

PAF in Pulmonary Surfactant Contributes to Neutrophilic Oxidative Stress-Induced Acute Lung Injury of Rats Given LPS Intratracheally

Young-Man Lee*

Department of Physiology, School of Medicine, Daegu Catholic University, Daegu 705-718 Korea

Received July 27, 2012 / Revised September 25, 2012 / Accepted October 22, 2012

In acute lung injury (ALI) by lipopolysaccharide (LPS), the underlying cause of infiltration and migration of neutrophils into the alveoli is considered to be from increased production of platelet-activating factor (PAF) in the pulmonary surfactant lining the alveolar lumen. In this study I partially confirmed this concept. LPS increased lung leak and the infiltration of neutrophils in the lung of rats given LPS intratracheally. The migration of neutrophils into the lung, which had caused oxidative stress, was also morphologically identified. I verified that the metabolism of the pulmonary surfactant was affected and that there was increased production of PAF in the pulmonary surfactant, both of which are considered to contribute to ALI by LPS in rats.

Key words : Lipopolysaccharide (LPS), acute lung injury, pulmonary surfactant, platelet-activating factor (PAF)

서 론

Platelet-activating factor (PAF)는 phospholipase A2 (PLA2)의 작용에 의해 생성된 lysophosphatidylcholine이 lysoPAF-acetyltransferase의 작용에 의하여 remodelling의 과정을 거쳐 생성되는 염성성 분자의 일종이다[21]. 내독소에 의해 유도되는 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)을 포함하는 급성 폐손상(acute lung injury, ALI)에서 PAF는 호중구의 침윤, 산소기의 생성 및 PLA2의 활성화에 중요한 역할을 한다[16]. ARDS 환자의 폐포세척액 및 조직에서는 PAF가 증가하고 폐장의 손상에 직접적인 영향을 준다고 알려져 있다[19]. 또한 급성 폐손상 시 PLA2의 활성화가 염증반응을 유발할 때 pulmonary surfactant의 대사에 영향을 미침으로써 폐부종의 원인이 된다[12]. 급성 폐손상 시에는 surfactant의 성분이 변하거나 모세혈관모세부터 빠져 나온 단백질에 의해 그 기능이 소실되어 폐부종을 일으키기도 한다[14]. Surfactant의 주성분인 인지질은 PLA2의 기질로 작용하므로 PLA2의 작용에 의하여 surfactant로부터 PAF의 생성이 폐장의 부종, 호중구의 화학주성 및 폐포세포의 손상에 직접적으로 관여할 가능성이 있다. 본 연구에서는 내독소로 흰쥐에서 급성 폐손상을 유도하고 폐세척액 내의 surfactant를 분리하여, surfactant내의 PAF의 함량의 변화를 조사하여 surfactant내의 PAF함량의 변화가 급성 폐손상에 미치는 영향을 알아보려 하였다.

재료 및 방법

시약 및 실험동물

실험동물은 체중 300 g 내외(주령 8주)의 Sprague-Dawley종 흰쥐, 수컷을 사용하였다(Sasco Korea). 실험동물은 실험 전 12 시간 전까지 물과 사료를 충분히(*ad libitum*)공급하였다. 내독소(*E.coli* type: 0127:B8) 및 기타 시약들은 특별한 언급이 없는 한 Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA)제를 사용하였고 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 위한 TLC plate는 Fisher사(USA)제를 사용하였다.

실험군 및 급성 폐손상의 유도

실험동물에서 급성 폐손상을 유도하기 위하여 실험군을 대조군(Sham group) 및 LPS투여군(LPS group)으로 구분하고 enflurane을 이용하여 마취시킨 뒤 목 부분을 정중절개 하여 기관지를 노출하였다. 그 후 18 G angiocatheter를 이용하여 기관지 내로 대조군 예서는 0.5 ml의 생리적 식염수를, LPS투여군에서는 100 µg의 내독소를 0.5 ml의 식염수에 녹인 후 기도 내로 직접 분무(*insufflation*)하였다. 내독소 투여 5 시간 후에 실험동물들을 처사 시키고 시료를 채취하였다.

Surfactant에서의 PAF의 분리 및 PAF-phosphorus의 정량

실험동물을 enflurane 및 xylazine으로 마취 후 처사시킨 다음 개흉술을 시행하고 Masterflex perfusion pump (Cole Parmer, USA)를 이용하여 폐장의 혈관을 관류하여 혈액을 제거하였다. 그 후 기도에 삽관 하여 6.0 ml의 생리적 식염수를 주입하고 흡인하는 과정을 3회 반복하여 4.0 ml의 폐포세척액

*Corresponding author

Tel : +82-53-620-4472, Fax : +82-53-621-4106
E-mail : leeym@cu.ac.kr

(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)를 얻었다.

이 BALF를 상온에서 2,000 rpm, 10 분간 원심분리 하여 상등액을 얻었다. Surfactant에 함유된 PAF의 정량을 위해서 4.0 ml의 BALF에서 Bligh와 Dyer의 방법[1]을 이용하여 지질을 추출하였다. 질소 하에서 완전히 건조된 지질을 1.0 ml의 chloroform-methanol용액(v/v, 1:2)에 녹인 후 박층 크로마토그래피(Silicagel G TLC plate thin layer chromatography)를 이용하여 지질을 분리하였다[24].

TLC의 용매로서 chloroform/methanol/acetic acid/water (50/25/8/4, v/v)의 혼합액을 사용하였고, 상온에서 분리한 다음 요오드 증기(iodine vapor)로 분리된 것을 확인하였다. PAF 표준시료와 시료를 동시에 분리하여 시료에서 PAF가 함유된 silica gel을 긁어 내어 분리한 뒤 chloroform:methanol (v/v, 1:2)용액으로 PAF를 추출한 뒤 Hess 및 Derr의 방법[5]에 따라 인(phosphorus)의 양을 측정하였다.

Surfactant의 분리 및 정량

Surfactant를 분리하고, surfactant의 주성분인 인지질을 정량 하기 위하여 1.0 ml의 BALF를 150 g, 4°C에서 10 분간 원심 분리하였다. 이때 얻은 상등액은 40,000 g, 4°C에서 15 분간 (Beckman, USA) 원심분리 하여 high density surfactant (HDS) 및 low density surfactant (LDS)로 분리하였다[20]. 상등액(LDS)및 침전층(HDS)은 다음과 같이 인지질을 분리, 측정하였다. 즉, 침전층에 1.0 ml의 생리적 식염수를 가하여 재부유 시키고, 상등액과 이 부유된 침전층을 각각, Bligh 및 Dyer의 방법[1]에 따라 인지질을 분리하였다. 분리된 surfactant 용액 1.0 ml에 2.0 ml의 chloroform-methanol 혼합액(1:2, v/v)을 첨가한 뒤 혼합하고 다시 1.0 ml의 chloroform을 첨가하여 강하게 교반(vortexing) 한 뒤 다시 1.0 ml의 생리적 식염수를 첨가하고 혼합하였다. 그 뒤 500 g에서 5 분간 원심분리 하여 chloroform층만 분리하고 질소가스 하에서 건조시켰다. 분리된 지질에서 인을 정량 하기 위하여 60% perchloric acid 및 10 N 황산용액을 가하고 250°C 이상의 silicon bath에서 유기물을 제거한 후 malachite green이 함유된 ammonium molybdate용액과 반응시켰다. 이때 발색의 정도를 파장 660 nm에서 UV-VIS spectrophotometer (Shimazu, Japan)를 이용하여 측정하여 인의 양을 알아낸 다음[5], Corbet 등의 방법[3]에 따라 인지질로 환산하였다.

폐장 내 호중구의 침윤검사(Lung myeloperoxidase 활동도의 검사)

LPS투여 5 시간 후 LPS에 의한 폐장 내 호중구의 침윤을 검사하기 위하여 Goldblum 등의 방법[4]에 따라 폐장의 myeloperoxidase (MPO)의 활성도를 측정하였다. -70°C에 동결된 조직을 20 mM의 인산완충용액에 녹인 후 분쇄하고 40,000 g, 4°C에서 30 분간 원심분리(Beckman, USA)하였다.

그 후 상등액을 버리고 침전층을 0.5% (HTAB, hexadecylammoniumbromide)가 함유된 50 mM 인산완충용액에 부유시킨 뒤 60 초간 Vibracell (USA)을 이용하여 0°C에서 초음파처리(sonication)하였다. 그 뒤 60°C의 항온조에서 120 분간 incubation하였다. 시료 1.0 ml를 13,000 rpm으로 원심 분리한 뒤 상등액 0.1 ml를 0.0168 g의 o-dianisidine이 함유된 5×10^{-4} M 과산화수소용액과 반응시키고 이때 시간에 따른 흡광도의 변화를 460 nm에서 측정하였다.

형태학적 검사

BAL-Cytospin후의 검경

BALF를 원심분리 하여 얻은 세포층을 0.1 ml의 생리적 식염수에 재 부유 시킨 후 이중 100 μ l의 부유액을 cytopsin을 이용하여 도말표본을 만든 후 Wright염색을 시행하였다. 염색한 표본은 광학현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하고 촬영하였다.

CeCl₃ histochemical electron microscopy를 이용한 산소기 생성의 검사[7]

내독소에 의해 유도된 폐장에서의 산소기 생성을 검사하기 위하여 조직 내 과산화수소의 생성을 검사하였다. 폐장조직을 적출 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1, 2, 3-triazol-0.1 M Tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 그 후 0.1 M Tris-maleate buffer (pH 7.4)와 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 차례로 수세한 후 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)로 고정시켰다. 고정이 끝난 조직을 sodium cacodylate로 세척하고 ethanol-propylene oxide로 농도를 점차적으로 증가시켜 탈수한 후 epoxy-resin에 포매하였다. 열중합 시킨 block은 ultramicrotome (Recher Supernova)을 이용하여 60 nm의 초박 절편을 만들어 uranyl acetate만으로 염색하여 투과전자현미경(9H-600, Hitachi)으로 검경하였다.

전자현미경을 이용한 폐장의 미세구조, surfactant 층 및 호중구의 변형

폐장의 미세구조 및 폐포 내의 surfactant를 관찰하기 위하여 폐장조직을 5% glutaraldehyde로 고정하고 밀폐된 용기 내에 공기를 주입하여 폐장조직 내의 공기를 제거 하였다. 전고정이 끝난 조직은 1.0 M 인산완충용액으로 세척한 후 1% osmium tetroxide로 후 고정하였다. 그 후 ethanol-propylene 계열로 순차적으로 농도를 증가시켜 탈수한 뒤 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직은 37°C에서 12 시간, 60°C에서 24 시간 열 중합 시키고 60-70 nm의 초절박편을 만든 뒤 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 뒤 투과전자현미경으로 관찰하였다. BALF내의 호중구는 BALF를 원심분리하여 얻은 세포층을 2.5% glutaraldehyde로 전 고정하고, 그 후 1% osmium

tetroxide로 후 고정하였다. 탈수의 과정을 거친 후 원침관에 그대로 epoxy-resin을 부어 포매 하였다. 얼중합 후 60 nm로 초절박편을 만들고 투과전자현미경으로 관찰하였다.

광학현미경을 이용한 폐장의 병리학적 검사

내독소 주입 5 시간 후 실험동물을 enflurane 및 xylazine으로 마취하여 치사 시킨 후 우측폐장을 절제하고, 무작위로 절편을 채취하였다. 10%의 중성 포르말린 액에 잠근 후 주사기로 조직이 담긴 밀폐된 용기에 공기를 주입하여 조직 내의 공기를 제거한 뒤 조직을 고정하였다. 그 뒤 세척, 탈수의 과정을 거친 뒤 paraffin에 포매하고, 미세절단기(Reichert-Jung 2040)로 박편을 제작하고 hematoxylin-eosin용액으로 염색 후 검정하였다.

Evans Blue염색액을 이용한 단백누출지수(lung leak index)의 측정

Evans Blue염색액을 이용하여 단백누출지수를 측정하였다 [10]. Evans Blue염색액(10 mg/0.5 ml/rat)을 외경정맥으로 투여하고 30 분 후에 실험동물을 치사 시킨 후 인산완충용액으로 관류하여, 폐장혈관 내의 혈액을 제거 하였다. 좌우의 폐장을 적출하고 무게를 측정하였다. 그 후 5.0 ml의 foramide 용액에 담근 후 60°C에서 24 시간을 incubation한 후 foramide 용액을 분리하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도를 이용하여 Evans Blue염색액 표준용액을 이용한 표준곡선에서 foramide 용액에 추출된 Evans Blue염색액의 양을 계산 하였다.

기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 이용한 단백질량 및 호중구의 산정

BALF를 상온에서 2,000 rpm, 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 Brown 등의 방법[2]으로 BALF내 단백질함량을 측정하였다.

세포 침전층은 0.1 ml의 생리적 식염수에 재 부유 하여 hemocytometer를 이용하여 백혈구를 산정하고 이중 100 µl를 이용하여 cytopsin을 시행하여 도말표본을 만들었다. 그 뒤 Wright염색 후, 분획검정(differential count)을 통해 호중구의 백분율을 계산, BALF내의 총 호중구의 수를 계산하였다.

통계처리

모든 성적은 Non-paired, two tailed, Student t-test로 검정하였고 p<0.05를 유의하다고 판정하였다.

결 과

LPS를 투여한 흰쥐의 surfactant내의 PAF-phosphorus의 함량(p mol/two lungs)은 1499.5±466.7로서 대조군의 291.1±119.4 보다 높았다(p<0.001) (Table 1). 산소기에 의한 surfac-

Table 1. Comparison of PAF-phosphorus content in isolated pulmonary surfactant

	Sham (n=7)	LPS (n=8)
PAF-phosphorus (p mol/two lungs)	291.1±119.4	1499.5±466.7 ^a

Values are given as mean±SD.

n indicates number of experiments.

a: p<0.001, Sham vs LPS

LPS: lipopolysaccharide, PAF: platelet-activating factor

tant의 손상을 나타내는 HDS및 LDS함량(mmol/two lungs)의 변화는 Table 2와 같다. 대조군에서의 HDS는 17.1±3.5였으나 LPS를 투여한 군에서는 9.1±2.0으로서 LPS를 투여한 군에서 낮았고(p<0.01), LDS는 대조군 에서는 0.8±0.3, LPS투여군 에서는 6.1±1.4로서 LPS 투여군에서 유의하게 높았다 (p<0.001). 폐장내의 호중구의 침윤을 나타내는 MPO의 활성화(U/g of wet lung)는 대조군에서 4.0±1.7이었고, LPS투여군 에서는 39.2±6.8로서 LPS 투여군 에서 현저히 높았다 (p<0.001). 폐포 내로의 호중구의 이동을 나타내는 BALF내의 호중구의 수(millions/two lungs)는 대조군에서 0.05±0.03, LPS투여군에서는 4.01±1.26으로서 LPS투여군에서 현저히 (p<0.001) 높았다(Table 3).

BALF내의 백혈구의 구성은 대조군의 경우는 거의 단핵구로 구성되어있으나(Fig. 1A), LPS를 투여한 경우에 있어서는

Table 2. Effect of LPS on surfactant content (mmol/two lungs) on Sham and LPS-treated rats

	Sham	LPS
HDS	17.1±3.5 (n=8)	9.1±2.0 ^a (n=7)
LDS	0.8±0.3 (n=9)	6.1±1.4 ^b (n=8)

Values are given as mean±SD.

n indicates number of experiments.

a: p<0.01, Sham vs LPS, b; p<0.001, Sham vs LPS

LPS: lipopolysaccharide. HDS: high density surfactant, LDS: low density surfactant

Table 3. Evaluation of PMN infiltration in the lung and migration of PMNs into the alveolar lumen

	Sham	LPS
BALF PMNs (millions/two lungs)	0.05±0.03 (n=8)	4.01±1.26 ^a (n=8)
MPO activity (U/g of wet lung)	4.0±1.7 (n=9)	39.2±6.8 ^b (n=9)

Values are given as mean±SD.

n indicates number of experiments.

a: p<0.01, Sham vs LPS, b; p<0.001, Sham vs LPS

BALF: bronchoalveolar lavage fluid, PMN: polymorphonuclear neutrophil, LPS: lipopolysaccharide, MPO: myeloperoxidase

거의 호중구로 구성되어 있었다(Fig. 1B). 대조군 에서의 폐장 내 호중구는 세포질내의 입자들이 잘 보존되어 있고 위축이 관찰되지 않았으나(Fig. 2A) LPS를 투여한 흰쥐 BALF 내의 호중구는 세포질내의 과립이 고갈되어 있고 수많은 위축이 관찰되었다(Fig. 2B). 또한 폐장조직에서의 과산화수소는 대조군 에서는 관찰되지 않았으나(Fig. 3A) LPS를 투여한 폐장에 서는 제2형폐포세포의 막을 따라 관찰 되었다(Fig. 3B).

LPS를 투여 후의 폐장의 미세구조의 변화는 Fig. 4와 같다.

대조군의 경우는 제1형폐포세포가 잘 보존되어 있고, 기저막 이 그 형태를 유지하고 있으나(Fig. 4A) LPS를 투여한 경우에는 혈관내피세포에서의 부종(endothelial bleb) 및 제2형폐포 세포에서의 충상체의 공포화 및 간질의 부종이 관찰되었다 (Fig. 4B).

제2형폐포세포의 막을 따라 분포하는 surfactant층은 불규 칩하게 분포하거나 폐포 강에 유주 하고 있고 제2형폐포의 세포질에는 충상체의 공포화가 현저하였다(Fig. 4C).

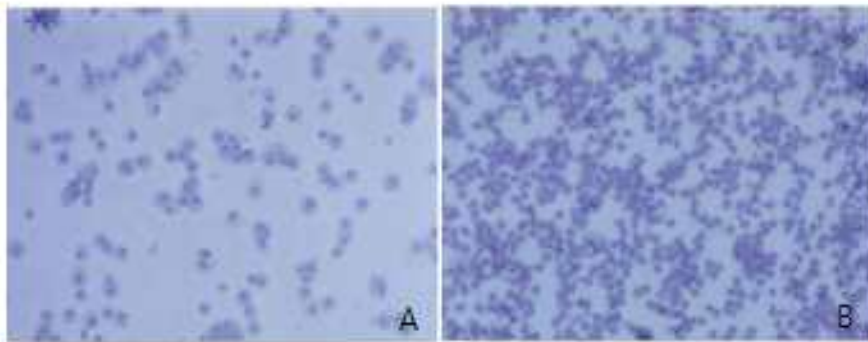


Fig. 1. Cell population in BALF after cytopspin. Alveolar macrophages are predominant cells in BALF of sham rats (A). By contrast, in LPS given rat's BALF, almost all of the cells are neutrophils (B). Wright stain, Original mag $\times 100$.

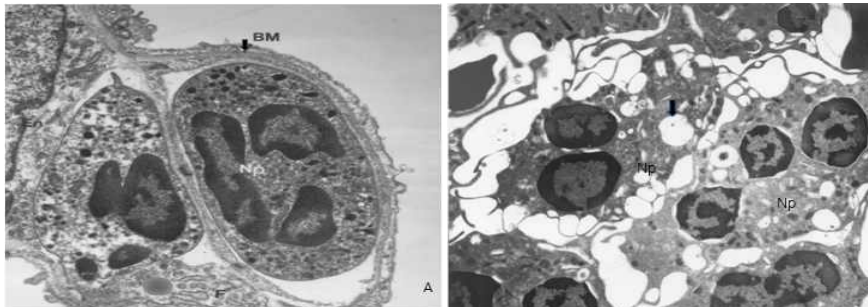


Fig. 2. Ultrastructure of neutrophils in sham and LPS given rats. In sham rats, neutrophil is trapped in capillary and cytoplasmic lysosomal granules are intact (A). By contrast, neutrophils in BALF of LPS given rat shows vacuolated lysosomes and multiple pseudopods (B). Np: neutrophils, BM: basement membrane (arrow: A). En: endothelial cell, F: fibroblast. Original mag. $\times 6,000$.

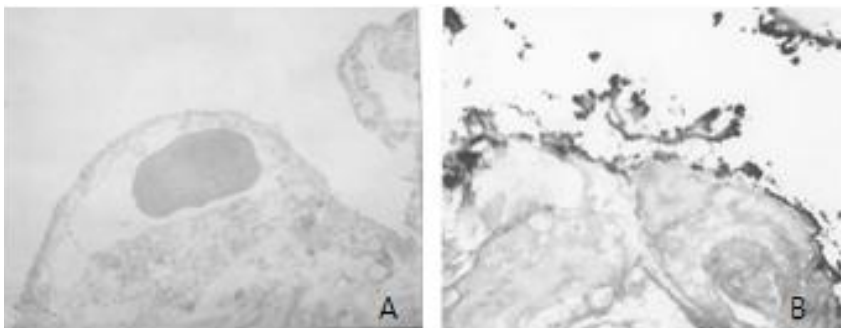


Fig. 3. $CeCl_3$ cytochemical electron microscopy for detection of hydrogen peroxide in the lung. Cerous perhydroxide is not detected in the lung of sham rats (A). By contrast, dense deposits of cerous perhydroxide are noted along the cell membrane of alveolar type II cells in the lung of LPS given rats (B). Original mag $\times 4,000$ (A), $\times 6,000$ (B)

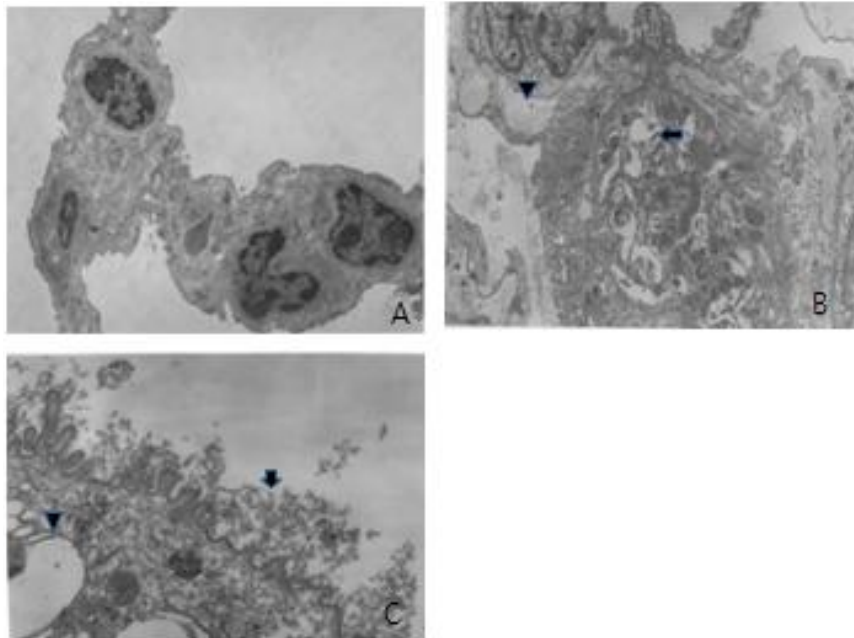


Fig. 4. Ultrastructural changes after LPS instillation in the lung. Ultrastructures and basement membranes are well preserved in endothelial and alveolar type II cells (A, original mag. $\times 5,000$) in sham rat. By contrast, in the LPS-instilled lungs, vacuolated lamellar bodies (arrow) and endothelial blebbing (arrow head) are shown in the lung (B, original mag. $\times 5,000$). Disrupted layer of surfactant (arrow), floating clumps of surfactant and vacuolated lamellar bodies (arrow head) are noted also (C, original mag. $\times 20,000$).

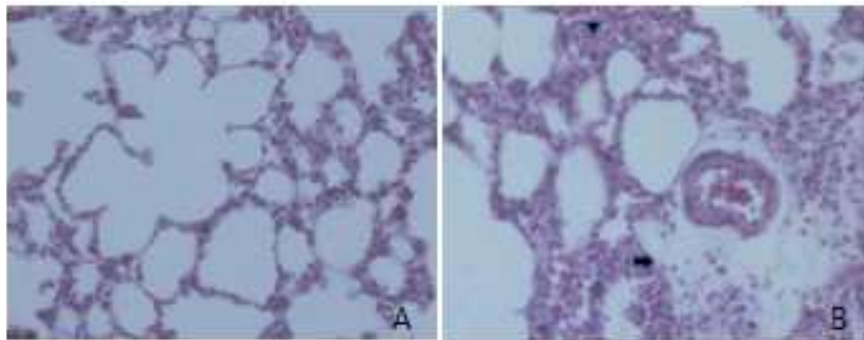


Fig. 5. Light microscopic findings of the LPS-induced acute lung injury. Normal alveoli and septa are noted in the lung of sham rat (A). By contrast, atelectasis (arrow head) and perivascular cuffing pertaining inflammatory cells are noted in LPS given rat's lung (B). H&E stain. Original mag. $\times 200$.

동시에 광학현미경을 통해 본 폐장조직은 LPS를 투여한 경우, 무기폐, 혈관주위의 부종이 관찰되었다(Fig. 5A, B).

폐모세혈관에서의 단백질의 유출을 알아보기 위해 시행한 Evans Blue염색액 누출(μg of EBD/g of wet lung) 실험에서 대조군은 7.0 ± 3.4 , LPS를 투여한 군에서는 10.7 ± 2.5 로서 LPS투여군에서 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. BALF내의 단백질함량($\text{mg}/\text{two lungs}$)도 대조군은 2.2 ± 0.6 , LPS투여군은 5.4 ± 0.7 로서 LPS군에서 유의하게($p < 0.01$) 높은 값을 보였다(Table 4).

고 찰

LPS에 의한 급성 폐손상에서 PAF의 역할은 호중구의 침윤에 따른 호중구성 산소기의 생성 및 유착분자의 활성화에 따른 혈관내피세포의 손상이라고 알려져 있다[11]. 본 연구에서는 LPS에 의해 surfactant내의 PAF의 함량이 증가함을 보여주고 있다. Surfactant의 주성분은 알려진 바와 같이 인지질이며 그 중에서도 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)이 주성분이며 폐장의 LPS에 의한 염증반응에 관여하는 phospholipase A2 (PLA2)의 기질로 작용한다[6]. 급성 폐손상 환자의

Table 4. Effect of LPS on alveolar flooding estimated by LLI and BALF protein

	Sham	LPS
LLI (μg EBD/g of wet lung)	7.0 \pm 3.4 (n=10)	10.7 \pm 2.5 ^a (n=18)
Protein content (mg/two lungs)	2.2 \pm 0.6 (n=6)	5.4 \pm 0.7 ^b (n=10)

Values are given as mean \pm SD.

n indicates number of experiments.

a: $p < 0.01$, Sham vs LPS, b: $p < 0.001$, Sham vs LPS

LPS: lipopolysaccharide, LLI: lung leak index, EBD: Evans Blue Dye

BALF에서 PLA2의 활동도 및 PAF의 함량이 증가한 것은 알려져 있지만[23] surfactant 자체 내에서 PAF함량이 증가한 것에 대한 보고는 없다. 급성 폐손상 시에 BALF내의 호중구가 증가하거나, 폐장 내에 호중구가 짧은 시간 내에 침윤하는 현상은 본 연구에서도 관찰되는데 이러한 현상은 surfactant내의 PAF 함량의 증가가 직접적인 원인이라고 본다. LPS는 surfactant대사의 이상을 초래하여, 그 기능이 상실된 LDS를 증가시킨다[9]. 동시에 형태학적으로는 충상체의 변형 및 공포화를 유도하고, 미세구조상으로는 surfactant층의 형태를 변형시켜 그 기능이 중지된다[15]. LPS에 의한 급성 폐손상 시에는 초기에 BALF내의 surfactant의 함량이 증가하는데 이것은 정상적인 surfactant의 exocytosis가 아닌 제2형 폐포세포의 손상에 따른 충상체의 폐포 강으로의 이동이라고 알려져 있다[13]. 이러한 충상체가 대식세포에 의해 탐식되기도 하지만 대개는 PLA2의 기질로 작용하여 PAF의 생성에 관여하는 것으로 생각된다.

즉, phosphatidylcholine은 PLA2에 의해 lysophosphatidylcholine으로 전환된 뒤에 lysoPAF-acetyltransferase의 작용에 의해 PAF로 변환되는 remodelling의 과정을 거칠 것으로 생각된다[22]. Surfactant를 분리하여 PAF의 함량을 관찰한 본 실험의 결과는 BALF내의 PAF의 함량의 증가를 관찰한 다른 보고[23]와 결과가 일치하지만 surfactant 자체가 PLA2의 기질이 되어 surfactant자체의 PAF의 함량이 증가한다는 것은 특기할 사항이다. Surfactant내의 PAF함량의 증가는 호중구에 대한 강한 화학주성을 유발하고 이에 따른 respiratory burst에 의해 산소기의 생성이 현저히 증가함을 보여주고 있다. 즉 LPS를 가한 실험동물의 BALF내의 호중구는 세포질내의 과립이 소진되어 공포화되어 있고 동시에 무수한 위축이 관찰됨으로 미루어 호중구의 respiratory burst가 있었음을 알 수 있다. 또한 CeCl_3 를 이용한 조직화학적 검사에서도 과산화수소의 생성이 현저함을 보여주고 있는데, 이것 또한 surfactant 내의 PAF의 작용과 관계가 있는 듯 하다. PAF는 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화 시켜 호중구에서의 산소기 생성에 관여한다[17]. 본 연구의 실험동물에서 보이는 혈관에서의 단백질층의 증가 및 광학적 미세구조적 폐손상의 원인은 surfactant내의 PAF함량의 증가와 관계가 있는 것 같다. 일찍

이 Holm은 surfactant가 PLA2의 기질로서 폐장의 손상에 관여할 것으로 보았고[8], Moya 등[18]도 surfactant내의 PAF가 신생아호흡부전증후군(infant respiratory distress syndrome, IRDS)에서 폐장의 손상을 유발 할 수 있음을 주장하였다. 급성 폐손상에서 BAL 세포 내의 PAF의 분해효소인 PAF-acetylhydrolase (PAF-AH)의 활성도가 감소해 있다[19]는 사실을 감안한다면 surfactant내 PAF의 증가는 폐손상의 직접적인 원인이 될 수 있고 폐포 내에 surfactant가 존재하는 한 급성 폐손상의 치료가 어렵다는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 대구 가톨릭대학교 의과대학 기초의학 연구비로 수행 되었음(Grant number 2011-11).

References

- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem Physiol.* **37**, 911-917.
- Brown, R. E., Jarvis, J. L. and Hyland, K. J. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance. *Anal. Biochem.* **180**, 136-139.
- Corbet, A., Cregan, J., Frink, J. and Rudolph, A. J. 1983. Distension-produced phospholipid secretion in postmortem in situ lungs of newborn rabbits: inhibition by specific beta-adrenergic blockade. *Am. J. Respir. Dis.* **128**, 695-701.
- Goldblum, S. E., Wu, K. E. and Jay, M. 1985. Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. *J. Appl. Physiol.* **119**, L104-112.
- Hess, H. H. and Derr, J. E. 1975. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomolar range. *Anal. Biochem.* **63**, 607-613.
- Hite, R. D., Seeds, M. C., Jacinto, R. B., Balasubramania, R. and Waite, M. 1998. Hydrolysis of surfactant associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipase A2. *Am. J. Physiol.* **275**, L740-747.
- Hobson, J., Wright, J. and Churg, A. 1991. Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants. *Am. J. Pathol.* **139**, 442-447.
- Holm, B. A., Keicher, L., Liu, M. A., Sokolowski, J. and Enhorning, G. 1991. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol.* **71**, 317-321.
- Ikegami, M., Kallapur, S., Michna, J. and Jobe, A. H. 2000. Lung injury and surfactant metabolism after hyper-ventilation of premature lambs. *Pediatr. Res.* **47**, 398-404.
- Kirsch, C. M., Brokaw, J. J., Prow, D. M. and White, G. W. 1992. Mechanism of platelet-activating factor-induced vascular leakage in the rat trachea. *Exp Lung Res.* **18**, 447-459.
- Lee, Y. M., Hybertson, B. M., Cho, H. G., Terada, L. S., Cho, O., Repine, A. J. and Repine, J. E. 2000. Platelet-activating

- factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L75-80.
12. Lee, Y. M., Hybertson, B. M., Terada, L. S., Repine, A. J., Cho, H. G. and Repine, J. E. 1997. Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am Rev. Respir. Crit. Care Med* **155**, 1624-1628.
 13. Lee, Y. M., Hybertson, B. M., Cho, H. G. and Repine, J. E. 2002. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J. Lab. Clin. Med* **140**, 312-319.
 14. Liau, D. F., Barret, C. R., Bell, A. L. and Ryan, S. F. 1987. Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. *Am Rev. Respir. Dis.* **136**, 395-401.
 15. Martensson, J. A., Jain, J. A., Frayer, W. and Meister, A. 1989. Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 5296-5233.
 16. Minayama, Y., Tozawa, K., Kitamura, M., Saito, S. and Ogawa, J. 1998. Platelet-activating factor mediates intracellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the non-hypoxic ischemia rat lung. *Am J. Cell. Mol. Biol.* **19**, 150-157.
 17. Mitola, J. M., Jeffrey, P. K. and Hellewell, P. G. 1998. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **18**, 197-204.
 18. Moya, F. R., Hoffman, D. R., Zhao, B. and Johnston, J. M. 1993. Platelet-activating factor in pulmonary surfactant preparation. *Lancet* **341**, 858-860.
 19. Nakos, G., Kitsioli, E., Hatzidaki, E., Koulouras, V., Touqui, L. and Lekka, M. E. 2005. Phospholipase A2 and platelet-activating factor acetylhydrolase in patients with acute respiratory syndrome. *Crit. Care Med* **33**, 772-779.
 20. Putman, E. J., Boere, F. Van Bree, L., Golde, L. M. G. and Haagman, H. P. 1995. Pulmonary surfactant subtype metabolism is altered after short-term ozone exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **134**, 132-138.
 21. Ribaldi, E., Mezzasoma, A. M., Francecangeli, E., Prosdicimi, M., Nenci, G. G. and Gesele, P. 1996. Inhibition of PAF synthesis by stimulated human polymorphonuclear leukocytes with cloricromene, an inhibitor of phospholipase A2 activation. *British J. Pharmacol.* **118**, 1351-1358.
 22. Shin, T. R., Na, B. K. and Lee, Y. M. 2005. Protective effect of the inhibition of PAF remodeling and adhesion molecule on the oxidative stress of the lungs of rats given endotoxin intratracheally. *Tuberc. Respir. Dis* **58**, 276-284.
 23. Sorensen, J., Kald, B., Tagesson, C. and Lindahl, M. 1994. Platelet-activating factor and phospholipase A2 in patients with septic shock and trauma. *Intensive Care Med* **20**, 551-561.
 24. Triggiani, M., Marino, V. D., Sofia, M., Faraone, S., Ambrosio, G., Carratu, L. and Marone, G. 1997. Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am J. Respir. Crit. Care Med* **156**, 94-100.

초록 : 흰쥐에서 내독소로 유도된 급성폐손상에서 surfactant내 PAF의 역할

이영만*

(대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실)

흰쥐에서 대장균(*E.coli*: E0127;B8)의 내독소(lipopolysaccharide)로 급성 폐손상을 유도하고 이때 폐장 내 호중구성 respiratory burst에 따른 폐장조직의 변화 및 폐포 내로의 단백질 유출을 확인하였다. Pulmonary surfactant를 분리하고 이때 surfactant대사의 변화와 surfactant내의 PAF함량이 증가한 사실도 확인하였다. Surfactant내의 PAF함량의 증가는 폐포 내로의 호중구의 이동 및 그에 따른 산소기 생성의 증가로 폐장 내의 모세혈관 및 제 1형 폐포세포의 직접적 손상의 원인으로 생각되었고, 이러한 surfactant내의 PAF의 증가가 실질적으로 급성 폐손상의 치료를 어렵게 하는 원인의 하나로 생각되었다.