

리포다당질로 유도된 급성 폐손상 후 섬유화증식에서 Transglutaminase-2의 역할

고려대학교 안산병원 호흡기내과
김제형

The Role of Transglutaminase-2 in Fibroproliferation after Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury

Je Hyeong Kim, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonary, Sleep and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Korea University Ansan Hospital, Ansan, Korea

Background: Transglutaminase-2 (TG-2) has been reported to play an important role in the process of fibrosis. However, TG-2 studies on fibroproliferation of acute lung injury (ALI) are absent. The purpose of this study was to investigate the role of TG-2 in the fibroproliferation of lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI.

Methods: The male C57BL/6 mice of 5 weeks age were divided into 3 groups; control group (n=30) in which 50 μ L of saline was given intratracheally (IT), LPS group (n=30) in which LPS 0.5 mg/kg/50 μ L of saline was given IT, and LPS+Cyst group treated with intraperitoneal 200 mg/kg of cystamine, competitive inhibitor of TG-2, after induction of ALI by LPS. TG-2 activity and nuclear factor (NF)- κ B were measured in lung tissue homogenate. Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, myeloperoxidase (MPO), and transforming growth factor (TGF)- β 1 were measured using bronchoalveolar lavage fluids. Histopathologic ALI score and Mallory's phosphotunistic acid hematoxylin (PTAH) for collagen and fibronectin deposition were performed.

Results: The TG-2 activities in the LPS group were significantly higher than the control and LPS+Cyst groups ($p < 0.05$). The TNF- α and IL-1 β concentrations and NF- κ B activity were lower in the LPS+Cyst group than the LPS group ($p < 0.05$). The LPS+Cyst group showed lower MPO, ALI score, TGF- β 1 concentration, and Mallory's PTAH stain than the LPS group, but the differences were not significant ($p > 0.05$).

Conclusion: Inhibition of TG-2 activity in the LPS-induced ALI prevented early inflammatory parameters, but had limited effects on late ALI and fibroproliferative parameters.

Key Words: Acute Lung Injury; Lipopolysaccharides; Inflammation; Fibrosis

서 론

지난 수십 년간 급성 폐손상(acute lung injury, ALI) 및 급성호흡곤란증후군(acute respiratory distress syndrome,

ARDS)의 병리기전에 대한 연구와 치료적 접근 및 중환자 관리에 있어서 괄목할만한 발전이 있었음에도 불구하고, ARDS 환자들의 사망률은 41% 정도로 매우 높다¹. 현재까지 알려진 바에 따르면, 전통적인 기계환기 양식으로 인한 폐손상(ventilator-induced lung injury, VILI)이 환자들의 사망에 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 VILI를 최소화하기 위해, 저일호흡량환기법(low tidal volume ventilation)이 모색되었고, 대규모 임상연구에서 환자들의 사망률을 유의하게 감소시켰다². 하지만, 폐의 심한 비균질성으로 인하여 그 효과가 제한적이어서, ARDS의 병리기전에 대한 추가적인 연구와, 이에 근거한

Address for correspondence: Je Hyeong Kim M.D., Ph.D.
Division of Pulmonary, Sleep and Critical Care Medicine,
Department of Internal Medicine, Korea University Ansan
Hospital, Gojan 1-dong, Danwon-gu, Ansan 425-707, Korea
Phone: 82-31-412-5950, Fax: 82-31-413-5950
E-mail: chepraxis@korea.ac.kr

Received: Oct, 5, 2010

Accepted: Oct, 5, 2010

다각적인 치료방법들을 모색하는 것이 필요하다.

ALI 및 ARDS의 급성기 후, 일부 환자들은 후유증 없이 증식기(proliferative phase)를 거쳐 치유되기도 하지만, 다른 생존자들에서는 폐섬유화(fibrotic phase)^{3,4} 및 이로 인한 폐기능 장애^{5,6}를 갖는 경우가 흔하다. 섬유화는 지속적이고 심한 염증이 치유되지 않음으로써 발생하는, 조직 손상에 대한 stereotypic response로, 최근 연구들에 의하면, collagen turnover가 ARDS의 비교적 초기에 증가하는 것으로 보고되고 있다^{7,8}. Transglutaminase (Tgase, TG)는 특이 펩티드에 결합된 glutamine residue의 γ -carbox-amine group과 다양한 amine들 사이의 결합을 촉진하는 효소⁹, 이 중 type 2 Tgase (TG-2)는 일차적으로는 손상의 예방과 방어 및 복구를 촉진하는 데 있어서 주요한 역할을 하는 것으로 여겨졌으나¹⁰, 최근의 연구들에 의하면 비정상적으로 과도하게 유발될 경우에는 neurodegenerative diseases, atherosclerosis, inflammatory diseases 및 autoimmune diseases 등과 같은 질병의 발생에 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다¹¹. 또한 collagen, fibronectin, laminin, nidogen 및 proteoglycan 등의 matrix protein들과 비가역적으로 결합하거나¹², 세포 외 기질의 proteolytic enzyme에 대한 저항성을 증가시켜, 심한 세포 외기질의 침착을 유도¹³하여 조직의 섬유화에 관여하는 것으로 제시되고 있다. 실제로 실험적인 신장¹⁴ 및 간¹⁵ 섬유화에 있어서 TG-2가 주요한 역할을 하고, 억제제를 이용하여, 그 활성을 억제하였을 경우, 섬유화의 정도가 감소하는 것으로 보고된 바 있다^{16,17}. TG-2는 collagen synthesis 및 epithelial-mesenchymal transition의 증가에 있어서 주요한 매개체인 transforming growth factor (TGF)- β 1와 밀접한 연관관계가 있어, 비활성화 상태의 TGF- β 1를 활성화시키는 데 있어서 주요한 역할을 하고¹⁸, TGF- β 1은 TG-2의 주요한 유도인자인 것으로 보고되고 있어^{19,20}, TGF- β 1와 TG-2가 조직 섬유화과정에서 상호 긴밀한 기능을 하는 것으로 판단된다. 하지만, 이와 같은 TG-2의 기능 및 역할에도 불구하고 폐질환에 있어서 TG-2에 대한 연구는 매우 드물고, 특히, ALI 후 폐섬유화의 병리기전에서 TG-2의 역할을 고찰한 연구는 없다.

본 연구는 리포다당질(lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 급성 폐손상에서 폐조직 내 TG-2의 활성을 급성 폐손상 및 섬유화 표지자 등의 활성 및 발현과 비교하고, TG-2 억제제의 효과를 고찰함으로써, 급성 폐손상의 급성 염증 및 폐섬유화 과정에서 TG-2의 역할을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 리포다당질로 인한 급성 폐손상의 유도 및 폐의 적출

5주령의 수컷 C57BL/6 mice를 pentobarbital sodium 65 mg/kg로 마취시키고, midcervical incision을 통해 기관을 노출시킨 후, 26 G microsyringe를 이용하여 LPS (*E. coli* 0127:B8; Sigma, St. Louis, MO, USA) in 50 μ L of saline을 기관 내로 주사하여 유도하였다. 폐의 적출은 마취가 되어있는 상태에서, 기관절개를 통해 angiocath를 고정된 후, 복강을 절개하여 대동맥 및 하대정맥을 절단하여 충분히 실험시킨 후에, 정중 흉골절개술로 흉곽을 절개하고, 폐와 심장을 함께 적출한 후, 기관에 고정된 angiocath를 통해서 15 cmH₂O의 압력으로 4% paraformaldehyde 용액을 주입하여 폐를 팽창시킨 다음, 4% paraformaldehyde 용액 내에서 48시간 동안 고정하였다. 이후 심장 및 종격동 조직을 제거한 후에, 좌측폐를 파라핀에 포매하였다.

2. 급성 폐손상 지수²¹ 및 Mallory's phosphotunstic acid hematoxylin 염색²²

급성 폐손상 정도의 조직학적 고찰을 위해, 파라핀에 포매된 폐조직을 5 μ m의 두께로 잘라 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색을 시행하여, 1) alveolar capillary congestion, 2) hemorrhage, 3) infiltration or aggregation of inflammatory cells in the airspace or interstitium, 4) thickness of the alveolar wall/hyaline membrane formation 등의 네 가지 지표에 대해서, 0, minimal (little) damage; 1+, mild damage; 2+, moderated damage; 3+, severe damage; 4+, maximal damage의 five-point scale system으로 점수화하여 비교하였다. 섬유화반응으로 인한 collagen 및 fibronectin 침착은, fibronectin에 대한 단클론항체(monoclonal antibody)를 이용한 면역조직화학염색(immunohistochemical stain)인 Mallory's phosphotunstic acid hematoxylin (PTAH) 염색을 시행한 후, 이미지분석시스템(Image-Pro[®] Plus; MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD, USA)을 이용하여 분석하였다.

3. 기관지 폐포 세척술 및 기관지 폐포 세척액 분석

기관지 폐포 세척술(bronchoalveolar lavage, BAL)은 1 mL의 PBS (pH 7.4)를 3차례 기도 내로 주입하여, 회수된 기관지폐포세척액을 4°C에서, 10분간 5,000 rpm으로 원

심분리한 후, 상층액은 분석을 위해 -70°C 에 보관하였다. BAL fluid (BALF) 내의 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1β , IL-6 및 TGF- $\beta 1$ 농도의 측정엔 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)법으로 시행하였고, 활성산소종의 주요한 원인인 활성화된 호중구의 지표로서, myeloperoxidase (MPO)의 활성을, 50 μL 의 BALF를 microtiter plate 내에서 200 μL 의 O-dianisidine dihydrochloride (1.25 mg/mL in PBS), 0.1% wt/vol의 bovine serum albumin (BSA) 및 H_2O_2 (0.05%=0.4 mM)과 반응시킨 후에, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 결정하였다.

4. Nuclear factor (NF)- κB activity의 측정

Tissue homogenate에서 NF- κB 의 활성의 측정은 정중

홍골절개술로 흉곽을 절개하고, 폐와 심장을 함께 적출한 후, 폐조직만을 절제하여, lung tissue homogenate에서 nuclear protein extraction kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여, nuclear protein을 추출하여, NF- κB 의 DNA binding capacity를 이용한 TransAMTM NF- κB Kit (Active Motif)으로 NF- κB 의 활성을 측정하였다.

5. TG-2 활성의 측정 및 TG-2 억제제

TG-2의 활성은 lung tissue homogenate에서 fluorescence based protein arrays를 이용하여 측정하였다. Fibrinogen과 incubation한 amine modified glass slide를 제작한 후, lung tissue homogenate를 CaCl_2 와 thrombin이 포함된 reaction buffer와 혼합하고, reaction mixture를 array well에 투여하였다. TG-2의 촉매반응에 의해서 fibrinogen내로 incorporation된 pentylamine을 Cy3-conju-

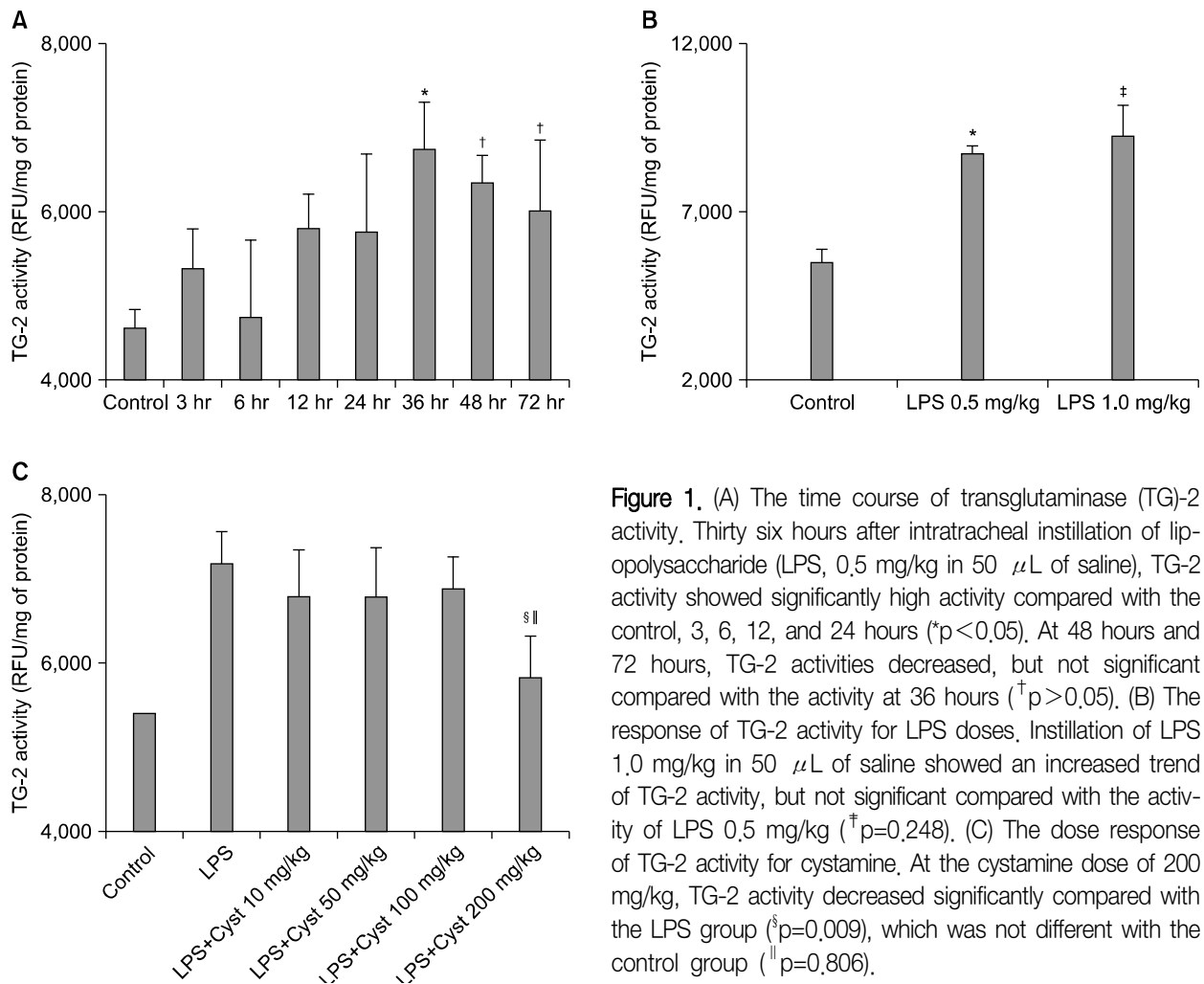


Figure 1. (A) The time course of transglutaminase (TG)-2 activity. Thirty six hours after intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS, 0.5 mg/kg in 50 μL of saline), TG-2 activity showed significantly high activity compared with the control, 3, 6, 12, and 24 hours ($*p < 0.05$). At 48 hours and 72 hours, TG-2 activities decreased, but not significant compared with the activity at 36 hours ($^{\dagger}p > 0.05$). (B) The response of TG-2 activity for LPS doses. Instillation of LPS 1.0 mg/kg in 50 μL of saline showed an increased trend of TG-2 activity, but not significant compared with the activity of LPS 0.5 mg/kg ($^{\dagger}p = 0.248$). (C) The dose response of TG-2 activity for cystamine. At the cystamine dose of 200 mg/kg, TG-2 activity decreased significantly compared with the LPS group ($^{\S}p = 0.009$), which was not different with the control group ($^{\parallel}p = 0.806$).

gated streptavidin으로 probe한 후, 543 nm에서 fluorescence scanner (GenePix Personal 4100A; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 스캔한 후, 그 활성도를 상대형광단위(relative fluorescence units, RFU)/mg of protein로 구하였다. TG-2 억제제는 TG activity에 대한 competitive inhibitor²³인 cystamine (Sigma)을 복강 내로 투여하였다.

6. 실험 모델의 형성

LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline을 기관 내로 주사한 후, TG-2의 활성을 3, 6, 12, 24, 36, 48 및 72시간 시점에서 측정된 결과, 36시간에 최고 활성을 보였고($p < 0.05$,

compared with the control, 3, 6, 12, and 24 hours time points), 48시간 및 72시간에는 감소하였으나, 36시간 활성과 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$) (Figure 1A). LPS에 대한 용량반응을 관찰하기 위하여, LPS 1.0 mg/kg in 50 μ L of saline을 기관 내로 투여한 후, 36시간에 TG-2의 활성을 측정된 결과 LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline의 경우와 비교하여, 정도의 증가는 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않아(Figure 1B), LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline를 급성 폐손상의 유도용량으로 결정하였다. LPS 투여 후, cystamine 10, 50, 100 및 200 mg/kg을 복강 내로 투여한 후, 36시간 후에 측정된 TG-2의 활성은, 200 mg/kg을 투여한 경우에, LPS 단독 투여군과 비교하

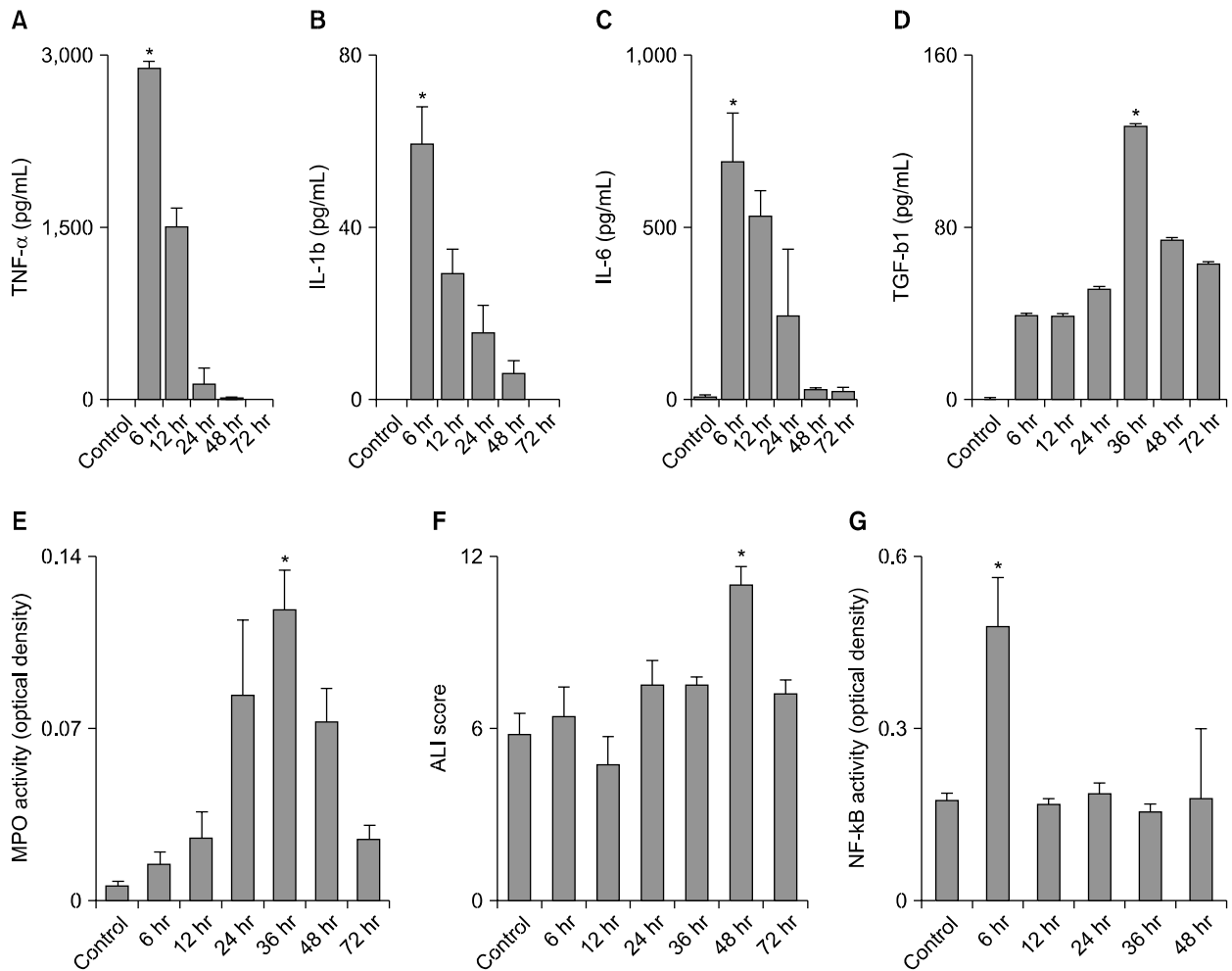


Figure 2. The time course of acute lung injury (ALI) parameters. The concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α (A), interleukin (IL)-1 β (B), and IL-6 (C) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and nuclear factor (NF)- κ B activity (G) in lung tissue homogenates showed peaks at 6 hours after lipopolysaccharide (LPS) administration. Transforming growth factor (TGF)- β 1 (D) and myeloperoxidase (MPO) activity (E) were highest at 36 hours, and ALI score (F) showed peak at 48 hours (* $p < 0.05$, compared with the control and other time points).

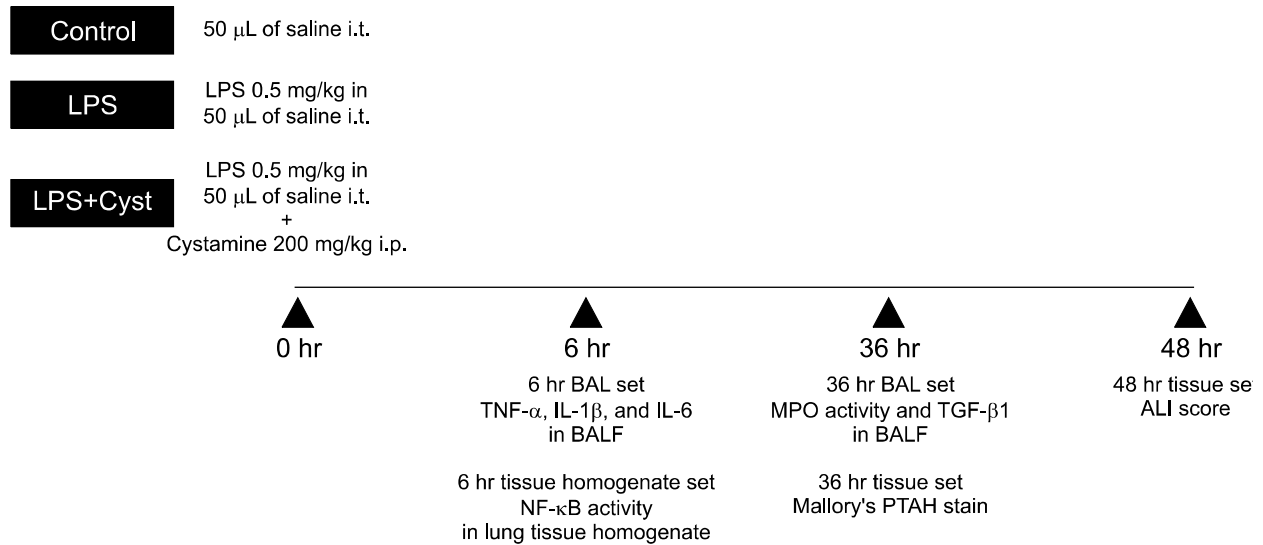


Figure 3. Overall study design. Control: control group; LPS: lipopolysaccharide group; LPS+Cyst: LPS+cystamine group; BAL: bronchoalveolar lavage; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; IL-1 β : interleukin-1 β ; IL-6, interleukin-6; BALF: bronchoalveolar lavage fluid; NF- κ B: nuclear factor- κ B; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; Mollory's PTAH: Mollory's phosphotunstic acid hematoxylin; ALI: acute lung injury.

여 유의하게 감소하였으며($p=0.009$), 대조군과 차이가 없었($p=0.806$), cystamine 200 mg/kg을 치료용량으로 결정하였다(Figure 1C). 각종 급성 폐손상의 지표들을 LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline을 기관 내로 주사한 후, 6, 12, 24, 36, 48 및 72시간 시점에서 고찰하였다. TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 NF- κ B activity는 6시간에서 최고 농도 및 활성을 보였다. MPO활성과 TGF- β 1의 농도는 36시간에 제일 높았고, 급성 폐손상 지수(ALI score)는 48시간에 최고를 나타냈다($p<0.05$, compared with the control and other time points) (Figure 2).

7. 실험 디자인

급성 폐손상 지표, TG-2 활성 및 cystamine 용량 반응에 대한 실험결과들을 근거로 다음과 같은 디자인으로 실험을 진행하였다. 정상대조군($n=30$), LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline을 기관 내로 주사하여 급성 폐손상을 유도한 LPS군($n=30$) 및 LPS를 기관 내로 투여한 후 200 mg/kg의 cystamine을 복강 내로 투여한 LPS+Cyst군($n=30$)으로 나누어 실험하였다. 각 군은 다시 BAL에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 측정을 위한 6시간 BAL set ($n=6$ /group), MPO 활성 및 TGF- β 1 측정을 위한 36시간 BAL set ($n=6$ /group), NF- κ B activity 측정을 위한 6시간 tissue homogenate set ($n=6$ /group), Mollory's PTAH 염

색을 위한 36시간 tissue set ($n=6$ /group) 및 급성 폐손상 지수 측정을 위한 48시간 tissue set ($n=6$ /group)들로 나누었다(Figure 3).

8. 통계

모든 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 비교는 비모수적 Kruskal-Wallis 검정과 Mann-Whitney U 검정을 사용하였으며, 모든 계산은 SPSS for Windows Release version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였고, p 값이 0.05 이하인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. TG-2 활성

정상대조군, LPS군 및 LPS+Cyst군에서 TG-2의 활성은, 각각 5408.8 ± 235.63 RFU/mg of protein, 7185.79 ± 371.13 RFU/mg of protein 및 5829.2 ± 496.08 RFU/mg of protein으로 세 군 간에 유의한 차이가 있었다($p=0.011$ by Kruskal-Wallis test). LPS군과 비교하여 LPS+Cyst군에서 TG-2의 활성이 유의하게 감소하였으며($p=0.009$), 대조군과 LPS+Cyst군 간에는 유의한 차이가 없었다($p=0.806$) (Figure 4A).

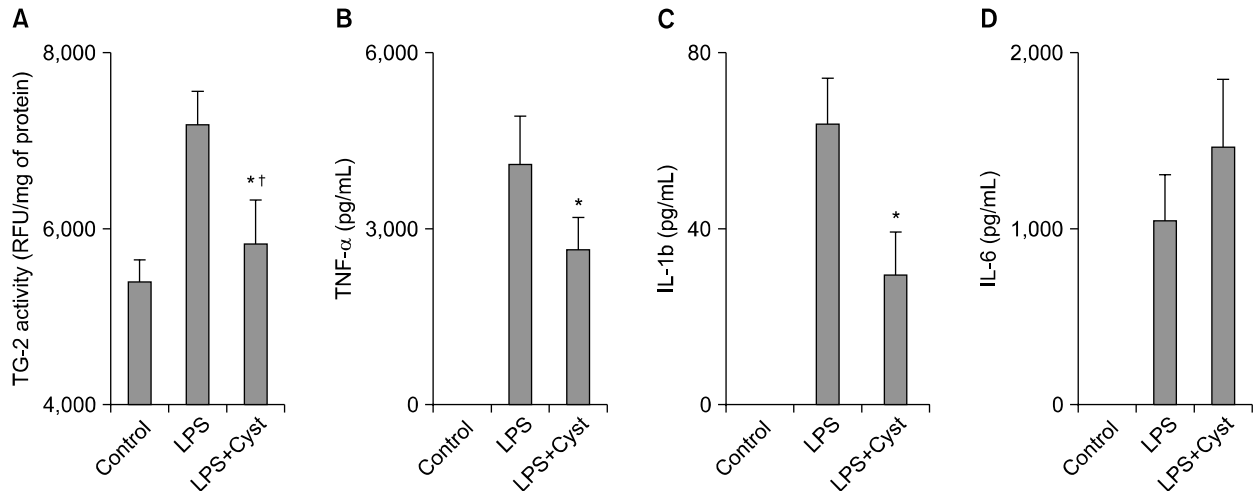


Figure 4. Transglutaminase (TG)-2 activity (A), tumor necrosis factor (TNF)- α (B), and interleukin (IL)-1 β (C) were significantly decreased in the lipopolysaccharide (LPS)+Cyst group compared with the LPS group (* $p < 0.05$). IL-6 (D) concentration was higher than the LPS group, but not significant ($\dagger p > 0.05$).

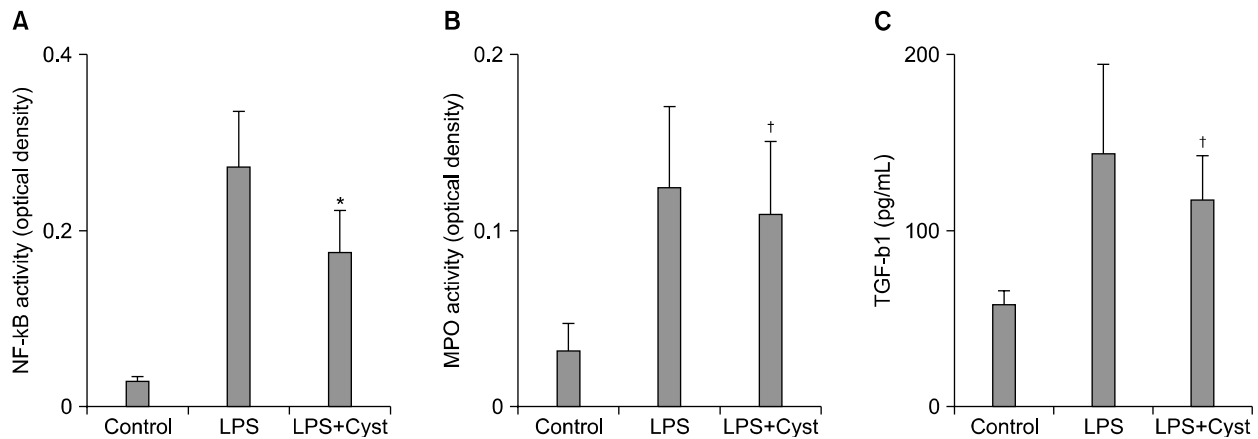


Figure 5. Nuclear factor (NF)- κ B activity (A) was significantly decrease in the lipopolysaccharide (LPS)+Cyst group compared with the LPS group (* $p = 0.028$). Myeloperoxidase (MPO) activity (B) and transforming growth factor (TGF)- β 1 concentration (C) in the LPS+Cyst group was lower than the LPS group, but not significant ($\dagger p > 0.05$).

2. 염증성 시토카인

LPS 투여 후 6시간에 BALF에서 측정된 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 농도는 정상대조군에서는 측정되지 않았고, TNF- α 의 농도는 LPS군 및 LPS+Cyst군에서 각각 $4,105.1 \pm 811.91$ pg/mL, $2,650.2 \pm 530.57$ pg/mL로 LPS+Cyst군에서 유의하게 낮았고($p = 0.14$) (Figure 4B), IL-1 β 의 농도 역시 64.2 ± 10.17 pg/mL, 29.7 ± 9.67 pg/mL로 LPS+Cyst군에서 유의하게 낮았다($p = 0.14$) (Figure 4C). 하지만 IL-6의 농도는 LPS군 및 LPS+Cyst군에서 각각 $1,050.2 \pm 261.99$ pg/mL, $1,468.5 \pm 381.28$ pg/mL로 LPS

+Cyst군에서 오히려 높은 경향을 보이기는 했지만, 통계적으로 유의하지는 않았다($p = 0.083$) (Figure 4D).

3. NF- κ B 활성, MPO 활성 및 ALI 지수

Lung tissue homogenate에서 LPS 투여 후 6시간에 측정된 NF- κ B의 활성은 정상대조군, LPS군 및 LPS+Cyst군에서, 각각 0.0289 ± 0.0053 optical density (O.D.), 0.2728 ± 0.0629 O.D. 및 0.1757 ± 0.0477 O.D로 세 군 간에 유의한 차이가 있었고($p = 0.001$ by Kruskal-Wallis test), LPS군과 비교하여 LPS+Cyst군에서 NF- κ B의 활성이 유의하게 감소하였다($p = 0.028$) (Figure 5A). LPS 투여

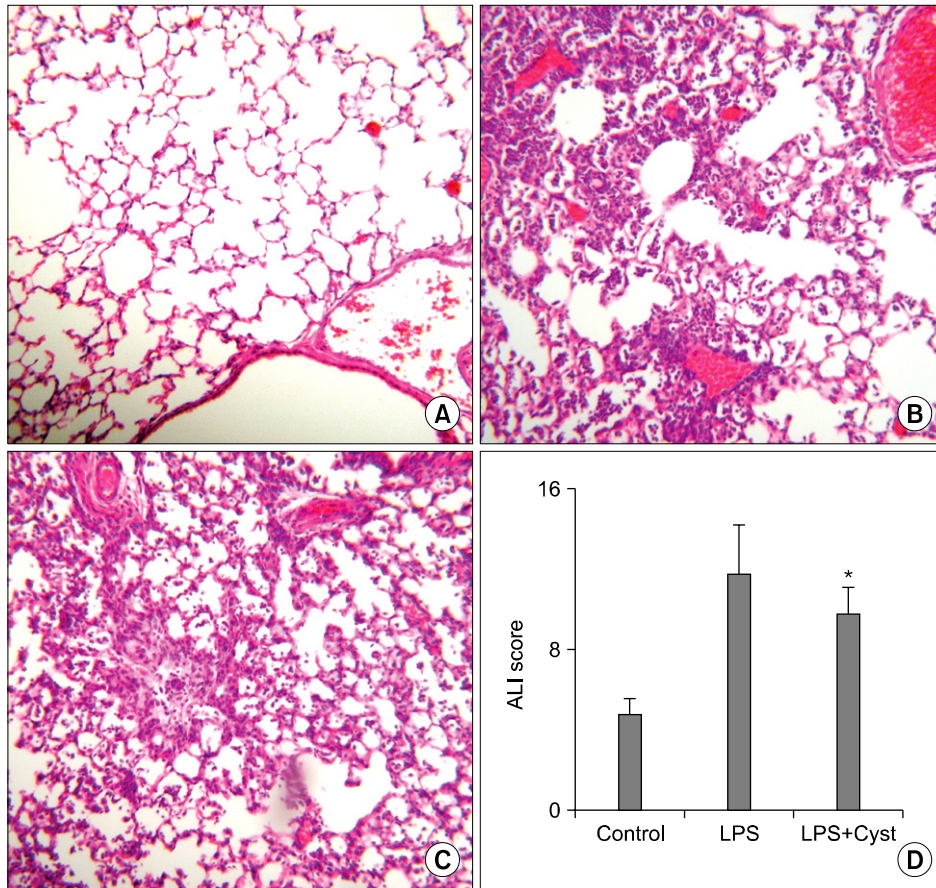


Figure 6. Histopathologic examination shows significantly higher levels of intra-alveolar exudates, inflammatory infiltration, hemorrhage, and interstitial edema in the lipopolysaccharide (LPS) group (B), compared with the control group (A). The LPS+Cyst group (C) showed similar findings with the LPS group. Acute lung injury (ALI) score (D) was not different between the LPS and LPS+Cyst groups (* $p=0.171$) (H&E stain, $\times 100$).

후 36시간에 BALF에서 측정된 MPO의 활성은 세 군에서, 각각 0.0324 ± 0.0151 O.D., 0.1246 ± 0.0461 O.D. 및 0.1094 ± 0.0414 O.D로 유의한 차이가 있었지만($p=0.004$ by Kruskal-Wallis test), LPS군과 비교하여 LPS+Cyst군에서 MPO의 활성이 감소하는 경향을 보이기는 했지만 통계적 유의성은 없었다($p=0.754$) (Figure 5B). 전반적인 폐손상의 정도를 H&E 염색 하에서 고찰한 결과, 정상대조군(Figure 6A)과 비교하여 LPS군(Figure 6B)에서 폐포 전반에 다량의 삼출액 및 초자막의 형성과 폐포벽 및 폐포 내에 많은 염증성 세포들의 침윤, 폐 모세혈관 주위 및 폐포 내 출혈과 간질의 비후 및 부종 등이 관찰되었다. LPS+Cyst군에서(Figure 6C) 현미경으로 관찰한 폐손상의 정도는 LPS군과 비교하여 뚜렷한 차이가 없었으며, 이를 ALI 지수로 정량화하여 비교한 결과, 정상대조군, LPS군 및 LPS+Cyst군에서, 각각 4.83 ± 0.7 , 11.8 ± 2.4 및

9.8 ± 1.3 으로 세 군 간에 유의한 차이가 있었으나($p=0.03$ by Kruskal-Wallis test), LPS군과 LPS+Cyst군 사이에 유의한 차이는 없었다($p=0.171$) (Figure 6D).

4. TGF- $\beta 1$ 및 Mallory's PTAH 염색

LPS 투여 후 36시간에 BALF에서 측정된 TGF- $\beta 1$ 의 농도는 정상대조군, LPS군 및 LPS+Cyst군에서, 각각 58.2 ± 7.92 pg/mL, 144.3 ± 50.32 pg/mL 및 118.2 ± 24.29 pg/mL로 유의한 차이가 있었다($p=0.004$ by Kruskal-Wallis test). 하지만 LPS군과 비교하여 LPS+Cyst군에서 TGF- $\beta 1$ 의 활성이 감소하는 경향을 보이기는 했지만 통계적 유의성은 없었다($p=0.347$) (Figure 5C). Mallory's PTAH 염색(Figure 7)을 시행하여 collagen 및 fibronectin 침착을 현미경으로 고찰한 결과, 갈색으로 염색된 양성염색의 정도가 LPS군(Figure 7B) 및 LPS+Cyst군(Figure

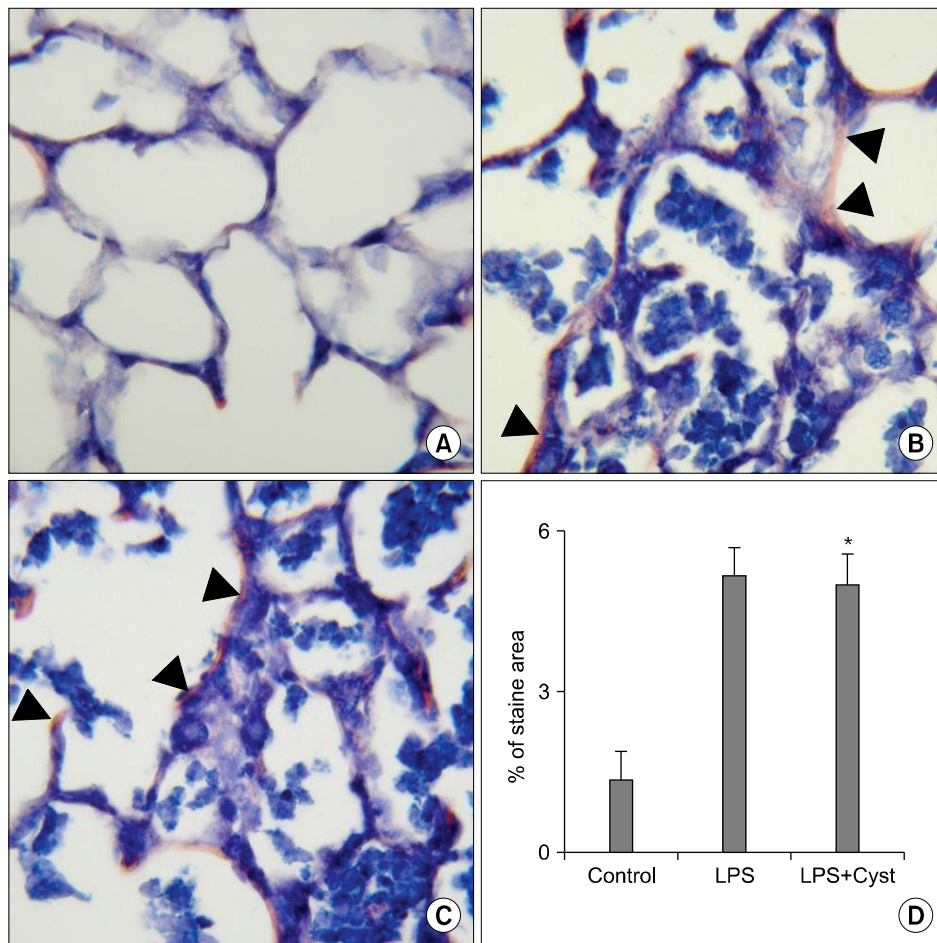


Figure 7. Mallory's phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) stain ($\times 400$). The percent area of positivity (brown color \blacktriangle) was significantly larger in the LPS group (B) than the control group (A). Between the LPS and LPS+Cyst (C) groups, the area was similar (D, $*p=0.423$).

7C)에서 정상대조군(Figure 7A)과 비교하여 증가하였으며, 이미지분석시스템을 이용하여 정량화한 결과, 세 군에서 각각 $1.35 \pm 0.53\%$ (of stained area), $5.17 \pm 0.52\%$ 및 $5.0 \pm 0.56\%$ 로 유의한 차이가 있었으나($p=0.003$ by Kruskal-Wallis test), LPS군과 비교하여 LPS+Cyst군에서 염색의 정도가 감소하는 경향을 보이기는 했지만 통계적 유의성은 없었다($p=0.423$) (Figure 7D).

고 찰

리포다당질로 유도된 급성 폐손상에서 폐조직 내 TG-2의 활성을 고찰한 결과, 정상대조군과 비교하여, TG-2의 활성이 유의하게 증가하였으며, TG-2 억제제에 의해서 TG-2의 활성이 현저히 감소하였다. 급성 폐손상의 초기 염증성 지표인 BALF 내 TNF- α 및 IL-1 β , 그리고 염증성

시토카인의 전사 인자인 NF- κ B의 활성이 TG-2 억제제에 의해 유의하게 감소되었으나, 36시간의 BALF 내 MPO 활성 및 48시간의 병리조직학적 소견은 감소하는 경향만을 보였다. 또한 섬유화와 관련된 지표인 TGF- β 1 및 Mallory's PTAH 염색의 경우에 있어서도 현저한 감소는 관찰되지 않았다.

일반적으로 ARDS의 병리단계는 급성삼출기(early exudative phase), 증식기(proliferative phase) 및 섬유화기(fibrotic phase)로 구분되는데, 섬유화기에는 collagen deposition을 동반한 진행성의 폐섬유화 및 미세혈관의 폐쇄가 발생한다²⁴. 이는 지속적이고 심한 염증이 치유되지 않음으로써 발생하는 반응으로, 과거에는 ALI 혹은 ARDS 발생 약 1주일 후부터 시작되는 것으로 여겨졌으나, 최근의 연구들에 의하면, collagen turnover가 ARDS의 비교적 초기에 증가하는 것으로 보고되었다^{7,8,25}. 과도한 섬유

염증반응(fibroproliferative response)은 폐의 고유기능인 가스교환을 감소시키고, 임상적으로는 심한 저산소증, 폐유순도의 감소 및 폐혈관 저항의 증가를 초래하며²⁶, ARDS 환자들의 사망률과 밀접한 연관성을 보인다²⁷. 하지만, 임상적 중요성에도 불구하고, ALI 및 ARDS와 연관된 대부분의 연구는 급성 삼출기의 염증반응에 집중되어 있었고, 섬유화증식 및 이로 인한 폐섬유화에 대한 연구는 상대적으로 매우 부족한 상황이다. 결과적으로, 최근까지도 폐포의 회복과 진행성 섬유화를 결정하는 정확한 기전은 불확실한 상태로, 폐섬유화 증식을 조절하는 기전을 밝히는 것은 ALI 및 ARDS의 합병증으로서 폐섬유화가 발생하는 환자들에 대한 새로운 치료법을 모색하는 데 있어서 매우 중요하다. 일반적으로 급성 염증반응 후의 섬유화증식은 interstitial fibroblast가 폐포 내 혈전으로 이동하면서 시작된다. 이후 interstitial fibroblast는 myofibroblast로 분화되며, 이 과정에서 cytoskeletal organization의 증가와 새로운 matrix receptor 발현이 증가된다. Myofibroblast는 증가된 세포표면의 receptor들을 매개로 하여 interstitium으로부터 airspace 내의 provisional matrix로 이동함으로써, 결과적으로 가스교환 표면의 effacement를 초래하며, 섬유화반응은 미세혈관에서도 진행하여 폐고혈압증이 발생하기도 한다²⁸. 이 과정에서 TGF- β 1는 세포외기질(extracellular matrix) 분자의 유전자 발현에 영향을 미치고, fibroblast의 증식을 유발하며, 구조유지세포(structural cell) 내에서의 자가분비자극(autocrine stimulation) 등의 기전을 통해서, 결체조직의 침착을 동반한 폐조직의 섬유화증식 및 개형(remodeling)에 있어서 중요한 역할을 한다²⁸.

TG는 특히 펩티드에 결합된 glutamine residue의 γ -carboxamine group과 다양한 amine들 사이의 결합을 촉진하는 효소로⁹, 포유류에서는 총 8종류의 TG가 보고되고 있다²⁹. 이 중 TG-2는 내피세포 및 평활근세포에서는 정상적으로 발현되나, 이외의 세포들에서는 서로 다른 신호전달을 통해서 그 발현이 유도되어, 일차적으로는 손상의 예방과 방어 및 복구를 촉진하는 데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨졌으나¹⁰, 최근의 연구들에 의하면 비정상적으로 과도하게 유발될 경우에는 각종 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다¹¹. 특히, TG-2는 LPS³⁰, oxidative stress³¹, UV³², calcium ionophores³³, retinoic acid³⁴, TNF- α 및 IL-6 등의 염증성 시토카인^{35,36}, 바이러스 감염³⁷ 등의 자극들로 인하여 활성화되는 것으로 알려져, LPS로 유도되는 급성 폐손상 및 이로 인한 염

증반응에 있어서 주요한 역할을 할 것으로 판단된다. 본 연구의 결과에 있어서도 LPS의 기관 내 투여로 유도된 급성 폐손상에서 TG-2의 활성이, TNF- α 및 IL-1 β 등의 염증성 시토카인의 증가와 동반하여 현저하게 증가되었으며, TG-2 억제제로 인해 감소되는 소견을 보였다. 또한 이와 같은 변화가 조직 내 NF- κ B의 증가 및 감소와 일치하는 소견을 보였다. 잘 알려진 바대로, ARDS의 병리기전과 연관된 다양한 시토카인의 발현에 있어서 NF- κ B는 필수적인 전사인자 중의 하나이다. 최근 TG-2의 활성도의 증가가 I- κ B의 polymerization을 통해 세포질 내의 유리 I- κ B α 를 감소시킴으로써, 결과적으로 활성화된 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 촉진하고³⁸, TG-2 promoter가 NF- κ B binding motif를 가지고 있음으로써, 직접적으로 NF- κ B의 활성을 유도함으로써 염증반응을 유발하거나 악화시키는 것으로 보고된 바 있다¹⁵.

각종 섬유화성 질환에서 TGF- β 1는 콜라겐 합성 및 epithelial-mesenchymal transition의 증가에 있어서 주요한 매개체로서, 기본적인 기능의 특성상 TG-2와 밀접한 연관관계가 보고되었다. 일부 연구에 따르면 TG-2가 비활성화 상태의 TGF- β 1를 활성화시키는 데 있어서 주요한 기여인자인 것으로 보고하고 있는가 하면¹⁸, 다른 연구들에 있어서는 TGF- β 1가 TG-2의 주요한 유도인자인 것으로 보고하고 있어서¹⁹, TGF- β 1와 TG-2가 조직 섬유화 과정에서 상호 긴밀한 기능을 하는 것으로 판단된다. 하지만, 이와 같은 TG-2의 기능 및 역할에도 불구하고 폐질환에 있어서 TG-2에 대한 연구는 매우 드물어서, Griffin 등³⁹이 파라콰트(paraquat)로 유도된 폐섬유화 모델에서 plasma transglutaminase (Factor XIIIa, different subtype of TG with TG-2)가 폐섬유화에 기여함을 보고한 바 있고, Suh 등⁴⁰이 복강 내 LPS 투여로 유도된 급성 폐손상 모델에서 anti-TG activity peptide가 몇몇 염증성 지표들을 감소시키는 것으로 보고한 것 이외에는, 폐질환, 특히, ALI 후 폐섬유화의 병리기전에서 TG-2의 역할을 고찰한 연구는 거의 없는 상황이다. 본 연구에서는 LPS로 유도된 급성 폐손상 모델에서 초기 섬유화성 기전에 있어서, TG-2의 역할을 급성 염증성 지표 및 섬유화성 지표인 TGF- β 1과 Mallory's PTAH 염색과의 변화와 비교하여 고찰한 결과, 일부 초기 염증성 지표와는 동반되어 증가하거나 감소하는 것이 관찰되었으나, TGF- β 1과 Mallory's PTAH 염색과의 관계에 있어서는, TG-2가 감소함에도 불구하고, 현저하게 감소되는 소견이 없어, TG-2가 LPS로 인한 급성 폐손상 후 초기 섬유화 기전에 있어서, 주요한 역할은 없

을 수 있는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과의 원인으로 추정할 수 있는 것은 LPS 0.5 mg/kg in 50 μ L of saline 를 기관 내 투여로 급성 폐손상을 유도하였을 경우, TG-2 의 활성이 정상대조군과 비교하여, 통계적으로 유의하게 증가하기는 하였지만, 그 정도가 약 145% 정도로, 병리기전에 관련된 다른 지표들의 변화와 비교하여 현저히 낮아서, 이를 억제함에도 불구하고, 병리현상에 대한 치료효과는 없었던 것으로 판단된다. 이와 같은 TG-2 활성의 변화는 LPS 1.0 mg/kg 투여하였을 경우에도 비슷하여, 향후 TG-2가 급성 폐손상의 염증성 병리기전 및 섬유화성 병리기전에 미치는 영향을 적절하게 연구하기 위해서는 TG-2의 활성이 좀 더 현저하게 증가하는 모델을 개발하고, 이를 이용하여 고찰하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005;353:1685-93.
2. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1334-49.
3. Desai SR, Wells AU, Rubens MB, Evans TW, Hansell DM. Acute respiratory distress syndrome: CT abnormalities at long-term follow-up. *Radiology* 1999;210:29-35.
4. McHugh LG, Milberg JA, Whitcomb ME, Schoene RB, Maunder RJ, Hudson LD. Recovery of function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:90-4.
5. Davidson TA, Caldwell ES, Curtis JR, Hudson LD, Steinberg KP. Reduced quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome compared with critically ill control patients. *JAMA* 1999;281:354-60.
6. Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:683-93.
7. Armstrong L, Thickett DR, Mansell JP, Ionescu M, Hoyle E, Billingham RC, et al. Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1910-5.
8. Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1783-8.
9. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 2002;368:377-96.
10. Folk JE, Finlayson JS. The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem* 1977;31:1-133.
11. Kim SY, Jeitner TM, Steinert PM. Transglutaminases in disease. *Neurochem Int* 2002;40:85-103.
12. Aeschlimann D, Thomazy V. Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* 2000;41:1-27.
13. Johnson TS, Skill NJ, El Nahas AM, Oldroyd SD, Thomas GL, Douthwaite JA, et al. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2146-57.
14. Shweke N, Boulos N, Jouanneau C, Vandermeersch S, Melino G, Dussaulte JC, et al. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am J Pathol* 2008;173:631-42.
15. Mirza A, Liu SL, Frizell E, Zhu J, Maddukuri S, Martinez J, et al. A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am J Physiol* 1997;272:G281-8.
16. Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, Hau Z, Skill NJ, Jones R, et al. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:3078-88.
17. Qiu JF, Zhang ZQ, Chen W, Wu ZY. Cystamine ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride via inhibition of tissue transglutaminase. *World J Gastroenterol* 2007;13:4328-32.
18. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003;116:217-24.
19. Shin DM, Jeon JH, Kim CW, Cho SY, Lee HJ, Jang GY, et al. TGFbeta mediates activation of transglutaminase 2 in response to oxidative stress that leads to protein aggregation. *FASEB J* 2008;22:2498-507.
20. Verderio EA, Johnson T, Griffin M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids* 2004;26:387-404.
21. Kim JH, Suk MH, Yoon DW, Kim HY, Jung KH, Kang EH, et al. Inflammatory and transcriptional roles of poly(ADP-ribose) polymerase in ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 2008;12:R108.
22. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L333-41.

23. Jeitner TM, Delikatny EJ, Ahlqvist J, Capper H, Cooper AJ. Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochem Pharmacol* 2005;69:961-70.
24. Tomaszefski JF Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 2000;21:435-66.
25. Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:840-5.
26. Steinberg KP, Hudson LD. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: the clinical syndrome. *Clin Chest Med* 2000;21:401-17.
27. Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome: a study in mechanically ventilated patients. *Chest* 1995;107:196-200.
28. Dhainaut JF, Charpentier J, Chiche JD. Transforming growth factor-beta: a mediator of cell regulation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003;31 Suppl 4:S258-64.
29. Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J Biol Chem* 2001;276:33066-78.
30. Park KC, Chung KC, Kim YS, Lee J, Joh TH, Kim SY. Transglutaminase 2 induces nitric oxide synthesis in BV-2 microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1055-62.
31. Lee ZW, Kwon SM, Kim SW, Yi SJ, Kim YM, Ha KS. Activation of in situ tissue transglutaminase by intracellular reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:633-40.
32. Shin DM, Jeon JH, Kim CW, Cho SY, Kwon JC, Lee HJ, et al. Cell type-specific activation of intracellular transglutaminase 2 by oxidative stress or ultraviolet irradiation: implications of transglutaminase 2 in age-related cataractogenesis. *J Biol Chem* 2004;279:15032-9.
33. Lorand L, Weissmann LB, Epel DL, Bruner-Lorand J. Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca²⁺-mediated crosslinking of erythrocyte proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:4479-81.
34. Scott KF, Meyskens FL Jr, Russell DH. Retinoids increase transglutaminase activity and inhibit ornithine decarboxylase activity in Chinese hamster ovary cells and in melanoma cells stimulated to differentiate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:4093-7.
35. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, et al. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1813-20.
36. Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, Liu SL, Nagy L, Thomazy V, et al. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol* 1998;274:G240-5.
37. Roberts ES, Zandonatti MA, Watry DD, Madden LJ, Henriksen SJ, Taffe MA, et al. Induction of pathogenic sets of genes in macrophages and neurons in NeuroAIDS. *Am J Pathol* 2003;162:2041-57.
38. Lee J, Kim YS, Choi DH, Bang MS, Han TR, Joh TH, et al. Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J Biol Chem* 2004;279:53725-35.
39. Griffin M, Smith LL, Wynne J. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br J Exp Pathol* 1979;60:653-61.
40. Suh GY, Ham HS, Lee SH, Choi JC, Koh WJ, Kim SY, et al. A Peptide with anti-transglutaminase activity decreases lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. *Exp Lung Res* 2006;32:43-53.