Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 45, No. 6, Dec, 1998

□원 저□

산화질소 공여물과 산화질소 합성효소 길항제가 백서 폐미세혈관 내피세포 산화제 손상에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 폐질환연구소, 유타대학교 의과대학 호흡기내과*
고려대학교 의과대학 내과학교실**, 병리학교실***

장 준, John R. Michael*, 김세규, 김성규, 이원영, 강경호**, 유세화**, 채양석***

= Abstract =

The Effect of Nitric Oxide Donor or Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Oxidant Injury to Cultured Rat Lung Microvascular Endothelial Cells

Joon Chang, M.D., John R. Michael, M.D.*, Se Kyu Kim, M.D., Sung Kyu Kim, M.D., Won Young Lee, M.D., Kyung Ho Kang, M.D., Se Hwa Yoo, M.D.** and Yang Seok Chae, M.D.*****

Department of Internal Medicine, The Institute of Chest Diseases, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea ; Division of Respiratory, Critical Care and Occupational Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Veterans Affair Medical Center and University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah 84132, U.S.A., Departments of Internal Medicine** and Pathology***, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

Background : Nitric oxide(NO) is an endogenously produced free radical that plays an important role in regulating vascular tone, inhibition of platelet aggregation and white blood cell adhesion to endothelial cells, and host defense against infection. The highly reactive nature of NO with oxygen radicals suggests that it may either promote or reduce oxidant-induced cell injury in several biological pathways. Oxidant injury and interactions between pulmonary vascular endothelium and leukocytes are important in the pathogenesis of acute lung injury, including acute respiratory distress syndrome(ARDS). In ARDS, therapeutic administration of NO is a clinical condition providing exogenous NO in oxidant-induced endothelial injury. The role of exogenous NO from NO donor or the suppression of endogenous NO production was evaluated in oxidant-induced endothelial injury.

Method : The oxidant injury in cultured rat lung microvascular endothelial cells(RLMVC) was induced by hydrogen peroxide generated from glucose oxidase(GO). Cell injury was evaluated by ^{51}chromium(^{51}Cr) release technique. NO donor, such as S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP) or sodium nitroprusside(SNP), was added to the endothelial cells as a source of exogenous NO. Endogenous production of NO was suppressed with N-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) which is an NO synthase inhibitor. L-NMMA was also used in in-

creased endogenous NO production induced by combined stimulation with interferon-γ (INF-γ), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and lipopolysaccharide(LPS). NO generation from NO donor or from the endothelial cells was evaluated by measuring nitrite concentration.

Result : ^{51}Cr release was 8.7±0.5% in GO 5 mU/ml, 14.4±2.9% in GO 10 mU/ml, 32.3±2.9% in GO 15 mU/ml, 55.5±0.3% in GO 20 mU/ml and 67.8±0.9% in GO 30 mU/ml ; it was significantly increased in GO 15 mU/ml or higher concentrations when compared with 9.6±0.7% in control($p < 0.05$; n=6). L-NMMA(0.5 mM) did not affect the ^{51}Cr release by GO.

Nitrite concentration was increased to 3.9±0.3 μM in culture media of RLMVC treated with INF-γ(500 U/ml), TNF-α(150 U/ml) and LPS(1 μg/ml) for 24 hours ; it was significantly suppressed by the addition of L-NMMA. The presence of L-NMMA did not affect ^{51}Cr release induced by GO in RLMVC pretreated with INF-γ, TNF-α and LPS.

The increase of ^{51}Cr release with GO(20 mU/ml) was prevented completely by adding 100 μM SNAP. But the add of SNP, potassium ferrocyanate or potassium ferricyanate did not protect the oxidant injury.

Nitrite accumulation was 23±1.0 μM from 100 μM SNAP at 4 hours in phenol red free Hanks' balanced salt solution. But nitrite was not detectable from SNP upto 1 mM.

The presence of SNAP did not affect the time dependent generation of hydrogen peroxide by GO in phenol red free Hanks' balanced salt solution.

Conclusion : Hydrogen peroxide generated by GO causes oxidant injury in RLMVC. Exogenous NO from NO donor prevents oxidant injury, and the protective effect may be related to the ability to release NO. These results suggest that the exogenous NO may be protective on oxidant injury to the endothelium. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 1265-1276)

Key words : Nitric oxide, Oxidant, Endothelium.

서 론

급성 호흡곤란 증후군은 폐혈관 내피 및 폐포 상피의 투과성 증가에 의한 폐부종이 주된 병인인 급성 폐손상으로 그중 심한 형태이다. 급성 호흡곤란 증후군의 폐손상 발병에서 호중구가 각종 자극을 받아 폐에 축적되고 활성화되면서 생성하는 산소 유리 반응기(free radical)가 매우 중요하다고 밝혀졌다[1]. 산화질소 (nitric oxide : NO·)는 생체에서 생성되는 유리 반응기로서 혈관 긴장도의 완화, 혈소판 응집 저지, 혈관 내피세포에 대한 백혈구 유착 방해, 감염에 대한 숙주 방어 등 여러 방면에 중요한 기능이 확인되었다[2]. NO는 전이성 금속(transition metal), 산소, 기타 반응기 등과 쉽게 반응하므로 여러 생체내 반응에 관여하여 산화제 손상을 촉진시키거나 감소시킬 가능성이 제기되었다[2].

NO를 흡입하면 급성 호흡곤란 증후군에서 폐혈관이 확장되어 폐동맥 고혈압이 완화되고 폐의 환기 관류 불균형이 개선되므로 치료에 시험적으로 이용된다[3]. 그러나 이는 급성 호흡곤란 증후군에서 혈관내피세포에 대한 산화제 손상이 주요한 기전임에도 불구하고 유리 반응기인 NO를 외부로 부터 첨가하는 상황이어서 NO와 superoxide(O_2^-)의 반응으로 생성되는 peroxynitrite ($OONO^-$) 혹은 NO 자체에 의하여 내피세포의 손상이 가중될 가능성이 우려되었다[4].

급성 호흡곤란 증후군 환자의 폐나 혈액 중에 보체

분절, interleukin-1, 종양 괴사인자(tumor necrosis factor), 혈소판 활성화인자(platelet activating factor), interleukin-6, interleukin-8 등의 염증성 자극물질이 증가되어 있으며 내독소가 이들 물질의 유리를 촉진한다[1]. 급성 호흡곤란 증후군에서 호중구가 증가되면서 이런 매개체에 전처치(priming)되어 방출하는 superoxide와 과산화수소는 탈과립시 나온 myeloperoxidase 등과 작용하여 폐손상을 야기한다[1]. 아울러 내피세포도 산화제를 생성할 가능성이 있다. 내독소, 내독소에 전처치되어 자극받은 호중구 등이 내피세포에서 xanthine dehydrogenase가 xanthine oxidase(XO)로 전환되도록 자극할 수 있다. 손상받은 내피세포는 XO를 누출하게 되며, 이 XO가 폐나 다른 장기의 내피세포에 부착하여 손상을 입히거나 호중구의 유입을 유도할 수 있다. 호중구에서 나오는 산소 반응기와 내피세포에서 나오는 XO가 항단백효소의 비활성화, 지질의 산화, 염증, 폐손상 등을 야기함이 밝혀졌다[1].

혈관 내피세포에는 구성형 산화질소 생성효소(constitutive nitric oxide synthase : cNOS) 외에도 유발형 산화질소 생성효소(inducible NOS : iNOS)가 모두 존재한다고 밝혀졌다[5]. iNOS는 대식세포의 경우 내독소, interferon-γ, tumor necrosis factor-α 등의 자극에 의하여 활성화 되면[6], cNOS보다 훨씬 많은양의 NO를 장시간 지속적으로 생성하여, 세균, 진균, 기생충, 종양세포 등의 살해나 억제같은 생체 방어 기구의 하나로 작용한다고 알려졌다[2].

NO와 superoxide는 공히 산화작용을 갖고 있으며 이들의 반응으로 peroxynitrite가 생성되고 peroxynitrite에서 강한 산화제인 hydroxyl기가 생성될 수 있다[7]. 혈관 내피세포에서 NO 생성을 자극하는 cytokines와 염증성 매개물질은 모두 내피세포에서 XO에 의한 superoxide 생성도 자극한다. 내피세포에 흡착되는 호중구 역시 다량의 superoxide를 방출한다[1]. 그리고 과다 생성된 NO는 해당작용, 미토콘드리아 호흡 연쇄, DNA 복제 등을 저해할 수 있는데 이런 효과의 일부분에 NO와 superoxide로부터 생성된 peroxynitrite가 관여한다[8]. NO와 superoxide의 비가 1 : 1이면 peroxynitrite가 생성되어 지질 과산화(lipid peroxidation)를 유발하지만, NO가 superoxide 보다 많으면 오히려 peroxyl radical을 청소하여 지질 과산화를 억제할 수도 있다[9].

염증성이나 병리적 손상의 실험에서 NO는 조직 손상을 촉진하거나 억제할 수도 있다[6]. NO를 흡입시키거나 L-arginine으로 내인성 NO 생성을 촉진시키면 실험 동물의 폐에서 산화제에 의한 혈관 손상을 감소시킬 수 있다[9,10]. 급성 호흡곤란 증후군에서 산화제 손상이 중요한 기전인데 소량의 NO를 장시간 흡입치료하는 임상 시험이 폐손상을 악화시키거나 완화시킬 가능성이 있는지 이와 유사한 조건의 폐혈관 내피세포 수준에서 실험적으로 평가할 필요가 있다.

본 연구에서는 NO 공여물에서 제공되는 외인성 NO가 내피세포의 산화제 손상에서 어떤 역할을 하는지 조사하고자 하였다. 산화제에 의한 세포손상은 백서 폐미세혈관 내피세포에 과산화수소를 생성하는 glucose oxidase를 투여하여 야기시키고 이를 ^{51}chromium(^{51}Cr) 방출양 측정으로 평가하였다. 산화제에 의한 폐혈관 내피세포의 손상에 외인성 NO가 미치는 영향은 NO 공여물인 S-nitroso-N-acetyl-penicillamine 혹은 sodium nitroprusside를 산화제와 동시에 투여하여 평가하였다. 산화제에 의한 폐혈관 내피세포의 손상에 내인성 NO 억제가 미치는 영향은 NOS 길항제인 N-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)을 추가하여 평가하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

백서 폐미세혈관 내피세포(rat lung microvascular endothelial cell)는 microcarrier beads를 이용하여 분리한 것을 유타대학교 John R. Michael교수(Salt Lake City, Utah, USA)로 부터 제공받았다. 이 세포는 광학 현미경 및 전자 현미경상 조약돌(cobble-

stone) 형태이고, 제 Ⅷ 인자 항원의 존재와 acetylated low density lipoproteins 섭취로 내피세포임을 확인하였다[11]. 배양 배지는 Ryan's red medium(M-199 medium, 6.7% bovine calf serum, 3.3% fetal bovine serum, 10^{-5} M thymidine, penicillin 60 units/ml, streptomycin 60 μg /ml, gentamicin 20 μg /ml)을 사용하여 5% 이산화탄소를 보충한 섭씨 37도의 항온 배양기에서 배양하였다. 세포는 trypsin 같은 효소를 사용하지 않고 세포 찰과기(scraper)로 찰과하여 계대 배양하였다.

2. 산화제 세포손상

백서 폐미세혈관 내피세포가 6 well plate에서 70-80% 융합되었을 때 ^{51}Cr을 1 μCi/ml 함유한 세포 배양액을 각 well당 1.5 ml로 16-18 시간 표지(label) 시킨 후 phenol red 비함유 Hanks' balanced salt solution(HBSS)로 3회 세척하였다. Glucose oxidase(GO) 5-30 mU/ml가 함유된 HBSS를 각 well에 2 ml씩 처치하여 4시간 경과후 상층액을 수거하고 세포를 0.1 N NaOH로 파괴하여 각각을 gamma counter(A5530 : Packard Instrument, Downers Grove, IL, U.S.A.)로 방사양을 측정한 후 ^{51}Cr 방출량을 (상층액)/(상층액+세포)로 계산하여 퍼센트로 표현하였다[11]. GO로 세포 손상을 일으키면서, 조사하고자 하는 물질을 같이 함유한 HBSS로 처치하여 세포 손상에 미치는 영향을 검토하였다.

3. NO 공여물의 효과

산화제 손상시 세포 외부로 부터 제공된 NO의 영향을 조사하고자 NO 공여물로 알려진 S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP), sodium nitroprusside(SNP)을 처치하였고, SNP의 대조군으로 SNP와 구조적으로 대등한 cyanide를 가졌으나 NO와 무관한 potassium ferrocyanide 혹은 potassium ferricyanide를 투여하였다.

4. 내인성 NO 억제 및 NO synthase 자극에 의한 NO 생성 유발

산화제 손상시 내인성 NO 생성 억제의 효과는 NOS 억제제인 L-NMMA를 0.5 mM로 처치하여 평가하였다. Rat recombinant interferon-γ (INF-γ : Gibco BRL, Grand Island, New York, U.S.A.) 500 U/ml, human recombinant tumor necrosis factor-α (TNF-α : Genzyme, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.) 150 U/ml, E. *coli* serotype 0128 : B12 lipopolysaccharide (LPS : Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, U.S.A.) 1 μg /ml를 동시에 투여하여 iNOS에 의한 NO 생성을 유발하고 이에 대한 GO와 L-NMMA 투여 효과도 조사하였다.

5. Nitrite 측정에 의한 NO 방출량 평가

NO 공여물로부터 NO 방출유무와 iNOS를 자극하여 NO 생성이 되는지를 nitrite 농도 측정으로 평가하였다. 검사물을 96 well plate에 넣고 30% 초산 중 1% sulfanilamide 용액과 60% 초산 중 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 용액을 각각 1 : 1 혼합한 Greiss reagent를 첨가하여 발색반응을 일으킨 후 microplate reader(MR700 : Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, U.S.A.)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이를 sodium nitrite를 첨가하여 얻은 표준곡선의 흡광도와 대조함으로써 nitrite 농도를 결정하였다[5].

6. Glucose oxidase에 의한 과산화수소 생성 측정

HBSS에서 GO에 의한 과산화수소가 생성되는 양과 GO가 SNAP에 의하여 방해받는지 여부를 확인하기 위하여, 과산화수소 농도를 GO 20 mU/ml 용액에서 SNAP 100 μM 유무 혹은 백서 폐미세혈관 내피세포 유무 상태로 측정하였다. 과산화수소 농도는 pH

7.0, 100 mM potassium phosphate buffer에 type II horseradish peroxidase(200 purpurogallin U/mg) 25 U/ml, 4-aminoantipyrene 1.875 mM, phenol 137.5 mM 등이 함유된 반응액 0.8 ml와 0.2 ml의 검체를 첨가하고 spectrophotometer(DU-80 : Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.)로 510 nm에서 흡광도를 측정한 후 molar extinction coefficient를 6.58 $mM^{-1}cm^{-1}$로 하여 계산하였다[12].

7. 통계적 분석

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성을 분산분석(analysis of variance : ANOVA) 및 Student unpaired t-test로 검정하였다. 모든 결과의 분석에서 P 값 0.05 미만인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. GO에 의한 손상에서 L-NMMA의 효과

백서 폐 미세혈관 내피세포에서 GO의 농도를 0-30 mU/ml로 4시간 동안 처치시 ^{51}Cr 방출이 GO 5 mU/ml에서 8.7±0.5%, 10 mU/ml에서 14.4±2.9%, 15 mU/ml에서 32.3±2.9%, 20 mU/ml에서 55.5±0.3%, 30 mU/ml에서 67.8±0.9%로 GO 15 mU/ml 이상에서 대조군의 9.6±0.7%에 비하여 유의하게 증가하였다($P<0.05$; $n=6$). 이 세포 손상은 0.1-1 mM의 L-NMMA를 추가하여도 영향이 없었다(Fig. 1).

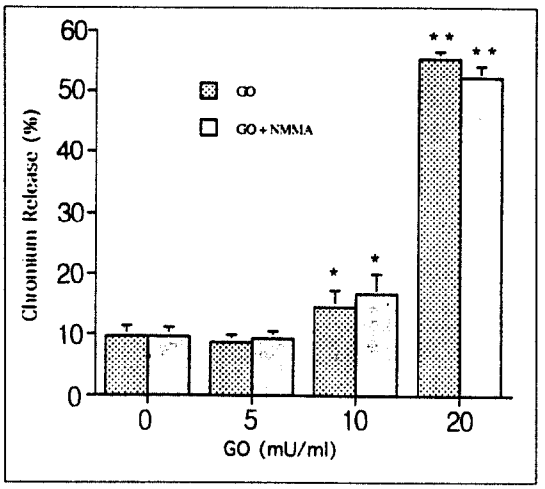

Fig. 1. Effect of glucose oxidase (GO) concentration and N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) on chromium release from rat lung microvasculature endothelial cells(RLMVC). GO (0-20 mU/ml) without or with L-NMMA (0.5 mM) was added to Hanks' balanced salt solution (HBSS) with glucose for 4 hours. Values are means ±SD ; n=6 for each condition. *P<0.01 vs. control ; **p<0.001 vs. control ; GO+NMMA : GO with L-NMMA 0.5 mM.

2. NO 생성 자극의 영향

INF-γ 500 U/ml, TNF-α 150 U/ml, LPS 1 μg/ml을 배양액에 첨가하여 24시간 경과시 배양액 중 nitrite 농도가 3.9±0.3 μM인 것에 비하여, INF-γ 500 U/ml, TNF-α 150 U/ml, LPS 1 μg/ml에 L-NMMA 0.5 mM을 첨가하면 nitrite 농도가 0.2±0.1 μM로 유의하게 억제되었으며($p<0.05$; $n=6$), 무처치군과 L-NMMA 0.5 mM군에서는 nitrite가 검출되지 않았다(Fig. 2A). INF-γ 500 U/ml, TNF-α 150 U/ml, LPS 1 μg/ml 24시간 전처치후 GO 10 mU/ml로 야기한 세포손상이 L-NMMA 0.5 mM 첨가에 영향받지 않았다(Fig. 2B).

3. NO공여물sodium nitroprusside(SNP) 및 S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP)의 영향

^{51}Cr 방출이 대조군 8.3±0.8%에 비하여 GO 20 mU/ml에서 55.0±2.8%, GO+SNP 100 μM에서

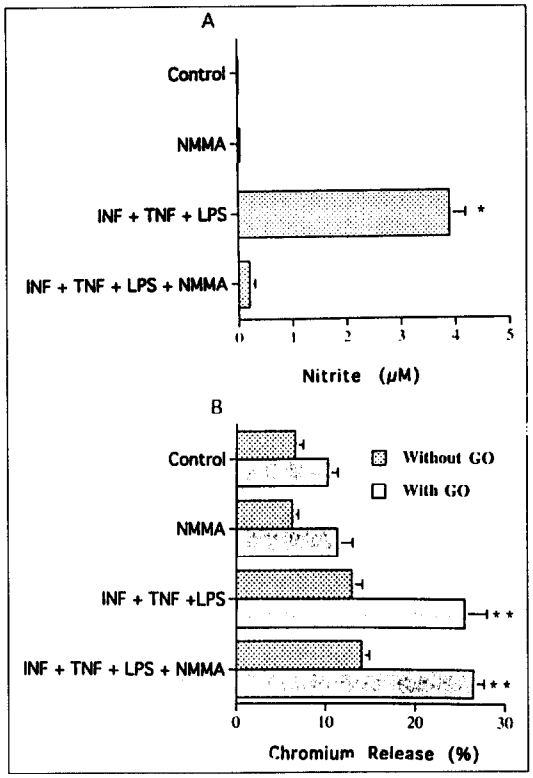

Fig. 2. Influence of stimulated nitric oxide production and its inhibition by L-NMMA on nitrite concentration(A) and chromium release(B) caused by exposing rat lung microvasculature endothelial cells to GO. Cells were exposed for 4 hours to HBSS with or without 10 mU/ml GO. INF+TNF+LPS : NO production was stimulated by treating cells for 24 hours prior to GO experiments with Ryan's media containing interferon-γ 500 U/ml, tumor necrosis factor-α 150 U/ml and lipopolysaccharide 1 μg/ml. INF+TNF+LPS+NMMA : same as INF+TNF+LPS except the addition of 0.5 mM NMMA. NMMA : cells were treated for 24 hours prior to GO experiments with Ryan's media containing 0.5 mM NMMA. Values are means±SD ; n=6 for each condition. *p<0.05 vs. control, NMMA or INF+TNF+LPS. **p<0.05 vs. control, NMMA or without GO.

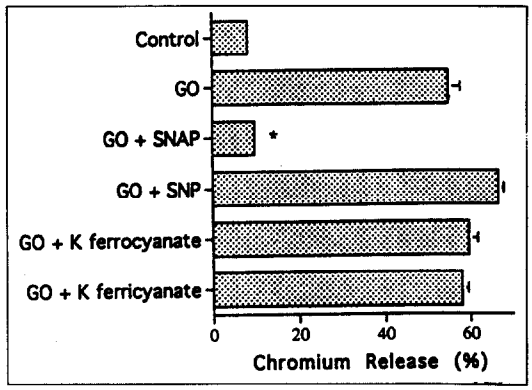

Fig. 3. Effect of 100 μM S-nitroso-N-acetyl-penicillamine(SNAP), 100 μM sodium nitroprusside(SNP), 100 μM potassium ferrocyanate(K ferrocyanate) and 100 μM potassium ferricyanate(K ferricyanate) on GO-mediated injury to rat lung microvasculature endothelial cells. Cells were exposed for 4 hours to HBSS with 20 mU/ml GO except control. Values are means±SD; n = 6 for each condition. *P < 0.001 vs. the others except control.

66.5±1.3%로 유의하게 증가한 반면($p<0.05$; n=6), GO+SNAP 100 μM에서 9.8±0.7%로 대조군과 동일한 수준으로 GO에 비하여 유의하게 감소하였다($p<0.01$; n=6). SNP의 대조군으로 NO 방출이 되지 않으면서 SNP와 구조적으로 대등한 cyanide 구조를 가진 물질을 각각 GO에 추가한 GO+potassium ferrocyanide 100 μM 및 GO+potassium ferricyanide 100 μM는 GO와 차이가 없었다 (Fig. 3). SNP 100 μM, SNAP 100 μM, potassium ferrocyanide 100 μM, potassium ferricyanide 100 μM 등 GO 없이 단독 투여된 대조군에서는 ^{51}Cr 방출이 무처치 대조군과 차이가 없었다.

4. SNAP 농도와 시간 경과에 따른 nitite 농도

시험관에서 HBSS에 용해시킨 SNAP 수용액을 섭씨 37도 5% CO_2항온 배양기에서 4시간 경과시킨 후

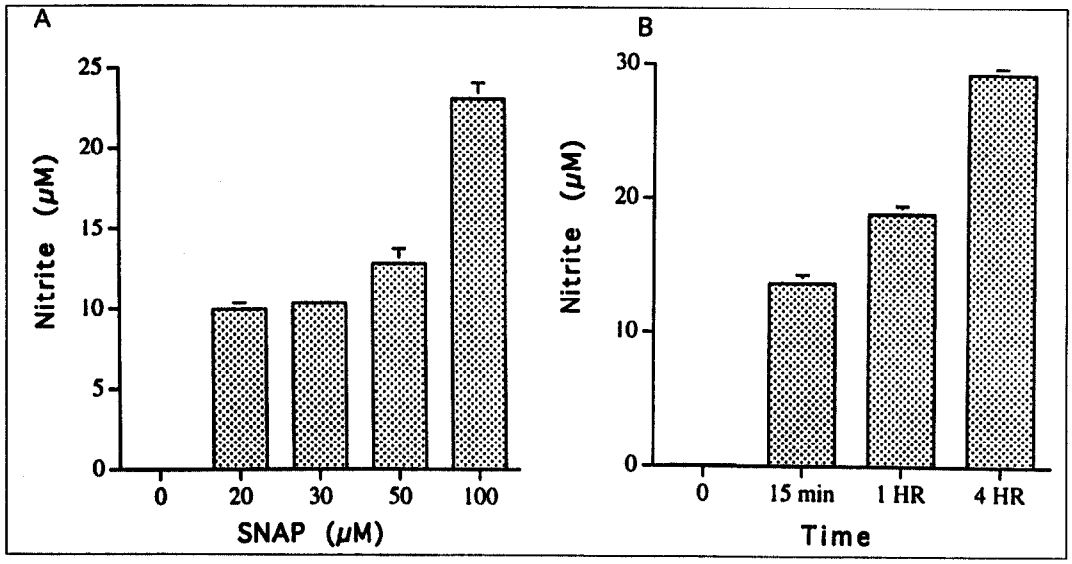

Fig. 4. Effect of SNAP concentration (A) and duration of exposure (B) on nitrite accumulation in HBSS. In dose-response experiments, SNAP (0-100 μM) was added to HBSS for 4 hours. In time-response experiments, SNAP 100 μM was incubated for 15 minutes to 4 hours. SNAP solutions in HBSS were incubated at 37℃ and 5% CO_2.

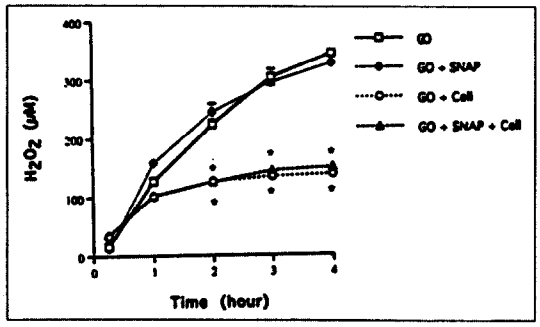

Fig. 5. The generation of hydrogen peroxide from GO(20 mU/ml) in phenol red free Hanks' balanced salt solution in the absence or the presence of SNAP(100μM) or rat lung microvasculature endothelial cells. Values are means±SD ; n=6 for each condition. *p<0.05 vs. GO or GO+SNAP.

측정한 nitrite농도가 SNAP 20 μM에서 10.0±0.4 μM, 30 μM에서 10.3±0.2 μM, 50 μM에서 12.8±0.9 μM, 100 μM에서 23.0±1.0 μM으로 SNAP 농도가 증가함에 따라 nitrite 농도가 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($p<0.01$; n=6) (Fig. 4A). SNAP 100 μM을 시험관에서 15분 - 4시간 경과후 nitrite를 측정시 시간 경과에 따라 유의하게 증가함을 관찰하였다(Fig. 4B). SNP 100-1,000 μM 용액에서는 nitrite가 측정 수준 범위에서 검출이 되지 않았다.

5. SNAP 유무와 GO에 의한 과산화수소 생성

HBSS중의 GO 20 mU/ml에 의하여 생성된 과산화수소 농도가 15분에 16±3 μM, 1시간에 127±3 μM, 2시간에 223±8 μM, 3시간에 302±14 μM, 4시간에 342±7 μM로 시간 경과에 따라 유의하게 증가하였으며, 이에 100 μM의 SNAP을 추가하여도 유의한 차이가 없었다($p>0.05$; n=6) (Fig. 5). 백서 폐미세혈관 내피세포 존재하에 상층액인 HBSS중의 GO 20 mU/ml에 의하여 생성된 과산화수소 농

도는 15분에 33±3 μM, 1시간에 101±4 μM, 2시간에 126±7 μM, 3시간에 134±1 μM, 4시간에 137±2 μM 등으로 이는 100 μM의 SNAP을 추가하여도 차이가 없었으며($p>0.05$; $n=6$), 시간 경과에 따른 증가가 2시간 이후에는 세포가 없는 경우에 비하여 유의하게 낮았다($p<0.01$; $n=6$) (Fig. 5).

고 찰

패혈증성 쇼크에 의한 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란 증후군에서는 폐혈관 내피세포 및 호중구의 상호작용이 병인에서 매우 중요하다고 알려져 있는데, 실험 동물에서 보체 활성화에 의한 폐손상이 superoxide dismutase, catalase, deferoxamine 등에 의하여 감소되며, 급성 호흡곤란 증후군 환자가 내쉬는 호기 중의 과산화수소 농도가 증가되었고, 환자의 혈청에서 대조군의 혈청에 비하여 과산화수소 청소 속도가 빠르며, 폐포액의 glutathione 농도가 감소되어 있다[1].

NOS 길항제의 투여로 패혈증성 쇼크의 저혈압을 교정 시킬 수 있었다는 보고[13]가 있는 반면 폐손상이나 실험동물의 치명율이 증가할 수도 있는 등 상충된 보고가 있다[14-17]. 내독소에 의한 쇼크 및 급성 폐손상에서 주로 내피세포, 혈관 평활근, 백혈구 등의 iNOS가 증진되어 다량의 NO가 방출되므로 혈관확장과 저혈압이 발생하며, 동물의 내독소 쇼크와 패혈증 환자에서 NOS 길항제인 L-NMMA 소량 투여로 혈압 상승제에 대한 혈관 반응과 혈압이 회복되었다[8,13]. NO가 과다 생성되는 내독소 쇼크에서 NOS 길항제 투여로 혈압이 정상화되는 긍정적 효과가 있는 반면, 혈관 내피세포에서 NO 생성이 감소하므로 백혈구와 혈소판의 미세혈관에 대한 유착 및 응집이 억제되지 않아 미세혈관 손상이 증가하고 폐손상도 증가할 가능성이 있다[16]. 생체 내에서는 NO가 내피세포 뿐만 아니라 백혈구, 혈소판의 작용에도 영향을 미치고 L-NMMA 등의 대다수 NOS 길항제가 선택성의 정도 차이는 있지만 iNOS와 cNOS를 함께 억제하므로 미세혈관 긴장도를 완화하여 혈류를 유지하도록 조절하는 내피세포의 cNOS, 자율신경계의 비아드레날린성 비콜린성 신경전달 등에 대한 영향 등이 복합되어 생체내 효과는 예측이 어렵다[7,17].

위중한 급성 호흡곤란 증후군에서 NO 흡입으로 폐동맥 고혈압과 저산소혈증을 개선시킬 수 있다. 환기가 되지 않는 부위의 폐포로는 NO가 흡입되지 않는 반면 환기가 양호한 폐포로 NO가 선택적으로 흡입되어 그 부위의 혈관을 주로 확장하므로 폐 환기관류 불균형이 개선되고 폐동맥압이 감소된다. 그러나 환자에 따라 혹은 동일 환자에서도 경과 중에 NO 흡입에 대한 혈역학적 및 호흡 효과가 다른 경우가 있으며, 일반적으로 NO 흡입전 폐동맥압이 높은 경우에 반응이 뚜렷하다[3,7,17].

NO 생성은 NO 산화산물인 nitrite(NO_2^-)와 nitrate(NO_3^-)를 측정하여 간접적으로 평가할 수 있다. 혈액에서는 NO에서 nitrite가 생성된 후 혈색소와 반응하여 nitrate로 신속히 전환되지만, 혈장, 수용액, ultrafitrate 등에서는 NO가 nitrite로 산화된 후 상당시간 안정적이기 때문에 세포배지에서 NO 생성 확인에 nitrite 측정으로 충분하다[18]. 그리고 단순 buffer 용액에서는 nitrite가 주된 NO 분해 산물이다[18]. Nitrate는 검체에 *E. coli* nitrate reductase를 처리하여 nitrite로 환원시켜서 검체내의 총 nitrite를 측정하고, 실제 nitrite와 nitrate가 함께 측정된 총 nitrite값에서 *E. coli* nitrate reductase 처치없이 측정한 nitrite를 빼는 방식으로 측정한다. Buffer 용액에 단백질이 있으면 NO의 반감기는 증가한다[19].

NO의 포화용액은 2 mM인데 물에서 반감기가 1초 미만이다. 생체내에서는 이보다 1,000-200,000배 희석된 상태로 NO가 낮은 농도에서는 반감기가 매우 길어질 수 있다[19]. 입증된 NO의 체내 최대 농도는 대뇌 허혈에 의한 4 μM이며 guanylate cyclase를 활성화시킬 수 있는 최저 농도는 5 nM으로 혈관 내피세포는 이의 10-40배의 NO를 생성할 수 있다. NO 5 nM의 반감기는 70시간에 달한다[19]. 임상적으로

NO를 흡입하는 것은 NO가 micromole 수준에서 수주간 공급되는 상황이다[19].

NO가 관련있는 상황에서 NO가 그 존재 시간이 짧고 반응성이 높다 하여 세포 독성을 일으켰다고 해석한 경우가 많으나, 생체외 실험과 달리 생체내의 낮은 NO 농도에서는 그 반응성이나 독성이 훨씬 낮다[19]. 무산소 상태에서 NO에 의한 유기물 분자의 산화는 산소에 의한 산화와 그 반응률이 거의 대등하다[19]. 생체내 생리적 상태에서는 혈관 내피세포에서 NO와 superoxide가 모두 생성되는데 NO가 superoxide보다 2-3배 많이 생성된다[20]. 산소 존재하에서 NO는 불안정하여 신속히 nitrite가 된다. NO는 superoxide와 강력히 반응하여 peroxynitrite가 생성되며 이의 protonated form이 hydroxyl기와 nitrite로 분해될 수 있다. NO가 과다하면 오히려 peroxyl radical을 청소하여 지질 과산화를 억제할 수도 있다[9,19,20].

과산화수소에 의한 세포손상은 철 의존성 기전이 관여한다[1,11]. 과산화수소는 철을 활성화하여 ferryl 이온, perferryl 이온, ferrous-dioxygen-ferric complex 등을 생성하며 이에 의하여 산소 라디칼이 발생하고 생체내 분자의 산화가 야기된다. NO와 철의 반응성이 매우 높은데 NO가 이러한 철 관련 반응을 저해할 가능성이 시사되었다[8,11].

NO가 산화제 손상을 악화 혹은 완화시킬지 여부는 생성되는 산화제의 종류와 양, NO 생성률, 산화제와 NO가 생성되는 해부학적 장소 및 세포 특성, 조직손상이 야기되는 주된 산화기전, 산화-환원 환경, 세포의 산화제나 NO 손상에 대한 감수성 등 복합적 요인이 서로 관계하고 있다[21-23]. 이렇게 복잡하지만 기저상태나 산화제 손상에서 NO가 보호작용을 하는 기전은 철 매개 산화제 생성 억제와 이에 따른 지질 과산화 억제[11], 백혈구 유착과 활성화의 방해, 염증세포에 의한 산화제 생성 감소, 비반세포의 탈과립 차단, 세포독성 매개물질의 분비 억제, 세포내 cGMP 증진 등이 제기되었다[24-28]. 가토 분리 관류폐에서 GO에 의한 폐혈관 투과성 증진이 NO 24 ppm 흡입으로 방지될 수 있었다는 보고[29]가 있었으며 이는 급성 호흡곤란 증후군에서 치료 목적으로 흡입시키는 수준의 NO 흡입이 폐손상을 완화시킬 수도 있음을 장기 수준에서 실험적으로 확인한 것이다.

본 연구에서 L-NMMA의 투여로 내인성 NO생성을 억제하여도 GO에 의한 과산화수소 매개 산화제 손상에 영향이 없었는데(Fig. 1, 2), 이는 내인성 NO의 생성량이 적어서 보호효과를 나타낼 수 없거나 산화제 손상으로 내인성 NO생성이 저하되었기 때문일 가능성이 있다. SNAP이 GO에 의한 과산화수소 생성으로 야기시키는 산화제 손상을 보호하지만 SNP는 보호효과가 없었다(Fig. 3). SNP도 NO 방출제로 알려졌으나 thiol과 반응하여야 cyanide를 유리하면서 NO를 방출한다[30]. 생체나 장기에 관한 연구에서는 NO 방출제로 작용하는 경우가 있으나, 세포에 관한 연구에서는 배양액이나 실험에 사용된 완충용액에서 NO 방출이 없거나 NO와 관계없이 SNP 자체가 직접 NO와 유사한 작용을 발현하거나 NO와 무관한 기타 효과를 발휘하는 경우가 상당히 있어 그 해석에 주의를 요한다[18]. 반면 SNAP은 강력하고 순수한 NO 공여 물질이다[18]. SNAP은 $O=N\text{-}SCMe_2CH(NHR)CO_2H$의 구조식으로 동종용해(homolytic cleavage)에 의하여 NO를 방출하면서 thiyl 라디칼이 생성되고 thiyl 라디칼은 다시 N-acetylpenicillamine disulfide가 되어 안정화된다[18]. 본 연구에서 NO 방출을 nitrite 측정으로 평가하였는데 SNAP은 농도와 시간 경과에 따라 NO를 방출하지만(Fig. 4A, B), SNP는 HBSS에서 1 mM까지의 농도로도 nitrite 축적이 측정 가능한 범위에 미달하였다. 따라서 SNAP의 보호효과는 NO 방출 능력과 관련이 있을 가능성을 다시 확인하였다.

GO는 glucose를 기질로 하여 과산화수소를 생성하는데 SNAP의 첨가는 이를 저해하지 않았으며, 세포가 함께 있으면 생성되는 과산화수소가 세포의 항산화효소와 단백 등에 의하여 소모가 되므로 그 농도의 증가가 완화되지만 이 역시 SNAP의 첨가로 영향을 받지 않아 SNAP의 보호효과가 GO에 의한 과산화

수소 생성을 억제하는 것이 무관함을 확인하였다 (Fig. 5).

결론적으로 폐미세혈관 내피세포에서 GO에 의하여 생성되는 과산화수소로 산화제 손상을 야기하였으며, NO 공여물인 SNAP으로부터 제공된 외인성 NO가 산화제 손상을 방지하고 이 보호효과는 NO 방출 능력에 의할 가능성이 시사되었다. 따라서 생체내 환경에 따라 외인성 NO가 내피세포에 대한 산화제 손상에 보호 효과가 있을 수 있다고 추정된다.

요 약

연구배경 :

NO는 생체내에서 생성되는 유리 반응기로서 혈관 긴장도의 완화, 혈소판 응집 저지, 혈관 내피세포에 대한 백혈구 유착 방해, 감염에 대한 숙주 방어 등에서 중요한 역할을 한다. NO는 전이 금속(transition metal), 산소, 기타 반응기 등과 쉽게 반응하므로 여러 생체내 반응에 관여하여 산화제 손상을 촉진시키거나 감소시킬 가능성이 제기되었다. 급성 폐손상 및 급성 호흡곤란 증후군에서는 폐혈관 내피세포 및 호중구의 상호작용 및 산화제 손상이 매우 중요한 병인으로 알려져 있으며, NO를 급성 호흡곤란 증후군에서 흡입하여 치료하는 것은 산화제에 의한 혈관 내피세포 손상에서 외부로부터 NO를 공급하는 상황이다. 본 연구에서는 외인성 NO의 공여나 내인성 NO 억제가 산화제에 의한 폐미세혈관 내피세포의 손상을 악화시키거나 완화시킬 수 있는지를 관찰하였다.

방 법 :

산화제에 의한 세포손상은 백서 폐미세혈관 내피세포에 과산화수소를 생성하는 glucose oxidase(GO)를 투여하여 야기시키고 이를 ^{51}Cr 방출 측정으로 평가하였다. 산화제에 의한 폐혈관 내피세포의 손상에 외인성 NO가 미치는 영향은 NO 공여물인 SNAP 혹은 SNP를 산화제와 동시에 투여하여 평가하였다. 산화제에 의한 폐혈관 내피세포의 손상에 내인성 NO 억제가 미치는 영향은 NOS 길항제인 L-NMMA을 추가로 투여하여 평가하였다. INF-γ, TNF-α, LPS 등으로 내인성 NO 생성을 자극한 후 L-NMMA의 효과도 관찰하였으며, NO 공여물이나 내피세포로 부터의 NO생성은 nitrite 측정으로 평가하였다.

결 과 :

백서 폐 미세혈관 내피세포에서 ^{51}Cr 방출이 GO 5 mU/ml에서 8.7±0.5%, 10 mU/ml에서 14.4±2.9%, 15 mU/ml에서 32.3±2.9%, 20 mU/ml에서 55.5±0.3%, 30 mU/ml에서 67.8±0.9%로 GO 15 mU/ml 이상에서 대조군의 9.6±0.7%에 비하여 유의하게 증가하였으며($P<0.05$; $n=6$), 이에 0.5 mM L-NMMA를 추가하여도 영향이 없었다.

INF-γ 500 U/ml, TNF-α 150 U/ml, LPS 1 μg/ml을 배양액에 첨가하여 24시간 경과시 배양액 중 nitrite 농도가 3.9±0.3 μM로 증가하였으며, 이에 L-NMMA 0.5 mM을 첨가하면 0.2±0.1 μM로 유의하게 억제되었다($p<0.05$; $n=6$). INF-γ, TNF-α, LPS 자극후 GO에 의한 ^{51}Cr 방출에 L-NMMA는 영향을 주지 않았다.

GO 20 mU/ml에 의한 ^{51}Cr 방출이 SNAP 100 μM의 추가로 대조군 수준으로 현저히 억제되었으나, SNP, potassium ferrocyanide, potassium ferricyanide 등의 추가는 영향이 없었다.

Hanks' balanced salt solution(HBSS) 중의 SNAP 100 μM로 부터 4시간 동안 nitrite가 23.0±1.0 μM 농도로 축적되었으나, SNP는 1 mM에서도 nitrite가 검출되지 않았다.

SNAP은 HBSS 중의 GO가 과산화수소를 시간 경과에 따라 생성하는데 영향이 없었다.

결 론 :

결론적으로 폐미세혈관 내피세포에서 GO에 의하여 생성되는 과산화수소로 산화제 손상을 야기하였으며, NO 공여물인 SNAP으로부터 제공된 외인성 NO가 산화제 손상을 방지하고 이 보호효과는 NO 방출 능력에 의할 가능성이 시사되었다. 따라서 생체내 환경에 따라 외인성 NO가 내피세포에 대한 산화제 손상에 보호 효과가 있을 수 있다고 추정된다.

참 고 문 헌

1. Repine JE, Parsons PE : Oxidant-antioxidant balance in endotoxin-induced oxidative injury and tolerance to oxidative injury. In Brigham KL (Ed) : Endotoxin and the lungs. P207, New York, Marcel Dekker, Inc., 1994
2. Moncada S, Higgs EA : The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 329 : 2002, 1993
3. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Salma K, Pison U, Zapol WM : Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. N Engl J Med 328 : 399, 1993
4. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 1620, 1990
5. Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG : Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterine-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. Biochem Biophys Res Commun 178 : 823, 1991
6. Nathan CF : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB 6 : 3051, 1992
7. Abdih H, Kelley CJ, Bouchier-Hayes D, William R, Watson G, Redmond HP, Burke P, Bouchier-Hayes DJ : Nitric oxide(endothelium-derived relaxing factor) attenuates revascularization induced lung injury. J Surg Res 57 : 39, 1994
8. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH : Nitric oxide : A physiologic messenger. Ann Intern Med 120 : 227, 1994
9. Darley-Usmar V, Wiseman M, Halliwell B : Nitric oxide and oxygen radicals : a question of balance. FEBS Lett 369 : 131, 1995
10. Kavanagh BP, Mouchawar A, Goldsmith J, Pearl RG : Effects of inhaled NO and inhibition of endogenous NO synthesis in oxidant-induced acute lung injury. J Appl Physiol 76 : 1324, 1994
11. Chang J, Rao NV, Markewitz BA, Hoidal JR, Michael JR : Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial injury. Am J Physiol 270(Lung Cell Mol Phsiol 14) : L931, 1996
12. Mathalon S, Beckman JS, Duffey M, Freeman BA : Oxidant inhibition of epithelial active sodium transport. Free Radical Biol Med 6 : 557, 1989
13. Petros A, Bennett D, Vallance P : Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. Lancet 338 : 1557, 1991
14. Kubes PM, Suzuki M, Granger DN : nitric oxide : an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 88 : 4651, 1991
15. Vallance P, Moncada S: Role of endogeneous nitric oxide in septic shock. New Horizon 1 : 77, 1993
16. Laszlo F, Whittle BJR, Moncada S : Time-dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide synthase inhibitors. Br J Pharmacol 111 : 109, 1994
17. Mizutami T, Layon AJ : Clinical application of nitric oxide. Chest 110 : 506, 1996
18. Feelish M : The biological pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators : Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. J Cardiovasc Pharm 17(Suppl 3) : S29,

1991

9. Beckman JS, Koppenol WH : Nitric oxide, superoxide, and peroxinitrite : the good, the bad, and the ugly. Am J Physiol 271(Cell Physiol 40 : C1424, 1996
20. Granger DN, Kubes P : Nitric oxide as antiinflammatory agent. Methods Enzymol 269 : 434, 1996
21. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J : Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science Wash DC 258 : 1898, 1992
22. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS : A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature Lond 364 : 626, 1993
23. Rubo H, Radi R, Trujillo M, Rtelleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA : Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 269 : 26066, 1994
24. Aoki N, Johnson G, Lefer AM : Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. Am J Physiol 258(Gastrointest Liver Physiol 21) : G275, 1990
25. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB : Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. J Clin Invest 90 : 1116, 1992
26. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P : Nitric oxide prevents white blood cell adherence : role of superoxide. Am J Physiol 265(Heart Circ Physiol 34) : H862, 1993
27. Kubes P : Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations : a regulatory role for cGMP. Am J Physiol 265(Heart Circ Physiol 34) : H1909, 1993
28. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN : Modulation of ischemia/reperfusion induced microvascular dysfuction by nitric oxide. Cir Res 74 : 376, 1994
29. Poss WB, Timmons OD, Farrukh IS, Hoidal JR, Michael JR : Inhaled nitric oxide prevents the increase in pulmonary vascular permeability caused by hydrogen peroxide. J Appl Physiol 79 : 886, 1995
30. Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG : Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochem Pharmacol 42(Suppl) : S157, 1991