

□ 원 저 □

출혈성 쇼크에 의한 급성 폐손상에서 Phospholipase A2의 활성화에 의한 산화성스트레스의 역할

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실, 흉부외과학교실¹, 내과학교실²

장유석, 김성은, 전상훈¹, 신태립², 이영만³

= Abstract =

Phospholipase A2 Contributes to Hemorrhage-induced Acute Lung Injury Through Neutrophilic Respiratory Burst

Yoo Suck Jang, M.D., Seong Eun Kim, Sang Hoon Jheon, M.D.¹,
Tae Rim Shin, M.D.², Young Man Lee, M.D.³

Department of Physiology, Chest Surgery¹, Internal Medicine², Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

Background : The present study was carried out in association with neutrophilic respiratory burst in the lung in order to clarify the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome(ARDS) following acute severe hemorrhage. Because oxidative stress has been suggested as one of the principal factors causing tissue injury, the role of free radicals from neutrophils was assessed in acute hemorrhage-induced lung injury.

Method : In Sprague-Dawley rats, hemorrhagic shock was induced by withdrawing blood(20 ml/kg of B.W) for 5 min and the hypotensive state was sustained for 60 min. To determine the mechanism and role of oxidative stress associated with phospholipase A2(PLA2) by neutrophils, the level of lung leakage, pulmonary myeloperoxidase(MPO), and the pulmonary PLA2 were measured. In addition, the production of free radicals was assessed in isolated neutrophils by cytochemical electron microscopy in the lung.

Results : In hypotensive shock-induced acute lung injury, the pulmonary MPO, the level of lung leakage and the production of free radicals were higher. The inhibition of PLA2 with mepacrine decreased the pulmonary MPO, level of lung leakage and the production of free radicals from neutrophils.

Conclusion : A. neutrophilic respiratory burst is responsible for the oxidative stress causing acute lung injury

Address for correspondence :

Young Man Lee, M.D.

Department of Physiology, Catholic University of Daegu, School of Medicine

3056-4 DaeMyung Dong, Nam Gu, Daegu, Korea

Phone : 053-651-4472 Fax : 053-621-4106 E-mail : leeym@cuth.cataegu.ac.kr

followed by acute, severe hemorrhage. PLA2 activation is the principal cause of this oxidative stress. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 503-516)

Key words : Acute hemorrhage, ARDS, Oxidative stress, PLA2

서 론

급성호흡곤란증후군(Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)은 급성 염증성 폐부종을 특징으로 하는 다발성 장기부전증후군(Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS)의 한 형태로 그 발생 원인은 패혈증, 화상, 다발성외상, 출혈 등으로 다양하나 최근까지도 그 병인론은 확실히 알려지지 않고 있다¹. Connelly 및 Repine²은 ARDS의 발병원인에 따라 병인론의 차이가 있을 것으로 보고한 바 있다. 폐장조직의 손상에 관련된 기전중 산소기 형성에 따른 폐부종에 관한 이론은 ARDS의 원인에 따라 산소기의 형성기전이 다름을 시사하는데 사이도카인이나 내독소에 의해 유도된 ARDS의 동물모델에서는 PLA2의 역할이 상당히 중요한 것으로 알려져 있고^{3,4} 재관류 손상에 따른 ARDS의 경우는 xanthine oxidase(XO)가 산소기 형성의 주원인이라고 알려져 있다⁵. 즉 조직에서의 허혈-재관류(ischemiareperfusion, I/R)에 의한 손상은 조직에서의 xanthine dehydrogenase(XD)의 XO로의 변환에 의한 산소기의 형성이 주원인으로 알려져 있고 특히 Terada등⁶에 따르면 출혈성 shock시에 병발하는 급성 폐손상은 주로 XO의 작용에 의한 혈관내피세포의 손상이 그 원인이라고 하였다. 그러나 gut I/R에 의한 폐부종시 PLA2의 억제제는 폐부종을 감소시킨다는 Koike등⁷의 보고에서 PLA2가 급성 폐부종에 관여할 뿐 아니라 PLA2의 억제에 따른 산소기 형성도 감소시키는 것이 확인되어 PLA2 역시 재관류 손상에 관여한다고 보여진다. 특히 Lee등⁸은 gut I/R에 의한 폐손상에서 혈액, 장 및 폐장내의 platelet activating factor(PAF)가 증가함과 동시에 폐장내의 PLA2의 활성도의 증가는 PAF의 remodelling을 통한 PAF의 증

가를 가져와 폐장조직내의 산소기의 형성을 증가시킴으로써 조직의 손상을 유발한다고 하였다.

이러한 조직의 손상원인인 산화성스트레스(oxidative stress)는 주로 호흡구의 respiratory burst에 의한 것임을 증명하는 결과가 많이 보고되었다⁹. 이러한 점에서 출혈성 쇼크에 동반되는 ARDS의 기전을 조직의 재관류에 의한 손상으로 보고 이때의 호흡구에 의한 산화성스트레스의 기전을 PLA2의 작용과 연관하여 알아봄으로써 ARDS 발병기전의 일단을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상

실험대상은 체중 300-350 g의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐로 하였다. 실험에 사용된 시약 중 PLA2의 활동도를 측정하기 위하여 사용한 방사성 동위원소인 Palmitoyl-2(9,10(N)-³H)palmitoyl)-phosphatidylcholine(³H-DPP C)은 New England Nuclear(Boston, MA, USA)사에서 구입하였고 그 외의 모든 시약은 Sigma사(St. Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 출혈에 의한 급성 폐손상의 유도

흰쥐에서 출혈성 쇼크에 의한 급성 폐손상을 유도하기 위하여 급성 출혈을 유발하였다. 즉 흰쥐를 ketamine hydrochloride(60 mg/kg) 및 xylaxine(6 mg/kg)를 복강내로 주사하여 마취를 유도한 뒤 흰쥐의 양쪽 대퇴동맥에 heparin(50 IU)을 채운 polyethylene catheter를 삽입하여 우측 대퇴동맥에서 평

관동맥압을 측정하고 동시에 좌측 대퇴동맥으로부터 체중의 3% 정도의 혈액을 withdrawl pump(Harvard Apparatus, UK)를 이용하여 1.0-2.0 ml/min 속도로 뽑아 급성 출혈성 쇼크를 유발하였다. 출혈직전, 출혈중 및 출혈후 60분간 혈압 및 심박동수를 Grass제 polygraph를 이용하여 측정하였다. 즉 Grass제 Model 79 polygraph에 Stetham's strain gauge coupler를 이용하여 수축기 및 이완기 혈압을 측정한 뒤 이를 평균동맥압으로 환산하여 묘기하였다. 심박동수는 흰쥐의 양쪽상지에 심전도 전극을 부착하여 심전도를 묘기하고 이를 tachometer coupler에 연결하여 시간의 변화에 따른 심박동수를 연속적으로 묘기하였다.

Mepacrine 전처치군에서는 PLA2의 억제효과를 보기 위해 catheter삽입직전 mepacrine(60 mg/kg)을 복강내로 투여하였다.

3. 출혈성 쇼크에 의한 급성 폐손상의 확인

출혈 1시간후에 혈중 단백질이 폐포강내로 유출된 것을 기관지폐포세척(bronchoalveolar lavage)을 통하여 얻은 세척액내의 단백질량을 측정함으로써 확인하였다. 즉 출혈후 1시간이 지난후 흰쥐에 succinylcholine(2 mg/kg)을 복강내로 주사하여 치사시키고 기도에 삽관한 뒤 8.0 ml의 식염수를 이용하여 기관지 폐포세척을 시행하였다. 대개의 경우 6.0 ml의 세척액을 얻을 수 있었고 단백질 함량의 측정은 상온에서 1,500 rpm에서 15분간 원심분리를 시행하여 세포성분을 갈아 앉힌 다음 상층액을 이용하여 Brown등의 방법¹⁰⁾에 따라 시행하였다.

4. 폐장내 myeloperoxidase(MPO)의 측정

출혈 60분후 폐장내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 폐장조직내의 MPO를 Goldblum등의 방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. 즉 출혈 60분 후 기도삽관하여 rodent ventilator(Harvard rodent ventilator, model

683, UK)를 연결하고 개흉술을 시행, 심장 및 폐를 노출시킨 뒤 우심방내로 heparin(50 IU)을 주입하였으며 폐동맥에 삽관한 뒤 Masterflex perfusion pump (Cole-Parmer, USA)를 이용하여 생리적 식염수를 주입하여 양측 폐장을 관류시켜 폐장내의 혈액을 제거하였다. 그 뒤 양측 폐장을 -70℃에 보관하였다. MPO의 정량을 위해서는 동결보관된 좌측폐장을 4.0 ml의 20 mM potassium phosphate(pH 7.4)용액에 담근 후 4℃에서 마쇄하여 균질액을 만들고 4℃, 18,000rpm(Beckman, USA)에서 30분간 원심하였다. 그 후 상층액을 버리고 침전층(pellet)을 4.0 ml의 0.5%의 hexadecyltetramethyl-ammonium bromide이 함유된 50 mM potassium phosphate(pH 6.0)용액에 재부유 시켰으며 90초간 Vibracell(Sonics & Materials Inc., USA)을 이용하여 sonication하였다. 그 뒤 균질액을 60℃에서 120분간 항온수조에서 반응시킨후 1.0 ml를 취하여 20,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 그 후 상층액 1.0 ml를 취하여 o-dianisidine(0.168 g)이 함유된 과산화수소 용액(500μM) 3.0 ml와 반응시켜 시간의 변화에 따른 흡광도의 변화를 측정하여 기울기를 구하고 이 기울기에 13.5를 곱한 값에 폐장의 무게로 나누어 MPO의 활동도(U/g of wet lung)를 계산하였다.

5. 기도폐포세척액내의 백혈구의 산정

출혈후 폐포내로 이동(migration)한 호중구의 증가를 관찰하기 위하여 기관지폐포세척액내의 백혈구 수를 산정하였다. 즉 8.0 ml의 생리적 식염수로 기관지 폐포세척을 시행한 후, 상온 1,500 rpm에서 15분간 원심분리를 시행한 뒤 상층액을 분리하고, 세포층에 0.1 ml의 생리적 식염수를 가하고 재부유 시킨 후 hemocytometer를 이용하여 백혈구 수를 산정하였다.

6. 폐장내 PLA2의 활성도의 측정

출혈 60분 후에 폐장내 PLA2의 활성도의 측정을

Katsumata 등의 방법¹²에 따라 시행하였다. 즉 -70℃로 보존된 폐장을 2.0 ml의 완충용액(0.15 mM KCl, 10 mM Tris base, 10 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 1 mM DTT, 50 µg/ml PMSF, 3 µg/ml leupeptin)에 담근 후 분쇄기(homogenizer, Polytron 1200, Kinematica AG, Swizland)를 이용하여 마쇄하고 Vibracell(Sonics & Materials Inc., USA)을 이용하여 90초간 sonication하였다 그 후 0.1 ml의 마쇄액을 취하여 $2\mu\text{Ci}$ 의 ^3H -DPPC가 포함된 완충용액(100 mM glycine, 10 g/L bovine serum albumin, 2.5 mM deoxycholate, 0.1 mM lecithin, 2.0 mM CaCl_2 , 1.75 mM ethanol, pH 9.0)과 혼합하고 37℃의 항온수조에서 60분간 반응시켰다. 이때 표준시료로 0.01 unit의 *Crotalus adamanteus* PLA2를 같이 반응시켜 실험의 재현성을 확인하였다. 60분 후 0.2% Triton X-100를 함유한 0.25 M EDTA 0.2 ml를 가하여 반응을 중지시키고 1.5g의 Na_2SO_4 를 가하여 단백질을 침전시켰으며 5.0 ml의 0.1% acidic hexane을 가하여 혼합한 후 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 분리된 상층액 1.0 ml는 3.0 ml의 scintillation cocktail과 혼합한 후 beta scintillation spectroscopy를 시행하였다. PLA2의 활동도 1 unit는 분당 1 µmol의 유리지방산이 생성되는 것으로 정의하였다.

7. 혈액에서의 호중구의 분리

PLA2 억제에 따른 호중구에서의 산소기 생성 억제 확인하고자 분리된 호중구에서 cytochrome-c를 이용한 NADPH oxidase의 활성도를 측정하기 위하여 호중구를 사람의 혈액에서 분리하였다. 즉 건강한 사람의 신선한 혈액에서 Haslett 등의 방법¹³에 따라 호중구를 분리하였다. 2개의 50 ml 주사기에 각각 혈액 30 ml당 15 ml의 Hetastarch와 heparin(50 IU)을 혼합한 후 40분간 실온에 세워 덩으로써 혈장과 적혈구를 분리하고 분리된 혈장은 등장성 percoll을 이용하여 55%, 74%의 gradient centrifugation을 상온

1,500 rpm에서 20분간 시행하였다. 그 후 74%와 55% percoll의 인접면에 모인 호중구만을 수집하여 생리적 식염수로 재부유시키고 800 rpm 상온에서 10분간 원심분리하는 과정을 2회 시행하여 호중구를 세척하였다. 그 후 호중구 pellet을 3.0 ml의 Hank's balanced salt solution에 재부유하여 1.0 ml당 10^7 개의 농도가 되게 한 뒤 cytochrome-c assay에 이용하였다.

8. 호중구에서의 산소기 생성의 측정

분리된 호중구를 이용하여 cytochrome-c assay를 Both 등의 방법¹⁴에 따라 시행하여 PLA2의 억제에 산소기 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 호중구 10^6 개당 PMA 용액 (5 µg/4.0ml) 0.1 ml, 0.1% normal pooled serum, 0.1 ml 200 IU superoxide dismutase, 0.1 ml ferricytochrome C (14.88 mg/ml), 100 nM mepacrine을 혼합한 후 37℃의 항온수조에서 반응시키고 상온, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리, 상층액을 파장 550 nm 에서 spectrophotometry를 시행하였다.

9. 미세구조적 관찰

출혈 후 폐장내의 미세구조적 변화를 관찰하기 위하여 폐조직을 적출 즉시 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 전 고정 시킨다음, 밀폐된 용기에 넣고 진공을 이용하여 조직내 공기를 제거하였다. 전 고정이 끝난 조직을 phosphate buffer로 세척한 후 1% osmium tetroxide (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 동안 후 고정시켰다. 후 고정이 끝난 후 phosphate buffer로 수세한 다음 alcohol-propylene oxide 계열로 농도를 순차적으로 증가시키고 epoxy resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 다음, ultramicrotome (Reicher Supernova)를 이용하여 60-70 nm 두께로 초박절편하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색

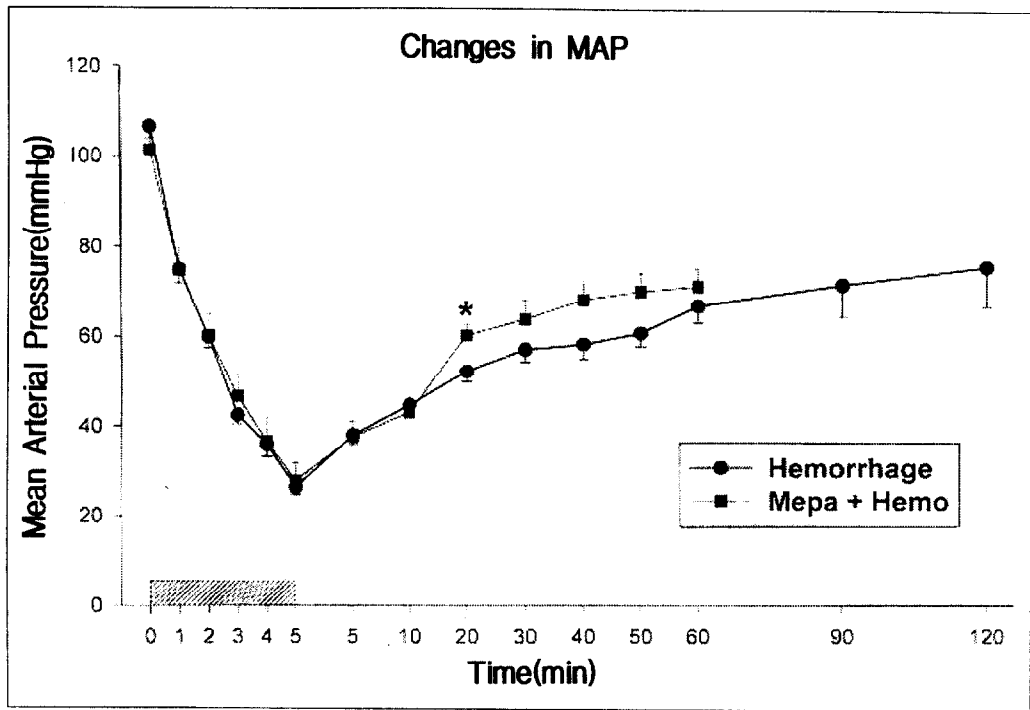


Fig. 1. Changes in mean arterial pressure(MAP) in rats following severe hemorrhage. At 5 min after hemorrhage, MAP had decreased conspicuously. In recovering period, mepacrine accelerated the recovery of MAP at 20 min but, afterwards there was no significant difference in MAP between hemorrhage and mepacrine treated rats. * <0.05 , hemorrhage vs. hemorrhage + mepacrine

한 후 투과전자현미경(H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

10. 과산화수소를 관찰하기 위한 세포화학적 방법

출혈성 쇼크에서 폐장내 산소기의 형성을 확인하기 위하여 cerium chloride를 이용한 Hobson등의 방법¹⁵에 따라 세포화학적 전자현미경법을 시행하였다.

폐조직 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 0.0002% Triton X-100으로 조제된 기질에 담그고, 밀폐된 용기에 넣어 진공을 이용하여 폐조직내 공기를 제거한 다

음 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 0.1 M tris-maleate buffer(pH 7.4)와 0.1 M sodium cacodylate buffer(pH 7.4)로 차례로 수세한 후 1% osmium tetroxide(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)로 고정시켰다. 고정이 끝난 조직을 sodium cacodylate buffer로 수세하고 alcohol-propylene oxide계열로 농도를 순차적으로 증가시키며 탈수시킨 다음 epoxy-resin에 포매하였다. 포매된 조직을 열중합시켜 블록을 제작한 뒤 ultramicrotome(Recher Supernova)을 이용하여 60-70 nm의 두께로 초박절편하여 uranyl acetate로 염색한 후 투과전자현미경(H-600, Hitachi)으로 관찰하였다.

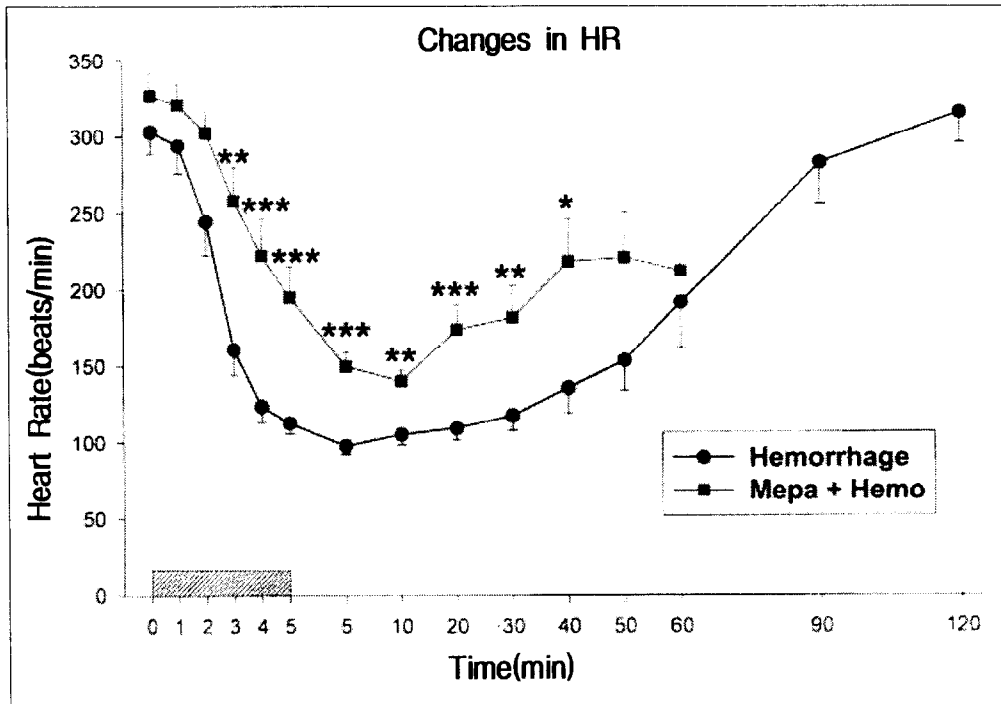


Fig. 2. Changes in heart rate(HR) in rats following severe hemorrhage and treatment of mepacrine. HR had decreased abruptly after hemorrhage whereas the recovery of HR was observed in 2 hrs. The treatment of mepacrine lessened($p < 0.05$, 0.01 , 0.001) the drop of HR after hemorrhage. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, hemorrhage vs. hemorrhage+mepacrine

11. 통계처리

모든 성적은 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 각 성적의 유의성은 ANOVA test 후에 Student-Newman-Keuls multiple comparison test로 검정하여 $p < 0.05$ 를 유의하다고 인정하였다.

결 과

출혈성 쇼크에 의한 급성 폐손상의 기전을 알아보기 위해 시행한 본 연구의 결과는 다음과 같다.

출혈군에 있어서의 평균동맥압은 출혈전 106.5 ± 2.59 mmHg에서 26.4 ± 1.78 mmHg로 감소하였다. 출혈 및 mepacrine을 투여한 군에 있어서는 출혈전

101.3 ± 4.82 mmHg에서 27.9 ± 3.93 mmHg로 감소하여 출혈군과 비교시 유의한 차이가 없었다. 회복기 20분에 있어서 평균동맥압은 출혈군에서는 52.1 ± 2.28 mmHg로 증가하였고 mepacrine을 투여한 군에서는 60.1 ± 2.69 mmHg로서 유의한($p < 0.05$) 차이가 있었으나 그후 60분에 이르기까지는 유의한 차이가 없이 서서히 증가하였다(Fig. 1). 출혈후 심박동수의 변화는 출혈직전 303.2 ± 14.13 회/min였고 출혈후 5분에는 113.2 ± 6.77 회/min로 감소하였다. 출혈전 mepacrine을 투여한 군에서는 실험직전 327.0 ± 14.67 회/min에서 출혈후 5분에는 195.7 ± 19.97 회/min로 감소하여 심박동수의 감소는 mepacrine을 투여한 군에서는 출혈군에 비하여 덜 감소하였고 회복기에 있어서는 mepacrine을 투여한 군에서 전반적으로

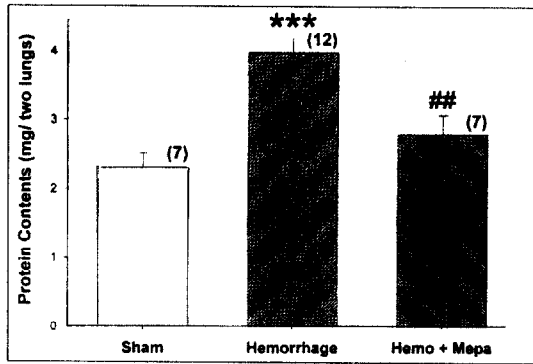


Fig. 3. Effect of severe hemorrhage on the protein contents in the bronchoalveolar lavage (BAL). Hemorrhage had increased ($p < 0.001$) protein contents in the BAL, which was reversed by mepacrine ($p < 0.01$).

*** $p < 0.001$ sham vs. hemorrhage,

$p < 0.01$ hemorrhage vs. hemorrhage + mepacrine. Numbers of experiments are in the parentheses.

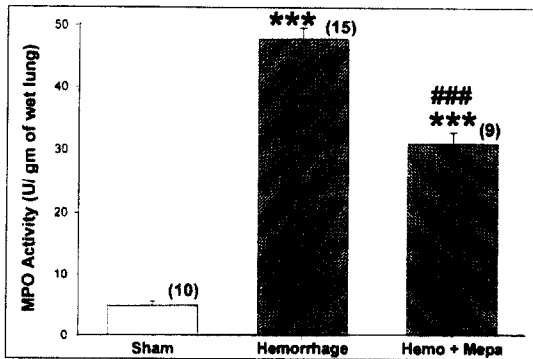


Fig. 4. Changes in lung myeloperoxidase(MPO) activity following severe hemorrhage. Hemorrhage had increased ($p < 0.001$) MPO activity compared with sham, which was reversed ($p < 0.001$) by mepacrine.

*** $p < 0.001$, sham vs. hemorrhage,

$p < 0.001$, hemorrhage vs. hemorrhage + mepacrine

Hemo ; hemorrhage, Mepa ; mepacrine. Numbers of experiments are in the parentheses.

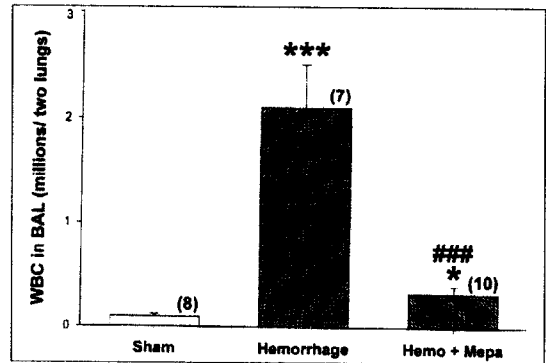


Fig. 5. Changes of the numbers of WBC in bronchoalveolar lavage(BAL). hemorrhage had increased ($p < 0.001$) numbers of WBC in BAL compared with sham. In contrast, treatment of mepacrine following hemorrhage had decreased ($p < 0.001$) the numbers of WBC in BAL.

*** $P < 0.001$, sham vs. hemorrhage,

$p < 0.001$, hemorrhage vs. hemorrhage + mepacrine

Numbers of experiments are in the parentheses.

유의하게 ($p < 0.05$) 빠른 회복을 보였다(Fig. 2).

대조군에 있어서는 기관지폐포세척액내의 단백질량은 2.3 ± 0.21 (mg/both lungs)였으나 출혈후 60분이 경과한 기관지폐포세척액내의 단백질량은 4.0 ± 0.21 로 유의한 ($p < 0.001$)증가를 보였고 출혈 및 mepacrine을 투여한 군에서는 2.8 ± 0.27 로서 출혈군과 비교시 유의한 ($p < 0.01$)감소를 보였다(Fig. 3).

출혈성 쇼크에 의한 폐장내 호중구의 침윤을 확인하기 위하여 시행한 MPO 활동도의 검사결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에 있어서는 5.0 ± 0.66 (U/g of wet lung)이었으나 출혈군에서는 47.6 ± 1.57 로 유의한 ($p < 0.001$)증가를 보였고 출혈 및 mepacrine을 투여한 군에서는 출혈군과 비교시 유의한 ($p < 0.001$)감소를 나타내었다. 또한 기관지폐포세척액내의 백혈구의 숫자도 대조군의 0.1 ± 0.02 (millions/ml)에서 출혈군의 경우는 2.1 ± 0.42 로 유의한 증가를 보였고 출

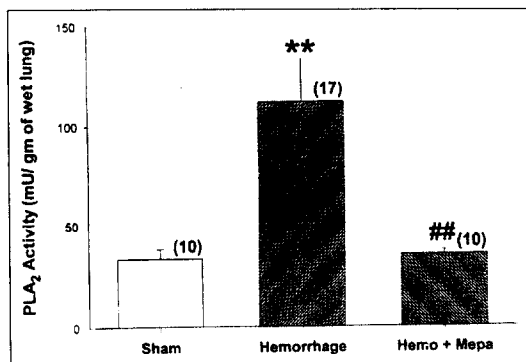


Fig. 6. Phospholipase A2 (PLA2) activity in the lung following hemorrhage. Hemorrhage had increased ($p < 0.01$) PLA2 activity in the lung, which was reversed by mepacrine ($p < 0.01$).

** $p < 0.01$, sham vs. hemorrhage,

$p < 0.001$, hemorrhage vs. hemorrhage + mepacrine

Numbers of experiments are in the parentheses.

혈 및 mepacrine을 투여한 군에서는 0.3 ± 0.07 로서 출혈군과 비교시 유의한 감소 ($p < 0.001$)를 나타내었다 (Fig. 5).

출혈 후 60분후의 폐장내의 PLA2활성도의 변화는 Fig. 6과 같다. 대조군의 폐장내 PLA2의 활성도는 33.8 ± 4.68 (mU/g of wet lung)이었으나 출혈 후 60분 후에 있어서는 111.6 ± 20.15 로서 현저한 증가 ($p < 0.01$) 나타내었고 출혈 및 mepacrine을 투여한 군에서는 35.4 ± 2.09 로서 출혈군과 비교시 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다.

분리된 호중구에서 PLA2의 억제가 산소기 형성에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험의 결과는 Fig. 7과 같다. 대조군에서의 cytochrome-C reduction은 6.2 ± 1.18 (nmol/ 10^6 cells)이었으나 phorbol myristate acetate (PMA)를 처리한 후에는 86.8 ± 4.58 로 유의하게 증가하였고 PMA 첨가 후 mepacrine을 첨가한 군에서는 7.1 ± 1.61 로 PMA 첨가군에 비하여 현저히 ($p < 0.001$) 감소하였다.

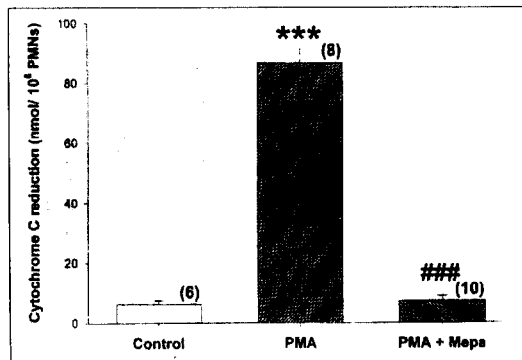


Fig. 7. Effect of the inhibition of phospholipase A2 (PLA2) on the generation of oxygen free radicals from phorbol myristate acetate (PMA)-activated neutrophils. PMA had increased ($p < 0.001$) the generation of free radicals from neutrophils, which was reversed ($p < 0.001$) by mepacrine.

Mepa; mepacrine

*** $p < 0.001$, sham vs. PMA,

$p < 0.001$, PMA vs. PMA + mepacrine
Numbers of experiments are in the parentheses.

출혈성 쇼크에서 폐장의 미세구조적 변화 및 세포화학적 방법을 통해 본 조직내 산소기 형성의 변화는 Fig. 8과 같다. 대조군에서는 제1형 및 제2형 폐포세포의 형태가 정상적인 상태이고 기저막 역시 정상적인 상태를 보였고 제2형 폐포세포내의 lamellar body의 구조도 정상적인 상태를 보였다 (Fig. 8-a). 또한 조직내 과산화수소의 형성을 검사한 세포화학적 검사에서도 cerrous perhydroxide의 과립은 관찰되지 않았다 (Fig. 8-b). 그러나 출혈 60분후의 폐장내의 미세구조적 변화로 혈관내의 호중구의 침윤, 제2형 폐포세포내의 lamellar body의 변형이 관찰되었다 (Fig. 9-a). 또한 조직내 과산화수소의 형성을 나타내는 cerrous perhydroxide의 과립이 제1형 폐포세포의 막을 따라 현저하게 형성되는 양상을 보였다 (Fig. 9-b). 출혈 전 mepacrine을 투여한 군에서는 출혈군과 비교시 비교적 정상적인 소견을 보였고 cerrous



Fig. 8. Ultrastructural and cytochemical electron microscopic findings of the normal lung. Normal alveolar type 1, 2 cells and endothelial cells are well preserved (8-a). In cytochemical electron microscopy, deposit of cerrous perhydroxide is not found (8-b). The unit of scale bar is μm .

perhydroxide과립의 형성도 현저히 감소한 양상을 나타내었다(Fig. 10-a, b).

고 찰

다발성 외상 등의 심한 출혈에 동반되는 MODS의 경우 ARDS가 병발하는 것은 잘 알려져 있다. 심한 출혈 후 나타나는 ARDS의 병인론을 규명하기 위하여 시행한 본 실험의 결과에서 출혈 5분후의 평균동맥압

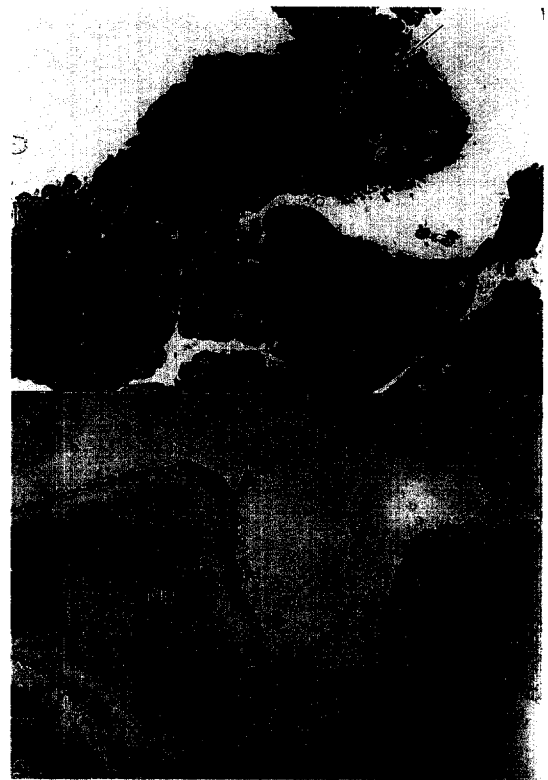


Fig. 9. Ultrastructural and cytochemical electron microscopic findings of the lung following hemorrhage. The deteriorated lamellar bodies of alveolar type 2 cell and infiltration of neutrophils are identified (9-a). In cytochemical electron microscopy, dense deposits of cerrous perhydroxide are shown on the lining of neutrophilic membrane (arrow) (9-b). The unit of scale bar is μm .

은 출혈전에 비하여 현저히 감소하여 26.4 ± 1.78 mmHg까지 낮아졌다. 이러한 혈압의 하강은 폐장뿐 만이 아니라 체내 거의 모든 장기에 허혈상태를 유발할 것으로 생각된다. 또한 심박동수에 있어서도 출혈 5분 후에는 현저히 감소하는 양상을 보이고 있다. 일반적으로 출혈로 인한 혈압의 하강시에는 심박동수가 증가하나 심한 출혈성 쇼크의 경우는 교감신경반사의 실조로 오히려 심박동수가 감소한다¹⁶. 본 연구에서의



Fig. 10. Effect of the prior treatment of mepacrine on the ultrastructural and cytochemical electron microscopic findings in the lung of rat following severe hemorrhage. Neutrophils are infiltrated but well-preserved structure is shown compared with the lung of hemorrhaged rat(10-a). In the cytochemical electro microscopy, the deposits of cerrous perhydroxide is shown in the vicinity of neutrophils (arrow), however the density is decreased markedly by the effect of mepacrine. The unit of scale bar is μ m.

이러한 혈압 및 심박동수의 변화는 흰쥐에서 심한 출혈성 쇼크가 왔다는 것을 의미한다.

폐세척액내의 단백질량의 증가는 일반적으로 급성 폐손상의 지표¹⁷로 이용된다. 출혈후 60분이 지난 폐

세척액내의 단백질량은 대조군에 비하여 현저히 증가하였고 이러한 단백질량의 변화는 mepacrine의 작용에 의하여 감소하였다. 급성 폐손상 특히 ARDS의 경우는 혈액내의 단백질이 폐장의 간질 및 폐포내로 유입되어 surfactant의 기능을 저하시킴과 동시에 hyaline membrane을 형성하여 산소의 확산장애를 일으킨다^{18,19}. 본 연구에서는 출혈성 쇼크에서 나타나는 혈중단백질의 폐포내 유입은 PLA2의 억제제인 mepacrine에 의하여 효과적으로 차단되었는데 이것은 출혈성 쇼크에 의해 폐장내의 PLA2가 활성화되어 염증성 지질분자 내지는 호중구에서의 산소기의 생성이 증가하여 폐장내 혈관내피세포의 손상을 유발한 것을 시사한다.

이러한 추론의 실험적 증거로서는 본 연구의 결과에서도 보듯이 출혈후 폐장내의 호중구의 침윤을 나타내는 MPO의 활동도가 현저히 증가하였고 동시에 이러한 변화 역시 mepacrine에 의하여 효과적으로 차단되었다. 또한 호중구의 이동(migration)을 나타내는 기도폐포세척액내의 백혈구의 수도 출혈에 의하여 현저히 증가하였고 이 또한 mepacrine에 의하여 효과적으로 차단되었다. 폐장의 급성폐손상에 관여하는 PLA2의 역할은 PLA2의 활성화에 따른 염증성 지질분자의 조직내 증가 및 호중구막에서의 NADPH oxidase의 활성화에 따른 산소기의 생성의 증가에 있다고 본다²⁰.

PLA2와 ARDS의 병인론을 연관하여 해석하고자 하는 많은 보고들²¹⁻²³에서 PLA2의 활성화는 직접적으로 호중구의 침윤, 산소기 생성의 증가를 일으킴으로써 조직의 손상을 유발한다고 한다. 즉 염증성 지질분자들은 호중구와 혈관세포로의 유착(adhesion)을 증가시키며²⁴ 동시에 혈관의 수축을 유발하기도하여 모세혈관내의 정수압을 증가시켜 폐부종을 유도한다²⁵. 또한 PLA2의 활성화에 따라 생성되는 platelet activating factor는 호중구에서의 산소기 생성, 호중구의 혈관내피세포로의 유착등을 유발하여 ARDS의 병인론에 관여한다²⁶.

출혈성 쇼크시에 보이는 PLA2의 활성화의 증가는

본 실험의 결과에서 보듯이 명백하고 동시에 mepacrine에 의해 효과적으로 차단되었다. 또한 호중구에서의 산소기 생성에 따른 조직손상기전을 생각할때에 mepacrine은 호중구에서의 산소기 생성은 거의 대조군 수준으로 감소시킴으로써 급성 폐손상의 감소를 가져 올 것으로 생각된다.

이러한 사실은 본 연구에서 관찰한 미세구조적인 변화 및 세포화학적 검사의 결과에서도 잘 드러나고 있다. Mepacrine에 의한 PLA2의 억제제는 분리된 호중구에서의 산소기의 생성의 감소뿐만 아니라 조직 내에서의 산소기 생성의 감소를 보여주고 또한 제1, 2형 폐포세포 및 혈관내피세포의 손상도 방지하고 있다.

Martensson등²⁷에 따르면 조직내에 산화성스트레스가 발생하면 제2형 폐포세포내의 lamellar body가 특징적으로 비후되거나 공포화현상을 보인다고 보고하고 있다. 이러한 소견은 본 연구의 출혈성 쇼크 후에도 나타나고 있으며 조직내의 산소기의 형성이 증가한 것으로 미루어 출혈성 쇼크 후의 산화성스트레스가 조직손상의 주된 원인이 아닌가 추정된다.

Gut I/R시의 산소기 생성의 기전은 조직의 허혈에 따른 XD의 XO로의 변환과 재관류에 따른 산소의 공급이 그 원인이라고 Terada등²⁸이 보고한바 있지만 폐장에서는 XO의 발현이 없다²⁹는 사실에 주목할 필요가 있다. 즉 Terada 등²⁸은 gut I/R model의 ARDS연구에서 장(intestine)에서 생성된 XO가 혈류를 통해 폐장으로 유입되어 산소기의 생성을 유도한다고 보고하고 있다. 이에 대하여 Lee등⁶은 gut I/R시에는 장(intestine)에서의 PLA2의 활성화도 역시 증가하며 이에 따라 PAF의 생성이 증가하여 혈중 PAF가 증가함과 동시에 폐장조직내 PAF의 생성이 증가함을 보고하고 있다. 이러한 보고들을 감안한다면 아직 그 기전은 알 수 없지만 출혈성 쇼크시에 보이는 PLA2 활성화도의 증가는 재관류에 의한 것이 아닌가 추정된다. 또한 Chang³⁰등에 따르면 폐장에 직접적인 재관류 손상을 유발하면 염증성 사이토카인인 interleukin-1의 발현이 관찰된다고 한다. Interleukin-1은 PLA2를 매개로 하여 급성 폐손상을 유발하는 것

이 알려져 있으므로 심한 출혈에 이은 재관류에 의해 이러한 사이토카인이 발현되어 PLA2가 활성화 되었을 수도 있겠다.

또 한가지의 가능성은 산소기에 의한 PLA2의 활성화의 가능성이다. Boyer등³¹ 및 몇몇 보고서^{32, 33}에서는 산소기가 직접 PLA2를 활성화시킨다고 주장하고 있다. 만약 재관류에 의하여 XO의 생성이 증가하고 이에 따라 산소기의 생성이 증가하였다면 산소기의 작용에 따른 PLA2가 활성화되고 이에 따라 PAF의 생성 및 산소기 생성의 증폭에 따른 PLA2의 활성화가 일어나는 positive feedback mechanism이 작용했을 가능성이 있다.

본 연구의 결과를 종합하여 보면 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

첫째, 출혈성 쇼크에 의해 발병하는 급성 폐손상은 호중구의 폐장내 침윤 및 이에 따른 산소기형성에 의한 산화성스트레스가 중요한 역할을 한다. 둘째, 이러한 호중구의 침윤 및 산소기의 생성에는 PLA2의 활성화가 그 원인 중의 하나이다. 셋째, 확실히 그 기전이 본 연구에서는 밝혀지지 않았으나 출혈성 쇼크 후에 재관류에 따른 XO의 작용에 따른 산소기의 생성 증가가 염증성 사이토카인의 발현과 PLA2의 활성화에 관여할 것으로 추정된다.

요 약

연구배경 : 급성 출혈성 쇼크에서 발생하는 급성폐손상의 병인론을 호중구의 산소기 생성과 연관하여 규명하고자 본 연구를 시행하였다. 급성출혈성쇼크에서 폐장내 산소기 생성의 주된 원인이 호중구의 침윤에 의한 것이며 이 때 PLA2의 활성화가 호중구의 respiratory burst의 직접적인 원인임을 밝히고자 하였다.

방 법 :

체중 300-350 g 정도의 흰쥐에서 체중/kg 당 20 ml정도의 혈액을 5분 동안 뽑아내어 급성 출혈성 쇼크를 유발하고 이 출혈성 쇼크 상태를 1시간 동안 유지하였다. 그 후 급성 폐손상의 지표들을 측정하였

다. 동시에 폐장의 미세구조의 변화 및 세포화학적 검사를 통하여 폐장조직내의 산소기의 형성을 확인하였다. 또한 PLA2 억제제인 mepacrine을 출혈직전에 투여하여 PLA2의 억제에 따른 변화도 검사, 비교하였다.

결 과 :

급성 출혈성 쇼크에 의해 유도된 급성 폐손상에서 호중구의 폐장내 침윤이 확인되었고 이 때 폐부종 및 조직내 산소기 형성의 증가가 관찰되었으며, 폐장내 PLA2의 활성도도 증가하였다. 그러나 mepacrine을 이용하여 PLA2를 억제한 결과, 폐부종의 감소, 산소기 형성의 감소가 확인되었다.

결 론 :

급성 출혈성 쇼크에 의한 급성폐손상은 호중구에 의한 산화성스트레스가 그 원인으로 생각되고 이 때 호중구에 의한 산화성스트레스의 발생에는 PLA2가 주된 역할을 한다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Temmesfeld-Wolbrueck B, Walmrath D, Grimmer F, Seeger W : Prevention and therapy of the adult respiratory distress syndrome. *Lung* 1995;173:139-64.
2. Connelly KG, Repine JE : Markers for predicting the development of acute respiratory distress syndrome. *Ann Rev Med* 1997;48:429-45.
3. van Helden KG, Kuijpers WC, Steenvoorden D, Go C, Bruijnzeel PLB, van Eijk, et al : Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat : A comprehensive animal model to study adult(acute) respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 1997;23:297-316.
4. Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE : Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1 induced acute lung injury in rats. *J Appl Physiol* 1995;79:472-8.
5. Anderson BO, Moore EE, Moore FA, Leff JA, Terada LS, Harken AS et al : Hypovolemic shock promotes neutrophil sequestration in lungs by a xanthine oxidase-dependent mechanism. *J Appl Physiol* 1991;71:1862-5.
6. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Dale-Piermattei D, et al : Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3362-66.
7. Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJW, Carl VS, Banerjee A : Gut phospholipase A2 mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1995;268:G397-G403.
8. Lee YM, Park Y, Kim T, Cho HG, Lee YJ, Repine J : Effect of the inhibition of phospholipase A2 in generation of free radicals in intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury. *Korean J Physiol Pharmacol* 1999;3:263-73.
9. Fujishima S, Aikawa N : Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Int Care Med* 1995;21:277-85.
10. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ : Protein measurement using bicinchoninic acid : elimination of interfering substance. *Anal Biochem* 1989;180:136-9.
11. Goldblum SE, Wu KE, Jay M : Lung myeloperoxidase as a measurement of leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* 1985;1978-85.
12. Katsumata M, Gupta C, Goldman AS : Rapid assay for activity of phospholipase A2 using radioactive substrate. *Anal Biochem* 1986;154:676-81.
13. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston Jr RB, Henson PM : Modulation of multiple neu-

- trophil functions by preparative methods or trace concentration of bacterial lipopolysaccharides. *Am J Pathol* 1985;119:101-10.
14. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Fontes B, Banerjee A, Peterson VM : Postinjury neutrophil priming and activation state : therapeutic challenges. *Shock* 1995;3:537-66.
15. Hobson J, Wright J, Chung A : Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke exposed tracheal explants. *Am J Pathol* 1991;139:573-80.
16. Dampney R : Functional organizations of cardiovascular system. *Physiol Rev* 1994;74:323-64.
17. Lee YM, Hybertson BM, Cho HG, Terada LS, Cho O, Repine JE, et al : Platelet activating factor contributes to acute lung injury in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Physiol* 2000; 279:L75-L80.
18. Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, et al : Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1033-39.
19. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH : Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J Appl Physiol* 1990;69:2303-10.
20. Dana R, Leto TL, Levy R : Essential requirement of cytosolic phospholipase A2 for activation of phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1998; 273:441-5.
21. 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* 1995;269:L109-L118.
22. Littner MR, Lott FD : Increase infiltration coefficient from actions of melittin on neutrophils in isolated rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:867-72.
23. Chakraborti S, Gurtner GH, Michel JR : Oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in pulmonary endothelium. *Am J Physiol* 1989;257: L430-L437.
24. Hotter G, Closa D, Prats N, Felipe P, Gelpi E, Resello-catafau J : Free radical enhancement promotes leukocyte recruitment through A PAF and LTB4 dependent mechanism. *Free Radical Biol Med* 1997;22:247-54.
25. Mitola JM, Jeffrey PK, Hellewell PG : Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:197-204.
26. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R, Lianxi L, Granger DN : Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction : role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997;272:H2976-H2982.
27. Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Adul PAM, Meister A : Inhibition of glutathione synthesis in newborn rat : A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9360-4.
28. Terada LS, Domish J, Shenley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE : Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1992;263:L394-L401.
29. Linder N, Rapola J, Raivio KO : Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* 1999;79:967-74.
30. Chang D, Hsu C, Ding Y, Chiang C : Interleukin-1 in ischemia-reperfusion acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1230-34.

31. Boyer SC, Bannenberg GL, Neve EPA, Ryefeldt A, Moldeus P : Evidence for the activation of the signal responsive phospholipase A2 by exogenous hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:753-61.
32. Rao GN, Runge MS, Alexander RW : Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1995;1265:67-72.
33. Chakraborti S, Michael JR : Role of protein kinase C in oxidant-mediated activation of phospholipase A2 in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 1993;122: 9-15.
-