

## Paraquat에 의한 肺胞纖維症의 發生機轉에 관한 研究

계명대학교 의과대학 병리학교실

이 상 숙 · 정 재 홍

경북대학교 의과대학 병리학교실

손 태 중

### 서 론

간질성폐질환의 특징은 하부 호흡기에 활성화된 폐포 대식구와 폐포벽내 섬유아세포의 수가 증가되어 비후를 초래함에 있다<sup>1,2)</sup>. 이런 폐포벽의 섬유화는 대부분 불가역성이므로 섬유화를 야기하는 기전의 이해가 간질성 폐질환의 병인을 이해하고 폐포와 모세혈관 단위의 불가역성 소실의 예방책을 세우는데 필요하다<sup>3)</sup>. 1976년 Crystal등<sup>4)</sup>이 발표한 특발성 폐섬유증 환자의 폐생검 조직학적 소견은 폐간질의 섬유화와 II형폐포상피세포의 증식과 폐포강내 세포들의 축적이었다. 이 축적된 세포들은 전자현미경적 연구로 탈락된 II형폐포상피세포 또는 폐포대식구로 밝혀졌다<sup>5,6)</sup>. 이러한 Crystal의 소견은 여러 동물실험에서도 확인되었다. 또, 최근 만성간질성폐질환에서 폐간질의 섬유증외에 폐포강내 섬유증이 생겨 폐포구조의 이상을 초래함이 알려져 있다<sup>7-11)</sup>. 그리고 paraquat<sup>5,12-16)</sup>, busulfan 및 bleomycin<sup>19,27-34)</sup> 같은 물질들이 사람이나 실험동물에서 폐섬유증을 유발함이 알려져 있다. 특히 paraquat(1-1'-dimethyl-4, 4'-dipyridylum dichloride)는 1955년 영국에서 처음 소개된 이래 세계적으로 널리 보급되어 사용되고 있는 제초제로서<sup>21)</sup> 사람과 실험동물에서 치명적인 폐섬유증을 초래한다. 우리나라에서도 최근에 gramoxone이란 상품명으로 널리 보급되고 있으며 사고 또는 자살 목적으로 paraquat를 흡입하는 경우가 종종 보고되고 있다<sup>22,23)</sup>. Paraquat를 흡입하는 모든 장기에 영향을 미치나 특히 폐가 손상을 받기 쉽고<sup>24,35)</sup> 대부분의 환자들은 급성호흡부전으로 1주일 내에 사망한다. 인체에서 생기는 것과 유사한 폐

의 병변들이 생쥐<sup>25)</sup>, 백서<sup>5,15,16,18,20,24,26)</sup>, 햄스터<sup>36)</sup>등에서도 paraquat 투여후 생긴다.

간질성 폐질환에서 폐포의 염증과 섬유화를 일으키는 기전에 대한 새로운 이해가 기관지폐포세정기법에 의해 이루어졌다<sup>37,38)</sup>. 사람의 기관지폐포세정액에서 발견되는 대식구, 임파구, 호중구와 섬유아세포들이 분비하는 mediator와 그외의 분비산물에 대한 연구가 활발하게 이루어져 간질성폐질환의 병인연구에 기여하고 있다<sup>39)</sup>. Paraquat에 노출된 사람이나 실험동물의 폐는 호중구와 대식구로 구성된 폐포염을 일으킴이 폐의 형태학적 연구와 기관지폐포세정법에 의하여 밝혀졌다<sup>13)</sup>. 간질성 폐질환에서 폐포내에 섬유아세포가 많아지는 것은 자극을 받은 폐포대식구가 AMDGF(alveolar macrophage derived growth factor)와 fibronectin을 방출함에 기인할 것이라고 추측하고 있다<sup>3,40-42)</sup>. 특히 fibronectin의 중요성은 섬유성폐질환을 가진 환자의 폐포대식구가 정상인보다 20배나 더 많은 fibronectin을 방출하고<sup>42)</sup> 또 폐포대식구 fibronectin은 폐섬유아세포에 대해 강력한 화학적 견인체로 역할을 한다는 보고<sup>42,43)</sup>로 미루어 보아 의심할 여지가 없다. 면역조직화학적 검색으로 fibronectin은 정상폐에서 비교적 소량이 염색되나<sup>44)</sup> 폐섬유증환자의 폐포의 기저판에 강하게 염색되고<sup>45)</sup> 폐섬유증환자와 paraquat에 노출된 동물의 기관지세정액내의 fibronectin양도 또한 증가되어<sup>13,46)</sup> fibronectin이 폐섬유증에 출현하는 폐포대식구나 섬유아세포와 관련이 있음을 입증해 주고 있다. paraquat에 의해 생기는 폐섬유증은 폐포간질이나 폐포강내에 생기나, 이때 폐포강내에 생기는 섬유화가 간질이 생기는 경우보다 폐포의 구조적 개축에 더욱 중요하다고 생각되는데, 그 이유는 폐

포강내 섬유화가 생기면 폐포를 폐쇄하고 폐포벽의 유착으로 인해 폐포와 미세혈관의 소실을 초래하여 폐포의 기능을 상실하기 때문이다<sup>9)</sup>. 이와같이 중요한 폐포강내 섬유증의 발생기전은 아직 잘 알려져 있지 않고 있는 실정이다. 그러므로 백서의 복강에 paraquat를 주사하여 실험적으로 백서폐에 폐포강내와 폐포간질의 섬유화를 유발하여 폐포의 개축을 초래하는 기전을 규명하고자 본 실험을 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

**실험동물** : 일정기간 사육하여 건강이 양호하다고 인정되는 체중 200 gm 정도의 백서 숫컷 63마리를 골라 실험에 제공하였다. 실험동물은 다음과 같이 대조군과 실험군으로 나누어 실험군은 표 1에서와 같이 정해진 양의 paraquat(10, 20, 25, 30, 40 mg/kg)를 1회 복강내에 주사하였다.

- 1) 제 1 군 : 대조군으로 10마리중 6마리를 6, 8, 10주에 도살하였다.
- 2) 제 2 군 : 급성기의 변화를 보고자 백서 13마리를 5시간, 1일과 2일째 도살하였다.
- 3) 제 3 군 : 2~5일에 걸쳐 사망한 백서 16마리를 대상으로 하였다.
- 4) 제 4 군 : 만성기의 변화를 보고자 백서 24마리를 1, 2, 6, 8, 10주째 도살하였다.

#### 시 약 :

- 1) Paraquat dichloride (methyl viologen, 1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride, Sigma M 2254, USA)을 생리적식염수에 희석하여 10 mg/ml의 농도로 만들어 백서의 무게에 따라 정해진 일정량을 복강내 주사하였다.

- 2) Nembutal (pentobarbital sodium, 50 mg/ml, Abbott No. 3778, Japan)을 체중당 20 mg/kg씩 복강내 주사하여 백서를 마취시켜 도살하였다.

- 3) Trypan blue(Sigma T0887, USA)는 일단 0.4% trypan blue 용액을 만든 후 다시 5배 희석하여 0.08% trypan blue 용액으로 만들어 동량의 세포부유액과 혼합하여 5~15분간 실온에 두어 염색하였다. 이때 viable cell은 염색이 되지 않고 non-viable cell은 푸르게 염색되므로 viable cell exclusion test에 사용하였다<sup>10)</sup>.

- 4) Giemsa's solution (Merck, Art. 9204, W. Germany)을 증류수로 50배 희석시켜 20~25분간 기관지폐포 세정액의 도말표본을 염색하고 pH 6.8의 buffered water solution으로 수세하여 검경하였다.

- 5) Pepsin(Sigma P7012, USA)는 0.1 N 염산으로 4 mg/ml의 농도로 만들어 간접면역조직화학법의 1차항체 사용전에 슬라이드에 부착된 조직절편위에 충분량을 놓아 37°C에서 2시간 부란하여 포르말린고정으로 mask된 조직내 항원성을 회복하는 목적으로 사용하였다<sup>10)</sup>.

- 6) Human fibronectin antisera(Biomedical Technologies Inc. BT551, USA)는 간접효소항체법과 간접면역형광법에서 1차 항체로서 phosphate buffered saline, pH 7.2(이하 PBS라 함)에 1 : 40으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.

- 7) Goat anti-rabbit IgG(HRP), affinity purified (BTI, BT572, USA)는 간접효소항체법의 2차 항체로서 PBS로 1 : 40으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.

- 8) Goat anti-rabbit IgG (FITC) (BTI, BT557, USA)는 간접면역형광법의 2차 항체로서 PBS로 1 : 40으로 희석하여 실온에서 30분간 부란하였다.

- 9) DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrachloride, Sigma D5637, USA)는 6 mg의 DAB를 10 ml의 0.05 M Tris buffer, pH 7.6, 용해하고 사용직전에 신선한 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.1 ml 첨가하여 간접효소항체법의 발색에 사용하였다.

- 10) Phosphate buffered saline, 0.01 M, pH 7.2,는 Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 1.48 gm과 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.43 gm과 NaCl 7.2 gm을 1000 ml의 증류수에 용해하여 간접면역조직 화학법에서 1차와 2차 항체 사용전후에 10분씩 3번 수세하는데 사용하였다.

- 11) Tris buffer, 0.05 M, pH 7.6, 은 tris (hydroxy-

**Table 1.** Protocol for Induction of Pulmonary Fibrosis in Rats

Group	No. of Animal	Paraquat Dosage (mg/kg)	Time of Survival
I	10	saline only	0, 6, 8, 10 wks
II	13	10, 20, 25, 30, 40	5 hr, 1, 2 days
III	16	20, 25, 30, 40	2-5 days
IV	24	10, 20, 25, 30, 40	1, 2, 6, 8, 10 wks

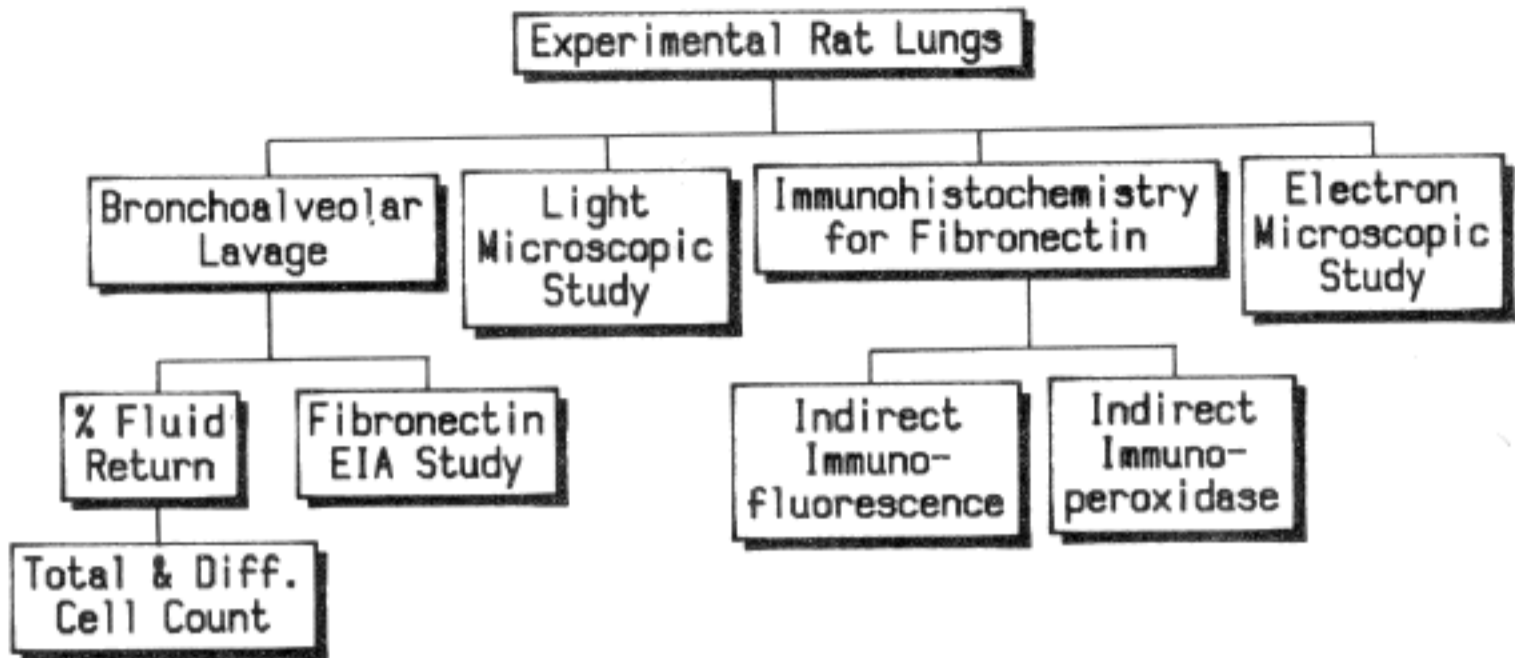


Fig. 1. Schematic diagram of experimental design for induction of pulmonary fibrosis in rats.

methyl) aminomethane (Sigma T1378, USA) 6.1 gm을 증류수 50.0 ml에 녹이고 37 ml의 1 N 염산을 가한 후 증류수에 전체양이 11가 되게 희석하여 DAB substrate를 만드는데 사용하였다.

12) Human fibronectin EIA(enzyme immunoassay) kit(BTI, BT500, USA)는 double antibody separation을 이용하는 heterogenous EIA법으로 백서의 기관지폐포세정액에 함유된 fibronectin양을 측정하고자 사용하였다.

13) Rat fibronectin standard (800  $\mu$ g/ml, BTI, BT999, USA)로 25~500 ng/ml의 표준용액을 만들어 rat fibronectin에 대한 표준곡선을 그리는데 사용하였다.

기 기 :

1) Sorvall GLC-2B General Centrifuge(USA)로 기관지폐포세정액을 2000 rpm으로 15분간 원심침전하였다.

2) Olympus model BH-RFL-W fluorescence microscope(Japan)은 간접면역형광법으로 조직내 fibronectin을 검정하기 위해 사용하였는데 이때 blue 여기(excitation)필터를 이용하고 주파장은 495 nm, 보조 여기필터는 490 nm, 대안렌즈용 흡수필터는 515 W를 사용하였다.

3) Forma bio-freezer(USA) -80°C에 fibronectin의 EIA 정량에 사용할 기관지폐포세정액을 동결보관하

였다.

4) Beckman Model J-6B Refrigerated centrifuge (USA) 4°C로 fibronectin의 EIA 검사과정중에 2000 RCF 이상으로 30분간 원심침전하였다.

5) EMITT assay system(Syva, USA)는 fibronectin의 EIA 과정을 마친후 spectrophotometer의 파장을 403 nm에 맞춘 후 표준용액 및 미지의 시료의 흡수능을 측정하였다.

6) Sorvall ultramicrotome MT 5000(USA)를 사용하여 전자현미경시료의 초박절을 시행하였다.

7) Hitachi H-600 transmission electron microscope(Japan)을 사용하여 전자현미경소견을 관찰하였다.

방 법

본 실험에서 사용한 방법은 그림 1과 같다.

기관지폐포세정액의 세포분석 : 백서를 nembutal마취 하에 Kawanami<sup>38)</sup>에 의한 기관지폐포세정법에 따라 10 cc의 생리식염수로 기관지폐포세정을 3번하였다. 혈구계에 trypan blue로 염색된 소량의 세정액을 넣고 chamber의 10개의 모눈속에 있는 세포수를 세었다. 총 세포수는 각 모눈에서 센 평균세포수에 10<sup>4</sup>과 희석배수인 2와 수거량을 곱하여 계산하였다. 세포의 viability는 toluidine blue로 염색이 되지 않은 세포수를 전세포수로 나눈 백분율로 계산하였다. 나머지 세정액은 2000 rpm

으로 15분간 원심침전하여 상침액은 일부 fibronectin의 EIA 정량을 위하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관하고 남은 세포결정소구(cell pellet)는 유리슬라이드에 도말하여 Giemsa 염색을 하여 광학현미경의 400배하에서 대식구, 임파구, 호중구와 호산구로 대별하여 각 세포의 백분율을 구하였다. 통계분석을 위해 호중구와 호산구를 함께 다핵백혈구로 나타내었다. 결과는 평균±표준오차로 나타내었다. 각군마다 평균의 비교는 SPSS/PC+를 이용한 단순분류분석에 의하였으며 유의차는 Scheffe test에 의하여 계산하였다<sup>49)</sup>.

**육안 및 광학현미경적 연구 :** 광학현미경 검사를 위해 폐조직은 마지막 분획의 세정후 약 10 cc의 10% 중성포르말린용액을 주입하여 고정된 후 육안적 소견을 관찰하고 좌엽은 횡절편, 우엽은 종절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색, PAS(Periodic acid-schiff) 염색, Masson's trichrome 염색, reticulum 염색 및 PASM(Periodic acid silver methanamine)염색으로 검경하였다.

**면역조직화학법에 의한 fibronectin의 조직내 분포 연구 :** 조직내 fibronectin의 분포를 알기 위하여 간접효소항체법과 간접면역형광법을 사용하였다<sup>50-54)</sup>. 포르말린 용액으로 고정되고 파라핀 포매된 폐조직을  $3\mu\text{m}$  두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 증류수에  $37^{\circ}\text{C}$ 에 10분간 부란하고 0.01 N 염산으로 만든 0.4% pepsin용액  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 부란하였다<sup>49)</sup>. 그후 흐르는 찬물에 10분간 두어 효소소화과정을 중지시켰다. 그후 0.3~0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 혼합한 methanol (Merck, W. Germany)이 담긴 coplin jar에 슬라이드를 30분 담구어 내인성 peroxidase에 대한 반응을 차단시켰다. 1차 항체로 rabbit anti-fibronectin IgG, 1:40, 을 사용하여 실온에서 30분간 부란하였다. 간접효소항체를 위해 2차 항체로 peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG, 1:40,으로 실온에서 30분간 부란한 후 DAB로 발색하여 광학현미경으로 검경하였다. 간접면역형광을 위해 2차항체로 FITC-labeled goat anti-rabbit IgG, 1:40,을 사용하여 실온에서 30분간 부란하고 슬라이드에 봉입한 후 형광현미경으로 검경하였다. 양성대조염색으로는 paraquat를 먹고 폐섬유증으로 사망한 사람의 폐조직을 사용하였다. 음성대조염색으로 백서의 폐조직으로 1차 항원 대신에 정상가토혈청 또는 PBS를 사용하였다. 1차와 2차 항체의 사용전후에 PBS로 10분씩

3번의 수세과정을 거쳤다.

**기관지폐포세정액의 fibronectin의 정량 :** Human fibronectin EIA kit를 사용하여 fibronectin stock solution ( $100\mu\text{g/ml}$ )과 rat fibronectin standard ( $800\mu\text{g/ml}$ )를 희석완충액으로 25 ng/ml부터 500 ng/ml까지의 농도를 가진 표준용액을 만들었다. 수매질(p-nitrophenylphosphate)을 4 mg/ml로 농도로 enzyme developing buffer(diethanolamine buffer)에 용해하여 사용직전까지  $0-4^{\circ}\text{C}$ 에 식혀 보관하였다.  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 동결 보관한 기관지 폐포세정액은 사용직전에  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 녹혀<sup>55)</sup> 1000배로 희석하여 사용하였다.  $12\times 75\text{mm}$ 의 polypropylene 시험관(Abbott, USA)에 번호를 정하고 1-4번 시험관을 제외한 정해진 시험관에 100  $\mu\text{l}$ 의 정해진 표준용액과 미지의 시료를 넣은 후 다시 100  $\mu\text{l}$ 의 rabbit anti-fibronectin 용액을 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에 45분간 부란하였다. 그후 모든 시험관에 100  $\mu\text{l}$ 의 fibronectin tracer(fibronectin-alkaline phosphatase adduct)를 넣어 흔든 후 다시  $37^{\circ}\text{C}$ 에 45분간 부란하였다. 1-2번 시험관을 제외한 모든 시험관에 50  $\mu\text{l}$ 의 precipitating antiserum(goat anti-rabbit gamma globulin antiserum)과 100  $\mu\text{l}$ 의 precipitating aide(polyethylene glycol solvntion)를 넣어 외동혼합한 후 실온에 30분간 두었다. 1-2번 시험관을 제외한 모든 시험관에 1 ml의 희석완충액을 넣고 Beckman refrigerated centrifuge  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2000 RCF(relative centrifugal force) 이상으로 30분간 원심한 후 조심스레 상정액을 drain했다. 수매질 blank 용 시험관 2개를 더 준비하여 수매질용액을 1.0 ml씩 모든 시험관에 분주한 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 부란하였다. 모든 시험관에 100  $\mu\text{l}$ 의 stopping reagent(potassium hydrozide solution)를 넣어 발색과정을 중지시켰다. Spectrophotometer를 403 nm로 고정하고 수매질 blanks로 "0" point를 정한 후 표준용액과 모든 시료의 흡수능을 측정하였다. 각 측정치에서 NSB(non-specific binding) 치를 빼어 net absorbance를 구하였다. Semi-log paper에서 net absorbance와 log concentration에 따라 표준곡선을 그리고 이 표준곡선에 따라 미지의 시료의 fibronectin양을 측정하였다.

**전자현미경적 연구 :** 투과 전자현미경용으로 제공된 조직편은 1 mm로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M, phosphate buffer, pH 7.4)으로  $0-4^{\circ}\text{C}$ 에 2시간 전고정하고 buffer로 세척하였다. 다음으로 1%  $\text{O}_2$

O<sub>4</sub>용액(0.1 M, phosphate buffer, pH 7.4, 0~4°C)에 2시간 동안 후고정을 한후 세척하고 계열 ethanol로 탈수하고 propylene oxide로 치환시켜 Luft 방법<sup>56)</sup>에 의한 epon mixture에 포매하여 열중합을 시켰다. 초박절은 Sorvall ultramicrotome MT 5000으로 Du-pont diamond knife로 행하고 Reynolds법<sup>57)</sup>에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 Hitachi H-600 전자현미경으로 관찰하였다.

## 성 적

### 기관지폐포세정액의 세포분석

정상백서의 기관지폐포세정액의 평균회수율은 89.8±2.5%, 총세포수는 2.94±0.7×10<sup>6</sup>/30 cc이었다. 각 세포들의 분포는 대식구가 평균 90.4±1.7%, 임파구가 7.0±1.4%, 다핵백혈구가 2.6±0.7%였다. 회수가 거듭됨에 따라 회수율이 늘고 세포성분중 대식구는 점차 증가되나 다핵백혈구는 감소됨을 표 2에서 볼 수 있다.

실험군에서 각 군의 기관지폐포세정액의 세포분석결과와 비교는 그림 1과 표 3에서와 같다. paraquat의 복강내주사후 5시간까지는 정상백서와 유사한 소견을 보였으나 1일째부터는 총세포수가 증가되었는데 대부분은 호중구의 증가였다. 호산구는 1일째 일시적인 증가를 보였다가 그후 감소했다. paraquat의 투여후 2일까지의 제 2군의 급성기 기관지폐포세정액의 특징은 회수율이 86.2±2.2%였으며 총세포수는 5.32±1.2×10<sup>6</sup>/30 cc로 정상백서보다 약 1.8배 증가되었고 그중 호중구가 주로 증가하였다. Paraquat 주사후 사망한 제 3군의 백서들에서의 기관지폐포세정액은 회수율이 73.8±2.8%로 타군들에 비해 저하되었으며 총세포수는 9.50±3.1×10<sup>6</sup>/30 cc로 증가되었다. 각 세포의 분포를 보면 호중구가 59.2±5.9%로 증가하였고 대식구가 34.5±7.7%로 감소하였다. 이러한 호중구의 증가는 기관지폐렴같은 감염에 의한 것이 아님을 조직학적 검사로 배제할 수 있었다. 제 3군은 나머지 군들에 비해 회수율, 총세포수, 호중구와 대식구의 백분율에서 통계학상 유의성이 있음이 밝혀졌다(p<0.05). paraquat 투여후 1주에서 10주까지의 만성기의 제 4군에서는 총세포수와 대식구, 임파구와 호중구의 비가 거의 정상백서의 수준으로 돌아갔다. 만성기의 기관지폐포세정액의 회수율은 92.9±1.1%였다.

전 군에서 toluidine blue 염색에 의한 cell viability의 백분율은 전에서 90% 이상이었다.

### 육안 및 광학현미경적 소견

급성기의 변화를 보기위해 5시간, 1일과 2일후 도살한 제 2군 백서의 폐에서는 산재한 울혈과 부분적 변색을 볼 수 있었다. 체중당 20-40 mg/kg의 paraquat를 주사한 16마리가 2일에서 5일 사이에 심한 호흡곤란 끝에 죽었는데 이 제 3군의 백서의 폐는 커져 있었고, 검붉고 무거웠으며 절단면은 심한 부종과 출혈을 보였다. 만성기의 변화를 보기위해 1주, 2주, 6주, 8주, 10주째 도살한 제 4군의 백서중 6마리 즉, 20 mg/kg의 paraquat를 투여한 백서중 1주와 8주째에 도살한 2마리에서, 25 mg/kg를 투여한 백서중 4주째 도살한 1마리에서, 30 mg/kg를 투여한 백서중 10주째에 도살한 3마리에서 육안적으로 다발성 췌기형 반흔을 보였다. 만성기의 폐는 상당히 경도가 증가되고 절단면에서 교질화된 부위가 주로 늑막하, 혈관과 기관지 주변에서 관찰되었다. 나머지 백서들은 불규칙적 울혈을 보였다.

광학현미경소견을 보면 제 1군인 대조군의 백서의 폐는 정상 폐포와 모세혈관의 구조를 보였다. 제 2군에서 paraquat 주사후 5시간만에 도살한 백서의 폐는 폐포강과 폐포벽내에 부종을 보였다. 1일후 도살한 백서의 폐는 전체적으로 염증세포수가 상당히 증가되었으며, 육아종같은 병소를 폐포내에서 볼 수 있었는데 이는 섬유아세포, 호중구, 임파구와 대식구들로 구성되어 있었다. 2일째 도살된 백서의 폐의 소견은 대체적으로 1일째 것과 유사하였으나 염증세포수가 감소됨을 볼 수 있었다. paraquat의 주사량이 증가함에 따라 폐포의 모세혈관의 울혈이 더 심해지는 양상을 볼 수 있었다.

Paraquat를 복강내 주사후 2-5일 내에 죽은 제 3군 백서에서는 폐포와 세기관지내에 상당한 양의 단백질 침출물이 있었다. 폐정맥, 미세정맥, 폐포 모세혈관내에 많은 적혈구가 차여 용혈성 변화(hemolytic change)를 보였고, 호중구, 대식구 및 임파구들이 폐실질에 산재해 있었다. 폐포구조는 대부분 파괴되고 부종을 보였으며 초자양막 및 피브린 사상체들이 폐포관과 폐포벽을 따라 관찰되었다. 제 4군에서는 6마리의 백서에서 미만성 간질성 섬유화를 볼 수 있었는데 이는 주로 기관지와 혈관 주변 및 늑막하방에 위치하였다. 폐포강에서 다양한 섬유화 과정이 관찰되었는데 즉, 폐포강으로 돌출하는 싹 또



**Table 2.** Cellular composition of bronchoalveolar lavage in control Rats

SBAL	Recovery of infused lavage fluid(%)	Total cells recovered (no. × 10 <sup>6</sup> )	Macrophages (%)	Lymphocytes (%)	Polys (%)
1	79.5 ± 4.3	1.08 ± 0.2	87.6 ± 2.6	7.9 ± 2.6	4.6 ± 1.6
2	91.7 ± 3.1	0.91 ± 0.2	93.8 ± 1.0	4.8 ± 1.0	1.4 ± 0.4
3	98.3 ± 1.7	0.95 ± 0.3	91.6 ± 2.8	7.0 ± 2.6	1.3 ± 0.4
Total	89.8 ± 2.5	2.94 ± 0.7	90.4 ± 1.7	7.0 ± 1.4	2.6 ± 0.7

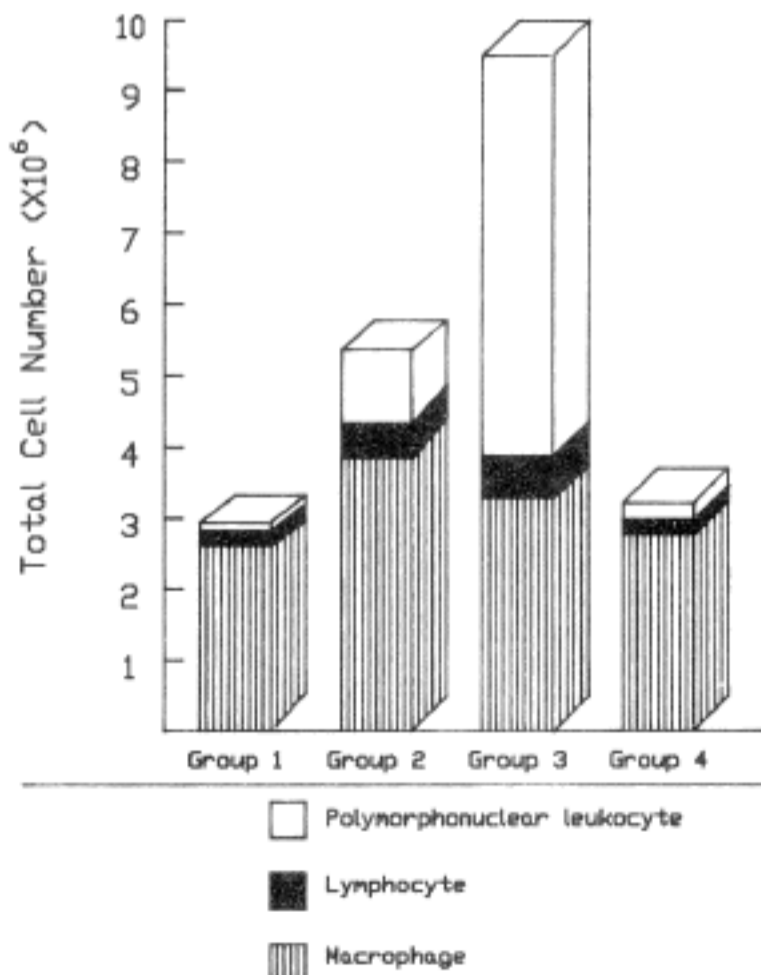
SBAL=Sequential bronchoalveolar lavage

**Table 3.** Cellular composition of bronchoalveolar lavage in experimental rats

Group*	Number of animal	Recovery of infused lavage fluid(%)	Total cells recovered (no. × 10 <sup>6</sup> )	Macrophages (%)	Lymphocytes (%)	Polys (%)
I	10	89.8 ± 2.5*	2.94 ± 0.7	90.4 ± 1.7	7.0 ± 1.4	2.6 ± 0.7
II	13	86.2 ± 2.2	5.32 ± 1.2	72.3 ± 6.9	9.3 ± 1.7	19.4 ± 7.4
III†	16	73.8 ± 2.8	9.50 ± 3.1	34.5 ± 7.7	6.3 ± 1.9	59.2 ± 5.9
IV	24	92.9 ± 1.1	3.22 ± 0.3	86.1 ± 2.8	6.5 ± 1.3	7.4 ± 2.1

\* Data expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

† Group III (p < 0.05) different from group I, II and IV in that total cells recovered and polys ratio in group III were significantly higher than groups I, II and IV whereas recovery rate of infused lavage fluid and macrophage ratio in group III were significantly lower than the rest of the groups.



**Fig. 2.** Total number of effector cells of bronchoalveolar lavage in experimental rats.

는 polypoid 결합조직 덩어리의 형성(그림 4-7), 폐포강측의 상피기저막에 신생결합조직의 부착(그림 8), 폐포강의 섬유화로 인해 폐포의 폐색(그림 9)을 일으키고 폐포강의 섬유화가 폐포벽과 융합하여 심한 폐포구조의 개축을 보였다. 폐포벽은 곳에 따라 폐포대식구의 증식(그림 10)과 함께 폐포간질의 섬유화로 불규칙적으로 비후되었다(그림 11). 특히 세기관지의 입방상피조직의 증식을 보이는 선구조들이 폐포벽이 심하게 파괴되어 허탈을 보인 부위에서 흔히 보였다(그림 12). 전반적으로 임파구, 형질세포와 섬유아세포들의 증가된 침윤이 관찰되었다. 나머지 백서들은 거의 정상구조를 보였다.

**Fibronectin의 면역 조직학적 검색**

제 1 군의 정상백서의 폐에서는 fibronectin이 폐포의 기저막을 따라 소량 염색되었다. 기관지주변의 간질조직에서도 fibronectin의 염색을 볼 수 있었다. 제 2 군인 급성기의 폐에서도 fibronectin은 1군과 차이가 없었으나 폐포대식구에 fibronectin이 염색이 되었다. 제 3 군에서는 fibronectin이 초자양막을 따라 강하게 염색되었다(그림 15). 제 4 군인 만성기의 폐에서는 fibronectin이 폐

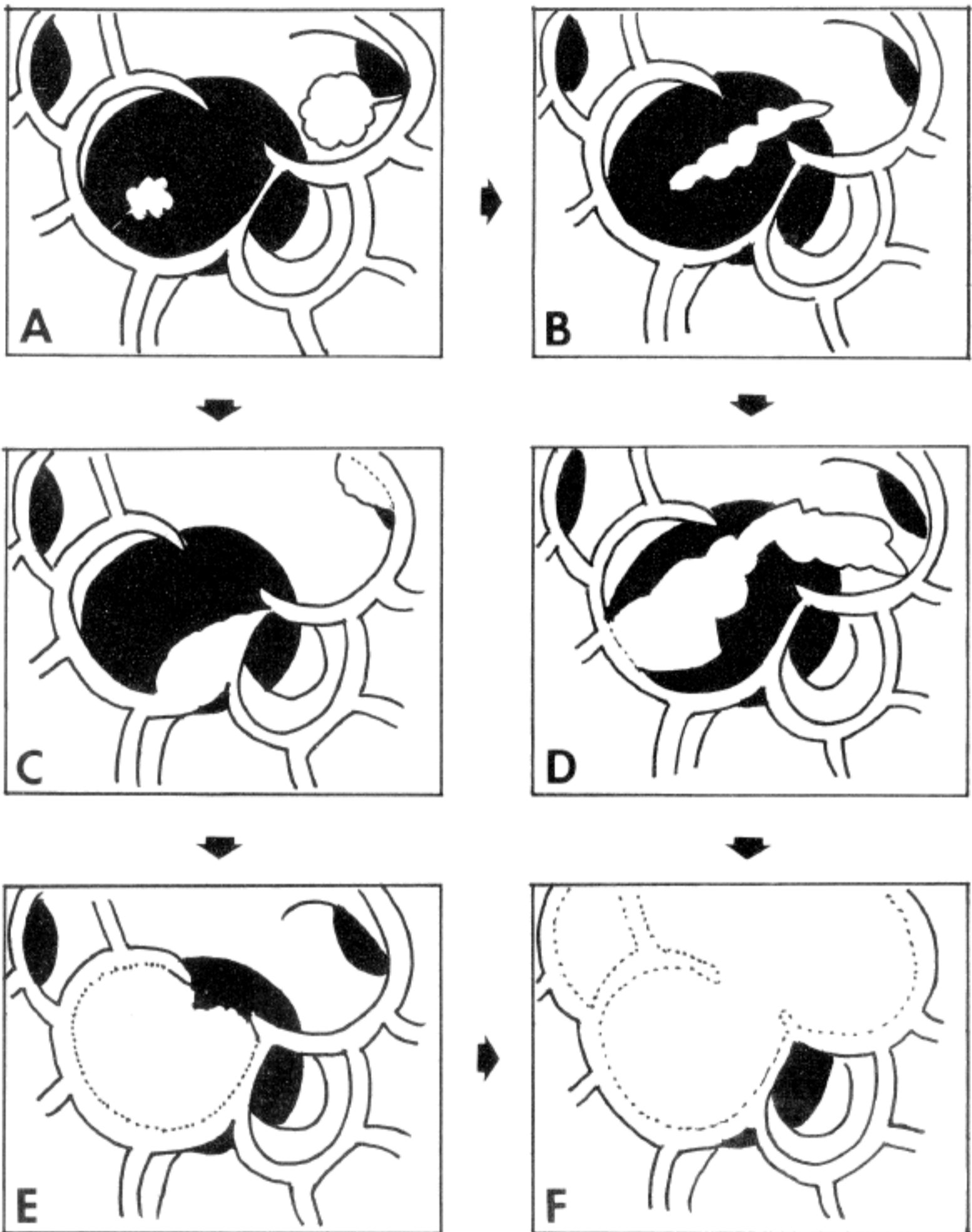
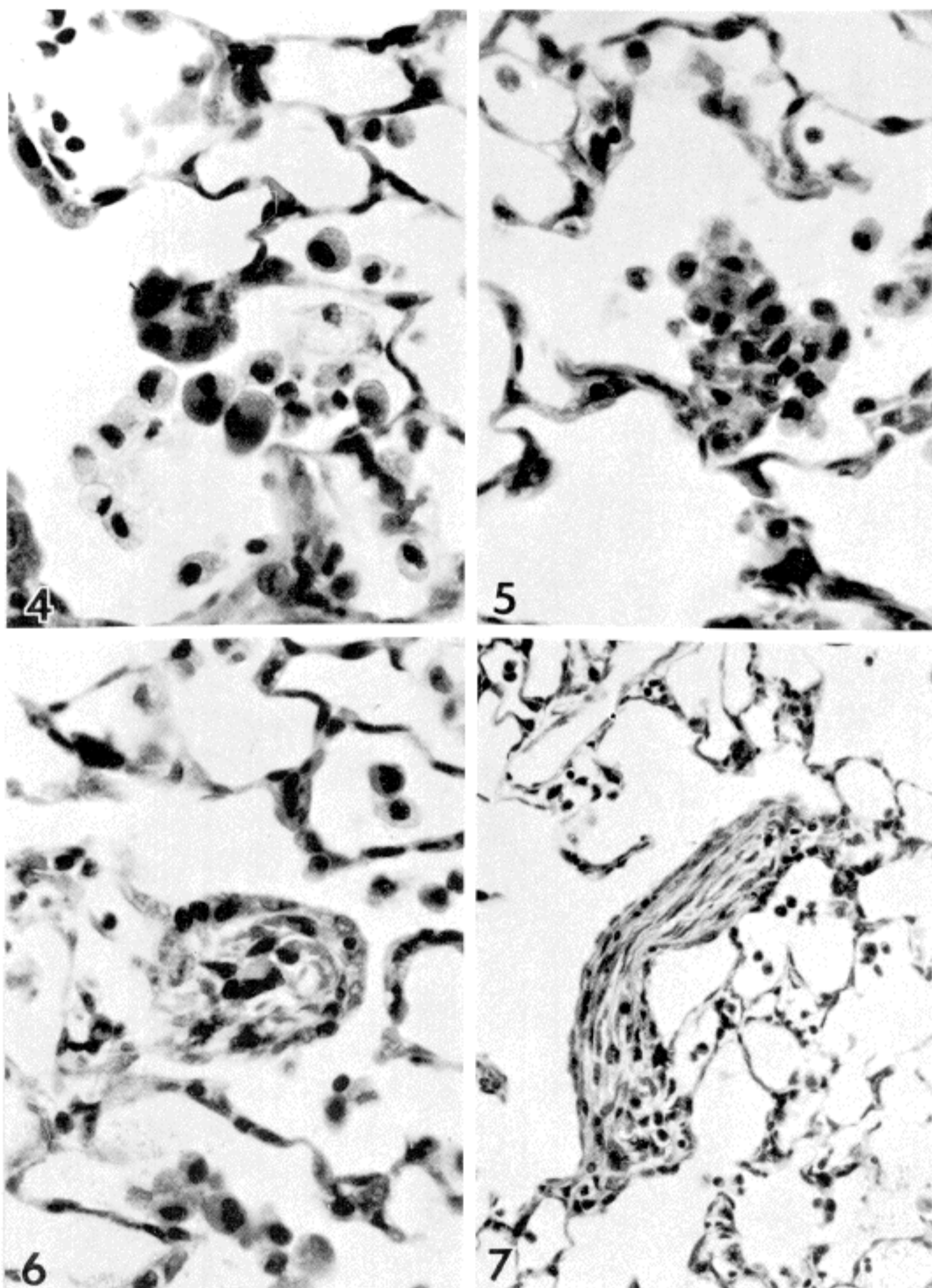


Fig. 3. Pathogenesis of intraalveolar fibrosis in paraquat-induced pulmonary fibrosis. A-Diagram of 2 intraalveolar buds which project into the lumen of alveoli and are attached to the alveolar wall by a thin stalk. B-Diagram of an intraalveolar polypoid mass. C-Diagram of areas of mural incorporation. D-Diagram of an organizing intraalveolar mass in several adjacent alveoli showing partial alveolar dissolution. E-Diagram of an area of obliteration of an alveolus. F-Diagram of an area of pulmonary remodeling related to the obliteration of several adjacent alveoli.



**Fig. 4 and 5.** Light micrograph of rat lung, 1 week after administration of paraquat, 20 mg/kg. Early alveolar bud, made up of alveolar macrophages, is attached to the alveolar wall. Note the proliferation of alveolar macrophages within the alveolar space in figure 4 (hematoxylin-eosin,  $\times 400$ ).

**Fig. 6.** Organizing intralveolar bud, showing fibroblast-like cells and loose connective tissue, surrounded by alveolar macrophages is noted (hematoxylin-eosin,  $\times 400$ ).

**Fig. 7.** Intraluminal polypoid mass involves several adjacent alveolar spaces. Note parallel arrangement of fibroblasts within the intra-alveolar polypoid mass (hematoxylin-eosin,  $\times 200$ ).



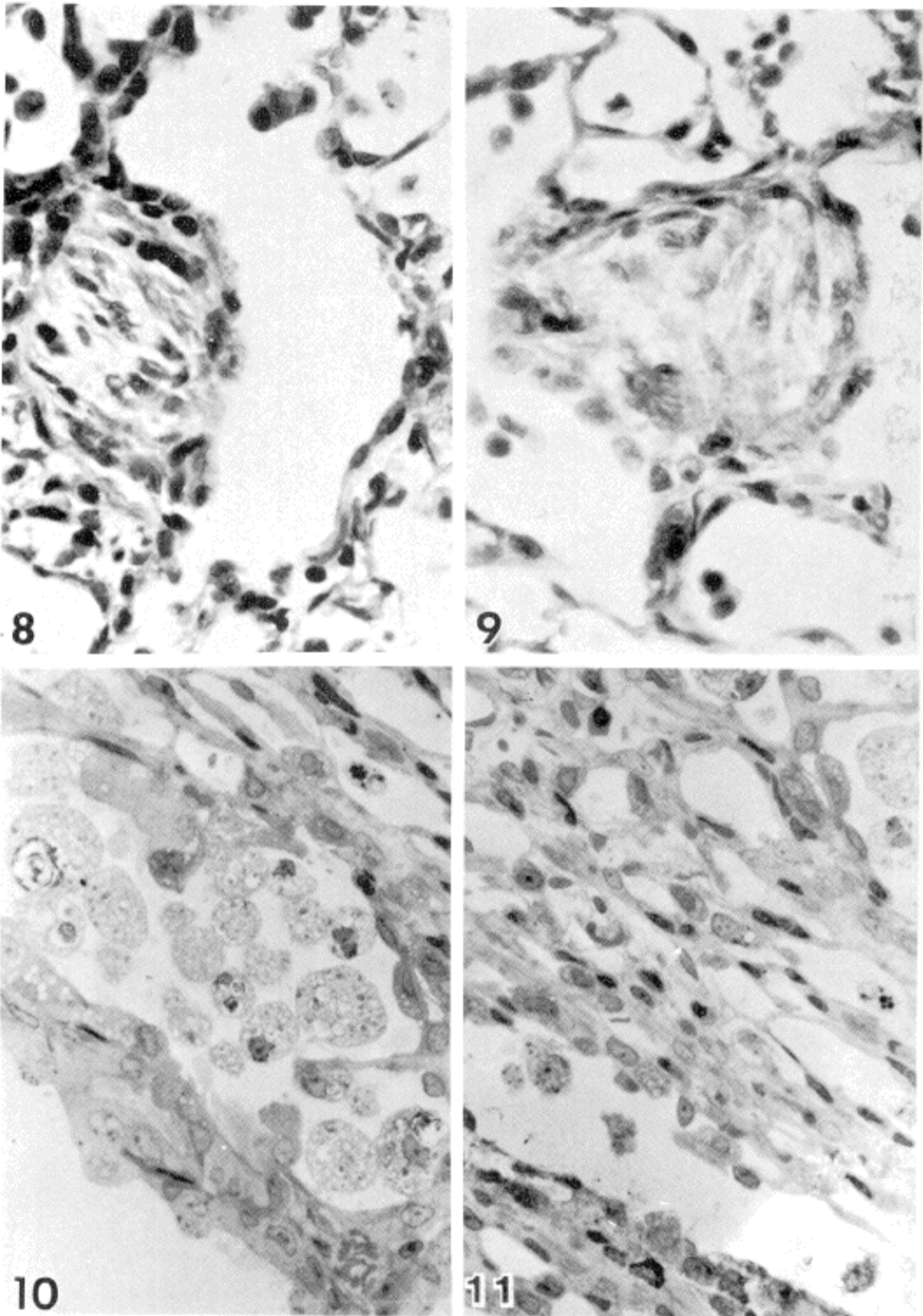


Fig. 8. Area of mural incorporation into the alveolar wall is found (hematoxylin-eosin,  $\times 400$ ).

Fig. 9. Alveolus has been completely obliterated by the mass of loose connective tissue, containing a few inflammatory cells and connective tissue cells (hematoxylin-eosin,  $\times 400$ ).

Fig. 10. Proliferation of alveolar macrophages, containing many heterophagosomes (toluidine blue,  $\times 400$ ).

Fig. 11. Areas of extensive alveolar collapse, replaced by fibroblastic proliferation (toluidine blue,  $\times 400$ ).

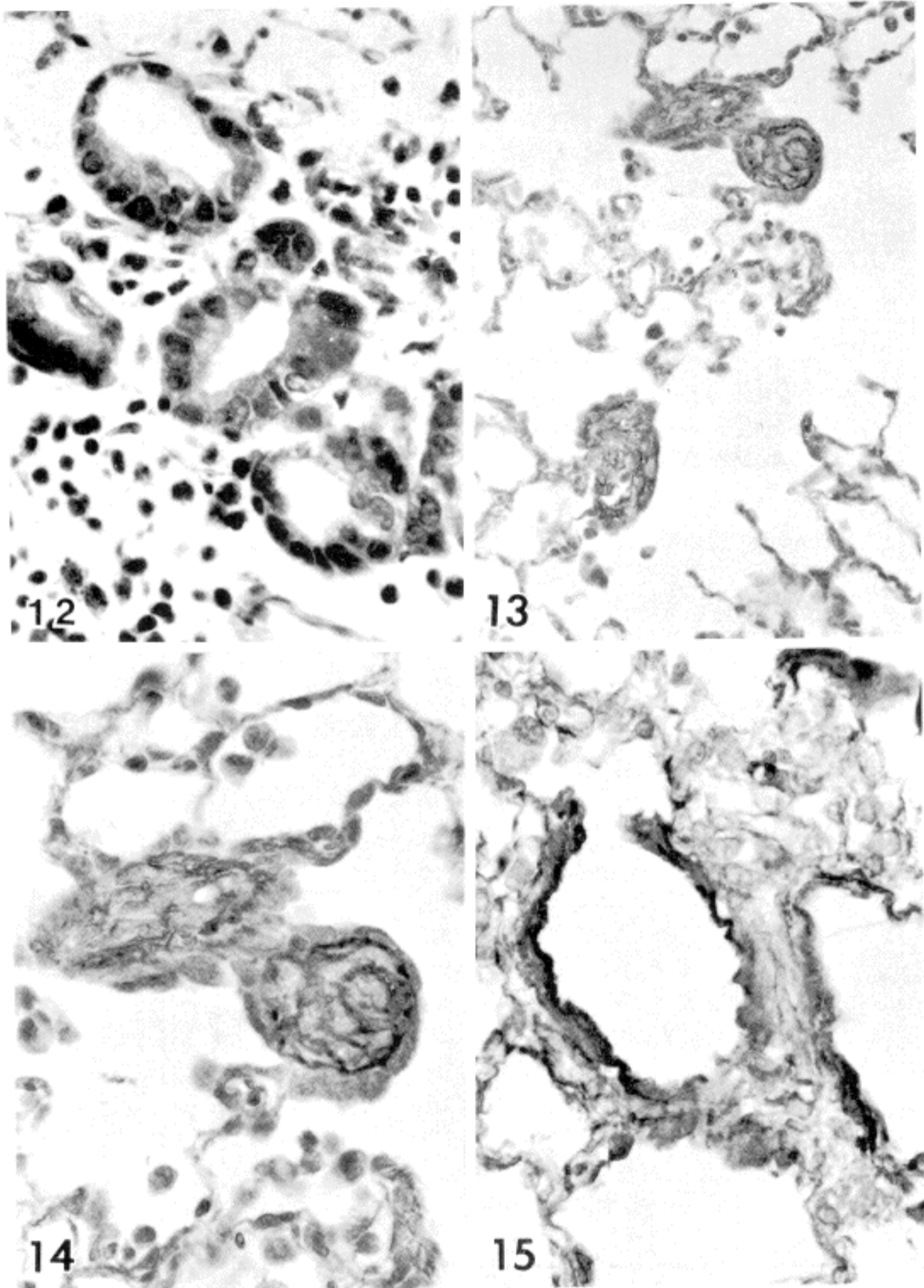
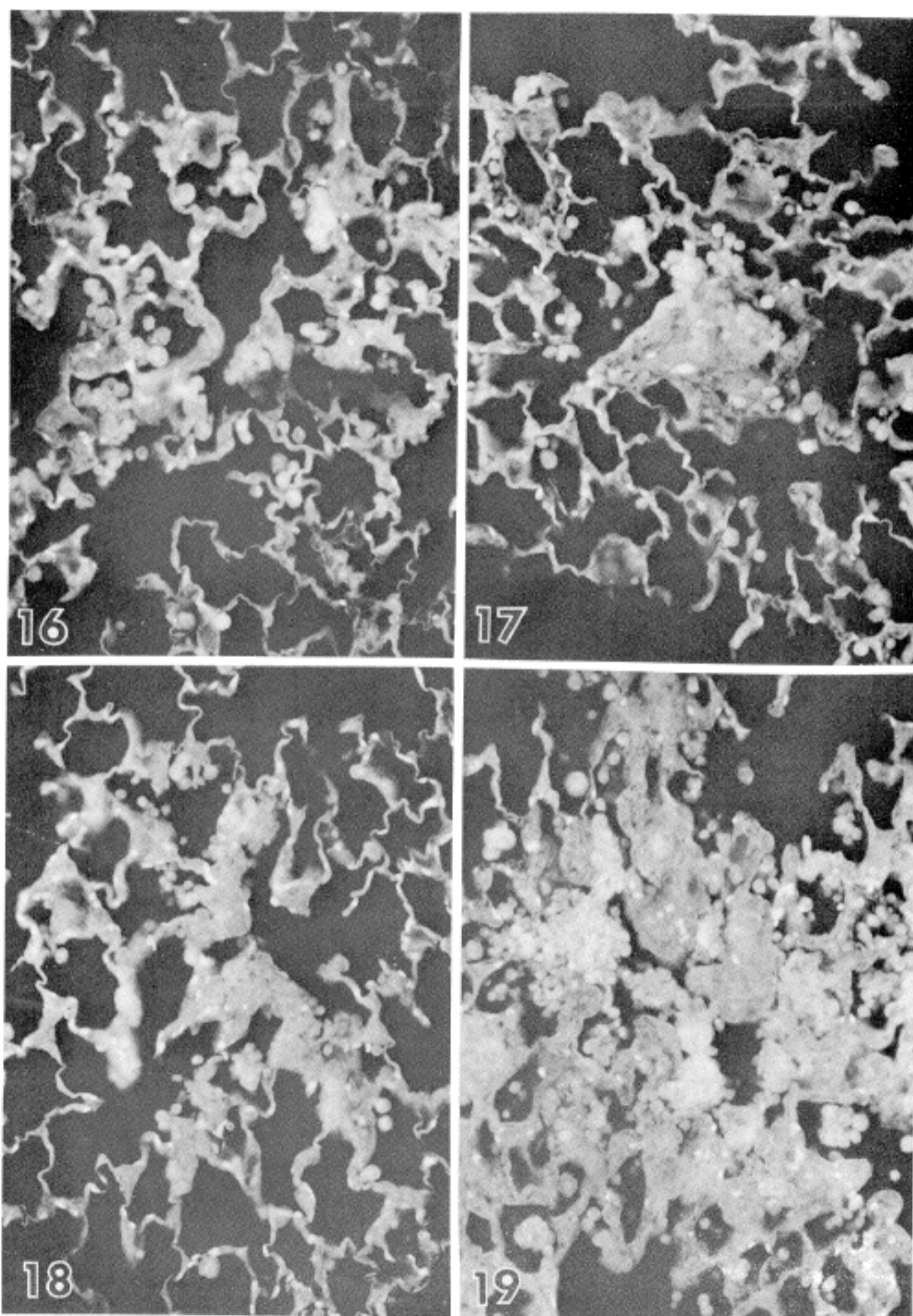


Fig. 12. Proliferation of glandular structures lined by cuboidal epithelial cells (hematoxylin-eosin,  $\times 400$ ).  
Fig. 13 and 14. Two intraalveolar buds projecting into the alveolar spaces, showing positive fibronectin staining (indirect immunoperoxidase stain for antifibronectin,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ).  
Fig. 15. Hyaline membrane, rat lung, died 3 days after administration of paraquat, 40 mg/kg, showing positive fibronectin staining (indirect immunoperoxidase for antifibronectin,  $\times 400$ ).



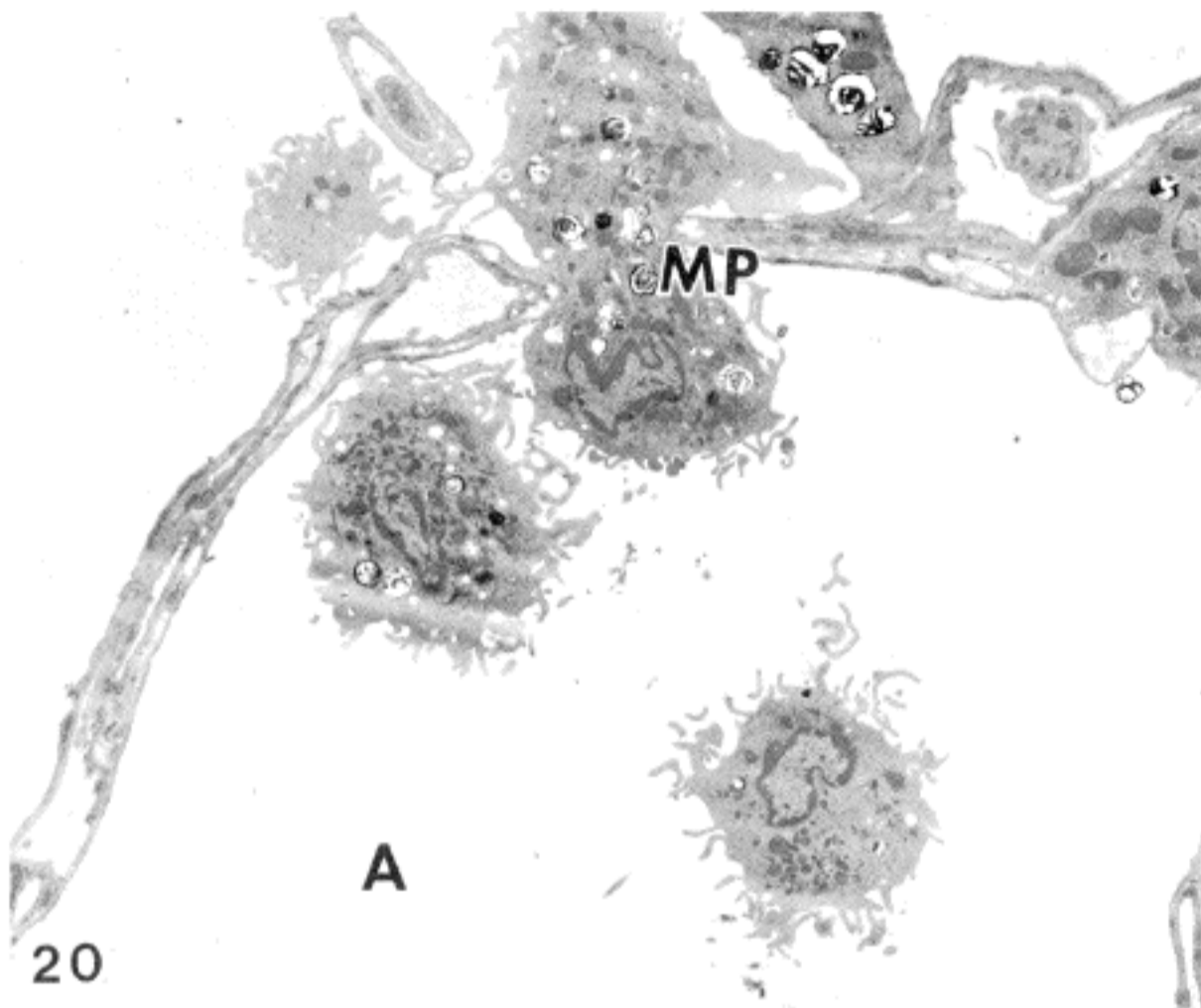
**Fig. 16.** Early intraalveolar buds and proliferation of alveolar macrophages, showing positive fibronectin staining (indirect immunofluorescence for antifibronectin,  $\times 200$ ).

**Fig. 17.** Organizing intraalveolar bud, the surface of which is covered by alveolar macrophages, showing positive fibronectin staining (indirect immunofluorescence for antifibronectin,  $\times 200$ ).

**Fig. 18.** Area of thickened alveolar wall, showing positive fibronectin staining (indirect immunofluorescence for antifibronectin,  $\times 200$ ).

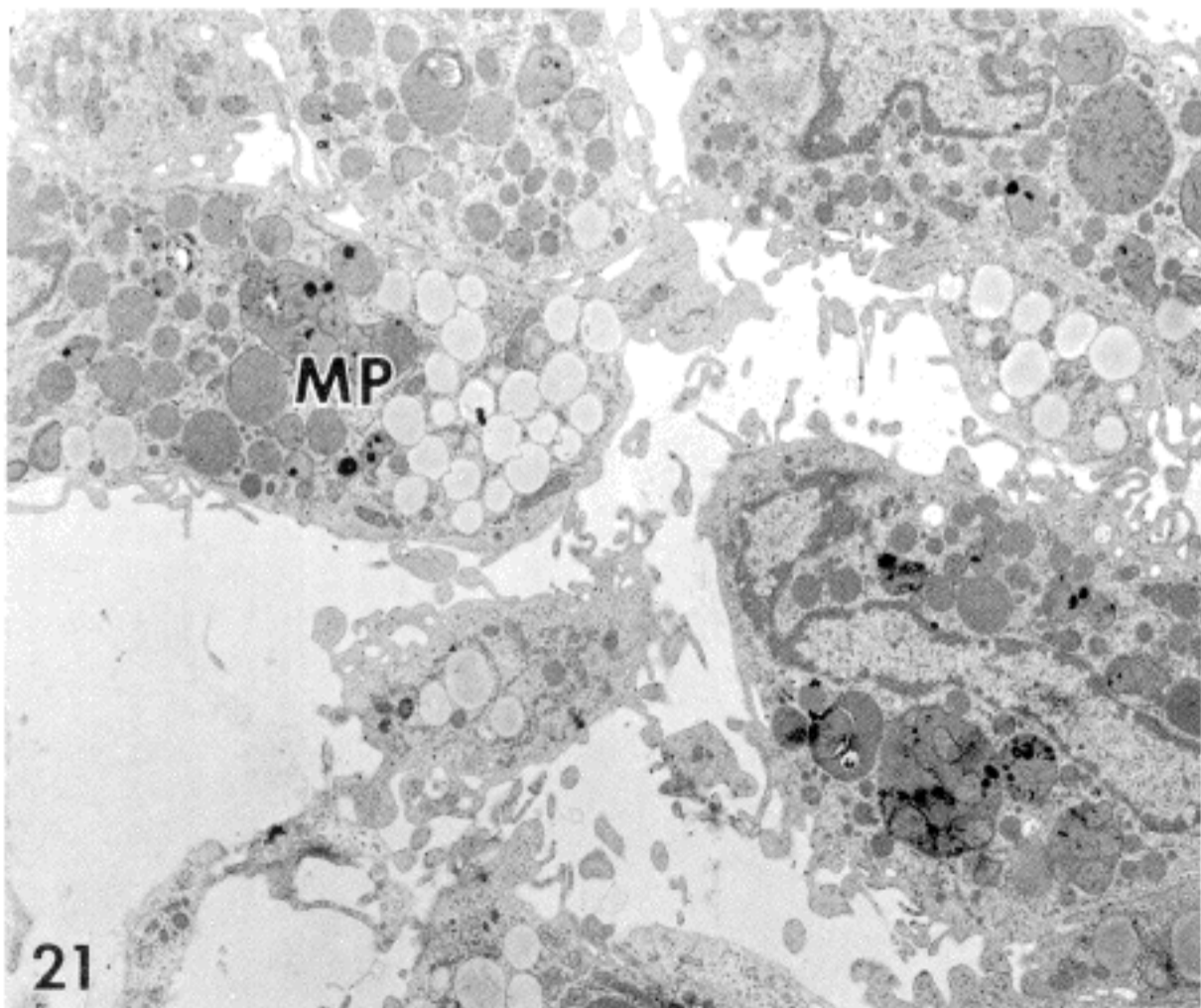
**Fig. 19.** Derangement of alveolar architecture due to multiple intraalveolar buds and thickened alveolar wall, showing positive fibronectin staining (indirect immunofluorescence for antifibronectin,  $\times 200$ ).





**Key for Abbreviation**

A	Alveolus
C	Capillary
Col	Collagen fibrils
F	Fibroblast
GP	Type II alveolar epithelium (granular pneumocyte)
MP	Macrophage
N	Neutrophil
Sm	Smooth muscle



**Fig. 20.** Electron micrograph of rat lung, 1 day after paraquat treatment of 10 mg/kg. Macrophages are passing through a gap of epithelial basement membrane into the alveolar space (original magnification,  $\times 2,500$ ).

**Fig. 21.** Electron micrograph of rat lung, 1 week after paraquat administration of 20 mg/kg. Earliest intraalveolar bud, composed of proliferating macrophages (original magnification,  $\times 4,000$ ).

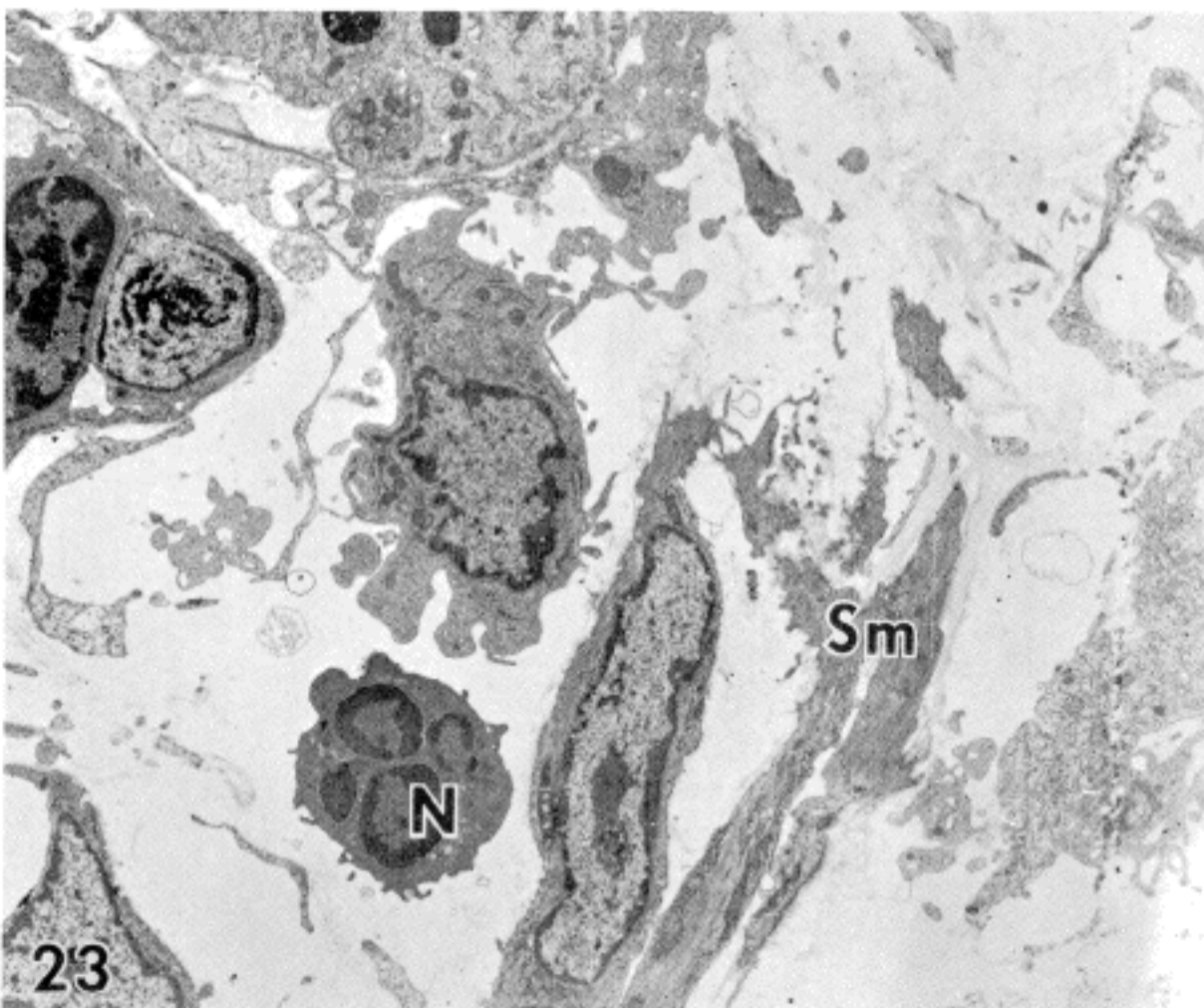
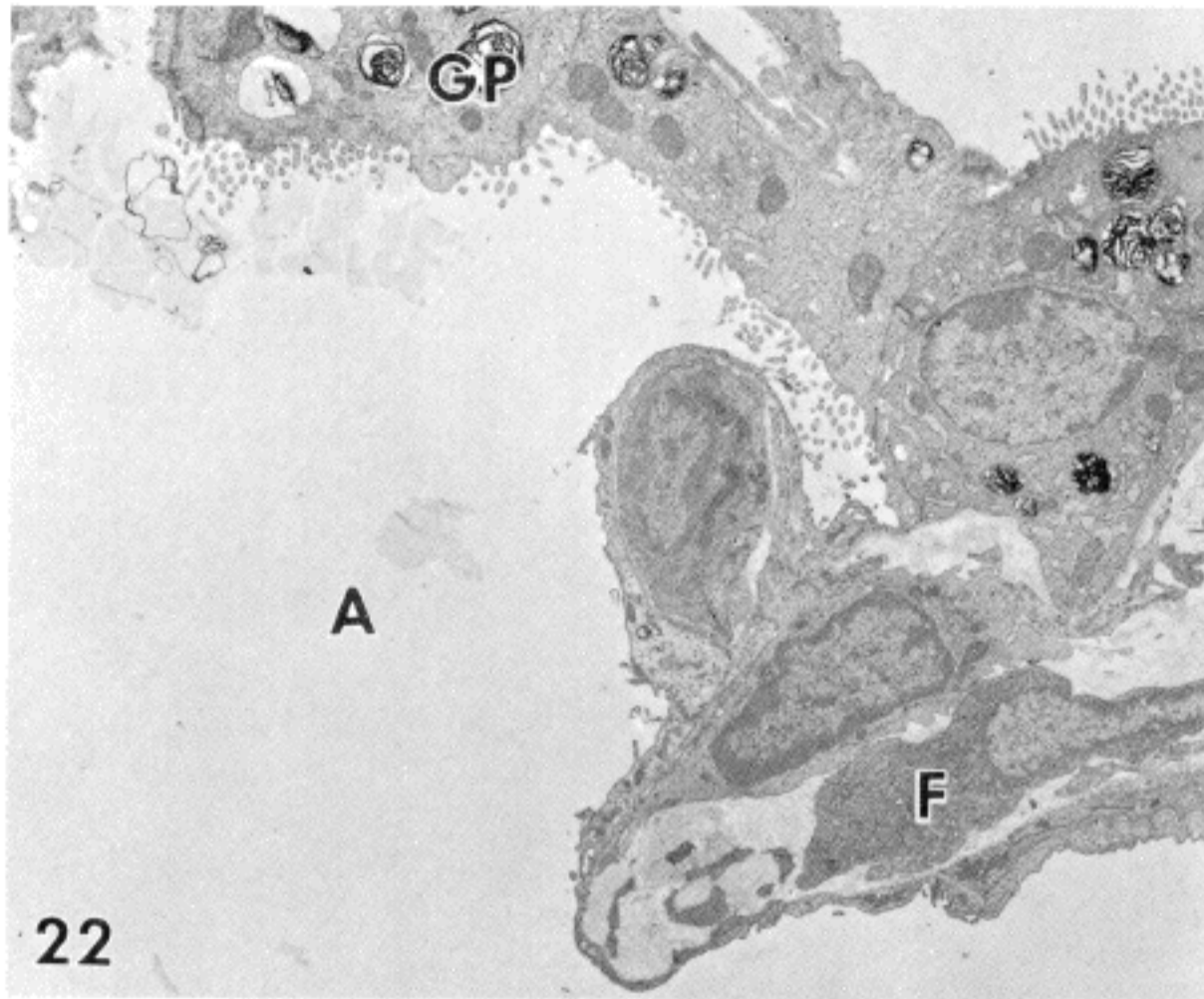
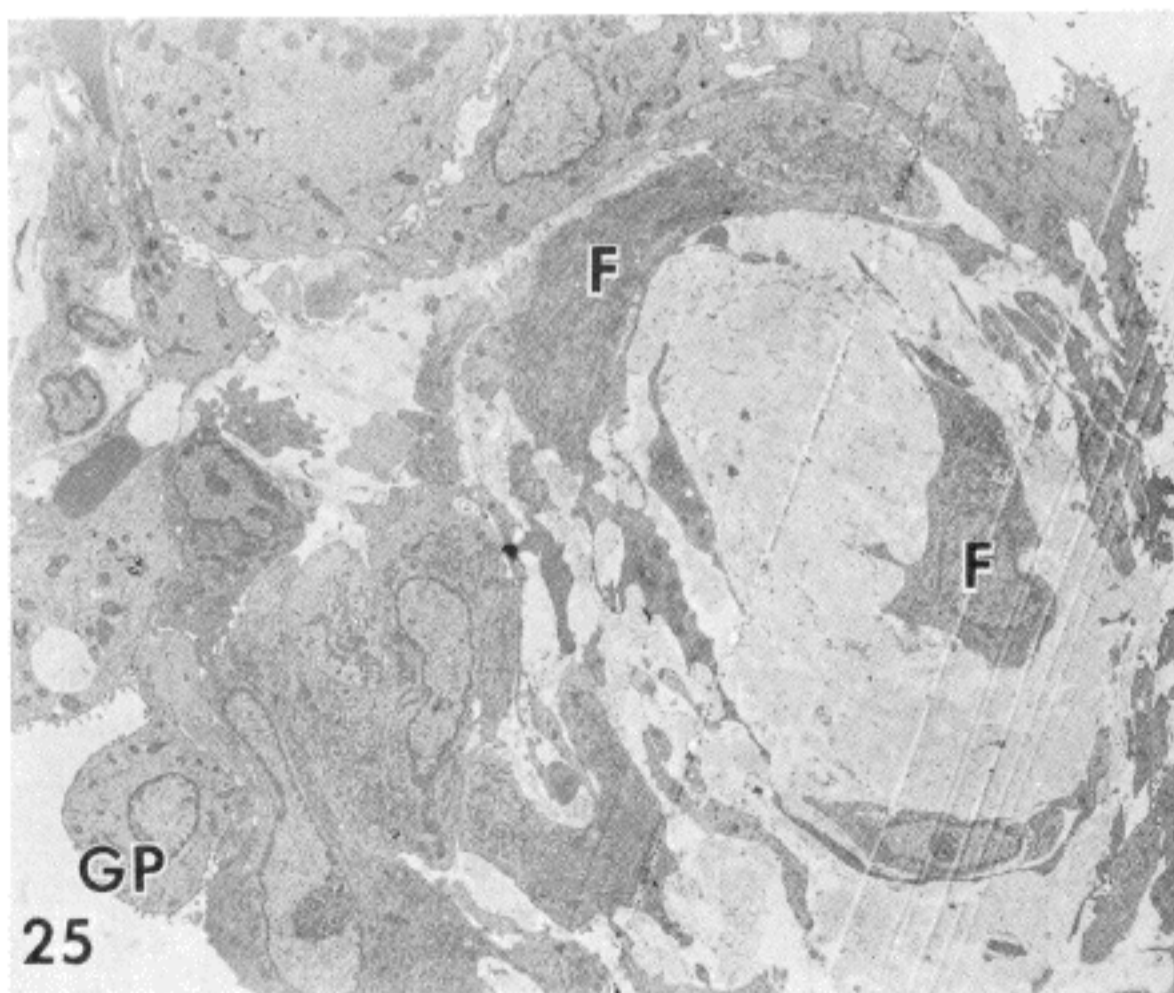
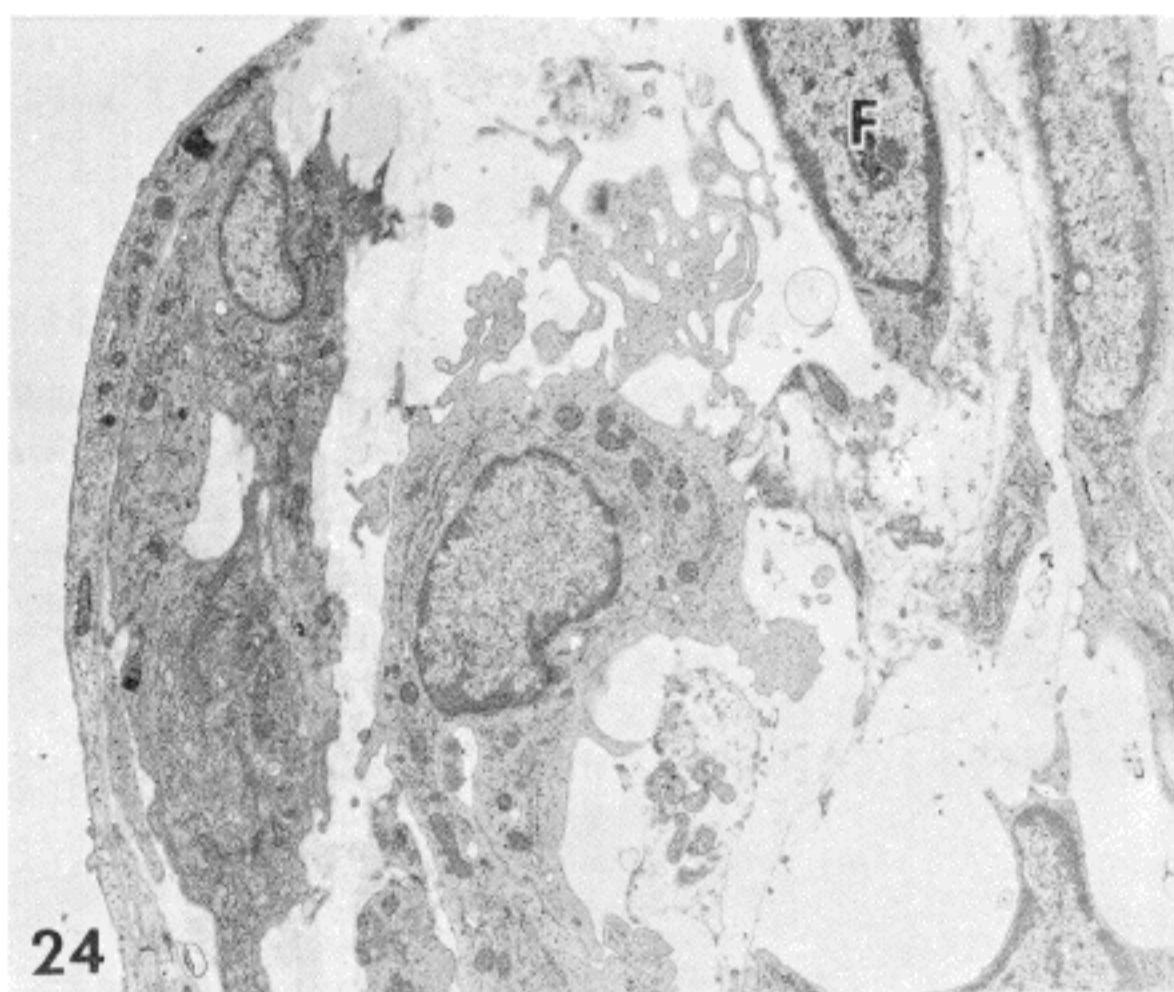


Fig. 22. Same lung as shown in figure 21. An intraluminally extruding fibroblast is found (original magnification,  $\times 2,000$ ).

Fig. 23. Same lung as shown in figure 21. Early intraalveolar bud, showing neutrophils, macrophages, smooth muscle cells and fibrillar stroma (original magnification,  $\times 4,000$ ).





**Fig. 24.** Electron micrograph of rat lung, 1 week after paraquat treatment of 20 mg/kg. Another area of early alveolar bud composed of fibroblasts, macrophages, cell debris and loose connective tissue, covered by thin, elongated alveolar epithelial cells (original magnification,  $\times 4,000$ ).

**Fig. 25.** Electron micrograph of rat lung, 2 days after paraquat administration of 30 mg/kg. Low magnification view of an organizing intraalveolar bud, the surface of which is covered by alveolar epithelial cells. The bud contains connective tissue cells in a very loose stroma (original magnification,  $\times 2,000$ ).

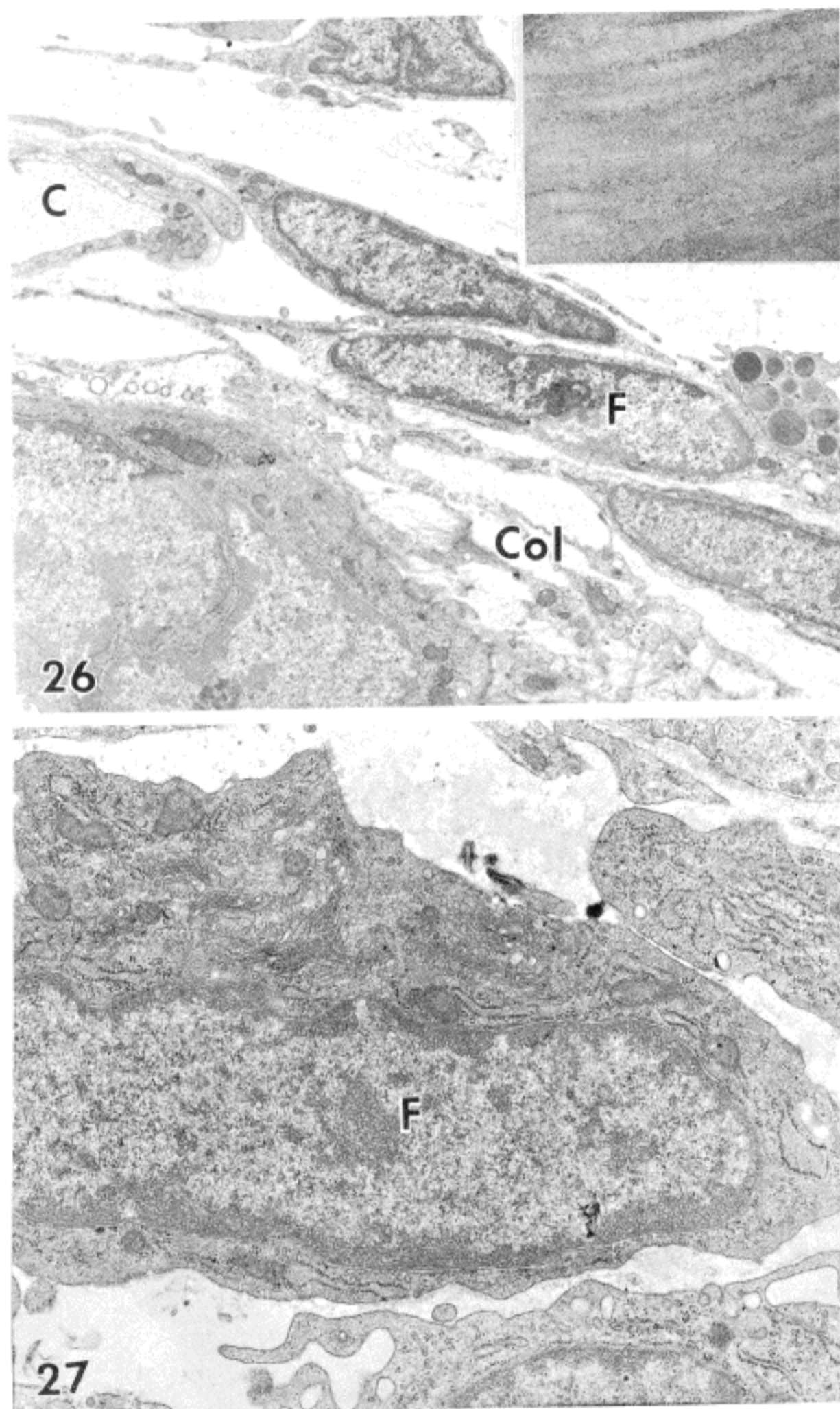


Fig. 26. Electron micrograph of rat lung, 8 weeks after paraquat administration of 40 mg/kg. Parallel arrangement of fibroblasts, collagen fibrils and amorphous electron-dense materials within the area of interstitial fibrosis (original magnification,  $\times 5,000$ ). Inset shows the details of collagen fibrils ( $\times 50,000$ ).

Fig. 27. Same lung as shown in figure 24. Details of a bud, showing fibroblast and loose connective tissue composed of finely fibrillar material (original magnification,  $\times 4,000$ ).

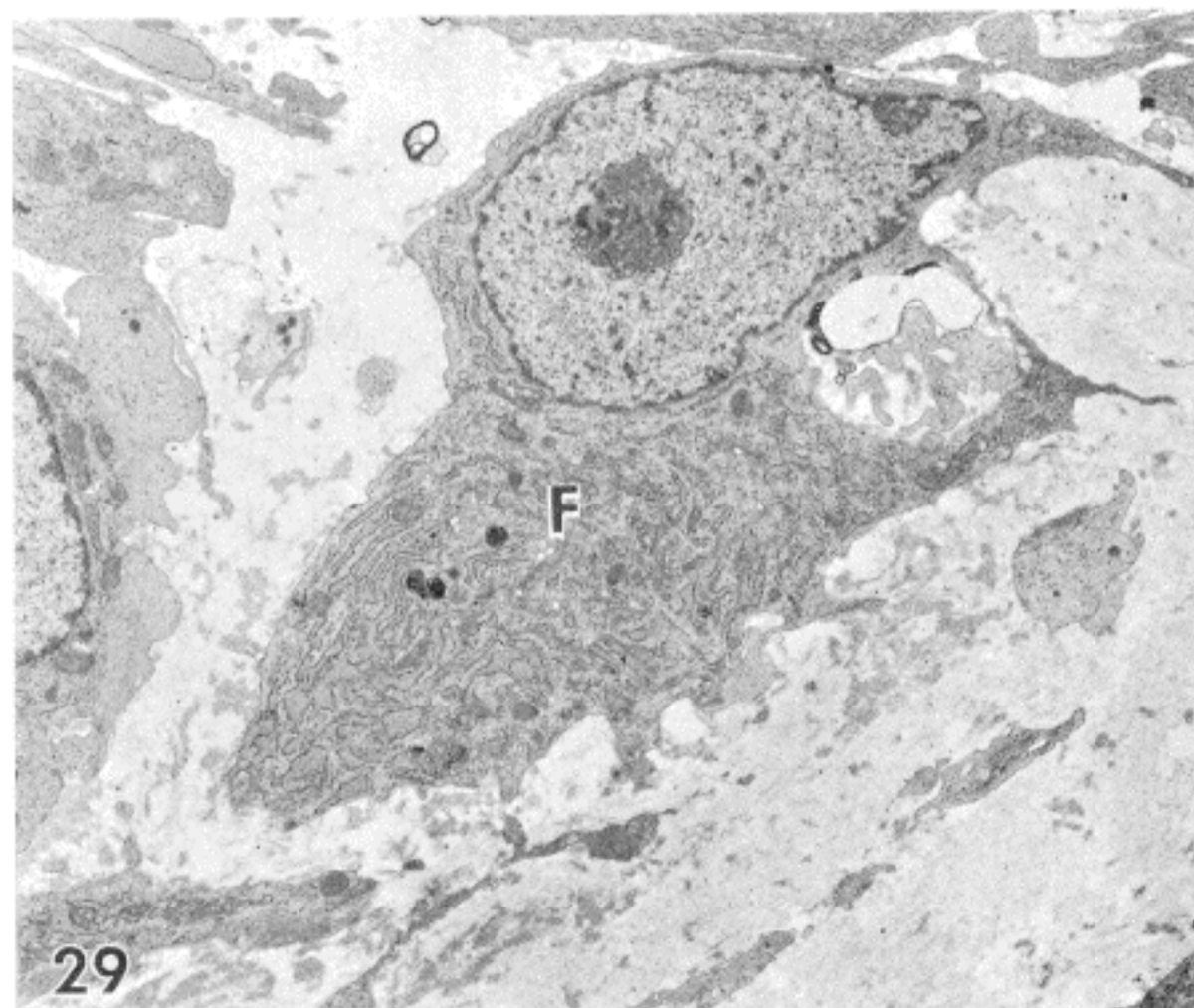
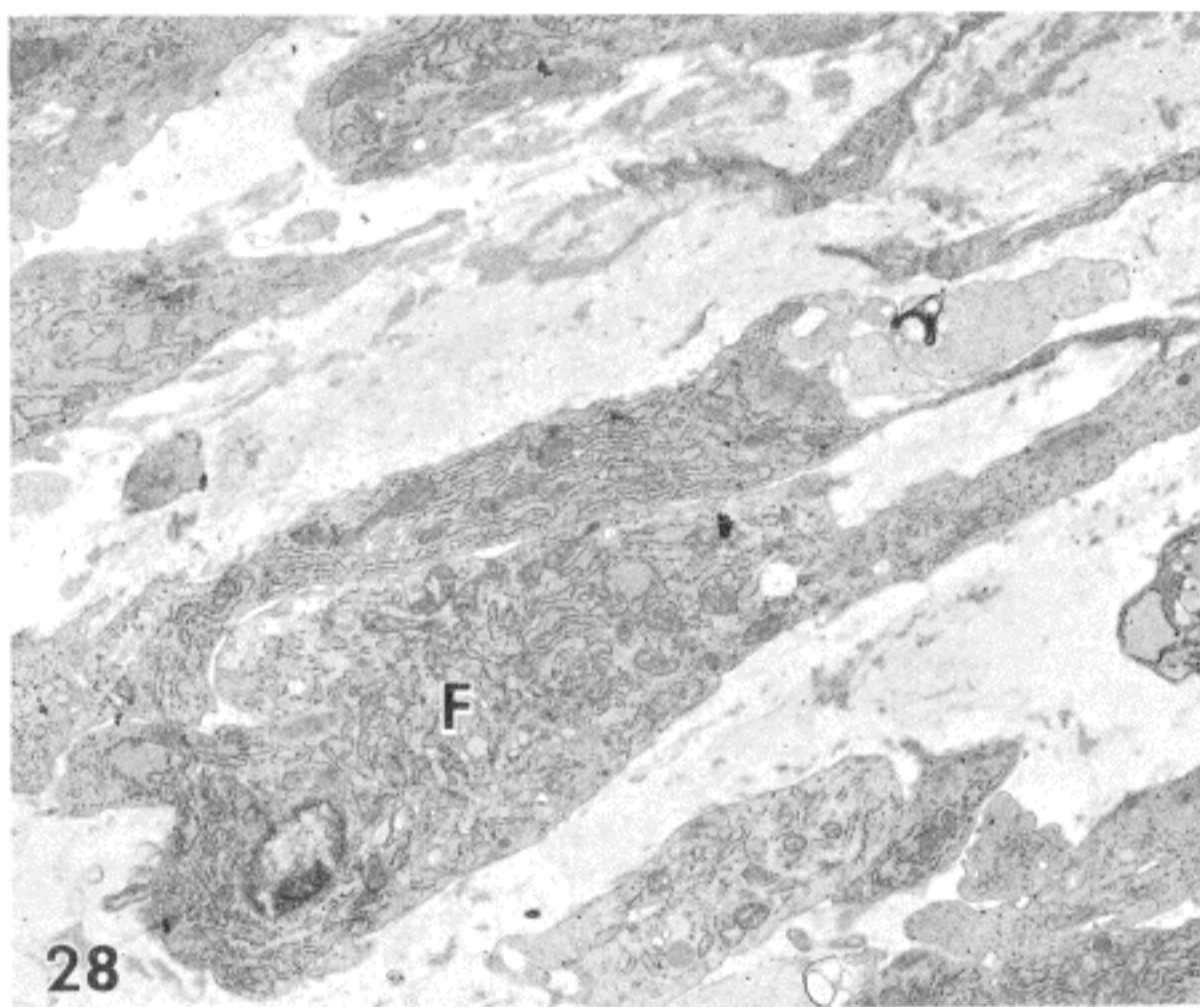


Fig. 28 and 29. Same lung as shown figure 24. Intraalveolar bud contains proliferating active fibroblasts, cell debris, fibrin, and other cells, including a macrophage. The fibroblast in figure 29 has prominent nucleolus and well-developed rough endoplasmic reticulum (original magification,  $\times 4,000$ ).



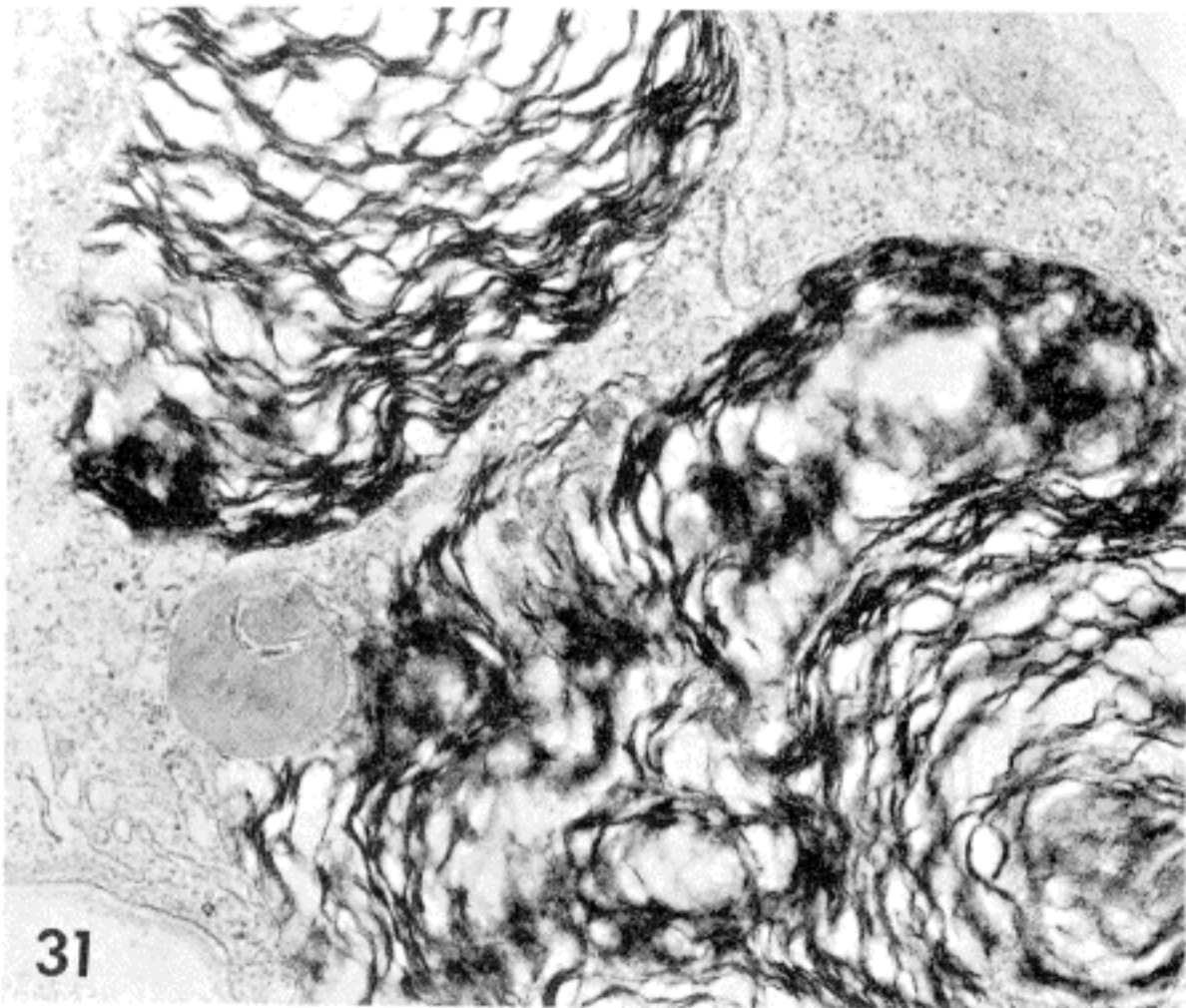
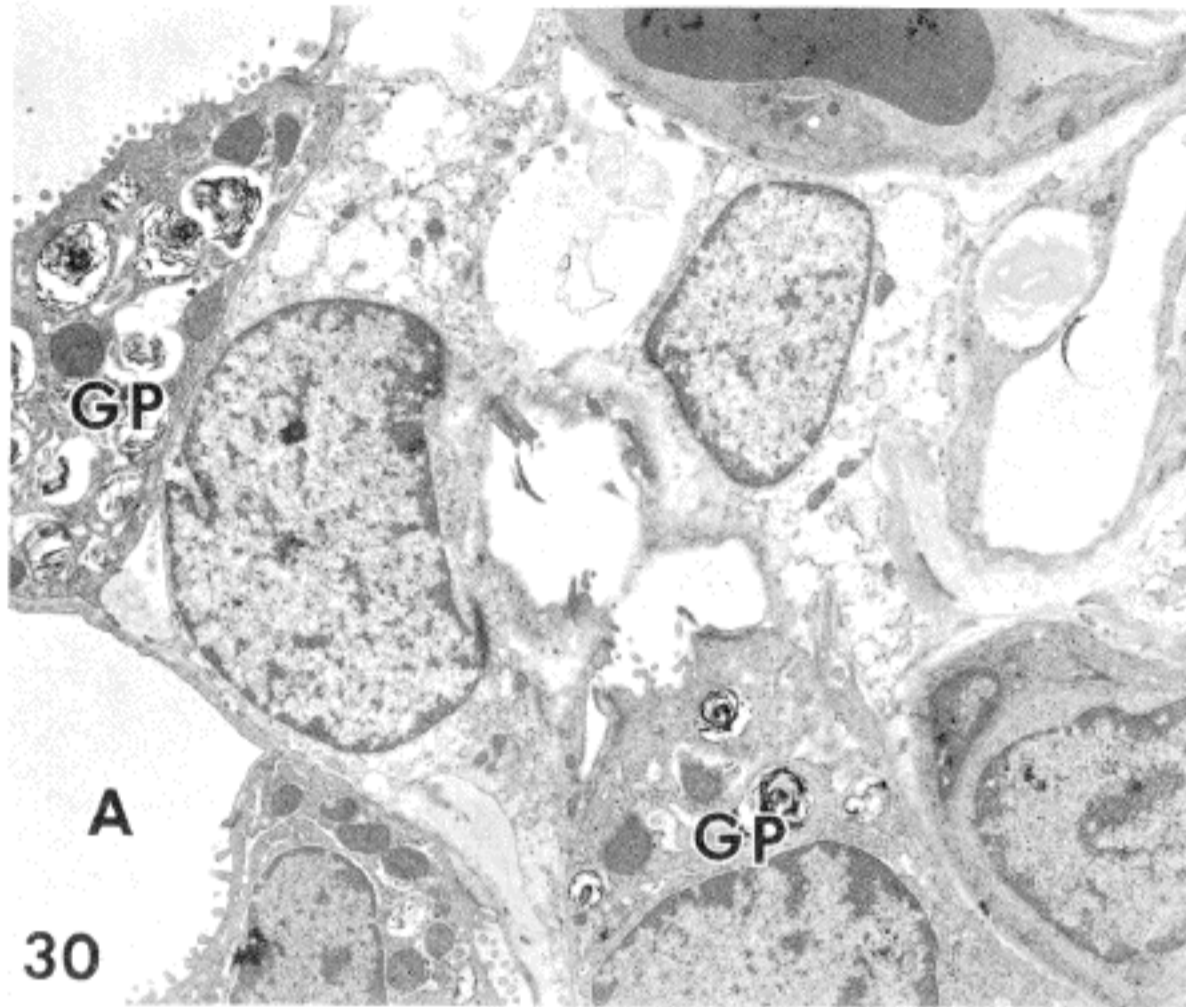
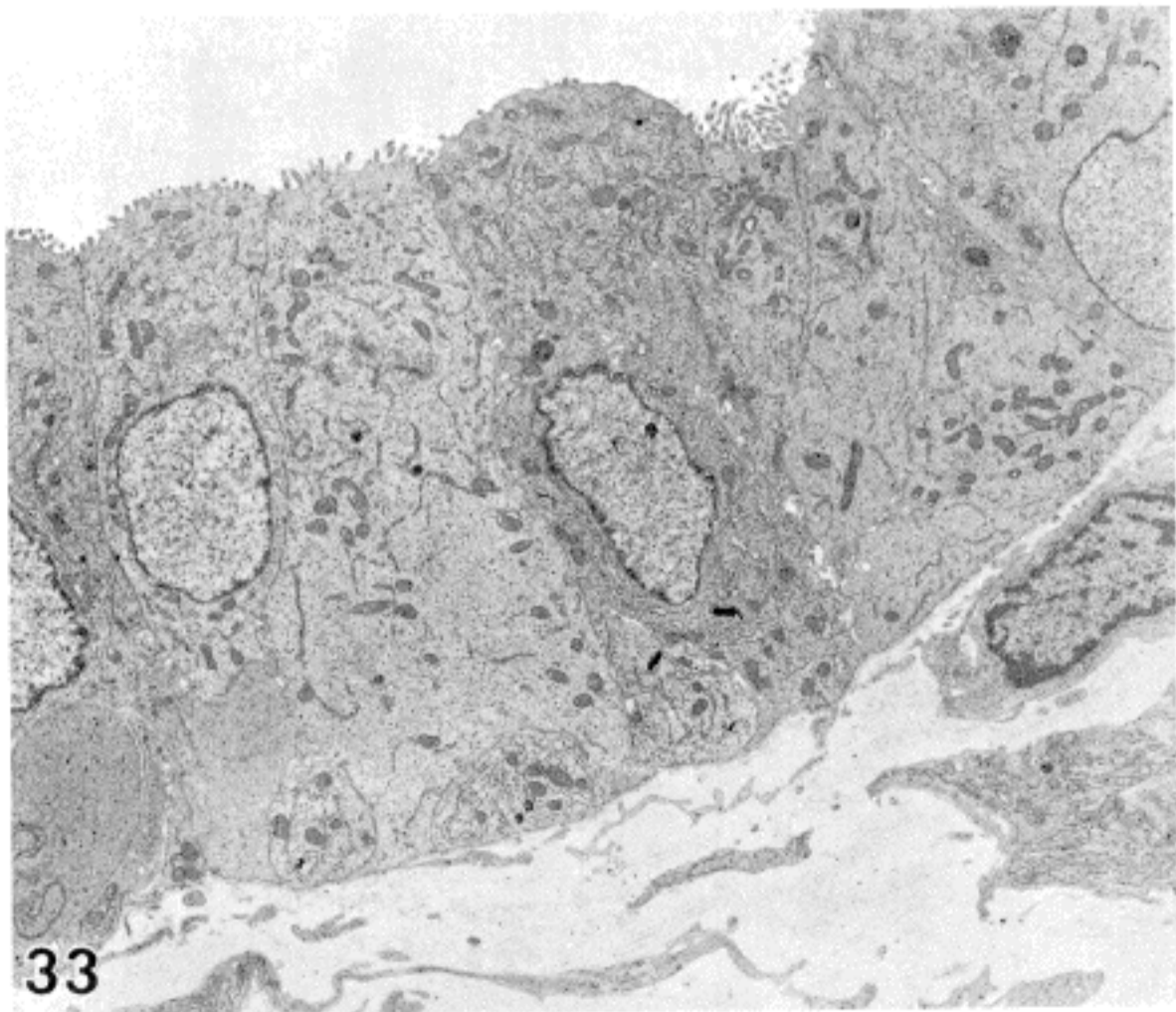
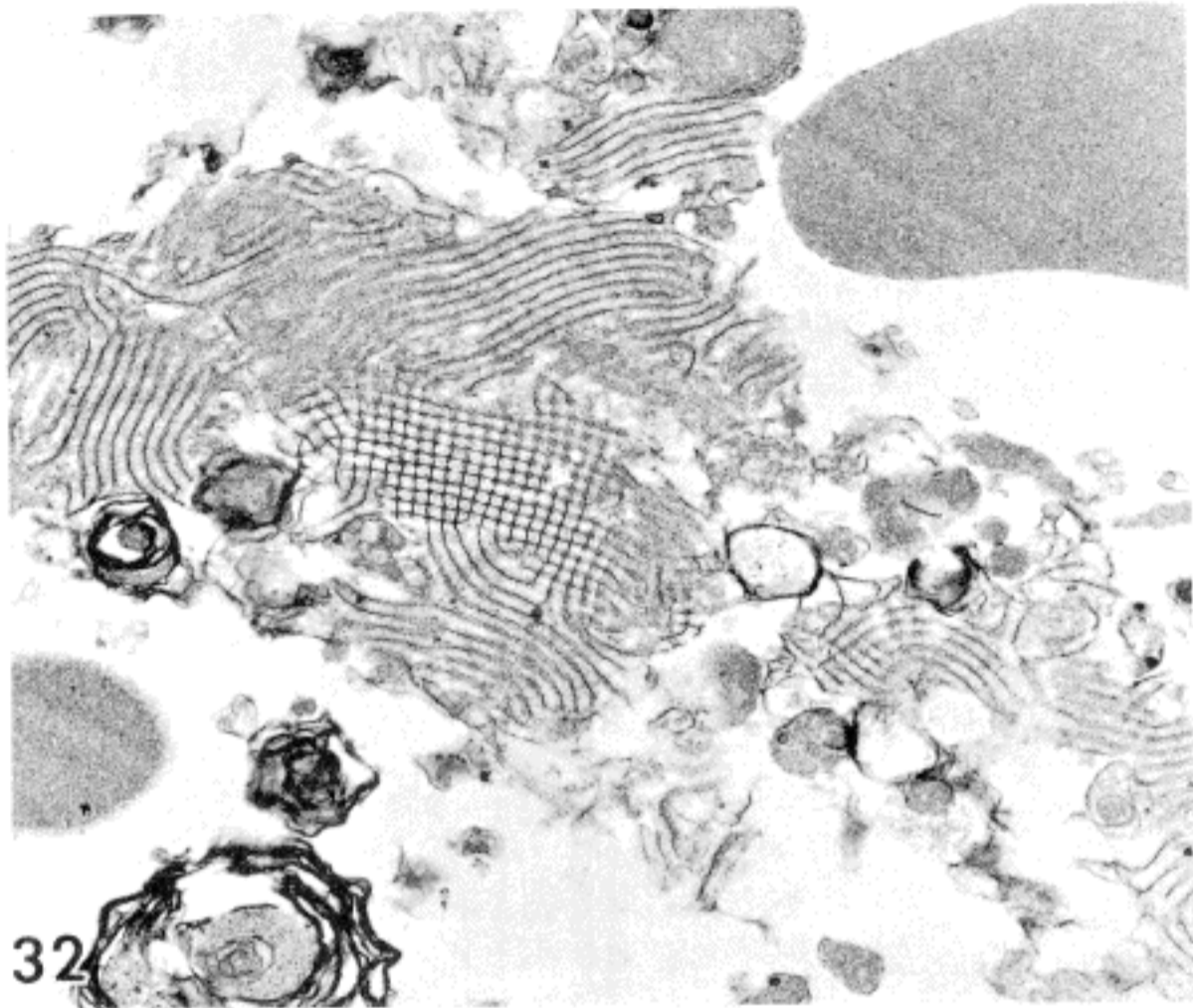


Fig. 30. Electron micrograph of rat lung. 10 weeks after injecting paraquat of 20 mg/kg, into the peritoneal cavity. Proliferation of regenerating type II alveolar epithelial cells (original magnification,  $\times 4,000$ ).

Fig. 31. Same lung as shown in figure 21. Giant multilamellar body formations in the type II alveolar epithelial cells (original magnification,  $\times 25,000$ ).



**Fig. 32.** Same lung as shown in figure 24. Surfactant material under high magnification, showing latticed structures lying free in the alveolar lumen (original magnification,  $\times 20,000$ ).

**Fig. 33.** Same lung as shown in figure 21. A glandlike structure is formed within the lumen of an alveolus by regenerating alveolar epithelium, consisting of type II alveolar epithelial cells recognizable by their microvilli in their luminal surfaces (original magnification,  $\times 3,000$ ).



포강 밖의 중심부와 섬유화된 간질, 그리고 증식된 폐포 대식구내에서도 강하게 염색되었다(그림 13, 14, 16-19).

#### 기관지폐포세정액의 fibronectin의 EIA

##### 연구결과

본 연구에서 시도한 fibronectin의 정량측정에는 실패하였다.

##### 전자현미경적 소견

광학현미경으로 정상구조를 보인 제 1 군은 전자현미경적소견상 I형폐포상피세포, II형폐포상피세포, 모세혈관과, 폐포벽내 간질조직의 정상적인 배열을 보였다. I형폐포상피세포는 평평한 세포질로 폐포벽 상방을 덮고, 둥근 II형폐포상피세포의 가장자리와 붙어 있었다. II형폐포상피세포는 주로 폐포벽의 두꺼운 부위에 위치했다. II형세포의 세포막은 내강측에 미세융모와 기저면에 microfoldings를 가졌다. 간질세포는 자신의 세포질돌기를 II형상피세포 기저막의 갈라진 틈을 통해 뻗어 II형상피세포 기저막의 microfoldings와 접촉하였다. 폐포모세혈관의 내피의 세포질은 기강측에서 얇고 막성(membranous)으로 공기와 혈관의 관문을 이루었다. 모세혈관과 상피기저막은 여러 곳에서 융합하여 하나의 기저막을 형성하였다.

Paraquat 투여후 급성기의 제 2 군과 3군의 폐는 폐포강내에 삼출물로 차여 있었고 상피와 모세혈관 기저막은 많은 곳에서 해리되었다. 폐포강과 폐포벽내에 소수의 호중구와 대식구들의 침윤이 관찰되었다. 미세혈관의 내피 세포들은 손상은 없었으나 세포질내에 세포흡수소포들의 형성이 저명하였다. 기저막의 단열부위를 따라 폐포대식구의 이동과 함께 폐포강내에 총판소체들을 탐식한 폐포대식구의 증식도 관찰되었다(그림 20). II형폐포상피세포들은 제한된 범위에서 증식하여 하부의 섬유아세포들과 접촉하였다. 일부 II형상피세포는 신장되고 세포질내의 총판소체는 커지고 수는 감소하였다. 또한 폐포강내에 유리된 총판소체들을 볼 수 있었다. 폐포벽은 심한 부종을 보였다. 어떤 곳에는 폐포강에 활성화된 섬유아세포가 기저막에 부착되어 있었다. 2개의 연결된 II형상피세포들이 기저막의 결손부위를 덮고 있는 부위도 역시 관찰되었다.

제 4 군의 paraquat 주사후 1주에서 10주까지 생존한 백서의 폐에서 폐포강내 섬유화를 보이는 곳에는 폐포강내에 많은 대식구(그림 21), 섬유아세포와 염증세포들을

가졌다. 섬유아세포가 폐포강내로 돌출하는 장소(그림 22)와 함께 때때로 평활근섬유들도 관찰되었다(그림 23-25). 폐포강내로 돌출하는 세포의 표면은 미용모를 보이는 II형상피세포로 싸여 있었다(그림 24, 25). 폐포강내 섬유화된 곳은 평행하게 배열된 섬유아세포들로 구성되고 기질은 미세필라멘트와 교원섬유로 구성되어 있었다(그림 26). 폐포강내 교원섬유는 속(束)을 형성하고 때로는 나선형을 이루었다. 곳에 따라 세포질내에 흔히 actin과 유사한 미세필라멘트를 형성하여 근섬유아세포의 초미세형태학적 소견을 보였다(그림 27). 이런 세포들은 자주 II형 폐포상피세포의 기저면의 microfolding과 긴밀하게 부착되었다. 때때로 분명한 핵소체와 증식된 조면세포질내세망(rough endoplasmic reticulum)을 가지는 활성화된 섬유아세포의 증식도 관찰되었다(그림 28, 29). 섬유화 병소는 주로 폐포강내에 존재하여 폐포의 허탈과 폐포벽의 유착이 수반되었다. 허탈된 폐포와 폐포강내 섬유화된 병소에 물결치는 모양의, 불연속적인 상피기저막이 흔히 발견되었다. 섬유화된 부분에 II형상피세포의 계속된 증식은 제한되어 전폐포를 채울 정도로 심하지는 않았다(그림 30). II형상피세포의 미용모의 수는 감소되고 II형상피세포의 기저면의 microfolding 수도 감소되었다. II형상피세포는 커져서 거대 총판소체를 가져(그림 31) 폐포강내에 돌출하였다. 폐포강내에 유리된 표면 활성제(surfactant)는 막성의 격자상(lattice-like) 구조를 보였다(그림 32). 폐포강내에 자주 폐포대식구가 부종을 일으켜 다양한 밀도와 형태를 가지는 heterophagosome을 가졌다. 폐포가 심하게 파괴되어 허탈을 보이는 지역에 증식된 선구조들의 입방형상피세포는 기강면에 미용모를 보이는 II형상피세포로 밝혀졌다(그림 33). 폐포강내 섬유화를 보이지 않는 폐포는 단지 기종성 확장을 보였다.

## 고 찰

간질성폐질환은 만성경과를 취하는 하부호흡기의 비감염성질환으로 폐포벽의 염증과 폐포간질의 장애를 일으켜 폐포-모세혈관단위의 상실을 초래한다. 이로 인해 공기에서 혈액내로의 산소이동에 지장이 생기고 더 진행되면 중요한 장기의 산소부족으로 사망하게 된다<sup>56)</sup>. 만성간질성폐질환은 대개 반흔조직의 축적을 보이므로 “섬유성폐질환”이라고도 한다<sup>58,59)</sup>. 모든 간질성폐질환의

2/3는 원인불명이다. 특발성폐섬유증은 Hamman과 Rich가 1935년 처음 발표한 후 Liebow<sup>21)</sup>에 의하여 낙설성간질성폐렴과 통상간질성폐렴으로, 그후 Scadding<sup>60)</sup>에 의해 fibrosing alveolitis로 분리되었다.

지난 십년동안 기관지폐포세정법의 도입으로 폐질환의 규명에 새로운 차원을 이루었다<sup>38-40)</sup>. 기관지폐포세정액의 세포분석으로는 면역주효체세포들의 대체적 분포를 알 수 있는데, 즉 염증이 기관지에서 생겼는지 폐포를 포함한 말초폐조직에서 생겼는지를 지적해 준다. 특발성폐섬유증에서 염증세포의 면역주효체세포들중 폐포대식구와 호중구의 절대적인 증가를 보인다<sup>37)</sup>. 본 실험에서 대조군인 정상백서에서 총세포수는  $2.94 \pm 0.7 \times 10^6 / 30 \text{ cc}$ 였고 대식구, 임파구 및 다핵백혈구의 백분율은 각각  $90.4 \pm 1.7\%$ ,  $7.0 \pm 1.4\%$ 와  $2.6 \pm 0.7\%$ 였으며 대식구의 백분율은 회수가 거듭됨에 따라 증가되고 다핵백혈구는 감소되었다. 이 결과는 Kawanami 등<sup>38)</sup>에 의한 연구와 일치되는 성적이다. 본 실험에서 급성기인 제2군에서 총세포수와 다핵백혈구의 백분율은 대조군보다 높았으며 반면 대식구는 감소했다. 다핵백혈구는 paraquat 투여후 1일까지 계속 증가하였다가 2일째부터는 감소하기 시작하였다. 그러나 paraquat 주사후 죽은 제3군의 백서에서는 총세포수와 다핵백혈구의 백분율의 유의한 증가를 볼 수 있었다( $p < 0.05$ ). 반면 세정액의 회수율과 대식구의 백분율은 유의하게 감소하였고 ( $p < 0.05$ ) 임파구는 일정수준을 유지하였다. 호산구도 1일째까지 증가되었다가 그후부터 감소하였다. 만성기에서 총세포수와 모든 세포성분의 백분율이 거의 대조군과 유사하게 돌아갔다. 염증세포들이 폐포에 이상을 초래하는 기전으로 첫째, 폐포벽의 국한된 장소에 염증세포들이 축적되어 정상구조의 변경을 일으켜 공기와 혈액간의 긴밀한 관계에 장애를 초래하고 둘째, 염증세포들이 폐실질세포들과 결합조직으로 구성된 기질에 상해를 줄 수 있는 mediators를 방출하고 섬유아세포가 증식하게 하여 섬유화를 촉진시킴을 들 수 있다<sup>38)</sup>. 염증세포들은 간질성 폐질환에 참여하면 활성화되어 정상폐포구조를 변경할 수 있는 mediators를 방출한다. 폐포대식구는 면역복합체에 의해 자극되어 호중구에 대한 화학결인인자를 국소적으로 방출하면 조직내에 호중구가 많아지고 활성화되어 neutral proteases와 collagenase와 아울러 산화기(radicals)를 방출하여 폐구조에 손상을 준다<sup>61)</sup>. 폐포대식구가 활성화되면 fibronectin<sup>40,42)</sup>과 AMDGF

(alveolar macrophage derived growth factor)<sup>39)</sup>를 방출하여 손상받은 간질내의 섬유아세포가 증식하여 수가 증가하고 섬유아세포가 결합조직, 주로 I형교원질을 생산하여 반흔을 형성하게 된다<sup>42)</sup>.

폐섬유증은 Kissler<sup>62)</sup>에 의해 10 model의 동물실험에 의해 확인되었는데 원인인자에 관계없이 정도의 차이는 있으나 특발성 폐섬유증의 전형적인 조직학적 변화가 생겼다. 특히 paraquat에 의한 폐섬유증은 많은 연구실에서 사용되고 있다. 이는 paraquat가 폐에 심한 독성과 섬유화를 초래하는 작용을 가지고 있고 1회 주사만으로도 소기의 효과를 나타내기 때문이다<sup>62)</sup>. 주요한 결점중의 하나는 동일하게 처리된 동물사이에 본 연구에서와 같이 반응이 다양한 점이다. 또한 paraquat는 상당한 종(species)간의 조직반응에 차이가 있어, 예를 들면 사람에서 한번의 경구 또는 주사량이 수일만에 폐의 치명적인 진행성간질성염증과 섬유화를 일으킬 수 있다는 것이다<sup>62)</sup>. 사람에서 paraquat로 야기된 폐질환은 잘 알려진 임상례로 이 제초제의 사고 또는 의도적인 흡입으로 생겨 상당히 흥미롭다<sup>22,23)</sup>. Paraquat에 의한 폐섬유증은 Wyatt 등<sup>16)</sup>이 주장한 바와 같이 크게 2시기로 나눌 수 있다. 첫째, 파괴시기로 폐포상피세포의 손상, 부종, 출혈과 염증세포, 즉 호중구와 대식구의 폐포실질내 침윤을 볼 수 있다. 둘째, 복구시기로 세포성분의 증가, 섬유화와 교원섬유의 축적이 있다. 양시기에서 다 산소결핍을 초래하여 심하면 사망하게 된다.

본 실험에서, 제2군에서 10 mg/kg의 paraquat를 복강내 투여한 백서에서 1일째부터 급성변화를 보이기 시작했다. 20 mg/kg 이상의 paraquat를 투여한 백서에서는 폐실질을 통한 출혈과 부종을 보였다. 폐포강과 폐포벽내에 많은 호중구와 폐포대식구의 침윤을 보여 폐포염의 소견을 보였다. 곳에 따라 호산구의 침윤도 눈에 띄었는데 2일째부터 감소되었다. 제2군에서 폐포벽의 파괴는 분명하지 않았다. 전 폐포구조를 통해 장애성 부종액이 축적되었다. 부종은 I형세포의 손상에 따른 삼투성변화의 결과로 생긴다. Paraquat의 양의 증가에 따라 특히 30 mg/kg 이상을 투여한 백서의 폐에서 혈관계가 심하게 확장되어 많은 적혈구로 차여 있었다. 이러한 폐출혈의 원인은 모세혈관내피에 대한 paraquat의 직접적인 독성과 혈관수축의 이중작용으로 생긴다고 여겨진다<sup>36)</sup>. Paraquat 주사후 죽은 제3군 백서의 폐포구조는 심하게 파괴되었고 전 모세혈관과 작은 혈관들은 확장되

어 일부 용혈현상을 보이는 많은 적혈구들에 의해 차여 있었다. 혈관의 이런 변화들은 "angioparesis"라고 불리는 혈관운동의 마비에 의한다고 추정된다. 혈관마비의 이유는 아직 알려져 있지 않으나 아마 심폐계내 급성순환부전에 기인하는 듯하다. 폐조직에서 호중구들도 심하게 침윤되어 있고 단백질이 풍부한 부종과 함께 많은 곳에서 초자양막형성을 관찰할 수 있었다. 2일부터 5일까지의 치명적인 시기를 지난 백서들은 급성염증은 서서히 감소되며 대신 폐포섬유화를 일으켰다. 만성기의 15마리의 백서중 6마리가 육안적으로 다발성 췌기모양의 반흔과 불규칙적이나 비교적 심한 섬유화를 보였다. 급성기의 호중구의 침윤과는 대조적으로 임파구의 침윤이 보였다. 광학현미경소견상 주된 소견은 폐포강내 섬유화로 곳에 따라 광범위한 폐포구조의 개축을 보였다. 폐포대식구와 섬유아세포로 구성되고 폐포강내로 돌출하는 싹형성이나 조성결합조직덩어리들과 함께 상당부분의 폐실질의 허탈과 폐포벽 간질의 비후도 관찰되었다. 특발성폐섬유증환자의 광학현미경 소견으로 증가된 양의 교원질이 존재함을 알고 있다. 정상폐는 약 2:1의 비로 I형과 III형 교원질을 가진다<sup>63</sup>. I형은 fibrillar 하여 피부, 골, 인대, 혈관들과 폐에서 발견된다. III형은 reticular 하여 역시 피부, 혈관, 소장과 폐에 발견되나 골과 인대에서는 보이지 않는다. 특발성폐섬유증환자의 폐내 교원질의 전체양의 증가는 없었으나 III형에 비하여 I형교원질의 증가가 밝혀졌다<sup>62</sup>. 이는 본 실험에서 섬유화를 보이는 백서폐의 육안적소견으로서도 뒷받침된다. 폐포가 심하게 손상되어 허탈을 보이는 곳에 새로운 선구조들의 증식이 보였다. 이런 선구조들은 입방형상피세포로 배열되어 있었다. 나머지 백서들은 비교적 정상적인 폐구조를 가지고 있어 paraquat에 덜 민감한 듯했다. 어떤 동물들은 치명적인 다량의 paraquat 주사로도 단지 가역 변화만을 일으키는데 백서들이 이 약제에 매우 다른 감수성을 보임을 알 수 있다.

Fibronectin(이하 FN이라 칭함)은 44만 dalton의 분자량을 가지는 큰 당단백으로 많은 세포들, 간질조직과 혈장내에 존재한다<sup>64</sup>. FN은 피브린, 교원질세포들과 proteoglycan에 특수한 결합부위를 가져 세포와 세포, 세포와 간질의 접촉등 세포의 골격을 유지한다<sup>64-66</sup>. 용성형(soluble form)은 1948년 처음 Morrison에 의해 분리되어 'cold insoluble globulin'(Clg)라고 불리워졌다. 정상인의 혈장내 FN 농도는 약 300  $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로서 남자

가 여자보다 높고 나이가 많아짐에 따라 증가한다<sup>67</sup>. FN은 성인의 모든 조직에 존재하는 주요 결합 단백질로 대부분의 기저막, 임파조직의 레티쿨린간질과 조성결합조직에 교원질과 같이 분포하여 조직학적으로 레티쿨린에 상응하였으나 교원섬유 또는 탄성섬유와의 분포와는 부합하지 않았다<sup>44,52</sup>. 사람의 호흡기에서 기관과 폐포에서는 FN이 상피적하의 기저막에서 폐포벽에서는 모세혈관과 폐포상피세포의 기저막 주변에서 교질섬유와 탄성섬유 들과 함께 존재한다<sup>68,69</sup>. 초미세형태학적 검색으로 FN은 폐포대식구의 소포체와 골지체에 국한되었다<sup>40,45</sup>. 정상백서의 폐에는 I형교원질, laminin과 FN의 결합조직으로 구성되어 있다. 그중 FN은 폐간질내에 존재하고 기저막에는 불규칙적으로 분포하여 FN이 기저막의 고유의 성분이 아니고 간질성 또는 혈장단백임을 말해준다<sup>70</sup>. 초미세형태학적 연구에서 FN의 정상백서폐의 I형 폐포상피세포의 기저면과 기강면에서 발견되었다<sup>71</sup>. FN이 폐의 결합조직기질의 한 화학성분으로 폐포의 기능에 영향을 미친다<sup>72</sup>. FN은 섬유아세포, 대식구, 근원세포, 성상세포, 시반세포와 약간의 상피세포에서 합성된다<sup>40,67</sup>. FN의 기능에 대한 연구가 섬유아세포의 배양으로 이루어졌는데, 여기서 FN은 접착을 피하였다<sup>44</sup>. 혈장의 FN은 옴소닌으로 작용하여 FN과 상호작용하는 교원질, 피브린과 다른 불용성 거대 분자들이 탐식세포들에 의해 제거되는 것을 용이하게 한다<sup>40,73</sup>. 유사한 경우가 섬유아세포가 특징적으로 증식하는 만성염증과 참상치유에서의 육아조직의 형성이다<sup>74</sup>. 이때 섬유아세포내와 주위에 다량의 FN이 관찰되었는데 이는 세포성 또는 혈장 FN이 피브린이나, 변질한 교원질과 세포표면이 상호작용하여 조직의 손상받은 부위와 형성된 응피주위의 결합조직과 결합하고<sup>44</sup> 대식구의 부착을 유도하여 창상의 치유에 중요한 역할을 한다<sup>60</sup>. 그의 FN은 기저막위로 재생하는 상피세포의 방향을 정하는 데도 중요한 역할을 한다<sup>44</sup>. 만성염증이 흔히 많은 수의 섬유아세포와 결합조직으로 대체되는 섬유화를 초래하는데 FN은 면역복합체와 결합이 가능한 보체성분인 Clq와 결합할 수 있다. 많은 염증과정에서 볼 수 있는 면역복합체는 Clq와 결합하여 FN이 섬유아세포에 부착하는 nidus를 제공하여 염증반응부위에서 섬유화가 생기는 데 기여한다<sup>75</sup>. FN은 또, 섬유아세포에 대한 화학적견인체로 작용하여 간질성폐질환에서 섬유화를 일으키는데 중요한 역할을 한다. 더우기 사람의 섬유성폐질환에서 폐

포대식구는 FN과 AMDGF를 방출하여 섬유아세포를 재생하고 증가시킨다. 이런 개념으로 폐포벽에서의 섬유아세포의 숫적 증가를 설명할 수 있다<sup>43</sup>). 특발성 폐섬유증 환자의 폐포대식구내의 FN양은 정상인의 폐포대식구보다 20배가량 더 높고 폐포대식구의 FN은 폐의 섬유아세포에 대하여 화학주성을 가지고 있는 것으로 보아 FN이 이 질환의 특징인 폐포구조의 장애를 초래함을 시사해 준다<sup>42</sup>). 또한 FN은 하부호흡기의 상피의 정상성분으로 사람의 기관지세정액에서 발견된다. 이 기관지세정액내의 FN은 사람의 혈장내의 FN과 유사하다. 정상인과 비간질성 폐질환환자에 비해 간질성폐질환을 가진 환자의 기관지세정액에서 FN이 유의하게 높은치를 보였다<sup>46</sup>). 또한 흡연자에서 비흡연자보다 더 높은 FN 농도를 보여 기관지세정액내 FN은 일부 하부호흡기에서 국소적으로 생산됨을 추측케 한다<sup>76</sup>). 특발성폐섬유증환자, 사르코이도시스와 다른 간질성폐질환환자에서 기관지세정액의 FN양은 2-4배 상승되었으나 혈장내 FN양은 변동이 없어 이는 폐내의 FN의 국소적인 합성을 암시한다<sup>46</sup>). 사람의 하부호흡기에서 FN의 생산을 한다고 제시하는 세포들로서는 폐포대식구, 다핵백혈구, 섬유아세포들이 보고되고 있다<sup>40</sup>). 저자는 본 실험에서 기관지폐포세정액내의 FN 양을 정량측정하려고 시도하였으나 실패하였다. 섬유성폐질환에서 정상폐보다 강하게 FN이 염색되는데 특히 기저막과 내피세포의 기저면, 간질의 상부에 위치하였다. 본 연구에서는 폐포강내 섬유화된 부위와 폐포대식구에서 면역조직학적 검색으로 FN이 인지되었다. 양성대조군으로, 사람의 paraquat에 의한 폐섬유증조직에서 FN의 강한 염색을 볼 수 있었다. 본 실험결과에서와 같이 백서폐의 섬유화병소와 사람의 폐섬유증조직에 FN이 선명하고 강하게 염색됨은 사람이나 실험동물의 폐섬유증발생에 FN이 참여함을 분명히 해주는 바다.

Paraquat에 의한 급성 또는 만성 상해의 초미세형태학적변화와 주된 장소는 I형 폐포상피세포이고 내피세포의 II형폐포상피세포는 변화가 적으나 만성상해에서는 II형폐포상피세포가 증식하여 I형세포의 괴사에 의한 폐포벽의 결손을 대치한다고 한다<sup>15,17,77,78</sup>). 본 실험에서도 모세혈관의 내피세포들의 장애는 없었고 단지 세포질내에 매우 증가된 흡수소포들을 보였다. 이는 Dearden 등<sup>79</sup>)이 제시한 혈관투과성의 증가를 지지하는 소견이다. 본 실험에서 II형상피세포들은 곳에 따라 증식하여 폐포

기저막의 결손부위를 덮고 있었다. II형폐포상피세포들은 처음 변성하나 그후 재생하는 양상을 보여 유리된 리보솜과 골지대, 소포체와 사립체가 많아지고 반면 충판소체들의 수는 감소된다. II형폐포상피세포들의 증식으로 표면활성제의 과도한 생산을 초래하여 폐포상피내면으로 확산되어 거대충판소체가 형성되고 이 II형세포가 점차 괴사됨에 따라 폐포내에 유리된 표면활성제가 폐포대식구에 의해 탐식된다<sup>29</sup>). 본 실험에서 입방형상피세포들의 증식을 보이는 선구조들이 폐포벽이 심하게 파괴되어 허탈을 보인 데에서 관찰되었다. 허탈을 보인 폐포는 증식된 섬유아세포로 대치되고 일부 남은 폐포내에는 심한 폐포대식구의 증식을 관찰할 수 있었다. 이 폐포대식구들은 많은 소체를 탐식하고 있었다. 선구조들을 싸고 있는 입방형상피세포는 초미세형태학상 미용모를 보이는 II형상피세포로 밝혀졌다. 폐포강에 수많은 유리된 충판소체와 격자모양의 표면활성제들이 눈에 띄고 이런 충판소체들을 탐식한 대식구의 증식이 관찰되었다. 또한 충판소체를 탐식한 폐포대식구의 기저막을 통한 이동이 보였다. 재생피화되지 않은 기저막은 찌그러져 폐포의 허탈을 보이고 기저막하부의 간질은 부종으로 넓어져 상당한 섬유화를 보였다. 이러한 폐병변은 폐포미세혈관의 손상에 의해 생기며 폐섬유화를 초래하는 다른 실험들에서도 종종 관찰할 수 있었다<sup>25</sup>). 초기에 폐포강내로 돌출하는 짙은 증식된 폐포대식구의 집합으로 구성되거나 섬유아세포, 폐포대식구, 염증세포와 소량의 기질로 이루어졌으나 점차 기질화됨에 따라 미세필라멘트와 교원질을 가지는 기질성분이 증가되고 반면 섬유아세포는 평행 또는 환형으로 배열되고 짙은 표면은 II형폐포상피세포로 피복됨을 볼 수 있었다. 곳에 따라 섬유아세포는 활성화되어 분명한 핵소체와 세포질내에 증식된 조면세포질내세망을 가졌다. 드물게는 섬유아세포의 세포질내에 actin과 유사한 미세필라멘트를 만들어 근섬유아세포의 특징적인 미세구조를 가지거나 평활근섬유의 형태를 보이기도 하였다. 폐포간질의 섬유화병소는 폐포벽의 간질이 넓어져 많은 섬유아세포가 증식되어 평행하게 배열되었다. 증식되는 간질세포들의 세포막의 모서리에서 속(束)이나 나선형으로 배열된 교원섬유들의 축적이 보였다. 드물게는 호염기구(basophil)도 관찰되었다. 이런 섬유아세포들이 때때로 비후하여 그들의 세포질돌기를 내어 II형폐포상피세포의 기저면의 microfoldings와 긴밀하게 접촉되는데 이러한 상피와 간질조직간의 상호작



용은 동물과 사람에서 hemidesmosomes과 anchoring fibrils에 의해 잘 특징지워 지는데<sup>80)</sup> 소위 나선성간질성 폐렴같은 경한폐섬유증들과 다른 간질성폐질환에서 흔히 본다. 본 실험의 미세형태학적 소견을 종합하면 paraquat로 인한 폐포섬유화는 paraquat에 의한 폐포 상피와 상피기저막의 손상으로 생긴 기저막의 단열부위를 통해 간질세포가 폐포강내로 이동하고 폐포강내로 이동한 간질세포가 근섬유아세포와 평활근세포들로 분화된다. 폐포강내 섬유화된 곳이 폐포간질과 융합되고 심하면 폐포의 폐색을 일으켜 폐포모세혈관단위의 상실을 초래하게 된다. 이는 Fukuda 등<sup>81)</sup>에 의해 제시된 바와 일치한다. 본 실험에서 paraquat에 의한 백서의 폐포섬유증을 유발하여 형태학적으로 폐포강내의 섬유증이 폐포간질의 섬유증보다 더욱 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 급성기에서 기관지폐포세정액분석과 형태학적 연구로 호중구가 증가된 폐포염의 소견을 보였으며 이러한 호중구가 더욱더 증가한 제 3군에서는 백서가 2-5일에 걸쳐 사망하여 호중구의 폐포에 미치는 상해를 형태학적 변화에 의해 추측할 수는 있었으나 생화학적 연구를 통한 호중구가 방출하는 neutral protease와 collagenase 등 효소의 규명에는 미흡하였고 앞으로 연구할 과제라고 생각된다. 이러한 폐포염이 만성적으로 지속되면 폐포섬유증을 일으키게 되는데 폐포염이 지속되는 원인은 아직 알려지지 않고 있다. 본 연구의 만성기의 기관지폐포세정액을 보면 제 2군과 3군에서 증가하였던 호중구는 감소되고 반면 대식구가 증가되었다. 폐포대식구가 FN과 AMDGF를 생산하여 폐포내에 섬유아세포가 증식하고 결합조직을 축적하여 폐조직에 반흔을 일으킨다고 한다. 본 실험에서 형태학적으로, 면역조직화학법으로 폐포강내로 돌출하는 싹이나 폐포벽과 융합된 부위와 증식된 폐포대식구내에서 FN을 규명하여 만성기에 증식된 폐포대식구가 FN을 생산하여 폐포강내 섬유증을 일으킨다고 생각되었다. 그러나 기관지폐포세정액내의 FN의 정량측정은 실패하였다. 또한 FN의 정량측정을 위하여서는 nephelometry와 rocket immunoelectrophoresis 등 다른 방법의 적용과 함께 기관지폐포세정액내의 대식구를 분리하여 배양을 해서 폐포대식구내의 FN양을 측정하여 대조군과 비교하거나 형태학적으로 전자현미경을 이용한 면역조직화학법의 응용으로 FN의 폐조직내의 정확한 위치 및 분포를 밝혀 줄 것으로 생각된다. 이상의 성적으로 미루어 보아, 본 연구의 만성기 백서에서 주된

소견인 폐포강내 섬유화는 폐포벽간질에 상주하는 세포들중 특히 결합조직세포들이 paraquat에 의한 상해로 생긴 폐포벽의 결손부(상피층과 기저막)를 통하여 폐포강내로 이동함으로써 이루어지며, 폐포강내로 들어온 활성화된 폐포대식구가 분비하는 FN은 섬유아세포를 폐포벽으로부터 폐포강내로 유인하고 또 이 세포의 증식도 꾀하는 것으로 사료되고, 이러한 폐포강내 섬유화는 폐포강내로 돌출하는 싹을 형성하거나 폐포벽과 융합하여 폐포강을 일부 폐색하거나 또는 폐포강내 섬유화과정으로 완전히 폐포강을 폐색하고 이런 과정이 여러 폐포, 폐포관과 호흡세기관지들을 침범하여 국소적이거나 심한 폐포구조의 개축도 아울러 수반하는 것으로 생각된다.

## 요 약

폐포강내의 섬유화와 이에 따른 폐포구조의 개축 (intraalveolar remodeling)의 발생기전을 규명하고자 백서 63마리를 4군으로 나누어 paraquat를 1회 복강내로 주사하여, 폐조직의 육안적, 광학현미경적, 면역조직화학적 및 전자현미경적 연구와 아울러 기관지 폐포세정액의 세포분석을 하였다.

육안적으로는 만성(1-10주)의 백서중 6마리가 다발성 새기모양의 반흔을 기관지나 혈관주위 혹은 늑막하에서 관찰할 수가 있었다.

만성기의 주된 광학현미경적 소견은 폐포강내 섬유화였다. 폐포강내로 돌출하는 폐포강싹(intraalveolar buds)이 성장해가는 과정이라든지, 또 이것이 커져서 풀잎모양의 덩어리가 되어 폐포강을 폐쇄하는 것을 볼 수가 있었다. 때로는 조성결합조직(loose connective tissue)이 폐포를 폐쇄하거나 폐포벽과 융합하여 심한 폐포구조의 개축을 보이기도 하였다.

면역조직화학법으로 fibronectin이 폐섬유화를 일으킨 백서에서 폐포강내로 돌출하는 폐포강싹의 중심부와 주변의 증식된 폐포대식구에서 염색되었다. Fibronectin의 정량측정에는 실패하였다.

전자현미경적으로는 만성기 폐포강내에 폐포대식구와 actin양 미세필라멘트를 가진 섬유아세포들의 증식을 볼 수 있으며, 또 속(束)을 이루거나 나선형의 교원섬유도 아울러 관찰되었다. 그리고 곳에 따라 근섬유아세포와 평활근세포도 볼 수가 있었다.

기관지폐포세정액의 세포분석 결과 만성기의 백서에서



는 대조군과 통계학상 유의한 차이를 발견할 수가 없었다.

이상의 성적으로 보아 폐포강내 섬유화는 폐포벽 간질에 상주하는 세포들중 특히 결합조직 세포들이 paraquat에 의한 상해로 생긴 폐포벽의 결손부(상피층과 기저막)를 통하여 폐포강내로 이동함으로써 이루어지며, 폐포강내로 들어온 활성화된 폐포대식구가 분비하는 fibronectin은 섬유아세포를 폐포벽으로 부터 폐포강내로 유인하고 또 이 세포의 증식도 꾀하는 것으로 사료되고, 이러한 폐포강내 섬유화는 폐포구조의 개축도 아울러 수반하는 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Crystal PG, Bitterman PB, Rennard SI, et al: *Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. (First of two parts) N Engl J Med* 310:154-166, 1984
- 2) Liebow AA: *Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. Prog Respir Res* 8:1-33, 1975
- 3) Bitterman PB, Adelberg S, Crystal RG: *Mechanisms of pulmonary fibrosis: Spontaneous release of the alveolar macrophage-derived growth factor in the interstitial lung disorders. J Clin Invest* 72:1801-1813, 1983
- 4) Crystal RG, Fulmer JD, Roberts WC, et al: *Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects. Ann Intern Med* 85:769-788, 1976
- 5) Smith P, Heath D, Kay JM: *The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. J Pathol* 114:57-67, 1974
- 6) Kissler W: *Formal genesis of pulmonary fibrosis: Experimental Investigations, in Muller KM(ed): Pulmonary diseases. Clinicopathological correlations, Berlin, Springer-Verlag, 1983, pp 207-231*
- 7) Basset F, Lacroque J, Ferrans V, et al: *Intraalveolar fibrosis: A second form of fibrosis of the interstitial lung disorders, Abstracted. Am Rev Respir Dis* 129(pt 2):A-72, 1984
- 8) Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, et al: *The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. Am J Pathol* 126:171-182, 1987
- 9) Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenberger CI, et al: *Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity, The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. Am J Pathol* 118:452-475, 1985
- 10) Basset F, Ferrans VJ, Soler P, et al: *Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. Am J Pathol* 122:443-461, 1986
- 11) Kawanami O, Basset F, Barrios R, et al: *Hypersensitivity pneumonitis in man. Light and electron-microscopic studies of 18 lung biopsies. Am J Pathol* 110:275-289, 1983
- 12) 이상숙, 정재홍, Kawanami O외 2인: 백서폐의 Paraquat 중독. - 분할적 기관지 폐포세정법과 형태학적 연구의 비교 -, 대한병리학회지 18:333-344, 1984
- 13) Schoenberger CI, Rennard SI, Bitterman PB, et al: *Paraquat-induced pulmonary fibrosis. Role of the alveolitis in modulating the development of fibrosis. Am Rev Respir Dis* 129:168-173, 1984
- 14) Corrin B, Vijeyaratnam GS: *Experimental models of interstitial pneumonia: Paraquat, iprindole. Prog Respir Res* 8:107-120, 1975
- 15) Sykes BI, Purchase IFH, Smith LL: *Pulmonary ultrastructure after oral and intravenous dosage of paraquat to rats. J Pathol* 121:233-241, 1977
- 16) Wyatt I, Doss AW, Zavala DC, et al: *Intrabronchial instillation of paraquat in rats: Lung morphology and retention study. Br J Ind Med* 38:42-48, 1981
- 17) Butler IIC: *Pulmonary interstitial fibrosis from paraquat in the hamster. Arch Pathol* 99:503-507, 1975
- 18) Greenberg DB: *Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. Chest* 74:421-425, 1978
- 19) Roujeau J, Leclerc JP: *Mechanism of action of bleomycin and paraquat in the genesis of interstitial pneumonias. Prog Respir Res* 8:121-122, 1975
- 20) Vijeyaratnam GS, Corrin B: *Experimental paraquat poisoning: A histological and electron-optical study of the changes in the lung. J Pathol* 103:123-129, 1971
- 21) Clark DG, McElligott TF, Hurst EW: *The toxicity of paraquat. Br J Ind Med* 23:126-132, 1966
- 22) 김정희, 이상숙, 노락균외 2인: Paraquat 중독. - 부검증례보고 -, 대한병리학회지 16:562-566, 1982

- 23) 김기식, 신현구, 현성택 외 3인 : Gramoxone-HCl (Paraquat) 중독환자 13예에 대한 임상적 고찰. 대한 내과학회잡지 26:292-301, 1983
- 24) Kimbrough RD, Gaines TB: Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 17:679-690, 1970
- 25) Brooks RE: Ultrastructure of lung lesions produced by ingested chemicals. I. Effect of the herbicide paraquat on mouse lung. *Lab Invest* 25:536-545, 1971
- 26) Selman M, Montano M, Montfort I, et al: A new model of diffuse interstitial pulmonary fibrosis in the rat. *Exp Mol Pathol* 43:375-387, 1985
- 27) Adamson IYR, Bowden DH: The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 77:185-198, 1974
- 28) Bedrossian CWM, Luna MA, Mackay B, et al: Ultrastructure of pulmonary bleomycin toxicity. *Cancer* 32:44-51, 1973
- 29) Fasske E, Morgenroth K: Experimental bleomycin lung in mice. A contribution to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Lung* 161:133-146, 1983
- 30) Snider GL, Hayes JA, Korthy AL: Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin. *Pathology and stereology. Am Rev Respir Dis* 117:289-297, 1978
- 31) Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, et al: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Inhibition by indomethacin. *Am J Pathol* 95:117-127, 1979
- 32) Phan SH, 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
- 33) Starcher BC, Kuhn C, Overton JE: Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am Rev Respir Dis* 117:299-305, 1978
- 34) Tryka AF, Witschi H, Lindenschmidt RC: Progressive pulmonary fibrosis in rats: A biochemical, cell kinetic, and morphologic analysis. *Exp Mol Pathol* 43:348-358, 1985
- 35) Rose MS, Lock EA, Smith LL, et al: Paraquat accumulation: Tissue and species specificity. *Biochem Pharmacol* 25:419-423, 1976
- 36) Kokubo T: Pathogenesis of paraquat-induced pulmonary hemorrhage in hamsters with special reference to arterial constriction. *Acta Pathol Jpn* 34:41-46, 1984
- 37) Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, et al: Bronchoalveolar lavage: Role in the pathogenesis, diagnosis and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 102:93-108, 1985
- 38) Kawanami O: A new aspect of the pulmonary researches by an application of the bronchoalveolar lavage method. *J Nippon Med School* 49:421-425, 1982
- 39) Reynolds HY, Fulmer JD, Kazmierowski JA, et al: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 59:165-175, 1977
- 40) Villiger B, Kelley DG, Engleman W, et al: Human alveolar macrophage fibronectin: Synthesis, secretion, and ultrastructural localization during gelatin-coated latex particle binding. *J Cell Biol* 90:711-720, 1981
- 41) Lacronique JG, Rennard SI, Bitterman PB, et al: Alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis have glucocorticoid receptors, but glucocorticoid therapy does not suppress alveolar macrophage release of fibronectin and alveolar macrophage derived growth factor. *Am Rev Respir Dis* 130:450-456, 1984
- 42) Rennard SI, Hunninghake GW, Bitterman PB, et al: Production of fibronectin by the human alveolar macrophage: Mechanism for the recruitment of fibroblasts to sites of tissue injury in interstitial lung diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7147-7151, 1981
- 43) Bitterman PB, Rennard SI, Adelberg S, et al: Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J Cell Biol* 97:1925-1932, 1983
- 44) Stenman S, Vaheri A: Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 147:1054-1064, 1978
- 45) Torikata C, Villiger B, Kuhn C III, et al: Ultrastructural distribution of fibronectin in normal and fibrotic human lung. *Lab Invest* 52:399-408, 1985
- 46) Rennard SI, Crystal RG: Fibronectin in human bronchopulmonary lavage fluid. Elevation in patients with interstitial lung disease. *J Clin Invest* 69:113-122, 1981
- 47) Colowick SP, Kaplan NO: *Methods in Enzymology*. Jakoby WB, Pastau IH(ed), New York, Academic Press, 1979, vol L VIII, Cell Culture, pp 143-144, pp 151-152

- 48) Kirkpatrick P, d'Ardenne AJ: *Effects of fixation and enzymatic digestion on the immunohistochemical demonstration of laminin and fibronectin in paraffin embedded tissue. J Clin Pathol* 37:639-644, 1984
- 49) Scheffe H, cited by Cochran WG, Cox GN: *Experimental designs, ed 2. New York, John Wiley & Sons Inc, 1957, pp 74-75*
- 50) Taylor CR: *Immunoperoxidase techniques. Practical and theoretical aspects. Arch Pathol Lab Med* 102:113-121, 1978
- 51) Kawanami O: *Immunohistochemical identification of the pulmonary immune effector cells. Respir (Jap)* 4:1367-1372, 1985
- 52) Linder E, Stenman S, Lehto VP, et al: *Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. Ann NY Acad Sci USA* 312:151-159, 1978
- 53) Mauro A, Bertolotto A, Germano I, et al: *Collagenase in the histochemical demonstration of laminin, fibronectin and factor VIII/R Ag in nervous tissue after fixation. Histochemistry* 80:157-163, 1984
- 54) Dixon AJ, Burns J, Dunnill MS, et al: *Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. J Clin Pathol* 33:1021-1028, 1980
- 55) Rennard SI, Berg R, Martin GR, et al: *Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. Anal Biochem* 104:205-214, 1980
- 56) Luft JH: *Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophys Biochem Cytol* 9:409-414, 1961
- 57) Reynolds ES: *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol* 17:208-212, 1963
- 58) Crystal RG: *Interstitial lung disorders, in Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, et al (eds): Harrison's principles of internal medicine, ed 11. New York, McGraw-Hill Inc, 1987, chap 209, pp 1095-1100*
- 59) Weg JG: *Diffuse interstitial fibrosis. in Guenter CA, Welch MH (eds): Pulmonary medicine, ed 2. Philadelphia, JB, Lippincott Co, 1982, chap 13, pp 611-617*
- 60) Scadding JG: *Fibrosing alveolitis. Br J Med* 2:686, 1964
- 61) Rinaldo JE, Rogers RM: *Adult respiratory-distress syndrome. Changing concepts of lung injury and repair. N Engl J Med* 306:900-909, 1982
- 62) Reiser KM, Last JA: *Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. Am Rev Respir Dis* 123:58-63, 1981
- 63) Bitterman PB, Rennard SI, Crystal RG: *Environmental lung disease and the interstitium. Clin Chest Med* 2:393-412, 1981
- 64) Hood LE, Weissman I: *Immunology, ed 2. California, Benjamin/cummings Publishing Co, 1984, pp 160-161*
- 65) McDonagh J: *Fibronectin. A molecular glue. Arch Pathol Lab Med* 105:393-396, 1981
- 66) Mosesson MW: *The role of fibronectin in monocyte/macrophage function. Prog Clin Biol Res* 154:155-175, 1984
- 67) Eriksen HO, Clemmensen I, Hansen MS, et al: *Plasma fibronectin concentration in normal subjects. Scand J Clin Lab Invest* 42:291-295, 1982
- 68) Akiyama SK, Yamada KM: *Fibronectin in disease, in Wagner BM, Fleischmajer R, Kaufman N(ed). Connective tissue diseases. Baltimore, Williams and Wilkins, 1983, pp 55-96*
- 69) d'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, et al: *Comparative distribution of fibronectin and type III collagen in normal human tissues. J Pathol* 141:55-69, 1983
- 70) Gil J, Martinez-Hernandez A: *The connective tissue of the rat lung: Electron immunohistochemical studies. J Histochem Cytochem* 92:230-238, 1984
- 71) Rosenkrans WA, Albright JT, Hausman RE, et al: *Ultrastructural immunocytochemical localization of fibronectin in the developing rat lung. Cell Tissue Res* 234:165-177, 1983
- 72) Bray BA: *Cold-Insoluble globulin (fibronectin) in connective tissue of adult human lung and in trophoblast basement membrane. J Clin Invest* 62:745-752, 1978
- 73) Oh E, Pierschbacher M, Ruoslahti E: *Deposition of plasma fibronectin in tissue. Proc Natl Acad Sci USA* 78:3218-3221, 1981
- 74) Grinnell F, Billingham RE, Burgess L: *Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. J Invest Dermatol* 76:181-189, 1981
- 75) Rennard SI, Chen YF, Robbins RA: *Fibronectin mediates cell attachment to Clq: A mechanism for the localization of fibrosis in inflammatory disease. Clin Exp Immunol* 54:239-247, 1983
- 76) Villiger B, Broekelmann T, Kelley DG, et al: *Bronchoalveolar fibronectin in smokers and nonsmokers. Am Rev Respir Dis* 124:652-654, 1981

- 77) Skillrud DM, Martin WJ: *Paraquat-induced injury of type II alveolar cells. An in vitro model of oxidant injury. Am Rev Respir Dis* 129:995-999, 1984
- 78) Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, et al: *Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to No<sub>2</sub>. Am J Pathol* 70:175-198, 1973
- 79) Dearden LC, Falrshter RD, McRae DM, et al: *Pulmonary ultrastructure of the late aspects of human paraquat poisoning. Am J Pathol* 93:667-680, 1978
- 80) Kawanami O, Ferrans VJ, Roberts WC, et al: *Anchoring fibrils, A new connective tissue structure in fibrotic lung disease. Am J Pathol* 92:389-410, 1978

— Abstract —

### Mechanisms of Experimental Pulmonary Fibrosis Following Paraquat Toxicity

Sang Sook Lee, M.D. and Chai Hong Chung, M.D.

*Department of Pathology, Keimyung University  
School of Medicine*

Tae Jung Sohn, M.D.

*Department of Pathology, Kyungpook National  
University School of Medicine*

This study was carried out to investigate the intricate mechanisms of intraalveolar fibrosis, leading to the alveolar structural remodeling, of rat lungs treated with paraquat. Sixty-three male Sprague-Dawley rats, maintained on a stock diet, weighing 200.0 gm, average, were divided into 4 experimental groups.

Group 1. Control group (10 rats). Intraperitoneal injections of 2-4 ml normal saline only.

Group 2(13 rats). 10, 20, 25, 30 and 40 mg per kg of body weight was administered intraperitoneally. Animals were sacrificed 5 hours, 1 and 2 days after paraquat treatment.

Group 3(16 rats). 20, 25, 30 and 40 mg per kg of body weight was administered to the animal, and animals died 2-5 days after paraquat administration.

Group 4(24 rats). The same amount of paraquat was

administered to the animal as in the group 2. Animals were sacrificed 1, 2, 6, 8 and 10 weeks after paraquat treatment.

Sacrificed animal lung was examined by gross, light-microscopic, immunohistochemical, ultrastructural observation, along with cellular and chemical analyses of bronchoalveolar lavage fluid. The results were as follows:

Grossly, 6 rats of chronic stage (1-10 weeks survival) developed multiple wedge-shaped scars on both lungs. These scars were situated mainly along the bronchial trees, blood vessels and subpleural regions.

Light microscopically, the salient features found of the chronic stage lungs were intraalveolar fibrosis. Intraluminal buds or polypoid masses projecting into the alveolar lumen and ducts. Elsewhere, loose connective tissue masses were found to fuse together to alveolar wall, obliterating the alveolar spaces with resultant severe alveolar structural remodeling.

Immunohistochemically, fibronectin was found in the center of intraalveolar buds and polypoid mass, projecting into the alveolar lumen, and in the adjacent proliferating alveolar macrophages. An attempt to measure the amount of fibronectin in the bronchoalveolar lavage fluid failed.

Electron microscopically, the chronic stage lung revealed marked proliferation of both alveolar macrophages and fibroblasts in the alveolar spaces, the latter containing actin-like microfilaments and collagen fibers arranged in bundles and spirals. In areas, myofibroblasts and smooth muscle cells also present.

Cellular analysis of the bronchoalveolar lavage fluid in chronic stage lungs revealed no significant findings.

It can be concluded, therefore:

That intraalveolar fibrosis of the paraquat-treated lungs of the rat is probably mediated by intraalveolar migrations of the interstitial cells, the main task force being the connective tissue cells, passing through the defects created in the epithelial lining surface to its basement membrane, which were inflicted upon the alveolar wall by the paraquat toxicity.

Fibronectin, released by activated alveolar macrophages, may be responsible for the migrations of fibroblasts and myofibroblasts into the alveolar spaces to form the intraalveolar fibrosis with subsequent alveolar structural remodeling.