

## 백서 기관 점막의 SO<sub>2</sub> 노출 후 회복과정의 조직학적 관찰 및 laminin의 발현에 관한 연구

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실

이형석 · 태 경 · 조석현 · 한장희 · 정진석

= Abstract =

The Histologic Findings and the Expression of Laminin in the Mucosa of the Rat Trachea During Healing Process after Exposure to Sulfur Dioxide Gas

Hyung-Seok Lee, MD, Kyung Tae, MD, Seok-Hyun Cho, MD,

Jang-Hee Han, MD, Jin-Suck Jeong, MD.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

**Background and Objectives** : Sulfur dioxide gas is one of the major airborne pollutants noxious to human in industrialized countries. The most vulnerable areas in the human respiratory system were the trachea and main bronchi and a gradient of decreasing damage was observed in the peripheral tracheobronchial tree. Induced functional alteration was increased mucosal permeability, and morphological changes were epithelial sloughing, intracellular edema, mitochondrial swelling, widened intercellular spaces, and ciliary cytoplasmic extrusions.

The laminins are a family of extracellular matrix glycoproteins localized in the basement membrane. Their primary role is cell-matrix attachment, but many additional biologic activities, including promoting cell growth and migration, tumor growth and metastasis, wound repair, and graft survival, have been demonstrated.

**Materials and Methods** : Histologic changes and expression of laminin in tracheal mucosa sacrificed at 1 day, 2 day, 3 day, 1 week, 2 weeks, and 3 weeks after continued SO<sub>2</sub> exposure of 250 ppm for 30 minutes a day (to 7week) were studied in rats.

In this study, mild immune reaction for laminin was noted at the apical cytoplasm of epithelial cells and basement membrane one day after a 7 week SO<sub>2</sub> exposure. The cilia and nuclei of epithelial cells were normal and no immune reaction was noted in Goblet cells. The lamina propria of the tracheal tissue was infiltrated by monocytes and lymphocytes. Results : At 24 hours after exposure, all tracheal cells except Goblet cells revealed a mild immune reaction for laminin. No immune reactions were noted in the basement membrane. At 72 hours after exposure, mild or moderate immune reactions for laminin was seen in the tracheal cell cytoplasm. Irregular faint immune reaction for laminin was noted in the basement membrane. At 1 week after exposure, strong immune reaction for laminin was detected over all tracheal cells, and the basement membrane was seen clearly. At 2~3 weeks after exposure, strong immune reaction for laminin was seen in all tracheal epithelial cells except Goblet cells and a mild immune reaction was partly revealed in the basement membrane.

**Conclusion** : Our study suggests that SO<sub>2</sub> produces histologic damage on the tracheal mucosa. Longer duration after exposure of SO<sub>2</sub> makes more progressive healing on the tracheal mucosa and increased immunoreactivity for laminin.

**Key Words** : Sulfur dioxide · Laminin

## 서론

아황산 가스는 산업화된 사회에서 발생하는 대표적인 공기오염물질의 하나로 인체에 유해한 가스로서 알려져 있다. 소아에서 아황산 가스에 노출시 만성상기도염의 위험도를 증가시키게 된다<sup>1)2)</sup>. 인체의 호흡기 중 기관과 주기관지에 가장 많은 손상을 주며, 이러한 손상의 정도는 말초기관지로 갈수록 감소하는 경향을 보인다<sup>3)</sup>. 기능적으로 점막상피세포의 투과성을 증가시키고, 기도내 분비물에서 산도를 증가시켜 섬모운동의 장애를 초래하고, 조직학적으로 상피세포의 탈락, 세포의 부종, 미토콘드리아의 종창, 세포간 간격의 증가 및 섬모의 탈락과 같은 변화를 일으킨다<sup>4)</sup>. Clark 등<sup>5)</sup>은 400ppm의 아황산 가스를 7주간 흰쥐에 폭로한 결과 점막하 점액선의 점진적인 비대와 증식 및 기도 점막상피세포의 편평화가 일어남을 관찰하였고, 이러한 변화는 노출 중단 2주 후에 정상화됨을 보고 하였다. Vai 등<sup>6)</sup>은 SO<sub>2</sub>를 만성적으로 흰쥐에 폭로한 후 광학 및 전자 현미경으로 관찰한 결과 기관과 기관지의 상피세포에서 ferritin의 수송이 증가되었고, 이러한 상기도의 기능적인 변화는 SO<sub>2</sub> 폭로 후 3개월이 지나서야 정상화되었다고 보고 하였다.

Laminin은 1979년 Timpl에 의해 처음으로 분리되고 명명되었으며, type IV collagen의 세 번째 사슬로 생각되어져 왔다<sup>7)</sup>. laminin은 상피세포, 지방세포, 근세포 및 섬유세포의 기저막에 존재하는 세포의 기질을 구성하는 당단백질로 세포와 기질의 부착, 세포의 성장과 이동, 종양의 증식과 전이, 신경의 성장과 재생, 상처의 치유 및 이식조직의 생존에 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>8)9)</sup>.

이에 저자는 흰쥐에 아황산 가스를 7주간 폭로하여 기관 점막의 손상을 유발시킨 후 시간에 따른 회복과정을 조직학적인 관찰을 하였고, 세포의 성장과 이동 및 상처의 치유에 관여하는 laminin의 발현 양상을 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에서는 한양대학 청정동물실에서 사육 중인 생후 4주령 체중 200gm 내외의 SD(Sprague-Dawley)계 흰쥐를 실험동물로 사용하였다. 대조군 2마리와 실험군 12마리를 사용하였고, 실험군은 매일 30분간 SO<sub>2</sub> 가스로 7주간 피폭하였다. 피폭을 중단 후 24시간, 48시간, 72시간, 1주, 2주, 3주 후 흰쥐를 경추탈구법으로 2구씩 희생시켜 기관을 절취하였다. 절취한 기관은 즉시 immuno-fixation 용액에 고정하였다.

### 2. 실험 방법

흰쥐의 기관내 laminin의 분포 및 형성 정도를 면역조직화학적 염색으로 관찰하기 위하여 각 조직을 immuno-fixation 용액(pH 7.4)에 7일간 고정시킨 후 6 $\mu$ m의 파라핀 절편을 제작하고 laminin 염색을 시행하였다.

#### ■ Laminin 염색

탈파라핀 및 함수과정을 거친 후 phosphate buffered saline(PBS) 용액에 세척하고 2~3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> methanol 용액에 5분간 반응시킨 다음 PBS 및 protease K(DAKO Co, USA) 용액에 37°C에서 15분간 적용하였다. 일차항체는 rabbit anti-laminin (Sigma Co, USA)를 1:20으로 희석하여 37°C에서 90분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였고, 이차항체는 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vectastain Co, USA)를 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 이어서 ABC(avidin-biotin complex, Vectastain Co, USA) kit로 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 발색은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 이용하였으며, 1% methylene green으로 대조염색 후 탈수, 청명 후 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결과

#### ■ 흰쥐 기관상피의 laminin 면역 반응소견

SO<sub>2</sub> 폭로를 중단한 후 24시간 경과군의 흰쥐 기관상피는 대부분의 상피세포가 첨단세포질(apical cytoplasm)과 기저막(basement membrane)에 약한 laminin

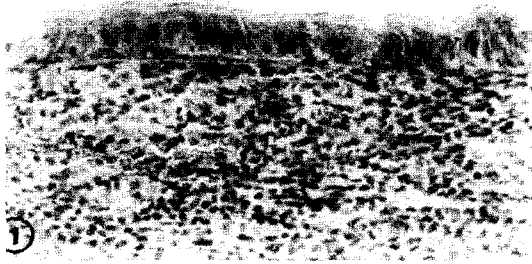


Fig 1. A microphotograph of rat tracheal mucosa expressing laminin at one day after 7 weeks SO<sub>2</sub> exposures. Mild immune reaction for laminin are seen apical cytoplasm of epithelial cells and basement membrane.(Immune reaction, stain, X400)

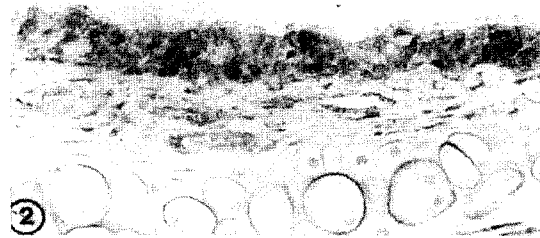


Fig 2. A microphotograph of rat tracheal mucosa expressing laminin at 48 hours after 7 weeks SO<sub>2</sub> exposures. All tracheal cells except Goblet cells revealed the mild immune reaction for laminin, but no immune reaction on the basement membrane. (Immune reaction, stain, X400)

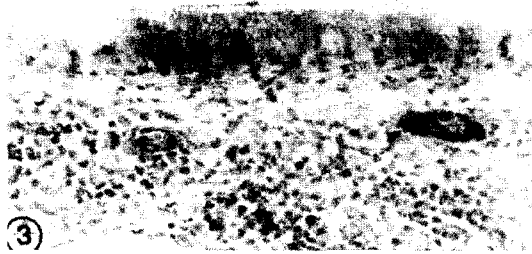


Fig 3. A microphotograph of rat tracheal mucosa expressing laminin at 72 hours after 7 weeks SO<sub>2</sub> exposures. Mild or moderate immune reactions for laminin are seen in tracheal cell cytoplasm. Irregular faint immune reaction for laminin on the basement membrane. (Immune reaction, stain, X400)



Fig 4. A microphotograph of tracheal mucosa expressing laminin at 1 week after 7 weeks SO<sub>2</sub> exposures. Strong immune reaction for laminin are detected over all tracheal cells, and basement membrane are seen clearly. (Immune reaction, stain, X400)

양성반응(+)이 나타났으며 상피의 섬모(cilia)와 핵, 배상세포(Goblet cell)에는 반응이 없었다. 한편, 기관의 고유층(lamina propria)은 단핵구와 림프구로 침윤되어 있었다(Fig. 1). SO<sub>2</sub> 폭로 중단 후 48시간 경과군에서는 배상세포를 제외한 대부분의 기관상피세포에서 laminin의 면역반응이 모든 세포질에 고르게 약한 반응(+)이 관찰되었고, 기저막에서 laminin 반응은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2).

SO<sub>2</sub> 폭로 중단 후 72시간이 경과한 흰쥐 기관조직은 상피세포의 침단세포질에 약한 양성반응과 일부 세포에는 중등도의 laminin 반응이 관찰되었고, 기저막에서 반응이 뚜렷하지 못하였다(Fig. 3). SO<sub>2</sub> 폭로 중단 후 1주일 경과군에서는 기관상피에 강한

laminin 면역반응이 나타났으며, 기저막이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 4). SO<sub>2</sub> 폭로 후 2주일 및 3주일 경과군에서는 기관상피세포의 세포질 전역에 강한 laminin 면역반응이 고르게 나타나 정상적인 기관상피에서 laminin 반응과 거의 동일하였다. 한편, 기저막에서도 약한 laminin 면역반응이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

## 고찰

이황산 가스(sulfur dioxide)는 산업화된 사회에서 발생하는 대표적인 공기오염물질의 하나로 인체에 유해한 가스로 알려져 있다. 정상적인 대기 온도에서 이산화황은 기체상태로 존재하며, 수용성이므로 물과

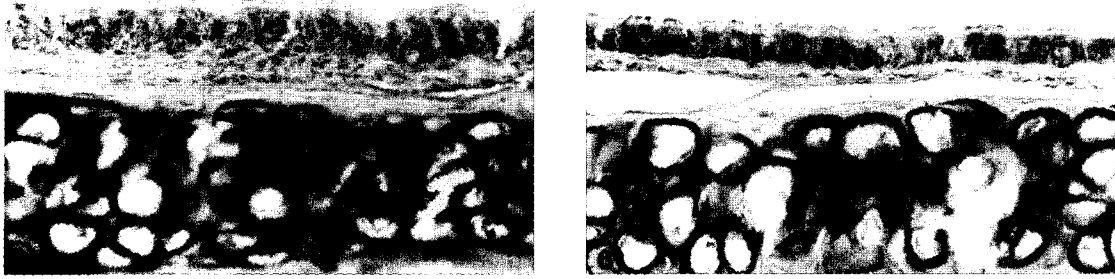


Fig 5, 6. A microphotograph of tracheal mucosa expressing laminin at 2 weeks and 3 weeks after 7 weeks SO<sub>2</sub> exposures. Strong immune reaction for laminin are seen on the cells of tracheal epithelial cells except Goblet cells and the mild laminin immune reactions are partly revealed in the basement membranes.(Immune reaction, stain, X400)

접촉하면 황화산(sulfurous acid)이 발생하여 비인강과 호흡기에 심한 자극을 주게 된다<sup>10)11)12)</sup>.

대부분의 사람들은 0.3~1ppm의 농도에서 아황산가스의 냄새를 맡을 수 있으며, 3ppm이상의 농도에서는 자극적이다<sup>12)</sup>. 급성 노출시 5ppm의 농도에서 코와 인후의 건조감을 느끼고, 기관내 기류의 저항이 증가하게 되며, 6~8ppm의 농도에서는 tidal volume이 감소한다<sup>10)</sup>. 10ppm의 농도에서는 재채기, 기침, 질식, 비분비물의 증가 및 비출혈을 일으키며, 20ppm에서는 기관지 경련을 일으킨다. 50ppm에서는 심한 불편을 느끼나 노출 시간이 30분 이내일 경우는 손상을 주지 않는다. 50~100ppm의 농도에서는 수분간성분의 반사적 폐쇄를 유발할 수 있다. 400~500ppm의 농도는 생명이 위험할 수 있으며, 1000ppm이상의 농도에서는 호흡 역제로 10분 이내에 사망할 수 있다<sup>13)14)</sup>.

아황산 가스는 인체의 호흡기 중에서 기관과 주기관지에 가장 많은 손상을 주며, 이러한 손상의 정도는 말초기관지로 갈수록 감소하는 경향을 보인다<sup>3)</sup>. 기능적으로 점막상피세포의 장애를 초래하고, 조직학적으로 상피세포의 탈락, 세포의 부종, 미토콘드리아의 종창, 세포간 간격의 증가 및 섬모의 탈락과 같은 변화를 일으킨다<sup>4)</sup>. Okuyama 등<sup>15)</sup>은 병아리에 SO<sub>2</sub> (3.4~18.5 parts per million ppm)를 14일 동안 폭로한 결과 기관의 점막은 증식되었으며, 분열 중인 점막상피세포, 대식세포, 임파구, 형질세포 및 증성백혈구등이 상피와 고유판에서 발견되었다고 하였다.

Bauer<sup>6)</sup>는 조류에서 SO<sub>2</sub>를 흡인시킨 후 기관과 기관지의 분비 변화를 연구한 결과 정상보다 350%까지 점액 분비가 있었고, 당단백질은 50% 정도 증가하였다고 보고하였다. Clark 등<sup>5)</sup>은 400ppm의 아황산가스를 7주간 흰쥐에 폭로한 결과 점막하 점액선의 점진적인 비대와 증식 및 기도 점막상피세포의 편평화가 일어남을 관찰하였고, 이러한 변화는 노출 중단 2주 후에 정상화됨을 보고하였다. Vai 등<sup>6)</sup>은 SO<sub>2</sub>를 만성적으로 흰쥐에 폭로한 후 광학 및 전자 현미경으로 관찰한 결과 기관과 기관지의 상피세포에서 ferritin의 수송이 증가되었고, 이러한 상기도의 기능적인 변화는 SO<sub>2</sub> 폭로 후 3개월이 지나서야 정상화되었다고 보고하였다. 이 등<sup>17)</sup>에 의하면 250ppm의 SO<sub>2</sub>을 1일 30분씩 7주간 폭로된 흰쥐 기관의 호흡상피에서 심한 병변을 일으키며, 제 7주째에는 laminin 면역반응이 약하게 관찰되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 호흡 점막 상피 세포의 기능적인 변화는 관찰하지 않았고, 흰쥐에서 SO<sub>2</sub> 7주간 폭로 후 2~3주일 경과군에서 laminin의 면역반응이 정상적인 기관 상피에서와 거의 동일하게 관찰되었다.

Laminin은 1979년 Timpl에 의해 처음으로 분리되고 명명되었으며, type IV collagen의 세 번째 사슬로 생각되어져 왔다<sup>7)</sup>. laminin의 구조는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 3개의 chain으로 구성되어지는 십자형태(cruciform-like structure)를 나타내며, 각각의 chain은 아미노산 배열에 있어서 약간의 차이를 보인다. 400 kDa의  $\alpha$  chain은 3개의 globular domain을 형성하며, 200 kDa

의  $\beta$ ,  $\nu$  chain은 각각 2개의 globular domain을 형성한다<sup>7)8)9)</sup>. laminin은 상피세포, 지방세포, 근세포 및 섬유세포의 기저막에 존재하는 세포외 기질을 구성하는 당단백질로 생물학적 상태와 발달의 단계에 따라 기저막의 구조, 세포의 분화와 이동, 세포간 접착 및 극성, 상처 치유, 종양의 침윤과 전이, 자가면역질환, 호르몬의 상호작용, 세균의 접착, 항세균 및 항종양 효과 등의 다양한 구조적, 기능적인 역할을 담당한다<sup>8)9)18)</sup>.

본 연구에서는 흰쥐를 실험 모델로 하여 SO<sub>2</sub>에 7주간 폭로시킨 후 24시간 경과군에서 대부분의 첨단 세포질과 기저막에 약한 laminin 양성반응을 보였고, 상피의 섬모와 핵, 배상세포에는 반응을 보이지 않는 정도의 손상이 관찰되었다. 이러한 변화는 2~3주 경과군에서 기관 상피 세포의 세포질 전역에 강한 laminin 면역반응이 고르게 나타나 정상적인 기관 상피에서 laminin 반응과 거의 동일하였다. 따라서, 기관점막의 손상 후 치유과정에 있어서 laminin이 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

## 결론

SO<sub>2</sub> 가스는 호흡 기관점막에 심한 병변을 일으키는 유해한 물질로 알려져 있으며, laminin은 세포 기저막에 존재하고 세포외 기질을 형성하며, 상처의 치유에 관여하는 당단백질로 호흡 기관 점막의 치유과정에 있어서 그 활성도의 변화에 대하여 관찰하였다. 흰쥐 기관 점막에 SO<sub>2</sub> 250 ppm을 매일 30분, 7주간 폭로시킨 후 24시간 경과군은 대부분의 기관상피세포에서 약하게 laminin의 반응을 보였다. 72시간 경과군에서 중등도의 laminin 반응이 관찰되었고, 1주일 경과군에서 기관 상피세포에 강한 laminin 면역반응이 나타났으며, 기저막이 뚜렷이 관찰되었다. 2주일 및 3주일 경과군에서는 기관상피세포의 세포질 전역에 강한 laminin 면역반응이 고르게 나타나 정상적인 기관상피에서 laminin 반응과 거의 동일하였다.

이상의 결과는 흡입된 아황산 가스는 흰쥐 호흡 기관 점막에 심한 병변을 일으켰으며, 폭로 후 시간이 경과함에 따라 조직의 치유과정이 일어나면서 laminin의 활성도가 증가하였다. 따라서, 기관점막의

손상 후 치유과정에 있어서 laminin이 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었다.

중심 단어 : 아황산 가스·Laminin

## References

- 1) Mainz. Ministry of environment and health of the state of Rheinland-Pfalz: *Clean air plan. Ludwigshafen-Frankenthal 237-50,1989.*
- 2) Dusseldorf. Ministry of environment, area and agriculture of the state of Nordrhein-Westfalen: *Register of effects of clean air acts southern rhine and mid rhine region: Effects of immissions of air pollutants on humans 95-102,1990.*
- 3) Stratmann U, Lehmann RR, Steinbach T, Wessling G: *Effect of sulfur dioxide inhalation on the respiratory tract of the rat. Zentralbl-Hyg Umweltmed 1991;192(4):324-35.*
- 4) Riechelmann H, Maurer J, Kienast K, Hafner B, Mann WJ: *Respiratory epithelial exposed to sulfur dioxide-functional and ultrastructural alterations. Laryngoscope 1995;105:295-9.*
- 5) Clark JN, Dalbey WE, Stephenson KB: *Effect of sulfur dioxide on the morphology and mucin biosynthesis by the rat trachea. J Environ Pathol Toxicol 1980;4(5-6):197-207.*
- 6) Vai F, Fournier M, Lafuma E, Pariente R: *Abnormalities in bronchial permeability after induction of a chronic SO<sub>2</sub> bronchopathy in rat. Poumon Coeur 1979;35(6):361-5.*
- 7) Monique A, Neil S: *The role of laminins in basement membrane function. J Anat. 1998; 193:1-21.*
- 8) Katherine MM, Hynda KK: *The laminins. Int J Biochem Cell Biol 1996;28:957-9.*
- 9) Campell JH, Terranova VP: *Laminin: molecular organization and biological function. J Oral Pathol 1988;17:309-23.*

- 10) Robinson DG, Lakshminarayan S: *Acute inhalation injury. Environmental Emergency* 1992;10:409-35.
11. Burg RV: *Sulfur dioxide. Journal of applied toxicology* 1996;16(4):365-71.
12. Petruzzi S, Musi B, Bignami G: *Acute and chronic sulfur dioxide exposure: an overview of its effects on humans and laboratory animals. Ann Ist Super Sanita* 1994;30(2):151-6.
13. Ellenhorn MJ, Barceloux DG: *Medical Toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. Elsevier, New York, 1988.*
14. Atkinson DA, Sim TC, Grant JA: *Thiens sodium metabisulfite and SO<sub>2</sub> release: an under-recognized hazard among shrimp fishermen. Ann Allergy* 1993;71(6):563-6.
15. Okuyama H, Majima Y, Dannerbery AM Jr, Suga M, Bang BG, Bang FB: *Quantitative histologic changes produced in tracheal mucosa of young chickens by the inhalations of sulfur dioxide in low concentrations. J Environ Sci Health* 1979;13:267-300.
16. Bauer E: *In vivo sampling and biochemistry of tracheobronchial secretions in the gowl: Influence of sulfur dioxide inhalation. Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1981;34:547-50.
17. Lee HS, Yu YH, Cho SH, Kim KR, Chung HS: *Expression of laminin in rat tracheal mucosa after exposure to sulfur dioxide gas. Korean J Bronchoesophagol* 2000;6(1):29-37.
- 18) Terranova VP, Lyall RM: *Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: A mechanism for epithelial cell apical migration. J Periodontol* 1986;57:311.