

□ 원      저 □

## 백서의 기도 신경성 염증에서 산화질소 합성효소(Nitric Oxide Synthase)의 역할과 분포

고려대학교 의과대학 내과학 교실, 해부 병리학 교실\*

심 재정, 이 상엽, 이 상화, 서 정경, 김 철환\*,  
조 재연, 인 광호, 유 세화, 강 경호

= Abstract =

### The Role and Localization of Nitric Oxide Synthase in Neurogenic Inflammation of the Rat Airways

Jae Jeong Shim, M.D., Sang Yub Lee, M.D., Sang Hwa Lee, M.D.,  
Jung Kyung Suh, M.D., Jae Youn Cho, M.D., Chul Hwan Kim\*, M.D.,  
Kwang Ho In, M.D., Seo Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D..

*Department of Internal Medicine, Anatomical Pathology\*, College of Medicine,  
Korea University, Seoul, Korea*

**Background** : There have been many debates about the effects of nitric oxide on the neurogenic inflammation. The role of nitric oxide in the neurogenic inflammation of airways will be required a better understanding of the localization and types of nitric oxide synthase(NOS) activity in the neurogenic inflammation of airways.

**Method** : To investigate the role of nitric oxide in airway neurogenic inflammation, 1) the effects of neurokinin receptor antagonist (FK224) and nitric oxide synthase inhibitor, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) on plasma extravasation were evaluated in four groups of Sprague-Dawley rats ; sham operation group(sham NANC group), electrical vagal stimulation group(NANC2 group), intravenous pretreatment groups with FK224 (1mg/kg ; FK224 group), and L-NNA(1mg/kg ; L-NNA group) 15 minutes before vagal NANC stimulation. 2) NOS activity in trachea with neurogenic inflammation was localized by immunohistochemical stain. Immunohistochemical stain was performed by antibodies specific for inflammatory cells(iNOS), brain(bNOS), and endothelium (eNOS) on trachea obtained from sham NANC, NANC2, and FK224 groups.

**Results** : The results are that plasma extravasation in neurogenic inflammation of rat airways was inhibited by FK224, but enhanced by L-NNA pretreatment(P<0.05). There was significantly

increased infiltration of inflammatory cells in subepithelium of neurogenic inflammatory trachea, but the reduction of subepithelial infiltration of inflammatory cells was observed after pretreatment with FK224( $P<0.05$ ). Immunostaining with anti-iNOS antibody showed strong reactivity only in infiltrated inflammatory cells in neurogenic rat trachea, and these iNOS reactivity was reduced by pretreatment with FK224. bNOS immunoreactivity was significantly increased only in the nerves both of neurogenic inflammatory and FK224 pretreated trachea compared with sham NANC trachea( $p<0.05$ ). eNOS immunoreactivity was not significant change in endothelium in neurogenic inflammation of rat trachea.

**Conclusion** : These results suggest that nitric oxide released from iNOS in infiltrated inflammatory cells has main role in neurogenic inflammation of rat trachea. The presence of bNOS immunoreactivity in the nerves indicates that nitric oxide may be released from the nerves in rat trachea with neurogenic inflammation.

---

**Key Word** : airway, neurogenic inflammation, nitric oxide synthase

## 서 론

기관지 천식은 염증성 질환으로 분류되고 있으며, 감각 신경(C-fiber)의 비교감성 및 비부교감성(nonadrenergic and noncholinergic, 이하 NANC)신경에 의한 신경성 염증도 기관지 천식의 염증에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 기도의 신경성 염증은 여러 종류의 자극으로 감각신경의 말단부에서 유리되는 substance P, neurokinin A(이하 NKA), calcitonin gene related peptide(이하 CGRP), neurokinin B(이하 NKB) 등 다양한 신경 단백질이 작용하여 기관지 근육의 수축, 염증 세포의 혈관 내피 세포에 대한 유착 및 혈관의 혈장 유출을 일으켜 기관지 천식의 발병에 관여하는 것으로 되어 있다<sup>2,3-5)</sup>.

그러나 최근에는 이러한 여러 종류의 신경단백질 이외에도 말초신경에서 유리되는 산화질소가 중요한 신경전달물질로 작용하는 것으로 밝혀지고 있다. 폐장 외의 장기에서 NANC신경이 많이 분포하는 평활근에서 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, 이하

NOS)가 분리되었고<sup>18-20)</sup>, Sheng<sup>21)</sup> 등은 산화질소 합성효소의 isoform I을 NANC신경에서 확인하고, NANC 신경말단부에서 합성되고 유리되는 산화질소가 신경전달물질로서 작용하며, 산화질소가 평활근을 이완시킨다고 밝힌 바 있다. 기도의 신경성 염증에서 산화질소의 역할에 대한 초기의 연구에서 Kuo<sup>22)</sup> 등은 기니픽에서 미주 신경 자극으로 유발된 기도 신경성 염증시에 산화질소가 혈관투과성을 증가시켜 신경성 염증을 유발시킨다고 하였다.

그러나 그 이후 산화질소는 혈관의 평활근 세포에서 soluble guanylate cyclase를 활성화시켜 혈관세포를 이완시키며, 백혈구의 활성화와 세포유착으로 혈관 투과성이 증가된 염증반응에서는 오히려 백혈구를 불활성화시켜 세포 유착을 막아 염증을 억제시킨다고도 하여 기도의 신경성 염증에서 산화질소의 역할은 아직 논란이 있다<sup>23-25)</sup>.

산화질소 합성효소의 종류에 따라 생성된 산화질소의 작용도 각각 다르며, 뇌(brain n-  
itric oxide synthase, isoform I, 이하 b NO-  
S)나 혈관 내피세포(endothelium nitric oxi-

de synthase, isoform III, 이하 eNOS)에서 구성형(constitutive form, 이하 cNOS) 효소에 의해 생성된 산화질소는 혈관의 평활근세포에서 soluble guanylate cyclase를 활성화하여 혈관근육을 이완시키며, 백혈구의 활성화와 세포 유착으로 혈관 투과성이 증가된 염증에서는 산화질소가 백혈구를 불활성화시키고 세포유착을 막아 염증을 억제시킨다고 한다. 한편 대식세포등에 존재하며 cytokine에 의해 조절되는 유도형(inducible form, isoform II, 이하 iNOS) 산화질소 합성효소는 많은 양의 산화질소를 생성하고, 표적 기관의 세포독성 작용을 중개하여 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>26-29)</sup>.

본 연구는 기도의 신경성 염증을 일으켜 신경단백질 수용체 차단제인 FK224와 산화질소 합성효소 억제제인 N<sup>w</sup>-nitro L-arginine (이하 L-NNA)를 투여한 후 혈장유출에 대한 효과를 관찰하고, 기도 신경성 염증에 관여하는 산화질소가 기도의 신경 말단에서만 유리되는 지 아니면 다른 기도 조직에서도 유리되는지를 규명함으로써 기관지 천식의 기전인 기도 신경성 염증에서 산화질소의 역할을 밝히고자 하였다.

## 실험 방법

### 1. 대상

Urethan을 25% wt/vol로 희석하여 6-8ml/kg를 복강내 주사로 마취시킨 150-350gm의 감염이 없는 백서(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 미주신경을 자극하지 않은 대조군(sham NANC군), 미주신경을 2분간 자극하여 신경성 염증을 유발한 군(NANC2군)과 미주신경을 전기적 자극 10분전에 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA (5mg/kg iv, Sigma사)와 FK224(1mg/kg iv, Fujisawa 사)를 각각 전처치한 군(L-NNA군과 FK224군)으로 총 4군을 대상으로 각 군은 백서 8마리를 사

용하였다. NANC를 위해 atropine(1mg/kg)과 propranolol(1mg/kg)을 정주하고, 신경성 염증의 유발은 신경자극기(Stoelting Co., square wave stimulator)로 5V, 1mSec, 5Hz의 전기적 자극을 nodose ganglion하방에서 절개 박리한 미주신경에 2분간 자극하여 유발하였다. H-E(hematoxylin-eosin)염색과 면역조직 화학 염색법에서 사용할 조직은 Lip freeze(L.I.P. ENGLAND)로 동결하여 -70°C에 보관하여 사용하였다.

### 2. FK224와 L-NNA의 기도 혈장 투과성에 대한 효과

NANC2군, FK224군 및 L-NNA군의 기도 혈장 투과성을 미주신경을 자극하지 않은 대조군인 sham NANC군과 비교하였다. 기도 혈장 투과성 측정은 Evans blue dye (20mg/kg iv, Janssen 사)를 미주 신경 자극하기 직전에 경정맥을 통하여 정주하고 자극이 끝난 후 흉부절개하여 좌심방을 절개하고, 폐순환의 혈관내 Evans blue dye를 우경정맥을 통하여 50cc 생리식염수로 주사하여 좌심방을 통하여 제거했다. 체순환은 카테타를 좌심실을 통하여 대동맥에 삽관하고 50cc 생리식염수로 혈관내 Evans blue dye를 우심실로 제거했다. 기관의 조직은 후두 하부에서 기관분지부 상방까지로 조직무게를 측정하고, 부위별로 formamide 2ml에서 40°C, 24시간 보관하여 Evans blue dye를 조직으로 부터 추출하여 추출액을 620nm의 분광 광도계(Hitachi, U-2000 spectrophotometer)로 측정하고, Evans blue dye 양은 농도 0.15-12µg/ml의 Evans blue dye 분광 표준곡선을 이용하여, 기도 부위별 조직 무게당 Evans blue dye의 양(ng of dye/mg of wet tissue weight)으로 기도 혈장 투과성의 정도를 비교하였다.

### 3. iNOS, bNOS 및 eNOS의 분포

sham NANC군, NANC2군 및 FK224군의 보관된 기관의 조직을 Cryostat로 6 $\mu$ m 두께로 자른 뒤 젤라틴으로 피막된 슬라이드에 고정하여 사용하였다. H-E (hematoxylin-eosin) 염색을 시행하여 기관의 상피세포, 조직내 염증세포의 정도, 연골, 점막하 혈관 및 신경을 먼저 확인하였다. 조직내 염증세포의 침윤 정도는 전체 점막하(submucosa)층에 염증세포가 25%이하의 세포 침윤이 있는 경우를 -, 25%에서 50%인 경우를 1+, 50%에서 75%를 2+, 75%이상인 경우를 3+로 측정하였다.

NOS에 대한 면역조직화학 염색은 가토의 다클론항체인 polyclonal anti-inducible nitric oxide synthase(iNOS) antibody, polyclonal antiendothelial nitric oxide(eNOS) antibody 및 polyclonal anti-brain nitric oxide(bNOS) antibody(Affinity BioReagent)를 이용하였다. 먼저 -70℃에 냉동 보관된 조직을 냉동절편기에서 6 $\mu$ m로 절편한 후, 2시간동안 실온에서 건조시킨 후 4℃에서 30분간 아세톤으로 고정하였다. 내인성 과산화효소를 억제하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 methanol을 혼합한 용액에 15분간 반응시키고 다시 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 PBS 완충액의 혼합액에 15분간 반응시켰다. pH 7.6 Tris완충액으로 10분간 3번 세척한 후 습한 chamber안에서 정상 염소 혈청(normal goat serum, Zymed Co.)을 가하고 30분간 반응시켜 비특이성 단백질의 표현을 억제시켰다. iNOS, eNOS 및 bNOS에 대한 일차 항체를 각각 1:500, 1:250, 1:800배로 희석시켜 4℃에서 overnight시킨 후 Tris완충액으로 20분간 3번 세척하였다. Biotinylated link antibody(Goat anti-rabbit IgG, Zymed Co.)와 30분간 반응시키고 Tris완충액으로 20분간 세척한 후 strepavidin-peroxidase conjugate(Zymed Co.)을 가하고 30분간 반응시켰다.

발색반응은 C-Amino-9-ethylcarbasol(AE C, Zymed Co.)를 사용하여 2-5분간 반응시킨 다음 증류수로 세척한 후 세포핵을 hem-

atoxylin으로 대조 염색하고 흐르는 물에 세척하여 수용성 봉입제로 봉입하였다. 기도 상피세포, 근육, 혈관내피세포, 조직내 염증세포, 신경 및 연골세포에서 NOS의 활성도는 염색이 되지 않으면 -, 미세과립으로 염색된 경우는 1+, 거친 과립으로 염색된 경우는 2+, 집성체의 과립으로 염색된 경우는 3+로 측정하여 NANC2군과 FK224군에서 NOS 종류별 분포부위와 염색강도를 sham NANC군과 비교 분석하였다.

## 5. 통계분석

혈장유출의 정도는 mean $\pm$ SE로 나타내고 각 군간의 비교는 t-test로 시행하였고, 염증세포의 침윤정도와 산화질소 합성효소의 분포부위 및 염색강도 median값으로 표시하였으며 각 군간의 비교는 Mann-Whitney rank sum test로 시행하였다.

## 결 과

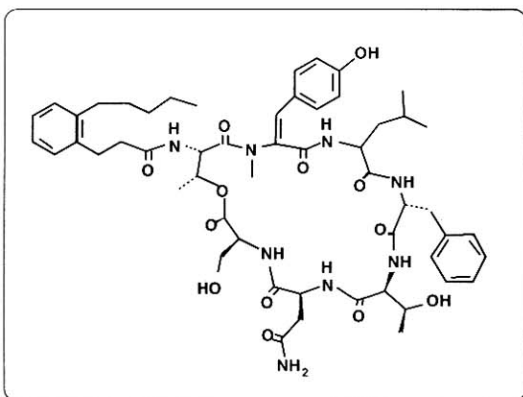
### 1. FK224와 L-NNA의 기도 혈장 투과성에 대한 효과

2분간 신경을 자극한 군(NANC2 group)과 대조군(sham NANC group)의 기도혈장 유출은 각각 14.7 $\pm$ 1.7 ng/mg, 49.1 $\pm$ 2.1 ng/mg으로 신경을 자극한 NANC2군에서 3.4배가 증가되었으며, 2분간의 신경 자극전에 신경단백질 수용체 차단제를 전처치한 군(FK224 group)은 25.1 $\pm$ 2.5 ng/mg으로 NANC2군보다 혈장유출이 유의하게 차단됨을 알 수 있었다. 기도의 신경성 염증에서 산화질소의 역할을 확인하기 위하여 2분간 신경자극전에 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA를 전처치한 L-NNA군의 혈장유출 정도는 61.2 $\pm$ 3.7 ng/mg으로 sham NANC군보다 4.2배, NANC2군보다 1.3배 증가하였다(Table 1, Fig. 2).

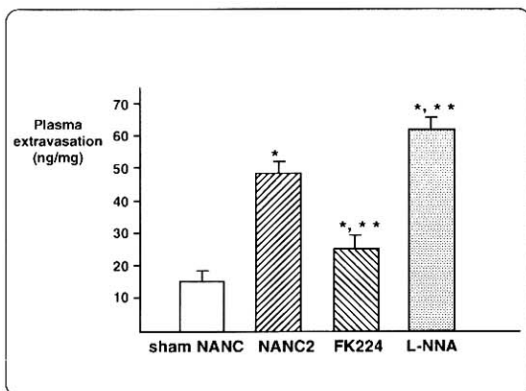
**Table 1** The effects of neurokinin and nitric oxide on plasma extravasation in neurogenic inflammation of rat trachea

group	extravasation (ng dye/mg tissue)
sham NANC	14.7±1.7
NANC2	49.1±2.1*
FK224	25.1±2.5*, **
L-NNA	61.2±3.7*, **

Values are means±SE expressed in ng dye/mg tissue ; \*p <0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC 2 group.



**Fig. 1** Structure of FK224

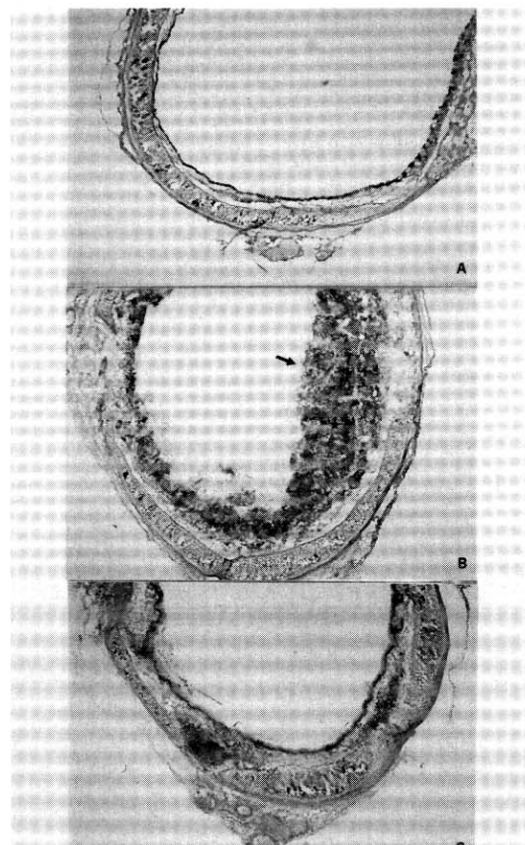


**Fig. 2** The effects of neurokinin and nitric oxide on plasma extravasation in neurogenic inflammation of rat trachea.

Values are means±SE expressed in ng dye/mg tissue : \*p<0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC2 group.

## 2. 조직내 염증세포의 침윤

H-E염색상에서 조직내의 염증세포인 호중구의 침윤정도가 2분간 신경을 자극한 NA-NC2군에서 3+로 sham NANC군의 1+보다 의미있게 증가하였다. 신경자극전에 FK224로 전처리한 FK224군에서는 1+로 sham NANC군 수준으로 의미있게 감소되었다(Table 2, Fig.3).



**Fig. 3** H&E stain on rat trachea( X40), A) Well preserved tracheal epithelium and no subepithelial infiltration of inflammatory cells in sham NANC group. B) Dense subepithelial infiltration of inflammatory cells and destruction of overlying epithelium in NANC2 group. C) Marked suppression of infiltrated inflammatory cells and intact overlying epithelium in FK224 group.

기타 병리학적 소견으로 2분간 신경자극한 NANC2군의 신경성 염증이 유발시킨 기관에서는 상피세포가 탈락되고 점막하 부종이 관찰되었다. FK224로 전처치한 FK224군은 점막하의 염증세포감소 뿐 만아니라 점막부종이 억제되고, 상피세포도 유지되었다(Fig.3).

**Table 2** Distribution and activity of polyclonal (Rabbit) anti-inducible nitric oxide synthase(iNOS) in neurogenic inflammation of rat trachea

Distribution	Group			
	sham	NANC	NANC2	FK224
Epithelium	+	++	+	
Inflammatory cells				
grade of infiltration	+	+++*	+	
activity of iNOS	+	++*	++	
Nerve	+	-/+	+	
Endothelium	-	-	-	
Smooth muscle	-	-/+	-	
Chondrocyte	+ / ++	+	+ / ++	

Scoring(median) of intensity of staining from 0 to +++ :

\*p<0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC 2 group.

**Table 3** Distribution and activity of polyclonal (Rabbit) anti-brain nitric oxide synthase(bNOS) in neurogenic inflammation of rat trachea

Distribution	Group			
	sham	NANC	NANC2	FK224
Epithelium	+	+	+	
Inflammatory cells				
grade of infiltration	+	+++*	+	
activity of bNOS	+	-/+	+	
Nerve	++	+++*	+++*	
Endothelium	-	-	-/+	
Smooth muscle	-	+	-/+	
Chondrocyte	+ / ++	+	+	

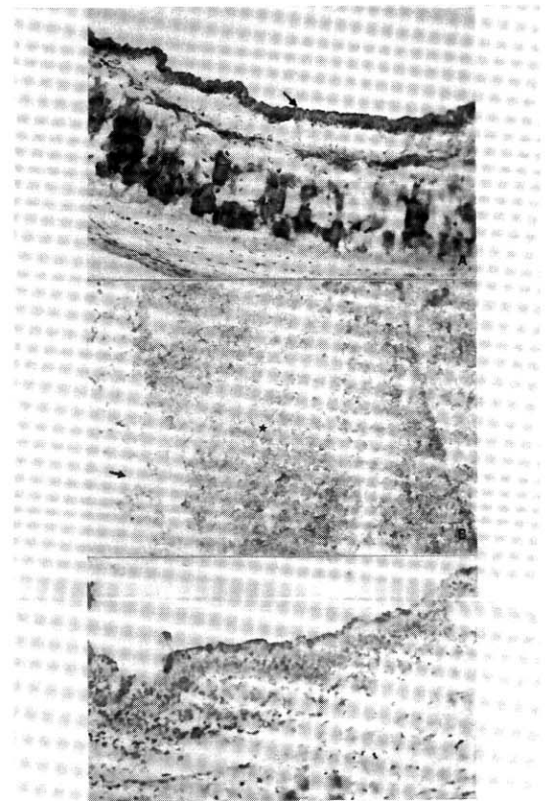
Scoring(median) of intensity of staining from 0 to +++ :

\*p<0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC 2 group.

### 3. iNOS, bNOS 및 eNOS의 분포

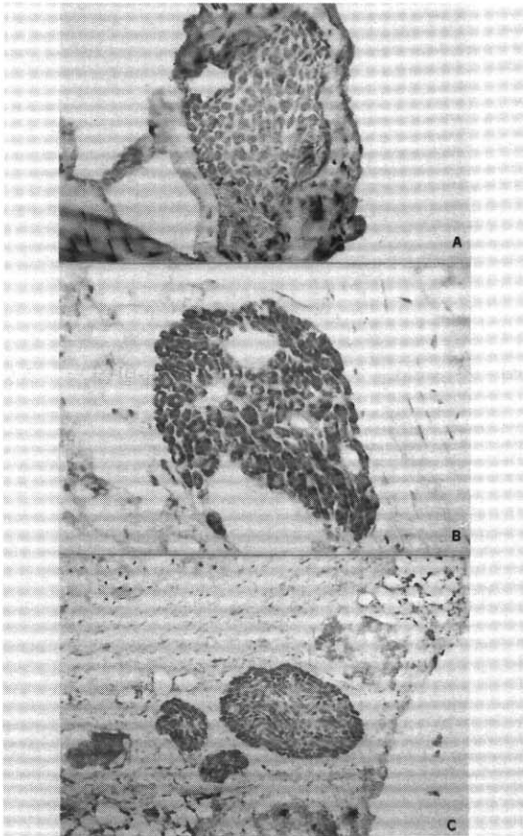
유도형 산화질소 합성효소(iNOS)에 대한

면역 조직 화학 염색은 2분간 신경을 자극한 NANC2군에서 호중구의 iNOS 활성도가 2+로 의미있게 증가하였으며, FK224로 전처치한 FK224군은 호중구의 iNOS 활성도가 sham NANC과 같은 수준으로 감소하였다(Table 2). 표피세포, 신경, 혈관내피세포, 근육 및 연골세포는 NANC2군과 FK224군에서 iNOS의 활성도가 증가를 보였으나 통계적 의미는 없었다(Table 2, Fig.4). cNOS의 일종으로 신경세포에 분포하는 isoform I 인 bNOS에 대한 면역조직염색은 신경조직에서만 NANC2군과 FK224군에서 3+로 의미있게 증가하였다(Table 3).



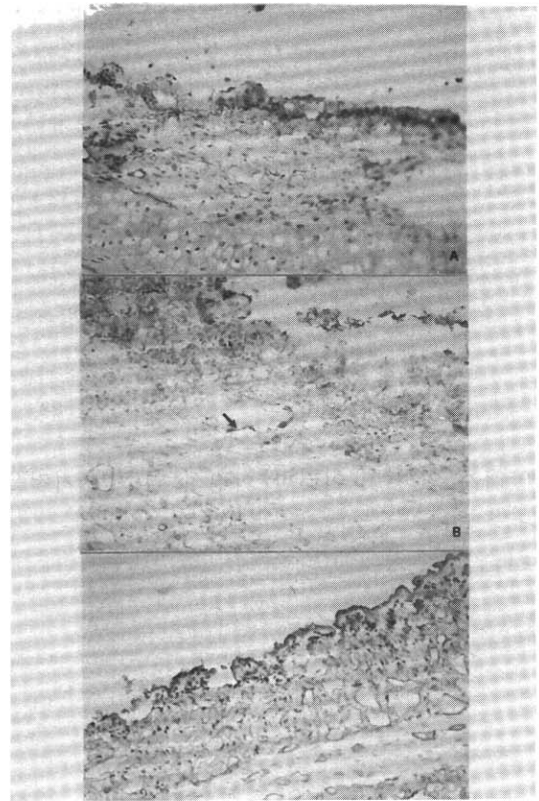
**Fig. 4** Immunohistochemical staining with polyclonal (rabbit) anti-inducible nitric oxide synthase(iNOS) on rat trachea( X 100), A) Positive reaction of iNOS on epithelium and chondrocytes in sham NANC group. B) Positive reaction of iNOS on subepithelial inflammatory cells. C) Weak positive reaction of iNOS on subepithelial inflammatory cells and epithelium.

증가된 bNOS의 활성도는 iNOS와 달리 FK224의 전처리로 억제되지 않았다(Fig. 5).



**Fig. 5** Immunohistochemical stain with polyclonal(rabbit) anti-brain nitric oxide synthase(bNOS) on rat trachea(X 400), A) Weak positive reaction of bNOS on nerves in sham NANC group. B,C) Strong positive reaction on nerves in both NANC2 and FK224 groups.

혈관내피세포에 분포하는 cNOS의 일종으로 isoform III 인 eNOS에 대한 염색에서는 NANC2군과 FK224군에서 혈관내피세포에만 2+로 증가를 보였으나 의미는 없었다(Table 4, Fig. 6).



**Fig. 6** Immunohistochemical stain with polyclonal(rabbit) anti-endothelium nitric oxide synthase(eNOS) on rat trachea(X200), Moderate positive reaction of eNOS on endothelium of subepithelial blood vessels in sham NANC(A), NANC2(B), and FK224(C) groups.

**Table 4** Distribution and activity of polyclonal (Rabbit) anti-brain nitric oxide synthase(eNOS) in neurogenic inflammation of rat trachea

Distribution	Group			
	sham	NANC	NANC2	FK224
Epithelium	+	-/+	+	+
Inflammatory cells				
grade of infiltration	+	+++*	+	**
activity of eNOS	-/+	-	+	+
Nerve	+	-	+	+
Endothelium	+/++	++	++	++
Smooth muscle	-	-	-	-
Chondrocyte	+	+	+	+

Scoring(median) of intensity of staining from 0 to +++ :

\*p<0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC2 group.

## 고 안

비교감신경 및 비부교감신경(NANC)인 감각 신경 C-섬유에서 분비되는 여러 종류의 신경 단백질에 의하여 기관지 근육의 수축, 염증 세포의 혈관유착 및 혈관의 혈장유출 등으로 인하여 발생하는 기도내 염증을 기도의 신경성 염증(neurogenic inflammation)고 한다<sup>1)</sup>. 기관지 천식의 중요한 병리로 기도염증과 기도 근육의 수축이며, 신경성 염증에서도 천식의 병리와 유사한 소견을 보이며 신경성 염증이 천식에 관여한다는 사실은 널리 알려져 있다<sup>1,4)</sup>. 이러한 신경성 염증의 기전을 이용하여 기관지 천식의 기전을 밝히는 데 이용되고 있다. 본 연구에서는 atropine과 propranolol을 전처치하고 미주신경을 절개하여 2분간의 미주신경을 역류성 전기적 자극으로 감각 미주신경인 NANC에 의한 기도 신경성 염증을 유발한 경우, 기도 신경성 염증의 혈장유출 정도는  $49.1 \pm 2.1 \text{ ng/mg}$ 으로 신경성 염증을 유발하지 않은 대조군  $14.7 \pm 1.7 \text{ ng/mg}$ 보다 유의한 증가를 보였다(table 1). 신경성 염증이 유발된 기관의 병리조직학적 변화는 H-E염색상에 기도 상피세포가 탈락되고 점막하에 염증세포가 증가되었고, 기도 부종도 관찰할 수 있었다(Fig.2B).

기도의 NANC에서 분비되는 신경 단백질은 억제 NANC신경(inhibitory NANC)에서 분비되는 vasoactive intestinal peptide(VIP), peptide histidine methionine(PHM)과 peptide histidine isoleucine(PHI)등과 흥분 NANC신경(excitatory NANC)에서 분비되는 substance P, NKA, NKB, CGRP등으로 나눌 수 있다. substance P, NKA, CGRP, gastrin-releasing peptide(GRP), cholecystokinin(CCK)등은 기관지 근육을 수축시키고, VIP, PHM, PHI등은 기관지를 이완시킨다. 신경 단백질의 혈관에 대한 작용은 NPY는 혈관 수축 작용과 substance P, VIP, PHM, PHI, NKA, CGRP등은 혈관 이완작용이 있다.

substance P와 NKA는 혈장 유출을 일으키며 CGRP는 단독으로 혈장 유출을 일으키는 효과보다는 다른 신경 단백질의 작용에 의하여 혈장 유출을 증가시키는 효과가 있다. 또한 substance P와 glycine related peptide(이하 GRP)는 점액의 분비를 촉진시키는 작용도 있는 것으로 알려져 있다. 여러 종류의 신경 단백질 중에서 기도내 신경성 염증에 주로 작용하는 신경 단백질은 substance P, neurokinin A, neurokinin B 와 CGRP 이다(1-6,30). 신경 단백질은 조직에서 작용시에 조직내의 각각 특이한 단백질 수용체를 통하여 작용한다. 신경성 염증을 유발하는 주된 신경 단백질인 substance P, NKA와 NKB는 carboxyl기의 말단부가 -Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>로 구성된 tachykinin으로 NK수용체를 통하여 작용하게 된다. NK수용체는 NK1, NK2, NK3 등의 3가지 아형이 있으며, 기관지의 혈관확장은 주로 substance P가 혈관내벽세포의 NK1 수용체에 작용하여 혈관을 확장시키고, 기관지 근육에 존재하는 NK2 수용체는 NKA가 주로 작용하여 기관지를 수축시키는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>. 신경성 염증을 억제하는 방법으로는 NK수용체 차단제를 많이 이용한다<sup>8-16)</sup>. FK224는 Streptomyces violaceoniger로 부터 분리한 {N-[N2-[N-[N-[N-[2,3-didehydro-N-methyl-N-[N-[3-(2-penthy-1-phenyl)-propionyl]-L-threonyl]tyrosyl]-L-leucynyl]-D-phenylalanyl]-L-asparaginyl]-L-serine-v-lactone}의 cyclopeptide 물질로 NK1, NK2수용체 차단제이다. FK224의 NK 수용체 차단 효과는 외인성(exogenous) 신경 단백질에 대한 효과 뿐만 아니라 내인성 신경 단백질에 대해서도 수용체 차단 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>33)</sup>. 본 연구에서도 신경 단백질 수용체 차단제인 FK224를 전처치하여 감각 미주신경의 전기적 자극으로 유발된 기도 신경성 염증에서 혈장 유출에 대한 효과는  $25.1 \pm 2.5 \text{ ng/mg}$ 으로 전처치하지 않은 기도 신경성 염증의  $49.1 \pm 2.1 \text{ ng}$



/mg보다 유의하게 억제되었을 뿐 만 아니라 병리조직학적 소견에서도 기관 상피세포의 탈락도 없었으며, 점막하 염증세포의 침윤도 억제되었다(Fig.2C). 따라서 기도 신경성 염증이 감각 미주신경인 NANC신경 말단부에서 유리되는 신경단백질과 관계가 있음을 알 수 있으며, 신경단백질은 neurokinin 수용체를 통하여 신경성 염증을 유발하는 것을 알 수 있었다.

최근에는 감각신경의 말단부에서 신경 단백질 뿐 만 아니라 산화질소가 분비되어 신경 전달 물질로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>18-21</sup>. 산화질소는 평활근의 이완작용 이외도 신체의 신경조직을 비롯하여 거의 모든 장기에서 합성 유리되는 물질이다. 산화질소는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)와 조인자인 환원형 pyrimidine nucleotide, 환원형 biopteridine과 calmodulin에 의하여 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되는 과정에서 생성되는 물질로서 3개의 다른 형태의 산화질소 합성효소가 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>26-29</sup>. 구성형 효소(constitutive isoform)의 isoform I, III와 cytokine으로 유도되는 유도형(inducible isoform)의 isoform II가 존재한다고 알려져 있다. 구성형 산화질소 합성효소(constitutive nitric oxide synthase)는 뇌등의 신경세포에 존재하는 isoform I인 bNOS와 혈관 내피세포에 특징적으로 존재하는 isoform III인 eNOS로 나누어진다. 이들은  $Ca^{++}$ 과 calmodulin의존형 효소로서 적은 양의 산화질소로 guanylate cyclase를 활성화하여 혈관 확장 등의 EDRF 기능이나 신경전달 물질 등의 여러 생리학적 반응을 조절한다<sup>28,29</sup>. 한편 종양괴사인자(TNF $\alpha$ ), interleukin(IL-1), interferon  $\gamma$  등과 같은 cytokine에 의해 많은 양으로 유도되는 산화질소는 heme group의 2가 철과 결합하여 철을 포함하고 있는 효소의 철-황 중심부를 파괴하여 세포독성을 초래하며, 대식세포, 백혈구등의 세망내피조직(reticuloendo-

thelial system) 뿐 만 아니라 혈관 평활근과 내피세포등의 비세망내피조직에서도 유도형 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase)가 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>34,35</sup>. 최근에는 말초신경에서 산화질소가 유리되는 중요한 신경 전달 물질로 작용한다고 밝혀지고 있다<sup>18-21</sup>.

산화질소의 조직파괴에 대한 작용은 세포 보호작용과 세포 독성의 양면성을 나타낸다<sup>26-29</sup>. 특히 산소 유리기(oxygen-derived radicals)가 관여하는 경우는 산화질소가 세포 독성을 띠고 산화질소 합성효소 억제제를 투여하면 조직손상을 보호할 수 있음을 보고하여 산화질소는 조직손상에 관여하는 것으로 알려져 있다. 반면에 산화질소는 혈관의 평활근 세포에서 soluble guanylate cyclase를 활성화하여 혈관 근육을 이완시키며, 배양된 혈관 내피 세포에 산화질소를 투여하면 혈관 내피 세포의 이완시키는 것이 증명되어 내피 세포의 간격이 좁아져 단백질 유출을 억제시킨다<sup>36</sup>. 또한 백혈구의 활성화와 세포유착으로 혈관 투과성이 증가된 염증 반응에서 산화질소는 백혈구를 불활성화시키고 세포유착을 막아 염증을 억제시킨다고도 하여 조직파괴에 대한 산화질소의 역할은 세포 조직 독성 작용과 혈관 이완, 조직 세포 보호 작용의 양면성이 존재하여 아직 논란이 많다<sup>37,38</sup>.

기니피크의 기도 신경성 염증에서 산화질소가 혈관 투과성을 증가시키고 산화질소 합성효소 억제제를 사용하면 혈관의 수축으로 혈관의 투과성이 감소한다고 Kuo<sup>22</sup> 등은 보고하였으나, 1994년 Liu<sup>24</sup> 등의 연구에 의하면 기도의 신경성 염증에서 산화질소 합성효소 억제제를 전처치를 하여 산화질소의 생성을 억제시키면 기도 내의 혈장 유출이 증가된다고 보고하여 상이한 결과를 보고하였다. 또한 심<sup>31</sup> 등이 백서의 미주 신경을 전기적 자극으로 유발시킨 기도의 신경성 염증에서 산화질소 합성효소 억제제를 사용하면 기도내 혈장 유출이 약 1.3배 증가한다고 하여 기도의

신경성 염증에서 혈장유출에 대한 산화질소의 역할에는 논란이 많은 실정이다. 그러나 최근 Erjefält<sup>25)</sup> 등에 의하면 산화질소는 기도 혈장유출에 강력한 억제제로 작용한다고 보고한 바있다. 본 연구에서도 기도 신경성 염증에서 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA의 전처치한 군에서 기도 혈장유출이  $61.2 \pm 3.7\text{ng/mg}$ 으로 L-NNA를 전처치하지 않은 군의 기도 혈장유출  $49.1 \pm 2.5\text{ng/mg}$ 보다 유의한 증가를 보여 산화질소가 기도 신경성 염증의 혈장유출을 억제시켰다.

신경성 염증에 작용하는 산화질소를 생성하는 세포와 산화질소 합성효소의 종류를 밝힘으로써 신경성 염증에서 논란이 되고 있는 산화질소의 역할을 이해하는 데 도움이 되며, 산화질소 합성효소의 분포를 밝힘으로써 신경성 염증에 작용하는 산화질소가 신경 전달 물질로서 염증 반응을 억제시키는지, 또는 미주신경 자극 시에 분비되는 신경단백질로 인하여 다른 폐장의 조직에서도 산화질소가 유리되는 지를 밝힐 수 있을 것으로 사료된다. 산화질소는 반감기가 수 초로 조직 내에서 직접 측정이 불가능하여 산화질소 합성효소의 억제제를 이용하여 병태생리작용을 연구하고 있으나<sup>39)</sup>, 산화질소가 어떤 종류의 산화질소 합성효소로부터 유리되는 지는 확인할 수 없고 산화질소가 어떤 조직으로부터 유리되는 지를 확인할 수 없는 단점이 있다. 산화질소 합성효소의 분포를 확인하기 위하여 산화질소 합성효소의 조인자인 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)-diaphorase 활성도를 면역 조직 염색법(immunohistochemical stain)으로 측정하여 NOS의 분포를 연구하는 방법이 시도되고 있으나<sup>40-42,44)</sup>, 산화질소 합성효소의 종류를 확인하지 못하는 단점이 있다. Erjefält<sup>25)</sup> 등의 연구에서 산화질소가 혈장의 유출을 억제하고 NADPH-diaphorase의 활성을 측정하여 산화질소가 관여한다고 보고하였다. 최근에 Kobzik<sup>43)</sup> 등이 뇌의 조직에서 분리한 cNOS

항체와 대식 세포에서 분리한 iNOS를 이용하여 lipopolysaccharide(LPS)로 기관 내에 전처치한 Sprague-Dawley 백서의 폐장 조직에서 cNOS는 신경,혈관 내피 세포와 기관지 점막에 분포하고, iNOS는 기관지 점막, 혈관 내피 세포, 대식 세포와 연골 세포에 분포하나 주로 대식 세포에 분포함을 증명하여 cNOS는 기관지 확장과 염증 억제에 주로 작용하며, iNOS는 염증에 주로 관여함을 알 수 있었다. 그러나 cNOS의 종류가 뇌세포에서 유래된 산화질소 합성효소 뿐 만 아니라 혈관 내피세포에서도 유래되므로 cNOS가 구분되어 있지 않은 연구였다. 신경 단백질로 인하여 산화질소 합성효소가 활성화하여 신경 말단부 뿐 만아니라 다른 폐장 조직 세포에서도 유리되므로 본 연구에서는 산화질소가 신경말단부에서 유리될 가능성을 증명하기 위하여 신경 단백질로 인하여 다른 폐장의 조직에서 이차적으로 유리되는 산화질소의 효과를 없애기 위해 신경 단백질 수용체 차단제인 FK224를 전처치하여 신경단백질이 조직내의 다른 세포에 대한 작용을 차단하여 산화질소가 신경말단부에서 신경 전달 물질로 작용함을 산화질소 합성효소에 대한 면역 조직염색법을 이용하여 확인하였다.

**Table 5** Summary of significant changes of nitric oxide synthase activity

Distribution	Group			
	sham	NANC	NANC2	FK224
Grade of Inflammatory cells infiltration		+	+++*	++
Activity of NOS				
iNOS				
Inflammatory cells	+	++*		++
bNOS				
Nerve	++	+++*		+++*
eNOS				
Endothelium	+ / ++	++		++

Scoring(median) of intensity of staining from 0 to +++ :

\*p<0.05 compared with sham NANC group, \*\*p<0.05 compared with NANC 2 group.

신경성 염증을 유발하지 않은 대조군의 백서 기관조직에서는 상피세포, 신경세포 및 연결세포에서 약하게 iNOS의 활성을 띄었고, 혈관내피세포나 기도 평활근에서는 iNOS의 활성을 나타내지 않았다. 신경성 염증이 유발된 기관에서 증가된 염증세포에서 iNOS의 활성이 유의한 증가를 보였으며, FK224의 전처치로 증가된 염증세포의 침윤이 감소될 뿐만 아니라 염증세포의 iNOS활성 자체도 억제되었다(Table 2). 이러한 결과는 신경단백질이 기관 조직내 염증세포의 침윤을 일으키고 염증세포에서 유도형 산화질소가 유리되어 신경성 염증을 일으키는 데 주된 역할을 하는 것으로 사료된다. 구성형 산화질소 합성효소의 일종인 bNOS에 대한 염색은 신경성 염증이 있는 기관의 신경에서 유의하게 증가되었으며 FK224의 전처치로도 억제되지 않았다(Fig. 4). 신경성 염증의 신경에서 bNOS 활성도가 증가되고 FK224로 억제되지 않은 것은 NANC 신경에서 산화질소가 유리되는 것을 의미하며, 구성형 산화질소로 부터 생성되는 산화질소는 염증을 억제하는 기능이 있으므로 신경세포에서 유리되는 산화질소는 신경성 염증을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다. 반면에 eNOS는 신경성 염증의 혈관내피세포에서 다소 활성을 띄나 의미는 없었다. 따라서 신경성 염증유발전 L-NNA를 전처치하는 경우 신경세포에서 유리되는 산화질소의 합성이 억제되어 혈장유출이 증가하였을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 기도의 신경성 염증에서 조직내 염증세포가 증가되며 iNOS에서 생성되는 산화질소가 주로 혈장유출에 관여하는 것으로 사료된다. FK224는 염증세포의 조직내 침윤을 억제시키며, iNOS의 활성도도 감소시켜 기도 혈장유출을 억제시키는 것으로 생각된다. 또한 기도의 신경성 염증에서 NANC신경에서도 산화질소가 유리됨을 알 수 있었으며, 기도 신경성 염증에서 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA로 혈장유출이 증가되는 것

은 bNOS에서 유리되는 산화질소의 생성을 L-NNA가 억제시킬 수 있으므로 산화질소 합성효소 억제제가 기도 신경성 염증의 혈장유출을 증가시키는 데에 bNOS가 일부 작용할 것으로 사료된다.

## 요 약

**연구 배경 :** 기도의 신경성 염증에서 산화질소가 관여하는 것으로 알려져 있으나, 그 역할에 대해서는 논란이 많다. 본 연구는 기도 신경성 염증에 관여하는 산화질소의 역할을 보다 명확히 밝히고자 하였다.

**방법 :** 150-350gm의 백서를 이용하여 기도의 신경성 염증에서 신경단백질 수용체 차단제인 FK224와 산화질소 합성효소 억제제인 N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA)의 혈장유출에 대한 효과를 먼저 확인하고, 기도 신경성 염증에 관여하는 산화질소가 기도의 신경말단에서만 유리되는 지 또는 신경성 염증에서 유리된 신경 단백질로 인하여 다른 폐장조직 세포에서도 산화질소가 유리되는 지를 규명하기 위하여 산화질소 합성효소의 종류와 그 분포를 polyclonal anti-NOS antibody에 대한 면역화효소법으로 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

**결과 :** 백서의 기도 신경성 염증에서 신경단백질 수용체 차단제인 FK224는 혈장유출을 억제시키며 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA는 혈장유출을 증가시켰다(P<0.05). 기도 신경성 염증유발시 조직내 염증세포의 침윤은 증가되었으며, FK224로 전처치시 조직내의 염증세포의 침윤을 억제시켰다(P<0.05). 염증을 유발하는 것으로 알려진 유도형 산화질소 합성효소(iNOS)의 활성도는 침착된 염증세포에서만 유의하게 증가하였다(P<0.05). 염증을 억제하는 것으로 알려진 산화질소를 생성하는 구성형 산화질소 합성효

소(cNOS)인 eNOS의 활성도는 혈관내피세포에서 증가하였으나 의미는 없었고, bNOS의 활성도는 신경성 염증에서 신경세포에서만 증가되었으며, FK224에 의해서도 bNOS의 활성도는 억제되지 않았다.

**결론** : 기도의 신경성 염증에서 조직내 염증세포가 증가되며 iNOS에서 생성되는 산화질소가 주로 혈장유출에 관여하는 것으로 사료된다. FK224의 전처치는 염증세포의 조직내 침윤을 억제시키며, iNOS의 활성도도 감소시켜 기도 혈장유출을 억제시키는 것으로 생각된다. 또한 기도의 신경성 염증에서 NANC신경에서도 산화질소가 유리됨을 알 수 있었으며, 기도 신경성 염증에서 산화질소 합성효소 억제제인 L-NNA로 혈장유출이 증가되는 것은 bNOS에서 유리되는 산화질소의 생성을 L-NNA가 억제시킬 수 있으므로 산화질소 합성효소 억제제가 기도 신경성 염증의 혈장유출을 증가시키는 데에 bNOS가 일부 작용할 것으로 생각되는 바이다.

## 참 고 문 헌

1. Barnes PJ : Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1: 242, 1986
2. Sekizawa K, Tamaoki J, Graf PD, Basbaum CB, Boroson DB, Nadel JA: Enkephaline inhibitor potentiates mammalian tachykinin-induced contraction in ferret trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 143: 1211, 1987
3. Shelhamer JH, Levine SJ, Wu T, Jacoby DB, Kaliner MA, Rennard SI : Airway inflammation. *Ann Intern Med* 123(4): 288, 1995
4. Barnes PJ : Neuropeptides and asthma. *Am Rev Respir Dis* 143: S28, 1991
5. Barnes PJ, Liu SF : Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 47(1): 87, 1995
6. Maggi CA, Giachetti A, Dey RD, Said SI : Neuropeptides as regulators of airway function : Vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol Rev* 75(2): 277, 1995
7. Quirion R, Dam TV : Multiple neurokinin receptors : Recent developments. *Reg Peptides* 22: 18, 1988
8. Snider RM, Constantine JW, Lowe JA, Longo KP, Lebel WS, Woody HA, Drozda SE, Desai MC, Vinick FJ, Spencer RW, Hess HJ : A potent nonpeptide antagonist of the substance P(NK1) receptor. *Science* 251: 435, 1991
9. Garret C, Carrutte A, Fardin V, Moussaoui S, Peryonel JF, Blanchard JC, Laduron PM : Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance Pantagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10208, 1991
10. Hagan RM, Ireland SJ, Jordan CC, Beresford IJM : Potent and highly selective antagonist at neurokinin NK1-receptors. *Br J Pharmacol* 99(S): 62, 1990
11. Hagan RM, Ireland SJ, Bailey F, McBride C, Jordan CC, Ward P : A spiroactam conformationally-constrained analogue of physalaemin which is a peptidase-resistant, selective neurokinin NK1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 102(S): 168, 1991
12. Ward P, Ewan GB, Jordan CC, Ireland SJ, Hagan RM, Brown JR : Potent and highly selective neurokinin(NK1) antagonist. *J Med Chem* 33: 1848, 1990
13. McKnight AT, Maguire JJ, Williams BJ, Foster AC, Trigett R, Iversen LL: Pharmacological specificity of synthetic peptides as antagonists at tachykinin receptors. *Regul Peptides* 22: 127, 1988
14. William BJ, Curtis AT, Foster A, Tridgett R : Development of NK2 selective antagonists. *Regul Peptides* 22: 189, 1988
15. van Giersbergen PLM, Shatzer SA, Henderson AK, Lai J, Nakanishi S, Yamaura HI, Buck SH : Characterization of a tachykinin peptide NK2

- receptors transfected into murine fibroblast B83 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1661, 1991
16. Maggi CA, Giulian S, Ballati L, Lecci A, Manzini S, Patacchini R, Renzetti AR, Rovero P, Quatrara L, Giachetti A: In vivo evidence for tachykinergic transmission using a new NK2 receptors selective antagonist, MEN 10376. *J Pharmacol Exp Ther* **257**: 1172, 1991
  17. Murai M, Morimoto H, Maeda Y, Kiyotoh S, Nishikawa M, Fujii T : Effects of FK224, a novel compound NK1 and NK2 receptor antagonist, on airway contraction and airway edema induced by neurokinins and sensory nerve stimulation in guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* **262**(1): 403, 1992
  18. Schmidt HHHW, Gane GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F: Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggest frequent co-localization with NADPH diaphorase, but not with soluble guanyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* **40**: 1439, 1992
  19. Toda N, Okamura T: Reciprocal regulation by putative nitroxidergic and adrenergic nerves monkey and dog temporal arterial tone. *Am J Physiol* **26**: H1740, 1991
  20. Toda N, Okamura T: Mechanism of neurally induced mesenteric artery relaxation and contraction. *Hypertension* **19**: 161, 1992
  21. Sheng H, Schmidt HHHW, Nakane M: Characterization and localization of nitric oxide synthase in nonadrenergic noncholinergic nerves from bovine retractor penis muscle. *Br J Pharmacol* **106**: 768, 1992
  22. Kuo HP, Liu S, Barnes PJ: The effects of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma extravasation in guinea pig airways. *Eur J Pharmacol* **221**: 385, 1992
  23. Kubes P, Suzuki M, Granger DN : Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4651, 1991
  24. Liu S, Kuo HP, Sheppard MN, Barnes PJ, Evans TW: Vagal stimulation induces increased pulmonary vascular permeability in guinea pig. *Am J Respir Crit Care Med* **149**(3): 744, 1994
  25. Erjefält JS, Erjefält I, Sundler F, Persson CGA: Mucosal nitric oxide may tonically suppressed airways plasma exudation. *Am J Respir Crit Care Med* **150**: 227, 1994
  26. Ånggård E: Nitric oxide: Mediator, murderer, and medicine. *Lancet* **343**: 1199, 1994
  27. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide : A physiologic messenger. *Ann Intern Med* **120**: 227, 1994
  28. Barnes PJ, Belvisi MG : Nitric oxide and lung disease. *Thorax* **48**: 1034, 1993
  29. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**(27): 2002, 1993
  30. McDonald DM : Neurogenic inflammation in the respiratory tract : Actions of sensory nerve mediators on blood vessels and epithelium of the airway mucosa. *Am Rev Respir Dis* **136**: S65, 1987
  31. 심재정, 박상면, 이진구, 조재연, 인광호, 유세화, 강경호, 김철환 : 산화질소(nitric oxide)의 기도내 신경성 염증(neurogenic inflammation) 조절에 관한 연구. *대한내과학 회지* **47**(4): 454, 1994
  32. Morimoto H, Murai M, Maeda Y, Yamaoka M, Nishikawa M, Kiyotoh S, Fujii T : FK224, a novel cyclopeptide substance P antagonist with NK1 and NK2 receptor selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* **262**(1): 398, 1992
  33. Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373, 1980
  34. Hevel J, White KA, Morletta MA : Purification of inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **266**: 22789, 1991

35. Drapier JC, Hibbs Jr JB : Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cell: Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. *J Clin Invest* **78**: 790, 1986
36. Oliver JA : Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. *J Cell Physiol* **151**: 506, 1992
37. Kubes P : Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* **262**: G1138, 1992
38. Del Mastro RF, Bjork J, Arfor KE : Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. I. In vivo study. *Microvasc Res* **22**: 239, 1981
39. Moncada S, Palmer RMT, Higgs EA : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43**: 109, 1991
40. Leeflang-de Pijper A, Hulsmann W: Pitfalls in histochemical localization studies of NADPH generating enzymes or enzyme systems in rat small intestine. *Histochemistry* **39**: 143, 1974
41. Brecht D, Hwang P, Snyder S : Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**: 768, 1990
42. Dawson T, Brecht D, Fotuhi M, Hwang P, Snyder S: Nitric oxide synthase and neural NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7797, 1991
43. Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stalmer JS: Nitric oxide synthetase in human and rat lung : Immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Moll Biol* **9**: 371, 1993
44. Fostermann U, Schmidt H, Pollock J, Sheng R, Mitchell J, Warner T, Nakane M, Murad F : Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* **42**: 1849, 1991