

## 폐장에서 내독소 및 Thiourea 투여 후 Surfactant Protein A mRNA 발현의 비교

한양대학교 및 한림대학교\* 의과대학 내과학교실

이재영\*, 김미옥, 손장원, 윤호주, 신동호, 김태화, 박성수

=Abstract=

### Gene Expression of Surfactant Protein A mRNA of the Lung in Endotoxin and Thiourea Treated Rats

Jae Young Lee, M.D., Mi Ok Kim, M.D., Jang Won Sohn, M.D., Ho Joo Yoon, M.D.,  
Dong Ho Shin, M.D., Tae Wha Kim, M.D., Sung Soo Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Hanyang & Hallym\* Universities, College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : The surfactant protein A(SP-A) is important in the regulation of surfactant secretion, synthesis and recycling. Since the acute respiratory distress syndrome(ARDS) is usually viewed as the functional and morphological expression of a similar underlying lung injury caused by a variety of insults and since abnormalities in surfactant function have been described in ARDS, the authors investigated the different effects of endotoxin and thiourea on the accumulation of mRNA encoding SP-A.

**Methods** : Sprague-Dawley rats were given 5 mg/kg intraperitoneal endotoxin from *Salmonella enteritidis* and 3.5 mg/kg intraperitoneal thiourea and sacrificed at different time periods.

**Results** : 1) SP-A mRNA was significantly increased 67.0% in 6 hours and 73.4% in 24 hours after 5 mg/kg endotoxin treatment respectively( $P<0.005$ ,  $P<0.005$ ). 2) SP-A mRNA was significantly decreased 32.9% in 24 hours after 3.5 mg/kg thiourea treatment( $P<0.05$ ).

**Conclusions** : These results indicate that the differential regulation of surfactant protein A in vivo is evident and suggest that surfactant protein A might be differentially regulated during different kind of insults of lung injury at different time periods without altering lung wet to dry ratios. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 55:257-266)

---

**Key words** : Gene expression, Surfactant protein A, Endotoxin & Thiourea.

Address for correspondence :

Sung Soo Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Hanyang University, College of Medicine,

17 Haengdang-dong, Sungdong-ku, Seoul, 133-792, Korea

Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2298-9183 E-mail : parkss@hanyang.ac.kr

## 서 론

내독소인 lipopolysaccharide는 조직 내에 다량으로 존재하는 대식세포를 활성화시키고, 내독소에 의하여 활성화된 대식세포는 많은 양의 TNF를 분비한다. TNF는 최염성(pro-inflammatory) 물질로 IL-1과 유사한 cytokine이며, 그람 음성균에 의하여 유발된 패혈증시 동반하는 폐손상의 중요한 매개체로 알려져 있다<sup>1-4</sup>.

Thiourea는 폐장의 미세혈관의 혈액동학적 변화와 투과성의 변화를 가져와서 폐부종을 유발시키는 약물이다<sup>5,6</sup>. 광학 및 전자현미경으로 관찰하면 thiourea에 의한 일차 표적세포는 모세혈관의 내피세포이다. 즉 thiourea는 내피세포의 장벽 상실을 초래케 하여 모세혈관의 투과성을 증가시키므로 간질 또는 폐포 내 부종을 일으킨다<sup>7</sup>.

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)에 있어서 표면활성물질(surfactant)의 역할은 복잡적이다. 그러나 표면활성물질이 표면장력의 이상에 영향을 미치어 폐탄성의 감소와 더불어 환기와 관류 사이의 균형을 악화시키므로 ARDS의 병태생리에 부분적으로 관여한다<sup>8</sup>. 표면활성물질계통의 변화가 ARDS 때 폐손상의 일차적인 발병기전은 아니지만 그렇다고 해서 ARDS의 이차적인 중요성만의 의미를 부여해서도 안된다. 왜냐하면 표면활성물질 계통은 일차적이든 이차적이든 간에 적절한 폐기능을 유지하는데 지극히 중요할 뿐만 아니라, 어떤 형태로든 표면활성물질 결핍이 폐의 병태생리학적 결과에 지대한 영향을 주기 때문이다<sup>9-12</sup>.

표면활성물질 단백질(surfactant protein: 이하 SP로 표기함) 중 SP-A의 기능은 2형 폐세포로부터 인지질의 흡수를 강화하고, 2형 폐세포로부터 surfactant의 분비를 조절하여 지질교체를 관장하며, tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. 또한 SP-A는 surfactant의 신속한 film형

성에 있어 필수적인 배수성 단백질 SP-B와 SP-C와 상호 협동작용을 하여 단층의 표면장력을 감소시킨다<sup>13</sup>. 그러므로 SP-A는 surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다.

배수성 SP인 SP-B와 SP-C mRNA에 대한 폐손상의 서로 다른 원인인 내독소와 thiourea의 유사한 조건하 투여 후 시간경과에 따른 동물실험내 SP-B와 SP-C의 유전자발현이 각각 특이하게 상이하게 감소하는 것을 알 수 있었고 배수성 SP에 대한 영향은 thiourea보다 내독소 투여시 더 감소가 있었다는 보고가 있었다<sup>14</sup>.

이에 저자들은 폐손상의 원인물질의 하나인 내독소와 thiourea를 유사한 조건하, 동일시간에 실험동물의 복강 내로 각각 투여한 후 시간경과에 따른 SP-A 유전자가 폐손상의 원인에 따른 발현의 차이가 있는지를 비교 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 300-380 gm의 Sprague-Dawley쥐(Sasco, Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응시킨 후 본 연구의 실험동물로 사용하였다. Salmonella enteritidis lipopolysaccharide B(Difco Laboratories, Detroit, MI) 5 mg/kg 및 thiourea(Fisher Scientific Company; T-101, NJ) 3.5 mg/kg을 각각 8마리의 실험동물의 복강 내로 투여 후 6시간 및 24시간에 각각 희생시켰다. 정상 대조군 8마리는 동량의 식염수를 복강 내로 각각 주사한 후 6시간 및 24시간에 희생하였다. 폐조직을 얻기 위해 쥐를 희생한 후 폐를 일괄 채취하였다. Wet to dry weight ratio(WDR)을 측정하기 위하여 한쪽 폐의 2/3 부위를 저울로 무게를 측정하였다. mRNA를 측정하기 위하여 500-750 mg의

폐조직을 10 ml의 solution D(4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에 넣은 후 Tissumizer(Tekma, Cincinnati, OH)로 high speed 에서 30-60초 동안 균질화 후 -70℃의 냉동실에 보관하였다.

## 2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi<sup>15</sup>의 방법으로 총 RNA를 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500 µL의 solution D에 pH 4.0 인 50 µL 2 M sodium acetate를 가하여 산성화한 후 pH 7.5인 0.1 M Tris 및 pH 7.5인 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 완충한 후 phenol 500 µL을 가하였다. 교반(vortex)으로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49 : 1인 용액 100 µL을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube 내 이 혼합물을 15분 동안 얼음에 담근 후 10,000 G의 microfuge로 5분 동안 실온에서 원침하였다. Aqueous phase를 micro-pipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간 이상 -20℃에 잠복시킨 후, 10,000 G에서 5분동안 원침하였다. 상층액을 서서히 따른 후 침전물을 150 µL의 solution D에 녹인 후 -20℃에 하룻밤 동안 동량의 isopropanol로 재침전시켰다. 5분 동안 10,000 G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음

70% ethanol로 한차례 씻었다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 1mM EDTA (pH 8)로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외시켰다.

## 3. RNA hybridization assay

각각의 mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과  $\beta$ -cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybridization 방법으로 측정하였다. 쥐의 SP-A의 표면활성물질단백의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 전사체를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 전사반응으로부터 산출물은 linealized vector microgram (µg)당 전체 길이가 20-30 µg의 전사체였다.

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 ng의 sense 전사체와 1 µg의 RNA를 65℃에서 10-15분 denature 후 3장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 µm in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, NH)에 10 x standard saline citrate (SSC)/ 50% formaldehyde을 20 µL씩 가하였다. Filter들을 80℃에서 2시간 구워낸 후 1M sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)을 포함하는 prehybridization용액을

**Table 1.** Mortality rate after endotoxin and thiourea injection

Time after endotoxin and thiourea	Mortality rate (%)		
	Control	Endotoxin*	Thiourea**
6 hr	0	0	0
24 hr	0	1	0

\* hours after endotoxin injection of 5 mg/kg

\*\* hours after thiourea injection of 3.5 mg/kg

**Table 2.** Lung wet to dry weight ratio in 5 mg/kg endotoxin and 3.5 mg/Kg thiourea injection and time course

Time after endotoxin and thiourea	Wet wt/dry wt ratio	
	Endotoxin	Thiourea
Control	5.02±0.21	4.98±0.03
6 hr	5.01±0.14	5.76±0.65
24 hr	5.13±0.17	5.11±0.09

Lung wet-to-dry ratios were used as indicators of lung injury.

Values given are mean + SEM of the number of rates.

filter당 0.2-0.5 mL양으로 56℃에서 12-14시간 50 mL Falcon centrifuge tube 내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 4× SSC, 1D×enhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 mL 가한 후 특이 활성도가  $5 \times 10^6$  cpm/mL인  $^{32}\text{P}$ 로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA probe로 56℃서 흔들면서 17-20시간 동안 hybridization하였다. 모든 filter는 실온에서 2×SSC, 0.2% SDS용액으로 3번, 65℃에서 0.1×SSC, 0.2% SDS 용액으로 3번 세척하였다. Filter는 공기중에 말린 후 scintillation vial로 각각 계산하였다. 특이 mRNA는 회귀방정식을 사용하여 표준곡선으로 부터 산출하였다.

#### 4. 성적 분석

통계학적 평가는 unpaired student's t-test로 정상 대조군과 각 군간의 mRNA값 사이에서 평가하였다. 회귀방정식은 Epistat statistical package를 이용하여 산출하였다. Probability value는 0.05미만을 유의한 것으로 판정하였다.

### 결 과

#### 1. 사망률 및 폐손상의 정도

정상대조군의 8마리의 사망률은 0%이었고, 내독소

5 mg/kg를 투여 후 6시간 및 24시간에서 사망률은 각각 0/8 (0%), 1/8 (12.5%)이었고, thiourea 3.5 mg/kg를 투여 후 6시간 및 24시간에서 사망률은 각각 0/8 (0%), 0/8 (0%)이었다(Table 1). Wet to dry weight ratio (WDR)은 정상대조군에 비하여 내독소 5 mg/kg 및 thiourea 3.5 mg/kg로 처치한 군과, 각각 통계학적으로 유의 있는 변화는 없었다 (Table 2).

#### 2. SP-A에 대한 sense 전사체의 표준곡선

SP-A의 sense 전사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng 에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수(r)는 다음과 같다. SP-A에 대한 sense 전사체의 표준곡선은  $Y=0.00068X-0.065$  ( $X=\text{CPM}$ ,  $Y=\text{SP-B mRNA 전사체}$ )이고 상관계수는 0.99 이었다.

#### 3. 내독소 및 thiourea 투여후 SP-A mRNA의 축적

SP-A mRNA양은 내독소를 1일 5 mg/kg 투여 후 6시간 및 24시간에서 대조군에 비하여 67.0%, 73.4%가 각각 증가하였으며( $p<0.005$ ,  $p<0.005$ )(Fig. 1), 반면 thiourea을 1일 3.5 mg/kg투여 후 SP-A mRNA양은 6시간에서 대조군에 비하여 32.9%가 감소하였고( $p<0.05$ ), 24시간 경과 후 SP-A mRNA 양은 대조군에 비하여 28.1%가 감소하였다( $p=0.16$ )(Fig.2).

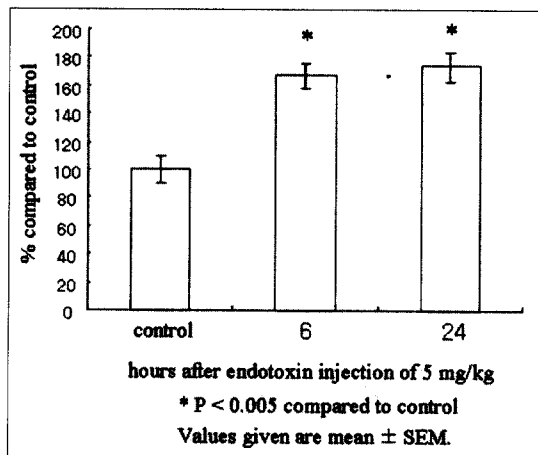


Fig. 1. Accumulation of SP-A mRNA after endotoxin administration

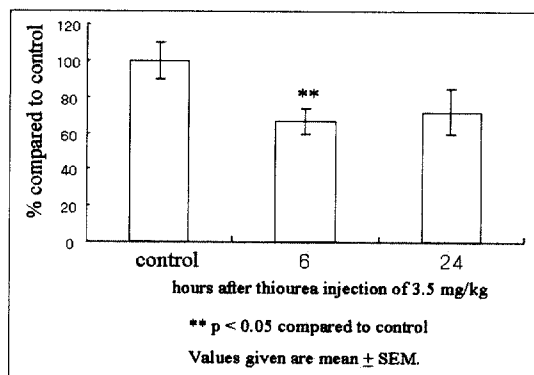


Fig. 2. Accumulation of SP-A mRNA after thiourea administration

#### 4. 내독소 및 thiourea 투여후 $\beta$ -actin mRNA의 측정

내독소 투여군의  $\beta$ -actin mRNA는 대조군은  $140.8 \pm 8.4$  cpm이었고, 6시간 및 24시간에서  $\beta$ -actin mRNA는 각각  $180 \pm 26$  cpm 및  $193.5 \pm 14.7$  cpm이었고(Fig. 3), 반면 thiourea 투여군의  $\beta$ -actin mRNA양은 대조군은  $133.7 \pm 9.3$  cpm 이었고, 6시간 및 24시간에서  $\beta$ -actin mRNA는 각각  $125.3 \pm 15.1$  cpm 및  $123.3 \pm 2.9$  cpm이었다(Fig. 4).

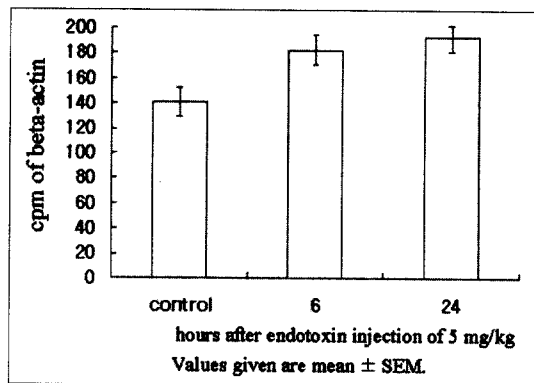


Fig. 3. Differential accumulation of Beta-actin mRNA after endotoxin injection

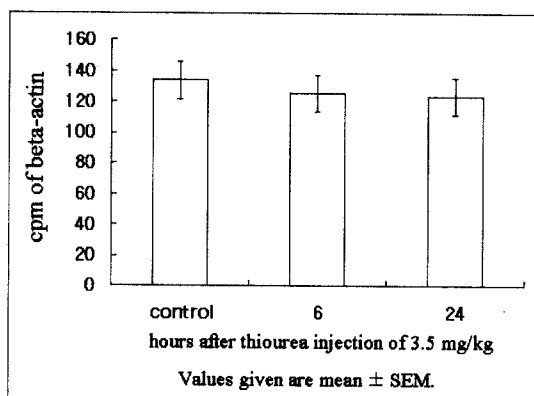


Fig. 4. Differential accumulation of Beta-actin mRNA after thiourea administration

내독소 및 thiourea 투여 후 SP-A의 각각의 시료의 양을 각 군간의  $\beta$ -actin mRNA의 양의 비로 시료의 양을 교정하였다.

#### 고 찰

전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense전사체를 이용한 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있었다. 이와같이 cpm치가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고, hybridization이 특이하다면 정상대조군 및 내독소 및 thiourea로 처

치한 군에서 filter당 cpm을 비교함으로써 상대량을 평가할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 량의 RNA와 결합할 수 있다. 본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 RNA를 측정할 수 있으며 민감하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다 또한 한꺼번에 많은 시료들을 동시에 측정하는 것이 가능하다<sup>16</sup>.

본 연구에서 thiourea투여 후 폐의 wet-to-dry ratio(WDR)은 6시간 및 24시간에 각각 15.7%, 2.6%가 증가하였으며, 내독소 투여후 폐의 WDR은 24시간에 2.2%가 증가하였다. 폐의 WDR는 일반적으로 폐손상의 지표로 사용되지만<sup>17</sup>, WDR의 변화 없이도 thiourea 처치 후 광학 또는 전자현미경으로 경미한 폐손상을 관찰할 수 있다<sup>6</sup>. Thiourea투여 후 쥐의 LD50은 3-4 mg/kg이다.

내독소는 호중구들을 자극하여 유리 산소기를 다량 생성하게 하는데 이 물질들이 혈관내피세포를 공격할 수 있기 때문에 출혈이나 미세순환 장애도 유발 할 수 있다. 그람음성균에 대한 적절한 치료가 이루어지지 않아서 병원균이 전신을 도는 경우, 균혈증이 발생하고 그 중 일부에서 패혈증으로 이행되는데 일단 패혈증 증상이 나타나기 시작하면 예후가 매우 나빠서 강력한 항생제의 사용에도 불구하고 죽음에 이르게된다. 이때 사망원인은 패혈성 속이라고 할 수 있는데 사망률이 20-80%에 이른다<sup>18,19</sup>. 이와같이 사망률의 범위가 넓은 것은 정의가 일치되지 못함을 나타내기도 하고 또한 연구된 대상균이 균일하지 못함을 반영하는 것으로 생각된다. 본 연구에서 정상대조군의 사망률은 0%이었고, thiourea 3.5 mg/kg를 투여후 6시간과 24시간에서 사망률도 0%이었다. 내독소 5mg/kg 투여후 24시간에서 사망률이 12.5%에 이른 것은 패혈성 속이 원인이라 생각된다. 세포가 내독소에 노출되면 칼슘의 수동적 유입이 증가하고 이로 인

해 arachidonic acid cascade가 활성화된다. 한편 증가된 칼슘에 의해 산화질소 synthetase가 활성화되고 산화질소의 합성이 증가되어 혈압이 강아된다. 미토콘드리아 내의 칼슘부하 증가는 세포의 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)를 방해하여 세포를 죽음에 이르게 한다.

Thiourea에 의한 내피세포 손상은 세포질 내 수포나 scallop현상으로 나타나 내피세포의 장벽 역할을 상실케 한다<sup>7</sup>. 방사능 표지단백량을 측정하여 혈관 투과성을 관찰한 보고에 의하면 thiourea투여 후 모세혈관 투과성은 3배이상 증가된다 하였다<sup>20</sup>. Thiourea에 의한 폐부종은 약물자체와 약물 대사가 폐 내의 폴리펩티드와 결합하기 때문이고, 이러한 결합이 모세혈관 내피와 폐포장벽의 투과성을 직접적 또는 간접적으로 증가시킨다<sup>21</sup>. 실제로 thiourea는 생체 내에서 cytochrome p-450을 포함하는 monooxygenase의 차단제로 작용하며<sup>20</sup>, 또한 thiourea산화물인 cyanide로 인하여 폐부종이 발생된다<sup>22</sup>.

SP들은 2형 폐세포기능의 표지자로 이용되고, 염증성 cytokine들에 의하여 조절되며, ARDS발생시 SP들의 농도는 감소한다<sup>23,24</sup>. SP들은 표면활성물질의 물리학적 성상의 결정 및 대사조절에 있어서 중요한 역할을 한다. SP들 중 SP-A는 당단백이며, 환원형의 분자량은 28-36 kDa이고, 전체 SP의 30-40%를 점한다<sup>25</sup>. SP-A의 기능은 2형 폐세포로부터 인지질의 흡수를 강화하고, 2형 폐세포로부터 표면활성물질의 분비를 조절하여 지질교체를 관장하며, tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. SP-A는 표면활성물질의 신속한 film형성에 있어 필수적인 배수성단백인 SP-B와 SP-C와 상호협동작용을 하여 단층의 표면장력을 감소시킨다<sup>13</sup>. 그러므로 SP-A는 표면활성물질의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다. 한편 SP-A치는 ARDS환자 및 ARDS으로 발전할 위험성이 큰 환자의 기관지폐포세척액 내에서 감

소하였다는<sup>26-28</sup> 보고가 있고 양수 내 저농도의 SP-A수치는 폐의 미성숙 및 ARDS의 발생을 예측할 수 있다 하였다<sup>29,30</sup>. 또한 혈청 SP-A수치를 이용하여 ARDS로 발전할 위험성이 큰 환자를 조기에 확인할 수 있다<sup>28</sup>.

본 연구결과 SP-A mRNA양은 1일 5 mg/kg의 내독소를 투여 하고 6시간과 24시간 후 대조군에 비하여 각각 67.0%와 73.4%로 유의하게 증가하였던 바, 이는 문 등<sup>31</sup>의 대조군에 비하여 5 mg/kg의 내독소를 투여하고 24시간 후 27.3%가 유의하게 증가한다는 보고와 유사하다. 이와같은 결과는 ARDS발생의 위험인자를 가진 환자의 76%에서 24시간 내에 ARDS가 발생되며 72시간 후에는 발생할 가능성이 적다<sup>32,33</sup>는 보고와 마찬가지로 24시간 이내에 내독소 투여 후 SP-A 유전자발현의 유의한 증가는 2형 폐세포의 손상으로 인한 감소에 대한 보상으로 SP-A mRNA량이 상향조절되었다고 생각된다. 내독소를 1일 5 mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 26.1%가 유의하게 감소하였고, 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 50%가 유의하게 감소하였다<sup>14</sup>. 내독소를 1일 5 mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 38.7%가 유의하게 감소하였고, 24시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 53.6%가 유의하게 감소하였다<sup>14</sup>. 이와같이 배수성 SP의 유전자 발현은 내독소를 투여하였을 시 유의하게 감소하는데 비하여 SP-A의 유전자 발현은 증가하였다. 내독소 투여후 친수성 SP와 배수성 SP의 이러한 유전자 발현의 차이의 기전은 확실치 않으며 차 후 연구할 과제이다.

SP-A mRNA양은 1일 3.5 mg/kg의 thiourea를 투여하고 6시간후 대조군에 비하여 32.9%가 유의하게 감소하였다. 이와같은 결과는 고 등<sup>34</sup>의 22.7%의 감소가 있었다는 결과와 유사하며, thiourea투여 후 2시간 후부터 내피세포의 수포현상, scallop현상

과 간질성 부종현상이 나타나며 6시간 경과 후에는 상피손상도 초래한다<sup>35</sup>는 보고와 일치하게 유의하게 감소하였다. Thiourea를 투여하고 24시간 경과 후 SP-A mRNA양은 대조군에 비하여 28.1%가 감소하였으나 유의하지 않았다. 이와같은 결과는 Hollinger와 Giri<sup>36</sup>에 의하면 thiourea투여 1시간 후에 폐의 glutathione은 90% 감소하여 최하점에 이르며, 24시간에는 대조군치로 환원된다 하였다는 보고에서와 같이 폐손상으로 부터 회복되는 단계라고 생각된다. Thiourea를 1일 3.5 mg/kg를 투여하고 6시간 및 24시간 경과 후 SP-B mRNA양은 대조군에 비하여 각각 9.8% 및 12.5%가 감소하였다<sup>14</sup>. Thiourea를 1일 3.5 mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-C mRNA양은 대조군에 비하여 22.8%가 유의하게 감소하였다<sup>14</sup>.

이상의 결과는 폐손상의 서로 다른 원인인 내독소와 thiourea를 유사한 조건하 투여 후 시간경과에 따라 동물실험 내 SP-A 유전자의 발현은 내독소를 투여 후 증가하고 반면에 thiourea투여시는 감소하였다. 이와같이 폐손상의 원인에 따른 시간경과에 따라 SP-A mRNA의 발현의 차이를 보임을 지적하였다. 폐손상의 원인에 따른 시간경과에 따라 SP-A mRNA의 발현의 차이를 보이는 기전 및 임상적 의의에 대하여서는 차후 연구할 과제라 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

내독소인 lipopolysaccharide는 조직 내에 다량 존재하는 대식세포를 활성화시키고, 내독소에 의하여 활성화된 대식세포는 많은 양의 TNF(tumor necrosis factor)를 형성한다. TNF는 최염성 물질로서 interleukin-1과 유사한 cytokine이며, 그람 음성균에 의해 유발된 패혈증시에 동반하는 폐손상의 중요한 매개체로 알려져 있다. Thiourea는 폐의

미세혈관의 혈액동학적 변화와 투과성의 변화를 가져와 폐부종을 유발시키는 약물이다. Thiourea는 모세혈관의 내피세포의 장벽을 상실케 하여 모세혈관의 투과성을 증가시키므로 간질 또는 폐포내 부종을 일으킨다. SP 중 SP-A의 기능은 2형 폐세포로부터 인지질의 흡수를 강화하고, 2형 폐세포로부터 표면활성물질의 분비를 조절하여 지질교체를 관장하며, tubular myelin 구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. 이와같이 SP-A는 표면활성물질의 분비, 합성 및 재순환에 관여하는 중요한 역할을 담당한다.

#### 방 법 :

저자들은 내독소와 thiourea를 백서에 각각 투여한 후 SP-A의 유전자 발현양상을 filter hybridization 방법으로 검색하고 내독소와 thiourea의 투여 양과 시간경과에 따라 SP-A의 유전자 발현의 변동을 비교 관찰하였다.

#### 결 과 :

1) 내독소를 1일 5 mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-A mRNA 양은 대조군에 비하여 67.0%가 증가하였다( $p<0.005$ ). 2) 내독소를 1일 5 mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-A mRNA양은 대조군에 비하여 73.4%가 증가하였다( $p<0.005$ ). 3) Thiourea를 1일 3.5 mg/kg를 투여하고 6시간 경과 후 SP-A mRNA양은 대조군에 비하여 32.9%가 감소하였다( $p<0.05$ ). 4) Thiourea를 1일 3.5mg/kg를 투여하고 24시간 경과 후 SP-A mRNA양은 대조군에 비하여 28.1%가 감소하였다( $p=0.16$ ).

#### 결 론 :

이상의 결과는 폐손상의 서로 다른 원인인 내독소와 thiourea를 유사한 조건하 투여 후 시간경과에 따라 동물실험 내 SP-A 유전자의 발현은 내독소를 투여 후 증가하고 반면에 thiourea투여 시는 감소하였다. 이와같이 폐손상의 원인에 따른 시간경과에 따라 SP-A mRNA의 발현의 차이를 보임을 지적하였다.

## 참 고 문 헌

1. Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Loyd JE, Lucht WD, et al. Septicemia and lung injury. Clin Lab Med 1983;3:719-44.
2. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ. Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. J Clin Invest 1988; 81: 1925-37.
3. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N Engl J Med 1988;318:1481-6.
4. Li XY, Donaldson K, Brown D, MacNee W. The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;13:185-95.
5. Richter CP. The physiology and cytology of pulmonary edema and pleural effusion produced in rats by alpha-naphthyl thiourea (ANTU). J Thorc Surg 1952;23:66-91.
6. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study. J Pathol 1972;106:25-35.
7. Pine MB, Beach PM, Cottrell TS, Scala M, Turino GM. The relationship between right duct lymph flow and extravascular lung water in dogs given alpha-naphthylthiourea. J Clin Invest 1976;58:482-92.
8. MacIntyre NR. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. Semin Respir Crit



- Care Med 1995;16:47-52.
9. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkin ND. Characteristics of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:531-6.
10. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence for lung surfactant abnormality in respiratory failure; study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 1982;70: 673-83.
11. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1987;317:1565-70.
12. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:218-33.
13. Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. *Biochem J* 1986;236:85-9.
14. 손동현, 손장원, 윤호주, 신동호, 박성수. 내독소 및 Thiourea 투여 후 Surfactant protein B 와 C유전자 발현의 비교 관찰. 결핵 및 호흡기 질환 2003;54:510-21.
15. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
16. Anderson MLM, Young BD : Chapter 4, Quantitative filter hybridisation, In Hames BD & Higgins SJ editors, *Nucleic acid hybridisation*, 1st ed. Oxford. ILR Press; 1985, p.73-111.
17. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987; 79:1498-1509.
18. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:485-9.
19. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-75.
20. Stelzner TJ, Welsh CH, Berger E, McCullough RG, Morris K, Repine JE, et al. Antiarrhythmic agents diminish thiourea-induced pulmonary vascular protein leak in rats. *J Appl Physiol* 1987;63(5):1877-83.
21. Hollinger MA, Giri SN, Alley M, Budd ER, Hwang F. Tissue distribution and binding of radioactivity from <sup>14</sup>C-thiourea in the rat. *Drug Metab Dispos* 1974;2:521-5.
22. Fox RB, Harada RN, Tate RM, Repine JE. Prevention of thiourea-induced pulmonary edema by hydroxyl-radical scavengers. *J Appl Physiol* 1983;55:1456-9.
23. Wispe JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hul WE, Holtzman RB, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest* 1990;86:1954-60.
24. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA 3rd, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88:1976-81.

25. Sueishi K, Benson BJ. Isolation of a major apolipoprotein of canine and murine pulmonary surfactant: biochemical and immunochemical characteristics. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:442-53.
26. Veldhuizen RA, McCaig LA, Akino T, Lewis JF. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1867-71.
27. Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:176-84.
28. Greene KE, Ye S, Mason RJ, Parsons PE. Surfactant protein-A levels predict development of ARDS in at risk patients. *Chest* 1999;116:90S-91S.
29. Katyal SL, Amenta JS, Singh G, Silverman JA. Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:48-53.
30. Kuroki Y, Takahashi H, Fukada Y, Mikawa M, Inagawa A, Fujimoto S, et al. Two-site "simultaneous" immunoassay with monoclonal antibodies for the determination of surfactant apoproteins in human amniotic fluid. *Pediatr Res* 1985;19:1017-20.
31. 문두섭, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수. 내독소가 surfactant protein A의 유전자 발현과 총단백량에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *결핵 및 호흡기질환* 2000;49(6):703-14.
32. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982;144:124-30.
33. Weinberg PF, Matthay MA, Webster RO, Roskos KV, Goldstein IM, Murray JF. Biologically active products of complement and acute lung injury in patients with the sepsis syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:791-6.
34. 고윤석, 박성수, 이정희. Thiourea를 투여한 백서에서 surfactant protein A, B, C의 유전자 발현동태. *대한내과학회잡지* 1992;43:545-54.
35. Meyrick B, Miller J, Reid L. Pulmonary edema induced by ANTU or by high or low oxygen concentrations in rat-An electron microscopic study. *Brit J Exp Pathol* 1972;53:347-58.
36. Hollinger MA, Giri SN. <sup>14</sup>C-thiourea binding in the rat lung. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979;26:609-12.