

내독소 투여 직후 가해진 열충격이 백서의 급성폐손상에 미치는 영향

순천향대학교 의과대학 내과학교실*, 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실

나주옥*, 심태선, 임채만, 이상도, 김우성, 김동순, 김원동, 고윤석

= Abstract =

The Effect of Heat Co-treatment on Acute Lung Injury of the Rat Induced by Intratracheal Lipopolysaccharide

Joo Ock Na, M.D.*, Tae Sun Shim, M.D., Chae-Man Lim, M.D.,
Sang Do Lee, M.D., Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D.,
Won Dong Kim, M.D., Younsuck Koh, M.D.

Department of Internal Medicine, Soon Chun Hyang University and
Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine,
Asan Medical Center, Seoul, Korea*

Background : The heat shock protein (HSP) 70 families are known to protect cells against the irreversible tissue injury induced by stress and to induce the recovery of cell function during stress. Heat pretreatment was reported to decrease the acute lung injury (ALI) of rats induced by lipopolysaccharide (LPS). However, the role of heat shock with LPS co-treatment on ALI is unclear. The purpose of this study was to investigate the effect of heat treatment, which was given immediately after the beginning of ALI induced by LPS intratracheally administered in rats.

Methods : Either saline (saline group) or LPS was intratracheally instilled without heat treatment (LPS group). In addition, heat was conducted 18 hours prior to the instillation of LPS (pre-treatment group) and conducted immediately after instillation of LPS (co-treatment group). Six hours after the LPS or saline treatment, blood, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung tissue samples were obtained. The myeloperoxidase

Address for correspondence :

Younsuck Koh, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, 388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-600, Korea

Phone : 02-3010-3134 Fax : 02-3010-6968 E-mail : yskoh@www.amc.seoul.kr

(MPO) activity and the heat shock protein expression in the lung tissue, the differential counts of the polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the BAL fluids, and the LDH, protein, IL-1 β TNF- α and IL-10 levels in BAL fluid and serum were measured.

Results : 1) The MPO activity, the differential PMN counts in the BAL fluid, BAL fluid and serum cytokines were higher in the LPS, the heat pre-treatment and co-treatment group than those of the saline group (p value <0.05). 2) The MPO activity and the protein level in the BAL fluid from the heat co-treatment group were similar to those of the LPS group. 3) The serum TNF- α level of the heat co-treatment group was significantly higher than that of the LPS group (p=0.01).

Conclusion : Heat shock response administered immediately after a LPS instillation did not attenuate the ALI in this model. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 356-366)

Key words : Acute lung injury, Lipopolysaccharide, Heat shock protein.

서 론

그람음성균의 내독소 성분은 그람음성균에 의한 패혈증을 가진 환자에서 다발성 장기 부전을 일으키며¹ TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등의 전구 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 생성을 증가시켜 ARDS의 발병과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다²⁻⁴. 지금까지 패혈증에 의한 ARDS의 발병과정에 관여하는 상기 매개 인자들을 차단하려는 시도들이 있었으나 ARDS의 사망률을 개선시킨 효과적인 치료법은 없었다⁵⁻⁷.

열충격으로 유도되는 열충격단백질(heat shock protein : 이하 HSP)은 스트레스에 의한 비가역적인 손상으로부터 세포 내 중요 요소들을 보호하고, 세포의 정상적인 기능 회복을 유도하는 것으로 알려져 왔다⁸. HSP가 ARDS에 미치는 영향에 대하여는 ARDS 환자들의 폐포 대식세포에서 HSP의 생성이 증가되며⁹ 열전처리로 HSP를 유도한 후 다양한 원인에 의한 급성폐손상 유도 시 급성폐손상을 감소시킨다고 보고 되어져 왔다¹⁰⁻¹². 그러나, 열 전처리에 의한 폐손상 감소기전은 아직 잘 밝혀지지 않았고 특히 열 전처리가 염증성 또는 항염증성 사이토카인들에 미치는 영향에 대하여는 논란이 많다. 고 등¹³은 열전처리

시 급성폐손상이 감소하였고 이는 항염증사이토카인 중의 하나인 IL-10의 혈중 내 생성 증가와 관련이 있을 것으로 추정하였고, Ribeiro 등¹⁴은 패혈증이 발생된 쥐에서 열 전처리 시 혈중 TNF- α 의 농도가 감소함을 보고하였다. 그러나 Sabrina 등¹⁵은 혈중 IL-10과 TNF- α 의 농도가 열 전처리에도 불구하고 내독소를 투여한 쥐에서 변화가 없었음을 보고하여 열충격이 사이토카인의 생성에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 잘 밝혀져 있지 않다.

또한 급성폐손상을 유도하는 원인에 노출된 후 시행된 열충격이 급성폐손상에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. Chu 등¹⁶은 치사 용량의 내독소를 정맥으로 투여한 후 시행된 열처리가 IL-1 β 의 혈중 농도를 감소시키고 백서의 사망률을 줄인다고 보고하였으나, 또 다른 보고에서는 백서에 내독소 투여 후 열처리 시 5시간째 혈중 IL-1 β 가 열처리 하지 않고 내독소만을 투여한 군에 비해 증가한다고 보고하였다¹⁷.

본 연구는 위와 같은 논란들을 검증하기 위하여 내독소 투여 직후 시행한 열충격이 내독소로 유도되는 급성폐손상에 미치는 영향과 열충격이 염증성 및 항염증성 사이토카인 생성에 미치는 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사용 동물과 내독소

몸무게 250-350g인 수컷 species pathogen free Sprague-Dawley rat 총 46마리를 사용하였고, 내독소는 *Escherichia coli* lipopolysaccharide, 055; B5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 사용하였다. 실험동물은 모두 5군으로 나누었다. 대조군(saline group)은 열처치 없이 기관지 내로 생리식염수를 투여하였고, 내독소군(LPS group)은 열처치 없이 내독소만 투여하였다. 열처치 대조군(Saline + Heat group)은 열 자체에 의한 폐 염증 지표들과 사이토카인의 변화를 알아보기 위하여 생리식염수 투여 직후 열처치를 시행하였다. 열 전처치군(Pre-treatment group)은 내독소 투여 18시간 전에 열처치를 시행한 후 내독소를 투여하였고 열 동시처치군(Co-treatment group)은 내독소 투여 직후 열처치를 시행하였다.

2. 실험방법

가) 열 전처치 및 열 동시처치

열 전처치는 기도로 내독소 투여 하기 18시간 전에 쥐의 복강 내로 ketamine(45 mg/kg)과 xylazine (3 mg/kg)를 주입하여 마취시킨 후 미리 덥혀 둔 보육기에 쥐를 넣어 직장으로 측정된 체온이 41℃가 되도록 하였다(temperature probe, Omron Co, Tokyo, Japan). 41℃의 체온에서 13분간 유지한 후 쥐를 보육기에서 꺼내고 회복 사육장(recovery cage)에 넣어 2시간 동안 관찰한 후 완전히 회복되면 내독소 투여 18시간 전까지 활동하도록 하였다. 열 동시처치는 내독소를 기도 내로 투여한 직후에 상기 열처치를 동일하게 시행한 후 다음 처치를 시행하기 전까지 활동하도록 하였다.

나) 내독소 투여

백서를 ketamine(45 mg/kg)과 xylazine(3 mg/

kg)으로 마취시킨 후 기도를 노출시키고 기도천자를 시행하여 내독소(3 mg/kg)를 기도 내로 투여하고 이어서 약물이 폐에 잘 퍼지도록 3 cc의 공기를 주입한 뒤 마취에서 회복되는 것을 확인하였고 다음 실험 때까지 자유롭게 활동하도록 하였다. 대조군은 생리식염수를 내독소와 동량으로 동일한 방법을 이용해 투여하였다.

다) 검체의 획득

내독소를 투여하고 6시간 후에 ketamine(90 mg/kg)과 xylazine(7 mg/kg)을 복강 내 투여하여 마취를 유도한 후 기관절개술을 시행하여 쥐를 인공호흡기(Servo 300, Simens)에 연결하고 개복술을 시행하였다. 혈중 IL-1 β , TNF- α , IL-10, LDH 및 단백질을 측정하기 위해 하대정맥에서 10 ml를 채혈하였고 우심실을 통해 해파린 200 단위를 주입한 후 phosphate-buffered saline으로 폐를 관류시킨 뒤 양측 폐와 심장을 함께 떼어내고 기관지 폐포세척을 시행하였으며 MPO와 HSP의 발현을 알아보기 위해 폐를 적출하였다.

3. 측정 지표들

1) 기관지폐포세척액 내 호중구 백분율

첫번째 기관지폐포세척액은 Ca과 Mg이 제외된 phosphate-buffered saline 6 ml를 넣은 후 3번 반복적으로 되 모으는 방법을 시행하였고 얻어진 세척액을 원심분리(500×g, 5분) 하여 세포를 모으고 그 상층액은 총 단백질과 LDH 활성도 및 사이토카인 농도를 측정하기 위해 -70℃에서 보존하였다. 또한 상기 시술 후 phosphate-buffered saline을 이용하여 두번째 기관지폐포세척을 시행하였으며 8 ml를 기관지에 주입 후 다시 모으는 방법으로 총 80 ml를 더 모아 원심 분리하여 얻어진 세포로 처음 기관지폐포세척 시 얻어진 세포와 함께 hemocytometer를 이용하여 총 백혈수 수를 구하고 cytopsin preparation으로 슬라이드를 만들어 Wright 염색하여 호중구의 백분율을 계산하였다.

2) 폐조직 내 호중구 침윤

폐 조직 내 호중구 침윤 정도는 MPO의 활성도를 측정하여 관찰하였다. 상기 기술한 시술로서 얻은 폐를 적출 후 즉시 -70°C 에서 MPO 측정할 때까지 얼려 두었다. MPO 측정 시에는 검체를 녹인 후 조직분쇄기(tissue homogenizer)로 4 mL의 phosphate buffer pH 7.4와 함께 분쇄시킨 후 4°C 에서 $30,000 \times g$ 로 30분간 원심분리 하였다. 얻은 pellet을 다시 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide를 포함한 phosphate buffer (pH 6)에 잘 섞은 후 90 초 동안 잘게 분쇄하였다. 잘게 부서진 검체는 조직 내 존재하는 MPO inhibitor를 불활성화 시키기 위해 60°C 에서 2시간 동안 보온시킨 뒤 O-dianisidine을 이용한 분광광도법(spectrometry)으로서 460 nm에서 MPO의 활성도를 측정하였다.

3) 총단백량 측정

기관지폐포세척액과 혈청 총 단백질의 농도는 단백질에 의해 알칼리 배지에서 Cu^{2+} 가 Cu^{1+} 로 환원되고 환원된 Cu^{1+} 를 bicinchonic acid protein assay reagent를 사용하여 albumin에 대한 standard curve에 따른 농도값을 colorimetric detection하는 방법을 이용하였다¹⁸.

4) LDH 측정

기관지폐포세척액과 혈청 LDH 활성도는 enzymatic test kit(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)로 lactate에서 pyruvate의 LDH catalyzed conversion에 의해 NAD가 NADH/H^{+} 로 환원되는 것을 이용하여 측정하였다¹⁹.

5) 기관지폐포세척액 및 혈청 내 IL-1 β TNF- α 및 IL-10 농도의 측정

Enzyme linked immunosorbent assay법(이하 ELISA)으로 각각의 측정 kit(R&D systems Inc. U.S.A)를 사용하여 혈중 및 기관지폐포세척액에서

상기 지표들을 측정하였다.

6) 폐조직의 HSP72 발현 정도

백서에 열 전처치나 열 동시처치 후 폐조직의 HSP72의 발현정도를 비교하기 위해 웨스턴분석(Western analysis)을 시행하였다²⁰. 내독소나 생리식염수 투여 6시간 후에 폐를 적출하고 적출한 폐는 액화질소에 얼린 뒤 -70°C 냉동고에 검사를 시행할 때까지 보관하였다. 검체를 녹여서 sodium dodecyl-sulfate-glycerol 완충액과 함께 잘게 분쇄한 뒤 Branford protein assay reagent(Bio-Red, Richmond, California)를 이용하여 단백질 농도를 구하고 sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel의 각 줄마다 $10 \mu\text{g}$ 의 총 단백을 부하시켰다. 단백질은 sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로서 분리시킨 후 nitrocellulose membrane에 옮기고 일차 항체로 HSP72에만 특이적인 mouse anti-HSP 72 monoclonal antibody(StressGen, Victoria, British Columbia, Canada)를 표지 하였다. 그 후 이차 항체인 alkaline phosphatase가 붙은 goat anti-mouse IgG(Serotec, Oxford, England)을 표지한 후 NBT/BCIP(Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)를 기질로 하여 발색시켰다.

4. 통계적 분석

모든 수치는 중앙값(최소값-최대값)으로 표기하였다. 각 실험에 사용된 백서의 수는 팔호 안의 숫자로 표기하였다. 통계 분석은 SPSS/PC+(Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc, Version 10.0, USA)를 이용하였다. 세군 이상의 비교는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 차이를 검정한 후 두군 사이의 비교는 비모수검정법인 Mann-Whitney U 검정을 이용하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성을 인정하였다.

Table 1. The effect of heat pre-treatment and co-treatment on the differential counts of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in BAL fluids and on the levels of protein and LDH in the serum from rats given saline or lipopolysaccharide intratracheally

	Saline	Saline+heat	LPS	Pre-treatment	Co-treatment
Number of rats	7	6	13	7	13
PMN(%) of WBC	4.3(1.2-9.3)	2.5(0.2-20.5)	91.0*(84.7-97.2)	94.4*(88.1-96.4)	91.0*(71.9-98.4)
Serum protein (ug/ml)	60333 (40928-67647)	54758 (31998-82076)	64250 (31375-83095)	48839 (36444-77648)	57495 (35853-80826)
Serum LDH(ug/ml)	17.3(4.6-73.2)	17.8(6.7-34.1)	10.7(5.2-47.7)	16.7(9.4-39.9)	11.5(4.9-45.6)

PMN : polymorphonuclear leukocyte, LPS : lipopolysaccharide, LDH : lactic dehydrogenase. * $p < 0.05$ compared with saline group.

결 과

1. 기관지폐포세척액 내 호중구 백분율 및 폐조직 MPO 활성도

기관지폐포세척액 내의 호중구 백분율 및 폐조직 MPO 활성도는 생리식염수만 투여한 대조군과 열처리 대조군에 비해 내독소군, 열 전처리군 및 열 동시처리군에서 모두 증가하였다($p < 0.001$) (Table 1, Fig. 1). 그러나, 기관지폐포세척액의 호중구 수 및 백분율은 내독소군과 열 전처리군 및 열 동시처리군 사이에서 차이를 보이지 않았다. 폐조직 MPO 활성도는 열 동시처리군(15.5, 15.0-28.0 μ/g ; $n=5$)과 내독소군(17.8, 10.0-28.0 μ/g ; $n=13$) 사이에 차이를 보이지 않았으나(Fig. 1), 열 전처리군(11.0, 9.84-15.77 μ/g ; $n=7$)은 내독소군에 비해 감소하였다($p=0.036$).

2. 혈청 및 기관지폐포세척액 내 단백질 및 LDH의 변화

기관지폐포세척액의 총 단백질량과 LDH는 대조군에 비해 내독소군, 열 전처리군 및 열 동시처리군 모두에서 증가하였으나($p < 0.05$) 혈청 총 단백질량과 LDH는 각 그룹간에 차이를 보이지 않았다. 기관지폐포세척액의 단백질은 내독소군(1752.7, 560.3-2512.1

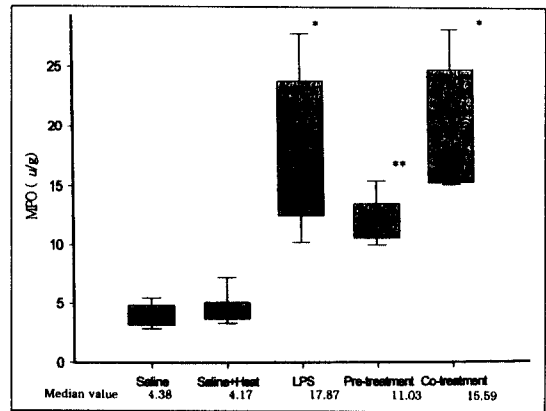


Fig. 1. The effect of heat co-treatment on the activity of myeloperoxidase in rats' lung treated by lipopolysaccharide(LPS, 3mg/kg) intratracheally. Boxplot: Box=25-75 percentile, median value; whiskers indicate 10 or 90 percentile. Six hours after LPS instillation intratracheally, the MPO activity in lung tissue of LPS-administered rats without or with heat treatment was significantly higher compared with that of saline treated rats without any heat treatment. The MPO activity in LPS-treated rats with heat pre-treatment was lower than that of LPS-treated rats without heat treatment. However, the MPO activity in LPS-treated rats with heat co-treatment was not different from that of LPS-treated rats without heat treatment. * $p < 0.05$ compared with saline group and ** $p < 0.005$ compared with LPS group.

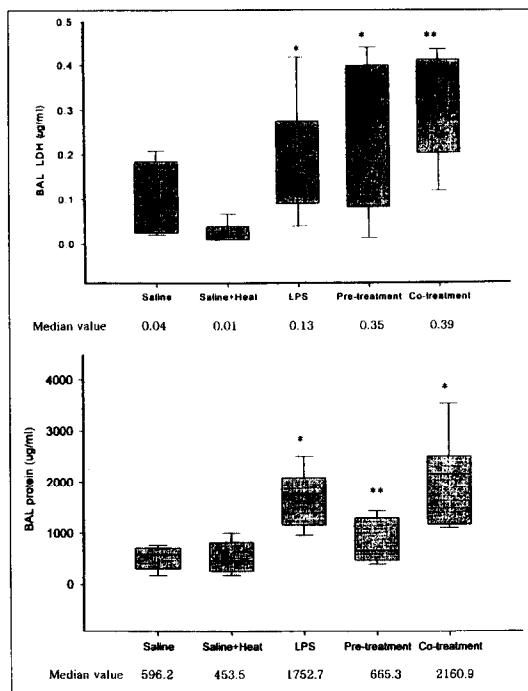


Fig. 2. The effect of heat co-treatment on the level of protein and LDH of BAL fluid in rats treated with lipopolysaccharide(LPS, 3mg/kg) intratracheally. Boxplot: Box=25-75 percentile; bold line, median value; whiskers indicate 10< 05 90> percentile. Six hours after LPS instillation intratracheally, the level of protein and LDH in BAL fluid of LPS-administered rats without or with heat treatment were significantly higher compared with those of saline treated rats without any heat treatment. The protein level of BAL fluid in LPS-treated rats with heat pre-treatment was lower compared with that of LPS-treatment rats without any heat treatment. However, the protein level of BAL fluid in LPS-treated rats with heat co-treatment was not different from that of LPS-treated rats without any heat treatment. The LDH level of BAL fluid in LPS-treated rats with heat co-treatment was higher compared with that of LPS-treated rats without any heat treatment. * $p < 0.05$ compared with saline group and ** $p < 0.05$ compared with LPS group.

$\mu\text{g/ml}$; $n=13$)과 열 동시처치군(2160.9, 1091.2-4544.9 $\mu\text{g/ml}$; $n=13$) 사이에는 차이를 보이지 않았으나, 열 전처치군(665.3, 374.1-1449.7 $\mu\text{g/ml}$;

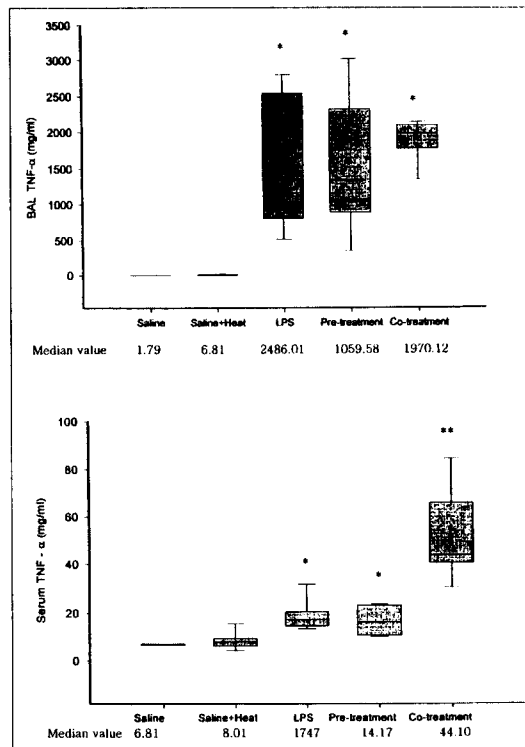


Fig. 3. The effect of heat co-treatment on TNF- α of serum and BAL fluid in rats treated with lipopolysaccharide(LPS, 3mg/kg) intratracheally. Boxplot: Box=25-75 percentile; bold line, median value; whiskers indicate 10< or 90> percentile. Six hours after LPS instillation intratracheally, the levels of TNF- α in serum and BAL fluid of LPS-administered rats without or with heat treatment were significantly higher compared with those of saline treated rats without any heat treatment. The TNF- α level of serum in LPS-treated rats with heat co-treatment was higher than that of LPS-treated rats without heat treatment. * $P < 0.05$ compared with saline group and ** $P < 0.05$ compared with LPS group.

$n=7$)에서는 내독소균에 비해 감소하였다($p=0.004$) (Fig. 2). 기관지폐포세척액의 LDH는 열 동시처치군(0.39, 0.08-0.46 $\mu\text{g/ml}$; $n=13$)에서 내독소균(0.13, 0.04-0.43 $\mu\text{g/ml}$; $n=13$)에 비해 증

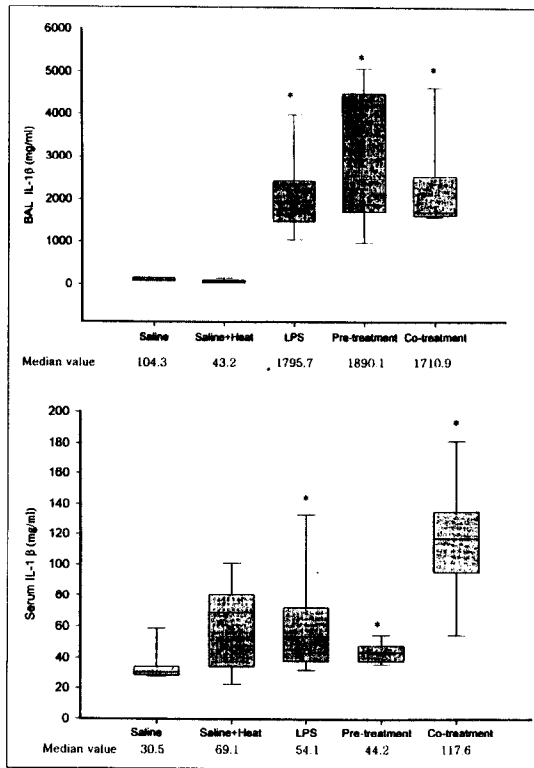


Fig. 4. The effect of heat co-treatment on IL-1 β of serum and BAL fluid in rats treated with lipopolysaccharide(LPS, 3mg/kg) intratracheally. Boxplot: Box=25-75 percentile; bold line, median value; whiskers indicate 10< or 90> percentile. Six hours after LPS instillation intratracheally, the levels of IL-1 β in serum and BAL fluid of LPS administered rats without or with heat treatment were significantly higher compared with those of saline treated rats without any heat treatment. The IL-1 β level of serum in LPS-treated rats with heat co-treatment was higher than that of LPS-treated rats without heat treatment without statistical significance. * $p<0.05$ compared with saline group.

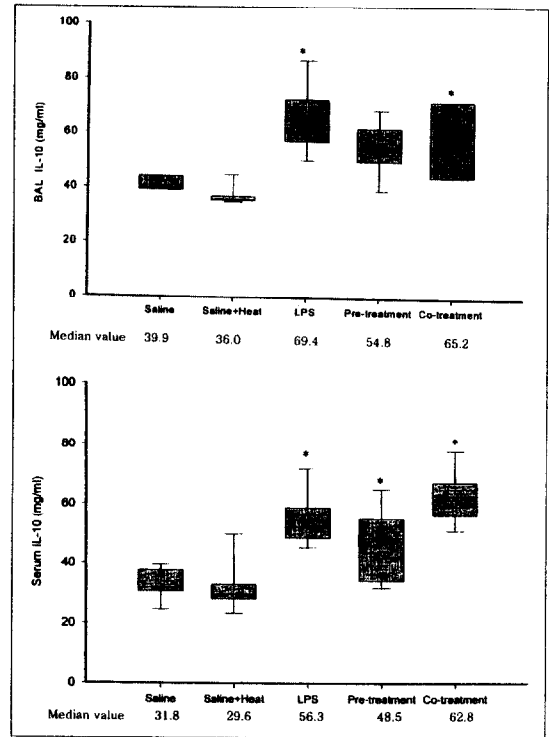


Fig. 5. The effect of heat co-treatment of IL-10 of serum and BAL fluid in rats treated with lipopolysaccharide(LPS, 3mg/kg) intratracheally. Boxplot: Box=25-75 percentile; bold line, median value; whiskers indicate 10< or 90> percentile. Six hours after LPS instillation intratracheally, the levels of IL-10 in serum and BAL fluid of LPS-administered rats without or with heat treatment were significantly higher compared with those of saline treated rats without any heat treatment. The IL-10 levels of serum and BAL fluid in LPS-treated rats with heat co-treatment were not different from IL-10 of LPS-treated rats without heat treatment. * $p<0.05$ compared with saline group.

3. 혈청 및 기관지폐포세척액 내의 사이토카인 농도

가하였으나($p=0.039$) 열 전처치군은($0.35, 0.01-0.45 \mu\text{g/ml}$; $n=7$)은 내독소군과 차이를 보이지 않았다.

사이토카인은 각군의 일부에서만 측정되었다. 혈청과 기관지폐포세척액의 IL-1 β TNF- α 및 IL-10은 생리식염수 대조군($n=3$)에 비해 내독소군($n=6$), 열 전처치군($n=7$) 및 열 동시처치군($n=5$) 모두에서

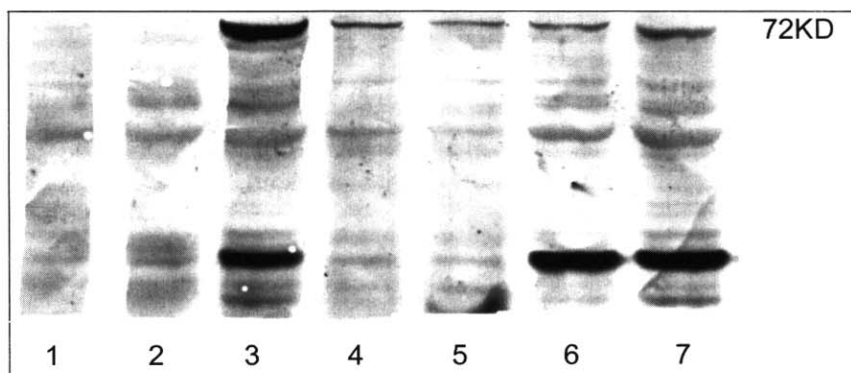


Fig. 6. Identification of heat shock protein (HSP) 72 by Western immunoblotting in rats after whole body hyper-thermia to a rectal temperature of 41°C. KD, kilodalton. 1, non-heated saline rat; 2, non-heated LPS rat; 3 & 6, co-treated LPS rat that heat was conducted immediately after LPS instillation; 4, co-treated saline rat; 5, heat pre-treated rats 18h prior to saline administration; 7, heat pre-treated rats 18h prior to LPS administration.

증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 3, 4, 5). 열 동시처치군의 혈중 TNF- α 의 농도(44.1, 30.6-84.5 mg/ml)는 내독소군의 혈중 TNF- α 의 농도(17.4, 13.6-33.1 mg/ml)에 비해 증가하였으며($p = 0.01$) (Fig. 3), 혈중 IL-1 β 의 농도도 내독소군(54.1, 31.2-140.2 mg/ml)에 비해 열 동시처치군(117.6, 54.8-181.7 mg/ml)에서 증가하였지만 통계적 의미는 없었다(Fig. 4). 기관지폐포세척액의 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10의 농도는 내독소군과 열 동시처치군 및 열 전처치군 사이에 차이가 없었다(Fig. 3, 4, 5). 또한 혈중 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10의 농도는 내독소군과 열 전처치군 비교 시 차이가 없었다. 생리식염수만 투여한 대조군의 혈청 및 기관지폐포세척액의 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10의 농도는 생리식염수 투여 직후 열처치를 시행 받은 백서($n=5$)와 차이가 없었다(Fig. 3, 4, 5).

4. 폐조직 HSP72의 발현

열처치 하지 않은 대조군 및 내독소군에 비해 열처치 대조군, 열 전처치군 및 열 동시처치군 모두에서 폐조직의 HSP72의 발현이 증가되어 나타났다(Fig. 6).

고 찰

본 연구는 내독소 투여 직후 시행한 열충격이 급성폐손상을 감소시키는지를 알아보고, 열처치에 따른 염증성 또는 항염증성 사이토카인 생성의 변화를 알아보고자 하였다. 본 실험 모형에서 내독소 투여 직후 시행된 열충격은 열 전처치한 경우와는 달리 급성폐손상을 감소시키지 못하고 혈중 염증성 사이토카인의 농도를 증가시켜 급성폐손상을 오히려 악화시킬 수 있는 가능성을 시사하였다. 이러한 결과는 쥐에 내독소 15 mg/kg를 정맥 투여한 후 시행한 열처치가 내독소 투여 후 12시간째 사망률을 개선시키며 이는 혈중 IL-1의 농도 감소와 연관되었을 것으로 추정한 Chu 등¹⁶의 보고와는 다른 결과로 사료된다. 그러나 치사량의 내독소를 정맥 투여한 후 12시간 후의 사망률을 비교한 Chu 등의 실험 결과와 소량의 내독소를 기도를 통하여 일회 투여한 후 6시간 뒤의 폐손상 지표만을 관찰한 본 연구와는 실험모형과 결과 비교 방법이 매우 달라 두 연구결과 차이의 이유를 추정하기는 어렵다. 다만, Chu 등¹⁶이 내독소 투여 후 열처치 시 2시간 후 혈중 IL-1 β 와 TNF- α 의 농도가 열처치 하지 않은 대조군에 비해 감소하고 6시간 후에도 IL-1 β 의 농도

는 계속 감소되어 있는 것으로 보고한 것에 비하여 본 연구에서는 오히려 내독소 투여 6시간 후에 측정된 IL-1 β 와 TNF- α 는 내독소 투여 직후 열충격을 가할 경우 내독소만 투여한 군에 비해 오히려 증가하여 상반된 결과로 나타났다. 본 연구의 결과는 Qingqi 등¹⁷이 생쥐에 내독소 투여 후 체온을 40℃ 이상으로 유지 할 경우 혈중 TNF- α 는 내독소 투여 후 1시간째 정상 체온군에 비해 의미 있게 상승하고 IL-1 β 는 내독소 투여 후 한시간째 정상 체온군에 비해 감소하다가 5시간 후에 증가한 소견과 유사하였다. 이러한 현상은 본 연구에서 열 전처치군의 경우 열충격 후 발열에 의한 효과가 없어지는 18시간 후 투여된 내독소에 의한 폐손상은 감소된 점으로 미루어 볼 때 열 동시처치군의 경우는 HSP72의 폐 내 생성은 증가되었으나 그 작용이 나타나는데 필요한 시간이 6시간만으로는 불충분하였거나 혹은 열 자체가 내독소로 유도되는 염증반응을 증폭시켜 HSP72로 유도되는 항염증작용을 상쇄시켰을 가능성이 있다. 이러한 추정은 외부에서 주어진 열에 의해서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 interferon 등과 같은 사이토카인이 혈중 내 증가된다는 보고와^{21, 22} 발열 자체가 급성 염증반응기에 사이토카인의 생성의 시간과 정도 그리고 조직 분포 등을 변화시킨다는 보고들에 의해 뒷받침된다¹⁷.

본 연구에서도 열 전처치는 백서의 폐 조직 내 HSP72를 발현시키면서 내독소로 유도되는 급성폐손상을 완화시켰다. 여러 실험동물 모형에서 열 전처치는 패혈증에 의한 사망률과 심폐손상을 줄이는 것으로 보고되었으며 이는 HSP72와 연관이 있을 것으로 간주되고 있다^{9, 23, 24}. HSP는 세포들이 스트레스에 반응하여 세포 내 다른 폴리펩티드(polypeptide)들의 생성보다 우선적으로 생성되는 단백질질이다. 특히 HSP70계는 열로 유도되는 HSP의 대표적 물질로서 단백질의 조합, 주름형성 및 분해 등과 같은 세포의 정상적인 과정에 중요한 역할을 하며^{8, 25-27}, HSP70 mRNA는 스트레스에 의해 급속히 유도되어 손상된 단백질들에 작용하여 조기 주름형성이나 변성을 방지하고 다른 단백질과 단백질 상호작용에 있어 보호자

(chaperon)적 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁸.

생체 외 실험에서 HSP는 TNF에 의한 세포의 파괴를 억제하며^{29, 30}, 백서에게 열 전처치 후 복막염에 의한 패혈증을 유도 시 사망률이 감소하여 HSP가 패혈증으로부터 보호작용을 할 가능성을 시사하였다²³. 또한 ARDS 환자들의 폐포대식세포에서 HSP의 생성이 증가됨이 보고되었으며⁹ 열을 전처치 시 phospholipase A2, TNF- α 및 내독소로 유도되는 급성 폐손상을 경감시킨다고 보고되어졌다¹⁰⁻¹².

전처치로 시행된 열충격이 여러 원인으로 유도되는 급성폐손상을 감소시키는 기전에 대하여는 잘 규명되어 있지 않다. 가능한 기전으로서 HSP72가 내독소로 유도되는 사이토카인들의 생성에 영향을 미칠 것이라는 추정이 제시되고 있다^{13, 31}. 즉, HSP는 사이토카인의 유전자 발현 및 신호전달의 조절에 관여할 것으로 추정되며³² 내독소로 자극된 복막대식세포에 열 전처치를 시행 시 열 처치하지 않은 세포에 비해 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성이 감소되는 것으로 보고되었다³¹. 고 등은 백서의 내독소 모형에서 열전처치 시 혈중 TNF- α 와 IL-1 β 의 농도는 열전처치 하지 않은 쥐와 차이가 없었으나 혈중 IL-10이 증가하여 폐손상이 감소되는 기전으로 항염증성 사이토카인인 혈중내 IL-10의 증가와 연관성이 있을 것으로 추정하였다¹³. 그러나, 쥐에게 내독소를 투여한 Ryan 등²⁴의 생체 연구에서는 열 전처치 시 열처치 하지 않은 쥐에 비해 TNF- α 의 농도는 감소하지 않는다고 보고하였고 Sabrina 등¹⁵도 열 전처치 후 쥐에게 내독소를 정맥 투여한 경우 혈중 TNF- α 와 IL-10의 농도는 열처치 하지 않은 쥐와 차이가 없었다고 보고하여 HSP가 사이토카인에 미치는 영향은 아직 논란이 많다. 본 연구에서도 열 전처치를 시행한 군에서 내독소로 유도되는 혈중 및 기관폐포세척액 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 농도가 감소되지 않아 생체 모형에서 내독소로 유도되는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-10의 생성에 HSP72가 관여하지 않을 가능성이 추정되었다.

본 연구에서 내독소를 기도로 투여하여 유도된 급성 폐손상 모형을 이용하였는데 이는 내독소로 유도되는

혈관 내피세포의 투과성 증가나 다양한 염증성 사이토카인들의 생성 등과 같은 급성폐손상 발병의 중요한 기전들이 잘 알려져 있기 때문이다'. 또한 패혈증은 임상에서 경험하는 ARDS의 중요한 원인이기 때문이다³³. 내독소로 유도되는 급성폐손상 모형은 내독소를 직접 정맥내로 투여하거나 본 연구와 같이 기도내로 투여할 수 있으며 혹은 장 파열을 인위적으로 유도하여 내인성 내독소 생성 증가를 통한 급성폐손상을 유도할 수도 있다. 흔히 기도 내로 내독소를 직접 투여하는 경우 폐성 급성폐손상 모형을 만들기 위한 의도이나, 정맥내로 내독소를 투여한 급성폐손상 모형과의 폐손상의 크기의 차이 등은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서 급성폐손상을 유도 후 열 충격이 내독소로 유도되는 폐손상의 지표에 미치는 영향을 관찰한 것은 비록 열 전처치가 내독소로 유도되는 급성폐손상을 완화시킨다 하여도 임상에서는 급성폐손상을 유발하는 원인에 이미 노출된 환자들을 치료하게 됨으로 열 전처치의 급성폐손상 경감 효과는 임상적 가치가 없기 때문이었다. 본 연구에서는 열 동시처치의 경우 내독소만 투여한 군에 비해 폐조직의 MPO 및 기관지폐포세척액의 단백질을 감소시키지 못하고 내독소 투여 군에 비해 기관지폐포세척액의 LDH를 증가시켜 급성폐손상을 감소시키지 못할 뿐만 아니라 TNF- α 의 혈중 농도가 내독소군에 비해 오히려 증가하며 IL-1 β 의 농도도 증가되는 경향을 보여 오히려 폐손상을 악화시킬 가능성이 제시되었다.

이상의 결과로 본 연구에서는 백서에게 내독소를 주입하여 급성폐손상을 유도한 직후 열충격을 시행할 경우 열 전처치와는 달리 급성폐손상을 감소시키지 못하고 오히려 염증성 사이토카인인 혈중 TNF- α 와 IL-1 β 를 증가시켰다.

요 약

연구배경 :

열 전처치는 조직 내에 열충격단백질의 생성을 유도하며 이러한 열 전처치가 내독소로 유도된 쥐의 급성폐

손상을 감소시키고 패혈증에 의한 사망률을 감소시킨다고 알려져 있다. 그러나, 폐손상을 유발하는 원인에 노출된 후 가해진 열처치가 폐손상에 미치는 효과에 대하여는 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 내독소 투여 직후 시행한 열충격이 내독소에 의해 유발된 쥐의 급성폐손상에 미치는 영향과 그에 따른 염증성 및 항염증성 사이토카인에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방 법 :

대조군은 백서의 기관지 내로 생리식염수를 투여하였고 열처치대조군은 생리식염수 투여 직후 열처치를 시행하였다. 내독소군은 열처치 없이 내독소를 기관지 내로 투여하였다. 열 전처치군은 내독소 투여 18시간 전에 열 전처치를 시행하였고, 열 동시처치 군은 내독소 투여 직후 열처치를 시행하였다. 내독소 투여 후 6시간에 기관지폐포세척을 시행하여 기관지폐포세척액 내의 호중구 백분율을 측정하였고 폐를 적출하여 myeloperoxidase(MPO)의 활성도를 측정하였으며 기관지폐포세척액과 혈청에서 LDH(lactic dehydrogenase), 단백질, IL(interleukin)-1 β TNF(tumor necrosis factor)- α 및 IL-10를 측정하였다. 또한 각군에서 폐 조직 내 HSP72의 표현정도를 관찰하였다.

결 과 : 1) 내독소군, 열 전처치군 및 열 동시처치군 모두에서 기관지폐포세척액 내의 호중구 백분율, 폐조직의 MPO, 혈청 및 기관지폐포세척액내의 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10이 대조군에 비해 증가하였다(각 $p < 0.05$). 2) 열 동시처치군은 폐조직의 MPO와 기관지폐포세척액 단백질의 농도가 내독소군과 차이가 없었고 기관지폐포세척액의 LDH가 내독소군에 비해 증가하였다($p < 0.05$). 3) 열 동시처치군의 혈청 TNF- α 의 농도는 내독소군과 비교 시 증가하였다($p = 0.01$).

결 론 :

내독소 투여 직후 시행한 열충격은 내독소로 유도되는 폐손상을 감소시키지 못하며 염증성 사이토카인의 농도를 증가시켰다.

참 고 문 헌

- Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:913-27.
- Dinarello C, Wolff S. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-13.
- Fong Y, Lowry SF. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;55:157-70.
- Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious disease. *Crit Care Med* 1993;21:S423-35.
- Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 1991;324:429-36.
- Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F. Assessment of the safety and Williams JG, Maier RV : Ketoconazole inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in acute lung injury(adult respiratory distress syndrome). *Surgery* 1992;112:270-7.
- Jepsen S, Herlevsen P, Knudsen P. Antioxidant treatment with N-acetylcystein during adult respiratory distress syndrome : A prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1992;20:918-23.
- Wong HR, Jonathan RW. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997;273:L1-L9.
- Kindas-Mugge I. Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA. *Shock* 1995;5(3):184-9.
- Villar J, Edelson JD, Post M, Mullen JBM, Slutsky AS. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:177-81.
- 고윤석, 임채만, 김미정, 조원경. Tumor necrosis factor- α 로 유도되는 백서의 급성폐손상에 열충격 반응이 미치는 효과. *결핵 및 호흡기질환* 1997; 44(6):1343-52.
- Y koh, CM Lim, MJ Kim, TS Shim. Heat shock response decreases endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Respirology* 1999;4:325-30.
- Younsuck Koh. The changes in histopathology, cytokine production, and surfactant by heat pretreatment in endotoxin-induced acute lung injury of rats. *Inflammation* 2001;25(3):187-96.
- Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Eldelson JD. Effects of the stress response in septic rats and lipopolysaccharide stimulated alveolar macrophage : Evidence for TNF- α posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1843-50.
- Sabrina MH, Lesley L, John PO, Ashok PS. The effect of heat on cytokine production in rat endotoxemia. *Crit Care Med* 2000;28(5):1465-68.
- Chu EK, Ribeiro SP, Slutsky AS. Heat stress increases survival rates in lipopolysaccharide stimulated rats. *Crit Care Med* 1997;25:1727-32.
- Qingqi J, Louis D, Ishwar SS, Lisa G. Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. *Am J Physiol* 1999;276:R1653-60.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
- Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J. Lactate dehydrogenase(LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol* 1992; 25(3):231-43.

20. Kondo T, Matsuda T, Tashima M, Umehara H, Domae N, Yokoyama K, Uchiyama T, Okazaki T. Suppression of heat shock protein-70 by ceramide in heat shock-induced HL-60 cell apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275(12):8872-9.
21. Changes DM. The role of cytokines in heat stroke. *Immunol Invest* 1993;22(8):553-61.
22. Drenth JP, van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Schalkwijk CG, van der Meer JW. Cytokine activation during attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Blood* 1995;85(12):3585-93.
23. Villar J, Ribeiro SP, Mullen BM, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS. Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 1994;22:914-21.
24. Ryan AJ, Flangan SW, Moseley PL. Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. *J Appl Physiol* 1992;73:1517-22.
25. Villar J, Mullen JBM, Slutsky AS. Stress proteins, disease and survival. *Intensive Care World* 1993;10:140-2.
26. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988;22:631-77.
27. Harrison GS, Drabkin HA, Kao F, Hartz J, Hart IM, Chu EH, Wu BJ, Morimoto RI. Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein hsp 70. *Somatic Cell Mol Genet* 1987;13:119-30.
28. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.
29. Gromowski S, Yagi J, Janeway CA JR. Elevated temperature regulates tumor necrosis factor-mediated immune killing. *Eur J Immunol* 1989;19:1709-14.
30. Kusher DI, Ware CF, Gooding LR. Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990;145:2925-31.
31. Snyder YM, Guthrie L, Evans GF, Zuckerman SH. Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1992;51(2):181-7.
32. Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 1998;856:206-13.
33. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 2000;28(1):232-5.