

□ 원      저 □

## 고농도의 산소에 노출시킨 쥐의 기관지폐포세척액내 호중구 화학주성활성화도

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

송정섭 · 이숙영 · 문화식 · 박성학

= Abstract =

### Neutrophil Chemotactic Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluid of the Rats Exposed to Hyperoxia

Jeong Sup Song, M.D., Sook Young Lee, M.D.,  
Wha Sik Moon, M.D., Sung Hak Park, M.D.

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

**Background** : An excessive accumulation of neutrophils in lung tissue has been known to play an important role in mediating the tissue injury among the adult respiratory distress syndrome, idiopathic pulmonary fibrosis and cystic fibrosis by releasing toxic oxygen radicals and proteolytic enzymes. Therefore, it is important to understand a possible mechanism of neutrophil accumulation in lung tissue. In many species, exposure to hyperoxic stimuli can cause changes of lung tissues very similar to human adult respiratory distress syndrome and neutrophils are also functioning as the main effector cells in hyperoxic lung injury.

The purpose of the present study was to examine whether neutrophils function as a key effector cell and to study the nature of possible neutrophil chemotactic factors found in bronchoalveolar lavage fluid from the hyperoxia exposed rats.

**Methods** : We exposed the rats to the more than 95% oxygen for 24, 48, 60 and 72 hours and bronchoalveolar lavage(BAL) was performed. Neutrophil chemotactic activity was measured from the BAL fluid of each experimental

groups.

We also evaluated the molecular weight of neutrophil chemotactic factors using fast performance liquid chromatography and characterized the substances by dialyzer membrane and heat treatment.

### Results :

1) The neutrophil proportions in bronchoalveolar lavage fluid began to rise from 48 hours after oxygen exposure, and continued to be significantly increased with exposure times.

2) Chemotactic index for neutrophils in lung lavages from rats exposed to hyperoxia was significantly higher in 48 hours group than in control group, and was significantly increased with exposure time.

3) No deaths occurred until after 48 hours of exposure. However, mortality rates were increased to 33.3 % in 60 hours group and 81.3 % in 72 hours group.

4) Gel filtration using fast performance liquid chromatography disclosed two peaks of neutrophil chemotactic activity in molecular weight of 104,000 and 12,000 daltons.

5) Chemotactic indices of bronchoalveolar lavage fluid were significantly decreased when bronchoalveolar lavage fluid was treated with heat (56°C for 30 min or 100°C for 10 min) or dialyzed (dialyzer membrane molecular weight cut off : 12,000 daltons).

**Conclusion :** These results suggested that the generation of neutrophil chemotactic factor and subsequent neutrophil influx into the lungs are playing an important roles in hyperoxia-induced acute lung injury. Neutrophil chemotactic factor in the lung lavage fluids consisted of several distinct components having different molecular weight and different physical characteristics.

---

**Key Words :** Hyperoxia, Neutrophil chemotactic factor, Acute lung injury

## 서론

건강한 사람의 폐나 기도에는 호중구가 거의 존재하지 않으며 말초혈액의 호중구가 폐로 이동하는 것은 여러가지 폐의 호중구 유주인자에 기인한다. 비정상적으로 많은 호중구가 폐에 침착하거나, 식작용이 불가능할 정도의 큰 물질에 의해 자극을 받으면 호중구는

세포외로 elastase, collagenase, myeloperoxidase와 같은 효소, 반응성 산소대사물, arachidonate 대사산물 등 여러가지 독성 물질을 분비하여 조직에 손상을 입힌다<sup>1)</sup>.

성인형 호흡곤란 증후군, 폐기종, 원발성 폐섬유화증 및 석면폐증 등의 호흡기 질환의 발병 기전에 활성화된 호중구는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 따라서 말초혈액의 호중구가 폐의 간질조직이나 폐포

내로 이동하는 기전을 규명하는 것은 이들 질환의 병인을 이해하고 치료하는데 중요하며 호중구가 혈관 내피세포를 지나 폐로 이동하는데에는 적어도 두가지 기전이 관여한다고 알려져 있다. 즉, 혈관 내피세포를 경계로 호중구 화학주성인자의 농도 차이에 의한 이동과 화학주성인자 없이 tumor necrosis factor(TNF)나 interleukin-1(IL-1)과 같은 cytokine에 의해 내피세포가 활성화되어 접착 분자를 표현하고 호중구의 ligand와 반응하여 호중구를 혈관외로 이동시키는 것이다<sup>3)</sup>. 하부기도에서 호중구 화학주성인자로 지금까지 알려진 것은 C5a, leukotriene-B4 (LTB4), N-formyl-methionidyl-phenylalanin(fMLP)와 interleukin-8(IL-8)등이 있으며, 이외에도 폐포대식세포에서 분비되는 여러가지 인자나, 손상 받은 조직 또는 콜라겐등이 보고되고 있다<sup>4-9)</sup>. 급성 폐손상은 동물에서 내독소, 면역복합체, 고농도 산소등으로 유발될 수 있는데 역시 하부기도에 호중구의 침윤이 특징적으로 나타난다<sup>10-12)</sup>. 호중구의 침윤을 일으키는 화학주성인자의 종류를 알아보고자 폐포대식세포를 분리한후 여러 물질로 자극하여 폐포대식세포에서 분비되는 호중구 화학주성인자를 분석한 결과가 많이 보고되고 있지만<sup>13-18)</sup> 호중구 화학주성인자는 폐포대식세포 뿐 아니라 하부기도에 존재하는 다른 세포에서도 분비될 수가 있고 손상받은 조직 자체가 화학주성능을 나타낼 수도 있다.

본 연구에서는 흰쥐를 고농도의 산소에 노출시켜 급성 폐손상을 일으킨 후 기관지폐포 세척액내에서 호중구와 호중구에 대한 화학주성능이 증가하는지를 관찰하고, 이러한 화학주성인자의 분자량을 측정하고 열처리 후의 변화를 관찰함으로써 호중구 화학주성인자의 특성을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 및 고농도 산소 노출

수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 이용하였으며 몸무게는 250-300 g이었다. 96-98% O<sub>2</sub>, 0.5% CO<sub>2</sub>, 22-25°C, 60-80% 습도로 유지시킨 oxygen chamber에 쥐를 노출시켰다. 노출 시간은 24, 48, 60, 72 시간 등 4군으로 나누어 각각 6, 6, 12, 16 마리로 하였는데 이렇게 각 군의 마리수가 달라진 것은 60시간 이상에서 사망율이 급격히 증가한 때문이었고 대조군은 대기중에 노출시킨 6 마리로 하였다.

### 2. 기관지 폐포세척

흰쥐에 sodium pentotal 60 mg/kg을 복강내 주사하여 마취한 후, 기관을 열고 polyethylene catheter를 삽입한 후 멸균된 Hank's balanced salt solution (HBSS) 10 ml를 넣은 후 주사기로 흡입하기를 5회 반복하여 기관지폐포세척액을 얻었다. 기관지폐포세척액을 거어조로 여과하여 불순물을 제거한 후 원심분리하여 상층액을 positive pressure ultrafiltration(Amicon Corp., U.S.A.)으로 농축시킨 후 -70°C에 보관하였다. 세포 침전물은 2회 HBSS로 세척 후 총 세포수를 세고 세포의 농도를  $1 \times 10^6$ /ml로 맞춘 후 이중 200  $\mu$ l 취하여 cytocentrifuge (Shandon Cytospin 2, U.S.A.)하고 Diff-Quick 염색으로 감별 세포계산을 하였다.

### 3. 호중구의 준비

호중구는 건강인의 말초혈액에서 분리하였다. 헤파린 처리한 정맥혈에 6% dextran을 가하여 잘 혼합하고 약 1 시간 실온에 방치하였다. 상층액을 Ficoll-Hypaque 용액에 중층시킨 후 원심분리하여 상층액을 버리고 적혈구는 증류수로 제거한 후 HBSS에 호중구의 농도를  $2 \times 10^6$ /ml로 조절하였다.

### 4. 호중구의 화학주성능 측정

modified Boyden chamber 방법으로 측정하였다. 즉, Neuro-probe 48 well chemotactic chamber를 이용하여 바닥의 plate에는 기관지폐포세척액 또는 양성 대조군으로 fMLP ( $10^{-6}$  M), 음성 대조군으로 HBSS를 각각 25  $\mu$ l씩 넣었다. 구멍의 크기가 3 $\mu$ m인 polycarbonate filter paper를 덮은 후 silicon gasket을 씌우고 위의 plate에는 48  $\mu$ l의 호중구 ( $2 \times 10^6$ /ml HBSS)를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양 시켰다. 그후 filter paper는 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척후 methanol로 고정하여 Diff-Quick 염색하였다. 각각의 표본은 삼중검색(triplicate)하여 현미경시야(x 400)에서 10군데 호중구를 세어 합하였고 화학주성능은 다음 식에 의하여 chemotactic index(CI)로 비교하였다.

$$CI = \frac{\text{mean number of neutrophil migration by(BALF-HBSS)}}{\text{mean number of neutrophil migration by(fMLP-HBSS)}} \\ (\text{BALF: bronchoalveolar lavage fluid})$$

## 5. 기관지폐포세척액의 열처리 및 dialysis

기관지폐포세척액을 56°C에서 30분, 또는 100°C에서 10분 열처리한 후, 4°C에서 냉각시키고 7000 g에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 얻어 호중구에 대한 화학주성능을 측정하였다.

한편 분자량 12,000 dalton 이하의 물질을 걸러낼 수 있는 cellulose membrane (Spectra/P20 membrane; Spectrum Medical Industries, U.S.A.)에 기관지폐포세척액을 넣은 후 membrane 내에 남아 있는 세척액으로 호중구에 대한 화학주성능을 측정하였다.

## 6. Fast performance liquid chromatography(FPLC)

기관지폐포세척액을 FPLC(Pharmacia,

Sweden)를 이용하여 분자량의 크기에 따라 분리하였다. elution buffer로 PBS를 사용하여 Superose 12 column(Pharmacia, Sweden)에 기관지폐포세척액 2ml를 넣은 후, 0.5ml/min 속도로 조절하고 2 ml씩 받았다. 각 fraction의 OD는 280 nm에서 측정하였다.

## 7. 통계처리

모든 연속변수는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈다. 변수간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test와 Analysis of Variance(ANOVA)를 적용하였으며 Scheffe의 다중비교를 하였다. 산소 노출 시간에 따른 호중구 및 호중구 화학주성능의 변화는 General Linear Model(GLM)로 분석하였다.

## 성 적

### 1. 고농도 산소에 노출된 쥐의 기관지폐포 세척액내 염증세포의 분포

대조군의 쥐는 기관지폐포세척액내 대식세포가  $88.3 \pm 5.5$  %, 임파구가  $9.5 \pm 6.8$  %로 호중구는 관찰되지 않았다. 24시간의 고농도 산소 노출군에서도 호중구가 관찰되지 않았으나 48시간 노출군에서  $37.8 \pm 28.5$  %, 60시간 노출군에서  $47.3 \pm 13.1$  %, 72시간 노출군에서  $56.6 \pm 6.4$  %로 노출시간이 길수록 유의하게 호중구의 백분율이 증가하는 경향을 보였다. 임파구와 호산구의 백분율은 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었으며 노출시간에 따른 차이도 없었다(Table 1).

### 2. 기관지폐포세척액의 호중구에 대한 화학주성능(CI)

대조군의 CI는  $8.9 \pm 4.5$  이었으며 24시간 고농도 산소에 노출시킨 군은  $26.3 \pm 7.0$ 로 증가

Table 1. Effect of exposure to hyperoxia in rats on the differential count of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid

Group	Macrophage	Neutrophil	Lymphocyte	Eosinophil
Control	88.3 ± 5.4	0	9.5 ± 6.8	0
24 hrs	85.3 ± 9.5	0.3 ± 0.8	11.0 ± 7.6	0
48 hrs	62.1 ± 2.9	37.8 ± 28.5	0	0
60 hrs	52.0 ± 12.0	47.2 ± 13.0	0	0
72 hrs	39.4 ± 0.8	56.6 ± 6.4	4.0 ± 3.5	0

Table 2 Effect of exposure to hyperoxia in rats on the neutrophil chemotactic activities in bronchoalveolar lavage fluid

Group	Control	24 hrs	48 hrs	60 hrs	72 hrs
CI*	8.9 ± 4.5	25.3 ± 7.0	72.9 ± 12.9	86.7 ± 11.6	98.5 ± 7.2

\* CI : chemotactic index

하는 경향을 보이다가 48시간 노출군은 72.9 ± 12.9, 60시간 노출군은 86.7 ± 11.6, 72시간 노출군은 98.5 ± 7.2로 노출 시간이 길수록 기관지폐포세척액의 호중구에 대한 화학주성능도 증가하였다(P<0.05)(Table 2).

### 3. 고농도산소 노출 시간에 따른 사망률

24시간 및 48시간 노출군에서는 사망한 쥐가 없었으나, 60시간 노출군은 12마리중 4마리가 사망하여 33.3 %의 사망률을 보였으며, 72시간 노출군은 16마리중 13마리가 사망하여 81.25 %의 높은 사망률을 보였다(Table 3).

Table 3. Effect of exposure to hyperoxia in rats on their mortality

Group	n	Survival	Death	Mortality(%)
Control	6	6	0	0
24 hrs	6	6	0	0
48 hrs	6	6	0	0
60 hrs	12	8	4	33.3
72 hrs	16	3	13	81.3

### 4. 호중구 화학주성인자의 분자량

기관지폐포세척액을 FPLC를 이용하여 분자량에 따라 분리하고, 각 fraction에서 호중구에 대한 화학주성능을 측정하였는데 elution time 22분과 38분의 fraction에서 CI가 75.46, 70.44로 상승되어 있었는데, 이는 분자량 104,700과 12,000 dalton에 해당되었다(Fig. 1).

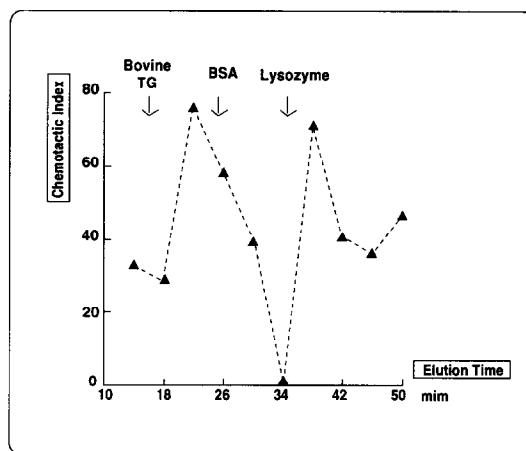


Fig 1. Molecular sieve chromatographic profile of NCF in BAL fluid from hyperoxia exposed rats.

Table 4. Change of chemotactic index in bronchoalveolar lavage fluid after heat treatment or dialysis

Group	Control n=17	56°C, 30min n=8	100°C, 10min n=8	Dialysis n=6
48 hrs	72.9±12.8	30.3±5.6	44.8±10.1	24.6±12.5
60 hrs	86.7±11.6	60.8±2.2	72.5± 1.7	56.9±10.5
72 hrs	98.6± 7.2	74.1±1.3	88.1	.
Total	84.5±13.6	52.7±19.6	60.0±17.9	40.8±20.5

## 5. 기관지폐포세척액의 열처리 및 dialysis 후 호중구 화학주성능의 변화

모든 실험군의 기관지폐포세척액의 평균 CI는 84.5±13.6 이었고 이를 56°C에 30분간 열처리하였을 때는 52.7±19.6으로 열처리전에 비하여 평균 62.4%로 감소하였고 100°C로 10분간 처리하였을 때는 CI가 60±17.9로 열처리전의 71%로 감소하였다(Table 4).

## 고 찰

호중구는 여러 가지 원인에 의하여 급성 폐손상이 유발된 경우 중요한 작동세포로 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있으며 실제로 동물에서 내독소, 면역복합체 또는 고농도 산소 등으로 급성 폐손상을 유발시켰을 때 하부기도에 호중구가 증가하고<sup>10-12)</sup> 토끼에서 고농도 산소를 흡입시켜 급성 폐손상을 유발하였을 때 폐혈관의 투과성이 증가하여 폐부종이 유발되며 그 정도는 혈액내 호중구의 수와 연관성이 있다고 하였다<sup>18)</sup>. 본 연구에서는 흰쥐를 95% 이상의 고농도 산소에 노출시킬 때 약 48시간 후부터 기관지폐포세척액내 호중구의 숫자 및 호중구에 대한 화학주성능이 유의하게 증가하였으며, 이러한 현상은 고농도 산소 노출 시간이 길수록 현저하였다. Shasby들<sup>19)</sup>은 동물 실험에서는 급성 폐손상을 일으키는데 다른 요인도 많기 때문에 호중구가 어느 정도로 중요한 역할을 하는지 알기 위하여 토끼의 폐를 분리하여 생리적

식염수로 관류시키면서 호중구와 phorbol myristate acetate(PMA)를 폐에 주입시 폐의 무게가 증가하고 세척액내 알부민의 농도가 증가함을 관찰하여 호중구가 급성 폐손상에 중요한 역할을 함을 증명하였다.

따라서 말초혈액의 호중구가 어떻게 폐로 이동하는가를 규명하는 것은 매우 중요하다. 폐에서 호중구에 대한 화학주성능이 있는 것으로 잘 알려진 것은 C5a, fMLP, LTB<sub>4</sub>, 콜라겐 등이 있으며, 이중 LTB<sub>4</sub>는 폐포대식세포등에서 분비되는 저분자량의 지방인데, 폐포대식세포는 LTB<sub>4</sub> 뿐 아니라 좀더 큰 분자량의 단백질로 이루어진 호중구 화학주성인자를 분비하는 것으로 알려져 있다. neutrophil activating peptide-1(NAP-1)/IL-8은 잘 알려진 호중구에 대한 화학주성인자로 IL-1, TNF, LPS 등으로 자극했을 때 여러 가지 세포에서 분비되며 분자량은 약 8,000 dalton 이다<sup>6,7)</sup>. 임상적인 예로 기관지폐포세척액에서 호중구의 증가가 관찰되는 성인형 호흡곤란 증후군의 경우 기관지폐포세척액내 IL-8이 증가되어 있고 이들은 주로 폐포대식세포에서 분비되며<sup>21)</sup> 원발성 폐섬유화증 환자에서도 만성경과를 앓는 환자들은 기관지폐포세척액내 IL-8의 증가가 없었지만 아급성으로 진행되는 환자에서는 IL-8의 증가가 현저하였다<sup>22)</sup>.

Sylvester들<sup>7)</sup>은 NAP-1/IL-8과 LTB<sub>4</sub>가 LPS로 자극된 폐포대식세포에 의해 나타나는 호중구에 대한 화학주성능을 모두 설명할 수 없다고 하였으며 이는 다른 화학주성인자

의 존재를 시사한다. Goodman들<sup>17)</sup>은 돼지의 폐포대식세포를 LPS로 자극하여 분자량이 10,000 dalton인 NAP-1과 구조적으로 비슷한 alveolar macrophage derived neutrophil chemotactic factor-1(AMCF-1)뿐 아니라 혈소판에서 분비되는 것으로 알려진 NAP-2<sup>22)</sup>와 비슷한 구조를 갖는 AMCF-II를 발견하였다. 또한 폐포대식세포에 대한 자극 물질의 종류나 자극 시간에 따라 조금씩 다른 특징을 갖는 호중구 화학주성인자가 보고되고 있다. 예를들면 Hunninghake들은 사람 폐포대식세포를 미생물 또는 면역 복합체로 자극했을 때 400-600 dalton의 지방과 비슷한 성질을 갖는 성분의 호중구 화학주성인자가 분비된다고 하였고<sup>13)</sup>, Merrill들은 면역글로부린과 zymosan으로 사람 폐포대식세포를 자극 후 10,000과 1,400 dalton의 호중구 화학주성인자를 관찰하였다<sup>14)</sup>. 그외에도 Laskin들은 콜라겐으로 쥐의 폐포대식세포를 자극하여 열에 약한 6,000-7,000 dalton의 호중구 화학주성인자를 분리하였다<sup>16)</sup>. 뿐만 아니라 같은 자극 물질이라도 자극하는 시간에 따라 분비되는 호중구 화학주성인자가 다른 경우도 있다. A23187 또는 zymosan으로 폐포대식세포를 자극하면 LTB<sub>4</sub>가 분비되고<sup>24)</sup>, LPS로 자극하면 NAP-1이 분비되며<sup>7)</sup> A23187은 LTB<sub>4</sub>만 분비시키지만 LPS와 zymosan은 LTB<sub>4</sub>와 NAP-1의 분비를 모두 자극하는데 전자는 24시간내 초기에 후자는 후기에 분비된다는 보고도 있다<sup>25)</sup>.

본 연구에서는 기관지폐포세척액내 존재하는 호중구에 대한 화학주성인자의 특성을 알아보고자 분자량과 열에 대한 내성을 실험하였다. FPLC로 분리한 기관지폐포세척액내에서 분자량 104,700과 12,000 dalton에서 호중구에 대한 화학주성능이 상승되어 있었고, dialyzer membrane으로 기관지폐포세척액내 12,000 dalton 정도의 분자량 이하인 물질을 제거한 후에는 dialysis 전에 비해 호중구에 대한 화학주성능이 유의하게 감소하여 고농

도의 산소에 48시간과 60시간 노출군에서 dialysis 전의 화학주성능의 33.7 %와 65.6 %를 나타냈다. 지금까지 보고된 폐포대식세포에서 분비되는 호중구 화학주성인자의 분자량은 400-10,000 dalton 정도인데<sup>13-18)</sup>, 본 연구에서는 기관지폐포세척액내에 10,000 dalton 이하의 저분자량 및 12,000 dalton 이상의 고분자량의 호중구 화학주성인자가 있음을 관찰할 수 있었다.

56℃에서 30분간 처리하면 보체가 불활성화되고, 100℃에서 10분간 처리하면 기타 다른 단백질이 변성하는데, 본 연구에서 56℃에서 30분간 처리 후에 호중구에 대한 화학주성능이 유의하게 감소하였으며 48시간과 60시간 및 72시간 노출군에서 열처리전 화학주성능의 41.5 %와 70.1 % 및 75.2 %로 감소하여 이미 알려진 C5a같은 보체가 호중구의 화학주성인자로 일부 관여하였음을 시사한다. 100℃에서 10분간 처리후에도 유의하게 감소하여 48시간과 60시간 노출군에서 열처리전 화학주성능의 61.5 %와 83.6 %이었다. LTB<sub>4</sub>는 열에 안정하며, 그동안 보고된 폐포대식세포에서 분비되는 호중구 화학주성인자의 열에 대한 안전성은 다양한데<sup>13,16)</sup> 본 연구에서의 기관지폐포세척액내에는 열에 안전한 LTB<sub>4</sub>와 같은 성분과 열에 활성도를 소실하는 C5a 같은 물질이 같이 존재할것으로 생각된다.

고농도 산소 노출에 의한 사망률은 60시간 노출군에서는 33.3 %, 72시간 노출군에서는 81.25 %로 거의 대부분의 쥐가 사망하였다. 1기압하에서 60 % 이상의 농도는 고농도 산소(hyperoxia)로 조직 손상을 일으킬 수 있다. Sprague-Dawley rat의 고농도 산소 노출에 따른 반응을 보면, 쥐에서 100% 산소를 24시간 노출 시키면 형태적 변화는 없지만 기관지폐포세척액에 생화학적 변화가 관찰되며<sup>26,27)</sup>, 48시간 노출시키면 폐부종과 기관지폐포세척액내 단백질의 증가가 관찰된다<sup>28,29)</sup>. 대개 100 % 산소에 48시간 이상 노출되면

급성 폐손상이 오는데 4일이상 노출 시킬 경우에는 거의 사망하는 것으로 알려져 있다. 보고자에 따라 쥐에서 고농도 산소 노출에 따른 사망률에 차이가 있는데, 이것은 얼마나 일정한 농도의 고농도 산소에 노출시켰는가와 대상 쥐의 나이가 관계한다. 저연령의 쥐가 고연령의 쥐에 비해 고농도 산소에서의 생존이 길어서, 30일된 쥐는 1 기압의 산소에서 2-3일 노출된 경우 심한 폐손상은 오지만 수주 동안 생존하는데 반해, 60일된 쥐는 1 기압의 고농도 산소에서 3일 이내에 사망하는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>. 이러한 차이는 superoxide dismutase와 같은 anti-oxidants의 출현 속도나 세포의 성장 및 회복의 차이에 기인한다<sup>31)</sup>.

결론적으로 쥐에 고농도의 산소를 노출시켰을 때 60시간부터 사망률이 급격히 증가하고 기관지폐포세척액내 호중구는 48시간부터 점차 증가하여 72시간에 최고치에 달하고 호중구에 대한 화학주성인자도 같은 경향을 보였으며 이러한 호중구 화학주성인자는 분자량이 10,000 dalton 이하인 것부터 12,000, 104,700 dalton까지 다양하고 그들의 열에 대한 반응도 일정하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 다양한 특성 및 분자량을 보인 상기 물질들이 폐의 어떤 염증 세포에서 분비되었으며 구체적으로 무엇인지를 규명하는 것이 고농도 산소에 의한 급성 폐손상의 기전을 이해하고 나아가 치료에 응용이 될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

**연구배경 :** 호중구는 성인형 호흡곤란증후군, 폐기종 및 원발성 폐섬유화증 등 여러 폐질환에서 과도하게 폐에 침착되어 여러가지 독성 물질을 분비하여 조직 손상을 일으키는 것으로 알려져 있어, 말초혈액 호중구가 폐포나 간질조직으로 이동하는 기전을 이해하는 것은 매우 중요하다.

저자들은 급성 폐손상의 동물실험모델로

흰쥐에 고농도 산소를 투여하여 급성 폐손상을 일으킨 후 기관지폐포세척액내 호중구 및 호중구에 대한 화학주성능이 증가하였는지 그리고 이러한 변화가 고농도산소 노출 시간에 따라 차이가 있는지를 관찰하였으며, 또한 호중구 화학주성인자의 분자량 및 물리적 특성을 알아보았다.

**방 법 :** 고농도산소를 투여할수 있는 기구(hyperoxic chamber)를 만들어 95%이상의 산소를 흰쥐에 24, 48, 60, 72시간 투여하였으며 각군의 쥐에서 기관지폐포세척을 실시하여 얻은 세척액내 호중구의 증가여부를 관찰하였고 호중구의 화학주성능은 정상인의 말초혈액내 호중구를 대상으로 Neuroprobe 48 well chemotactic chamber를 이용하여 계산하였다. 또한 기관지 폐포세척액을 열처리하거나 cellulose membrane에 filter 시켰을 때 화학주성능의 변화여부를 관찰하였고 FPLC(Fast performance liquid chromatography)로 분자량을 측정하였다.

**결 과 :** 1) 기관지폐포세척액내 호중구는 대조군에 비해 고농도 산소 노출 48시간에서부터 증가하여 노출 시간이 길수록 유의하게 증가하였다.

2) 기관지폐포세척액의 호중구 화학주성능(chemotactic index)도 대조군에 비해 고농도 산소 노출 48시간에부터 유의하게 증가하기 시작하여 노출 시간이 길수록 유의하게 증가되었다.

3) 흰쥐는 48시간까지는 한마리도 사망하지 않았으나 60시간에 33.3 %, 72시간에 81.3 %의 사망률로 현저히 증가하였다.

4) FPLC를 이용하여 호중구 화학주성인자를 분석하였을 때 chemotactic index는 분자량이 104,000과 12,000 dalton에서 peak를 나타냈다.

5) 48시간과 60시간 및 72시간 노출군에서 기관지폐포세척액을 56℃에서 30분과 100℃에서 10분 열처리 후 chemotactic index는 열처리 전보다 모두 유의하게 감소하였으며,



48시간과 60시간 노출군에서 12,000 dalton 이하의 물질을 dialysis 후 chemotactic index 도 dialysis 전에 비해 유의하게 감소하였다.

**결론** : 이상의 결과로서 흰쥐에 고농도의 산소를 48시간 이상 노출 시키면 기관지폐포 세척액에 호중구 화학주성인자가 증가되고 그에따라 호중구가 폐에 증가하여 급성 폐손상을 일으키고, 이때 나타나는 호중구 화학주성인자는 분자량이 작은 것 뿐 아니라 큰 것까지 다양하며, 열에 대해 약한 것 뿐 아니라 강한 성분 등 여러가지가 있음을 관찰하였으며 앞으로 이들 성분에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Tate RM, Repine JE : Neutrophils and adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Resp Dis* **128** : 552, 1983
- 2) Nathan CF : Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* **79** : 319, 1987
- 3) Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas AM : Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* **72** : 65, 1991
- 4) Synderman R, Shin H, Phillips, J, Gewartz H, Mergenhagen S : A neutrophil chemotactic factor derived from C5 upon interaction of guinea pig serum with endotoxin. *J.Immunol.* **103**, 413, 1989
- 5) Goetzl, E.J., Woods, J.M. & Gorman, R.R. Stimulation of human eosinophil and neutrophil polymorphonuclear leukocyte chemotactic and random migration by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. *J.Clin.Invest.* **59**, 179-183. 1977
- 6) Schiffman, E., Corcoran, B. & Wahl, S. N-Formylmethionine peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc.Natl. cad.Sci.* **72**, 1059-1062. 1975
- 7) Sylvester, I., Rankin, J.A., Yoshimura, T., Tanaka, S. & Leonard, E.J. Secretion of neutrophil attractant/activation protein(NAP-1) by lipopolysaccharide-stimulated lung macrophages determined by both enzyme-linked immunosorbent assay and N-terminal sequence analysis. *Am .Rev.Respir.Dis.* **141**, 683-688. 1990
- 8) Senior, R., Griffin, G. & Mecham, R. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J.Clin.Invest.* **66**, 859-862. 1980
- 9) Riley, D.I., Kramer, M.J., Kerr, J.S., Chae, C.U., Yu, S.Y. & Berg, R.A. Damage and repair of lung connective tissue in rats exposed to toxic levels of oxygen. *Am.Rev.Respir.Dis.* **135**, 441-447. 1987
- 10) Terashima, T., Kanazama, M., Sayama, K., Ishioaka, A., Urano, T., Sakamaki, F., Nakamura, H., Waki, Y. & Tasaka, S. Granulocyte colony stimulating factor exacerbates acute lung injury induced by intratracheal endotoxin in guinea pig. *Am.J. Resp.Crit.Care.Med.* **149**, 295-303. 1994
- 11) Mulligan, M.S., Miyasaka, M., Tamatan, T., Jones, M.L. & Ward, P.A. Requirement for L-selectin in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J.Immunol.* **152**, 832-40. 1994
- 12) Fox, R.B., Hoidal, J.R., Brown, D.M. & Repine, J.E. Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity; involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes. *Am.Rev.Respir.Dis.*

- 123, 521-525. 1981
- 13) Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Fales, H.M. & Crystal, R.G. Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils : Stimuli and partial characterization. *J.Clin.Invest.* **66**, 473-483. 1980
- 14) Merrill, W.W., Naegel, G.P., Mattay, R.A. & Reynolds, H.Y. Alveolar macrophage-derived chemotactic factor : Kinetics of in vitro production and partial characterization. *J.Clin.Invest.* **65**, 268-276. 1980
- 15) Pennington, J.E., Rossing, T.H., Boerth, L.W. & Lee, T.H. Isolation and partial characterization of a human alveolar macrophage-derived neutrophil-activating factor. *J.Clin.Invest.* **75**, 1230-1237. 1985
- 16) Laskin, D.L., Soltys, R.A., Berg, R.A. & Rikey, D.J. Activation of neutrophils by factors released from alveolar macrophage with collagen-like polypeptides. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.* **2**, 463-470. 1990
- 17) Goodman, R.B., Forstrom, J.W., Osborn, S.G., Chi, E.Y. & Martin, T.R. Identification of two neutrophil chemotactic peptides produced by porcine alveolar macrophage. *J.Biol.Chem.* **266**, 8455-8463. 1991
- 18) Baruffi, M.D., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. & Roque-Barreira, M.C. Macrophage released neutrophil chemotactic factor(MNCF) induced PMN-neutrophil migration through lentin-like activity. *Agent Actions* **38**, C54-C56. 1993
- 19) Shasby, D.M., Fox, R.B., Harada, R.N. & Repine, J.E. Reduction of edema of acute hyperoxic lung injury by granulocyte depletion. *J.Appl.Physiol.* **52**, 1237-1244. 1982a
- 20) Shasby, D.M., VanBenthuysen, K.M., Tate, R.M., Shasby, S.S., McMurtry, I.F. Repine, J.E. Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate : Role of oxygen radicals. *Am.Rev.Respir. Dis.* **125**, 443-447. 1982b
- 21) Donnelly, S.C., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Walz, A., Robertson, C.R., Carter, D.C., Grant, I.S., Pollok, A.J. & Haslett, C. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* **341**, 643-647. 1993
- 22) Nakamura H., Fujishima S., Waki Y., Urano T., Sayama, Sakamaki F., Terashima T., Soejima K., Tasaka S., Ishizaka A., Kawashiro T., Kanazawa M. Priming of alveolar macrophages for interleukin-8 production in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **152** : 1579, 1995.
- 23) Walz, A. & Baggiolini, M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J.Exp.Med.* **171**, 449-454. 1990
- 24) Mortin, T.R., Raugi, G., Merritt, T.L. & Henderson, W.R. Jr. Relative contribution of leukotriene B4 to the neutrophil chemotactic activity produced by the resident human alveolar macrophage. *J.Clin.Invest.* **80**, 1114-1124. 1987
- 25) Rankin, J.A., Sylvester, I., Smith, S., Yoshimura, T. & Leonard, E.J.

- Macrophages cultured in vitro release leukotriene B<sub>4</sub> and neutrophil attractant /activation protein(interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J.Clin.I nvest.* **86**, 1556-1564. 1990
- 26) Currie, W.D., Pratt, P.C. & Sanders, A.P. Hyperoxia and lung metabolism. *Chest* **66**, 19S-21S. 1974
  - 27) Valimaki, M. & Niinikoski, J. Development and reversibility of pulmonary oxygen poisoning in the rat. *Aerospace Medicine* **44**, 533-538. 1973
  - 28) Kister, G.S., Coldwell, P.R.G. & Weibel, E.R. Development of fine structural damage to alveolar and capillary lining cells in oxygen poisoned rat lungs. *J.Cell.Biol.* **33**, 605-628. 1967
  - 29) Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A. & Shelburne, J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *J.Appl.Physiol.* **66**, 989-996. 1989
  - 30) Tierney, D.F., Ayers, L. & Kasuyama, R.S. Altered sensitivity to oxygen toxicity. *Am.Rev.Respir.Dis.* **115**, 59S-65S. 1977
  - 31) Autor, A.P., Frank, L. & Roberts, R.J. Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase : relationship to idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediatr.Res.* **10**, 154-158. 1976
-