

# 내독소에 의해 유도된 급성 폐 손상에서 PAF Remodelling 및 Adhesion Molecule의 억제가 폐장내 Oxidative Stress에 미치는 영향

한림대학교 의과대학 내과학교실, <sup>1</sup>대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실  
신태림, 나보경<sup>1</sup>, 이영만<sup>1</sup>

## Protective Effect of the Inhibition of PAF Remodeling and Adhesion Molecule on the Oxidative Stress of the Lungs of Rats Given Endotoxin Intratracheally

Tae Rim Shin, M.D., Bo Kyung Na<sup>1</sup>, Young Man Lee, M.D.<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine,

<sup>1</sup>Department of Physiology, Catholic University of Daegu College of Medicine, Korea

**Background :** There have been many reports on the pathogenesis of sepsis-induced acute respiratory distress syndrome(ARDS) but, the precise mechanism has not been elucidated. This study examined the protective effect of an inhibition of platelet activating factor(PAF) remodeling and the adhesion molecule on the oxidative stress of the lungs in rats with an endotoxin induced acute lung injury(ALI).

**Methods :** ALI was induced in Sprague-Dawley rats by instilling an *E-coli* endotoxin into the trachea. Ketotifen and fucoidan were used respectively to inhibit PAF remodeling and adhesion molecule. The lung leak index, lung myeloperoxidase(MPO) activity, bronchoalveolar lavage(BAL) fluid neutrophil count and lyso PAF acetyltransferase activity(AT), were measured and an ultrastructural study and cytochemical electron microscopy were performed.

**Results :** The lung leak index, lung MPO activity, BAL fluid neutrophil count and lyso PAF AT activity was higher in the endotoxin-treated rats. In addition, severe destruction of the pulmonary architecture and increased hydrogen peroxide production were identified. These changes were reversed by ketotifen. However, fucoidan did not appear to have any protective effects.

**Conclusion :** The inhibition of PAF remodeling appeared to be effective in decreasing the endotoxin-induced ALI. In addition, this effect might be derived from the inhibition of neutrophilic oxidative stress. However, the inhibition of the adhesion molecules by fucoidan appeared to be ineffective in decreasing the endotoxin-induced ALI.

(*Tuberc Respir Dis* 2005; 53:276-284)

**Key words :** ALI, PAF remodelling, Adhesion molecule, Oxidative stress

## 서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome, 이하 ARDS)은 다양한 자극에 대한 부적절한 숙주 반응의 결과로 생기는 과도한 염증으로, 발병 원인에 따르는 다양한 병인론에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다<sup>1,2</sup>.

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의해서 연구 되었음. (KRF-2002-003-E00142)

Address for correspondence : **Young Man Lee, M.D.**  
Department of Physiology, Catholic University of Daegu College of Medicine 3056-4  
DaeMyung 4 Dong, Nam Gu, Daegu, 705-718, Korea  
Phone : 053-650-4472 Fax : 053-621-4106  
E-mail : leeym@cuth.cataegu.ac.kr

Received : Nov. 18. 2004

Accepted : Feb. 1. 2005

인체 방어기전에 중요한 역할을 담당하는 호중구는 이러한 염증반응에서도 중추적인 역할을 함이 알려져 있다<sup>3</sup>. ARDS에서 폐장내 침윤한 호중구는 세포막의 NADPH oxidase의 작용에 의해 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 생성, respiratory burst에 따르는 산화성 스트레스를 유발하여 조직 손상을 일으키는데<sup>4</sup>, 이를 위해 호중구는 폐모세혈관내로 격리(sequestration), 내피세포와 유착한 후 폐실질내로 이동한다<sup>5</sup>. 유착분자는 이 과정에서 호중구의 혈관내피세포와의 결합을 매개하며 또한 호중구의 활성화와 매개체 유리를 조정한다<sup>6</sup>.

한편 platelet activating factor(PAF)은 전염증성 인지질 매개체로서 패혈증, 급성 폐손상에서 증가되어 있음이 알려져 있고 실험동물에 PAF 투여시 패혈증이나 미세 혈관 손상을 일으키는 것으로 보고되었다<sup>7</sup>. De novo 경로와 remodeling 경로의 두가지 경로

에 의해서 생성되며<sup>8</sup> 염증 상태에서는 염증성 사이토카인에 의해 활성화된 membrane phospholipase A<sub>2</sub>을 통해 lyso PAF을 생성, 이것이 acetyl coenzyme-A acetyltransferase(AT)의해 acetylation되어 PAF가 생성되는 remodeling 경로가 주를 이룬다. 이렇게 생성된 PAF은 PAF receptor의 존재에 의해 다양한 생물학적 활성을 가지는데, 호중구 침윤에 화학유인물질(chemoattractant)로 작용하고 유착분자와 호중구막의 NADPH oxidase의 활성화에 관여하여 호중구의 유착과 활성화를 자극한다<sup>9,10</sup>.

이러한 사실에 근거하여 본 연구에서는 내독소에 의한 급성 폐손상 모델에서 ketotifen을 사용하여 PAF remodelling을 억제하거나<sup>11</sup> fucoidan을 이용하여 호중구의 혈관내피세포 유착에 관여하는 유착분자를 억제함으로써<sup>12</sup> 호중구에 의한 산화성 스트레스 감소에 따르는 폐손상 억제효과를 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

**실험 대상 및 시약 :** 실험 대상은 체중 300g 내외의 *Sprague-Dawley* 수컷으로 하였으며 실험군은 대조군, 내독소 투여군, 내독소 투여 전 ketotifen 투여군 및 내독소 투여 전 fucoidan 투여군으로 나누었다.

원쥐에서 급성 폐손상을 유발하기 위해서 대장균 내독소(*E-coli* endotoxin, 0127; B8) 100  $\mu$ g을 0.5 ml 생리적 식염수에 녹인 후 기도 내로 분무하였다. PAF remodelling을 억제하기 위해서 내독소 투여 60분 전에 ketotifen fumarate (1 mg/kg)를 복강 내 주사하였고 유착분자의 직접적인 억제를 위해서는 fucoidan (25 mg/kg)을 생리적 식염수에 용해한 뒤 내독소 투여 60분 전에 복강 내로 주사하였다. 대조군의 경우 0.5 ml 생리적 식염수를 기도내로 분무, 주입하였다. 대조군을 제외한 내독소를 투여한 군은 내독소 투여 5시간 후에 치사시킨 후 필요한 폐장을 적출하거나 기관지폐포세척(bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였다. lysoPAF acetyltransferase (AT)의 활성도를 측정하기 위해 사용한 <sup>3</sup>H-acetyl co A 및 폐장 단백질누출지수 (lung leak index)를 측정하기 위한 <sup>131</sup>I-bovine

serum albumin (BSA)는 NEN사에서, 나머지 시약은 모두 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

**폐장단백누출지수(lung leak index)의 측정 :** 내독소에 의한 폐장 내 모세혈관의 손상 유무 및 그 정도를 가늠하기 위하여 <sup>131</sup>I-BSA을 이용하여 폐장 단백질누출을 측정하였다. 실험동물은 치사 30분 전 ketamine hydrochloride (60 mg/kg) 및 xylazine (6 mg/kg)으로 마취하였다. 경정맥에 1.0  $\mu$ ci의 <sup>131</sup>I-BSA를 주사, 30분 후 1.0 ml의 혈액을 채취하고 폐장을 생리적 식염수로 관류 세척하여 폐장 내 혈액을 제거한 후 우측 폐장을 절제하였다. 이때 우측 폐장 내 방사성 동위원소의 활성도를 1.0 ml 혈액 내의 방사성 활성도로 나누어 그 값을 단백질누출지수로 하였다.

**폐장 내 호중구 침윤 검사 :** 내독소 투여 5시간 경과 후 폐장 내 호중구의 침윤 정도를 검사하기 위하여 Goldblum등의 방법<sup>13</sup>에 따라 myeloperoxidase (MPO)의 활성도를 측정하였다. 실험동물을 ketamine hydrochloride 및 xylazine으로 마취한 다음 기도 삽관하여 rodent ventilator (Harvard rodent ventilator, model 683, UK)에 연결하고 개흉술을 시행한 다음 우심실에 50IU의 heparin을 주사하고 관류펌프를 이용하여 폐장을 생리식염수로 세척한 후 적출, -70℃에 보관하였다. MPO 활성도 측정을 위해 동결된 좌측폐장을 20 mM 인산완충용액 (pH 7.4)에 담그고 4℃에서 균질하게 갈아서 그 용액을 4℃, 14000 g에서 30분간 원심분리 하였다. 침전층 (pellet)을 4.0 ml 0.5 % hexadecyl tetramethy ammonium bromide (HTAB)이 함유된 50 mM 인산완충용액 (pH 6.0)에 재부유시키고 4℃에서 Vibracell (Sonics & Materials Inc., USA)을 이용하여 초음파 처리하여 세포막을 파열시켰다. 그 후 균질액을 60℃ 항온수조에서 120분간 처리하여 단백질분해효소를 불활성화시키고 12000 rpm으로 원심분리, 상등액은 *o*-dianisidine이 함유된 500  $\mu$ M과산화수소용액과 반응시켜 파장 460 nm에서 분광비색계를 이용하여 MPO 활성도를 측정하였다.

**기관지폐포세척액 내의 호중구 수 산정 :** 내독소에 의한 호중구의 폐포강 내로의 이동을 관찰하고 ke-

totifen 및 fucoidan에 의한 호중구의 이동 억제 효과를 관찰하기 위하여 기관지폐포세척액내 호중구 수를 산정 하였다. 8.0 ml의 생리적 식염수로 기관지폐포세척을 시행한 후, 상온 1,500 rpm에서 15분간 원심분리를 시행하여 상등액을 분리하고, 세포층에 0.1 ml의 생리적 식염수를 가하여 채부유시키고 hemocytometer를 이용하여 백혈구 수를 산정하였다. 채부유액의 일부는 cytopspin을 이용하여 도말 표본을 만들고 이 표본에 Wright 염색을 시행하여 호중구의 백분율을 구하여 기관지폐포세척액내의 호중구 수를 산정 하였다.

**폐장내 lyso PAF AT 활성도의 측정** : Bussolino등의 방법<sup>14</sup>에 따라 폐장 조직에서 lyso PAF AT 활성도를 측정하였다. 동결 보존된 좌측 폐장을 1 mM DTT가 함유된 1.0 ml 0.25 M sucrose용액에 담그고 균질하게 마쇄한 후 4℃에서 90초간 초음파 처리하였다. 그 후 100  $\mu$ l lyso PAF, 200  $\mu$ M <sup>3</sup>H-acetyl-coA(0.5  $\mu$ ci), 40  $\mu$ g BSA이 함유된 0.1 M-Tris-HCl (pH 6.9)완충용액과 혼합하여 37℃ 항온수조에서 15분간 반응시켰다. 2.0 ml chloroform-methanol 혼합액 (1:2, v/v)을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 Bligh와 Dyer의 방법에 따라 지질을 추출하였다. Chloroform층 지질은 질소로 chloroform을 제거한 뒤 방사능 활동도를 측정하여 생성된 PAF의 양을 계산하였다.

**미세구조적 관찰** : 폐장 내 미세구조의 변화를 관찰하기 위하여 폐장을 적출 즉시 2.5 % glutaraldehyde (0.1 M 인산완충용액, pH 7.4)로 전 고정시키고 밀폐된 용기에 공기를 계속 넣어 압축시켜 폐장내의 공기를 제거하였으며 전 고정이 끝난 조직은 1 % osmium tetroxide (0.1 M인산완충용액, pH 7.4)로 후 고정하였다. 후 고정이 끝난 후 인산완충용액으로 수세한 다음 alcohol-propylene oxide 계열로 농도를 순차적으로 증가시켜 탈수를 행하고 탈수 후 epoxyresin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 다음, ultramicrotome(Reicher Supernova)을 이용하여 60-70 nm의 두께로 초박절편하여 uranylacetate와 lead citrate로 염색한 후 투과전자현미경 (H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

**폐장 내 산소기 생성 관찰** : 내독소에 의한 폐장내 산소기 생성과 이에 미치는 ketotifen 및 fucoidan의 효과를 알아보기 위하여 Warren등의 방법<sup>15</sup>에 따라 cerium chloride cytochemical electron microscopy를 시행하였다. 폐장을 적출 즉시 2.0 mM cerium chloride, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.4), 7 % sucrose 그리고 0.002 % Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고, 밀폐된 용기에 넣어 압축공기를 이용하여 폐조직 내의 공기를 제거한 후 37℃의 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.1 M tris-maleate buffer (pH 7.4)와 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4)로 차례로 수세한 다음 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate buffr, pH=7.4)로 고정시켰다. 고정이 끝난 조직은 sodium cacodylate buffer로 수세하고 alcohol-propylene-oxide계열로 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시켜 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 후 ultramicrotome (Recher Supernova)을 이용하여 60-70 nm의 두께로 초박절편하고 uranyl acetate로 염색하여 투과전자현미경(H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

**통계처리** : 모든 성적은 평균±표준오차로 표시하였고 각 성적의 유의성은 Student-Newman-Keul's multiple comparison test로 검정하여 p<0.05를 유의하다고 인정하였다.

## 결 과

### 1. 폐장단백누출지수(lung leak index)의 측정

폐장내 손상의 정도를 나타내는 폐장 단백누출지수는 Figure 1과 같다. 대조군에서는 0.06±0.01 였으나, 내독소 투여 5시간 후 0.22±0.02 로 유의하게 증가(p<0.001)하여 내독소에 의해 모세혈관에서 단백여과가 증가하였음을 알 수 있었다. Ketotifen 투여군에서는 0.11±0.01 로 내독소 투여군에 비해 유의한 감소(p<0.001)를 보였고 이에 비하여 fucoidan 투여군에서는 0.28±0.04로서 내독소 투여군과 비교시 차이가 없었다.

## 2. 폐장내 호중구 침윤 검사

폐장에서 호중구 침윤을 나타내는 지표로서 MPO 활동도(U/g of wet lung)는 Figure 2와 같다. 대조군의  $4.92 \pm 0.59$ 에 비하여 내독소 투여군에서  $77.50 \pm 3.69$

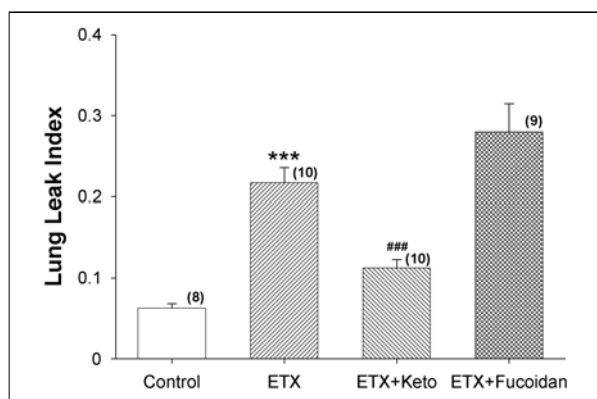


Figure 1. Comparison of the lung leak index (LLI) according to the experimental conditions. ETX increased the LLI compared with the control. In contrast, ketotifen decreased the LLI compared with that of the ETX-treated rats. Fucoidan had no effect LLI on the ETX-treated rats.

\*\*\* $p < 0.001$ , Control vs ETX

### $p < 0.001$ , ETX vs ETX+keto

ETX: endotoxin

keto: ketotifen fumarate

The number of experiments are in parentheses.

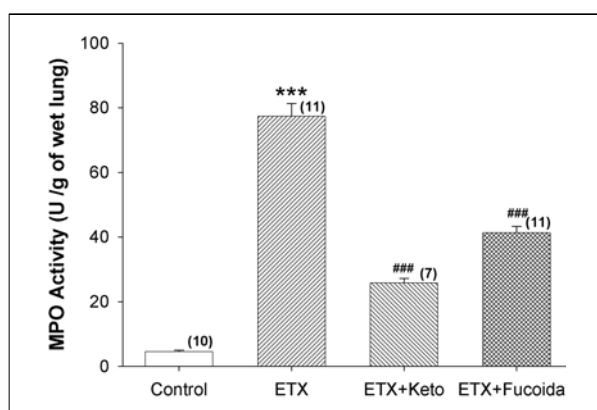


Figure 2. Changes in the MPO activity in the lung according to the experimental conditions. With the ETX treatment, lung MPO activity increased significantly compared with Figure 2.

\*\*\* $p < 0.001$ , Control vs ETX

### $p < 0.001$ , ETX vs ETX+Keto, ETX+Fucoidan

ETX: endotoxin

keto: ketotifen fumarate

로 유의하게 증가( $p < 0.001$ )하였고, ketotifen 투여군에서는  $25.85 \pm 1.39$ 로서 내독소 투여군에 비해 유의한 감소( $p < 0.001$ )를 보였다. Fucoidan 투여군에서는  $41.30 \pm 1.98$ 로서 내독소 투여군에 비해 유의한 감소 ( $p < 0.001$ )를 보였다.

## 3. 기관지폐포세척액 내의 호중구 수 산정

내독소 투여 후 BAL내 호중구 수(millions/two lungs)

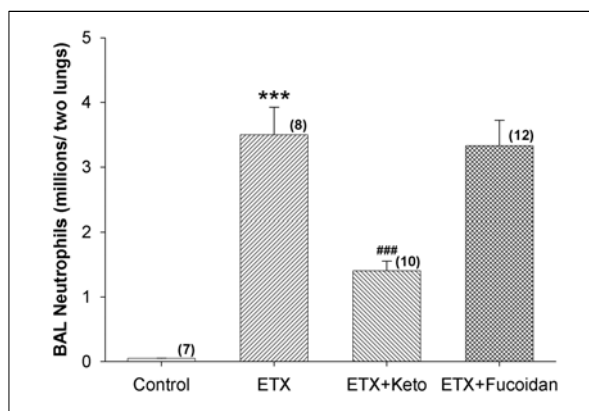


Figure 3. The effect of ketotifen and fucoidan on the migration of neutrophils from the interstitium into the alveolar lumen. After the ETX treatment, the number of BAL neutrophils increased compared with that of the control. Ketotifen decreased the number of BAL neutrophils compared with that of the ETX-treated rats. Fucoidan had no effect on the decrease in the BAL neutrophils.

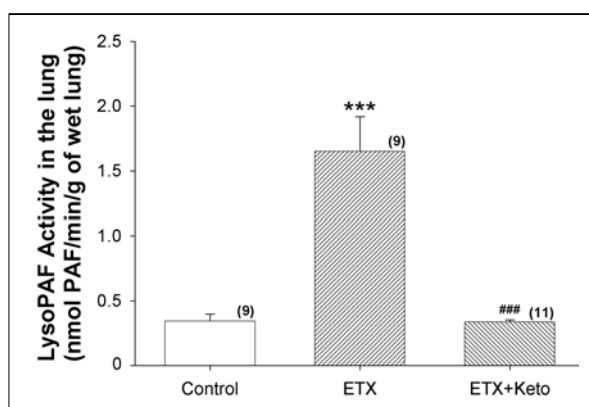


Figure 4. Effect of ETX and ketotifen on the lyso PAF AT activity in the lung. ETX increased the lyso PAF AT activity significantly compared with that of the control. However, ketotifen decreased the lysoPAF-AT activity significantly in ETX-treated rats, almost to the control level.

는 대조군에서  $0.05 \pm 0.01$ 로 Wright염색 도말표본에서 거의 단핵구만이 관찰되었으며 내독소 투여 5시간 후에는  $3.49 \pm 0.42$ 로 유의하게 증가( $p < 0.001$ )하였다. 이에 비하여 ketotifen 투여군은  $1.40 \pm 0.15$ 로 내독소 투여군과 비교시 유의한 감소( $p < 0.001$ )를 보였고 fucoidan 투여군은  $3.33 \pm 0.39$ 로서 내독소 투여군과 비교시 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Figure 3).

#### 4. 폐장내 lyso PAF AT 활성도의 측정

폐장내에서 PAF remodelling 즉, 생성을 나타내는 지표로서 lyso PAF AT의 활동도(nmol PAF/min/g of wet lung)는 Figure 4에서 보는 바와 같이 대조군의  $0.35 \pm 0.05$ 에 비하여 내독소 투여군은  $1.65 \pm 0.27$ 로 유의한 증가( $p < 0.001$ )를 보였고 ketotifen 투여군은  $0.34 \pm 0.01$ 로 내독소 투여군에 비해 유의한 감소( $p <$

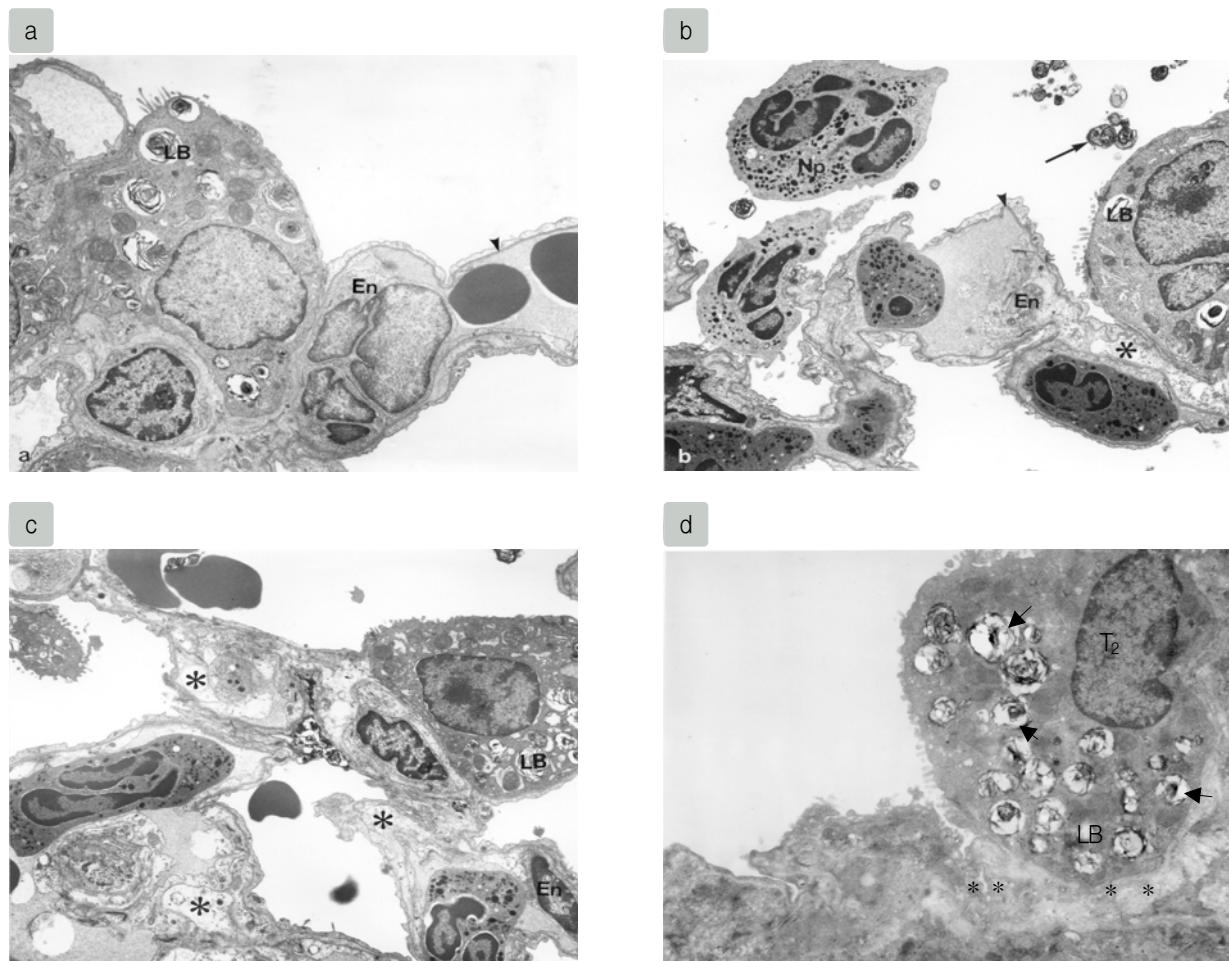


Figure 5. Ultrastructural findings in the lungs of the rats according to the experimental conditions. In the control rats, the lamellar bodies of alveolar type II cells were well preserved and the basal lamina of endothelial cell was intact (a, original mag.  $\times 3500$ ). In contrast, endotoxin caused conspicuous structural changes such as an infiltration of neutrophils (NP), interstitial edema (asterik), a thinning of the basal lamina of endothelial cell, floating of lamellar bodies in the alveolar lumen. The lamellar bodies of the alveolar type II cells were denatured (LB) (b, original mag.  $\times 3500$ ). Even if ketotifen did not affect the ultrastructural changes caused by the endotoxin such as diffuse interstitial edema (asterik), the lamellar bodies of the alveolar type II cell were relatively intact (LB) (c, original mag.  $\times 4000$ ). Fucoidan did not alter the ultrastructural changes caused by the endotoxin (d, original mag.  $\times 5000$ ). Denaturation and vacuolization of the lamellar bodies, which is a specific finding of oxidative stress, were evident in the alveolar type II cells, and the interstitial edema was diffuse. LB: lamellar body, En: endothelial cell, NP: neutrophil, T2: alveolar type II cell

0.001)보였다.

## 5. 미세구조적 관찰

폐장의 조직학적 변화는 Figure 5와 같다. 대조군은 혈관내피세포와 기저막이 명확하게 보존되어 있으며 특히 제2형 폐포세포내의 층상체(lamellar body)가 잘 보존되어 있었다(Figure 5-a). 그러나 내독소 투여군은 혈관내피세포의 blebbing 및 간질 조직의 부종이 현저히 관찰되며 특히 폐포강내에 층상체 및 호중구

의 유주, 세포간질에 호중구의 침윤이 현저하였다. 동시에 조직에 침윤한 호중구가 혈관내피세포막과 융합(fusion)된 모습이 보였다(Figure 5-b). 이에 비하여 ketotifen 투여군에서는 호중구 침윤이 감소하고 제 2형 폐포세포 내의 층상체가 비교적 잘 보존되어 있었다. 그러나 전반적으로 혈관내피세포의 괴사, 간질의 부종 등은 개선되지 않았다(Figure 5-c). Fucoidan 투여군에서는 제 2형 폐포세포 내의 층상체의 공포화 및 변성이 눈에 띄며 간질의 부종이 현저하여 내독소에 의한 손상을 억제되지 못하였음을 보여주었다(Figure 5-d).

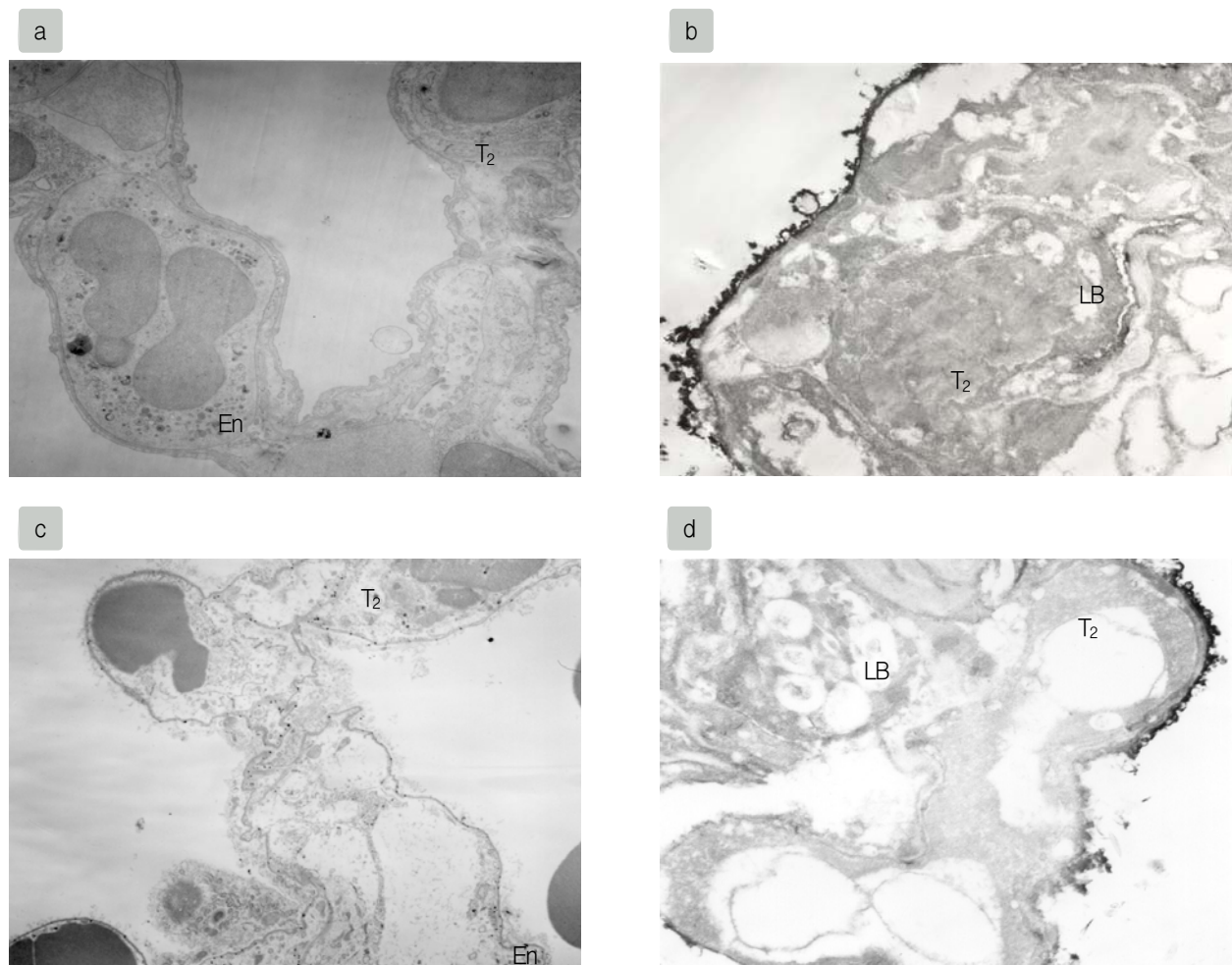


Figure 6. Representative photograph of the electron microscopic cytochemical detection of hydrogen peroxide in the lung.

In the control lung of the rats, no cerous perhydroxide granules were found (a, original mag $\times$ 4000). In contrast, clumped granules of cerous perhydroxide were found along the epithelial lining of the alveolar type II cells in endotoxin treated rats (b, original mag  $\times$  5000). Interestingly, ketotifen decreased the granules of cerous perhydroxide in the lungs of the rats given the endotoxin (c, original mag $\times$ 4000). Probing the effect of fucoidan on the production of cerous perhydroxide showed that, there was no significant decrease in cerous perhydroxide level compared with that of the endotoxin-treated rats (d, original mag. $\times$ 4000).



## 6. 폐장 내 산소기 생성 관찰

폐장조직에서 산소기 형성 검사에서 대조군(Figure 6-a)에 비해 내독소 투여군에서 폐포장벽(alveolar barrier)을 따라 다량의 cerrous perhydroxide가 관찰되고 있어 내독소에 의해 폐장 내 산소기, 특히 과산화수소 생성이 현저하다는 사실을 알 수 있었다(Figure 6-b). 그러나 ketotifen 투여군에서는 간질조직 및 폐포 세포막을 따라 소량의 cerrous perhydroxide 과립만이 관찰되었으며(Figure 6-c), 이에 비해 fucoidan 투여군에서는 폐포막을 따라 형성된 cerrous perhydroxide 과립의 감소가 관찰되지 않았다(Figure 6-d).

## 고 찰

ARDS에서 가장 중요한 병태생리학적 변화는 폐장 내 모세혈관의 투과도 증가에 따르는 수분 및 단백질의 폐포강내 이동이다. 내독소는 염증반응을 유발하여 이러한 수분 및 단백질의 이동을 일으키는데 폐손상의 지표로 사용되는 폐장단백누출지수(lung leak index)는 내독소에 의한 급성 폐손상에서 현저히 증가한다<sup>16</sup>. 본 연구의 결과에서 내독소 투여 5시간 후에 폐장단백누출지수가 증가하여 모세혈관투과도 증가 및 혈관내피세포의 손상이 생겼음을 알 수 있다. 염증 상태에서 PAF 형성의 주요 통로인 PAF remodelling을 감소시키자 단백질누출이 감소하였으며 이러한 손상의 감소가 단순히 호중구의 조직내 침윤에 따른 것인지를 확인해 보기 위해 fucoidan을 투여한 결과 단백질누출은 오히려 증가하였다.

내독소에 의한 폐장의 손상이 호중구의 침윤과 관계가 있다는 사실, 그리고 호중구의 산소기 생성에 따른 산화성 스트레스가 그 원인의 일부라는 사실은 많은 실험적 증거에 의해 확인되었다<sup>17-19</sup>. 본 연구의 결과에서도 내독소에 의해 MPO 활동도가 증가하고 BAL내의 호중구 수가 증가하였다. 내독소는 ARDS에서 폐장내 PLA<sub>2</sub>의 활성도를 증가시켜 PAF의 생성을 증가시키고<sup>20</sup> 이때 생성된 PAF는 화학주성에 의해 호중구의 침윤을 유도하고, 동시에 호중구막의 NADPH oxidase를 활성화하여 산소기 생성을 증가시키고, 유

착분자를 활성화한다<sup>21</sup>. 이러한 과정을 통해 PAF는 호중구에 의한 산화성 스트레스를 유발한다. 이때 PLA<sub>2</sub>의 작용에 의해 생성된 lyso PAF가 PAF로 변화되는 과정(remodelling)에 작용하는 lyso PAF AT의 억제제인 ketotifen을 사용하여 PAF 생성의 억제<sup>22</sup>, 즉 lyso PAF의 remodelling을 억제하면 MPO 활동도 및 BAL내의 호중구 수가 감소하였다. 그러나 단순히 유착세포를 억제한 경우 MPO 활동도는 감소하였으나 BAL내의 호중구 수는 감소하지 않았는데, 이는 급성 폐손상에서 증가하는 PAF를 포함하는 화학주성인자들이 fucoidan에 의해서 변화하지 않았거나, fucoidan 작용에 따른 폐장내 출혈에 의한 혈액의 혼재가 그 원인이 될 수 있을 것으로 생각된다.

내독소 투여군에서 관찰되는 조직학적인 변화, 즉 조직내 호중구의 침윤과 혈관 내피세포의 괴사, 폐포강 내의 lamellar체 변성은 내독소에 의해 폐장내에서 산화성 스트레스가 유발되었음을 의미한다<sup>23</sup>. 이러한 병리학적 소견들은 ketotifen에 의한 PAF remodelling 억제시 감소를 보였는데 특히 제 2형 폐포세포에서 보이는 산화성 스트레스에 의한 변화가 감소하였다. PAF생성 감소에 따라 폐장 내 과산화수소의 생성도 현저히 감소하였다. 이에 반하여 fucoidan 투여시 내독소 투여군에서 관찰되는 조직학적인 변화의 경감이 관찰되지 않았다. 제 2형 폐포세포는 세포질내 lamellar체의 공포화 등 산화성 스트레스 양상을 그대로 유지하고 있으며 내독소에 의해 형성된 산소기 생성도 변화를 보이지 않았다. 오히려 fucoidan의 과량 투여는 폐장의 출혈 및 이에 따른 사망률을 증가시켰다(data not shown). 이것은 fucoidan의 항혈액응고 작용에 의한 것으로 생각되지만<sup>24</sup> 동시에 출혈에 따른 폐장내 철분의 증가가 생성된 과산화수소와 반응하여 중독한 hydroxyl radical을 형성하여 혈관내피세포에 손상을 주었을 가능성도 있다<sup>25</sup>. fucoidan 투여 후 단백질누출지수가 오히려 증가하는 것이 그 실험적 증거가 될 수 있을 것으로 보인다.

호중구가 ARDS의 병인론에 관여하며 특히 산소기의 형성에 따른 폐장 내 산화성 스트레스를 유발하는 것은 많은 실험적 증거를 통하여 증명되었다. 그러나 단순한 호중구의 침윤 자체가 산화성 스트레스를 유

발하는 것은 아닌 듯하다. CINC에 의해 유도된 호중구의 침윤시 IL-1이 관여해야만 급성 폐 손상이 일어난다던지<sup>26</sup>, IL-1을 기도내 투여시 PLA<sub>2</sub>의 활성화가 선행되고 PAF의 생성이 증가되어 이에 따른 급성 폐 손상이 일어난다던지 하는 실험적 증거들<sup>27</sup>은 모두가 단순한 호중구 침윤만이 산화성 스트레스의 원인이 아니라는 것을 시사한다. 본 연구의 결과에서도 보듯이 fucoidan에 의한 유착분자 억제로 호중구의 침윤은 감소하였으나 내독소에 의한 급성 폐 손상은 호전되지 않았으며 동시에 폐장 내의 산화성 스트레스도 감소하지 않았다.

이상의 실험결과로 미루어 볼 때 내독소에 의한 급성 폐 손상에서 ketotifen을 이용한 PAF remodeling 억제는 호중구에서 산소기 생성을 감소시켜 폐장내 산화성 스트레스를 감소, 이에 따라 급성 폐 손상을 경감시킬 것으로 생각된다. 반면 fucoidan을 이용한 유착분자의 억제는 내독소에 의한 폐장내 손상, 특히 호중구에 의한 손상을 억제하지 못하는 것으로 미루어 단순히 fucoidan을 이용하여 유착분자 활성화를 억제하는 것만으로는 폐 손상을 경감시키는 효과가 없을 것으로 사료되었다.

## 요 약

### 연구배경 :

호중구는 급성 폐 손상에서 폐장내 염증반응에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 호중구가 조직 손상을 유발하기 위해서 폐모세혈관내로 격리(sequestration), 유착(adhesion) 및 화학주성(chemotaxis)에 의한 폐장내의 간질(interstitium)쪽으로의 이동(migration)등의 과정을 거치며, 유착분자는 이 과정에서 호중구의 혈관내피세포와의 결합을 매개한다. 한편 폐 손상에서 remodeling 경로를 통해 생성되는 PAF은 호중구 침윤에 화학유인물질로 작용하고 호중구의 유착과 활성화를 자극한다. 이에 근거하여 본 연구에서는 내독소로 유도된 의한 급성 폐 손상에서 ketotifen을 사용하여 PAF remodelling을 억제하거나 fucoidan을 이용하여 유착분자를 억제함으로써 호중구에 의한 산화성 스트레스 감소에 따르는 폐 손상 억제 효과를

확인하고자 하였다.

### 방 법 :

체중 300g 내외의 수컷 *Sprague-Dawley*에서 대장균 내독소의 기도내 투여로 급성 폐 손상을 유도하고 PAF remodeling 및 유착분자의 억제 효과를 보기 위해 각각 ketotifen fumarate와 fucoidan을 내독소 투여 전 복강내 주사하였다. 각 군에서 단백 누출지수, 폐장내 MPO 활동도, 기관지 폐포세척액내 호중구수와 lyso PAF AT 활성도를 측정하였고 폐장의 미세 구조적 변화 및 산소기 생성을 관찰하였다.

### 결 과 :

내독소 투여군에서 대조군과 비교하여 단백 누출지수, 폐장내 MPO 활동도, 기관지 폐포세척액내 호중구수, 폐장내 lyso PAF AT 활성도가 증가하였고 조직내 호중구의 침윤 및 산소기 생성이 현저하여 폐 손상이 유발되었음을 알 수 있었다. ketotifen 투여군에서는 내독소 투여군에 비해 단백 누출지수, 폐장내 MPO 활동도, 기관지 폐포세척액내 호중구수, 폐장내 lyso PAF AT 활성도가 감소하였으며 조직학적 변화도 경감되었다. 반면 fucoidan 투여군에서는 단백 누출지수, 기관지 폐포세척액내 호중구수의 감소를 보이지 않았고 내독소에 의한 조직학적 변화의 경감도 보이지 않았다.

### 결 론 :

내독소에 의한 급성 폐 손상에서 PAF remodeling의 억제는 호중구에서 산소기 생성을 감소시켜 폐장내 산화성 스트레스를 감소, 이에 따라 폐 손상을 경감시킬 것으로 생각되며 fucoidan에 의한 유착분자의 억제는 내독소에 의한 폐장내 손상, 특히 호중구에 의한 손상을 억제하지 못하는 것으로 미루어 단순히 fucoidan을 이용하여 유착분자 활성화를 억제하는 것만으로는 폐 손상을 경감시키는 효과가 없을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Demling RH. The modern version of adult respiratory distress syndrome. *Ann Rev Med.* 1995;46:193-202.
2. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 2002;



- 57:540-6.
3. Cholle-Martin S, Jourdain B, Gibert C, Elbim C, Chastre J, Gougerot-Pocidal MA. Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:594-601.
4. Dana R, Malech HL, Levy R. The requirement for phospholipase A<sub>2</sub> for activation of the assembled NADPH Oxidase in human neutrophils. *Biochem J* 1994;297:217-23.
5. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S195-9.
6. Albert RK. Mechanisms of the adult respiratory distress syndrome: selectins. *Thorax* 1995;50:S49-52.
7. Rabinovici R. Platelet activating factor inhibition in sepsis: The end? *Crit Care Med* 2003;31:1861-2.
8. Snyder F, Fitzgerald V, Blank ML. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 1996;416:5-10.
9. Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, et al. Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 1999;104:1071-6.
10. Sorensen J, Kald B, Tagesson C, Lindahl M. Platelet-activating factor and phospholipase A<sub>2</sub> in patients with septic shock and trauma. *Intensive Care Med* 1994;20:551-61.
11. Craps LP. Immunologic and therapeutic aspects of ketotifen. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:389-93.
12. Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. A revised structure for fucoidan may explain some of its biologic activities. *J Biol Chem* 1993;268:21770-6.
13. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measurement of pulmonary leukotaxis in rabbits. *J Appl Physiol* 1985;59:1978-85.
14. Bussolino F, Gremo F, Tetta C, Pescarmona GP, Camussi G. Production of platelet-activating factor by chicken retina. *J Biol Chem* 1986;261:16502-8.
15. Warren JS, Kunkel RG, Simon RH, Johnson KJ, Ward PA. Ultrastructural cytochemical analysis of oxygen radical-mediated immunoglobulin A immune complex induced lung injury in the rat. *Lab Invest* 1989;60:651-8.
16. Liao DF, Barret CR, Bell AL, Ryan SF. Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:395-401.
17. Delclaux C, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, Brun-Buisson C, Lafuma C, Harf A. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol* 1997;273:L104-12.
18. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory syndrome. *Br J Surg* 1993;80:10-7.
19. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Repine JE. Platelet-activating factor induces lung inflammation and leak in rats: Hydrogen peroxide production along neutrophil-lung endothelial cell interfaces. *J Lab Clin Med* 2002;140:312-9.
20. Bulger EM, Maier RV. Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit Care Med* 2000;28:N27-36.
21. Ingraham LM, Coates TD, Allen JM, Higgins CP, Baehner RL, Boxer LA. Metabolic membrane and functional responses of human polymorphonuclear leukocytes to platelet-activating factor. *Blood* 1982;59:1259-66.
22. Bussolino F, Camussi G. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem* 1995;229: 327-37.
23. 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* 1989;86:5296-300.
24. Harris G, Doctor VM. The effect of 6-aminohexanoic acid and fucoidan on the activation of glutamic plasminogen by streptokinase. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:355-9.
25. Sharkey RA, Donnelly SC, Connelly KG, Robertson CE, Haslett C, Repine JE. Initial serum ferritin levels in patients with multiple trauma and the subsequent development of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1506-9.
26. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced lung leak in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:472-8.
27. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine AJ, et al. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L75-80.