

Analysis of Protease and Antiprotease Concentrations in Retired Workers Exposed to Inorganic Dusts

Jae Hoon Shin^{1,2,†}, JooHwan Hwang², Kyung Myung Lee², Jong Seong Lee²,
Jeong Oh Lee², Byung-Soon Choi² and In Sik Kim^{1,3,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Graduate School of Health Science,
Eulji University Daejeon 301-746, Korea

²Center for Occupational Lung Diseases, KWAMCO, Ansan 426-858, Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, Daejeon 301-746, Korea

Occupational exposure to inorganic dusts such as coal and silica has been identified as a chronic obstructive pulmonary disease (COPD) risk factor. This risk factor causes lung inflammation and protease-antiprotease imbalance. This abnormal inflammatory response of the lung induces parenchymal tissue destruction and leads to progressive airflow limitation that is characteristics of COPD. The aim of this study was to determine the relationship of proteases such as neutrophil elastase (NE) and matrix metalloproteinase (MMP)-9 and antiproteases such as alpha-1 antitrypsin (AAT) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 with lung function. The study population contained 223 retired workers exposed to inorganic dusts. We performed lung function test, including percent of forced expiratory volume in one second (%FEV₁) predicted and %FEV₁/forced vital capacity (FVC). We analyzed serum MMP-9, AAT, TIMP-1 and plasma NE concentrations by sandwich enzyme immunoassay. NE, AAT, and TIMP-1 concentrations in workers, who had %FEV₁<80% predicted, were higher than those of workers who had %FEV₁≥80% ($P<0.05$). Both AAT and TIMP-1 concentrations in workers with airflow limitation were higher than those of workers with normal airflow ($P<0.05$). %FEV₁ predicted showed significant negative correlation with AAT ($r=-0.255$, $P<0.01$), TIMP-1 ($r=-0.232$, $P<0.01$), and NE ($r=-0.196$, $P<0.01$). %FEV₁/FVC predicted showed significant negative correlation with NE ($r=-0.172$, $P<0.05$). From the results of stepwise multiple regression analysis about %FEV₁ and %FEV₁/FVC, significant independents were NE ($r=-0.135$, $P=0.001$) and AAT ($r=-0.100$, $P=0.013$) in %FEV₁, and NE ($r=-0.160$, $P=0.014$) in %FEV₁/FVC. In the present study, there were significant correlations between airflow limitation and protease concentration and between airflow limitation and antiprotease concentration. Serum protease and antiprotease concentrations, however, may be affected by the biological and inflammatory responses. It is necessary to evaluate specimens more reflected the effects of proteases and antiproteases in the lung such as lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid, and exhaled breath condensate (EBC).

Key Words: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD), Neutrophil elastase (NE), Matrix metalloproteinase (MMP), Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)

*접수일: 2009년 11월 3일 / 수정일: 2009년 12월 9일

채택일: 2009년 12월 10일

†Corresponding authors (equal contribution): In Sik Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, 143-5, Yongdoo-dong, Jung-gu, Daejeon 301-746, Korea.

Tel: +82-42-259-1753, Fax: +82-42-259-1759, e-mail: orientree@eulji.ac.kr

†Corresponding authors (equal contribution): Jae Hoon Shin, Center for Occupational Lung Diseases Korea Workers Accident Medical Corporation (K-medi), Ansan 426-858, Korea.

Tel: 82-31-500-1807, Fax: 82-31-500-1811, e-mail: penta3@kmedi.or.kr

서 론

장기간 탄 및 유리규산 등 무기분진에 노출된 이직 근로자들에서 주로 발병하는 진폐증은 간질성 폐질환에 속하지만, 폐기종, 세기관지염 및 만성기관지염 등이 흔하게 합병되어 만성폐쇄성폐질환 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)과 매우 흡사한 양상을 띠고 있다. 같은 연령대의 일반 남성 인구나 무기분진 노출 이직근로자의 만성폐쇄성폐질환 유병률을 비교한 국내 연구에서는 무기분진 노출 이직근로자가 일반인보다 2배 정도 높은 것으로 보고되었다. 이러한 원인은 젊어서부터 진폐증이 유발될 정도로 고농도 무기분진에 노출되어 기류제한이 일찍 시작되었고, 진폐증을 유발하는 무기분진 자체가 만성폐쇄성폐질환을 유발하기 때문이다. 이에 따라 진폐증이 유발될 정도로 장기간 고농도 무기분진에 노출된 이직근로자들은 만성폐쇄성폐질환이 발생할 수 있는 직업의 소지자들이며, 특히 유리규산 노출은 진폐증의 방사선학적 소견이 없는 탄광 및 금광 광부에서 기류제한이 일어나며, 이러한 기류제한은 흡연 및 진폐증과는 무관하게 발생하는 것으로 알려져 있어 진폐증이 없더라도 과거 오랜 기간 노출된 무기분진에 의해서 만성폐쇄성폐질환이 발생할 수 있다 (Hnizdo, 1992; Hnizdo et al., 2002).

만성폐쇄성폐질환은 완전히 가역적이지 않은 기류제한을 특징으로 하며, 유해한 입자나 가스 상 물질의 흡입으로 인한 폐의 비정상적인 염증반응으로 발생하고 점차 진행된다 (Rabe et al., 2007). 만성폐쇄성폐질환은 소기도 질환 (폐쇄성 세기관지염)과 폐실질의 파괴 (폐기종)가 혼재되어 발생하며, 폐의 비정상적인 만성 염증으로 인하여 소기도의 구조개형과 폐쇄 및 폐 실질이 파괴되어 소기도에 대한 폐포의 부착력 소실과 탄력성의 감소가 발생하고 결국 호기 시 기도가 개방된 상태를 유지하지 못하여 만성 기류제한이 나타난다 (Barnes et al., 2003; Hogg, 2004).

폐에서 가스교환이 이루어지는 폐포는 탄력소 등 세포의 기질 단백질에 의해 탄력성을 유지하고 있으며, 정상인의 경우 항단백분해효소인 알파 1-항트립신 (alpha 1-antitrypsin, AAT)과 금속성단백분해효소 억제인자 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)가 세포의 기질 단백질 분해효소인 중성구 탄력소분해효소 (neutrophil elastase, NE)와 기질 금속성단백분해효소 (matrix metalloproteinase,

MMP)에 대한 억제인자로 작용하여 폐 조직을 보호하고 있다. 그러나 무기분진에 대한 직업적 노출 등 만성폐쇄성폐질환의 위험요인으로 인하여 단백질분해효소와 항단백분해효소 간의 불균형이 발생하면 폐에서 단백질분해효소의 활성도가 증가하여 폐포 벽을 파괴하고 결국 폐기종과 만성폐쇄성폐질환으로 진행된다. 단백질분해효소-항단백분해효소 불균형 가설 (protease-antiprotease imbalance hypothesis)에 관한 연구에서는 만성폐쇄성폐질환으로 진행된 흡연자의 혈액, 유도객담, 기관지세척액, 폐 조직 및 호기응축액 등에서 단백질분해효소와 항단백분해효소가 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Barnes, 2004).

국내에서는 『진폐의 예방과 진폐근로자의 보호 등에 관한 법률 (진폐보호법)』에 의해 무기분진 노출 작업장에서 근무 경험이 있는 이직근로자들을 대상으로 진폐정밀건강검진을 통하여 보상, 치료, 요양 및 역학 연구는 이루어지고 있으나, 만성폐쇄성폐질환에 대한 조기진단 및 예후를 예측할 수 있는 생물학적 지표 개발, 및 면역학적 발병기전 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 장기간 무기분진 노출로 인해 만성폐쇄성폐질환에 대한 위험도가 일반인에 비해 상대적으로 높은 광업 및 비 광업 이직근로자들을 대상으로 혈중 단백질분해효소 및 항단백분해효소 농도와 연구대상자의 일반적 특성, 폐기능 및 흉부방사선 촬영 결과를 비교·분석하여 만성폐쇄성폐질환의 조기진단 지표와 예후를 예측할 수 있는 전향적 예측지표 및 생물학적 표지자로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

과거 석탄 등 무기분진 작업장에서 근무 경험이 있는 이직근로자로서 『진폐의 예방과 진폐근로자의 보호 등에 관한 법률 (진폐보호법)』에 의해 2008년도 4월부터 9월까지 ○○병원에 진폐정밀건강진단을 위해 내원한 남자 수진자 중 생체시료를 채취한 223명을 연구대상자로 하였다. 연구대상자에 대하여 혈액과 소변을 채취하였고, 면접설문조사를 통해 연구대상자의 일반적 특성인 연령, 분진작업기간, 흡연여부, 질병여부 및 호흡기질환 약제 투약여부 등을 조사하였다. 모든 연구대상자에 대해서는 자발적으로 연구참여동의서에 대해 동의를 받은 후 진행하였으며, 동의 거부자에 대해서는 연구대상자에서 제외하였다. 연구진행 및 연구참여동의서에 대한 심의는 한

국산재의료원 직업성폐질환연구소 기관연구윤리심의위원회 사전 승인을 받은 후 진행하였다.

2. 연구방법

1) 혈청 중 AAT, MMP-9, TIMP-1 농도

연구대상자의 혈액을 9 cc 혈청분리용 진공채혈관에 채취하여 2시간 이내에 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 혈청 500 µL를 시료 분석일 까지 -80°C에서 냉동 보관하였다. 혈중 AAT 농도 분석은 면역비탁법 (immunoturbidometry), MMP-9과 TIMP-1은 효소면역법 (sandwich enzyme immunoassay)에 의해 분석하였다.

2) 혈장 중 NE 농도

연구대상자의 혈액을 EDTA K3가 첨가된 6 mL 진공채혈관에 전혈을 채취하여 30분 이내에 2,500 rpm으로 15분간 원심분리한 후, 혈장을 시료분석일까지 냉동 보관용 PCR 용기에 담아 -80°C에서 냉동 보관하였다. 혈장 중

NE의 농도는 효소면역법 (sandwich enzyme immunoassay)에 의해 분석하였다.

3) 폐기능 검사

폐활량검사 방법은 미국호흡기학회 (American Thoracic Society) 및 유럽호흡기학회 (European Respiratory Society)에서 제시하는 방법에 따라 실시하였다. 검사 횟수는 적합성이 있는 검사가 3번 이상이 되도록 하였으며, 검사 즉시 재현성을 판단하였다. 호기 시간은 최소 6초 이상이 되도록 독려하였고, 최대한 호기하도록 시간에 제한을 두지 않았다. 재현성 판단을 위한 검사 횟수에 측정치가 5% (150 mL) 이내의 차이가 나는 결과 값들이 3회 이상 되도록 실시하여 가장 좋은 폐활량 결과 값을 선택하였다.

4) 흉부방사선 검사

흉부방사선촬영은 특수건강진단기관 정도관리 규정에 준수하여 디지털 방사선촬영 (Chest P-A 및 Lt Lat view)을 하였고, 진폐 촬영 정도관리 기준에 맞는 조건으로 선

Table 1. General characteristics of study subjects

	N	Mean*	SD	Range
Age (years)	223	64.3	7.6	46~84
BMI ¹⁾ (kg/m ²)	223	22.3	2.7	16.4~29.7
Work duration (year)	223	18.7	8.2	2~42
Type of industries (%)				
Mining	207 (92.8)			
The others	16 (7.2)			
Type of mining (%)				
Coal mining	184 (82.5)			
Support (mining)	21 (9.4)			
The others	18 (8.1)			
Smoking status (%)				
Non smokers	138 (61.9)			
Smokers	85 (38.1)			

*Arithmetic mean and arithmetic standard deviation

¹⁾BMI, body mass index

Table 2. Pulmonary function test of study subjects

	N	Mean*	SD	Range
Predicted FVC [†] , L	223	3.65	0.63	2.16~ 6.04
%FVC, %	223	95.7	13.6	55.7~141.1
Predicted FEV ₁ [†] , L	223	2.48	0.55	0.75~ 3.93
%FEV ₁ , L	223	88.2	19.5	17.4~150.5
%FEV ₁ /FVC [†] , %	223	68.1	9.4	29.8~92.0

*Arithmetic mean and arithmetic standard deviation

[†]Morris predicted value: 0.0583 × height - 0.025 × age - 4.241

FVC, forced vital capacity; %FVC, percent of FVC; FEV₁, forced expiratory volume in one second; %FEV₁, percent of FEV₁; %FEV₁/FVC, percent of FEV₁/FVC

Table 3. ILO categories of study subjects

ILO category*	N	%	Profusion, N(%)
0 (Normal)	96	43.0	0/0, 79 (35.4); 0/1, 17 (7.6)
Small opacity	96	43.0	
I	61	27.3	1/0, 20 (9.0); 1/1, 20 (9.0); 1/2, 21 (9.4)
II, III	35	15.7	2/1, 12 (5.4); 2/2, 17 (7.6); 2/3, 3 (1.3) 3/2, 2 (0.9); 3/3, 1 (0.4)
Large opacity	31	13.9	4A, 27 (12.1); 4B, 4 (1.8)

*Reference: ILO, 2002

Table 4. Comparison with mean concentrations of proteases and antiproteases by the %FEV₁

	%FEV ₁	N	Mean ¹	SD	t	P-values ²
AAT	80 <	32	130.61	1.13	-2.749	0.006
	80 ≥	191	142.64	1.19		
MMP-9	80 <	32	171.72	1.87	-1.490	0.138
	80 ≥	191	200.98	1.72		
TIMP-1	80 <	32	151.65	1.17	-2.546	0.012
	80 ≥	191	166.13	1.21		
M/T R	80 <	32	1.13	0.02	-0.646	0.519
	80 ≥	191	1.21	0.02		
NE	80 <	32	6.68	1.51	-2.137	0.034
	80 ≥	191	7.85	1.48		

¹Geometric mean and geometric standard deviation

²Calculated by t-test

AAT, alpha 1-antitrypsin mg/dL; MMP-9, matrix metalloproteinase-9 ng/mL; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinase ng/mL; M/T R, MMP-9/TIMP-1 ratio; NE, neutrophil elastase ng/mL

Table 5. Comparison with mean concentrations of proteases and antiproteases by the airflow limitation

	Airflow limitation [†]	N	Mean ²	SD	t	P-values ³
AAT	Normal	97	137.01	1.19	-2.145	0.033
	Limitation	126	143.88	1.18		
MMP-9	Normal	97	189.67	1.75	-0.835	0.405
	Limitation	126	201.91	1.74		
TIMP-1	Normal	97	157.70	1.20	-2.730	0.007
	Limitation	126	168.97	1.21		
M/T R	Normal	97	1.20	0.02	0.081	0.935
	Limitation	126	1.19	0.02		
NE	Normal	97	7.41	1.46	-1.136	0.257
	Limitation	126	7.87	1.51		

[†]%FEV₁/FVC 70%> or %FEV₁ 80%>, ² Calculated by t-test, ³ Geometric mean and geometric standard deviation
AAT, alpha 1-antitrypsin mg/dL; MMP-9, matrix metalloproteinase-9 ng/mL; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinase ng/mL; M/T R, MMP-9/TIMP-1 ratio; NE, neutrophil elastase ng/mL

Table 6. Comparison with mean concentrations of proteases and antiproteases by the ILO Category

Opacity	ILO Category [†]	N	Mean ¹	SD	Min	-	Max	P-values ²			
								I	II, III	4A, 4B	
AAT ²	0 (Normal)	96	140.75	1.20	94	-	262	0.999	0.898	0.167	
	Small	I	61	141.66	1.17	101	-	263		0.853	0.147
		II, III	35	138.33	1.19	96	-	198			0.560
	Large	4A, 4B	31	142.46	1.19	111	-	261			
F=0.199 (P=0.897)											
MMP-9	0 (Normal)	96	193.22	1.65	69.7	-	986.7	0.841	0.959	0.213	
	Small	I	61	204.53	1.71	77.9	-	881.3		0.995	0.606
		II, III	35	193.64	2.03	69.5	-	2494.7			0.529
	Large	4A, 4B	31	194.47	1.76	73.4	-	1157.0			
F=0.146 (P=0.932)											
TIMP-1	0 (Normal)	96	163.47	1.22	108.7	-	447.7	0.841	0.959	0.213	
	Small	I	61	163.86	1.22	111.1	-	452.5		0.995	0.606
		II, III	35	164.25	1.13	137.4	-	225.5			0.529
	Large	4A, 4B	31	165.46	1.23	110.5	-	251.2			
F=0.033 (P=0.992)											
M/T R	0 (Normal)	96	1.18	0.02	0.23	-	5.32	0.841	0.959	0.213	
	Small	I	61	1.25	0.02	0.39	-	4.27		0.995	0.606
		II, III	35	1.18	0.02	0.43	-	11.38			0.529
	Large	4A, 4B	31	1.18	0.02	0.50	-	5.88			
F=0.153 (P=0.927)											
NE	0 (Normal)	96	7.98	1.46	3.60	-	23.16	0.974	0.917	0.166	
	Small	I	61	7.65	1.56	2.42	-	29.95		0.752	0.340
		II, III	35	7.99	1.41	3.39	-	17.53			0.077
	Large	4A, 4B	31	6.48	1.48	2.86	-	16.29			
F=2.320 (P=0.076)											

[†] ILO Category (0: 0/0, 0/1; I: 1/0, 1/1, 1/2; II: 2/1, 2/2, 2/3; III: 3/2, 3/3; 4A; 4B)

¹ Geometric mean and geometric standard deviation, ² Calculated by ANOVA test (Scheffe test)

AAT, alpha 1-antitrypsin mg/dL; MMP-9, matrix metalloproteinase-9 ng/mL; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinase ng/mL; M/T R, MMP-9/TIMP-1 ratio; NE, neutrophil elastase ng/mL

자세에서 후 전면으로 180 cm 거리에서 고관전압 촬영 하였다.

결 과

1. 연구대상자의 일반적 특성

연구대상자의 평균 연령은 64.3±7.6세, 체질량지수 (body mass index, BMI)는 22.3±2.7 kg/m², 분진노출기간 은 18.7±8.2년이었다. 연구대상자의 92.8% (207명)는 광 업 이직근로자이었으며, 대부분 (82.5%) 석탄 광산에서 채탄 또는 굴진작업을 수행하였다. 설문조사 결과, 금연 자를 포함한 비 흡연자는 61.9% (138명)이었으며, 흡연자 는 38.1% (85명)이었다 (Table 1). 연구대상자의 노력성폐 활량 (forced vital capacity, FVC)과 %FVC는 각각 3.65± 0.63 L와 95.7±13.6%이었고, 1초간 노력성폐활량 (forced expiratory volume in one second, FEV₁)과 %FEV₁은 각각 2.48±0.55 L와 88.2±19.5%이었으며, 1초율 (%FEV₁/FVC)

은 68.1±9.4%이었다 (Table 2). 흉부방사선 촬영 결과, 국 제노동기구 (International labor Organization) 분류상 정상 인 0/0인 경우는 전체의 35.4% (79명)이었으며, 진폐의증 (0/1)인 경우는 7.6% (17명)이었다. 소음영인 I형은 27.3% (61명)이었고, II형 및 III형은 15.7% (35명)이었다. 다음영 소견을 보인 경우는 전체 연구대상자의 13.9%인 31명이 었다 (Table 3).

2. 혈중 단백분해효소 및 항단백분해효소 농도와 연구대 상자의 일반적 특성과의 평균 비교

%1초간 노력성폐활량이 80% 미만인 집단에서 80% 이상인 집단보다 AAT (142.64±1.19 vs 130.61±1.13 mg/dL, *P*=0.006), TIMP-1 (166.13±1.21 vs 151.65±1.17 ng/mL, *P*=0.012) 및 NE (7.85±1.48 vs 6.68±1.51 ng/mL, *P*=0.034) 의 평균 농도가 유의하게 높았다 (Table 4). 일초율 70% 미만 또는 %1초간 노력성폐활량이 80% 미만인 기류제 한이 있는 집단에서 정상 집단보다 AAT (143.88±1.18 vs

Table 7. Comparison with mean concentrations of proteases and antiproteases by the smoking status

	Smoking status	N	Mean ¹	SD	t	<i>P</i> -values ²
AAT	Non smokers	138	139.31	1.20	-1.296	0.197
	Smokers	85	143.39	1.16		
MMP-9	Non smokers	138	195.07	1.67	-0.250	0.803
	Smokers	85	198.83	1.85		
TIMP-1	Non smokers	138	163.20	1.20	-0.473	0.637
	Smokers	85	165.23	1.22		
M/T R	Non smokers	138	1.19	0.02	-0.093	0.926
	Smokers	85	1.20	0.02		
NE	Non smokers	138	7.72	1.49	0.320	0.750
	Smokers	85	7.58	1.49		

¹ Geometric mean and geometric standard deviation

² Calculated by t-test

AAT, alpha 1-antitrypsin mg/dL; MMP-9, matrix metalloproteinase-9 ng/mL; TIMP-1, tissue inhibitors of metalloproteinase ng/mL; M/T R, MMP-9/TIMP-1 ratio; NE, neutrophil elastase ng/mL

Table 8. Correlation coefficient between proteases and antiproteases with associated each variables

	N	<i>P</i> -values ¹				
		AAT [†]	MMP-9	TIMP-1	M/T R	NE
Age (years)	223	0.156*	-0.012	0.135*	-0.060	0.047
Work duartion (year)	223	0.012	-0.016	0.038	-0.029	-0.136*
BMI (kg/m ²)	223	-0.275**	-0.037	0.019	-0.046	0.011
%FEV ₁	223	-0.255**	-0.098	-0.232**	-0.019	-0.196**
%FEV ₁ /FVC	223	-0.083	-0.100	-0.130	-0.057	-0.172*

* *P*<0.05, ** *P*<0.01

¹ Calculated by Pearson's product moment correlation coefficient

[†] Log transformed

137.01±1.19 mg/dL, $P=0.033$), TIMP-1 (168.97±1.21 vs 157.70±1.20 ng/mL, $P=0.007$)의 평균 농도가 유의하게 높았다 (Table 5). 국제노동기구 범주 및 흡연 여부에 따른 단백분해효소와 항단백분해효소의 평균 농도는 유의한 차이가 없었다 (Table 6 & 7).

3. 혈중 단백분해효소 및 항단백분해효소 농도와 연구대상자의 일반적 특성과의 상관 분석

혈중 AAT는 연령 ($r=0.156$, $P<0.05$)과 BMI ($r=-0.275$, $P<0.01$) 및 %1초간 노력성폐활량 ($r=-0.255$, $P<0.01$)과 유의한 상관성을 보였다. TIMP-1은 연령 ($r=0.135$, $P<0.05$)과 %1초간 노력성폐활량 ($r=-0.232$, $P<0.01$)과 유의한 상관성을 보였으며, NE는 분진노출기간 ($r=-0.136$, $P<0.05$), %1초간 노력성폐활량 ($r=-0.196$, $P<0.01$) 및 일초율 ($r=-0.172$, $P<0.05$)과 유의한 상관성을 보였으나, MMP-9과 MMP-9/TIMP-1 비율은 일반적 특성 및 폐기능검사 결과와 유의한 상관성은 없었다 (Table 8). 각각의 단백분해효소와 항단백분해효소 간의 상관성은 AAT, MMP-9, TIMP-1 및 NE에서 모두 서로 유의한 상관성을 보였다 ($P<0.01$) (Table 9). %1초간 노력성폐활량과 관련 변수들 간의 다단계회귀분석 (stepwise multiple regression analysis) 결과, 연령 ($\beta=-0.783$, $P<0.001$), NE ($\beta=-0.135$, $P=0.001$) 및

AAT ($\beta=-0.100$, $P=0.013$)가 음의 방향으로 영향을 미치는 변수이었으며, 일초율은 연령 ($\beta=-0.247$, $P<0.001$), NE ($\beta=-0.160$, $P=0.014$)가 음의 방향으로 영향을 미치는 변수이었다 (Table 10).

고 찰

Laerell와 Eriksson에 의해 AAT 결핍이 만성 기류제한과 폐기종을 유발하고 유전적 소인에 의한다는 보고가 있었고 (Laurell et al., 1963; Eriksson, 1965), Gross 등은 설치류의 폐에 식물성 탄력소분해효소인 papain을 투여한 결과 폐포 관이 확대되고 폐기종이 발병한다고 보고하였다 (Gross et al., 1965). 이러한 생체 및 동물실험 연구 결과를 통하여 NE, MMP 등 단백분해효소가 폐의 탄력소 등 결합조직의 구성 성분을 분해하고, 흡연과 무기분진 등 직업적 노출로 인한 산화적 스트레스의 증가 및 AAT의 유전적 결핍 등 여러 요인에 의하여 단백분해효소-항단백분해효소 불균형이 발생하게 된다. 단백분해효소와 항단백분해효소 간의 불균형으로 인하여 단백분해효소의 영향력이 증가하게 되면 소기도에서 폐포의 부착력 감소와 탄력소 분해로 인한 폐 실질의 파괴가 나타나 폐기종이 발병하고 결국 비가역적인 만성 기류제한을 특징으로 하는 만성폐쇄성폐질환으로 진행한다. 이에 따라 단백분해효소-항단백분해효소 불균형 가설은 폐기종과 만성폐쇄성폐질환 발병에 중요한 기전으로 인식되어지고 있다.

유전적 결핍이 없는 폐기종 환자의 기관지세척액에서 탄력소 분해효소 농도는 전산화 단층촬영 (computed tomography, CT) 결과와 확산능에 따른 폐기종 중증도가 증가할수록 탄력소 분해효소의 농도가 증가하는 상관성을 나타냈으며, 탄력소 분해 억제능은 역의 상관관계가 있는 것으로 보고되었다 (Fujita et al., 1990). 기관지세척

Table 9. Correlation matrix between proteases and antiprotease

	N	AAT [†]	MMP-9	TIMP-1	NE
AAT	223	1.000			
MMP-9	223	0.323**	1.000		
TIMP-1	223	0.366**	0.243**	1.000	
NE	223	0.245**	0.420**	0.223**	1.000

** $P<0.01$, Calculated by Pearson's product moment correlation coefficient

[†]Log transformed

Table 10. Stepwise multiple regression analysis of %FEV₁ and %FEV₁/FVC against associated variables (N=223)

Variables	%FEV ₁				%FEV ₁ /FVC			
	Ba	SE	β	P	B	SE	β	P
Intercept	3.278				88.206			
Age	-0.016	0.001	-0.783	0.000	-0.304	0.079	-0.247	0.000
NE	-0.118	0.034	-0.135	0.001	-8.650	3.484	-0.160	0.014
AAT	-0.204	0.081	-0.100	0.013				
R ²			0.647				0.065	
adjusted R ²			0.646				0.061	
F		156.252 ($P<0.001$)				10.926 ($P<0.001$)		

^aB, regression coefficients; SE, standard error; β , standardized B

Associated variables: Age, work duration, BMI, smoking status, AAT, MMP-9, TIMP-1, NE

액 상층액에서의 NE와 결합된 AAT 복합체의 농도는 현재 흡연을 하고 있는 폐기종 환자군에서 폐기종이 없는 흡연군과 비 흡연군보다 높게 나타났으며 (Yoshioka et al., 1995), 이와 관련된 연구로서 기관지세척액에서 NE-AAT 복합체의 농도가 높은 군에서 낮은 군에 비해 연간 폐기능 감소율이 더 많이 감소하였다 (Betsuyaku et al., 2000). 흡연과 혈중 NE 농도에 관한 연구에서 흡연자와 비 흡연자의 농도 차이는 없었지만, 흡연자들에게 짧은 시간 동안 집중적인 흡연 (2시간 내에 8개피 흡연)을 하였을 경우 1시간 후와 2시간 후 모두 중성구 수는 증가하였고, NE의 농도는 1시간 후에 상승하였으나, 2시간 후에는 차이가 없었다 (Abboud et al., 1986). 기관지세척액에서는 흡연자의 NE 농도가 비 흡연자에 비해 높았지만, 흡연자들을 대상으로 흡연 전과 흡연 후 8시간 경과 후의 NE 농도 차이는 없었다 (Fera et al., 1986). 기관지세척액에서의 탄력소 분해 억제능은 흡연자에서 비 흡연자에 비해 40% 정도 감소하였으며, 흡연자의 기관지세척액에서 AAT를 순수하게 분리하여 아미노산 서열을 분석한 결과 AAT가 산화되어 나타나는 methione sulfoxide가 포함된 결과를 나타냈으나, 비 흡연자에서는 나타나지 않았다. 이에 따라 흡연으로 인해 AAT의 활성부위인 methione이 산화되어 정상적인 탄력소 분해 억제 기능을 하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Carp et al., 1982).

폐의 세포의 기질은 콜라젠 (collagen), 탄력소 (elastin) 등의 단백질과 여러 당단백질 (glycoproteins), 프로티오글리칸 (proteoglycan) 및 글리코사미노글리칸 (glycosaminoglycan) 등이 복합적인 구조를 이루고 있으며, 폐에서 정상적인 구조를 유지하는데 매우 중요한 역할을 하고 있다. gelatinase인 MMP-9은 젤라틴 (gelatin)과 탄력소 등 여러 종류의 기질 단백질을 분해하며 (Opdenakker et al., 2001), MMP-9의 주요 억제인자인 TIMP-1은 세포 외로 분비되어 전구체와 활성 형태의 MMP-9과 결합하여 활성을 억제한다. MMP-9은 여러 사이토카인과 염증매개 인자의 분해 작용을 하며, 비활성 막결합 형태의 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)를 분해하여 활성화시켜 염증반응을 증가시키고, 비활성 형태의 transforming growth factor (TGF)- β 를 활성화 시켜 섬유화 과정을 진행하는 것으로 알려져 있다 (MacNee, 2007).

만성폐쇄성폐환자와 정상인을 대상으로 유도객담에서 MMP-9 활성도에 관한 연구에서는 만성폐쇄성폐질환자군에서 전구체 MMP-9의 젤라틴 분해능이 정상 대조군보다 높았으며, 활성화된 MMP-9의 분해능은 만성폐쇄

성폐질환자군의 85%에서 나타났지만 정상 대조군에서는 나타나지 않았고, 만성폐쇄성폐질환자군의 TIMP-1의 농도가 정상 대조군보다 높았다 (Cataldo et al., 2000). 유도객담을 이용한 또 다른 연구에서는 만성폐쇄성폐질환자군에서 객담 중성구의 수가 정상 대조군보다 증가하였으며, 만성폐쇄성폐질환자군에서 MMP-9의 농도와 MMP-9/TIMP-1의 비율은 정상 대조군보다 증가하였고, 만성폐쇄성폐질환자군의 TIMP-1의 농도는 정상 대조군보다 상승하였다. 또한 만성폐쇄성폐질환자군에서 MMP-9의 농도는 기류제한 정도와 역의 상관관계가 있었다 (Beech et al., 2003). 혈액에서 TIMP-1의 농도는 만성폐쇄성폐질환자군에서 대조군에 비해 높았으며, 기류제한과는 역의 상관관계가 있었고, MMP-9/TIMP-1의 비율은 대조군에 비해 낮았다 (Hagashimoto et al., 2005).

본 연구결과 %1초간 노력성폐활량이 80% 미만인 집단에서 80% 이상인 집단보다 AAT, TIMP-1 및 NE의 평균 농도가 유의하게 높았으며, 기류제한이 있는 집단에서 정상 집단보다 AAT, TIMP-1의 평균 농도가 유의하게 높았으나, ILO Category 및 흡연 여부에 따른 진행 병형별 단백질분해효소와 항단백분해효소의 평균 농도는 유의한 차이가 없었다. 또한 %1초간 노력성폐활량과의 상관성은 AAT, TIMP-1 및 NE가 음의 상관성을 보였고, 일초율은 NE가 음의 상관성을 나타냈다. 단백질분해효소인 MMP-9 및 NE와 이에 상응하는 억제인자인 AAT와 TIMP-1은 모두 유의한 상관성을 보였다. %1초간 노력성폐활량과 일초율 모두 연령이 음의 방향으로 영향을 미치는 주요한 변수이었으며, %1초간 노력성폐활량에서 NE와 AAT, 일초율은 NE가 음의 방향으로 영향을 주는 변수이었다.

만성폐쇄성폐질환의 위험요인 중 흡연이 가장 중요한 부분을 차지하고 있지만 이 연구에서는 흡연자와 비 흡연자에서 AAT, NE 및 MMP-9의 평균 농도 차이는 없었다. 본 연구에서 이루어진 흡연 여부에 대한 조사는 개인별 설문조사에 의해 이루어졌기 때문에 실제 흡연 여부를 정확히 반영하지는 못하였고, 채혈 시 흡연 시점에 대한 조사도 이루어지지 못했다. 또한 폐기종에 대한 CT 촬영 결과도 반영치 못했다. 따라서 실제 흡연 여부를 확인할 수 있는 흡연 대사산물인 소변 중 cotinine 분석과 채혈 시 흡연 시점 조사를 통하여 흡연에 따른 단백질분해효소와 항단백분해효소 농도 변화에 대한 연구와 CT 촬영 결과를 비교 분석하여 폐기종과의 관련성 규명이 앞으로 필요하다고 볼 수 있다.

연령 증가와 관련된 최근 연구에서는 연령이 증가할수

록 MMP-9의 농도는 감소하며 AAT의 농도는 증가하고, 젊은 연령 대에 비해 고령에서 탄력소 분해효소의 활성도가 증가하였다. 이러한 결과는 연령이 증가함에 따라 혈관질환 등 전신 염증반응의 증가로 인하여 AAT가 증가하는 것으로 보고하였다 (Paczek et al., 2008). 이번 연구에서도 연령이 증가함에 따라 AAT의 농도가 증가하는 상관성을 보였으며, 폐기능 감소에 따른 AAT의 증가는 연령 증가로 인한 전신 염증반응의 증가로 판단된다. 또한 만성폐쇄성폐질환이 고령화가 진행됨에 따라 유병률이 증가하는 상관관계가 있으므로 연령 증가와 관련된 염증성 매개인자의 추가적인 연구가 필요하였다.

본 연구에서는 만성폐쇄성폐질환의 주요 특징인 만성 기류제한과는 연령이 가장 중요한 변수로 작용하였지만, 연령을 제외하면 AAT, TIMP-1 및 NE가 관련성이 있는 것으로 평가되었다. 또한 단백질분해효소인 MMP-9 및 NE와 이에 상응하는 억제인자인 AAT와 TIMP-1은 모두 유의한 상관성을 보였다. 이러한 결과는 단백질분해효소와 억제인자간의 복합적인 네트워크를 통한 염증반응을 조절하는 것으로 보인다. 이에 따라 이번 연구대상자들의 주요 질환인 진폐증과 만성폐쇄성폐질환의 전향적 예측지표 및 생물학적 모니터링의 기초 자료로서 활용 가능성이 기대된다. 단백질분해효소와 항단백분해효소의 평균 농도가 흉부방사선 소견과 연관성을 나타내지 않은 것은 이러한 효소들이 세포 외 기질 분해와 관련된 조절 작용을 하는 반면, 진폐는 진행성 폐 섬유화 과정을 특징으로 하고 있으므로, 진행성 진폐증 여부는 이번 연구만으로는 확인할 수 없었다. 또한 혈중 단백질분해효소와 항단백분해효소는 폐 이외에 백혈구, 염증세포 및 모든 조직에 영향을 받을 수 있으므로 향후 혈액보다 호흡기의 상태를 정확히 평가할 수 있는 기관지세척액, 유도객담 및 호기응축액 등에서 염증매개인자, 단백질분해효소 및 항단백분해효소에 대한 농도 분석 및 코호트 구축을 통하여 만성폐쇄성폐질환의 발병기전에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Acknowledgements

This study was conducted by the financial contribution of Korea Workers Accident Medical Corporation (K-medi).

REFERENCES

Abboud RT, Fera T, Johal S, Richter A, Gibson N. Effect of

smoking on plasma neutrophil elastase levels. *J Lab Clin Med.* 1986. 108: 294-300.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003. 22: 672-688.

Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev.* 2004. 56: 515-548.

Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med.* 2003. 97: 634-639.

Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Decline in FEV(1) in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiration* 2000. 67: 261-267.

Carp H, Miller F, Hoidal JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982. 79: 2041-2045.

Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000. 123: 259-267.

Eriksson S. Studies in α 1 antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand. Suppl.* 1965. 432: 1-85.

Fera T, Abboud RT, Richter A, Johal SS. Acute effect of smoking on elastase-like esterase activity and immunologic neutrophil elastase levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1986. 133: 568-573.

Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, Dobry CA, Spurzem JR, Irino S, Rennard SI. Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1990. 142: 57-62.

Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kasxhak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health.* 1965. 11: 50-58.

Hnizdo E. Loss of lung function associated with exposure to silica dust and with smoking and its relation to disability and mortality in South Africa gold miners. *Br J Ind Med.* 1992. 49: 472-479.

Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between

- chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol.* 2002. 156: 738-746.
- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004. 364: 709-721.
- Laurell CB, Eriksson A. The electrophoresis alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963. 15: 132-140.
- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2007. 28: 479-513.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001. 69: 851-859.
- Paczek L, Michalska W, Bartłomiejczyk I. Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum concentration during the ageing process. *Age Ageing* 2008. 37: 318-323.
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 176: 532-555.
- Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995. 152: 2127-2132.
-