

Moxifloxacin의 Cytosolic Phospholipase A₂ 억제효과가 흰 쥐 호흡구의 Respiratory Burst에 미치는 영향

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실
이영만

Moxifloxacin Alleviates Oleic Acid-provoked Neutrophilic Respiratory Burst in the Rat Lung through the Inhibition of Cytosolic Phospholipase A₂

Young Man Lee, M.D.

Department of Physiology, Daegu Catholic University School of Medicine, Daegu, Korea

Background: According to the notion of the immunoregulatory functions of moxifloxacin (MFX), the effect of MFX on the neutrophilic respiratory burst in conjunction with the expression of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) was investigated.

Methods: The effects and possible mechanisms of MFX on neutrophilic respiratory burst in oleic acid (OA)-induced acutely injured rats lung and OA-stimulated, isolated murine neutrophils were probed, associated with the expression of cytosolic phospholipase A₂ *in vivo* and *in vitro*.

Results: In the OA-induced acutely-injured lungs, neutrophils were accumulated, which was attenuated by MFX. The parameters denoting a neutrophilic respiratory burst, such as nitro blue tetrazolium reaction, cytochrome-c reduction, neutrophil aggregation, H₂O₂ production in neutrophils revealed increased neutrophilic respiratory burst by OA, and MFX decreased all of these parameters. In addition, the enhanced expression of cPLA₂ in the lung and isolated murine neutrophils by OA were decreased by MFX.

Conclusion: MFX suppresses the OA-induced neutrophilic respiratory burst by the suppression of cPLA₂ in neutrophils.

Key Words: Oleic Acid; Neutrophils; Phospholipases A₂; Cytosolic; Moxifloxacin

서 론

급성 폐손상의 일종인 급성호흡곤란증후군의 병태생리학에 관한 연구는 최근에 이르러 염증반응에 관련된 새로운 기전들에 상당한 관심이 모아지고 있다¹. 즉, 급성호흡곤란증후군의 병리학적인 소견은 다양한 병인에도 불구하고

하고 거의 일정한 염증반응의 양상을 보이고 있으나 기존의 항염증약물에는 반응하지 않으므로 급성호흡곤란증후군의 폐장의 염증의 발생기전에 대한 연구가 지속적으로 이뤄지고 있다. 이러한 측면에서, 최근 새로운 형태가 계속 발견되고 있는 phospholipase A₂ (PLA₂)와 급성호흡곤란증후군을 연관시켜 그 병태생리학을 이해하고, 새로운 치료제 개발의 전기를 삼아야 한다는 주장이 제기되었다^{2,3}. 급성호흡곤란증후군의 초기 연구단계에서는 PLA₂가 체장의 소화효소로서의 역할에 관심이 모아졌으나⁴ 최근에는 그 아형(subtype)이 계속적으로 발견됨으로 말미암아⁵, 그 아형들이 다양한 기전에 의하여 급성호흡곤란증후군의 병인론(pathogenesis)에 관여한다고 보는 견해도 있다⁶. PLA₂가 염증반응을 조절하는 기능은 잘 알려져 있고⁷

Address for correspondence: Young Man Lee, M.D.
Department of Physiology, Daegu Catholic University
School of Medicine, 3056-6, Daemyung 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: Aug. 5, 2010

Accepted: Sep. 16, 2010

특히 PLA₂의 활성화는 세포막 또는 폐포내면활성물질 (surfactant)을 기질로 다양한 지질을 생성하는데 이 물질 들은 거의 염증을 촉진한다⁸. 이 중 phosphatidylcholine 의 분해산물인 아라키돈산은 염증세포, 그중에서도 호중 구막의 NADPH oxidase를 활성화시켜 산소기를 생성하 게 한다⁹.

이러한 사실은 호중구의 respiratory burst에 PLA₂가 관 여하며 급성호흡곤란증후군 시에는 호중구가 폐장 내에 축적되므로 호중구에서의 산소기의 생성에 의한 폐장의 손상이 PLA₂의 작용과 관계가 있음을 의미한다. 이미 Dana 등¹⁰은 호중구에서의 PLA₂의 역할이 조직의 손상과 연관됨을 시사하고 최근에 발견된 여러 종류의 PLA₂의 아 형 중에 cPLA₂가 호중구의 산소기 생성에 관여함을 보고 하였다.

cPLA₂는 분자량이 다양한 일종의 중합체(polymer)로서¹¹ cPLA₂ 내에서도 아형을 분리하여 그 기능에 대한 연구가 이뤄지고 있는데 분명히 호중구의 respiratory burst와 관 련이 있다고 본다.

최근 fluoroquinolone계의 항생제가 급성 폐손상을 감 소시킨다는 보고¹², 또한 fluoroquinolone계의 항생제 중 moxifloxacin (MFX)의 면역변환작용이 탐식구 특히 호중 구의 기능의 변화가 관계가 있다는 보고¹³는 급성 폐손상 의 감소가 항염증작용이 그 기전임을 시사하므로, 본 연구 에서는 MFX가 직접 호중구의 respiratory burst에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

동물실험에서는 올레인산으로 급성 폐손상을 유발하 고, 이 손상이 산화성 스트레스와 관련이 있는지를 폐장 내에 침윤한 호중구에서의 산소기 생성을 검사하여 확인 하고, 또한 분리된 실험동물의 호중구에서 시험관 내 실험 을 통하여 올레인산에 의한 respiratory burst의 유무를 확 인함과 동시에 MFX가 호중구의 respiratory burst에 미치 는 영향을 cPLA₂의 작용과 연관하여 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 체중 300 g 내외의 Sprague-Dawley종(patho- gen free; Sasco, Seoul, Korea) 흰 쥐, 수컷을 사용하 였다. 실험동물에게는 물과 먹이를 자유로이 먹게 하였고 (ad libitum) 실험 12시간 전부터는 절식 시켰다. 조직 및 세포면역화학검사를 위해 Santa Cruz사제(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 goat anti-human

cytosolic phospholipase A₂ polyclonal antibody 및 2차 항체인 rabbit anti-goat antibody와 biotinylated anti-goat IgG를 사용하였다. Moxifloxacin hydrochloride는 Bayer사 (Leverkusen, Germany)로부터 기증받아 사용하였다. 흡입 마취제인 아리레인(enflurane)은 일성신약(Seoul, Korea) 제품을 사용하였다. 그 외의 시약들은 특별한 언급이 없 는 한 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용 하였다.

2. 흰 쥐에서의 급성 폐손상의 유발 및 MFX의 투여

흰 쥐의 대퇴동맥에 300 μ L의 올레인산 혼합액(30 μ L 올레인산+0.1% bovine serum albumin 270 μ L)을 주사 하여 급성 폐손상을 유발하였다¹⁴. MFX (10 mg/kg)는 올 레인산 주사 직후 복강 내로 주사하였다. 실험동물은 올 레인산 투여 후 5시간 후 치사시켰다.

3. 실험군

In vivo 실험에서 실험군은 0.1% BSA 300 μ L를 대퇴정 맥으로 주사한 군(Sham group), 올레인 산을 투여한 군 (OA-group)과 올레인산과 MFX를 투여한 군(MFX-group) 으로 하였고 *in vitro* 실험에서는 분리, 배양된 호중구에 무처리 대조군(Control group), 올레인산 첨가군(OA- group, 100 mM) 및 올레인산 및 MFX 첨가군(MFX- group, 100 nM)으로 구분하였다.

4. Lung myeloperoxidase (MPO)의 활성화도 및 폐포세 척액 내의 호중구의 산정

폐장 내의 호중구의 침윤(infiltration), 침윤된 호중구의 폐포로의 이동을 검사하기 위하여 Goldblum 등¹⁵의 방법 에 따라 폐장 내의 MPO의 활동도를 측정하고 폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내의 호중구의 수를 산정하였다.

5. 형태학적 관찰

1) 광학현미경을 이용한 관찰

올레인산에 의한 폐장의 손상 및 MFX의 효과를 확인하 기 위하여 각 실험군에서의 광학현미경을 이용한 조직의 소견을 관찰하였다. 실험동물의 기관을 절개하여 4% par- aformaldehyde (PFA, pH 7.4)를 기도 내로 주입하고 기 도를 결찰하였다. 폐를 적출한 뒤 무작위로 폐조직의 절 편을 얻어 4% PFA 용액에 24시간 고정하였다. 이때 용기 내에 양압을 가하여 폐장 내의 공기를 제거하였다. 그 후

탈수 및 세수의 과정을 거친 후 파라핀(paraplast; Oxford, St. Louis, MO, USA)에 포매하고 RM2155 microtome (Leica, Wetzlar, Germany)으로 박절하여 연속절편을 만든 후 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색 후 관찰하였다.

2) 전자현미경을 이용한 조직 내 호중구에서의 산소기 생성검사(Electron microscopic cerium chloride cytochemistry)

폐장 내에 침윤한 호중구에서의 산소기 생성을 검사하기 위하여 Hobson 등¹⁶의 방법에 따라 CeCl₃ cytochemical electron microscopy를 시행하였다. 폐장조직을 1×1 mm의 절편을 만든 뒤 2.0 nM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1, 2, 4-triazol, 0.1 M trismaleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% triton X-100로 조제된 기질에 담그고 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 수세와 탈수의 과정을 거친 후 epoxy-resin에 포매한 후 열중합시키고, 초박절 후 대조염색을 하지 않고 Hitachi 9H-600 (Hitachi, Tokyo, Japan) 투과 현미경으로 관찰하였다.

6. 분리된 흰 쥐 호중구에서의 산소기생성 및 응집반응 검사

1) 흰 쥐에서의 호중구의 분리

흰 쥐의 혈액으로 부터 Haslett 등¹⁷의 방법에 따라 호중구를 분리하였다. 흰 쥐 한 마리당 10 mL의 혈액을 복대 동맥으로부터 채취하여 50 mL를 모아 헤파린(100 IU)이 든 주사기에 25 mL의 Pentaspan과 25 mL의 혈액을 혼합하였다. 상온에서 45분간 세워둔 후에 호중구를 포함한 혈장이 분리된 다음 이 혈장을 74%, 55% percoll gradient에 엮은 뒤 1,500 rpm에서 20분간, 상온에서 비중차 원심 분리(gradient centrifugation)를 시행하였다. 호중구 층을 분리한 뒤 섞여있는 적혈구를 저장액 용혈법(hypotonic lysis)으로 제거 후 Hank's balanced salt solution (HBSS in 1 mM CaCl₂, pH 7.4)에 부유시켰다.

2) Nitro blue tetrazolium (NBT) 검사

황색분말인 NBT는 산소기에 의해 환원되어 짙은 감색의 formazan 과립으로 변한다. 호중구성 respiratory burst를 검사하기 위하여 분리된 호중구 용액(2×10^7 cells/mL)에 0.02% NBT, 100 μ M 올레인산(sodium oleate) 및 MFX (100 nM)를 첨가하고 37°C 수조에서 20분간 반응시켰다. 그 후 800 rpm에서 상온에서 원심분리 후 침전층을 유리 슬라이드 위에 놓은 뒤 도말, 건조 후 wright 염색을 시행하였다. 200개의 호중구에서 formazan 과립이 확인된 세포 수를 확인하였다. 또한 호중구 세포질 내의 for-

mazan 과립을 확인하고 AxioCamMRc5 (Carl Zeiss, Jena, Germany)로 촬영하였다.

3) 호중구의 NADPH oxidase 활동도의 검사: cytochrome-c 환원검사

Botha 등¹⁸의 방법에 따라 분리된 호중구에서의 산소기 생성에 따른 cytochrome-c의 환원의 정도로 NADPH oxidase의 활동도를 간접 측정하였다. 호중구용액(1×10^7 cells/mL)에 올레인산(100 μ M), MFX (100 nM)를 첨가하여 이때 cytochrome-c 환원의 정도를 검사하였다.

4) 올레인산에 의한 호중구의 화학주성(chemotaxis) 및 이에 미치는 MFX의 효과

올레인산 및 MFX가 호중구의 화학주성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 호중구응집반응을 시행하였다. 즉, 호중구용액(1×10^7 cells/mL)에 0.02% NBT, 올레인산(100 μ M, sodium oleate), MFX (100 nM)를 첨가 후 37°C의 수조에서 20분간 반응시켰다.

7. BALF에서 분리된 세포의 면역화학조직염색(immunohistochemistry)

BALF를 cytopspin하여 얻은 대조군과 실험군의 슬라이드 표본들을 4% PFA로 30분간 고정하였다. 그 후 인산완충용액으로 세척한 후 세포 속의 비특이적 반응을 억제하기 위하여 10% 정상토끼혈청으로 30분간 처리하였다. 그 후 1차 항체인 goat-anti human cPLA₂ polyclonal antibody (C-20; Santa Cruz Biotechnology)를 1 : 50으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 인산완충용액으로 10분간 3회 세척 후 2차 항체인 rabbit anti-goat IgG, FITC (Santa Cruz Biotechnology)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시키고, 인산완충용액으로 세척하였다.

그 후 propidium iodide (0.01 mg/mL)로 10분간 대조 염색을 한 다음 fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA)으로 봉입한 후 AxioPhot Photomicroscope (Carl Zeiss)로 관찰하고 AxioCam MRc5 (Carl Zeiss)로 촬영하였다.

8. Western blot analysis

분리한 흰 쥐의 호중구를 HBSS 용액에 부유시킨 후 (2.5×10^7 cells/mL), 800 rpm, 상온에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 버린 후 침전층에 10% fetal calf serum 이 함유된 RPMI1640에 부유시킨 뒤 Nuclon Surface Culture Dish (DK-4000; Nunc, Roskilde, Denmark)에 올

레인산(100 μ M), MFX (100 nM)를 첨가한 뒤 16시간을 배양하였다. 호중구액을 다시 800 rpm, 상온에서 10분간 원심분리한 뒤 세포성분을 분리한 다음 상등액은 버렸다. 세포성분의 단백질을 측정하여 30 μ g의 농도로 SDS-PAGE를 시행하고 Immobilion-P-membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이하고 membrane은 1차 항체인 anti-cPLA₂ (Santa Cruz Biotechnology)와 반응시킨 후 2차 항체와 반응시켰다. 항체들에 대한 발현 분석은 Horseradish Peroxidase-linked secondary antibody에 의해 발현되는 ECL Western Blot Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK)를 이용하여 확인하였다.

9. 통계처리

모든 성적은 평균±표준오차로 나타내었다. 성적을 변수별로 정규분포화 한 후 로그변환 된 변수를 이용하여 ANOVA 검정 후 오류를 보정하기 위하여 Student-Neumann-Keul test를 이용하였고 $p < 0.05$ 를 유의하다고 인정하였다.

결 과

1. 올레인산에 의한 폐장 내 호중구의 축적 및 폐포로의 이동

Sham group에서의 lung MPO의 활동도(U/g of wet lung)는 6.38 ± 2.8 , OA-group에서는 39.5 ± 4.1 로서 sham group에 비해 높았다($p < 0.001$). MFX-group에서는 16.7 ± 3.8 로서 OA-group에 비해 유의하게 낮았다($p < 0.001$) (Table 1). 폐포 내로 호중구의 이동을 나타내는 BALF 내의 호중구의 수(millions/two lungs)는 sham group에서는 0.5 ± 0.3 이었고 OA-group에서는 22.1 ± 8.0 로서 sham group보다 현저히 높았다($p < 0.001$). MFX는 올레인산에 의한 이러한 효과를 억제하여 MFX-group에서는 1.7 ± 1.1

로서 OA-group에 비하여 낮았다($p < 0.001$) (Table 1).

2. 광학현미경을 통해 본 폐장 손상의 비교

Figure 1A는 정상적인 폐장의 광학현미경 소견이다. 폐포가 잘 보존되어 있고, 폐포강 내에 탐식구가 보이지 않으며 폐포벽의 부종도 관찰되지 않는다. 그러나 OA-group에서는 폐포강 내에 염증세포와 적혈구가 차있고 혈관주위에는 탐식구들의 이동이 관찰되며 동시에 폐포 내의 간유리질막도 관찰되어 염증반응이 진행되고 있음을 알 수 있다. 특히 상당수의 적혈구가 혈관을 벗어나 폐포 내로 이동한 사실은 모세혈관의 심한 손상이 있음을 나타낸다(Figure 1B). MFX-group에서는 폐포내의 세포가 완전히 없는 상태는 아니지만 호중구는 관찰되지 않고 폐포강도 잘 보존되고 있으며 폐부종의 소견도 보이지 않는다(Figure 1C).

3. 올레인산의 호중구의 respiratory burst 및 화학주성에 미치는 영향 및 MFX의 효과

1) Sham group의 BALF 내의 NBT검사 양성 수(number/200 cells)는 8.0 ± 5.4 였고 OA-group의 경우 191.7 ± 4.9 로서 sham group에 비해 훨씬 높았다($p < 0.001$). MFX group의 경우는 2.5 ± 1.0 으로서 OA-group에 비해 훨씬 낮은 수치를 나타내었다($p < 0.001$) (Table 2).

2) 흰 쥐에서 분리된 호중구를 이용한 cytochrome-c 환원검사는 NADPH oxidase의 활성도를 간접적으로 나타내는 지수로서, 대조군에서는 45.8 ± 1.3 , OA-group에서는 99.9 ± 12.2 로서 OA-group에서 훨씬 높았고($p < 0.001$), MFX-group에서는 77.9 ± 7.0 로서 OA-group에 비해 낮았다($p < 0.001$) (Table 2).

3) 호중구 응집검사는 대조군과 MFX를 첨가한 경우에는 응집반응이 전혀 일어나지 않았고 올레인산을 첨가한 경우에는 100% 응집반응이 일어났다(Table 2).

4) Figure 2는 NBT검사의 광학현미경 소견이다. Sham

Table 1. Effect of oleic acid and moxifloxacin on the infiltration and migration of neutrophils in the lung

	Sham	OA	OA+MFX
Lung MPO (U/g of lung)	6.3 ± 2.8 (n=7)	39.5 ± 4.1 (n=8)*	16.7 ± 3.8 (n=8) [†]
BAL PMNs (millions/two lungs)	0.5 ± 0.3 (n=12)	22.1 ± 8.0 (n=9)*	1.7 ± 1.1 (n=8) [†]

Values are given as mean±SE, n indicates number of experiments.

OA: oleic acid; MFX: moxifloxacin; MPO: myeloperoxidase; BAL: bronchoalveolar lavage; PMN: polymorphonuclear neutrophils.

* $p < 0.001$, sham vs. OA, [†] $p < 0.001$, OA vs. OA+MFX.

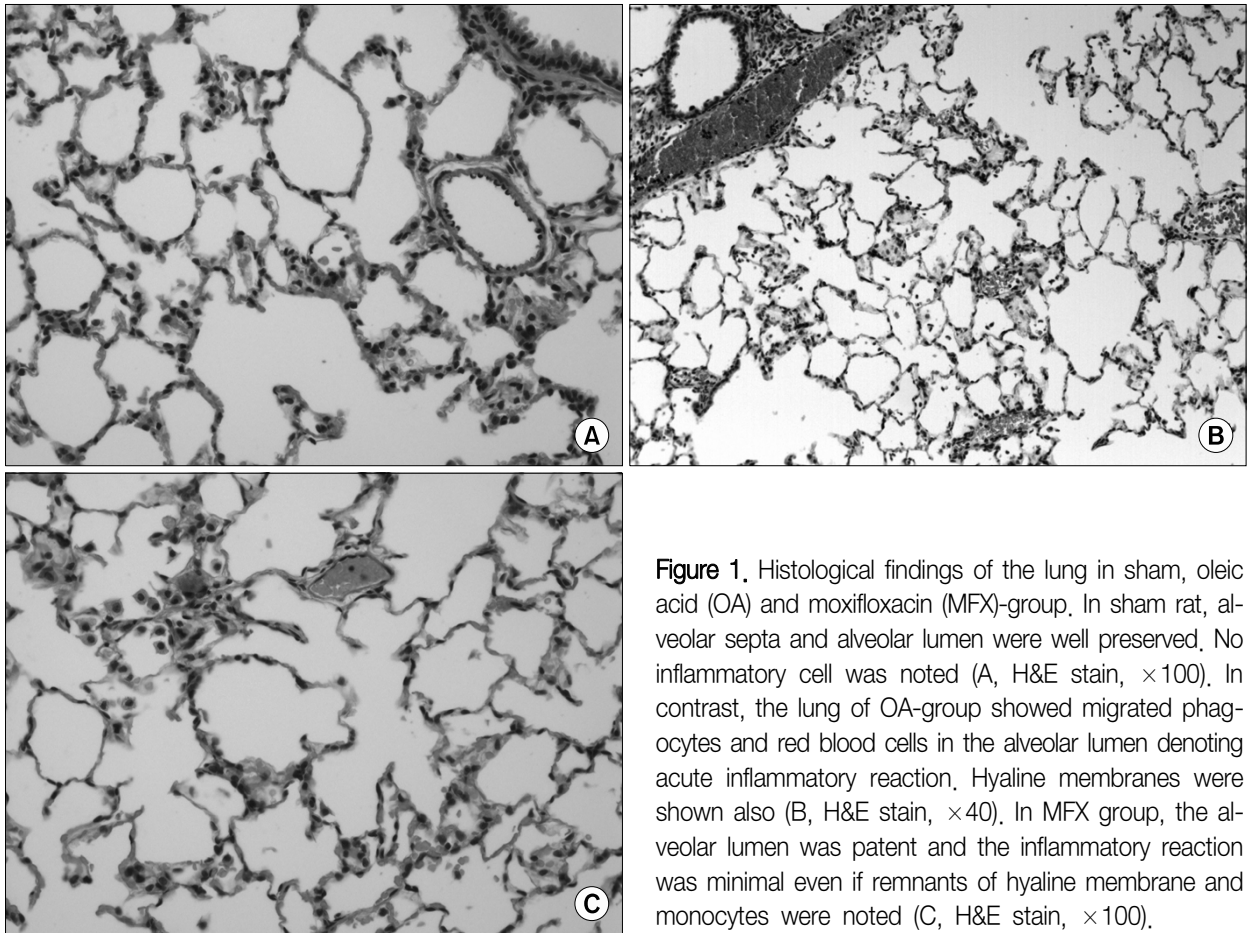


Figure 1. Histological findings of the lung in sham, oleic acid (OA) and moxifloxacin (MFX)-group. In sham rat, alveolar septa and alveolar lumen were well preserved. No inflammatory cell was noted (A, H&E stain, $\times 100$). In contrast, the lung of OA-group showed migrated phagocytes and red blood cells in the alveolar lumen denoting acute inflammatory reaction. Hyaline membranes were shown also (B, H&E stain, $\times 40$). In MFX group, the alveolar lumen was patent and the inflammatory reaction was minimal even if remnants of hyaline membrane and monocytes were noted (C, H&E stain, $\times 100$).

Table 2. Effect of oleic acid and moxifloxacin on the neutrophilic oxidative stress and chemotaxis

	Control	OA	OA+MFX
No. of NBT (+) PMNs/200 PMNs	8.0 \pm 5.4 (n=9)	191.7 \pm 4.9 (n=8)*	2.5 \pm 1.0 (n=10) [†]
Cytochrome-c reduced (nmol/ 2×10^7 PMNs)	45.8 \pm 1.3 (n=7)	99.9 \pm 12.2 (n=9)*	77.9 \pm 7.0 (n=9) [†]
PMN aggregation, %	0 (n=10)	100 (n=10)	0 (n=10)

Values are given as mean \pm SE, n indicates number of experiments.
 OA: oleic acid; MFX: moxifloxacin; PMN: polymorphonuclear neutrophil.
 *p<0.001 sham vs. OA, [†]positive, ^{††}p<0.01 OA vs. OA+MFX.

group의 경우 BALF 내의 호중구 내에는 formazan 과립이 관찰되지 않고 OA-group의 BALF 내의 호중구의 세포질 내에는 formazan 과립이 묻혀있고, 호중구가 밀집해 있는 현상이 관찰되었다. 또한 MFX-group의 경우에는 호중구의 세포질 내에 formazan 과립이 보이는 경우가 거의 없었다.

5) 흰 쥐 폐장 내에 침윤된 호중구에서의 *in vivo* 상태에서의 산소기 생성검사 결과

Sham group에서의 호중구막 주변에는 cerrous perhydroxide 과립이 관찰되지 않지만(Figure 3A), OA-group에서는 호중구 막을 따라 cerrous perhydroxide 과립이 진하게 나타났(Figure 3B). 반면 MFX-group에서는 호중구막을 따라 cerrous perhydroxide의 과립이 없거나 미량이 관찰되었다(Figure 3C).

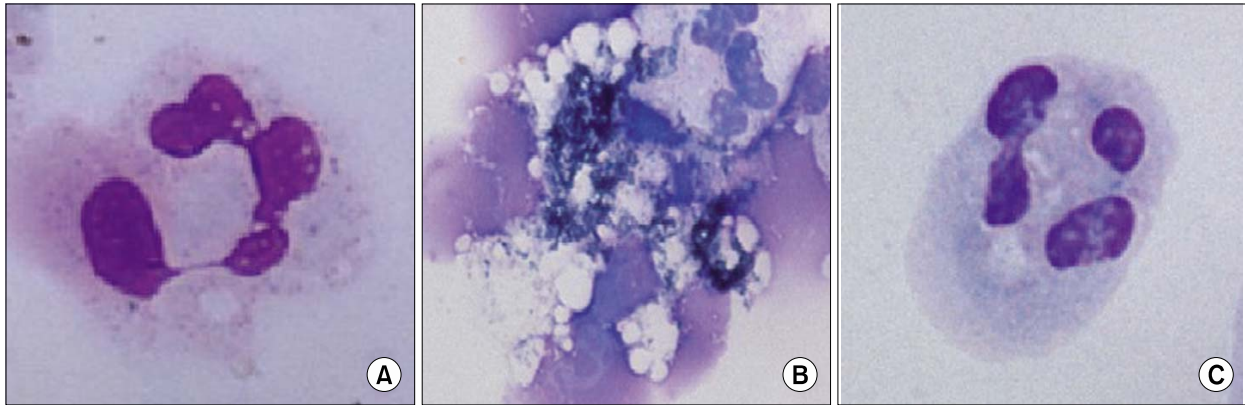


Figure 2. The representative of findings of the nitro blue tetrazolium (NBT) test in cytopinned bronchialveolar lavage fluid (BALF). In the neutrophil from the BALF of sham group, the resting, normal neutrophil showed no formazan granule in the cytoplasm, denoting absence of respiratory burst (A). In contrast, in BALF of oleic acid-group, neutrophils were clumped and deep, dense formazan granules were found in the cytoplasm of activated neutrophils, depicting severe respiratory burst (B). In neutrophils from the BALF of moxifloxacin group, formazan granules were not found suggesting the absence or minimal respiratory burst (C).

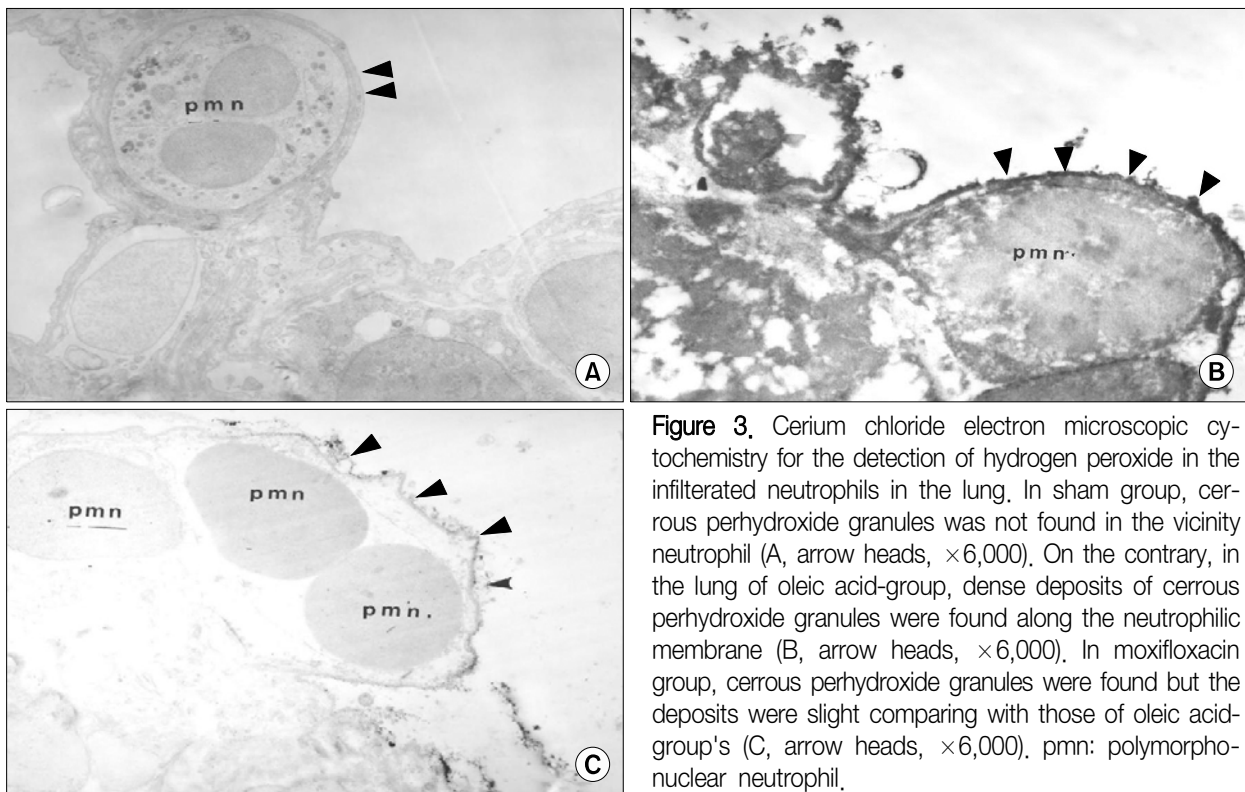


Figure 3. Cerium chloride electron microscopic cytochemistry for the detection of hydrogen peroxide in the infiltrated neutrophils in the lung. In sham group, cerous perhydroxide granules was not found in the vicinity neutrophil (A, arrow heads, $\times 6,000$). On the contrary, in the lung of oleic acid-group, dense deposits of cerous perhydroxide granules were found along the neutrophilic membrane (B, arrow heads, $\times 6,000$). In moxifloxacin group, cerous perhydroxide granules were found but the deposits were slight comparing with those of oleic acid-group's (C, arrow heads, $\times 6,000$). pmn: polymorphonuclear neutrophil.

4. BALF 내의 세포를 이용한 cPLA₂의 면역조직화학염색(cPLA₂ immunohistochemistry)

Sham group의 BALF 내의 세포는 주로 단핵구이며

cPLA₂의 발현이 없고(Figure 4A), OA-group에서는 BALF 내의 세포가 주로 호중구이며 호중구 세포질 내의 cPLA₂가 현저히 발현되었다. 즉, 호중구 세포질 내에서 cPLA₂는 밝은 점으로 나타나 sham group과 비교 시 현저히 cPLA₂

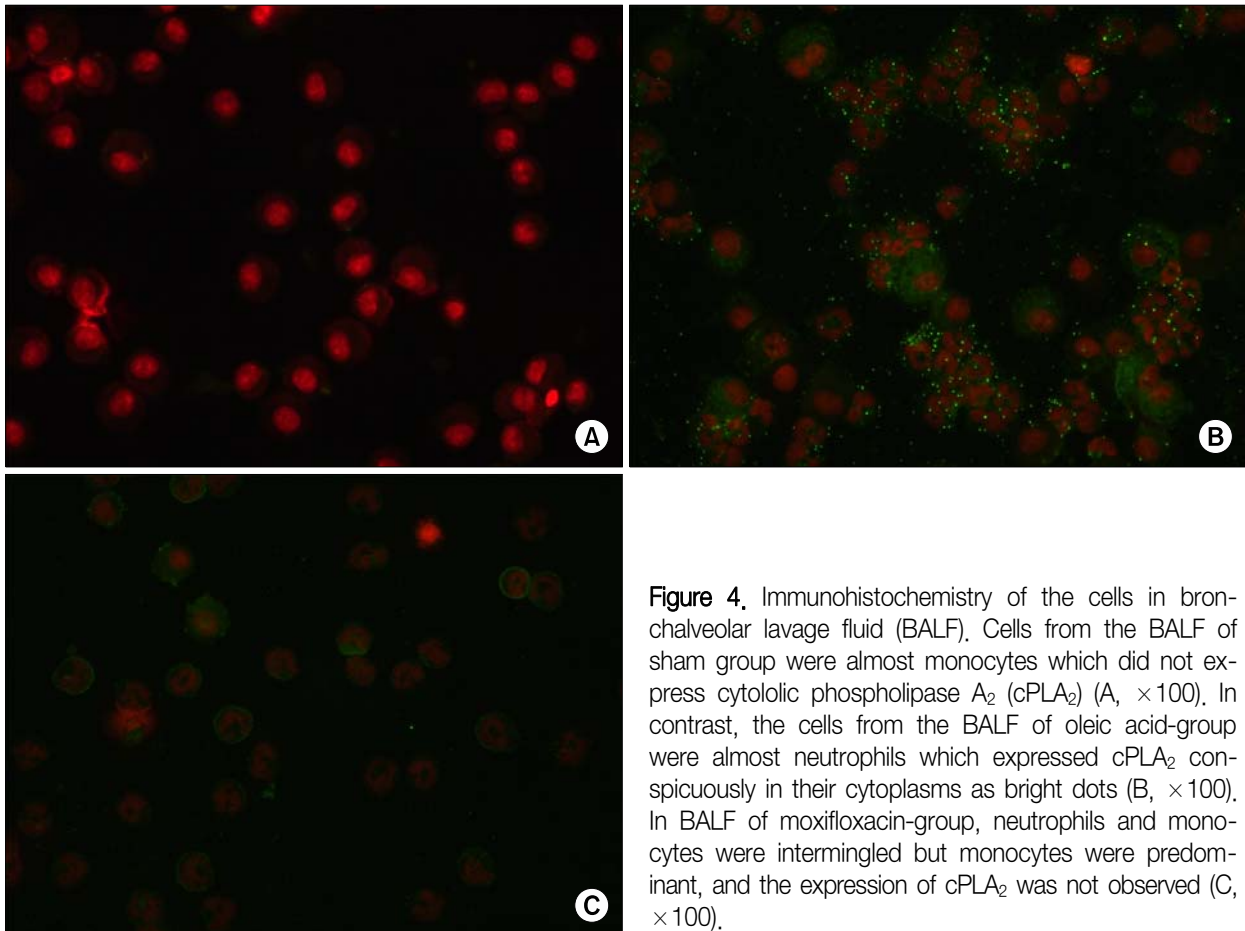


Figure 4. Immunohistochemistry of the cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Cells from the BALF of sham group were almost monocytes which did not express cytolitic phospholipase A₂ (cPLA₂) (A, ×100). In contrast, the cells from the BALF of oleic acid-group were almost neutrophils which expressed cPLA₂ conspicuously in their cytoplasm as bright dots (B, ×100). In BALF of moxifloxacin-group, neutrophils and monocytes were intermingled but monocytes were predominant, and the expression of cPLA₂ was not observed (C, ×100).

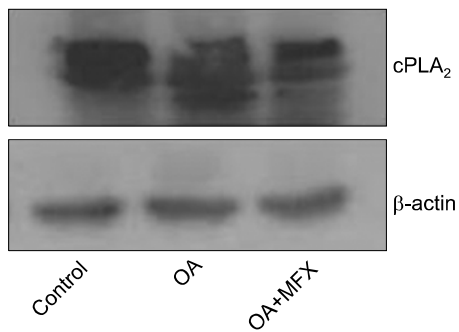


Figure 5. Immunoprecipitation of cytolitic phospholipase A₂ (cPLA₂) in isolated murine neutrophils. Oleic acid (OA) increased the expression of cPLA₂ compared with that of control neutrophils. Moxifloxacin (MFX) suppressed the expression of cPLA₂ caused by OA.

가 발현되었음을 알 수 있다(Figure 4B). 이에 비해 MFX-group에서는 BALF 내의 세포는 단핵구가 주종을 이루고, 호중구가 약간 혼재되어 있으나 cPLA₂는 거의 발현되지 않았다(Figure 4C).

5. 배양된 흰 쥐 호중구에서의 cPLA₂의 발현검사 (Western blot analysis of neutrophilic cPLA₂)

cPLA₂는 분자량이 다양한 polymer이다. Figure 5에서는 흰 쥐 호중구에서의 올레인산 및 MFX의 cPLA₂의 발현에 미치는 효과를 보여주고 있다. 대조군에 비해 OA-group에서는 cPLA₂의 발현이 현저하고 MFX-group에서는 그 발현이 현저히 감소하여 오히려 대조군에 비해서도 그 발현이 낮았다.

고 찰

Moxifloxacin의 면역변환효과는 주로 탐식구의 사이토카인, 산소기의 형성 및 이동에 관여한다¹⁹. 올레인산에 의한 폐장의 손상은 주로 호중구의 산소기 생성에 따른 산화성스트레스 및 PLA₂의 활성화에 따른 염증성 지질분자의 작용에 의한 것으로 알려져 있다²⁰.

본 실험의 결과는 기초적이기는 하지만 moxifloxacin이

호중구에 직접 작용하여 산소기의 생성을 억제하는 것을 보여주고 있다. 올레인산이 호중구의 화학주성을 유발하거나 혈관 내에서 응집반응을 일으켜 모세혈관 내의 정수압을 증가시키거나 유리지방산을 생성하여 혈관내피세포에 손상을 준다는 사실²¹은 잘 알려져 있다. Moxifloxacin이 올레인산에 의한 호중구의 폐장 내 축적을 억제하거나 간질에서 폐포로 이동하는 것을 억제하고 있으며 이러한 사실은 폐장 내의 MPO의 활성도의 감소 및 BALF 내의 호중구의 감소로서도 알 수가 있고, 형태학적으로도 명백히 드러나고 있다. 흥미로운 것은 호중구의 산소기 형성 또는 respiratory burst를 직접 반영하는 NBT 검사나 호중구막의 NADPH oxidase 활성도의 간접지표인 cytochrome-c 환원검사에서도 올레인산에 의한 respiratory burst나 산소기의 생성이 moxifloxacin에 의해 억제된 것이다. 또한 호중구에 대한 올레인산의 화학주성도 차단하고 있다.

Moxifloxacin의 이러한 효과는 형태학적으로 간질 및 폐포 내로의 호중구 이동의 감소 및 폐포 내 출혈의 감소로 이어지고 있다. 올레인산에 의한 독작용은 올레인산이 직접 혈관내피세포에 작용한다는 보고²²도 있으나 올레인산이 호중구와 응집반응에 따른 덩어리를 형성하고 호중구나 주위조직 특히 혈관내피세포의 cPLA₂의 활성화에 따른 산소기의 대량생성 또는 염증성 지질분자의 작용에 의한 기능성²³이 더 큰데 이러한 과정을 moxifloxacin은 차단하고 있다.

올레인산에 의해 호중구 내의 산소기 생성에 따른 formazan 생성이 moxifloxacin에 의해 감소하거나 폐장조직에 침윤한 호중구 막에서의 과산화수소의 생성이 감소한 것은 분명히 moxifloxacin이 호중구의 respiratory burst를 억제함을 의미한다. Moxifloxacin의 이러한 작용은 BALF 내의 염증세포의 cPLA₂의 발현에 미치는 결과나 분리된 호중구에서의 cPLA₂의 발현에 미치는 영향을 통해 유추해 볼 수 있다. Sham group의 BALF 내에서는 세포성분이 거의 단핵구이나 올레인산에 의해 BALF 내의 탐식구는 거의 호중구로 채워지고 있으며 MFX group에서는 단핵구와 호중구가 섞여있는 양상을 보인다. 올레인산은 BALF 내의 탐식구 중 호중구의 cPLA₂의 발현을 현저히 증가시키고 있고, cPLA₂의 발현 위치도 호중구의 세포질에 거의 한정되어 있다. 반면, moxifloxacin은 이러한 cPLA₂의 발현을 거의 차단하고 있다. 분리된 흰 쥐 호중구를 배양하여 올레인산과 moxifloxacin을 처리한 다음 western blot을 시행한 결과도 동일한 결과를 보여주고 있다. 즉, 올레인산은 호중구에서의 cPLA₂의 발현을 증가시키고 moxi-

floxacin은 효과적으로 이를 억제하고 있다. cPLA₂가 호중구에서의 산소기의 생성에 관여함은 이미 밝혀졌으며²⁴ cPLA₂의 활성화에 따른 호중구의 산소기 생성 및 염증성 지질분자의 증가가 염증반응을 심화시킨다.

cPLA₂는 처음 알려진 바로는 분자량 85 kDa 정도의 단백질로 알려져 있었으나²⁵ 최근의 연구결과, 적어도 4가지의 아형이 있으며 개개의 아형의 기능이 다를 것으로 보고 있다²⁶. 본 실험에서도 호중구에서의 cPLA₂의 발현을 보면 역시 중합체라는 사실을 알 수 있고 moxifloxacin은 이들 대부분의 발현을 억제하고 있다. 급성호흡곤란증후군 또는 급성 폐손상의 병태생리학적 기전에는 cPLA₂가 관여하며 그 기전의 규명은 급성호흡곤란증후군의 치료에 중요한 전기를 가져올 수 있다는 보고^{27,28}를 감안하면 moxifloxacin에 의한 호중구에서의 respiratory의 억제는 치료라는 측면과 병인론 연구라는 측면에서 의의가 있을 것으로 생각된다.

적어도 올레인산에 의한 또는 지방 색전 증후군(fat embolism syndrome)에서 보이는 급성 폐손상의 경우에는 호중구에서의 cPLA₂의 역할이 중요하다고 보며 특히 산화성 스트레스에 의한 조직의 손상기전이 호중구의 기능과 관계가 있으므로 이러한 면에서 moxifloxacin이 cPLA₂에 미치는 작용기전에 대한 연구는 더 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ware LB. Advances in the pathogenesis and treatment of the acute respiratory distress syndrome. *Clin Pul Med* 2003;10:208-18.
2. Kitsioulis E, Nakos G, Lekka ME. Phospholipase A2 subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:941-53.
3. Nakos G, Kitsioulis E, Hatzidaki E, Koulouras V, Toukili L, Lekka ME. Phospholipases A2 and platelet-activating-factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2005;33:772-9.
4. Stommer P, Steinmann U. Phospholipase A2 induced diffuse alveolar damage: effect of indomethacin and dexamethasone upon morphology and plasma-histamine level. *Klin Wochenschr* 1989;67:171-6.
5. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:1246-59.
6. Wheeler DS. Phospholipase A2 and acute lung injury: it's just not that simple. *Crit Care Med* 2005;33:904-5.
7. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2: a mediator

- between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991;12:143-6.
8. Arbibe L, Vial D, Touqui L. Phospholipase A2 and acute respiratory distress syndrome. *Prog Surg* 1997;24:79-87.
 9. Kramer RM, Sharp JD. Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA₂). *FEBS Lett* 1997;410:49-53.
 10. Dana R, Malech HL, Levy R. The requirement for phospholipase A2 for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J* 1994;297:217-23.
 11. Lucas KK, Dennis EA. The ABC's of Group IV cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* 2004;1636:213-8.
 12. Huang HC, Shieh CC, Yu WL, Cheng KC, Chen CC, Chang ST, et al. Comparing the protective effects of ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin in mice with lipopolysaccharide-induced acute lung injuries. *Respirology* 2008;13:47-52.
 13. Wang JP, Raung SL, Huang LJ, Kuo SC. Involvement of cyclic AMP generation in the inhibition of respiratory burst by 2-phenyl-4-quinolone (YT-1) in rat neutrophils. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1505-14.
 14. Weiner RE, Sasso DE, Gionfriddo MA, Syrbu SI, Smilowitz HM, Vento J, et al. Early detection of bleomycin-induced lung injury in rat using indium-111-labeled antibody directed against intercellular adhesion molecule-1. *J Nucl Med* 1998;39:723-8.
 15. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 1985;59:1978-85.
 16. Hobson J, Wright J, Churg A. Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants. *Am J Pathol* 1991;139:573-80.
 17. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB Jr, Henson PM. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1985;119:101-10.
 18. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges. *Shock* 1995;3:157-66.
 19. Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Inf Dis* 2003;3:359-71.
 20. Koxsel O, Cinel I, Tamer L, Cinel L, Ozdulger A, Kanik A, et al. N-acetylcysteine inhibits peroxynitrite-mediated damage in oleic acid-induced lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17:263-70.
 21. Karagiorga G, Nakos G, Galiatsou E, Lekka ME. Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in fat embolism. *Intensive Care Med* 2006;32:116-23.
 22. Julien M, Hoeffel JM, Flick MR. Oleic acid lung injury in sheep. *J Appl Physiol* 1986;60:433-40.
 23. Lee YM, Kim BY, Park YY. Role of the PLA2-activated neutrophilic oxidative stress in oleic acid-induced acute lung injury. *Tuberc Respir Dis* 2010;68:55-61.
 24. Shmelzer Z, Haddad N, Admon E, Pessach I, Leto TL, Eitan-Hazan Z, et al. Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* 2003;162:683-92.
 25. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997;272:16709-12.
 26. Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 2006;45:487-510.
 27. Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kume K, Izumi T, Ouchi Y, et al. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2. *Nat Immunol* 2000;1:42-6.
 28. Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:1-18.