흰쥐 Kupffer 세포에 대한 Propofol의 작용

*울산대학교 의과대학 마취통증의학교실, 영남대학교 의과대학 마취통증의학교실,
† 해부학교실 및 ‡ 미생물학교실

박세훈* · 지대림 · 성언기† · 김희선‡ · 송인환†
박희영† · 김준수 · 이덕희 · 박대팔

= Abstract =

The Effects of Propofol on Kupffer Cells in the Rat Liver

Se-Hun Park, M.D.*, Dae-Lim Jee, M.D., Eon-Gi Sung, M.D.†, Hee-Sun Kim, M.D.‡
In-Hwan Song, M.D.†, Hee-Young Park, B.S., Jun-Su Kim, M.D.
Deok-Hee Lee, M.D., and Dae-Pal Park, M.D.

*Department of Anesthesiology, College of Medicine, Ulsan University, Ulsan, Departments of Anesthesiology,
† Anatomy and ‡ Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Background: Propofol has an antioxidant capacity and can be used for ischemia-reperfusion injury of the liver. However, the effects of propofol on the Kupffer cells have not been established.

Methods: Kupffer cells were isolated and cultured from male Sprague-Dawley rats. The effects of propofol on the Kupffer cells were evaluated by a phagocytosis assay, TNF- α gene expression, TNF- α production, and superoxide anion release after administering propofol in different concentrations on the cultured Kupffer cells.

Results: The latex bead phagocytosis by the Kupffer cells was suppressed when the Kupffer cells were exposed to propofol irrespective of concentrations. Higher propofol concentrations decreased the loss of Kupffer cells after latex bead phagocytosis. Propofol induced TNF- α mRNA expression in the Kupffer cells, but the mRNA expression level after 50 μ g/ml of propofol decreased. The pattern of TNF- α mRNA expression induced by propofol was different to that induced by LPS: TNF- α mRNA was expressed continuously in the propofol-treated cells until 16 hours after exposure to propofol, whereas the level of TNF- α mRNA expression induced by LPS was evident after 2 hours and was not found thereafter. TNF- α production after propofol treatment was not higher than that of the control. Formazan precipitation did not show any qualitative differences between cells untreated or treated with propofol concentrations of 0.5, 5.0, and 50 μ g/ml.

Conclusions: These results showed that propofol might inhibit Kupffer cells. This suggests that propofol can be used for patients with ischemia-reperfusion injury of the liver. (**Korean J Anesthesiol 2002; 43: 475~484**)

Key Words: Kupffer cells; propofol.

논문접수일 : 2002년 8월 5일

책임저자 : 지대림, 대구시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 마취통증의학교실, 우편번호: 705-035

Tel: 053-620-3354, 3367, Fax: 053-626-5275, E-mail: dljee@med.yu.ac.kr

박사학위 논문임.

서 론

조직 대식세포의 80-90%를 차지하는 Kupffer 세포는 간에 상주하는 대식세포이며^{1,2)} 문맥순환을 통해서 유입되는 미생물이나 내독소 등을 제거하는 중요한 역할을 수행한다.^{1,3)} Kupffer 세포는 자극에 의해 활성화 될 경우 생화학 및 형태학적인 변화가 발생하게 되며^{4,5)} 탐식능력이 증가하고⁶⁾ 사이토카인, 반응성 산화물 질(reactive oxygen species-ROS), 단백질분해효소(proteases), prostanoids 등의 생성과 분비가 증가하게 된다.^{2,7)} 이와 같은 Kupffer 세포의 활성화는 halothane과 같은 마취약제에 의한 간손상,⁸⁾ 패혈증,^{9,10)} 혹은 간이식 후 발생된 허혈-재관류 손상 등¹¹⁾ 여러 임상 상황에서 관찰된다.

Propofol (2, 6-diisopropylphenol)은 작용발현과 의식의 회복이 빠르므로 임상에서 많이 사용되고 있는 정맥마취제이다. Propofol은 페놀 OH 구조를 지니고 마취용량에서 지질과산화물을 억제하여 ROS로 인한 조직손상을 감소시킨다.¹²⁻¹⁴⁾ 이처럼 propofol에 의한 항산화 작용이 밝혀지면서 신경세포,¹⁵⁾ 심장¹⁶⁾ 및 간¹⁷⁾ 등에서도 허혈-재관류 과정에서 발생된 ROS에 의한 조직손상이 propofol에 의해 억제된다고 알려지고 있다.

간에 대한 propofol의 항산화 작용에 관한 연구는 간 세포에 한정되어 있어^{12,17,18)} 허혈-재관류 손상에서 중요한 역할을 담당할 것으로 여겨지는 Kupffer 세포에 대한 연구는 없는 실정이다. 단핵세포에 대한 propofol의 약리작용으로 propofol의 Kupffer 세포에 대한 작용을 유추할 수 있을 것으로 생각되나, 시험관 내 실험에서 propofol이 사람의 단핵세포로부터 사이토카인의 생성을 자극한다는 보고와¹⁹⁾ 단핵세포의 산화 방출(oxidative burst)과 탐식 작용을 억제한다는 보고^{20,21)} 및 단핵세포의 화학주성(chemotaxis)에 영향을 미치지 않는다는 보고²²⁾ 등 서로 다른 결과를 보고하고 있어 Kupffer 세포에 대한 propofol의 약리작용을 유추하기가 쉽지는 않으므로 Kupffer 세포에 대한 propofol의 약리작용 규명이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 Kupffer 세포에 미치는 propofol의 작용을 Kupffer 세포의 활성화 정도를 측정하여 관찰하였다. 이를 위해 흰쥐 간에서 분리, 배양된 Kupffer 세포를 여러 농도의 propofol에 노출시킨 후, Kupffer 세포의 형태학적 변화와 탐식능력, TNF- α mRNA 발

현, TNF- α 단백질 분비, 및 superoxide 음이온의 생성 등의 변화를 추적하였다.

대상 및 방법

재 료

간 관류액은 Ca^{2+} 이 첨가되지 않은 Hanks' balanced salt solution (HBSS)을 사용하였고, 제작은 HBSS powder (Gibco, USA)를 3차 증류수에 녹이고 penicillin G sodium 20,000 units/ml, streptomycin sulfate 20,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 amphotericin B 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하였다. 최종 pH를 7.35-7.40으로 유지하여 4°C에 보관하였고, 사용 전에 37°C에 맞추었다. Kupffer 세포 분리에 사용된 효소용액은 collagenase type IV (Worthington Biochemical, USA)를 phosphate buffer solution (PBS)에 0.05% 농도로 녹여 사용하였다. PBS의 제조는 PBS powder (Gibco, USA)를 3차 증류수로 녹이고 penicillin G sodium 20,000 units/ml, streptomycin sulfate 20,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 amphotericin B 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 후 pH를 7.35-7.40으로 유지하여 4°C에 보관하였다.

Percoll (Sigma, USA) 용액은 사용직전에 20°C로 유지된 PBS를 이용하여 50% 및 25%로 희석된 용액을 만들어 사용하였다. Kupffer 세포 배양액으로 RPMI 1640에 20% 농도로 혈청을 첨가하고, penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 사용하였다. Latex bead (LB30, Sigma, USA)는 알갱이가 2×10^7 개/ml의 농도가 되도록 Kupffer 세포 배양액에 섞어 사용하였다.

Propofol (Zeneca Ltd., UK)은 Kupffer 세포 배양액에 0.5, 5.0, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석 사용하였다.

Kupffer 세포로부터 total RNA 분리를 위한 시약은 Trizol (Gibco/BRL, Life Technologies, USA)을 사용하였다. TNF- α 활성도 측정을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R & D systems사 (USA)로부터 구입하였다. TNF- α 및 GAPDH plasmid cDNA의 탐식자 표식(probe labelling)은 high prime (Boehringer, USA) kit를 이용하여 [^{32}P]-dCTP (Dupont, USA)로 표식하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)의 시행은 RNA PCR kit (N808-0017, Perkin Elmer, USA)를 사용하였고 사용된 rat

TNF- α 및 GAPDH primer들은 바이오니아사(한국)로부터 주문, 구입하였다.

Kupffer 세포에서 생산되는 superoxide 음이온을 추적하기 위하여 nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma, USA) 염색을 이용하였다.

실험동물

Kupffer 세포는 수컷 Sprague-Dawley 중 흰쥐(200-300 g)에서 분리하였고, 실험 전까지 먹이를 자유롭게 먹을 수 있도록 허용하였다.

방 법

Kupffer 세포의 분리 및 시험관내 배양: Kupffer 세포의 분리는 무균실에서 실시하여 오염을 방지하였다. Kupffer 세포의 분리방법은 흰쥐를 ether로 마취하여 수술대에 눕힌 후 음경 정맥으로 heparin 500 U를 주사한 후 피부를 절개하고 배를 열어 간을 노출시켰다. 간문맥을 찾아 16 G catheter를 삽입한 후 37°C의 HBSS 용액을 20-30 ml/min 속도로 관류하면서 간을 떼어내었고, 37°C 0.05% collagenase 용액으로 교환하여 20-30 ml/min 속도로 15-20분간 관류하여 간을 소화하였다. 소화된 간을 37°C 1.5% albumin이 첨가된 HBSS 용액에 담구어 구멍 크기가 100 μ m의 stainless 그물을 통과시킨 후 원침관에 옮기고 50 g에서 2분간 원침하였다. 상층액을 취하여 300 g로 4분간 원침하여 부유된 세포를 모았다. 원침된 세포를 미리 준비된 50% 및 25% Percoll 용액이 담긴 원침관에 서로 섞이지 않게 첨가하여 800 g로 10분간 원침한 후 Kupffer 세포를 취하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 Kupffer 세포 배양액(RPMI 1640)으로 15분간 배양하였다. 15분 후 배양액을 교환하여 배양용기에 붙지 않은 세포를 제거하여 Kupffer 세포의 순수도를 높였다. Kupffer 세포는 $1-3 \times 10^6$ 개/ml의 농도로 배양하였고, 24시간마다 배양액을 교환하였다.

Kupffer 세포의 탐식작용: Kupffer 세포의 탐식능력의 변화는 propofol의 농도 차이에 따른 변화, latex beads의 처리시간에 따른 변화, 및 LPS (lipopolysaccharide) 첨가 유무에 따른 변화를 관찰하였다. 실험군은 propofol이 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml의 농도로 첨가된 배양액에서 12시간 배양된 Kupffer 세포로 하였고 대조군은 propofol이 첨가되지 않은 배양액에서 배양

된 Kupffer 세포로 하였다. Latex beads는 실험군 및 대조군에 2시간 처리하여 탐식능력을 구하고, 동일한 표본을 12시간 latex beads 처리한 후 2시간의 것과 탐식능력을 비교하였다. LPS는 latex beads가 첨가된 배양액에 10 ng/ml 농도로 첨가하여 LPS 유무에 따른 탐식능력의 차이를 비교하였다.

Latex beads 탐식에 따른 Kupffer 세포의 손실을 알기 위하여 대조군 및 실험군 모두에서 latex beads를 2시간 처리한 후 배양용기에 붙어있는 세포 수를 계산하고 동일 표본을 다시 12시간 latex beads 처리한 후 세포 수를 구하여 상대적인 생존율을 구하였다. Kupffer 세포의 탐식능력은 위상차현미경 하에서 200 배 배율로 관찰하면서 latex beads를 탐식한 세포 수의 변화를 계산하였다. 모든 표본에서 무작위로 20개의 현미경 시야를 선택하여 전체 세포 수를 구하고 이 중 탐식작용을 보이는 세포의 비를 계산하여 평균 값 $\pm$ 표준편차로 표시하고 통계적 검정은 SPSS 10.0을 이용하였다. 대조군과 propofol 처리에 따른 실험군과의 비교는 one way ANOVA 및 post hoc Scheffe test를 이용하여 통계적으로 검정하였다.

노던 블롯팅(Northern blotting): Total RNA의 분리는 Trizol 법을 시행하였다. Kupffer 세포에 trizol 용액 1 ml와 클로로포름 200 μ l를 섞어서 15분간 얼음에 정치시킨 뒤 원심 분리하여 윗층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isoproterenol을 넣고 -20°C에서 45분간 정치시켰다. 이를 원심분리하여 얻어진 침전물은 70% 에탄올로 세척하여 말린 뒤 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)가 첨가된 증류수에 녹인 뒤 RNA의 농도를 측정하였다.

분리된 total RNA 농도를 각각 10 μ g로 조정 한 후 1% agarose/2.2 M formaldehyde 겔로 전기영동 한 뒤 전기영동 된 겔을 나일론 흡착지(nylon membrane)에 capillary transfer법을 이용하여 16시간 동안 전이시켜 RNA를 나일론 흡착지로 옮겼다. 그 후 RNA가 전이된 흡착지를 UV crosslinker (Stratagen, USA)를 통하여 RNA 부착을 견고하게 하였다. 전이된 나일론 흡착지에 비특이적으로 소식이 결합하는 것을 막기 위하여 전보합 용액(50% formamide, 1% SDS, 1 $\times$ Denhardt's solution, 0.25 mg/ml denatured salmon sperm DNA 및 50 mM sodium phosphate)에 넣어 42°C에서 8시간 동안 전보합반응을 시켰다.

소식자의 표식은 high prime법을²³⁾ 사용하였다. 간

락하게 설명하면, 1.5 ml 시험관에 100 ng에서 1 μ g 되게 주형 DNA를 평균 증류수로 전체 11 mg가 되게 조정하여 끓는 물에 10분간 변성시킨 후 단일 DNA가 다시 결합하는 것을 막기 위해 재빨리 얼음에 냉각시켰다. 여기에 5 mg [α^{32} P]-dCTP를 첨가하고, 4 mg high prime용액을 첨가한 후 37°C에서 100분간 반응시켰다. 합성된 소식자에서 표식된 dCTP monomer를 제거하기 위해서 microspin S-200 HR columns (Pharmacia, Biotech, USA)으로 원심 분리하였다. Liquid scintillation counter로 표지된 소식자의 표지 정도를 측정하고 보합결합(hybridization) 전 100°C에서 10분간 처리하여 변성시킨 후 얼음에 1분 동안 정치하여 보합결합 용액에 1.4×10^7 count per minute (CPM)/membrane이 되도록 첨가하여 42°C에서 16시간 내지 18시간 보합반응을 실시하였다. 그 후 0.5 $\times$ SSC, 0.1% SDS의 세척 용액으로 42°C에서 30분간, 65°C에서 15분간 전이된 막을 세척한 후 완성된 흡착지를 x-ray 감광필름과 함께 감광 필름 카세트에 넣어 -70°C에서 4시간에서 24시간 자기방사 기록 후 관찰하였다.

나타난 TNF- α 및 GAPDH 유전자 띠의 밀도 분석은 컴퓨터 프로그램(Vibler Lourmat Bio 1D V 6.23)을 이용하여 분석하였다.

역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR): PCR 시험관에 농도가 200 ng/mg의 RNA 3 mg, MgCl₂ 1 mg (4 μ g/ml), 10 $\times$ PCR buffer 2 mg, dNTP 2 mg씩 8 mg, RNase inhibitor 1 mg, 역전사 효소(M-MLVRT: RAV-2) 1 mg, oligo{dT} 1 mg가 혼합된 RT 시료 17 mg를 넣고 그 위에 mineral oil을 증첩시킨 후 42°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그 후 99°C에서 5분간, 5°C에서 5분간 반응시켜 역전사 효소를 불활성화시킨 다음 PCR을 실시하였다. PCR 혼합물은 MgCl₂ 4 μ g/ml, 10 $\times$ PCR buffer 8 mg 그리고 Taq polymerase 0.5 mg와 평균 증류수를 혼합하여 전체 78 mg가 되도록 하였다. 여기에 각각 20 μ M의 sense primer (각각 시발체)와 antisense primer를 1 mg 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR은 DNA thermal cycler (Perkin Elmer)를 이용하여 실시하였으며, 처음의 thermal cycling 단계는 95°C에서 30초 동안의 불활성화 단계, 50°C에서 30초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하였다. 33회의 thermal cycling 후 별도로 72°C에서 10분 동안 더 핵산 중합 반응을

실시하여 부분적으로 신장된 산물을 완전한 가닥으로 완성시켜 주는 단계로 하였다. 그 후 증폭된 상보 DNA는 8% polyacrylamide gel 상에서 1배 농도의 TAE buffer로 150 volt에서 50분간 전기영동 시켰다. EtBr (0.5 μ g/ml)에 20분 염색 후 나타나는 띠(band)를 관찰하였다. DNA 표지(marker)로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다. 사용된 primer sequence (시발체 서열)는 다음과 같다. TNF- α (251 bp); sense: 5'-atgacgacagaaagcatgac c-3', antisense: 5'-gaagatgactgtgtgtg-3', GAPDH (515 BP); sense: 5'-aatgcatcctg caccacaa-3', antisense: 5'-gtagccatattcattgtcata-3'.

ELISA를 이용한 TNF- α 의 활성도 측정: 분리된 Kupffer 세포를 일정 시간 배양한 뒤 배양액을 조심스럽게 취하여 1,000 g에 10분 원심분리 후 시료로 사용하였다. TNF- α 의 활성도 측정 방법은 R & D사에서 제시한 실험의 방법에 준하여 실행하였다. 간단히 설명하면 TNF- α test well에 100 mg씩 세포배양액을 분주 후 well을 공기와 차단하여 37°C에서 60분 정치시킨 뒤 세척 완충용액으로 well을 3회 세척하였다. 그 뒤 항TNF- α 항체를 각 well 당 100 mg씩 분주하고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 well들을 다시 3회 세척하고 TBM substrate (기질) 용액을 10 mg씩 첨가하여 상온에서 15분간 정치시킨 후 반응 정지액 100 mg/well을 넣고 450 nm의 ELISA reader (판독기) (Dynatech®, MR5000)를 사용하여 TNF- α 의 활성도를 측정하여 평균값 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 대조군, LPS 처리군 및 propofol 처리군의 TNF- α 의 활성도는 one-way ANOVA로서 분석하였다.

Superoxide 음이온 염색: 배양중인 Kupffer 세포에서 superoxide 음이온이 생성되는지를 알아보고 propofol이 그 생산에 영향을 미치는 지를 알아보고자 nitro blue tetrazolium (NBT) 염색을 하였다. 실험군은 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml 농도의 propofol이 첨가된 배양액으로, 대조군에는 propofol이 없는 배양액으로 2시간 배양한 다음 0.05% NBT를 포함한 배양액으로 20분 처리하였다. 발색반응이 일어난 표본을 고정 후 탈수한 다음 봉입하였다. 일반광학현미경하에서 반응은 푸른색의 formazan 결정이 세포질에 침착되어 나타나며 이들을 사진 촬영하여 농도에 따른 비교를 하였다.

Fig. 1. Kupffer cells demonstrating phagocytosis of latex beads at 3rd day of culture. Round shaped Kupffer cells (arrows) phagocytosed more latex beads compared with irregular shaped ones (arrow heads). Magnification ($\times 200$).

결 과

위상차 현미경 소견

대부분의 Kupffer 세포는 둥근 모양이었고 크기는 다양하였으며, 일부 세포는 돌기를 가지는 불규칙한 모양을 보였다. 배양된 Kupffer 세포의 탐식능력은 세포간에 많은 차이를 보였는데, 세포질에 탐식된 latex beads의 수가 한 개에서 수십 개로 매우 다양하였다. 크고 둥근 모양의 Kupffer 세포가 많은 latex beads를 탐식하였고, 작거나 불규칙한 모양의 세포는 탐식능력이 떨어졌다(Fig. 1). Propofol 처리에 따른 Kupffer 세포의 위상차현미경 소견에서 0.5 혹은 5.0 μ g/ml의 농도에서는 변화가 없었고 50 μ g/ml에서는 약간의 세포수축이 관찰되었다.

Propofol 농도, latex beads 처리시간, 및 LPS 유무에 따른 탐식능력의 변화

2시간 latex beads 처리에 의해 탐식작용을 보이는 Kupffer 세포의 비율은 propofol 농도가 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml일 때 각각 $12.0 \pm 3.7\%$, $11.2 \pm 3.2\%$, 및 $11.3 \pm 2.3\%$ 이었으며, 대조군의 탐식 세포 비율 $14.7 \pm 2.3\%$ 과 비교하여 유의하게 낮았다(각각 $P = 0.041$, $P = 0.004$, $P = 0.005$). 또한 12시간 latex beads 처리

Fig. 2. The percentage of Kupffer cells phagocytosing latex beads according to the concentrations of propofol, the presence of LPS in culture, and the durations of latex beads treatment. □ means that Kupffer cells were treated with latex beads for 2h. ▒ means that Kupffer cells were treated with latex beads and LPS for 2 h. ■ means that Kupffer cells were treated with latex beads for 12 h. * $P < 0.05$ compared with control. † $P < 0.05$ compared with 0.5 μ g/ml propofol. †† $P < 0.05$ compared with 5.0 μ g/ml propofol.

에서도 propofol 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml에서 각각 $43.8 \pm 5.7\%$, $44.5 \pm 10.3\%$, 및 $33.8 \pm 6.0\%$ 의 세포가 탐식작용을 보여 대조군의 $53.0 \pm 6.7\%$ 에 비교하여 유의한 차이를 보였으며(각각 $P = 0.03$, $P = 0.007$,

$P < 0.001$), 특히 propofol 50 μ g/ml군은 대조군과 더불어 다른 모든 실험군과의 비교에도 유의한 차이를 보였다($P \leq 0.001$). 2시간 latex beads 처리 시 LPS를 함께 처리하였을 때, 대조군과 propofol 농도 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml 군에서 각각 $22.8 \pm 3.5\%$, $22.1 \pm 3.1\%$, $21.2 \pm 3.6\%$, 및 $17.0 \pm 2.5\%$ 의 세포가 latex beads를 탐식하여 LPS에 의해 대조군 및 propofol 처리군 모두에서 탐식작용이 증가하였으나, LPS 자극이 없었던 Kupffer 세포에 비교하여 상대적으로 탐식작용을 보이는 세포가 증가하였다(각각 $P < 0.05$, Fig 2). Propofol 50 μ g/ml군은 여전히 대조군과 propofol 0.5 μ g/ml 군과 비교하여 탐식작용의 유의한 감소($P = 0.003$, $P = 0.006$)를 보였다(Fig. 2).

Latex beads 탐식에 따른 Kupffer 세포의 생존율이 propofol 0.5, 5.0, 및 50 μ g/ml 각 군에서 $64.5 \pm 8.8\%$, $71.2 \pm 13.9\%$, 및 $74.9 \pm 15.8\%$ 로 대조군의 $57.1 \pm 9.3\%$ 과 비교해 볼 때 propofol 5.0 μ g/ml군($P = 0.007$)과 50 μ g/ml군($P < 0.001$)에서 Kupffer 세포의 손실을 억제하는 효과가 있었다(Fig. 3).

Propofol에 노출된 Kupffer 세포에서의 TNF- α 유전자 발현

Propofol이 Kupffer 세포에서의 TNF- α 유전자 발현을 유도하는지 알기 위하여 분리된 Kupffer 세포에 propofol 5.0 μ g/ml 또는 50 μ g/ml의 농도로 12시간 각각 노출시킨 뒤 TNF- α mRNA의 발현을 RT-PCR 법

Fig. 3. The propofol increased the survival of Kupffer cells after treatments of latex beads for 12 h. The survival rate of cells means the proportion of cell number at 12h to that at 2 h after latex bead treatment. * $P < 0.05$ compared with control group.

으로 시행하였다. Propofol 5.0 μ g/ml 농도에 노출시킨 경우 뚜렷한 TNF- α 의 유전자 발현이 관찰되었으며 50 μ g/ml 농도에 노출시켰을 때 오히려 TNF- α 유전자 발현이 떨어지는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

Propofol에 의한 TNF- α 유전자 발현의 시간 경과성 반응

Propofol과의 반응 시간에 따른 TNF- α 유전자 발현의 변화를 관찰하고자, 분리된 Kupffer 세포를 유전자 발현이 가장 뚜렷했던 5.0 μ g/ml의 propofol 또는 LPS 100 ng/ml에 2시간 및 16시간 노출시킨 뒤 TNF- α 유전자 발현을 관찰하였다. LPS에 2시간 노출 시 TNF- α 의 강한 발현이 관찰되고 16시간 노출 시 그 발현도는 확연히 줄어든 반면, propofol에 의한 TNF- α 의 발현은 2시간대 발현도와 차이 없이 노출 16시간대에서도 TNF- α 유전자 발현이 그대로 유지됨을 관찰하였다(Fig. 5).

Fig. 4. The effect of propofol concentrations on TNF- α gene expression in rat Kupffer cells. Kupffer cells from rat liver were untreated (NT) or treated with 5.0 or 50 μ g/ml of propofol for 12 h. Total RNA was prepared and the levels of TNF- α mRNA were analyzed by RT-PCR. Similar results were obtained in two separate experiments.

Fig. 5. Time kinetics of propofol-induced TNF- α mRNA expression in rat Kupffer cells. Confluent monolayers of Kupffer cells were untreated (NT) or treated with propofol (5.0 μ g/ml) or LPS (100 ng/ml) for the indicated times. mRNA levels were determined by RT-PCR. Similar results were obtained in two separate experiments.

Propofol에 의한 Kupffer세포의 TNF- α 생성

Kupffer 세포를 5.0 μ g/ml propofol과 100 ng/ml LPS에 노출시킨 뒤 세포 부유물을 취하여 ELISA방법으로 TNF- α 의 생성 농도를 측정한 결과, LPS에 2시간 노출되었을 때에는 아무 것도 처리하지 않은 군에 비하여 TNF- α 의 생성이 증가하지는 않았으나 propofol에 2시간 노출되었을 때 보다 증가하였으며($P < 0.001$), 24시간 노출되었을 때에는 아무것도 노출되지 않은 군 및 propofol에 노출되었을 때에 비해 TNF- α 의 생성이 높게 측정되었다(각각 $P = 0.006$, $P = 0.001$). propofol에 2시간 노출되었을 때, 아무것도 처리하지 않았을 때와 비교하여 TNF- α 의 생성이 오히려 감소하였으나($P = 0.003$), 24시간 노출하였을 때에는 차이가 없었다(Fig. 6).

Propofol에 의한 Kupffer 세포의 superoxide 음이온의 생성 효과

배양된 모든 군의 Kupffer 세포에서 푸른색의 formazan의 침착이 관찰되었다. 세포전반에 걸친 균질한 연한 반응과 더불어 세포질 일부에 국한된 진한 과립형태

의 반응을 보였다(Fig. 7). Propofol의 농도에 따른 반응의 차이를 관찰할 수 없었고, 대조군과도 유의할 만한 차이는 발견되지 않았다.

Fig. 6. TNF- α production of Kupffer cells after treatment of LPS or propofol. Confluent monolayers of Kupffer cells from rat liver were untreated (NT) or treated with propofol (5.0 μ g/ml) or LPS (100 ng/ml) for 2 or 24 h. Protein levels of TNF- α were determined by ELISA. * $P < 0.001$ compared with propofol. † $P < 0.05$ compared with NT and propofol. * $P < 0.05$ compared with NT.

Fig. 7. Kuffer cells were treated with 0.05% nitro blue tetrazolium for 20 min. Blue formazan granules were precipitated within cytoplasm. No qualitative difference in formazan precipitation was found between cells untreated or treated with propofol concentrations of 0.5, 5.0, and 50 μ g/ml. Magnification ($\times 1000$).

고 찰

본 연구의 목적은 정맥마취제로서 중요한 영역을 확보하고 있는 propofol이 Kupffer 세포에 미치는 영향을 관찰하고자 한 것이다. 저자들은 Kupffer 세포의 전신인 단핵세포와 propofol의 관계에 대한 문헌들을 검토해 보았으나 다소 상반된 결과를 보이고 있어서 Kupffer 세포에 대한 propofol의 약리작용을 단핵세포에 관한 앞선 연구들로부터 유추하는 것이 쉽지 않아 본 실험을 하였다. 본 실험의 결과 propofol은 Kupffer 세포의 탐식작용을 감소시켰고, latex beads에 12시간 노출된 Kupffer 세포의 손실을 억제하였으며, TNF- α 의 생성을 억제하였다. 반면, TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향은 농도에 따라 달라, 고농도 보다 저농도에서 유전자 발현이 더 뚜렷하였다. 비록 TNF- α mRNA가 발현되긴 하였지만, TNF- α 의 생성이 억제되고 탐식작용이 억제된 것으로 보아 propofol은 Kupffer 세포를 억제하는 작용이 있는 것으로 판단된다.

Kupffer 세포의 탐식능력에 미치는 propofol의 효과는 propofol의 농도에 비례하여 탐식작용이 억제됨을 알 수 있었다. 2시간 latex beads 처리의 경우 대조군에 비해서 모든 propofol 처리군에서 탐식작용이 억제되었다. 12시간 latex beads 처리 시에는 대조군에 비해서 모든 propofol 처리군에서 탐식작용이 억제될 뿐 아니라 propofol 50 μ g/ml 군에서는 대조군을 비롯한 저농도의 propofol 모든 군과 비교해서도 탐식작용이 억제되었다. 2시간 latex beads 처리 시에 LPS를 추가한 후 탐식작용을 관찰한 경우에는 고농도의 propofol 50 μ g/ml 군에서 대조군과 propofol 0.5 μ g/ml 군에 비해 뚜렷한 탐식 억제를 보였다. 결국 이러한 propofol의 탐식 억제 작용은 propofol의 농도가 높고 latex beads나 LPS와 같은 강한 탐식촉진 물질에 함께 노출되었을 때 그 효과가 더욱 강하게 나타났다. 지금까지 여러 가지 흡입마취제들이 다형핵 호중구(PMN)의 탐식 작용을 억제한다는 보고와²⁴⁾ 더불어 thiopental, midazolam과 더불어 propofol이 다형핵 호중구와 단핵세포의 탐식작용을 억제했다는 보고가 있으며^{20,25)} 이들이 보고한 마취제들이 Kupffer 세포의 전신인 단핵세포의 탐식작용을 억제한다는 연구 결과와 동일하게 저자들의 연구결과도 propofol이 Kupffer 세포의

탐식을 억제하였다. Kupffer 세포가 활성화될 경우 탐식작용이 증가한다는²⁶⁾ 점으로 볼 때, propofol이 농도에 비례하여 Kupffer 세포의 탐식이 억제되었으므로 Kupffer 세포의 활성화도 억제되었다고 판단할 수 있다.

동일한 Kupffer 세포를 2시간 및 12시간 처리 후 Kupffer 세포의 생존율이 propofol 0.5 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 및 50 μ g/ml 각 군에서 약 65%, 71%, 및 75%이었고 대조군에서 약 57%와 비교해 볼 때 propofol의 농도가 증가할수록 손실 정도가 현저하게 감소되었다. 이러한 사실은 propofol이 Kupffer 세포의 탐식억제를 통하여 과다한 탐식에 의한 세포손실을 막았다고 생각된다.

TNF- α 유전자 유도인자인 LPS와 비교하여 propofol에 2시간 및 16시간 노출시킨 뒤 TNF- α mRNA 발현을 관찰한 결과 propofol에 의한 TNF- α mRNA의 발현도는 전반적으로 LPS에 의한 발현도에 비해 약하였으나 LPS에 의한 TNF- α 의 발현이 단시간인 2시간에서 강하게 관찰되고 16시간대에서 TNF- α 의 발현이 확연히 낮아지는 전형적 TNF- α mRNA 발현양상에 비해 propofol에 의한 TNF- α mRNA 발현 유도는 반응 16시간째에도 그 유전자가 뚜렷이 발현 유지가 되는 것으로 확인되어 propofol에 의한 TNF- α 의 발현 기전은 LPS에 의한 TNF- α 유전자 발현 기전과는 다른 것으로 추측되었다. 본 연구에서 아무 것도 처리되지 않은 대조군의 경우에도 TNF- α 의 생성을 측정할 수 있었으나 이는 LPS에 의해 생성된 TNF- α 의 농도에 비해 낮았고, propofol을 처리한 군에서의 TNF- α 생성 농도는 대조군에 비해 오히려 낮게 측정되어 propofol이 Kupffer 세포에서 TNF- α 의 생성을 유도하지는 않는 것을 확인하였다. LPS는 대식세포에서 사이토카인 유전자 발현 및 생성연구에 있어 대표적인 유도인자로 사용됨에 본 연구의 Kupffer 세포 탐식능 및 TNF- α 유전자 발현의 유도인자로 사용하였다.²⁷⁻²⁹⁾ 본 연구에서의 propofol에 의한 Kupffer 세포에서의 TNF- α mRNA 발현 및 생성은 대식세포에서의 LPS에 의한 TNF- α 생성 양상과는³⁰⁻³²⁾ 상당히 다르게 관찰되었으나 propofol이 LPS와 같이 유발인자의 특징도 동시에 나타내었다. 대식세포에서는 일반적으로 TNF- α 가 단시간 내에 발현 및 작용을 하나, Kupffer 세포의 경우 propofol 작용에 의해서 TNF- α 생성에 상당한 시간을 요구되는 지연형 반응이 관

찰되었다. 또한 TNF- α 발현에 있어 많은 유도 인자들이 갖는 농도 의존성 유발반응과는 달리 propofol의 경우에는 50 μ g/ml의 고농도 시 오히려 TNF- α 의 발현이 감소하는 것이 관찰되어 고농도의 propofol에서 latex beads 탐식 억제 현상이 나타나는 현상과 더불어 고농도 propofol이 Kupffer세포의 활동을 억제한다는 것을 알 수 있다.

Kupffer 세포는 자극을 받았을 때 superoxide 음이온을 생산하는 것으로 알려져 있다. 생체실험에서 자극을 주지 않은 상태에서는 NBT용액을 간으로 순환시켜도 formazan 침착이 관찰되지 않으나 phorbol myristate acetate를 첨가하여 자극을 유도하였을 때는 formazan 침착이 관찰된다는 보고를³³⁾ 볼 때 생체 내에서는 자극이 없을 때는 Kupffer 세포가 상당히 안정적이며 superoxide 음이온이 생산이 미미한 것을 알 수 있다. 본 실험에서는 대조군을 포함한 모든 군의 Kupffer 세포에서 formazan 침착이 관찰되어 propofol이 superoxide 음이온 생성을 특별히 자극하지는 않은 것으로 생각된다. 그러나, PI로 대조염색한 표본을 형광현미경으로 관찰한 결과 Kupffer 세포내의 많은 수의 핵들이 관찰되는 것으로 보아 배양액 내에 부유하는 다른 세포를 다수 탐식한 것으로 보여지며, 이런 상황이 Kupffer세포를 어느 정도 활성화하여 모든 군에서 formazan 침착을 일으킨 한 요인이 될 수도 있었다고 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 propofol은 농도 비례적으로 Kupffer 세포의 탐식 작용을 억제하며, Kupffer 세포의 과도한 탐식에 의한 세포손상도 propofol에 의해 억제됨을 관찰하였고, TNF- α 의 생성을 억제하고 superoxide 음이온의 발생을 증가시키지는 않은 것으로 보아, Kupffer 세포를 억제하는 것으로 생각된다. 따라서 propofol은 Kupffer세포의 활성화가 우려되는 관류-재관류 간 손상의 가능성이 있는 환자의 마취에 안전하게 사용할 수 있는 마취제라고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Bouwens L: Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Revis Biol Celular* 1988; 16: 69-94.
2. Decker K: Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-61.
3. Nolan JP: Intestinal endotoxins as mediators of hepatic injury: an idea whose time has come again. *Hepatology* 1989; 10: 887-91.
4. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ: Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: Effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13: 83-95.
5. Carles J, Fawaz R, Hamoudi NE, Neaud V, Balabaud C, Bioulac-Sage P: Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion. *Liver* 1994; 14: 50-6.
6. Watanabe N, Susuki J, Kobayashi Y: Role of calcium in tumor necrosis factor - α produced by activated macrophages. *J Biochem* 1996; 120: 1190-5.
7. Roska AK, Lipsky PE: Monocytes and macrophages. In: *Textbook of Rheumatology*. 3rd ed. Edited by Kelley WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB: Philadelphia, Pennsylvania, WB Saunders. 1989, pp 346-66.
8. Furst SM, Gandolfi AJ: Interaction of lymphocytes with Kupffer cells from halothane-exposed guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114: 46-53.
9. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH: Mechanism of hepatocellular dysfunction during early sepsis. Key role of increased gene expression and release of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6. *Arch Surg* 1997; 132: 364-9.
10. Koo DJ, Chaudry IH, Wang P: Mechanism of hepatocellular dysfunction during sepsis: the role of gut-derived norepinephrine. *Int J Mol Med* 2000; 5: 457-65.
11. Decker K: The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J Med* 1998; 47: 1-9.
12. Murphy PG, Bennett JR, Myers DS, Davies MJ, Jones JG: The effect of propofol anaesthesia on free radical-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Eur J Anaesthesiol* 1993; 10: 261-6.
13. Aarts L, van der Hee R, Dekker I, de Jong J, Lange-meijer H, Bast A: The widely used anesthetic agent propofol can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett* 1995; 357: 83-5.
14. Kahraman S, Kilinc K, Dal D, Erdem K: Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 1997; 78: 279-81.
15. Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG: Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol* 1997; 14: 320-6.
16. Ko S, Yu C, Lee S, Choe H, Chung M, Kwak Y, et

- al: Propofol attenuates ischemia-reperfused injury in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 1997; 87: 717-24.
17. Navapurkar VU, Skepper JN, Jones JG, Menon DK: Propofol preserves the viability of isolated rat hepatocyte suspensions under an oxidant stress. *Anesth Analg* 1998; 87: 1152-7.
18. Eriksson O, Pollesello P, Saris NE: Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 391-3.
19. Rossano F, Tufano R, Cipollaro de L'Ero G, Servillo G, Baroni A, Tufano MA: Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14: 439-50.
20. Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T: Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42: 518-26.
21. Chanimov M, Berman S, Weissgarten J, Averbukh Z, Cohen M, Grinshpun Y, et al: Substances used for local and general anaesthesia in major surgery suppress proliferative responsiveness of normal rat peripheral blood mononuclear cells in culture. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17: 248-55.
22. Krumholz W, Reussner D, Hempelmann G: The influence of several intravenous anaesthetics on the chemotaxis of human monocytes in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 1999; 16: 547-9.
23. Kim HS, Tebo JM, Armstrong D, Hamilton TA: IL-10 suppresses LPS-induced KC mRNA expression via a translation-dependent decrease in mRNA stability. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 33-9.
24. Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC: The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990; 72: 542-52.
25. Davidson JA, Boom SJ, Pearsall FJ, Zhang P, Ramsay G: Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Br J Anaesth* 1995; 74: 315-8.
26. Wardle EN: Kupffer cells and their function. *Liver* 1987; 7: 63-75.
27. Morrison DC, Ryan JL: Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979; 28: 293-450.
28. Maier RV, Ulevitch R: The response of isolated rabbit hepatic macrophage (H-M Ø) to lipopolysaccharide (LPS). *Circ Shock* 1981; 8: 165-81.
29. Hayes MP, Zoon KC: Priming of human monocytes for enhanced lipopolysaccharide responses: Expression of alpha interferon, interferon regulatory factors, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1993; 61: 3222-7.
30. Djeu JY, Blanchard DK, Richards AL, Friedman H: Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 1988; 141: 4047-52.
31. Ausiello CM, Urbani F, Gessani S, Spagnoli G, Gomez MJ, Antonio C: Cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by mannoprotein constituents from *Candida albicans*. *Infect Immun* 1993; 61: 4105-11.
32. 김희선, 성열오, 이영선, 김성광: *Candida albicans*에 의한 말초혈액 림프구의 Tumor necrosis factors α 생성 양상 및 특성. *대한미생물학회지* 1995; 30: 1-12.
33. Ogata I, Mochida S, Fujiwara K: Formazan formation in hepatic macrophages after nitro blue tetrazolium perfusion into rat liver. *Biomed Res* 1988; 9: 113-7.