

Paraquat의 편측 기관지 주입에 의해 유발된 폐섬유화증에서 Cyclophosphamide와 Methylprednisolone의 투여에 따른 Endothelin-1의 발현의 변화

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*

이소라, 정혜철, 김경규, 이상엽, 이신형, 조재연, 심재정, 인광호, 최종상*, 유세화, 강경호

= Abstract =

The Effects of Treatment with Cyclophosphamide and Methylprednisolone on Expression of Endothelin-1 in Unilateral Instillation of Paraquat-induced Pulmonary Fibrosis in Guinea Pigs

So Ra Lee, M.D., Hye Cheol Jeong, M.D., Kyung Kyu Kim, M.D., Sang Youb Lee, M.D.,
Sin Hyung Lee, M.D., Jae Youn Cho, M.D., Jae Jeong Shim, M.D.,
Kwang Ho In, M.D., Jong Sang Choi, Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine and Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : The herbicide paraquat can cause severe lung injury and fibrosis in experimental animals. In this study we have investigated the changes in lung endothelin-1(Et-1) levels and immunohistochemical localization in relation to treatment with cyclophosphamide and methylprednisolone in paraquat induced pulmonary fibrosis in guinea pigs.

Material and methods : 29 male Hartley guinea pigs were divided into 4 groups. Group I was normal control. Paraquat was instilled into the lung of guinea pig of group II, III and IV unilaterally. Group II was treated with cyclophosphamide and methylprednisolone. Group III was treated with methylprednisolone. Group IV was not treated. The degree of fibrosis was evaluated by H-E stains and Masson's trichrome stains and cell activity was assessed by Et-1 immunohistochemical stains. Statistical evaluation was performed using the Kruskawallis oneway analysis.

Results : Paraquat induced an increase in numbers of fibroblasts and total amount of lung collagen in Group IV compared to the normal controls. There was no significant difference in total numbers of fibroblasts between any of paraquat instilled groups, but there was significant increase in total amount of collagen in Group IV compared to group II and III ($p < 0.05$). The treatment of cyclophosphamide and methylprednisolone suppressed the growths of both fibroblasts and collagen, but this suppression was stastically significant only in the case of

collagen. Et-1 immunoreactivities of bronchial epithelium, type II pneumocytes, endothelial cells and fibroblast in group II and III were decreased compared to those in group IV.

Conclusion : These results demonstrate that Et-1 is an important contributing factor in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Et-1 is synthesized and released by bronchial epithelium, Type II pneumocyte, endothelial cells, alveolar macrophages and fibroblasts. Especially they are associated with alveolar macrophage and fibroblasts. We conclude that combined therapy of cyclophosphamide and methylprednisolone are more effective in the control of Et-1 expression and collagen deposition. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 775-785)

Key words : Paraquat, Cyclophosphamide, Methyprednisolone, Pulmonary fibrosis, Endothelin-1.

서 론

제초제의 농업사용이 증가하면서 우발적인 사고나 자살 목적으로 음독하면서 paraquat 중독 사고가 증가하고 있다. 소량에 노출되어도 상부 위장관의 궤양이 생기고 만성적으로는 폐 섬유화와 저산소혈증을 유발하여 호흡부전을 일으킨다¹⁾. Paraquat의 중독은 크게 3가지 형태의 임상증상이 있다. 중증의 중독시에는 몇 일 내에 사망하며 호흡기, 간장, 신장 등의 다발성 장기 부전증으로 대부분 사망하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 그러나 경한 중독의 경우는 구강 점막의 자국, 위장관의 궤양이 발생하나 대부분 대증요법에 의해 호전이 된다¹⁾. 중증도의 중독시에도 신부전, 간염, 점진적인 호흡부전이 증식성 모세 기관지염(proliferative bronchiolitis), 폐포염(alveolitis) 등의 다양한 형태로 나타날 수 있으며 늦게는 6주 후에도 후유증이 발생하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

Paraquat는 폐포 세포내에서 monocation radical로 환원되어 산소와 반응하여, 과산화물의 반응성 산소기(reactive oxygen radical)²⁾가 세포에 손상을 주는 직접적인 독성과 염증세포 및 섬유아세포에 의한 간접적인 독성으로 폐섬유화증을 유발하는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 여러 종류의 염증세포, 면역세포 및 섬유아세포 등에서 유리되는 cytokine들이 직접 또는 간접적으로 폐섬유화에 관여하는 것으로 알려져 있으며⁴⁾, 최근에는 endothelin-1 (이하 Et-1)이 폐섬유화의 병태생리에 관여하는 것으로 보고되었다⁵⁾. 혈관

내피세포, 폐포 대식세포, 기관지 상피세포 및 섬유아세포등 다양한 세포에서 생성하는 Et-1은 21개의 아미노산으로 구성된다⁶⁻¹⁴⁾. Et-1은 강력한 혈관 수축 작용을 하며, 화학주성(chemoattractants), 세포분열 및 섬유아세포의 교원질(collagen)의 생성을 촉진하는 다양한 기능을 갖고 있다¹⁵⁾. 그러나 폐섬유화과정에 Et-1의 생성과 역할에 대해서는 논란이 많고, 폐섬유화증 치료제로 쓰이는 스테로이드나 cyclophosphamide에 대한 Et-1의 변화에 대한 연구가 거의 없다. 최근 인체에서 paraquat 중독시에 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병용하여 사용시에 사망률을 감소시킨다는 보고가 있어¹⁶⁾, 본 연구에서는 paraquat로 유발된 폐섬유화에서 면역 조직 화학 염색법(immunohistochemical stain)으로 Et-1의 분포를 관찰하고, 폐섬유화의 정도에 따른 Et-1의 변화와 paraquat로 유발된 폐섬유화증에서 스테로이드나 cyclophosphamide의 치료에 따른 Et-1의 변화를 관찰하여 폐섬유화과정에 Et-1의 역할을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1) 대 상

수컷 Hartley 기니피그를 85mg/kg의 Methohexital Sod(Brevital, Eli, Lilly Indianapolis, IN)을 복강 주사후 마취가 된 상태에서 PE50 polyethylene

tube를 기도 삽관후에 두부의 경사를 약 15도 상승시키고 우측으로 약 30도 가량 양외위로 기울려 약물 주입시에 우측으로만 주입이 되도록 하였다. Paraquat는 생리 식염수에 paraquat(methyl viologen, Gramoxone : 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, Sigma Co) 1mg/ml의 용액을 이용하였다. 편측 기관지내 주입은 100 μ l Hamilton syringe를 이용하여 우측 주기관지와 성대까지의 길이만큼 tube를 전진 시킨후에 기니픽에 1mg/kg의 paraquat를 주입하여 폐섬유화를 유도하였다.

2) 대상군 설정 및 약물 투여 방법

29마리의 수컷 Hartley 기니픽을 8마리씩 4군으로 나누어 실험을 하였다. I 군 (정상 대조군)은 paraquat를 투여하지 않은 군이었고, II 군은 paraquat를 폐에 주입한 후 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 투여한 군이었으며, III 군은 paraquat를 폐에 주입한 후 methylprednisolone을 투여한 군이었다. IV 군은 paraquat를 폐에 주입한 후 methylprednisolone이나 cyclophosphamide를 모두 투여하지 않은 군이었다. 모든 군은 gentamycin을 100mg/kg로 매일 근육 주사하여 감염을 예방하였다 (표 1).

표 1. 대조군과 실험군간의 약물 투여 방법 비교

I 군 : 정상 대조군
II 군 : paraquat(1mg/kg) cyclophosphamide(125mg/kg, 제 1일, 제 8일 복강내 투여)와 methylprednisolone (30mg/kg, 제 1일부터 제 14일까지 매일 복강내 투여)의 병합 투여한 군
III 군 : paraquat(1mg/kg) methylprednisolone(30mg/kg, 제 1일부터 제 14일까지 매일 복강내 투여)
IV 군 : paraquat(1mg/kg)만 투여한 군

3) 폐섬유화의 측정

Paraquat를 투여한 후 15일째에 25% wt/vol Urethane을 6-8ml/kg를 복강내 주입후 마취상태에서 복강 절개후 횡격막을 절개하여 흉곽벽을 열고 폐장을 적출하였다. 적출한 폐장은 formaline용액을 기도를 통해서 25 cmH₂O의 압력으로 주입한 다음 formaline 용액에 고정하여 보관하였다. 보관된 폐의 일부는 H-E stain과 Masson's trichrome 염색을 시행하여 각 군의 폐포 손상 정도, 섬유화 정도, 염증의 정도를 확인하였다. 폐섬유화의 정도는 섬유아세포의 침윤의 정도와 교원질의 침윤정도로 판단하였다. 섬유아세포의 분포의 평가에서 섬유아세포가 관찰되지 않을 경우를 -, 폐포간질에 섬유아세포가 한층으로 관찰된 경우는 1+, 섬유아세포가 두층 이상으로 관찰된 경우는 2+로 정하였다. 교원질의 침윤은 교원질이 전혀없는 경우를 -, 교원질이 정상 대조군의 폐간질보다 2배미만의 비후가 있을 경우는 1+, 정상 대조군의 폐간질보다 2배이상의 비후가 있을 경우는 2+로 정하였다.

4) Endothelin-1의 면역 조직 화학 염색

Formaline에 보관된 폐장을 tissue processor에서 ethanol로 탈수, xylene으로 투명화 시킨후 paraffin을 조직에 침투시킨후 조직을 embedding 후 xylene에 10분간, 100% ethanol에 10분, 70% ethanol에 5분간 순서대로 담근 다음, 흐르는 물에 30초간 행켰다. 내인성 과산화 효소를 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 5분간 담근 다음 증류수에 5분간 세척하였다. Tris-buffer saline solution (이하 TBS, PH 7.6)에 5분간 담근 다음 정상 염소혈청(normal goat serum, Dako, Denmark)에 20분간 반응하여 비특이성 단백질의 표현을 억제시켰다. 1 : 200의 Et-1 (polyclonal rabbit, Pennsylvania Lab)을 4℃에서 overnight 시킨 후 TBS로 5분간 3회 총 15분간

Table 1. Proliferation of fibroblast and collagen deposition on paraquat induced pulmonary fibrosis

	group I	group II	group III	group IV	P value
Fibroblast	-	-/+	-/+	+ / + +	0.0660
Collagen	-	-	-/+	+ / + +	0.0130*

Kruskalwallis test (chi-square approximation)

p value : Group IV was compared with group I, II and III. (* : $p < 0.05$)

Scoring (median) of intensity of stain from - to + +

Fibroblast : - : no expression of fibroblasts

1+ : expressed by one layer.

2+ : expressed over two layers.

Collagen : - : no expression of collagen

1+ : collagens layer were hypertrophied less than two times comparing with normal control.

2+ : collagens layer were hypertrophied more than two times comparing with normal control.

세척하였다. Biotinylated link antibody (goat anti-rabbit IgG, Dako Co.)와 30분간 반응시키고 TBS로 15분 세척한 후 streptavidin-peroxidase conjugate (Dako Co.)을 가하고 30분간 반응시켰다. 발색반응은 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Dako Co.)를 사용하여 10분간 발색 반응시킨 다음 증류수로 세척한 후 세포핵을 hematoxylin으로 대조 염색하고 흐르는 물에 세척하여 수용성 봉입제로 봉입하였다. Et-1의 활성도는 염색이 되지 않으면 -, 미세과립으로 염색된 경우는 1+, 거친 과립으로 염색된 경우는 2+, 집성체의 과립으로 염색된 경우는 3+로 측정하였다.

5) 통계 분석

Paraquat에 의한 폐조직의 섬유화는 섬유아세포의 침윤 정도와 교원질의 침윤 정도로 측정하였으며, endothelin-1의 활성도와 분포를 측정하였다. 각 군의 평균값은 median값으로 표시하고, 각 군간의 비교는 Kruskal-Wallis oneway analysis를 시행하였다.

결 과

1. Paraquat에 의한 폐섬유화

4군 모두에서 실험 중 폐섬유화로 인한 사망은 없었으며, paraquat를 투여한 편측에서만 폐섬유화 소견을 관찰할 수 있었다. 정상 대조군인 I군에서는 관찰되지 않은 섬유아세포의 침윤과 교원질의 침윤이 paraquat를 투여한 IV군에서는 증가하는 경향이 보였고, II군과 III군에서는 감소하는 경향을 보였다. 섬유아세포의 경우는 paraquat를 투여한 IV군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 의미는 없었다. 교원질의 경우는 paraquat만 사용한 IV군을 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병용한 II군과 비교시에 통계학적으로 의미있게 증가하였다 (Fig. 1) (Table 1).

2. Endothelin-1에 대한 면역조직화학 염색

Et-1에 대한 면역 조직 화학 염색에서 기관지 상피세

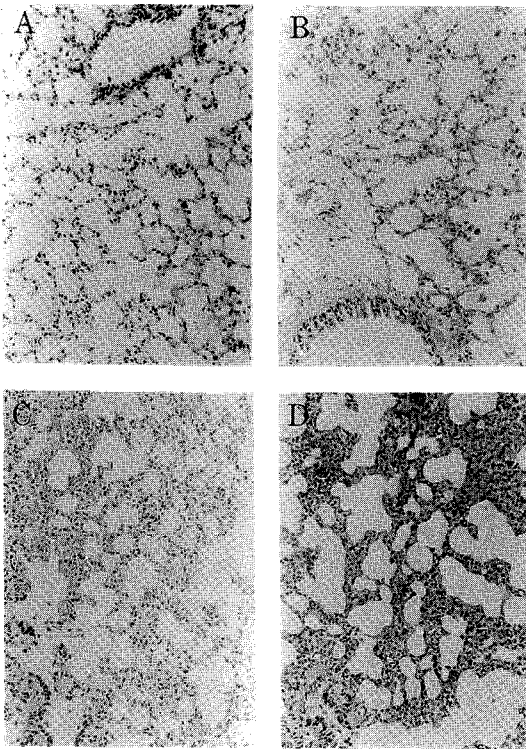


Fig. 1. H & E stain ($\times 20$)

A) Well preserved lung parenchyme and no interstitial infiltration of fibroblasts and collagen in guinea pig lung. B) Relatively preserved lung parenchyme and no interstitial infiltration of fibroblasts and collagen in guinea pig. C) Moderately increased numbers of fibroblasts and collagen deposit. D) Markedly increased numbers of fibroblasts and collagen deposit.

포, 제2형 폐포세포, 폐포의 대식세포, 혈관 내피세포 및 섬유아세포 등이 양성을 나타냈다(Fig. 2). 기관지 상피세포에서는 paraquat의 투여로 endothelin-1의 발현이 의미있게 증가하였으며($p < 0.05$), 증가된 Et-1의 발현이 cyclophosphamide와 methylprednisolone의 병합 투여로 II군에서 발현이 의미있게 감소하였다($p < 0.05$). 제2형 폐포 세포에서는 paraquat만 투여한 IV군에서 Et-1의 발현이 의미있게 증가하였으며($p < 0.05$), methylprednisolone 단독이나

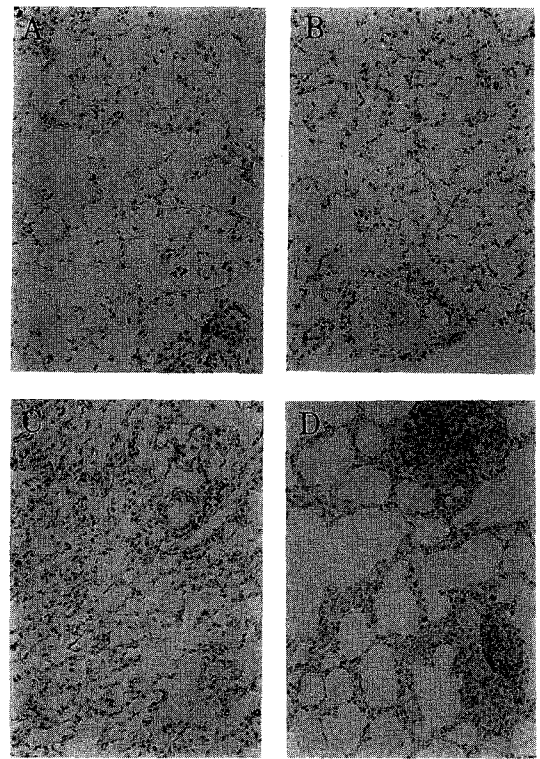


Fig. 2. Endothelin immunohistochemical stains ($\times 20$)

A) Mild expression is shown in bronchial epitheliums, macrophages and type II pneumocytes. Mild expression is shown in bronchial epitheliums, macrophages and type II pneumocytes. C) Moderate expression is shown in bronchial epitheliums, type II pneumocytes, macrophages and fibroblasts. D) Moderate expression is shown in bronchial epitheliums, type II pneumocytes, macrophages and fibroblasts.

cyclophosphamide와 병합 투여한 II 또는 III군에서 대조군인 I군과 같은정도로 Et-1의 발현이 감소하였다($p < 0.05$). 반면에 폐포의 대식세포에서는 paraquat의 투여로 증가된 Et-1의 발현이 methylprednisolone의 투여에는 효과가 없었으나, cyclophosphamide와 병합 투여한 II군에서는 정상

Table 2. The degree of immunoreactivity of endothelin-1 after the treatment with cyclophosphamide and methylprednisolone

	group I	group II	group III	group IV	P value
Bronchial Epithelium	++/+++	+ / ++	+ / ++	++ / +++	0.0141*
Type II Pneumocyte	- / +	+	- / +	++ / +++	0.0006**
Macrophage	- / +	+	++ / +++	++ / +++	0.0003**
Endothelial Cell	- / +	- / +	- / +	+ / ++	0.0080*
Fibroblast	-	- / +	+ / ++	++ / +++	0.0005**

Kruskalwallis test (chi-square approximation)

p value : Group IV was compared with group I, II and III.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$)

Scoring (median) of intensity of staining from - to +++

- : no expression of endothelin-1

1+ : Endothelin-1 was expressed with fine granules.

2+ : Endothelin-1 was expressed with coarse granules.

3+ : Endothelin-1 was expressed with group of granules.

대조군과 같은 정도로 감소하였다 ($p < 0.05$). 혈관 내피 세포와 섬유아세포에서는 paraquat의 투여로 증가된 Et-1의 발현이 cyclophosphamide와 methylprednisolone의 병합투여로 의미있게 감소하였으며 ($p < 0.05$), 혈관내피세포의 Et-1에 대한 발현 정도는 정상 대조군보다 오히려 감소하는 경향을 보였다. Paraquat의 투여로 발생한 폐섬유화증에 대한 치료의 종류에 따른 Et-1의 발현은 methylprednisolone의 단독 투여로도 폐포의 대식세포를 제외한 기관지 상피세포, 제2형 폐포세포, 혈관 내피세포 및 섬유아세포 등에서 Et-1의 발현이 감소하는 경향을 보였으며, cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병합한 II군에서는 모두 의미있게 Et-1의 발현이 감소하였으며, 특히 폐포의 대식세포와 섬유아세포에서는 methylprednisolone을 단독 투여한 III군보다 의미있게 감소하였다 (Table 2, $p < 0.05$).

고 찰

폐섬유화증의 연구에 동물 실험 모델로 paraquat은

널리 이용되고 있으며, 그 기전은 paraquat가 폐포 세포내에서 monocation radical로 환원되어 산소와 반응하여, 과산화물의 반응성 산소기(reactive oxygen radical)가 세포에 손상을 주는 직접적인 독성과 염증세포 및 섬유아세포에 의한 간접적인 독성으로 폐섬유화증을 유발한다고 알려져 있다^{2,3}. Paraquat를 경구, 정맥 또는 복강주사로 투여하는 경우는 폐섬유화로 인한 호흡부전증으로 사망하는 경우가 많으므로¹⁷, 본 연구는 실험동물의 사망을 초래하지 않고 폐손상을 관찰하기 위해 직접 기도를 통해 한쪽 폐에만 paraquat를 주입하는 방법으로 폐섬유화를 유발하였다¹⁸. 본 연구에서는 29마리의 기니피그 4마리를 제외한 나머지에서는 의도한대로 한쪽 폐로만 주입되었다. 폐섬유화증은 폐간질내에 비가역적으로 결체조직이 축적되는 것을 말하며, 많은 원인의 폐손상에서 마지막으로 나타나는 병리형태이며, 폐의 세포외 간질(extracellular matrix, 이하 ECM)의 비후가 특징이며, ECM의 비후는 fibronectin, 교원질, laminin, 및 elastin을 포함한 다양한 분자들의 생산과 침착이 증가되어 발생된다¹⁹. 본 연구에서는 paraquat의 기

관지내 투입으로 발생된 폐섬유화는 섬유아세포의 증식과 교원질의 침착정도로 확인하였다. Paraquat에 의한 폐섬유화는 정상 대조군에서는 관찰되지 않은 섬유아세포의 침윤과 교원질의 침윤이 paraquat를 투여한 IV군에서 증가하는 경향을 보였다. 섬유아세포의 경우는 paraquat를 투여한 IV군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다. Collagen의 경우는 paraquat를 투여한 IV군에서 통계학적으로 의미있게 증가하였다. 또한, cyclophosphamide나 methylprednisolone의 치료로 paraquat에 의한 섬유아세포의 증식이 억제되고, 교원질의 침윤도 cyclophosphamide나 methylprednisolone의 치료로 의미있게 억제되었다. 특히 cyclophosphamide와 methylprednisolone의 병합치료한 II군의 교원질의 침윤은 정상 대조군과 같은 정도로 억제되었다. 폐섬유화증의 발병이나 치유과정에 대한 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않지만, 폐섬유화증에는 여러 종류의 cytokine과 성장인자들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다⁴⁾. 사이토카인은 transforming growth factor- β (이하 TGF- β)^{20, 21)} 이 폐섬유화를 일으키는 대표적인 인자로 알려져 있으며, 그 이외에도 platelet derived growth factor²²⁾, granulocyte macrophage colony stimulating factor^{28, 29)}, insulin like growth factor-1, interleukin-1^{23- 25)}, interleukin-6^{26, 27)} 및 tumor necrosis factor- α ^{28, 29)}과 같은 여러 물질이 관여하는 것으로 알려져 있다.

Endothelin은 1985년에 심장의 관상동맥의 혈관 수축물질로 혈관 내피세포에서 생성되는 물질로 발견된 이래로 Et-1, endothelin-2 (이하 Et-2) 및 endothelin-3 (이하 Et-3)의 3종류⁶⁾가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 endothelin은 혈관 수축작용의 조절, 세포의 증식 및 호르몬의 생성 등에 관여하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. Et-1은 인간, 돼지, 쥐, 개 등에 존재하고, Et-2는 인간에서만 존재하고, Et-3는 인간과 쥐에서 존재하는 것으로 보고되고 있다⁶⁾. Endothelin은 염색체 6번에 존재하는 유전자로부터 203개의 아미노산으로 구성된 preproendothelin-1이 생성되고 dibasic endopeptidase에 의하여 38개

의 proendothelin-1로 형성된다. Proendothelin-1은 다시 endothelin converting enzyme (이하 ECE)에 의해 Et-1으로 전환된다. ECE는 neutral metalloendopeptidase로 phosphoramidon에 의해 억제되며³¹⁾, 미란세포의 chymase에 의하여 활성화되는 것으로 보고되고 있다^{32, 33)}. 그외에도 ECE는 TGF- β , TNF- α , IL-1 β 등의 사이토카인을 통해서도 활성화되어 Et-1의 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있다^{33, 34)}. Et-1은 혈관 내피세포에서 처음 밝혀졌지만, 기관지 점막세포, Type II 폐포세포, 대식세포 및 섬유아세포에서도 생성되는 것으로 밝혀졌다^{34, 35)}. 본 연구에서도 정상 기니피크의 폐장에서는 기관지 점막세포, 제2형 폐포세포, 폐포의 대식세포 및 혈관 내피세포 등에서 Et-1에 대한 면역 조직 화학 염색에서 활성을 보여, 기니피크의 정상 폐장에서도 Et-1이 기관지 점막세포, 제2형 폐포세포, 폐포의 대식세포 및 혈관 내피세포 등에서 생성됨을 알 수 있었다. 특발성 폐섬유화증 환자에서 Et-1의 발현이 증가되고³⁶⁾, 육아종에서 기관지 점막세포와 제2형 폐포세포의 Et-1과 preproendothelin-1의 발현이 증가됨을 밝혔고, 공피증 환자에서도 Et-1의 혈중 농도가 증가되어 있어 폐섬유화증에서 endothelin이 관여하는 것으로 보고되고 있다^{37, 38)}. 폐섬유화에서 endothelin의 작용기전은 정확하지 않지만, endothelin은 섬유아세포의 chemotaxis 및 증식, 교원질의 합성에 강력한 촉진제이며, 혈관 평활근의 증식을 촉진하는 것으로 밝혀지고 있다¹⁵⁾. 즉 Et-1은 섬유아세포의 강력한 분열 유발인자이고, 다른 성장인자(TGF- β , TNF- α)와 상호보완적으로 작용하며³⁾, 섬유화성 폐질환의 특징인 type II pneumocyte의 증식에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 paraquat로 유발된 폐섬유화증의 기니피크의 폐장에서 섬유아세포 뿐만 아니라, 기관지 점막세포, 제2형 폐포세포, 폐포 대식세포 및 혈관 내피세포 등에서 Et-1에 대한 면역 조직 화학 염색에서 활성이 의미있게 증가되어(p<0.05), Et-1이 폐섬유화증의 기전에 관여함을 알 수 있었다. 최근 임상 보고에서 paraquat 중독시 cyclophosphamide의 투여로 사망률을 감소시킨다는 보고가 있으며 본 실험에

서도 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병행시에 폐섬유화의 완화를 유발하여 일치된 결과를 얻었다. 치료방법에 따른 Et-1의 활성은 methylprednisolone의 단독 투여로도 폐포의 대식세포를 제외한 기관지 상피세포, 제 2형 폐포세포, 혈관 내피세포 및 섬유아세포 등에서 Et-1의 활성이 감소하는 경향을 보였으나, cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병합한 II군에서는 모든 세포에서 의미있게 Et-1의 활성이 감소하였고, 특히 폐포 대식세포와 섬유아세포에서는 methylprednisolone의 단독 투여한 군보다 의미 있게 Et-1의 활성이 감소하였다. 따라서, methylprednisolone의 단독 투여보다는 cyclophosphamide와의 병합투여가 paraquat에 의한 폐섬유화증에 보다 효과적이라 할 수 있다.

요 약

목 적 :

폐섬유화증 연구의 동물 실험 모델로 paraquat 중독이 자주 이용되고 있다. 본 연구에서는 paraquat로 유발된 폐섬유화에서 폐섬유화의 정도에 따른 Et-1의 변화를 면역조직화학적으로 관찰하고 스테로이드나 cyclophosphamide의 치료에 따른 Et-1의 변화를 관찰하여 폐섬유화과정에 Et-1의 역할을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법 :

수컷 Hartley 기니픽을 4군으로 나누어 실험하였다. I 군은 paraquat를 투여하지 않은 군이었고, II 군은 paraquat를 폐에 주입한 후 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 투여한 군이었고, III 군은 paraquat를 폐에 주입한후 methylprednisolone만 투여하였고, IV 군은 paraquat만 투입하였다. I 군을 제외한 나머지 군에서는 PE50 polyethylene tube를 이용하여 paraquat를 우측 폐로 주입하였다. 섬유화의 정도는 H-E와 Masson's trichrome 염색을 통해서 섬유아세포의 침윤 정도와 교원질의 침윤 정도로 판단하였고, Endothelin-1 면역조직화학염색을 통해서

세포의 활성도를 평가하였다. 각 군의 평균값은 median 값으로 표시하였고, 각 군간의 비교는 Kruskal-Wallis oneway analysis로 시행하였다.

결 과 :

1. Paraquat에 의한 폐 섬유화

Cyclophosphamide나 methylprednisolone의 치료로 paraquat에 의한 섬유아세포의 증식이 억제되었으나 통계학적 의미는 없었다. 교원질의 침윤은 cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병합한 경우 paraquat만 투여한 군보다 의미있게 감소하였다($p < 0.05$).

2. Endothelin-1에 대한 면역조직화학염색

Paraquat의 투여로 발생된 폐섬유화증에 대한 치료의 종류에 따른 Et-1의 발현은 methylprednisolone의 단독 투여로도 폐포의 대식세포를 제외한 기관지 상피세포, 제2형 폐포세포, 혈관 내피세포 및 섬유아세포 등에서 Et-1의 발현이 감소하는 경향을 보였으며, cyclophosphamide와 methylprednisolone을 병합한 군에서는 모든 세포에서 의미있게 Et-1의 발현이 감소하였고, 특히 폐포 대식세포와 섬유아세포에서는 methylprednisolone의 단독 투여한 III군보다 의미있게 감소하였다(Table 2, $p < 0.05$).

결 론

Paraquat의 폐섬유화증은 H&E 염색에서 교원질의 증가와 Et-1 염색에서 Et-1의 활성도가 증가하는 것으로 측정할 수 있었으며, 폐섬유화증의 치료방법으로 methylprednisolone과 cyclophosphamide의 병합 투여가 methylprednisolone의 단독투여보다 교원질의 감소를 일으키며, 특히, 폐의 대식세포와 섬유아세포에서 Et-1의 발현을 보다 많이 억제함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. : Paraquat poisoning : clinical features and immediate gen-

- eral management. *Hum Toxicol* 6 : 4, 1987
2. Smith LL. : The toxicity of paraquat. *Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning reviews* 1 : 1, 1988
 3. Cooper JA Jr, Zitnik RJ, Matthay RA : Mechanisms of drug-induced pulmonary disease. *Annu Rev Med* 39 : 395, 1988
 4. 이용희, 정순희, 안철민, 김성규, 조상호 : Bleomycin 유도 폐섬유화에 있어서 성장 인자 및 cytokine의 역할, 결핵 및 호흡기 질환 44 : 872, 1997
 5. Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ : Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell mol biol* 18 : 611, 1998
 6. Barnes PJ : Endothelins and pulmonary diseases. *Am Physiol Soc* 1051, 1994
 7. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomabe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 : 411, 1988
 8. Matumura Y, Ikegawa R, Ohyama T, Hayashi K, Morimoto S : Endothelin immunoreactivity in medium from cultured porcine aortic endothelial cells correlates with the biological activity. *Biochem Biophys Res Commun* 160 : 602, 1989
 9. Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A : A specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3 : 145, 1990
 10. Giaid A, polak JM, Gaitonde V, Hamid QA, Moscoso G, Legon S, Uwanogho D, Roncalli M, Shinmi O, Sawamura T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T, Springall DR : Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4 : 50, 1991
 11. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q : Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 341 : 1550, 1993
 12. Springall DR, Howarth PH, Counihan H, Djukanovic R, Holgate ST, polak JM : Endothelin immunoreactivity of airway epithelium in asthmatic patients. *Lancet* 337 : 697, 1991
 13. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WP, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS : Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by human macrophages. *J Exp Med* 172 : 1741, 1990
 14. Gu J, pinheiro JM, Yu CZ, Andrea MD, Murlidharan S, Malik A : Detection of endothelin-like immunoreactivity in epithelium and fibroblasts of the human umbilical cord. *Tissue cell* 23 : 437, 1991
 15. O'Brien RF, Robbins RJ, McMurty IF : Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J cell physiol* 132 : 263, 1987
 16. Lin Ja-Liang, Wei Mein-Chung, Lin Yu-Chih : Pulse therapy with cyclophosphamide and methylprednisolone in patients with moderate to severe paraquat poisoning : A preliminary report. *Thorax* 51 : 661, 1996
 17. Dubaybo BA, Durr RA, Thet LA : Unilateral paraquat-induced lung fibrosis : Evolution of changes in lung fibronectin and collagen after graded degrees of lung injury. *J Toxicol Environ Health* 22 : 439, 1987
 18. Dubaybo Ba, Thet LA : A technique for unilateral instillation of agents into the rat lung. *J Appl Physiol* 59 : 266, 1985

19. Crouch E : pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J physiology* 259 : L 159, 1990
20. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK : Transforming growth factor β modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 6 : 1899, 1987
21. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA : transforming growth factor β is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* 88 : 6642, 1991
22. Smits A, Funahashi K, Vassbotn FS, Beausang-Linder M, af Ekenstam F, Heldin CH, Westermarck B, Nister M : Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in proliferative disorders of fibroblastic origin. *Am J Pathol* 140 : 639, 1992
23. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I : Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128 : 2177, 1982
24. Postlethwaite AE, Raghov R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH : Modulation of fibroblast functions by interleukin 1 : increased steady state accumulation of type 1 procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but chemotaxis by human recombinant IL-1 α and IL-1 β . *J Cell Biol* 106 : 311, 1988
25. Elias JA, Lentz V : IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* 145 : 161, 1990
26. Lesur OJ, Mancini NM, Humbert JC, Chabot F, Polu JM : IL-6, INF- γ , and phospholipid levels in the alveolar lining fluid of human lungs. profiles in coal worker's pneumoconiosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 106 : 407, 1994
27. Vanhee D, Gosset P, Marquett CH, Wallaert B, Lafitte JJ, Gosselin B, Voisin C, Tonnel AB : Secretion and mRNA expression of TNF- α and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 152 : 298, 1995
28. Massague J : The transforming growth factor family. *Annu Rev Cell Biol* 6 : 597, 1990
29. Assoian R, K., B.E. Fleurdelys, H.C. Stevenson et al. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6020, 1987
30. Kehrl J.H., L. M. Wakefield, A.B. Roberts et al. production of transforming growth factor factor- β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163 : 1037, 1986
31. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y : Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 159 : 1435, 1989
32. Masaki, T, Yanagisawa M, Goto K : physiology and Pharmacology of endothelins. *Med Res Rev* 12 : 391, 1992
33. Kurihara HM, Yoshizumi T, Sugiyama F, Takaku M, Yanagisawa T, Masaki M, Hamaoki H, kato, and Y. Yazaki. : Transforming growth factor-beta stimulate the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 : 1435, 1989
34. Rozengurt N, Springall DR, Polak JM : Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J pathology* 160 : 5, 1990
35. Marciniak, SJ, Plumpton C, Barker PJ, Huskisson NS, Davenport AP : Localization of

- immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. *Pulm. Pharmacol.* 5 : 175, 1992
36. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q : Expression of endothelin-1 in lung of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 341 : 1550, 1993
37. Gambrey AD, Harrison NK, Dawer KE, southcott AM, Black CM, Du Bois RM, Laurent GJ, McNulty RJ : Increased levels of endothelin-1 in bronchioalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am j respir cell Mol Biol* 11 : 439, 1994
38. Bashar Kahaleh M : Endothelin, an endothelial dependent vasoconstrictor in scleroderma . *Arthritis Rhem* 34 : 978, 1991