대한방사선종양학회지 2001;19(2):190 198

# 방사선조사에 의한 쥐 폐손상에 방사선보호제로서 Captopril의 역할에 관한 연구

국립의료원 치료방사선과*, 이화여자대학교 의과대학 치료방사선과학교실†, 해부병리과‡

송미희* ·이경자† ·구혜수‡ ·오원용*

목 적 : Captopril을 방사선조사와 병용하여 조기 폐손상을 감소시킬 수 있는 방사선보호제로서의 역할을 확인하고 TNFα와 TGFβ1이 방사선 보호기전에 관여하는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 실험동물(Sprague-Dawley 흰쥐)은 정상대조군, 실험군(방사선 단독군, Captopril과 방사선 병용군)으로 분류하였다. 실험군은 12.5 Gy의 방사선을 좌측 흉곽에 단일조사 하였다. Captopril과 방사선 병용군은 Captopril (50 mg/kg/d)을 방사선조사 1주전부터 실험종료시인 8주까지 식수에 섞어 경구 투여하였다. 실험결과는 방사선조사 2주와 8주 후에 병리조직 소견을 분석하였고 면역조직화학염색으로 TNFα와 TGFβ1의 발현을 관찰하였다.

결 과 : 방사선조사 2주 후에, Captopril과 방사선 병용군은 방사선 단독군에 비해 폐포강내 출혈, 폐포 상피세포 변화, 기관지 상피세포 변화, 혈관변화, 혈관주위 부종과 같은 조직소견의 정도가 현저히 감소되었다. 방사선조사 8주 후에는 기관지 상피세포 변화와 혈관주위 부종이 방사선 단독군에 비해 적었다. Captopril과 방사선 병용군에서 방사선조사 2주후 TNFα의 발현은 방사선 단독군과 비교시 폐포 상피세포($p<0.01$) 및 폐포강의 대식세포($p<0.01$)에서 현저히 감소되었고, 기관지 주변의 림프조직($p=0.06$)에서는 감소하는 경향이었다. TGFβ1은 폐포상피세포($p<0.02$) 및 폐포강의 대식세포($p<0.02$)에서 양성세포가 현저히 감소되었다. 방사선 단독군과 비해 8주후 Captopril과 방사선 병용군의 TNFα는 차이가 없었고, TGFβ1의 발현은 폐포강의 대식세포($p=0.09$)에서만 감소하는 경향이었다.

결 론 : 흰쥐의 폐에 Captopril을 방사선과 병용투여하여 병리조직 소견을 관찰한 결과 방사선에 의한 조기 폐손상이 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 방사선조사 2주 후는 TNFα와 TGFβ1의 발현이 감소하고, 8주 후에는 TGFβ1 발현의 감소가 관찰되어, Captopril이 조기 폐손상을 억제하는 방사선보호제로서 기전의 일부에 TNFα와 TGFβ1이 관여함을 확인할 수 있었다.

핵심용어 : Captopril, 방사선보호제

## 서 론

방사선치료는 치료효율의 극대화를 위해서는 종양제어율을 최대화하고 치료로 인한 정상조직의 부작용을 최소화해야 한다. 방사선량을 증가시키거나 방사선 증강제를 병용하여 종양제어율을 높이고자 많은 노력을 하지만 정상조직의 부작용을 줄이려는 노력은 때때로 간과되는 경우가 있다. 정상조직의 내성은 치료 중단 또는 방사선량 감소의 원인이 되어 치료 효과를 떨어뜨리게 된다. 흉부 악성종양의 방사선치료시 폐손상은 방사선량을 제한하는 결정인자이며 치료효율을 높이기 위해서는 폐손상을 줄이기 위한 방사선보호제가 필요하다.

이 논문은 2001년 3월 13일 접수하여 2001년 5월 21일 채택되었음.

책임저자 : 송미희, 국립의료원 치료방사선과
Tel : 02)2260-7333, Fax : 02)2268-6882
E-mail : isylover@hanmail.net

방사선조사로 인한 폐손상은 임상양상에 따라 잠복기의 조기(첫 1개월), 급성 폐렴을 보이는 중기(1개월에서 수개월), 섬유증을 보이는 만기(6개월 이후)로 구분되며,[1] 각 시기에 따라 병리조직 변화의 차이를 보인다. 또한 방사선 손상의 표적이 되는 세포는 혈관내피세포[1] 및 폐포 상피세포[2]이다. 이와 같이 방사선폐렴과 폐섬유증은 시간적 발생 순서와 표적세포의 차이 때문에 별개의 증후군으로 생각하였다. 그러나 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 방사선에 의한 폐손상으로 발생하는 연속적인 사이토카인 케스케이드(cascade)가 밝혀지면서 이러한 개념은 변화되고 있다. 각각의 폐반응은 시간적 순서의 명확한 구분 없이 연속 선상에 있어, 즉 염증반응의 조기 활성화로 인해 사이토카인 케스케이드가 발현되고 지속되어 만기 폐섬유증이 유발된다는 것이다.[3]

폐에 방사선을 조사할 때 발현되는 염증성 사이토카인으로 interleukins (ILs)과 TNF가 있으며, 이들은 림프구 및 섬유아세포의 활성화, 괴사, 출혈, 대식세포의 세포독성 등의 작

용으로 방사선 염증의 급성기 소견을 초래한다.[3] 쥐의 폐에서 방사선조사 후에 TNFα, IL-1α, 및 IL-1β의 mRNA 발현은 잠복기 초기에 유도되며 그 이후에는 감소한다.[4] TGFβ 및 platelet derived growth factor (PDGF) 등의 섬유성 사이토카인은 방사선조사 후 현미경으로 확인할 수 있는 섬유증이 나타나기 전에 증가한다.[5, 6] 또한 TGFβ1은 쥐(C57BL/6)에서 12.5 Gy의 방사선조사 후 2주에 증가되어 8주까지 지속된다.[3]

Angiotensin I에서 angiotensin II로의 전환을 방해하는 ACE 억제제(Angiotensin converting enzyme inhibitor)인 Captopril은 고혈압이나 울혈성 심부전치료에 주로 사용하는 약물이다.[7] Captopril이 식물성 알칼로이드인 monocrotaline에 의한 폐섬유증의 억제 작용[8]이 알려진 후부터 Captopril의 방사선에 의한 폐손상의 보호효과에 대한 연구가 시도되었다. Captopril은 쥐의 폐에서 방사선조사로 인한 내피 기능장애를 호전시키고,[9] 방사선에 의한 폐렴 및 폐섬유증을 감소시키는 효과[10, 11]가 있다. Captopril의 방사선으로 인한 폐독성을 경감시키는 작용기전은 비특이적인 thiol 효과 및 ACE 억제와 관련이 있다고[12] 하였으나, 아직까지 그 기전은 정확히 알려지지 않았다.

이에 본 연구는 정상 흰쥐의 좌폐에 방사선을 조사하여 2주(잠복기)와 8주(급성 폐렴기) 후에 발생하는 폐손상의 병리조직학적 소견과 면역조직화학염색에 의한 TNFα과 TGFβ1의 발현을 관찰하고 Captopril을 방사선조사와 병용투여시 방사선조사에 의한 조직소견과 TNFα과 TGFβ1의 발현 변화를 관찰함으로서, Captopril의 방사선에 의한 폐손상 보호기전에 사이토카인의 역할을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험동물로는 생후 4 5개월, 체중 250 300 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 43마리를 사용하였고, 실험군은 방사선 단독군, Captopril과 방사선 병용군으로 분류하였다. 정상대조군은 방사선이나 약물을 투여하지 않은 흰쥐를 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Grouping of Experimental Animals

| Group / Time | 2 weeks (No) | 8 weeks (No) | Total (No) |
|---|---|---|---|
| Control | 3 | 3 | 6 |
| Radiation only | 10 | 8 | 18 |
| Captopril & Radiation | 10 | 9 | 19 |
| Total | 23 | 20 | 43 |

### 2. 방 법

#### 1) 방사선조사

흰쥐를 ketamine (카타라®, 유한양행, 50 mg/ml) 60 mg/kg을 복강내로 주사하여 마취시킨 후 앙아위로 고정틀에 사지를 고정하고, 6 MV 선형가속기(Linear accelerator, NEC 1006X, Japan)를 이용하여 선원중심축 거리는 80 cm, 분당 선량율은 2 Gy로 좌측 흉곽에 12.5 Gy의 방사선을 단일 조사하였다.

#### 2) Captopril 투여

Captopril과 방사선 병용군에서 Captopril (캅틸®, 유나이티드제약, 50 mg/kg/d) 투여는 식수에 섞어 방사선조사 1주전부터 실험종료시인 8주까지 투여하였다.

#### 3) 조직소견의 평가방법

##### (1) 광학현미경 검사

방사선조사 후 2주와 8주에 ketamine으로 마취하여 흰쥐를 개흉한 뒤, 양측 폐를 적출하여 육안소견을 관찰하였다. 조직검사를 위하여 고정액(0.67M phosphate buffer saline, pH 7.3에 용해시킨 4% paraformaldehyde 용액)에 24시간 이상 고정한 뒤, 3 mm 두께로 절단하여 통상의 조직검사 처리과정을 거친 다음 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매절편은 hematoxylin-eosin (H-E) 염색, Masson-Trichrome 염색을 시행하여 관찰하였다.

##### (2) TNFα와 TGFβ1 면역조직화학염색

면역조직화학검사는 peroxidase-antiperoxidase 방법을 사용하였다.[13] 먼저 파라핀에 포매된 조직을 5 μm 두께로 절편하여 자일렌과 알코올을 이용하여 탈파라핀화와 함수화시켰다. 자일렌에는 5분간 3번씩 담갔으며 알코올은 100, 90, 80, 70%의 순서로 각각 2번씩 2분 동안 처치하였다. 비특이 단백의 결합에 의한 반응을 막기 위해서 10% 염소 혈청으로 20분간 반응시켰고 조직내의 내인성 peroxidase의 활성화를 억제하기 위해 3% 과산화 수소에 15분간 반응시켰다. 증류수로 수세한 조직을 PBS에 5분간 담근 후 1:50으로 희석한 TNFα 항체(HyCult biotechnology b.v., Uden-the Netherlands; mouse monoclonal antibody to human TNFα Clone:52B83)와 TGFβ1 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Delaware, CA, USA; rabbit polygonal antibody to carboloy terminus of human TGFβ1)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 각각의 1차 항체와 반응시킨 후 PBS로 5분간 3번씩 수세하고 DAKO (Santa Babara, CA, USA)사의 LSAB kit를 사용하여 peroxi-

dase-antiperoxidase 반응을 일으켰다. Peroxidase 반응은 결합항체와 streptavidin으로 각각 20분간 반응시키고 PBS로 수세한 다음 AEC (3-aminoethyl 9-carbasol)로 발색시켰고, Meyer's hematoxylin으로 대조염색하여 봉입하였다. 면역염색의 음성대조 슬라이드는 각각의 1차 항체를 제조한 같은 동물에서 얻은 면역반응을 일으키지 않은 혈청을 사용하였다.

4) 결과 판정

조직소견 평가는 방사선조사를 하지 않은 동년배 흰쥐의 폐에서 보이는 변화를 정상대조군으로 하고 실험군에서 보이는 변화를 비교하였다. 방사선조사 후 조직 손상의 정도를 각각 1+ 3+로 분류하였고(Table 2), 면역조직화학검사에서 보이는 반응은 폐포 상피세포, 폐포강내에 있는 대식세포, 기관지 주변에 있는 림프조직에서 양성반응 정도에 따라 1+ 3+로 분류하였다. 1+는 10%이하의 폐조직에 양성세포가 있는 경우, 2+는 10 50%인 경우, 3+는 50%이상의 조직에서 강한 양성반응을 보이는 경우로 하였다. 실험군에서 병리조직과 사이토카인 발현의 차이는 2+이하와 3+이상으로 나누어서 Fisher's exact test (SPSS program)로 검정하였고 유의수준은 5% 이하로 하였다.

Table 2. Grading of Histopathological Findings in Rats Lung

| |
|---|
| Parenchymal collapse, consolidation, hemorrhage, and alveolar epithelial cell changes |
| 1+ : less than 10% of lung parenchymal changes |
| 2+ : 10 50% of lung parenchymal changes |
| 3+ : more than 50% of lung parenchymal changes |
| Bronchial epithelium |
| 1+ : mild proliferation of epithelium |
| 2+ : moderate proliferation with papillary configuration |
| 3+ : marked proliferation of epithelium with detachment of epithelial cells |
| Perivascular edema |
| 1+ : mild accumulation of edema fluid |
| 2+ : moderate accumulation of fluid |
| 3+ : marked accumulation of fluid with fibrin deposition |
| Blood vessels |
| 1+ : vacuolization of vascular endothelial cells |
| 2+ : vacuolization of vascular muscle layer |
| 3+ : marked degeneration of vascular wall or thickening of muscle layer with narrowing of the vascular lumen |

## 결 과

### 1. 광학현미경 소견

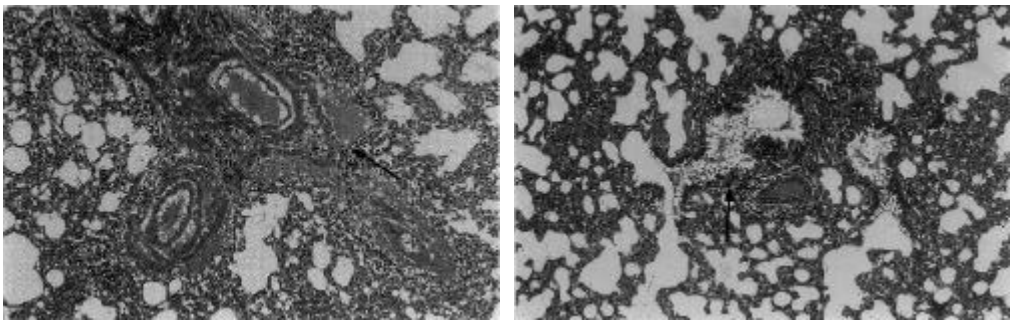
1) 정상대조군

정상대조군에서 폐의 육안소견은 정상이었으며, 조직소견에서는 폐포강, 폐포중격과 혈관이 정상으로 유지되어 있었고, 좌측과 우측의 차이나 검사시기에 따른 차이도 없었다. 총 6마리 중 2마리에서 급성 기관지폐렴의 소견을 보였다.

2) 방사선 단독군

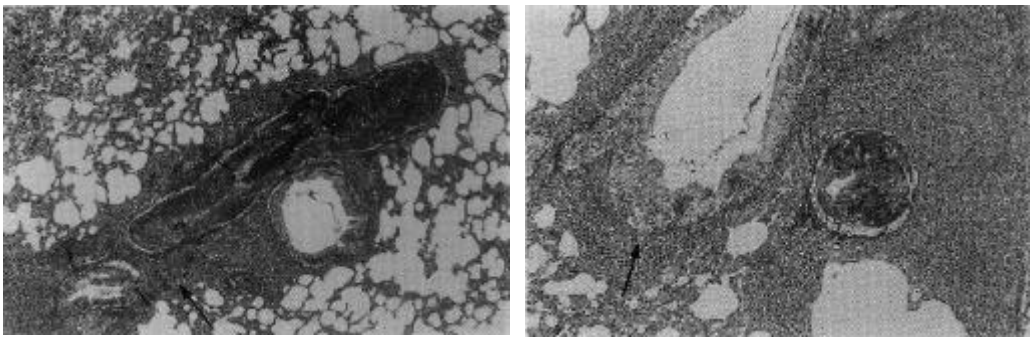
방사선 단독군의 방사선조사 2주 후의 육안소견에서 국소 출혈이 관찰되었다. 조직소견상 정상대조군에 비해 심한 폐실질 허탈과 경화 및 폐포강내 출혈을 보였고, 폐포상피세포는 박리, 부종, 파괴의 변화를 보였다. 혈관은 충혈되고 내피세포는 기저막으로부터 분리되었으며, 혈관주위 부종이 보였다(Fig. 1).

방사선조사 8주 후에는 2주보다 더욱 심한 손상이 관찰되었다. 폐실질 허탈과 경화가 증가했고, 기관지 상피세포도 심한 퇴행성 변화를 보였으며, 혈관벽의 퇴행성 변화와 내피세포의 파괴가 심했을 뿐 아니라, 혈관강이 좁아지고 혈관주위에는 부종과 함께 섬유소의 침착이 보였다(Fig. 2).



A B

**Fig. 1.** Light microscopic findings of the left lung in the radiation only group at 2 weeks after irradiation. There are severe parenchymal patch consolidation, blood vessels with detachment of endothelial cells and perivascular edema (A, arrow), and proliferation and detachment of alveolar lining cells (B, arrow) (H-E stain, A & B: ×25).



A B

**Fig. 2.** Light microscopic findings of the left lung in the radiation only group at 8 weeks after irradiation. The blood vessels show vacuolization and irregular thickening of muscle layer and detachment of endothelial cells with extensive perivascular edema and fibrin deposition (A, arrow). Bronchiole shows distorted lining epithelium with focal detachment (B, arrow) (Masson-Trichrome stain, A : ×16, B : ×33).

Table 3. Histopathological Findings of Left Rat Lung of the Radianion only Group and the Combined Captopril and Radiation Group at 2 and 8 Weeks after Irradiation

| | RT only (No) | | | | Cap and RT (No) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 weeks | | 8 weeks | | 2 weeks | | 8 weeks | |
| | ≤2+ | 3+ | ≤2+ | 3+ | ≤2+ | 3+ | ≤2+ | 3+ |
| Collapse & consolidation | 6 | 4 | 2 | 6 | 7 | 3 | 5 | 4 |
| Hemorrhage | 6 | 4 | 6 | 2 | 10 | 0 | 9 | 0 |
| Edema | 7 | 3 | 7 | 1 | 9 | 1 | 9 | 0 |
| Alveolar epithelial cell change | 3 | 7 | 8 | 0 | 8 | 2 | 9 | 0 |
| Macrophage accumulation | 6 | 4 | 5 | 3 | 9 | 1 | 7 | 2 |
| Bronchial epithelium change | 5 | 5 | 2 | 6 | 10 | 0 | 7 | 2 |
| Blood vessels change | 1 | 9 | 2 | 6 | 10 | 0 | 4 | 5 |
| Perivascular edema | 2 | 8 | 4 | 4 | 10 | 0 | 8 | 1 |
| Perivascular fibrosis | | | 7 | 1 | | | 8 | 1 |

RT : radiation, Cap : Captopril

3) **Captopril과 방사선 병용군**

**방사선조사 2주 후에 좌측 폐는 심한 폐포강내 출혈, 기관지 상피세포 및 혈관의 퇴행성 변화 등이 보이지 않았으며, 전반적으로 중등도 이하의 병리조직 소견 변화를 보였다. 방사선조사 8주 후는 기관지 상피세포, 혈관의 퇴행성 변화가 2주에 비해 손상의 정도가 심해지는 경향이었다.**

4) **방사선 단독군과 Captopril과 방사선 병용군간의 비교** (Table 3)

**방사선조사 2주 후의 Captopril과 방사선 병용군은 방사선 단독군에 비해 폐포강내 출혈, 폐포상피세포 변화, 기관지 상피세포 변화, 혈관변화, 혈관주위 부종과 같은 조직손상의 빈도가 현저히 적게 관찰되었다. 방사선조사 8주 후에는 기관지 상피세포 변화와 혈관주위 부종이 방사선 단독군에 비해 적게 관찰되었다.**

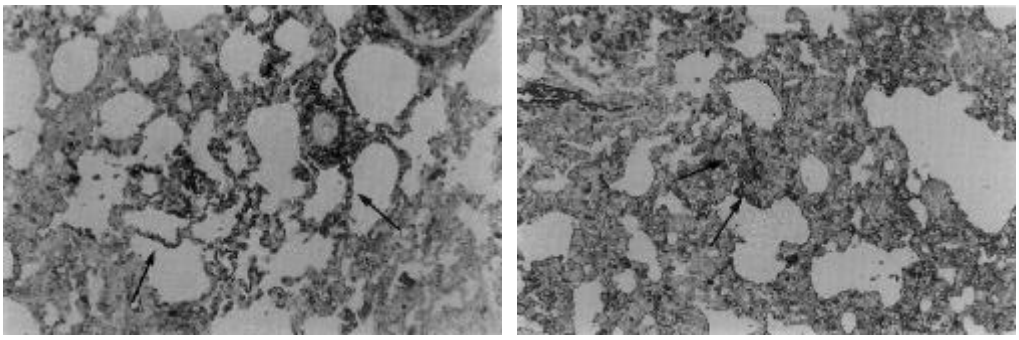
2. **TNFα와 TGFβ1 면역조직화학염색 소견**

1) **정상대조군**

**정상대조군에서 폐포 상피세포, 폐포강의 대식세포, 기관지 주변의 림프조직에 TNFα와 TGFβ1 양성인 세포가 관찰되었다.**

2) **방사선 단독군**

**방사선조사 2주 후에 방사선이 조사된 좌측 폐의 TNFα의 발현은 정상대조군에 비해 폐포상피세포 및 폐포강의 대식세포에서 현저하게 증가되었으나, 기관지 주변의 림프조직에서는 발현의 차이가 없었다. 또한 폐포상피세포 및 폐포강의 대식세포에서 TGFβ1 양성세포가 현저하게 증가된 반면,**



A B

**Fig. 3.** Immunohistochemical stain of left lung in radiation only group at 2 weeks after irradiation. TGFβ1 reaction is markedly increased in alveolar lining cells (A, arrows) and macrophages in alveolar space (B, arrows) (Peroxidase-antiperoxidase, A & B : ×50)

Table 4. Cytokine Changes of Left Rat Lung of the Radiation Only Group and the Combined Captopril and Radiation Group at 2 and 8 Weeks after Inadiation

| | | RT only (No) | | | | | | Cap and RT (No) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 weeks | | | 8 weeks | | | 2 weeks | | 8 weeks | | |
| | | ≤2+ | 3+ | * | ≤2+ | 3+ | * | ≤2+ | 3+ | ≤2+ | 3+ | * |
| TNFα | septal epithelium | 2 | 8 | | 6 | 1 | 1 | 9 | 1 | 7 | 2 | |
| | lymphoid tissue | 4 | 6 | | 5 | 2 | 1 | 8 | 2 | 5 | 4 | |
| | macrophage | 2 | 8 | | 6 | 1 | 1 | 7 | 1 | 6 | 3 | |
| TGFβ1 | septal epithelium | 2 | 6 | 2 | 7 | 1 | | 9 | 1 | 5 | 4 | |
| | lymphoid tissue | 3 | 4 | 3 | 7 | 1 | | 8 | 2 | 4 | 5 | |
| | macrophage | 2 | 6 | 2 | 1 | 6 | 1 | 9 | 1 | 5 | 4 | |

RT : radiation, Cap : Captopril, * : no reactive

기관지 주변의 림프조직은 대조군과 비슷하게 나타났다(Fig. 3). 방사선조사 8주 후 좌측 폐에서는 폐포강내 대식세포에서만 TGFβ1의 발현이 증가하였고 모든 부위의 TNFα와 폐포상피세포 및 기관지 주변의 림프조직에서의 TGFβ1은 발현이 증가되지 않았다.

3) **Captopril과 방사선 병용군**

방사선조사 2주 후의 방사선이 조사된 좌측 폐에서 TNFα 및 TGFβ1는 대부분 중등도 이하의 발현을 보였고 대조군에 비해 발현정도가 증가하지 않았다. 방사선조사 8주 후의 사이토카인의 발현은 2주의 변화에 비해 그 정도가 심해지는 경향이었다.

4) **방사선 단독군과 Captopril과 방사선 병용군간 비교** (Table 4)

Captopril과 방사선 병용군에서 2주 후 TNFα의 발현은 방사선 단독군과 비교해서 폐포상피세포($p$<0.01) 및 폐포강의 대식세포($p$<0.01)에서 현저하게 감소되었고 기관지 주변의 림프조직($p$=0.06)에서는 감소하는 경향이었다. TGFβ1은 폐포상피세포($p$<0.02) 및 폐포강의 대식세포($p$<0.02)에서 양성세포가 현저히 감소되었다. 방사선 단독군과 비교해서 8주 후 Captopril과 방사선 병용군의 TNFα 발현은 차이가 없었고, TGFβ1의 발현은 폐포강의 대식세포($p$=0.09)에서만 감소하는 경향이었다.

## 고안 및 결론

방사선조사로 인한 폐손상의 병리조직 변화는 조기, 중기, 만기로 구분한다.[1, 14] 조기 방사선 손상의 전형적인 특징은 혈관울혈과 모세혈관의 투과성 증가를 동반한 소혈관 및 모세혈관 손상이다. 혈관 내피가 손상되고 기저막으로부터 박리되어 혈관을 폐쇄하면 간질의 부종이 보이고 폐중격 내에 대식세포가 증가한다. 또한 전반적으로 폐포벽이 두꺼워지며 폐포 상피세포가 박리되고 혈관 및 기관지주위에 결체조직이 증가한다. 중기는 혈소판, 섬유소, 그리고 교원질에 의한 모세혈관의 폐색이 특징이며 내피의 증식, 폐포벽의 섬유아

세포 및 비만세포 침윤,[10] 중격의 증식 및 교원질 섬유에 의한 간질의 섬유증 등을 보인다. 방사선 손상이 미미하면 이 변화는 소실되지만, 손상이 심하면 만기로 이어져 진행성 폐포 중격 비후와 혈관경화가 심해지므로 결국 폐섬유증이 발생한다.[15] 본 실험에서는 잠복기(2주)와 초기 급성폐렴기(8주)의 병리소견을 관찰하였다. 방사선조사 2주 후는 잠복기 폐손상의 병리조직 변화를 보였고 이 소견은 시간이 경과할수록 즉 방사선조사 후 2주보다 8주에서 조직손상의 정도가 두드러졌다.

방사선에 의한 손상은 유사분열성 세포사에 의해서 이차적으로 발생하기 때문에 높은 유사분열지수를 갖는 세포가 그 표적이 된다. 제2형 폐포세포는 손상에 대한 반응으로 제1형 세포로 분열할 수 있는 유사분열후 세포이며, 표면활성제(surfactant)의 주요 공급원이다. 혈관 내피세포도 제2형 폐포세포와 유사한 유사분열 활성도를 보인다. 이와 같이 혈관내피세포[1]와 폐포 상피세포[2]는 방사선에 의해 손상되는 표적세포이므로 방사선에 의한 폐독성의 기전에 밀접하게 연관되어 있다.[16]

최근 급속한 분자생물학의 발전으로 방사선으로 인한 폐손상 시에 일어나는 사이토카인의 연속적인 케스케이드가 밝혀지면서, 만기 손상을 분자 수준에서 조기의 "구심성 및 원심성" 세포간 방사선 반응 모형으로 설명한다.[5] 구심성 가지로써 대식세포와 제 2형 폐포세포에 방사선조사 후 세포막과 세포내 손상 또는 DNA 단쇄 및 중쇄 절단 등의 즉각적인 세포 손상이 일어나게 된다.[17] 이러한 세포손상은 유전적 표현의 변화와 사이토카인 및 성장인자의 즉각적인 방출을 유발한다. 원심성 가지로써 섬유아세포에서 성장인자 수용체가 활성화되어 신호전달이 일어나서 섬유아세포가 자극되면 콜라겐 유전자를 자극하게 되어 세포외 기질 단백질(콜라겐)을 생산한다. 따라서 방사선조사 후 수일 또는 수주내의 조기변화는 5 6개월 후의 만기 섬유증의 발생에 주요 역할을 한다는 것이다. 결과적으로 방사선에 의한 폐독성은 시간적인 순서의 명확한 구분 없이 연속선상에 있으며, 염증성 반응은 사이토카인 케스케이드의 발현이 조기에 활성화된 결과이고, 이러한 사이토카인 케스케이드의 지속이 폐섬유증으로 이행된다는 것이다.[3]

TNFα는 폐의 감염, 방사선조사, 독성물질 흡입에 대한 숙주 방어에서 초기의 중요한 단계인 염증세포의 모집을 유도하는 강력한 염증성 사이토카인으로 알려져 있다.[3, 4, 18, 19] TNFα는 혈관내피에 직접 작용하여 염증기에 백혈구 침착을 증가시켜서 출혈성괴사를 일으킬 수 있고 시험관내 인체 암세포 주에 직접 작용하여 세포사를 일으켜서 성장을 방해한다. C57BL6 (radiation fibrosis-prone) 쥐의 폐에서 12.5 Gy의 방사선조사 2주 후 TNFα mRNA 발현이 정상대조군보다 현저하게 증가되었고, 방사선조사 8주 후에는 정상대조군 수준으로 회복됨이 보고되었으며,[4] 본 실험의 결과도 Johnstone의 실험과 유사하였다. 즉, 방사선 단독군의 TNFα 발현이 방사선조사 2주 후에 폐포상피세포와 폐포강의 대식세포에서 현저하게 증가되었다가 8주에 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

방사선조사를 포함하여 폐의 섬유증식성 자극은 IL-1, TGFβ, PDGF, 그리고 TNFα 등의 분비를 증가시킨다.[6, 20 22] TNFα는 염증성 사이토카인인 동시에 섬유성증식성 유사분열물질로서, TNFα 투여시에 섬유증식성 사이토카인을 유도하고 섬유증을 일으키며, 다른 섬유증식성 사이토카인보다 많은 양이 생기므로 폐섬유증의 주요 인자이기도 하다.[19] TGFβ는 토끼에 방사선조사 후 폐세척액에서 정상 폐보다 생산과 분비가 증가되고,[23] 섬유아세포 증식에 의한 교원질과 파이브로넥틴을 포함한 세포외기질 성분을 합성, 분비하므로 이 유전자 발현의 조기 변화는 만기 폐섬유증의 지표가 된다.[5] 또한 방사선치료 중 혈장에서 TGFβ 수준의 변화로 방사선폐렴의 가능성을 예측할 수 있다.[24] C57BL6 쥐의 폐에 RNA 탐식자와 동소부합법(in situ hybridization techniques)을 이용한 실험[3]에서 TGFβ1은 12.5 Gy의 방사선조사 후에 즉시 감소했다가 2주에 증가하여 8주까지 지속되었고 교원질 I, III, IV 및 파이브로넥틴 유전자 발현도 8주까지 TGFβ1와 유사하게 변화하며 병리소견상 콜라겐 침착이 확인되는 6개월째에 다시 증가되었다. TGFβ는 대식세포에서 주로 생성되지만,[25] 그 외 폐포상피세포[26] 및 활성화된 림프구에서도 생성된다.[27] 본 실험에서도 방사선 단독군의 TGFβ1 발현은 방사선조사 2주 후에 폐포 상피세포와 대식세포에서 현저하게 증가되었고 방사선조사 8주 후에는 대식세포에서 지속적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

Captopril 투여로 쥐의 폐에서 monocrotaline에 의한 폐고혈압과 폐섬유증을 감소됨이보고된 후[8], 방사선에 의한 손상이 피부,[28] 소장[29] 및 신장[30]에서도 경감됨이 발표되었다. 쥐의 폐에서 Captopril을 방사선조사(10 30 Gy)와 투여시에 Captopril은 방사선조사로 인한 내피의 기능장애를 호전시키고[9], hydroxyproline과 비만세포의 축적을 억제함으로서 방사선에 의한 폐섬유증을 감소시켰다.[10] 또한 쥐의 폐에 20 80 Gy의 방사선을 10회 분할조사한 후 고해상도 단층촬영상에서 Captopril 병용군은 폐 밀도가 감소하고 방사선폐렴 정도가 경감되었다.[11] 본 연구에서도 방사선조사에 Captopril을 추가함으로써 방사선조사로 인한 폐 손상이 잠복기와 초기 방사

선 폐렴기에서 현저하게 감소하여 Captopril의 방사선보호 효과를 확인하였다.

그러나 현재까지 Captopril의 방사선으로 인한 폐독성을 경감시키는 작용기전은 명확하지 않다. Captopril은 sulfhydryl기를 포함하는 methylated 아미노산 유도체로 세포손상에서 자유기의 발생을 억제하는 기청소물(radical scavenger)로서 비특이적 thiol 효과를 나타낸다.[12] TNFα는 자유기 생성에 의하여 세포독성을 나타내며,[31] 기청소물인 thiol은 사람의 폐대식세포에서 LPS (lipopolysaccharide)에 의한 TNFα 등의 사이토카인 생성을 억제한다.[32] 또한 Captopril은 사람의 신경배아종세포에서 유사분열을 방해하며,[33] 사람과 쥐의 폐포 상피세포에서 세포고사(apoptosis)를 억제한다.[34] 본 연구에서 Captopril을 방사선조사에 병용함으로써 폐포상피세포와 대식세포에서 TNFα와 TGFβ1의 발현이 현저하게 감소하였다. Captopril이 thiol 효과에 의하여 폐포 상피세포와 대식세포에서 방사선에 의한 자유기의 생성을 저하시켜 TNFα와 TGFβ1 생성을 감소시킴으로서 조기의 폐손상을 경감시키는 것으로 생각된다. 이외에도 Captopril은 조직배양에서 직접 인간의 섬유아세포의 증식을 억제하며,[35] 쥐의 폐에서 방사선조사로 인한 혈관내피손상을 감소시켜 혈관의 투과성을 억제하고,[36] 내피의 기능장애를 호전시키고,[9] 혈관내피세포의 세포고사를 억제한다.[37]

본 연구에서는 Captopril이 방사선에 의한 조기 폐손상의 경감효과가 있으며 TNFα와 TGFβ1이 Captopril의 방사선보호효과와 관련이 있음을 알 수 있었지만, 향후 Captopril의 만기 방사선보호효과 기전을 규명하기 위해서는 연구기간을 연장하여 Captopril의 만기 폐섬유증의 억제효과를 확인하고, 폐포 상피세포 및 대식세포 이외의 혈관내피세포와 섬유아세포에서 TGFβ1과 그 밖의 사이토카인 및 성장인자의 변화를 정성적 및 정량적으로 분석하여 확인하는 것이 필요하다고 생각한다.

흰쥐의 좌폐에 방사선을 조사하여 2주(잠복기)와 8주(초기 급성폐렴기) 후에 발생하는 폐손상의 병리조직 소견과 면역화학염색에 의한 TNFα와 TGFβ1의 발현을 관찰하고, Captopril을 방사선조사와 병용투여하여 Captopril의 방사선에 의한 폐손상 보호기전에 사이토카인의 역할을 규명하기 위한 실험을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Captopril과 방사선 병용군은 방사선 단독군과 비교시 폐손상의 정도가 감소하였으며, 방사선조사 2주 후에는 폐포강내 출혈, 폐포 상피세포 변화, 기관지 상피세포 변화, 혈관변화, 및 혈관주위 부종의 정도가 현저히 감소되었고 방사선조사 8주 후에는 기관지 상피세포 변화와 혈관주위 부종이 감소했다.

2) 방사선 단독군과 비교해서 Captopril과 방사선 병용군의 방사선조사 2주 후 TNFα의 발현은 폐포 상피세포, 폐포강의 대식세포 및 기관지 주변의 림프조직에서 유의하게 감소되었다. TGFβ1은 폐포 상피세포 및 폐포강의 대식세포에서 유의하게 감소되었다. 방사선조사 8주 후 TNFα의 발현은 차이가 없었고, TGFβ1은 폐포강의 대식세포에서만 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 흰쥐 폐에 Captopril을 방사선조사와 병용투여하여 방사선에 의한 조기 폐손상이 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 방사선조사 2주 후에는 TNFα와 TGFβ1의 발현이 감소되고 방사선조사 8주 후에는 TGFβ1의 발현이 감소됨을 관찰함으로서, Captopril이 폐손상을 억제하는 방사선보호제로서의 기전의 일부에 염증성 사이토카인 TNFα와 섬유증식성 사이토카인 TGFβ1이 관여함을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌


1. **Rubin P and Caserrat GW.** ed. Respiratory system. In: Clinical radiation pathology. Vol. 1. Philadelphia: W.B. Sanders 1968:423-470
2. **Van den Brenk.** Radiation effects on the pulmonary system. In Berdjis, C. C., ed. Pathology of Irradiation. baltimore: Williams and Wilkins Co. 1971:569-591
3. **Rubin P, Johnstone CJ, Williams JP.** A perpetual cascade cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;33:99-109
4. **Johnstone CJ, Piedboeuf B, Rubin P, et al.** Early and persistent alteration in the expression of interleukin-1α, interleukin-1β and TNFα mRNA levels in fibrosis-resistant and fibrosis-sensitive mice after thoracic irradiation. Radiat Res 1996;145:762-767
5. **Finkelstein JN, Johnstone CJ, Baggs R.** Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;28:621-631
6. **Harmon KR, Witkop CJ, White JG, et al.** Pathogenesis of pulmonary fibrosis: Platelet derived growth factor precedes structural alterations in the Hermankey-Pudlak syndrome. J Lab Clin Med 1994;123:617-627
7. **Kostis JB and DeFelice EA. Ed.** Angiotensin converting enzyme inhibitors. New York: Liss 1987:93-148
8. **Molteni AW, Ward WF, Ts'ao CH, et al.** Moncrotaline-induced pulmonary fibrosis in rats: amelioration by Captopril and penicillamine. Proc Soc Exp Biol Med 1985;180:112-120
9. **Ward WF, Kim YT, Molteni A, et al.** Radiation-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats: modification by an inhibitor of angiotensin converting enzyme. Int J Radiat Oncol

Biol Phys 1988;15:135-140

10. **Ward WF, Moteni AW, Ts'ao CH, et al.** Captopril reduced collagen and mast sell accumulation in irradiated rat lung. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1990;19:1405-1409
11. **Ward WF, Lin PP, Wong PS, et al.** Radiation pneumonitis in rat and its modification by the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril evaluated by high resolution computed tomography. Radiat Res 1993;135:81-87
12. **Ward WF, Moteni AW, Ts'ao CH, et al.** Radiation pneumotoxicity in rats: modification by inhibitor of angiotensin converting enzyme. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992;22: 623-625
13. **Hsu SM and Raine L. Protein A.** Avidin and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 1981;29:1349-1353
14. **Gross NJ.** The pulmonary effect of radiation therapy. Ann Intern Med 1977;129:127-136
15. **Movsas BT, Raffin A, Epstein AH, et al.** Pulmonary radiation injury. Chest 1997;111:1061-1067
16. **Guerry-Force ML, Perkett EA, Brigham KL.** Early structural changes in sheep lung following thoracic irradiation. Radiat Res 1988;114:138-153
17. **Coggles JE.** Biologic effects of Radiation. 2nd Ed. London. UK. Taylor and Francis 1983:29-51
18. **Wright TW, Johnson CJ, Harmson AG, et al.** Analysis of cytokine gene expression in the lungs of pneumocytis carinii-infected mice. Am J Resp Cell Mol Biol 1997;334:491-500
19. **Piguet PF, Collart MA, Grau GE, et al.** Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. Nature 1997;334:245-247
20. **Piguet PF.** Cytokines involved in pulmonary fibrosis. Int Rev Exp Pathoph 1993;34(B):173-181
21. **Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, et al.** Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. N Engl J Med 1993;328:1592-1598
22. **Plantanias LC and Vogelzang NJ.** Interleukin-1: Biology, pathophysiology, and clinical prospects. Am J Med 1990;89: 621-629
23. **Rubin P, Finkelstein JN, Shapiro D.** Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24:93-101
24. **Anscher MS, Murase T, Prescott DM.** Change of 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
25. **Brandes ME and Finkelstein JN.** The production of alveolar macrophage-derived growth regulating proteins in response to lung injury. Toxicology Lett. 1990;54:3-22
26. **Finkelstein JN.** Physiologic and toxicologic responses of alveolar type II cells. Toxicology 1990;60:41-52
27. **Khalil NR, O'Connor N, Flanders KC, et al.** TGFβ1, but not TGFβ2 or TGFβ3, is different present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. Am J Respir Cell Mol Biol 1996;14:131-138
28. **Ward WF, Molteni AW, Ts'ao CH.** The effects of captopril benign and malignant reactions in irradiated rat skin. Br J Radiol 1990;63:349-354
29. **Yoon SC, Park JM, Jang HS.** Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;30:873-878
30. **Cohen EP, Molteni AW, Hill P.** Captopril preserves function and ultrastructure in experimental radiation nephropathy. Lab Invest 1996;75:349-367
31. **Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA.** Increased TNFα mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:10104-10107
32. **Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, et al.** Thiol regulation of the production of TNFα, IL-6, and IL-8 by human alveolar macrophages. Eur Respir J 1999;14:98-105
33. **Chen L, Re RN, Prakash O, et al.** Angiotensin converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. Proc Soc Exp Biol Med 1991;196:280-283
34. **Uhal BD, Gidea C, Bargout R, et al.** Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. Am J Physiol 1998;275:L1013-1017
35. **Nguyen L, Ward WF, Ts'ao CJ, et al.** Captopril inhibits proliferation of human lung fibroblast in culture: a potential antifibrotic mechanism. Proc Soc Exp Biol Med 1994;205:80-84
36. **Fanton JC, Schrier D, McMurray J.** Inhibition of vascular permeability changes in rats by captopril. J Clin Invest 1982; 69:1207-1211
37. **Dinmeler S, Rippmann V, Weiland U, et al.** Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Circ Res 1997; 81:970-976

대한방사선종양학회지 2001;19(2):190 198

*Abstract*

# The Radioprotective Effect and Mechanism of Captopril on Radiation Induced Lung Damage in Rat

Mi Hee Song, M.D.*, Kyung Ja Lee, M.D.†, Heasoo Koo, M.D.‡ and Won Young Oh, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, National Medical Center
†Department of Radiation Oncology and ‡Anatomic Pathology, Ewha Women University


**Purpose** : It was reported that Captopril (angiotensin converting enzyme inhibitor) had an effect to reduce the pneumonitis and pulmonary fibrosis induced by radiation in rat. We performed this study to investigate the radioprotective effect and mechanism of Captopril.

**Methods and Materials** : The comparison was made between the radiation only group and the combined Captopril and radiation group by examining histopathologic findings and immunohistochemical stains (TNF $\alpha$ and TGF $\beta$1) at 2 and 8 weeks after irradiation. Each group has 8 to 10 rats (Sprague-Dawley). 12.5 Gy of X-ray was irradiated to the left hemithorax in a single fraction. Captopril (50 mg/kg/d) mixed with water was given per oral and continuously from 1 week prior to irradiation up to 8th week of the experiment.

**Result** : In the combined Captopril and radiation group, the histopathologic changes which were hemorrhage into alveolar space, changes of alveolar epithelium, bronchial epithelium and blood vessels, and perivascular edema were less severe than in the radisation only group at 2 weeks. At 8 weeks, the alveolar epithelial changes and perivascular edema were less prominant in the combined Captopril and radiation group. At 2 weeks, the TNF $\alpha$ expression of the combined Captopril and radiation group was markedly decreased at the alveolar epithelium ($p<0.01$), lymphoid tissue ($p=0.06$) and the macrophage of alveolar space ($p<0.01$) compared with the radiation only group. Furthermore the TGF $\beta$1 expression was significantly prominant at the alveolar epithelium ($p<0.02$) and the macrophage in alveolar space ($p<0.02$). At 8 weeks, the expression of TNF $\alpha$ and TGF $\beta$1 of most sites, except TGF $\beta$1 of the macrophage of alveolar space ($p=0.09$), showed no significant difference between 2 groups.

**Conclusion** : This study revealed that early lung damage induced by irradiation was reduced with the addition of Captopril in the latent and early pneumonitis phase. The expression of TNF $\alpha$ and TGF $\beta$1 at 2 weeks and TGF $\beta$1 at 8 weeks was further decreased in the combined Captopril and radiation group than the radiation only group. From these results, it may be concluded that the proinflammatoy cytokine (TNF $\alpha$) and fibrogenic cytokine (TGF $\beta$1) probably play the role of the radioprotective mechanism in Captopril.

**Key Words** : Captopril, Radioprotector