대한의생명과학회지: 제2권 제2호 1996
Korean J. Biomed. Lab. Sci.
Vol. 2, No. 2, p.159~166, December, 1996

인터루킨-1α를 기관지 투입 후 나타난 폐세척액에서의 대식세포의 미세구조적 변화

영남대학교 생물학과, 대구효성가톨릭대학교 의과대학 생리학교실*

조현국 · 이영만* · 박원학†

국문초록: 인터루킨-1을 흰쥐의 기관지 내로 투여하였을 때 급성 부종성 폐손상(acute edematous lung injury)이 유발되며, 폐세척액 내 호중구가 증가되고 surfactant의 양도 증가한다. 대식세포는 증가된 surfactant에 기인한 탐식작용 활동이 증가하여 세포 내 환상의 구조물들이 증가하나 정상군과 비교하여 형태적으로 세포기관의 구조에서 차이를 보이고 있다. 이러한 세포구성은 세포간 기능상의 차이를 나타내는 것이며, surfactant의 순환과 연관성이 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 정상군에 있어서 폐포강 내 대식세포가 환상의 구조물들을 합성하는 형태를 보였으며, 이것은 surfactant의 재합성과 분비작용과 매우 밀접한 연관성이 있음을 보여 주는 것이다.

서 론

인터루킨-1(interleukin-1; IL-1)은 염증반응시 초기에 대식세포에서 유리되는 사이토카인으로 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome; ARDS) 환자의 폐세척액(bronchoalveolar lavage; BAL)에서 증가되며[9,19,20], 최근 IL-1을 이용한 ARDS model에서의 ARDS의 발병기전(pathogenesis)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 IL-1을 실험동물의 기도로 직접 투여하는 경우 폐포강내로의 단백질의 유입이 증가하고 염증세포의 침윤이 증가되므로 급성폐손상이 유발된다[5,8,11,12]. 이러한 ARDS시 나타나는 surfactant 기능의 변화는 주로 단백질에 의한 표면장력 감소기능의 상실이다[18]. 또한 ARDS시 폐강내로 염증세포의 침윤, 특히 초기에 대식세포의 침윤이 현저하므로 대식세포에 의한 surfactant 대사의 변화가 예측된다. Surfactant는 그 대사과정에서 일부는 폐포강내의 대식세포에 의해 탐식되는데[4,14] 그 양은 미량으로 측정이 어렵다[1,10,16,17]. 한편 대식세포는 surfactant의 주성분인 인지질을 신속하게 가수분해 할 수 있고[13] surfactant를 분비하는 큰폐포상피세포(alveolar type Ⅱ cell)와 같이 소포체, 골지체, 그리고 사립체의 발달[7]을 보이므로 대식세포는 단순히 기능을 상실한 surfactant의 탐식작용에만 관여하는 것 같지는 않다. 따라서 본 연구에서는 염증 초기에 대식세포의 침윤을 유도하는 것으로 알려진 IL-1을 이용, 폐강내 염증반응을 유도한 뒤 이때 폐세척액내의 증가한 대식세포를 분리, 수집하여 surfactant의 재합성과 분비에 관련된 형태학적 변화를 알아보려 하였다.

*논문접수 1996년 10월1일, 수정재접수 1996년 11월 22일.
†별책요청저자

재료 및 실험방법

동물 및 IL-1 투여

동물은 300gm 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였으며(Sasco, Omaha, NE, USA), 대조군과 IL-1(interleukin-1α) 투여군으로 구분하였다. IL-1을 투여하기 위하여 metofane® (metoxyflurane)을 이용하여 마취시킨 뒤 stub adapter tube가 있는 16게아지 바늘을 사용하여 0.5ml의 생리적 식염수에 50 ng의 IL-1을 혼합한 후 기도로 직접 분무하였다. 대조군은 멸균한 생

리식염수 동량을 같은 방법으로 주입하였다.

폐세척액 내의 인지질 함량측정

IL-1 투여후 5시간 뒤 8.0ml의 생리적 식염수를 이용하여 폐세척을 시행하여 약 6.0ml의 폐세척액을 얻은 뒤 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 세포성분을 제거한 뒤, 상층액을 4℃, 20,000×g로 120분간 원심분리하여 surfactant를 분리하였다. 인지질의 함량을 측정하기 위해서는 surfactant 침전물을 Folch 등의 방법[3]에 따라 지질을 분리한 후 Hess와 Derr의 방법[6]으로 인지질 인(phospholipid phosphorus)을 정량하였고, Corbet 등의 방법[2]에 따라 인지질로 환산하였다.

미세구조적 관찰

IL-1 투여 5시간 후 폐세척액을 채취하기 위해 ketamin hydrochloride(90mg/kg)과 xylazine (7mg/kg)을 이용하여 마취한 후 기관지를 통하여 8.0ml의 생리식염수를 폐에 주입하고 폐세척을 실시한 다음, 1,200×g로 상온에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전물을 E-튜브로 옮긴 후 2.5% glutaraldehyde로 20분간 고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)으로 수세한 후 1% osmium tetroxide로 15분간 후고정하였다. Alcohol-propylene oxide 계열로 탈수하고 Epon-812에 포매하였다. 전과정은 원심분리하에서 실시하였으며, 포매된 조직은 60-70 nm로 초박절편하고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 관찰하였다.

결 과

폐세척액 내에서의 인지질 함량

IL-1 투여 5시간 후 폐손상 정도를 알아보기 위한 방법의 하나로 폐세척액 내의 인지질 함량을 측정한 결과, IL-1 투여군은 IL-1 투여 5시간 후 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다($p<0.01$).

Table 1. Phospholipid content in BAL of lungs of rats given IL-1 treated intratracheally

	Control(n=10)	IL-1(n=19)
Lung phospholipid content(mM/gm lung)	13.84±2.49	19.40±3.89*

Each value represents the mean±S.E.
*; significantly different from control group; $p< 0.01$.

폐세척액 내 대식세포의 미세구조적 관찰

IL-1 투여 5시간 후 ketamine hydrochloride와 xylazine을 이용하여 마취하고 폐세척을 시행하였다. 그 결과 생리적 식염수만을 투여한 정상군의 대식세포는 두가지 형태로 관찰되었다. 첫번째 형태는 그림 1의 A와 같이 세포의 체적이 증가하고 세포질 내 거의 모든 부분에서 환상 구조를 하고 있는 구조물들을 탐식하고 있는 형태이며, 두번째 형태는 그림 1의 B, 그림 2a, 2b와 같이 전체 세포에 대한 핵의 비율이 증가하고, 사립체, 리보오솜, 그리고 소포체가 발달한 형태로 환상의 물질(lamellar body) 형성이 관찰되었다. 이러한 환상의 물질들은 큰폐포상피세포의 환상의 물질과 그 형태가 동일하며, 그 뿐만 아니라 세포내 소기관들의 구성 형태가 유사하였다.

IL-1을 투여한 실험군의 대식세포는 그림 1의 A와 같은 형태의 세포가 많이 관찰되며, 그림 4a, 4b에서와 같이 정상군과 비교하여 볼 때 사립체의 수가 감소하였고, 소포체의 발달이 거의 관찰되지 않을 뿐만 아니라, 탐식된 환상의 구조물들은 퇴화하는 모습을 보였다. 그림 4c에서도 대식세포들은 이러한 구조물들을 많이 함유하고 있으며 정상군에 비해 그 수는 현저히 증가되어 관찰되었다.

고 찰

대식세포는 형태학적 특징을 갖지 않는 세포이다. 본 실험에서 IL-1을 기관지 내로 투여한 5시간 후 기관지를 통한 폐세척액에서의 대식세포는 미세구조적으로 정상군과 차이를 보였다. 또한 IL-1을 기관지 내 투여시 폐세척액 내 surfactant의 주성분인 인지질은 유의하게 증가($p<0.01$) 하였다. 이러한 surfactant 함량의 증가는 정상적인 세포외 유출(exocytosis)에 의한 것이라기 보다는 큰폐포상피세포의 직접적인 손상의 결과로 보인다. 증가한 surfactant의 모습은 대부분 환상구조를 보였으며, 매우 소량은 미엘린구조로도 관찰되었다. 대식세포에 의해 탐식된 구조물들은 대부분 환상구조를 하고 있으며 그림 1의 A형태로 나타난 대식세포는 정상군, 실험군 모두에서 관찰되었으나 그림 1의 B형태로 나타난 대식세포는 IL-1 투여군에서 거의 찾아볼 수가 없었다.

분비된 surfactant는 4가지 경로로 제거되는데[4]

대식세포의 탐식작용에 의한 것이 그 중 하나이나[14] 그 양이 매우 소량[1,10,16,17]일 뿐이라고 밝히고 있다. 대식세포는 surfactant를 구성하는 지질을 함유하고 있으며[15] apoprotein도 함유하고[21,22] 있지만 그 곳이 surfactant를 형성하는 전구체인지 혹은 합성에 관계하는지는 명확하지 않다[1].

그렇지만 본 실험에서 나타난 바와 같이 그림 1의 B형태의 세포는 환상구조를 갖는 surfactant 지질의 합성이 가능함을 충분히 보여주고 있다. 그 이유는 첫째 surfactant를 합성 · 분비하는 큰 폐포상피세포와 같이[7] 발달된 소포체와 사립체를 가지며, 둘째 IL-1에 의한 손상을 mepacrine으로 감소시킨 이전의 실험에서 나타난, 폐조직내 큰폐포상피세포에서 형성된 환상 구조물(그림 3a, 3b)과 동일한 물질을 함유하고 있는 것이다.

반면 IL-1을 투여한 실험군에서는 정상군과 달리 소포체의 발달이 없어 지질의 합성이 불가능하며 특히 세포내 환상 구조물들이 퇴화되는 모습을 보이고 있다.

이와 같이 볼 때 정상적으로 폐포강내 대식세포는 소량이지만 surfactant의 합성 · 분비기능을 담당하는 것으로 가정할 수 있다. 이것과 연관되어 IL-1으로 발생한 손상 폐 조직내 대식세포는 환상 구조물로 된 비활성 surfactant의 탐식작용이 증가하고 이와 병행하여 지질의 합성 · 분비기능은 저하되어 surfactant의 활성감소에 의한 가중된 폐손상도 가능하리라는 것을 말해 주고 있다.

참 고 문 헌

1. Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J and Clements JA(1981): Precursor-product relationship between rabbit type Ⅱ cell lamellar bodies and alveolar surface active material. Surfactant turnover time. *Biochim Biophys Acta,* 666: 382-93.
2. Corbet A, Creegan J, Frink J and Rudolph AJ (1983): Distension-produced phospholipid secretion in postmortem in situ lungs of normal rabbits. *Am Rev Respir Dis,* 128: 695-701.
3. Folch J, Lees M and Stanley GHS(1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from aniaml tissues. *J Biochem,* 226: 497-509
4. Fujiwara T(1970): Transport and removal of pulmonary surfactant in mammalian and avian lungs. *Proc Jap Soc Biol Interface,* 1: 5-24.
5. Guidot DM, Stevens EE, Repine MJ, Lucca Broco AE and Repine JE(1994): Intertracheal but not intravascular interleukin-1 causes acute edematous injury in isolated neutrophil perfused rat lungs through an oxygen radical mediated mechanism. *J Lab Clin Med,* 12: 605-609.
6. Hess HH and Derr JE(1975): Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomolar range. *Anal Biochem,* 63: 607-613.
7. Hollingsworth M and Gilfillan AM(1984): The pharmacology of lung surfactant secretion. *Am Soc pharmacol Exp Therap,* 36(2): 69-90.
8. Hybertson BM, Leff JA, Beehler CJ, Barry PC and Repine JE(1995): Effect of vitamin E deficiency and supercritical fluid aerosolized vitamin E supplementation of interleukin-1 induced oxidative lung injury in rats. *Free Radic Biol Med,* 18: 537-542.
9. Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW and Campbell GD(1989): Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis,* 140: 1686-1692.
10. King RJ and Martin H(1980): Intracellular metabolism of the apoproteins of pulmonary surfactant in rat lung. *J Appl physiol,* 42: 812-20.
11. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ and Repine JE(1995): Cytokine induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced lung leak in rats. *J Appl physiol,* 79: 472-478.
12. Leff JA, Wilke CP, Furman MJ, Bodman ME and Repine JE(1995): Interleukin-1 pretreatment prevents interleukin-1 induced lung leak in rats. *Am J physiol,* 268: L12-L16.
13. Miles PR, Bowman L and Castranova V(1985): Incoaporation of [^{3}H] palmitate and [^{14}C] choline into saturated phosphatidyl cholines into rat alveolar macrophages. *Bichin Biophys Acta,* 833: 342.
14. Naimark A(1973): Cellular dynamics and lipid metabolism in the lung. *Fed Proc,* 32: 1967-71.

15. Nichols BA(1976): Normal rabbit alveolar macrophages. Ⅰ. The phagocytosis of tubular myelin. *J Exp Med,* 144: 906-919.
16. Oyarzun MJ and Clements JA(1978): Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators and prostaglandins in the rabbit. *Am Rev Respir Dis,* 17: 879-91.
17. Oyarzun MJ and Clements JA(1977): Ventilatory and cholinergic control of pulmonary surfactant in the rabbit. *J Appl physiol,* 43: 39-45.
18. Reyanolds HY(1987): Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis,* 135: 250-263.
19. Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA and Webster RD(1989): Immunoreactive interleukin-1 in broncheoalveolar lavage fluid of high risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res,* 15: 881-894.
20. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Gran GE and Dayer J(1992): High broncheoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Resp Dis,* 145: 1016-1022.
21. Walker SR, Williams MC and Benson BJ(1986): Immunocytochemical localization of the major surfactant apoproteins in type Ⅱ cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem cytochem,* 34: 1137-1148.
22. Williams MC and Benson BJ(1981): Immunocytochemical localization and identification of the major surfactant protein in adult rat lung. *J Histochem Cytochem,* 29: 291-305.

Photographs of electron microscope stained with uranyl acetate and lead citrate

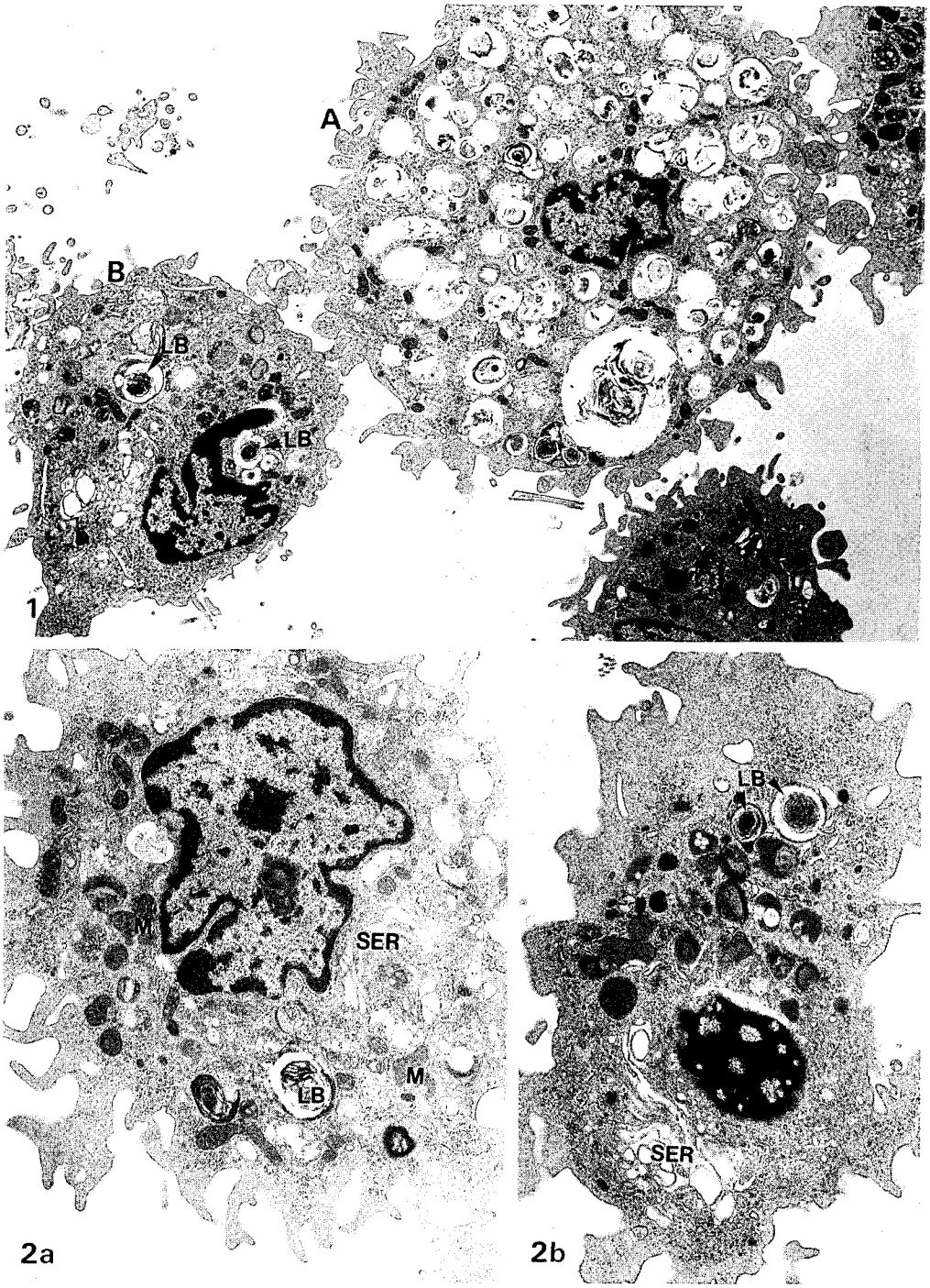

Figure 1. Macrophages in the BAL of control group(×5,600); Two types of macrophages are shown. A; type A macrophage, B; type B macrophage, LB; lamellar body.

Figure 2a,b. Macrophage in the BAL of control group(×9,600);Mitochondria, smooth-endoplasmic reticulum were developed, and formation of surfactant lamellar bodies is shown. M; mitochondria, SER; smooth-endoplasmic reticulum, LB; lamellar body.

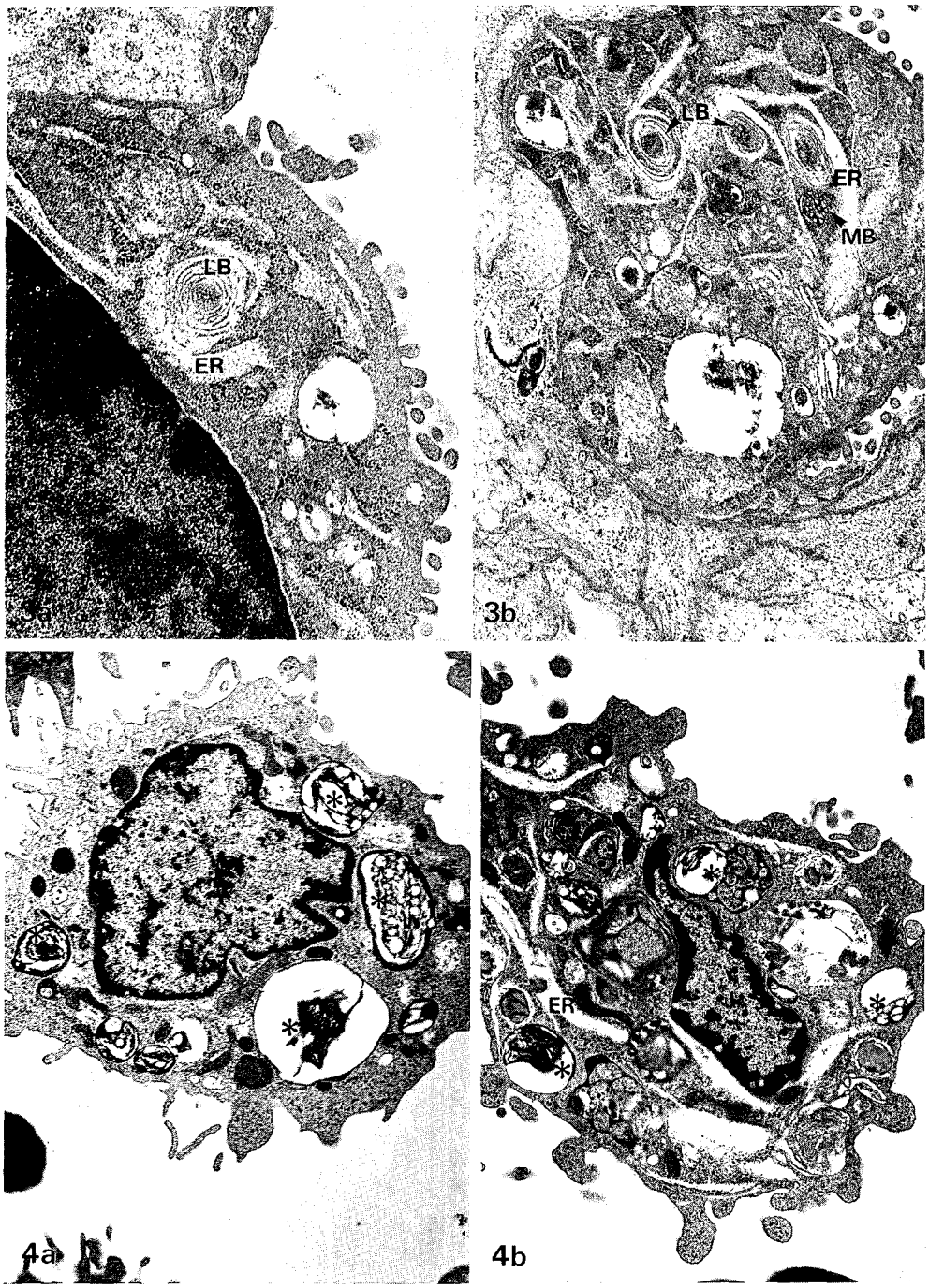

Figure 3a,b. Alveolar type Ⅱ cell in mepacrine and IL-1 treated rats' lungs(×9,600); Lamellar bodies were formed in the cytoplasm of the alveolar type Ⅱ cell. LB; lamellar body, ER; endoplasmic reticulum, MB; microvesicular body.

Figure 4a,b,c. Macrophages in the BAL of IL-1 treated rats(a,b:×4,200 c:×5,600); The phagocytic materials containing lamellar structures(*) and apoptotic neurophil(4c,*) are shown in cytoplasm. ER; endoplasmic reticulum.

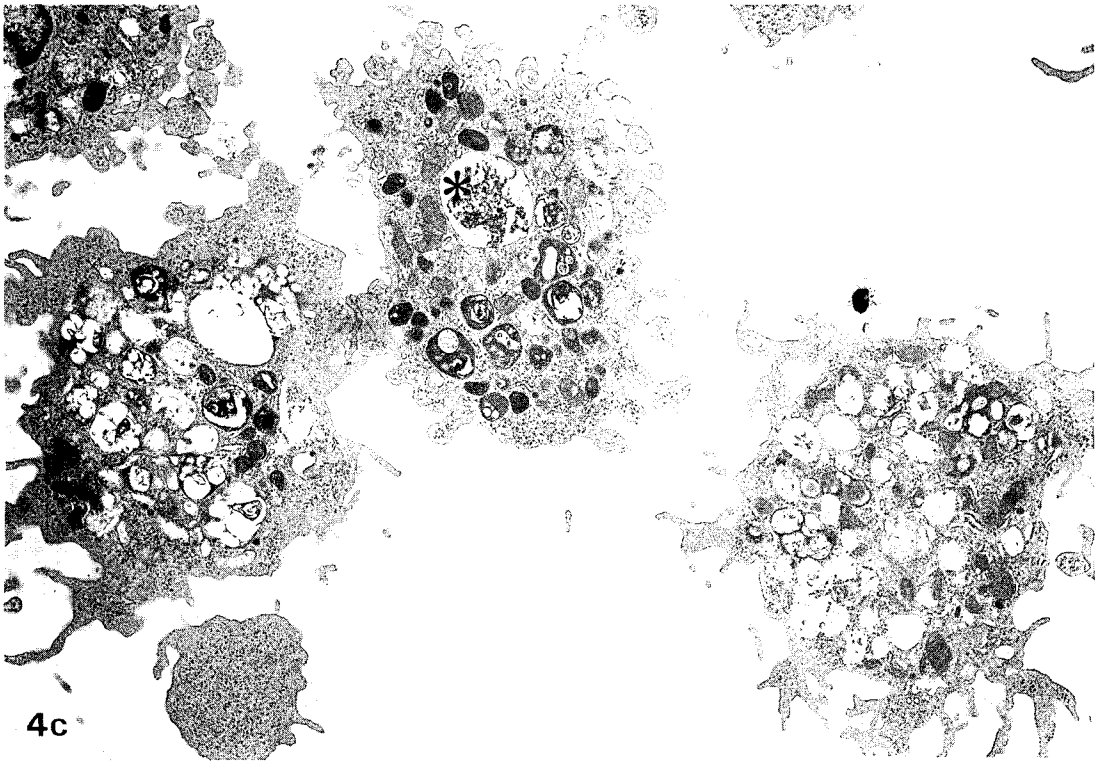

Figure. 4c.

=Abstract=

Ultrastructure of Macrophages in BAL of Rat Given Interleukin-1 α Intratracheally

Hyun-Gug Cho†, Young-Man Lee* and Won-Hark Park

Department of Biology, Yeungnam University, Kyongbuk, Kyongsan, 712-749, Korea
**Department of Physiology, School of Medicine, Catholic of Taegu-Hyosung Catholic University, Taegu, 705-716 , Korea*

In order to investigate the recycling of the pulmonary surfactant in association with morphological changes in macrophage after interleukin-1 α (IL-1) induced lung injury, an acute lung injury was induced by instillation of IL-1 into the trachea. Numbers of neutrophils and phospholipid content were increased significantly($p<0.01$) in IL-1 treated BAL(brochoalveolar lavage) compared to control rat. By increased phagocytosis, the lamellar structures in the macrophges of IL-1 treated rats' BAL were increased and the compositions of the cellular organelles were changed in comparison to control rat. This difference in compositions of cellular organelles denotes difference of functions in macrophages between control and IL-1 treated rats. As macrophages have been said to implicate (in the difference in the recycling of pulmonary surfactant, it is highly probable that the difference in compositions of cellular organelles is closely related to the recycling of pulmonary surfactant. In the present study circular structures were synthesized in the cytoplasm of the macrophages in BAL of normal rats. Based on these experimental results, it is suggested that macrohages might synthesize surfactant during recycling of surfactant in the lung.

Key Words: Interleukin-1, Macrophages, Recycling of pumonary surfactant

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 159~166, December 1996]

†Corresponding author