

TGF- β 1으로 자극한 사람중피세포주에서 조직플라스미노겐 활성제가 미치는 영향

건양대학교 의과대학 ¹미생물학교실, ²내과학교실, ³명곡의과학연구소

이정림^{1,3}, 전수진^{1,3}, 유영춘^{1,3}, 김지혜², 이유미², 권선중^{2,3}, 손지웅^{2,3}, 최유진^{2,3}, 나문준^{2,3}

The Effect of Tissue Plasminogen Activator on TGF- β 1 Pre-Treated Human Mesothelial Cell Line

Junglim Lee, M.D.^{1,3}, Soo Jin Jeon, B.S.^{1,3}, Young Choon Yoo, Ph.D.^{1,3}, Ji Hye Kim, M.D.², Yu Mi Lee, M.D.², Sun Jung Kwon, M.D.^{2,3}, Ji Woong Son, M.D.^{2,3}, Eugene Choi, M.D.^{2,3}, Moon Jun Na, M.D.^{2,3}

Departments of ¹Microbiology, ²Internal Medicine, and ³Myunggok Research Institute of Medical Science, Konyang University College of Medicine, Daejeon, Korea

Background: In an effort to find alternative therapeutic agents to prevent excessive fibrosis as a sequela to complicated parapneumonic effusion or empyema, we examined the effect of tissue plasminogen activator (tPA) as a fibrinolytic agent combined with talc or transforming growth factor (TGF)- β 1 in a human pleural mesothelial cell line, MeT-5A.

Methods: MeT-5A cells were stimulated with various doses of talc, doxycycline or TGF- β 1 for 24 h and then were treated with tPA for an additional 24 h. Cell viability was measured by MTT assay. The production of interleukin (IL)-8 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the culture supernatants was measured by ELISA. Real-time PCR was carried out for measurement of type I collagen mRNA.

Results: MeT-5A cells treated with talc showed a dose-dependent increase in production of IL-8. Talc also increased production of type I collagen mRNA at low doses, but talc did not influence the induction of VEGF. Addition of tPA to talc-stimulated cells showed further increases in the production of IL-8, but tPA did not influence the production of VEGF or type I collagen mRNA. TGF- β 1 increased the production of both VEGF and collagen type I mRNA, both of which were effectively inhibited by additional tPA treatment in MeT-5A cells.

Conclusion: TGF- β 1 is a potent inducer of collagen synthesis without induction of IL-8 in MeT-5A cells. Addition of tPA after TGF- β 1 stimulation inhibited further fibrosis by direct inhibition of collagen mRNA synthesis as well as by inhibition of VEGF production.

Key Words: Humans; Mesothelium; Cell Line; Tissue Plasminogen Activator; Transforming Growth Factor; Collagen

서 론

중피세포는 흉막과 복막 표면을 덮고 있는 세포로서 포식작용과 함께 세포용해 성분, 응고물질, 세포 외 기질성

분을 분비하고, 포식세포에 대한 화학주성분을 분비하여 각종 염증 반응이나 흉막 비후와 관련된 섬유화에 중요한 역할을 하는 세포이다¹. 중피세포는 tumor necrosis factor (TNF)- α , platelet derived growth factor (PDGF), epithelial growth factor (EGF) 등의 다양한 성장촉진 물질들에 의해 세포증식이 촉진되며 세포자멸사(apoptosis)를 통해 일정한 세포 수를 유지한다고 알려져 있다¹. 흉막 중피세포에 대해서는 재발성 흉막염 치료의 일환으로 시행되는 흉막 유착술(pleurodesis)과 연관되어 다양한 실험이 진행되고 있으며, 중피세포의 염증 후 섬유화에 대한 관심

Address for correspondence: Moon Jun Na, M.D.
Department of Internal Medicine, Konyang University Hospital, 685, Gasuwon-dong, Seo-gu, Daejeon 302-718, Korea
Phone: 82-42-600-8821, Fax: 82-42-600-9090
E-mail: mjnamd@hanmail.net

Received: Jan. 7, 2011

Accepted: Apr. 4, 2011

은 심혈관계, 수술 후 복막의 유착과 같은 분야뿐만 아니라 폐나 흉막의 섬유화에 대한 분야까지 다양하게 집중되어 있어 섬유용해소 등을 이용하여 이를 방지하기 위한 연구도 활발하게 진행되고 있다^{2,5}. 최근에 스트렙토키나아제(streptokinase)를 사용한 대규모 무작위 연구에서 스트렙토키나아제가 농흉이나 부폐렴성 흉막염 이후에 발생하는 흉막의 섬유화를 방지하는데 큰 영향을 미치지 못한다는 연구발표⁶ 이후에 많은 연구자들이 흉막비후 방지를 위한 대체적인 약물을 찾기 위해 노력 중에 있다.

플라스미노겐 활성화제(plasminogen activator)는 이전부터 혈전용해 치료에 이용되고 있는 약물로, 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue-type plasminogen activator, tPA)와 우로키나제 플라스미노겐 활성화제(urokinase-type plasminogen activator, uPA)로 구분된다⁷. 조직 플라스미노겐 활성화제 및 우로키나제 플라스미노겐 활성화제는 다양한 연구를 통해 섬유소 용해 능력뿐 아니라 혈관내피세포, 피질 별아교세포(cortical astrocyte) 등 다양한 종류의 세포들에서 염증에 관여하는 시토카인 및 케모카인 생산에 관여한다고 보고되었다⁷. 또한 혈관내피세포, 종양세포 등에서 TNF- α 등의 염증성 시토카인에 의해 이들의 발현이 조절될 수 있다고 보고되었다⁸. 최근 몇 개의 중례 및 비조절 연구⁹⁻¹²를 통하여 조직 플라스미노겐 활성화제를 부폐렴성 흉막염 및 농흉을 가진 환자에서 섬유용해제로서 흉강 내로 투여한 결과 일부분의 환자에서 임상적인 호전과 무관하게 배액되는 흉수의 양이 증가하는 결과를 보였으나, 최근까지 대규모 연구결과는 없는 상태이다.

본 연구에서는 흉막염 및 농흉에서 합병증으로 발생하는 흉막비후를 줄이기 위한 다른 유용한 섬유용해제를 찾기 위해 사람의 정상 흉막 중피세포 유래주인 MeT-5A 세포주에서 talc, doxycycline 및 transforming growth factor (TGF)- β 1 등의 흉막유착제를 투여하여 흉막유착과 같은 상황을 만들고, 이에 섬유용해제인 조직 플라스미노겐 활성화제를 추가 처리한 후 나타나는 중피세포의 변화를 관찰하고, 흉막비후와 관련된 시토카인 및 콜라겐 mRNA 발현 변화를 측정하여 조직 플라스미노겐 활성화제의 작용 기전을 밝혀보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 재료

세포주 배양에 Medium 199, 우태아혈청(fetal bovine serum), Eagle's BSS, L-glutamine, epidermal growth fac-

tor (EGF), 중탄산나트륨, 항생제, trypsin-EDTA (Gibco Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA)와 Hydrocortisone 및 insulin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 세포주 자극에 사용한 흉막유착제로는 asbestos-free talc powder (Sigma, St. Louis, MO, USA), doxycycline (Fujisawa, Deerfield, IL, USA)과, recombinant human TGF- β 1 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였다. 섬유용해소로는 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA, Boehringer ingelheim, Germany)를 사용하였다.

2. 세포주 배양

MeT-5A 사람중피세포주는 ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. MeT-5A 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 Eagle's BSS, 75 mM L-glutamine, 1.25 g/L 중탄산나트륨, 3.3 mM EGF, 400 nM hydrocortisone, 870 nM insulin, 20 mM HEPES와 10% 우태아 혈청이 함유된 Medium 199로 배양하였다.

3. 중피세포 생존율 측정

세포생존율을 평가하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 시행하였다¹³. MeT-5A 세포(1×10^4 개/well)를 96 well-flat-bottom plated에 분주하고 18시간 이상 CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 바닥에 붙도록 한 후, 다양한 농도의 talc, doxycycline, TGF- β 1 및 조직 플라스미노겐 활성화제가 포함된 배양액으로 교체한 후 24시간 배양하였다. 각 well당 MTT 용액 50 μ L를 첨가하고 37°C에서 4시간 반응시켰다. 4시간 후 원심분리로 배양액을 제거하고 침전물에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 침전물을 녹인 후 환원된 MTT를 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570 nM의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값을 이용하여 세포생존율을 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. 시토카인 측정

Talc, doxycycline 및 TGF- β 1으로 각각 자극한 MeT-5A 세포 배양액에 포함된 IL-8 또는 VEGF를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 제조사의 권장 방법에 의해 측정하였다. 간략하면, anti-cytokine capture antibody를 coating buffer (0.1 M carbonate, pH9.5)에 희

Table 1. Primers used for RT-PCR or real-time RT-PCR

Primer	Sequences
IL-8	Sense: 5'-GTGCCTTGGTTTCTCCTTTATTT-3' Anti-sense: 5'-TGTGGAGTTTTGGCTGTTTAAT-3'
VEGF	Sense: 5'-AACCATGAACTTTCTGCTGTCTT-3' Anti-sense: 5'-TGCAAGTACGTTTCGTTTAACTCA-3'
MMP-9	Sense: 5'-GACTTGAACCTTCAGCTCTTGGAA-3' Anti-sense: 5'-AAGGGTTACCAAATCCCACTTTA-3'
MCP-1	Sense: 5'-CTTCACTTTCTGGGTAAGGAGT-3' Anti-sense: 5'-CCTTGAACAAATACAGCTGGTTC-3'
RANTES	Sense: 5'-CCAGAAACATCCAATTCTCAAAC-3' Anti-sense: 5'-GGTAGAACTGTGGTTCAAGAGGA-3'
Collagen-1	Sense: 5'-TCTCCTGGTGAACAAGGTCC-3' Anti-sense: 5'-GAATCCATCGGTCATGCTCT-3'
β -actin	Sense: 5'-TTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC-3' Anti-sense: 5'-AAGGGTGTACGCAACTAAGTCA-3'

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; VEGF: vascular endothelial growth factor.

석하여 microtiter plate (Costar, Acton, MA, USA)에 분주하고 4°C에서 하룻밤 동안 부착시킨 후, 0.05% Tween 20이 함유된 PBS (0.05% PBST)로 3회 세척하고 10% FBS-PBS로 차단시켰다. 세포배양액을 10% FBS-PBS로 희석하여 평판의 각 well에 분주한 후 상온에서 2시간 반응시킨 후 0.05% PBST로 4회 세척하였다. 검출항체에 biotin이 부착된 항 IL-8 항체 및 항 VEGF 항체와 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin을 10% FBS-PBS로 250배 희석하여 각 well에 첨가한 후 상온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 0.05% PBST로 세척한 후 tetramethyl benzide (TMB)와 hydrogen peroxide의 혼합액을 각 well에 첨가하여 어두운 상온에서 반응시킨 후 2N H₂SO₄ 용액으로 발색반응을 정지시켰다. 흡광도는 ELISA microplated reader (BioRad)를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다. 분비된 시토카인 양은 human recombinant IL-8 또는 VEGF 표준곡선으로부터 유추하여 계산하였다.

5. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

다양한 농도의 조직 플라스미노겐 활성화제로 6시간 자극한 MeT-5A세포로부터 Easy Spin-total RNA extraction kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 μ g은 10 pmole/mL oligo-dT primer (Bioneer, Daejeon, Korea), 10 mM dNTP mix, 20 U reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA)가 포함된 50

μ L의 반응혼합액에서 42°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들었다. 만들어진 cDNA는 IL-8, VEGF, angiopoietin (AGP)-2, matrix metalloproteinase (MMP)-9, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 및 regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) 등과 같은 시토카인 및 케모카인에 대한 primer (Table 1)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. PCR을 수행하기 위하여 cDNA 2 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L, 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), 25 pmol primer, 2 mM MgCl₂를 넣어서 50 μ L의 반응액을 만든 다음 94°C에서 5분간 초기 변성(denaturation) 후, 94°C에서 30초 변성, 57°C에서 30초간 불림(annealing), 72°C에서 30초 확장(extension)하며 30주기 동안 반응시켰다.

6. Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Talc 및 TGF- β 1로 자극한 MeT-5A 세포를 조직 플라스미노겐 활성화제로 24시간 처리한 후 I형 콜라겐 mRNA 양의 변화를 real-time RT-PCR을 이용하여 측정하였다. MeT-5A 세포를 다양한 농도의 TGF- β 1 및 talc가 함유된 배양액에서 24시간 배양한 후 세포배양액을 제거하고 50 μ g/mL의 조직 플라스미노겐 활성화제가 포함된 배양액으로 교체한 후 24시간 배양하였다. 24시간 후 세포를 모아 Easy Spin-total RNA extraction kit (iNtRON, Seoul, Korea)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 μ g은 RT-PCR에서와 같은 방법으로 cDNA를 만들었다.

만들어진 cDNA를 2.5 μ L의 10x PCR reaction buffer, 1 mM의 dNTP, 200 nM의 I형 콜라겐 primer (Table 1), 2.5 μ L의 Syber green (Bio-Rad)과 2.5 U의 Taq polymerase enzyme (Takara, Otsu, Shiga, Japan)이 포함된 25 μ L의 반응액에 첨가한 후, 94°C에서 2분간 열 변성, 58.5°C에서 30초간 불림 후 72°C에서 30초간 확장을 40회 반복하는 PCR 반응을 시행하였다. 이러한 PCR 반응은 iQTM5 cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 시행하였다.

PCR 생산물에 첨가되는 SYBR green의 양을 측정하여 cDNA의 실시간 양적인 변화를 분석하였으며, I형 콜라겐 cDNA양을 β -actin cDNA양과 비교 분석하여 PCR 반응이 시작될 당시의 I형 콜라겐 RNA의 상대적 양으로 표시하였다.

7. 통계 처리

결과는 3회 이상의 독립적인 실험 결과로서 각각의 실험 물질의 투여농도에 따른 세포생존율과 IL-8, VEGF 및 collagen 1 mRNA 수치의 변화는 one-way ANOVA test를

이용하여 분석하였고, tPA 투여 유무에 따른 차이는 student t-test로 비교 분석하였다. 실험결과는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하여 표시하였다. 통계 분석에는 SPSS for Windows version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다.

결 과

1. MeT-5A 세포주에서 talc, doxycycline 및 TGF- β 1 자극에 의한 세포생존율 변화

100~800 μ g/mL 농도의 talc로 자극한 MeT-5A 세포는 아무 자극도 하지 않은 대조군에 비해 세포생존율에 거의 변화가 없었으나 1,000 μ g/mL 이상의 농도로 자극 시 세포 독성이 나타나 생존율이 70%대로 급격히 감소하였다($p < 0.001$, Figure 1A). Doxycycline도 5 μ g/mL까지의 농도에서는 대조군과 비슷한 수준의 생존율을 보였으나 20 μ g/mL의 농도에서는 세포생존율이 의미있게 감소됨을 관찰하였다($p < 0.01$, Figure 1B). TGF- β 1의 경

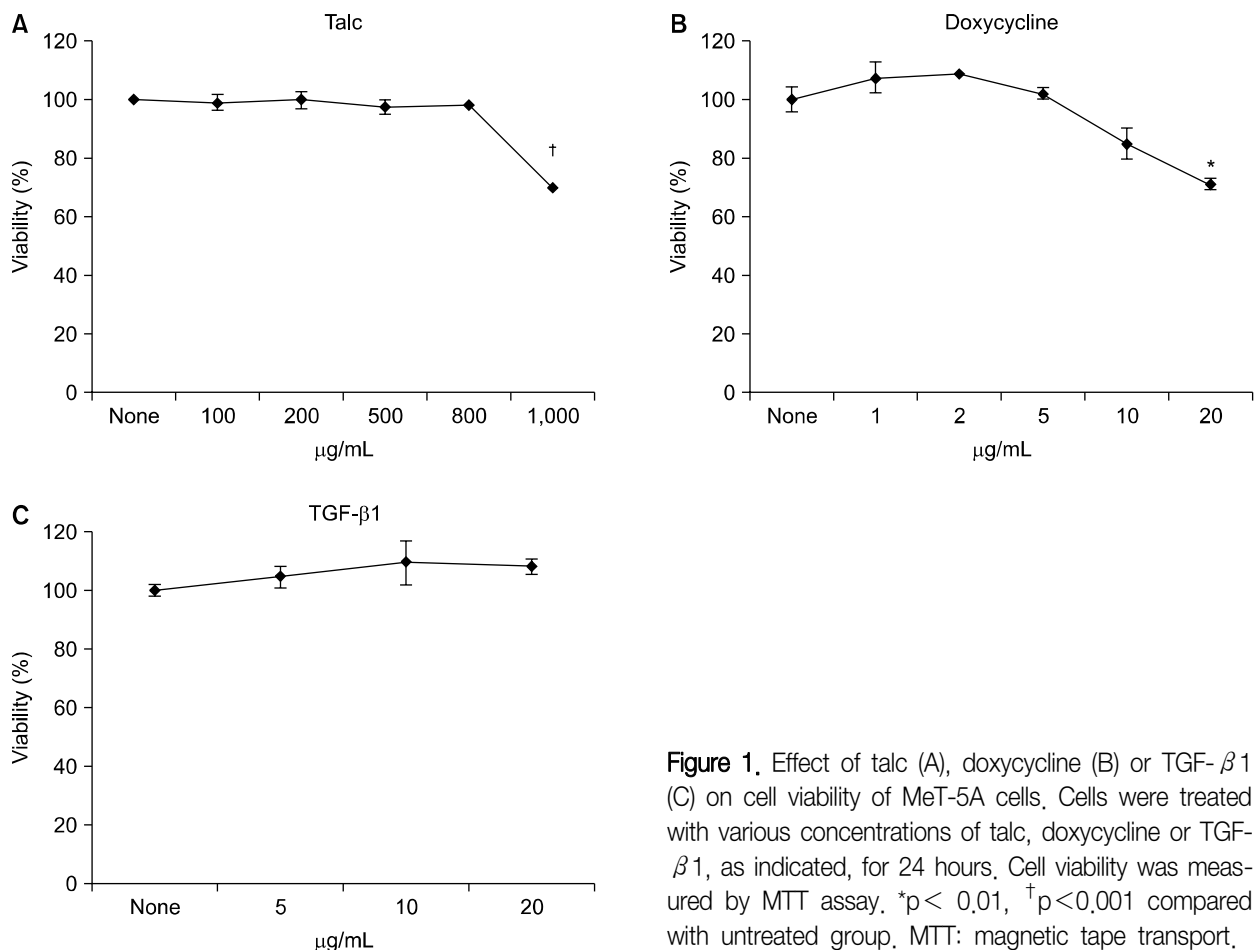


Figure 1. Effect of talc (A), doxycycline (B) or TGF- β 1 (C) on cell viability of MeT-5A cells. Cells were treated with various concentrations of talc, doxycycline or TGF- β 1, as indicated, for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. ^{*} $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$ compared with untreated group. MTT: magnetic tape transport.

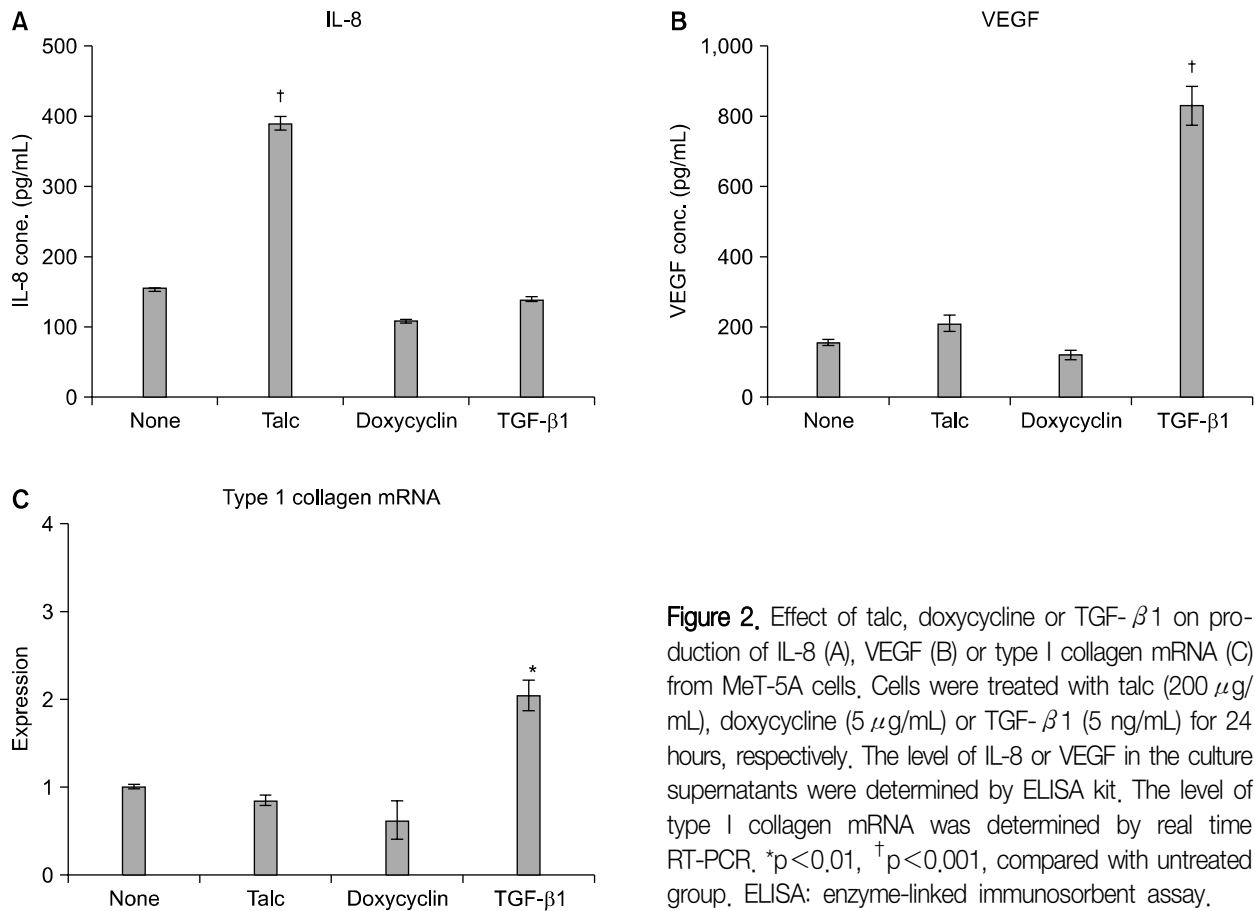


Figure 2. Effect of talc, doxycycline or TGF- β 1 on production of IL-8 (A), VEGF (B) or type I collagen mRNA (C) from MeT-5A cells. Cells were treated with talc (200 μ g/mL), doxycycline (5 μ g/mL) or TGF- β 1 (5 ng/mL) for 24 hours, respectively. The level of IL-8 or VEGF in the culture supernatants were determined by ELISA kit. The level of type I collagen mRNA was determined by real time RT-PCR. * $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$, compared with untreated group. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

우는 실험에 사용된 5, 10 및 20 ng/mL의 농도에서 대조군과 비교하여 세포생존율에 변화가 거의 없음을 관찰하였다(Figure 1C).

2. MeT-5A 세포주에서 talc, doxycycline 및 TGF- β 1 자극에 의한 IL-8, VEGF 및 type I collagen mRNA 생산 변화

MeT-5A 세포주를 아무 자극 없는 배양액(대조군)과 세포생존율 측정(Figure 1)에서 세포 독성을 나타내지 않았던 200 μ g/mL의 talc, 5 μ g/mL의 doxycycline 및 5 ng/mL의 TGF- β 1으로 24시간 자극한 후(Figures 2A, B) talc의 경우 대조군에 비해 IL-8 생산이 의미있게($p < 0.001$) 증가하였으나 VEGF의 증가는 관찰되지 않았으며, 반면, TGF- β 1의 경우 대조군에 비해 VEGF 생산이 의미있게($p < 0.001$) 증가하였으나, IL-8 생산은 변화가 없었다. 또한, 각 흉막유착제로 24시간 자극한 MeT-5A 세포주를 모아 총 RNA를 분리한 후 real-time RT-PCR로 I형 콜라겐 mRNA의 변화를 관찰한 결과(Figure 2C), TGF- β 1

으로 자극한 경우에만 collagen mRNA의 양이 의미있게($p < 0.01$) 증가하였으나 talc 또는 doxycycline에 의해서는 변화가 없음이 관찰되었다.

3. 조직 플라스미노겐 활성화제 자극에 따른 MeT-5A 세포의 변화

5~50 μ g/mL 농도의 조직 플라스미노겐 활성화제로 MeT-5A를 처리하였을 때는 아무런 자극이 없는 대조군과 거의 비슷한 세포생존율이 관찰되었으나 50 μ g/mL보다 높은 농도로 처리할 경우 점차 생존율이 감소하였다($p < 0.01$, Figure 3A). 또한 다양한 농도의 조직 플라스미노겐 활성화제로 MeT-5A를 자극한 후 염증반응 및 흉수생성과 관련된 여러 시토카인 및 케모카인의 발현을 RT-PCR (Figure 3B) 또는 ELISA (Figures 3C, D)로 측정한 결과, IL-8, VEGF 및 MCP-1은 조직 플라스미노겐 활성화제 처리에 의해 대조군과 거의 비슷한 수준의 발현이 관찰되었으나, AGP-2, MMP-9 및 RANTES는 발현이 관찰되지 않았다.

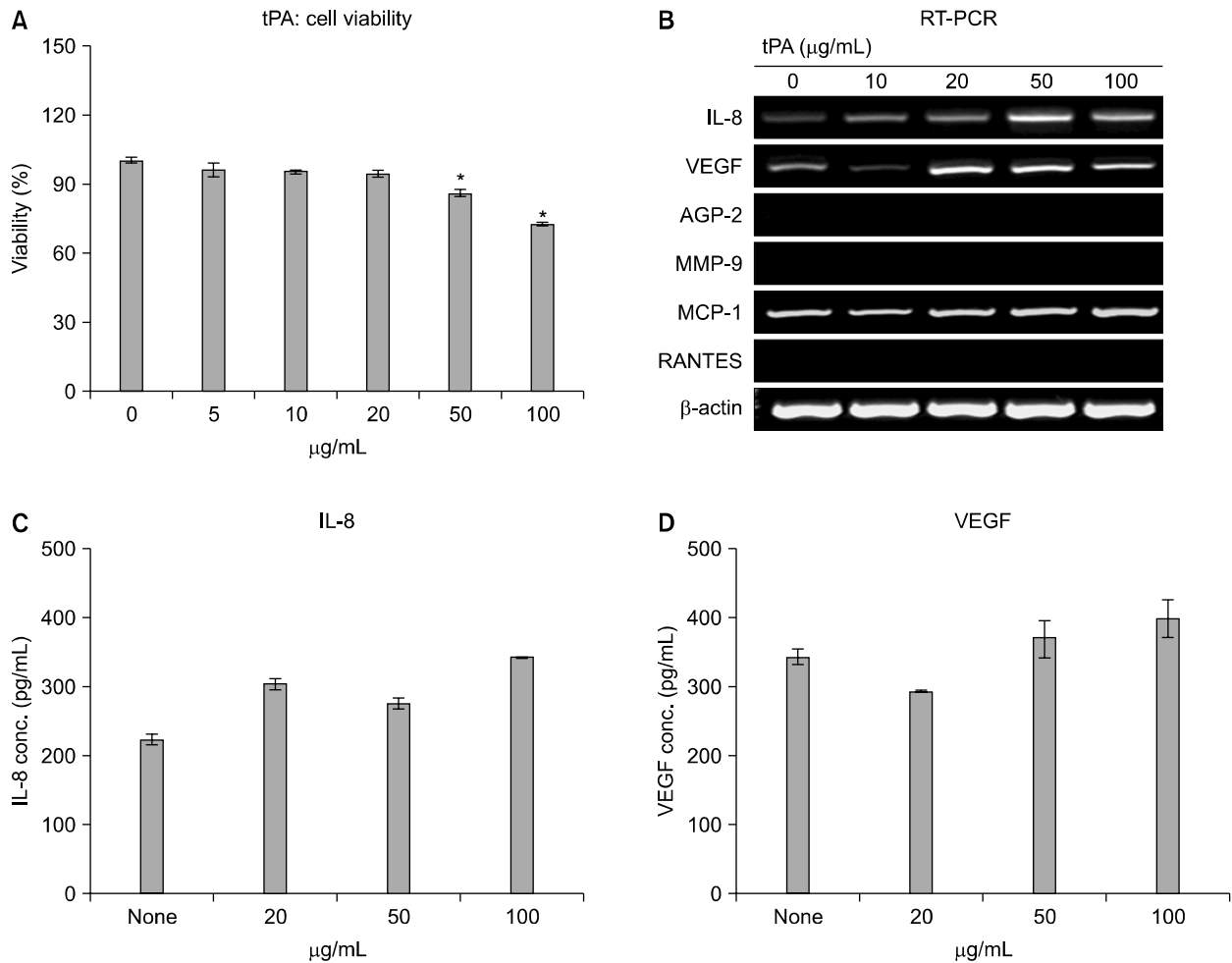


Figure 3. Effect of tPA on MeT-5A cells. Cells were treated with various concentration of tPA, as indicated, for 24 hours. (A) Cell viability was measured by MTT assay. (B) The induction of cytokine mRNA or chemokine mRNA was determined by RT-PCR. The level of IL-8 (C) or VEGF (D) in culture supernatants were determined by ELISA. * $p < 0.01$, compared with untreated group. MTT: magnetic tape transport; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

4. Talc 및 TGF- β 1로 자극한 MeT-5A 세포주에서 조직 플라스미노겐 활성화제 처리에 의한 IL-8 생산 변화

아무 자극을 가하지 않은 대조군에 비해 talc로 24시간 자극한 MeT-5A 세포주는 처리한 talc 농도에 비례하여 IL-8의 생산이 증가하였으며, 이에 24시간 동안 추가로 50 μ g/mL의 조직 플라스미노겐 활성화제로 자극하였을 때 저 농도의 talc 투여에 따른 IL-8 생산 증가를 더 촉진시켰다 (Figure 4A). 반면, TGF- β 1의 경우 대조군과 비교하여 IL-8 생산량의 변화가 없었으며, 조직 플라스미노겐 활성화제 추가자극에 의해서도 IL-8 생산에 변화가 없음을 관찰하였다(Figure 4B).

5. Talc 및 TGF- β 1로 전 처리한 MeT-5A 세포주에서 조직 플라스미노겐 활성화제 자극에 의한 VEGF 생산 변화

Talc로 24시간 동안 자극한 MeT-5A 세포주에서 대조군과 비슷한 수준의 VEGF 양이 측정되었으며, 이후에 조직 플라스미노겐 활성화제의 추가자극에도 변화가 없었다 (Figure 5A). 반면, TGF- β 1으로 24시간 동안 자극한 경우 VEGF 생산이 현저히 증가되었으며, 증가된 VEGF 생산은 조직 플라스미노겐 활성화제 추가 처리에 의해 의미있게 감소됨이 관찰되었다(Figure 5B).

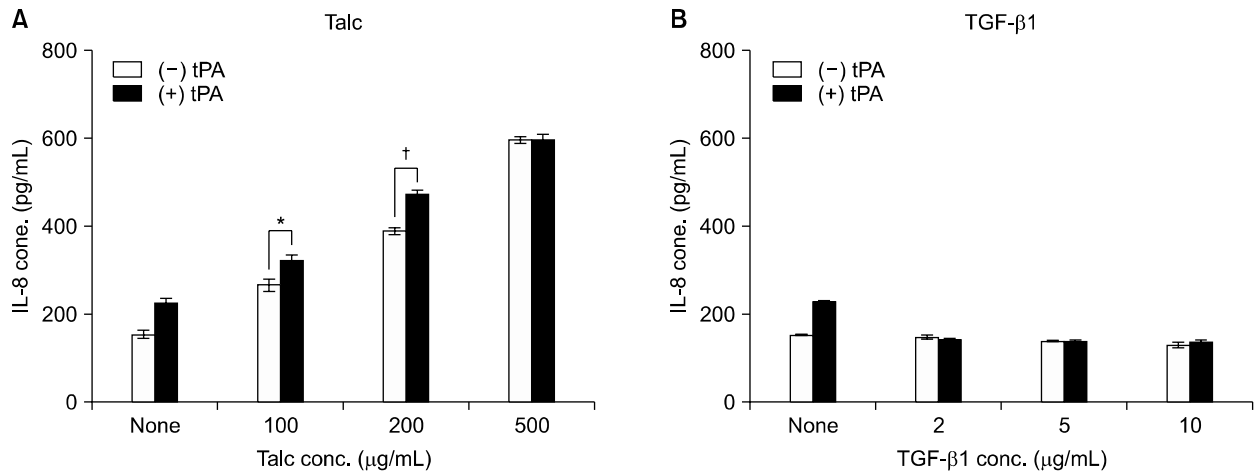


Figure 4. Effect of additional treatment of tPA on IL-8 production from talc- or TGF- β 1-treated MeT-5A cells. Cells were treated with various concentration of talc (A) or TGF- β 1 (B), as indicated, for 24 hours. Then 50 μ g/mL of tPA were added to each cell and cultured for additional 24 hours. The level of IL-8 in culture supernatants were determined by ELISA kit. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ compared with tPA-untreated group. tPA: tissue plasminogen activator; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

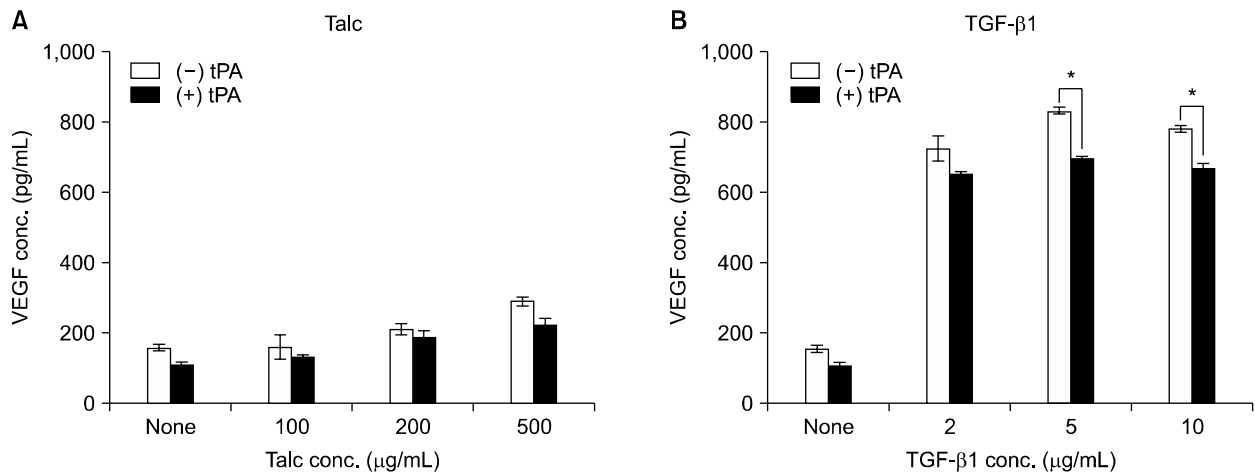


Figure 5. Effect of additional treatment of tPA on VEGF production from talc- or TGF- β 1-treated MeT-5A cells. Cells were treated with various concentration of talc (A) or TGF- β 1 (B), as indicated, for 24 hours. Then 50 μ g/mL of tPA were added to each cell and cultured for additional 24 hours. The level of VEGF in culture supernatants were determined by ELISA kit. * $p < 0.01$ compared with tPA-untreated group. tPA: tissue plasminogen activator; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

6. Talc 및 TGF- β 1로 전 처리한 MeT-5A 세포주에서 조직 플라스미노겐 활성화제 자극에 의한 type I collagen mRNA 변화

Talc로 24시간 동안 자극한 MeT-5A 세포주는 talc 농도를 증가시키에 따라 I형 콜라겐 mRNA 양이 점차 증가한 후 감소하는 경향을 보였으며, 이렇게 talc로 자극한 세포

에 조직 플라스미노겐 활성화제를 24시간 동안 추가로 처리한 경우 collagen mRNA 발현 정도에는 거의 변화가 없었다(Figure 6A). TGF- β 1으로 MeT-5A 세포주 자극 시 농도가 증가함에 따라 점차 I형 콜라겐 mRNA 발현이 2배 이상 의미있게 증가되었으며, 조직 플라스미노겐 활성화제를 추가 처리한 후에 현저하게 I형 콜라겐 mRNA 발현이 감소되는 것을 관찰하였다(Figure 6B).

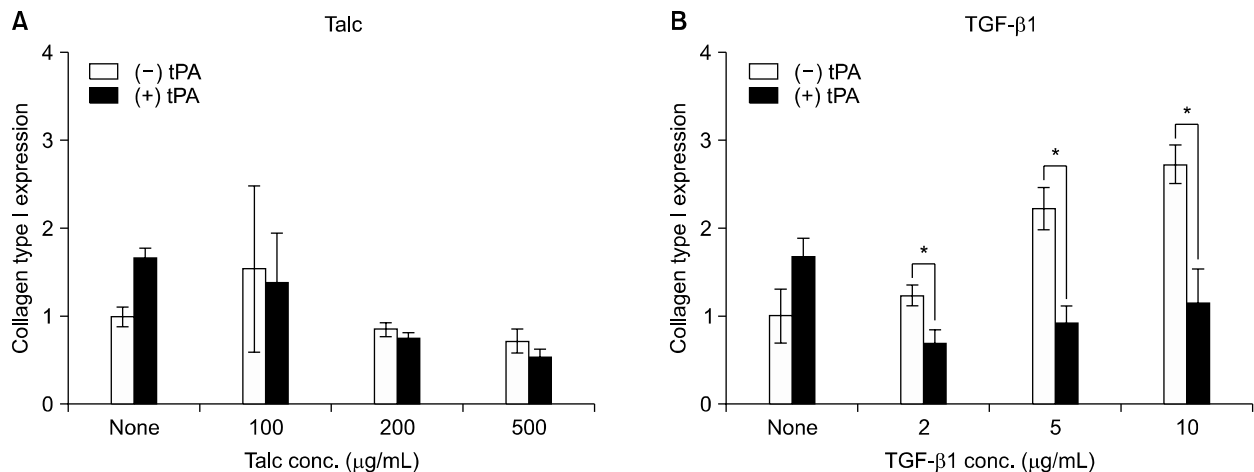


Figure 6. Effect of additional treatment of tPA on type I collagen mRNA induction from talc- or TGF- β 1-treated MeT-5A cells. Cells were treated with various concentration of talc (A) or TGF- β 1 (B), as indicated, for 24 hours. Then 50 μ g/mL of tPA were added to each cell and cultured for additional 24 hours. The expression of type I collagen mRNA determined by real-time RT-PCR. * p <0.05 compared with tPA-untreated group. tPA: tissue plasminogen activator.

고 찰

본 연구는 농흉이나 부폐렴성 흉막염의 합병증으로 발생하는 흉막의 섬유화를 막기 위해 사용되는 조직 플라스미노겐 활성제의 기전을 알기 위하여 중피세포주에서 흉막의 섬유화를 유발하는 TGF- β 1과 같은 흉막유착제로 처리하기 전후에 중피세포주로부터 분비되는 IL-8 및 VEGF의 변화를 관찰하고자 했던 연구이다. 조직 플라스미노겐 활성제 자체는 MeT-5A 중피세포주에 대하여 저농도(<50 μ g/mL)에서 세포 생존율이나 IL-8, VEGF 및 각종 효소 생산과 관련된 케모카인 생성에 큰 영향이 주지 않았다(Figure 3). 반면에 TGF- β 1으로 먼저 자극한 MeT-5A 세포주를 조직 플라스미노겐 활성제로 추가 처리하면 TGF- β 1 처리로 인하여 증가되었던 VEGF의 생산이 의미있게(p <0.01) 감소하였으며, I형 콜라겐 mRNA의 생성 증가 즉, 섬유화도 감소함이 관찰되었다(p <0.05).

임상에서 흉막유착은 다양한 원인에 의한 삼출성 흉막염의 합병증으로 발생하여 제한성 폐장애헤를 일으키기도 하지만, 악성 흉수가 반복적으로 발생하여 호흡곤란을 일으키는 악성 흉막삼출증의 치료방법으로 이용하기도 한다. 흉막유착술은 흉막에 섬유화를 일으켜 흉강을 폐쇄시킴으로써 주로 악성 흉수의 생성을 저지하는 치료법으로 흉막섬유화 기전에 대해서는 아직도 논란이 많다. 세균 또는 talc 및 doxycycline과 같은 화학물질이 흉강 내로 들어가게 되면 대식세포가 활성화되어 중피세포를 자극

하는 다양한 매개물질들을 분비하게 되고, 활성화된 중피세포로부터 분비된 IL-8과 같은 전-염증성 시토카인이 흉강 내로 호중구들과 단핵구들의 이동을 초래하여 염증반응이 일어나게 된다¹⁴. 이후 염증반응이 해소되면서 섬유아세포의 증식 및 콜라겐 합성이 증가되어 흉막섬유화가 진행되는데, 이 때 흉막 중피세포가 중요한 역할을 담당한다고 여겨진다. 이러한 염증 반응은 흉막유착술 시술 후 동반되는 발열 및 통증의 원인이 되며, 폐와 흉막벽 사이의 섬유화 유착이 심하게 진행되어 심각한 제한성 호흡장애를 초래하기도 한다^{15,16}. 본 연구에서는 talc를 처리한 경우 그 용량에 따라서 IL-8이 점차 증가되었고, 섬유화 반응을 나타내는 I형 콜라겐 mRNA가 저용량에서 증가하였다가 고용량에서는 점차 감소하는 경향을 보여 고용량의 talc는 세포독성으로 인하여 오히려 섬유화 반응이 떨어지는 것으로 보인다.

최근 들어 talc 혹은 doxycycline과 같은 흉막유착제의 부작용을 예방하며 흉막에 염증을 덜 일으키면서 흉막유착을 효과적으로 유도하는 TGF- β 가 그 대안으로 제시되고 있다¹⁷⁻²⁰. 이와 관련하여 TGF- β 3를 토끼의 흉강 내로 투여할 경우 흉막유착이 성공적으로 이루어지며, 사람 흉막 중피세포로부터는 콜라겐 mRNA 합성을 증가시킨다는 보고가 있으며¹⁹, 또한, TGF- β 2가 흉막 중피세포로부터 vascular endothelial growth factor (VEGF) 분비를 촉진시켜 효수 분비가 증가할 수 있다고 보고되었다²⁰. 그러나 TGF- β 가 어떠한 기전으로 흉막유착을 일으키는지는 잘

알려져 있지 않다. 일부의 실험적인 연구에 따르면 농흉 토끼의 흉수 내 TGF- β 1 양은 흉막비후와 직접적인 관련이 있으며²¹, TGF- β 1은 섬유화와 관련이 많은 플라스미노겐 활성 억제제(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 발현을 촉진시켜 섬유성 질환을 유발한다²². 사람 중피세포주인 MeT-5A를 이용한 본 연구의 결과에서도, talc는 IL-8의 생성을 증가시키면서 I형 콜라겐 mRNA의 생성을 증가시킨 반면, TGF- β 1은 IL-8 생산 증가 없이 I형 콜라겐 mRNA의 생성을 증가시켜 섬유화를 진행시켰으며, 또한 VEGF의 생산도 증가시키는 것으로 확인되어 이전의 연구들^{19,20}과 유사한 결과를 관찰하였다. VEGF는 혈관 누수를 유발하여 흉수 및 복수 형성에 관여하는 시토카인으로 TGF- β 에 의해 상피세포나 몇몇 종양세포에서 분비되며, 사람의 흉막에는 VEGF 수용체가 높게 발현되고 있어 흉수 생성에 있어서 VEGF가 중요한 역할을 담당한다고 여겨지고 있다^{23,29}. 실제로 Light 등¹⁷은 TGF- β 2를 토끼 흉막에 주사하였을 때 talc나 doxycycline보다 더 효과적인 흉막유착을 유도하지만 많은 양의 흉수 생산 또한 자극한다고 보고하였다. 본 연구에서는 talc로 전 자극한 MeT-5A 세포주에서 IL-8 생성이 증가하고, 조직 플라스미노겐 활성제를 추가로 투여하게 되면 50 μ g/mL의 저농도 조직 플라스미노겐 활성제에서는 오히려 IL-8 생성이 더욱 증가된 결과를 보이고 있다. 조직 플라스미노겐 활성제가 혈관내피세포, 피질 별아교세포 및 종양세포 등을 자극하여 TNF- α 등의 염증성 시토카인을 분비한다는 연구^{7,8}를 볼 때 조직 플라스미노겐 활성제 자체가 염증성 시토카인을 분비할 수도 있을 것으로 생각된다. 그러나 TGF- β 1의 경우에는 IL-8에 대한 영향이 없으며, 조직 플라스미노겐 활성제 추가 투여도 IL-8 생성 변화에 영향을 미치지 못하였다. 따라서 각각 다른 여러 가지 종류의 흉막유착제는 중피세포에 각기 다르게 작용하며, 조직 플라스미노겐 활성제 또한 다양한 흉막유착에 대하여 각기 다르게 다양한 기전으로 작용할 것으로 예상되어, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

조직 플라스미노겐 활성제를 포함한 섬유용해제의 흉강 내 작용에 대한 자세한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만, 최근 여러 임상연구³⁰⁻³⁴에 따르면 폐렴에 합병된 흉막삼출증 및 농흉 성인 환자들에서 재조합 조직 플라스미노겐 활성제를 흉강 내로 주입하면 흉수가 효과적으로 배출되어 흉부 방사선 소견도 향상되고, 약 72~93%의 환자가 수술을 피할 수 있으며, 염증 표지들이 현저히 감소된다고 보고되었다. 그러나 농흉 및 부폐렴성 흉막염

환자를 대상으로 한 대규모 무작위 연구⁶에서는 섬유용해제로서의 스트렙토키나아제 흉강 내 투여로 사망률이나 수술적 처치의 감소, 입원기간의 단축과 같은 효과는 볼 수 없었다고 발표한 바 있고 조직 플라스미노겐 활성제를 사용한 대규모 연구는 없는 상태여서 아직까지도 섬유용해제의 흉강 내 치료에는 논란의 여지가 많다고 여겨진다.

기존의 동물실험 모델에서 효과적인 흉막유착 효과를 보고하였던 TGF- β 1을 조직 플라스미노겐 활성제와 병합치료 할 경우 중피세포 자체에 큰 자극 없이 TGF- β 1에 의한 VEGF 생산을 억제하여 흉수의 생성을 억제할 수 있으며 또한 collagen 합성을 억제하여 흉막유착술 후에 일어날 수 있는 과도한 섬유화에 의한 유착 등의 합병증을 예방할 수 있는 가능성을 제시하였지만 부폐렴성 흉막염이나 농흉에서 발생하는 흉막의 섬유화와 흉막유착제를 사용한 섬유화는 기전이 다를 수 있기 때문에 본 연구의 결과를 직접 적용하여 흉막유착술 후의 합병증을 예방할 수 있다는 결론에 도달하기에는 아직 일부 제한점이 있다. 또한, 각종 흉막염 환자들의 중피세포는 정상 중피세포주인 MeT-5A와는 달리 이미 여러 염증 자극에 노출되어 있어 TGF- β 1 및 조직 플라스미노겐 활성제에 대해 다르게 반응할 수도 있기 때문에 각기 다른 원인으로 흉막 섬유화가 진행된 흉피세포에서의 조직 플라스미노겐 활성제의 효과 또한 다양할 것으로 판단되어 향후 기전에 대한 광범위한 연구도 진행되어야 할 것으로 판단되며 본 연구가 방향을 제시하는 데 도움이 될 것으로 여겨진다.

본 연구를 요약해보면 MeT-5A 세포주에서 talc는 IL-8 생산을 증가시키며, TGF- β 1은 VEGF 및 I형 콜라겐 생산을 증가시킨다. MeT-5A 세포주에서 조직 플라스미노겐 활성제는 IL-8, VEGF 및 I형 콜라겐 생산에 아무런 영향을 미치지 못하지만, TGF- β 1의 전 처치로 인한 VEGF 및 I형 콜라겐 생산 증가를 억제하는 효과를 보였다. 부폐렴성 흉막염이나 농흉에 의한 흉막의 섬유화와 관련된 정확한 기전이 알려져 있지는 않으나 일부 제한점에도 불구하고 조직 플라스미노겐 활성제는 흉막의 섬유화 예방에 중요한 역할을 할 것으로 보이며, 특히 콜라겐 생성이 증가된 상황에서는 흉막 섬유화 예방에 효과가 클 것으로 판단된다.

감사의 글

This work was supported by Konyang University Myunggok Research Fund of 2007.

참 고 문 헌

1. Leard LE, Broaddus VC. Mesothelial cell proliferation and apoptosis. *Respirology* 2004;9:292-9.
2. Iakhiaev AV, Nalian A, Koenig K, Idell S. Thrombin-thrombomodulin inhibits prourokinase-mediated pleural mesothelial cell-dependent fibrinolysis. *Thromb Res* 2007;120:715-25.
3. Lee YC, Knight DA, Lane KB, Cheng DS, Koay MA, Teixeira LR, et al. Activation of proteinase-activated receptor-2 in mesothelial cells induces pleural inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288:L734-40.
4. Diacon AH, Theron J, Schuurmans MM, Van de Wal BW, Bolliger CT. Intrapleural streptokinase for empyema and complicated parapneumonic effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:49-53.
5. Mithos P, Sepsas E, Konstantinou M, Athanassiadi K, Skottis I, Lioulis A. Early use of intrapleural fibrinolytics in the management of postpneumonic empyema. A prospective study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 28:599-603.
6. Maskell NA, Davies CW, Nunn AJ, Hedley EL, Gleeson FV, Miller R, et al. U.K. Controlled trial of intrapleural streptokinase for pleural infection. *N Engl J Med* 2005;352:865-74.
7. Niedbala MJ, Picarella MS. Tumor necrosis factor induction of endothelial cell urokinase-type plasminogen activator mediated proteolysis of extracellular matrix and its antagonism by gamma-interferon. *Blood* 1992; 79:678-87.
8. Lee SR, Guo SZ, Scannevin RH, Magliaro BC, Rhodes KJ, Wang X, et al. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* 2007;417:1-5.
9. Ray TL, Berkenbosch JW, Russo P, Tobias JD. Tissue plasminogen activator as an adjuvant therapy for pleural empyema in pediatric patients. *J Intensive Care Med* 2004;19:44-50.
10. Bishop NB, Pon S, Ushay HM, Greenwald BM. Alteplase in the treatment of complicated parapneumonic effusion: a case report. *Pediatrics* 2003;111: E188-90.
11. Walker CA, Shirk MB, Tschampel MM, Visconti JA. Intrapleural alteplase in a patient with complicated pleural effusion. *Ann Pharmacother* 2003;37:376-9.
12. Weinstein M, Restrepo R, Chait PG, Connolly B, Temple M, Macarthur C. Effectiveness and safety of tissue plasminogen activator in the management of complicated parapneumonic effusions. *Pediatrics* 2004; 113:e182-5.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
14. Mutsaers SE, Prele CM, Brody AR, Idell S. Pathogenesis of pleural fibrosis. *Respirology* 2004;9:428-40.
15. Kennedy L, Harley RA, Sahn SA, Strange C. Talc slurry pleurodesis. Pleural fluid and histologic analysis. *Chest* 1995;107:1707-12.
16. Light RW. Talc for pleurodesis? *Chest* 2002;122:1506-8.
17. Light RW, Cheng DS, Lee YC, Rogers J, Davidson J, Lane KB. A single intrapleural injection of transforming growth factor-beta(2) produces an excellent pleurodesis in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:98-104.
18. Lee YC, Lane KB, Zoia O, Thompson PJ, Light RW, Blackwell TS. Transforming growth factor-beta induces collagen synthesis without inducing IL-8 production in mesothelial cells. *Eur Respir J* 2003;22:197-202.
19. Kalomenidis I, Guo Y, Lane KB, Hawthorne M, Light RW. Transforming growth factor-beta3 induces pleurodesis in rabbits and collagen production of human mesothelial cells. *Chest* 2005;127:1335-40.
20. Gary Lee YC, Melkerneker D, Thompson PJ, Light RW, Lane KB. Transforming growth factor beta induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:88-94.
21. Sasse SA, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:700-5.
22. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:527-38.
23. Grove CS, Lee YC. Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:294-301.
24. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77:527-43.
25. Boussat S, Eddahibi S, Coste A, Fataccioli V, Gouge M, Housset B, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*

- 2000;279:L371-8.
26. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett* 1996;102:209-15.
27. Donovan D, Harmey JH, Toomey D, Osborne DH, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. TGF beta-1 regulation of VEGF production by breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* 1997;4:621-7.
28. Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammatory and malignant pleural effusions. *Thorax* 1999;54:707-10.
29. Cheng D, Rodriguez RM, Perkett EA, Rogers J, Bienvenu G, Lappalainen U, et al. Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999;116:760-5.
30. Gervais DA, Levis DA, Hahn PF, Uppot RN, Arellano RS, Mueller PR. Adjunctive intrapleural tissue plasminogen activator administered via chest tubes placed with imaging guidance: effectiveness and risk for hemorrhage. *Radiology* 2008;246:956-63.
31. Levinson GM, Pennington DW. Intrapleural fibrinolytics combined with image-guided chest tube drainage for pleural infection. *Mayo Clin Proc* 2007;82:407-13.
32. Skeete DA, Rutherford EJ, Schlidt SA, Abrams JE, Parker LA, Rich PB. Intrapleural tissue plasminogen activator for complicated pleural effusions. *J Trauma* 2004;57:1178-83.
33. Thommi G, Nair CK, Aronow WS, Shehan C, Meyers P, McLeay M. Efficacy and safety of intrapleural instillation of alteplase in the management of complicated pleural effusion or empyema. *Am J Ther* 2007;14:341-5.
34. Zuckerman DA, Reed MF, Howington JA, Moulton JS. Efficacy of intrapleural tissue-type plasminogen activator in the treatment of loculated parapneumonic effusions. *J Vasc Interv Radiol* 2009;20:1066-9.