대한산업의학회지 제 12 권 제 2 호 (2000년 6월)
Korean J Occup Environ Med, 2000;12(2):209-217

결정형 규산분진에 폭로된 섬유모세포의 자가증식

가톨릭대학교 의과대학 성모병원 산업의학과

안병용 · 김경아 · 문제혁 · 정진숙 · 김은경 · 임 영

— Abstract —

Autoproliferation of Fibroblast by Exposure to Crystalline Silica - Evaluation by H_2O_2 and PDGF-AA와 TGFβ -

Byoung Young Ahn, Kyoung-Ah Kim, Je-Hyeok Mun, Jin-Sook Jeong, Eun Kyung Kim, Young Lim

Department of Occupational & Environmental Medicine, St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea

Objectives : The aim of this study is to find out the activity of autoproliferation of rat fibroblast exposed to crystalline silica and the role of mediators secreted from rat fibroblast.

Methods : The effect of α-quartz on production of growth factor (platelet-derived growth factor-AA and transforming growth factorβ) from rat fibroblasts were evaluated by ELISA and immunocytochemical analysis. Gene expression of these growth factors in rat fibrobast exposed to crystalline silica was evaluated by RT-PCR. Furthermore, fibroblast proliferation by culture supernatant of rat fibroblast was assayed by the neutral red test.

Results : The amounts of H_2O_2 and growth factors synthesized in rat fibroblasts were significantly increased by the stimulation of crystalline silica(α-quartz), which showed the dose-dependent manner to the concentration of α-quartz with the maximum response at the dosage of 100 ㎍/㎠. The result of RT-PCR demonstrated that α-quartz induced gene expression of PDGF-AA and TGFβ in rat fibroblast. We also found that supernatant of α-quartz-cocultured rat fibroblast induced a significant proliferation of fibroblast.

Conclusion : Crystalline silica directly induce functional change in fibroblast such as increased release of reactive oxygen species and growth factors. The products of these functional change promote fibroblast proliferation via autocrine loop.

Key Words : Platelet-derived growth factor-AA, Transforming growth factor β, Crystalline silica, Rat fibroblast

〈접수일 : 2000년 4월 10일, 채택일 : 2000년 5월 24일〉

교신저자 : 임 영(Tel : 02-3779-1401) E-mail : nglim@cmc.cuk.ac.kr

서 론

산업장에서 광물성 분진에 폭로되면 이에 의한 간질성 폐질환이 흔히 발생할 수 있으며 이를 진폐증이라고 하는데, 흡입되는 분진의 종류에 따라 진폐증의 발생이나 진행속도가 다르다(Begin등, 1989). 결정형 규산분진에 의한 규폐증은 진행속도가 빠르며 폐의 조직변화가 심하고 산업장에서 빈번하게 발생되는 진폐증 중의 하나지만, 이 질환의 발생기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다(Jagirdar등, 1996).

최근 실험관내 모델이나 동물의 실험규폐증 모델을 통한 연구에 의하면 규폐증은 결정형 규산분진에 의한 폐포염으로 시작하여 점차 간질의 섬유화로 진행하는 질환이며, 결정형 규산분진이 폐장내로 흡입되면 폐장내 반응세포을 자극하여 반응성 산소기가 유리되는 것으로 생각되고 있다(Kamp등, 1992; Vallyathan등, 1992; Schapira등, 1994). 반응성 산소기의 작용은 직접적인 세포손상과 세포의 활성화 두가지로 나눌 수 있는데 규폐증의 발생과정에서 어느쪽이 더 중요한 작용을 하는지는 확실하지 않다. 다만 상황에 따라 다소의 차이는 있으나 두가지 기전이 모두 작용할 것으로 생각되고 있다(김경아등, 1999).

고농도의 분진 폭로시에는 산소기에 의한 직접적인 세포손상이 더 지배적이지만, 실제로 작업장에서 분진에 저농도로 그리고 지속적으로 폭로되는 환경에서는 세포의 활성화가 더 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 염증성 섬유화성 매개물질, 즉 cytokine의 분비가 더 주도적인 역할을 할 것으로 생각되는 바(Donaldson등, 1998) 산소기와 cytokine의 관련기전 파악이 진폐증 발생과 그 경과에 중요할 것으로 생각된다. 분진흡입시 급성기의 반응성산소기 발생은 주로 폐포대식세포와 중성구에서 유래하며 이들 세포가 진폐증 병태생리기전에 가장 중요한 것으로 이해되고 있다(Donaldson등, 1988; Henderson등, 1991; Donaldson등, 1992; Hill등 1995). 그러나 많은 실험결과 진폐증을 비롯한 만성경로를 취하는 질환의 발생기전에 이들 세포외에 상피세포, 임파구, 섬유모세포, 그리고 호산구등의 세포의 역할이 밝혀지고 있다.

염증반응 이후 분비되는 cytokine중 transforming growth factor(TGF)나 platelet derived growth factor(PDGF)와 같은 성장 촉진인자들은 섬유모세포를 증식시켜 이들로부터 콜라겐(collagen)의 생성을 촉진시키는등 직접 흡입된 분진과 반응함으로써 파괴된 폐조직을 섬유화로 대치시키는데 직접적인 역할을 하는 것으로 생각되고 있다(Flanders등, 1989; Warheit등, 1984; Chang등 1988). 지금까지 폐포대식세포가 이러한 성장촉진인자들을 분비하는 세포이며, 섬유모세포는 다른 세포로부터 분비된 성장촉진인자에 반응하는 세포로만 알려져 왔다. 그러나, 진폐증의 발생과정 중 폐포대식세포들의 작용이 뚜렷하긴 하나, 그 생존기간이 짧아서 규폐증과 같이 만성으로 진행하는 질병의 병태생리를 이러한 일과성 염증세포에서 분비하는 매개물질들만으로는 설명하기가 부족하다. 따라서 폐조직을 구성하는 세포들이 관여할 것이라는 가설하에 섬유모세포는 섬유화를 유발하는 중심세포로서 기능에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 또한 최근의 연구에 의하면 섬유모세포가 cytokine의 작용을 받아 증식하거나 기타 세포외 기질을 만들어 내는 수동적인 작용 뿐 아니라, 주위 다른 종류의 세포나 섬유모세포 자체의 기능에 영향을 미치는 여러 물질을 분비하는 효과세포로서의 역할도 가지고 있음이 알려져 있다(Rolfe등 1992).

따라서, 저자들은 실험관내 실험을 통해 결정형 규산분진이 섬유모세포의 반응성산소기와 PDGF-AA와 TGFβ같은 성장인자의 생산에 미치는 영향을 알아보고, 규폐증의 발생과정 중 섬유모세포의 역할에 대하여 알아보고자 하였다. 그리고, 결정형 규산분진으로 자극한 섬유모세포의 배양상층액이 같은 섬유모세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보아 결정형 규산분진에 의한 섬유모세포의 증식 및 그에 따른 섬유화 반응에 미치는 파급효과를 알아보았다. 이와같은 실험을 통하여 섬유모세포가 규폐증 발생과정 중에 단순히 섬유화를 유발하는 기질을 분비하는 세포로써의 역할외 주위세포에 여러 가지 기능에 영향을 미치는 효과세포로써 작용하는 것을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 분진

결정형규산 분진으로 α-quartz(Min-U-sil, Pennsylvania Glass Sand Corp., Pittsburg, PA)을 사용하였다. α-quartz는 실험에 사용하기전 분진에 함유되어 있을 수 있는 내독소를 제거하기 위하여 고압멸균하였으며 실험직전 배지에 섞어 1시간동안 초음파 처리한 후 사용하였다.

2. 세포배양

섬유모세포는 Rat2(ATCC CRL-1764, Rockvill, MD)를 이용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 부유시킨 세포를 1×10^6 well의 밀도로 6-well plate에 분주하고 37℃, 5 % 이산화탄소 배양기에 배양하였다. 세포가 well에 90 % 정도 차기를 기다렸다가 0.1 % 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 갈아주고 48시간 동안 이산화탄소 배양기에서 생존율은 변화가 없으나 증식이 억제된 상태로 유지시켰다. 48시간 뒤 세포를 DMEM으로 세척한 후 1, 10, 100 및 1000 ㎍/㎠ α-quartz가 포함된 배지로 교환하였다. 각 군의 시료수는 6개가 되게 준비하였다. 분진으로 자극하고 24 시간 후 배양 상층액을 거두어 3,000×g로 원심분리하여 분진을 제거한 후 즉시 상층액내 과산화수소 (H_2O_2)의 농도를 측정하였고 남은 상층액은 PDGF-AA와 TGFβ를 측정할때까지 -70℃에 보관하였다. 바닥에 남아 있는 세포는 trypsin으로 처리하여 부유시킨 후 인산완충용액(PBS)으로 세척하고 세포원심분리(cytocentrifuge)하여 PDGF-AA와 TGFβ 에 대한 면역세포화학염색을 시행하였다. 한편 대조군은 α-quartz가 포함되지 않은 배양액을 사용하였다는 점 이외에는 실험군과 같은 조건의 배양 및 분석과정을 가지도록 설계하였다.

3. 섬유모세포 배양상층액내 H_2O_2 농도 측정

배양상층액내 H_2O_2의 농도는 Heinzel 등(1992)이 기술한 방법에 의하여 측정하였다. 즉 상층액에 HCl을 넣고 잘 섞은 후 10 mM ferrous ammonium sulfate 20 ㎕와 2.5 M potassium thiocyanate 30 ㎕을 가하여 10 분간 반응시킨 다음 495 nm에서 흡광도를 측정하고 H_2O_2 표준곡선에 의하여 농도를 환산하였다.

4. 섬유모세포 배양상층액 내 PDGF-AA와 TGFβ의 측정

성장촉진인자 중 PDGF-AA와 TGFβ의 농도를 indirect ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)방법으로 측정하였다. 측정범위는 PDGF-AA가 0.1-64 ng/㎖, TGFβ는 2-64 ng/㎖였다. 표준시료로써 사람의 PDGF-AA와 TGFβ을 이용하여 표준곡선을 구하였으며, 각 시료의 PDGF-AA와 TGFβ 농도를 환산하였다.

5. 섬유모세포의 면역세포화학염색(Immunocytochemistry)

결정형 유리규산(α-quartz)과 반응시킨 섬유모세포의 PDGF-AA와 TGFβ 발현을 보기 위하여 면역세포화학 염색을 실시하였다. 즉 1×10^6개의 세포를 세포원심분리하여 슬라이드에 부착한 뒤 1 % formalin(Sigma, St. Louis, MO)이 함유된 PBS(phosphate buffered saline, Sigma, St. Louis, MO)에 10분, -10°C methanol에 5분, 그리고 ice cold acetone에 2분간 담그는 순으로 세포를 고정하였다. 이때 면역화학세포염색을 실시하기 전 차가운 10 % DMSO를 포함하는 인산완충용액(PBS)에 10분간 반응시켜 세포들이 투과성을 갖게한 후 염색을 시작하였다.

각 슬라이드는 내재되어 있는 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3 % H_2O_2를 투여하였고 배경염색을 막기 위하여 5 % bovine serum albumin(BSA, Sigma, St Louis, MO)으로 처리하였다. 각각 PDGF-AA와 TGFβ에 대한 항체 100 ㎕를 세포 위에 떨어뜨려 1시간 동안 반응시켰다. 이때 PDGF-AA에 대한 항체(rabbit anti-human PDGF-AA, SantaCrutz, USA)는 1:20으로, TGFβ에 대한 항체(rabbit anti-human TGFβ, SantaCrutz, USA)는 1:40으로 희석하여 사용하였다. 세포 슬라이드는 2 배수로 준비하여 1차 항체 대신에 희석액 100 ㎕만 반응시켜 이를 음성대조 슬라이드로 이용하였다. 세포들을 PBS로 세척한 후 biotin 표지된 각각의 2차 항체 100 ㎕와 1 시간 동안 반응시켰다. 세포를 다시 세척하고 peroxidase

Table 1. Oligonucleotide primers and sizes of PCR products for PDGF-AA & TGFβ

Gene		Primer	Size(bp)
PDGF-AA	Up	5' AGAAGTCCAGGTGAGGTTAGAGGAGCAT3'	304
	Down	5' CTGCTTCACCGAGTGCTACAATACTTGCT3'	
TGFβ	Up	5' ATGGTCCCCTCGGCTGGACAG3'	228
	Down	5' TGGCCTGCTTCTTCTGGCTGGCA3'	
GAPDH	Up	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT3'	983
	Down	5' CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC3'	

conjugated extravidin(Sigma, St. Louis, MO) 100 μl를 가하고 1시간 동안 반응시킨 후 immunoperoxidase 염색을 실시하였다. 섬유모세포의 PDGF-AA와 TGF β 발현의 증가를 정량하기 위하여 총 500개의 세포중 면역반응성을 보인 세포를 세어 총세포 중 백분율을 구하였다.

6. PDGF-AA와 TGFβ의 유전자 발현

결정형 규산분진의 자극에 의한 섬유모세포의 PDGF-AA와 TGFβ의 mRNA 발현의 변화는 RT-PCR을 이용하여 관찰하였다. 즉, 지름 10 cm 배양접시에 쥐의 섬유모세포가 90 % 정도 찬 후 α-quartz를 처리하고 24 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 Tri Pure Isolation Reagent(Boehringer Mannheim, USA)를 이용하여 RNA를 추출한 후, First strand cDNA synthesis kit (Amersham Phamarcia Co.)로 cDNA를 합성하였다. 각각 PDGF-AA와 TGFβ의 primer와 cDNA 산물 5 μl을 Pre-Mix PCR Tube (Bioneer)에 넣고, 총반응액이 20 μl이 되도록 증류수를 가하였다. PDGF-AA, TGFβ 그리고 internal standard로 사용된 GAPDH의 primer 염기서열과 PCR 산물의 크기는 Table 1과 같다. PCR을 이용하여 30회의 cDNA 증폭반응을 실시하였는데, PCR 조건은 동일하게 95℃에서 30초, annealing은 58℃에서 30초, extension은 72℃에서 1분간 반응시켰다. PCR이 끝난 후 10 μl의 증폭된 PCR 산물을 취하여 2 % agarose gel 상에 전기영동하였으며, 이동한 DNA 밴드의 위치를 ethidium bromide 염색으로 관찰하였다.

7. 섬유모세포 증식측정

96-well plate에 rat fibroblast(Rat2)를 well당 1×10^4/well의 밀도로 분주하여 배양하였다. 24시간 후 0.1 % FCS가 포함된 배지로 갈아주고 다시 48시간 동안 배양하여 생존율에 변화는 없으나 증식은 억제된 상태로 유지시켰다. 48시간 후 세포를 DMEM으로 세척한 섬유모세포(Rat2) 배양 상층액으로 바꾸어 주고, 24 그리고 48 시간 후 neutral red 방법(김경아 등, 1999)으로 증식된 세포수를 정량하였다.

8. 통계학적 검정

자료처리는 SAS 6.12 프로그램을 이용하였고, 실험성적은 평균±표준편차로 표시하였다. 결정형 규산분진을 처리한 실험군과 대조군과의 차에 대해 Wilcoxon 순위검정법을 시행하였다. 시간에 따른 변화나 분진농도에 따른 변화의 경향은 GLM(general linear model)의 trend test로 검정하였다.

결 과

1. H_2O_2의 생성

반응성 산소기중의 하나인 H_2O_2를 측정하여 α-quartz가 섬유모세포의 반응성 산소기 발생에 미치는 영향을 알아보았다. 농도 역시 α-quartz의 농도를 증가시킬수록 섬유모세포의 배양액내의 H_2O_2의 농도 역시 증가하였으며, 분진의 농도가 100 $\mu g/cm^2$일 때 상층액내 H_2O_2의 농도가 최대치를 보였다.

2. PDGF-AA와 TGFβ 의 생성

쥐의 섬유모세포를 결정형 규산분진의 농도를 달리하여 자극한 후 24 시간까지 배양하여 그 상층액내 PDGF-AA와 TGFβ의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 자극한 분진농도가 100 $\mu g/cm^2$이 될 때까지 용량대반응의 관계로써

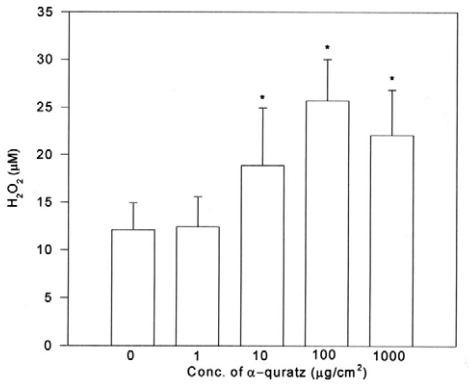

Fig. 1. Effects of increasing doses of α-quartz on H_2O_2 release from rat fibroblasts * : p<0.05

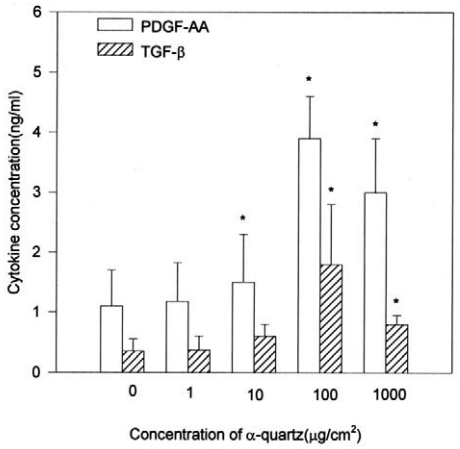

Fig. 2. Effects of α-quarts on production of PDGF-AA & TGFβ from rat fibroblasts * : p<0.05

Table 2. Proportion of positive repair cytokine rat fibroblast 24 hours after exposure to α-quartz

Conc. of α-quartz(㎍/㎠)	% of PDGF-AA positive cell	% of TGFβ positive cell
0	11.6±0.2	10.4±0.4
1	16.4±1.2*	16.4±2.2*
10	33.0±2.3*	28.0±2.1*

* Significantly different from the control groups, which were α-quartz free.

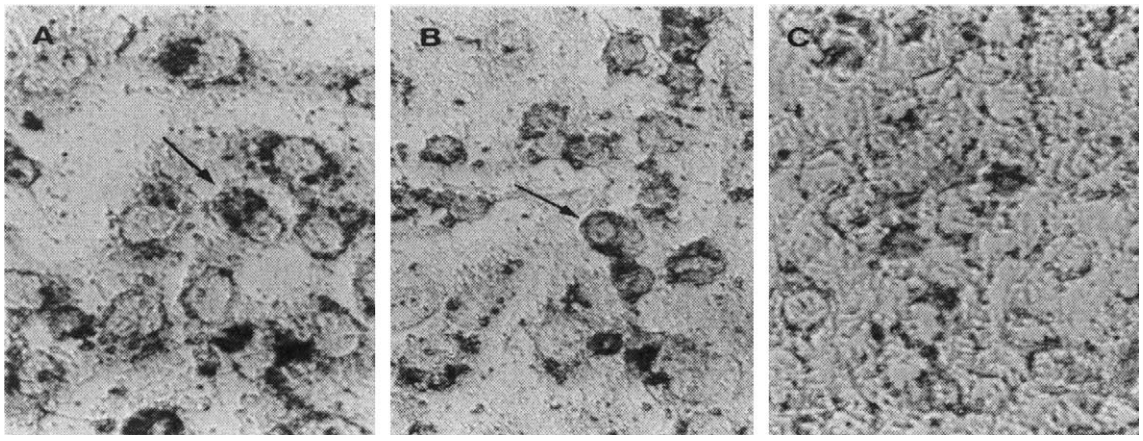

Fig. 3. Cytoplasmic immunolocalization of PDGF-AA with immnoperoxidase technique in rat fibroblast cells after stimulation with α-quartz. **A.** The expression of PDGF-AA was presented in rat fibroblast exposed to α-quartz(10㎍/㎠) **B.** The expression of TGF β was presented in rat fibroblast exposed to α-quartz(10㎍/㎠) **C.** Cytocentrifused rat fibroblast exposed to α-quartz(10㎍/㎠). Control for anti-growth factor stain using dilent only.

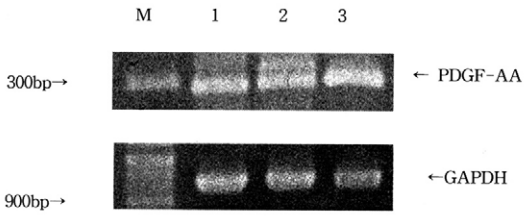

Fig. 4. PDGF-AA m-RNA expression in rat fibroblast exposed to α-quartz. Rat fibroblasts were grown to 90% confluence on 10㎝ cultre dish. Cells were incubated without(lane 1), with 1㎍/㎠(lane 2), and 10㎍/㎠(lane 3) of α-quartz. M : 100bp ladder marker.

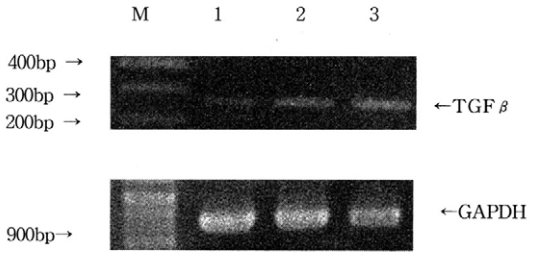

Fig. 5. TGF β m-RNA expression in rat fibroblast exposure to α-quartz. Rat fibroblasts were grown to 90% confluence on 10㎝ culture dish. Cells were incubated without(lane 1), 1㎍/㎠(lane 2), and 10㎍/㎠(lane 3) of α-quartz. M : 100bp ladder marker.

PDGF-AA와TGFβ의 농도가 증가하였으며, 100 ㎍/㎠에서 최대치를 나타냈다.

3. PDGF-AA와 TGFβ 면역화학염색

α-quartz와 반응시킨 섬유모세포의 PDGF-AA와 TGFβ의 발현을 보기 위하여 면역세포화학염색을 실시하였다(Fig. 3). 섬유모세포내 PDGF-AA와 TGFβ가 존재하는지를 면역화학염색을 실시하여 정성적인 확인을 한 다음 정량을 위하여 총 500개의 세포 중 면역반응성을 보인 세포를 세어 백분율을 구하였다(Table 2). 대조군에서는 PDGF-AA 양성세포가 11.6±0.2 %, TGFβ 양성세포가 10.4±0.4 %로 관찰된 반면, α-quartz로 자극한 실험군의 경우 α-quartz 농도가 1 ㎍/㎠ 일 때 PDGF-AA 양성세포가 16.4±1.2 %, TGFβ 양성세포가 16.4±2.2 %, 그리고 α-quartz 농도가 10 ㎍/㎠ 일 때 각각 33.0±2.3 %, 28.0±2.1 %로 α-quartz의 농도가 증가함에 따라 면역반응양성을 보인 세포가 현저하게 증가하였다.

4. α-quartz에 의한 PDGF-AA와 TGFβ의 유전자 발현

α-quartz가 섬유모세포의 PDGF-AA와 TGFβ 유전자 발현에 미치는 영향은 Fig. 4 와 5 에서 보는 바와 같이 α-quartz의 농도가 증가할수록(1 과 10 ㎍/㎠) PDGF 와 TGFβ의 mRNA 발현이 증가하였으며, GAPDH mRNA의 발현은 별다른 변화가 없었다.

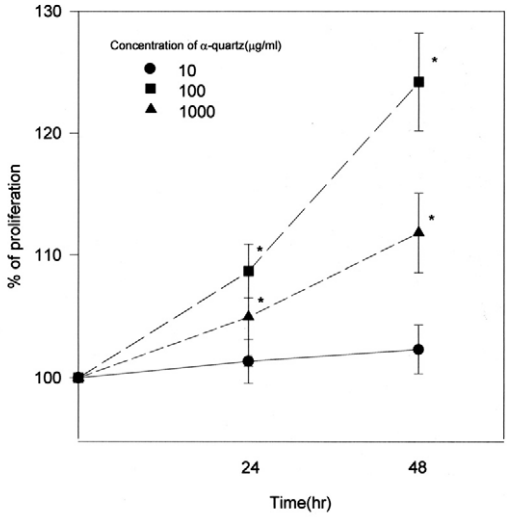

Fig. 6. Fibroblast proliferation by culture supernatant of fibroblast stimulated with α-quartz. *p<0.05

5. α-quartz에 의한 섬유모세포의 자가증식

Fig. 6은 섬유모세포를 α-quartz로 자극하고 배양한 후 그 배양상층액으로 동종의 섬유모세포를 배양하였을 때의 섬유모세포 증식정도를 보여주며, 그 정도는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 이 실험에서 대조군은 0.1 % 우태아 혈청이 포함된 DMEM 만으로 배양하였으며, α-quartz농도 100 과 1000 ㎍/㎠ 자극군에서 24시간 배양시 108.76±2.18 %과

104.98±4.04 %, 그리고 48시간 배양시 124.2±4.0 %와 111.82±3.24 %로 섬유모세포의 증식이 유의하게 증가하였으며, 특히 100 ㎍/㎠ 자극군에서 증가가 가장 현저하였다.

고 찰

결정형 규산분진이 폐장으로 흡입되면 만성적인 염증을 유발하고 이는 결국 폐장의 섬유화로 진행되는데, 섬유화라는 것은 정상조직이 섬유모세포와 이 세포로부터 분비되는 세포외 물질로 치환되는 것을 일컫는다(Wagner등, 1974). 과거에는 섬유모세포가 대식세포나 상피세포로부터 분비된 cytokine의 영향을 받아 증식하면서 섬유소원이나 기타 세포외 기질물질 (extra-cellular matrix)을 만들어내는 수동적인 세포로 생각되었지만, 최근의 연구결과 섬유모세포는 직접 여러가지 cytokine을 분비하여 스스로(autocrine) 또는 인접한 다른 세포들의 (paracrine) 기능이나 증식에 영향을 미치는 효과세포로 작용한다는 것이 밝혀지고 있다(Driscoll등 1993; Lasky등 1995; Driscoll등 1996). 따라서 본 연구에서는 쥐의 섬유모세포인 rat2 cell을 결정형 유리규산 분진인 α-quartz로 처리하고 그 반응을 관찰한 결과, 반응성 산소기, PDGF-AA 그리고 TGFβ가 유의하게 증가하였다. 이와 같은 결과는 섬유모세포가 결정형 규산분진의 자극에 의하여 직접적인 반응을 나타냄을 시사하는 결과이다.

분진이 폐장내로 흡입되면 일차적으로 폐포대식세포에 탐식되며 이를 시작으로 일련의 조직반응이 일어난다. 따라서 분진에 의한 폐질환 연구는 주로 폐포대식세포를 중심으로 이루어지고 있다(Rojanadakul등, 1993; Kim등 1999). 그러나 분진은 파괴된 상피세포를 통과하거나 폐포대식세포에 탐식된 채로 폐간질로 들어 갈 수 있음으로 폐간질의 주요 세포인 섬유모세포와 반응을 일으킬 수 있을 것으로 생각되며, 실제로 실험적 규폐증을 일으킨 쥐를 통한 연구에서, 폐간질 섬유모세포 내에 결정형 규산분진이 탐색된 것이 관찰된 바 있어(Brody등, 1985) 분진과 섬유모세포가 직접 반응함을 추측하게 한다.

반응성산소기는 결정형 규산분진으로 자극된 대식세포에서 산화환원반응에 의해 생산되며, 세포독성 및 발암성의 기전에 중요한 작용을 하고 cytokine을 포함한 여러 가지 물질을 분비하는데 있어 중요한 신호전달물질로 작용한다(Vallyathan 과 Shi, 1997; Shi등, 1998). 그러나 최근 연구에 의하면 탐식세포 이외의 세포에서도 ROS가 생산될 수 있음이 증명된 바 있으며(Bae등, 1997), 본 연구에서 결정형 규산분진의 자극을 받은 섬유모세포에서 반응성산소기인 H_2O_2의 생산이 증가되었으며, 이러한 H_2O_2는 일차적인 신호전달물질로 작용하여 transcriptional factor를 자극하고 여러 가지 매개물질의 분비를 유도할 수 있다. 이러한 사실은 섬유모세포가 결정형 규산분진과의 반응에 의하여 효과세포로서의 역할을 한다는 또 하나의 예가 되었다.

본 연구에서는 위에서 설명한 바와 같이 섬유모세포 배양상층액에서 섬유모세포 성장촉진인자인 PDGF-AA와 TGFβ를 측정하였으며, PDGF는 30-38 kD의 polycoprotein dimer로 A와 B chain의 이중황화결합으로 만들어지며, AA 또는 BB homodimer또는 AB heterodimer 형태로 있을 때만 활성화되어 반응을 나타내며 monomer는 활성도가 없다(Heldin과 Westermark, 1990). 모든 간질세포들은 PDGF α와 β수용체를 가지고 있으며, 이러한 수용체들이 중합되어 기능적으로 αα, αβ, 또는 ββ수용체로 존재한다(Seifert등, 1989). Bonner등(1993)의 연구에 의하면 석면분진에 폭로된 섬유모세포는 PDGFα 수용체만 선택적으로 발현이 증대되어 PDGF-AA에 대한 반응성이 크게 증가하며, 또한 Lasky등(1995)은 쥐의 폐섬유모세포에 석면분진을 반응시키면 PDGF-AA가 선택적으로 분비 또는 발현된다는 것을 관찰하였다. 따라서 이 연구에서 분진과 반응시킨 섬유모세포로부터 분비되는 PDGF 양을 측정시 PDGF-AA가 선택적으로 분비증가 또는 활성화될 것으로 생각되어 총 PDGF 보다는 PDGF-AA의 농도를 측정하였으며, 그 결과 결정형 규산분진이 섬유모세포로부터 PDGF-AA의 분비를 촉진함을 관찰할 수 있었다.

TGFβ또한 성장촉진인자의 하나로써 섬유모세포 주유성이 있고 미성숙 섬유모세포를 분화시키며(Jagirdar등, 1996), 세포외간질의 축적을 증가시키는 등, 섬유화 과정에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Jagirdar등, 1996). TGFβ도 PDGF-AA와 마찬가지로 결정형 규산분진의 자극에 의하여

섬유모세포로부터의 생산이 증가되었는 바, 결정형 규산분진으로 자극한 섬유모세포의 배양상층액이 동종의 섬유모세포의 증식을 증가시키는 작용을 한 것으로 생각되었다.

정상적으로 생체내에서 섬유모세포를 포함한 간질세포들은 대부분 증식이 정지된 상태로 존재한다(Lasky등, 1995). 따라서 본 연구에서는 α-quartz로 처리하기 전 배양액의 혈청 농도를 0.1 %로 낮추어 세포생존율이 어느 수준이상으로 유지되며 활동적으로 증식하지 않는 상태에서 분진을 첨가하였다.

이상의 결과로 보아 섬유모세포는 결정형 규산분진과의 직접반응에 의해 반응성산소기 또는 PDGF-AA와 TGFβ같은 성장촉진인자의 분비를 증가시키는 등 기능적인 효과의 역할을 수행하여 섬유모세포가 규폐증의 진행과정 중에 단순히 다른 세포의 매개물질에 반응을 보이는 수동적인 세포가 아니라, 기능적인 변화를 통해 특정물질을 분비하여 자가증식을 조절한다는 것을 밝힘으로써 향후 유리규산에 의한 섬유화반응의 새로운 연구방향을 제시하였다.

요 약

목적 : 본 연구는 결정형 규산분진에 폭로된 섬유모세포에서 다른 세포로부터의 영향없이 스스로 반응성산소기나 성장촉진인자 분비하여 자가증식의 작용이 있는지를 알아보고자 하였다.

방법 : 결정형 규산분진에 폭로된 섬유모세포의 성장촉진인자(PDGF-AA와 TGFβ) 분비능을 알아보기 위해 ELISA와 면역세포화학 염색을, PDGF-AA와 TGFβ 의 유전자 발현을 알아보기 위해 RT-PCR을, 그리고 결정형 유리규산에 의하여 자극된 섬유모세포의 배양상층액에서 섬유모세포 증식을 보기위하여 neutral red 방법을 사용하였다.

결과 : 섬유모세포를 결정형 유리규산분진으로 처리하였을 경우, 결정형 규산분진의 농도가 증가할수록 섬유모세포로부터 반응성산소기의 분비가 현저하게 증가하였으며, 특히 결정형 규산분진의 농도가 100 ㎍/㎠ 일 때 가장 높았다. 또한 같은 조건하에서 PDGF-AA와 TGFβ의 유전자 발현과 cytokine 분비도 현저하게 증가하였으며, 결정형 유리규산분진과 함께 배양한 섬유모세포의 배양상층액을 일반 배양조건에 첨가했을 때 그 자체만으로도 섬유모세포의 증식이 현저히 증가되는 것을 관찰하였다.

결론 : 결정형 규산분진은 직접적으로 섬유모세포에 작용하여 반응성산소기와 PDGF-AA와 TGFβ의 분비를 증가시킴으로써 autocrine loop에 의한 섬유모세포의 증식을 나타내었다.

참고문헌

김경아, 김은경, 김지홍, 임영. 결정형 규산분진에 의한 A549 세포의 독성 및 섬유모세포 증식에 Desferrioxamine이 미치는 영향. 대한산업의학회지 1999;11(2):127-136.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF) - induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 1997;272(1):217-221.

Begin R, Cantin A, Masse S. Recent advances in the pathogenesis and clinical assessment of mineral dust pneumoconiosis : asbestosis, silicosis and coal pneumoconiosis. Eur Respir J 1989;2:988-1001.

Bonner JC, Gooddell AL, Coin PG, Brody AR. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. J Clin Invest 1993;92:425-430.

Brody AR, Hill LH, Warheit DB. Induction of early alveolar injury by inhaled asbestos and silica. Fed Proc 1985;44:2596-2601.

Chang LY, Overby LH, Brody AR, Crapo JD. Progressive lung cell reactions and extracellular matrix production after a brief exposure to asbestos. Am J Pathol 1988;131:156-170.

Donaldson K, Bolton RE, Jones A. Brown GM, Robertson MD, Slight J, Cowie H, Davis JM. Kinetics of the bronchoalveolar leukocyte response in rat during exposure to equal airborne mass concentration of quartz, chrysotile asbestos or titanium dioxide. Thorax 1988;43(7):525-533.

Donaldson K, Li XY, Dogra S, Miller BG, Brown GM. Asbestos-stimulated tumor necrosis factor release from alveolar macrophages depends on fibre length and opsonisation. J Pathol 1992;168:243-248.

Donaldson K. Mechanism of Pneumoconiosis. In

occupational Lung Disease. An International Perspective. eds. DE Banks, JE Parker. London: Chapman and Hall Medical, 1998.

Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : expression by rat alveolar macrophaes, fibroblasts and epithelial cells and in the rat lung after mineral dust exposure. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;8:311-318.

Driscoll KE, Howard BW, Carter JM, Asquith T, Johnston C, Desrilleux P, Kunkel SL, Isfort RJ. Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: effects of in vivo and in vitro particle exposure. 1996;149:1423-1426.

Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, Van Obberghen-Schilling E, Baker CC, Kass ME, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor-beta 1: Histochemical localization with antibodies to different epitopes. J Cell Biol 1989;108(2):653-660.

Hendeson RF, Harkema JR, Hotchkiss JA, Bochme DS. Effect of blood leukocyte depletion on the inflammatory response of the lung quartz. Toxicol Appl Pharmacol 1991;109:127-136.

Heinzel B, John M, Klatt R, Bohme E, Mayer B. Ca2+/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthetase. Biochem J. 1992;281:627-630.

Heldin CH, Westermark B. Signal transduction by receptors for platelet-derived growth factor. J Cell Sci 1990;96:193-196.

Hill I, Beswick PH, Donaldson K. Differrential release of superoxide anion by macrophages treated with long and short fiber amosite asbestos is a consequence of differential affinity for opsonin. Occup Environ Med 1995;52:92-96.

Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN. Transforming growth factor-β (TGFβ) in silicosis. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1076-1081.

Kamp DW, Gracefla P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced disease. Free Radic Biol Med 1992;12:293-315.

Kim JK, Lee WK, Lee EJ, Cho YJ, Lee KH. Mechanism of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. J Toxicol Environ Health 1999;58:437-450.

Lasky JA, Coin PG, Lindroos PM, Ostrowski LE, Brody AR, Bonner JC. Chrysotile asbestos stimulates platelet-derived growth factor-AA production by rat lung fibroblast in vitro: Evidence for an autocrine loop. Am J Resp Cell Mol Biol 1995;12:162-170.

Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Orringer MB, Phan S, Evanoff HL, Burdick MD, Strieter RM. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. Am J Physiol 1992;263(5 Pt 1):L536-542.

Rojanasakul Y, Wang L, Malanga CJ, Ma JY, Banks DE, Ma JK. Altered calcium homeostasis and cell injury in silica-exposed alveolar macrophages. J Cell Physiol. 1993;154:310-316.

Schapira RM, Ghio AJ, Effros RM, Morrisey J, Dwson CA, Hacker AD. Hydroxyl radicals are formed in the rat lung after asbestos instillation in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994;10:573-579.

Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factors. J Biol Chem. 1989;264(15):8771-8778.

Shi X, Castronova V, Halliwell B, Vallyathan V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. J Toxicol Environ Health 1998;1:181-197.

Vallyathan V, Mega JF, Shi X, Dala NS. Enhanced generation of free radical from phagocytes induced by mineral dust. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;6:404-413.

Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung disease. Environ Health Perspect 1997;105(Suppl. 1):165-177.

Wagner JC, Berry G, Skidmore JW, Tmbrell V. The effects of the inhalation of asbestos in rats. Br J Cancer 1974;29:252-269.

Warheit DB, Chang LY, Hill LH, Hook GE, Crapo JD, Brody AR. Pulmonary macrophage accumulation and asbestos-induced lesions at sites of fiber deposition. Am Rev Respir Dis. 1984;129:301-310.