

## 유아기 급성폐손상 병태생리 연구를 위한 어린 토끼 실험모델

권영민\* · 최석철\*\* · 박종원\*\*\*\* · 김양원\*\*\* · 이양행\* · 황윤호\* · 조광현\*

### Young Rabbit Model for Pathophysiologic Study of Acute Lung Injury in Early Childhood

Young-Min Kwon, M.D.\*, Seok-Cheol Choi, Ph.D.\*\*, Jong-Won Park, M.D.\*\*\*\*, Yang-Won Kim, M.D.\*\*\*  
Yang-Haeng Lee, M.D.\*, Yoon-Ho Hwang, M.D.\*, Kwang-Hyun Cho, M.D.\*

**Background:** Adult respiratory distress syndrome (ARDS) is of particular interest because of its severity of the associated lung injury and its high mortality. However, the pathophysiologies of ARDS in infant and childhood groups are still not well clarified inspite of many previous investigations. To investigate the time course of pathophysiology of ARDS in infant and childhood groups, this study was designed with experimental endotoxin-induced ARDS model using young rabbits (8 week-old). **Material and Method:** Rabbits were divided into the control group (n=8) and the endotoxin-treated group (n=32). The endotoxin group was subdivided into 4 groups by the sampling times as 3, 6, 12 and 24 hr-groups (G-E<sub>3,6,12,24</sub>, each n=8). The experimental ARDS was made by a bolus injection of endotoxin (*Escherichia coli* serotype O55 : B5, 0.50 mg/kg) via rabbit ear vein. For evaluation of the hematologic and inflammatory markers, and superoxide dismutase (SOD) concentrations, the blood samples were taken from the heart. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were obtained for analysis of the leukocytes and protein concentration. With biopsy of the lung, histopathologic changes of the lung were also evaluated. **Result:** In the endotoxin groups, significant leukopenia (owing to pancytopenia) occurred in 3 and 6-hr groups, which was followed by significant leukocytosis (owing to neutrophilia) in the 12 and 24-hr groups ( $p < 0.05$ ). Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the endotoxin groups were higher than those of control group ( $p < 0.05$ ). Serum levels of superoxide dismutase (SOD) of G-E<sub>3</sub> and G-E<sub>6</sub> were higher than those of control group, whereas those of G-E<sub>12</sub> were lower than those of control groups ( $p < 0.05$ ). Total leukocyte counts and protein concentrations in BALF were significantly elevated in the endotoxin groups compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The hemorrhagic pattern of BALF showed occurred in the endotoxin groups. The endotoxin groups (in G-E<sub>6</sub>) had severe infiltration of inflammatory cells (lymphocyte and monocyte) in the pulmonary interstitium and parenchyma, migrations of neutrophil and eosinophil into alveolar spaces and interstitial widening, which are the evidences of acute lung injury. In the endotoxin groups, there were significant positive correlations between the BALF findings and the immunologic markers (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , SOD) ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Severe acute lung injury occurred in all the endotoxin-treated rabbits. The pathophysiologic findings were so

\*인제대학교 의과대학 부산백병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Pusan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University

\*\*부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan

\*\*\*인제대학교 의과대학 부산백병원 응급의학과

Department of Emergency Medicine, Pusan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University

\*\*\*\*백제의원

Baek Je Medical Clinic

책임저자 : 조광현 (614-735) 부산광역시 부산진구 개금동 633-135, 부산백병원 흉부외과학교실

(Tel) 051-890-6336, (Fax) 051-896-6801, E-mail: CTSCKH@inje.ac.kr

논문접수일 : 2003년 2월 21일, 심사통과일 : 2003년 6월 28일

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

progressive until 6-hr by time dependant pattern, and then recovered slowly. Variable hematologic, immunologic, and pathologic factors were well correlated in the development and progression of endotoxin-induced lung injury. The pathophysiologic responses were sensitive and rapid in young rabbit Young rabbit seemed to be a useful experimental animal model for infant and childhood groups.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:545-558)

**Key words:** 1. Animal models  
2. Endotoxins  
3. Lung injuries

## 서 론

급성 세균성 폐렴과 성인성 호흡곤란증후군(adult respiratory distress syndrome, ARDS)은 폐모세혈관 및 폐포 상피의 투과성 증가에 기인한 폐부종으로 흉부 X-ray상 미만성 폐침윤을 보이는 급성 호흡부전 상태이며 높은 치사율(50~60%) 때문에 많은 임상인들의 관심과 연구대상이 되어왔다. ARDS는 미만성 폐감염, 독성물질이나 자극제에 대한 노출, 여러 약물, 면역학적 질환, 외과적 손상 및 전신성 세균감염 등에 의하여 발생 가능하지만 가장 대표적인 원인은 그람음성 세균성 폐혈증으로 알려져 있다[1]. 그람음성 박테리아의 외막에 존재하는 지다당류(lipopolysaccharide molecules, LPS)의 복합체인 내독소(endotoxin)가 세균성 전신 염증반응의 중요한 병인으로 인식되고 있다. 시험관적으로 내독소는 많은 종류의 세포들을 자극하여 활성화시키며 생체 내 투여 시 ARDS와 유사한 특성의 폐내 변화를 일으킨다[2]. 내독소에 의한 human monocyte의 자극은 tumor necrosis factor (TNF), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), neutrophil-activating factor, prostaglandin, 보체 성분, 그리고 전응고 조직인자(procoagulant tissue factor) 등의 활성을 포함한 광범위한 2차성 세포반응을 초래한다[3,4].

동물이나 인간을 대상으로 지금까지 수행되어 온 대부분의 기존연구들은 유아 및 소아의 병태생리학적 상황을 규명하기엔 상당한 한계점을 지니고 있다. 따라서 성인에 비해 생리학적으로나 면역학적으로 매우 유약한 유아 및 소아 그룹의 급성 폐손상 병태생리학적 상황과 그 진행과정을 규명하기 위한 적절한 실험모델이 필요하다고 생각된다. 본 연구의 목적은 어린 토끼를 재료로 한 실험적인 내독소성 급성폐기능 손상 모델에서 급성폐손상의 병리

학적 상황과 혈액학적 면역학적 시간대별 진행양상을 분석하여 상호 인과적 상관관계를 조사하며, 어린 토끼 모델이 유아나 소아 그룹의 급성폐손상 실험모델로서의 타당성을 검토함에 있다.

## 대상 및 방법

### 1) 실험 동물

실험재료는 대한실험동물센터에서 구입한 생후 약 8주 된 *New Zealand White*종 토끼 수컷으로서 체중이 1.6~1.9 kg (평균 1.78 kg) 정도였다. 구입 시 상처가 있거나, 설사나 여타 질환이 의심되는 토끼는 연구대상에서 철저히 제외하고, 건강한 토끼만을 선택하였다.

### 2) 내독소

실험적 패혈증 유발을 위해 대장균으로부터 순수분리 정제해낸 내독소 (Lipopolysaccharide; *E. coli* serotype O55 : B5, Sigma, Co., U.S.A.)를 사용하였다.

### 3) 실험동물의 사육 및 관리

실험동물 전용 사육실의 온도는 20~25°C, 습도는 50% 정도 유지하였고 환기가 잘 되도록 하여 쾌적한 사육조건을 유지하였다. 실험용 토끼는 사육용 토끼장에 넣고 식수와 사료를 규칙적으로 공급해 주면서 실험 전 1주일 동안 충분한 휴식 및 적응시간을 갖게 하고 건강상태를 세심하게 관찰하다가 설사나 다른 이상이 발생한 경우 연구대상에서 제외시켰다. 실험 당일 각 토끼의 체중을 다시 측정된 뒤 체중이 최초 구입 당시보다 감소한 개체는 제외시켰다.

#### 4) 내독소의 50% 치사량(50% lethal dose) 구하기

토끼에 대한 내독소 '24시간 50% 치사량'(LD<sub>50</sub>)을 제시한 자료가 없으므로, LD<sub>50</sub>값 결정을 위한 예비실험이 필요하였다. LD<sub>50</sub> 값 결정은 Litchifield Wilcoxon 방법[5]을 이용하여 구하였고, 그 결과 토끼에 대한 내독소의 24시간 LD<sub>50</sub> 값은 약 0.60 mg/kg이었다.

#### 5) 내독소 혈증의 유도를 위한 내독소의 준비 및 투여

(1) 내독소 용량의 결정 및 실험군의 분류: 전술한 방법에 의해 결정된 내독소의 24시간 LD<sub>50</sub> 값이 약 0.60 mg/kg이었으므로 이 용량보다 덜 치명적이면서도 내독소 투여에 따른 충분한 생체 내 반응이 일어나도록 0.50 mg/kg의 용량 (sublethal dose)을 본 실험의 투여용량으로 결정하였다. 총 40마리의 생후 8주된 *New Zealand White* 종 토끼 수컷만을 실험대상으로 하여 연구의 목적에 따라 대조군 ( $n=8$ )과 내독소 투여군(G-E)으로 분류하였고, 내독소 투여군을 채혈 시간에 따라 다시 아그룹화시켰다. 즉, 0.50 mg/kg 투여 후 3, 6, 12, 24시간 그룹(G-E<sub>3</sub>, G-E<sub>6</sub>, G-E<sub>12</sub>, G-E<sub>24</sub> 등으로 표현) 등 총 4 그룹으로 분류하였고 각 그룹당 토끼 수는 8 마리씩 배정하였다.

(2) 내독소의 투여: 대조군을 제외한 나머지 4 그룹에 대해 투여할 내독소는 미국 시그마 회사로부터 lipopolysaccharide (*E.coli* serotype O55 : B5)를 직접 구입하였으며 사용 전까지 -20°C 냉동 보관하고 실험 당일 pH 7.4의 생리식염수에 0.10 mg/0.10 ml의 비율로 용해시켜 사용하였다. 버퍼용 생리식염수는 후시 함유되어 있을지도 모를 환경적 내독소의 제거를 위해 사용 전 증기 고압 멸균시킨 뒤 식혀서 사용하였다. 내독소를 투여할 모든 토끼들을 내독소 투여 전 최소 6시간 동안 금식을 시킨 후 귀의 굽은 정맥을 통해 미리 계산된 양의 내독소를 천천히 1회 주사하였다. 내독소 투여 후 모든 토끼들에게 물 외 먹이는 공급하지 않았으며 실험을 위해 희생시킬 때까지 상태를 지속적으로 관찰 기록하였다.

#### 6) 검체의 채취 및 성분분석

(1) 혈액검체: 모든 실험 토끼들의 혈액 검체 채취는 마취하에서 실시하였다. 마취제로는 ketamine과 ether를 사용하였는데, 우선 ketamine 10 mg/kg을 둔부에 근육주사 한 후, 앙와위 자세로 ether 보즈 흡입마취를 시키면서 흉부 절개를 통해 심장을 직접 노출시켰다. 주사기를 이용하여 심실부위에 직접 찔러서 약 10 cc씩 채혈하였다. 채혈 즉

시 분석용 튜브(혈액분석 진공튜브, 혈청 분리용 진공튜브)에 나누어 넣은 후 혈청 분리용 튜브를 제외한 혈액분석용 튜브들은 혈액응고가 일어나지 않도록 부드럽게 흔들어 주었다. 분리한 혈청은 분석 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다. 혈액 및 혈청 검체를 이용하여 아래와 같은 변수를 분석하였다.

① 혈액학적 변수; 혈액분석용 진공 튜브에 주입한 3 ml의 혈액 중 약 0.1 ml를 유리 슬라이드에 도말시킨 후 나머지 혈액 검체를 이용하여 총 백혈구 수를 분석하였다. 분석에 이용된 기기는 H-1 자동 혈구분석기(Technoland Co., America)였다. 유리 슬라이드 상에 이미 도말한 혈액이 완전히 마른 후, Diff-Quik 염색법으로 염색을 한 뒤 현미경(Nikon Co., Japan)으로 1,000× 하에서 백혈구 감별계산(호중구 분획, 림프구 분획, 단구 분획, 호산구 분획)을 실시하였다. 이때 적어도 1개의 검체 슬라이드당 300개의 혈액세포를 관찰한 후 그 결과를 세포수/mm<sup>3</sup>로 기록하였다.

② 염증표지자; 내독소 투여로 인한 생체 내 염증 반응과 역할을 확인하기 위해 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )를 내독소 투여 용량별, 시간대별로 측정하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1  $\beta$ 는 각각의 검사시약인 TNF- $\alpha$ -IRMA와 IL-1  $\beta$ -IRMA (Biosource Co., Belgium)를 이용하여  $\gamma$ -counter COBRA 5010 Quantum (Packard Co., America) 기기로 분석하였고 분석 방법은 radioimmunoassay법이었다.

③ Superoxide dismutase (SOD) 농도; 시간대별 혈청 SOD 농도는 검사시약인 BIOXITECH SOD-525 (OXIS International Inc., America)를 이용하여 Spectrophotometer 4020 (Hitachi, Japan) 기기로 분석하였고 분석법은 colorimetry 이었다.

(2) 기관지폐포 세척술 시행 및 폐조직 생검 채취: 심장에서부터의 혈액채취 후 흉부 절개를 상부로 연장하여 좌측 기관지를 외과용 견사(5~0)로 결찰하고 전경부를 신전시킨 후 9 Fr의 고무관을 주기관을 통해 우측기관지까지 삽입한 후 기관지폐포 세척술을 시행하였다. EDTA 3 mM이 함유된 phosphate buffered saline을 1회 약 20 mL의 양으로 총 3회 실시하여 수집하였다. 그 후 결찰한 좌측 기관지를 잘라 좌측 폐 전체를 조심스레 적출해서 10% 중성 formalin에 고정시켰다.

① 기관지폐포 세척액의 처리 및 백혈구계 세포분석; 3회에 걸쳐 실시한 기관지폐포 세척액 중 1/2을 1,500 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액 1 ml를 단백질 농도

의 측정을 위해  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 냉동 보관하였다. 나머지 절반은 잘 혼합한 후 그중 약 0.5 ml를 cytopsin을 이용하여 1,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 뒤 유리슬라이드에 도말하고 Diff-Quick염색 후 현미경(400 $\times$ ) 시야에서 백혈구 감별계산을 하였다. 나머지 기관지폐포 세척액은 잘 혼합 후 다시 1,500 rpm에서 10분간 원심분리시킨 뒤 상층액을 1 ml를 남겨 재부유시킨 액을 coulter count로 총 백혈구 수를 산출하였다.

② 기관지폐포 세척액의 단백질 농도 측정; 기관지폐포 세척액의 단백질 농도는 상품화된 표준분석 kit를 이용하여 Autohumalyzer 900S (Automated Clinical Chemistry Analyzer Co., Germany) 기기로 분석하였다.

③ 병리조직학적 소견; 신선 폐조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 통상의 과정으로 파라핀 포매 후 5  $\mu\text{m}$  두께로 박절하여 HE (hematoxylin & eosin) 염색을 시행하였다. 광학현미경하에서 각 실험군별로 폐조직의 간질 및 폐포 내 염증세포의 침윤정도, 간질의 확장(widening) 소견을 관찰하였고 이를 각각 정도에 따라 1+~4+로 점수화하였다.

## 7) 자료의 분석 및 통계처리

모든 자료들의 분석 및 통계처리는 전문 통계프로그램 패키지인 SAS (version 6.03)를 이용하였다. 우선 분석한 모든 결과를 코딩하여 컴퓨터 프로그램 내에 입력시킨 후, General linear model procedure의 다중분산분석(MANOVA)을 실시하여 그룹간 차이에 대한 통계적 비교검정을 실시하였다. 이 과정에서 각 그룹 사이에 통계적으로 유의한 차이가 인정되는 경우에 한해( $p < 0.05$ ) 대비검정(contrast test)을 통하여 대조군과 각 시간대별 검정을 실시하여서 대조군과 어느 시간대 그룹 간에 차이가 있는지, 그리고 서로 다른 시간대의 내독소 투여군 간의 유의한 차이를 함께 알아보았다. 아울러 각 변수들 간의 인과관계 규명을 위한 상관분석에는 Pearson의 분석기법을 이용하였다. 숫자적 표현이 가능한 모든 자료들은 평균값 $\pm$ 표준오차로 표시하였고  $p \leq 0.05$ 일 때 통계적 유의성을 부여하였다.

## 결 과

### 1) 총 백혈구 수

총 백혈구 수는 대조군의 경우  $6,320 \pm 750/\text{mm}^3$ 인데 비해 내독소 투여군의 경우 3시간대( $3,400 \pm 230/\text{mm}^3$ )와 6시간대( $5,020 \pm 472/\text{mm}^3$ )는 대조군보다 유의하게 낮았으나( $p$

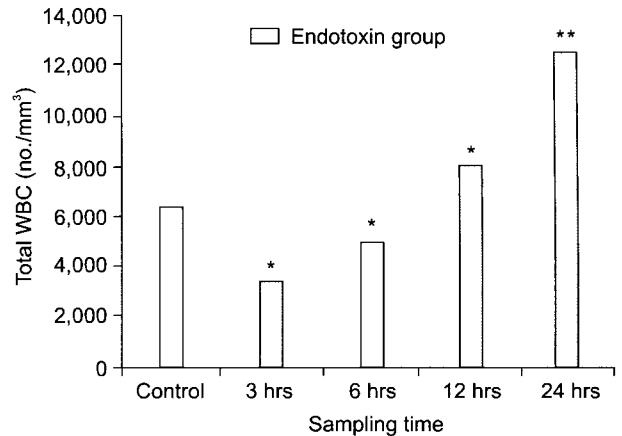


Fig. 1. The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of total leukocyte counts in blood. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).

$< 0.05$ ) 12시간대( $8,050 \pm 1,930/\text{mm}^3$ )와 24시간대( $12,640 \pm 1,571/\text{mm}^3$ )에는 더 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 1).

### 2) 호중구 수

호중구 수는 대조군( $2,760 \pm 272/\text{mm}^3$ )에 비해 내독소 투여군의 경우 3시간대( $1,673 \pm 98/\text{mm}^3$ )와 6시간대( $2,080 \pm 130/\text{mm}^3$ )에서 유의하게 낮았으나( $p < 0.05$ ), 12시간대( $4,850 \pm 935/\text{mm}^3$ )와 24시간대( $10,087 \pm 920/\text{mm}^3$ )에서는 오히려 더 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 2A).

### 3) 림프구 수

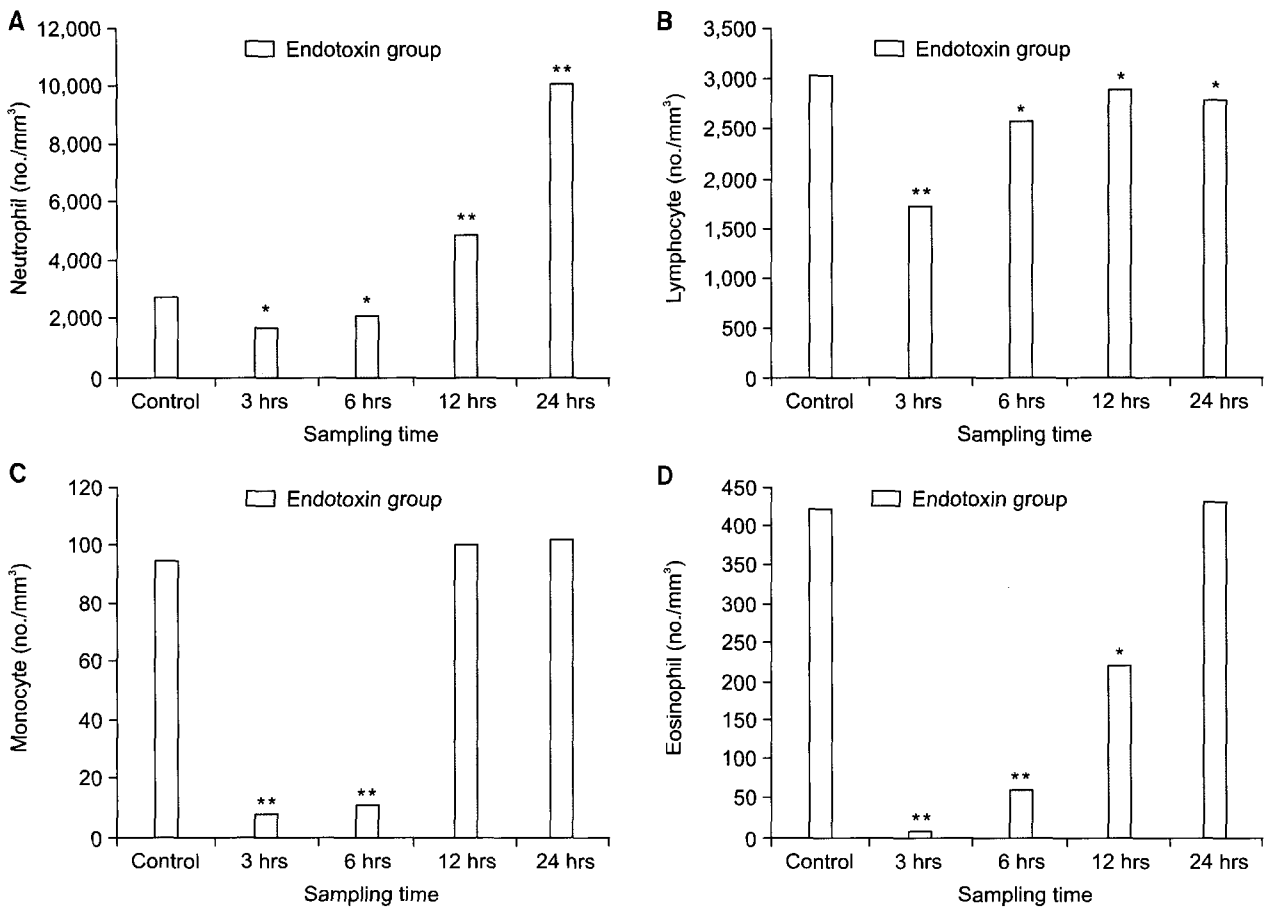
림프구 수는 대조군( $3,044 \pm 331/\text{mm}^3$ )보다 내독소 투여군이 전 시간대에 걸쳐 유의하게 더 낮았다( $p < 0.05$ , Fig. 2B).

### 4) 단구 수

단구 수는 대조군( $95 \pm 7/\text{mm}^3$ )에 비해 내독소 투여군이 3시간 및 6시간대에 유의하게 더 낮았으나( $p < 0.05$ ) 나머지 시간대는 유의한 차가 없었다(Fig. 2C).

### 5) 호산구 수

호산구 수는 대조군( $422 \pm 87/\text{mm}^3$ )에 비해 G-B<sub>24</sub>만을 제외한 나머지 내독소 투여군들 모두에서 유의하게 더 낮았다( $p < 0.05$  혹은  $p < 0.01$ , Fig. 2D).



**Fig. 2.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of leukocyte differential fraction counts in blood. (A) Neutrophil, (B) Lymphocyte, (C) Monocyte, (D) Eosinophil. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).

#### 6) Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

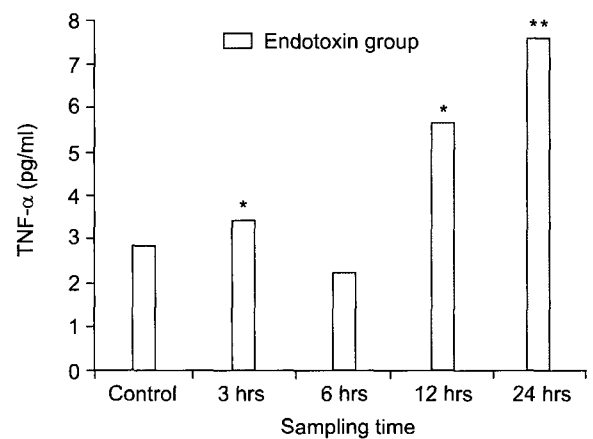
TNF- $\alpha$ 의 농도는 6시간대를 제외한 나머지 모든 내독소 투여군들이 대조군( $2.84 \pm 0.10$  pg/ml)보다 유의하게 더 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 3).

#### 7) Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

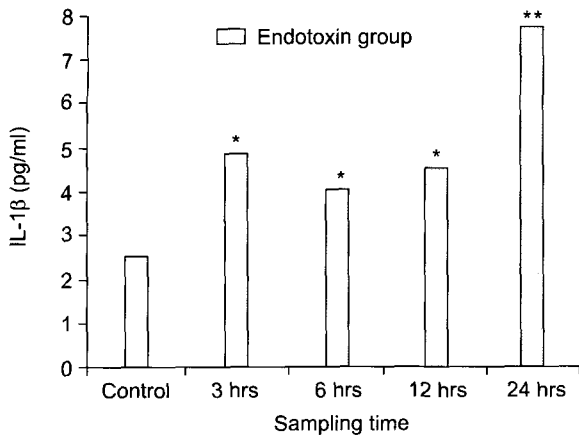
IL-1 $\beta$ 의 농도는 모든 내독소 투여군들이 대조군( $2.52 \pm 0.12$  pg/mL)보다 의미있게 더 높았다( $p < 0.05$  혹은  $p < 0.01$ , Fig. 4).

#### 8) Superoxide dismutase (SOD)

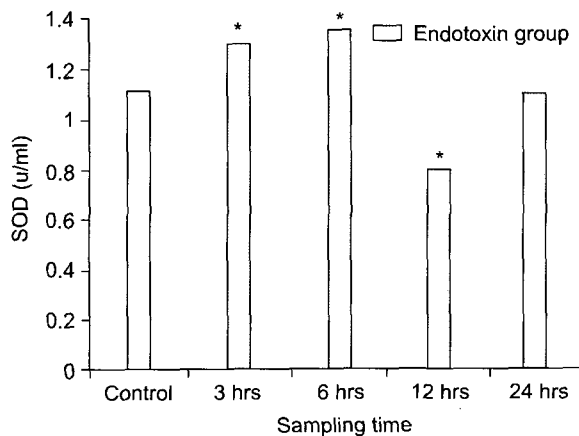
SOD의 농도는 내독소 투여 3시간 군과 6시간 군은 대조군( $1.12 \pm 0.17$  unit/mL)보다 유의하게 더 높았으나( $p < 0.05$ ), 12시간 군은 오히려 대조군보다 낮았다( $p < 0.05$ ,



**Fig. 3.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of TNF- $\alpha$  level in blood. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).



**Fig. 4.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of IL-1 $\beta$  level in blood. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).

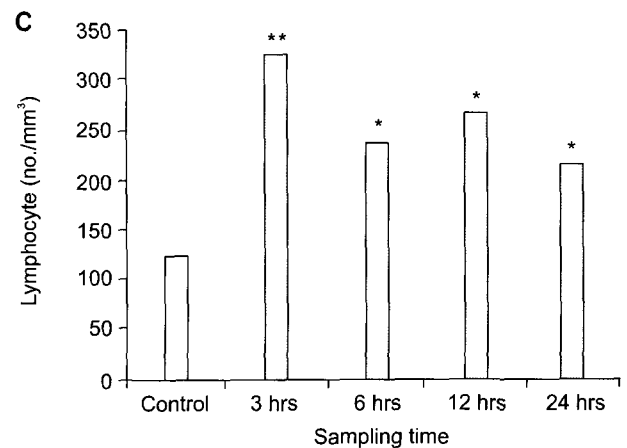
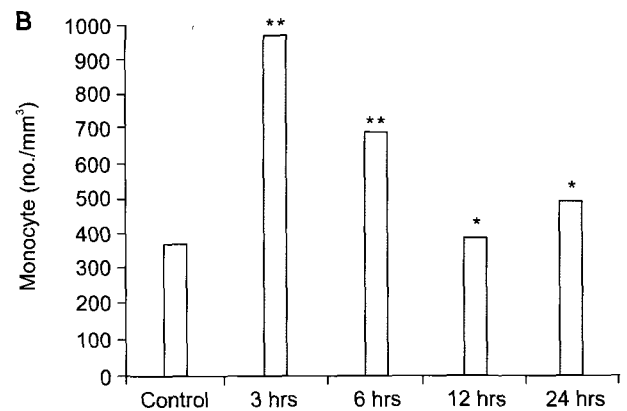
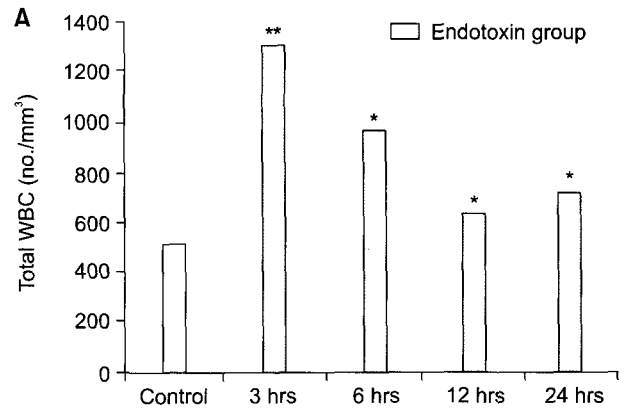


**Fig. 5.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of SOD (superoxide dismutase) activity in blood. \* $p < 0.05$  (compared with control).

Fig. 5).

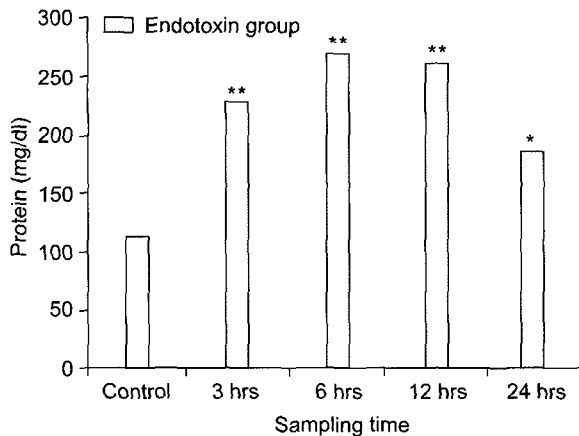
### 9) 기관지폐포 세척액의 총 백혈구 수 및 각 분획 세포 수

(1) 총 백혈구 수: 기관지폐포 세척액 내 총 백혈구 수는 모든 내독소 투여군들이 전 시간에 걸쳐 대조군( $515 \pm 47/\text{mm}^3$ )보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$  혹은  $p < 0.01$ ). 내독소그룹 간의 비교에서는 3시간대에서 가장 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 6A). 기관지폐포 세척액 내에서 호중구는 거의 관찰할 수 없었던 관계로 수적 계산이 불가능하였다.



**Fig. 6.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of leukocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid. (A) Total leukocyte, (B) Monocyte, (C) Lymphocyte. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).

(2) 단구 수: 기관지폐포 세척액 내 단구 수는 대조군의 경우  $386 \pm 23/\text{mm}^3$ 이었으나 내독소 투여군들은 모두 전시간대에 걸쳐 이보다 훨씬 증가되어 있었다( $p < 0.05$  혹은



**Fig. 7.** The comparison of the control group with each endotoxin-treated group in the sequential changes of protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (compared with control).

$p < 0.01$ ). 내독소그룹 간의 비교에서는 3시간대에서 가장 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 6B).

(3) 림프구 수: 기관지폐포 세척액 내 림프구 수는 대조군의 경우  $129 \pm 14/\text{mm}^3$ 였으나 내독소 투여군들은 모두 전 시간대에 걸쳐 이보다 더 높았다( $p < 0.05$  혹은  $p < 0.01$ ). 내독소그룹 간의 비교에서는 3시간대에서 가장 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 6C).

#### 10) 기관지폐포 세척액의 단백질 농도

기관지폐포 세척액의 단백질 농도는 대조군의 경우  $114.47 \pm 18.5 \text{ mg/dL}$ 였으나 내독소 투여군들 모두 전 시간대에 걸쳐 대조군보다 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$  혹은  $p < 0.01$ ). 내독소그룹 간의 비교에서는 6시간대에서 가장 높았다(Fig. 7).

#### 11) 기관지폐포 세척액의 출혈

기관지폐포 세척액의 출혈건수는 대조군의 경우 한 건도 없었는데 비해 내독소 투여군의 경우 3시간대에 5건, 6시간대에 3건, 12시간대에 1건으로 나타났다. 그러나 24시간대에서는 전혀 관찰되지 않았다( $p < 0.05$ , Table 1). 내독소그룹 간의 기관지폐포 세척액의 출혈정도(degree)는 12시간대에서 가장 심하였다.

#### 12) 폐의 병리조직학적 소견

내독소 투여군들의 폐세포 간질에의 백혈구계 세포(호

**Table 1.** Prevalence of hemorrhage in bronchoalveolar lavage fluid

Time	Hemorrhagic sample/Total BALF sample		
	Control	Endotoxin group	Hemorrhagic degree
3 hr	0/8	5/8	2+
6 hr	0/8	3/8	3+
12 hr	0/8	1/8	4+
24 hr	0/8	0/8	-

중구, 단구, 림프구, 호산구)의 결집정도는 대조군(-)에 비해 모든 시간대에 걸쳐 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가되어 있었는데, 대조군의 정상적인 조직소견(Fig. 8A)과는 달리 내독소 투여군들의 경우 주로 +2~+4의 변화를 보였다. 폐실질조직, 기관지 및 기관지 주위의 림프구와 조직구의 침윤정도, 세포간질의 염증성 확장(widening)정도 역시 대조군에서보다 내독소 투여군에서 모두 유의하게( $p < 0.05$ ) 높게 나타났으며, 그 정도는 주로 +2~+4의 변화를 보였다(Fig. 8B). 폐조직 내 국소성 출혈은 내독소 투여 3시간 및 6시간대에서 현저하게 관찰되었고(Fig. 8C), 폐포내 섬유소성 물질은 6시간 및 12시간대에서 관찰되었다. 이와 같은 폐의 병리조직학적 소견에 대한 내독소그룹 간의 비교에서는 6시간대에서 그 정도가 가장 심하였다(Table 2).

#### 13) 염증 표지자들과 기관지폐포 세척액 내 각 변수들 간의 상관관계

(1) **TNF- $\alpha$** 와 기관지폐포 세척액의 백혈구와의 관계: 내독소 투여군의 TNF- $\alpha$ 농도와 기관지폐포 세척액의 백혈구 수(총 백혈구 수, 림프구 수, 단구 수) 사이에 여러 시간대에서 양의 상관성이 있었다( $p < 0.05$ , Table 3).

(2) **IL-1 $\beta$** 와 기관지폐포 세척액의 백혈구와의 관계: 내독소 투여군의 IL-1 $\beta$ 농도와 기관지폐포 세척액의 백혈구 수(총 백혈구 수, 림프구 수, 단구 수) 사이에 여러 시간대에서 양의 상관성이 있었다( $p < 0.05$ , Table 4).

(3) **SOD**와 기관지폐포 세척액의 백혈구와의 관계: 내독소 투여군의 SOD활성정도와 기관지폐포 세척액의 백혈구 수(총 백혈구 수, 림프구 수, 단구 수) 사이에는 24시간대를 제외한 나머지 시간대에서 양의 상관성을 보였다( $p < 0.05$ , Table 5).

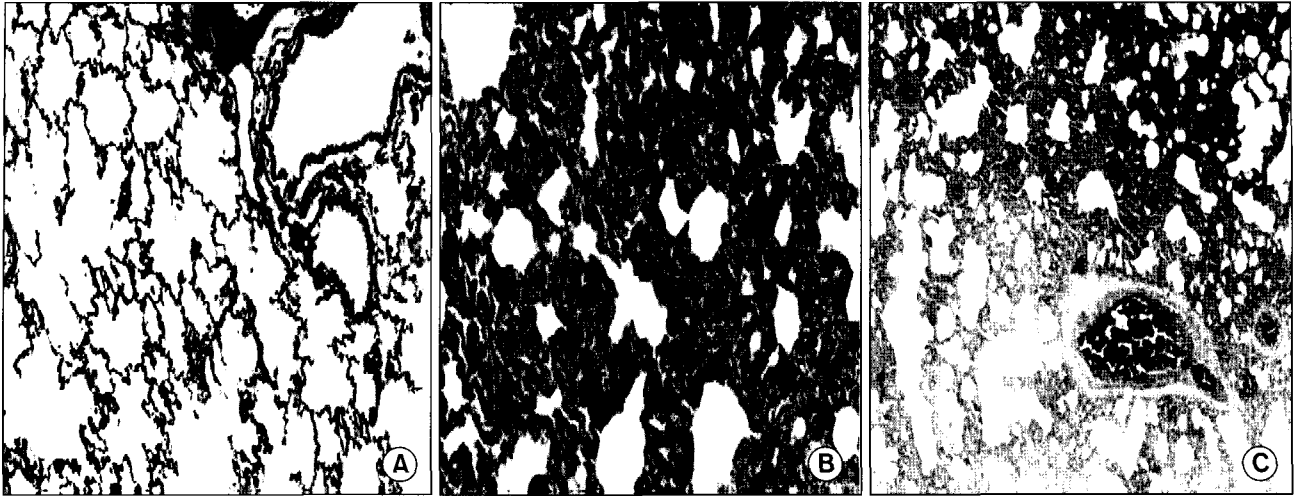


Fig. 8. Histopathologic findings of the control and endotoxin-treated groups. (A) Normal control group (H&E, ×100). (B) Inflammatory infiltration is noted in markedly widened interstitium of lung parenchyma (+4 in endotoxin group, 6 hr) (H&E, ×200). (C) Remarkable bleeding in lung parenchyma in endotoxin group, 6 hr (H&E, ×200).

Table 2. The histopathologic findings of lung in the control and endotoxin-treated groups

Parameter	Group & time Control	Endotoxin group			
		3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
Int rec of neutrophil	-	2+	3+	2+	1+
Int rec of monocyte	-	3+	4+	2+	1+
Int rec of lymphocyte	-	3+	4+	2+	2+
Int rec of eosinophil	-	1+	2+	1+	1+
Int rec of macrophage	-	1+	2+	1+	-
Int inflammatory alv widening	-	1+	2+	1+	1+
Int infil in lung parenchyma	-	3+	4+	2+	2+
L-infil in lung parenchyma	-	3+	4+	2+	1+
Peribronchial-L-infil	-	3+	4+	2+	2+
Bronchial-L-infil	-	3+	4+	2+	2+
Histiocyte-infil	-	3+	4+	2+	1+
Follicle formation	-	-	2+	1+	1+
Focal hemorrhage	-	2+	3+	1+	1+
Fibrinoid material in alv	-	-	1+	1+	-

Values mean the degree of severity. (-) negative; (1+) mild; (2+) moderate; (3+) severe; (4+) very severe. Int rec=Interstitial recruitment; alv=Alveolar space; L-infil=Lymphocyte infiltration.

(4) TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 그리고 SOD와 기관지폐포 세척액의 단백질 농도와의 관계: 내독소 투여군의 TNF- $\alpha$ 의 변화와 기관지폐포 세척액의 단백질 농도의 변화 사이에 3, 6 및 12시간대까지 양의 상관관계를 보여주었다( $p < 0.05$ ,

Table 6). IL-1 $\beta$ 와 기관지폐포 세척액의 단백질 농도 변화 사이에도 3, 6 및 12시간대까지 양의 상관관계를 보여주었다( $p < 0.05$ , Table 6). SOD 농도와 기관지폐포 세척액의 단백질 농도 변화 사이에는 3시간 및 6시간대에서 양의 상



**Table 3.** Correlation of TNF- $\alpha$  change to leukocyte counts of bronchoalveolar fluid in the endotoxin-treated groups

		Endotoxin group				
Leukocyte	TNF- $\alpha$	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	
	① Total WBC	3 hr	① 0.74*			
② Lymphocyte		② 0.66*				
③ Monocyte		③ 0.71*				
	6 hr		① NS ② 0.63* ③ 0.63*			
	12 hr			① NS ② 0.60* ③ NS		
	24 hr				① 0.61* ② 0.68* ③ NS	

Values imply correlation coefficient (r). \*p<0.05 (significant positive correlation); NS p>0.05 (not significant).

**Table 4.** Correlation of IL-1 $\beta$  change to total total and differential leukocyte counts of bronchoalveolar fluid in the endotoxin-treated groups

		Endotoxin group				
Leukocyte	IL-1 $\beta$	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	
	① Total WBC	3 hr	① 0.70*			
② Lymphocyte		② 0.72*				
③ Monocyte		③ 0.63*				
	6 hr		① 0.79* ② 0.63* ③ 0.67*			
	12 hr			① 0.61* ② NS ③ NS		
	24 hr				① NS ② NS ③ 0.60*	

Values imply correlation coefficient (r). \*p<0.05 (significant positive correlation); NS p>0.05 (not significant).

**Table 5.** Correlation of SOD change to total and differential leukocyte counts of bronchoalveolar fluid in endotoxin-treated groups

		Endotoxin group				
Leukocyte	SOD	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	
	① Total WBC	3 hr	① 0.73*			
② Lymphocyte		② 0.69*				
③ Monocyte		③ 0.65*				
	6 hr		① 0.65* ② 0.68* ③ 0.64*			
	12 hr			① NS ② NS ③ 0.63*		
	24 hr				① NS ② NS ③ NS	

Values imply correlation coefficient (r). \*p<0.05 (significant positive correlation); NS p>0.05 (not significant).

**Table 6.** Correlation of protein concentration in bronchoalveolar fluid to TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and SOD in endotoxin-treated groups

		Endotoxin group				
Parameter	Protein	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	
	① TNF- $\alpha$	3 hr	① 0.75*			
② IL-1 $\beta$		② 0.68*				
③ SOD		③ 0.61*				
	6 hr		① 0.63* ② 0.77* ③ 0.65*			
	12 hr			① 0.79* ② 0.69* ③ 0.60*		
	24 hr				① NS ② 0.73* ③ NS	

Values imply correlation coefficient (r). \*p<0.05 (significant positive correlation); NS p>0.05 (not significant).

관관계를 보여주었다( $p < 0.05$ , Table 6).

## 고 찰

본 실험의 내독소혈증에 따른 혈액 내 백혈구 변화를 보면 내독소 투여 후 3시간에서 6시간까지 주로 호중구 및 림프구의 주도적 저하와 단구 및 호산구의 부수적 감소로 인한 총 백혈구 수의 급격한 감소가 관찰되었다. 그러나 동일한 시간대에서 폐조직의 현미경적 소견을 보면 폐모세혈관과 폐간질, 기관지 내 및 기관지 주변에 주로 림프구와 단구의 심한 결집과 침윤을 보였다. 아울러 중등도의 대식세포의 결집에 이어 경도 혹은 중등도의 호중구 및 호산구의 결집과 침윤이 동시 관찰되었다. 이러한 백혈구계 세포들의 폐포로의 이주(migration)는 내독소 투여 후 3시간대에는 거의 관찰하기 어려웠고 다만 6시간대에 폐포 내로의 호중구 및 호산구의 제한적 이주가 관찰되었을 뿐이다. 이후 12시간대부터는 상기한 대부분의 급성 염증성 폐손상 소견들은 점차 회복되는 양상을 보임으로써 실험적 내독소혈증으로 인한 급성폐손상은 6시간대에 가장 극심함을 알 수 있었다. 본 연구의 이러한 결과는 기존의 여러 연구들[2,6,7]과 다소 차이가 있다. 기존의 연구에서는 내독소 투여 초기부터 호중구의 주도적이고 격심한 폐내 격절(sequestration)과 기관지 폐포 쪽으로의 이동이 관찰되었다. Yamamoto 등[7]의 경우에는 다소 큰 토끼(2.0~2.5 kg)에서 내독소를 기관지 안으로 직접 점적 투여하였다. 기관지 내 내독소의 투여는 기관지 내에 직접적인 염증변화를 일으켜 보다 신속하고 광범한 호중구의 폐포 내 이동을 초래할 것으로 생각된다. 투여한 내독소의 양에 따른 차이도 고려해 볼 수 있는데, 비교된 대부분의 타 연구들은 비교적 소량( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )의 내독소를 투여한 데 비해 본 연구의 경우 치사량에 가까운 0.50 mg/kg의 용량을 투여하였는 바 고용량의 내독소가 폐 이외 다른 장기의 심한 다발성 염증 반응 및 손상을 일으킴으로써 호중구의 폐 내 격절 및 기관지 폐포로의 이동이 보다 경미했을 가능성이 있다. Meszaros 등[8]은 내독소 혈증 쥐의 간에서 과립백혈구의 심한 침윤을 보고한 바 있어 본 연구의 가설을 뒷받침해주고 있다.

아무튼 그 정도의 차이에도 불구하고 내독소 기인성 호중구의 폐 내 격절은 급성폐손상의 발생에 매우 중요한 환경을 제공하게 된다. 내독소로 인해 자극 받은 호중구는 elastase와 같은 독성 유리산소기를 방출함으로써 폐 내피에 대한 잠재적 손상을 줄 수 있다[9,10]. 폐 내에 격절

된 호중구의 그 다음 작용은 폐 실질 조직, 폐 간질, 기관지 등으로의 이주인데, 본 연구에서도 모든 내독소 투여 군들에서 대부분의 시간대에 호중구의 이주에 따른 폐 조직 침윤현상을 확실하게 관찰할 수 있었다. 한편 본 연구에서 관찰된 폐 및 기관지 실질조직 내 림프구와 단구의 심한 결집과 침윤현상은 급성 염증성 폐손상에 있어 호중구가 주도적 역할을 하리라는 생각에 반한 의외의 결과였다. 본 연구의 이러한 관찰 결과는 어린 토끼의 내독소혈증 급성폐손상에선 호중구보다 오히려 림프구 및 단구가 더 주도적 병인으로써 작용할 가능성을 시사하는 중요한 사실로 판단된다. 그러나 이 실험 결과가 사람에서 유아나 소아그룹에 그대로 적용될 수 있을지 의문스럽긴 하나 양자에서 순환백혈구 중 호중구보다 림프구가 수적으로 우위이거나 비슷하다는 공통점이 있기 때문에 어린 토끼 모델을 통한 유소아의 급성 폐손상의 병태생리를 이해할 수 있다는 가능성이 시사되었다. 주로 성인모델을 통한 동물실험이거나 시험관적인 과거의 여러 보고들[11,12] 역시 호중구 외 림프구 및 단구의 내독소 기인성 폐 내 격절이 급성 혹은 만성폐손상의 발생과 진행과정에 깊이 관여할지도 모른다는 가능성을 제시해 주고 있다. 흉관(thoracic duct)을 통한 림프구 배출이나, 면양을 이용한 림프구 대항 항체 사용에 의한 순환 림프구 제거 실험에서 림프구의 역할감소는 내독소에 대한 초기 반응을 감소시켰으며[13], 내독소 투여 후 말초혈액  $T_4$ ,  $T_8$  및 B 림프구의 수적 저하와 폐모세혈관 내 림프구 집단의 격절 간에 일정한 상관관계가 있다고 하였다[11]. 림프구의 내독소 기인성 폐 내 격절에는 다양한 부착 integrin들이 관여하는 것으로 보고되고 있는데, 모세혈관 내피에 대한 활성화된 림프구의 부착에 뒤이어 모세혈관 내피층을 경유한 폐간질 쪽으로 림프구 이주가 일어나며 본 연구에서도 이와 같은 현상이 내독소 투여군에서 관찰되었다. 내독소 투여로 인해 폐 내 결집된 림프구는 interferon- $\gamma$ 와 interleukin을 포함한 다양한 cytokines를 생성 분비하며 interferon- $\gamma$ 는 대식세포의 IL-1 생성능을 증강시킨다[14]. 이러한 cytokines의 국소 부위에서의 증강된 생성은 폐 내피세포에 작용하여 전술한 여러 부착 분자들을 더욱 활성화시켜 폐 조직 속으로 염증세포의 이주를 한층 촉진시킨다. 본 연구에서 관찰된 림프구의 폐 내 결집 및 침윤은 기존의 연구결과에 부합하며 폐손상의 중요한 발생매개체로서 작용했을 가능성이 높았다. 내독소혈증은 인체 및 실험적 동물모델에서 말초 혈액 내 단구의 심한 수적 저하를 가져오며[2], 폐 내 결집된 단구와 단구-유래 대식세포는 염

증성 cytokines, growth factors, 유리산소기, 및 단백질 분해 효소들을 합성 분비함으로써 급성염증성폐손상에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다[15]. 내독소나 IL-1 및 TNF 의해 자극된 단구는 조직인자를 표출(express)시켜 원형질막의 외엽(outer leaflet)에서 phosphatidylserine을 노출시킨다. phosphatidylserine은 트롬빈생성의 표면증폭을 위한 필수 음이온인 인지질 성분으로 혈액응고반응의 세포성 촉발제로 작용하게 된다[16]. 안정상태의 단구와 내피세포는 tissue factor Ag이나 mRNA를 합성하지 않지만 내독소, IL-1, 혹은 TNF로 인해 유도된 조직인자 표출에 자극 받을 경우 전응고상태(procoagulant state)로 전환될 수 있다[16]. 그 결과 폐 내 출혈과 트롬빈 형성을 가져올 것으로 예측되는데, 실제 본 연구의 경우에도 내독소 투여군의 6시간대 및 24시간대에 폐포 내 섬유소성물질의 형성과 폐조직 내 국소적 출혈양상을 확인할 수 있었다. 따라서 내독소로 인한 호중구나 림프구의 폐 내 격절보다 단구의 폐 내 격절과 침윤이 오히려 임상적으로 더 유해한 병리학적 상황을 유도할 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 내독소 투여군에 있어 폐 내 국소적 출혈 자체가 폐손상을 더욱 악화시킬 가능성이 높다. 왜냐하면 국소적 출혈에 이은 용혈반응으로 적혈구로부터 헤모글로빈이 유리될 경우 내독소의 혈관내피세포로부터 조직인자 방출효과를 더욱 증강시키고, 헤모글로빈-내독소 복합체가 형성되면 이 복합체가 단핵백혈구세포, 보체계 그리고 혈액응고계간의 상승적 활성화를 조장할 수 있기 때문인데 특히 헤모글로빈의 분해산물인 헤마틴이 독성효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[17,18]. 따라서 세균감염이나 내독소혈증으로 인한 급성폐손상 시 용혈반응을 보이는 경우 훨씬 심각한 임상 예후를 나타낼 수 있다. 본 연구에서도 내독소 투여군들 중 임상적으로 매우 심각해 보이는 개체들에서 폐 내 국소적 출혈과 용혈현상이 더욱 심한 상태로 관찰되었고 이러한 개체들의 상당수는 기관지폐세척액에서도 심한 출혈을 보였다. 비록 그 정도는 미약했지만 본 연구에서 관찰된 내독소 투여군들의 폐모세혈관 및 간질내의 호산구 결집 및 침윤현상은 다소 이외의 결과였다. 호산구의 역할에 대한 일부의 연구가 있긴 하지만[19], 어떤 병적 상황에서 성숙된 정상 호산구가 어떻게 조직세포로 이주하는지 그 기전에 관해 알려진 바가 거의 없다. 급성 폐손상의 병태생리에 미치는 호산구의 역할이 어느 정도인지는 불분명하고, 다만 일부 내독소 투여군에 있어 호중구와 함께 기관지 폐포 속으로의 침윤이 관찰됨에 따라 그 병인적 가능성을 유추해 볼 뿐이다.

내독소는 지금까지 설명한 백혈구 계통 세포의 자극과 매개를 통해 급성 염증성 폐손상을 유발시키지만 내독소 자체가 내피세포에 직접 손상을 일으키기도 한다. Gartner 등[20]은 시험관적 연구에서 내독소가 내피세포의 DNA 및 RNA 합성을 손상시키고, 기포를 형성시키며 형태학적 변화까지 일으켜 내피를 기저층으로 부터 탈락시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 이와 유사한 여포(follicle) 형성이 관찰되었는데, 이러한 내독소 기인성 폐모세혈관 내피세포의 변화는 혈관의 투과성 증가를 가져와서 폐부종을 유도할 것이다. 내독소 기인성 급성폐손상에 따른 기관지 폐포 내 변화 관찰을 위해 흔히 기관지 폐포 세척술이 시행된다[21]. 본 연구에서 관찰된 기관지 폐포 내 변화양상은 내독소 투여군들 모두가 관찰시기 내내 단구 수와 림프구 수의 절대적 증가에 기인한 총 백혈구 수의 증가가 있었다. 흥미로운 사실은 기관지 폐포 세척액 내 호중구가 거의 관찰되지 않은 반면, 말초 혈액이나 폐 내의 경우와 달리 단구수가 림프구 수에 비해 2.5~3.0배 정도로 높았다는 점인데 이러한 결과로 보아 기관지 폐포 내의 숙주 방어체계엔 단구계열의 백혈구가 주도적 역할을 하고 부수적으로 림프구의 역할이 뒤따른다는 사실을 짐작할 수 있었다. 내독소 투여 후 단구와 림프구 수의 증가양상은 폐 내의 상황과는 달리 3시간대에 가장 심하였고 이후엔 시간경과에 따라 대체로 저하되는 양상을 보임으로써 동일한 시간대에 말초혈액 내 변화양상과는 매우 깊은 반비례적 상관관계를 시사하였다. 기관지폐포 세척액 내 단백질 농도는 내독소 투여 후 3시간대에 급격한 증가를 보였고 6시간대에 거의 최고치를 나타낸 후 이후 시간대엔 점차 감소하여서 24시간대에는 대조군에 비해 높긴 하나, 상당히 감소됨으로써 폐 내 병리조직학적 소견과 일치된 정비례적 상관관계를 나타내었다. 이러한 결과들은 내독소 투여 후 급격한 폐손상으로 인해 폐모세혈관 투과성이 증가되어 기관지 폐포 내로의 단백질 유출이 생겼고 시간경과에 따라 폐손상 정도가 다소 완화됨으로써 기관지 폐포 내로의 단백질 유출량이 감소되었음을 의미하였다. 이러한 결과는 쥐를 실험대상으로 한 문 등[22]의 연구결과와는 다소 차이를 보였는데 그들은 내독소 주입 후 기관지 폐포 세척액 내 단백질의 농도는 3시간 때부터 지속적으로 증가되어 24시간에 이르러 최고치를 이루었다고 보고하였다. 또한 그들은 기관지 폐포 세척액 내 단구 수 역시 내독소 투여 후 24시간 때에 가장 높았다고 보고함으로써 역시 본 연구와는 상당한 차이점을 보였다. 두 연구 간의 이와 같은 차이를 발생시킨 매개변수가 무

엇인지 명확한 설명은 불가능하나, 동물 종에 따른 차이 이거나 성인그룹(문 등이 대상으로 한 쥐)과 유소아(본 연구의 어린 토끼) 그룹 간의 차이, 혹은 내독소에 대한 민감성 발현의 시간 차이 가능성이 있다고 생각된다. 비록 두 연구 간에 약간의 차이점이 있긴 하나 폐 모세혈관 투과성의 증가로 인한 기관지폐포 내로의 단백질 유출의 임상적 중요성에 대한 인식에는 일치된 소견들을 보이고 있다. 즉, 급성폐손상이 심할수록 기관지폐포 내 단백질농도는 증가하는데 본 연구의 경우에도 심한 급성폐손상을 보인 토끼일수록 기관지폐포 세척액의 단백질농도가 높았다. 또 중요한 사실은 내독소 투여 3시간 및 6시간대의 기관지폐포 세척액 검체의 상당수가 심한 출혈성 양상을 보여 급성폐손상의 진행양상 및 그 정도와 매우 일치된 소견을 보였다는 점이다. 따라서 내독소 유발 급성 폐손상 시 기관지폐포 세척액 내 인자들의 변화는 폐손상의 진행양상과 회복 정도를 반영해주는 중요한 지표가 될 수 있다고 판단된다.

이미 전술한 바 내독소 기인성 급성폐손상은 많은 백혈구계 세포들을 폐와 기관지 내에 격절 및 침윤시키게 되고 이때 폐 내 격절된 백혈구들과 내독소에 자극된 혈관 내피세포들은 다량의 superoxide anion을 생성시키게 되며 여기에 용혈로 인해 유출된 다량의 철이 반응하게 될 경우, 폐 실질 조직을 광범위하고 심하게 파괴시킬 수 있는 많은 양의 OH<sup>·</sup> 생성을 유도하게 될 것이다. 본 연구에서도 내독소 투여에 따른 유리산소기 생성여부를 조사하기 위해 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)를 측정하였다. SOD의 활성은 내독소 투여 후 3시간대와 6시간대에 대조군보다 유의한 증가를 보였는데, SOD의 증가는 혈중 내 superoxide anion의 증가된 생성을 의미한다.

내독소는 대식세포, 단구, 림프구, Kupffer cell 등을 자극하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8과 같은 proinflammatory cytokines의 생성과 방출을 유도한다. 이러한 cytokines는 급성폐손상 시에도 유리되어 염증성 폐손상의 병리학적 매개인자로서 작용하게 된다. 특히 내독소로 인해 혈중으로 분비된 TNF- $\alpha$ 나 IL-1 $\beta$ 는 백혈구의 화학주성물질로 작용하여 백혈구의 응집과 부착능을 증가시켜 폐 내 격절을 유도하고 또한 백혈구들로 하여금 더 많은 cytokines를 생성 분비시킨다. 본 연구에 있어 내독소 투여 후 혈중 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 농도는 시간의존성으로 지속적 증가를 보였고 24시간대에 두 물질 모두 최고치를 나타내었다. 이와 같은 결과는 기존의 연구보고와는 상당한 차이를 보였다. Lindsey 등[23]은 원숭이를 모델로 한 연구에서 TNF- $\alpha$ 는

내독소 투여 후 증가하기 시작하여 90분경에 최고치에 달한 후 급격히 감소하기 시작하여 3시간 후에는 검출되지 않았다고 보고한 바 있고, Van Deventer 등[24] 역시 성인을 대상으로 한 연구에서 내독소 투여 30~45분 후 급격히 증가해서 60~90분에 최고치에 달하고 이후 서서히 감소했다고 보고하였다. 이런 차이에 대한 요인으로, 첫째 실험대상이 서로 다른 종간의 차이점, 둘째 선행 연구그룹에서 이용한 내독소 투여량에 비해 본 연구에서는 거의 치사량에 가까운 고용량이 사용되었다는 점, 마지막으로 본 연구에는 유아나 소아 그룹에 해당하는 어린 동물 모델이 이용되었다는 점 등이 고려되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 나타난 특이 사실은 대부분의 측정변수들이 급성폐손상 진행의 시간적 추이 및 경과와 매우 밀접하게 상호 인과적 관계를 가지고 변화되어 갔으나, cytokines의 변화양상은 폐손상 상황과 일치되지 않는다는 점이다. 즉, 폐손상의 병리조직학적 소견과 대부분의 다른 변수들은 내독소 투여 후 6시간대까지 격심한 증가 이후엔 점차 완화되거나 감소되는 양상을 보인 반면, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 3시간대 이후 오히려 점차 증가되었다. 이러한 결과들은 몇 가지 추론을 가능케 한다. 첫째, 내독소 투여에 따른 이 cytokines의 변화 양상만으로는 급성폐손상의 시간적 추이를 충분히 설명할 수 없을 것이다. 따라서 향후 이와 유사한 연구에서는 혈중 내 cytokines 농도의 측정보다는 기관지폐포 세척액 내 cytokines 동태의 측정이 더 바람직할 것이다. 둘째, 내독소 유도 염증 반응시 시간경과에 따라 백혈구계 세포들의 수적 증가에 따라 증강된 백혈구들로부터 cytokines의 새로운 합성이 개시될 가능성이 있다. 이와 같은 연구결과에도 불구하고, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 간의 시간대별 유사한 변화양상은 이 두 cytokines 간에 서로를 자극하는 feedback 기전을 통한 동반적 생성을 유도한다는 점을 시사하였다. 더구나 이 두 가지 cytokines는 폐생검의 병리조직학적 소견을 제외한 모든 혈액학적 변수들 및 기관지폐포 세척액 내 변수들 간에 여러 시간대에 걸쳐 매우 광범위한 유의한 상관관계를 보임으로써 내독소혈중 급성폐손상에 있어 이들 두 cytokines의 병인적 매개가능성이 강하게 시사되었다.

## 결 론

연구저자들은 유아나 소아 그룹의 급성폐손상 발생과 진행의 병태생리학적 양상을 이해하기 위해 전향적으로 실시한 내독소혈중 토끼실험에서 다음과 같은 연구결과

를 얻었다.

첫째, 내독소는 어린 토끼에 있어 급격하고 치명적인 급성염증성폐손상을 일으키며, 그 병태생리학적 진행은 6 시간대까지 시간의존성으로 격심해지고 이후부터 완화되는 경향을 보였다.

둘째, 어린 토끼의 내독소 유발 급성폐손상에서 호중구 뿐만 아니라 림프구, 단구, 호산구 역시 병인학적으로 깊이 관여하였다.

셋째, 내독소 기인성 급성폐손상의 발생과 진행에 혈액학적, 면역학적 인자들의 활성뿐만 아니라 유리산소기 역시 깊이 관여하였다.

넷째, 내독소 기인성 급성폐손상은 기관지폐포 내 상황 역시 변화시켜 백혈구의 이주와 단백질 유출을 가져왔다.

다섯째, 어린 토끼는 혈관적으로 투여한 내독소에 대해 매우 민감하고 신속한 병리학적 반응을 보임으로써, 향후 유아나 소아 그룹 연구를 위한 실험동물모델로서의 이용 가능성을 보여주었다.

#### 참 고 문 헌

- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, et al. *Clinical risks for development of adult respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med 1995;151:293-9.
- Meyrick BO, Brigham KL. *Acute effects of E. coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep: structure & function relationships*. Lab Invest 1983;48:458-70.
- Cavaillon JM, Haeflner-Cavaillon N. *Signals involved in interleukin-1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages*. Cytokine 1990;2:1-11.
- Semeraro N, Biondi A, Lorenzet R, et al. *Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophage from diverse anatomical sites*. Immunology 1983;50:529-40.
- Lee YS. *Laboratory animal medicine*. Seoul: Seoul University Publishing Department 1997. 456-60.
- Mikawa K, Maekawa N, Nishina K, et al. *Effect of lidocain pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits*. Anesthesiol 1994;81:689-99.
- Yamamoto T, Kajikawa O, Martin TR, et al. *The role of leukocyte emigration and IL-8 on the Development of lipopolysaccharide-induced lung in rabbits*. J Immunol 1998;161: 5704-9.
- Meszaros K, Bojta J, Abraham P, et al. *Glucose utilization by kupffer cells, endothelial cells, and granulocytes in endotoxemic rat liver*. Am J Physiol 1991;260:G7-12.
- Swank DW, Moore SB. *Roles of neutrophil and other mediators in adult respiratory distress syndrome*. Mayo Clin Proc 1989;64:1118-32.
- Tate RM, Repine JE. *Neutrophils and adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis 1983;128:552-9.
- Duke SS, Guerry-Force ML, Forbes JT, et al. *Acute endotoxin-induced lymphocyte subset sequestration in sheep lungs*. Lab Invest 1990;62:355-62.
- Jones M, Hoover R, Meyrick B. *Endotoxin enhancement of lymphocyte adherence to cultured sheep lung microvascular endothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:81-9.
- Traber DL, Jinkins J, Rice K, et al. *Role of lymphocytes in the ovine response to endotoxin*. Adv Shock 1983;9:257-63.
- Berman JS, Beer JS, Theodore DJ, et al. *Lymphocyte recruitment to the lung*. Am Rev Resp Dis 1990;142:238-57.
- Welbourn CRB, Young Y. *Endotoxin: Septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators*. Br J Surg 1992;79:998-1010.
- Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. *Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide*. J Immunol 1994;153:3245-55.
- White CT, Murrig AJ, Green DJ, Bolin RB. *Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin*. J Lab Clin 1986; 108:132-41.
- Anderson WAD, Morrison DB, Williams EF. *Pathologic changes following infection of hematin in dogs*. Arch Pathol 1992;33:589-97.
- Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, et al. *Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein*. J Immunol 1979;123:2925-7.
- Gartner SL, Sieckman DG, Kang YH, et al. *Effects of lipopolysaccharide, lipid A, lipid X, and phorbol ester on cultured bovine endothelial cells*. Lab Invest 1988;59:181-91.
- Delclaux C, Rezaiguia-delclaux S, Delacourt C, et al. *Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats*. Am J Physiol 1997;273:L104-12.
- Moon SH, Oh JH, Park SW, et al. *Time course change of phagocytes and proinflammatory activities in BALF in endotoxin-induced acute lung injury*. J Korean Tuberculosis & Resp Dis 1997;44:360-78.
- Lindsey DC, Emerson TE, Thompson Jr TE, John AE, Fournel MA. *Charaterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction*. Circ Shock 1991;34: 298-310.
- Van Deventer SJ, Buler HR, Ten Cate JW, et al. *Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways*. Blood 1990;76:2520-6.

=국문 초록=

배경: 급성 폐 손상을 초래하는 성인호흡곤란증후군(ARDS)은 높은 치사율 때문에 많은 임상 의 관심과 연구대상이 되어왔다. 그동안 선행 연구자들의 지속적인 노력에도 불구하고 유아 및 소아 그룹의 ARDS에 관한 병태생리학적 규명은 여전히 미흡한 실정이다. 본 연구는 어린 토끼(생후 약 8주)를 실험적 내독소성 급성폐손상 모델로 사용하여 유소아 그룹의 급성폐손상 병태생리의 시간적 진행양상을 규명하기 위해 전향적으로 계획되었다. 대상 및 방법: 연구목적에 따라 실험용 토끼를 대조군(n=8)과 실험적 급성폐손상을 위한 내독소 투여군으로 나눈 후, 검체의 채취시간에 따라 내독소 투여군을 다시 3, 6, 12 및 24시간 군으로 아그룹화하였다(시간대별 각 군의 n=8). 토끼의 귀정맥을 통해 대장균 내독소(*Escherichia coli* serotype O55 : B5)를 0.50 mg/kg 투여한 후, 각 군별로 혈액 및 기관지폐포 세척액을 채취하여 백혈구계의 동태, 면역학적 인자들, 단백질 농도를 측정하였고, 폐의 병리조직학적 소견도 함께 관찰하였다. 결과: 내독소 투여군들에서 3시간 및 6시간대에 혈액 내 호중구, 림프구, 단 구, 그리고 호산구 수 감소에 기인한 총 백혈구 수의 유의한 감소가 있는 반면, 12시간 및 24시간 때 호중구 수 증가에 기인한 총 백혈구수의 증가가 있었다( $p < 0.05$ ). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )의 혈중농도는 대부분의 시간대에 내독소 투여군들이 대조군보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). Superoxide dismutase (SOD) 농도는 3시간 및 6시간 때에는 내독소 투여군들이 대조군보다 높았으나( $p < 0.05$ ) 12시간 때에는 오히려 낮았다( $p < 0.05$ ). 기관지폐포 세척액 내 총 백혈구 수와 단백질 농도는 내독소 투여군들이 전 시간대에 걸쳐 대조군보다 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 내독소 투여군들의 경우 기관지폐포 세척액의 출혈성 경향을 보였다. 내독소 투여군들은 폐간질 및 실질조직 내 주로 림프구와 단구로 구성된 염증성 세포들의 심한 침윤, 폐포 내 약간의 호중구 격절, 그리고 간질의 비후와 같은 폐 손상 징후를 보였다. 이러한 현상은 내독소 투여 6시간대에 가장 심하였으나 시간경과에 따라 조금씩 호전되었다. 내독소 투여군들의 면역학적 표식자들(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , SOD)과 기관지폐포 세척액 변수들 간에 여러 시간대에 걸쳐 유의한 양 혹은 음의 상관관계를 보였다( $p < 0.05$ ). 결론: 내독소는 어린 토끼에 있어 급격하고 치명적인 급성염증성 폐손상을 일으키며 그 병태생리학적 진행이 6시간대까지는 시간의존성으로 격심해지고 이후부터 완화되는 경향을 보였다. 이러한 내독소 기인성 급성폐손상의 발생과 진행에는 혈액학적, 면역학적, 생화학적 변수들이 복합적으로 관여하였으며, 어린 토끼는 혈액 내 투여된 내독소에 대해 매우 민감하고 신속한 반응을 보임으로써 향후 유아 및 소아 그룹 연구를 위한 실험동물모델로서의 이용 가능성을 보여주었다.

- 중심 단어 : 1. 동물모델  
2. 내독소  
3. 폐손상