

내독소에 의한 급성폐손상에서 Protein Kinase C의 역할

순천향대학교 의과대학 내과학교실

김용훈, 문승혁, 기신영, 주재학, 박태웅, 임건일, 정성환, 김현태, 박춘식, 진병원

= Abstract =

The Role of Protein Kinase C in Acute Lung Injury Induced by Endotoxin

Yong Hoon Kim, M.D., Seung Hyug Moon, M.D., Hyeon Tae Kim, M.D.,
Sin Young Kee, M.D., Jae Hak Ju, M.D., Tae Eung Park, M.D., Keon IL Im, M.D.,
Seung Whan Cheong, M.D., Choon Sik Park, M.D., Byung Won Jin, M.D.

Soonchunhyang University Hospital, Internal Medicine, Chonan, Korea

Background : The signal pathways and their precise roles for acute respiratory distress syndrome caused by endotoxin (ETX) has not been established. Since there has been several in vitro experiments suggesting that activation of protein kinase C (PKC) pathway may be responsible for endotoxin-induced inflammatory reaction, we performed in vivo experiments in the rats with the hypothesis that PKC-inhibition can effectively prevent endotoxin-induced acute lung injury.

Methods : We studied the role of PKC in ETX-induced ALI using PKC inhibitor (staurosporine, STP) in the rat. Specific pathogen free male Sprague-Dawley weighted from 165 to 270g were used for the study.

Animals were divided into the normal control (NC)-, vehicle control (VC)-, ETX-, PMA (phorbolmyristateacetate)-, STP+PMA-, and STP+ETX-group. PMA (50mg/kg) or ETX (7mg/kg) was instilled through polyethylen catheter after aseptic tracheostomy with and without STP (0.2mg/kg)-pretreatment. STP was injected via tail vein 30min before intratracheal injection (IT) of PMA or ETX. Bronchoalveolar lavage (BAL) was done 3- or 6-hrs after IT of PMA or ETX respectively, to measure protein concentration, total and differential cell counts.

Results : The results were as follows.

The protein concentrations in BALF in the PMA- and ETX-group were very higher than that of VC-group ($p < 0.001$). When animals were pretreated with STP, the %reduction of the protein concentration in BALF was 64.8 ± 8.5 and $30.4 \pm 2.5\%$ in the STP+PMA- and STP+ETX-group, respectively ($p = 0.028$).

There was no difference in the total cell counts between the PMA- and VC-group ($p = 0.26$). However the

ETX-group showed markedly increased total cell counts as compared to the VC- ($p = 0.003$) and PMA-group ($p = 0.0027$), respectively. The total cell counts in BALF were not changed after pretreatment with STP compared to the PMA- ($p = 0.22$) and ETX-group ($p = 0.46$).

The percentage of PMN, but not alveolar macrophage, was significantly elevated in the PMA-, and ETX-group. Especially in the ETX-group, the percentage of PMN was 17 times higher than that of PMA ($p < 0.001$). The differential cell counts was not different between the PMA and STP+PMA. On the contrary the STP+ETX-group showed decreased percentage of PMN ($p = 0.016$). There was no significant relationship between the protein concentration and the total or differential cell counts in each group.

Conclusion : Pretreatment with PKC-inhibitor (staurosporine) partially but significantly inhibited ETX-induced ALI.

Key Words : Acute lung injury, Endotoxin, PKC, PMA, staurosporine

서 론

급성호흡곤란증후군의 발병기전과 치료에 관한 많은 연구에도 불구하고 발병시 사망률은 50% 이상이며 특히 그원인이 그람음성균에 의한 경우 사망률은 더욱 높다^{1,2}). 그람음성균에 의한 패혈증의 증세는 내독소의 핵심성분인 리포다당질(lipopolysaccharide)에 의해 발생한다. 실험동물의 생체내로 리포다당질을 투여하면 급성호흡곤란증후군의 임상 및 병리소견이 발생하는 것은 잘알려진 사실이나³) 급성호흡곤란증후군의 발병에 관여하는 내독소의 세포내 신호전달경로와 각 경로의 역할은 아직 확실하지않다. 리포다당질은 그 자체로서 또는 리포다당질결합 단백질과 복합체를 형성하여 정상인의 말초혈액 단핵구에 존재하는 내독소 수용체인 CD14에 결합되며 이때 CD14에 인접한 제2의 세포 표면 수용체가 CD14와 결합하여 세포내로의 신호전달이 시작된다. 이신호전달은 tyrosine 인산화를 통하여 종양괴사인자-알파 ($\text{TNF-}\alpha$), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8)등의 염증성 cytokine을 단핵구로부터 분비하도록 하는 것으로 통상 알려져 있다⁴). 그러나 최근의 연구결과를 보면 리포다당질은 인간 단핵구에서 CD14를 통하여 tyrosine phosphoprotein인 mitogen-activated protein kinase (MAPkinase)

의 형성은 물론 calcium에 비의존적인 PKC를 활성화시키기도한다⁵). 그외에도 몇몇 다른 보고에의하면 리포다당질은 림프구와 대식세포에 있는 80kD의 세포 표면 수용체 같은⁶⁻⁹) CD14 및 protein tyrosine kinase (PTK)와 무관한 경로를 통해서도 PKC를 활성화시켜 단핵구로부터 $\text{TNF-}\alpha$ 와 $\text{IL-1}\beta$ 를 분비하며 이것은 PKC 억제제에 의하여 완벽하게 차단된다¹⁰). 그러나 CD14-단클론항체나 herbimycin A같은 PTK-억제제등도 리포다당질에 의한 $\text{TNF-}\alpha$ 분비와 $\text{TNF-}\alpha$ mRNA 생성을 유의하게 감소시키므로 인간 단핵구에서 리포다당질에 의한 $\text{TNF-}\alpha$ 와 $\text{IL-1}\beta$ 분비 및 유전자형성은 PTK와 PKC 모두에 상호 의존하고 있는 것으로 생각된다^{10,11}). 인간¹¹⁻¹⁵) 및 동물^{16,17})의 단핵구에서 리포다당질이 PKC를 활성화시켜 급성폐손상의 주요 매개물인 $\text{TNF-}\alpha$ 와 IL-1 을 분비시키며 그중에서도 IL-1 에 의한 ICAM-1 표현은 PKC에 의존적이나 $\text{TNF-}\alpha$ 에 의한 ICAM-1 표현은 PKC와 무관하여 내독소에 의한 세포내 신호전달체계는 여러개의 신호전달로가 작용하고있고 상호간의 조정기전이 특정물질의 생성에 서로 다르게 작용하고 있는 것을 알 수 있다^{10,11,18}). 그러나 현재까지의 결과들은 시험관내에서 특정세포들을 대상으로 얻은 단편적 실험성적이므로 내독소에 의한 급성호흡곤란증후군의 병인론에 이결과를 그대로 적용할 수는 없을 것이다.

phorbol ester (PMA)를 투여하여 PKC만 활성화시켜도 급성폐손상이 발생하는 것은 고립 폐관류실험이나 동물생체실험에서 이미 확인되어있으며 호중구에 의한 활성 산소기유리가 주요한 기전으로 밝혀져있다¹⁹⁾. 그러나 고농도의 PMA를 전신투여하면 호중구 결핍상태하에서도 정상쥐와 차이가 없는 폐손상을 유발하며^{20, 21)} 단핵구에서 PMA가 IL-1 β 및 IL-8 mRNA을 상승시키는 것으로 보아²²⁾ 단핵구에서 유리되는 염증성 cytokine도 PMA가 급성폐손상을 유발하는 중요한 요소일 것으로도 생각된다.

이상의 문헌고찰에서 저자들은 내독소가 PTK는 물론 PKC 신호전달로 활성화시키는 시험관내 실험성적들을 확인하였고 PKC 단독 활성화의 경우에도 내독소경우와 유사한 급성폐손상이 발생함을 확인하였으므로 PKC를 미리 차단한 동물에 내독소를 투여하면 내독소에 의한 급성폐손상이 상당부분 억제될 수 있을 것이라는 가능성을 예측하고 백서를 이용한 생체실험을 시행하였다.

방법 및 재료

1. 실험시약

phorbolmyristateacetate (PMA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, 100mg, Sigma)와 staurosporine (STP, Sigma)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해시켜 -70°C에 보관하였고 실험직전 endotoxin-free PBS (Sigma)에 희석시켜 사용하였다. 전실험에서 DMSO의 최종농도는 0.1%를 유지하였다. lipopolysaccharide (LPS, E.coli sero type 0111 : B4 ; Sigma) 역시 endotoxin-free PBS에 실험직전 용해하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 실험순서

체중이 165g에서 270g사이의 웅성 Sparague-

Dawley를 사용하였다. pentotalsodium (40mg/kg)을 복강내로 투여, 충분히 마취된 후 기관지절개술, 기관지내 약물투여, 정맥주사를 실시하였다. 기관지내 약물투여는 기관지 절개후 polyethylene 카테터를 기도에 삽입한 후 endotoxin-free PBS (Sigma) 200ml 에 각각의 약물을 희석 후 5~10분간에 걸쳐 아주 천천히 투여하였다. 정맥주사는 백서의 미부정맥을 통해 23-gauge 바늘로 주입하였다. 백서를 정상대조군 (normal control ; NC-group), 매개물 대조군 (vehicle control ; VC-group), PMA 유발 폐손상군 (PMA 군), 리포다당질 유발 폐손상군 (ETX 군), staurosporine 전처치-PMA 군 (STP+PMA 군), staurosporine 전처치-ETX군 (STP+ETX 군)등 6군으로 분류하고, 정상대조군에서는 기관지내로 어떠한 약물도 투여하지않고 기관지폐포세척 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였으며, 매개물대조군에서는 endotoxin-free PBS로 희석한 0.1% DMSO 200ml를, PMA 및 ETX군에서는 각 군에서 PMA (50mg/Kg)와 내독소 (7mg/Kg) 200ml를 각각 기도내 직접 주입하였다. STP+PMA 군 및 STP+ETX군에서는 기관지내로 PMA 또는 내독소를 투여하기 30분전에 STP 0.2mg/Kg를 체중당 1ml의 양으로 정주하였다.

3. 기관지폐포세척 및 분석

BAL을 시행하기전 백서의 복부대동맥을 절단하여 혈액을 유출시켰고, 횡격막을 약간 절개하여 폐를 허탈시켰다. BAL은 EDTA 3mM을 혼합한 PBS 용액을 미리 37°C로 데워 다음 1회에 23ml/Kg의 양으로 three-way valve를 통해 주입하고 모두 6회 실시하여 얼음에 저장하였다²³⁾. 매회 주입시마다 1분간 세척액을 폐조직내에 저류시키고 흉벽을 부드럽게 massage하여 세포의 회수를 촉진하였다²⁴⁾. 처음 2회 세척액은 500xg로 10분간 원심분리하여 상층액 3ml은 단백질을 측정하기 위해 -20°C에 보관하고 하층의 세포성분은 나머지 세척액과 혼합하여 총세포수와 세

포백분율을 계산하였다. VC군에서는 기도내로 0.1% DMSO를 주입한 후 3시간 및 6시간째에 BAL을 각각 3마리의 백서에서 실시하였다. PMA 및 STP+PMA군에서는 PMA의 기관지주입 후 3시간째에 BAL을 실시하였고 ETX 및 STP+ETX군에서는 ETX의 기관지주입 후 6시간째에 BAL을 실시하였다. 기관지폐포세척액내 (bronchialveolar lavage fluid, BALF)의 단백질을 측정하는 Sigma사의 brilliant blue G dye를 이용하여 분광계에서 595nm에 측정하였고, 총세포수는 Coulter counter로 측정하였으며 표기는 $\times 10^5/\text{ml}$ 로 하였다. 세포백분율은 cytopsin으로 처리, Diff-Quickstain (Sigma) 후 1000배 시야에서 200개 이상의 세포를 읽어 계산하였다.

4. 통계

각 측정값은 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SE)로 표시하였고 비모수적방법으로 검정하여 독립적 두군간의 비교 및 세군이상의 비교는 Mann-Whitney U test 및 Kruskal-Wallis분석법을 각각 이용하였다. 통계적 유의성은 p값이 0.05 이하일 때 인정하였다.

결 과

전체실험동물 (n = 38)의 기관지폐포세척액의 회수율은 최저 72.4%에서 최고 95.5%로 평균값은 $82.7 \pm 2.0\%$ 이었다. 기도내 0.1% DMSO를 주입한 후 3시간 및 6시간에 각기 3마리의 백서에서 BALF의 단백질농도를 측정하고 결과 시간에 따른 차이가 없어 매개물대조군값으로 data에 포함시켰다. 각군의 BALF내 단백질농도(Fig. 1.)는 매개물대조군 (n = 8)에서 $51.6 \pm 7.3\text{mg}\%$ 로 정상대조군 (n = 6)의 $19.3 \pm 3.7\text{mg}\%$ 보다 높았으며 (p = 0.005), PMA군 (n = 9)과 ETX군 (n = 5)에서는 197.7 ± 16.3 및 $164.0 \pm 11.2\text{mg}\%$ 로 양군간에는 차이가 없었으나 (p = 0.205) 매개물대조군에 비해 아주 높

은 단백질농도를 보여 (p < 0.001) PMA군과 ETX군에서 폐포혈관막사이의 심한 투과성 증가가 발생하였음을 알 수 있었다.

STP로 전처치하였을 경우(Fig. 2.), STP+PMA군 (n = 5)에서는 BALF내 단백질농도가 $74.9 \pm 16.8\text{mg}\%$ 로 PMA군보다 $64.8 \pm 8.5\%$ 감소하였고 (p = 0.004), STP+ETX군 (n = 5)에서는 $113.6 \pm 13.0\text{mg}\%$ 로 PMA군보다 $30.4 \pm 2.5\%$ 감소하여 (p = 0.04), STP가 PMA 및 ETX에 의한 폐포혈관막사이의 투과성 증가를 억제함을 관찰하였다.

그러나 STP가 투과성 증가를 억제하는 효과가 ETX에 대해서는 PMA보다 현저히 낮아 (Fig. 3, p = 0.028), ETX에 의한 폐손상에서 PKC신호전달로가 부분적으로만 관여하는 것으로 생각되었다. BAL내 총세포수 ($\times 10^5/\text{ml}$)(Fig. 4.)는 정상대조군에서 5.2 ± 0.4 , 매개물대조군에서 7.6 ± 0.7 로 양군간에 유의한 차이가 있었으나 (p = 0.035), PMA군에서 10.9 ± 1.7 로 매개물대조군과는 통계적 유의성이 없었으며 (p = 0.26), ETX군에서는 100.6 ± 11.9 로

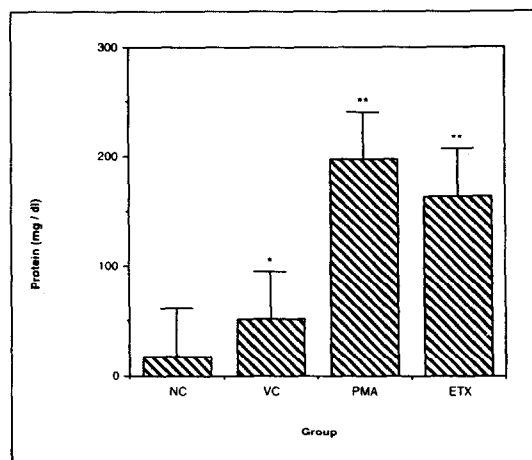


Fig. 1. Protein concentration in BALF in each group.

*p = 0.005 vs NC-group, **p < 0.001 vs VC-group.

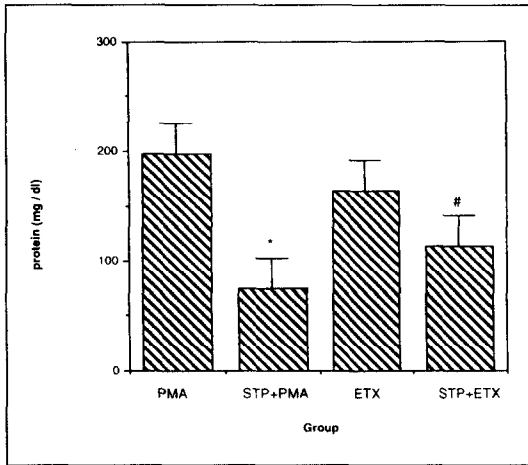


Fig. 2. Protein concentration in BALF in the PMA-and ETX-group before and after pretreatment with staurosporine.
* $p = 0.004$ vs PMA-group, # $p = 0.04$ vs ETX-group.

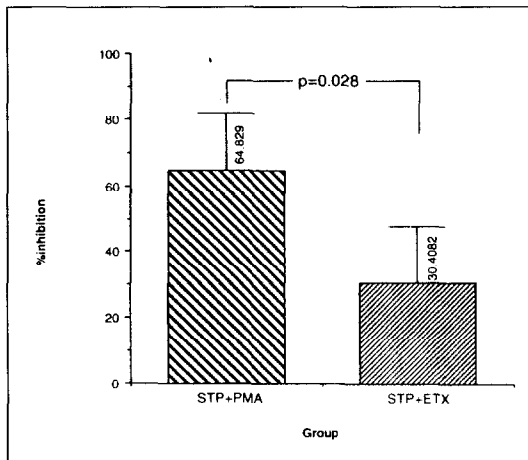


Fig. 3. Comparison of % inhibition of protein concentration in BALF after pretreatment with staurosporine in the PMA-and ETX-group.

매개물대조군 ($p = 0.003$)과 PMA군 ($p = 0.0027$)에 비해 매우 증가하였다. STP로 전처리하였을 경우 STP+PMA군에서는 총세포수가 7.4 ± 1.9 로 PMA군에 비해 차이가 없었으며 ($p = 0.22$),

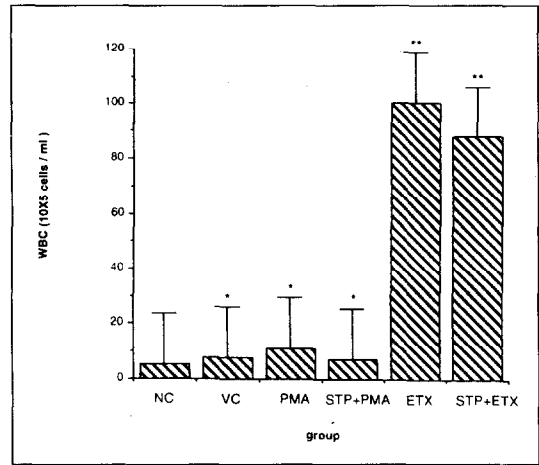


Fig. 4. Total cell counts in BALF in each group with and without staurosporine-pretreatment.
* $p < 0.05$ vs NC-group, ** $p < 0.01$ vs VC-group.

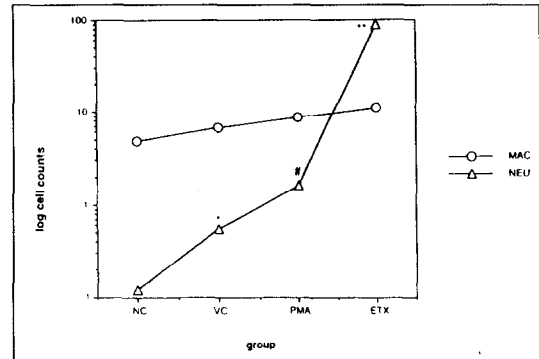


Fig. 5. Macrophage and neutrophil counts in BALF in each group.
* $p < 0.01$ vs NC-group, # $p < 0.05$ vs VC-group, ** $p < 0.01$ vs PMA-group.

STP+ETX군의 경우에서도 88.3 ± 10.6 으로 ETX군에 비해 역시 차이가 없었다 (Fig. 4, $p = 0.46$). 각세포구성분의 백분율과 수에서 PMA 및 ETX로 자극하였을 때 정상대조군에 비해 매개물대조군, PMA군, ETX군에서 호중구의 세포수는 증가하나 대식세포의 세포수는 증가가 없어(Fig. 5.), 상대적으

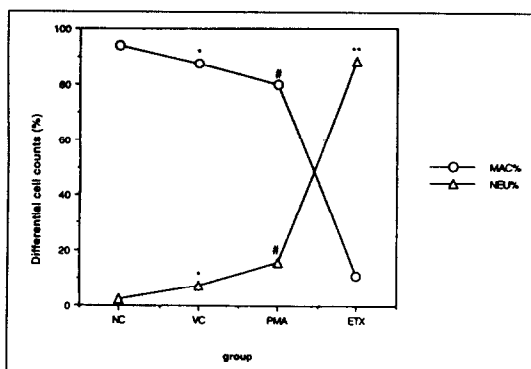


Fig. 6. Percentage of macrophage and neutrophil in BALF in each group.

* $p < 0.01$ vs NC-group, # $p < 0.01$ vs VC-group, **The composition (%) of neutrophil of ETX-group is 17 times higher than that of PMA-group($p = 0.001$)

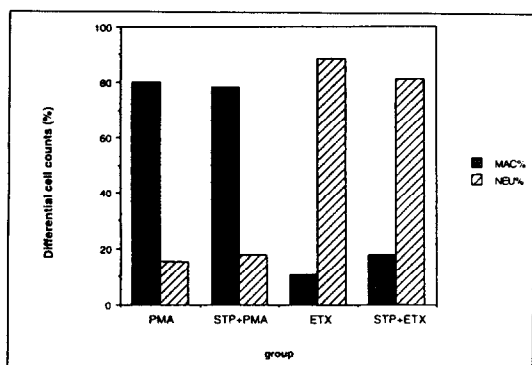


Fig. 7. Differential cell counts (%) in BALF before and after pretreatment with staurosporine on the PMA and ETX-group.

* $p < 0.05$ vs ETX-group.

로 호중구의 백분율은 증가하고 대식세포의 구성백분율은 감소하였는데 특히 ETX군에서의 호중구 백분율은 PMA의 경우보다 17배나 높았다 (Fig. 6, $p < 0.001$). STP로 전처치한 경우 (Fig. 7.), STP+PMA군에서는 PMA군에 비해 호중구나 대식세포의 구성백분율은 차이가 없었으나 ($p = 0.28, 0.54$), STP+ETX군에서는 호중구의 백분율은 감소하고

($p = 0.016$) 대식세포의 구성백분율은 증가하여 ($p = 0.017$), PMA와 ETX에 대한 STP의 처리효과는 일치하지 않았다. BALF내 단백질농도는 각군에서 총세포수 혹은 호중구나 대식세포의 수 및 백분율과는 상관관계가 없었다.

고찰

본연구의 예비실험에서 PMA의 용량-반응측정상 10 및 30mg/kg에서는 BALF내 단백질량의 재현성이 없었고 또 50mg/kg의 용량에서도 1시간 및 2시간에서는 재현성이 없었으므로 연구자들은 향후의 실험에서 50mg/kg의 용량으로 3시간의 기도내 저류시간을 유지하였다. 또한 ETX군의 용량-반응실험에서도 1~3mg/Kg에서는 매개물대조군에 비해 BALF내 단백질농도의 유의한 차이가 없었고 5mg/kg에서는 매개물대조군에 비해 단백질농도의 유의한 차이가 있었으나 PMA군에 비해 상대적으로 낮아 PMA군과 비슷한 단백질농도를 보이는 7mg/kg, 6시간을 선택하였다.

매개물대조군에서 정상대조군보다 높은 BALF내 단백질농도를 보이는 것은 ($p = 0.005$) 기도내 이물질의 투여로 인한 저산소증에 의한 반응으로 생각된다. 그이유로는 예비실험에서 기도내에 PBS를 투입하였을 때도 매개물대조군과 차이가 없는 결과가 나와 0.1% DMSO가 폐조직에 영향을 미치는 것으로는 보기 어렵고 저산소증은 그자체로 혈관내피세포에서 endothelin, platelet derived growth factor (PDGF)같은 혈관 작용성물질의 형성을 촉진시킬 수 있기 때문이다^{25, 26}). 저자들이 기도내 약물주입 용량을 200ml로 결정한 것은 예비실험에서 PBS 300ml를 주입시 동물의 사망률이 30%였으므로 사망률을 줄이기 위하여 200ml를 선택하였고, 결과적으로 본실험의 전체동물 44마리중 6마리만이 사망하여 사망률은 13.6%였다. staurosporine을 이용한 혈액학적 실험을 보면²⁷) 웅성 Sprague-Dawley에서 0.55mg/kg를 정주하였을 때 심장의 수축 감소작용이 있고 1mg

/kg이상 투여시 심한 저혈압과 높은 사망률을 보이며 0.1mg/kg에서 0.5mg/kg사이에서 심혈관계에 유의한 반응을 보였다는 보고가 있으므로 저자들은 예비실험에서 staurosporine을 0.05mg/kg에서 부터 0.1mg/kg, 0.2mg/kg를 각기 3마리의 백서에 정주하고 PMA로 처리한 결과 0.2mg/kg에서 부터 BAL내 단백질농도가 유의하게 감소됨을 알았고 이결과는 본논문의 data에 포함되었다. STP로 전처리하였을 경우 (Fig. 2.) STP+PMA군에서는 BALF내 단백질농도가 PMA군 보다 $64.8 \pm 8.5\%$ 감소 하였다 ($p = 0.004$). 그러나 같은 STP 용량에서 ETX군에서는 PMA군의 약반에 해당되는 30.4%정도만 억제하여 ($p = 0.028$), ETX에 의한 폐손상에서는 PKC신호전달로와의 다른기전이 다소 우세할 것으로 생각되었다.

BALF내 단백질농도가 PMA군이 매개물대조군에 비해 약3.8배 높았고 ETX군과는 차이가 없었으나 총세포수가 PMA군과 매개물대조군사이에 통계적 유의성이 없었고 ($p = 0.26$), ETX군에서는 PMA군에 비해 총세포수가 약10배 증가한 점으로 보아 총세포수보다는 폐포기관지내의 염증세포를 포함한 폐혈관내의 염증세포²⁸⁾, 폐혈관내피세포, 또는 폐포상피세포등의²⁹⁾ 기능적 활성화가 투과성 증가에 더 영향을 미치는 인자로 추정할 수 있다. 또 STP처리군에서도 PMA 및 ETX 양군에 비해 단백질농도는 유의하게 감소하였으나 총세포수가 변화가 없는 점으로 보아 STP는 폐조직내세포의 기능적 활성화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. PMA에 의한 급성폐손상은 생산된 반응성산소기의 농도와 양에 의존적이므로 PMA에 의한 폐손상은 어떤 특정세포의 활성화도 중요하나 폐조직내에 증가된 전체적인 반응성산소기에 의한 총체적 반응의 결과일 수도 있다³⁰⁾.

염증세포의 구성분과 BALF내 단백질농도와와의 상관관계에서도 호중구 혹은 대식세포의 구성백분율과 단백질농도와는 상관관계가 없었다. 특히 ETX군에서의 호중구 백분율은 PMA의 경우 보다 17배나 높았으나 ($p < 0.001$), 두군간에 투과성 증가의 차이는 없었으므로 이역시 어떤 특정세포의 단독기능보다는

폐조직내 전체세포의 기능적활성이 급성폐손상의 결정적 요인임을 시사하는 소견으로 볼 수 있다. STP+PMA군에서 PMA군에 비해 호중구나 대식세포의 구성백분율은 차이가 없는 가운데에도 ($p = 0.28, 0.54$), 단백질농도가 감소한 점으로 보아 STP+ETX군에서는 호중구의 백분율은 감소한 것은 ($p = 0.016$) 큰 의미가 없다고 생각된다. PMA에 의한 급성폐손상의 발생기전에 호중구의 역할이 중요한 것은 사실이나 호중구를 제거한 쥐¹⁹⁾, 토끼³¹⁾, 양에²¹⁾ PMA를 기관지내 혹은 정맥으로 투입하였을 때도 급성폐손상이 발생하는 것으로 보아 호중구외의 다른 인자 또는 다른 세포도 중요하게 작용하고 있을 것으로 추측된다. 실험관 실험상 PMA는 호산구³²⁾, 대식세포³³⁾, 혈관내피세포²⁴⁾ 등을 자극 반응성산소기를 분비할 수 있다. 본실험에서는 STP를 기도가 아닌 정맥내로 투여하였으므로 STP가 폐혈관내피세포 또는 폐혈관내의 염증세포에 작용하여 폐손상을 감소시켰을 가능성이 있다고 생각된다.

내독소에 의한 폐손상에서 호중구뿐만 아니라 혈관내피세포도 호중구의 염증작용에 관여하고 있고, PMA에 의한 급성폐손상의 기전도 명백하지는 않으나 호중구에서 형성된 반응성산소기와 thromboxan 등이 혈관내피세포를 손상시켜 폐부종을 형성하는 것이 중요한 기전으로 알려져있다³⁰⁾. 활성화된 반응성산소기의 분비는 급성호흡곤란증후군을 비롯한 각종 폐손상의 기전이다. 염증반응에서 호중구가 반응성산소기 생산의 주세포이지만 혈관내피세포에서도 cytokine등의 자극으로 반응성산소기가 생산, 분비되며 특히 저산소증후의 산소공급에 따른 내피세포의 반응성산소기의 분비는 PKC억제제로 방지된다³⁵⁾.

PKC는 혈관내피세포의 mitogen에 대한 반응, prostacyclin합성, 혈소판활성인자에 의한 투과성증가등에 관여하는 신호전달경로로 보고되어 있다. 특히 PKC는 호중구와 혈관내피세포의 부착성에 일부 관여한다³⁶⁾. PMA나 호중구에 의한 혈관내피세포의 투과성이 호중구에서 분비되는 반응성산소기에 의존하며 이때 cytochalasinB등으로 호중구가 혈관내피세포에

근접하는 것을 방해함으로써 혈관내피세포의 투과성이 감소되는 것으로 보아 급성폐손상의 기전에서 호중구-혈관내피세포 부착성이 핵심적 요소임을 알 수 있다³⁷⁾. PKC억제제인 H-7을 이용한 실험에서 내독소, TNF- α , IL-1 β 등에 의한 호중구-혈관내피세포 부착성이 일부이지만 통계적으로 유의하게 감소하므로 혈관내피세포의 활성화시 PKC신호전달로가 부분적으로 관여됨을 알 수 있다³⁶⁾.

본 실험에서는 시간에 따른 BAL내 염증세포의 분포를 비교하지 못하였는데 기관지폐포내로의 호중구의 이동은 폐손상발생후 상당 시간이 지나서 이루어진다는 실험보고가 있으므로³⁸⁾ PKC투여 전후의 시간에 따른 BAL내 염증세포의 분포를 확인하는 실험이 요구된다. staurosporine은 미생물의 알칼로이드성분으로 nM농도에서는 PKC의 catalytic fragment에 선택적으로 작용하는 강력한 PKC억제물이지만 농도가 증가할수록 cyclic AMP-dependent kinase나 tyrosine protein kinase같은 다른 종류의 protein kinase를 억제할 수 있다^{27, 39)}. 따라서 저자들이 투여한 staurosporine의 용량이 실제로 PKC만 선택억제하는 용량인지는 분명치 않은 점이 있으나 본실험에서 PKC에 의한 폐손상이 약 65%감소되었으므로 STP 투여가 리포다당질에 의한 PKC 활성화를 상당 부분 억제한 것은 분명하다.

요 약

연구배경 :

급성호흡곤란증후군의 발병에 관여하는 내독소의 세포내 신호전달경로와 각경로의 역할은 아직 확실하지 않으나 몇몇 시험관실험에서 내독소가 염증세포내 protein kinase C (PKC) 경로를 활성화한다는 보고들이 있다. 따라서 저자들은 PKC를 미리 차단한 동물에 내독소를 투여하면 내독소에 의한 급성폐손상이 상당 부분 억제될 수 있을 것이라는 가능성을 예측하고 백서를 이용한 생체실험을 시행하였다.

방 법 :

체중이 165g에서 270g사이의 웅성 Spa-rague-Dawley를 정상대조군 (normal control ; NC-group), 매개물대조군 (vehicle control ; VC-group), PMA유발폐손상군 (PMA 군), 내독소유발 폐손상군 (ETX군), staurosporine전처치-PMA군 (STP+PMA군), staurosporine전처치-ETX군 (STP+ETX군) 등 6군으로 분류하고, 정상대조군에서는 기관지내로의 어떠한 약물도 투여하지않고 기관지폐포세척 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였으며, 매개물대조군에서는 DMSO 200ml를, PMA 및 ETX군에서는 각군에서 PMA (50mg/Kg)와 내독소 (7mg/Kg) 200ml를 각각 기도내로 직접 주입하였다. STP+PMA군 및 STP+ETX군에서는 기관지내로 PMA 또는 내독소를 투여하기 30분전에 STP 0.2mg/Kg를 체중당 1ml의 양으로 정주하였다. BAL은 EDTA 3mM을 혼합한 PBS 용액을 1회에 23ml/Kg의 양으로 three-way valve를 통해 주입하고 모두 6회 실시하였다. 처음 2회 세척액은 원심분리후 상층액 3ml로 단백질을 농도를 측정하였고 하층의 세포성분은 나머지 세척액과 혼합하여 총세포수와 세포백분율을 계산하였다. VC군에서는 기도내로 0.1% DMSO를 주입한 후 3시간 및 6시간에 BAL을 실시하였다. PMA 및 STP+PMA군에서는 PMA의 기관지주입후 3시간째에 BAL을 실시하였고 ETX 및 STP+ETX군에서는 ETX의 기관지주입후 6시간째에 BAL을 시행하였다.

결 과 :

BALF내 단백질농도는 PMA군과 ETX군에서 매개물대조군에 비해 아주 높은 단백질농도를 보였다 ($p < 0.001$).

STP로 전처치하였을 경우, BALF내 단백질농도 감소율은 STP+PMA군에서 $64.8 \pm 8.5\%$, STP+ETX군에서는 $30.4 \pm 2.5\%$ 로 양군간에 의미있는 차이를 보였다 ($p = 0.028$).

BAL내 총세포수는 PMA군에서는 매개물대조군과 차이가 없었으나 ($p = 0.26$), ETX군에서는 매개

물대조군 ($p = 0.003$)과 PMA군 ($p = 0.0027$)에 비해 매우 증가하였다.

BAL내 총세포수는 STP로 전처리하여도 PMA군과 ETX군 모두에서 변화가 없었다 ($p = 0.46$).

각 세포구성분의 백분율과 수에서 PMA 및 ETX로 자극하였을 때 정상대조군에 비해 매개물대조군, PMA군, ETX군에서 호중구의 세포수는 증가하나 대식세포의 세포수는 증가가 없어, 상대적으로 호중구의 백분율은 증가하고 대식세포의 구성백분율은 감소하였는데 특히 ETX군에서의 호중구 백분율은 PMA의 경우 보다 17배나 높았다 ($p < 0.001$).

STP로 전처리 한 경우, STP+PMA군과 PMA군 사이에서는 세포의 구성백분율은 차이가 없었으나, STP+ETX군에서는 호중구의 백분율은 감소하여 ($p = 0.016$) PMA와 ETX에 대한 STP의 처리 효과는 일치하지 않았다.

PMA군과 ETX군에서 BALF내 단백질농도가 전체세포, 호중구 혹은 대식세포의 수 또는 구성백분율과 상관관계가 있는지 살펴보았으나, 어느세포도 BALF내 단백질농도와는 상관관계가 없었다.

결 론 :

PKC 신호전달로를 차단함으로써 내독소에 의한 급성 폐손상의 정도가 부분적이지만 유의하게 감소되므로 PKC 신호전달로가 내독소의 염증성대사에 일부 관여하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Montgomery AB, Stager MA, Carrico J, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132: 485, 1985
2. Bone RC. Adult Respiratory Distress syndrome. *Semin Respir Med* 7(Suppl): 1, 1986
3. Meyrick B: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133: 913, 1986
4. Han J, Lee J-D, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induce rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 268: 25009, 1993
5. Liu MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 153: 2642, 1994
6. Lei MG, Morrison DC. Specific-endotoxic lipopolysaccharide-binding proteins on murine splenocytes. *J Immunol* 141: 996, 1988
7. Prpic V, Weid JE, Somers SD, Diguseppi J, Gonias SL, Pizzo SV, Hamilton TA, Herman R, Adams DO. Effects of bacterial lipopolysaccharide on the hydrolysis of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 139: 526, 1987
8. Wrightman PD, Reatz CRH. The activation of protein kinase C by biologically active lipid moieties of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 259: 10048, 1984
9. Rosoff PM, Cantley LC. Lipopolysaccharide and phorbol esters induce differentiation but have opposite effects on phosphatidylinositol turnover and Ca^{2+} mobilization in 70Z/3 preB-1 lymphocytes. *J Biol Chem* 260: 9209, 1985
10. Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, VanDyke TE; Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β . *J Immunol* 153: 1818, 1994
11. Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD; Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor- α and interleukin-10 expression. *Eur J Immunol* 26: 1580, 1996

12. Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, Castillo J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. *Am J Pathol* **138**: 1485, 1991
13. Becker S, Devlin RB, Haskill JS: Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin-1 by human alveolar macrophages. *J Leuko Bio* **145**: 353, 1989
14. Bakouche O, Moreau JL, Lachman LB. Secretion of IL-1: Role of protein kinase C. *J Immunol* **148**: 84, 1992
15. Prabhakar U, Lipshutz D, Pullen M, Turchin H, Kassis S, Nambi P. Protein kinase C regulates TNF- α production by human monocytes. *Eur Cytokine Netw* **4**: 31, 1993
16. Tschaikowsky K. Protein kinase C inhibitors suppress LPS-induced TNF production in alveolar macrophages and in whole blood: the role of encapsulation into liposomes. *Bio chem Biophys Acta* **222**: 113, 1994
17. Nakano Y, Yamasu H, Matsuura M, Shinomiya H. Intracellular protein phosphorylation in murine peritoneal macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS): effects of kinase-inhibitors and LPS-induced tolerance. *Immunobiology* **187**: 272, 1993
18. Eissner G, Kolch W, Mischak H, Bornkamm GW, Holler E. Differential role of protein kinase C in cytokine induced lymphocyte-endothelium interaction in vitro. *Scand J Immuno* **140**: 395, 1994
19. Johnson KJ, Ward PA. Acute and progressive lung injury after contact with phorbol-myristateacetate. *Am J Pathol* **107**: 29, 1982
20. Carpenter LJ, Johnson KJ, Kunkel RJ, Roth RA. Phorbol myristate acetate produces injury to isolated rat lungs in the presence and absence of perfused neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* **91**: 33, 1987
21. Dyer EL, Snapper JR. Role of circulating granulocytes in sheep lung injury produced by phorbol myristate acetate. *J Appl Physiol* **60**: 576, 1986
22. Gross V, Zhang B, Geng Y, Villiger PM, Lotz M. Regulation of interleukin-6 (IL-6) expression: evidence for a tissue-specific role of protein kinase C. *J Clin Immunol* **13**: 310, 1993
23. Bassett DJP. Ozone-induced lung injury, in *Handbook of Animal models of Pulmonary Disease*, Vol.1, Cantor JO., Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, 22.
24. Frevert CW, Warner AE, Kobzik L. Defective pulmonary recruitment of neutrophils in a rat model of endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**: 716, 1994
25. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelium gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* **88**: 1054, 1991
26. Kourembanas S, Hanna RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest* **86**: 670, 1990
27. Dundore RL, Brousseau AC, Habeeb PG, Pratt PF, Becker L T, Clas DM, Silver PJ, Buchholz RA. Hemodynamic and renal effects of the protein kinase inhibitor staurosporine in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **120**: 525, 1992
28. Williams H, Patel SK, Hatakeyama D, Arian R, Guo K, Hickey TJ, Liao SY, Ulich TR. Activated pulmonary vascular neutrophils as early mediators of endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**: 134, 1993
29. 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
30. 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
 31. Schraufstatter IU, Revak SD, Cochrane CG. Proteases and oxidants in experimental pulmonary inflammatory injury. *J Clin Invest* **73**:1175, 1984
 32. Yamashita T, Someya A, Hara E. Response of superoxide anion production by guinea pig eosinophils to various soluble stimuli: comparison to neutrophils. *Arch Biochem Biophys* **241**:447, 1985
 33. Hoidal JR, Repine JE, Beall GD, Rasp RL, White JG. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages. *Am J Pathol* **191**:469, 1978
 34. Matsubara T, Ziff M. Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between phorbol ester and a calcium ionophore. *J Cell Physiol* **127**:207, 1986
 35. 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
 36. Magnuson DK, Maier RV, Pohlman TH. Protein kinase C: A potential pathway of endothelial cell activation by endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1. *Surgery* **106**:216, 1989
 37. Shasby DM, Shasby SS, Peach MJ. Granulocytes and phorbol myristate acetate increase permeability to albumin of cultured endothelial monolayers and isolated perfused lungs. *Am Rev Respir Dis* **127**:72, 1983
 38. Lawrence E, Eeden SV, English D, Hogg JC. Polymorpho nuclear leukocyte (PMN) migration in streptococcal pneumonia: comparison of older PMN with those recently released from the marrow. *Am J Respir Cell Mol Bio* **114**:217, 1996
 39. Nakadate T, Jeng AY, Blumberg PM. Comparison of protein kinase C functional assays to clarify mechanisms of inhibitor action. *Biochem Pharmacol* **137**:1541, 1988