

방사선에 의한 폐 섬유화증에서 c-Jun N-terminal Kinase(JNK)의 역할[†]

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실*, 방사선 종양학과교실**

어수택, 홍기영, 이영목, 김기업, 김도진,
김용훈, 박춘식, 염 욱*, 김은석**, 최두호**

= Abstract =

The Role of c-Jun N-terminal Kinase in the Radiation-Induced Lung Fibrosis

Soo-Taek Uh, M.D., Ki Young Hong, M.D., Young Mok Lee, M.D., Kiup Kim, M.D.,
Do Jin Kim, M.D., Seung Hyuk Moon, M.D., Yong Hoon Kim, M.D.,
Choon Sik Park, M.D., Eun Suk Kim, M.D.*, and Doo Ho Choi, M.D.*

Department of Internal Medicine and Radiation Oncology,
Collage of Medicine, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea*

Background : The underlying pathogenesis of radiation-induced lung fibrosis (RTLF) has not been very well defined. However, the role of TGF- β in the generation of RTLF has been a major focus because there is an increase in the expression of both the TGF- β m-RNA and its protein preceding RTLF lesions. The down stream signal after a TGF- β stimulated lung fibrosis includes the activation of many mediators such as Smad and c-Jun N-terminal kinase (JNK) through TAK1. It is we hypothesized that JNK activation may play a pivotal role in RTLF pathogenesis through increased transcription of the fibrogenic cytokines. The present study evaluates JNK activity in alveolar macrophages after irradiation and the relationship between JNK activity and the amount of collagen in the lung tissues.

Methods : C57BL/6 mice(20-25 gr, males) received chlorotetracycline(2g/L) in their drinking water 1 week prior to irradiation and continuously there after. The mice were irradiated once with 1400 cGy of 60CO γ -ray

[†]이 연구는 1999 학년도 순천향대학교 의학연구소 지원에 의한 결과임.

Address for correspondence :

Soo-Taek Uh, M.D.

Department of Internal Medicine , Collage of Medicine, Soon Chun Hyang University Hospital
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

over the whole chest. The cellular composition of the whole lung bronchoalveolar lavage fluids(BALF), elastin expression in the lung tissues, the level of hydroxyproline in lung tissues, and an *in vitro* JNK assay was measured before irradiation and one, four, and eight weeks after irradiation (RT).

Results : The volumes of BALF retrieved from instilled 4 mL of saline with 2% heparin were 3.7–3.8 mL for each group. The cell numbers were similar before ($4.1 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4/\text{mL}$) and 1 week ($3.1 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4/\text{mL}$) after RT. At four and eight weeks after RT, the cell number reached to $14.0 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4/\text{mL}$ and $10.0 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4/\text{mL}$, respectively. There were no changes in the lymphocytes and neutrophils population observed in the BALF after RT.

The H-E stain of the lung tissues did not show any structural and fibrotic change in the lung tissues at 4 and 8 weeks after RT. In addition, the amount of elastin and collagen were not different on Verhoeff staining of the lung tissues before RT to eight weeks after RT. The hydroxyproline content was measured with the left lung dissected from the left main bronchus. The lung were homogenized and hydrolyzed with 6 N HCl for 12 hours at 110°C then measured as previously described. The content of hydroxyproline, standardized with a lung protein concentration, reached a peak 4 weeks after RT, and thereafter showed a plateau.

An *in vitro* JNK assay using c-Jun₁₋₇₉-GST sepharose beads were performed with the alveolar macrophages obtained from the BAL. JNK activity was not detected prior to RT, However, the JNK activity increased from one week after RT and reached a peak four weeks after RT.

Conclusion : JNK may be involved in the pathogenesis because the JNK activity showed similar pattern observed with the hydroxyproline content. However, it is necessary to clarify that the JNK increases the transcription of fibrogenic cytokines through the transcription factor. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 450–461)

Key words : JNK, Irradiation, Fibrosis.

서 론

폐암의 치료에 사용되는 방사선 조사(thoracic irradiation)는 흉곽 및 여러 장기에 다양한 합병증을 발생시키며, 특히 방사선 섬유화증(radiation fibrosis)과 방사선 폐렴(pneumonitis)을 일으킨다. 이 두 가지 합병증에 의해 보다 많은 양의 방사선 조사는 제한 받고 있는 실정이다. 방사선 조사(irradiation)의 초기 효과는 보통 염증 세포들의 침윤, 간질 및 폐포 부종, 상피세포의 탈락에 의한 방사선 폐렴이며^{1,2}, 후기 효과는 호흡 곤란 등을 호소하는 방사선 섬유화증을 초래한다³.

현재까지도 방사선 섬유화증의 기전은 밝혀져 있지 않다. 따라서 방사선 섬유화증의 기전을 분자 생물학

적 관점에서 규명할 수 있다면, 이의 치료와 예방법을 밝히고 이어 유효한 양의 방사선 조사 투여를 가능하게 함으로써 폐암의 치료 효과가 증대될 수 있다.

특발성 폐 섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 어떤 원인인든 폐포 상피 세포(alveolar epithelium)가 상처를 받아 기저층(basal lamina)이 폭로되고 동시에 폐포 대식 세포(alveolar macrophage)에서 여러 가지 cytokines(interleukin 1, interleukin 8, TNF- α)과 산소기(hydrogen peroxide, superoxide 등)가 분비된다. 이어 growth factor인 platelet-derived growth factor(PDGF), insulin like growth factor-I(IGF-I) 등이 분비되어, 폐장내에 collagen I 과 III 의 생성이 증가되고 이들 collagen의 증가로 인하여 폐포 및 간질의 섬유화를

일으킨다⁴. 결국 폐포 및 간질내의 섬유화로 인해 가스 교환을 위한 폐포의 면적이 줄어들어 환자는 심한 저 산소증으로 결국 사망하게 되며, 그 5년 생존율은 약 50% 정도로⁵, 이 예후는 제1기 비소세포암 폐암 환자의 5년 생존율 67%⁶ 보다 나쁘게 보고되고 있다. 비록 폐암보다 그 빈도는 낮지만, 영국의 경우 그 빈도는 인구 10만명당 5명이며, 이 질병으로 인한 사망률은 연간 1,400명으로 보고하고 있을 정도로⁷ 예후가 나쁜 질병이다. 만약 방사선 섬유화증과 특발성 폐 섬유화증의 병인에 같은 성장 인자(growth factors)와 cytokines이 관계한다면, 같은 세포내 신호 전달 체계의 과정을 밟아 폐 섬유화증을 초래할 것으로 판단된다. 따라서 방사선 섬유화증의 병인에 관계하는 신호 전달 체계 과정을 이해하는 것이 IPF의 병인을 이해하는 데 필요하며 추후 IPF의 병인 연구와 치료 약제의 개발에 도움이 될 것이다.

방사선 섬유화증에 대한 정확한 발생 기전은 알려져 있지 않으나 섬유아세포에서의 collagen 합성을 촉진시키는 transforming growth factor- β (TGF- β)가 증가한다는 것은 이미 여러 실험에서 증명된 바 있다. 하지만 TGF- β 이후의 신호 전달 체계에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 다만 세포배양을 이용한 생체의 실험에서 TGF- β 에 의해 Smad pathway와 mitogen activated protein kinases(MAPKs)가 활성화된다는 것은 알려져 있다. 따라서 활성화된 TGF- β 에 의해 MAPKs중 c-Jun N-terminal kinase(JNK)가 활성화되고 활성화된 JNK에 의해 fibrogenic cytokine이 증가하여 fibrosis가 일어날 것이라고 가정할 수 있다.

본 연구는 흉부에 방사선을 조사한 백서를 이용하여 방사선 섬유화증 형성 과정에 JNK가 활성화되는 지, 그리고 JNK의 활성화와 collagen 합성과의 상관 관계를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 백서의 방사선 조사

10-16주령의 방사선 조사에 민감한 C57BL/6 mice⁸

를 2.5% 2,2,2-tribromoethanol(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA)로 복강을 통하여 마취시키고, 편평한 받침대에 양와위의 자세로 고정시켜 백서의 전 흉부에 14 Gy 혹은 16 Gy⁹의 ⁶⁰Co γ -ray (Eldorado Unit AECL, 1.25 MeV, 0.80 Gy/min)를 피부에서 80 cm 떨어진 상방에서 조사하였다. 방사선 조사는 20×25 mm portal을 사용하였고, 흉부 이외의 부위는 5.1 cm 두께의 납판으로 막았다. 방사선 조사 하루 전부터 백서를 희생시킬 때 까지 감염을 예방하기 위하여 백서가 마시는 물에 chlortetracycline(2 g/L)을 섞었다¹⁰.

방사선 조사 전과 조사 1, 4, 8 주후의 폐 조직을 얻어 실험에 사용하였다. 폐 조직의 염색을 위한 paraffin embedding에 소요된 군은 각 군마다 3마리를 사용하였고, 기관지 폐포 세척 세포의 처리 및 hydroxyproline을 위해 사용된 백서의 수는 6마리, 그리고 JNK assay를 위한 백서의 수는 5마리였다.

2. 기관지 폐포 세척술 및 세포의 처리

기관지 폐포 세척술은 Giri등¹¹의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 백서를 복강을 통하여 과다한 sodium phenobarbital(150 mg/kg)로 마취시킨 후, 20 gauge needle로 기관 삽관후 2% heparin이 함유된 1 ml의 생리 식염수로 4회 세척을 시행하고, 회수된 액은 세포의 분석때 까지 얼음에 보관하고 그 양을 기록하였다. 세포의 분석¹²은 먼저 회수된 기관지 폐포 세척액을 1,000 rpm에서 10분간 4℃에서 원심 분리한 후, phosphate buffered saline으로 1×10^6 /mL의 수로 맞추고 이를 이용하여 세포의 감별 분석(differential count) 및 총 세포수를 구했다.

3. 폐 조직의 준비 및 Verhoeff stain

백서를 마취한 후, 흉곽을 절개하고 기관에 삽관하여 폐를 분리한 후 분리된 폐는 10% neutralized formalin으로 30 cm H₂O의 압력으로 1시간 동안 실온에서 방치한 다음, paraffin embedding까지 10% neutralized formalin에서 밤새 고정하였다¹³. Ver-

hoeff stain은 고식적인 방법으로 시행하였다.

4. Hydroxyproline의 양 측정

Hydroxyproline의 양은 Eitzman 등¹⁶의 방법을 변형하여 사용하였다. 우심실을 통하여 3 mL의 PBS로 폐장내의 혈관을 세척한 후 좌측 폐를 얻어 2 mL의 PBS로 분탕(homogenize)시킨 후, 1 mL을 vacuum pump를 이용하여 건조시키고, 6 N HCl로 110°C에서 12시간 동안 가수 분해시켰다. 이어 가수 분해된 50 μ L에 1 mL의 1.4% (w/v) chloramine T(Sigma), 10% n-propranolol, 0.5 M sodium acetate, pH 6.0를 더한 후, 상온에서 20분간 방치한 후 1 mL의 Erlich's reagent (70% ethanol, 20% perchloric acid, 1 M p-dimethyl aminobenzaldehyde)를 가한 후, 65°C에서 15분간 처리하고 550 nm의 파장에서 양을 측정하였다.

5. 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°C에서 1시간 동안 혼합한 후 beads를 차가운 phosphate buffered saline 으로 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.

6. JNK assay

기관지 폐포 세척술로 5 마리의 백서에서 획득한 대식세포를 모두 모으고, RPMI 배지로 1×10^6 /ml의 수로 희석한 다음, 0.5×10^5 의 수를 6-well plates에서 5% CO₂, 37°C로 15분간 배양하였다.

In vitro kinase assay는 Chan등의 방법을 사용하였다¹⁷. 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 5 \times Laemmli로 중단시키고, 5분간 95°C에서 끓인 후 원심 분리시키고 12%의 SDS-PAGE를 이용하여 단백을 분리하고, nitrocellulose

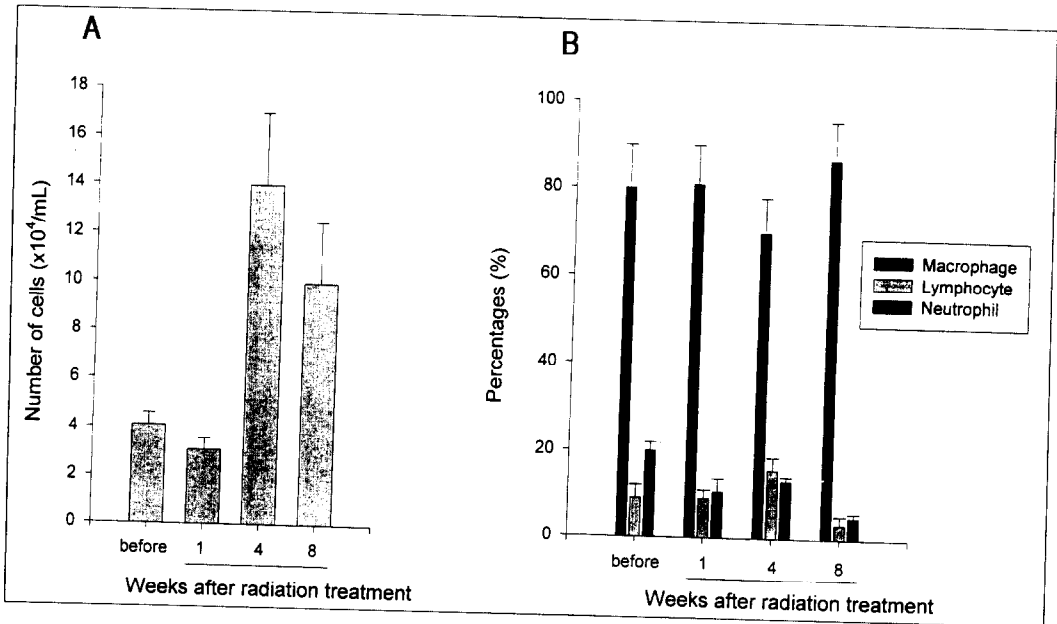


Fig. 1. The total cell count (A) and differential count (B) in bronchoalveolar lavage fluid from irradiated mice before and after irradiation. The total cell count increased from 4 weeks after irradiation (A). There was no significant changes of differential count in inflammatory cells before and after irradiation (B), however, the percentage of lymphocyte tend to increase 4 weeks after irradiation.

membrane으로 이동시킨 후 autoradiogram하여 분석하였다.

7. 결과 표시 및 통계 처리

결과는 평균 ± 표준 오차로 표시하였다. 각 군간의 기관지 폐포세척액내의 세포 분석과 hydroxyproline의 양은 Kruskal-Wallis H 분석을 이용하였으며, 의미가 있으면 Mann-Whitney U 분석을 하였다. 의미있는 차이는 p값이 0.05 이하일 때로 하였다.

결 과

1. 기관지 폐포 세척술상 세포의 감별 분석 및 총세포수

기관지 폐포 세척술시 회수되는 양은 방사선 조사 전, 후의 모든 군에서 백서 1마리당 3.5-3.8 mL로 일정

하였다. 총 세포수는 방사선 조사 전 ($4.1 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$ /mL)에 비해 1주 후 ($3.1 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$ /mL)에는 증가되어 있지 않았으나, 방사선 조사 4주 후 ($14.0 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$ /mL)부터 증가되어 8주 후 ($10.0 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$ /mL)에도 계속 증가되어 있었다 ($p < 0.01$) (Fig. 1-A).

세포의 감별 분석 상 대식 세포는 방사선 조사 전 ($76.0 \pm 0.9\%$)에 비해 8주 후에 증가 ($86.8 \pm 0.8\%$)되는 경향을 보였다. 림프구는 조사 전 $9.2 \pm 0.2\%$ 에 비해 조사 4주후 $15.8 \pm 0.3\%$ 로 증가되는 경향을 보였으나, 8주후에는 $3.3 \pm 0.1\%$ 로 감소하였다 (Fig. 1-B).

2. 폐장의 Verhoeff stain

방사선 조사 후 elastin의 합성이 증가되는 지를 알아보기 위하여 elastin, collagen, 세포를 구별할 수 있

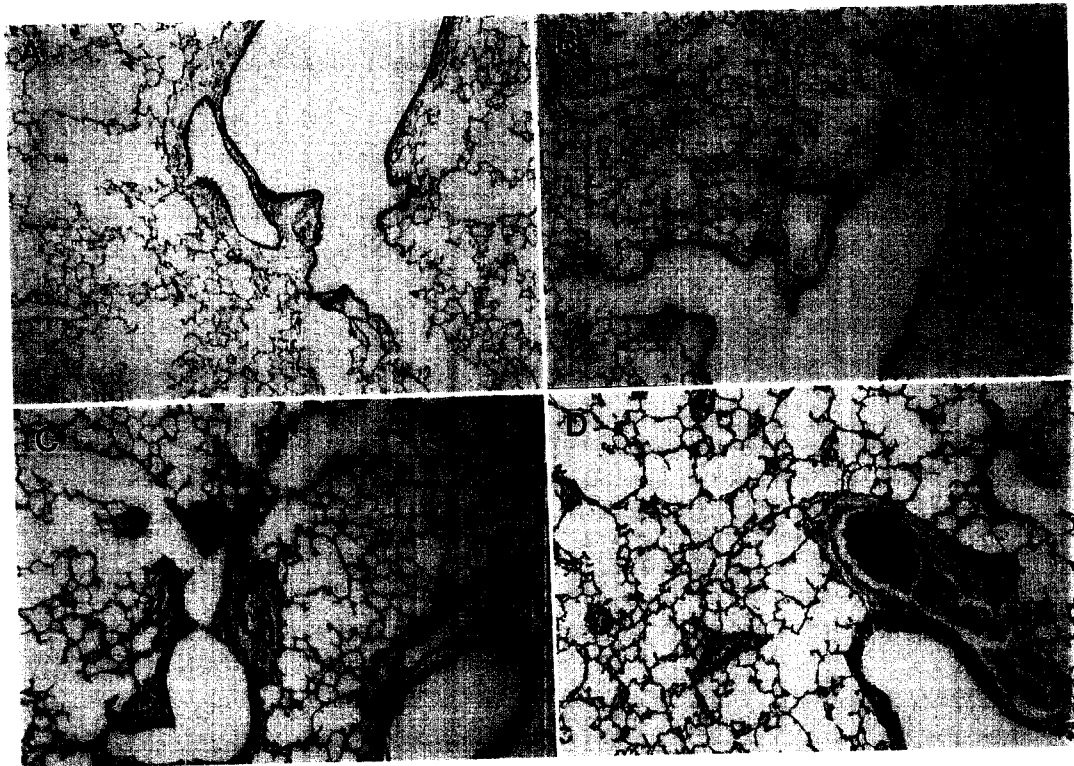


Fig. 2. Verhoeff staining of lung tissues before and 1, 4, 8 weeks after radiation. Radiation did not make any abnormal changes in lung tissues before (A) and 1 (B), 4 (C) weeks after radiation. Lung tissues after 8 weeks radiation (D) shows increased interstitial cellular infiltrations, but the amount of elastin was not changed.

는 Verhoeff stain을 시행하였다.

폐 조직은 방사선 조사 전과 방사선 조사 1주, 4주 후에 특이 소견 관찰되지 않았으며 8 주후 폐포 격막의 세포 침윤이 약간 증가된 것 이외에 특별한 폐포 조직의 변화 소견은 관찰되지 않았다. 또한 방사선 조사 8주 후에도 elastin의 염색이 증가되지는 않았다 (Fig. 2).

3. Hydroxyproline양의 변화

폐의 collagen양의 변화를 시사해주는 hydroxyproline의 양은 방사선 조사 전($137 \pm 14 \mu\text{g}/\text{mg}$)에 비해 조사 1주 후에는 비슷한 소견($140 \pm 15 \mu\text{g}/\text{mg}$)

을 보였으나 방사선 조사 4주($192 \pm 8 \mu\text{g}/\text{mg}$)에 증가하기 시작하여, 8주 후($183 \pm 13 \mu\text{g}/\text{mg}$)에도 계속 증가되었다($p < 0.05$) (Fig. 3).

4. JNK의 *in vitro* kinase assay

JNK *in vitro* kinase assay에 앞서 기질(substrates)이 정확하게 생성되었는 지를 알아보기 위하여 IPTG로 자극 전과 자극 1, 3시간 후의 세포 용해액 (cell lysates), 그리고 최종적으로 만들어진 GST-c-jun을 SDS-PAGE gel에서 전기 영동후 Coomassie 염색하여 확인한 결과 Fig. 4와 같이 정상적으로 만들어졌음을 알 수 있었다.

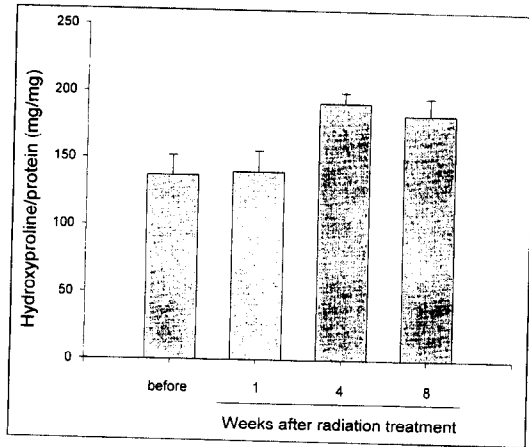


Fig. 3. The content of hydroxyproline in lung tissues before and 1,4,8, weeks after radiation. The amount of hydroxyproline was standardized by the amount of the lung. The amount of hydroxyproline increased 4 and 8 weeks after radiation.

방사선 조사후 시간 경과에 따른 JNK의 활성도를 알아보기 위한 JNK의 *in vitro* kinase assay 결과 방사선 조사 전에는 JNK의 활성도가 전혀 관찰되지 않았으나, 조사 1주 후에 활성도가 관찰되기 시작하였고, 방사선 조사 4주 후에 최고치에 도달하였으며 8주 후에는 4주 후와 비슷한 소견을 보였다(Fig. 5).

고 찰

다른 원인에 의한 폐 섬유화 처럼 방사선에 의한 폐

섬유화의 기전도 현재까지는 밝혀져 있지 않지만, 조직 손상 후 간질 세포의 증식이 주된 기전으로 만성적인 염증에 의한 cytokines 및 growth factors의 분비가 관계될 것으로 추측된다^{18,19}. 방사선 섬유화증의 병리 소견은 간질 내 collagen의 침착, 혈관 벽의 확장, 그리고 혈관 폐쇄가 특징이며²⁰, 아울러 대식세포를 포함한 여러 염증 세포가 간질 내에 침착된다²¹. 이들 염증 세포중 대식세포가 가장 중요하다고 생각되며, 기도나 폐포에서 발견된다²². 최근의 연구에 의하면, 폐의 방사선 조사 후 monocyte chemotactic protein-1이 증가하는 것으로 보아 림프구의 역할과 함께 대식 세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²³. 따라서 본 연구에서도 폐장의 여러 세포들 중 폐포 대식세포를 대상으로 하였다. 본 실험에서와 같이 대식세포는 방사선 조사 후 증가하며, 아울러 platelet-derived growth factor(PDGF)²⁴, interleukin-1(IL-1)²⁵, tumor necrosis factor- α (TNF- α)²⁶를 분비하는 것으로 알려져 있고, 이들 cytokines은 섬유아 세포의 기능과 collagen의 합성을 증가시켜 폐 섬유화를 유발할 것으로 추측된다.

Johnston등의 실험에 의하면 백서에 방사선 조사를 한 후, TNF- α 의 전사가 1, 7, 14일째 증가됨을 관찰하였고²⁶, 방사선 조사 8주 후에도 여전히 TNF- α 의 전사와 translation이 증가되어 있는 소견으로 보아 TNF- α 가 방사선 폐 섬유화증에 주요하게 관계할 것으로 추측할 수 있다. 방사선 폐섬유화증 외에도 TNF- α 는 IPF의 병인으로 여겨지고 있다. 즉, IPF

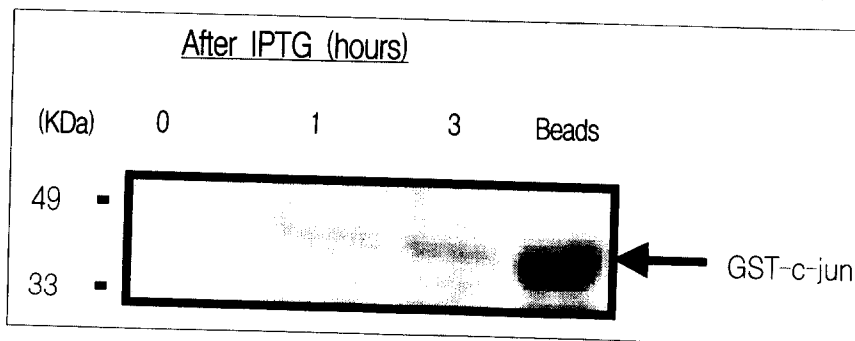


Fig. 4. The purification of GST-c-jun was confirmed by Coumassie blue stain of SDS-PAGE gel. GST-c-jun was well induced 1 and 3 hours after IPTG and well purified by beads.

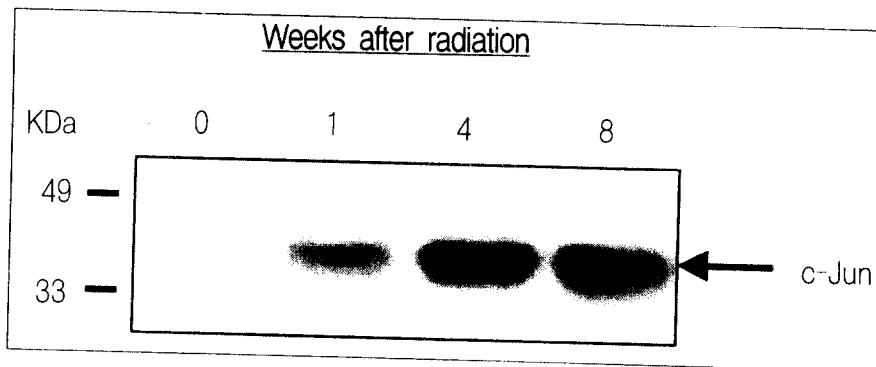


Fig. 5. *In vitro* kinase assay of JNK. The c-Jun was phosphorylated from 1 week after radiation. The phosphorylation of c-Jun reached a peak 4 weeks after radiation and then decreased 8 weeks after radiation, showing similar pattern with the content of hydroxyproline in the lung (Fig. 3).

와 병리학적으로 유사한 bleomycin-induced lung 모델의 백서에 bleomycin 투여 5내지 15일 후 부터 전체 폐의 TNF- α m-RNA가 증가되고, anti-TNF- α antibody나 항 TNF- α 혈청을 투여하면, bleomycin에 의한 폐 섬유화를 예방한다고 보고하였다²⁸. IPF 환자의 기관지 폐포 세척액내에는 TNF- α 의 단백질 양이 정상인에 비하여 증가되어 있고, IPF 환자의 대식세포도 TNF- α 의 m-RNA 양이 증가되어 있다²⁹. 그리고 IPF 환자와 정상인의 폐에서 추출한 RNA로 Northern blot을 시행하면 IPF 환자에서 정상인에 비하여 TNF- α 가 현저하게 표현이 증가됨을 보였고, 그리고 섬유화된 폐에서도 TNF- α 는 대식세포, 제 II 형 폐포표피 세포에서 관찰되었다³⁰. Kapanci 등의 실험에 의하면 IPF 환자의 제 II 형 폐포상피 세포 및 간질성 대식 세포에서 TNF- α 가 표현된다고 보고 한 바 있다³¹. 최근 TNF- α transgenic mice를 이용한 흥미있는 실험에서, 아무런 처치를 하지 않아도 사람의 IPF와 유사한 폐 병변을 보였으며, 그 병변 정도가 심할수록 TNF- α m-RNA가 증가되었으며, 상기 실험과 유사하게 제 II 형 폐포표피 세포에서 TNF- α 의 표현이 증가되었다³². 이상의 실험에서 TNF- α 가 폐 섬유화증에 중요한 역할을 할 것으로 생각되지만 어떠한 신호전달체계를 통하여 폐 섬유화에 이르는지는 밝혀져 있지 않다. 다만, TNF- α 에 의해 활성화된

TNF receptor I (이하 CD120a (p55)로 표현)의 신호전달 체계를 통하여 TRAF2, TRADD, MEKK1, MKK4, JNK 순으로 활성화되고 이어 활성화된 JNK를 통하여 c-Jun, Elk1, ATF2 등의 transcription factor(activator protein-1, AP-1)가 활성화되고³⁴⁻³⁷ 이들이 핵내로 이동되어 섬유화를 일으킬 수 있는 단백질의 전사를 유도하여 폐 섬유화가 일어날 것으로 추측된다.

JNK는 MAPKs 중의 하나로 핵단백질이며 전사인자인 c-Jun을 인산화시켜 전사를 증가시키는데 본 연구에서 JNK의 *in vitro* kinase assay 결과 방사선 조사 전에는 JNK의 활성도가 전혀 관찰되지 않았으나, 조사 1주후에 활성도가 관찰되기 시작하였고, 방사선 조사 4주후에 최고치에 도달하였으며 8주후에는 4주후와 비슷한 소견을 보여 방사선을 조사후 일정한 시간이 경과함에 따라 총 세포수와 대식 세포 분획의 증가와 hydroxyproline 양의 증가를 동반한 JNK 활성도의 증가 등의 연구 결과를 통해 방사선 폐섬유화증의 형성 과정에 있어 JNK가 관여되는 것을 확인하였다.

Collagen은 세포 외부의 골격을 구성하는 주된 단백질로 체단백질의 약 30%를 이루고 있으며 collagen type I, II, III로부터 fibril의 중합체가 생성된다. 특징적인 α -chain의 triple-helix 구조를 만들기

위해서는 proline이나 lysine의 hydroxylation이 필요하게 되어 collagen의 약 10%는 hydroxyproline으로 구성되어 있어 폐의 collagen양의 변화는 hydroxyproline의 양을 이용하여 측정할 수 있는 데 본 연구에서도 방사선 조사 4주후 hydroxyproline 양의 증가 소견 보여 이를 통해 collagen 생성이 증가되었음을 알 수 있었다. Elastic fiber는 elastin과 microfibril로 구성되어 있는데 불용성 단백 중합체인 elastin의 전구물질인 tropoelastin은 평활근이나 섬유아 세포에서 생성된다. 본 연구에서 대사의 방사선 조사 후 elastin의 합성 정도를 알기 위한 Verhoeff stain상 폐 조직은 방사선 조사전과 방사선 조사 1주, 4주 후에 특이 소견 관찰되지 않았으며 8주 후에도 폐포 격막의 세포 침윤이 약간 증가된 것이외에 특별한 폐포 조직의 변화 소견은 관찰되지 않았고, 8주 후에도 elastin의 염색이 증가되지 않아 elastic fiber는 형성되지 않았다. 이는 방사선 조사 후 8주 이상 계속 관찰한다면 elastic fiber는 관찰될 것으로 판단된다.

향후 폐 섬유화증에서의 신호 전달체계 과정에서 JNK의 역할을 확인하기 위해서는 첫째로, 방사선 조사 후 JNK에 의한 장기적인 영향과 둘째, fibrogenic cytokine과 JNK의 활성화와의 관계, 셋째, 특발성 폐섬유화증에서의 JNK의 활성화에 대한 연구가 추후 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

서 론:

폐암의 치료에 사용되는 방사선 조사는 흉곽 및 여러 장기에 다양한 합병증을 발생시키며, 특히 방사선 섬유화증과 방사선 폐렴을 일으킨다. 방사선 조사의 초기 효과는 보통 염증 세포들의 침윤, 간질 및 폐포 부종, 상피세포의 탈락에 의한 방사선 폐렴이며 후기 효과는 방사선 섬유화증을 초래한다.

방사선 조사는 폐장의 염증 세포에서 TGF-beta의 단백 합성 및 활성도를 증가시키고, 생체의 실험에서

TGF-beta는 mitogen activated protein kinases (MAPKs)를 활성화시킨다는 것이 알려져 있다. c-Jun N-terminal kinase(JNK)는 MAPKs중의 하나로 핵단백질인 c-Jun을 인산화(phosphorylation)시켜 전사(transcription)를 증가시키는데 생체의 실험에서 자외선 조사 후 대식 세포에서 JNK의 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다.

하지만 현재 까지 생체내에서 JNK가 방사선 조사에 의해 활성화되는지 그리고 이들 활성화가 방사선 섬유화증의 병인에 관계하는 지는 알려진 바 없다. 본 연구는 흉부에 방사선을 조사한 백서를 이용하여 방사선 섬유화증의 병인에 JNK가 신호 전달 체계에서 주요한 역할을 담당하는 지를 알아보고자 시행하였다.

대상 및 방법:

C57BL/6 백서의 전 흉부에 14 Gy의 $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray를 조사한 후 일정한 간격(1주, 4주, 8주)으로 폐장의 세포 분석을 위한 기관지 폐포 세척술, elastin의 합성 정도를 측정하기 위한 Verhoeff stain, collagen 합성 양을 알기 위한 hydroxyproline의 측정, JNK 활성도를 알기 위한 *in vitro* JNK assay를 시행하였다.

결 과:

폐장의 기관지 폐포 세척 소견상 총세포수는 방사선 조사 4주, 8주 후에 증가하는 소견을 보였다. 세포의 감별 분석상 림프구는 4주 후 증가되는 경향을 보였다.

Verhoeff 염색상 폐포 조직의 특이 변화 소견은 없었으며 hydroxyproline의 양은 방사선 조사전에 비해 4주, 8주 후에 증가하는 소견을 보였다.

방사선 조사 후 시간이 경과함에 따라 4주 후에 c-Jun N-terminal kinase(JNK)의 활성도가 가장 높았으며 8주 후에는 4주 후와 비슷한 활성도를 보였다.

결 론:

흉곽에 방사선 조사 후 hydroxyproline양의 증가와 함께 JNK 활성도의 증가 소견을 보여 방사선 폐섬유화증의 병인에 JNK가 관여될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Jennings FL, Arden A. Development of experimental radiation pneumonitis. *Arch Pathol* 1961; 71:437-46
2. Bennett DE, Million RR, Ackerman LV. Bilateral radiation pneumonitis, a complication of the radiotherapy of bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1969;23:1001-18
3. Warren S, Spencer J. Radiation reaction in the lung. *Am J Roentgenol* 1940;43:682-701
4. Chan ED, Worthen GS, Augustin A, Lapadat R, Riches DWH. Inflammation in the pathogenesis of interstitial lung diseases. In : King, T. E. Jr, and Schwarz, M., eds. *Interstitial Lung diseases* : B.C. Decker Inc., 1998.
5. 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 combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1989;44:280-8
6. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997;111:1718-23
7. Coker PK, Laurent GJ. Anticytokine approaches in pulmonary fibrosis: bringing factors into focus. *Thorax* 1997;52:294-6
8. Hanston CK, Travis EL. Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 1997;57:5286-91
9. Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor β gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:621-31
10. Adamson IYR, Bowden DH, Wyatt JP. Radiation survival: improved rates following chlortetracycline administration. *Radiat Res* 1970;44: 478-83
11. Giri SN, Hyde DM, Nakashima JM. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid from bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Toxicol Pathol* 1986;14:149-56
12. Giri SN, Hyde DM. Ameliorating effect of an interferon inducer polyinosinic polycytidylic acid on bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters: morphologic and biochemical evidence. *Am J Pathol* 1988;133:525-36
13. Scherle WF. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Microscopie* 1970;26:57-60
14. Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* 1996;97:232-7
15. Chan ED, Winston BW, Jarpe MB, Wynes MW, Riches DWH. Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by $\text{TNF}\alpha$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 13169-74
16. Kumar RK, Lykke AWJ. Messages and handshakes: Cellular interactions in pulmonary fibrosis. *Pathology* 1995;27:18-26
17. Rochester CL, Elias JA. Cytokines and cytokine networking in the pathogenesis of interstitial and fibrotic lung disorders. *Semin Respir Med* 1993; 14:389-416
18. Vergara JA, Raymond U. Changes in lung mor-

- phology and cell number in radiation pneumonitis and fibrosis : a quantitative ultrastructural study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;2:273-232
19. Carrington CB, Gaensler EA, Coutur RE, Fitzgerald MX, Gupta RG. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med* 1978;298:801-9
20. Wesseliuss LJ, Kimler BF. Alveolar macrophage proliferation in situ after thoracic radiation of rats. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:212-20
21. Johnston CJ, Wright TW, Rubin P, Finkelstein JN. Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp Lung Res* 1998;24:321-37
22. Martinet Y, Rom WM, 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* 1987; 317:202-9
23. Matsushima K, Taguchi M, Kovacs EJ, Young HA, Oppenheim JJ. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin-1(IL-1) activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J Immunol* 1986;136:2883-91
24. Johnston CJ, Piedboeuf B, Rubin P, Williams JP, Baggs R, Finkelstein JN. Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat Res* 1996;145:762-7
25. 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
26. 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 fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993;150:4188-96
27. Piguet PF, Ribaux C, Karpuz V, Grau GE, Kapanci Y. Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1993;143:651-5
28. Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2163-9
29. Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, Kapanci Y, Whitesett JA, Piguet PF, Vassalli P. Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1995;96:250-9
30. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85: 803-15
31. 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
32. 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

33. 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.