

## 내독소로 유도된 급성 폐 손상에서 게르마늄의 투여로 인한 호중구 세포사의 증가

조 현 국  
경운대학교 안경광학과

### Germanium Increases Alveolar Macrophage Engulfment of Apoptotic Neutrophils in Acute Lung Injury Induced by Endotoxin

Hyun Gug Cho

Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Kyungbuk 730-739, Korea

(Received November 25, 2005; Accepted December 20, 2005)

#### ABSTRACT

Neutrophils that influx into the alveolar spaces from circulatory bloods play an important role in pathogenesis of acute lung injury. During the acute inflammatory phase, in order to investigate the acceleration of macrophage phagocytosis to the neutrophils is able to reduce the neutrophil derived acute lung injury, endotoxemia was induced by insufflation of lipopolysaccharide intratracheally and organic germanium was injected intraperitoneally after endotoxin treatment.

At 5 h after endotoxin treatment, lung weight and BAL protein concentration are significantly increased ( $p < 0.001$ ) compared to sham, and that was remarkably decreased ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) by injection of germanium. In addition germanium treatment resulted to decreased the number of alveolar PMNs and to increase the percentage of engulfed neutrophils by alveolar macrophages.

These observations indicate that organic germanium may have a role of reduction to neutrophil derived acute lung injury in endotoxemia.

**Key words** : Acute lung injury, Germanium, Macrophage engulfment

#### 서 론

급성염증 과정에서 순환계로부터 유입된 호중구는 기능을 다한 후에 신속히 세포사(apoptosis) 과정을 거치게 되고, 이 때 유리되는 elastase, myeloperoxidase

와 같은 효소들은 조직손상의 원인이 된다. 따라서 급성염증이 화해되기 위해서는 세포사한 호중구를 제거하는 것이 그 첫 번째 단계라고 볼 수 있다(Savill et al., 1989, 1992; Cox et al., 1995; Tsuyuki et al., 1995). 특히 급성 폐 손상의 환자로부터 수거한 폐 세척액 내 호중구의 세포사 비율이 감소되고(Matute-Bello et

\* Correspondence should be addressed to Dr. Hyun Gug Cho, Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Kyungbuk, 730-739 Korea. Ph.: (054) 479-1333, FAX: (054) 479-1333, E-mail: hgcho@ukw.ac.kr

al., 2000), 내독소증으로 유도된 폐 손상의 경우에도 호중구의 세포사 비율은 감소된다고 하여 (Parsey et al., 1999), 호중구 세포사의 조절호르몬은 급성 폐 손상의 개시인자로 작용할 수 있음을 말해 주고 있다 (Dunican et al., 2000). Kupfner et al. (2001)은 내독소증을 유발한 경우 폐 내 호중구들은 항세포사 매개물질을 발현시켜 세포사를 감소시킨다고 하였으며, 이러한 물질들의 발현을 억제함으로써 세포사를 증가시킬 수 있다고 하였다. 이러한 세포사 호중구의 제거는 거의 대부분 대식세포의 탐식작용에 의해 이루어지게 되는데 (Newman et al., 1982; Savill et al., 1992), Morimoto et al. (2001)은 박테리아로 유도된 폐렴의 경우 폐포강 대식세포가 세포사 호중구를 탐식함으로써 손상을 호흡상피의 수복은 물론 염증반응에 있어서 핵심적인 역할을 할 것이라고 하였다.

이러한 배경으로부터 본 연구에서는 내독소로 유도된 급성 폐 손상에서 나타나는 폐포강 대식세포에 의한 호중구 탐식작용의 변화가 폐 손상의 진행과 어떠한 연관성이 있는가를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 내독소 및 게르마늄의 투여

동물은 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터(Korea)로부터 구입한 후 2주일간 적응사육시킨 후 250~270g의 외견상 건강한 동물들을 실험에 사용하였다. 동물은 isoflurane으로 흡입마취시킨 다음 lipopolysaccharide (Sigma, USA) 0.5 mg을 0.5 mL 식염수와 혼합하여 기관지 내로 분무하였다. 그리고 정상군은 내독소와 동량의 식염수만을 분무하였다. 게르마늄 (Bis-carboxyethyl-germanium sesquioxide, Weinstein Chemical, USA)은 내독소 투여 1시간 후 체중 100 g 당 3 mg을 복강주사하였다.

### 2. 폐 무게 측정 및 폐 세척액 내 단백질 함량 측정

내독소 투여 5시간 후 양쪽 폐를 잘라 무게를 측정하고 체중 당 비율을 계산하였다. 단백질 함량측정은 기관지를 통해 8.0 mL의 생리식염수를 주입하여 세척

하고 6.0 mL의 폐 세척액을 얻은 다음, 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포성분을 제거한 상층액을 이용하여 단백질 함량을 측정하였다 (Brown et al., 1989).

### 3. 폐 조직 내 myeloperoxidase (MPO) 활성 측정

내독소 투여 5시간 후 폐를 적출하여 4 mL phosphate buffer (20 mM, pH 7.4)를 가하여 균등마쇄하고 원심분리 (4°C, 30,000×g, 30 min)하였다. Pellet을 채취하여 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide가 포함된 4 mL phosphate buffer (50 mM, pH 6.0)에 재현탁시키고 90초간 초음파 분쇄한 다음, 60°C에서 120분간 방치시켰다. MPO 활성은 *o*-diazidine을 사용하여 chromogenic substrate와 hydrogen peroxide가 반응을 일으킨 양을 460 nm에서 흡광도를 측정하고 그 측정값의 비율로 표시하였다.

### 4. 폐 세척액 내 호중구의 산정

폐 세척액의 원심분리에서 얻은 pellet을 1 mL의 생리식염수로 재현탁시킨 다음 200 μL를 취하여 Wright 염색하고 총 백혈구 수를 산정하였다. 그리고 호중구의 구성비율을 이용하여 호중구의 수를 추정하였다.

### 5. 폐포강 대식세포가 탐식한 호중구의 비율산정과 미세구조의 관찰

폐 세척액의 원심분리에서 얻은 pellet을 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 이중고정시킨 다음 알코올의 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시켰다. 탈수가 끝난 후 epoxy resin에 포매하여 열중합시킨 다음, 60~70 nm 두께로 박절하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하여 투과전자현미경 (H-600, Japan)으로 관찰하였다. 고정에서부터 포매까지의 전 과정은 원심분리 하에 실시하였다. 그리고 탐식된 호중구의 비율은 각 블록 당 1 μm 간격으로 초박절편하여 5개씩 150 mesh grid에 부착시키고, 1개의 grid 내에 10개의 lattice를 무작위 선택하여 총 50개의 lattice에서 동정된 탐식 호중구를 관찰된 전체 호중구에 대한 비율로 표시하였다.

6. 통계처리

실험에서 얻어진 모든 성적은 SPSS WIN 통계 프로그램을 이용하여 95% 신뢰구간으로 하는 일원배치 분산분석을 실시하였다.

결 과

1. 폐 손상의 변화

폐 손상의 변화를 알아보기 위해 내독소 투여 5시간 후의 체중 당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질의 함량을 측정하였다(Fig. 1). 체중 당 폐 무게는 내독소

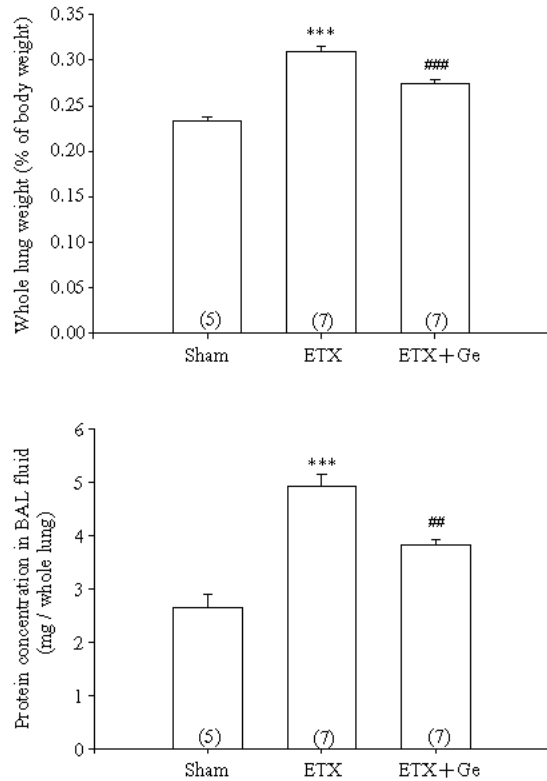


Fig. 1. Changes of lung weight and protein concentration in BAL fluid at 5 h after endotoxemia. The bar is expressed mean ± S.E. The numbers of determinations are in the parentheses. ETX : lipopolysaccharide insufflation. Ge : germanium injection. \*\*\*p < 0.001 : significantly different from sham. ###p < 0.001, \*\*p < 0.01 : significantly different from ETX

투여 5시간 후 정상군과 비교하여 유의하게 증가되었으며 (p < 0.001), 게르마늄을 병행 투여한 경우 내독소군과 비교하여 볼 때 폐 무게는 뚜렷하게 감소되었다 (p < 0.001). 이와 함께 폐 세척액 내 단백질의 함량을 비교한 결과 내독소 투여 5시간 후 정상군과 비교하여 단백질 함량은 약 1.9배 증가되었고 (p < 0.001), 게르마늄 병행투여군은 내독소군과 비교하여 유의하게 감소되었다 (p < 0.01).

2. 폐 세척액 내 호중구의 수적 변화와 폐 조직 내 MPO의 활성 변화

폐 손상의 변화에 따른 폐 세척액 내 유입된 호중

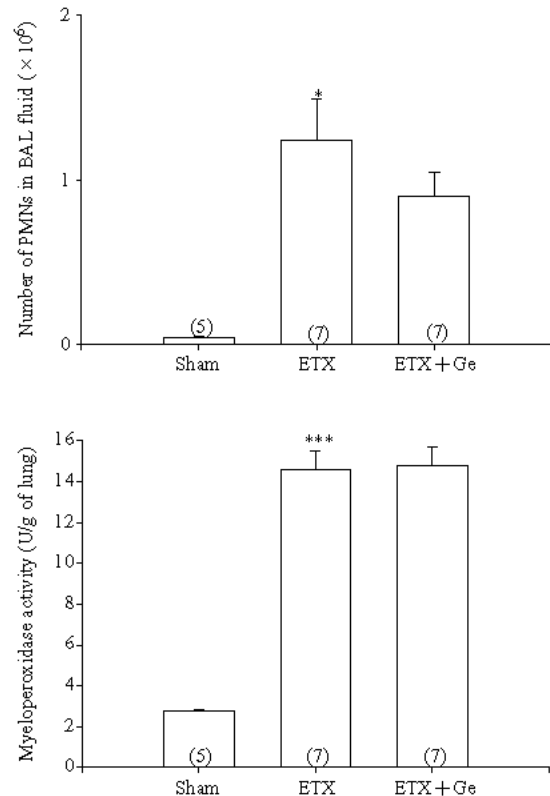
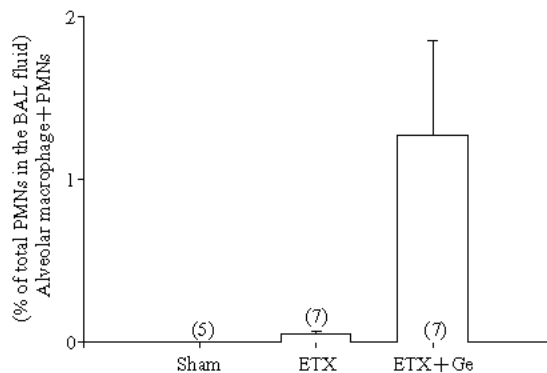


Fig. 2. Changes of PMNs number in BAL fluid and MPO activity in lung tissue at 5 h after endotoxemia. The bar is expressed mean ± S.E. The numbers of determinations are in the parentheses. ETX : lipopolysaccharide insufflation. Ge : germanium injection. \*\*\*p < 0.001, \*p < 0.05 : significantly different from sham.

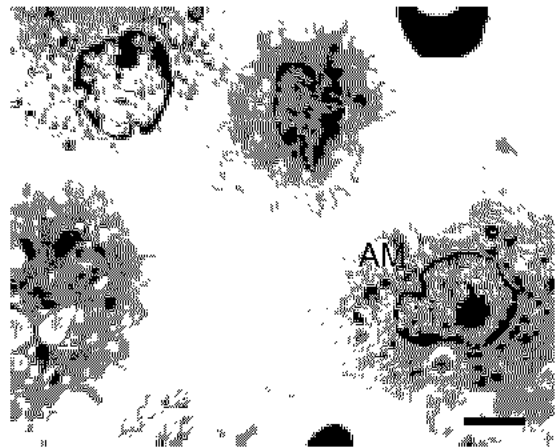
구의 수적 변화와 폐 조직 내 MPO의 활성 변동을 측정 한 결과(Fig. 2), 내독소 투여로 폐포강 내 호중구의 유입은 유의하게 증가되었고( $p < 0.05$ ), 게르마늄의 병행투여는 호중구의 수를 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 MPO의 활성 변동에 있어서는 내독소군이 정상군과 비교하여 그 활성이 현저히 증가되었으나( $p < 0.001$ ), 호중구의 수적 변화와는 달리 게르마늄 병행 투여군의 MPO 활성은 내독소군보다 오히려 약간 높게 나타났다.

### 3. 탐식된 호중구의 비율과 폐포강 내 세포들의 미세구조 변화

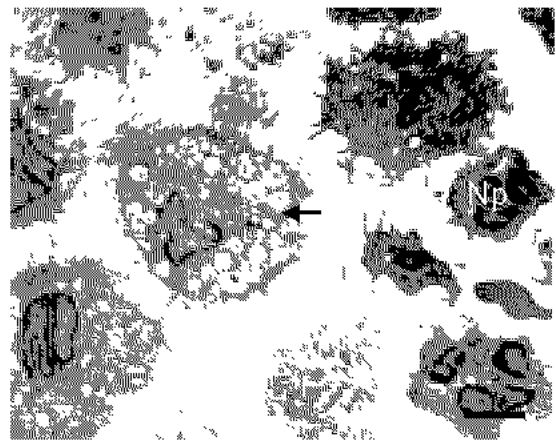
폐 세척액 내에서 발견되는 전체 호중구 중 폐포강 대식세포에 탐식된 호중구의 비율을 산정해 본 결과(Fig. 3), 내독소 투여군에서 대식세포에 탐식된 호중구들은 약 0.05% 정도에 불과하였으나, 게르마늄 병행 투여군에서는 약 1.27% 정도까지 상승하는 것으로 계산되었다. 폐포강 내 세포들을 관찰한 결과, 정상군에서는 폐포강 대식세포의 세포구조는 내독소군과 게르마늄 병행투여군과 비교하여 볼 때 탐식작용은 상대적으로 활발하지 않은 모습이었고, 호중구는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4). 내독소 투여군은 폐포강 대식세포의 세포질 내에는 다양한 탐식 소화물들을 포함하고 있었으나, 폐포강 내 흔히 관찰되는 호중구의 탐



**Fig. 3.** Changes of percentage of engulfed neutrophil by alveolar macrophages in BAL fluid at 5 h after endotoxemia. The bar is expressed mean  $\pm$  S.E. The numbers of determinations are in the parentheses. ETX : lipopolysaccharide insufflation. Ge : germanium injection

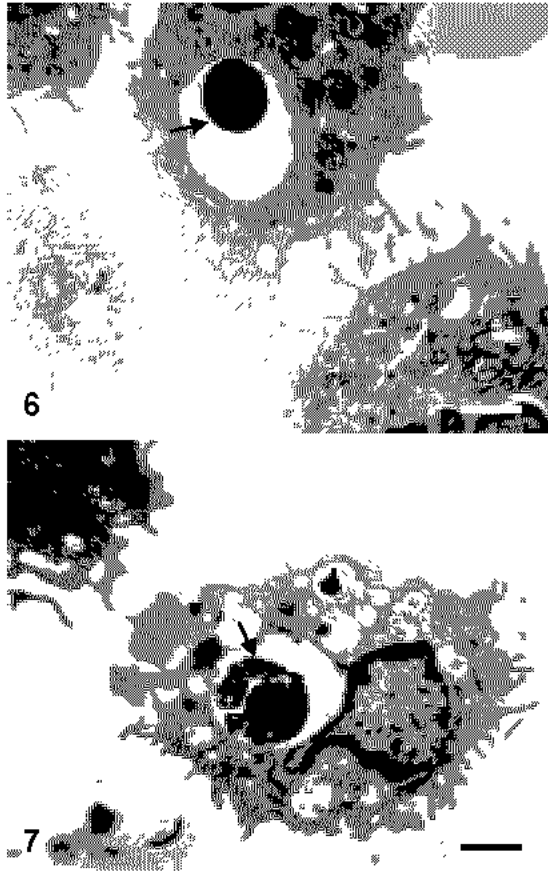


**Fig. 4.** Ultrastructure of BAL pellet in sham, uranyl acetate and lead citrate, scale = 2.8  $\mu$ m. Alveolar macrophages (AM) phagocytosed a various debris.



**Fig. 5.** Ultrastructure of BAL pellet in ETX, uranyl acetate and lead citrate, scale = 3.3  $\mu$ m. Alveolar macrophages are activated and a lot of phagocytic vesicles (arrow) are found in their cytoplasm. But macrophage engulfment of neutrophils (Np) is rarely found.

식작용은 드물게 관찰되었다(Fig. 5). 게르마늄 병행투여군에서는 호중구를 탐식한 폐포강 대식세포들이 수적으로 증가되었고, 탐식된 호중구들은 대부분 핵이 응축된 모습으로 관찰되었다(Figs. 6, 7).



**Figs. 6, 7.** Ultrastructure of BAL pellet in ETX+Ge, uranyl acetate and lead citrate, scale = 1.6  $\mu$ m. Apoptotic neutrophils showing a nuclear condensation (arrows) are engulfed by alveolar macrophages.

**고 찰**

내독소에 의한 급성 폐 손상은 호중구에서 유리되는 단백분해효소에 의한 혈관내피세포의 손상 때문이라고 하였다(Delclaux et al., 1997). 급성 폐 손상의 심화는 호중구의 침윤이 중요한 요소라고 알려져 있으나 단순한 호중구의 침윤만으로는 조직의 손상이 유발되지 않고 호중구 막의 NADPH oxidase의 활성화가 선행되어야 한다. 이전 연구에서(Lee et al., 1997, 1999) interleukin-1과 gut ischemia reperfusion으로 유도된 급성 폐 손상 실험에서 호중구에 의한 산화적

손상이 염증과정에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 폐포강 대식세포가 조직 내로 유입된 호중구를 제거함으로써 급성 폐 손상의 과정에 변화를 줄 수 있는지에 대해서 검토하였다.

내독소 투여 5시간 후 폐포강 내 체중 당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질의 함량이 증가되어 폐 손상이 유도되었음을 알 수 있었으며, 이와 비례적으로 폐포강 내에서 발견되는 호중구의 수가 증가됨으로 보아 내독소 유도 폐 손상이 호중구의 유입과 매우 밀접한 관련성이 있는 것으로 추정되었다.

유기 게르마늄은 그 작용기전은 정확히 밝혀져 있지 않으나, 대식세포의 활성화를 촉진시키고(Aso et al., 1985; Suzuki et al., 1986), 항염증작용이 있다는 선행보고들(Sasaki et al., 1984; DiMartino, 1986)을 근거로 내독소 투여 1시간 후 복강으로 병행 투여하였다. 그 결과 체중 당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질의 함량은 모두 감소되어 게르마늄이 폐 손상을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 폐포강 내 호중구의 수도 내독소 투여군과 비교하여 다소 감소하는 것으로 나타났다고, 폐포강 내 대식세포에 의해 탐식된 호중구를 전체 호중구에 대한 비율로 계산해 보았을 때 게르마늄 병행 투여군이 내독소 투여군보다 현저히 높게 나타나 폐포강 대식세포의 탐식기능 증가가 폐 손상을 감소시키는 요인으로 작용한 것으로 추측되었다. 그러나 MPO 활성변화는 오히려 내독소 투여군보다 게르마늄 병행군이 약간 높게 나타났는데 이것은 대식세포로부터 유리된 MPO 활성증가(Sugiyama et al., 2001) 때문으로 생각된다. 그리고 폐포강 내 세포들의 미세구조를 관찰한 결과, 내독소 투여군에서는 대식세포의 수적 증가와 함께 탐식기능이 증가된 형태였지만 호중구를 탐식한 모습은 매우 적었고, 상대적으로 게르마늄 병행 투여군에서는 호중구를 탐식한 형태의 대식세포들이 증가되어 위의 사실들을 뒷받침해 주었다.

Cox et al.(1994)은 내독소로 유도된 폐 손상에서 대식세포의 호중구 탐식작용이 염증의 화해에 매우 중요한 역할을 담당한다고 하였는데, 내독소 투여 18시간 후에 폐포강 내 호중구의 수는 최대에 이르며, 24시간 후에 탐식 대식세포들의 비율이 1%를 상회하며

최대에 이른다고 하였다. Kupfner et al. (2001)은 내독소 투여 4시간 후에 호중구의 세포사가 최저에 이른다고 하였으며, 저자의 이전 연구들에서 (Lee et al., 2002, 1997) interleukin-1, platelet activating factor로 유도된 급성 폐 손상에서 호중구에 의한 산화적 손상은 투여 5시간 후가 최대에 이르는 것으로 나타났다. 본 연구결과에서 나타난 내독소 투여 후 5시간 후에 나타난 탐식 호중구의 비율이 이미 약 1.27%에 이른 것은 대식세포에 의한 탐식작용의 증가가 호중구 유도 폐 손상을 감소시켰을 가능성을 제시해 주는 것이라 볼 수 있다.

이러한 결과로 볼 때, 유기 게르마늄은 폐포강 대식세포의 호중구 탐식능력을 증가시켜 호중구의 산화적 손상에 의한 급성 폐 손상을 감소시키는 효과가 있는 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

- Aso H, Suzuki F, Yamaguchi T, Hayashi Y, Ebina T, Ishida N: Induction of interferone and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge 132, and organic germanium compound. *Microbiol Immunol* 29(1) : 65-74, 1985.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ: Protein measurement using bicinoninic acid: elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 102 : 1152-1160, 1989.
- Cox GJ, Crossley J, Xing Z: Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 : 232, 1995.
- 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 rat. *Am J Physiol* 273 : 104-112, 1997.
- DiMartino MJ: Antiarthritic and immunoregulatory activity of aprotogermanium. *J Pharmacol Exp Ther* 236(1) : 103-110, 1986.
- Duncan AL, Leuenroth SJ, Grutkoski P, Ayala A, Simms HH: TNF $\alpha$  induced suppression of PMN apoptosis is mediated through interleukin 8 production. *Shock* 14(3) : 284-289, 2000.
- Kupfner JG, Arcaroli JJ, Yum HK, Nadler SG, Yang KY, Abraham E: Role of NF- $\kappa$ B in endotoxemia induced alteration of lung neutrophil apoptosis. *J Immunol* 167(12) : 7044-7051, 2001.
- Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Repine JE: Platelet activating factor induces lung inflammation and leak in rats: hydrogen peroxide production along neutrophil lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med* 140 : 312-319, 2002.
- 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, Kim T, Cho HG, Lee YJ, Repine JE: Effect of the inhibition of phospholipase A2 in generation of free radicals in intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury. *Kor J Physiol Pharmacol* 3 : 263-273, 1999. (Korean)
- Matute Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR: Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony stimulating factor and granulocyte/macrophage colony stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28; 1, 2000.
- Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senda M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Nakatake T: Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24(5) : 608-615, 2001.
- Newman SL, Henson JE, Henson PM: Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med* 156 : 430, 1982.
- Parsey MV, Kaneko D, Shenkar R, Abraham E: Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1 $\beta$ . *Clin Immunol* 91 : 219, 1999.
- Sasaki K, Ishikawa M, Morima K, Takanayaki G: Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge 132) on the acute inflammation and CCl $_4$  induced hepatic damage in mice. *Pharmacometrics* 27(6) : 1119-1131, 1984.
- Savill JS, Smith J, Ren Y, Sarraf C, Abbott F, Rees AJ: Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int* 42 :

924, 1992.

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport ME, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83 : 865, 1989.

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P: Macrophage myeloperoxidase regulation by glanulocyte macrophage colony stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 158(3) : 879-891, 2001.

Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB: Cooperation of lymphokine (s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium (Ge 132). *Antitumor Res* 62(2) : 177-182, 1986.

Tsuyuki S, Bertrand C, Erard F, Trifilieff A, Tsuyuki J, Wesp M, Anderson GP, Coyle AJ: Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J Clin Invest* 96 : 2924, 1995.

### < 국문초록 >

호중구는 다양한 원인에 의해서 발생하는 급성 폐 손상의 발병기전에 중요한 역할을 담당한다. 폐 손상 시 순환계로부터 유입된 호중구들에 대한 폐포강 대식세포의 탐식작용이 증가될 경우 손상기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 내독소를 흰쥐의 기관지 내로 분무하고 유기 게르마늄을 복강으로 투여하였다.

실험 결과 내독소 투여 5시간 후 체중당 폐 무게와 폐 세척액 내 단백질 함량은 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 증가되었으나, 게르마늄 병행 투여로 폐 무게와 단백질 함량은 현저하게 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 감소되었다. 내독소 투여군은 폐 손상과 함께 폐포강 내 호중구는 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 증가되었으나, 게르마늄의 투여로 감소되었고 폐포강 내 탐식된 호중구의 비율은 증가되었다.

이와 같은 결과들을 볼 때, 유기 게르마늄은 내독소증에 의한 급성 폐 손상에서 폐포강 대식세포들의 호중구 탐식작용을 증가시켜 폐 손상을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.