

□ 원 저 □

폐포대식세포의 부착에 의한 산소유리기 분비능 활성화 및 그 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

정만표*, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철*

= Abstract =

Adhesion-induced generation of oxygen free radical from human alveolar macrophages and its mechanisms

Man Pyo Chung, M.D.*, Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Yong Chol Han, M.D.*

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Neutrophils or monocytes separated in vitro by the adherence to plastic surface are known to be activated by surface adherence itself and subsequent experimental data might be altered by surface adherence. In the process of surface adherence, adhesion molecules have a clear role in intracellular signal pathway of cellular activation. Human alveolar macrophages(HAM) are frequently purified by the adherence procedure after bronchoalveolar lavage. But the experimental data of many reports about alveolar macrophages have ignored the possibility of adhesion-induced cellular activation.

Method : Bronchoalveolar lavage was performed in the person whose lung of either side was confirmed to be normal by chest CT. With the measurement of hydrogen peroxide release from adherent HAM to plastic surface and non-adherent HAM with or without additional stimulation of phorbol myristate acetate(PMA) or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), we observed the effect of the adherence to plastic surface. We also evaluated the effect of various biological surfaces on adhesion-induced activation of HAM. Then, to define the intracellular pathway of signal transduction, pretreatment with cycloheximide, pertussis toxin and anti-CD11/CD18 monoclonal antibody was done and we measured hydrogen peroxide in the culture supernatant of HAM.

Results :

1) The adherence itself to plastic surface directly stimulated hydrogen peroxide release from human alveolar macrophages and chemical stimuli such as phorbol myristate acetate(PMA) or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(fMLP) could not increase hydrogen peroxide release in these adherent macrophages which is already activated

이 연구는 1994년도 서울대학교병원 지정진료연구비(02-94-037)의 지원에 의한 결과임.

본 연구과제는 1995년도 삼성생명과학연구소 연구비(C-95-008)의 보조로 이루어졌음.

* : 현재는 삼성서울병원 호흡기내과 및 삼성생명과학연구소 임상의학연구센터 근무

2) PMA activated human alveolar macrophages irrespective of the state of adhesion. However, fMLP stimulated the release of hydrogen peroxide from the adherent macrophages, but not from the non-adherent macrophages.

3) HAM adherent to A549 cell(type II alveolar epithelium-like human cell line) monolayer released more hydrogen peroxide in response to both PMA and fMLP. This adherence-dependent effect of fMLP was blocked by pretreatment of macrophages with cycloheximide, pertussis toxin and anti-CD18 monoclonal antibody.

Conclusion : These results suggest that the stimulatory effect of PMA and fMLP can not be found in adherent macrophage because of the activation of human alveolar macrophage by the adherence to plastic surface and the cells adhered to biologic surface such as alveolar epithelial cells are appropriately responsive to these stimuli. It is also likely that the effect of fMLP on the adherent macrophage requires new protein synthesis via G protein pathway and is dependent on the adhesion between alveolar macrophages and alveolar epithelial cells by virtue of CD11/CD18 adhesion molecules.

Key Words : Alveolar macrophage, Adherence, CD11/CD18 adhesion molecule

서 론

폐포대식세포는 폐포로 흡입되거나 침입하는 외 부인자에 일차적으로 반응하는 세포로서, 자극물질에 노출되면 세포가 활성화되어 식작용(phagocytosis)이 증가하면서 각종 세포동력물질(cytokines), 유리산소기(oxygen free radicals), 단백분해효소(proteolytic enzymes)와 같은 독성물질을 분비하여 외부로부터 침입한 물질을 제거하는 폐장방어 기능이 있는 반면에, 주위 폐조직도 이런 독성물질에 노출되면 손상을 받게 되므로 급성 또는 만성 폐질환에서는 염증반응중에서 특히 식세포의 활성화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1),2)}. 이렇게 양면성을 가진 폐포대식세포의 기능³⁾에 많은 연구자들이 관심을 갖게 되고 폐포대식세포에 대한 연구가 활성화된 것은 실험동물에서 전 폐세척술(whole lung lavage)을 통해⁴⁾, 인체에서는 기관지폐포세척술(bronchoalveolar lavage, 이하 BAL이라 약함)을 통해⁵⁾ 많은 수의 폐포대식세포를 얻어 다양한 시험관내 조건에서 실험이 가능하게 된 이후이다. 그렇지만 기관지폐포세척술로 얻은 세척액에는 폐포대식세포 외에도 비록 적

은 숫자이지만 임파구, 호중구 및 적혈구 등이 포함되어 있으므로, 폐포대식세포가 유리 및 플라스틱(polystyrene) 표면에 잘 부착되는 성질을 이용하여 기능하면 순수한 폐포대식세포만을 분리해야 될 필요성이 있었다. 이런 과정을 거치면 전체 세포중에서 폐포대식세포가 98%이상 차지하게 되어⁶⁾ 폐포대식세포의 분리에 유용한 방법으로 사용되어 왔다. 그러나 식세포인 호중구가 플라스틱 표면에 부착되면 그 자체만으로도 세포가 활성화되어 각종 화학주성물질이나 유리산소기가 분비되는 것이 최근 보고되어^{7),8),9)} 지금까지 알려진 폐포대식세포의 활성화 및 자극에 따른 분비양상이 플라스틱 표면부착에 의해 직접 또는 간접적으로 영향받아 최종 연구결과 및 해석이 상당히 왜곡되었을 가능성이 제기되고 있다. 실제로 생체내의 폐포대식세포는 폐포내에 존재하므로 세포 표면의 극히 일부분만 허족(pseudopods)을 통해 표면활성물질(surfactant)로 덮인 폐포상피세포와 부착되어 있다는 사실을 상기하면 실험조건과 실제상황과는 너무나 달라 과연 이와 같은 연구결과가 생체내 상황을 대변할 수 있는지 의문시된다.

세포와 세포 또는 세포와 세포의 성분 사이의

부착은 근본적으로 부착분자(adhesion molecule)에 의해 이루어지고, 단순한 물리적 결합뿐만 아니라 세포 상호간 신호전달 기능도 있으므로 부착분자는 세포동력물질과 함께 세포간 반응 및 활성화에 중요한 인자라 할 수 있다¹⁰⁾. 이런 부착분자 중에서 CD11/CD18 계통(CD11/CD18 family) 또는 β_2 integrin 계통(β_2 integrin family) 부착분자가, 부착상태에 있는 호중구에서 화학주성물질에 의한 유리산소기 분비에 밀접하게 관련되어 있다는 사실이 보고되고⁹⁾ 폐포대식세포에서도 CD11/CD18 계통이 주요 부착분자로 존재함이 알려지면서¹¹⁾ 부착에 의한 폐포대식세포의 활성화에도 부착분자가 어떤 역할을 할 것으로 추정되고 있다.

이에 저자들은 폐포대식세포가 플라스틱표면 부착 자체에 의해 활성화되고 생체내와 유사한 시험관 조건하에서만 자극물질에 대한 적절한 반응이 나타나는지 여부를 알아보고, 부착분자를 비롯하여 이런 세포활성화에 관여하는 기전을 규명하고자 본 연구를 시행하게 되었다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

최근 6주 이내에 상기도감염력이 없고 과거력 상 폐결핵을 앓은 병력이 없으며 복용하고 있는 약물이나 기타 전신질환이 없는, 나이 60세 이하인 사람으로서 고립성폐결절(solitary pulmonary nodule)이나 종격동종양과 같이 국소적인 폐질환 또는 폐외질환만이 있고 폐의 고해상도컴퓨터단층촬영(high resolution computed tomography, 이하 HRCT라 약함)을 시행하여 적어도 한 쪽 폐에 이상이 없는 것으로 판명되었으며 기관지내시경 및 BAL을 시행할 수 있는 사람을 대상으로 폐포대식세포를 얻었다.

2. 전체적인 연구진행 단계

이상이 없는 쪽의 폐에서 사람의 폐포대식세포

를 BAL로 추출하여 무균작업대(clean bench)에서 다음의 3 단계로 나누어 실험을 진행하였다.

1) 일정시간 플라스틱 표면에 부착된 폐포대식세포에서 세포활성화 여부를 평가하였다. 이를 위해서 2시간동안 24-well Linbro plate(Falcon사)의 각 well 바닥면(플라스틱면, 이하 PS라 약함)에 부착시킨 부착세포군과 15ml 원추형 시험관내에서 계속 흔들어 같은 기간동안 부유상태를 유지한 부유세포군에서 분비된 유리산소기의 일종인 과산화수소(hydrogen peroxide)양을 세포상층액에서 각각 측정하여 세포활성화의 지표로 평가했다. 또한 두 군에서 세포자극물질인 Phorbol myristate acetate(Sigma사, 이하 PMA로 약함)와 N-formyl-methionyl - leucyl - phenylalanine(Sigma사, 이하 fMLP로 약함)로 자극하면서 분비되는 과산화수소양을 측정하여 자극 반응도를 비교하였다.

2) PS가 아닌 여러가지 생체학적 표면에서의 폐포대식세포 활성화 여부를 분석하였다. 이를 위해서 우태혈청(fetal bovine serum, GIBCO사, 이하 FBS로 약함)으로 PS를 도포한 표면, 젤라틴을 혼합한 표면, 인체의 기관지폐포암세포주(human bronchioloalveolar cancer cell line, American tissue culture collection)인 A549 세포로 만든 세포단층(cell monolayer)에 폐포대식세포를 각각 2시간동안 부착시켜 무자극, PMA자극, fMLP자극 상태에서 분비되는 과산화수소 양을 측정하였다.

3) 표면부착에 의한 세포활성화의 세포내 신호전달 과정을 밝히기 위해 부착세포군과 부유세포군을 CD11/CD18 계통 부착분자의 공동아단위(common subunit)인 CD18에 대한 단세포항체(GIBCO사, 이하 CD18 mAb라 약함), G 단백질경로(G protein pathway)를 차단하는 백일해독소(pertussis toxin, CALBIOCHEM사, 이하 PT라 약함)와 단백질합성억제제인 cycloheximide(Sigma사, 이하 CHX라 약함)로 각각 전처리한 다음 무자극, PMA자극, fMLP자극 상태에서 분비되는 과산화수소양을 측정하여 비전처리군의 결과와 비교 평가하였다.

3. 연구 방법

1) 사람 폐포대식세포의 분리

10시간 이상 금식시킨 대상인을 atropine 0.5mg과 meperidine 50mg으로 전처치하고 lidocaine으로 인후마취한 후, 흉부 HRCT상 이상이 없는 것으로 확인된 우중엽 또는 좌설상엽에서 BAL을 시행하였다. BAL은 해당 폐분절에 37℃ 생리식염수를 1회 50ml씩 5-6회 정도 주입한 후, 총 150-200ml의 폐포세척액을 회수하여 얻었으며, 이 세척액을 2겹의 무균 거즈로 거른 뒤 4℃에서 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시키고 phenol red가 없는 Hanks' balanced salts solution(GIBCO사, 이하 HBSS라 약함)으로 2번 원심세척(4℃, 1200rpm, 10분)후 hemocytometer로 폐포대식세포의 숫자를 세어 phenol red가 없는 RPMI-1640 배양액(GIBCO사)으로 1×10^6 개/ml이 되도록 세포수를 조절하여 세포부유액을 만들었다. 이 중 trypan blue 염색상 세포활성(cell viability)이 90% 이하인 폐포대식세포는 실험에 사용하지 않았다. 동일 환자의 폐포대식세포로 부유상태 및 부착상태를 동시에 형성하여 서로 비교하였다.

2) 각종 부착표면 및 부유세포 준비

PS는 24-well Linbro plate의 well 바닥면을 이용하고, FBS 도포면은 FBS 500ul를 각 well에 넣어 37℃, 5% CO₂ incubator에서 90분이상 놓아둔 후 37℃ 생리식염수 1ml로 부드럽게 3회 세척하여 만들었으며 젤라틴 혼합 표면은 무균처리한 10% 젤라틴 용액을 세포배양액과 함께 10ul씩 넣었다. A549 세포단층은 A549세포를 24-well plate의 각 well에 분주한 후 10% FBS, streptomycin (Sigma사) 100mg/ml, penicillin(Sigma사) 100U/ml이 포함된 RPMI-1640 배양액으로 37℃, 5% CO₂ incubator에서 약 18-24시간 배양하여 세포단층이 형성되면 phenol red가 없는 37℃ HBSS 1ml로 2회 세척한 후 폐포대식세포를 부착시켰다. 부유상태는 1×10^6 /ml의 세포부유액을 15ml 원

추형 시험관에 넣고 37℃ shaking incubator에서 분당 150회 정도로 계속 흔들어 주어 부착이 되지 않도록 하여⁷⁾ 유지하였다. 표면 부착시간은 2시간으로 하였고 부유상태 세포도 이 시간동안 부착이 되지 않도록 유지하였다. 표면부착 2시간후에 37℃ HBSS 1ml로 2회 세척하여 미부착세포를 제거한 후 과산화수소 분비량을 측정하였으며 부유세포도 37℃ HBSS로 2회 원심세척한 후 과산화수소 측정을 시행하였다.

3) 과산화수소 측정

세포배양 상층액에서 과산화수소량을 측정하는 방법은 peroxidase 존재하에서 phenol red가 과산화수소에 의해 산화되면 과산화수소의 양에 따라 일정하게 색깔이 변하는 원리를 이용하여¹²⁾ 측정하였다. 간단히 기술하면, phenol red가 없는 HBSS에 horseradish peroxidase(Sigma사) 8.5U/ml과 phenol red(Sigma사) 0.28nM을 포함한 혼합시약 1ml을 만들어, 1×10^6 개의 폐포대식세포를 부착시킨 24-well Linbro plate의 각 well과 부유상태로 만든 15ml 원추형 시험관에 넣은 다음, 2시간 동안 부착과 부유상태를 계속 유지하면서 폐포대식세포에서 분비된 과산화수소가 phenol red를 산화시켜 색깔 변화를 일으키면, 이를 spectrophotometer로 610nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 수치를 미리 만들어 놓은 과산화수소양-흡광도 표준곡선을 이용하여 nM/well/2hours의 단위로 전환하여 표시하였다. 폐포대식세포의 추가적인 화학자극물질인 PMA, fMLP는 각각 100ng/ml, 100nM의 농도로 혼합시약에 같이 섞어 사용하였다.

4) 각종 전처치

CHX는 10ug/ml의 농도로 세포부착 30분전부터 과산화수소 측정 종료시까지 처리하고, PT는 1ug/ml, CD18 mAb는 1ug/ml의 농도로 부착전 1시간동안 배양하여 HBSS로 세척한 후 실험을 진행하였다.

4. 유의성 검증

매킨토시 컴퓨터를 이용한 Starview II software 통계 package(Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA)를 사용하여 유의성 검정을 했고, 한 환자의 폐포대식세포를 부유상태와 표면 부착상태, 기저상태와 PMA 또는 fMLP 자극후 상태끼리 각각 비교하기 위해 paired t-test를 시행하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적인 유의성이 있다고 인정하였다.

결 과

1. BAL 대상 환자의 특성

대상 환자는 HRCT상 병소 반대편 폐가 정상인 폐암 환자가 가장 많았고, 그 외에 폐나 늑막의 양성종양 환자, 중격동종양 환자, 식도암 환자, 흉부 x-선 사진 및 기타 검사상 폐는 정상인 소량 객혈 환자였으며 각종 검사에서 전신질환 및 기타 감염성질환이 있었던 환자는 제외하였다. BAL 시행 전후에 기관지내시경으로 인한 합병증은 없었다.

2. BAL fluid의 성상

BAL fluid내 폐포대식세포의 세포수는 평균 $2.8 \pm 1.5 \times 10^7$ 이었고 세포활성도는 $93.7 \pm 2.4\%$ 이었다.

3. 여러가지 표면부착에 따른 과산화수소 분비량 변화

PS, FBS도포면, 젤라틴혼합면, A549세포단층에 부착시킨 폐포대식세포(n=7)는 과산화수소 분비능이 각각 8.78 ± 2.64 , 9.92 ± 2.77 , 5.95 ± 1.95 , 6.75 ± 1.60 nM/well/2hrs로서, 부유상태 세포의 과산화수소 분비능인 3.03 ± 1.39 nM/well/2hrs에 비해 젤라틴혼합면을 제외하고는 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p < 0.05, Figure 1).

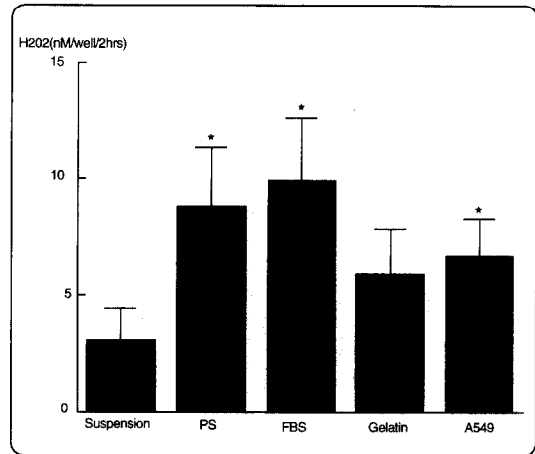


Figure 1. Adherence itself triggers hydrogen peroxide release from human alveolar macrophages(n=7, *:p<0.05). PS=plastic surface, FBS=fetal bovine serum-coated surface, A549=A549 cell monolayer

4. 여러가지 표면부착 상태에서 PMA, fMLP 자극에 의한 과산화수소 분비능 변화

PS, FBS도포면, 젤라틴혼합면, A549세포단층에 폐포대식세포(n=7)를 부착시킨 후 PMA로 자극했을 경우의 과산화수소 분비능은 각각 10.68 ± 2.78 , 11.14 ± 3.04 , 7.49 ± 2.05 , 9.28 ± 1.56 nM/well/2hrs이고, fMLP로 자극했을 경우는 각각 11.72 ± 3.42 , 12.14 ± 3.52 , 9.79 ± 3.02 , 9.75 ± 1.96 nM/well/2hrs로서, PMA나 fMLP 자극이 없는 무자극군에 비해 A549세포단층 부착시에만 PMA와 fMLP 자극시 동시에 통계적으로 유의한 증가를 보였다(p < 0.05, Figure 2).

5. 부유상태에서 PMA, fMLP 자극에 의한 과산화수소 분비능 변화

부유상태에서의 PMA나 fMLP 자극군은 과산화수소 분비능이 각각 6.85 ± 2.73 , 3.61 ± 1.63 nM/well/2hrs를 보여, PMA자극군은 무자극군에 비해 통계적으로 유의한 분비능 증가를 보이면서

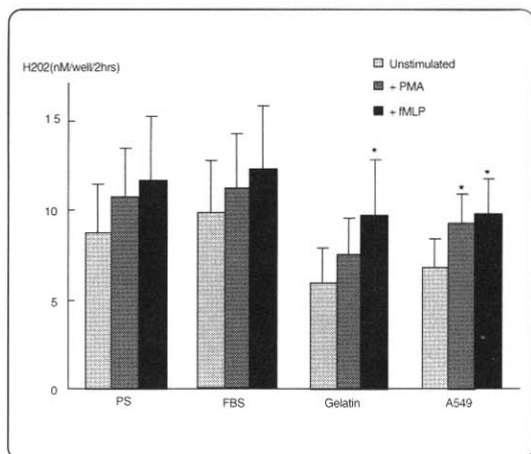


Figure 2. Only alveolar macrophages adhered to A549 cell monolayer are stimulated by both PMA and fMLP(n=7, *:p< 0.05). PS=plastic surface, FBS=fetal bovine serum-coated surface, A549=A549 cell monolayer, PMA=Phorbol myristate acetate, fMLP=N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

($p < 0.05$) 부착상태의 PMA자극군과 차이가 없는 반면에($p > 0.05$), fMLP자극군은 무자극군과 차이가 없으면서($p > 0.05$) 부착상태의 fMLP자극군과 비교하여 통계적으로 유의한 분비능 감소를 보였다($p < 0.05$)(Figure 3).

6. A549세포단층에 부착시킨 폐포대식세포에서 CHX, PT, CD18 mAb 전처치가 과산화수소 분비능에 미치는 효과

PMA와 fMLP 모두에서 적절한 반응을 나타낸 A549세포단층에 부착시킨 폐포대식세포를 CHX (n=6), PT(n=8), CD18 mAb(n=11)로 처리한 경우, CHX(무자극군 8.50 ± 1.92 , PMA자극군 9.68 ± 1.99 , fMLP자극군 9.96 ± 2.37 nM/well/ 2hrs) 나 PT(무자극군 5.45 ± 1.88 , PMA자극군 7.79 ± 2.19 , fMLP자극군 5.70 ± 1.95 nM/well/ 2hrs)전 처치군에서는 PMA에 의한 과산화수소 분비능 증가는 관찰되었으나($p < 0.05$) fMLP에 의한 과산화수소 분비능 증가는 보이지 않았으며 CD18 mAb(무자극군 6.96 ± 1.44 , PMA자극군 $8.06 \pm$

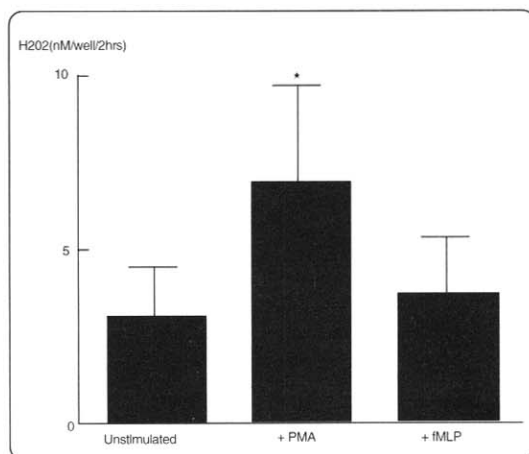


Figure 3. Only alveolar macrophages adhered to A549 cell monolayer are stimulated by both PMA and fMLP(n=7, *:p< 0.05). PMA=Phorbol myristate acetate, fMLP=N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

1.49, fMLP자극군 7.10 ± 1.50 nM/well/ 2hrs)전 처치군에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Figure 4, 5, 6).

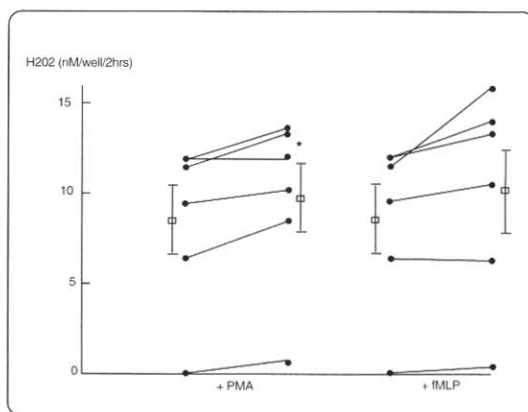


Figure 4. Cycloheximide inhibits fMLP-induced H₂O₂ release from alveolar macrophages adhered to A549 cell monolayer(* : p< 0.05). PMA=Phorbol myristate acetate, fMLP=N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.

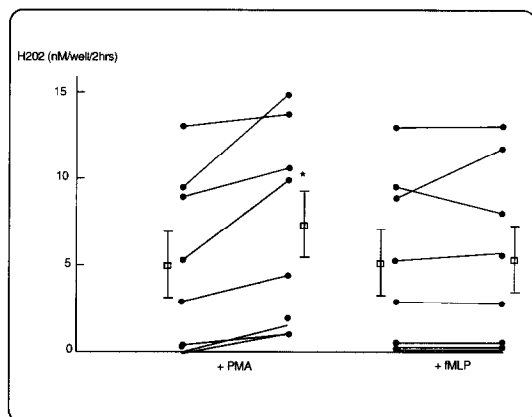


Figure 5. Pertussis toxin-treated human alveolar macrophages do not release more H_2O_2 by fMLP stimulation. (* : $p < 0.05$). PMA=Phorbol myristate acetate, fMLP=N-formyl-methionyl-leucyl-p henylalanine

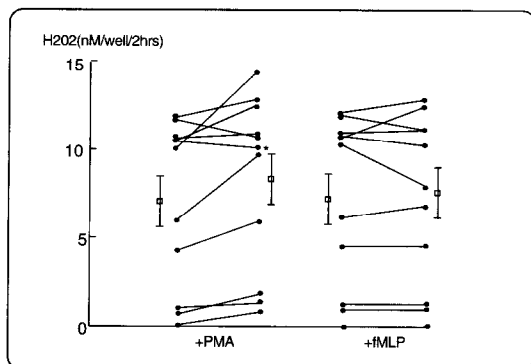


Figure 6. Anti-CD18 monoclonal antibody blocks fMLP-induced H_2O_2 production by human alveolar macrophages on A549 cell monolayer(* : $p < 0.05$). PMA=Phorbol myristate acetate, fMLP=N-formyl-methionyl-phenylalanine

고 찰

본 연구결과로 사람의 폐포대식세포도 호중구처럼 polystyrene과 같은 플라스틱 표면에 부착되면

다른 추가적 자극없이도 유리산소기 분비능이 증가하는 것과 같은 세포활성화가 이루어질 뿐만 아니라, 이런 상태에서는 PMA나 fMLP와 같은 강력한 자극물질에 의해서도 과산화수소 분비능이 더 증가하지 못한다는 것도 확인할 수 있었다. 이는 플라스틱표면 부착 자체가 상당히 강력한 자극효과를 가지고 있어 다른 자극을 해도 별 반응이 나타나지 않는다는 것을 의미한다. Russell¹³⁾도 대식세포가 외부물질에 접촉하면 식작용이 촉진되어 세포활성화가 이루어진다고 하였고 Merrill 등¹⁴⁾은 대식세포를 플라스틱에 부착시키면 IL-8 등의 분비가 촉진된다고 주장하여 단순한 표면접촉만으로도 대식세포의 활성화가 일어나는 것으로 알려져 왔다. 따라서 폐포대식세포를 Petri dish와 같은 플라스틱 표면에 부착시킨 상태에서 여러가지 조건을 주고 나타나는 유리산소기 분비능 변화로 세포기능을 해석하는 것은 옳지 않은 방법이라 할 수 있겠다. 기관지폐포세척액에서 가능한 한 호중구나 임파구 등과 같은 세포를 제거하는 방법으로는 플라스틱 부착법 외에 Percoll을 이용한 밀도구배원심침전법(density gradient centrifugation)이 있지만 어떤 방법으로도 폐포대식세포를 100% 순수하게 분리할 수는 없다고 알려져 있다¹⁵⁾. 본 실험의 부유세포군에서는 폐포대식세포 이외에 호중구나 임파구 등이 섞임으로써 부착세포군과 똑같은 세포구성이라 할 수는 없으나, 대상인을 선정하는 과정에서 정상으로 판정된 폐에서만 기관지폐포세척을 시행했기 때문에 기관지폐포세척액 내 세포구성상 적어도 90-95%가 이미 폐포대식세포이기¹⁶⁾ 때문에 큰 차이는 없을 것으로 생각된다. 설사 유리산소기를 훨씬 많이 분비하는 호중구가 부유세포군에 포함되어 있다고 하여도 부유세포군에서는 유리산소기 분비가 거의 없었으므로 부착세포군에서 측정된 유리산소기는 폐포대식세포에서 유래한 것이라고 할 수 있다. 결국 폐포대식세포를 분리하는 방법으로 가장 흔히 이용하는 방법인 표면부착법은 기저상태의 폐포대식세포를 얻는 실험방법으로는 적당한 방법이 아닌 것으로 생각된다.

폐포대식세포의 활성화 여부를 알 수 있는 지표로는 균 성장 억제도, 암세포 파괴도 등의 방법도 있지만 주로 세포로부터 분비되는 물질을 측정하는 것이 가장 보편적인데, 그 중에서도 유리산소기를 측정하는 것이 비용 측면이나 용이성에서 가장 흔히 이용되어 온 방법이다. 2개의 well이 있어야 한 가지 측정치가 계산되고 세포외로 분비된 부분만 측정되는 *superoxide* 측정에 비해, 과산화수소 측정은 well 하나로 측정이 이루어지고 세포 내에서 만들어진 부분도 측정이 이루어지므로¹⁷⁾ 본 실험과 같이 제한된 세포수로 여러 조건에서 실험을 하기에는 과산화수소 측정법이 적당하였다. 또한 그 측정시간을 2시간으로 정한 것은 제한된 수의 폐포대식세포를 가지고 활성화 여부를 알기 위해 필요한 시간이 최소한 2시간이었기 때문이다.

이와 같은 플라스틱 표면의 세포활성화 효과가 없는 표면 모델을 만들고자, 호중구에서 그 효과가 입증된⁷⁾ FBS 도포면을 이용해 보았으나 과산화수소 분비능은 전혀 억제되지 않았다. 그 이유로 생각할 수 있는 것은 첫째로 호중구의 생체내 환경은 혈청에 둘러싸여 있지만 폐포대식세포는 이미 혈관밖으로 나와 존재하는 세포이므로 혈청에 의해 부착이 오히려 증가하기¹⁸⁾ 때문일 수 있고 둘째로 호중구에서 FBS 도포면의 세포활성화 억제효과는 최대 60분까지만 지속되므로⁷⁾ 이 실험에서의 과산화수소 측정시간인 2시간 동안에는 세포활성화가 억제되지 않았을 수 있다. 또한, 변성된 고원질(denatured collagen)인 젤라틴을 사용한 이유는 생체내 세포간질의 교원조직과 유사한 성분이기 때문이었는데 부착에 의한 세포활성화가 젤라틴에 의해 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 젤라틴의 이런 효과는 자세한 기전은 모르지만 유리산소기 측정방법을 방해한다거나 생성된 유리산소기와 직접 반응하여 유리산소기를 없애주거나 혹은 부착분자가 관여하는 것은 아닌 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. A549 세포는 인체 폐포상피세포에서 유래한 폐암세포주로서 그 성장 및 생화학적 특성이 폐포상피세포와 상당히 유사한 것으로 알려져

^{20),21),22)} 있어 폐포상피세포가 필요한 실험모델에서 흔히 쓰이는 세포이다. 따라서 A549 세포는 폐포상피세포처럼 부착분자도 ICAM-1(inter-cellular adhesion molecule-1)이 기저상태에 이미 존재하면서 여러가지 세포동력물질에 의해 그 발현이 증가될²¹⁾ 뿐만 아니라 표면활성물질도 생성하는 세포이다. 폐포대식세포가 생체에서도 폐포상피세포로 이루어진 폐포내에 존재하므로 A549세포로 이루어진 세포단층은 이런 생체내 조건과 상당히 유사한 상황이라 할 수 있겠다. 그러나 이런 상황에서도 부착에 의한 세포활성화는 억제되지 않았다. 이는 아마도 생체내에서 폐포대식세포는 허적을 통해서 세포막의 일부분만이 폐포상피세포와 접촉하면서 호흡운동에 의하여 계속 움직이는데¹⁶⁾ 반하여, A549 세포단층과 폐포대식세포는 상당히 오랜 시간동안 부착이 이루어지기 때문이 아닐까 생각된다. A549 세포단층은 비록 부착 자체에 의한 세포활성화를 억제하지는 못했지만 PMA나 fMLP와 같은 추가적 자극에 모두 잘 반응하여 과산화수소 분비능이 증가하므로, 부착이 아닌 화학적 자극물질에 적절한 반응을 보이는 가장 좋은 표면으로 생각되어 다음 실험과정인 기전규명을 위한 실험모델에 이용하였다. 반면에 젤라틴 혼합면의 폐포대식세포는 PMA로 자극했을 경우 제대로 자극이 되지 않았고 그 기전도 불확실하며 생체내 상황도 A549 세포단층이 더 유사하므로 젤라틴 혼합면을 기전규명에 관한 실험에는 이용하지 않았다.

부유상태의 폐포대식세포는 부착상태의 세포에서처럼 PMA에 의해서 과산화수소 분비능이 증가하였지만 fMLP에 의해서는 자극이 이루어지지 않았다. fMLP는 세균에서 유래된 화학주성 펩티드(chemotactic peptide)로서 강력하게 부착을 유도하는 물질인데 폐포대식세포에는 이에 대한 특이 수용체가 있어²³⁾ 이 수용체와 G단백 경로가 연결되어 세포내로 신호전달이 이루어지는 것으로 알려져 있다³⁾. 부유상태에서는 자극이 일어나지 않았다는 것은 부착 현상이 fMLP에 의한 과산화수소 분비자극에 어떤 역할을 한다는 것을 시사하는

데, Nathan^{7,8)}도 호중구에서 세포동력물질이나 화학주성인자에 의한 유리산소기 분비가 부착에 의해 상승되고 여기에 CD11/CD18 부착분자가 관여하고 있다고 주장하여 폐포대식세포에서도 이 주장에 합당한 결과를 얻었다고 생각된다. 반대로 PMA에 의한 자극효과는 부착 여부에 관계없이 나타나는 것으로 보아 부착분자와의 관련성이 적을 것으로 생각된다.

A549 세포단층에 부착시킨 폐포대식세포를 PMA나 fMLP로 자극하면서 단백질합성 억제제인 cycloheximide, fMLP 수용체에 연결된 G단백경로를 차단하는 백일해독소, 세포막에 발현된 β_2 integrin을 차단하는 항CD18단세포항체로 처리한 경우 모두에서 fMLP에 의한 자극효과는 모두 차단되었지만 PMA에 의한 자극은 전혀 영향받지 않았다는 사실은 폐포대식세포에서의 fMLP에 의한 과산화수소 분비는 특이 수용체를 통한 G단백경로를 경유하고 세포내 정보전달은 새로운 단백질합성이 관여하며 여기에는 β_2 integrin이 연관되어 있다는 것을 알 수 있었다. 반면에 PMA는 세포내에 존재하는 protein kinase C에 직접 작용하므로³⁾ 이런 차단물질에 의해 과산화수소 분비가 영향받지 않게 된다는 사실을 확인할 수 있었다. 폐포대식세포의 대부분이 혈액의 단핵세포에서 유래된 세포이므로 혈관내에서 간질조직을 거쳐 폐포까지 이동해 오는 도중에 이미 부착분자를 모두 사용하여 부착분자를 더 이상 유도해 낼 수 없고²⁴⁾, 기저상태의 A549 세포단층과 폐포대식세포 사이의 부착정도는 CD18에 대한 단세포항체로는 억제되지 않지만 종양괴사인자(Tumor necrosis factor)로 24시간동안 자극하여 A549세포의 ICAM-1 발현을 증가시킨 경우에는 항CD18 단세포항체로 부착이 일부 억제된다는 보고¹¹⁾로 볼 때, 본 실험에서 PMA나 fMLP로 자극받지 않은 폐포대식세포의 과산화수소 분비능이 항CD18 단세포항체로 억제되지 않는 것을 이해할 수 있다. 결국 두 세포사이의 결합은 부분적으로는 β_2 integrin에 의존하지만 완전히 β_2 integrin에 의해서만 이루어지는 것이 아니라 다른 부착분자도 관

여할 것으로 생각된다.

본 실험의 대상인 사람의 폐포대식세포는 그동안 많은 연구가 진행된 호중구나 단핵세포에 비해 부착분자의 분포와 역할도 이제 겨우 밝혀지기 시작하는 단계이다. β_2 integrin이 폐포대식세포에서 유리산소기 분비를 비롯한 방어기전에 관여한다는 사실은 폐염증성 질환에서 부착분자의 역할에 대한 보다 많은 연구가 필요하다는 것을 의미하며, 향후 이런 연구결과를 토대로 부착분자에 대한 항체 등을 이용한 치료에도 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

식세포인 호중구나 단핵세포는 생체의실험에 사용하기 위한 세포분리법인 플라스틱 표면부착만으로도 세포활성화가 일어나 이후의 실험결과에 영향을 주고 이 과정에 부착분자가 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 폐의 주된 면역세포인 폐포대식세포도 대부분 플라스틱 표면부착에 의해 세포를 분리하므로 사람의 폐포대식세포가 표면부착 자체에 의해 활성화되는지 알아보고 세포활성화에 부착분자와 같은 기전이 관여하는지 밝히기 위해 적어도 한 쪽 폐가 정상인 사람에서 기관지폐포세척술을 통해 얻은 폐포대식세포를 대상으로 표면부착이 미치는 영향을 과산화수소 분비량 측정으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 폐포대식세포는 플라스틱 표면에 부착되면 부착 자체에 의해 과산화수소 분비능이 증가하고 이런 상태에서는 PMA나 fMLP와 같은 추가적인 화학자극물질에 의해 과산화수소 분비가 증가되지 않았다.
- 2) 여러가지 표면중 A549세포단층에 부착될 경우에만 이후의 PMA와 fMLP자극 모두에 의해 과산화수소 분비가 증가하였다.
- 3) PMA는 세포 부착여부에 관계없이 과산화수소 분비를 자극하지만 fMLP는 폐포대식세포가 표면에 부착된 상태에서만 자극효과가 나타났고 이런 부착세포에서의 fMLP에 의한 과산화수소 분비

효과는 단백질합성억제제인 cycloheximide, G단백차단제인 백일해독소와 β_2 integrin 부착분자에 대한 항체인 항CD18 단세포항체 3가지 모두에 의해 차단되었다.

이상의 결과로 사람의 폐포대식세포는 플라스틱 표면 부착 자체에 의해 활성화되므로 부착 이후의 자극물질에 대한 효과가 반감되지만 폐포상피세포와 같은 생물학적 표면에 부착될 경우에는 이후의 세포자극에 민감하게 반응한다는 것을 알 수 있었고, PMA는 세포 부착여부에 관계없이 세포를 자극하는 반면 fMLP는 세포 부착상태에서만 자극효과가 나타나며 이런 부착세포에서의 fMLP에 의한 산소유리기 자극효과는 G단백결합 수용체를 통한 새로운 단백질합성 과정으로 이루어지면서 β_2 integrin을 통한 폐포대식세포와 폐포상피세포의 부착에 의존하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Brieland J, Kunkel R, Fantone J. Pulmonary macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 135:1300-6, 1987.
- Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation : oxidants, proteinase, and cationic proteins. *J Clin Invest.* 79:669-74, 1987.
- Crystal RG, West JB. The lung : scientific foundations. p527-38, New York, Raven Press, 1991.
- Myrvik QN, Leake ES, Fariss B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit : a technique to procure them in a high state of purity. *J Immunol.* 86:128-36, 1961.
- Finley TN, Swenson EW, Curran WS, Haber GL, Ladman AJ. Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung diseases. *Ann Intern Med.* 66:651-8, 1967.
- Herscovitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A. Manual of macrophage methodology : collection, characterization, and function. p23-30, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc., 1981.
- Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces : Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest.* 80:1550-60, 1987.
- Nathan CF. Respiratory burst in adherent neutrophils : triggering by colony- stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood.* 73:301-6, 1989.
- Shappell SB, Toman C, Anderson DC, Taylor AA, Entman ML, Smith CW. Mac-1(CD11/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immunol.* 144:2702-11, 1990.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346:425-34, 1990.
- Albert RK, Embree LJ, McFeely JE, Hickstein DD. Expression and function of β_2 integrins on alveolar macrophages from human and nonhuman primates. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:182-9, 1992.
- Homan-Muller J, Weening R, Ross D. Production of hydrogen peroxide by phagocytizing human granulocytes. *J Lab Clin Med.* 141:198-207, 1975.
- Russell S. Stimulate the phagocyte. *Immunol Today.* 7:347-9, 1986.
- Merrill WW, Naegel GP, Matthay RA, Reynolds HY. Alveolar macrophage- derived chemotactic factor : kinetics of in vitro production and partial characterization. *J Clin Invest.* 65:268-76, 1980.
- Toews GB. Macrophages. in Pulmonary cell biology : practical issues. California, American Thoracic Society Meeting. May, 1991.
- Anna F, Cohn Z. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol.* 60:353-69, 1986.
- Pick E. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enz.* 132:407-21, 1986.
- McGowan SE, Heckman JG. Mechanisms of serum-enhanced adhesion of human alveolar macrophages to epithelial cells. *Lung.* 169:215-26, 1991.
- Williams AJ, Cole PJ. In vitro stimulation of

- alveolar macrophage metabolic activity by polystyrene in the absence of phagocytosis. *Br J Path.* **62**:1-7. 1981.
- 20) Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer.* **17**:62-70, 1976.
 - 21) Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. *J Immunol.* **141**:1665-9, 1988.
 - 22) Wellicome SM, Thornhill MH, Pitzalis C, Thomas DS, Lanchbury JS, Panayi GS et al. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J Immunol.* **144**:2558-65, 1990.
 - 23) aniele RP, Diamond MS, Holain A. Demonstration of a formyl peptide receptor on lung macrophages : correlation of binding properties with chemotaxis and release of superoxide anion. *Am Rev Respir Dis.* **126**:274-80, 1982.
 - 24) Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest.* **80**:535-44, 1987.