

# 만성폐쇄성폐질환의 급성악화와 회복기에서 유도객담 내 Nuclear Factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 활성도와 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

송소향, 김치홍, 권순석, 김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학

## Nuclear Factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) Activity and Levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ in Induced Sputum in the Exacerbation and Recovery of COPD Patients

So Hyang Song, M.D., Chi Hong Kim, M.D., Soon Seog Kwon, M.D., Young Kyoon Kim, M.D., Kwan Hyung Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background :** Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are thought to be associated with increased airway inflammation, and the NF- $\kappa$ B is known to be an indicator of cellular activation and of inflammatory mediator production. This study was undertaken to investigate the change of cytokine characteristics and NF- $\kappa$ B activity in induced sputum of COPD patients during exacerbation and recovery of the disease.

**Methods :** Sputum induction was performed in 37 patients with COPD during exacerbation and during recovery and in 15 healthy subjects. Cell counts, levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  in induced sputum and NF- $\kappa$ B activity in macrophage of induced sputum were measured.

**Results :** Patients with COPD showed significantly increased levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ( $p<0.01$ ) and increased NF- $\kappa$ B activity in induced sputum( $p<0.05$ ) as compared with control subjects. Level of IL-8 during exacerbation of COPD decreased significantly during recovery( $p<0.05$ ). NF- $\kappa$ B activity and levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  tended to be decreased during recovery, but not significantly.

**Conclusion :** Activation of NF- $\kappa$ B and increased levels of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  were thought to be associated with pathogenesis and exacerbations of COPD. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 58:152-159)

**Key words :** COPD, exacerbation, NF- $\kappa$ B, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$

## 서 론

만성폐쇄성폐질환(COPD)은 여러 가지 치료에도 불구하고 완전히 회복되지 않는 점진적인 기도폐쇄를 특징으로 하는 질환이다. 최근 기도의 만성염증이 기관지천식의 증상 발현에 결정적인 역할을 한다는 것이 밝혀지면서 흡입용 스테로이드제를 중심으로 한 항염증치료가 기관지천식의 일차적 치료로 각광을 받고 있지만, 같은 폐쇄성 환기장애를 특징으로 하는

COPD에 있어서의 항염증치료의 효과에 대해서는 부정적인 결과가 많다. 그러므로 흡입용 스테로이드를 비롯한 항염증치료가 COPD의 치료에서 차지하는 역할은 기관지천식에서처럼 뚜렷하지는 않은 실정이다. 그러나 COPD의 급성악화 시 스테로이드의 투여가 대조군에 비해 의미 있는 효과를 보였다는 임상연구결과들은 COPD의 급성악화 시에는 기도에 발생하는 만성염증이 이 질환의 악화를 가져오는 중요한 인자임을 추측케 한다. 그러므로 이러한 염증반응의 기전을 규명하는 것이 이 질환의 급성악화시의 치료뿐만 아니라 이 질환 자체를 겨냥한 새로운 치료법의 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

만성염증성질환의 병태생리는 복잡다단하지만 각종 염증을 매개하는 물질을 합성하도록 유도하는 전사인자(transcription factor)의 활성이 필수적이다. 여러 가지 전사인자 중에서 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)는 급성 폐손상, 급성호흡곤란증후군, 기관지

본 연구는 2002년 성빈센트병원 임상의학연구소 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence : **Chi Hong Kim, M.D.**

Department of Internal Medicine, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea 93 Chi-dong, Paldal-ku, Suwon, 442-723, Korea  
Phone : 031-249-7361 Fax : 031-253-8898  
E-mail : chihongk@yahoo.co.kr

Received : Nov. 29, 2004

Accepted : Feb. 1, 2005

천식, 바이러스성 호흡기감염 등에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>. NF- $\kappa$ B는 다양한 종류의 유전자 발현을 조절하는 것으로 밝혀졌고, 그들 중 많은 수가 면역 혹은 염증반응에 관련되어 있다<sup>2</sup>. 이들 유전자들이 NF- $\kappa$ B에 의해서만 조절되는 것은 아니지만 NF- $\kappa$ B는 대표적인 다른 전사인자인 activator protein-1 (AP-1) 등과 함께 이들 유전자 발현에 주도적인 역할을 한다. NF- $\kappa$ B에 의해 발현이 조절되는 단백질에는 TNF- $\alpha$ , IL-1 등의 염증성 cytokine, IL-8, MIP-1 $\alpha$  등의 chemokine, ICAM-1, E-selectin 등의 세포유착분자, 유도 NO 합성효소 (iNOS)와 유도 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증 매개인자 합성효소가 포함되므로 NF- $\kappa$ B가 염증반응을 지휘하는 총사령관의 역할을 함을 짐작할 수 있다<sup>2</sup>.

한편 COPD에서의 염증은 기관지천식에서와는 다른 염증세포, 염증매개물질이 작용하기 때문에 항염증치료에 대한 반응도 미미한 것으로 보고 되고 있다<sup>3</sup>. 그러나 COPD의 급성악화시 스테로이드의 투여가 임상적인 호전을 보였다는 보고가 있어<sup>4,5</sup>, COPD의 치료에서 스테로이드가 갖는 의미에 대한 새로운 조명이 이루어지고 있다. 스테로이드의 강력한 항염증 작용은 복잡다단한 경로를 통해 이루어지는데, 그 중에서도 NF- $\kappa$ B의 활성을 방해하여 이루어지는 경로가 가장 중요한 것으로 알려져 있다<sup>2</sup>. 그러므로 스테로이드가 임상적인 유용성을 나타내는 급성악화기의 COPD는 안정된 상태와는 다른 병태생리를 보일 것으로 생각되고, 특히 만성 염증반응의 총사령관적인 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 역할을 하리라는 추측을 해 볼 수 있다. 그러므로 연구자들은 실제로 이러한 변화가 COPD의 악화 시 발생하는지를 알아봄으로써 COPD의 복잡한 병태생리 규명에 접근하고자 하였다.

COPD의 급성악화의 원인은 세균에 의한 감염, 바이러스성 상기도 감염, 대기오염, 기후변화 등에 의하며<sup>6,7</sup>, COPD의 급성악화 시에는 객담 내 호중구의 증가 및 IL-6와 IL-8 농도의 증가를 보이고 기도염증을 반영하는 지표인 oxidative stress의 marker와 호기 중산화질소(nitric oxide)의 증가를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>8</sup>. 그 외에 COPD 환자의 기도에서 일어난 염증과정에 관련이 있는 cytokine들은 IL-1, monocyte

chemoattractant protein(MCP)-1, TNF- $\alpha$ , endothelin-1, intracellular adhesion molecule(ICAM)-1 등이 있고, 이 cytokine 유전자들은 NF- $\kappa$ B에 의해 조절된다고 한다<sup>2,9,10</sup>. 이러한 모든 염증관련 지표들은 NF- $\kappa$ B의 활성화와 관련된 것으로 알려져 있으므로 NF- $\kappa$ B 활성화의 억제자가 결국 COPD의 악화를 막을 수 있는 근본적인 방법이 될 가능성이 높다.

COPD 환자의 기관지 조직검사에서 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65의 표현이 증가되었다는 보고<sup>11</sup>와, COPD의 급성악화시에 유도객담의 대식세포에서 p65 면역염색으로 NF- $\kappa$ B활성도가 증가되었다는 보고<sup>12</sup>는 이를 뒷받침한다.

이에 본 연구자들은 정상대조군과 COPD의 악화로 입원하였던 환자들을 대상으로 급성악화기 및 회복기에 유도객담에서 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 활성화 정도를 측정함으로써 COPD의 급성악화와 회복기에서 NF- $\kappa$ B의 활성화도와 이들 cytokine의 변화에 대하여 연구하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2003년 3월부터 2004년 5월까지 COPD의 악화로 가톨릭대학교 성빈센트병원 호흡기내과에 입원하여 치료하였던 환자 37명을 대상으로 하였고, 대조군으로는 정상 성인 15명을 대상으로 하였으며, 이들은 모두 유도객담 채취와 본 연구에 동의하였다. 만성폐쇄성폐질환의 진단은 미국흉부학회의 진단기준<sup>13</sup>에 따라 폐활량측정법을 이용하여(Sensormedics, Vmax2200, YobaLinda, California), 일초간 노력성호기량(forced expiratory volume at 1 second, FEV1)이 예측치의 80%미만이고, 노력성폐활량(forced vital capacity, FVC)에 대한 일초간 노력성호기량의 비(FEV1/FVC)가 70%미만인 환자로 하였다.

COPD의 심한 급성 악화는 COPD로 치료 받던 환자 중 증상의 악화로 일상활동(평지에서 걷기, 옷 입기, 먹기)에 제한이 될 정도의 호흡곤란이 있거나, 밤에 수면장애가 있을 정도의 호흡곤란을 보이거나 호흡부전의 소견을 나타낼 경우( $\text{PaO}_2 < 45 \text{ mmHg}$  또는

PaCO<sub>2</sub> > 45 mmHg) 등으로 하였다. 기관지천식의 과거력이나 가족력이 있는 경우, 아토피나 알러지 질환이 있는 경우, 호산구 증가증이 있거나, 연구시점에서 1개월 이내에 15 mg 이상의 prednisolone을 투여했던 경우는 제외하였다. 정상대조군은 기침, 객담, 호흡곤란 등의 증세가 없고, 천식의 과거력이나 가족력이 없고, 아토피나 알러지 질환의 병력이 없고, 호산구 증가증이 없는 환자를 대상으로 하였다.

## 2. 연구방법

COPD 환자 및 정상대조군 환자에서 흡연력 및 병력청취, 흉부 X-선, 말초혈액검사, 동맥혈가스검사, 객담배양검사, 폐기능 검사 등을 시행하였고, 유도객담을 채취하였다. COPD 환자들은 FEV1이 낮아서 메타콜린 기관지유발검사를 시행하지 못하였고, 정상대조군에서는 메타콜린 기관지유발검사를 시행하지 않았다. COPD 급성악화의 치료로는 아미노필린을 정주하였고, methylprednisolone 125 mg을 하루에 4번씩 2-3일간 정주한 후 감량하여 경구용 prednisolone 또는 흡입용 스테로이드제로 유지하였다. 필요할 경우 다른 기관지확장제 및 항생제 등을 병용투여하였다. 입원 당시(급성악화시) 및 치료 후 회복된 상태에서 유도객담을 채취하였고, 정상대조군에서도 유도객담을 채취하였다.

## 3. 객담유도 및 처리과정

연무기를 사용하여 3% 생리식염수를 7분씩 흡입시킨 후 객담배출을 30초간 3회 반복 시도하였고, 객담이 나오지 않으면 4%, 5% 생리식염수흡입을 각각 차례로 반복 실행하였다. 3%, 4%, 5% 생리식염수 흡입이 각각 다 끝나기 전이라도 충분한 양(2.0 g 이상)의 객담이 얻어진 경우에는 흡입을 중지하였다. Pizzichini 등<sup>14</sup>의 방법에 따라 배양접시에 받은 유도객담을 타액과 선별하여 15 ml falcon tube에 옮긴 후 무게를 측정하였다. 객담 4배량의 0.1% dithiotreitol 희석액(DTT, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 혼합하고 37 °C 수조에서 30분간 배양하였고 각 10분마다

vortex로 혼합시켜 주었다. 여기에 객담량과 동량의 Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS, pH 7.0, 10.6 g/L, GYBCOBR, NY, USA)을 혼합하여 DTT의 작용을 중지시키고, 37°C 수조에서 5분간 배양하였다. 배양후 48  $\mu$ m 나일론 거즈로 여과하고 원심 분리(1500 rpm, 10 분)하여 얻은 상층액을 -70°C에서 보관하였다. 세포침전물은 200-600  $\mu$ l의 PBS에 부유시켜 cytocentrifuge(700 rpm, 5분)하여 슬라이드를 만든 후 Diff-Quik으로 염색하고 100배 시야에서 세포를 세어서 폐포 대식세포, 호산구, 림프구, 호중구를 감별 계산하였다. 세포침전물을 RPMI 1640 배지(2 mM L-glutamine, penicillin, streptomycin, neomycin)에 부유시켜서 plastic culture dishes(직경 35 mm well에 2mL씩)에 넣어서 37°C에서 2시간동안 plastic dishes에 붙도록 하였다. plastic dishes에 붙지 않은 세포들은 RPMI로 세척해내고, 붙었던 세포를 모았는데, 이들 세포의 95%이상이 폐포 대식세포였다.

## 4. 유도객담에서 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 의 측정

-70°C에서 보관하였던 유도객담 상층액에서 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 의 농도는 ELISA kits(Quantikine; R & D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정하였다.

## 5. 핵추출물의 준비

유도객담에서 모은 대식세포의 핵 추출물의 분리는 Carter 등<sup>15</sup>에 의한 방법으로 시행하였다. 대식세포는 찬 PBS로 세척한 뒤 냉각시킨 100  $\mu$ l EMSA(electrophoretic mobility shift assay) 완충액에 10분간 넣어 두었다. EMSA 분해완충액의 조성은 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF 및 단백분해억제제(protease inhibitor) 등이었다. Nonidet P-40 (NP-40, 10%)은 세포를 분해하기 위해 첨가하였고, 5분간 얼음위에서 반응시켜 세포질을 추출하였다. 2500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액(세포질추출물)을 모아서 즉시 얼려두었다. 남은 핵 내용물을 핵 추출 완충액에 10분간 얼음위에서 반응시켰다. 핵 추출 완충액은 20

nM Hepes pH 7.9, 0.4 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF와 단백분해억제제로 구성되었다. 14000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상층액(핵 추출물)을 모아서 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법(BioRad)으로 측정하였다.

## 6. Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)

EMSA는 Promega(Madison, WI) gel shift assay에 의해서 시행되었다. NF- $\kappa$ B consensus oligonucleotide (5'AGTTGA GGGGACTTTCAGGC3') 1 $\mu$ l, kinase buffer 1 $\mu$ l, [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP 1  $\mu$ l, T4 polynucleotide kinase 1 $\mu$ l 등을 실온에서 30분간 반응시켰고, 이 반응은 0.5 M EDTA 1  $\mu$ l에 의해 정지되었고, chromaspin columns (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)를 통한 chromatograph에 의해 labeled oligonucleotide를 분리하였다.

추출된 핵단백 5  $\mu$ g, 2  $\mu$ l poly dI-dC oligonucleotide, P32 labeled consensus oligonucleotide(30000 cpm), 4  $\mu$ l gel shift buffer를 포함한 총 20  $\mu$ l를 30분간 실온에서 반응시킨 후 6% TBE non-denaturing gel에서 160V에서 90분간 전기 영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리하여 autoradiograph로 결과를 얻었다.

## 7. 통계

모든 변수는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타났다. 각 변수간

의 통계적 검정은 SPSS 프로그램을 이용하였으며, 각 집단간의 평균비교는 independent sample T-test 및 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 하였고, p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 대상환자의 특징

COPD 환자 37명중 남자 27명, 여자 10명이었고, 정상 성인 15명중에서 남자 9명, 여자 6명이었다. COPD 환자의 흡연력은 정상 성인의 흡연력에 비해 유의하게 높았다( $p<0.01$ ). COPD 환자에서 current smoker는 32%(12/37명)였고, 정상대조군에서는 40%(6/15 명)으로 양 군 간에 차이가 없었다. COPD 환자에서 노력성폐활량(FVC), 1초간노력성호기량(FEV1), FEV1/FVC 및 폐확산능(DLCO)등에서 정상대조군에 비해 유의하게( $p<0.01$ ) 감소된 소견을 보였다(Table 1). COPD 환자의 급성악화 시 혈중 백혈구수는 회복기에 비해 유의하게 증가되었고( $p<0.01$ ), 동맥혈 검사에서  $\text{PaO}_2$ 가 급성악화 시와 회복기에 차이가 없었다(Table 2).

### 2. 유도객담 내 총세포수 및 세포분획

유도객담 내 세포총수는 COPD 환자에서 대조군과 차이가 없었다. 대식세포는 COPD 환자에서 대조군에 비해 적었고( $p<0.01$ ), 호중구는 COPD 환자에서 대조

Table 1. Characteristics of COPD patients and healthy subjects

	COPD patients (n=37)	Healthy subjects (n=15)
Age (year)	67.2 $\pm$ 8.3*	55.6 $\pm$ 6.8
Male / Female	27/10	9/6
Smoking		
Current smoker	12	6
Ex-smoker	18	4
Non-smoker	7	5
Pack-years(n)	45 $\pm$ 28*	32.3 $\pm$ 13.2
FVC(% pred)	57 $\pm$ 18*	102.3 $\pm$ 14.3
FEV1 (% pred)	42 $\pm$ 19*	99.6 $\pm$ 15.2
FEV1 / FVC	52 $\pm$ 18*	92.2 $\pm$ 2.5

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $P<0.01$  significant difference between COPD patients and healthy subjects.

군에 비해 많았다( $p<0.01$ ). COPD 환자의 회복기 및 악화기에 총세포수, 호중구 및 대식세포는 회복기에 급성악화기에 비해 적었지만 유의하지 않았고, 호산구는 회복기에 급성악화기에 비해 유의하게( $p<0.05$ ) 감소되었다(Table 3).

### 3. 유도객담내의 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 의 양

유도객담내의 IL-6는 COPD 환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고( $p<0.01$ ), 회복기와 급성악화시 사이에 차이는 없었다. 유도객담 내 IL-8은 COPD

환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고( $p<0.01$ ), COPD의 회복기에는 급성악화 시에 비해 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ ). 유도객담 내의 TNF- $\alpha$ 는 COPD 환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고( $p<0.01$ ), COPD의 회복기 및 급성악화시 사이에 차이가 없었다(Table 4).

### 4. 유도객담 내 대식세포에서 NF- $\kappa$ B activity

유도객담내 대식세포에서의 NF- $\kappa$ B activity(optical density)는 COPD 환자에서 대조군에 비해 유의하게

Table 2. Laboratory findings of COPD patients

	exacerbation	Recovery
CBC : WBC (/mm <sup>3</sup> )	13,700 $\pm$ 5,700*	10,100 $\pm$ 3,070
ABGA		
pH	7.41 $\pm$ 0.07	7.43 $\pm$ 0.05
PaCO <sub>2</sub>	45.7 $\pm$ 13.9	46.9 $\pm$ 9.5
PaO <sub>2</sub>	63.2 $\pm$ 18.8	75.1 $\pm$ 17.2
HCO <sub>3</sub>	29.2 $\pm$ 9.8	32.5 $\pm$ 5.3

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $P<0.01$  significant difference between COPD patients with acute exacerbation and COPD patients with recovery state.

Table 3. Total and differential cell counts in induced sputum from COPD patients and healthy subjects.

	COPD patients (n=37)				Healthy subjects (n=15)	
	exacerbation		recovery			
Total cell, 10 <sup>6</sup> cells/ml	2.1	± 0.9	1.4	± 0.8	1.6	± 0.6
Macrophage (%)	16.7	± 13*	21.6	± 20.5*	67.5	± 24.7
Neutrophil (%)	80.1	± 22*	76.2	± 21.4*	30.7	± 25.6
Eosinophil (%)	1.4	± 1.2 <sup>†</sup>	0.2	± 0.1	0.6	± 0.8
Lymphocyte (%)	1.8	± 2.2	2.0	± 1.8	1.2	± 1.7

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $P<0.01$  significant difference vs healthy subjects.

<sup>†</sup>  $P<0.05$  significant difference vs COPD patients with acute exacerbation.

Table 4. Inflammatory mediators in induced sputum of patients with COPD patients and healthy subjects.

	COPD patients				Healthy subjects	
	Exacerbation		recovery			
IL-6, pg/ml	55.5	± 51.2*	45.6	± 40.2*	15.4	± 13.2
IL-8, pg/ml	956.5	± 749.8* <sup>†</sup>	560.9	± 479.7*	142.5	± 124.6
TNF-α, pg/ml	36.6	± 31.4*	32.9	± 29.2*	3.8	± 2.8

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $P<0.01$  significant difference vs healthy subjects.

<sup>†</sup>  $P<0.05$  significant difference between exacerbation and recovery state of COPD.

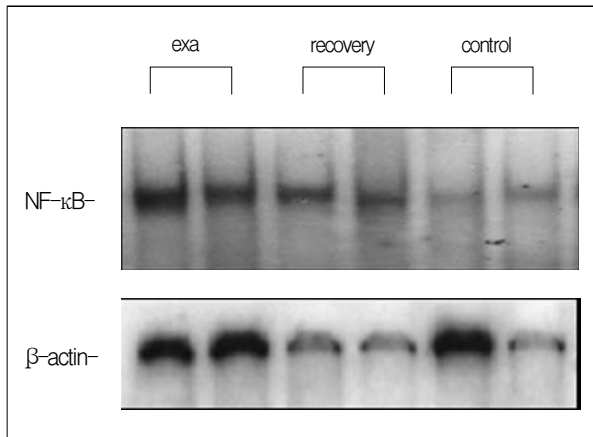


Figure 1. NF- $\kappa$ B expression by EMSA in induced sputum during exacerbation and recovery state of COPD patients and control (healthy subjects).  
exa: exacerbation of COPD

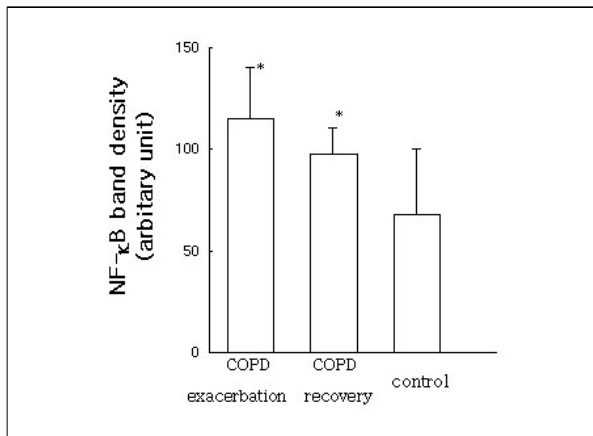


Figure 2. Activity of NF- $\kappa$ B in induced sputum in exacerbation and recovery state of COPD patients and healthy subjects.

\* $P < 0.05$  significant difference vs healthy control

증가되었고( $p < 0.05$ ), COPD의 회복기 및 급성악화시 사이에 차이는 없었다(Fig.1, Fig.2).

## 고 찰

본 연구에서 COPD 환자의 유도객담 내 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$  등은 정상대조군에 비해 증가되었고, COPD 환자의 유도객담 내 대식세포의 NF- $\kappa$ B의 활성도가 정상대조군에 비해 증가된 소견을 보였다. 회복기에는 유도객담 내의 IL-8이 악화 시에 비해 감소하였고, 유도객담 내 IL-6, TNF- $\alpha$  및 대식세포의

NF- $\kappa$ B의 활성도는 회복기에서 악화 시에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다.

COPD에서의 염증은 기도 내에 호중구, 림프구 및 대식세포 등의 침윤이 특징적이다<sup>16</sup>. 호중구는 조직 내의 염증 및 손상을 일으키는 elastase, metalloprotease, oxygen radical 등을 포함한 다수의 염증매개인자들을 분비하기 때문에 COPD의 기도염증의 병인에 중요한 역할을 한다<sup>17</sup>. COPD환자의 기도에 호중구의 침윤은 이런 세포에 화학주성을 가진 cytokine에 의하여, 이 cytokine 중에서 IL-8 및 TNF- $\alpha$ 가 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>18,19</sup>. COPD 환자의 기도에 IL-8 및 TNF- $\alpha$ 가 증가되어 있다는 보고가 있고<sup>20</sup>, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 가 COPD의 병인에 중요한 역할을 하며 폐기능 저하와 관련이 있다는 보고들<sup>21,22</sup>이 있는데, 이는 본 연구에서의 결과와 일치되는 소견이다.

COPD의 급성악화 시에는 유도객담 내의 IL-8이 회복기에 비해 증가되었고, 유도객담 내 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 회복기에 비해 약간 증가한 경향을 보였다. 유도객담을 얻기 위해 환자마다 사용한 생리식염수의 양이 차이가 있어서, 유도객담의 생리식염수에 의해 희석된 정도가 다를 수 있으므로 유도객담에서 단백질 정량 분석을 하여 ELISA로 얻어진 cytokine의 양을 단백질 양으로 보정하였다.

Bhowmik<sup>8</sup> 등은 COPD의 악화 시에 유도객담 내의 IL-6 및 IL-8이 증가하였다고 보고하였다. COPD의 악화는 바이러스에 의한 상기도 감염 또는 *Haemophilus influenzae*나 *Moraxella catarrhalis* 등의 세균 감염에 의한 경우가 흔한데<sup>23,24</sup>, rhinovirus 감염으로 기도상피세포에서 이들 cytokine들을 증가된다는 보고가 있고<sup>25</sup>, 또는 *Haemophilus influenzae*의 세균감염 시 기도상피세포에서 IL-6의 생산이 증가된다는 보고<sup>26</sup>가 있어서 COPD 악화 시 유도객담 내의 위의 cytokine들의 증가의 원인으로 설명되기도 한다.

COPD의 염증반응은 cytokine, chemokine 또는 접착물질(adhesion molecule)등의 염증매개물질의 증가와 관련이 있으며, 염증매개물질에 연관된 유전자들은 전사인자들에 의해 조절된다. COPD에 병인에 관련이 있는 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  및 ICAM-1 등의 유전자가 NF- $\kappa$ B에 의해 조절되는데, NF- $\kappa$ B는 p65(RelA)

와 p50의 두개의 단위를 가진 heterodimer로서 안정 시의 NF- $\kappa$ B는 억제단백질(I $\kappa$ B)의 결합으로 인해 세포질에 남아 있다가 세포가 활성화되면 I $\kappa$ B가 떨어지면서 p65가 핵 내로 들어가서 유전자의 promotor에 있는  $\kappa$ B인자부위에 결합하여 전사를 일으킨다<sup>10</sup>. Stefano 등<sup>11</sup>은 COPD 환자의 기관지조직의 p65의 면역염색결과 정상인에 비해 2-4배 이상의 면역염색이 증가하였으며, 질환의 중증도와 p65염색정도와 관련이 있다고 하였는데, 본 연구에서도 COPD환자의 유도객담 내 대식세포의 NF- $\kappa$ B의 활성도가 정상대조군에 비해 증가된 소견을 보였다. COPD의 급성악화 시에는 바이러스 및 세균감염 등에 의해 NF- $\kappa$ B의 유도 및 활성, cytokine 및 chemokine의 활성, 그리고 염증세포의 침윤이 일어날 것이라는 가정 하에 급성악화기 및 회복기에 유도객담 내 NF- $\kappa$ B의 활성도를 비교해 보았는데, NF- $\kappa$ B 활성도는 회복기에 악화 시에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다.

COPD의 급성악화 시 스테로이드는 임상적으로 유용한 효과를 나타내지만, 그 기전은 잘 알려져 있지는 않다. 스테로이드가 세포질에 있는 스테로이드 수용체와 결합하여 핵 내로 이동하여 스테로이드 반응 표적유전자에 결합하여 I $\kappa$ B 등의 생산을 증가시켜 NF- $\kappa$ B를 세포질로 이동시켜 비활성화 시킨다는 보고가 있고<sup>2,27</sup>, 또는 스테로이드-수용체 복합체가 핵 내로 이동하여 직접 NF- $\kappa$ B의 p65에 결합하여 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제한다는 보고도 있다<sup>28</sup>. 본 연구에서 급성악화기에 비해 고용량의 스테로이드를 투여한 뒤의 회복기에 유도객담에서 NF- $\kappa$ B의 활성도가 감소할 것으로 기대하였는데, 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이는 대상 환자군의 COPD의 중증도가 중등도 이상이어서, 급성악화기 전에 이미 prednisolone 10 mg 이하로 투여한 경우가 65% (24/37명)로 많았던 관계로 이미 투여되었던 스테로이드가 급성악화기와 회복기 사이에 NF- $\kappa$ B의 활성도의 차이를 의미 있게 나타내지 않았던 것으로 추정된다.

본 연구에서는 COPD 환자의 유도객담 내 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  및 NF- $\kappa$ B의 활성도 등이 정상대조군에 비해 증가되었고, COPD의 회복기에 IL-8은 감소하였고, NF- $\kappa$ B의 활성도, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 가 감소하는 경향

을 보여서, NF- $\kappa$ B의 활성도가 부분적으로 COPD의 악화 및 COPD의 병인에 연관이 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

COPD의 급성악화는 세균에 의한 감염, 바이러스성 상기도 감염, 대기오염, 기후변화 등에 의하며, COPD의 급성악화 시에 객담 내 호중구의 증가, IL-6와 IL-8 농도의 증가, 그리고 산화질소의 증가는 NF- $\kappa$ B의 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 그러므로 COPD의 병인 및 급성악화의 기전에 NF- $\kappa$ B 활성도와 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 가 관련이 있는지 연구하고자 하였다.

### 방 법 :

정상대조군 및 COPD로 입원하였던 환자들의 급성악화기 및 치료 후 회복기에 유도객담에서 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 활성화 정도를 측정하여 비교하였다.

### 결 과 :

1) 유도객담내의 IL-6, IL-8 및 TNF- $\alpha$ 는 COPD 환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었다( $p < 0.01$ ). IL-8은 급성악화 시에 비해 회복기에 유의하게 감소되었고( $p < 0.05$ ), IL-6와 TNF- $\alpha$ 는 회복기에도 차이가 없었다. 2) 유도객담 내 대식세포에서의 NF- $\kappa$ B의 활성도는 COPD 환자에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고( $p < 0.05$ ), 회복기에는 악화 시에 비해 감소하는 경향을 보였다.

### 결 론 :

COPD 환자에서 유도객담 내 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  및 NF- $\kappa$ B의 활성도 등이 정상대조군에 비해 증가되었고, 회복기에 IL-8은 감소하였고, NF- $\kappa$ B의 활성도, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 감소하는 경향을 보여서, COPD의 급성악화 및 COPD의 병인에 NF- $\kappa$ B가 일부 관여할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구에 많은 도움을 주신 성빈센트병원 임상의학 연구소 김수연 연구원에게 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of Nuclear factor- $\kappa$ B in pulmonary diseases. *Chest* 2000;117:1482-7.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000;343:269-80.
- Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, Collins D, Gross NJ, Light RW, et al. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1999;340:1941-7.
- Davis L, Angus RM, Carverley PM. Oral corticosteroids in patients admitted to hospital with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomised controlled trial. *Lancet* 1999;354:456-60.
- Seemungal TA, Wedzicha JA. Viral infection in obstructive airway disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003;9:111-6.
- Donaldson GC, Seemungal T, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of temperature on lung function and symptoms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:844-9.
- Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000;55:114-20.
- Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
- Baldwin AS Jr. The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3-6.
- di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor- $\kappa$ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002;20:556-63.
- Camori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, et al. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax* 2003; 58:348-51.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S77-121.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-17.
- Carter AB, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:384-91.5.
- Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998;53: 129-36.
- MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med* 2001;7:55-62.
- Churg A, Dai J, Tai H, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166: 849-54.
- Woolhouse IS, Bayley DL, Stokley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B4 and interleukin 8. *Thorax* 2002;57:709-14.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530-4.
- Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997;112:505-10.
- Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1218-24.
- Stockley RA. Role of bacteria in the pathogenesis and progression of acute and chronic lung infection. *Thorax* 1998;53:58-62.
- Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002;121:136s-41s.
- Subauste M, Jacoby D, Richards S, Proud D. Infection of a human respiratory epithelial cell line with rhinovirus. *J Clin Invest* 1995;96:549-57.
- Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Tarraf H, Davies RJ. Effect of Haemophilus influenzae endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and expression of ICAM 1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1994;7:2109-16.
- Adok IM, Shirasaki H, Gelder CM, Peter MJ, Brown CR, Barn PJ. The effects of glucocorticoids on phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. *Life Sci* 1994;55: 1147-53.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. Characterization of mechanisms involved in transcription of NF- $\kappa$ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995;15:943-53.