

백서 패혈증 모델에서 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 발현에 미치는 효과에 관한 연구

이용근 · 안 용 · 임대호 · 백진아 · 고승오 · 신효근

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 구강생체과학연구소, BK21사업

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:346-52)

The effect of heat shock protein 70 on inducible nitric oxide synthase during sepsis in rats

Yong-Keun Lee, Yung Ahn, Dae-Ho Leem, Jin-A Baek, Seung-O Ko, Hyo-Keun Shin

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Institute of Oral Bioscience, Brain Korea 21 project, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Introduction: Heat shock protein70 (HSP70) is a highly conserved family of proteins produced after a variety of stresses. Many studies reported that the overexpression of HSP70 can improve the prognosis of the patients with sepsis through a reduction of the nitric oxide concentration. However, these results only revealed the effect of HSP70 and nitric oxide. No studies have examined the relationship between HSP70 and nitric oxide. The aim of this study was to evaluate the effect of the overexpression of HSP70 on the expression of inducible nitric oxide synthase and the nitric oxide concentration. In addition, the mechanism of the relationship of HSP70 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in sepsis was examined.

Materials and Methods: The experiments were performed on male sprague-dawley rats. Sepsis was induced by a cecal ligation and puncture (CLP). Glutamine (GLN) or saline was administered 1 hour after the initiation of sepsis. Serum and lung tissues were acquired from the rats 12 hours or 24 hours after the initiation of sepsis. The nitric oxide concentration, the expression of HSP70 in lung, and the gene expression of iNOS in lung were analyzed. The three groups, sham operation, CLP and CLP+GLN, were compared.

Results: Compared to the other groups, in CLP+GLN, GLN administered after the initiation of sepsis enhanced the expression of HSP70 in the lung at 12 hours (47.19 ± 10.04 vs. 33.22 ± 8.28 , $P=0.025$) and 24 hours (47.06 ± 10.60 vs. 31.90 ± 4.83 , $P=0.004$). In CLP+GLN, GLN attenuated the expression of iNOS messenger RNA (mRNA) in the lung at 12 hours ($5,513.73 \pm 1,051.60$ vs. $4,167.17 \pm 951.59$, $P=0.025$) and 24 hours ($18,740.27 \pm 8,241.20$ vs. $9,437.65 \pm 2,521.07$, $P=0.016$), and reduced the concentration of nitric oxide in the serum at 12 hours (0.86 ± 0.48 vs. 3.82 ± 2.53 , $P=0.016$) and 24 hours (0.39 ± 0.25 vs. 1.85 ± 1.70 , $P=0.025$).

Conclusion: The overexpression of HSP70 induced by the administration of GLN in sepsis attenuates the expression of the iNOS gene but reduces the nitric oxide concentration.

Key words: Heat shock proteins, inducible nitric oxide synthase (iNOS), Nitric oxide (NO), Sepsis

[paper submitted 2010. 6. 18 / revised 2010. 10. 11 / accepted 2010. 10. 18]

I. 서 론

국내의 패혈증에 의한 사망 통계는 정확히 집계되고 있지 않으나 미국의 경우 연간 패혈증 환자 수는 751,000명으로 1,000명당 3명의 발생률을 보이고 있다. 또한 연간 사망 환자 수는 215,000명으로 전체 사망 환자 중 9.3%를 차지하고 있어 급성 심근경색에 의한 사망률에 근접해 있으며 비 심혈관계 중환자실의 가장 흔한 사망원인으로 보고되고

있다. 기존의 많은 연구에도 불구하고 지난 수십 년간 패혈증 환자의 사망률은 30% 내외에서 유지되고 있으며 의미 있는 향상을 보이지 못하고 있다^{1,2}. 더구나 1995년 미국 내 패혈증 환자의 평균 1인당 진료비가 22,100달러, 연간 총 진료비가 167억 달러였으며 2020년까지 매년 1,000,000명 이상(1.5%) 증가할 것으로 보고하고 있어 막대한 의료자원의 소요가 예상되고 있다³⁻⁵. 임상적으로 패혈증은 대사 장애, 조직 기능 저하, 관류 장애 등을 유발하며 이로 인해 전신적인 조직 관류 장애가 나타나 결국 다발성 장기 부전에 빠지게 되며 조직 관류 장애의 주요 원인은 에너지 공급의 장애로 알려져 있다. 패혈증 상황에서는 적절한 산소 공급에도 불구하고 미토콘드리아에서의 산소 이용이 감소하게 되어 ATP의 적절한 생산이 이루어지지 않아 세포 저산소증에 빠지게 되며 많은 외인성, 내인성 매개 물질들이 이러한 세포의 기능 장애에 관여하게 된다⁶⁻⁸. 특히 nitric oxide

신효근

전라북도 전주시 덕진구 덕진동 664-14
전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Hyo-Keun Shin

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Chonbuk National University 664-14, Duckjindong, Jeonju, Chonbuk, 561-756, Korea
TEL: +82-63-250-2014 FAX: +82-63-250-2089
E-mail : hkshin@jbnu.ac.kr

synthase (NOS)의 활성화와 이로부터 유발된 nitric oxide (NO)의 유리 물질과 산소 유리기들은 미토콘드리아의 기능 장애의 중요한 원인으로 고려되고 있다⁹. 패혈증의 병인, 병태 생리, 진단 등에 관한 연구에서 많은 발전이 있었으나, 효과적인 치료방법은 아직 정립되지 못하고 있다. 다만 현재까지 연구된 패혈증 쇼크의 진행과정 및 치료방법은 크게 다음과 같은 3가지로 알려져 있다^{4,5,10,11}. 첫째, 감염원 배양 후 경험적 항균제 및 배양결과에 따른 적절한 항균제 투여를 통해 감염의 원인인자를 제거하는 방법이며, 둘째, 감염원에 의해 활성화된 염증성 매개물질에 의한 염증반응 과정이 패혈증, 중증 패혈증, 패혈증 쇼크, 다발성 장기부전 및 사망으로 이르는 질병 진행의 가장 중요한 요인으로 알려져 있으므로 체외순환장치를 이용한 혈액여과 및 투석을 통해 염증성 매개물질을 제거하여 염증반응 과정의 진행을 억제하거나, 스테로이드제제, 항응고인자, 수용체 차단을 통해 염증성 매개물질의 활동성을 조절하여 염증반응 과정의 진행을 차단하는 방법이며, 셋째, 순환 혈액량을 유지하기 위해 수액 및 혈액을 투여하거나 혈관 수축 약물을 투여하여 혈관의 긴장도를 강화하고 심박출량을 유지하기 위해 심근 강화 약물을 투여하여 심근수축력 및 심박동수를 증가시키는 방법이다. 그러나 기존의 많은 연구들로부터 이러한 치료방법의 제한점이 밝혀지고 있다. Opal 등¹²은 적절한 항균제 사용이 감염성 질환에 의한 사망률을 줄일 수 있음을 보고했으나, Wenzel¹³에 의하면 패혈증 환자에서는 일단 염증반응 과정이 시작되면 감염원의 유무와 관계없이 질병이 진행되어 다발성 장기부전으로 이르게 되어 생존율을 향상시키지 못함이 보고되었다¹²⁻¹⁴. Annane 등¹⁵과 기타 여러 연구에서 제시된 스테로이드제제의 투여, Bernard 등¹⁶, Corrigan 등¹⁷과 기타 여러 연구에서 제시한 항응고 인자의 투여, Augus와 Wax³, Abraham 등¹⁸과 기타 여러 연구에서 제시한 inducible NOS (iNOS) 억제물질의 투여, 수용체 차단 등 여러 치료방법이 시도되었으나 복잡한 염증반응 과정을 전체적으로 조절할 수 없어 생존율을 향상시키지 못함을 보고하였다^{3,13-18}. 최근 여러 연구에서 체외순환장치를 통해 염증성 매개물질을 제거하는 치료법이 제시되었으나, 순환 혈액량, 심박출량의 저하 등의 부작용으로 인해 생존율을 향상시키지 못함을 보고하였다^{10,19-23}. 조직관류 유지를 위한 수액, 혈액 및 약물의 투여는 항균제 투여와 함께 현재까지 가장 널리 사용되고 있는 방법이나, 염증성 매개물질을 제거할 수 없어, 다발성 장기손상으로의 진행을 막을 수 없고, 다발성 장기손상 발생 시 조직관류가 제대로 이루어지지 않아 손상이 악화되어 생존율을 향상시키지 못함을 보고하였다^{13,14,24}. 다만 초기 6시간 내의 집중 치료(early goal-directed therapy)를 통해 생존율을 향상시킬 수 있다고 보고하였다^{25,26}. 결국 기존의 여러 연구에서 이들 치료방법의 임상 적용 시 임상 양상의 호전은 일시적으로 나타나지만 복잡한 염증반응 과정 자체를 회복시키거나 조직관류를 개선하지 못하고 다발성

장기부전이 진행하여 획기적인 생존율의 향상을 보이지 못하는 것으로 보고되고 있으며^{10,24,26}, 이의 극복을 위한 여러 시도들이 이루어지고 있다. 그 중 패혈증, 특히 수액요법과 승압제에 반응하지 않는 후기 패혈증의 병태 생리에서 iNOS의 과도한 발현과 이로 인한 NO의 증가의 중요성은 매우 잘 알려져 왔다²⁷. NO는 다양한 생물학적 활성도를 지닌 지질친화성 가스로서 조직이 허혈성 상태에 있는 경우 합성이 증가한다. NO의 현재까지 알려진 작용으로는 첫째, guanylyl cyclase를 자극하여 세포 내의 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)를 증가시켜 혈관 평활근을 이완시켜 혈압을 감소시키며, 둘째, 신경세포의 N-methyl D-aspartate (NMDA) 수용체를 자극하여 신경전달물질로 작용하며, 셋째, 산소유리기 등과 반응하여 살균작용 및 세포독성 작용을 나타내며, 염증반응에 관여하여 항염증작용을 하거나 염증반응을 촉진하는 이중적인 작용을 한다. 혈중 NO의 증가를 억제하기 위해 NOS의 길항제 개발 등이 이를 막기 위한 여러 방법들이 시도되고 있으며, 동물 실험에서는 많은 효과를 보았으나, 임상실험에서는 모두 실패한 상태이다²⁸⁻³⁰.

1962년부터 heat shock response (HSR)라고 불리는 자기방어 현상(self-protective phenomenon)이 연구되어 갑작스런 열 자극(heat stress)이 생체 내에서 일단의 단백질 발현을 유발함을 알게 되었고 이들을 heat shock protein (HSP)이라고 부르게 되었다³¹. HSP는 정상 상황에서도 존재하고 있으나 스트레스 상황에서 합성이 증가되며 HSP의 증가는 치명적일 수 있는 추가 스트레스에 대한 세포의 내성을 증가시키는 것으로 밝혀지고 있다³²⁻³⁵. 내독소 투여 또는 cecal ligation and puncture (CLP)등을 통해 유발된 백서의 패혈증 모델을 대상으로 한 기존 여러 연구에서는 패혈증 유발 수 시간 전의 가온요법(heat shock treatment) 또는 geranylgeranylacetone (GGA)의 경구 투여를 통해 HSP 중 하나인 HSP70의 발현을 증가시킬 경우 생존율이 향상되며 NO, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, 6 등의 염증성 매개물질의 발현 및 활성이 저하됨을 보고하였다³⁶⁻³⁸. 그러나 이들 연구는 HSP70과 NO의 현상에 대한 관찰일 뿐 상호관계와 영향에 대한 기전을 밝히지는 못하고 있다. 만일 HSP70과 iNOS의 상호관계를 알 수 있다면, 패혈증의 치료에서 iNOS의 활성을 억제하기 위한 주 치료목표를 정하는 데 도움이 될 수 있을 것이며 만약 HSP70이 iNOS를 억제한다면 HSP70의 과도 발현이 패혈증 환자의 주 치료목표가 될 수 있을 것이다. 그러나 현재까지 패혈증을 포함한 쇼크모델에서 HSP70과 iNOS의 상관관계에 대한 연구는 없는 상태이다. 또한 HSP70이 iNOS의 활성도를 억제할 것이라는 가설은 제기되었으나³⁹, 이를 증명한 연구는 없는 상태이다. 따라서 본 연구는 백서의 패혈증 모델에서 패혈증 유발 후 glutamine (GLN)의 투여를 통해 HSP70가 과도하게 발현되었을 때 iNOS의 발현이 감소되며 이를 통해 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 발현을 억제하여 혈중 NO의

증가를 억제한다는 점을 보여주고자 시행되었다.

II. 연구대상 및 방법

본 연구는 패혈증 발생 후 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 발현 및 혈중 NO의 농도에 미치는 영향을 확인함으로써 후기 패혈증의 다양한 병태 생리 중에서 HSP70과 iNOS와의 상관관계를 밝히며 이를 통해 임상에서 패혈증 환자의 예후에 큰 영향을 미치는 iNOS의 발현을 억제하기 위한 치료방법으로 HSP70의 과도 발현의 유도를 임상에 적용할 수 있는 기틀을 마련하고자 시행되었다.

1. 실험동물

1) 실험군

280-330 g의 병원균이 없는 스프라그-다울리(sprague-dawley)종의 수컷 쥐를 사용하였다. 실험동물군은 2주 이상 사료와 물을 주며 12시간마다 밝고 어둡게 주위 조명을 반복하여 주위 환경에 적응시킨 후 실험 6시간 전부터 물만 주며 금식시켰다^{1,7,37,38}. 실험군은 다음과 같이 분류하여 각각의 처치를 시행하였으며, 각 군은 6마리씩으로 하였다.

- (1) Sham operation (SHAM): ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg를 복강 내 투여(intraperitoneal inject)하여 마취시켰다. 2 cm 복벽 절개 후 cecum을 빼낸 후 아무런 처치도 시행하지 않고 복강 내로 다시 집어넣었다. 복벽 근육 및 피부층을 봉합한 후 피하로 20 mL/kg의 생리식염수를 투여하였다. 1시간 후 GLN과 동량의 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.
- (2) Cecal ligation and puncture (CLP): 동일한 방법으로 마취시킨 후 2 cm 복벽 절개 후 cecum을 빼내어 ileocecal valve 직하방에서 25%의 cecum을 결찰하였으며, 18 gauge 바늘로 두 차례 관통한 후 대변이 복강 내로 나오도록 처치하였다. 복벽 근육 및 피부층을 봉합한 후 피하로 20 mL/kg의 생리식염수를 투여하였다. 1시간 후 GLN과 동량의 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.
- (3) CLP와 GLN 투여군(CLP+GLN): 동일한 방법으로 마취시킨 후 CLP를 시행하였으며 1시간 후 GLN 0.75 g/kg/dose를 복강 내로 투여하였다. 수술이 끝난 개체는 사육시설에 넣어 물과 사료를 주고 관찰하였다.

2) 조직 적출

CLP 12시간 및 24시간 후 ketamine 80 mg/kg 및 xylazine 12 mg/kg를 복강 내 투여하여 마취시킨 후 흉부를 절개하

여 심장에서 혈액을 채취하며 폐조직을 적출하였다. 채취된 혈액은 즉시 4℃에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후에 혈장만 분리하여 -7℃에 보관하였으며, 적출한 조직은 4℃ 생리식염수로 철저히 세척한 후, 액체질소에 담가 급냉시킨 후 -70℃에서 보관하였다.

2. 실험방법

1) 혈중 산화질소 측정

액체 용액상태 하에서는 산화질소는 저질로 nitrate (NO_3^-)와 nitrite (NO_2^-) 이온으로 변하는데 생체 내에서는 이들이 가장 안정된 산화질소 산물이다. 본 연구에서는 nitrate와 nitrite를 합한 산화질소의 농도를 측정하였으며, 이 방법은 Greiss reagent를 사용하는 kit로 구성되어 있다. 본 방법에서는 nitrate와 nitrite의 농도를 구분하지 않았다. 혈중 산화질소의 농도는 $\mu\text{mol/L}$ 로 표시하였다.

2) iNOS messenger RNA (mRNA) 발현 측정

상업용 kit (TRI Reagent, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 절제된 폐조직 100 mg에서 RNA를 추출한 뒤, 분광광도계(Beckman, USA)를 사용하여 260 nm에서 추출된 RNA의 농도를 측정하였다. 추출된 RNA 중 100 ng을 역전사하여 first strand complementary DNA (cDNA)를 만들었다. 역전사에 필요한 반응혼합물은 5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTP, 2.5 mM Random Hexamer (Promega, USA), 1 U/ μL ribonuclease inhibitor (Promega, USA), Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (GibcoBRL, USA) 등으로 만들었다. cDNA를 합성한 후에 rat iNOS와 rat glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 대한 PCR (PTC-200 Peltier thermal cycler, MJ Research, USA)을 시행하였다. PCR을 위한 반응화합물은 2 pmol primer, 2.5 U/ μL Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan), 0.8 mM dNTP와 1.5 mM MgCl_2 등으로 만들었다. Polymerase chain reaction (PCR)은 초기 94℃에서 3분간 denaturation 후 30 cycle을 시행하였으며, 각 cycle은 94℃에서 1분간 denaturation 후 58℃에서 1.5분간 annealing을 하고 72℃에서 10분간 elongation하였다. 백서의 iNOS cDNA 합성에 필요한 oligonucleotide primers 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGG-3' (sense)와 5'-GGCTGTCA-GAGCCTTGTGCCTTTGG-3' (antisense)이고, 백서의 GAPDH cDNA를 위한 oligonucleotide primer는 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (sense)와 5'-AGATC-CACAACGGATACATT-3' (antisense)이다. Housekeeping gene GAPDH의 발현을 control로 하며, GAPDH band가 없는 RNA는 제외시켰다. 증폭된 PCR products는 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromidewere가 포함된 1.5% agarose gels에서 전기영동 시킨 후에 자외선으로 검사하였다. iNOS와 GAPDH gene PCR products의 크기는 각각 498 bp와 309 bp로 한다.

겔 사진촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Korea)를 사용해서 스캐닝하였다. iNOS와 GAPDH 유전자 발현의 band density는 imaging densitometer (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

3) 조직에서의 HSP70 발현 측정

Yang 등³⁸과 Sumioka 등⁴⁰이 제시한 방법에 따라 Western blot을 사용하여 측정하였다. 냉동된 각 조직 100 mg을 1.5 mL의 완충용액에 넣은 후 잘게 간 후 5분간 끓인다. 22 gauge의 바늘에 3회 통과시켜 DNA를 잘게 분리하여 -80°C에 보관하였다. 12.5% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하여 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기적으로 부착시켜 50 µg의 단백질을 추출하였다. 비특이적 반응 부위를 제거한 후 rabbit anti-HSP70 polyclonal antibody (1:1,000 dilution)과 함께 2시간 동안 배양하였다. 깨끗하게 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit antibody (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) (1:2,000 dilution)과 함께 1시간 동안 배양하였다. Western blot을 사용하여 추출된 단백질 막의 항체 반응 부위를 확인하였다. 겔 사진 촬영은 bioimage processing system (Biomedlab, Korea)를 사용하여 스캐닝하였다.

3. 자료 분석

자료분석은 SPSS for Windows version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 비모수적 통계분석법을 사용하였다. 세 군의 비교는 Kruskal-Wallis test를, 각 군간 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하여 분석하였다. 각 측정치의 값은 평균 ± 표준편차로 표시하고 유의점정 수준은

$P<0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 혈중 산화질소 농도

CLP 12시간 후 채혈하였을 때 CLP만 시행한 군에서 혈중 산화질소의 농도가 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다. (47.19 ± 10.04 vs. 33.22 ± 8.28 , $P=0.025$) (Fig. 1) CLP 24시간 후 채혈하였을 때에도 CLP만 시행한 군에서 혈중 산화질소의 농도가 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다. (47.06 ± 10.60 vs. 31.90 ± 4.83 , $P=0.004$) (Fig. 2)

2. 폐조직의 iNOS mRNA의 발현

CLP 12시간 후 적출하였을 때 CLP만 시행한 군에서 폐조직의 iNOS mRNA의 발현이 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다. ($5,513.73 \pm 1,051.60$ vs. $4,167.17 \pm 951.59$, $P=0.025$) (Fig. 3) CLP 24시간 후 적출하였을 때에도 CLP만 시행한 군에서 폐조직의 iNOS mRNA의 발현이 CLP+GLN 군보다 유의하게 높게 측정되었다. ($18,740.27 \pm 8,241.20$ vs. $9,437.65 \pm 2,521.07$, $P=0.016$) (Fig. 4)

3. 폐조직의 HSP70의 발현

CLP 12시간 후 적출하였을 때 CLP+GLN 군에서 폐조직의 HSP70의 발현이 CLP만 시행한 군보다 유의하게 높게 측정되었다. (3.82 ± 2.53 vs. 0.86 ± 0.48 , $P=0.016$) (Fig. 5) CLP 24시간 후 적출하였을 때에도 CLP+GLN 군에서 폐조직의 HSP70의 발현이 CLP만 시행한 군보다 유의하게 높게 측정되었다. (1.85 ± 1.70 vs. 0.39 ± 0.25 , $P=0.025$) (Fig. 6)

No 12 hours after CLP (µM)

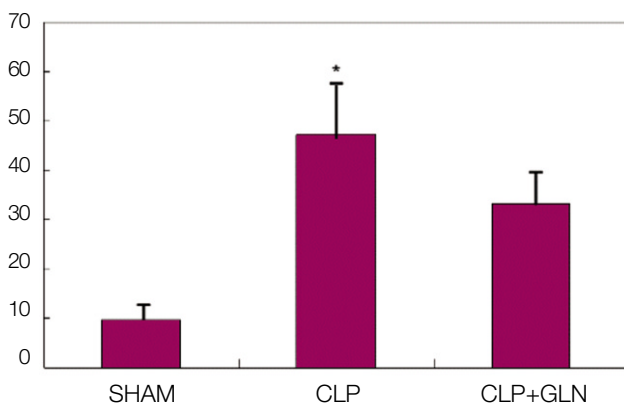


Fig. 1. NO concentration 12 hours after CLP. (NO: nitric oxide, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP+GLN)

No 24 hours after CLP (µM)

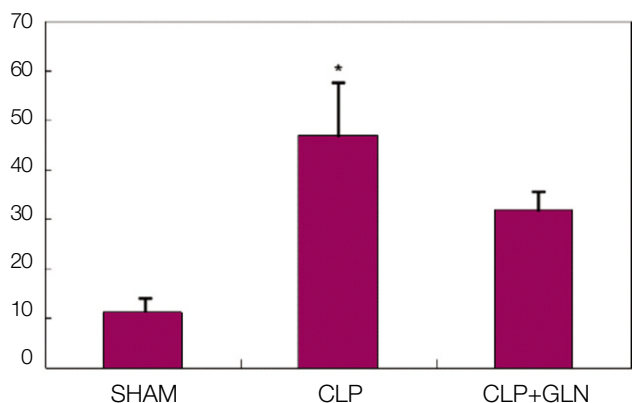


Fig. 2. NO concentration 24 hours after CLP. (NO: nitric oxide, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP+GLN)

Relative density of iNOS mRNA 12 hours after CLP

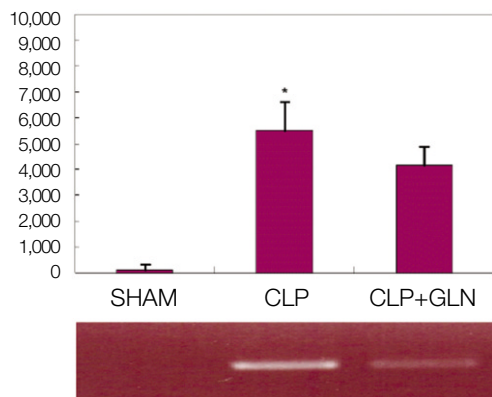


Fig. 3. iNOS mRNA in lung 12 hours after CLP. (iNOS: inducible nitric oxide synthase, mRNA: messenger RNA, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP+GLN)

Relative density of iNOS mRNA 24 hours after CLP

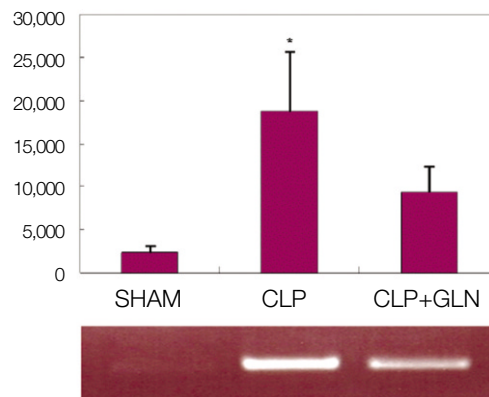


Fig. 4. iNOS mRNA in lung 24 hours after CLP. (iNOS: inducible nitric oxide synthase, mRNA: messenger RNA, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP+GLN)

Relative density of HSP70 12 hours after CLP

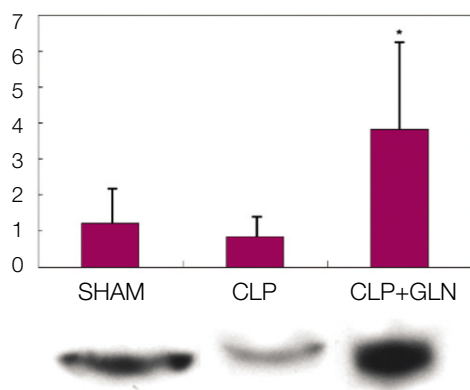


Fig. 5. HSP70 in lung 12 hours after CLP. (HSP: heat shock protein, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP)

Relative density of HSP70 24 hours after CLP

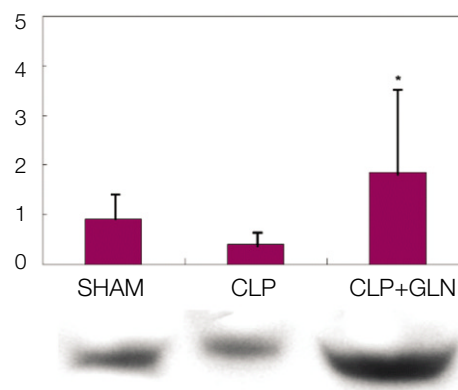


Fig. 6. HSP70 in lung 24 hours after CLP. (HSP: heat shock protein, CLP: cecal ligation and puncture, SHAM: Sham operation, GLN: glutamine, *: $P<0.05$ compared with SHAM, CLP)

IV. 고 찰

HSP70의 패혈증에서의 역할 및 이의 임상적 적용 가능성에 대해서는 아직 확실하게 정립되고 있지 못한 상태이다. 세계적으로도 패혈증에 대한 HSP70의 예방적 효과에 대한 연구만 시행되어 왔으며 실제 임상에 적용할 수 있는 방법은 아직 개발되지 못하고 있다. Heat shock, GGA 등의 전처치를 통해서 생존 향상 및 예후의 호전을 가져올 수 있으나 오히려 패혈증 유발 후 heat shock treatment를 가했을 경우에는 HSP70의 감소 및 예후의 악화를 보고하고 있어 이를 heat shock paradox라고 보고하고 있다⁴¹. 다만 패혈증 유발 후 GLN의 투여 등 간접적으로 HSP70이 과도 발현된 치료 효과에 대한 결과는 보고되고 있다⁴². 또한 GLN의 투여는 iNOS mRNA, nuclear factor (NF)- κ B의 발현 및 활성의

억제와 관련된 것으로 보고되고 있다⁴². 그러나 세계적으로도 패혈증 유발 후 GLN 투여 시 발생하는 HSP70과 iNOS의 변화에 대한 직접적인 상호관계 및 기전에 관한 연구는 이루어진 바 없으며 지금까지의 결과들을 통해 HSP70이 iNOS를 억제하지 않을까 하는 정도의 가설만 제시되고 있다. 본 연구에서는 HSP70, iNOS mRNA, NO간의 직접적인 상호관계를 확인하여 이를 통해 패혈증 발생 후 GLN을 투여하여 유발된 HSP70의 과도 발현이 iNOS의 gene expression을 억제함으로써 iNOS의 합성을 억제하고 이를 통해 혈중 NO의 농도가 저하되어 패혈증의 임상 양상을 호전시킬 수 있음을 보여주고자 하였다.

본 연구에서는 기존 연구를 참고하여 GLN을 복강 내 투여하여 HSP70의 과도 발현을 유도하였으며 GLN은 alanyl-GLN을 투여하였다. Alanyl-GLN은 용매에 잘 녹고 열에 안

정적이며 임상적으로도 사용 중인 GLN 제제이며 투여 15 분 내에 완전히 분해되는 것으로 알려져 있으며, alanine은 HSP70의 발현에 유의한 영향을 미치지 않다고 보고되고 있어 본 연구에 적합한 제제로 선택하였다. 투여 용량은 복강 내 투여 시 0.25 g/kg부터 1.5 g/kg까지 보고되고 있으며 본 연구에서는 0.75 g/kg의 용량을 투여하였다⁴²⁻⁴⁴.

전 처치를 시행한 기존 연구들에서 가온요법은 패혈증 유발 18-24시간 전, GGA의 경구 투여는 내독소 투여 8-16 시간 전에 시행되었으며 HSP70 유전자의 발현은 내독소 투여 후 5시간이 경과되어야 확인할 수 있음이 보고되었다. 조직에서 HSP70의 발현은 최소 6시간이 지나면 증가하는 것으로 알려져 있고, 패혈증 유발 후 24시간까지 관찰한 연구가 대부분이며^{1,7,37,38}, 특히 본 연구와 동일한 CLP 모델에서 패혈증 유발 후 GLN의 투여를 통해 간접적으로 HSP70의 발현 효과에 대한 보고에서는 CLP 24시간 후 혈액 및 조직을 채취하여 측정을 시행하였다⁴². 또한 본 연구와 동일한 CLP 모델에서 패혈증 유발 후 GLN의 투여를 통해 iNOS, NF- κ B의 발현을 관찰한 보고에서는 CLP 후 6시간에 혈액 및 조직을 채취하여 측정을 시행하였다. 따라서 본 연구에서는 CLP를 통한 패혈증 유발 후 12시간 및 24시간 후의 발현 및 활성을 평가하였다.

연구결과 CLP를 시행하고 GLN을 투여한 군에서 CLP만 시행한 군에 비해 HSP70이 과도 발현되었으며 iNOS mRNA의 발현이 억제되며 그 결과 혈중 산화질소의 농도가 감소하였다. 결과에서 언급하지는 않았으나 12시간 군과 24시간 군을 비교하였을 때 12시간 군에서 HSP70의 발현이 상대적으로 높은 경향을 보였으며 iNOS mRNA의 발현 및 혈중 산화질소의 농도 역시 12시간 군에서 24시간 군보다 상대적으로 낮은 경향을 보임을 확인하였다. 이를 통해 HSP70의 발현 정도와 iNOS mRNA의 발현 및 이로 인한 혈중 산화질소 농도의 감소 정도의 관련성 역시 추측해 볼 수 있을 것이다. 또한, 조직 내에서 HSP70이 가장 많이 발현되는 시간은 기존 연구들에서 패혈증 유도 후 8-24시간으로 보고되고 있으며 폐조직에서는 다른 장기에 비해 HSP70의 발현 정도가 빨리 감소하여 8-16시간에 가장 많이 발현됨이 보고되어 이는 본 연구 결과에 부합되는 소견으로 볼 수 있다³⁷.

본 연구의 제한점은 첫째, 여러 장기에서 HSP70 및 iNOS mRNA의 측정이 시행되지 못했다는 점이다. 여러 기존 연구에서 폐조직에서의 HSP 및 iNOS의 측정을 통해 패혈증의 예후를 평가하였으므로⁴²⁻⁴⁶ 본 연구 결과를 통해 HSP70, iNOS mRNA, NO의 상관관계를 설명할 수는 있으나 심장, 신장, 간 등의 조직에서의 HSP 및 iNOS의 측정을 통해 각 장기에 따른 발현 양상의 차이로 인하여 혈중 산화질소에 미치는 영향을 확인할 수는 없었다³⁷. 둘째, HSP70 inhibitor를 투여하여 GLN을 투여하여 HSP70의 발현을 억제한 후 iNOS mRNA 및 NO의 발현을 확인하지 못한 점이다. Quercetin은 HSP70의 발현을 억제하는 물질로 알려져 있

며 HSP70의 효과에 대한 기전을 규명하는 많은 연구에서 사용되고 있다^{37,38}. 본 연구에 대한 추가 연구로써 quercetin을 투여하여 GLN 투여로 유발되는 HSP70의 발현을 억제하였을 때 iNOS mRNA 및 NO의 발현이 억제됨을 확인한다면 본 연구를 통해 보여준 상관관계를 더욱 확실히 증명할 수 있을 것이다. 셋째, iNOS mRNA의 발현으로 인한 iNOS의 활성도를 직접 측정하지 못한 점이다. 혈중 NO의 증가를 통해 iNOS mRNA의 발현으로 iNOS가 활성화되었음을 간접적으로 보여주었으나 직접 iNOS의 활성도를 측정할 수 있다면 본 연구의 결과를 더욱 확실히 증명할 수 있을 것이다. 이러한 제한점을 극복하기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 CLP를 적용한 백서의 패혈증 모델에서 GLN을 투여하여 HSP70의 과도 발현을 유발하였을 때 iNOS mRNA의 발현이 감소하였으며 혈중 산화질소의 농도가 감소하였다. 따라서 패혈증에서 HSP70의 과도 발현은 iNOS의 gene expression을 억제함으로써 혈중 산화질소의 증가를 억제하여 패혈증의 예후를 향상시킬 수 있을 것이다.

References

1. Dong HP, Chen HW, Hsu C, Chiu HY, Lin LC, Yang RC. Previous heat shock treatment attenuates lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of platelets in rats. *Shock* 2005;24: 239-44.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
3. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29(7 Suppl):S109-16.
4. O'Brien JM Jr, Abraham E. New approaches to the treatment of sepsis. *Clin Chest Med* 2003;24:521-48.
5. Dellinger RP. Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med* 2003;31:946-55.
6. Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-15.
7. Chen HW, Hsu C, Lu TS, Wang SJ, Yang RC. Heat shock pretreatment prevents cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. *Shock* 2003;20:274-9.
8. Pinsky MR. Dysregulation of the immune response in severe sepsis. *Am J Med Sci* 2004;328:220-9.
9. Cohen RI, Wilson D, Liu SF. Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3', 5' (cyclic) phosphate-dependent and independent pathways. *Crit Care Med* 2006;34:173-81.
10. Cariou A, Vinsonneau C, Dhainaut JF. Adjunctive therapies in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;32(11 Suppl):S562-70.
11. Opal SM, Glück T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(1 Suppl): S57-64.
12. Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry

- SF, *et al.* Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997;25:1115-24.
13. Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med* 2002;347:966-7.
14. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med* 1999;340:207-14.
15. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, *et al.* Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fluorocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002;288:862-71.
16. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, *et al.* Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
17. Corrigan JJ Jr. Heparin therapy in bacterial septicemia. *J Pediatr* 1977;91:695-700.
18. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, *et al.* Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998;351:929-33.
19. Cole L, Bellomo R, Hart G, Journois D, Davenport P, Tipping P, *et al.* A phase II randomized, controlled trial of continuous hemofiltration in sepsis. *Crit Care Med* 2002;30:100-6.
20. Sander A, Armbruster W, Sander B, Daul AE, Lange R, Peters J. Hemofiltration increases IL-6 clearance in early systemic inflammatory response syndrome but dose not alter IL-6 and TNF- α plasma concentrations. *Intensive Care Med* 1997;23:878-84.
21. Kellum JA, Johnson JP, Kramer D, Palevsky P, Brady JJ, Pinsky MR. Diffusive vs. convective therapy: effects on mediators of inflammation in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1998;26:1995-2000.
22. Braun N, Rosenfeld S, Giolai M, Banzhaf W, Fretschner R, Warth H. Effects of continuous hemodiafiltration on IL-6, TNF- α , C3a and TCC in patients with SIRS/septic shock using two different membranes. *Contrib Nephrol* 1995;116:89-98.
23. McMaster P, Shann F. The use of extracorporeal techniques to remove humoral factors in sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2003;4:2-7.
24. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004;32:858-73.
25. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001;345:1368-77.
26. Rhodes A, Bennett ED. Early-goal directed therapy: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;32(11 Suppl):S448-50.
27. Thiemeermann C, Szabó C, Mitchell JA, Vane JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:267-71.
28. Aranow JS, Zhuang J, Wang H, Larkin V, Smith M, Fink MP. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase prolongs survival in a rat model of bacterial peritonitis: comparison with two nonselective strategies. *Shock* 1996;5:116-21.
29. Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1999;27:913-22.
30. Watson D, Grover R, Anzueto A, Lorente J, Smithies M, Bellomo R, *et al.* Cardiovascular effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) in patients with septic shock: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). *Crit Care Med* 2004;32:13-20.
31. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-3.
32. Tandara AA, Kloeters O, Kim I, Mogford JE, Mustoe TA. Age effect on HSP70: decreased resistance to ischemic and oxidative stress in HDF. *J Surg Res* 2006;132:32-9.
33. Sigal LH. Molecular biology and immunology for clinicians 18: Heat shock proteins/chaperonins. *J Clin Rheumatol* 2002;8:174-80.
34. Li PL, Chao YM, Chan SH, Chan JY. Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarius confers cardiovascular protection during heatstroke. *Circulation* 2001;103:2114-9.
35. Yang RC, Yang SL, Chen SW, Lai SL, Chen SS, Chiang CS. Previous heat shock treatment attenuates bicuculline-induced convulsions in rats. *Exp Brain Res* 1996;108:18-22.
36. Nakada J, Matsura T, Okazaki N, Nishida T, Togawa A, Minami Y, *et al.* Oral administration of geranylgeranylacetone improves survival rate in a rat endotoxin shock model: administration timing and heat shock protein 70 induction. *Shock* 2005;24:482-7.
37. Masuda Y, Sumita S, Fujimura N, Namiki A. Geranylgeranylacetone attenuates septic diaphragm dysfunction by induction of heat shock protein 70. *Crit Care Med* 2003;31:2585-91.
38. Yang SL, Jing SH, Chen SS, Chen TJ, Yang RC. The effect of hyperthermic treatment on electroencephalographic recovery after interruption of respiration in rats. *Exp Brain Res* 1994;99:431-4.
39. Kiang JG. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res* 2004;14:450-9.
40. Sumioka I, Matsura T, Kai M, Yamada K. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci* 2004; 74: 2551-61.
41. Su F, Nguyen ND, Wang Z, Cai Y, Rogiers P, Vincent JL. Fever control in septic shock: beneficial or harmful? *Shock* 2005;23:516-20.
42. Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med* 2005;33:1206-13.
43. Sanli A, Onen A, Sarioglu S, Sis B, Guneli E, Gokcen B, *et al.* Glutamine administration enhances the healing of lung parenchymal injuries and reduces air leakage in rats. *Tohoku J Exp Med* 2006;210:239-45.
44. Doruk N, Buyukakilli B, Atici S, Cinel I, Cinel L, Tamer L, *et al.* Oral The effect of preventive use of alanyl-glutamine on diaphragm muscle function in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005;29:36-43.
45. Kim DJ, Park SH, Sheen MR, Jeon US, Kim SW, Koh ES, *et al.* Comparison of experimental lung injury from acute renal failure with injury due to sepsis. *Respiration* 2006;73:815-24.
46. Torres-Dueñas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: effects of the inhibition of nitric oxides production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock* 2006;25:267-76.