

사람 폐 섬유아세포의 전환성장인자-β1에 의한 fibronectin 분비와 α-smooth muscle actin 표현에 있어서 활성산소종의 역할

순천향대학교 현암신장연구소¹, 이화여자대학교 약학대학², 순천향대학교 의과대학 내과학교실³
하현주^{1,2}, 유미라¹, 어수택^{1,3}, 박춘식^{1,3}, 이희발^{1,3}

Role of Reactive Oxygen Species in Transforming Growth Factor-β1-induced Fibronectin Secretion and α-Smooth Muscle Actin Expression in Human Lung Fibroblasts

Hunjo Ha^{1,2}, Mi-Ra Yu¹, Soo-taek Uh, M.D.^{1,3}, Choon Sik Park, M.D.^{1,3}, and Hi Bahl Lee, M.D.^{1,3}

Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University¹, Ewha Womans University College of Pharmacy², and Department of Internal Medicine, Soon Chun Hyang University College of Medicine³

Background : The transforming growth factor-β1 (TGF-β1) plays a key role in lung fibrosis. However, the molecular mechanisms involved in TGF-β1-induced lung fibrosis are unclear. TGF-β1 is the key inducer of myofibroblast transdifferentiation via de novo synthesis of α-smooth muscle actin (α-SMA). Since TGF-β1 signals through reactive oxygen species (ROS) and ROS have been shown to induce accumulation of extracellular matrix (ECM) in various tissues, this study examined if ROS play a role in TGF-β1-induced fibronectin secretion and α-SMA expression in human lung fibroblasts, MRC-5 cells.

Methods : Growth arrested and synchronized MRC-5 cells were stimulated with TGF-β1 (0.2-10 ng/ml) in the presence or absence of N-acetylcysteine (NAC) or diphenyleneiodonium (DPI) for up to 96 hours. Dichlorofluorescein (DCF)-sensitive cellular ROS were measured by FACScan and secreted fibronectin and cellular α-SMA by Western blot analysis.

Results : TGF-β1 increased the level of fibronectin secretion and α-SMA expression in MRC-5 cells in a dose-dependent manner. Both NAC (20 and 30 mM) and DPI (1 and 5 μM) significantly inhibited TGF-β1-induced fibronectin and α-SMA upregulation. The TGF-β1-induced cellular ROS level was also significantly reduced by NAC and DPI.

Conclusions : The results suggest that NADPH oxidase-dependent ROS play an important role in TGF-β1-induced fibronectin secretion and α-SMA expression in MRC-5 cells, which leads to myofibroblast transdifferentiation and progressive lung fibrosis. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 58:267-275)

Key words : Pulmonary fibrosis, Transforming growth factor-beta1, Reactive oxygen species, α-Smooth muscle actin, Fibroblast, Myofibroblast, Fibronectin, N-acetylcysteine, Diphenyleneiodonium

서 론

세포외기질(extracellular matrix: ECM)의 과다한 축적으로 정의되는 조직 섬유화는 다양한 원인에 의한 폐 질환에서도 관찰되는 공통적인 병리소견이다¹.

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소 육성과제(1999-005-F00024) 지원에 의하여 수행되었음.

Address for correspondence : **Hi Bahl Lee, M.D.**

Hyonam Kidney Laboratory Soon Chun Hyang University 657 Hannam-dong, Yongsan-gu Seoul 140-743

Phone : 02-709-9171 Fax : 02-792-5812

E-mail : hblee@hkl.ac.kr

Received : Dec. 14, 2004

Accepted : Feb. 4, 2005

α-Smooth muscle actin (α-SMA)의 신생합성(de novo synthesis)은 폐 섬유아세포(lung fibroblast)를 근 섬유아세포(myofibroblast) 표현형으로 변화시키고 이 근 섬유아세포의 표현은 폐 섬유화가 진행되는 부위에서 상향조절되고 지속적으로 표현¹⁻⁵되기 때문에 폐 섬유화의 발생과 진행에 주 역할을 할 것으로 추정되고 있다. Zhang 등은 bleomycin에 의한 폐 섬유화에서 폐 섬유아세포양(fibroblast-like) 세포에서 α-SMA의 표현과 함께 collagen I과 전환성장인자-β1 (transforming growth factor-β1: TGF-β1)이 표현되고⁷ 세포 수축을 유도할 뿐 아니라 단핵구화학주성 단백질-1 (monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1)의 표현을 증가시킴을 보고하였다⁹. 폐의 근 섬유아세포는

기관지 또는 혈관외막(perivascular adventitium)에 존재하던 섬유아세포의 표현형이 변화된 것으로 생각된다. α -SMA의 표현이 근 섬유아세포로의 변화를 특징짓고 있기 때문에 폐 섬유아세포에서의 α -SMA의 표현 조절 기전을 이해하면 폐 섬유화의 발생과 진행을 억제할 수 있는 새로운 치료법을 제시할 수 있을 것이다.

TGF- β 1은 정상 폐조직의 기관지 상피세포와 섬유아세포에서 생산되는 주된 TGF- β 아형이다¹⁰. TGF- β 1은 ECM 단백을 생산하는 유전자를 상향조절하여 그 합성을 증가시키고, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 표현을 상향조절하여 plasmin이나 collagenase 등 ECM 분해효소의 활성을 감소시킴으로써 ECM 축적을 매개한다^{11,12}. TGF- β 1은 상피세포-중간엽세포 이행(epithelial-mesenchymal transition: EMT)을 유도하는 주된인자로 이 과정에서 α -SMA의 신생합성을 유도하고 상피세포의 표현형을 근 섬유아세포로 변화시킨다¹³. 또 TGF- β 1에 의한 α -SMA의 표현은 폐 섬유아세포를 근 섬유아세포로 변화시키는 중요한 지표이다¹⁴.

TGF- β 1에 의한 세포 활성화에는 Smad 경로¹⁵와 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 경로가 관여함이 잘 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸. 그러나 최근의 연구 결과로 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)도 TGF- β 1의 세포내 신호전달자로 관여한다는 것이 알려져 있다¹⁹⁻²⁶. Junn 등²²은 폐 섬유아세포에서 TGF- β 1에 의한 IL-6의 상향조절에 ROS가 관여한다고 보고한 바 있다. 본 연구진은 신장 사구체 혈관간세포에서 ROS가 TGF- β 1에 의한 PAI-1 상향조절에 관여하고 TGF- β 1에 의한 ROS 증가에는 NADPH oxidase가 관여함을 보고하였다^{26,27}. 또 외부에서 투여한 과산화수소(H_2O_2)가 신장세포의 fibronectin 단백 생산을 상향조절할 뿐 아니라 PAI-1을 상향조절함으로써 ECM 분해를 억제하여 ECM 축적을 유발하고^{26,27} α -SMA를 상향조절함²⁸을 보고한 바 있다. Hagiwara 등²⁹은 항산화제 N-acetylcysteine (NAC)이 bleomycin에 의한 폐 섬유화를 억제하는 것을 보고하여 ROS가 폐 섬유화에 관여함을 시사하였다. 본 연구에서는 조직 섬유화의 기전을 이해하고 섬유화를 예방 또는 억제하

는 전략을 수립하기 위한 연구의 일환으로 폐 섬유아세포에서 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 표현 상향조절에 ROS가 관여하는지를 검색하였다. 이를 위하여 MRC-5 세포를 이용하여 dichlorofluorescein (DCF)에 민감한 세포내 ROS를 FACScan으로 측정하였고, TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 표현 상향조절에 미치는 항산화제의 효과를 관찰하였다.

대상 및 방법

실험에 사용한 재료는 따로 제시되지 않은 한 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)와 Nalge Nunc International (Naper Ville, IL, USA)에서 구입하였다.

1. 폐 섬유아세포주 배양

이미 성상이 확인되어 실험에 사용되고 있는 폐 섬유아세포주(MRC-5)를 American Type Culture Collection (ATCC: Rockville, MD, USA)에서 구입하여 5% 우태아 혈청이 포함된 5.6 mM 포도당 함유 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다. 세포가 배양 용기를 가득 채우면 trypsin/EDTA (0.25%/0.1%)로 처리하여 계대 배양하였고 실험을 위하여 6 well plate (1×10^5 cells/well)에서 배양하였다.

2. 실험 조건

세포가 배양 용기의 대부분을 채우면 우태아 혈청을 포함하지 않는 배지로 교체하여 24시간 배양함으로써 세포 성장을 정지시키고 성장 주기를 동일화 하였다. 이 후 실험 목적에 알맞게 혈청이 배제된 배지를 대조군으로 하고, 실험군은 0.2-10 ng/ml TGF- β 1 (R&D, Mpls., MN, USA)을 첨가한 군으로 구성하여 96시간까지 배양하였다. 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC: 5-30 mM)이나 NADPH oxidase 억제제인 diphenyleneiodonium (DPI: 0.1-5 μ M)은 TGF- β 1 투여 1 시간 전부터 실험이 종료될 때까지 지속적으로

투여하였다. 배양액은 48시간에 동일한 실험 조건의 배양액으로 교환함으로써 포도당을 비롯한 영양 공급을 유지하였다.

3. 세포 독성 분석

NAC와 DPI에 의하여 손상을 입은 세포로부터 배지 내로 유리되는 LDH를 측정함으로써 세포 독성을 정량하였다³⁰. 세포 독성은 실험이 완료될 때까지 배지로 유리된 LDH 양과 분석 시점에서 1% Triton X-100으로 처리하여 인위적으로 세포들을 모두 파괴시킨 후 측정된 세포내 LDH를 합한 총 LDH 양 중 배지로 유리된 LDH 양의 백분율(%)로 표시하였다. 시료의 LDH는 pyruvic acid, 환원 형태의 β -nicotinamide adenosine dinucleotide (NADH)와 반응시켜 SOFTMAX PRO multiple reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 340 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

$$\% \text{ 세포 손상} = 100 \times \frac{\text{손상된 세포에서 배지로 유리된 LDH}}{\text{LDH}(\text{배지로 유리된 LDH} + \text{세포내 LDH})}$$

4. Western Blot 분석

실험이 완료된 후 배양 상층액을 취하여 원심분리한 후 aliquot하여 분석할 때 까지 -70°C 에서 보관하였다. 세포 용해액(lysis buffer: 50mM Tris-HCl PH 7.5, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM dithiothritol, 0.1mM PMSF, leupeptin, aprotinin, 1% Triton X-100)으로 세포를 용해한 후 Bio-Rad 분석 시약(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 단백질량을 측정하였다. 세포 단백질(20 μg)으로 보정된 배양액(농축이 필요하지 않음) 또는 세포 용해액에 reducing sample buffer를 넣고 95°C 에서 5분간 끓였다. Fibronectin 단백질과 α -SMA 단백질 측정을 위해서 각각 5%와 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 단백질을 분리하고 완충액을 이용하여 nitrocellulose 흡착지에 전이하였다. 흡착지를 blocking 용액(5% skim milk 및 0.1% Tween 20이 포함된 TBS)에 넣고 1시간동안

반응을 시켰다. Peroxidase-conjugated rabbit anti-human fibronectin (DAKO, Glostrup, Denmark)을 이용하여 2시간 동안 반응을 시킨 후 washing 용액(0.1% Tween 20을 포함한 TBS)을 이용하여 15분간 한 번과 5분씩 세 번을 반복하여 반응하지 않은 항체를 제거하고 ECL solution kit (Amerham Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 X-ray film을 이용하여 감광을 시켰다. α -SMA 단백질은 1차 항체로 anti-mouse α -SMA antibody (1:2000)와 2차 항체인 anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 각각 2시간동안 반응시켰다. 감광된 필름을 scan 하여 density를 구하여 대조군과 비교하였다. α -SMA 단백질은 anti-mouse β -actin antibody (1:10,000)로 보정하였다.

5. 세포내 DCF-sensitive ROS 측정

DCF에 민감한 세포내 ROS를 정량하기 위하여 FACS (Becton Dickinson Immunocytometry System, Mountain View, CA, USA)를 이용하였다²⁶. 실험이 완료되면 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA: Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) 5 μM 을 첨가하여 세포배양기에서 20분간 배양하였다. PBS로 씻어준 후 10,000 세포에 함유된 산화된 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)의 형광을 488 nm excitation과 515-540 nm emission에서 측정하였다. TGF- β 1에 의한 세포내 ROS의 측정은 예비실험 결과에 따라 TGF- β 1 자극 후 30 분에 측정하였다.

6. 자료 분석

모든 자료는 “평균값+표준 오차”로 기술하였다. 각 조건에서 실험군 간의 변화 양상을 검토하기 위하여 분산분석(analysis of variance: ANOVA)을 이용하였고, F 값이 의의가 있을 때에는 각 군간의 차이를 Fisher's least significant difference 방법으로 비교하였다. P 값이 0.05 이하일 때를 통계적으로 유의한 차이로 정의하였다.

결 과

1. TGF- β 1이 MRC-5 세포의 fibronectin 분비와 α -SMA 표현에 미치는 영향

TGF- β 1을 첨가하고 48시간(Figure 1A) 또는 96시간(Figure 1B) 후 배양액으로 분비된 fibronectin을 Western blot 분석으로 측정하였다. TGF- β 1은 MRC-5 세포의 fibronectin 분비를 용량의존적으로 증가시켰다.

혈청배제 DMEM에서 배양한 MRC-5 세포는 α -SMA 단백을 미량 표현하였으며(Figures 1C와 D), TGF- β 1 자극 후 48시간(Figure 1C) 또는 96시간(Figure

1D) 후 α -SMA 단백 표현은 TGF- β 1에 의하여 용량 의존적으로 증가하였다.

2. N-acaetylcystein (NAC) 또는 diphenyleneiodonium (DPI)이 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 표현에 미치는 영향

MRC-5 세포의 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 단백 표현은 2 ng/ml 이상에서 48 시간과 96 시간 모두에서 대조군과 비교하여 통계적으로 의미있게 증가하였으므로 항산화제 NAC와 NADPH oxidase 억제제 DPI의 영향을 관찰하기 위하여 2 ng/ml의 TGF-

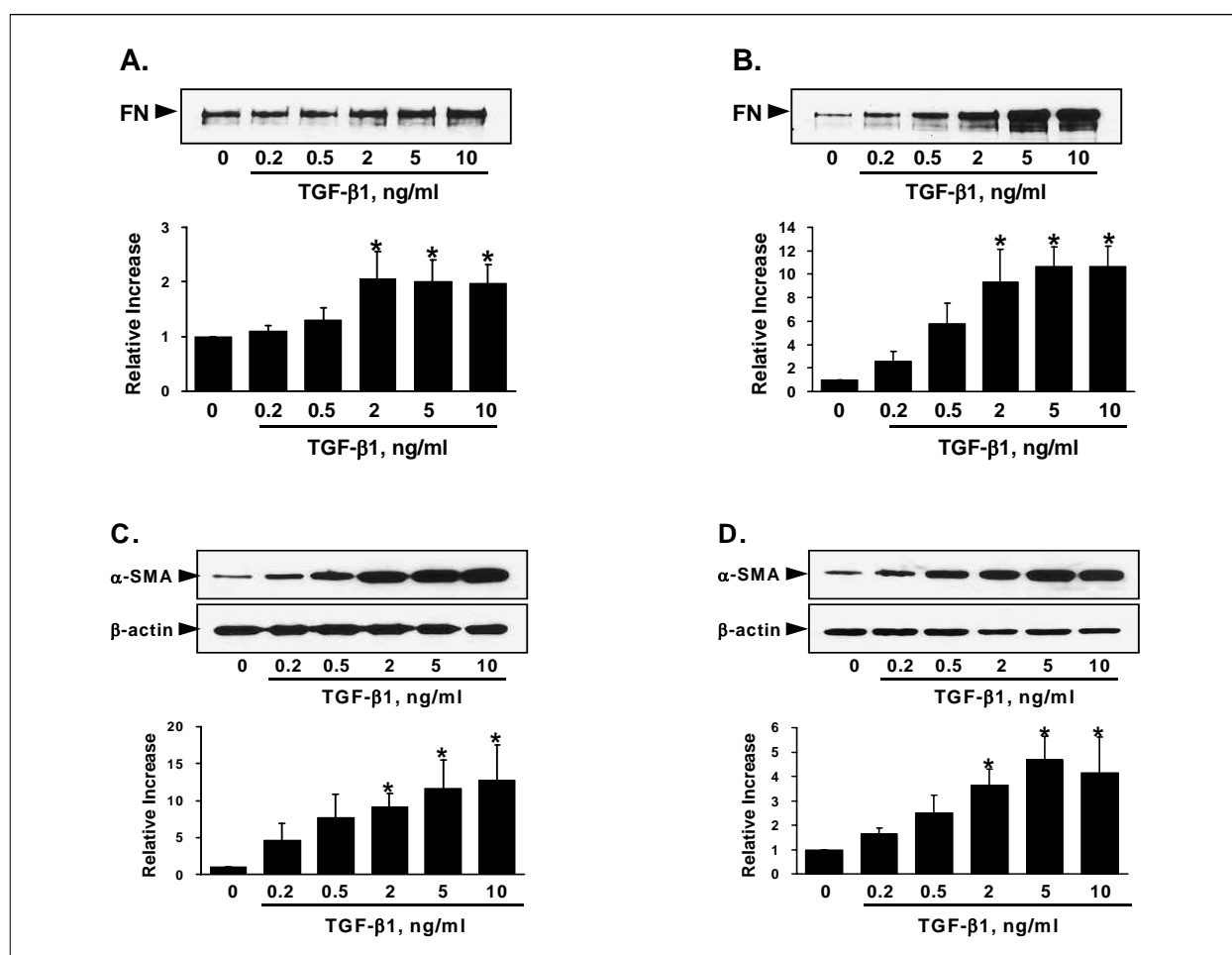


Figure 1. Effect of TGF- β 1 on fibronectin secretion (A, B) and α -SMA expression (C, D) in MRC-5 cells. After incubating the quiescent MRC-5 cells with increasing TGF- β 1 concentrations for 48 (A, C) or 96 (B, D) hours, aliquots of the conditioned media (A, B) or cell lysate (C, D) containing the same concentrations of proteins were electrophoresed under reducing conditions, and Western blots were performed as described in the text. The upper panel shows a representative Western blot and the lower panel represents the relative change as the mean \pm SE of 3 experiments. * P <0.05 compared with the control

$\beta 1$ 으로 48 시간동안 자극하였다. NAC는 20 과 30 mM 에서 TGF- $\beta 1$ 에 의한 fibronectin 분비를 의미있게 억제하였고(Figure 2A), 30 mM에서 α -SMA 표현을 의미있게 억제하였다(Figure 2B). DPI는 1과 5 μ M에서

TGF- $\beta 1$ 에 의한 fibronectin 분비(Figure 3A)를, 5 μ M에서 α -SMA 표현(Figure 3B)을 의미있게 억제하였다. NAC는 30 mM까지 그리고 DPI는 10 μ M까지 MRC-5세포의 LDH 분비에 영향을 주지 않았다(Figure 4).

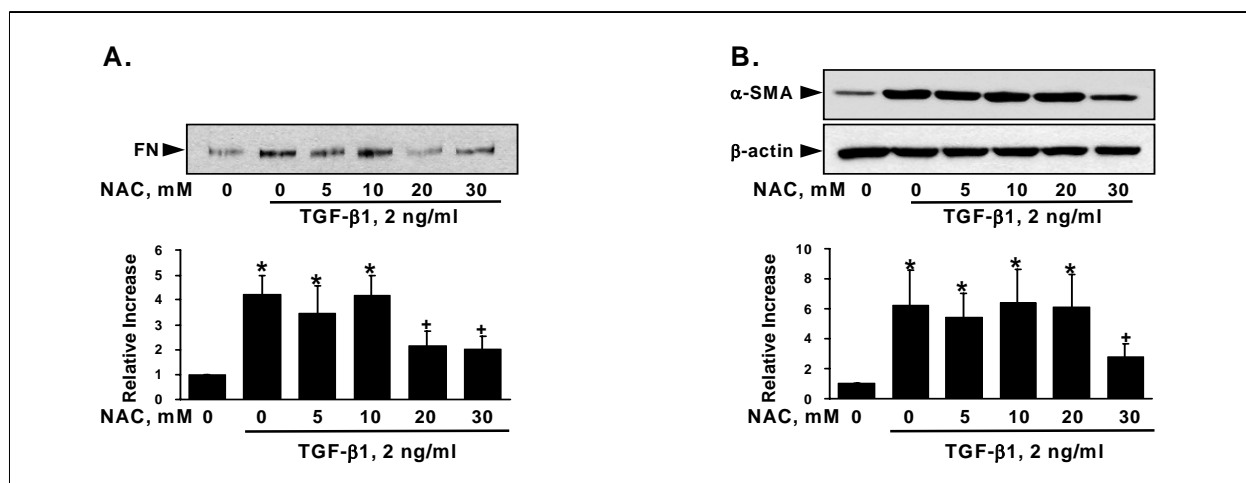


Figure 2. Effect of N-acetyl cysteine (NAC) on the TGF- $\beta 1$ -induced fibronectin secretion (A) and α -SMA expression (B) in MRC-5 cells.

After incubating the quiescent MRC-5 cells for 48 hours under TGF- $\beta 1$ in the presence or absence of NAC, aliquots of the conditioned media (A) or the cell lysate (B) containing the same concentrations of proteins were electrophoresed under reducing conditions, and Western blots were performed as described in the text. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 experiments. * $P < 0.05$ compared with the control, † $P < 0.05$ compared with the TGF- $\beta 1$ control

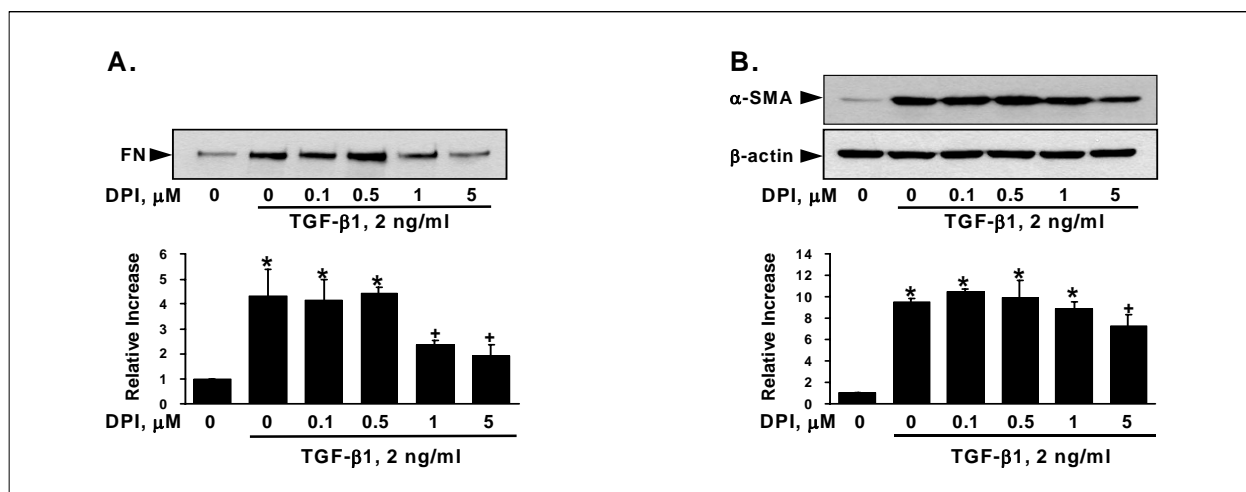


Figure 3. Effect of diphenyliodonium (DPI) on TGF- $\beta 1$ -induced fibronectin secretion (A) and α -SMA expression (B) in MRC-5 cells.

After incubating the quiescent MRC-5 cells for 48 hours under TGF- $\beta 1$ in the presence or absence of DPI, aliquots of the conditioned media (A) or the cell lysate (B) containing the same concentrations of proteins were electrophoresed under reducing conditions, and Western blots were performed as described in the text. Values are expressed as the mean \pm SE of 6 experiments. * $P < 0.05$ compared with the control, † $P < 0.05$ compared with the TGF- $\beta 1$ control

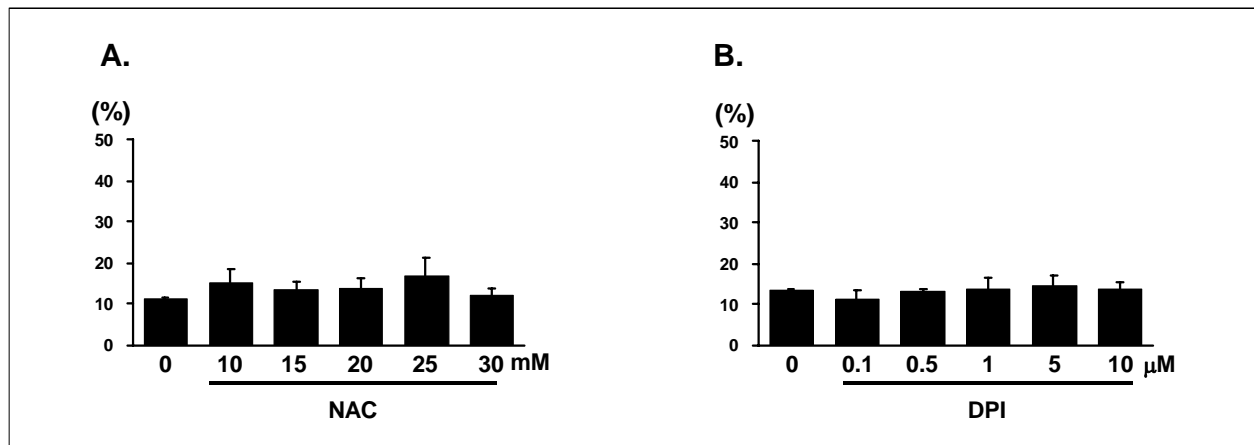


Figure 4. Effect of N-acetyl cystein (NAC) (A) or diphenyliodonium (DPI) (B) on LDH release by MRC-5 cells. After incubating the quiescent MRC-5 cells for 48 hours with NAC (A) or DPI (B), the level of LDH released was measured as described in the text. NAC: N-acetylcysteine, DPI: diphenyliodonium. The values are expressed as a mean \pm SE of 3 experiments

3. TGF- β 1이 MRC-5 세포의 세포내 ROS에 미치는 영향

MRC-5 세포내의 DCF에 민감한 ROS는 TGF- β 1 투여 후 30분에 최대에 도달하였다(자료 제시 없음).

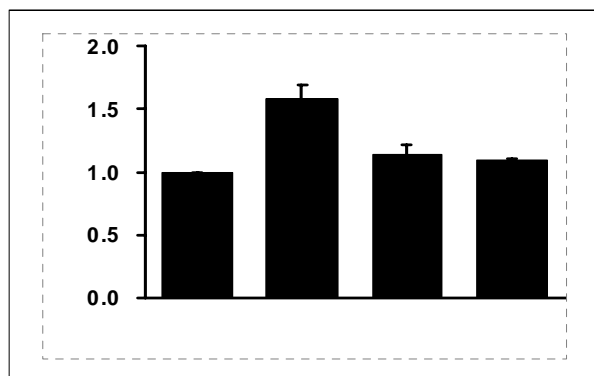


Figure 5. Effect of N-acetyl cystein (NAC) or diphenyliodonium (DPI) on TGF- β 1-induced DCF-sensitive cellular ROS in MRC-5 cells.

After incubating the quiescent MRC-5 cells for 30 minutes under TGF- β 1, the level of DCF-sensitive cellular ROS were measured as described in the text. Control: culture media without TGF- β 1, TGF- β 1: 2 ng/ml TGF- β 1 without inhibitors, NAC: N-acetylcysteine 5 mM, DPI: diphenyliodonium 0.5 μ M. Values are expressed as the mean \pm SE of 4 experiments. * P <0.05 compared with the control, + P <0.05 compared with the TGF- β 1 control.

TGF- β 1에 의하여 세포내 ROS는 의미있게 증가하였고, NAC와 DPI는 TGF- β 1에 의한 세포내 ROS 증가를 의미있게 억제하였다(Figure 5).

고 찰

본 연구의 결과는 사람 폐 섬유아세포인 MRC-5 세포에서 TGF- β 1이 세포내 ROS를 증가시키는 동시에 fibronectin의 분비와 α -SMA 표현을 증가시키고 항산화제인 NAC와 NADPH oxidase 억제제인 DPI가 TGF- β 1에 의한 세포내 ROS의 증가 억제와 동시에 fibronectin 분비와 α -SMA 표현의 상향조절을 억제함을 관찰함으로써 NADPH oxidase에 의하여 생산된 ROS가 TGF- β 1에 의한 폐 섬유화의 발생과 진행에 관여함을 증명하였다. Hagiwara 등²⁹은 NAC가 bleomycin에 의한 폐 섬유화를 억제하는 것을 관찰하여 ROS가 폐 섬유화에 관여함을 시사하였다.

TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비 상향조절은 신장 사구체 혈관간세포³¹와 세뇨관 상피세포²⁸에서 보고되었고, TGF- β 1에 의한 α -SMA 표현의 상향조절은 신장 세뇨관 상피세포^{13,15,28}와 폐 섬유아세포¹⁴에서 보고되었다. 본 연구의 결과는 TGF- β 1이 폐 섬유아세포에서 collagen I⁶ 뿐 아니라 fibronectin의 분비도 상향조절함으로써 ECM 축적에 관여하고 근 섬유아세포

로의 표현형 변화를 유도하는 α -SMA 표현을 상향조절함으로써 폐 섬유화의 발생과 진행에 중요한 역할을 함을 확인하였다.

TGF- β 1이 ROS를 증가시키는 잘 알려져 있다. MRC-5 폐 섬유아세포에서 TGF- β 1이 세포내 ROS를 증가시킨 본 연구의 결과는 사람의 폐 섬유아세포인 HRF²², 신장의 사구체 혈관간세포^{26,27} 및 세뇨관 상피세포²⁸의 결과와 일치한다. 그러나 폐 섬유아세포에서 세포내 ROS를 증가시키는 성장인자인 혈소판유래 성장인자(platelet-derived growth factor: PDGF)나 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor: FGF)와 달리 TGF- β 1은 세포외로의 ROS 분비를 증가시키고³² ECM 단백질의 tyrosine 잔기를 산화시켜 교차결합을 증가시킴으로써 폐 섬유화에 관여할 수 있음이 보고³³된바 있다. 본 연구의 목표는 신호전달자로서의 세포내 ROS의 역할 검색임으로 세포내 ROS를 측정하였다. MRC-5 세포에서 NADPH oxidase 억제제인 DPI가 TGF- β 1에 의한 세포내 ROS, fibronectin 분비 및 α -SMA 표현의 상향조절을 억제함은 TGF- β 1에 의한 세포내 ROS 증가에는 NADPH oxidase가 관여함을 시사한다. NADPH oxidase는 흰쥐의 간세포²⁴, 신장 사구체 혈관간세포^{26,27} 및 세뇨관 상피세포^{27,28}에서도 TGF- β 1에 의한 세포내 ROS 생산에 주된 역할을 한다. 그러나 세뇨관 상피세포²⁸에서는 mitochondria의 전자전달계도 TGF- β 1에 의한 ROS 생산에 관여함으로 MRC-5 세포에서도 mitochondria의 전자전달계가 관여하는지를 검색하여야 할 것이다.

TGF- β 1에 의한 세포 활성화에는 Smad 경로¹⁵, MAPK 경로¹⁶⁻¹⁸ 뿐 아니라 ROS가 세포내 신호전달자로 관여한다¹⁹⁻²⁶. MRC-5 세포에서 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 표현 증가에 ROS가 관여함은 신장세포의 결과²⁶⁻²⁸와 일치한다. 흰쥐 폐에서 분리한 섬유아세포에서 TGF- β 1에 의한 α -SMA 표현 증가에 Smad 3 단백질 활성화가 관여한다¹⁴고 보고된바 있다. TGF- β 1에 의한 세포내 신호전달에 Smad 경로와 MAPK 경로 사이의 cross-talk^{34,35}이 있다는 것과 ROS가 MAPK의 상위 신호전달자임²⁷은 알려져 있다. 폐 섬유아세포에서 ROS에 의한 fibronectin 분

비와 α -SMA 표현의 상향조절에 관여하는 정확한 신호전달계는 추후 연구에서 규명되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구는 폐 섬유아세포에서 TGF- β 1에 의한 α -SMA의 표현과 fibronectin 분비의 증가에 ROS가 관여하는 것을 증명함으로써 TGF- β 1에 의한 폐 섬유화의 발생과 진행에 있어서 ROS가 중요한 역할을 담당한다는 증거를 제시하였다.

요 약

연구배경 :

전환성장인자- β 1(transforming growth factor- β 1: TGF- β 1)은 폐 섬유화를 매개하는 주된 인자이지만 TGF- β 1에 의한 폐 섬유화의 발생과 진행기전의 이해는 아직 불완전하다. TGF- β 1은 다양한 세포에서 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 통하여 세포내 신호를 전달하고 α -smooth muscle actin (α -SMA)의 신생합성을 통하여 상피세포와 폐 섬유아세포를 근 섬유아세포 표현형으로의 변화를 유도하는 주된 인자이다. ROS는 또 다양한 세포에서 세포외기질(extracellular matrix: ECM) 축적을 유발하는 것이 알려져 있음으로 본 연구에서는 폐 섬유아세포인 MRC-5 세포에서 TGF- β 1이 ROS를 매개하여 fibronectin 분비와 α -SMA 표현의 증가에 관여하는지를 검색하였다.

방 법 :

성장이 동일화된 MRC-5 세포를 TGF- β 1 (0.2-10 ng/ml)으로 96 시간까지 자극하였고, 필요에 따라 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC)이나 NADPH oxidase 억제제인 diphenyliodonium (DPI)을 TGF- β 1 투여 1 시간 전부터 전처리하였다. Dichlorofluorescein (DCF)에 민감한 세포내 ROS는 FACS로, 분비된 fibronectin과 세포의 α -SMA 표현은 Western blot 분석으로 측정하였다.

결 과 :

TGF- β 1은 용량의존적으로 fibronectin 분비와 α -SMA 표현을 상향조절하였다. NAC와 DPI는 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비 증가와 α -SMA 상향조절을 유의하게 억제하였다. TGF- β 1에 의한 세포내 ROS의

증가도 NAC나 DPI에 의하여 유의하게 억제되었다.

결 론 :

본 연구의 결과는 폐 섬유아세포에서 NADPH oxidase에 의하여 생산된 ROS가 TGF- β 1에 의한 fibronectin 분비와 α -SMA 표현을 상향조절함으로써 폐 섬유화의 발생과 진행에 관여할 수 있음을 증명하였다.

참 고 문 헌

1. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002;122:286S-9S.
2. Adler KB, Low RB, Leslie KO, Mitchell J, Evans JN. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab Invest* 1989;60:473-85.
3. Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Reynolds S, Low R, Leslie K, Adler K, et al. α -smooth muscle actin in parenchymal cells of bleomycin-injected rat lung. *Lab Invest* 1989;60:643-50.
4. Kuhn C, McDonald JA. The role of myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis: ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991;138:1257-65.
5. Pache JC, Christakos PG, Gannon DE, Mitchell JJ, Low RB, Leslie KO. Myofibroblasts in diffuse alveolar damage of the lung. *Mod Pathol* 1998;11:1064-70.
6. Zhang K, Rekhater MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis: a combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994;145:114-25.
7. Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor β expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1995;147:352-61.
8. Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Zhang K, Karmiol S, Phan SH. Lung fibroblast α -smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996;148:527-37.
9. Zhang K, Gharaee-Kermani M, Jones ML, Warren JS, Phan SH. Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1994;153:4733-41.
10. Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Hernandez-Rodriguez NA, Pantelidis P, du Bois RM, et al. Diverse cellular TGF- β 1 and TGF- β 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J* 1996;9:2501-7.
11. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3. *Am J Physiol* 1999;276:L814-24.
12. Border W, Noble NA. Transforming growth factor-beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
13. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:1465-75.
14. Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor- β -induced α -smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:397-404.
15. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lam HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF- β on renal tubular epithelial cells by blocking smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1464-72.
16. Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor beta activation of p44MAPK in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:7117-24.
17. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6686-91.
18. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, et al. Transforming growth factor- β 1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 2001;61:4222-8.
19. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzog M, Downward J, et al. Ras and TGF- β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathway. *J Cell Biol* 2002;156:299-313.
20. Lafon C, Mathieu C, Guerrin M, Pierre O, Vidal S, Valette A. Transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and bcl-2. *Cell Growth Differ* 1996;7:1095-104.
21. Hong YH, Peng HB, la Fata V, Liao JK. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulation factor by TGF- β 1. *J Immunol* 1997;159:2418-23.
22. Junn E, Lee KN, Ju HR, Han SH, Im JY, Kang HS, et al. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF- β 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca^{2+} in TGF- β 1-induced IL-6 expression. *J Immunol*

- 2000;165:2190-7.
23. Chiu C, Maddock DA, Zhang Q, Souza KP, Townsend AR, Wan Y. TGF- β -induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med* 2001;8:251-5.
24. Herrera B, Alvarez AM, Sanchez A, Fernandez M, Roncero C, Benito M, et al. Reactive oxygen species mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor- β in fetal hepatocyte. *FASEB J* 2001;15:741-51.
25. Herrera B, Fernandez M, Roncero C, Ventura JJ, Porras A, Valladares A, et al. Activation of p38MAPK by TGF- β in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *FEBS Lett* 2001;499:225-9.
26. Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, et al. Reactive oxygen species mediate TGF- β 1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:961-6.
27. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S241-5.
28. Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, et al. Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced MAPK activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005. (In press)
29. Hagiwara S, Ishii Y, Kitamura S. Aerosol administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:225-31.
30. Ha H, Yu MR, Choi HN, Cha MK, Kang HS, Kim MH, et al. Effects of conventional and new peritoneal dialysis solution on human peritoneal mesothelial cell viability and proliferation. *Perit Dial Int* 2000;20:S10-8.
31. Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB. Sequential effect of high glucose on mesangial cell transforming growth factor- β 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* 1998;54:1872-8.
32. Thannickal VJ, Day RM, Klinz SG, Bastien MC, Larios JM, Fanburg BL. Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF- β 1. *FASEB J* 2000;14:1741-8.
33. Larios JM, Budhiraja R, Fanburg BL, Thannickal VJ. Oxidative protein cross-linking reaction involving L-tyrosine in transforming growth factor- β 1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem* 2001;276:17437-41.
34. Bottinger EP, Bitzer M. TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2600-10.
35. Hayashida T, deCassestecker M, Schnaper HW. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad-signaling pathways enhances TGF- β dependent responses in

HJ Ha, et al.: ROS and lung fibrosis

human mesangial cells. FASEB J 2003;17:1576-8.