대한방사선종양학회지 2000;18(4):321~328

쥐의 폐에서 방사선이 Nitric Oxide (NO), Nitric Oxide Synthase (NOS) 및 TGF-β의 발현에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 호흡기내과학교실†, 의과학연구소‡,
을지의과대학 치료방사선과학교실§

오영택* · 박광주† · 길훈종* · 하만준‡ · 전미선* · 강승희* · 박성은‡ · 장세경§

목 적 : 방사선폐렴에서 NO가 염증반응을 매개하는 물질로 보고되고 있는데, 이때 유도형의 Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2) 가 주로 Nitric Oxide (NO) 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 NOS2의 억제조절물질로 TGF-β가 알려져 있으며, 최근에는 NO가 증가하면 TGF-β의 활성이 증가하고 그에 따라 NOS2가 억제되어 NO의 생성이 억제되는 간섭기전(feedback mechanism)이 보고되어 있다. In vivo 동물모델에서 방사선조사 후에 NOS2 발현 및 NO 생성의 변화를 측정하고, 그에 따라 TGF-β가 어떻게 변하는지를 관찰하고자 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법 : Sprague-Dawley 쥐 60마리를 마취 후 5 Gy와 20 Gy의 방사선을 우측 폐에 조사하고 대조군은 위조사를 시행하였다. 방사선조사 후 3일, 7일, 14일, 28일, 56일에 방사선 조사군(5 Gy, 20 Gy) 각 5마리와 대조군 2마리를 희생시키고, 희생시키기 전에 우측 폐와 좌측 폐의 주기관지에서 각각 폐포 세척을 시행하여 폐포 세척액을 얻었다. 폐포 세척액에서 단백질과 세포 수를 측정한 후 원심 분리하여 상층액은 NO와 TGF-β 단백의 양을 측정하는데, 가라앉은 폐포 대식세포는 TGF-β와 NOS2 mRNA의 RT-PCR을 위한 검체로 사용하였다.

결 과 : 방사선조사 후 5 Gy군에서는 NOS2 mRNA가 14일 째에 우측 폐에서 발현하였고, 28일 째에는 양쪽 폐에서, 56일 째에는 좌측 폐에서 증가하였다. TGF-β mRNA는 계속 발현되었으나 28일 째에 발현이 감소하는 양상이었고 56일에는 좌측 폐에서 증가하였다. 폐포세척액내의 NO는 28일 째 증가하였고, TGF-beta 단백의 양이 56일 째 좌측 폐에서 증가하였다. 20 Gy 군에서는 NOS2 mRNA는 5 Gy와 마찬가지로 14일주 째에 우측 폐에서 발현하여 28일주 째에 양쪽 폐에서 발현하고 56일 째에 양쪽 폐에서 강하게 발현하였다. TGF-β mRNA는 28일 째에 우측 폐에서 56일 째에 양측 폐에서 증가하였다. 폐포 세척액 내의 NO의 양은 28일 째에 양쪽 폐에서 증가하였고, TGF-β 단백의 양은 우측 폐에서 28일 째 정점을 이루고, 56일 째에 좌측 폐에 비해 유의한 증가 양상을 보여주었다.

결 론 : 방사선폐렴의 동물모델에서 NO, NOS2 와 TGF-β는 선량에 따라 약간의 차이가 있었지만 14일 째 우측 폐에서의 NOS2 mRNA의 발현을 시작으로 비교적 일관된 발현 양상을 보여 주었고 그에 따라 폐포세척액 내의 NO 및 TGF-β 단백의 양이 변하였다. 그러나 예상과는 달리 56일 째에는 NOS2와 TGF-β가 모두 발현하여, 좀 더 많은 개체 수를 대상으로 장기간을 통해 발현 양상을 관찰할 필요성이 있으며, 이 연구를 바탕으로 NOS2 억제제를 사용하여 TGF-β의 발현 양상에 어떤 변화가 오는지에 대한 연구가 필요하다고 평가되었다.

핵심용어 : 방사선폐렴, Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase 2, TGF-β, 방사선

서 론

일반적으로 종양의 치료에 사용되는 비교적 고선량의 방사선에 대한 정상조직의 반응은 그 관점에 따라 여러 가지가 있을 수 있으나 그 중 방사선에 의한 염증 및 섬유화에 의한 각종 증후군의 발생은 방사선에 의한 이차암의 발생과 더불어 방사선의 의학적인 이용이라는 측면에서 가장 중요하다고 할 수 있다.

인체조직이 방사선에 노출되어 조직손상이 발생하게 되면 대식세포나 단핵세포 및 혈소판 등이 활성화되고, 활성화된 이들 세포로부터 여러 가지 세포활성물질(cytokine)이나 성장인자(growth factor)들이 분비되어 국소적인 염증반응을 유도하고, 염증과정에서 분비된 세포활성물질 및 성장인자들이 섬유아세포를 자극하면 섬유아세포들이 결집하고(recruitment),

본 연구는 학술진흥재단 2000년도 신진교수 연구비의 지원을 받았음.
이 논문은 2000년 8월 30일 접수하여 2000년 11월 30일 채택되었음.
책임 저자 : 오영택, 아주대학교병원 치료방사선과
Tel : 031)219-5338, Fax : 031)219-5894
E-mail : ohyoung@madang.ajou.ac.kr

성장하여(proliferation) 세포외 기질(extra-cellular matrix)의 생성을 촉진하게 되며 동시에 세포외 기질의 분해(degradation of extra-cellular matrix)는 감소하게 되는데 이러한 과정이 궁극적으로는 조직의 섬유화를 일으킨다고 할 수 있다. 이처럼 방사선에 의한 정상조직의 염증 및 섬유화 과정은 그 형태학적인 요인, 병리학적인 소견, 임상적인 경과 등에 대해서 비교적 널리 알려져 있으며, 이와 같은 염증 및 섬유화 과정은 인체내 대부분의 주요장기에서 유사한 양상으로 나타내며, 염증 및 섬유화를 동반하는 일반적인 다른 여러 임상증후군과도 그 원인만 다를 뿐이지 대체적으로 공통적인 질병경과를 나타낸다.[1, 2] 또한 아직까지 명확한 기전들이 다 밝혀져 있지는 않지만 그 분자생물학적인 기전도 근본적으로는 다르지 않을 것으로 추정하고 있다.[1] 인체 정상조직에서 방사선조사 후에 염증 및 섬유화 반응을 동반하는 임상적인 증후군들을 살펴보면 선량이 증가함에 따라 염증반응이 발생하고, 어느 한계선량을 넘어서면 염증반응이 우세한 가역적인 상태에서 비가역적인 섬유화로 진행하는 것을 알 수 있다. 대표적으로 폐암에서 방사선치료를 받는 경우 방사선조사 후 약 1개월에서 6개월 사이에 방사선폐렴이 발생하고, 그 후에 일부에서 폐의 섬유화가 진행되는 것으로 알려져 있다. 이처럼 폐의 섬유화가 진행하는 과정에 관여하는 가장 중요한 세포활성물질이 TGF-β이며, 방사선이 아닌 다른 원인에 의한 폐의 섬유화에서 뿐만 아니라, 폐가 아닌 다른 장기에서 발생하는 섬유화를 동반하는 임상증후군에서도 그 발현이 보고되고 있어, 전체적으로 섬유화의 과정에 관여하는 가장 중요한 인자로 알려져 있다.[3]

최근 과거에는 단순한 공기오염물질에 불과했던 NO (Nitric Oxide)가 인체 내에서 여러 가지 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있는데, 그 중에 한가지가 염증반응을 매개하는 기능이다.[4] 일반적으로 방사선이 조사되면 NO가 증가하게 되는데 방사선폐렴에서도 이 NO가 염증반응을 매개하는 물질로 최근에 보고되었다.[5] 이 NO를 생성하는 효소가 NOS (Nitric Oxide Synthase)로 3가지 동위효소가 있는데 유동형(inducible form)의 iNOS 즉 NOS2가 주로 관여한다. 이 NOS2의 대표적인 억제조절물질이 TGF-β이며, 최근에는 NO가 증가하면 비활성형(latent form)의 TGF-β에서 활성형(active form)의 TGF-β로의 변환이 증가하고 그에 따라 NOS2가 억제되어 NO의 생성이 억제되는 억제간섭(negative feedback) 기전이 보고되어 있다.[6]

TGF-β를 섬유화가 동반되는 임상 증후군의 치료목표로 하는 것이 가장 효과적일 것으로 생각되지만, TGF-β가 워낙 다양한 기능을 수행하고 있을 뿐만 아니라, 종양억제유전자의 역할을 담당하고 있음을 고려할 때, 현실적으로 아직까지는 불가능하다고 할 수 있다. 따라서 만약 이 가설대로 NO를 경유하는 경로가 실제 in vivo 에서도 작용하고, TGF-β 발현의 조절에 중요한 역할을 한다면, NOS2와 NO생성의 경로를 조절하는 것이 섬유화를 억제하는 치료방법일 가능성이 높다. 따라서 in vivo 동물모델에서 방사선조사 후에 NOS2 및 NO 의 발현 및 생성의 변화를 측정하고, 그에 따라 TGF-β가 어떻게 변하는지를 관찰하여 이 가설이 실제로 작용하는지를 규명하는 것이 필요하다.

따라서 본 연구자는 in vivo 동물모델에서 방사선에 의한 NOS2의 발현과 NO의 생성을 측정하고, NO 생성의 변화에 따른 TGF-β의 발현의 변화를 관찰하여, 방사선이 NOS2와 NO, TGF-β의 발현 및 상호관계에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 방사선조사

실험동물은 Sprague-Dawley rats 60마리로 pentotal sodium (40 mg/kg)을 복강 내로 주입하여 마취하였다. 마취 후 5 Gy와 20 Gy 의 방사선을 우측 폐에만 조사하였고, 이때 반대편 좌측 폐는 3 mm의 납으로 표면을 차폐하여 산란선에 의한 방사선조사를 차단하고, 방사선이 조사되는 우측 폐는 선량의 균등한 조사를 위해서 조직등가물질로 표면을 덮어 주었다. 대조군은 위 조사를 시행하였다. 방사선조사 후 3일, 7일, 14일, 28일, 56일에 방사선 조사군(5 Gy, 20 Gy)과 대조군을 과용량의 pentotal sodium으로 희생시켰으며, 이 때 방사선조사군은 각각 5마리, 대조군은 2마리에서 시행하였다.

2. 폐포 세척(Bronchoalveolar Lavage : BAL) 및 검체 준비

정중앙 절개로 쥐의 기관 및 폐를 박리하고 폐포 세척관을 이용하여 우측 폐와 좌측폐의 주기관지를 대상으로 각각 폐포 세척을 시행하였다. 폐포 세척은 2 cc의 PBS로 5회 반복 시행하였고, 세척액에 대한 세포성상 관찰 및 단백질 양을 측정하여 폐포 세척이 제대로 이루어지지 않은 검체는 연구에서 제외하였다. 폐포 세척액은 원심 분리하여 상층액은 NO 및 TGF-β1 단백의 양을 측정하는데 사용하였고, 가라앉은 폐포 내 세포는 PBS로 세척한 후 TGF-β1 및 NOS2 mRNA의 RT-PCR을 위해 -70도에 냉동시켰다.

3. 폐포 세척액에서 TGF-β1 단백의 측정

폐포 세척액을 원심 분리한 후 따로 모은 상층액의 일정량을 대상으로 TGF-β1 ELISA kit (R&D System, Minneopolis,

MN)로 설명서에서 권고하는 대로 폐포 세척액내 TGF-β1의 양을 측정하였다.

4. Nitrite/Nitrate 농도측정

Nitrite/Nitrate 농도는 Griess 법으로 측정하였다.[7] 상층액 내에 들어 있는 단백질의 양을 정량한 후 샘플과 표준용액(standard solution: 1M sodium nitrite 69,000 μg/ml in water)을 50~100 μl/well씩 넣어 주었다. 동량의 sulfanilamide solution (1% sulfanilamide solution in 5% phosphoric acid)을 각각의 용기에 넣고 5분간 방치한 후 동량의 NED solution (0.1% N-1-napthylethlyldiamine dihydrochloride in water)을 넣고 다시 5분간 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 판독하여 측정하였다. Nitrate는 nitrate reductase를 사용하여 nitrite로 enzymatic conversion을 시킨 후 동일한 방법으로 측정하였다.

5. RNA 추출, cDNA 합성 및 RT-PCR

냉동하였던 폐포 내 세포로부터 RNA 분리는 RNAzol B를 사용하여 분리한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 증류수에 녹인 후 자외선 분광비색계로 농도 및 순도를 측정한 후 사용하였다. cDNA합성은 분리된 RNA 2 μg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40 μl 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 μg, 5 mM MgCl2, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/μl RNase 억제제 (Perkin-Elmer제품), 2.5 U/μl MuLV 역전사 효소(Perkin-Elmer 제품), 2.5 μM oligo dT (16 mer)로, 반응 조건은 42℃ 1시간, 99℃ 5분, 5℃ 5분으로 하였다. PCR은 10X 반응 완충액(15 mM MgCl2, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 μl와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 μl씩, 그리고 30 μM sense 및 antisense primer를 각각 1 μl를 넣은 혼합물에 1 μl의 반응시킨 cDNA 반응 혼합액과 2.5 단위의 Taq 중합효소 (Perkin-Elmer제품)를 넣은 후 증류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 중층한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer제품)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 μl를 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. NOS2의 RT-PCR에 사용된 primer의 염기서열은 upstream primer로 5'-AGA TGG ATC AAG TGG ACA TC-3'를 down stream primer로 5'-CAT GTT CTC CGG TTT CCA T-3'를 사용하였고, TGF-β는 5'-TGG ACC GCA ACA ACG CCA TCT ATG AGA AAA CC-3'과 5'-TGG AGC TGA AGC AAT AGT TGG TAT CCA GGG CT-3'을 사용하였다.

6. 통계처리

실험으로부터 얻어진 자료는 평균값(mean±1 standard deviation)으로 나타내고 통계적인 유의성 검증은 Student's t-test와 x2 test로 하였으며 p값이 0.05이하인 경우를 유의하게 판정하였다.

결 과

폐포 세척액에서 방사선이 조사된 우측 폐에서 단백질이 증가하는 양상을 보여주었으며, 5 Gy군에서는 방사선 조사 후 56일 째에, 20 Gy군에서는 28일 째부터 유의하게 증가하는 양상을 보여주었다(Fig. 1). 또한 폐포 세척액내의 세포의 수는 양쪽 폐에서 모두 56일 째에 유의하게 증가하였으며, 그 값은 방사선이 조사된 우측 폐에서 방사선이 조사되지 않은 좌측 폐에 비해 유의하게 높았다(Fig. 2). 폐포 세척액

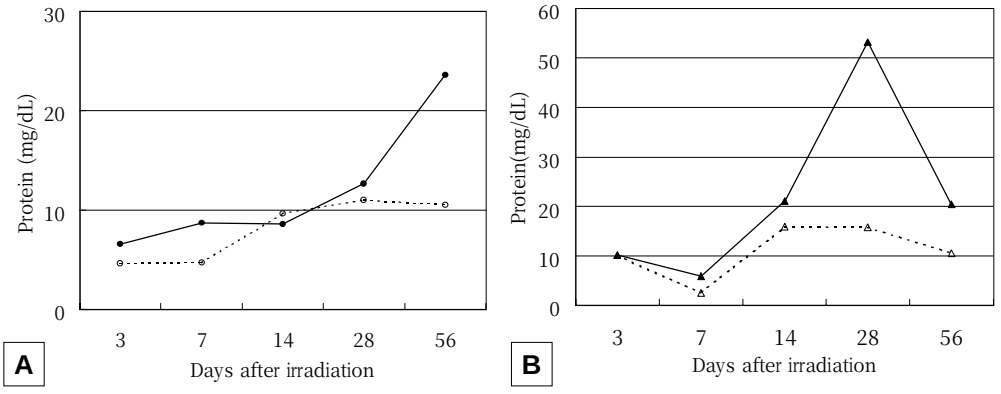

Fig. 1. Measurement of total protein in BAL fluid after irradiation. **A)** 5 Gy of irradiation on right lung, **B)** 20 Gy of irradiation on right lung

내에서의 단백질의 양의 증가와 세포 수의 증가는 모두 5 Gy군보다 20 Gy군에서 현저하게 높았다.

폐포 세척액에서 NO의 양은 28일 째에 5 Gy와 20 Gy군의 좌우 폐 모두에서 4주 째에 정점을 이루며 유의하게 증가하였다(Fig. 3, Table 1).

또한 세척액 내의 TGF-β1 단백의 양은 5 Gy군에서는 56일 째에 방사선이 조사되지 않은 좌측 폐에서 우측 폐에 비해 증가하는 양상을 보였지만 통계적인 유의성은 없었고, 20 Gy군에서는 28일 후부터 정점을 이루며 증가하는 양상을 보였으며, 56일 째에는 그 증가폭은 감소하였으나 우측 폐의 증가가 좌측 폐에 비해 통계적으로 유의하였다(Fig. 4, Table 2).

폐포 내 세포에서의 NOS2 mRNA의 발현은 방사선조사

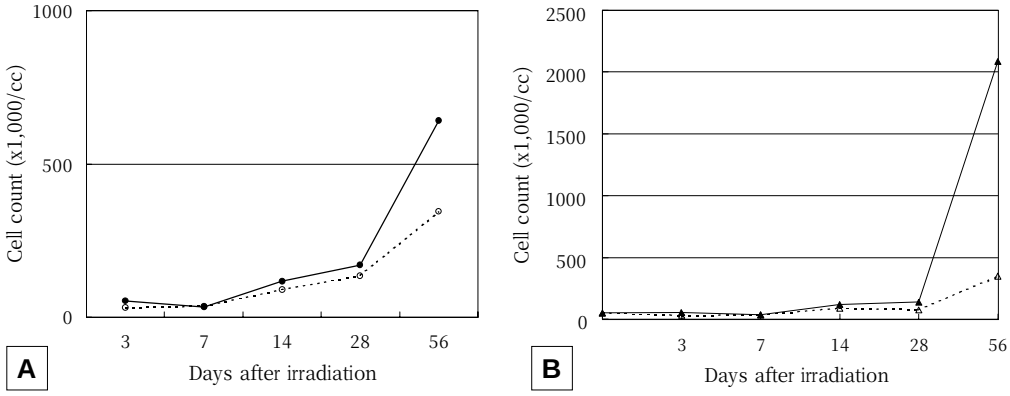

Fig. 2. Measurement of total cell count in BAL fluid after irradiation. **A)** 5 Gy of irradiation on right lung, **B)** 20 Gy of irradiation on right lung

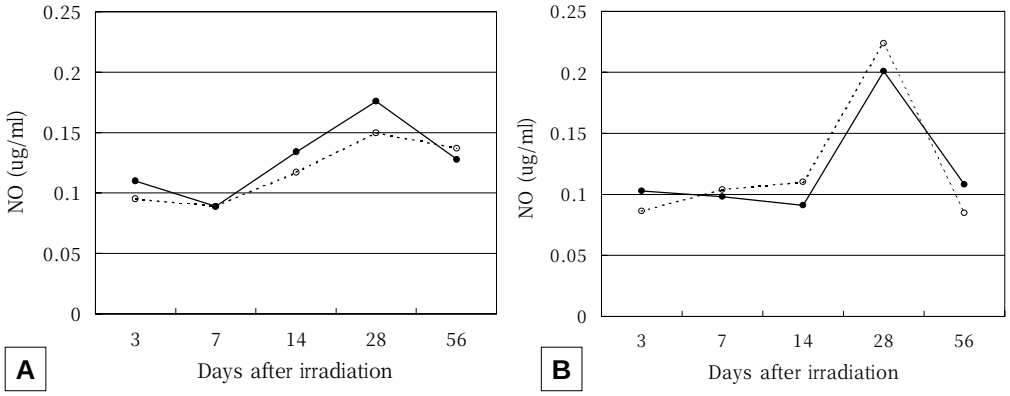

Fig. 3. Measurement of NO in BAL fluid after irradiation. **A)** 5 Gy of irradiation on right lung, **B)** 20 Gy of irradiation on right lung

Table 1. Measurement of Nitric Oxide in BAL (Broncho-Alveolar lavage) Fluid

	5 Gy of Radiation		20 Gy of Radiation	
	Right Lung (Mean±SD)	Left Lung (Mean±SD)	Right Lung (Mean±SD)	Left Lung (Mean±SD)
3 days after	0.095±0.025	0.110±0.022	0.103±0.075	0.086±0.024
7 days after	0.090±0.011	0.089±0.018	0.098±0.020	0.104±0.028
14 days after	0.117±0.026	0.134±0.014	0.091±0.017	0.110±0.029
28 days after	0.150±0.030	0.176±0.031	0.201±0.077	0.224±0.074
56 days after	0.137±0.051	0.128±0.051	0.108±0.008	0.085±0.010

The right lung is irradiated side

Table 2. Measurement of TGF-β1 Protein in BAL (Broncho- Alveolr Lavage) Fluid

	5 Gy of radiation		20 Gy of radiation	
	Right Lung (Mean±SD)	Left Lung (Mean±SD)	Right Lung (Mean±SD)	Left Lung (Mean±SD)
3 days after	16.8±1.8	16.5±0.6	16.9±4.3	15.3±2.1
7 days after	18.2±6.0	14.8±2.0	14.7±1.2	13.8±0.0
14 days after	15.2±3.1	17.5±5.1	15.8±2.7	14.8±2.0
28 days after	18.9±2.7	18.7±2.7	47.1±47.1	20.3±5.3
56 days after	16.8±2.7	31.6±24.6	30.4±6.7	16.8±3.5

The right lung is irradiated side

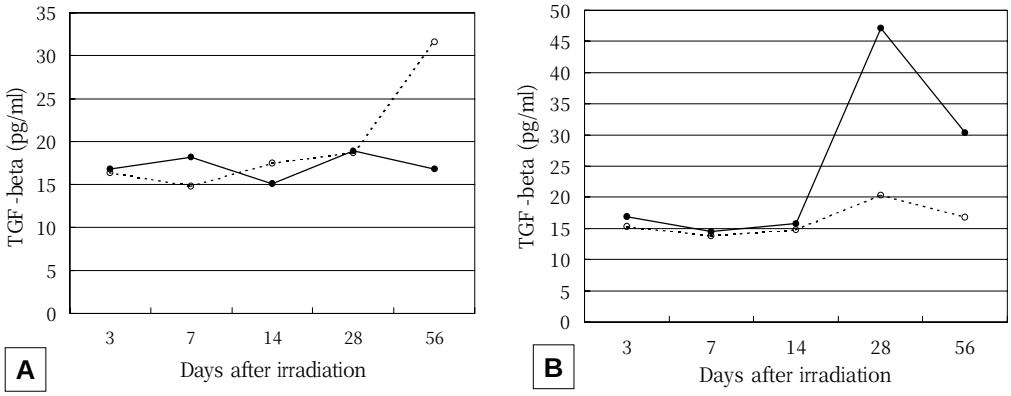

Fig. 4. Measurement of TGF-β1 protein in BAL fluid after irradiation. **A)** 5 Gy of irradiation on right lung, **B)** 20 Gy of irradiation on right lung

후 14일 째에는 방사선이 조사된 우측 폐에서만 발현되었고, 28일 째에는 양쪽 폐에서 모두 발현되었으며 5 Gy군에서 발현이 증가된 양상이었다. 56일째에는 5 Gy군은 방사선이 조사되지 않은 좌측 폐에서 20 Gy군의 양측 폐에서 그 발현이 증가한 양상이었다(Fig. 5).

또한 TGF-β1 mRNA의 발현은 대조군을 포함하여 선량 시기와 관계없이 계속 발현되었지만, 14일째에는 20 Gy군에서 발현이 증가하는 양상이었고, 28일 째에는 5 Gy군에서 발현이 감소하는 양상을 보여주었다. 그리고 56일째에는 5 Gy군의 좌측 폐와 20 Gy군의 양측 폐에서 발현이 증가하는 양상을 보였다(Fig. 5).

고안 및 결론

일반적인 섬유화 과정뿐만 아니라 방사선에 의한 섬유화 과정에 관여하는 가장 강력하면서도 널리 알려진 세포활성물질이 TGF-β이다. TGF-β는 여러 가지 기능을 가지고 있는 대표적인 세포활성물질(multifunctional cytokine)로서 혈소판에서 처음 분리되어 10여년 전부터 널리 알려지기 시작하였다. TGF-β 즉 형질전환 성장인자(Transforming Growth Factor)란 명칭으로 불리어지는 이유는 TGF-β가 정상세포를 마치 바이러스에 의해 형질 전환된 것처럼 세포를 성장시키는 현상을 발견한데서 비롯되었다. 포유동물에서 TGF-β는 세 가지 동위효소를 가지고 있는데, TGF-β1, TGF-β2, 그리고 TGF-β3로 불리며 아직까지는 그 발현양상에 어느 정도의 차이는 있으나 생물학적인 특성에 있어서 거의 동일한 것으로 알려져 있다.[1] TGF-β는 다른 성장인자를 조절하는 등의 많은 생물학적인 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 세포수준에서는 그 작용이 표적세포의 종류에 따라 좌우된다. 예를 들어 일반적으로 상피세포에 대해서는 그 성장을 억제하는 작용을 가지고 있는 반면, 섬유아세포에 대해서는 강력한 화학주성(chemotaxis)을 일으킨다. 이와 같이 화학주성을 유발하는 특성은 많은 동물모델과 인체질환에서 일어나는 섬유화의 발병과정에서 관찰되며, TGF-β가 섬유화의 과정에서 어떠한 역할을 하고 있는지를 설명할 수 있다. 또한 방사선에 의한 섬유화 반응도 일반적인 섬유화 과정과 마찬가지로 TGF-β에 의한 화학주성이 중요한 역할을 할 것으로 생각할 수 있으며 실재로 TGF-β와 방사선에 의한 섬유화

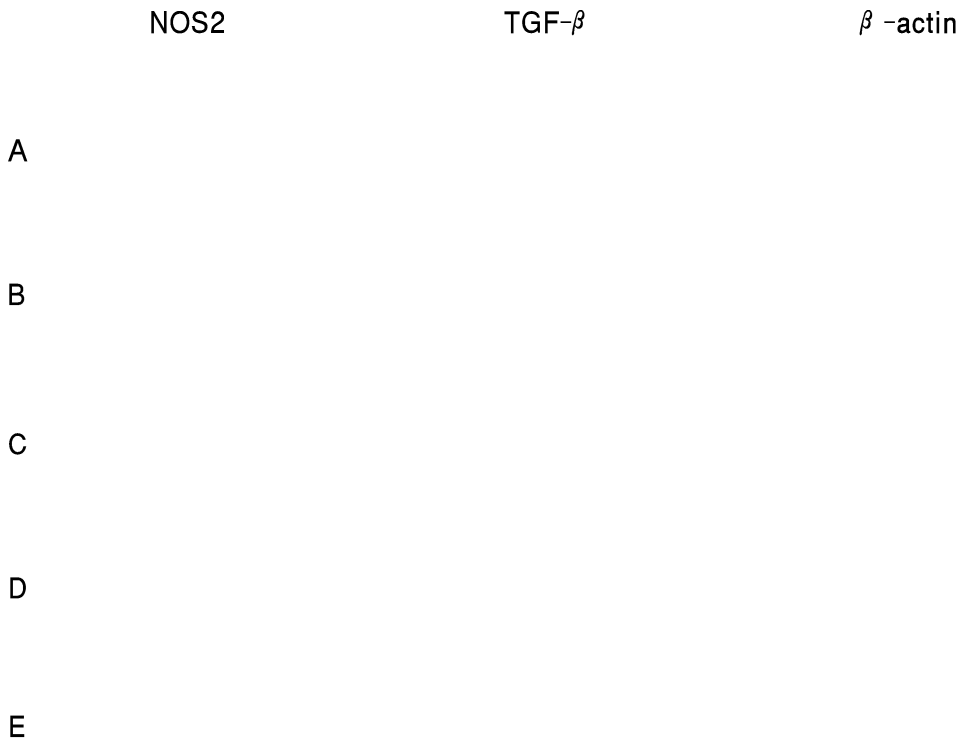

Fig. 5. NOS2 and TGF-β1 mRNA expression in alveolar cells. lane1 : Molecular weight marker, lane2 : righ lung of control, lane3 : left lung of control, lane4 : right lung of 5 Gy group, lane5 : left lung of 5Gy group, lane 6 : right lung of 20Gy group, lane 7: left lung of 20Gy group. **A)** 3 days after irradiation, **B)** 7 days after irradiation, **C)** 14 days after irradiation **D)** 28 days after irradiation, **E)** 56 days after irradiation

과정의 연관관계를 시사하는 많은 실험결과들이 있고, 그 대상조직도 간, 근육, 피부, 장, 폐, 신장, 유선 등으로 매우 다양하다.

이러한 TGF-β를 섬유화 과정을 동반하는 질환에서 이용하고자 하는 연구가 꾸준히 있어왔으며, 실제로 자가골수이식을 시행할 예정인 유방암환자의 혈장에서 TGF-β의 농도를 측정하였더니 그 측정치가 자가골수이식후의 간의 정맥협착질환 과 특발성 간질성 폐렴의 발생위험도와 연관관계를 갖는다는 보고도 있으며,[8] 폐암으로 방사선치료를 시행받은 환자에서 TGF-β 수치의 변화가 향후 방사선폐렴의 발생과 높은 연관관계를 갖고 있다는 보고도 있다.[3]

Yi 등[9]은 본 연구와 같은 방법으로 폐포 세척액에서 TGF-β 단백의 양을 측정하여 30 Gy 조사 후 21~42일 사이에 정점을 이루며 증가하고 TGF-β mRNA의 발현도 그와 연관되어 발현하는 것으로 보고하였는데, 본 연구에서도 20 Gy 조사 후 TGF-β1 단백의 양이 28일주째에 정점을 이루며 56일주 째까지 증가하였고, TGF-β mRNA의 발현도 20 Gy 군에서 28~56주일 째에 증가하여 이와 유사한 실험 결과를 보여 주었다. 또한 다른 연구에서도 폐에서의 TGF-β의 발현이 2~8주 사이에 증가하는 것으로 보고되어 있어 본 연구의 결과와 일치하였다.[3, 10]

TGF-β 이외에도 여러 가지 분자생물학적인 인자들이 방사선에 의한 염증 및 섬유화반응에 관여하는데, 그 중 최근에 주목받고 있는 물질이 NO와 NOS2이다. NO는 매우 짧은 반감기를 갖는 inorganic free radical gas로서 혈관확장인자(vascular relaxing factor)로 작용한다. Palmer 등[11]이 혈관내피세포가 NO를 합성할 수 있음을 증명한 이후로 많은 다른 세포에서 NO의 존재 및 생물학적 연관성이 입증되었다. NO는 혈관계, 신경계, 및 면역체계에서 중요한 세포신호 전달 물질(cell signaling molecule)로서 작용하며 활성화된 대식세포 및 내피세포에 의해 고농도로 생성되는 cytostatic 또는 cytotoxic mediator로서의 역할을 한다. NO는 NOS에 의해 arginine을 기질(substrate)로 하여 합성된다. NOS는 조직 내에 기본적으로 존재하는 기본형(constitutional form : cNOS)과 어떤 외부적 자극에 의해 유도되는 유도형(inducible form : iNOS)의 두 가지 형태가 있다. cNOS는 혈관내피세포, 신경세포(중추신경

계 및 말초신경계)에 존재하며 iNOS는 내분비독소(endotoxin), 세포활성물질, 미생물 및 이의 생성물, 일부의 종양세포 등의 자극에 의해 다양한 세포들(hepatocyte, chondrocyte, adenocarcinoma cell, keratinocyte, respiratory epithelium, macrophage)에서 발현된다. NO의 생성은 L-arginine의 구조적 유사체(structural analogs)인 L-NMMA, L-NNA, L-NAME와 NO의 음성 간섭작용 등에 의해 억제된다.[4)]

일반적으로 많은 질병에서 iNOS가 활성화되면 NO의 생성이 증가하게 되고 그에 따라 여러 가지 질병이 유발되는 것으로 알려져 있으며, 방사선폐렴에서도 NO가 염증반응의 중간 매개역할을 하는 것으로 보고되고 있다.[4, 5)] Nozaki 등[5)]은 폐포 세척액에서 NO가 방사선이 조사 된 폐에서 방사선이 조사되지 않은 폐와 비교하여 7일주부터 56일까지 유의하게 증가하고, NOS2 mRNA발현도 방사선이 조사된 폐에서만 증가하는 것으로 보고하며 NOS2 억제제를 사용하여 방사선폐렴을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 NO가 방사선이 조사된 폐에서 증가하고, NOS2 발현도 동반되어 NO 및 NOS2가 방사선 폐렴의 염증반응을 주도할 것이라는 점에서는 일치하는 결과를 얻었지만, 양쪽 폐에서 모두 NOS2가 발현되어 결과에는 차이가 있었다. 그 이유로는 본 연구에서도 5 Gy와 20 Gy군간에 발현의 차이가 있듯이 아마도 선량의 차이에 의한 것으로 생각된다. Nozaki 등[5)]은 40 Gy의 선량을 사용하였고, 선량이 많기 때문에 조직학적인 변화가 동반되었지만, 본 연구에서는 결과를 제시하지는 않았으나 5 Gy와 20 Gy의 방사선량을 사용하여 조직학적인 소견에서는 특별한 변화가 발견되지 않았다. 그러나 폐포 내 단백질 및 세포의 성상은 방사선 폐렴과 일치하고 있어 임상적인 방사선폐렴으로는 본 연구의 동물모델이 적합한 것으로 생각되며, 양쪽 폐에서 염증반응을 보이며 NOS2의 발현이 증가한 것은 방사선에 의한 폐의 반응이 방사선이 조사된 부위에만 국한되지 않음을 보여주는 결과로 방사선이 조사되지 않은 폐에서도 방사선에 의한 폐 손상이 발생하는 기전을 제시하는 것으로 생각된다.[12)]

TGF-β는 NOS2의 대표적인 억제제로 알려져 있으며,[13)] 최근에는 종양세포와 대식세포를 같이 배양하는 환경에서 NO가 TGF-β의 활성화에 관여함으로써 TGF-β의 활성을 증강시키고 그에 따라 NOS2가 억제되고 따라서 NO의 생성이 억제되는 음성간섭의 기전이 작용할 가능성이 제시되었다.[6)] 방사선조사 후에는 TGF-β의 활성이 증가하는 것으로 알려져 있음과 동시에 NOS2의 활성을 증가시켜 NO의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있으므로 이러한 상호 작용기전은 방사선폐렴에서도 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

20 Gy의 방사선이 조사된 폐에서 보면 방사선 조사 후 14일 경부터 방사선이 조사된 폐에서부터 NOS2 mRNA가 발현하여 양쪽 폐에서 발현되며 28일째에 NO의 양이 정점을 이루고 TGF-β 단백의 양은 28일부터 증가하여 56일 째에는 유의한 증가를 보인다. NOS2 mRNA는 28일 째에 발현정도가 감소하며 TGF-β의 발현이 가장 증가하는 8주 째에는 NO의 양이 감소하여 NOS2-NO-TGF-beta의 상호 간섭 관계에 일치되는 결과를 방사선폐렴의 동물모델에서 얻을 수 있었다. 그러나 이 때 이론상으로는 56일째에는 TGF-β의 발현이 증가하므로 NOS2의 발현이 감소할 것으로 예상하였으나 오히려 같이 증가하는 양상을 보여 주었다.

또한 5 Gy군에서는 14일째에 NOS2가 발현되고, 28일째에는 TGF-β mRNA의 발현이 감소하면서 양쪽 폐에서 NOS2 mRNA가 발현되며 NO의 양이 양쪽 폐에서 증가하였다. 56일 째에는 방사선이 조사된 폐에서는 NOS2와 TGF-β 발현이 감소되어 있고, NO와 TGF-β의 양도 감소되어 있었다. 그러나 방사선이 조사되지 않은 좌측 폐에서는 NOS2와 TGF-β의 발현이 증가하면서 TGF-β의 분비량도 증가하는 양상을 보여주었다. 20 Gy군에서와 마찬가지로 TGF-β의 발현이 증가하였고 NO의 양에 변화가 없으므로 NOS2 mRNA 발현이 감소하여야 하는데 역시 TGF-β와 같이 동반하여 증가하였다. 이러한 현상이 관찰되는 이유를 알 수는 없으나, in vivo에서 NO, NOS2, TGF-β가 일관된 발현양상을 보이는 것은 매우 고무적이며, 특히 4주까지는 서로 상호 간섭하는 양상을 보여주었다. 따라서 NOS2 억제제를 쓰면 NO가 감소하고, 그에 따라 TGF-β의 발현 및 분비가 감소하여 방사선에 의한 폐렴 및 폐 섬유화를 감소시킬 수 있는 가능성이 있다고 판단된다. 따라서 향후 방사선조사 후의 NOS2 mRNA의 발현 및 NO의 양이 TGF-β mRNA의 발현에 미치는 영향에 대한 연구가 좀 더 많은 개체수를 대상으로 좀더 오랜 기간동안 이루어져야 하겠으며, 동시에 NOS2 억제제가 TGF-β의 발현 및 분비를 억제할 수 있는가에 대한 연구가 필요할 것으로 평가된다.

참 고 문 헌

1. **Border WA and Noble NA.** Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med 1994;331:1286-1292
2. **Franklin TJ.** Therapeutic approaches to organ fibrosis. Int J Biochem Cell Biol 1997;29:79-89
3. **Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, et al.** A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;33:99-109
4. **Wink DA and Mitchell JB.** Chemical biology of nitric oxide: insight into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mecha-

nisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 1998;25:434-456
5. **Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, et al.** Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. Am J Physiol 1997;272:651-658
6. **Vodovotz Y, Chesler L, Chong H, et al.** Regulation of Transforming Growth Factor β1 by nitric oxide. Cancer Res 1999;59:2142-2149
7. **Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S.** Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthase by IFN-gamma. J Immunol 1990;145:940-944
8. **Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL.** Transforming growth factor-beta1 expression in irradiated liver. Radiat Res 1990; 122:77-85
9. **Yi ES, Bedoya A, Lee H.** Radiation induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor-beta precedes fibrosis. Inflammation 1996;20:339-352
10. **Rube CE, Uthe D, Schmid KW.** Dose-dependent induction of transforming growth factor β (TGF-β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thorasic irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;47:1033-042
11. **Palmer BMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived re laxing factor. Nature 1987;327:524-526
12. **Prakash UBS.** Radiation-induced injury in the "nonirradiated" lung. Eur Respir J 1999;13:715-717
13. **Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, et al.** Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by Transforming Growth Factor β. J Exp Med 1993;178:605-613

Abstract

Radiation Effect on NO, NOS and TGF-β Expressions In Rat Lung

Young-Taek Oh, M.D.[*], Kwang-Joo Park, M.D.[†], Hoon-Jong Kil, M.D.[*], Mahn Joon Ha, Ph.D.[†], Mison Chun, M.D.[*], Seung-Hee Kang, M.D.[*], Seong-Eun Park, M.D.[†] and Sei-Kyung Chang, M.D.[§]

[*]Department of Radiation Oncology, [†]Department of Pulmonary Medicine, [†]Institute for Medical Sciences, School of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea
[§]Department of Radiation Oncology, Eulji Medical College, Daejon, Korea

Purpose : NOS2 induce NO production and NO activate TGF-β. The TGF-β is a inhibitor of NOS2. If this negative feedback mechanism operating in radiation pneumonitis model, NOS2 inhibitor may play a role in TGF-β suppression. We planned this study to evaluate the expression patterns of NO, NOS2 and TGF-β in vivo radiation pneumonitis model.

Materials and Methods : Sixty sprague-Dawley rat were irradiated 5 Gy or 20 Gy. They were sacrificed 3, 7, 14, 28 and 56 days after irradiation. During sacrifice, we performed broncho-alveolar lavage (BAL). The BAL fluids were centrifuged and supernatents were used for measure NO and TGF-β, and the cells were used for RT-PCR.

Results : After 5 Gy of radiation, NO in BAL fluid increased at 28 days in both lung and TGF-β in left lung at 56 days. NO increased in BAL fluid at 28 days in both lung after irradiation and TGF-β in right lung at 28-56 days after 20 Gy of radiation. After 5 Gy of radiation, NOS2 expression was increased in right lung at 14 days, in both lung at 28 days and in left lung at 56 days. TGF-β expression was reduced in both lung at 28 days and increased in left lung at 56 days.

Conclusions : The proposed feedback mechanism of NO, NOS2 and TGF-β was operated in vivo radiation pneumonitis model. At 56 days, however, NOS2 and TGF-β expressed concurrently in left lung after 5 Gy and in both lung after 20 Gy of radiation

Key Words : Radiation pneumonitis, NO, NOS2, TGF-β, Radiation