

## 장의 허혈-재관류로 유도된 급성 폐손상에서 아스피린의 작용

박 윤 엽\*

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Received May 7, 2009 / Accepted May 14, 2009

**Effect of Aspirin on the Acute Lung Injury Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion.** Yoon-Yub Park\*. *Department of Physiology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea* - The mechanisms responsible for ischemia/reperfusion (I/R) injury have direct or indirect relevance to clinical lung injury after severe shock, cardiopulmonary bypass, and transplantation. This study investigated the effects of aspirin on intestinal I/R-induced acute lung injury (ALI) in rats. Lipopolysaccharide (LPS) induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in A549 and RAW264.7 cells. RAW264.7 macrophages had shown greater expression of COX-2 than A549 cells. In addition, the NADPH oxidase inhibitor apocynin and p38 MAPK inhibitor SB203580 attenuated LPS-stimulated COX-2 expression. To induce ALI, intestinal ischemia was performed for 60 min prior to the 4 hr reperfusion by clamping the superior mesenteric artery in Sprague-Dawley rats. In order to test and compare the effect of non-specific COX inhibitor aspirin with the effect of mepacrine, a well known phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, rats were divided into 4 groups: Sham, I/R, Mepa+I/R (mepacrine, 60 mg/kg, i.p.), ASA+I/R (aspirin, 10 mg/kg, i.p.). In the present investigation, myeloperoxidase activities in the lung and intestinal tissues were increased by I/R. These changes were reduced by single pretreatment of mepacrine (60 mg/kg, i.p.) or aspirin (10 mg/kg, i.p.) 30 min before I/R. Structural studies demonstrated that the tissue injuries in the lung and intestine after I/R were also attenuated by the pretreatment of mepacrine or aspirin. These results suggest that I/R-induced ALI is mediated, in part, by the activation of COX. In addition, pretreatment of aspirin might be helpful for the prevention of ALI in ARDS-prone patients. In addition, the p38 MAPK inhibitor and apocynin also might be helpful to ALI through the inhibition of COX-2 expression.

**Key words :** Aspirin, cyclooxygenase-2, acute lung injury, ischemia-reperfusion injury

### 서 론

급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 위 내용물의 흡인, 폐 좌상, 독성가스 흡입, 심한 폐혈증, 출혈성 쇼크, 허혈-재관류 손상과 같은 다양한 원인으로 폐장내 모세혈관이 손상되어 급성 폐부종을 유발하는 심한 염증성 질환이다[2,5]. ARDS는 폐포막과 폐모세혈관이 손상에 따른 혈관 투과도 증가로 혈중의 단백질이 폐포 내로 빠져 나오는 것이 특징인데, 최근까지도 확실한 치료법이 개발되지 않아서 사망률이 매우 높은 질환이다[35].

급성 폐손상은 전신성 염증반응의 결과로 일어나는데 이는 염증유발 전구물질의 분비를 자극하여 국소적 조직손상을 초래한다고 한다[29]. 조직에서의 허혈-재관류(ischemia/reperfusion)에 의한 폐손상도 많은 문제를 야기하는데 임상적으로는 주로 심한 쇼크, 심폐관류(cardiopulmonary bypass) 및 폐 또는 장기이식 수술에 직간접적으로 관련되어 있다[28]. 이는 조직에서 xanthine dehydrogenase가 xanthine oxygenase로 변화되어 생성되는 산소기[30], phospholipase A<sub>2</sub> [15]

및 platelet activating factor [16] 등이 관련되어 있다고 한다. 그러므로 발병기전이나 주요 원인 물질은 다양하지만 궁극적으로는 염증반응이 폐손상을 일으키는 중요한 과정임을 시사하고 있다.

비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs)로 널리 사용되고 있는 아스피린(aspirin, acetylsalicylic acid)은 cyclooxygenase (COX)를 아세틸화시켜 아라키돈산에서 prostaglandin의 생성을 억제한다[32]. 이는 염증과정에 필요한 효소인 nuclear transcription factor kappa B 혹은 activator protein 1의 효과를 억제한다고 한다[1]. 그러므로 아스피린이 산화성스트레스로 발생하는 과산화수소로부터 세포를 보호하는 효과를 나타내는데, 다양한 조건의 연구에서 아스피린이 산화성스트레스로 인한 급성 폐손상을 방지 또는 감소시킨다고 보고되었다[22,33].

한편 최근 몇 건의 보고에 의하면, NADPH oxidase 억제작용 및 항산화작용을 나타내는 apocynin과 염증반응에 관여하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 하나인 p38 MAPK도 COX-2의 발현에 관계한다고 한다[4,27]. 그러나 대부분의 보고에서는 염증세포를 대상으로 하였고, 실제 손상을 받게 되는 상피세포에서의 COX-2 발현에 대해서는 보고가 많지 않은 실정이다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4475, Fax : +82-53-621-4106

E-mail : yypark@cu.ac.kr

이러한 관점에서 허혈-재관류에 의해 유도된 급성 폐손상의 기전을 알아보기 위하여 기존에 연구결과가 많이 알려진 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 억제제인 mepacrine과 비특이성 COX 억제제인 아스피린의 효과를 동물모델에서 비교해보고, 급성 폐손상에 관여할 것으로 여겨지는 대식세포 RAW264.7 과 급성 폐손상시 염증성 반응이 직접 일어나는 기도 상피세포인 A549 세포에서 COX-2의 발현을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험동물의 마취제로 사용한 Enflurane은 일성신약주식회사, Xylazine은 Haver (New York, NY, USA) 제품을 이용하였다. 세포배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)-low glucose 배지, fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin은 GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA)에서, p38 MAPK 억제제인 SB203580은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, COX-2 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, 기타 실험 재료는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 세포배양 및 Lipopolysaccharide (LPS)에 의한 COX-2 단백질 분석

실험에 사용한 A549 세포와 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection에서 구입하였다. 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 DMEM-low glucose 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 24시간 동안 배양하였으며 2~3일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 배지를 제거한 세포를 PBS로 씻은 다음 각 세포를 2x10<sup>5</sup> cells/ml로 분주한 뒤 세포의 염증반응을 유발하는 LPS에 의한 COX-2 단백질 발현을 보기위하여 0, 0.1, 1 및 2 µg/ml 농도의 LPS를 12시간 동안 처리하여 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 세포를 scraper로 긁어모아 4°C, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하고 IPH lysis buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 100 mM PMSF, leupeptin 1 mg/ml, Aprotinin 1 mg/ml, 1 M DTT]로 현탁시켰다. 4°C에서 30분 동안 현탁시킨 세포를 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 단백질을 분리하였다. 추출한 단백질은 정량하여 DTT가 첨가된 2xSDS-loading buffer [Tris-Cl (pH 6.8) 100 mM, glycerol 20%, bromophenol blue 0.2%, SDS 4%, dithiothreitol 200 mM]와 섞어 98°C에서 5분간 가열 후 10% SDS-PAGE gel로 전기영동하여 Immobilon-P-membrane (Milipore, USA)에 transfer 시켰다. Membrane은 COX-2 일차항체와 반응시키고 anti-rabbit 이차항체와 반응시

켰다. 항체들에 대한 발현분석은 Horseradish Peroxidase-linked 이차항체에 의해 발현되는 ECL Western Blot Analysis 시스템을 이용하여 결과를 얻었다.

### 실험동물 그룹

실험동물은 체중 260~300 g 정도의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐를 사용하였다. 실험군은 각각 정상군(Sham), 허혈-재관류 처치군(I/R), mepacrine을 전처치한 허혈-재관류 처치군(Mepa+I/R) 및 아스피린을 전처치한 허혈-재관류 처치군(ASA+I/R)으로 분류하였다. 정상군은 허혈-재관류 처치군과 동일하게 수술하되 복부절개만 시행하였고, 나머지군은 허혈-재관류 처치군과 동일하게 처리하였다. Mepacrine (60 mg/kg) 및 아스피린(10 mg/kg)은 허혈-재관류 처치 30분 전에 복강 내로 주사하였다.

### 쥐에서 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상의 유도

장의 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상을 유도하기 위하여 ketamine (80 mg/kg)과 xylazine (16 mg/kg)을 복강 내로 주사하여 마취한 후 개복술을 시행하여 bulldog 클램프를 이용하여 1시간 동안 상장간막동맥(superior mesenteric artery)의 혈류를 차단하였다. 그 후 클램프를 풀고 4시간 동안 재관류(reperfusion)시켜 급성 폐손상을 유발하였다.

### 소장 및 폐장 조직의 myeloperoxidase 활성도 측정

호중구의 장관 및 폐장 조직 내 침윤 정도를 알아보기 위하여 Goldblum 등[11]의 방법에 따라 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 측정하였다.

실험동물을 마취한 뒤, 양측 폐장 및 소장 일부를 절제하고 액체질소로 급속냉각 후 -70°C에 보관하였다. MPO 활성도를 측정하기 위해, 4.0 ml의 20 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.4)에 조직을 녹인 후 Polytron PT 1200 homogenizer (Kinematica AG, Swizerland)를 이용하여 조직을 분쇄하여 균질액을 만든 뒤 18,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리(Beckman, J2-M1 high Speed centrifuge, USA) 하였다. 그 후 상등액은 제거하고 침전물에 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (50 mM potassium phosphate, pH 6.0) 4.0 ml를 첨가한 후 90초간 sonication (Vibracell, Sonics & Material Inc, USA)하였다. 이후 60°C의 항온수조에서 2시간 반응시켜 조직 내에 있는 MPO 분해효소를 불활성화 시킨 후 폐장 분쇄액 1.0 ml를 4°C, 20,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액 0.1 ml를 취하여 o-dianisidine이 함유된 500 µM 과산화수소 용액 2.9 ml와 반응시키고 시간에 따른 흡광도의 변화(dA/dt)를 460 nm에서 측정하였다. MPO 활성도(U/g of wet tissue)는 측정된 흡광도 변화를 조직의 무게로 나누고 이 값에 13.5를 곱하여 구하였다.

소장 및 폐장 조직의 형태학적인 관찰

장관 및 폐장 조직의 손상을 확인하기 위하여 실험동물을 충분히 마취한 뒤, 양측 폐장 및 소장 일부를 절제하고 10% 포르말린 용액에 담근 다음 조직을 박절하고 hematoxyline-eosin 용액으로 염색 후 검경하였다.

통계처리

모든 성적은 평균±표준오차로 표시하였고, 각 성적의 유의성은 ANOVA test 후에 Student-Newman-Keuls multiple comparison test를 이용하여 p 값이 0.05보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

LPS에 의한 COX-2의 발현 증가

LPS 처리 농도가 증가할수록 COX-2의 발현이 증가하였는데, 염증성 세포인 RAW264.7 세포에서 더 많이 증가하였다 (Fig. 1). LPS 처리 시간에 따른 변화도 상피세포인 A549 세포가 RAW264.7 세포보다 발현량의 증가가 미미하였다. RAW264.7 세포에서 LPS 2 µg/ml로 처리 시 9시간에 발현량이 가장 많았으며 이후 감소하였다(Fig. 2).

장의 허혈-재관류에 따른 조직의 염증성 호중구 증가

장의 허혈-재관류에 따른 조직내 염증성 호중구의 침윤 정도를 알아보기 위하여 MPO 활성도를 측정하였다. 허혈-재관

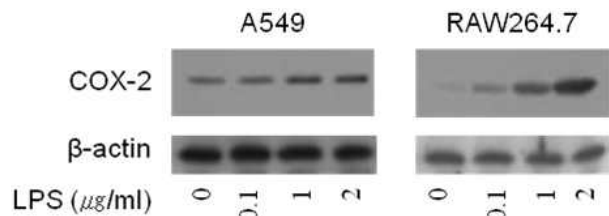


Fig. 1. (LPS). A549 and RAW264.7 cells were treated with various concentrations of LPS. The expression of β-actin in cell lysates was used as a control.

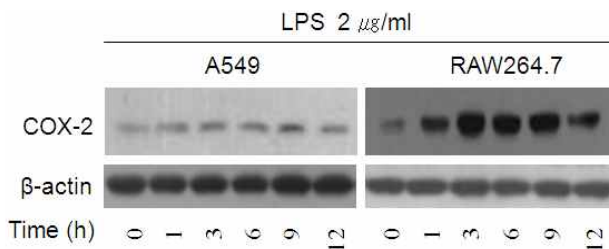


Fig. 2. LPS-stimulated cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. A549 and RAW264.7 cells were incubated for indicated times with 2 µg/ml of LPS. The expression of β-actin in cell lysates was used as a control.

류 처치군의 폐장(26.34±2.69)은 정상군(12.75±0.10 U/g of wet lung)에 비해 유의하게 증가하였으며, mepacrine(18.90±0.69) 및 아스피린 전처리 시(17.41±1.23 U/g of wet lung) 허혈-재관류 처치군의 폐장에 비해 MPO 활성도가 현저히 둔화되었다(Fig. 3). 소장 조직의 MPO 활성도도 폐장 조직의 MPO 결과와 비슷한 양상을 나타내었는데, 허혈-재관류 처치군의 소장 조직(3.46±0.81)은 정상군(0.93±0.06 U/g of wet intestine)에 비해 유의하게 증가하였다. 폐장 조직의 결과와는 달리 mepacrine 전처리 시에는 2.78±0.75, 아스피린 처치 시에는 2.38±0.30(U/g of wet intestine)로 통계적인 유의성은 없으나 MPO 활성도가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

장의 허혈-재관류에 따른 조직의 형태학적인 변화

조직의 손상정도를 확인하기 위하여 광학현미경으로 검경한 결과 폐장 및 소장조직은 허혈-재관류에 의한 조직 손상과 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, mepacrine과 아스피린 전처리한 군에서는 조직 손상정도가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5, 6).

NADPH oxidase와 p38 MAPK의 COX-2 발현 조절

COX-2 발현에 관여한다고 알려진 NADPH oxidase 억제제인 apocynin과 p38 MAPK 억제제인 SB203580은 COX-2 발현을 억제시켰는데, RAW264.7 세포에서 더 크게 억제되었다 (Fig. 7).

고 찰

ARDS는 병인과 발병기전이 매우 다양하여 염증 조절기전

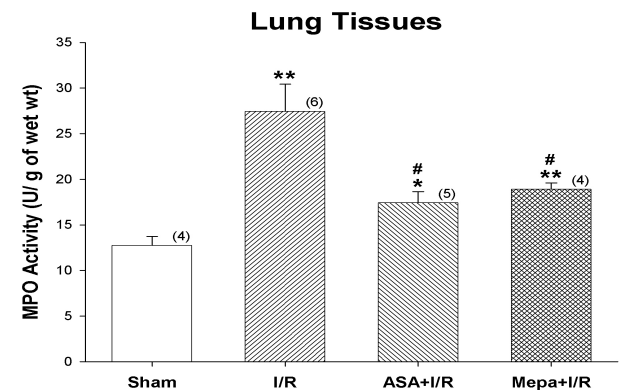


Fig. 3. Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) increased lung tissue myeloperoxidase (MPO) activities. These changes were decreased by the pretreatment of aspirin (ASA+I/R; 10 mg/kg, i.p.) or mepacrine (Mepa+I/R; 60 mg/kg, i.p.) significantly. The data shown are the means±S.E.M. for the number of determinations shown in the parenthesis. \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with Sham, #p<0.05, compared with I/R.

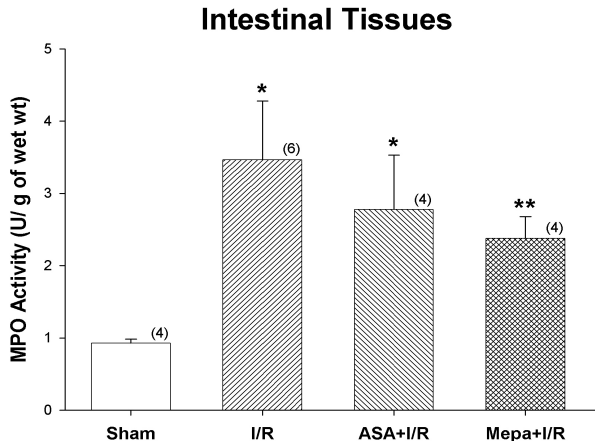


Fig. 4. Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) increased intestinal tissue myeloperoxidase (MPO) activities. These changes were decreased by the pretreatment of aspirin (ASA+I/R; 10 mg/kg, i.p.) or mepacrine (Mepa+I/R; 60 mg/kg, i.p.) but not significantly. The data shown are the means±S.E.M. for the number of determinations shown in the parenthesis. \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with Sham.

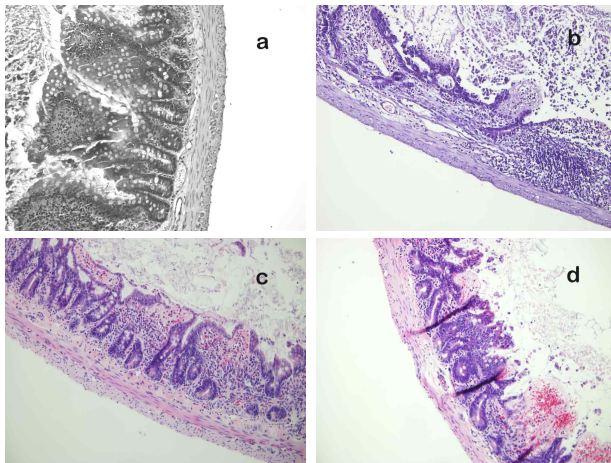


Fig. 5. Effects of aspirin (10 mg/kg, i.p.) and mepacrine (60 mg/kg, i.p.) pretreatment on the intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury of intestinal tissues (original mag. X200). Comparing with the Sham (a), villous necrosis, epithelial destruction, and infiltration of inflammatory cells into the villi were seen after I/R (b). Aspirin (c) or mepacrine (d) pretreatment attenuated the changes.

의 이해를 통한 다양한 치료제 개발에 관심을 쏟고 있다. ARDS의 주된 병리학적 소견이 나타나는 조직의 상피세포인 A549 세포와 염증반응에 관여하는 대식세포인 RAW264.7 세포에 급성 폐손상을 유발하는 내독소의 일종인 LPS를 처치했을 때 COX-2가 증가한 결과는 다른 연구자들의 결과[19,27]와 같다. 염증 반응시 COX-2가 증가하는 것은 산 흡입[8]이나 급성 염증 시[25]에 볼 수 있는 현상과 일치하는 것으로 초기

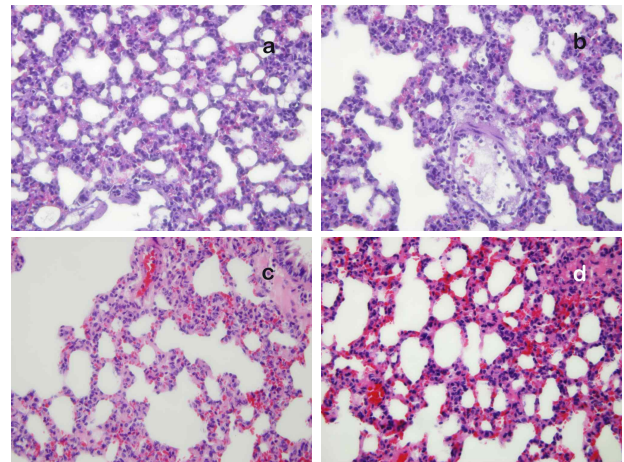


Fig. 6. Effects of aspirin (10 mg/kg, i.p.) and mepacrine (60 mg/kg, i.p.) pretreatment on the intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury of lung tissues (original mag. X400). Comparing with the Sham (a), diffuse emphysematous change, alveolar protein sequestration, and leukocyte infiltration in the alveolar lumen were seen after I/R (b). Aspirin (c) or mepacrine (d) pretreatment attenuated the changes.

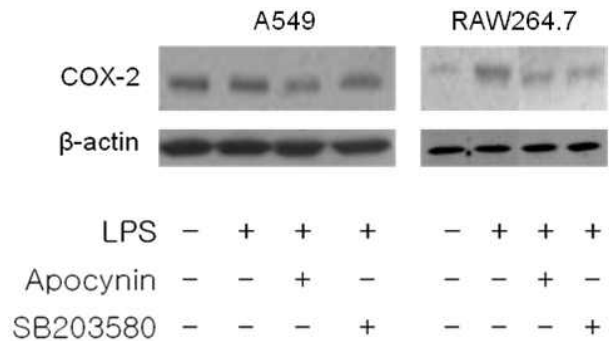


Fig. 7. NADPH oxidase inhibitor (apocynin 300 μM) and p38 MAPK inhibitor (SB203580 10 μM) down-regulated LPS-induced COX-2 expression in A549 and RAW264.7 cells. β-actin was used as an internal control.

염증 반응에 COX-2가 중요한 요인이 되며 이를 차단하는 약제가 치료에 도움이 될 것이라는 것을 시사한다. 더불어 A549 세포보다 RAW264.7 세포에서의 COX-2 발현이 빠르고, 더 크게 나타나는 것으로 보아 두 세포간의 조절기전이나 작용시간이 다르며, 대식세포가 상피세포보다 염증반응 조절에 더 깊게 관여할 것이라고 생각된다.

ARDS시 폐장에 침윤한 호중구는 산소기, 단백분해 효소, 염증성 cytokine을 조직으로 유리하여 급성 폐손상에 관여한다[6]. 염증세포는 호중구 외에도 여러 종류가 있으나 MPO의 현저한 증가는 호중구가 조직에 많이 침윤되었다는 것을 의미한다. 본 실험에서도 내장 허혈-재관류를 시행한 실험군에서 폐장의 MPO 활성도가 유의하게 증가하여 급성 폐손상이 염

증반응에 의해 일어났음을 보여주었다. 허혈-재관류 실험 모델에서 장관조직의 MPO 활성도가 증가한다는 보고[14,38]들이 있는데, 본 실험에서도 동일한 결과를 얻었다. 허혈-재관류를 시행하기 전 mepacrine 또는 아스피린을 전처치한 경우에서 MPO 활성도는 크게 억제되었다. 이와 같은 MPO 활성도의 감소는 이들 약물에 의한 염증작용의 억제 효과로 호중구 침윤이 차단되어 나타난 결과라고 볼 수 있다. 이는 장관 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상이 mepacrine 전처치에 의해 감소되었다는 보고[16,20]와 출혈성 쇼크에서 나타나는 급성 폐손상이 mepacrine 및 아스피린 전처치로 차단되었다는 보고들[21,22]과도 일치한다. 이와 같은 결과로 보아 장의 재관류에 의한 염증성 물질이 혈류를 통해 폐장으로 유입되어 호중구를 집결시키고 폐장에서의 산화성 스트레스를 유발한 것이라고 생각할 수 있겠다.

장관 허혈 및 재관류에 따른 폐장의 조직 손상으로 폐모세혈관 내피세포 손상 및 염증성 백혈구 침윤, 간질 및 폐포 부종, 기관지 주변 출혈 등이 나타난다고 하는데[7], 본 실험에서도 유사한 폐조직 손상 소견이 관찰되었다. Zou 등[38]은 허혈-재관류 시 장관 조직에서 상피세포 손상, 염증세포 침착 등을 보고하였는데, 본 실험 결과에서도 장 융모(villi)의 탈락과 염증세포 침착을 전반적으로 관찰 할 수 있었다. 허혈-재관류에 의한 이상의 조직 손상 소견은 mepacrine이나 아스피린을 전처치 한 군에서 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 그러므로 심한 출혈 및 장 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상에 PLA<sub>2</sub>와 COX-2가 주요 인자가 되며 이를 적절히 차단 또는 조절하는 것이 치료에 도움이 될 것이라는 사실을 보여준다. Wang 등[34]도 cPLA<sub>2</sub>가 p38 MAPK와 COX-2의 조절에 관여하여 염증성 cytokine의 조절에 중요한 역할을 한다고 보고하였다.

급성 폐손상을 유발하는 산화성 스트레스는 심순환계의 중요한 위험인자인데 동맥경화 시에 혈관내피세포를 손상시킨다고 한다[3]. 아스피린은 산화성 스트레스 시 세포를 보호하고 세포질내의 독성 철이온을 제거하므로 혈관 내피세포의 저항성을 증가시켜 항염증 작용을 나타낸다고 한다[24,33]. 저용량의 아스피린은 thromboxane A<sub>2</sub>를 억제하여 혈소판 응집을 감소시키고[17], salicylate는 hydroxyl radical을 제거하는 항산화제로 작용하여 재관류에 의한 심근손상을 줄일 수 있으므로 심근경색의 예방과 재발목적으로 널리 사용되고 있다[31]. 그러나 아스피린 같은 비특이성 COX 억제제는 위궤양이나 신장 및 혈소판 기능저하 같은 부작용이 있어서[18] 최근 선택적 COX-2 억제제가 개발되어 치료용으로 사용되고 있으나 이 또한 몇 가지 부작용을 나타내고 있다. 아스피린은 선택적 COX 억제제와는 달리 COX-2 유전자의 전사를 억제하는 작용을 가지고 있어서 아직 아스피린의 항염증 작용이 다 알려져 있지 않은 실정이다[36,37].

Hartel 등[12]은 염증질환의 치료목적으로 아스피린과 같은 비스테로이드성 항염증제가 널리 사용되고 있지만 용량에 따

라 상반된 작용을 나타낸다고 보고하였는데, 고용량에서는 항염증작용을 나타내지만 저용량에서는 오히려 염증유발성 cytokine의 발현을 증가시킨다고 보고하였다. 최근 많은 연구가 되고 있는 COX-2 억제제를 아스피린 대신 사용할 경우에는 COX-2가 초기에는(2시간) 염증반응을 유발하지만, 나중에는(48시간) 염증을 억제하고 회복에 관여한다는 보고[8-10]를 고려해야 될 것 같다. 그러므로 COX-2를 단순히 억제하는 것은 중요한 문제를 유발할 수 있으므로 COX-2 억제를 통한 항염증작용에 대하여 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

최근의 연구에 의하면 직접적인 COX-2 차단제뿐만 아니라 COX-2 발현에 관여하는 다른 기전으로 작용하는 NADPH oxidase 억제제인 apocynin도 COX-2 발현을 차단하여 급성 염증반응 억제에 효과가 있다고 한다[4,13]. 그리고 p38 MAPK 억제제인 SB203580도 COX-2 발현과 cytokine 생성을 억제하지만[34], 허혈-재관류시의 보호기전을 차단해서 세포 손상을 유발한다는 보고도 있다[26]. 본 실험에서도 apocynin과 SB203580에 의해서 LPS에 의한 COX-2 증가가 둔화된 것으로 나타났는데, 급성염증의 치료목적으로 사용할 수 있는지 알아보기 위해서는 추가적인 실험이 절실하다고 생각된다.

이와 같은 결과를 토대로 살펴보면 허혈-재관류에 따른 급성 폐손상은 일련의 염증성 반응으로 유발되며, 염증반응에 의한 COX-2의 발현은 상피세포보다는 대식세포 같은 염증세포에서의 발현이 더 크게 나타나서 다른 조절기전이 존재하는 것으로 생각된다. 급성 심근경색의 예방 및 재발 목적으로 널리 사용되고 있는 아스피린이 일반적인 항혈전 용량으로도 이와 같은 효과를 나타낼 수 있다고 하므로[23], 아스피린이 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상의 예방목적으로 사용 될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 예방목적이 아닌 치료목적인 아스피린이 효과를 나타낼 수 있을지를 알아보기 위해서는 COX-2의 조절과 연관된 다른 조절기전에 미치는 영향도 고려해야 하므로 더 많은 연구결과가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

급성 폐손상시 아스피린이 나타내는 염증 억제작용의 기전을 이해하기 위하여 쥐에서 장 허혈-재관류에 의한 급성 폐손상을 유발하여 phospholipase A<sub>2</sub> 억제제인 mepacrine과 아스피린의 효과를 비교하였다. 내독소 처치시 A549 세포와 RAW264.7 세포에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현이 증가했는데, RAW264.7 세포의 반응이 더 크게 나타났다. 장의 허혈-재관류에 의해 장관 및 폐장조직에서 myeloperoxidase 활성도가 증가하여 염증성 호중구의 침윤이 증가했음을 보여주었다. 조직 소견상에서도 조직 손상과 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 이는 아스피린 또는 mepacrine 전처치 시 억제되었다.

NADPH oxidase 억제작용이 있는 apocynin과 p38 MAPK 억제제인 SB203580은 A549 세포와 RAW264.7 세포의 LPS에 의한 COX-2 발현을 억제시켰으며 RAW264.7 세포에서 더 크게 억제되었다.

이상의 결과를 통해서 아스피린이 급성 폐손상의 예방 목적으로 사용될 수 있다고 보여지며, RAW264.7 세포와 A549 세포에서 COX-2 발현은 다른 특성을 보여서 다른 조절기전이 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 연구는 2007년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

### References

- Amann, R. and B. A. Peskar. 2002. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur. J. Pharmacol.* **447**, 1-9.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty, and B. E. Levine. 1967. Acute respiratory distress syndrome in adults. *Lancet* **2**, 319-323.
- Awtry, E. H. and J. Loscalzo. 2000. Aspirin. *Circulation* **101**, 1206-1218.
- Barbieri, S. S., V. Cavalca, S. Eligini, M. Brambilla, A. Caiani, E. Tremoli, and S. Colli. 2004. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 156-165.
- Connelly, K. G. and J. E. Repine. 1997. Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Annu. Rev. Med.* **48**, 429-445.
- Delclaux, C., S. Rezaiguia-Delclaux, C. Delacourt, C. Brun-Buisson, C. Lafuma, and A. Harf. 1997. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria induced acute lung injury in rats. *Am J. Physiol.* **273**, L104-L112.
- Dodd-O, J. M. and D. B. Pearse. 2000. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J. Physiol.* **279**, H303-H312.
- Fukunaga, K., P. Kohli, C. Bonnans, L. E. Fredenburgh, and B. D. Levy. 2005. Cyclooxygenase 2 plays a pivotal role in the resolution of acute lung injury. *J. Immunol.* **174**, 5033-5039.
- Gilroy, D. W., A. Tomlinson, and D. A. Willoughby. 1998. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **355**, 211-217.
- Gilroy, D. W., P. R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M. J. Paul-Clark, and D. A. Willoughby. 1999. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* **5**, 698-701.
- Goldblum, S. E., K. M. Wu, and M. Jay. 1991. Lung myeloperoxidase as a measure of leukostasis in rabbit. *J. Appl. Physiol.* **59**, 1978-1985.
- Hartel, C., J. von Puttkamer, F. Gallner, T. Strunk, and C. Schultz. 2004. Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J. Immunol.* **60**, 412-420.
- Hougee, S., A. Hartog, A. Sanders, Y. M. Graus, M. A. Hoijer, J. Garssen, W. B. van den Berg, H. M. van Beuningen, and H. F. Smit. 2006. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **531**, 264-269.
- Ichikawa, H., N. Yoshida, T. Takagi, N. Tomatsuri, K. Katada, Y. Isozaki, K. Uchiyama, Y. Naito, T. Okanou, and T. Yoshikawa. 2004. Lansoprazole ameliorates intestinal mucosal damage induced by ischemia-reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2814-2817.
- Koike, K., E. E. Moore, F. A. Moore, F. J. Kim, V. S. Carl, and A. Banerjee. 1995. Gut phospholipase A2 mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J. Physiol.* **268**, G397-G403.
- Lee, Y. M., Y. -Y. Park, T. Kim, H. G. Cho, Y. J. Lee, and J. E. Repine. 1999. Effect of the inhibition of phospholipase A2 in generation of free radicals in intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **3**, 263-273.
- Lopez-Farre, A., C. Caramelo, A. Esteban, M. L. Alberola, I. Millas, M. Monton, and S. Casado. 1995. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* **91**, 2080-2088.
- Masferrer, J. L., B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, and K. Seibert. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3228-3232.
- Pae, H.-O., S.-O., Jeong, B. S. Koo, H.-Y. Ha, K.-M. Lee, and H.-T. Chung. 2008. Tranilast, an orally active anti-allergic drug, up-regulates the anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression but down-regulates the pro-inflammatory cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 361-365.
- Park, S. D. and Y.-Y. Park. 2006. Changes of serum ferritin in acute lung injury unduced by intestinal ischemia/reperfusion. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **10**, 187-191.
- Park, Y.-Y., B. M. Hybertson, R. M. Wright, M. A. Fini, N. D. Elkins, and J. E. Repine. 2004. Serum ferritin elevation and acute lung injury in rats subjected to hemorrhage: reduction by mepacrine treatment. *Exp. Lung Res.* **30**, 571-584.
- Park, Y.-Y. and Y. M. Lee. 2006. Effects of aspirin on the pathogenesis of acute lung injury in rats subjected to hemorrhage. *Tuberc. Respir. Dis.* **60**, 83-91.
- Patrono, C. 1989. Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 453-458.

24. Podhasky, H. P., A. Abate, T. Polte, S. Oberle, and H. Schroder. 1997. Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress - possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett.* **417**, 349-351.
25. Pouliot, M., C. Gilbert, P. Borgeat, P. E. Poubelle, S. Bourgoin, C. Créminon, J. Maclouf, S. R. McColl, and P. H. Naccache. 1998. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. *FASEB J.* **12**, 1109-1123.
26. Powell, C. S., M. M. Wright, and R. M. Jackson. 2004. p38mapk and MEK1/2 inhibition contribute to cellular oxidant injury after hypoxia. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L826-L833.
27. Reddy, D. B. and P. Reddanna. 2009. Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 112-117.
28. Sakuma, T., K. Takahashi, N. Ohya, O. Kajikawa, T. R. Martin, K. H. Albertine, and M. A. Matthay. 1999. Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanisms of injury and protection. *Am J. Physiol.* **276**, L137-L145.
29. Shimabukuro, D. W., T. Sawa, and M. A. Gropper. Injury and repair in lung and airways. *Crit. Care Med* **31**, S524-S531.
30. Terada, L. S., D. M. Guidot, J. A. Leff, I. R. Willingham, M. E. Hanley, D. Piermattei, and J. E. Repine. 1992. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3362-3366.
31. van Jaarsveld, H., J. M. Kuyf, G. F. van Zyl, and H. C. Barnard. 1994. Salicylate in the perfusate during ischemia/reperfusion prevented mitochondrial injury. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **86**, 287-295.
32. Vane, J., Y. S. Bakhle, and R. M. Botting. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 97-120.
33. Wahn, H. and S. Hammerschmidt. 1998. Inhibition of PMN- and HOC1-induced vascular injury in isolated rabbit lungs by acetylsalicylic acid: a possible link between neutrophil-derived oxidative stress and eicosanoid metabolism? *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 55-66.
34. Wang, X., H. Xue, Q. Xu, K. Zhang, X. Hao, L. Wang, and G. Yan. 2008. p38 kinase/cytosolic phospholipase A2/cyclooxygenase-2 pathway: a new signaling cascade for lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta and interleukin-6 release in differentiated U937 cells. *Prostaglandins Other Mediat.* **86**, 61-67.
35. Ware, L. B. and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1334-1349.
36. Wu, K. K. 1998. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 543-547.
37. Xu, X. M., L. Sansores-Garcia, X. M. Chen, N. Matijevic-Aleksic, M. Du, and K. K. Wu. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 5292-5297.
38. Zou, L., B. Attuwaybi, and B. C. Kone. 2003. Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J. Physiol.* **284**, G713-G721.