

원발성 기흉환자 폐기포의 면역조직화학적 분석

김 광 호* · 윤 용 한* · 김 정 택* · 백 완 기* · 김 현 태*
김 영 삼* · 손 국 희* · 한 혜 승** · 박 광 원*** · 송 순 욱***

=Abstract=

Immunohistochemical Analysis of the Bullae in Patients with Primary Spontaneous Pneumothorax

Kwang Ho Kim, M.D.*, Yong Han Yoon, M.D.*, Joung Taek Kim, M.D.*, Wan Ki Baek, M.D.*
Hyun Tae Kim, M.D.*, Young Sam Kim, M.D.*, Kuk Hi Son, M.D.*, Hae Seung Han, M.D. **,
Kwang Won Park, BA***, Sun U. Song, Ph D. ***

Background: Bulla is an air-filled space within the lung parenchyma resulting from deterioration of the alveolar tissue. Molecular mechanism of the formation of the bulla is not well described. Fibroblast growth factor(FGF)-7, bone morphogenetic protein(BMP) receptor, and transforming growth factor(TGF)- β receptor are known to have a stimulatory or inhibitory role in the lung formation. We investigated to see if these growth factor or cytokine receptors are involved in the bulla formation by immunohistochemical staining of bullous lung tissues from patients with primary spontaneous pneumothorax. **Material and Method:** Bullous lung tissues were obtained from 31 patients with primary spontaneous pneumothorax, including 30 males and 1 female from 15 to 39 years old. The bullous tissues were obtained by video-thoroscopic surgery and/or mini-thoracotomy and fixed in formalin. Blocks of the specimens were embedded with paraffin and cut into 5~6 μ m thick slices. The sections were deparaffinized and hydrated and then incubated with primary antibodies against FGF-7, BMP-RII, or TGF-RII. **Result:** Of the 31 patients, 24 were TGF-RII positive including 18 strong and 6 weak positives. Observation with high magnification showed that strong immunostaining was detected in the boundary region between bullous and normal lung tissues. In contrast, all of the sections were negative with FGF-7 or BMP-RII antibodies. **Conclusion:** These results suggest that overexpression of

*인하대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

**제주대학교 의과대학 해부병리학교실

Department of Pathology, Medical School, Jeju National University, Jeju, Korea

***인하대학교 의과대학 임상중양연구소

Clinical Research Center, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

논문접수일 : 2002년 10월 23일 심사통과일 : 2002년 12월 23일

† 본 논문은 2001년도 인하대학교 교수연구비 지원에 의하여 실시되었음.(INHA-22066)

책임저자 : 송순욱 (400-711) 인천 중구 신흥동 3가 7-206, 인하대학교 부속병원 임상중양연구소. (Tel) 032-890-2640, (Fax) 032-890-3099

E-mail:sunuksong@inha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

TGF-β RII may be involved in the formation of bulla, although further molecular studies are needed to find out more detailed molecular mechanisms.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:86-90)

Key words : 1. Bleb
2. Growth factor

서 론

자연기흉은 젊은 연령층의 환자에서 갑자기 발생하여 일시적이지만 생활의 흐름을 바꾸게 하는 질환이다. 자연기흉의 발생 원인은 폐의 대부분은 정상 소견을 갖으나 상엽에 발생하는 폐기포의 파열에 의한 것임이 널리 알려져 있는 사실이다. 폐기포가 어떤 원인으로 인하여 생성이 되는지는 확실히 규명되어있지 않으나 폐상엽에 생기는 공기의 기계적인 압박(mechanical stress)에 의한 폐포벽에 발생하는 벽의 장력에 의하여 폐기포의 생성이 촉진되는 것으로 설명된다¹⁾. 그러나 이런 기계적인 공기의 작용과 더불어 폐포의 세포조직학적인 변화 즉 폐의 일부가 파괴적인 과정으로 그 벽이 약하여져 정상 폐포벽을 갖지 못하며 그 벽들의 교통으로 국소적으로 확대되어 정상 폐 표면보다 융기되는 것으로 설명되는²⁾, 즉 구조적인 문제가 있을 것으로 생각되는 견해가 있다. 현재까지 정상적인 폐의 형성에 관여한다고 알려진 활성 유전자로는 Fibroblast growth factors(FGF) 수용체, Epidermal growth factor(EGF) 수용체, Insulin-like growth factor(IGF) 수용체, Platelet-derived growth factor(PDGF) 수용체, Bone morphogenetic protein(BMP) 수용체, BMP4 인자 등이 있고, 억제 유전자로는 Transforming growth factor-(TGF-) 수용체가 있다고 알려져 있다³⁾. 본 연구에서는 이러한 폐의 형성에 관여하는 유전자의 발현에 이상이 생겨 폐기포가 생성될 수 있는 가능성이 있는지를 먼저 면역조직화학적 방법으로 가능 유전자들을 탐색하여 살펴 보았다. 따라서, 폐 형성에 활성적인 또는 억제적인 기능을 가지고 있다고 알려져 있는 FGF-7 성장인자, BMP수용체 II, 그리고 TGF-β 수용체 II 유전자의 비정상 발현 여부를 각각의 단일 클론성 항체를 사용하여, 수술로 절제된 자연기흉 환자의 폐기포 조직을 면역조직염색 방법으로 염색하여 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

인하대병원 흉부외과에서 재발성 또는 지속성 기흉으로 흉강경 또는 개흉술로 폐기포 절제술을 실시한 환자들을 대상으로 하였다. 총 31명의 환자로 15세에서 39세까지 연령분

포를 보였으며 남자 30명, 여자 1명이었다. 대상 환자에 대한 자세한 내용은 Table 1과 같다.

폐기포 절제는 비디오흉강경이나 소절개개흉술을 통하여 폐기포벽에 손상을 가하지 않게 주의하면서 비디오흉강경용 스테플러(Endo GIA stapler)를 이용하여 절제하였으며 가능한 원형을 유지하여 신선한 상태로 포르마린에 고정하여 면역조직화학적 연구를 위한 표본을 만들었다.

2. 면역조직화학적 염색

중성포르말린 용액으로 고정된 조직을 파라핀에 포매한 후 폐기포와 주변조직을 5~6μm 두께의 절편으로 여러 장의 슬라이드를 만들었다. 이들 파라핀 포매 조직을 자일렌을 사용하여 탈파라핀화 한 후 100%, 75% 알코올로 함수화 하였고, 내재성 페록시다아제를 억제하기 위하여 37℃에서 3% 과산화수소를 10분간 반응시켰다. 조직 내에 비특이적 결합을 억제하기 위하여 단백질 억제물질 (Histostain™ SP Kit 85-9043, Zymed, USA)을 실온에서 10분간 적용하였다. 단일 클론성 항-TGF-β 수용체 II, BMP 수용체 II 그리고 FGF-7인자 항체 (Santa Cruz, USA)를 1:40, 1:20, 그리고 1:20으로 각각 희석하여 습윤 챔버에서 1시간 정도 반응시켰다. 바이오틴이 부착된 복합이차항체(Histostain™ SP Kit 85-9043, Zymed, CA, USA)를 1:35로 희석하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 스트렙타비딘-HRP를 실온에서 10분간 반응시키고, 발색제로는 스트렙타비딘에 반응하는 DAB (3,3-diaminobenzidine tetrachloride, Zymed, CA, USA)를 실온에서 5분간 반응하였으며 대조염색을 시행하였다. 음성대조군은 일차항체 대신에 이차항체용액을 사용하여 위와 동일한 방법으로 시행한 후 관찰하였다.

결 과

폐기포 조직 슬라이드를 단일 클론성 항 TGF-β 수용체 II, BMP 수용체 II 그리고 FGF-7인자 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색방법으로 관찰한 결과, 항 TGF-β 수용체 II항체는 음성대조군에 비하여 TGF-β 수용체 II의 발현 정도가 월등히 높게 나타남을 관찰할 수 있었다. 전체 환자 31명중 TGF-β 수용체 II항체에 양성 반응을 나타낸 환자 수는 모두

Table 1. Patient's Profile

Number of Patients	31
Age(years) :	15 ~ 39
Male : Female	30:1
Site of Pneumothorax	
Left	17
Right	12
Both	2
Surgical Indications :	
Recurrence	21
Persistence	8
Visible bulla	2
Surgical Approach :	
VATS	22
Thoracotomy	9

VATS, Video-assisted thoracic surgery

Table 2. Results of Immunohistochemical staining

	Positive	Negative
TGF- β R II	24	7
FGF-7	0	31
BMP R II	0	31

TGF, Transforming Growth Factor; FGF, Fibroblast Growth Factor; BMP, Bone Morphogenetic Protein

24명 이었다(Table 2). 이들 중에는 18명이 강한 양성 반응을 보였고, 6명이 약한 양성 반응을 보였다. 강한 양성 반응을 나타낸 2명의 면역조직화학적 염색 결과를 살펴보면, TGF- β 수용체 II의 염색이 기흉과 정상 폐조직 경계 부위에서 특히 강하게 염색됨을 살펴볼 수 있었다(Fig. 1-A, B, C, & D). 이에 반하여, BMP 수용체 II 그리고 FGF-7인자의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 결과는 모든 환자들에서 음성으로 관찰되었다(Table 2). TGF- β 수용체 II의 항체에 강한 양성 반응을 보인 두 환자의 조직을 BMP수용체 II 그리고 FGF-7인자의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 실험을 실시한 결과는, Fig. 2에서 보여주듯이 모두 음성으로 나타났다(Fig. 2).

고 찰

본 연구에서는 폐의 형성에 관여하는 유전자의 발현에 이상이 생겨 폐기포가 생성될 수 있는 가능성이 있는지를 먼저 면역조직화학적 방법으로 가능 유전자들을 탐색하여 살

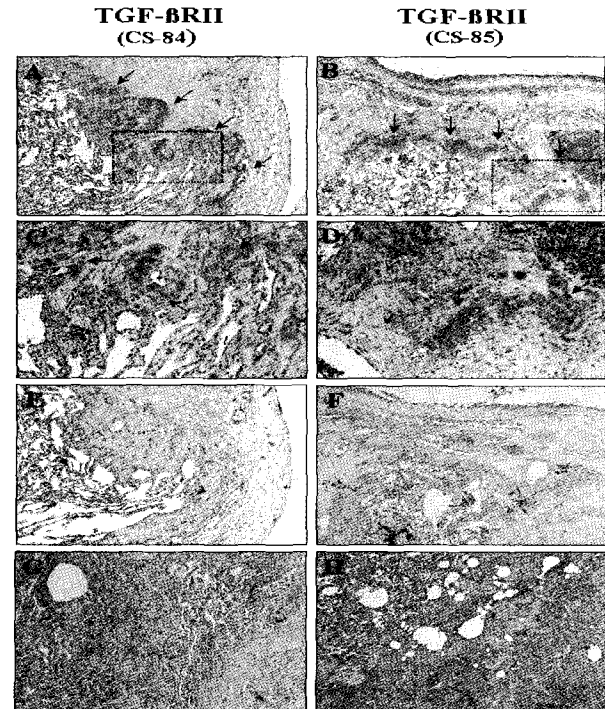


Fig. 1. Results of immunohistochemical staining of bullous tissues using TGF-RII antibody. (A & B) Picture of bullous tissues from two patients (CS-84 and CS-85) immunohistochemically stained with TGF-RII antibody, low magnification (40X). (C & D) Picture of the same bullous tissues shown in A & B with high magnification (100X). The areas in the dotted rectangles in A & B are shown respectively. (E & F) Picture of bullous tissues immunohistochemically stained with secondary antibody alone, low magnification (40X). (G & H) Picture of normal lung tissues immunohistochemically stained with TGF-RII antibody, low magnification (40X).

펴 보았다. 정상적인 폐의 형성에 관여한다고 알려진 유전자들 중에서 TGF- β 수용체 II, BMP 수용체 II, FGF-7 성장인자의 발현을 우선적으로 살펴보았다. TGF- β 수용체 II와 BMP 수용체 II는 각각 TGF- β 와 BMP cytokine인자들과 결합하여 세포밖의 성장, 분화, 형성에 관련된 신호를 세포 안으로 전달해주는 역할을 한다. 이러한 수용체들의 발현이 증가하거나, 감소할 경우에는 세포 안으로 전달되는 신호의 양도 정상적일 때와 달라져서 Fibrosis를 일으키거나 정상세포가 암세포로 변화되는 과정에서 역할을 한다고 알려져 있다^{4,5)}. FGF-7 성장인자는 중배엽세포, 표피세포, 신경세포들의 성장과 분화에 일반적으로 관여하는 인자이지만, 폐조직 형성에도 활성유전자로 관여한다고 알려져 있다³⁾.

본 연구의 결과를 살펴보면, 유전자 발현을 면역조직화학적 염색 방법으로 관찰한 유전자들 중에서 TGF- β 수용체 II의 비정상적인 발현이 폐기포 조직과 정상 폐조직 경계 부위에

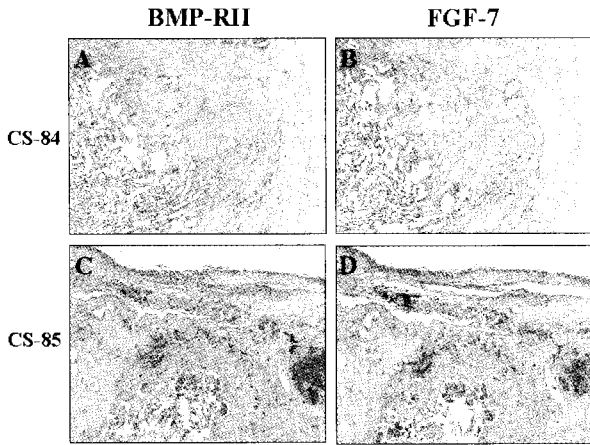


Fig. 2. Results of immunohistochemical staining of bullous tissues using BMP-RII and FGF-7 antibodies. (A & C) Picture of bullous tissues from two patients (CS-84 and CS-85) immunohistochemically stained with BMP-RII antibody, low magnification (40X). (B & D) Picture of bullous tissues from two patients (CS-84 and CS-85) immunohistochemically stained with FGF-7 antibody, low magnification (40X).

서 관찰되었다. 이러한 결과는 자연기흉 환자들 중에서 TGF-β 수용체 II 유전자의 발현에 이상이 생겨서 폐기포가 생성될 수도 있다는 가능성을 제시해 준다고 할 수 있다.

기흉환자들의 폐기포 조직에서 TGF-β 수용체II에 대한 항체에 의해 염색된 부위를 좀더 자세히 살펴보면, 폐기포 조직과 정상 폐조직이 접해 있는 지역의 섬유아세포와 그 주변 조직에서 주로 관찰되었고, 그 다음이 폐기포 조직 내에서 염색 강도는 낮았지만 관찰되었다. 이러한 결과는 다음의 두 가지 사실을 예시해 준다고 가정할 수 있다. 첫째, 정상 폐 조직에 있는 섬유아 세포에서 TGF-β 수용체 II 발현의 증가가 일어나 TGF-β 인자에 의한 신호전달조직에 활성화가 유도되어, 이에 의해 발현이 증가하거나 감소하는 유전자들이 폐세포들에서 일어날 수 있다는 사실과 둘째로는 TGF-β 인자에 의한 신호전달 증폭에 의해 Extracellular matrix protein들의 분비가 많아져서 조직의 경화(Fibrosis)가 일어날 수 있다는 사실이다. 실제로 폐기포 조직을 현미경으로 관찰하면 경화된 조직으로 구성되어 있음을 알 수 있다. 따라서 위의 두번째 가능성은 많은 편이라 예상된다. 그러나 단지 TGF-β 수용체 II의 증가에 의한 신호전달 증폭에 의한 것인지 아니면 다른 유전자 발현의 변이가 동반되는지는 더 상세한 분자생물학적 연구가 요구된다고 할 수 있다.

다음 단계의 실험으로는 폐기포 조직에서 TGF-β 수용체 II 단백질의 양이 증가되었다는 면역조직학적 실험 결과를 우선 Northern Blot Analysis와 Western Blot Analysis를 통하여 확인하는 실험이 될 것이다. 이 실험들에서는 폐기포 조직,

정상 폐조직과의 경계부위, 그리고 정상 폐조직을 각각 나누어서 각 조직에서의 mRNA와 단백질의 양을 측정하게 될 것이다. 또한 각 환자의 폐기포 생성빈도에 따라서 환자 군을 나누어서 유전자의 변이를 살펴보는 것도 유의한 실험이 될 것이다.

40대 이하의 젊은 연령층에서 발병하는 자연기흉의 발생 원인은 대부분의 폐는 정상 조건을 갖으나 상엽에서 주로 발생하는 폐기포의 파열에 의한 널리 알려져 있다. 폐기포가 어떤 원인으로 생성이 되는지는 확실히 규명되어 있지 않으나 앞의 서론에서 언급했듯이, 폐상엽에 생기는 공기의 기계적인 압박에 의한 폐포벽에 발생하는 벽의 장력에 의하여 폐기포의 생성이 촉진된다는 가설과 폐포의 세포조직학적인 변화 즉 폐의 일부분이 파괴적인 과정으로 그 벽이 약하여져 정상 폐포벽을 갖지 못하며 그 벽들의 교동으로 국소적으로 확대되어 정상 폐표면보다 융기되는 것으로 설명되는 가설이 있다⁶⁾. 특히 단백질분해효소(protein protease)와 그의 억제제(antiprotease)의 불균형에 의한 폐조직 파괴가 기흉 발생에 관여할 가능성이 제시되기도 한다⁷⁾. Alpha-1 protease 라는 단백질의 발현이 감소할 경우에 기흉 발생에 관여할 수 있다는 결과들이 보고되었다^{8,11)}. 그러나 본 연구의 결과로 살펴볼 때, TGF-β 인자에 의한 신호전달조직 체계에 이상이 생겨서 기흉이 발생할 수 있다면, Protease-antiprotease 가설에 직접적으로 관여하지 않는 타 유전자들이 기흉 발생에 관여할 수 있다는 가능성이 제시됐다고 할 수 있다. 앞으로 이러한 기흉 발생의 과정들이 분자생물학적 연구를 통하여 메커니즘들이 밝혀진다면, 분자생물학적 표적들을 목표로 한 치료 방법들도 개발되리라 예상된다.

결 론

정상적인 폐조직의 형성에 활성화나 억제에 관여하는 유전자의 발현에 이상이 생겨 폐기포가 생성될 수도 있다는 가정을 두고 실험된 이 연구에서는 폐조직이 형성될 때, 억제유전자의 역할을 담당하고 있다고 알려진 TGF-β 수용체 II의 발현이 증가되면서 일어날 수 있다는 가능성을 제시하였다. 이번 결론은 면역조직학적 염색 실험 결과만으로 밝혀진 사실임으로 좀 더 체계적인 분자생물학적인 연구가 요구된다.

참고 문헌

1. Cohen RG, DeMeester TR, Lafontaine E: *The pleura*. In : Sabiston Jr DC, Spencer FC. *Surgery of the Chest*. 6th ed. Philadelphia: W B Saunders Company 1995;523-75.
2. Shamji F. *Classification of cystic and bullous lung*

- disease. Chest Surg Clin North Am 1995;5:701-16.
- Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. *The molecular basis of lung morphogenesis. Mechanism of Development.* 2000; 92; 55-81.
 - Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).* Mol Genet Metab 2000;71(1-2):418-35.
 - Wakefield LM, Roberts AB. *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis.* Curr Opin Genet Dev. 2002;12(1):22-9.
 - Klingman RR, Angelillo VA, DeMeester TR. *Cystic and Bullous Lung Disease.* Ann Thorac Surg 1991;52:576-80.
 - Perlmutter DH, Pierce JA. *The al-antitrypsin gene and emphysema.* Am J Physiol 1989;L147-62.
 - Gross P, Pfitzer EA, Toker E, Babyak MA, Kaschak M. *Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats.* Arch Environ Health 1965;11: 50-8.
 - Janoff A. *Elastase and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis.* Am Rev Respir Dis 1985;132:417-33.
 - Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. *The induction of pulmonary emphysema with leukocyte elastase.* Am Rev Respir Dis 1977;116:469-75.
 - Snider GL, Lucey EC, Christensen TG, Stone PJ, Calore JD, Catanese A, Franzbalu C. *Emphysema and bronchial secretory metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products.* Am Rev Respir Dis 1984;129:155-60.

=국문초록=

배경: 폐 형성에 활성적인 또는 억제적인 기능을 갖고 있다고 알려져 있는 FGF-7 성장인자, BMP수용체 II, 그리고 TGF- β 수용체 II 유전자의 비정상 발현이 폐기포 생성에 관여하는지를 각각의 단일성 클론 항체를 사용하여 수술로 절제된 자연기흉 환자의 폐기포 조직들을 면역조직염색 방법으로 염색하여 관찰하였다. **대상 및 방법:** 재발성 또는 지속성 기흉으로 흉강경 또는 개흉술로 폐기포 절제술을 실시한 환자들을 대상으로 하였다. 총 31명의 환자로 15세에서 39세까지 연령분포를 보였으며 남자 30명, 여자 1명이었다. 폐기포 절제는 비디오흉강경이나 소절개개흉술을 통하여 폐기포벽에 손상을 가하지 않게 주의하면서 비디오흉강경용 스테플러(Endo GIA stapler)를 이용하여 절제하였으며 가능한 원형을 유지하여 신선한 상태로 포르마린에 고정하여 면역조직화학적 연구를 위한 표본을 만들었다. 폐기포 조직 슬라이드를 단일 클론성 항 TGF- β 수용체 II, BMP수용체 II 그리고 FGF-7인자 항체를 이용하여 면역조직학적 염색방법으로 관찰하였다. **결과:** 전체 환자 31명중 TGF- β 수용체 II항체에 양성 반응을 나타낸 환자수는 모두 24명이었다. 이들 중에는 18명이 강한 양성 반응을 보였고, 6명이 약한 양성 반응을 보였다. 면역조직화학적 염색 결과를 고배율 현미경으로 살펴보면, TGF- β 수용체 II의 염색이 기흉과 정상 폐조직 경계 부위에서 특히 강하게 염색됨이 관찰되었다. 이에 반하여, BMP수용체 II 그리고 FGF-7인자의 항체를 이용한 면역조직학적 염색 결과는 모든 환자의 조직들에서 음성으로 관찰되었다. **결론:** 폐 조직이 형성될 때, 억제유전자의 역할을 담당하고 있다고 알려진 TGF- β 수용체 II의 발현이 증가되면서 폐기포가 생성될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 이번 결론은 면역조직학적 염색 실험 결과만으로 밝혀진 사실임으로 좀 더 체계적인 분자생물학적인 연구가 요구된다.

중심 단어: 1. 폐기포
2. 성장인자