

□ 원 저 □

## 백서에서 Bleomycin 투여로 인한 폐손상 및 폐섬유화에 대한 Vitamin E의 영향

- Penicillamine, Deferoxamine 투여군과 비교 -

연세대학교 원주의과대학 병리학교실, 내과학교실\*

연세대학교 의과대학 병리학교실\*\*\*, 내과학교실\*\*\*

정순희 · 용석중\* · 안철민\*\*\* · 신계철\* · 최인준\*\* · 조상호\*\*

= Abstract =

### The Effect of Vitamin E on Bleomycin-Induced Pulmonary Injury and Fibrosis in Rat

- Comparison of Penicillamine- or Deferoxamine-Treated Group -

Soon-Hee Jung, M.D., Suk-Joong Yong, M.D.,\* Chul Min Ahn, M.D.,\*\*\*

Kye Chul Shin, M.D.,\* In Joon Choi, M.D.\*\* and Sangho Cho, M.D.\*\*

Departments of Pathology and Internal Medicine\*, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Departments of Pathology\*\* and Internal Medicine\*\*\*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Pulmonary toxicity by bleomycin has multiple mechanisms including direct tissue toxicity due to oxygen-derived free radicals and indirect toxicity through amplification of pulmonary inflammation. To evaluate the effect of chelators or free radical scavenger to lung damage induced by bleomycin, penicillamine as a copper chelator, deferoxamine as an iron chelator and vitamin E as a free radical scavenger were administered.

**Methods:** Two hundred Wistar rats were divided into five groups: Control, bleomycin treated, bleomycin-penicillamine treated, bleomycin-deferoxamine treated, and bleomycin-vitamin E treated groups. Rats sacrificed on day 1, day 3, day 4, day 7, day 14, and day 28 after treatment. Bronchoalveolar lavage, light microscopic and immunohistologic studies for type I, III, IV collagens, fibronectin, laminin and NBD phalloidin were evaluated.

**Results:** There was a significant increase in the total cell counts of bronchoalveolar lavage on day 1 from all treated animals and vitamin treated group showed an abrupt decrease in total cell counts with decrease of neutrophils on day 3. Bleomycin-vitamin E treated group had the least histologic changes such as pulmonary fibrosis. The alveolar basement membranes were positive for type IV collagen and laminin. Basement membranes of bleomycin, bleomycin-penicillamine, or

본 연구의 일부는 1992년도 연세대학교 교수연구비로 이루어 졌음.

bleomycin-deferoxamine treated groups were disrupted and fragmented on day 4 or 7. The bleomycin-vitamin E treated group had intact basement membranes until day 28.

**Conclusion:** Bleomycin-induced pulmonary fibrosis was related to the severity of acute injury to oxygen radicals or activation of neutrophils and disruption of basement membrane. Vitamin E seemed to be the most effective antioxidant in the inhibition of bleomycin-induced pulmonary injury and fibrosis.

**Key Words:** Bleomycin, Pulmonary injury, Vitamin E, Oxygen radicals, Extracellular matrix

## 서 론

항암제로 흔히 쓰이는 bleomycin에 의한 폐손상 및 폐섬유화는 잘 알려진 실험 모델로써 특발성 폐섬유증 연구의 토대가 되어왔다. 1944년 Hamman과 Rich<sup>1)</sup>가 처음으로 원인 불명인 폐포벽의 점진적 미만성 섬유증 2예를 기술한 이래로 Liebow 등<sup>2)</sup>이 간질성 폐질환의 개념을 소개했다. 급성기의 이런 질환들이 일으키는 폐 손상을 diffuse alveolar damage란 용어로 소개했으며, 임상적으로는 adult respiratory distress syndrome이라고 보편적으로 사용하고 있다. 또한 Scadding과 Fishman 등<sup>3~5)</sup>은 폐포염의 개념을 소개하면서 이때 폐포의 구성조직들이 변화하여 폐섬유화를 유발한다고 하였다. 그러나 이러한 폐포염, 폐섬유화의 원인이나 병인과 진행과정은 불분명하고 복잡적이다. 최근 많은 약물사용으로 인한 폐손상의 발생빈도가 증가되면서 생검, 부검의 소견으로 기술되었고, 실험 모델로써 bleomycin 투여로 인한 폐손상 및 폐섬유화가 연구되어 왔으나 아직도 많은 문제점들이 규명되지 못한 상태이다<sup>6~12)</sup>.

Bleomycin은 copper-chelating glycopeptides의 혼합물로서 산소와 철 또는 구리 이온들이 상호작용하여 DNA를 분해시킨다. 대부분의 조직들은 bleomycin hydrolase의 활성도가 높지만, 폐와 피부는 이 효소의 활성도가 낮아서 bleomycin 투여 후 독성이 잘 나타난다. 폐 손상을 일으키는 약제들의 폐 독성의 기전은 산화제/산화방지제계(oxidant/antioxidant system)와 면역계, 기질 수복계(matrix repair system), 단백분해계와

중추신경계의 변화에 의한 것으로 알려져 있는데, 이중 산화제/산화방지제계에 의한 손상이 가장 주목받고 있다<sup>13)</sup>. Bleomycin의 폐독성 기전은 과산화음이온, 과산화수소, 수산화이온 등의 산소유리기에 의한 직접 독성과 중성구, 림프구, 대식세포등의 염증세포들과 섬유모세포에 의한 간접 독성으로 나누어 설명한다<sup>13)</sup>. 직접 독성을 일으키는 산소유리기중 수산화 이온은 구리나 철이온이 과산화수소와 작용하여 형성하는데, bleomycin은 주로 이 기전을 통하여 세포 손상을 주게 된다<sup>14)</sup>. 산소유리기에 의한 조직의 손상을 억제시키는 산화방지제에는 superoxide dismutase, catalase와 glutathione peroxidase 같은 효소들과 ceruloplasmin이나 transferrin 등의 철청단백질 같이 생체내에 존재하는 것도 있지만, 외부적으로 투여가 가능한 산화방지제로는 vitamin E나 d-penicillamine과 셀프하이드릴을 함유하고 있는 cysteine이나 glutathione 같은 것들이 있다<sup>15)</sup>.

따라서 구리의 킬레이트제인 penicillamine이나 철의 킬레이트제인 deferoxamine을 투여하여 수산화 이온같은 산소유리기의 형성을 억제하고, vitamin E를 투여하여 이미 생성된 산소유리기를 보집하면 bleomycin 투여에 의한 폐손상을 억제 할 수 있다고 사료되나, 이에 대한 연구는 거의 없을 뿐만 아니라 deferoxamine을 투여 한 경우 오히려 상반된 결과를 보고하고 있다<sup>16~18)</sup>. 또한 penicillamine 투여시 폐섬유증을 억제시켰다는 연구결과가 monocrotaline 투여나 방사선 조사에 의한 폐손상 실험에서는 보고되고 있지만, bleomycin 투여 실험에서는 아직 발표된 바가 없다<sup>19~24)</sup>. Vitamin E는 잘 알려진 산화방지제로 여러 산소유리기를 보집하고 조직의 지질과산화과정을 억제하여 조직

손상을 막을 수 있는데<sup>25~26)</sup>, bleomycin에 의한 폐손상에서 vitamin E를 투여하여 그 영향을 보고한 실험은 아직 없었고 vitamin E 결핍 음식으로 bleomycin에 의한 폐독성을 악화시킨 보고만이 있을 뿐이다<sup>27,28)</sup>.

Bleomycin 투여에 의한 폐손상 및 폐섬유화에 대한 형태학적 연구는 주로 광학현미경과 전자현미경조건에 관한 관찰이 대부분인데 최근 많이 시행하고 있는 기관지폐포세척술에 의해 얻은 세척액내 염증세포 구성의 관찰은 생체내에서의 이들 세포의 변화를 간접적으로 대별하여 주며, 특히 실험적 연구에서 각 시기별 변화를 관찰함은 폐손상의 단계를 진단함과 동시에 병인을 이해하는데 도움을 줄 수 있다<sup>29~32)</sup>. Bleomycin 투여로 인한 폐손상에 관여하는 염증세포들의 변화는 결국 염증반응을 유발시킨 후 폐섬유화를 초래하는데, 폐섬유화는 세포외 기질의 변화로써 발생한다<sup>33,34)</sup>. 세포외 기질은 교원섬유성 기질과 비교원섬유성 기질로 나눌 수 있는데<sup>15,35)</sup>, 폐에서는 교원섬유 I, II, III, IV, V, VI 형의 분포를 볼 수 있으며, 이 중 I, III 형은 폐 간질조직에 분포하고, II형은 연결조직내에, IV형은 폐포상피세포 및 혈관 내피세포의 기저막에 존재한다<sup>36~38)</sup>. 비교원섬유성 기질인 fibronectin은 폐포간질에, laminin은 기저막에 존재하나 조직 손상에 의한 이들의 변화는 다양하다. 그러므로 bleomycin 투여후 폐의 교원섬유 성분, fibronectin과 laminin의 변화가 폐섬유화의 병인을 이해하는데 중요한 것으로 사료되며, 이들 세포외 기질 변화의 전구요인으로 섬유모세포외에 근섬유모세포의 역할에 대해 제시되고 있으나 이에 대한 기술은 매우 드물다<sup>33,39,40)</sup>.

따라서 저자들은 bleomycin 투여로 유발된 폐손상 및 폐섬유화를 억제시킬 수 있을 것으로 사료되는 약제들, 즉 구리의 킬레이트제인 penicillamine과 철의 킬레이트제인 deferoxamine 및 산소 유ри기의 보집제로 작용할 수 있는 vitamin E를 투여한 다음, 기관지폐포세척술을 이용하여 각 시기별 염증세포의 구성 변화를 광학현미경조건과 병행하여 관찰하고 세포외 기질인 교원섬유 I형, III형, IV형 및 fibronectin, laminin과 근섬유모세포에 대한 NBD-phalloidin의 면역학적 염색조건을 관찰함으로써 bleomycin 투여와 여러가지 산화방지제 투여에 의한 폐손상 및 폐섬유화의 발생과 그 억

제 기전을 이해하고자 본 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

기초사육후 1주일간 환경에 적응시킨 체중 200gm내외의 웅성 Wistar 백서 200마리를 대조군(12마리)과 실험군(188마리)으로 나누어 실험하였다. 실험군 188마리중 계획된 도살일 전에 사망한 29마리는 실험성적의 판독에 포함하지 않았고, 생존한 동물 159마리중 144 마리만 실험성적 판독에 포함시켰다. 각 실험군은 다음과 같이 5군으로 나누어 실험하였고, bleomycin 투여후 1일, 3일, 4일, 7일, 14일, 28일에 각각 6마리씩 대조군 2마리와 함께 도살하였다.

제 1 군 정상 대조군	12마리
제 2 군 Bleomycin 단독투여군	36마리
제 3 군 Bleomycin과 penicillamine 투여군	36마리
제 4 군 Bleomycin과 deferoxamine 투여군	36마리
제 5 군 Bleomycin과 vitamin E 투여군	36마리

### 2. 약물투여 방법

Bleomycin 투여는 백서를 ether 마취하에 실험대에 위에 배위로 고정하고 멸균 식염수에 용해시킨 bleomycin(일본화학주식회사 제품, 상품명 Bleocin)을 체중 200gm 당 1.5unit 씩 백서에 알맞은 후두경을 이용하여 삼관법으로 기관내로 투여하였다. 대조군은 0.3ml의 멸균식염수를 같은 방법으로 투여하였다. Penicillamine(d-penicillamine; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)은 bleomycin 투여 2일전 부터 증류수에 용해시켜 30mg/kg/day 씩 도살할 때까지 매일 복강내로 주사하였다. Deferoxamine mesylate(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)는 bleomycin 투여 5일전부터 도살할 때까지 50mg/kg/day씩 인산염 완충식염수(phosphate-buffered saline; PBS)에 용해시켜서 1일 2회 복강내로 주사하였다.

Vitamin E( $\alpha$ -tocopherol; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)는 bleomycin 투여 2일전부터 도살할 때까지 corn oil에 용해시켜 100mg/kg/day를 매일 경구투여 하였다.

### 3. 검사 방법

#### 1) 기관지폐포세척술

실험동물은 제충 측정후 pentobarbital 30mg/kg를 복강내에 주사하여 마취시킨 후 동맥 전채혈(aortic exsanguination)하여 도살하였다. 도살한 동물은 폐주위조직을 박리하여 좌엽 기관지를 기관 근위부에서 절찰한 후 우측 폐로만 인산염완충식염수(PBS)가 25cm H<sub>2</sub>O의 압력으로 중력에 의해 주입되게 하였는데, three-way tube를 이용하여 3ml씩 5회 주입하였다. 각 주입시마다 용액이 폐내에 3분씩 머무르게 한후 중력에 의해 회수된 세척액을 얼음으로 채워진 용기내의 50ml 시험관에 모았고, 배반 회수된 세척액의 용량을 기록하였다. 회수된 세척액은 낮은 속도의 원심법(1,500rpm at 4℃ for 10min)으로 용액내의 세포를 분리한 후, RPMI 1,640 배지로 2회 더 세척하였다. 세포수의 측정은 hemocytometer를 이용하였으며, 총 세포수는 기관지폐포 세척액의 ml당 세포수로 표현하였다. 이 후 세포수를  $1.0 \times 10^6$ /ml로 맞추후 200 $\mu$ l를 채취하여 cytocentrifuge 시켜서 슬라이드에 도말 건조후 Wright-Giemsa 염색을 시행하였다. 구성 세포들은 micrometer가 표시된 렌즈로 바꾼 광학현미경으로 400 배 시야에서 500개의 세포를 세어시 그 비율을 표시하였다.

#### 2) 광학현미경적 관찰

광학현미경검사를 위해 좌측 폐의 남은 조직과 동결절편후의 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후, 통상의 제작과정을 거쳐 파라핀에 포매한 다음 5~6 $\mu$ m로 세절하여, 일반적인 변화를 보기위한 hematoxylin-eosin염색, 교원섬유의 분포를 보기위한 Masson's trichrome 염색과 폐포 간질의 혈관내피세포 및 폐포상피세포의 기저막 변화를 보기위한 Jones' methenamine silver 염색을 시행하였다.

#### 3) 면역병리학적 관찰

기관지폐포세척술 시행전에 기관지 근위부를 절찰한 좌측폐는 병변이 심한 부위를 채취하여 면역형광현미경검사를 시행을 위해 신선한 상태로 cryocut(Histostat microtome, Shandon)를 이용, 3~4 $\mu$ m 두께로 동결절편을 만들어 보관하였다. Deep freezer에 보관되었던

신선한 상태의 동결절편 폐조직은 공기중에 건조시킨 후 4℃의 아세톤에 고정시키고 PBS buffer(pH 7.4)로 세척 후 교원섬유 I형, III형 및 laminin에 대한 항체(Chemicon, Temecula, CA)는 FITC로 fluorescein Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-Rabbit Total Ig (Oncogene Science, Manhasset, NY)를 이용, fibronectin에 대한 항체(BioGenex Laboratories, San Ramon, CA)는 FITC로 fluorescein Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-Mouse Total Ig (Oncogene Science, Manhasset, NY)를 이용하여 간접 면역형광염색을 하였고, NBD phalloidin (Molecular Probes, USA)은 직접 면역형광염색을 시행하여 면역형광현미경으로 관찰하였다. 교원섬유 IV형 (Sanbio bv, Uden, the Netherlands)에 대한 면역조직화학염색은 labeled streptavidin biotin(LSAB) 방법을 이용하였으며 발색제로 three, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 사용하여 염색하였다.

#### 4) 결과 판독 및 통계처리

광학현미경 소견은 부종, 중성구, 림프구, 대식세포의 침윤, 상피세포 증식과 섬유화로 나누어 관찰하였다. 면역학적 염색 소견은 교원섬유 IV형과 laminin은 기저막이 양성으로 유지되면(+), 흔적으로 유지되면(±), 그리고 파괴되어 음성이면(-)로 표시하였고, 교원섬유 I형과 III형 및 fibronectin은 면역형광 물질의 침착정도에 따라 음성(-), 부분적으로 미세한 침착(±), 섬유화 부위의 1/3 이하에 양성(+), 섬유화 부위의 1/3 이상 2/3 이하에 양성(++), 섬유화 부위의 2/3 이상에 양성(+++)으로 나누어 표시하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 비교는 Mann-Whitney U test로 검정하였고 p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 인정하였으며, 실험값은 평균±표준 오차로 표시하였다.

## 결 과

### 1. 사망률과 체중의 변동

#### 1) 사망률

실험군 동물 188마리 중 29마리가 계획된 도살일전에 사망하였으며, 생존한 동물 159마리 중 144마리만 실험에 포함하였다. 각 군에 따른 사망률을 보면 BLM

단독투여군은 제 4일 전에 9마리가 사망하였고 나머지 1마리는 제 14일에 사망하였다. Penicillamine 처치군은 제 7일과 제 14일 사이에 3마리가 사망하였으나 전체적으로 실험동물들은 호흡 곤란이 심하였다. Deferoxamine 처치군은 제 4일전에 2마리가 사망하였고, 제 21일과 제 28일 사이에 11마리가 사망하였다. Vitamin E 처치군은 제 3일에 3마리가 사망한 후 도살시까지 모두 생존하였다. 대조군의 12마리 동물은 각 도살일까지 모두 생존하였다.

## 2) 체중 변동

각 동물들의 처치전 체중을 100%로 하고 도살시의 체중 변동을 보면 대조군은 체중감소없이 제 28일군에서 130.2%로 증가하였다. BLM 단독투여군에서는 제 14일까지 감소(94.7%) 하였는데 제 4일군의 체중이 가장 현저하게 감소(85.1%)하였다. 제 14일부터 체중이 증가하기 시작하여 제 28일군의 체중은 113.3%에 달하였다. Penicillamine 처치군은 제 7일까지 감소(93.6%)하다가 이 후 증가하기 시작하여 제 28일군의 체중은 111.3%로 증가하였다. Deferoxamine 처치군과 vitamin E 처치군은 모두 체중 감소없이 제 28일에 각각 134.6%, 139.2%로 증가하였다. 이러한 결과를 대조군과 약물 투여군 간에 비교해 보면 BLM 단독투여군과 penicillamine 처치군은 대조군에 비하여 체중 감소가 심하지만 제 14일 이후 모두 체중 증가가 시작되어 말기에는 체중 회복을 하였다. 이에 비하여 deferoxamine 처치군과 vitamin E 처치군은 대조군보다도 체중 증가가 높았다.

## 2. 기관지폐포세척액의 검사조건

### 1) 기관지폐포 세척액의 회수율, 세포의 생존율 및 총 세포수

세척액 회수율은 대조군이나 약물 투여군간에 평균 값은 차이가 없었다. 그러나 약물 투여군 간의 시기에 따른 변화는 차이가 있었는데, BLM 단독투여군과 penicillamine 처치군은 제 3일, 제 4일에 회수율이 감소하다가 제 7일부터 평균치로 회복된 반면, deferoxamine이나 vitamin E 처치군은 시간 경과에 따른 변화 없이 거의 비슷하였다. 세포의 생존율 역시 대조군과 약물 투여군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었는데( $p > 0.1$ ), 그 범위는 80.9%에서 93.1% 였고 평균 세포 생존율은 대조군의 경우 87.3%, 약물 투여군은 88.6%였다.

총 세포수는 약물투여군이 정상 대조군에 비하여 통계학적으로 유의있게 높았는데( $p < 0.05$ ), BLM 단독투여군은 제 1일부터 14일까지 약 2~4배로 증가되었으며, 제 4일에 최고값에 도달한 후 서서히 감소하기 시작하여 제 28일에는 거의 대조군과 비슷한 값에 도달하였다. 그러나 penicillamine과 deferoxamine 처치군들은 제 1일부터 증가하여 제 28일까지 대조군에 비하여 유의있게 높았다( $p < 0.05$ ). 특히 penicillamine 처치군의 총 세포수가 실험군중에서 가장 많이 증가되었는데, 1일부터 14일까지 거의 4배로 증가되었으며 28일에도 거의 3배에 가까웠다. BLM 단독투여군과 deferoxamine 처치군은 전 기간을 통하여 중등도로 증가되었다. 이에 비해 vitamin E 처치군은 제 1일에는  $2.88 \pm 1.55$  (정상대조군  $1.01 \pm 0.43$ )로 증가되었으나 3일에

Table 1. Total Cell Counts of Bronchoalveolar Lavage Fluid ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) at Various Times

Groups	1	3	4	5	14	28(days)
Control			$1.01 \pm 0.43$			
Bleomycin	$2.04 \pm 0.61^*$	$3.50 \pm 0.55^*$	$4.07 \pm 0.38^*$	$3.04 \pm 0.56^*$	$2.00 \pm 0.42^*$	$1.32 \pm 0.27$
Bleomycin+ Penicillamine	$4.85 \pm 0.75^*$	$4.04 \pm 0.63^*$	$3.84 \pm 0.49^*$	$4.26 \pm 0.47^*$	$4.25 \pm 0.52^*$	$2.88 \pm 1.49^*$
Bleomycin+ Deferoxamine	$2.12 \pm 0.38^*$	$3.06 \pm 0.04^*$	$2.46 \pm 0.89^*$	$2.44 \pm 2.50^*$	$2.46 \pm 1.38^*$	$2.63 \pm 0.55^*$
Bleomycin+ Vitamin E	$2.88 \pm 1.55^*$	$1.91 \pm 0.96^*$	$1.89 \pm 1.19^*$	$1.42 \pm 0.20$	$1.06 \pm 0.28$	$1.22 \pm 0.66$

\*  $p < 0.05$

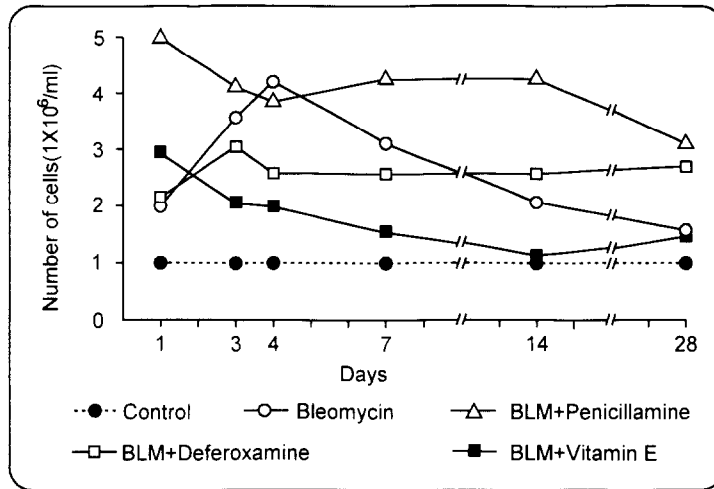


Fig. 1. Changes of total cell counts of bronchoalveolar lavage fluid at various times.

이미 감소하였으며 시기별 변화도 미약하였다(Table 1, Fig. 1).

## 2) 기관지폐포세척액의 각 염증세포 구성비

정상대조군은 95% 이상이 단핵구로 이루어져 있었으나, BLM 단독투여군은 제 3,4일에 중성구가 증가하다가 제 7일부터 감소하기 시작하여 제 28일에 대조군과 비슷해졌다. 호산구가 제 3,4일에 일시적으로 증가하였으며, 림프구는 제 3일부터 증가하여 지속적으로 유지되다가 제 28일에 감소하기 시작하였다. Penicillamine 처치군은 다른군에 비하여 전체적으로 중성구의 비율이 높고 림프구는 낮다가 제 28일에 증가되었다. 단핵구의 비율은 대조군이나 vitamin E 처치군에 비하여 낮지만 BLM 단독투여군 보다는 제 7일에 다소 많은 비율이나 전체적으로 낮았다. Deferoxamine 처치군은 다른 군에 비하여 림프구의 비율이 높았는데 초기에는 비슷하다가 제 4일부터 높아졌다. 중성구는 초기에 증가를 보이나 BLM 단독투여군이나 penicillamine 처치군에 비해 낮았고, 단핵구의 비율은 deferoxamine 처치군이 가장 낮았다. Vitamin E 처치군은 다른군에 비해 제 3일 이후 중성구의 비율이 급격히 감소하였으나 상대적으로 단핵구의 비율은 높았고, 림프구는 BLM 단독투여군에 비하여 지속적으로 높았다(Table 2). BLM 단독투여군과 약물처치군을 비교해 보면 중성구

의 변화가 특징적이었는데, BLM 단독투여군은 제 7일까지 지속적으로 높았지만 vitamin E 처치군은 제 1일에는 다른 약물 처치군과 비슷하였으나, 3일 이후 BLM 단독투여군의 중성구 비율의  $\frac{1}{3}$  이하로 급격히 감소하였다(Fig. 2). 단핵구는 vitamin E 처치군만 BLM 단독투여군보다 높았고 penicillamine이나 deferoxamine 처치군은 더 낮았으며, 림프구는 deferoxamine 처치군이 다른 약물처치군에 비하여 제 4일 이후 뚜렷이 높았다. 호산구는 BLM 단독투여군이 다른군에 비하여 약간 높았지만 대체로 초기에 일시적으로 증가하는 추세였다.

## 3. 광학현미경소견

### 1) 일반염색소견

대조군은 도살시기에 상관없이 유의할만한 변화가 없었다. 실험군 중 BLM 단독투여군은 부종이 BLM 투여 제 1일부터 소혈관 주위와 주변 간질에서 관찰되었으며 전 실험기간 동안 경하게 지속되었다. 폐포 중격의 부종은 BLM 투여 제 1일부터 나타나기 시작했지만 3,4일에 현저하였고, 폐포강내 부종은 3, 4일에 뚜렷하게 관찰되었으며(Fig. 3), 제 7, 14일까지 지속되다가 제 28일군에서는 관찰되지 않았다. 염증세포의 침윤은 주로 소혈관 주위에서 시작하여 간질조직으로 침윤되

Table 2. Cell Profiles(%) Obtained from Bronchoalveolar Lavage Fluid at Various Times

Groups		1	3	4	7	14	28(days)
Control	MØ	97.4	93.8	97.4	94.9	95	95.8
	PMN	1.6	1.4	1.8	1.6	0	2
	L	0.8	4.8	0.8	3.1	5	2.2
	E	0.2	0	0	0.4	0	0
Bleomycin	MØ	45.9	23.3	21.2	36.1	56.1	83.1
	PMN	43.7	48.0	52.6	36.5	19.8	3.5
	L	5.8	28.2	23.1	22.6	23.8	13.1
	E	1.0	0.5	3.1	4.8	0.3	0.3
Bleomycin+ Penicillamine	MØ	22.7	17.6	38.5	40.1	40.3	43.9
	PMN	70.1	70.5	45.3	45.0	33.6	21.5
	L	6.7	11.2	14.3	14.5	26	34.5
	E	0.5	0.7	1.9	0.4	0.1	0.1
Bleomycin+ Deferoxamine	MØ	45.8	21.4	18.5	33.1	35.0	26.6
	PMN	48.4	59.8	30.6	15.6	10.3	12.3
	L	5.6	18.7	50.9	51.2	54.6	61.0
	E	0.2	0.1	2.5	0.1	0.1	0.1
Bleomycin+ Vitamin E	MØ	38.9	49.5	44.4	45.9	59.4	72.1
	PMN	40.5	14.4	13.7	12.2	12.8	4.1
	L	20.8	36.0	41.6	29.3	24.9	23.7
	E	0.1	0.1	0.3	0.1	0.4	0.1

Abbreviation : MØ : Monocytes L : Lymphocytes PMN : Polymorphonuclear leukocytes E : Eosinophils

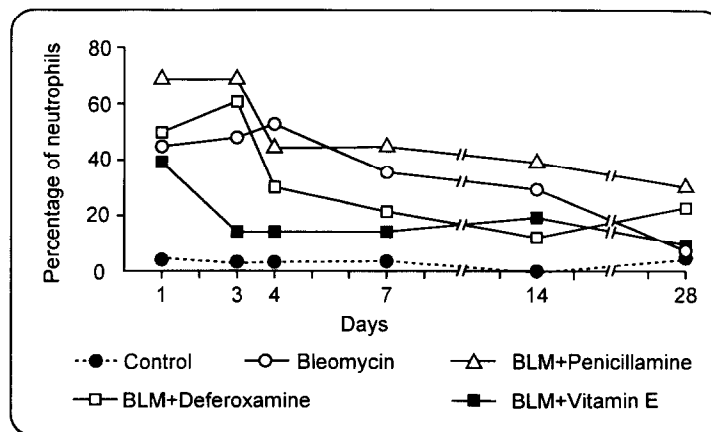


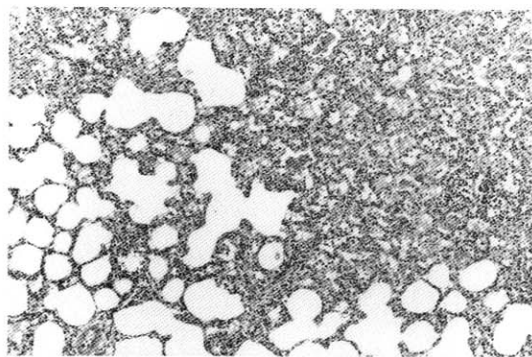
Fig. 2. Changes of polymorphonuclear leukocytes percentage in bronchoalveolar lavage fluid at various times.

었는데, 중성구의 침윤은 BLM 투여 제 1일부터 소혈관 주위와 폐포중격에서 관찰되었고, BLM 투여 제 3, 4일에는 폐포강내에서도 다수 관찰되었으며, 제 7일군에서

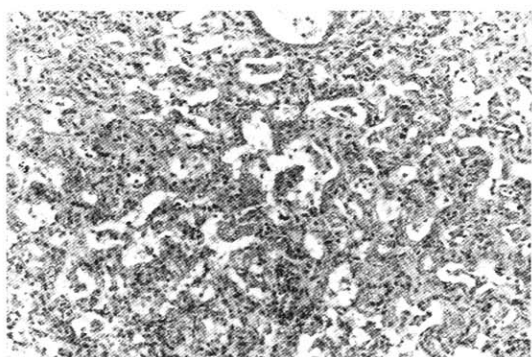
는 폐포강내에서 간혹 관찰되었다. 림프구의 침윤은 폐포강 내에서는 관찰되지 않았고 소혈관 주위의 간질과 폐포중격에 BLM 투여 제 3일부터 관찰되기 시작하여

실험기간의 경과에 따라 더욱 심하였고 제 7일군에서는 림프구성 간질성 폐염 소견이 보이기도 하였으며, 제 14일에는 이러한 간질성 소견은 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4). 폐포 내의 대식세포들은 BLM 투여 제 1일부터 관찰되었고 전 실험기간 동안 관찰되었는데, 이들의 침윤은 폐포강내와 폐포중격에서 보였고 제 7일군부터 뚜렷하게 증가되어 나타났다. 폐포상피세포증식 소견은 염증성 변화가 있는 부위의 폐포에서 흔히 볼 수 있었으며 BLM 투여 제 3일부터 관찰되기 시작하여 제 28일군에서는 뚜렷하게 보였다(Fig. 5). 이들 세포들의 증식은 늑막하 주변부에서 더욱 심하게 관찰되었고 여러곳에서 보였다. 섬유화의 소견은 제 7일군부터 국소

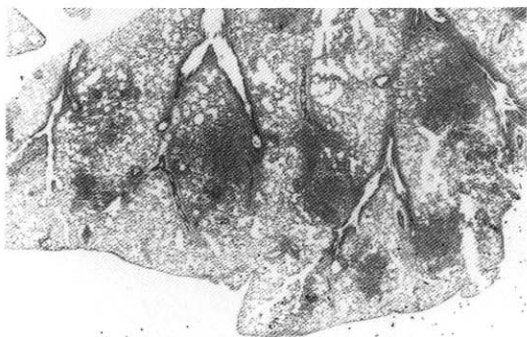
적으로 보이기 시작하여 제 14일군에서 좀 더 자주 뚜렷이 보였으며, 제 28일군은 대부분 여러곳의 폐포 중격에 섬유화가 동반되어 있었는데, 늑막하 주변부에서 관찰되기도 하였다(Fig. 6). Penicillamine 처치군은 BLM 단독투여군에 비하여 제 1일군부터 중성구의 폐포중격 및 폐포강내 침윤이 뚜렷하여 제 28일군까지 다소의 정도의 차이는 있지만 급성 염증반응이 계속 관찰되었다(Fig. 7). 이와 함께 림프구의 침윤도 실험 제 1일군부터 혈관주위 및 폐포중격에서 관찰되었는데 제 3일부터 늑막하 침윤이 관찰되었고, 대식세포들은 BLM 단독투여군과 비슷한 분포로 제 7일군부터 증가되어 나타났으며, 폐포상피세포증식은 제 7일부터 관찰되었으



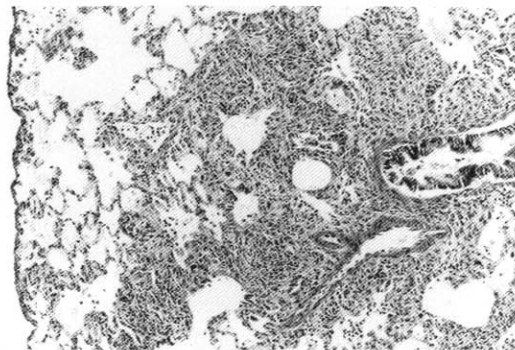
**Fig. 3.** Intraalveolar edema and neutrophilic infiltration in the alveolar wall and intraalveolar spaces (Bleomycin group, 3 days, H&E, X 100).



**Fig. 5.** Intraalveolar and interstitial lymphocytic infiltration with hyperplasia of type II pneumocytes (Bleomycin group, 14 days, H&E, X 20).



**Fig. 4.** Diffuse multifocal patchy inflammatory reaction (Bleomycin group, 7 days, H&E, x20).



**Fig. 6.** Subpleural fibrosis showing fibroblastic proliferation (Bleomycin group, 28 days, H&E, X 100).



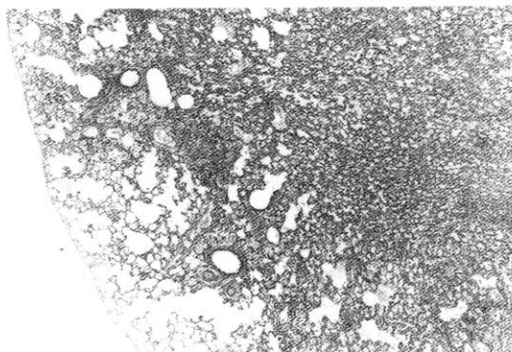


Fig. 7. Diffuse acute inflammatory reaction and intraalveolar edema without fibrosis (Bleomycin-Penicillamine group, H&E,  $\times 40$ ).

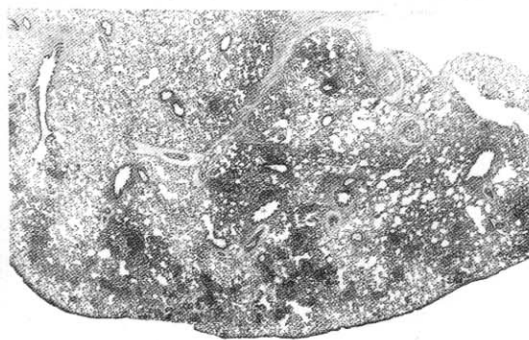


Fig. 8. Severe interstitial lymphocytic infiltration and focal fibrosis (Bleomycin-Deferoxamine group, 14 days, H&E,  $\times 20$ ).

나, 섬유화는 BLM 단독투여군이나 deferoxamine 처치군보다 적었다. Deferoxamine 처치군은 penicillamine 처치군과 마찬가지로 제 1일부터 BLM 단독투여군에 비해 급성 염증 반응이 심하였으나, penicillamine 처치군에 비해 폐포중격의 림프구 침윤이 뚜렷하였고(Fig. 8), 초기부터 늑막하 침윤이 관찰되기도 하였다. 또한 폐포중격의 섬유화가 국소적으로 보이는 반면 폐포 중격의 섬유화 및 폐포상피세포 증식은 BLM 단독투여군보다 감소되어 있었으나 penicillamine 처치군 보다는 많았다. Vitamin E 처치군은 제 1일에는 BLM 단독투여군과 비슷한 정도의 중성구 침윤 및 부종이 있었는데 제 3일부터 다른 약물 처치군에 비하여 중성구의 침윤

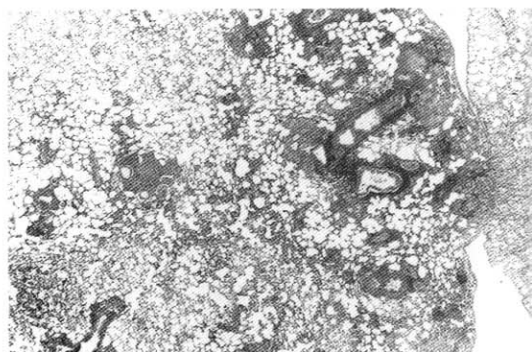


Fig. 9. The least inflammatory reaction without fibrosis comparing with other groups (Bleomycin-Vitamin E group, H&E,  $\times 20$ ).

이 적었고, 폐포강내 대식세포의 증가가 제 1일군부터 제 28일군까지 뚜렷하게 많았다. Vitamin E 처치군의 급성 염증반응은 제 3, 4일 부터 다른군에 비하여 변화의 범위가 감소하였고, 폐포상피세포증식 및 폐포 중격의 섬유화는 거의 없었다(Fig. 9).

## 2) 특수 염색 소견

Jones' methenamine silver 염색상 대조군은 기관지, 세기관지, 혈관의 기저막과 간질 조직의 폐포 기저막 및 모세혈관의 기저막에 가늘고 규칙적인 주행을 갖는 섬유들이 존재하였다. 이들은 BLM 단독투여군, penicillamine 처치군과 deferoxamine 처치군에서 공통적으로 초기(제 1, 3, 4일)에 간질 조직내에서 단열 및 불규칙한 주행을 갖는 변화를 초래하였다. 제 4일, 7일부터 이러한 섬유들은 국소적인 염증 또는 섬유화 반응 부위에 불규칙하게 흩어져 있었는데, 이 시기에 이미 얇은 벽을 갖는 폐포 간질 조직에서도 기저막에 염색되는 섬유들은 파괴되기 시작하였다. 그러나 vitamin E 처치군은 초기에 간질내 염증 반응과 국소적으로 기저막에 염색되는 섬유들의 파괴가 있었음에도 불구하고, 제 14, 28일군에서 폐포 간질 조직내 규칙적이고 균일한 섬유들로 존재하여 대조군의 간질 조직과 유사하였다.

Masson's trichrome 염색시 나타나는 교원섬유는 BLM 단독투여군과 deferoxamine 처치군에 있어서 약간의 시간 차이는 있어도 제 7일부터 폐포 간질 및 소

혈관 주위에서 증가되기 시작하여 국소적으로 늑막하 주변부에서 잘 관찰되었다.

#### 4. 면역형광염색 및 면역조직화학염색조건

세포의 기질의 변화를 보기 위한 면역병리학적 검사상 교원섬유성 기질 및 비교원섬유성 기질의 분포와 근섬유모세포 분포의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과

를 얻었다.

교원섬유성 기질 중 제 IV형 교원섬유는 대조군에서 기관지, 세기관지 및 혈관기저막과 간질 조직내 존재하는 폐포 기저막 및 모세혈관들의 기저막에 균일하게 가는 섬유들로 염색되었다(Fig. 10A). 제 IV형 교원섬유의 분포는 Jones' methenamine silver 염색에서 관찰되었던 섬유들과 동일하였고, 그 변화도 약물투여군에서

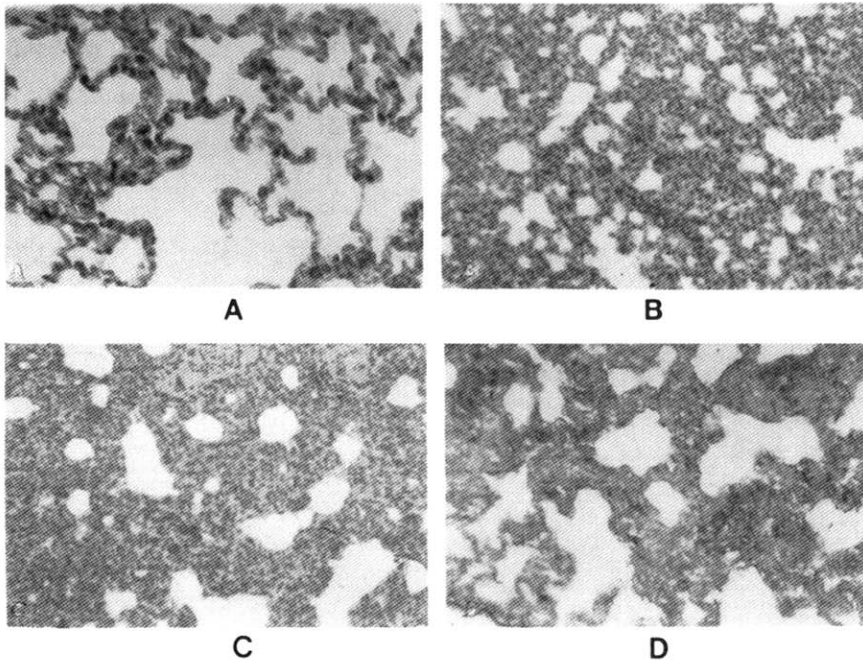


Fig. 10. Immunohistochemical findings for type IV collagen;

- Positive reaction along the basement membranes of the alveolar interstitium (control group,  $\times 100$ ).
- Focal negative reaction in the acute inflammatory foci (Bleomycin-Penicillamine group, 3 days,  $\times 40$ ).
- Negative reaction in the fibrotic areas (Bleomycin group, 28 days,  $\times 100$ ).
- Persistent positive reaction along the interstitial basement membranes (Bleomycin-Vitamin E group, 28 days,  $\times 200$ ).

Table 3. Immunohistochemical Findings for Type IV Collagen

Groups	Change of Immunohistochemical Stain for Type IV Collagen					
	1	3	4	5	14	28(days)
Bleomycin	+	±	±	±	-	-
Bleomycin+ Penicillamine	±	±	±	±	-	-
Bleomycin+ Deferoxamine	±	±	±	±	±	-
Bleomycin+ Vitamin E	+	+	+	+	+	+

비슷하였다. 즉 다소의 시간에 따른 차이 및 강도의 차이는 있었어도 BLM 단독투여군, penicillamine 처치군 및 deferoxamine 처치군들은 초기(제 1, 3, 4일)에 이들 섬유들이 단열되어 폐포 내강면을 따라 흩어져 있었고(Fig. 10B), 제 7일부터 보였던 국소적인 만성 염증 반응 부위 및 섬유화 부위에는 양성반응을 나타내는 섬유들이 거의 없었다(Fig. 10C). 그러나 vitamin E 처치군은 초기에 국소적인 간질내 폐포기저막의 단열과 염증반응이 있었음에도 불구하고 계속 간질내에서 양성

반응을 나타냈으며(Fig. 10D), 이러한 반응은 제 28일군에서도 관찰되었다(Table 3).

제 I형과 제 III형 교원섬유는 둘 다 대조군에서 기관지 및 혈관주위와 간질 조직에서 양성반응으로 나타났다. BLM 단독 투여군에서 제 I형 교원섬유는 제 4일부터 약하게 간질조직에 나타나기 시작하여 제 14일경에 불규칙한 형태로 뚜렷이 양성반응을 보였으며(Fig. 11A), 제 28일군에서는 늑막하 주변부에 강하게 양성반응을 나타내었다(Fig. 11B). 제 III형 교원섬유는 제

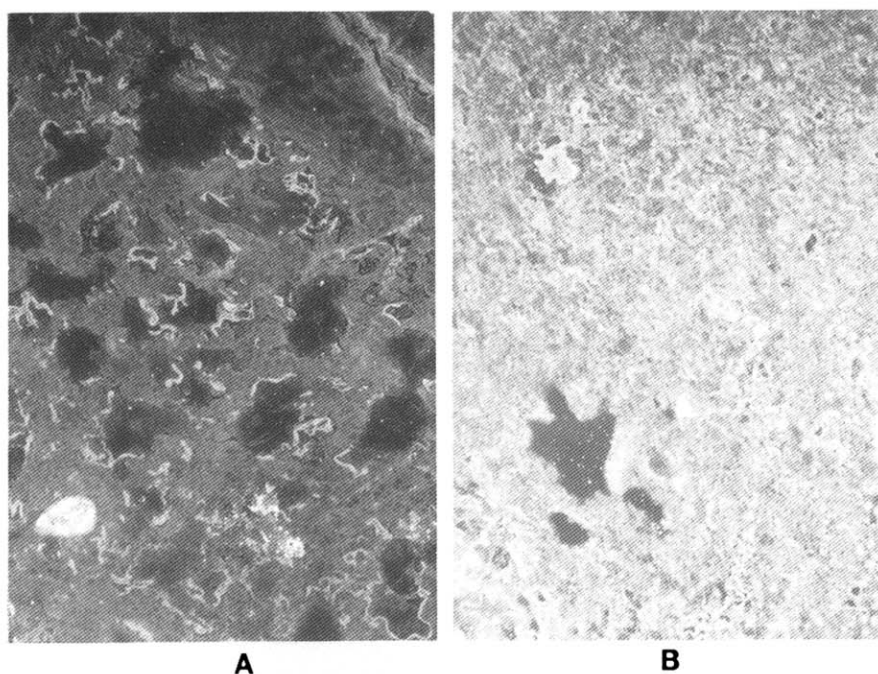


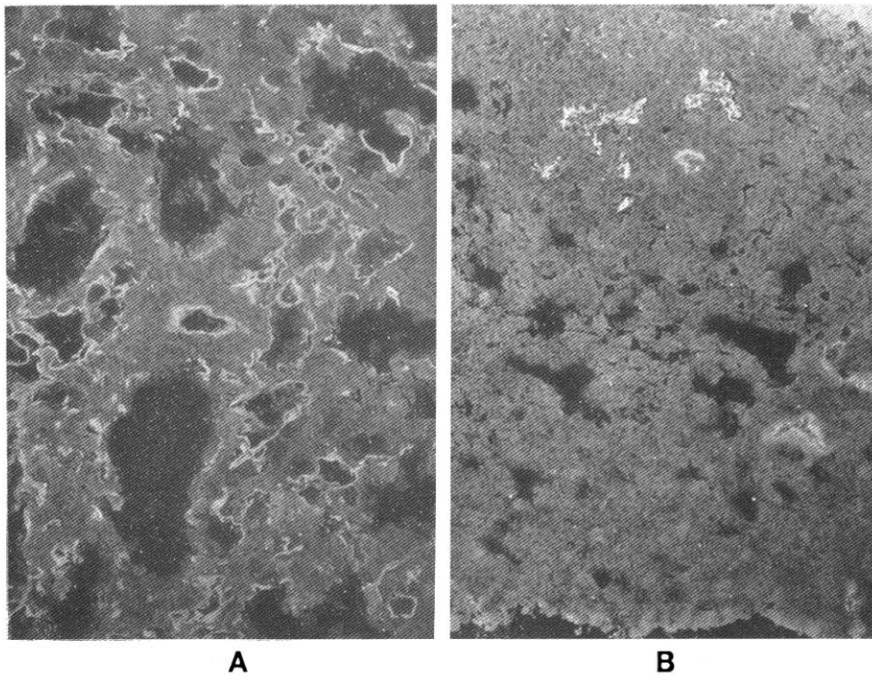
Fig. 11. Indirect immunofluorescent findings for type I collagen.

A. Initial positive reaction along the intraalveolar spaces (Bleomycin group, 14 days,  $\times 100$ ).

B. More intense reaction in the fibrotic area (Bleomycin group, 28 days,  $\times 100$ ).

Table 4. Indirect Immunofluorescent Findings for Type I Collagen

Groups	Degree of Immunofluorescent Deposition					
	1	3	4	5	14	28(days)
Bleomycin	—	—	±	±	+	++
Bleomycin+ Penicillamine	—	—	—	—	±	±
Bleomycin+ Deferoxamine	±	—	±	+	±	+
Bleomycin+ Vitamin E	—	—	—	—	±	±



**Fig. 12.** Indirect immunofluorescent findings for type III collagen.  
**A.** Transient positive reaction in the severe chronic inflammatory reaction (Bleomycin-Deferoxamine group, 14 days,  $\times 200$ ).  
**B.** Negative reaction in the fibrotic area (Bleomycin group, 28 days  $\times 100$ ).

I일군에서 약하게 관찰되다가 제 3일군에 가장 강하게 나타났으나(Fig. 12A), 그후 점점 약해지기 시작하여 제 28일군에서는 간질 조직내에서 음성이었다(Fig. 12B). Penicillamine 처치군은 제 I형 교원섬유가 거의 관찰되지 않았고, 제 III형 교원섬유는 제 4일군에서 폐포벽을 따라 양성반응으로 관찰되었는데 제 14일경까지 보이다가 점차 사라졌다. Deferoxamine 처치군에서 제 I형 교원섬유의 분포 및 염색의 강도는 BLM 단독투여군과 비슷하였지만, 제 III형 교원섬유는 제 7일군까지 양성반응을 나타냈고 제 28일군에서는 거의 음성이었다. Vitamin E 처치군은 제 I형 교원섬유가 다른 군과 마찬가지로 초기에는 음성이었다가 제 14일부터 국소적으로 불규칙한 섬유들이 양성반응을 나타내기 시작하였으나 변화가 국소적이었고(Table 4), 제 III형 교원섬유는 초기(제 1일, 3일)에 기관지 주위 조직, 흉막조직 등에서 양성반응을 나타냈지만 그 후에는 음성이었다.

비교된 섬유성 기질 중 fibronectin은 대조군의 경우 기관지 및 세기관지와 혈관의 기저막에 양성반응을 보였는데, BLM 단독투여군은 제 3일부터 폐포 간질에 국소적으로 양성반응을 나타내기 시작하여 제 7일군에서는 그 강도 및 분포부위가 증가되었고(Fig. 13A) 제 28일군에서는 폐포간질 및 늑막하 주변부에서 불규칙한 섬유모양으로 양성 반응이 나타났다(Fig. 13B). Penicillamine 처치군은 제 4일군에서 국소적으로 폐포 간질에서 양성반응이 나타나기 시작하였는데, 제 14일군에서는 광범위하고 강하게 나타났다. 그러나 제 28일군은 BLM 단독투여 제 28일군보다 감소되어 있었다. Deferoxamine 투여군은 제 1일부터 부분적으로 양성반응을 보였는데 제 4일군이 다른 어느군보다 가장 강하고 광범위하였다. 그러나 제 14일군의 염색강도는 제 4일군과 비슷하였지만 국소적이었고, 제 28일군은 BLM 단독투여 제 28일군과 비슷하였다. Vitamin E 투여군은 제 4일군에서 국소적으로 양성반응을 나타내

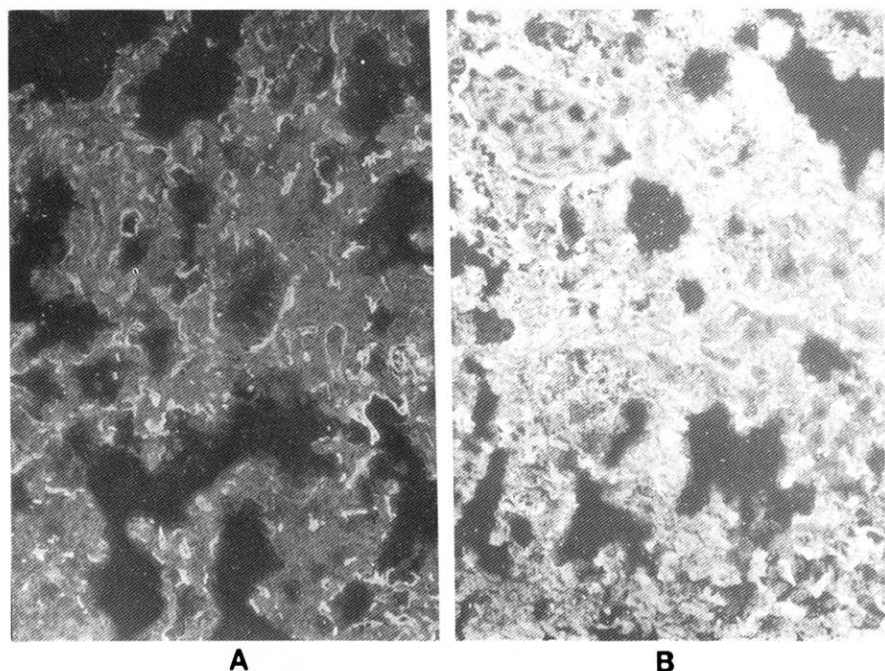


Fig. 13. Indirect immunofluorescent findings for fibronectin.  
A. Irregular positive reaction along the intraalveolar spaces (Bleomycin group, 7 days,  $\times 200$ ).  
B. Positive reaction in the fibrotic area (Bleomycin group, 28 days,  $\times 400$ ).

Table 5. Indirect Immunofluorescent Findings for Fibronectin

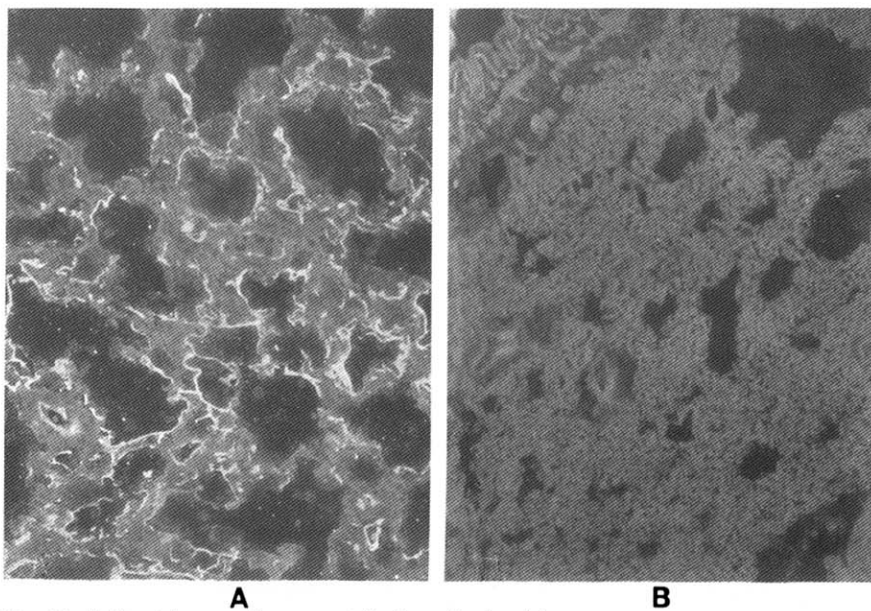
Groups	Degree of Immunofluorescent Deposition					
	1	3	4	5	14	28(days)
Bleomycin	—	±	+	++	++	++
Bleomycin+ Penicillamine	—	—	±	+	+	+
Bleomycin+ Deferoxamine	±	+	+++	++	+	++
Bleomycin+ Vitamin E	—	+	+	±	—	—

기 시작하였으나 제 14일, 28일군은 거의 모두 음성이었다(Table 5).

Laminin은 대조군의 경우 기관지 및 세기관지와 혈관의 기저막에 양성반응을 보였는데 제 IV형 교원섬유의 염색 결과와 비슷하였다. BLM 단독투여군의 경우 초기에 폐포간질에 광범위하고 강하게 양성반응이 나타났으며(Fig. 14A), 제 14일, 28일군에서 거의 음성이면서 경미하게 양성반응을 보인 부위는 불규칙하게 구슬모양의 형태로 나타나서 폐포간질내 모세혈관의 기

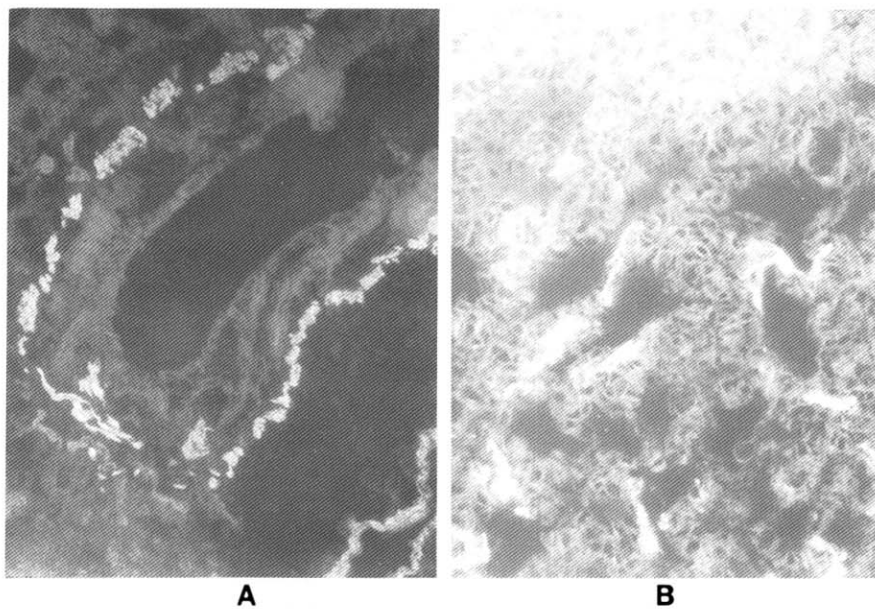
저막처럼 보였다(Fig. 14B). Penicillamine 처치군은 제 4일군에서 강하고 광범위하게 양성반응이 나타났으나 제 7일군부터 제 28일군까지 모두 음성이었다. Deferoxamine 처치군 역시 제 4일군이 가장 강하고 광범위하게 양성반응이 나타났는데, 제 14일까지도 광범위하게 양성반응을 보였으나 제 28일군은 음성이었다. Vitamin E 처치군은 제 3일군이 강하고 광범위하게 양성반응을 보이다가 제 4일군은 국소적으로 그 강도가 약해졌으나, 제 14일, 28일군에서도 양성반응을 나타내





**Fig. 14.** Indirect immunofluorescent findings for laminin.

- A. Positive reaction in the intact alveolar basement membranes (Control group,  $\times 100$ ).
- B. Negative reaction in the inflammatory or fibrotic area (Bleomycin group, 28 days,  $\times 100$ ).



**Fig. 15.** Direct immunofluorescent findings for NBD phalloidin.

- A. Positive reaction along the muscle coat of the bronchus or vascular walls (Control group,  $\times 100$ ).
- B. Positive reaction in the spindle cells of the granulation tissue (Bleomycin group, 28 days,  $\times 200$ ).

었다.

근섬유모세포에 양성반응을 나타내는 NBD phalloidin은 대조군의 경우 기관지, 세기관지 및 혈관의 근육층에 양성반응을 나타냈으며(Fig. 15A), BLM 단독 투여군은 제 7일군부터 폐포관을 따라 미세한 섬유성 물질에 양성반응을 나타냈는데 근세포에서 섬유성 물질로 이행되는 듯한 모습을 보였다. 또한 제 14일군부터 혈관벽의 비후가 관찰되었으며, 폐포관을 따라 나타나는 양성반응은 실험기간의 경과에 따라 점점 강도 및 범위가 증가되었으며 제 28군에서는 육아조직내 방추형세포에 양성반응을 보였다(Fig. 15B). 그러나 penicillamine 처치군에서는 폐포관을 따라 나타나는 양성반응이 관찰되지 않았고, deferoxamine 처치군에서는 제 1일군부터 폐포관을 따라 강양성반응이 나타났는데 제 4일군에서 가장 강하게 나타나다가 제 14일군부터 사라지기 시작하였다. Vitamin E 처치군은 제 1일군에서 국소적으로 폐포관을 따라 양성반응이 나타나기 시작하여 제 3일군에서 범위가 넓어졌지만 제 7일군부터는 거의 음성반응을 나타내었다.

## 고 찰

Bleomycin은 피부, 두경부, 폐의 편평상피세포암, 악성 림프종과 고환의 악성종양 환자에게 사용하는 항종양성 항생제로, 투여시 산소와 철 또는 구리이온이 작용하여 유발된 산소유리기에 의하여 종양세포내 DNA를 분해하여 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>41~43</sup>. Bleomycin이 종양세포외의 정상세포에도 작용을 하는데 특히 폐와 피부에 독성이 잘 나타나는 이유는 이 부위에 DNA hydrolase가 적기 때문이다. Bleomycin 투여로 인한 폐손상은 특발성 폐섬유증과 비슷하고 동물 실험시 단기간내 폐섬유화를 유발하여 폐손상 및 폐섬유화의 기전을 이해하고자 하는 실험에 많이 이용되고 있다<sup>6,7,10~12</sup>. 이제까지 bleomycin 투여 실험을 통해 알려진 폐손상 및 섬유화의 기전은 산소유리기 생성으로 인한 직접독성과 염증세포들 및 섬유모세포와 세포외기질 등에 의한 간접독성에 의해 유발되는 것 등이 있다<sup>13</sup>. 특발성 폐섬유증의 발생기전도 이와 비슷하게 설명되고 있으며, 특히 간접 독성이 더 중요한데 면역복

합체에 의해 활성화된 대식세포가 중성구에 대한 화학주성인자를 유리하여 중성구를 증가시키면 대식세포 자체와 증가된 중성구가 산소유리기를 생성하여 조직에 손상을 주고, 대식세포에서 유리된 fibronectin이나 성장인자들이 작용하여 섬유화를 초래한다는 것이다<sup>15,44,45</sup>. 이 두 기전의 공통점은 산소유리기에 의하여 조직의 손상이 시작된다는 것인데, 산소유리기와 조직 손상 간의 관계는 오래전부터 연구대상이 되어왔으며<sup>46</sup>, 조직 손상을 억제시켜보기 위하여 superoxide dismutase나 수산화 이온의 보집제인 dimethylthiourea 같은 산화방지제들을 투여하여 실험한 보고도 있다<sup>47</sup>. 따라서 bleomycin 투여시 유발되는 폐손상을 억제시켜보기 위하여 산소유리기 형성시 관여하는 철 이온을 킬레이트화시키는 deferoxamine을 투여하여 그 효과를 보고한 논문들이 있으나 결과는 다양하였다<sup>16~18,28</sup>. 그러나 bleomycin의 폐독성 기전 중 직접 독성을 일으키는 가장 중요한 산소유리기는 수산화기로서, 이것의 형성은 과산화수소가 철이온뿐만아니라 구리이온과도 작용하는 Fenton 반응에 의하므로 구리이온의 역할도 bleomycin 투여로 인한 폐손상에 중요한 것으로 사료된다<sup>14,42,43,48</sup>. 구리의 킬레이트제인 penicillamine을 사용한 폐손상 억제 실험은 주로 방사선 조사에 의한 실험에 이용되었는데<sup>19~22</sup>, 방사선 조사에 의한 폐손상은 대부분 penicillamine을 투여함으로써 폐섬유화를 억제하였다. 또한 인체에서 섬유화된 폐질환환자에게 penicillamine을 투여하여 효과가 있었다는 보고도 있으나<sup>23</sup>, bleomycin 투여시 유발된 폐섬유화는 구리킬레이트제 투여에 의하여 오히려 악화가 되었다는 보고만이 있다<sup>49</sup>. 또한 bleomycin 투여로 인해 이미 형성된 산소유리기의 보집제로써의 vitamin E는 수산화, 과산화음이온등의 산소유리기를 보집하기 때문에 폐손상 억제에 효과가 있으리라 기대되는데 bleomycin 투여 실험에 vitamin E를 투여한 실험은 아직 없었다<sup>25,26</sup>. 그러므로 본 연구에서 철의 킬레이트제와 구리의 킬레이트제와 vitamin E 등의 산화방지제를 투여함은 bleomycin에 의한 폐손상 유발 및 억제의 기전을 이해하는데 도움이 되리라 사료되었다. 그러나 산화방지제를 투여하여 bleomycin으로 인한 폐손상을 얼마나 억제시켰는지 그 효과를 객관적으로 평가하는 것이 문제

인데, 최근에는 기관지폐포세척액 소견, 면역조직화학 및 면역형광염색소견과 면역전자현미경소견들을 이용한 보고들이 많다<sup>29,31,37,39,50</sup>. 실험에서도 위의 방법들을 이용하여 그 효과를 비교하였는데, 특히 본 연구에서 이용한 기관지폐포세척법은 Nettelbladt 등<sup>32</sup>이 고안한 방법으로 백서에게 인위적인 압력에 의한 손상을 주지 않고 세척액을 회수할 수 있어서 출혈이나 압력 증가로 인한 파열이 없었고, 폐의 좌엽을 미리 결찰하였기 때문에 면역학적 염색을 위한 조직 보존도 가능하였다.

본 연구에서 여러가지 형태학적 검사를 통해 알 수 있었던 BLM 단독투여군의 특징적인 변화 중 기관지폐포세척액 소견은 대조군에 비하여 총 세포수가 제 14일까지 유의있게 많았고, 특히 중성구의 비율이 제 7일까지 지속적으로 높았는데, 이러한 소견은 광학현미경 소견상 심한 급성염증 반응이 제 7일까지 지속된 것과 일치하였다. 이러한 결과는 다른 연구자들의 결과와 비슷하였으며<sup>29,31,50</sup>, 특히 특수염색소견과 제 IV형 교원섬유 및 laminin에 대한 면역학적 염색상 폐포벽의 기저막이 파괴되면서 폐포상피세포 증식 및 섬유화가 유발되는 소견은 Shen 등<sup>50</sup>이 기술한대로 bleomycin 투여후 급성 염증의 정도와 만성염증 및 섬유화는 서로 직접적인 관계가 있다는 결론에 합당하였다. 폐포벽의 기저막은 폐포상피세포의 기저막과 간질내 모세혈관의 기저막으로 이루어져 있는데, 광학현미경소견으로는 폐포벽 기저막이 파괴되는 소견이 단열이나 불규칙한 주행의 섬유들로써 관찰된다. 이들을 전자현미경으로 관찰하면 폐포상피세포의 기저막이 먼저 파괴되는 것을 볼 수 있는데, 이는 bleomycin의 직접독성에 의해 유리된 산소유리기와 조직손상이후 증가된 폐포강내 중성구들이 폐포상피세포에 먼저 작용함을 시사한다.<sup>51</sup> 초기의 폐포기저막파괴는 때로 laminin으로 이루어진 기저막이 두꺼워진 것처럼 보이기도 하는데<sup>39</sup>, 이는 파괴된 기저막 성분들이 흩어져서 축적된 양상으로 나타나기 때문으로 사료된다. 또한 폐에 존재하는 결체조직은 여러종류의 교원섬유와 비교원성 세포의 기질들로 이루어져 있는데<sup>15,35,36,38</sup>, 정상 백서의 폐 조직에서는 제 I, III, IV, VI형 교원섬유들, fibronectin과 laminin 등의 결체조직들을 관찰할 수 있다<sup>37,40</sup>. 이 중 제 I형 교원섬유는 기관지주위, 혈관주위 및 폐포벽에 분포하

나 laminin은 기저막에 존재하며, fibronectin은 폐간질 및 교원섬유의 표면에 분포한다. 제 IV형 교원섬유는 laminin과 같이 기저막에서 관찰되지만 제 III형과 제 VI형은 제 I형 교원섬유와 비슷한 분포를 한다. Bleomycin을 비롯한 폐손상 유발 약제 투여시 발생하는 폐 섬유화부위에서는 이러한 결체조직의 분포 및 성상이 달라지는데, 기저막을 형성하는 제 IV형 교원섬유와 laminin은 염증이 심해지면서 파괴되어 단열되지만, 폐포벽의 간질에 존재하였던 제 I, III, VI형 교원섬유와 fibronectin등은 섬유화의 속도에 따라 급성염증 반응이 심한 시기에는 혈장형의 fibronectin과 제 III형 교원섬유가 침착되고, 서서히 진행된 섬유화부위는 세포형의 fibronectin 침착과 제 I형 교원섬유의 합성부위를 관찰할 수 있다<sup>52~55</sup>. 이는 bleomycin 투여로 유발된 백서의 폐섬유화시 섬유모세포에서 주로 제 I형 전구교원질 합성이 증가되어 제 I형에 대한 제 III형 교원질의 비율이 낮아진다는 보고와 같은 소견이다<sup>33</sup>. 본 실험에서도 제 I, III형 교원섬유와 fibronectin의 분포는 심한 급성염증시에는 폐포 내강면을 따라 fibronectin이 강하게 염색되어 혈장형 fibronectin임을 시사하였으며, 점차 섬유화가 뚜렷한 부위에서는 제 I형 교원섬유와 fibronectin이 강하게 염색되어 세포형 fibronectin이 침착됨을 알 수 있었다. 이 외에 근섬유모세포의 분포를 보기 위한 NBD phalloidin 염색소견은 폐포 간질의 육아조직내 방추형 세포에 염색이 되어, 피부의 창상조직에 나타나는 양성반응 소견과 비슷하였다<sup>56~58</sup>. 이제까지 기술된 세포의 기질의 변화는 폐포상피세포의 증식 및 섬유모세포의 성장을 촉진시켜서 기능 및 형태학적으로 비가역적인 상태의 섬유화를 일으켜 치명적인 손상을 일으키게 된다는 보고가 대다수였는데<sup>59,60</sup>, 본 연구의 결과에서는 폐포벽의 기저막 유지여부가 섬유화 유발과 직접적으로 관계가 있었다. 또한 제 I형 교원섬유 및 fibronectin 등 세포의 기질의 변화는 섬유화부위에 결과적으로 축적되는 양상을 나타냈는데, 세포의 기질과 폐포상피세포 및 섬유모세포와의 관계에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요하다고 사료된다.

Bleomycin 투여와 함께 폐손상을 억제시켜보고자 투여하였던 산화방지제 처치군중 가장 효과가 있었던 것은 vitamin E 처치군 이었는데, 이는 실험기간 중 가



장 낮았던 사망률과 가장 많은 체중 증가외에 초기의 급성염증후 폐포 기저막이 유지될 정도로 변화가 미약하여 섬유화도 유발되지 않은점 등으로 알 수 있었다. 이런 결과를 BLM 단독투여군과 비교해 보면 기관지폐포세척액 소견상 총 세포수의 증가 및 감소 시기와 중성구 비율의 급격한 감소 시기에 차이가 있었다. 즉 BLM 단독투여군은 제 14일까지 총 세포수가 증가되어 있는데 비하여 vitamin E 처치군은 제 3일부터 급격히 감소하여 제 7일 이후 대조군과 유의한 차이가 없었으며( $p>0.05$ ), 이와 함께 중성구의 비율이 vitamin E 처치군은 제 3일에 BLM 단독투여군의  $\frac{1}{2}$  이하 비율로 감소되었다. 이러한 결과는 vitamin E 결핍에 의해 bleomycin 투여로 유발된 폐손상을 악화시켰다는 보고와 상관관계는 있지만<sup>28)</sup>, vitamin E가 어떻게 폐손상을 억제시켰는지 명확히 규명할 필요가 있었다. 따라서 이러한 결과를 penicillamine이나 deferoxamine 처치군과 비교해 보면 penicillamine 처치군은 지속적으로 급성염증 반응이 유지되어 폐포벽의 기저막은 파괴되었으나 BLM 단독 투여군이나 deferoxamine 처치군에 비하여 섬유화가 적었는데, 이 이유는 penicillamine 자체가 폐손상을 유발시키는 약제이기 때문에 비록 킬레이트제의 적은 용량이지만 계속적인 투여로 인해 급성염증반응은 지속되었고, penicillamine이 교원질 합성의 길항제로도 작용하기때문에 교원섬유의 증식이 억제되어 섬유화가 적은 것으로 보였다. 본 실험에서 penicillamine은 구리이온의 킬레이트제로서 작용을 하여 산소유리기 형성을 억제시켰을지라도 약제자체의 지속적인 직접 독성은 결국 폐손상을 유발시키는 요소로서도 작용하였으리라 사료되며, 방사선 조사시 발생한 폐섬유화의 억제에는 효과가 있었던 점과는 차이가 있었다<sup>19~21,23,42,43)</sup>. 본 실험에서 철의 킬레이트제로 투여되었던 deferoxamine 처치군은 산화방지제 처치군 중 가장 변화가 심하였고 제 28일군에서 섬유화가 관찰되어 폐손상을 유발하는 산소유리기 생성 억제에 효과가 없었다고 보았는데, 이는 다른 연구자들의 deferoxamine 처치는 bleomycin 투여로 유발된 폐섬유화를 억제 시키지 못하였다는 의견과 일치하였다<sup>17,18)</sup>. 이 실험군은 기관지폐포세척액 소견상 제 4일에 림프구의 비율이 급격히 증가하여 지속되었는데, 이런 소견은 광

학현미경검색시 관찰된 림프구성 폐렴의 소견과 비슷하였다. 특히 deferoxamine 처치군은 제 25일에 실험 동물 13 마리가 갑자기 사망하여 실험군 중 가장 높은 사망률을 보였는데, 그 이유를 명확히 알수는 없으나 다른 실험군에 비하여 기관지폐포세척액 소견상 제 4일 이후 림프구의 비율이 높았고, 폐조직내 림프구 침윤이 많았던 점과 laminin에 대한 면역형광염색소견이 제 14일과 28일 사이에 음성으로 변한 점과 laminin에 대한 면역형광염색 소견이 제 14일과 28일 사이에 음성으로 변한점 등을 고려하면 림프구에서 유리되는 화학매개체 폐포 간질의 기저막 파괴간에 서로 연관성이 있으리라고 리라고 사료된다<sup>61)</sup>.

본 연구의 결과를 토대로 vitamin E가 bleomycin으로 인한 폐손상 및 폐섬유화 억제에 작용한 기전을 요약해보면 vitamin E 처치후 제 1일의 변화는 다른 실험군과 비슷한 점으로 보아 vitamin E가 bleomycin의 직접 독성에 의해 발생한 산소유리기 보집제로서의 작용은 미약하고, 제 3일 이후 급성염증반응이 급격히 감소한 점을 중시하면 직접독성 이후 증가된 중성구의 활성화때문에 생성된 산소유리기 보집제로서의 역할이 더 강하면서 동시에 지질 과산화과정도 억제하여 초기의 폐 손상을 방지한 것으로 사료되었다. 또한 초기의 폐손상 억제는 주로 제 IV형 교원섬유와 laminin으로 구성된 폐포벽의 기저막을 유지시킬 뿐만 아니라 제 I형 교원섬유와 fibronectin 증가를 초래하는 폐섬유화도 억제시킬 수 있었다고 생각된다(Fig. 16). 이러한 결론은 vitamin E가 소장에서 흡수된 후 림프관을 통하여 림프절, 간, 비장 및 폐에 분포하며, vitamin E 투여후 폐조직에 축적된 vitamin E는 폐포상피세포나 중성구를 비롯한 여러 염증세포들의 세포막에 직접작용하여 지질과산화반응을 억제시켰다는 보고와 같고<sup>56,62)</sup>, vitamin E가 bleomycin에 의한 폐손상 억제시 산화방지는 매우 중요한 단계임을 시사한다. 그러나 본 실험에서 vitamin E 투여군은 초기 중성구의 감소와 함께 상대적인 단핵구의 증가가 있었고, 제 3일 이후 총 세포수는 감소하였다고 해도 광학현미경 소견에서 대식세포의 증가가 뚜렷하였던 점은 vitamin E 투여로 인한 폐손상 억제에 폐포 대식세포가 관여했으리라고 추정되는데, 최근에 폐포 대식세포가 산화방지제를 유리한다

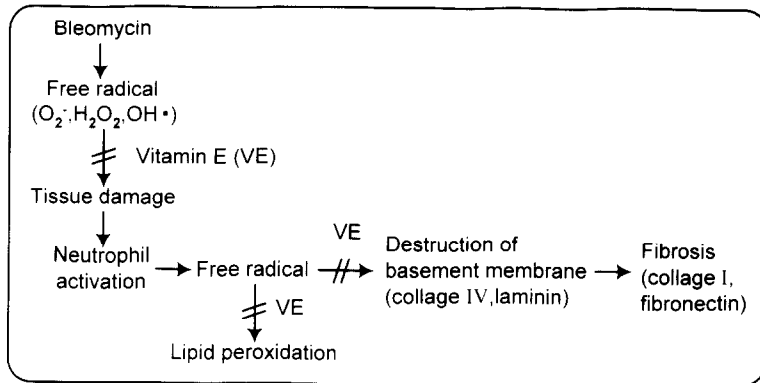


Fig. 16. Summary of the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary injury and fibrosis in rats and action sites of vitamin E.

는 보고도 있으므로<sup>63,64)</sup>, 그 기능성은 매우 높다고 할 수 있다. 또한 vitamin E가 염증세포들의 다른 작용에도 영향을 줄 수 있기 때문에 흥미로운데, vitamin E는 급성 염증시 발생하는 혈관내 중성구의 변연화(margination)를 정상적인 순환상태가 되도록 유도하며, helper T 림프구의 수와 기능을 증강시켜서 면역반응을 조절하고, 탐식세포의 기능을 조절하기도 하는데<sup>25,26,65~69)</sup>, 본 연구결과에서 나타난 vitamin E 처치군의 폐독성 억제기전에 이와같이 복합적인 요소도 관여되었으리라 생각되지만, vitamin E의 폐손상억제와 염증세포들의 여러 작용과의 관계에 대해서는 앞으로 더 연구가 이루어져야 된다고 사료된다.

## 요 약

**연구배경:** Bleomycin(BLM) 투여로 유발되는 폐손상 및 폐섬유화는 특발성 폐섬유증의 실험적 모델로써 BLM의 폐독성 기전은 산소유리기에 의한 직접 독성과 염증세포, 섬유모세포 및 세포의 기질에 의한 간접 독성으로 나누어 설명하고 있다. 이에 저자는 폐손상의 주요 원인이 되는 산소유리기의 생성과 이미 형성된 산소유리기를 보집할 수 있는 산화방지제들을 투여함으로써, BLM에 의한 폐손상 및 폐섬유화의 발생과 그 억제기전을 이해하고자 본 실험을 시행하였다.

**방법:** 웅성 백서에 폐손상 및 폐섬유화의 대표적인 실험적 방법인 bleomycin (BLM)을 투여함과 동시에 산화방지제로 구리의 킬레이트제인 penicillamine, 철의 킬레이트제인 deferoxamine과 산소유리기의 보집제인 vitamin E를 투여한 후 그 형태학적 변화를 보기 위해 기관지폐포 세척액 검사, 광학현미경 소견과 세포외 기질인 교원섬유 제 I, III, IV형과 비교원성 기질인 fibronectin과 laminin 그리고 근섬유모세포에 대한 NBD phalloidin에 대한 면역형광염색 및 면역조직화학염색소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 결과:

1) 기관지폐포세척액의 검사소견상 총 세포수는 BLM 단독투여군의 경우 제 4일에 최고값에 도달한 후 감소하기 시작하여 제 28일에 대조군과 비슷해졌지만, penicillamine과 deferoxamine 처치군은 제 1일부터 제 28일까지 계속 높았으며, vitamin E 처치군은 제 3일부터 현저한 차이로 감소하여 제 7일부터 대조군과 비슷해졌다. 기관지폐포 세척액의 각 염증세포구성비는 BLM 단독투여군은 초기 즉 제 1, 3, 4일에 중성구가 현저히 증가하다가 제 7일부터 감소하여 제 28일에 대조군과 비슷해졌지만, vitamin E 처치군은 중성구가 제 3일부터 BLM 단독투여군의 1/3 이하로 현저히 감소하였다.

2) 광학현미경소견은 BLM 단독투여군의 경우 다른

실험군에 비해 섬유화가 가장 심하였고, penicillamine 처치군은 중성구의 침윤이 지속적으로 많았으며, deferoxamine 처치군은 폐포 중격의 림프구 침윤이 뚜렷하였고, vitamin E 처치군은 폐포 중격 및 폐포강내 대식세포 증가가 많았다. 이러한 소견은 기관지폐포세척액 소견과 잘 일치하였다. 산화방지제 처치군의 섬유화 소견은 deferoxamine 처치군이 가장 뚜렷하였고, penicillamine 처치군은 적었지만 관찰되었으며, vitamin E 처치군은 거의 없었다.

3) 세포외 기질의 변화로 폐포 간질의 기저막에 양성 반응을 나타내는 제 IV형 교원섬유와 laminin 및 Jones' methenamine silver 염색결과는 비슷한 양상이었는데, BLM 단독투여군, penicillamine 처치군과 deferoxamine 처치군은 모두 제 28일군에서 음성반응을 나타냈으나, vitamin E 처치군은 제 28일까지 대조군과 비슷하게 기저막이 유지되었다. 섬유화 부위에 증가된 세포외 기질은 제 I 형 교원섬유와 fibronectin 이었으며, 제 III 형 교원섬유는 각 군에서 초기에 일시적으로 양성반응을 나타내었다. NBD phalloidin은 BLM 단독투여군에서 특히 제 28일군 육아조직의 방추형세포에 양성반응을 보였다.

**결론:** Bleomycin 투여에 의한 폐손상 및 폐섬유화 기전은 bleomycin이 구리 또는 철 이온의 존재하에 생성한 산소유리기에 의해 유발될 수도 있으나, 주로 중성구의 활성화로 인한 산소유리기에 의해 유발되고, 폐의 섬유화는 제 I 형 교원섬유와 fibronectin의 증가로 초래되었다. 폐손상의 억제제는 킬레이트제 보다는 산소유리기의 보집제인 vitamin E 투여시 가장 효과가 있었는데, 이것은 초기의 중성구 증가 및 중성구의 활성화 정도에 따라 간질내 폐포의 기저막 유지 및 재생이 가능하고 이것이 폐의 탄력성을 유지시켜 폐손상을 억제할 수 있기 때문으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Hamman L, Rich AR: Acute diffuse interstitial fibrosis of the lungs. Bull Johns Hopkins Hosp 74:177, 1944
- 2) Liebow AA, Steer A, Billingsley JG: Desquamative interstitial pneumonia. Am J Med 39:360, 1965
- 3) Scadding JG: Fibrosing alveolitis. Br Med J 2: 941, 1964
- 4) Scadding JG: Diffuse pulmonary alveolar fibrosis. Thorax 29:271, 1974
- 5) Fishman AP: UIP, DIP, and all that. New Eng J Med 298:843, 1978
- 6) 이광길, 김정숙, 이유평, 김동식: Bleomycin에 의한 폐손상의 기전에 관한 형태학적 연구. 연세의대 논문집 12:127, 1979
- 7) 이종달, 이유평: Bleomycin의 기관내 투여로 유발된 폐장의 간질성 섬유증식증의 실험적 연구. 연세의대 논문집 12:158, 1979
- 8) Meyrick B, Brigham KL: Acute effects of Escherichia coli endotoxin on the pulmonary microcirculation of anesthetized sheep. Structure: Function relationships. Lab Invest 48:458, 1982
- 9) Amenta PS, Gil J, Martinez-Hernandez A: Connective tissue of rat lung II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. J Histochem Cytochem 36:1167, 1988
- 10) Bowden DH: Unraveling pulmonary fibrosis: The bleomycin model. Lab Invest 50:487, 1984
- 11) Moseley PL, Shasby DM, Brady M, Humminghake GW: Lung parenchymal injury induced by bleomycin. Am Rev Respir Dis 130:1082, 1984
- 12) Cooper JAD Jr, White DA, Matthay RA: Drug-induced Pulmonary disease: Part 1: Cytotoxic drugs. Am Rev Respir Dis 133:321, 1986
- 13) Cooper JAD Jr, Zitnik RJ, Matthay RA: Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. Ann Rev Med 39:395, 1988
- 14) Gutteridge JMC, Chang FX: Protection of iron-catalysed free radical damage to DNA and lipids by copper(II)-bleomycin. Biochem Biophys Res Comm 99:1354, 1981
- 15) Cottrane RS, Kumar V, Robbins SL: Pathologic basis of disease. 4th ed., p 78, Philadelphia, WB

Saunders, 1989

- 16) Chandler DB, Fulmer JD: The effect of deferoxamine on bleomycin-induced lung fibrosis in the hamster. *Am Rev Respir Dis* **131**:596, 1985
- 17) Cross CE, Warren D, Gerriets JE, Wilson DW, Halliwell B, Last JA: Deferoxamine injection does not affect bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Lab Clin Med* **106**:433, 1985
- 18) Ward HE, Hicks M, Nicholson A, Berend N: Deferoxamine infusion does not inhibit bleomycin-induced lung damage in the rat. *Am Rev Respir Dis* **137**:1356, 1988
- 19) Port CD, Ward WF: The ultrastructure of radiation injury in rat lung; Modification by D-penicillamine. *Radiat Res* **92**:61, 1982
- 20) Ward WF, Shin-Hoellwarth A, Tuttle RD: Collagen accumulation in irradiated rat lung: Modification by D-penicillamine. *Radiology* **146**:533, 1983
- 21) Okuyama S, Mishina H, Matsuzawa T: Principle of cancer therapy VIII. Role of D-penicillamine in the prevention of radiation pneumonitis and fibrosis: An experimental demonstration. *Sci Rep Res Inst Tohoku Univ* **31**:30, 1984
- 22) Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Solliday NH, Dunne M: Monocrotalline-induced pulmonary fibrosis in rats: Amelioration by captopril and penicillamine. *Proc Soc Exp Biol Med* **180**:112, 1985
- 23) Chapela R, Zuniga G, Selman M: D-penicillamine in the therapy of fibrotic lung diseases. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **24**:16, 1986
- 24) Van der Schee AC, Dinkla BA, Festen JJM: Penicillamine for interstitial lung disease in rheumatoid arthritis. *Respiration* **56**:134, 1989
- 25) Green J: Vitamin E and the biological theory. p 29, *Annals New York Academy of Science*, 1972
- 26) Witting LA: Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions. In Pryor WA, eds. *Free Radicals in Biology*. Vol IV. p295, Isbn, Academic Press, 1980
- 27) Chandler DB, Barton JC, Briggs III DD, Butler TW, Kennedy JJ, Grizzle WE, Fulmer JD: Effect of iron deficiency on bleomycin-induced lung fibrosis in the hamster. *Am Rev Respir Dis* **137**:85, 1988
- 28) Nakamura H, Sato S, Takahashi K: Effects of vitamin E deficiency on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the hamster. *Lung* **166**:161, 1988
- 29) Thrall RS, Barton RW, D'Amato DA, Sulavik SB: Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Am Rev Respir Dis* **126**:488, 1982
- 30) Reynolds HY: Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* **135**:250, 1987
- 31) White DA, Kris MG, Stover DE: Bronchoalveolar lavage cell populations in bleomycin lung toxicity. *Thorax* **42**:551, 1987
- 32) Nettelbladt O, Hallgren R: Hyaluronan (Hyaluronic acid) in bronchoalveolar lavage fluid during the development of bleomycin-induced alveolitis in the rat. *Am Rev Respir Dis* **140**:1028, 1989
- 33) Phan SH, Varani J, Smith D: Rat lung fibroblast collagen metabolism in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **76**:241, 1985
- 34) Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE: Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* **131**:281, 1985
- 35) Weiss L: *Cell and Tissue Biology*. 6th ed. p160, Baltimore, Urban & Schwarzenberg Inc., 1988
- 36) Madri JA, Furthmayr H: Collagen polymorphism in the lung: An immunohistochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* **11**:353, 1980
- 37) Gil J, Martinez-Hernandez A: The connective tissue of the rat lung: electron immunohistoche-

- mical studies. *J Histochem Cytochem* **32**:230, 1984
- 38) Laurent GJ: Lung collagen: more than scaffolding. *Thorax* **41**:418, 1986
  - 39) Singer II, Kawka DW, McNally SM, Eiermann GJ, Metzger JM, Peterson LB: Extensive laminin and basement membrane accumulation occurs at the onset of bleomycin-induced rodent pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **125**:258, 1986
  - 40) Baur PS Jr, Parks DH: The myofibroblast anchoring strand-The fibronectin connection in wound healing and the possible loci of collagen fibril assembly. *J Trauma* **23**:853, 1983
  - 41) Burger RM, Peisach J, Horwitz SB: Activated bleomycin: A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem* **256**:11636, 1981
  - 42) McEvoy GK: AHFS Drug information. p470, p 1692, p1700, and p2116, Bethesda, American Society of Hospital Pharmacists, 1990
  - 43) Gilman AG, Rall TW, Neis AS, Taylor P: The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. p 1244, p1566, and p1610, New York, Pergamon Press, 1991
  - 44) Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG: Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **68**:259, 1981
  - 45) Kaelin RM, Center DM, Bernardo J, Grant M, Snider GL: The role of macrophage-derived chemoattractant activities in the early inflammatory events of bleomycin-induced pulmonary injury. *Am Rev Respir Dis* **128**:132, 1983
  - 46) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**:412, 1982
  - 47) Fox RB: Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, Dimethylthiourea. *J Clin Invest* **74**: 1456, 1984
  - 48) Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH, Ischiropoulos H: Serum copper concentration as an index of experimental lung injury. *Adv Exp Med Biol* **258**:287, 1989
  - 49) Lin PS, Kwock L, Goodchild NT: Copper chelator enhancement of bleomycin cytotoxicity. *Cancer* **46**:2360, 1980
  - 50) Shen AS, Haslett C, Feldsien DC, Henson PM, Cherniack RM: The intensity of chronic lung inflammation and fibrosis after bleomycin is directly related to the severity of acute injury. *Am Rev Respir Dis* **137**:564, 1988
  - 51) Vaccaro CA, Brody JS, Snider GL: Alveolar wall basement membrane in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **132**:905, 1985
  - 52) 이상숙, 정재홍: Paraquat에 의한 폐포섬유증의 발생기전에 관한 연구. *대한병리학회지* **21**:111, 1987
  - 53) 홍승표, 이상숙, 정재홍: Paraquat에 의한 폐섬유증조직내의 Fibronectin의 면역조직화학적 검색. *대한병리학회지* **21**:138, 1987
  - 54) Kuhn III C, Boldt J, King TE Jr, Crouch E, Vartio T, McDonald JA: An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **140**:1693, 1989
  - 55) Lazenby AJ, Crouch EC, McDonald JA, Kuhn III C: Remodeling of the lung in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: An immunohistochemical study of laminin, type IV collagen and fibronectin. *Am Rev Respir Dis* **142**:206, 1990
  - 56) Bjorneboe A: Transport and distribution of alpha-tocopherol in rats: Effect of ethanol. p7, National Institute of Forensic Toxicology, 1988
  - 57) Doillin CJ, Hembry RM, Ehrlich HP, Burke JF: Actin filaments in normal dermis and during wound healing. *Am J Pathol* **126**:164, 1987

- 58) Eddy RJ, Petro JA, Tomasek JJ: Evidence for the nonmuscle nature of the "Myofibroblast" of granulation tissue and hypertrophic scar: an immunofluorescence study. *Am J Pathol* **130**:252, 1988
- 59) Rannels DE, Rannels SR: Influence of the extracellular matrix on type 2 cell differentiation. *Chest* **96**:165, 1989
- 60) Federspiel SJ, DiMari SJ, Howe AM, Guerry-Force ML, Haralson MA: Extracellular matrix biosynthesis by cultured fetal rat lung epithelial cells. III. Effects of chronic exposure to epidermal growth factor on growth, differentiation, and collagen biosynthesis. *Lab Invest* **64**:463, 1991
- 61) Karpel JP, Aldrich TK, Mitsudo S, Norin AJ: Lung lymphocytes in bleomycin-induced pulmonary disease. *Lung* **167**:163, 1989
- 62) Peake IR, Windmueller HG, Bieri JG: A comparison of the intestinal absorption, lymph and plasma transport, and tissue uptake of  $\alpha$ - and  $\alpha$ -tocopherols in the rat. *Biochim Biophys Acta* **260**:679, 1972
- 63) Zeidler RB, Flynn JA, Arnold JC, Conley NS: 68) Panush RS, Delafente JC: Vitamins and immunocompetence. *Wld Res Nutr Diet* **45**:97, 1985
- 69) Boxer LA: Regulation of phagocyte function by  $\alpha$ -tocopherol. *Proc Nutrit Societ* **45**:333, 1986
- Subpopulation of alveolar macrophages inhibits superoxide anion production by macrophages. *Inflammation* **11**:371, 1987
- 64) McDonald RJ, Berger EM, Repine JE: Alveolar macrophage antioxidants prevent hydrogen peroxide-mediated lung damage. *Am Rev Respir Dis* **143**:1088, 1991
- 65) Tengerdy RP, Heinzerling RH, Brown GL, Mathias MM: Enhancement of the immune response by vitamin E. *Int Arch Allergy* **44**:221, 1973
- 66) Tanaka J, Fujiwara J, Torisu M: Vitamin E and immune response. *Immunology* **38**:727, 1979
- 67) Lafuze JE, Weisman SJ, Ingraham LM, Butterick CJ, Alpert LA, Baehner RL: The effect of vitamin E on rabbit neutrophil activation. p 130, In Porter R, Whelan J, eds. *Biology of vitamin E*. London, Pitman Books Ltd., 1983