

기니픽에서 Ovalbumin으로 유발된 즉시형 기관지 수축반응에 대한 Pranlukast의 효과[†]

고려대학교 의과대학 내과학교실

이신형, 심재정, 김경규, 정혜철, 권영환, 김제형,
이승룡, 이소라, 이상엽, 조재연, 인광호, 유세화, 강경호

= Abstract =

Effects of Pranlukast on Ovalbumin Induced Early-Phase Bronchoconstriction in Guinea Pigs

Sin Hyung Lee, M.D., Jae Jeong Shim, M.D., Kyung Kyu Kim, M.D.,
Hye Cheol Jeong, M.D., Young Hwan Kwon, M.D., Je Hyeong Kim, M.D.,
Sung Yong Lee, M.D., So Ra Lee, M.D., Sang Youb Lee, M.D., Jae Youn Cho, M.D.,
Kwang Ho In, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Leukotriene (LT) C₄, D₄, and E₄, the main components of slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A), have been suggested to play an important role in bronchial asthma such as antigen-induced bronchoconstriction, airway hyperreactivity, and pulmonary eosinophil accumulation. The purpose of this study was to evaluate the effects of treatment with the cysteinyl-LTs (cys-LTs) antagonist, pranlukast on allergen-induced guinea pig asthma model.

Methods : Guinea pigs of treatment and placebo groups were sensitized by subcutaneous injection of ovalbumin (OVA) and challenged by inhalation of aerosolized OVA (1% weight/volume OVA). Normal control group did not sensitize with OVA. Oral ingestion of pranlukast and normal saline to the treatment and placebo groups was performed. In the treatment and placebo groups, airway resistance was measured before and after oral ingestion. Serum LTC₄ and eosinophilic infiltration of the bronchiolar and peribronchiolar tissues were measured after ingestion in the treatment and placebo groups.

Results : Allergen-induced airway constriction developed in 20 (8 in treatment group, 12 in placebo group) among 35 guinea pigs. Airway resistance was significantly decreased at 3 and 6 minutes after OVA challenge in the pranlukast treatment group. In the placebo group, there was no difference of airway resistance between

[†]본 연구는 (주)동아제약의 지원에 의하여 이루어진 것임

before and after saline ingestion. Serum LTC₄ levels showed 348.4 pg/ml in the treatment group, 373.9 pg/ml in the placebo group, and 364.4 pg/ml in the control group. There were no statistically significant difference between treatment and placebo group ($p=0.232$), and treatment and control group ($p=0.501$). Eosinophilic infiltrations in the peribronchiolar region per one-microscopic field (X400 high power fields) demonstrated 7.06 in the treatment group, 19.2 in the placebo group, and 4.50 in the control group. There was significant decrement of eosinophilic infiltration in the treatment group which was compared with placebo group ($p=0.001$).

Conclusion : These results demonstrate that pranlukast, a cys-LTs receptor antagonist, can attenuate allergen induced early-phase bronchoconstriction and eosinophilic infiltration in the bronchiolar tissues. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 697-708)

Key words : Asthma, Leukotriene, Leukotriene antagonist.

서 론

기관지 천식은 기도의 간헐적 수축, 기도 염증, 기관지 과민성을 특징으로 하는 가역적인 만성 염증성 질환이다¹⁾. 이때 기도의 염증은 각종 싸이토카인 (cytokine)과 염증 매개물질 (mediator)로 인하여 발생되며 이러한 염증 반응이 기도 평활근의 수축이나 기도 과민반응을 악화시킬 수 있다. 염증세포의 일종인 호산구가 기도벽에 침윤되면 호산구로부터 생성된 매개물질이 미세혈관 투과성의 항진, 기도부종 및 기도과민 반응의 항진등 기도 염증상태를 유발시키고 천식의 악화에 관여한다²⁾. 대부분의 천식환자에서 발생하는 기도수축 반응은 원인 항원 물질 흡입 10-20 분 후에 일어나는 즉시형 반응과 4-12 시간 후에 나타나는 지연형 반응으로 나눌 수 있는데 이와 같은 즉시형 및 지연형 과민반응을 일으키는 물질을 slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) 라고 하여 천식유발의 중요한 매개물질로 알려져 있으며 주로 leukotriene (LT) C₄, D₄, E₄와 같은 cysteinyl-LTs (cys-LTs)로 구성 되어있다³⁾. 따라서 cys-LTs의 작용을 억제시킴으로써 천식반응을 방지할 수 있다는 가정아래 여러 가지 천식 치료제가 개발되고 있으며 크게 cys-LTs의 합성 억제제와 수용체 차단제로 나뉘어 진다. 알레르겐 유발 기관지 천식 기니피 모델에서 cys-LTs의 선택적 수용체 차단제의 일종인

pranlukast의 효과가 보고⁴⁻⁸⁾되고 있으나 현재 국내에서는 실험동물 천식 모델에 대한 pranlukast의 효과를 평가한 연구가 아직 없다.

따라서 저자들은 첫째 Ovalbumin (OVA)으로 감작된 기니피 기관지 천식 모델에서 즉시형 기관지 수축 반응 시 비마취, 비결박 상태의 기도저항의 변동을 측정하고, 둘째 기도저항 및 기관지 조작성 호산구 침윤에 미치는 pranlukast의 효과를 평가하며, 셋째 수용체 차단제인 pranlukast가 cys-LTs의 혈중 농도에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

체중 250-400g의 수컷 Hartley 기니피 44마리 (치료군 16마리, 대조군 19마리, 정상군 9마리)를 대상으로 하였으며 온도와 습도가 일정하게 유지되는 동물 사육실에서 하루 12시간씩의 일광 조건으로 사육하며 22일간 연구하였다.

2. 방 법

치료군과 대조군 기니피에 체중 1kg당 OVA 1mg을

1주 간격으로 (제1실험일, 제8실험일) 2회 후경부에 피하 주사하여 감각 시켰으며 면역 보강제로 겔 형태의 aluminum hydroxide 200mg을 혼합하여 투여하였다. OVA 감각 1주후(제15실험일)에 김등⁹⁾이 보고한 방법으로 OVA를 연무기를 이용하여 흡입시켜 기관지 천식 모델을 만들었다. 이 때 사용된 연무는 입자의 크기가 전체적으로 10 μm 이하이고 그 중 60%는 2.5 μm 이하였으며 1.5 기압, 분당 1 ml의 속도로 975cm³의 공간에 30초간 연무 비산되는 특성을 가졌다. 기도 저항은 독일 Hugo Sachs Elektronik사의 Pulmodyn 실험동물용 체적기록 상자 (animal plethysmograph box)를 이용하여 Pennock 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. 감각된 치료군과 대조군 기니픽 40마리 중 OVA 흡입 시 기도저항이 기저치의 150% 이상으로 증가한 기니픽만을 천식 모델로 간주하여 이후의 실험에 사용하였으며 기도저항의 증가가 없거나 150% 이하인 기니픽은 연구 대상에서 제외시켰다. 정상군은 감각하지 않은 상태에서 기도저항을 측정하였다.

치료군은 cys-LTs 수용체 차단제인 pranlukast hydrate (ONO-1078)를 10mg/kg/day 용량으로 7일간 (제16-22실험일) 경구 투여하였고, 대조군과 정상군은 생리식염수 1 ml를 경구 투여하였다. 제22실험일에 치료군은 pranlukast 투여 30분 후 indomethacine 10mg/kg과 mepyramine 10mg/kg를 복강내 투여하였고, 대조군 및 정상군은 생리 식염수 투여 후 indomethacine과 mepyramine을 같은 용량, 같은 방법으로 투여하였다. indomethacine과 mepyramine 투여 30분 후 치료군, 대조군, 정상군 모두 앞의 방법대로 연무기를 이용한 OVA 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 발생시킨 후 기도저항을 측정하였다.

기도저항 측정 후 기니픽을 희생시켜 심장 천자로 5 ml의 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 후 혈중 LTC₄의 농도를 측정하였다. 이때 혈중 LTC₄의 측정은 영국 Amersham사의 BIOTRAK® 키트를 이용하여 효소면역 측정법으로 검사하였다. 또한 한 쪽 폐장을 적

출하고 1% paraformaldehyde 2ml를 기관지를 통하여 점적 주입하여 폐를 부풀린 후 1% paraformaldehyde에 담가 보관하였다. 보관된 폐장은 파라핀 포매조직을 만들어 4 μm 두께로 절단하여 Hematoxyline and Eosin (H-E) 염색으로 호산구의 침윤 정도를 확인하였다. 호산구의 침윤 정도는 세기관지를 포함하는 400배 현미경 시야 내에 존재하는 호산구의 수로써 나타내었는데 인접한 5개 시야의 평균치를 취하였다. 호산구 침윤 정도의 측정은 병리 전문의에 의하여 수행되었다.

3. 통계처리

치료군과 대조군 각각 약물투여 전후의 기도저항의 차이는 3분 단위 시간대 별로 Wilcoxon의 순위합 검정으로 비교하였다. 조직내 호산구의 침윤 정도와 혈중 LTC₄ 농도는 치료군, 대조군, 정상군의 세 군간에 차이가 있는지는 Kruskal-Wallis 검정을 하였으며 각각 두 군간의 비교는 Man Whitney U 검정을 시행하였다. 모든 계산은 SPSS 8.0 프로그램을 사용하였고, p값이 0.05이하인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. OVA으로 감각된 기니픽에서 기관지 천식의 발생을

OVA 피하주사로 감각시킨 치료군 16마리와 대조군 19마리의 기도저항의 기저치는 평균 3.86 mmHg*sec였고, 연무기를 이용한 OVA 흡입 후 3분에서 24분까지 3분 간격으로 기도저항을 측정하였을 때 기도저항이 한번 이상 기저치에 비해서 150% 이상 증가된 기니픽은 치료군 8마리, 대조군 12마리로 도합 20마리였으며 평균 기도저항은 기저치 3.36 mmHg*sec, 3분 6.95 mmHg*sec, 6분 10.14 mmHg*sec, 9분 9.41 mmHg*sec, 12분 10.36 mmHg*sec, 15분 8.77 mmHg*sec, 18분 10.11 mmHg*sec, 21

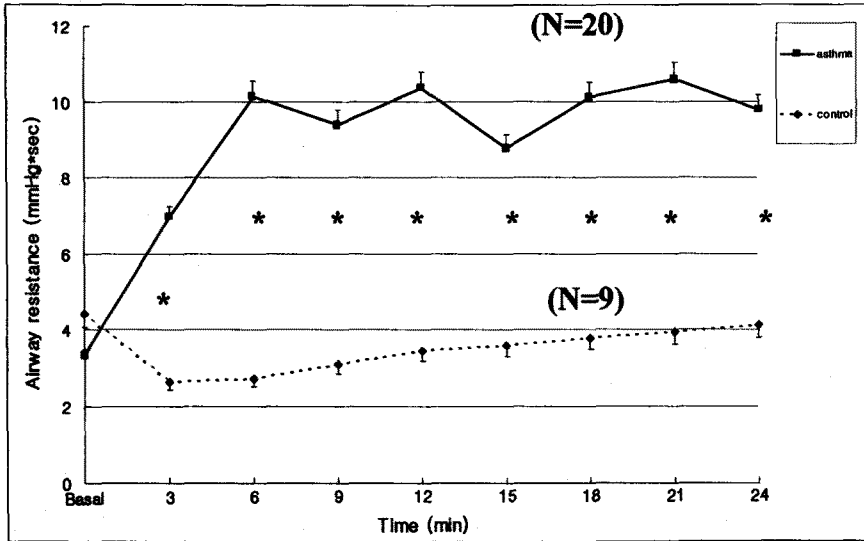


Fig. 1. Airway resistance of ovalbumin induced asthmatic models and control guinea pigs. *p<0.05 between asthmatic models and control guinea pigs.

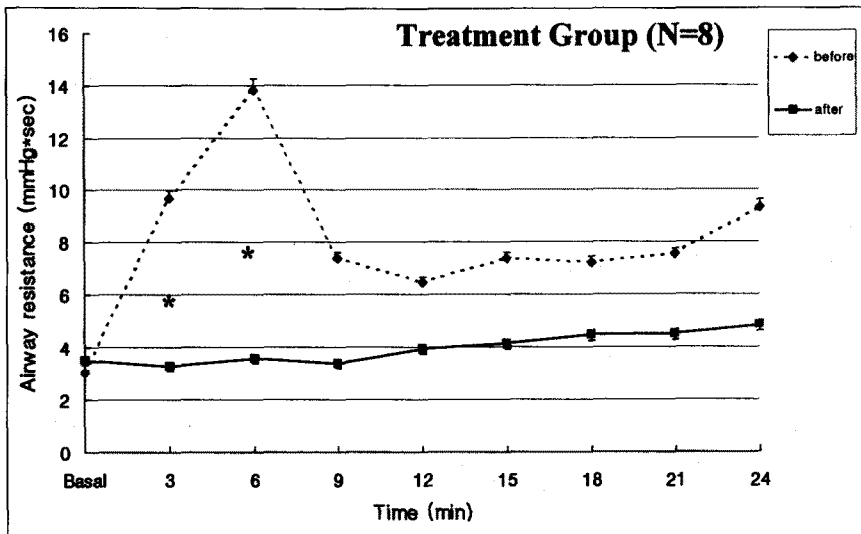


Fig. 2. Time course of airway resistance before and after medication in the pranlukast treatment group.

*p<0.05 between before and after medication of pranlukast.

분 10.60 mmHg*sec, 24분 9.78 mmHg*sec 이었다(Fig. 1). 본 연구에서 항원 유발 기도수축 기니피크 모델의 발생율은 57.1%로 이들 20마리를 기관지 천

식 모델로 정의하여 이후의 실험에 이용하였다. 기도 수축이 유발되지 않은 기니피크 (치료군 8마리, 대조군 7마리)의 평균 기도저항은 기저치 4.31 mmHg*sec,

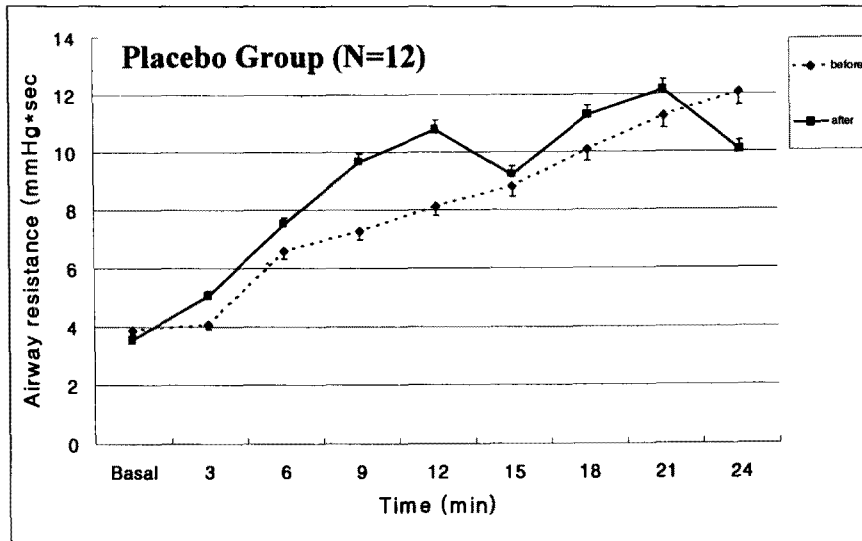


Fig. 3. Time course of airway resistance before and after saline medication in the placebo group.

Table 1. Serum LTC₄ and bronchial epithelial eosinophilic infiltration in the pranlukast treatment, placebo, and normal control group

Group	n	serum LTC ₄ (pg/ml)	Eosinophils (/HPF*)
Treatment	8	348.4 ± 14.9	7.06 ± 0.80 †
Placebo	12	373.9 ± 12.8	19.2 ± 3.77
Control	9	364.4 ± 16.6	4.50 ± 1.96

* high power field (×400)

† p<0.05 compared to placebo group and p>0.05 compared to control group

3분 3.19 mmHg*sec, 6분 2.83 mmHg*sec, 9분 2.53 mmHg*sec, 12분 3.08 mmHg*sec, 15분 3.84 mmHg*sec, 18분 2.98 mmHg*sec, 21분 3.01 mmHg*sec, 24분 2.38 mmHg*sec로 이들은 실험 대상에서 제외하였다. OVA 감작 시키지 않은 정상군 9마리의 OVA 흡입 후 기도저항의 변동은 기저치의 50% 내외였다(Fig. 1).

2. 치료군과 대조군에서 약물 투여 전후의 기도저항의 변화

Pranlukast 및 생리 식염수를 1주일간 경구 투여 후 OVA 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 일으킨 상태에서 측정된 기도저항은 치료군에서는 흡입 후 3분

부터 24분까지 3분 간격으로 측정했을 때 3분, 6분에서 pranlukast 투여 후가 투여 전에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았고 24분까지 통계적 유의성은 없었지만 기도저항이 투여전에 비하여 감소된 경향을 나타내었다(Fig. 2). 대조군에서는 OVA 흡입 후 3분부터 30분까지 생리식염수 투여 전과 후에 기도저항의 차이가 없었다(Fig. 3).

3. 혈중 LTC₄ 농도

치료군의 혈액 내 LTC₄ 농도는 348.4 pg/ml, 대조군은 373.9 pg/ml였으며, 정상군에서는 364.4 pg/ml로써 치료군과 대조군(p=0.232) 사이에 통계적으

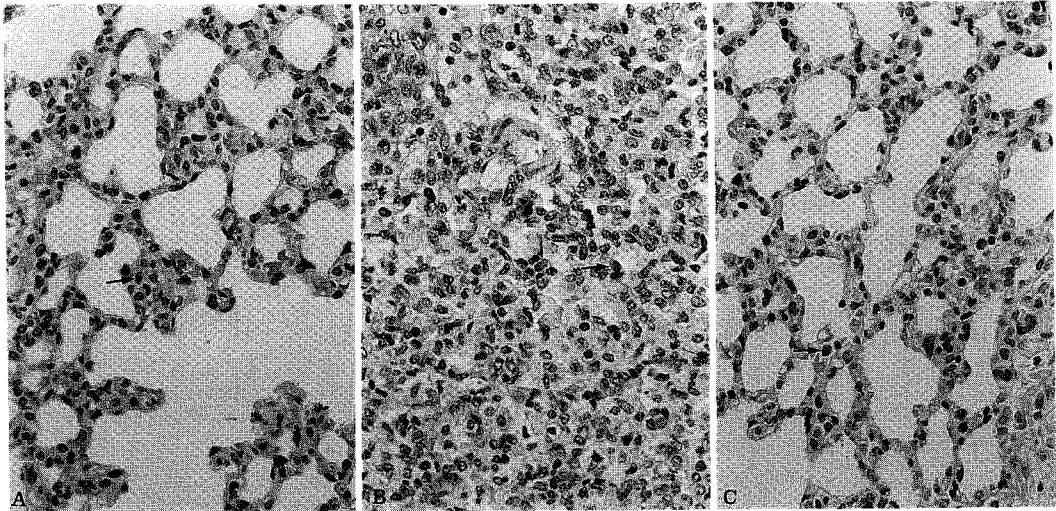


Fig. 4. These histologic findings show peribronchiolar region taken from the control (A), placebo (B), and pranlukast group (C) of guinea pigs. Eosinophilic infiltration (arrow) is significantly decreased in the pranlukast treatment group which was compared with placebo. (original magnification; $\times 400$)

로 유의한 차이가 발견되지 않았고, 치료군, 대조군 및 정상군의 세 군간의 비교에서도 통계적으로 의미 있는 차이가 없었다($p=0.456$) (Table 1).

4. 폐 조직내 호산구 침윤의 정도

세기관지 및 그 주변의 호산구 침윤은 400배 현미경 시야당 치료군, 대조군, 정상군 각각 7.06, 19.2, 4.50개로 치료군이 대조군에 비하여 통계적으로 의미 있는 감소를 나타내었다($p=0.001$) (Table 1) (Fig. 4). 치료군, 대조군, 정상군 사이의 분산분석에서는 세 군간에 의미 있는 차이가 있었고 ($p=0.008$) 정상군과 대조군의 비교에서는 대조군에서 호산구의 침윤이 유의하게 증가되었다($p=0.004$). 치료군과 정상군의 차이는 통계적 유의성이 없었다($p=0.093$) (Table 1) (Fig. 4).

고 안

실험 동물의 기관지 천식 모델은 기니피크를 이용했는

데, 감작은 OVA을, 면역 보강은 aluminum hydroxide를 피하 주사하는 방법으로 하였다. 이 때 aluminum hydroxide는 겔 형태이어서 21게이지 이하의 주사침으로는 막힘 현상 때문에 기니피크의 후경부에 피하주사가 거의 불가능하여 본 연구에서는 18게이지 주사침을 사용하였다. 큰 구경 (large bore) 주사침에 의하여 피하주사 후 3분 정도 지혈이 필요할 정도로 출혈이 나타났으며 지혈을 안한 경우 출혈에 의하여 기니피크가 사망한 경우도 경험하였다. 또한 OVA을 연무기를 이용하여 흡입시킴으로써 즉시형 기관지 수축 반응을 유발 시켰고, 기니피크 천식모델에 대한 기도저항은 김등⁹⁾의 연구와 동일한 방법으로 측정하였다. 김등⁹⁾에 의하면 천식이 유발된 기니피크의 기도저항이 OVA 흡입 3분 후부터 증가하여 6분에 최고치에 이르고, 이후 18분까지 점차 감소하여 18분부터 실험 종료 시까지 기저치 보다 증가된 상태를 유지한다고 하였다. 본 연구 결과 OVA 감작 후 흡입으로 천식 모델로 확인된 치료군 8마리와 대조군 12마리의 기도저항의 변동은 OVA 흡입 3분 후 기저치의 207%, 6분에는 302%로 증가되어 24분까지 유

지되는 양상을 보였다. 이는 천식을 유발시키지 않은 정상군 9마리와 비교해 보았을 때 3분부터 24분까지 유의하게 기도저항이 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 기니피 천식모델의 천식 발생율은 본 연구에서 57.1%로 김등⁹⁾의 연구 65.0% 보다 약간 낮았다. 기도 저항의 측정에 사용된 비 침습적 방법은 기관지 수축 반응에 여러 가지 영향을 미칠 수 있는 마취와 침습적인 조작을 피할 수 있는 방법으로서 두부와 흉부의 서로 다른 두 방(chamber)에서 기록된 기류의 위상차를 이용하여 기도저항을 측정 할 수 있다고 알려져 있다¹⁰⁾.

기관지 천식의 발생과정 및 병태생리에 대한 지식이 발전되어감에 따라 그 치료에 있어서 항염증 제제 사용에 대한 관심이 대두되고 있다. 기관지 천식 환자에서 염증 매개물질이 기도 점막세포에 작용하게 되면 주로 핵막에 존재하는 인지질로부터 phospholipase A₂에 의하여 아라키돈산이 생성되고 5-lipoxygenase (5-LO) 경로 반응으로 5-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid (5-HPETE), LTA₄, LTB₄ 및 LTC₄ 등이 순차적으로 생성되며 LTC₄는 α -glutamyl transpeptidase에 의해 LTD₄가, LTD₄는 dipeptidase에 의해 LTE₄가 생성되며 이들 LTC₄, D₄, E₄를 cys-LTs로 분류한다¹¹⁻¹⁵⁾. LTC₄와 LTD₄는 기관지 수축능력이 히스타민 보다 1,000 내지 5,000배 강하며 작용시간 또한 긴 것으로 알려져 있고¹⁶⁾ LTE₄도 비슷한 효과를 나타낸다고 한다. LTC₄, D₄, E₄는 기관지 수축 뿐 아니라 기니피에서 미세혈관 투과성을 증가시키며¹⁷⁾ 피부에서는 혈관을 확장시켜 발적 및 담마진을 일으키고¹⁸⁾ methacholine으로 유발된 기도 수축시 수축이 악화되며 기도 부종을 발생시키는 효과가 관찰되었다¹⁹⁾. 기관지 천식의 급성 악화와 아스피린 유발성 천식 환자에서 소변내 LTE₄의 증가가 증명되었고²⁰⁾, 기관지폐포 세척액에서도 증가되어 있음이 보고²¹⁾ 되었다. 따라서 cys-LTs의 작용을 억제하여 기관지 천식 반응을 감소시키려는 처치가 시도되고 있다. 이러한 cys-LTs의 억제는 크게 생산억제와 수용체 억제의 두 가지로 나눌 수 있는데²²⁾ 생산

억제제로는 5-LO 억제제인 N-hydroxyurea (zileuton), benzofurans (L-670,630), indazolinones (ICI 207,968)과 5-LO activating protein (FLAP) 억제제인 MK-886, MK-591 등이 포함된다. 수용체 억제제로는 최초 FPL-55712²³⁾가 개발되었으나 짧은 반감기와 경구 흡수 불량으로 사용이 제한되었고 L-649,923²⁴⁾도 빈번한 소화기계 부작용으로 실용적이지 못하였다. 최근에는 경구투여가 가능하고 LT 수용체 억제 효과가 훨씬 더 강력한 제제가 소개되고 있는데, ICI 204,219²⁵⁻²⁷⁾, MK-571²⁸⁾, MK-0679²⁹⁾, ONO-1078 (pranlukast)등³⁰⁾이 해당된다. Pranlukast는 분자량 491, 무취의 황색분말로 물에는 녹지 않고 에탄올에 약간 녹으며 상온에서 안정 상태로 존재한다⁴⁾.

본 연구에서 OVA 감작 기니피에서 OVA의 분무 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 발생시킬 때 mepyramin과 indomethacine으로 전처리 하였는데 이로써 히스타민과 cyclooxygenase 경로의 반응에 의한 기관지 수축을 억제시킬 수 있다고 한다³¹⁾. 치료군에서 pranlukast 투여 후의 기도저항은 OVA 흡입 3분과 6분 후에서 통계적으로 유의하게 감소된 결과를 나타내었고 9분부터 실험 종료시까지는 통계적 유의성은 없었지만 기도저항이 약물 투여 전에 비하여 약 50%로 감소된 소견을 보였다. pranlukast 투여 전 OVA 흡입 3에서 6분에 최고 기도저항을 나타내는 경향은 김등⁹⁾의 결과와 유사하였는데 pranlukast 투여 후에는 이러한 최고점을 나타내는 경향이 없이 실험 종료 시까지 기저치의 150% 내외로 기복 없이 유지됨을 관찰 할 수 있었다. 즉 약물 투여 전후의 기도저항의 변화중의 하나는 기도저항의 기복이 없어진 것이라 할 수 있다.

이러한 기도저항의 변화는 Nakagawa등⁴⁾의 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 pranlukast의 용량은 10mg/kg를 사용하였는데 다양한 용량에 따른 효과를 비교한 문헌⁵⁾에 의하면 30 및 100mg/kg의 용량 보다 10mg/kg에서 기도저항의 감소 효과가 더 크다고 하였다.

대조군에서 생리 식염수 투여 후의 기도저항은 투여 전에 비하여 통계적 차이가 없었다. 그러나 기도저항의 평균치가 완전히 일치하지 않고 투여 전보다 투여 후가 약간 큰 경향을 보였는바 이에 대한 원인으로 가능한 것은 식염수 투여 전 기도저항을 측정할 때 OVA을 흡입하였고 1주 간 식염수 투여 후 기도저항 측정 시 다시 OVA을 흡입함으로써 반복적 OVA 흡입에 의하여 항원 유발 기도수축 반응이 더 강화된 것으로 설명할 수 있겠다. 실지로 Garlisi 등³²⁾은 백서에서 첫 번째 OVA 흡입에 비하여 1주일후 두 번째 흡입시 기관지 폐포 세척액내 호산구 및 활성 T세포(CD44⁺, CD45RB⁶)가 증가됨을 보고하였다. 따라서 치료군에서 pranlukast 투여 후의 기도저항의 감소가 비록 OVA 흡입 9분에서 24분까지 약물 투여 전에 비하여 통계적 유의성이 없다하더라도 반복적 OVA 흡입에 의한 기도저항의 증가를 감안하여야 할 것으로 사료된다. 향후 알레르겐의 반복적 흡입에 대한 기도저항의 변동양상 등에 관한 연구가 필요할 것이다.

기관지 및 폐에서 pranlukast는 cys-LTs에 대하여 경쟁 길항 물질 (competitive antagonist)로 작용한다고 알려져 있는데, Obata 등⁶⁾은 방사배위 결합 측정법(radioligand binding assay)으로 pranlukast에 의하여 LTC₄, D₄, E₄가 기관지 및 폐 점막 조직에 결합되는 것을 억제하는 현상을 증명하였다. 또한 OVA으로 유발된 기니피 천식 모델에서 pranlukast 투여시 LTD₄ 및 LTD₄에 의하여 유도 생성된 thromboxane B₂ (TxB₂)의 농도를 폐에서 측정하였을 때 두 물질 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 관찰한 보고⁷⁾도 있다. 항류코트리엔 제제중 5-LO 억제제 즉, LTs 생성 억제제의 경우는 투여시 혈중 LTs의 농도가 감소되지만 pranlukast와 같은 수용체 억제제는 cys-LTs의 생산과는 관계가 없고 기관지, 폐의 cys-LTs 수용체 단계에서 작용하므로 혈중의 cys-LTs 농도가 어떠한 변화를 나타내는지 확실히 알려져 있지 않다. Fugimoto 등³³⁾에 의하면 기관지 천식환자는 정상인에

비하여 혈중 LTC₄ 농도가 높고, 천식 발작 시에 안정 상태 보다 혈중 LTC₄ 농도가 증가한다고 하는데 cys-LTs 수용체 억제제 투여 후 수용체 단계에서 작용하는 cys-LTs이 감소하여 전신적으로 순환하는 cys-LTs의 양이 증가한다면 반감기가 약 1.2 시간인 pranlukast의 수용체 억제 효과가 사라지고 난 후에는 순환하는 증가된 cys-LTs에 의해 기관지 천식이 악화될 수도 있을 것이다. 본 연구에서 치료군의 혈중 LTC₄의 농도는 대조군과 차이가 없었고, 천식을 유발시키지 않은 정상군과도 차이가 없어서 pranlukast에 의하여 혈중 LTC₄의 농도는 변화가 없는 것을 알 수 있었다.

Cys-LTs은 미세 혈관 투과성을 증가시키고 과립 백혈구 특히 호산구에 대하여 화학 주성 효과를 나타낸다고 알려져 있다³⁴⁾. Pranlukast는 기관지, 폐에서 이러한 호산구의 집적을 방지하는 효과를 가지는데 기니피⁵⁾과 양³⁵⁾의 알레르겐 유발 기관지 천식 모델의 기관지 폐포 세척액에서 pranlukast 투여 전에 비하여 투여 후 호산구가 감소됨이 보고되었다. 또한 Nakamura 등³⁶⁾에 의하면 기관지 천식 환자에서 pranlukast 투여 후 기관지 점막 조직 내 EG2 단일 클론 항체를 이용한 호산구의 면역 조직 화학 염색에서 EG2 양성 세포가 감소되어 활성 호산구의 감소 효과를 나타낸다고 한다. 본 연구에서 호산구 침윤의 범위로 설정한 부분은 기관지 점막을 가장 많이 포함하는 400배 현미경 시야로서 H-E 염색으로 호산구를 다른 혈액 세포와 형태적으로 구별할 수 있었다. 치료군에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 호산구의 침윤이 적었으며 또한 치료군은 기관지 천식을 일으키지 않은 정상군과 호산구 침윤 정도의 통계적인 차이는 없었다. 즉 pranlukast 투여후 기관지 점막 및 주위 폐조직에 호산구의 침윤이 감소됨을 알 수 있었다.

결론적으로 OVA 감작된 기니피 천식 모델에서 OVA 분무 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 일으켰을 때 cys-LTs 수용체 억제제인 pranlukast 경구 투여로써 기도저항의 감소 및 기관지 점막내 호산구

침윤의 감소가 관찰되었고, 혈중 LTC₄의 농도는 변화가 없음을 알 수 있었다. 이상의 기니픽에 대한 결과를 바탕으로 향후 기관지 천식 환자에 대한 pranlukast의 효과에 관하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

기관지 천식에서 기관지 수축 및 호산구 화학 주성 효과를 나타내는 Leukotrienes (LTs)의 역할이 최근 잘 알려져 있으며 이러한 LTs의 작용을 억제하는 치료제에 대한 관심이 대두되고 있다. 저자들은 비마취, 비결막 상태의 기니픽 기관지 천식 모델에서 즉시형 기관지 수축 반응 시 기도저항의 변동을 측정하고, pranlukast 투여가 기도저항, 기관지 조직내 호산구의 침윤 정도, 혈중 LTC₄의 농도의 변화에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구를 실시하였다.

방 법 :

기니픽 44마리 (치료군 16마리, 대조군 19마리, 정상군 9마리)를 대상으로 하였으며 치료군과 대조군 기니픽에 ovalbumin(OVA)을 감작하고 1주후 OVA을 연무기를 이용하여 흡입시켜 즉시형 기도수축 모델을 만든 뒤 실험 동물용 체적 기록 상자를 이용하여 기도저항을 측정하였다. 정상군은 감작하지 않은 상태에서 기도저항을 측정하였다.

치료군은 pranlukast 10mg/kg/day를, 대조군과 정상군은 생리식염수 1ml/day를 7일간 경구 투여한 후 치료군, 대조군, 정상군 모두 indomethacine 10mg/kg 및 mepyramine 10mg/kg를 복강내 투여한 다음 OVA 분무로 즉시형 기관지 수축반응을 일으켜 기도저항을 측정하였다.

기도저항 측정 후 혈중 LTC₄의 농도를 측정하고 한 쪽 폐장을 적출하여 파라핀 포매조직을 만들어 H-E 염색으로 세기관지를 포함하는 400배 현미경 시야 내에 존재하는 호산구의 수로써 호산구의 침윤 정도를 확인하였다.

결 과 :

천식 모델로 확인된 기니픽은 치료군 8마리, 대조군 16마리로 57.1%의 발생율을 나타내었고 기관지 천식이 발생되지 않은 기니픽은 모두 본 연구 대상에서 제외시켰다. OVA으로 감작 시키지 않은 정상군의 기도저항의 변동은 기저치의 50% 내외였다.

OVA 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 나타낸 상태에서 측정된 기도저항은 치료군에서는 흡입 후 3분부터 24분까지 3분 간격으로 측정 했을때 3분, 6분에서 pranlukast 투여 후가 투여 전에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았고 24분까지 통계적 유의성은 없었지만 기도저항이 투여전에 비하여 감소된 경향을 나타내었다. 대조군에서는 OVA 흡입후 3분부터 30분까지 생리식염수 투여전과 후에 기도저항의 차이가 없었다.

혈중 LTC₄ 농도는 치료군 348.4 pg/ml, 대조군 373.9 pg/ml 였으며, 정상군에서는 364.4 pg/ml로 치료군과 대조군(p=0.232), 치료군과 정상군(p=0.501), 사이에 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았고, 치료군, 대조군 및 정상군의 세 군간의 비교에서도 통계적으로 의미 있는 차이가 없었다(p=0.456).

기관지 조직내 호산구의 침윤은 400배 현미경 시야 당 치료군, 대조군, 정상군 각각 7.06, 19.2, 4.50개로 치료군, 대조군, 정상군 사이의 분산분석에서는 세 군간에 의미 있는 차이가 있었고(p=0.008) 치료군이 대조군에 비하여 통계적으로 의미 있는 감소를 나타내었다(p=0.001).

결 론 :

OVA으로 감작된 기니픽 천식 모델에서 즉시형 기관지 수축 반응 시 cys-LTs 수용체 억제제인 pranlukast 경구 투여는 대조군과 비교하여 기도저항의 감소 및 기관지, 폐 조직 내 호산구 침윤의 감소를 나타내어 기관지 수축 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 혈중 LTC₄의 농도는 대조군과 차이가 없음을 관찰되어 전신의 순환 cys-LTs에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 기니픽에 대한 결과를 바탕

으로 향후 기관지 천식 환자에 대한 pranlukast의 효과에 관하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. American Thoracic Society : Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am Rev Respir Dis* 136 : 225, 1987
2. Samuelsson B : Leukotrienes ; Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220 : 568, 1983
3. Busse WW : Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 157 : S210, 1998
4. Nakakawa N, Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nambu F, Terawaki T, Aishita H : In vivo pharmacologic profile of ONO-1078 ; A potent, selective and orally active peptide leukotriene (LT) antagonist. *Jpn J Pharmacol* 60 : 217, 1992
5. Nakagawa N, Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nambu F, Terawaki T, Furuya T, Muryobayashi K, Sawada M, Aishita H : Effect of peptide leukotriene receptor antagonist, ONO-1078, on guinea-pig models of asthma. *Eur J Pharm* 235 : 211, 1993
6. Obata T, Okada Y, Motoishi M, Nakagawa N, Terawaki T, Aishita H : In vitro antagonism of ONO-1078, a newly developed anti-asthmatic agent, against peptide leukotrienes in isolated guinea pig tissues. *Jpn J Pharmacol* 60 : 227, 1992
7. Obata T, Okada Y, Motoishi M, Nakagawa N, Terawaki T, Aishita H : Inhibitory effect of a peptide leukotriene antagonist ONO-1078 on LTD₄ and antigen-induced thromboxane B₂ production in guinea pig lungs. *Life Sci* 52 : 97, 1993
8. Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nakagawa N, Terawaki T, Aishita H : Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea pigs. *Life Sci* 51 : 1577, 1992
9. 김제형, 심재정, 이승룡, 권영환, 이소라, 이상엽, 조재연, 인광호, 유세화, 강경호 : Ovalbumin으로 감각된 기니픽에서 Allergen 흡입으로 인한 즉시형 기관지 수축반응에 대한 비침습적 측정. *결핵 및 호흡기 질환* 45(1) : 99, 1998
10. Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Wells JH : A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol* 46(2) : 399, 1978
11. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST : Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 142 : 434, 1990
12. Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Wasserman SI : Cytokines in symptomatic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 89 : 958, 1992
13. Chung KF, Barnes PJ : Role of inflammatory mediators in asthma. *Br Med Bull* 48 : 135, 1992
14. Peters-Goldon M : Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 157 : S227, 1998
15. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF : Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C₄ synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A₄. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 7663, 1994
16. Barnes NC, Piper PJ, Costello JF : Comparative effects of inhaled leukotriene C₄, leukotriene D₄, and histamin in normal human subjects. *Thorax* 39 : 500, 1984
17. Woodward DF, Wasserman MA, Weichman

- BM : Investigation of leukotriene involvement in the vasopermeability response associated with guinea-pig tracheal anaphylaxis : comparison with cutaneous anaphylaxis. *Eur J Pharmacol* 93 : 9, 1983
18. Camp RDR, Coutts AA, Greaves MW, Kay AB, Walport MJ : Response of human skin to intradermal injection of leukotrienes C₄, D₄ and B₄. *Br J Pharmacol* 80 : 497, 1983
19. Bel EH, Van der Veen H, Kramps JA, Dijkman JH, Sterk PJ : Maximal airway narrowing to inhaled leukotriene D₄ in normal subjects : comparison and interaction with methacholine. *Am Rev Respir Dis* 136 : 979, 1987
20. Smith CM, Hawksworth RJ, Thien FCK, Christie PE, Lee TH : Urinary leukotriene E₄ in bronchial asthma. *Eur Respir J* 5 : 693, 1992
21. Crea AEG, Nakhosteen JA, Lee TH : Mediator concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with mild asymptomatic bronchial asthma. *Eur Respir J* 5 : 190, 1992
22. Chung KF : Leukotriene receptor antagonists and biosynthesis inhibitors : potential breakthrough in asthma therapy. *Eur Respir J* 8 : 1203, 1995
23. Augstein J, Farmer JB, Lee TB, Sheard P, Tattersall ML : Selective inhibitor of slow reacting substance of anaphylaxis. *Nature* 245 : 215, 1973
24. Britton JR, Hanley SP, Tattersfield AE : The effect of an oral leukotriene D₄ antagonist L-649, 923 on the response to inhaled antigen in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 79 : 811, 1987
25. Smith LJ, Geller S, Ebright L, Glass M, Thyrum PT : Inhibition of leukotriene D₄-induced bronchoconstriction in normal subjects by the oral LTD₄ receptor antagonist ICI 204,219. *Am Rev Respir Dis* 141 : 988, 1990
26. Spector SL, Smith LJ, Glass M : Effect of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204,219, a leukotriene D₄ receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 150 : 618, 1994
27. Donnelly AL, Glass M, Minkwitz MC, Casale TB : The leukotriene D₄-receptor antagonist, ICI 204, 219, relieves symptoms of acute seasonal allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 151 : 1734, 1995
28. Kips JC, Joos GF, Delepeleire I : MK-571 : a potent antagonist of LTD₄-induced bronchoconstriction in the human. *Am Rev Respir Dis* 144 : 617, 1991
29. Dahlen B, Margoldkee DJ, Zetterstrom O, Dahlen SE : Effect of the leukotriene receptor antagonist MK-0679 on baseline pulmonary function in aspirin sensitive asthmatic subjects. *Thorax* 48 : 1205, 1993
30. Nakai H, Konno M, Kosuge S, Sakuyama S, Toda M, Arai Y, Obata T, Katsube M, Miyamoto T, Okegaya T, Kawasaki A : New potent antagonists of leukotrienes C₄ and D₄. Synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem* 31 : 84, 1983
31. Ritchie DM, Sierchio JN, Capetola RJ, Rosenthale ME : SRS-A-mediated bronchospasm by pharmacologic modification of lung anaphylaxis in vivo. *Agents Actions* 11 : 396, 1981
32. Garlisi CG, Falcone A, Hey JA, Paster TM, Fernandez X, Rizzo CA, Minnicozzi M, Jones H, Billah MM, Egan RW, Umland SP : Airway eosinophils, T cells, Th2-type cytokine mRNA, and hyperreactivity in response to aerosol challenge of allergic mice with previously established pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17 : 642, 1997

33. Fujimoto K, Yoshikawa S, Shinozaki S, Matsuzawa Y, Kubo K, Kobayashi T, Sekiguchi M : Arachidonic acid metabolites on peripheral blood plasma in patients with bronchial asthma. *Jpn J Thorac Dis* 28(9) : 1155, 1990
34. McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM : Leukotrienes C₄ and D₄ stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2204, 1986
35. Abraham WA, Ahmed A, Cortes A, Sielczac M, Hallmon J : The effects of a cysteinyl leukotriene antagonist (ONO-1078) on antigen-induced responses in allergic sheep. *Prostaglandins* 48 : 233, 1993
36. Nakamura N, Hoshino M, Sim JJ, Ishii K, Hosaka K, Sakumoto T : Effect of the leukotriene on cellular infiltration in the bronchial mucosa of patients with asthma. *Thorax* 53 : 835, 1998