

□ 원 저 □

Paraquat에 의한 백서의 폐섬유화증에서 비선택적 Endothelin-1 receptor blocker(Bosentan®)의 치료효과

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

정혜철, 정기환, 김병규, 이승현, 김민경*, 김정열*, 박상면, 이신형,
신 철, 조재연, 심재정, 인광호, 김한겸*, 유세화, 강경호

= Abstract =

The Effect of Nonspecific Endothelin-1 Receptor Blocker (Bosentan®) on Paraquat Induced Pulmonary Fibrosis in Rat

Hye Cheol Jeong, M.D., Ki Hwan Jung, M.D., Byung Gyu Kim, M.D.,
Seung Heon Lee, M.D., Min Kyung Kim, M.D.*, Chung Yeul Kim, M.D.,
Sang Myun Park, M.D., Sin Hyung Lee, M.D., Chol Shin, M.D., Jae Youn Cho, M.D.,
Jae Jeong Shim, M.D., Kwang Ho In, M.D., Han Gyum Kim, M.D.*,
Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine & Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

Background : Idiopathic pulmonary fibrosis(IPF) is a devastating illness for which there is little effective treatment. The key cytokines currently implicated in the fibrotic process are the transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), endothelin-1(ET-1) and interferon- γ (IFN- γ). The rat model for paraquat-induced pulmonary fibrosis was chosen to investigate the role of ET-1 in this disease. Both ET-1 and TGF- β_1 expression in lung lesions were examined using immunohistochemical staining. After Bosentan® administration, an orally active ET-1_A and ET-1_B receptor antagonist, the degree of pulmonary fibrosis and ET-1 and TGF- β_1 expression were analyzed.

Method : Sprague-Dawley rats were divided into three groups, the control group, the fibrosis group, and the fibrosis-Bosentan®-treated group. The animals were sacrificed periodically at 1, 3, 5, 7, 10, 14 days after

Address for correspondence :

Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal medicine, Korea University Guro Hospital.

80 Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, Korea

Phone : 02-818-6638 Fax : 02-865-9670 E-mail : kkhchest@kumc.or.kr

administering saline or paraquat. The effects between groups were compared with the results of light microscopy and immunohistochemical staining for ET-1 and TGF- β_1 . The degree of fibrosis was evaluated by H&E and Masson's trichrome staining, which were graded by a computerized image analyzer. The degree of immunohistochemical staining was categorized by a semi-quantitative analysis method.

Results : The lung collagen content had increased in the paraquat instilled animals by day 3, and continued to increase up to day 14. A daily treatment by gavage with Bosentan® (100mg/kg) did not prevent the increase in collagen deposition on the lung that was induced by paraquat instillation. There were increased immunohistochemical stains of ET-1 on the exudate, macrophages, vascular endothelial cells and pneumocytes in the paraquat instilled group. Furthermore, TGF- β_1 expression was higher on the exudate, macrophages, some inflammatory cells, pneumocytes (type I, and II), vascular endothelium and the respiratory epithelial cells around the fibrotic area. After Bosentan treatment, there were no definite changes in ET-1 and TGF- β_1 expression.

Conclusion : Fibrosis of the Paraquat instilled group was more advanced when compared with the control group. In addition, there was increased ET-1 and TGF- β_1 expression around the fibrotic area. ET-1 is associated with lung fibrosis but there was little effect of the ET-1 receptor blocker (Bosentan®) on antifibrosis. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2001, 50 : 182-195)

Key words : Paraquat, Pulmonary fibrosis, Endothelin-1, Bosentan, TGF- β_1 .

서 론

폐 섬유화는 여러 가지 원인에 의한 폐 손상이 있은 후에 최종적인 합병증으로 발생한다. 폐 섬유화의 유발인자로써 먼지 흡입(dust inhalation), 방사선(radiation), 약제(drug), 결체조직 질환(connective tissue disorders), 유육종증(sarcoidosis), 감염(infection) 등 매우 다양하다. 그런데 특별한 원인이 없이 폐 섬유화가 발생한 것을 원발성 폐섬유화증(Idiopathic pulmonary fibrosis, 이하 IPF) 이라고 한다.

전 세계적으로 IPF의 발생과 사망률은 점차 증가하는 추세를 보이고 있으나 뚜렷한 치료제가 없는 실정이다. 현재 스테로이드를 근간으로 하는 치료가 주로 행해지고 있고 이밖에도 여러 가지 면역억제제, 콜히친(colchicin)과 같은 약제가 사용되고 있으나 치료 효과에 비해서 부작용이 심하다. 따라서 치료의 효과를 높이면서 합병증이 적은 약제의 개발이 진행되고

있는데 그 중 Endothelin-1 receptor antagonists에 대해서도 연구가 진행되고 있다¹.

IPF의 병인론에는 transforming growth factor- β_1 (이하 TGF- β_1)를 비롯한 여러 사이토카인(cytokine)이 관련되어 있고 특히 섬유화를 유발하는 쪽으로 Endothelin-1(이하 ET-1)의 역할이 알려지고 있다^{2,3}.

IPF의 병리소견과 유사한 폐 섬유화에 대한 동물 실험은 블레오마이신(bleomycin)을 이용한 모델과 파라콰트를 이용한 방법이 있다. 본 실험에서는 폐 섬유화에 관련되어 중요하다고 생각되는 ET-1의 발현이 백서를 이용한 파라콰트 모델에서 증가되는 지를 확인하고 ET-1에 대한 receptor blocker의 효과를 살펴보고자 하였다. 그리고 폐 섬유화 과정에서 일반적으로 가장 중요하다고 알려진 TGF- β_1 의 발현 양상과도 함께 비교하였다. 그리하여 파라콰트를 이용한 폐섬유화증 유발 모델에서 ET-1의 역할에 대해서 살펴보고 병인론적 관련성을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상군

7-8 주령의 웅성 백서(Sprague-Dawley) 120마리를 대상으로 하였다. 모든 쥐는 호흡기계를 비롯하여 다른 질병이 없이 건강하였다. 대상 쥐는 제1군(대조군 24마리), 제2군(파라콰트 투여군 48마리), 제3군(파라콰트-보센탄 투여군 48마리)의 세 군으로 나누었다.

2. 한쪽 기관지에 파라콰트를 주입하고 보센탄을 위내로 투여하는 과정

백서를 에테르(ether) 흡입 마취하에 실험대 위에 배위(supine position)로 고정시킨 후 기관절개(tracheotomy)를 하고 16 게이지(gauge) 쥘코를 기도 내로 삽관하여 통로를 확보하였다. 이 통로를 통해서 해밀턴 주사기(hamilton syringe)를 이용하여, 제1군에는 생리식염수를 오른쪽 기관지내로 50 μ L를 주입하였고 제2군과 3군에는 멸균 식염수에 용해시킨 paraquat(methyl viologen, Gramoxone : 1,1'-Dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride, Sigma Co) 1mg/kg을 50 μ L 용량으로 주입하였다. 다음으로 백서를 우측으로 30도, 머리 쪽을 위쪽으로 15도 기울여 5분간 유지하여 반대쪽 기관지로의 유입을 억제하였다. 파라콰트 주입이 끝난 뒤 제3군에 대해서는 Bosentan[®] (Actelion Ltd, Allschwil, Switzerland) 100mg/kg을 2cc 용량으로 gastric gavage 방법으로 실험 시작 일로부터 매일 14일 동안 투여하였다. Bosentan[®]은 매주 5% 아라비아 검에 섞어서 현탁액을 만들어 사용하였다. 모든 쥐에 대해 겐타마이신(gentamycin) 100mg/kg를 예방적으로 매일 근육주사 하였다⁴.

3. 백서의 폐 조직에 대한 처리과정

파라콰트 투여 후 제1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일

에 제2, 3군 각각 8마리와 대조군 4마리를 같은 날짜에 희생시켰다. 케타민(ketamine hydrochloride) 25mg을 복강 주사하여 백서를 마취시킨 후 폐와 심장을 떼어내고 주사기를 이용하여 폐 조직을 확장시켜 10% 포르말린에 8시간 이상 고정하였다. 육안적인 폐의 모양으로 손상된 폐를 확인하고 손상 받은 폐의 문부(hilum)의 중앙에서부터 전체를 코로날(coronal) 절개를 하여 파라핀 블록(paraffin block)을 만들었다. 그리고 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매 과정을 거쳐 5 μ m의 연속절편을 만들어 Hema-toxylin-eosin stain(H&E)과 Masson's trichrome stain (M-T)을 하고 ET-1, TGF- β_1 에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

4. 폐 조직에서 콜라겐 양의 측정

M-T 염색으로 처리된 유리 슬라이드를 영상 분석기를 이용하여 분석하였다. 가장 심하게 손상된 폐엽을 선택한 뒤 Olymplus BX 50 현미경에서 200배 시야로 확대하여 관찰하였다. 콜라겐이 염색된 파란색갈의 단면적을 Optimas 6.1 프로그램을 통해서 image analyzer(from Images to AnswersTM)를 이용하여 구하고, 200배 시야의 전체 면적을 구하여서 콜라겐이 차지하는 단면적의 비율을 계산하였다. 그리고 하나의 슬라이드마다 무작위로 5개의 시야에서 콜라겐 침착 부위를 측정하여 평균값을 구하였다(단 기관지 혹은 혈관 주위에 콜라겐 염색이 된 경우는 제외함). 단면적의 비율에 대해 세 그룹간의 비교를 해보았다.

5. 면역조직화학 염색방법

파라핀 블록을 4-5 μ m 두께로 박절하여 56 $^{\circ}$ C 부란기에서 30분 동안 부치시킨 후 탈 파라핀 과정을 거쳤다. 내인성 peroxidase를 억제시키기 위해 3% H₂O₂(Methanol+H₂O₂) 용액에 10분 동안 반응시켰다. 증류수로 수세 후 차폐된 항원 단백질의 노출을 위해 citrate Buffer (pH 6.0)로 세척 한 후(5분/3회) 정상 혈청(normal blocking serum)으로 비 특

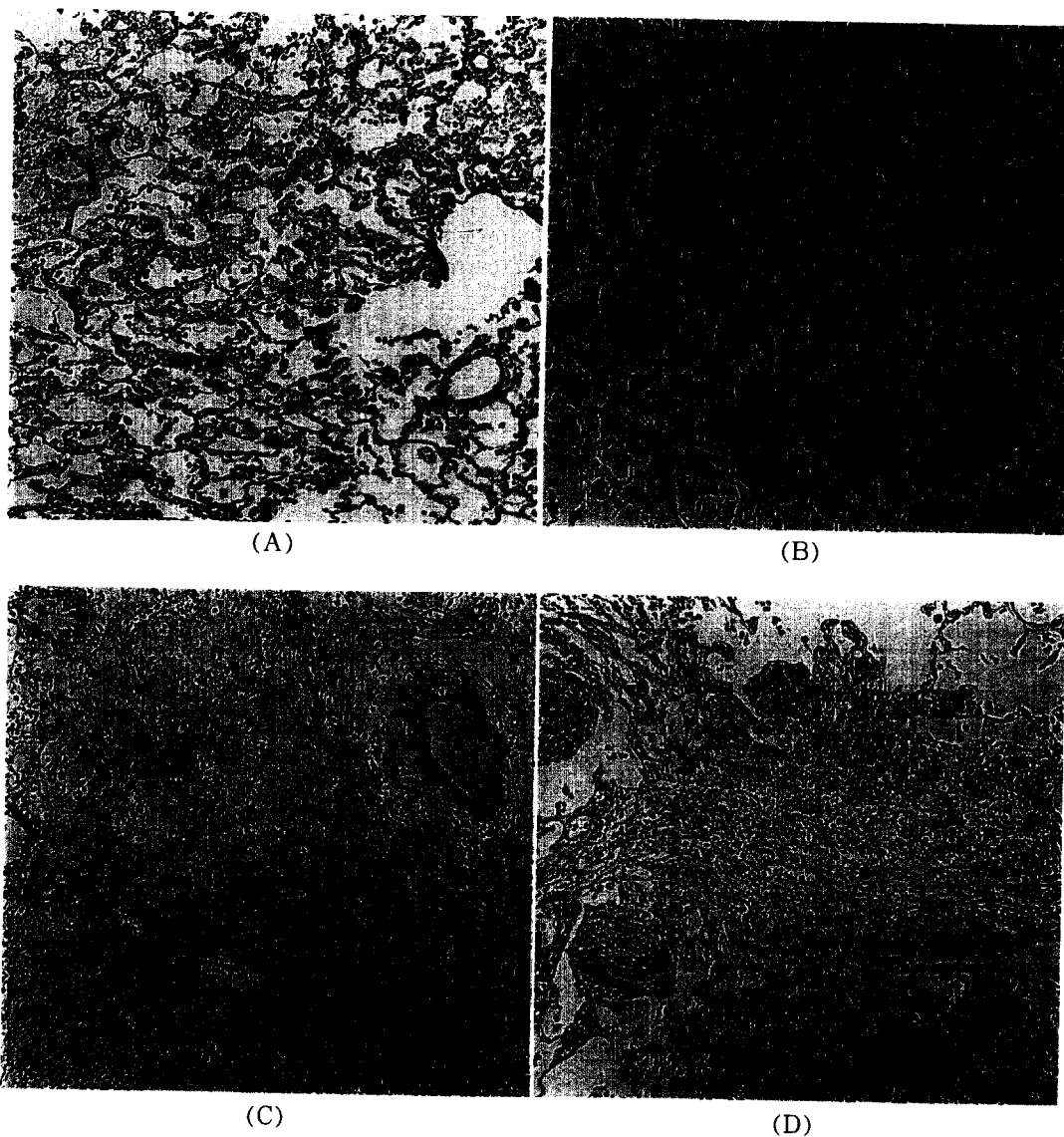


Fig. 1. H&E stain($\times 100$)

Normal lung(a). Diffuse alveolar damage with infiltration of neutrophils and exudate on first day(b), peribronchial parenchymal damage on third day(c) and fibrosis of interstitium and intraalveolar space on fifth day(d) in paraquat group

이 반응을 차단시켰다.

준비한 1차 항체 $TGF-\beta_1$ (Monoclonal, mouse, Serotec) 과 ET-1 (Mono-clonal, Mouse, Alexis) 를 각각 1 : 50, 1 : 100으로 희석하여 실온에서 2시

간 동안 반응시켰다. Tris Buffer로 세척 한 후(5분/3회) 2차 항체(Biotinylated antimouse Ig)를 실온에서 20분간 반응시켰다. 그리고 Tris Buffer로 세척 (5분/3회) 한 후 표지항체 (peroxidase la-

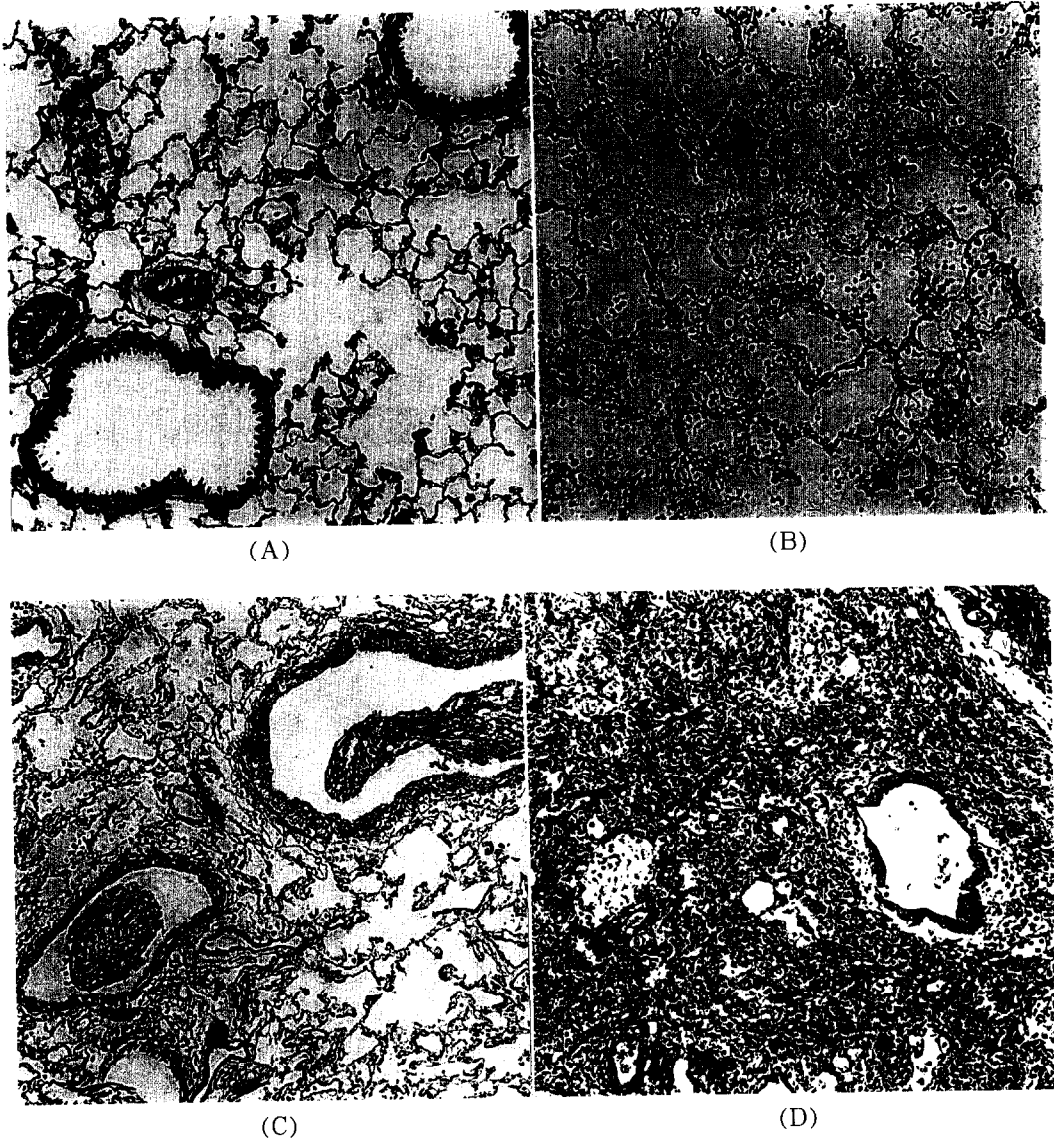


Fig. 2. Masson-Trichrome stain ($\times 100$)

Normal lung(a). Mild interstitial fibrosis on fifth day(b), moderate interstitial fibrosis with Masson's body in the bronchiolar lumen on seventh day(c) and severe interstitial fibrosis with atelectasis on seventh day(d) in paraquat group.

belled streptavidin Ig)를 실온에서 20분간 반응시켰다. Tris Buffer로 세척 후 AEC(3-Amino -9-Ethyl carbazole)로 발색시켜 증류수로 세척하고

Harris Hematoxylin으로 10초간 대조 염색을 한 후 수용성 봉입제로 봉입하였다.

Table 1. Percentage of collagen measured by computerized image analyzer

Group/day	1st	3rd	5th	7th	10th	14th
Control(%)	3.42±1.26	4.18±0.89	4.33±0.70	3.95±0.96	4.38±1.14	4.47±1.64
Paraquat(%)	4.36±0.84	22.29±2.76*	24.01±5.18*	21.46±5.81*	23.59±5.33*	24.23±2.74*
Bosentan(%)	4.79±0.63	21.23±3.36*	17.85±3.86*	20.84±2.88*	21.99±6.30*	20.44±3.62*

*P<0.05 versus control

6. 면역조직화학염색의 분석

grade 0 : 음성(negative)=no stain

grade I : 경함(mild)=focal and weak or medium stain

grade II : 중간(moderate)=multifocal and medium or focal and dense stain

grade III : 심함(severe)=diffuse and dense (100배 시야에서 1 power field 이상)

슬라이드가 대조군인지 실험군인지 모르는 상태에서 병리의사 2인이 위의 기준에 따라서 발현의 정도를 판정하였다.

7. 통계방법

컴퓨터 영상 분석기에 의해서 콜라겐의 양을 면적비로 환산한 값을 세 군간의 비교를 하였는데 이것은 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 로 분석하였다. 그리고 면역조직화학염색 결과는 grade 0, I, II, III에 따라 각각 0, 1, 2, 3점으로 점수를 매겨서 시간 별로 평균값을 기록하였다. 그리고 시점별로 파라콰트군과 보센탄군간의 비교는 Mann-Whitney U test를 하였다. 그리고 grade를 판정하기 어려운 경우는 양성파 음성으로 나누고 결과분석에는 양성으로 나타나는 빈도를 구하고 각 군간의 비교는 χ^2 test를 하였다.

결 과

1. 병리학적 소견

육안적으로 초기에는 출혈에 의해 백서의 폐 표면이

발적되어 있었다. 실험 3일째부터 섬유화가 진행된 폐 조직은 표면이 회백색을 띄면서 포르말린으로 고정하기 위해 주사기로 부풀릴 때 잘 팽창되지 않는 특성을 보였다.

광학 현미경으로 보면 실험군의 폐조직이 대조군에 비해서 전 실험 기간에 걸쳐서 염증이 증가되었다. 주로 중성구와 호산구의 침범이 증가하였으며 초기에는 폐출혈이 심하게 동반되었다. 초기에는 대식세포의 증식이 심하였고 며칠 후부터는 주로 림프구와 형질세포가 나타났다. 그리고 폐포와 간질내에 삼출액이 증가되었다(Fig. 1(b)).

섬유화는 제3일째부터 섬유아세포의 증가와 콜라겐의 침착이 관찰되었고 시간이 흐름에 따라서 Mason's body를 포함한 간질의 섬유화 과정이 진행되었다(Fig. 1, 2). 섬유화의 병소는 주로 파라콰트가 투여된 기관지 주위로 세포의 변성을 보였다. 그리고 심하게 섬유화가 진행된 것은 폐엽 전체의 부피가 줄어들어 있으면서 허탈된(atelectasis) 소견이 보였다(Fig. 2(d)). 치료군에서도 일부를 제외하고 대부분 섬유화로 진행됨이 관찰되었다.

2. 컴퓨터 영상 분석기(computerized image analyzer)를 이용한 정량 분석

파라콰트를 투여한 군에서는 대조군에 비해 콜라겐의 침착된 단면적이 넓었다. 이러한 변화는 실험 3일째부터 나타나서 파라콰트 투여 3일째부터 섬유화가 시작됨을 알 수 있다. 그리고 보센탄을 투여하고 난 뒤에도 콜라겐이 침착된 면적의 유의한 변화는 보이지 않았다(Table 1).

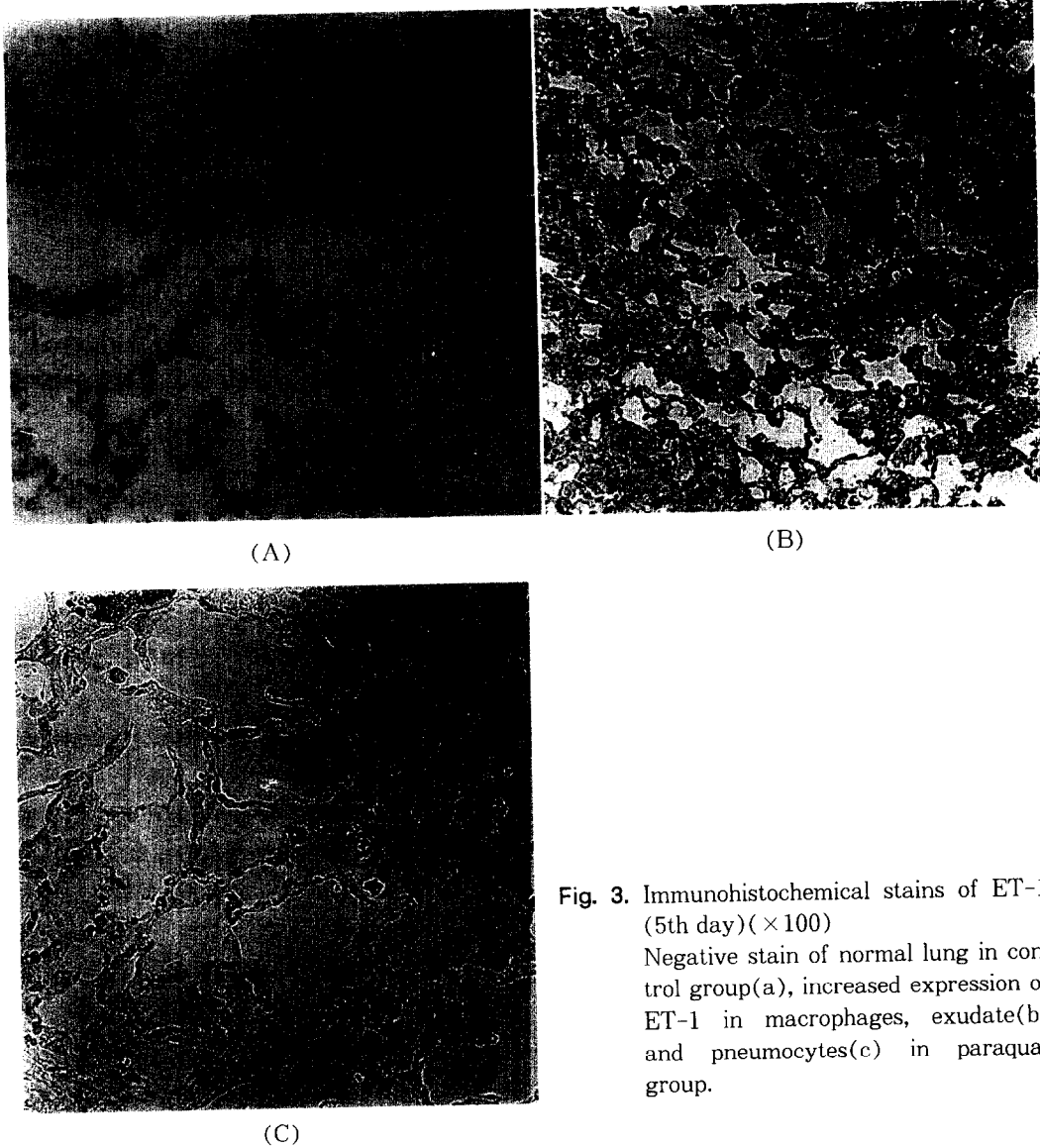


Fig. 3. Immunohistochemical stains of ET-1 (5th day)($\times 100$)
Negative stain of normal lung in control group(a), increased expression of ET-1 in macrophages, exudate(b) and pneumocytes(c) in paraquat group.

3. 면역 조직화학 염색 결과

ET-1의 발현을 분석해 본 결과, 폐포세포와 내피세포의 경우는 grade를 나누기 어려워서 양성과 음성으로 판정하였다. 그리고 TGF- β_1 에서는 기관지 상피세포와 내피세포의 분석시 양성과 음성으로 나누었다.

ET-1은 대조군에서는 발현되지 않았고 파라과트를

투여한 쥐의 폐 조직에서는 대식세포, 삼출액, 혈관 내피세포 및 폐포 세포에서 발현이 되었다(Fig. 3, 5). 대식세포는 주로 초반에 발현이 나타나서 점차 감소되었다. 삼출액에서는 3-5일에 발현이 증가되었고 이후 감소했으며 14일째에도 증가되었다. 폐포세포에서는 3일째와 7일째에 각각 발현이 증가되었다. 혈관 내피세포에서는 3일째부터 점차 증가하였다가 7일째

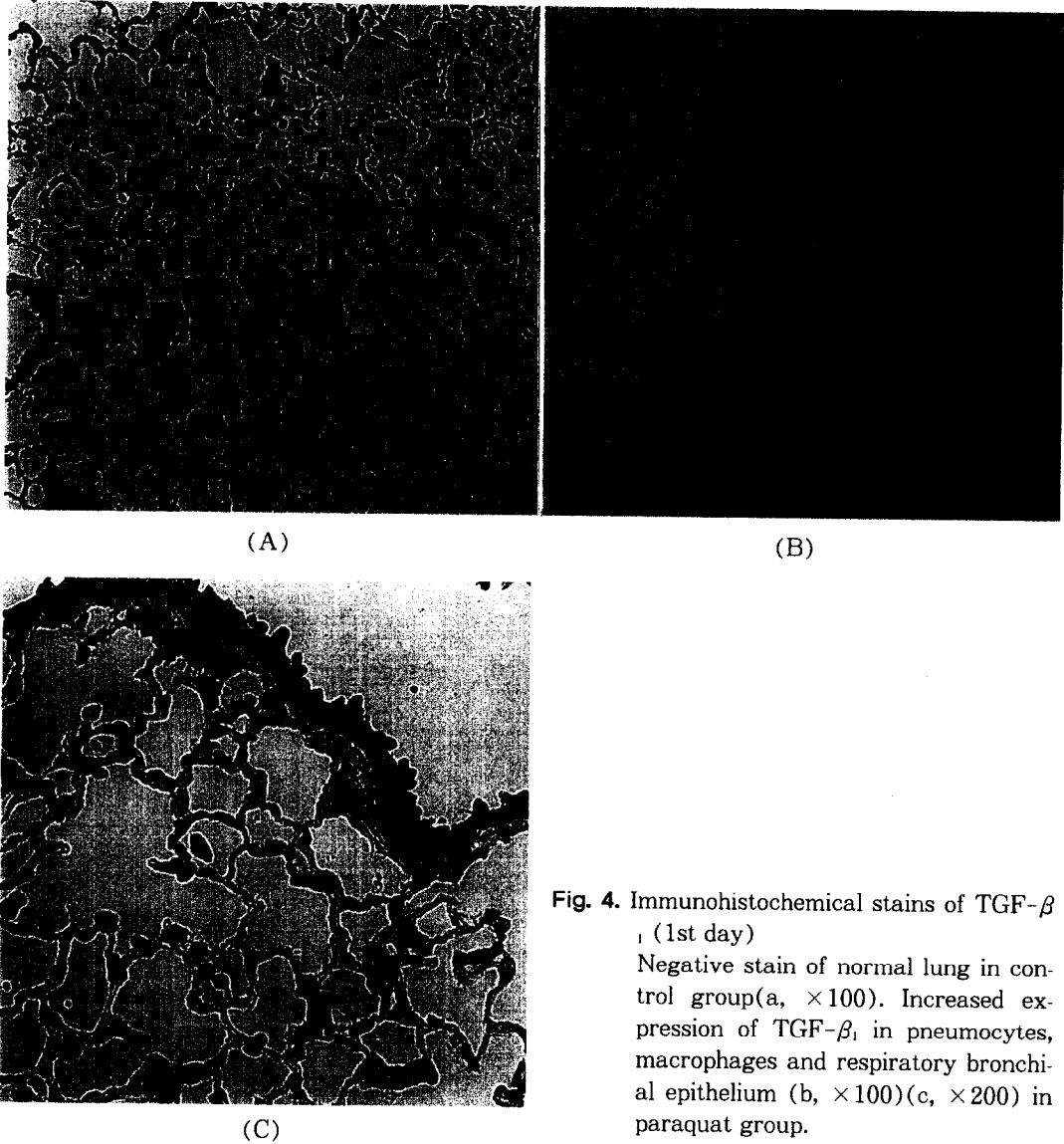


Fig. 4. Immunohistochemical stains of TGF- β_1 (1st day)
Negative stain of normal lung in control group(a, $\times 100$). Increased expression of TGF- β_1 in pneumocytes, macrophages and respiratory bronchial epithelium (b, $\times 100$)(c, $\times 200$) in paraquat group.

이후로 감소되었다. 특징적으로 폐포 세포를 제외하고는 대부분 실험 초반기에 발현이 증가되었다. 보센탄 치료군에서는 대부분 별다른 변화가 없었다. 그런데 혈관 내피세포에서 파라과트군에 비해 3일째에는 감소하였다가 점차 증가하여 14일째에는 오히려 파라과트군 보다 발현이 증가되었다(Fig. 5).

TGF- β_1 은 ET-1의 발현과 유사한 양상으로 관찰

되었다. 섬유화가 일어난 폐조직과 정상부위의 경계부에서 삼출액, 대식세포를 포함한 염증세포, 폐포세포, 혈관 내피세포, 그리고 호흡성 기관지 상피세포의 TGF- β_1 발현이 증가되었다(Fig. 4, 6). 또한 염증세포를 제외하고는 실험 초반기에 증가되었다. 치료군에서도 여전히 TGF- β_1 의 증가상태가 확인되었다. 그러나 내피세포에서는 5일째에 보센탄군에서 TGF- β_1 이

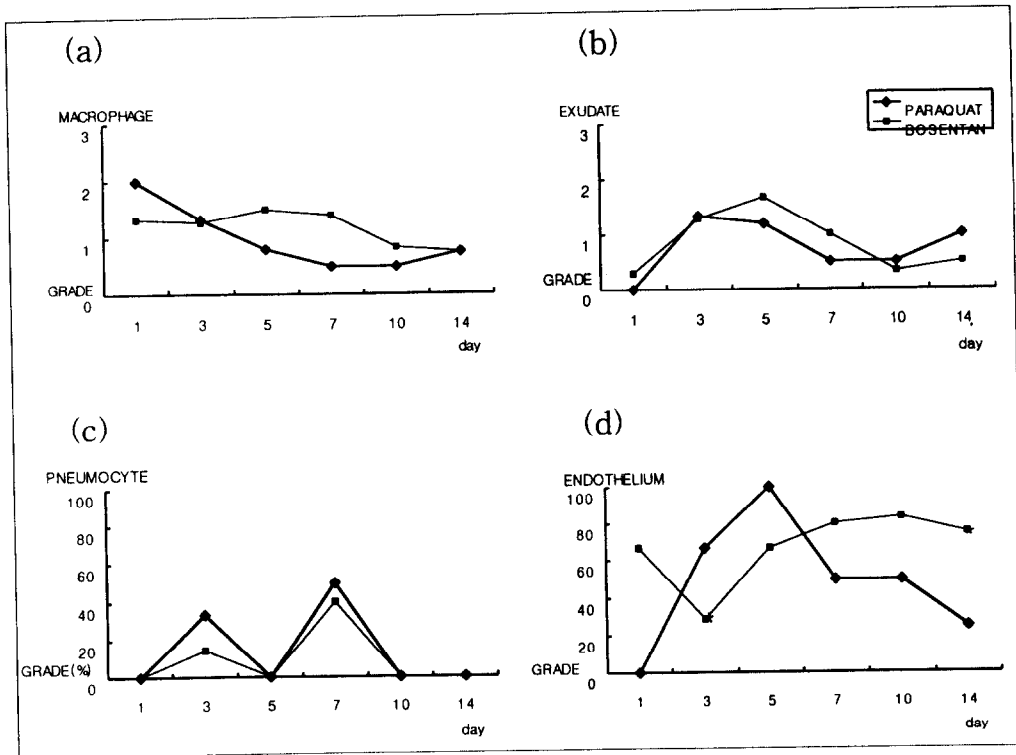


Fig. 5. Localization of immunohistochemical stains of ET-1.

* $p < 0.05$ Bosentan group versus paraquat group

감소되었다(Fig. 6).

고 찰

IPF의 병리소견과 유사한 폐 섬유화에 대한 동물 실험은 주로 블레오마이신(bleomycin)을 이용해서 많이 이루어지고 있다. 제초제 사용에 따른 중독으로 혹은 자살목적으로 음독하여 사망률이 높은 파라쿼트를 이용한 실험도 또한 일반적으로 시도되고 있는 방법이다. 파라쿼트 중독으로 인한 호흡부전과 사망이 드물지 않은 우리나라의 현실에 비추어 보아 파라쿼트를 이용한 실험은 IPF 연구에서뿐만 아니라 파라쿼트 중독에 이은 폐 섬유화와 호흡부전의 병인 기전과 치료제 연구에 있어서도 중요하다.

IPF에서 보이는 초기 변화는 폐포의 상피세포와

모세혈관의 손상에서 시작된다. 이어서 단핵세포, 중성구, 림프구, 호산구와 같은 염증세포가 손상된 폐포로 이동하게 되고 이것들은 폐포에 존재하고 있던 대식세포, 폐포의 상피세포, 내피세포와 더불어 여러 가지 사이토카인을 분비하게 된다. 이러한 사이토카인은 섬유아세포를 자극해서 콜라겐의 합성이 증가하고 분해가 억제되어서 폐 간질이 두꺼워지고 정상적인 폐포 구조가 소실되어 폐의 용적이 감소하고 가스교환의 장애가 일어나게 된다².

폐 섬유화에는 TGF- β_1 , ET-1, TNF- α , IFN- γ 를 비롯한 여러 사이토카인이 관여되어있다². 블레오마이신 모델(bleomycin model)에서 알려진 바로는 지금까지 가장 강력하다고 알려져 있는 사이토카인은 TGF- β_1 이고, 그밖에 ET-1의 중요성이 밝혀지고 있다.

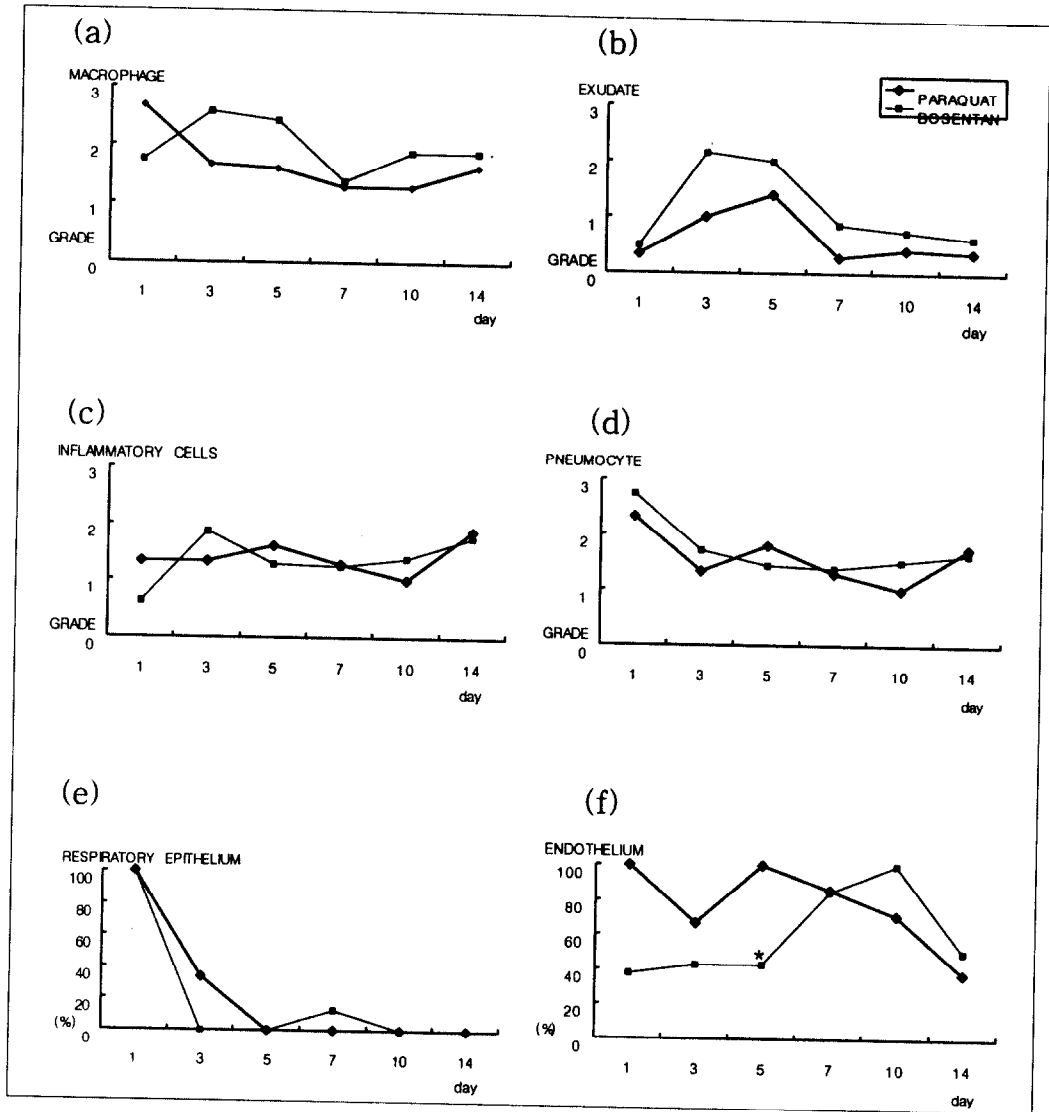


Fig. 6. Localization of Immunohistochemical stains of TGF- β_1 .

* $p < 0.05$ Bosentan group versus paraquat group

ET-1은 1988년 Yanagisawa 등에 의하여 돼지의 대동맥 내피세포에서 처음으로 발견되었고 강력한 혈관 수축유발 물질로 보고되었다. 인간에서 ET-1의 생성은 전구물질인 212 아미노산으로 구성된 preproET-1이 endopeptidase에 의해서 38 아미노산인 bigET-1이 생성되고 endothelin converting enzyme(이하 ECE)에 의해서 21 아미노산 ET-1이

생성된다³. ET-1은 정상조직의 성장과 발달에 중요하고 재생과정에서 세포 증식과 유사분열 생식에 관계한다. 그리고 endothelin-1은 여러 가지 질병에 관련되어 있다. 첫째, 혈관에서 평활근의 수축을 유발하는 것과 관련하여 본태성 고혈압, 폐동맥 고혈압, 임신중독증(pre-eclampsia), 레이노드씨병(Raynaud's disease), 관상동맥 혈관수축(coronary vasospasm)과

심부전에 관련되어 있다. 둘째, 신부전과 여성의 생식기의 기능이상에 관여한다. 셋째, 기도의 평활근의 경련, 염증세포의 활성화 과정 등을 통해 천식에 중요한 물질이다. 마지막으로 IPF에서 섬유화 과정에 관여되어 있다⁴.

ET-1과 IPF와의 관련성을 보면 ET-1이 섬유아세포의 증식을 촉진하고 화학주성 역할을 하는 것이 밝혀진 바 있다^{5,6}. 성인에서 IPF가 발생할 경우 기도의 상피세포와 2형 폐포 세포에서 ET-1이 증가됨이 면역조직화학 염색과 *in situ* hybridization으로 확인되었다⁷. 그리고 IPF 환자의 혈청 내에서 ET-1의 증가됨이 확인된 바 있다⁸. Dina Saleh(1997년) 등은 IPF 환자의 폐 조직에서 ECE-1, big ET-1, ET-1을 *in situ* hybridization과 면역조직화학염색을 이용하여 차례로 확인하였다. 정상인의 기도상피세포, 내피세포, 기도와 혈관의 평활근에서도 ET-1의 존재가 확인된 바 있는데, IPF 환자에서는 ECE이 훨씬 강하게 발현되었다. ECE의 발현은 big ET-1과 ET-1이 염색되는 부위에서 동일하게 발견되었고 질병의 심한 정도와 비례하였다⁹. Mutsaers(1998) 등은 블레오마이신에 의해 섬유화가 유발된 백서 모델에서 ET-1의 양이 주로 초기에 증가함을 볼 수 있었고 본 실험에서도 동일한 결과를 얻었다⁶.

고려대학교 호흡기내과 교실에서는 이전 연구로 기니아피그(guinea pig)에서 파라콰트를 한쪽 기관지 내로 투여하는 방법¹⁰에 의해서 폐 섬유화를 유발하는 실험을 했고 섬유화가 유발된 조직에서 ET-1의 발현이 증가되었음을 처음으로 확인한 바가 있다¹¹. 이번 연구 결과에서도 동일한 결과를 보였고 주로 혈관 내피세포, 대식세포, 삼출액과 폐포세포에서의 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

포유류에서는 ET-1에 대한 수용체가 ET-1_A와 ET-1_B 2가지가 있다. 본 실험에서는 두 종류를 모두 억제하는 보센탄(Bosentan[®])을 사용하였는데 이 약제는 경구용 제제로서 주로 ET-1과 관련하여 폐동맥 고혈압, 폐 섬유화에 관련하여 실험적으로 쓰여지고 있다^{4,24}. 폐섬유화증에서 보센탄의 효과는 상반된 결과가 있었다. 블레오마이신 모델에서 보센탄이 효과가

있었다⁴는 보고가 있었던 반면 콜라겐의 침착을 줄이지 못했다고 보고한 연구도 있었다¹². 본 연구에서는 보센탄의 투여에 따라서 폐 섬유화가 약간 감소된 듯 보였으나 통계적 유의성이 없어서 치료효과가 뚜렷하지 않았다. 보센탄의 용량을 100mg/kg으로 한 것은 이전 블레오마이신을 이용한 폐 섬유화증 연구에서 가장 효과적이라는 보고가 있었고 널리 사용되는 용량이기 때문이었다⁴. 하지만 파라콰트를 이용한 실험에서는 처음으로 시도를 했기 때문에 향후 용량에 따른 변화를 확인하는 것이 필요할 것이다.

TGF- β 에는 TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 의 세 가지가 존재한다. TGF- β_1 mRNA는 주로 내피세포, 조혈세포, 그리고 결합조직의 세포에서 발현되고 TGF- β_2 mRNA는 상피세포와 신경세포에서 나오고 TGF- β_3 mRNA는 mesenchymal cells에서 주로 발현된다. TGF- β 는 상처회복에 중요한 역할을 하고 TGF- β 의 과다한 생산은 반흔 조직(scar tissue)의 과다한 축적과 섬유화를 일으킨다. 동물실험에서 TGF- β 의 과다 발현이 췌장, 간, 폐의 섬유화에 각각 관여되어 있음은 잘 알려진 사실이다¹³. 폐섬유화증에 관한 동물 실험에서 TGF- β_1 의 유전자 발현이 증가된 경우 콜라겐 합성유전자의 발현과 콜라겐 단백질의 침착이 증가된다고 보고되고 있다^{14,15}. 블레오마이신 모델에서 TGF- β_1 항체를 이용하여 콜라겐의 침착을 감소시킨 예가 있고^{16,17}, TGF- β_1 soluble receptor를 기관지 내로 투여하여 섬유화를 감소시킨 예¹⁸도 있다. 인간의 섬유화된 폐 조직에서도 TGF- β_1 유전자와 단백질의 발현은 증명되어 있다¹⁹. 본 실험에서는 섬유화가 유발되고 있는 폐 조직의 삼출액, 대식세포를 포함한 여러 염증세포, 내피세포, 호흡성 기관지 상피세포, 폐포세포에서 TGF- β_1 의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 폐 섬유화에 관련된 TGF- β_1 와 ET-1 두 가지 사이토카인을 조사하였다. TGF- β_1 과 ET-1의 상관 관계는 In vitro 연구에서 TGF- β_1 이 활성화되면 ET-1의 생성이 증가한다는 결과가 알려진 바가 있다^{20,21}. 본 연구에서는 ET-1과 TGF- β_1 의 발현이 주로 염증이 진행되는 시기인 섬유화가 일어나기 전에 거의 유사한 양상으로 증

가됨이 확인되었다. ET-1 receptor blocker를 이용한 치료군에서도 섬유화가 진행되었는데 TGF- β_1 의 발현은 여전히 증가되어 있었다. 이것으로 보아서 TGF- β_1 이 ET-1 보다 더 강하게 작용하였을 가능성이 있겠다. 혹은 ET-1의 억제에 의해 반대로 TGF- β_1 의 기능이 좀더 활성화되었을 수도 있을 것이다. 그러나 내피세포에서는 보네탄 치료군에서 3일째 TGF- β_1 의 발현이 감소되어 있어(Fig. 6) 오히려 ET-1의 억제에 의한 TGF- β_1 의 변화 양상을 보였으나 이는 향후 검증이 필요하리라 생각된다.

파라콰트에 의한 폐섬유화 기전은 파라콰트가 폐포 세포 내에서 일가 양이온기(monocation radical)로 환원되어 산소와 반응하여, 과산화물의 반응성 산소기(reactive oxygen radical)가 세포에 손상을 주는 직접적인 독성과 염증세포 및 섬유아 세포에 의한 간접적인 독성으로 폐섬유증을 유발한다고 알려져 있다²². 파라콰트 중독에 의한 폐 손상의 병리소견은 초기에는 주로 폐출혈과 범발성 폐포 손상(diffuse alveolar damage)의 소견을 보이다가 10-14일째에는 폐포 내로 삼출물의 기질화가 일어나서 폐쇄성 섬유화가 생긴다²³. 본 실험 결과로는 파라콰트 주입 후 첫날부터 심한 폐 손상과 폐출혈, 삼출물을 동반한 염증 반응이 관찰되었고 비교적 빠른 시기인 3일째부터 섬유화가 진행되는 것을 알 수 있었다. 주로 기관지 주위에서 세포의 손상이 있고 난 뒤 폐쇄성 섬유화가 특징적으로 관찰되었고 BOOP(Bronchiolitis obliterance with organizing pneumonia)를 동반하였다(Fig. 2(c)).

본 연구의 제한점으로는 첫째, 섬유화가 일어난 부위의 콜라겐을 측정하여 정량 분석 할 때 초기(young) 콜라겐과 성숙된(mature) 콜라겐 중 어느 것이 섬유화가 일어난 것인 지를 결정하기가 어려웠다. 본 실험에서는 두 가지 모두를 섬유화가 일어난 것으로 해석하였다. 둘째, 컴퓨터를 이용한 정량 분석은 조직의 어느 부위를 볼 것이며 몇 개의 부위를 볼 것인가에 따라서 주관적 편향이 있을 가능성이 있다. 본 실험에서는 일단 섬유화가 일어난 폐엽을 먼저 선정하고 이 부위를 200배 시야에서 5개를 무작위로 고르고 큰 혈관이나 기도를 배제하고 분석하였다. 컴퓨터 이미지를 이용한

분석은 주관적 편향의 여지는 있으나 비교적 객관적 분석이 가능하고 수치화가 가능해서 통계 분석에 용이한 잇점은 있었다²⁵. 셋째로 섬유화된 폐 조직에서 면역조직화학 염색으로 ET-1과 TGF- β_1 의 발현을 분석함에 있어서 해석하는 사람에 따른 차이가 있을 수 있겠다. 본 실험에서는 병리과 의사 2인에 의해 분석이 진행되었다. 그리고 본 실험의 대조군, 즉 정상인 백서의 폐조직에서는 어디에도 ET-1과 TGF- β_1 의 발현을 볼 수 없었는데 실제로 그런 것인지 아니면 염색에 문제가 있던지 혹은 발현되는 정도가 아주 미약하여서 그럴 가능성도 있겠다. 본 연구에서는 시간의 변화에 따라서 어느 세포에서 주로 발현되는지 반정량화분석(semiquantitative analysis)을 하였으므로 ET-1과 TGF- β_1 의 작용의 강도를 비교할 때는 해석에 주의해야 한다. 섬유화된 폐조직을 갈아서 사이토카인의 양을 정량 분석해보는 것을 병행하는 것이 필요할 것이다. 본 실험의 특징은 백서에 파라콰트를 주입하여 폐 섬유화를 유발시키는 기존의 동물모델의 틀에서 크게 벗어나지 않으면서 초기 염증이 일어나는 시기와 후기 섬유화의 시기에 일어나는 조직학적 과정을 연속적으로 확인하였다는데 의의가 있다. 그리고 폐 섬유화에 중요하다고 알려진 ET-1과 TGF- β_1 이 파라콰트를 투여하여 섬유화 과정에 있는 백서의 폐 조직에도 역시 발현됨을 알 수 있었다는 것이 중요하겠다. 따라서 향후 파라콰트 중독에 의해 폐 섬유화의 병인에도 위의 두가지 사이토카인이 관계할 것이라고 생각해 볼 수 있겠다. 다만 본 실험결과에서 보듯이 ET-1이 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것만으로는 섬유화의 억제가 일어나지 않았기 때문에 ET-1이 가장 중요한 인자라고 말할 수는 없을 것이고 그밖에 여러 가지 인자들의 상호작용이 관계할 것이라 생각된다. 향후 TGF- β_1 을 비롯한 다른 사이토카인에 대한 연구가 좀더 진행되어야 할 것이다.

요 약

연구배경 :

IPF에 의한 유병률과 사망률은 점차 증가하는 추세이

나 좋은 치료는 없는 상태이다. 폐 섬유화 과정에서 TGF- β_1 , TNF- α , ET-1, IFN- γ 등의 사이토카인이 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 본 실험은 파라콰트를 기관지 내로 주입하여 섬유화가 유발되는 과정의 백서의 폐 조직 내에서 ET-1과 TGF- β_1 의 발현을 살펴보고, 또한 비선택적 ET-1 receptor blocker인 Bosentan이 폐 섬유화의 치료에 효과가 있는지를 보고자 하였다.

방 법 :

웅성 7-8 주령의 백서 120 마리를 세 그룹으로 나누고 제1그룹은 대조군으로 하여 기관지 내로 생리 식염수를 투여하였고, 제2그룹은 파라콰트를 투여하였으며, 제3그룹은 첫날 파라콰트를 투여한 후 매일 gastric gavage 방법으로 보센탄을 투여하였다. 파라콰트 혹은 생리식염수를 투여한 지 1, 3, 5, 7, 10, 14 일째 각각 세 그룹의 일정 수를 희생하여 폐의 병리조직을 보고 면역세포화학염색으로 ET-1과 TGF- β_1 의 발현을 조사하여 분석하였다. 폐 섬유화의 정도는 H&E 염색과 Masson trichrome 염색을 하여 컴퓨터 영상분석을 시행하였고, 면역세포화학염색은 염색정도에 따라 반정량화하여 분석하였다.

결 과 :

파라콰트를 투여한 군이 대조군에 비해 콜라겐의 침착이 실험 3일째부터 현저히 증가하였고, ET-1과 TGF- β_1 의 발현이 주로 실험 초기에 증가하였다. 그러나 보센탄을 투여한 경우 콜라겐이 침착된 양에는 유의한 변화가 없었고 파라콰트군과 비교해서 ET-1과 TGF- β_1 의 발현에 뚜렷한 변화는 없었다.

결 론 :

파라콰트를 투여한 경우 폐 섬유화가 증가하였다. 그리고 ET-1과 TGF- β_1 의 발현이 증가하였다. 그러나 ET-1에 대한 receptor blocker인 보센탄이 폐 섬유화를 막지는 못하였다. 파라콰트에 의한 폐 섬유화에 ET-1이 연관성이 있으나 그 역할에 대해서는 추후 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Masson RJ, Schwarz MI, Hunninghake GW, and Musson RA : Pharmacological therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(5):1771-7
2. Coker RK, Laurent GJ : Pulmonary cytokines in the balance. *Eur Respir J* 1998;11:1218-21
3. Goldie RG : Endothelins in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:145-8
4. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michael RP : Increased Endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(2):600-8
5. Marini M, Carpi S, Bellini A, Patalano F, Mattoli S : Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220(3):896-9
6. Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GL, McAnulty RJ : Increased Endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Biol* 1998;18(5):611-9
7. Giaid A, Michael RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q : Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993;341:1550-4
8. Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C et al : Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 1995;48:330-4
9. Saleh D, Furukawa K, Tsao MS, Maghazachi A, Corrin B, Yanagisawa M et al. : Elevated expression of Endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis : possi-

- ble involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:187-93
10. Dubaybo BA, Durr RA, Thet LA : Unilateral paraquat induced lung fibrosis. *J Toxicol Environ Health* 1987;22(4):439-57
11. 이소라, 정혜철, 김경규, 이상엽, 이신형, 조재연 등 : paraquat의 폐측 기관지 주입에 의해 유발된 폐섬유화증에서 cyclophosphamide와 methylprednisolone의 투여에 따른 endothelin-1의 발현의 변화. *결핵 및 호흡기 질환* 1999;46(6):775-85
12. Mutsaers SE, Marshall RP, Goldsack NR, Laurent GJ, McAnulty RJ. Effect of endothelin receptor antagonists(BQ-485, Ro 47-0203) on collagen deposition during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 1998;11(2-3):221-5
13. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF : Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000;342(18):1350-8
14. Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Lymphany PA, du Bois RM, Jeffery PK et al. : Transforming growth factors- β_1 , β_2 , and β_3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:981-91
15. Santana A, Saxena B, Voble NA, Gold LI, Marshall BC : Increased expression of transforming growth factor beta isoforms(beta 1, beta 2, beta 3) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13(1):34-44
16. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K : Anti-sclerotic effect of transforming growth factor-beta antibody in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 1999;92(1):6-13
17. Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA : Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 1993;48(10):959-66
18. Wang Q, Wang Y, Hyde DM, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Ryan ST et al. : Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor β soluble receptor in hamsters. *Thorax* 1999;54(9):805-12
19. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA : Transforming growth factor β_1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:6642-6
20. Murata S, Matsumura Y, Takada A, Asai Y, Takaoka M and Morimoto S : Role of transforming growth factor- β_1 on platelet-induced enhancement of Endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:1524-30
21. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M and Masaki T : Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159(3):1435-40
22. Smith LL : The toxicity of paraquat. *Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning reviews* 1988;1:1
23. Thurlbeck WM, Churg AM : Paraquat. *Pathology of the lung* (2nd edition) 1995;327-9
24. Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA and Chiles PG et al. : Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000;15:640-8
25. Shirai M, Fujise H, Masaoka T, Takeda S, Tsuboi T and Akahori F : Histometric changes in connective fibers of the lung following paraquat administration in rats. *J Toxicol Sci* 1993;18:167-70