C57BL/96 Mouse의 폐, 간, 신장에서 방사선조사 후 TIMP-1, TIMP-2의 발현에 대한 면역조직화학적 연구

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 방사선종양학과

노영주 ·안승도 ·김종훈 ·최은경 ·장혜숙

목 적 : 피부나 폐, 간, 신장 등의 섬유화가 방사선 조사 후 주요한 부작용 중의 하나이나 아직까지 이 과정에서 TGF-β가 주요한 역할을 하는 것 이외에는 밝혀진 것이 거의 없는 상태이다. 또 matrix metalloproteinase (MMP) 및 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 유전자 활성 및 발현이 조직의 재구성과 손상, 암세포의 침윤과 전이에 관여하고 있고, 방사선이 종양의 치료에 널리 이용되고 있음에도 방사선에 의한 MMP와 TIMP 유전자의 발현에 대한 연구는 거의 없는 상태이다. 이에 저자들은 방사선 조사가 TIMP-1, TIMP-2의 발현에 어떤 영향을 끼치는지 알아보고자 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법 : C57BL/6 생쥐를 Varian CL-4/100을 사용하여 각각 0, 2, 10 Gy의 조사량으로 전신조사를 하였다. 방사선 조사 후 24, 48 시간에 생쥐를 희생하여 폐, 간, 신장을 얻어 paraffin 포매 조직 절편을 만들어 Avidin-Biotin complex 방법으로 면역 염색을 한 후 광학 현미경으로 관찰하여 염색의 강도와 면적에 따라 점수화 하였다.

결 과 : TIMP-1은 대조군에 비해 방사선 조사 후 폐조직에서는 변화가 없는 것으로 나타났다. 간조직에서는 간세포와 Kupffer 세포에서 발현이 증가하였고, 신장조직에서는 주로 세뇨관 세포에서 발현이 증가하였고 방사선 조사 후 경과 시간에 따른 변화는 거의 없었다. 방사선량에 따른 발현의 정도는 신장을 제외하고는 변화가 거의 없었다. TIMP-2는 폐조직에서는 2 Gy 조사 후 발현이 증가되었고, 간조직에서도 2 Gy 24 시간에는 활성이 증가했으나 10 Gy에서는 대조군 수준이었다. 신장조직에서는 10 Gy에서는 발현의 정도의 변화는 없었고 2 Gy에서는 발현이 감소하였다.

결 론 : 각 장기에서 TIMP-1과 TIMP-2의 발현의 정도는 차이가 있었으며, 각 장기의 특정한 세포에서만 발현이 되었다. TIMP-1의 경우 간과 신장에서는 방사선에 의해 발현이 증가되었으나 폐에서는 발현이 증가되지 않았다. TIMP-2의 경우 폐에서는 방사선에 의해 발현이 증가하였으나 간과 폐에서는 방사선에 의한 발현의 변화는 불규칙적이었다. 방사선 조사 후 경과 시간과 방사선량에 따른 발현의 변화도 일정하지 않았다.

핵심용어 : TIMP, Radiation, C57BL/6 mouse, Immunohistochemistry

서 론

방사선치료는 악성 종양의 치료 방법 중 하나로 단독이나 혹은 수술이나 항암 화학 요법과의 병용 치료법으로 광범위하게 활용되고 있다. 그러나 성공적인 방사선치료에 있어 가장 큰 장애는 조직의 방사선으로 인한 손상으로 인한 부작용과 암세포의 전이 가능성이다.

최근 방사선에 의해 발현되는 여러 유전자들이 발견되었고 이들은 방사선이라는 외부 자극에 대한 신호 전달에 관여하여 분화와 성장, 조직의 손상 및 염증 반응, 섬유화 등의 다양한 세포 및 조직 반응에 관여하는 것이 밝혀지고 있다.[1] 이 중 조직의 반응을 볼 때 조직의 재구성을 일으키는 여러 인자들이 matrix metalloproteinase (MMP)와 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)의 발현에 영향을 미쳐 세포의 운동성, 유착, 이동 등에 영향을 주어 암세포의 주위 조직으로의 침윤과 전이에 관여하고 세포간질의 섬유화를 일으킨다고 알려져 있다.[2-7]

섬유화는 방사선치료의 흔한 부작용 중의 하나로 피부, 간, 신장, 특히 폐에 관하여 많은 연구가 있다. 섬유화 과정에서 섬유아세포가 주된 역할을 하지만 실제로는 여러 세포들간의 작용이라고 할 수 있다. 방사선치료 후 일어나는 섬유화에 영향을 미치는 인자로는 치료 기간, 방법, 치료량, 각 장기의 방사선 감수성 등이 있고 현재까지의 여러 논문에서 TGF-β1이 방사선 섬유화의 유발과 진행에 많은 역할을 하

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단 학술연구조성비(과제번호 1998-0325)에 의하여 지원되었음

이 논문은 2000년 12월 23일 접수하여 2001년 4월 24일 채택되었음.

책임 저자 : 장혜숙, 서울중앙병원 방사선종양학과

Tel : 02)2224-4431, Fax : 02)486-7258

E-mail : www.hschang@amc.seoul.kr

는 것으로 알려져 있다.[8 11)] TGF-β1은 TIMP나 다른 MMP inhibitor를 자극하여 교원질(collagen)의 분해를 막고 교원질 유전자(collagen gene)를 유도하여 교원질을 많이 생성하게 한다.[12 14)]

TIMP는 대부분의 조직과 체액에 분포하는 것으로 알려져 있으며 TIMP 군에는 TIMP-1, -2, -3, -4가 있다.[7)] TIMP-1, -2는 가용성이고 TIMP-3는 불용성으로 주로 세포간질에 부착되어 변형된 세포의 박리를 촉진하며 TIMP-4는 주로 심장에 분포하는 것으로 알려져 있다.[15, 16)] TIMP-1은 184개의 아미노산으로 구성된 28.5 kDa의 당단백질이고 TIMP-2는 194 개의 아미노산으로 구성된 21 kDa의 비당화 단백질로 43%의 아미노산이 일치하는 homology를 보인다. TIMP는 MMP와 비공유적인 결합을 하여 MMP의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있고 TIMP-1은 92 kDa gelatinase B (MMP-9)와 TIMP-2는 72 kDa gelatinase B (MMP-2)와 결합한다.[17 20)]

현재까지 발표된 TIMP에 대한 연구에서는 암의 성장 및 전이를 억제한다고 하나 방사선치료 후 정상 조직에 미치는 조직 반응에서의 TIMP의 역할에 대해 연구된 것은 거의 없는 실정이다. Terada 등[21)]은 사람의 정상 간조직에서 TIMP-1, TIMP-2가 담즙관에서 일부 약하게 염색되고 간세포(hepatocyte)에서는 발현되지 않았다고 하였고 Pagenstecher 등[22)]은 정상 생쥐의 뇌에 대한 면역염색에서 TIMP-2와 TIMP-3가 신경원(neuron)과 맥락총(choroid plexus)에서 높게 발현되었고 interleukin-3, interleukin-6, TNF-α로 염증을 유발시킨 뇌에서는 염증 부위와 주변의 신경원에서는 TIMP-1이 발현되었다고 하였다. Tatsuguchi 등[23)]은 정상 사람과 토끼의 위에서 벽세포(parietal cell), 상피세포, foveolar cell에서 TIMP-2가 발현되었다고 하였다.

섬유화와 관련된 TIMP에 대한 연구를 보면 Herbst 등[24)]은 carbon tetrachloride로 유발한 쥐와 사람 간의 섬유화된 병변과 담즙성 간경변에서 주로 성상세포(stellate cell)에서 높이 발현되었다고 보고하였다. Yaguchi 등[25)]은 토끼에서 bleomycin으로 유발한 섬유화 병변에서 상피세포와 일부 섬유아세포에서 TIMP-2가 발현되었다고 보고하였다.

방사선조사와 관련된 MMP나 TIMP에 대한 논문을 보면 방사선조사 후 생쥐의 성상세포(astrocyte)에서 MMP gene family 중 gelatinase A gene의 활성이 증가했다는 것이 보고된 바 있고 쥐 신장의 방사선조사 후 mesangial 세포에서 MMP-2와 TIMP-2의 양이 증가했다는 것이 보고되었다.[26, 27)] 이외에 Lafuma 등[12)]은 방사선조사 후 섬유화가 된 돼지 피부의 섬유아세포에서 MMP-1 mRNA의 양은 감소하고 TIMP mRNA의 양은 대조군에 비해 4배 증가하였다고 보고하였다.

따라서 MMP 및 TIMP 유전자 활성 및 발현이 방사선에 의한 조직 손상 기전에 관여할 가능성이 높다고 추정할 수 있지만 방사선치료가 악성 종양 및 양성 종양의 치료에 널리 이용되고 있음에도 방사선에 의한 MMP와 TIMP 유전자의 영향에 대한 연구는 거의 없는 상태이다.

저자들은 방사선 조사가 TIMP-1, TIMP-2의 발현에 어떤 영향을 끼치는지 먼저 정상 조직에 대해 연구하기로 하였고 방사선에 의해 폐섬유화가 많이 발생하는 것으로 알려진 C57BL/6 생쥐를 대상으로 하여 면역조직화학적 연구를 시행하였다.[28 32)]

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 시약

본 실험에서 사용한 동물은 10 12 주령의 암컷 C57BL/6 생쥐로 이 생쥐는 아산재단 생명과학연구소에서 계대 배양하였고 물과 먹이가 충분히 공급되는 환경에서 사육하였다. 면역 염색은 Avidin-Biotin complex (ABC) 방법으로 시행하였고 이 때 Vector사(Burlingame, U.S.A.)의 M.O.M. immunodetection kit (CA No. PK-2200)를 이용하여 항체를 붙이고 발색에는 Vector사의 3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate kit (CA No. SK-4100)를 이용하였다. TIMP-1 antibody (CA No. IM32L), TIMP-2 antibody (CA No. IM56L)는 CALBIOCHEM사(La Jolla, U.S.A.) 제품이었다. 이외의 화학물은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을 사용하였다.

2. 방사선조사

방사선조사는 Varian CL-4/100를 사용하여 4 MV의 광자선으로 전신 조사를 하였다. 생쥐는 마취하지 않았으며 조사량은 0, 2, 10 Gy 였다. 각 군 당 생쥐는 2마리씩 배정하였다.

3. 장기 획득 및 slide 준비

Ketamine을 생쥐의 복강에 주입하여 희생시킨 후 간, 폐, 신장을 적출하여 즉시 4% neutral buffered formalin으로 고정하였다. 이후 alcohol로 탈수(dehydration), xylene으로 세척을 하고 난 후 paraffin에 봉입하여 microtome으로 3 μm 두께의 절편을 만들었다.

만들어진 slide는 말린 후 deparaffinization을 하였고 면역염색 전 antigen unmasking과정은 이전의 여러 TIMP의 면역염색에 관한 논문을 참고하여 시행하지 않았다.[33 36)]

4. 면역 염색

실온에서 3% hydrogen peroxidase 용액에 5분간 incubation

하여 endogenous peroxidase의 활성을 억제한 다음 phosphate buffered saline (PBS)에 2분간 2번 세척하였다. 비특이적인 배경 염색을 방지하기 위해 실온에서 1시간 M.O.M. mouse IgG blocking reagent에 incubation하여 IgG blocking을 하고 PBS에 2분간 2번 세척하고 5분간 M.O.M. diluent에 incubation하였다. 여분의 M.O.M. diluent를 버린 후 TIMP-1 antibody (1:10), TIMP-2 antibody (1:100) 용액을 가하고 비특이적인 항체 결합을 방지하기 위해 4℃에서 overnight incubation하여 일차 항체(primary antibody)를 부착하고 PBS에 2분간 2번 세척하였다. biotinylated anti-mouse IgG reagent에 실온에서 10분간 incubation하여 이차 항체(secondary antibody)를 부착하고 PBS에 2분간 2번 세척하였다. 이 후 avidin-biotin complex (ABC) reagent에 실온에서 5분간 incubation하여 peroxidase를 부착하고 PBS에 5분간 2번 세척하고 Vector사의 DAB용액을 가하여 3분간 incubation하여 DAB를 발색하였다. 물로 5분간 세척한 후에 hematoxylin 용액에 10초간 담그어 대조 염색을 하고 다시 물로 5분간 세척하였다. 100% ethanol에 2분간 4번 탈수하고 xylene에 2분간 4번 세척한 후에 봉입제로 덮개 유리를 부착하여 mounting하였다.

5. 광학현미경 검사 및 결과 분석

전체 장기를 100 400배에서 현미경으로 관찰하였고 Bergeron 등[37, 38]의 분류를 참조하여 Table 1와 같이 분석하였다.

면역 염색의 강도는 0에서 4등급으로 나누었고 각각 0에서 4점을 배당하였다. 면역 염색의 분포는 전체 세포에 대한 염색된 세포의 비율을 구하여 염색된 세포가 없을 때 0 점, 10% 미만시 1점, 10%에서 1/3 이하시 2점, 1/3에서 2/3시 3점, 2/3 이상시 4 점을 주었다. 전체 점수는 면역 염색의 강도와 분포를 더하여 합계가 0이면 (−), 1에서 3점이면 (+), 4에서 6 점이면 (++), 7 8 점이면 (+++)으로 표시하였다.

Table 1. Scoring of Immunohistochemical Staining of TIMP-1, TIMP-2

Organ	Antigen	0 Gy	2 Gy		10 Gy	
			24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
Lung	TIMP-1	++	++	++	++	++
	TIMP-2	++	+++	+++	++	+++
Liver	TIMP-1	−	++	++	++	++
	TIMP-2	++	+++	++	++	++
Kidney	TIMP-1	−	+	++	++	++
	TIMP-2	++	+++	++	+++	++

Table 2. Results of Immunohistochemical Staining of TIMP-1, TIMP-2

	0	1	2	3	4
Staining intensity	−	Weak	Moderate	Strong	Very strong
Proportion of positive cells	−	<1/10	1/10 1/3	1/3 2/3	≥2/3

결 과

1. 방사선조사 후 TIMP-1의 발현

1) 폐조직(Fig. 1A)

Table 2과 Fig. 1A에서 보이는 것처럼 TIMP-1은 폐조직에서는 0 Gy에서 전체적으로 아주 약하게 폐포의 상피 세포에서 염색이 되어 (++)로 간주하였다. 2 Gy, 10 Gy 방사선조사 후 24시간에 TIMP-1의 발현 정도는 0 Gy와 비교시 변화가 없었으며 48시간에서도 변화가 없었다.

2) 간조직(Fig. 1B)

간조직에서는 0 Gy에서는 면역 염색이 되지 않았으며 2 Gy, 10 Gy 방사선조사 후 24시간 절편에서 면역 염색의 정도는 전체적으로 볼 때 변화가 거의 없었지만 10% 미만의 일부 간세포에서 TIMP-1이 발현되어 염색이 되었고 Kupffer 세포가 염색이 되어 sinusoid가 진하게 보여 (++)로 점수를 매겼다. 방사선조사량에 따른 차이는 없었고 조사 후 48 시간의 절편에서도 24시간과 비교시 발현의 변화는 없었다.

3) 신장조직(Fig. 1C)

신장조직을 보면 0 Gy에서는 TIMP-1이 염색되지 않았다. 방사선조사 후 TIMP-1이 발현되어 사구체는 염색이 되지 않았지만 일부 세뇨관에서 염색이 되어 24시간에서 2 Gy에서는 (+), 10 Gy에서는 (++)로 방사선에 의해 발현의 정도가 증가하였다. 48시간에서 보면 2 Gy에서는 (++)로 발현의 정도가 증가하였지만, 10 Gy에서는 (++)로 24시간과 비교할 때 변화가 없었다.

2. 방사선조사 후 TIMP-2의 발현

1) 폐조직(Fig. 2A)

Fig. 2에서 보이는 것과 같이 TIMP-2는 폐조직에서는 0 Gy에서 염색이 전체 상피 세포에서 아주 약하게 되어서 (++)로 보였다. 방사선조사 24 시간 후 2 Gy에서는 (+++), 10 Gy에서는 (++)로 2 Gy에서는 방사선에 의해 발현이 증가하였으나 10 Gy에서는 변화가 없었고, 방사선조사 48시간 후에는 2 Gy에서는 변화가 없었으나 10 Gy에서는 (+++)로 발현이 증가하였다.

2) 간조직(Fig. 2B)

간조직에서는 0 Gy에서 전체적으로 약하게 염색이 되어 (++)로 보였고 간세포와 Kupffer 세포에서는 염색이 되었으

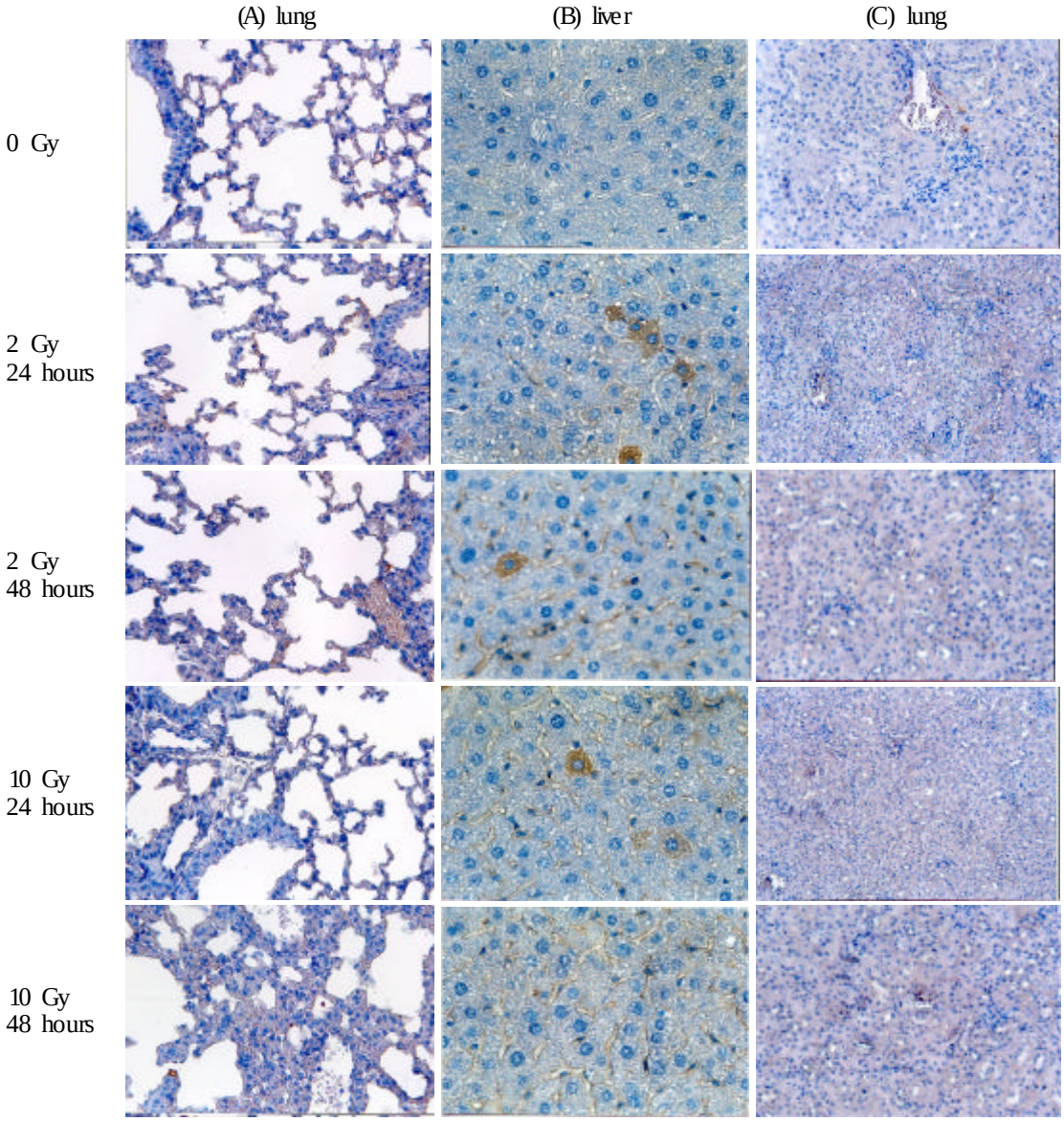

Fig. 1. Immunohistochemical staining of TIMP-1. TIMP-1 staining was localized to alveolar epithelial cell with diffuse weak intensity in lung (A) (original magnification ×100), to Kupffer cell (indicated by arrow) and some hepatocyte after radiation (original magnification ×400) in liver (B), and to tubule cell after radiation (original magnification ×200) in kidney (C).

나 혈관의 내피 세포에서는 염색이 되지 않았다. 방사선조사 24시간 후 2 Gy에서는 (+++), 10 Gy에서는 (++)로 2 Gy에서는 방사선에 의해 발현이 증가하였으나 10 Gy에서는 변화가 없었고, 방사선조사 48시간 후에는 2 Gy에서는 (++)로 발현이 감소하였으나 10 Gy에서는 (++)로 변화가 없었다.

3) 신장조직(Fig. 2C)

0 Gy에서 신장조직은 전체가 중간 정도로 염색이 되면서 일부 세뇨관에서는 부분적으로 세뇨관 세포가 강하게 염색된 부분도 있어 (+++)로 보였다. 세뇨관에서 선택적으로 염색이 되었고 사구체 세포와 mesangial 세포, 내피 세포는 염색이 되지 않았다.

방사선조사 24시간 후에는 2 Gy에서는 일부 세뇨관 세포에서 염색성이 증가하였으나 전체적으로는 염색성이 감소하여 (+++)로 전체적으로 점수는 같았고 10 Gy에서도 (+++)로 보였다. 방사선조사 48시간 후에는 2 Gy에서는 (++)로 발현이 감소하였으나 10 Gy에서도 (++)로 발현이 감소하였다.

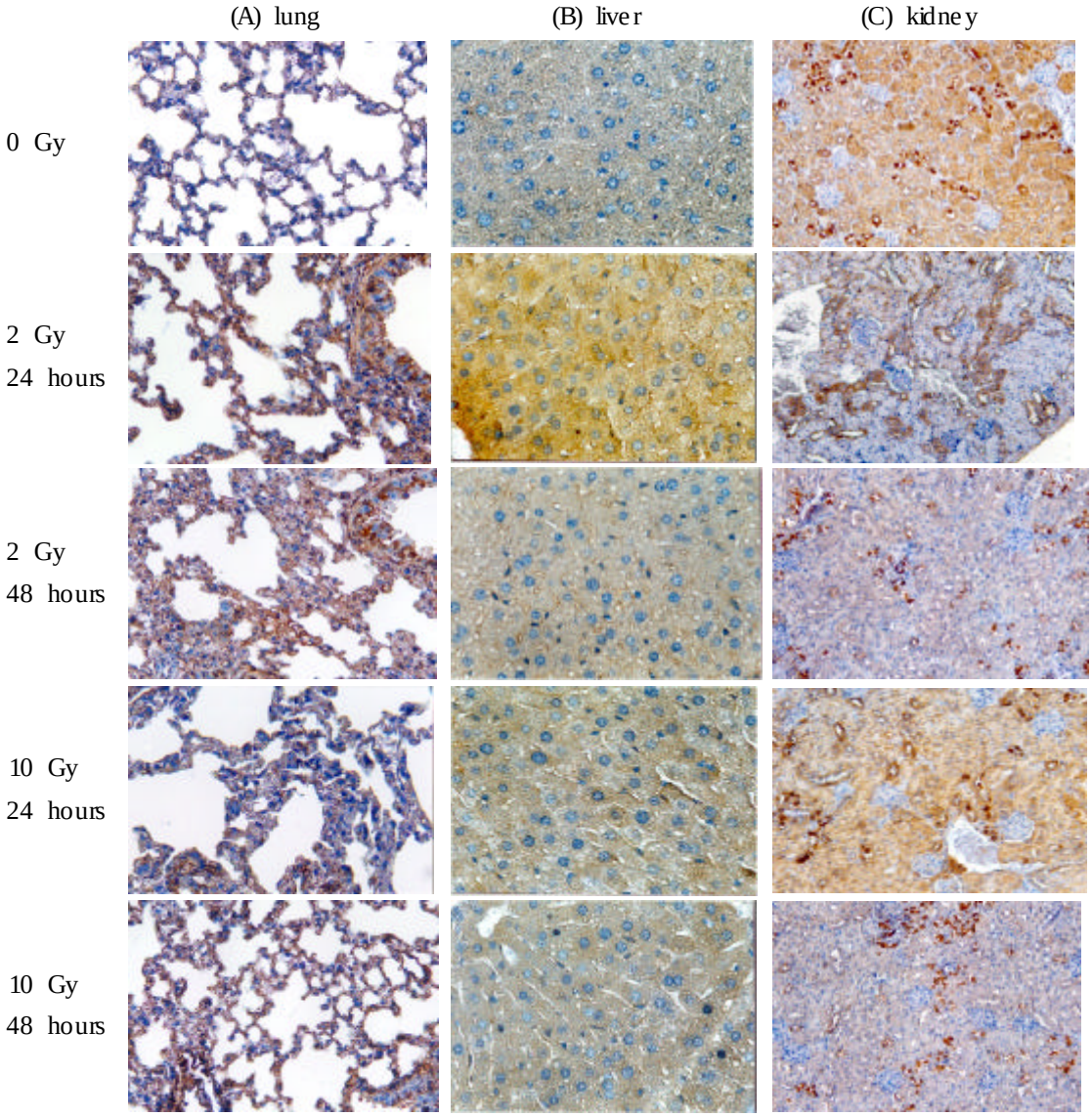

Fig. 2. Immunohistochemical staining of TIMP-2. TIMP-2 staining was localized to alveolar and bronchial epithelial cell with diffuse weak intensity in lung (A) (original magnification ×100), to Kupffer cell (indicated by arrow) and hepatocyte at 0 Gy and after radiation (original magnification ×400) in liver (B), and to tubule cell at 0 Gy and after radiation (original magnification ×200) in kidney (C).

고안 및 결론

본 연구는 방사선에 의한 TIMP 발현을 알기 위한 연구 중의 일부로 각 군에서의 TIMP의 면역염색으로 본 발현의 정도는 일치하였다.

본 연구를 통해 알 수 있었던 것은 첫째, TIMP-1과 TIMP-2의 방사선조사 전후 발현의 정도는 전체적으로 차이가 있었다는 것이다. 면역 염색시 사용한 일차 항체의 농도가 10배 차이가 나는 데도 불구하고 TIMP-1과 TIMP-2의 면역 염색의 강도는 매우 많이 달랐다. TIMP-1의 경우 방사선조사 후 간조직에서 10% 미만에서 일부 간세포에서만 3등급으로 염색이 되었고 나머지 신장조직이나 폐조직에서는 1등급 정도로만 염색이 된 반면에, TIMP-2는 여러 장기에서 4등급까지 염색이 강하게 되어 각 세포에서 TIMP의 발현 정도에 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 현재까지 정상 장기에서 TIMP-1, TIMP-2의 발현 정도에 관한 연구는 없는 상태로 본 결과와 비교할 만한 대상은 없다.

둘째, TIMP의 발현이 각각의 장기에서 특정한 세포에서만 이루어진다는 점이다. TIMP-1의 경우 폐조직에서는 폐포의 상피세포에서만, 간조직에서는 Kupffer 세포와 일부의 간세포에서만, 신장조직에서는 일부의 세뇨관 세포에서만 발현되었고, TIMP-2의 경우 폐조직에서는 폐포와 기관지의 상피세포에서, 간조직에서는 Kupffer 세포와 대부분의 간세포에서, 신장조직에서는 일부의 세뇨관 세포에서만 발현되었다. 이전의 TIMP에 대한 면역 염색 연구를 보면 정상 조직에 대해 연구된 것은 거의 없다. Terada 등[21]은 사람의 정상 간에서 담즙관에서 TIMP-1, TIMP-2가 일부에서 약하게 염색되고 간세포에서는 발현되지 않았다고 하였으나 본 연구에서는 TIMP-1은 0 Gy에서 모든 세포에서 발현되지 않았으나 TIMP-2는 간세포와 Kupffer 세포에서 발현되었고 이는 종의 차이로 인한 것으로 추측할 수 있겠다. 이외에 정상 폐나 신장에 대한 연구는 없었다.

셋째, TIMP의 방사선에 의한 발현은 장기와 TIMP의 종류에 따라 다르다는 사실이다. TIMP-1은 폐조직에서는 방사선에 의해 발현이 증가되지 않았지만 간조직에서는 일부 간세포와 Kupffer 세포에서 발현이 증가하였고 신장조직에서도 일부 세뇨관 세포에서 발현이 증가하였다. TIMP-2는 폐조직에서는 2 Gy에서 방사선에 의해 발현이 증가하였고 간조직에서도 2 Gy에서 전체 간세포와 Kupffer 세포에서 발현이 증가하였지만, 신장조직에서는 2 Gy에서는 발현이 동일하였지만 10 Gy에서는 발현이 감소하였다. Zhao 등[27]은 쥐의 mesangial 세포의 방사선조사 후 MMP-2와 TIMP-2의 양이 증가했다고 하였지만, 본 실험에서는 C57BL/6 생쥐의 신장에서 TIMP-2가 mesangial 세포에서 대조군에서도 염색이 되지 않고 방사선량에 따른 변화도 없고 48시간에 활성이 증가한 상태도 아니었다. 하지만 Zhao 등[27]은 mesangial 세포만 대상으로 하였으며 in vitro 실험인 반면에 본 연구는 전체 조직을 대상으로 하였고 in vivo 실험이지만 정량화를 하지 못했다는 점이 Zhao 등의 연구와 다른 결과를 보인 요인으로 사료되었다.

넷째, 방사선량에 따른 TIMP-1과 TIMP-2의 발현 정도가 일정하지 않았다는 점이다. TIMP-1은 폐조직과 간조직에서는 방사선조사량에 따른 발현 정도의 차이가 없었지만, 신장조직에서는 2 Gy시 (+), 10 Gy시 (++)로 방사선조사량이 증가함에 따라 발현이 증가하였다. TIMP-2는 이미 기술한 것과 같이 폐조직과 간조직에서는 2 Gy에서 방사선에 의해 발현이 증가하였지만 10 Gy에서는 변화가 없었고 신장조직에서는 2 Gy와 10 Gy에서는 발현이 동일하였다.

다섯째, 방사선조사 후 시간에 따른 TIMP-1과 TIMP-2의 발현 정도는 일정하지 않았다는 점이다. TIMP-1의 경우 폐와 신장에서는 24시간과 48시간간의 발현의 차이는 없었지만 신장조직에서 2 Gy 방사선조사시 24시간에서 (+), 48시간에서 (++)로 발현이 증가하였다. TIMP-2에서는 폐조직에서 2 Gy에서는 변화가 없었으나 10 Gy에서는 24시간의 (++)에서 48시간에서는 (+++)으로 발현이 증가하였고 간조직에서는 2 Gy에서 24시간에서 (+++), 48시간에서는 (++)으로 발현이 감소하였고 10 Gy에서는 24, 48시간 모두 (++)로 변화가 없었고, 신장조직에서는 2 Gy와 10 Gy에서 24시간은 (+++), 48시간은 (++)으로 발현이 감소하였다.

여러 급성 염증과 관련된 TIMP에 관한 연구들 중 Pagenstecher 등의 보고를 보면, 정상 SWR 쥐의 뇌에서는 MMP 유전자의 발현은 적고 TIMP-2, -3의 발현은 많은 상태에서 염증을 유발시킨 후에는 MMP 유전자의 발현은 증가하고 TIMP-2, -3의 발현은 변화가 없는 반면 TIMP-1의 발현은 증가하면서 주로 염증 주위의 성상세포에서 발현되었다고 보고하였다.[22] 본 연구에서는 방사선조사 후 TIMP-1의 발현은 미미하고 TIMP-2의 발현이 강하게 나타나 이들의 결과와 차이를 보여주고 있다. In vivo study로 mesothelial cell 계통의 Met-5A와 대식 세포 계통의 U-937 세포를 TGF-β1로 처리한 Ma 등의 연구에서는 처음 48시간 동안 Met-5A 세포에서 TIMP-1, -2의 발현이 증가하고 U-937 세포에서는 TIMP-1의 발현만 증가하였다고 하였다.[39] Cook 등은 오래된 상처에서 배양한 섬유아세포에서 MMP-1, -2의 양이 감소되어 있고 TIMP-1, -2의 양이 증가하였다고 보고하였다.[40]

방사선으로 인한 섬유화가 수개월에서 수년에 걸쳐 진행하는 점을 고려할 때 향후 24, 48시간 뿐아니라 수개월에 걸친 TIMP의 면역 염색성의 변화에 관한 실험뿐아니라 활성의 변화 정도를 정확하게 수치화하여 정량화할 수 있는 western blot analysis나 northern blot analysis 등의 실험과 함께 이미 방사선으로 인한 섬유화에 역할을 하고 있는 것으로 알려진 TGF-β와의 관련 연구가 방사선에 의한 섬유화 등의 조직반응에 있어 TIMP의 역할을 규명하는데 큰 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. **Hallahan DE.** Radiation mediated gene expression in the pathogenesis of the clinical radiation response. Seminars Radiat Onc 1996;6:250-261
2. **Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA.** Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. J

Natl Cancer Inst 1990;82:589-595

3. **Brinckerhoff CE, Suzuki K, Mitchell TI, et al.** Rabbit procollagenase synthesized and secreted by a high-yield mammalian expression vector requires stromelysin (matrix metalloproteinase-3) for maximal activation. J Biol Chem 1990;265:22262-22269
4. **DeClerck YA, Yean TD, Chan D, Shimada H, Langley KE.** Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers byrecombinant human metalloproteinase inhibitor. Cancer Res 1991;51:2151-2157
5. **DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM.** Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. Cancer Res 1992; 52:701-708
6. **Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, et al.** Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. Invasion Metastasis 1992;12:168-184
7. **Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997;74:111-122
8. **Gauldie J, Jordana M, Cox G.** Cytokines and pulmonary fibrosis. Thorax 1993;48:931-935
9. **Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC, Kane CJ.** Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. Radiot Oncol 1994;32:29-36
10. **Yi ES, Bedoya A, Lee H, et al.** Radiation-induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor-beta precedes fibrosis. Inflammation 1996;20:339-352
11. **Burger A, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP.** Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. Int J Radiat Biol 1998;73:401-408
12. **Lafuma C, El Nabout RA, Crechet F, Hovnanian A, Martin M.** Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. J Invest Dermatol 1994;102:945-950
13. **Overall CM, Wrana JL, Sodek J.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. J Biol Chem 1991;266:14064-14071
14. **Shi DL, Savona C, Gagnon J, Cochet C, Chambaz EM, Feige JJ.** Transforming growth factor-beta stimulates the expression of alpha 2-macroglobulin by cultured bovine adrenocortical cells. J Biol Chem 1990;265:2881-2887
15. **Yang TT, Hawkes SP.** Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. Pro Natl Acad Scie USA 1992;89:10676-10680
16. **Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE.** Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem 1996;271:30375-30380
17. **Stetler-Stevenson WG.** Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 1990;9:289-303
18. **Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS.** Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. Pro Natl Acad Scie USA 1989;86:8207-8211
19. **Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL.** Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. J Biol Chem 1992;267:4583-4591
20. **Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulbrich N.** The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. Eur J Biochem 1991;198:775-781
21. **Terada T, Okada Y, Nakanuma Y.** Expression of immunoreactive matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. Hepatology 1996;23:1341-1344
22. **Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL.** Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. Am J Pathol 1998;152:729-741
23. **Tatsuguchi A, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N.** Localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in normal human and rabbit stomachs. Digestion 1999;60:246-254
24. **Herbst H, Wege T, Milani S, et al.** Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. Am J Pathol 1997;150:1647-1659
25. **Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N.** Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Pathol International 1998;48:954-963
26. **Sawaya R, Tofilon PJ, Mohanam S, et al.** Induction of tissue-type plasminogen activator and 72-kDa type-IV collagenase by ionizing radiation in rat astrocytes. Int J Cancer 1994;56:214-218
27. **Zhao W, O'Malley Y, Robbins ME.** Irradiation of rat mesangial cells alters the expression of gene products associated with the development of renal fibrosis. Radiat Res 1999;152:160-169
28. **Sharplin J, Franko AJ.** A quantitative histological study of strain-dependent differences in the effects of irradiation on mouse lung during the intermediate and late phases. Radiat Res 1989;119:15-31
29. **Johnston CJ, Piedboeuf B, Baggs R, Rubin P, Finkelstein JN.** Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. Radiat Res 1995;142:197-203.

30. **Johnston CJ, Piedboeuf B, Rubin P, Williams JP, Baggs R, Finkelstein JN.** Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. Radiat Res 1996; 145:762-767
31. **Franko AJ, Sharplin J, Ghahary A, Barcellos-Hoff MH.** Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha in the lungs of fibrosis-prone and "non-fibrosing" mice during the latent period and early phase after irradiation. Radiat Res 1997;147:245-256
32. **Johnston CJ, Wright TW, Rubin P, Finkelstein JN.** Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and-sensitive mice after thoracic irradiation. Exp Lung Res 1998;24:321-337
33. **Afzal S, Lalani el-N, Foulkes WD, et al.** Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and synthetic matrix metalloproteinase-2 inhibitor binding in ovarian carcinomas and tumor cell lines. Lab Invest 1996;74:406-421.
34. **Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P.** Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. Cell Tissue Res 1998;291:133-148
35. **Ara T, Fukuzawa M, Kusafuka T, et al.** Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. J Ped Surg 1998;33:1272-1278
36. **Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, et al.** MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. Gynecol Oncol 1999;73:372-382
37. **Bergeron C, Ferenczy A, Toft DO, Schneider W, Shyamala G.** Immunocytochemical study of progesterone receptors in the human endometrium during the menstrual cycle. Lab Invest 1988; 59:862-869
38. **Bergeron C, Ferenczy A, Shyamala G.** Distribution of estrogen receptors in various cell types of normal, hyperplastic, and neoplastic human endometrial tissues. Lab Invest 1988;58:338-345
39. **Ma C. Tarnuzzer RW. Chegini N.** Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta 1. Wound Rep Reg 1999;7:477-485
40. **Cook H. Davies KJ. Harding KG.** Thomas DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. J Invest Dermatol 2000;115:225-233

Abstract

Immunohistochemical Studies for TIMP-1 and TIMP-2 Expression after Irradiation in Lung, Liver and Kidney of C57BL/6 Mouse

Young Ju Noh, M.D., Seung Do Ahn, M.D., Jong Hoon Kim, M.D.,
Eun Kyung Choi, M.D., Hyesook Chang, M.D.

Department of Radiation Oncology, Asan Medical Center, College of Medicine,
University of Ulsan, Seoul, Korea

Purpose : Changes in the balance between MMP and TIMP can have a profound effect on the composition in the extracellular matrix (ECM) and affect various cellular functions including adhesion, migration, differentiation of cells, and fibrosis and invasion and metastasis of cancer cells. Radiation therapy is a popular treatment modality for benign and malignant tumor, but the study for radiation effect on MMP and TIMP is scarce. In the current study, we have examined the expression of TIMP in fibrosis-prone (C57BL/6) mice after radiation.

Methods and Materials : Adult female mice of 10 12 weeks were used. The whole body were irradiated using a Varian CL-4/100 with 2 and 10 Gy. Immunohistochemical staining was performed according to Avidin Biotin complex method and evaluated by observing high power field. For TIMP-1, TIMP-2 antibodies, reactivity was assessed in the parenchymal cell and in the stromal cell. The scale of staining was assessed by combining the quantitative and qualitative intensity of staining.

Results : TIMP-1 immunoreactivity did not change in lung. But, in liver, TIMP-1 immunoreactivity was localized in cytoplasm of hepatocyte and Kupffer cell. In kidney, TIMP-1 immunoreactivity was localized in cytoplasm of some tubular cell. Temporal variations were not seen. Dose-response relationship was not seen except kidney. TIMP-2 immunoreactivity in lung was a score (++) at 0 Gy and elevated to a score (+++) at 2 Gy. TIMP-2 immunoreactivity was a score (++) in liver at 0 Gy. TIMP-2 immunoreactivity was localized in cytoplasm of hepatocyte and Kupffer cell as same as patterns of TIMP-1 immunoreactivity. The TIMP-2 immunoreactivity in liver was elevated to (+++) at 2 Gy. Immunoreactivity to TIMP-2 in kidney was a score (+++) at 0 Gy and was not changed at 10 Gy. The score of TIMP-2 immunoreactivity was reduced to (++) at 2 Gy. TIMP-2 immunoreactivity was confined to tubules in kidney. Temporal variation of TIMP-2 immunoreactivity was irregular. Dose-response relationship of TIMP-2 immunoreactivity was not seen.

Conclusions : Differences between intensity of expression of TIMP-1 and TIMP-2 in each organ was present. Expression of TIMP was localized to specific cell in each organ. Irradiation increased TIMP-1 immunoreactivity in the liver and the kidney. Irradiation increased TIMP-2 immunoreactivity in the lung. But, in the liver and the kidney, TIMP-2 expression to radiation was irregular. Temporal variation of TIMP-2 immunoreactivity was irregular. Dose-response relationship of TIMP-2 immunoreactivity was not seen. In the future, we expect that the study of immunohistochemical staining of longer period of post-irradiation and quantitative analysis using western blotting and northern blotting could define the role of TIMP in the radiation induced tissue fibrosis.

Key Words : TIMP, Radiation, C57BL/6 mouse, Immunohistochemistry