

N-nitroso-*N*-methylurethane으로 유도된 급성 폐손상에서 호중구에 의한 산화성 스트레스의 역할

김성은¹, 김덕영, 나보경, 이영만*

¹영남대학교 이과대학 생물학과, 대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Neutrophilic Respiratory Burst Contributes to Acute Lung Leak in Rats Given *N*-nitroso-*N*-methylurethane

Seong Eun Kim¹, Dug Young Kim, Bo Kyung Na and Young Man Lee*

¹Department of Biology, Younngnam University, Daegu, Korea,

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

(Received December 10, 2002; Accepted January 24, 2003)

ABSTRACT

As is well known that *N* nitroso *N* methylurethane (NNNMU) causes acute lung injury (ALI) in experimental animals. And ALI caused by NNNMU is very similar to ARDS in human being in its pathology and progress. In its context, we investigated the pathogenetic mechanism of ARDS associated with oxidative stress by neutrophils in Sprague Dawley rat model of NNNMU induced ALI. NNNMU had increased lung weight/body weight ratio (L/B ratio), lung myeloperoxidase (MPO) activity, protein content and number of neutrophils in bronchoalveolar fluid (BALF) compared with those of control rat ($p < 0.001$, respectively). In contrast, the amount of pulmonary surfactant in BALF was decreased by NNNMU ($p < 0.001$). Morphologically, light microscopic examination denoted pathological findings such as formation of hyaline membrane, infiltration of neutrophils and perivascular cuffing in the lungs of NNNMU treated rats.

In addition, ultrastructural changes such as the necrosis of endothelial cells, swelling and vacuolization of lamellar bodies of alveolar type II cells, and the degeneration of pulmonary surfactant were identified after treatment of NNNMU. Very interestingly, cerium chloride electron microscopic cytochemistry showed that NNNMU had increased the production of cerrous peroxide granules in the lung, which signified the increased production of hydrogen peroxide in the lung.

Collectively, we conclude that NNNMU causes acute lung leak by the mechanism of neutrophilic oxidative stress of the lung.

Key words : Acute lung injury, Neutrophils, *N* nitroso *N* methylurethane, Oxidative stress

* Correspondence should be addressed to Young Man Lee, M.D., Department of Physiology, Catholic University of Daegu, School of Medicine, 3056-4 DaeMyung Dong, Nam Gu, Daegu, Korea. Ph.: 053-650-4472, FAX: 053-621-4106, E-mail: leeym@cataegu.ac.kr
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

급성호흡곤란증후군 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)은 심한 저산소혈증 및 모세혈관투과성 폐부종을 특징으로 하는 급성 염증성 폐질환이다 (Ware & Matthay, 2000). ARDS는 Ashbaugh et al. (1967)의 보고 이후 지속적인 연구가 이뤄져오고 있으나 그 병인론(pathogenesis)은 완전히 확립되지 않고 있다. 이러한 병인론의 불확실함으로 인하여 확실한 치료방법이 개발되지 않고 그 진행이 대단히 신속하여 높은 사망률을 나타낸다 (Zilberberg & Epstein, 1998). ARDS 연구의 어려운 점은 그 병인(etiology)에 따른 병인론이 다 다를뿐만 아니라 조기진단이 어렵기 때문이다 (Connelly & Repine, 1997).

ARDS의 병리학적인 소견은 다양한 병인에도 불구하고 급성염증성폐부종의 소견을 보이며 특히 혈관 내피세포의 손상 및 폐포장벽 (alveolar barrier)의 손상을 동반한다. 특히 제2형 폐포세포는 특징적인 변화가 나타나는데 세포질내의 pulmonary surfactant의 저장소인 lamellar body의 팽대 및 공포화현상 (vacuolization)과 더불어 surfactant 대사의 변화가 초래된다 (Coalson et al., 1989). 이러한 병리학적인 소견을 근거로 하여 ARDS의 동물모델은 다양하게 개발되어 병인론의 연구에 사용되었다. 즉 cytokine을 이용한 급성폐부종 (Leff et al., 1994), gut ischemia/reperfusion (Welbourn et al., 1991), oleic acid aspiration (Furue et al., 1999), 염산의 기도내 주입 (Matthay & Rosen, 1996), 내독소를 이용한 급성폐손상 (Van et al., 1997), 약물을 이용한 급성폐손상 (Ono & Voelkel, 1991) 등이 이용되었다. 실험동물을 이용한 거의 모든 ARDS 모델에서 폐장의 염증성 반응과 더불어 호중구의 침윤이 관찰되므로 Repine (1992)은 호중구에서의 과도한 산소기 (oxygen derived free radicals)가 ARDS 발병의 중요한 원인이라고 주장하고 있다.

이 중에서도 *N*-nitroso-*N*-methylurethane (NNNMU)에 의한 급성폐손상의 모델은 지금까지 주로 surfactant의 대사변화에 관련하여 이용되었다 (Harris et al., 1989). NNNMU에 의해 유도된 급성폐손상은 사람에게서 볼 수 있는 ARDS의 손상과 거의 유사하며 특히

제2형 폐포세포의 변형 및 surfactant 대사에 변화를 가져와 폐장의 용압률의 감소 및 무기폐를 초래함과 동시에 투과성 폐부종을 유도한다. NNNMU에 의한 급성폐손상의 경우 특히 주목할 만한 것은 폐장내 염증세포의 심한 침윤 (infiltration)과 간유리질막 (hyaline membrane)의 형성이다. 그러나 아직까지도 이러한 병리학적인 소견의 기전은 밝혀지지 않았다. 최근 Cruz et al. (1997)은 NNNMU에 의한 급성폐손상이 호중구의 침윤에 따른 것이라고 보고하고 있다. 또한 Lee et al. (1996)은 NNNMU에 의한 급성폐손상은 γ -glutamyltransferase (γ -GT)의 활성도의 증가 및 제2형 폐포세포의 형태학적인 변화는 oxidative stress가 원인일 가능성이 있다고 보고한 바 있다. ARDS의 병인론 중 호중구에 의한 oxidative stress가 급성폐부종을 일으킨다는 증거는 실험적으로 보고되었으나 이 때 조직내 산소기 생성의 기전은 명확하지가 않다. 폐장내 산소기 생성의 원인은 XO (Terada et al., 1992)나 phospholipase A₂의 활성화가 그 원인이라고 보는 보고들은 산소기의 주된 생성은 주로 호중구라고 보고 (Slonim & Dalton, 2001)하고 있다.

이러한 점을 감안하여 본 연구에서는 흰쥐에서 NNNMU를 이용하여 ARDS와 유사한 급성폐손상을 유발하고 이 때 급성 폐손상의 기전이 산화성 스트레스 특히 호중구의 respiratory burst에 따른 것인지를 규명하는 것을 그 목적으로 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 체중 300 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐를 암수 구별없이 이용하였다.

NNNMU는 일본 동경화성공업사 (東京化成工業社, Japan)제를 구입하여 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 Sigma사에서 (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) 구입하여 사용하였다.

2. 급성폐손상의 유도

NNNMU를 이용한 급성폐손상의 유도는 Liou et al.

(1987)의 방법에 따랐다. 즉 NNNMU (7 mg/kg)를 피하로 주사하고 72시간 뒤에 실험동물을 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)를 이용하여 마취한 후 Harvard제 rodent ventilator에 연결하였다. 그 뒤 개흉술을 시행하였고 폐동맥에 polyethylene tube를 삽관하고, 좌측심실에 개출구를 만든 뒤 폐장을 Masterflex계 perfusion pump (Cole-Parmer, USA)를 이용하여 생리적 식염수로 폐장을 관류하여 혈액을 제거한 뒤 양측 폐장을 적출하였다. NNNMU 투여 후 72시간 후에는 거의 모든 실험동물에서 급성 폐손상이 유도되었으며 육안적으로는 호흡곤란의 증상이 확연히 나타났다. 조직학적으로는 폐장의 심한 부종이 확인되었다.

3. Gravimetry를 이용한 급성폐부종의 확인

NNNMU 투여 후 72시간 후 실험동물을 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)으로 마취한 뒤 개흉술을 시행하여 폐장을 관류하지 않은 상태에서 좌, 우측 폐장을 적출하고 그 무게를 측정하였다. 그 뒤 몸무게와 폐장무게를 이용하여 폐장무게/체중의 비를 산출하여 급성 폐부종의 지표로 삼았다.

4. 폐장내 myeloperoxidase (MPO) 활성도의 측정

폐장 내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 MPO의 활성도를 Goldblum et al. (1985)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 실험동물을 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 복강 내로 투여하여 마취한 뒤 개흉술을 시행하고, 오른심방을 통해 폐동맥에 삽관한 뒤 좌심실에 개출구를 만든 뒤 Masterflex계 perfusion pump (Cole Parmer, USA)를 이용하여 생리적 식염수로 폐장을 관류시켰다. 관류직전 폐장 내의 혈액을 완전히 제거하기 위하여 50IU의 heparin을 우측심방내로 주입하였다. 폐장의 관류가 끝난 뒤 좌, 우측 폐장을 적출 후 무게를 측정하고 -70°C에 보관하였고 MPO 측정을 위해서는 좌측폐장을 이용하였다. 즉 동결보존된 좌측폐장을 4.0 ml의 20 mM potassium phosphate (pH 7.4) 용액에 녹인 뒤 90

초간 Polytron homogenizer (Swizland)를 이용하여 분쇄한 뒤 40,000 g (Beckman, USA), 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 그 뒤 상층액은 버리고 pellet을 0.5 % hexadecyltetramethylammonium bromide가 함유된 50 mM potassium phosphate (pH 6.0) 용액에 재부유한 뒤 60초간 Vibracell (USA)을 이용하여 얼음 위에서 sonication하였다. 그 뒤 60°C의 항온수조에서 120분간 incubation 하였다. 120분간의 incubation 뒤에 시료 1.0 ml를 12,000 rpm으로 원심분리하고 그 중 0.1 ml을 2.9 ml의 0.0168 g의 *o*-dianisidine이 함유된 5×10^{-4} M의 과산화수소 용액과 반응시키고 이 때 흡광도의 시간에 따른 변화를 파장 460 nm에서 측정하여 MPO의 활동도를 측정하였다.

5. 폐포세척액 내의 단백질량 및 호중구의 산정

NNNMU 투여 후 혈중 호중구가 조직으로 이동 (migration)한 것을 검사하기 위하여 폐포세척액내의 호중구의 수를 산정하고 동시에 혈관내피세포의 손상을 확인하기 위하여 폐포세척액내의 단백질량도 측정하였다. 즉 실험동물을 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)을 복강내로 투여하여 마취하고 개흉술을 시행한 뒤 Masterflex perfusion pump (Cole Parmer, USA)를 이용하여 관류하여 폐장 내 혈액을 제거한 뒤 기도에 삽관하여 8.0 ml의 생리적 식염수로 기관지 폐포세척 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였다. 8.0 ml의 생리적 식염수를 이용하여 2회 세척하고 약 6 ml의 폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 얻었다. 그 뒤 2,000 rpm, 상온에서 10분간 원심분리하여 상층액을 Brown et al. (1989)의 방법에 따라 bicinchoninic acid를 이용하여 단백질량을 측정하였다. 그 뒤 세포침전층은 0.1 ml의 생리적 식염수와 혼합한 뒤 hemocytometer를 이용하여 백혈구를 산정하고 이 중 70~100 μ l를 이용, cytospin (cytospin, UK)을 시행하여 도말표본을 만든 뒤 Wright stain을 시행하였고 전체 백혈구 중 호중구의 수를 산정하여 전체 백혈구 중의 호중구의 백분율을 계산하여 폐세척액 내의 호중구의 수를 계산하였다.

6. Surfactant의 정량

Surfactant의 정량을 위해서는 먼저 생리적 식염수 8.0 ml를 이용하여 폐포세척을 시행한 뒤 실험동물 한 마리당 6.0 ml 정도의 BALF를 얻었다. BALF 내의 surfactant를 분리하기 위해 Bligh와 Dyer(1959)의 방법에 따라 지질을 추출하였다. 즉 BALF 2.0 ml에 4.0 ml의 chloroform-methanol 혼합액 (1:2, v/v)을 섞은 뒤 vortex mixer로 혼합하고 그 뒤 2.0 ml의 chloroform을 혼합하여 다시 vortex mixer로 혼합하였다. 그 뒤 2.0 ml의 증류수를 가하여 vortex mixer로 혼합한 뒤 18,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 organic layer를 분리하였다.

그 후 시료를 질소 가스 하에서 완전히 건조시키고, 다시 1.0 ml의 chloroform-methanol 혼합액 (2:1, v/v)에 녹여서 0.1 ml를 Pyrex tube에 옮겼다. 여기에 0.8 ml의 60% perchloric acid와 0.4 ml의 10 N 황산을 가한 후 silicon oil bath에서 200°C 이상으로 20분간 가열하여 시료내 유기물을 완전히 제거하였다. 시료가 든 시험관이 완전히 식은 후 ammonium molybdate가 함유된 malachite green 용액을 1.0 ml 가하여 Hess와 Derr(1975)의 방법에 따라 10분간 반응시키고 660 nm에서 비색정량하였다.

7. 조직학적 관찰

1) 광학현미경을 이용한 관찰

내장의 재관류 후 120분 뒤에 우측폐장을 절제하고 무작위로 조직의 절편을 절취한 뒤 10%의 중성 formalin 용액에 고정하였다. 그 뒤 세척, 탈수의 과정을 거친 뒤 paraffin에 포매하고 Reichert-Jung 미세절단기 2040으로 박절한 뒤 hematoxylineosin 용액으로 염색 후 검경하였다.

2) 전자현미경을 이용한 미세구조적 변화의 관찰

폐장의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 폐장 조직을 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 밀폐된 용기에서 진공을 이용하여 조직내 공기를 제거하였다. 전고정이 끝난 조직은 1.0 M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세한 후 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. Alcohol-propylene 계열로 순차적으로 농도를 증가

시켜 탈수하고 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 37°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 동안 열중합시키고 60~70 nm로 초박절편을 만든 뒤 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 뒤 투과전자현미경 (9H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

3) 전자현미경을 이용한 폐장내 과산화수소

형성의 관찰

내장의 재관류 후 폐장내 과산화수소의 생성을 검사하기 위해 cerium chloride cytochemical electron microscopy를 Hobson et al.(1991)의 방법에 따라 시행하였다. 폐장조직을 적출 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1, 2, 4-triazol 10.1 M tris-maleate buffer (pH 7.5), 7% sucrose, 0.002% Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고 30분간 37°C에서 반응시켰다. 이 반응은 조직내의 과산화수소가 cerium chloride와 반응하여 cerrous perhydroxide를 형성하는 과정이다. 반응이 끝난 조직을 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 cacodylate buffer로 수세하고 alcohol-propylene oxide 계열로 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시킨 다음 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 뒤 ultramicrotome (Recher Supernova)을 이용하여 60~70 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl acetate로 염색한 뒤 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

ARDS의 병인론을 호흡기의 산소기 형성과 연관하여 규명하기 위하여 NNNMU로 유도된 급성 폐손상에서의 실험 결과는 다음과 같다.

NNNMU 투여 후 72시간 후 L/B ratio $\times 10^{-3}$ 은 대조군에서는 5.01 ± 0.264 였으나 NNNMU 투여 후에는 14.74 ± 1.995 로 현저히 ($p < 0.001$) 증가하여 NNNMU에 의해 급성 폐부종이 유발되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). BALF내의 단백질량 (mg/two lungs)도

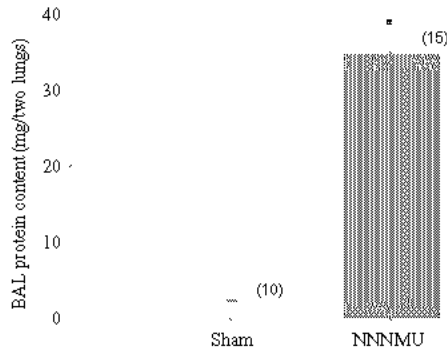


Fig. 1. Lung weight/body weight ratio (L/B ratio) was increased by NNNMU. 72h after NNNMU injection, L/B ratio increased significantly ($p < 0.001$) compared with that of control rat. Value are given as mean \pm S.E. Numbers of experiments are in the parenthesis. NNNMU : *N*-nitroso-*N*-methylurethane

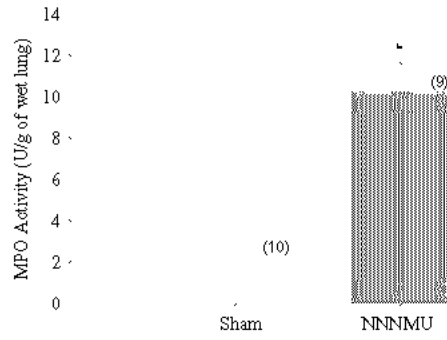


Fig. 3. NNNMU increased lung MPO (U/g of wet lung) activity compared with that of control rat ($p < 0.001$). The NNNMU seemed to have neutrophils infiltrate the lung which was denoted by the increased lung MPO activity. Values are given as mean \pm S.E. Numbers of experiments are in the parenthesis. NNNMU : *N*-nitroso-*N*-methylurethane

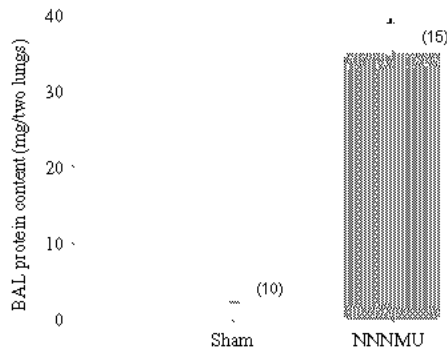


Fig. 2. Content (mg/two lungs) of BALF protein was increased by NNNMU compared with that of control. The increased BALF protein signifies the endothelial injury by NNNMU-induced infiltrated neutrophils. Values are given as mean \pm S.E. Numbers of experiments are in the parenthesis. NNNMU : *N*-nitroso-*N*-methylurethane

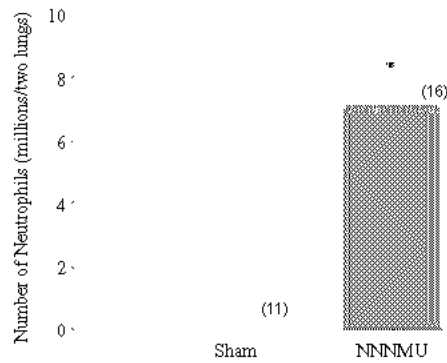


Fig. 4. The number of neutrophils in the BALF (millions/two lungs) was increased by NNNMU ($p < 0.001$). The increased number of neutrophils in BALF implicates the increased migration of neutrophils from vascular lumen into interstitium and alveolar lumen. Values are given as mean \pm S.E. Numbers of experiments are in the parenthesis. NNNMU : *N*-nitroso-*N*-methylurethane

대조군의 2.20 ± 0.186 에서 NNNMU 투여군에서는 34.77 ± 1.075 로 현저히 증가($p < 0.001$)하여 혈관내피 세포의 손상에 의한 단백유출(lung leak)이 일어났음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). NNNMU 투여 후 폐장내 호중구의 침윤 및 폐포내로의 이동의 증가를 확인하기 위해 시행한 폐장내 MPO의 측정 및 BALF 내 호중구의 산정의 결과는 Figs. 3, 4와 같다. 즉 MPO (U/g of lung)는 대조군에서는 2.19 ± 0.486 이었

으나 NNNMU 투여 후에는 10.21 ± 1.462 로 증가($p < 0.001$)하였고 BALF내 호중구의 수(millions/two lungs)도 대조군의 0.29 ± 0.040 에서 7.11 ± 0.636 으로 증가하여 NNNMU에 의해 폐장내 호중구의 침윤이 증가하고 간질조직 및 폐포내로 호중구의 이동(migration)이 증가했음을 관찰할 수 있었다. NNNMU 투여 후 BALF내 surfactant 함량의 변화는 Fig. 5와 같

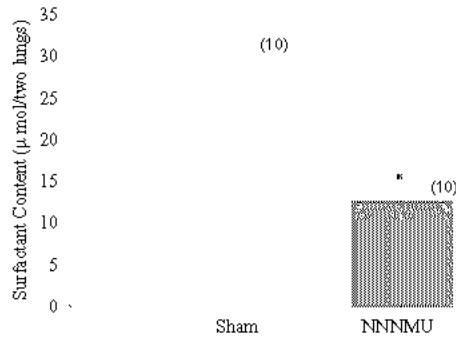


Fig. 5. NNNMU decreased the secretion of pulmonary surfactant. 72h after NNNMU injection, the secretion of surfactant decreased significantly ($p < 0.001$) compared with that of control rat. Values are given as mean \pm S.E. Numbers of experiments are in the parenthesis. NNNMU: *N*-nitroso-*N*-methylurethane

다. 대조군에서는 29.5 ± 2.03 ($\mu\text{mol}/\text{two lungs}$)였으나 NNNMU 투여 후에는 12.5 ± 1.12 로 현저히 ($p < 0.001$) 감소하였다.

조직학적인 변화는 광학현미경하에서는 대조군에 (Fig. 6-a) 비해 NNNMU를 투여한 군에서는 폐장내 출혈 및 무기폐가 현저하고 (Figs. 6-b, 6-c, 6-d) 특히 염증세포의 심한 침윤 (Fig. 6-e) 및 hyaline membrane의 형성 (Fig. 6-f)이 두드러지게 나타났다.

전자현미경을 이용한 미세구조의 변화는 대조군 (Fig. 7)에 비하여 혈관내피세포의 부종 및 괴사, 간질 조직의 부종이 나타나고, 호중구의 침윤이 두드러졌으며 (Figs. 8-a, b) 특히 제2형 폐포세포 내의 lamellar body의 변성, 팽대 및 공포화가 두드러지게 나타났다 (Figs. 8-c, d).

세포화학적 방법을 이용한 과산화수소의 생성을 알아보기 위한 실험의 결과는 Figs. 9, 10과 같다. 조직내 과산화수소는 cerium chloride와 반응하고 전자의 밀집도가 높은 cerous perhydroxide를 형성한다. 대조군 (Fig. 9)에 있어서는 cerous perhydroxide의 과립이 전혀 관찰되지 않았으나 NNNMU를 투여한 군 (Fig. 10)에서는 cerous perhydroxide의 과립이 현저히 증가한 것이 관찰되었고, 특히 제1형 폐포 및 제2형 폐포세포의 표면에서의 밀집도가 현저하였다. 이러한 폐장조직내의 산소기의 형성은 호중구의 침윤

및 혈관내피세포의 괴사, 제2형 폐포의 변형 및 lamellar body의 팽대 및 공포화현상과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되어 흥미롭다고 생각되었다.

고 찰

ARDS에서 폐장내 호중구의 침윤에 따른 산소기 형성이 중요한 병인론의 일부를 차지한다는 많은 실험적 증거들이 제시되고 있다 (Terada et al., 1996; Repine, 1994). 호중구는 ARDS시 폐장에 침윤하여 산소기 뿐만 아니라 단백분해 효소 및 염증성 cytokine을 조직으로 유리하여 폐장조직의 손상에 관여한다 (Delclaux et al., 1997). 이러한 호중구의 작용은 면역학적으로는 보체계 (complement system)의 활성화, 염증성 cytokine의 단핵구로부터의 유리 및 염증성 지질분자의 작용 등에 의한다 (Vadas et al., 1991; Lee et al., 2000). 이러한 사실은 ARDS시의 폐장의 손상은 바로 염증성 변화에 의한 것임을 시사한다.

본 연구에서는 NNNMU에 의한 급성 폐손상이 이러한 호중구의 작용과 관계가 있음을 보여주고 있다. NNNMU는 그 기전은 명확하지 않으나 일종의 발암 물질로서 만성적으로는 DNA의 변성을 초래하는 물질로 알려져 있다. 그러나 NNNMU를 흰쥐의 피하에 주사하면 짧은 시간내에 인체에서 볼 수 있는 다발성 장기부전 증후군 (multiple organ dysfunction syndrome, ARDS)과 같은 증상, 특히 심한 급성폐손상이 유발된다. Lewis et al. (1991)은 NNNMU에 의해 급성 폐부종이 유발되는 것은 주로 surfactant 대사의 이상에 의한다고 보고하고 있으며 surfactant 대사 이상은 주로 무기폐의 형성 및 hyaline membrane의 형성과 관계가 있다고 밝히고 있다. 또한 Richardson et al. (1986), Ryan et al. (1981)은 NNNMU에 의한 급성 폐손상은 인체에서 발병하는 ARDS와 그 조직학적 변화가 유사하여 ARDS의 모델로서 의의가 있다고 보고하고 있다.

본 연구의 결과에서 보듯이 NNNMU를 투여 후 72시간 뒤에는 L/B ratio의 증가가 현저하고 또한 BALF 내의 단백질량이 현저히 증가하는 점으로 미루어 폐부종이 유발되었음을 알 수 있다. NNNMU를

투여한 흰쥐에서의 심한 염증세포의 침윤이 형태학적으로 관찰되고 있다. 염증세포는 호중구 외에도 다양한 종류가 관찰되나 MPO의 현저한 증가는 호중구가 수적으로 많다는 것을 의미한다.

ARDS 환자에서는 폐장내 호중구의 침윤은 두드러지고, 동시에 폐세척액내의 PLA₂ 및 PAF 등의 화학주성 물질이 증가하는 점 등(Kim et al., 1995; Nagase et al., 1990)은 ARDS가 호중구의 산소기 및 단백질해효소의 유리와 관계가 있다는 것을 시사한다. 최근의 몇몇 보고들(Lee et al., 1997; Hybertson et al., 1997)은 이러한 호중구에 의한 산화성스트레스가 조직의 lipid peroxidation을 유발하여 조직의 손상을 유발함으로써 ARDS의 발병에 직접적으로 관여함을 증명하고 있다. 본 연구에서는 또한 NNNMU 투여 후 surfactant의 분비가 감소한 것을 관찰할 수 있었다. ARDS시의 surfactant 분비의 변화는 Nakos et al. (1998)에 의하여 기술된 바 있고 Lewis et al. (1993)은 ARDS시 surfactant 성분의 변화가 유발된다고 보고한 바 있다. 이러한 surfactant의 분비 및 성분의 변화는 폐포표면의 표면장력의 증가로 이어져 무기폐 및 폐부종의 원인이 된다. 또한 surfactant 대사의 변화는 산소기의 작용과 관계가 있다. 즉 Martensson et al. (1989, 1991)은 폐장조직내에 glutathione을 고갈시킨 상태에서 고농도의 산소를 계속적으로 공급하거나, 내인성 산화성 스트레스(endogenous oxidative stress)가 유발되면 제2형 폐포세포내의 lamellar body의 팽대 및 공포화현상(vacuolization)이 유발된다고 보고하고 있다. 이러한 점에서 본 연구에서의 제2형 폐포세포의 형태학적인 변화는 아주 흥미롭다. 즉 NNNMU 투여 후 제2형 폐포세포내 surfactant의 저장소인 lamellar body의 팽대 및 공포화가 아주 두드러질 뿐 아니라 폐포강내에 surfactant가 tubular structure가 아닌 lamellar structure가 그대로 유주하는 것이 관찰되는 것이다. 이러한 현상은 제2형 폐포세포가 산화성스트레스로 인해 분비과정에 문제가 생긴 것을 의미한다. 또한 제2형 폐포세포의 세포질내에서의 lamellar body의 변성도 관찰되는데 이러한 사실은 NNNMU에 의해 폐장내의 산화성스트레스가 유발된 것으로 보인다. 즉 surfactant의 주성분인 lamellar body 내의 인지질은 산소기에 의해 lipid peroxidation의 과정을

거쳐 원래의 기능을 상실할 수도 있음을 시사한다.

또 한가지 흥미로운 것은 광학현미경적 사진에서 보이는 심한 염증세포의 침윤, 출혈 및 무기폐의 소견과 더불어 세포화학적 방법에 의해 확인된 과산화수소의 생성이 현저히 증가한 것은 폐장내 산화성스트레스가 일어났다는 직접적인 증거이다. 폐장조직에서의 산소기 생성 증가는 호중구 침윤에 의한 것으로 생각된다.

즉 Dana et al. (1994)은 탐식구, 특히 호중구에서의 산소기의 생성은 세포막의 NADPH oxidase의 활성화에 의한다고 하고 이 때 NADPH oxidase는 phospholipase A₂의 활성화에 의한다고 하였다. 또한 폐장내 출혈 및 산소기의 형성이 폐장조직의 손상과 무관하지 않은 것은 산소기 중 과산화수소는 철이온과 반응하여 독성이 강한 hydroxyl radical을 형성할 수 있다는 사실에서도 짐작할 수 있다(1989).

본 연구에서 보이는 NNNMU 투여 후의 호중구의 침윤, 조직학적으로 증명되는 폐장의 급성 손상 및 산소기의 생성증가는 모두 NNNMU에 의한 급성폐 손상의 발생기전과 연관이 있으며 이러한 실험적인 증거들은 NNNMU에 의한 ARDS와 유사한 병변이 호중구의 산소기 형성에 따른 조직의 손상 및 surfactant 대사의 이상으로 인한 것임을 증명한다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Ashbaugh DG, Bigelow DG: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2 : 319-323, 1967.
- Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37 : 911-917, 1959.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ: Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 180 : 136-139, 1989.
- Coalson JJ, King RJ, Winter WT, Prihoda TJ, Anzueto AR, Peters JI, Johanson, Tr WG: O₂ and pneumonia induced lung injury. I. Pathological and morphometric studies. *J Appl Physiol* 67 : 346-356, 1989.

- Connelly KG, Repine JE: Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Ann Rev Med* 48 : 429-445, 1997.
- Cruz WS, Moxley MA, Corbet JA, Longmore WJ: Inhibition of nitric oxide synthase attenuates NNNMU induced alveolar injury *in vivo*. *Am J Physiol* 273 (Lung Cell. Mol. Physiol 1997; 17): L1167-1173.
- Dana R, Malech HL, Levy R: The requirement for phospholipase A₂ for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem J* 297 : 217-223, 1994.
- Delclaux C, Rezaiguia Delclaux S, Delacourt C, Brun Buisson C, Lafuma C, Harf A: Alveolar neutrophils in endotoxin induced and bacteria induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol* 273 : L104-L112, 1997.
- Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Ueno M, Chikazawa Y, Ono T, Hori Y, Matsukawa A, Yoshinaga M, Obara H: Crucial role of group II phospholipase A₂ in oleic acid induced acute lung injury in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 160 : 1292-1302, 1999.
- Goldblum SE, Wu KM, Jay M: Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 59 : 1978-1985, 1985.
- Halliwell B, Gutteridge JM: Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford 2nd Edition pp. 18-19, 1989.
- Harris JD, Jackson, Jr F, Moxley MA, Longmore WJ: Effect of exogenous surfactant instillation on experimental acute lung injury. *J Appl Physiol* 66 : 1846-1851, 1989.
- Hess HH, Derr JE: Assay of organic and inorganic phosphorus in the 0.1-5 nanomolar range. *Anal Biochem* 63 : 607-613, 1975.
- 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* 139 : 573-580, 1991.
- Hybertson BM, Lee YM, Repine JE: Phagocytes and acute lung injury : Dual roles for interleukin 1. *Ann NY Acad Sci* 843 : 266-273, 1997.
- Kim DK, Fukuda T, Thomson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV: Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* 269 : L109-L118, 1995.
- Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terade LS, Cho O, Repine AJ, Repine JE: Platelet activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin 1 intratracheally. *Am J Physiol (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 279 : L75-L80, 2000.
- Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE: Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin 1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 155 : 1624-1628, 1997.
- Lee YM, Park Y: PAF contributes to intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury through neutrophilic oxidative stress. *Korean J Physiol Pharmacol* 3 : 405-414, 1999.
- Lee YM, Park YY, Koh YS: Effect of high dose of dexamethasone on PLA₂, GGT activity and lung morphology in NNNMU induced ARDS rats. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 43 : 925-935, 1996. (Korean)
- Leff JA, Baer JW, Kirkman JM, Bodman ME, Shanley PF, Cho OJ, Ostro MJ, Repine JE: Liposome entrapped PGE₂ posttreatment decreases IL-1 α induced neutrophil accumulation and lung leak in rats. *J Appl Physiol* 76 : 151-157, 1994.
- Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH: Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol* 69 : 2303-2310, 1990.
- Lewis JF, Jobe AH: Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147 : 218-233, 1993.
- Liau DF, Barret CR, Loomis Bell AL, Ryan SF: Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute lung injury in the dog. *Am Rev Respir Dis* 136 : 395-401, 1987.
- Martensson A, Jain A, Frayer W, Meister A: A glutathione metabolism in the lung : inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 5296-5300, 1989.
- Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld PM, Meister A: Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat : A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9360-9364, 1991.
- Mathay MA, Rosen GD: Acid aspiration lung injury: New insights and therapeutic options. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 277-278, 1996.
- Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T: Platelet activating factor mediates acid induc-

- ed lung injury in generically engineered mice. *J Clin Invest* 104 : 1071-1076, 1990.
- Nakos G, Kitsioulis EI, Tsangaris I, Lekka ME: Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 24 : 296-303, 1998.
- Ono S, Voelkel NF: PAF antagonists inhibit monocrotalin induced lung injury and pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 71 : 2483-2492, 1991.
- Repine JE: Interleukin 1 mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury. *Environ Health Perspec* 102 (Suppl 10) : 75-78, 1994.
- Richardson P, Bose CL, Dayton V, Carlstrom JR: Cardiopulmonary function of cats with respiratory distress induced by *N* nitroso *N* methylurethane. *Pediatr. Pulmonol* 2 : 296-302, 1986.
- Ryan SF, Liau DF, Bell ALL, Hashim SA, Barret CR: Correlation of lung compliance and quantities of surfactant phospholipid after acute alveolar injury from *N* nitroso *N* methylurethane in the dog. *Am Rev Respir Dis* 123 : 200-204, 1981.
- Repine JE: Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 339 : 466-469, 1992.
- Slonim AD, Dalton HJ: Therapeutic use of a group II phospholipase A₂ inhibitor in acute respiratory distress syndrome: time is of the essence. *Crit Care Med* 29 : 719-727, 2001.
- Terada LS, Domish J, Shenley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE: Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia reperfusion. *Am J Physiol* 263 : L394-L401, 1992.
- Terada LS, Mahr NN, Jacobson ED: Nitric oxide decrease lung injury after intestinal ischemia. *J Appl Physiol* 81 : 2456-2460, 1996.
- Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E: Extracellular phospholipase A₂ secretion is a common effector pathway of interleukin 1 and tumor necrosis factor action. *Immunol Letter* 28 : 187-193, 1991.
- Van Helden HPM, Kuijpers WC, Steenvoorden D, Go C, Buijnzeel PLB: Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat: A comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 23 : 297-316, 1997.
- Ware LB, Matthay MA: Medical progress: The acute respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* 342 : 1343-1349, 2000.
- Welbourn CRB, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hetchman HB: Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78 : 651-655, 1991.
- Zilberberg MD, Epstein SK: Acute lung injury in the medical ICU: Comorbid conditions, age, etiology and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 157 : 1159-1164, 1998.

< 국문초록 >

급성 호흡곤란증후군 (acute respiratory distress syndrome)을 포함한 급성폐손상의 기전을 산화성스트레스와 연관하여 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다. *N* nitroso *N* methylurethane (NNNMU)은 실험동물에 있어서 사람에게서 보이는 ARDS와 유사한 병리학적인 소견을 보이므로 ARDS의 모델로 사용된다. 본 연구에서는 흰쥐에서 NNNMU로 급성폐손상을 유도한 뒤 이를 Lung weight/Body weight ratio, 폐포세척액 (BAL)내의 단백질량을 측정하여 확인하고, 동시에 호중구의 침윤에 의한 산소기형성, 이에 따른 산화성스트레스를 확인하기 위하여 BAL 내의 호중구수의 산정 및 폐장의 MPO 활성도를 측정하였다. 동시에 광학현미경, 전자현미경 및 세포화학적 전자현미경법을 이용하여 호중구에 의한 급성폐손상, 호중구의 침윤 및 미세구조의 변화 및 산소기의 생성을 확인하였다. 대조군에 비하여 NNNMU를 투여한 흰쥐에서는 BAL 내의 단백질이 증가하고 BAL 내의 호중구의 증가, 폐장의 MPO 활성도의 증가로 호중구의 침윤이 증가함을 관찰하였다. 광학현미경상 호중구의 침윤, 폐포내 호중구의 유입 및 vascular cuffing 등이 관찰되었다. 전자현미경 소견상 제2형 폐포세포는 산화성스트레스의 전형적 소견을 보이고 조직의 손상은 호중구에 의한 손상으로 생각되었으며 세포화학적 전자현미경법으로 산소기의 생성이 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과들을 종합할 때 NNNMU에 의한 급성폐손상은 호중구의 산소기 생성에 의한 산화성스트레스에 의한 것으로 생각되었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 6.** Light microscopic findings of the lungs of rats given NNNMU subcutaneously. In control lung, alveolar lumens are well preserved and the infiltration of inflammatory cells is not observed (a). In contrast, NNNMU-given lungs show atelectasis and formation of hyaline membrane in alveolar lumen (arrow) (b). And in NNNMU treated rat's lung, inflammatory cells are infiltrated (arrow and arrow head) (c). Intrapulmonary hemorrhage (d, arrow head), perivascular infiltration of various inflammatory cells (e) and formation of hyaline membrane (f) are observed in the lungs of NNNMU given rats. Bar indicates 100 μm (a), 50 μm (b, c), 250 μm (d), 25 μm (e, f).
- Fig. 7.** Electron microscopic finding of normal lung. Lamellar bodies (LB) in alveolar type II cell are well preserved and lamellated. In endothelial cells (En), basement membrane is clear and well preserved. Bar indicates 3.3 μm .
- Fig. 8.** Electron microscopic finding of the lung after NNNMU treatment. Neutrophils and eosinophil are infiltrated in the interstitium and fibrotic changes are observed (a, arrow head). Endothelial necrosis and interstitial edema are found (arterik), especially at the vicinity of neutrophil (b). In ultrastructure of the alveolar type II cell, degeneration of lamellar structure (LB) is found (c). Prominent microvilli (arrow head), necrosis of endothelial cells (double arrow head), and giant vacuoles (asterik) in the cytoplasm of the alveolar type II cell are noted (d). Bar indicates 0.33 μm . LB : lamellar body, En : endothelial cell, NP : neutrophil, AL : alveolar lumen, RBC : red blood cell, Mv : microvilli, Ep : eosinophil
- Fig. 9.** Normal CeCl_3 cytochemical electron microscopic finding of the lung. Cerrous perhydroxide granules are not found. Bar indicates 3.3 μm .
- Fig. 10.** CeCl_3 cytochemical electron microscopic finding of NNNMU-injected rat's lung. Electron dense cerrous perhydroxide granules are noted along the alveolar lining of the alveolar type II cells (arrow head). Bar indicates 3.3 μm .

