

## Interleukin-1으로 유도된 흰쥐 급성폐손상에서 neutrophil elastase 억제제인 ICI 200,355의 효과

영남대학교 의과대학 내과학교실  
정진홍 · 문영철 · 박혜정 · 신경철 · 이관호

Effect of Neutrophil Elastase Inhibitor, ICI 200,355,  
on Interleukin-1 Induced Acute Lung Injury in Rats

Jin Hong Chung, Yeung Chul Mun, Hye Jung Park, Kyeong Cheol Shin, Kwan Ho Lee

*Department of Internal Medicine  
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

### —Abstract—

**Background:** Interleukin-1(IL-1) and neutrophil appear to contribute to the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome(ARDS). Elastase, as well as reactive oxygen species released from activated neutrophil, are thought to play pivotal roles in the experimental models of acute lung leak. This study investigated whether ICI 200,355, a synthetic elastase inhibitor, can attenuate acute lung injury induced by IL-1 in rats.

**Materials and Methods:** We intratracheally instilled either saline or IL-1 with and without treatment of ICI 200,355 in rats. Lung lavage neutrophils, lung lavage cytokine-induced neutrophil chemoattractant(CINC) concentration, lung lavage protein concentration, lung myeloperoxidase(MPO) activity and lung leak index were measured at 5 hours of intratracheal treatment.

**Results:** In rats given IL-1 intratracheally, lung lavage neutrophils, lung lavage CINC concentration, lung lavage protein concentration, lung MPO activity and lung leak index were higher. Intratracheal ICI 200,355 administration decreased lung lavage neutrophils, lung MPO activity and lung leak index, respectively, but did not decrease lung lavage CINC

concentration.

**Conclusion:** These results suggest that ICI 200,355 decreases lung inflammation and leak without decreasing lung lavage CINC concentration in rats given IL-1 intratracheally.

**Key Words:** Acute lung injury, Interleukin-1, Elastase, ICI 200,355

## 서 론

급성폐손상(acute lung injury)은 다양한 원인으로 초래되는 폐의 염증 및 투과성증가로 임상적, 방사선학적, 생리학적 이상을 나타내는 증후군이며, 이 중 성인형호흡곤란증후군(adult respiratory distress syndrome, ARDS)은 급성폐손상 중 가장 심각한 질환이다(Bernard 등, 1994). Ashbaugh 등(1967)이 인공호흡보조치료를 받던 272명 중에 임상양상 및 병태생리학적 변화, 병리조직학적 변화가 신생아의 호흡곤란증후군과 매우 비슷한 12명의 ARDS환자들을 처음 보고한 이래, 수많은 연구논문들이 발표되었으나 아직도 ARDS의 정의 및 발병기전에 대해서도 논란이 많다. 또한 인공호흡보조기술 등의 보전요법기술이 많이 발전하였음에도 불구하고 ARDS의 사망률은 50-70%에 달하고 있는 실정이다.

ARDS를 초래하는 급성폐손상의 발병기전은 아직도 명확히 밝혀지지 못하였으나 여러 종류의 세포와 매개체 그리고 여러 가지의 체액성 요소들이 복잡하게 얽혀 폐의 혈관내피세포와 폐포상피세포의 손상을 일으켜 폐포 모세혈관막의 투과성 증가로 인한 비심인성 폐부종으로 알려져 있다. 특히 proinflammatory cytokine 인 interleukin(IL)-1과 호중구는 급성폐손상의 발병기전에 핵심적으로 관여한다고 보고되었고, 활성화된 호중구에서 유리되는 단백분해효

소(elastase)에 의한 조직손상은 단백유출을 일으켜 급성폐손상의 발병에 아주 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(장준, 1994; Repine, 1992).

최근 elastase에 대한 억제제들이 몇 종류가 개발되었으며, 이 합성 elastase 억제제들은 동물실험에서 폐의 염증성 손상을 감소시킨 것으로 보고되고 있다(Herbert 등, 1992; Ahn 등, 1993; Gossage 등, 1993; Kubo 등, 1994; Sakamaki 등, 1996; Nishina 등, 1997; Ahn 등, 1998). 그 중 ICI 200,355는 human leukocyte elastase의 선택적이고 강력한 억제제로 보고되고 있다. 본 연구는 급성폐손상의 치료를 위한 ICI 200,355의 적용가능성을 검증하기 위하여 IL-1을 흰쥐의 기도내로 주입하여 유발된 급성폐손상 모델에서 ICI 200,355의 투여가 폐의 염증 및 단백유출에 미치는 영향을 조사하였다.

## 대상 및 방법

### (1) 실험대상 및 재료

실험동물은 Sprague-Dawley종의 평균체중이 300-350 g인 수컷 흰쥐를 5 마리씩 세 군으로 나누었다. I 군은 생리식염수를 기도내로 주입하고 생리식염수를 복강내로 투여하였고, II 군은 IL-1을 기도내로 주입하고 생리식염수로 복강내로 투여하였으며, III 군은 IL-1을 기도내로 주입하고 ICI 200,355를 복강내로 투여

Table 1. The effects of ICI 200,355 on interleukin-1 induced acute lung injury in rats

Variables	Group I (Saline+Saline)	Group II (IL-1+Saline)	Group III (IL-1+ICI 200,355)
Lung lavage neutrophil ( $\times 10^6/ml$ )	0.002 $\pm$ 0.001	6.276 $\pm$ 0.142*	3.082 $\pm$ 0.110 <sup>†</sup>
Lung lavage CINC (ng/ml)	0.166 $\pm$ 0.017	1.026 $\pm$ 0.031*	1.008 $\pm$ 0.040
Lung lavage protein (mg/ml)	0.078 $\pm$ 0.004	2.094 $\pm$ 0.022*	1.150 $\pm$ 0.025 <sup>†</sup>
MPO activity (u/g lung)	2.496 $\pm$ 0.022	21.344 $\pm$ 0.297*	8.668 $\pm$ 0.219 <sup>†</sup>
Lung leak index	0.082 $\pm$ 0.003	0.169 $\pm$ 0.003*	0.091 $\pm$ 0.003 <sup>†</sup>

Values are means  $\pm$  SE.

\* P<0.05 for Group I versus Group II. <sup>†</sup>P<0.05 for Group II versus Group III.

하였다. IL-1 및 ICI 200,355는 각각 R & D system사와 Zeneca 제약회사로부터 구입하였다.

## (2) 실험 방법

흰쥐를 methoxyflurane 흡입으로 마취시킨 후, Teflon catheter를 기도에 삽입하고 IL-1 50 ng을 생리식염수 0.5 ml에 섞어 기도로 빨리 주입하였다. 이어서 ICI 200,355 250  $\mu$ g을 생리식염수 1 ml에 섞어 복강내로 투여하였다. Placebo로 사용한 생리식염수는 위와 같은 방법으로 기도와 복강내로 각각 투여하였다.

5시간이 경과한 후 흰쥐를 다시 마취시켜 기도로 삽관을 삽입하고 생리식염수 6.0 ml를 폐내로 서서히 주입하여 다시 회수하는 폐세척을 시행하였다. 회수된 세척액에서 호중구수, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) 농도 그리고 단백량을 측정하였다. 그리고 개흉술로 얻은 폐조직에서 호중구의 침윤 정도를 알기 위해서 폐조직내 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 측정하였다.

폐모세혈관의 단백유출의 정도를 측정하기 위해서 lung leak index를 구하였다. Lung leak index는 I-125 bovine serum albumin 0.1  $\mu$ Ci를 대퇴정맥에 주사하여 30분이 경과후 우측폐내 I-125의 분당 측정량과 1 ml의 혈중내 I-125의 분당 측정량의 비율로 나타내었다.

## (3) 통계처리

모든 성적은 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 실험군간의 통계적 유의성은 ANOVA test로 검정하여 p<0.05을 통계적으로 유의하다고 인정하였다.

## 결 과

I 군, II 군 및 III 군에서의 폐세척액의 호중구수, CINC 농도 및 단백질치, 폐조직내 MPO 활성도 그리고 lung leak index는 표 1에 나타내었다.

### (1) IL-1에 의한 급성폐손상

IL-1을 기도내로 주입한 II 군에서 생리식염수를 기도내로 주입한 I 군보다 폐세척액의 호중구수, CINC 농도 및 단백질치, 폐조직내 MPO 활성화도 그리고 lung leak index 등 모든 측도에서 유의하게 증가되었다( $p < 0.05$ ).

(2) 급성폐손상에 대한 ICI 200,355의 영향  
ICI 200,355를 복강내로 투여한 III 군에서는 생리식염수를 투여한 II 군 보다 폐세척액의 호중구수 및 단백질치, 폐조직내 MPO 활성화도, lung leak index가 유의하게 감소되었으나( $p < 0.05$ ) 폐세척액의 CINC 농도는 감소되지 않았다.

## 고 찰

급성폐손상의 발병에는 생물학, 생화학, 생리학적인 기전이 다양하게 관여하며, 특히 proinflammatory cytokine인 IL-1과 호중구는 급성폐손상의 발병기전에 아주 중요한 역할을 한다. 활성화된 호중구에서 유리되는 elastase는 폐의 혈관내피세포와 폐포상피세포의 손상을 일으켜 폐포 모세혈관막의 투과성 증가로 인한 급성폐손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(장준, 1994; Repine, 1992).

동물실험에서 급성폐손상시 폐세척액과 폐조직에서 IL-1의 농도 및 호중구수의 증가는 이미 보고되었으며, IL-1의 폐내 국소적인 상승이 폐내 활성화된 호중구의 유입을 조장시킨다고 보고되었다(Jacobs 등, 1989; Guidot 등, 1994; Leff 등, 1994; Koh 등, 1995; Hybertson 등, 1996; Hybertson 등, 1997; Lee 등, 1997). 본 실험에서도 IL-1을 기도로 주입하였을 때, 폐세척액의 호중구수가 증가된 소견을 보였으

며 폐조직의 호중구침윤정도를 나타내는 폐조직내 MPO활성도도 증가되었다. 본 실험에서 폐세척액에서 호중구주성 cytokine인 CINC 농도가 증가된 소견이 보여 폐세척액 및 폐조직의 호중구증가에는 IL-1에 유도된 CINC으로 인한 호중구유입이 어느 정도 기여한다고 생각한다. 본 실험에서 폐세척액의 단백질치 및 lung leak index 역시 증가되어 IL-1의 기도주입시 급성폐손상을 일으켰다.

급성폐손상의 치료에 여러 가지 치료들이 시도되는 데도 불구하고 ARDS의 사망률은 여전히 감소되지 않고 20년전이나 유사하다. 장차 급성폐손상의 치료는 호흡보조치료의 개발 등 더 나은 지지요법, 잘 고안된 임상실험, ARDS의 조기진단, 발병기전에 관여하는 매개체의 차단요법 등에 초점이 맞추어지고 있다. 급성폐손상의 발생기전에 근거하는 치료법으로 corticosteroid, prostaglandin E1, cyclooxygenase 억제제, 활성화산소기 제거제 등이 동물실험에서 좋은 성적을 보고하고 있으며, elastase 억제제도 이러한 치료법의 일환으로 최근에 합성제제가 개발되어 급성폐손상의 치료에 대한 연구가 시작되고 있다(박성수, 1994).

급성폐손상이 진행중일 때에는 기관지폐포세척액 및 혈장내에서 elastase와 같은 자유효소들이 발견되고 있고 이와같은 자유효소들은 폐조직손상과 부종을 더 조장시킨다. ARDS에서 수반되는 과도한 elastase 유리와 동시에 alpha-1 protease 억제제의 산화불활성현상은 조절할 수 없는 단백질분해현상을 초래한다. 특히 elastase 억제제는 급성폐손상의 발병에 중요한 역할을 하는 호중구에서 유리되는 단백질분해효소억제제로, 최근 합성개발되어 ARDS의 예방과 치료에 있어서 새로운 장을 열 것으로 생각한다.

Human neutrophil elastase (HNE)는 220 아미노산 당단백으로 호중구내 primary azurophilic 과립내에 존재한다. HNE는 용해성 단백질 및 비용해성 단백을 파괴하는 단백질분해효소의 작용뿐만 아니라 비세포독성효과를 가져 호흡기계 질환을 일으킬 수 있다. 한편 탈과립되어 유리된 HNE는 alpha1-proteinase inhibitor, alpha2-macroglobulin 등과 같은 고유의 proteinase 억제제에 의해서 불활성화된다. 반면, 급성폐손상과 같은 호중구가 많이 침착되는 병적인 상태에서는 고유의 proteinase 억제제는 호중구에서 유리되는 superoxide에 의해 불활성화되어 그 역할을 하지 못하며, 분자량이 커서 elastase가 작용하는 폐포 혈관내피세포까지 도달하지 못한다. 그러므로 급성폐손상의 치료에서 elastase의 작용을 단절하기 위해서는 분자량이 적고, 산화반응에 저항력이 있으며, 항원성이 약한 합성 elastase 억제제에 대한 개발이 요구되고 있다(정진홍, 2000; Vender, 1996).

현재까지 개발되어 사용중인 합성 elastase 억제제는 ICI 200,355, SR-26831, SC-37698, SC-39026 그리고 ONO-5046 등이 있다(Herbert 등, 1992; Ahn 등, 1993; Gossage 등, 1993; Kubo 등, 1994; Sakamaki 등, 1996; Nishina 등, 1997; Ahn 등, 1998). ICI 200,355는 미국 Zeneca 제약회사에서 개발된 분자량 731 Da의 합성물질로, Ahn 등(1993)은 thrombin으로 유도된 폐부종 흰쥐에서 폐포 미세혈관 투과성을 감소시킨다고 보고하였다. Ahn 등(1998)은 동일 모델에서 폐부종을 감소시킬 수 있는 ICI 200,355의 적정용량을 관찰한 바, 20, 200, 그리고 2000 µg/kg의 용량에서 폐부종 감소효과는 있었으며 그 효과는 차이가 없었다고 보고하였다. ONO-5046은 일본 Ono 제약회사에서 개발

된 분자량 549 Da의 합성물질로 Kubo 등(1994)이 내독소에 의해 유발된 급성폐손상 양에서 그 효과를 보고한 이래 최근까지도 급성폐손상에서의 효과에 대해서 연구가 진행되고 있다. Nishina 등(1997)의 연구결과에 의하면, 내독소에 유발된 급성폐손상 토끼에서 ONO-5046을 전처치했을 때 혈중 산소분압의 상승, wet/dry weight ratio의 감소, 폐세척액내 호중구수, 단백질농도 및 interleukin-8 농도의 감소를 관찰할 수 있었다. 그러므로 elastase 억제제는 폐포손상에 의한 폐부종을 감소시킬 뿐만 아니라 interleukin-8 같은 chemokine의 분비도 억제하여 호중구의 유입을 막을 수 있다.

본 실험에서는 급성폐손상 모델에 ICI 200,355를 복강내로 투여시 폐세척액의 호중구수 및 단백질량치, 폐조직내 MPO 활성도, lung leak index가 유의하게 감소되었으나 폐세척액의 CINC 농도는 감소되지 않았다. 이 결과는 elastase 억제제인 ICI 200,355의 투여로 폐세척액과 폐조직의 호중구수를 감소시키고 단백질 유출도 감소시켜 급성폐손상을 억제할 수 있을 것으로 생각한다. 폐세척액의 CINC 농도가 감소되지 않은 것을 보아 이미 IL-1에 유도된 CINC는 ICI 200,355에 영향을 받지 않는 것으로 생각한다.

## 요 약

Proinflammatory cytokine인 IL-1과 호중구는 급성폐손상의 발병기전에 관여한다고 알려져 있다. IL-1을 기도내로 주입시 호중구의 폐침윤이 일어나며, 활성화된 호중구에서 분비된 단백질분해효소인 elastase는 급성폐손상을 일으킨다. 최근 elastase에 대한 억제제들이 몇 종

류 개발되었는데, 이들 합성 elastase 억제제들은 동물실험에서 폐의 염증성 손상을 감소시켰다고 보고되고 있다. 그 중 ICI 200,355는 human leukocyte elastase의 선택적이고 강력한 억제제로 보고되고 있어, 본 연구에서는 IL-1을 기도내로 주입하여 유발된 급성폐손상 흰쥐의 모델에서 ICI 200,355를 투여했을 때 폐의 염증과 단백유출을 감소시켜 급성폐손상의 치료에 도움이 되는지 알아보려고 하였다.

실험대상은 흰쥐로 하였고, 이들을 무작위로 세 군으로 나누었다. 1군은 생리식염수를 기도내로 주입하고 생리식염수를 복강내로 투여하였고, 2 군은 IL-1을 기도내로 주입하고 생리식염수로 복강내로 투여하였으며, 3 군은 IL-1을 기도내로 주입하고 ICI 200,355를 복강내로 투여하였다. 5시간이 경과한 후 흰쥐에서 폐세척을 시행하여 회수된 세척액에서 호중구수, cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) 농도 그리고 단백량을 측정하였다. 그리고 개흉술로 얻은 폐조직에서 호중구의 침윤정도를 알아보기 위해서 폐조직내 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 측정하였다. 한편 폐모세혈관의 단백유출의 정도를 측정하기 위해서 lung leak index를 구하였다.

그 결과로 IL-1을 기도내로 주입한 군은 폐세척액의 호중구수, CINC 농도 및 단백질치, 폐조직내 MPO 활성도 그리고 lung leak index 등 모든 측도에서 유의하게 증가되었다. 급성폐손상모델에 ICI 200,355를 복강내로 투여한 군에서 폐세척액의 호중구수 및 단백질치, 폐조직내 MPO 활성도, lung leak index가 유의하게 감소되었으나 폐세척액의 CINC 농도는 감소되지 않았다.

결론적으로 IL-1의 기도내 주입으로 유발된

급성폐손상 모델에서 neutrophil elastase 억제제인 ICI 200,355의 투여로 이미 증가된 CINC 농도에는 변화없이 폐의 염증과 단백유출을 감소시켜 급성폐손상을 억제시키는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 박성수: 성인성 호흡곤란 증후군의 치료. 대한내과학회지 46(suppl II): 206-215, 1994.
- 장준: 성인성 호흡곤란 증후군의 병태생리. 대한내과학회지 46(suppl II): 198-205, 1994.
- 정진홍: 급성폐손상에서 elastase inhibitor와 antioxidants의 효과. 대한중환자의학회지 15: 11-15, 2000.
- Ahn CM, Sandler H, Glass M, Saldeen T: Effect of a synthetic leukocyte elastase inhibitor on thrombin-induced pulmonary edema in the rat. *Exp Lung Res* 19: 125-135, 1993.
- Ahn CM, Sandler H, Saldeen T: A leukocyte elastase inhibitor reduces thrombin-induced pulmonary oedema in the rat: mechanism of action. *Pulmonary PA leukocyte elastase inhibitor reduces thrombin-induced pulmonary oedema in the rat: mechanisms of action. Pulm Pharmacol Ther* 11: 291-299, 1998.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323, 1967.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, et al.: The American-European consensus con-

- ference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994.
- Gossage JR, Kuratomi Y, Davidson JM, Lefferts PL, Snapper JR: Neutrophil elastase inhibitor, SC-37698 and SC-39026, reduce endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. *Am Rev Respir Dis* 147: 1371-1379, 1993.
- Guidot DM, Stevens EE, Repine MJ, Lucca-Broco AE, Repine JE: Intratracheal but not intravascular interleukin-1 causes acute edematous injury in isolated neutrophil-perfused rat lungs through an oxygen radical mediated mechanism. *J Lab Clin Med* 123: 605-609, 1994.
- Herbert JM, Frehel D, Rosso MD, Seban E, Castet C, Pepin O, Maffrand JP, et al.: Biochemical and pharmacological activities of SR 26831, a potent and selective elastase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 809-816, 1992.
- Hybertson BM, Jepson EK, Clarke JH, Spelts RJ, Repine JE: Interleukin-1 stimulates rapid release of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in rat lungs. *Inflammation* 20: 471-483, 1996.
- Hybertson BM, Bursten SL, Leff JA, Lee YM, Jepson EK, Dewitt CR, Zagorski J, et al.: Lisofylline prevents leak, but not neutrophil accumulation, in lungs of rats given IL-1 intratracheally. *J Appl Physiol* 82: 226-232, 1997.
- Jacobs RF, Tabor DR, Burks AW, Campbell GD: Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 140(6): 1686-1692, 1989.
- Koh Y, Hybertson BM, Jepson EK, Cho OJ, Repine JE: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant is necessary for interleukin-1-induced lung leak in rats. *J Appl Physiol* 79: 472-478, 1995.
- Kubo K, Kobayashi T, Hayano T, Koizumi T, Honda T, Sekiguchi M, Sakai A: Effect of ONO-5046, a specific neutrophil elastase inhibitor, on endotoxin-induced lung injury in sheep. *J Appl Physiol* 77: 1330-1340, 1994.
- Lee YM, Hybertson BM, Terada LS, Repine AJ, Cho HG, Repine JE: Mepacrine decreases lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1624-1628, 1997.
- Leff JA, Baer JW, Bodman ME, Kirkman JM, Shanley PF, Patton LM, Beehler JM, et al.: Interleukin-1-induced lung neutrophil accumulation and oxygen metabolite-mediated lung leak in rats. *Am J Physiol* 266: L2-L8, 1994.
- Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Maekawa N, Shiga M, Obara H: ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Anesth Analg* 84: 1097-1103, 1997.
- Repine JE: Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 339:

- 466-469, 1992.
- Sakamaki F, Ishizaka A, Urano T, Sayama K, Nakamura H, Terashima T, Waki Y, et al.: Effect of a specific neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046, on endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 391-397, 1996.
- Vender RL: Therapeutic potential of neutrophil-elastase inhibition in pulmonary disease. *J Investig Med* 44: 531-539, 1996.
-