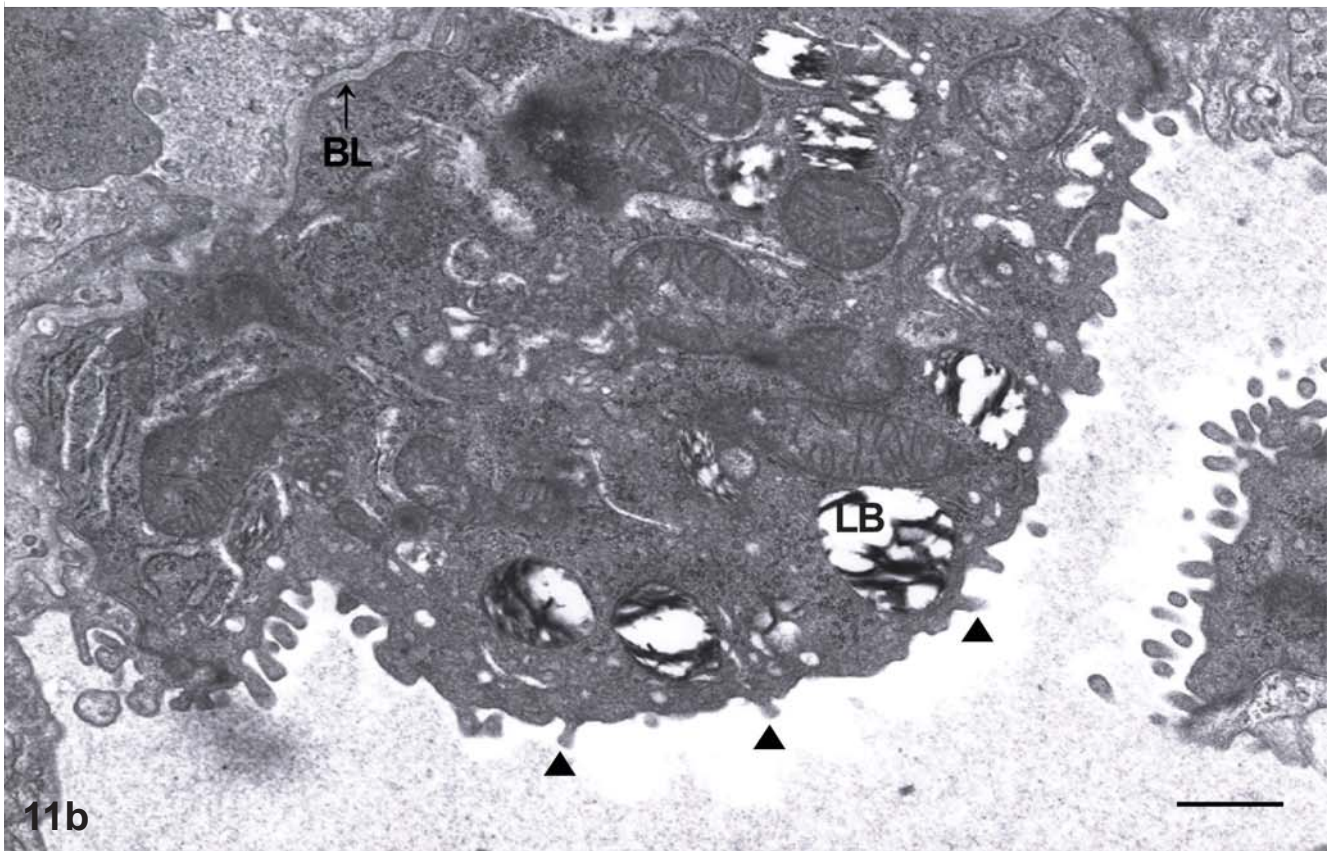
Fig. 11. Representative electron microscopic images from the lung in control rats stained with Uranyl acetate and lead citrate. The alveolar-capillary barrier consisted of endothelial cell (En), alveolar type I cell (Ep) and basal lamina (BL) was well preserved. Alveolar lumen (AL) was shown clearly (11a, scale bar=3.3 µm). Lamellar bodies (LB) of alveolar type II cell were well preserved and microvillies (arrow head) were shown clearly. Basal lamina (BL) was intact (11b, scale bar=1.6 µm).

Fig. 12. Representative electron microscopic images from the lung in LPS-treated rats stained with Uranyl acetate and lead citrate. The alveolar-capillary barrier consisted of endothelial cell (En), alveolar type I cell (Ep) and basal lamina (BL) was injured with edema (*). And basal lamina structure were not clearly (12a, scale bar=1.6 µm). Alveolar type I cells were injured with edema, which showed blebbing of membrane (#). and edema (*) were observed between basal lamina and endothelial cell, and basal lamina structure were not clearly at a region of edema (*) (12b, scale bar=0.67 µm). Vascular neutrophils (Np) adhered to adjacent cell membranes in vascular lumen (12c, scale bar=5 µm). Necrosis of alveolar type II cells (AM) and giant vacuoles (*) in the cytoplasm of the alveolar type II cell were noted. Alveolar lumen (AL) was not clear (12d, scale bar=2 µm).

Fig. 13. Representative electron microscopic images from the lung in germanium-pretreated rats stained with Uranyl acetate and lead citrate. The alveolar-capillary barrier consisted of endothelial cell, alveolar type I cell and basal lamina was relatively preserved. Interstitial edema were observed but it was less prominent compared with LPS-treated rat's lung (13a, scale bar=14.3 µm). Lamellar bodies (LB) and microvillies (arrow head) of alveolar type II cell (AM) were relatively preserved. Basal lamina (BL) was intact compared with LPS-treated rat's lung (13b, scale bar=2 µm).



11a



11b

