

□ 원 저 □

호중구 감소증을 보이는 백서의 급성폐손상에서 대식세포의 기능적 역할*

순천향대학교 의과대학 내과학교실

김용훈, 기신영, 임건일, 문승혁, 정성환, 김현태, 어수택, 박춘식, 진병원

= Abstract =

An Appreciation of Functional Role of Macrophage in the Acute Lung Injury in the Neutropenic Rat.

Yong Hoon Kim, M.D., Sin Young Ki, M.D., Keon IL Im, M.D., Seung Hyug Moon, M.D.,
Seung Whan Cheong, M.D., Hyeon Tae Kim, M.D., Soo Taek Uh, M.D.,
Choon Sik Park, M.D. and Byung Won Jin, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Soon Chun Hyang University, Chonan, Korea

Background : It has long been suggested that neutrophils and their products are implicated as the central mediators of the acute lung injuries. Contrary to the dominant role of neutrophils in ARDS, many cases of ARDS has occurred in the setting of severe neutropenia without pulmonary neutrophil infiltration. Therefore it is certain that effector cell(s) other than neutrophil play an important role in the pathogenesis of ARDS. This experiment was performed to define the mechanism of ARDS in the setting of neutropenia, 1) by comparing the severity of endotoxin-induced lung injury, 2) by measurement of hydrogen peroxide production and cytokine concentration in the bronchoalveolar lavage cells and fluids obtained from different rats with and without cyclophosphamide-pretreatment.

Method : The male Sprague-Dawleys were divided into the normal control (NC)-, endotoxin (ETX)-, and cyclophosphamide (CPA)-group in which neutropenia was induced by injecting cyclophosphamide intraperitoneally. Acute lung injury was evoked by injecting lipopolysaccharide (LPS) into a tail vein. The bronchoalveolar lavage (BAL) was performed at 3 and 6 hour after administration of LPS to measure the change of cell counts and concentrations of protein and cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Hydrogen peroxide (HPO) production from BAL cells was measured at 6 hour after LPS administration by phenol red microassay with and without zymosan stimulation.

Results : The results were as follows.

A change of leukocyte counts in the peripheral blood after treatment with CPA : More than 95% of total leuk-

※ 이 연구는 1995년도 순천향대학교 임상의학연구비의 보조로 이루어졌음

ocytes and neutrophils were reduced after CPA administration, resulting in severe neutropenia.

A change of BAL cells : In the ETX-group, the number of total cells ($p < 0.01$) and of macrophage and neutrophil ($p < 0.05$) were increased at 3 and 6 hour after LPS administration compared to those of NC-group. In the CPA-group, the number of total leukocyte and macrophage were not changed after LPS administration, but neutrophil counts were significantly reduced and it took part in less than 0.1% of total BAL cells ($p < 0.01$ vs NC-group). BAL cells in this group were almost all macrophages (99.7%).

A change of protein concentration in the BALF : In the ETX-group, protein concentration was increased at 3 hour and was more increased at 6 hour after LPS administration ($p < 0.05$ and < 0.01 vs NC-group, respectively). In the CPA-group, it was also significantly elevated at 3 hour after LPS administration ($p < 0.05$ vs NC-group), but the value was statistically not different from that of ETX-group. The value measured at 6 hour after LPS administration in the CPA-group became lower than that of ETX-group ($p < 0.05$), but showed still a higher value compared to that of NC-group ($p < 0.05$).

A change of cytokine concentration in the BALF : TNF- α and IL-6 were elevated in the ETX- and CPA-group compared to those of NC-group at both time intervals. There was no statistical difference in the values of both cytokines between the ETX- and CPA-groups.

Measurement of hydrogen peroxide production from BAL cells : There was no intergroup difference of HPO production from resting cells. HPO production after incubation with opsonized zymosan was significantly elevated in all groups. The percent increment of HPO production was highest in the ETX-group (89.0%, $p < 0.0008$ vs NC-group), and was 42.85 in the CPA-group ($p = 0.003$ vs NC-group). Conclusion : Acute lung injury in the setting of neutropenia might be caused by functional activation of resident alveolar macrophages.

Key words : ARDS, Acute lung injury, Neutropenia

서론

급성호흡곤란증후군 (acute respiratory distress syndrome)은 폐포-모세혈관벽의 투과성증가에 의한 질환으로¹⁾ 그 병인론은 확실치 않으나 일반적으로 호중구와 호중구에서 생산된 매개물들이 중심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 즉 1) 급성폐손상의 조직학적 관찰상 호중구가 폐혈관 및 폐조직 내에 결집되고, 결집 정도와 저산소증이 상관관계가 있는 점⁴⁻⁶⁾, 2) 인위적으로 호중구를 제거한 동물에서 내독소나 종양괴사인자를 투여시 폐손상의 정도가 감소하는 점⁷⁻⁹⁾, 3) 호중구의 기능을 변화시키면 폐손상의 정도가 심해지거나 경감하는 점¹⁰⁻¹²⁾ 등으로 보아 호중구가 급성호흡곤란증후군에서 매우 중요한 역할을 하고 있음을

알 수 있다. 그러나 지속적이며 심한 호중구 감소증에도 불구하고 실제 임상에서 급성호흡곤란증후군이 발생한 경우가 상당수 보고되어 있으며 특히 이러한 환자의 병리조직학적 소견상 호중구의 침윤이 없었다는 점을 고려해 볼 때¹³⁻¹⁶⁾, 급성호흡곤란증후군의 병리기전에 호중구 이외의 다른 효과세포가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 또 호중구를 인위적으로 제거한 동물 생체실험이나^{17,18)} 분리폐관류실험에서도¹⁹⁾ 급성폐손상이 관찰되는 실험결과도 다수 보고되어 있다. 따라서 저자들은 정상 백서와 약물을 이용하여 말초혈액내 호중구를 거의 제거한 백서에 내독소를 투여하여 1) 호중구가 급성폐손상에서 차지하는 역할의 정도를 상대 평가하고, 2) 기관지폐포세척액내의 염증세포와 cytokine의 변화를 관찰하며 3) 기관지폐포세척

액내의 염증세포의 과산화수소 분비능을 각군간에서 비교함으로써 호중구 감소증하에서의 급성폐손상의 발병기전을 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

체중 350 ± 50 g의 건강체인 웅성 Sprague-Dawley를 정상 대조군 (control group; NC-group), 내독소주입군 (내독소군; ETX-group), cyclophosphamide (CPA)를 주입하여 호중구를 결핍시킨군 (CPA군; CPA-group)으로 분류하였다.

2. 실험방법

1) 급성폐손상 유발 백서의 복강내로 pentotal sodium, 40mg/kg를 주입하여 마취시킨후 endotoxin-free water에 용해시킨 lipopolysaccharide (LPS) (E. coli Serotype 055: B5; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 5mg/kg의 용량으로 백서의 미부 정맥을 통하여 주입하였다.

2) 호중구 감소증 유발백서의 말초혈액내 호중구를 제거하기 위하여 cyclophosphamide (CPA, 7mg/kg)를 복막강내로 투여하였다. 저자들은 예비실험에서 4일, 5일, 6일째에 각각 말초혈액을 추출하여 호중구 감소를 측정한 결과 5일째에 가장 낮은 수치를 보이는 것을 발견하였으므로 향후의 실험은 CPA 투여후 모두 5일째에 시행하였다.

3) 기관지폐포세척술각군에서 백서의 복강내로 치사량의 pentotal sodium, 70mg/kg를 주입하여 희생시킨 후 백서의 전경부를 전진시켜 99% 알코올로 소독한 후 무균적으로 기관지를 절개하여 polyethylene catheter를 기관지내에 고정 위치시킨후 EDTA 3 mM가 함유된 phosphate buffered saline을 1회 23ml/kg의 양으로 총 6차례에 걸쳐 기관지폐포세척술을 시행하였다. 적절한 세포의 회수를 위해 각 세척

술시 1분간 부드럽게 흡입 마사지를 시행하였다. 모든 기관지폐포세척액은 즉시 얼음위에 놓고, 1회 및 2회차의 기관지폐포세척액은 단백질의 측정 및 cytokines의 측정을 위해 3~6회차와 각각 분리 보관하였다.

4) 기관지폐포세척액의 처리 1회 및 2회차의 기관지 폐포세척액을 모아 1000 rpm으로 10분간 원심분리시킨 후 상층액 3ml을 따내어 단백질의 측정 및 cytokines의 측정을 위해 -20°C 에 냉동보관한 후 측정 조건을 같게할 목적으로 단백질 및 cytokine을 한번에 측정하였다. 남은 4회차의 기관지폐포세척액을 잘 혼합한 후 0.4ml을 따내 cytospin(Shandon Co.)을 이용하여 850rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 Diff-Quick 염색하여 400배시야에서 300개 이상의 세포를 세어 감별세포수를 산출하였다. 전체 세포수는 coulter count로 산출하였다.

5) 기관지폐포세척액 단백질의 측정단백측정 kit (Sigma Diagnostica)를 이용하여 brilliant blue G.로 착색시켜 분광비색계로 595nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 단백질농도의 측정은 내독소군과 CPA군에서 각각 내독소 투여후 3시간 및 6시간째에 측정하였다.

6) 기관지폐포세척액 cytokine의 측정종양괴사인자 (TNF- α)와 interleukin 6 (IL-6)는 각각 murine L929 섬유모세포와 B9세포(murine hybridoma cell line)를 이용하여 생물학적 방법으로 측정하였다. cytokine의 측정은 모든군에서 각각 3시간 및 6시간째에 측정하였다.

7) 기관지폐포세척액내 염증세포의 과산화수소 분비능 측정 대조군 및 내독소 투입후 6시간째 각군의 기관지 폐포세척액에서 10^5 개의 세포를 분리하여 sodium azide (최종 농도 10^{-3} M)를 첨가한 HBSS 용액에 부유시키고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 1시간 배양한 후 phenol red microassay 법을²⁰⁾ 이용하여 측정하였다. 각군 세포의 과산화수소 분비능은 무자극 상태 (resting cell)와 백서의 혈청으로 opsonin화한 zymosan (최종 농도 0.5mg/ml)으로 자극을 가한

상태하에서 배양하여 자극전후의 분비능을 비교하였다.

3. 유의성 검정

Statsoft사의 STATISTICA 4.1 통계 package 를 이용하여 유의성을 검증하였으며 평균 \pm 표준오차로 결과를 나타내었고 시간별 각군의 실험결과치 비교에는 Kruskal-Wallis one-way ANOVA by ranks를 사용하였고 유의한 차이를 보인 항목에서 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 과산화수소분비능의 측정에서 무자극 및 자극값의 비교는 Wilcoxon matched pairs test를 시행하였다. p 값이 0.05이하인 경우 통계상의 유의성을 인정하였다.

결 과

1. Cyclophosphamide (CPA) 투여후 말초혈액내 백혈구수의 변화.

CPA투여군에서 ($n = 10$) 5일째 백혈구 전체수는 $6,830 \pm 612$ 으로부터 $395 \pm 88/\text{ml}$ 으로 약 95% 감소하였으며 ($p = 0.0001$), 호중구는 CPA 투여전 $2,405 \pm 275$ 에서 $88 \pm 20/\text{ml}$ 으로 약 95% 감소하였다 ($p = 0.0001$).

2. 기관지폐포세척액내의 전체 및 감별 세포수의 변화.

내독소 투여후 내독소군에서는 총세포수가 3시간 및 6시간째 모두 정상군에 비해 매우 유의하게 상승하였으나 ($p < 0.01$) CPA군에서는 세포증가를 관찰할 수 없었다 (Table 1.). 내독소군에서 대식세포수와 호중구수는 모두 증가를 보였으나 ($p < 0.05$), 대식세포의 백분율의 증가가 없고 호중구의 백분율이 증가하는 것으로 보아 ($p < 0.05$), 호중구가 말초 혈액의 단핵구보다 더 많은 비율로 폐포내로 이동함을 알 수 있었다. CPA군에서는 대조군과 비교시 대식세포의 수와 구성비는 차이가 없었으나 호중구의 수가 매우 감소하여 구성비는 전체 세포의 0.1% 이하였고 ($p < 0.01$), 대식세포가 99.7% 이상을 차지하였다.

Table 1. Changes of Total and Differential Cell Counts in BALF ($\times 10^5/\text{ml}$)

	Control	ETX-3h [†]	ETX-6h [†]	ETX-3h [‡]	ETX-6h [‡]
n	5	5	6	5	5
Total cell	5.2 ± 0.6	$13.0 \pm 1.0\#$	$23 \pm 2.5\#$	3.0 ± 0.3	4.5 ± 0.6
Macrophage					
Count	4.9 ± 0.5	$12.3 \pm 1.1^*$	$17.9 \pm 4.0^*$	3.0 ± 0.1	4.5 ± 0.1
%	94.1 ± 0.4	94.3 ± 1.5	80.0 ± 6.1	99.7 ± 0.2	99.7 ± 0.2
PMN					
Count	0.1 ± 0.0	$0.5 \pm 0.0^*$	$4.4 \pm 1.9^*$	$0.03 \pm 0.0^!$	$0.04 \pm 0.0^!$
%	2.3 ± 0.1	$3.7 \pm 0.5^*$	$16.6 \pm 5.4^*$	$0.09 \pm 0.0^!$	$0.09 \pm 0.0^!$

[†]ETX-3h, ETX-6h and CPA-6h mean endotoxin-or cyclophosphamide-group at 3 or 6 hour after endotoxin administration, respectively.

* $p < 0.01$ vs, control-group, * $p < 0.05$ vs control-group, ! $p < 0.01$ vs control- and endotoxin-group

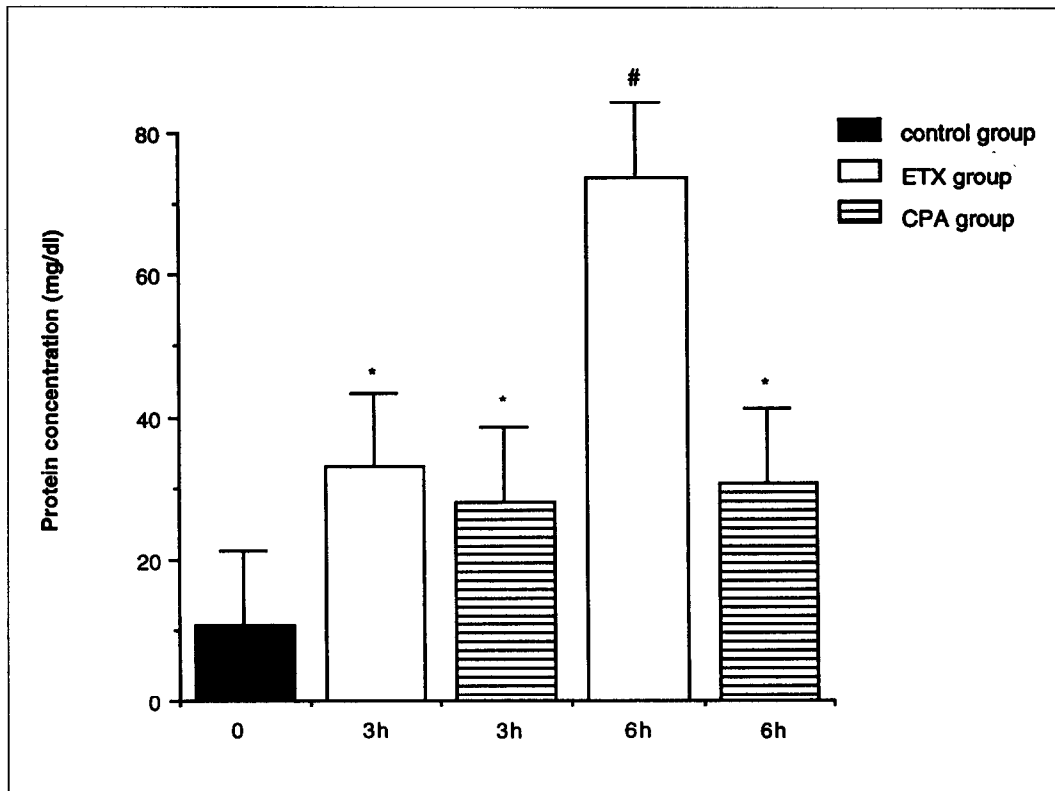


Fig. 1. Comparison of protein concentration of BALF between ETX-and CPA-groups at 3 and 6 hour after endotoxin administration.

*P < 0.05 vs control group, #P < 0.05 vs CPA-6h group.

3. 기관지폐포세척액내의 단백질 농도의 변화.

내독소군에서는 내독소 투여전 10.76 ± 0.75 에서 투여후 3시간째에 $33.03 \pm 11.81\text{mg/dl}$ 으로 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$), 6시간째에 $73.68 \pm 8.65\text{mg/dl}$ 에 도달하였다 ($p < 0.01$) (Fig. 1.). CPA군에서는 3시간째에 단백질농도가 $28.10 \pm 4.26\text{mg/dl}$ 으로 대조군보다 유의하게 상승되어 있었으나 ($p < 0.05$), 같은 시간대의 내독소군과는 차이가 없었다. 6시간째에는 CPA군이 $30.63 \pm 5.21\text{mg/dl}$ 으로 내독소군에 비해 유의하게 감소하였으나 ($p < 0.05$), 대조군에비해서는 여전히 높은 수치를 보였다 ($p < 0.05$).

4. 기관지폐포세척액내의 cytokine농도의 변화.

TNF- α 는 대조군 ($0.06 \pm 0.06\text{U/ml}$)에 비해 내독소투여후 3시간, 6시간째에 각각 3.53 ± 1.39 ($p < 0.05$), $4.22 \pm 1.38\text{U/ml}$ ($p < 0.01$)으로 상승되었고, CPA군에서도 3.06 ± 1.38 , $1.53 \pm 0.57\text{U/ml}$ ($p < 0.05$)으로 유의하게 증가되었으며 내독소군과 CPA 양군간의 각 시간대별 차이는 없었다 (Fig. 2.). IL-6 역시 대조군 ($0.451 \pm 0.230\text{U/ml}$)에 비해 내독소군에서 3시간, 6시간에 각각 146.40 ± 34.01 , $77.75 \pm 27.98\text{U/ml}$ ($p < 0.01$)로 증가되었고, CPA군에서도 같은 시간대별로 102.02 ± 72.95 , $32.26 \pm 20.98\text{U/ml}$ ($p < 0.01$)으로 증

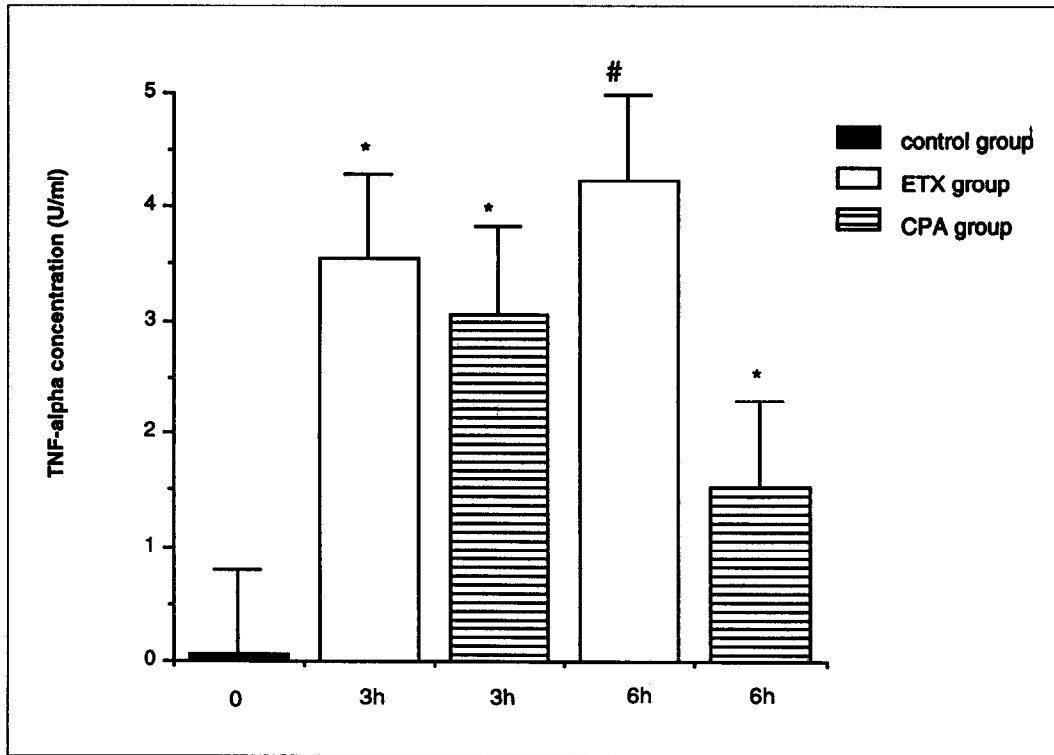


Fig. 2. Comparison of concentration of TNF-alpha in BALF between ETX-and CPA-groups at 3 and 6 hour after endotoxin administration.

*P < 0.05 vs control group, # P < 0.01 vs control group

가되었으며 내독소군과 CPA 양군간의 각 시간대별 차이는 없었다 (Fig. 3.).

5. 기관지폐포세척액내 염증세포의 과산화수소 분비능 측정

전 군에서 과산화수소분비능은 무자극 상태에서는 서로 유의한 차이가 없었으나 zymosan으로 자극한 상태에서는 모두 자극전에 비해 유의한 차이로 증가하였으며 그 증가의 정도가 서로 틀려 각 군간의 측정값에도 매우 유의한 차이를 보였다 (Table 2.). 각 군에서 자극전후의 과산화분비능 증가를 대조군의 증가값 (14.1%)과 비교해보면 내독소군의 경우 약 89.0%로서 상당히 큰 증가를 보였고 ($p < 0.0008$), CPA군

도 42.8%로서 내독소군에 비해서는 그 정도가 다소 작았으나 ($p = 0.033$) 대조군에비해서는 역시 큰 증가를 보였다 ($p = 0.003$), (Fig. 4.).

고 찰

호중구는 감염장소에 가장 먼저 그리고 가장 많이 증가하므로 인체의 초기 방어기전상 핵심적인 세포라고 할 수 있다. 급성폐손상시 염증의 조직화적인 특징은 혈관, 폐간질, 폐포내에 대량의 호중구가 밀집해있는 것으로⁴⁻⁶⁾ 호중구가 염증성 매개물을 분비하여 조직의 방어기전에 참여할 뿐만 아니라 조직의 파괴도 동시에 일으키는 것으로 알려져 있다. 실험적으로 호중구를 제거하면 폐손상이 감소하거나⁷⁻⁹⁾, 호중구의

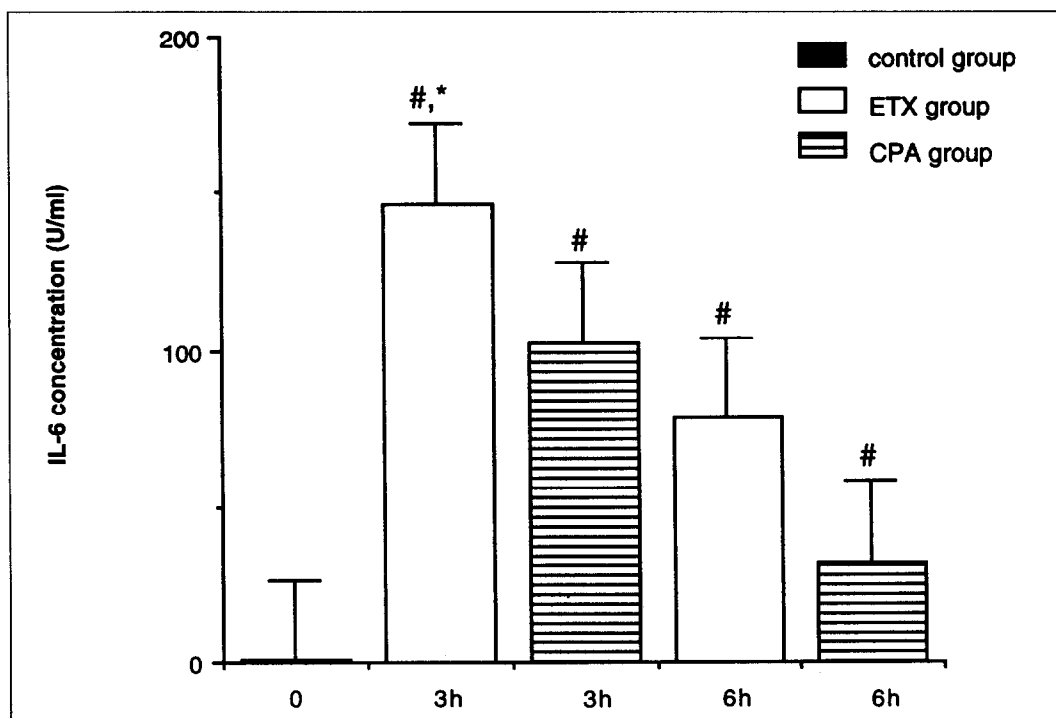


Fig. 3. Comparison of concentration of IL-6 in BALF between ETX- and CPA-groups at 3 and 6 hour after endotoxin administration.

* $p < 0.05$ vs ETX-6h group, # $p < 0.01$ vs control group.

Table 2. Hydrogen Peroxide Production from BAL Cells before and after stimulation with opsonized zymosan ($\times 10^{-6}$ M/ 10^5 cells)

	n	Resting cells	Zymosan stimulation	P value
NC-group	5	2.28 ± 0.002	2.60 ± 0.06	0.002
ETX-group	6	2.46 ± 0.11	4.57 ± 0.19	0.0003
CPA-group	5	2.36 ± 0.05	3.37 ± 0.15	0.0009

기능을 변화시키면 폐손상의 정도가 심해지거나 경감하는 점등은^{10~12)} 호중구가 급성폐손상의 시작과 진행에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 그러나 기도내로 내독소를 투여한 동물 실험에서 cyclophosphamide로 호중구를 제거한 경우에도 급성폐손상의 정도가 감소하지 않았다는 보고가 있으므로²¹⁾ 호중구

만이 급성 호흡증후군의 유일한 효과세포가 아니라는 것을 뜻한다. 또 임상적으로도 지속적이며 심한 호중구감소증상태에서 급성 호흡증후군이 발생한 경우가 상당수 보고되어 있으므로 급성호흡곤란증후군의 병리기전에 호중구외의 다른 효과세포가 작용하고 있음을 알 수 있다. 그러나 호중구 감소증하에서 발생하는

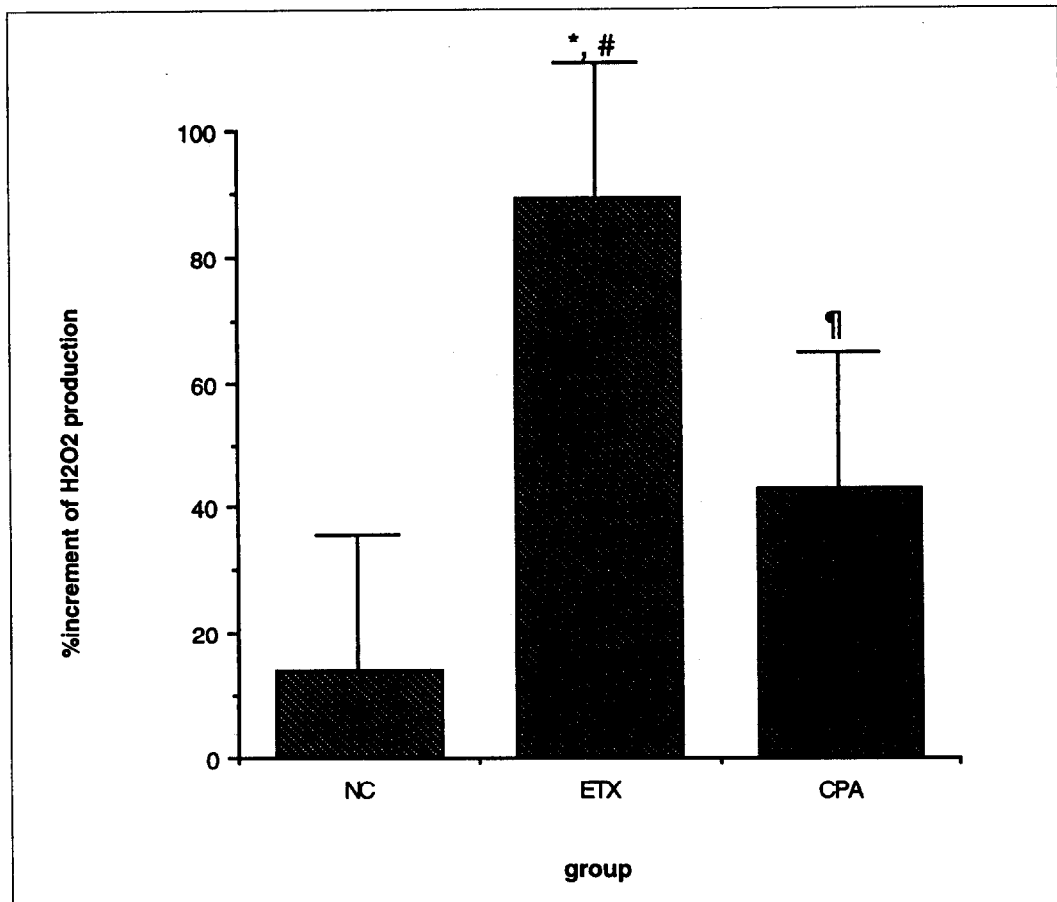


Fig. 4. Comparison of % increment of hydrogen peroxide production after stimulation with opsonized zymosan in each group.

*P = 0.0008 vs control group,

#P = 0.033 vs CPA-group, ¶P = 0.003 vs control-group.

급성폐손상에서 어떤 세포가 어떤 정도로 급성폐손상에 관여하고 있는지는 아직 알려져 있지 않다. 본 실험의 결과를 보면 CPA군에서 3시간 및 6시간 모두 단백질농도가 대조군보다는 상승되어 있으므로 말초혈액의 호중구 결핍상태에서도 내독소가 급성폐손상을 일으킬수 있음을 알 수 있다. CPA군에서 기관지폐포세척액내 총세포수는 내독소군과 대조적으로 3시간과 6시간째 모두에서 증가가 없었는데 특히 호중구가 총세포수의 0.1% 미만으로 감소하여 기관지폐포세

척액내세포의 99.7%이상은 대식세포였다.

따라서 cyclophosphamide로 처리시 폐포세포구성상에서 호중구결핍은 물론 단핵구의 폐포내 유입도 차단된 것으로 보이며 기관지폐포세척에서 발견된 대식세포는 모두 기존의 폐포대식세포인 것으로 생각되었다. 각군에서 측정된 과산화수소 분비능을 보면 무자극 상태에서 서로 유의한 차이가 없었으나 zymosan으로 자극한 후 내독소군과 CPA군에서 대조군에 비해 분비능이 각각 1.8배 ($p = 0.0008$) 및 1.4배

($p = 0.003$) 증가하는 것으로 보아 내독소에 의한 폐포 염증세포의 활성화도가 증가하였음을 알 수 있다. 특히 CPA군에서 기관지폐포세척액내 세포의 99.7% 이상이 대식세포였으므로 이 경우의 과산화수소분비능은 전적으로 폐포대식세포의 활성도를 반영하는 것으로 볼 수 있다. 과산화수소는 급성폐손상의 주요 원인물질이므로^{19, 22)} 본 실험의 결과는 대식세포단독으로도 폐손상에 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다. Christman등은²³⁾ 내독소를 정주한 백서의 폐포대식세포에서 과산화수소분비능이 65%증가하고 호중구에 대한 화학적 주성이 70%이상증가하여 급성호흡곤란증후군의 진행과 예후에 폐포대식세포의 관련성을 주장한바 있는데 본 실험에서도 폐포대식세포의 과산화수소분비능이 약 42.8%증가하여 비슷한 경향을 보이고 있다. 따라서 본 실험의 결과는 호중구 결핍상태의 급성폐손상에서 단핵구, 그중에서도 기존의 폐포대식세포가 중요한 역할을 하고 있음을 예측할 수 있게 한다. CPA군의 기관지폐포세척액내 단핵구가 폐포 기존의 대식세포 (resident alveolar macrophage)이며 이 세포에 의해 급성폐손상이 유발되었음을 추측하게 하는 근거는 본 실험에서 세가지 측면에서 요약할 수 있다. 1) 말초혈액내의 전체세포수가 CPA 투여로 약 17배 감소함에도 불구하고 CPA군의 기관지폐포세척액내 대식세포가 대조군에 비해 감소하지 않았고 2) CPA군에서 3시간째에 기관지폐포세척액내의 호중구수가 내독소군에 비해 아주 낮은 상태이지만 단백질 농도는 양군간에 차이가 없었다. 물론 CPA군의 6시간째 세척액내 단백질 농도가 내독소군보다 감소하였기 때문에 급성폐손상에서의 호중구의 역할이 중요한 것을 알 수는 있지만, 그러나 이 경우에서도 호중구가 거의 제거된 상태에서 단백질농도는 정상 대조군에 비해 유의하게 높은 상태이고 과산화수소분비능으로 평가한 폐포대식세포의 활성화도가 매우 높다는 결과를 참조해볼때 폐손상의 시작과 진행 모두에 폐포대식세포가 관여되어 있음을 추측할 수 있다. 3) CPA군과 내독소군 모두에서 3시간, 6시간째에 종양괴사인자와 IL-6가 증가되어 있으며 양군간에 차

이가 없다는 점이다. 폐포상피세포 역시 IL-8, IL-6, granulocyte/macrophage colony stimulating factor 및 종양괴사인자를 분비하여 호중구를 염증장소로 이동시키며 그 작용을 상승시킬 수 있으나^{24~27)} 종양괴사인자를 생산하는 주된 세포는 대식세포이다²⁸⁾. 그 램 음성균으로부터 분비되는 내독소는 급성호흡곤란증후군의 가장 중요한 원인으로서 내독소의 병리생리적 효과는 단핵구로부터 초기반응-cytokine인 IL-1, 종양괴사인자, IL-6를 분비하게함으로서 시작된다²⁹⁾. 종양괴사인자는 호중구와 혈관내피세포사이에 부착작용을 유도하는 매개물로서 호중구를 통하여 간접적으로 폐손상을 일으키는 것으로 알려져 있으나³⁰⁾ 최근 Li등은 시험관 실험에서 대식세포로부터 유리된 종양괴사인자가 호중구보다 더 강력하고 직접적인 급성폐손상의 인자임을 보고하였고 아울러 대식세포와 호중구의 상호 보완적인 관계를 입증하였다²⁸⁾. 급성 호흡중후군때 호중구가 폐혈관과 폐포에 결집하여 산소기, 단백분해효소, 지질대사물들을 유리하여 폐포상피세포의 투과성을 증가시키는 것은 지금까지의 연구 결과로^{31~33)} 볼때 거의 틀림이 없지만 폐포대식세포 역시 염증성 cytokine을 분비하여 상피세포에 영향을 줄 수 있다. 특히 대식세포로부터 유리된 종양괴사인자는 호중구기능을 조절하여 폐손상을 일으키는 간접적인 방법 외에도 폐포상피세포에 직접적인 손상을 일으킬 수 보고가 있다^{34, 35)}. 또한 호중구와 대식세포는 폐포상피세포에 부착되어 상호 보완적으로 손상을 초래하여 폐포-상피세포간의 투과성을 증가시킬 가능성이 높다³⁶⁾. 본 실험에서 6시간째의 기관지폐포세척액내 단백질농도를 기준으로 호중구와 대식세포의 폐손상 기여도를 단순히 산술적으로 계산해보면 약 24%의 폐손상은 대식세포에 의한것으로 평가되지만 두 세포사이의 상승효과를 고려해보면 대식세포단독의 역할은 이 보다 더 클 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

급성호흡곤란증후군의 병인론은 확실치 않으나 일반적으로호중구와 호중구에서 생산된 매개물들이 중심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 지속적이며 심한 호중구감소증에도 불구하고 실제 임상에서 급성 호흡중후군이 발생한 경우가 상당수 보고되어 있으며 특히 환자의 병리조직학적 검사상에서도 호중구의 침윤이 없었다는 점을 고려해볼때 급성호흡곤란증후군의 병리기전에 호중구의 다른 효과세포가 작용하고 있음을 알 수 있다. 따라서 저자들은 백서에 약물을 투여하여 호중구를 거의 제거한 다음 호중구 감소증 하에서 내독소에 의한 급성폐손상의 발병기전을 알아보고자 하였다.

방 법 :

웅성 Sprague-Dawley를 정상 대조군과 내독소주입군(내독소군), cyclophosphamide (CPA)를 주입하여 호중구를 결핍시킨군(CPA군)으로 분류하였다. LPS 5mg/kg를 미부정맥을 통하여 주입하여 급성폐손상을 유발시킨후 3시간 및 6시간째에 급성폐손상지표로서 기관지폐포세척액내 단백질 농도를 측정하였고 병리기전을 이해하기 위하여 기관지폐포세척액내 염증 세포의 변화를 관찰하고 TNF- α 와 IL-6를 측정하였으며 기관지폐포세척액내 염증세포의 과산화수소 분비능을 각군간에서 비교하였다.

결 과 :

Cyclophosphamide (CPA) 투여후 말초혈액내 백혈구수의 변화 CPA 투여후 전체 백혈구와 호중구수가 각각 95%이상 감소하였다.

기관지폐포세척액내의 전체 및 감별 세포수의 변화 내독소군에서는 총세포수가 3시간 및 6시간째 모두 정상군에 비해 매우 유의하게 상승하였으나 ($p < 0.01$) CPA군에서는 세포증가를 관찰할 수 없었다. 내독소군에서 대식세포수와 호중구수는 모두 증가를 보였으나 ($p < 0.05$), CPA군에서는 대조군과 비교시 대식세포의 수와 구성비는 차이가 없었고 호중구의 수가 매우 감소하여 ($p < 0.01$), 대식세포가 99.7% 이상을 차지하였다.

기관지폐포세척액내의 단백질 농도의 변화 : 내독소군

에서는 3시간째부터 유의한 증가를 보였고 ($p < 0.05$), 6시간째에는 더욱 증가하였다 ($p < 0.01$). CPA군 역시 3시간째에 단백질농도가 대조군에 비해 유의하게 상승되었으나 ($p < 0.05$) 내독소군과는 차이가 없었으며, 6시간째에는 내독소군에 비해 유의하게 감소하였으나 ($p < 0.05$), 대조군에비해서는 여전히 높은 값을 보였다 ($p < 0.05$).

기관지폐포세척액내의 cytokine 농도의 변화

종양괴사인자와 IL-6는 내독소군 및 CPA군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고 내독소군과 CPA군간의 차이는 없었다.

기관지폐포세척액내 염증세포의 과산화수소 분비능 측정

각 군에서 과산화수소분비능은 무 자극 상태에서는 서로 유의한 차이가 없었으나 zymosan으로 자극한 상태에서는 모두 자극전에 비해 유의한 차이로 증가하였으며 내독소군의 경우 약 89.0%로서 가장 큰 증가를 보였고 ($p < 0.0008$), CPA군도 42.85로서 내독소군에 비해서는 그 정도가 다소 작았으나 ($p = 0.033$) 대조군에비해서는 역시 큰 증가를 보였다 ($p = 0.003$).

결 론 : 호중구 결핍상태의 급성폐손상은 단핵구, 그 중에서도 기존의 폐포대식세포의 활성화에 의존하고 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319, 1967
2. Tats RM, Repine JE. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 128: 552, 1983
3. Rinaldo JE. Mediation of ARDS by leukocytes: clinical evidence and implications for therapy. *Chest* 89: 590, 1986
4. Elliott CG, Zimmerman GA, Orme JF, Morris AH,

- Mortensen JD. Granulocyte aggregation in adult respiratory distress syndrome (ARDS), serial histologic and physiologic observations. *Am J Med Sci* **289** : 70, 1985
5. Powe JE, Short A, Sibbald WJ, Driedger AA. Pulmonary accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **10** : 712, 1982
 6. Meyrick B, Brigham KL. Acute effect of E coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep : structure : function relationship. *Lab Invest* **48** : 458, 1983
 7. Heflin AC Jr, Brigham KL. Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* **68** : 1253, 1981
 8. Flick MR, Perel A, Staub NC. Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep. *Circ Res* **48** : 344, 1981
 9. Stephens KE, Ishizaka A, Wu ZH, Larrick JW, Raffin TA. Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*, **138** : 1300, 1988
 10. Worthen GS, Haslett C, Rees AJ, Gumbay RS, Henson JE, Henson PM. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury : synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am Rev Respir Dis* **136** : 19, 1987
 11. Ismail G, Morganorth ML, Todd RF III, Boxer LA. Prevention of pulmonary injury in isolated perfused rat lungs by activated human neutrophils preincubated with anti-Mo1 monoclonal antibody. *Blood* **69** : 1167, 1987
 12. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors K-E, Harlan JM. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein CD 18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest* **81** : 939, 1988
 13. Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* **315** : 9, 1986
 14. Maunder RJ, Hackman RC, Riff E, Albert RK, Springmeyer SC. Occurrence of the adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am Rev Respir Dis* **133** : 313, 1986
 15. Sivan Y ; Mor C ; al-Jundi S ; Newth CJ. Adult respiratory distress syndrome in severely neutropenic children. *Pediatr Pulmonol* **8** : 104, 1990
 16. Vansteenkiste JF ; Boogaerts MA. Adult respiratory distress syndrome in neutropenic leukemia patients. *Blut* **58** : 287, 1989
 17. Johnson, K. J. and Ward, P. A.. Acute and progressive lung injury after contact with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol* **107** : 29, 1982
 18. Dyer, E. L. and Snapper, J. R., Role of circulating granulocytes in sheep lung injury produced by phorbol myristate acetate. *J Appl Physiol* **60** : 576, 1986
 19. Carpenter-Deyo LJ, Roth RA : Injury to the isolated perfused lung induced by phorbol myristate acetate, In Cantor JO (Ed.) *Handbook of animal models of pulmonary disease*, vol.1., p47, New York, CRC 1989
 20. Pick E and D. Mizel. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. **46** : 211, 1981
 21. Tershima T, Kanazawa M, Sayama K, Ishizaka A, Urano T, sakamaki F, Nakamura H, Waki Y,

- Tasaka S. Granulocyte colony stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 149 : 1295, 1994
22. Zulueta JJ, Yu FS, Hertig IA, Thannickal VJ, Hassoun PM. Release of Hydrogen Peroxide in Response to Hypoxia-Reoxygenation : Role of an NAD(P)H Oxidase-like Enzyme in Endothelial Cell Plasma Membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 : 41, 1995
 23. Christman JW, Petras SF, Hacker M, Absher PM, Davis GS. Alveolar macrophage function is selectively altered after endotoxemia in rats. *Infect Immun* 5 : 1254, 1988
 24. Cromwell O, Hamid Q, Corngan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB. Expression and generation of IL-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumor necrosis factor alpha. *Immunology* 77 : 330, 1992
 25. Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sariban E, Kufe D. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 81 : 455, 1988
 26. Casale TB, Abbas MK, Carolan EJ. Degree of neutrophil chemotaxis is dependent upon the chemoattractant and barrier. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7 : 112, 1992
 27. Leikauf GD, Driscoll DE, Wey HE. Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in epithelial cells from bovine trachea. *Am Rev Respir Dis* 137 : 435, 1988
 28. Li XY, Donaldson K, Brown D, MacNee W. The role of tumor necrosis factor in increased air-space epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 : 185, 1995
 29. Hyers TM, Flower AA. Adult respiratory distress syndrome : causes, morbidity, and mortality. *Fed Proc* 45 : 25, 1986
 30. Rinaldo JE, Christman JW. Mechanisms and mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 11 : 621, 1990
 31. Sugahara KG, Cott R, Parsons PE, Mason RJ, Sandhaus RA, Henson PM. Epithelial permeability produced by phagocytosing neutrophils in vitro. *Am Rev Respir Dis* 133 : 875, 1986
 32. Chollet-Martin S, Jourdain B, Gibert C, Elbim C, Chastre J, Cougerot-Pocidallo MA. Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 594, 1996
 33. Coodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 602, 1996
 34. Horvath CJ, Ferro TJ, Jesmok G, Malik AB. Recombinant tumor necrosis factor increases pulmonary vascular permeability independent of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 9219, 1988
 35. Brett J, Grelach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 172 : 1977, 1989
 36. Robbins RA, Koyama S, Spurzem JR, Richard KA, Nelson KI, Gossman GL, Thiele GM, Rennard SI. Modulation of neutrophil and mononuclear cell adherence to bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 7 : 19, 1992