

## 기관지 천식의 병인에서 Matrix Metalloproteinase의 역할

전북대학교 의과대학 내과학교실

이 용 철

=Abstract=

### Role of Matrix Metalloproteinase in the Pathogenesis of Bronchial Asthma

Yong Chul Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Medical School, Chonju, Korea*

**Background** : Toluene diisocyanate(TDI) is a leading cause of occupational asthma. However, the pathogenesis of TDI-induced asthma is largely unknown because there is no suitable animal model.

**Methods** : We developed a murine model of TDI-induced asthma by performing two sensitization with 3% TDI and one challenge with 1% TDI using ultrasonic nebulization.

**Results** : Similar to occupational asthma in humans, murine TDI-induced asthma includes findings 1) increased inflammatory cells, including neutrophils and eosinophils, 2) histologic changes, including infiltration of inflammatory cells around bronchioles, thickened airway epithelium, contraction of bronchioles, and accumulation of mucus and debris in the bronchioles, 3) increased MMP-9 activity in inflammatory cells in the airway lumen, 4) airway hyperresponsiveness. Administration of an MMP inhibitor, MMPI-I, remarkably reduced all these pathophysiological findings.

**Conclusion** : Therefore, we conclude that TDI-induced occupational asthma is associated with the induction of MMP-9 in inflammatory cells, and the inhibition of MMP-9 may be a good therapeutic strategy. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2002, 53:101-112)

---

**Key words** : MMP-9, Asthma, TDI.

Author for correspondence:

**Yong Chul Lee, M.D., Ph.D.**

Department of Internal Medicine,

Chonbuk National University Medical School

634-18 Keum-Am Dong, Chonju, 561-712, Korea

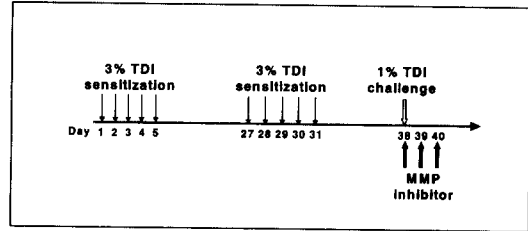
Phone : 063-250-1664 Fax : 063-254-1609 E-mail : leeyc@moak.chonbuk.ac.kr

## 서 론

폴리우레탄 포말, 자동차 페인트, 광택제 등의 생산에 주로 사용되는 toluene diisocyanate (TDI)는 직업성 천식의 주원인으로 알려져 있는 저분자 화합물이다<sup>1,2</sup>. TDI에 의해 유발되는 천식은 기도의 과민성과 염증 반응에 의해 특징 지워지는데<sup>2,3</sup>, 이러한 염증 반응은 기관지 내강으로의 림프구, 호산구, 중성구의 침윤과 관련된다<sup>3,4</sup>. 최근 기관지 천식에서 주관심 대상인 기도 재모형 (airway remodeling)은 다양한 염증 과정의 결과로 나타날 것으로 생각되며, 기도내 세포외 기질(extracellular matrix)의 과도한 침착이 상피하 교원질 침착을 유발한다.

세포외 기질은 동적 구조이고, 그 항상성은 세포외 기질 구성성분의 합성과 분해의 균형에 의한다. Protease와 antiprotease, 특히 matrix metalloproteinase(MMPs)와 그 억제제의 발현 사이의 균형은 정상 상태에서 이러한 항상성을 잘 유지한다. 이러한 protease와 antiprotease의 발현은 몇몇 폐의 염증성 질환의 조직 정비와 재모형 과정에 있어 필수적이다<sup>5-8</sup>. 세포외 기질의 항상성은 폐 기도벽의 기질 성분의 파괴와 침착에 있어서 중요한 역할을 한다. 알레르기성 천식에서 기관지 재모형의 기전이 세포외 기질 침착에 의한다는 것은 잘 알려져 있다. MMP족 중 특히 MMP-9은 천식의 기관지 재모형을 유발하는 주요 단백분해 효소이다<sup>9,10</sup>. 또한, MMP-9은 기저막을 통한 호산구와 중성구의 이동을 유발한다고 알려져 있다<sup>11,12</sup>. 최근에는 MMP가 천식의 쥐 모형에서 기도 과민성의 유발과 ovalbumin 유발성 기도 염증 세포의 침윤에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어졌다<sup>13</sup>. 그러나, TDI 유발성 천식에 있어서 MMP의 역할에 대한 유효한 자료는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서 저자는 MMPs의 연관성을 밝히기 위해 TDI 유발성 천식의 쥐 모형을 개발하였고,



**Fig. 1.** Schematic diagram of the experiments. Mice were sensitized twice by intranasal administration of 3% TDI once a day for 5 consecutive days, with a three-week interval between sensitizations. Seven days later, mice were challenged with 1% TDI for 10 min by ultrasonic nebulization. In the case of MMP inhibitor treatment, MMPI-I was administered intraperitoneally (20 mg/kg body weight) three times at 24-h intervals, beginning at 30 min before the TDI challenge.

기도 염증 세포에서 추출된 MMP-9이 TDI 유발성 천식의 주요 결정인자이며, MMP 억제제가 TDI 유발성 천식에 있어서 효과적인 치료제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 대상 및 방법

### 1. TDI 유발성 천식 쥐 모형의 개발

특정 항원이 없는 암컷 BALB/c 쥐를 한국 과학 연구소(한국 대전)에서 구입하였고, 생후 8-10주 된 쥐를 사용하였다. 본 연구는 전북대학교 의과대학의 동물실험에 대한 윤리 위원회에 의해 승인되었다. 약간 변형된 Sugawara 등<sup>14</sup>의 방법에 따라 ethyl acetate에 3% TDI를 녹인 용액을 5일 연속 매일 한번씩 비강내 주입하여 쥐를 감작시켰다 (Fig. 1).

### 2. 기관지폐포 세척액의 채취와 세포 분석

기관지폐포 세척액은 1% TDI 부하 0, 4, 24, 48,

72시간 후에 sodium pentobarbitone의 과량사용으로 (pentobarbital sodium, 100mg/kg, 복강내 주입) 희생시켜 채취하였다. 0.9% NaCl 용액(0.7ml)을 폐내에 천천히 주입하였고, 주입된 용액의 0.4ml을 각 쥐로부터 동시에 채취하였다. 이러한 기관지폐포 세척액을 모아 4℃에서 원심 분리시킨 후, 상청액은 -70℃로 냉동 유지하였다. Hemocytometer로 총 세포수를 세었고, 기관지폐포 세척액 세포의 도말 후, 세포수 측정을 위해 Diff-Quik solution (Dade Diagnostics of P.R. Inc. Aquada, PR)으로 염색하였다. 신뢰도를 높이기 위하여 각각 전혀 관계가 없는 두 연구원이 현미경을 이용하여 약 400개의 세포를 무작위적으로 4개의 다른 위치에서 세포수를 측정하였다. 연구원간 편차는 5% 미만이었으며, 두 연구원으로부터 얻어진 평균수로 세포수를 계산하였다.

### 3. 기관지폐포세척액에서 MMPs의 측정

MMPs의 전구체(proMMPs)는 manufacturer's protocol(Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan)에 따라 효소 면역분석에 의해 정량화하였다. MMP-9의 가수분해 활성도는 gelatin-zymography를 이용하여 측정하였고, Zymography는 기존에 많은 연구자에 의해 이미 발표되었던 방법대로 시행되었다<sup>9</sup>.

### 4. 조직학적 소견과 면역화학

폐조직은 10%(v/v) 중성 완충 포르말린에 고정하였고, paraffin 조직 덩어리는 4μm로 절편하였으며, 기관지폐포 세척액을 원심 분리하여 얻은 세포는 5분 동안 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 각각의 조직과 세포는 4℃에서 하룻밤동안 anti-MMP-9 항체와 함께 배양되었고, 신호(signal)의 강도는 EnVision system(DAKO, Copenhagen,

Denmark)으로 시각화되었다. 절편은 Meyer's hematoxylin으로 역염색하였다.

### 5. MMP 억제제의 주입

MMP inhibitor I (MMPI-I, IC<sub>50</sub> on MMP-9; 150μM, 4-Abz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH, Calbiochem, San Diego, CA)를 MMP-9 활성도를 억제하는 데 이용하였다. MMPI-I는 TDI 부하(challenge) 30분전에 시작하여 24시간 간격으로 3회 복강내로 (10 또는 20mg/kg) 주입하였다.

### 6. 기도 반응도의 측정

기도 반응도는 TDI 부하 3일후(41일)에 측정하였다. 실험은 Hamelmann 등<sup>15</sup>의 방법에 따라 시행되었다. 결과는 methacholine 각각의 농도 부하후 Penh의 증가 백분율로 나타내었고, 기저 Penh(생리 식염수 부하후)을 100%로 나타내었다.

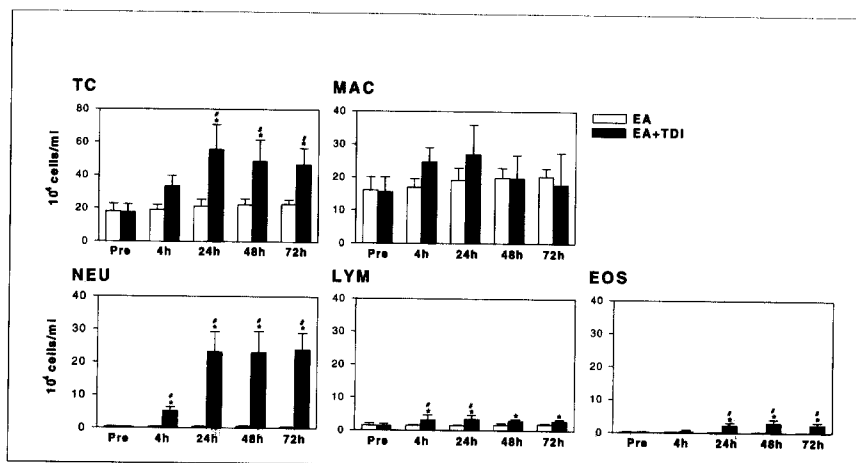
### 7. 통계 분석

자료는 평균±표준 편차(mean±S.D.)로 나타내었다. 통계적 비교는 one-way ANOVA로 시행한 후 Fisher's test로 시행하였다. 관련성은 Spearman's rank test를 이용하여 측정하였고, 통계학적 의의성은 p<0.05로 정의하였다.

## 결 과

#### 1. TDI 감작 부하군의 기관지폐포 세척액 염중 세포수의 증가

부하전 시기에 채취된 기관지폐포 세척액내 세포는 주로 폐포 대식세포였으며, TDI 흡입 후에도 대식세포 수의 유의한 변화는 없었다. 그러나 TDI



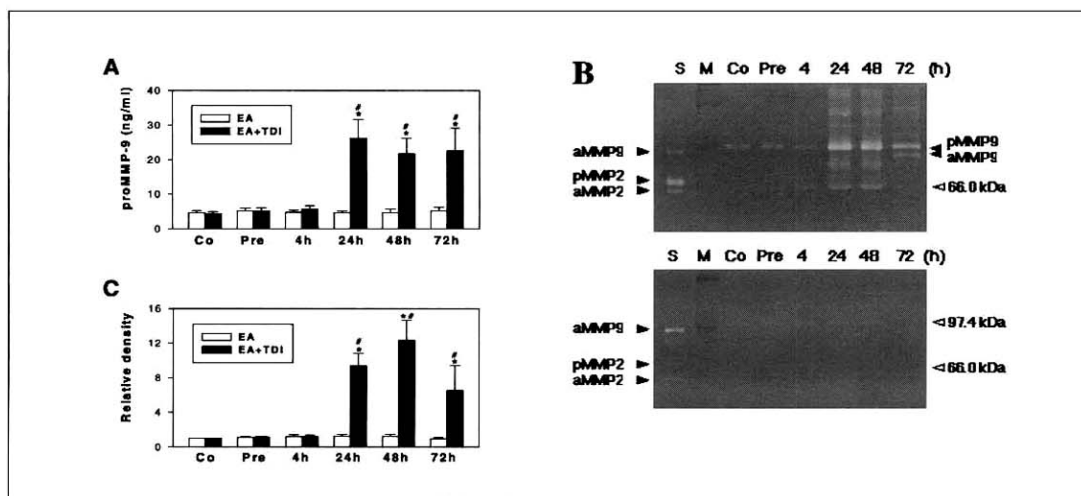
**Fig. 2.** Effect of TDI challenge on total and differential cellular components in the BAL fluids. A. Smears of BAL fluids at 24 hr after challenge are stained with Diff-Quik solution. Bar indicates scale 50 m. B. The number of each cellular component was counted. Data represent the mean±S.D. from five independent experiments. Pre, 24 hr before the challenge. \*,  $p < 0.05$  versus Pre; #,  $p < 0.05$  versus ethyl acetate (EA).

흡입 24시간 후, 기관지폐포 세척액에서 중성구가 현저한 증가를 나타내었고 TDI 흡입 후 72시간까지 중성구는 증가되어 있었다. 림프구와 호산구의 수는 상대적으로 적은 분포를 보였으나 TDI 흡입 4-72시간 후에는 유의한 증가를 보였다. 전체적으로, 총 세포수는 TDI 흡입 24-72시간 후에 가장 많은 분포를 보였다 (Fig. 2). 그러나 이에 비하여, 대조군인 ethyl acetate 흡입 군에서는 어떠한 유의한 변화도 나타나지 않았다.

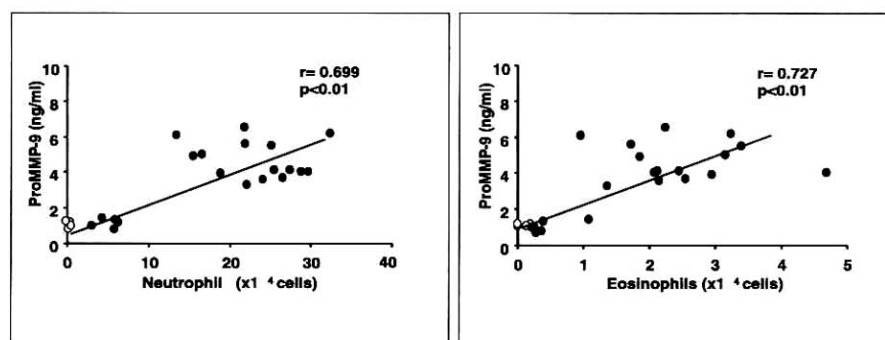
## 2. TDI 감작 부하 군의 기관지폐포 세척액내 MMP-9

부하전 시기에 채취된 기관지폐포 세척액의 효소 면역분석에서 proMMP-9이 주된 MMP이었으며, TDI에 노출된 군의 proMMP-9은 TDI 흡입 24시간 후에 약 5.7배로 증가하였고, 이는 72시간 후까지도 같은 수준으로 유지되었다. 이에 비하여, 대조군인 ethyl acetate 흡입 군에서는 proMMP-9양

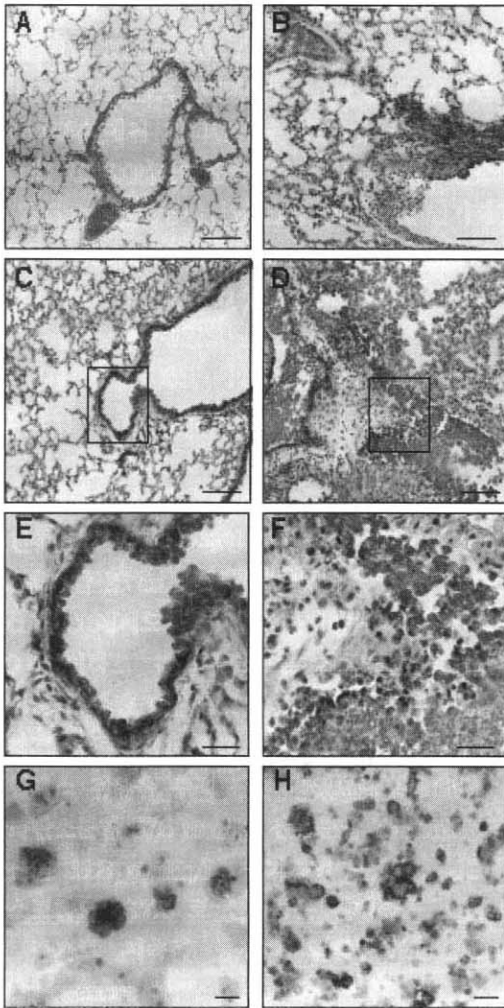
에 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 3A). 또 한 실험 기간동안 채취된 기관지폐포 세척액에서 proMMP-1, proMMP-2, proMMP-3 등은 전혀 측정되지 않았다. 기관지폐포 세척액에서의 MMP-9 profile은 gelatin-zymography에 의해 반정량적으로 측정되었는데, 효소 면역분석으로부터 얻어진 결과를 종합하면, TDI 부하 후 gelatin-zymography에서 92-kDa pro MMP-9 band가 우세적이었다(Fig. 3B). proMMP-9 양은 부하전 시기와 비교하여 TDI 흡입 24, 48, 72시간 후에 각각 3.1, 2.1, 2.3배씩 증가하였고(Fig. 3B와 3C), 활성 MMP-9(약 84kDa)은 72시간에 가장 우세하게 관찰되었으며, 흥미롭게도 TDI 흡입 24시간 후와 48시간 후에 여러 불확실한 gelatinolytic band가 관찰되었다(Fig. 3B). 이에 비하여, ethyl acetate 흡입 후에는 불확실한 gelatinolytic band나 MMP-9 양의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3B와 3C). 또한, 같은 시점에 채취된 기관지폐포 세척액의 중성구와 호산구의 수는 proMMP-9와 유의한



**Fig. 3.** Effect of TDI challenge on MMP secretions in the BAL fluids. A. Enzyme immunoassay of proMMP9 and proMMP2. B. Gelatin-zymography. In each lane, 100 ng of protein from each BAL fluid was loaded. The animals were challenged with TDI in ethyl acetate (upper panel) or EA alone (lower panel). Lane S contains standards: the proform of MMP-9 (pMMP9), the active form of MMP-2 (aMMP2), and the MMP-2 (pMMP2). Molecular weight markers (open arrowheads on the right) were used to estimate molecular masses. Co, no treatment; Pre, before the challenge; 4, 24, 46, and 72 hr, after challenge. C. Densitometric analyses of the zymographs are presented as the relative ratio of induction of proMMP9 before and after the challenge. The proMMP9 in the BAL fluid of control mice (Co) is arbitrarily presented as 1. Data represent the mean $\pm$ S.D. from five independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus Pre; #,  $p < 0.05$  versus ethyl acetate (EA).



**Fig. 4.** Correlation between the levels of proMMP-9 and the number of neutrophils (A) or eosinophils (B) in the BAL fluids from sensitized mice challenged with TDI. Statistical analysis by Spearman's rank test.



**Fig. 5.** Effect of TDI challenge on MMP9 secretions in the bronchioles and BAL fluids. Mice were treated as described in Fig. 1 and sampling was performed at 72 hr after ethyl acetate alone (A, C, E and G) or TDI in ethyl acetate (B, D, F and H). Representative hematoxylin and eosin-stained sections of the lungs (A and B). Representative light microscopy of MMP9-positive cells in the lungs (C and D). Dark brown color indicates MMP9-positive cells. Higher magnification of bronchioles in C and D (E and F). Representative light microscopy of MMP9-positive cells in the BAL fluids (G and H). Brownish pink color indicates MMP9-positive cells. Bar indicates scale 50  $\mu$ m (A, B, C, D, G and H) or 5  $\mu$ m (E and F).

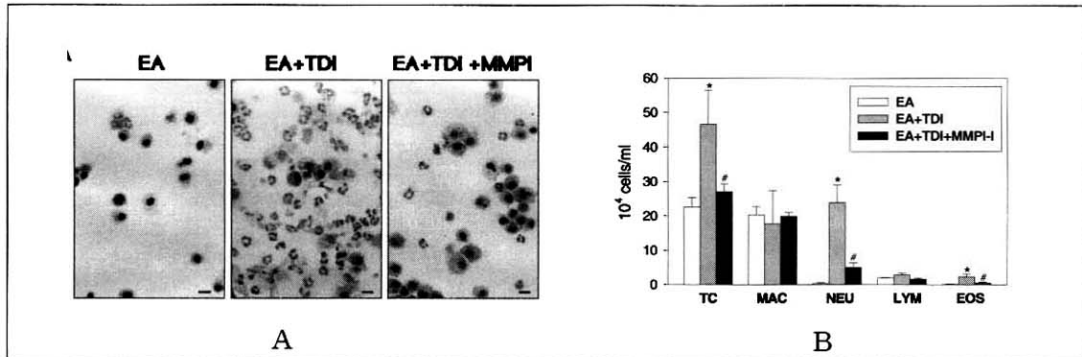
연관성을 나타내었다. (중성구  $r = 0.699$ ,  $p < 0.01$ , 호산구  $r = 0.727$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 4).

### 3. 기도의 조직학적 소견과 MMP-9의 발현

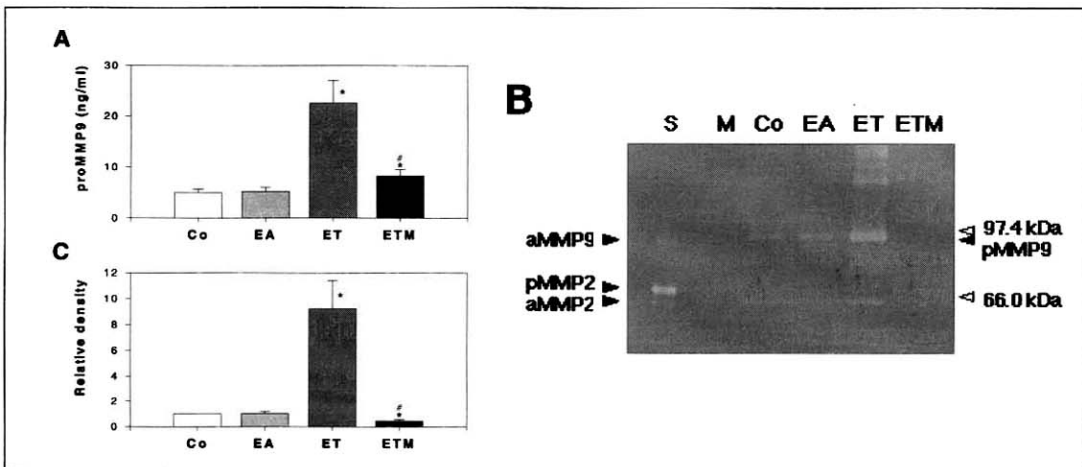
조직학적으로 TDI에 노출된 쥐는 천식의 전형적 병리소견을 나타내었다. 풍부한 염증 세포, 특히 중성구가 세기관지 주위에 침윤되었고, 기도 상피세포가 비후되었으며, 세기관지 내강에 점액과 조직파편이 축적되었다(Fig. 5B). TDI에 노출된 쥐의 폐 조직은 면역 조직화학적으로 세기관지 주위의 염증세포와 세포의 기질, 그리고 기도 내강의 염증세포와 조직파편에서 면역활성을 가지는 MMP-9에 대하여 양성 소견을 보였다(Fig. 5D, 5F). 그러나 대조군에서는 기도 상피세포에서만 MMP-9에 대하여 양성을 보였다(Fig. 5C, 5E). TDI에 노출된 쥐의 기관지폐포 세척액의 면역세포 분석에 따르면, 면역활성 MMP-9은 대식세포, 중성구, 호산구를 담은 세포를 포함하여 기관지폐포 세척액 세포에 국소화되어 있었으나(Fig. 5H), 대조군에서는 MMP-9 양성 세포가 거의 검출되지 않았다(Fig. 5G).

### 4. TDI 감작 부하군의 세포병리학적 MMPI-I의 효과

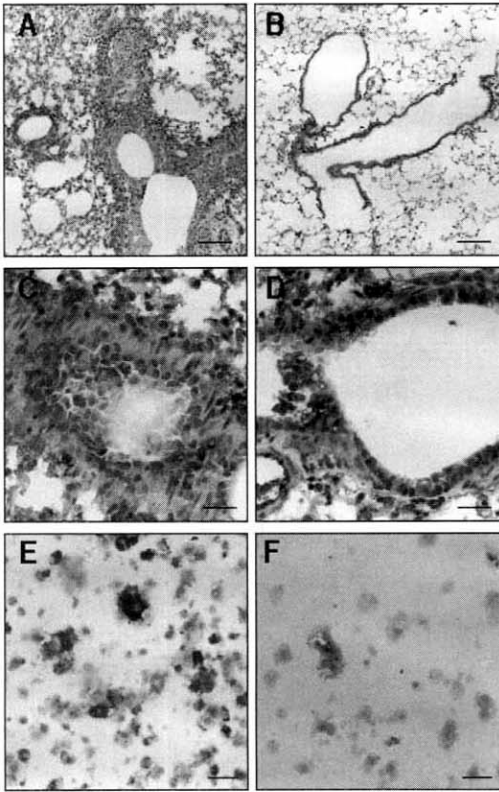
MMPI-I(20mg/kg, 복강내 주입)를 매일 주입하였을 때, TDI 흡입 72시간후의 기관지폐포 세척액 내의 총세포, 중성구, 호산구 수의 증가 성향이 억제되었으며(Fig. 6), 또한 MMPI-I의 주입시 대조군과 비교하여 TDI 흡입 72시간 후 기관지폐포 세척액내 MMP-9의 활성도와 양이 감소되었고(Fig. 7A, 7B), 기도 내강의 조직파편과 염증세포의 수, 세기관지 주변의 염증 세포의 침윤, 기도 상피세포의 비후가 모두 현저한 저하를 보였다(Fig. 8). MMPI-I 치료군의 기관지폐포 세척액의



**Fig. 6.** Effect of MMPI-I on total and differential cellular components of BAL fluids in TDI-sensitized mice. Mice were treated as described in Fig. 1. A. Smears of BAL fluids after challenge are stained with Diff-Quik solution. B. The number of each cellular component was counted. Data represent the mean $\pm$ S.D. from five independent experiments. TC, total cell; MAC, macrophage; NEU, neutrophil; LYM, lymphocyte; EOS, eosinophil; EA, ethyl acetate. \*,  $p < 0.05$  versus EA; #,  $p < 0.05$  versus EA+TDI.



**Fig. 7.** Effect of MMPI-I on MMP secretions in the BAL fluids of TDI-sensitized and challenged mice. Mice were treated as described in Fig. 1 and sampling was performed at 72 hr after TDI challenge. A. Enzyme immunoassay of proMMP9 and proMMP2. B. Gelatin-zymography. Five microliters of sample were loaded. Lane S contains standards: the proform of MMP-9 (pMMP9), the active form of MMP-2 (aMMP2), and the MMP-2 (pMMP2). Lane M contains standard molecular weight markers (open arrowheads on the right). Co, no treatment; EA, ethyl acetate; ET, EA plus TDI; ETM, EA plus TDI plus MMPI-I. C. Densitometric analyses of the zymographs are presented as the relative ratio of induction of proMMP9 before and after the challenge. The proMMP9 level in the BAL fluid of control mice (Co) is arbitrarily presented as 1. Data represent the mean $\pm$ S.D. from five independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus EA; #,  $p < 0.05$  versus ET.



**Fig. 8.** Effect of MMPI-I on MMP9 secretions in the bronchioles and BAL fluids in the TDI-sensitized and challenged mice. Mice were treated as described in Fig. 1 and sampling was performed at 72 hr after TDI plus EA (A, C and E) or TDI plus EA plus MMPI (B, D and F). Representative hematoxylin and eosin-stained sections of the lungs (A and B). Representative light microscopy of MMP9-positive cells in the bronchioles (C and D). Dark brown color indicates MMP9-positive cells. Representative light microscopy of MMP9-positive cells in the BAL fluids (E and F). Brownish pink color indicates MMP9-positive cells. Bar indicates scale 50  $\mu$ m (A, B, E and F) or 5  $\mu$ m (C and D).

면역세포 분석시 면역활성 MMP-9이 현저히 감소되어 있었다(Fig. 8E). 이러한 결과는 염증세포, 특히 MMP-9을 표현하는 중성구와 호산구의 기관지 내강으로의 이동이 MMPI-I에 의해 강력히 억제됨을 시사한다고 할 수 있다.

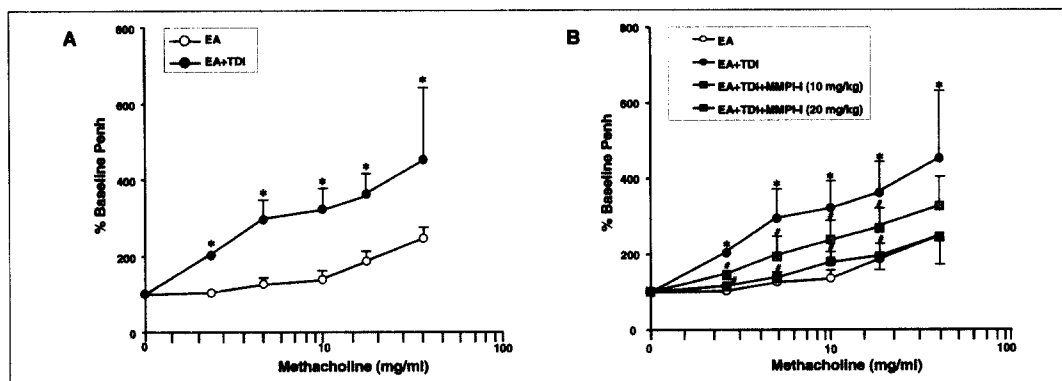
## 5. TDI 유발성 기도 과민성을 억제한 MMPI-I

저자는 methacholine 용량 증가에 따른 Penh 백분율의 증가로 기도 반응성을 측정하였다. TDI 감작 부하된 쥐에서 Penh 백분율의 용량-반응 곡선은 대조군과 비교하여 좌측 편위되었으며, 또한 methacholine(2.5-50mg/ml) 주입에 따른 Penh 백분율의 증가는 대조군과 비교하여 TDI 감작 부하군에서 유의있게 증가되었다(Fig. 9A). 이러한 소견은 TDI 감작 부하군에서 methacholine에 대하여 기도 과민성을 반영하는 소견이다. MMPI-I(20mg/kg, 복강내 주입)를 매일 주입하였을 때, TDI 유발성 기도 과민성은 감소하였으며, Methacholine의 용량 증가에 따른 용량 의존적 반응을 보여, MMPI-I 치료군은 비치료군과 비교하여 Penh 백분율 증가의 용량-반응 곡선은 우측 편위되었다(Fig. 9B).

## 고 찰

TDI를 비롯한 isocyanate chemicals는 최근 선진국에서 직업성 천식의 가장 흔한 원인으로 알려져 있다<sup>16</sup>. 비록 그 병인에 관하여 아직 논란의 여지가 있지만, TDI 유발성 천식은 TDI에 대한 기도 과민성에 의해 특징 지워진다. 또한, TDI 유발성 천식의 중요한 병태생리학적 특징은 기도의 염증 반응이다. 본 연구에서 저자는 TDI 유발성 천식의 쥐 모형을 개발하였다. 이러한 쥐는 사람의 TDI 유발성 천식의 전형적 병태생리학적 특징을 가진다. 즉, 기도 과민성; 세기관지 주위의 염증 세포,





**Fig. 9.** Effect of TDI challenge (A) and MMPI-I (B) on airway responsiveness in the TDI-sensitized and challenged mice. A. Mice were treated as described in Fig. 1 and airway responsiveness was measured at 72 hr after TDI challenge. Airway responsiveness to aerosolized methacholine was measured in unrestrained, conscious mice. Mice were placed into a chamber and were nebulized first with saline, then with increasing doses (2.5 to 50 mg/ml) of methacholine for 3 min for each nebulization. Breathing parameters were measured for 3 min after each nebulization, and Penh values were determined. Data represent the mean±S.D. from five independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus ethyl acetate (EA). B. Mice were treated as described in Fig. 1 and airway responsiveness was measured at 72 hr after TDI challenge. Data represent the mean±S.D. from five independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus EA; #,  $p < 0.05$  versus EA+TDI.

특히 중성구와 호산구의 침윤; 기도 상피세포의 비후; 기도 내강내의 염증 세포와 조직파편; 기도내 MMP-9의 발현 증가와 같은 소견을 보이며, 이러한 특징은 사람에서 발생하는 TDI 유발성 천식의 병태생리학적 변화와 일치한다<sup>3,4,17,18</sup>. 따라서, 저자는 이 모형이 TDI 유발성 천식의 연구에 있어 앞으로 매우 유용하리라 생각된다.

저자의 문헌고찰에 의하면 TDI 유발성 천식의 쥐 모형에 있어 granulocyte collagenase (MMP-9)의 유도에 관한 연구로는 본 연구가 처음인 것으로 생각된다. 이에 따르면, MMP-9의 억제 효과를 갖는 MMP 억제제, MMPI-I의 주입은 TDI 유발성 천식의 병태생리학적 특징을 거의 완전히 억제시킨다. TDI 유발성 천식의 기도 염증반응은 기도 내강으로의 염증 세포의 침윤에 의해 특징 지워지며, MMP-9은 이러한 기도로의 염증 세포의 이동을 촉진시키는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 이것

은 기관지폐포 세척액내 중성구, 호산구의 수와 MMP-9의 증가 사이의 연관성을 설명할 수 있다. 따라서, 저자는 MMP-9이 TDI 유발성 천식의 유발에 관여하고 지속시키는 데 있어 중요한 역할을 수행할 것으로 결론지었다.

여러 연구에서 TDI 유발성 천식의 병인에서 중성구의 연관성에 대한 증거를 제공하고 있다<sup>3,4,19</sup>. 사람의 TDI 유발성 천식에서 기관지폐포 세척액의 중성구증은 isocyanate 부하에 의해 유발된 천식 반응과 관련되어 발현된다<sup>19</sup>.

중성구는 inflammatory cytokine과 단백분해 효소(proteolytic enzyme)의 중요한 제공원이 된다<sup>20,21</sup>. 이러한 염증 산물의 지속적 생산은 중성구 유도성 염증을 더욱 활성화시키고, 기도 과민성을 유발한다고 생각되고 있다<sup>22,23</sup>. 이미 보고된 바와 같이<sup>19</sup>, 중성구는 TDI에 의한 기관지 수축을 일으킬 수 있으며, 또한 비록 중성구보다 중요하지는 않으나,

본 TDI 유발성 천식 쥐모형에서 기관지폐포 세척액내 호산구의 수도 증가하였다. 호산구는 활성화되어 호산구 양이온 단백질(eosinophilic cationic protein), 주요 기본 단백질(major basic protein), 혈소판 활성화 인자(platelet activating factor), leukotriene C4와 같은 독성 과립 단백질을 생산한다<sup>24</sup>. 이러한 산물도 기도 과민성을 유발하는데 관여할 것으로 생각된다.

기도 내강 세포와 세척액내 MMP-9의 현저한 증가에 착안하여, 저자는 MMPI-I의 치료 효과를 검증하기 위하여 MMPI-I를 주입하였다. MMPI-I는 모든 병리생리학적 소견에 극적인 효과를 나타내었는데, MMPI-I 효과에 대한 한가지 가능성 있는 기전은 MMP-9이 중성구와 호산구를 포함한 염증 세포의 기도로의 이동이 가능하도록 세포의 기질을 변화시킨다는 것이다. 본 연구에서 MMP 억제제 투여가 단지 기관지 내강의 구성성분의 MMP-9 활성화도 뿐 아니라, 내피세포와 외피세포의 기저막을 통한 염증 세포의 이동을 억제시킴이 증명되었다. 이러한 염증 세포 없이 다른 병리적 변화는 발생하지 않는다. 이로한 기전으로 MMP 억제제는 기도의 과민성을 억제시킨다고 생각된다. 본 연구의 결과는 MMP 억제제가 TDI 유발성 천식에 대한 훌륭한 치료제로서 향후 연구의 가치가 있음을 강력히 시사한다.

## 요 약

### 연구배경 :

알레르기성 천식에서 기관지 재모형의 기전이 세포외 기질 침착에 의한다는 것은 잘 알려져 있다. MMP중증 특히 MMP-9은 천식의 기관지 재모형을 유발하는 주요 단백분해 효소이다. 또한, MMP-9은 기저막을 통한 호산구와 중성구의 이동을 유발한다고 알려져 있다. 최근에는 MMP가 천식의 쥐 모형에서 기도 과민성의 유발과 oval-

bumin 유발성 기도 염증 세포의 침윤에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어졌다. 그러나, TDI 유발성 천식에 있어서 MMP의 역할에 대한 유효한 자료는 거의 없는 실정이다.

### 연구방법 :

특정 항원이 없는 암컷 BALB/c 쥐를 약간 변형된 Sugawara 등의 방법에 따라 ethyl acetate에 3% TDI를 녹인 용액을 5일 연속 매일 한번씩 비강내 주입하여 쥐를 감작시켰다. 기관지폐포 세척액의 채취하여 세포 분석과 MMPs의 측정하였고 폐조직에서 면역화학적 검사를 시행하였다. MMP 억제제를 TDI 부하(challenge) 30분전에 시작하여 24시간 간격으로 3회 복강내로 (10 또는 20mg/kg) 주입하고 기도 반응도를 측정하였다.

### 결 과 :

TDI 감작 부하군에서 기관지폐포 세척액 염증 세포수와 MMP-9 및 폐조직의 면역화학적 검사상 MMP-9의 발현의 유의한 증가가 관찰되었다. MMP 억제제투여후 TDI 감작 부하군에서 기관지폐포 세척액 염증 세포수와 MMP-9 및 폐조직의 면역화학적 검사상 MMP-9의 발현의 유의한 감소를 보였고 기도 과민성을 억제하였다.

### 결 론 :

본 연구의 결과는 MMP 억제제가 TDI 유발성 천식에 대한 훌륭한 치료제로서 향후 연구의 가치가 있음을 강력히 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Chan-Yeung M. Occupational asthma. Chest 1990;98:148S-61S.
2. Park HS, Nahm DH. Isocyanate-induced occupational asthma : challenge and immunologic studies. J Korean Med Sci 1996; 11:314-8.
3. Mapp CE, Boschetto P, Zocca E, Milani GF,

- Pivrotto F, Tegazzin V et al. Pathogenesis of late asthmatic reactions induced by exposure to isocyanates. *Bull Eur Physio-pathol Respir* 1987;23:583-6.
4. Boschetto P, Fabbri LM, Zocca E, Milani G, Pivrotto F, Dal Vecchio A et al. Prednisone inhibits late asthmatic reactions and airway inflammation induced by toluene diisocyanate in sensitized subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 80:261-7.
5. Delacourt C, Le Bourgeois M, DOrtho MP, Doit C, Scheinmann P, Navarro J et al. Imbalance between 95 kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:765-74.
6. Hayashi T, Stetler-stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA et al. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996;149:1241-56.
7. Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM. Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:346-52.
8. Sepper R, Kontinen YT, Ding Y, Takagi M, Sorsa T. Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. *Chest* 1995;107:1641-7.
9. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airway obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158: 1945-50.
10. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim JJ. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:356-64.
11. Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Migration of eosinophils through basement membrane component in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:519-28.
12. Delclaux C, Delacourt C, DOrtho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14: 288-95.
13. Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T et al. Inhibition of matrix metalloproteinase prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 1999;162: 4212-19.
14. Sugawara Y, Okamoto Y, Sawahata T, Tanaka K. An asthma model developed in the guinea pig by intranasal application of 2,4-toluene diisocyanate. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:95-101.
15. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG et al.

- Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:766-75.
16. Park HS, Hwang SC, Nahm DH, Yim HE. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in airway mucosa of toluene diisocyanate (TDI)-induced asthma: comparison with allergic asthma. *J Korean Med Sci* 1998;13:21-6.
17. Fabbri LM, Picotti G, Mapp CE. Late asthmatic reactions, airway inflammation and chronic asthma in TDI sensitized subjects. *Eur Respir J* 1991;13:136S-8S.
18. Park HS, Jung KS, Kim HY, Nahm DH, Kang KR. Neutrophil activation following TDI bronchial challenges to the airway secretion from subjects with TDI-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;29:1395-401.
19. Fabbri LM, Boschetto P, Zoca E, Milani G, Pivrotto F, Plebani M et al. Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:36-42.
20. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995;16:21-6.
21. Sibille Y, Marchandise FX. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J* 1993;6: 1529-43.
22. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1532-9.
23. Meltzer S, Goldberg B, Lad P, Easton J. Superoxide generation and its modulation by adenosine in the neutrophils of subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83: 960-6.
24. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma : current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:422-36.
-