

□ 원 저 □

Bleomycin 유도 폐 섬유화에 있어서 성장인자 및 Cytokine의 역할

연세대학교 의과대학 병리학교실, 내과학교실* 연세대학교 원주의과대학 병리학교실**

이용희, 정순희**, 안철민*, 김성규*, 조상호

= Abstract =

Role of Growth Factors and Cytokines on Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis

Yong Hee Lee, M.D., Soon Hee Jung, M.D.**, Chul Min Ahn, M.D.*,
Sung Kyu Kim, M.D.*, Sang Ho Cho, M.D.

Department of Pathology and Internal Medicine Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

*Department of Pathology**, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea*

Background : It is now thought that the earliest manifestation of idiopathic pulmonary fibrosis is alveolitis, that is, an accumulation of inflammatory and immune effector cells within alveolar walls and spaces. Inflammatory cells including alveolar macrophages and resident normal pulmonary tissue cells participate through the release of many variable mediators such as inflammatory growth factors and cytokines, which contribute to tissue damage and finally cause chronic pulmonary inflammation and fibrosis. This study was performed to investigate the source and distribution pattern of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the role of these mediators on bleomycin (BLM)-induced pulmonary injury and fibrosis in rats.

Method : Wistar rats were divided into three groups (control group, BLM treated group, BLM and vitamin E treated group). Animals were sacrificed periodically at 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21, 28 days after saline or BLM administration. The effects were compared to the results of bronchoalveolar lavage fluid analysis, light microscopic findings, immunohistochemical stains for six different mediators (TGF- β_1 , PDGF, bFGF, IL-1, IL-6 and TNF- α) and mRNA in situ hybridization for TGF- β_1 .

본 연구는 1995년도 연세대학교 학술연구비로 이루어졌음

교신 저자 : 조상호

서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 병리학교실

Results : IL-1 and IL-6 are maximally expressed at postbleomycin 1~7th day which are mainly produced by neutrophils and bronchiolar epithelium. It is thought that they induce recruitment of inflammatory cells at the injury site. The expression of IL-1 and IL-6 at the bronchiolar epithelium within 7th day is an indirect evidence of contribution of bronchiolar epithelial cells to promote and maintain the inflammatory and immune responses adjacent to the airways. TNF- α is mainly produced by neutrophils and bronchiolar epithelial cells during 1~5th day, alveolar macrophages during 7~28th day. At the earlier period, TNF- α causes recruitment of inflammatory cells at the injury site and later stimulates pulmonary fibrosis. The main secreting cells of TGF- β_1 are alveolar macrophages and bronchiolar epithelium and the target is pulmonary fibroblasts and extracellular matrix. TGF- β_1 and PDGF stimulate proliferation of pulmonary fibroblasts and TGF- β_1 and bFGF incite the fibroblasts to produce extracellular matrix. The vitamine E and BLM treated group shows few positive cells($p < 0.05$).

Conclusion : After endothelial and epithelial injury, the neutrophils and bronchiolar epithelium secrete IL-1, IL-6, TNF- α which induce infiltration of many neutrophils. It is thought that variable enzymes and O₂ radicals released by these neutrophils cause destruction of normal lung architecture and progression of pulmonary fibrosis. At the 7~28th day, TGF- β_1 , PDGF, bFGF, TNF- α secreted by alveolar macrophages sting pulmonary fibroblasts into proliferating with increased production of extracellular matrix and finally, they make progression of pulmonary fibrosis. TNF- α compares quite important with TGF- β_1 to cause pulmonary fibrosis. Vitamine E seems to decrease the extent of BLM induced pulmonary fibrosis.

Key words : Bleomycin, Pulmonary fibrosis, TGF- β , PDGF, bFGF, IL-1, IL-6, TNF- α

서 론

특발성 폐 섬유화의 병인론은 아직도 밝혀지지 않은 점들이 많으나 초기에 폐포 중격 및 폐포강내에 염증 및 면역세포들의 침윤을 보이는 폐포염(alveolitis)이 발생하고 그 이후 염증세포, 면역세포의 침윤증가 및 활성화로 정상 폐 구조가 변형되고 또한 이들 세포가 단백질 분해효소, 성장인자를 포함하는 다양한 cytokine과 같은 매개체를 분비하여 실질조직을 구성하는 세포에 손상을 일으키고 종국에는 섬유화를 초래하는 것으로 이해하고 있다^{1~5)}. 이들 매개체들은 폐 조직에 정상적으로 존재하는 세포들에 직접적으로 작용하여 이들의 행동양식을 변형시키고 기질 유전자의 발현에 변화를 가져오는 듯하다.

최근 이러한 매개체들중 transforming growth factor- β (이하 TGF- β)가 폐 섬유화를 야기시키고 진행 및 유지시키는데 있어서 가장 중요한 인자로 부

각되고 있으며^{6~9)} 그 외에도 platelet derived growth factor(이하 PDGF)¹⁰⁾, granulocyte macrophage colony stimulating factor, insulin like growth factor-1, interleukin-1 (이하 IL-1)^{11~13)}, interleukin-6(이하 IL-6)^{14,15)}, tumor necrosis factor- α (이하 TNF- α)^{13,15)}등과 같은 많은 수의 cytokine이 세포의 기질 증가를 직접, 간접적으로 유도하는데 관여할 것으로 생각하고 있다. 또한 면역조직화학 염색이나 in situ hybridization 및 Northern blot과 같은 방법들을 이용하여 이들 cytokine의 생성소를 규명하는 연구들이 활발히 진행되고 있다^{6,16,17)}.

항암제로 알려져 있는 bleomycin(이하 BLM)은 폐 섬유화를 일으키는 동물실험모델의 하나로 이의 발생기전은 산소유리기에 의한 직접독성 및 염증세포, 섬유모세포에 의한 간접독성에 의한 것으로 설명하고 있다¹⁸⁾. 이중 후자에서 TGF- β 의 생성증가가 중요한 역할을 하는 것으로 생각하고 있는데 이는 TGF-

β 가 교원질과 같은 세포의 기질의 분해효소의 합성을 저하시킴과 동시에 세포의 기질의 합성을 강력하게 자극하고^{8, 16, 19~20}), 섬유화에 중요한 대식세포, 섬유모세포의 화학유인물질 분비할 뿐 아니라^{21, 22}) PDGF와 같은 다른 성장인자를 유도하는 간접적인 방식으로 섬유모세포의 증식을 가져오는 것으로 알려져 있다^{22~24}). 따라서 본 연구에서는 성장인자와 cytokine들이 BLM유도 폐 섬유화의 발생, 진행 및 유지에 어떤 역할을 하는지를 체계적으로 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

기초사육후 1주일간 환경에 적응시킨 체중 200g내외의 웅성 Wistar 백서 171마리를 대조군(27마리), BLM투여군(72마리) 및 BLM과 비타민 E 병합투여군(72마리)의 3군으로 나누어(표 1) 실험하였고 BLM 투여후 제 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 14일, 21일, 28일에 각각 실험군 8마리와 대조군 3마리를 함께 도살하였다.

2. 약물 투여 방법

백서를 ether 마취하에 실험대위에 배위로 고정하고 멸균 식염수에 용해시킨 BLM(NIPPON KAYAKU Co., Tokyo, Japan, 상품명 Bleocin)을 체중 200 gm당 1.5unit씩 백서에 알맞은 후두경을 이용하여 삼관법에 의해 기관지내로 투여하였다. 비타민 E(α

tocopherol ; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri)는 bleomycin 투여 2일전부터 도살할 때까지 옥수수 기름에 용해시켜 100mg/kg/day을 매일 경구투여 하였다. 대조군은 0.3ml의 멸균 식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

3. 검사방법

가. 기관지 폐포 세척술

실험동물은 체중 측정후 pentobarbital 30mg/kg를 복강내에 주사하여 마취시킨 후 동맥 전채혈(aortic exsanguination)하여 도살하였다. 도살한 동물은 폐 주위조직을 박리하여 좌엽 기관지를 기관 근위부에서 결찰한 후 우측 폐로만 인산염 완충 식염수(PBS)가 25cm H₂O의 압력으로 중력에 의해 주입되게 하였는데 three way tube를 이용하여 3ml씩 5회 주입하였다. 각 주입시마다 용액이 폐내에 3분씩 머무르게 한 뒤 중력에 의해 회수된 세척액을 얼음으로 채워진 용기내의 50ml 용량의 원추형 시험관에 모았고, 회수된 세척액은 4℃ 원심분리기내에서 1,500r.p.m.의 속도로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전한 세포층은 RPMI 1,640 배지로 2회 더 세척하였다. Hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였고 총 세포수는 기관지 폐포 세척액 ml당 세포수로 표현하

Table 2. Evaluation criteria of positive expression of growth factors and cytokines

| |
|--|
| 기관지 상피세포 |
| <10 : 1+, 10~20 : 2+, >20 : 3+ |
| 대식세포 |
| <10 : 1+, 10~20 : 2+, >20 : 3+ |
| 염증세포 (혈관 및 기관지 주변, 폐포강내, 폐포중격내) |
| <20 : 1+, 20~40 : 2+, 41~60 : 3+, >60 : 4+ |

Table 1. Experimental and control group

| | |
|------------------------------|------|
| 제 1군 정상 대조군 | 27마리 |
| 제 2군 Bleomycin 단독투여군 | 72마리 |
| 제 3군 Bleomycin 과 비타민 E 병합투여군 | 72마리 |

였다. 이 후 세포수를 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 로 맞춘 후 200 μl 를 채취하여 원심분리시켜서 슬라이드에 도말 건조 후 Wright-Giemsa 염색을 시행하였다. 구성 세포들은 눈금이 그려진 micrometer 대안 렌즈를 이용, 광학현미경으로 400배 시야에서 500개의 세포를 세어서 그 비율을 표시하였다.

나. 광학현미경적 관찰

광학현미경 검사를 위해 좌측편을 10% 중성 포르말린에 8시간 고정된 후, 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매과정을 거쳐 5 μm 의 연속절편을 만든 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였으며, 교원 섬유 분포를 보기위해 Masson's trichrome 염색을 시행하였다.

다. 면역병리학적 관찰

연속절편을 poly-L-lysine으로 처리된 슬라이드에 붙인 후 xylene으로 탈랍시키고 알코올에 탈수시킨 후 10분간 3% H_2O_2 에 처리하여 내인성 peroxidase를 차단하였다. 3분간 증류수로 수세한 후 10mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에 담그어 10분간 극초단파로 가열하였다. 가열이 끝난 후 흐르는 냉수에 약 15분간 식힌 후 PBS로 5분간 수세하였다. 일차항체는 TGF- β_1 (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), PDGF (Oncogene Science Inc., Uniondale, NY, USA, Ab-1), bFGF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)의 경우 1 : 400으로 희석하였고 TNF- α (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA)는 1 : 500, IL-1(R and D system, AB-200 NA), IL-6(R and D system, AB-406 NA)는 각각 1 : 200으로 희석하였다. 항체 반응시간은 실온에서 1시간하였으며 biotinylated anti-mouse IgG, biotinylated anti-rabbit IgG (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)와 30분, peroxidase conjugated streptavidin (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)에 30분 동안 차례로 반응시키고 PBS로

세척한 후 aminoethyl carbazole(AEC)로 발색하고 hematoxylin으로 대조 염색하여 광학 현미경하에서 검색하였다. 각 성장인자 및 cytokine의 생성소, 시기별 발현 분포 및 정도를 살펴보았는데 이중 발현 정도는 다음의 기준 (표 2)을 근거로 평가하였다. 10 곳의 고배율 시야(high power field, HPF)를 무작위로 선택하여 양성인 세포수를 세었고 이들을 다시 한 개의 고배율시야당 양성인 세포수로 맞추어 평가하였다.

라. TGF- β_1 에 대한 mRNA 동소보합결합 검사 (TGF- β_1 mRNA in situ hybridization)

TGF- β_1 에 대한 30mer oligonucleotide antisense probe를 제조하여(5'-GAAGTTGGCATGGTAGC CCTTGGGCTCGTG-3', Takara biomedical) 5' end에 digoxigenin을 labelling하여 동소보합결합 검사를 시행하였다. 동소보합결합 검사는 Fisher Biotech.에서 제조한 MicroProbe staining system을 이용하였으며 xylene으로 탈랍과정을 거친 후 알코올로 탈수 후 pepsin을 30초간 37°C에서 처리하였다. Prehybe plus에 슬라이드를 적셔 37°C에서 처리한 후 TGF- β_1 probe의 동소보합결합 검사는 110°C에서 20분간 변성(denaturation)시킨 후 post hybe로 세척한 후 ribonuclease(RNase)를 약 30분간 37°C에 처리하였다. KREATECH digoxigenin detection system(KREATECH biotechnology, Amsterdam, Netherlands)/alkaline phosphatase assay를 이용하였고 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate(BCIP), nitro blue tetrazolium(NBT)을 이용하여 검출(detection)하였다.

마. 통계분석

실험자료중 수치화 된 것의 통계학적 분석은 각 실험 군간의 변화를 비교 분석하기 위하여 SAS program을 이용한 2요인 분산분석법중 비모수검정으로 Kruskal-Wallis Test로 검정하였다.

결 과

1. 기관지 폐포 세척액의 검사소견

가. 기관지 폐포 세척액의 생존율 및 총 세포수

생존율은 각각의 실험군 세 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었으며 그 범위는 93.1%에서 100%였다. 총 세포수는 정상대조군에 비해 BLM을 투여한 두 실험군이 통계학적으로 유의있게 높았는데 ($p < 0.05$), BLM투여군은 1일부터 14일까지 약 2~4배로 증가되었으며 제 4일에 최고값에 도달한 후 서서히 감소하기 시작하여 제 28일에는 거의 대조군과 비슷한 값에 도달하였다. 비타민 E 병합투여군은 제 5일에 최고치에 도달후 서서히 감소하여 제 28일에는 거의 대조군과 비슷한 값에 도달하였다 (그림 1).

나. 기관지 폐포 세척액의 염중세포 구성비

정상대조군은 95% 이상이 단핵구로 이루어져 있었으나 BLM투여군은 제 2일부터 중성구가 평균 239개

로 증가하기 시작하다가 제 4일에 평균 295개로 최고조에 달한 이후 급격히 감소, 제 7일 이후 대조군과 비슷해졌다(그림 2). BLM투여군중 호산구는 제 4, 5일에 평균 102개로 일시적으로 증가하였으며 림프구는 제 3일부터 평균 138개로 증가하여 제 28일까지 평균 102개로 지속적으로 유지되었다. 비타민 E 병합투여군의 경우 BLM 단독투여군에 비해 하루 늦게인 제 5일에 최고에 달한 후 14일까지 급격히 감소, 그 이후로는 서서히 감소하는 양상을 보였다.

2. 광학현미경 소견

가. Hematoxylin-eosin 염색소견

대조군과 비타민 E 병합투여군의 경우 전 실험기간에 걸쳐 BLM투여군보다 염증은 미약하였고 섬유화는 없었다. BLM투여군에서는 부종이 BLM 투여 제 1일부터 소혈관 주위와 주변 간질 조직, 폐포중격에서 관찰되었고 폐포중격의 부종은 3, 4일에 현저하였다가 5일부터 감소하기 시작하여 7일째부터는 거의 관

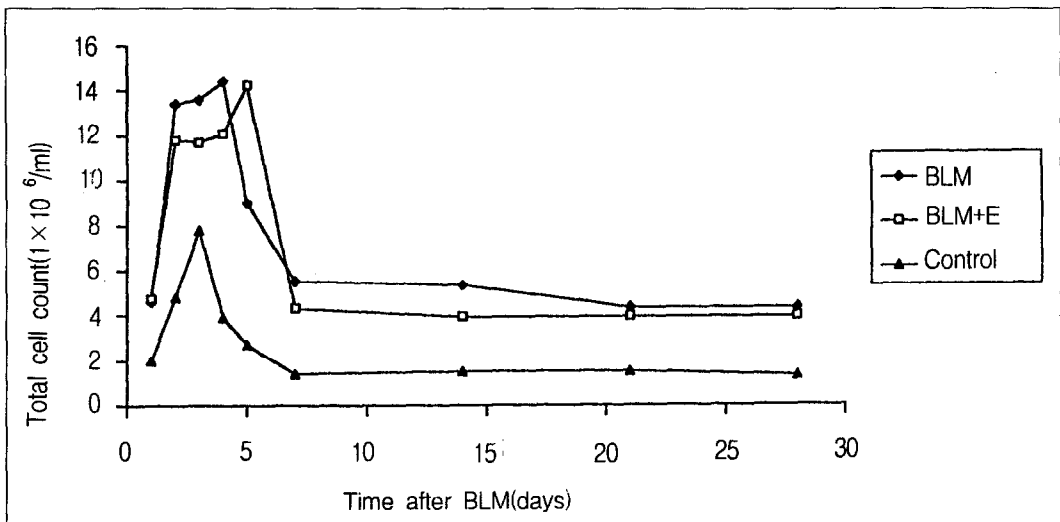


Fig. 1. Total cell counts of bleomycin treated group and control group. There is significant difference between control and BLM treated group. There is significant difference between control and bleomycin with vitamine E cotreated group, also. ($p < 0.05$) (BLM : bleomycin treated group, BLM+E : bleomycin and vitamine E treated group)

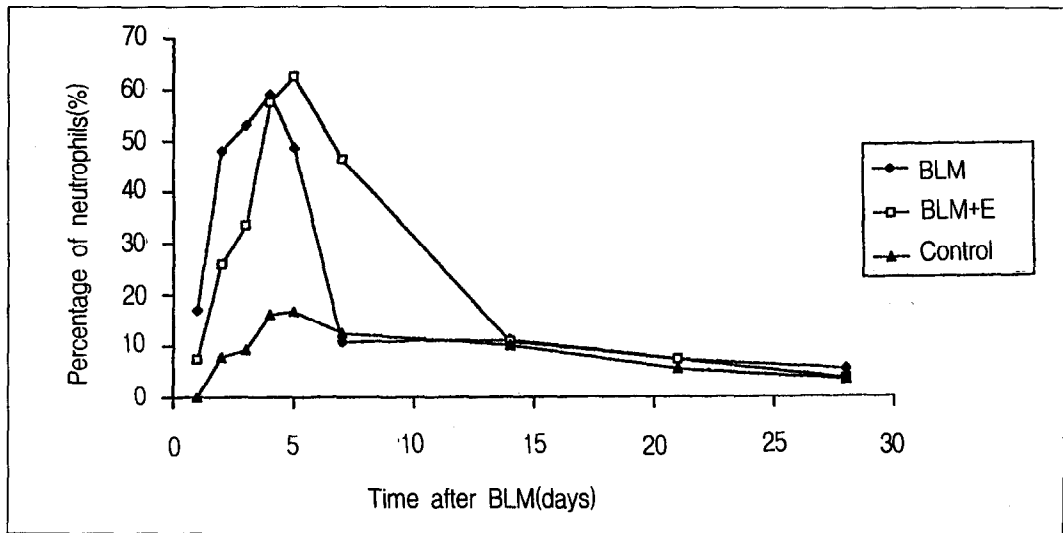


Fig. 2. The changes of percentage of neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid during experimental period. The value of neutrophil percentage is significantly different between the control and BLM treated group and the same is between the control and BLM with vitamin E cotreated group

찰되지 않았다. 폐포강내 부종도 2일부터 부분적으로 나타나기 시작하여 3, 4일에 뚜렷이 관찰되었으며 제 5일까지 지속되다가 제 7일군부터는 관찰되지 않았다. 염증세포의 침윤은 소혈관 주위, 종말 세기관지 주변의 폐 실질에서부터 시작하여 간질조직으로 파급되는 양상을 보였는데 중성구의 침윤은 BLM 투여후 제 1일부터 소혈관 주위, 종말 세기관지 주변, 폐포 중격에서 관찰되었고 BLM 투여 제 2, 3일군부터는 폐포강내에서도 관찰되었다. 림프구의 침윤은 소혈관 주위의 간질과 폐포 중격 및 종말 세기관지 주변부로 BLM 투여후 제 3일부터 관찰되기 시작하여 7일 이후 증가하다가 제 28일까지 지속적으로 관찰되었다. 대식세포들은 BLM 투여 제 1일부터 1~2개씩 소수 관찰되었고 전 실험기간 동안 관찰되었는데 이들은 폐포강내 및 폐포중격에서 다수 보였고 제 7일군부터는 20개이상/HPF으로 뚜렷이 증가되어 나타났다. 섬유화의 소견은 제 7일군에서부터 초기 미성숙한 교원질

섬유가 폐동맥 및 기관지 주변 및 폐포중격에서 보이기 시작하였고 간질조직내 대식세포가 모여있는 곳에 교원질 섬유 침착이 두드러졌다. 제 14일에는 교원질 섬유 침착 면적이 넓어지면서 부분적으로 폐포강내 섬유화도 미약하게 보이기 시작하였다. 제 21일군부터는 교원질 섬유가 더욱 성숙한 양상으로 나타났고 제 28일에는 다발성으로 성숙한 교원질 섬유로 이루어진 섬유화를 보였다.

나. Masson's trichrome 염색소견

대조군과 비타민 E 병합투여군의 경우 BLM투여군과 비교하여 보았을 때 교원질 섬유의 침착은 극히 미약하였다. BLM투여군은 7일 이후 간질조직내 대식세포가 모여있는 곳에 미성숙한 교원질 섬유의 침착이 보이기 시작하면서 14일, 21일, 28일로 진행됨에 따라 면역조직화학 검색상 TGF- β_1 이 양성으로 발현되는 곳에 교원질 섬유의 침착이 관찰되었다.

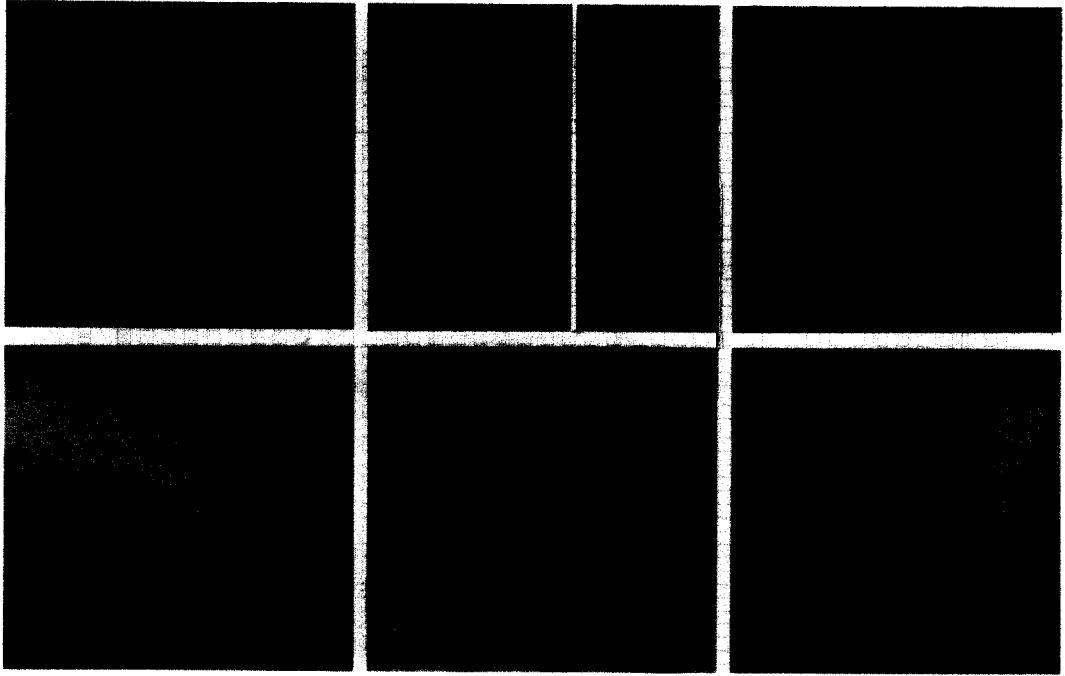


Fig. 3. The immunohistochemical finding of TGF- β_1 . A : Positive reaction of peribronchiolar inflammatory cells(lymphocytes, monocytes) B : Positive reaction of perivascular inflammatory cells(neutrophils, lymphocytes, monocytes) (left : $\times 200$, right : $\times 400$) C : Positive reaction of endothelial cells and intravascular inflammatory cells D : Positive reaction of bronchiolar epithelial cells E : Positive reaction of interstitial organized macrophages F : Positive reaction of interstitial extracellular matrix($\times 400$)

3. 면역조직화학 염색소견

가. IL-1과 IL-6의 염색소견

대조군은 평균 1~2개/HPF, 비타민 E 병합투여군은 평균 2~4개/HPF의 양성세포수를 보인 반면 BLM투여군은 평균 10개/HPF의 양성세포수를 나타내어 대조군이 의의있게 적은 양성세포수를 보였다. BLM투여군의 경우 IL-1과 IL-6는 거의 동일한 세포, 동일한 부위에 비슷한 정도의 양성세포수를 나타내었는데 기관지 상피세포에 염색되는 양성세포수는 IL-1(평균 26개/HPF)이 IL-6(평균 19개/HPF)보다 많았다. 제 1일에는 기관지 상피세포, 혈관내피

세포, 기관지 주변 림프구, 중성구 및 단핵구에서 평균 14개/HPF의 양성세포가 발현되었고 제 2일 이후 양성세포수가 평균 36개/HPF로 급격히 증가되고 간질조직내의 대식세포에도 양성으로 발현되기 시작하였다. 제 5일에 최고의 양성세포수(평균 55개/HPF)를 보였으며 그 이후 양성세포수가 급격히 감소하여 제 7일부터 기관지 상피세포의 양성발현이 음성으로 전환되었다. 14일부터는 주로 대식세포에서 양성(평균 13개/HPF)을 보였는데 이러한 발현정도는 28일까지 비슷하게 유지되었다. 제 7일부터 28일에 이르기까지 간질 및 폐포강내 대식세포의 양성발현은 TGF- β_1 과 동일하였다(그림 4, 5, 6).

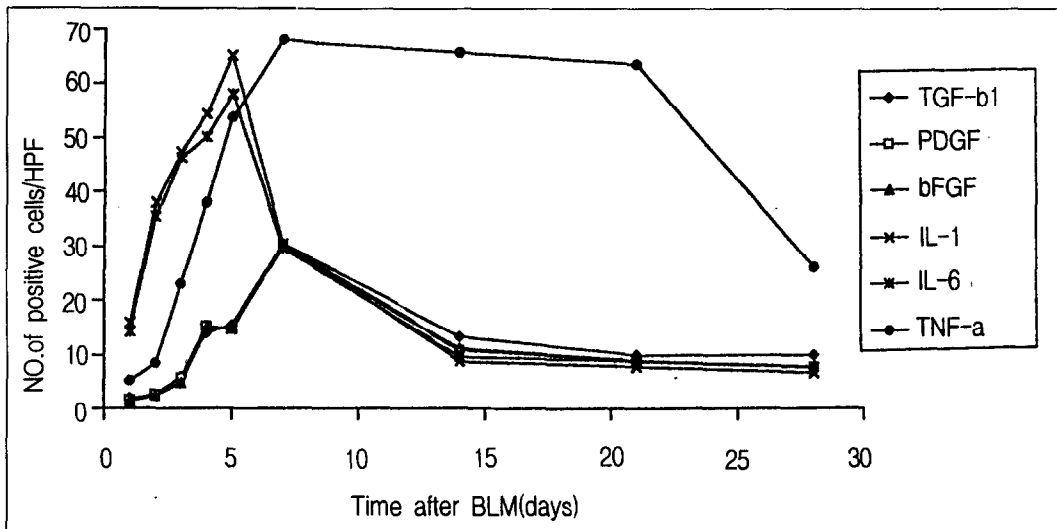


Fig. 4. The changes of number of positive cells per high power field(HPF) during experimental period. The positive number of IL-1 and IL-6 immunoreactive cells is increasing until 5 day and thereafter is decreasing. That of TNF- α is increasing until postbleomycin 7th day, maintaining similar number until 21th day and decreasing thereafter. The pattern of those of TGF- β_1 , PDGF, bFGF is similar which reveal increasing until postbleomycin 7th day and decreasing thereafter

나. TNF- α 의 염색소견

대조군이 평균 3개/HPF, 비타민 E 병합투여군이 평균 2~3개/HPF의 양성세포수를 보인 반면 BLM투여군은 평균 15개/HPF의 양성세포수를 나타내어 BLM단독투여군이 의의있게 많은 양성세포수를 나타내었다. 제 1일에는 기관지 상피세포(평균 7개/HPF)에 양성을 보였고 기관지 주변 림프구, 중성구 및 단핵구, 폐포강내 대식세포에도 양성을 보였다. 제 3일 이후 21일까지 기관지 상피세포에서 지속적으로 많은 수의 양성세포(평균 21개/HPF)를 나타냈으며 대식세포 양성 발현양상은 TGF- β_1 과 동일하였다(그림 4, 5, 6).

다. TGF- β_1 염색소견

BLM투여군(평균 21개/HPF)에 비해 대조군(평균 3개/HPF), 비타민 E 병합투여군(평균 4개/HPF)은 양성세포수와 세포외기질에 양성인 정도가 의의있

는 차이를 보였는데 대조군의 경우 양성인 세포와 간질의 양성도가 미약하였다. 제 1일에는 기관지 상피세포와 혈관내피세포, 기관지 주변의 림프구, 중성구 및 단핵구에 양성있었고 제 2일에는 간질조직내 침윤한 중성구, 대식세포, 단핵구에 양성을 보였다. 제 4일 이후 폐포중격내 침윤한 단핵구, 대식세포에 강양성을 보였다. 제 4~7일까지 TGF- β_1 에 양성인 대식세포는 곳곳에 산재한 형태로 분포하였고 약한 정도로 염색되었으나 14일부터는 대식세포가 군집을 이루면서 이들에 강양성으로 염색되었다. 제 21일에는 섬유화가 진행되는 부위에 대식세포의 수가 많아지고 그 염색정도는 제 14일과 비슷하였다. 세포외기질에 양성인 곳을 시기별로 살펴보았을 때 제 7일 이후로 교원질 섬유화의 침착이 있는 부위가 약양성으로 염색되었으며 이러한 양상은 28일까지 지속되었다. 병변이 진행함에 따라 양성부위의 면적이 커졌다. 제 28일에는 폐의 곳곳에 진행된 섬유화 병변이 관찰되었다. 시기

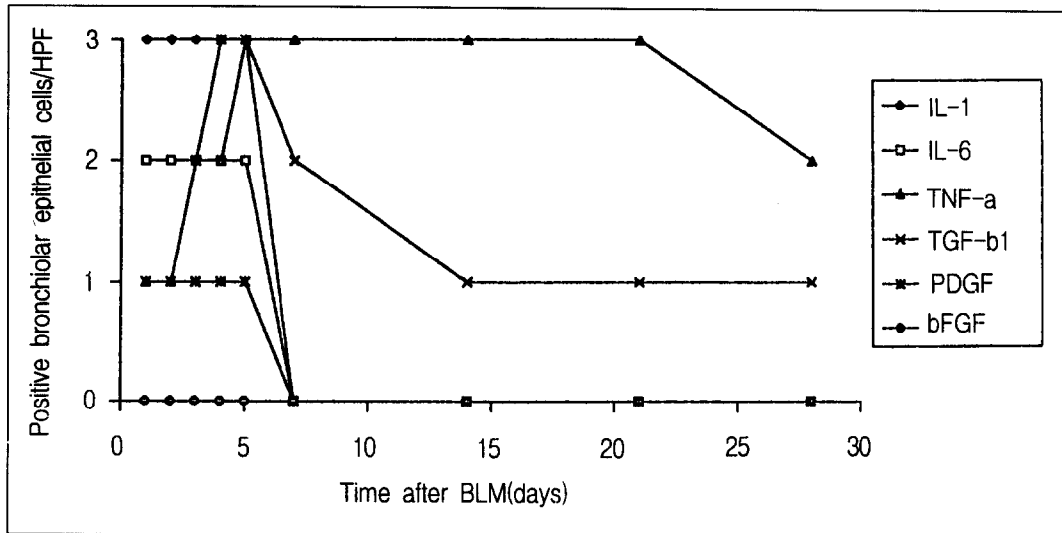


Fig. 5. Changes of positive bronchiolar epithelial cells per high power field(HPF). The positive immunoreactivity of IL-1, IL-6, PDGF convert negative reaction after postbleomycin 5 th day. That of TNF- α and TGF- β_1 reveals increasing number of positive expression until postbleomycin 5th day, while the number of positive reaction for TGF- β_1 is decreasing after postbleomycin 7th day, that of TNF- α reveals continuously high reactivity until postbleomycin 21th day

별로 양성인 세포수를 살펴보았을 때, 1~3일사이에는 소수(평균 2~6개/HPF)에서 관찰되었으나 7일까지 양성세포수가 증가(평균 30개/HPF)하여 최고조를 이룬 후 14일에는 감소(평균 13개/HPF)하였고 제 21일, 28일에는 평균 9개/HPF로 유지되었다. BLM투여 초기인 1주이전에는 양성세포가 주로 혈관주변 및 기관지 주변 염증세포였고(43개/HPF), 14일이후부터는 대식세포가 주 생성소(17개/HPF)였다(그림 3, 4, 5, 6).

라. PDGF의 염색조건

양성세포수는 BLM투여군(17개/HPF)이 대조군(평균 2개/HPF), 비타민 E 병합투여군(평균 3~4개/HPF)보다 유의하게 많았다. 시기별 양성세포수는 TGF- β_1 과 큰 차이를 보이지 않았으며, 기관지 상피세포에서의 양성발현도가 아주 미약한 정도(평균 5~6개/HPF)인 점외에 TGF- β_1 의 발현양상과 큰 차

이는 없었다. PDGF는 세포외기질에 약양성 반응을 보였던 TGF- β_1 와는 다르게 세포의 기질에는 음성반응을 보였다. 시기별로 양성반응을 보이는 세포들의 발현양상은 TGF- β_1 과 유사하였다(그림 4, 5, 6).

마. bFGF의 염색조건

대조군의 경우 양성세포수가 평균 3개/HPF, 비타민 E 병합투여군은 평균 3~4개/HPF로 BLM투여군의 15개/HPF에 비해 유의하게 적은 양성세포수를 보였다. bFGF는 실험 전기간을 걸쳐 대식세포가 주 발현소였으며 혈관주변 및 기관지주변 염증세포는 TGF- β_1 이나 PDGF보다는 적은 수에서 양성발현을 보였다(평균 23개/HPF). 14일이후 폐 간질조직의 섬유모세포가 많은 수(평균 13개/HPF)에서 양성을 보였으며 이러한 섬유모세포의 양성발현수는 28일까지 지속적으로 증가되었다(평균 19개/HPF, 그림 4, 5, 6).

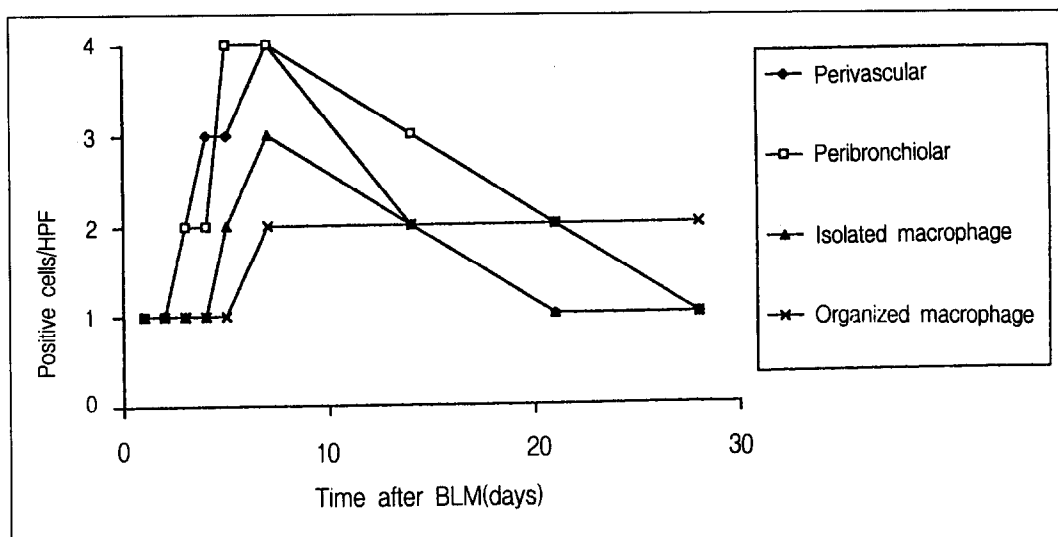


Fig. 6. Positive immunoreactive source for each six variable mediators. The pattern for each mediators is similar. At the early phase(before the 7th day), the predominant positive expression site is perivascular and peribronchiolar inflammatory cells(neutrophils, eosinophils, lymphocytes). For the macrophages, the scattered isolated macrophages reveal strong positive reaction before the 7th day while the organized macrophages after the 7th day

4. TGF- β_1 에 대한 mRNA 동소보합결합 검사 (in situ hybridization) 소견

TGF- β_1 에 대해 시행한 동소보합결합 검사소견은 면역조직화학 염색소견상 관찰했던 생성소 및 발현분포와 일치하는 양상을 보였는데 BLM 투여후 제 1일로부터 28일에 이르기까지 주 발현소는 혈관 및 기관지 주변 염증세포(다핵 중성구, 림프구, 단핵구)였다. 양성세포의 발현을 보았을 때 기관지 상피세포에서의 양성 반응은 제 1, 2일에서 관찰되다가 3일부터는 음성으로 변화였다. 제 1~7일까지는 염증세포에 양성인 세포수가 증가하여 제 7일에 최고조(평균 28개/HPF)에 달하였으며 그 이후 14일군부터는 염증세포에 양성인 세포수가 감소(평균 8개/HPF)하였고 대식세포가 주된 발현소를 이루어 28일까지 양성발현(평균 10개/HPF)이 지속되는 양상을 보였다(그림 7).

고 찰

항암제로 알려진 BLM을 동물에 투여함으로써 인위적인 폐 섬유화를 유도하는 모델은 특발성 폐 섬유화를 연구함에 있어서 기초가 되어왔다^{25~29}). 특발성 폐 섬유화의 병인론중 최근 성장인자를 포함한 다양한 cytokine이 폐 실질을 구성하는 세포에 손상을 야기하는 중요한 인자로 알려져 있으며 이중 TGF- β ^{20, 21, 30, 31}), PDGF^{17, 32, 33}), IL-1^{34~36}), TNF- α ^{37~39}) 등의 폐 섬유화에서의 역할에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.

BLM유도 폐 손상의 기전에 대해서는 아직도 불확실한 점이 많으나 DNA-BLM-Fe²⁺-O₂ 복합체의 산화로 반응성 산소 유리기를 형성하여 이들이 민감한 세포의 지방성분의 과산화(peroxidation), DNA strand 파괴, 세포사망을 초래한다. BLM유도 폐 섬유화시 폐 손상과 그에 따른 초기변화는 폐동맥, 폐정

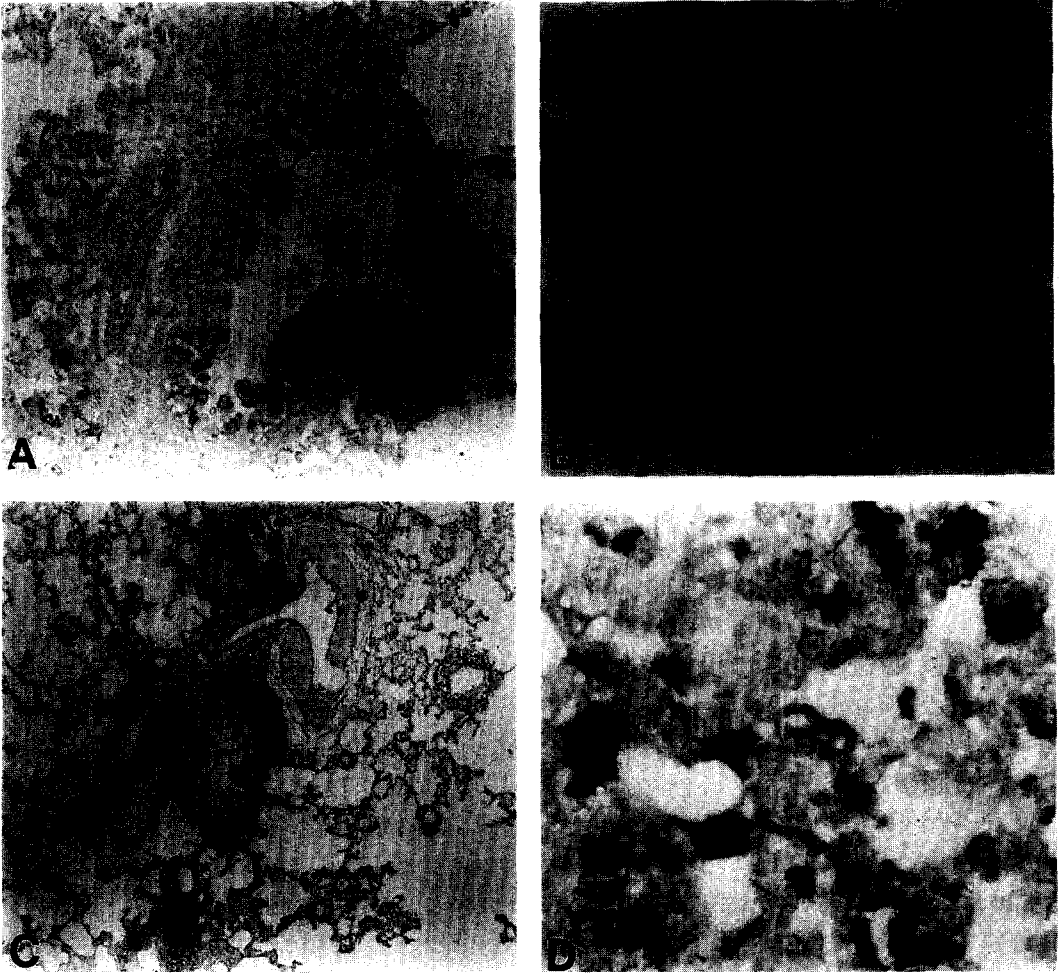


Fig. 7. mRNA in situ hybridization of TGF- β_1 . A : Positive signal of bronchiolar epithelial cells ($\times 200$) B : Positive signal of perivascular inflammatory cells ($\times 400$) C : The maximal number of positive signal is seen at the perivascular and peribronchiolar inflammatory cells, 7th day ($\times 40$) D : Positive signal of macrophages after 14day

맥의 혈관내피세포 손상과 I형 pneumocyte의 괴사이다. 혈관내피손상에 따른 변화로는 혈관내피세포의 종창, 기저막으로부터의 분리이며 그 결과 혈관의 투과성 증가에 따른 부종이 나타나게 된다. I형 pneumocyte의 괴사는 기저막의 노출과 함께 폐포강내로 부종액, 섬유모세포, 염증세포들이 모여드는 결과를 가져오며 II형 pneumocyte의 증식을 초래한다.

섬유모세포는 fibrin침착이 있는 곳에 부착하여 결합조직성분을 분비하고 종국에는 폐포강내 및 간질조직내 섬유화를 초래한다.

본 연구에서 IL-1은 BLM투여후 기관지 상피세포에서 강양성으로 발현되었고, 폐포강 및 간질조직내 대식세포, 혈관내 중성구, 단핵구, 혈관주변 및 기관지 주변 중성구, 림프구에 양성반응을 보였으며 미약

하나마 혈관내피세포에서도 양성반응을 보였다.

BLM유도 폐 손상 및 폐 섬유화 과정은 혈관내피 및 폐포상피에 손상을 줌으로써 대식세포를 포함한 염증세포들이 유입하는 단계와 이들이 매개체를 분비하여 섬유모세포 및 세포의 기질과 같은 환경을 조절함으로써 섬유화가 진행되는 기반을 제공하는 단계로 크게 나누어 볼 수 있다. IL-1의 생체기능 정상 혈관내피세포의 활성화 및 유착물질 발현의 증가유도, IL-8을 활성화하여 중성구를 침윤시키는 기능은 전자의 단계에서 주된 역할을 담당할 것이며 후자의 단계에서는 섬유화를 조장시키는 방향으로 작용할 것으로 생각된다⁴¹⁾. 본 연구에서 BLM유도 폐 손상조직의 면역조직화학 염색과 기관지 폐포 세척액소견을 비교하여 보았을 때, BLM투여 제 1~7일에는 염증세포들이 유입하여 있는 단계로 IL-1의 양성세포 발현이 대식세포보다는 주로 혈관내 중성구, 혈관주변 및 기관지주변의 중성구를 중심으로한 염증세포에 집중적으로 나타났고 기관지 폐포 세척액 소견도 이 시기에 주 성분을 차지하는 것이 중성구이므로 BLM유도 폐 손상의 초기단계에서 IL-1의 주 생성소는 대식세포보다는 활성화된 중성구일 것이다.

본 연구에서 면역조직화학 염색상 특이하였던 점은 기관지 상피세포에서의 IL-1, IL-6, TNF- α 의 강 양성 발현이었는데, BLM유도 폐 섬유화시 기관지 상피세포에서의 cytokine과 같은 매개체 분비의 역할에 대해서는 문헌 보고가 없다. 본 연구결과상 기관지 상피세포가 IL-1, IL-6, TNF- α 를 발현함으로써 혈관내피세포에의 유착, 이동과정을 통해 염증세포를 손상받은 부위로 동원하고 IL-6와 같은 cytokine의 생성을 증폭시킴으로써 기관지 상피세포가 기도주변에서 일어나는 염증 및 면역반응을 항진 및 유지시키는 데 중요한 것 같다. 또 다른 가능성으로는 이들 cytokine에 대한 항체가 기관지 상피세포의 aberrant epitope와 교차반응을 일으키고 다른 세포가 분비한 cytokine을 상피세포가 흡수하여 마치 상피세포가 생성한 듯한 착각을 일으키게 했을 수도 있다. 이런 미비한 점은 추후 동소보합결합 검사나 Northern

blot과 같은 방법들을 통해 이들의 생성소를 보다 명확히 규명해볼 필요가 있을 것으로 사료된다. 시기적으로 IL-1, IL-6가 BLM투여후 일주일 이내에 기관지 상피세포에서 강하게 발현되다가 음성으로 전환된 점은 이들이 앞서 언급한 염증세포들의 혈관 밖으로의 유출 및 손상부위로의 이동에 관여할 것이라는 가정을 지지해 줄 수 있는 소견이다. IL-1과 IL-6의 경우 BLM유도 폐 손상 초기에 다른 성장인자들보다 약 2배에 가까운 많은 수(약 58개~65개/HPF)에서 양성반응을 보였는데 폐포염 및 혈관내피손상을 일으키는 BLM유도 폐 손상초기에 IL-1과 IL-6가 주된 역할을 하는 것으로 생각된다.

IL-6의 폐 섬유화의 역할에 대해서는 아직도 불확실한 점이 많으나 Yoshida등⁴²⁾은 IL-6를 adeno-virus 벡터를 이용하여 쥐에게 주입하여 본 바 IL-6는 폐 조직에 섬유화를 일으키지 않고 림프구성 폐포염의 병변을 유발한 반면 TGF- β 나 PDGF 유전자를 주입한 경우 폐포염의 병리소견은 미약하고 심한 폐 섬유화를 일으킨 것을 보고하였다. Denis⁴³⁾는 IL-6가 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)의 생성을 자극한다고 보고하면서 과민성 폐렴의 마우스 실험모델에서 IL-6을 주입시 섬유화가 감소하는 소견을 보았고 IL-6에 대한 항체 주입시 섬유화가 증가하는 소견을 보고하였다. Scheule 등(1992)의 보고에³⁵⁾ 따르면 IL-1 β , TNF- α 는 섬유모세포의 감수분열의 활성화도 및 교원질 섬유 생성을 증가시키는 반면 PGE₂와 IL-6는 섬유모세포의 성장을 저지하는 쪽으로 작용하며 이들의 균형이 깨져 IL-1 β , TNF- α 의 양이 우세할 때는 BLM유도 폐 섬유화를 유도할 수 있을 것이라고 하였다. 본 연구상 IL-6가 1주일 이후 급격히 그 양성발현정도가 감소한 점은 IL-6가 섬유화보다는 폐포염을 일으키는데 주된 역할을 하는 것으로 사료되며 PGE₂의 발현양상을 본 연구에서 분석해보지는 못했으나 TNF- α 가 21일까지 지속적으로 많은 수에서 양성으로 발현된 점을 감안해볼 때 IL-1 β , TNF- α 와 PGE₂와 IL-6의 균형이 섬유화 유도에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

TNF- α 는 중성구를 활성화시켜 탈과립을 유도하고 반응성 산소유리기의 방출을 자극하며 또한 섬유모세포의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다^{44~46}). Bienkowski 및 Gotkin⁴¹⁾은 TNF- α 는 IL-1 β 와 함께 I형 및 III형 교원질 섬유, fibronectin 유전자 발현을 증가시키며 BLM유도 폐 손상 및 섬유화시 초기에는 IL-1과 함께 collagenase 합성을 자극하는 쪽으로 주로 작용하고 폐 손상에 대한 복구가 일어나는 후기에 이들은 함께 교원질 섬유생성을 자극하는 쪽으로 작용한다고 하였다. 또한 Phan 및 Kunkel⁴⁰⁾은 BLM유도 폐 섬유화시 폐의 전체 TNF- α mRNA양이 BLM투여 후 15일까지 지속적으로 증가되어 있다고 하였다. 본 연구에서 TNF- α 의 면역조직화학 염색결과를 보면 BLM투여 1주일 이내에는 주로 혈관주변 및 기관지주변의 염증세포에서 양성을 보였고 그 이후 양성도가 60개이상에서 20~40개/HPF로 급격히 감소한 반면 기관지 상피세포와 대식세포의 양성발현은 21일까지 20개이상/HPF을 유지하였다. 이와 같은 소견상 TNF- α 가 초기에는 염증의 진행에, 후기에는 섬유화의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이를 뒷받침하는 간접증거로 TNF- α 에 대한 항체를 주입시 BLM이나 규소에 노출된 폐 조직에 섬유화를 감소시키는 효과를 가져왔다는 보고가 있다^{37, 38)}.

TGF- β 의 경우 폐 섬유화에 관여하는 매개체로서 가장 중요하게 부각되고 있는데^{16, 20, 21, 30)} 본 연구에서는 TGF- β 중 BLM 투여 후 폐의 대식세포가 분비하는 TGF- β 의 isoform은 TGF- β_1 으로서 TGF- β_2 , TGF- β_3 의 양은 변화를 보이지 않는다는 보고⁴⁷⁾에 근거를 두고 TGF- β_1 에 대한 면역염색을 시행하였다. 특발성 폐 섬유화 질환환자의 폐 조직 및 BLM유도 폐 섬유화 조직내에서 TGF- β_1 의 주생성소로는 폐의 대식세포, 기관지 상피세포가 알려져 있으며¹⁶⁾, 이점이 있으나 복구(repair) 및 섬유화 과정에 있어서 근섬유모세포 혹은 섬유모세포 및 호산구가 TGF- β_1 의 생성소라는 보고도 있다^{48, 49)}. 본 연구에서 TGF- β_1 은 7일이전에는 주로 혈관 및 기관지주변 염증세포와

기관지 상피세포에서 양성으로 발현된 반면 섬유화가 진행됨에 따라 이들의 양성발현은 급격히 감소되었고 폐 조직 간질내의 세포외 기질에도 약양성 반응으로 발현되었는데 이러한 양상은 28일까지 지속되었다. 이는 세포외 기질에 TGF- β_1 이 부착하여 세포외 기질이 BLM유도 폐 섬유화의 후반기 섬유화 진행시 TGF- β_1 의 저장소로서 계속적인 섬유화를 초래할 가능성을 뒷받침해준다. TGF- β_1 에 대한 면역조직화학 염색 및 동소보합결합 검사는 생성소에 있어서는 대체적으로 일치하는 모습을 보였으나 양성으로 발현되는 세포수에 있어서는 반드시 비례하지 않았는데 이는 TGF- β_1 mRNA의 발현기간이 너무 짧기 때문인 것으로 생각된다. Zhang 등⁵¹⁾은 TGF- β_1 mRNA가 1일에는 기관지 상피세포에서 음성이었다가 3일부터 양성으로 발현되었다고 보고하였지만 본 연구상에서는 1일부터 기관지 상피세포에 양성발현을 보였다. 이러한 결과의 차이는 추측해보건대 본 연구에서 이용한 digoxigenin labeled probe detection kit system이 Zhang 등이 사용한 isotope labeled probe detection system보다 결과해석상 더욱 객관적이고도 용이한 장점을 지니고 있기때문으로 사료되며 이러한 소견으로 미루어 기관지 상피세포는 BLM투여 1일부터 관여할 것으로 생각한다. TGF- β_1 에 대한 양성세포 발현수나 TGF- β_1 mRNA 양성 발현율을 볼 때 BLM 투여 제 7일군에서 최고조를 이루었던 점은 이전의 보고와 일치하였다^{16, 30, 51)}. 기관지 상피세포에서의 TGF- β_1 의 발현의 의미를 생각해 볼 때 TGF- β_1 은 상피세포의 강력한 억제자로 알려져 있으므로^{52, 53)} 상피세포에서의 TGF- β_1 의 발현은 상피세포의 증식을 억제하기 위한 증거라고 생각해 볼 수 있겠다.

혈소판에서 기원하는 PDGF는 중성구 및 섬유모세포를 이동시키는 화학주성을 갖고 있기때문에 복구과정을 유발시키는데 중요하며 반면 대식세포에서 유리되는 PDGF는 섬유화의 지속적인 유지에 주요 역할을 담당하는 것으로 생각하고 있다. 본 연구에서 PDGF는 폐의 대식세포에서 주로 발현되었으며 기관지 상피세포 및 혈관내피세포에서는 약양성으로 발현

되었는데 이는 PDGF가 폐 섬유화의 지속적인 유지에 더 많은 관여를 하는 증거로 생각한다. 대식세포에 발현되는 양상은 TGF- β_1 과 유사하였고 이 점은 PDGF가 TGF- β_1 의 영향하에 있는 한 증거로 생각한다.

본 연구에서 bFGF는 대식세포 및 섬유모세포가 주된 양성발현소였고 TGF- β_1 , PDGF에 의해 진행되는 섬유화를 성숙시키는 것으로 생각한다.

비타민 E를 BLM과 같이 투여시 BLM단독투여군에 비해 기관지 폐포 세척액 소견상에서는 총 세포수는 적은 경향을 보였으나 통계적으로 유의있는 차이는 보이지 않았으며 기관지 폐포 세척액내의 중성구의 비율 또한 통계적으로 유의있는 차이를 보이지 않았다. 성장인자 및 cytokines에 대한 면역조직화학 염색 소견상에서 모든 성장인자 및 cytokine에 대하여 발현되는 양성세포수가 적었던 점으로 미루어 BLM으로 인한 폐 손상 및 섬유화 과정에서 비타민 E가 미치는 영향가운데 상기한 6가지 매개체가 관여할 것으로 생각한다. 또한 금번 실험에서는 콜라겐의 양을 정량분석하여 보지는 못하였으나 비타민 E 병합투여군의 경우 BLM단독투여군에 비해 hematoxylin-eosin 염색 및 trichrome염색상 콜라겐 침착이 적은 것으로 판단되었으므로 이러한 결과는 정 등의 보고⁵⁵⁾와 부합되는 것으로 여겨지며, 섬유화가 감소하는 과정에 위의 매개체들이 또한 작용할 것으로 여겨진다.

BLM의 폐 손상 및 섬유화의 기전은 BLM투여 1~7일에는 폐포상피 및 혈관내피세포의 손상부위를 통한 중성구 등의 염증세포동원에서 이들이 유리하는 IL-1, IL-6, TNF- α 가 폐포의 정상구조파괴를 심화시키는 것으로 생각되며, 7~28일에는 대식세포에서 유리되는 TNF- α , TGF- β , PDGF, bFGF가 섬유모세포를 자극하여 섬유화를 진행시키는 것으로 생각된다. BLM유도 폐 섬유화의 한 기전으로 설명하는 IL-1, TNF- α 와 IL-6, PGE₂의 불균형관계, 교원질과 collagenase합성을 조절하는 기전, 또한 급성 염증으로부터 섬유화로의 전환기전에 대해 향후 더욱 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨지며 이는

특발성 폐 섬유화의 치료를 위해 필수적일 것으로 생각한다.

요 약

연구배경 :

특발성 폐 섬유화의 병인론으로 폐포염과 폐에 침윤한 염증세포 및 폐 조직자체의 실질세포들이 성장인자를 포함한 다양한 cytokine을 분비하여 실질조직을 구성하는 세포에 손상을 야기함으로써 중국에는 섬유화를 초래하는 것으로 이해하고 있다. 그러나 이들에 대한 개괄적인 연구가 부족하고 매개체 각각에 대한 단편적인 논문들뿐이어서 본 연구에서는 BLM유도 폐 손상 및 섬유화의 발생기전에 있어서 IL-1, IL-6, TNF- α 와 TGF- β_1 , PDGF, bFGF들의 역할을 규명하고자 하였다.

방 법 :

Wistar백서를 정상대조군, BLM투여군, BLM과 비타민 E병합투여군으로 나누었고 BLM 투여후 제 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21, 28일에 각각 도살한 다음 기관지폐포 세척술을 시행하여 시기별 총 세포수, 세포 구성성분비율을 살펴보고 TGF- β_1 , PDGF, bFGF, IL-1, IL-6, TNF- α 에 대한 면역조직화학 염색, TGF- β_1 mRNA에 대한 동소보합결합검사를 시행, 각 매개체의 생성소, 발현분포 및 정도를 분석하였다.

결 과 :

BLM투여후 1~7일에 중성구와 기관지상피세포에서 주로 생성된 IL-1, IL-6는 폐손상부위로 중성구를 동원하는 것으로 생각되며 7일이내에 기관지상피세포에서의 IL-1, IL-6의 양성발현은 기관지상피세포가 BLM유도 폐 섬유화시 기도주변에서 일어나는 염증 및 면역반응을 항진 및 유지시키는 간접증거로 생각된다. TNF- α 는 BLM투여후 1~5일에는 기관지상피세포, 중성구가 주생성소로 폐손상부위로의 염증세포의 이동에 주요역할을 하는 것으로 생각되며 7~28일에는 대식세포가 주생성소로서 섬유화를 촉진시키는 것으로 생각된다. TGF- β_1 은 기관지 상피세포,대

식세포가 주생성소로서 섬유모세포가 표적세포로 생각되며 섬유모세포가 세포의 기질을 생성하도록 자극하고 대식세포에서 유리된 PDGF와 함께 섬유모세포의 증식을 자극한다. 대식세포 및 섬유모세포에서 유리된 bFGF는 TGF- β_1 과 함께 교원질과 같은 세포외기질의 생성을 자극하는 것으로 여겨진다. 비타민 E와 BLM 병합투여군의 경우 6가지 성장인자 및 cytokine의 발현세포는 같았으나 발현세포수는 극히 미미하였고 trichrome염색상 섬유화도 미약하였다.

결론:

BLM으로 인한 혈관내피 및 폐포상피세포 손상이후 침윤한 중성구 및 기관지 상피세포가 IL-1, IL-6, TNF- α 를 분비하여 BLM투여 1~7일에 많은 수의 중성구를 동원하도록 유도하며 이들이 유리하는 다양한 효소 및 산소유리기가 폐의 정상구조를 파괴하여 섬유화를 시작하게 하는 것으로 생각한다. 손상이 진행됨에 따라 BLM투여 7~28일에 대식세포가 유리하는 TGF- β_1 , PDGF, bFGF, TNF- α 는 섬유모세포를 자극, 이들의 증식을 유도하고 또한 세포외기질의 생성증가를 유도하여 폐 섬유화를 진행시키는 것으로 사료되며 TNF- α 는 BLM투여후 전 기간에 걸쳐 다수의 세포에서 발현된 점으로 미루어 섬유화에 있어서 TGF- β_1 못지않은 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 또한 비타민 E가 BLM유도 폐 손상으로 인한 폐 섬유화의 정도를 감소시키는 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Jordana M, Richards C, Irving LB, Gauldie J: Spontaneous in vitro release of alveolar-macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. *Am Rev Respir Dis* 137: 1135, 1988
- Crouch E: Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 259: L159, 1990
- Shaw RJ, Benedict SH, Clark RAF, King TE: Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 143: 167, 1991
- Sheppard MN, Harrison N: Lung injury, inflammatory mediators and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax* 47: 1064, 1992
- Gauldie J, Jordana M, Cox G: Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* 48: 931, 1993
- Raghow R, Irish P, Kang AH: Coordinate regulation of transforming growth factor gene expression and cell proliferation in hamster lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 84: 1836, 1989
- Border WA, Ruoslahti E: Transforming growth factor-in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1, 1992
- Roberts AB, McCune BK, Sporn MB: Transforming growth factor- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41: 557, 1992
- Aubert JD, Dalal BI, Bai TR, Roberts CR, Hayashi S, Logg JC: Transforming growth factor- β_1 gene expression in human airways. *Thorax* 49: 225, 1994
- Smits A, Funa K, Vassbotn FS, Beausang-Linder M, Ekenstam F, Heldin CH, Westermark B, Nister M: Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in proliferative disorders of fibroblastic origin. *Am J Pathol* 140: 639, 1992
- Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128: 2177, 1982
- Postlethwaite AE, Raghow R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH: Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human

- recombinant IL-1 α and IL-1 β . *J Cell Biol* **106** : 311, 1988
13. Elias JA, Lentz V : IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* **145** : 161, 1990
14. Lesur OJ, Mancini NM, Humbert JC, Chabot F, Polu JM : IL-6, IFN- γ , and phospholipid levels in the alveolar lining fluid of human lungs. Profiles in coal worker's pneumoconiosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **106** : 407, 1994
15. Vanhee D, Gosset P, Marquette CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB : Secretion and mRNA expression of TNF alpha and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* **152** : 298, 1995
16. Khalil N, Bereznay O, Sporn M, Greenberg AH : Macrophage production of transforming growth factor- β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* **170** : 727, 1989
17. Antoniadou HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M : Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **86** : 1055, 1990
18. Cooper JAD Jr, Zitnik RJ, Matthay RA : Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. *Annu Rev Med* **39** : 395, 1988
19. Ignatz RA, Massague J : Transforming growth factor-stimulates expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* **261** : 4337, 1986
20. Border WA, Noble NA : Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **10** : 1286, 1994
21. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Stimulation of chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Exp Med* **165** : 251, 1987
22. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM : Transforming growth factor- β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 5788, 1987
23. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* **109** : 429, 1989
24. Pelton RW, Moses HL : The beta-type transforming growth factor- β . Mediators of cell regulation in the lung. *Am Rev Respir Dis* **142** : S 31, 1990
25. Fleischman RW, Barber JR, Thompson GR, Schaeppi UH, Illievsky VR, Coonney DA, Davis RD : Bleomycin induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax* **26** : 675, 1971
26. Starcher BC, Kuhn C, Overton JE : Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am Rev Respir Dis* **117** : 299, 1978
27. 이광길, 김정숙, 이유복, 김동식 : Bleomycin에 의한 폐 손상의 기전에 관한 형태학적 연구. 연세의대 논문집 **12** : 127, 1979
28. 이중달, 이유복 : Bleomycin의 기관내 투여로 유발된 폐장의 간질성 섬유증식증의 실험적 연구. 연세의대 논문집 **12** : 158, 1979
29. Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, McReynolds RA, Ward PA : Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat : inhibition by indomethacin. *Am J Pathol* **95** : 117, 1979
30. Hoyt DG, Lazo JS : Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagen, fibronectin and

- transforming growth factor-precipitate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **246** : 765, 1988
31. Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A : Increased production and immunohistochemical localization of TGF- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **5** : 155, 1991
 32. Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG : Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **317** : 202, 1987
 33. Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG : Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **85** : 2023, 1990
 34. Suwabe A, Takahashi K, Yasui S, Arai S, Sendo F : Bleomycin-stimulated hamster alveolar macrophages release interleukin-1. *Am J Pathol* **132** : 512, 1988
 35. Scheule RK, Perkins RC, Hamilton R, Holian A : Bleomycin stimulation of cytokine secretion by the human alveolar macrophage. *Am J Physiol* **262** : L386, 1992
 36. Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN : Enhanced IL-1 β and TNF- α release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* **150** : 4188, 1993
 37. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P : Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* **170** : 655, 1989
 38. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P : Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* **344** : 245, 1990
 39. Everson MP, Chandler DB : Changes in distribution, morphology and tumor necrosis factor- α secretion of alveolar macrophage subpopulations during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **140** : 503, 1992
 40. Phan SH, Kunkel SL : Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* **18** : 29, 1992
 41. Bienkowski RS, Gotkin MG : Control of collagen deposition in mammalian lung. *Proc Soc Exp Biol Med* **209** : 118, 1995
 42. Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, Satake M, Yamamoto S, Matsumoto N, Kaneda Y : A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, TGF- β_1 or PDGF B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 9570, 1995
 43. Denis M : IL-6 in mouse hypersensitivity pneumonitis : changes in lung free cells following depletion of endogenous IL-6 or direct administration of IL-6. *J Leukoc Biol* **52** : 197, 1992
 44. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LJ, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM : Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* **136** : 4220, 1986
 45. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-Destefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, Tsujimoto M : Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* **163** : 632, 1986

46. Le J, Vilcek J : Biology of disease : Tumor necrosis factor and interleukin 1 : cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 56 : 234, 1987a
47. Khalil N, Whitman C, Li Z, Danielpour D, Greenberg A : Regulation of alveolar macrophage TGF- β secretion by corticosteroids in bleomycin induced pulmonary inflammation in the rat. *J Clin Invest* 92 : 1812, 1993
48. Spry CJF, Karry AB, Gleich GJ : Trend : eosinophils. *Immunol Today* 12 : 384, 1992
49. Zhang K, Gharaee-Kermani M, Jones ML, Warren JS, Phan SH : Lung monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 153 : 4733, 1994
50. Silberstein GB, Flanders KC, Roberts AB, Daniel CW : Regulation of mammary morphogenesis : evidence for extracellular matrix-mediated inhibition of ductal budding by TGF- β_1 . *Dev Biol* 152 : 354, 1992
51. Zhang K, Flanders KC, Phan SH : Cellular localization of transforming growth factor- β expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 147 : 352, 1995
52. Jetten AM, Shirley JE, Stoner G : Regulation of proliferation and differentiation of respiratory tract epithelial cells by TGF- β . *Exp Cell Res* 167 : 539, 1986
53. Masui T, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC : Type β TGF is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2438, 1986
54. Panos RJ, Rubin JS, Aaronson SA, Mason RJ : Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast conditioned medium. *J Clin Invest* 92 : 969, 1993
55. 정순희, 용석중, 안철민, 신계철, 최인준, 조상호 : 백서에서 bleomycin투여로 인한 폐 손상 및 폐 섬유화에 대한 vitamine E의 영향. 대한 결핵 및 호흡기 학회지 42 : 184, 1995