

쥐 폐의 허혈-재관류 손상에 대한 *N*-acetylcystein과 Epigallocatechin-3-gallate의 효과

연세대학교 의과대학 강남세브란스병원 흉부외과학교실¹, 연세대학교 의과대학 세브란스병원 흉부외과학교실²,
연세대학교 의과대학 강남세브란스병원 병리학교실³

함석진¹ · 이진구² · 이성수¹ · 백효채² · 임범진³

The Effects of *N*-acetylcystein and Epigallocatechin-3-Gallate in Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Lungs

Seokjin Haam, M.D.¹, Jin Gu Lee, M.D.², Sungsoo Lee, M.D.¹, Hyo Chae Paik, M.D.²
and Beom Jin Lim, M.D.³

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine¹,
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine²,
Department of Pathology, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine³, Seoul, Korea

Background: Ischemia-reperfusion injury (IRI) is a major cause of early graft dysfunction after lung transplantation. The aim of this study was to assess the effects of *N*-acetylcystein (NAC) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on IRI of rat lungs.

Methods: Sprague-Dawley rats were divided into four groups. Sham group (n=6) did not receive IRI. Rats in the control group (n=6), NAC group (n=6), and EGCG group (n=6) were treated with an intraperitoneal injection of normal saline, NAC, and EGCG, respectively, prior to IRI. In the latter three groups, IRI was induced by clamping the left pulmonary artery, vein, and main stem bronchus for a period of 60 minutes. After ischemia, reperfusion and ventilation of the lung was allowed for a period of 180 minutes. The expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), hemeoxygenase-1 (HO-1), AMP-activated protein kinase- α (AMPK), and caveolin-1 in lung tissues were evaluated by Western blot. The pathological findings and the extent of pulmonary edema after IRI were compared among the groups.

Results: The expression levels of iNOS decreased in the Sham and EGCG groups. The expression level of HO-1 was significantly higher in the EGCG group ($P=0.0001$). Although the expression levels of AMPK and caveolin-1 showed no differences, the extent of phosphorylation of AMPK and caveolin-1 was higher in the EGCG and NAC groups, respectively. In hematoxylin-eosin staining, the lungs in the NAC and EGCG groups showed fewer alveolar injuries and less hemorrhagic congestion compared with the control group.

Conclusions: NAC and EGCG enhanced the phosphorylation of caveolin-1 and AMPK, respectively, and attenuated lung injury induced by ischemia-reperfusion.

Key Words: Lung transplantation, Reperfusion injury, Epigallocatechin gallate, Acetylcystein

중심 단어: 폐이식, 재관류 손상, 에피갈로카테킨, 아세틸시스테인

Received July 14, 2015, Revised July 16, 2015, Accepted July 16, 2015

Corresponding author: Hyo Chae Paik

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

Tel: 82-2-2228-2140, Fax: +82-2-393-6012

E-mail: hcpaik@yuhs.ac

서 론

폐이식은 말기 폐질환에 가장 효과적인 치료법이지만, 폐이식 후에 필연적으로 발생하는 폐의 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury, IRI)은 이식 후 높은 유병률과 사망률을 가져오는 중요한 원인 중의 하나다. 이러한 폐의 IRI를 줄이기 위해 aprotinin(1), lazaroide(2), captopril(3), platelet activating factor acetylhydrolase(4), trime-tazidine(5), melatonin(6) 등과 같은 여러 약제가 연구되었으며, 이러한 약제들이 IRI를 줄이는 효과가 있다는 결과들이 지속적으로 발표되고 있다.

N-acetylcysteine (NAC)은 항산화제인 glutathione의 전구체이며 이 glutathione의 환원체(GSH)는 자유기(free radical)나 과산화효소(peroxidase)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species)에 의해 발생하는 세포 손상을 방지하는 효과가 있을 뿐만 아니라, 세포의 산화-환원 균형을 유지하고, 세포 내외의 여러 가지 자극으로부터 세포를 보호하는 역할을 한다(7,8). NAC는 실제 임상에서 이미 만성 기관지염이나 acetaminophen 중독에 의한 급성 간손상에 쓰이고 있으며, 실험적으로 활성산소에 의한 폐 손상이나 심장의 온열 IRI에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(9,10).

한편, 항산화, 항염증 작용이 있는 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 녹차 내 가장 풍부한 catechin으로, 다른 종류의 catechin에 비해 더 강력한 활성도를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(11). 최근 EGCG가 심장과 장, 골격근 등에서 IRI를 줄이는 효과들이 보고되고 있으나(12-14), 폐의 IRI에 대한 그 효과는 아직 연구되지 않고 있다.

본 연구에서는 IRI를 받은 쥐의 폐를 대상으로 항산화 효과를 가진 EGCG가 IRI를 회복시킬 수 있는지 NAC와 비교하여 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

300~350 g의 쥐(Sprague-Dawley rat) 24마리를 각 군당 6마리씩 4군으로 무작위로 분배하였다. Sham 군(group I)은 폐의 IRI가 없고 전 처치 또한 시행하지 않은 군으로 정의하였고, Control 군(group II)은 IRI가 있었으나 전 처치를 받지 않은 군으로, EGCG 군(group III)은 IRI 전 EGCG를 주사한 군으로 정의하였다. 또한, NAC 군(group IV)은 IRI 전 NAC를 주사한 군으로 정의하였다.

2. 허혈 및 재관류

쥐를 enflurane (중외제약, 서울, 한국)이 충전된 25×15 cm 크기의 acryl resin 상자에 넣어 마취시킨 후 경구를 통해 16-gauge angiocatheter를 이용하여 기도 삽관하고 Harvard rodent ventilator (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA)에 연결하였다. 인공호흡기는 100% 산소, 호흡수 분당 80회, 1회 호흡량 kg당 10 mL, 호기말 양압 3 cm H₂O로 설정하였다. 모든 쥐에 0.4 mg의 atropine을 근육주사하였다.

마취 후 group II에서 1 mL의 생리식염수를, group III에서는 kg당 10 mg의 EGCG (Sigma Aldrich, Munich, Germany)를, group IV에서는 kg당 10 mg의 NAC (한화제약, 서울, 한국)를 각각 복강 내 주사하였다.

50 IU의 heparin을 좌측 대퇴정맥을 통해 주입하고 우측 측와위에서 5번째 늑간을 통하여 좌측 개흉술을 시행하였다. 하폐인대(inferior pulmonary ligament)를 절제하여 폐 문부가 잘 노출되도록 하였다. 생리식염수, EGCG, NAC를 복강 내 주사한 후 15분 경과 뒤 미세혈관검자(microvascular clamp)를 이용하여 좌측 폐동맥, 폐정맥, 주기관지를 한번에 결찰하여 좌측 폐의 허혈을 유도하였다.

60분간 허혈 상태를 유지한 후, 혈관검자를 제거하여 재관류와 환기를 180분간 유지하였다. 과정 중에 폐 표면이 마르지 않도록 따뜻한 생리식염수를 폐 표면에 도포하였고, 체내 수분 공급을 위해 시간당 1 mL의 생리식염수를 피하 주사하였다.

3시간의 재관류 후 정중흉골절개를 통해 심장과 폐를 노출시킨 후 주폐동맥을 통해 20 mL의 생리식염수를 주사하여 폐혈관 내로 관류시킨 후 심장과 폐를 같이 절제하였다. Group I의 경우는 이러한 과정 없이 마취 후 정중흉골절제하고 주폐동맥을 통해 생리식염수를 투여 후 심장과 폐를 절제하였다. 심장을 제거하고 IRI가 있는 좌측 폐를 절제하여 병리검사와 Western blot을 준비하였다.

3. 조직 내 단백질 측정

Western blot을 이용하여 폐조직 내 단백질의 발현 정도를 측정하였다. 본 실험에서 측정한 단백질은 inducible nitric oxide synthase (iNOS), hemeoxygenase-1 (HO-1), AMP-activated protein kinase (AMPK), caveolin-1 (CAV-1)로 각각의 일차항체로 iNOS polyclonal antibody (1:1,000, BD transduction laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), HO-1 monoclonal antibody (1:500, StressGen Biotechnologies Corp., San Diego, CA, USA), AMPK polyclonal antibody (1:2,000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), CAV-1 polyclonal antibody (1:2,000, Santa Cruz

Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 이차항체로는 rabbit polyclonal antibody (1:5,000, Cell Signaling Technology, Inc.)와 mouse monoclonal antibody (1:5,000, Cell Signaling Technology, Inc.)를 사용하였다.

4. 병리 조직검사

병리검사를 위한 조직은 4% formalin 용액에 고정한 후 paraffin에 포매하고 hematoxylin & eosin (HE) 염색하였다. 폐조직의 손상 정도는 lung injury severity (LIS) scoring system을 이용하였다. 폐포 모세혈관의 울혈, 출혈, 혈관벽에 호중구의 침윤과 응집, 폐포벽/유리질 막(hyaline membrane) 구조의 비후 등 4가지 항목에 대해 최소 손상의 경우 0점부터 최대 손상 4점까지 부여한 후 네 항목 점수의 평균을 측정하여 각 군 간에 손상 정도를 비교하였다(15).

5. Wet/dry 비

적출한 폐조직 일부를 80°C 오븐에 72시간 보관하였고, 보관 전후의 무게를 측정하여 wet/dry 비를 계산, 폐부종 발생 정도를 비교하였다.

6. 통계

모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계방법은 일원분산분석을 사용하였으며, 사후 검정은 Bonferroni 방법을 시행하였다. P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였고, 자료의 입력과 분석은 SPSS ver. 20.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였다.

결 과

1. iNOS

iNOS의 발현은 group I과 III에서 낮은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다($P=0.477$) (Fig. 1A).

2. HO-1

HO-1의 발현은 group I과 III에서 통계적으로 유의하게 높았으며($P=0.001$), EGCG군에서 NAC군에 비해 높게 발현되었다($P=0.005$) (Fig. 1B).

3. AMPK

각 group간 AMPK 자체의 발현 정도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($P=0.241$), AMPK의 활성화를 의미하는 인산화 정도는 group I과 III에서 높았다($P=0.002$). Group II와 III의 AMPK 인산화 정도를 비교했을 때, group III에서 높게 나타났으나($P=0.065$), group IV는 II에 비해 증가하지 않았다($P=1.000$). Group III와 IV의 비교에서도 인산화 정도에 차이를 보이지 않았다($P=0.220$) (Fig. 2).

4. CAV-1

CAV-1의 발현 정도는 군 간 차이를 보이지 않았다($P=0.784$). 그러나, CAV-1의 인산화 정도는 군 간에 유의한 차이를 보였으며($P=0.012$), Group IV가 II에 비해 인산화 정도가 높고($P=0.010$), group III는 II와 차이를 보이지 않았다($P=0.753$) (Fig. 3).

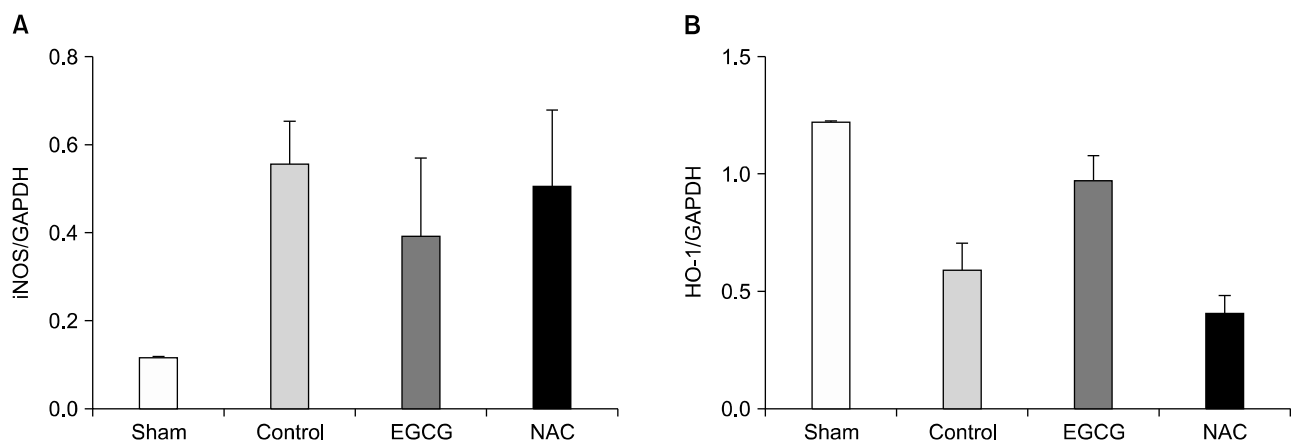


Fig. 1. (A) The expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lung tissues. Sham and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) group showed lower the expression levels but, these were not significant ($P=0.477$). (B) The expression levels of hemeoxygenase-1 (HO-1) in lung tissues. The expression levels of HO-1 had the significant differences ($P=0.001$). EGCG group showed the higher level than *N*-acetylcystein (NAC) group ($P=0.005$; $n=6$ in each group; mean±SD). Abbreviation: GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

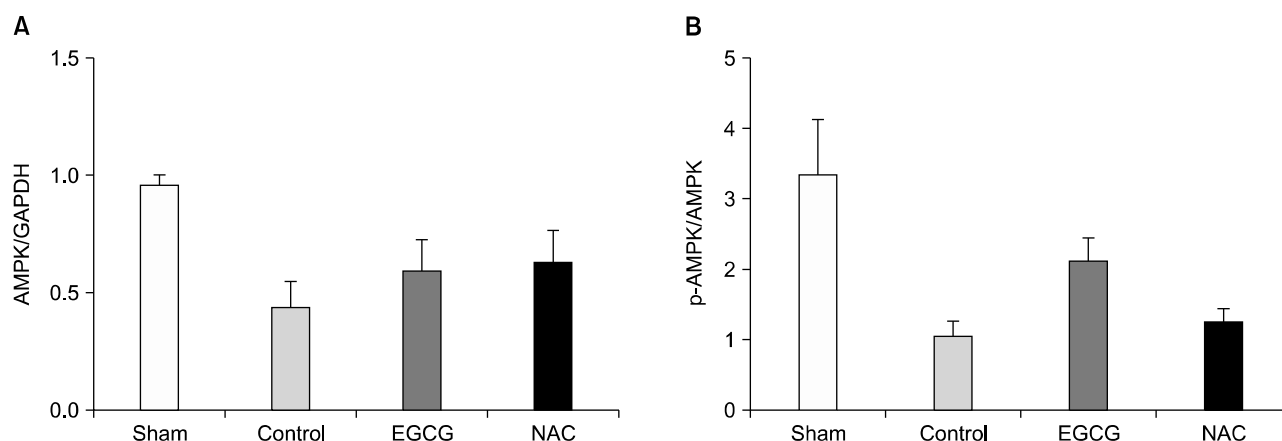


Fig. 2. (A) The expression levels of AMP-activated protein kinase (AMPK) in lung tissues. There were no differences in the expression levels of AMPK. (B) The extents of phosphorylations of AMPK. The extents of phosphorylation in sham and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) group were higher ($P=0.002$), but there was no difference between control and *N*-acetylcystein (NAC) group ($P=1.000$; $n=6$ in each group; mean \pm SD). Abbreviation: GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

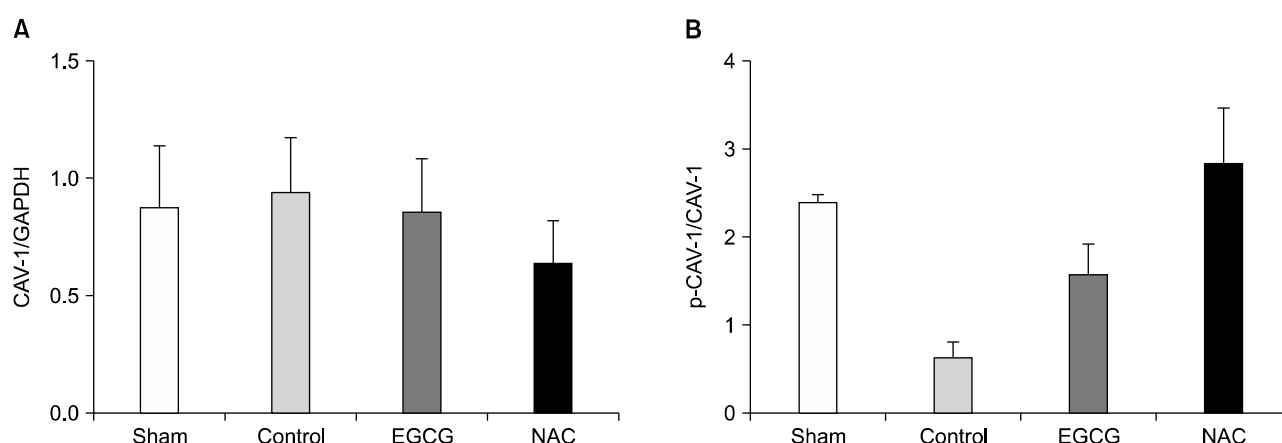


Fig. 3. (A) The expression levels of caveolin-1 (CAV-1) in lung tissues. There were no differences in the expression levels of CAV-1 among groups ($P=0.784$). (B) The extents of phosphorylations of CAV-1. In *N*-acetylcystein (NAC) group, the extent of phosphorylation of CAV-1 was higher ($P=0.010$). Although epigallocatechin-3-gallate (EGCG) group showed the higher extent of phosphorylation than control group, it was not significant ($P=0.753$; $n=6$ in each group; mean \pm SD). Abbreviation: GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

5. 병리 결과 및 LIS score

HE 염색에서 group II는 림프구의 침윤을 동반한 폐포의 파괴와 조직의 부종이 심하게 관찰되었으나, group III와 IV에서는 group I에 비해 다소 림프구의 침윤은 증가되어 있었으나 폐포의 구조는 비교적 양호하게 유지되고 있었고, 심한 부종도 관찰되지 않았다(Fig. 4). LIS score를 비교하였을 때, group I, II, III, IV에서 각각 0.38 ± 0.18 , 2.67 ± 0.13 , 1.13 ± 0.26 , 1.42 ± 0.26 으로 group II와 비교하여 group III, IV에서 손상 정도가 적었다($P<0.0001$, Fig. 5).

6. Wet/dry 비

Group I, II, III, IV의 wet/dry 비는 각각 2.21 ± 0.28 , 5.92 ± 0.55 , 3.21 ± 0.42 , 3.85 ± 0.39 로 group II에서 높았으며 이는 통계적으로 유의하였다($P=0.045$) (Fig. 6).

고 찰

폐이식에서의 IRI는 폐혈관 저항의 상승과 조직 내 산소공급을 불량하게 하고, 폐의 순응도(compliance) 저하와 모세혈관의 투과성을 증가시켜 결국 폐부종에 이르게 한다. 폐에 허혈 손상은 시토카인(cytokine)의 생성을 증가시

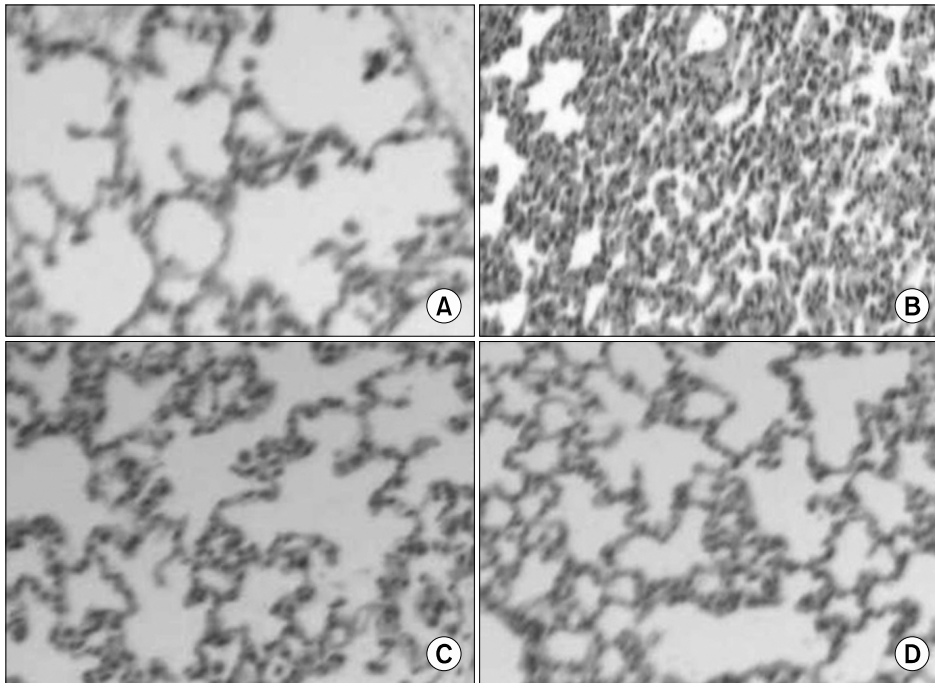


Fig. 4. Pathologic findings of lung after ischemia-reperfusion injury (HE stain, $\times 40$). (A) Sham group: the alveolar structure was maintained well and there was no congestion. (B) Control group: the most of alveolar structure was destroyed and severe neutrophil infiltration and congestion were found. (C) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) group: although mild neutrophil infiltration and congestion were found, alveolar structure was maintained relatively well. (D) *N*-acetylcystein group: the finding was similar to that of EGCG group.

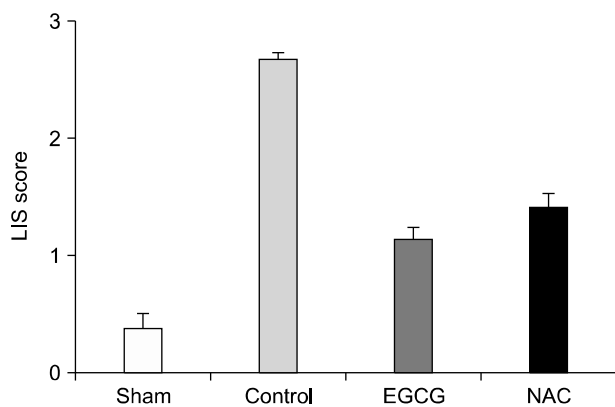


Fig. 5. Lung injury severity (LIS) scoring. Lung injuries such as congestion, hemorrhage and neutrophil infiltration were less in epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and *N*-acetylcystein (NAC) group ($P=0.0001$; $n=6$ in each group; mean \pm SD).

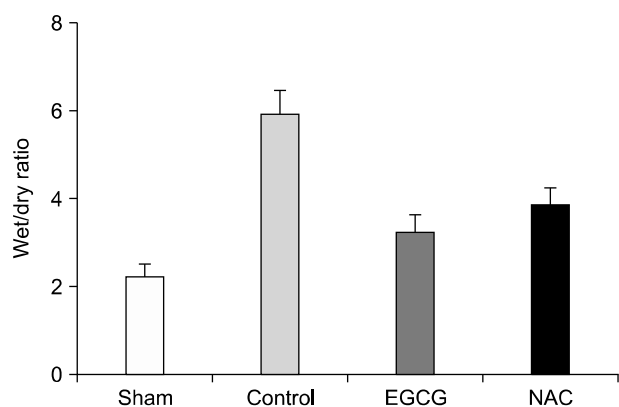


Fig. 6. Wet/dry ratio. Wet/dry ratio in control group was higher than other groups ($P=0.045$). This result means that lung edema in control group was more severe ($n=6$ in each group; mean \pm SD). Abbreviations: EGCG, epigallocatechin-3-gallate; NAC, *N*-acetylcystein.

키고 저산소 세포들(hypoxic cells)에 부착 분자(adhesion molecule)의 발현을 증가시킨다.

이러한 일련의 손상 과정은 주로 호중구와 혈관 내피 세포의 부착에 의해 조절되며 결국 호중구에 의한 장기 손상이 발생하게 된다. 활성화된 호중구는 활성산소종과 단백질을 분해 효소들을 분비하여 폐실질의 구조적, 기능적 파괴를 가져온다(16). IRI 이후에 발생하는 염증, 면역체계의 손상-회복 반응은 폐이식의 결과를 결정짓는 중요한 위험인자인 primary graft dysfunction의 발생에 중요한 원인으

로 알려져 있으며 폐이식 후 발생하는 이러한 IRI를 줄이려는 연구들이 지속되고 있다(17).

NAC는 항산화 작용과 세포보호 기능을 가진 약물로(7,8), Inci 등(18)은 쥐를 이용한 폐이식 실험에서 NAC가 효과적으로 IRI로부터 폐를 보호한다는 결과를 발표하였다. Glutathione은 대부분의 포유동물에 고농도로 존재하는, 생존에 필수적인 대사물질로, 이의 환원형태인 GSH는 자유기로부터 세포를 보호하는 중요한 기능을 할 뿐만 아니라, 세포 밖에서 직접 혹은 glutathione peroxidase 촉매작

용을 통하여 자유기를 제거하는 기능을 수행한다(19). NAC는 세포 내에서 이 GSH 합성에 필요한 성분인 cysteine으로 가수분해되어 GSH의 합성을 촉진하는 역할을 한다(20). 또한, NAC는 폐이식 환자의 대식세포에서 tumor necrosis factor α (TNF- α) mRNA의 발현과 TNF- α 의 분비를 억제하여 거부반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다(21).

EGCG는 녹차의 주요 성분 중 하나로 여러 실험에서 항산화, 항암작용 뿐만 아니라 돌연변이의 생성을 억제하거나 세포의 자연사(apoptosis)를 막는 등 다양한 생화학적 기능들을 하는 것으로 알려진 물질로(22), 특히, 항산화 작용에서는 이미 그 효과가 알려진 vitamin C에 비해 100배 이상의 강력한 효과를 나타낸다(23). 또한 IRI에도 효과가 있어 IRI가 있는 심장에서 signal transducers and activators of transcription-1의 인산화를 억제함으로써 세포를 보호하는 역할을 하고(12), 장이나 골격근에서도 IRI에 대한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(13,14). 그러나, 현재까지 폐 자체에 발생한 IRI에 대한 EGCG의 효과는 잘 알려지지 않고 있다. 따라서, 본 연구에서는 폐에 발생한 IRI에 대한 EGCG의 효과를 이미 그 효과가 입증된 NAC와 비교하여 알아보려고 하였다.

먼저, 1시간 동안의 허혈과 뒤이은 3시간 동안의 재관류로 인한 폐 손상 후 적출한 폐조직을 병리학적으로 살펴보았을 때, control군에서는 모든 개체에서 심한 울혈과 출혈, 염증세포의 침윤이 심하게 관찰되었고, 폐포 구조 자체가 대부분 파괴된 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, EGCG와 NAC를 전처치한 군에서는 염증세포의 침윤이 다소 증가되어 있었으나, 전반적인 폐포 구조 자체가 잘 유지되고 심한 울혈이나 출혈은 관찰되지 않았다. EGCG군과 NAC군의 LIS score를 비교했을 때, 두 군 간의 차이는 관찰되지 않았다. Wet/dry 비 또한 control군에서 통계적으로 유의한 수준으로 증가되어 NAC와 EGCG를 투여한 군에 비해 폐부종의 발생 정도가 심함을 알 수 있었고, wet/dry 비 역시 EGCG군과 NAC군에서는 유의한 차이가 발생하지 않았다. 이러한 결과를 볼 때, EGCG와 NAC가 폐에 발생하는 허혈-재관류로 인한 폐 손상을 줄이는 효과가 있으며, 그 효과에서는 EGCG와 NAC간에 차이가 없는 것으로 나타났다.

EGCG와 NAC의 IRI에 대한 폐조직의 보호 효과는 조직의 단백질 발현 정도에서도 유사한 결과를 보였다. NO는 조직의 허혈 이후에 생성되는 중요한 자유기로, 분비되는 세포와 농도에 따라 다른 작용을 나타낸다. 혈관에서 생성되는 NO의 경우는 혈관의 저항을 조절하고 혈소판과 백

혈구의 활성화와 부착을 억제하는 작용을 하며(24), 정상적인 환경에서 농도가 낮을 경우 NO 자체는 항산화 작용을 나타낸다(25). 그러나, iNOS에 의해 합성된 NO의 경우, 출혈이나 패혈증, 급성 호흡부전 증후군이나 허혈-재관류 등과 같은 병리적 환경에서는 세포의 손상을 유도한다(26). 본 연구에서 측정된 iNOS는 각 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았으나, sham군과 EGCG군에서 낮게 발현되는 경향을 보였으며, EGCG군과 NAC군을 비교했을 때, 그 효과는 EGCG군에서 더욱 뚜렷하였다. 따라서, EGCG의 iNOS에 대한 억제 효과는 IRI 하에서 iNOS에 의해 생성되는 NO의 양을 줄임으로써 세포 보호기능을 가져올 것으로 생각된다.

HO-1는 과산화물증이나 저산소혈증과 같은 산화적 스트레스(oxidative stress)에 반응하여 유도되는 물질로(27), 이식 후 발생하는 IRI를 줄이고(28), 저온의 IRI에서 세포의 apoptosis를 방지하며(29), 약물을 이용해 과발현이 유도된 경우에도 IRI에 대한 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있다(30). 본 실험에서, HO-1의 발현 정도는 EGCG군에서 control군 보다 높게 나타나 EGCG에 의한 HO-1의 발현 유도를 유추할 수 있었으나, NAC군에서의 발현 정도는 control군과 차이를 보이지 않았다.

AMPK는 세포의 에너지 항상성을 유지하는 효소로 세포 내 glucose의 흡수나 지방산의 산화 등에 관여한다(31). 최근에는 이러한 AMPK의 대사조절 역할 이외에, 혈관내피세포의 기능 유지에 AMPK가 중요한 역할이 있음이 밝혀졌다. Xing 등(32)은 쥐를 이용한 지질다당질(lipopolysaccharide) 폐 손상 모델에서 AMPK의 억제가 심한 혈관내피세포의 손상을 유발하고, 반대로 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside를 이용하여 AMPK의 활성을 증가시키면 내피세포의 과투과성(hyperpermeability)을 감소시킬 수 있다고 하였다. 또한, AMPK는 endothelial NOS (eNOS)의 활성화를 통한 NO의 생성을 증가시켜 혈관 이완 작용을 나타내기도 한다(33). Reiter 등(34)은 EGCG가 AMPK를 활성화 시키고, 이로 인한 endothelin-1 (ET-1)의 발현과 분비를 억제함으로써 혈관내피세포를 보호할 수 있다고 하였다. 이러한 결과들을 고려해 볼 때, 본 실험에서 EGCG는 AMPK의 인산화를 촉진시켜 혈관을 이완 시키는 NO의 생성을 증가시키고, 동시에 혈관의 수축에 관여하는 ET-1의 발현을 억제함으로써 IRI에도 불구하고 폐혈관 저항을 정상적으로 유지하여 혈관내피세포의 손상과 과투과성을 방지해, 결국 폐부종의 발생을 억제하는 것으로 생각된다. 한편, AMPK의 활성화는 EGCG군에서 control군에 비해 유의하게 높게 나타났으나 NAC군

에서는 control군과 차이가 나타나지 않았다.

CAV-1은 세포의 원형질막에 존재하는 caveolae를 형성하는 단백질로, 구조 단백질로서의 기능뿐만 아니라, caveolae에 존재하는 신호전달 관련 단백질들과 복합체를 형성하여 관련 효소의 활성화에 관여함으로써 세포 내 신호전달 경로(signaling pathway)에서도 중요한 역할을 수행한다. Young 등(35)은 쥐의 심장을 이용한 실험에서, CAV-1이 superoxide의 분비를 증가시키고 eNOS를 억제하여 NO의 분비를 감소시키는 protein kinase C를 억제함으로써 IRI 이후에 발생하는 호중구 침윤과 심근의 기능 저하를 지연시킨다고 하였다. 또한, Patel 등(36)은 허혈성 전처치를 시행한 쥐의 심장에서 Src와 CAV-1의 인산화가 IRI를 줄인다고 하였다. 본 연구에서는 caveolin-1의 발현 자체는 모든 군에서 차이가 없었으나, CAV-1의 인산화 정도에서는 control군에서 가장 낮고, NAC군이 다른 군에 비해 유의미하게 높았다. 또한, EGCG군에서도 통계적으로 유의한 수준에 이르지지는 않았으나 control군에 비해 인산화 정도가 높게 나타나는 경향을 보여, NAC와 EGCG가 CAV-1의 인산화를 정상화하는 역할을 하는 것으로 생각되었다. 그러나, 최근에는 CAV-1의 발현이나 인산화 정도가 혈관내피세포와 폐부종에 오히려 악영향을 준다는 연구 결과들이 계속 발표되고 있어 결과의 해석에 주의가 필요하다(37,38).

본 연구의 제한점은 산소 포화도나 폐혈관 저항, 폐 순응도 등 폐의 기능적인 변수들을 측정하지 않았고, 실제 이식을 시행하지 않은 단순 IRI 모델이라는 점이다. Wet/dry 비나 LIS score 등의 조직학적 비교에서 EGCG와 NAC 모두 control군과 비교하여 양호한 결과를 얻었으나, 실제 임상에서 폐 기능의 평가는 기능적인 변수들이 더 중요하게 고려되기 때문에 앞으로 추가 연구를 통하여 이러한 기능적인 측면도 평가되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 실제 이식에서는 IRI 이외에도 면역 반응을 포함한 여러 다양한 손상 기전이 있기 때문에 단순 IRI 모델에서 도출된 결과를 실제 이식에 적용시키기에는 한계가 있다.

결론

본 연구에서 NAC의 CAV-1 인산화 과정 촉진과 EGCG의 AMPK 인산화 과정의 촉진을 통해 EGCG와 NAC의 전처치가 폐에 발생하는 IRI로부터 폐의 조직학적인 손상을 줄이고 폐부종의 발생을 약화시키는 효과를 관찰하였다.

EGCG와 NAC가 폐의 IRI에서 조직학적 측면뿐만 아니라 폐의 기능을 유지 향상시킬 수 있는지와 이러한 보호

효과가 실제 이식 후에도 지속적으로 유지되는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 의과대학 2009년도 신진교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2009-0109).

REFERENCES

- Mathias MA, Tribble CG, Dietz JF, Nguyen RP, Shockey KS, Kern JA, et al. Aprotinin improves pulmonary function during reperfusion in an isolated lung model. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1671-4.
- Kuwaki K, Komatsu K, Sohma H, Abe T. Improvement of ischaemia-reperfusion injury by lazardoid U74389G in rat lung transplantation model. *Scand Cardiovasc J* 2000; 34:209-12.
- Fischer S, Maclean AA, Liu M, Kalirai B, Keshavjee S. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by captopril: a novel approach to reduce ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:573-80.
- Kim JD, Baker CJ, Roberts RF, Darbinian SH, Marcus KA, Quardt SM, et al. Platelet activating factor acetylhydrolase decreases lung reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:423-8.
- Inci I, Dutly A, Rousson V, Boehler A, Weder W. Trimetazidine protects the energy status after ischemia and reduces reperfusion injury in a rat single lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:1155-61.
- Inci I, Inci D, Dutly A, Boehler A, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002;73:220-5.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-60.
- Arrick BA, Nathan CF. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* 1984; 44:4224-32.
- Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL. Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary response to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J Clin Invest* 1984;73:1772-84.
- Qiu Y, Bernier M, Hearse DJ. The influence of N-acetylcysteine on cardiac function and rhythm disorders during ischemia and reperfusion. *Cardioscience* 1990;1:65-74.
- Giakoustidis AE, Giakoustidis DE, Iliadis S, Papageorgiou

- G, Koliakou K, Kontos N, et al. Attenuation of intestinal ischemia/reperfusion induced liver and lung injury by intraperitoneal administration of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Free Radic Res* 2006;40:103-10.
- 12) Townsend PA, Scarabelli TM, Pasini E, Gitti G, Menegazzi M, Suzuki H, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-induced apoptosis. *FASEB J* 2004;18:1621-3.
 - 13) Gomez-Caro A, Garcia S, Reguart N, Cladellas E, Arguis P, Sanchez M, et al. Determining the appropriate sleeve lobectomy versus pneumonectomy ratio in central non-small cell lung cancer patients: an audit of an aggressive policy of pneumonectomy avoidance. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:352-9.
 - 14) Buttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant Proc* 2003;35:3116-20.
 - 15) Fang WF, Cho JH, He Q, Lin MC, Wu CC, Voelkel NF, et al. Lipid A fraction of LPS induces a discrete MAPK activation in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L336-44.
 - 16) Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991;78:651-5.
 - 17) Suzuki Y, Cantu E, Christie JD. Primary graft dysfunction. *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34:305-19.
 - 18) Inci I, Zhai W, Arni S, Hillinger S, Vogt P, Weder W. N-acetylcysteine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2007;84:240-6.
 - 19) Weinbroum AA, Kluger Y, Ben Abraham R, Shapira I, Karchevski E, Rudick V. Lung preconditioning with N-acetyl-L-cysteine prevents reperfusion injury after liver no flow-reflow: a dose-response study. *Transplantation* 2001;71:300-6.
 - 20) Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* 1991;91(3C):54S-9S.
 - 21) Hulten LM, Lindmark H, Schersten H, Wiklund O, Nilsson FN, Riise GC. Butylated hydroxytoluene and N-acetylcysteine attenuates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion and TNF-alpha mRNA expression in alveolar macrophages from human lung transplant recipients in vitro. *Transplantation* 1998;66:364-9.
 - 22) Chen L, Zhang HY. Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Molecules* 2007;12:946-57.
 - 23) Ignatov S, Shishniashvili D, Ge B, Scheller FW, Lisdat F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosens Bioelectron* 2002;17:191-9.
 - 24) Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR Jr. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2175-9.
 - 25) Phelps DT, Ferro TJ, Higgins PJ, Shankar R, Parker DM, Johnson A. TNF-alpha induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. *Am J Physiol* 1995;269(4 Pt 1):L551-9.
 - 26) Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-47.
 - 27) Lee PJ, Camhi SL, Chin BY, Alam J, Choi AM. AP-1 and STAT mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L175-82.
 - 28) Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest* 1999;115:1672-7.
 - 29) Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 2002;73:287-92.
 - 30) Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 2001;1:121-8.
 - 31) Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):E1-10.
 - 32) Xing J, Wang Q, Coughlan K, Viollet B, Moriasi C, Zou MH. Inhibition of AMP-activated protein kinase accentuates lipopolysaccharide-induced lung endothelial barrier dysfunction and lung injury in vivo. *Am J Pathol* 2013;182:1021-30.
 - 33) Kim JA, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, et al. Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem* 2007;282:13736-45.
 - 34) Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology* 2010;151:103-14.
 - 35) Young LH, Ikeda Y, Lefer AM. Caveolin-1 peptide exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-re-

- perfusion via nitric oxide mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2489-95.
- 36) Patel HH, Tsutsumi YM, Head BP, Niesman IR, Jennings M, Horikawa Y, et al. Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1. *FASEB J* 2007;21:1565-74.
- 37) Sun Y, Hu G, Zhang X, Minshall RD. Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circ Res* 2009;105:676-85.
- 38) Maniatis NA, Kardara M, Hecimovich D, Letsiou E, Castellon M, Roussos C, et al. Role of caveolin-1 expression in the pathogenesis of pulmonary edema in ventilator-induced lung injury. *Pulm Circ* 2012;2:452-60.