

## Interferon- $\gamma$ 투여가 쥐에서의 Bleomycin 유도 폐 섬유화에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

윤형규, 김용현, 권순석, 김영균  
김관형, 문화식, 박성학, 송정섭

=Abstract=

### The Effect of Interferon- $\gamma$ on Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in the Rat

Hyoung Kyu Yoon, M.D., Yong Hyun Kim, M.D., Soon Seog Kwon, M.D.,  
Young Kyoon Kim, M.D., Kwan Hyung Kim, M.D.,  
Hwa Sik Moon, M.D., Sung Hak Park, M.D., Jeong Sup Song, M.D.

*Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine,  
College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

**Objectives** : The matrix metalloproteinases (MMPs) that participate in the extracellular matrix metabolism play a important role in the progression of pulmonary fibrosis. The effects of the MMPs are regulated by several factors including Th-1 cytokines, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Up to now, IFN- $\gamma$  is known to inhibit pulmonary fibrosis, but little is known regarding the exact effect of IFN- $\gamma$  on the regulation of the MMPs.

This study investigated the effects of interferon- $\gamma$  on the pulmonary fibrosis and the expression of the lung MMP-2,-9, TIMP-1,-2, and Th-2 cytokines in aa rat model of bleomycin induced pulmonary fibrosis.

**Materials and methods** : Male, specific pathogen-free Sprague-Dawley rats were subjected to an intratracheal bleomycin instillation. The rats were randomized to a saline control, a bleomycin treated, and a bleomycin+IFN- $\gamma$  treated group.

---

본 논문은 가톨릭 중앙의료원 연구비의 보조로 이루어졌음.

Address for correspondence:

Jeong Sup Song, M.D.

Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, College of Medicine,  
the Catholic University of Korea, Seoul, Korea

150-713, #61 Youido-dong, Youngdeungpo-ku, Seoul, Korea

Phone : (02) 3779-1146 Fax : (02) 780-3132

The bleomycin+IFN- $\gamma$  treated group was subjected to an intramuscular injection of IFN- $\gamma$  for 14 days. At 3, 7, 14, and 28 days after the bleomycin instillation, the rats were sacrificed and the lungs were harvested. In order to evaluate the effects of the IFN- $\gamma$  on lung fibrosis and inflammation, the lung hydroxyproline content, inflammation and fibrosis score were measured. Western blotting, zymography and reverse zymography were performed at 3, 7, 14, 28 days after bleomycin instillation in order to evaluate the MMP-2,-9, and TIMP-1,-2 expression level. ELISA was performed to determine the IL-4 and IL-13 level in a lung homogenate.

**Results** : 1. 7 days after bleomycin instillation, inflammatory changes were more severe in the bleomycin+IFN- $\gamma$  group than the bleomycin group (bleomycin group : bleomycin+IFN- $\gamma$  group=2.08 $\pm$ 0.15 : 2.74 $\pm$ 0.29, P<0.05), but 28 days after bleomycin instillation, lung fibrosis was significantly reduced as a result of the IFN- $\gamma$  treatment (bleomycin group : bleomycin+IFN- $\gamma$  group=3.94 $\pm$ 0.43 : 2.46 $\pm$ 0.13, P<0.05).

2. 28 days after bleomycin instillation, the lung hydroxyproline content was significantly reduced as a result of IFN- $\gamma$  treatment (bleomycin group : bleomycin+IFN- $\gamma$  group=294.04 $\pm$ 31.73  $\mu$ g/g : 194.92 $\pm$ 15.51  $\mu$ g/g, P<0.05).

3. Western blotting showed that the MMP-2 level was increased as a result of the bleomycin instillation and highest in the 14 days after bleomycin instillation.

4. In zymography, the active forms of MMP-2 were significantly increased as a result of the IFN- $\gamma$  treatment 3 days after the bleomycin instillation, bleomycin+IFN- $\gamma$  group (bleomycin group : bleomycin+IFN- $\gamma$  group=209.63 $\pm$ 7.60% : 407.66 $\pm$ 85.34%, P<0.05), but 14 days after the bleomycin instillation, the active forms of MMP-2 were significantly reduced as a result of the IFN- $\gamma$  treatment (bleomycin group : bleomycin+IFN- $\gamma$  group=159.36 $\pm$ 20.93% : 97.23 $\pm$ 12.50%, P<0.05).

5. The IL-4 levels were lower in the bleomycin and bleomycin+IFN- $\gamma$  groups but this was not significant, and the IL-13 levels showed no difference between the experiment groups.

**Conclusion** : The author found that lung inflammation was increased in the early period but the pulmonary fibrosis was inhibited in the late stage as a result of IFN- $\gamma$ . The inhibition of pulmonary fibrosis by IFN- $\gamma$  appeared to be associated with the inhibition of MMP-2 activation by IFN- $\gamma$ .

Further studies on the mechanism of the regulation of MMP-2 activation and the effects of MMP-2 activation on pulmonary fibrosis is warranted in the future. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:51-66)

---

**Key words** : Pulmonary fibrosis, Matrix metalloproteinase-2, Interferon- $\gamma$ .

## 서 론

특발성 폐 섬유화증은 반복적인 폐 실질의 염증과 손상으로 인해서 발생하며, 특징적으로 심한 간질

세포의 증식과 교원질을 비롯한 세포 외 기질의 과도한 침착이 일어나 폐 섬유화가 생긴다. 심한 폐 섬유화로 인해 정상조직구조가 변형됨으로써 결국은 폐기능을 잃게 되고, 환자의 평균 수명은

적극적인 치료와 진단에도 불구하고 증상이 최초로 생긴 후 4년 내지 5년에 불과하다. 더욱이 최근 10년 간 사망률이 더욱 증가하고 있어서<sup>1</sup> 효과적인 치료법의 개발이 절실한데, 예후가 매우 불량한 만성 폐질환으로서 일부의 경우를 제외하고는 대부분 발생 원인을 모르며, 병의 진행이 느리고 비교적 드문 질환이기 때문에 병인의 연구와 치료법의 개발이 매우 어려운 상태이다<sup>2</sup>. 그 동안 부신피질 호르몬이나 면역억제제를 치료에 사용하여 왔으나 뚜렷한 효과가 없었고, 효과적인 치료법은 아직 개발되고 있지 않다<sup>3,4</sup>.

최근의 연구에 의하면 폐 섬유화증은 여러 사이토카인의 발현에 의해서 섬유화의 정도가 조절되고, 특정한 사이토카인의 발현양상이 폐 섬유화의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있는데, interleukin-4(IL-4)나 interleukin-13(IL-13)과 같은 Th-2 사이토카인은 섬유모세포의 증식과 교원질의 생산을 촉진시켜 폐의 섬유화를 악화시키고, 반대로 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )와 같은 Th-1 사이토카인은 폐 섬유화를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>5</sup>.

폐에 섬유화가 일어나는 데에는 세포 외 기질을 분해하는 여러 가지 종류의 효소 중에서 matrix metalloproteinase(MMP)가 중요한 작용을 하고, 이 효소에 길항 작용을 하는 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)와 MMP의 상호작용도 크게 기여하는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

MMP와 TIMP의 작용은 여러 가지 요소에 의해 조절되는데, 이 MMP와 TIMP의 작용에 Th-1과 Th-2 사이토카인이 미치는 영향은 잘 밝혀져 있지 않다.

최근의 여러 보고에 의하면 Th-1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 는 폐 섬유화증의 진행을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있는데<sup>7</sup>, 아직까지 IFN- $\gamma$ 가 MMP와 TIMP에 대해서 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없다.

이에 저자들은 폐 섬유화증의 대표적인 동물모델인 bleomycin 유도 백서 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 의 투여가 폐의 MMP-2,-9과 TIMP-1,-2에 미치는 영향을 대조군과 비교하여 알아보고, IFN- $\gamma$ 의 투여에 따른 Th-2 사이토카인의 변화를 조사함으로써 IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화증을 호전시키는 지 아니면 악화시키는 지 알아보고 MMP와 TIMP의 작용과 Th-2 사이토카인에 영향과 기전을 연구하고자 하였다.

## 방 법

### 1. 실험동물의 준비와 처치

실험동물은 체중 200-250g의 무균(specific pathogen free, SPF) Sprague-Dawley계의 수컷 흰쥐를 사용하여, 무작위로 정상 대조군, bleomycin 군, bleomycin+IFN- $\gamma$  군의 세 군으로 나누었다.

Bleomycin 군에서는 ketamin을 근육 주사하여 마취시킨 다음 경부 중양을 절개하여 기관 고리를 노출시키고, kg당 6 U의 bleomycin sulfate(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mi)를 300  $\mu$ l의 생리식염수에 섞어 기관 내로 주입하였다. Bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서는 bleomycin군과 동일한 처치를 한 후 14일간 매일 400  $\mu$ l의 phosphate buffer saline(PBS)에 섞은 IFN- $\gamma$ (Peprotech, Rocky Hill, NJ)를  $2 \times 10^5$  U/Kg 씩 14일간 근육주사 하였다. 정상 대조군에서는 bleomycin군과 동일한 방법으로 300  $\mu$ l의 생리식염수를 기관 내로 주입하였으며, 정상 대조군과 bleomycin군은 PBS 400  $\mu$ l를 근육 내로 매일 14일간 주사하였다.

실험동물은 3, 7, 14, 28일에 각 군마다 5마리씩 마취 후 실험사 시킨 다음, 흉부 중양을 절개하여 폐를 노출시킨 후 폐동맥으로 PBS를 관류시켜 혈액을 제거하였다. 관류 후 우측 폐는 기관지와 늑막 등의 결체 조직을 분리하고 PBS로 세척한 다

음 잘게 분쇄하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였으며 hydroxyproline 측정, Western blot, zymography, reverse zymography 등의 실험에 이용하였다. 좌측 폐는 흉곽에서 분리한 후 4% neutral formalin을 주입하여 균일하게 팽창시키고, 4% neutral formalin에 넣어 보관 후 조직학적 검사에 이용하였다.

## 2. 병리조직학적 분석

폐 절편을 폐 기저부에서 얻어 hematoxyline-eosin(H&E) 염색과 Masson's trichrome 염색을 하였다. 폐의 염증 정도는 H&E 염색에서 염증세포 침윤이나 간질 비후, 폐 구조가 파괴된 부위, 비정상적인 조직이 침착된 부위를 %로 나타내어 조사하였다. 다음과 같은 기준으로 조직학적 등급을 평가하여 통계에 이용하였다. 40배 시야에서 관찰하였을 때 0, 비정상 소견이 없는 경우; 1, 폐 조직의 10% 미만; 2, 폐 조직의 10-25%; 3, 폐 조직의 25-50%; 4, 폐 조직의 50-75%; 5, 폐 조직의 75% 이상에서 병소가 관찰되는 경우로 각각 정의하였다.

폐의 섬유화 정도는 Masson's trichrome 염색에서 섬유화 점수를 0, 비정상 소견이 없는 경우; 1, 폐포벽과 기관지벽에 미량의 섬유화; 3, 폐의 구조는 유지되고 있으나 폐포와 기관지벽에 중등도의 섬유화; 5, 폐 섬유화의 증가로 인해서 폐의 구조가 손상되고 작은 섬유화 종괴가 발견; 7, 폐 구조가 심하게 손상되고 커다란 섬유화 종괴가 발견; 8, 시야가 섬유화로 완전히 대체된 경우로 정하였다. 구분이 어려운 경우는 중간 값을 취하였다.

## 3. 단백질의 추출과 정량

냉동된 폐 조직 400 mg과 protease inhibitors [PMSF(100 mM), leupeptin(10 mg/ml), pepstatin (10 mg/ml)]가 포함된 lysate buffer [50 mM Tris

· Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% nonidet P-40 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS] 800  $\mu\text{l}$ 를 넣고 얼음 위에서 homogenizer(Tissue tearer, biospec, Bartlesville, OK)으로 10초 정도 균질화 시킨 후 Eppendorf tube에 넣고 원심분리를 한 다음( $4^{\circ}\text{C}$ , 1000g, 30 min), 상청액을 모아  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 단백질의 농도는 Bradford assay를 이용하여 결정하였다.

## 4. Hydroxyproline 정량

Hydroxyproline의 정량은 Woessner의 방법을 응용하여 측정하였다<sup>8</sup>. 실험동물의 폐 조직 100 mg에 PBS 100 ml를 넣고 homogenizer로 균질화 시킨 후, 10 N HCl를 1.5 ml 더하여 최종 6 N의 농도로 만들었으며  $130^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 반응시켜 가수분해 시켰다. 가수분해 후 증류수 10 ml와 2.5 N NaOH를 더하여 pH 7.0로 중화시킨 다음, 2 ml를 취하여 1 ml의 chloramine-T 용액을 넣고 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 perchloric acid 1 ml를 넣고 5분간 반응시키고, p-dimethyl amino benzaldehyde 용액 1 ml를 넣고  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 발색 반응을 일으켰다. 흡광도를 557 nm에서 측정하여 농도를 알고 있는 hydroxyproline standard로 구한 표준곡선을 이용하여 hydroxyproline의 양을 구하였다.

## 5. Western blot

폐 단백질 30  $\mu\text{g}$ 을 sample buffer(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L dithiothreitol, pH 6.8, 4% SDS and 0.01% bromophenol blue)와 섞어  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, 9% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 다음 PVDF 막에 전이하여 5% 차단 용액으로 차단 시켰다. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2에 대한 일차항체(Oncogene,

Cambridge, MA)로 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 세척 후 biotin 부착 이차항체를 첨가한 후, NovaRed(Vector, Burlingame, CA)로 상온에서 1시간 반응시켰다. Chemiluminescent detection 방법(ECL, Amersham Life Science, Piscataway NJ)을 이용하여 발색하였다.

#### 6. Zymography와 reverse zymography

폐 추출 단백질 100  $\mu$ g과 sample buffer를 1:1로 섞어 실온에서 15분간 반응시킨 다음, 1 mg/ml의 gelatin(Sigma)이 함유된 10% SDS-polyacrylamide gel에 20  $\mu$ l를 넣고 4°C에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel을 분리하고 염색접시에 gel을 옮겨 증류수로 세척하였다. 이후 denaturing buffer 50 ml를 넣고 15분간 2회에 걸쳐 세척한 다음 developing buffer 100 ml를 넣고 진탕하면서 37°C에서 밤새도록 반응시키고 증류수로 세척하였다. 이후 Coomassie brilliant blue R250(Sigma)로 염색을 하였고, 7.5% acetic acid와 5% methanol의 용액으로 탈염색 시켰다. 효소 작용이 있는 부위는 청색바탕에 투명한 부분으로 나타났다. Reverse zymography는 gel을 만들 때 160 ng/ml의 recombinant gelatinase A를 추가한 외에는 zymography와 동일한 방법으로 시행하였으며, 첨가한 gelatinase가 폐 단백질에 들어있는 TIMP에 의해 억제된 부위가 투명한 바탕에 청색 부위로 나타났다. 각 band의 densitometer 분석은 Image Master(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 이용하였다.

#### 7. 폐 균질액 내의 IL-4와 IL-13의 측정

Falcon tube에 폐 조직 100 mg과 1 ml의 생리 식염수를 넣고 homogenizer로 30초 동안 균질화 시켰다. 균질화 시킨 후 4°C, 2,000 rpm에서 10분간

원심분리 하여 얻은 상청액을 -20°C에서 보관하였다. 균질액 내의 IL-4와 IL-13의 양은 구입한 IL-4 ELISA kit(Endogen, Woburn, MA)와 IL-13 ELISA kit(BioSource, Camarillo, CA)로 측정하였다. 검사의 민감도는 IL-4<2 pg/ml, IL-13<1.5 pg/ml 였다.

#### 8. 통계처리

폐 조직의 염증정도, 섬유화 정도, hydroxyproline 함량, Western blot 검사, zymography 검사, ELISA 검사의 세 군간의 통계적 유의성은 Kruskal-Wallis test를 이용하여 검정하였고 서로 다른 두 군 간의 통계적 유의성은 Mann-Whitney U test를 이용하여 검정하였다. 모든 통계분석은 P<0.05인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### 결 과

#### 1. Bleomycin 유도 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 투여에 의한 폐의 병리조직학적 소견과 hydroxyproline 함량의 변화

##### 1) 폐 조직의 염증과 섬유화 정도

생리 식염수를 투여한 정상 대조군은 투여 후 3일에서 28일까지 기관지 주위 림프조직의 비후 외에 폐 조직의 특별한 염증이나 섬유화 변화는 없었다. Bleomycin 군과 bleomycin+IFN- $\gamma$  군은 처음 3일째에 염증 정도는 양군에서 유의한 차이가 없이 폐 실질에 전반적으로 가벼운 정도의 염증성 변화가 관찰되었으나, 7일째부터 양 군 모두 폐 실질의 심한 염증성 변화가 관찰되었다. 7일 후의 염증성 변화는 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 보다 더 심하게 일어나, 염증 지수에서 bleomycin 군과 유의한 차이를 보였다(bleomycin 투여군 : bleomycin+IFN- $\gamma$ 투여군

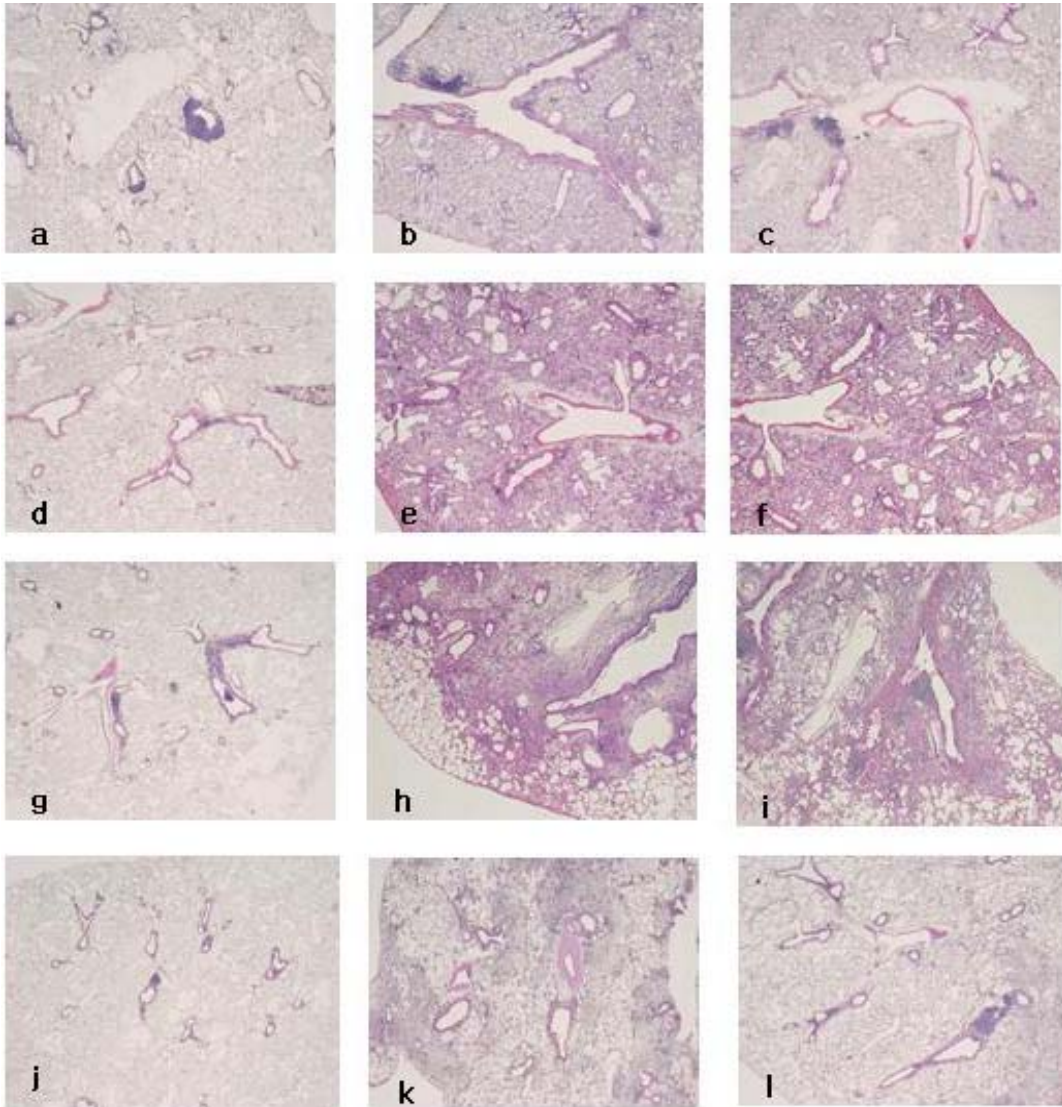


Fig. 1. Photomicrographs of rat lung after intratracheal instillation of saline or bleomycin. Lungs are collected on day 3 (a,b,c), 7 (d,e,f), 14 (g,h,i), 28 (j,k,l) after bleomycin injection. Lungs from saline control (a, d, g, j), bleomycin treated (b,d,h, k) and bleomycin+INF- $\gamma$  treated (c,f,i,l) group are illustrated. Extensive interstitial inflammatory cell infiltration, interstitial thickening and architectural distortion are seen both bleomycin treated and bleomycin+INF- $\gamma$  treated rat (H&E stain,  $\times 40$ ).

$=2.08\pm 0.15$  :  $2.74\pm 0.29$ ,  $P<0.05$ ). 염증성 변화는 14일에도 심하게 일어났지만 양 군간 유의한 차이는 없었으며, 28일에는 염증성 변화는 거의 소실되

었으나 bleomycin 군이 bleomycin+INF- $\gamma$  군보다 섬유성 변화가 심한 염증 병소가 더 많이 남아있는 경향을 보였다(그림 1, 2).

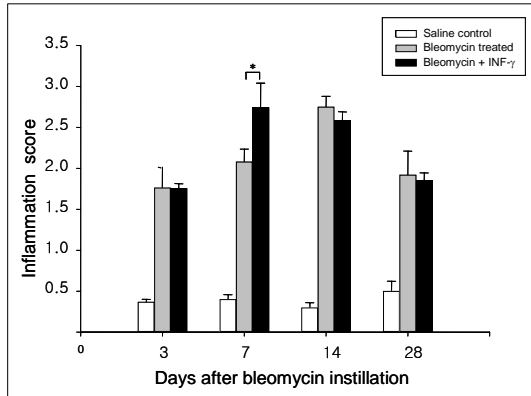


Fig. 2. Evaluation of inflammatory changes on day 3, 7, 14, and 28 after bleomycin treatment in the lung by inflammatory scoring. Bars denote inflammatory score (mean $\pm$ SE) of each experimental group. \* $P$ <0.05, denote significant differences in values measured in bleomycin treated group compared with corresponding bleomycin+INF- $\gamma$  treated group(n=5). 7 days after bleomycin instillation, inflammatory changes were more severe in bleomycin+INF- $\gamma$  group than the bleomycin group.

폐의 섬유화 지수는 bleomycin 투여 후 증가하여 14일에 최고 수준에 다다랐으며 28일에는 양 군 모두 섬유화 지수가 감소하는 경향을 보였으나, bleomycin+INF- $\gamma$  군이 bleomycin 군 보다 섬유화 지수가 유의하게 감소하였다(bleomycin 군 : bleomycin+INF- $\gamma$  군=3.94 $\pm$ 0.43 : 2.46 $\pm$ 0.13,  $P$ <0.05)(그림 3).

## 2) 폐 hydroxyproline 함량의 변화

폐 hydroxyproline 함량은 생리식염수 대조군에 비해서 bleomycin 군, bleomycin+INF- $\gamma$  군 모두에서 초기부터 유의하게 증가하여 있었고 14일까지 계속 증가하였으나 양 군간 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 bleomycin 투여 28일 후 bleomycin+INF- $\gamma$  군에서는 hydroxyproline의 폐 내 함량이 생리식염수 대조군과 비슷하거나 낮은 수준으로 감소한 반면 bleomycin 군에서는 14일보다는 감소했으나 bleomycin+INF- $\gamma$  군 보다는 hydroxy-

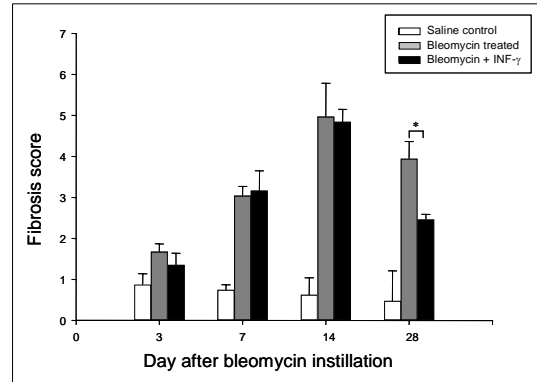


Fig. 3. Evaluation of fibrotic changes on day 3, 7, 14, and 28 after bleomycin treatment in the lung by fibrosis. Bars denote inflammatory score (mean $\pm$ SE) of each experimental group. \* $P$ <0.05, denote significant differences in values measured in bleomycin treated group compared with corresponding bleomycin+INF- $\gamma$  treated group (n=5). 28 day after bleomycin instillation, lung fibrosis was significantly reduced by INF- $\gamma$  treatment.

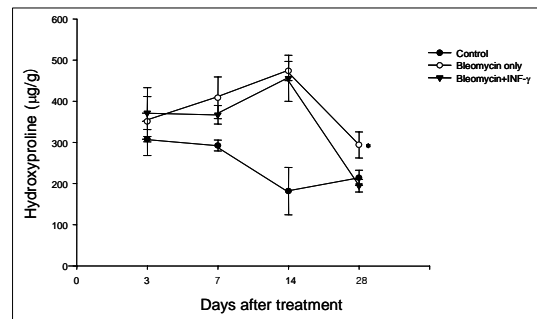


Fig. 4. Time course of hydroxyproline levels in lung homogenate obtained from saline control (closed circle), bleomycin treated (open circle) and bleomycin+INF- $\gamma$ treated (closed triangle) rat at days 3, 7, 14, and 28 postinstillation of 0.6 U/kg of bleomycin. Symbols represent means $\pm$ SE of at least 4 animals. \* $P$ <0.05, denotes significant differences in values measured in bleomycin treated group compared with corresponding bleomycin+INF- $\gamma$ treated group (n=5). 28 days after bleomycin instillation, lung hydroxyproline contents were significantly reduced by INF- $\gamma$  treatment.

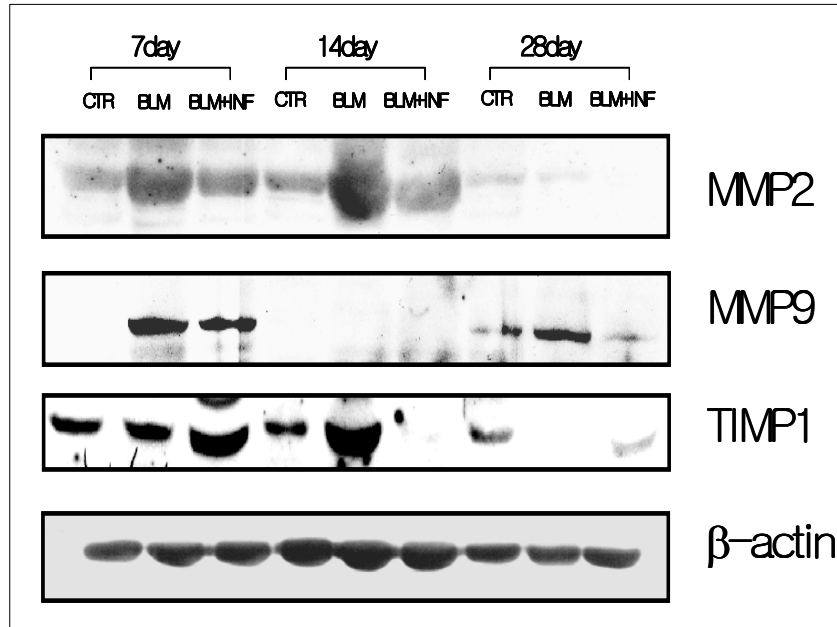


Fig. 5. Western blot analysis for MMP-2, MMP-9, TIMP-1 immunoreactive protein in lung tissue, collected at day 7, 14, and 28 after intratracheal administration of saline (control) or bleomycin. MMP-2 were increased by bleomycin instillation and highest in the 14 days after bleomycin instillation.

proline의 폐 함량이 유의하게 증가한 상태로 유지되고 있었다(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군=294.04 $\pm$ 31.73  $\mu$ g/g : 194.92 $\pm$ 15.51  $\mu$ g/g, P<0.05).

## 2. Bleomycin 유도 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 투여에 의한 폐 내 MMP-2,-9과 TIMP-1,-2의 발현

### 1) Western blot

Bleomycin 투여에 의해 MMP-2 단백질의 양이 증가되는 소견이 Western blot검사에서 관찰되었는데, MMP-2의 증가는 bleomycin 투여 14일에 최고에 이르렀고, 28일째에는 생리식염수 수준으로 감소하였다. IFN- $\gamma$ 의 투여에 의해 bleomycin에 의한 MMP-2의 증가는 억제되었으나, 대조군 수준으로 감소하지는 않았다(그림 5). MMP-2와는

달리 MMP-9, TIMP-1은 유의한 특징을 관찰할 수 없었으며, TIMP-2는 Western blot 검사에 의해 검출되지 않았다.

### 2) Zymography과 Reverse Zymography

Bleomycin 투여 초기인 3일째에는 bleomycin 군과 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 비활성 MMP-2와 활성화된 MMP-2를 합한 MMP-2의 총량은 양 군 간 별 다른 차이가 없는데 비해서 활성화된 형태의 MMP-2가 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 유의하게 증가되어 있었고 (bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군=209.63 $\pm$ 7.60% : 407.66 $\pm$ 85.34%, P<0.05), MMP-2의 활성화 비도 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 유의하게 증가되어 있었다(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군=0.36 $\pm$ 0.03 : 0.64 $\pm$ 0.13, P<0.05). 투여 7일 후에는 MMP-2의 양은 대조군에 비하여



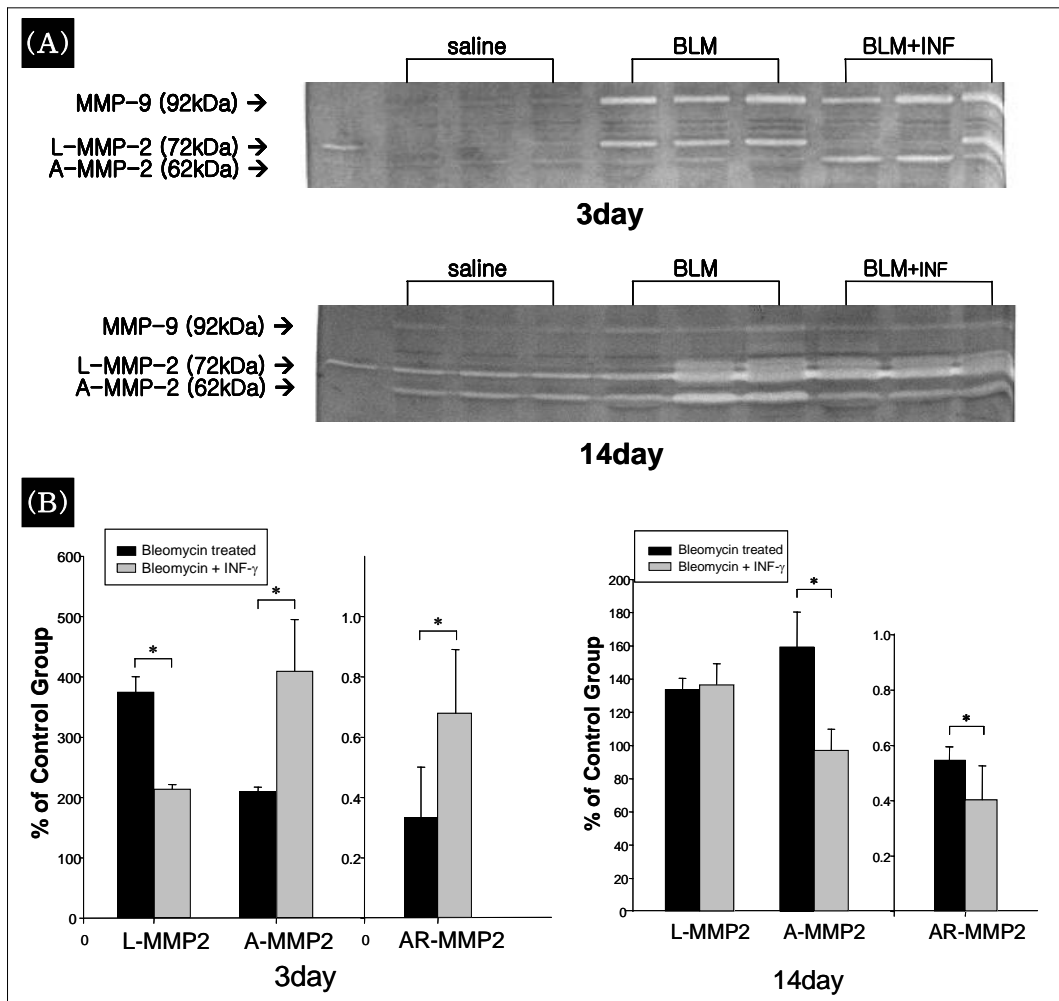


Fig 6. (a) Gelatin zymogram performed with lung tissue from saline control, bleomycin treatment, and bleomycin+INF- $\gamma$  treated rats at day 3 and 14 after bleomycin administration.

(b) Comparison of latent form of matrix metalloproteinase (L-MMP-2), active form of matrix metalloproteinase (A-MMP-2) levels, and activation ratio of matrix metalloproteinase (AR-MMP-2) bleomycin treatment and bleomycin+INF- $\gamma$  treatment group. Active forms of MMP-2 were significantly increased by INF- $\gamma$  treatment in 3 days after bleomycin instillation ( $P < 0.05$ ), but 14 days after bleomycin instillation, active forms of MMP-2 were significantly reduced by INF- $\gamma$  treatment ( $P < 0.05$ ).

증가된 상태로 있었지만 양 구간 유의한 차이는 없었고 bleomycin+INF- $\gamma$  군에서 관찰되었던 활성화된 형태의 MMP-2의 증가는 관찰되지 않았다. 투여 14일 후에는 특징적으로 bleomycin+INF- $\gamma$  군이 bleomycin 군보다 활성화된 상태의 MMP

-2의 양이 유의하게 감소되었고(bleomycin 군 : bleomycin+INF- $\gamma$  군 =  $159.36 \pm 20.93\%$  :  $97.23 \pm 12.50\%$ ,  $P < 0.05$ ) 이에 따라 MMP-2의 활성화 비도 bleomycin+INF- $\gamma$  군에서 유의하게 감소하였다 (bleomycin 군 : bleomycin+INF- $\gamma$  군 =  $0.54 \pm 0.04$  :

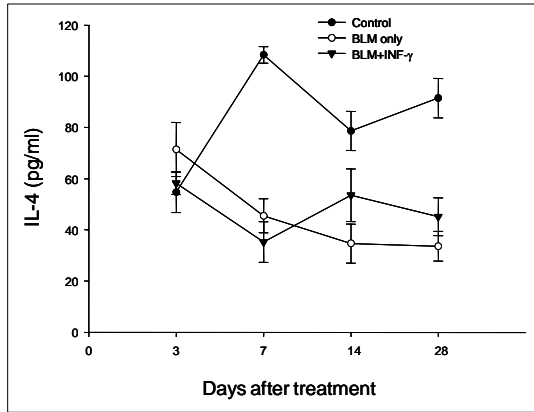


Fig. 7. Time course of IL-4 levels in lung homogenate obtained from saline control (closed circle), bleomycin treated (open circle) and bleomycin+INF- $\gamma$  treated (closed triangle) rat at days 3, 7, 14, and 28 postinstillation of 0.6 U/kg of bleomycin. Symbols represent means $\pm$ SE of at least 4 animals. There were no significant differences among three groups.

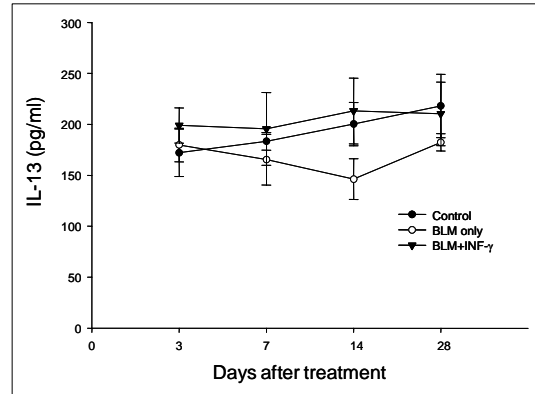


Fig. 8. Time course of IL-13 levels in lung homogenate obtained from saline control (closed circle), bleomycin treated (open circle) and bleomycin+INF- $\gamma$  treated (closed triangle) rat at days 3, 7, 14, and 28 postinstillation of 0.6 U/kg of bleomycin. Symbols represent means $\pm$ SE of at least 4 animals. There were no significant differences among three groups.

0.71 $\pm$ 0.31,  $P < 0.05$ ). 투여 28일 후에는 양 군 모두 MMP-2의 양이 감소하였고 활성화 상태의 MMP-2도 감소하였다(그림 6).

MMP-9은 초기인 투여 3일 후에는 bleomycin 군과 bleomycin+INF- $\gamma$  군 모두에서 증가하였으나 유의한 차이는 관찰할 수 없었고, 시간이 지나면서 MMP-2와는 반대로 MMP-9의 양과 활성도가 양 군 모두 감소하였다.

Reverse zymography를 이용하여 MMP들을 억제하는 TIMP-1과 TIMP-2의 변화를 조사하였으나 MMP들에 비하여 적게 검출되었으며 bleomycin 투여에 의해 별다른 변화를 보이지 않았다.

### 3. Bleomycin 유도 폐 섬유화 모델에서 INF- $\gamma$ 투여에 의한 폐 내 IL-4와 IL-13의 변화

INF- $\gamma$ 와 길항작용을 하는 것으로 알려진 대표적인 Th-2 사이토카인인 IL-4는 bleomycin을 투여

한 후 생리식염수 대조군에 비하여 bleomycin 군과 bleomycin+INF- $\gamma$  군 모두에서 그 양이 감소되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이러한 IL-4의 감소는 투여 후 28일 까지 실험 전 기간에 걸쳐 계속 관찰되었다. 그리고 bleomycin 군과 bleomycin+INF- $\gamma$  군 사이에서 약간의 변동은 있었으나 양군간 별다른 차이는 관찰되지 않았다(그림 7).

IL-13은 시간이 경과함에 따라 bleomycin 군에서 감소되는 경향을 관찰할 수 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았으며 대체적으로 실험 전 기간 동안 큰 변동없이 일정한 수준을 유지하고 있었다(그림 8).

## 고 찰

본 실험은 bleomycin 유도 폐 섬유화 백서 모델을 이용하여 INF- $\gamma$ 가 폐 섬유화에 있어서 중요한 역할을 하는 MMP와 TIMP 그리고 Th-2 사이토카

인에 미치는 영향을 알아보기 위하여 계획되었다.

Bleomycin 유도 폐 섬유화 백서 모델은 특발성 폐 섬유화증과 같이 폐 섬유화를 초래하는 여러 가지 폐 질환의 연구에 다양하게 이용되고 있다<sup>9</sup>. Izbicki 들<sup>10</sup>에 의하면 bleomycin을 기관 내로 투여 하면 투여 후 3에서 5일 사이의 초기에는 주로 중성구가 폐 조직으로 침윤하여 염증을 일으키고, 시간이 지나면서 6일에서 7일부터 지속적으로 림프구가 증가되어 폐 염증을 지속시키며, 폐의 염증과 섬유화는 투여 후 14일에 가장 심하게 일어나는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 bleomycin 투여에 의한 초기 염증 반응에 있어서 특징은 투여 후 3일에는 bleomycin +IFN- $\gamma$  군이나 bleomycin 군 양 군 사이에 폐 염증 변화에는 유의한 차이가 없었지만, 투여 후 7일에는 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 더 심하게 염증성 변화가 관찰된 것이다. 이러한 차이가 나타난 원인을 Izbicki 들의 실험결과를 고려하여 해석해보면, 중성구가 주로 폐 염증을 일으키는 bleomycin 투입 초기인 3일에는 IFN- $\gamma$ 의 투여가 별다른 영향을 주지 않지만, 림프구가 침윤되기 시작하는 시기에 IFN- $\gamma$ 가 주된 영향을 미쳐서 비교적 후기인 투여 후 7일의 폐 염증이 심해진 것으로 생각된다.

IFN- $\gamma$ 는 활성화된 림프구에서 생산되는 사이토카인으로서, 정상적인 상태에서는 대식세포가 림프구의 증식을 억제하지만, IFN- $\gamma$ 로 자극되면 대식세포의 림프구 억제작용이 감소되어 림프구의 증식이 일어나고<sup>11</sup>, 대식세포에서 IL-1의 생산이 늘어나면서 활성화된 림프구에서 IL-2의 생산을 증가시키기 때문에 림프구가 증식되는데<sup>12</sup>, 이 때문에 bleomycin 투여 후 IFN- $\gamma$ 를 투여했을 때 폐의 염증이 더 심해진 것으로 생각된다.

MMP는 아연 의존성 기질분해효소로서 현재까지 20종류가 넘게 발견되고 있는데, 정상적인 조건에서 MMP는 폐의 발달, 기관지의 형성, 기도 분

비선의 발달에 관여하고, 폐 기질의 대사와 혈관형성을 촉진하며 염증세포를 손상된 폐 조직으로 이동할 수 있게 하여, 폐의 면역방어에 필수적인 역할을 수행한다<sup>13</sup>. 세포 외 기질의 생성과 재구성은 여러 질환에 의한 폐 섬유화에서 중요한 단계이며, MMP들은 이 과정에서 가장 필수적인 기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>. MMP의 작용은 조직의 항상성을 유지하는데 필수적이기 때문에, 전사단계, 비활성화된 전호소의 활성화, TIMP와의 결합에 의한 비활성화 등 3가지 방법을 통해서 매우 정밀하게 조절되는데, 위의 3단계는 사이토카인, 호르몬, 종양 유전자 등의 다양한 자극에 의해서 영향을 받는다<sup>15</sup>.

MMP가 폐에 과다하게 발현되면 심한 폐 손상이 일어나기 때문에 MMP는 최근 여러 폐 질환의 연구에서 많은 주목을 받고 있는데, 그 동안의 연구에 의하면 MMP는 폐포 대식세포와 중성 백혈구, 기도 상피세포 등에서 생산되며<sup>16</sup>, 급성 폐 손상, 기관지 천식, 폐 섬유화증, 만성 폐쇄성 폐질환의 병인에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 폐 섬유화증에는 TNF- $\alpha$ <sup>17</sup>, TGF- $\beta$ <sup>18</sup>, IL-1<sup>19</sup>과 같은 여러 종류의 사이토카인이 관여하는데, 이 중 IFN- $\gamma$ 는 bleomycin 폐 섬유화 모델에서 폐 섬유화를 억제한다고 알려져 있다<sup>20,21</sup>.

본 실험에서 가장 특징적인 소견은 폐 섬유화를 억제한다고 알려진 IFN- $\gamma$  투여에 의해서 폐 섬유화가 가장 활발하게 일어나는 bleomycin 투여 후 14일 경의 폐 조직에서 활성화된 MMP-2의 비율이 유의하게 감소한다는 것, 즉 MMP-2의 활성화가 폐 섬유화 형성에 가장 중요한 시기에 IFN- $\gamma$  투여에 의해서 억제된다는 있다는 것이다.

그 동안 MMP가 폐 섬유화증에 미치는 영향에 대해서는 여러 가지 상반된 주장이 많았다. 일부에서는 MMP가 조직의 파괴를 증가시켜 폐 섬유화를 촉진한다고 주장하는가 하면<sup>22,23</sup> 일부에서는 세포 외 기질을 분해하여 폐 섬유화를 억제한다고

주장하기도 하였다<sup>14</sup>. 그러나 본 실험에서 MMP-2의 활성화가 증가할수록 폐 섬유화가 심한 것으로 보아 MMP-2가 폐 섬유화를 악화시키는 것으로 판단되지만 본 실험은 동물실험이며 bleomycin에 의한 급성 폐 섬유화 모델이기 때문에 사람의 폐 섬유화증에 일반적으로 적용하기에는 무리가 있을 것으로 보인다.

Bleomycin 군과 bleomycin+IFN- $\gamma$  군의 MMP-2의 총량이 양 군간 별다른 차이가 없고, IFN- $\gamma$  군에서 후기 폐 섬유화가 억제되어 있는 것을 감안할 때, 폐의 섬유화의 형성에 MMP-2의 활성화가 중요한 역할을 한다는 것을 본 실험으로 알 수 있었다. IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화를 억제하는 기전에 관한 최근의 연구에 의하면 IFN- $\gamma$ 는 강력한 섬유화 사이토카인인 TGF- $\beta$ 를 억제함으로써 섬유화가 일어나지 않도록 하는 것으로 알려지고 있는데<sup>7</sup>, IFN- $\gamma$ 가 MMP-2의 활성화에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

그동안 알려진 바에 의하면 MMP-2는 다른 MMP들과는 다르게 비활성화 상태로 생산되어 세포 표면에서 활성화 되는데, 세포막의 MMP-2 활성인자는 다양한 자극에 의해서 활성화되지만 특히 TGF- $\beta$ 1에 의해 활성화 되는 것으로 보고되고 있다<sup>24</sup>. 따라서 본 실험에서 bleomycin+IFN- $\gamma$  군에서 후기 폐 섬유화가 bleomycin 군에 비해서 억제된 것은 IFN- $\gamma$ 의 투여에 의해서 TGF- $\beta$ 가 억제되면서 MMP-2의 활성화가 억제되었기 때문이 아닐까도 추측될 수 있는데, 이에 대해서는 아직 알려진 것이 부족하기 때문에 IFN- $\gamma$ 에 의한 MMP-2의 비활성화에 대해서는 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Bleomycin 투여 전후에 MMP들을 억제하면 폐 섬유화가 억제되는데<sup>25,26</sup> 비해서, Betsuyaku<sup>27</sup>들에 의하면 MMP-9이 발현되지 않는 생쥐에 bleomycin을 투여하면 폐의 섬유화가 감소하지 않고 정상적인 생쥐와 차이 없이 폐 섬유화가 진행되는 것

을 관찰할 수 있었다.

본 실험에서도 MMP-9은 IFN- $\gamma$  투여 초기에는 증가하다가 시간이 지나면서 감소되어 거의 검출이 안되는 수준으로 감소하였는데, 위의 여러 실험결과와 종합하여 볼 때 MMP-9이 bleomycin 폐 섬유화 모델에서는 폐 염증과 섬유화에 별다른 중요한 역할을 하지 않기 때문에, bleomycin 투여 후 오히려 감소했을 것으로 생각된다.

하지만 특발성 폐 섬유화 환자를 대상으로 한 여러 연구에 의하면<sup>28</sup>, 폐 조직에서 MMP-9이 다른 MMP 보다 유의하게 증가하는 것을 보고한 바 있는데 이런 차이가 관찰되고 있는 것은 bleomycin 폐 섬유화 모델이 특발성 폐 섬유화증과 다른 차이점에 기인할 수도 있기 때문에 이에 대한 보다 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

TIMP는 MMP와 1대 1로 결합하여 MMP의 활성을 억제하며 TIMP-1에서 -4까지 모두 4종류가 알려지고 있는데, TIMP는 MMP를 억제하는 기능 외에, 세포분열을 자극하고 세포소멸을 촉진하며<sup>29</sup>, MMP를 증가시키는 작용을 한다<sup>30</sup>.

Madetes 들<sup>31</sup>은 TIMP-1과 -2가 bleomycin에 의한 폐 손상에서 폐 섬유화에 중요한 역할을 함을 보고했으나, 본 실험에서는 TIMP-1가 TIMP-2가 zymography와 Western blot 모두에서 잘 검출되지 않았고, 검출이 되더라도 미량으로 유의한 변화를 볼 수 없었다. 여러 보고<sup>6,32</sup>에 의하면 폐의 섬유화가 진행되는 것은 TIMPs의 작용이 중요한 요인으로 지적되어 왔는데, 본 실험에서 TIMP의 작용은 미미하며 MMP-2를 중심으로 하는 MMP가 폐 섬유화에 중요한 역할을 하는 것에 대해서는 실험동물이나 방법의 차이 등 여러 원인이 있을 것으로 생각되며, 이에 대해서는 보다 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

최근의 연구에 의하면 말기의 폐 섬유화로 진행되는지 아니면 회복이 되는지 결정이 되는 데에는 환자의 사이토카인 표현형이 중요하며, Th-2 사이

토카인인 IL-5와 IL-13은 폐의 섬유모세포의 증식과 교원질의 생산을 촉진하고, IFN- $\gamma$ 와 같은 Th-1 사이토카인은 섬유모세포의 증식을 억제하고 교원질의 생산을 억제하는 것으로 알려져, Th-2 표현형이 우세하게 나타나면 폐 섬유화가 진행된다는 것이 알려져 있다<sup>5</sup>.

Th-1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 는 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 폐 섬유화를 억제하는 작용이 관찰되어 임상실험 중에 있으나<sup>7</sup> 아직 정확한 작용기전이 밝혀져 있지 않고 있으며, 일부의 연구에서는 초기에는 오히려 폐 염증을 악화시킨다는 반론도 제기되고 있다<sup>33</sup>.

본 실험에서 폐 섬유화 과정에서 Th-1과 Th-2 사이토카인의 상호작용을 알아보기 위하여 IFN- $\gamma$ 투여 후 IL-4와 IL-13의 변화를 조사한 결과, bleomycin 투여에 의해 IL-4는 감소되었으나 통계적으로 유의하지 않았고, 길항작용을 하는 IFN- $\gamma$ 에 의해서도 억제되지 않았다. IL-13도 bleomycin 투여나 IFN- $\gamma$ 에 의해서도 영향을 받지 않았고, bleomycin 투여 후 IFN- $\gamma$ 를 투여한 군이나 IFN- $\gamma$ 를 투여하지 않은 군이나 모두에서 큰 변화 없이 거의 일정한 수준을 유지하였다.

Th-2 사이토카인의 폐 섬유화에서의 역할에 대해서는 많은 이견이 있어왔다. IFN- $\gamma$ 가 발현되지 않는 쥐 bleomycin 폐 섬유화 모델에서 IL-4가 증가되어 있지 않고<sup>33</sup>, bleomycin에 의해 폐 섬유화가 잘 일어나는 동물품종에서 IL-4 mRNA가 증가되어 있지 않는 등<sup>34</sup> 여러 실험에서 IFN- $\gamma$ 와 IL-4는 독립적인 발현양상을 보이는 것이 관찰되었는데, 본 실험의 결과도 위의 실험과 같이 IFN- $\gamma$ 가 MMP를 조절하는 것은 Th-1과 Th-2 사이토카인의 상호조절에 의한 것이 아닌 다른 기전에 의한 것이기 때문일 가능성이 크다는 것을 말해준다. 그러나 IL-4 결핍 생쥐 모델에서 bleomycin을 투여하면 정상 생쥐에 비해서 유의하게 후기 폐 섬유화가 감소되는 등<sup>35</sup>, 많은 연구에서 IL-4가 폐

섬유화에 중요한 역할을 하는 것은 확실한 것으로 여겨지기 때문에, 폐 섬유화에서 Th-1과 Th-2 사이토카인의 역할과 상호작용에 대해서는 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 bleomycin에 의한 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 투여에 의해 초기 폐 염증은 증가하지만 후기 폐 섬유화는 억제된다는 것을 알 수 있었고, IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화를 억제하는 것은 MMP-2의 활성화를 IFN- $\gamma$ 가 억제하기 때문인 것으로 생각된다.

본 연구를 기초로 폐 섬유화증에서 MMP-2의 활성화를 조절하는 기전과 MMP-2의 활성화가 폐 섬유화에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며, bleomycin 이외의 다른 종류의 폐 손상에서 MMP-2의 활성화에 대해서도 연구가 필요하리라고 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

폐 섬유화증의 진행에는 세포외 간질의 대사에 관여하는 gelatinase가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, gelatinase의 작용은 사이토카인을 비롯한 여러 가지 요소에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 지금까지 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )는 폐 섬유화를 억제하는 것으로 알려져 있지만 gelatinase의 작용에 IFN- $\gamma$ 가 미치는 영향은 잘 밝혀져 있지 않다.

이에 저자들은 bleomycin 유도 백서 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화에 미치는 영향과 MMP-2, -9과 이의 길항제인 TIMP-1, -2 그리고 Th-2 사이토카인의 변화에 미치는 영향을 조사함으로써, IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화증에 미치는 영향과 기전을 연구하고자 하였다.

### 재료 및 방법 :

Sprague-Dawley계의 수컷 흰쥐를 정상 대조군,

bleomycin 군, bleomycin+IFN- $\gamma$  군의 세 군으로 나누어, bleomycin 군 과 bleomycin+IFN- $\gamma$  군은 bleomycin sulfate를 생리식염수에 섞어 기관 내로 주입하였고(6 U/kg), bleomycin+IFN- $\gamma$  군은 IFN- $\gamma$ 를 14일간 근육주사 하였다( $2 \times 10^5$  U/kg). 실험동물은 3, 7, 14, 28일에 폐를 얻어 hematoxylin eosin 염색과 Masson's trichrome 염색을 하여 폐의 염증 반응과 섬유화 정도를 관찰하였고, 폐 조직 내의 hydroxyproline 함량, MMP-2, -9, TIMP-1, -2에 대한 Western blot, zymography와 reverse zymography, IL-4와 IL-13에 대한 ELISA 검사를 시행하였다.

**결 과 :**

1. 폐 염증은 bleomycin 투여 7일째에는 IFN- $\gamma$ 를 투여한 경우 더 심하게 일어났으나(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군= $2.08 \pm 0.15$  :  $2.74 \pm 0.29$ ,  $P < 0.05$ ), 폐 섬유화는 bleomycin 투여 후 28일째 IFN- $\gamma$  투여에 의해 유의하게 감소되었다(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군= $3.94 \pm 0.43$  :  $2.46 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ ).
2. 폐 내 hydroxyproline 함량은 bleomycin 투여 28일 후 IFN- $\gamma$  투여에 의해 유의하게 감소되었다(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군= $294.04 \pm 31.73$   $\mu\text{g/g}$  :  $194.92 \pm 15.51$   $\mu\text{g/g}$ ,  $P < 0.05$ ).
3. Bleomycin 투여에 의해 MMP-2 단백질의 양이 증가되는 소견이 Western blot에서 관찰되었는데 MMP-2의 증가는 bleomycin 투여 14일에 최고에 이르렀으며, IFN- $\gamma$ 의 투여에 의해 bleomycin에 의한 MMP-2의 증가는 억제되었으나 대조군 수준으로 감소하지는 않았다.
4. Zymography 검사에서 bleomycin 투여 3일째에는 활성화된 형태의 MMP-2가 IFN- $\gamma$ 에 의해 유의하게 증가되었으나(bleomycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군= $209.63 \pm 7.60\%$  :  $407.66 \pm 85.34\%$ ,  $P < 0.05$ ), 투여 14일 후에는 IFN- $\gamma$ 에 의해 활성화된 상태의 MMP-2가 유의하게 감소되었다(bleo-

mycin 군 : bleomycin+IFN- $\gamma$  군= $159.36 \pm 20.93\%$  :  $97.23 \pm 12.50\%$ ,  $P < 0.05$ ).

5. Bleomycin을 투여한 후 bleomycin 군과 bleomycin+IFN- $\gamma$  군 모두에서 IL-4의 양이 감소되었으나, 두 군간 차이는 통계적으로 유의하지는 않았고, IL-13은 별 다른 차이가 없었다.

**결 론 :**

Bleomycin에 의한 백서 폐 섬유화 모델에서 IFN- $\gamma$ 는 초기 폐 염증을 증가시키지만 후기 폐 섬유화는 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. IFN- $\gamma$ 가 폐 섬유화를 억제하는 것은 MMP-2의 활성화를 억제하기 때문인 것으로 생각한다. 또한 IFN- $\gamma$ 에 의한 MMP-2의 기능 억제는 Th-2 사이토카인을 억제하여 이루어지는 것 같지는 않았다.

본 논문을 기초로 향후 IFN- $\gamma$ 가 MMP-2의 활성화를 조절하는 기전과 MMP-2의 활성화가 폐 섬유화에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

**참 고 문 헌**

1. Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:450-4.
2. Cottin V, Cordier JF. [Idiopathic diffuse interstitial lung disease]. *Rev Prat* 2000;50:1901-5.
3. Raghu G, Depaso WJ, Cain K, et al. Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:291-6.
4. Selman M, Carrillo G, Salas J, et al. Colchicine, D-penicillamine, and prednisone in

- the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a controlled clinical trial. *Chest* 1998; 114:507-12.
5. Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001; 120:5S-8S.
  6. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L562-74.
  7. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999; 341:1264-9.
  8. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93:440-7.
  9. Snider GL, Hayes JA, Korthy AL. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: pathology and stereology. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117:1099-108.
  10. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002; 83:111-9.
  11. Boraschi D, Censini S, Tagliabue A. Interferon-gamma reduces macrophage-suppressive activity by inhibiting prostaglandin E2 release and inducing interleukin 1 production. *J Immunol* 1984; 133:764-8.
  12. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol* 1985; 3:263-87.
  13. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001; 2:10-9.
  14. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 1991; 5:2145-54.
  15. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:345-55.
  16. Shapiro SD. Diverse roles of macrophage matrix metalloproteinases in tissue destruction and tumor growth. *Thromb Haemost* 1999; 82:846-9.
  17. Bachwich PR, Lynch JP, 3rd, Larrick J, Spengler M, Kunkel SL. Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. *Am J Pathol* 1986; 125:421-5.
  18. Khalil N, Greenberg AH. The role of TGF- $\beta$  in pulmonary fibrosis. *Ciba Found Symp* 1991; 157:194-207; discussion 207-11.
  19. Chensue SW, Otterness IG, Higashi GI, Forsch CS, Kunkel SL. Monokine production by hypersensitivity (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign body (Sephadex bead)-type granuloma macrophages. Evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 142:1281-6.
  20. Hyde DM, Henderson TS, Giri SN, Tyler NK, Stovall MY. Effect of murine gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Exp Lung Res* 1988; 14:687-704.

21. Jaffe HA, Gao Z, Mori Y, Li L, Varga J. Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon-gamma transgene. *Exp Lung Res* 1999;25:199-215.
22. Lemjabbar H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, et al. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B(MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: effects of steroid and immunosuppressive treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:903-13.
23. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, et al. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1949-56.
24. Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* 1993; 43:163-70.
25. Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, et al. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L895-902.
26. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol* 2001;193:538-45.
27. Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2000;157:525-35.
28. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:12-24.
29. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102:2002-10.
30. Clark IM, Powell LK, Cawston TE. Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP-1) stimulates the secretion of collagenase from human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203:874-80.
31. Madtes DK, Elston AL, Kaback LA, Clark JG. Selective induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:599-607.
32. Perez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1274-82.
33. Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:545-55.
34. Baecher-Allan CM, Barth RK. PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis. *Reg Immunol* 1993;5:207-17.
35. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol* 2003; 170:2083-92.