

흰쥐 폐의 분화과정에서 폐포막내 Fibronectin발현에 대한 면역조직학적 연구

문 광 덕* · 지 행 옥** · 정 호 삼***

=Abstract=

An Immunohistological and Immunogold Study on the Fibronectin Reactions in Rat Lung Differentiation

Kwang Deok Moon, M.D.* · Heng Ok Jee, M.D.* · Ho Sam Chung, M.D.*

Background: Fibronectins(FN) are large, dimeric glycoproteins present in the plasma, loose connective tissues, and some basal lamina in vivo and synthesized by a number of cells in vitro, including lung fibroblasts, and alveolar macrophages. FN can affect the migration, proliferation, differentiation, and even apoptosis of various cell types, all considered necessary for organogenesis. This study was undertaken to detect the changes of localization and activity of FN, a glycoprotein molecule, in stages of lung differentiation in rats. **Material and Method:** The experimental animals(Sprague-Dawley strain) were divided into 8 groups, a control group(adult male rats), and experimental groups of 17th day fetus, 20th day fetus, first day newborn, second day newborn, 3rd day newborn, 5th day new born, 7th day newborn. We used the immunohistological stain method with gold particle to obtain the data for distribution of FN in the alveoli, blood vessels, terminal bronchioles, alveolar macrophages and type II pneumocytes. This study revealed the FN reactions at the light and electron microscopic levels. **Result :** At 17th day fetal stage, FN reactions in fetal lung were strong on the blood vessels and moderate on the stroma. At 20th day fetal stage, FN reactions were strong on the blood vessels. After birth, FN reactions in alveolar basement membrane were maximum in the 5th and 7th day newborns. FN reactions in the blood vessels were observed to be moderate in first and second day newborns, but decreased in third day newborns. FN reactions in alveolar macrophages increased after birth. FN reactions in terminal bronchioles gradually increased after birth. 6. In type II pneumocytes, FN reactions were observed to be moderate in 1st and 3rd day newborns. **Conclusion:** Immunohistochemical analysis of rat lungs at various developmental stages revealed increased

*아주대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ajou University School of Medicine.

**한양대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Hyayang University School of Medicine.

***한양대학교 의과대학 해부학교실

Department of Anatomy, Hyayang University School of Medicine.

본 논문은 98년 10월 22일 제30차 흉부외과 가을학회에서 구연

논문접수일 : 99년 3월 11일 심사 통과일 : 99년 10월 12일

책임저자 : 문광덕, (442-749) 수원시 팔달구 원천동 산 5번지, 아주대학교 의과대학 흉부외과학교실.

(Tel) 0331-219-5210, (Fax) 0331-219-5215

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

deposition of FN during the pseudoglandular stage of lung development, coinciding with the period of branching morphogenesis. Also, FN is released from type II pneumocytes. This observation, together with the strategic location of FN, suggests a role in airway formation.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1999;32:1078-86)

Key word : 1. Fibronectin

서 론

생체 조직에서 세포와 세포외기질을 결속시키거나 세포와 조직구조물을 연결시키는 접착분자(adhesive molecule)에 대한 연구는 활발히 전개되고 있으며, 특히, 발생과 분화과정에서 주요관심의 대상이 되고 있다. 그중 fibronectin(FN)은 섬유모세포, 골세포, 상피세포 및 내피세포 등 발생계열이 같은 세포에서 분비되는 주요 표면 당단백으로 알려져 있고 조직내 지질(stroma)의 구성에 주요한 촉매제이며 세포와 조직의 분화, 성장, 이동, 접속 및 재형성에 필요한 물질로 해부조직학 및 병리학의 주요한 연구대상이 되고있다. FN은 asparaginyll에 oligosaccharide chain을 가진 220,000 dalton의 monomer로 합성된 단백질이 disulfide로 연결된 중합체(dimer)이며 세포의 표면 및 세포외기질에 결합되어 있다고 알려져 있다. FN이 섬유모세포에서 합성되어 분비된다는 것은 Yamada 등¹⁾, Fleischmajer 및 Timpl²⁾, Furcht 등³⁾, Nordahl 등⁴⁾ 여러 학자들의 동물실험적 연구에서 밝히고 있고 생체조직의 재형성(remodeling), 질병에 의한 조직병변시 조직내 증가하는 현저하다고 하였다.

FN은 정상적인 폐조직에서 폐포의 기저막과 모세혈관 등과 아교섬유와 결속되어 있고 폐포내 소기관지 및 기관에서 평활근의 기저층과 결속되어 있음이 밝혀져 있다. 이러한 FN은 정상적인 폐포가 아닐때는 보다 많은 양이 폐포내에서 발현된다고 Torikata 등⁵⁾이 보고하였고 Schoenberger 등⁶⁾은 폐 섬유화(pulmonary fibrosis)에 의해 폐포염(alveolitis)이 일어날 때는 폐포세척액(lung lavage fluid)에 FN이 증가된다고 하였으며, Lazenby 등⁷⁾은 흰쥐 기관지에 bleomycin을 투여하면 patchy pulmonary fibrosis가 유발되는데 이때 FN이 폐내에 축적된다고 하였다. Rom 등⁸⁾은 사람의 폐포내에 간질성폐질환(interstitial lung diseases)이 있을 때는 FN의 분비가 많아진다고 주장했다. Begin 등⁹⁾도 chryostile asbestos를 양에게 폭로한 결과 폐포염이 야기되고 FN이 증가되며, Kifune 등¹⁰⁾은 paraquat를 쥐의 폐포내 투여한 결과 폐포막이 두터워지는 간질성폐화(interstitial fibrosis)가 일어나며 이때 FN의 분비가 증가된다고 하였다.

이상과 같은 여러학자들은 폐질병시 및 실험적인 폐질병

유발시에 FN은 폐포내 증가되며 폐질병의 진단과 치료에 주요한 역할을 할 것이라고 주장해 왔다. Rosenkrans 등¹¹⁾은 흰 쥐 폐의 발생과 분화는 계속적인 형태적 변화이며 이러한 변화의 조절은 FN에 의해 주도된다고 하였으며, Crouch와 Longmore¹²⁾는 폐의 발생과 분화에 주요 역할을 하는 폐포의 기저막의 구조는 아직 잘 알려져 있지 않으나 FN이 그 중의 하나라고 했다. Arai 등¹³⁾은 폐의 발생은 세포와 기질의 상호 작용에 의해서 조절된다고 하였고, FN은 RNA splicing에 의해서 형성되는 다수의 유사체(isoforms)로 폐포 세포외기질의 주요성분이라고 했다.

이러한 폐의 분화에 주요 역할을 하는 FN은 어디에서 분비되는지에 대한 연구는 아직도 확실치 알려져 있지 않으나 폐포의 구성세포에서는 폐포대식세포(alveolar macrophage)가 가장 많은 양의 FN을 분비한다고 주장한 학자들이 많다 (Kinsella 등¹⁴⁾, Driscoll 등¹⁵⁾, Ozaki 등¹⁶⁾, Rom 등⁸⁾, Schoenberger 등⁶⁾).

한편, 폐포대식세포가 폐포의 세척액(lavage fluid)을 분비한다는 것은 이미 잘 알려져 있으나 큰폐포세포(type II alveolar cell)가 FN을 분비할 것이라고 주장한 학자도 있다 (Crouch 및 Longmore¹²⁾). 따라서, 저자는 신생아기에 폐포의 분화과정과 FN의 발현과의 관계를 추구하고자 하였으며, 이때 FN을 분비하는 세포는 폐대식세포 이외의 폐포실질세포들 중에서도 일어나는지 여부를 면역도금법을 이용한 전자현미경으로 증명하고자 본 연구에 착수하였다.

대상 및 방법

본 실험에 사용된 실험동물은 한양대학교 의과대학 청정 동물실에서 사육한 SPF (specific pathogen free)의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 교배하여 얻은 동일배의 태아와 신생 흰쥐로서 태아의 흰쥐는 임신 시작부터 17일, 20일군으로 구분하고, 신생흰쥐는 출생일을 기준으로 하여 1일, 2일, 3일, 5일 및 7일된 경과군으로 나누었다. 대조군으로는 동일한 계열의 200g 내외의 8주된 흰쥐를 사용하여 각 군당 5마리씩 배당하였다.

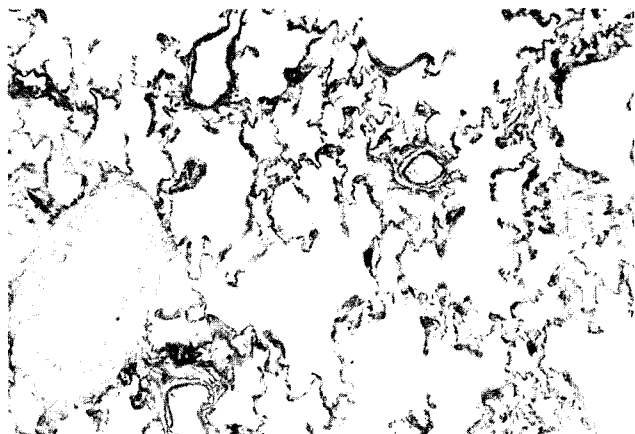


Fig 1. Photographs of normal adult rat lungs. Strong FN reactions are seen in alveolar septum, blood vessels and macrophages. Only the epithelial cells of bronchioles revealed no FN reactions. (Immune stains, X 200)

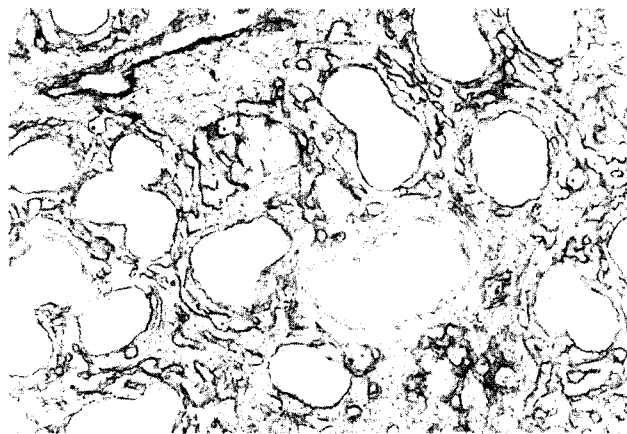


Fig 2. Photographs of 17 day fetus rat lung. The strong FN reactions are seen in the blood vessels and interstitial connective tissues showed moderate FN reactions. (Immune stains, X200)

1. 면역조직염색법

각 실험군과 대조군의 실험동물의 폐 조직절편은 FN의 분포 정도를 관찰하기 위하여 0.1% glutaldehyde-4% paraformaldehyde 혼합용액(pH 7.4)으로 고정하고 5 μ m의 파라핀 절편을 제작하고 염색을 시행하였다. 탈파라핀 및 합수 과정을 거친 후 tris buffered saline(TBS) 용액에 세척하고 2~3% H₂O₂ methanol 용액에 5분간 반응시킨 다음 TBS 및 0.5% trypsin 용액에 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 적용하였다. 일차항체는 rabbit anti-rat fibronectin polyclonal antibody(Chemicon Int. Co.)를 1: 500으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응시켰으며 TBS로 세척하고 이차항체 biotinylated goat anti rabbit IgG (Vectastain, USA) kit로 30분간 반응시키고 TBS에 세척하였다. 발색은 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 이용하였으며, 1% methylene blue로 대조염색 후 탈수, 청명 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다. 면역조직반응이 확실한지 여부를 확인하기 위해 일차항체를 제외한 반응액으로 음성대조군의 염색을 시행하였다.

2. 금과립 첨가항체를 이용한 면역조직 염색법

제 1일, 제 3일 및 제 7일 경과군의 신생 흰쥐의 폐포에서 FN을 분비하는 세포가 어떠한 세포인지를 추적하기 위해 폐포세포 중 제 1형 폐포세포, 제 2형 폐포세포(큰폐포세포), 폐포대식세포 및 내피세포를 전자현미경으로 관찰하였다.

3개의 실험군과 대조군의 폐조직을 희생 즉시 세절하여 0.5% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde에 전고정하고 3% sucrose가 함유된 cacodylate buffer혼합용액(pH 7.4)으로 2시간

동안 후고정한 후 LR white로 포매하였다. 포매된 조직은 48시간 동안 43 $^{\circ}$ C에서 중합하여 nickel grid에 두께 60nm의 초박 절편을 제작하였다.

폐조직내 FN의 반응을 관찰하기 위해 1차 항체로 rabbit anti-rat fibronectin polyclonal antibody를 사용하여 bovine serum albumin이 첨가된 tris buffer로 1:20의 비율로 희석하여 2시간동안 실온에서 반응시켰으며, Tween 20 과 NaCl이 함유된 Gold particle conjugated biotinylated goat anti rabbit IgG를 이차항체로 사용하여 1시간동안 반응시켰다. 이어서 조직편은 tris buffer와 알콜증류수로 세척한 후 건조시켜서 uranyl acetate로 10분간 단일 염색하고 투과전자현미경(Hitach-600)으로 관찰하였다.

결 과

1. 폐장내 fibronectin 분포조건

1) 대조군

체중 200g의 성숙흰쥐의 폐조직에서 폐포의 분화가 포상으로 형성되고 폐포낭(alveolar sac)등이 분명하게 관찰되었으며, 종말세기관지(terminal bronchiole)의 상피세포도 비교적 긴 원주형세포를 나타내었고 폐포막의 굴절이 다수 관찰되었다. 모든 조직에서 FN반응이 강하게 관찰되었으며 종말세기관지 상피세포에만 FN 반응이 없었다(Fig. 1).

2) 실험군

17일 태아군의 폐조직에서는 혈관주위에는 강한 FN반응을 보였고 기질내에는 중등도의 반응이 나타났다. 기관에는 거의 반응이 없었다(Fig. 2). 20일 태아군의 폐에서는 혈관에 가

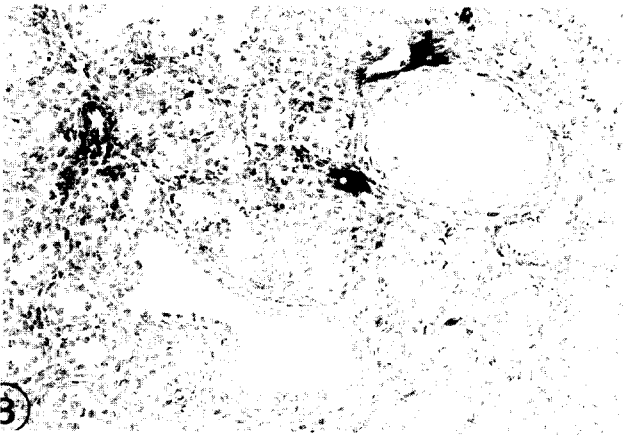


Fig. 3. Photographs of 20 day fetus rat lung. The strong FN reactions are seen in the blood vessels and interstitial connective tissues revealed the moderate FN reactions. (Immune stains, X200)

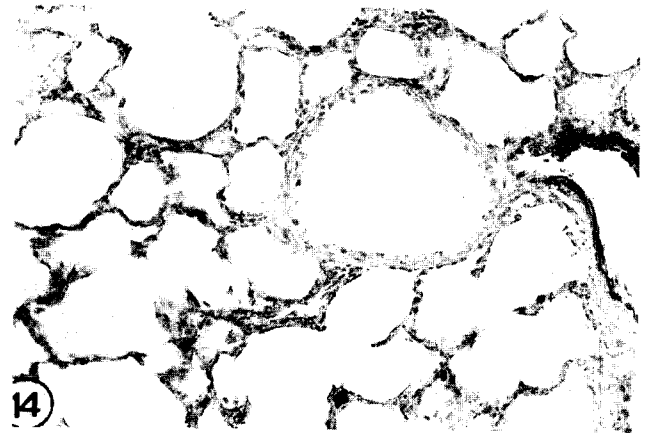


Fig. 5. Photographs of 2 day old newborn rat lung. Alveolar septa revealed the weak FN reactions, the blood vessels and alveolar macrophages showed moderate FN reactions. (Immune stains, X200)

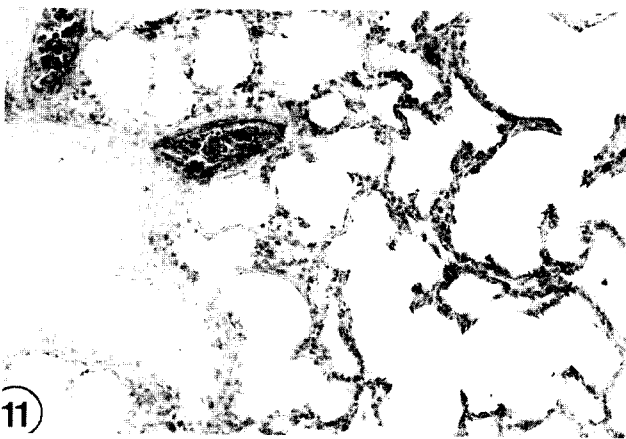


Fig. 4. Photographs of 1 day old newborn rat lung. The surface of alveoli showed mild FN reactions, moderate in blood vessels and alveolar macrophages. (Immune stains, X200)

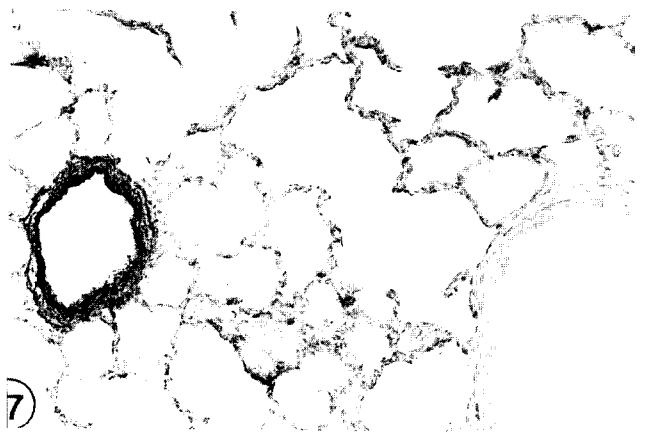


Fig. 6. Photographs of 3 day old newborn rat lung. FN reactions on the alveolar septa were moderate, blood vessels and alveolar macrophages revealed the strong reactions. (Immune stains, X200)

장 강한 반응이, 지질에 중등도의 반응이 나타났다(Fig. 3).

출생 제 1일군 폐의 폐포막은 폐포의 분화가 대조군에 비교하여 소수 분화되어 있었고 폐포막의 표면에만 미약한 FN 반응이 관찰되었으며, 다수의 세포가 응집되어 나타났다(Fig. 4). 출생 제 2일의 폐의 폐포막은 제 1일군의 것과 비슷한 분화가 관찰되었지만 폐포막내 다수의 세포에서 FN반응이 약한 양성으로 나타났고, 호흡기관지에서는 미약한 FN반응이 관찰되었다(Fig. 5). 출생 제 3일군의 흰쥐 폐에서 폐포의 분화는 거의 이루어졌으며 FN 반응은 혈관조직에서 가장 강하게 나타났고 폐포의 표면에 중등도의 반응을 보였으며, 한편, 세기관지에는 약한 반응이 나타났다(Fig. 6). 출생 제 5일군의 폐조직은 폐포, 기관지 등이 분화되어 있었으며, 폐포

막과 혈관에 중등도의 FN반응이 관찰되었고 기관지 상피세포와 폐포막의 일부 세포를 제외하고는 모든 조직 구조물에서 FN 반응이 중등도에 이르렀다(Fig. 7). 출생 제 7일의 폐조직은 성숙 흰쥐의 폐조직과 거의 같은 분화정도를 나타내었고 모든 조직에서 FN반응이 고루 강하게 나타난 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 8, Table 1).

2. 제 2 폐포세포(type II pneumonocyte)의 전자현미경 소견

대조군의 흰쥐의 폐포에서 제 2 폐포세포내 금과립의 분포는 소량 관찰되었으며 세포내 고루 분포되어 있었다(Fig. 9). 출생 제 1일 및 제 3일군에서는 대조군에 비교하여 다량의 금과립이 세포질과 미세융모에 까지 고루 분포되어 있었

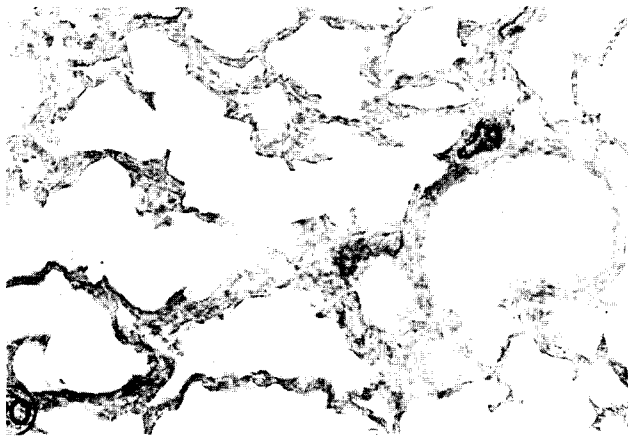


Fig. 7. Photographs of 5 day old newborn rat lung. Alveoli and bronchioles revealed moderate FN reactions and blood vessels and alveolar macrophages showed moderate FN reactions. (Immune stains, X200)

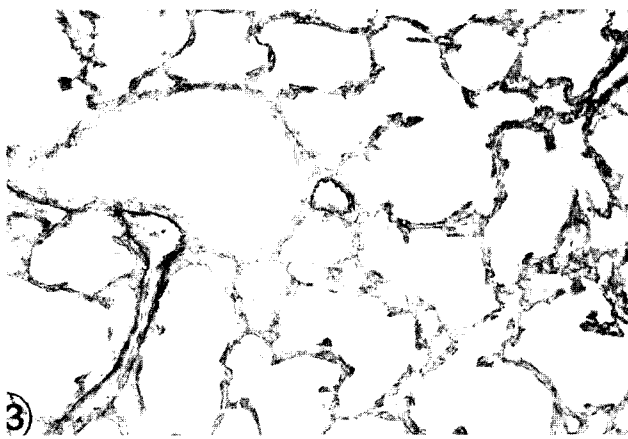


Fig 8. Photographs of 7 day old newborn rat lung. All alveolar septa and blood vessels revealed strong FN reactions, bronchioles and alveolar macrophages showed weak FN reactions. (Immune stains, X200)

다(Fig. 10). 출생 제 7일군에서는 세포질의 금과립의 분포가 현저하게 저하되었다(Fig. 11).

고 찰

폐의 발생과 분화는 태아기와 신생아기에서 급진적으로 이루어지고 이때 fibronectin의 활성이 큰 역할을 한다는 보고가 다수 있다. Rosenkrans 등¹¹⁾은 흰쥐의 폐 발생은 계속적인 형태적 변화이며 이러한 변화의 조정은 FN이 주도한다고 하였다. 흰쥐의 태아기, 신생아기 및 성숙기를 통하여 peroxidase-antiperoxidase방법으로 폐의 FN을 검색한 결과 모

Table. 1. Fibronectin reactions of alveolar septum, alveolar macrophages, type II pneumocytes and bronchioles in developing rat lung

	Alveoli	Blood Vessel	Terminal Bronchiole	Alveolar Macrophage	Type II Pneumocyte
17th day fetus	-	+++	++	-	-
20th day fetus	-	+++	+	-	-
1st day newborn	+	++	+	++	++
2nd day newborn	+	++	+	++	
3rd day newborn	++	+++	+	++	++
5th day newborn	+	++	+	++	
7th day newborn	+++	++	+	+	+
control	+++	+++	++	++	+

- no reaction + weak reaction ++ moderate reaction
+++ strong reaction



Fig. 9. An electron microscopic photograph of type II pneumocyte in the control rat lungs. Few gold particles are distributed in the cytoplasm. (Immunogold and uranyl acetate stain, X30,000)

든 시기에서 anti-fibronectin serum이 관찰되었지만 성숙 흰쥐의 폐조직에서는 FN이 폐포 표면(alveolar space)과 폐포 기저막(alveolar basal lamina)에 국한되어 있었으며 신생아기에는 폐포소관벽(pulmonary tubule wall)과 기저막, septal buds의 기

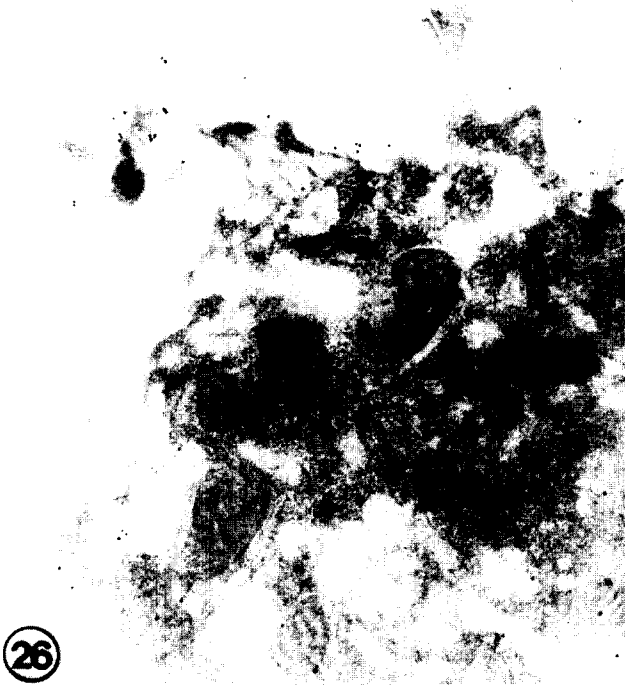


Fig. 10. Electron microscopic photographs of type II pneumocytes in 1 day old newborn rat lung. Few gold particles are seen in the microvilli, surface membrane and apical cytoplasm. (Immunogold and uranyl acetate stain, X30,000)



Fig 11. An electron microscopic photograph of type II pneumocyte in 7 day old rat lung. Scanty gold particles are seen in the cytoplasm. (Immunogold and uranyl acetate stain, X30,000)

저층에서 소량이 세포와 결합되어 있다고 하였다. 또, 이러한 실험결과는 FN이 아교질결합조직(collagenous connective tissue)의 축적을 위한 예비 기질로서 역할을 하며, 세포접착 단백질, 세포 이동을 위한 표면 결합물질(surface bound material)이라 할 수 있다고 했다. Ozaki 등¹⁶⁾은 FN은 폐에서 폐포대식세포에서 생성되고, 원인불명 폐섬유화(idiopathic pulmonary fibrosis)와 같은 폐질환에서 염증반응에서 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 폐포대식세포에서 FN의 분비기작을 아는 것은 폐질환의 원인 파악과 치료방법을 개발하는데 주요한 사항이라고 하였다. Wasowicz 등¹⁷⁾은 흰쥐 폐 발생의 마지막 부분인 결합조직 부분의 발생과정을 분석한 바 있다. 흰쥐 태아 17, 19, 21일령과 신생아 2, 4, 7, 10, 14, 21일 령을 이용하여 탄력섬유와 아교섬유 및 기저막에 관한 연구도 EM과 immuno-EM등을 이용하여 FN등을 연구하였다. 세포외 기질을 구성하는 결합조직의 분포와 분량(levels)의 변화와 폐포의 성숙과 형성을 결부하여 관찰하였던 바, 흰쥐 태아의 호흡기도의 말단에는 아교섬유, 탄력섬유가 함유되어 있고, 폐포의 기저막은 불완전하다고 하였다. 그러나 기저막, 아교섬유 및 섬유모세포 사이에서 강한 FN

의 반응이 있었다고 하였으며, 신생 흰쥐에서는 FN의 면역특수화는 약화되었고, 분포가 불규칙하였다고 주장했다.

Arai 등¹³⁾은 폐의 발생은 세포와 기질의 상호작용에 의해서 조절되어 왔으며, 특히, 기도의 분지와 폐포화(alveologenesis)에서 더욱 그러하다고 하였다. FN은 RNA splicing에 의해서 형성되는 다수의 유사체로 폐포의 세포외 기질의 주요 구성요소이며, 폐포의 상피세포의 분화에서 FN은 EDB segments가 제 2형 폐포세포(type II pneumocyte)로 분화에 조정 역할을 하고 태아의 폐조직의 기능적 성숙에 새로운 조직 화학적 표지로서 역할을 할 것이라고 하였다.

Rennard 등¹⁸⁾은 사람의 폐장의 하부호흡기도에서 조직간질 폐염(interstitial lung disease)시 폐포대식세포가 FN 분비를 증가하여 폐섬유화를 촉진하는 지를 연구한 바 있다. 원인불명의 폐섬유증이 있는 환자에서 폐포대식세포는 정상 폐포대식세포가 생성하는 FN보다 30배 정도 높은 비율로 생성한다고 하였으며, 또 pulmonary sarcoidosis를 가진 환자에서 폐포대식세포는 정상세포에서 보다 10배 가까운 FN을 분비한다고 하였다. 사람의 폐포대식세포의 FN은 사람의 폐섬유모세

포에 대하여 화학 주행성을 갖고 있고, 폐포 구조의 조정에서 FN은 어떤 기능적인 역할을 하는 것으로 생각한다고 하였다. Torikada 등⁵⁾은 사람의 정상적인 폐에서 폐포벽의 모세혈관, 폐포상피의 기저막, 폐포벽내 간질의 아교섬유 등에서 FN이 분포되어 있지만 섬유증폐(fibrotic lung)에서는 폐포의 기저막에 강한 FN반응이 있었다고 하였다. 이러한 섬유증폐에서 FN의 분포와 함량의 현저한 증가는 사람폐의 섬유화(human lung fibrosis)에 동반한 폐포의 세포에서 FN 생성증가로 볼 수 있다고 하였다.

Baum 등¹⁹⁾, Gil 및 Martinez-Hernandez²⁰⁾ 및 Sage 등²¹⁾은 폐조직에서 FN은 in vivo 실험에서 소성 결합조직, 기저막 및 혈장 등에 존재하고, in vitro에서 많은 세포에서 생성된다고 주장했는데 이들 세포는 섬유모세포, 내피세포 및 제 2형 폐포세포 등이라고 하였다.

또한 이 FN은 몇 개의 세포와 세포외기질의 구성요소인 아교질, hyaluronate, fibrin, heparin sulfate에 결합하는 결합부위(binding site)를 갖고 있다고 하였다.

Stenman 및 Vaheri²²⁾는 면역 형광법을 이용하여 성인의 폐에서는 폐포기저막에 FN의 반응이 보인다고 처음 보고하였다. 그러나 Gil 및 Martinez-Hernandez²⁰⁾와 Rosenkrans¹¹⁾는 전자현미경을 이용하여 성숙흰쥐와 성장 중인 쥐에서 관찰한 바 기저막에서 FN은 거의 없거나 분명치 않다고 주장했다. Johard 등²³⁾과 Villiger 등²⁴⁾은 FN은 정상적인 폐에서는 폐포 세척액에 혼합되어 존재하고 대부분 FN은 폐포대식세포에서 분비된다고 주장하였다. Roman²⁵⁾은 폐발생과정에서 FN은 세포외기질에서 다량 발현되며, FN의 역할이 발생과정에 주요한 역할을 한다고 주장했다. In vitro에서 FN은 폐조직에서 폐포세포와 기질의 이동, 분화, 증식, 세포사멸(apoptosis)등에 영향을 주며 이런 것은 기관발생(organogenesis)를 위해 필요한 기능이라고 하였다. FN의 세포에 대한 영향은 기본적으로는 integrin속의 세포표면의 이종합수용체(heterodimeric receptors)에 의해 조정된다. 이들 수용체와 결합시키는 ligand는 유전자 전사(gene transcription)등 세포기능에 대한 어떤 변화와 관계있는 세포내로의 신호 활성을 시발시킨다고 주장했다. 배자의 면역조직학적 분석에 의하면 폐포 발생의 위선기(pseudoglandular stage)에 FN 축적의 증가가 관찰되었고, 이때 분지형태발생(branching morphogenesis)기와 일치되며, cleft site에서 다량 관찰되는 발생중인 기도 주위에 FN의 전략적 분포(strategic location)는 기도 형성에 하나의 역할을 의미한다고 하였다. 그러나 폐의 발생과정 중 이것을 제외하고 다른 부분에서 FN의 potential role에 대해서는 거의 알려지지 않지만, in vitro연구에서 FN은 혈관형성, 폐포상피세포의 분화, 폐의 성장 및 폐의 성숙에 영향을 미칠 것이라고 예상했다.

이상과 같이 FN이 폐장 발생과 분화시에 발현되어 폐장의 완전한 발생을 유도한다고 여러 학자들이 주장했으며, 또, 일부 학자들은 폐가 fibrotic lung이 되었을때 FN이 폐의 폐포막 표면에 대량 발현된다고 주장한 연구결과가 있었다. 또 대부분의 학자들은 폐포대식세포는 FN의 최대분비세포이고, 특히, 폐질병시에 거의 대부분의 FN을 생성한다고 주장했다(Lazenby 등⁷⁾ 1990, Driscoll 등¹⁵⁾ 1990, Schoenberger 등⁶⁾ 1984, Ozaki 등¹⁶⁾, Cordier 등²⁶⁾ 1990).

본 연구에서 제 17일 태아기부터 출생 제 7일까지의 신생아기까지 폐장조직내 FN의 발현은 혈관과 종말세기관지에는 초기에 강하게 나타났으나 폐포막에서는 분화가 진행될수록 점차 강하게 나타났다. 또, 제 2형폐포세포내 FN 반응은 폐포막의 형성시 다량 나타나고 점차 감소하였다. 폐포대식세포의 FN발현은 출생후 5일까지 계속 중등도의 반응이 지속되었다. 이와 같은 현상은 폐장의 분화시 각 구성조직과 세포내 FN발현은 분화의 완성시까지 차례로 계속됨이 관찰되었다. 이와 같은 현상은 Roman(1997)의 발생시 FN의 전략적 분포를 예측한 것과 맥을 같이 하는 것으로 폐포발생과 FN의 발현의 증가는 불가분의 관계가 있는 것으로 생각되었다. 그러나 Crouch 및 Longmore¹²⁾는 흰쥐의 폐포내 큰폐포세포(type II pneumocyte)를 배양한 결과 큰폐포세포에서 분비된 아교질 결합단백질(collagen-binding proteins)는 폐포의 기저막의 형성에 참여하고 세포외기질의 성분이며 이것이 FN이라고 암시하여 폐포에서 큰폐포세포가 FN을 분비한다고 가설을 주장했다. Yamada 등¹⁾은 계대의 섬유모세포를 배양하여 FN이 조면내형질세망과 골지체내에 합성된다는 것을 최초로 발표한 이후 Fleishmajer와 Timpl²⁾도 섬유모세포의 FN합성을 관찰하게 되었다. 따라서, 중배엽성세포인 골세포, 외배엽세포인 상피세포 및 신경교세포 등이 FN을 생성한다고 알려져 있다(Nordahl 등⁴⁾, Stenman 및 Vaheri²²⁾).

상기와 같은 학자들의 연구보고로 미루어 폐포내에서 형성되는 FN은 폐포대식세포와 섬유모세포에서 분비되는 것은 확실하다. 큰폐포세포의 FN 분비여부는 학자들간에 찬반양론이 있다. 본 연구에서는 금과립을 제 2차 항체에 첨가하여 면역조직염색을 시행하고 전자현미경표본을 만들어 uranyl acetate로 단회 염색하여 FN반응이 큰 폐포세포에서 있는지를 관찰한 결과 큰폐포세포의 세포질내에 반응이 있었다. 따라서, 흰쥐의 폐포의 발생과 분화 시기에서는 폐포내 FN을 분비하는 세포는 폐포대식세포, 섬유모세포 및 큰폐포세포일 것으로 확인되었다.

결론

포유동물인 흰쥐의 폐의 조직 분화과정에서 FN의 역할을

추구하기 위하여 흰쥐의 태자기 후반과 신생아기에서 FN 분비 정도와 FN을 분비하는 폐의 실질세포를 관찰하고자 면역조직염색법과 면역전자현미경적 방법을 이용하였다.

실험동물로는 건강한 SPF 암컷 흰쥐를 교배하여 얻은 태아와 신생아를 실험군으로 정하고 면역조직 염색을 시행하여 태아와 신생흰쥐의 발생에 따라 폐조직내 FN의 분포의 변화를 광학현미경을 이용하여 관찰한 결과와 폐조직의 분화시기에 제 2형 폐포세포에서 FN합성 여부를 추적하기 위해 면역도금법을 이용한 전자현미경으로 관찰한 결과로 흰쥐의 폐포의 분화과정이 계속되는 출생후 폐에서 FN의 분비는 7일 이내에 성숙흰쥐의 폐포내 반응과 비슷한 반응을 보이며, 이때 폐의 실질조직은 분화가 거의 완료되었을 것으로 사료되었고, 큰폐포세포에서도 FN이 분비되는 것으로 결론 지을 수 있다.

참 고 문 헌

1. Yamada SS, Yamada KM, Willingham MC. Intracellular localization of fibronectin by immunoelectron microscopy. *J Histochem cytochem* 1980;28:953-60.
2. Fleishmajer R, Timpl R. Ultrastructural localization of fibronectin to different anatomic structures of human skin. *J Histochem Cytochem* 1984;32:315-21.
3. Furcht LT, Smith D. Fibronectin presence in native collagen fibrils of human fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 1980;28:1319-33.
4. Nordahl J, Mengarelli-Widholms, Hultenby K, Reinholt FP. Ultrastructural immunolocalization of fibronectin in epiphyseal and metaphyseal bone of young rats. *Calcif Tissue Int* 1995;57:442-9.
5. Torikata C, Villger B, Kuhn C, et al. Ultrastructural distribution of fibronectin in normal and fibrotic human lung. *Lab Invest* 1985;52:399-408.
6. Schoenberger CI, Rennard SI, Bitterman PB, et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis. Role of the alveolitis in modulating the development of fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1984;128:168-73.
7. Lazenby AJ, Crouch EC, McDonald JA, Kuhn C. Remodeling of the lung in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. An immunohistochemical study of laminin, type IV collagen and fibronectin. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:206-14.
8. Rom WN, Bitterman PB, Rennard SI, Cantin A, Crystal RG. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1429-34.
9. Begin R, Dufresne A, Cantin A, et al. Quartz-exposure, retention, and early silicosis in sheep. *Exp Lung Res* 1990;15:409-28.
10. Kifune K, Takatsu A, Shigeta A, Kuniyoshi N. Scanning electron microscopic study of rat lungs in experimental chronic paraquat poisoning. *Nippon Hoigaku Zassi* 1990;44:302-13.
11. Rosenkrans WA Jr, Albright JT, Hausman RE, Penny DP. Light microscopic immunocytochemical localization of fibronectin in the developing rat lung. *Cell Tissue Res* 1983;233:113-23.
12. Crouch E, Longmore W. Collagen-binding proteins secreted by type II pneumocytes in culture. *Biochem Biophys Acta* 1987;924:81-6.
13. Arai H, Hirano H, Mushike S, Nakayama M, et al. Loss of EDB+ fibronectin isoform is associated with differentiation of alveolar epithelial cell in human fetal lung. *Am J Pathol* 1997;151:403-12.
14. Kinsella MB, Smith EA, Miller KS, LaRoy EC, Silver RM. Spontaneous production of fibronectin by alveolar macrophages in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1989;32:577-83.
15. Driscoll KE, Maurer JK, Lindersmidt RC, et al. Respiratory tract responses to dust ; relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;106:88-101.
16. Ozaki T, Moriguchi H, Nakamura Y, Kamei T. Regulatory effect of prostaglandin E2 on fibronectin release from human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1990;141: 965-9.
17. Wascowicz M, Yokoyama S, Kashima K, Makavama I. The connective tissue compartment in the terminal region of the developing rat lung. An ultrastructural study. *Acta Anat Basel* 1996;156:268-82.
18. Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage : mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7147-51.
19. Baum BJ, McDonald JA, Crystal RG. Metabolic fate of the major cell surface protein of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;79: 8-15.
20. Gil J, Martinez-Hernandez A. The connective tissue of the rat lung: electron immunohistochemical studies. *J Histochem Cytochem* 1984;32:230-8.
21. Sage H, Farin FM, Striker G, Fisher AB. Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of extracellular matrix. *Biochemistry* 1983;22:2148-55.
22. Stenman S, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978;147:1054-9.
23. Johard U, Ekland A, Dahlqvist M, et al. Signs of alveolar inflammation in non-smoking Swedish wood trimmers. *Br J Ind Med* 1992;49:428-34.
24. Villiger B, Kelley DG, Engleman W, et al. Human alveolar macrophage fibronectin: Synthesis, secretion and ultrastructural localization during gelatin coated latex

particle binding. J Cell Biol 1981;90:711-24.

25. Roman J. Fibronectin and fibronectin receptors in lung development. Exp Lung Res 1997;23:147-59.

26. Cordier G, Cozon G, Greeland T, Rocher F. In vivo activation of alveolar macrophage in ovine lentivirus infection. Clin Immunol Immunopathol 1990;55:355-67.

=국문초록=

배경: 폐포내 fibronectin(FN)의 분포와 역할은 많은 연구자에 의하여 연구되어 왔다. 흰쥐에서 폐의 분화 시 FN은 태자에서 폐포의 기저막에 주로 분포되고 간엽조직에서도 관찰되며, 분화가 진행되면 폐포막의 간질조직에 FN의 함량이 높아진다. 또, FN은 일반적으로 폐포대식세포(alveolar macrophage)에서 분비되고 폐에 질병이 발생하였을 때 다량의 FN이 폐포대식세포에서 분비된다고 보고되어 있다(Schoenberger 등 1984; Ozaki 등 1990; Rom 등 1987; Cordier 등 1990). 저자는 흰쥐의 폐포발생이 진행중인 폐포기 후반에서의 폐포막내 정상적인 FN의 분포의 변화와 폐포를 구성하는 큰폐포세포(type II pneumocyte)에서의 FN의 분비여부를 면역조직염색법과 전자현미경을 이용하여 추적하고자 하였다. **실험대상 및 방법:** 청정 동물실에서 사육한 SPF 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 임신시켜 질도말법을 이용하여 태령을 정한 뒤 태아 제 17일 및 20일, 출생 제 1일, 2일, 3일, 5일 및 7일의 신생흰쥐를 실험동물로 사용하였으며 대조군의 흰 쥐는 체중 200g의 건강한 수컷을 사용하였다. 흰쥐의 폐조직은 면역조직염색을 위해 rabbit anti rat fibronectin polyclonal antibody를 일차항체로, biotinylated goat anti rabbit IgG를 이차항체로 사용하여, 폐실 질세포내 FN의 분포를 LM으로 관찰하였고, 한편, 폐포막을 구성하는 세포 중 큰폐포세포가 FN을 분비하는 세포인지를 추적하기 위해 금과립을 첨가한 항체를 사용하여 큰폐포세포내 FN의 분포를 EM을 이용하여 추적한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

결과: 제 17일 및 20일 태아시기의 폐에서는 혈관주위에 강한 FN반응이 관찰되었다. 출생후 폐포막의 FN의 활성은 출생후 5일 및 7일에 최고조에 달했다. 출생 직후 1~2일경에 혈관의 조직내 FN의 활성이 양성을 나타내지만 3일 이후 활성이 감소되었다. 폐포대식세포내 FN의 활성은 출생후 증가되었다. 폐조직내 소기관지의 FN의 활성은 출생후 완만하게 상승되었다. 큰 폐포세포는 출생 1~3일에 일정량의 FN 반응이 세포질과 미세용모내에 관찰 되었다.

결론: 이상과 같은 결과로 흰쥐의 폐포의 분화과정이 계속되는 출생후 폐에서 FN의 분비는 7일 이내에 성숙흰쥐의 폐포내 반응과 비슷한 반응을 보이며, 이때 폐의 실질조직은 분화가 거의 완료되었을 것으로 사료되었고, 큰폐포세포에서도 FN이 분비되는 것으로 결론지을 수 있다.

중심단어 : 1. Fibronectin