Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 49, No. 6, Dec, 2000

□원 저□

내독소가 Surfactant Protein A의 유전자 발현과 총단백량에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

한양대학교 및 관동대학교* 의과대학 내과학교실

문두섭*, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수

= Abstract =

The Effect of Endotoxin on Gene Expression and Total Amount of Surfactant Protein A

Doo Seop Moon, M.D.*, Jang Won Sohn, M.D., Seok Chul Yang, M.D., Ho Joo Yoon, M.D., Dong Ho Shin, M.D., Sung Soo Park, M.D.

Department of Medicine, Colleges of Medicine, Hanyang and Kwandong Universities, Seoul, Korea*

Background : Surfactant protein A (SP-A) is important in the regulation of surfactant secretion, synthesis and recycling. SP-A has important roles in regulating surfactant metabolism as well as in determining surfactant's physical properties. Since systemic sepsis is one of the common causes of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and abnormalities in surfactant function have been described in ARDS, the authors investigated the effects of endotoxemia on the accumulation of mRNA encoding SP-A and SP-A protein content.

Methods : Adult rats were given various doses of intraperitoneal endotoxin from *Salmonella enteritidis* and sacrificed at different times. SP-A mRNA was measured by filter hybridization method. Lung SP-A protein content was determined by double sandwich ELISA assay using a polyclonal antiserum raised in rabbits against purified rat SP-A.

Results : 1) The accumulation of SP-A mRNA in the endotoxin treated group 24 hours after 2mg/kg and 5mg/kg endotoxin treatments was significantly increased 50.9% and 27.3%, respectively, compared to the control group ($P<0.001$, $P<0.025$). 2) The accumulation of SP-A mRNA 24 hours in the 5mg/kg endotoxin treated group was significantly increased by 26.5% compared to the control group ($P<0.01$). 3) Total

Address for correspondence :
Sung Soo Park, M.D.
Department of Medicine, College of Medicine, Hanyang University
17 Haeng dang dong, Sung dong ku, Seoul, 133-792, Korea
Phone : 02-2290-8347 Fax : 02-2298-9183 E-mail : parkss@email.hanyang.ac.kr

amount of lung SP-A was not altered at 24 hours by various doses of treatment. Total lung SP-A content 144 hours after endotoxin administration was significantly decreased by 51.4% compared to the control group ($P < 0.01$).

Conclusions : The specific regulation of SP-A by various time course in vivo is evident. The late decline in SP-A protein content was unexpected and suggests that SP-A may be differentially regulated during lung inflammation. The functional significance of these alterations remains to be clarified. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 703-714)

Key words : Gene expression, Surfactant protein A, Endotoxemia.

서 론

급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome : ARDS)은 1967년 Ashbaugh[1]가 처음 보고할 당시 사망률이 58%이었고 현재도 50-80%의 높은 사망률을 보이고 있다[2-4]. ARDS의 발생 원인은 다양하고 여러가지 기전에 의하여 특징적인 폐손상을 유발시킨다. ARDS의 가장 흔한 병리학적 특징은 미세혈관의 투과성 증가로 인한 폐포내의 단백성분이 풍부한 부종현상이다[5-7]. 이 결과 가스교환의 장애, 폐탄성의 소실 및 비심장성 부종의 결과를 초래한다. 호중구, 혈소판 및 보체, prostaglandin, leukotriene, thromboxane, interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF)와 같은 체액매개물들이 ARDS의 병인에 관여하는 것으로 알려져 있다[8].

세포가 내독소에 노출되면 칼슘의 수동적 유입이 증가하고 이로 인해 arachidonic acid cascade가 활성화된다. 다른 한편 증가된 칼슘에 의해 산화질소 synthetase가 활성화되고 산화질소의 합성이 증가되어 혈압이 강하된다. 마이토콘드리아내 칼슘부하증가는 세포의 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)을 방해하여 세포를 죽음에 이르게 한다. 내독소인 lipopolysaccharide는 조직 내에 많이 존재하는 대식세포를 활성화시키고 활성화된 대식세포는 많은 량의 TNF를 분비한다. TNF는 IL-1과 유사한 cytokine이며, 최염성 물질로 그람 음성균으로 유발된 패혈증에서 발생하는 폐손상의 중요한 매개물로 알려져 있다[9-12]. 실험동물에서 TNF를 폐장내 주입하면 내독소에 의하여 유발되는 폐손상과 동일한 병리소견들을 관찰할 수 있으며, 생체 주입시 패혈성 저혈압을 관찰할 수 있으므로 TNF는 폐손상이나 패혈증의 주요 매개물의 하나로 알려져 있다[13]. 동물실험에서 이 cytokine을 전신 또는 폐장내에 국소적으로 투여하면 급성 폐손상을 유발하고 ARDS환자의 혈청 및 기관지폐포세척액에서 TNF농도가 증가되며 ARDS의 발생기전에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[14-17]. 또한 폐부종 및 백혈구 축적현상이 TNF에 대한 항혈청을 투여하였을 때 개선되었다는 보고가 있다[18].

ARDS에 있어서 surfactant의 역할은 복합적이지만 표면장력의 이상이 ARDS의 병태생리에 부분적으로 기여하여[19] 폐탄성의 감소와 환기와 관류사이의 균형을 악화시킨다. Surfactant 계통의 변화가 ARDS 때 폐손상의 일차적인 발병기전은 아니지만 그렇다고 해서 ARDS의 이차적인 중요성만의 의미를 부여해서도 안된다[20]. Surfactant 계통은 일차적이든 이차적이던간에 적절한 폐기능을 유지하는데 있어서 지극히 중요할 뿐만 아니라, 어떤 형태이던 surfactant결핍이 폐의 병태생리학적 변화에 크게 기여하기 때문이다[21-23].

Surfactant단백(surfactant protein, SP)들은 surfactant의 물리학적 성상의 결정 및 대사조절에 있어서 중요한 역할을 하며 SP-A의 기능은 type II pneumocyte로부터 인지질의 흡수를 강화하고 type II pneumocyte로부터 surfactant의 분비를 조절하

여 지질교체를 관장하며 tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. 이와같이 SP-A는 surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다.

따라서 ARDS의 주요원인이 되는 내독소가 SP-A에 영향을 미쳐 ARDS로 발전에 기여할 가능성이 높아, 이에 저자들은 ARDS의 중요한 매개물의 하나인 내독소를 실험동물의 복강내 투여후 내독소의 투여양과 작용시간에 따라 SP-A 유전자와 총 SP-A단백량이 어떻게 발현하는지를 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

Sasco 회사로부터 분양받은 300-380 gm의 Sprague-Dawley쥐(Grand Island, Nebraska)를 새 환경에 2주 동안 순응 시킨후 본 연구의 실험동물로 사용하였다. *Salmonella enteritidis* lipopolysaccharide B (Difco Laboratories, Detroit, MI) 2mg/kg, 5mg/kg 및 7.5mg/kg를 각각 8마리의 실험동물의 복강내 투여 후 24시간에 각각 희생시켰다. 정상 대조군 8마리는 동량의 식염수를 lipopolysaccharide B대신으로 복강내 주사한 후 24시간에 희생하였다. *Salmonella enteritidis* lipopolysaccharide B 5mg/kg를 각각 8마리의 실험동물 복강내 투여 후 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 및 144시간에 희생하였고, 정상대조군 8마리는 동량의 식염수을 복강내 주사한 후 24시간에 희생하였다. 폐조직을 얻기 위해 실험동물을 희생한 후 폐를 전부 절취하였다. Wet to dry lung 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, Ohio)로 high speed에서 30-60초 동안 균질화후 -70℃의 냉동실에 보관하였다.

2. RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi[24]의 방법으로 총 RNA을 solution D의 균등액으로부터 분리하였다. 즉 Eppendorf tube에 500 $\mu\ell$ 의 solution D에 pH 4.0인 50 $\mu\ell$ 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 $\mu\ell$ 을 가하였다. 교반(vortex)으로 잘 섞은 다음 chloroform과 isoamyl alcohol의 비가 49 : 1인 용액 100 $\mu\ell$ 을 가한 후 다시 교반하였다. Eppendorf tube내 이 혼합물을 15분 동안 얼음에 담근 후 10,000 G의 microcentrifuge로 5분 동안 실온에서 원침하였다. Aqueous phase을 micropipet로 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 가하여 RNA를 침강시켰다. 2시간이상 -20℃에 잠복시킨 후, 10,000G에서 5분동안 원침하였다. 상층액을 가만히 따른후 침전물을 150 μl의 solution D에 녹인 후 -20℃에 하룻밤동안 동량의 isopropanol로 재침전 시켰다. 5분동안 10,000 G로 원심분리 후 침전물을 모은 다음 70% ethanol로 한차례 씻었다. 침전물을 건조한 후 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처치한 1 mM EDTA(pH 8)로 다시 부유액을 만들었다. 분리한 RNA는 spectrophotometry 260 nanometer에서 정량 측정하였다. RNA의 질 (quality)은 ethidium bromide로 염색한 formaldehyde/agarose denaturing gel로 확인하여 붕괴 변질된 시료는 분석대상에서 제외 시켰다.

3. RNA Hybridization Assay

mRNA의 정량을 전체 RNA의 fraction과 β-cytoskeletal actin mRNA와 관련지어 filter hybri-

dization 방법으로 측정하였다. 쥐의 SP-A의 surfactant단백의 complementary DNA (cDNA)에 대한 완전한 coding부위를 Gem 4Z에 각각 subclone 하였다. Anti-sense나 sense 복사체 (transcript)를 SP6 RNA polymerase를 이용하여 얻었다. 복사반응으로부터 산출물은 linealized vector microgram(μg)당 전체 길이가 20-30 μg의 복사체였다.

0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ng의 sense 복사체와 1 μg의 RNA를 65℃에서 10-15분 denature후 3장의 13 mm nitrocellulose filter (0.45 μm in pore size, Schleicher and Schuell, Keene, N.H.)에 10×standard saline citrate (SSC)/50% formaldehyde을 20 $\mu\ell$ 씩 가하였다. Filter들을 80℃에서 2시간 구워낸 후 1 M sodium chloride, 10% dextran sulfate, 50% formamide, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)을 포함하는 prehybridization 용액을 filter당 0.2-0.5 ml양으로 56℃에서 12-14시간 50 ml Falcon centrifuge tube내에서 흔들면서 prehybridization 하였다. Prehybridization 후 4×SSC, 1×Denhardt's solution, 45% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 0.1mg/ml salmon sperm DNA의 용액을 filter당 0.2-0.5 ml 가한 후 특이 활성도가 5×10^6 cpm/ml인 ^{32}P로 표지시킨 쥐의 특이 cDNA probe로 56℃ 에서 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 회귀방정식 (regression equation)을 사용하여 표준곡선 (standard curve)으로 부터 산출하였다.

4. SP-A단백량의 측정

폐의 SP-A단백양의 측정은 정제된 쥐의 SP-A에 대한 토끼에서 제조한 다클론성 항혈청을 이용한 double sandwich ELISA방법으로 측정하였다. 측정한 폐조직을 4 ml의 1% Triton X-100/polytron을 사용한 phosphate-buffered saline(PBS)에 균등화한후 잠시동안 초음파 처리 하였다. Well당 0.1ml의 rabbit anti-rat SP-A IgG fraction(0.1 μg/ml와 0.1 M $NaHCO_3$, pH 9.3)으로 22℃에서 하룻밤동안 담궜다. 항체용액을 제거한 후 30분동안 1% Triton X-100과 3% bovine serum albumin이 포함된 PBS용액에 담근다음 같은 buffer 용액으로 2번 씻었다. 0-20 ng/ml의 정제된 쥐의 SP-A표준희석액 0.1 ml에 1 : 250에서 1 : 1000로 희석된 폐조직 균등희석액을 각 well들에 가한 다음 37℃에서 90분동안 잠복시켰다. Well들은 3% albumin/PBS/1% Triton X-100과 horseradish peroxidase과 접합시킨 rabbit anti-rat SP-A IgG fraction 0.1ml을 각 well에 첨가한 후 37℃에서 90분동안 잠복시켰다. Well들을 1% Triton X-100/PBS로 4차례 씻은 다음 각 well에 0.1 ml의 0.1%(wt/vol) o-phenylenediamine, 0.03%(vol/vol) hydrogen peroxide와 0.1M citrate buffer(pH 4.6)를 첨가하였다. Plate를 22℃에서 10분동안 어두운 곳에서 잠복시켰다. 0.1 ml의 2 M H_2SO_4를 각 well에 가한 후 490 nm에서 microtiter autoreader EL307(Biotech Instruments)로 측정하였다[25].

5. 성적 분석

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

결 과

1. 사망률과 폐손상의 정도

정상대조군의 8마리에서 사망률은 0%이었고, 내독소 2mg/kg, 5mg/kg 및 7.5mg/kg를 투여후 24

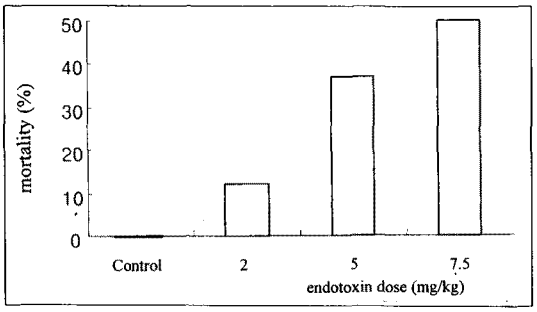

Fig. 1. Mortality rates of rats in 24 hours after endotoxin administration.

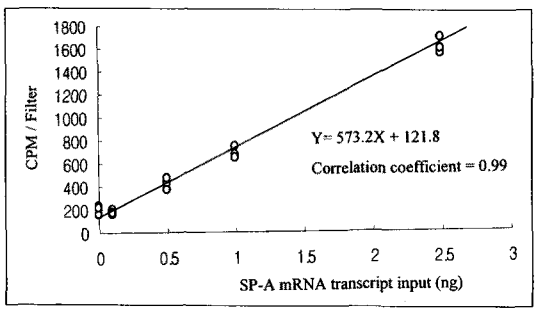

Fig. 2. Standard curve for SP-A mRNA transcript input.

시간에서 사망률은 각각 1/8(12.5%), 3/8(37.5%) 및 4/8(50%)이었다(Fig. 1). Wet to dry weight ratio(WDR)는 정상대조군에 비하여 내독소 2mg/kg, 5mg/kg 및 7.5mg/kg로 처치한군과, 통계학적으로 의의 있는 변화는 없었다. 정상대조군에 비하여 내독소 5mg/kg를 투여 후 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 및 144시간군의 WDR은 통계학적으로 의의 있는 변화는 없었다.

2. SP-A에 대한 sense 복사체의 표준곡선

SP-A의 sense 복사체 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 및 5 ng에 대한 cpm과의 표준곡선 및 상관계수(r)는 다음과 같다. SP-A에 대한 sense 복사체의 표준곡선은 Y=573.2X+121.8 (X=SP-A mRNA 복사체, Y=CPM)이고 상관계수는 0.99 이었다(Fig. 2).

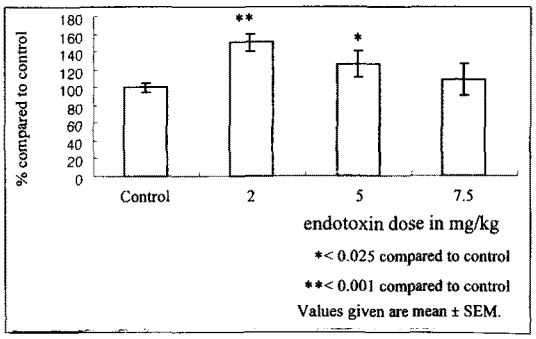

Fig. 3. Dose dependent alteration of SP-A mRNA in 24 hours after endotoxin administration.

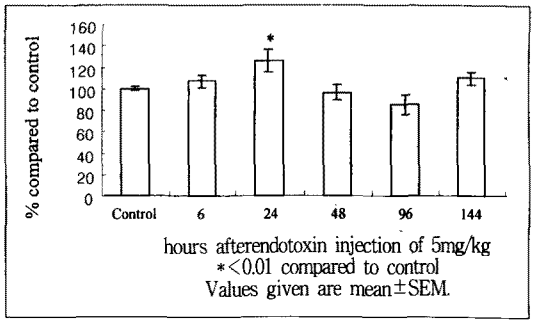

Fig. 4. Time dependent alteration of SP-A mRNA after endotoxin administration.

3. SP-A mRNA의 축적

내독소의 투여양에 따른 SP-A mRNA량은 내독소 2mg/kg와 5mg/kg를 투여후 24시간에서 대조군에 비하여 50.9%, 27.3%가 각각 유의하게 증가하였으나($P<0.001$, $P<0.025$), 7.5mg/kg 투여시는 유의한 증감은 없었다(Fig. 3). 내독소의 작용시간에 따른 SP-A mRNA량은 내독소 5mg/kg를 투여후 24시간에서 대조군에 비하여 26.5%가 유의하게 증가하였다($P<0.01$)(Fig. 4).

β-actin mRNA의 축적은 정상대조군과 각 군간의 의의있는 변화는 없었고, β-actin mRNA의 축적은 일정하였다.

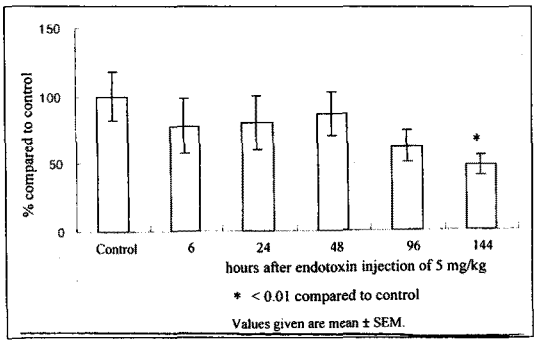

Fig. 5. SP-A content after endotoxin injection.

4. 폐의 총 Surfactant A 단백량

SP-A단백량과 SP-A mRNA사이에 상관관계를 알아보기 위하여 폐의 SP-A단백량의 축적을 측정하였던바, 폐의 SP-A단백량은 다양한 내독소의 양을 투여한후 변화가 없었으나, 폐의 SP-A단백량은 5mg/kg의 내독소투여한후 144시간에 대조군에 비하여 51.4%가 유의하게 감소하였다($P<0.01$)(Fig. 5).

고 찰

내독소에 의해 유발되는 급성 폐손상은 사람과 동물실험에서 ARDS 모델로 잘 확립되어 있다[26,27]. 내독소인 lipopolysaccharide는 CD 18의 표현을 증가시켜 조직 내에 많이 존재하는 대식세포를 활성화시키고 활성화된 대식세포는 많은양의 TNF를 분비한다. TNF는 IL-1과 유사한 cytokine이며, 최염성 물질로 그람 음성균으로 유발된 패혈증에서 발생한 폐손상의 중요한 매개물로 알려져 있다[10-12]. TNF를 폐장내 주입시 내독소에 의하여 유발되는 폐손상과 동일한 병리소견 및 생체 주입시 패혈성 저혈압을 관찰할 수 있으므로 TNF는 폐손상이나 패혈증의 주요 매개물의 하나로 알려져 있다[13]. TNF 투여 12시간후 폐포액내 호중구에서 증가된다고 하며[28], TNF는 호중구와 상호작용하여 모세혈관 투과성과 모세혈관압을 증가시켜 폐부종을 유발한다[29,30]. TNF는 동물실험에서 전신 또는 폐장내 국소적으로 투여하면 기능 및 구조적변화를 가져와 ARDS과 유사한 급성 폐손상을 유발한다[14]. ARDS환자의 혈청 및 기관지폐포세척액에서 TNF의 농도가 증가되며 ARDS의 발생기전에도 중요한 매개물로 알려져 있다[15-17,31]. 이와같이 내독소 투여시 생성되는 TNF는 ARDS의 병인에 중요한 매개물중 하나로 알려져 있다[14,16]. TNF는 고열, 조직에 출혈성 괴사나 대사장애를 유도하고 허혈성 쇽에 빠지게한다[32,33]. TNF분비 후 IL-1, IL-6와 IL-8등이 과량 분비되는데 이들 cytokine은 본래 소량 분비되어서 인체의 면역체계를 적절하게 자극하고 조절하는 것이나 지나치게 많은 양이 분비되면 패혈증 증상이 나타나 개체를 죽음에 이르게 한다. 내독소는 호중구들을 자극하여 유리산소기를 많이 생성하게 하는데 이 물질들이 혈관내피세포를 공격할 수 있기 때문에 출혈이나 미세순환 장애도 유발 할 수 있다.

그람음성균에 대한 적절한 치료가 되지 않아 병원균이 전신을 순환하는 경우 균혈증이 발생하고 그 중 일부에서 패혈증으로 이행되며 일단 증상이 나타나기 시작하면 예후가 매우 나빠서 강력한 항생제의 사용에도 불구하고 죽음에 이르게된다. 이때의 사망원인은 패혈성 쇽이라고 할 수 있는데 사망률이 20-80%에 이른다[34,35]. 이와같이 사망률의 범위가 넓은 것은 정의가 일치되지 못함을 나타내기도 하고 또한 연구된 대상군이 균일하지 못함을 반영하는 것으로 생각된다. 본 연구에서 정상대조군의 사망률은 0%이었고, 내독소 2mg/kg, 5mg/kg 및 7.5mg/kg를 투여후 24시간에서 사망률은 각각 12.5%, 37.5% 및 50%이었다(Fig. 1). 내독소 5mg/kg 및 7.5mg/kg투여후 24시간에서 사망률이 각각 37.5%, 50%에 이른 것은 패혈성 쇽이 원인이라 생각된다. 동물실험에서 S. Tiphimurium 내독소에 의한 폐손상의 심한 정도가 반드시 폐포상피의 심한 정도를 조직학적으로 반영하는 것은 아니라는 보고들도 있어서[36,37] 이러한 내독소양의 증가에 따른 사망률의 증가는 내독소의 양이 증가할수록 폐손상 손상정도가 심하였다는 것을 간접적으로 반영할 수 있다고 생각된다.

본 연구에서 Wet to dry lung weight ratio (WDR)은 내독소로 처치한 군이 정상대조군에 비하여 감소하였으나, 정상대조군과 내독소로 처치군사이에 통계학적으로 의의 있는 변화는 없었다. 이는 폐의 WDR이 폐손상의 지표로 사용되지만[36], WDR의 변화없이도 광학 또는 전자현미경상 폐손상이 발생할 수 있다[38].

전체 RNA에 대한 정상 mRNA의 함량은 sense 복사체를 이용한 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있다 (Fig. 2). 이와는 대조적으로 β-actin mRNA의 축적은 각 군에 있어서 항상 일정하였다. 이와같이 cpm치가 각 filter에 부하된 RNA와 관련하여 직선관계가 성립되고, hybridization이 특이하다면 정상대조군 및 내독소로 처치한 군에서 filter당 cpm을 비교함으로서 상대량을 평가할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 각 nitrocellulose filter는 80 $\mu g/cm^2$량의 RNA와 결합할 수 있다. 본 연구에서 사용한 filter hybridization방법은 Northern blot이나 slot blot보다 소량의 변화에도 민감하고 재현성이 높을 뿐 아니라 방법에 있어서도 용이하다[39].

Surfactant는 폐방어기전에 영향을 미쳐서 염증에 관여되는 많은 매개물들을 적절이 조정하며[40,41], surfactant 단백자체가 중요한 산화방지능이 있고[42], 또한 호기시 폐포밖으로 입자들을 제거하며[43] 특히 SP-A와 대식세포간 상호작용이 적절한 대식세포기능을 유지하는데 중요하다[44]. 이 중 어느하나에 장애가 있게 되면 ARDS의 병인에 중요한 영향을 미친다. ARDS에 있어서 surfactant구성성분 중 표면활성 특성을 갖는 phosphatidylinositol과 phosphatidylethanolamine같은 지질성분 및 surfactant의 유포기능과 폐의 방어기전에 중요한 역할을 하는 surfactant단백의 변화가 초래된다[4,43,45].

Surfactant단백들은 type II pneumocyte기능의 표지자로 이용되고, 염증성 cytokine들에 의하여 조절되며, surfactant단백농도들은 ARDS발생시 감소한다[46,47]. Surfactant단백들은 surfactant의 물리학적 성상의 결정 및 대사조절에 있어서 중요한 역할을 하는데 surfactant 단백 중 SP-A는 당단백이며, 환원형의 분자량은 28-36 kDa 이고, 전체 surfactant 단백의 30-40%를 점한다[48]. SP-A의 기능은 type II pneumocyte로부터 인지질의 흡수를 강화하고 type II pneumocyte로부터 surfactant의 분비를 조절하여 지질교체를 관장하며 tubular myelin구조를 안정시키는 중요한 역할을 한다. SP-A는 surfactant의 신속한 film형성에 있어 필수적인 배수성단백인 SP-B와 SP-C와 상호협동작용을 하여 단층의 표면장력을 감소시켜[49] surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다. SP-A치가 ARDS 환자 및 ARDS으로 발전할 위험성이 큰 환자의 기관지폐포세척액내에서 감소하였다는 보고[45,50,51]가 있고 양수내 저농도의 SP-A수치는 폐의 미성숙 및 ARDS의 발생을 예측할 수 있다 하였다[52,53]. 또한 혈청 SP-A수치를 이용하여 ARDS로 발전할 위험성이 큰 환자를 조기에 확인할 수 있었다[54]. 본 연구의 결과 내독소 투여양에 따른 SP-A mRNA량은 내독소 2mg/kg와 5mg/kg를 투여한후 24시간에 대조군에 비하여 50.9%, 27.3%가 각각 유의하게 증가하였다. 내독소 투여양에 따른 SP-B mRNA 량은 내독소 2mg/kg를 투여후 24시간에서 대조군에 비하여 32.8%가 유의하게 증가한 반면 SP-C mRNA량은 5mg/kg 및 7.5mg/kg를 투여후 24시간에 대조군에 비하여 38.3%, 36.4%가 유의하게 각각 감소하였다는 보고와 비교하면[55], 내독소 양에 따른 SP-A의 유전자발현이 증가하는 특이한 변화를 알 수 있었다. 특히 5mg/kg나 7.5mg/kg같이 많은양의 내독소 투여 후 SP-A mRNA 량의 증가는 폐포의 type II pneumocyte손상으로 인한 감소에 대한 보상으로 SP-A mRNA양이 상향조절되었다고 생각된다. 본 연구에서 내독소 작용시간에 따른 SP-A mRNA량은 5mg/kg의 내독소를 투여후 6시간부터 증가하여 24시간에서 대조군에 비하여 26.5%가 유의하게 증가하였으며, 내독소를 투여후 48시간 및 96시간에 감소하다가 144시간에 다시 증가하였다. SP-A mRNA에 대한 내독소의 효과가 시간경과에 따른 특이한 변화를 알

수 있었으며 이와같은 결과는 type II 세포사망의 경감을 반영한다고 생각된다. ARDS발생의 위험인자를 가진 환자의 76%에서 24시간 이내에 ARDS가 발생되며 72시간후에는 발생할 가능성이 적다는 보고[56,57]가 있는데 본 연구에서 24시간 이내에 SP-A 유전자발현의 유의한 증가가 있었던 결과는 ARDS의 사망률에 가장 중요한 시기인 72시간내 surfactant의 신속한 film형성에 관여하는 배수성단백들의 감소에 대한 보상으로 생각된다[55].

저자의 연구결과 SP-A단백은 다양한 내독소의 양을 투여후 변화가 없었으나, 폐의 총 SP-A단백양은 5mg/kg의 내독소투여후 144시간에 대조군에 비하여 51.4%가 유의하게 감소하였다. 패혈증이나 흡인이 원인이된 ARDS환자에서 12시간내 채취한 혈청 SP-A치가 대조군에 비하여 더 높다는 보고[54]와 ARDS환자에서 72시간에서 기관지폐포세척액내 SP-A치는 대조군에 비하여 감소한다는 보고들[45,47]에 비하여 이와같이 후기에 SP-A단백양의 감소결과는 예기치 않았던 일로 폐의 복원을 의미한다고 추측한다.

이상의 결과는 SP-A mRNA는 대한 내독소의 투여양과 작용시간에 따라 실험동물내 SP-A 유전자의 발현이 특이한 변화를 알 수 있었고 SP-A단백량은 작용시간 후기에 감소가 있었다. 이러한 특이한 SP-A유전자의 발현양상과 SP-A단백양의 감소가 기능적인 면에서 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 더 연구 할 과제라고 생각된다.

요 약

연구배경 :

ARDS에 있어서 surfactant의 역할은 복합적이지만 표면장력의 이상이 ARDS의 병태생리에 부분적으로 기여하여 폐탄성의 감소와 환기와 관류사이의 균형을 악화시킨다. SP-A는 surfactant의 분비, 합성 및 재순환에 있어 중요한 역할을 한다. 따라서 ARDS의 주요원인이 되는 내독소가 SP-A에 영향을 미쳐 ARDS로 발전에 기여할 가능성이 높아, 이에 저자들은 ARDS의 중요한 매개물의 하나인 내독소를 실험동물의 복강내 투여후 내독소의 투여양과 작용시간에 따라 SP-A 유전자와 총 SP-A단백량이 어떻게 발현하는지를 관찰하기 위하여 이 연구를 시행하였다.

방 법 :

저자들은 내독소를 백서에 투여후 SP-A의 유전자 발현양상을 filter hybridization방법으로, 총 SP-A단백량을 double sandwich ELISA방법으로 각각 검색하고 내독소의 투여양과 작용시간에 따라 SP-A의 실험동물내 유전자 발현과 총 SP-A단백량에 대한 내독소의 효과를 관찰하였다.

결 과 :

1) 내독소 투여량에 따른 SP-A mRNA량은 내독소 2mg/kg 및 5mg/kg를 투여한후 24시간에 대조군에 비하여 50.9%, 27.3%가 각각 유의하게 증가하였다($P<0.001$, $P<0.025$).

2) 내독소 작용시간에 따른 SP-A mRNA량은 내독소 5mg/kg를 투여후 24시간에 대조군에 비하여 26.5%가 유의하게 증가하였다($P<0.01$).

3) 폐의 SP-A단백량은 5mg/kg의 내독소투여후 144시간에 대조군에 비하여 51.4%가 유의하게 감소하였다($P<0.01$).

결 론 :

이상의 결과는 SP-A mRNA는 내독소의 투여양과 작용시간에 따른 실험동물내 SP-A 유전자의 발현 및 SP-A단백량의 변화가 특이하다는것을 알 수 있다. 이러한 특이한 SP-A유전자의 발현양상과 SP-A단백량의 감소가 기능적인 면에서 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 더 연구 할 과제라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. Lancet 1967;2:319-23.
2. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, et al. Adult respiratory dis-

tress syndrome : risk with common predispositions. Ann Intern Med 1983;98:593-7.
3. Hudson LD, Steinberg KP. Epidemiology of acute lung injury and ARDS. Chest 1999;116:74S-82S.
4. Steinberg KP. Surfactant therapy in the adult respiratory distress syndrome. Respir Care 1993; 38:365-72.
5. Rinaldo JE, Rogers RM. Adult respiratory distress syndrome : changing concepts of lung injury and repair. N Engl J Med 1982;306:900-9.
6. Shale DJ. The adult respiratory distress syndrome : 20 years on. Thorax 1987;42:641-5.
7. Petty TL.Acute respiratory distress syndrome: where did we start and where are we now? Sem Respir Crit Care Med 1994;15:243-9.
8. Hanley ME, Repine JE : Pathogenetic aspects of the adult respiratory distress syndrome. Sem Respir Crit Care Med 1994;15:260-70.
9. Brigham KL, Begley CJ, Bernard GR, Hutchison AA, Lord JE, Lucht WD, et al. Septicemia and lung injury. Clin Lab Med 1983;3:719-44.
10. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N Engl J Med 1988;318:1481-6.
11. 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.
12. 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.
13. Thomas R, Luke U, Waston R. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. Am J Pathol 1991;138:1485-95.
14. Ferrari-Baliviera E, Mealy K, Smith RJ, Wilmore DW. Tumor necrosis factor induces adult respiratory distress syndrome in rats. Arch Surg 1989;124:1400-5.
15. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, et al. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock;Mortality rate, incidence of adult respiratory distress syndrome and effects of methylprednisolone administration. Am Rev Respir Dis 1990;141:94 -7.
16. Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA, Fowler AA. Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1991;144:268-71.
17. Parsons PE, Moore FA, Moore EE, Iklé DN, Henson PM, Worthen GS. Studies on the role of tumor necrosis factor in adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1992;146:694-700.
18. Colletti LM, Remick DG, Burtch DG, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA. Role of TNF in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion in the rat. J Clin Invest 1990; 85:1936-43.
19. MacIntyre NR. Surfactant and adult respiratory distress syndrome. Semin Respir Crit Care Med 1995;16:47-52.
20. Sragg RG. Chapter 17. Abnormalities of lung surfactant function in patients with acute lung injury. In : Adult respiratory distress syndrome. 1st ed. Basel : Marcel Dekker, INC.;1991. p.381-95.
21. Petty TL, Reiss OK, Paul GW, Silvers GW, Elkins ND. Charateristics of pulmonary surfac-

tant in adult respiratory distress syndrome associated with trauma and shock. Am Rev Respir Dis 1977;115:531-6.

22. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence for lung surfactant abnormality in respiratory failure. J Clin Invest 1982;70: 673-83.
23. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald W, et al. High dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. N Engl J Med 1987;317:1565-70.
24. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.
25. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985;150:76-85.
26. Gordon T. Dose-dependent pulmonary effects of inhaled endotoxin in guinea pig. Environ Res 1992;52:117-25.
27. Sandstrom T, Bjermer L, Rylander R. Lipopolysaccharide(LPS)inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. Eur Respir J 1992;5:992-6.
28. Ulich TR, Watson LR, Yin S, Guo K, Wang P, Thang H, et al. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines ; Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS, IL-1, and TNF-induced inflammatory infiltrate. Am J Pathol 1991;138:1485-96.
29. Wedmore CV, Williams TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature 1981;289:646-50.
30. Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, Johnson A. Mechanisms of pulmonary edema induced by tumor necrosis factor-α Circ Res 1990;67:68-77.
31. Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema : comparison to septic acute lung injury. Am Rev Respir Dis 1988;137:1364-70.
32. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. Science 1985;229:869-71.
33. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. J Exp Med 169:333-338, 1989
34. 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.
35. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. Chest 1991;99:169-75.
36. Chang SW, Fedderson CO, Henson PM, Voelkel NF . Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. J Clin Invest 1987;79:1498-509.
37. Chang SW, Westcott JY, Pickett WC, Murphy RC, Voelkel NF. Endotoxin-induced lung injury in rats : role of eicosanoids. J Appl Physiol 1989; 66:2407-18.
38. Cunningham AL, Hurley JV. Alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary oedema in the rat : a topographical and electron-microscope study. J Pathol 1972;106:25-35.
39. Margaret LM, Anderson, Young BD. Chapter 4. Quantitative filter hybridization. In : Nucleic acid

hybridization. 1st ed. Oxford : ILR Press;1985. p. 73-110.

40. Ansfield MJ, Kaltreider H, Benson BJ, Shalaby MR. Canine surface active material and pulmonary lymphocyte function : studies with mixed-lymphocyte culture. Exp Lung Res 1980;1:3-11.
41. Sitrin RG, Ansfield MJ, Kaltreider HB. The effect of pulmonary surface active material on the generation and expression of murine B- and T-lymphocyte effector functions in vivo. Exp Lung Res 1985;9:85-97.
42. Ghio AJ, Young SL, Piantadosi CA. Synthetic surfactant diminishes oxidant generation in vitro. (Abst.) Am Rev Respir Dis 1993;147:A362.
43. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 1993;147:218-33.
44. van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defence mechanism of rat alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 1990;2:91-8.
45. 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: 176-184.
46. Wispé JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman R, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. J Clin Invest 1990;86:1954-60.
47. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler III AA, et al.: Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. J Clin Invest 1991;88:1976-81.
48. 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.
49. Yu SH, Possmayer F. Reconstitution of surfactant activity by using the 6 kDa apoprotein associated with pulmonary surfactant. Biochem J 1986;236:85-9.
50. Greene KE, Wright JR, Wong WB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, et al. Serial SP-A levels in BAL and serum of patients with ARDS (abstract). Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:A587.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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
55. 김연수, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수: 내독소가 surfactant protein B와 C의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한내과학회지 2001;90:in press

56. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of adult respiratory distress syndrome. Am J Surg 1982; 144:124-30.
57. 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.