

흰쥐에서 광물성 섬유상 이물질에 대한 조직 반응과 Matrix Metalloproteinases 및 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase의 발현

서동권 · 이종임 · 김정란

동국대학교 의과대학 병리학교실

Foreign Body Reaction and Expression of Matrix Metalloproteinases/ Tissue Inhibitor of Metalloproteinase by Injection of Mineral Fibers in Rats

Dong Kweon Seo · Jong Im Lee · Jung Ran Kim

Department of Pathology, Dongguk University College of Medicine, Gyeongju, Korea

Background: The host response to natural fibers results in granuloma formation in an effort to limit tissue destruction. Matrix metalloproteinases (MMPs) are important molecules in the inflammatory granulomatous or reparative reaction. Here, we studied the foreign body reaction that occurs following natural fibers implantation by investigating MMPs and tissue Inhibitor of MMPs (TIMPs) in an *in vivo* model. **Methods:** Female Sprague-Dawley rats were treated with crocidolite fiber or fibrous talc via subcutaneous and intraperitoneal injections and immunohistochemistry was conducted to confirm the expression of MMPs and TIMP-2 in tissue sections. **Results:** We identified that mineral fibers elicited granulomas. Fibrous talc or intraperitoneal injection resulted in larger granulomas and severe tissue destruction compared with the lesions induced by crocidolite or subcutaneous injection. The expression of MMPs was elevated while granulomatous lesions were formed. The relative levels of MMPs were lower in the talc injected or intraperitoneal route models than those of crocidolite injected or subcutaneous injection models during the entire experiment. **Conclusions:** These findings demonstrate that specific expression of MMPs/TIMP is inversely related to the grade of tissue destruction and suggest that expression of MMPs is required for promoting granuloma formation and limiting tissue destruction.

Key Words: Fibrous talc; Talc; Asbestos; Crocidolite; Foreign body reaction

접 수: 2011년 2월 22일
게재승인: 2011년 11월 22일

책임저자: 김 정 란
우 780-714 경주시 석장동 707
동국대학교 의과대학 병리학교실
Tel: +82-54-770-8282
Fax: +82-54-770-2447
E-mail: kjr@dongguk.ac.kr

이물질에 대한 육아종성 염증은 활성화된 대식구인 유상피세포로 구성된 만성 염증의 특이한 형태이자, 숙주의 방어기전 중 하나이다. 육아종성 염증은 주로 소화되지 않은 균, 기생충, 곰팡이 등의 감염물질이나, 완전히 분해되지 못한 복합다당류 등의 다양한 이물질에 대한 세포 매개성 면역반응인데, 조직이 광물성 미세입자에 노출되면 조직 내 탐식세포가 이들을 소화하지 못하고 활성화된 조직구와 거대세포로 구성된 육아종성 이물반응을 일으키게 된다.¹

이러한 광물성 이물질에 대한 조직 반응은 이물질 자체의 광물학적 요소뿐만 아니라 조직 내 체류기간이나 이물질의 형태, 또는 크기와 같은 물리적 요인 등에 의해 달라진다고 알려져 있다.^{1,2} 그러나 이물반응을 조절하는 기전은 거의 밝혀지지 않고 있는데, 이물반응의 정도도 이물질의 화학적 조성보다 물리적 형태에 따라 차이가 있다고 보고되어 있다. 일반적으로 섬유형태를 취하는 이물질은 비섬유상의 이물질에 비해 강한 세포독성을 나타낸다.^{3,4}

Misiek 등³은 수산기인회석(hydroxylapatite)을 동물의 연부조직

에 이식한 실험에서 입자의 모양이 염증 반응의 정도에 영향을 주는 인자라고 주장한 바 있다. 또 Watanabe 등⁴과 Oberdorster⁵는 비섬유상 이산화 티타늄(titanium dioxide)보다 섬유상 이산화 티타늄의 세포독성이 더 강하다고 주장하였으며, Fenoglio 등⁶은 실리카의 폐포 대식구에 대한 세포독성을 비교한 결과, 이물질의 길이 대 폭의 비가 클수록 강한 세포독성을 보인다고 보고하였다. 그러나 Choi⁷는 다양한 종류의 광물성 이물질을 흰쥐의 피하에 주사하여 이물반응을 유도한 결과 이물질의 형태뿐만 아니라 이물질의 종류에 따라라도 조직 손상의 정도가 다양하며 손상의 지속 정도가 다르다고 하였다.

또한 최근에는 matrix metalloproteinases (MMPs)나 tissue inhibitor of MMP (TIMP)의 발현이 스폰지에 의한 이물반응과, 병원균 감염에 의한 육아종성 염증 과정에 미치는 영향⁸⁻¹³ 그리고 악성 폐종양 늑막삼출 환자를 대상으로 활석을 이용한 흉막유착술(pleurodesis) 후 MMP의 발현¹⁴에 대한 연구 등이 진행되고 있다. 그러나 생체모델에서 육아종이 형성되는 과정을 경시적으로 관찰하고 시

간의 경과에 따른 MMPs/TIMP의 발현을 관찰하거나 MMPs/TIMP의 발현이 이물반응이나 육아종성 염증과정에 미치는 영향을 관찰한 연구는 매우 드물었다.

따라서 본 연구에서는 이물질에 대한 조직의 반응이 이물질의 물리적 성상에 따라 달라지는 것을 배제하기 위하여 물리적인 형태는 섬유상으로 비슷하지만 조직손상의 정도나 염증의 지속기간이 확연히 다른 섬유상 활석과 청석면을 사용, 흰쥐의 피하와 복강 내에 주사한 후 시간의 경과에 따른 조직반응의 차이를 관찰하고 병변에서 면역화학염색으로 MMP-2, MMP-9 및 TIMP-2의 발현양상을 비교하여 이들 물질이 이물질에 의한 육아종의 형성에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

연구 재료

섬유상 활석

섬유상 활석은 섬유상 광물질을 함유하고 있는 활석광석(Gouverneur Talc Co., Harrisville, NY, USA)을 구입하여 Choi⁷가 사용한 방법으로 처리하여 사용하였다. 이를 간단히 설명하면 활석을 습식 분쇄법으로 분쇄하여 활석 현탁액을 만들고, 이것을 1,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 침전층에 에탄올을 가하여 초음파(sonication)로 부유시켰으며 이 과정을 반복하여 만들어진 침전된 분획을 70°C에서 건조시켜 활석 분말을 얻었다. 이 건조된 활석 분말은 X-선회절 분석 결과 99% 이상이 활석이었고, 소량의 투각섬석(tremolite)과 극미량의 녹니석(chlorite)이 포함되어 있었다.

청석면

청석면은 미국의 국립표준기술연구소(National Institute of Standard and Technology)에서 공급하는 표준참조물질(Standard Reference Material, SRM 1866)을 구입하여 사용하였는데, 먼저 2 g의 청석면을 30 mL의 순수 에탄올에 초음파를 이용하여 부유시킨 다음, 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 부유층을 회수하였다. 그리고 회수된 부유층을 폴리카보네이트 여과막(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 여과하고 50 mL의 순수 에탄올로 세척한 후 건조시켜 사용하였다.

광물성 섬유상의 입자 크기 및 단위 무게 당 섬유 수의 측정

광물성 섬유상의 크기와 단위 무게 당 섬유 수의 수는 Choi⁷의 방법으로 측정하였다. 그 결과 섬유상 활석의 길이는 1.33-39.85 μm , 폭은 0.2-2.1 μm 의 범위에 있었으며, 입자는 전체의 64%가 길이 2-10 μm , 폭 0.5-2 μm 의 분포를 보였다. 청석면은 길이가 0.9-39.02 μm 이었고 그 중 55.8%가 길이 2-10 μm 로 섬유상 활석과 비슷한 범위에 있었으나, 폭은 0.06-0.6 μm 로 섬유상 활석에 비해 가늘었다. 한편 단위

무게 당 섬유와 입자의 수는 같은 배율에서 20개의 시야에서 관찰되는 모든 섬유의 수를 합하여 유효면적으로 환산하여 계산하였다.

동물 실험

동물은 110-120 g의 건강한 5주령 흰쥐(Sprague-Dawley, KIST, Daejeon, Korea)를 사용하였는데 활석과 석면에 노출되면 난소중양의 위험성이 높다는 역학 및 실험적 연구가 있고 난소의 상피세포에서 유두상 변화가 초래된다는 보고¹⁵도 있기 때문에 모두 암컷을 사용하여 난소중양의 발생 유무도 관찰하였다. 그리고 사육 기간 중 물과 고형사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험과정은 대한의학회가 제정한 동물실험지침에 따랐으며 동국대학교 의과대학 동물윤리위원회의(Animal Ethics Committee)의 승인을 받았다.

실험동물은 1주일간의 적응 기간을 거친 뒤 두 개의 군으로 나누었는데, 첫째군은 다시 둘로 나누어 청석면(n=29)과 섬유상 활석(n=29)을 실험동물의 등에 피하주사하였다. 이때 주사 부위는 마리당 3군데로 하였으며 부위별로 투여되는 입자의 수를 9.08×10^8 (standard deviation, 1.21×10^7)로 일정하게 하기 위하여 청석면은 1 mg, 섬유상 활석은 195 mg을 각각 투여하였다. 그런 후 각 시료를 0.4 mL의 생리식염수에 부유시켜 80°C에서 두 시간 동안 멸균하고 주사 직전에 초음파 처리로 부유시킨 후 주사하였다. 둘째군은 청석면(n=13)과, 섬유상 활석(n=13)을 복강 내에 주사한 후 1주일 간격으로 주사 부위를 관찰하였고 체중을 측정하였으며, 제1일, 7일, 15일 및 30일에는 각 군당 3마리를 경추탈골법으로 희생시켰는데 시험기간 중 폐렴으로 폐사한 예(15일에 각 2마리, 30일에 청석면을 투여한 예 2마리, 활석을 투여한 예 3마리, 60일에 청석면을 투여한 예 2마리)도 포함하였다. 또한 장기적인 변화를 관찰하기 위하여 각 군에서 4-5마리를 222일까지 관찰하였다(Table 1).

복강 내에 주사한 실험군은 실험기간 내 폐사하여 부패한 1예를 제외한 나머지(60일에 각 군당 2마리, 143일에 섬유상 활석을 투여한 1마리)를 포함하여 주사한 후 60일, 143일 및 222일에 희생시켰다(Table 1).

대조군(각각 n=3)은 생리식염수 0.4 mL를 같은 방법으로 주사하였으며, 60일, 143일 및 222일에 희생시켰다. 희생시킨 흰쥐는 육안으로 전체 장기의 이상 유무를 관찰하였고 주사부위와 간, 폐, 콩팥 등 주요 장기와 양측 난소를 채취하였다. 주사 부위는 병변의 장경을 측정 후 피부와 함께 조직을 채취하였으며, 조직의 일부는 단백질 분석을 위해 급속 동결시킨 후 영하 70°C 냉동고에 보관하였다.

광학현미경 검사

실험군과 대조군에서 채취한 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정하고 알코올로 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 파라핀포매체는 4 μm 의 박절편을 만들어 hematoxylin & eo-

Table 1. The numbers of rats sacrificed for histological analysis after subcutaneous or intraperitoneal injection of mineral fiber

Mineral fibers	Days post-injection								
	Subcutaneous injection						Intraperitoneal injection		
	1	7	15	30	60	143	60	143	222
Crocidolite	3	3	5 (2)	5 (2)	5	4	5 (2)	3	4
Fibrous talc	3	3	5 (2)	5 (2)	6 (2)	3	5 (2)	4 (1)	4

The numbers of dead animals are listed in parentheses.

sin 염색을 하였으며, 필요한 경우 Masson's trichrome 염색을 추가하였다. 각각의 이물질에 대한 이물반응은 염증세포의 침윤, 거대세포의 형성, 괴사 및 아교질 침착 등을 관찰하였다.

MMPs/TIMP-2 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 병변 부위의 조직을 4 μm 의 두께로 박절하여 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 증류수로 5분간 2회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소의 활성을 제거하기 위하여 0.3% H_2O_2 로 5분간 처리하였다.

MMP-2는 항원의 회복을 유도하기 위하여 10 mM sodium citrate 완충액(pH 6.0)에 넣어 121°C에서 15분간 고온가압 전처리를 하였다. 또 MMP-9은 proteinase K로 실온에서 15분간 처리하였으며, TIMP-2는 전처리 과정을 거치지 않았다.

MMP-2 특이 항체(monoclonal, Oncogene, San Diego, CA, USA)는 1:300, MMP-9 (monoclonal, Oncogene)은 1:100으로 희석하였으며, TIMP-2 (monoclonal, Oncogene)는 1:1,000으로 희석한 용액과 4°C에서 밤샘 반응시킨 후 Tris 완충액(pH 7.6)으로 5분간 3회 세척한 후 universal kit (LSAB+ kit, K0679, Dako, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 이차항체와 20분간 반응시켰다. 이때 MMP-2는 초기 임신자궁내막을, MMP-9과 TIMP-2는 지방암 조직을 양성대조군으로 이용하였고 음성대조군은 일차항체대신 항체 희석액(antibody diluents, S0809, Dako)을 사용하였으며 나머지 과정은 동일하게 시행하였다. 다시 Tris 완충액으로 5분간 3회 세척한 다음 horseradish peroxidase가 부착된 스트렙타비딘에 20분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 5분간 3회 세척한 후 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색을 하여 관찰하였다. MMP-2와 TIMP-2의 면역조직화학염색의 진위 여부를 확인하기 위하여 면역조직화학 검사에서 양성으로 나온 검체 중 섬유상 활석을 피하 주사한 후 30일이 경과한 검체를 임의적으로 선택하여 Western blot을 시행하였다. 이때 동결 보관된 조직 1g을 Bradford법¹⁶으로 단백질을 정량한 후 추출된 단백질 50 μg 이 포함된 상층액을 NuPAGE LDS sample buffer (NP0007, Novex, San Diego, CA, USA)와 혼합하였으며 열처리로 단백질을 변성시켰다. 그 후 4-12% NuPAGE Bis-tris polyacrylamide gel (Novex)에 적재하여 전기영동을 시행하고 분리된 단백질을 nitrocellulose (NC) 막(Biorad, Westborough, MA, USA)에 전사하였다. 그리고 일차항체인 MMP-2와 TIMP-2 (monoclonal, Oncogene) 특이 항체를 1:1,000

으로 희석하여 NC막과 실온에서 4시간 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 이차항체(goat anti-rabbit IgG)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 ECL kit (SC-2028, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 hyper film (Fuji film, Tokyo, Japan)에 노출시킨 후 현상하고 AlphaImager 2200 Document and Analysis System (Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA)으로 발현 정도를 측정하였다. 이때 MMP-2 및 TIMP-2 특이항체는 MMP-2 및 TIMP-2의 분자량에 해당하는 72 및 21 kDa의 위치에 있는 단백질을 인지할 수 있었다.

면역조직화학염색의 결과판정 및 통계학적 분석

MMP-2, MMP-9 및 TIMP-2에 대한 면역조직화학염색은 염색이 잘된 부위를 선택한 후 고배율 시야에서 관찰하여 세포질이 갈색 또는 적갈색 과립으로 뚜렷하게 염색되는 경우를 양성으로 판정하였다. 즉 염색 강도와 염색 범위에 따라 음성, 미약(\pm), 1등급(+), 2등급(++), 3등급(+++)으로 분류하였고(Fig. 1), 통계처리의 편리성을 더하기 위하여 음성을 1점, 미약을 2점, 1등급부터 3등급을 3점에서 5점으로 점수를 부여한 다음 이물질의 종류에 따른 반응과 시간 경과에 따른 변화를 비교하기 위하여 Kruskal-Wallis 일원배치 분산분석과 Mann-Whitney U 검정을 시행하였다. 이때 p값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

육안 소견

실험군이 대조군에 비하여 시간 경과에 따라 통계적으로 유의한 체중감소를 보였으며($p < 0.05$), 폐의 기관지 확장증과 폐농양을 동반한 폐렴으로 폐사한 예($n = 16$)를 제외하면 대조군을 포함하는 모든 예에서 내부 장기의 이상은 발견되지 않았다. 또 피하에 주사한 실험군에서 섬유상 활석과 청석면은 각각 황백색과 암청색 결절을 7일부터 형성하였으며, 결절은 30일까지 크기가 증가하였고 60일에는 감소하였지만 143일에는 육안적으로 병변이 관찰되지 않았다. 이때 병변의 크기는 활석에 의한 병변이 청석면에 의한 병변보다 유의하게 큰 결절을 형성하였다($p < 0.05$) (Fig. 2).

그리고 복강 내에 주사한 실험군은 전 예에서 간과 장 또는 장과

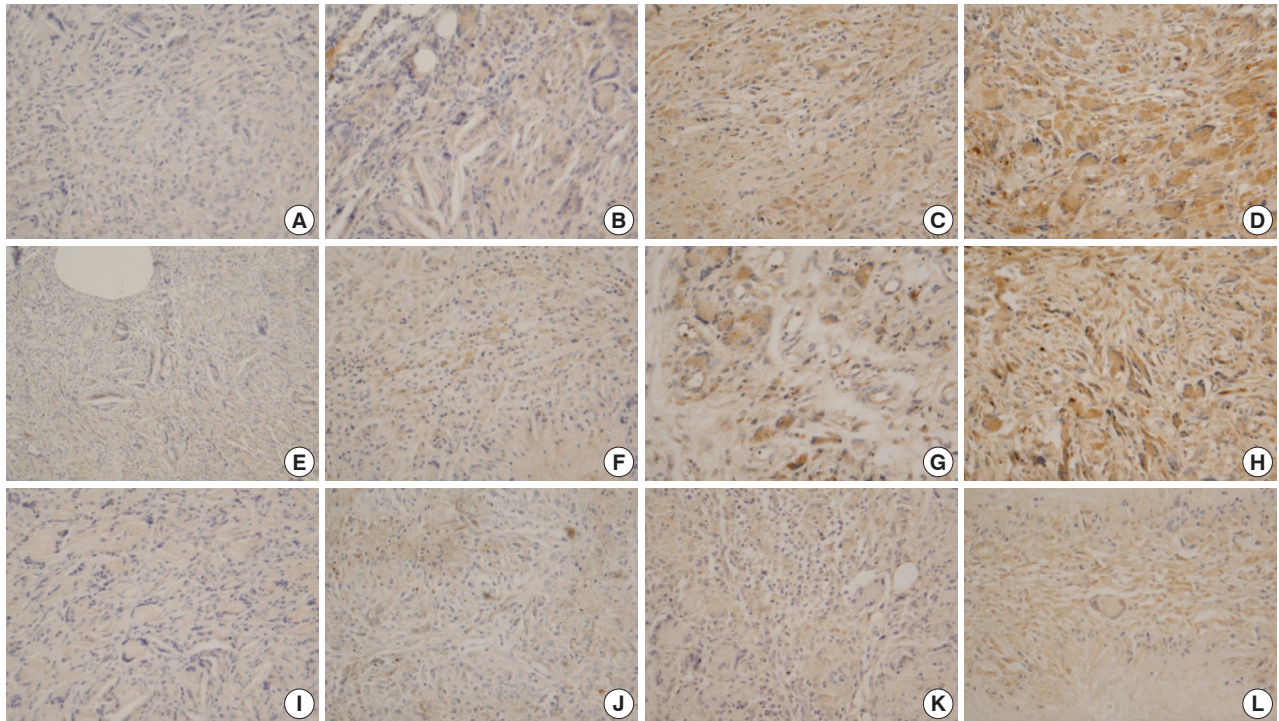


Fig. 1. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase (MMP)-2 (A-D), MMP-9 (E-H) and tissue Inhibitor of MMP (TIMP)-2 (I-L) expression in granulomas of rats by crocidolite or fibrous talc. Negative (A, E, I), mild (B, F, J), moderate (C, G, K), and strong (D, H, L) staining.

장 사이에 유착이 발견되었으며, 실험동물 일부에서는 간의 피막이나 복막에 좁쌀 크기의 결절이 발견되었다.

조직학적 소견

이물질의 피하 내 투여군

피하 내로 이물을 투여한 실험군은 모두 피하조직에 국한하여 염증세포의 침윤을 보였으며 이물질을 중심으로 육아종을 형성하였다(Fig. 3). 또 같은 실험군이나 같은 동물 내 다른 병변은 서로 비슷한 소견을 보였다.

이물질은 실험 초기에는 주로 세포 외에 존재하였지만, 실험 후기에는 탐식세포에 의해 탐식되면서 세포 내로 이동하였다. 주사 후 1일에는 급성 염증 반응을 보였고, 7일 이후에는 이물질을 중심으로 조직구 및 유상피세포와 다핵거대세포로 구성된 육아종성 염증 반응을 보였는데, 주사한 이물질은 주로 병변의 간질에서 관찰되었으며, 일부는 조직구와 거대세포의 세포질 내에서도 관찰되었다.

주사 후 15일에는 모든 병변에서 조직구와 유상피세포의 침윤 및 거대세포의 수가 증가하였으며, 주위조직과 뚜렷이 구별되었다. 이물질은 대부분 조직구 및 거대세포의 세포질 내로 이동하여 병변의 중앙은 공동화가 진행되었다. 이런 소견은 청석면에서 더 뚜렷하였다.

주사 후 30일에는 가성막 형성이 두드러졌는데, 청석면에 의한 병변에서는 중앙에 공동화된 괴사 부위의 크기가 감소하였고 석회

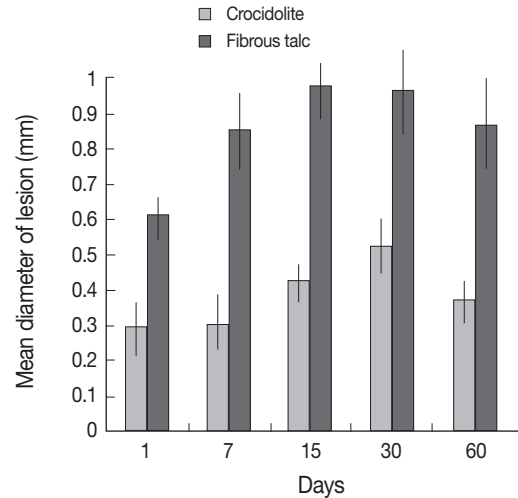


Fig. 2. Size of lesions induced by subcutaneous injection of mineral fibers. The size of lesions induced by fibrous talc is larger than that of crocidolite ($p < 0.05$).

화가 관찰되었다. 그러나 섬유상 활석에 의한 병변에서는 청석면에 의한 병변에서보다 큰 지도양 괴사(geographic necrosis)가 관찰되었으며 염증세포의 밀도도 더 높았다.

주사 후 60일이 지난 병변은 크기가 줄었으며, 아교질이 침착되었지만 활석에 의한 병변에서 염증세포의 밀도나 괴사, 석회화 및 섬유화의 정도가 더 강하였다. 그리고 143일과 222일 이후에는 두

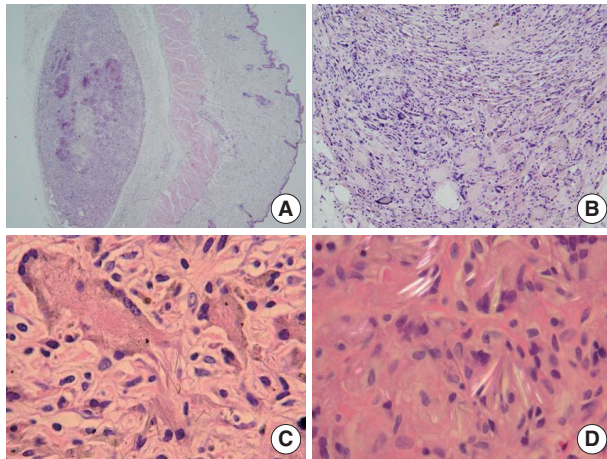


Fig. 3. Photomicrograph of the lesion at 60 days after subcutaneous injection of crocidolite. The well-delineated subcutaneous nodule (A), consisting of sheets of histiocytes and scattered giant cells (B). High power view of the lesion demonstrates mineral fibers in the cytoplasm of histiocytes and giant cells (C). Under polarizing light strong birefringence of crocidolite is seen (D).

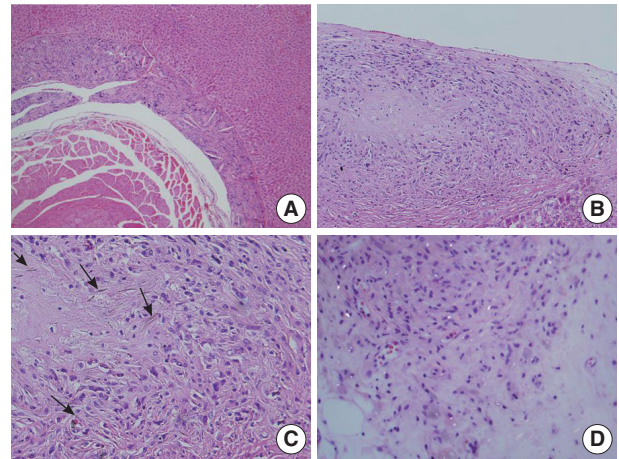


Fig. 4. (A-D) Microscopic finding of the lesion with or without polarizing light at day 222 after intraperitoneal injection of fibrous talc. The foreign body reaction is still present at the adhesion site between the hepatic capsule and intestinal wall (A) and at the hepatic capsule (B). The arrows indicate fibrous talc (C). The fibrous talc shows birefringence (D).

Table 2. Frequency of granuloma formation in rats after subcutaneous or intraperitoneal injection of mineral fiber

Mineral fibers	Days post-injection					
	Subcutaneous injection			Intraperitoneal injection		
	60	143	222	60	143	222
Crocidolite	5/5 (100)	1/4 (25)	1/4 (25)	5/5 (100)	2/3 (66.7)	3/4 (75)
Fibrous talc	6/6 (100)	0/3 (0)	0/4 (0)	5/5 (100)	2/4 (50)	2/4 (50)

The frequency percentage of granuloma formation at each time point is described in parentheses.

그림 모두 육안 병변이 소실되었으며 청석면(투여군 1예)에서 현미경으로 육아종성 병변을 확인할 수 있었다(Table 2).

이물질의 복강 내 투여군

복강 내에 청석면을 투여한 흰쥐는 60일에는 5마리 중 전 예(100%)에서, 143일에는 3마리 중 2마리(66.7%)에서, 222일에는 4마리 중 3마리(75%)에서 육아종이 관찰되었다. 육아종은 주로 장기와 장기 사이의 유착 부위나 간의 피막 및 복막에서 관찰되었는데, 병변의 조직 소견은 피하에 주입한 경우와 유사하였다(Fig. 4).

활석을 투여한 경우 60일에는 5마리 중 5마리(100%), 143일과 222일에는 각각 4마리 중 2마리(50%)에서 육아종성 염증이 지속되었다. 또 복강 내 광물섬유를 투여한 군이 피하 내 이물을 투여한 군에 비해 염증 반응의 기간이 유의하게 길어졌다($p < 0.05$) (Table 2).

MMPs 및 TIMP-2의 발현

이물질의 피하 내 투여군

MMP-2, MMP-9, TIMP-2는 모두 대식구의 세포질에서 양성반응을 보였으며(Figs. 1, 5), MMP-2와 MMP-9은 발현이 서로 비슷하였고

실험 7일과 15일 이후 실험 중반까지 지속적인 증가를 보였으나, 실험 143일과 222일에는 육아종이 관찰된 예에서도 정상수준으로 감소하였다. MMP-2와 MMP-9은 거대세포의 세포질과 가성막을 이루는 섬유모세포에서 다소 강하게 발현되었다.

MMPs는 청석면 투여군보다 섬유상 활석을 투여한 군에서 다소 늦게 증가하였으며 발현 정도도 다소 약하였고 일찍 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6). TIMP-2는 거대세포에서는 거의 발현되지 않았으며 병변 전반에 걸쳐 주로 대식구의 세포질 내에서 발현되었다(Figs. 1, 5). TIMP-2는 석면과 활석 모두에서 초기에 강하게 발현되었으나 실험 30일 이후 감소하였으며 활석군에서 더 심한 감소를 보였다(Fig. 6).

이물질의 복강 내 투여군

이물질의 복강 내 투여군에서도 MMP-2, MMP-9, TIMP-2 모두 대식구의 세포질에서 발현되었다. 청석면을 투여한 군에서 60일에는 MMP-2, MMP-9 및 TIMP-2가 모두 발현이 증가하였으며 발현 정도는 피하 내 투여군과 비슷하거나 다소 강하였다. 143일에는 거의 정상수준으로 감소하였고 222일에는 도리어 약간 증가하였다(Fig. 7). 복강 내 활석을 투여한 군에서 MMP-2는 피하조직 투여군보다

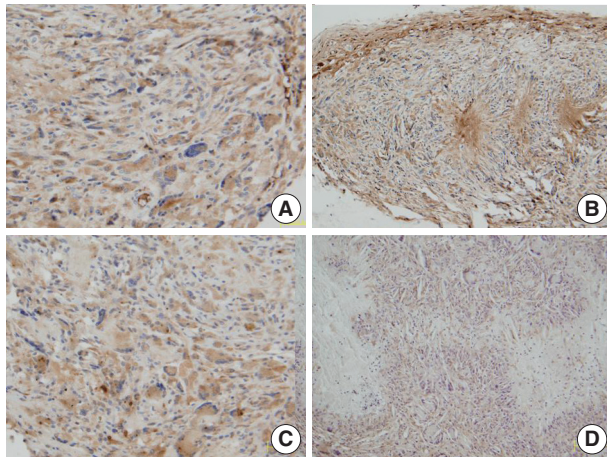


Fig. 5. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases (MMPs)/tissue Inhibitor of MMP (TIMP)-2 at 60 days after subcutaneous injection of crocidolite. The majority of macrophages and multinucleated giant cells strongly express MMP-2 (A) and MMP-9 (B, C). The TIMP-2 is expressed in monocytes within granuloma (D).

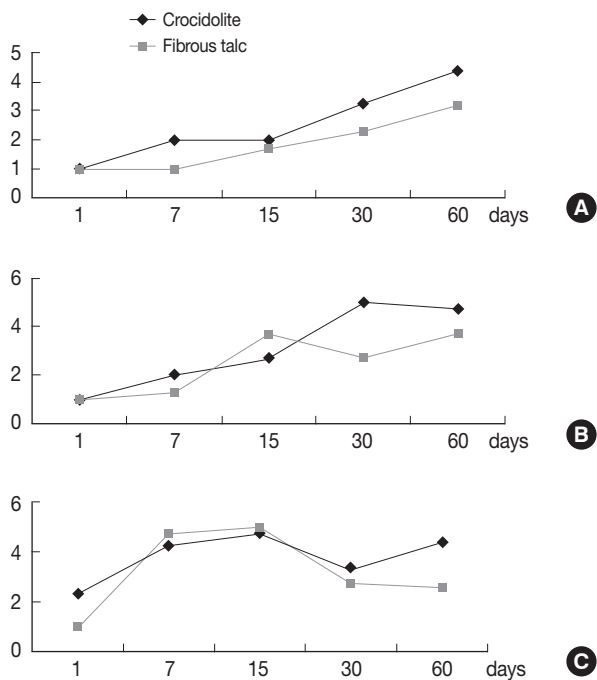


Fig. 6. Semi-quantitative determination of the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue Inhibitor of MMPs (TIMP)-2 in the subcutaneous lesions of rats by crocidolite and fibrous talc at days 1, 7, 15, 30, and 60 after injection. MMP-2 (A) and MMP-9 (B) in the lesion by crocidolite are consistently elevated after 7 days that is when granulomatous reaction occurs to the foreign body. In the lesion by fibrous talc, MMP-2 (A) is below the level than that seen in the crocidolite lesion. TIMP-2 expression is earlier than MMPs (C). Immunoreactivity: 1, negative; 2, trace; 3, mild; 4, moderate; 5, strong.

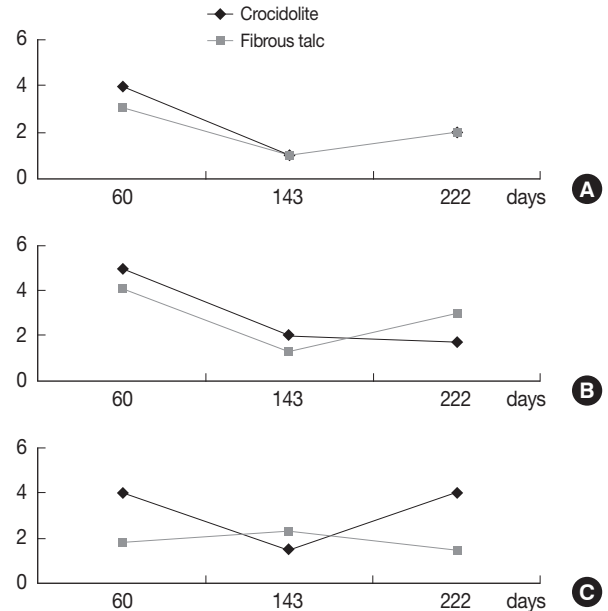


Fig. 7. Semi-quantitative analysis of matrix metalloproteinases (MMPs)/tissue Inhibitor of MMPs (TIMP)-2 in the granulomatous lesion of rats by intraperitoneal injection at day 60, 143, and 222. MMP-2 (A) and MMP-9 (B) decrease below detectable level at day 143 (A). At day 222 after injection, the levels of MMP-9 (B) and TIMP-2 (C) in two types of lesions are reversed. 1, negative; 2, trace; 3, mild; 4, moderate; 5, strong.

높은 발현을 보였으며, MMP-9과 TIMP-2 발현도 피하조직 투여군 보다 다소 강하였다. 222일에는 MMP-2와 MMP-9이 143일보다 모두 증가하였다(Fig. 7).

대조군

대조군은 이물질의 피하 내 투여군과 복강 내 투여군 모두에서 육안 및 현미경으로 이상 병변을 확인할 수 없었다.

고 찰

섬유상 광물성 이물질에 대한 조직반응은 이물질의 종류에 따라, 그리고 투여경로에 따라 염증의 정도나 지속기간에 차이를 보였고 육아종 병변 내에서 MMPs와 TIMP-2의 과발현이 관찰되었으며 발현의 정도는 섬유상 활석에 비해 육아종의 크기가 작고 조직손상이 적은 청석면에서 다소 강하게 관찰되었다.

활석은 활석 광산에서 일하는 광부와 공업용 활석 제품을 사용하는 요업관련 산업에 종사하는 근로자들을 대상으로 한 폐암과 중피종에 대한 코호트 조사에서, 섬유상 형태를 띤 활석이 발암성이 있다는 점이 제기되면서 활석의 물리적 특성에 따라 생물학적 반응이 다를 것이라는 가설이 제시되고 있다.¹⁷ 국내에서도 유리섬유 폐기물의 매립지 인근에 거주하는 주민을 대상으로 실시된 한

역학조사 결과, 광물섬유에 의한 지하수의 오염과 피하에 발생한 지방종과의 관련성이 시사된 바 있으며, 종양 내에서 다량의 섬유상 활석이 발견되어 광물섬유에 의한 조직반응을 연구할 필요성이 제기되었다.¹⁸

섬유상 활석은 직경이 작은 미세 광물섬유이며, 다발 형태를 취하기도 하고 길이 대 직경의 비가 커서 석면과 유사한 물리적 특징을 갖기 때문에 판상이나 엽상의 구조를 갖는 비섬유상 미안용 활석에 비해 심한 염증 반응을 초래한다.^{17,18} 특히 Choi⁷는 다양한 광물질을 흰쥐의 피하에 주사하여 이물반응을 유도한 결과 섬유상 활석은 물론 비섬유상 활석에서도 다른 광물섬유에 비하여 독성이 강하다고 보고하였다. 본 연구에서도 섬유상 활석은 청석면에 비하여 더 큰 육아종을 형성하였고 염증이 더 오랜 기간 지속되었다.

한편 MMP는 현재까지 MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (72 kD type 4 collagenase, gelatinase A), MMP-3 (stromelysin), MMP-7, MMP-8 (granulocyte collagenase), MMP-9 (92 kD type collagenase, gelatinase B) 등 적어도 23종이 발견되어 있다. MMP는 손상 치유과정 중 버팀질의 분해에 관여하며 손상의 증식기와 재형성기에 관여한다. 손상치유과정에 관련이 있는 MMPs로는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 등이 알려져 있다.¹⁹

대식세포는 만성 감염 병변으로 유입되어 MMPs와 TIMPs의 분비를 유도하며 육아종에서 관찰되는 T세포도 MMP-2 및 MMP-9을 분비하고 T세포의 이주를 돕는다. 즉 MMPs는 L-selectin과 같은 수용체나 세포외버팀질 성분과 국소적인 접촉부를 용해시켜 활성화된 T세포나 대식세포의 이동을 촉진시킨다고 한다.^{20,21}

본 연구에서는 MMP-2와 MMP-9은 석면과 활석모델 모두에서 육아종이 형성되는 실험 15일 이전부터 증가하였으며 60일 이후에도 발현이 지속되었다. Majka 등⁹이나 Kyriakides 등¹³의 연구에서도 본 연구와 비슷하게 MMP-2가 실험 후 14일과 21일 또는 28일에 증가하였다. 즉 MMP-2는 감염에 의한 육아종뿐 아니라 이물반응에서도 발현되어 조직의 재형성에 관여한다고 생각된다.

Jones 등²²은 인체 단핵구 이물반응 거대세포(human monocyte/macrophage/foreign body giant cells)를 세포배양기에 배양하고 5 종류의 생체적합물질을 이식한 후 배양액 내 MMPs와 TIMPs를 측정된 결과, 모든 물질에서 MMP-9, TIMP-1과 TIMP-2를 검출하였으며, 그 중 MMP-9의 농도는 시간의 경과에 따라 유의하게 증가하여 거대세포 형성에 관여한다고 하였다. 그러나 실험기간 내 TIMP-1과 TIMP-2의 농도는 변화가 없었다고 하였다. 본 연구에서는 TIMP-2의 농도가 실험 초기에 높은 발현을 보였는데 이는 염증 진행 과정 후반까지 유지한 점과 일치한다고 생각되었다.

육아종은 대식세포의 T세포 매개 활성으로 형성되며 조직손상을 최소화시키는 숙주의 방어기전 중 하나이다! 쥐의 폐포대식세포를 자극하면 MMP-9과 MMP-12가 급격히 증가하는데 폐의 감염 초기에 폐포대식세포는 감염을 최소화하는 데 중요한 역할을 한다.^{23,24} 또 MMP-2가 염증반응 초기에 증가한 경우에는 육아종이 잘 형성되었으며 MMP-2의 발현이 조직의 손상을 최소화한다고 하였다.²⁵ 그러나 이런 소견과는 다르게 결핵균 등 감염증에 의한 조직

파괴는 MMPs에 의한 과도한 단백질 분해로 발생한다는 연구도 있다.^{10,12,25,26}

또 D'Agostino 등¹⁴은 활석으로 흉막유착술을 시행한 폐의 악성 종양 환자에게서 MMP-1이 감소하는 현상을 관찰하였다. 본 연구에서는 MMPs가 활석모델보다 조직손상이 적었던 청석면 투여군에서 일찍 증가하기 시작하였으며 오랜 기간 강하게 발현되었다. 이런 소견은 MMPs의 조기 발현이 조직 손상을 최소화하는 데 관여할 것으로 생각된다.

MMP는 풋효소 형태(proenzyme)로 분비되며 활성화 과정을 거쳐야 되는데, 이 단계는 TIMP에 의해 억제 가능하다. TIMP는 MMP의 자연 억제단백으로 MMP의 활성을 조절하는데, 지금까지 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 등 4종류 이상이 발견되었으며^{26,27} TIMP의 생성도 전사 과정에서 다양한 cytokine과 성장인자에 의해 조절된다고 알려져 있다. 또 TIMP-1과 TIMP-2는 여러 세포의 배양에서 분비되는 것이 확인되었으며 체액이나 조직의 추출물에서도 발견되고 폐기종을 일으킨 폐 조직에서도 검출되어 폐기종을 일으키는 데 일조한다고 추정되고 있다.²⁶

TIMP/MMP 복합체는 같은 몰(equimolar) 농도에서 아주 제한적으로 형성되며 가역적이다.²⁸ TIMP-1은 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 활성을 억제하고 TIMP-2는 MMP-2와 2:1의 비율로 결합하여 MMP-2의 활성을 억제한다.²⁷ 또 TIMP-2는 MMP-2와 결합하여 MMP-2의 자가용해를 방지하고 안정화시킨다.²⁹

본 연구에서 TIMP-2는 실험 초기 단계에서 활석과 청석면 투여군 모두에서 이미 발현하였으며 염증 진행과정 후반에 감소하였다. 그러므로 염증 반응의 경과에 따라 실험 30일에는 MMP-2가 증가하였기 때문에 MMP-2/TIMP의 비가 커졌다. 이런 소견은 면역반응이 최고인 15일 이후 이 두 물질의 발현이 역전된다는 Majka 등⁹의 주장과 일치하였다. 또 조직의 손상이 심한 섬유상 활석 투여군과 염증 경과 기간이 긴 복강 내 투여군에서 MMPs와 TIMP 발현의 비가 적은 것으로 보아 MMPs의 낮은 발현 또는 TIMP의 높은 발현이 MMPs를 과도하게 억제하여 조직파괴의 정도가 심하였을 가능성이 높았다. 앞으로 이물반응에서 조직의 파괴를 국소화하는 데 MMPs와 MMPs를 조절하는 물질에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각되며, 이런 연구는 이물반응에 의한 조직손상을 치료하는 데 표적으로 활용될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Huffnagle GB, Lipscomb MF. Cells and cytokines in pulmonary cryptococcosis. *Res Immunol* 1998; 149: 387-96.
- Boros DL, Warren KS. The bentonite granuloma. Characterization of a model system for infectious and foreign body granulomatous inflammation using soluble mycobacterial, histoplasma and schistosoma antigens. *Immunology* 1973; 24: 511-29.
- Misieck DJ, Kent JN, Carr RF. Soft tissue responses to hydroxylapa-

- tite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac Surg* 1984; 42: 150-60.
4. Watanabe M, Okada M, Kudo Y, *et al.* Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65: 1047-60.
 5. Oberdörster G. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal Toxicol* 2002; 14: 29-56.
 6. Fenoglio I, Croce A, Di Renzo F, Tiozzo R, Fubini B. Pure-silica zeolites (Porosils) as model solids for the evaluation of the physicochemical features determining silica toxicity to macrophages. *Chem Res Toxicol* 2000; 13: 489-500.
 7. Choi SJ. Tissue reaction and expression of inducible nitric oxide synthase induced by subcutaneous injection of mineral fibers in rats [Dissertation]. Gyeongju: Dongguk University, 2002.
 8. Kreuger MR, Tames DR, Mariano M. Expression of NO-synthase in cells of foreign-body and BCG-induced granulomata in mice: influence of L-NAME on the evolution of the lesion. *Immunology* 1998; 95: 278-82.
 9. Majka SM, Kasimos J, Izzo L, Izzo AA. Cryptococcus neoformans pulmonary granuloma formation is associated with matrix metalloproteinase-2 expression. *Med Mycol* 2002; 40: 323-8.
 10. Wright KM, Friedland JS. Regulation of monocyte chemokine and MMP-9 secretion by proinflammatory cytokines in tuberculous osteomyelitis. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 1086-92.
 11. Price NM, Gilman RH, Uddin J, Recavarren S, Friedland JS. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 2003; 171: 5579-86.
 12. Hsu CC, Lai SC. Matrix metalloproteinase-2, -9 and -13 are involved in fibronectin degradation of rat lung granulomatous fibrosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Int J Exp Pathol* 2007; 88: 437-43.
 13. Kyriakides TR, Zhu YH, Yang Z, Huynh G, Bornstein P. Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 1255-62.
 14. D'Agostino P, Camemi AR, Caruso R, *et al.* Matrix metalloproteinases production in malignant pleural effusions after talc pleurodesis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 138-42.
 15. Gertig DM, Hunter DJ, Cramer DW, *et al.* Prospective study of talc use and ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 249-52.
 16. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994; 32: 9-15.
 17. Kleinfeld M, Messite J, Langer AM. A study of workers exposed to asbestiform minerals in commercial talc manufacture. *Environ Res* 1973; 6: 132-43.
 18. Kim JR, Lim HS, Cheong HK, Kim JY, Sakai K, Hisanaga N. Talc deposition in lipoma: a pathologic and mineralogic study. *Korean J Pathol* 1999; 33: 1024-32.
 19. Witte MB, Thornton FJ, Kiyama T, *et al.* Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery* 1998; 124: 464-70.
 20. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156: 1-4.
 21. Preece G, Murphy G, Ager A. Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 11634-40.
 22. Jones JA, McNally AK, Chang DT, *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84: 158-66.
 23. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 1136-44.
 24. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 1145-54.
 25. Izzo AA, Izzo LS, Kasimos J, Majka S. A matrix metalloproteinase inhibitor promotes granuloma formation during the early phase of *Mycobacterium tuberculosis* pulmonary infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 387-96.
 26. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 734-40.
 27. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
 28. Gonzalez AA, Segura AM, Horiba K, *et al.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of cardiac and pulmonary sarcoidosis: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 2002; 33: 1158-64.
 29. Murphy G, Stanton H, Cowell S, *et al.* Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999; 107: 38-44.