

## Balb/C mouse의 폐장대식세포에서 유리규산 자극에 의한 Proinflammatory Cytokine과 TGF- $\beta$ 의 생성 및 상관관계†

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 현암신장연구소

기신영, 김은영, 김미호, 어수택, 김용훈, 박춘식, 이희발

= Abstract =

### The Production and Correlation of Silica Induced Proinflammatory Cytokines and TGF- $\beta$ from Monocytes of Balb/C Mice

Shin Young Ki M.D., Eun Young Kim, Mi Ho Kim, Soo-Taek Uh M.D.,  
Yong Hoon Kim M.D., Choon Sik Park M.D., Hi Bal Lee M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine,  
Hyonam Kidney Laboratory, Soonchunhyang University, Seoul, Korea

**Background :** Chronic inhalation of silica induces the lung fibrosis. The alveolar macrophages ingest the inhaled silica ; they liberate the pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and fibrogenic cytokines, TGF- $\beta$  and PDGF. Cytokines liberated from macrophage have pivotal role in pulmonary fibrosis. There is a complex cytokine network toward fibrosis. However, the exact roles and the interaction among the proinflammatory cytokines and TGF- $\beta$ , a fibrogenic cytokine, have not been defined, yet. In this study, we investigated silica induced IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  production and the effect of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  on the production of TGF- $\beta$  from lung macrophages of Balb/C mice.

**Method :** We extracted the lung of Balb/C mice and purified monocytes by Percoll gradient method. Macrophages were stimulated by silica (SiO<sub>2</sub>) in the various concentration for 2, 4, 8, 12, and 24 hours. The supernatants were used for the measurement of protein levels by bioassay, and cells for the levels of mRNA by in situ hybridization.

**Results :** The production of IL-6 was not observed till 4 hours, and reached the peak levels at 8 hours after stimulation of silica. The production of TNF- $\alpha$  increased from 2 hours and reached the peak levels at 4 hours after stimulation of silica. The spontaneous TGF- $\beta$  production reached the peak levels at 24 hours. TNF- $\alpha$  upregulated the silica induced TGF- $\beta$  production. Silica induced TGF- $\beta$  production was blocked by pretreated anti-TNF- $\alpha$  antibody. In situ hybridization revealed the increased positive signals at 4 hours in IL-6, at 4 hours

† 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제(과제번호 94-1400-07-01-3) 연구비에 의하여 연구되었음.

in TNF- $\alpha$  and 12 hours in TGF- $\beta$ .

**Conclusion :** The results above suggest that silica induced the sequential production of IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  from macrophages and TNF- $\alpha$  upregulates the production of TGF- $\beta$  from silica-induced macrophages. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 823-834)

**Key words :** Silica, Fibrosis, macrophages, Proinflammatory cytokines, TGF- $\beta$

## 서 론

유리규산 (silica)의 만성적인 지속적 흡입은 폐의 섬유화를 초래하여 규폐증 (silicosis)을 일으킨다는 사실은 1세기전에 알려졌다<sup>1)</sup>. 최근 규폐증과 진폐증환자의 수가 작업환경의 호전과 석탄의 소비 감소로 점차 줄어드는 경향이 있으나, Silica는 무기질로서 낮은 화학적 자극에 비하여 폐섬유증의 발생도가 높아 실험적 동물에서 유리규산에 의한 폐섬유화증의 연구는 일반적인 폐섬유화증의 병태생리 규명과 치료방법의 개발차원에서 활발히 진행되고 있다<sup>2,3)</sup>. Silica에 의한 초기 폐병변은 폐포관과 세기관지에서 시작되는 폐포염으로 관찰되며 폐포에 침착된 Silica는 대식세포에 탐식되어 폐간질로 이동되고, silica 탐식에 의해 활성화된 대식세포는 염증매개물을 분비한다. 그 결과, 염증세포의 축적에 의한 염증반응이 발생하고 염증반응의 치유 과정에서 형성된 교원질의 비정상적인 형성으로 폐장의 구조적 변화를 초래하게 된다<sup>4)</sup>. 폐포대식세포는 폐장내에 풍부히 존재하며 장기간 여러 물질의 자극에 의하여 염증반응을 일으키고 증폭시키는 cytokines들을 분비하여 폐섬유화과정에서 핵심적인 염증세포로 간주되고 있으며 규폐증의 경우에서도 폐섬유화증의 진행에 폐포대식세포에서 매개되는 cytokines이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

실험적 폐섬유화증의 기전에 관여되는 cytokines은 여러가지가 규명되어 있으며, 초기 염증반응에는 Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )가 주로 염증반응에 관여하나 염증이 만성화 될수록 transforming growth

factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet derived growth factor (PDGF) 등이 관여하며<sup>6)</sup> 이 중 섬유모세포증식능이나 교원질 형성을 증가시키는 섬유화 (fibrogenic) cytokines로는 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF등이 관여하며 IL-6도 대식세포, 섬유모세포 등에서 분비되는 급성염증반응의 매개물로 염증반응을 억제시키는 역할도 있는 것으로 알려져 있지만<sup>7)</sup> 규폐증에서 각각의 cytokine의 역할은 아직 확실하지 않다.

Piguet는 silica를 폐장내 주입 후 폐장내 생성된 규폐결절내에서 TNF- $\alpha$ 의 mRNA가 증가하며, 또한 같은 실험에서 TNF- $\alpha$  중화항체를 전처치했을 때 silica에 의한 폐섬유화가 억제되고, IL-1 $\beta$  수용체의 길항제로 전처치 한 경우도 섬유화가 억제되어 IL-1 $\beta$ 과 TNF- $\alpha$ 가 silica에 의한 폐섬유화에 중요한 역할을 한다고 보고하였다<sup>8)</sup>. IL-1 $\beta$ 과 TNF- $\alpha$  사이의 상관관계는 복잡하여 IL-1 $\beta$ 은 대식세포의 IL-6 분비를 자극하고, 생성된 IL-6는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제한다고 알려져 있으나 IL-1 $\beta$ 과 IL-6, TNF- $\alpha$ 가 공존할 때의 결과는 예측하기가 어렵다<sup>9,10)</sup>. 유리규산을 생쥐의 폐장내로 주입했을 때 TGF- $\beta$  단백질의 발현이 증가한다<sup>11)</sup>. TGF- $\beta$ 는 fibronectin과 collagen을 증가시키며 단백질분해효소의 분비를 억제하거나 단백질분해효소의 억제제의 분비를 증가시켜 단백질분해효소에 의한 기질 (matrix)의 분해 (degradation)를 억제하여 세포의 기질(extracellular matrix)을 증가시킨다. 그러므로 규폐증에서 조직내 기질 (matrix)의 침착과 섬유화에 TGF- $\beta$ 가 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 그러나 초기의 규폐증 병변에서 TGF- $\beta$ 의 형성은 관찰되어지지 않고 후기의 규폐결절에서 TGF

- $\beta$ 의 증가가 관찰되어 규폐증에서 TGF- $\beta$ 가 섬유화 과정의 후기에 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있으나<sup>6)</sup> silica에 의한 폐섬유화증에서의 정확한 역할은 아직 확실히 밝혀진 바 없으며 초기에 분비된 TNF- $\alpha$ 나 다른 proinflammatory cytokine에 매개되어 TGF- $\beta$ 가 분비되는지 silica가 직접 TGF- $\beta$ 를 분비하는 지는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다.

본 연구는 Balb/C의 폐장대식세포를 silica로 자극한 후 IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 의 양을 측정하고 mRNA의 발현을 관찰하였고, 대식세포의 TGF- $\beta$  생성에 대한 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 영향을 알기 위하여 L-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 에 대한 중화항체를 이용하여 대식세포의 TGF- $\beta$ 의 생성 억제 유, 무를 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 유리 규산의 준비

Dauber 등의 방법을 이용하여 Silica (SiO<sub>2</sub>, 약 80%가 입자크기 1-5 $\mu$ m Sigma co.) 분말을 1N HCl에 넣고 끓인 후 증류수로 세척하고 건조시킨 후 무게를 측정하여 200 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 건열 멸균하여 내재된 내독소를 제거하였다<sup>12)</sup>.

### 2. Balb/c 폐장대식세포 분리

무게 25-30gm의 숫놈 Balb/C를 경추 탈골로 희생시킨 후 폐장을 적출하여 Percoll gradient 방법을 이용하여 획득하였다<sup>13)</sup>. 약술하면 적출한 폐장을 칼로 가늘게 자른 후, 88 $\mu$ m의 steel gauze에 통과시켰다. 획득된 세포는 비중 1.080, 1.070, 1.030 Percoll 용액위에 중첩시켜 4 $^{\circ}$ C, 3,500 rpm에서 30분간 원심 분리시켰다. 비중 1.080과 1.070 사이의 세포를 획득하여 Ca<sup>++</sup>과 Mg<sup>++</sup>이 없는 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척 후 총 세포수와 trypan blue

dye exclusion test로 생존율을 확인하였다. 생존도는 98% 이상이었으며, 비특이 esterase 염색 (nonspecific esterase stain)으로 세포 감별을 하여 95% 이상이 대식세포임을 확인하였다.

### 3. 폐장대식세포의 배양

획득된 세포를 10% FCS 완전배지에 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml로 맞추어 24 well culture plate에 각각 분주후 0, 0.2, 1, 5, 25g/ml의 silica를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 가습 배양기에서 0, 2, 4, 8, 12, 24시간 동안 배양한 후 상청액을 수거하여 IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 의 단백양을 측정하였다. In situ hybridization을 위하여 chamber slide(Nunc, IL, USA)에 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml의 세포를 0, 0.2, 1, 5, 25  $\mu$ g/ml의 silica와 함께 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 가습배양기에서 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간 동안 배양하여 상청액은 버리고, 세포는 4% paraformaldehyde에 5분 고정하였다.

### 4. Proinflammatory cytokines 및 중화항체의 전처리

Proinflammatory cytokines을 전처리한 효과를 알아보기 위하여 배양대식세포에 recombinant human IL-1 $\beta$  (Genzyme), recombinant mouse IL-6 (Genzyme), recombinant human TNF- $\alpha$  (Genzyme)를 각각 50ng/ml로 자극하였으며 그리고 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 동시에 24시간 전 처리 후, 5  $\mu$ g/ml의 silica와 함께 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 배양하였다. 회수 후 원심분리하여 상청액은 TGF- $\beta$ 의 단백양 측정을 위하여 실험때 까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 아울러 2 $\times$ 10<sup>5</sup>의 세포를 in situ hybridization 측정을 위하여 위와 같은 방법으로 chamber slide (Nunc. Co.)에서 배양하였다. monoclonal hamster anti-IL-1 $\beta$  Ab (Genzyme), monoclonal mouse anti-IL-6 Ab(Genzyme), polyclonal rabbit anti-TNF- $\alpha$  Ab (Genzyme) 10

$\mu\text{g/ml}$  를 각각 그리고 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6를 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 silica와 함께 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO $_2$ 에서 24시간 동안 위와 같은 방법으로 배양 처리하였다.

## 5. Cytokines의 측정

### a. Tumor necrosis factor- $\alpha$ 의 측정 방법

TNF- $\alpha$ 의 정량은 cell lytic assay를 이용하였으며 TNF- $\alpha$ 에 예민하며, actinomycin D (Sigma)로 처리된 생쥐의 L929 섬유모세포를 이용한 bioassay로 측정하였다<sup>14)</sup>. L929 섬유모세포를 96 well-flat bottom으로 된 microplate에 분주한 후 검체와 표준시약인 rhTNF- $\alpha$  (Genzyme, USA)를 2000pg/ml부터 0.64pg/ml의 농도까지 50  $\mu\text{l}$  씩 분주하였다. 8  $\mu\text{g/ml}$  actinomycin D 용액을 30  $\mu\text{l}$  첨가한 후 5% CO $_2$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 배양하였다. 배양 후 0.9% 생리식염수 200  $\mu\text{l}$  로 1회 세척한 후 20% ethanol에 녹인 0.05% crystal violet 용액 50  $\mu\text{l}$  를 분주하여 세포를 염색한 후 흐르는 물로 세척하고 말렸다. 100  $\mu\text{l}$  의 methanol을 첨가하여 세포내에 흡수된 crystal violet이 유리되어 나오게 되면 595nm에서 분광 흡수량을 측정하고 검체의 TNF- $\alpha$ 의 양을 구하였다.

### b. IL-6의 측정 방법

IL-6 의존성 B9 hybridoma 세포주의 증식능을 이용한 3-(4,5-dimethyl thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method를 사용하였다<sup>15)</sup>. 약술하면 IL-6 의존성 B9 hybridoma 세포주를 10% FCS완전배지에 2u/ml의 rhIL-6 (Genzyme, USA)로 배양한 후 3회 세척하고 10% FCS완전배지로 5 $\times$ 10 $^4$  cell/ml로 분주하여 96 well culture plate에 100  $\mu\text{l}$  씩 각 well에 가하고 rhIL-6 표준시약을 4,000pg에서 1.28pg까지의 농도로 5배수 희석하여 만든 후, 검체도 5배수씩 희석하여 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO $_2$  가슴배양기에서 B9 hybridoma 세포와 같이 92시간 배양 후 10  $\mu\text{l}$  의 MTT를 첨가하고 4시간 반응시킨 후 25  $\mu\text{l}$  의 acid SDS를 첨가한 후

24시간 반응시켰다. 색소가 녹아나오면 620nm에서 micro-ELISA reader로 분석하였다. 흡광도를 측정하여 B9 세포의 증식능을 측정하여 표준 interleukin-6의 B9 세포 증식능에 맞추어 검체내의 IL-6의 양을 구하였다.

### c. TGF- $\beta$ 의 측정 방법

TGF- $\beta$  의존성으로 억제되는 mink lung fibroblast 세포주인 MV-309 세포 증식의 억제정도를 측정함으로써 TGF- $\beta$ 의 양을 측정할 수 있었다<sup>16)</sup>. MV-309 cell line은 5% FCS이 함유된 완전조건 배지에서 3일 간격으로 trypsin 처리한 후 부유세포를 적정수 조절하여 재배양하여 증식시켰다. 50  $\mu\text{l}$  의 세포부유층을 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO $_2$  가슴배양기에서 3시간 배양한 후 희석된 표준용액과 RPMI 100  $\mu\text{l}$  를 flat-bottom microtiter plate에 넣은 후 TGF- $\beta$ 를 10ng에서 0.6410pg까지 5배씩 희석하여 표준용액을 만들어 100  $\mu\text{l}$  를 각 well에 넣고 검체를 2배씩 희석하여 따로 첨가하였다. 검체를 넣고 92시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO $_2$  가슴 보온기에서 배양한 후 MTT를 첨가하고 IL-6 측정에서 기술된 방법으로 시행하였다.

## 6. In situ hybridization

Chamber slide에서 배양된 세포를 공기 중에서 잘 말리고, 4% paraformaldehyde으로 5분간 고정시킨 후 실험 때까지 70% ethanol에 보관하였다. Slide는 조직의 탈락을 막기 위하여 poly-L-lysine으로 처리하였다<sup>17)</sup>.

### a. RNA probe의 제조

Probe의 제조는 digoxigenin을 이용한 in vitro transcription 방법을 시행하였다<sup>18,19)</sup>.

#### 1) Vector 의 준비

Vector는 BamHI과 HindIII enzyme site가 있는 2746bp의 pZEM.4Z(Promega, WI, USA)을 사용

하였다. pZEM.4Z이 들어있는 JM 109 strain으로부터 small scale preparation하여 얻었다. 간략히 기술하면, 25 $\mu$ g/ml의 ampicillin이 함유되어 있는 10% LB agar plate에 JM 109 strain을 접종하여 12시간 이상 배양시켜 자란 colony를 5ml의 10% LB media에 접종하여 밤새 배양시켰다. 다음날 배양액 1 ml을 취하여 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 30초간 원심분리하고 상청액은 버린 다음 50mM glucose, 10mM EDTA가 함유되어 있는 용액을 첨가한 후 잘 섞고 이어 0.2 N NaOH, 1% SDS를 가하고 5M potassium acetate를 잘 섞는다. 이어 12,000 rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리하고 상청액을 얻어 phenol/chloroform을 넣고 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 원심분리하여 상청액을 얻는다. Propranolol로 DNA를 침강시킨 후 70% ethanol로 세척하고, 이어 RNase가 첨가되어 있는 증류수에 DNA를 잘 녹이고 HindIII로 enzyme digestion하여 agarose gel상에서 2746 bp의 pZEM.4Z DNA band를 확인하였다. 얻어진 DNA를 모두 agarose gel running하여 DNA band를 자른 후, gene cleaning으로 정제하여 transformation 준비를 하였다.

## 2) Insert DNA의 준비

IL-1 $\beta$ 는 RT-PCR로, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6는 PCR을 시행하였다. 각 cytokine의 PCR product의 크기가 IL-1 $\beta$ 는 312bp, PDGF는 369bp, IL-6는 422bp, TNF- $\alpha$ 는 361bp, TGF- $\beta$ 는 360bp가 되도록 계획하였다. RT-PCR과 PCR products는 phenol/chloroform 및 isoamylalcohol로 purification한 후에 BamHI과 HindIII enzyme으로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 반응시킨 후 digested DNA를 1% agarose gel에 running시켜 cDNA band가 있는 gel 절편을 잘라내어 gene cleaning을 시행하여 insert DNA를 수거하고 spectrophotometer (UV light 260/280nm)에서 농도를 측정했다. 이 insert DNA를 다시 1% agarose gel에 running하여 위와 동일한 band인가를 확인되면 transformation 준비

를 하였다.

## 3) Cytokines의 transformation

먼저 각 cytokines의 DNA와 vector DNA인 pGEM.4Z에 ligation시켰다. 이 vector DNA를 insert DNA와 ligation 시행하기 전에 BamHI과 Hind III로 처리하여 spectrophotometer (UV light 260/280nm)에서 농도를 측정하고 Ligation시에는 vector DNA와 insert DNA를 혼합한 후 1 unit의 T4 DNA ligase를 넣어 16 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. Ligation이 끝나면 transformation을 위하여 DH-5로 competent cell을 만들었다. Competent cell과 위에서 만든 ligation mixture를 혼합한 후 30분간 얼음 위에서 두었다가 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heat shock을 준 다음 LB media를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 이것을 원심분리하여 재부유시키고 이를 ampicillin이 포함된 LB media plate에 접종시킨 다음 16시간 후에 자란 균주를 취하여 DNA를 수거하였다.

여기서 나온 plasmid DNA를 BamHI과 Hind III로 약 1시간 이상 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 vector DNA (pGEM.4Z)와 insert DNA의 band를 확인하였다. 여기서 추출한 plasmid DNA를 insitu hybridization에 필요한 RNA probe를 만들때 template로 사용하였다.

## 4) Probe의 제작

추출한 plasmid DNA에서 antisense probe를 만들기 위해 plasmid DNA를 linealization 시킨 후 template DNA를 5-10  $\mu$ g/ $\mu$ l의 최종 농도로 만들어 놓았다. Template DNA를 이용 in vitro transcription을 시켜서 RNA probe를 만들었으며 표식자로 11-digoxigenin-labelled UTP를 사용하였다. In vitro transcription은 antisense의 경우는 T7 polymerase, sense의 경우는 SP6 polymerase를 이용 하였다. TGF- $\beta$ 의 경우는 PCR을 이용 digoxigenin을 부착시켰다. PCR 시행시 11-

digoxigenin-labelled dUTP를 사용하였다. Labeling efficiency는 anti-digoxigenin alkaline phosphatase를 반응시켜 semiquantitative dot blot analysis를 시행 확인하였다.

b. In situ hybridization

Cytospin으로 만든 slide를 실온에서 건조시키고, 이어 4°C에서 4% paraformaldehyde로 5분간 고정시켰다. Slide를 DEPC-water로 씻은 후 70%, 80%, 100% ethanol에 각각 5분간 반응후 건조시켰다. 위에서 만든 RNA 혹은 DNA probe, hybridization mixture, t-RNA (25 µg/µl)로 혼합된 용액 30 µl를 조직위에 얹고, sigmacote로 처리된 cover glass로 덮어 37°C에서 16시간 반응시켰다. 다음날 2 X SSC, 1 X SSC에서 각각 30분, 0.5 X SSC로 37°C에서 30분간, 0.5 X SSC로 실온에서 30분간 세척하였다. 이어 sheep serum과 triton-X가 포함된 blocking solution으로 30분간 처리후, 1 : 500으로 희석된 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate로 2시간 반응시켰다. Buffered solution으로 30분간 세척후, NBT 4.5 µl, BCIP 3.5 µl 씩 분주하여 빛을 차단한 채 반응을 관찰하였다. Anti-sense probe를 사용한 slide에서는

뚜렷한 갈색의 반응이 보이면서, sense probe를 사용한 slide에서는 희미한 갈색의 반응이 나타날 때까지 기다렸다. 이후 EDTA가 함유된 buffered solution으로 반응을 중단시키고 광학현미경하에서 확인하였다.

결 과

1. TNF-α, IL-6, TGF-β 단백질 측정 결과

TNF-α 측정에 사용된 적정 세포수는 1×10<sup>6</sup> 개로 silica로 자극한 모든 농도에서 silica로 자극하지 않은 자연 생성능보다 2시간째 TNF-α의 생성이 증가되기 시작하였다. Silica 0.2 µg/ml과 5 µg/ml의 농도에서 4시간째 최고의 생성능을 보였으나, 배양 8, 12시간째는 silica의 모든 농도에서 감소하였다. 24시간째는 silica로 자극하지 않은 자연 생성능이 증가하였지만, 4시간째 증가되었던 silica 0.2 µg/ml과 5 µg/ml의 농도에서는 기저 상태로 감소하였다. 또한 silica 1 µg/ml과 25 µg/ml의 농도에서는 2시간째도 증가되었고, 24시간째도 증가되는 biphasic한 양상을 보였다. 이상의 결과로 TNF-α는 silica로 자극시 4시간만에 최대로 증가함을 알 수 있었다 (Fig.1A).

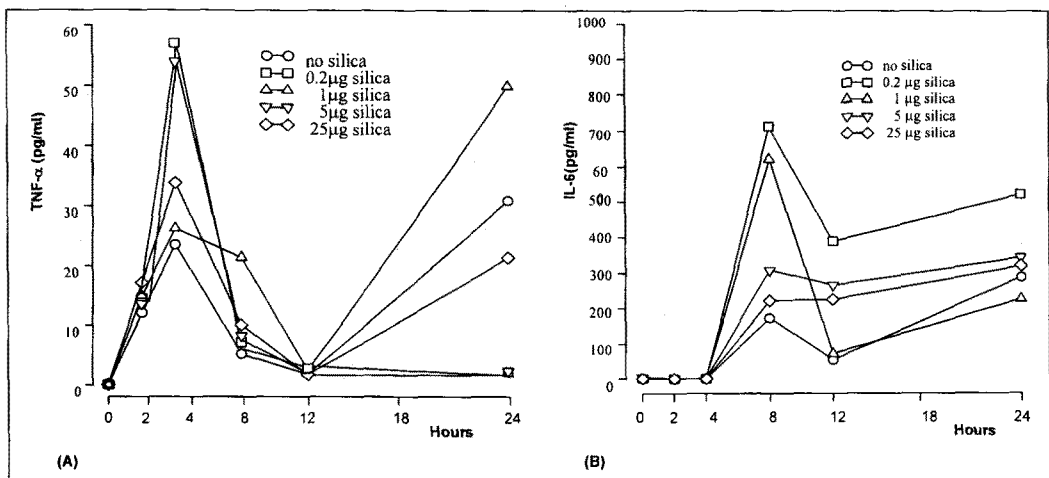


Fig. 1. Time and dose response curve of TNF-α (A) and IL-6 (B) production from macrophages (1×10<sup>6</sup> cells) after silica stimulation.

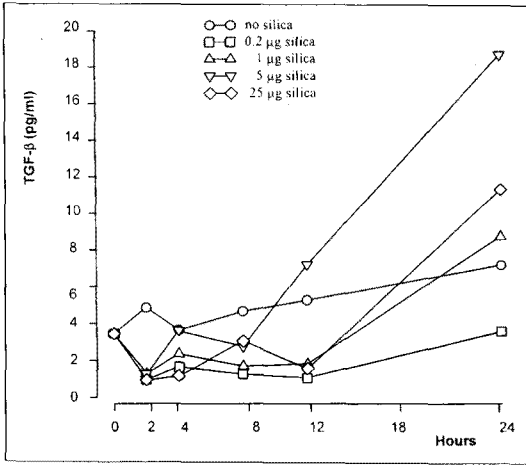


Fig. 2. Time and dose response curve of TGF- $\beta$  production from macrophages ( $2 \times 10^6$  cells) after silica stimulation

IL-6 측정에 사용된 적정 세포수는  $1 \times 10^6$ 개로 TNF- $\alpha$ 와는 달리 2, 4시간째는 아무런 변화가 없었으나, 8시간째 자연생성능이 증가하는 소견을 보였다. Silica 0.2  $\mu$ g/ml의 농도에서 배양 8시간째 IL-6의 생성능이 가장 높았고, 1  $\mu$ g/ml에서 25  $\mu$ g/ml의 농도로 증가할 수록 IL-6의 생성능은 감소하였지만, 자연생성능보다는 증가되어있었다. IL-6는 전 농도에서 배양 12시간째는 다시 감소하였다가 24시간째 증가하는 biphasic한 소견을 보여 주었다 (Fig. 1B). TGF- $\beta$ 의 측정에 사용된 적정 세포수는  $2 \times 10^6$ 개였으며, silica의 양과 관계없이 1시간 부터 12시간까지의 배양액에서는 TGF- $\beta$ 의 증가가 관찰되지 않았다. 배양 24시간째 자연생성능도 증가될 뿐만 아니라, silica로 자극시에도 증가되었으며, 특히 silica 5  $\mu$ g/ml의 농도에서 최고의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

## 2. IL-1 $\beta$ , IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 TGF- $\beta$ 형성에 대한 효과

Silica와 함께 IL-1 $\beta$  (50ng/ml)로 자극시는 silica 단독 자극에 의한 TGF- $\beta$ 의 형성과 차이가 없었다 ( $p > 0.05$ ). Silica와 함께 IL-6 (50ng/ml)로 자극시

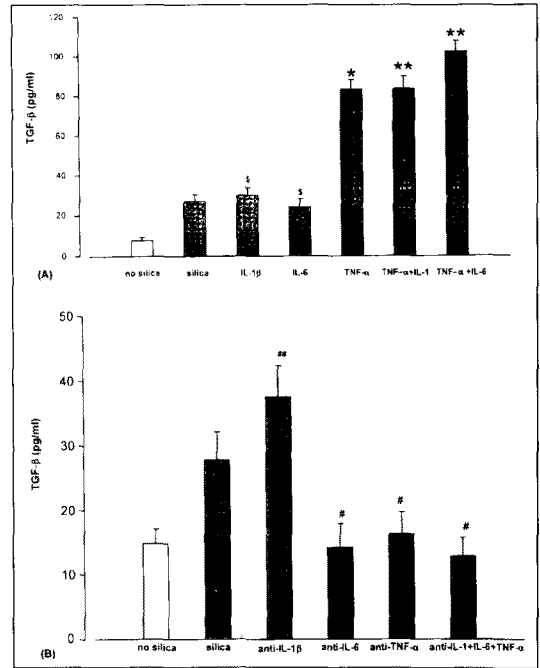


Fig. 3. The effects of proinflammatory cytokines (A) and the anti-proinflammatory cytokines antibodies (B) on the production of TGF- $\beta$  with silica.

\* , # :  $p < 0.05$  vs silica, anti-IL- $\beta$   
 \* \* :  $p > 0.05$  vs TNF- $\alpha$   
 \$ , ## :  $p > 0.05$  vs silica

는 silica 단독으로 자극한 경우 보다도 TGF- $\beta$  생성이 감소하는 경향을 보였다 ( $p > 0.05$ ). Silica와 TNF- $\alpha$  50ng/ml을 함께 자극시 TGF- $\beta$ 의 생성은 현저히 증가되었으며 ( $p < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  50ng/ml과 IL-6 50ng/ml으로 동시 자극시에는 TNF- $\alpha$ 에 의한 TGF- $\beta$ 의 형성이 증가하는 경향을 보였다 ( $p > 0.05$ ) (Fig. 3A). 이의 결과로 TGF- $\beta$ 의 형성에 TNF- $\alpha$ 가 중요한 역할을 하며 IL-1 $\beta$ , IL-6는 TNF- $\alpha$ 의 TGF- $\beta$  생성에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

## 3. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 중화항체 효과

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 중화항체를 전처치 후 silica

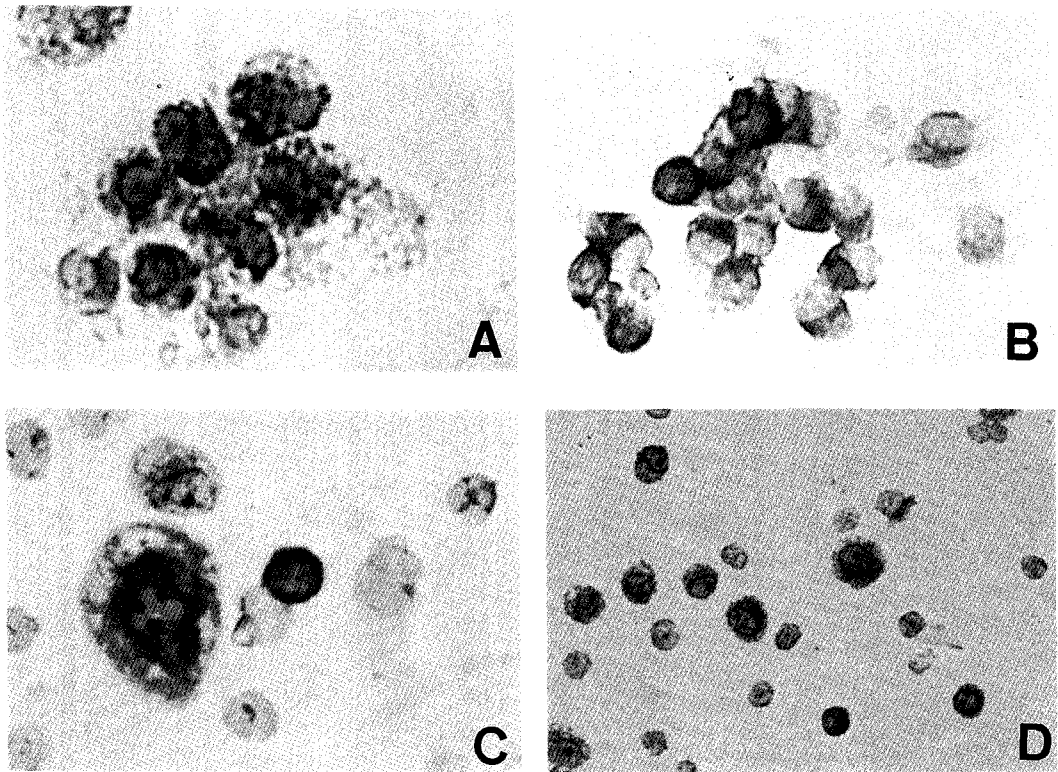


Fig. 4. Light microscopic findings of in situ hybridization for macrophages stimulated with silica after 2 hours by IL-1 $\beta$  (A, 400 $\times$ ), IL-6 (B, 200 $\times$ ) and TNF- $\alpha$ (C, 200 $\times$ ) antisense probe. And the expression of TGF- $\beta$  was shown in macrophages stimulated with silica after 12 hours by digoxigenin-labelled TGF- $\beta$ DNA probe (D, 100 $\times$ )

자극시 anti-IL-1 $\beta$  antibody 10  $\mu$ g/ml은 TGF- $\beta$ 의 생성을 증가시키는 경향을 보였고( $p > 0.05$ ) anti-IL-6 antibody 10  $\mu$ g/ml과 anti-TNF antibody 10  $\mu$ g/ml은 각각 단독으로도 silica에 의한 TGF- $\beta$ 의 생성능을 억제시킴을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ ). Anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$  antibody 모두를 동시에 투여하였을 때도 silica에 의한 TGF- $\beta$ 의 생성능을 억제시킴을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3B).

#### 4. In situ hybridization의 결과

Silica의 농도와는 관계없이 antisense probe IL-1 $\beta$

의 mRNA는 silica 자극 2시간 이후 부터 관찰되기 시작하였으며, 24시간 까지 계속적으로 관찰되었다 (Fig. 4A). IL-1 $\beta$  sense probe에서는 음영이 전혀 관찰되지 않았다.

IL-6의 경우 silica의 농도에 관계없이 antisense probe로 hybridization 시키면 mRNA의 발현이 4시간째 부터 나타나기 시작하여 12시간째 부터는 발현이 소실되는 소견을 보였다(Fig. 4B). TNF- $\alpha$ 의 경우는 2시간째부터 mRNA의 발현을 관찰할 수 있었고 silica로 자극한 경우와 자극하지 않은 모든 slide에서 관찰되었으며, 특히 저농도 (0.2  $\mu$ g/ml)의 silica로 자극하였을 경우 갈색의 음영이 더욱 현저하게 관찰되었다. 이후 4, 8시간째는 갈색의 음영이 감



소하다 12시간 쯤은 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 4C).

TGF- $\beta$ 의 경우는 silica로 자극하거나 silica로 자극하지 않은 양자 모두에서 12시간째 mRNA의 발현이 가장 강하게 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). IL-1 $\beta$ , IL-6를 각각 단독으로 자극시 silica 단독자극에 비하여 TGF- $\beta$ 의 mRNA 발현이 증가되지 않았지만, TNF- $\alpha$ 를 단독으로 자극시는 12시간째 현저한 증가를 관찰할 수 있었다. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 모두 같이 자극시키거나, 혹은 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 IL-6, TNF- $\alpha$ 를 동시에 자극시는 TNF- $\alpha$  단독으로 자극한 결과와 유사하였다. Anti-IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  antibody를 각각 투여하거나 혹은 세가지를 동시에 투여할 경우에는 silica 단독으로 투여한 경우와 차이점이 없었다.

## 고 찰

Silica 입자에 의해 발생하는 염증반응에는 폐포대식세포가 중요한 역할을 하며 silica를 탐식한 폐포대식세포는 eicosanoid metabolite, destructive proteolytic enzyme, inflammatory growth factor 등의 매개물을 분비하여 염증반응을 일으키며 염증반응의 치유화 과정에서 섬유아세포의 증식과 조직의 회복에 필요한 교원질의 합성 및 침전으로 폐섬유화증이 발생한다. 폐의 경우, 세균 감염에 의한 폐농양의 치유 이후에서는 과도한 교원질의 침착이 없지만, silica와 같은 비정상적인 자극들 즉, 방사선, 섬유축진성 먼지, 독성 물질, 과산소증 (hyperoxia), 산소기 (oxidants), 항대사제 (antimetabolites) 등에 의한 폐장내 세포손상시에는 혈관 투과성이 증가하게 되고 이어서 백혈구의 주화 및 활성화가 나타나며, 궁극적으로 치유 과정에서 섬유모세포의 활성화를 초래하여 비정상적인 교원질의 침착이 발생하게 된다<sup>20</sup>. 이 과정에서 silica를 탐식한 대식세포에서 분비되는 cytokines의 역할은 폐섬유화의 발생과 유지에 중요한 역할을 한다. Borm 등은 석탄광부의 말초혈액단구를 내독소

나 silica와 같은 무기입자로 자극하였을 때 정상인에 비하여 TNF의 분비가 현저히 많이 분비됨을 관찰하였고<sup>21</sup> Piguert는 silica에 의해 폐섬유화증이 유발된 mouse의 폐장내에서 TNF mRNA의 발현이 증가하며 같은 실험에서 TNF에 대한 중화항체에 의해 silica에 의한 교원질의 침착이 완전히 억제됨을 관찰하여 TNF가 silica에 의한 폐장의 섬유화 발생에 중요한 역할을 할 것으로 추정하였다<sup>9</sup>. 본 연구에서도 silica로 폐장 대식세포를 자극시 TNF- $\alpha$  mRNA가 초기 2시간째부터 빠르게 발현이 되어 4시간째 대부분의 세포가 강한 양성 음영을 보여 주었고, 세포 배양상청액내의 단백질양은 농도에 따른 차이는 있지만, silica 자극 후 4시간째 최대로 증가하는 소견을 보여 주어 silica 자극시 단구세포에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 이루어질 뿐 만 아니라 분비의 시기가 다른 cytokine에 비해 조기에 발현됨을 확인 하였다. 그러나, Piguert의 실험에서는 섬유화에 관여할 것으로 추정되는 TGF- $\beta$ mRNA의 발현의 변화를 관찰하지 못하였는데, Williams 등은 rat의 폐장내 silica 투여 후 면역조직화학염색을 시행한 시험에서 TGF- $\beta$ 1이 규산결절 주위의 대식세포와 섬유모세포 내에서 TGF- $\beta$ 1의 발현을 관찰하여 silica에 의한 섬유화과정에서 TGF- $\beta$ 가 관계함을 시사하였다<sup>11</sup>. 본 연구에서도 silica 자극 후 24시간째, 모든 농도에서 증가하여 단구세포에서 silica에 의해 TGF- $\beta$ 의 생성이 증가됨을 확인하였고 그 시기는 proinflammatory cytokine인 IL-6나 TNF- $\alpha$ 의 증가 후에 증가되어 TGF- $\beta$ 의 생성은 초기 염증반응 보다는 후기의 염증반응 즉, 섬유화 과정에 관여할 것으로 추정된다. Williams 등의 실험에서도 TGF- $\beta$ 의 발현은 규폐결절이 형성된 곳에서 증가되므로 TGF- $\beta$ 는 silica 자극 후 초기 염증반응기보다는 후기의 섬유화 과정에 관여할 것으로 추정되었으나, silica 투여 후 초기부터 규폐결절이 형성되어지는 시기까지의 시간적 변화에 따른 cytokine의 역동관계에 대한 언급이 없어 폐섬유화과정에서 TGF- $\beta$ 의 기능을 이해하기 위해서는 생체 (in vivo) 실험을 통한 TGF- $\beta$ 의 시간적 변화를 아는 것이 필요할

것이다. 본 연구에서는 silica에 의한 단구세포의 TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 의 분비는 시간적인 차이를 보였는데 이는 silica에 의한 폐섬유화과정의 초기염증반응에 관여하는 proinflammatory cytokines와 섬유화 cytokine인 TGF- $\beta$ 의 형성과정에서의 상관관계가 있음을 시사하는데 이에 대한 상호 관련성은 극히 일부만이 알려져 있다<sup>9,10</sup>. IL-1 $\beta$ 은 IL-6의 분비를 유발하며 IL-6는 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제 하여 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 가 서로 상호작용을 하는 염증반응을 거쳐 섬유화과정이 진행된다. 또한 TGF- $\beta$ 의 형성에 대한 proinflammatory cytokine의 역할은 아직 정확히 알려져 있지 않으나 Phan과 Kunkel<sup>22</sup>)은 rat에 bleomycin을 투여한 후 TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 에 관한 역동학 실험에서 초기에 TNF- $\alpha$ 가 증가되고 이어 TGF- $\beta$ 의 mRNA와 단백질이 증가되는 것으로 보아 TNF- $\alpha$ 가 TGF- $\beta$ 를 증가시킬 것을 시사 하였다. 본 연구에서도 IL-1 $\beta$ , IL-6는 TGF- $\beta$ 의 생성에 영향을 미치지 않았으나 TNF- $\alpha$  전처치시에는 TGF- $\beta$ 의 자연생성능을 증가시키고, silica와 동시에 자극한 경우에도 TGF- $\beta$ 의 생성이 증가하였다. 또한 이를 확인하기 위한 중화항체 실험에서도 TNF- $\alpha$ 에 대한 중화항체는 silica에 의한 TGF- $\beta$ 의 생성능을 억제시켜 TNF- $\alpha$ 가 TGF- $\beta$ 의 생성에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 TNF- $\alpha$ 의 TGF- $\beta$ 에 대한 생성은 in situ hybridization에서 TNF- $\alpha$  전처치시 TGF- $\beta$  mRNA 발현이 증가하는 결과를 보여 TNF- $\alpha$ 의 TGF- $\beta$ 에 대한 작용은 직접적인 유전자 발현과정에서 이루어 질 것으로 추정되나 silica 단독자극에 의한 TGF- $\beta$  mRNA 발현과의 감별 실험을 보다 확실하게 할 필요가 있을 것으로 사료된다. IL-6는 매우 다양한 기능을 가지고 있는 proinflammatory cytokine으로 단구세포에 대한 adhesion molecule을 활성화시켜 폐장내 침윤을 증가시키고<sup>23</sup>, 특히 진폐증에서는 자가면역질환의 발생과 관련이 있으며, collagen 합성에도 관여하여<sup>24</sup> 폐섬유화증에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 그러나 일부에서는 항염증작용을 보인다는 보고도 있어<sup>25</sup> 폐섬유화증에서 IL-6의 정확한

기능은 아직 확실치 않다. 본 실험에서도, IL-6는 silica 자극에 의해 단구세포내에서 형성은 증가되었으나 TGF- $\beta$  생성에 대한 단독자극실험과 중화항체실험에서는 상반된 결과를 보여주고 있어 IL-6의 정확한 역할을 여기서는 알 수가 없었다. 또한 Aderka 등<sup>10</sup>)과는 달리 TNF에 대한 IL-6억제 효과를 관찰할 수 없어 IL-6는 자극이나 질환에 따라 기능적 차이가 있을 것으로 추정된다.

결론적으로 silica자극에 의해 폐장대식세포는 IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 가 순서적으로 분비하며 자극 초기에는 TNF- $\alpha$ 가 가장먼저 형성되고 후기에 TGF- $\beta$ 가 형성되고 TGF- $\beta$ 의 형성에는 TNF- $\alpha$ 가 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다.

## 요 약

### 연구배경 :

유리규산(silica) 자극에 의해 폐장내 대식세포에서 형성되는 proinflammatory cytokines인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 fibrogenic cytokine인 TGF- $\beta$ , PDGF는 섬유화 과정에 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 cytokine의 역할과 상호관련성에 대해서는 아직 확실히 밝혀진 바 없다. 본 연구는 Balb/C mouse의 폐장단구세포를 silica로 자극시 형성되는 IL-6, TNF- $\alpha$ 와 폐섬유화의 발생과 유지에 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 TGF- $\beta$ 의 생성을 관찰하고 TGF- $\beta$ 의 생성에 proinflammatory cytokine이 미치는 영향에 대해서 알아 보고자 하였다.

### 방 법 :

Balb/C의 폐장대식세포를 silica로 자극한 후 IL-6, TNF- $\alpha$  TGF- $\beta$ 의 양을 bioassay로 측정하였고 mRNA의 발현을 in situ hybridization을 통해 관찰하였으며, 대식세포의 TGF- $\beta$  생성에 대한 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 영향을 알기 위하여 L-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 에 대한 중화항체를 이용하여 대식세포의 TGF- $\beta$ 의 생성 억제 유, 무를 관찰하였다.

결 과 :

Silica로 대식세포자극시 TNF- $\alpha$ 는 초기 4시간째 최고의 생성능을 보였으며, IL-6는 silica 0.2  $\mu$ g/ml의 농도에서 배양 8 시간째 생성능이 가장 높았고 배양 12시간째는 다시 감소하였다가 24시간째 증가하는 biphasic한 소견을 보여 주었다. TGF- $\beta$ 는 silica의 양과 관계없이 배양 24시간째 자연생성능뿐 아니라, silica로 자극시에도 증가되었다. Silica와 TNF- $\alpha$  50ng/ml을 함께 자극시 TGF- $\beta$ 의 생성은 현저히 증가되었으며, TNF- $\alpha$  50 ng/ml과 IL-6 50 ng/ml으로 동시 자극시에는 TNF- $\alpha$ 에 의한 TGF- $\beta$ 의 형성이 증가하는 경향을 보였다. TNF- $\alpha$ 의 중화항체를 전 처치 후 silica 자극시 TGF- $\beta$ 의 생성능을 억제시킴을 관찰할 수 있었다. Anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$  antibody 모두를 동시에 투여하였을 때도 silica에 의한 TGF- $\beta$ 의 생성능을 억제시킴을 관찰할 수 있었다. Silica 자극 후 대식세포의 in situ hybridization에서 TNF- $\alpha$  mRNA는 2시간째부터 발현되었고 IL-6 mRNA는 4시간째부터 발현된 후 8시간째 소실되었고 TGF-mRNA는 12시간째 가장 강한 발현을 보였다.

결 론 :

Silica 자극에 의해 폐장대식세포는 자극 초기에는 TNF- $\alpha$ 가 가장먼저 형성되고 후기에 TGF- $\beta$ 가 형성되며 TNF- $\alpha$ 가 TGF- $\beta$ 형성에 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Ziskind M, Jones RN, Weil H. Silicosis. Am Rev Respir Dis 133 : 643-65, 1976
2. Lee JS, Kim SY, Kang HS, Yoon SR, Lee CE, Pyun KH. The role of monokines in the development of silicosis. Korean J Internal Med 43 : 79-89, 1992
3. Schmidt JA, Oliver CN, Lepe-Zuniga JL, Green I, Gery I. Silica-stimulated monocytes release fi-

- broblast proliferation factors. J Clin Invest 73 : 1462-72, 1984
4. Davis GS. Pathogenesis of silicosis. Current concepts and hypothesis. Lung. 164 : 139-154, 1986
5. Vanh e D., Gosset P, Boitelle A, Wallaert B, Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. Eur Respir J. 8 : 834-842, 1995.
6. Jaishree J. Raymond B., Andre D. S. Gosawami, Theodore C. Lee, William N. Rom. Am J Respir Crit Care Med 154 : 1076-1081, 1996.
7. Ray A, Tatter S, May L, Sehgal P Activation of the human beta2-interferon/hepatocyte - stimulating factor/interleukin 6 promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. Proc Natl Acad Sci 85(18) : 6701-6705, 1988
8. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Sappino AP, Vassalli P. Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. Nature 344 : 245-47, 1990
9. Navarro S Debili N, Bernaudin JF, Vainchenker W, Doly J. : Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. J Immunol 1989; 142 : 4339-4345.
10. Aderka D, Le J, Vilcek J. : IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced TNF production in cultured human monocytes, U937 cells and in mice. J immunol 1989 ; 143 : 3517-3523.
11. Williams AO, Flanders KC, Saffiotti U. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in rats with experimental silicosis, alveolar type II hyperplasia, and lung cancer. Am J Pathol 142 : 1831-40, 1993
12. Dauber GH, Rossman MD, Pietra GG, Jimenez SA, Daniele RP. Experimental silicosis : Morphologic and biochemical abnormalities produced by intratracheal instillation of quartz into guinea pig

- lungs. *Am J Pathol* 101 : 595-612, 1980
13. Denholm EM, Wolber FM. A simple method for the purification of human peripheral blood monocytes. A substitute for Sepracell-MN. *J Immunol Methods* 22 : 144(2) : 247-251, Nov, 1991
  14. Wang AM, Creasey AA, Landner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdell JN, Yamamoto R, Mark DF: Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228 : 149-154, 1985
  15. Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PM : Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17 : 1411-1416, 1987
  16. Garrigue-Antar L, Barbieux I, Lieubeau B, Boisteau O, Gregoire M. Optimisation of CCL64-based bioassay for TGF- $\beta$ . *J Immunol Methods* 186(2) : 267-274, 1995.
  17. Tautz D, Hulskamp M, Sommer R.J. Whole mount in situ hybridization in *Drosophila*. In *in situ hybridization*, Wilkison DG Ed., Irl Press, New York, pp 61-73, 1992.
  18. Kessler C, Holtke H-J, Scibl R, Bugr J, Muhlegger K. Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids : I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system). *Mol Gen Hoppe-Seyler* 371 : 917-27, 1990
  19. Patel NH, Goodman CS. DIG-labelled single-stranded DNA probes for in situ hybridization. In nonradioactive labelling and detection of biomolecules, Kessler C Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 377-81, 1992
  20. Rochester CL, Elias JA. Cytokines and cytokine networking in the pathogenesis of interstitial and fibrotic lung disorders. *Seminar in Respir Med* 14 : 389-416, 1993
  21. Borm PJA, Pamen N Engelen JIM, Buurman WA. spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) from blood monocytes of miners with coal worker's pneumoconiosis. *Am rev Respir Dis* 138 : 1589-1594, 1988
  22. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 18 : 29-43, 1992
  23. Miyasaka N, Sato K, Hashimoto J, Kohsaka H, Yamamoto K, Goto M, Inoue K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Nishioka K. Constitutive production of interleukin-6/B cell stimulatory factor-2 from inflammatory synovium. *Clin immunol Immunopath* 52 : 238-47, 1989
  24. Choi I, Kang HS, Yang Y, Pyun KH. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin Exp Immunol* 95 : 530-535, 1985
  25. 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 Leukoc Biol* 52 : 197-201, 1992