

□ 원 저 □

Ovalbumin으로 유발된 백서의 즉시형 기관지 수축 반응에서 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 양상 및 혈중 프로스타글란딘 E2 농도와 COX-2 억제제의 효과

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

이승룡, 이신형, 정기환, 김병규, 정혜철, 김경규, 권영환, 김제형, 이주한*,
이상엽, 조재연, 심재정, 인광호, 유세화, 강경호

= Abstract =

The Effects of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitor on COX-2 and
Prostaglandin E2 Expression in Ovalbumin Induced Early Phase
Bronchoconstriction of Rats

Sung Yong Lee, M.D., Sin Hyung Lee, M.D., Ki Hwan Jung, M.D., Byung Gyu Kim, M.D.,
Hae Chul Jung, M.D., Kyung Kyu Kim, M.D., Young Hwan Kwon, M.D.,
Ja Hyeong Kim, M.D., Ju Han Lee, M.D.*, Sang Youb Lee, M.D., Jae Yoen Cho, M.D.,
Jae Joeng Shim, M.D., Kwang Ho In, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Pathology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Bronchial asthma is characterized by airway hyperresponsiveness (BHR) and inflammation. The cyclooxygenase(COX) is believed to be one of the important enzymes in these inflammatory reactions. Recently, the COX was divided into two isoforms, COX1 and COX2. COX2 is induced by lipopolysaccharide and some cytokines at the inflammation site. Prostaglandin E2 (PGE2), produced from COX2, may affect airway inflammation. The purpose of this study is to evaluate the effect of COX2 inhibitor on COX2 expression, plasma PGE2, airway resistance and histologic finding in an animal asthma model.

Methods : Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups. The normal control group did not receive any treatment, but the asthma control group was sensitized by ovalbumin but not treated with the COX2 inhibitor

Address for correspondence :

Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Korea University Guro Hospital.

80 Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, Korea

Phone : 02-818-6638 Fax : 02-865-9670 E-mail : kkhchest@kumc.or.kr

(nimesulide, Mesulid®). The treatment group was sensitized and treated with nimesulide. Specific airway resistance (sRaw) before and after nimesulide ingestion was investigated. The PGE2 level in the plasma was examined and COX2 immunogold-silver stain on lung tissue was performed.

Results : sRaw and eosinophilic infiltration on airway, which increased in the asthma control group, was compared to normal control($p=0.014$). However, there was no difference in eosinophilic infiltration between asthma control and treatment groups($p=0.408$) and no difference in COX2 expression on bronchiolar epithelium among the three groups. Plasma PGE2 levels were not statically different among the three groups.

Conclusion : The role of COX2 in the allergen-induced BHR was not significant. The effect of nimesulide was not observed on BHR, COX2 expression, and plasma PGE2 level. Therefore, COX2 may not be a major substance of allergic asthma. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 191-202)

Key words : Nimesulide, Cyclooxygenase-2, Prostaglandin-E2, Asthma.

서 론

기관지 천식은 기도의 과민 반응을 특징으로 하는 기도 내 염증 질환이다. 최근 염증 반응과 관계 있는 지방 매개 물질을 생성하는 cyclooxygenase (COX)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. COX는 세포막 특이성이 있고 생리적인 반응과 염증 반응에 관여하는 세포 내 효소로서 세포막 지질 성분인 아라키돈산(arachidonic acid)을 분해하여 프로스타글란딘과 트롬복산을 형성한다¹. 이러한 물질들이 기도내의 염증 세포를 활성화시키고 기도 점막에서 점액 분비를 활성화시켜 점막 부종을 유발하며 또한 기도 수축을 유발한다.

90년대 초 두 가지 형태의 COX로 구분이 되었는데^{2,3} COX1은 위장, 신장, 혈소판 및 혈관 등의 조직에서 생리적인 항상성을 유지하는 기능⁴을 갖고 있는 반면 COX2는 주로 염증 부위에서 발현이 증가하여 염증 반응을 매개하는 프로스타글란딘을 형성한다^{5,6}. 아스피린 유발성 기관지 천식에서 COX2 생성의 부적절한 조절이 병태 생리에 관여한다고^{6,7} 하지만 알레르겐 유발성 기관지 천식에서의 COX2 발현 및 그 주 생성 물질인 프로스타글란딘 E2의 변화에 대해선 아직 확실치 않다. 또한 최근에 개발된 COX2 만을 선택적으로 억제하는 약제⁸가 알레르겐 유발성 기관지

천식에 미치는 효과에 대하여도 그 기전이 잘 알려져 있지 않다. 따라서 저자는 ovalbumin (OVA)으로 유발된 백서의 즉시형 기관지 수축 모델에서 COX2 발현 양상과 혈중 프로스타글란딘 E2를 측정하여 정상 백서와 비교 하므로써 알레르겐 유발성 기관지 천식에서 COX2 및 프로스타글란딘 E2의 역할에 대해 알아보고자 하였다. 또한 COX2 억제제인 nimesulide⁹를 투여한 후 COX2, 프로스타글란딘 E2 및 기도 저항을 측정하여 알레르겐 유발성 기관지 천식에서 COX2 억제제의 효과에 대하여 알아보고자 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

체중 250-300g의 Sprague-Dawley 백서 38마리를 대상으로 30일간 연구하였다. 정상 대조군은 OVA에 감작 시키지 않은 정상 백서군 이었고, 천식 대조군은 OVA으로 감작 시킨 후 즉시형 기관지 수축 반응이 발생한 군으로 nimesulide를 복용시키지 않은 군이었으며, 치료군은 OVA으로 감작 시킨 후 기도 과민 반응이 발생하고 nimesulide를 복용시킨 군으로 정의 하였다.

2. Ovalbumin의 감작 및 즉시형 기관지 수축 반응 유발과 기도 저항 측정

1mg/kg의 ovalbumin(OVA)과 면역 보강제 (adjuvant)로 200mg의 aluminum hydroxide를 각각 1cc 생리 식염수에 녹여 연구 1일과 7일째 백서의 후 경부에 피하 주사하여 감작시켰다. 감작이 끝난 후 7일(제 14연구일)째에 마취나 기관 삽관 없이 의식이 있는 상태에서 머리와 몸통 부분으로 나뉘어진 두 chamber로 구성된 Pulmodyn 실험 동물용 체적 기록 상자(Hugo Sachs Elektronik, German)에서 OVA 흡입으로 즉시형 기관지 수축 반응을 발생시킨 후 기도 저항을 측정하였다¹⁰. 즉시형 기관지 수축 반응은 0.9% 생리식염수에 섞은 1% wt/vol의 OVA를 Pulmodyn내에 설치된 연무기로 머리 부분 chamber의 부피 975cm³에 30초간 분무하였다. 기관지 수축으로 발생한 기도 저항의 변동은 Pulmodyn에서 두부와 체부의 기류 곡선을 이용하여 Pen-nock법으로 컴퓨터 프로그램에 의해 측정하였다¹⁰. 기도 저항은 연속적으로 측정하여 4초 간격으로 컴퓨터에 결과를 저장하였으며 OVA 분무 전 2분에서 분무 후 14분까지 2분 간격으로 평균 기도 저항을 기록하여 기도 저항의 변화가 150% 이상 증가한 백서만을 천식 모델로 간주하여 이후의 실험에 사용하였으며 기도 저항의 증가가 없거나 150% 이하인 백서의 경우에 연구 대상에서 제외시켰다. 정상 대조군은 OVA 감작하지 않은 상태에서 기도 저항을 측정하였다.

3. 기도 저항 변화, 기도내 염증 및 PGE2 측정

치료군에 대하여 COX2 억제제인 nimesulide (Mesulid®, Choong Wae, Korea)를 3mg/kg 용량으로 매일 같은 시각에 1회씩 2주간 투여한 후 제 28연구일에 연무기를 이용하여 OVA를 흡입시켜 즉시형 기관지 수축 반응을 유발시킨 후 기도 저항을 측정하였다. 기도 저항 측정 48시간 후에 ketamin hydrochloride 25mg을 근육 주사하여 마취하고 복강

절개 후 횡격막을 절개하여 흉곽벽을 열고 심장천자로 3cc 가량의 혈액을 채취하였다. 혈액은 3.8% citrate bottle에 넣은 후 4℃에서 2500rpm으로 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장으로 프로스타글란딘 E2 효소 면역 분석 키트(Amersham, UK)를 이용하여 혈중 프로스타글란딘 E2 농도를 측정하였다. 채혈 후 즉시 폐장을 적출하고 좌측 폐를 절개하여 formaline 용액에 고정하여 보관하였다. 보관된 좌측 폐는 파라핀 포매 조직을 만들고 4μm 두께로 절단해서 H-E 염색을 한 후 기도 및 폐 실질 내 호산구 침윤 정도를 확인하였다. 호산구 침윤 정도는 기도 및 폐 실질 내 염증 세포들 중 호산구가 차지하는 비율로 정의하였으며 측정은 병리 전문의에 의해 수행되었다.

4. COX2 면역 조직 화학 염색

파라핀에 고정된 폐조직을 xylene으로 탈파라핀 과정과 재합수 과정을 거쳐 phosphate buffered saline (PBS, 0.01M pH 7.6) 용액에 세척한 후 1% Triton 용액에 15분간 처리하였다. 비특이 반응을 억제시키기 위해 5% goat serum을 함유한 PBS 용액에 20분간 전처리하였다. Polyclonal primary antibody rabbit-anti-PGHS-2 (PG26, polyclonal; Oxford Biomedical Research, UK)를 1:50으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 처리하였다. 그 후 1:200으로 희석한 COX2 1차 항체에 대한 goat anti-rabbit F(ab)₂ gold conjugate (Jackson-Immuno Research, USA)에 상온에서 1시간 30분 반응시켰다. 다시 PBS으로 3회 세척한 후 2% phosphate-glutaladehyde 용액에 20분간 고정하였다. PBS으로 3회 세척한 후 Silver Enhancer solution (Zymed, USA)으로 5분간 처리하고 nuclear fast red로 대조 염색을 시행하고 xylene으로 봉입하였다. COX2에 대한 발색 정도는 100배 시야에서 5개의 세 기관지 상피세포에 염색된 COX2 면역 조직 화학 염색에 대해 image analysis system을 이용하여 측정

하였다. Image analysis는 image 분석 프로그램인 OPTIMA (Optimas, Bothell, WA)를 이용하여 동일 광도하에서 intensity scale 범위를 0에서 255까지 정하고 가장 진하게 염색된 경우는 0, 염색이 되지 않은 경우를 255로 정의하였다.

5. 통계 분석

각 측정치는 평균±표준 오차로 표시하였으며, 치료군에서 약물 투여 전후의 기도 저항의 차이는 약물 투여 전후의 최대 기도 저항값에 대한 Wilcoxon 순위합 검정을 하였다. 또한 천식 대조군과 치료군 사이의 기도 저항에 대해 2분 단위 시간대 별로 측정된 수치의 평균값에 대해 Mann-Whitney-U 검정을 하였다. 호산구 침윤 정도나 COX2 그리고 혈중 프로스타글란딘 E2 값의 각각 두 군간의 비교는 Mann-Whitney-U 검정을 하였다. 모든 통계 분석은 컴퓨터 통계 프로그램인 SPSS 9.0를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. OVA 감작 후 즉시형 기관지 수축 반응의 측정

제 14연구일에 시행한 즉시형 기관지 수축 반응에서 정상 대조군 (C군)은 평균 기도 저항의 변화가 거의 없었고, 16마리의 백서 (A군)에서 평균 기도 저항의 증가가 150% 이상을 보였다(Fig. 1). 기도 과민 반응을 보인 백서 (A군)를 천식 대조군과 치료군으로 나누었다.

2. 기도 및 폐 실질 내 호산구 침윤

기관지 및 폐 실질 내 호산구 침윤은 400배 시야에서 정상 대조군과 천식 대조군에서 각각 $0.8 \pm 0.8\%$, $10.7 \pm 3.5\%$ 으로 천식 대조군이 정상 대조군에 비해

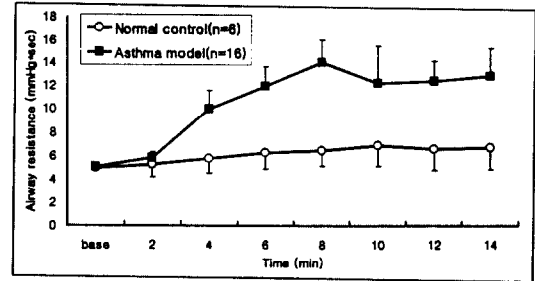


Fig. 1. Airway resistance of ovalbumin induced asthmatic model.

통계적으로 유의하게 호산구 침윤 정도가 증가하였다 ($p=0.014$). 천식 대조군과 nimesulide 치료군은 각각 $10.7 \pm 3.5\%$, $9.4 \pm 4.4\%$ 으로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.408$)(Table. 1)(Fig. 2).

3. COX2 면역 조직 화학 염색

COX2 면역 조직 화학 염색은 주로 기관지 상피 세포, 기관지 평활근, 폐 실질 내 혈관의 평활근, 기도 및 혈관 주위의 염증 세포에 염색되었다. 정상 대조군과 천식 대조군에서 Mean Gray Value가 각각 118.7 ± 3.6 , 125.7 ± 4.1 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고($p=0.366$), 천식 대조군과 nimesulide 치료군에서의 Mean Gray Value는 각각 125.7 ± 4.1 , 118.1 ± 3.9 로 역시 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.351$)(Table. 1)(Fig. 3). 정상 및 천식 대조군, 치료군의 세 군간의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.588$).

4. 혈중 프로스타글란딘 E2 농도

정상 대조군과 천식 대조군에서 혈중 평균 프로스타글란딘 E2 농도는 각각 19.2 ± 6.8 pg/dl, 52.2 ± 24.0 pg/dl로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었고($p=0.101$), 천식 대조군과 치료군에서의 혈중 프로스타글란딘 E2 농도는 각각 52.2 ± 24.0 pg/dl, 25.2

Table 1. Eosinophil infiltration, COX2 immunostain, and plasma PGE2 level of each study groups.

	Normal control	Asthma control	Treatment
No. of rats	6	7	9
Eosinophil(%)	0.8±0.84*	10.7±3.5	9.4±4.4**
COX2 immunostain(gray scale)	118.7±3.6	125.7±4.1	118.1±3.9
plasma PGE2(pg/dl)	19.2±6.8	52.2±24.0	25.2±10.7

Data were expressed as mean±SEM.

*p=0.014 compared between normal and asthma control group

**p=0.408 compared between asthma control and treatment group

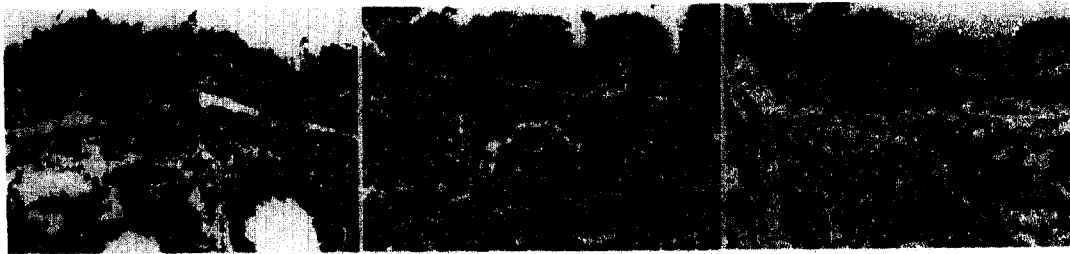


Fig. 2. Histologic findings of airway of each study groups. H-E stain, original magnification, X200. A) Normal control rat. B) Asthma control rat. C) Nimesulide treated rat. No evidence of eosinophilic infiltration in interstitial and perivascular space of normal control rat. Eosinophil infiltration was noted in the asthma control and nimesulide treated group.

±10.7 pg/dl로 천식 대조군에서는 증가하는 경향이 있었고 치료군에서는 감소하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.174)(Table. 1). 정상 및 천식 대조군과 치료군의 세 군간의 비교에서도 통계적인 차이는 없었다(p=0.198).

5. Cox2 억제제 투여 전후의 기도 저항의 변화

Nimesulide를 3mg/kg씩 2주간 투여한 후 OVA으로 즉시형 기관지 수축 반응을 일으킨 상태에서 측정 한 specific airway resistance는 nimesulide를 투여 하기 전에는 13.8±1.78 mmHg*sec, 투여 후에는 13±1.3 mmHg*sec로 투여 전후를 비교해서 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.917). 연구 제 28 일째 시행한 OVA 즉시형 기관지 수축 반응 검사 상 천식 대조군의 평균 기도 저항값과 치료군의 평균 기도 저항값의 비교에서도 통계적으로 유의한 차이가 없

었다(p=0.944)(Fig. 5).

고 안

기관지 천식의 주된 병태 생리는 염증 매개 물질에 의한 기도 수축, 혈관 투과성 항진에 따른 부종 및 염증 반응이 특징인데 이러한 염증 매개 물질은 기도 내 염증 세포 및 상피 세포의 인지질로부터 일련의 반응에 의하여 생성된다. 즉, 인지질에 phospholipase A2가 작용하여 아라키돈산이 생성되고 아라키돈산은 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase (COX)에 의해 각각 다른 경로로 대사된다. COX는 아라키돈산을 프로스타글란딘 H로 전환시키고 프로스타글란딘 H는 다양한 프로스타글란딘, 프로스타사이클린, 트롬복산으로 대사된다. 이러한 COX는 2가지 형태의 이성체(isoform)로 존재하는데^{2,3}, COX1은 인체의 신장, 소화기, 뇌조직, 생식 기관, 혈소판에 주로 분포하

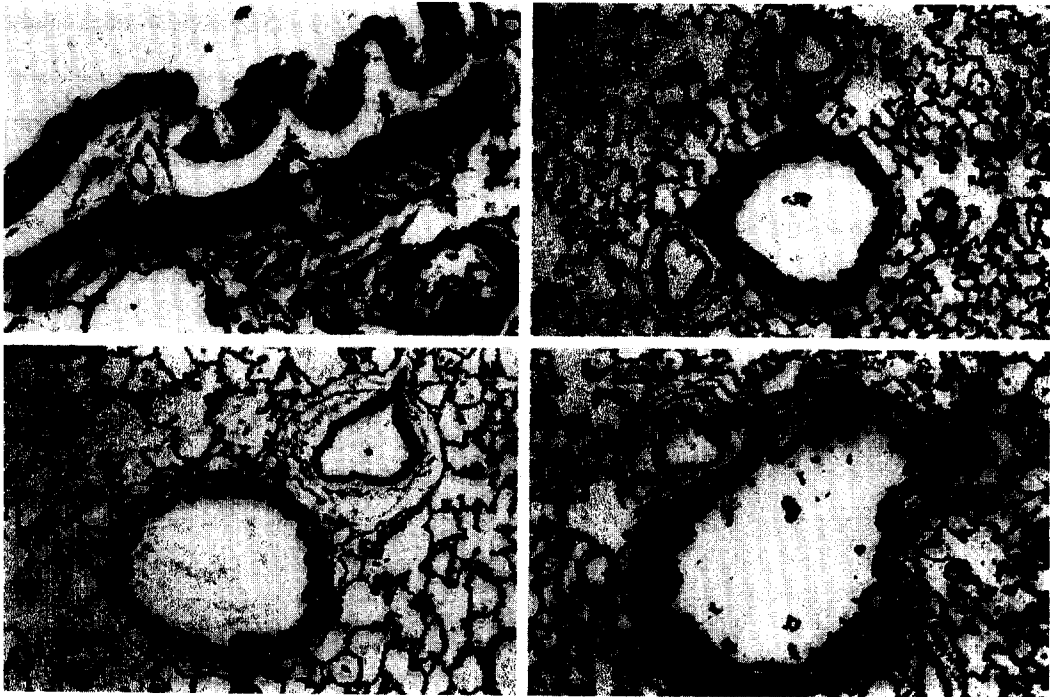


Fig. 3. COX2 immunostain in rat lung. A) The sites of COX2 immunostain expression were airway epithelium, airway smooth muscle, vascular smooth muscle, and inflammatory cells. Original magnification, X400. B) Normal control rat. C) asthma control rat. D) Nimesulide treated group. Original magnification, X100.

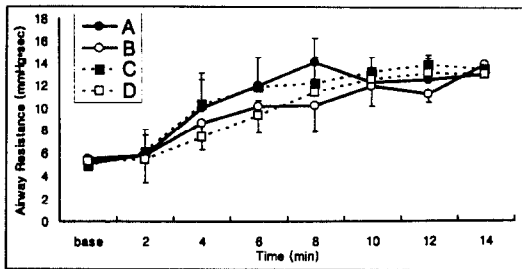


Fig. 4. Airway resistance of before and after nimesulide or placebo administration in asthmatic rats.

A : Asthma control, at 14th day
 A : Asthma control, at 28th day
 C : Nimesulide group, at 14th day
 D : Nimesulide group, at 28th day

여 체내 항상성 유지에 필요한 프로스타글란딘을 생성하고^{5,6}, COX2는 섬유모세포, 단핵세포, 내피세포,

비만세포에서 혈소판 활성화인자(platelet activating factor)와 같은 알레르기 매개 물질이나 사이토카인¹¹, 성장인자(growth factor)¹² 그리고 박테리아의 지다당류(lipopolysaccharide)의 자극¹³에 의해 내형질세포(endoplasmic reticulum) 및 세포 핵막에서 발현되어¹⁴ 트롬복산이나 프로스타글란딘을 생성하여 염증 반응에 관여한다. 그리고 이러한 COX2는 스테로이드나 IL-4, IL-13 같은 사이토카인에 의해 발현이 억제된다고 한다^{15,16}. COX의 분자구조에 있어서 COX1과 COX2에 대한 유전자는 각각 인간의 9번, 1번 염색체에 존재하고^{17,18}, 엑손 1과 2를 제외하곤 COX1과 COX2는 동일한 인트론/엑손 배치를 갖는다. COX1 인트론의 분자 크기가 22kb 인데 비해 COX2는 8kb로 작아 빠르게 전사되고 mRNA processing을 빨리 진행한다¹⁹. 따라서 염증 반응이나 다른 병리학적 반응에서 빨리 항진되는 특성이 있다. 이러한

COX의 경로에 의해 생성되는 대사 산물은 특정 세포에 대해 특이성을 갖는다. 즉, 혈소판에서 주로 트롬복산을, 내피 세포에서는 주로 프로스타글란딘 I₂를 생성하고 기도 내 염증 세포에서는 트롬복산이나 프로스타글란딘 D₂가 생성되는²⁰ 반면 기도 상피 세포에서는 프로스타글란딘 E₂가 COX₂의 주된 대사산물로서²¹⁻²³ 기도 평활근의 이완 작용^{24,25} 및 기도 상피 세포에서 점액 분비를 억제하고 사이토카인의 분비를 억제하는²⁶⁻²⁸ 등 기도내 항상성 유지에 관여한다²⁹. 중요한 것은 기도 상피 세포에서 프로스타글란딘 E₂의 감소는 기도 과민성과 기관지 천식의 병태 생리학과도 관련성이 있다는 것이다^{30,31}. 현재 염증 반응에 관여하는 이러한 COX₂에 대한 연구는 류마치스 관절염이나^{32,33} 염증성 장 질환 또는 대장 내 용종³⁴ 등에서 많이 시도되고 있으며, 호흡기 영역에선 기도 내 염증을 특징으로 하는 기관지 천식에서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 아스피린 유발성 천식에서는 아스피린이나 비스테로이드성 항염증제(NSAID)가 COX를 억제함으로써 COX의 대사 산물인 프로스타글란딘 E₂의 생성이 억제되어 프로스타글란딘 E₂의 기도 내 방어 작용인 류코트리엔 생성 억제 및 비만 세포로부터의 히스타민 유리 억제 작용이 차단되어 기관지 수축이 유발된다는 병태 생리^{6,7}가 알려져 있으나 알레르기성 천식에 대해서는 아직 COX₂에 대한 역할이 명확히 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 백서의 즉시형 기관지 수축 모델에서 COX₂ 및 프로스타글란딘 E₂의 발현 양상 및 COX₂ 억제제 사용 후의 기도 내 COX₂의 발현, 혈중 프로스타글란딘 E₂의 농도와 기도 내 저항의 변화에 대해 알아보았다.

정상 폐 조직에서 COX₂ 면역 조직 화학 염색은 주로 기관지 상피세포, 기관지 평활근, 기도 및 혈관 주위의 염증 세포에 염색되었다. 이것은 Ermert 등³⁵의 연구 결과 정상 백서의 폐 조직에서 COX₂는 기도 내 상피세포, 혈관 주위 결체 조직, 대식 세포와 비만 세포, 혈관내 평활근에서 발현된다는 것과 Walenga 등³⁶의 보고인 정상 조건 하에서 COX₂의 발현과 일치

하는 결과로 이는 다른 조직과 달리 쥐나 사람의 폐 조직에서 COX₂는 폐 조직의 염증 반응에만 관여하는 것이 아니라 정상 생리 조건 하에서도 발현되는 것으로 사료된다. 또한 폐 조직에서는 COX₁보다 COX₂가 더 많이 발현되는 것으로 알려져 있다³⁷. 그리고 이렇게 COX₂의 발현이 염증 반응이 없는 곳에서 발현되는 조직으로 신생아의 신장, 흉선 그리고 성인의 뇌조직, 폐, 고환 조직이 있는데³⁸ 이런 조직에서 COX₂ 발현이 증가되는 이유에 대해서는 아직 확실히 밝혀진 것이 없다.

기관지 천식이 유발된 백서 모델과 정상군에서 COX₂ 발현은 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었고 또한 COX₂의 활성도를 나타내는 혈중 프로스타글란딘 E₂의 차이도 관찰할 수 없었다. Demoly 등³⁹에 의하면 stable asthma 환자나 만성 기관지염 환자에서 COX₂의 발현이 항진되지 않는다고 한다. 아마도 이러한 결과는 폐장에서는 다른 조직과 달리 정상 상태에서도 COX₂가 발현되기 때문에 다른 염증 조직의 COX₂ 발현과는 다른 기전으로 COX₂ 발현이 나타날 수 있고 또는 COX₂의 대사 산물인 프로스타글란딘 E₂가 정상 기도 내에서 염증 반응에 대해 방어 기전으로 작용²⁹을 하지만 기관지 천식과 같은 기도 내 염증 반응을 특징으로 하는 조직에서는 이러한 COX₂의 발현에 장애가 생기고 이로 인해 프로스타글란딘 E₂의 생성이 적절치 못해 결국엔 기도 내 염증 반응을 억제하지 못하기 때문이라고 생각된다.

COX₂ 선택적 억제제인 nimesulide를 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 기도 및 폐 실질 내 COX₂ 발현 및 혈중 프로스타글란딘 E₂ 농도에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없어서 다른 연구들^{40,41,42}과 일치하지 않는 결과를 나타내었다. 본 연구에서 nimesulide를 투여한 군과 위약을 투여한 두 군간에 COX₂와 프로스타글란딘 E₂의 차이가 없는 것에 대한 이유로 아마도 nimesulide 투여 군에서 nimesulide가 기도 내에서 COX₂를 억제하기 위한 적절한 치료 농도에 도달하지 않았을 가능성이 있고 또한 기도 내 상피 세포에서 COX₂ 발현의 장애로 말미암아

nimesulide에 의한 COX2의 억제에 영향을 미치지 못할 가능성도 있을 수 있다.

Nimesulide를 투여한 군에서 투여 전 후의 기도 저항의 변화는 통계적으로 의미가 없었는데, 기도 내 저항에 대한 몇몇 실험에서 서로 상반된 결과를 보고하고 있다⁴²⁻⁴⁴. 이는 아마도 기도 내 과민 반응은 COX 경로보다는 주로 lipoxxygenase 경로에 의해 영향을 받기 때문이라 사료된다.

본 연구에서 몇 가지 제한점이 있는데 첫째, 각 군에 있어서 대상 숫자가 적어서 통계적 의미를 부여하기엔 무리가 있으나 비모수 통계 분석으로 판단 오류를 최소화시켰다. 향후 더 많은 수를 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 둘째, 면역 조직 화학 염색으로 효소 발현의 위치는 정확하게 판단 가능하나 발색의 정도로 효소 발현의 정도를 정량적으로 비교하는데 있어서 오차가 발생할 수 있다는 점이다. 이러한 문제를 극복하기 위해 주관적인 판단을 배제하고 기계를 통한 image 분석을 시행하여 객관적으로 분석하려고 노력하였지만 어느 정도의 오차는 있을 것으로 사료된다. 이는 향후 COX2 mRNA에 대한 경쟁적 역전사 중합 효소 연쇄 반응법(competitive RT-PCR) 등의 연구를 통하여 해결되어야 할 것이다. 셋째, 혈중 프로스타글란딘 E2의 농도가 기도 상피 세포 및 폐 실질에서의 프로스타글란딘 E2의 농도를 간접적으로 반영할 뿐 정확한 농도를 반영하지 못한다는 것이다. 향후 이에 대한 문제점은 기관지 세척액에서 직접 프로스타글란딘 E2 농도를 측정하는 것이 적절하리라 사료된다.

결론적으로 아스피린 유발성 기관지 천식은 COX의 억제제 lipoxxygenase의 경로가 활성화되어 류코트리엔의 생성이 상대적으로 증가하고, 기도 내 염증 및 기도 과민 반응에 대한 방어 작용을 하는 프로스타글란딘 E2의 생성의 감소로 기도 내 염증과 과민 반응이 증가하는 반면, 알레르겐 유발성 기관지 천식에서의 COX의 역할에 대해서는 적어도 아스피린 유발성 천식보다는 적을 것으로 사료된다. 이것은 아마도 기도 염증과 과민 반응에 주로 관여하는 경로가 COX

에 의한 경로가 아니고 lipoxxygenase 경로 등의 다른 경로가 주로 관여⁴⁵⁻⁴⁷하리라 사료된다.

향후 천식 모델에서 COX2 억제제를 사용한 후 lipoxxygenase 경로의 대사 산물(류코트리엔)의 변화와 이로 인한 기도 염증 반응에 미치는 영향에 대한 연구와 COX2 억제제의 투여하는 방법에 있어서 투여 용량 또는 투여 횟수를 달리하거나 COX2에 대한 선택성이 더 높은 약제를 투여한 후 기도 내 COX2의 변화에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

목 적 :

기관지 천식은 기도의 과민 반응을 특징으로 하는 기도 내 염증 질환이다. 최근 염증반응에 관여하는 cyclooxygenase(COX)에 대해 90년대 초 새로운 형태의 COX2가 발견되었다. 또한 최근 COX2만을 선택적으로 억제하는 약제가 개발되어 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 따라서 저자는 기도 내 염증 반응을 특징으로 하는 기관지 천식에서 COX2 발현 양상과 혈중 프로스타글란딘 E2를 측정하고 COX2 억제제를 사용한 후 COX2 발현, 프로스타글란딘 E2의 변화 및 기도 저항의 변화를 알아보았다.

대상 및 방법 :

총 38마리의 Sprague-Dawley 백서(250-300g)를 대상으로 정상 대조군, 천식 대조군, 치료군의 3군으로 나누어 실험하였다. 각 세 군에 대해 제 28연구일에 즉시형 기관지 수축 반응을 유발시킨 후 기도 저항을 측정하였다. 제 30연구일에 혈장 내 프로스타글란딘 E2 수치를 측정하고 기도 및 폐 실질 내 호산구 침윤 정도 및 COX2 면역 조직 화학 염색에 대한 발색 정도를 image analysis를 통해 확인하였다.

결 과 :

기관지 및 폐 실질 내 호산구 침윤은 천식 대조군과 치료군의 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. COX2 면역 조직 화학 염색 및 혈중 프로스타글란딘 E2 농도에 있어서 정상 대조군, 천식 대조군,

치료군의 세 군에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 치료군에서 nimesulide 투여 후 OVA으로 즉시형 기관지 수축 반응을 일으킨 상태에서 측정된 기도 저항은 nimesulid를 투여하기 전과 비교해서 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

결 론 :

결론적으로 COX2는 알레르겐 유발성 천식의 병태생리에 있어서 주된 경로가 아니며 향후 천식 모델에서 COX2 억제제를 사용한 후 lipoxygenase 의한 대사산물과의 상관 관계와 COX2 억제제의 투여하는 방법에 있어서 투여 용량 또는 투여 횟수를 달리하거나 COX2에 대한 선택성이 더 높은 약제를 투여한 후 기도 내 COX2의 변화에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Peters SP, MacGlashan Jr. DW, Schulman ES, Schleimer RP, Hayes EC, Rockach J, et al. Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells. *J Immunol* 1984;132:1972-9.
2. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(7):2692-6.
3. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase /cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266(20):12866-72.
4. Smith WL, Dewitt DL. Biochemistry of prostaglandin endo- peroxide H synthase-1 and -2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995;15:179-94.
5. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(25):12013-7.
6. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma : advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(1):5-13.
7. Picado C, Fernandez-Morata JC, Juan M, Roca-Ferrer J, Fuentes M, Xaubet A, et al. Cyclooxygenase-2 mRNA is down-expressed in nasal polyps from aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):291-6.
8. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999;353:307-14.
9. Davis R, Brogden RN. Nimesulide. An update on its pharmaco-dynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1994;48(3):431-54.
10. Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Well JH. A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol* 1979;46(2):399-406.
11. Jones, DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 1993;268(12):9049-54.
12. Hamasaki Y, Kitzler J, Hardman R, Nettesheim P, Eling TE. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1993;304(1):226-34.
13. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW.

- Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994;93(1):391-6.
14. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, Dewitt DL, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270(18):10902-8.
15. Masferrer JL, Seibert K, Zweifel B, Needleman P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(9):3917-21.
16. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3228-32.
17. Kraemer SA, Meade SA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: Identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992;293:391-400.
18. Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 1992;267(7):4338-44.
19. Crofford LJ. COX-1 and COX2 Tissue Expression: Implications and Predictions. *J Rheumatol (suppl 49)*1997;24:15-9.
20. Kleeberger SR, Freed AN. Prostanoids. In: Busse WW, Holgate ST, editors. *Asthma and Rhinitis*. Boston: Blackwell Scientific; 1995. p. 825-37.
21. Delamere, F, Holland E, Patel S, Bennett J, Pavord I, Knox A. Production of PGE2 by bovine cultured airway smooth muscle cells and its inhibition by cyclo-oxygenase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1994;111(4):983-8.
22. Hansbrough JR, Atlas AB, Turk J, Holtzman MJ. Arachidonate 12-lipoxygenase and cyclooxygenase: PGE isomerase are predominant pathways for oxygenation in bovine tracheal epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1989;1(3):237-44.
23. Salari H, Chan-Yeung M. Release of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE) and prostaglandin E2(PGE2) by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1(3):245-50.
24. Devillier P, Acker GM, Advenier C, Marsac J, Regoli D, Frossard N. Activation of an epithelial neurokinin NK-1 receptor induces relaxation of rat trachea through release of prostaglandin E2. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263(2):767-72.
25. Yu XY, Hubbard W, Spannhake EW. Inhibition of canine tracheal smooth muscle by mediators from cultured bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;262:L229-L234.
26. Peters SP, Schulman ES, Schleimer RP, MacGlashan DW Jr, Newball HH, Lichtenstein LM. Dispersed human lung mast cells. pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. *Am Rev Respir Dis* 1982;126(6):1034-9.
27. Kita H, Abu-Ghazaleh RI, Gleich GJ, Abraham RT. Regulation of Ig-induced eosinophil degranulation by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *J Immunol* 1991;146(8):2712-8.
28. Alam R, DeJarnatt A, Stafford S, Forsythe PA, Kumar D, Grant JA. Selective inhibition of the cutaneous late but not immediate allergic response to antigens by misoprostol, a PGE analog. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1066-70.

29. Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. Protective effects of Inhaled PGE₂ on allergen-induced airway responses and Airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(1):31-36.
30. Braunstein G, Labat C, Brunelleschi S, Benveniste J, Marsac J, Brink C. Evidence that the histamine sensitivity and responsiveness of guinea-pig isolated trachea are modulated by epithelial prostalands E₂ production. *Br J Pharmacol* 1988;95(1):300-8.
31. Gray PR, Derksen FJ, Broadstone RV, Robinson NE, Peters-Golden M. Decreased airway mucosal prostaglandin E₂ production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(3):586-91.
32. Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, et al. In Vivo Cyclooxygenase Expression in Synovial Tissues of Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis and Rats with Adjuvant and Streptococcal Cell Wall Arthritis. *J Clin Invest* 1992;89(1):97-108.
33. Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, et al. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994;93(1):1095-101.
34. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107(4):1183-8.
35. Ermert L, Ermert M, Goppelt-Strube M, Walmrath D, Grimminger F, Steudel W, et al. Cyclooxygenase Isoenzyme Localization and mRNA Expression in Rat Lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18(4):479-88.
36. Walenga RW, Kester M, Coroneos, Butcher S, Dwivedi R, Statt C. Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro. *Prostaglandins* 1996;52(5):341-59.
37. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993;330(2):156-60.
38. Tippetts MT, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. Tumor promoter-inducible genes are differentially expressed in the developing mouse. *Mol Cell Biol* 1988;8(10):4570-2.
39. Demoly P, Jaffuel D, Lequeux N, Weksler B, Creminon C, Michel FB, et al. Prostaglandin H synthase 1 and 2 immunoreactivities in the bronchial mucosa of asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(2):670-5.
40. Asano K, Lilly CM, Drazen JM. Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1996;271:L126-131.
41. Futaki N, Arai I, Hamasaka Y, Takahashi S, Higuchi S, Otomo S. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J Pharm Pharmacol* 1993;45(8):753-5.
42. Berend N, Armour CL, Black JL. Indomethacin inhibits C5a des arg-induced airway hyperresponsiveness in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:24A.
43. Lanes S, Stevenson JS, Codias E, Hernandez A, Sielczak MW, Wanner A, et al. Indomethacin and FPL 57231 inhibit antigen-induced airway hyperresponsiveness in sheep. *J Appl Physiol*

- 1986;61(3):864-72.
44. Lee HK, Murlas C. Ozone-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs is abolished by BW 755C or FPL 55712 but not by indomethacin. *Am Rev Respir Dis* 1985;132(5):1005-9.
45. Joubert JR, Shephard E, Mouton W, Van Zyl, Viljoen I. Non-steroid anti-inflammatory drugs in asthma : dangerous or useful therapy? *Allergy* 1985;40(3):202-7.
46. Kirby JG, Hargreave FE, Cockcroft DW, O'Byrne PM. Effect of indomethacin on allergen-induced asthmatic responses. *J Appl Physiol* 1989; 66(2):578-83.
47. Dahlen S, Hansson G, Hedqvist P, Björck T, Granström E, Dahlen B. Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C4, D4 and E4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80(6):1712.
-