Indomethacin이 흰쥐의 Bleomycin에 의한 폐섬유증발생에 미치는 효과

인제대학교 의과대학 내과학교실

김 동 순 · 염 호 기 · 김 예 희

서울대학교 의과대학 병리학교실

함 의 근

— Abstract —

The Effect of Indomethacin on the Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in the Rats

Dong-Soon Kim, M.D., Ho-Kee Yeom, M.D. and Re Hwe Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Inje University, Seoul, Korea

Euy-Geun Ham, M.D.

Department of Pathology, Seoul National University, Seoul, Korea

The effect of indomethacin on the collagen synthesis was controversial and Thrall et al reported that indomethacin reduced the degree of pulmonary fibrosis after the bleomycin administration.

According to the recent in vitro fibroblast culture study, monocytes can produce not only stimulating factors for the fibroblasts but also the inhibitory factor(s) for the synthesis of collagen which acts by increasing the fibroblast PGE₂ production. But the results of in vitro culture studies may be affected by various factors, such as the source of fibroblast, metabolic state of fibroblast, culture condition and culture methods. Furthermore, in vivo effects may be different from in vitro effects. So we performed this experiment to study the direct in vivo effect of indomethacin on the development of pulmonary fibrosis after the intratracheal injection of bleomycin and also the time sequence. The animals were divided into 4 groups: Group B received only intratracheal injection of bleomycin, Group BI received indomethacin subcutaneously (2 mg/kg/day) after the bleomycin, Group C received only intratracheal saline and Group I had indomethacin in addition to saline.

Serial bronchoalveolar lavages, histopathologic examination, and the measurement of total hydroxyproline content of the lung and collagen synthesis rate of the lung tissue using ³H-proline were done on 3 days, one week, 2 weeks, 4 weeks, and 6 weeks after the bleomycin.

We found: (1) Total cell counts, percentage of neutrophils and lymphocytes were markedly increased in group B and group BI from 3 days after the bleomycin to 2 weeks. There was no significant difference in bronchoalveolar lavage fluid cell patterns and histopathologic findings between Group B and Group BI. (2) In Group B, total hydroxyproline content of the lung was increased significantly

*이 연구는 한국 학술진흥재단의 자유과제 연구비 보조에 의해 시행 되었음.

from one week ($160 \pm 28.5\%$) after the bleomycin. In Group BI, from 3 days after the bleomycin, the increase of hydroxyproline content was statistically significant. (3) In Group B, the incorporation rate of ^3H -proline to newly synthesized collagen per specific radioactivity of free proline pool was increased to 265% of control group from the 3rd day of bleomycin injection to 2 weeks and then decreased to the level of control group. In Group BI, it was significantly higher than Group B (589% of control group) on day 3, but from 1 week after the bleomycin, there was no difference between Group B and BI. (4) The synthesis rate of noncollagenous protein was also enhanced from day 3 to 1 week in group B and BI without significant difference between these 2 groups. These results suggest that indomethacin stimulates the collagen synthesis in the early acute stage probably by blocking the effect of monocyte derived fibroblast suppressive factor(s).

서 론

간질성 폐섬유증등의 섬유화질환들에서는 섬유아세포의 증식 및 섬유아세포에서의 섬유소합성의 증가가 주 기전으로 생각되고 있으나, 이러한 섬유아세포의 활성화를 유발하는 원인이나 그 조절기능에 관해서는 아직도 확실히 밝혀지지 못하고 있다. 염증이 생기는 경우에 초기에는 결합조직이 파괴되나, 염증이 만성화되거나 치유되는 과정에서는 섬유아세포의 증식 및 교원질의 침착이 동반되는 것으로 미루어 염증세포들이 섬유아세포의 대사의 조절에 관여하리라는 추측을 할 수 있다. 실제, 최근에 대식세포나 임파구등이 여러가지 물질을 분비하여 섬유증발생 및 섬유아세포의 대사에서 중요한 조절작용을 한다는 보고들이 나오고 있으며¹⁻²⁹⁾, 또한 이때 prostaglandin (PG)이 관여한다는 사실이 알려지고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 또한 염증반응 자체에도 PG이 관여하므로 PG 생합성억제제인 indomethacin이 섬유증 발생에 영향을 미치리라는 추측을 할 수 있다. Indomethacin은 골절 등의 외상 환자들에서 염증성 부종등을 감소시키기 위하여 많이 사용되는데 그동안의 보고들을 보면 교원질의 합성을 저하하여 상처의 치유나 골형성을 지연시킨다는 보고도 있고, 오히려 항진시킨다고 하는 사람도 있어 논란이 많다³⁰⁻³⁴⁾. 폐섬유증에서는 Thrall등이 indomethacin 투여로 흰쥐에서 bleomycin에 의한 폐섬유증이 감소하는 것을 관찰하였으나³⁵⁾, 최근의 세포배양실험등의 결과에 의하면 PGE_2 가 섬유아세포를 억제하므로 오히려 항진시킬 가능성이 높다. 그러나 체외실험과 생체내에서의 효과는 다를 수도 있으므로, 저자들은 indomethacin을 직접 동물에 투여한 후 기관지폐포세척액내 세포변동 및 폐조직의 교원질 합성속도와 폐조직내

교원질 총량의 변화를 관찰하여 indomethacin의 생체내 효과를 규명하고, 폐섬유증발생기전 규명에 도움을 주고자 이 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

서울대학교 동물사육장에서 계대배양한 나이와 체중이 비슷한 순종 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다.

2. 방 법

모든 동물들은 실험시작 3일전부터 털등을 소독한 후, 수공양행에서 제조한 "무균동물사육장치(laminar flow apparatus)" 내에서 다른 동물들과 격리하여 최대한 무균적으로 사육하였다. 개개의 쥐장 및 톱밥등은 증기소독하였고, 사료와 음료수도 소독후 투여하였으며, 기관투여 후에는 2주일간 penicillin과 kanamycin을 투여하였다.

1) 실험군

동물은 4군으로 분류하였다. C군은 대조군으로서, 무균생리식염수 0.3ml만을 기관내 투여하였고, I 군은 indomethacin 대조군으로, 무균생리식염수를 투여한후 그날부터 indomethacin(보령 제약)을 매일 2mg/kg씩 피하내 주사하였다. B군은 bleomycin(일본 Nippon Kayaku 회사) 1.5mg을 식염수 0.3ml에 혼합하여 기관내에 투여하였으며, BI군은 같은 방법으로 bleomycin을 동량 주입한 후, indomethacin을 2mg/kg씩 피하주사하였다.

2) 실험 방법

기관내 주사는 전에 보고한 것과 같은 방법으로 시행하였고³⁶⁾, 기관내 투여후, 3일, 1주일, 2주일 및 4주일

후에 실험을 하였다. 먼저 동물에 다량의 pentothal을 투여한 후 전과 같은 방법으로³⁶⁾, 기관지폐포세척을 하였다. 세척이 끝난 직후에 폐를 전부 적출하여, 우상엽을 제외한 우측 폐는 기도, 기관지 및 큰 혈관들을 제거하고 즉시 교원질 합성속도 측정을 위해 조직배양을 실시하였다. 동시에 좌측 폐도 기관지와 혈관들을 제거한 후 교원질 총량을 측정하기 위해 -70도에 보관하였다. 세척이 끝난후에 우상엽은 10% 중성 formalin에 고정하여 paraffin 포매법으로 5 μ 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색 및 Masson trichrome 염색을 하여 관찰하였다.

3) 교원질총량측정

전과 같이 Woessner 방법으로 hydroxyproline 총량을 측정하였다³⁷⁾.

4) 교원질 합성속도측정

교원질 합성속도는 Phan의 방법을 약간 변형하여 측정하였다³⁸⁾. 간단히 기술하면, 조직을 냉각한 무균 PBS로 세척하고 사방 1mm 정도의 크기로 잘라, 4ml 배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium, streptomycin, penicillin, ascorbic acid, beta-aminopropionitril)에 혼합하여, 연속 진탕시키면서 5% CO₂ 기에 섭씨 37도로 배양하였다. 1시간 후에 20 μ Ci ³H-proline을 포함한 새 배양액으로 갈아주고 20시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 즉시 냉각된 PBS로 3번 세척하고 2ml acetic acid에 녹여 polytron으로 조직을 분쇄하여 일부는 동결건조시킨 후에 Blumenkrantz 등의 방법으로 교원질내 ³H-hydroxyproline 함량을 측정하였다³⁹⁾. 먼저 동결건조된 조직을 10% TCA와 0.5% tannic acid로 처리한 후 6N HCL을 가하여 180도에서 18시간 가수분해시킨 후 염산을 증발시키고, 증류수 4ml을 가하여 그중 0.1ml을 beta counter로 동위원소 활성도를 측정하여 총 활성도가 150,000 dpm이 되도록 조정한다. L-proline 1.0mg과 L-hydroxy proline 2.0mg을 가하고 총용적이 8.0ml이 되도록 증류수를 넣은 다음 pH를 조절하고, 0.2 M pyrophosphate를 가하여 잘 혼합후, chloramine-T로 20분간 산화시킨다. pH를 맞추고, Tris buffer를 가하여 25분간 끓는물로 가열한 후, 다시 식혀서 toluene 12ml에 녹여 5분간 평형상태에서 진탕시키고 원심분리한다. ³H-proline과 ³H-hydroxyproline을 분리하기 위하여 toluene층 10ml을 silicic acid column chromatography 시킨다. 이때

toluene을 2번 10ml, 5ml씩 남아있던 검체에 혼합시킨 후 다시 silicic acid column에 통과시켜 ³H-hydroxyproline의 회수율을 높였다. silicic acid column 유출액에서 동위원소 활성도를 측정하고, 동시에 0.1ml을 toluene 4.9ml로 희석하고 Ehrlich's 시약을 가하여 560nm에서 분광도를 계측하여 ³H-pyrrole 농도를 측정하였다. 새로 생합성된 ³H-hydroxyproline량은

$$\text{dpm } ^3\text{H-hydroxyproline} = \text{계측 cpm} \times 100 / E \times 25/20 \times 3/2 \times 100/R$$

E : 사용한 beta counter의 효율

3/2: ³H-proline이 ³H-pyrrole로 전환시 발생하는 수소원자 분실.

25/20: silicic acid column 유출액중 계측에 사용된 용량

R : 내부 표준으로 사용된 운반체(carrier) hydroxyproline의 회수율

$$R = (\text{ODs}) / (\text{ODp}) \times 0.04 \times 25 / 0.1 \times 100 / H$$

ODs : 검체내 pyrrole의 분광도

ODp : 표준 pyrrole의 분광도

25/0.1 : 분광도 계측시 사용된 toluene액의 분할률

H : 계측에 사용된 운반체 hydroxyproline의 량(M)

교원질 합성속도 = dpm/조직내 유리 proline pool의 동위원소 특이활성도

5) 조직의 건조시 무게 및 비교원질성 단백질합성속도 측정

먼저 시험관의 무게를 측정한 뒤 조직분쇄액 일정량을 넣어 동결건조한 후 무게를 계측하여 전체 폐의 건조시 무게를 계산한다. 이 건조된 조직을 10% TCA에 녹여 90도로 1시간 가열하여, TCA에 녹지 않은 침전물의 동위원소 활성도를 계측하여 TCA에 비가용성인 비교원질성 단백질내의 ³H-hydroxyproline의 함량을 측정하였다.

6) 조직내 유리 Proline Pool 및 유리 Proline Pool의 특이활성도

³H-proline이 합성에 사용되는 윗은 조직내에 유리 proline의 양에 의해 영향을 받는다. 즉 이미 조직내에 유리 proline이 많이 존재하면 ³H-proline이 사용될 기회가 줄어들게 되므로 조직내 유리 proline양 및 유리 proline pool의 동위원소 특이활성도를 꼭 고려하여야 한다⁴⁰⁾.

Fig. 1. Change in body weight of the animals in each group (mean $\pm$ SEM). Asterisk(*) means a significant difference from the control group.

동결건조된 조직분쇄액의 남은 부분은 10% TCA에 용해시켜 600 G로 15분간 원침하고 다시 5% TCA로 두 번 세척한 상층액을 혼합한 용액의 동위원소 활성도를 계측하였다(조직내 유리 proline 활성도).

상층액의 일부는 HPLC법으로 조직내 유리 proline 총량을 측정하고, 침전물은 0.1 N NaOH를 가하여 1시간 반응시킨후에 Coomassie-briliant blue 법으로 총 단백량을 측정하였다¹¹⁾.

조직내 유리 proline pool 특이활성도=

조직내 유리 proline 활성도/유리 proline 총량

결 과

1. 체중 변화

실험 기간중의 동물들의 체중변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군 및 I 군에서는 일정속도로 증가하였으나, B군과 BI군에서는 bleomycin 투여후 1주일까지는 감소하다가 bleomycin 투여후 2주일부터는 증가하기 시작하였으나, 전 기간에 걸쳐 대조군에 비해 유의하게 낮았다.

2. 기관지폐포세척액 소견

대조군 및 B군의 기관지폐포세척액 소견은 전에 보고한 바와 비슷하였고, I 군은 대조군과, BI군은 B군과 큰 차이가 없었다. 각 군의 기관지폐포세척액내 총 세포수의 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 B군 및 BI군에서는 bleomycin 투여후 3일부터 2주까지 대조군에 비해, 유의하게 증가하였고, 기관지폐포세척액내 호중구도 비슷한 변화를 보여주었다(Fig. 3). 기관지폐포세척액내 임파구는 bleomycin 투여후 1주일부터 증가하기 시작하여 2주에 가장 높았고, 4주부터는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 4).

3. 조직내 교원질 총량

조직내 교원질 총량을 반영하는 hydroxyproline량의 변화는 Table 5와 같다. I 군은 대조군과 전혀 차이가 없었다. B군의 hydroxyproline량은 bleomycin 투여후 3일부터 증가하기 시작하여 ($124 \pm 22.4\%$), bleomycin 투여후 1주일부터는 통계학적으로도 대조군과 유의한 차이를 보였다($160 \pm 28.5\%$). BI군에서는 hydroxypro-

Fig. 2. Changes of the number of total cells in the bronchoalveolar lavage fluid. (mean $\pm$ SD). Asterisk (*) represents $P < 0.05$ compared to the control group.

Fig. 3. Percentage of the neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid (mean $\pm$ SD). Asterisk (*) represents $P < 0.05$ compared to the control group.

Fig. 4. Percentage of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid (mean $\pm$ SD). Asterisk (*) represents $P < 0.05$ compared to the control group.

Fig. 5. Changes in the total hydroxyproline content of the lung in each group. Asterisk (*) means a significant difference from the control group.

line량의 증가가 더욱 심하여 bleomycin 주입 후 3일부터 대조군과 유의한 차이를 보였고($140 \pm 33.7\%$), 1주일 후에는 대조군의 $180 \pm 36.7\%$, 2주일 후에는 대조군의 $198 \pm 25.5\%$ 로 증가하였다. 전 기간에 걸쳐, BI군의 hydroxyproline량이 B군보다 높았으나, 통계학적인 유의성은 없었다(Fig. 5).

4. 폐조직의 교원질합성 속도

^3H -proline을 이용하여 측정한 각 실험군의 폐조직의 교원질합성속도를 대조군의 교원질합성속도의 백분율로 표시한 것이 Fig. 6이다. I군의 교원질 합성속도는 대조군에 비해 약간 증가된 경향을 보였으나 통계학적으로 의의는 없었다. 이에 반해 B군에서는 bleomycin 주입 후 3일에 교원질합성속도가 대조군의 265%로 증가하였고($p < 0.05$), 1주일 후에는 317%로 정점을 이루었다가 감소하기 시작하였으나, bleomycin 투여 후 2주까지는 대조군보다 유의한 증가를 보였다($249 \pm 85\%$) (Fig. 6). BI군에서는 B군보다 더 심한 변화가 관찰되었는데, bleomycin 후 3일에 교원질 합성속도가 대조군의 589%로 증가하였고(대조군과 $p < 0.001$), 1주일 후에는 감소하는 경향을 나타내었으나 아직도 대조군의 359%이었

Fig. 6. Changes in the collagen synthesis rate after the intratracheal administration of bleomycin in each group. Values are expressed as the percentage of the means of control animals. (mean $\pm$ SEM). Asterisk (*) indicates a significant difference from the control group and (*) means a significant difference from the B group.

Fig. 7. Changes in the collagen synthesis rate per mg of protein in each group. (mean $\pm$ SEM). Asterisk (*) means a significant difference from the control group.

다($p < 0.025$). 그러나 4주일부터는 대조군과 차이가 없었다(113%). BI군의 교원질합성속도는 bleomycin 주입 후 3일에는 B군보다 통계학적으로도 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 1주부터는 B군과는 차이가 없었다. 교원

Fig. 8. Changes in the collagen synthesis rate per total lung dry weight. (mean $\pm$ SEM). Asterisk (*) indicates a significant difference from the control group and represents a significant difference from the B group.

질합성속도를 폐조직내 단백질량의 비로 표시한 것이 Fig. 7로서, Fig. 6과 거의 차이가 없었고, 교원질합성속도를 폐조직의 건조시 무게로 나눈 것은 Fig. 8로 역시 Fig. 6과 비슷하였으나, bleomycin 투여후 2주일부터는 B군과 BI군 모두가 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없는 점이 달랐다.

5. 비교원질성 단백질 합성속도

bleomycin 투여후 교원질 이 아닌 단백질의 합성속도의 변화와 indomethacin의 효과는 Fig. 9와 같다. Bleomycin 주입 후 비교원질성 단백질 합성속도는 교원질합성속도 보다는 정도가 약하나 3일후부터 현저하게 증가하기 시작하여(대조군의 189%, $p < 0.025$), 1주일에 가장 높았으나(대조군의 218%, $p < 0.001$), 그 이후는 급격히 감소하여 bleomycin 투여후 2주일에는 대조군과 유의한 차이는 없었다. BI군에서도 비슷한 변화를

Fig. 9. Changes in the synthesis rate of non-collagenous protein after the intra-tracheal instillation of bleomycin or saline in each group (mean $\pm$ SEM). Asterisk (*) means a significant difference ($P < 0.05$) from the control group.

보여, bleomycin 주사후 3일에는 대조군의 166% ($p < 0.05$), 1주일후에는 185%로 증가하였으나 2주일부터는 대조군과 차이가 없었다. 비교원질성 단백질 합성속도는 교원질합성속도와 달리, B군과 BI군사이에 전혀 차이를 관찰할 수 없었던 점으로 미루어, indomethacin은 특이하게 교원질합성속도에만 작용하는 것을 알 수 있었다.

6. 병리조직학적 변화

bleomycin 투여후 대조군 및 B군의 병리조직학적 변화는 전에 보고한 바와 거의 같았고, BI군에서는 염증성 변화는 비슷하였으나, 교원질침착이 B군보다 약간 더 심한 경향이 있는 것이 관찰되었다.

고 안

본 연구결과 bleomycin과 indomethacin을 함께 투여한 경우에 교원질합성속도가 bleomycin만을 투여한 때보다 현저히 증가하고 폐내 교원질총량이 더 빨리 증가하였는데 이는 섬유아세포 촉진물질이 더 많이 분비되었거나, 아니면 섬유아세포 억제물질의 작용이 억제된 것을 의미한다. 또한 생리식염수를 주입한후 indomethacin을 투여한 I 군에서는 생리식염수만을 주입한 대조

군과 전혀 차이가 없었기 때문에 indomethacin 자체는 섬유아세포대사에 직접 영향을 주지는 못하고 bleomycin 투여후 발생한 섬유아세포 조절 물질들에 작용한다는 것을 알 수 있다. 만일 indomethacin이 섬유아세포 촉진물질에 작용한다면 섬유아세포 촉진물질의 작용은 bleomycin에 의해 이미 섬유아세포대사가 항진된 상태에서 보다는 안정상태에 있는 대조군에서 효과가 더 많을 것이 예상되므로 I 군에서 대조군보다 합성속도나 교원질 총량이 더 증가되어야 하는데 실제로는 대조군과 차이가 없었으므로, BI군에서의 indomethacin의 효과는 섬유아세포 촉진물질이 더 증가하는 것 보다는 섬유아세포 억제물질의 감소가 주기전일 가능성이 많다. 이러한 본 실험결과는 이제까지의 체외실험 결과와도 부합하며 세포배양 실험에서 암시되었던 섬유아세포 조절물질들의 생체내에서의 기능을 확인시켜 주었다.

최근 세포배양 실험을 통하여, 대식세포나 임파구등의 단핵염증 세포들이 섬유아세포의 증식이나 대사를 조절하는 여러가지 물질을 분비한다는 사실이 알려졌다. 우선 섬유아세포를 자극하는 물질들로는, 섬유아세포를 병소부위로 끌어들이는 화학주유성인자인 fibronectin이 있고^{42,43)}, 섬유아세포의 증식을 촉진하는 물질^{1~9)} 및 섬유아세포에서 교원질 합성을 증가시키는 것들이 알려져 있는데^{8~16)}, 섬유아세포의 증식에 관여하는 물질들 중에도 세포분열시기중 G₁시기 초에 작용해서 세포들을 다음에 작용할 progression factor에 반응하도록 준비시키는 competence factor와^{1~3,6)}, competence factor가 작용한 다음에 계속 증식하도록 하는 progression factor⁴⁾가 있는 것이 밝혀졌다. 이러한 섬유아세포 촉진물질이 무엇인지는 아직도 확실치 않으며, 한가지인지, 또는 여러가지가 있는지도조차도 명확하지 않다. 이들의 분자량도 Estes등¹⁾은 56,000, Wahl⁹⁾과 Neilson등¹⁶⁾은 50,000이라고 보고하였으나, Bitterman⁴⁾은 18,000, Krane등¹⁴⁾은 14,000이라고 주장하였고, Schmidt등⁷⁾은 13,000과 75,000, Postlethwaite 등^{8,44)}은 16,000과 6,000(섬유아세포증식 촉진), 100,000과 160,000(교원질 합성촉진)의 두 종류라고 보고하였으나, Hibbs등¹³⁾은 160,000, 80,000, 25,000의 3종류라고 하여 논란이 많다. 또한 Krane등¹⁴⁾과 Mizel등⁴⁵⁾은 이물질이 interleukin-1 (IL-1)과 비슷하다고 하였으나, Estes¹⁾와 Wharton 등³⁾은 IL-1에 대한 단일항체와 유전공학적으로 합성한 recombinant IL-1을 이용하여 IL-1과 섬유아세포 촉진

물질이 같지 않다는 것을 증명하였다. 한편, 같은 단핵염증세포들이 오히려 섬유아세포의 증식을 억제하고^{6,16~22)}, 섬유아세포에서 교원질합성을 저하시키는 작용도 하는 것이 관찰되었다^{6,21,23~29,43)}. 이 경우에 섬유아세포 배양액내에 PGE₂가 증가하고, 또 섬유아세포를 미리 indomethacin으로 처리하면 폐포대식세포의 억제 효과가 없어지고, 섬유아세포 배양액에 PGE₂를 첨가하면 다시 섬유아세포가 억제되는 것으로 미루어 이러한 섬유아세포 억제물질들은 섬유아세포내에서 PGE₂의 합성을 항진시키고 그 결과 c-AMP를 증가시켜 작용한다고 추측되고 있다^{17~20)}. 또한 섬유아세포에서 생성되는 것 보다는 적은 양이지만 폐포대식세포에서도 직접 PGE₂를 분비하는 것이 알려져, 폐포대식세포는 섬유아세포 억제물질과 PGE₂의 두가지 방법으로 섬유아세포 대사를 억제하는 것으로 생각된다. 또한 IL-1도 섬유아세포에서 PGE₂를 증가시키는 사실이 관찰되었다. 전에는 IL-1이 섬유아세포를 억제한다고 주장되었는데²²⁾ Dinarello등이 IL-1을 indomethacin과 함께 투여할 경우에 합성이 증가하는 것으로 미루어 IL-1의 억제작용은 IL-1에 의한 섬유아세포내 PGE₂ 증가로 인한 것이고 IL-1 자체는 섬유아세포 촉진작용을 한다는 것을 증명하였다^{46~47)}. 섬유아세포 억제물질의 성격도 아직 밝혀지지 못하고 있으나, Korn등과 Pujol등은 분자량이 12,000~20,000이라고 하였고^{17,26)}, Elias²⁰⁾는 12,000, Clark⁶⁾는 20,000~30,000, Jimenez²³⁾와 Postlethwaite⁴⁴⁾는 55,000이라고 하였다. Jimenez등은 순수분리한 α -interferon(IF)과 γ -IF이 섬유아세포에서 교원질 합성을 감소시키는 것을 관찰하였으며⁴⁸⁾, Duncan등²⁴⁾은 T세포를 concanavalin-A로 자극하였을 때 나오는 분자량 50,000인 lymphokine과 대식세포를 세균의 lipopolysaccharide로 자극해 생성되는 분자량 20,000인 monokine이 섬유아세포 억제작용이 있으며, 이들이 γ -IF 및 β -IF과 분자량이 비슷하고 이들 IF에 대한 단일항체로 섬유아세포 억제작용이 소실되는 것으로 미루어 섬유아세포 억제물질이 IF이라고 주장하였다. 그러나 Brinckerhoff등은 recombinant-IF을 섬유아세포배양액에 첨가하는 경우에 24시간후에는 증식을 억제하나, 48~96시간후에는 오히려 증식을 촉진한다고 주장하여⁴⁹⁾ IF의 섬유아세포에 대한 작용에 대해서는 아직도 완전히 규명이 안된 상태이다.

이같은 사실들은 거의 대부분이 섬유아세포배양시에

폐포대식세포 등의 단핵구 배양액을 첨가하여 섬유아세포의 증식이나 ^3H -proline을 이용한 교원질합성에 미치는 효과를 관찰하여 얻은 결론들로서, 단핵구를 분리하는 방법, 단핵구 배양조건이나, 섬유아세포의 종류, 섬유아세포배양 조건이나 배양방법 등에 따라 상이한 결과가 나올 수 있다⁵⁰⁾. 예를 들면, 배양액내 혈청농도가 높아 빠른 속도로 증식하고 있는 섬유아세포의 경우에는 증식촉진 효과를 관찰하기는 힘들다. 반대로 혈청농도가 낮거나, ascorbic acid가 없는 배양조건에서는 섬유아세포들이 휴지기에 있게 되므로 억제효과보다는 증식촉진 효과만이 나타나게 된다. 또한 이러한 생체 밖에서의 시험관내 실험결과가 그대로 생체내에 적용된다고 할 수는 없다. 그러나 폐포대식세포 등의 단핵구들이 섬유아세포에 대해 촉진도 할 수 있고 억제도 하는 두가지 기능을 할 수 있다는 것은 Clark, Hibbs, Postlethwaite 등에 의해^{10,13,44)} 증명이 되었으나, 직접 생체내에서 질병 경과중에 이들이 어떤 경과를 취하는지는 아직도 확실치 않다. 본 연구는 bleomycin 투여후 발생하는 폐섬유증의 경과가 indomethacin을 직접 동물에 투여한 후 오히려 항진되는 것을 관찰하여 bleomycin 투여후에 섬유아세포 촉진물질뿐 아니라 실제로 섬유아세포 억제물질이 분비됨을 확인하였다.

bleomycin을 기도내 주입후 교원질 합성속도의 증가는 Clark등¹¹⁾은 6일부터 시작하여 8일에는 약 10배까지 증가하고 24일까지 대조군과 유의한 차이를 보였다고 하였다. 또 Phan등^{38,47)}은 2~4일부터 시작해 20일까지 증가한다고 하여 본 실험과 비슷한 결과를 보였다. 폐내 hydroxyproline으로 측정된 교원질 총량은 교원질합성 속도 보다는 느리게 약 1주일부터 증가를 나타내었는데 이것도 Clark의 11일¹¹⁾, Phan등의 5~7일⁴⁷⁾과 일치한다.

본 실험에서 bleomycin과 indomethacin을 같이 투여한 BI군에서는 bleomycin 투여후 3일에 교원질 합성속도가 대조군의 약 6배로 대조군은 물론 B군과도 유의한 차이를 보인 것은 섬유아세포 촉진물질이 indomethacin 투여로 더 많이 분비되었거나, 섬유아세포 억제물질의 작용이 감소된 것을 의미한다. 그러나 지금까지의 in vitro 실험결과에 의하면, indomethacin은 섬유아세포 촉진물질에는 큰 영향이 없다고 하므로¹²⁾, 이는 섬유아세포 억제물질이 BI군에서 저하된 것을 나타내고, 따라서 bleomycin 투여후 폐실질내 염증이 심한 초기에

섬유아세포 촉진물질뿐 아니라 섬유아세포 억제물질도 같이 분비된다는 것을 시사한다. 이는 Phan, Jordana, Clark등^{21,22,29)}이 bleomycin 투여후 초기에는 섬유아세포 억제물질이 감소하였다가 약 2주일부터 증가한다고 보고한 것과는 다른 결과이다. 그러나 이는 검사법의 차이에 의한 것으로, 초기의 폐포대식세포에서는 섬유아세포 억제물질뿐 아니라, 섬유아세포 촉진물질이 함께 분비되고, 오히려 섬유아세포 촉진물질이 더 많이 나오므로 결과적으로는 섬유아세포 촉진효과가 나타나는데, 그들은 빠른 속도로 분열하는 섬유아세포를 사용하여 섬유아세포 억제효과만을 측정하는 실험을 하였으므로 초기에 섬유아세포 억제물질이 감소하는 결과가 나온 것으로 추측된다. 또한 생체의 실험이긴 하지만 Elias등¹⁹⁾도 폐포대식세포를 자극하면 24시간내에 섬유아세포 억제물질이 분비된다고 하였고, Jimenez등²³⁾도 단핵구를 자극하면 4시간내에 섬유아세포 억제물질이 나오는 것을 관찰하여 병의 초기에 섬유아세포 억제물질도 분비될 수 있음을 시사하였다. 그리고 이러한 indomethacin 투여후 초기에 교원질합성속도의 증가는 폐조직내 교원질 총량도 BI군에서는 3일부터 대조군과 유의한 차이를 보인 사실과 부합된다. 그러나 bleomycin 투여후 1주일부터는 indomethacin 투여군에서도 교원질합성속도가 감소하기 시작해 B군과 거의 차이가 없었던 것은 indomethacin의 효과가 감소한 것을 의미하므로 B군에서 PGE₂의 효과가 감소한 것을 시사한다. 즉 PGE₂의 생성이 감소하였거나 B군의 섬유아세포가 PGE₂에 대한 반응도가 감소한 경우거나, PGE₂가 아닌 다른 섬유아세포 억제물질이 분비된 경우들을 생각할 수 있다. McArthur등²⁸⁾은 T세포 자극시에 48시간안에 indomethacin에 영향을 받지 않는 섬유아세포 억제물질이 나오는 것을 관찰하였는데 bleomycin 투여후 1주일부터 기관지폐포 세척액내에 임파구들이 증가되므로 이도 한 요인으로 작용할 가능성도 있다. 또한 Ko등과 Korn등^{21,51)}은 섬유아세포도 채취부위에 따라 성격이 다르고, 또 심지어는 같은 섬유아세포에서 계대배양한 섬유아세포들간에도 특성이 다른 것이 관찰되었는데, indomethacin 투여후에도 이같은 섬유아세포들의 subpopulation 변화에 의해 indomethacin에 덜 예민하게 되었을 가능성도 있다.

이번 논문에서는 교원질 합성속도와 교원질 총량만을 측정하여 여러가지 문제에 대해 추측만을 할 수 있을뿐이나 앞으로 이들 대상에서 시행한 폐포대식세포배양액

이 섬유아세포대사에 미치는 효과 및 PGE_2 등을 관찰하면 폐섬유증발생기전을 이해하는데 더 도움이 될 것이다. 또한 본 연구에서는 교원질 합성속도만을 측정하였으나 실제로는 교원질 분해속도의 감소도 폐섬유증 발생에 중요한 역할을 하므로^{52,53)} 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

결 과

indomethacin이 폐섬유증발생에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 흰쥐에 bleomycin을 기도내 주입한 후, 기관지폐포세척액 소견, 폐병리조직학적 소견 및 폐내 교원질 합성속도와 폐조직내 교원질 총량의 변화를 indomethacin을 투여한 군과(BI군), 투여하지 않은 군(B군)을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 기관지폐포세척액 소견은 양군간에 의미있는 차이는 관찰되지 않았고, 폐병리조직학적 변화도 BI군에서 B군에서보다 교원질침착이 약간 더 심한 경향이 있었던 것 외에는 큰 차이는 관찰할 수 없었다.

2) Hydroxyproline량으로 측정된 폐조직내 교원질 총량은 B군에서는 bleomycin 투여후 1주일부터 대조군과 유의한 차이를 나타내었는데(대조군의 $160 \pm 28.5\%$), BI군에서는 bleomycin 주입후 3일부터(대조군의 $140 \pm 33.7\%$) 유의한 증가를 보였다.

3) 단기간의 폐조직배양을 이용한 교원질 합성속도는 B군에서는 bleomycin 투여후 3일부터 대조군의 265%로 증가하기 시작하여 2주일후까지 유의하게 높았다. BI군에서는 bleomycin 주입후 3일에는 대조군의 589%로 대조군은 물론 B군보다도 유의한 차이를 보였으나, 1주일부터는 감소하기 시작하여 B군과 비슷한 정도로 2주일 후까지 항진된 상태를 유지하다가 4주일부터는 대조군과 차이가 없었다.

4) 비교원질성 단백질합성속도는 B군과 BI군이 같은 정도로 bleomycin 투여후 3일과 1주일에는 대조군의 약 2배까지 증가하였으나 bleomycin 투여후 2주일부터는 대조군과 같아, indomethacin은 교원질 합성에만 특이하게 작용하는 것을 알 수 있었다.

이상으로 indomethacin은 폐섬유증발생을 항진시키는 것을 관찰하였고, 지금까지 체외의 세포배양검사 결과로 시사되었던 섬유아세포내 PGE_2 생성 촉진작용을 하는 섬유아세포 억제물질이 실제로 생체내에서 분비되

는 것을 확인하였다.

REFERENCES

- 1) Estes JE, Pledger WJ, Gillespie GY: Macrophage-derived growth factor for fibroblasts and interleukin-1 are distinct entities. *J Leukocyte Bio* 35:115-129, 1984
- 2) Kovacs EJ, J Kelley: Secretion of macrophage-derived growth factor during acute lung injury induced by bleomycin. *J Leukocyte Bio* 37:1-14, 1985
- 3) Wharton W, Gillespie GY, Russell SW, Pledger WJ: Mitogenic activity elaborated by macrophage-like cell lines acts as competence factor(s) for balb/c 3T3 cells. *Cell Physiology* 110:93-100, 1982
- 4) Bitterman PB, Rennard SI, Hunninghake GW, Crystal RG: Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts. Regulation and partial characterization. *J Clin Invest* 70:806-822, 1982
- 5) Cathcart MK, Krakauer RS: Immunologic enhancement of collagen accumulation in progressive systemic sclerosis (PSS). *Clin Immunol* 21:128-133, 1981
- 6) Clark JG, Kostal KM, Marino BA: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. An alveolar macrophage product increases fibroblast prostaglandin E_2 and cyclic AMP and suppresses fibroblast proliferation and collagen production. *J Clin Invest* 72:2082-2091, 1983
- 7) Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green IRA: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 128:2177-2182, 1982
- 8) Postlethwaite AE, Kang AH: Induction of fibroblast proliferation by human mononuclear leukocyte-derived proteins. *Arthrit Rheum* 26:22-27, 1983
- 9) Wahl SM, Wahl LM, McArthur JB: Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J Immunol* 121:942-946, 1978
- 10) Clark JG, Greenberg J: Modulation of the effects of alveolar macrophages on lung fibroblast collagen production rate. *Am Rev Respir Dis* 135:52-56, 1987
- 11) Clark JG, Overton JE, Marino BA, Uitto J, Statcher BC: Collagen biosynthesis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *J Lab Clin Med* 96: 943-953, 1980
- 12) Jordana M, Newhouse MT, Gauldie G: Alveolar macrophage/peripheral blood monocyte-derived factors modulate proliferation of primary lines of

- human lung fibroblasts. *J Leukocyte Bio* **42**:51-60, 1987
- 13) Hibbs MS, Postlethwaite AE, Mainardi GL, Seyer JM, Kang AH: Alterations in collagen production in mixed mononuclear leukocyte-fibroblast cultures. *J Exp Med* **157**:47-59, 1983
 - 14) Krane SM, Kayer JM, Simon LS, Byrne MS: Mononuclear cell-conditioned medium containing mononuclear cell factor (MCF), homologous with interleukin 1, stimulates collagen and fibronectin synthesis by adherent rheumatoid synovial cells: effects of prostaglandin E₂ and indomethacin. *Collagen Rel Res* **5**:99-117, 1985
 - 15) Johnson RL, Ziff M: Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J Clin Invest* **58**:240-252, 1976
 - 16) Neilson EG, Jimenez SA, Phillips SM: Cell-mediated immunity in interstitial nephritis. III. T lymphocyte-mediated fibroblast proliferation and collagen synthesis: An immune mechanism for renal fibrogenesis. *J Immunol* **125**:1708-1714, 1980
 - 17) Korn JH, Torres D, Downie E. Fibroblast prostaglandin E₂ synthesis. Persistence of an abnormal phenotype after short term exposure to mononuclear cell products. *J Clin Invest* **71**:1240-1246, 1983
 - 18) Korn JH, Halushka PV, LeRoy EC, Mononuclear cell modulation of connective tissue function. Suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest* **65**:701-705, 1982
 - 19) Elias JA, Rossman MD, Daniele RP. Inhibition of human lung fibroblast growth by mononuclear cells. *Am Rev Respir Dis* **125**:701-705, 1982
 - 20) Elias JA, Rossman MD, Zurich RB, Daniele RP. Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. *Am Rev Respir Dis* **131**:94-99, 1985
 - 21) Ko SD, Page RC, Narayanan AS. Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci* **74**:3429-3432, 1977
 - 22) Neilson EG, Phillips SM, Jimenez SA, Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. *J Immunol* **128**:1484-1486, 1982
 - 23) Jimenez SA, McArthur W, Rosenbloom J. Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates *J Exp Med* **150**:1421-1431, 1979
 - 24) Duncan MR, Berman B. γ -Interferon is the lymphokine and β -interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med* **162**:516-527, 1985
 - 25) Jimenez SA, McArthur WM, Bashey RI, Rosenbloom J. Selective inhibition of excessive scleroderma collagen production by lymphokines from normal human mononuclear cells. *Arthri Rheum* **28**:502-510, 1985
 - 26) Pujol JP, Penfornis H, Arezana-Sesdedos F, Bocquet M, Farjanel J, Rattner A. Br. Mononuclear cell-mediated modulation of synovial cell metabolism. I. Collagen synthesis. *Exp Cell Res* **158**:63-74, 1985
 - 27) Pujol JP, Brisset M, Jourdan C, Boquet J, Louis V, Beliard R, Loyau G. Effect of monocyte cell factor (MCF) on collagen production in cultured articular chondrocytes: Role of prostaglandin E₂. *Biochem Biophys Res Comm* **119**:499-508, 1984
 - 28) McArthur W, Derr K, Dixon M, Jimenez SA, Rosenbloom J. Immune modulation of connective tissue functions: studies on the production of collagen synthesis inhibitory factor by populations of human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Imm* **74**:126-139, 1982
 - 29) Phan SH, Thrall RS. The role of soluble factors in bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **106**:156-164, 1982
 - 30) Arumungham R, Bose SM. Effect of indomethacin and naproxen on the metabolism of collagen in adjuvant-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* **10**:161-167, 1981
 - 31) Kulonen E, Potila M. Effect of administration of antirheumatic drugs on experimental granuloma in rat. *Biochem Pharm* **24**:219-225, 1975
 - 32) Carlstedt CA, Madsen K, Wrethmark T. The influence of indomethacin on collagen synthesis during tendon healing in the rabbit. *Prostaglandins* **32**:353-358, 1986
 - 33) Aalto M, Kulonen E. Effects of serotonin, indomethacin and other antirheumatic drugs on the synthesis of collagen and other proteins in granulation tissue slices. *Biochem Pharm* **21**:2835-2840, 1972
 - 34) Alvarez OM, Levendorf DK, Smerbeck RV, Mertz PM, Eaglstein WH. Effect of topically applied steroid and nonsteroid anti-inflammatory agents on skin repair and regeneration. *Federation Proc* **43**:2793-2798, 1984

- 35) Thrall RS, McCormick PD JR, Jack RM, Mc Reynolds RA, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Inhibition by indomethacin. *Am J Pathol* **95**:117-127, 1979
- 36) 김동순, 함의근, 심영수. Steroid가 흰쥐의 bleomycin에 의한 폐섬유증에 미치는 영향 : 기관지폐포세척액 세포관찰소견, 폐병리조직학적 소견 및 폐내 섬유소함량 측정 결과. *결핵 및 호흡기질환* **34**:95, 1987
- 37) Woessner JF, The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**:440-447, 1961
- 38) Phan SE, Thrall RS, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Biochemical demonstration of increased rate of collagen synthesis. *Am Rev Respir Dis* **121**:501-506, 1980
- 39) Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. Simple procedures for determination of ¹⁴C-hydroxyproline. *Analyt Biochem* **66**:330-339, 1975
- 40) Hesterberg OW, Last GA. Ozone-induced acute pulmonary fibrosis in rats. *Am Rev Respir Dis* **123**:47-52, 1981
- 41) Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for 0.5 to 50 microgram of protein. *Analyt Biochem* **86**:142-146, 1978
- 42) Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, Crystal RG. Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: Mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of interstitial injury in interstitial lung disease. *Proc Natl Acad Sci* **78**:7147, 1981
- 43) Postlethwaite AE, Kang AH. Characterization of guinea pig lymphocyte-derived chemotactic factor for fibroblasts. *J Immunol* **124**:1462-1466, 1980
- 44) Postlethwaite AE, Smith GN, Mainardi CL, Seyer JM, Kang AH. Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: Stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J Immunol* **132**:2470-2477, 1984
- 45) Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1) *Proc Natl Acad Sci* **78**:2474-2477, 1981
- 46) Dinarello CA. An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J Clin Imm* **5**:287-297, 1985
- 47) Goldering MB, Krane SM. Modulation recombinant of interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J Biol Chem* **34**:16724-16729, 1987
- 48) Jimenez SA, Freundlich B, Rosenbloom J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J Clin Invest* **74**:1112-1116, 1984
- 49) Brinckerhoff EC, Guyre PM. Increased proliferation of human synovial fibroblasts treated with recombinant immune interferon. *J Immunol* **134**:3142-3146, 1985
- 50) Leslie CC, Musson RA, Henson PM. Production of growth factor activity for fibroblasts by human monocyte-derived macrophages. *J Leukocyte Bio* **36**:143-159, 1984
- 51) Freundlich B, Bomalaski JS, Neilson E, Jimenez SA. Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunology Today* **7**:303-307, 1986
- 52) Korn JH, Torres D, Downie E. Clonal heterogeneity in the fibroblast response to mononuclear cell derived mediators. *Arthritis Rheum* **27**:174-179, 1984
- 53) Selman M, Montano M, Ramos C, Chapela R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **41**:355-359, 1986
- 54) Phan SH, Thrall RS, Williams C. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Effects of steroid on lung collagen metabolism. *Am Rev Respir Dis* **124**:428-434, 1981