

정상인 및 간질성 폐섬유증 환자들의 폐 병변내 섬유모세포주의 증식양상 및 Cytokine분비능에 관한 연구⁺

울산대학교 의과대학, 서울 중앙병원 호흡기내과, 흉곽외과*, 아산 생명과학 연구소** 해부병리학과***

김동순, 백상훈**, 공경엽***, 김동관*, 박승일*,
심태선, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김원동

= Abstract =

Proliferative Properties and Cytokine Secretion of Lung Fibroblast Cell Lines of the Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Dong Soon Kim, M.D., Sang Hoon Paik, M.D.,** Kyung Yup Kong, M.D.,**
Dong Kwan Kim, M.D.,* Seong Il Park, M.D.,* Tae Sun Shim, M.D., Chae Man Lim, M.D.,
Sang Do Lee, M.D., Younsuck Koh, M.D., Woo Sung Kim, M.D., Won Dong Kim, M.D.

Department of Medicine, Chest Surgery, Anatomical Pathologie***, Asan Life Science Institute**,
Asan Medical Center-Ulsan University, Seoul, Korea*

Background : It is well known that various cytokines and growth factors secreted mainly from alveolar macrophages do the key role in the pathogenesis of IPF. But recently it has been known that structural cells like fibroblast can also release cytokines. So the phenotypic changes in fibroblasts of IPF may do a role in continuous progression of fibrosis. The aim of this study is to find out whether there is a change in the biologic properties of the lung fibroblasts of IPF.

Subjects and Method : The study was done on 13 patients with IPF diagnosed by open or thoracoscopic lung biopsy and 7 control patients who underwent resectional surgery for lung cancer. Lung fibroblast cell lines (FB) were established by explant culture technique from the biopsy or resected specimen.

Result : Basal proliferation of the fibroblast of IPF(IFB) measured by BrdU uptake tended to be higher than control fibroblast(NFB) (0.212 ± 0.107 vs 0.319 ± 0.143 , $p=0.0922$), also there was no significant difference in proliferation after the stimulation with PDGF or 10% serum. On the contrary, the degree of inhibition in proliferation by PGE_2 was significantly lower ($33.0 \pm 13.1\%$) in IFB than control ($46.7 \pm 10.0\%$, $p=0.0429$). The IFB secreted significantly higher amount of MCP-1 (1574 ± 1283 pg/ml) spontaneously than NFB (243 ± 100 pg/

⁺본 연구는 한국학술진흥재단의 연구비 보조로 이루어 졌음.

ml) and also after the stimulation with TGF- β (3.23 ± 1.31 ng/ml vs 0.552 ± 0.236 ng/ml, $p=0.0012$). Similarly IL-8 and IL-6 secretion of IFB was significantly higher than NFB at basal state and with TGF- β stimulation. But after the maximal stimulation with IL-1 β , no significant difference in cytokine secretion was found between IFB and NFB.

Conclusion : Above data suggest that the fibroblasts of IPF were phenotypically changed and these change may do a role in the pathogenesis of IPF.

Key words : IPF, Fibroblast, Prolifereation, IL-6, IL-8, MCP-1, TGF- β

서 론

특발성 미만성 간질성 폐섬유증(IPF)은 아직 밝혀지지 않은 원인에 의해 폐포염(alveolitis)으로 시작해서 점차 섬유화로 진행되는 질병으로서 반 이상의 환자가 진단후 5년 이내에 폐기능부전으로 사망하게되는 질병이다¹⁾. 그동안 BAL 및 분자생물학적 기법으로 IPF의 발병기전이 여러가지 cytokine 및 growth factor가 분비되어 폐포염과 섬유화가 계속 진행되는 것으로 알려졌다^{2~7)}. 즉 어떠한 원인에 의해서든간에 폐조직이 손상을 받게 되면 이에 의해 폐포대식세포(AM)가 자극되어 여러가지 단백분해효소 및 독성이 심한 유리 산소기(oxygen free radical)들이 유리되어 조직손상을 심화시키는 한편, AM에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 등 여러가지 cytokine들이 분비되어 염증반응이 유발되며 또한 이러한 조직손상의 치유기전으로서, TGF- β , IGF, PDGF 등 여러가지 성장촉진인자들이 AM 등에서 분비되어 섬유모세포들이 증식하고 섬유모세포에서의 collagen 생성이 촉진되기 때문에 섬유화가 남게되는 것으로 생각하고 있다. 이러한 cytokine이나 growth factor들을 분비하는 세포가 무엇인가에 대해서는 AM이 BAL방법으로 쉽게 얻을 수 있었기 때문에 AM에 대해서만 주로 연구가 행해졌으므로 AM이 IPF의 발생기전에 주 역할을 하는 세포로 알려지고 있다⁸⁾. 그러나 이들 염증세포들은 작용은 뚜렷하나, 그 수명이 짧아서 IPF같은

만성으로 진행되는 질병의 기전을 이러한 일과성인 염증세포에서 기원하는 cytokine들로만은 설명하기 힘들기 때문에, 지속적으로 폐조직에 존재하는, 즉 폐조직의 구조를 형성하는 세포들이 관여될 가능성이 대두되었고, 전부터 이러한 구조 세포들, 그중에서도 특히 섬유모세포는 섬유소원을 합성하여 섬유화를 유발하는 중심 세포이기 때문에 이에 대한 관심이 있어 왔다. 또한 근래에 이들 세포들이 cytokine의 작용을 받아 증식하거나, 섬유소원이나 기타 세포외 기질(extra-cellular matrix : ECM) 물질을 만들어 내기만 하는 수동적인 세포일 뿐 아니라, 이들이 직접 여러가지 cytokine들을 분비하여 자기자신(autocrine), 또는 인접한 다른 세포들의(paracrine) 증식이나 기능에 영향을 미치는 effector 세포로도 작용한다는 사실들이 밝혀졌다^{8~11)}. 또한 신체의 여러 장기에 섬유모세포가 존재하는데 이러한 섬유모세포들은 장기의 종류에 따라, 뿐 아니라 같은 장기에서도 모든 섬유모세포가 단일한 성분의 한가지 세포로만 존재하는 것이 아니라, 같은 섬유모세포라도 그 성상이 다른 여러 종류의 섬유모세포로 구성되어 있다는 것을 암시하는 사실들이 알려지게 되었다^{12~19)}. 그러므로 IPF환자들에서는 섬유모세포 자체가 정상인의 세포와는 분열속도나 여러가지 조절인자들에 대한 반응이 다르기 때문에 섬유화가 계속 진행될 가능성도 있다. 이에 연구자들은 IPF환자들의 섬유모세포들이 질적으로 변화하였는지를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

환자군은 임상 소견, 흉부 X선 및 HRCT, 폐기능검사 소견이 IPF에 합당하고, 개흉폐생검검사나 흉곽경을 통한 폐생검의 조직학적검사로 IPF로 확진된 환자들 13명을 대상으로 하였고, 이들의 평균 연령은 60.4±10.6세, 남:여 비는 11:2였다. 대조군은 폐암 등의 원인으로 폐절제술을 받은 환자들 중에서 완전히 정상 폐조직이 포함되어 절제된 환자들 7명(남자 5명과 여자 2명)이었고, 연령은 평균 57.7±13.6세이었다.

2. 방법

1) 섬유모세포주 생성 방법

개흉(또는 흉곽경을 통한) 폐생검검사시 미리 냉각시킨 무균 배양액(DMEM)을 준비하여 수술장에서 대기하였다가 조직검사를 시행한 즉시 그 일부를 배양액에 넣어 clean bench내에서 직경 1mm이하로 잘게 자른 다음에 DMEM배지로 2번 세척한 후에 10% fetal bovine serum(FBS)을 포함한 완전배지(DMEM, HEPES buffer, amphotericin B, penicillin-streptomycin)에 넣어 plastic 배양기, Falcon)에 심고 섭씨 37도, 5% CO₂하에서 배양하였다. 4~5주일 후에 세포들이 confluent하게 되면, trypsin으로 세포들을 분리하여 세척한 후에 다시 2개의 culture dish에 나누어 심는 방법으로 계대 배양하여 4~6 passage의 세포들을 실험에 사용하였다. 정상 폐섬유모세포주는 폐암이나, 고립성 폐결절 등으로 폐적출술을 받은 환자들의 폐조직중에 정상적인 부위의 폐 일부를 같은 방법으로 계대 배양하여 얻었다.

2) 섬유모세포주의 증식 양상

DNA 합성속는 BrdU-labelling법으로 측정하였고, 모든 실험은 3배수로 실시하였다. 증식 양상을 위한 실험은 ① 아무 자극도 없는 기저상태(BSA배지)와 ② 증식 촉진제로 competence 형 증식촉진제인 PDGF와 progression 형의 증식촉진제인 IGF-I, 최대 자극으로 10% FBS를 첨가한 경우 ③ 증식 억제제로 PGE₂와 dexamethasone를 10% FBS에 첨가했을 때에 세포의 분열 속도가 어떻게 변화하는지를 비교 관찰 하였다. 각 약제의 농도는 먼저 4~5세포주에서 여러 농도의 약제의 효과를 관찰한 다음 (PDGF : 0.1 ng/ml, 0.5 ng/ml, 1.0 ng/ml, 5 ng/ml, IGF : 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, dexamethasone : 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, PGE₂ : 100 ng/ml, 1 ug/ml, 2.5 ug/ml) 가장 적절한 농도를 찾아 실험하였다.(PDGF : 5 ng/ml, IGF : 20 ng/ml, dexamethasone : 50 ng/ml, PGE₂ : 1 ug/ml)

* BrdU-labelling법 :

1. 96-well plate에 1×10⁴/well로 섬유모세포를 분주하여 10% FBS-완전배지에 배양하여 confluent하게 되면 배지를 제거하고
2. 0.4% FBS-배지에 24시간 배양하여 세포주기를 G₀기에 고정시키고
3. 실험하려는 조건의 배지로 갈아 24시간 더 배양하면서, 배지를 갈은 후 6시간되었을 때에 BrdU labelling액을 가해 16시간 더 배양하고
4. 미리 냉각한 고정액을 가하여 -20도에서 30분간 고정후
5. Nuclease를 가하여 37도에서 30분간 반응시키고
6. Peroxidase가 붙은 BrdU에 대한 항체를 가해 37도에서 30분간 반응 시킨 후
7. Peroxidase의 substrate를 가하여 발색반응이 일어나도록 한 후에 ELISA plate reader로 405-490 nm에서 OD를 측정하였다.

3) 섬유모세포의 Cytokine 분비능 측정방법

A. 기저상태

우선 기저상태의 cytokine 분비능은 섬유모세포를 1×10^5 세포/ml로 희석하여 10% FBS를 포함한 완전배지에서 confluent하게 될때까지 배양한 다음에 BSA-배지로 교환하여 24시간 후에 상층액을 채취하여 ELISA법으로 cytokine의 농도를 측정하였다. 모든 실험은 2배수로 실험하고, ELISA 역시 2배수로 측정하였다.

B. 섬유모세포 기능 항진 상태

섬유모세포 기능촉진물질로 잘 알려진 IL-1 β 와, TGF- β 로 섬유모세포를 자극하였을때의 cytokine분비를 측정하기 위하여서 먼저 IPF 및 정상섬유모세포주들 중 각각 2~3세포주씩을 선택하여 IL-1 β , 또는 TGF- β 농도를 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml를 첨가하여 어떤 농도의 IL-1 β , 또는 TGF- β 에서 측정하려는 cytokine의 분비가 가장 높은가를 알아보았다. 그 이후의 실험에서는 그 농도의 IL-1 β , TGF- β 로 실험 대상 세포주들에 적용하여 측정하였다. 즉 기저상태와 같은 방법으로 실험을 시작하여 confluent하게 되면 세척후에 BSA대신 IL-1 β 나 TGF- β 를 각각 1 ng/ml씩 첨가한 배지로 갈아주고 24시간 배양후 상층액내로 분비된 cytokine의 량을 ELISA 방법으로 측정하였다. TGF- β 분비는 TGF- β 로 자극하였을때 자극제로 투여한 TGF- β 가 배지내 그대로 존재하므로 TGF- β 를 측정하는 것은 의미가 없을 것으로 생각되고, IL-1 β 로 자극시에 다른 cytokine들의 분비가 정상섬유모세포와 IPF섬유모세포간에 차이가 없었기 때문에 기저상태의 분비만을 측정하였다. ELISA kit는 IL-6만 미국 Genzyme Diagnostics의 IL-6 Predicta(측정범위 : 35-1800 pg/ml, 최소측정치 : 18 pg/ml)이었고, 다른 cytokine들은 미국 R&D System 제품을 사용하였다 : IL-8 Quantikine(측정범위 : 31.2-2000 pg/ml, 최소측정치 : 10 pg/ml), MCP-1 Quantikine(측정범위 : 31-2000 pg/ml, 최소측정치 : 5 pg/ml),

TGF- β 1 Quantikine(측정범위 : 31.2-2000 pg/ml, 최소측정치 : 5 pg/ml).

4) 통계 처리방법

통계학적인 의의는 Student t-test로 검정하였다.

결 과

1. 섬유모세포주 형성

모든 대상군에서 섬유모세포주를 만들 수 있었고, 조직편에서 섬유모세포들이 자라나와 배양 plate를 채우는데 걸리는 기간은 정상 섬유모세포에서는 35.8 ± 5.5 일이었고, IPF섬유모세포에서는 33.6 ± 7.8 일로 차이가 없었다.

지라난 세포들은 광학현미경하에서 섬유모세포에 합당한 방추형(spindle) 형태를 지니고 있었고, 특수 염색으로 α -smooth muscle actin에 음성, vimentin에 양성, desmin에 음성, collagen에 양성으로 섬유모세포임을 확인하였다.

2. 섬유모세포주의 증식양상

A. 세포 수 측정

대조군 5명과 IPF환자군 5명에서 배양시간 경과에 따른 세포수의 증가 양상을 직접 hemocytometer로 측정한 기저상태에서의 증식양상은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상 섬유모세포와 IPF환자들의 섬유모세포들 사이에 유의한 차이는 관찰할 수 없었으며, 2배수로 되는데 걸리는 시간도 차이가 없었다.

B. DNA 합성 속도

아무 자극도 없는 기저 상태에서의 BrdU 섭취율은 IPF환자의 FB에서 정상 FB보다 높은 경향을 보였으나 통계학적 의미는 없었고($p=0.0922$), PDGF나 IGF 또는 10% FBS로 자극을 한 경우에는 양군간에

Table 1. Proliferative profile measured by BrdU uptake of the lung fibroblast cell line of the control and IPF.

Condition	Control	IPF
Basal	0.212 ± 0.107	0.319 ± 0.14
PDGF	0.408 ± 0.121	0.622 ± 0.427
IGF	0.402 ± 0.12	0.637 ± 0.406
10% FBS	1.153 ± 0.195	1.251 ± 0.403
10% FBS+PGE ₂ (%reducion)	46.7 ± 10.1	33.0 ± 13.1*
10% FBQ+dexamethasone(%)	44.7 ± 22.3	28.1 ± 18.3

* : p < 0.05 compared to normal fibroblast.

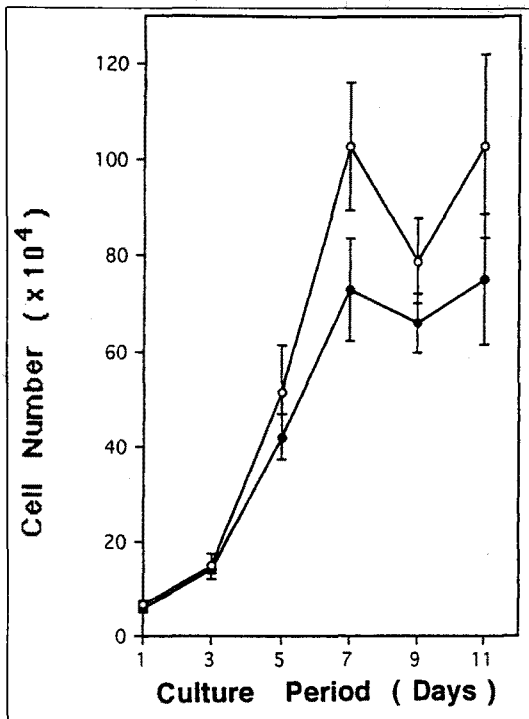


Fig. 1. Proliferation profile of normal fibroblast cell line(empty circle) and IPF fibroblast (solid circle) measured by counting the cell number with hemocytometer(mean ± S.E.).

전혀 차이가 없었다.

그러나 10% FBS와 증식 억제제인 PGE₂를 첨가

했을 때에 정상 섬유모세포에서는 FBS만 주었을 때보다 46.7 ± 10.0%가 감소한 반면에 IPF의 섬유모세포에서는 33.0 ± 13.1%만 감소하였고, 양 군간의 차이는 통계학적으로도 의미가 있어서(p=0.0358) IPF의 섬유모세포들이 PGE₂에 역제가 잘 되지 않음을 보여주었다. 그러나 dexamethasone의 경우에는 IPF의 섬유모세포에서는 증식이 28.1 ± 18.3%가 감소하였고, 정상 섬유모세포는 44.7 ± 22.3% 감소하여 약한 경향은 있었으나 통계적인 유의성은 없었다(p=0.097).

3. 섬유모세포의 Cytokine분비능

Chemokine 중에서 C-C형으로서 임파구 및 단핵구에 작용하는 MCP-1의 기저상태분비도 IPF의 섬유모세포에서는 1.57 ± 1.28 ng/ml로 정상 섬유모세포의 0.243 ± 0.100 ng/ml보다 유의하게 증가하였고(p=0.014), 섬유모세포의 여러가지 기능을 향진시켜서 IPF의 발생기전에서 주역할을 한다고 생각되는 TGF-β로 자극하였을 때에도 IPF의 섬유모세포에서 정상 섬유모세포보다 MCP-1의 분비가 향진되었다(p=0.0012). 그러나 IL-1β자극시의 MCP-1분비량은 IPF 섬유모세포에서 높은 경향은 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 다음 C-X-C형의 chemokine인 IL-8의 기저상태 및 TGF-β자극시의 분비도 IPF의 섬유모세포에서 역시 정상 섬유모세포보다 높았다

Table 2. Cytokine production from the fibroblast cell line of the control and IPF.

Stimulant\		MCP-1	IL-8	IL-6	TGF- β
Spontaneous (pg/ml)	Control(7)	243 \pm 100	37.9 \pm 11.7	93.8 \pm 47.8	156 \pm 121
	IPF(13)	1574 \pm 1283*	397 \pm 360*	183 \pm 81*	98.9 \pm 34.3
TGF- β (pg/ml)	Control(7)	552 \pm 236	235 \pm 75(5)	1313 \pm 240	
	IPF(13)	3233 \pm 1305*	1324 \pm 969*(11)	2199 \pm 692*	
IL-1(ng/ml)	Control(7)	29.7 \pm 11.8	36 \pm 2.9	15.7 \pm 2.4	
	IPF(13)	33.2 \pm 6.9	35.2 \pm 4.7	14.5 \pm 3.2	

* : $p < 0.05$ compared to normal fibroblast cell line.

() : number of cell line

(Table 2). 그리고 섬유모세포에서 분비되는 cytokine으로 가장 잘 알려진 IL-6의 분비 역시 기저상태 및 ($p=0.038$), TGF- β 로 자극시에 분비도 IPF의 섬유모세포에서 정상 섬유모세포보다 유의하게 높았다($p=0.0142$). 그러나 기저상태에서의 TGF- β 의 분비는 정상이나 IPF의 섬유모세포나 차이가 없었다.

또한 본 연구에서는 섬유모세포에 TGF- β 를 투여 하였을 때에 MCP-1, IL-8, IL-6 분비가 모두 증가함을 관찰하였다.

고 찰

본 연구에서는 폐생검검사 조직에서 만들어진 섬유모세포주들이 그 기원한 조직에 따라 phenotype의 특성이 다른 것이 관찰 되었다. 즉 IPF환자들의 섬유모세포주들은 기저상태에서의 세포증식정도나 증식을 촉진시키는 자극에 대한 반응은 정상 섬유모세포주들과 큰 차이가 없었으나, 증식을 억제하는 물질, 특히 PGE₂에 대해서는 정상 섬유모세포주들보다 억제가 잘 되지 않았으며, IPF의 섬유모세포주들은 정상 섬유모세포주들보다 기저상태에서 IL-6, IL-8 및 MCP-1 등의 cytokine들을 더 많이 분비하는 것이 관찰되었다. 또한 본 연구의 결과, 섬유화 과정에서 주 역할을 한다고 알려진 TGF- β 가 섬유모세포에서 IL-6,

IL-8, MCP-1 등의 cytokine의 분비도 향진시키는 것을 알게되었으며, 이러한 TGF- β 의 작용에 대한 반응도도 IPF의 섬유모세포에서 정상 섬유모세포주들보다 증가된 것을 관찰하였다. 이상의 결과들은 IPF에서는 섬유모세포자체에 phenotype 변화가 발생하며 이것이 IPF병변이 계속 진행되는 한 기전일 가능성을 시사하고 있다.

섬유모세포는 체내의 구조세포들중 가장 보편적인 세포로서 거의 모든 장기에 존재하지만 장기의 종류에 따라, 또한 같은 장기에서도 단일한 성분의 한가지 종류로만 존재하는 것이 아니라, 그 성상이 다른 여러 종류로 구성되어 있다는 것이 알려졌다¹²⁻¹⁹⁾. 그 예로는 형태학적으로도 크기 및 lipid함량이 다르고, 또 세포 표면의 CD4항원이나, Thy1항원(Thymocyte-1 antigen) 등의 표현정도가 차이가 있을 뿐 아니라, 증식속도도 빠른 것과 느린 세포들이 있으며, ECM중에서도 주로 분비하는 종류가 세포에 따라 다르다는 것이 알려졌다. 이러한 다양한 종류의 섬유모세포들이 어떠한 기전에 의해 조절을 받는가는 아직 확실치 않으나, 정상시에는 잘 조화를 이루지만 조직이 손상될 받거나, 상처에서 치유되는 시기에는 빨리 증식하고, ECM도 많이 만들어내는 섬유모세포가 증식하여 손상된 조직을 보완하고 상처가 완전히 치유된 후에는 다시 정상상태로 환원된다고 추측되고 있다. 그러나

IPF같은 만성 섬유화질환에서는 어떤 기전에 의해 빨리 증식하고, ECM도 많이 만들어내는 섬유모세포들이 선택적으로 증식되어 병변이 계속 진행될 가능성이 있다. 실제로 Kreig 등은 공피증환자의 피부 섬유모세포들은 정상인의 피부의 섬유모세포보다 교원질이나 fibronectin을 더 많이 생성한다고 보고하여 이러한 가설을 뒷받침하였다¹⁹⁾. IPF에서도 이에 대한 연구들이 시도되었으나 그 결과에는 서로 일치를 보이지 못하였다. Jordana 등은 IPF환자들의 폐내 섬유모세포들은 정상인의 섬유모세포들에 비해 분열속도가 항진되었다고 보고하였고²¹⁾. Raghu 등은 폐섬유증환자들의 폐내 섬유모세포중에서도 비교적 초기 섬유화병변을 보인 부위의 섬유모세포의 분열속도는 정상 섬유모세포보다 빠르나 오래 지속된 후기 섬유화 부위의 섬유모세포들이 분열은 오히려 정상 섬유모세포보다도 느린것을 관찰하여 병변에 따라 섬유모세포의 성상이 다르다고 주장하였다²²⁾. 그러나 최근에 Mio 등은 이들과는 달리 전체세포의 분열속도는 IPF의 섬유모세포나 정상 섬유모세포가 차이가 없었다고 이의를 제기하면서 기저상태에서의 분열속도는 차이가 없었으나, 증식억제제인 PGE₂에 대한 억제반응이 IPF의 섬유모세포에서 감소한것을 관찰하여 섬유모세포의 증식의 조절기전 장애가 섬유화가 지속되는 한 기전이라고 제안하였다²³⁾. 본 연구의 결과는 Mio의 보고와 비슷하여 기저상태의 분열속도는 정상 섬유모세포나 IPF환자들의 섬유모세포나 차이가 없었고, 증식촉진제에 대한 반응도 서로 비슷하였으나, 증식억제제인 PGE₂에 대한 반응도는 IPF의 섬유모세포에서 저하를 보여, 일단 섬유모세포가 증식이 항진된 후에 원상으로 회복시키는 조절기전에 장애가 있음을 시사하였다.

이러한 섬유모세포의 증식이나 ECM생성의 증가 외에도 IPF가 처음에 폐포염으로부터 시작하여 섬유화로 진행되는 병이므로 폐포염이 지속하기 위하여서는 병소내에 염증세포를 끌어들이는 화학성주유인자(chemotactic factor)들이 필요하다. 염증세포들을 유인하는 화학성주유인자로는 leukotriene, C5a, prostaglandin 등 외에, 세포내에서 자극에 의해 새

로 생성되어 분비되는 pro-inflammatory cytokine (chemokine)들이 있는데 이들 chemokine들은 그 구조에 따라 4개 cysteine분자들중에 첫 두개의 사이에 다른 아미노산이 끼어들어간 C-X-C군(또는 alpha-아형)과 두개의 cysteine분자들이 그대로 연결된 C-C군(beta 아형)으로 분류된다^{24~27)}. C-X-C군에는 IL-8, GRO2/MGSA, platelet factor-4, IP-10, ENA-78 등이 있고 C-C군에는 MIP-1 β , RANTES, MCP-1/MCAF, MCP-2, MCP-3 및 I-309 등이 있는데, 이들은 구조만 다를 뿐 아니라 기능적으로도 차이가 있어 C-X-C군은 주로 호중구를 유인 및 활성화시키는데 관여하고, C-C군은 주로 단핵구에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이중 IL-8은 주로 호중구를 끌어들이고 활성화시키지만²⁸⁾ T-임파구에도 작용한다고 알려졌으며²⁹⁾ IPF환자들의 BAL액 내 IL-8이 증가된 것이 보고되었을 뿐 아니라³⁰⁾ 섬유모세포배양액내 호중구 유인인자가 있다는 보고로 미루어³¹⁾ IPF의 섬유모세포의 IL-8분비능에 차이가 있을 가능성이 많다. 또한 MCP-1은 C-C군으로, 주로 단핵구에 작용하는 화학주유인자로서 다른 cytokine과 달리 폐포대식세포(AM)에서는 분비되지 않는다고 알려졌기 때문에 섬유모세포가 주 분비원일 가능성이 많다⁹⁾. IPF환자들의 섬유모세포들은 정상 섬유모세포와 달리 이러한 chemokine의 분비가 항진되고 또한 이것이 IPF의 발생기전에 한 역할을 할 수도 있다. 그러나 섬유모세포에서의 cytokine들에 대한 연구는 Standiford 등이 IPF환자들의 섬유모세포들에서 MCP-1의 분비가 증가되었다는 보고외에는 발표된 것이 없다³²⁾. Rolfe 등은 AM은 MCP-1을 분비하지 못하나, 섬유모세포에서는 IL-1이나 TNF- α , LPS로 자극시에 MCP-1의 mRNA 및 MCP-1단백이 시간경과에 따라, 또 용량에 비례해서 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 그들은 이 섬유모세포에서 분비되는 물질이 단핵구에 대한 화학주유성이 있음을 확인하였고, MCP-1에 대한 항체치리로 이 화학주유성이 53~60%가 감소되는 것을 관찰하여⁹⁾ 섬유모세포에서 분비되는 단핵구에 대한 화학주유인자는 MCP-1

이 주 인자이나 다른 물질도 함께 분비됨을 암시하였다. 이후 같은 연구소의 Standiford 등은 IPF의 섬유모세포에서 정상 섬유모세포보다 MCP-1의 분비가 항진되었다고 보고하여 섬유모세포의 성상의 변화가 IPF의 발병기전에 중요한 역할을 할 가능성을 제시하였고, 본 연구에서는 MCP-1 뿐 아니라 IL-8의 분비도 항진됨이 관찰되었다. TGF- β 는 단핵구와 대식세포에 대해 화학유성이 있으며, 이들 세포에서 여러 가지 cytokine(IL-1 β , PDGF, bFGF, TNF- α , TGF- β)분비를 유도한다. 또한 섬유모세포에 대해서도 화학유성이 있으며 섬유모세포에서 교원질, fibronectin 및 proteoglycan 등의 ECM 합성을 항진시킬 뿐 아니라 이들 ECM을 분해하는 collagenase나 stromelysin같은 효소의 생산을 감소시키고, 또한 PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1)이나 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase) 같은 이들 ECM분해효소의 억제제의 생산을 증가시킴으로써 ECM의 조직내 침착을 항진시키는 cytokine으로 섬유화를 일으키는데에 가장 중심적인 역할을 한다고 추정되고 있다³³⁾. 또한 TGF- β 는 아마도 integrin의 양상을 변화시킴으로써 폐내 염증세포 침윤에도 관여하리라고 추측되고 있으며³⁴⁾, 여러 종류의 proteoglycan들의 발현양상도 변화시킨다고 알려졌다. IPF에서도 TGF- β 가 중요한 역할을 한다는 것은 면역염색법으로 IPF환자의 폐조직내에 TGF- β 가 증가되었고^{6,7)} 동물 실험에서 bleomycin을 투여후 섬유화가 일어나기 전에 TGF- β 의 발현이 항진되고, 또 TGF- β 의 항체를 사용하여 폐섬유화가 감소되었다는 보고로 짐작할 수 있다³⁵⁾. TGF- β 는 대식세포, 세기관지상피세포, 혈관내피세포등 여러 종류의 세포에서 생성되나 섬유모세포에서도 TGF- β 가 생성되며, TGF- β 는 여러종류의 세포들에서 PDGF 등의 cytokine뿐 아니라 TGF- β 자체의 생성을 촉진시키는 자가 유발효과(autoinduction)를 가지는 것으로 알려져 있다^{33, 36~38)}. 본 연구에서는 TGF- β 가 섬유모세포에서 IL-6 및 MCP-1의 분비도 항진시키고, IPF환자들의 섬유모세포들은 TGF- β 에 정상 섬유

모세포들보다 더 예민하게 반응하는 것이 관찰되었다. 섬유모세포가 폐조직내 세포들중 가장 많은 비율을 차지하는 사실을 고려하며, 이러한 섬유모세포들의 TGF- β 에 대한 반응도의 증가와 같은 섬유모세포의 성상의 변화가 IPF의 섬유화를 악화시키는 중심기전일 가능성도 많다. 그러나 본 연구에서는 섬유모세포들에서 TGF- β 자체의 분비는 IPF나 정상 섬유모세포간에 차이가 없게 나왔는데, 이는 TGF- β 의 조절기전은 TGF- β 의 전사나 번역과정(translation)보다는 일단 TGF- β 단백이 생성분비된 후에 산이나 효소에 의해 latent TGF- β 가 활성화 TGF- β 로 전환되는 활성화가 주 조절기전이기 때문에 TGF- β 분비 자체는 차이가 없을 수도 있을 것으로 생각된다³³⁾.

IL-6는 발열같은 급성기 반응을 매개하는 가장 중요한 cytokine으로 B-임파구의 분화를 촉진할 뿐 아니라 T-임파구의 분화 및 활성화에도 작용한다^{9,39)}.

IL-6는 대부분의 세포에서 다 생산될 수 있으나, 폐에서는 주로 폐포대식세포와 폐내 섬유모세포에서 생성되는 것으로 알려져 있다. 폐포대식세포에서는 LPS가 가장 강력한 IL-6분비 촉진제이지만, 섬유모세포에서는 LPS는 별로 영향을 주지 못하고, IL-1 β 에 의해 IL-6분비가 증가한다고 알려져 있다^{9,39)}. IL-6가 IPF 및 과민성폐렴 환자들의 BAL액내 증가되었고 bleomycin에 의한 폐섬유증에서도 폐내 IL-6가 증가하는 것 등으로 IL-6가 간질성 폐질환의 발생기전에 관여될 것으로 추측되고 있다^{9,40,42)}. 또한 섬유모세포가 폐내 IL-6의 주요 생성 세포이므로 IPF의 섬유모세포주에서 IL-6생성능이 변화하였을 가능성이 있으며 본 연구 결과는 이를 뒷받침하고 있다. 그러나 폐섬유증의 발병기전에서 IL-6의 역할에 대해서는 아직 논란이 있어 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다⁴³⁾.

결론으로 본 연구에서는 IPF환자들에서는 섬유모세포자체가 PGE₂ 등에 잘 억제되지 않고, IL-8, MCP-1, IL-6 등의 cytokine분비가 항진되며, 특히 TGF- β 에 대한 반응도가 증가하는 것을 관찰하여 섬유모세포의 질적인 변화가 IPF의 발병기전에 중요한

역할을 하는 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경 :

특발성 미만성 간질성 폐섬유증(IPF)은 아직 밝혀지지 않은 원인에 의해 폐포염으로 시작해서 점차 섬유화로 진행되는 질병이다. 그동안 BAL 및 분자생물학적 기법으로 여러가지 cytokine 및 성장촉진인자가 분비되어 폐포염과 섬유화가 계속 진행되는 것으로 알려졌다. 그러나 최근에 이제까지는 cytokine이나 growth factor 등의 작용을 받기만 하는 피동적인 세포로 생각되었던 섬유모세포 등도 직접 여러가지 매개물을 분비한다는 것이 알려지고 있으므로 IPF에서 폐포염을 지속시키고 섬유화를 일으키는 데에 섬유모세포가 중요한 역할을 할 것이라는 추측을 할 수 있다. 또한 IPF환자들에서는 섬유모세포 자체가 정상인의 세포와는 분열속도나 여러가지 조절인자들에 대한 반응이 다르기 때문에 섬유화가 계속 진행될 가능성도 있으나 이에 대한 연구는 그리 많지 않고 그 결과도 보고자마다 상이하였다. 이에 연구자들은 IPF환자들의 섬유모세포들이 질적으로 변화하였는지를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 :

개흉 폐생검검사나 흉곽경을 통한 폐생검의 조직학적 검사로 IPF로 확진된 환자들 13명과 대조군으로는 폐절제술을 받은 폐암환자들 중에서 완전히 정상 폐조직이 포함되어 절제된 환자들 7명을 대상으로 하였다. 개흉 폐생검검사로 얻은 조직에서 섬유모세포를 분리 배양하여 IPF의 섬유모세포주를 만들고 이들 세포의 증식양상을 BrdU법으로 측정하고 cytokine의 분비양상을 ELISA법으로 측정하여 정상 폐조직에서 분리한 섬유모세포주와 비교 관찰하였다.

결 과 :

1) 섬유모세포주의 증식 양상 : 아무 자극도 없는 기저 상태의 BrdU 섭취율은 환자군에서 높은 경향을

보였으나(0.212 ± 0.107 vs 0.319 ± 0.143) 통계학적인 의미는 없었고($p=0.0922$), PDGF나 10% serum으로 최대 자극을 한 경우에는 양군간에 전혀 차이가 없었다. 증식 억제제인 PGE_2 를 첨가했을 때에 환자군에서 억제되는 정도가 $33.0 \pm 13.1\%$ 로 대조군보다($46.7 \pm 10.0\%$) 낮았고($p=0.0358$), dexamethasone의 경우에는 환자군에서($28.1 \pm 18.3\%$) 약한 경향은 있었으나 대조군과($44.7 \pm 22.3\%$) 통계적인 유의성은 없었다($p=0.097$).

2) 섬유모세포의 cytokine 분비능 : IPF의 섬유모세포는 기저상태 및 TGF- β 로 자극시에 MCP-1의 분비가(1.57 ± 1.28 ng/ml, 3.23 ± 1.31 ng/ml) 정상 섬유모세포보다(0.243 ± 0.100 ng/ml, 0.552 ± 0.236 ng/ml) 유의하게 높았고($p=0.014$, $p=0.0012$) IL-8과 IL-6분비도 비슷하게 IPF의 섬유모세포에서 증가를 보였다. 그러나 IL-1 β 자극시의 MCP-1, IL-8, IL-6분비는 통계적 유의성은 없었고, 기저상태에서의 TGF- β 자체의 분비도 정상섬유모세포와 IPF사이에 차이가 없었다. 또한 TGF- β 는 섬유모세포에서 MCP-1, IL-8, IL-6 모두의 분비를 증가시켰다.

결 론 :

IPF환자들에서는 폐섬유모세포 자체가 PGE_2 등의 증식억제제에 대한 반응도 및 cytokine분비 양상이 정상 폐의 섬유모세포와 차이가 있어, 이러한 섬유모세포의 변화가 IPF의 발병기전에 관여될 가능성을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A : Cryptogenic fibrosing alveolitis : Response to corticosteroid treatment and its effect on survival. Thorax 35 : 593, 1980
2. Sheppard MN, Harrison NK : Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. Thorax 47 : 1064, 1992

3. Doherty DE, Worthen GS, Henson PM. : Inflammation in interstitial lung disease. In Schwarz MI and King TE(Ed.) Interstitial lung disease, 2nd Ed. p23, St. Louis, Mosby-Yearbook, Inc. 1993
4. Kelley J. : Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141 : 765, 1990
5. Martinet Y, Rom W, Grotendorst G, Martin G, Crystal RG. : Exaggerated spontaneous release of platelet derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 317 : 202, 1987
6. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. : Transforming growth factor β -1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* 88 : 6642, 1991
7. Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berenzay OH, Greenberg AH. : Increased production and immuno-histochemical localization of Transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5 : 155, 1991
8. Jordana M, Saerstrand B, Sime PJ, Ramis I. : Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *Eur Respir J* 7 : 2212, 1994
9. Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Orringer MB, Phan S, Evanoff HL, Burdick MD, Strieter RM, Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. : *Am J Physiol* 263(5 Pt 1) : L536, 1992
10. Rojas-Valencia L, Montiel F, Montano M, Selman M, Pardo A. : Expression of a 2.8-kb PDGF-B/c-sis transcript and synthesis of PDGF-like protein by human lung fibroblasts. *Chest* 108 : 240, 1995
11. Driscoll KE, Hassenbreim DG, Carter J, Poyter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. : Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : Expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8 : 311, 1993
12. Froncek MJ, Derdak S, Felch ME, Silvera MR, Watts HB, Phipps RP. : Cellular and molecular characterization of Thy-1+ and Thy-1- murine lung fibroblasts. In Phipps RP. Eds. Pulmonary fibroblast heterogeneity, p135, Boca Raton, CRC Press, 1992
13. Goldering SR, Stephenson ML, Downie E, Krane SM, Korn JH. : Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 85 : 798, 1990
14. Elias JA, Rossman MD, Phillips PD. : Phenotypic variability among density-fractionated human lung fibroblasts. *Am Rev Respir Dis* 135 : 57, 1987
15. Xing Z, Jordana M, Braciak T, Ohtoshi T, Gauldie J. : Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung fibroblasts : evidence for heterogeneity within the respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9 : 255, 1993
16. Ko SD, Page RC, Narayan AS. : Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74 : 3429, 1977
17. Derdak S, Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps RP. : Differential collagen and fibronectin production by Thy1+ and Thy1- lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol* 263 (Lung Cell Mol Physiol 7) : L283, 1992

18. Korn JH : Substrain heterogeneity in prostaglandin E₂ synthesis of human dermal fibroblast. Difference in prostaglandin E₂ synthetic capacity of substrains are not stimulus-restricted. *Arthritis Rheum* 28 : 315, 1985
19. Phipps RP, Penney DP, Keng P, Silbera M, Harkins S, Derdak S : Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. *Immunol Res* 9 : 275, 1990
20. Eckes B, Mauch C, Huppe G, Krieg T. Differential regulation of transcription and transcript stability of pro- α 1(I) collagen and fibronectin in activated fibroblasts derived from patients with systemic scleroderma. *Biochem J* 315 (pt2) : 549, 1996
21. Jordana M, Schulman J, Mcsharry C, Irving LB, Newhouse MT, Jordana G, Gaudie J. : Heterogeneous proliferative characteristics of human adult lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis* 137 : 579, 1988
22. Raghu G, Chen Y, Rusch V, Rabinovitch S. : Differentiation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 138 : 703, 1988
23. Mio T, Nagai S, Kitaichi M, Kawatani A, Izumi T. : Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF(UIP). *Chest* 102 : 832, 1992
24. Oppenheim JJ, Zacharine COC, Mukaida N, Matsushima K. : Properties of the novel proinflammatory supergene : intercrine : cytokine family. *Am Rev Immunol* 9 : 617, 1991
25. Taub DD, Oppenheim JJ. : Review of the chemokine meeting. The third international symposium of chemotactic cytokines. *Cytokine* 3 : 175, 1992
26. Miller MD, Krangel MS. : Biology and biochemistry of the chemokines : A family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12 : 17, 1992
27. Miller MD, Krangel MS. : Biology and biochemistry of the chemokines : A family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12 : 17, 1992
28. Baggiolini M, Waltz A, Kunkel SL. : Neutrophil-activating peptide/interleukin-8. a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84 : 1045, 1989
29. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. : Neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243 : 1464, 1989
30. Car BD, Meloni F, Luisetti M, Semenzato G, Gialdroni-Grassi G, Walz A. : Elevated IL-8 and MCP-1 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 149 : 655, 1994
31. Ogushi F, Masuda M, Fujisawa K, Tani K, Asada K, Yasuoka S, Ogura T. : Neutrophil chemotactic factor in supernatant from pulmonary fibroblasts stimulated with cytokines. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 31 : 453, 1993
32. Standiford TJ, Rolfe MR, Kunkel SL, Lynch JP 3d, Becker PS, Orringer MB, Phan S, Strieter RM. : Altered production and regulation of monocyte chemoattractant protein-1 from pulmonary fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 103(2Suppl) : 121S, 1993
33. Kelley J. Transforming growth factor- β . In Kelley J. (Ed.) *Cytokines of the lung*. p101, New

- York, Marcel Dekker, 1992.
34. Heino J, Igotz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. : Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 264 : 389, 1989
 35. Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. : Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. : *Thorax* 48 : 969, 1993
 36. Battagay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. : TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. : *Cell* 63 : 515, 1990
 37. Fabisiak JP, Kelley J. : Platelet-derived growth factor. In Kelley J.(Ed.) *Cytokines of the lung*. p3. New York, Marcel Dekker, 1992
 38. Rochester CL, Ackerman SJ, Zheng T, Elias JA. Eosinophil-fibroblast interactions. Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6 type cytokine production. : *J Immunol* 156 : 4449, 1996
 39. Zitnik RJ, Elias JA. : Interleukin-6 and the lung. In Kelley J.(Ed.) *Cytokines of the lung*. p229. New York, Marcel Dekker, 1992
 40. Fries KM, Felch ME, Phipps RP. : Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subsets. *Am J Respir Cell mol Biol* 11 : 552, 1994
 41. Shahar I, Fireman E, Topilsky M, Grief J, Kivity S, Spirer Z, Efraim SB. : Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. *Clin Immunol Immunopath* 79 : 244, 1996
 42. Jones KP, Reynolds SP, Capper SJ, Kalinka S, Edwards JH, Davies BH. : Measurement of interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid by radiolimmunoassay : differences between patients with interstitial lung diseases and control subjects. *Clin Exp Immunol* 83 : 30, 1991
 43. Denis M. Interleukin-6 in mouse hypersensitivity pneumonitis : changes in lung free cells following depletion of endogenous IL-6 or direct administration of IL-6. : *J Leukocyte Biol* 52 : 197, 1992