J. Korean Soc Ther Radiol Oncol 1999;17(3):238 248

X-선 조사로 생긴 흰쥐 폐장 상해의 형태학적 변화 : Captopril에 의한 폐장 상해의 경감 효과

계명대학교 의과대학 치료방사선과학교실

김 진 희

목 적 : 방사선조사 후 발생하는 폐손상을 형태학적 측면에서 평가하고 captopril의 방사선조사 후 폐손상의 경감효과가 있는지를 확인하고 captopril의 방사선에 의한 폐손상의 영향에서 TNF-α와 TGF-β의 변화을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법 : Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐 30마리를 골라 방사선조사만 한 군, 방사선조사 후 captopril을 투여한 군으로 나누어 실험하였다. 방사선조사는 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy를 우측 폐에 조사하였다. 방사선 단독 조사군은 방사선조사 후 각각 12 시간, 11주 후에 도살하고 방사선조사 후 captopril을 투여한 군(captopril 500 mg/L를 증류수에 타서 먹임)은 11주(fibrotic period) 후에 도살하여 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였다.

결 과 : 방사선조사 후 12 시간내의 실험군의 폐는 부분적으로 폐실질의 허탈과 경화가 방사선조사량이 많아질수록 그 정도와 범위가 증가하였다. 방사선조사 후 11주에는 방사선 단독 조사군에서 폐섬유화의 정도와 범위가 방사선조사량이 많아질수록 증가하였고 captopril을 함께 사용한 군에서 방사선조사 단독군에 비해 폐섬유화의 경감효과가 현저하였다. 방사선 단독군에서는 방사선량이 많아질수록 비만세포의 수는 급격히 증가하였으며 captopril을 사용한 군이 사용하지 않은 군과 비교하여 비만세포 수의 증가 정도는 현저히 낮았고 교원질 침착의 정도도 현저히 감소되었다. TNF-α, TGF-β는 방사선조사 직후(12 시간) 군에서는 방사선량이 증가함에 따라 그 발현이 증가하였으나 방사선조사 후 11주군에서는 TGF-β는 방사선량이 많아짐에 따라 그 발현이 증가하였으며 captopril 투여군에서는 그 발현이 다소 감소하였다. Captopril을 사용한 군에서는 교원질의 양은 증가하였으나 방사선 단독군에 비해 교원질의 양이 적었고 혈관주위 비후의 정도와, 모세혈관의 변화정도, mast cell의 수와 탈과립, 섬유모세포의 수도 적었다.

결 론 : 방사선조사후 방사선 폐렴에서 captopril의 영향은 방사선에 의한 비만세포의 출현을 억제시키고 교원질의 침착을 감소시킴으로써 방사선에 의한 섬유화를 예방할 것으로 생각된다. TNF-α와 TGF-β의 발현은 방사선조사 후 초기에 증가하며 TGF-β는 방사선조사 후 만성기에 방사선량이 많아질수록 발현이 증가하는 것으로 판단되었다. 본 연구 결과는 captopril이 방사선조사 후 발생하는 폐손상을 감소시키는 기전을 밝히는 향후 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선폐렴, Captopril, 방사선보호제

1)

서 론

흉부 악성종양의 치료에 있어 고선량 방사선을 조사하면 방사선에 의한 정상 폐조직의 손상은 흔히 볼 수 있는 부작용이며 종양의 근치적 방사선치료를 방해한다. 그럼에도 불구하고 폐에 방사선치료가 요구되는 환자의 수는 계속 증가하고 있으며 특히 폐암은 계속적으로 증가 추세이다. 또한 예후가 불량한 국소적으로 진행된 폐암도 정상 폐조직의 내성범위 안에서 방사선조사량을 증가시킬 수 있으면 치료결과를 향상시킬 수도 있을 것이다. 최근 진보된 선형가속기와 3차원적 방사선조사법의 발달로 치료목적에 적당한 방사선량을 사용하여 부작용을 최소화하면서 치료하고자 노력하고 있다. 그러나 어느 정도의 폐손상은 불가피하고 방사선에 의한 급성 폐손상을 일으키는 경우 환자의 생존기간을 단축시키고 만성으로 진행할 경우 폐섬유증을 흔히 초래하여 만성호흡곤란으로 지속적인 고통을 받을 수도 있다. 방사선조사 후 폐손상의 발생과 관련

본 논문은 1998년도 계명대학교 신진연구비로 이루어졌음.이 논문은 1999년 5월 27일 접수하여 1999년 8월 30일 채택되었음.책임저자 : 김진희, 계명대학교 동산의료원 치료방사선과
Tel : 053)250-7665, Fax : 053)250-7661

이 있는 인자로서 방사선조사량, 방사선조사 방법, 조사 부위에 포함된 폐의 용적 등을 들고 있으며, 폐손상을 최소화하기 위한 방법이 다각도로 모색되어 왔다.[1)] 이러한 노력들 중 정상 폐조직의 내성을 증가시키는 방법은 상당히 임상적으로 중요하다. 여러 방사선 보호약제들이 개발되어 왔으나 이들은 대부분 치료량이 인체에 유독한데 최근 항고혈압제로 사용하고 있으며 angiotensin- 1 converting enzyme의 억제제인 captopril은 동물실험에서 방사선조사에 의한 폐손상을 줄이는 효과가 있음이 보고되고 있다.[12, 15, 17, 18, 25, 26)] 이미 외국에서는 보고된 바가 있으나 국내에서는 연구된 바가 없어 저자는 방사선조사 후 발생하는 폐손상을 형태학적 측면에서 광학현미경, 면역조직화학적 관찰과 투과 및 주사전자현미경적 관찰을 통하여 방사선조사만을 실시한 군과 비교하여 방사선조사 후 captopril을 사용한 실험군에서 폐손상의 경감효과가 있는지를 형태학적으로 확인해 보고 동시에 TNF-α와 TGF-β의 변화도 같이 관찰하여 captopril의 방사선에 의한 폐손상의 방어효과의 기전을 알아내는 데 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험 동물

체중 250 g 내외의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐를 일정기간 사육하여 건강하다고 판단되는 30마리를 골라 방사선조사만 한 군, 그리고 방사선조사 후 captopril를 물에 타서 경구 투여한 군으로 나누어 실험하였다.

2. 실험 방법

1) 방사선조사

방사선조사는 제작된 cage에 고정하여 6 MV X-선을 이용하여 전후방향으로 10 Gy, 20 Gy 및 30 Gy를 우폐에 조사하였다.

대조군 : 방사선조사를 실시하지 않은 흰쥐 2마리를 실험군과 같은 시기에 도살하였다.

제1군 : 방사선조사만 한 군으로 10 Gy, 20 Gy 및 30 Gy를 각각 3마리의 흰쥐 우폐에 조사하고 12 시간 후에 도살한 군과 같은 방사선량으로 각각 3마리에 조사한 후 11주에 도살한 군으로 나누었다.

1-1군 : 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy 방사선을 조사 후 12 시간 이내에 도살하였다.

1-2군 : 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy 방사선을 조사하고 11주 후에 도살하였다.

제2군 : 방사선조사 후 captopril을 투여한 군으로 10 Gy, 20 Gy 및 30 Gy를 각각 3마리의 흰쥐 우폐에 조사하고 captopril 500 mg/L를 물에 타서 매일 11주간 경구투여하고 11주(fibroptic period)에 도살하였다.

2) 광학현미경적 관찰

각각의 도살된 쥐에서 우측 폐 조직을 얻은 후 10% 중성 포르말린 고정액에 고정하였다. 고정된 폐조직을 적당한 크기로 잘라 계열 에탄올에 탈수한 후 파라핀 포매 과정을 거쳐 microtom을 사용하여 4 μm 두께의 박절편을 광학현미경 검경용 유리 슬라이드에 부착한 후 탈 파라핀 고정 및 함수과정을 거쳐 hematoxylin and eosin (H&E), Masson-trichrome 염색을 각각 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 mast cell 의 변화를 보기 위해 toluidin blue 염색을, 교원질 침착을 보기 위해 trichrome 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) TGF-beta 및 TNF-alpha를 이용한 면역조직화학 검색

파라핀 포매조직으로부터 5 μm 두께의 절편을 만들어 3-aminoprophy-triethoxysiane이 도포된 유리 슬라이드에 부착한 후 100% xylene에서 탈 파라핀을 하고 100, 95% 및 70% 알코올에서 함수과정을 거쳐서 증류수에서 5분간 수세하였다. 내인성 과산화효소의 억제를 위하여 0.3% 과산화수소수와 100% 메탄올의 혼합액에서 30분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (0.01M, pH 6.0)에 담구어 5분간 두차례 microwave로 열을 가하여 실온에서 냉각시킨후 PBS (phosphate buffered solution)로 수세하였다. 일차 항체인 TGF-β1 (Serotec MCA 797)과 TNF-α를 각각 1:100으로 희석하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 이차항체인 biotinylated link anti mouse antibody (DAKO, USA)로 37℃에서 20분간 반응시켜 PBS로 수세하고 streptovidin biotin 합성체 (DAKO, USA)로 37℃에서 20분간 반응시키고 PBS로 수세하였다. Immidazol buffer와 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogen (DAKO, USA)을 1:1로 혼합하여 발색시킨 후 증류수로 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하여 광학현미경 상에서 관찰하였다.

4) 전자현미경 관찰

투과전자현미경 관찰을 위해 각 실험군에서 얻은 폐조직을 1 mm^3 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1 4℃에서 2 시간 전고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 다음 1% O_5O_4용액에서 2 시간 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척한 뒤 계열 에탄올로 탈수과정을 거친 후 propylene oxide로 치환하였다. Luft 방법 2에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37℃에 12 시간, 45℃에 48 시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여 toluidine blue로 염색하고 광학현미경상에서 관찰부위를 결정한 다음 Sorvall MT 5000형 초박절기에서 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40 60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 제작하여

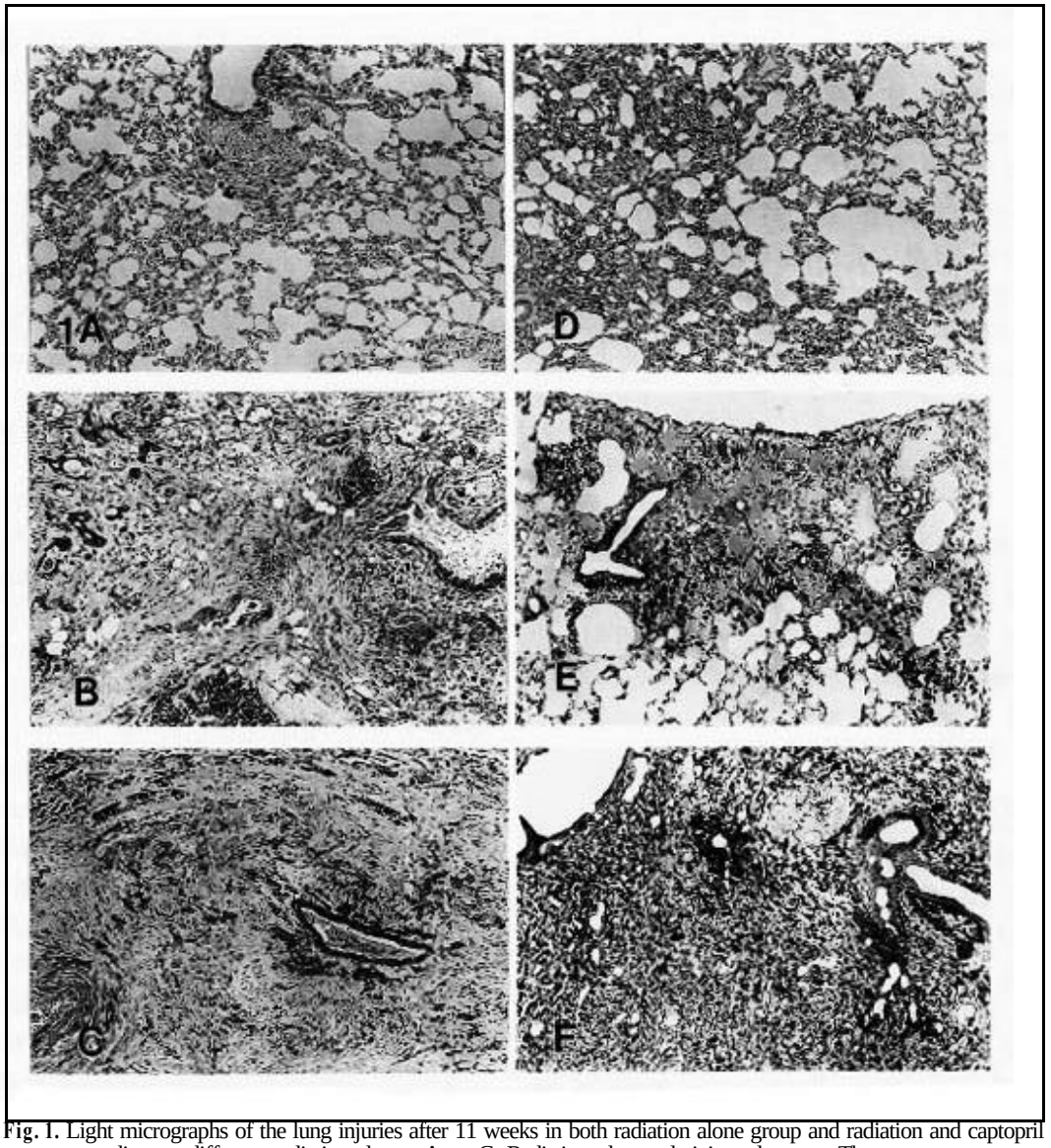

Fig. 1. Light micrographs of the lung injuries after 11 weeks in both radiation alone group and radiation and captopril group according to different radiation doses. A to C: Radiation alone administered group. There are more severe parenchymal alterations with fibrous consolidation in the higher radiation dose (20 Gy and 30 Gy) than lower radiation dose (10 Gy). D to F: Radiation and captopril administered group. The degrees of pulmonary fibrosis and parenchymal injuries are less severe than those of radiation alone group (A, D: 10 Gy; B, E : 20 Gy; C, F : 30 Gy). A to F=Original magnification, ×100.

nickel grid에 부착하고 Watson 및 Reynolds[3, 4] 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시하여 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

주사전자현미경 관찰을 위해서는 역시 각 실험군에서 얻은 폐조직을 1×1×4 mm^3 크기로 세절한 다음 2.5% glutaraldehyde용액으로 4℃에서 2 시간 동안 전고정한 후 0.1M 인산염 완충액으로 세척하였다. 1% O_5O_4 용액에서 1 시간 동안 후고정한 다음 2% tannic acid로 전도염색을 실시하였고 다시 1% O_5O_4 용액으로 1 시간 동안 고정한 다음 계열 에탄올로 탈수하고 isoamyl acetate로 침투시켰으며 Hitachi HCP-2형 임계점 건조기를 실시하였다. 건조된 시료를 시료판에 부착한 후 Eiko IB-3형 ion coater로 Pt-Pd를 사용하여 증착한 후 Hitachi S-4200형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경 소견

방사선조사 후 12 시간 내의 실험군에서 폐실질에 국소적인 허탈 및 경화성 변화가 방사선조사량이 10 Gy에서 20 Gy 및 30 Gy로 많아질수록 그 정도(severity)와 범위(area)가 증가하였다. 방사선조사 후 11주가 경과한 실험군 중 방사선조사 단독군에서 방사선조사량이 10 Gy에서 20 Gy 및 30 Gy로 많아질수록 폐섬유화의 정도와 범위가 증가하였다. 방사선조사 후 11주가 경과한 실험군 중 방사선과 captopril을 함께 투여한 군에서 폐섬유화의 정도 및 범위가 방사선 단독 투여 군에 비해 그 정도가 훨씬 경한 소견을 볼 수 있었다(Fig. 1, Table 1).

2. 비만세포(Mast cell)의 변화

방사선조사 후 비만세포가 폐조직 내의 늑막하 혈관주위 및 기도주위에서 많이 침윤되어 있었으며 특히 늑막하에서 그 수가 증가되었다. 방사선량이 증가할수록 비만세포는 많이 출현하였으며 captopril을 사용한 군에서 captopril을 사용하지 않은 군과 비교하여 mast cell의 출현

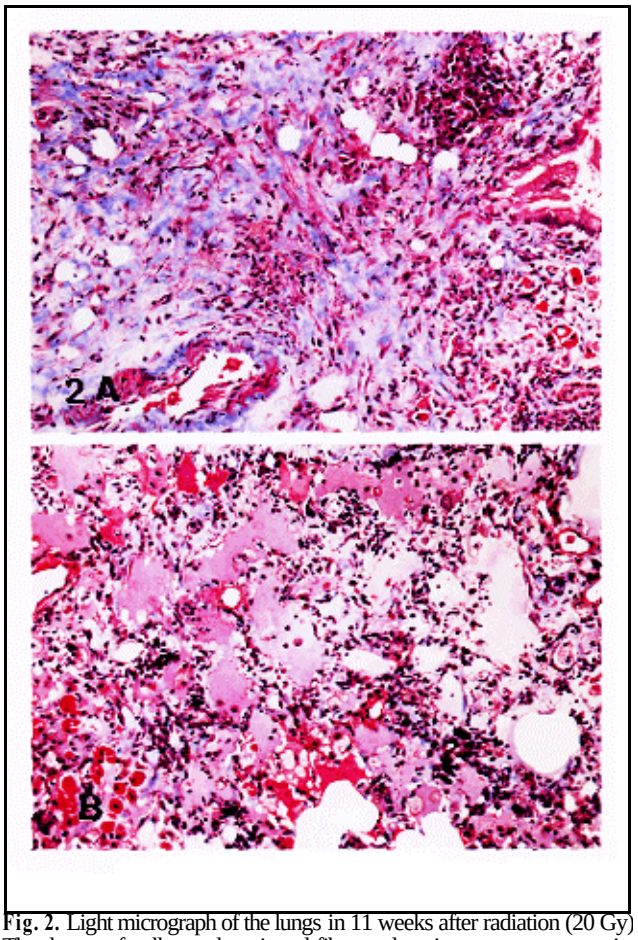

Fig. 2. Light micrograph of the lungs in 11 weeks after radiation (20 Gy) The degree of collagen deposit and fibrous alteration are more severe in radiation alone group (A) than those of radiation and captopril group (B) Trichrome stain, A & B=Original magnification, ×200.

Table 1. Microscopic Changes According to Radiation Dose with or without Captopril

Dose	10 Gy			20 Gy			30 Gy		
Time after radiation	12h	11wk*	11wk+Cap†	12h	11wk	11wk+Cap	12h	11wk	11wk+Cap
Amount of fibrosis	−	+	+/−	−	++	+/++	−	+++	+/+++
TNF-α expression	+	−	−	++	−	−	++	−	−
TGF-β expression	+/++	+/−	+/−	++/+++	+	+/−	++	+/++	+/−
Mast cell‡	+/−	+	+/−	+	++	+	++	+++	++

*weeks, †capropril, ‡increase of number of mast cell, − : absent, +/− : trace, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

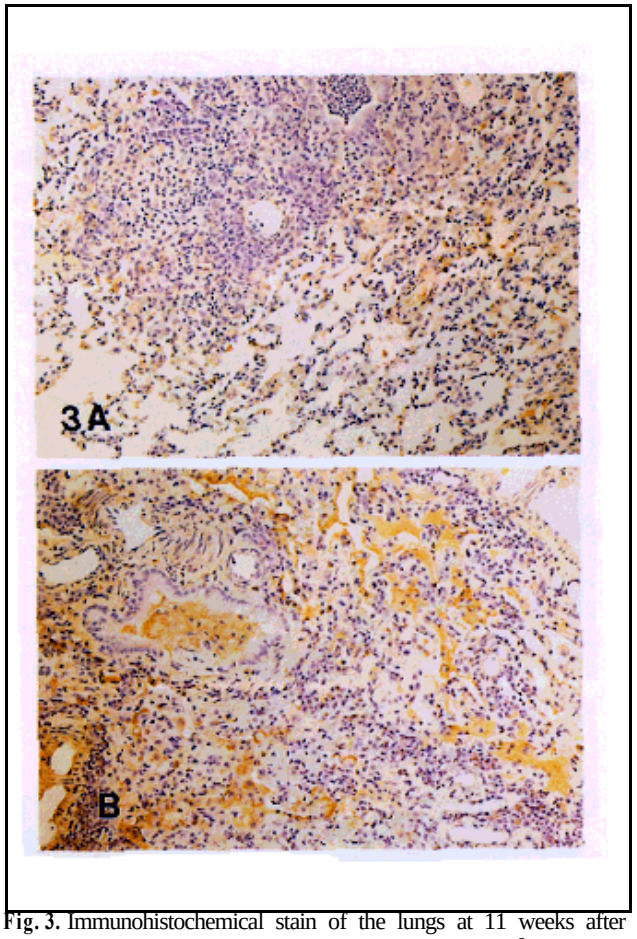

Fig. 3. Immunohistochemical stain of the lungs at 11 weeks after radiation (A : 10 Gy, B : 30 Gy). The expression of TGF-β is stronger and wider in 30 Gy than 10 Gy group. A & B=Original magnification, ×200.

정도가 훨씬 낮았다(Table 1).

3. Collagen 침착 정도 평가

방사선조사 11 주 후 관찰한 실험군에서 방사선 10 Gy 조사 후에는 국소적으로 폐 실질, 기관지 주위 및 혈관 벽 주위에 교원질의 침착을 관찰할 수 있었다. 20 Gy 조사 후에는 교원질 침착의 정도와 침착 부위가 넓어졌으며 30 Gy 조사 후에는 교원질 침착이 더욱 미만성으로 이 루어지면서 정상 폐 실질 구조를 현저히 변형시켰다. Captopril을 사용한 실험군에서는 교원질 침착의 정도가 captopril을 사용하지 않은 실험군에 비

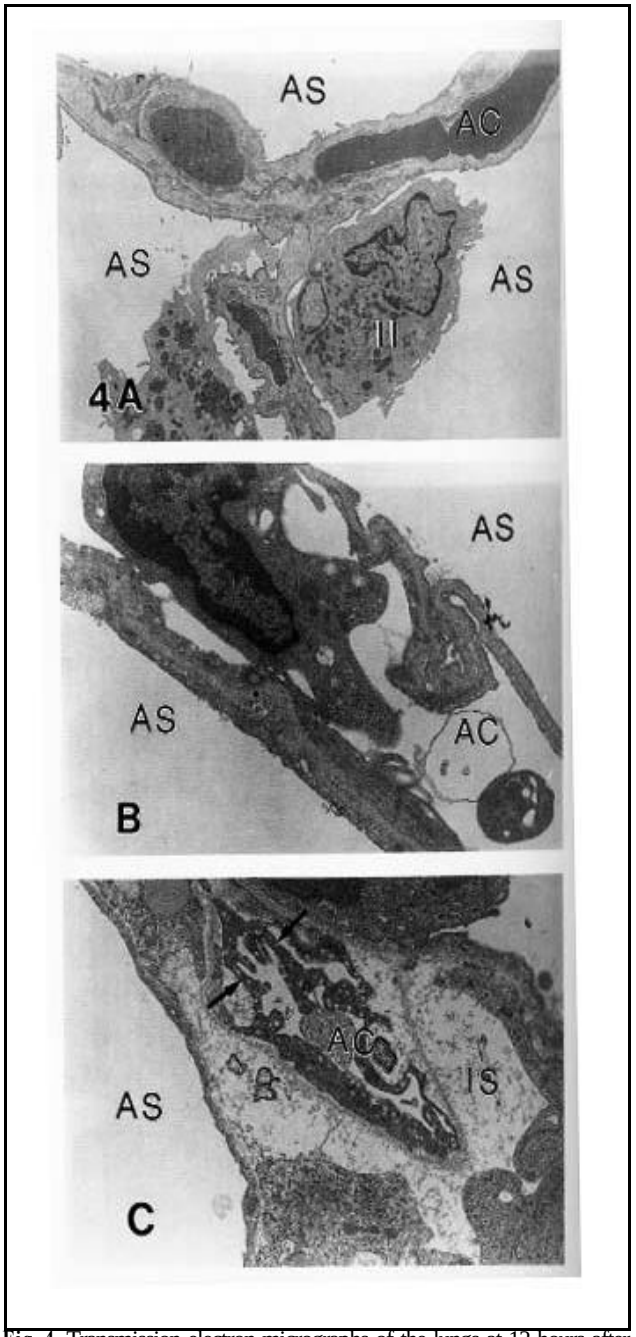

Fig. 4. Transmission electron micrographs of the lungs at 12 hours after radiation in different radiation doses. A: 10 Gy. Mild alteration of capillary and alveolar structures is seen. B : 20 Gy. Moderate alteration of capillary structure with endothelial swelling and papilary projection is seen. C : 30 Gy. Marked edematous change and capillary alteration with severe papillary projection of endothelial cells (arrows) are seen. A : ×4,500, B : ×15,000, C : ×15,000.

해서 현저히 감소되었다(Fig. 2).

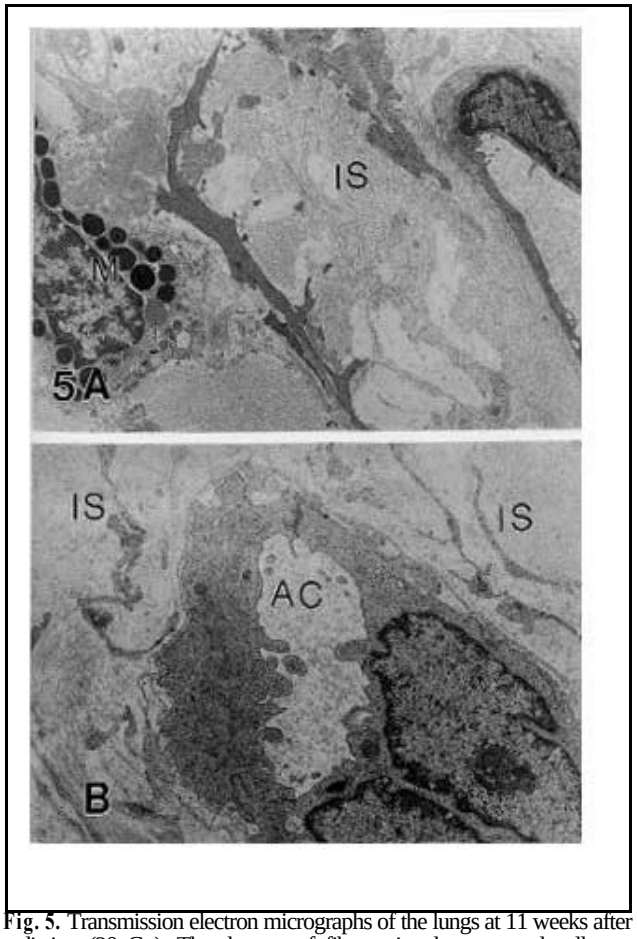

Fig. 5. Transmission electron micrographs of the lungs at 11 weeks after radiation (20 Gy). The degrees of fibrous involvement and collagen deposits in the interstitium are more severe in radiation alone group (A) than those of radiation and captopril group (B). A: ×6,000, B: × 9,000.

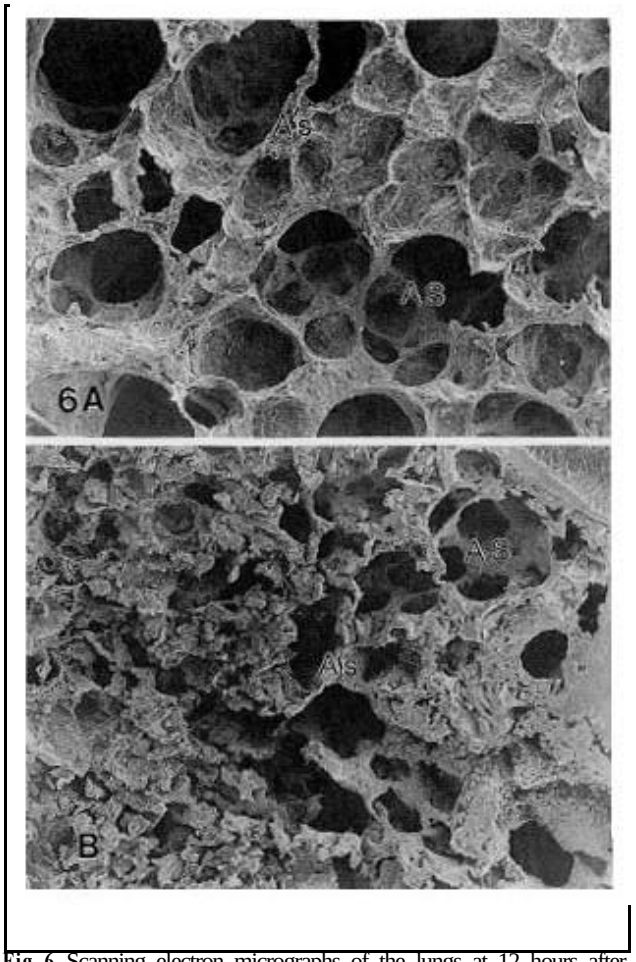

Fig. 6. Scanning electron micrographs of the lungs at 12 hours after radiation in different radiation doses. A : 10 Gy. Relatively well preserved lung parenchyma with mild alveolar damage is seen. B: 30 Gy. Marked alteration and damage of lung parenchyma with alveolar wall destruction are seen. A & B=× 230.

4. TNF-α 및 TGF-β의 면역조직화학 소견

TNF-α 및 TGF-β는 방사선조사 후 12 시간 경과 한 군에서는 방사선량이 많아짐에 따라 그 발현이 증가하였다.

11주 경과한 군에서는 TGF-β는 방사선량이 많아짐에 따라 그 발현이 증가하였으며 captopril 투여군에서는 그 발현이

다소 감소하였다. TNF-α는 방사선량을 다르게 한 실험군 모두에서 발현되지 않았고 captopril 투여군에서도 발현되지 않았다(Fig. 3, Table 1).

5. 전자현미경 소견

1) 투과전자현미경 소견

방사선조사 후 12 시간 경과한 실험군 중 10 Gy를 조사한 군에서는 모세혈관의 형태는 변화를 보이지 않았고 혈관 내피세포의 손상도 현저하지 않았다. 20 Gy 조사 후 모세혈관의 형태의 경미한 변화를 보였고 혈관 내피세포에는 수포(bleb)와 유두상 돌기가 관찰되었다. 30 Gy 조사 후에는 모세혈관 모양의 변화가 현저

하였고 혈관 내피세포는 유두상 돌기가 현저하고 부종과 모세혈관 내강에 세포

파괴물이 많아졌으며, 혈관주위의 기질에 부종이 관찰되었다(Fig. 4).

방사선조사 후 11주가 경과한 실험군 중 10 Gy를 조사

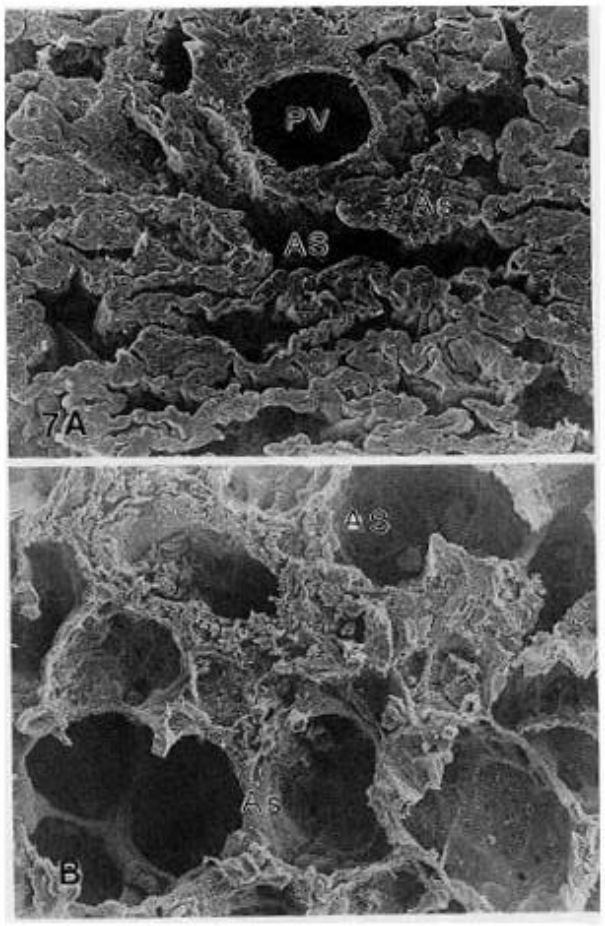

Fig. 7. Scanning electron micrographs of the lungs at 11 weeks after radiation (20 Gy). The pulmonary alterations with fibrous alveolar wall thickening and diffuse consolidation are less severe in radiation and captopril group (B) than those in radiation alone group (A). A & B=× 570.

한 군에서는 모세혈관의 모양에 약간의 불규칙한 변화를 보였고 혈관 내피세포 손상, 간질의 섬유화와 교원질의 침착을 보였다. 20 Gy를 조사한 군에서는 폐실질의 경화와 섬유화의 정도가 심해지면서 교원질의 침착이 많아졌다. 혈관 내피세포의 상피손상이 뚜렷하면서 혈관주위에 mast 세포의 출현이 증가하였다. 30 Gy를 조사한 군에서는 혈관 내피세포의 손상이 현저하였고 교원질 침착이 더욱 증가하였으며 mast 세포의 탈과립이 관찰되었고, 폐포상피세포 중 제 II형 세포의 수가 증가되었고 세포잔해물도

증가하였다(Fig. 6).

방사선조사 후 captopril을 사용한 군에서는 11주가 경과한 실험군 중 10 Gy를 조사한 군에서는 captopril을 함께 사용한 군에서 폐포모세혈관의 형태 변화가 경하게 관찰되었으나 폐실질의 섬유화와 교원질의 침착량이 방사선조사 단독군과 비교하여 상당히 적었으며, 혈관 내피세포 손상 및 세포 잔해물의 양도 적었다. 20 Gy를 조사한 실험군 중 captopril을 사용한 군에서 대식세포가 많아지고 교원질의 침착이 감소되고 무정형 과립상으로 보였으며 혈관주위조직의 비대가 관찰되었으나 방사선 단독군에 비해서는 그 변화가 경하였다(Fig. 5). 30 Gy 조사 후 captopril을 함께 사용한 군에서는 교원질의 양은 증가하였으나 방사선 단독군에 비해 느슨하였

으며 혈관의 비후의 정도와, 모세혈관의 변화정도, mast 세포의 수와 섬유모세포의 수도 적었다(Fig. 6A, B).

2) 주사전자현미경 소견

방사선조사 후 12 시간 경과한 실험군 중 10 Gy를 조사한 군에서는 폐포 구조의 변화가 경한 편이었으며, 전반적으로 폐실질의 형태를 잘 유지하고 있었다. 20 Gy 조사 후 폐포벽은 부종성 비후를 보였으며, 30 Gy를 조사한 군에서는 부분적으로 폐실질의 심한 손상과 함께 폐포의 구조가 파괴되면서 세포 잔해물이 폐포강에 흔히 관찰되었다(Fig. 6). 방사선조사 후 11주가 경과한 실험군에서는 방사선량이 10 Gy, 20 Gy 및 30 Gy로 증가될수록 폐실질의 섬유화 정도가 심해지면서 폐포벽의 비후 및 미만성 경화가 관찰되었다. 방사선조사 후 11주가 경과한 실험군에서 captopril을 함께 투여한 실험군에서는 10 Gy, 20 Gy 및 30 Gy에서 방사선 단독 투여 군과 비교하여 폐포벽의 비후 및 폐실질의 섬유화 정도가 보다 경한 편이었다(Fig. 7).

고찰 및 결론

방사선치료는 전신성 및 국소적인 악성 종양의 치료 방법으로써 널리 사용되고 있으며 골수 이식 환자에서는 미리 면역억제를 위해 방사선조사를 보편적으로 실시하고 있으나 방사선조사 후 필연적으로 수반되는 정상조직의 손상은 피할 수 없는 실정이다. 방사선에 의한 정상조직의 손상을 예방 또는 감소시킬 목적으로 colchicine,[5] penicillamine,[6] pentoxifylline[7] 등 여러 가지 약제들이 사용되어 왔지만 동물 실험을 통해 약제들의 독성으로 인해 임상적으로 사용하기에는 부적합하다는 의견이 지배적이다. 급성 폐손상을 방지하기 위해 Bergman 등[8]은

prednisolone을 사용하였으며 성 등[9]도 스테로이드를 급성 폐손상에 사용하였으나 환자에게 널리 사용하는 것에는 주의할 것을 권하였다. Captopril은 angiotensin I converting enzyme (ACE)의 억제제로서 전신 소동맥의 저항을 저하시키고 이완기 및 수축기 혈압을 낮추는 항고혈압제제로 잘 알려져 있다.[10] 이는 신성 혹은 유전성 고혈압 동물에서 실험적으로 적용된 바 있으며[11] 최근 이와 같은 작용과 더불어 이 약제는 여러 동물실험에서 폐,[12] 신장,[13] 소장,[14] 피부[15] 등에서 방사선조사 후 조직 상해를 예방 또는 개선시킨다는 보고들이 있다. Captopril의 이러한 효과를 Chopra 등[16]은 captopril이 방사선조사로 생긴 세포내 자유기를 제거하는 능력에 기인한다고 주장하였다.

방사선조사에 의한 조직 손상은 혈관 내피세포의 손상과 폐간질의 근섬유모세포의 증식에 의한 교원질 침착으로 일어난다.[17, 18] 급성 폐손상이 발생하는 경우 병리조직학적으로 급성 기관지염과 미만성 폐포손상을 보이며, 폐포 상피세포와 폐포 모세혈관 내피세포의 손상을 주로 초래한다.[19, 20] 방사선조사 후기에는 교원질 침착에 의해 폐섬유화가 진행한다. Vergara 등[21]은 흉부에 30 Gy 방사선을 조사한 후 12주와 16주가 경과한 후 폐조직을 관찰하였을 때 Ⅰ형 및 Ⅱ형 폐포 상피세포와 혈관 내피세포의 수가 모두 감소하였고 세포외 기질은 증가하였으며, 폐간질 세포와 비만세포의 수는 대조군과 비교하여 훨씬 증가함을 보고하였다. 비만세포는 섬유모세포가 교원질 합성을 하도록 자극을 주어 폐섬유화를 촉진하는 역할을 하여 비만세포가 폐섬유화의 정도를 나타내는 표지자로 사용되어왔다.[22] 본 연구에서는 방사선조사 단독군에서 방사선조사후 11주에는 방사선조사량이 10 Gy에서 20 Gy, 30 Gy로 많아질수록 폐섬유화의 정도와 범위가 증가하였다. 방사선조사의 단독군과 방사선과 captopril을 함께 투여한 군의 비교에서 captopril을 함께 사용한 군에서 폐섬유화의 경감효과가 현저하였다. 최근 연구에서 방사선조사 후 captopril을 투여한 군에서는 혈관 확장이 경미하고 파열이나 출혈은 없었으며 점막 표면의 손상도 경미하고 교원질 침착도 감소함을 보고하였다. 이는 captopril이 방사선조사에 의한 혈관 투과성 변화를 막아 주고 교원질 침착을 예방하는 것으로 해석하고 있다.[10, 17] Captopril의 효과에 대해 밝혀진 기전으로는 첫째, 변형된 섬유모세포와 닮은 근섬유모세포의 증식을 억제하여 조직의 교원질 축적을 억제한다. 이 기전을 뒷받침하는 것으로 흰쥐 신장에 angiotensin Ⅱ를 주사하면 근섬유모세포 수가 증가하며 captopril이 angiotensin converting enzyme의 억제 역할을 함으로서 근섬유모세포의 증가를 억제하는 것으로 설명하고 있다. 둘째, 혈관내피세포 손상을 감소시켜 혈관 투과성을 억제시킨다.[17] 셋째, captopril은 기청소물(radical scavenger)의 역할로서 세포 손상에서 유리되는 자유기(free radical) 발생을 억제하는 작용을 한다.[23, 24] 그리고 조직 배양실험에서 captopril은 폐섬유모세포의 증식을 감소시키고 유사분열을 억제하여 세포증식 억제작용을 가짐이 밝혀졌으며, captopril의 투여량에 따라 그 작용의 차이를 보였다.[25] Captopril의 항섬유화 작용의 기전은 아직 확실하지 않으나 이는 free-thiol compound이며 기청소물로써 항산화제 작용을 가진 copper 복합체를 형성하여 만성적인 섬유화를 저지할 것이라고도 하며 thiol 화합물로써 captopril은 교원질의 교차결합과 성숙을 저지하여 교원질 turn over를 촉진시킨다. 또한 쥐의 폐에서 방사선조사 후 hydroxyprolin의 양과 농도를 감소시키며 비만세포의 축적을 억제하는데 비만세포의 분비과립들이 섬유모세포에 의한 교원질의 합성을 자극하므로 부분적으로는 비만세포에 대한 직접적인 captopril의 작용으로 항 섬유화작용이 나타날 수도 있을 것이다.[26]

방사선에 의한 정상 폐조직의 변화는 염증 유발 물질들이 직접 혹은 간접으로 염증세포에 작용할 수 있으며, 최근 섬유화에 사이토카인과 성장요소가 분비된다고 보고되고 있다.[27, 28] 이들 중 대식세포와 Ⅱ형 폐포상피세포에서 분비되는 TGF-β의 mRNA가 섬유화에 민감한 C57BL/ 6종 마우스에서 방사선을 조사한 2 주 후에 증가된다고 하며,[29] bleomycin에 민감한 마우스에서 치료 후 1 주일에 TGF-β mRNA가 증가되는 반면 저항성을 보이는 마우스에서는 감소를 보인 것으로 보고되었다.[30] 여러 염증과정에 기본적인 매개체인 TNF-α는 섬유모세포의 증식과 염증세포의 재순환 그리고 혈관 내피세포의 활성화를 유도하며,[31, 32] 교원질 분비를 억제한다는 보고도 있다.[33] Johnston 등[30]은 TNF-α는 폐섬유화의 critical mediator이라고 한다. Piguet 등[28]은 bleomycin을 투여했을 때 TNF-α의 message가 증가되고 anti-TNF-α항체를 치료 전에 투여시 hydroxyprolin의 양이 감소됨을 보고하였다. Interleukin 1은 IL-1α, IL-1β 두 종류가 있는데 그 기능은 거의 중복되며

같은 수용체에 작용한다. IL-1α는 막에 결합된 형태이고 IL-1β는 유리되는 형태가 더 많이 존재한다. IL-1은 collagenase의 생산 뿐만 아니라 여러 섬유모세포주에서 억제와 자극을 동시에 나타내며,[33 35] 방사선조사 후 폐섬유화에 관여한다. IL-1β는 방사선 저항을 보이는 C3H/ HeJ종 마우스에서 방사선조사 후 증가하였다.[30] 또한 IL-1β는 복강내로 주입시 방사선조사 후 보호 작용을 나타내었다.[36, 37] 임상적으로 TGF-β는 결합조직(connective tissue)의 형성을 자극하는 성장 인자로 흉부 방사선치료 후 증상을 보이는 방사선폐렴을 일으키기 쉬운 위험소인을 가진 환자의 혈청에서 증가된다고 알려져 있다.[38] 본 연구에서는 TGF-β 및 TNF-α가 방사선조사후 12 시간 지나서는 방사선량이 증가할수록 발현정도가 높았다. 방 사선에 의한 섬유화를 감소시키는 captopril의 효과에서 TNF-α의 변화는 없었고 TGF-β는 captopril 투여군에서 그 발현이 다소 감소하였다. TGF-β의 변화를 정량적이나 정성적 변화를 관찰한 것은 아니나 방사선조사 후 초기 및 만성기에도 TGF-β가 관계되며 captopril의 효과에도 역할을 할 것으로 사료된다.

본 연구의 전자현미경 소견에서 방사선 단독조사에서는 방사선조사 후 12 시간에는 방사선량이 증가할수록 모세혈관 모양의 변화가 현저하였다. 혈관 내피세포는 유두상 돌기가 뚜렷하고 부종과 모세혈관강내 세포 잔해물이 많아졌으며 부종성 기질이 관찰되었다. 11주에는 방사선량이 증가할수록 혈관 내피세포와 폐포상피세포의 손상이 현저하였고 교원질 다발(bundle)도 더욱 증가하였다. 비만세포의 탈과립이 흔히 관찰되었고 II형 폐포 상피세포의 수가 증가되고 세포 잔해물도 증가하였다. Captopril을 사용한 군에서 각 방사선량마다 간질의 섬유화와 교원질 다발의 양이 방사선단독 조사군과 비교하여 감소되었고 내피세포 파괴물도 적었다. 대식세포의 수는 많아지며 교원질의 무정형 과립상이 증가되고 혈관주위조직의 비대가 관찰되었다. Captopril을 사용한 실험군에서 방사선량이 증가됨에 따라 교원질의 양은 증가하였으나 방사선단독 조사군에 비해 느슨하였으며 혈관주위의 비후 정도와, 모세혈관의 변화정도, 비만세포의 수와 섬유모세포의 수도 적었다. 다른 문헌상에서도 captopril은 방사선조사를 받은 쥐의 폐에서 교원질과 비만세포의 축척을 감소시킨다고 보고되어 있다.[26] 혈관 내피세포의 손상은 captopril을 투여 군에서 감소되며, captopril은 손상의 발생을 지연시키고 방사선이 조사된 폐혈류의 초기 변화의 정도를 감소시킨다고 하였다.[39]

본 실험의 결과와 문헌상의 보고를 종합하여 볼 때 방사선조사후 방사선 폐렴에서 captopril은 방사선에 의한 비만세포의 침착을 감소시키고 교원질의 침윤을 감소시킴으로써 방사선에 의한 폐렴을 경감 또는 예방하는 것으로 생각된다. TGF-β의 발현은 방사선조사 후 captopril의 투여군에서 방사선 단독군에 비해 다소 감소하였다. 본 연구결과는 방사선조사 후 발생하는 폐손상을 감소시키는데 중요한 자료가 될 것으로 생각되며 향후 임상적인 연구와 면역학적 또는 분자 생물학적 연구를 통해 captopril의 방사선보호 효과에 대한 기전을 밝힌다면 방사선보호제의 개발에도 일조를 할 수 있을 것이다

감사의 글

본 논문을 제출하기까지 도와주신 병리학교실 권건영 교수님께 감사를 드리며 본 연구에 유용하게 쓰인 captopril을 제공해주신 동아 바이오테크 마케팅팀 강성욱 대리님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. **Salazar OM, Rubin P, Keller B, et al.** Systemic(half body) radiation therapy : Response and toxicity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1978; 4:937-950
2. **Luft JH.** Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophysic Biochem Cytol 1961; 9:409-414
3. **Watson, ML.** Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J Biophysic Biochem Cytol 1958; 226:475-479
4. **Reynolds ES.** The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17:208-212
5. **Dubrawsky C, Dubravsky NB, Wither HR.** The effect of colchicine on the accumulation of hydroxyproline and on lung compliance after irradiation. Radiat Res 1978; 73:111-120
6. **Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH, et al.** Functional responses of the pulmonary endothelium to thoracic irradiation in rats. Differntial modification by D-penicillamine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987; 13:1505-1509
7. **Dion MW, Hussey DH,** Obborne JW. The effect of pentoxifylline on early and late radiation injury following fractionated irradiation in C34 mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17:101-107
8. **Bergman M, Graham EA.** Pneumonectomy for severe irradiation damage of the lung. J thor Surg 1951; 2:549-
9. **성낙관, 신세원, 권건영. 전폐조사로 유발된 마우스의 급성 폐손상에 대한 스테로이드의 효과. 대한치료방사선과학회지** 1997; 15:37-47.
10. **Gavras I, Gavras H.** The use of ACE inhibitors in hypertension. In ; Kostis JB, DeFelice EA, eds. Angiotension converting enzyme

inhibitors. New York, Liss, 1987, pp93-122
11. **Frohlich ED.** Angiotensin converting enzyme inhibitors. Hypertension 1989; 13:125-130(Suppl I)
12. **Ward WF, Kim YT, Molteni A, et al.** Radiation induced pulmonary endothelial dysfunction in rats : Modification by an inhibitor of angiotension converting enzyme. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988; 15:135-140
13. **Cohen EP, Molteni A, Hill P, et al.** Captopril preserves function and ultrastructure in experimental radiation nephropathy. Lab Invest 1996; 75:349-3607.
14. **Yoon SC, Park JM, Jang HS, et al.** Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 30:873-878
15. **Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH, et al.** The effects of captopril on benign and malignant reactions in irradiated rat skin. Br J Radiol 1990; 63:349-354
16. **Chopra M, Scott N, McMurray J, et al.** Captopril: A free radical scavanger. Br J Clin Pharm 1989; 27:396-399
17. **Fantone JC, Schrier D, Weingarten B.** Inhibition of vascular permeability changes in rats by captopril. J Clin Invest 1982; 69:1207-1211
18. **Waters CM, Tayor JM, Molteni A, et al.** Dose -response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. Radiat Res 1996; 146:321-328
19. **Ward WF, Molteni A, Solitary NH.** The relationship between endothelial dysfunction and collagen accumulation in irradiated rat lung. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1985; 11: 1985-1990
20. **Roswit B, White DC.** Radiation injuries of lung : A fresh perspective, AJR 1977; 129:127-136
21. **Vergara JA, Raymond-U, Thet LA.** Changes in lung morpholo Gy and cell number in radiation pneumonitis and fibrosis: A quantitative ultrastructural study. Int J radiat Oncol Biol Phys 1987; 13:723-732
22. **Atkins FM, Friedman MM, Subba Rao PV, et al.** Interaction between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. Int Archs Aller Gy Appl Immun 1985; 77: 96-102
23. **Kunkel SL, Fantone JC, Ward PA, et al.** Modulation of inflammatory reaction by prostaglandins. Pro Lipid Res 1982; 20:633-640
24. **Zurier RB, Quagliata F.** Effects of prostaglandin E on adjuvant arthritis. Nature 1971; 234:304-306
25. **Nguyen L, William WF, Chung T, et al.** Captopril inhibits proliferation on human lung fibroblasts in culture: a potential antifibrotic mechanism. Proc Soc Exp Biol Med 1994; 205: 80-84
26. **Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH, et al.** Captopril reduces collagen and mast cell accumulation in irradiate rat lung Int J radiat Oncol Biol Phys 1990; 19:1405-1409
27. **Hoyt DG, Lazo JS.** Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens fibronectin and transforming growth factor-β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. J Parmacol Exp Ther 1988; 246:765-771
28. **Piguet PF, Collart MA,Grau GE, et al.** Tumor necrosis factor cachectin plays a key role in bleomycin induced pneumopathy and fibrosis. J Exp Med 1989; 170:655-663
29. **Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, et al.** Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor β gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 28: 621-631
30. **Johnston CJ, Piedboeuf B, ubin P, et al.** Early and persistent alterations in the expression of interleukin-α, interleukin-1β and tumor necrosis factor α mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. Radiat Res 1996; 145:762-767
31. **Bachwich PR, Lynch JP, Larrick J, et al.** Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. Am J Physiol 1986; 125:421-425
32. **Fiers W.** Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and in vivo level. FEBS Leu 1991; 285: 199-212
33. **Dayer JM, Rochemonteix B de, Burrus B, et al.** Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. J Clin Invest 1986; 77:645-648
34. **Postlethwaite AE, Lachman LE, Mainardi CL, et al.** Interleukin 1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts J Exp Med 1983; 157:801-806
35. **Schmidt JA,Mizel SB, Cohen D, et al.** Interleukin 1. a potential regulator of fibroblast proliferation. J immunol 1982; 128:2177-2182
36. **Constine LS, Harwell S, keng P, et al.** Interleukin-1-alpha stimulates hemopoiesis but not tumor cell proliferation and protects mice from lethal total body irradiation. Radiat Res 1991; 128:316-319
37. **Dorie MJ, Bedarida G, Kallman RF, et al.** Protecton by interleukin 1 against lung toxicity caused by cyclophosphamide and irradiation. Radiat Res 1991; 128:316-319
38. **Anscher MS, Murase T, Prescott DM, et al.** Changes in plasma TGFβ levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 30:671-676
39. **Peterson LM, Evans M, Graham MM, et al.** Vascular response to radiation injury in rat lung. Radiat Res 1992; 129, 139-148

J. Korean Soc Ther Radiol Oncol 1999;17(3):238 248

Abstract

Histomorphologic Change of Radiation Pneumonitis in Rat Lungs : Captopril Reduces Rat Lung Injury Induced by Irradiation

Jin Hee Kim, M.D.

Department of Therapeutic Radiology, Keimyung University Dongsan Medical Center, Taegu, Korea

Purpose : To assess the histomorphologic changes in the rat lung injury induced by radiation, to determine whether captopril reduces the rat lung injury and to evaluate change in TNF-α and TGF-β in rat lung damage by radiation and captopril

Methods and material : Right lungs in male Sprague-Dawley rats were divided irradiation alone (10, 20, 30 Gy) or radiation (same dose with radiation alone group) with captopril (500 mg/L). Radiation alone group were sacrificed at twelve hours and eleven weeks after radiation and radiation with captopril group (captopril group) were sacrificed at eleven weeks after radiation with captopril. We examined the light microscope and electron microscopic features in the groups.

Results : In radiation alone group, there were patch parenchymal collapse and consolidation at twelve hours after radiation. The increase of radiation dose shows more prominent the severity and broader the affected areas. Eleven weeks after radiation, the severity and areas of fibrosis had increased in proportion to radiation dose given in the radiation alone group. There was notable decrease of lung fibrosis in captopril group than in radiation alone group. The number of mast cells rapidly increased with increase of radiation dose in radiation alone group and the degree of increase of mast cell number and severity of collagen accumulation more decreased in captopril group than in radiation alone group. In radiation alone group, expression of TNF-α and TGF-β increased according to increase of radiation dose at twelve hours after radiation in both group. At eleven weeks after radiation, expression of TGF-β increased according to increase of radiation dose in radiation group but somewhat decreased in captopril group. In the captopril group the collagen deposition increased but less dense than those of radiation alone group. The severity of perivascular thickening, capillary change, the number and degranulation of mast cells more decreased in the captopril group than in the radiation alone group.

Conclusion : It is concluded that the effect of captopril in the rat lungs after radiation was considered to be due to its effect on inhibition of mast cells and reduction of collagen deposition, and captopril may be protect in lung damage after radiation. We observed expression of TNF-α and TGF-β increased at the early phase after radiation and expression of TGF-β increased in proportion to increase of radiation dose at the chronic phase after radiation. This results will contribute to future investigation in reduction mechanism of capt opril in lung damage after radiation

Key Words : Radiation pneumonitis, Captopril, Radioprotector