

## 자연기흉환자의 폐기포에서 TGF-β 1 단백질 발현에 대한 연구

김광호\* · 조정수\* · 김영삼\* · 윤용한\* · 김정택\* · 백완기\* · 김루시아\*\* · 송순욱\*\*\*

### TGF-β1 Protein Expression in Bullae of Patients with Spontaneous Pneumothorax

Kwang Ho Kim, M.D.\*, Jung-Soo Cho, M.D.\*, Young Sam Kim, M.D.\*, Yong Han Yoon, M.D.\*,  
Joung Taek Kim, M.D.\*, Wan Ki Baek, M.D.\*, Lucia Kim, M.D.\*\*\*, Sun U. Song, Ph.D.\*\*\*

**Background:** In our previous study, we demonstrated that transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF-β1RII) may have a role in the formation of bullae. In this study, we investigated if expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) ligand was altered in a bullous lung tissue by immunohistochemical staining of bullous tissues from patients with primary spontaneous pneumothorax. **Material and Method:** Bullous lung tissues were obtained from 36 patients with primary spontaneous pneumothorax, including 34 males and 2 females aged 14 to 38 years old. **Result:** Of the 36 patients, 19 were TGF-β1 positive and 24 were transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF-β1RII) positive. Among the 19 TGF-β1 positives, 15 were also TGF-β1RII positive, observation at high magnification showed that strong immunohistochemical stain was detected in the boundary region between the bullous and normal lung tissues. **Conclusion:** These results suggest that overexpression of TGF-β1 may be involved in the formation of a bulla as well as the alteration of TGF-β1RII expression. Further molecular studies are needed to elucidate the more detailed molecular mechanisms of the bulla formation.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:805-809)

**Key words:** 1. Bullae  
2. Proteins

### 서 론

자연기흉의 원인이 되는 폐기포의 형성기전에 대하여는 아직도 확실히 밝혀지지 않았지만 폐포 벽에 작용하는 공기압의 변화는 폐기포의 형성과 폐기포의 파열에 중요한 역할을 할 것이라는 설명이 설득력이 있음은 부정할 수 없을 것이다[1]. 폐포내의 공기압이 폐포벽에 미치는

영향, 즉 폐포벽에 대한 국소적인 surface tension의 변화와 더불어 폐포벽의 구조적인 변화는 폐기포 형성에 중요한 요인이 될 것으로 생각된다[2]. 그러므로 폐포벽의 분자유전학적인 변화는 폐포벽의 구조적인 변화를 초래하여 폐기포 형성의 원인이 될 것으로 추론할 수 있다. 정상 폐조직의 발생과 발달 시 폐의 발달을 촉진시키는 유전자 즉 유전자 발현이 증가하는 유전자들(up-regulated genes)에는

\*인하대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Inha University

\*\*인하대학교 의과대학 병리학교실

Department of Pathology, College of Medicine, Inha University

\*\*\*인하대학교 의과대학 임상연구센터

Clinical Research Center, College of Medicine, Inha University

†본 연구는 인하대학교 Research Grant (INHA-30318-01)의 지원에 의하여 연구되었음.

‡본 논문 내용은 2005년 제37차 대한흉부외과학회 추계학술대회 포럼에서 발표되었음.

논문접수일 : 2006년 7월 4일, 심사통과일 : 2006년 8월 8일

책임저자 : 송순욱 (400-711) 인천광역시 중구 신흥동 3가 7-206, 인하대학교 의과대학 임상연구센터

(Tel) 032-890-2460, (Fax) 032-890-2462, E-mail: sunuksong@inha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

Table 1. Patient's profile

Number of patients	36
Age (years)	14~38
Sex (M : F)	34 : 2
Surgical indications	
Recurrence	25
Persistence	5
Visible bulla	4
Bilaterality	1
With hemothorax	1
Site of pneumothorax	
Right	13
Left	22
Both	1

fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF)와 platelet-derived growth factor (PDGF)가 있으며 반대로 폐 조직의 발달을 저해하는, 즉 유전자 발현이 감소하는 유전자(down-regulated gene)에는 transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )가 있다[3]. TGF- $\beta$ 1의 신호전달체계가 세포내에서 증가하는 경우, cellular matrix (ECM)의 분비를 증가시켜 주변 조직의 섬유화를 촉진시킬 수 있음은 이미 잘 알려진 사실이다[4]. 본 연구팀은 TGF- $\beta$ 1의 수용체인 TGF- $\beta$ 1RII의 과발현이 폐 기포 형성에 관계가 있을 것이라 보고한 바가 있다[5]. 본 연구에서 저자들은 자연기흉환자의 수술 시 획득한 폐기포조직에서 TGF- $\beta$ 1의 발현 정도를 monoclonal antibody를 이용한 면역조직화학적 염색법으로 염색하고 이를 분석하여 TGF- $\beta$ 1 단독 또는 TGF- $\beta$ 1RII와의 공동 과발현이 TGF- $\beta$ 1 신호전달체계를 변화시켜 폐기포 형성에 어떠한 변화를 줄 수 있는지에 대하여 조사하고자 하였다.

### 대상 및 방법

비디오흉강경술을 실시하여 폐기포 절제술을 실시한 환자 36명을 대상으로 하였다. 36명 중 남자는 34명이었으며 환자의 연령 분포는 14세에서 38세까지였다. 흉강경술을 받게된 이유로는 재발성 25예, 지속성 5예, 폐기포가 흉부 X-선촬영상 발견된 경우 4예 등이었으며, 우측 기흉이 13예, 좌측 기흉이 22예, 양측성 기흉이 1예였었다(Table 1).

흉강경술을 실시하여 폐기포를 찾아내어 가능한 한 폐기포벽에 손상을 피하면서 폐기포가 발생된 폐조직을 폐

Table 2. Results of immunohistochemical staining

	Positive	Negative
TGF- $\beta$ 1	19	17
TGF- $\beta$ 1R II	24	12
TGF- $\beta$ 1 & TGF- $\beta$ 1R II	15	21

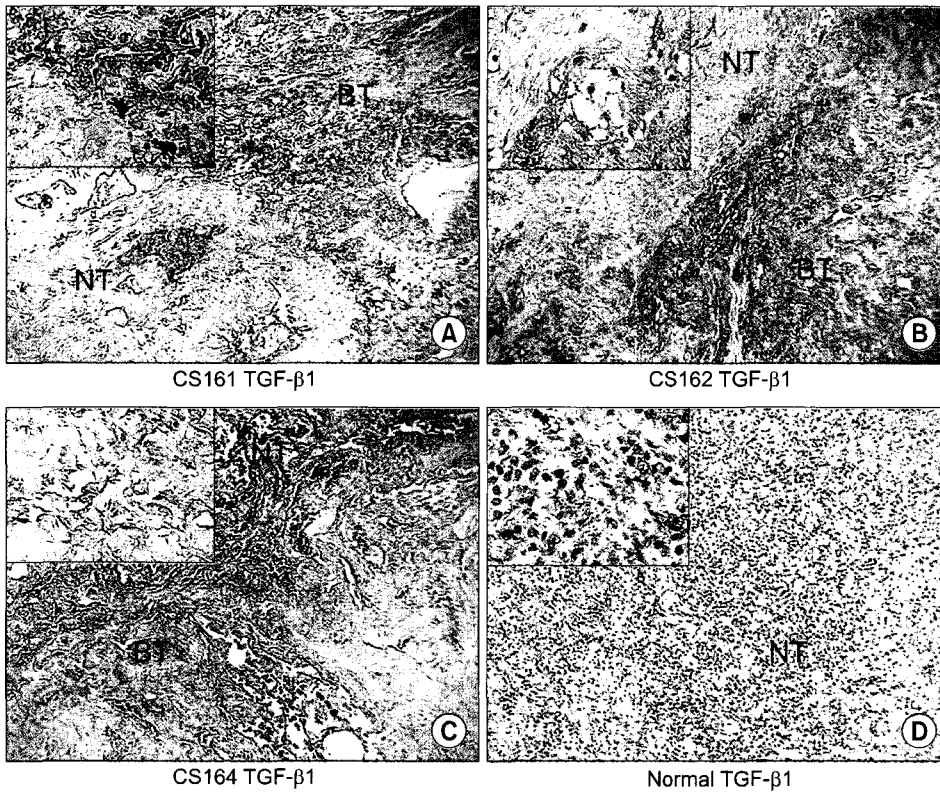
TGF- $\beta$ 1=Transforming growth factor  $\beta$ 1; TGF- $\beta$ 1R II=Transforming growth factor  $\beta$ 1 receptor II.

기포를 포함하여 GIA stapler를 이용하여 췌기절제술을 실시하였다.

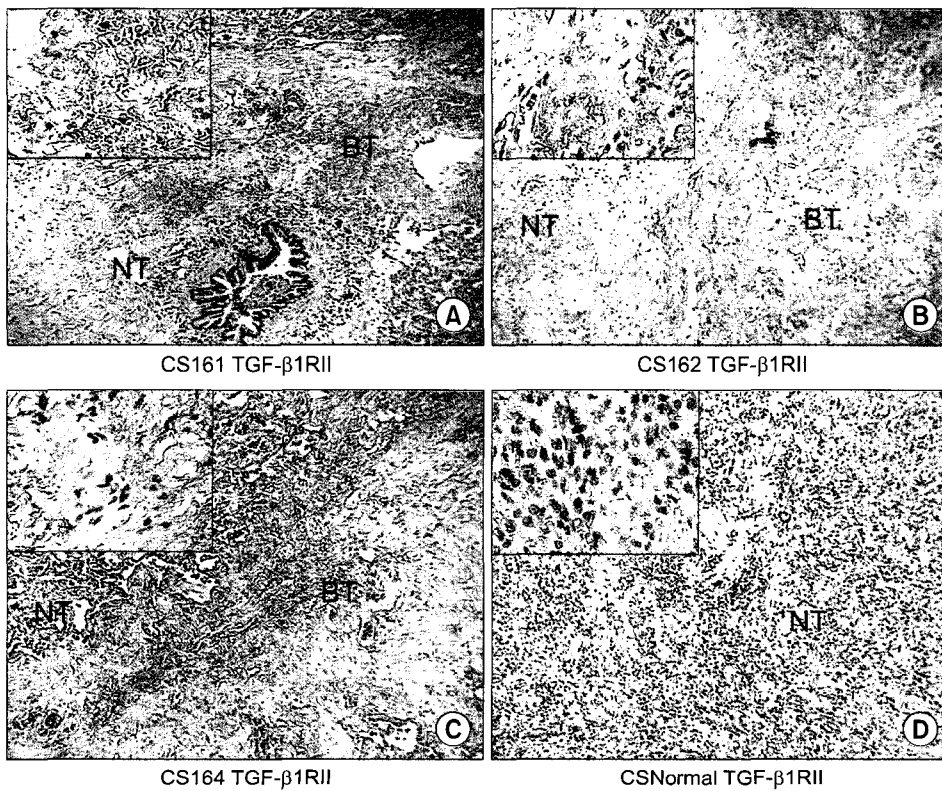
절제된 폐기포 조직은 즉시 formalin 용액에 고정을 하였으며 면역조직화학적 분석을 위하여 준비하였다. 대조군으로 폐암 환자에서 폐 절제 시 암 조직과 멀리 위치한 정상 조직을 이용하였다. 면역조직화학적 염색 분석을 위하여 formalin에 고정된 폐기포 조직을 paraffin에 포매한 후 이 포매된 조직을 5~6  $\mu$ m의 두께로 절편을 만들었다. 표본 준비를 위하여 절편들을 100% hydrolyzed xylene과 75% alcohol로 paraffin을 탈취하였다. 절편 내의 과산화제 (intrinsic peroxidase)의 활동을 제거키 위하여 3%의 과산화수소와 반응을 시켰다. 단백질의 분해(degradation)를 방지하기 위하여 실온에서 10분간 proteinase inhibitor (Histostat<sup>TM</sup> SP Kit 85-9043, Zymed, USA)을 첨가하였다. Anti-TGF- $\beta$ 1 ligand monoclonal antibody (1 : 50,000, Serotec, UK)와 anti-TGF- $\beta$ 1RII monoclonal antibody (1 : 100, Santa Cruz, USA)를 희석하여 moisture chamber에서 1시간 동안 항체와 반응시켰다. Biotin-labelled secondary antibody (Histostat<sup>TM</sup> SP Kit 85-9043, Zymed, USA)를 희석하지 않고 10분 동안 조직표본과 실온에서 반응토록 하고 Streptavidin labeled horse radish peroxidase (HRP)를 10분 동안 실온에서 조직표본과 반응시켰다. Streptavidin-HRP에 반응하는 stable DAB (3,3-diaminobenzidine tetrachloride, Invirogen, USA)을 사용하여 실온에서 5분간 조직표본의 색깔을 나타나게 하였다. 위와 같은 방법으로 대조군에서도 실시하였고 일차 항체 없이 이차 항체만을 사용하였다.

### 결 과

Anti-TGF- $\beta$ 1 ligand 또는 anti-TGF- $\beta$ 1RII monoclonal antibody 갖는 폐기포조직의 면역조직화학적 염색에서 폐기포조직에서 이러한 단백질들이 높은 발현을 보이는 것이 측정되었다. 즉 36 조직표본 중 19 표본에서 anti-TGF- $\beta$ 1



**Fig. 1.** Results of immunohistochemical staining of bullous tissues using TGF- $\beta$ 1 antibody (A, B, C). Pictures of bullous tissues immunohistochemically stained with TGF- $\beta$ 1 antibody from three patients (CS161, 162 and 164), magnification  $\times 100$ . Lung tissues were positive for TGF- $\beta$ 1 antibody at the border of the bullous and normal lung tissue. (D) Picture of normal tissue immunohistochemically stained with TGF- $\beta$ 1 antibody, magnification  $\times 100$ . Some background stain of TGF- $\beta$ 1 antibody was observed in red blood cells of both bullous and normal tissues. BT=Bulla tissue and NT=Normal tissue. Insets= Higher magnification views ( $\times 400$ ).



**Fig. 2.** Results of immunohistochemical staining of bullous tissues using TGF- $\beta$ RII antibody (A, B, C). Pictures of bullous tissues immunohistochemically stained with TGF- $\beta$ RII antibody from three patients (CS161, 162 and 164), magnification  $\times 100$ . Lung tissues were positive for TGF- $\beta$ RII antibody at the border of the bullous and normal lung tissue. (D) Picture of normal tissue immunohistochemically stained with TGF- $\beta$ RII antibody, magnification  $\times 100$ . BT=Bulla tissue and NT=Normal tissue. Insets= Higher magnification views ( $\times 400$ ).

ligand antibody가 양성으로 나타났으며 anti-TGF- $\beta$ 1RII는 24 표본에서 양성으로 관찰되었다(Table 2). 19 표본의 TGF- $\beta$ 1 ligand 양성 조직들 중, 15 표본에서는 anti-TGF- $\beta$ 1RII 단백질도 양성 반응을 보였다. TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII 두 단백질 모두 양성 반응을 보이는 조직들을 자세히 분석한 결과 두 가지 항체에 대하여 모두 양성을 나타내는 염색 부위는 정상 폐조직과 폐기포의 경계 부위에서 강하게 염색됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2) 이에 반하여 암환자로부터 얻은 정상 폐 조직 부위에서는 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 염색이 주로 이차 항체에 대한 background 염색만 주로 관찰되었고, 일차 항체에 대해서는 음성으로 관찰되었다(Fig. 1, 2).

## 고 찰

자연기흉 환자에서 획득된 폐기포 조직의 면역조직화학적 염색에 의한 분석 결과 폐기포에서의 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 발현에 많은 변화를 보여주고 있음을 알 수 있었다. Lijnen 등[6]과 Wakefield와 Roberts[7]는 TGF- $\beta$ 1RII와 TGF- $\beta$ 1 ligand의 과발현은 TGF- $\beta$ 1 신호전달체계의 비정상적인 활성화에 관계가 있음을 발표한 바 있다. 본 연구팀도 과거 연구결과 발표에서[5] TGF- $\beta$ 1RII protein이 면역조직화학적 염색법으로 정상 폐조직과 폐기포 조직의 경계 부위에서 과발현됨을 보고한 바 있다. 이상을 분석하여 볼 때 자연기흉환자 중에서 TGF- $\beta$ 1RII의 과발현이 TGF- $\beta$ 1 신호전달체계의 비정상적인 증가를 초래하게 되고 이로 인하여 세포외간질 단백질(extracellular matrix protein)을 대량 분비하여 섬유화를 촉진하는 것으로 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 선행 연구결과들을 살펴볼 때, TGF- $\beta$ 1 신호전달체에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 TGF- $\beta$ 1 ligand의 발현을 폐기포 조직에서 조사하는 것이 매우 중요한 의미가 있을 것으로 생각되었다. 따라서, 본 연구에서는 TGF- $\beta$ 1 신호전달체계의 증가에 직접적으로 관여할 수 있는 TGF- $\beta$ 1 ligand의 발현을 관찰하게 되었다. 본 연구결과에서는 TGF- $\beta$ 1 ligand의 발현이 폐기포 조직에서 과발현되고 있음이 관찰되었고, 이러한 결과에서 유추할 수 있는 것은 만약 TGF- $\beta$ 1 ligand의 과발현과 TGF- $\beta$ 1RII의 과발현이 동시에 발생된다면 폐기포 조직에서의 섬유화를 더욱 심하게 초래할 수 있을 것이라는 사실이다.

본 연구에서 36명의 자연기흉 환자에서 흉강경술로 절제된 폐기포 조직에서 TGF- $\beta$ 1 ligand antibody에 대한 양성 반응을 보인 환자는 19예였으며 24명의 환자에서는 TGF-

$\beta$ 1RII antibody에 대하여 24명이 양성반응을 보였다(Table 2). 19명의 TGF- $\beta$ 1 ligand antibody에 양성을 보인 환자 중 15명은 anti-TGF- $\beta$ 1RII antibody에 양성반응을 보였다. 즉 저자들의 지난 번 연구 결과에서 anti-TGF- $\beta$ 1RII antibody에 양성반응 77.4%[4]보다는 낮지만 66.7%의 환자에서 보여주고 있다. 이 같은 결과는 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 과발현이 폐의 섬유화에 중요한 요인이 될 수 있음을 보여주는 것으로 생각할 수 있다. 또한 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 과발현이 정상 폐조직과 폐기포조직의 경계 부위에서 동시에 같이 과발현되고 있어 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 공동 과발현은 세포외기질 단백질의 증식을 유도하여 폐기포조직에서 섬유화를 가속화시키거나 확대시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다 하겠다. 따라서 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII의 공동 과발현은 시너지 효과를 일으켜 이들이 동시에 과발현되는 환자에서는 거대 폐기종이나 다수의 폐기종을 갖지 않을까 추론된다. 참고로 TGF- $\beta$ 1 ligand 항체에 대한 background 염색이 폐기종 조직이나 정상 조직에서 높은 이유는 TGF- $\beta$ 1 ligand 단백질이 일반적으로 적혈구에 많이 존재하고 있어서 TGF- $\beta$ 1 ligand 항체에 의한 염색이 각 조직들이나 정상 조직들의 적혈구에서도 background 염색을 보여주고 있다.

앞으로의 연구과제로서 TGF- $\beta$ 1 ligand와 TGF- $\beta$ 1RII를 분자생물학적인 분석법인 northern blot analysis, western blot analysis나 real-time PCR 등의 방법으로 조직에서 정량적으로 측정한다면 좀 더 구체적인 폐기포 섬유화에 대한 기전을 밝히는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 일차성 자연기흉은 40세 이하의 젊은 연령층에서 발생되며 폐첨부에 주로 발생하는 폐기포가 파열되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 아직도 폐기포의 발생 기전은 정확히 밝혀지지 않고 있지만 흉강 내에 작용하는 공기의 압이 약하거나 손상을 받은 폐포벽 부위에 작용하여 폐포가 국소적으로 팽창하고 파열되는 것으로 설명되고 있다[8]. 또한 protein protease와 antiprotease의 불균형이 폐기포 발생에 관계된다는 설[9]과 alpha-1 protease의 발현이 기흉 발생에 원인이 된다는 보고들이 있었다[10,11]. 그러나 본 연구에서 보면 protease-antiprotease에 연관된 유전자 이외에 다른 유전자도 관계됨을 보여주고 있다. 그러므로 폐기포의 섬유화는 폐기포의 유연성(recoiling)을 저하시키고 공기압의 지속적인 영향으로 폐기포가 커지지 않을까 생각된다. 앞으로 더 심층적인 폐기포 형성에 관련된 분자생물학적 연구가 된다면 폐기포 형성에 관계되는 유전자를 분석하여 폐기포 발생의 예방과 치료에 도움

을 받을 수 있을 것으로 생각된다.

저자들은 위의 실험을 통하여 TGF-β1 ligand와 TGF-β1RII의 과발현이 TGF-β1 신호전달체계를 증가시켜 세포외기질 단백질의 발현을 촉진하여 섬유화를 유발시키고 이로 인하여 폐의 정상조직이 파괴되면서 폐기포가 발생할 수 있는 가능성을 제시하였으며 좀 더 확실한 매커니즘의 규명을 위하여 폐기포에 대한 더 자세한 분자생물학적 분석 및 기타 연구들이 필요할 것으로 생각한다.

## 결 론

본 연구의 결과들은 TGF-β1 싸이토카인의 과발현이 TGF-β1RII 수용체 과발현으로 야기될 수 있는 폐조직의 섬유화와 유사한 변이를 초래하여 폐기포 형성에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 두 유전자들이 동시에 과발현이 일어난다면 더욱 심한 폐조직의 섬유화와 폐기포 형성을 유도할 수 있음을 시사하였다.

## 참 고 문 헌

1. Cohen RG, De Meester TR, Lafontaine E. *The pleura*. In: Sabiston DC Jr, Spencer FC. *Surgery of the chest*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1995;523-75.
2. Shamji F. *Classification of cystic and bullous lung disease*. Chest Surg Clin North Am 1995;5:701-16.
3. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. *The molecular basis of lung morphogenesis*. Mechanism of Development 2000;92:55-81.
4. Sporn MB, Vilcek JT. *Cytokine and growth factor (reviews)*. New York: Elsevier. 2000;11:1-176.
5. Kim KH, Yoon YH, Kim JT, et al. *Immunohistochemical analysis of the bullae in patients with primary spontaneous pneumothorax*. J Korean Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:86-90.
6. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta1*. Mol Genet Metab 2000;71:418-35.
7. Wakefield LM, Roberts AB. *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Curr Opin Genet Dev 2002;12:22-9.
8. Gross P, Pfitzer EA, Toker E, Babyak MA, Kaschak M. *Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats*. Arch Environ Health 1965;11:50-8.
9. Janoff A. *Elastase and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis*. Am Rev Respir Dis 1985;132:417-33.
10. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. *The induction of pulmonary emphysema with leukocyte elastase*. Am Rev Respir Dis 1977;116:469-75.
11. Snider GL, Lucey EC, Christensen TG, et al. *Emphysema and bronchial secretory metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products*. Am Rev Respir Dis 1984;129:155-60.

### =국문 초록=

**배경:** Transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF-β1RII) 단백질의 과발현이 폐기포 조직의 형성에 관여할 수 있다는 연구 결과를 본 연구팀은 발표한 바 있다. 이와 관련하여 폐기포벽에서 발견되는 섬유화에 관계될 것으로 생각되는 Transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) ligand의 발현의 변화를 보기 위하여 자연기흉 환자에서 폐기포 절제술로 획득한 폐기포조직을 면역조직화학적 염색법으로 염색하여 관찰하려 하였다. **대상 및 방법:** 36명의 자연기흉의 환자에서 비디오흉강경 폐기포절제술 시 획득된 폐기포조직을 획득하였다. 36명 환자 중 남자가 34명, 여자가 2명이었고 연령은 14세에서 38세였다. 획득된 폐기포조직을 면역조직화학적 염색방법으로 염색하였다. **결과:** 36명 중 19예에서 TGF-β1 양성하였고 24예에서는 transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF-β1RII)가 양성이었다. 19예의 TGF-β1 양성 예 중 15예에서 TGF-β1RII에도 양성으로 관찰되었다. 이 같은 양성 변화는 폐기포조직과 정상 폐 조직과의 경계선에서 가장 강하게 관찰되었다. **결론:** TGF-β1의 과발현은 TGF-β1RII 발현의 변이 여부와 마찬가지로 폐기포벽의 섬유화를 초래하여 폐기포 형성에 영향을 미치는 것으로 생각되며 확실한 규명을 위하여 분자생물학적 및 기타 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

**중심 단어 :** 1. 폐기포  
2. 단백질