

□ 원 저 □

미만성 간질성 폐질환 환자들의 폐포대식세포의 chemokine(MIP-1, IL-8) 분비능에 관한 연구

울산대학교 의과대학, 내과학 교실, 아산 생명 과학 연구소*

김동순, 백상훈*, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김원동.

= Abstract =

Chemokine Secretion From Alveolar Macrophages in Patients with Diffuse Interstitial Lung Diseases(DILD).

Dong Soon Kim, Sang Hoon Paik*, Chae Man Lim, Sang Do Lee, Younsuck Koh, Woo Sung Kim, Won Dong Kim.

Asan Medical Center, Asan Institute for Life Science, School of Medicine, Ulsan University, Seoul, Korea.*

Background : The type of the infiltrating cells in alveolitis may be determined by the chemokines in the lesion. MIP-1 α , a C-C type chemokine, stimulates proliferation and cytokine secretion from macrophages and induces early neutrophilic and later monocytic inflammation in vivo. IL-8, a C-X-C type chemokine is known to attract neutrophils and T-lymphocytes. This study is performed to find out the relative role of two different chemokines in diffuse interstitial lung disease.

Subject and Method : We measured the secretion of MIP-1 α and IL-8 from alveolar macrophages(AM), and their level in BAL fluid of 26 patients with DILD (10 IPF, 4 collagen disease, 10 sarcoidosis, and 2 hypersensitivity pneumonitis) and 7 normal control.

Result : IL-8 secretion was significantly increased in patients with DILD (8.15 ± 4.58 ng/ml) than in normal (1.10 ± 0.93 ng/ml, $p=0.0003$). Significant correlation was found between IL-8 secretion and total cell number in BAL fluid ($r=0.484$, $p=0.0068$), %($r=0.592$, $p=0.0004$) and No. ($r=0.516$, $p=0.0042$) of lymphocyte, and % of AM ($r=-0.505$, $p=0.0032$). MIP-1 α secretion was also increased in DILD (2.41 ± 1.45 ng/ml) compared to control (0.63 ± 0.30 ng/ml, $p=0.0031$), and showed a tendency of correlation with total cell number ($r=0.368$, $p=0.0456$) and No. of alveolar macrophages ($r=0.356$, $p=0.0579$) in BAL fluid. The concentration of IL-8 in BAL fluid was significantly increased in the patients with DILD (40.4 ± 34.5 pg/ml) compared to control (3.90 ± 2.47 pg/ml, $p=0.0094$) and it showed a significant correlation with the total cell number ($r=0.484$, $p=0.0068$), %($r=-0.505$, $p=0.0032$) of AM, and % ($r=0.592$, $p=0.0004$) and No. ($r=0.516$,

* 본 연구는 아산생명과학연구소의 연구비 보조로 이루어 졌음

p=0.0042) of lymphocyte in BAL fluid. But there was a no significant difference in MIP-1 α concentration in BAL fluid between normal control group and the patients with DILD.

Conclusion : From the above results, we concluded that AM of DILD releases increased amount of both IL-8 and MIP-1 α but IL-8 has better correlation with the type of alveolitis.

Key word : Interstitial lung disease (DILD), BAL, IL-8, MIP-1 α .

서 론

특발성 미만성 간질성 폐섬유증(Idiopathic pulmonary fibrosis : IPF로 약칭)은 아직 밝혀지지 않은 원인에 의해 처음에 폐포염(alveolitis)으로 시작해서 점차 섬유화로 진행되는 질병으로서 기관지 폐포세척검사(bronchoalveolar lavage : BAL)상 호중구와 폐포대식세포(alveolar macrophage : AM으로 약칭)가 증가하는 것이 특징이다¹⁻⁴⁾. 병리 조직학적으로도 염증시기에는 호중구뿐 아니라 AM 및 임파구 등의 단핵구의 침윤이 주 병변인데, 이러한 염증세포의 침윤을 일으키는 기전은 이들 염증 세포들에 대한 화학주유물질(chemotactic substance)이 병소내 존재하기 때문인 것으로 생각된다. IPF 뿐 아니라 다른 미만성 간질성 폐질환(DILD)들도 폐포염으로 시작해 섬유화로 진행하며, 병의 종류에 따라 침윤되는 염증세포들의 종류에 차이가 있으나, 여러 가지 병적상태에서 어떠한 화학주유물질들이 어떻게 작용하는지에 대해서는 아직도 명확이 규명되지 못하고 있다. 근래에 염증세포들의 침윤을 유도하는 화학주유물질들이 많이 발견되었는데, 염증세포들을 유인하는 화학 주유물질로는 leukotriene, C5a, prostaglandin 등 외에도, 세포내에서 자극에 의해 새로 생성되어(inducible) 분비되는 pro-inflammatory cytokine(chemokine) 들이 있다^{5,8)}.

이들중 IL-8은 주로 호중구를 끌어들이고 활성화시키지만 T-임파구에도 작용한다고 알려졌으며^{9,10)}, MIP-1 α 는 처음에 LPS로 자극한 대식세포에서

TNF- α 를 분리하다가 발견된 새로운 chemokine으로서^{11,12)} 조직내의 대식세포의 분열을 촉진하고 대식세포에서 TNF- α 및 IL-1 α , IL-6 등의 cytokine의 분비를 유발하고^{13,14)}, 동물실험상 초기에는 호중구 침윤을 유발하나, 나중에는 주로 단핵구침윤을 일으킨다고 보고되었다¹⁵⁾. 그러므로 간질성 폐질환들에서도 이들 chemokine들의 분비가 증가되어 폐포염이 발생하리라고 생각되며, chemokine의 종류에 따라 폐포염의 양상이 다르리라고 추측되므로, 여러 종류의 DILD 환자들의 BAL 액내의 IL-8과 MIP-1 α 의 농도변화를 관찰하고 이것과 BAL액의 세포구성 등을 비교 관찰하여 DILD에서 이들 chemokine의 역할을 규명하고자 본 연구를 시행하였다. 또한 이들 chemokine 이 주로 어느 세포에서 분비되는가에 대해서는 아직 연구가 많이 되어 있지 못하나, AM이 여러가지 cytokine들을 분비하는 중심적인 세포로 알려져 있으므로^{16,17)}, DILD 환자들의 BAL액에서 폐포대식세포 (AM)를 분리하여, 24시간 체외 배양을 하는동안 배지내로 분비되는 IL-8과 MIP-1 α 의 양을 측정하여 BAL액 내의 농도와 비교 분석하여 chemokine 분비에서 AM의 역할도 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1) 환자군으로는 임상소견, 흉부 X-선 사진, HRCT 소견, 폐기능검사 소견 및 조직검사로 확

진된 IPF환자 10명, 교원성질환과 연관된 DILD 환자가 4명, 폐유육종증이 10명과 과민성 폐렴환자 2명을 대상으로 하였다.

2) 건강 대조군으로는 호흡기증상이 전혀없는 건강인 (본원 호흡기내과 의사, 전공의 및 의과대학 학생) 7명에서 BAL을 시행하였다. 이들의 임상소견은 Table 1과 같다.

Table 1. Clinical Characteristics of the Subjects.

	Control	DILD
Total number	7	26
Age(years)	24.7±3.7	53.2±3.4
Gender(M : F)	5 : 2	13 : 13
Diagnosis		
IPF		10
Collagen D.		4
Sarcoidosis		10
H. P.		2

IPF : Idiopathic pulmonary fibrosis,

CVD : Collagen vascular disease,

H. P. : Hypersensitivity pneumonitis

2. 방 법

1) BAL

BAL은 고식적인 방법으로 우중엽이나, 설상엽의 분지에 내시경을 wedging시킨 후에 생리식염수 50ml 씩으로 6번 세척을 실시하고, 첫번 세척액은 폐포보다는 기관지 세척액이 주이기 때문에 제외하였다¹⁸⁾. 세척액은 2장의 꺼-즈로 점액등을 걸러내고 용적을 측정된 후에 2,000 rpm에서 10분간 원심시킨 후에 BAL상청액은 Amicon ultrafiltration apparatus와 PM 10,000 membrane을 이용하여 15배로 농축하여 측정시까지 따로 -70도에 보관하였다. 세포층은 Hank's 용액으로 2번 세척하여 hemocytometer로 총 세포수를 측정하고, trypan blue

로 viability를 검사하였다. 일부 세포는 cytopsin을 시킨 후에 Diff. Quik 염색을 하여 총 300개의 세포를 세어서 각 세포의 백분율을 계산하였다.

2) 폐포대식세포 배양

RPMI 1640배지 (1 mg/ml bovine serum albumin : BSA, HEPES buffer, penicillin-streptomycin)에 살아 있는 AM이 ml당 1×10^6 개가 되도록 희석하여 6 well culture plate에 심어, 섭씨 37도, 5% CO₂ 하에서, 1시간 배양한 후 여러번 세척하여 nonadherent cell을 제거하였다. 다음에 새로운 RPMI-1640 배지를 동량 가한 후에 같은 조건으로 24시간 배양을 한 후에 상층액을 걷어서 2,000rpm에서 10분간 원심시켜 debris를 제거하여 측정시까지 -70도에 보관하였다.

3) MIP-1 α 및 IL-8 측정

MIP-1 α 및 IL-8 측정은 상품화되어 있는 R & D사의 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 간단한 원리는 chemokine의 서로 다른 epitope에 대한 항체를 chemokine에 의해 bridging을 시키는 방법으로서, 먼저 chemokine에 대한 항체를 96 well plate에 부착시키고, 측정하려는 세포배양액이나 BAL액을 반응 시킨 후에 반응하지 않은 액들을 세척하고, horseradish peroxidase (HRP)를 부착시킨 chemokine의 다른 epitope에 대한 이차 항체에 반응시키면, chemokine 분자가 이 두 항체를 연결시켜 well의 표면에 남게 된다.

여기에 이 HRP 효소의 기질(substrate)를 가하면, HRP양에 비례해서 발색반응이 나타나므로 이것의 optical density를 spectrophotometry로 측정하여 chemokine량을 측정한다. MIP-1 α ELISA kit의 측정 최저치는 2.0 pg/ml이고 IL-8의 측정 최저치는 6 pg/ml이며, 이들 kit는 다른 chemokine이나, cytokine들과 교차 반응이 없다고 확인되었다.

3. 통계처리

대조군과 DILD군에서의 IL-8과 MIP-1 α 분비의 비교는 unpaired Student t-test로 검정하였고, BAL액 내 세포변동과 IL-8, MIP-1 α 분비와의 상관관계는 linear regression analysis법으로 구하였고, 모든 통계처리는 MacIntosh computer의 Statview program을 이용하였다.

결 과

1) 폐포대식세포에서의 MIP-1 α 분비

폐포대식세포에서의 MIP-1 α 분비는 DILD환자군에서 2.41 ± 1.45 ng/ml로 대조군의 0.63 ± 0.29 ng/ml 보다 $P=0.0031$ 로 유의하게 증가하였고(Table 2, Fig. 1) 이러한 MIP-1 α 분비양상은 원인 질환의 종류에 따른 유의한 차이는 없었다.

그러나 AM의 MIP-1 α 분비와 BAL액내 세포변동과의 상관관계는(Table 3) 전체 DILD 환자군에서는 BAL액내 총세포수와 $r=0.368$, $P=0.0456$ 으로 유의한 관계를 보였고(Fig. 2), AM의 수효와($r=0.356$, $P=0.0579$) 상관관계의 경향을 보였을 뿐이어서 MIP-1 α 는 BAL액내 염증세포양상, 즉 폐내로 유입되는 염증세포들의 종류와는 큰 연관이 없음을 시사하였다.

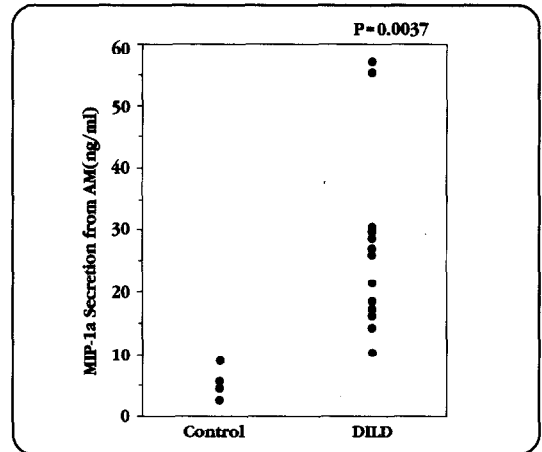


Fig. 1. MIP-1 α secretion of the alveolar macrophages.

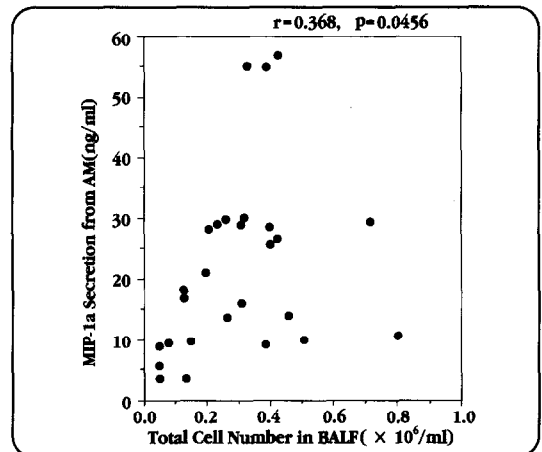


Fig. 2. Correlation between the total cell number in BAL fluid and the MIP-1 α secretion from the alveolar macrophages.

Table 2. MIP-1 α And IL-8 Secretion From Alveolar Macrophages And Their Level In BAL Fluid Of The Control And The Patients With Diffuse Interstitial Lung Diseases.

	Control	DILD	P-value
AM Conditioned Medium			
MIP-1 α (ng/ml)	0.63 ± 0.30	2.41 ± 1.45	0.0031
IL-8 (ng/ml)	1.10 ± 0.93	8.15 ± 4.58	0.0003
BAL Fluid			
MIP-1 α (pg/ml)	1.67 ± 0.38	1.87 ± 1.70	NS
IL-8 (pg/ml)	3.90 ± 2.47	40.4 ± 34.5	0.0094

2) 폐포대식세포의 IL-8 분비

DILD 환자들의 폐포대식세포의 IL-8분비는 8.15 ± 4.58 ng/ml로 대조군의 1.10 ± 0.93 ng/ml보다 $p=0.0003$ 으로 통계학적으로 유의하게 증가되었으며(Table 2), 이러한 폐포대식세포에서의 IL-8분비 양상은 BAL내 세포변동과도 상관관계를 보였다(Table 3).

Table 3. Correlation Between The Chemokines Released From Alveolar Macrophages And The Cell Patterns in BAL Fluid.

	Correlation coeff(r)	P-value
I. MIP- α in AM-CM		
DILD		
Total Cell No.	0.368	0.0456
AM (No.)	0.356	(0.0579)
II. IL-8 in AM-CM		
DILD		
BAL Cell No.	0.484	0.0068
AM(%)	-0.505	0.0032
AM(No.)	0.329	(0.0817)
Lymphocyte(%)	0.592	0.0004
Lymphocyte(No.)	0.516	0.0042
III. IL-8 in BAL Fluid		
BAL Cell No. 0.552	0.0016	
AM(%)	0.413	0.0189
AM(No.)	0.425	0.0215
Lymphocyte(No.)	0.329	0.0809
Neutrophil(%)	0.839	0.0001
Neutrophil(No.)	0.857	0.0001

즉, AM의 IL-8분비는 BAL액내 총세포수와 $r=0.484$, $P=0.0068$ 로 유의한 상관관계가 있었을 뿐

아니라, BAL액내 임파구의 백분율 및 임파구의 수효(각각 $r=0.592$, $P=0.0004$, $r=0.516$, $P=0.0042$) (Fig. 2), AM의 백분율 및 수효($r=-0.505$, $P=0.0032$, $r=0.329$, $P=0.0817$)와도 상관관계를 보였다.

그러므로 IL-8은 BAL액내 유입된 염증세포들의 종류, 즉 폐포염의 양상과 연관이 있음을 시사하였다.

3) BAL액내 MIP-1 α 및 IL-8 농도

BAL액내 MIP-1 α 의 농도는 정상인(1.67 ± 0.38 pg/ml)과 환자군사이에는 (1.87 ± 1.70 pg/ml) 차이가 없었다. 그러나 BAL액내 IL-8의 농도는 환자군에서 40.4 ± 34.5 pg/ml로 정상인(3.90 ± 2.47 pg/ml)보다 유의하게($P=0.0094$) 증가되어 있었고, BAL액내 IL-8 농도는 BAL액내 총세포수 ($r=0.552$, $P=0.0016$), AM의 백분율 ($r=0.413$, $P=0.0189$) 및 수효 ($r=0.425$, $P=0.0215$), 호중구의 백분율 ($r=0.839$, $P=0.0001$) (Fig. 4) 및 수효 ($r=0.857$, $P=0.0001$)와 유의한 상관관계를 보였다.

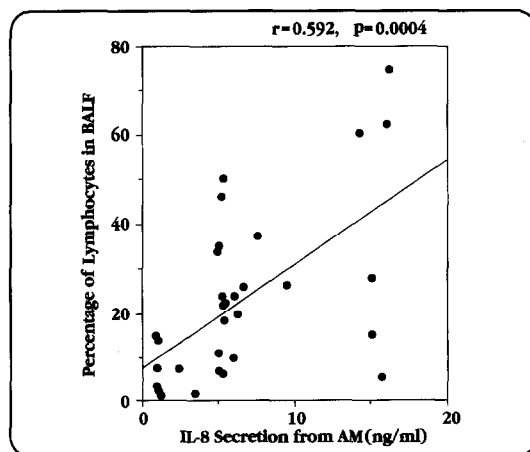


Fig. 3. Correlation between IL-8 secretion from alveolar macrophages and the percentage of lymphocytes in BAL fluid

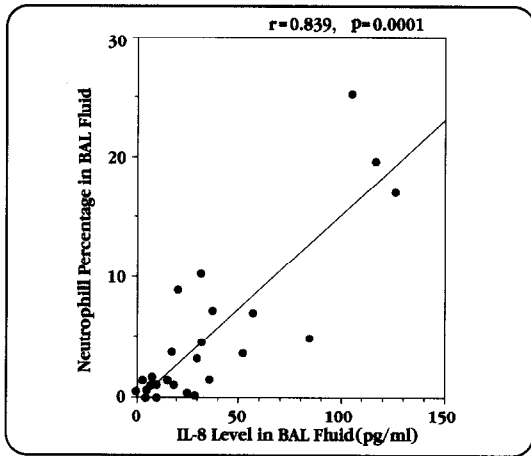


Fig. 4. Correlation between the IL-8 level in BAL fluid and percentage of neutrophil percentage

고 안

대부분의 간질성 폐질환이 폐포염으로 시작해서 섬유화로 진행되는데 IPF 환자들의 BAL액내에는 호중구가 증가하는 것이 특징적이나, 호산구도 증가하며, AM도 상대적인 %는 감소하나, 총세포수가 증가하기 때문에 AM의 절대적인 세포수효는 증가한다. 뿐 아니라, 병리 조직학적 소견상으로는 호중구보다는 임파구나 대식세포등의 단핵구의 침윤이 주로 나타나기 때문에 이러한 단핵구의 침윤이 지속적으로 유지되는 것이 IPF 병변의 진행에 중추적인 역할을 할 것으로 생각되지만, 아직까지는 이 기전은 명확히 밝혀지지 못하였다.

염증세포들을 유인하는 화학성주유물질로는 leukotriene, C5a, prostaglandin등외에, 세포내에서 자극에 의해 새로 생성되어 분비되는 chemokine들이 있다^{6,8-10,19,20}. 이들 chemokine들은 10-50% 정도의 아미노산 구조가 서로 비슷하며, 특히 4개의 cysteine분자들이 연결된 구조는 모든 chemokine들에 가장 공통된 점이고, 그 구조에 따라 크게 2가지로 분류되고 있다. 즉 이 4개 cysteine 분자들 중

에 첫 두개 사이에 다른 amino acid가 끼어들어간 C-X-C (또는 alpha-subfamily) 형과 두개의 cysteine 분자들이 그대로 연결된 C-C형 (beta subfamily)으로 분류되는데, C-X-C 형에는 IL-8, GRO α /MGSA, platelet factor-4, IP-10, ENA-78 등이 속하고, C-C 형에는 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, MCAF, MCP-2, MCP-3 및 I-309 등이 속한다^{6,19,20}. 이들은 구조만 다를 뿐 아니라 기능적으로도 차이가 있어 C-X-C 형은 주로 호중구를 유인하고 활성화시키는데 관여하고, C-C 형은 주로 단핵구에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이 중에 MIP-1은 처음에 LPS 로 자극한 대식세포에서 TNF- α 를 분리하다가 발견된 비교적 새로운 chemokine으로서 C-X-C형에 속하고 자연적으로 존재하는 native MIP-1 α 는 SDS PAGE 상에서 8kDa 정도의 두개의 분자 (MIP-1 α 와 MIP-1 β)의 중합체 (doublet)로서, 현재는 이들의 amino acid 구조 및 유전자 구조가 모두 밝혀졌다^{7,11,12,14}. MIP-1 α 는 69개의 amino acid로 구성되어 MW가 7889 Dalton인 heparin binding protein으로 정상에서는 만들어 지지 않고 내독소로 자극을 받은 대식세포에서만 생성되며, prostaglandin과 상관없이 발열을 유발하는 것이 알려졌다²¹. 또한 이 MIP-1 α 를 내독소에 내성이 있는 C3H/HeJ mice의 말발닥에 주입했을 때 국소에 호중구 침윤을 유발하고, 토끼의 뇌강에 주입했을 때에는 처음에는 호중구의 침윤이 나타나고, 연이어 단핵구 침윤이 발생하는 것이 관찰되었다^{11,15}. 시험관내 실험으로도 murine MIP-1 α 는 사람의 호중구에 대한 화학주유능이 있는 것이 확인 되었고, Fahey등은 이 MIP-1 α 가 조직내의 대식세포의 분열을 촉진하고 대식세포에서 TNF- α 및 IL-1 α , IL-6등의 cytokine의 분비를 유발하는 것을 보고하였다^{14,22}. 뿐 아니라 MIP-1 α 는 호산구에 대해서도 화학주유작용이 있고, 호염기구세포를 자극하여 히스타민과 leukotriene의 분비

를 항진시키는 작용도 하는 것이 밝혀졌다²³⁾. 그러나 MIP-1 β 는 오히려 MIP-1 α 의 이러한 작용을 억제하는 것이 관찰되어 MIP-1 α 와 MIP-1 β 가 서로 상이한 작용을 하는 사실이 알려졌다²²⁾. 이러한 MIP-1 α 의 작용과 IPF환자들의 BAL 소견을 고려하면 MIP-1 α 가 IPF의 발병기전을 잘 설명할 수 있을 것으로 추측할 수 있으나, 아직은 IPF에서 MIP-1 α 의 역할에 대한 연구는 발표된 것이 별로 없었다. Standiford등은 BAL액에서의 MIP-1 α 의 농도를 측정한 결과 정상인에서는 7명중 1명에서만 측정이 되었으나, 폐유육종증에서는 23명중 22명에서(평균 443 ± 76 pg/ml), IPF환자들에서는 9명 전부에서(평균 427 ± 81 pg/ml) 측정되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 BAL액을 15배로 농축한 후 ELISA법으로 사용하여 정상인에서도 MIP-1 α 농도를 측정할 수 있었으나 정상인과 DILD 환자군 사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었고, 측정치도 차이가 심했다. 이러한 두 연구간의 차이는 이유는 확실하게 설명할 수는 없으나, BAL액내 농도는 폐포액이 BAL 과정에서 생리식염수에 희석되는 정도에 따라 좌우되고, 또한 ELISA 측정법이 서로 다르기 때문이 아닌가 추측된다. 즉 본 연구에서는 15배 농축액을 측정범위가 좁은 상업용 kit로 측정한 것에 비해 Standiford등은 농축하지 않은 원액을 자체 생산한 항체를 사용하여 측정범위가 넓은(1 pg/ml에서 100,000 pg/ml 까지) ELISA 검사로 측정하였다.(정상인의 BAL액내 MIP-1 α 의 농도가 측정범위 이하라고 하였으므로 1pg/ml 이하임) 실제 BAL액내 cytokine등의 농도 측정은 희석정도등 여러가지 요소에 의해 영향을 받으므로 결과를 판정하는데 문제점이 많기 때문에 MIP-1 α 를 생산하는 주 세포에서의 분비양상을 비교하는 것이 더 의미가 있을 가능성이 많다. MIP-1 α 는 처음에 LPS로 자극된 대식세포에서 분비되는 것이 발견되었으나 이후에 호중구 및 섬유

모세포에서도 생성되는 것이 알려졌고, Standiford등은 DILD 환자들 조직에서 면역화학염색법으로 AM 및 간질내 대식세포와 섬유모세포에서 MIP-1 α 가 증가된 것을 관찰하였다. 또한 Smith등은 생쥐에 bleomycin을 기도내 주입후 면역조직학적 염색으로 2-4일 후에는 기도상피세포와 AM에서 MIP-1 α 가 발현되다가 12-16일 후에는 주로 AM에서만 발현이 되는 것을 관찰하여 DILD의 경우에는 AM이 MIP-1 α 의 주 생산 세포임을 암시하였다²⁵⁾. 그러나 Standiford 등은 AM에서의 MIP-1 α 의 분비는 측정하지 않았고, 실제 환자들에서 AM에서의 MIP-1 α 의 분비양상을 측정한 보고는 없었다.

본 연구에서는 AM의 MIP-1 α 분비는 정상인에 비해 환자군에서 뚜렷이 증가하여 MIP-1 α 가 DILD의 발병기전에 관여한다는 것을 시사하여 주었다. 그러나 AM의 MIP-1 α 분비와 BAL액내 세포 양상과 사이에 밀접한 상관관계는 관찰되지 않았고, 또 BAL액내 농도는 정상인과 차이가 없었던 점들로 미루어 MIP-1 α 가 폐내로 유입되는 염증세포의 종류를 결정하는 주 chemokine은 되지 못하는 것으로 사료된다. 그러나 규소 분진에 노출된 흰쥐의 폐조직내 MIP-1 α 와 MIP-2의 단백질 및 RNA가 증가하는 것을 관찰한 Driscoll등의 보고나²⁶⁾ Smith의 bleomycin model에서도 MIP-1 α 는 초기에 증가한 사실등을 고려하면 본 연구의 대상이 IPF나 교원성 폐섬유증환자들로 이미 섬유증으로 진행된 후기 환자들이 많았기 때문에 MIP-1 α 의 역할이 중요치 않게 나왔을 가능성도 있으나, 앞으로 더 많은 환자들을 대상으로 단일 질환에서 병의 시기 및 활동성 여부 등에 따른 분석이 필요할 것으로 사료된다.

IL-8은 가장 많이 연구된 C-X-C형의 chemokine으로 호중구에 대해 강력한 화학주유성이 있을 뿐 아니라, 호중구에서의 lysozyme 분비 촉진 및

respiratory burst를 유발하고, 내피세포에 접착분자(CD11abc/CD18) 발현을 증가시키고, 호중구가 자극받지 않은 내피세포에 접착하도록 유도하여 내피세포를 통한 호중구의 이동을 돕는등 주로 호중구에 작용한다고 알려졌다¹⁹⁾. 그러나 최근에 IL-8이 T-세포에 대해서도, 특히 자극받지 않은 상태의 CD4 및 CD8세포에도 화학주유성이 있는 것이 알려졌다^{6,28)}, 또한 호염기구세포(basophil)에도 작용하며²⁹⁾, 강력한 혈관형성인자(angiogenic factor)일 뿐 아니라³⁰⁾, 흑색종세포(melanoma)에 대해서도 haptotactic한 작용 있는 것이 밝혀졌다³¹⁾. IL-8이 염증반응에 중요한 역할을 한다는 사실은 IL-8을 피부내 주입시 호중구와 임파구의 침윤이 유발되고, 관절강내로 주입하면 호중구침윤에 의한 synovium의 파괴가 일어난다는 사실외에도³²⁾ LPS로 유발된 피부염이나 재관류(perfusion)에 의한 손상등 여러 종류의 급성 염증에 IL-8에 대한 항체를 투여하면 호중구의 침윤 및 조직손상이 억제되는 사실로 확인되었다^{33,34)}. 실제로 류마티스관절염이나, 성인형 호흡곤란증후군(ARDS), 패혈증, 재관류성 폐손상(reperfusion lung injury) 등에서 IL-8의 증가가 관찰 되었다³²⁻³⁴⁾.

DILD의 경우에는 Carre등이 IPF환자들의 BAL액내 IL-8농도의 증가와 (IPF: 58.5 ± 11.2 pg/ml, 교원성 폐섬유증: 32.7 ± 7.4 pg/ml, 대조군: 11.0 ± 3.6 pg/ml) AM내 IL-8의 mRNA의 항진을 관찰하였고, Car등도 IPF환자 및 폐유육종환자들의 BAL액내에 MCP-1과 함께 IL-8이 각각 15.5와 26.0 ng/mg albumin으로 정상인 (2.14 ng/mg albumin)에 비해 증가되었다고 보고하였다^{35,36)}.

본 연구의 결과도 역시 BAL액내 IL-8의 농도 뿐 아니라 AM에서의 IL-8의 분비가 유의하게 증가하였으며, 이들과 BAL액내 염증세포들의 양상과 의미있는 상관관계를 나타내서 IL-8이 DILD의 폐내로 유입되는 염증세포들의 종류를 결정하는

데에 중요한 역할을 한다는 것을 뒷받침 하였다.

요 약

배경 : 미만성 간질성 폐질환(DILD)들은 처음에 폐포염(alveolitis)으로 시작해 섬유화로 진행하여 심한 폐기능장애를 초래하는 질병군들로서 병의 종류에 따라 침윤되는 염증세포들의 종류에 차이가 있다. 근래에 염증세포들의 침윤을 유도하는 화학주유물질들(chemokine)이 많이 발견되었는데 이들은 화학구조에 따라 C-X-C형과 C-C형으로 분류되며, 구조만 다를 뿐 아니라 작용하는 세포도 차이가 있기 때문에 주로 분리되는 화학주유물질의 종류에 따라 폐포염의 종류가 결정될 가능성이 많다. 이에 연구자들은 폐포염과 화학주유물질과의 연관성 및 폐포대식세포(AM)가 이들 화학주유물질의 주 근원이 되는가를 알아보기 위하여 DILD 환자들에서 cytokine을 분리하여 발병기전에 주작용을 한다고 알려진 AM에서의 C-X-C형 IL-8과 C-C형인 MIP-1 α 의 분비 및 BAL액내에서의 이들 화학주유물질들의 농도를 폐포염의 양상을 잘 반영한다고 알려진 BAL액내 세포양상과 비교분석 하였다.

대상 및 방법 : 대상은 임상소견과 조직검사로 확진된 IPF 환자 10명, 교원성질환과 연관된 폐섬유증 환자 4명, 폐유육종 10명과 과민성폐장염 환자 2명, 총 26명과 정상 대조군 7명이었고, 이들에게서 BAL을 시행하여 그 세포구성의 변화를 관찰하고, AM을 분리배양하여 그 상청액 및 BAL액에서의 IL-8과 MIP-1 α 의 농도를 ELISA 방법으로 측정하여 비교 분석하였다.

결과 : AM에서의 IL-8 분비는 DILD 환자들에서 8.15 ± 4.58 ng/ml로 정상 대조군 (1.10 ± 0.93 ng/ml)보다 유의하게 ($p=0.0003$) 증가하였고, AM에서 분리된 IL-8량은 BAL액내 총세포수와 ($r=0.484$,

p=0.0068), 또 BAL액내 임파구의 백분률 ($r=0.592$, $p=0.0004$) 및 임파구의 수효 ($r=0.516$, $p=0.0042$), AM의 백분률 ($r=-0.505$, $p=0.0032$)과 유의한 상관관계를 보여 주었다. AM에서의 MIP-1 α 분비는 DILD환자군에서 (2.41 ± 1.45 ng/ml) 정상인보다 (0.63 ± 0.30 ng/ml, $p=0.0031$) 유의하게 증가되었으나, MIP-1 α 의 분비량은 BAL액내 총세포수와 $r=0.368$, $p=0.0456$ 로 유의한 상관관계를 나타내었고, AM의 수효와 연관이 있는 경향을 ($r=0.356$, $p=0.0579$) 보여 주었을 뿐이었다. BAL액내의 IL-8 농도는 DILD 환자군에서 40.4 ± 34.5 pg/ml로 정상인의 3.90 ± 2.47 pg/ml보다 높았고 ($p=0.0094$), IL-8 농도와 BAL액내 총 세포수($r=0.484$, $p=0.0068$), AM의 백분율($r=-0.505$, $p=0.0032$), 임파구의 백분율 ($r=0.592$, $p=0.0004$) 및 임파구의 수효 ($r=0.516$, $p=0.0042$)와 좋은 상관관계를 나타내어 IL-8이 폐내 침윤된 염증세포의 종류를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것을 시사하였다. 그러나 BAL액내 MIP-1 α 의 농도는 정상인과 차이가 없었다.

결론 : 이상의 결과로 미루어 IL-8과 MIP-1 α 모두가 DILD의 발병기전에 작용하나, IL-8이 폐포염의 양상을 결정하는데 더 중요한 역할을 하는 것으로 추측되었다.

참 고 문 헌

- 1) King TE Jr. Idiopathic pulmonary fibrosis. In Interstitial lung disease edited by Schwarz MI and King TE Jr. 2nd Edition, Mosby-Year Book Inc. St. Louis, 1993. P367.
- 2) Doberty DE, Worthen GS, Henson PM. Inflammation in interstitial lung disease. In Interstitial lung disease (2nd Ed.) edited by Schwarz MI and King TE. Mosby -Year book, Inc. 1993, p23.
- 3) The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. Am Rev Respir Dis **14**(Suppl) : 188-192, 1990.
- 4) Haslam PL, Turton CWG, Heard B. Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis : composition of cells obtained with lung biopsy and clinical feature. Thorax **35** : 9, 1980.
- 5) Oppenheim JJ, Zacharine COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene : intercrine : cytokine family. Ann Rev Immunol **9** : 617-648, 1991.
- 6) Taub DD, Oppenheim JJ. Review of the chemokine meeting. The third international symposium of chemotactic cytokines. Cytokine **3** : 175-179, 1992.
- 7) Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : members of novel superfamily of cytokines. FASEB J **3** : 2565, 1989.
- 8) Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines : A family of chemotactic and inflammatory cytokines. Crit Rev Immunol **12** : 17-46, 1992.
- 9) Baggiolini M, Waltz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide/interleukin-8. a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest **84** : 1045 -1049, 1989.
- 10) Larsen CG, Anderson QO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsudhima K. Neutrophilic activating factor(NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. Science **243** : 1464-1466, 1989.
- 11) Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan

- CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophage secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* **167** : 570, 1987.
- 12) Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermesen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein(MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp. Med* **167** : 1939, 1988.
- 13) Fahey TJ III, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage Inflammatory Protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* **148** : 2764, 1992.
- 14) Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins : biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* **20** : 473-490, 1994.
- 15) Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe C, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental meningitis. *J Exp Med* **171** : 439, 1990.
- 16) Cherniak RM, Crystal RG, Kalica AR. Current concepts in idiopathic pulmonary fibrosis : A road map for the future. *Am Rev Respir dis* **143** : 680, 1991
- 17) Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* **141** : 765, 1990.
- 18) 김동순 : 특발성 간질성 폐섬유증 및 교원성 질환에 병발된 간질성 폐섬유증 14예의 기관지폐포 세척액 소견 및 임상상. *대한내과 학회잡지* **35** : 87, 1988.
- 19) Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines : A family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* **12** : 17-46, 1992.
- 20) Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* **3** : 165-183, 1991.
- 21) Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A. Macrophage inflammatory protein-1 : A prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* **243** : 1066-1068, 1989.
- 22) Fahey TJ III, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* **148** : 2764-2969, 1992.
- 23) Alam R, Forsythe PA, Stafford S, Lett-Brown MA, Grant JA. Macrophage inflammatory protein-1a activates basophils and mast cells. *J Exp med* **9** : 781-786, 1992.
- 24) Standiford TJ, Rolfe MR, Kunkel SL, Lynch JP 3d, Burdick MD, Gilbert AR, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1a expression in interstitial lung disease. *J Immunol* **151** : 2852-2863, 1993.
- 25) Smith RE, Strieter RM, Phan S, Lukacs NW, Huffnagle GB, Wilke CA, Burdick MD, Lincoln P, Evanoff H, Kunkel SL. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1a in bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* **153** : 4704-4712, 1994.
- 26) Driscoll KE, Hassenbreim DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : Expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial

- cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8** : 311-18, 1993
- 27) Huber QR, Kunkel SL, Todd III RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous Interleukin-8. *Science* **254**:99-102, 1991.
 - 28) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. Neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* **243** : 1464-1466, 1989.
 - 29) White MV, Yoshimura T, Hook W, Kaliner M, Leonard EJ. Neutrophil attractant/activation protein 1 (NAP-1) causes human histamine release. *Immunol Lett* **22** : 151-154, 1989.
 - 30) Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258** : 1798-1901, 1992.
 - 31) Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K, Van DJ, Mantovani A. Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun* **169** : 165-170, 1990.
 - 32) Endo H, Akaboshi T, Takagishi K, Kashiwazaki S, Matsushima K. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbits joint. *Lymphokine Cytokine Res* **10** : 245-252, 1991.
 - 33) Harada A, Sekido N, Kuno K, Akiyama M, Kasahara T, Nakanishi I, Mukaida N, Matsushima K. Expression of recombinant rabbit IL-8 in *Escherichia coli* and establishment of the essential involvement of IL-8 in recruiting neutrophils into lipopolysaccharide - induced inflammatory site of rabbit skin. *Int Immunol* **5** : 681-690, 1993.
 - 34) Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* **365** : 654-657, 1993.
 - 35) Carre PC, Motenson RL, King Jr TE, Noble PW, Sable CL, Riches DWH. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **88** : 1802-1810, 1991.
 - 36) Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **149** : 655, 1994.