

□ 원 저 □

만성폐쇄성 폐질환 환자에서 적혈구 항산화효소의 변화

조선대학교 의과대학 내과학교실

이승일

=Abstract=

The level of antioxidant enzymes in red blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease

Seung-II Lee

Department of Internal Medicine, Chosun University Medical College, Kwangju, Korea

Background : Toxic oxygen free radicals have been implicated as important pathologic mediators in many clinical disorders. Enhancing the intracellular content of antioxidant enzymes(superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase) can provide means of limiting biological damage caused by oxygen free radicals. The oxygen free radicals and changes of antioxidant enzymes are thought to play a role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.

Method : To investigate the pulmonary oxygen radical injury and the protective role of antioxidant enzymes in Chronic obstructive pulmonary disease(COPD), author measured the amount of thiobarbituric acid reactants, the activities of antioxidant enzymes and the sulfhydryl groups of glutathione in serum and red blood cells from the patients with COPD(COPD patients) and the normal controls.

Results : The thiobarbituric acid reactant in serum and red blood cells of COPD patients was increased than those of the normal controls, and the superoxide dismutase activity in red blood cells was no statistical difference in both groups. But the glutathione peroxidase and catalase activities in red blood cells of COPD patients were significantly lowered than those of the normal controls.

The sulfhydryl groups in serum and red blood cells were no statistically difference in both groups.

Conclusion : These results suggest that the increased thiobarbituric acid reactants in serum and RBCs of chronic obstructive pulmonary disease mean oxygen radical toxicity, and the decreased glutathione peroxidase and catalase activities in RBC could take part in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.

Key words : chronic obstructive pulmonary disease, oxygen radical, antioxidant enzyme

이 논문은 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었습니다.

만성폐쇄성 폐질환은 만성적이고 반복적으로 나타나는 기도 호기유속의 감소를 초래하는 질환군으로 만성기관지염 및 폐기종의 두질환군으로 대별될 수 있으며 최근들어 흡연인구의 증가와 노령인구의 증가 등으로 우리나라에서도 환자가 급격히 늘어나는 추세이다. 호기성 생물에서 산소의 대사과정중에 산소의 불완전한 환원으로 superoxide radical (O_2^-)등의 산소 유리기가 생성되는데 이들 산소 유리기의 현저한 증가시 폐손상 등 임상적으로 중요한 독성을 일으킬 수 있다고 알려져 있어^{1,2)} 증가된 산화물이 여러 형태로 만성폐쇄성 폐질환의 발생에 관여할 것으로 생각된다. 이들 산소 유리기를 제거시켜 생물체를 보호하는 효소로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), catalase등이 있으며 작은 분자로서 항산화제 혹은 유리기를 제거하는 것으로 비타민E, 비타민C, β -carotene 및 glutathione등이 알려져 있다³⁾. 이들 항산화 효소들의 생체보호를 위한 생물학적 방어기전의 중요성이 계속 연구되고 있으며, 산소유리기의 증가와 더불어 SOD 등 효소활성이 증가되거나, SOD 등의 효소활성이 감소하면 산소유리기의 생성이 증가됨이 관찰되었다⁴⁾. 따라서 저자는 이들 산소유리기의 생성이 만성폐쇄성 폐질환 환자의 폐손상에 영향을 미칠 것으로 생각하고 이를 제거하는 항산화효소의 활성화도 변화를 관찰하기 위해 만성폐쇄성 폐질환 환자의 혈청과 적혈구 내에서 thiobarbituric acid reactant의 변화와 항산화효소들(SOD, GPX, catalase)의 활성화도 및 sulfhydryl기 등을 측정하여 이를 정상대조군과 비교하였다.

1. 대상

1996년 1월부터 1996년 8월까지 조선대학교 부속병원 내과에 입원한 환자중 증상 및 징후(호흡곤란, 천명음, 객담, 기침, pursed lip breathing, 호흡 보조근육의 사용, 청색증), 흉부 X-선 사진(hyperinflation, bronchial wall thickening, lung marking)의 증가, 편평한 횡격막, narrow or vertical heart), 폐기능검사(FEV1 감소, FEV1/FVC감소), 동맥혈가스검사($PaCO_2$ 증가, PaO_2 감소)등을 토대로 ATS의 기준⁵⁾에 합당한 만성폐쇄성 폐질환으로 진단된 환자중 다른 질환이 합병된 경우를 제외한 15명을 대상으로 하였고 성별 분포는 남자 12명, 여자 3명이었다. 정상대조군은 신체검사를 받기위해 내원한 사람중 신체검사상 이상이 없는 15명을 대상으로 하였다. 평균연령은 만성폐쇄성 폐질환 환자군 65세, 정상대조군 61세이었다 (Table 1).

Table 1. Clinical characteristics of the subjects.

	Normal control(n=15)	COPD(n=15)
Age(years)	61.2 ± 18.1	65.3 ± 13.7
Sex(Male : Female)	10 : 5	12 : 3
Cigaretts Smoking (Pack-years)	6 ± 9.1	24.2 ± 11.6

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

만성폐쇄성 폐질환 환자군의 폐기능검사상 평균치는 FEV₁이 0.72 ± 0.3L, FEV₁/FVC는 41.3%였고, 동맥혈 가스검사상 평균치는 $PaCO_2$ 는 47.0 ± 16.2mmHg, PaO_2 는 62.9 ± 20.7mmHg였다.(Table 2).

Table 2. Pulmonary function tests and Arterial blood gas analysis of the subjects.

	Normal control(n=15)	COPD(n=15)
PFT		
FEV1(Liters)	1.97±0.5	0.72±0.3
FEV1/FVC(%)	75.8±8.2	41.3±5.4
VC(Liters)	2.56±0.7	1.71±0.7
TLC(Liters)	10.27±11.6	6.31±8.2
RV(Liters)	7.71±8.9	6.11±7.9
RV/TLC(%)	75.0±12.5	78.5±10.4
ABGA		
PaCO ₂ (mmHg)	39.3±2.1	47.0±16.2
PaO ₂ (mmHg)	98.7±2.7	62.9±20.7

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

PFT : Pulmonary function Test

ABGA : Arterial Blood Gas Analysis

FEV₁ : Forced Expiratory volume at one second

FVC : Forced Vital Capacity

VC : Vital Capacity

TLC : Total Lung Capacity

RV : Residual volume

2. 방법

1) 시약

Thiobarbituric acid(TBA), butylated hydroxytoluene, cytochrome C, xanthine, xanthine oxidase, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione(GSSG), heparin, glutathione reductase(GSSG reductase), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), sodium azide(NaN₃), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB), 5-sulfosalicylic acid(SSA), triethanolamine, dulbeccos phosphate buffered saline(DPBS)등은 Sigma Chemical Company시약을, hydrogen peroxide(H₂O₂)는 E.Merk 회사의 시약을 사용하였고 trichloroacetic acid,

hydrochloric acid(HCl)등 기타 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

2) 혈액채취

혈액은 heparin이 들어있는 주사기로 채혈하고 4℃에서 500xg로 10분간 원심분리시켜, 혈청을 취하고, buffy coat를 제거한 후 적혈구는 생리 식염수로 3회 더 세척하여 실험에 사용하였고, 적혈구에 5배 (W/V)의 냉각된 증류수를 가하여 용혈시킨 후 조효소액으로 사용하였다.

3) TBA반응성 산물의 측정

TBA반응성 산물의량은 Buege등⁶⁾의 TBA법에 의해서 측정하였다. 즉 TBA시약 (15% w/v trichloroacetic acid : 0.375% thiobarbituric acid : 0.25N hydrochloric acid) 1.0ml에 butylated hydroxytoluene을 최종농도가 0.01%가 되게 첨가하고 혈청 0.5ml 또는 적혈구 0.2ml를 가하여 90℃에서 1시간동안 가열한 후 즉시 냉각시켜 5000xg로 15분간 원심분리하여 상청액을 취해 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD 활성도는 Crapo등⁷⁾의 방법에 의해서 측정했다. 즉 0.1mM EDTA를 함유한 0.05M phosphate buffer(pH 7.8) 2.3ml에 0.5mM xanthine 0.3ml, 0.1M cytochrome C 0.3ml를 넣은 후 xanthine oxidase 0.1ml를 가하여 500nm에서 1분간 흡광도의 증가를 측정하여 흡광도의 증가 속도가 매분당 0.020이 되게 xanthine oxidase의 농도를 조절하였다. 효소의 활성도는 상기 조건에서 효소액 0.05ml를 가하여 흡광도 증가의 억제정도를 측정하였으며, cytochrome C의 환원속도를 50% 억제하는 효소의량을 1 unit로 표시하였다.

5) Glutathione peroxidase 활성도 측정

Glutathione peroxidase활성도는 Flohe등⁸⁾의 방법에 의해 측정했다. 즉 1mM EDTA를 함유한 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.5ml에 3mM GSH, 20mM NaN₃, glutathione reductase 0.72 U, NADPH 0.45mM과 효소 용액 10ul를 넣고 37℃에서 5분간 방치한 후 0.45mM H₂O₂를 가하여 340nm에서 3분동안 흡광도의 변화를 측정하였으며, 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 0.45mM H₂O₂에서 가하지 않고 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였고, 효소활성도는 비효소적 반응에 의한 흡광도변화를 감한 값을 다음식에 의해서 계산하였다.

$$A = 0.868([NADPH] / [GSH]_0 \cdot t)(V_i/V_s)$$

(A : 효소 활성도, [NADPH] : NADPH농도변화, [GSH]₀ : GSH의 처음농도, t : 반응시간, V_i : 반응액의 용량, V_s : 효소액의 용량)

6) Catalase 활성도 측정

Catalase활성도는 Abei등⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0ml에 효소액 20ul, 10mM H₂O₂용액 1.0ml를 넣은 후 240nm에서 30초간 흡광도의 변화를 측정했다. 효소의 활성도는 1분동안에 1 uM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

7) Sulfhydryl groups의 측정

Sulfhydryl groups의 측정은 Habeed등¹⁰⁾의 방법에 의해서 측정하였다. 즉 혈청과 적혈구를 각각 0.3ml를 미리 냉각된 20mM EDTA를 함유한 50mM phosphate buffer(pH 4.7) 1ml에 혼합하여 시료로 사용하였다. 총 sulfhydryl groups 측정은 시료 0.5ml를 가한 후 상온에서 30분 경과후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 비단백성 sulfhydryl groups는 시료 2.5ml에 50% TCA용액 0.5ml를 가하고 혼합하여 원심분리하여 상청액 2ml를 취해

400mM Tris buffer(pH 8.9) 4ml, DTNB용액 0.1ml를 가하고 상온에서 30분 경과후 412nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 sulfhydryl groups는 총 sulfhydryl groups에서 비단백성 sulfhydryl groups를 감한 값으로 나타냈으며, sulfhydryl groups량은 nitrobenzoic acid의 흡광계수를 $1.36 \times 10^4/M/Cm$ 로 간주하여 계산하였다.

8) Hemoglobin정량

Hemoglobin 정량은 cyanomethemoglobin법¹¹⁾에 의해서 측정하였다.

9) 통계방법

모든 수치들은 산술평균±표준편차로 표시하였으며 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군의 비교는 student-t-test에 의해 검정하였다.

실 험 결 과

1. 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군의 혈청과 적혈구내 Thiobarbituric acid reactant

535nm에서 읽은 Thiobarbituric acid reactant 흡광도는 만성폐쇄성 폐질환 환자군의 혈청과 적혈구에서 각각 1.85 ± 0.24 , 13.68 ± 3.66 으로 정상대조군의 1.27 ± 0.22 , 9.17 ± 0.57 보다 유의한 증가를 보였(p<0.01) (Table 3).

Table 3. The level of TBA reactant in serum and red blood cells of COPD patients and normal controls. (mean±SD)

	TBA reactant (A535-nm)	
	Normal control(n=15)	COPD(n=15)
Serum	1.27 ± 0.22	$1.85 \pm 0.24^*$
RBC	9.17 ± 0.57	$13.68 \pm 3.66^*$

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

TBA : Thiobarbituric acid (*:p<0.01)

2. 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군의 적혈구내 항산화효소들(Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, catalase)의 활성도

Superoxide dismutase활성도는 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군 간에 유의한 차이가 없었으나, Glutathione peroxidase와 Catalase의 적혈구내 활성도는 만성폐쇄성 폐질환 환자군에서 정상대조군 보다 유의하게 감소되었다(각각 $p<0.05$, $p<0.01$) (Table 4, Fig. 1).

Table 4. The level of Antioxidant enzymes (SOD, GPX, Catalase) activities in red blood cells of COPD patients and normal controls. (mean \pm SD)

Enzyme	Normal control(n=15)	COPD(n=15)
SOD(U/mgHb)	0.31 \pm 0.02	0.29 \pm 0.03
GPX(mU/mgHb)	0.33 \pm 0.06	0.22 \pm 0.07*
Catalase(mU/mgHb)	171.04 \pm 2.18	147.46 \pm 11.22**

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary disease

SOD : Superoxide Dismutase

GPX : Glutathione Peroxidase

(*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

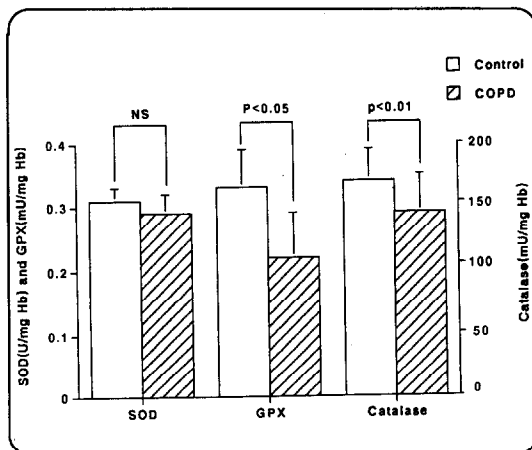


Fig. 1. The level of Antioxidant enzymes activity in red blood cell of COPD Patients(dashed bar) and normal controls(blank bar). (mean \pm SD)

NS : Nonspecific

3. 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군의 혈청과 적혈구내 sulfhydryl기

총 sulfhydryl기와 비단백성 sulfhydryl기 모두 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군의 혈청과 적혈구에서 유의한 차이가 없었다(Table 5).

Table 5. The level of Sulfhydryl groups in serum and red blood cells of COPD patients and normal controls. (mean \pm SD)

	Norma control(n=15)		COPD(n=15)	
	Serum (uM/ml)	RBC (uM/mgHb)	Serum (uM/ml)	RBC (uM/mgHb)
T-SH	8.18 \pm 0.42	0.77 \pm 0.06	7.19 \pm 0.28	0.73 \pm 0.05
NP-SH	1.78 \pm 0.42	0.07 \pm 0.00	1.23 \pm 0.41	0.07 \pm 0.01

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

T-SH : Total-Sulfhydryl

NP-SH : Nonprotein-Sulfhydryl

고 찰

만성폐쇄성 폐질환의 폐손상 병리기전은 여러 가지가 알려져 있으나 아직 확실히 정립되지는 않은 상태로 산소유리기의 증가가 폐손상의 원인에 중요한 원인임을 알게되어 이들 산소 유리기와 만성폐쇄성 폐질환 발생과의 연관성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 폐의 산소로 인한 독성에 큰 영향을 미치는 superoxide radical은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, dihydro-orotate dehydrogenase, flavoprotein dehydrogenase의 효소 촉매 반응과 quinone, catecholamine의 자가산화, 6-hydroxydopamine의 산화 등의 생물학적 반응으로 생성된다고 보고 되었으며^{12,13)} 생물체내에서 thiol group 및 tryptophan 잔기와 반응하여 치명적인 작용을 하는 것으로 알려졌다. Lavelle등은 환원형 flavin의 광선에 의한 산화 및 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide가 박테리아를 죽인다고 하였

고¹⁴⁾, Petrone등은 중성백혈구에 의해 발생하는 superoxide가 세포밖에 존재하는 진구물질에 작용하여 chemotactic factor를 생성한다고 하였다¹⁵⁾. 또 Kono등은 superoxide가 catalase의 촉매작용을 억제한다고 하였다¹⁶⁾. 조직이 산소대사물에 의해 공격을 받을 때 중성구가 폐조직에 나타나 활성화되어 손상받은 상피세포를 포함하여 많은 물질들을 식작용한다. 이때 산소유리기가 분비되는데, 중성구의 이러한 능력이 한계에 달할 때 세포밖으로 반응성 산소유리기의 배출이 증가될 것이고 궁극적으로는 오히려 세포손상을 촉진하는 방향으로 작용한다는 보고가 있다¹⁷⁾. 또한 적혈구의 포도당 대사장에서 NADPH생성 감소와 NAD생성 증가를 초래하는데 이는 산소유리기 생성을 촉진하고, 산소유리기는 주로 적혈구 세포막의 불포화지방산을 산화시켜 MDA(malonyldialdehyde)를 생성하며 지질의 과산화는 적혈구 용혈증가, 적혈구변형장애, 혈소판기능장애, 막이온 운반장애를 초래한다고 한다^{18,19)}. 본실험에서는 TBA reactant(malonyldialdehyde)가 만성폐쇄성 폐질환 환자군의 혈청과 적혈구에서 정상대조군보다 모두 증가되었는데 이는 산소유리기 생성증가로 인한 세포 손상의 결과로 해석된다.

이들 산소유리기에 의한 조직손상을 막기 위해 여러 방어기전들이 존재하고 있다. 그 중 항산화효소는 제거효소(scavenger enzyme)로서 유리기로부터의 조직손상을 보호하고 방사선 조사나 고농도 산소하에서 현저히 증가된다. 1969년 McCord와 Fridovich가 산소유리기를 특이적으로 제거해주는 효소, 즉 superoxide dismutase(SOD)을 발견하였다²⁰⁾. 항산화효소로는 superoxide dismutase외에도 catalase, glutathione peroxidase등이 알려져 있다.

Superoxide dismutase는 소의 적혈구와 간에서 구리를 함유하는 단백질로 처음 발견되었으며, Stansell, Carrico등이 이들 3종의 단백질이 이화학

적 성상과 면역학적으로 동일한 단백질을 밝혔다^{21,22)}. 이들 SOD는 생물체에서 산소대사시 superoxide radical이 증가될 때 $2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ 의 반응에 의해 반응성이 약한 과산화수소로 전환시킨다^{23,24)}. 이들 dismutation은 자발적 반응에 의한 속도($2 \times 10^5/M/sec$)보다 SOD효소반응에 의한 속도가 104배 빠르게 큰 영향을 미친다는 보고가 있으며²⁵⁾, superoxide radical의 빠른 dismutation과 비교적 낮은 재활성 때문에 superoxide radical이 산소독성이 있어 즉각적인 효과를 나타내는 것이 아닐 수도 있다는 보고가 있었다²⁶⁾. 동물 실험에서 paraquat로 인해 산소유리기에 의한 독성 발생시 superoxide dismutase의 활성도가 증가한다는 보고가 있으나²⁷⁾ 본 실험에서는 superoxide dismutase활성도는 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군에서 유의한 차이를 보여주지 않았다.

Catalase는 $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ 의 반응을 촉매하여 hydrogen peroxide을 제거하고, glutathione peroxidase도 hydrogen peroxide을 제거하는 기능을 갖고 있다. 본 실험에서 glutathione peroxidase와 catalase 활성도는 만성폐쇄성 폐질환 환자군에서 정상대조군보다 유의하게 감소되어 이들 효소활성도의 감소가 항산화능력의 저하를 초래하여 산소유리기에 의한 폐 손상을 유발하는 것으로 생각된다. 즉, 이들 항산화효소들의 방어기전은 정상적인 산소농도 하에서 세포의 superoxide radical과 과산화수소를 독성 수준 이하로 유지시키고 폐세포내 유기체들로 부터의 급격한 산소유리기와 그외의 대사산물들의 생성으로 인한 폐 손상을 막는데 중요한 역할을 한다고 하겠다.

Glutathione의 sulfhydryl기는 glutathione-s-transferase와 같은 효소군에 대한 기질로 작용하여 황(sulfur)을 매우 다양한 수용체에 포함(conjugation)시키는 역할을 하는데 이런 포함은 보통 해독작용을 하는 것으로 여겨지며 이 sulfhydryl기가 산

소유리기에 의한 산화적 손상으로부터 각종 세포 구조물을 보호한다고 한다. 본 실험에서는 총 sulfhydryl기와 비단백 sulfhydryl기 모두에서 만성 폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

현재까지 알려진 바에 따르면 폐세포는 산소유리기에 의한 손상을 막기 위해 세가지 방어기전을 갖고 있는데, 첫째는 지나친 산소유리기 생성을 방지하도록 세포가 작용하는 것으로 산소대사와 정중 univalent reduction을 피하는 것이고, 둘째는 여러가지 효소나 물질들에 의해 이미 생성된 유리기를 반응성 약한 물질로 변환시키거나 제거시키는 것, 셋째는 손상받은 세포부위를 신속하게 복구하는 것이다. 정상적으로 폐는 산소가 풍부한 장기로 세포의 대사과정중에 생기는 반응성 산소 대사물과 이를 제거하기 위한 세포내외의 항산화 효소가 서로 균형을 유지하고 있으며, 세포는 항상 산소유리기 형성을 제한하고 다양한 항산화효소계에 의해 세포내외의 산소유리기 증가에 대체하게 된다. 따라서 산소유리기가 증가되거나 항산화체계의 작용이 위축될 때 폐세포의 손상과 파괴가 일어나며 폐질환을 유발시킨다고 한다. 또한 만성폐쇄성 폐질환에서의 폐손상은 생성되는 산소유리기가 폐의 항산화 능력을 초과하기 때문이 아닌가 추측된다. 그리고 흡연시 하부기도에 중성구수가 증가되어²⁸⁾ 산소유리기 생성이 더욱 많아지고²⁹⁾, 따라서 항산화효소의 고갈을 초래할 수 있다고 한다³⁰⁾. 본 실험에서도 만성폐쇄성 폐질환 환자군에서 모두 흡연자였던 관계로, 흡연 자체로 인한 산소유리기 생성도 배제할 수 없으나 대조군과의 비교가 안되어 추후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

이와같은 직접작용 이외에 oxidants는 alpha-1-antiprotease의 methionine을 methionine sulfoxide로 산화시켜 불활성화 시킨다. 따라서 중성구 elastase에

의한 폐조직 파괴에 방어를 할수 없게 되며, 이와 같은 현상이 폐기종의 병태생리에 중요한 역할을 한다는 보고도 있다³¹⁾. 현재 산소유리기에 대한 방어기전을 증가시킬 수 있는 방법이 연구되고 있는데 첫째는 항산화효소를 증가시키는 것인데 실제로 SOD나 catalase를 외부에서 투여했을 때 이들 효소의 분자량이 커서 세포내로의 이동이 어렵고 특히 catalase는 정상세포막을 통과할 수 없으며, SOD도 거의 통과하지 못하여 이의 효과에 대해서는 이론이 많다. 이런 문제를 해결하기 위해 liposome효소를 캡슐화시켜 세포로 하여금 endocytosis 하게 한 결과 SOD나 catalase의 세포내 농도가 증가되고, 효소의 반감기도 증가되었다는 보고도 있다^{32,33)}. 그리고 corticosteroids는 세포로부터 SOD와 glutathione peroxidase등 항산화효소의 유리를 촉진시켜 산소 독성에 대한 내성발현을 증가시킨다는 보고도 있다³⁴⁾. 둘째는 산소유리기가 생성되는 것에서 철을 이용할 수 없도록 chelation시키는 방법이 시도되고 있기도 하다.

본 실험에서 나타난 결과로 만성폐쇄성 폐질환의 병인을 단순한 산소유리기 생성 변화와 항산화효소의 변화만으로 척도를 삼기에는 무리가 있을 것으로 보인다. 추후 이러한 산소유리기의 변화가 폐 세포에 미치는 영향을 더 연구하여 만성폐쇄성 폐질환의 발병 기전을 더 확실히 밝혀야 할 것이며 또한, 이들 유리기에 의한 폐 손상을 막기 위해 항산화계통을 증진시키기 위한 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

연구배경 : 호기성 생물에서 산소의 대사과정중에 산소의 불안정한 환원으로 산소유리기가 생성되는데 이들 산소유리기의 현저한 증가시 폐손상 등 임상적으로 중요한 독성을 일으킬 수 있다고 5

알려져 있어 증가된 산화물이 여러 형태로 만성폐쇄성 폐질환의 발생에 관여 할 것으로 생각된다. 산소유리기의 폐손상과 이에 대한 항산화효소의 방어효과 및 활성도 변화를 관찰함으로써 만성폐쇄성 폐질환의 병태생리의 일부분을 알 수 있겠다.

방법 : 만성폐쇄성 폐질환 환자군과 정상대조군 각 15명의 혈청과 적혈구에서 thiobarbituric acid reactant변화와 항산화효소들(superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase)의 활성도, 그리고 glutathione의 sulfhydryl기를 측정하여 비교하였다.

결과 : Thiobarbituric acid reactant는 만성폐쇄성 폐질환 환자군에서 정상대조군보다 혈청과 적혈구에서 모두 유의한 증가를 보였고, superoxide dismutase활성도는 두 군사이에 유의한 차이가 없었으나, glutathione peroxidase와 catalase활성도는 만성폐쇄성 폐질환군에서 정상대조군보다 유의하게 감소되었다. 그리고 총 sulfhydryl기와 비단백 sulfhydryl기 모두 혈청과 적혈구에서 유의한 차이가 없었다.

결론 : 만성폐쇄성 폐질환 환자에서 thiobarbituric acid reactant의 증가를 보인 것은 산소유리기에 의한 세포손상을 나타내며, 항산화효소들중 superoxide dismutase는 큰 차이가 없었으나 glutathione peroxidase, catalase등은 대조군에 비해 유의하게 감소하여 만성폐쇄성 폐질환 환자에서 glutathione peroxidase와 catalase감소가 세포손상 기전의 한부분으로 작용한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Freeman BA, Topolosky MK, Crapos Jd. : Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. Arch Biochem Biophys **216** : 477, 1982
- 2) Freeman BA, Crapos JD : Biology of disease,

free radicals and tissue injury. Lab Invest **47** : 412, 1982

- 3) Borrello S, Seccia A, Galleotti T, Bartoli GM, Farallo E, Serri F : Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. Arch Dermatol Res **276** : 338, 1984
- 4) 서승천, 허성호, 김종숙 : 고농도 산소로 인한 폐 산소독성에 대한 Superoxide dismutase 및 Catalase의 영향에 관한 연구. 중양의대지 **12** : 259, 1987
- 5) American college of chest physicians-American Tharocic Society joint committee on pulmonary nomenclature : Pulmonary terms and Symbols. Chest **67** : 5, 1975
- 6) Buege JA, Aust SD : Microsomal lipid peroxidation, In Felischer S, Packer L (Ed.) Methods in enzymology, p302, New York, Academic Press, 1978
- 7) Crapo CH, McCord JM, Fridovich I : Preparation and assay of superoxide dismutase. In Felischer S, Packer L (Ed.) Methods in enzymology, p382, New York, Academic Press, 1978
- 8) Flohe L, Wolfngng A, Gunzler WA : Assay of glutathione peroxidase. In Felischer S, Packer L (Ed.) Methods in enzymology, p114, New York, Academic Press, 1984
- 9) Abei H : Catalase, In Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M (Ed.) Methods of Enzymatic analysis, p.273, New York, Verlag Chemie Academic Press, 1983
- 10) Habeeb AF: Reaction with protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent, In Hirs CH, Timasheff SN (Ed.) Methods in enzymology, p.457, New York, Academic Press, 1972

- 11) Salvati AM, Tentori L : Determination of aberrant hemoglobin derivatives in human blood, In Antonini E, Bernardi LR, Chiancone E (Ed.) *Methods in enzymology*, p.715, New York, Academic Press, 1981
- 12) Ross D, Cotgreave I, Moldeus D : The interaction of reduce glutathione with active oxygen species generated by xanthine oxidase-catalyzed metabolism of xanthine. *Biochemica Biophysica Acta* **841** : 278, 1985
- 13) Mittag TW, Hammond BR, Eakins KE, Bhattacharjee P : Ocular responses to superoxide generated by intraocular injection of xanthine oxidase. *Exp Eye Res* **40** : 411, 1985
- 14) Lavelle F, Michelosn AM, Dimitrijevic L : Biological Protection by superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun* **55** : 350, 1973
- 15) Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM : Free radicals and inflammation : Superoxide dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci* **77** : 1159, 1980
- 16) Kono Y, Frdovich I : Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* **257** : 5751, 1982
- 17) Tate RM, Repine JE : Neutrophils and adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **28** : 552, 1983
- 18) Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R : Effects of alpha-tocopherol administration on red blood cell membrane lipid peroxidation in hemodialysis patients. *Clin nephrol* **21** : 174, 1984
- 19) Kuroda M, Asaka S, Tofuku Y, Takeda R : Serum antioxidants activity in uremic patients. *Nephron* **41** : 293, 1985
- 20) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol chem* **224** : 6049, 1969
- 21) Stansell MJ, Deutsch HF : Immunochemical studies of human erythrocyte proteins, erythrocyte and catalase. *J Biol chem* **241** : 2509, 1966
- 22) Carrico FJ, Deutsch HF : The presence of zinc in human cytochrome c and some properties of the apoprotein. *J Biol Chem* **245** : 723, 1970
- 23) Michelson AM, Buckingham ME : Effects of superoxide radicals on myoblast growth and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **58** : 1079, 1974
- 24) Misra HP, Fridovich I : Superoxide dismutase and the oxygen enhancement of radiation. *Arch Biochem biophys* **176** : 577, 1976
- 25) Fridovich I. : Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* **44** : 147, 1975
- 26) Sawyer DT, Valentine JS : How super is superoxide ?. *Acc Chem Res* **14** : 393, 1981
- 27) 송현곤, 유옥희, 이근배, 오현관 : paraquat 투여로 손상된 백서폐에서의 superoxide dismutase 활성도에 관한 연구. *대한내과학회잡지* **27** : 447, 1984
- 28) Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG : Inflammatory and immune process in the human lung in health and disease, evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* **97** : 149, 1979
- 29) Hoidal JR, Fox RB, Le Marbe PH, Perri R, Repine JE : Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smoker. *Am Rev Respir Dis* **123** : 85, 1981

- 30) Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M : Lung protection by a thiol containing antioxidant. *Respir* 50 : 31, 1986
- 31) Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST: Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* **227** : 747, 1985
- 32) Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA : Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* **78** : 87, 1984
- 33) Freeman BA, Young SL, Crapo JD : Liposome Mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258 : 12534, 1983
- 34) Heffner JE, Repine JE : Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir dis* **140** : 531, 1989
-