

광물성 섬유유 의 폐장내 주입에 따른 조직변화와 MIP-2의 관련성**

가톨릭대학교 의과대학 산업의학 센터, 한독의료원 건강관리과

김경아 · 임 영 · 이동원 · 김홍남 · 장황신
김지홍 · 서화석* · 박정일 · 윤임중

— Abstract —

Relationship Between Mineral Fiber-Induced Pulmonary Tissue Reaction and MIP-2

Kyoung Ah Kim, Young Lim, Dong Won Lee, Heung Nam Kim, Hwang Sin Chang,
Ji Hong Kim, Hwa Suck Suh*, Chung Yill Park, Im Goung Yun

*Catholic Industrial Medical center, College of Medicine, Catholic University
Department of Health Management, Han Dock Medical Center**

The pulmonary recruitment and activation of inflammatory cells, in particular, neutrophils is thought to contribute to lung injury resulting from dust exposure.

MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) which is a member of C-X-C chemokine plays a key role in neutrophil recruitment to sites of tissue injury.

Especially, mineral fiber induced pulmonary response is as a model for the neutrophil recruitment. Therefore, we evaluated the distribution of MIP-2 expression in lung tissue of mineral fiber exposed rat using immunohistochemical study and the relationship between degree of inflammation of lower respiratory tract and MIP-2 expression.

Total cell counts in bronchoalveolar lavage(BAL) fluid in mineral fiber-exposed group were markedly increased compared with each control group even not in ceramic fiber group. Number of neutrophil in BAL fluid in mineral fiber-exposed group were markedly increased compared with each control group until 4th week but except ceramic fiber group. In chrysotile group, number of neutrophil in BAL fluid were markedly increased compared with control group at 8th week.

Lung tissue instilled with all kinds of mineral fibers showed remarkable developments of bronchus associated lymphoid tissue(BALT) and small multiple granulomas but not for

* * : 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제 연구비에 의하여 연구되었음.

ceramic fiber group. In chrysotile group, multiple granuloma and inflammatory change were more profuse response compared with other groups.

MIP-2 was predominantly expressed in epithelial cells of bronchioles and bronchus and was express also found in macrophages with lung section at 1 week after fiber instillation. Small amount of epithelial cell associated MIP-2 was present in chrysotile at 8 week group.

But MIP-2 was not seen in epithelial cells and macrophages in the lung tissue instilled with crocidolite, ceramic fiber and glass fiber at 8 weeks.

Our finding suggest that MIP-2 is predominantly expressed in bronchial epithelial cells of lung from mineral fiber-exposed rat and correlated with inflammatory cell, especially neutrophil, recruitment and tissue reaction. And we documented that MIP-2 expression and neutrophil recruitment in man-made vitreous fiber-exposed rat, especially glass fiber, less than chrysotile.

Key Words : Mineral fiber, Chemokine, MIP-2, Neutrophile

서 론

진폐증의 병리기전에 폐장내 활성화된 염증세포의 침윤이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 분진이 흡입되었을 때 일차적으로 폐포염이 발생되며, 폐포염이 심하고 오래 지속될수록 강한 섬유화 반응이 일어나는 것으로 알려져 있다. 특히 폐포염을 구성하는 염증세포중 중성구는 세포와 조직을 파괴시키는 물질들을 많이 분비하므로 폐포염중세포중 중성구의 백분율이 높을수록 심한 조직변화를 일으키는 것으로 생각되고 있다(Admason과 Bowden, 1984).

예를 들어 이산화 티타늄이나 비결정형 유리규산(amorphous silica)과 같이 독성이 약하고 조직변화를 적게 일으키는 분진들은 폭로시 폐포염증변화가 일시적이며 중성구의 침윤도 적은반면, 결정형 유리규산(crystalline silica) 처럼 독성이 강한 분진의 경우 폐포염증이 오랫동안 지속되고 중성구의 침윤도 계속되어 결과적으로 심한 섬유화 조직반응을 초래한다(Yuen등, 1996).

분진폭로후 중성구가 포함된 폐포염이 계속되는 데에는 여러 가지 염증성 매개물질이 관여하게 되는데 이중 chemokine이 대표적이다. chemokine이란 chemotactic cytokine으로 그구조에 따라 C-X-C(cystein-intervening amino acid-cystein)군과 C-C(cystein-cystein)군 2군으로 나뉘며 폐장내에서 폐조직이 파괴되거나 감염된 부위로 염증세포가 침윤되는데 중요한 역할을 한다. C-X-C군에

는 interleukin-8(IL-8)과 macrophage inflammatory protein-2(MIP-2)가 속하는데 중성구에 대한 강력한 화학주성(chemotactic activity)이 특징적이다(Driscoll등, 1993).

최근 chemokine중 MIP-2와 진폐증에 관한 연구중 1996년 Driscoll은 결정형 유리규산인 석영으로 유발시킨 실험진폐증에서 MIP-2의 증가를 보고하였으나 그의 다른 분진에서의 연구는 전무한 형편이다. 석영과 같은 유리규산 분진은 입자형 분진으로 크기가 0.5-5 μm 의 호흡성분진이 폐포 주위에 침착되어 병변을 일으키지만 석면이나 그 대체물질로 사용이 증가되고 있는 인조섬유와 같은 광물성 섬유분진은 그 물리적인 성질로 인하여 폐장내 침착부위가 입자형 분진과 다르며 병변을 잘일으키는 분진의 크기도 입자형분진과 상이한 것으로 생각되고 있다(Lippman, 1994). 따라서 입자형분진과 섬유형 분진은 분진 흡입에 따른 염증세포의 반응과 병리기전에 차이가 있을 것으로 생각되나 이에 대하여 확실히 밝혀지지 않고 있다. 또한 석면의 대체물질로 사용되고 있는 인조섬유들의 흡입에 따른 신체 반응의 기전은 물론 신체에 미치는 영향들이 아직까지 확실하게 규명되지 않고 있어 광물성 섬유분진에 의한 폐장내의 폐포염 등 조직변화와 chemokine의 변화에 대한 연구가 중요한 의미를 가질 것이다. 또한 동물실험에서 MIP-2에 대한 항체로 전처리하고 석영분진에 폭로시켜 진폐증을 유발시킬 경우 폐조직내 중성구의 침윤이 현저하게 감소하였다는 연구가 발표되어(Driscoll등, 1996) 분진폭로후 폐포염발생에 MIP-2의 중요성과 더불어 치료방법의 개발 가능성도 제시하고 있

어 이에 관한 연구의 필요성을 배가시키고 있다.

따라서 여러가지 광물성 섬유로 쥐에 실험진폐증을 유발시킨 후 폐포염의 정도 및 조직변화를 관찰하고 immunohistochemical study를 통하여 MIP-2의 발현을 조사하고자 이연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

흰쥐(Sprague-Dawley)의 체중이 250-300 그램이 될 때까지 약 1-2주간 동일한 조건하에서 사육한 후 외견상 건강한 쥐를 대상으로 하였으며 실험에 사용된 쥐의 수는 각군당 10마리였다.

2. 주입된 분진

흰쥐의 기관내 광물성섬유분진을 주입하였는데 사용된 분진은 석면(백석면<chrysotile>, 청석면<crocidolite>) 과 인조섬유(유리섬유<glass fiber>, 요업섬유<ceramic fiber>)가 사용되었다.

1) 석면과 그농도

모든 석면은 日本作業環境測定協會에서 표준화한 시료를 입수하여 사용하였다. 사용된 석면의 길이를 일정하게 하기위하여 침강방법(Sedimentation method)으로 분류하여 사용하였다. 침강방법은 wide-mouth bottle에 석면과 증류수를 넣고 2시간 동안 초음파 처리(sonication) 하고 24시간 방치하였다가 침강정도에 따라 섬유를 분리하여 섭씨 50도에서 완전히 물기를 증발시킨 후 섬유를 굵어서 사용하였다.

석면섬유 그램당 섬유수를 측정하기 위하여 pore size가 0.8 μ m 인 cellulose ester membrane filter를 vaccum filter system에 연결하여 적절한 농도로 희석한 석면섬유 현탁액 1ml를 여과시킨 후 95% ethanol로 세척하였다. membrane filter를 건조시킨 후 slide glass 위에 acetone vapor로 고정하였다. 석면섬유는 Walton-Beckett graticule 이 삽입된 위상차현미경으로 400배 배율에서 주의깊게 관찰하여 μ g당 섬유수로 환산하였고 석면섬유의 길이도 같이 측정하였다. 석면섬유의 μ g당 섬유수는 Table 1에서 보는바와 같이 청석면 60,015.8 f/ μ g 그리고 백석면은 86,999.6 f/ μ g이었다. 석면 길이

의 기하 평균 \pm 기하표준편차는 청석면 12.1 \pm 1.7 m 그리고 백석면 23.1 \pm 1.8 m 이었다.

2) 인조섬유

日本産業醫科大學에서 성분 및 크기가 분석된 인조 섬유들을 입수하여 사용하였다. 실험에 사용된 인조섬유는 유리섬유($\text{SiO}_2 \cdot \text{Na}_2\text{O}$)와 요업섬유($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{SiO}_2$)이었다. 각각의 인조섬유별 섬유수는 유리섬유가 μ g당 11,820개, 요업섬유는 3,440 f/ μ g 이었다. 그리고 길이의 기하 평균 \pm 기하표준편차는 유리섬유 12.8 \pm 3.0 μ m, 요업섬유는 29.5 \pm 3.0 μ m이었다.

3. 실험방법

1) 분진투여

Ketamine(25g/kg)을 근육주사하여 전신마취 시킨 흰쥐의 경부를 절개하고 기관을 노출시킨 다음 광물성 섬유 분진 2 mg이 함유된 0.8 ml의 생리 식염수를 그리고 대조군에는 생리식염수 0.8 ml를 기도내 주입하였다. 주입후 각각 1주, 4주 그리고 8주째 도살하여 시료를 얻었다.

2) 기관지폐포세척

흰쥐에 urethane을 복강내 주사하여 마취한 후 개흉하여 기관을 절개하고 정맥도자를 기관에 삽입하였다. 삽입한 도자를 이용하여 1회에 6ml씩 총 100ml의 37°C 생리 식염수를 기관내 주입하였다가 회수하는 방법으로 기관지 세척을 실시하였다. 회수된 세척액을 50ml conical tube(Falcon, USA)에 모은 뒤 즉시 얼음속에 보관하였다. 기관지폐포세척액을 1000 rpm으로 10분간 원심분리한후 상층액을 제거하고 남은 세포를 인산완충액에 부유시켰다.

3) 총세포수 및 세포의 백분율 측정

기관지폐포세척액내 총세포수를 hemocytometer로 측정하였고 trypan blue exclusion 방법으로 세포 생존율을 측정하였다.

총세포중 0.5×10^6 cell을 세포원심분리(cyocentrifuge)한후 Giemsa법으로 염색하여 염색세포의 종류별 비율을 측정하였다.

4) 조직학적 검사

10% 포르말린 10ml 를 주사기로 우폐에 주입하여 폐를 팽창시킨 후 절찰하고 이를 다시 같은 농도의 포르말린액에 고정시켰다. 고정된 조직을

paraffin에 묻어 5 μ m의 두께로 자른 조직절편을 슬라이드에 부착시켰다. 같은 부위의 조직절편 슬라이드를 3개 준비하여 하나는 H-E염색을 실시하여 폐의 조직학적 변화를 관찰하였고 2개는 MIP-2 immunohistochemical staining에 이용하였다.

5) MIP-2 immunohistochemical staining

모든 조직 슬라이드는 paraffin을 제거한후 내재되어 있는 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수로 처리하였다. Background staining을 막기 위하여 5% bovine serum albumin(BSA, Sigma chemical)로 처리하였다. MIP-2에 대한 항체(rabbit anti-rat MIP-2, BioSource International, Camarillo, CA) 100 μ l를 조직절편과 1시간 동안 반응시켰다. 같은 부위의 조직절편인 음성 대조 슬라이드에는 1차 항체(primary antibody, rabbit anti-rat MIP-2)을 제외한 희석액 100 μ l만 반응시켰다.

조직절편을 PBS로 세척한후 2차항체(secondary antibody)로 1:1000의 biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin(BioSource) 100 μ l를 1시간 동안 반응시켰다.

조직절편을 다시 세척하여 immunoperoxidase 염색을 시행한후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 관찰하였다.

4. 통계학적 검정

모든 변수는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 대조군과 각 광물성 섬유 분진군 간의 차이는 Student's t-test로 분석하였고 광물성섬유분진군 사이의 차이는 ANOVA와 Scheffe's multiple comparison test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 기관지 폐포세척액내 세포변화

1) 총세포수

주입된 분진과 관찰기간에 따른 기관지폐포세척액내 총세포수의 변화는 Table 1과 같다. 청석면 그리고 백석면 분진 주입군은 1, 4, 8주에서 같은 시기에 도살한 생리식염수 대조군에 비하여 기관지 폐포세척액내 총세포수가 유의하게 증가되어 있었다($P < 0.05$).

유리섬유 주입군은 1주와 4주에서 총세포수가 $7.71 \pm 0.86 \times 10^6$ 개와 $5.77 \pm 0.88 \times 10^6$ 개로 각각의 대조군의 총세포수 $3.40 \pm 1.46 \times 10^6$ 개와 $3.66 \pm 0.91 \times 10^6$ 에 비하여 유의하게 증가되어 있었으나 ($P < 0.05$), 8주째는 총세포수가 $3.45 \pm 1.42 \times 10^6$ 개로 8주째의 대조군 $2.86 \pm 0.80 \times 10^6$ 개와 차이가 없었다. 그러나 요업섬유는 기도내 주입한 군에서는 1, 4, 8주에서 모두 대조군과 차이가 없었다.

기관지폐포세척액내 총세포수를 대조군을 제외하고 주입된 분진군에 따라 비교하였을 때, 광물성 섬유 분진간에는 8주째는 차이가 없었으나 1주군에는 기관지폐포세척액내 총세포수가 석면분진 군에서 가장 높았고 백석면군과 유리섬유군사이에는 차이가 없었으며 요업섬유군에서는 다른 광물성 섬유분진 주입군에 비하여 유의하게 적었다. 4주 관찰군에서는 요업섬유에서 가장 낮았고 다른 분진군 사이에는 차이가 없었다.

2) 기관지폐포세척액내 염증세포의 백분율

기관지폐포세척으로 회수된 염증세포의 백분율은 Table 2에서 주입된 분진과 관찰기간에 따라 표시하였다. Table 2에서 볼수 있는 바와같이 분진주입군에서 같은 주에 도살한 생리식염수 대조군에 비하여 폐포대식세포의 백분율이 감소하였는데, 청석면, 백석면, 그리고 유리섬유 주입시 유의한 변화였고 ($P < 0.05$) 요업섬유 주입군에서는 4주 관찰군에서만 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

반면에 중성구는 각각의 대조군에 비하여 증가되어 있었는데 백석면주입군에서는 모든 관찰기간 동안에 유의하게 증가되어 있었다. 청석면군과 유리섬유주입군은 관찰기간이 4주와 8주일 때 그리고 요업섬유군은 8주째만 중성구와 백분율이 각각의 대조군에 비하여 증가되어 있었다($P < 0.05$).

3) 시간 경과에 따른 기관지 폐포세척액내 중성구수의 변화

기관지 폐포세척액내 중성구 수의 시간 경과에 따른 변화는 그림 1과 같다. 모든 광물성 분진 주입군에서 중성구의 수는 시간 경과에 따라 점차 감소하는 경향이였다.

백석면은 1, 4, 8 주 군 모두에서 대조군에 비하여 중성구의수가 유의하게 증가되어 있었다($p <$

0.05). 청석면과 유리섬유군은 1, 4주군에서는 중성구의 수가 각각의 대조군에 비하여 유의한 차이가 있었으나(P<0.05), 8주군에서는 차이가 없었다. 요업섬유군에서는 모든 관찰기간에서 각각의 대조군과 중성구의 수에 차이가 없었다.

2. 병리조직학적 소견

청석면 주입군에서 1주째 부터 8주째까지 BALT와 폐포염 및 간질의 염증 세포 침윤이 관찰되었고 1주째 다발성의 작은 육아종이 관찰되는 조직 표본도 있었으나 모든 표본에서 관찰되지는 않았다. 기도내 백석면을 주입한 쥐와 폐조직 소견은 청석면과

유사하였으나 BALT가 더 현저하고 심한 다발성의 육아종 및 결점이 관찰 되었다. 유리섬유주입군의 조직소견도 청석면 주입군과 유사하였으며 1주째 다발성의 작은 육아종이 관찰되었다. 요업섬유 주입시 미약한 폐포염, 기관지 주위 염증 그리고 BALT가 관찰되었다. 8주째 BALT와 미약한 폐포염을 제외하고는 대조군과 유사 하였다.

3. 면역화학 염색

분진을 기관내 주입하고 도살한 쥐의 폐조직을 MIP-2에 대해 면역화학 염색한바, 1주째군에서는 생리식염수 대조군을 제외한 모든 분진 주입군에서

Table 1 Number of total cell in BAL fluid of rat after dust instillation.

	1 wk	4 wks	8 wks
Control	3.40 ± 1.46*	3.66 ± 0.91	2.86 ± 0.80
Crocidolite	14.18 ± 3.37* A**	8.65 ± 2.06* A	10.06 ± 3.26* A
Chrysotile	11.59 ± 3.70* AB	8.89 ± 3.48* A	8.18 ± 6.25* A
Glass fiber	7.71 ± 0.86* BC	5.77 ± 0.88* AB	3.45 ± 1.42* A
Ceramic fiber	4.44 ± 2.11 C	3.49 ± 1.29 B	2.20 ± 0.39 A

* : p > 0.05 significant difference compared with saline control.

** : Multiple comparison test (Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level)

Table 2. Changes of differential percentage in BAL fluid according to kind of instilled dust and observational period

	observation period (week)	Macrophage	Lymphocyte	Neutrophil
control	1	88.60±1.14	4.24±2.26	7.16±2.78
	4	92.70±0.84	3.20±0.84	4.10±1.52
	8	93.30±0.45	3.20±0.84	3.50±1.00
crocidolite	1	77.98±6.62*	14.26±7.84	7.76±3.03
	4	82.20±6.17*	7.90±3.01	9.90±4.04*
	8	87.06±2.86*	6.04±1.07	6.90±1.31*
chrysotile	1	79.52±4.60*	5.10±1.43	15.38±5.20*
	4	74.60±3.90*	8.32±4.14	17.08±4.31*
	8	80.80±6.65*	6.80±2.28	12.40±5.08*
glass fiber	1	84.98±0.98*	8.70±2.46	7.40±2.51*
	4	86.80±4.48*	4.40±2.86	7.08±2.36*
	8	88.36±3.15*	3.94±1.75	7.70±3.23*
ceramic fiber	1	85.30±5.33	3.60±5.59	11.10±6.50
	4	84.50±5.85*	6.32±2.28	9.18±5.93
	8	91.80±2.17	2.80±1.30	5.40±1.14*

* : p < 0.05 significant difference compared with saline control.

기관지 및 세기관지의 상피세포에 MIP-2의 발현이 두드러지게 관찰되었다. 대식세포와, 거대 세포에서도 세포내 MIP-2의 발현이 관찰되었는데 백석면에서 더 현저한 변화를 보였다. 4주째에서는 상피세포의 세포내 MIP-2 발현이 미약하나마 관찰되었고, 8주째에는 백석면군에서만 관찰되었다.

고 찰

분진에 장기간 폭로되면 대부분 폐기능 저하와 함께 폐조직에 간질성 변화가 발생하는데 이를 흔히 진폐증이라 한다. 진폐증은 매우 오랜 역사를 가지고 있으나 분진 폭로에 의한 간질성 폐질환이 하기도의 만성적인 염증반응에 의한 것으로 알려진 것은 최근 10여년간의 연구 결과이다(Warheit 등, 1986). 지금까지 연구에 의하면 독성이 강한 유리규산이나 석면분진에 폭로되면 폐포 및 하기도에 염증 세포들이 계속 침윤되어 있으면서 소화효소나 산소기들을 분비시켜 폐조직을 파괴하고 섬유모세포에 대한 화학주성을 가지는 매개물질을 분비하여 섬유화 병변을 유발 시킨다. 따라서 진폐증의 병리기전에 활성화된 염증 세포의 침윤이 중요한 역할을 한다고 생각되는데 특히 중성구의 수가 증가될수록 폐조직 파괴와 섬유화성이 강한 것으로 생각된다(Begin 등, 1989).

유화성이 강한 것으로 생각된다(Begin 등, 1989).

분진폭로에 의한 폐질환 발생에 있어 중성구의 역할에 대한 논의는 독성이 강하고 섬유화 반응이 심한 유리규산이나 석면 분진에 폭로후 중성구의 증가가 심하고 분진폭로가 중단된 후에도 계속되는 것에 근거하여 시작되었다. 1981년 Adamson과 Bowden의 연구에 의하면 섬유화 반응을 유발 시키지 않는 것으로 알려진 Carbon이나 latex bead 같은 불활성 분진에 폭로된 경우 중성구가 일시적으로 증가되고 곧 정상 대조군과 유사하게 감소 되었다. 그러나 폐조직에 심한 섬유화성 변화 및 진폐 결절을 발생시키는 결정형 유리규산을 쥐의 기도내 주입시켰을 때 급성기에 다형핵 백혈구가 급격히 증가하는 것은 물론이고 그 이후에 감소하기는 하나 20주 후까지도 정상 대조군보다는 유의하게 증가되었다. 그중에서도 중성구의 급격한 증가는 분진 주입후 5일 까지 관찰되었는바 본 연구에서는 광물성 섬유분진에 폭로 후 급성기라고 생각되는 5일 이후까지 중성구의 침윤이 계속되는지 여부와 조직변화를 보기 위하여 분진 주입후 7일째를 1차 도살시기로 잡았다.

1주 관찰군에서 두 석면(청석면과 백석면)군은 물론이고 인조섬유중 유리섬유주입군에서 중성구의 수가 대조군보다 증가되어 있었고 백석면군은 중성구 수의 유의한 증가가 8주까지 그리고 청석면군과 유리섬유군은 4주후 까지 계속되었다.

또한 하기도 염증반응의 지표로서 기관지폐포세척으로 회수된 세포의 총수를 측정하였는바 이미 그유해성이 잘 알려진 석면 이외에도 유리섬유군에서 분진 폭로후 4주후까지 총세포수가 대조군 보다 증가하여 하기도 염증반응이 계속됨을 시사해 주고 있으며 이는 중성구 수의 증가와 유사한 의미를 갖는다.

본실험에서 유리섬유주입후 말초 기도내의 염증세포침윤 및 중성구 증가가 지금까지 알려진 것에 비하여 장기간 지속되었고 폐조직 변화도 심하였는데 상대적으로 유리섬유는 이러한 염증성 변화가 적은 것으로 나타났다. 요업섬유가 인조섬유들 중에 독성이 비교적 크고 발암성도 의심된다는 발표들이 있어 본실험의 결과 해석에 어려움이 있었으나 실제로 산업장에서 사용되는 요업섬유들은 섬유적의 너비가 1.2-6 μ m로 흡입이 용이하여 폐장의 독성 및 발암성이 문제시되나 유리섬유들은 흡입되지 못할 정도로 직경이 두꺼운 섬유들이 많이 포함되어있어 이러한

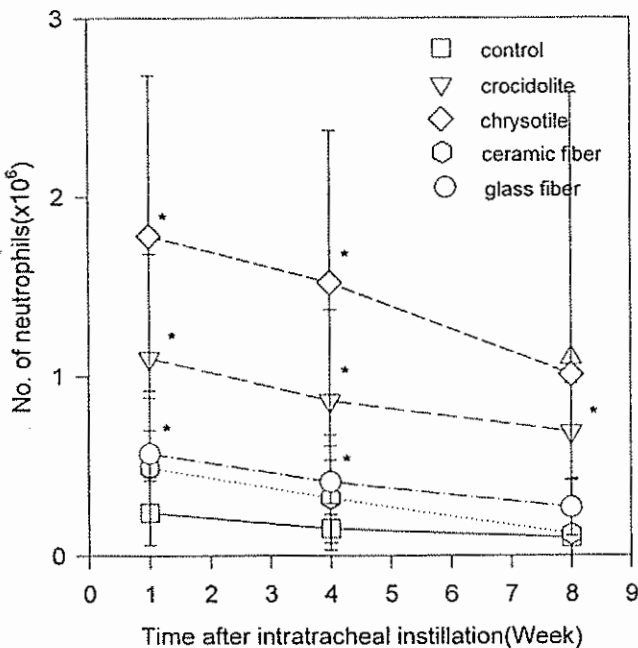


Fig. 1. Changes of number of neutrophils in BAL fluid after dust instillation.

*: P<0.05 significant difference compared to control.

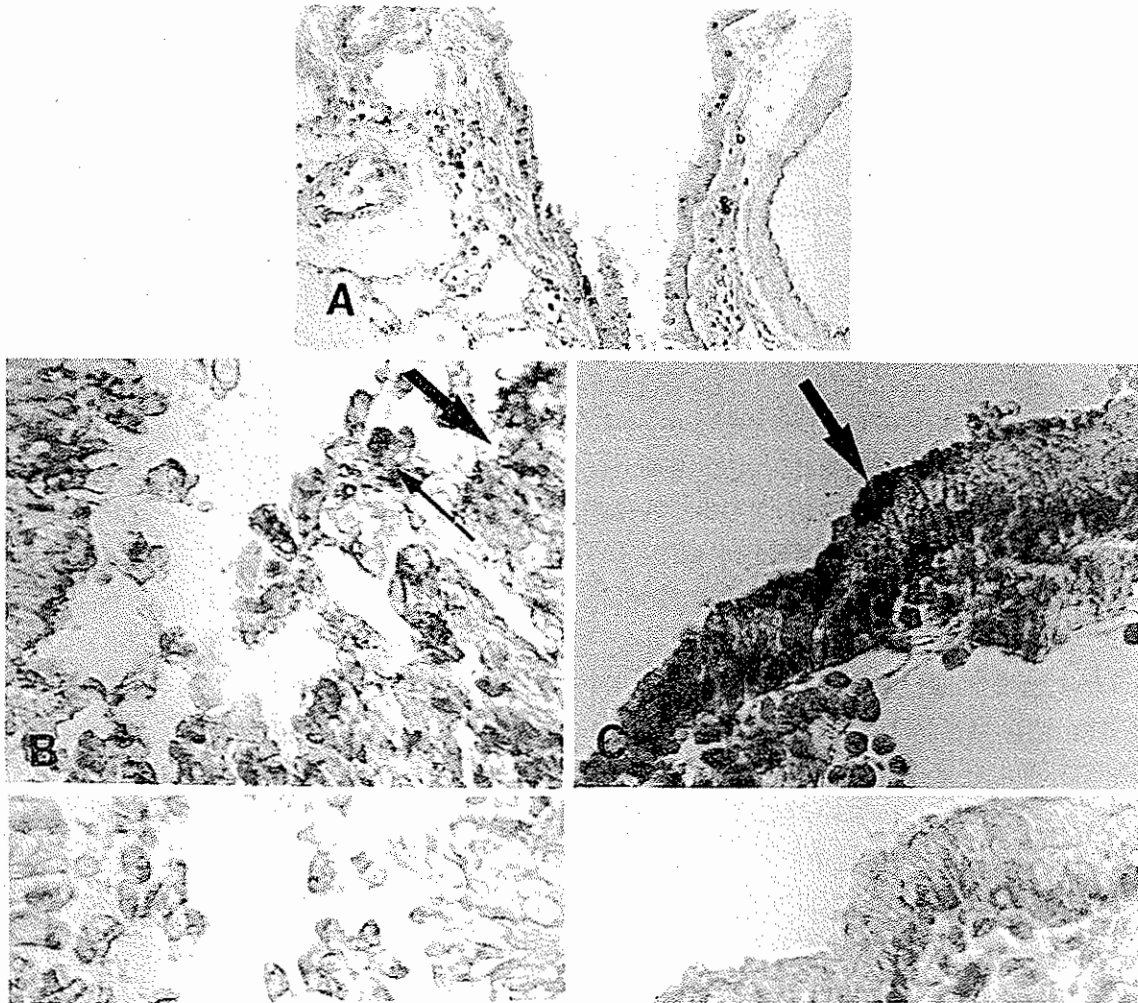


Fig. 2. Immunohistochemical localization of MIP-2 in lung section from intratracheally dust-instilled rat.

A Tissue section from a control rat at 1 week after saline instillation.

B Rat lung at 1 week after crocidolite instillation. Lower inset is a control for anti-rat MIP-2 stain using diluent only.

C Tissue section from rat lung 1 week after chrysotile instillation. Lower inset is a control for anti-MIP-2 stain using diluent only. The expression of MIP-2 was present in epithelial cell (B, C large arrow) as well as macrophages. (B, small arrow)

요인이 실험결과에 일부 작용되었을 것으로 생각된다. 또한 본실험에서는 폐장내 독성이나 발암성을 잘 일으킨다고 알려진 가늘고 긴 섬유들을 사용하였기 때문에 산업장내 섬유와 양상의 차이가 있을 것으로 추정된다. 인조섬유에 의한 독성은 그 화학조성의 차이나 크기, 숫자들에 의한 영향이 클 것으로 생각되는데 본연구에서 같은 중량의 인조섬유를 기관내 주입하였지만 그간의 섬유수는 차이가 있어 요업섬유는 μg 당 3,440개 이었으나 유리섬유는 μg 당 11,820개로 큰 차이가 있었던 것도 하나의 원인이 되었을 것으로 생각된다. 이연구에 사용된 인조섬유는

일본의과대학에서 분리하여 크기 및 구성이 분석된 섬유들을 사용하였는데 이들 섬유로 연구한 다른 연구결과와 비교해보면(Fujino, 1995) 유리섬유로 자극하였을 때 강력한 proinflammatory cytokine인 $\text{TNF-}\alpha$ 나 세포파괴의 지표인 LDH의 생산이 요업 섬유에 비하여 증가되어 있어 염증반응에 관하여 본 연구결과와 상응하는 결과를 보였다.

폐포 및 하기도에 증성구가 침윤되는데 몇가지 매개물질들이 관여하는 것으로 알려져 있는데 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), KC 그리고 MIP-1과 2가 대표적이다. TNF- α 와

IL-1은 폐포대식세포에서 주로 분비되는 proinflammatory cytokine으로 (Driscoll 등, 1990) 중성구에 강한 화학주성을 나타내는 chemokine의 분비를 자극하는 것으로 생각된다. KC와 MIP-2는 C-X-C chemokine군으로 중성구의 활성화와 침윤에 직접적으로 작용한다(Driscoll, 1994; Gupta 등, 1996).

분진폭로후 중성구의 침윤에 대한 MIP-2의 역할에 대하여는 주로 석영을 비롯한 유리규산 분진에서 연구된바 있다. Yuen(1996)은 결정형 유리규산분진 주입시 폐장내 중성구의 침윤과 MIP-2의 유전자 발현이 관련성이 있다고 발표하였고 1996년 Driscoll은 쥐에 MIP-2에 대한 항체로 처리한후 석영분진을 기도내 주입하면 중성구의 침윤이 분진만 주입한 군에 비하여 현저하게 감소함을 증명하여 분진에 의한 폐포염에 MIP-2가 중요한 역할을 하며 진폐증의 치료방법으로 MIP-2에 대한 항체의 사용 가능성을 제시한바 있다. 본 실험에서 면역화학염색법으로 광물성 섬유분진에 의한 하기도 염증반응에 MIP-2가 관여함을 알수 있었으며 석면중 백석면에서 두드러진 변화를 보였는데 아직 유해성에 대하여 논란이 계속되고 있는 인조섬유에서도 MIP-2의 발현이 관찰되었다. 기관지 폐포세척액중 중성구수의 증가 및 조직변화가 가장 현저하였던 chrysotile군에서 MIP-2의 발현이 가장크고 8주까지 계속되어 중성구의 증가를 동반한 하기도 염증반응과 MIP-2이 상관관계가 있음을 알수 있었다.

분진에 폭로된후 chemokine이 어떤 경로로 발현되는지는 아직 확실하지 않는데 분진에 의하여 활성화된 대식세포로부터 분비된 IL-1과 TNF- α 와 같은 cytokine이 대식세포, 상피세포 그리고 섬유모세포들에서 chemokine의 발현을 증가시킨다는 설이 가장 유력하다(Kunkel 등, 1991; Standiford 등, 1990; Standiford 등, 1991). 그외 다른 가능한 경로는 분진이나 다른 흡입된 인자가 폐상피세포에 직접 작용하여 chemokine의 분비를 자극한다는 것이다(Driscoll 등, 1993). 따라서 상피세포도 대식세포와 같이 외부환경에 직접적으로 그리고 계속해서 노출되어 chemokine을 분비함으로써 진폐증의 병태생리에 중요한 작용을 할것으로 생각된다. 본 실험에서는 모든 분진 주입군의 1주 관찰군에서 세기관지나 기관지의 상피세포에 MIP-2의 발현이 특히 증가되어 있어 석영을 기관내 주입후 상피세포와 대식세포 그리고 2형 호흡상피세포에 MIP-2의 발현이 증가되었다는 1996년

Driscoll의 연구결과와 약간의 차이가 있었다. 이와 같은 차이는 석영과 같은 입자형 분진과 본 실험에서 사용한 광물성 섬유 물리적 성질과 폐장내 침착부위의 차이에 근거한 것으로 생각되었다. 즉 입자형 분진은 직경이 1-5 μm 정도의 호흡성 분진이 주로 병변을 일으키며 폐포를 비롯한 말초기도에 침착되는 반면 석면과 같은 광물성 섬유분진은 길이가 8-10 μm 이상일 때 병변을 잘일으키고(Morgan 등, 1982; Oberdorster 등, 1988) 섬유의 크기에 따라 기관지에서 세기관지까지 침착 부위가 달라지게 된다(Lippmann, 1994). 따라서 입자형 분진과는 달리 광물성 섬유분진 주입시 대식세포나 호흡상피 보다는 세기관지의 상피세포에서 MIP-2 발현이 증가되는 것이 논리적으로 합당하다.

본 연구결과 광물성 섬유분진에 폭로된 후 MIP-2의 분비 증가에는 기관지나 세기관지의 상피세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

요 약

면역화학염색(immunohistochemical staining) 방법으로 광물성 섬유분진에 폭로된 쥐의 폐조직에서 중성구의 침윤을 유발하는 MIP-2의 발현 및 그 분포를 알아보고 하기도 염증 및 조직반응과 MIP-2의 관련성에 대하여 알아보고자 하였다.

요업섬유를 제외한 모든 분진 주입군에서 기관지 폐포세척액내 총세포수가 모든 관찰기간에서 대조군에 비하여 증가되었다. 기관지 폐포세척액내 중성구의 수도 4주째까지는 요업섬유주입군을 제외한 모든 분진 주입군에서 대조군에 비하여 증가되었으나 8주 관찰군에서는 백석면 주입군에서만 유의한 변화였다.

폐조직내 염증세포의 침윤과 육아종의 형성은 백석면군에서 가장 심하였으며 청석면과 유리섬유군에서도 육아종이 관찰되는 경우도 있었으나 요업섬유군에서는 육아종이 관찰되지 않았다.

1주째에는 생리식염수 대조군을 제외한 모든 광물성 섬유분진 주입군에서 기관지 및 세기관지의 상피세포에 MIP-2의 발현이 두드러지게 관찰되었다. 대식세포와 거대세포에서도 세포내 MIP-2의 발현이 관찰되었으나 상피세포보다는 미약하였으며 분진별로 비교하였을 때 백석면에서 가장 현저한 변화를 보였다. 4주째에서는 모든 분진 주입군에서 상피세포의 MIP-2 발현이 미약하게 관찰되었고 8주째에

는 백석면군에서만 관찰되었다.

여러 가지 광물성 섬유로 쥐에 실험진폐증을 유발시켰을 때 폐조직변화나 염증반응과 MIP-2와의 관련성을 살펴본바 쥐의 폐조직에서 주로 상피세포에 MIP-2 발현이 증가되어 있었으며 MIP-2 발현의 증가는 폐조직변화나 염증세포, 특히 중성구의 침윤과 관계가 있었다. 석면 폭로시 가장 심하고 지속적인 조직변화와 MIP-2 발현을 보였으나 유리섬유 폭로 시에도 1달이상 지속되는 하기도염증 및 chemokine의 발현이 관찰되었다.

REFERENCES

- Adamson IYR, Bowden DH. Role of Polymorphonuclear leukocytes in silica-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1984 ; 117 :37 - 43.
- 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.
- Driscoll KE, RC Lindenschmit, JK Maurer, Jm Hiffins, G ridder. Pulmonary response to silica or titanium dioxide : inflammatory cells, alveolar macrophages-derived cytokine and histopathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;2:381-390.
- 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 macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am Rev Respir Cell Mol Biol.* 1993; 8:311-318.
- Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins : biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res.* 1994;20:473-489.
- Driscoll Ke, Hassenbein DG, Carter JM, Kunkel SL, Quinlan TR, Mossman BT. TNF- α and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol Lett.* 1995;82/83:483-489.
- Driscoll KE, Howard BW, Carter JM, Asquith T, Johnston C, Dettileax P, Kun Kel SL, Isofort RJ. α -quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells : effects of in vivo and in vitro particle exposure. *AJP* 1996; 149 : 1627 - 1637.
- Fujino A, Hori H, Higashi T, Morimoto Y, Tanaka I, Kaji H. In-vitro biological study to evaluate the toxic potentials of fibrous materials. *Int J Occup Environ Health* 1995;1:21-28.
- Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM: Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* 1991, 17:17-23.
- Lippmann M. Deposition and retention of inhaled fibers: effects on incidence of lung cancer and mesothelioma. *Occup Environ Med* 1994; 51:793-798.
- Morgan A, Holmes A, Davison W. Clearance of sized glass fibers from the rat lung and their solubility in vivo, *Ann Occup Hyg.* 1982;25:317-331.
- Oberdorster G, Morrow PE, Spurng K. Size dependent lymphatic clearance of amosite fibers in the lung. *Ann Occup Hyg.* 1988;32:149-156.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chesue SW, Lyuch JP III, Toews GB, Westwick J. Strieter RM. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line: a model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest.* 1990, 86:1945-1953.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Rollins BJ, Strieter RM: Alveolar macrophages-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991, 266:9912-9918.
- Warheit DB, Hill LH, George G, Brody AR. Time course of chemotactic factor generation and the corresponding macrophage response to asbestos inhalation. *Am Rev Respir Dis.* 1986;134:128-133.
- Yuen IS, Hartsky MA, Snajdr SI, Warheit DB. Time course of chemotactic factor generation and neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:268-274.