

내독소 및 Thiourea 투여 후 Surfactant protein B와 C 유전자 발현의 비교 관찰

한양대학교 의과대학 내과학교실

손동현, 손장원, 윤호주, 신동호, 박성수

=Abstract=

Gene Expression of Surfactant Protein B and C in Endotoxin and Thiourea Treated Rats

Dong Hyun Sohn, M.D., Jang Won Sohn, M.D., Ho Joo Yoon, M.D.,
Dong Ho Shin, M.D., Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University Hospital, Seoul, Korea

Background : The surfactant specific proteins, SP-B and SP-C are believed to be important regulators of the surfactant function and homeostasis. Since acute respiratory distress syndrome(ARDS) is usually viewed as the functional and morphological expression of a similar underlying lung injury caused by a variety of insults, and since abnormalities in the surfactant function have been described in ARDS, the authors investigated the different effects of endotoxin and thiourea on the accumulation of mRNA encoding SP-B and SP-C.

Methods : Sprague-Dawley rats were given 5 mg/kg of an intraperitoneal endotoxin from Salmonella enteritidis and 3.5 mg/kg intraperitoneal thiourea and were sacrificed at different time periods.

Results : 1. The SP-B mRNA levels 6 and 24 hours after the 5 mg/kg endotoxin treatment was significantly reduced by 26.1% and 50%, respectively($P<0.01$, $P<0.001$). 2. The SP-B mRNA levels 24 hours after the 3.5 mg/kg thiourea treatment was reduced by 9.8% and 12.5%, respectively. 3. The SP-C mRNA levels 6 and 24 hours after the 5 mg/kg endotoxin treatment was significantly reduced by 38.7% and 53.6%, respectively($P<0.01$, $P<0.001$). 4. The SP-C mRNA level 6 hours after the 3.5 mg/kg thiourea treatment was reduced by 22.8%($P<0.05$).

Address for correspondence:

Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University

17, Haeng dang dong, Sung dong ku, Seoul. 133-792, Korea

Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2298-9183 E-mail : parkss@hanyang.ac.kr

Conclusion : These results indicate that the differential regulation of the hydrophobic surfactant proteins in vivo is evident, and suggest that the hydrophobic surfactant proteins might be differentially regulated during lung injury at different time periods without altering the lung wet to dry ratios. The mechanism of these alternations at the different time periods and the different kinds of etiology remain to be determined.(*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 54:510-521)

Key words : Gene expression, Hydrophobic surfactant proteins, Endotoxin & thiourea.

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)의 발생의 원인은 직접적 폐손상을 유발하는 인자와 혈행성으로 염증성 매개체를 방출하는 간접적 기전으로 손상을 유발하는 인자가 포함된다. 직접적 폐손상을 유발하는 인자로는 흡인, 미만성 폐감염, 익사직전, 독성물질 흡입 및 폐타박상 등이며, 간접 폐손상을 유발하는 인자로는 폐혈증, 심한 흉곽외 외상, 과수혈, 심폐우회술, 및 췌장염이 해당된다. ARDS의 가장 흔한 병리학적 특징은 미세혈관의 투과성 증가로 인한 폐포 내 단백성분이 풍부한 삼출로 심각한 폐부종현상이다¹⁻³. 이 결과 가스교환의 장애, 폐탄성의 소실 및 비식장성 부종의 결과를 초래한다. 호중구, 혈소판 및 보체, prostaglandin, leukotriene, thromboxane, interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF)들 같은 체액매개체들이 ARDS의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있다⁴.

내독소인 lipopolysaccharide는 조직 내에 많이 존재하는 대식세포를 활성화시키고 활성화된 대식세포는 많은양의 TNF를 분비한다. TNF는 IL-1과 유사한 cytokine이며, 최염성물질로 그람음성균으로 유발된 폐혈증에서 발생한 폐손상의 중요한 매개체로 알려져 있다⁵⁻⁸. TNF를 폐장 내로 주입하면 내독소에 의하여 유발되는 폐손상과 동일한 병리소견들을 관찰할 수 있으며, 생체 주입 시 폐혈

성 저혈압을 관찰할 수 있으므로 TNF는 폐손상이나 폐혈증의 주요 매개체의 하나로 알려져 있다⁹.

Thiourea는 폐장의 미세혈관의 혈역동학적 변화와 투과성의 변화를 초래하여 폐부종을 유발하는 약물이며^{10,11}, 광학 및 전자현미경으로 관찰하면 thiourea에 의한 일차 표적세포는 모세혈관의 내피세포이고 내피세포의 장벽 상실을 초래해 모세혈관의 투과성을 증가시켜 간질 또는 폐포 내 부종을 초래한다¹².

ARDS에 있어서 표면활성물질의 역할은 복잡하지만 표면장력의 이상이 ARDS의 병태생리에 부분적으로 기여하여¹³ 폐유순도의 감소와 환기와 관류 사이의 균형을 악화시킨다. 표면활성물질계통의 변화가 ARDS 때 폐손상의 일차적인 발병기전은 아니지만 그렇다고 해서 ARDS의 이차적인 중요성만의 의미를 부여해서도 안된다. 표면활성물질계통은 일차적이든 이차적이든간에 적절한 폐기능을 유지하는데 지극히 중요할 뿐만 아니라, 어떤 형태든 표면활성물질결핍이 폐의 병태생리학적 결과에 지대하게 관여하기 때문이다¹⁴⁻¹⁶. 표면활성물질 단백질(surfactant protein: 이하 SP로 표기함)B와 SP-C는 배수성 단백질(hydrophobic protein)이며, SP-B 비환원형의 분자량은 18 kDa 이고, SP-C의 전체 제조과정 및 인지질의 포장에 필수적으로 관여한다. 기관지 폐포 세척액 내 SP-B양은 ARDS, 폐렴, 바이러스감염 및 미숙아에서 감소한다¹⁷. SP-C 비환원형의 분자량은 5-8 kDa이고 SP-A와

SP-B에 비하여 지방친화성이 가장 강하다. SP-B와 SP-C는 표면활성물질의 신속한 film형성에 관여하며 SP-A와 상호협동작용을 하며 단층의 표면장력을 감소시킨다¹⁸. ARDS가 대부분 6시간 이내에 출현하였으며 ARDS로 발전할 위험상태에 있었던 환자의 80%가 24시간 이내에 급성 폐손상을 보였다 하였다^{19,20}. 동물의 폐손상 모형에서 oleic acid의 주입, 양측 미주신경의 절단, N-nitroso-N-methylurethane, 100%산소에 노출, bleomycin의 투여, 이산화규소의 주입등의 방법들이 보고되었다²¹⁻²⁶. 본 저자들은 내독소, thiourea와 같은 직접적 폐손상을 유발하는 인자와 TNF와 혈소판활성인자(platelet activating factor)같은 매개체를 이용하여 SP의 유전자 발현에 미치는 영향을 보고 하였었다²⁷⁻³¹.

이에 저자들은 폐손상의 중요한 원인물질인 내독소와 thiourea를 실험동물의 복강 내로 유사한 조건하, 동일시간에 각각 투여하여 내독소와 thiourea의 투여후 시간경과에 따른 SP-B와 C 유전자가 폐손상의 원인에 따른 발현의 차이가 있는지를 비교 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

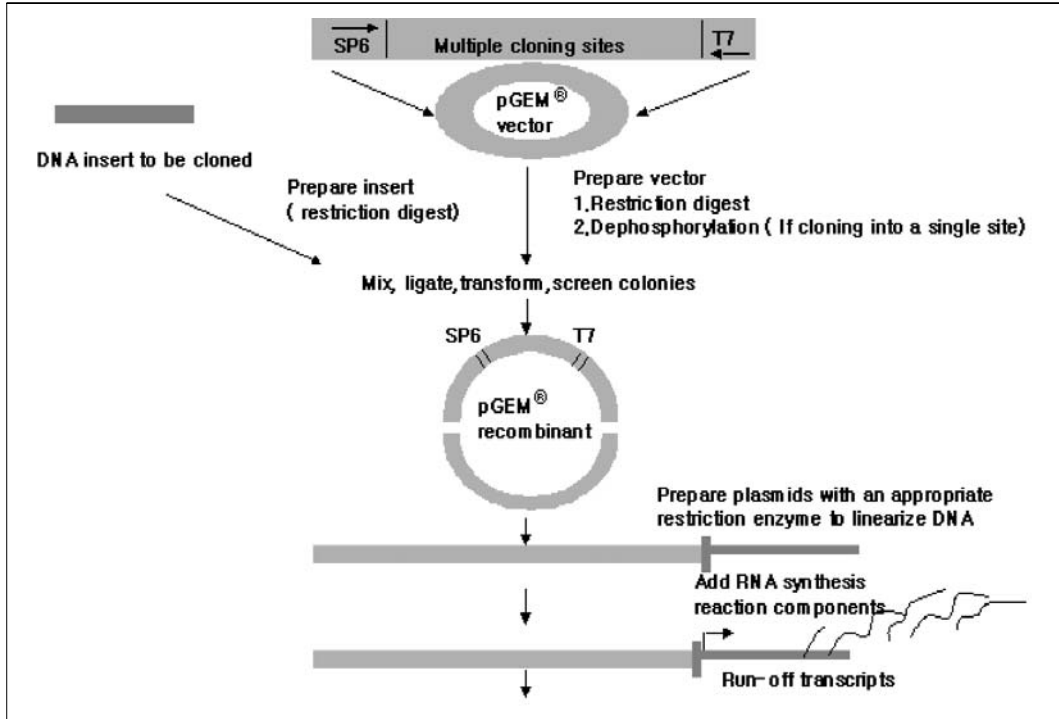
1. 연구대상

실험동물은 300-380 gm의 Sprague-Dawley쥐 (Sasco, Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응 시킨후 본 연구의 실험동물로 사용하였다. Salmonella enteritidis lipopolysaccharide B(Difco Laboratories, Detroit, MI) 5 mg/kg 및 thiourea (Fisher Scientific Company; T-101, New Jersey) 3.5 mg/kg을 각각 8마리의 실험동물의 복강 내로 투여 후 6시간 및 24시간에 각각 희생시켰다. 정상 대조군 8마리는 동량의 식염수를 복강내로 각각 주사한 후 6시간 및 24시간에 희생하였다. 폐조직을 얻기 위해 쥐를 희생한 후 폐를 일괄 채취하였다.

Wet to dry weight ratio(WDR)을 측정하기 위하여 한쪽 폐의 2/3 부위를 저울로 무게를 측정하였다. mRNA를 측정하기 위하여 500-750 mg의 폐 조직을 10 ml의 solution D(4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)에 넣은 후 Tisumizer(Tekma, Cincinnati, Ohio)로 high speed에서 30-60초 동안 균질화 후 -70°C의 냉동실에 보관하였다.

2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi³²의 방법으로 총 RNA를 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500 µL의 solution D에 pH 4.0인 50 µL 2 M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)로 완충한 후 phenol 500 µL을 가하였다. 교반(vortex)으로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49 : 1인 용액 100 µL을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube내 이 혼합물을 15분 동안 얼음에 담근 후 10,000 G의 microfuge로 5분 동안 실온에서 원침하였다. Aqueous phase을 micropipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간 이상 -20°C에 잠복시킨 후, 10,000 G에서 5분동안 원침하였다. 상층액을 서서히 따른후 침전물을 150 µL의 solution D에 녹인 후 -20°C에 하룻밤동안 동량의 isopropanol로 재침전 시켰다. 5분동안 10,000 G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻는다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 1mM EDTA(pH 8)로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질은 ethidium bromide로



염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외시켰다.

3. RNA hybridization assay

각각의 mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과 β -cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybridization 방법으로 측정하였다. 쥐의 SP-B와 SP-C 각각의 SP의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 복사체를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 전사반응으로부터 산출물은 linearized vector microgram(μ g)당 전체 길이가 20-30 μ g의 전사체였다 (Fig. 1).

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ng의 sense 전사체와 1 μ g의 RNA를 65°C에서 10-15분 denature 후 3장의 13 mm nitrocellulose filter(0.45 μ m in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 10 \times standard saline citrate (SSC)/ 50% formaldehyde을 20 μ L씩 가하였다. Filter들을 80°C에서 2시간 구워낸 후 1M sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)을 포함하는 prehybridization용액을 filter당 0.2-0.5 mL양으로 56°C에서 12-14시간 50 ml Falcon centrifuge tube 내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 4 \times SSC, 1 \times Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1mg/mL salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 mL 가한 후 특이 활성도가 5 $\times 10^6$ cpm/mL인 32 P로 표시시킨

Table 1. Mortality rate after endotoxin and thiourea injection

Time after endotoxin and thiourea	Mortality rate(%)		
	control	Endotoxin (5 mg/kg)	Thiourea (3.5mg/kg)
6 hr	0	0	0
24 hr	0	12.5	0

Table 2. Lung wet to dry weight ratio in 5mg/kg endotoxin and 3.5 mg/kg thiourea injection and time course

Time after endotoxin and thiourea	Wet wt/dry wt ratio	
	Endotoxin	Thiourea
Control	5.02±0.21	4.98±0.03
6hr	5.01±0.14	5.76±0.65
24hr	5.13±0.17	5.11±0.09

Lung wet-to-dry ratio were used as indicators of lung injury. Values given are mean±SEM of the number of rats.

취의 특이 cDNA probe로 56℃에서 흔들면서 17-20시간 동안 hybridization하였다. 모든 filter는 실온에서 2×SSC, 0.2% SDS용액으로 3번, 65℃에서 0.1×SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다. 특이 mRNA는 회귀방정식을 사용하여 표준곡선으로 부터 산출하였다.

소 5mg/kg를 투여 후 6시간 및 24시간에서 사망률은 각각 0/8 (0%), 1/8(12.5%)이었고, thiourea 3.5 mg/kg를 투여 후 6시간 및 24시간에서 사망률은 각각 0/8(0%), 0/8(0%)이었다(Table 1). Wet to dry weight ratio(WDR)은 정상대조군에 비하여 내독소 5 mg/kg 및 thiourea 3.5 mg/kg로 처치한 군과, 각각 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다 (Table 2).

4. 성적 분석

통계학적 평가는 unpaired student's t-test로 정상대조군과 각 군간의 mRNA값 사이에서 평가하였다. 회귀방정식은 Epistat statistical package를 이용하여 산출하였다. Probability value는 0.05미만을 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 사망률 및 폐손상의 정도

정상대조군의 8마리의 사망률은 0 %이었고, 내독

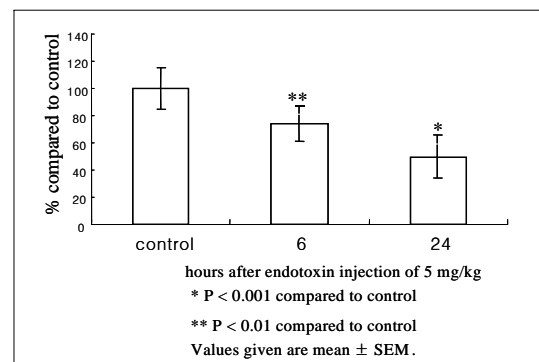


Fig. 2. Differential accumulation of SP-B mRNA in the rat lungs after intraperitoneal injection of endotoxin

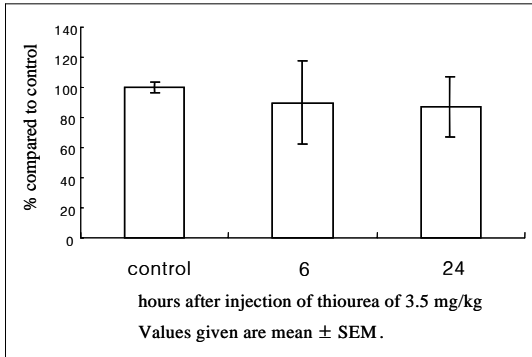


Fig. 3. Differential accumulation of SP-B mRNA after intraperitoneal injection of thiourea

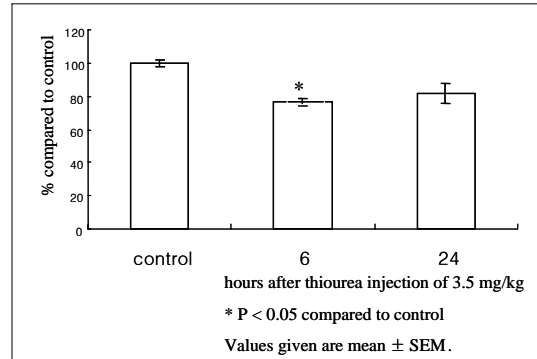


Fig. 5. Differential accumulation of SP-C mRNA after intraperitoneal injection of thiourea

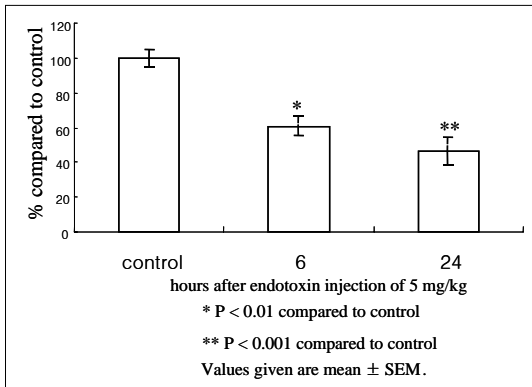


Fig. 4. Differential accumulation of SP-C mRNA after intraperitoneal injection of endotoxin

2. SP-B 및 SP-C에 대한 sense 전사체의 표준곡선

SP-B와 SP-C의 sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수(r)는 다음과 같다. SP-B에 대한 sense 전사체의 표준곡선은 $Y=0.00037X-0.04$ ($X=CPM$, $Y=SP-B$ mRNA 전사체)이고 r은 0.99 이었다. SP-C에 대한 sense 전사체의 표준곡선은 $Y=0.0014X-0.19$ ($X=CPM$, $Y=SP-C$ mRNA 전사체)이고, r은 0.99 이었다.

3. 내독소 및 thiourea 투여후 SP-B mRNA의 측정

SP-B mRNA양은 내독소를 1일 5 mg/kg 투여 후 6시간 및 24시간에서 대조군에 비하여 26.1%, 50%가 각각 감소하였으며($P<0.01$, $P<0.001$)(Fig. 2), 반면 thiourea를 1일 3.5 mg/kg투여 후 SP-B mRNA양은 6시간 및 24시간에서 대조군에 비하여 각각 9.8%, 12.5%가 감소하였다(Fig. 3).

4. 내독소 및 thiourea 투여후 SP-C mRNA의 측정

SP-C mRNA양은 내독소를 1일 5 mg/kg투여 후 6시간과 24시간에서 대조군에 비하여 각각 38.7% 및 53.6%가 감소하였으며($P<0.01$, $P<0.001$)(Fig. 4), 반면 thiourea를 1일 3.5 mg/kg투여 후 SP-C mRNA양은 6시간에서 22.8%가 감소하였다($P<0.05$) (Fig. 5).

5. 내독소 및 thiourea 투여후 β -actin mRNA의 측정

내독소 투여군의 β -actin mRNA은 대조군은 140.8 ± 8.4 cpm이었고, 6시간 및 24시간에서 β -actin

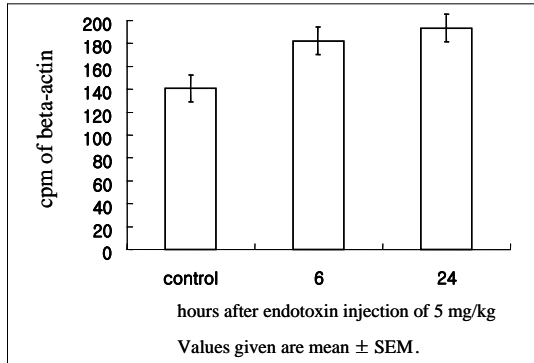


Fig. 6. Differential accumulation of Beta-actin mRNA after endotoxin injection

mRNA은 각각 180±26 cpm 및 193.5±14.7 cpm 이었고(Fig. 6), 반면 thiourea 투여군의 β-actin mRNA양은 대조군은 133.7±9.3 cpm 이었고, 6시간 및 24시간에서 β-actin mRNA은 각각 125.3±15.1 cpm 및 123.3±2.9 cpm이었다(Fig. 7).

내독소 및 thiourea투여 후 SP-B와 SP-C의 각각의 시료의 양을 각 군간의 β-actin mRNA의 양의 비로 시료의 양을 교정하였다.

고찰

본 연구에서 thiourea투여 후 폐의 wet-to-dry ratio(WDR)은 6시간 및 24시간에 각각 15.7%, 2.6%가 증가하였으며, 내독소 투여후 폐의 WDR은 24시간에 2.2%가 증가하였다. 폐의 WDR는 일반적으로 폐손상의 지표로 사용되지만³³, WDR의 변화 없이도 thiourea처리 후 광학 또는 전자현미경으로 경미한 폐손상을 관찰할 수 있다¹⁰.

Thiourea투여 후 쥐의 LD50은 3-4 mg/kg이다. 본 연구에서 정상대조군의 사망률은 0%이었고, thiourea 3.5 mg/kg를 투여후 6시간과 24시간에서 사망률은 0%이었다. 내독소 5mg/kg 투여후 24시간에서 사망률이 8/1(12.5%)이었다. 각군의 WDR나 사망률에 있어 유의한 변화가 없는 것으로 보아 비교적 경한 폐손상을 입은 것으로 생각된다.

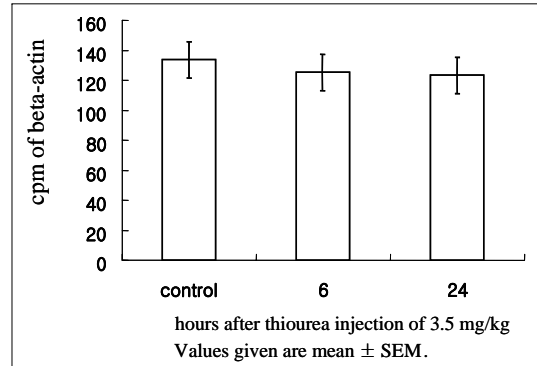


Fig. 7. Differential accumulation of Beta-actin mRNA after thiourea administration

TNF 투여 12시간후 폐포액내 호중구에서 증가된다고 하며³⁴, TNF는 호중구와 상호작용하여 모세혈관 투과성과 모세혈관압을 증가시켜 폐부종을 유발한다^{35,36}. 이와같이 내독소 투여시 생성되는 TNF는 ARDS의 병인에 중요한 매개체 중 하나로 알려져 있다^{37,38}. TNF는 고열, 조직에 출혈성 괴사나 대사장애를 유도하고 허혈성 속에 빠지게한다^{39,40}. 내독소는 호중구들을 자극하여 유리산소기를 많이 생성하게 하는데 이 물질들이 혈관내피세포를 공격할 수 있기 때문에 출혈이나 미세순환 장애도 유발 할 수 있다.

Thiourea에 의한 내피세포 손상은 세포질내 수포나 scallop현상으로 나타나 내피세포의 장벽 역할을 상실케 한다¹². 방사능 표지단백양을 측정하여 혈관 투과성을 관찰한 보고에 의하면 thiourea 투여한 후 모세혈관 투과성은 3배이상 증가된다 하였다⁴¹. Thiourea에 의한 폐부종은 약물자체와 약물 대사물이 폐내의 폴리펩티드와 결합하기 때문이고, 이러한 결합이 모세혈관 내피와 폐포장벽의 투과성을 직접 또는 간접으로 증가시킨다⁴². 실제 thiourea는 생체내에서 cytochrome p-450을 포함하는 monooxygenase의 차단제로 작용하며⁴¹, 또한 thiourea산화물인 cyanide로 인하여 폐부종이 발생된다⁴³.

SP들은 2형 폐세포기능의 표지자로 이용되고, 염증성 cytokine들에 의하여 조절되며, SP농도들은 ARDS발생시 감소한다^{44,45}. SP들은 표면활성물질의 물리학적 성상의 결정 및 대사조절에 있어서 중요한 역할을 한다. SP-B는 표면활성물질기능을 위한 필수적이며 동형접합 유전적 SP-B단백의 결합은 치명적이다⁴⁶.

SP-C는 배수성 단백질이며, 비환원형의 분자량은 5-8 kDa이고 SP-A와 SP-B에 비하여 지방친화성이 강하다. 새로 생성된 SP-B와 SP-C의 세포내 진행과정은 서로 유사한 경로를 거친다. SP-C는 표면에서 인지질의 흡수를 촉진하고⁴⁷, film내 인지질의 구성을 변화시켜 작은 압축된 영역을 산출한다⁴⁸. 폐손상을 입은 쥐에 SP-C단백만 포함한 표면활성물질을 투여하였을 시 폐기능이 호전되었다⁴⁹.

본 연구결과 SP-B mRNA양은 1일 5 mg/kg의 내독소를 투여 후 6시간과 24시간에서 대조군에 비하여 각각 26.1%와 50%로 유의하게 감소하였으며, SP-C mRNA양은 1일 내독소 5 mg/kg 투여 후 6시간과 24시간에서 대조군에 비하여 각각 38.7% 및 53.6%가 유의하게 감소하였다. 김등³⁰은 내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 6시간 및 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 유의하게 감소하지 않았다고 하였다. 또한 내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 6시간 및 24시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 29.0% 및 26.8%가 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 ARDS발생의 위험인자를 가진 환자의 76%에서 24시간 이내에 ARDS가 발생되며, 72시간 후에는 발생할 가능성이 적다는 보고^{50,51}와 마찬가지로 24시간 이내에 SP-B와 SP-C 유전자발현의 유의한 감소가 있었으며, ARDS의 사망률에 가장 중요한 시기인 24시간내 표면활성물질의 신속한 film형성에 관여하는 배수성 단백질의 감소로 인하여 표면활성물질의 불활성화 현상을 초래하고 이미 존재하

는 폐손상을 악화시키는 방향으로 작용하여 조장하였다고 생각한다. 또한 저자간의 SP-B와 SP-C 유전자 발현의 차이는 개체의 감수성의 차이에서 기인한다고 사료된다.

본 연구에서 1일 3.5mg/kg의 thiourea를 투여 후 SP-B mRNA양은 6시간과 24시간에서 대조군에 비하여 각각 9.8%, 12.5%가 감소하였으며, SP-C mRNA양은 6시간에서 대조군에 비하여 22.8%가 유의하게 감소하였다. 이에 반해 고등²⁷의 연구에서는 thiourea를 1일 3.5mg/kg를 투여하고 6시간 및 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 감소는 없었으며, SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 22.8%가 유의하게 감소하였다는 연구결과와 유사하였다. 이전의 실험들^{27,30}과 본 실험의 차이는 시간적인 차이와 대상동물 즉 개체간의 차이가 있었다. 이러한 data상의 차이는 확실치는 않지만 개체간의 차이로 생각된다. 이러한 점이 시험관내 실험보다 동물에서 실험의 어려운 점의 하나라 생각된다. Thiourea는 복강내 투여 15분 후에 흡수되고, 폐에서의 반감기는 20시간 내이다⁴¹. Thiourea투여 후 2시간 후부터 내피세포의 수포현상, scallop현상과 간질성 부종이, 6시간에는 상피손상도 초래한다⁵². Hollinger와 Giri⁵³에 의하면 thiourea투여 1시간 후에 폐의 glutathione은 90% 감소하여 최하점에 이르며, 24시간에는 대조군치로 환원된다 하였다.

이와같이 SP-B와 SP-C mRNA에 대한 폐손상의 서로 다른 원인인 내독소와 thiourea의 유사한 조건하 투여후 시간경과에 따른 동물실험내 SP-B와 SP-C의 유전자발현이 각각 특이하게 상이하게 감소하는 것을 알 수 있었고 배수성 SP에 대한 영향은 thiourea보다 내독소 투여시 더 감소가 있었다.

이러한 서로 다른 원인에 대한 SP-B 및 SP-C 유전자의 서로 다른 발현양상의 기전에 대해서는 더 연구 할 과제라고 생각된다.

요 약

연구배경 :

내독소인 lipopolysaccharide는 조직 내에 많이 존재하는 대식세포를 활성화시키고 활성화된 대식세포는 폐손상의 중요한 매개체로 알려진 많은양의 TNF를 형성한다. Thiourea는 폐장의 미세혈관의 혈액동학적 변화와 투과성의 변화를 초래하여 폐부종을 유발하는 약물이며, 모세혈관의 내피세포의 장벽 상실을 초래해 모세혈관의 투과성을 증가시켜 간질 또는 폐포내 부종을 초래한다. 표면활성물질은 ARDS의 병태생리적인면에 있어서 중요한 역할을 하며 SP는 표면활성물질의 물리학적 성상의 결정 및 대사를 결정하는데 있어서 중요하다. SP는 염증성 cytokine들에 의하여 조절되며, SP들은 ARDS발생 시 감소한다. SP-B와 SP-C는 배수성 단백질이며 표면활성물질의 신속한 film형성에 관여한다. 이에 저자들은 폐손상의 서로 다른 원인물질인 내독소와 thiourea를 실험동물의 복강 내로 유사한 조건하, 동일시간에 각각 투여하여 내독소와 thiourea의 투여후 시간경과에 따른 SP-B와 C 유전자가 폐손상의 원인에 따른 발현의 차이가 있는지를 비교 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

방 법 :

저자들은 내독소와 thiourea를 백서에 각각 투여후 SP-B와 C의 유전자 발현양상을 filter hybridization방법으로 검색하고 내독소와 thiourea의 투여 후 시간경과에 따른 SP-B와 C의 유전자 발현의 변동을 비교 관찰하였다.

결 과 :

내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 26.1%가 감소하였다($P<0.01$). 내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 50%가 감소하였다($P<0.001$). Thiourea를 1일

3.5mg/kg를 투여하고 6시간 및 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 각각 9.8% 및 12.5%가 감소하였다. 내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 38.7%가 감소하였다($P<0.01$). 내독소를 1일 5mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 53.6%가 감소하였다($P<0.001$). Thiourea를 1일 3.5mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 22.8%가 감소하였다($P<0.05$).

결 론 :

SP-B와 SP-C mRNA에 대한 폐손상의 서로 다른 원인인 내독소와 thiourea의 유사한 조건하 투여후 시간경과에 따른 동물실험내 SP-B와 SP-C의 유전자발현이 각각 특이하게 상이하게 감소하는 것을 알 수 있었고 배수성 SP에 대한 영향은 thiourea보다 내독소 투여시 더 감소가 있었다.

참 고 문 헌

1. Pelosi P, Caironi P, Gattinoni L. Pulmonary and extrapulmonary forms of acute respiratory distress syndrome. *Sem Respir Crit Care Med* 2001;22:259-68.
2. Shale DJ. The adult respiratory distress syndrome : 20 years on. *Thorax* 1987;42:641-5.
3. Petty TL. Acute respiratory distress syndrome : where did we start and where are we now? *Sem Respir Crit Care Med* 1994;15:243-9.
4. Günther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. *Sem Respir Crit Care Med* 2001; 22(3):247-58.
5. Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hu-

- tchison AA, Loyd JE, Lucht WD, et al. Septicemia and lung injury. *Clin Lab Med* 1983;3:719-44.
6. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 1988;81:1925-37.
 7. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988;318:1481-6.
 8. Li XY, Donaldson K, Brown D, MacNee W. The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:185-95.
 9. Thomas R, Luke U, Waston R. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am J Pathol* 1991;138:1485-95.
 10. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in the rat : a topographical and electron-microscope study. *J Pathol* 1972;106:25-35.
 11. Richter CP. The physiology and cytology of pulmonary edema and pleural effusion produced in rats by alpha-naphthyl thiourea (ANTU). *J Thorc Surg* 1952;23:66-91.
 12. Pine MB, Beach PM, Cottrell TS, Scala M, Turino GM. The relationship between right duct lymph flow and extravascular lung water in dogs given alpha-naphthylthiourea. *J Clin Invest* 1976;58:482-92.
 13. MacIntyre NR. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 1995;16:47-52.
 14. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkins ND. Characteristics of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock. *Am Rev Respir Dis* 1997;115:531-6.
 15. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence for lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982;70:673-83.
 16. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, et al. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987;317:1565-70.
 17. Whisett JA, Nogee LM, Weaver TE, Horowitz AD. Human surfactant proein B : structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* 1995;75:749-57.
 18. Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem J* 1986;236:85-9.
 19. Pope PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ : Clinical predictors of the respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982; 144:124-30
 20. Weinberg PF, Mattay MA, Webster RO, Roskos KV, Goldstein IM, Murray JF. Biologically active products of complement and acute lung injury in patients with the sepsis syndrome. *Am Rev Respir dis* 1984; 130:791-6.
 21. Casals C, Herrera L, Miguel E, Garcia-Barreno P, Municio AM. Comparison between intra- and extracellular surfactant in respiratory distress induced by oleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1989;1003:201-3.

22. Berry D, Ikegami M, Jobe A. Respiratory distress and surfactant inhibition following vagotomy in rabbits. *J Appl Physiol* 1986;61:1741-8.
23. Liao DF, Barrett CR, Bell AL, Ryan SF. Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:395-401.
24. Holm BA, Notter RH, Siegle J, Matalon S. Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hypoxia. *J Appl Physiol* 1985;59:1402-9.
25. Low RB, Adler KB, Woodcock-Mitchell J, Giancola MS, Vacek PM. Bronchoalveolar lavage lipids during development of bleomycin-induced fibrosis in rats. Relationship to altered epithelial cell morphology. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:709-13.
26. Dethloff LA, Gilmore LB, Hook GE. The relationship between intra- and extra-cellular surfactant phospholipids in the lungs of rabbits and the effects of silica-induced lung injury. *Biochem J* 1986;239:59-67.
27. 고유석, 박성수, 이정희. Thiourea를 투여한 백서에서 Surfactant protein A, B, C의 유전자 발현 동태. *대한내과학회잡지* 1992;43:545-54.
28. 손장원, 신동호, 박성수, 이정희. Platelet-activating factor기도내 투여 후 surfactant protein A,B, 및 C의 유전자 발현에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1998;45:369-79.
29. 최진원, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수. Tumor necrosis factor가 surfactant protein A,B,C의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *결핵 및 호흡기질환* 2000;48:513-21.
30. 김연수, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수. 내독소가 Surfactant protein B와 C의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한내과학회지* 2001;60:139-47.
31. 문두섭, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수. 내독소가 Surfactant protein A의 유전자 발현과 총단백량에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *결핵 및 호흡기 질환* 2000;49:703-14.
32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
33. Chang SW, Fedderson CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987;79:1498-1509.
34. Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, et al. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines: Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1, and TNF-induced inflammatory infiltrate. *Am J Pathol* 1991;138:1485-96.
35. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature* 1981;289:646-50.
36. Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, Johnson A. Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 1990;67:68-77.
37. Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW. Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. *Arch Surg* 1989;124:1400-5.
38. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of

- patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:268-71.
39. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985;229:869-71.
 40. Waage A, Espevik T. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha cachectin in mice. *J Exp Med* 1988;167:1987-92.
 41. Stelzner TJ, Welsh CH, Berger E, McCullough RG, Morris K, Repine JE, et al. Antiarrhythmic agents diminish thiourea-induced pulmonary vascular protein leak in rats. *J Appl Physiol* 1987;63(5):1877-83.
 42. Hollinger MA, Giri SN, Alley M, Budd ER, Hwang F : Tissue distribution and binding of radioactivity from ¹⁴C-thiourea in the rat. *Drug Metab Dispos* 1974;2(6):521-5.
 43. Fox RB, Harada RN, Tate RM, Repine JE. Prevention of thiourea-induced pulmonary edema by hydroxyl-radical scavengers. *J Appl Physiol* 1983;55(5):1456-9.
 44. Wispé JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman RB, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 1990;86:1954-60.
 45. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88:1976-81.
 46. Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New Engl J Med* 1993;328:406-10.
 47. Qanbar R, Cheng S, Possmayer F, Schürch S. Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability. *Am J Physiol* 1996;271 (Lung Cell Mol Physiol 15):L572-L80.
 48. Pérez-Gil J, Nag K, Taneva S, Keough KM. Pulmonary surfactant protein SP-C causes packing rearrangements of dipalmitoylphosphatidylcholine in spread monolayers. *Biophys J* 1992;63:197-204.
 49. Häfner D, Beume R, Kilian U, Krasznai G, Lachmann B. Dose dependent comparisons of five lung surfactant factor(LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome(ARDS). *Br J Pharmacol* 1995;116:451-8.
 50. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982;144:124-30.
 51. Weinberg PF, Matthay MA, Webster RO, Roskos KV, Goldstein IM, Murray JF. Biologically active products of complement and acute lung injury in patients with the sepsis syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:791-6.
 52. Meyrick B, Miller J, Reid L : Pulmonary edema induced by ANTU or by high or low oxygen concentrations in rat-An electron microscopic study. *Brit J Exp Pathol* 1972;53:347-58.
 53. Hollinger MA, Giri SN. ¹⁴C-thiourea binding in the rat lung. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;26(3):609-12.