

□ 원 저 □

Proinflammatory Cytokines과 TGF-beta가 섬유모세포의 증식에 미치는 영향†

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 현암 신장 연구소 한양대학교 이과대학 생화학및 분자생물학과*

김 철, 박춘식, 김미호, 장현수*, 정일엽*, 기신영, 어수택, 문승혁, 김용훈, 이희발

= Abstract =

The Effects of Proinflammatory Cytokines and TGF-beta, on The Fibroblast Proliferation

Chul Kim M.D., Choon Sik Park M.D., Mi Ho Kim,
Hun Soo Chang,* Il-Yup Chung Ph.D.,* Shin Young Ki M.D.,
Soo-Taek Uh M.D., Seung Hyuk Moon M.D., Yong Hoon Kim M.D., Hi Bal Lee M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hyonam Kidney Laboratory
Soonchunhyang University, Seoul, Korea*

Department of Biochemistry & Molecular Biology, College of Science, Hanyang University Ansan, Korea*

Backgrounds : The injury of a tissue results in the inflammation, and the inflamed tissue is replaced by the normal parenchymal cells during the process of repair. But, constitutional or repetitive damage of a tissue causes the deposition of collagen resulting in the loss of its function. These lesions are found in the lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis, complicated fibrosis after diffuse alveolar damage (DAD) and inorganic dust-induced lung fibrosis. The tissue from lungs of patients undergoing episodes of active and/or end-stage pulmonary fibrosis shows the accumulation of inflammatory cells, such as mononuclear cells, neutrophils, mast cells and eosinophils, and fibroblast hyperplasia. In this regard, it appears that the inflammation triggers fibroblast activation and proliferation with enhanced matrix synthesis, stimulated by inflammatory mediators such as interleukin-1 (IL-1) and/or tumor necrosis factor (TNF). It has been well known that TGF- β enhance the proliferation of fibroblasts and the production of collagen and fibronectin, and inhibit the degradation of collagen. In this regard, It is likely that TGF- β undergoes important roles in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Nevertheless, this single cytokine is not the sole regulator of the pulmonary fibrotic response. It is likely that the

† 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제(과제 번호 94-1400-07-01-3) 연구비에 의하여 연구되었음.

balance of many cytokines including TGF- β , IL-1, IL-6 and TNF- α regulates the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In this study, we investigate the interaction of TGF- β , IL-1 β , IL-6 and TNF- α and their effect on the proliferation of fibroblasts.

Methods : We used a human fibroblast cell line, MRC-5 (ATCC). The culture of MRC-5 was confirmed by immunofluorescent staining. First, we determined the concentration of serum in culture medium, in which the proliferation of MRC-5 is suppressed but the survival of MRC-5 is retained. Second, we measured optical density after staining the cytokine-stimulated cells with 0.5% naphthol blue black in order to detect the effect of cytokines on the proliferation of MRC-5.

Result : In the medium containing 0.5% fetal calf serum, the proliferation of MRC-5 increased by 50%, and it was maintained for 6 days. IL-1 β , TNF- α and IL-6 induced the proliferation of MRC-5 by 45%, 160% and 120%, respectively. IL-1 β and TNF- α enhanced TGF- β -induced proliferation of MRC-5 by 64% and 159%, but IL-6 did not affect the TGF- β -induced proliferation. And TNF- α -induced proliferation of MRC-5 was reduced by IL-1 β in 50%. TGF- β , TNF- α and both induced the proliferation of MRC-5 to 89%, 135% and 222%, respectively.

Conclusions : TNF- α , TGF- β and IL-1 β , in the order of the effectiveness, showed the induction of MRC-5 proliferation of MRC-5. TNF- α and IL-1 β enhance the TGF- β -induced proliferation of MRC-5, but IL-6 did not have any effect. TNF- α -induced proliferation of MRC-5 is diminished by IL-1, and TNF- α and TGF- β showed an additive effect. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 861-869)

Key words : IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , Fibroblast, Proliferation, Fibrosis

서론

조직이 손상을 받으면 방어기전으로 염증반응이 오며, 회복과정으로 실질세포(parenchymal cells)로 정상 복원이 된다. 그러나 손상이 반복적이거나 지속적인 경우 회복과정에서 실질조직은 결체조직으로 대체되어 반흔이 남아 기능을 상실하게 된다^{1, 2)}. 폐장의 경우 혈관내피세포나 폐포 상피세포의 손상으로 염증성 매개물이 간질내로 축적되고 제1형 상피세포의 탈락과 제2형 상피세포의 증식이 생기면서 제1형 상피세포로 분화되어 손상된 폐포벽을 정상으로 복원한다. Fibrinolysis의 장애로 폐포강내 섬유소(fibrin)가 남아 있거나, fibronectin이 공존하고 있으면 섬유모세포의 착상(anchorage)과 증식이 유발되며^{3, 4)}, 섬유모세포에 의해 축적된 세포외기질(extracellular matrix)은 정상조직을 대체하게 된다. 이러한 현상은

임상적으로 특발성 폐섬유화증, 미만성 폐포손상(diffuse alveolar damage)후의 섬유화증, 규폐증을 포함한 inorganic dust에 의한 섬유화증에서 관찰된다⁵⁾. 이들 질환에서 섬유화 과정은 공통된 부분이 많으나 현재까지의 치료 방법으로는 섬유화 과정이 진행된 후의 대증적 치료외의 방법이 없기 때문에 섬유화 과정을 이해하고 이를 조절할수 있는 방법의 개발이 필요하다.

섬유화증을 가진 환자의 폐조직에서는 염증세포(단핵구, 호중구, mast cells, 호산구등)의 축적및 섬유모세포의 과도한 조직형성이 관찰된다. 따라서 섬유모세포에의해 이것들이 폐섬유화증의 주원인이 된다. 이런 관점에서, 조직의 염증반응은 섬유모세포의 활성화와 증식을 촉진하여 matrix 합성을 항진시키며, 이는 interleukin-1 (IL-1)및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 같은 염증 매개물에 의해 자극됨

을 시사한다⁶⁾. 따라서, 섬유모세포는 염증세포로부터 분비된 염증 매개물의 표적이라고 할 수 있다.

근래의 연구에서, 폐포 대식세포같은 폐염증 세포^{7, 8, 9)}나 상피세포¹⁰⁾, 내피세포¹¹⁾와 같은 구조세포에서 유래된 섬유모세포 조절 cytokine들이 섬유모세포의 증식, 자극에 대한 반응성의 증가, 연결조직 합성의 증진등을 조절한다는 것이 증명되었다. 이들 섬유모세포 기능에 영향을 미치는 인자로 잘 알려진 cytokine¹²⁾ 중 폐섬유화증에 가장 중요하게 작용하는 것은 TGF- β 로서, 섬유모세포의 증식을 유도하며, 섬유모세포에 대한 화학주성능이 있고, 교원질과 fibronectin 형성을 증가시키며, 교원질 분해를 억제시켜 총체적으로 섬유화 과정을 항진시키는 주요한 cytokine이다^{9, 10)}. 그러나, 어느 한가지의 cytokine에 의해서가 아니라, 여러 cytokine들의 작용이 상호 조절됨으로써 섬유모세포의 증식이 조절되며, 이에 따라 폐섬유화증이 조절된다고 생각되고 있다.

IL-1은 섬유모세포의 증식과 collagen, fibronectin 및 proteoglycan 생성능을 증가시킨다. 실험적 규폐증 모델과 bleomycin에 의한 폐 손상에서 IL-1 수용체에 대한 antagonist는 방어 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 폐섬유화증에서 IL-1이 중요한 역할을 함을 시사한다¹³⁾.

TNF는 섬유모세포의 생물학적 생태를 변화시키는 것으로 알려져 있으며¹⁴⁾, 또한 교원질의 형성을 조절하고^{15, 16)}, fibronectin 합성을 저해하며^{17, 18)}, collagenase 및 glycosaminoglycan의 생성을 증가시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

지금까지의 연구들은 어느 한가지의 cytokine에 의한 영향이 주로 다루어졌을 뿐, 섬유모세포의 증식에 여러 cytokine들이 복합적으로 어떻게 작용하는지에 대한 연구는 별로 진행되지 않은 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 섬유모세포의 증식에 주로 작용하는 TGF- β 와, proinflammatory cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 섬유모세포의 증식에 미치는 상호작용을 규명하는데 목적을 두었다.

대상 및 방법

1. 섬유모세포의 배양

섬유모세포는 사람 태아의 섬유모세포주인 MRC-5 (ATCC)를 이용하였다. 배양은 4×10^5 의 MRC-5를 50ml의 10% 우태아혈청이 함유된 EMEM에 부유시킨 다음 5일 내지 7일간 37°C, 5% CO₂의 보온가습기에서 배양하였다. 4일 간격으로 유착세포는 놔두고 배지만 교환시켰다. 세포층이 뽕뽕해지면 배지를 걷어낸 다음 trypsin 용액으로 채운 후 37°C에서 1내지 2분간 방치시킨 뒤, 유착세포를 부유시키기 위해 flask를 진탕시킨 후 10% 우태아혈청이 함유된 EMEM 15ml를 첨가하여 trypsin의 효과를 없앴다. 50ml 원추형 원심분리관으로 옮긴 후 10분간 650 × g에서 원심분리하고 세포층을 모은 후 10ml의 EMEM을 재첨가한 후 hemocytometer에서 tryphan blue dye exclusion 검사로 총세포수와 생존율을 구한 후 EMEM을 첨가하여 세포수를 4×10^5 /ml로 맞추어 재배양하였다. 배양된 MRC-5는 역위상차 현미경 조건과 viemntin에 대한 단클론 항체를 이용한 면역염색 조건 (Fig. 1)를 이용하여 확인하였다.



Fig. 1. Immunofluorescence microscopic findings of MRC-5 stained with anti-vimentin monoclonal antibodies ($\times 200$).

2. 면역형광염색법을 이용한 섬유모세포의 규명

배양된 MRC-5를 cytospin으로 poly-L-lysine 처리된 slide위에 부착시킨 뒤, slide를 acetone으로 4℃에서 15분간 처리하여 고정시켰다. 이것을 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후, 비특이 결합을 방지하기 위하여 blocking solution (3% Bovine serum albumin-PBS, 0.3% Triton X100, 10% sheep serum)으로 10분간 처리하였다. 여기에 solution A (3% Bovine serum albumin-PBS, 0.3% Triton X100)로 희석한 vimentin에 대한 단클론 mouse 일차항체 (DAKO, Denmark)를 떨어뜨려 상온에서 1-2시간 방치한 뒤, solution A로 3회 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거하였다. 여기에 solution A로 희석한 이차항체 (FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin, DAKO, Denmark)를 떨어뜨려 상온에서 30분내지 1시간 방치시킨 후, solution A로 3회 세척하여 결합하지 않은 항체를 제거하였다. 이것을 상온에서 말린 후, glycerol을 위에 한방울 떨어뜨려 cover glass를 덮어 형광현미경으로 검경하였다.

3. 섬유모세포의 증식능 측정

섬유모세포 자극은 Genzyme사(미국)에서 구입한 인형 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 를 사용하였다.

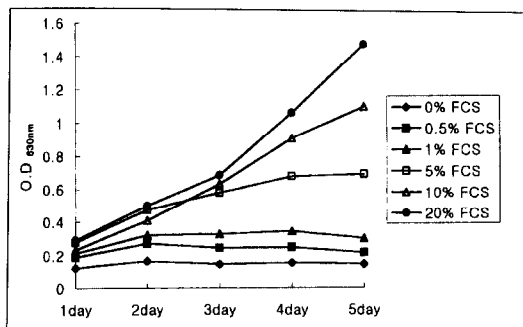
섬유모세포의 증식능은 자극 후 4일간 37℃, 5% CO₂의 보온가습기에서 배양된 섬유모세포의 수를 측정하는 것으로, 세포들을 9% acetic acid/0.1M sodium acetate 완충액내에 10% formalin 용액으로 고정시킨 후 0.5% naphthol blue black으로 염색하였다. 증류수로 세척한 후 50mM의 NaOH로 Naphthol blue black을 유리시켜 630nm에서 분광 흡수 (optical density : OD)를 측정하였다.

결 과

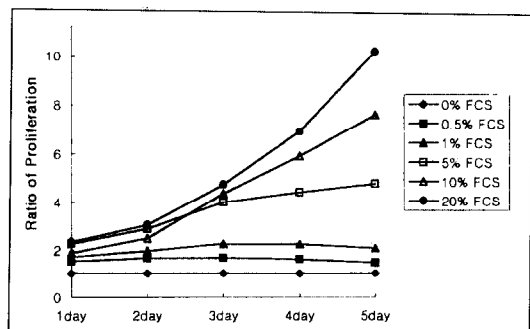
1. 우태아혈청 농도에 따른 섬유모세포의 증식능

MRC-5의 증식의 유도과 유지는 우태아혈청을 이용하였다. 혈청의 존재하에서 섬유모세포는 증식되므로 TGF- β 에 의한 섬유모세포의 증식능을 알기 위해서는 우태아혈청에 의한 섬유모세포의 증식이 최소한으로 유지되면서, 생존이 유지되는 우태아혈청의 농도를 사용할 필요가 있어, 우태아 혈청의 농도에 따른 MRC-5의 증식을 시간에 따라 측정하였다(Fig. 2).

그림에서 보는 바와 같이 1일째 부터 6일째 까지 MRC-5를 우태아혈청의 농도를 0%에서 20%까지로 하여 배양한 결과 우태아혈청이 없는 상태에서는 증식능의 변화가 없었으나 5% 이상의 농도에서는 시간이 지남에 따라 MRC-5의 증식이 유의하게 높아짐을 알 수 있었으며, 20% 우태아 혈청에 의하여 6일째는 우태아혈청이 없는 상태에 비하여 10배 이상



A



B

Fig. 2. The proliferation of MRC-5 by the different serum concentration.

증식함을 알 수 있었다 (Fig. 2, a). 0.5% 우태아 혈청에서는 2일째까지 약간의 상승을 보이나 그 후로는 변화가 없었다.

상기 결과를 0% 우태아혈청에 의한 MRC-5의 증식을 1로하여 비율로 환산하면 0.5%의 우태아 혈청이 있는 경우 MRC-5의 증식능이 50% 증가 된 상태로 배양 6일째 까지 더 이상의 증가가 없이 그대로 유지하고 있었으나, 우태아 혈청이 1% 이상인 경우 MRC-5는 100% 이상의 증식증가를 보이면서 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 소견을 보였다 (Fig. 2, b).

2. IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 에 의한 MRC-5 증식

인형 IL-1 β , IL-1, TNF- α , TGF- β 를 각각 0.1, 1, 10, 50 ng/ml의 농도로 혼합배양한 후 96시간째 MRC-5의 증식을 6회 측정하였다. 0.5% 우태아 혈청만이 있는 상태에서의 MRC-5의 증식정도를 1로 기준하여 계산하였을 때 IL-1 β 는 50ng/ml에서만 45%의 유의한 MRC-5의 증식 증가효과가 있었으며 (Fig. 3), IL-6의 경우 약 15% 정도 억제하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 반면 TGF- β , TNF- α 는 1 ng/ml의 농도에서 각각 20%와 55%의 유의한 MRC-5의 증식 증가효과가 있었으며, 10ng/ml에서는 100% 이상, 50 ng/ml의 TNF- α 는 160%,

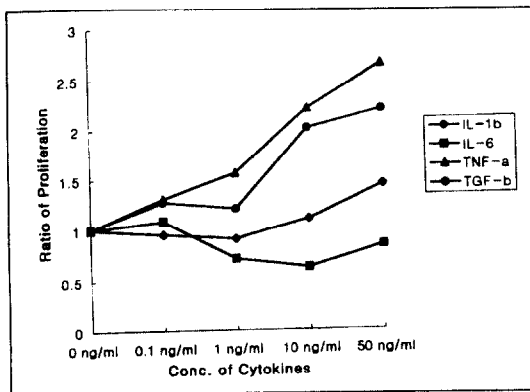


Fig. 3. The effect of cytokines on the proliferation of MRC-5.

TGF- β 는 120%의 MRC-5의 증식 증가효과가 있었다.

3. TGF- β 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 IL-1 β , IL-6, TNF- α 가 미치는 영향

50ng/ml의 TGF- β 단독 자극에 비하여 IL-1 β 를 혼합 배양하였을 때 0.1ng/ml의 IL-1 β 는 22%, 1ng/ml의 IL-1 β 는 41%, 10ng/ml의 IL-1 β 는 45%, 50ng/ml의 IL-1 β 는 64 %의 MRC-5 증식을 증가시키는 효과를 보였다 (Fig. 4). TNF- α 를 혼합 배양하였을 때 TGF- β 단독 자극에 비하여 0.1ng/ml의 TNF- α 는 44%, 1 ng/ml의 TNF- α 는 121%, 10 ng/ml의 TNF- α 는 155%, 50 ng/ml의 TNF- α 는 159 %의 MRC-5 증식을 증가시키는 효과를 보였다. IL-6를 혼합 배양하였을 때 TGF- β 단독 자극 시에 비하여 0.1 ng/ml의 IL-6는 16% 억제효과를, 1 ng/ml의 IL-6는 3%의 억제효과, 10 ng/ml과 50 ng/ml의 IL-6는 1%의 MRC-5의 증식 증강 효과를 보였으나 IL-6는 TGF- β 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 영향을 미치지 못하였다.

4. TNF- α 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 IL-1 β , IL-6가 미치는 영향

50 ng/ml의 TNF- α 는 0.5% 우태아혈청만으로 배

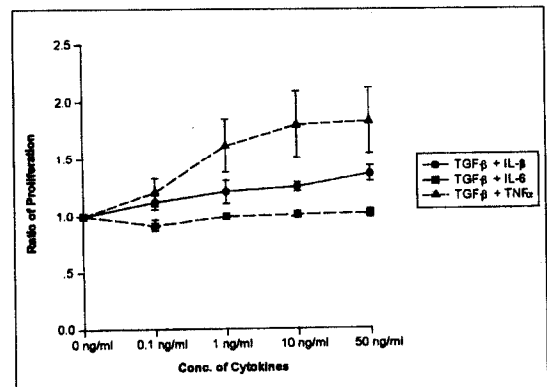


Fig. 4. The effect of IL-1 β , IL-6 and TNF- α on the TGF- β -induced proliferation of MRC-5.

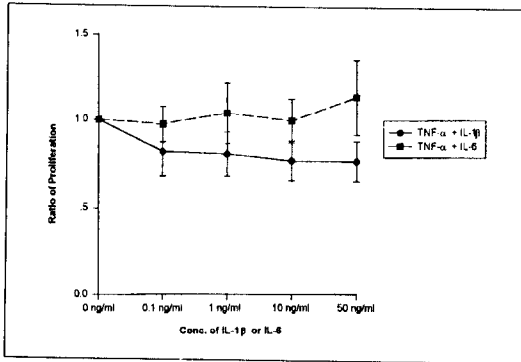


Fig. 5. The effect of IL-1 β and IL-6 on the TNF- α -induced proliferation of MRC-5.

양한 MRC-5의 증식에 비하여 122%의 증식능 증가 효과가 있었다 (Fig. 5). TNF- α 단독 자극에 비하여, IL-1 β 를 혼합 배양하였을 때 0.1 ng/ml의 IL-1 β 는 13%, 1 ng/ml의 IL-1 β 는 24%, 10 ng/ml의 IL-1 β 는 34%, 50 ng/ml의 IL-1 β 는 50%의 MRC-5 증식 억제 효과를 보였다. IL-6를 혼합 배양하였을 때 TNF- α 단독 자극시에 비하여 0.1 ng/ml의 IL-6는 15%, 1 ng/ml의 IL-6는 7%의 억제효과를 보였고, 10 ng/ml의 IL-6는 영향이 없었으며, 50 ng/ml의 IL-6는 10%의 MRC-5의 증식 증가효과를 보여 IL-1 β 만이 TNF- α 의 MRC-5 증식능 증가 효과를 상쇄시키는 것으로 사료되었다.

5. TNF- α 와 TGF- β 의 MRC-5 증식능 증가에서의 상호 관련성

TNF- α 와 TGF- β 의 혼합 자극 실험은 4회에 걸쳐 반복 실험되었다 (Fig. 6). 50 ng/ml의 TNF- α 와 TGF- β 는 단독으로 MRC-5의 증식을 각각 89%, 135% 증가시키며, 공존시 MRC-5의 증식을 222% 증가시키는 효과가 관찰되어, 증식능의 증가정도는 TNF- α 와 TGF- β 상호간의 첨가효과 (additive effect)임을 관찰할 수 있었다.

고 찰

Virus, 세균, 약물, 화학물질, 면역복합체등의 여러

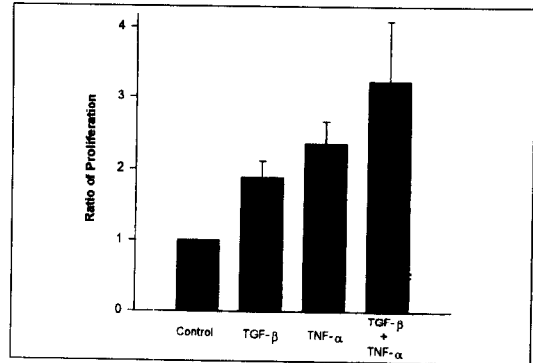


Fig. 6. The interaction of TGF- β and TNF- α on the proliferation of MRC-5.

인자에 의해 조직이 손상을 받으면 방어기전으로 염증 반응을 보이다가 회복과정이 시작된다. 이때 손상의 원인이 제거되면 원래 있었던 실질세포로 복원되어 정상적인 기능을 유지하는 경우가 대부분이나, 자극에 의한 손상이 지속적으로 계속되거나, 조직의 손상에 따른 염증반응의 조절이 부적절할 때 회복은 되었을지라도 비정상적인 결체조직으로 대체되어 영구적인 반흔(scar)이 남아 기관의 기능을 상실하여 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있다^{1,2)}.

급, 만성 염증 반응에 동반된 염증세포에서는 여러 종류의 cytokine이 분비되어 염증반응을 조절하며, 이들 cytokine이 섬유모세포의 증식과 교원질 합성능을 향진시켜 섬유화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있다. 따라서, 본 연구에서는 섬유모세포의 증식과 교원질 합성에 중요한 역할을 하는 transforming growth factor (TGF- β)와, proinflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 이 각각 섬유모세포의 증식에 어떤 영향을 미치는지와, 이들 cytokine의 섬유모세포 증식에 미치는 상호 관련성을 규명하고자 하였다.

0.5%의 우태아혈청이 포함된 배지에서, IL-1 β 는 약 15% 정도 MRC-5의 증식을 증가시켰으며, IL-6는 약한 억제경향을 보였고, TNF- α 와 TGF- β 는 농도의존성으로 MRC-5의 증식을 증가시켜 50 ng/ml의 농도에서는 120% 이상의 증식 증가효과를 보

였다. 이는 섬유모세포의 증식에 TGF- β 뿐만 아니라 TNF- α 도 중요하게 작용함을 뒷받침하며, 이외의 cytokine들도 섬유모세포의 증식에 영향을 준다는 것을 시사한다.

TGF- β 가 섬유모세포 증식을 촉진한다는 것은 잘 알려진 사실이나, 다른 cytokine과 상호작용은 잘 알려지지 않았으므로, 섬유모세포의 증식을 촉진시키는 TGF- β 의 기능에 다른 cytokine들이 미치는 영향을 알아보고자 TGF- β 에 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 각각 첨가하여 섬유모 세포를 배양하였다. 그 결과, IL-1 β 는 농도의존성으로 MRC-5 증식증가에 대한 TGF- β 의 영향을 약 50% 정도 증가시켰으며, IL-6는 TGF- β 의 작용에 영향이 없었고, TNF- α 는 농도에 의존성을 보이며 100% 이상 TGF- β 의 MRC-5 증식 증가능을 증가시켰다. 이는 TNF- α 와 TGF- β 가 섬유모세포의 증식 증가에 상호 첨가효과(additive effect)를 보임을 시사한다.

위의 실험 결과에서, TNF- α 도 MRC-5의 증식을 크게 증가시켰으므로, TNF- α 가 MRC-5 증식에 미치는 영향에 다른 cytokine들이 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 TNF- α 과 IL-1 β , IL-6를 각각 혼합 배양하여 보았다. 그 결과, IL-1 β 만이 농도의존성을 보이며 최고 50%까지 TNF- α 의 MRC-5 증식 증가 효과를 상쇄시켰다.

마지막으로, TGF- β 와 TNF- α 의 섬유모세포 증식에 있어서의 상호관계를 확인하기 위하여, 이들 두 cytokine을 혼합하여 배양한 결과, TNF- α 와 TGF- β 는 각각 89%, 135%의 MRC-5 증식 증가 효과를 보였고, 혼합 배양시는 222%의 증식 증가 효과를 나타내 이들 두 cytokine들은 상호 첨가효과(additive effect)를 나타내는 것으로 확인 되었으며, 이는 위의 실험 결과와 부합되는 것이었다.

상기 일련의 실험에서, 여러종류의 proinflammatory cytokine들이 TGF- β 와 함께 작용하고, 이들이 조절됨으로써 섬유모세포의 증식을 조절한다는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 염증반응 후의 섬유화 과정에 염증세포에서 분비된 proinflammatory

cytokine들이 TGF- β 와 상호 관련성을 가지고 섬유모세포의 증식을 조절하여 섬유화 과정에 중요하게 작용함을 확인하였다. 이는 이들 cytokine, 특히 TNF- α 의 분비와 작용을 조절함으로써 섬유모세포의 증식을 조절하여 비가역적으로 진행되는 섬유화증의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있음을 시사한다. 또한 앞으로 TNF- α 와 TGF- β 의 상호 관련성 및 교원질 합성에 미치는 영향등을 연구할 필요성이 제기되었다.

요 약

연구배경 :

조직의 손상에 의한 염증반응 후 회복과정에서 정상조직으로 환원되지 않고 일부는 결체조직으로 대체되어 섬유화가 일어난다. 이 비정상적 섬유화에 의해 섬유화증이 일어나 조직의 원래 기능을 상실하기도 한다. 이때 염증에 관계되는 세포로부터 분비된 여러종류의 cytokine들이 섬유모세포의 증식과 교원질 합성을 조절한다. 이에 관계된 cytokine들의 상호 관련성과 섬유모세포 증식에의 영향을 알아내어 조절함으로써 섬유화증을 예방하고 치료하는데 도움을 줄 수 있다. 본 연구에서는 proinflammatory cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 섬유모세포의 증식에 큰 영향을 미치는 TGF- β 의 상호 관련성을 알아보고자 하였다.

방 법 :

섬유모세포는 사람 태아의 섬유모세포주인 MRC-5를 사용하였으며, 0, 0.5, 1, 5, 10, 20%의 우태아 혈청을 첨가하여 1, 2, 3, 4, 5일째의 MRC-5 증식을 측정하여, 최소한으로 MRC-5의 증식을 억제하면서 생존을 유지시킬 수 있는 배양액중 혈청농도를 먼저 확인한 후, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6를 각각 RPMI 배지에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 보온기에서 96시간동안 배양하여 0.5% naphthol blue black으로 염색한 뒤, 50mM의 NaOH로 naphthol blue black을 유리시켜 630nm에서의 분광흡수를 잴으로써 MRC-5의 수를 측정하였다. 또한 TGF- β 와 다른 cytokine의 관련성을 알아보기 위해 TGF- β 와

함께 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 각각 배지에 첨가하여 96시간 배양 후, 위와 동일한 방법으로 MRC-5의 수를 측정하였으며, TNF- α 와 IL-1 β , IL-6의 상호 관련성을 알아보기 위해 TNF- α 와 함께 IL-1 β , IL-6를 각각 배지에 첨가하여 96시간 배양한 뒤 위와 동일한 방법으로 MRC-5의 수를 측정하였고, 마지막으로 TGF- β 와 TNF- α 의 섬유모세포 증식에 미치는 상호 관련성을 알아보기 위하여 TGF- β 와 TNF- α 를 함께 배지에 첨가하여 96시간 배양 후, MRC-5의 수를 역시 동일한 방법으로 측정하였다.

결 과 :

1. 최소한으로 MRC-5의 증식을 억제하면서 생존을 유지할 수 있는 배양액중 혈청 농도를 측정한 결과, 0.5% 혈청 농도에서 MRC-5의 증식이 50% 증가된 상태로 배양 6일째 까지 유지되었다. 따라서 이후의 실험에서 사용된 배양액에는 0.5%의 우태아혈청을 포함시켰다.

2. 각 cytokine이 MRC-5 증식에 미치는 영향
0.5%의 우태아혈청만이 있는 상태에서의 MRC-5 증식 정도를 100%로 기준하였을 때, IL-1 β 는 50 ng/ml의 농도에서만 45%의 증식 촉진효과를 보였고, IL-6는 영향이 없었으며, TGF- β 와 TNF- α 는 농도에 의존성을 보이며 MRC-5의 증식을 최고 160%까지 증가시켰다.

3. TGF- β 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 IL-1 β , IL-6, TNF- α 가 미치는 영향

50 ng/ml의 TGF- β 단독 자극에 비하여, IL-1 β 혼합배양시 농도에 의존성으로 보이며 최고 64%까지, TNF- α 혼합배양시 농도에 의존성을 보이며 최고 159%까지 MRC-5의 증식을 증가시켰다. IL-6는 약한 억제효과를 보였으나 TGF- β 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 영향을 미치지 못하였다.

4. TNF- α 에 의한 MRC-5 증식능 증가에 IL-1 β , IL-6가 미치는 영향

50 ng/ml의 TNF- α 단독자극에 비하여, IL-1 β 을 혼합 배양하였을때 농도에 의존성을 보이며 최고 50%까지 MRC-5의 증식을 억제하였고, IL-6는 영향

을 미치지 못하였다.

5. TNF- α 와 TGF- β 의 MRC-5 증식능 증가에서의 상호 관련성

50 ng/ml의 TGF- β 와 TNF- α 는 MRC-5의 증식을 각각 89%, 135% 증가시켰으며, TGF- β 와 TNF- α 공존시에는 MRC-5의 증식을 222% 증가시켰다.

결 론 :

TNF- α , TGF- β , IL-1 β 의 순서로 MRC-5에 대한 증식 자극효과가 있으며 IL-6는 증식을 억제하는 효과가 있었다. TGF- β 의 MRC-5에 대한 증식 자극효과는 IL-1과 TNF- α 에 의해 첨가효과를 관찰할 수 있었고, TNF- α 의 MRC-5 증식 자극효과는 IL-1 β 에 의하여 억제되었다.

참 고 문 헌

1. Derks CM, Jacobovitz-Derks D : Embolic pneumopathy induced by oleic acid: a systematic morphology study. *Am J Pathol* 87 : 143-158, 1977
2. Nakashima JM, Levin JR, Hyde DM, Giri SN : Repeated exposures to enzyme-generated oxidants cause alveolitis, epithelial hyperplasia and fibrosis in hamsters. *Am J Pathol* 139 : 1485-1499, 1991
3. Idell S, James KK, Levin EG : Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 84 : 695-705, 1989
4. Bertozzi P, Astedt B, Zenius L, Lynch K, Lemaire F, Zapol W, Chapman HA : Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult distress syndrome. *N Engl J Med* 322 : 890-897, 1990
5. Katzenstein A-L, Bloor CM, Liebow AA : Diffuse alveolar damage : the role of oxygen, shock,

- and related factors. *Am J Pathol* 85 : 210-228, 1976
6. Guy MT, Jordana M, Gauldie J : Chapter 16, Fibroblasts as effector cells in fibrosis, In Lenfant C, Sem HP, Roger ST(Ed.) *Pulmonary Fibrosis*, p541, New York, Marcel Dekker, Inc., 1995
7. Jordana M, Richards TB, Irving A, Gauldie J : Spontaneous in vitro release of alveolar-macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. Characterization and kinetic studies. *Am Rev Respir Dis* 137 : 1135-1140, 1988
8. Martinet Y, William NR, Grtendorst GR, Martin GR, Crystal RG : Exaggerated spontaneous release of platelet derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 317 : 202-209, 1987
9. Khalil N, Bereznay O, Sporn MB, Greenberg AH : Macrophage production of transforming growth factor- β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 170 : 727-737, 1989
10. Khalil N, Bereznay O, Greenberg AH : Alveolar macrophages from bleomycin-induced pulmonary inflammation synthesiza and secrete transforming growth factor- β (TGF- β). *Am Rev Respir Dis* 141 : A138, 1990
11. Phan S, Gharaee-Kermani M, Wolber F, Ryan U : Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor- β production by bleomycin. *J Clin Invest* 87 : 148-154, 1991
12. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P : Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 170 : 655-663, 1989
13. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC : Interleukin 1 receptor antagonist(IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 5 : 57-61, 1993
14. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, Tsujimoto M : Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163 : 632-643, 1986
15. Mauviel A, Heino J, Kahari VM, Hartmann DJ, Loyau G, Pujol JP, Vuorio E : Comparative effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α on collagen production and corresponding procollagen mRNA levels in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96 : 243-249, 1991
16. Solis Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M : Tumor necrosis factor α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 263 : 5841-5845, 1988
17. Mauviel A, Daireaux M Redini F, Galera P, Loyau G, Pujol JP : Tumor necrosis factor inhibits collagen and fibronectin synthesis in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 236 : 47-52, 1988
18. Duncan MR, Berman B : Differential regulation of collagen, glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1- α and β and tumor necrosis- α and β . *J Invest Dermatol* 92 : 699-706, 1989