

특발성 폐섬유화증환자의 기관지폐포세척액 및 폐포대식세포 배양액의 Matrix metalloproteinase의 변화

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실

박주현, 심태선, 임채만, 이상도,
고윤석, 김우성, 김원동, 김동순

= Abstract =

Matrix Metalloproteinase in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Joohun Park, M.D., Tae Sun Shim, M.D., Chae-Man Lim, M.D.,
Younsuck Koh, M.D., Sang Do Lee, M.D., Woo Sung Kim, M.D.,
Won Dong Kim, M.D., Dong-Soon Kim, M.D.

*Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,
University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Matrix metalloproteinase(MMP)-2 and MMP-9 have been known to play an important role in cell migration and the tissue remodeling process by type IV collagen lysis, a major component of the basement membrane. Intra-alveolar fibrosis, secondary to an injury to the basement membrane of the alveolar epithelial lining, is a major process in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis(IPF). Therefore, MMP-2 and MMP-9 was hypothesized to play an important role in IPF pathogenesis. As a result, their level may reflect the activity or prognosis.

Method : Forty one progressive IPF patients(age 59.82 ± 1.73 years, M : F = 23 : 18), 16 patients with stable IPF for more than one year without therapy(age : 63.6 ± 2.8 years, M : F = 13 : 3), and 7 normal controls were enrolled in this study. The MMP-2 and MMP-9 levels in the BAL fluid and alveolar macrophage conditioned media(AM-CM) were measured by zymography and the TIMP-1 level was measured by ELISA.

*본 연구는 아산생명과학 연구비 보조에 의해 시행되었습

Address for correspondence :

Dong-Soon Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, University of Ulsan, College of Medicine, Asan Medical Center
388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul, 138-600, Korea

Phone : 02-2224-3132 Fax : 02-2224-6968 E-mail : dskim@amc.seoul.kr

Results : 1) The MMP-2 level in BALF was highest in the progressive IPF group (1.36 ± 0.28) followed by the stable group (0.46 ± 0.13) and the controls (0.08 ± 0.09), which was statistically significant. The MMP-9 level of the IPF (0.31 ± 0.058) and the stable group (0.22 ± 0.078) were higher than that of the control group (0.002 ± 0.004). In the AM-CM, only MMP-9 was detected, which was significantly higher in IPF group (0.80 ± 0.10) than in the control group (0.23 ± 0.081). The TIMP-1 level was also higher in both the IPF ($36.34 \pm 8.62 \mu\text{g/ml}$) and stable group ($20.83 \pm 8.53 \mu\text{g/ml}$) compared to the control group ($2.80 \pm 1.05 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$). 3) There was a correlation between the MMP-2 level in the BALF with the total cell number ($r = 0.298$) and neutrophils ($r = 0.357$) ($p < 0.05$), and the MMP-9 level with the number of neutrophils ($r = 0.407$) and lymphocytes ($r = 0.574$) ($p < 0.05$). The TIMP-1 level correlated with the total number of cell ($r = 0.338$, $p < 0.05$) and neutrophils ($r = 0.449$, $p = 0.059$).

Conclusion : Both MMP and TIMP appear to play an important role in IPF pathogenesis, and their level may reflect the disease activity. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 303-314)

Key words : Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Matrix Metalloproteinase, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase, BAL, Prognosis.

서 론

특발성간질성폐섬유증(IPF로 약칭)은 아직 밝혀지지 않은 원인에 의해 폐 내 교원질이 과도하게 침착되는 질병으로서 3년 이내에 반수 이상이 사망하는 질병이다¹. 폐 내 교원질의 증가는 교원질 생성이 증가할 때 뿐 아니라, 교원질의 분해효수의 감소로 인해서도 초래될 수 있는데, IPF에서는 여러 종류의 cytokine 및 성장촉진 인자들에 의해 생성이 증가한다는 것은 잘 알려져 있으나²⁻⁴, 교원질분해에 대해서는 collagenase에 관한 소수의 보고들이 있을 뿐이다⁵⁻⁸. 교원질 등의 세포외 기질(extracellular matrix: ECM으로 약칭)을 분해하는 효소들로는 collagenase뿐 아니라 20여 종류의 matrix metalloproteinase(MMP)가 알려져 있다. MMP는 아연의존효소로서¹⁻³ 비활성형으로 분비되어 아미노기의 가수분해에 의해 활성화 되며 TIMP에 의해 분비가 억제된다고 한다⁹⁻¹⁴. 그 중 MMP-2와 MMP-9은 변성된 교원질인 gelatin과 폐기저막의 주요한 구성 성분인 제4형 교원질의 가수분해를 초래하여 세포증식과 분화를 조절할 뿐 아니라, 세포의 유착과 이동, 종양의

침습 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷. 제4형 교원질은 폐포벽의 구조를 유지하는데 매우 중요한 역할을 하기 때문에, MMP-2와 MMP-9는 제4형 교원질의 분해에 의하여 폐기저막의 변화를 가져오며 염증세포의 이동과 침윤에 관련되는 것으로 보고되었다⁹⁻¹⁶. 더 나아가 이 MMP들에 의한 전체 기저막의 파괴는 근섬유아세포(myofibroblast)의 폐포내로의 이동, 교원질의 침착 및 폐 구조의 재조정과 연관이 있는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²¹. 따라서 MMP-2와 MMP-9는 IPF에서도 중요한 역할을 할 가능성이 높다. 즉 폐손상 후 정상적으로 치유 되려면 기저막이 제 모양을 유지하고 있어야 하는데 IPF등의 간질성폐질환에서는 기저막이 파괴되어 정상적인 치유반응이 일어나지 못하고 비정상적으로 섬유화가 진행되는 것으로 생각되고 있으며, 또한 IPF에서는 병리학적 특징인 산발적(patchy) 병변분포와, 시기적으로 다른(temporal inhomogeneity) 미루어 폐손상이 지속적으로 일어나는 것으로 추측되고 있다²². 그러므로 IPF에서는 MMP-2나 MMP-9의 작용이 항진되었을 것을 가정할 수 있고, 더 나아가서는 이들 효소의 증

가여부가 IPF의 예후의 지표로 사용될 가능성도 있다.

이러한 가정을 검증하기위한 첫 단계로 연구자들은 정상인 및 IPF 환자들을 대상으로 비관혈적으로 채취할 수 있으면서 폐실질내의 변화를 반영한다고 알려진 기관지폐포세척액(BALF) 및, MMP를 분비하는 주세포인 폐포대식세포(AM) 배양액에서의 MMP-2와 MMP-9의 양을 zymography로 측정 비교하였다. 또한 환자들 중 경과 관찰 상 진행하지 않고 비교적 안정된 균을 따로 분리하여 비교 분석하고 MMP치와 BALF에서의 세포양상과의 연관성을 분석하여 MMP가 IPF의 발병기전과 연관이 있고 예후의 지표가 될 가능성이 있는가를 검사하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

서울중앙병원에서 IPF로 진단된 57명(연령 60.1 ± 1.6세, 남:여 = 36 : 21 흡연:금연:비흡연 = 12 : 20 : 24)을 대상으로 하였다. IPF는 1)간질성 폐질환의 다른 원인이 없으면서 2)임상적으로 흡기말 수포음(velcro rale)이 양쪽 폐 하부에서 청진되고 3)방사선학적으로 흉부 고해상도단층촬영(High-resolution computed tomography)상 IPF의 특징적 소견인 봉와양(honey-combing) 병변이나 망상(reticular) 또는 경결성(nodular) 병변이 늑막에 인접한 폐 주변부위에서 양측성으로 관찰되거나 개흉, 또는 흉강경을 통한 수술적 폐생검검사로 특발성 폐섬유화증이 증명된 경우면서 4)교원성 폐질환이나 악성 종양이 동반되지 않은 경우에 진단하였다²³⁻²⁵. IPF 환자들 중 PFT가 정상이고 치료를 받지 않은 상태에서 1년간 안정적이었던 환자들을 안정된 IPF 환자군으로 따로 분리하여 대조군과 IPF 환자군과 비교 분석하였다.

2. 기관지폐포세척검사

기관지폐포세척검사(BAL)는 고식적인 방법으로

50ml씩 5회 실시하였으며 BALF을 2000 rpm 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액은 측정 전까지 -70℃에 보관하였다²⁶. 세포층은 Hank's 용액으로 2번 세척하여 hemocytometer로 총 세포수를 측정하고, trypan blue로 viability를 검사하였다. 일부 세포는 세포원심분리(cytospin)을 시킨 후에 Diff. Quik 염색을 하여 총 300개의 세포를 세어서 각 세포의 백분율을 계산하였다.

3. 폐포대식세포 배양

RPMI 1640배지(1 mg/ml bovine serum albumin : BSA, HEPES buffer, penicillin-streptomycin)에 살아 있는 AM이 ml당 1×10^6 개가 되도록 희석하여 6 well culture plate에 심어, 섭씨 37도, 5% CO₂하에서, 1시간 배양한 후 여러번 세척하여 nonadherent cell을 제거하였다. 다음에 새로운 RPMI-1640 배지를 동량 가한 후에 같은 조건으로 24시간 배양을 한 후에 상층액을 걷어서 2,000rpm에서 10분간 원심시켜 debris를 제거하여 측정시까지 -70도에 보관하였다.

4. Zymography에 의한 MMP의 측정

MMP-2와 MMP-9의 발현을 보기 위하여 zymography를 실시하였다. 즉 MMP가 gelatin을 분해하는 것을 이용하여, 대식세포, BAL액을 0.1% gelatin을 기질로 하여 단백질 전기영동(sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE)을 시행하였다. 전기영동후 gel을 2.5% Triton X-100 으로 1시간동안 씻고 100mM Tris-HCl(pH 7.4)와 10mM CaCl₂을 포함하는 완충제에서 24시간동안 37℃에서 배양하였다. 배양후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R250(Sigma)으로 염색하였고 7.5% acetic acid와 5% methanol 용액으로 탈염색을 시행한 후 gelatin의 가수분해에 의하여 나타나는 band를 관찰하였다. MMP-2는 72kDa, MMP-9는 92kDa의 각각 다른 분자량을 가졌기 때

문에 이 부위의 band를 densitometry에 의하여 정량분석을 시행하였다.

5. TIMP-1의 측정

Amersham pharmacia biotech사의 Biotrak™ TIMP-1 키트를 사용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

6. BAL액 희석정도 보정

BALF는 폐포 표면을 식염수로 세척해 얻은 액이므로 BALF내의 성분의 농도는 이것이 얼마나 희석되었는지를 아는 것이 중요하나 아직은 좋은 방법을 모르고 있다. 일부 연구자들은 혈청 및 BALF 내 albumin이나 methylene blue, urea에 대한 비율을 이용하여 그 희석 정도를 표시하기도 하나 논란이 많고, 폐내 염증이 있는 경우에는 albumin등으로 교정을 한 경우에 오히려 더 오차가 크다는 보고가 있기 때문에²⁷ 본 연구에서는 BALF 자체에서의 농도를 그대로 비교하였다.

7. 통계처리

각 측정치는 평균±표준오차(SD)로 표시하였고 범주형 데이터들은 카이제곱검정을 실시하였고, 연속형

데이터들은 독립표본t검정을 실시하였다. 상관관계는 Pearson Spearman 방법에 의하여 분석하였다. P값은 0.05미만인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 대상군의 특징

IPF 환자 41명(연령 59.82±1.73세, 남:여=23:18 흡연:금연:비흡연=5:16:19)과 안정군 16명(연령 63.6±2.8, 남:여=13:3 흡연:금연:비흡연=7:4:5), 대조군 7명(연령 37.5±12.50세, 남:여=6:1, 비흡연 5명)을 대상으로 하였다(Table 1). IPF환자군의 폐기능(FVC: 67.6±3.5, DLco: 55.9±2.6)은 안정군의 폐기능(FVC: 93.5±2.7 DLco: 90.1±4.3)에 비하여 유의하게 저하되어 있었다(p<0.05).

2. 기관지폐포세척액의 세포분포

전체 세포수(×10⁶/ml)는 IPF군(3.40±0.20)과 안정군(2.92±0.39)에서 대조군(0.91±0.15)에 비하여 높았다(p<0.05). 폐포대식세포수효는 IPF환자군(24.74±1.88)과 안정군(19.16±2.26)에서 대조군(7.36±1.04)에 비하여 높았고(p<0.05) 그 비율은 다른 세포들의 증가에 의하여 낮게 측정되었다.

Table 1. Demographic Features of the Subjects

	Control	IPF	Stable IPF
No. of patients	7	41	16
Age(year)	37.5±12.50	59.82±1.73	63.6±2.8
Sex (M : F)	6 : 1	23 : 18	13 : 3
smoking(S : E : N)	0 : 2 : 5	5 : 16 : 19	7 : 4 : 5
FVC		67.6±3.5	93.5±2.7*
D _{LCO}		55.9±2.6	90.1±4.3*

S : Smoker E : Exsmoker N : Nonsmoker

*P<0.05 compared to control

**P<0.05 compared to IPF

Table 2. Bronchoalveolar Lavage Findings

	Control	IPF	Stable IPF
Total Cell ($\times 10^6/ml$)	0.91 \pm 0.15	3.40 \pm 0.20*	2.92 \pm 0.39*
AM %	82.14 \pm 3.31	70.95 \pm 2.47*	70.63 \pm 4.72
AM No. ($\times 10^5$)	7.36 \pm 1.04	24.74 \pm 1.88*	19.16 \pm 2.26*
PMN %	0.72 \pm 0.29	6.29 \pm 1.00*	2.79 \pm 0.55**
PMN No. ($\times 10^5$)	0.052 \pm 0.038	2.15 \pm 0.35*	0.63 \pm 0.11**
Lymphocyte %	17.43 \pm 3.22	20.59 \pm 2.34	25.63 \pm 4.93
Lymphocyte No. ($\times 10^5$)	9.36 \pm 3.74	6.10 \pm 0.71	9.12 \pm 3.42
Eos %	0 \pm 0	2.83 \pm 0.66*	1.50 \pm 0.42*

*P < 0.05 compared to control

**P < 0.05 compared to IPF

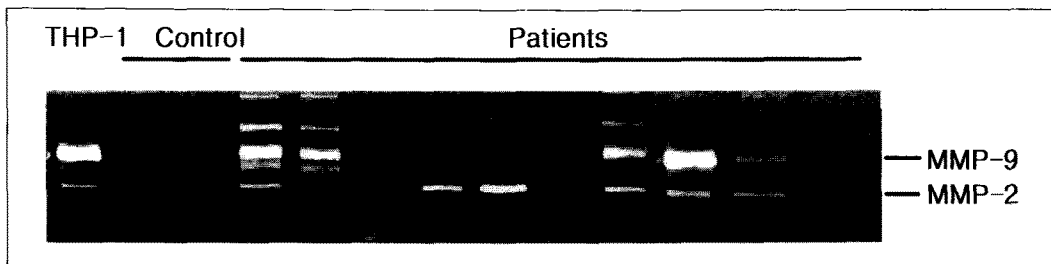


Fig. 1. Matrix metalloproteinase(MMP) zymographic findings of BAL fluid of the patients with idiopathic pulmonary fibrosis and control.

* THP-1 : positive control

세 군 간 임파구수와 ($6.10 \pm 0.71 (\times 10^5/ml)$ vs. $9.12 \pm 3.42 (\times 10^5/ml)$ vs. $9.36 \pm 3.74 (\times 10^5/ml)$) 비율은 차이가 없었으나 호중구와 호산구비율은 IPF 환자군과 안정군에서 대조군에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$) (Table 2).

3. 기관지폐포세척액의 MMP와 TIMP 농도

Zymography 에 의한 육안적 관찰에서 IPF 환자군은 41명중 34명(82.9%)에서 band가 관찰되었고(Fig. 1), 안정군은 15명중 9명(60%)에서 band가 관찰되었으나 대조군에서는 6명중 한명에서도 관찰되지 않았다. Densitometry에 의한 농도분석은 대조군에서는 거의 측정이 되지 않아 정확한 측정이 힘들었으

나, MMP-2는 IPF 환자군에서 1.36 ± 0.28 로 가장 높았고, 다음이 안정군으로 0.46 ± 0.13 이었고, 대조군에서(0.08 ± 0.09) 가장 낮았으며, 세 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). MMP-9도 IPF 환자군(0.31 ± 0.0058)과 안정군(0.22 ± 0.078)에서 대조군(0.002 ± 0.004)에 비하여 높았다($p < 0.05$). TIMP-1 농도도 IPF 환자군과($36.34 \pm 8.62 \mu g/ml$) 안정군($20.83 \pm 8.53 \mu g/ml$)에서 대조군($2.80 \pm 1.05 \mu g/ml$)에 비하여 높았다($p < 0.05$) (Table 3).

4. 폐포대식세포 배양액의 MMP 농도

폐포대식세포 배양액에서는 MMP-9만이 관찰되었고

Table 3. Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 Level

	Control	IPF	Stable IPF
BAL Fluid			
MMP-2	0.08 ± 0.09	1.36 ± 0.28*	0.46 ± 0.13**
MMP-9	0.002 ± 0.004	0.31 ± 0.058*	0.22 ± 0.078*
TIMP-1 (μg/ml)	2.80 ± 1.05	36.34 ± 8.62*	20.83 ± 8.53*
AM CM			
MMP-9	0.23 ± 0.081	0.80 ± 0.10*	0.60 ± 0.20

AM : alveolar macrophage, CM : conditioned medium

*P < 0.05 compared to control

**P < 0.05 compared to IPF

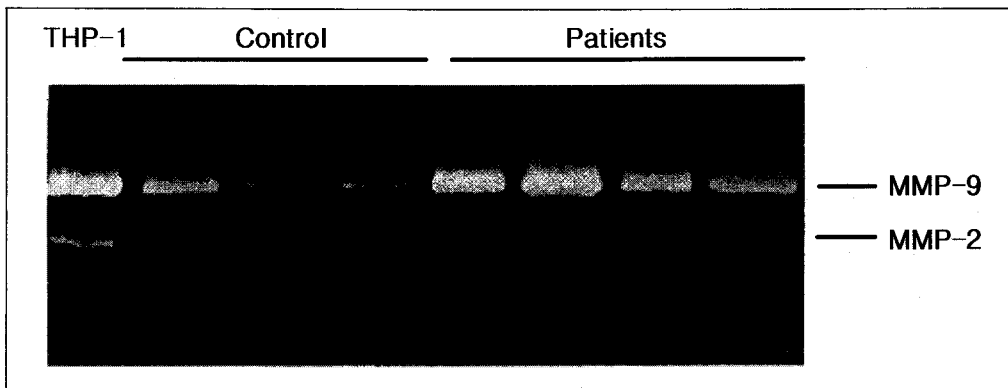


Fig. 2. Matrix metalloproteinase(MMP) zymographic findings of alveolar macrophage conditioned medium of the patients with idiopathic pulmonary fibrosis and control.

*THP-1 : positive control

(Fig. 2), 역시 IPF 환자군과 안정군에서 대조군보다 유의하게 많은 양이 분비되었고, 안정군보다는 환자군에서 높은 경향을 보였다(Table 3).

5. 기관지폐포세척액의 세포분포와 MMP, TIMP 농도와의 상관관계

MMP-2는 전체 세포수($r=0.298$, $p=0.026$)와 호중구수($r=0.357$, $p=0.008$)와 유의한 상관관계를 보였으나 폐포대식세포수($r=0.096$)와 임파구수($r=0.100$)와는 상관관계를 보이지 않았다($p>0.05$). MMP-9은 호중구수($r=0.407$, $p=0.000$)와 임파구

수($r=0.574$, $p=0.005$)와는 유의한 상관관계를 보였으나 전체세포수($r=0.146$, $p>0.05$)와는 상관관계가 없었다. TIMP-1은 전체 세포수($r=0.338$, $p=0.038$)와 유의한 상관관계가 있었고 호중구수($r=0.449$, $p=0.059$)와는 상관관계 경향을 보였으며 폐포대식세포수($r=0.190$)와 임파구수($r=0.087$)와는 상관관계를 보이지 않았다($p>0.05$) (Table 4).

고 찰

본 연구의 결과로 IPF 환자들의 BAL 상청액과 AM 배양액내 MMP-2, MMP-9, 및 TIMP-1이 대조군

Table 4. Correlation of Matrix Metalloproteinase and TIMP-1 Level with Cell Pattern in BAL Fluid.

	MMP-2		MMP-9		TIMP-1	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Total cell ($\times 10^5$ ml)	0.298	0.026		N.S.	0.338	0.038
AM %	-0.643	0.000	-0.551	0.000	-0.630	0.000
AM No. ($\times 10^5$)		N.S.		N.S.		N.S.
PMN %	0.867	0.000	0.536	0.000	0.536	0.000
PMN No. ($\times 10^5$)	0.357	0.008	0.407	0.000	0.449	0.059
Lymphocyte (%)	0.296	0.039		N.S.		N.S.
Lymphocyte No. ($\times 10^5$)		N.S.	0.574	0.005		N.S.

AM : alveolar macrophage, PMN : neutrophil

Table 5. Recurrence Rates by the Extent of Bleeding

	One lobe	Two lobes~one lung	Both lungs
Recurrence rate	47.9% (23/48)	66.7% (4/6)	83.3% (10/12)
Short-term & long-term results			
1 month-NR	72.9% (35/48)	66.7% (4/6)	66.7% (8/12)
1 year-NR	58.3% (28/48)	33.3% (2/6)	41.7% (5/12)
3years-NR	52.1% (25/48)	33.3% (2/6)	13.3% (2/15)
Hemoptysis control period(months)			
Mean \pm SD	32 \pm 4	27 \pm 14	20 \pm 4
Median	31	22	15
Range	0-59	0-66	0-45

NR : nonrecurrence rate SD : standard deviation

에 비해 유의하게 높은 것을 관찰하였을 뿐 아니라 IPF 환자들 중에서도 1년 이상 비교적 안정된 경과를 취했던 사람들에서는 대조군보다는 높았지만 다른 환자군보다는 낮은 경향을 관찰하였다. 또한 이들 MMP와 TIMP-1 농도는 BALF의 세포분포와도 밀접한 상관관계를 갖는 것을 확인하여 이들 MMP-TIMP가 IPF의 병인에서 중요한 역할을 하고 특히 질병의 진행과정과 연관이 있을 것을 추정케 하였다. 교원질의 분해 및 침착은 MMP와 TIMP의 상호 균형에 의해 조절되나, MMP는 교원질 뿐 아니라 proteoglycan, laminin, fibronectin 및 elastin 등을

포함하는 세포의 기질을 분해하여 정상조직의 발달, 조직재형성, 세포의 이동, 염증, 혈관재형성 및 상처의 회복 등의 여러가지 중요한 생리적 과정에도 관여하는 효소이다^{9-17, 19-21}. 이십여 종의 MMP중에서도 MMP-2와 MMP-9는 상피기저막의 주 성분인 제 IV형 교원질을 분해하기 때문에 이들에 의한 상피기저막의 파괴는 폐포 내로 큰-섬유모세포의 이동을 초래하여 폐포내 섬유화-순(alveolar bud)를 형성하며 폐 섬유화증의 특징인 구조재조정과 연관되어 있음이 알려졌다¹⁸. 이런 작용으로 인하여 MMP는 IPF 외에도 폐기종, 기관지천식, 급성폐손상, 산소 파다에 의한

폐손상 및 급성호흡곤란증후군 등의 질환의 중요한 병인으로 작용을 할 뿐 아니라 정상 폐의 발달에도 중요한 역할을 하며, 종양의 침윤, 전이 및 혈관형성에도 필수적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{17, 28-31}. 본 연구에서 BALF내 MMP-2는 활동성 IPF군에서 안정군에 비하여, 안정군에서 대조군에 비하여 증가된 소견을 보였고 MMP-9과 달리 BAL액에서 호중구 및 AM뿐 아니라 전체 세포수와의 유의한 상관관계를 보여 IPF군의 활성도와 연관된 인자일 수 있음을 제시하였다. MMP-9은 AM에서 생산되는 주요한 MMP이고 호중구에서 생산되는 유일한 형태의 MMP로서, Delclaux 등은 혈류로부터 기저막을 통하여 호중구가 이동하는데 MMP-9가 중요한 요소임을 보고하였고³², IPF에서도 AM의 MMP-9 과생성은 기저막을 분해하여 폐포내로 AM를 이동시키고 다른 염증세포들을 동원시켜 염증을 증폭시키는 매개자들을 분비하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³³. 본 연구에서도 AM배양액내에서는 MMP-9만이 IPF군과 안정군에서 대조군 보다 증가됨을 관찰하였다. MMP-2는 다른 MMP와는 달리 serine 단백분해효소에 의해 분해되지 않는 특징을 가진 효소로³⁴, 종양주위에서 변형된 결합조직 세포들은 MMP-2, MMP-9을 모두 생산할 수 있으나 결합조직세포들은 일반적으로 MMP-2를 선택적으로 더 생산한다고 보고되어 왔고¹¹, Welgus 등은 사람의 섬유아세포는 92-kD의 MMP-9을 생산할 수 없다고 보고한 바 있다³⁵. Hayashi 등³⁶도 면역조직화학염색에서 섬유아세포가 MMP-2에만 강하게 반응하는 양상을 보임을 보고하였으나, 최근에 Suga 등은 면역염색상 IPF에서는 MMP-9, MMP-2가 모두 강하게 염색되는 것을 관찰하여 이견을 보였다³⁷. Fukuda 등은 BOOP 에서 MMP-2의 활성형/비활성형 비율이 대조군에 비하여 유의하게 높고 근섬유아세포에서는 MMP 에만 현저한 반응을 보이는 현상을 관찰하여 MMP가 BOOP의 섬유화 현상의 가역성과 연관이 있음을 관찰하였고³⁸, Suga 등도 면역염색상 IPF에서는 MMP-9, MMP-2, TIMP-2가 모두 강하게 염색된 반면,

NSIP나 BOOP에서는 MMP-2만 강하게 염색되고 TIMP-2는 미약하여, TIMP-2가 IPF에서 비가역적인 섬유화 과정과 연관이 있다고 보고하였다³⁷. Suga 등은 IPF에서는 주로 MMP-9이 증가하고, NSIP와 BOOP에서는 MMP-2가 증가한다고 보고하였으나, 본 연구에서는 IPF군에서 MMP-9 뿐 아니라 MMP-2도 현저하게 증가하여 차이를 보였다. 그러나 Selman 등과 Hayashi 등은 면역염색상 IPF에서 MMP-2, MMP-9 모두 강하게 염색되는 것을 관찰하였을 뿐 아니라^{36, 39} Swiderski 등은 bleomycine을 투여한 생쥐의 폐에서 MMP-2유전자는 증가하나 MMP-9유전자 발현은 차이가 없었고, TIMP-1유전자 발현이 증가함을 관찰하여 본 연구의 결과를 뒷받침하고 있다⁴⁰. 또한 Yaguchi 등은 같은 bleomycin 동물실험에서 초기에는 주로 MMP-9이 증가하나 후기 섬유화시기에는 MMP-2가 증가하는 것을 보고하여⁴¹ Suga 등의 보고와 본 연구간의 차이가 환자들의 병기의 차이에 기인할 가능성도 시사하고 있으나, 본 연구 대상환자들 중 비교적 초기 환자들로 생각되는 안정군에서도 MMP-2와 MMP-9이 모두 증가한 것은 병기의 차이만으로 설명하기는 힘들다. Lamjabbar 등⁴²은 IPF환자들에서 BALF 및 AM 배양액내 MMP-9가 증가되어 있고, IPF을 스테로이드나 면역억제제로 치료한 경우에는 MMP-9가 정상화됨을 관찰하여 폐의 재구조화(lung remodelling)에 중요한 역할을 한다고 보고하였으나 IPF내에서 MMP치를 안정시와 악화과정을 보이는 경우를 비교 분석한 보고는 없는 상태이며, 종양질환에는 현재는 제2상 임상 실험에 들어간 약물이 있는 상황이나⁴³, IPF에서는 MMP들이 아직까지 치료적 영역에 이용되고 있지는 못하다.

폐섬유화현상에서는 MMP 뿐 아니라 TIMP가 중요한 역할을 하는 것이 알려졌다. TIMP 는 총 4가지가 있으나, 주로 TIMP-1과 TIMP-2에 대한 연구가 많다. TIMP-1과 TIMP-2는 MMP와 비공유결합을 형성하여 활성화된 모든 형태의 MMP의 작용을 억제하며 또한 비활성화된 MMP에도 TIMP-1은 MMP

-9과, TIMP-2는 MMP-2와 결합하여 그 작용을 조절한다^{11,14}. Pardo등¹⁹은 폐섬유화시기에 collagenase가 감소됨을 보고한 바 있고 지속적인 염증이 특징인 질환에서는 MMP가 증가하는 반면 섬유화가 주된 특징을 이루는 질환에서는 TIMP가 MMP에 비하여 높게 발현되는 것으로 보고되고 있다²⁰⁻²¹. 본 연구에서 BALF내 TIMP-1은 IPF에서 대조군에 비하여 증가되어 있었고 호중구수와 유의한 상관관계가 있음을 관찰하였다. 그러나 환자군에서 MMP 뿐 아니라 TIMP도 같이 증가하였으므로 MMP와 TIMP의 비율을 비교하는 것이 중요할 것으로 생각되나, 대조군에서의 MMP농도가 정확한 정량적 분석이 힘들 정도로 낮았기 때문에 MMP/TIMP비를 직접적으로 비교 분석을 할 수는 없었던 것이 본 연구의 가장 큰 취약점이다. 그러나 이제까지 환자들의 임상경과와 MMP와의 관계를 연구한 보고는 없었는데, 본 연구에서는 환자들 중 안정군에서 다른 환자들에 비해 MMP가 낮은 것을 관찰하여 MMP가 IPF병변의 활성도와 연관이 있음을 시사하였으며, 앞으로 IPF진단시의 MMP농도와 이후 임상경과를 비교 분석하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 결론적으로 본 연구의 결과 ECM, 특히 IV형 교원질을 분해하는 효소인 MMP와 그 길항제인 TIMP는 IPF의 병인에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 사료되고, MMP농도는 IPF/UIP 병변의 활성도 및 IPF의 예후를 반영하는 지표가 될 가능성을 시사하였다.

요 약

연구배경 :

특발성 폐섬유화증은 병리학적으로 폐구조가 파괴되면서 섬유아세포 및 교원질이 간질 및 폐포내에 침착하는 질환으로 교원질의 침착은 cytokine 및 성장촉진인자들에 의한 교원질생성의 증가 뿐 아니라 교원질의 분해효소의 감소로도 초래될 수 있다. IPF의 또 다른 특징인 폐구조의 파괴 및 폐포내 섬유화 현상은 기저막 파괴로 인한 섬유아세포 등의 폐포내 유입 및 비정

상적 증식이 기전으로 생각되므로 기저막의 주요 성분인 제4형 교원질을 분해하는 Matrix metalloproteinase(MMP)-2와 MMP-9이 IPF의 발병기전에 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다. 또한 병이 계속 활발히 진행되는 상태에서는 이들 효소의 농도도 높을 것이 예상되므로 본 연구는 특발성 폐섬유화증에서 질병의 진행과정에 따른 기관지폐포세척액(BALF)내 MMP 농도 및 BALF내 세포분포와의 관계를 관찰하여 IPF에서 MMP의 역할 및 예후인자로서의 가능성을 규명하고자 시행되었다.

방 법 :

서울중앙병원에서 진단된 41명(연령 59.82 ± 1.73 세, 남:여=23:18)의 IPF환자들과, IPF진단을 받았으나 1년 이상 치료하지 않고도 병이 진행되지 않았던 안정군 16명(63.6 ± 2.8 세, 남:여=13:3) 및 정상 대조군 7명을 대상으로 BAL액과 AM배양 배지에서 MMP-2와 MMP-9농도를 zymography와 densitometry에 의한 정량분석을 시행하였고, TIMP-1 농도는 상업용 ELISA kit로 측정하였다.

결 과 :

1) BAL액내 총 세포수($\times 10^6/ml$)는 IPF환자군(3.40 ± 0.20), 안정군(2.92 ± 0.39), 대조군(0.91 ± 0.15)간 유의한 차이를 보였고 AM수효($\times 10^5/ml$)와 호중구 수($\times 10^5/ml$)는 IPF환자군(24.74 ± 1.88 , 2.15 ± 0.35)과 안정군(19.16 ± 2.26 , 0.63 ± 0.11)에서 대조군(7.36 ± 1.04 , 0.052 ± 0.038)에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 호산구비율도 IPF환자군($2.83 \pm 0.66\%$)과 안정군($1.50 \pm 0.42\%$)에서 대조군($0 \pm 0\%$)에 비하여 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 림프구수나 비율은 차이가 없었다.

2) Zymography에 의한 육안적 관찰에서 IPF환자군은 34/41(82.9%), 안정군은 9/15(60%), 각각 band를 관찰하여 대조군 0/6(0%)과 차이를 보였다.

3) BALF내 MMP-2는 IPF환자군(1.36 ± 0.28)은 안정군(0.46 ± 0.13)에 비하여, 또 안정군도 대조군(0.08 ± 0.09)에 비하여 유의하게 높았다. MMP-

9은 IPF 환자군 (0.31 ± 0.058) 과 안정군 (0.22 ± 0.078)에서 대조군(0.002 ± 0.004)보다 높았다. TIMP-1도 IPF 환자군 ($36.34 \pm 8.62 \mu\text{g/ml}$)과 안정군 ($20.83 \pm 8.53 \mu\text{g/ml}$)에서 대조군($2.80 \pm 1.05 \mu\text{g/ml}$)에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$)

4) AM배양액에서는 MMP-9만이 관찰되었으며, 역시 IPF군에서 (0.80 ± 0.10) 대조군보다 (0.23 ± 0.081) 높았다.

5) BALF내 MMP-2는 전체 세포수($r=0.298$)와 호중구수($r=0.357$)와 유의한 상관관계를 보였으나($p < 0.05$), AM수($r=0.096$)나 임파구수($r=0.100$)와는 상관관계가 없었고, MMP-9은 호중구수($r=0.407$) 및 임파구수($r=0.574$)와 유의한 상관관계를 보였다. TIMP-1은 전체 세포수($r=0.338$, $p < 0.05$) 및 호중구수($r=0.449$, $p=0.059$)와 상관관계의 경향을 보였다.

결 론 :

본 연구의 결과로 MMP와 TIMP는 IPF의 병인에 있어서 중요한 역할을 하며, BALF내MMP농도는 IPF의 활성도와 연관이 있을 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis : Diagnosis and treatment. International Consensus statement. Am J respir Crit Care Med 2000;161:646-64.
2. Kelly J. Cytokines of the lung. Am Rev Respir Dis 1990;141:765.
3. Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenburg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 1991;5:155-62
4. Antoniadis HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville J, Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 1990;86:1055-64.
5. Gadek JE, Kelman JA, Fells G, Weinberger SE, Horwitz AL, Reynolds HY, Fulmer JD, Crystal RG. Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. 1979; N Engl J Med 301:737-42.
6. Selman M, Montano M, Ramos C, Chapela R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. Thorax 1986;41:355-9. IPF lung tissue : collagen, col degradation, N biosynthesis
7. Montano M, Ramos C, Gonzalez G, Vadilo F, Pardo A, Selman M. Lung collagenase inhibitors and spontaneous and latent collagenase activity in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. Chest 1989;96:1115-19.
8. Selman M, Pardo A, Barqin N, Samsore R, Ramirez R, Ramos C, Monato M, Stricklin G. Collagenase and collagenase inhibitors in bronchoalveolar lavage fluids. Chest 1991;100:151-55.
9. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Boddin MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases : a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4:197-250.
10. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999;274:21491-4.
11. O'Connor CM, FitzGerald MX. Matrix metalloproteinases and lung diseases. Thorax 1994; 49: 602-9.
12. Senior RM, Shapiro SD. Introduction : The matrix metalloproteinases. Am J Respir. Cell Mol Biol. 1992;7:119.
13. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases. Am J Respir. Cell Mol Biol. 1992; 7: 120-5.

14. Gomez D, Alonso D, Yoshiji U, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:111-22
15. Salo T, JG Lyons, F Rahemtulla, H Birkedla-Hansen, J Larvaja. Transforming growth factor- β 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 1991;266:11436-41.
16. Plunznik, D.H, R. Fridman, and R Reich.. Correlation in the expression of the type IV collagenase and the invasive and chemotactic abilities of myelomonocytic cells during differentiation into macrophages. *Exp. Hematol.* 1992;20:57-63.
17. Ray JM, WG Stetler Stevenson, The role of MMP and their inhibitors in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis *Eur Respir J* 1994;7: 2062-72.
18. Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y, Crystal RG : Intraluminal fibrosis in interstitial lung disease. *Am J Pathol* 1986;122: 443-61.
19. Pardo A, Selman M, Ramirez R, Carlos R, Montano M, Stricklin G, Raghu G, Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic lungs. *Chest* 1992;102:1085-9.
20. Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR Arbeit LA.. Markedly elevated serum MMP-9 levels in rheumatoid arthritis : a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol. Immunopathol.* 1996;78:161-71.
21. Kikuchi K, Kubo M, Sato S, Fujimoto M, Tamaki. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:973-8.
22. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1301-15.
23. Cherniack RM, Crystal RG, Kalica AR. Current concepts in idiopathic pulmonary fibrosis: a road map for the future. *Am Rev Resp Dis* 1991;143: 680-3.
24. King TE. Diagnostic advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1991;100:238-41.
25. Marinelli WA. Idiopathic pulmonary fibrosis : progress and challenge. *Chest* 1995;108:297-8.
26. 김동순, 백상훈, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김원동 : 미만성 간질성 폐질환 환자들의 폐포대식세포의 chemokine(MIP-1, IL-8) 분비능에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 1996;43(6):763.
27. Stockley RA. Measurement of soluble proteins in lung secretions. *Thorax* 1984;39:241-7
28. Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A, Leco JK, Watson A, Kossakowska AE. Expression metalloproteinases and their inhibitors in primary carcinoma. *B J Cancer* 1992;66:1188-94.
29. D'Armittento J, Dahal SS, Okaday, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 1992;91:955-61.
30. Torii K, Iida KI, Miyazaki Y, Saga S, Kondoh Y, Taniguchi H Taki F, Tagaki K, Matsuyama M, Suzuki R. Higher Concentrations of Matrix Metalloproteinases in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Adult Respiratory Distress Syndrome *Am Rev Respir Crit Care Med* 1997; 155:43-6.
31. Pardo A, Selman M, Ridge K, Barrios R, Sznajder JI. Increased Expression of Gelatinases and Collagenase in Rat Lungs Exposed to 100% Oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154: 1067-75.

32. Delclaux C, Delacourt C, d'Ortho M-P, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polynuclear neutrophil migration across basement membran. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14:288-95.
33. Sstaniford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Lynch JP, Burdict AR, Gilbert MB, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J Immuno*. 1993. 151:2825-63.
34. Nagase H, Ogagta Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvensen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans* 1991;19:715-8.
35. Welgus HG, Campell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wihelim SM, Goldberg GI, Neutral Metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1990;86:1496-502.
36. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD. Immunohistochemical Study of Metalloproteases and Their Tissue Inhibitors in the Lungs of Patients with Diffuse Alveolar Damage and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* 1996;149:1241-56.
37. Suga M, Iynaga K, Okamoto K, Ygushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M. Characteristic Elevation of Matrix Metalloproteinase Activity in Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000;162:1949-56.
38. Fukuda Y, Ishizaki M, Kodoh S, Kitaichi M, Yamanaka N, Localization of matrix metalloproteinases-1,2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998;70:687-98
39. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(3):L562-74
40. Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, Hunninghake GW. Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1998;152:821-8.
41. Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Int* 1998;48:954-63.
42. Lemjabbar H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya M-L, Wallaert B, Harf A, Lafuma C. Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1999;20:903-13.
43. Talbot DC, Brown PD, Experimental and clinical studies on the use of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of lung cancer 1996; 14:2528-33.