Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 49, No. 6, Dec, 2000
□원 저□

In Vitro 내독소 유도성 급성 폐손상에서 Pentoxifylline과 Neutrophil Elastase Inhibitor의 항염효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

김영균, 김승준, 박용근, 김석찬, 김관형
문화식, 송정섭, 박성학, 김상호*

= Abstract =

Anti-inflammatory Effects of Pentoxifylline and Neutrophil Elastase Inhibitor on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury *In Vitro*

Young Kyoon Kim, M.D., Seung Joon Kim, M.D., Yong Keun Park, M.D., Seok Chan Kim, M.D., Kwan Hyoung Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D., Sang Ho Kim, M.D.*

Department of Internal Medicine and Department of Pathology, The Catholic University of Korea, School of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Acute lung injury (ALI) is a commonly encountered respiratory disease and its prognosis is poor when the treatment is not provided promptly and properly. However no specific pharmacologic treatment is currently available for ALI, although recently several supportive drugs have been under scrutiny. We studied anti-inflammatory effects of pentoxifylline (PF), a methylated xanthine, and ONO-5046, a synthetic neutrophil elastase inhibitor on lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI *in vitro*.

Methods : To establish an *in vitro* model of LPS-induced ALI, primary rat alveolar macrophages and peripheral neutrophils in various ratios (1:0, 5:1, 1:1, 1:5, 0:1) were co-cultured with transformed rat alveolar epithelial cells (L2 cell line) or vascular endothelial cells (IP2-E4 cell line) under LPS stimulation. Each experiment was divided into five groups-control, LPS, LPS+PF, LPS+ONO, and LPS+PF+ONO. We compared

Address for correspondence :
Sung Hak Park, M.D.
Department of Internal Medicine, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea
505 Banpo-dong, Seocho-ku, Seoul, 137-701, Korea
Phone : 02-590-1114 Fax : 02-599-3589 E-mail : cmcpsh@cmc.cuk.ac.kr

LPS-induced superoxide anion productions from primary rat alveolar macrophages and peripheral neutrophils in various ratios, and the resultant cytotoxicity on L2 cells or IP2-E4 cells between groups. In addition we also compared the productions of tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, monocyte chemotactic protein(MCP)-1, IL-6, and IL-10 as well as mRNA expressions of TNF-α, inducible nitric oxide synthetase (iNOS), and MCP-1 from LPS-stimulated primary rat alveolar macrophages between groups.

Results : (1) PF and ONO-5046 in each or both showed a trend to suppress LPS-induced superoxide anion productions from primary rat alveolar macrophages and peripheral neutrophils regardless of their ratio, except for the LPS+PF+ONO group with the 1:5 ratio, although statistical significance was limited to a few selected experimental conditions. (2) PF and ONO-5046 in each or both showed a trend to prevent IP2-E4 cells from LPS-induced cytotoxicity by primary rat alveolar macrophages and peripheral neutrophils regardless their ratio, although statistical significance was limited to a few selected experimental conditions. The effects of PF and/or ONO-5046 on LPS-induced L2 cell cytotoxicity varied according to experimental conditions. (3) PF showed a trend to inhibit LPS-induced productions of TNF-α, MCP-1, and IL-10 from primary rat alveolar macrophages. ONO-5046 alone didnot affect the LPS-induced productions of proinflammatory cytokines from primary rat alveolar macrophages but the combination of PF and ONO-5046 showed a trend to suppress LPS-induced productions of TNF-α and IL-10 PF and ONO-5046 in each or both showed a trend to increase LPS-induced IL-β and IL-6 productions from primary rat alveolar macrophages. (4) PF and ONO-5046 in each or both showed a trend to attenuate LPS-induced mRNA expressions of TNF-α and MCP-1 from primary rat alveolar macrophages but at the same time showed a trend increase iNOS mRNA expression.

Conclusion : These results suggest that PF and ONO-5046 may play a role in attenuating inflammation in LPS-induced ALI and that further study is needed to use these drugs as a new supportive therapeutic strategy for ALI. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 691-702)

Key words : Pentoxifylline, Neutrophil elastase inhibitor(ONO-5046), Acute lung injury, TNF-α, MCP-1, iNOS, IL-6, IL-1β, IL-10.

서 론

급성 폐손상(acute lung injury : ALI)은 임상에서 매우 흔히 접하는 호흡기질환으로서 감염증, 독성가스의 흡입, 흡인, 외상, 심혈관질환 및 약제 등의 다양한 원인에 의해 발생하며, 조기에 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 급성 호흡부전 증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)으로 이행하여 예후가 극히 불량한 것으로 알려져 있다[1]. 현재까지 많은 연구자들이 ALI의 병태생리 규명을 위해 꾸준한 노력을 해오고 있음에도 불구하고 이로 인한 사망률은 좀처럼 감소하지 않고 있다.

ALI의 병태생리와 관련하여 현재까지 알려진 내용은 호중구 및 폐포대식세포 가 가장 중요한 염증세포로 작용하며[2-5], 주로 손상되는 폐조직세포는 폐포상피세포와 폐혈관내피세포이고, 염증세포들로부터 분비되는 독성산화물, cytokines, 지질성 매개물질, 단백분해효소 및 유착분자 등의 각종 염증성 매개물질들이 직접 혹은 간접적으로 폐조직세포 손상에 영향을 미친다는 것이다[7-11].

이상과 같이 현재까지 알려진 ALI의 병태생리를 근간으로 하여 많은 연구자들이 ALI에 대한 새로운

치료약제 개발을 위해 다방면으로 연구를 진행하고 있으나 아직 어떤 약제도 ALI에 의한 사망률을 감소시키는데 효과적이지 못한 실정이다. 이에 본 연구자들은 내독소-유도성 ALI의 생체외(*in vitro*) 모델을 이용하여, 최근 ALI의 보조 치료약제로서의 가능성이 대두되고 있는 pentoxifylline[12-22] 및 specific neutrophil elastase inhibitor인 ONO-5046[23-26]이 내독소 유도성 ALI의 염증반응에 어떤 효과를 나타내는지 관찰해 보았다.

대상 및 방법

1. 백서 폐포대식세포 및 말초혈액 호중구 분리

무균 백서(Sprague-Dawley rat)에 적당량(0.5-1 ml)의 50 mg/ml ketamine hydrochloride를 복강내로 주사하여 마취시킨 후, 기관을 노출시켜 절개하고 소아용 cut-down tube를 기관 내로 삽입하여, 차가운 생리식염수로 1회에 5 ml씩 6회 기관지폐포세척술을 시행하였다. 회수된 기관지폐포세척액은 점액을 제거하기 위해 거즈에 거른 후, 차가운 50 ml conical polystyrene tube에 담아 4℃에서 1000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 남은 cell pellet에 적당량(1-2 ml)의 배양액(minimal essential medium : MEM)을 첨가하여 세포혼탁액을 만든 다음, trypan blue exclusion 방법으로 총 세포수 및 세포생존도를 확인하고 다시 적당량의 MEM을 첨가하여 세포밀도를 1×10^6 cells/ml로 조정하여 사용하였다. 준비된 폐포대식세포 현탁액 약 50 $\mu\ell$를 cytocentrifuge slide에 분주하여 800 rpm으로 5 분간 cytospin 후 Diff-Quik(International Reagent Corp., Japan) 시약으로 염색하여 관찰한 결과, 폐포대식세포가 95% 이상이었던 관계로 본 실험 시에는 plate adhesion 과정을 거치지 않고 바로 사용하였다.

기관지폐포세척술이 끝난 즉시 헤파린 처리한 주사기로 복부대동맥으로부터 말초혈액을 채취한 후, dextran(Sigma. USA)에 의한 적혈구 침강법(sedimentation) 및 Ficoll-Hypaque(Sigma, USA)에 의한 밀도차 분리법(density gradient separation)을 이용하여 백서의 말초혈액 호중구를 분리하였으며 남은 적혈구는 lysis buffer(Sigma, USA)를 이용하여 제거하였다.

2. 백서 염증세포들로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능 측정

과산화 음이온 생성능의 측정은 SOD inhibitable ferricytochrome-C 환원방법으로 측정하였는데, 요약하면 96 well flat-bottomed microplate에 위에서 얻은 백서의 폐포대식세포와 말초혈액 호중구를 well 당 총 세포 수는 1×10^5개, 세포 비는 1:0, 5:1, 1:1, 1:5, 0:1로 각각 분주한 다음, 각 세포 비에 따라 실험군을 다시 LPS로 자극하지 않은 대조군, LPS(10 ng/ml)만 투여한 LPS군, LPS와 1 mM의 pentoxifylline(Trental, Sigma, USA, 이하 PF로 약기함)을 함께 투여한 LPS+PF군, LPS와 1×10^{-4} mM의 neutrophil elastase inhibitor(ONO-5046, Elaspol, Ono Pharmaceutical Co, Osaka, Japan, 이하 ONO로 약기함)를 투여한 LPS+ONO군, LPS와 1 mM의 PF 및 1×10^{-4} mM의 ONO를 동시에 투여한 LPS+PF+ONO군으로 각각 구분하여, cytochrome-C(50 $\mu\ell$/ml)를 첨가한 후 37℃, 5% CO_2/air incubator에서 40분간 배양하여 double beam spectrophotometer(Hewlett Packard, USA)로 550 nm에서 분광도(optical density : OD)값을 측정하였다.

3. 백서 염증세포들의 폐조직세포에 대한 내독소 유도성 세포독성능 측정

백서의 폐포상피세포주(L2 cell line) 및 혈관내피세포주(IP2-E4 cell line)를 각각 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입하여,

37℃, 5% CO_2/air incubator에서 항생제(100 U/ml penicillin 및 50 mg/ml streptomycin) 및 10% fetal bovine serum이 첨가된 MEM으로 배양하였다. 백서 염증세포들의 폐조직세포에 대한 내독소 유도성 세포독성능은 ^{51}Cr-release assay를 이용하여 측정하였는데, 요약하면 96 well flat-bottomed microplate에 1-2×10^4/well로 각 표적세포(L2 cells 및 IP2-E4 cells)들을 분주하여 37℃, 5% CO_2/air incubator에서 하루동안(overnight) 배양한 후, 다시 하루동안 well당 2μCi의 $_{51}$Cr(NEN™, Boston, USA)을 표지(labelling)시킨 다음 표적세포로 사용하였다. 그 다음 test well에는 실험 2에서와 같이 well당 총 세포수를 1×10^5개로 하고 백서 폐포상피세포와 말초혈액 호중구 수의 비를 1:0, 5:1, 1:1, 1:5, 0:1로 하여 분주하고, control well에는 작동세포대신 MEM을, maximum release well에는 작동세포대신 1% Triton-X 100(Sigma, USA)을 각각 분주하였으며, 최종용적은 well당 200 $\mu\ell$ 가 되도록 조절하였다. 다음에는 각 test well을 실험 2에서와 같이 대조군, LPS군, LPS+PF군, LPS+ONO군, LPS+PF+ONO군으로 분류하여 각각 처치하고 37℃, 5% CO_2/air incubator에서 4시간 배양한 후, 각 표적세포들의 용해정도(% lysis)를 측정하기 위하여, 2000rpm으로 10분간 원심 분리하여 그 상층액 100$\mu\ell$ 씩을 시험관에 옮겨 담아서 gamma counter(Hewlett Packard, USA)로 gamma emission을 측정하였다. 이때 각 표적세포들의 용해정도는 [(cpm Test-cpm Control)]/[(cpm Maximum-cpm Control)]×100 으로 계산하였다.

4. 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 cytokine 생성능 측정

실험 1에서 분리된 백서의 폐포대식세포를 6-well plate에 well당 2 ml의 MEM과 함께 2×10^6 cells로 분주한 다음, 실험 2 및 3에서와 동일한 실험군(대조군, LPS군, LPS+PF군, LPS+ONO군, LPS+PF+ONO군)으로 구분하여 4시간 배양한 후, rat 혹은 mouse ELISA kits (Biosource International, USA)로 배양상층액 내의 TNF-α, MCP-1, IL-1β, IL-6 및 IL-10 농도를 측정하였다.

5. 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 염증매개물질 mRNA 발현 측정

백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 염증매개물질(TNF-α, iNOS 및 MCP-1) mRNA 발현은 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 관찰하였는데, 방법을 요약하면 다음과 같다.

우선 RNA 분리를 위해 실험 4에서 얻은 cell pellet을 Trizol reagent (Gibco-BRL, USA) 1 ml에 녹인 후, 이 균질액에 0.2 ml의 chloroform을 가하여 RNA를 추출하였다. 이를 12,000 g에서 15분간 원침한 후, aqueous phase를 수집하여 이를 isopropanol 0.5ml에 다시 녹이고, 다시 12,000 g에서 10분간 원침한 후, RNA pellet을 1 ml의 75% ethanol으로 닦고, 다시 12,000 g에서 5분간 원침한 후, RNA pellet을 수분간 공기 건조시킨 후 0.1% DEPC와 RNAsin 처리 증류수에 녹였다.

Superscript II를 이용한 RT-PCR은 다음의 순서로 하였다. first strand cDNA는 샘플인 total RNA 1-5 μg에 oligo dT(Promega, WI, USA) stock 500 μg/ml) 1 $\mu\ell$ 와 증류수를 혼합하여 최종 12 $\mu\ell$ 가 되게 하여 70℃에서 10분간 가온한 후 즉시 얼음속에 보관하였다. 그 후 tabletop centrifuge를 이용하여 원침한 후, 5배 농축 first strand buffer 4 $\mu\ell$ 와 0.1 M DTT 2 $\mu\ell$ 및 10 mM dNTP (Promega, WI, USA) 혼합액 1 $\mu\ell$ 를 섞어서 총 20 $\mu\ell$ 의 volume으로 만든 후에 42℃ 에서 2분간 가온하고 reverse transcriptase인 superscript II (Gibco-BRL, USA)를 1 $\mu\ell$ 를 넣은 후 42℃ 에서 50분간, 70℃에서 15분간 추가로 가온 후 이 cDNA sample을 PCR의 template로 사용하였다.

PCR은 다음의 조건으로 하였다. 1 $\mu\ell$ cDNA sample과 1 $\mu\ell$ 의 forward primer 및 1 $\mu\ell$ 의 reverse primer를 섞은 후, 여기에 PCR master mix (10×PCR buffer 와 $MgCl_2$, sterile DW, dNTP mix, ^{32}p 및 Taq polymerase, Promega, WI, USA)를 가하여 총 20 $\mu\ell$ 의 용액으로 만들고, 이를 PCR machine(PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, USA)에 넣고 25-30 cycle로 증폭시켰다. TNF-α에 대한 PCR primer (734 bp)는 SCL Gene Research Center(서울)로부터 주문 생산하여 사용하였으며, PCR 조건은 1 min/96℃, 30 sec at 55℃, 1 min at 72℃로 하고 25 cycle을 시행하였다. iNOS(563 bp) 및 MCP-1 (266 bp)에 대한 PCR primer pair는 미국 Biosource International 회사 제품을 사용하였으며, 이들은 모두 manual에 따라 94℃에서 1분 30초간 denaturing시키고, 94℃에서 30초간 25-35 cycle 증폭시킨 후, 60℃에서 45초간, 72℃에서 45초간 및 72℃에서 7분간 extension 시켰다.

6. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였으며, 각 실험군간의 통계분석은 nonparametric ANOVA를 이용하였고, 통계적 유의수준은 P 값이 0.05 이하일 때로 하였다.

결 과

1. PF 및 ONO-5046이 백서 폐포대식세포 및 말초혈액 호중구로부터의 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능에 미치는 영향

폐포대식세포 및 말초혈액 호중구의 혼합비에 따라 다소 차이는 있었지만, 두 약제 모두 단독 혹은 동시 투여에 상관없이 염증세포들로부터의 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능을 억제하는 경향을 나타냈으며,

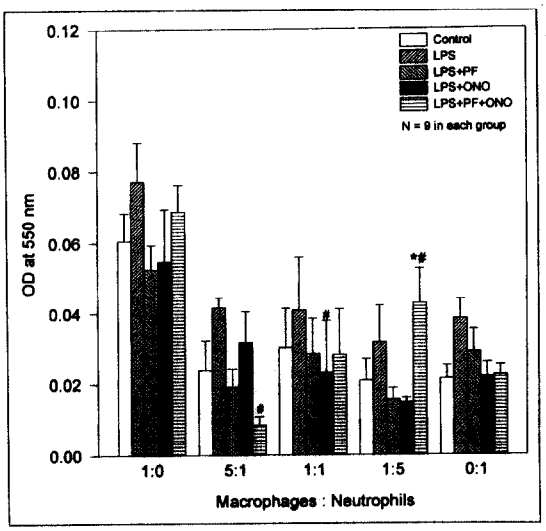

Fig. 1. Effects of pentoxifylline (PF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO) on LPS-induced superoxide anion productions from rat alveolar macrophages and/or peripheral neutrophils
*$P<0.05$ compared to the control group, #$P<0.05$ compared to the LPS group.

각각의 LPS군에 비해 통계적으로 유의한 억제효과는 세포혼합비가 5 : 1일 때 LPS+PF+ONO군 및 세포혼합비가 1 : 1일 때 LPS+ONO군에서만 관찰되었다(0.01±0.00 vs. 0.04±0.01, 0.02±0.03 vs. 0.04±0.03 OD at 550 nm, $P<0.05$, Fig. 1). 하지만 세포혼합비가 1 : 5일 때 LPS+PF+ONO군에서는 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능이 LPS군에 비해 오히려 증가하는 양상을 보였다(0.04±0.02 vs. 0.03±0.02 OD at 550 nm, $P<0.05$, Fig. 1).

2. PF 및 ONO-5046이 백서 염증세포들의 폐조직세포들에 대한 내독소 유도성 세포독성능에 미치는 영향

폐포대식세포 및 호중구의 혼합비에 따라 다소 차이는 있었지만, 두 약제 모두 염증세포들이 폐조직세포들에 대한 세포독성능을 억제하는 경향을 나타냈으며, 이러

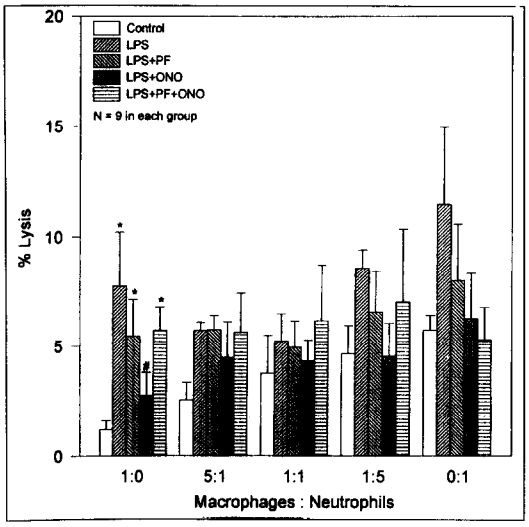

Fig. 2. Effects of pentoxifylline (PF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO) on LPS-induced L2 cell injury by rat alveolar macrophages and/or peripheral neutrophils
*$P<0.05$ compared to the control group,
#$P<0.05$ compared to the LPS group.

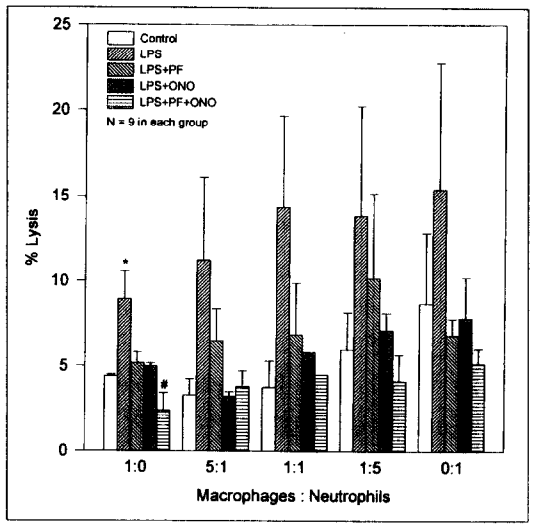

Fig. 3. Effects of pentoxifylline (PF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO) on LPS-induced IP2-E4 cell injury by rat alveolar macrophages and peripheral neutrophils
*$P<0.05$ compared to the control group,
#$P<0.05$ compared to the LPS group.

한 현상은 백서의 폐포상피세포(L2 cells)보다는 혈관내피세포(IP2-E4 cells)에 대한 세포독성능에서 더욱 두드러지게 관찰되었다. 하지만 각각의 LPS군에 비해 통계적으로 유의한 억제 효과는 L2 cell의 경우 세포혼합비가 1 : 0일 때 LPS+ONO군에서, IP2-E4 cell의 경우 LPS+PF+ONO군에서만 관찰되었다(2.75±2.11 vs. 7.74±0.80, 2.39±1.77 vs. 8.91±2.85 %, $P<0.05$, Fig. 2, Fig. 3).

3. PF 및 ONO-5046이 백서 폐포대식세포의 내독소 유도성 cytokine 생성능에 미치는 영향

백서 폐포대식세포의 내독소 유도성 cytokine 생성능에 대한 PF 및 ONO-5046의 투여 효과를 관찰한 결과, LPS군에 비해 LPS+PF군 및 LPS+PF+ONO군에서 TNF-α 생성능이 현저하게 억제됨과 동시에(340.00±227.29, 530.08±549.56 vs. 826.45±370.40 pg/ml, $P<0.05$) MCP-1 및 IL-10 생성

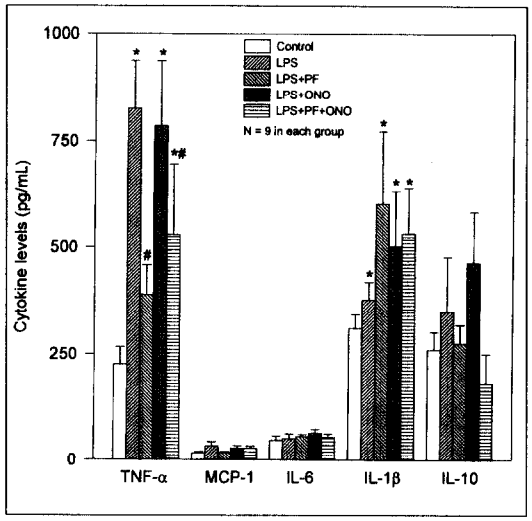

Fig. 4. Effects of pentoxifylline (PF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO) on LPS-induced cytokine productions from rat alveolar macrophages.
*$P<0.05$ compared to the control group,
#$P<0.05$ compared to the LPS group.

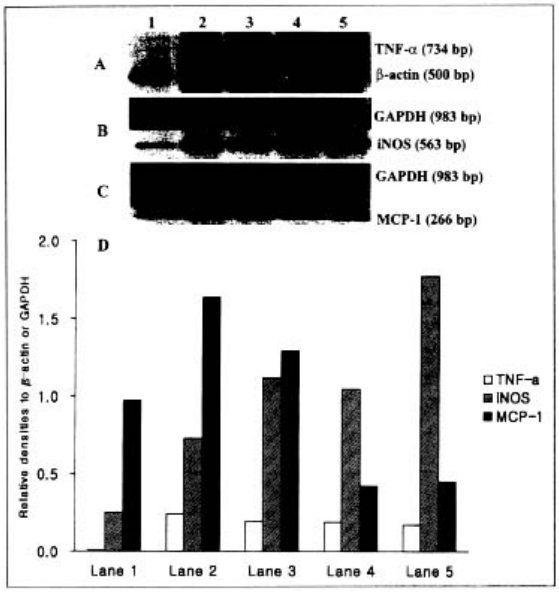

Fig. 5. Effects of pentoxifylline (PF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO) on LPS -induced TNF-α, iNOS, and MCP- 1 mRNA expressions from rat alveolar macrophages analyzed by RT-PCR. (Lane 1 : Control, Lane 2 : LPS, Lane 3 : LPS+PF, Lane 4 : LPS+ONO, Lane 5 : LPS+PF+ONO)

능도 다소 억제되는 경향을 나타낸 반면, IL-1β 및 IL-6 생성능은 억제되지 않았다. 하지만 LPS+ONO군에서는 MCP-1 생성능만 다소 억제되는 경향을 보였을 뿐 다른 cytokine 생성능은 억제되지 않았으며, 대신 항염 cytokine으로 알려진 IL-10 생성능이 다소 증가되는 양상을 보였다(Fig. 4).

4. PF 및 ONO-5046이 백서 폐포대식세포의 내독소 유도성 염증매개물질 mRNA 발현에 미치는 영향

백서 폐포대식세포의 내독소 유도성 염증성 매개물질 mRNA 발현에 대한 PF 및 ONO-5046의 투여 효과를 관찰한 결과, 각 약제의 단독 혹은 병용 투여 시 모두 TNF-α 및 MCP-1 mRNA 발현이 억제되는 소견을 나타냈으며, 그 억제효과는 병용 투여 시에 더욱 현저하였다(Fig. 5-A, Fig. 5-C). 하지만 두 약제 모두 단독 혹은 병용 투여에 상관없이 iNOS mRNA 발현은 억제하지 못했다(Fig. 5-B).

고 찰

ARDS는 일련의 염증반응에 의해 폐포모세혈관이 손상되고 그로 인한 비심인성 폐부종이 나타나 궁극적으로는 극심한 저산소증을 초래함으로써, 조기에 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 높은 사망률을 나타내는 호흡기 질환이다. ALI는 이러한 ARDS의 전 단계에 해당하기 때문에 ALI에서 ARDS로의 이행을 어떻게, 얼마나 효과적으로 차단하느냐가 ARDS 치료의 관건이라고 할 수 있다. 하지만 불행하게도 아직 ALI에서 나타나는 염증반응을 효과적으로 차단할 수 있는 치료약제가 개발되어 있지 않아, 현재까지의 ALI 치료는 주로 폐부종에 의한 가스교환 장애를 호전시키고자 하는 기계호흡치료 등의 보조적인 치료에만 국한되고 있는 실정이다.

현재까지 보고된 ALI의 병태생리에 관한 연구들을 살펴보면, 종래에는 호중구가 ALI의 병태생리에 가장 중요한 역할을 하는 염증세포로 생각되었으나[2], 근래에 호중구가 결핍된 환자에서도 ALI가 심하게 발생할 수 있음이 밝혀진 이후로는[10], 호중구 외에도 폐포대식세포 및 그로부터 분비되는 TNF-α나 IL-1β와 같은 염증전구 싸이토카인들(proinflammatory cytokines) 또한 ALI의 병태생리에 매우 중요한 역할을 한다는 것이 알려졌다[3,4]. 이러한 cytokine들은 호중구를 활성화하여 다양한 단백분해효소들(proteolytic enzymes)과 superoxide anion 및 hydrogen peroxide와 같은 세포독성 염증매개물질들의 생성을 유도함으로써 간접적으로 혈관내피세포의 손상에 기여할 뿐만 아니라, TNF-α의 경우에는 직접적으로 혈관내피세포에 손상을 줌으로써 혈관투과성을 증가시키기도 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근 ALI의 주요 매개인자인 호중구 및 proinflammatory cytokines를 억제하는데 초점을 맞추어 ALI에 대한

새로운 치료약제를 개발하고자 하는 노력이 계속 진행되고 있다.

이와 관련하여 최근에 methylated xanthine인 pentoxifylline (PF)이 ALI의 염증반응을 어느 정도 호전시킬 수 있는 것으로 알려져 이에 대한 관심이 높아지고 있다[5,13]. PF이 어떤 기전으로 ALI를 호전시키는 지에 대해서는 아직 명확히 정립된 바가 없지만, McDonald[14] 및 Hoffmann 등[18]은 PF이 호중구 매개성 염증반응을 억제한다고 보고하였으며, Seear 등[19]은 토끼의 ALI 모델에서 PF이 폐포 재흡수를 촉진함으로써 폐부종을 감소시킨다고 보고한 바 있다. 또한 Mandell 등[16]은 PF이 염증세포들로부터 TNF-α, IL-1, IL-6와 같은 proinflammatory cytokines 분비를 억제함으로써 ALI를 호전시키는 것이 아닌가 제시한 바 있다.

한편 ONO-5046은 저분자량의 neutrophil elastase inhibitor로서 인간에서뿐만 아니라 토끼, 쥐, 햄스터, 마우스 등의 neutrophil elastase를 억제하여 ALI를 호전시키는 것으로 알려져 있다[23-26]. Miyazaki 등은[24] 토끼에 TNF-α을 주입하여 ALI 모델을 만든 후, ONO-5046를 투여하여 활성화된 중성구에 의한 폐포상피세포 및 혈관내피세포의 손상을 줄임으로써 모세혈관 투과성을 감소시켰다고 보고하였고, Sakamaki 등은[26] *in vitro* 실험에서 LPS로 자극된 guinea pig의 기관지폐포세척액 내의 호중구수 및 neutrophil elastase의 농도를 ONO-5046이 농도 의존성으로감소시켰다고 하였다.

본 연구에서는 다양한 ALI 모델 중에서 임상에서 비교적 흔히 접하는 내독소 유도성 급성 폐손상의 생체외 (*in vitro*) 실험모델을 이용하여 PF 및 ONO-5046이 ALI의 염증반응에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였는데, 비록 *in vitro* 실험이기는 하지만 가능한 생체 (*in vivo*) 실험과 유사한 실험환경을 조성하기 위해 백서의 폐포대식세포 및 말초혈액 호중구를 다양한 비율(1 : 0, 5 : 1, 1 : 1, 1 : 5, 0 : 1)로 혼합하여 실험에 사용하였다는 점이 종래의 *in vitro* 모델과는 특이하다고 할 수 있다. 또한 종래의 연구와는 달리 어떤 한 가지 측면에서가 아니라 LPS로 활성화된 염증세포들에 의한 독성 산화물(과산화 음이온) 생성능, 폐조직세포(폐포상피세포 및 혈관내피세포)에 대한 세포독성능, proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, MCP-1, IL-6, IL-10) 분비능 및 염증매개물질들(TNF-α, iNOS, MCP-1)의 mRNA 발현 등 ALI의 병태생리에 관여하는 가능한 모든 염증반응을 동시에 관찰하였다는 것도 본 연구의 특이점이라고 할 수 있다. 뿐만 아니라 PF 혹은 ONO-5046을 단독으로 투여한 경우와 두 가지 약제 모두를 병용 투여한 경우를 함께 비교한 것도 본 연구에서 처음으로 시도된 바가 아닌가 생각된다.

본 연구의 결과 PF 단독 투여는 세포혼합비에 따라 다소 차이는 있었지만 백서의 염증세포들(폐포대식세포 및 말초혈액 호중구)로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성을 억제함으로써 폐조직세포(특히 혈관내피세포)에 대한 세포독성능을 감소시켰을 뿐 아니라, 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 TNF-α 분비도 현저하게 억제시키는 것으로 확인되었다. 또한 그리 뚜렷하지는 않았지만 PF 단독 투여는 TNF-α 및 MCP-1 mRNA 발현과 MCP-1 및 IL-10 분비를 다소 감소시키는 경향을 보인 반면, 백서의 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 IL-6 및 IL-1β 분비와 iNOS mRNA의 발현 등은 오히려 다소 증가시키는 경향을 보였다. 이상의 결과로 보아 PF는 내독소 유도성 ALI에서 분명히 항염효과를 나타내며, 그 주된 항염기전은 염증세포들로부터 내독소 유도성 독성산화물 생성 억제 및 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 TNF-α 분비 억제가 아닌가 추측되는 바이다.

ONO-5046 단독 투여 역시 세포혼합비에 따라 다소 차이는 있었지만 백서의 염증세포들(폐포대식세포 및 말초혈액 호중구)로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성을 억제함으로써 폐조직세포(폐포상피세포 및 혈관내피세포)에 대한 세포독성능을 감소시키는 것으로 확인되었다. 그리고 PF 단독 투여 때와는 달리 ONO-50476 단독 투여는 백서 폐포대식세포의 내독소 유도성 TNF-α 및 MCP-1 분비능에는 별 영

향을 미치지 않았으며, IL-1β IL-6 및 IL-10 분비능은 오히려 다소 증가키는 경향을 보였다. 또한 ONO-5046 단독 투여는 PF 단독 투여에 비해 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 MCP-1 mRNA 발현을 보다 현저하게 억제시킨 반면, TNF-α mRNA 발현에 대해서는 PF 단독 투여 때와 마찬가지로 다소 억제하는 경향만을 나타내었다. 하지만 PF 단독 투여 때와 마찬가지로 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 iNOS mRNA의 발현은 ONO-5046 단독 투여에 의해 오히려 증가하는 경향을 나타냈다. 이상의 결과로 보아 ONO-5046 역시 내독소 유도성 ALI에서 어느 정도 항염효과를 나타내며, 그 주된 항염기전은 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 염증전구 cytokines 분비 억제보다는, 염증세포들로부터 내독소 유도성 독성산화물 생성 억제가 아닌가 추측되는 바이다.

아울러 저자들은 내독소 유도성 급성 폐손상 모델에서 PF과 ONO-5046의 병용투여 효과도 함께 관찰해 보았는데, 두 가지 약제 병용투여 역시 염증세포들의 세포혼합비에 따라 다소 차이는 있었지만 염증세포들로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성 및 폐포대식세포로부터 일부 염증성 매개물질들(TNF-α, MCP-1)의 mRNA 발현 및 분비를 억제함으로써 폐조직세포(특히 혈관내피세포) 손상을 방지할 수 있음을 알 수 있었다. 특히 두 약제는 이들 염증성 매개물질들의 mRNA 발현을 억제하는데는 서로 상승 효과를 나타냈지만, 실제 분비를 억제하는 데에는 뚜렷한 상승효과를 보이지 않았을 뿐 아니라, 어떤 세포혼합비에서는 두 약제의 병용투여가 오히려 과산화음이온 생성능을 증가시키는 경향을 나타내었으며, PF 혹은 ONO-5046 단독 투여 때와 마찬가지로 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 iNOS mRNA의 발현을 오히려 증가시키는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 PF 및 ONO-5046의 병용투여 시에는 약제간 상호작용에 의해 염증세포들에 미치는 영향이 각 약제의 단독 투여 시와는 다르게 나타날 수도 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

한편 본 연구에서 폐포대식세포와 호중구를 여러 비율로 혼합하여 실험을 진행한 본래의 취지는, 실제로 *in vivo*에서는 ALI의 시간 경과에 따라 폐조직 내 염증세포의 비율이 달라지게 되므로, 가능한 이와 유사한 *in vitro* 실험환경을 조성해 줌으로써, 실제 *in vivo*에서 상기 약제들의 투여시기에 따른 효과의 차이를 *in vitro* 실험모델을 통하여 간접적으로 관찰하고자 함이었다. 그 결과 이미 위에서 기술한 바와 같이 폐포대식세포 대 호중구의 비가 1 : 5일 때 PF와 ONO를 병합 투여하여 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능이 오히려 증가한 경우를 제외하고는 대체적으로 세포 혼합비에 큰 상관없이 상기 약제들 단독 혹은 병합 투여에 의하여 내독소 유도성 독성 산화물 생성능 혹은 폐조직세포 손상이 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 상기 약제들을 실제 *in vivo* 모델에 사용할 경우 그 투여 시기는 약제의 효과에 그다지 큰 변수로 작용하지 않을 가능성을 시사한다고도 볼 수 있으나, 한편으로는 폐포대식세포 대 호중구의 비가 1 : 0일 때 주로 폐조직세포 손상이 통계적으로 유의하게 감소하였던 점을 감안하면 가능한 ALI 초기에 이들 약제를 투여하는 것이 바람직할 것으로 추측된다.

이상의 *in vitro* 연구결과로 보아 PF 및 ONO-5046은 단독 혹은 병용투여 모두 다양한 경로의 항염효과를 통해 내독소 유도성 ALI를 호전시킬 수 있을 것으로 추측되나, 폐포대식세포로부터의 내독소 유도성 IL-1β 분비 및 iNOS mRNA 발현 증가, 병용투여 시 염증세포들로부터 독성산화물 생성 증가 등의 문제점이 관찰되기 때문에 향후 *in vivo* 모델을 이용한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

내독소 유도성 급성 폐손상(acute lung injury : ALI)은 비교적 임상에서 흔히 접하는 호흡기질환으로서, 조기에 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 예

후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 하지만 최근 몇 가지 보조치료약제가 임상에서 사용되고 있기는 하지만, 아직 ALI를 효과적으로 치료할 수 있는 약제는 개발되어 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구자들은 최근 ALI의 새로운 보조치료약제로서의 가능성이 대두되고 있는 pentoxifylline (PF) 및 ONO-5046 (specific neutrophil elastase inhibitor)이 백서의 내독소 유도성 ALI와 관련된 염증반응에 대해 어떤 효과를 나타내는지 알아보고자 하였다.

방 법:

내독소 유도성 ALI의 생체외(*in vitro*) 모델을 확립하기 위해 백서의 폐포대식세포 및 말초혈액 호중구를 다양한 비율(1:0, 5:1, 1:1, 1:5, 0:1)로 혼합하여 내독소 자극 하에서 백서의 폐포상피세포주(L2 cells) 혹은 혈관내피세포주(IP2-E4 cells)와 함께 혼합 배양하였다. 모든 실험은 5군(대조군, LPS군, LPS+PF군, LPS+ONO군, LPS+PF+ONO군)으로 나누어 비교하였는데, 우선 다양한 비율로 혼합된 백서 폐포대식세포 및 말초혈액 호중구의 배양상층액으로부터 내독소 유도성 과산화음이온 생성능을 측정하고, 이들 염증세포들이 각 폐조직세포에 미치는 세포독성능을 측정하였다. 아울러 백서의 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-1β, IL-10 분비 및 TNF-α, iNOS, MCP-1 mRNA 발현을 관찰하였다.

결 과:

(1) 세포혼합비가 1 : 5일 때 LPS+PF+ONO군을 제외하고는 세포혼합비에 상관없이 LPS+PF군, LPS+ONO군 및 LPS+PF+ONO군 모두에서 각 세포혼합비의 LPS군에 비해 백서 폐포대식세포와 말초혈액 호중구로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성능이 억제되는 경향을 보였다. (2) 백서 혈관내피세포(IP2-E4 cells)에 대한 염증세포들의 내독소 유도성 세포독성능은 세포혼합비에 상관없이 LPS+PF군, LPS+ONO군 및 LPS+PF+ONO군 모두에서 각 세포혼합비의 LPS군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 하지만 백서 폐포상피세포(L2 cells)에 대한 염증세포들의 내독소 유도성 세포독성능은 세포혼합비 및 각 실험군에 따라 다양한 양상을 보였다. (3) LPS+PF군 및 LPS+PF+ONO군 모두에서 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 TNF-α 분비가 LPS군에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었으며, MCP-1 및 IL-10 분비도 LPS군에 비해 다소 감소하는 경향을 보였다. 반면에 LPS+ONO군은 LPS군과 비교하여 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 cytokines 분비에 별 차이가 없었다. LPS+PF군, LPS+ONO군 및 LPS+PF+ONO군 모두에서 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 IL-1β 및 IL-6 분비는 LPS군에 비해 오히려 증가하는 경향을 보였다. (4) LPS+PF군, LPS+ONO군 및 LPS+PF+ONO군 모두에서 백서 폐포대식세포로부터 내독소 유도성 TNF-α 및 MCP-1 mRNA 발현이 억제되는 경향을 보였으나, iNOS mRNA 발현은 오히려 증가하는 경향을 보였다.

pentoxifylline은 백서의 염증세포들로부터 내독소 유도성 과산화 음이온 생성을 억제하였고 폐포대식세포로부터 TNF-α 및 MCP-1 mRNA 발현과 분비를 효과적으로 억제하여 폐조직세포 손상을 감소시켰으며 ONO-5046은 과산화 음이온 생성억제 및 TNF-α, MCP-1 mRNA 발현억제, MCP-1의 분비를 억제하였을 뿐 아니라 항염증 매개물질인 IL-10 분비를 증가시킴으로써 폐조직세포의 손상을 방지할 수 있음을 확인하였다. pentoxifylline과 ONO-5046의 병용투여시에도 과산화 음이온 생성 및 일부 염증성 물질의 mRNA의 발현 및 분비를 억제함으로써 폐조직세포의 손상을 방지함을 확인할 수 있었다.

결 론:

이상의 결과들로 보아 PF 및 ONO-5046은 내독소 유도성 ALI의 염증반응을 완화시키는 역할을 하는 것으로 추측되며, 향후 이 약제들을 ALI의 새로운 보조 치료제로 사용하기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 생각되는 바이다.

참 고 문 헌

1. Schuster DP. What is acute lung injury? : what is ARDS? Chest 1995;107:1721-6.
2. Weiland JE, Davis WB, Holter JF, Mohammed JR, Dorinsky PM, Gadek JE. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. Am Rev Respir Dis 1986;133:218-25.
3. Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury : the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. J Invest Med 1994;42:640-51.
4. Chollet-Martin S, Jourdain B, Gibert C, Elbim C, Chastre J, Gougerot-Pocidalo MA. Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:594-601.
5. Tran Van Nhieu J, Misset B, Lebargy F, Carlet J, Bernaudin JF. Expression of tumor necrosis factor-alpha gene in alveolar macrophages from patients with the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1993;147:1585-9.
6. Janoff A. Elastase in lung injury. Annu Rev Med 1985;36:207-216.
7. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:602-11.
8. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. Chest 1995;107:1062-73.
9. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:1850-6.
10. Kiehl MG, Ostermann H, Thomas M, Muller C, Cassens U, Kienast J. Inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid and plasma in leukocytopenic patients with septic shock-induced acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med 1998;26:1194-9.
11. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. Am Rev Respir Dis 1992;145:1016-22.
12. Muller R : Pentoxifylline-a biomedical profile. Journal of Medicine 1979;10:307-329.
13. Ward A, Clissold SP: Pentoxifylline a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy. Drugs 1987; 34:50-97.
14. McDonald RJ. Pentoxifylline reduces injury to isolated lungs perfused with human neutrophils. Am Rev Respir Dis 1991;144:1347-50.
15. Mandell GL. ARDS, neutrophils, and pentoxifylline. Am Rev Respir Dis 1988;138:1103-1105.
16. Mandell GL. Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. J Cardiovasc Pharmacol 1995;25 Suppl 2:S20-2.
17. Zabel P, Schade FU. Pentoxifylline and tumour necrosis factor-induced lung injury. Eur Respir J 1994;7:1389-91.
18. Hoffmann H, Hatherill JR, Crowley J, Harada H, Yonemaru M, Zheng H, Ishizaka A, Raffin TA.

Early post-treatment with pentoxifylline or Dibutyryl cAMP attenuates Escherichia coli-induced acute lung injury in guinea pigs. Am Rev Respir Dis 1991;143:289-293.

19. Seear MD, Hannam VL, Kaapa P, Raj JU, O' Brodovich HM. Effect of pentoxifylline on hemodynamics, alveolar fluid reabsorption, and pulmonary edema in a model of acute lung injury. Am Rev Respir Dis 1990;142:1083-7.
20. Kullmann A, Vaillant P, Muller V, Martinet Y, Martinet N. In vitro effects of pentoxifylline on smooth muscle cell migration and blood monocyte production of chemotactic activity for smooth muscle cells : potential therapeutic benefit in the adult respiratory distress syndrome. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;8:83-8.
21. Sheridan BC, McIntyre RC, Meldrum DR, Fullerton DA. Pentoxifylline treatment attenuates pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury. J Surg Res 1997;71:150-4.
22. Montravers P, Fagon JY, Gilbert C, Blanchet F, Novara A, Chastre J. Pilot study of cardiopulmonary risk from pentoxifylline in adult respiratory distress syndrome. Chest 1993;103:1017-22.
23. Yasui S, Nagai A, Aoshiba K, Ozawa Y, Kakuta Y, Konno K. A specific neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046.Na) attenuates LPS-induced acute lung inflammation in the hamster. Eur Respir J 1995;8:1293-9.
24. Miyazaki Y, Inoue T, Kyi M, Sawada M, Miyake S, Yoshizawa Y. : Effects of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on acute pulmonary injury induced by tumor necrosis factor alpha and activated neutrophils in isolated perfused rabbit lungs. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:89-94.
25. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Maekawa N, Shiga M, Obara. ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. Anesth Analg 1997;84:1097-103.
26. Sakamaki F, Ishizaka A, Urano T, Sayama K, Nakamura H, Terashima T, Waki Y, Tasaka S, Hasegawa N, Sata K, Hakagawa N, Obata T, Kanazawa M. : Effect of a specific neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046, on endotoxin-induced acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 1996;153: 391-397.