

□ 원 저 □

기니픽에서 흡연 노출에 의한 젤라틴 분해 단백질 효소의 발현 양상에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소, 서울대학교 의과대학 병리과학교실*

강민종¹, 이재호, 유철규, 이춘택, 정희순,
서정욱*, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

The Increased Expression of Gelatinolytic Proteases Due to Cigarette Smoking Exposure in the Lung of Guinea Pig

Min-Jong Kang, M.D.¹, Jae Ho Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Choon-Taek Lee, M.D., Hee Soon Chung, M.D., Jeong Wook Seo, M.D.*,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., and Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine, Pathology**, Seoul National University, College of Medicine,
and Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea.

Background : Chronic obstructive pulmonary disease(COPD) is one of the major contributors to morbidity and mortality among the adult population. Cigarette smoking(CS) is undoubtedly the single most important factor in the pathogenesis of COPD. However, its mechanism is unclear. The current hypothesis regarding the pathogenesis of COPD postulates that an imbalance between proteases and antiproteases leads to the destructive changes in the lung parenchyma. This study had two aims. First, to evaluate the effect of CS exposure on histologic changes of the lung parenchyme, and second, to evaluate the effect of CS exposure on the expression of the gelatinolytic enzymes in BAL fluid cells in guinea pigs.

Methods : Two groups of five guinea pigs were exposed to the whole smoke of 20 commercial cigarettes per day, 5 hours/day, 5 days/week, for 6weeks, and 12 weeks, respectively, using a smoking apparatus. Five age-matched guinea pigs exposed to room air were used as controls. Five or more sections were microscopically ex-

¹현재는 한림대학교 의과대학 내과학교실 소속임.

Address for correspondence :

Young-Soo Shim, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

28, Yongon-Dong, Chongno-Ku, Seoul, 110-744, Korea

Phone : 02-760-2391 Fax : 02-762-9662 E-mail : ysshim@medicine.snu.ac.kr

aminated($\times 400$) and the number of cellular infiltration of the alveolar wall was measured in order to evaluate the effect of CS exposure on the histologic changes of lung parenchyme. The statistical significance was analyzed by a linear regression method. To evaluate the expression of the gelatinolytic enzymes in intraalveolar cells, BAL fluid was obtained and the intraalveolar cells were separated by centrifugation (500 g for 10 min at 4°C). Two sets of culture plates were loaded with 1×10^6 intraalveolar cells. One plate, contained 0.1mM EDTA, a inhibitor of matrix metalloproteases(MMPs), and the other plate had no EDTA. Both plates were incubated for 48 hours at 37°C. After incubation, gelatinolytic protease expression in the supernatants was analyzed by gelatin zymography.

Results : At the end of CS exposure, the level of blood carboxy Hb had increased significantly(4.1g/dl in control group, 24g/dl immediately after CS exposure, 18g/dl 30 min after CS exposure, 15g/dl 1 hour after CS exposure). Alveolar inflammatory cells were identified in the CS exposed guinea pigs. The number of alveolar cellular cells observed in a microscopic field ($400 \times$) was 121.4 ± 7.2 , 158.0 ± 20.2 , 196.8 ± 32.8 , in the control, the 6 weeks, and the 12 weeks group, respectively. The increased extent of inflammatory cellular infiltration of the lung parenchyma showed a statistically significant linear relationship with the duration of CS exposure($p=0.001$, $r^2=0.675$). Several types of gelatinolytic enzymes in the intraalveolar cells of CS exposed guinea pigs were expressed, of which some were inhibited by EDTA. However, the gelatinolytic enzymes were not expressed in the control groups.

Conclusion : CS exposure increases inflammatory cellular infiltration of the alveolar wall and the expression of gelatinolytic proteases in guinea pigs. EDTA inhibits some of the gelatinolytic proteases. These findings suggest a possibility that CS exposure may increase MMP expression in the lungs of guinea pigs. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 426-436)

Key words : Chronic obstructive pulmonary disease(COPD), Cigarette smoking(CS), Protease-antiprotease hypothesis, Gelatinolytic protease, Matrix metalloproteases(MMPs)

서 론

만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)은 상병 및 사망의 중요한 원인을 차지하는 호흡기 질환이다. 통계청에서 발간한 1998년 사망원인 통계연보에 의하면, 우리나라에서 만성 폐쇄성 폐질환에 의한 사망이 인구 10만 명 당 12.7 명으로 아홉 번째 사망 원인을 차지하였으며, 특히 70세 이상의 고령 인구에서는 인구 10만 명 당 244.9 명으로 네 번째 사망 원인을 차지하였다¹. 또한 유럽에서는 기관지 천식 및 폐렴을 합한 만성 폐쇄성 폐질환이 사망원인의 세 번째를 차지하며, 미국에서도

만성 폐쇄성 폐질환이 사망원인의 네 번째를 차지하는 것으로 조사되었다². 또한 전 세계적으로 COPD는 그 유병률 및 사망률이 점점 증가하는 추세에 있어³ 이 질환의 효과적인 관리는 앞으로 그 필요성이 더욱 더 커질 것으로 생각된다.

만성 폐쇄성 폐질환 발병의 가장 중요한 원인은 두 말할 필요도 없이 흡연이다. 이는 수많은 역학 자료 및 문헌에 의해 그 인과 관계가 잘 알려져 있으며, 미국에서의 한 보고에 의하면 만성 폐쇄성 폐질환 환자의 약 80-90% 가량에서 흡연이 위험요인으로 작용했다고 하였다⁴. 이처럼, 만성 폐쇄성 폐질환의 원인이 거의 대부분 흡연에 의한 것이므로, 우리가 만일

흡연에 의한 폐조직의 손상 및 이에 따르는 만성 폐쇄성 폐질환으로의 발병기전에 대해 잘 알고 있다면, 이 질환의 치료 및 더 나아가 흡연에 의한 폐 실질 손상의 방지에 중요한 계기를 마련할 수 있을 것이다.

하지만, 불행히도 흡연에 의한 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전에 대해서는 아직 완전히 규명되어 있지 못하며 여러 가설 및 병태생리의 부분적인 이해에 머물러 있는 실정이다. 이들 중, “단백분해효소-항효소제 가설(proteinase-antiproteinase hypothesis)”이 가장 널리 받아들여지고 있는데, 이 이론은 간단히 말해서 어떤 원인에 의해서든 폐조직 내의 단백 분해 효소와 그 억제제 사이의 불균형이 초래되어 폐조직의 구성 성분 -elastin 및 기타 결합조직 - 이 비정상적으로 과도하게 파괴됨으로써 폐기종이 발생하게 된다는 이론이다.

“단백분해효소-항효소제 가설”이 처음 등장한 이후 지금까지 여러 단백 분해 효소들이 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전에 관여할 것으로 제시되었다. 특히 최근 들어 폐기종의 병태생리학적 기전으로서 폐포대식세포가 중요하게 관여할 것이라는 연구 결과들이 축적되면서 이들이 분비하는 단백분해 효소들, 특히 matrix metalloproteinases(MMPs)의 역할에 대해 관심이 모아지고 있다.

MMPs는 세포간질(extracellular matrix)을 분해하는 여러 단백분해 효소(proteolytic enzymes) 중의 한 종류로 대부분 광범위한 젤라틴 분해능을 보이며 그 효소 작용에는 아연(Zn^{2+}) 이온의 존재가 필수적이다. 따라서 EDTA와 같은 metal chelating agent에 의해 그 효소 작용이 억제되는 것이 특징이다.

이에 연구자들은 흡연에 의한 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전에 단백 분해 효소, 특히 MMPs가 관여하는지를 알아보기 위한 연구의 첫 단계로 다음과 같은 가설을 세웠다. 즉, 첫째, 흡연에 의해 기니피크의 폐조직에서 만성 폐쇄성 폐질환에서 관찰되는 병리학적인 이상 소견이 발생되는가, 둘째, 흡연에 의해 기니피크의 폐포 내 세포에서 젤라틴 분해능을 보이는 단백 분해 효소의 발현이 증가하는가, 그리고 만일 젤라틴 분해

단백 효소의 발현이 증가한다면, 이것이 EDTA에 의해 그 효소 활성이 억제되는가 라는 가설을 규명하고자 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 암수 구별 없이 500g 내외의 건강한 기니피크(중양실험동물, 서울)을 분양받아 실험실 환경에 2주 간 적응시킨 후 실험에 이용하였다. 15 마리를 대조군, 6주 흡연군, 12주 흡연군의 세 군으로 각각 5마리 씩 나누어 후술한 바와 같이 흡연노출을 시켰다.

2. 연구 방법

1) 흡연 장치의 고안 및 기니피크에 대한 흡연노출⁵

두께 5mm의 아크릴 판을 이용하여, 100×80×60cm의 직육면체 상자(chamber)를 만들고 그 뚜껑의 가장자리에는 고무판을 대고 잠금장치를 달아 뚜껑을 닫았을 때 완전히 밀폐될 수 있도록 하였다. 이 상자의 한쪽 면에 담배를 꽂을 수 있는 구멍을 만들고, 반대편 아크릴 판에는 진공 펌프를 연결할 수 있도록 하여, 불 붙인 담배를 꽂고 진공 펌프를 작동시키면 상자 내에 음압이 걸려 담배가 타들어가면서 그 연기가 상자 안으로 흡입되도록 고안하였다(그림 1). 이

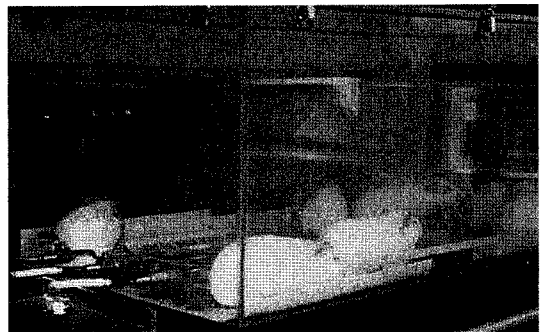


Fig. 1. Smoking apparatus.

흡연 장치(smoking apparatus)를 이용하여 10분 동안 흡연을 시킨 후 15분간 대기를 호흡하도록 하고 다시 10분 간 흡연 시키는 과정을 약 5 시간에 걸쳐 반복 시행하여 하루에 담배 20개피(1갑)를 간접 흡연 시키고 이를 일주일에 5일 간 반복하였다. 대조군에 대해서는 흡연을 시키지 않고 사육장에서 사육하였으며, 흡연군은 각각 6주 및 12주간 흡연시켰다. 간접 흡연에 충분히 폭로되었는지를 확인하기 위해, 흡연이 끝난 직후, 흡연 노출 30분 후, 흡연 노출 60분후에 각각 무작위로 3회씩 채혈하여 동맥혈 내의 카르복시헤모글로빈(COHb) 농도를 측정하였다.

2) 기니픽에서 기관지폐포세척술 시행

6주 및 12주 간의 흡연 노출 후 기니픽의 복강 내에 펜토트르바비탈(pentobarbital, 50mg/kg)을 주사하여 마취를 시켰다. 마취 직후, 무균조작 및 최소한의 출혈 조건에서 상부 기도를 박리한 후, 이를 절개하여 지름 0.21cm 카테터를 삽입하였다. 그 다음, 1회에 10ml씩, 모두 10번에 걸쳐 100ml의 생리 식염수를 부드럽게 집어 넣은 후 흡인해 내는 기관지폐포세척술을 시행하였다. 회수된 기관지폐포세척액을 4°C, 500 × g(1500rpm)에서 10분간 원심분리한 후 침전된 세포층을 따로 모아 RPMI 세포 배양액으로 3회 씻어내고 3ml의 RPMI 용액에 다시 녹였다. 이 중의 일부를 trypan blue로 염색하여 세포의 생존능 평가 및 총 세포 수를 측정하였고, 또한 Wight-Gimsa 염색을 해서 감별 세포 수(differential count)를 측정하였다.

3) 흡연량에 따른 기니픽의 폐조직 병리조건 관찰

대조군, 6주 흡연군, 12주 흡연군 각각에서 기관지폐포세척술을 시행한 직후에, 기니픽의 폐를 'en block'으로 적출한 후 10% phosphate-buffered formalin (PH 7.4) 용액에 담가 고정하였다. 이때, 기관지폐포세척술 시행을 위해 이용했던 카테터를 통해 25cmH₂O의 일정한 압력으로 폐를 팽창시키면서 만 하루 이

상을 고정한 다음, 파라핀 절편으로 만들고 현미경 검사를 위한 조직을 얻어 HE 염색을 시행하였다. 이를 400배 시야에서 관찰하면서, 현미경 시야 내에 보이는 염증세포의 수를 측정하였는데, 각각 다섯 군데에서 세어 이의 평균을 구하였다.

4) 기관지폐포세척액 내 세포의 젤라틴 분해 단백질 발현 양상 관찰 -Gelatin Zymography⁶

흡연에 의한 젤라틴 분해 단백질 발현 양상을 알아보기 위해 대조군, 6주 흡연군, 12주 흡연군 각각에서 얻은 기관지폐포세척액 내 세포를 지름 50mm의 배양 접시 두 개에 각각 1×10⁶ 개가 되도록 분주한 후 FBS가 첨가되지 않은 RPMI 용액을 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 이 때 한 접시는 대조군으로 삼아 아무런 처치를 하지 않았고 다른 한 쪽에는 0.1mM의 EDTA를 첨가하였다. 48시간의 배양 후 얻은 상층액으로 'gelatin zymography'를 시행하였다. 즉, 0.1%의 젤라틴이 첨가된 10% SDS-polyacrylamide gel을 만든 다음 폐포내 세포를 배양하여 얻은 상층액을 젤에 걸었다. 먼저 50V에서 1시간 동안 전기 영동을 수행하여 'stacking gel'에서의 전기영동을 시킨 다음, 150V에서 2시간 30분 가량을 전기영동 시켜 단백질 분리를 수행하였다. 그 다음 젤을 통째로 Triton X-100(2.5%)이 첨가되어 있는 SDS-washing buffer에 1시간 동안 담가 두어 젤에 들어 있는 SDS 성분을 제거한 후 지름 100mm의 배양 접시에 옮기고, 효소 반응 용액(enzyme-reaction buffer : 50mM Tris HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂)을 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 덩으로써 효소 작용에 의해 젤라틴이 분해되도록 하였다. 이렇게 하여 젤 내의 젤라틴 분해 단백질 분해 효소가 위치한 부위에서 효소 작용에 의해 젤라틴 성분이 분해되게 되며, 단백질 분해 효소의 존재 및 위치를 확인하기 위해 다음과 같은 단백질 염색 및 탈색 과정을 수행하였다. 즉, 37°C에서 24시간 동안 경과한 후 젤을 꺼내어 Staining buffer(0.5% coomassie blue G-250, 30% methanol, 10% acetic

Table 1. BAL cell profile (mean ± SD)

	Total Cells, ($\times 10^6$)	Macrophages(%)	Neutrophils(%)	Lymphocyte(%)
Control	3.2 ± 1.1	64.2 ± 13.1	7.1 ± 2.7	27.9 ± 7.3
6 week-CS	6.7 ± 2.8	68.7 ± 19.5	12.4 ± 5.3	17.5 ± 10.6
12 week-CS	7.4 ± 3.1	62.1 ± 16.7	10.8 ± 5.8	25.4 ± 9.2
p-value	<0.05	NS	NS	NS

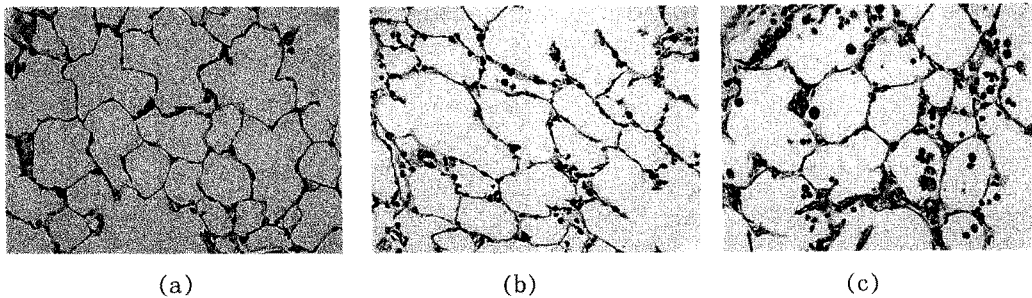


Fig. 2. (a) Control, (b) 6 week-CS exposed Lung, and (c) 12 week-CS exposed Lung : they show the increased cellular infiltration of alveolar walls according to CS exposure duration.

acid)에서 3시간 가량 염색한 다음, destaining buffer(30% methanol, 10% acetic acid)로 세척하면서 젤라틴 단백 분해 효소에 의해 분해되어 밀감게 탈색되는 밴드가 나타나는지를 관찰하였다.

결 과

1. 흡연 장치를 이용한 기니픽의 흡연 노출 적정성

본 연구에 사용된 흡연 장치로 기니픽에 충분한 흡연 노출이 이루어졌는지를 평가하기 위해 하루 20개피의 흡연 노출이 이루어진 다음에 기니픽의 혈중 COHb 농도를 동맥혈 가스 분석 장치로 분석하였다. 이 때 대조군의 혈중 평균 COHb 농도는 4.1g/dl 인 반면, 흡연 노출군의 혈중 평균 COHb 농도는 흡연 노출이 끝난 직후에는 24g/dl, 노출 후 30분 에는 18g/dl, 노출 후 1시간 에는 15g/dl로 측정되어 충분한 흡연 노출이 이루어졌음을 확인하였다.

2. 흡연량에 따른 기관지폐포세척액 내 총 세포수 및 감별 세포 수의 변화

기니픽에서 기관지폐포 세척술을 시행하여 기관지폐포 세척액 내의 총 세포수의 변화 및 감별 세포 수의 변화가 흡연 노출 기간에 따라 차이가 나는지를 살펴 보았을 때, 흡연 노출 기간이 길어질수록 총 세포 수가 유의하게 증가함을 관찰하였다. 즉, 폐포대식세포, 호중구, 림프구 등의 염증 세포들이 흡연 노출이 증가할수록 그 절대수가 늘어남을 확인하였다. 하지만, 총 세포 수에서 이들 염증세포들이 차지하는 비율, 즉 감별 세포 수의 변화는 뚜렷한 통계학적 의미를 찾을 수 없었다(표 1).

3. 흡연량에 따른 폐 병리조직 소견 변화

흡연 노출의 정도에 따른 기니픽 폐 조직의 병리학적 변화를 살펴 보기 위해 400배 현미경 시야에서 보이

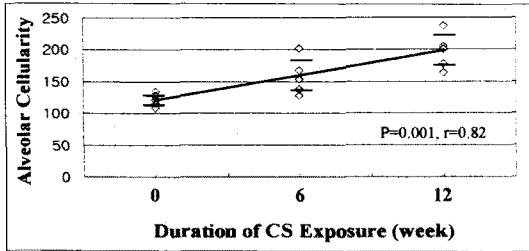


Fig. 3. The graph shows linear relationship between the cellularity of Alveolar Walls and the CS exposure duration.

는 폐포벽의 세포 수를 측정하였다. 폐포벽에 침윤된 세포의 거의 대부분은 호중구, 대식세포 등의 염증 세포로 관찰되었으며 이들 총 세포 수가 대조군은 121.4 ± 7.2 개로 측정된 반면, 6주 흡연군은 158.0 ± 20.2 12주 흡연군은 196.8 ± 32.8 로 측정되어 흡연 노출 기간이 길어질수록 폐 조직 내 세포 침윤이 증가하는 양상을 관찰하였다(그림 2). 또한 통계학적 유의성을 검증하기 위해 흡연 노출 기간에 따른 폐 조직 내 세포 침윤의 정도의 관련성을 선형회귀분석을 이용하여 분석하였을 때 유의한 선형회귀관계

가 있음이 확인되었다($p=0.001$, $r^2=0.675$) (그림 3).

4) 흡연량에 따른 폐포 내 세포의 젤라틴 분해 단백질 효소의 발현 양상

흡연 노출에 따른 폐 조직 내 단백질 분해 효소의 발현 양상을 살펴 보기 위해 기관지폐포세척술을 시행하여 그 세척액에서 얻은 세포가 분비하는 단백질 분해 효소의 발현 양상을 연구하였다. ‘gelatin zymography’를 시행하여 단백질 분해 효소의 발현 양상을 관찰하였을 때, 대조군에서는 전혀 젤라틴 분해 단백질 효소가 발현되지 않았다. 반면에, 6주 흡연군은 다섯 마리 중 두 마리에서, 12주 흡연군은 다섯 마리 중 세 마리에서 젤라틴을 분해하는 단백질 분해 효소가 관찰되었는데, 이들 효소 활성에 의한 젤 내 “lytic band”의 위치가 여러 군데에서 관찰되었다. 또한 흡연 노출에 의해 그 활성도가 증가된 여러 젤라틴 분해 단백질 효소 중의 일부는 EDTA에 의해 효소 활성도가 억제됨을 확인하였다(그림 4).

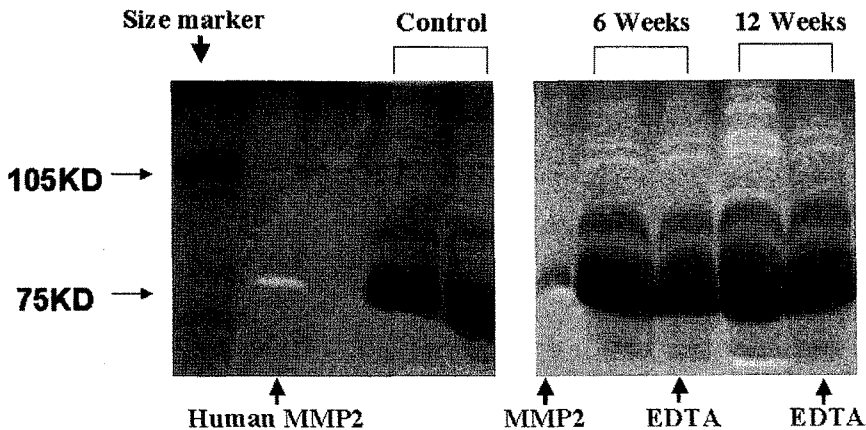


Fig. 4. Gelatin zymography shows the several lytic bands(white color) in CS exposed guinea pigs, some of which are inhibited by EDTA.

고 찰

흡연에 의한 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전으로 “단백분해효소-항효소제 가설(proteinase-antiproteinase hypothesis)”이 가장 널리 받아들여지고 있는데, 이는 만성 폐쇄성 폐질환의 주요한 병리학적 소견인 폐기종의 병태생리가 폐 실질의 구성성분인 elastin 섬유의 손상에 따른 폐 탄성도의 감소에 기인한다는 점 및 실제로 $\alpha 1$ -antitrypsin의 결핍으로 인한 폐기종의 발생이 1963년도에 처음 보고되고⁷ 곧이어 $\alpha 1$ -antitrypsin의 역할이 호중구의 중요한 단백분해 효소인 neutrophil elastase를 억제함이 밝혀진 이후 지금까지 30여 년 간, 폐기종의 발생 원인으로서 가장 많이 연구된 주제이다.

“단백분해효소-항효소제 가설”이 처음 등장한 이후 지금까지 여러 단백 분해 효소들이 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전에 관여할 것으로 제시되었다. 그동안 호중구 및 neutrophil elastase에 관한 연구가 많이 있었는데, 예를 들어 흡연자의 기관지폐포세척액에서 정상인에 비해 호중구 및 elastase의 농도가 증가되어 있었으며^{8,9} 흡연에 의해 단백 분해 효소 억제제의 기능이 저하된다는 연구¹⁰ 등을 통해 호중구 및 호중구에서 생성되는 elastase의 역할의 중요성을 밝힌 연구 등을 대표적으로 들 수 있을 것이다.

하지만 $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency는 폐기종 환자의 1% 가량에서만 원인으로 작용한다는 점이나¹¹ 호중구의 elastase가 광범위한 단백질 분해능을 보이지만 폐조직의 50-60% 가량¹²을 차지하는 type I collagen을 분해하지 못한다는 점¹³, 그리고 폐기종 환자의 주요한 염증 반응 세포(inflammatory effector cell)가 호중구가 아니라 폐포대식세포 라는 점^{14,15} 등의 여러 실험적 사실들은 호중구 및 호중구 elastase 만으로는 폐기종 환자에서의 폐기종 발생 기전을 충분히 설명해 주지 못한다는 것을 의미한다.

한편, 폐기종으로 진행하기 전의 흡연자 폐(smoker's lung)에 관한 연구에서, 호흡 세기관지(respiratory bronchiole), 폐포관(alveolar duct), 폐포벽

등의 부위에 폐포 대식세포, 림프구, 호중구 등의 축적이 관찰됨은 기존에 잘 알려져 있는데, 이들 세포의 침윤과 흡연자의 폐기종 조직에서의 폐포 파괴 정도와의 상관성을 본 최근의 논문¹⁶에서도 폐조직의 파괴 정도와 호중구의 침윤 정도는 오히려 역 상관관계를 보였으며, 폐포대식세포 및 T-lymphocyte의 침윤 정도가 폐조직의 파괴 정도에 비례하였다는 연구결과를 제시하였다. 그 밖에도 다른 연구들¹⁷⁻¹⁹에서 폐기종의 병태생리학적 기전으로서 폐포대식세포가 중요하게 관여할 것이라는 연구 결과들이 축적되면서 최근에는 폐기종의 병태생리학적 기전으로서 폐포대식세포 및 폐포대식세포가 분비하는 단백분해 효소들, 특히 matrix metalloproteinases(MMPs)의 역할에 대해 관심이 모아지고 있다.

MMPs는 세포간질을 분해하는 여러 단백분해 효소(proteolytic enzymes) 중의 한 종류²⁰로 많은 생물학적 현상(biologic processes)에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려지면서 최근 주요한 연구 대상이 되고 있는 효소이다. 이들이 관여하는 중요한 생물학적 현상들로 배란(ovulation), 배아 착상(embryo implantation), 형태발생(morphogenesis), 조직 퇴화(tissue involution) 등이 대표적이며, 정상 생리 상태(normal physiologic conditions)에서 세포간질의 분해와 합성은 정교하게 균형적으로 조절되는데, 이 과정에 장애가 생길 때 여러 병태생리학적 상황이 초래된다고 알려져 있다²¹. 특히 손상부위의 복구(wound healing), 암의 침윤 및 전이, 류마티스 관절염, 치주질환 등에서 이들 MMPs가 중요한 역할을 한다는 여러 연구 결과^{22,23}들이 발표되기도 하였다.

그동안, 외국에서는 흡연에 의한 만성 폐쇄성 폐질환의 동물 실험 모델이 개발되어 여러 실험에 적용되어왔지만²⁴, 아직까지 국내에서는 장기간의 흡연 노출을 통해 만성 폐쇄성 폐질환의 동물 실험 모델을 시도한 연구는 없었다. 이에 연구자들은 기존의 외국 문헌에 보고된 방법과 유사한 흡연 장치를 고안하여 기니 피에 흡연 노출을 장기간 시켜 만성 폐쇄성 폐질환의

병리학적 이상 소견이 발생하는지 또한, 이러한 병리학적 이상 소견과 더불어 흡연 노출에 의해 폐 조직 내 단백질 분해 효소의 활성이 증가하는지를 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

흡연 노출의 정도에 따른 기니픽 폐의 병리학적 변화 소견을 관찰하기 위하여 400 배 시야에서 보이는 폐포벽에 침윤된 세포의 개수를 측정하여 선형 회귀분석을 시행하였을 때, 흡연 노출의 기간이 길어질수록 세포 침윤의 정도가 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. 폐기종의 병리학적 소견의 정도를 평가하기 위한 가장 고전적인 방법은 폐포 크기(alveolar dimension)의 정도를 현미경 시야에서 계량화하는 방법으로 그 계량적 수치는 폐포벽 사이의 평균 거리를 의미하는 지표인 Lm(mean linear intercept)을 이용하여 표시하는 방법이 널리 쓰였다^{25, 26}. 하지만 이 방법의 가장 큰 제한점으로 폐포벽의 파괴 없이 폐포의 크기가 늘어난 경우, 즉 전형적인 폐기종성 변화가 아닌 단순한 낭종성 변화에 의한 폐포 크기의 증가를 제외시킬 수가 없다는 점이 지적되었다. 이후, Cosio 등은 폐기종의 가장 큰 병리학적 특징인 폐포벽의 파괴(alveolar destruction) 정도를 계량화하는 지표를 개발하여 이를 DI(alveolar destruction index)라 하였고, Lm 및 DI 간에는 그 연관성이 매우 높고 더구나 Lm 수치의 변화까지는 오지 않은 만성 흡연군에서 폐조직의 DI를 측정하였을 때 DI 수치가 환자의 폐쇄성 환기 장애의 정도인 FEV₁, MMEF, 'Recoil pressure at 90% TLC' 등의 지표와의 연관성이 좋아 DI가 폐기종성 변화의 계량적 지표로서의 활용도가 매우 높으며 폐기종의 병리학적 변화를 계량하는 주요 측정방법이 될 수 있다고 하였다²⁷. 또한 이들은 뒤이어 DI, 즉 폐포벽의 파괴 정도는 폐포벽 내 염증세포의 침윤 정도와도 정비례하고 있음을 밝히고 폐포벽의 세포 침윤에 의한 염증성 변화로 폐포벽이 파괴되는 것이 중요한 폐기종의 병태생리일 것이라고 제안하였다²⁸. 즉, 요약하면 폐포벽의 염증세포의 침윤 정도, 즉 폐포염(alveolitis)과 폐 조직의 파괴 정도에는 밀접한 관련성이 있고 궁극적으로 이는 폐포의 확장

정도, 즉 폐기종의 정도와도 밀접한 관련이 있다는 것이다. 이러한 점에서 본 연구에서도 흡연 노출의 정도에 따른 기니픽 폐 조직 내의 폐포의 세포 침윤 정도, 즉 폐포염의 정도를 계량화하였고 흡연 노출이 증가할수록 폐포염이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 폐 조직의 파괴 정도의 계량적 지표인 'DI' 및 폐기종성 변화의 정도를 보는 'Lm'을 직접 측정하지는 못하였다. 왜냐하면, 이것들의 측정을 위해서는 폐조직의 고정 단계에서부터 25-50cmH₂O의 일정한 압력을 가해 폐의 인위적 허탈을 배제하고 가능한 한 생리적 상태에 맞추어 폐 조직을 고정하는 것이 필수적인데 본 실험에서도 이러한 방법을 시도하기는 하였지만, 그것이 제대로 이루어지지 못했다고 판단되어 무리하게 측정하는 것은 실험 결과의 왜곡을 가져올 것으로 판단하였기 때문이다.

EDTA는 대표적인 MMPs 억제제이다. 본 실험에서는 흡연에 의해 그 발현이 증가된 젤라틴 분해 단백질 효소가 직접적으로 MMPs 임을 증명하지는 못했지만 흡연 노출에 의해 그 발현이 증가된 여러 단백질 분해 효소 중의 일부는 EDTA에 억제됨을 관찰함으로써 MMP일 가능성을 시사한다고 할 수 있다. 이의 정확한 규명을 위해서는 추후 연구가 필요하다.

본 연구에서 흡연 노출군의 일부에서만 단백질 분해 효소의 발현이 증가함을 관찰하였는데 이것의 원인이 무엇 때문인지는 분명치 않다. 다만, 사람에서도 흡연에 의한 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 과정에서 단지 흡연자의 10-15%에서만 유의한 만성 폐쇄성 폐질환으로 진행함이 알려져 있고^{4, 29}, 이의 원인으로서 유전적 감수성(genetic susceptibility)이 거론되고 있음을 볼 때³⁰, 이러한 유전적 감수성이 기니픽에서도 관여하고 있을 가능성을 추측해볼 수 있을 것이다. 역시 이에 대해서도 추후 연구를 통해 규명되어야 할 것으로 판단된다.

만성 폐쇄성 폐질환은 우리 나라에서 중요한 사망 및 상병의 원인이며 고령화 사회로 급속히 진행되는 현실을 고려할 때 이 질환의 효과적인 치료 및 관리의 필요성은 더욱 증대될 전망이다. 최근 대한 결핵 및 호

흡기 학회에서도 만성 폐쇄성 폐질환의 진료 지침을 발표한 바 있다³⁾. 이런 점에서 본 연구는 중요 질환임에도 불구하고 연구 수행이 쉽지 않다는 점으로 인해 활성화가 되고 있지 못한 현재의 국내 현실에서 만성 폐쇄성 폐질환의 발병 기전을 연구하기 위한 동물 실험 모델의 한 시도라는 점에서 의미를 찾을 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구를 통해 장기간의 흡연 노출을 통해 기니피크의 폐포벽에서 염증세포의 침윤이 증가하는 폐포염의 소견을 관찰하였고, 그 염증 세포 침윤의 정도는 흡연 노출의 기간에 비례하였다. 또한 흡연 노출에 의해 기니피크 폐포 내 세포에서 여러 종류의 젤라틴 분해 단백질분해효소 활성화도가 증가함을 확인하였다. 그리고 이들 중의 일부는 MMPs의 억제제인 EDTA에 의해 억제됨을 관찰하였는데 이는 흡연에 의해 MMPs의 발현이 증가할 가능성을 시사한다.

요 약

흡연은 만성 폐쇄성 폐질환의 가장 흔하고 중요한 원인이며 발생기전으로 단백질분해효소 및 그 억제제의 불균형에 의한 폐조직 파괴가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 생체내의 여러 단백질분해효소 중 matrix metalloproteinases(MMPs)의 역할에 대한 연구가 최근 활발한데, 이들의 다수는 젤라틴 분해능을 보인다.

연구자들은 흡연에 의한 MMPs의 발현 및 폐기종 발생과의 관련성을 규명하기 위한 첫 단계로 기니피크에서 흡연에 의한 젤라틴 분해 단백질분해효소의 발현 양상을 알아보고자 하였다.

방 법 :

500gm 가량의 건강한 기니피크 15마리를 대조군 5마리, 6주 흡연군 5마리, 12주 흡연군 5마리 씩 배정한 후, 하루에 5시간 씩, 담배 20개피를 간접 흡연시키는 과정을 일주일에 5회 반복하였다. 흡연력의 정도에 따른 폐조직 내 세포 침윤의 증가를 알아보기 위해, 폐조직을 H&E 염색한 후 400배 확대 시야에서 보이는 폐포벽의 세포 수를 계산하여 일반선형모델을

이용한 통계 분석법으로 처리하였다. 흡연에 의한 젤라틴 분해 단백질분해효소의 발현 양상을 알아보기 위해 기관지폐포세척술을 시행하여 폐포내 세포를 얻은 다음 이를 배양접시에 1×10^6 개 씩 분주하였는데, 한 배양접시에는 아무 처치도 하지 않았고 다른 한쪽은 0.1mM의 EDTA를 첨가하였다. 48시간의 배양 후 얻은 상층액으로 'gelatin zymography'를 시행하여 젤라틴 분해 단백질분해효소의 발현 및 EDTA에 의한 억제 여부를 관찰하였다.

결 과 :

대조군의 혈중 평균 COHb 농도는 4.1g/dl인 반면, 흡연 노출군의 혈중 평균 COHb 농도는 5시간 노출 직후에는 24g/dl, 노출 후 30분에는 18g/dl, 노출 후 1시간 후에는 15g/dl로 측정되어 충분한 흡연 노출이 이루어졌다. 400배 시야에서 보이는 폐포벽의 세포 수는 대조군은 121.4 ± 7.2 , 6주 흡연군은 158.0 ± 20.2 , 12주 흡연군은 196.8 ± 32.8 로 측정되어 선형회귀관계가 관찰되었다($p=0.001$, $r^2=0.675$). 또한 침윤된 세포의 대부분은 염증 세포였다. 한편, 대조군에서는 젤라틴 분해 단백질분해효소가 발현되지 않은 반면에, 6주 흡연군 및 12주 흡연군에서는 젤라틴 분해 단백질분해효소가 여러 개 관찰되었다. 또한 이 중의 일부는 EDTA에 의해 효소 활성화도가 억제되었다.

결 론 :

흡연에 의해 기니피크의 폐조직에서 여러 젤라틴 분해 단백질분해효소 발현이 증가하며 이 중의 일부는 MMPs의 억제제인 EDTA에 의해 억제된다. 이는 흡연에 의해 MMPs의 발현이 증가할 가능성을 시사한다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. 1998년 사망 원인 통계 연보-인구 동태 신고에 의한 집계. 통계청. 1999.
2. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:S77-S120.

3. Rijcken B, Britton J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon.* 1998;7:41-73.
4. U.S. Surgeon General. The health consequences of smoking: Chronic obstructive lung disease. U. S. Department of Health and Human Services, Washington, D. C. DHHS Publication No. 84-50205.
5. Sansores RH, Abboud RT, Becerril C, Montano M, Ramos C, Vanda B, et al. Effect of exposure of guinea pigs to cigarette smoke on elastolytic activity of pulmonary macrophages. *Chest.* 1997; 112:214-9.
6. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography : detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochem.* 1994;218:325-9.
7. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum of α 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963;15:132-40.
8. Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:833-8.
9. Janoff A, Raju L, Dearing R. Levels of elastase activity in bronchoalveolar lavage fluids of healthy smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127:540-4.
10. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG. Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science.* 1979;206:1315-6.
11. Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: Risk factors of pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med.* 1989;40:411-429.
12. Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJS, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax.* 1994;49:319-26.
13. Mainardi CL, Hasty DL, Seyer JM, Kang AH. Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 1980;255:12006-10.
14. Merchant RK, Schwartz DA, Helters RA, Dayton CS, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage cellularity : the distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:448-53.
15. Niewoehner DE, Klierman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med.* 1974;291:755-8.
16. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:1666-72.
17. Chapman HG, Stone OL. Comparison of human neutrophil and alveolar macrophages elastolytic activity in vitro : relative resistance of macrophage elastolytic activity to serum and alveolar proteinase inhibitors. *J Clin Invest.* 1984;74:1693-700.
18. Senior RM, Connelly NL, Cury JD. et al. Elastin degradation by human alveolar macrophages : a prominent role of metalloproteinase activity. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:1251-6.
19. Snider GL. Emphysema : the first two centuries and beyond : a historical overview, with suggestions for future research. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1333-44.
20. Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Mandelin J, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in Loose artificial hip joints. *Clin Orthop* 1998 Jul;352:35-45.
21. Takagi M, Santavirta S, Ida H, Ishii M, Mandelin

- J, Kontinen YT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in Loose artificial hip joints. *Clin Orthop* 1998 Jul;352:35-45.
22. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases : A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
23. Cawston T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today*. 1998 Mar;4(3):130-7.
24. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:1422-8.
25. Thurbeck WM. The internal surface area of nonemphysematous lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1967;95:765-73.
26. Thurbeck WM. Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax*. 1967;22:483-96.
27. Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang N, King M, et al. Destructive index : a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131:764-9.
28. Eidelman D, Saetta MP, Ghezzi H, Wang N, Hoidal JR, King M, et al. Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:1547-52.
29. Sherrill DL, Lebowitz MD, Burrows B. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 1990;11:375-88.
30. Sandford AJ, Pare PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2000;21:633-43.
31. 결핵 및 호흡기학회 만성폐쇄성폐질환 치료지침 위원회. 만성폐쇄성폐질환 진료지침. 대한결핵 및 호흡기학회. 2000.