Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 45, No. 4, Aug, 1998

□원 저□

유리규산에 의한 폐장내 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β의 발현†

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 현암신장연구소

기신영, 박성우, 이명란, 김은영, 어수택, 김용훈, 박춘식, 이희발

= Abstract =

Silica induced Expression of IL-1β, IL-6, TNF-β, TGF-α, in the Experimental Murine Lung Fibrosis

Shin Young Ki M.D., Sung Woo Park M.D., Myung Ran Lee, Eun Young Kim, Soo-Taek Uh M.D., Yong Hoon Kim M.D., Choon Sik Park M.D., Hi Bal Lee M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hyonam Kidney Laboratory, Soonchunhyang University, Seoul, Korea

Background : Silica-induced lung diseases is characterized by the accumulation of inflammatory cells at early stage and fibrosis in pulmonary parenchyma and interstitium at late stage. As a consequence of inflammation, silicosis is accompanied with the expansion of interstitial collagen and the formation of fibrotic nodule. In this process, several kinds of lung cells produce cytokines which can amplify and modulate pulmonary fibrosis. The alveolar macrophage is a potent source of proflammatory cytokines and growth factor. But in the process of silicotic inflammation and fibrosis, there are many changes of the kinetics in cytokine network. And the sources of cytokines in each phase are not well known.

Method : 2.5 mg of silica was instillated into the lung of C57BL/6J mice. After intratracheal instillation of silica, the lungs were removed for imunohistochemical stain at 1, 2, 7 day, 2, 4, 8, 12 week, respectively. We investigated the expression of IL-1β, IL-6, TNF-α and TGF-β in lung tissue.

Results : 1) The expression of IL-6 increased from 1 day after exposure to 8 weeks in vascular endothelium. Also peribronchial area were stained for IL-6 from 7 days and reached the peak level for 4 weeks. 2) The IL-1β was expressed weakly at the alveolar and peribronchial area through 12 weeks. 3) The TNF-α expressed strongly at alveolar and bronchial epithelia during early stage and maintained for 12 weeks. 4) TGF-β was expressed strongly at bronchial epithelia and peribronchial area after 1 week and the strongest at 8 weeks.

Conclusion : The results above suggests IL-6, TNF-α appear to be a early inflammatory response in silica

† 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제(과제번호 94-1400-07-01-3) 연구비에 의하여 연구되었음.

induced lung fibrosis and TGF-β play a major role in the maintenance and modulation of fibrosis in lung tissue. And the regulation of TNF-α production will be a key role in modultion of silica-induced fibrosis. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 835-845)

Key words : silica, fibrosis, macrophage, immunohistochemical stain, TNF-α, TGF-β

서 론

유리규산 (silica) 이 폐장내로 흡입되면 폐장의 하부 기도에 염증세포의 축적이 초기에 발생하고 후기에 규폐결절 (silicotic nodule) 의 형성과 함께 폐실질과 간질(interstitium)에 섬유화가 발생한다[1]. Silica가 폐장내로 흡입되면 폐포관과 세기관지에서 시작되는 폐포염이 발생하고 폐포에 침착된 silica 는 대식세포에 탐식되어 폐간질로 이동되어 염증매개물을 분비한다. 그 결과, 염증세포 축적에 의한 염증반응이 발생하고 염증반응의 치유 과정에서 형성된 교원질의 비정상적인 형성으로 폐장의 구조적 변화를 초래하게 된다[2]. 이 과정에서 폐포대식세포나 폐간질에 있는 대식세포에서 염증반응에 중요하게 관여하는 cytokines이 분비된다. Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6) , tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등과, 염증이 만성화되는 과정에서는 섬유화에 관계한다고 알려진 transforming growth factor-β (TGF-β), platelet derived growth factor (PDGF) 등이 분비되어[3] 폐섬유화의 진행과 유지에 중요한 역할을 한다.

실험적 폐섬유화증의 model에서 각 cytokine의 변화에 대해서는 많은 연구가 진행되어져 왔다. TNF-α의 활성화는 Piguet 등의 실험에서 mouse의 폐장내로 silica를 투여 후 형성된 silicotic nodule에서 TNF-α의 mRNA가 증가하고, 또한 같은 실험에서 TNF-α 중화항체를 전처치했을 때 silica에 의한 폐섬유화가 억제되어 silica에 의한 폐섬유화증에 TNF-α가 중요한 역할을 할 것을 시사하였으나 이 실험에서 TNF-α의 분비부위에 대해서는 밝히지 못하였다[4]. 폐포대식세포가 lipopolysaccharide (LPS)로 자극받으면 TNF-α의 분비가 증가되어 폐포대식세포가 TNF-α 형성의 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔으나 그외 혈관의 내피세포나 평활근에서도 TNF-α의 분비를 관찰할 수 있었다[5]. IL-1β는 여러 폐질환에 따라 활성화에 차이를 보이며, silica에 의한 폐섬유화증에서 IL-1β는 폐포대식세포에서 비교적 초기에 분비되는 것으로 알려져 있으나[6], 활성화의 정도와 시간에 따른 변화는 잘 알려져 있지 않다. IL-6의 분비부는 다양하여 폐포대식세포 뿐만 아니라 섬유모세포에 의해서도 분비되며 폐섬유화에 관여할 것으로 추정되고 있으나 폐섬유화 과정에서 IL-6의 역할은 확실히 규명되어있지 않다[7,8]. TGF-β는 규폐증에서 조직내 기질(matrix)의 침착과 섬유화에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다[1]. 그러나 초기의 규폐증 병변에서는 TGF-β의 형성은 관찰되어지지 않고 후기의 규폐결절에서 TGF-β의 증가가 관찰된다는 보고는 있으나 보고마다 차이가 있어[4] silica에 의한 폐섬유화과정에서 TGF-β의 역할은 아직 확실히 규명되어 지지는 않았다. 또한 TGF-β의 형성에 대한 proinflammatory cytokine의 역할도 아직 정확히 알려 있지 않다. TNF-α가 TGF-β를 증가시킬 것을 시사하는 실험의 보고도 있으나[9] cytokine들의 상호관련성에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 섬유화 과정에서 분비되는 cytokine들의 상호작용은 일부 밝혀진 바에 의하면 IL-1β는 대식세포의 IL-6 분비를 자극하고 생성된 IL-6는 TNF-α의 생성을 억제한다고 알려져 있어 cytokine 간의 상호연결망(network)이 있을 것으로 추정되나 IL-1β과 IL-6, TNF-α가 공존하여 섬유화 cytokine의 생성에 어떠한 영향을 미칠지에 대해서는 아직 확실치 않다[10,11]. 그러므로 폐섬유화증이 진행되는 과정에서 cytokine

의 변화를 분석하는 것은 폐섬유화증의 병태생리를 규명하는데 매우 중요할 것으로 사료된다.

본 연구는 silica 투여시 폐섬유화증이 잘 유발되어지는 C57BL/6J[12] mouse의 폐장내로 silica를 투여 후 시간에 따른 폐조직의 변화와 면역화학조직염색법(immunohistochemical stain)을 이용하여 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β 단백 발현의 변화와 분비부위를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 유리 규산의 준비

Dauber 등의 방법을 이용하여 Silica (SiO_2, 약 80%가 입자크기 1-5㎛ Sigma co.) 분말을 1N HCl에 넣고 끓인 후 증류수로 세척하고 건조시킨 후 무게를 측정하여 200℃에서 2시간 동안 건열 멸균하여 내재된 내독소를 제거하였다[14].

2. 대상동물 및 silica 투여

생후 8-10주 된 체중 15-20gram의 수컷 C57BL/6J을 이용하였다. C57BL/6J에 sodium phenobarbital를 복강내로 주사하여 마취시킨 후, 앙와위로 눕힌 다음 기관(trachea)과 식도 주위의 결체조직을 박리하였고, 기관과 식도 사이에 봉합사를 두었다. 이어 후두 직하방의 기관의 연골 사이에 26Gauge 주사침으로 2.5mg의 silica가 혼합된 endotoxin-free saline50 μℓ 를 주입하였다. 음성대조군으로는 생리식염수 50 μℓ 를 주입하였다. Silica 주입 1일, 2일, 1주, 2주, 4주, 8주, 12 주째 실험동물을 경추 탈골로 희생시키고 개흉하여 육안 관찰을 한 후 일측폐를 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β에 대한 면역화학조직염색을 위해 OCT 액에 도포하여 액화질소에 얼린 후, -70℃에 저장하였다. 다른 일측폐는 병리조직의 소견을 관찰하기 위하여 4% paraformaldehyde에 20분간 고정한 후 인산완충식염수로 세척 후 0.5M sucrose용액에 16시간 담가 놓고 paraffin으로 조직을 포매한 후 periodic acid schiff (PAS) 염색을 시행하였다. 실험쥐의 구성은 50 μℓ 의 생리식염수를 투여한 정상대조군, 2.5mg silica를 단독 투여한 후 0주, 1주, 2주, 4주, 8주, 12주까지 각각 6마리씩 희생하였다.

4. IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β의 면역화학조직염색법

-70℃에 동결보관된 폐장조직을 두께 4mm로 동결절편 (cryosection) 한 뒤 poly-L-lysine으로 처리된 slide에 부착시켰다. 조직의 고정을 위하여 cold acetone으로 4℃에서 10분간 처리하고 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β의 면역화학조직 염색을 시행하기 위하여 조직절편을 0.01mM의 Tris-buffer saline (pH 7.6)에 세척한 후 내재된 avidin-biotin을 억제하기 위하여 0.1% avidine-biotin blocking 용액으로 실온에서 10분간 반응시켰다. 비특이 결합을 방지하기 위하여 3% 토끼혈청을 첨가하고 실온에서 10분간 처리하였다. 조직을 적정희석된 일차항체와 4℃에서 16시간 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 5회 세척후 이차항체를 실온에서 1시간, 삼차항체는 Streptavidine이 부착된 alkaline phosphatase로 실온에서 1시간 반응시켰다. Chromogen으로 levamisol 5mM이 함유된 Naphtol phosphate/Fast red TR salt를 이용, 직사광선을 차단하고 어두운 곳에서 반응시켰다. 발색반응을 끝내기 위해 증류수로 cover glass를 제거한 후, pH 8.0의 Tris 완충액으로 세척한 다음 건조시키고 crystal mount (Biomeda corp., USA)로 봉입하였다. 실험에 사용된 항체의 종류와 구입회사, 희석농도는 Table 1에 정리하였다.

5. 면역화학조직 염색법의 반정량적(semiquantitative) 분석

폐조직은 기관지 상피층, 기관지의 기저막과 주위조직, 혈관, 폐포의 4곳을 나누어 40, 100, 200, 400

Table 1. Antibodies for immunohistochemical stain.

		사용희석용량
A. 일차항체		
Monoclonal hamster anti-mouse-IL-1	(Genzyme)	5 μg / mℓ
Monoclonal rat anti-mouse-IL-6	(Genzyme)	10 μg / mℓ
Monoclonal goat anti-mouse-TGF-β	(R & D)	10 μg / mℓ
Polyclonal rabbit anti-mouse-TNF-α	(Genzyme)	25 μg / mℓ
B. 이차항체 (biotinylated-polyclonal)		
Rabbit Ab anti-mouse Ig	(Dakopatts, Denmark)	1 : 200
Rabbit anti-goat Ig	(Dako)	1 : 300
Rabbit anti-rat Ig	(Dako)	1 : 300
Wsine anti-rabbit Ig	(Dako)	1 : 200
Goat anti-hamster Ig	(Jackson)	1 : 200
C. 삼차항체		
Avidin conjugated alkaline phosphatase	(Dako)	2g/mℓ(1 : 200)

의 배율로 전폐를 관찰하였다. 발현의 정도는 Craighead 의 방법[15]을 변형하여 제4도까지 나누어 반정량적으로 분석하였으며 제0도는 발현이 없는 상태, 제4도는 진한 적색의 염색이 있으면서 세포안의 모습이 구별이 안될 정도의 염색 상태, 제1도는 약한 적색, 제2도는 약간 진한 적색이나 세포내의 모양을 볼 수 있는 상태, 제3도는 진한 적색이면서 세포안의 구조를 볼 수 있는 상태로 세분하였다. 대조군은 실험 제0일부터 제8주까지 변화가 없이 일정한 소견을 보여 제0일째의 소견만을 기술하였다.

결 과

1. Silica 투여 후 폐장 조직의 변화

1) 육안소견

Silica군에서는 2주부터 육안적 소견의 변화가 관찰되었으며 8주째 변화가 가장 심했다. 정상폐는 폐조직이 부드럽고 표면이 매끈하였으나 silica흡인군에서는 폐조직이 단단하였으며 표면이 백색으로 변화된 여러 크기의 결절 관찰되었다. 폐엽을 절편한 면에서 염증변화의 소견을 관찰할 수 있었으나 폐전체에 미만성으로 균일하게 변화가 생긴 예보다는 국소적으로 병변이 있는 부위와 정상적 소견을 가지고 있었던 부위가 섞여 있었다. 염증변화는 주로 큰 기관지부터 작은 기관지에 이르기까지 기관지를 중심으로 백색의 결절성 병변을 관찰할 수 있었으며 결절의 크기가 다양하였다.

2) Silica 흡입 폐장에서 광학현미경 소견

정상대조군에서는 시간이 지나도 광학현미경소견상 폐포, 혈관, 기관지에 병변을 관찰할 수 없었다 (Fig. 1A). Silica군에서 1주일째 혈관과 기관지와 세기관지 주위로 염증세포들이 경도의 결절의 형태로 침윤되는 소견과 함께 폐포벽의 비후가 관찰되었다.

Silica 군에서 2주일째 염증세포의 침윤은 기관지와 세기관지 주위로 중등도의 침윤을 관찰할 수 있었고 혈관주위의 염증세포의 침윤이 1주일째의 조직 소견과 비교하여 심해졌다 (Fig. 1B). 4주째에는 기관지를 중심으로 심한 염증세포 침윤으로 세포증식성 결절성 병변을 형성하였고 기도점막의 기도내로의 함몰이 관찰되었다. 기관지안으로도 염증세포의 침윤에 의한 세포증식성 결절성 병변이 생기면서 기관지의 변형

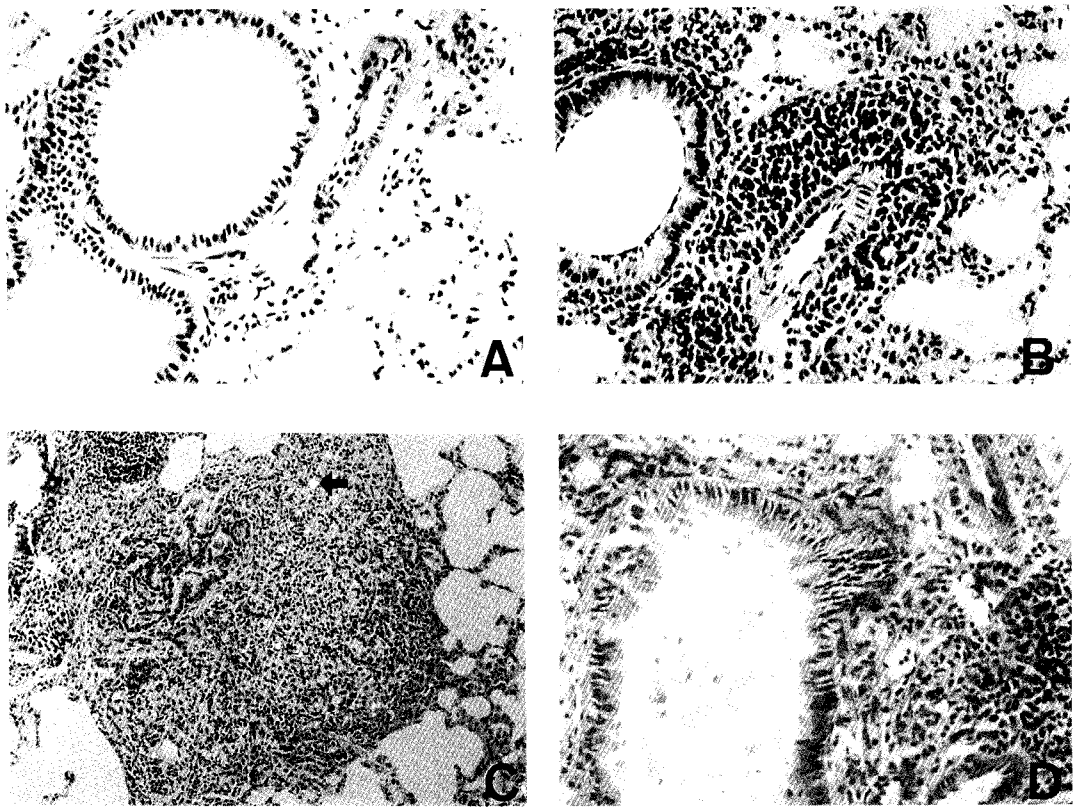

Fig. 1. Light microscopic findings of silica-induced lung (PAS stain). As compared normal control (A:, 200×), there is aggregation of inflammatory cells around peribronchiolar and perivascular area (B : 200×) at 2 weeks after exposure to silica. Following 8 weeks after exposure to silica, inflammatory nodules were formed around silica particles (arrow) (C : 100×, by polarized microscopy) in peribronchiolar area. At 4 weeks, collagen deopsition was seen in pepribronchiolar and perivascular area(D : 100×).

을 초래하였다. 폐포내에도 국소적으로 심한 염증세포 침윤과 폐포벽의 비후로 폐포강이 꽉 차있으면서 일부에서는 정상적인 폐포의 구조를 관찰할 수가 없었다. 기관지 주위에 나타난 염증세포 침윤의 양상은 기관지를 중심으로 하는 결절형으로 보였다. Silica 노출 8주째는 기관지 주위의 심한 염증세포 침윤과 섬유화 결절에 의해서 기관지가 완전히 폐쇄되었으며 기도 상피세포의 흔적만이 남아 있었다. 섬유화 결절 주위로는 폐기종의 소견이 동반되어 있으며 폐포강내 염증세포의 침윤은 4주보다 감소 되었다. 이 결절내에서 편광현미경을 이용하여 관찰해 본 결과 기도내로 주입된 silica가 폐장내에 균일하게 분포되어지기 보다는 국소적으로 섬유화 결절내에 주로 침착되어 있었고 주로 세기관지를 중심으로 많은 양의 silica가 침착되어 있었으며 심한 염증반응을 수반하는 섬유화가 같이 진행된 결절성 병변이 산재해 있었다. 이런 폐장내 염증반응은 침착된 silica의 양이 많을수록 심한 경향을 보였다(Fig. 1C).

Collagen의 침착정도를 알기 위하여 PAS 염색에서와 같은 방법으로 처리한 조직을 Masson-Trichrome 염색을 시행하였고 염색시 교원질은 파란색으로 나타났다. 정상대조군에서는 혈관, 폐포, 기관

지 주변에서 교원질 침착이 거의 보이지 않았으며 silica군에서 1주째에는 혈관주위, 기관지 및 세기관지 주위로 경도의 collagen 침착을 볼 수 있었으며 4주째 혈관 주위, 세기관지 뿐만 아니라 폐포벽에 광범위하게 침착된 중등도의 collagen침착을 볼 수 있었다. 8주째는 4주에 비해 더욱 뚜렷하게 세기관지, 혈관주위 및 폐포에 collagen 침착이 이루어졌으며 기관지 안의 결절성 병변에도 collagen침착이 증가되었다 (Fig. 1D).

2. MSilica 투여에 따른 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β의 면역화학조직염색 소견

IL-1β는 정상군의 혈관내피세포에서 1 도 정도의 경한 발현이 있은 후 큰 변화없이 12주까지 지속적으로 발현되었다. 폐포강은 정상군에서 발현이 없었으나 silica 투여 1일째부터 약하게 발현이 있은 후 8주까지 지속적으로 발현되었다. 기관지 주위에서는 IL-1β의 발현을 관찰할 수 없었으나 2주부터 기관지 주위에 염증세포의 침윤으로 형성된 결절에서 제2도로 발현된 후 12주까지 지속되었다. 기관지상피세포에서는 1주째 제1도정도 나타나기 시작하여 8주째까지 지속되었다.(Fig. 2A, 3A)

IL-6의 발현은 정상군에서도 혈관내피세포에 제3도의 강한 발현을 보였으며 폐포강과 기도상피에 1도

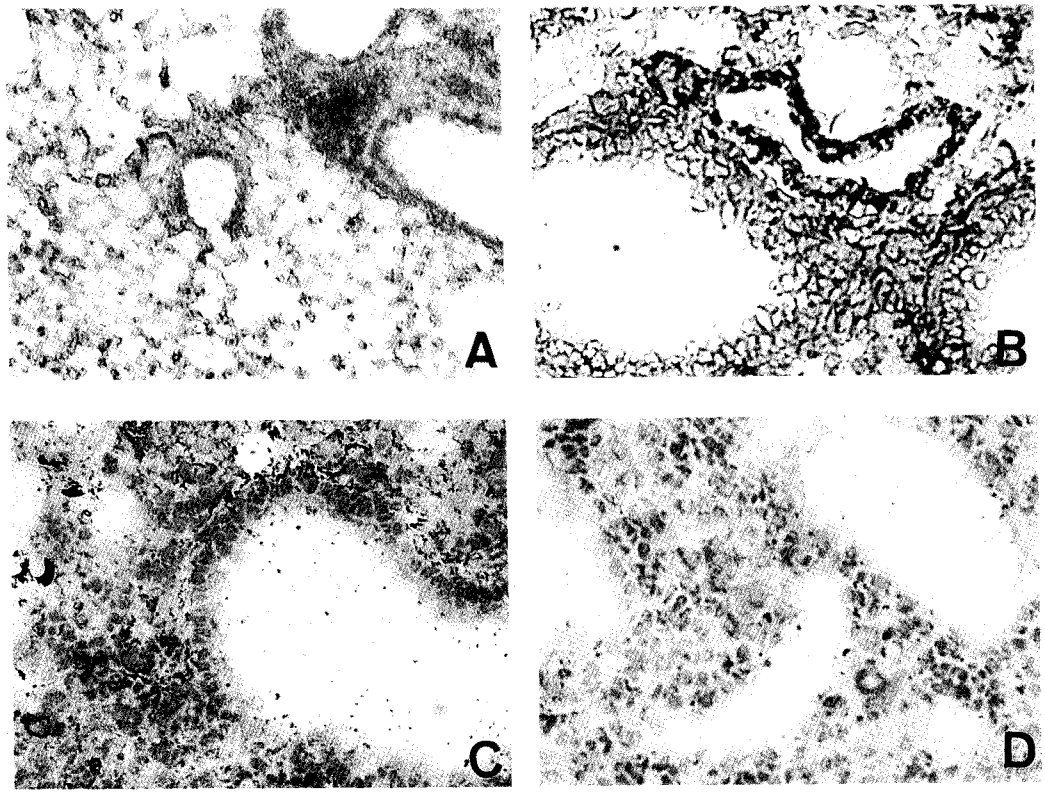

Fig. 2. Immunohistochemical staining of silica-induced lung.
IL-1-β was expressed in alveolar area at 2 day (B : 100×). IL-6 was expressed in perivascular and peribronchiolar area at 1 week (A : 200×). TNF-α was expressed in aggregated inflammatory cells in peribronchiolar area at 2 weeks(C : 200×). TGF-β was expressed in peribronchiolar inflammatory nodules and it was maintained until 12 week (D : 200×).

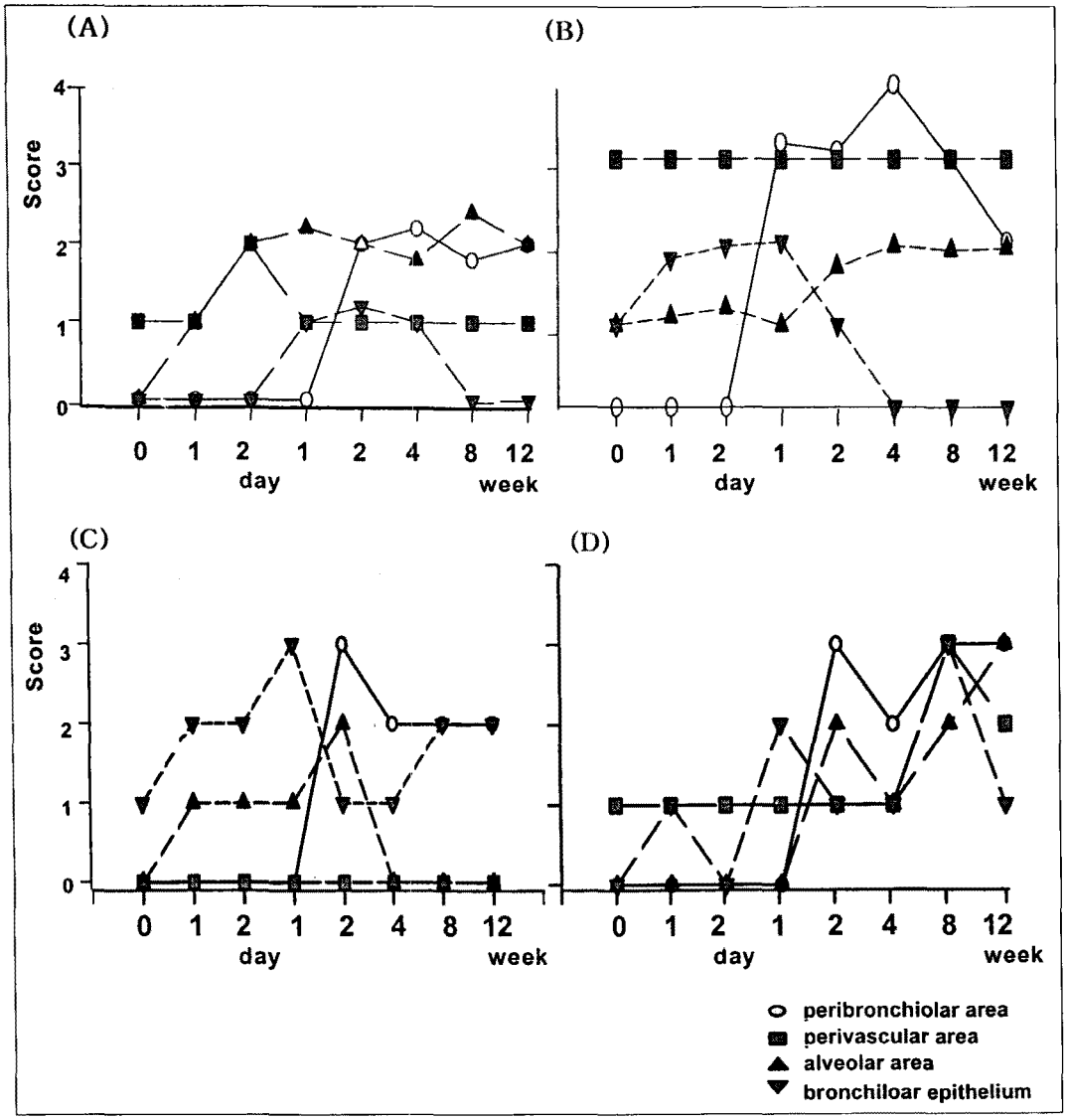

Fig. 3. Changes of IL-1β (A), IL-6(B), TNF-α (C) and TGF-β (D) in silica-induced lung.

정도 발현되었다. 그리고 기관지 주위조직에서는 IL-6의 발현을 관찰할 수 없었다. 혈관내피세포의 강한 발현은 silica투여후에도 발현의 정도는 변화없이 제8주까지 지속되었다. 그러나 silica투여 제1주부터 기관지 주위 조직에 침윤된 염증세포에 IL-6 발현이 제3도로 증가 되었고, 제4주째 제4도의 발현을 보이면서 정점에 도달되었으며, 제8주때는 제3도로 감소하는 경향을 보였다. 폐포강은 세포의 침윤이 있음에도 불구하고 발현의 정도가 제2도 정도로 증가하여 8주까지 지속되었다. 상피세포도 비슷한 변화를 보이나 제2주이후 부터는 발현이 없었다.(Fig. 2B, 3B)

TNF-α는 정상군의 기도상피세포에서 1도로 발현될 뿐 다른 부위에서는 발현이 없었다. Silica 투여후 기도상피세포에서 발현이 점차 증가하여 2주째 3도로

증가된 후 감소하였다. Silica 투여후 2주째 기관지 주위에 염증세포의 침윤이 심해지면서 형성된 결절에서는 3도의 강한 발현이 나타난 후 8주까지 지속되었고 폐포강에서는 제1도 정도의 약한 발현이 2일째 발현된 후 2주째 소실되었다. 폐혈관의 내피세포에서는 발현을 관찰할 수 없었다. 위 소견은 silica의 흡인이 초기에 기도의 상피세포에 직접적으로 작용하여 TNF-α의 생성이 증가하나 2주후부터는 기관지 주위로 침윤된 염증세포에서 TNF-α의 생성이 증가되는 양상을 보여 전술한 IL-1와 IL-6와는 생성부위와 생성양상이 서로 달랐다.(Fig. 2C, 3C)

TGF-β는 정상군의 혈관내피세포에서 제1도로 관찰되었다. silica 투여후 혈관내피세포에서 발현된 TGF-β는 4주까지 변화없이 지속되어지다 8주째 급격하게 발현이 증가한 후 12주에서 약간 감소하는 소견을 보였다. 기관지의 기저막에서는 전시기에 걸쳐 TGF-β의 발현을 관찰할 수 있었다. 기관지 주위로 침윤된 염증 세포에서는 초기에 염증 세포 침윤이 미약하여 TGF-β의 발현을 관찰할 수 없었으나 염증세포의 침윤이 심해지는 2주째에 3도의 강한 발현이 나타난 후 12주까지 지속적으로 높은 발현을 나타내었다. 폐포강에서도 TGF-β의 발현이 2주째부터 나타나기 시작하여 12주까지 지속되는 소견을 보였다. 기관지상피세포에서는 1 주째부터 뚜렷한 발현을 보인 후 지속적으로 8주째까지 발현되어 3도의 최고 발현을 보인 후 감소하는 경향을 보였다.(Fig. 2D, 3D)

고 찰

Silica를 흡인하면 폐장내에 교원질 fibril이 풍부해지고, 대식세포와 섬유모세포로 둘러싸인 특징적인 silicotic nodule과 함께 폐섬유화가 발생한다[14]. Silica에 의한 폐장내 반응은 초기에 폐포나 세기관지에 침착된 silica 입자를 제거하기 위해 염증세포 특히, 중성백혈구(PMN) 세포와 대식세포가 기관지주위(peribronchial area) 에 침윤되어 염증반응을 일으킨다. 기관지 주위에 침윤된 PMN세포와 대식세포는 기관지 주위에 결절성 형태 (nodular aggregates)로 침윤되고 이러한 염증성 결절은 1주후 구성세포가 섬유모세포와 대식세포로 치환되어 결국 기관지 주위에 육아종 (peribronchial granuloma)을 형성하게 되어 교원질로 대치된 후 섬유화 결절을 형성한다[16]. Silica를 탐식하여 활성화된 대식세포는 여러 염증반응의 매개물을 분비하여 조직의 손상을 일으키는데 초기에는 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 cytokine들이, 후기에는 염증반응의 회복과정에서 손상된 조직을 치환시키는 실질세포나 세포외 기질의 형성을 촉진하는 TGF-β 등의 성장인자 (growth factor) 들을 분비한다[3]. 본 연구에서의 LM 소견에서 silica를 폐장내로 투여하여 조직의 변화를 살펴볼ㄸ 초기 염증반응이 기관지 주위로부터 시작되는 것을 관찰할 수 있었고 이러한 염증세포의 침윤은 시간이 경과함에 따라 결절의 형태를 나타내어, 8주째에는 기관지 구조의 변형과 파괴를 초래하는 결절이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 결절은 편광현미경 (polarized microscopy) 소견에서 silica의 침착부위를 중심으로 결절이 형성되어 silica를 탐식한 대식세포에 의해 염증이 매개됨을 알 수 있었다. 대식세포의 염증매개물로서 IL-1β는 폐섬유화 과정의 초기에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 석면(asbestos)을 rat에 흡입시켰을 때 염증반응의 초기에 IL-1β 증가한 후 시간이 지남에 따라 감소함을 관찰하여 IL-1β는 석면에 의한 폐섬유화증의 기전에서 초기의 염증반응에 관여할 것으로 추정하였으나 silica에 의한 폐섬유화증에서의 역할은 뚜렷하지 않다[6]. Piguet의 실험에서도 후기에 형성된 silicotic nodule에서는 IL-1β의 발현을 관찰할 수 없어 silica로 자극된 대식세포에서 IL-1β가 분비된다는 *in vitro* 실험의 결과와는 차이를 보였다. 그러므로 IL-1β는 후기의 폐섬유화에 관계하기 보다는 초기에 발현되어 대식세포의 축적(recruitment) 이나 활성화에 관여하며, 또는 TGF-β와 같은 섬유화 cytokine의 보조적인 역할을 할 것으로 추정되고 있다[17]. 본 연구에서도 silica 흡입 후 폐포와 기관지 주위에 침윤되는 염증세포에서 IL-1β의 발현은 초기에

소량 형성된 후 변화없이 지속되어 silica 유발 폐섬유화증에 IL-1β가 크게 관여하지 않음을 알 수 있었다. IL-6는 폐섬유화증환자의 기관지 폐포세척액내에서도 증가되어 폐섬유화에 관여할 것으로 추정되나, 질환에 따라 섬유화에 관여하는 기능에 차이가 있어 폐섬유화에서의 IL-6의 역할은 아직까지 정확히 규명되어있지 않다. IL-6는 silica에 의한 대식세포의 활성화에 의해 분비되기도 하지만 Vanhée 등은 silica 자극시 폐장내 혈관의 내피세포(endothelial cells)에서도 IL-6 mRNA의 발현이 관찰됨을 보고 하였다[18]. 본 연구에서는 silica 투여 후 IL-6의 발현이 혈관에서는 변화없이 지속적으로 발현되었고 시간 경과에 따라 기도상피세포와 혈관내피세포에서 IL-6 발현이 관찰되어 IL-6의 형성은 혈관에서 기도내로 이동하는 염증세포에 의해 과형성됨을 알 수 있었고 초기의 염증반응에는 관여하나 후기의 폐섬유화의 진행과정에는 큰 역할을 하지 않음을 알 수 있었다. TNF-α는 염증반응의 급성기에 증가하여 염증세포의 침윤을 증가시키는 것으로 알려져 있으나 폐섬유화증에서 섬유모세포의 화학주성능을 증가시키고 collagenase gene의 발현을 증가시켜 폐섬유화에서도 중요한 역할을 할 것으로 추정된다[19]. Piguet의 실험에서도 silica를 mouse의 폐장내로 주입하였을 때 TNF-α mRNA가 2주부터 증가되어 70일간 지속되고 silicotic nodule 에서도 발현되어 TNF-α는 초기 염증반응에 증가하여 섬유화의 유지에도 관여함을 시사 하였다. 본 연구에서도 silica 투여 후 초기에 기도의 상피세포에서 TNF-α의 생성이 증가하여 2주후부터는 기관지 주위로 침윤된 염증세포의 결절부에서 TNF-α의 생성이 증가되어 지속적으로 발현되어 Piguet의 결과와 유사한 소견을 보였다. 또한 폐섬유화의 발생과 유지에 관여할 것으로 추정되는 TGF-β는 silica 투여 후 초기의 염증반응기에는 발현이 적으나 염증세포들이 모이는 2주후부터 주로 염증성 결절에서 강한 발현을 보여, 같은 부위에서 발현되는 TNF-α와 시간적 관련성(temporal relationship)을 보여주고 있어 TNF-α가 초기 염증 반응 뿐만 아니라 TGF-β 생성에 관여할 가능성을 보였다. TGF-β는 본 연구의 결과와 같이 후기에 기관지 주위에 형성된 염증세포의 결절에서 지속적으로 분비되는 소견을 보여 직접적으로 silicotic nodule의 형성과 폐섬유화의 유지에 관여할 것으로 추정된다. 또한 본 연구에서 관찰되어진 TGF-β의 변화 중 염증세포의 결절에서 발현이 시작되기 전 기도상피세포에서 TGF-β의 발현이 관찰되어 계속 증가됨은 흥미로운 사실이나 그 기전이 silica 입자의 직접적인 손상에 의한 세포막의 손상에 기인한 것인지 아니면 세포의 손상 후 간질내로 이동한 silica 입자를 대식세포에서 탐식한 후에 발생되는지에 대한 연구는 더 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, silica 자극시 IL-6, TNF-α가 조기에 분비되어 모두 폐섬유화의 발생에 관여하며 silica에 의한 폐섬유화증에 IL-1는 크게 관여하지 않을 것으로 사료된다.

TGF-β는 후기의 기관지주위의 염증세포의 결절에서 지속적으로 분비되어 silicotic nodule의 형성과 폐섬유화에 유지에 관여할 것으로 추정된다. Silica에 의한 폐섬유화의 조절방법으로는 TNF-α의 형성조절이 좋은 방법이될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

유리규산(silica)이 폐장내로 흡입되면 폐장내 염증세포의 축적이 발생하고 폐실질과 간질에 섬유화가 발생한다. Silica 가 폐장내로 흡입되면 대식세포에 탐식되어 염증매개물을 분비한다. 대식세포에서 염증반응에 중요하게 관여하는 cytokines 은 IL-1β, IL-6, TNF-α 등이 있으며 후기 섬유화에 관계하는 TGF-β 등이 분비되어 폐섬유화의 진행과 유지에 중요한 역할을 한다. 그러나 silica에 의한 폐섬유화 과정에서 각 cytokine의 역할과 분비부위 시간에 따른 변화에 대해서는 아직 확실히 규명된 바 없다.

방 법 :

silica 투여시 폐섬유화증이 잘 유발되어지는 C57BL

/6J(ref) mouse의 폐장내로 silica를 투여 후 1일, 2일, 7일, 2주, 4주, 8주, 12주째마다 폐장을 적출하여 시간에 따른 폐조직의 변화와 면역화학조직염색법을 이용하여 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β 단백 발현의 변화와 분비부위를 관찰하였다.

결 과:

Silica군에서는 2주부터 육안적 소견의 변화가 관찰되었으며 8주째 변화가 가장 심하였고 초기에 염증세포의 침윤이 기관지와 세기관지 주위로 시작되어 8 주째는 기관지 주위의 심한 염증세포 침윤과 섬유화 결절에 의해서 기관지가 완전히 폐쇄되는 소견을 보였다. IL-6의 발현은 혈관에서는 변화없이 지속적으로 발현되었고 시간 경과에 따라 기도상피세포와 혈관내피세포에서 IL-6 발현이 관찰되어 IL-6의 형성은 혈관에서 기도내로 이동하는 염증세포에 의해 과형성됨을 알 수 있었다. IL-1는 정상군의 혈관내피세포에서 1도 정도의 경한 발현이 있은 후 큰 변화없이 12주까지 지속적으로 발현되었다. TNF-α는 기도상피세포에서 발현이 점차 증가하였고 2주째 기관지 주위에 염증세포의 침윤이 심해지면서 형성된 결절에서 강한 발현이 나타난 후 8주까지 지속되었다. TGF-β는 기관지 주위에서 초기에 발현을 관찰할 수 없었으나 염증 세포의 침윤이 심해지는 2주째부터 강한 발현이 나타난 후 12주까지 지속적으로 높은 발현을 나타내었다.

결 론:

Silica를 폐장내 투여시 IL-1β, IL-6, TNF-α가 조기에 분비되어 모두 폐섬유화의 염증반응에 관여하고 TGF-β는 후기의 폐섬유화에 유지에 관여할 것으로 추정되며 silica에 의한 폐섬유화의 조절방법으로는 TNF-α의 형성조절이 좋은 방법이될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G. Pulmonary response to silica or titanium dioxide : inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. Am J Respir Cell Mol Biol 2 : 381-390, 1990.
2. Davis GS. Pathogenesis of silicosis. Current concepts and hypothesis. Lung. 164 : 139—154, 1986
3. Jaishree J. Raymond B., Andre D. S. Gosawami, Theodore C. Lee, William N.Rom. Transforming growth factor-β (TGF-β) in silicosis. Am J Respir Crit Care Med 154 : 1076-1081, 1996.
4. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. Nature 344 : 245-47,1990
5. Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D, Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. Am J Pathol 1991 ; 138 : 1097-1101, 1991.
6. Lemaire I, Jones S, Khan MF. Bombesin-like peptides in alveolar amcrophage : increased release in pulmonary inflammation and fibrosis. Neuropeptides 20 : 63-72, 1991
7. Choi I, Kang HS, Yang Y, Pyun KH. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis *in vivo*. Clin Exp Immunol 95 : 530-535, 1985
8. Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. Infect Immun 6 : 1496, 1993
9. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Exp Lung Res 18 : 29-43, 1992
10. Aderka D, Le J, Vilcek J. : IL-6 inbhibits lipopolysaccharide-induced TNF production in cultured human monocytes, U937 cells and in

mice. J immunol 1989 ; 143 : 3517-3523.

11. Navarro S Debili N, Bernaudin JF, Vainchenker W, Doly J. : Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. J Immunol 1989 ; 142 : 4339-4345.
12. Ohtsuka Y, Munakata M, Ukita H, Takahashi T, Satoh A, Homma Y, Kawakami Y Increased susceptibility to silicosis and TNF-α production in C57BL/6J mice, Am J Respir Crit Care Med 152 : 2144-2149, 1995
14. Dauber GH, Rossman MD, Pietra GG, Jimenez SA, Daniele RP. Experimental silicosis : Morphologic and biochemical abnormalities produced by intratracheal instillation of quartz into guinea pig lungs. Am J Pathol 101 : 595-612, 1980
15. Craighead JE, Kleinerman, JL, Abraham AR, Gibbs FHY, Green RA, Harley JR, Harley JR. R, Vallyathan NV, Juliano EB Disease associated with exposure to silica and nonfibrous silica minerals. Arch Pathol Lab Med 112-673-720, 1988.
16. Bowden DH, Adamson IYR The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis J Pathol 144 : 149-154, 1984
17. Kovacs E, Fibrogenic cytokines : the role of immune mediators in the development of scar tissue. Immunol Today 12 : 17-23, 1991
18. Vanh e D., Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. Eur Respir J. 8 : 834-842, 1995.
19. Dayer JM, Beutler B, Cerami A, Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostagalndin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts J Exp Med 162 : 419-425, 1985