

UIP 환자에서 c-Jun N-terminal Kinase (JNK) 활성화에 관한 연구

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실*, 진단방사선학과교실**

김기업, 이영목, 김도진, 문승혁, 어수택
김용훈, 박춘식, 김현조*, 엄 옥*, 황정화**

= Abstract =

The Activity of c-Jun N-terminal Kinase (JNKb) in Patients with UIP

Kiup Kim, M.D., Young Mok Lee, M.D., Do Jin Kim, M.D.¹,
Seung Hyuk Moon, M.D.², Soo-taek Uh, M.D., Yong Hoon Kim, M.D.²,
Choon Sik Park, M.D.¹, Hyunjo Kim, M.D.*, Wook Youm, M.D.*,
and Jung Hwa Hwang, M.D.**

Department of Internal Medicine, Thoracic Surgery, and Radiology**,*

Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea

Department of Internal Medicine, Soon Chun Hyang University, Bucheon¹, Cheonahr², Korea

Background : TNF-alpha is related to the generation of lung fibrosis in patients with UIP. The precise mechanism leading to lung fibrosis by TNF-alpha is unknown. However, the activation of a transcription factor like AP-1(down stream of c-jun N-terminal kinase, JNK) by TNF-alpha may be related to the induction of fibrogenic cytokines like PDGF or IGF-I. Furthermore, JNK was reported to be activated in the radiation-induced lung fibrosis model. This study examined JNK activity in patients with UIP.

Methods : The expression of phosphorous JNK(p-JNK), macrophage/monocyte specific markers, CD68, and cytokeratin was evaluated by immunohistochemical(IHC) staining of lung tissues from patients with UIP and lung cancer. An in vitro kinase assay was performed with alveolar macrophages obtained by a bronchol-

Address for correspondence :

Soo-taek Uh, M.D.

Department of Internal Medicine, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea
657-58, Hannam-Dong, Yongsan-Ku, Seoul, 140-743, Korea.

Phone : 02-709-9195 Fax : 02-709-9554 E-mail : uhs@hosp.sch.ac.kr

alveolar lavage from patients with UIP and healthy persons as the control.

Results : The IHC stain showed that p-JNK is expressed in the almost all of the alveolar macrophages and smooth muscle cells in patients with UIP. In case of the normal areas of the lung from patients with lung cancer, the alveolar macrophages showed little p-JNK expression. Interestingly, increased JNK activity was not found in the in vitro kinase assay of the alveolar macrophages obtained from both patients with UIP and healthy persons as the control. Furthermore, 10 ng/mL of TNF- α failed to increase the JNK activity of the alveolar macrophages in both patients with UIP and healthy people.

Conclusion : The JNK was activated constitutionally in patients with UIP. However, the role of JNK in the pathogenesis of lung fibrosis needs to be clarified. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 437-447)

Key words : Fibrosis, JNK, TNF, UIP

서 론

특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonia)의 하나인 통상성 간질성 폐렴(usual interstitial pneumonia, UIP)은 원인 불명의 진행성 간질성 폐 질환으로 결국에는 폐 섬유화로 인한 호흡 부전으로 사망하게 된다. 일반적으로 알려진 UIP의 5년 생존율은 약 50% 정도¹⁾, 이 예후는 제1기 비소세포암 폐암 환자의 5년 생존율 67%²⁾ 보다 나쁘게 보고되고 있다. 이러한 불량한 예후에도 불구하고 UIP의 병인에 대해서는 현재 많이 알려져 있지 않다.

폐의 섬유화를 일으키는 기전은 현재 밝혀져 있지 않지만, 폐의 섬유화 과정에 TNF- α 의 역할이 강조되었다. 그 증거로는 bleomycin에 의한 폐 섬유화 과정에서 bleomycin 투여 후 전체 폐의 TNF- α mRNA가 증가되고, anti-TNF- α antibody나 항 TNF- α 혈청을 투여하면, bleomycin에 의한 폐 섬유화가 예방되는 점³⁾, IPF 환자의 기관지 폐포 세척액 내에는 TNF- α 의 단백질이 정상인에 비하여 증가되어 있고, IPF 환자의 대식세포도 TNF- α 의 mRNA 양이 증가되어 있는 점⁴⁾, 그리고 최근 TNF- α transgenic mice를 이용한 실험에서, 아무런 처치를 하지 않아도 사람의 IPF와 유사한 폐 병변을 보였으며, 그 병변 정도가 심할수록 TNF- α mRNA가 증가되었다는 것이다⁵⁾. 상기 실험들로 보아 폐의 섬유화

에 TNF- α 가 주요한 역할을 할 것으로 생각된다. 하지만 TNF- α 이후의 어떤 신호 전달 체계로 폐의 섬유화에 영향을 미치는지는 알 수 없다.

대식세포에서 TNF- α 의 신호 전달체계는 TNF receptor I [CD120a(p55)로 약함]으로부터 MAPKs (mitogen activated protein kinases)의 활성화까지는 잘 알려져 있다. 즉, TNF- α 와 CD120a(p55)가 결합하면, CD120a(p55)의 intracellular domain이 삼중합(trimerization) 된다⁶⁾. 이 결과로 여러 adapter protein이 모이게 되며, 결국 TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2)가 활성화된다⁷⁾. TRAF2로부터, 어떤 경로를 밟는지는 모르지만, 먼저 MEKK1이 활성화되고 이어 MKK4, c-jun N-terminal kinase(JNK)가 순차적으로 활성화되어 c-Jun, ELk1, ATF2등의 전사 인자가 활성화되고 이들이 핵내로 이동되어 전사가 일어나게 된다^{8,9)}. 아마도 이들 전사 인자가 fibrogenic cytokines의 전사에 관계할 것으로 추측하지만 정확히 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 UIP 환자에서 TNF- α 의 증가가 보고되어 있으므로 위에서 기술한 경로를 통하여 폐장내의 JNK가 활성화되는 것을 확인하고자 하며, 그 방법으로 UIP 환자의 대식세포에서 JNK의 활성화 유무를 측정하고, 그리고 UIP 환자의 폐 조직내의 JNK의 활성화를 알 수 있는 phosphorylated-JNK

Table 1. Clinical characteristics of patients with UIP

	1	2
Gender	Male	Male
Age (years)	65	68
Smoking (pack-years)	35	40
FVC (pred.%)	67	60
FEV ₁ (pred.%)	60	55
TLC (pred.%)	56	70
DLco/VA (pred%)	70	65
(A-a)DO ₂ (mmHg)	45	55
Major symptom	Dyspnea	Dyspnea
Symptom duration (month)	5	12
Auscultation	Crackles	Crackles
Clubbing, finger	Yes	No

Table 2. Clinical characteristics of patients with lung cancer

	1	2
Gender	Male	Female
Age	67	67
Pack-years	50	45
Cell type	Squamous	Squamous
Major symptom	Coughing	No
Pathological staging	T ₃ N ₂ M ₀	T ₃ N ₀ M ₀

를 측정하여 JNK가 UIP 환자에서 활성화되는 지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

대상은 2명의 IPF 환자로 하였으며, IPF의 진단은 ATS/ERS/ACCP의 진단 기준¹⁰, 즉, 개흉 조직으로 얻은 병리 조직 소견상 UIP의 소견을 보이고, 폐 섬유화를 일으킬 수 있는 환경적 요인, 교원성 혈관 질환, 약물 요법이 없고, 폐 기능 검사상 제한성 폐 질환 소견과 저 산소증을 보이는 경우로 하였다. 환자 1은 남자, 65세 였고, 환자 2도 남자, 68세 였다. 이

들의 chest P-A와 HRCT는 전형적인 IPF의 소견을 보였으며, 임상적 소견은 표 1과 같다.

JNK의 면역조직화학검사의 대조군으로 이용된 폐 조직은 기저 질환없이 폐암으로만 폐 절제술을 받은 환자의 폐 말초 부위를 이용하였다. 이들 모두에서 흉부 전산화 단층 촬영상 honeycombing(벌집 모양)의 소견은 보이지 않았으며, 모두 운동시 호흡 곤란은 없었다. 진찰 소견상 손가락과 발가락의 굳음지도 없었다. 이들의 간략한 임상적 특징은 표 2와 같다.

2. 기관지 폐포 세척술 및 세포의 처리

기관지 폐포 세척술은 Uh 등¹¹의 방법을 이용하였으며, 개흉 조직 검사 3일과 2일 전에 각각 시행하였

다. 그리고 정상인은 아무런 호흡기 증상이 없는 29세의 건강한 남자를 대상으로 하였다. 간략히 기술하면 우중엽에서 총 200 mL의 생리 식염수를 4회에 나누어 주입한 후 50 mmHg이하의 음압으로 회수하였다. 회수된 세척액은 두장의 멸균된 거즈에 거르고, 500g에서 5분간 원심 분리하고 phosphate buffered salts(PBS) 액으로 세척하고 다시 500g에서 5분간 원심 분리하였다. 회수된 세포의 감별 세포 분석은 500개의 세포를 이용하였으며, 1×10^6 개의 살아있는 대식세포를 4개의 well에 10% FBS이 함유되어 있는 RPMI 배지로 분주하였으며, 37°C, 5% CO₂ 하에서 10분간 배양하였다. 배양 후 부착되어 있지 않은 세포를 제거하기 위하여 PBS 액으로 세척하였다. 이어 한 well은 JNK assay를 위하여 밑에서 기술하는 방법으로 세포를 용해하였다. 그리고 3 well은 각각 TNF- α 1 ng/mL과 10 ng/mL, 그리고 TNF- α 가 없는 상태로 10분간 재배양하였다. 이어 JNK assay를 위하여 밑의 방법으로 세포를 용해시켰다.

3. GST-c-Jun의 분리

c-Jun₁₋₇₉-GST sepharose beads의 획득 방법을 위해 c-Jun₁₋₇₉-GST를 함유하는 DH-5 α (Gary Johnson으로부터 얻음, National Jewish and Medical Research Center, Denver, CO, USA)를 배양하여 optical density가 550nm에서 0.5 혹은 0.7에 이르면, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (최종 농도, 0.1 mM)로 37°C에서 3시간 동안 단백을 induction 시켜 세포들을 획득한 후 10 mM Tris buffer pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 μ g/ml lysozyme, 1.5% (w/v) sarkosyl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride로 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 sonication 후, 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여, 상청액을 glutathione-agarose beads(1:1 slurry) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)와 함께 4°C에

서 1시간 동안 혼합한 후 beads를 차가운 phosphate buffered saline으로 5회 세척한 후 실험에 이용될 때 까지 4°C에서 보관하고 획득된 c-Jun₁₋₇₉-GST의 확인과 순수도를 알기 위하여, 12% SDS-PAGE gel에 전기 영동후 Coomassie-blue 염색하여 확인하였다.

4. JNK assay

In vitro kinase assay는 어둠의 방법을 사용하였다¹². 세포는 얼음 위에서 5 ml의 150 mM NaCl이 포함된 20 mM HEPES buffer(pH 7.4)/saline으로 씻고, 0.5 ml의 NP-40 lysis buffer(50 mM Tris HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 1%(v/v) Nonidet P-40, 10%(v/v) glycerol, 1 mM NaF, 10 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 세포를 lysis시킨 후 용해되지 않은 핵 부산물(nuclear debris)을 제거하기 위하여 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다.

상청액을 새로운 tube에 옮긴 후, 미리 NP-40 lysis buffer로 세척한 15 μ l의 c-Jun₁₋₇₉-GST sepharose beads를 첨가한 후 4°C에서 2시간 동안 혼합한 후 beads를 0.5 ml의 NP-40 lysis buffer로 두 번, 동위원소가 포함되어 있지 않은 0.5 ml의 kinase buffer(20 mM HEPES, 30 mM β -glycerophosphate, 10 mM p-Nitrophenylphosphate, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.05 mM sodium vanadate)로 두 번 세척하였다. 10 μ ci의 [³²P]- γ -ATP가 함유되어 있는 41 μ L의 kinase buffer를 첨가한 후 30분간 30°C의 수조에서 *in vitro* kinase assay를 시행한 후 반응은 40 mM의 DTT가 함유되어 있는 12 μ l의 5x Laemmli로 중단시키고, 5분간 95°C에서 끓인 후 원심 분리시키고 12%의 SDS-PAGE를 이용하여 단백을 분리하고, nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후 autoradiogram하여 분석하였다.

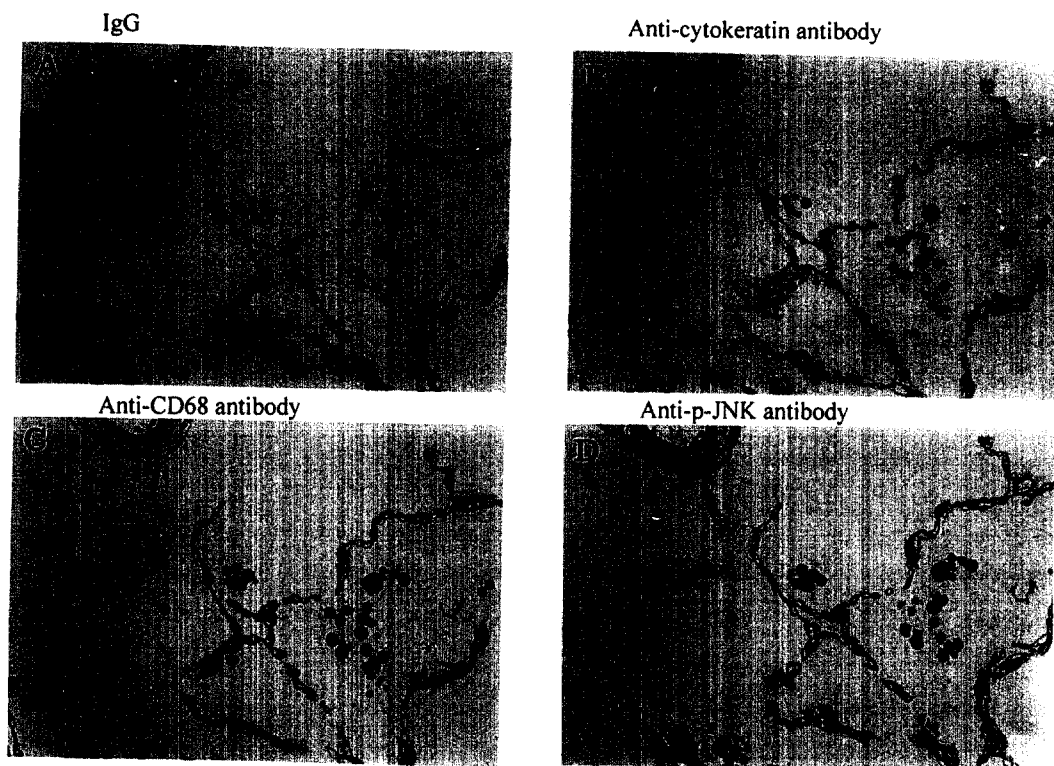


Fig. 1. The immunohistochemical stain of lung from lung cancer. Phosphorous-JNK is not detected in normal area of lung tissues (D), but, CD68 containing cells, suggesting alveolar macrophages, are well detected (C) suggesting alveolar macrophages in normal area do not express the p-JNK.

5. 면역화학 조직 검사

사용된 항체는 monoclonal anti-p JNK antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), antihuman CD68 antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA), antihuman cytokeratin antibody (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, 음성 대조군으로 mouse IgG (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 이차 항체는 biotinylated anti-mouse IgG와 biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다.

면역 조직 화학 염색은 Flanders 등¹³⁾의 방법을 사용하였다. 간략히 기술하면 paraffin에 고정되어 있는

폐 조직을 3 μ m의 두께로 연속적으로 절단하였다. 조직을 slide에 고정한 후 0.3% (v/v) hydrogen peroxide을 함유하는 methanol에서 30분간 잠복시켜 내재성 peroxidase의 활성도를 없앴다. 이어 Tris-buffered saline, pH 7.4 (TBS)로 씻고, 0.1% (wt/vol) trypsin과 0.1% (wt/vol) CaCl_2 용액에 10분간 담구었다. 비특이적 반응을 없애기 위해서 1.5% normal horse serum 으로 실온에서 2시간 잠복시키고, 이어 primary antibody와 non-immune IgG를 같이 잠복시켰다. 이어 이차 항체를 30분간 잠복시켰다. 발색은 DAB substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법대로 시행하였다. 대조 염색은 hematoxylin-eosin 염색을 이용하였다.

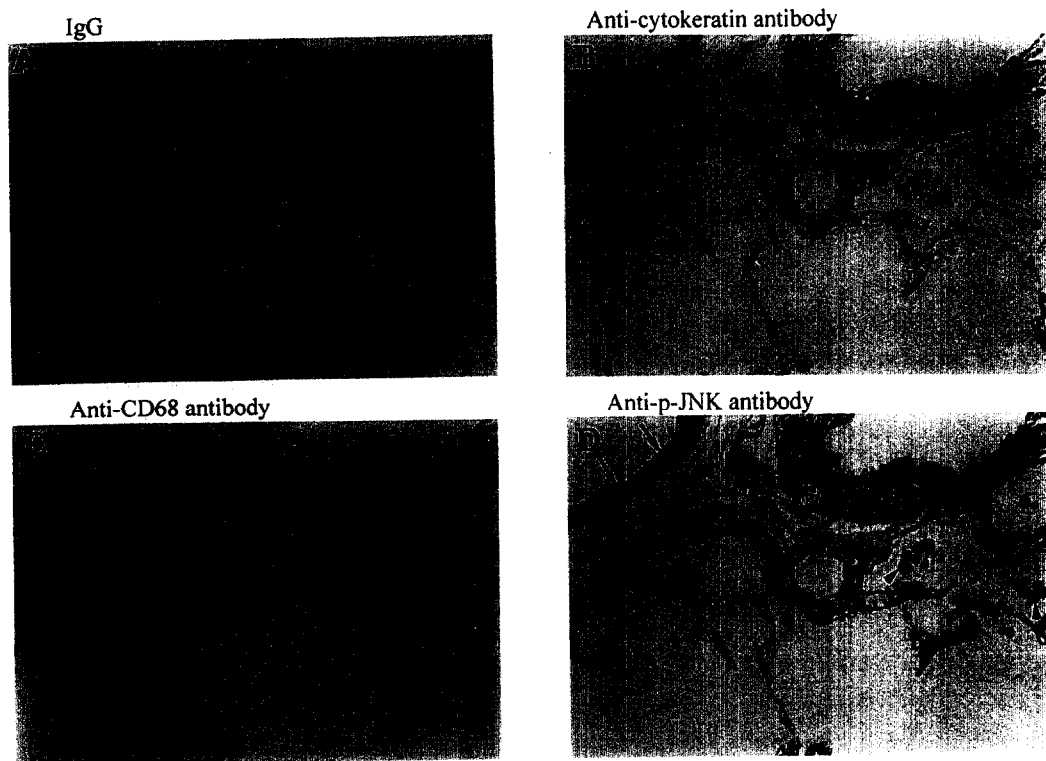


Fig. 2. The immunohistochemical stain of lung from patient 1. A lot of p-JNK are detected in smooth muscles (arrow) and alveolar macrophages (arrow head) (D). Corresponding lung tissues reacted with anti-CD68 antibody (C) and anti-cytokeratin (B) show that the p-JNK expressing cells are alveolar macrophages.

결 과

1. 기관지 폐포 세척액내의 세포 분석

환자 1은 회수율이 35%, 총 세포 수는 $5.5 \times 10^6/\text{mL}$, 대식세포 80%, 림프구 10%, 중성구 5%, 호산구 5%였으며, 환자 2의 경우는 회수율이 38%, 총 세포 수는 $6.2 \times 10^6/\text{mL}$, 대식세포 75%, 림프구 19%, 중성구 5%, 호산구 1%였다.

2. p-JNK의 면역 조직화학 검사

대조군으로 사용된 폐암 환자의 정상 폐 조직에서의 non-immune IgG에 대한 면역 조직화학 검사 상 양

성 반응은 관찰할 수 없었다(Fig. 1-A). JNK의 활성화를 알기 위한 anti-p-JNK를 사용하였을 때, 폐포 대식세포는 거의 p-JNK를 함유하지 않음을 알 수 있었고(Fig. 1-D), 이는 대식세포를 표현하는 항 CD68 항체를 사용하여 대식세포임을 알 수 있었다(Fig. 1-C).

대조군으로 사용된 다른 폐암 환자의 정상 폐 조직에서도 위의 경우와 비슷한 소견을 보여 주었다.

UIP 환자 1의 경우는 non-immune IgG에 대한 면역 조직화학 검사 상 양성 반응은 관찰할 수 없었다(Fig. 2-A). 앞의 경우와는 달리 anti-p-JNK에 대해서는 평활근(arrow)과 일부 폐포 대식세포(arrow head)는 양성을 보임을 알 수 있었고(Fig. 2-D), 항 CD68 항체를 사용한 검사와 비교해 볼 때

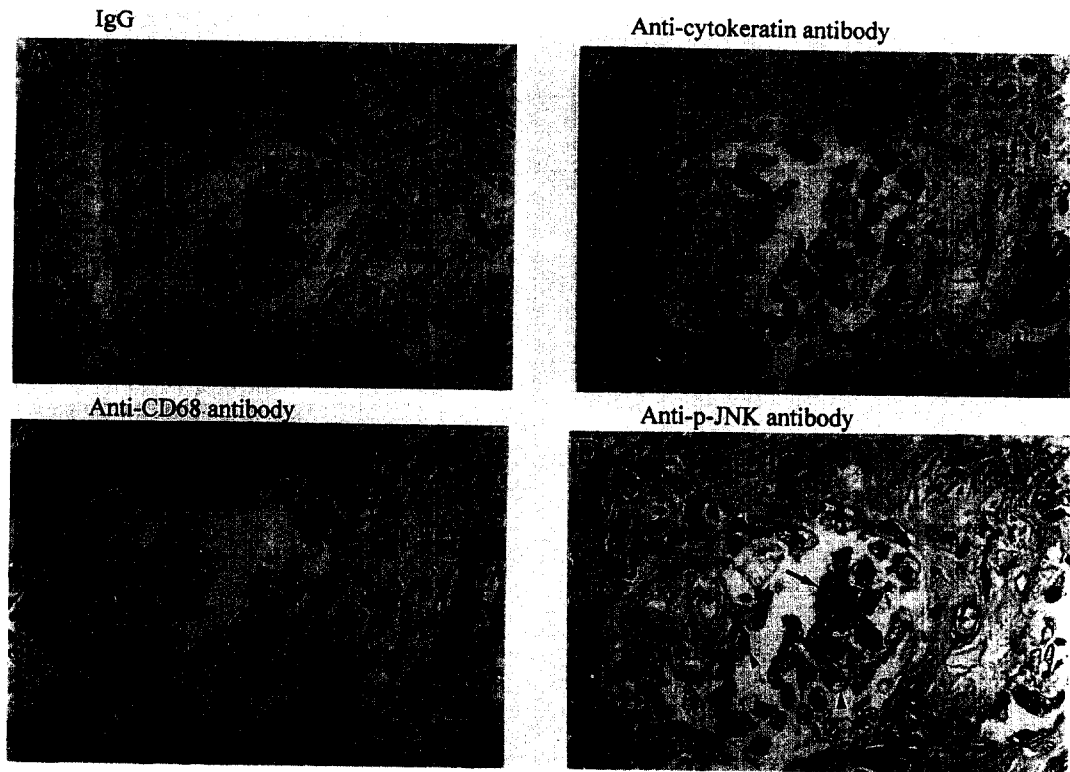


Fig. 3. The immunohistochemical stain of lung from patient 2. P-JNK are detected in alveolar macrophages (arrow, D) which are stained with anti-CD68 antibody (C). And unstained cells with anti-p-JNK-antibody in alveolar cavity (arrow head) are denued alveolar epithelium which are well stained with anti-cytokeratin antibody (B).

모두 대식 세포임을 알 수 있었다(Fig. 2-C). 그리고 anti-p-JNK에 양성을 보이는 세포가 상피세포가 아님을 관찰하고자 항 cytokeratin 염색과 비교하였을 때, 제2형 폐포 상피세포가 아님을 알 수 있었다(Fig. 2-B).

UIP 환자 2의 폐 조직을 사용하였을 때도, non-immune IgG에 대한 면역 조직화학 검사 상 양성 반응은 관찰할 수 없었다(Fig. 3-A). Anti-p-JNK로 염색한 경우(Fig. 3-D), 폐포강 내에서 양성으로 염색되는 세포(arrow)는, 항 CD68 항체를 사용한 염색과 비교해볼 때(Fig. 3-C), 폐포 대식세포임을 알 수 있었고 그리고 폐포강내에 있으면서도 anti-P-JNK에 염색되지 않는 세포(arrow head, Fig. 3-D)

는 anti-cytokeratin 염색(Fig. 3-B)과 비교해볼 때 탈락된 폐포 상피세포임을 알 수 있었다.

2. 대식세포를 이용한 JNK assay

먼저 양성 대조군과 음성 대조군을 위하여 백서의 골수에서 획득한 대식세포를 이용하였다. 백서의 골수에서 추출한 대식세포를 10 ng/mL의 TNF- α 로 자극하지 않거나 10분간 자극한 세포를 각각 음성 대조군과 양성 대조군으로 사용하였으며, 그림 4와 5에서 음성 대조군(lane 1)은 kinase activity가 증가되어 있지 않지만, 양성 대조군(lane 2)은 음성 대조군에 비해 현저한 kinase activity를 보였다. 이는 kinase

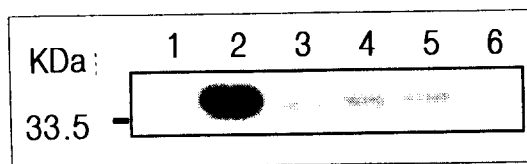


Fig. 4. *In vitro* JNK assay with alveolar macrophages from healthy person. Ten ng/mL of TNF- α increases JNK activity (lane 2, positive control) compared to unstimulated bone-marrow derived macrophages (BMM) (lane 1, negative control). The unstimulated alveolar macrophages show basal JNK activity (lane 3, 5) and the stimulation with 10 ng/mL of TNF- α fails to increase JNK activity (lane 4,6) in both healthy person.

assay가 정상적으로 수행되었음을 시사하는 소견이었다.

2명의 정상인에서의 대식세포는 TNF- α 로 자극하지 않은 경우(lane 3, 5)처럼 10 ng/ml로 10분간 자극 시(lane 4, 6)도 kinase activity의 증가를 보이지 않았다(Fig. 4).

환자 1과 2 모두에서 JNK activity는 조건의 변화에 관계없이 증가가 없었다. 즉, 분리된 대식 세포를 배양하지 않고 직접 사용한 경우 [lane 3 (환자 1), lane 7 (환자 2)], 그리고 분리된 대식 세포를 TNF- α 자극하지 않고 10분간 배양 후 [lane 4 (환자 1), lane 8 (환자 2)], TNF- α 를 1 mg/mL로 10

분간 자극한 후 [lane 5 (환자 1), lane 9 (환자 2)], 그리고 TNF- α 를 10 mg/mL로 10분간 자극한 후 [lane 6 (환자 1), lane 10 (환자 2)]의 모든 경우에 kinase activity는 증가되지 않았다(Fig. 5).

고 찰

이 연구는 UIP 환자에서 폐 조직에서 JNK가 활성화되어 있다는 것을 p-JNK(활성화된 JNK)를 조직에서 직접 측정하고, 그리고 이를 뒷받침하기 위하여 JNK의 kinase activity를 측정하여 이를 증명하고자 하였다. 물론 JNK의 활성화가 폐의 섬유화에 어떠한 영향을 미치는 지는 본 연구만으로는 알 수 없다. 다만 백서의 흉부에 방사선을 조사한 후 회수된 대식세포에서 JNK activity가 증가되고, 이들 증가된 JNK activity와 collagen 양과 비슷한 관계를 보여 JNK가 폐 섬유화에 관계될 수 있을 것으로 예상되었다¹². 따라서 본 연구는 동물 모델인 아닌 환자의 폐 조직에서 JNK activity를 측정하여, 폐 섬유화를 일으키는 UIP 환자에서 비정상적으로 증가되어 있는지를 측정하고자 하였다. 결과에서처럼 UIP 환자의 폐 조직내에서 p-JNK가 정상인에 비해 표현이 증가되어 있는 것으로 보아 UIP 환자의 폐 섬유화에 p-JNK가 관계될 것으로 사료되지만, 이러한 p-JNK의 표현이 UIP에서 증가되는 TNF- α 에 의한 2차적인 변화인지 아니면 폐 섬유화의 병인에 직접 관계할 지는 알

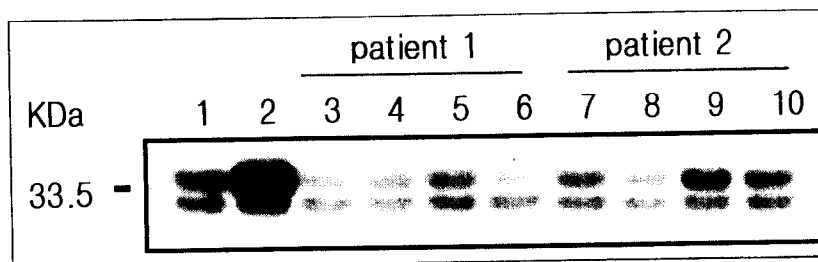


Fig. 5. *In vitro* JNK assay with alveolar macrophages from patients with UIP. Stimulated BMMs with 10 ng/mL of TNF- α show increased JNK activity (lane 2). JNK activity of alveolar macrophages without incubation (lane 3, 7) dose not increase. The incubation alone (lane 4, 8), 1 ng/mL (lane 5, 9), and 10 ng/mL (lane 6, 10) of TNF- α do not increase the JNK activity in both patients with UIP.

수 없다. 그리고 만약 폐 섬유화에 관계한다면 어떠한 신호전달체계를 밟을 지는 추후 연구되어야 할 과제라고 생각된다. 다만 앞에서 기술한 것 처럼 여러 경로를 통하여 먼저 MEKK1이 활성화되고 이어 MKK4, c-jun N-terminal kinase(JNK)가 순차적으로 활성화되어 c-Jun, ELk1, ATF2등의 전사 인자가 활성화되고 이들이 핵내로 이동되어 전사가 일어나게 된다^{8,9}. 아마도 이들 전사 인자가 platelet-derived growth factor(PDGF)등의 fibrogenic cytokines의 전사에 관계할 것으로 추측하지만 정확히 알려져 있지 않다.

IPF의 폐의 섬유화에 관한 기전은 정확히 알려져 있지 않지만 여러 세포와 cytokines가 관계할 것으로 알려져 있다. 이들 세포 중 근섬유아세포(myofibroblast)가 폐의 기질(extracellular matrix)의 생성과 폐의 간질에 이들 단백질의 침착에 주요한 역할을 하는 세포로 연구되어졌다¹⁴. 최근의 보고에 의하면 섬유아세포(fibroblast)를 TGF-beta로 자극한 후 근섬유아세포(myofibroblast)로의 phenotypic modulation에 관한 실험에서, ERK와 p38의 억제제를 투여하여도 근섬유아세포로의 형질 조절에는 변화가 없었지만 JNK 억제제를 투여한 경우에는 억제가 관찰되어 근섬유아세포 형성에도 JNK가 관계할 것으로 추측된다¹⁵.

본 연구의 결과에서 대조군으로 사용된 폐암 환자의 섬유화가 없는 폐 조직에서는 p-JNK에 반응하는 폐포 대식세포가 거의 관찰되지 않았지만, UIP 환자의 폐 조직의 면역조직 화학검사에서 p-JNK에 반응하는 많은 수의 대식세포가 관찰되어 JNK가 활성화됨을 알 수 있었다. 하지만 JNK의 kinase 활성도를 kinase assay로 직접 측정하였을 때, 증가를 전혀 관찰할 수 없었다. 또한 TNF- α 로 자극하였을 때도 kinase activity는 증가되지 않았다. 이런 현상을 정확하게 설명할 수 없지만, 다음과 같은 가능성이 있을 것으로 생각된다. 즉, UIP 환자에서는 폐포 대식세포가 어떤 원인에 의해 자극된 상태로¹⁶ 있으므로(p-

JNK에 대한 염색상 양성으로 보이는 대식세포가 많은 점) 다시 TNF- α 로 자극하여도 TNF- α 에 반응이 없을 것으로 사료된다. 하지만, 이 현상은 아무런 호흡기 증상이 없는 정상 성인에서도 TNF- α 에 의해 대식세포의 JNK의 활성도가 kinase assay에서 증가되지 않아 설명하기 곤란할 것 같다.

이 연구의 또 다른 제한점은 UIP 환자의 폐 조직에서는 p-JNK가 관찰되었지만 JNK kinase assay에서는 증가되지 않았다. 이 현상은 사람의 폐포 대식세포를 이용한 kinase assay를 할 경우 백서의 BMM을 이용하여 시행하는 kinase assay 방법보다 더 많은 수의 대식세포가 필요할 지 모른다는 것이다. 왜냐하면 백서를 이용한 대부분의 다른 연구자의 실험에서도 1×10^6 의 세포를 이용하였고¹⁷, 그리고 본 실험의 대조군으로 사용된 백서의 대식세포의 수도 1×10^6 으로 모두 성공적인 결과를 얻었다. 그리고 본 실험에서도 살아있는 대식 세포 1×10^6 개를 이용하였음에 불구하고 kinase assay에서 대식세포의 JNK 활성화가 관찰되지 않았으므로 대식세포를 이용한 JNK assay는 더 많은 수의 대식세포가 필요할 수 있다는 것이다. 왜냐하면 현재까지 사람의 대식세포를 이용한 JNK assay는 한번도 보고되지 않았기 때문이다. 따라서 추후 사람의 대식세포를 이용하여 JNK assay를 할 경우는 1×10^6 이상의 세포를 이용하여 JNK assay를 확인할 필요가 있다.

이 연구의 또 다른 결과로서 interstitial macrophages가 p-JNK에 반응하는 새로운 결과를 얻었다. 저자는 UIP 환자의 폐 조직에서 interstitial macrophages내의 IGF-I에 대한 면역화학검사를 시행하여 염색되는 양의 정도와 임상 양상을 비교한 결과, IGF-I의 양과 폐조직내의 간질에 있는 collagen의 양, 그리고 임상 점수(clinical score)가 서로 상관관계가 있음을 보고하였다¹⁸. 이 연구 결과와 본 연구가 동시에 진행되지 않았지만, 본 연구와 앞의 연구를 같이 추론하여 생각한다면 JNK가 활성화되고 이어 전사 인자가 활성화되어 fibrogenic cytokines인 IGF-I이

interstitial macrophages 내에서 발현될 수 있을 것으로 가정할 수 있다. 따라서 추후 p-JNK와 IGF-I의 면역화학조직 검사를 동시에 시행하여 같은 세포에서 두 단백질이 동시에 발현된다면 위의 가정을 더 뒷받침할 수 있을 것이다.

결론적으로 UIP 환자의 폐 조직에서 비록 kinase assay에서 JNK의 활성화를 직접 관찰할 수는 없었지만, p-JNK에 대한 면역조직화학 검사에서 정상인과 비교해 볼 때 반응이 증가되어 JNK가 활성화되어 있음을 간접적으로 확인하였으며, 추후 이들 활성화된 JNK와 fibrogenic cytokines과의 관계는 더 연구되어야 할 과제로 생각된다.

요 약

배 경 :

TNF- α 는 UIP 환자의 폐 섬유화에 관계하는 cytokine으로 잘 알려져 있지만, 폐 섬유화를 일으키는 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. TNF- α 에 의해 AP-1(c-jun N-terminal kinase, JNK의 하부 신호 전달체계) 같은 전사 인자가 활성화되고 이들에 의해서 PDGF 나 IGF-I 같은 fibrogenic cytokines의 전사가 관계있을 것으로 추측된다. 더구나 방사선에 의한 폐 섬유화 과정에서 JNK가 활성화되어 있는 것이 확인되었다. 본 연구의 목적은 UIP 환자에서 JNK의 활성도를 확인하고자 하였다.

방 법 :

UIP 환자의 폐 조직과 대조군으로 이용된 폐암 환자의 정상 폐조직에서 phosphorous JNK (p-JNK), 대식세포의 표지자인 CD68, 그리고 cytokeratin을 이용하여 면역화학검사를 시행하였다. JNK의 *in vitro* kinase assay는 UIP 환자와 호흡기 증상이 없는 정상인에서 기관지 폐포세척술로 획득한 대식세포를 이용하였다.

결 과 :

면역조직화학검사에서 UIP 환자의 대부분의 폐포 대식세포는 p-JNK를 발현하였지만, 폐암 환자의 정상

조직에서는 UIP 환자보다는 p-JNK 발현이 거의 없었다. 그러나 폐포 대식세포를 이용한 *in vitro* JNK kinase assay에서는 UIP 환자와 정상인 모두에서 JNK 활성도를 관찰할 수 없었다. 더구나 10 ng/mL의 TNF- α 로 자극하여도 JNK 활성도는 관찰할 수 없었다.

결 론 :

UIP 환자의 폐 조직에서 JNK가 활성화되어 있음을 간접적으로 확인하였고, 추후 이들 활성화된 JNK와 fibrogenic cytokines과의 관계는 더 연구되어야 할 과제로 생각된다.

감사의 글

이 실험의 p-JNK에 대한 면역조직화학검사를 수행하신 순천향대학교 현암신장연구소의 김 은영, 이 명란 기사님께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Johnson MA, Kwan S, Snell NJC, Nunn AJ, Darbyshire JH, Turner-Warwick M. Randomized controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. Thorax 1989;44:280-9.
2. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. Chest 1997;111:17-23.
3. Piguet PF, Vesin C. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. Eur Respir J 1994;7:515-8.
4. Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibro

- sis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993; 150:4188-96.
5. Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitesett JA, et al. Expression of a tumor necrosis factor- α transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1995;96:250-9.
6. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation, and death. *Cell* 1994; 76:959-62.
7. Hsu, H., Shu, H-B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996, 84:299-308.
8. Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor(TNF)-mediated kinase cascades : Bifurcation of Nuclear Factor- κ B and c-jun N-terminal kinase(JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9792-6.
9. Liu Z-G, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effect functions : JNK Activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565-76.
10. Americian Thoracic Society, European Respiratory Society. Idiopathic pulmonary fibrosis : diagnosis and treatment. International Consensus Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:646-64.
11. Uh S, Ki SY, Lim GI, Moon SH, Jeong SW, Kim HT, et al. The T cell receptor subsets of lymphocytes in bronchoalveolar lavage in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respir Med* 1998; 92,408-14.
12. 어수택, 홍기영, 이영목, 김기업, 김도진, 김용훈 등. 방사선에 의한 폐섬유화증에서 c-Jun-N-terminal Kinase (JNK)의 역할. 결핵 및 호흡기 질환 2001;50:450-61.
13. Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn NB. Transforming growth factor- β 1 : histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 1989;108:653-60.
14. Zhang K, Rekheter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their repair role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis, a combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994;145:114-25.
15. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T. Transforming growth Factor- β 1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:152-7.
16. Chan ED, Worthen GS, Augustin A, Lapadat R, Riches DWH. Inflammation in the pathogenesis of interstitial lung diseases. In : Schwarz MI, King TE, Jr., editors. *Interstitial lung diseases*. 3rd ed. London : B.C. Decker ; 1998. p.135-64.
17. Chan ED, Winston BW, Uh ST, Wynes MW, Rose DM, Riches DWH. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinase in the expression of inducible nitric oxide synthase by IFN- γ and TNF- α in mouse macrophages. *J Immunol* 1999, 162;415-422.
19. Uh S, Inoue Y, King T, Chan E, Newman L, Riches D. Morphometric analysis of insulin-like growth factor-I localization in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998,158:1626-35.