

□ 원 저 □

내독소에 의한 혈관 내피세포 손상에서 혈관 내피세포로부터 유리된 산소기의 역할에 관한 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

최형석¹ · 정기호² · 유철규 · 김영환 · 한성구 · 심영수 · 김건열³ · 한용철⁴

한림대학교 의과대학 내과학교실

정 기 석

= Abstract =

The Role of Oxygen Free Radicals from Endothelial Cells in Endotoxin-induced Endothelial Cell Cytotoxicity

Hyung-Seok Choi, M.D.,¹ Ki Ho Jeong, M.D.,² Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Keun Youl Kim, M.D.³ and Yong Chol Han, M.D.⁴

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute, Seoul National University
College of Medicine, Seoul, Korea

Ki Suck Jung, M.D.

Department of Internal Medicine, Hanlim University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The pathogenetic mechanism of adult respiratory distress syndrome(ARDS) is not clearly defined yet, but it is well known that increased pulmonary capillary permeability is characteristic feature of ARDS. The increased alveolar-capillary permeability is usually preceded by damage of pulmonary artery endothelial cells. The released enzymes and oxygen free radicals from the activated neutrophils seem to play a predominant role in endothelial cell cytotoxicity. The activated neutrophils, however, probably are not the sole contributing factor in this type of damage because many cases of ARDS have been reported in severe neutropenia. Bacterial endotoxin per se and/or oxygen free radicals released from endothelial cells are suggested to be possible factors that contribute to the development of ARDS. The purpose of this study is to investigate the direct cytotoxicity of endotoxin and the role of oxygen free radicals released from the endothelial cells

본 연구는 1992년도 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어 졌음.

1 현재 지방공사 강남병원 내과 근무

2 현재 인천 중앙길병원 내과 근무

3 현재 단국대학교 의과대학 내과학교실 근무

4 현재 삼성의료원 내과 근무

in endotoxin-induced endothelial cell cytotoxicity.

Methods: First, to investigate whether endotoxin is cytotoxic to HUVE by itself, various doses of endotoxin were added to culture medium and cytotoxicity was measured. Second, to evaluate the possible role of oxygen free radical in endotoxin-induced HUVE cytotoxicity, various antioxidants were added on the endotoxin-induced HUVE cytotoxicity and cytotoxicity was measured. Third, to verify the release of oxygen free radicals from HUVE, the concentrations of hydrogen peroxide in the endotoxin-treated culture supernatant were measured. Finally, to observe the cytotoxic effect of hydrogen peroxide, HUVE cytotoxicity in the presence of various doses of hydrogen peroxide was measured. The fourth generations of subcultured HUVE from primary culture were used. The cell cytotoxicity was quantified by the chromium-51 release assay.

Results:

- 1) Endotoxin alone showed HUVE cytotoxicity in a dose-dependent fashion.
- 2) Endotoxin-induced HUVE cytotoxicity was significantly attenuated by the pretreatment of catalase and DMTU.
- 3) Hydrogen peroxide was released from HUVE after endotoxin treatment in a dose-dependent fashion.
- 4) Exogenous hydrogen peroxide also showed HUVE cytotoxicity in a dose-dependent fashion.

Conclusion: These results suggest that endotoxin alone can directly injure HUVE, and, oxygen-free radicals released from HUVE in response to endotoxin may also participate in the endotoxin-induced HUVE cytotoxicity.

Key Words: Endothelial Cell, Endotoxin, Hydrogen peroxide, Catalase

서 론

성인성 호흡곤란증후군은 폐부종으로 인해 동맥혈의 심한 저산소혈과 호흡부전이 초래되는 급성 폐손상으로 심장원인성 폐부종과는 달리 폐포-모세혈관 투과성 증가에 의한¹⁾. 성인성 호흡곤란증후군을 유발시키는 원인으로서는 미만성 폐감염, 흡인, 독성물질이나 자극제에 노출, 여러가지 약물, 면역학적 질환, 폐 이외의 전신적 감염 등을 들 수 있는데, 기계적 환기 등 고식적 치료의 발전에도 불구하고 아직도 사망률이 높은 이유는, 이 질환의 정확한 발병기전이 규명되어 있지 않아 특이적 치료법이 개발되지 못한 때문이다²⁾.

내독소를 실험동물에 투여하면 폐부종과 호흡부전이 관찰되어 성인성 호흡곤란증후군의 실험모델로 널리 사용되고 있다^{3,4)}. 실험동물에 내독소를 투여하면 폐혈관 내피세포의 손상, 탈락과 증식 등이 관찰되고, 이런 내

피세포의 손상은 폐포-모세혈관 투과성 증가 이전에 관찰되어 폐포-모세혈관 투과성 증가가 내피세포 손상에 기인함을 시사하고 있다⁵⁻⁷⁾. 임상적으로도 심한 육체적 손상을 입은 환자의 폐를 시간경과에 따라 관찰해 보면 호중구가 폐혈관 내피세포에 부착된 후 내피세포의 손상이 생기고 폐간질에 부종이 형성되며 궁극적으로는 폐포부종의 단계를 거치는데, 이런 현상도 성인성호흡곤란증후군에서 폐포-모세혈관 투과성 증가는 폐혈관 내피세포의 손상에 기인함을 뒷받침해주는 소견이다¹⁾. 따라서 폐포-모세혈관 투과성 증가의 기전을 이해하기 위해서는 폐혈관 내피세포 손상의 기전을 규명하는 것이 급선무라 하겠다.

성인성 호흡곤란증후군의 발병기전에서 호중구가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 이는 급성 폐손상으로 사망한 환자의 부검시 폐혈관과 폐조직에서 많은 호중구의 침윤이 관찰되고 성인성호흡곤란증후군 환자의 기관지폐포세척액에서도 호중구와 호중구의 과

립내에 존재하는 엘라스타제(elastase)가 급성 폐손상의 초기에 증가되는 사실로 뒷받침되고 있다^{8,9)}. 성인성 호흡곤란증후군은 활성화된 보체에 의해 폐포로 이동된 호중구의 작용을 통해 폐혈관 내피세포의 손상이 생기고, 이로 인해 폐부종이 발생하는 것으로 이해되고 있다. 이러한 가설이 성인성 호흡곤란증후군의 유일한 기전이라고 할 수는 없지만 동물모델에 의해 확인되고 있다^{10,11)}.

그러나 호중구가 어떤 기전을 통해 혈관 내피세포에 손상을 가져오는지는 아직 확실하게 규명되어 있지 못한 실정이다. 외부자극에 의해 활성화된 호중구는 여러 종류의 염증매개성 물질을 분비하는데, 최근에 호중구로부터 유리된 산소기의 역할에 관해 많은 관심이 모아지고 있다. Sacks 등은 C5a에 의해 자극된 호중구가 사람 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVE)에 세포독성을 보이고 이는 항산화 효소인 superoxide dismutase(이하 SOD이라 함)와 catalase에 의해 완화되어 활성화된 호중구에서 생성된 산소기에 의해 폐혈관 내피세포의 손상이 초래될 가능성을 제시하였다¹²⁾. 최근에는 호중구와 함께 호산구에서 생성된 과산화수소(hydrogen peroxide)에서 생성된 hypohalous acid 등과 같은 다른 산소기도 내피세포에 세포독성을 보이는 것이 알려졌다. 내피세포는 정상적으로 산소기의 작용을 중화시키는 세포내 항산화효소를 함유하고 있는데, 환원상태의 glutathione을 제거한 내피세포와 hydroxyl radical형성에 중요한 촉매제로 작용하는 철분이 많은 내피세포는 호중구에서 분비되는 산소기에 의해 쉽게 손상을 받고^{13,14)}, 또한 내피세포를 항산화제나 철분제거제로 처리한 경우에는 호중구에 의한 손상이 완화된다는^{15,16)}, 이는 모두 내피세포의 손상에 산소기가 관여함을 뒷받침해 주는 소견이다¹⁷⁻¹⁹⁾. 반면에 호중구를 고갈시키고 시행한 실험의 결과가 사용한 실험동물의 종류에 따라 차이를 보이고 있어, 호중구에서 유리된 산소기가 내피세포 손상의 유일한 기전이라고 하기는 곤란하다. 또한 호중구의 침윤이나 보체 활성화만으로는 패혈증시 관찰되는 심한 내피세포의 손상이 관찰되지 않고 임상적으로도 심한 호중구 감소증이 있는 환자에서 발생한 성인성 호흡곤란증후군이 보고되어 있어²⁰⁻²²⁾, 내독소에 의한 혈관 내피세포의 손상에는 호중구를 통하지 않는 다른 기전이 존재할 것으로 생각된다.

다. 호중구없이 혈관내피세포를 고농도의 산소나, paraquat에 노출시키면 혈관 내피 세포의 손상이 관찰되고 이는 산소기 제거제에 의해 완화된다는^{23,24)}, 이는 혈관 내피세포에서도 외부자극에 의해 산소기의 분비가 가능하다는 것을 시사하는 소견이다. 따라서 호중구를 통하지 않는 혈관 내피세포의 손상기전에는 내독소의 직접 독성과 내독소에 혈관 내피세포에서 분비된 염증매개성 물질이 관여할 가능성이 있다. 그러나 현재까지는 호중구나 보체없이 내독소 단독으로 혈관 내피세포의 손상이 생기는지, 내독소에 의해 혈관 내피세포에서 산소기가 분비되는지, 분비된다면 이것이 세포독성에 관여하는지 등은 확실하게 규명되어 있지 못한 실정이다.

본 연구의 목적은 호중구나 활성화된 보체의 도움없이 내독소만에 의해 혈관 내피세포의 손상이 발생하는지의 여부와 내독소에 의해 혈관 내피세포에서 산소기가 유리되는지를 관찰하고, 이것이 혈관 내피세포의 손상에 관여하는지를 규명하는데 있다.

대상 및 방법

1. 혈관내피세포의 배양

분만직후의 탯줄을 얻어 소독된 용기에 넣은 후 냉장고의 냉장실에 보관하여 24시간 이내에 실험에 사용하였다²⁵⁾. 탯줄을 DPBS로 여러번 깨끗이 세척한 후 주사기로 제대정맥내에도 DPBS를 주입하여 혈액성분을 깨끗이 씻어 내었다. 제대동맥도 압축시에는 내부에 존재하던 혈액이 나와 혈관 내피세포와 섞이게 되므로 가능한한 압축시켜서 밖으로 흘러나오게 하고 깨끗이 씻어 내었다. 탯줄의 한쪽 끝을 묶고 0.05% collagenase를 제대정맥내로 주입한 후 나머지 반대쪽 끝도 collagenase가 새어나오지 못하도록 묶었다. collagenase를 넣고 양쪽 끝을 묶은 탯줄을 뚜껑이 있는 깨끗한 용기에 담아서 CO₂ incubator에 10분 정도 방치한 후 꺼내어 손으로 여러번 주무른 다음 한쪽 끝을 풀어 안의 내용물을 50ml Falcon tube에 서서히 따르고, 이때 손으로 탯줄을 압축하여 내용물이 나오게 하면 혈관내피세포외의 다른 세포의 오염이 생길 수 있으므로 피하였다. 얻어진 용액에 Medium 199를 10~20ml 첨가하여 1000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 Medium 199를 넣고 원심분리하는 세척과정을 두세번 반복하였

다. 원심분리후 얻어진 침전물을 미리 준비한 세포 배양 배지가 들어있는 배양 용기에 담아 CO₂ incubator에서 배양하였다. 매일 편광현미경으로 성장을 관찰하며 2~3일에 한번씩 배지를 교환해 주었다. 혈관 내피세포는 배양용기바닥에 부착되어 단층으로 자라기 때문에 상층의 배지를 피펫으로 조심스럽게 흡입하여 제거한 후 새로운 배지를 공급하였다. 배지는 Medium 199에 HEPES 완충용액, 항생제, fetal calf serum을 혼합하여 사용하였다. 세포들이 단층으로 배양 용기 바닥을 모두 덮게 되면 다른 용기로 세포를 옮겨 주었다. 즉, 먼저 배지 상층의 배양액을 따라버리고 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺이 들어있지 않은 DPBS를 첨가한 후 CO₂ incubator에서 약 10분간 방치하였다. 상층액을 버리고 0.05% Trypsin, 0.53% EDTA를 넣고 CO₂ incubator에 넣은 후 30초 혹은 1분마다 꺼내어 편광현미경으로 관찰하여 배양용기 바닥에 부착되어 있던, 세포의 약 60%가 상층액으로 떨어져 나오면 상층액만을 50ml Falcon tube로 옮겼다. 이 상층액에 적당량의 배양액을 넣은후 1000rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액은 버린후 다시 배양액을 넣어 원심분리하는 세척과정을 2~3회 반복하여 trypsin, EDTA를 제거하고 배양액이 담긴 새 배양용기로 옮겨 CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. ⁵¹Chromium 부착

상기 과정을 통하여 얻어진 세포는 일정 숫자를 세어 24 well 배양용기의 각 well에 넣은 후 같은 방법으로 배양하는데, 배양후 각 well 내에서 단층을 이룬 세포의 수는 약 2.0×10⁵개가 되도록 하였다. 본 실험에서는 제 4세대의 배양세포를 사용하였다. 실험 24시간전에 ⁵¹chromium 10 μCi를 각 well에 넣어 24시간동안 CO₂ incubator에서 배양하였다.

3. 내독소에 의한 혈관내피세포 손상의 측정

내독소투여군에는 E.coli 055B5 내독소(Sigma Chemical, U.S.A.)를 최종 농도가 0.01, 0.1, 1.0, 10 μg/ml이 되도록 각 well에 첨가하였고 전처치군에는 SOD, catalase, dimethylthiourea(DMTU)를 최종 농도가 각각 20 μg/ml, 1100 unit/ml, 0.01 M/L가 되도록 한 후 내독소를 10 μg/ml의 농도로 첨가하였다. 세포손상의 정도는 내독소를 투여하고 24시간이 경과한 후, 다음의 방법으

로 정량화하였다. 즉, 실험전 일정량의 ⁵¹chromium을 혈관 내피세포에 부착시킨 후 여러 조건하에서 세포손상을 유발시킨 다음, 상층액과 배양 용기의 바닥에 남아 있는 세포를 DPBS로 수회 씻은 용액의 방사능을 gamma counter로 측정하여 다음 식으로 세포 손상정도를 정량화하여 세포독성지표로 하였다²⁶⁾.

$$\frac{\text{세포손상 후 상층액의 } ^{51}\text{Cr}(\mu\text{Ci}) - \text{대조군 상층액의 } ^{51}\text{Cr}(\mu\text{Ci})}{\text{실험전 세포에 부착된 } ^{51}\text{Cr}(\mu\text{Ci}) - \text{대조군 상층액의 } ^{51}\text{Cr}(\mu\text{Ci})} \times 100(\%)$$

4. 혈관 내피세포에서 유리된 과산화수소의 측정

⁵¹Cr을 붙이지 않은 혈관 내피세포 배양액에 내독소를 최종 농도가 0.01, 0.1, 1.0, 10 μg/ml이 되도록 각 well에 첨가하였다. 각 군은 3 well씩 시행하고 내독소를 투여하고 24시간이 경과한 후 각각의 상층액으로부터 과산화수소의 농도를 측정하였다. 과산화수소의 측정은 phenolsulfonphthalein(phenol red)이 horseradish peroxidase(HRPO)에 의해 과산화수소의 농도에 따라 의존적으로 변환되어 원래의 phenol red의 빨간색이 노란색으로 변색되어 다른 흡광도를 보이는 원리를 이용하여 측정하였다²⁷⁾. 즉, 140mM NaCl, 10mM potassium phosphate buffer, 0.28mM phenol red, 5.5 mM dextrose 및 8.5 U/ml HRPO가 혼합된 phenol red 용액을 세포배양액에 넣고 내독소의 농도를 0.01, 0.1, 1.0, 10 μg/ml로 첨가한후 24시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시키고 이를 4°C, 2000g에서 5분간 원심시킨 후 1 N NaOH 20 μl를 넣어 pH를 12.5로 조절한후 610nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소의 농도는 흡광도와 농도간의 표준곡선을 이용해 결정하였다.

5. 과산화수소에 의한 혈관 내피세포의 손상

과산화수소를 최종농도가 0.1, 1, 10, 100 μM/L가 되도록 투여하고 3시간이 경과한 후 앞의 방법으로 세포독성지표를 측정하였다. 과산화수소의 직접적인 세포독성임을 확인하기 위하여 SOD, catalase, dimethylthiourea(DMTU)를 최종 농도가 각각 20 μg/ml, 1100unit/ml, 0.01 M/L로 전처치한 후 과산화수소를 100 μM/L로 첨가하고 3시간이 경과한 후 같은 방법으로 세포독

성지표를 측정하였다.

6. 통계 처리

각 군간의 유의성 검정에는 비모수검정법인 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W Test를 이용하였다.

결 과

1. 내독소에 의한 혈관 내피세포의 손상.

내독소의 농도를 각각 0.01, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml로 증가시키면서 세포손상정도를 관찰하였을 때, 세포손상지표가 각각 $1.37 \pm 0.23\%$, $12.18 \pm 3.88\%$, $21.85 \pm 5.9\%$, $70.84 \pm 10.55\%$ 로 증가하였다(Fig. 1).

2. 내독소에 의한 혈관 내피세포손상에서 산소기의 역할

내독소 10 μ g/ml 투여시 세포독성지표는 $70.84 \pm 10.55\%$ 였으나, SOD 전처치시 $61.22 \pm 9.34\%$, catalase 전처치시 $34.90 \pm 4.15\%$, DMTU 전처치시 $50.9 \pm 4.64\%$ 로서 catalase와 DMTU 전처치시 내독소투여군에 비해 세포독성지표가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 2).

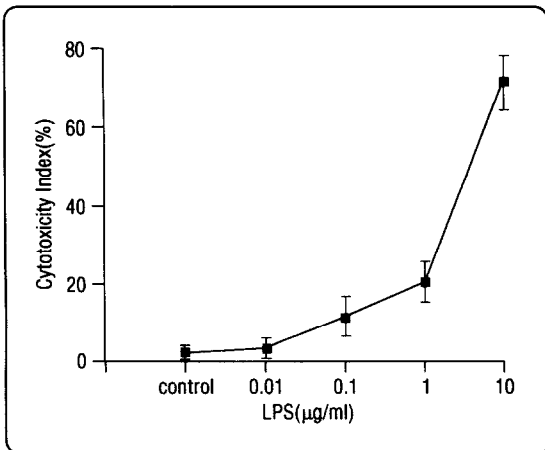


Fig. 1. Cytotoxicity Index with varying concentration of LPS.

3. 내독소에 의한 혈관 내피세포에서의 산소기 유리

배양액내의 과산화수소 농도는 대조군이 34 ± 18 nM/L였고 내독소 투여시 0.01, 0.1, 1.0, 10 μ g/ml에서 각각 79 ± 5 nM/L, 237 ± 158 nM/L, 289 ± 237 nM/L, 789 ± 289 nM/L로서 내독소의 농도가 증가됨에 따라 혈관 내피세포로부터의 과산화수소 분비도 증가하였다(Fig. 3).

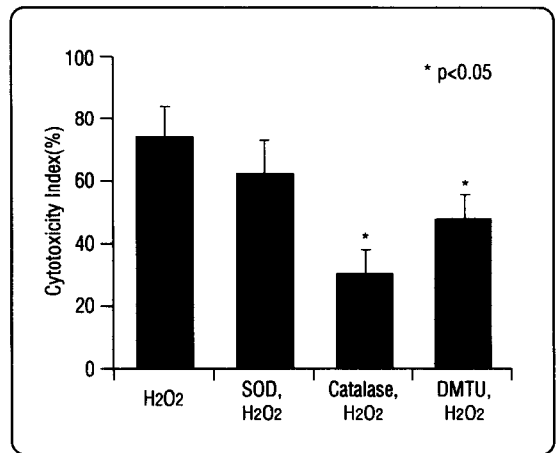


Fig. 2. Inhibition of cytotoxicity by pretreating cells with SOD, Catalase and DMTU in LPS-treated endothelial cells.

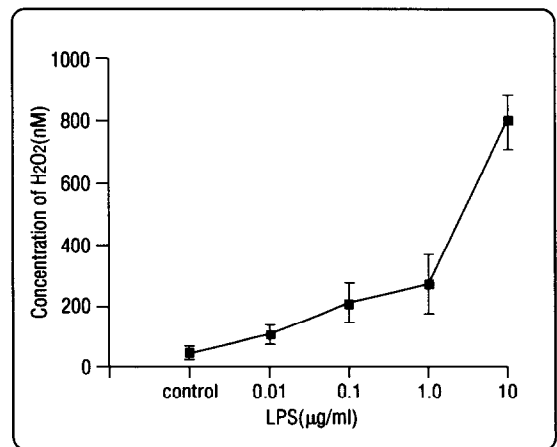


Fig. 3. H₂O₂ release from endothelial cells treated with endotoxin(LPS).

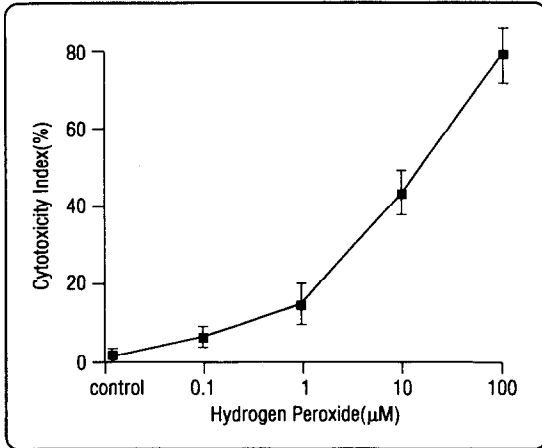


Fig. 4. Cytotoxicity Index according to increased H_2O_2 concentration.

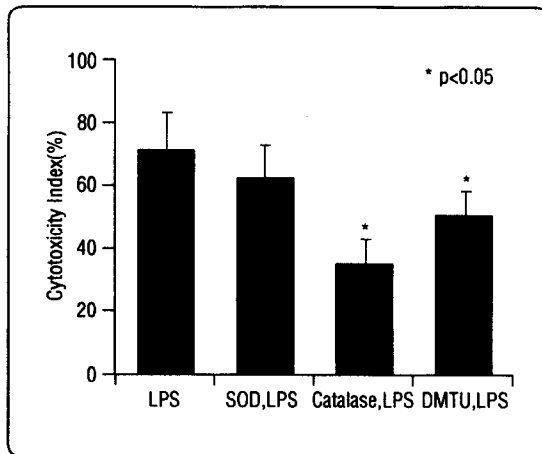


Fig. 5. Inhibition of cytotoxicity by pretreating cells with SOD, Catalase and DMTU in H_2O_2 -treated endothelial cells.

4. 산소기의 혈관 내피 세포에 대한 세포 독성

과산화수소를 최종농도가 0.1, 1.0, 10, 100 $\mu M/L$ 로 투여하였을 때 각각의 세포독성지표는 $6.51 \pm 1.97\%$, $13.19 \pm 4.76\%$, $41.76 \pm 4.49\%$, $75.42 \pm 5.42\%$ 로 농도증가에 따라 세포독성지표도 증가하였다(Fig. 4). 과산화수소 100 $\mu M/L$ 투여에 의한 세포독성지표는 catalase와 DMTU 전치치로 유의하게 완화되었다($p < 0.05$) (Fig. 5).

성인성 호흡곤란증후군은 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 의한 급성 폐부종을 특징으로하는 질환으로서 아직 확실한 발병기전과 특이적 치료법이 제시되어 있지 않은 질환군이다. 폐포-모세혈관 투과성의 증가는 폐혈관 내피세포의 손상에 의한 것으로서 성인성 호흡곤란증후군의 발병기전에서 혈관 내피세포의 손상기전을 이해하는 것은 필수적이다. 혈관 내피세포의 손상을 과거에는 호중구로부터 분비되는 여러 염증매개성 물질에 의한 것으로 단순하게 이해해 왔으나 호중구를 통하지 않는 다른 기전의 존재 가능성을 시사하는 동물 실험 및 임상 소견이 알려져²⁰⁻²²⁾, 현재는 혈관 내피세포의 손상은 여러 종류의 인자가 복합적으로 작용하는 것으로 이해되고 있다. 본 연구에서는 호중구나 활성화된 보체의 도움없이 내독소만에 의해 혈관 내피세포의 손상이 발생하는지의 여부와, 그 기전을 규명하고자 하였다.

본 연구에서는 태아 제대정맥 내피세포를 사용하였는데, 신생아의 탯줄에서 내피세포를 분리할 때 적혈구가 섞이면 내피세포의 배양이 제대로 이루어지지 않는다. 본 연구에서는 탯줄을 충분히 주물러 주어 제대동맥을 포함하여 탯줄내에 존재하는 혈액을 완전히 제거한 후에 사용하여 적혈구가 섞이지 않은 순수한 내피세포만을 분리 배양할 수 있었다.

세포독성지표의 측정은 ^{51}Cr 을 세포내에 부착시킨 다음 내독소나 과산화수소에 의해 손상을 일으킨 후 세포 배양액의 상층액에서의 방사능을 측정하는 ^{51}Cr release 법을 사용했는데, 상층액의 방사능과 세포 손상의 정도는 비례하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 내피세포의 배양 및 증식상태에 따라 ^{51}Cr 의 세포내 부착정도에 차이가 생기면 세포독성지표에 영향을 미칠 수 있는데, 본 연구에서는 내독소 투여군과 과산화수소 투여군에서 부착율이 각각 18.2%, 18.1%로 양군간에 통계학적인 차이가 없이 ^{51}Cr 이 부착되는 과정에서는 내피세포의 배양 및 증식상태가 거의 동일 하였음을 알 수 있었다. 세포손상 정도를 잘 반영하는 또 다른 지표로는 LDH 측정법을 들 수 있는데 이는 세포내에 존재하는 LDH가 세포손상 후 세포밖으로 유리되는 것을 이용하여 세포독성지표를 구

하는 방법이다. 즉, 세포손상 후 상층액의 LDH를 측정하고 배양용기 바닥에 남은 세포도 분리시켜 전체 LDH를 측정한 후 chromium 측정법과 같은 공식에 의해 세포독성지표를 구하는 방법이다. 저자들은 LDH측정법도 동시에 시행하여 ^{51}Cr 을 이용한 방법과 같은 결과를 관찰하였다(data not shown).

과산화수소의 정량적 측정은 과산화수소의 농도가 증가함에 따라 phenol red가 빨간색에서 노란색으로 변색되는 원리를 이용하였다²⁷⁾. 이때 산도를 강알칼리로 맞추지 않으면 산도의 변화만으로도 변색이 되므로 주의가 요한다. 이 방법은 phenol red 자체는 조직배양액에서 독성이 전혀 없다는 장점이 있다.

혈관 내피세포 배양액의 내독소 농도가 증가됨에 따라 혈관 내피세포의 세포독성지표는 점차 증가하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 70%의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 1). 활성화된 호중구와 폐 혈관 내피세포를 반응시키면 40~50%의 세포독성이 관찰되고¹³⁾, 포도당과 포도당 산화효소에 의해 생성된 과산화수소는 60~90%의 혈관 내피세포독성을 보인다²⁶⁾. 이는 내독소에 의한 혈관 내피세포손상에는 호중구를 경유하지 않는 기전이 존재함을 시사하는 소견이다. 즉, 내독소는 호중구가 없는 상태에서도 다른 독성 물질과 같은 정도의 혈관 내피세포손상을 가져오는 것을 알 수 있었다. 내독소 단독 투여에 의한 혈관 내피세포독성의 기전으로는 내독소 자체에 의한 세포독성을 우선 생각할 수 있고 내독소 자극으로 혈관 내피세포에서 분비되는 물질에 의한 세포독성을 고려할 수 있다. 산소기는 그 자체가 강력한 세포독성을 보이고 최근 성인성 호흡곤란증후군의 발병기전에는 활성화된 호중구에서 분비되는 산소기가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 다음 단계로서 내독소에 의한 혈관 내피세포손상에서 산소기의 관련 유무를 규명하고자 SOD, catalase, DMTU 등의 전처치가 내독소에 의한 혈관 내피세포손상에 미치는 영향을 관찰하였다. 내독소에 의한 세포독성지표는 SOD 전처치로는 유의하게 완화되지 않았으나, catalase와 DMTU 전처치로 각각 약 50%, 30%의 세포독성이 완화되었다(Fig. 2). 이 결과는 내독소에 의한 혈관 내피세포의 손상에는 산소기가 일부 역할을 하며 과산화수이온보다는 과산화수소, hydroxyl radical 등이 주로 관

여하는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 항산화제로 전처치시, 세포독성이 일부만 억제되는 것으로 보아 내독소의 직접적인 독성과 산소기와의 다른 물질에 의한 세포독성도 같이 관여할 것으로 생각된다. 본 실험에서는 혈관 내피세포만이 유일한 세포성분이므로 산소기는 내독소 자극으로 혈관 내피세포에서 분비될 것으로 생각할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 내독소처리 후 혈관 내피세포 배양액의 과산화수소 농도를 측정하였다. 내독소의 농도를 증가시킴에 따라 배양액내 과산화수소의 농도가 증가하여 내독소 자극으로 혈관 내피세포에서 산소기가 분비됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 이런 과산화수소 농도의 증가가 내독소에 의한 세포손상으로 세포내의 과산화수소가 단순히 유리되었을 가능성을 생각할 수 있지만 과산화수소는 세포내에 저장되어 있는 물질이 아니기 때문에 그 가능성은 희박할 것으로 판단된다. Catalase 전처치시 내독소에 의한 과산화수소 분비가 완화되어(data not shown) 본 연구에서 관찰된 항산화제에 의한 세포독성의 감소는 혈관 내피세포의 산소기 분비 억제에 의한 것을 알 수 있었다. 본 연구의 다음 단계에서는 혈관 내피세포에서 분비된 과산화수소가 직접 세포독성을 나타내는지를 평가하였다. 즉, 과산화수소의 농도 증가에 따른 내피세포독성을 측정하고 항산화제에 의한 완화 효과를 관찰하여 과산화수소의 직접적인 독성여부를 평가하였다. 과산화수소의 농도 증가에 따라 세포독성지표도 증가하였고 이는 catalase와 DMTU 전처치로 유의하게 완화되었다(Fig. 4, 5). 따라서 과산화수소는 혈관 내피세포에 직접적인 세포독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 내독소 처리시 세포 배양액에서 측정되었던 과산화수소 농도로는 의미있는 세포독성을 관찰할 수 없었는데, 이는 내독소에 의해 세포내에서 생성된 산소기는 대부분 세포내에 존재하며, 독성 작용을 나타내고 일부분만이 세포외로 분비되기 때문인 것으로 생각된다.

내독소에 의한 혈관 내피세포의 손상을 내피세포에서 생성되는 산소기에 의한 것만으로 설명하기는 곤란하기 때문에 항 후 산소기와의 세포독성 물질의 규명에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 폐포-모세혈관 투과성의 증가에 의한 폐부종을 특징으로하는 성인성 호흡곤란증후군(ARDS)의 발병기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 폐포-모세혈관 투과성의 증가는 폐 혈관 내피세포의 손상에 의한 것으로 알려져 있어 폐포-모세혈관 투과성 증가의 기전을 이해하기 위해서는 폐혈관 내피세포 손상의 기전을 규명하는 것이 필요하다. 혈관 내피세포 손상은 주로 활성화된 호중구에서 분비된 염증매개성 물질에 의한다고 생각되고 있다. 그러나 최근 들어 내피세포 손상에서 호중구와 무관한 새로운 기전의 존재를 시사하는 결과들이 알려지고 있다. 본 연구에서는 호중구나 활성화된 보체의 도움없이 내독소만에 의해 혈관 내피세포의 손상이 발생하는지, 내독소에 의해 혈관 내피세포에서 산소기가 유리되는지를 관찰하고, 이것이 혈관 내피세포의 손상에 관여하는지를 규명하고자 하였다.

방법: 내독소가 호중구의 도움없이 혈관 내피세포에 손상을 가져오는지를 관찰하기 위해 내독소 투여후 세포독성지표를 측정하였다. 이때 산소기가 관여하는지를 평가하기 위해 여러 항산화제로 전처리한 후 내독소에 의한 세포독성을 측정하였다. 다음 단계로 내독소에 의한 혈관 내피세포에서의 산소기 분비 유무를 관찰하고자 내독소 처치후 배양액내의 과산화수소 농도를 측정하였다. 마지막으로 과산화수소의 세포독성 유무를 관찰하고자 과산화수소 처치후 세포독성검사를 시행하였다. 모든 실험에서 일차 배양한 HUVE의 제 4세대 제대 배양 세포를 사용하였고 세포독성검사는 ^{51}Cr 유리법을 사용하였다.

결과:

- 1) 내독소 단독 처치시 혈관 내피세포의 손상이 관찰되었는데, 이는 용량-반응관계를 보였다.
- 2) 내독소에 의한 혈관 내피세포의 손상은 catalase와 DMTU에 의하여 각각 유의하게 억제되었다.
- 3) 내독소에 의해 혈관 내피세포로부터 과산화수소가 용량-반응관계를 보이면서 분비되었다.
- 4) 과산화수소는 혈관 내피세포독성을 보이고 이는 catalase와 DMTU 전처치로 완화되었다.

결론: 내독소는 단독으로 혈관 내피세포독성을 보이며 이때 혈관 내피세포에서 분비된 산소기가 세포독성에 관여할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Cochrane CG, Spragg R, Revak SD: Pathogenesis of Adult Respiratory Distress Syndrome. *J Clin Invest* 71:754, 1983
- 2) Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Int Med* 115:457, 1991
- 3) Brigham KL, Bowers RE, Haynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* 45:292, 1979
- 4) Esbensen AM, Newman JH, Lams PM, Jolles H, Brigham KL: Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: Lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol: Respir Environ Exercise Physiol* 53:967, 1982
- 5) Gaynor E: Increased mitotic activity in rabbit endothelium after endotoxin: An autoradiographic study. *Lab Invest* 24:318, 1971
- 6) Meyrick B, Brigham KL: Acute effects of *Escherichia coli* endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep: Structure:Function relationships. *Lab Invest* 48:458, 1983
- 7) Stewart GJ, Anderson MJ: An ultrastructural study of endotoxin induced damage in rabbit mesenteric arteries. *Br J Exp Path* 52:75, 1971
- 8) Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med* 304:192, 1981
- 9) McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, Cochrane CG: Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 69:543, 1982
- 10) Heflin AC, Brigham KL: Prevention by granulo-

- cyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia. *J Clin Invest* **68**:1253, 1981
- 11) Ward PA, Till GO, Kunkel R, Beauchamp C: Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J Clin Invest* **72**: 789, 1983
 - 12) Sacks T, Moldow SF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *J Clin Invest* **61**:1161, 1978
 - 13) Gannon DE, Varani J, Phan SH, Ward JH, Kaplan J, Till GO, Simon RH, Ryan US, Ward PA: Source of iron in neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *Lab Invest* **57**:37, 1987
 - 14) Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR: Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest* **73**: 706, 1984
 - 15) Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA: Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* **263**:6884, 1986
 - 16) Dobrina A, Patriarca P: Neutrophil-endothelial cell interaction. Evidence for and mechanisms of the self-protection of bovine microvascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *J Clin Invest* **78**:462, 1986
 - 17) Jacob HS, Hammerschmidt DE: Complement-induced granulocyte aggregation. *JAMA* **245**:2013, 1981
 - 18) Varini J, Fligiel SEG, Till GO, Kunkel RG, Ryan RS, Ward PA: Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils. Possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest* **53**:656, 1985
 - 19) Weiss SJ, Lobuglio AF: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* **47**:5, 1982
 - 20) Laufe MD, Simon RH, Flint A, Keller JB: Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am Med J* **80**:1022, 1986
 - 21) Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE: Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* **315**:547, 1986
 - 22) Rinaldo JE, Borovetz H: Deterioration of oxygenation and abnormal lung microvascular permeability during resolution of leukopenia in patients with diffuse lung injury. *Am Rev Respir Dis* **131**:579, 1985
 - 23) Freeman BA, Young SL, Crapo JD: Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* **258**:12534, 1983
 - 24) Martin WJ, Gadek JE, Hunninghake GW, Crystal RG: Oxidant injury of lung parenchymal cells. *J Clin Invest* **68**:1277, 1981
 - 25) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**:2745, 1973
 - 26) Weiss SJ, Young J, Lobuglio AF, Slivka A, Nimheh NF: Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest* **68**:714, 1981
 - 27) Pick E, Keisari Y: A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* **38**: 161, 1980