

단백분해제가 내독소 혈증시 폐장에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 병리학교실

조창호 · 손윤경 ·곽정식 · 손태중

= Abstract =

The Effects of Proteolytic Agent on the Lung Injured by Endotoxemia

Chang Ho Cho, M.D., Yoon Kyung Sohn, M.D., Jyung Sik Kwak, M.D. and Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine

The authors studied the lung injury induced by endotoxemia and the effects of proteolytic agent on the lung changed by endotoxemia. Sprague-Dawley rats were intraperitoneally administrated with a single dose of endotoxin (4 mg/kg, E. coli 025 : B6 lipopolysaccharide) or with endotoxin and gabexate mesilate (200 mg/kg), a proteolytic agent, concomitantly. Rats of each group were scarified at 9, 18, and 27 hours after injection. Light and electron microscopic examination were done. The results obtained were summarized as follows:

Light microscopic exmination revealed congested capillaries and neutrophilic infiltration in both groups. Electron microscopic findings were interstitial and alveolar neutrophilic infiltration, endothelial swelling with increased pinocytotic vesicles and cytoplasmic process formation, and interstitial edema. Decrease of osmiophilic bodies in the type II pneumocytes had appeared at 9 hours after endotoxin injection. These changes were increased in severity at 18 hours and 27 hours after endotoxin injection.

In the group of concomitant treatment of gabexate mesilate and endotoxin, there was no edema at 9 hours after injection. After 18 hours swelling of endothelial cell and interstitial edema had appeared. However, the severity of the edema was markedly decreased. Type II pneumocytes showed well preserved osmiophilic bodies.

According to these results, it is considered that administration of gabexate mesilate can significantly redeced the lung injury induced by endotoxemia.

Key Words : Endotoxemia, Lung, Gabexate mesilate

서 론

그람음성균에 의한 패혈증은 각종 전신장애를 유발

접 수 : 1990년 11월 27일, 게재승인 : 1991년 2월 19일
주 소 : 대구시 중구 삼덕동 2가 335, 우편번호 700-412
경북대학교 의과대학 병리학교실, 조 창 호

하여 환자에게 치명적인 손상을 입히게 된다. 최근들어 그 발생율과 이로 인한 사망율이 증가하고 있는데 이는 평균수명의 증가와 항생제의 사용으로 억제내성이 생긴 균의 증가 및 원내술식등으로 인한 의원성 감염등의 요소가 관련되었을 것으로 생각된다¹⁻⁴. 그람음성균에 의한 패혈증은 균체의 세포벽에 존재하는 지질 다당류인 내독소에 의해 일어난다는 것은 이미 잘 알

려져 있다⁶. 내독소는 1889년 Pfeiffer가 처음으로 기술한 이래 생화학적, 면역학적 및 분자생물학적 수기의 개발에 의해 그 성분과 작용기전에 대해 많이 밝혀지게 되었다⁶. Morrison과 Ulevitch⁶가 내독소의 생물학적 작용에 관한 지금까지의 연구들을 종합한 바에 의하면 내독소는 응고기전 및 보체계의 활성화에 의한 액체매개계(humoral mediator system)와 비만세포, 호염기구, 호중구, 혈소판, 단핵구, 대식세포, 내피세포 및 림프구 등의 세포매개계(cellular mediator system)에 모두 작용함으로써 개체의 방어기전을 작동시킬 뿐만 아니라 그 개체에도 상해를 주는 양면성을 나타낸다. 특히 이런 세포매개계의 여러 염증세포로부터 유리된 각종 화학매개인자들은 상호작용에 의해 연쇄적인 반응을 일으킨다. 이런 기전의 결과 폐, 심, 신, 간 등의 주요 장기의 기능부전을 초래할 수 있으며 심하면 개체의 생명에 치명적인 결과를 초래하기도 한다⁷. 이 중에서 폐는 속 상태에서 가장 손상받기 쉬운 장기이기 때문에 내독소혈증시 폐의 손상이 문제시 되고 있다.

내독소혈증시 폐의 손상에 관한 연구는 Vaughan 등⁸이 폐의 부종, 출혈, 미소혈전형성, 내피세포의 변성, 폐포세포의 괴사 및 백혈구 출현 등이 일어남을 보고 한바 있고 Harrison 등⁹이 내독소에 의해 폐포모세혈관의 투과성 및 백혈구 미세구조의 변화에 대해 보고한 바 있다. 이후 내독소 혈증시 폐의 손상에 관한 많은 연구가 있었다¹⁰⁻¹⁷. 이들을 요약하면 내독소가 직접 내피세포에 손상을 주어 내피세포의 부종 및 탈락을 초래하며¹³ 호중구나 내피세포간의 친화력을 증가시켜 혈관내벽에 부착된 호중구의 활성화로 과산화기(superoxide radical)가 방출되어 내피세포가 손상을 받게 된다⁷. 한편으로 내독소나 단백질분해효소들이 보체계를 활성화시켜 호중구의 활성화를 초래하며 활성화된 호중구가 각종 화학매개체를 분비함으로써 내피세포의 손상을 초래함은 물론 내피세포의 투과력도 증가시킨다^{13,14}. 이런 일련의 과정의 결과 폐장의 간질조직의 부종이 일어나고 폐부종이 야기되어 급성 호흡부전이 일어나게 된다. 이러한 관점에서 볼 때 강력한 투과성 항진인자인 kinin계는 물론 보체계 및 단백질분해효소의 작용을 억제한다면 내독소혈증으로 인한 폐상태를 어느정도 완화시킬 수 있으리라 예상 된다.

저자들은 kinin, 보체 및 단백질분해효소를 광범위하

게 파괴하는 것으로 알려진 gabexate mesilate를 내독소와 함께 실험동물에 투여하여 내독소에 의한 폐상태에 미치는 단백질분해효소의 효과를 전자현미경적으로 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험 동물은 체중 250 gm 정도의 Sprague-Dawley 종수컷 흰쥐들을 일정 기간 사육하여 건강이 양호하다고 인정되는 30마리를 골라 실험에 사용하였다. 내독소는 E. coli O26:B6, lipopolysaccharide(미국, Sigma사)를 사용하였으며 단백질분해제로서 gabexate mesilate(일본, Ono사, [Ethyl-4-(6-guanidino hexanoyl-oxy) benzoate] methan sulfonate)를 사용하였다.

2. 방법

대조군은 생리식염수 0.5ml를 대퇴정맥으로 투여한 후 24시간 뒤에 관찰한 군과 gabexate mesilate를 생리식염수에 50mg/ml로 녹여 200mg/kg을 복강내 투여한 후 24시간 뒤에 관찰한 군으로 나누었다.

실험군은 생리식염수에 내독소를 10mg/ml로 녹여 4mg/kg를 대퇴정맥으로 투여한 내독소 단독 투여군과 gabexate mesilate를 대조군에서와 같이 복강내에 투여한 직후 동량의 내독소를 대퇴정맥으로 투여한 gabexate mesilate 및 내독소 병합투여군으로 나누어 시행하였다.

각각의 실험군은 내독소 투여 후 9시간, 18시간 및 27시간 후에 sodium pentothal 50mg/kg를 복강내 주입하여 마취한 후 흉강을 개방하고 양쪽 폐를 채취하여 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하였다.

광학현미경 재료는 10% 중성 formalin에 고정하고 paraffin에 포매한 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 관찰하였다.

전자현미경 재료는 조직을 1mm³의 크기로 자른 후 2.5% glutaraldehyde(0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 0-4°C)에 2시간 동안 전고정하였고 1% OsO₄(0.1M phosphate buffer, 실온)에 2시간 동안 후고정을 한 후 계열 ethanol로 탈수하고, propylene oxide로 치환한 후 Luft방법¹⁸에 따라 epon 혼합물에 포매

하였다. 포매된 조직은 $1\mu\text{m}$ 의 두께로 박절하여 alkaline toluidine blue 염색을 하여 관찰 부위를 결정 한 후 Porter-Blum MT-2B 초박절기에 Dupont diamond knife를 사용하여 $40\sim 60\text{nm}$ 로 초박절하여 Reynold 방법¹⁹⁾에 따라 lead citrate와 uranyl acetate로 이중 전자염색을 하여 Jeol JEM 100-CX 전자 현미경으로 가속전압 80 kV 에서 관찰하였다.

성 적

1. 광학현미경적 소견

대조군 즉 생리식염수 투여군과 gabexate mesilate 투여군의 폐는 동맥 및 정맥에 약간의 울혈이 일어났고 폐포내에는 대식세포와 림프구가 간혹 있었으나 부종이나 염증세포 침윤은 없었다. 실험군으로서 내독소 단독 투여군에서는 투여 9시간 후에 동맥 및 정맥의 울혈과 모세혈관의 확장 및 울혈이 있었다. 내독소 투여 18시간 뒤에는 울혈이 더 심해졌고 부종이 있었으며 간질 조직 및 폐포내 호중구의 침윤이 있었고, 24시간 뒤에도 상기한 변화가 지속되었다. 내독소와

gabexate mesilate 병합 투여군에서도 내독소 투여군과 비슷한 소견이 관찰되었다. 즉 9시간 후에는 울혈이 심하였고 18시간 뒤에는 호중구가 간질 및 폐포에 침윤되었으나 부종은 내독소 단독 투여군보다 경한 편이었다. 이러한 소견은 27시간까지도 지속되었다.

2. 전자현미경적 소견

대조군으로서 생리식염수 투여군에서 폐포모세혈관은 대체로 둘레의 반이상이 폐포강내로 돌출되어 있었으며 폐포강 쪽으로는 I형 폐포세포가 막처럼 얇게 덮혀 있었다. 그리고 II형 폐포세포와 폐포대식세포가 간혹 분포되었는데 II형 폐포세포는 표면에 많은 미용모 모양의 돌기가 있었고 세포질내에는 osmiophilic body가 풍부하였다. 대식세포는 세포질이 많고 그 안에 미토콘드리아와 리소좀이 많았다. 이들 세포의 기저부에는 균일한 두께의 기저막이 있었다. 모세혈관 내강 쪽으로는 내피세포가 막처럼 얇게 덮혀있었다. 내피세포의 세포질에는 많은 수의 pinocytotic vesicle이 있었으며 세포 소기관은 핵부근의 세포질에 주로 분포되었다. 폐포의 간질조직은 섬유세포와 교원섬

KEY FOR ABBREVIATIONS

EN: Endothelial cell

Neu: Neutrophil

In: Interstitial space

PII: Type II Pneumocyte

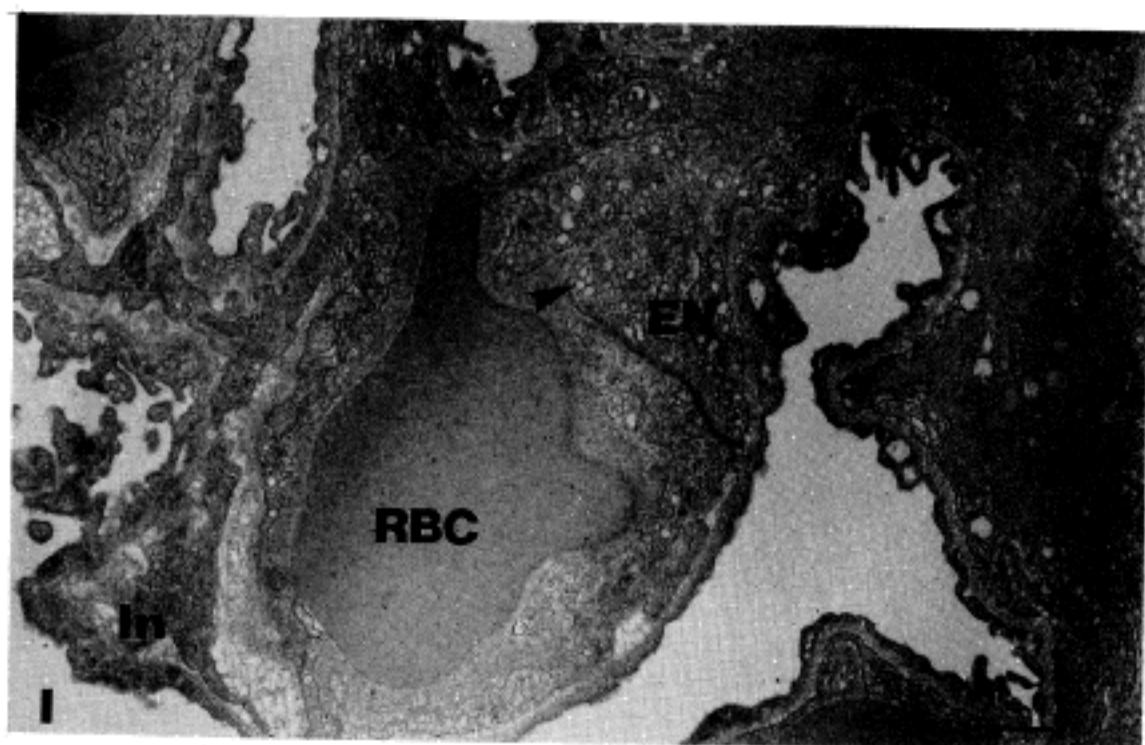


Fig. 1. Electron micrograph of the lung, 9 hours after injection of endotoxin (ET), rat. Endothelial cell swelling and interstitial edema are seen. Pinocytotic vesicles (arrow) are increased. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = $1\mu\text{m}$

유, 소량의 탄력섬유로 형성되었고 소량의 무정형 과립성의 기질물질이 있었다. 또한 gabexate mesilate 를 투여한 대조군의 폐조직 미세구조도 생리식염수 투여군과 비슷하였다.

실험군으로서 내독소 투여군에서는 투여 9시간의 소견으로 모세혈관의 확장, 혈관내 호중구 및 림프구의 침윤이 있었다. 또한 폐포 모세혈관내에 혈소판이 증가되어 있었다. 모세혈관 내피세포는 심한 종창을 나타내었다(Fig. 1). 간질조직에서도 부종이 나타났으며 간혹 호중구가 침윤되어 있었다. I형 폐포세포는 종창이 있었고 II형 폐포세포에서는 osmiophilic body 수가 감소되어 있었다. 폐포강내에는 다수의 myelin fi-

gure가 있었고 대식세포와 파괴된 세포잔해가 있었다. 내독소 투여 18시간 후에는 모세혈관 확장이 현저하였고 다수의 호중구들이 혈관을 폐쇄시킨 곳도 있었다(Fig. 2와 3). 내피세포는 심한 종창을 나타내었고 부분적으로 기저막에서 탈락되었다. 세포질 내에 pinocytotic vesicle이 증가되었고 표면에 불규칙적인 돌기가 있었다. 또한 간질조직의 부종이 뚜렷하였으며 호중구가 침윤되었다. II형 폐포세포는 osmiophilic body의 수가 현저히 감소하였다. 폐포강내에는 파괴된 osmiophilic body로 생각되는 구조물이 다수 분포하였다(Fig. 4). 내독소 투여 27시간 후에는 간질조직의 부종, 내피세포의 종창, II형 폐포세포내에서의

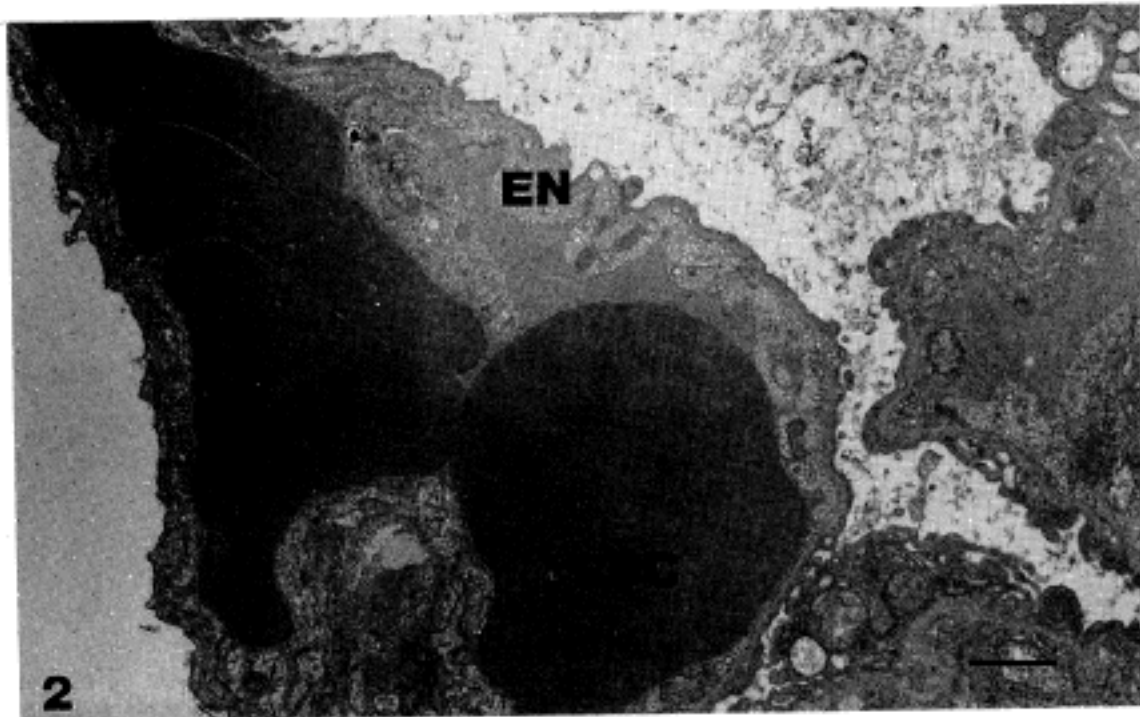


Fig. 2. Lung, 18 hours after injectoin of ET, rat. Severe capillary dilatation with congestion and endothelial swelling is present. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 μ m



Fig. 3. Lung, 18 hours after injection of ET, rat. Neutrophils are increased in the cpillary lumen and endothelial swelling is present. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 μ m

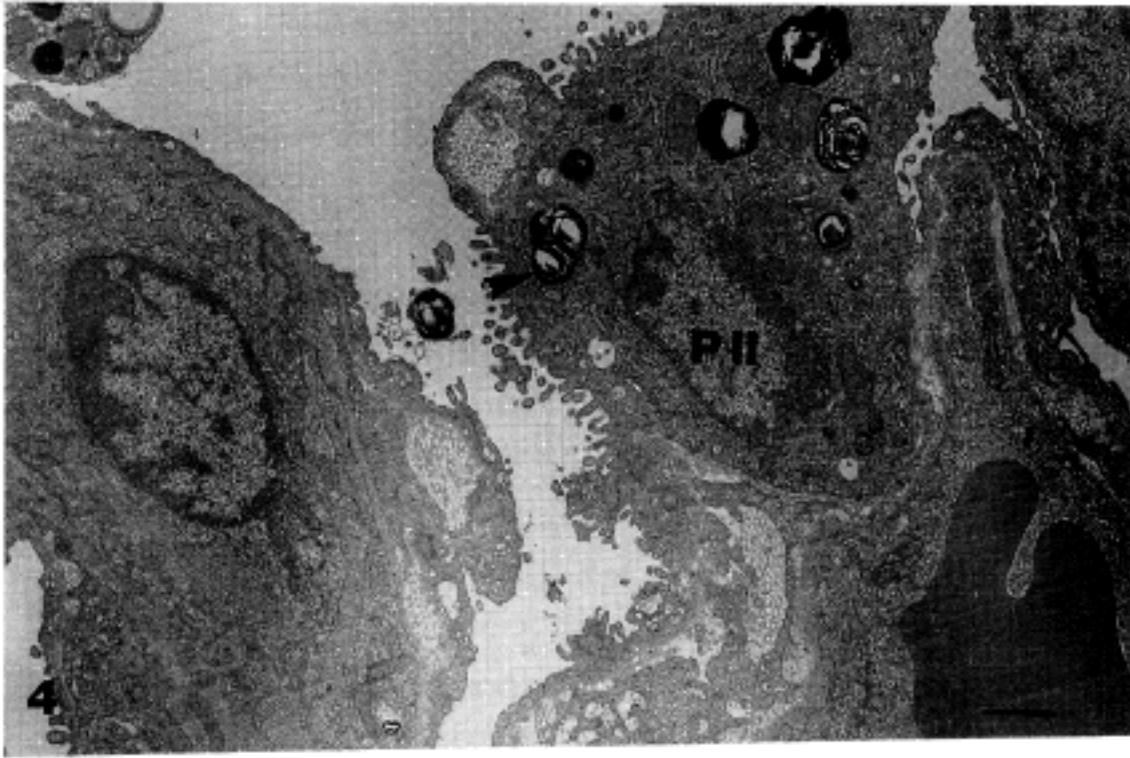


Fig. 4. Lung, 18 hours after injection of ET, rat. The type II pneumocyte shows decrease of osmiophilic bodies(arrow). Endothelial swelling is persisted. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 μ m

Fig. 5. Lung, 18 hours after gabexate mesilate and ET injection, rat. Endothelial and interstitial edema are absent. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 μ m

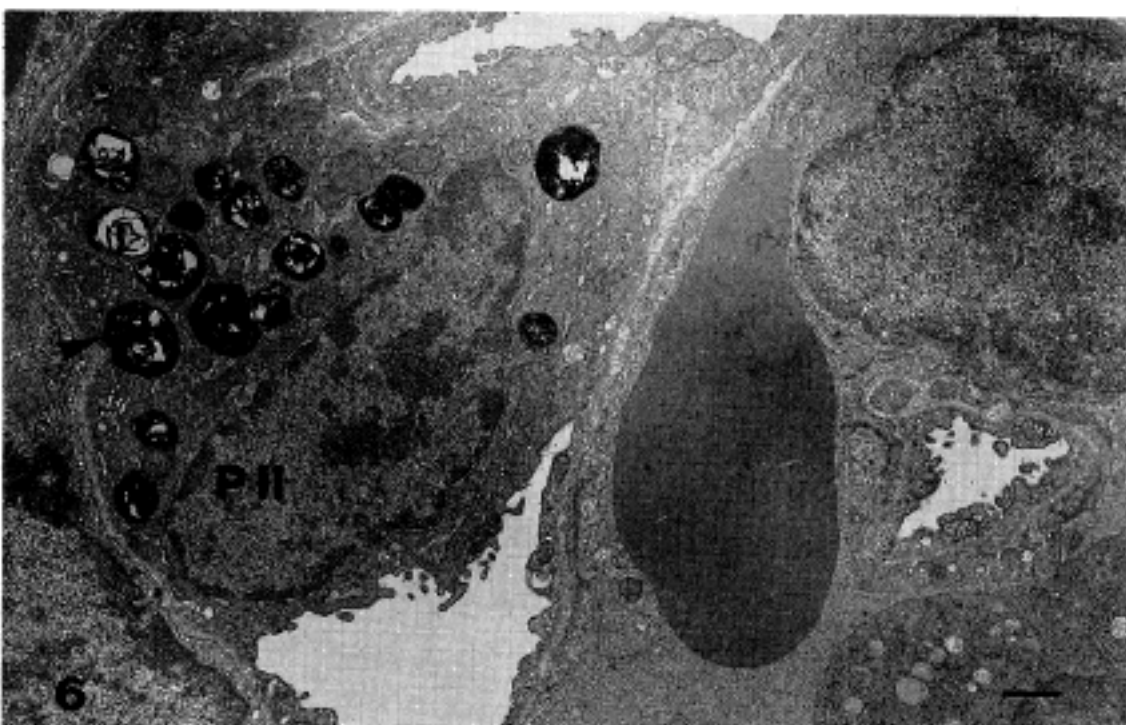
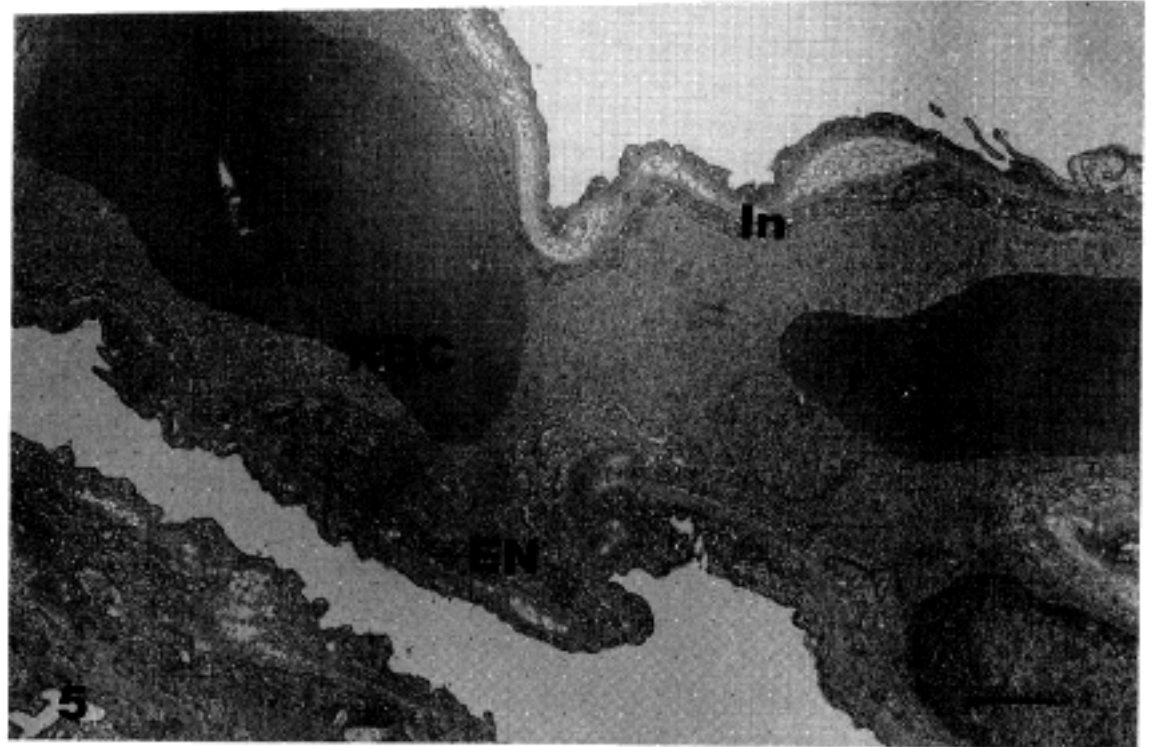


Fig. 6. Lung, 27 hours after gabexate mesilate and ET injection, rat. Type II pneumocyte shows well preserved osmiophilic bodies. Notable interstitial edema is absent. Uranyl acetate and lead citrate. Bar = 1 μ m

osmiophilic body의 감소 등 18시간 군에서의 소견들이 지속되었다.

내독소와 gabexate mesilate 병합 투여군에서는 투여 후 9시간군에서 혈관의 확장과 호중구의 증가가 있었으며 내피세포의 세포질은 많은 돌기를 형성하고 있었다. I형 및 II형 폐포세포는 잘 보존되어 있었다. 내독소 단독 투여군에 비해 간질조직이나 내피세포의 종창은 거의 없었으며 폐포강내에 간혹 적혈구가 있었다. gabexate mesilate와 내독소 병합 투여 후 18시간에서는 모세혈관내 호중구의 출현, 내피세포의 종창 및 돌기형성, 간질조직의 부종이 일어났으나 내독소 단독 투여군에 비하여 현저히 감소되었다(Fig. 5). gabexate mesilate 병합 투여 후 27시간 소견도 18시간 군에서 보이던 소견과 유사하였으나 내피세포 및 간질조직의 부종은 경미하였다(Fig. 6).

고 찰

내독소혈증시 폐상해 기전에 관여하는 것으로 알려진 호중구의 증가 및 보체계, kinin계, 혈액응고계의 활성화에 대해서는 많은 연구가 있어왔다. 이를 요약하면 내독소 투여시 직접 보체계의 alternate pathway를 활성화시키고 항내독소 항체형성으로 classic pathway가 활성화된다¹⁹. 그 결과 혈관투과성 항진제인 C3a와 C5a가 형성되어 혈관투과성이 항진된다. 또한 C5a는 주화성 인자로 작용하여 호중구를 불러 모으게 된다. 이들 호중구의 활성화에 의해 과산화기와 각종 단백을 분해할 수 있는 중성 및 산성의 단백분해효소가 방출된다. 이 과산화기와 단백분해효소는 내피세포를 비롯하여 폐포의 구조를 형성하는 단백을 파괴한다²⁰. 또한 파괴된 내피세포가 kinin계를 활성화시켜 지속적인 투과항진이 일어난다. 한편 단백분해효소나 kinin계의 kallikrein이 hageman factor를 활성화시켜 혈액응고를 유발한다²¹. 이런 일련의 상호작용 결과 진행성이고도 지속적인 투과성 항진과 함께 폐부종을 초래하게 되며 동시에 내피세포의 손상으로 인한 허혈성 장애, 혈액응고계의 활성화로 인한 과중성 혈관내 용고증등으로 폐손상을 초래하게 된다. 본 연구는 내독소를 투여한 뒤 kinin계, 보체계 및 단백분해효소억제제²²인 gabexate mesilate를 투여하여 내독소 혈증시 액체매개계의 활성을 억제시킨 효과를 알아보고

자 시행하였다.

본 연구의 결과는 내독소 투여 후 폐포모세혈관 내피세포의 종창과 탈락, II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소, 간질의 부종 및 호중구와 대식세포의 간질 및 폐포내 침윤이 특징이었고 내독소와 gabexate mesilate 병합투여군에서 이와 같은 변화는 볼 수 있었으나 그 정도는 현저히 감소되었다. 이와 같은 성격으로 미루어 보아 내독소 혈증시 초기 폐 손상의 형태학적 특징은 내피세포의 부종과 II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소가 주된 변화이며 내피세포의 손상 및 화학매개체로 인한 혈관투과성 항진의 결과 일어난 간질의 부종을 들 수 있다. 또한 II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소는 II형 폐포세포내에서의 합성의 저하이거나 폐포강내 myelin figure의 존재로 미루어 보아 세포밖으로의 과다분비를 시사한다. 그러나 이런 소견들이 II형 폐포세포의 직접적인 손상의 증거인지는 본 실험으로 확인할 수 없다. 한편 I형 폐포세포의 변화는 거의 관찰되지 않았던 바 I형 폐포세포는 내독소 혈증시 폐의 초기 상해에서 주된 손상을 받는 것은 아니라고 생각된다.

Gabexate mesilate와 내독소 병합투여군에서는 내피세포의 부종, 간질의 부종 및 II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소는 경하였으며 호중구의 침윤은 일어났다. 따라서 gabexate mesilate는 호중구의 침윤은 막을 수 없었으나 내독소에 의해 활성화된 kinin계, 보체계 및 각종 단백 분해효소의 작용을 억제함으로써 내독소에 의한 폐장의 변화 나아가서 속폐의 진행을 억제시키거나 완화하는데 그 효과가 인정된다. Yokoi²³도 gabexate mesilate와 내독소를 병합투여하여 horseradish peroxidase의 확산정도를 폐장에서 검색한 결과 내독소 단독투여군 보다 gabexate mesilate 병합투여군에서 그 확산정도가 감소되었음을 관찰한 바 있다. 그러나 Yokoi²³와 본 실험의 결과를 보면 내독소로 인한 폐부종을 완전히 방지할 수 없었다. 이는 gabexate mesilate의 상용량으로는 더 이상의 폐부종을 막을 수 없다는 가능성과 내독소에 의해 폐실질에 침윤된 호중구로부터 방출되는 다량의 과산화기에 의해 내피세포의 손상이 초래되는 기전을 제거하지 않고는 폐부종을 근본적으로 막을 수 없을 것이라는 점을 고려하지 않을 수 없다. 따라서 gabexate mesilate와 함께 유리기 흡수제를 같이 투

여한다면 내독소에 의한 폐상해를 상당히 완화시킬 수 있으리라 기대된다.

결 론

내독소에 의한 폐상해에 단백질분해제가 미치는 영향을 규명하기 위해 Sprague-Dawley계 흰쥐에 내독소(4mg/kg) 단독 및 단백질분해제인 gabexate mesilate(200mg/kg)를 병용투여하여 9, 18 및 27시간 후에 광학 및 전자현미경 검색을 실시하였던 바 그 소견은 다음과 같다.

광학현미경 소견은 내독소 단독투여군 및 단백질분해제와 내독소 병합투여군 모두 모세혈관의 울혈 및 확장과 호중구의 침윤이 있었다. 전자현미경 소견으로는 내독소만 투여한 군에서 9시간 뒤에 호중구의 출현, 내피세포의 종창과 pinocytotic vesicle의 증가 및 세포돌기 형성이 있었고 간질의 부종과 II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소가 나타났다. 이러한 소견은 18시간 뒤에 더욱더 현저하게 나타났으며 27시간 뒤에도 지속되었다. 그러나 gabexate mesilate를 병합투여한 군에서는 9시간 뒤에는 울혈이 있었고 18시간 뒤에 호중구의 침윤과 내피세포 및 간질조직에 부종이 나타났으나 부종의 정도는 내독소 단독투여군에 비해 경하였으며 II형 폐포세포의 osmiophilic body의 감소는 없었다. 이상의 성적에 의하면 gabexate mesilate 투여는 내독소 혈중시 폐상해를 완화시키는데 효과가 있다고 인정된다.

참 고 문 헌

- 1) Finland M: Changing ecology of bacterial infection as related to antibacterial therapy. *J Infect Dis* 122: 419-431, 1970
- 2) Simmons HE, Stolley PD: This is medical progress; Trends and consequences of antibiotic use in the United States. *JAMA* 227: 1023-1028, 1974
- 3) Myerowitz RA, Medeiros AA, O'Brien TF: Recent experience with bacillemia due to gram negative organisms. *J Infect Dis* 124: 239-246, 1971
- 4) McCabe WR, Jackson GG: Gram negative bacillemia. I. Etiology and ecology. *Arch Int Med* 110: 847-855, 1962-935, 1954
- 5) Elin RJ, Wolff SM: Bacterial endotoxins. In the *Textbook of microbiology*, Ed. by Laskin AI, Lechevalier HA, Cleveland, CRC, 1973, 215-239
- 6) Morrison DC, Ulevitch RJ: The effects of bacterial endotoxins on the host mediation system. A review. *Am J Pathol* 93: 526-617, 1978
- 7) McMenamy RH, Birkhan R, Oswald G: Multiple systems organ failure: the basal state. *J Trauma* 21: 99-114, 1981
- 8) Vaughan DL, Gunter CH, Stookey JL: Endotoxin shock in primates. *Surg Gynecol Obstet* 126: 1309-1317, 1968
- 9) Harrison LH, Beller JJ, Hinshaw LB, Coalson JJ, Greenfield LJ: Effect of endotoxin on pulmonary capillary permeability, ultrastructure, and surfactant. *Surg Gynecol Obstet* 129: 723-733, 1969
- 10) Nies AS, Forsyth RP, Williams HE, Melmon KL: Contribution of kinins to endotoxin shock in unanesthetized rhesus monkeys. *Cir Res* 22: 155-164, 1968
- 11) Stewart GJ, Anderson MT: An ultrastructural study of endotoxin induced damage in rabbit mesenteric arteries. *Br J Exp Pathol* 52: 75-80, 1971
- 12) Pietra GG, Szidon JP, Carpenter HA, Fishman AP: Bronchial venular leakage during endotoxin shock. *Am J Pathol* 77: 387-406, 1974
- 13) Meyrick BO, Ryan US, Brigham KL: Direct effects of *E. coli* endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. *Am J Pathol* 122: 140-151, 1986
- 14) Jones R, Kerton OC, Zapol WM, Reid L: Rat pulmonary artery wall injury by chronic intermittent infusion of *Escherichia coli* endotoxin. *Lab Invest* 54: 282-294, 1986
- 15) Winn R, Maunder R, Chi E, Harlan J: Neutrophil depression does not prevent lung edema after endotoxin infusion in goat. *J Appl Physiol* 62: 116-121, 1987
- 16) Meyrick BO: Endotoxin mediated pulmonary endothelial cell injury. *Fed Proc* 45: 19-24, 1986
- 17) Worthen GS, Smedly LA, Rees AJ, Gunbay RS, Henson JE, Henson PM: Lung vascular injury induced by chemotactic factor: Enhancement by bacterial endotoxin. *Fed Proc* 45: 7-12, 1986
- 18) Luft JH: Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414, 1961
- 19) Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J*

Cell Biol 17 : 208-212, 1963

20) Renaldo JE, Rogers RM: *Adult respiratory distress syndrome, changing concept of lung injury and repair. N Engl J Med* 306 : 900-906, 1982

21) Kaplan A, Meirs HL, Mendle R Jr: *The Hageman factor dependent pathways of coagulation fibrinolysis and kinin regeneration, Semin*

Throm Haemos # : 1-12, 1976

22) Muramata M, Fujii S: *Inhibitory effect of w-guanidinoacid esters on trypsin, plasmin, plasma kallikrein and thrombin. Biochem Biophys Acta* 268 : 221-224, 1972

23) Yokoi K: *Personal communication.*