

□ 원 저 □

N-Acetylcysteine이 호중구의 Superoxide, Chemotaxis 및 혈장과 호중구의 Glutathione에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

송정섭 · 이숙영 · 문화식 · 박성학

= Abstract =

Effect of N-Acetylcysteine on the Superoxide Release, Chemotaxis from the Neutrophils and Glutathione Level of Plasma and Neutrophils

Jeong-Sup Song, M.D., Sook-Young Lee, M.D., Hwa-Sik Moon, M.D. and Sung-Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Background: N-acetylcysteine(ACE) is used both orally and intravenously in a variety of experimental pathologies resembling human disease states which exhibit endothelial toxicity as a result of oxidative stress, including acute pulmonary oxygen toxicity, septicemia and endotoxin shock. Despite these observations in vivo, it is not certain how this thiol drug produces its protective effects. ACE is a cysteine derivative which is able to directly react with oxygen radicals and may also act as a cysteine and glutathione(GSH) precursor following deacetylation. In this paper, we tried to know whether the therapeutic doses of ACE can modify the inflammatory function of the neutrophils and can increase the glutathione level of plasma in chronic obstructive pulmonary disease(COPD) patients. In addition, the effect of ACE to the purified neutrophil in terms of superoxide release and glutathione synthesis were observed.

Method: Firstly, we gave 600mg of ACE for seven days and compare the release of superoxide, luminol-enhanced chemiluminescence from the neutrophils, neutrophil chemotaxis, and plasma GSH levels before and after ACE treatment in COPD patients. Secondly, we observed the dose dependent effect of ACE to the purified neutrophil's superoxide release and GSH levels in vitro.

Results:

1) Usual oral therapeutic doses(600mg per day) of ACE for seven days did affect neither on the neutrophil's superoxide release, chemiluminescence, chemotaxis, nor on the plasma GSH concentration in the COPD patients.

2) ACE decreases the purified neutrophil's superoxide release and increase the GSH production in dose dependent fashion in vitro.

Conclusion: Despite the fact that oral ACE treatment did not affect on the neutrophil's inflam-

* 본 논문은 1994년도 가톨릭 중앙의료원 학술연구비의 보조로 이루어 졌음.

matory function and plasma GSH concentration in COPD patients in usual therapeutic doses, it decreases the superoxide release and increases the GSH production from the isolated neutrophils in high molar concentrations. These findings suggest that to obtain an antioxidative effects of ACE, it might be needed to increase the daily dosage of ACE or therapeutic duration or change the route of administration in COPD patients.

Key Words: N-acetylcysteine(ACE), Neutrophil, Superoxide, Chemotaxis, Glutathione(GSH)

서 론

N-acetylcysteine(ACE)은 cysteine 유도체로서 임상에서 점액용해제로 천식이나 급만성 기관지염등의 치료에 널리 쓰이거나¹⁾, paracetamol 중독의 해독제로 쓰이지만²⁾, 최근 이 약제가 산소유리기를 제거하는 기능 및 세포내,외에서 강력한 항산화효과를 나타내는 glutathione(GSH) 합성의 전구물질로 작용하는 것이 밝혀져 이를 이용한 실험동물 및 내피세포등에서의 연구가 활발히 진행되고 있다. Leff 등³⁾은 쥐에 interleukin-1 α (IL)를 기도에 주입하여 호중구에 의한 성인성호흡곤란증후군(adult respiratory distress syndrome: ARDS)을 유발시켰을때 ACE를 투여한 군에서는 대조군에 비하여 H₂O₂가 감소하고 산화형태의 glutathione인 GSSG가 감소하며 혈중 sulfhydryl이 증가하고 폐부종이 감소함을 보고하였다. Bernard 등⁴⁾도 양에 내독소를 주입하여 ARDS를 만들었을때 정맥으로 투여한 ACE는 폐동맥고혈압을 막고 림프유출의 증가를 감소시키고 폐의 유순도를 증가시키는등의 효과를 관찰하고, 이것이 ACE가 산소유리기를 제거하는 때문이라고 추정하였다. GSH는 H₂O₂나 과산화지질을 glutathione peroxidase의 존재하에 환원시키는 능력이 있으며 고산소혈증, 오존, 항암제, 방사선치료등에 의하여 세포내 산화제가 많아져 세포가 손상을 입기 쉬운 상태에 있을때 이를 보호해주는 항산화능력이 탁월한 성분이다^{5~7)}. GSH는 세포내에서 두단계로 형성되는데 첫번째는 ATP 의존성으로 γ -glutamylcysteine synthetase의 촉매하에 glutamate과 cysteine이 반응하여 γ -glutamylcysteine을 만든후 두번째로 glutathione synthetase의 촉매하에 glycine이 가해져 GSH가 만들어진다. ACE는 cysteine 유도체로 세포

내,외에서 deacylation이 되어 cysteine이 만들어져 GSH 합성이 증가되거나 ACE가 혈중 cystine을 환원하여 cysteine을 만들어 혈중 sulfhydryl이 축적되고 결국에는 GSH가 증가된다^{8~10)}.

저자들은 만성폐쇄성폐질환 환자에게 ACE를 통상 투여용량인 매일 600mg씩 7일간 주고 투여전, 후 혈액내 호중구를 분리하여 superoxide, chemiluminescence 및 chemotaxis의 변화와 혈장내 GSH의 변화를 비교하여 보았고, 시험관내 실험으로 정상인의 호중구를 분리하여 ACE의 농도변화에 따라 호중구의 superoxide 분비와 glutathione 양이 변화하는지를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

생체내 실험으로 만성폐쇄성폐질환 환자 17명을 대상으로 하여 ACE를 매일 600mg씩 7일간 투여하였으며, 이들의 평균연령은 66.4 \pm 9.9%, 폐기능검사 소견은 FVC가 예측치의 82.7 \pm 15.8%, FEV1이 1.2 \pm 0.5l, FEV1이 예측치의 50.2 \pm 12.7%, FEV1/FVC가 49.5 \pm 5.8%, TLC가 예측치의 125.1 \pm 18.4%이었다(Table 1).

시험관내 실험의 대상은 정상 건강한 14명으로 이들의 평균연령은 30.1 \pm 10.8세 이었다.

Table 1. Pulmonary Function Test of the COPD Patients

	COPD(n=17)
FVC(% Pred)	82.7 \pm 15.8
FEV1 (l)	1.2 \pm 0.5
FEV1 (% Pred)	50.2 \pm 12.7
FEV1/FVC (%)	49.5 \pm 5.8
TLC (% Pred)	125.1 \pm 18.4

2. 방 법

1) 호중구의 분리, Superoxide 및 Chemiluminescence 측정

heparin 처리한 정맥혈에 6% dextran을 가하여 약 1시간 실온에 방치한 후 상층액을 Ficoll-Hopaque 용액에 중층시켰다. 그 후 상층액은 버리고 적혈구는 증류수로 제거한 후 HBSS(Hank's balanced salt solution)에 호중구의 농도를 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조절하였다. Superoxide는 SOD(superoxide dismutase) inhibitable ferricytochrome-C 환원방법으로 측정하였다. 즉, 1.4ml의 호중구에 $10\mu\text{l}$ 의 증류수 또는 SOD(3 mg/ml)를 가하고 37°C 에 2분간 배양 후 0.1ml의 ferricytochrome-C(30 mg/ml)와 1.5ml의 PMA(phorbol myristate acetate, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가하여 재빨리 혼합 후 그중 1.5ml은 37°C 에 15분간 배양하여 측정시료로 사용하였고 나머지 1.5ml은 얼음에 15분간 방치한 후 blank로 이용하였다. 각각을 원심분리하여 상층액을 얻은 후 double beam 분광광도계를 이용하여 530~570nm에서 scan하였다. superoxide의 농도는 $\Delta E_{550\text{nm}} = 21 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 계산하였다.

Chemiluminescence는 500ul의 호중구에 luminol (10^{-4} mone) 900ul을 가하고 37°C 에 15분간 배양 후 PMA(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 200ul로 자극 후 luminometer(LKB-Wallac 1243)에서 30분간 측정하여 최고값(mV)을 기록하였다.

2) 호중구의 화학주성 검정

Neuro-probe 48 well chemotactic chamber를 이용하여 바닥의 plate에는 56°C 에서 30분간 비활성화시킨 20%의 정상인 혈청 또는 37°C 에서 5분간 warming시킨 FMLP(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, 10^{-6} Mole)를 가하고 구멍의 크기가 3um인 polycarbonate filter paper를 덮은 후 silicon gasket 및 위의 plate을 씌우고 5% CO_2 보육기에 10분간 방치한 후 48ul의 호중구($2 \times 10^6/\text{ml}$ HBSS)를 넣고서 37°C , 5% 보육기에 1시간 배양시켰다. 그 후 filter membrane을 PBS(phosphate buffered saline)로 3번 세척 후 methanol에 고정하여 diff-quick 염색하였다. 각각의 표본은 삼중검정(triplicate)하여 현미경시야($\times 1,000$)에서 10군데 호중구를 세어 합하였다. 화학주성능은 chemotactic index(CI)로

비교하였다.

$$CI = \frac{\text{mean number of neutrophil migration by (serum - HBSS)}}{\text{mean number of neutrophil migration by (FMLP - HBSS)}}$$

3) Glutathione(GSH)의 측정

Brehe와 Burch¹¹⁾의 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 방법으로 측정하였다. 분리한 호중구(2×10^6 cells/ml in 0.05% Triton X-100) 또는 혈장에 동량의 2M HClO_4 , 4mM EDTA 용액을 가한 후 5,000g에 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 pH를 6.2로 맞추었다. 각각의 표본 200ul에 A시약(Na_2HPO_4 91.7mM, NaH_2PO_4 33.3mM, DTNB 0.25mM, EDTA 12.5mM, BSA 0.0333%, pH 7.2) 400ul를 가하고 B시약(Imidazole 41.7mM, EDTA 0.83mM, BSA 0.0167%, Glutathione reductase 5ug/ml, NADPH 0.5mM) 400ul를 가하여 분광광도계 412nm에서 6분간 광학밀도의 변화를 기록하였다. 각각의 blank는 0.01N HCl을 이용하였고 측정치는 0.1uM에서 1.5uM까지의 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

결 과

COPD 환자들에게 600mg의 ACE를 1주일간 경구투여 전, 후의 말초혈액내 호중구의 superoxide 분비는 아무런 자극을 가하지 않았을 때 $1.97 \pm 1.75 \text{nM}/1.4 \times 10^6$ cells/15 min, $2.75 \pm 2.14 \text{nM}$ 이었고 PMA로 자극 시에는 $67.52 \pm 13.41 \text{nM}$, $67.99 \pm 13.54 \text{nM}$ 로서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다($p > 0.05$, Fig. 1). ACE 투여 전, 후의 호중구의 luminol-enhanced chemiluminescence도 무자극 시 $2.64 \pm 2.29 \text{mV}$, $2.91 \pm 3.58 \text{mV}$ 이었고 PMA로 자극 시 40.76 ± 30.09 , $37.33 \pm 30.03 \text{mV}$ 로서 특별한 변화가 없었다($p > 0.05$, Fig. 2). ACE 투여 전, 후의 호중구의 chemotactic index는 55.71 ± 16.34 , 59.68 ± 11.57 로 역시 변화가 없었고($p > 0.05$, Fig. 3), 혈장의 GSH도 $0.37 \pm 0.17 \text{nM}/4 \times 10^5$ cells, $0.39 \pm 0.18 \text{nM}$ 로 변화가 없었다($p > 0.05$, Fig. 4).

시험관내 실험으로 정상인의 호중구를 분리하여 10^2 - 10^5 mole 농도의 ACE를 가한 후 PMA로 자극하여 superoxide의 농도를 측정하였을 때 ACE를 가하지 않은

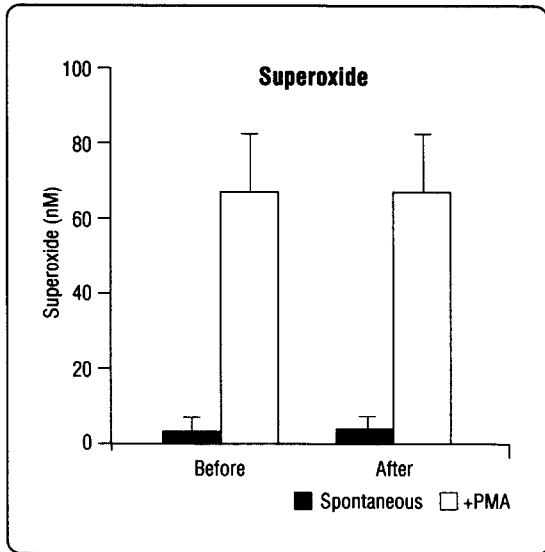


Fig. 1. Superoxide release from the neutrophils of COPD Pt before and after taking ACE for 7 days.

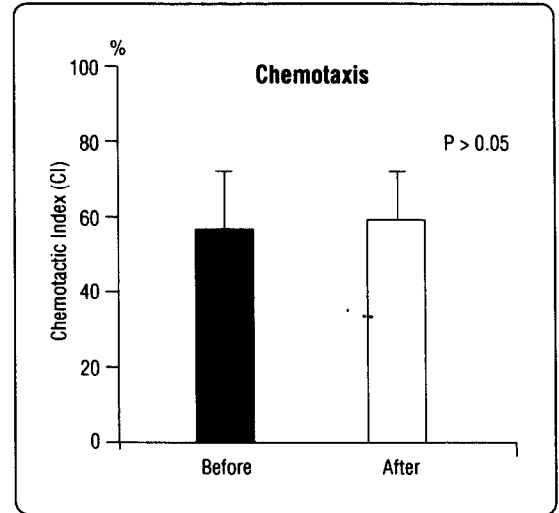


Fig. 3. The change of neutrophil chemotaxis before and after taking ACE for 7 days.

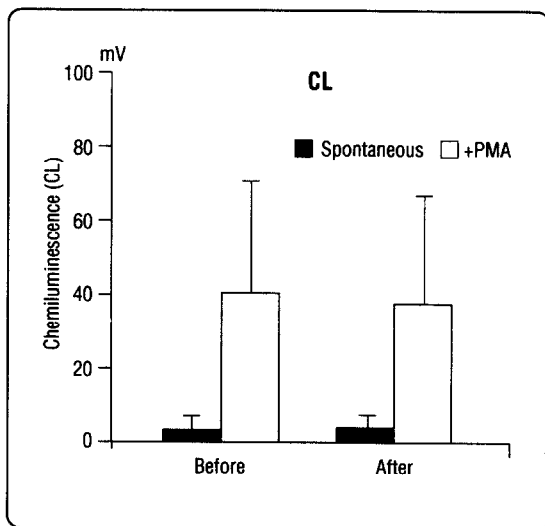


Fig. 2. The change of chemiluminescence(CL) before and after taking ACE for 7 days.

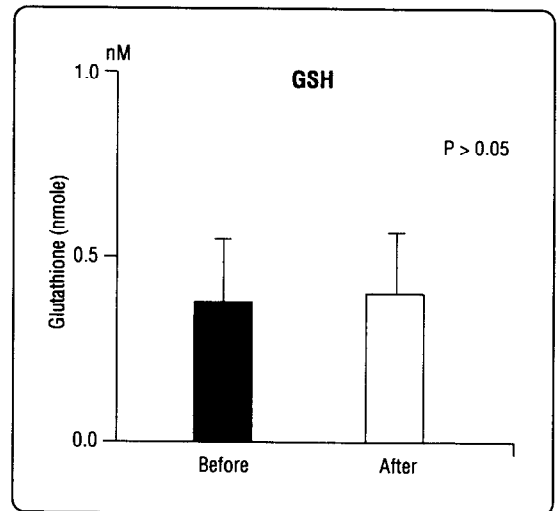


Fig. 4. The change of plasma glutathione levels before and after taking ACE(600mg/day) for 7 days.

대조군의 56.54nM/1.4×10⁶ cells/15min에 비하여 ACE의 10⁻⁵ mole에서 44.77nM, 10⁻⁴ mole에서 44.86nM, 10⁻³ mole에서 48.3nM, 10⁻² mole에서 37.0nM로서 ACE의 농도가 증가함에 따라 superoxide가 감소함을 관찰하였다(r=-0.269, p<0.05, Fig. 5).

또한 분리한 정상인 호중구의 GSH 농도도 ACE를 가하지 않은 대조군의 0.27nM/4×10⁵ cells에 비하여 ACE의 10⁻⁵ mole에서 0.21nM, 10⁻⁴ mole에서 0.28nM, 10⁻³ mole에서 0.35nM, 10⁻² mole에서 1.15nM로 ACE의 농도가 증가함에 따라 호중구내 GSH가 증가함을 관찰할 수 있었다(r=0.72, p<0.01, Fig. 6). 그러나 PMA로 자극 후 측정된 호중구의 luminol-enhanced chemilumine-

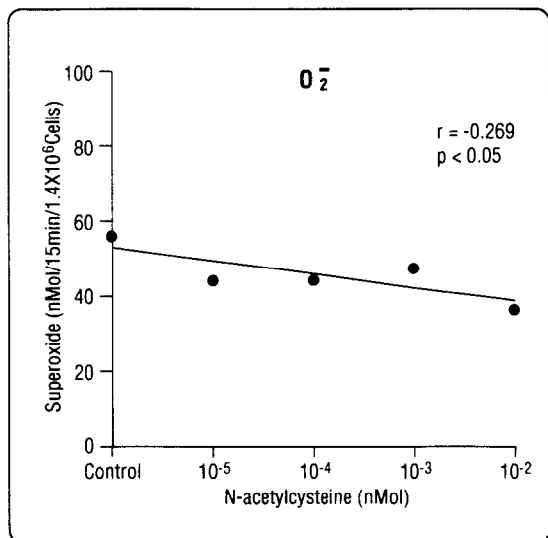


Fig. 5. Dose response of superoxide production from neutrophils by N-acetylcysteine in normal subject.

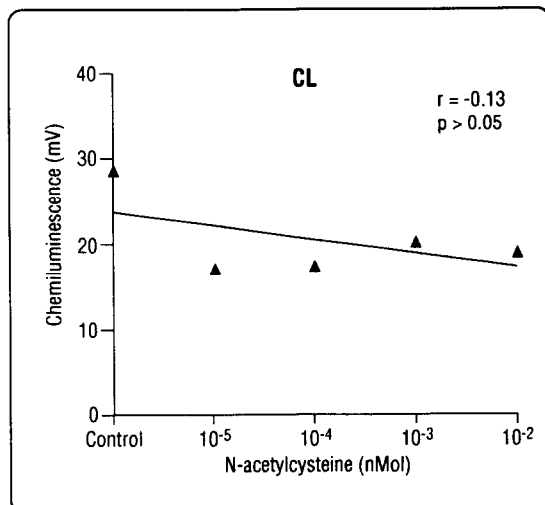


Fig. 7. Dose response of neutrophils' chemiluminescence by N-acetylcysteine in normal subject.

Fig. 7).

고 찰

ACE는 thiol을 함유하는 약제로서 임상에서는 객담 용해제로 만성 기관지염등의 치료에 널리 쓰이고 있다. 호중구에서 분비하는 산화물 특히 hypochlorous acid나 hydroxy radical 등이 흡연으로 인한 폐기종등의 호흡기 질환의 원인이 됨은 잘 알려진 사실인데 ACE가 30uM, 480uM에서 각각 hypochlorous acid 및 hydroxy radical의 발생을 50% 억제한다고 알려져서 ACE가 mesna와 비슷한 정도의 항산화제로서의 기능을 갖고 있음이 밝혀졌다¹²⁾. 그 외에도 세포의 손상을 줄수있는 반응성 산화물로서 superoxide, H₂O₂ 등이 있는데 폐조직은 염증 세포나 대기오염등에 의한 산화물에 노출되는 기회가 많으므로 이들에 의한 손상을 막기위하여 세포내에는 항산화기능을 갖고 있는 SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 및 glutathione(GSH) 등이 존재한다. 이중 GSH는 세계의 peptide로 구성된 비단백성 thiol로서 N-(N-L-γ-glutamyl-L-cysteinyl) glycine으로 구성되어 H₂O₂ 및 lipid hydroperoxide를 분해하여 해독하는 중요한 물질로서¹³⁾, 실험적으로 GSH를 결핍시킨 내피세포는 산화물에 의한 손상에 극

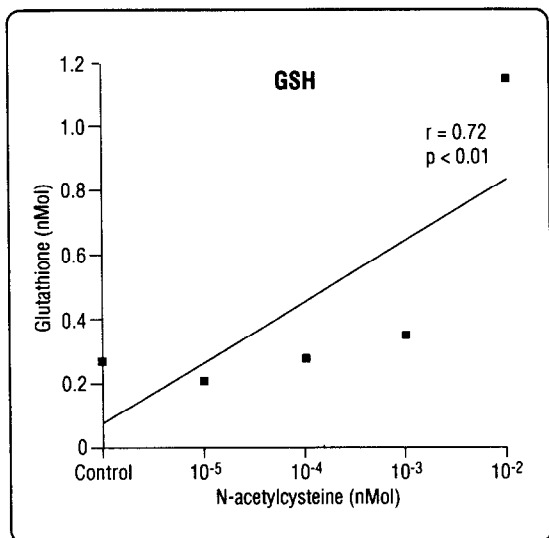


Fig. 6. Dose response of glutathione production from neutrophils by N-acetylcysteine in normal subject.

science는 대조군의 28.75mV에 비하여 ACE의 10⁻⁵ mole에서 17.06mV, 10⁻⁴ mole에서 17.48mV, 10⁻³ mole에서 20.38mV, 10⁻² mole에서 19.09mV로서 감소되어 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(r=-0.13, p>0.05,

히 예민해짐이 보고되었다¹⁴⁾. 호흡기 질환과의 관계를 살펴보면 ARDS환자들은 폐포세척액내에 GSH가 결핍되어 있고 그 GSH의 대부분도 환원형태가 아닌 산화형태의 glutathione disulfide(GSSG)로 구성되어 있어 이러한 환원형태의 GSH의 결핍이 폐세포의 손상과 관계가 있을것이라고 하였다^{15,16)}. 반면 정상인의 폐포상피내막액내에는 고농도의 GSH를 함유하고 있음이 밝혀져 있고¹⁷⁾, 흡연에 의해서 폐포상피세포 투과성이 증가되는것은 흡연에 의해서 상피세포내 GSH가 감소하기 때문이며¹⁸⁾, 원발성폐섬유화증 환자의 상피내막액내 GSH는 정상인에 비하여 1/4로 감소되어 있고¹⁹⁾, 따라서 산화물-항산화물간의 불균형이 유발되어 폐의 상피세포 손상을 초래한다고 하였다. 그 외에도 GSH는 leukotriene C의 전구물질로 작용하고 prostaglandin E₂ 합성의 보조인자로 사용되며 입과구의 활성화에 관여하는데²⁰⁾, 후천성면역결핍증 환자들은 혈장과 상피내막액내 GSH 농도가 정상인에 비해 현저히 감소하여 이러한 GSH의 결핍이 면역기능 이상의 원인이 될수 있다고 하였다²¹⁾.

따라서 세포내 glutathione의 농도를 증가시키면 산화물에 의한 세포손상을 막는다면 면역기능을 증가시키는등의 효과를 기대할수 있는데 불행하게도 외부에서 주입한 glutathione은 세포내로 들어가지 못하여 도움이 되지 못한다. 최근 ACE를 경구투여시 간, 혈장, 기관지 폐포세척액에 GSH의 농도가 증가되고 내독소에 의한 ARDS의 발생을 막고 혈청내 TNF의 증가를 막는다는 동물실험 결과가 보고되었고²²⁾, 이러한 현상은 경구투여한 ACE가 체내에서 빨리 deacetylation되어 GSH의 전구물질인 cysteine으로 바뀌어 환원형태의 GSH가 증가됨으로 인하여 폐의 항산화기능이 증가되기 때문이다²³⁾. ACE의 이러한 성질을 이용하여 acetaminophen 중독의 치료에 쓰이는데 이는 acetaminophen에 의하여 간의 GSH가 결핍되기 때문이다^{24,25)}.

저자들은 폐기종을 위시한 만성폐쇄성폐질환이 말초혈액내 호중구의 폐로의 이동 증가 및 호중구의 반응성 산화물로 인한 폐손상 또는 GSH를 비롯한 항산화제의 결핍등으로 인한 산화물-항산화물간의 불균형때문이라는 학설이 인정을 받고 있으므로 이들 각각에 ACE의 경구투여가 미치는 영향을 관찰하고 시험관내 실험으로 정상인의 호중구에 ACE를 넣었을때 ACE의 농도에 따

라 superoxide, chemiluminescence, GSH가 어떻게 변화하는지를 관찰하고자 하였다. 만성폐쇄성폐질환 환자에게 매일 600mg의 ACE를 1주일간 경구투여하고 투여전, 후의 호중구에서 분비하는 superoxide 및 chemiluminescence는 PMA로 자극하였을때나 안하였을때 모두 변화가 없었고 호중구의 chemotaxis도 변화가 없었다. 혈장의 glutathione 농도도 ACE 투여후에 별 변화를 보이지 않았다. 반면에 정상인의 혈액에서 분리한 호중구에 ACE를 농도별로 가하고 PMA로 자극하였을때 ACE의 고농도에서 superoxide의 분비가 감소하고 호중구의 GSH농도는 ACE의 농도에 비례하여 증가하는 것을 관찰할수 있었다.

이렇게 시험관내 실험과 생체실험이 다른 결과를 보인데에는 몇가지 설명이 가능한데 MacNee 등²⁶⁾은 ACE를 매일 600mg씩 투여한경우 정상인에서는 혈장과 기관지폐포세척액내 GSH의 증가를 보였으나 만성폐쇄성폐질환 환자들에서는 하루에 600mg씩 3번 즉 1,800mg을 주어야 GSH의 증가가 있음을 관찰하였는데 본실험에서도 만성폐쇄성폐질환 환자에게 ACE의 투여용량을 증가시켰더라면 혈중 GSH 농도가 증가하여 항산화효과의 증가를 관찰할수 있었을 것으로 생각된다. 또한 ACE의 투여경로가 문제될수도 있는데 ARDS 환자에서 감소되어 있는 혈장과 적혈구내 GSH의 농도가 정맥으로 주입한 ACE에 의해서 증가되었다는 보고^{27,28)}를 참고하면 본환자의 경우처럼 ACE를 경구투여하는것보다는 정맥주입이 더 효과적일지도 모른다. ARDS의 원인은 여러가지이지만 공통되는 병인론은 폐포-모세혈관 내피세포가 손상을 받는것인데 ACE의 고농도에서 내피세포내 GSH의 농도를 증가시켜^{29~30)}, 고농도의 산소, 내독소, paraquat등에 의한 ARDS의 발생을 현저히 감소시키며 이는 ACE가 염증세포에서의 superoxide 음이온등의 분비를 감소시키는데도 기인한다^{31,32)}.

Drost 등³³⁾은 ACE를 5일간 경구투여하고 말초혈액내 호중구와 폐포대식세포에서의 superoxide, H₂O₂의 변화를 관찰하였으나 특별한 변화가 없었고 혈장과 폐포세척액내 cysteine은 증가하였으나 GSH는 큰 변화가 없었는데 이는 저자들의 결과와 유사하다. 이도 역시 ACE의 투여기간이 짧고 용량이 부족한데 기인할것으

로 생각되는데, 그 이유는 저자들의 시험관내 실험에서 ACE의 농도에 비례하여 호중구의 superoxide 분비가 억제되며 이는 Bernard 등⁴⁾의 결과와 일치하였고 그 외에도 호중구의 GSH 농도가 ACE에 비례하여 증가하기 때문이다.

저자들의 생체내 실험에서 1주일간의 ACE 경구투여가 호중구의 chemotaxis에 특별한 영향을 주지는 않았으나 Leff 등³⁾은 쥐에 IL-1을 주입하여 폐에 호중구의 이동증가에 의한 폐부종을 만들었을때 ACE는 호중구의 chemotaxis를 억제하는 것을 관찰하였는데, 이러한 결과의 차이도 혈중 ACE의 농도차이 때문일 것으로 추정된다.

이상의 결과를 요약하면 ACE는 호중구를 포함한 염증세포에서의 superoxide등의 반응성 산소기의 분비를 억제하며 혈장 및 세포내의 GSH의 농도를 증가시켜 세포손상을 억제하나 COPD 환자에게 매일 600mg씩 1주일간의 경구투여로는 그러한 효과를 관찰할수 없었다. 따라서 ARDS나 원발성폐섬유화증, 폐기종, AIDS등 폐내 염증세포에서의 반응성 산소기의 증가 또는 폐포 세척액내 GSH의 감소가 문제가 되는 질환에서 ACE의 적절한 투여경로 및 투여용량으로 혈중 ACE의 농도를 증가시키면 이들 질환에서 ACE의 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : N-acetylcysteine(ACE)은 임상에서는 객담용해제로 널리 쓰이고 있으나 시험관내 실험 또는 동물실험에서 ACE는 염증세포에서의 산소유리기를 감소시키고, 세포내 강력한 항산화기능을 갖고있는 glutathione(GSH)의 합성을 촉진한다고 알려졌다. 저자들은 만성폐쇄성폐질환 환자에게 통상 투여용량인 매일 600mg씩 1주일간 ACE를 투여했을때 말초혈액내 호중구의 superoxide 분비, chemotaxis 등의 기능에 변화가 오는지 또는 혈장의 GSH 농도가 증가되는지를 살펴보고 동시에 시험관내 실험으로 정상인의 호중구에 ACE를 가했을때 ACE의 농도에 따라 superoxide나 GSH의 양에 변화가 오는지를 관찰하였다.

방법 : ACE 투여 전, 후에 만성폐쇄성폐질환 환자

의 말초혈액에서 호중구를 분리하여 PMA로 자극하거나 안했을때의 superoxide 분비를 분광광도계로, luminol-enhanced chemiluminescence를 luminometer로, 혈장의 GSH 농도를 분광광도계로 각각 측정하였다. 한편 정상인의 호중구를 분리하여 10^{-2} - 10^{-5} mole의 ACE와 혼합배양시의 superoxide, chemiluminescence 및 GSH를 각각 같은 방법으로 측정하였다.

결과 : ACE를 투여하기 전, 후의 말초혈액내 호중구의 superoxide 분비는 $1.97 \pm 1.75 \text{ nM} / 1.4 \times 10^6 \text{ cells} / 15 \text{ min}$, $2.75 \pm 2.14 \text{ nM}$ 이었고 PMA로 자극하였을때는 $67.52 \pm 13.41 \text{ nM}$, $67.99 \pm 13.54 \text{ nM}$ 로서 각각 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 호중구의 chemiluminescence도 ACE 투여전, 후에 $2.64 \pm 2.29 \text{ mV}$, $2.91 \pm 3.58 \text{ mV}$ 이었고 PMA로 자극하였을때는 $40.76 \pm 30.09 \text{ mV}$, $37.33 \pm 30.03 \text{ mV}$ 로서 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 호중구의 chemotaxis를 chemotactic index로 비교하였을때 ACE투여전, 후에 55.71 ± 16.34 , 59.68 ± 11.57 이었고 혈장의 GSH는 $0.37 \pm 0.17 \text{ nM} / 4 \times 10^5 \text{ cells}$, $0.39 \pm 0.18 \text{ nM}$ 로서 역시 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

정상인의 호중구를 분리하여 10^{-5} - 10^{-2} mole의 ACE와 동시배양하며 PMA로 자극하였을때 superoxide는 ACE를 가하지 않은 대조군에서의 $56.54 \text{ nM} / 1.4 \times 10^6 \text{ cells} / 15 \text{ min}$ 에 비해 ACE의 10^{-2} mole에서 37.0 nM 로서 유의하게 감소하였고 ACE의 농도에 따라 감소하는 양상을 보였다($r = -0.269$, $p < 0.05$).

호중구의 GSH 농도는 대조군의 $0.27 \text{ nM} / 4 \times 10^5 \text{ cells}$ 에 비하여 ACE의 10^{-3} mole에서 0.35 nM , 10^{-2} mole에서 1.15 nM 로서 유의하게 증가하여 ACE의 농도에 따라 증가하였다($r = 0.72$, $p < 0.01$).

결론 : ACE를 만성폐쇄성폐질환 환자에게 매일 600mg씩 1주일간 투여하였을때 말초혈액내 호중구의 superoxide 분비, chemotaxis에 영향을 주지 않았고 혈장의 glutathione 농도에도 변화가 없었다. 그러나 정상인의 호중구를 분리하여 ACE와 같이 배양한 실험에서 ACE는 농도에 비례하여 호중구의 superoxide 분비를 억제하였고 GSH를 증가시켰다. 이상으로 미루어 ACE는 염증세포에서의 superoxide 분비를 억제하고 GSH를 증가시키므로서 oxidant-antioxidant간의 불균형으로 야기되는 ARDS, 폐기종, 간질성폐질환등의 치료에 이용

될수 있을것으로 생각되나 폐기종을 포함한 만성폐쇄성 폐질환의 치료에 이용되기 위해서는 ACE의 혈중농도 또는 폐포세척액내의 농도를 충분히 증가시키는 방법이 강구되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Bowman G, Badker U, Larsson S, Melander B, Wahlander L: Oral N-acetylcysteine reduces exacerbation rate in chronic bronchitis: Report of a trial organized by the Swedish Society for Pulmonary Diseases. *Eur J Respir Dis* **64**:405, 1983
- 2) Lauterberg BH, Corcoran GB, Mitchell JR: Mechanisms of N-acetylcysteine in the protection against hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J Clin Invest* **71**:980, 1983
- 3) Leff JA, Wilke CP, Hyberson BM, Shanley PF, Beehler CJ, Repine JE: Postinsult treatment with N-acetyl-L-cysteine decreases IL-1-induced neutrophil influx and lung leak in rats. *Am J Physiol* **265**:L501, 1993
- 4) Bernard GR, Lucht WD, Niedermeyer ME, Snapper JR, Ogletree ML, Brigham KL: Effect of N-acetylcysteine on the pulmonary responses to endotoxin in the awake sheep and upon in vitro granulocyte function. *J Clin Invest* **73**:1772, 1984
- 5) Tsan MF, White JE, Rosano CL: Modulation of endothelial GSH concentrations: effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester. *J Appl Physiol* **66**:1029, 1989
- 6) White CW, Jackson JH, McMurty, Repine JE: Hypoxia increases glutathione redox cycle and protects rat lungs against oxidants. *J Appl Physiol* **65**:2607, 1988
- 7) Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL: Transient depletion of lung glutathione by diethylmaleate enhances oxygen toxicity. *J Appl Physiol* **58**:571, 1985
- 8) Junod AF, Jornot L, Grichting G: Comparative study on the selenium and N-acetylcysteine related effects on the toxic action of hyperoxia, paraquat and the enzyme reaction hypoxanthine-xanthine oxidase in cultured endothelial cells. *Agents Actions* **22**:176, 1987
- 9) Sheffner AL: The mucolytic activity, mechanism of action, and metabolism of acetylcysteine. *Pharmacotherapeutica* **1**:46, 1965
- 10) Cotgreave I, Moldeus P, Schuppe I: The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **42**:13, 1991
- 11) Brehe JE, Burch HB: Enzymatic assay for glutathione. *Anal Biochem* **74**:189, 1976
- 12) Gressier B, Cabins A, Lebegue S, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC: Decrease of hypochlorous acid and hydroxyl radical generated by stimulated human neutrophils: comparison in vitro of some thiol-containing drugs. *Methods Findings Exp Clin Pharm* **16**:9, 1994
- 13) Meister A, Anderson ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**:711, 1983
- 14) Tsan MF, Danis EH, del Vecchio PJ, Rosano CL: Enhancement of intracellular glutathione protects endothelial cells from oxidant damage. *Biochem Biophys Res Commun* **127**:270, 1985
- 15) Bunnell E, Pacht ER: Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **148**:1174, 1993
- 16) Pacht ER, Timmerman AP, Lykens MG, Merola AJ: Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **100**:1397, 1991
- 17) Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG: Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* **63**:152, 1987
- 18) Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W: An investigation of the role of glutathione in increas-

- ed epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* **149**:1518, 1994
- 19) Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG: Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **139**:370, 1989
 - 20) Droege W, Pottmeyer-Gerber C, Schmidt H, Nick S: Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiology* **172**: 151, 1986
 - 21) Buhl R, Jaffe HA, Holroyd K, Wells FB, Mastrangeli A, Saltini C, Cantin AM, Crystal RG: Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet* 1295, 1989
 - 22) Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P: N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cellular Immunology* **140**:390, 1992
 - 23) Bridgeman MM, Marsden M, MacNee W, Flenley DC, Ryle AP: Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax* **46**:39, 1991
 - 24) Rumack BH, Peterson RG: Acetaminophen overdose: incidence, diagnosis and management in 461 patients. *Pediatrics* **62**:898, 1978
 - 25) Lauterberg BH, Corcoran GB, Mitchell JR: Mechanism of action of N-acetyl-cysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J Clin Invest* **71**:990, 1983
 - 26) MacNee W, Bridgeman MM, Marsden M, Drost E, Lannan S, Selby C, Donaldson K: The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells. *Am J Med* **91**:60S, 1991
 - 27) Bernard GR: Potential of N-acetylcysteine as treatment for the adult respiratory distress syndrome. *Eur Resp J* **11**:496S, 1990
 - 28) Bernard GR: N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med* **91**:54S, 1991
 - 29) Phelps DT, Deneke SM, Daley DL, Fanburg BL: Elevation of glutathione levels in bovine pulmonary artery endothelial cells by N-acetylcysteine. *Am J Resp Cell Mol Biol* **7**:293, 1992
 - 30) Sala R, Moriggi E, Corvasce G, Morelli D: Protection by N-acetylcysteine against pulmonary endothelial cell damage induced by oxidant injury. *Eur Resp J* **6**:334, 1993
 - 31) Langley SC, Kelly FJ: N-acetylcysteine ameliorates hyperoxic lung injury in the preterm guinea pig. *Biochem Pharm* **45**:841, 1993
 - 32) Hoffer E, Avidor I, Benjaminov O, Shenker L, Tabak A, Tamir A, Merzbach D, Taitelman U: N-acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharm* **120**:8, 1993
 - 33) Drost E, Lannan S, Bridgeman MM, Brown D, Selby C, Donaldson K, MacNee W: Lack of effect of N-acetylcysteine on the release of oxygen radicals from neutrophils and alveolar macrophages. *Eur Resp J* **4**:723, 1991