

□ 원 저 □

내독소로 유도되는 급성폐손상의 발병기전에서 내인성 히스타민의 역할

광명성애병원 내과¹, 울산대학교 의과대학, 한양대학교* 및 관동대학교 의과대학 내과학교실, 아산생명과학연구소[†]

김태형¹, 김은경, 윤호주[†], 김미정[†], 최정은[†], 오연목, 심태선, 임채만, 이상도, 김우성, 김동순, 김원동, 고윤석

=Abstract=

Role of Endogenous Histamine on the Pathogenesis in the Endotoxin-Induced Acute Lung Injury

Tae-Hyung Kim, M.D., Eun-Kyung Kim, M.D., Ho Joo Yoon, M.D., Mi Jung Kim[†], Jeoung Eun Choi[†], M.D., Yeon Mok Oh, M.D., Tae Sun Shim, M.D., Chae Man Lim, M.D., Sang Do Lee, M.D., Woo Sung Kim, M.D., Dong-Soon Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D., Younsuck Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, Kwang-Myung Sung-ae General Hospital¹, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Han Yang University College of Medicine, Kwandong University College of Medicine[†], Asan Institute for Life Science, Seoul, Korea*

Background : Histamine is widely distributed in the lung. It increases capillary permeability and the P-selectin expression on vascular endothelial cell surfaces. We studied the role of endogenous histamine on the pathogenesis of endotoxin-induced acute lung injury (ALI) in rats.

Methods : We instilled either normal saline (control group) or lipopolysaccharide (3 mg/Kg, LPS group) to tracheas of Sprague-Dawley rats. H1-receptor blocker (mepyramine, 10 mg/Kg, H1RB group), H2-receptor blocker (ranitidine, 10 mg/Kg, H2RB group), and H3-receptor blocker (thioperamide, 2 mg/Kg, H3RB group) were administered through vein or peritoneum along with intratracheal LPS administration. Statistical significance was accepted at p<0.05.

Results : LPS increases the histamine level in BAL fluid significantly at 2 h after the treatment compared with control group. LPS significantly increases protein concentration, PMN cell count in

[†]This work was Supported by the Korea Research Foundation (2001-F00158).

Address for correspondence :

Younsuck Koh, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine

388-1 Pungnap Dong Songpa Ku, Seoul, 138-736, Korea

Phone : 02-3010-3134 Fax : 02-3010-6968 E-mail : yskoh@amc.seoul.kr

bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, and myeloperoxidase (MPO) activity in the lung tissue at 6 h compared to control group. PMN cell count in BAL fluid and MPO activity in lung tissue were significantly lower in H2RB-group compared to LPS-group. However, protein concentration in BAL fluid showed no significant differences between the LPS alone and LPS with histamine receptor blockade. **Conclusions** : Endogenous histamine might be involved in the recruitment of PMNs in LPS-induced ALI via H2 receptor. However, its role in ALI would not be significant in this model. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 54:91-103)

Key words : Histamine, Acute lung injury (ALI), Endotoxin, Histamine receptor blockades.

서론

급성 폐손상(acute lung injury, ALI)은 내과적 혹은 외과적 손상에 노출된 후 폐포모세혈관 및 폐포상피의 손상으로 인하여 폐포-모세혈관 막의 투과성이 증가되어 양측성 미만성 폐부종이 나타나고 심한 저산소증을 초래하는 급성호흡부전 상태로¹, 최근 중환자 집중 치료법의 많은 발전에도 불구하고 발병 이전에 근거한 특이 치료가 확립되지 못하였다.

급성 폐손상의 병리 기전은 여러 가지 유발 원인에 의해 폐포-모세혈관 막의 광범위한 손상이 진행되는 생리적 염증 반응으로 폐포대식세포, 호중구, 혈소판 및 TNF- α , proteases, arachidonic acid 대사물질 그리고 활성 산소기 등이 매개하는 것으로 알려져 있다²⁻⁴. 이 중 패혈증에서 내독소로 유도되는 급성 폐손상은 내독소에 의한 직접적인 손상과 내독소에 의해 활성화된 호중구, 폐포대식세포 및 혈관내피세포들로부터 유리되는 염증 유발성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 IL-1, IL-8 및 TNF- α 와 염증 억제성 사이토카인(antiinflammatory cytokine)인 IL-10 등의 상호 작용들이 그 발병기전에 주로 관여하는 것으로 알려져 왔으나⁵⁻⁸, 이러한 물질들만으로 급성폐손상의 병태생리가 모두 설명되지는 못하였다.

히스타민은 많은 급성 염증성 질환들의 주요 매

개물질로 잘 알려져 있으며 폐혈관 주위에 분포하는 비만세포(mast cell)에 풍부하게 분포하므로, 히스타민과 급성 폐손상의 상관성과 그 기전에 대하여 많은 실험들이 진행되어왔다⁹⁻¹². 최근 백서를 이용한 내독소로 유도되는 급성 폐손상 모델에서는 H1 및 H2 수용체 차단 항히스타민제를 이용하여 내인성 히스타민의 작용을 차단 시 I²⁵-BSA를 이용하여 측정된 폐 단백질 누출지표가 내독소군에 비해 유의하게 감소하여 내인성 히스타민이 내독소로 유도되는 폐포 모세혈관 내피세포 및 폐포상피세포의 투과성 증가 기전에 관여한다는 것을 시사하였으며¹³, 특히 H2 수용체 차단제에 의해서는 폐포세척액 단백질 및 LDH 농도도 유의하게 감소되었으므로 내독소에 의하여 그 생성이 증가된 내인성 히스타민이 주로 H2 수용체를 통하여 폐포세포의 투과성 증가 작용을 나타낼 것으로 사료되었다¹³. 하지만, 이러한 연구결과에서도 급성 폐손상 모델에서 내인성 히스타민의 농도를 직접 측정할 바가 없어 히스타민이 실제 급성 폐손상의 발병 기전에 관여할 것이라는 직접적인 결과를 제시하지 못하였고, 급성 폐손상의 가장 흔한 원인이며 발생하면 그 사망률이 매우 높은, 내독소로 유도되는 급성 폐손상의 생체 모델에서 히스타민과 호중구의 상관성에 대하여는 밝혀져 있지 않다.

이에 본 연구는 내독소는 폐장 내에서 히스타민의 생성을 증가시킬 것이며 이렇게 생성된 히

스타민은 H2 수용체를 통하여 내독소로 유도되는 급성 폐손상의 발병 기전에 관여할 것이라는 가설을 설정하고 내독소로 유발된 급성 폐손상의 발병 기전에 내인성 히스타민의 역할을 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사용 동물과 치료군의 처치

몸무게 270-370g인 *Sprague-Dawley* 수컷 쥐(Section of Laboratory animals, ASAN Institute for Life Science, Seoul, Korea)를 사용하여 대조군은 생리 식염수 0.5 ml를 기도 내 투여하고, 내독소군은 내독소(*Escherichia coli* lipopolysaccharide 055:B5, sigma, L2880, St. Louis, MO, USA)를 기도 내로 체중 당 3 mg을 투여하여 급성 폐손상을 유발하였다. 항히스타민 처치군은 내독소 주입 직전에 H1 수용체 차단제 mepyramine (pyrilamine, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)을 체중 kg 당 10 mg 정주하거나(H1 처치군)¹⁴, H2 수용체 차단제 ranitidine (Zantac[®] : Glaxo Smith Kleine, USA)을 체중 kg당 10 mg 정주하거나¹⁴ H3 수용체 차단제 thioperamide을 체중 kg당 2 mg을 복강 내로 주사하였다(H2 및 H3 처치군).

2. 실험 과정

1) 약물 투여 :

실험 쥐에 enflurane을 기도로 흡입시킨 후 ketamine (45 mg/kg, Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO, USA)과 xylazine (3 mg/kg, Haver, New York, NY, USA)을 복강 내 투여하여 전처치 과정 중 일시적인 마취를 유도하였다. 기도와 정맥, 혹은 복강 내로 생리 식염수 혹은 내독소와 항히스타민 등을 투여한 후 곧 깨워서 다음 실험

때까지 쥐가 활동하도록 하였다.

2) 6시간 모형 :

기도 내 약물을 투여 후 5시간 30분 뒤에 ketamine (90 mg/kg, Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO, USA)과 xylazine (7 mg/kg, Haver, New York, NY, USA)을 복강 내 투여하여 마취를 유도하였다. 각 실험 군에서 상기 마취 후 16-gauge stub adaptor tube를 주기관지에 삽입시키고 쥐를 인공 호흡기에 연결한 뒤 개복 및 개흉술을 시행하여 우심실을 통해 헤파린 200단위를 주입 후 30분이 경과되면 phosphate-buffered saline (PBS)을 관류펌프(masterflex pump, Cole-Parmer Instrument Co. Barrington, IL, USA)를 사용하여 폐를 관류시키면서 양측 폐와 심장을 함께 떼어내었다. 폐는 조직을 분쇄하여 호중구의 폐침윤을 알기 위하여 myeloperoxidase 활성도를 측정하였다. 폐포 세척액은 약물 투여 후 6시간 뒤에 마취 유도 후 기도 내 16-gauge stub adaptor tube를 삽입하고 기도 내로 생리식염수 6 ml씩 3 회 넣은 후 되모은 총 폐포세척액을 검체로 사용하였다.

3) 폐포세척액 히스타민 측정 검체의 획득 :

약물 투여 후 1시간, 2시간 및 6시간에 마취 유도 후 기도 내 16-gauge stub adaptor tube를 삽입하고 기도 내로 생리식염수 6 ml씩 3 회 넣은 후 되모은 총 폐포세척액을 검체로 사용하였다.

3. 측정 변수들

1) 혈청 및 폐포세척액 내 히스타민 농도의 측정

각 군에서 1시간, 2시간 및 6시간에 각각 5마리씩 혈청과 폐포세척액을 획득하여 Astoria Analyzer Series 300(Clackamas, Oregon 97015-0830 USA)을 사용한 자동형광법으로 히스타민의 농도를 측정하였다¹⁵.

2) 폐장 내 myeloperoxidase(MPO)의 활성화 측정

상기 기술한 방법으로 얻은 좌측 폐를 이용하여 추출 즉시 -70°C 에 냉동 보관하였으며 MPO 측정 시 검체를 녹인 후 조직분쇄기(Vertishear tissue homogenizer, Virtis, Gardiner, NY, USA)로 4 ml의 phosphate buffer와 함께 분쇄시킨 후 Sorvall RC-5B refrigerated centrifuge (Dupont Instruments, Irving, TX, USA)로서 4°C 에서 30,000g 로 30분간 원심분리 하였다. Pellet을 얼으면 이를 다시 4 ml phosphate buffer와 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide로서 잘 섞은 후 다시 90초 동안 sonification (Kontes micro-ultrasonic cell disrupter, Vineland, NJ, USA)시켰다. 잘게 부서진 검체는 조직 내 존재하는 MPO억제제를 불활성화시키기 위해 60°C 에서 2시간 동안 보온시킨 뒤 O-dianisidine을 이용한 분광광도법(spectrometry)으로 MPO의 활성도를 측정하였다¹⁶.

3) 폐 염증 및 손상 지표의 측정

각 군에서 획득한 폐포세척액은 원심분리 시킨 후 상층액은 분획(aliquot)해서 60°C 에 얼린 후 검사에 이용하였다. 원심 분리된 세포는 leukocyte pellet를 만든 후 이를 1 ml의 상층액으로써 다시 섞은 후 혈구계(hemocytometer)로서 총 백혈구 숫자를 세고 cytopspin preparation을 Wright 염색하여 호중구의 백분율을 계산하였다. 우심실에서 얻은 정맥혈은 즉시 원심분리 후 상층액을 분리하여 혈청으로 보관하였으며, 폐포세척액의 단백질농도 BSA 농도를 표준으로 bicinchoninic acid (BCA) method¹⁷를 이용하여 구하였다.

3. 통계처리

각 수치는 평균과 표준 오차로 표기하였으며, 폐조직 MPO 활성도는 중앙값(median)과 범위(range)로

표기하였다. 대조군, 내독소군, 항히스타민 처치군들 사이의 측정값은 통계꾸러미 SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 nonparametric Kruskal-Wallis test를 시행 후 Duncan's multiple comparison으로 다섯 군의 측정 지표 사이의 차이를 비교하고 두 군 사이의 비교는 Mann-Whitney U test로서 재검증하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 폐포세척액 및 혈청 히스타민 농도의 측정

폐포세척액 히스타민 농도는 대조군에서 생리식염수 투여 후 1 (n=5), 2 (n=4), 6 (n=4) 시간째에 각각 28.78 ± 8.83 ng/ml, 31.67 ± 9.53 ng/ml, 28.90 ± 6.72 ng/ml이었으며 내독소군(n=5)에서는 내독소 투여 후 각 시간대에 27.58 ± 6.72 ng/ml, 75.96 ± 4.85 ng/ml, 37.47 ± 10.59 ng/ml로 내독소 투여 후 2시간째에 대조군에 비해 유의하게 높았다 ($p=0.016$). 항히스타민 병용군에서 폐포세척액 히스타민 농도는 H1 처치군(n=5)에서 내독소 투여 후 각 시간대에 41.05 ± 23.04 ng/ml, 81.79 ± 12.32 ng/ml, 46.59 ± 17.52 ng/ml로 내독소 투여 후 2시간째에 대조군에 비해 높은 경향을 보이나 ($p=0.063$), 통계적 유의성은 없었다. H2 처치군(n=5)에서는 내독소 투여 후 각 시간대에 62.53 ± 26.76 ng/ml, 195.34 ± 58.70 ng/ml, 31.98 ± 16.50 ng/ml로 내독소 투여 후 2시간째에 대조군에 비해 유의하게 높았으나($p=0.032$), 내독소군에 비해 유의한 차이는 없었다. H3 처치군(n=4)에서는 내독소 투여 후 각 시간대에 61.45 ± 13.22 ng/ml, 42.23 ± 13.01 ng/ml, 31.12 ± 15.51 ng/ml로 전시간대에서 대조군이나 내독소군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었다. (Table 1.)

혈청 히스타민 농도는 대조군에서 생리식염수

Table 1. Effects of histamine receptor blockades on BAL histamine level (ng/ml)

	1h	2h	6h
Control group	28.78 ± 8.83 (n=5)	31.67 ± 9.53 (n=4)	28.90 ± 6.72 (n=4)
LPS-group (n=5)	27.58 ± 6.72	75.96 ± 4.85 [‡]	37.47 ± 10.59
H1RB-group (n=5)	41.05 ± 23.04	81.79 ± 12.32	46.59 ± 17.52
H2RB-group (n=5)	62.53 ± 26.76	195.34 ± 58.70 [‡]	31.98 ± 16.50
H3RB-group (n=4)	61.45 ± 13.22	42.23 ± 13.01	31.12 ± 15.51

[‡]p <0.05 compared with control group

Table 2. Effects of histamine receptor blockades on serum histamine level (ng/ml)

	1h	2h	6h
Control group	84.67 ± 30.52 (n=5)	116.88 ± 16.32 (n=4)	80.84 ± 22.14 (n=4)
LPS-group (n=5)	86.24 ± 4.61	96.24 ± 17.24	101.66 ± 4.99
H1RB-group (n=5)	170.79 ± 35.55	260.81 ± 30.51 ^{‡#}	181.26 ± 30.86 [#]
H2RB-group (n=5)	68.70 ± 29.44	149.38 ± 23.27	43.71 ± 26.51
H3RB-group (n=4)	43.25 ± 26.51 [#]	17.96 ± 4.87 [#]	35.53 ± 13.77 [#]

[‡] p <0.05 compared with control group

[#] p <0.05 compared with LPS-group

투여 후 1(n=5), 2(n=4), 6(n=4) 시간째에 각각 84.67 ± 30.52 ng/ml, 116.88 ± 16.32 ng/ml, 80.84 ± 22.14 ng/ml였으며 내독소군(n=5)에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에 각각 86.24 ± 4.61 ng/ml, 96.24 ± 17.24 ng/ml, 101.66 ± 4.99 ng/ml로 대조군과 비교하여 유의한 차이는 없었다. H1 처치군(n=5)의 경우 혈청 히스타민 농도는 각각 170.79 ± 35.55 ng/ml, 260.81 ± 30.51 ng/ml, 181.26 ± 30.86 ng/ml로 2시간째 대조군 및 내독소군에 비해 유의하게 높았고(p=0.029, p=0.016), 6시간째에는 내

독소군에 비해 유의하게 높았다. (p=0.032) H2 처치군(n=5)의 경우에는 각각 68.70 ± 29.44 ng/ml, 149.38 ± 23.27 ng/ml, 43.71 ± 26.51 ng/ml로 대조군 및 내독소군에 비해 유의한 차이는 없었다. H3 처치군(n=4)에서는 혈청 히스타민 농도는 43.25 ± 26.51 ng/ml, 17.96 ± 4.87 ng/ml, 35.53 ± 13.77 ng/ml로 전시간대에 걸쳐 내독소군에 비해 유의하게 낮았다(각각 p=0.016, p=0.016, p=0.008). (Table 2.)

2. 폐장 내 myeloperoxidase(MPO)의 활성도 측정

호중구의 폐조직 내 침윤과 활성도의 지표인 폐장 내 MPO 활성도는 대조군(n=6)은 1.72(1.38-8.36) unit/g, 내독소군(n=5)은 18.05(10.30-25.04) unit/g 으로서 내독소군에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며(p<0.01), H1 처치군(n=5)은 16.19(11.49-16.61) unit/g, H3 처치군(n=5)은 13.82(3.93-14.80) unit/g로 내독소군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, H2 처치군(n=5)은 7.18(6.68-10.79) unit/g 으로 폐장 내 MPO 활성도가 내독소군에 비해 유의하게 낮았다(p<0.01). (Fig. 1)

3. 폐염증 지표의 측정

폐포세척액 총 백혈구 수는 대조군(n=4)에서 생리 식염수 투여 후 1, 2, 6시간째에 각각 $7.33 \pm 1.19 \times 10^6/\text{ml}$, $1.77 \pm 0.45 \times 10^6/\text{ml}$, $2.72 \pm 0.52 \times 10^6/\text{ml}$ 이었으며, 내독소군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 $4.20 \pm 2.25 \times 10^6/\text{ml}$, $14.01 \pm 5.71 \times 10^6/\text{ml}$, $53.55 \pm 14.15 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 2, 6시간 째에 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았다(각 p=0.016). HI 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(각 군에서 n=5) 각각 $6.08 \pm 1.95 \times 10^6/\text{ml}$, $1.96 \pm 0.45 \times 10^6/\text{ml}$, $25.87 \pm 4.34 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 6시간째에 폐포세척액 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으나(p=0.016), 내독소군과 비교 시 모든 시간대에서 유의한 차이는 없었다. H2 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(각 군에서 n=5) 각각 $3.92 \pm 1.99 \times 10^6/\text{ml}$, $1.89 \pm 0.34 \times 10^6/\text{ml}$, $11.62 \pm 1.31 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 후 6시간째에 폐포세척액 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으며(p=0.016), 내독소군과 비교 시 내독소 투여 2, 6시간째에 내독소군에 비해 유의하게 낮았다(각 p=0.008). H3 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6

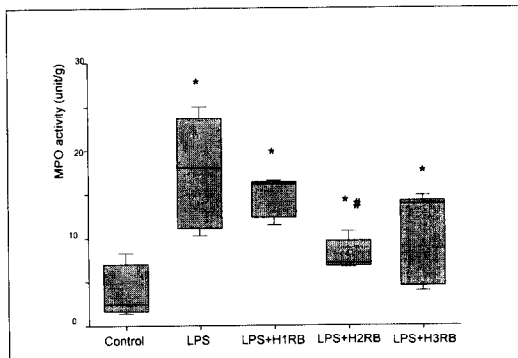


Fig. 1. Effects of H1, H2, and H3 histamine receptor blockades on lung myeloperoxidase (MPO) activity at 6 hours after lipopolysaccharide(LPS) intratracheal instillation in rats. Lines within box indicate median value.; Whiskers indicate the minimum and maximum value.

*p<0.05 compared with the control group.
#p<0.05 compared with LPS-group.

시간째에(n=5) 각각 $9.87 \pm 0.98 \times 10^6/\text{ml}$, $3.42 \pm 1.39 \times 10^6/\text{ml}$, $51.31 \pm 16.12 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 후 6시간째 폐포세척액 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으나(p=0.016), 내독소군과 비교시에는 유의한 차이는 없었다. (Table 3.)

폐포세척액 내 호중구는 대조군(n=4)에서 생리 식염수 투여 후 1, 2, 6시간째에 각각 $0.74 \pm 0.25 \times 10^6/\text{ml}$, $0.22 \pm 0.12 \times 10^6/\text{ml}$, $0.42 \pm 0.26 \times 10^6/\text{ml}$ 이였으며, 내독소군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 $1.51 \pm 1.01 \times 10^6/\text{ml}$, $5.13 \pm 2.19 \times 10^6/\text{ml}$, $50.58 \pm 13.40 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 2, 6시간 째에 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았다(각 p=0.016). HI 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 $0.78 \pm 0.28 \times 10^6/\text{ml}$, $0.49 \pm 0.15 \times 10^6/\text{ml}$, $23.89 \pm 4.06 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 내독소 투여 6시간째에 폐포세척액 호중구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으나(p=0.016), 내독소군과 비교 시 유의한 차이는 없었다. H2 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각

Table 3. Effects of histamine receptor blockades on BAL total cell count(10^6 /ml)

	1h	2h	6h
Control group (n=4)	7.33 ± 1.19	7.77 ± 0.45	2.72 ± 0.52
LPS-group (n=5)	4.20 ± 2.25	14.01 ± 5.71 [†]	53.55 ± 14.15 [†]
H1RB-group (n=5)	6.08 ± 1.95	1.96 ± 0.45	25.87 ± 4.34 [†]
H2RB-group (n=5)	3.92 ± 1.99	1.89 ± 0.3 [‡]	11.62 ± 1.31 ^{‡#}
H3RB-group (n=5)	9.87 ± 0.98	3.42 ± 1.39	51.31 ± 16.12 [†]

[†]p <0.05 compared with control group

[#]p <0.05 compared with LPS-group

Table 4. Effects of histamine receptor blockades on BAL neutrophil count(10^6 /ml)

	1h	2h	6h
Control group (n=4)	0.74 ± 0.25	0.22 ± 0.12	0.42 ± 0.26
LPS-group (n=5)	1.51 ± 1.01	5.13 ± 2.19 [†]	50.58 ± 13.40 [†]
H1RB-group (n=5)	0.78 ± 0.28	0.49 ± 0.15	23.89 ± 4.06 [†]
H2RB-group (n=5)	1.00 ± 0.51	1.00 ± 0.17	10.60 ± 1.37 ^{‡#}
H3RB-group (n=5)	1.49 ± 0.11 [†]	1.64 ± 0.80 [†]	47.55 ± 14.7 [†]

[†]p <0.05 compared with control group

[#]p <0.05 compared with LPS-group

각 $1.00 \pm 0.51 \times 10^6$ /ml, $1.00 \pm 0.17 \times 10^6$ /ml, $10.60 \pm 1.37 \times 10^6$ /ml 으로 내독소 투여 후 6시간째에 폐포 세척액 호중구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으며(p=0.016), 내독소군과 비교 시에는 내독소 투여 6시간째에 내독소군에 비해 유의하게 낮았다(p=0.008). H3 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 $1.49 \pm 0.11 \times 10^6$ /ml, $1.64 \pm 0.80 \times 10^6$ /ml, $47.55 \pm 14.72 \times 10^6$ /ml 으로 내독소 투여 후 지속적으로 폐포세척액 호중구 수가 대조군에 비해 유의하게 높았으나(각각 p=0.032, p=

0.032, p=0.016) 내독소군과 비교시에는 유의한 차이는 없었다. (Table 4.)

4. 폐손상 지표의 측정

폐포세척액 단백질량은 대조군(n=4)에서 생리식염수 투여 후 1, 2, 6시간째에 각각 238.83 ± 5.25 μ g/ml, 553.80 ± 73.74 μ g/ml, 590.97 ± 54.49 μ g/ml이었으며, 내독소군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 368.08 ± 118.28 μ g/ml, 644.47 ± 132.34

Table 5. Effects of histamine receptor blockades on BAL protein concentration(g/ml)

	1h	2h	6h
Control group(n=4)	238.83 ± 5.25	553.80 ± 73.74	590.97 ± 54.49
LPS-group (n=5)	368.08 ± 118.28	644.47 ± 132.34	1032.82 ± 153.55
H1RB-group (n=5)	456.44 ± 49.98	386.97 ± 76.30	564.94 ± 153.16
H2RB-group (n=5)	417.89 ± 135.73	638.13 ± 61.93	1681.92 ± 455.24 ¹
H3RB-group (n=5)	647.33 ± 207.31	969.98 ± 164.05	2733.79 ± 792.35 ¹

¹p <0.05 compared with control group

μg/ml, 1032.82 ± 153.55 μg/ml로 내독소 투여 6시간째에 단백질이 대조군에 비해 유의하게 높은 경향을 보였으나(p=0.063), 통계적 유의성은 없었다. H1 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 456.44 ± 49.98 μg/ml, 386.97 ± 76.30 μg/ml, 564.94 ± 153.16 μg/ml로 전시간대에 걸쳐 대조군 및 내독소군과 비교하여 유의한 차이는 없었다. H2 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 417.89 ± 135.73 μg/ml, 638.13 ± 61.93 μg/ml, 1681.92 ± 455.24 μg/ml로 내독소 투여 6시간째에 단백질이 대조군에 비해 유의하게 높았으나(p=0.032) 내독소군과 비교 시 유의한 차이는 없었다. H3 처치군에서는 내독소 투여 후 1, 2, 6시간째에(n=5) 각각 647.33 ± 207.31 μg/ml, 969.98 ± 164.05 μg/ml, 2733.79 ± 792.35 μg/ml로 내독소 투여 후 6시간째에 폐포세척액 단백질이 대조군에 비해 유의하게 높았으나(p=0.016) 내독소군과 비교 시 유의한 차이는 없었다. (Table 5.)

고 찰

급성 폐손상의 진행 시 폐장 내 호중구의 침윤이 진행되고, 이렇게 모집된 호중구가 급성 폐손상의 실험모델에서 중심적인 역할을 함은 잘 알려진 바

있다. 또한, 호중구의 폐침윤에는 반드시 호중구의 모집이 선행되어야 하므로, 호중구의 이동에 관여하는 화학주성인자(chemotactic factor)의 역할은 매우 중요하다고 할 수 있다. 히스타민은 강력한 폐혈관 수축 및 모세혈관 투과성 증가 작용이 있으며¹⁸ 폐혈관 주위의 비만세포(mast cell)에 풍부하게 존재할 뿐 아니라 폐포대식세포에서 분비되는 histamine releasing factor나 IL-1 등에 의해 분비되므로^{19,20} 내독소로 증가된 IL-1에 의해 그 분비가 증가될 것으로 예상된다. 또한, 히스타민은 혈관 내피세포에 분포하는 히스타민 수용체를 통하여²¹ 호중구의 이동에 관여하는 P-selectin의 표현을 내피세포 표면상에서 증가시키며^{22,23} 염증세포 특히 호중구의 활성화에 중요한 작용을 하는 IL-8의 분비를 내피세포에서 촉진시킨다²⁴. 그러므로, 내인성 히스타민이 급성 폐손상에서 호중구 침윤에 관여할 것으로 가정할 수 있으나 그 역할에 대해서는 확실히 규명되지 않았다²⁵⁻²⁷.

본 연구에서는 H2 처치군에서 내독소 투여 6시간째 폐포세척액 총 세포수와 호중구 수, 폐조직 MPO 활성도가 내독소군에 비해 유의하게 낮았다. 이는 내인성 히스타민이 H2 수용체를 통하여 호중구의 폐내 침윤을 증가시키고 호중구 매개성 폐손상에 관여할 것임을 추정할 수 있는 소견이다. 반

면, H2 수용체 차단 시 급성 폐손상은 감소시키지 못하였는데 이는 여러 보고에서 히스타민이 호중구의 화학운동성(chemokinesis)을 증가시키나 화학주성(chemotaxis)은 감소시키며²⁸ 호중구의 산화성 대사나 리소자임(lysozyme), β -glucuronidase 등 호중구 내용물의 분비를 억제시키는 것²⁹으로 보고되고 있어 내인성 히스타민이 호중구의 활성화에는 관여하지 않고 폐조직으로의 호중구 모집만을 증가시키는 것으로도 추론할 수 있다.

폐 조직에는 적어도 세 가지 다른 형태의 히스타민 수용체가 분포하며³⁰, 이중 H1 수용체는 기관지 수축 및 폐혈관 수축작용을, H2 수용체는 약한 기관지 확장과 점액 분비 및 폐혈관 이완 작용을 매개하는³¹ 것으로 알려져 있다. 또한, 폐포 모세혈관 내피 세포의 투과성 증가에는 주로 H1 수용체가³¹, 폐포 상피세포의 투과성 증가에는 H2 수용체가³² 관여한다는 보고가 있었으나 그 작용 기전에 대하여는 명확히 알려지지 않았다. 이외에 조직 내 호중구의 침윤은 H1 수용체의 활성화에 의한 것으로³³, 호중구 활동성(chemokinesis)의 증가는 H2 수용체의 활성화에 의한 것²⁸으로 알려져 있으며 내피 세포에서 IL-8의 생성을 증가시키는 효과는 H1 및 H2 수용체 차단제 모두에 의하여 차단되는 것으로 알려져 있어²⁴ 히스타민에 의한 호중구 매개성 혹은 사이토카인 매개성 급성 폐손상이 H1 및 H2 수용체를 일률적으로 혹은 독립적으로 매개하여 진행하는 것으로 추론할 수 있으나 그 자세한 기전은 확실히 알려지지 않았다. 반면, 이전의 한 연구에서³⁴ 염증억제성 사이토카인 중 하나인 IL-10의 생성에 히스타민이 H2/H3 수용체를 매개하여 관여한다는 보고 이외에 급성 폐손상에 대한 어떤 연구에서도 H3 수용체에 대한 연구는 진행되지 않았다.

시간 경과에 따른 각 염증 지표들의 변화 양상은 내독소 투여와 동시에 히스타민 수용체를 차단한 각 처치군에서도 내독소군과 비슷하였으나, 혈청 히스타민 농도는 H1 처치군에서 2시간 이후 내

독소군에 비해 유의하게 높았으며, H3 처치군에서는 유의하게 낮았다. H1 처치군에서 내독소군에 비해 혈청 히스타민 농도가 높았던 것에 대한 한 가지 가능한 설명은, H2 수용체 차단 시 히스타민의 분해(degradation)가 저해된다는 것이다. 이러한 추론은 히스타민의 대사에 중요한 역할을 하는 2가지 효소 중 하나인 histamine methyl transferase (HMT)의 작용이 전형적인 H1 및 H2 수용체 차단 시 저해된다는 관찰로 부분적이거나 설명될 수 있겠다³⁰. 최근까지 급성 폐손상에서 H3 수용체의 역할이나 H3 수용체 차단 시 혈청 히스타민 농도의 변화에 대한 보고는 없었는데, 본 연구에서 H3 처치군에서 혈청 히스타민 농도는 내독소군에 비해 유의하게 낮았다. H3 수용체는 신경 말단에서 히스타민의 생성과 분비에 대한 음성피드백조절(negative feedback control)에 관여하는³⁵ 것으로 알려져 있어, H3 수용체 차단이 내독소로 유도되는 히스타민 생성이나 분비에 관여했을 가능성도 있으나, 급성 폐손상 모델의 경우에도 이러한 조절이 존재하는지 확실히 밝혀진 바는 없다.

BAL fluid에서 여러 인자, 특히 가용성 단백질의 농도의 측정에 있어서 그 희석 정도의 교정이 필요한 지에 대해서는 debate가 있으나, 기존의 여러 논문들에서도 BAL fluid의 dilution correction 여부에 대하여 큰 의미를 두고 있지 않아 본 연구의 경우 BAL fluid의 dilution 정도에 대한 측정이나 교정은 시행하지 않았다³⁶.

급성 폐손상 환자에서 기계 환기 동안 스트레스성 궤양의 발생을 예방하기 위하여 표면 보호제(surface coating agent)인 sucralfate나 ranitidine 등의 H2 히스타민 수용체 차단제가 흔히 투여되는데, 그 2가지 약제간의 선택에 대하여는 오랜 논란이 있어왔다³⁷. 만약, 급성 폐손상의 진행을 H2 수용체 차단제가 조절할 수 있다면, 급성 폐손상 환자들의 스트레스성 궤양 발생의 예방요법으로 가장 먼저 고려되어야 할 것이다. 그러나, 본 연구에서는

H2 수용체 차단 시 폐포세척액 호중구 및 폐조직 MPO 활성도가 내독소군에 비해 유의하게 낮아, H2 수용체를 통하여 히스타민이 호중구의 폐 침윤을 증가시킴을 추정할 수 있었던 반면, 폐포세척액 단백질 등 폐손상 지표의 변화는 동반하지 않았으므로, 이는 본 연구에서 사용된 용량의 히스타민 수용체 차단제로는 모집된 호중구의 작용으로 유발되는 폐손상을 조절할 수 없었던 것으로 사료된다.

결 론

내독소로 유도되는 급성 폐손상 모델에서 내인성 히스타민은 H2 수용체를 매개하여 호중구의 폐내 침윤 기전에 관여할 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경 :

히스타민은 폐 내에 널리 분포하며 강력한 폐혈관 수축 작용과 모세혈관 투과성 증가 작용이 있을 뿐만 아니라 폐포내피세포 표면에서 P-selectin의 발현을 증가시키고 IL-8 분비를 촉진시켜 호중구의 조직 내 이동 및 활성화에 관여한다고 보고되고 있어, 호중구의 역할이 중요한 내독소로 유도되는 급성폐손상의 발병기전에 내인성 히스타민이 관여할 것으로 추정되나 자세한 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 연구는 내독소로 유도되는 급성폐손상의 발병기전에서 내독소는 폐장내에서 히스타민의 생성을 증가시키며, 이렇게 생성된 내인성 히스타민은 H2 수용체를 통하여 호중구의 폐내 침윤에 관여할 것이라고 가정하고 이를 검증하려 하였다.

방 법 :

Sprague-Dawley 쥐를 이용하여 생리 식염수를 기도 내 투여한 대조군, 내독소를 기도 내 투여한 내독소군, H1 수용체 차단제(mepyramine) 및 H2 수

용체 차단제(ranitidine)를 정주한 H1 처치군 및 H2 처치군, H3 수용체 차단제(thiopramide)를 복강내 투여한 H3 처치군 등 모두 다섯 군으로 나누어 내독소 투여 후 각각 1,2,6 시간에 시간대 별로 혈청 및 폐포세척액내에서 히스타민의 농도를 측정하였고, 각군에서 폐 염증 및 폐 손상 지표로써 폐포세척액 내 총세포 수, 호중구 수 및 폐포세척액 단백질을 측정하여 내독소 투여군과 비교하였다. 또한, 내독소 투여 후 6시간째에 폐 관류 후 얻은 폐 조직에서 폐 조직 내 호중구 침윤을 반영하는 myeloperoxidase 활성도를 비교하였다.

결 과 :

내독소군에서 내독소 투여 2시간째 폐포세척액 히스타민 농도가 대조군에 비해 유의하게 높았으며, 폐포세척액 총 세포 수와 호중구 수는 내독소 투여 6시간째에 유의하게 높았다. 폐조직내 MPO 활성도 역시 대조군에 비해 유의하게 높았다. H2 처치군에서 폐포세척액 총 세포 수 및 호중구 수는 내독소 투여 후 6시간 째에 내독소군에 비해 유의하게 낮았으며, 폐 조직 내 MPO 활성도 역시 내독소군에 비해 유의하게 낮았다

폐포세척액 단백질량은 각 군에서 내독소군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다.

결 론 :

이상의 결과로 내독소로 유도되는 급성 폐손상에서 내독소 투여 2시간 후 폐포세척액 히스타민 농도가 증가하며 내인성 히스타민은 주로 H2 수용체를 매개하여 호중구의 폐내 침윤 기전에 관여할 것으로 추정되었다.

중심단어 : 내독소, 급성폐손상, 히스타민, 히스타민 수용체 차단제

감사의 글(Acknowledgement)

이 논문은 2001년 한국학술진흥재단의 보조로 이루어졌습니다. (과제번호 : 2001/F00158)

참 고 문 헌

1. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS : definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818-24.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-23.
3. Snapper JR, Hutchinson AA, Olgertree ML, Brigham KL. Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanaesthetized sheep. *J Clin Invest* 1983;72:63-76.
4. Tranbaugh RF, Lewis FR. Mechanisms and etiologic factors of pulmonary edema. *Surg Gynecol Obstet* 1984;158:193-206.
5. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1850-6.
6. Jorens PG, Van Damme J, De Backer W, Bossaert L, De Jongh RF, Herman AG, et al. Interleukin-8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine* 1992; 4:592-7.
7. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997; 52:442-6.
8. Parsons PE, Moss M, Vannice JL, Moore EE, Moore FA, Repine JE. Circulating IL-1 and IL-10 levels are increased but do not predict the development of acute respiratory distress syndrome in at-risk patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1469-73.
9. Brigham KL, Owen PJ. Increased sheep lung vascular permeability caused by histamine. *Circ Res* 1975;37:647-57.
10. Brigham KL, Padove SJ, Bryant D, Mckeen CR, Bowers RE. Diphenhydramine reduces endotoxin effects on lung vascular permeability in sheep. *J Appl Physiol* 1980;49: 516-20.
11. Sielaff TD, Sugerman HJ, Tatum JL, Blocher CR. Successful treatment of adult respiratory distress syndrome by histamine and prostaglandin blockade in a porcine pseudomonas model. *Surgery* 1987;102:350-7.
12. 고윤석, Hybertson BM, Jepson EK, 김미정, 임채만, 이상도, 등. The study for the roles of intratracheally administered histamine in the neutrophil-mediated acute lung injury in rats. *결핵 및 호흡기질환* 1996;43:308-22.
13. 정복현, 고윤석. 내독소 유도 급성폐손상에서 항히스타민의 역할.(2001년 울산의대 박사학위논문)
14. Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 1998;123:390-9.
15. Siraganian RP. An automated continuous flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal Biochem* 1974; 57: 383-94
16. Krawisz HE, Sharon P, Stenson WF. Quanti-

- tative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
 18. Ahmed T, Mirbahar KB, Oliver JW, Eyre P, Wanner A. Characterization of H1 and H2 receptor function in pulmonary and systemic circulations of sheep. *J Appl Physiol* 1982; 53:1765-84.
 19. Subramanian N, Bray MA. Interleukin 1 release histamine from human basophils and mast cells in vitro. *J Immunol* 1987;138: 271-5.
 20. Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, MacGlashan DW Jr, Schleimer RP, Adkinson NF Jr, et al. Human lung macrophage-derived histamine-releasing activity is due to IgE-dependent factors. *J Immunol* 1986;136: 2588-95.
 21. Simionescu N, Heltianu C, Antohe F, Simionescu M. Endothelial cell receptors for histamine. *Ann NY Acad Sci* 1982;401: 132-49.
 22. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J* 1993;65:1560-9.
 23. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 1994; 152:3570-7.
 24. Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Tonnel AB. Histamine induces Interleukin8 secretion by endothelial cells. *Blood* 1994;84:2229-33.
 25. Traber DL, Adams T, Henriksen N. Ibuprofen and diphenhydramine reduce the lung lesion of endotoxemia in sheep. *J Trauma* 1984;24:835-40.
 26. Maino G, Palade GE. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: An electron microscope study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:571-606.
 27. Byrne K, Sielaff TD, Michna B, Carey PD, Blocher CR, Vasquez A, et al. Increased survival time after delayed histamine and prostaglandin blockade in a porcine model of severe sepsis-induced lung injury. *Crit Care Med* 1990;18:303-8.
 28. Schaefer U, Schneider A, Rixen D, Neugbauer E. Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediated via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. *Inflamm Res* 1998;47:256-64.
 29. Seligmann BE, Fletcher MP, Gallin JI: Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. *J Immunol* 1983;130: 1902-9.
 30. Rangachari PK, Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol* 1992;262(1 Pt 1): G1-13.
 31. Barnes PJ. Histamine receptors in the lung. *Agents Actions* 1991;33: 103-22.
 32. Braude S, Royston D, Coe C, Barnes PJ. Histamine increases lung permeability by an H2-receptor mechanism. *Lancet* 1984;2:372-4.
 33. Perretti M, Harris TG, Flower RJ. A role for

- endogenous histamine in interleukin-8-induced neutrophil infiltration into mouse air-pouch: investigation of the modulatory action of systemic and local dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1994;112:801-8.
34. Sirois J, Menard G, Moses AS, Bissonnette EY. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H₂ and H₃ receptors: Stimulation of IL-10 production. *J Immunol* 2000;164:2964-70.
35. Ishikawa S and N Sperelakis. A novel class (H₃) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. *Nature* 1987;327: 158-60.
36. Stockley RA. Measurement of soluble proteins in lung secretions. *Thorax* 1984;39:241-247.
37. Cook D, Guyatt G, Marshall J, Leasa D, Fuller H, Hall R , Peter S, Rutledge F, Griffith L, McLellan A, Wood G, Kirby A. A comparison of sucralfate and ranitidine for the prevention of upper gastrointestinal bleeding in patients requiring mechanical ventilation. Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J Med.* 1998;338(12):791-7.
-