

자연 기흉 환자의 혈액 내 TGF-beta 1 Ligand 양과 폐 기포 형성과의 연관관계에 대한 연구

김영삼* · 김광호** · 백완기** · 김정택** · 차일규*** · 김지혜** · 송순욱**** · 최미숙****

The Correlation between TGF-beta 1 Blood Levels and the Formation of Bullae in Patients with Spontaneous Pneumothorax

Young Sam Kim, M.D.*; Kwang-Ho Kim, M.D.**, Wan Ki Baek, M.D.**, Joung-Taek Kim, M.D.**, Il Kyu Cha***, Ji Hye Kim, R.N.**, Sun U. Song, Ph.D.****, Mi Sook Choi, M.S.****

Background: The overexpression of transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF- β 1RII) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) ligand may be involved in the formation of a bulla. In this study, we tested if serum TGF- β 1 ligand levels correlated with the expression level of TGF- β 1RII and TGF- β 1 in bullous tissues from patients with spontaneous pneumothorax. **Material and Method:** Bullous lung tissues and blood samples were obtained from 19 patients with spontaneous pneumothorax, 18 males and 1 female, aged 17 to 35 years old. The bullous tissues were obtained by video-assisted thoracic surgery (VATS), fixed in formalin, embedded in paraffin, and cut into 5~6 μ m thick slices. Sections were immunohistochemically stained with primary antibodies against TGF- β 1 or TGF- β 1RII, and serum levels of TGF- β 1 in patients and normal controls was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Of the 19 patients, 16 were TGF- β 1 positive and 10 were TGF- β 1RII positive. Among the 16 TGF- β 1 positives, 9 were also TGF- β 1RII positive. As seen previously, strong immunohistochemical staining of TGF- β 1RII and TGF- β 1 was detected in the boundary region between the bullous and normal lung tissues. Average TGF- β 1 blood levels of both TGF- β 1 and TGF- β 1RII positive patients was 38.36 ± 16.2 ng/mL, and that of five controls was 54.06 ± 15 ng/mL. **Conclusion:** These results suggest that overexpression of TGF- β 1 and TGF- β 1RII expression may be involved in the formation of bullae. TGF- β 1 blood levels in patients with primary spontaneous pneumothorax is lower than normal people, suggesting that the high level of local TGF- β 1 expression in the bullous tissue region, but not in the whole blood, may contribute more in the formation of bullae.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:394-398)

Key words: 1. Growth factor
2. Bulla
3. Pneumothorax

*인하대학교 의과대학 부속병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Inha University Hospital

**인하대학교 의학대학원 흉부외과학교실

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

***한동대학교 생명과학부

Department of Life Science, Handong Global University

****인하대학교 의과대학 부속병원 임상연구센터

Clinical Research Center, Inha University Hospital

논문접수일 : 2010년 2월 24일, 논문수정일 : 2010년 5월 10일, 심사통과일 : 2010년 6월 15일

책임저자 : 김광호 (400-711) 인천시 중구 신흥동 3가 7-206, 인하대학교 의학대학원 흉부외과학교실

(Tel) 032-890-2280, (Fax) 032-890-3099, E-mail: khkim@inha.ac.kr

송순욱 (400-711) 인천시 중구 신흥동 3가 7-206 인하대학교 의과대학 부속병원 임상연구센터

(Tel) 032-890-2460, (Fax) 032-891-2277, E-mail: sunuksong@inha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 저작소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

흉부외과 영역에서 가장 흔하게 보는 질환인 자연 기흉의 원인이 되는 폐 기포의 발생 기전을 밝히기 위하여 저자들은 수술 시에 획득한 폐 기포 조직에서 폐 조직의 발달을 억제하는 유전물질인 transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)이 폐 기포 형성에 관계가 있는지 여부를 알기 위하여 수술 시에 획득된 폐 기포 조직을 면역조직화학적 염색법으로 염색하여 TGF- β 1RII와 TGF- β 1 ligand의 발현유무를 확인한 바 상기 물질이 과 발현됨을 보고한 바 있다[1-3]. 그러나 상기 유전 물질이 폐 조직에서만 국소적으로 과 발현되어 폐 기포 형성에 관여하는지, 아니면 혈액 내에 존재하는 TGF- β 1 ligand의 양도 폐 기포 형성에 영향을 미치는지 여부를 알아보기 위하여 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

자연 기흉으로 입원하여 수술로 폐 기포를 절제한 환자 19명을 대상으로 하였다. 남자가 18명이었으며 17세에서 35세의 연령분포를 보였다. 좌측의 기흉이 8예, 우측이 10예, 양측성 기흉이 1예였다. 폐 기포절제술의 이유로는 재발성, 지속성, 폐기증이 x-ray상 확인된 경우 등이었다. 19예에서는 비데오흉강경술을 실시하여 폐 기포 절제술을 실시하였다(Table 1). 획득된 폐 기포를 formalin용액에 고정을 하였으며 파라핀에 포매하여 5~6 μ m의 두께로 절편을 만들었다. 표본 준비를 위하여 절편들을 100% hydrolyzed xylene과 75% alcohol로 paraffin을 탈취하였다. 절편 내의 과산화제(intrinsic peroxidase)의 활동을 제거하기 위하여 3%의 과산화수소와 반응을 시켰다. 단백질의 분해(degradation)를 방지하기 위하여 실온에서 10분간 proteinase inhibitor (Histostatin™ SP Kit 85-9043, Zymed, USA)을 첨가하였다. Anti-TGF- β 1 ligand monoclonal antibody (1 : 50,000, Serotec, UK)와 anti-TGF- β 1RII monoclonal antibody (1 : 100, Santa Cruz, USA)를 희석하여 moisture chamber에서 1시간 동안 항체와 반응시켰다. Biotin-labelled secondary antibody (Histostatin™ 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

Table 1. Patient's profile

Number of patients	19
Gender	
Male	18
Female	1
Age (years old)	17 ~ 35
History of smoking	
Yes	3
No	16
Site of pneumothorax	
Left	8
Right	10
Bilateral	1
Surgical indication	
Recurrence	13
Persistent	1
Incidental	1
Visible bullae	4
Surgical approach	VATS
	19

VATS=Video-assisted thoracic surgery.

조직표본의 색깔을 나타나게 하였다. 위와 같은 방법으로 대조군에서도 실시하였고 일차 항체 없이 이차 항체만을 사용하였다. 혈장내의 TGF- β 1의 양을 측정하기 위하여 수술 종료직전 혈액 5 cc를 채취하였고 대조군으로 25~27세의 건강한 5명의 자원자의 혈액 5 cc를 채취하였다. 채취된 혈액은 1 mg/mL의 ethylenediamine tetra acetic acid 가 함유된 튜브에 넣어 2,000×g의 힘으로 30분간 원심분리를 하였으며 분리된 혈장은 -70°C로 저장하였다. TGF- β 1 양은 Human TGF- β 1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit (Abazyme, MA, USA)를 이용하였다. TGF- β 1 단일항체가 입혀져 있는 Kit에 혈장을 첨가하여 배양시켰고 biotin이 결합되어 있는 TGF- β 1 특이적인 항체를 추가한 후 다시 반응시켰다. 그런 다음 Horseradish peroxidase (HRP)를 첨가하였고 기질(substrate)을 사용하여 배양시킨 후 automatic plate reader (Universal microplate Reader ELx800G, USA)를 이용하여 450 nm에서 96-well microplate를 판독하였다.

결 과

폐 기포의 면역조직화학염색법에 의한 염색 결과 폐 기포와 정상 폐 조직 경계 부위에서 강한 염색의 양상을 보였으며(Fig. 1), 19명 환자에서 획득된 폐 기포 중 16명에서 TGF- β 1에 양성(2+ 이상)으로 확인되었으며 10명에서는 TGF- β 1RII에 양성(2+ 이상) 반응을 보였다(Table 2). ELISA assay에 의한 혈액내의 TGF- β 1 양은 용혈이 되어 측정할 수 없었던 2례를 제외한 17예에서 32.19±17.9

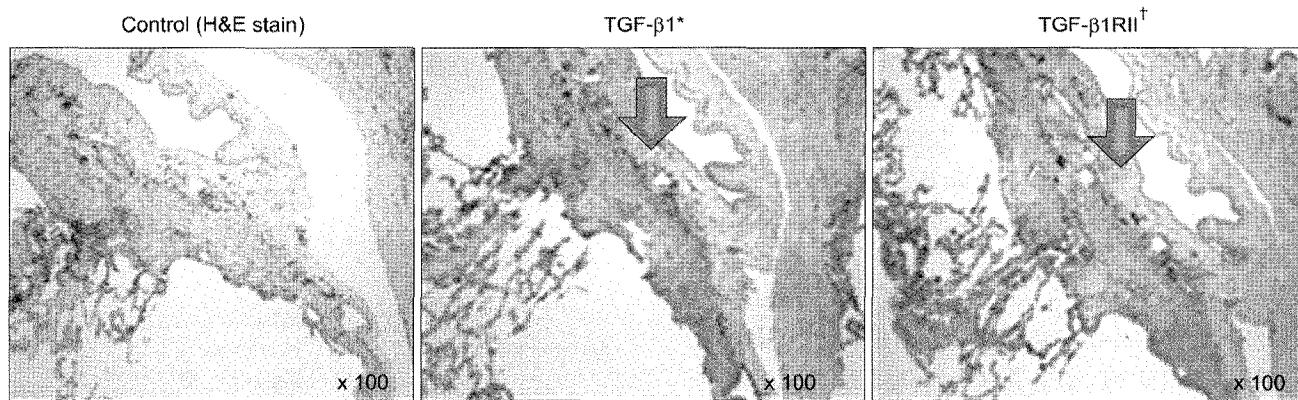


Fig. 1. Immunohistochemical stain of bullae tissue (case #6). Pictures of bullous tissues immunohistochemically stained with TGF- β 1 and TGF- β 1RII antibody from case #6. The lung tissues were highly positive for TGF- β 1 and TGF- β 1RII antibody at the border region of the bullous and normal lung tissues (arrow). H&E=Hematoxylin&Eosin; *TGF- β 1=Transforming growth factor beta 1; [†]TGF- β 1RII=Transforming growth factor beta 1 receptor 2.

Table 2. Result of immunohistochemical stain and ELISA

	Gender	Age (years old)	TGF- β 1*	TGF- β 1RII [†]	ELISA (ng/mL)
1	Male	20	++	+	4.35
2	Male	17	++	+	1.92
3	Male	20	++	++	32.20
4	Male	23	+	+	Hemolysis
5	Male	18	+++	+++	17.82
6	Male	18	++	+++	20.77
7	Female	19	++	+	Hemolysis
8	Male	18	+++	+	33.39
9	Male	17	+++	++	28.04
10	Male	17	+++	+	46.74
11	Male	19	+++	+	11.51
12	Male	19	+++	+++	45.33
13	Male	16	++	++	41.62
14	Male	19	++	+++	58.53
15	Male	20	++	+++	66.37
16	Male	35	+	+	49.74
17	Male	19	++	+	27.21
18	Male	18	+++	+++	36.61
19	Male	29	+	++	27.07

*TGF- β 1=Transforming growth factor beta 1; [†]TGF- β 1RII=Transforming growth factor beta 1 receptor 2.

ng/mL이었다(Table 2). TGF- β 1과 TGF- β 1RII가 동시 양성으로 나타난 9명의 환자의 혈액내의 TGF- β 1 양은 38.36 \pm 16.2 ng/mL였다. 대조군 5예의 TGF- β 1 치는 54.06 \pm 15 ng/mL였다(Table 3).

시에 획득한 폐 기포 조직에서 폐 조직의 발달에 관여하는 유전물질인 TGF- β 1RII와 TGF- β 1 ligand가 폐 기포 조직에서 과 발현됨을 보고한 바 있다[1-3]. 그러나 TGF- β 1 ligand는 폐 기포 조직뿐만 아니라 혈액 내에도 존재하므로 장기 조직에 작용할 때 국소적인 작용과 더불어 전신적으로도 작용할 것으로 생각된다. Kong 등[4]은 폐 암환자에서 TGF- β 1 ligand가 혈액지표로 사용될 수 있을 보고하였으며 Zimmermann 등[5]은 골절환자에서 혈액

고 찰

폐 기포의 발생 기전을 밝히기 위하여 저자들은 수술

Table 3. Result of ELISA in control group

	Gender	Age (years old)	ELISA (ng/mL)
1	Male	25	55.26
2	Female	26	52.18
3	Male	27	30.17
4	Male	26	69.85
5	Male	25	62.87

의 TGF- β 1가 골절융합의 경과에 따라 변동함을 보고하였고 Blann 등[6]은 죽상경화증(atherosclerosis) 환자의 혈장 내에서 TGF- β receptor가 증가함을 보고하였다. Sheen-Chen 등[7]은 폐쇄성 황달을 유발시킨 쥐에서 혈장내의 TGF- β 1이 변동이 있음을 보고하였다. 환자에서 이러한 실험적 결과를 바탕으로 이번 연구에서는 자연 기흉 환자들의 혈액 내에 존재하는 TGF- β 1 ligand의 양이 폐 기포 조직의 형성에 영향을 줄 수 있는지에 대한 가능성 여부를 알아보았다.

이번 연구 결과에서는 자연 기흉 환자 19명 중 16명에서 TGF- β 1에 양성이었으며 10명에서 TGF- β 1RII에 양성의 소견을 보였다. TGF- β 1에 양성인 16명 중 9명에서 TGF- β 1RII에 양성으로 확인되었다. 본 연구의 결과에서도 강하게 염색된 부위는 예전의 연구 결과들처럼 폐 기포 조직과 정상 폐 조직의 경계선 부위였다. TGF- β 1과 TGF- β 1RII가 동시에 양성인 환자 9명의 혈액내의 TGF- β 1의 양은 38.36 ± 16.2 ng/mL이었으며 대조군은 54.06 ± 15 ng/mL이었다(Fig. 2). TGF- β 1만 양성인 환자군의 TGF- β 1의 양은 32.19 ± 17.9 ng/mL이었다. 이상의 결과를 볼 때 혈액내의 TGF- β 1 양은 폐기포 조직에서 양성 유무와 특이한 관계가 있어 보이질 않았다. 만약 자연 기흉 환자들의 혈액 내에서 TGF- β 1 양이 높게 나왔다면, 가능했던 가설은 유전자 돌연변이 등의 선천적인 요인이든지 아니면 후천적으로 갖게 된 타 질환 또는 환경적 요인 등으로 인하여 높아진 혈액 내 TGF- β 1 양이 폐 기포 형성에도 관여될 수 있을 것이라는 것이라는 것이다. 하지만 본 연구 결과로 살펴볼 때, 이러한 가설들은 가능성성이 희박함을 알 수 있다. 따라서 자연 기흉 환자들에서의 폐 기포 형성은 국소적으로 과발현되는 TGF- β 1RII와 TGF- β 1 ligand가 직접적으로 관여될 가능성이 높을 것임을 내포한다고 할 수 있다.

국소적으로 TGF- β 1RII와 TGF- β 1 ligand가 과발현될 수 있는 이유로는 폐 조직이 형성이 되면서 각각의 상기

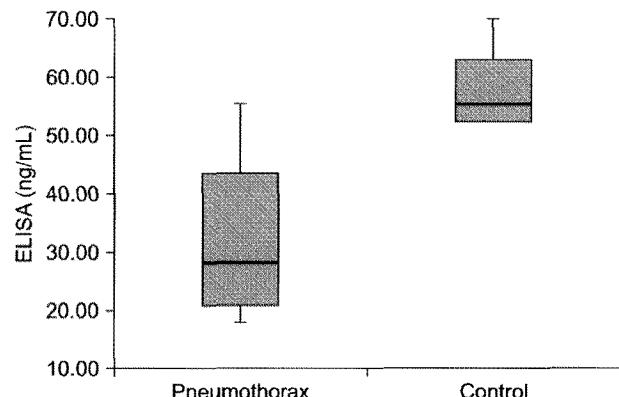


Fig. 2. Serum TGF- β level of pneumothorax patient (TGF- β 1 and TGF- β 1 receptor positive patient) and control group.

유전자가 유전적 변이를 동반할 가능성이 있을 수 있다. 이러한 가설을 증명하기 위하여는 폐 기포 환자가 많이 발생한 가족들을 대상으로 소아부터 성인이 될 때까지 폐 조직에서의 상기 유전자들의 변이를 관찰하는 것이 하나의 방법이 될 수 있다. 또한 발생학적으로 유전적 변이를 폐 조직에서 인위적으로 일으킬 수 있는 동물모델을 만들어 보는 것도 또 다른 방법이 될 수 있다.

결 론

자연 기흉 환자 군의 혈액내의 TGF- β 1의 양이 대조군보다 높지 않은 수치를 보이는 것으로 보아 혈액 내 TGF- β 1 양은 폐 기포 형성에 직접적으로 관여될 가능성은 적고, 폐 조직에서 국소적으로 과발현되는 TGF- β 1RII and TGF- β 1 ligand가 폐 기포 형성에 더 많이 관여될 수 있을 것으로 예상한다.

참 고 문 헌

- Kim KH, Yoon YH, Kim JT, et al. Immunohistochemical analysis of the bullae in patients with primary spontaneous pneumothorax. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36: 86-90.
- Kim KH, Cho JS, Kim YS, et al. TGF- β 1 protein expression in bullae of patients with spontaneous pneumothorax. Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:805-9.
- Kim YS. Immunohistochemical analysis of the bullae in patients with secondary pneumothorax [dissertation]. Incheon: Inha Univ.; 2009.
- Kong F, Jirtle RL, Huang DH, Clough RW, Anscher MS. Plasma transforming growth factor- β 1 level before radio-

- therapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma. Cancer 1999;86:1712-9.
5. Zimmermann G, Henle P, Kuesswetter M, et al. TGF- β 1 as a marker of delayed fracture healing. Bone 2005;36:779-85.
 6. Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. Atherosclerosis 1996;120:221-6.
 7. Sheen-Chen SM, Eng HL, Hung KS. Altered serum transforming growth factor- β 1 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in obstructive jaundice. World J Surg 2004; 28:967-70.

-국문 초록-

배경: 저자들은 자연 기흉 환자의 폐 기포에서 transforming growth factor-beta 1 receptor II (TGF- β 1RII)와 transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) ligand를 면역조직화학염색법으로 조사하여 상기 유전 물질이 과 발현되어 폐 기포 형성에 관여될 수 있음을 보고한 바 있다. 그러나 TGF- β 1 ligand는 혈액 내에도 존재하고 있으므로 혈액내의 TGF- β 1 ligand 양이 폐 기포 조직의 형성에도 관여가 될 수 있는 가능성 여부를 알아보기 위하여 연구를 하였다. 대상 및 방법: 자연 기흉으로 폐 기포 절제술을 실시한 환자 19명에서 폐 기포 조직과 혈액을 채취하였다. 대조군으로 25~27세의 정상인 5명에서 혈액을 채취하였다. 획득된 폐 기포 조직은 formalin 용액에 고정하였으며 파라핀에 포매하여 5~6 μ m 두께로 블록을 만들었으며 면역조직화학염색방법으로 염색하여 관찰하였다. 채취된 혈액에서 ELISA assay로 혈액내의 TGF- β 1의 양을 측정하였다. 결과: 19명 중 16명에서 TGF- β 1에 양성이었으며 10명에서 TGF- β 1RII에 양성의 소견을 보였다. TGF- β 1에 양성인 16명 중 9명에서 TGF- β 1RII에 양성으로 확인되었다. 강하게 염색된 부위는 폐 기포 조직과 정상 폐 조직의 경계선 부위였다. 폐 기포 조직에서 TGF- β 1과 TGF- β 1RII가 동시에 양성인 환자 9명의 혈액내의 TGF- β 1의 양은 38.36 \pm 16.2 ng/mL이었으며 대조군은 54.06 \pm 15 ng/mL이었다. 결론: 폐 기포를 갖는 수술 환자 군의 혈액내의 TGF- β 1의 양이 대조군보다 높지 않은 수치를 보이는 것으로 보아 혈액 내 TGF- β 1 양은 폐 기포 형성에 직접적으로 관여될 가능성은 적고, 폐 조직에서 국소적으로 과 발현되는 TGF- β 1RII and TGF- β 1 ligand가 폐 기포 형성에 더 많이 관계하는 것으로 예상한다.

중심 단어 : 1. 성장인자
 2. 폐 기포
 3. 기흉