

□ 원 저 □

NNNMU로 유도된 급성호흡곤란증후군 흰쥐 폐장에서의 dexamethasone에 의한 PLA₂, GGT의 활성도 및 형태학적인 변화

대구효성가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

이영만, 박윤엽

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실

고 윤 석

= Abstract =

Effects of high dose of dexamethasone on PLA₂, GGT activity
and lung morphology in NNNMU-induced ARDS rats

Young Man Lee, M.D., Yoon Yub Park, M.D.

Department of Physiology, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu, Korea

Younsuck Koh, M.D.,

Department of Internal Medicine, ASAN Medical Center,
College of Medicine University of Ulsan, Seoul, Korea

Background : In order to elucidate one of the pathogenic mechanisms of ARDS associated with pulmonary surfactant and oxidant injury, acute lung injury was induced by N-nitroso-N-methylurethane (NNNMU). In this model, the role of phospholipase A₂ (PLA₂), surfactant, gamma glutamyl transferase (GGT) and morphology were investigated to delineate one of the pathogenic mechanisms of ARDS by inhibition of PLA₂ with high dose of dexamethasone.

Method : Acute lung injury was induced in Sprague-Dawley rats by NNNMU which is known to induce acute lung injury in experimental animals. To know the function of the alveolar type II cells, GGT activity in the lung and bronchoalveolar lavage was measured. Surfactant phospholipid was measured also. PLA₂ activity was measured to know the role of PLA₂ in ARDS. Morphological study was performed to know the effect of PLA₂ inhibition on the ultrastructure of the lung by high dose of dexamethasone.

Results : Six days after NNNMU treatment (4 mg/kg), conspicuous pulmonary edema was induced and the secretion of pulmonary surfactant was decreased significantly. In the acutely injured rats' lung massive infiltration of leukocytes was observed. At the same time rats given NNNMU had increased PLA₂ and GGT activity tremendously. Morphological study revealed bizarre shaped alveolar type II cells and hypertrophied lamellar bodies in the cytoplasm of the

alveolar type II cells. But after dexamethasone treatment (20 mg/kg, for six days) in NNNMU-treated rats, these changes were diminished i.e. there were decrease of pulmonary edema and increase of surfactant secretion from alveolar type II cells. Rats given dexamethasone and NNNMU had decreased PLA₂ and GGT activity in comparison to NNNMU induced ARDS rats.

Conclusion : Inhibition of PLA₂ by high dose of dexamethasone decreased pathological findings caused by infiltration of leukocytes and respiratory burst. Based on these experimental results, it is suggested that an activation of PLA₂ is the one of the major factors to evoke the acute lung injury in NNNMU-induced ARDS rats.

Key words : acute lung injury, N-nitroso-N-methylurethane(NNNMU), PLA₂, alveolar type II cells, GGT, dexamethasone

서 론

1967년 Ashbaugh 등¹⁾이 급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)을 기술한 뒤로 ARDS에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 최근에 이르러 염증성 반응에 따른 호중구(neutrophils)의 침윤과 호중구의 과다한 elastase의 유리, 발생기 산소 및 기타 free radical의 과다한 유리와 과산화수소의 생성 등이 그 원인이라는 보고^{2,3)}가 증가하고 있다. 또한 ARDS가 폐혈증환자에게서 많이 발생한다는 점에 착안하여 phospholipase A₂(PLA₂)에 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다⁴⁾. 최근 Kim등⁵⁾은 ARDS 환자의 BAL에서 phospholipase A₂를 분리하고 분자량이 14K Da 및 80-90Da의 phospholipase A₂가 증가한다고 보고한 바 있다. 따라서 혈중 혹은 BAL내의 phospholipase A₂의 증가는 ARDS의 발현과 관련이 있다고 생각된다. ARDS에서 급성 폐부종이 일어나는 기전은 혈관내피세포들이 위에서 말한 기전들에 의해 파괴됨으로써 생긴다고 보지만 동시에 대기와 접하는 제 I형 폐포세포와 pulmonary surfactant의 기능이 저하됨으로써 발생하기도 한다⁶⁾. 일차적으로

폐장 내로 염증세포들이 침윤하면 이에 따른 PLA₂의 활성도의 증가와 free radical 생성의 과다한 증가(respiratory burst)가 나타난다. 그리고 이에 따른 lipid peroxidation으로 인한 surfactant lipid의 파괴 및 혈중단백질의 간질 및 폐포내로의 이동 등이 폐부종을 더욱 심화시킬 것으로 생각된다. 즉 ARDS에서의 폐부종은 일차적으로는 폐모세혈관의 투과도가 증가하여 혈중 단백질이 간질 및 폐포강 내로 이동하기 때문이라고 생각되지만 surfactant 층의 파괴와 이에 따른 alveolar barrier의 파괴에 따른 효과도 있을 것으로 생각된다⁷⁾. 이와 함께 PLA₂의 활성화는 여러 종류의 lipid mediator를 유리한다. 즉 prostaglandins, leukotriens, platelet activating factor 및 lysophosphatides 등은 혈관의 투과도를 증가시킬 뿐만 아니라 chemoattractant로도 작용하여 염증반응을 심화시킨다⁸⁾.

이러한 관점에서 제 II형 폐포세포의 기능 및 antioxidant의 일종인 glutathione의 생성에 관여하는 효소인 gamma glutamyl transpeptidase (GGT)와 PLA₂를 연관시켜 ARDS의 발병기전을 살펴보는 것은 흥미로운 일로 생각된다. 한편 glucocorticoid는 조직에서 lipocortin을 생성하여 PLA₂의 작용을 억제 하며⁹⁾ 또한 제 II형 폐포세포의 분비기능을

항진시킨다고도 알려져 있다¹⁰⁾.

따라서 본 연구에서는 실험동물에서 급성 폐손상을 유발한 뒤 dexamethasone을 투여하여 비특이적으로 phospholipase A₂를 억제하여 제II형 폐포세포의 기능 및 형태학적인 변화를 살펴봄으로써 ARDS 발병기전의 일단을 알아보려 하였다.

대상 및 방법

실험동물로는 무게 250~300gm 사이의 Sprague-Dawley 중 흰쥐를 이용하였다. 급성 폐손상군은 N-nitroso-N-methylurethane (NNNMU; 일본 동영회사)을 피하로 주사(4mg/kg)하였으며, 대조군에서는 생리식염수 4ml를 피하로 주사하였다. Dexamethasone 투여군은 NNNMU 투여 직후 dexamethasone (20mg/kg)을 6일간 근육내로 주사하였다. 폐장조직 및 폐세척액을 얻기 위하여 NNNMU 투여군 및 dexamethasone 투여군에서는 NNNMU 투여 6일 후 실험동물을 실험치사시킨 뒤 HBSS용액으로 폐장을 관류하여 폐장내 혈액을 제거하고 폐장을 적출한 뒤 무게를 측정하였다. 10ml의 TN 완충용액(Tris-Sodium buffer, pH 7.4)으로 폐를 세척하고, 약 8ml의 세척액은 세포성분을 원심제거 후 -70℃에서 분석 시까지 보관하였다. 폐조직에서의 PLA₂ 및 GGT 활성도를 알아보기 위해서는 폐장조직을 0.15 M KCl, 10 mM Tris base(pH 7.4), 10 mM EDTA, 50μg/ml PMSF, 3μg/ml leupeptin 용액에서 Virtis homogenator를 이용 20%의 homogenate로 만들어 분석 시까지 -70℃에서 보관하였다. 각 실험군에서의 체중에 대한 폐장무게의 비는 실험치사시의 체중을 측정하고 이때의 폐장의 무게를 이용하여 계산하였다.

폐세척액내의 인지질의 정량 : Surfactant의 주성분인 인지질의 정량은 Liao 등¹¹⁾의 방법에 따라 폐세척액에서 surfactant를 분리하고 Folch 등¹²⁾의

방법에 따라 지질을 분리한 다음 Hess & Derr¹³⁾의 방법에 따라 인지질 인(phospholipid phosphorus)을 정량한 후 인지질로 환산¹⁴⁾하였다.

Phospholipase A₂ 활성도의 측정 : PLA₂ 활성도의 측정은 Katsumata 등¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 양측 폐장을 HBSS 용액으로 관류하여 혈액을 제거한 뒤 우측폐장을 20mM의 potassium phosphate 용액(pH 7.4)을 가하여 분쇄하였다. 이 homogenate를 90초간 sonication 한 뒤 L- α -dipalmitoyl-2(9,10(N)-³H)palmitoyl)-phosphatidylcholine(30C i/mmol)을 100μl의 lung homogenate와 880μl의 glycine 완충용액 (100 mM, pH 9.0-10mg/L BSA, 2.5mM sodium deoxycholate, 0.1 mM DPPC, 2.0 mM CaCl₂, 1.75 M ethanol)과 혼합한 뒤 37℃의 수조에서 60분간 반응시켰다. 이 반응은 200 mM의 EDTA를 함유한 200μl의 5%(v/v) Triton X-100 용액으로 정지시켰다. PLA₂에 의해 유리된 지방산은 0.1%의 acetic acid가 함유된 5.0ml의 hexane에 2.5 gm의 Na₂SO₄를 첨가한 뒤 hexane층을 분리하고 beta scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Snake venom인 Crotalus adamanteus PLA₂ (0.01 U/ml)를 대조군으로 매 실험마다 동시에 반응시켰다. 이때 1unit는 기질에서 지방산이 분당 1μmol이 생성되는 것으로 정의하였다.

GGT 활성도의 측정 : GGT 활성도의 측정은 Meister 등¹⁶⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 폐세척액 및 lung homogenate에 0.1%의 Triton X-100을 첨가하여 37℃의 수조에서 30분간 반응 후 GGT specific inhibitor인 serine-borate 용액을 이용하여 반응을 중지시켰다. 이때 GGT의 기질로는 glycylglycine과 L-gamma glutamyl anilide를 사용하였다. 이때 1unit는 분당1μmol의 p-nitroaniline이 생성되는 것으로 정의하였다.

광학 및 전자현미경을 이용한 형태학적인 관찰 : 형태학적인 관찰을 위해서는 각 실험군에서

조직을 무작위로 절취한 뒤 광학 현미경적 관찰을 위한 조직은 10%의 중성 formalin 용액에 고정하였다.

그리고 세척, 탈수의 과정을 거친 뒤 paraffin에 포맷하고 Rechart-Jung microtome 2040으로 박절한 뒤 hematoxylin-eosin 용액으로 염색후 검경하였다. 전자현미경적인 관찰을 위해서는 조직을 4℃의 2.5% glutaraldehyde 용액으로 고정한 뒤 세척하고 1%의 OsO_4 용액으로 후고정하였다. 그런 다음 에탄올을 이용하여 단계적으로 탈수시킨 후 Epon 812 resin에 포매 후 60~80nm의 두께로 Sorval MT-7000 ultramicrotome을 이용하여 절편을 얻었다. 그리고 isoamyl acetate가 coating된 grid 상에서 uranyl acetate 및 lead citrate로 염색후 Hitachi H-600 전자현미경으로 검경하였다. 모든 성적의

통계처리는 Student's t-test를 이용하여 검정하였다.

결 과

NNNMU 처리 후 제 6일째에서의 폐장의 무게/체중의 비(L/B ratio)는 NNNMU 투여군에서 현저히 증가하였다($p<0.001$). 그러나 NNNMU 투여 후 dexamethasone을 투여한 군에서는 NNNMU 투여군에 비해 L/B ratio가 유의하게 감소하였다($p<0.005$, Fig. 1).

Surfactant의 주성분인 인지질(phospholipid)의 bronchoalveolar lavage(BAL) 내의 함량은 대조군에 비해 현저히 감소하였고($p<0.001$), dexamethasone 투여 후 인지질의 양은 NNNMU 투여군에 비하여 유의하게 증가하였다($p<0.005$, Fig. 2).

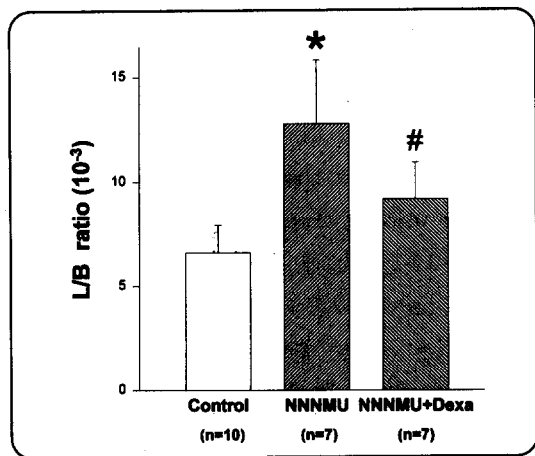


Fig. 1. Changes of lung weight/body weight ratio (L/B) after NNNMU and dexamethasone (Dexa). L/B ratio of rats given NNNMU had increased in comparison to control rats(*, $p<0.001$). In contrast, L/B ratio of rats given NNNMU and then dexamethasone had decreased compared to NNNMU treated rats(#, $p<0.005$). Each bar represents the mean \pm SE and numbers of determinations are in the parentheses.

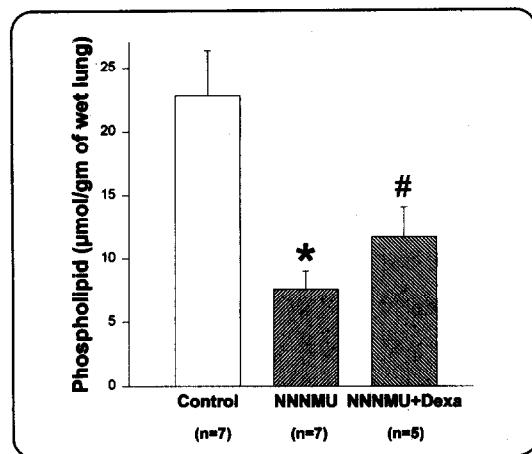


Fig. 2. Effects of NNNMU and dexamethasone (Dexa) on surfactant phospholipid in BAL. Surfactant phospholipid in BAL of rats given NNNMU had decreased in comparison to control rats(*, $p<0.001$). In contrast, surfactant phospholipid of rats given NNNMU and then dexamethasone had increased compared to NNNMU treated rats(#, $p<0.005$). Each bar represents mean \pm SE and numbers of determinations are in the parentheses.

Lung homogenate 내의 PLA₂ 활성도의 변화는 NNNMU 투여 후 현저히 증가하였으나($p < 0.001$) dexamethasone 투여 후에는 현저히 감소하여 대조군과 차이가 없었다(Fig. 3).

Lung homogenate 내의 GGT 활성도의 변화는 NNNMU 투여 후 현저히 증가하였으나($p < 0.001$) dexamethasone 투여 시에는 GGT의 활성도가 NNNMU 투여군에 비해 현저히 감소하여 대조군과 비교시 차이가 없었다(Fig. 4).

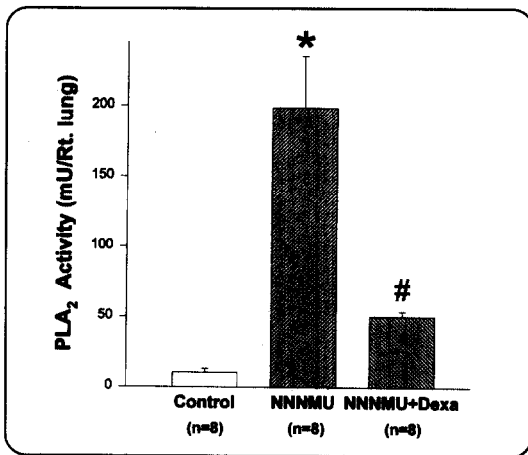


Fig. 3. Effect of NNNMU and dexamethasone (Dexa) on PLA₂ activity. PLA₂ activity in lungs was increased after NNNMU(*, $p < 0.001$) but after NNNMU and dexamethasone PLA₂ activity was decreased(#, $p < 0.005$) in comparison to NNNMU treated rats. Each bar represents mean \pm SE and numbers of determinations are in the parentheses.

BAL내 GGT 활성도의 변화는 lung homogenate 내의 변화와 동일하여 NNNMU 투여군에서는 대조군에 비하여 현저히 증가하였고($p < 0.001$), dexamethasone을 투여한 군에서는 NNNMU 투여군에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.005$, Fig. 5).

NNNMU 투여군에서의 광학현미경적 소견은 대

조군(Fig. 6, panel A)에 비해 심한 염증세포들의 침윤, 출혈, hyaline membrane의 형성 및 부분적인 무기폐의 소견을 볼 수 있었으며, 특히 혈관주위의 호중구 침윤이 현저하였다(Fig. 6, panel B).

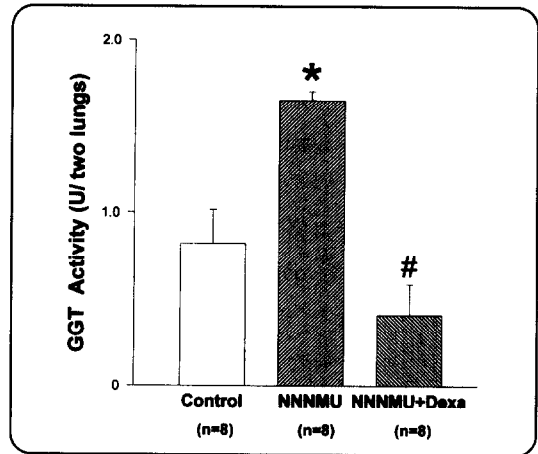


Fig. 4. Effect of NNNMU and dexamethasone on GGT activity in the lung. GGT activity of the lungs in rats given NNNMU had increased in comparison to control rats(*, $p < 0.001$). In contrast, GGT activity of the lungs in rats given NNNMU and then dexamethasone (Dexa) had decreased compared to NNNMU treated rats(#, $p < 0.005$). Each bar represents mean \pm SE and numbers of determinations are in the parentheses.

Dexamethasone을 처리한 군에서는 이러한 소견이 현저히 감소하였고 특히 염증세포의 침윤이 미미하였다(Fig. 6, panel C).

전자현미경을 통해 본 미세구조의 변화는 NNNMU를 투여한 군에서는 미세융모(microvilli)가 발달한 제II형 폐포세포들이 폐포강 주위(alveolar lumen)에 입방형 혹은 원주상대로 그 수가 증가하였으며 세포내 RER은 발달되었으나 surfactant를 함유한 lamellar body는 공포현상(vacuolization)을 보였다(Fig. 6, panel D).

제II형 폐포세포의 경우 lamellar body의 심한 비후가 관찰되고, 세포자체의 모양은 비정형적인 모습을 보였다(Fig. 6, panel E).

또한 폐포강은 단백질로 채워지거나 염증세포들의 유주가 관찰되었으며 세포함유물과 간질조직의 구성물들도 그 형태를 그대로 유지한 채 유출되어 있었고, 제I형 폐포세포의 기저막이 소실되어 있었다(Fig. 6, panel F).

Dexamethasone을 투여한 군에서 폐포상피의 가장 특징적인 현상은 제II형 폐포세포의 수적인 증가가 NNNMU 투여군에 비하여 미미하고, 제II형 폐포세포내의 작은 lamellar body의 수가 증가하였으며 상피층의 활발한 세포분화와 성장이 관찰되었다(Fig. 6, panel G).

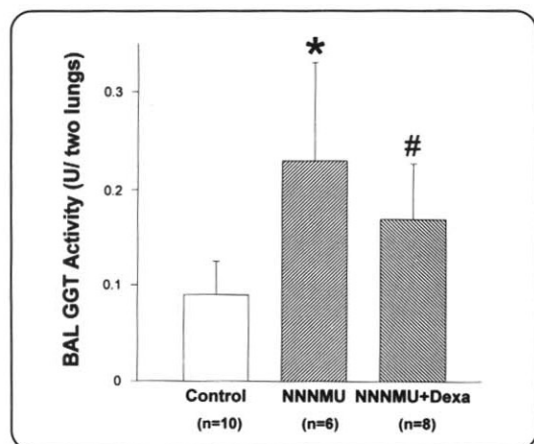
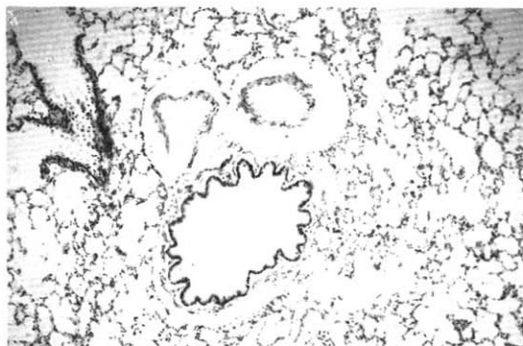
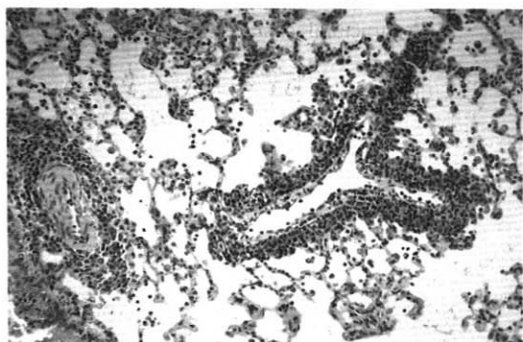


Fig. 5. Effect of NNNMU and dexamethasone (Dexa) on GGT activity in BAL. GGT activity of BAL in rats given NNNMU had increased in comparison to control rats(*, $p < 0.001$). In contrast, GGT activity of BAL in rats given NNNMU and then dexamethasone had decreased compared to NNNMU treated rats(#, $p < 0.005$). Each bar represents mean \pm SE and numbers of determinations are in the parentheses.

Panel A ($\times 40$)



Panel B ($\times 100$)



Panel C ($\times 200$)

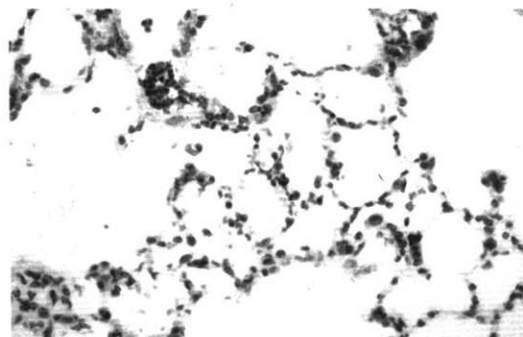
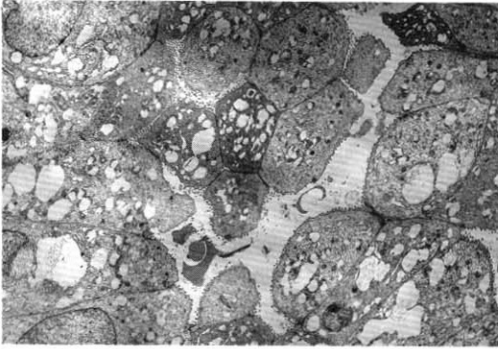


Fig. 6. Histological changes after NNNMU and dexamethasone in the lung.

Massive infiltration of leukocytes was observed in NNNMU treated rats' lungs (Fig. 6, panel B) compared to control lungs (Fig. 6, panel A). In contrast, after dexamethasone treatment infiltration of leukocytes was lessened in the lungs (Fig. 6, panel C).

Panel D ($\times 6,000$)



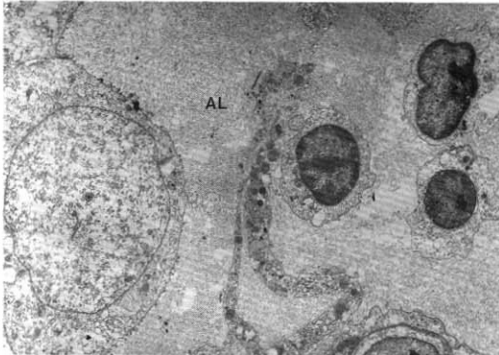
Panel E ($\times 9,000$)



Fig. 6. Histological changes after NNNMU and dexamethasone in the lung.

Ultrastructural changes after NNNMU showed proliferation of alveolar type II cells into the alveolar lumen (Fig. 6, panel D) and bizarre shaped and hypertrophied lamellar bodies in the cytoplasm of the alveolar type II cells (Fig. 6, panel E).

Panel F ($\times 9,000$)



Panel G ($\times 6,000$)

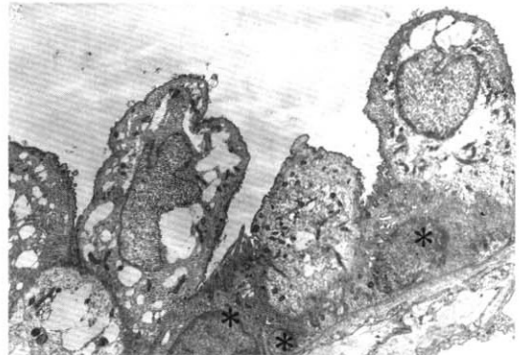


Fig. 6. Histological changes after NNNMU and dexamethasone in the lung.

Proteinaceous materials and leukocytes were shown in the alveolar lumen in the lungs of rats given NNNMU (Fig. 6, panel F). In contrast, after dexamethasone, these pathological findings were lessened and newly growing alveolar type II cells were observed in the vicinity of necrotized alveolar type II cells (Fig. 6, panel G).

AL ; alveolar lumen

N ; nucleus

고 찰

ARDS의 발병기전은 원인만큼 다양하여 최근까지도 근본적인 발병기전에 대한 연구가 여러 방면

에서 진행 중이다. 이러한 연구들 중에서 Repine 등¹⁷⁾은 neutrophil에 의한 oxidant의 과다한 생성이 ARDS의 한가지 원인일 것이라고 시사한 바 있다. 패혈증이 ARDS의 중요한 원인이며 이때 관찰되

는 폐장내의 형태학적인 변화는 이러한 가설을 뒷받침한다¹⁸⁾. 특히 superoxide anion이나 hydroxyl radical의 생성이 neutrophil에 의한 것이라는 것과 이러한 free radical이 조직의 손상을 유발한다는 사실은 많은 보고를 통해 증명되었다^{19~21)}. 본 연구에서 사용된 NNNMU는 실험동물에서 형태학적으로 또는 기능적으로 ARDS와 같은 병변을 일으키므로 Lewis 등²²⁾ 및 Liao 등¹¹⁾은 NNNMU를 이용한 model에서 ARDS와 연관된 surfactant에 대한 보고를 한 바 있다.

본 연구에서 NNNMU 투여 6 일째 L/B ratio의 현저한 증가는 폐부종이 일어났다는 것을 시사하는데 dexamethasone은 이러한 폐부종의 정도를 감소시켰다. Dexamethasone이 PLA₂의 inhibitor라는 것은 잘 알려져 있으며⁹⁾ 이러한 PLA₂의 억제에 의한 효과는 lipid mediator의 생성억제 및 세포막의 보호 등으로 인해 염증반응을 감소시킨다.

NNNMU 투여시 나타나는 폐장내 조직소견은 심한 염증세포의 침윤 및 폐포세포의 손상인데 이러한 조직의 손상은 dexamethasone을 투여한 군에서는 많이 감소하였다. Dexamethasone에 의한 PLA₂의 억제는 lipid mediator의 유리의 방지 즉 leukotrien이나 prostaglandin, thromboxane 등의 생성을 억제했을 가능성이 있다. 또한 PLA₂는 neutrophil에서 세포막의 NADPH oxidase를 활성화하여 free radical 특히 superoxide anion(O₂⁻)의 생성을 증가시킨다는 보고^{23,24)}도 있으므로 PLA₂의 억제는 free radical의 생성도 감소시켰을 것으로 생각된다. PLA₂ 활성화에 의해 생성되는 free radical은 혈관 내피세포에 직접적인 손상을 줌으로써 혈관내의 단백질이 간질조직 또는 폐포강 내로 유출된다²⁵⁾. 따라서 본 실험에서 NNNMU에 의해 유발된 현저한 염증세포 특히 neutrophil의 침윤 및 PLA₂ 활성도의 증가는 조직의 손상과 관계가 있을 것으로 생각된다.

NNNMU는 폐장에 ARDS와 유사한 병변을 일으킬 뿐만 아니라 제II형 폐포세포의 기능을 감소시키는 것도 잘 알려져 있으나²⁶⁾ 현재까지 그 손상의 기전은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서 antioxidant인 glutathione의 생성에 관여하는 GGT의 활성도가 NNNMU 투여 후 현저히 증가하였는데 이는 glutathione의 생성이 증가한 것을 의미한다. 즉 NNNMU에 의한 과다한 neutrophil의 침윤, PLA₂ 활성도의 증가 및 과다한 free radical의 생성은 antioxidant인 glutathione의 사용을 증가시키고 이에 따른 GGT의 활성도를 증가시킨 것으로 생각된다. 실제로 ARDS 환자의 BAL내의 oxidized glutathione 양이 증가한다는 보고도 있다²⁷⁾.

Joyce-Brady 등²⁸⁾은 GGT가 제II형 폐포세포에서 surfactant의 분비능의 지표가 될 수 있다고 하였는데, 본 연구에서 제II형 폐포세포의 형태학적인 변화, surfactant의 분비 및 GGT를 연관시켜 보면 흥미로운 결과를 유추할 수 있다.

즉, NNNMU에 의해 염증세포의 침윤이 심해지고 이에 따른 antioxidant의 요구가 증가하여 GGT의 활성도가 증가함과 동시에 surfactant의 분비도 초기에는 증가하였을 것이라고 생각된다.

본 연구에서 제II형 폐포세포는 심한 기형을 보이는데 surfactant의 저장소인 lamellar body의 공포현상과 심한 팽대가 나타나고, 제II형 폐포세포의 미세용모가 현저히 많아진 형태를 보인다. 이러한 제II형 폐포세포의 형태학적인 변화는 폐장내 glutathione의 고갈시 나타나는 현상과 일치한다²⁹⁾.

이러한 병적인 변화는 PLA₂의 inhibitor인 dexamethasone에 의해 현저히 감소하는 현상을 보인다. 즉 NNNMU에 의해 GGT의 활성도가 증가하고 surfactant의 분비는 초기에는 증가하다가 후기에는 완전히 고갈되고 이러한 변화들은 dexamethasone의 효과에 의해 차단되는 것으로 생각된다.

또한 혈관 내피세포의 손상은 혈중 단백질을 폐포강 내로 유출시키고 이 단백질은 surfactant의 기능을 억제한다. 이러한 surfactant의 기능인 표면장력감소 기능의 소실은 폐부종을 더욱 악화시키고 결국은 무기폐를 유도한다. 결과적으로 NNNMU에 의해 유도된 염증세포의 침윤이 이러한 일련의 과정의 원인일 것으로 생각되며, 그 중에서도 PLA₂의 활성화에 의한 결과들이 이러한 급성 폐손상의 원인이 아닌가 사료된다. 최근 Lee 등³⁰⁾은 interleukin-1을 이용한 acute lung injury model에서 PLA₂의 inhibitor인 mepacrine이 급성 폐손상을 감소시킨다고 보고하였는데, mepacrine은 superoxide anion의 생성을 억제하여 호중구의 혈관내피세포로의 adhesion을 억제하는 것으로 보고하고 있다. 따라서 dexamethasone에 의한 PLA₂의 억제는 free radical 및 lipid mediator의 생성을 감소시켜 급성 폐손상을 억제하는데 효과적인 것으로 생각된다. 최근 PLA₂의 subtype에 대한 연구³¹⁻³³⁾가 많이 이루어져 이러한 phospholipase A₂의 subtype에 따른 염증반응시의 역할이 다양한 것으로 알려지고 있으므로 PLA₂의 특이적 isoform에 의한 ARDS의 발병기전에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구목적 : ARDS 발병기전의 일단을 알아보기 위하여 실험동물에서 ARDS와 같은 병변을 유도하는 N-nitroso-N-methylurethane(NNNMU)로 흰쥐에서 급성 폐손상을 유도하였다. ARDS에서의 제II형 폐포세포의 기능 및 형태학적인 변화가 폐포강 내로의 단백질 이동과 관계 있다고 생각되므로 surfactant를 정량하고 동시에 gamma glutamyl transpeptidase(GGT)의 활성도를 측정하였다. 그리고 백혈구와 연관된 free radical의 역할을 알아보

고자 phospholipase A₂(PLA₂)의 활성도도 측정하였다. 이때 PLA₂의 inhibitor인 dexamethasone을 이용하여 PLA₂가 ARDS 발병에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방법 : NNNMU에 의해 나타나는 폐부종의 확인을 위해 체중에 대한 폐장의 무게의 비를 계산하였고, 제II형 폐포세포의 기능을 알아보기 위하여 surfactant의 양 및 GGT의 활성도를 측정하였다. 또한 염증세포의 침윤 및 제II형 폐포세포의 형태학적인 변화를 광학 및 전자현미경을 이용하여 확인하였으며 PLA₂의 활성도도 측정하였다. 또한 이 모든 실험을 dexamethasone을 투여한 군에서도 시행하여 PLA₂의 억제로 나타나는 효과를 관찰하였다.

결과 : NNNMU로 유도된 ARDS와 유사한 급성 폐손상시 dexamethasone은 폐부종을 감소시키고 GGT 및 PLA₂의 활성도를 감소시켰다. 형태학적으로는 염증세포 침윤의 감소가 관찰되었으며 병리학적인 소견도 호전시켰다.

결론 : ARDS의 병인 중 PLA₂의 활성화가 염증세포의 침윤을 증가시키고 동시에 respiratory burst에 의한 free radical의 생성과 그 작용이 급성 폐손상의 중요한 기전으로 생각된다. 특히 PLA₂는 백혈구 세포막의 NADPH oxidase의 활성화에 따른 free radical의 생성뿐만 아니라 lipid mediator의 생성에도 관여하여 폐부종을 야기하는 중요한 요소가 되는데, 과량의 dexamethasone은 PLA₂를 억제함으로써 이러한 변화를 감소시키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE : Acute respiratory Distress in Adults. Lancet 2 : 319, 1967.

- 2) Ryrfeldt A, Bannenberg G, Moldeus P : Free radicals and lung disease. *Brit Med Bul* **49** : 588, 1993.
- 3) Repine JE : Scientific perspective on Adult respiratory Distress Syndrome. *Lancet* **339** : 466, 1992.
- 4) Vernon LP, Bell JD : Membrane structure, toxins and phospholipase A₂ activity. *Pharmac Ther* **54** : 269, 1992.
- 5) Kim DK, Fukuda T, Thomson BT, Cockrill B, Hales C, Bonventre JV : Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* **269** : L109, 1995.
- 6) 고윤석, 박성수, 이정희 : Thiourea를 투여한 백서에서 surfactant protein A, B, C의 유전자 발현 동태. *대한내과학회잡지* **43** : 545, 1992.
- 7) Lewis JF, Jobe AH : Surfactant and the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Respir Dis* **147** : 218, 1993.
- 8) Anderson BO, Moore EE, Banerjee A : Phospholipase A₂ regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure. *J Sur Res* **56** : 199, 1994.
- 9) Blackwell GJ, Flower RJ : Inhibition of phospholipase. *Brit Med Bul* **39** : 260, 1983.
- 10) Frank L, Lewis PL, Sosenko IR : Dexamethasone stimulation of fetal rat lung antioxidant enzyme activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics* **75** : 569, 1985.
- 11) Liao DF, Barret CR, Loomis-Bell AL, Ryan SF : Functional abnormality of lung surfactant in experimental alveolar injury in the dog. *Am Rev Respir Dis* **136** : 395, 1987.
- 12) Folch J, Lees M, Stanley GHS : A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animal tissues. *J Biochem* **226** : 497, 1957.
- 13) Hess HH, Derr JE : Assay of organic and inorganic phosphorus in the 0.1–5 nanomolar range. *Anal Biochem* **63** : 607, 1975.
- 14) Corbet A, Creagan J, Frink J, Rudolph AJ : Distension produced phospholipid secretion in postmortem in situ lungs of normal rabbits. *Am Rev Respir Dis* **128** : 695, 1983.
- 15) Katsumata M, Gupta C, Goldman AS : Rapid assay for activity of phospholipase A₂ using radioactive substrate. *Anal Biochem* **154** : 676, 1986.
- 16) Meister A, Tate SS, Griffith W : Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol* **77** : 237, 1981.
- 17) Repine JE : Interleukin-1 mediated acute lung injury and tolerance to oxidant injury. *Environ Health Perspec* **102(suppl 10)** : 75, 1994.
- 18) Leff JA, Baer JW, Bodeman ME, Kirkman JM, Shamley PF, Patton LM, Guidot DM, Beehler CJ, McCord JM, Repine JE : Interleukin-1 α induced neutrophil accumulation and oxygen metabolite mediated lung leak in rats. *J Appl Physiol* **266** : 2, 1994.
- 19) Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE : Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now ? *J Lab Clin Med* **119** : 598, 1992.
- 20) Goode HF, Webster NR : Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med* **21** : 1770, 1993.
- 21) Cross AR : Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase : mechanisms of

- action and methods for their elucidation. *Free Radical Biol Med* **8** : 71, 1990.
- 22) Lewis JM, Ikegami M, Jobe AH : Altered surfactant function and metabolism. *J Appl Physiol* **69** : 2303, 1990.
 - 23) Maridonneau-Parini I, Tauber AI : Activation of NADPH-oxidase by arachidonic acid involves phospholipase A₂ in intact human neutrophils but not in the cell free system. *Biochem Biophys Res Comm* **138** : 1099, 1986.
 - 24) Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG : Superoxide generation is inhibited by phospholipase A₂ inhibitors; Role for phospholipase A₂ in the activation of the NADPH oxidase. *Biochem* **264** : 249, 1989.
 - 25) Brigham KL : Role of free radicals in lung injury. *Chest* **89** : 859, 1986.
 - 26) Higuchi R, Lewis J, Ikegami M : In vitro conversion of surfactant subtype is altered in alveolar surfactant isolated from injured lungs. *Am Rev Respir Dis* **145** : 1416, 1992.
 - 27) Bunnell E, Pacht ER : Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am Rev Respir Dis* **148** : 1174, 1993.
 - 28) Joyce-Brady M, Takahashi Y, Oakes SM, Rishi AK, Levine RA, Kinlough CL, Hughey RP : Synthesis and release of amphipathic gamma-glutamyltransferase by the pulmonary alveolar type 2 cell. *J Biol Chem* **269** : 14219, 1994.
 - 29) Martensson J, Jain A, Frayer W, Meister A : Glutathione metabolism in the lung : inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 5296, 1989.
 - 30) Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE : Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* (in print).
 - 31) Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N : Phospholipase A₂ enzymes : Regulation and physiological role. *Biochem Pharmacol* **48** : 1, 1994.
 - 32) Vernon LP, Bell JD : Membrane structure, toxins and phospholipase A₂ activity. *Pharmac Ther* **54** : 269, 1992.
 - 33) Pruzanski W, Vadas P, Browning J : Secretory non-pancreatic group II phospholipase A₂ : role in physiologic and inflammatory processes. *J Lipid Med* **8** : 161, 1993.