

내독소로 자극된 당뇨 쥐에서 단백분해효소와 그 억제제 발현

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 임상의학연구소
서기현, 최재성, 나주옥, 어수택, 김용훈, 박춘식

Expression of Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 after Administration of Endotoxin in Diabetic Rats

Ki Hyun Seo, M.D., Jae Sung Choi, M.D., Joo Ok Na, M.D., Soo Taek Uh, M.D., Yong Hoon Kim, M.D.,
Choon Sik Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University College of Medicine, Clinical Research institute, Cheonan, Korea

Background: An acute lung injury(ALI) is characterized by the recruitment, activation, and apoptosis of inflammatory cells, numerous products released by inflammatory cells such as reactive oxygen species, inflammatory mediators, and a variety of proteolytic enzymes. It was reported that bacterial infections in diabetics showed impaired PMN functions such as reduced PMN respiratory burst and decreased microbicidal activity in inflamed tissue. However, the effect of the proteinase - inhibitor (MMP-9 vs TIMP-1) in ALI in diabetics is unclear. This study evaluated the differences in the expression of MMP-9 and TIMP-1 after the stimulation of endotoxin in a rat model.

Methods: Six-week-old male Sprague-Dawley rats were classified into normal, DM, LPS and DM+LPS groups. The peripheral blood, BAL fluids, and lung tissues were obtained from individual rats. The MMP-9 activity was measured by gelatin zymography and the TIMP-1 level was measured by Western blotting.

Results: The total BAL cells of the DM+LPS groups were significantly lower than the LPS groups ($p < 0.01$). The MMP-9 activities in the serum were higher in the DM+LPS groups than in the other groups. The MMP-9 activities in the BAL fluids were significantly higher in the DM+LPS group than in the normal and diabetic rats ($p < 0.05$). TIMP-1 expressions in the BAL fluids were significantly lower in the DM+LPS group than other groups ($p < 0.05$). The ratio between MMP-9 and TIMP-1 in the BAL fluids was significantly higher in the DM+LPS groups ($p < 0.05$).

Conclusion: In ALI in diabetics the higher MMP-9 activity and lower TIMP-1 level are believed to prolonged and intensify the course of inflammation. (*Tuberc Respir Dis 2006; 61: 256-264*)

Keywords: MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1), LPS (lipopolysaccharide), Diabetes.

서 론

폐혈증으로 인한 급성폐손상은 혈관내피세포와 폐상피세포, 세포외 기질의 변화로 인해 폐포-모세혈관 장벽 투과성이 증가하고 그로 인해 폐부종과 저산소혈증을 동반하는 질환으로^{1,2} 염증 세포의 모집과 활성화, 특히 중성구의 화학 주성과 활성화로 인한 부산물인 사이토카인, 활성산소, 기질단백분해효소 (matrix

metalloproteinase)가 폐손상에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³⁻⁹. 기질단백분해효소는 아연과 칼슘-의존 엔도펩티다제 (endopeptidase)의 일종으로 MMP-1, MMP-2 (gelatinase A), MMP-3 및 MMP-9 (gelatinase B) 등으로 구분되고 결체 조직들의 여러 구성 성분을 분해한다⁷. 주로 중성구와 대식세포에서 분비되고 일부는 2형 폐 상피세포, 섬유아세포, 혈관내피세포에서 분비된다고 알려져 있으며¹⁰ 성장기 골수 내에서 중성구가 MMP-9을 합성하여 과립 내에 저장되어 있다가 어떤 자극이 들어오면 단독인 형태나 lipocalin과의 공유결합을 통해 배출되어 중성구 표면에 결합된다고 한다¹¹. 배출된 MMP-9은 기저막의 주요 성분인 젤라틴 (gelatin)과 교원질을 분해하며 염증 반응 시 염증 세포들, 특히 중성구의 이동과 침윤을 촉진시키고^{8,9,12} 혈관내피성장인자 (vascular

Address for correspondence: **Yong Hoon Kim, M.D.**
Department of Internal Medicine, Soonchunhyang
University Hospital, 23-20, BongMyung-Dong, Cheonan,
330-721, Korea.
Phone: 041-570-2124 Fax: 041-574-5762
E-mail: welkim@schch.co.kr
Received : Apr. 24. 2006
Accepted : Sep. 4. 2006

endothelial growth factor) 분비를 통해 신생혈관재생에도 관여한다고 알려져 있다¹¹. 실제로 MMP-9은 천식, 만성폐쇄성 폐질환, 폐섬유화증, 급성폐손상 등에서 조직이나 기관지폐포세척액에서 증가되는 것이 확인되었고 각종 염증세포의 침윤과 기도 내 개형에 관계된다고 알려졌다. 또한 MMP-9의 작용은 생체 내에서 분비되는 억제제인 TIMP-1(Tissue inhibitor of metalloproteinase-1)에 의해 억제될 수 있고 조직의 재생이나 개형에 결정적인 역할을 한다고 하였다. 따라서 기존의 연구에서처럼¹³ MMP-9의 활성과 그 억제제인 TIMP-1의 비를 비교하는 것이 중요하다고 하겠다.

당뇨에서는 Klebsiella, E.coli, Acinetobacter 같은 그람 음성균이나 황색포도상구균 같은 치사율이 높은 균에 감염될 가능성이 높으며, 인플루엔자에 감염시 비 당뇨 환자에 비해 폐렴으로 진행하기 쉬운 것으로 알려져 있다¹⁴. 특히 폐렴연쇄구균의 경우에는 폐혈증에 빠지기 쉬운 위험인자 중의 하나이며 그로 인하여 급성호흡부전증으로 진행할 가능성이 높다¹⁵. 또한 당뇨는 부폐렴성 흉수 또는 농흉으로 발전할 수 있는 가장 높은 위험인자이다. 이 경우 Klebsiella 같은 그람 음성균이 주 원인균으로 농흉 환자에서 22%의 높은 사망률을 보였다¹⁶. 또한 폐결핵의 경우 다제 내성 폐결핵이 발생할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다¹⁷. 즉 당뇨 환자는 폐 감염증이 있을 경우 그에 수반하는 합병증의 발생빈도가 높고 질환의 정도가 심한 것으로 인식되어 왔다. 감염증 외에도 폐장 내 탄성 반동의 조기 파괴로 인해 기도폐쇄가 일반인에 비해 빠르게 진행되며, 폐 미세혈관병증으로 인해 폐 확산능 감소로 운동능력이 감소한다고 알려져 있다¹⁸. 특히 당뇨를 동반한 COPD 환자나 천식환자에서 폐포 내 leukotriene B4를 포함한 염증성 매개물이 당뇨를 동반하지 않은 환자보다 증가되어 있어서 염증성 질환이 합병될 때 일반 환자보다 더 심한 손상을 받을 수 있는 바탕구조를 가지고 있는 것으로 밝혀져 있다¹⁹. 이처럼 당뇨에서 중증 폐렴으로의 높은 이환률과 이로 인한 사망률의 증가는¹⁴⁻¹⁷ 중성구의 기능 장애가 중요한 기전으로 알려져 있다¹⁸⁻²⁰. 즉 중성구의 화학주

성, 부착력, 포식 작용의 기능 이상과 또한 중성구가 분비하는 활성 산화기의 기능이상, 살균 능의 저하를 가져온다고 현재까지 밝혀져 있다²¹⁻²⁴. 당뇨에서 기질단백분해효소에 대한 연구로 Dandona 등²⁵은 비만증을 가진 비당뇨 일반인에게 당을 주입한 결과 혈청 내 MMP-9과 혈관내피성장인자가 증가하며 인슐린 투여 시 2~4시간에 걸쳐 80%이상이 감소함을 관찰하여 고농도의 당이 기질단백효소 대사에 영향을 미치는 것을 증명하였고, 고농도의 당에서는 세포외 간질의 균형을 깨는 신호전달 체계가 이루어진다는 연구 결과가 있었다²⁶.

이상의 연구 결과들을 토대로 중증 감염을 유발하는 당뇨에서 급성폐손상은 더욱 심해질 것으로 예상할 수 있는데 이의 기전으로 기질단백분해효소가 깊이 관여할 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 급성폐손상 모델에서 중성구로 인해 증가된 기질단백분해효소 대한 변화를 당뇨에서 관찰한 연구는 매우 드문 실정이다. 이에 저자는 정상과 당뇨 쥐를 내독소로 자극하여 유발된 급성폐손상에서 폐장 내 기질단백분해효소의 변화를 알고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

생후 6주된 수컷 SD (Sprague-Dawley) 쥐를 구입하여 몸무게가 평균 250 g 될 때까지 키우고 각각 10 마리씩 정상군, 당뇨군, 내독소군, 당뇨-내독소군으로 나누었다.

2. 연구 방법

1) 당뇨, 급성 폐 손상 쥐 모델 제작

정상군은 미주 정맥을 통해 생리식염수 0.3 ml을 투여하고 24시간 후 희생시켰다. 당뇨군은 streptozotocin 60 mg/kg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 citrate buffer solution pH 4.8, 2.5 ml/kg을 복강 내로 투입하였고 3-5일 후 혈당이 300 mg% 이상이 되는 것을 확인하고서 희생시켰다. 급성폐손상, 즉

내독소균은 미주정맥을 통해 내독소인 lipopoly-saccharide (LPS) (E. coli Serotype 055:B5;Sigma Chemical Co.)을 5 mg/kg 투여하고 24시간 후 희생시켰다. 당뇨-내독소균은 우선 당뇨를 만들고 내독소를 미주정맥 내 투여한 지 24 시간 후 희생시켰다.

2) 검체의 채취 및 처리

① 혈액 채취 및 혈청 분리

Penthotal sodium을 미주 정맥 내 70 mg/kg을 주입 후 희생시키고 실험대에 고정된 상태에서 복부의 중앙선을 따라 절개하여 우심방에서 혈액을 3 - 5 ml 가량 수거하였다. 수거된 혈액을 4°C 400(x g) 10분간 원심분리 후 혈청을 얻었고 -70°C 에 보관하였다.

② 기관지폐포세척액 모집

기도 부위를 절개하여 기도 내로 20 gauge angio needle을 삽관하고 endotoxin-free phosphate buffered saline (PBS, Sigma Chemical Co.) 23 ml/kg을 6회에 걸쳐 반복해서 천천히 주입한 후 기관지폐포세척액을 회수하여 15 ml Falcon tube에 모았다. 모집된 세척액 중 1과 2회차의 기관지폐포세척액의 일부는 Bradford reagent (Bio-Rad protein assay) 방법으로 단백질 양을 측정하였고 나머지는 4°C 1500 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 -70°C에 보관하였다. 1,2 회차 침전세포 잔재 (cell pellet)와 3-6 회차의 기관지폐포세척액을 합쳐 잘 흔든 후 coulter count로 총 세포 수를 계산하였고 Cytospin (Shandon Co, PA, USA)을 이용하여 900 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 Diff-Quick (modified Giemsa) 염색하여 광학현미경 400배 시야에서 500개의 세포 수를 세어 분획 세포수를 산출하였다.

③ 조직 채취

기관지폐포세척술을 시행하지 않은 각 군에서 실험백서를 치사량의 penthotal sodium, 70 mg/kg를 주입하여 희생시킨 후 흉부를 절개하여 노출시키고 인위적으로 폐 허탈을 유발한 후 조심스럽게 폐를 적출하여 우선 폐 무게를 측정하였고 10 % formalin에 밤새 담가 고정시킨 후 paraffin block을 시행하였다. Paraffin block은 paraffin을 제거한 후 슬라이드에 4

µm 두께로 연속 절편을 만들어서 hematoxylin eosin 염색을 시행하였다.

3) Gelatin Zymography

0.1 % gelatin이 함유된 10 % SDS polyacrylamide gel을 제작하여 미리 30분간, 100V 에서 전기영동시켜 불순물을 제거하였다. 혈청, 기관지폐포세척액의 단백질 농도를 측정하여 단백질 농도가 30 µg이 되도록 혈청은 희석하였고 기관지폐포세척액은 Apollo high-performance concentrator (Orbital biosciences, LLC)를 이용하여 10배 농축한 후 6 x sample buffer와 동량으로 혼합하고서 60V, 3시간 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동 후 젤을 실온에서 2.5 % Triton X-100에 30분간 담그고 developing buffer (0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.02 mol/L NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 % Triton X-100)에 30분간 담근 후 새 developing buffer에 젤을 담그고서 37°C, 12시간 배양한다. 젤을 0.5 % Coomassie brilliant blue 250 용액으로 착색시킨 후 30 % methanol과 10 % acetic acid로 탈색시켰다. 효소 활성이 있는 부위는 파란 바탕에 투명한 밴드로 관찰되었다. 젤을 sealing 하고서 densitometry로 밴드의 양을 측정하였다.

4) Western blot

10 % SDS polyacrylamide gel을 제작하여 불순물 제거를 위해 100V, 30분간 전기영동 시킨 후 혈청의 단백질 양을 100 µg, 기관지폐포세척액은 30 µg으로 맞추고 동량의 sample buffer와 혼합하여 94°C 에 4분간 가열한 후 식혔다. 준비된 샘플을 젤에 분주하고서 100V, 2시간 30분 전기영동 시킨 후 젤을 분리하여 transfer buffer에 담근 후 4°C, 25 mA를 유지하면서 12시간 PVDF membrane (polyvinylidene difluoride, Roche Co)에 transfer시켰다. PVDF membrane을 분리시키고 실온에서 blocking solution에 30분간 담근 후 washing solution으로 세척하였다. 1:500으로 희석된 primary antibody (TIMP-1, Santa Cruz. Co)에 1시간 담근 후 세척하였고 1:5000 으로 희석된

Table 1. General characteristics of experimental rats.

	Normal	DM	LPS	DM+LPS
Body weight(g)	258.6±14.5	296.5±16.8	265.6±12.1	247.5±26.3
Weight loss(g)		33.2±18.3	26.5±5.6	31.3±15.1
Lung weight(g)	1.24±0.04	1.1±0.03	1.55±0.13*	1.72±0.25*
LW/BW(%)	0.49±0.06	0.54±0.04	0.64±0.08†	0.76±0.01†
Total BAL cells (x 103/μl)	1.79±0.67	1.56±0.47	4.49±2.29‡	0.94±0.31§
Macro(%)	98.6±0.6	97.9±0.7	34.6±14.2	48.3±33.8
PMN(%)	0.3±0.1	0.7±0.4	64.2±13.5*	51.2±34.4*
Protein(μg/ml)	60.0±19.4	69.2±8.4	81.3±7.4*	89.9±13.2*

* P < 0.01 compared with normal and DM groups
 † P < 0.05 compared with normal and DM groups
 ‡ P < 0.05 compared with normal, DM, and DM+LPS groups
 § P < 0.05 compared with normal, DM, and LPS groups
 || LW: lung weight, BW: final body weight

secondary antibody (Anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase whole ab, Amersham life science)에 1시간 담근 후 세척하였다. 마지막으로 ECL detection reagent kit (Amersham life science)를 이용하여 membrane을 현상하였다.

3. 통계

통계는 Window용 SPSS 11.5를 이용하였다. 실험군이 대부분 비정규분포를 보여 일차적으로 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였고 유의성이 있다고

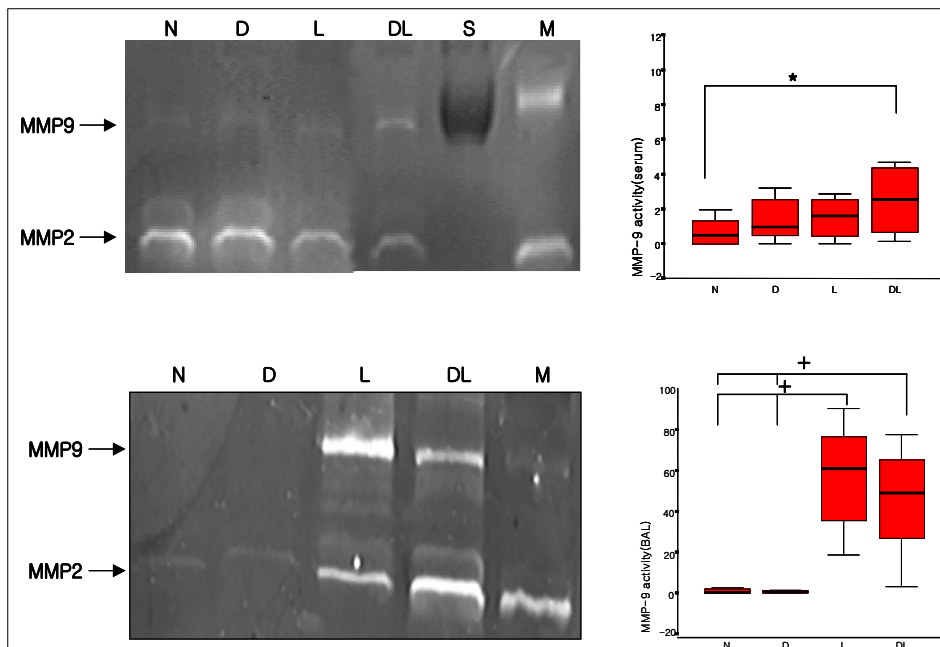


Figure 1. MMP-9 hydrolytic activity in serum (upper) and BAL fluids (lower) by gelatin zymography (left) and comparison of MMP-9 activity in four groups (right) (N: normal, D: DM, L: LPS, DL: DM + LPS, M: MMP-9, 2 marker) (*p < 0.05 vs N and +p < 0.05 vs N, D)

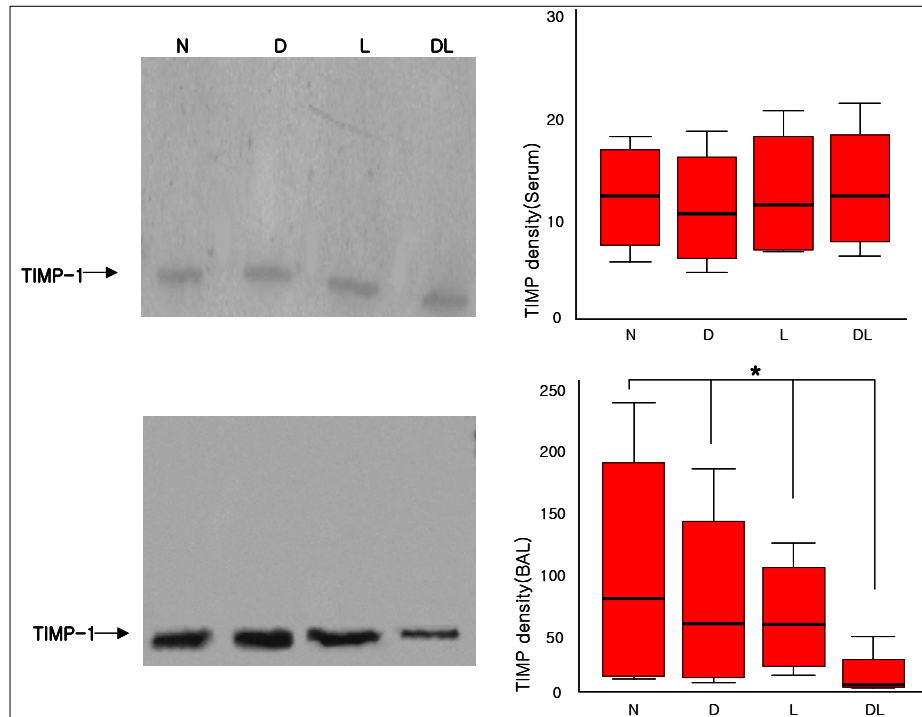


Figure 2. TIMP-1 expression in serum (upper) and BAL fluids (lower) by western blot (left) and comparison of TIMP-1 expression in four groups (right) (N: normal, D: DM, L: LPS, DL: DM + LPS) (* $p < 0.05$ vs N, D, L)

판정되는 두 군 간의 비교는 Mann-Whitney U 검정을 이용하였다. 여러 변수에 따른 평균값과 표준 오차 (mean \pm S.E.)로 표기하였다. p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. 실험동물군 특성

몸무게는 당뇨군 33.2 ± 18.3 g, 내독소군 26.5 ± 5.6 g, 당뇨-내독소군 31.3 ± 15.1 g 의 감소가 있었고 세 군간의 차이는 없었다. 폐 무게는 정상군 1.24 ± 0.04 g, 당뇨군 1.1 ± 0.03 g, 내독소군 1.55 ± 0.13 g, 당뇨-내독소군 1.72 ± 0.25 g 으로 내독소와 당뇨-내독소군에서 폐 무게가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 또한 쥐를 희생할 당시 몸무게에 따른 폐 무게의 비를 보았을 때도 비슷한 결과를 보였다. 조직 소견 관찰 결과 내독소군과 당뇨-내독소군에서 염증 세포수와 폐포벽 두께가 다른 두 군에 비해 증가하는

것을 육안으로 확인할 수 있었다. 기관지폐포세척액의 전체 세포 수는 정상군 $1.79 \pm 0.67(x10^5/\mu\text{l})$, 당뇨군 $1.56 \pm 4.72(x10^5/\mu\text{l})$, 내독소군 $4.49 \pm 2.29(x10^5/\mu\text{l})$, 당뇨-내독소군 $0.94 \pm 0.31(x10^5/\mu\text{l})$ 의 소견을 보여 내독소군의 전체 세포 수가 세 군보다 높았고 당뇨-내독소군은 다른 세 군보다 가장 낮았다 ($p < 0.05$). 그러나 중성구 분획은 각각 $0.3 \pm 0.1\%$, $0.7 \pm 0.4\%$, $64.2 \pm 7.4\%$, $51.2 \pm 34.4\%$ 로 내독소군과 당뇨-내독소군이 정상과 당뇨군보다 의미 있게 높았다 ($p < 0.05$). 기관지폐포세척액의 단백질 농도는 정상군 $60.0 \pm 19.4 \mu\text{g/ml}$, 당뇨군 $63.2 \pm 8.4 \mu\text{g/ml}$, 내독소군 $87.3 \pm 7.4 \mu\text{g/ml}$, 당뇨-내독소군 $89.9 \pm 13.2 \mu\text{g/ml}$ 의 소견을 보여 내독소군과 당뇨-내독소군이 정상과 당뇨군보다 높았다 ($p < 0.05$) (Table 1).

2. MMP-9 hydrolytic activity (Gelatin zymography)

혈청에서는 당뇨-내독소군이 다른 세 군보다 높은 활성을 보였고 기관지폐포세척액에서는 내독소군과

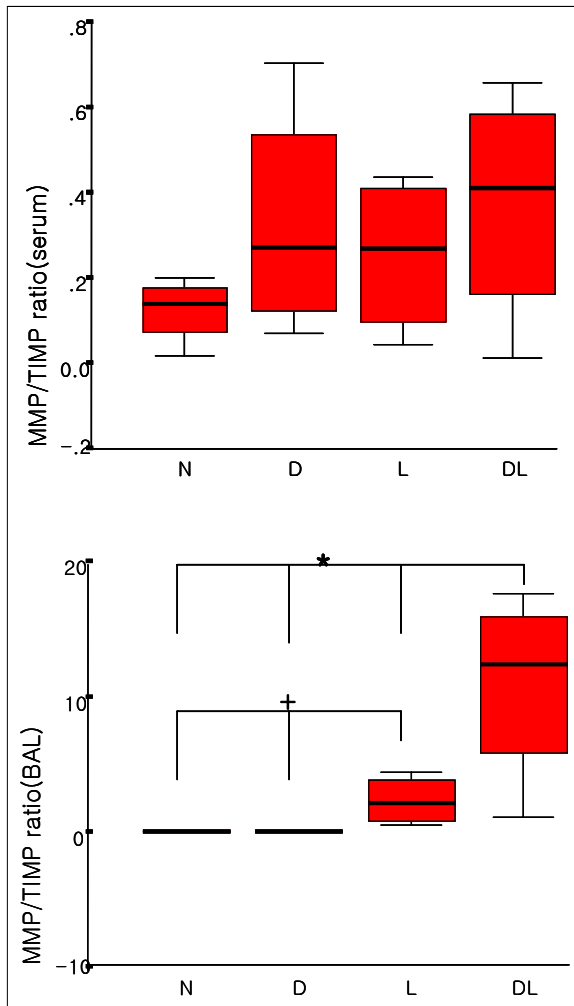


Figure 3. MMP-9/TIMP-1 ratio in serum (upper) and BAL fluids (lower) (N: normal, D: DM, L: LPS, DL: DM + LPS) (*p: < 0.05 vs N, D, L and +p: < 0.05 vs N, D)

당뇨-내독소군은 차이가 없었으나 정상, 당뇨군에 비해 높은 활성을 보였다(p < 0.05)(Figure 1).

3. TIMP-1 expression (Western blot)

혈청에서는 네 군 간의 차이가 없었고 기관지폐포 세척액은 당뇨-내독소군이 다른 세 군보다 가장 낮은 발현을 보였다 (p < 0.05) (Figure 2).

4. MMP-9/TIMP-1 density ratio

혈청에서는 네 군 간의 차이가 없었고 기관지폐포

세척액에서 당뇨-내독소군이 다른 세 군보다 가장 높은 수치를 보였고 특히 내독소군 보다 더 높았다. 또한 내독소군도 정상과 당뇨군보다 높았다 (p < 0.05) (Figure 3).

고 찰

급성폐손상에 주로 관여하는 중성구의 부산물인 활성 산소, 사이토카인, 단백질분해효소의 분비를 통해 조직의 파괴가 유발되고, 특히 단백질분해효소는 중성구의 화학주성에 관여한다고 알려져 있다³⁻⁹. 또한 감염에 쉽게 이환되고 사망률이 높은 당뇨에서 중성구의 기능 이상이 잘 밝혀져 있으므로, 당뇨에서 기질단백분해효소 분비의 차이를 아는 것은 매우 중요하다고 하겠다. 본 연구를 통해 당뇨의 급성폐손상에서 정상인 경우보다 기질단백분해효소의 활성이 그 억제제보다 증가하는 것을 관찰하였다.

당뇨 쥐는 몸무게 감소와 비례하여 폐 무게의 감소를 보였지만 정상 쥐와 비슷한 기관지폐포세척액, 폐 조직 소견을 보였다. 내독소군에서는 몸무게의 감소를 보였으나 오히려 폐 무게는 증가하는 것을 보였고 기관지폐포세척액과 폐 조직 소견에서 염증세포, 특히 중성구와 단백질 양의 증가를 보였다. 즉 내독소 투여 후 관찰할 수 있는 급성폐손상시 폐조직과 폐포 내에 염증세포의 증가와 투과성 폐부종으로 증가된 삼출액으로 인한 폐장내 변화를 간접적으로 확인할 수 있었다. 당뇨-내독소군은 내독소군과 비슷한 소견을 보였지만 한 가지 특이한 점은 중성구의 분획은 높았으나 전체 염증세포 수는 오히려 감소하는 소견을 보인 점이다. 당뇨환자의 백혈구는 혈관내피세포에 대한 부착력이 떨어져 폐 내로의 이동이 감소하거나 또는 화학 주성에 대한 반응 감소가 염증 세포 감소의 주요 원인일 수 있겠고^{23,24}, 이 중 중성구는 내독소에 주로 반응하는 세포이므로 내독소 투입시 중성구 분획을 높일 수 있겠다.

단백분해효소는 주로 중성구와 대식세포에서 분비되고 일부는 2형 폐상피세포, 섬유아세포, 혈관내피세포에서 분비된다고 알려져 있다¹⁰. 또한 중성구의 화학주성에 관여하여 중성구의 폐포 내 모집을 증가시

킨다고 알려져 있는데⁸⁹, 본 실험결과 모든 급성폐손상에서 기관지폐포 내 MMP-9의 활성이 증가하는 것을 관찰하였고 (Figure 1) 이를 토대로 기관지폐포세척액 내 중성구 증가를 설명할 수 있겠다.

세포의 기질은 역동적인 구조물이고 기질 구성물질의 합성과 분해를 반복하며 평형을 이루어 항상성을 유지하고 있다. 특히 정상 조건에서는 기질단백분해효소와 그 억제제가 균형을 이루어 항상성을 유지한다²⁷. 즉 생체내에서 MMP-9은 그 억제제인 TIMP-1과 1:1로 비공유적으로 결합하여 MMP-9의 작용을 억제하고 있어 조직의 통합성을 유지하고 있다. 이 상태에서 과도한 MMP의 분비는 조직의 구조적인 퇴행을 일으키고 반면 과도한 TIMP의 분비는 조직 재생과정과 섬유화를 촉진하게 된다²⁸⁻³⁰.

당뇨 쥐에 내독소를 가했을 때 단백질분해효소인 MMP-9과 TIMP-1의 비는 기관지폐포세척액에서 다른 세 군보다 가장 증가하였다 ($p < 0.05$). 또한 내독소군에서도 정상과 당뇨에 비해 MMP-9/TIMP-1의 비가 증가하는 것을 관찰하였다 ($p < 0.05$). 물론 MMP-9의 활성도는 내독소군과 당뇨-내독소군에서 차이가 없었지만, 오히려 TIMP-1의 발현이 당뇨-내독소군에서 가장 낮아 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 심해진 것이다. 본 실험은 내독소 투여 24시간 후에 관찰하는 것으로 초기의 폐손상을 관찰하는 모델이다. 초기엔 폐섬유화를 동반한 조직 내 개형이 적고 부종과 섬유질을 함유한 심한 염증 소견을 관찰할 수 있다³¹. 또한 고농도의 당은 중성구의 유동성을 떨어뜨려 경직된 형태를 띄게 하고 단백질분해효소나 유해산소의 분비로 혈관 기저막을 파괴하고 주변 조직에 손상을 준다고 알려져 있다³². 즉 폐손상 초기에는 폐포내 염증 반응에는 MMP-9이 주로 관여할 것으로 생각되고 이로 인해 기관지폐포 내에 MMP-9/TIMP-1의 심한 불균형을 초래할 것으로 사료된다. 본 실험 결과로 이를 확인할 수 있었고 당뇨-내독소군에서 내독소군보다 더 심한 불균형을 초래하는 것을 알 수 있었다. 다시 말하면 당뇨-내독소군은 내독소군보다 기관지폐포 내에서의 염증이 더 심할 것으로 예상할 수 있겠다.

이상의 결과를 토대로 당뇨환자에서 급성폐손상 초

기에는 손상 부위의 염증 세포의 이동 감소로 인해 정상적인 방어기전이 악화되어 중증 감염으로 진행될 수 있겠고 기질단백분해효소 활성 증가와 그 억제제의 감소로 인해 폐손상이 가중될 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 급성폐손상에서 염증세포의 모집과 활성, 그 염증세포의 부산물인 활성산소, 사이토카인, 기질단백분해효소등과 기혹성 세포사멸이 폐실질 파괴와 재구성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 당뇨환자에서 세균 감염 시 중성구의 기능 이상과 활성 산화기의 기능이상, 살균 능의 저하를 가져온다고 알려져 있으나 단백질분해효소 대한 견해가 부족한 편이다. 본 연구에서는 동물 모델에서 내독소로 유발된 급성폐손상의 기전에 중요한 역할을 하는 단백질분해효소와 그 억제제의 분비를 비교 관찰하였다.

방 법: 생후 6주된 수컷 쥐 40마리를 정상군, 당뇨군, 내독소군, 당뇨-내독소군으로 나누어 당뇨군은 streptozotocin을 투여하였고 내독소군은 지질다당질을 투여하고서 희생시켰다. 각각 혈액, 기관지폐포세척액을 얻어 gelatin zymography를 이용하여 MMP-9의 활성을 측정하였고 Western blot으로 TIMP-1을 측정하였다.

결 과: 1) 내독소군과 당뇨-내독소군은 정상과 당뇨군에 비해 폐 무게의 증가와 기관지폐포세척액과 폐 조직 소견상 염증세포, 특히 중성구의 증가를 보였고 기관지폐포세척액 내 단백질 양의 증가를 보였다 ($p < 0.05$). 또한 당뇨-내독소군은 내독소군과 달리 기관지폐포세척액 내 총 염증세포 수가 유의하게 감소하였다 ($p = 0.001$).

2) MMP-9의 활성은 혈청에서는 당뇨-내독소군이 다른 세 군보다 가장 높은 활성을 보였고 기관지폐포세척액에서는 내독소군과 당뇨-내독소군은 차이가 없었으나 정상과 당뇨군에 비해 높은 활성을 보였다 ($p < 0.05$). TIMP-1 발현은 혈청에서는 네 군간의 차이가 없었고 기관지폐포세척액은 당뇨-내독소군이 가장 낮은 발현을 보였다 ($p < 0.05$). MMP-9/ TIMP-1 density ratio를 비교했을 때 기관지폐포세척액에서 당뇨-내독소군이 다른 세 군보다 높았고 내독소군도

정상과 당뇨병보다 높았다 ($p < 0.05$).

결론: 급성폐손상이 있는 당뇨병에서는 염증세포의 화학 주성 감소로 중증 감염에 민감해지고, 기질단백 분해효소 활성 증가와 그 억제제의 감소로 폐손상이 가중될 것으로 예상된다.

참고 문헌

- Hanley ME, Repine JE. Pathogenesis aspects of the adult respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 1994;15:260-70.
- Holter JF, Weiland JE, Patcht ER, Gadek JE, Davis WB. Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome: loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest* 1986;78:1513-22.
- Simon RH, DeHart PD, Todd RF 3rd. Neutrophil-induced injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1375-86.
- Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB Jr, et al. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells: enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1986;77:1233-43.
- Katzenstein AL, Bloor CM, Liebow AA. Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock and related factors. *Am J Pathol* 1976;85:209-28.
- Palmgren MS, deShazo RD, Carter RM, Zimny ML, Shah SV. Mechanisms of neutrophil damage to human alveolar extracellular matrix: the role of serine and metalloproteinases. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:905-15.
- Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases: matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1100-2.
- Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1969-77.
- van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000;96:2673-81.
- Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury: evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1145-54.
- Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:12-24.
- Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1996;148:1345-50.
- Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, Germain N, Boichot E, Theret N, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases(MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 2003;31:536-42.
- Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999;341:1906-12.
- Lippmann ML, Goldberg SK, Walkenstein MD, Herring W, Gordon M. Bacteremic pneumococcal pneumonia: a community hospital experience. *Chest* 1995;108:1608-13.
- Chen KY, Hsueh PR, Liaw YS, Yang PC, Luh KT. A 10-year experience with bacteriology of acute thoracic empyema. *Chest* 2000;117:1685-9.
- Bashar M, Alcabes P, Rom WN, Condos R. Increased incidence of multidrug-resistant tuberculosis in diabetic patients on the Bellevue chest service, 1987 to 1997. *Chest* 2001;120:1514-9.
- Goldman MD. Lung dysfunction in diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:1915-8.
- Becher G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E. Breath condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways. *Pneumologie* 1997;51(Suppl 2):456-9.
- Enomoto T, Usuki J, Azuma A, Nakagawa T, Kudoh S. Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2003;123:2007-11.
- Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:256-60.
- Shah SV, Wallin JD, Eilen SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:402-9.
- Anderson B, Goldsmith GH, Spagnuolo PJ. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular and plasma factors. *J Lab Clin Med* 1988;111:275-85.
- Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, le Goff MC, Allanic H, Genetet B. Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997;14:29-34.

25. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Bandyopadhyay A, Chaudhuri A. Insulin suppresses plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes Care* 2003;26:3310-4.
 26. Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168:263-9.
 27. Lee YC, Lee HB, Rhee YK, Song CH. The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1623-30.
 28. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitor in lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996;149:1241-56.
 29. Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:346-52.
 30. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Matrix metalloproteinases expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:240-7.
 31. Gunther A, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W. Pathophysiology of acute lung injury. *Semin Respir Crit Care Med* 2001;22:247-58.
 32. Pecsvarady Z, Fisher TC, Darwin CH, Fabok A, Maqueda TS, Saad MF, et al. Decreased polymorphonuclear leukocyte deformability in NIDDM. *Diabetes Care* 1994;17:57-63.
-