

방사선조사를 받은 흰쥐 소장 점막의 손상과 재생과정 중 금속단백효소 및 억제자의 발현

성균관대의대 강북삼성병원 진단방사선과*,
이화여자대학교 의과대학 방사선종양학교실†, 진단방사선과학교실†

곽현주* · 이경자† · 이정식†

목적 : 금속단백효소(MMPs)는 세포외 기질의 분해가 주 기능이며 금속단백효소와 억제자(TIMPs)가 상처 치유 과정과 자외선 조사에 의한 피부노화에 관여한다는 것이 알려져 있다. 그러나 방사선조사 후 금속단백효소와 억제자의 발현에 관한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 흰쥐의 소장에 방사선을 조사하여 금속단백효소와 억제자의 발현을 시간적으로 관찰하여 방사선에 의한 소장 점막 손상 및 재생과정과 금속단백효소와 억제자의 관계를 밝히고자 하였다.

대상 및 방법 : 실험동물로 암, 수 구별 없이 생후 4~5개월, 체중 250~300 gm의 흰쥐(Sprague-Dawley) 30마리를 대상으로 하여 실험군으로 전복부에 8 Gy의 방사선을 조사한 후 1일, 2일, 3일, 5일, 7일, 14일에 각각 5마리씩 희생시켜 소장을 적출하여 사용하였고, 정상대조군은 각 시기별로 1마리씩 사용하였다. H&E 염색을 하여 조직병리검사를 하였고, MMP-2와 TIMP-2의 발현에 대해서는 면역조직화학염색, 면역블로팅, ELISA법으로 확인하였다.

결과 : 조직병리 소견상 방사선조사에 의한 소장 조직손상은 1일부터 관찰되어 2일과 3일에 현저하였고 재생은 3일에 관찰되어 5일에 현저하였다. 면역조직화학염색 결과 MMP-2는 1일에 발현되어 3일, 5일에 가장 강하게 나타났으며 TIMP-2는 1일에 나타나기 시작하여 5일에 가장 강하게 나타났다. 면역블로팅 결과 MMP-2는 3일과 5일에 강하게 나타났으며 TIMP-2는 1, 3, 5, 7일에 같은 정도의 양성반응을 보였다. 혈액에서의 MMP-2와 TIMP-2의 ELISA 검사법에서는 대조군에 비해 방사선조사군에서 통계적으로 유의한 증가가 있었고 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 7, 14일 각각에서 유의한 차이가 있었으며 5일에 가장 높은 수치를 보였다.

결론 : 방사선조사 후 조직병리학적 검사에서 손상의 척도인 염증 반응과 재생의 척도인 유사분열 수의 변화가 면역조직화학염색, 면역블로팅, ELISA검사에 의한 MMP-2, TIMP-2의 증가와 일치하는 것으로 나타나 이들이 방사선조사 후 조직 손상과 재생 기전에 역할을 하고 있음을 보여주었다.

핵심용어 : 금속단백효소, 금속단백효소억제자, 방사선조사, 흰쥐 소장

서 론

방사선조사에 의한 세포 손상과 재생 과정에 관한 연구는 대부분 신호전달기전, 아포토시스(apoptosis) 및 cytokines과의 연관성을 밝힌 것들이 알려져 있다. 신호전달기전에 관한 연구는 방사선조사 후 손상된 조직의 재생에 phospholipase C (PLC) 동위효소와 ras 암유전자단백이 관여하며 조직 손상에 protein kinase C (PKC) 등이 관여한다는 보고가 있다.¹⁻³⁾ 또한 방사선조사에 의해 아포토시스가 유도되며^{4,5)} 인터루킨 1 (IL-1), 인터루킨 6 (IL-6), 종양괴사인자(tumor necrosis factor,

TNF) 같은 cytokine이 방사선조사에 의해 증가되어 이러한 cytokine이 방사선에 의한 조직 손상에 역할을 한다는 보고가 있다.^{5,6)} 금속단백효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 세포외 기질의 분해가 주 기능으로 태생기 발달, 상처 치유, 임신, 분만, 골 흡수, 유선 쇠퇴 등의 생리적 상태나 관절염, 치주 질환, 종양 침윤과 전이 등의 병리적 상태 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)} 현재까지 알려진 MMP family는 17종류가 있으며 이들은 분해하는 기질의 특이성에 의해 나뉜다. 활성화된 MMP는 조직내 억제자인 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)에 의해 억제되며 현재까지 알려진 TIMP는 4종류가 있다. MMP와 TIMP는 주로 종양의 침윤과 전이에 관여함이 이미 많은 연구를 통해 보고된 바 있으나⁹⁻¹⁴⁾ 저산소증에 의한 폐 손상,¹⁵⁾ 피부의 상처 치유,^{16,17)} 간 조직 손상,^{18,19)} 허혈성 손상을 받은 심근의 재생,²⁰⁾ 혈관 손상,^{21,22)} 및 허혈성 뇌손상²³⁾시에도 관여한다고 알려져 여러 원인에

이 논문은 2002년 10월 2일 접수하여 2003년 1월 6일 채택되었음.

책임저자: 곽현주, 성균관대의대 강북삼성병원 진단방사선과
Tel: 02)2001-2343, Fax: 02)2001-2354
E-mail: radiokwag@hanmail.net

의한 조직의 손상과 재생과정에서도 역할을 한다.

현재까지 방사선조사에 의한 조직의 손상과 재생에 MMP와 TIMP가 관여함은 연구된 바가 없으나 자외선조사 후 피부에서 collagenase, stromelysin 및 gelatinase-B 등의 MMP가 증가하며 TIMP-1이 유도되어 피부 노화에 역할을 함이 알려져 있다. 자외선에 의한 피부 손상의 기전은 명백히 밝혀지지 않았으나 진피와 표피층의 콜라겐 손상이 원인이 되며 이는 MMP에 의해 매개되는 세포외 기질의 분해와 관련이 있을 것으로 알려졌다.^{24, 25)} 이에 방사선에 의한 조직 손상에도 MMP와 TIMP가 관여할 것이라는 가정하에 이를 확인하기 위하여 방사선조사에 예민하게 반응하고 재생이 잘 되는 모델로서 자주 이용되는 흰쥐 소장 점막에서의 MMP-2와 TIMP-2 발현을 관찰하여 보고자 하였다. 방사선조사 후 흰쥐 소장 점막의 조직병리학적 소견을 관찰하고 조직 손상과 재생 여부에 따른 MMP-2와 TIMP-2 발현과의 연관성을 알아본다 방사선조사에 의한 조직 손상과 재생의 기전을 밝히고자 함이 이 연구의 목적이다.

대상 및 방법

1. 대 상

실험동물은 암수 구별없이 생후 4~5개월, 무게 250~300 gm의 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였고 조직병리학적 검사와 면역조직화학염색은 35마리, 혈청의 ELISA 검사는 21마리를 시행하였다.

2. 연구방법

1) 실험군 분류 및 방사선조사

방사선조사는 흰쥐를 가볍게 에테르로 흡입 마취한 후 고정틀에 사지를 고정하고 균등한 조사를 위해 볼루스와 판틀을 사용하여 6 MV 선형가속기(NEC 1006X, Japan)를 이용하여 시행하였다. 분당 2 Gy 선량률로 8 Gy의 방사선을 일회 전복부에 조사하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 7, 14일에 흰쥐를 희생하여 공장을 절제하였다. 실험군은 방사선조사 후 기간에 따라 1일군(I), 2일군(II), 3일군(III), 5일군(IV), 7일군(V), 14일군(VI)으로 구분하여 각 군에 5마리씩 사용하였다. 방사선을 조사하지 않은 5마리를 정상대조군(Control)으로 하였다(Table 1).

2) 시료채취 및 제조

조직병리 소견의 관찰과 면역조직화학염색을 위하여 Treitz인대 직하부의 공장을 2 cm 길이로 절단하여 포르말린에 고정, 파라핀에 포매한 후 통상의 방법대로 5 μ m 두께로

잘라 hematoxilin과 eosin 염색으로 표본제작하였다. 면역블로팅을 위해서는 희생시킨 흰쥐의 소장 조직을 채취한 즉시 섭씨 영하 70도에 저장하였다.

3) 조직병리학적 검사

흰쥐 소장에서 4개의 횡단면을 얻어 통상의 hematoxilin과 eosin 염색을 하여 각 군의 특징적인 조직병리 소견을 관찰하고 방사선조사에 의한 조직 손상의 정도를 평가하고자 염증의 정도를 등급화하였다. 정상 대조군의 경우를 -, 염증 세포 침윤이 표면에만 국한된 경우를 +, 점막하 조직을 침범한 경우를 2+, 조직 전층을 침범한 경우를 3+로 정하였다. 방사선조사 후 흰쥐 소장의 재생 정도를 평가하기 위하여 광학대(400배) 시야에서 관찰한 100개의 핵당 관찰되는 유사분열 수를 측정하여 등급화하였다. 유사분열 수가 5개 미만인 경우를 -, 5개에서 9개인 경우를 +, 10개 이상인 경우를 2+로 하였고 10개 이상의 유사분열을 보이고 소낭선의 수가 증가되어 있는 경우를 3+로 정하였다.

4) 면역조직화학염색법

MMP-2와 TIMP-2의 발현분포를 관찰하기 위하여 시행한 면역조직화학염색은 Hsu와 Raine (1984)이 기술한 방법을 응용하여 시행하였다. 즉, 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m 두께로 자른 후 xylene으로 각각 5분씩 3회 씻어 파라핀을 제거한 후 100% 에탄올로 2분씩 2회 수화시키고, 90%, 80%, 70% 에탄올로 각기 2회 수화하였다. 비특이적 단백질의 결합을 막기 위해 10% 염소 혈청으로 20분간 반응시키고 조직내 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3% hydroxide에 15분간 반응시켰다. 그 후 증류수로 2번 수세하고 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)에 5분간 담근 후 MMP-2와 TIMP-2의 일차항체를 각각 실온에서 2시간 반응시켰다. MMP-2에 대한 일차항체는 상품으로 시판되는 것(Ab-3, monoclonal mouse IgG, Oncogene Research Products, Calbiochem)을 사용하였고 TIMP-2에 대한 일차항체는 한효과학연구소에서 제조한 것을 받아 사용하였다. 이들은 사람의 TIMP-2를 토끼에 면역

Table 1. Experimental Animal Groups

Group	Radiation dose (Gy)	No. of rats (*)	Day of sacrifice
Control	-	5 (3)	-
I	8	5 (3)	1
II	8	5 (3)	2
III	8	5 (3)	3
IV	8	5 (3)	5
V	8	5 (3)	7
VI	8	5 (3)	14

(*) No. of rats used in ELISA

시켜 골수종 세포와 융합시켜 만든 hybridoma로부터 얻었다. 그 다음 PBS로 5분간 3회씩 수세한 후 DAKO사의 LSAB (labelled streptavidin biotin) kit를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 즉, biotin이 결합된 link antibody를 20분간 반응시키고 PBS로 수세한 후 peroxidase가 배합된 streptavidin을 20분간 반응시킨 후 다시 PBS로 수세하였다. AEC (3-amino-9-ethyl carbazole)로 발색시킨 후 Meyer's hematoxilin으로 대조염색한 후 현미경으로 검색하였다. 음성대조군은 MMP-2, TIMP-2에 대한 일차항체대신 PBS로 대체시키고 나머지 과정은 그대로 하여 이를 사용하였다. 양성 대조군으로는 가장 반응이 강하게 나오는 슬라이드를 골라 매번 염색시 같이 염색하여 비슷한 염색상을 보이는지 비교하였다. 결과는 광학현미경으로 관찰하여 통상 면역조직화학염색에서 시행되는 염색상의 강도(intensity)와 빈도(distribution)를 기준으로 사용하여 등급화하였다. 즉, 음성 대조군에서 보이는 정도를 -, 표현이 약하게 나타나는 경우를 +, 표현이 강하며 대부분의 세포가 양성을 보인 경우를 3+라하고, 일부의 세포가 양성 반응을 보이는 경우를 2+로 기준을 정하였다.

5) 면역블로팅

MMP-2와 TIMP-2의 면역블로팅을 위하여 얼린 정상 흰쥐 소장 조직과 방사선 조사된 소장 조직을 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 10 µg/mL, leupeptin, 1 mM PMSF가 함유된 10 mM HEPES의 균질액에 담고 polytron homogenizer로 균일하게 분쇄한 후 섭씨 4도에서 20,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 그 상층액을 취하였다. 상층액에서 단백질 정량을 시행한 후 이 단백질 20 µg을 취하여 8% SDS-PAGE로 분리시킨 후 nitrocellulose paper로 이동시키고 이를 면역조직화학염색에서와 동일한 MMP-2 및 TIMP-2에 대한 단클론성 항체로 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이차항체로 반응시킨 후 ECL system (Amersham, U.S.A.)으로 발색시킨 후 immunoreactive band를 관찰하였다.

6) ELISA

혈청은 분리한 즉시 검사를 시행하기 전까지 섭씨 영하 20도에 보관하였다. 검사를 시행할 때는 모든 시약 및 혈청을 실온, 즉 섭씨 20~27도로 유지하도록 하였다. 각각 100 µL의 완충액 및 표준액을 MMP 및 TIMP가 공액된 well에 넣은 후 시료 역시 같은 양을 well에 분주하였다. 플레이트를 뚜껑을 닫은 후 실온에서 2시간 배양하였다. 세척 완충액을 이용하여 4번 세척한 후 paper를 이용하여 검체가 남지 않도록 blor하였다. 다시 100 µL의 peroxidase conjugate를 well에 분주한 후 뚜껑을 닫고 실온에서 1시간 배양하였다. 다시 같은 방법으로 세척한 후 실온에 보관 중인 TMP용액 100 µL를 well에 분주한 후 다시 뚜껑을 닫고 30분 실온에서 배양한 후 푸른색(blue color)이 나오면 630 nm에서 측정하였다.

7) 통계처리

통계처리는 ELISA 검사를 통해 얻은 MMP-2와 TIMP-2의 측정치에 대하여 시행하였다. 대조군과 각 실험군간의 비교는 비모수적 변수에 대한 비교를 위하여 두 군간의 비교에는 Mann-Whitney test를, 세 군 이상의 비교에는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 처리하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 조직병리학적 소견

정상 흰쥐의 소장 점막은 점막표면이 고르며 소낭선내에 배상세포가 규칙적으로 분포되어 있고 기저부에 증식대가 잘 발달되어 있는데 비하여 방사선조사된 흰쥐의 소장은 조사 후 1일부터 소장 점막의 위축과 함께 염증세포 침윤이 있었고 조직 손상이 2일과 3일에 2+, 3+로 가장 심하게 관찰되었다. 기저부의 증식과 유사분열 수의 증가와 같은 재생의 증거는 3일부터 +, 2+로 나타나서 5일에 2+, 3+로 가장 활발하게 나타났다(Table 2 & Fig. 1).

Table 2. Histopathologic Findings of Inflammation & Regeneration in Jejunal Mucosa of Rats after Irradiation

	Control		I		II		III		IV		V		VI	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
1 st rat	-	-	2+	-	2+	-	2+	-	2+	2+	+	3+	-	+
2 nd rat	-	-	-	-	2+	+	2+	+	+	3+	+	2+	-	+
3 rd rat	-	-	+	-	+	-	+	2+	2+	2+	+	2+	+	-
4 th rat	-	-	2+	-	2+	-	2+	+	+	+	2+	-	2+	-
5 th rat	-	-	-	-	3+	-	3+	-	2+	3+	+	+	-	+

Abbreviations : I, inflammation; R, regeneration

2. MMP-2 및 TIMP-2의 발현

1) 면역조직화학염색

MMP-2는 방사선조사 후 1일부터 +로 나타나기 시작하여 3일과 5일에 2+, 3+로 가장 강하게 나타났으며, TIMP-2 역시 방사선조사 후 1일부터 +로 나타나기 시작하여 5일에

2+, 3+로 가장 강한 양성반응을 보였다(Table 3, Fig. 2 & 3).

2) 면역블로팅

MMP-2의 발현은 72 kDa에서 양성 띠가 관찰됨으로써 확인되었고 3일과 5일에 강한 발현을 보였다. TIMP-2의 발현은 21 kDa에서 양성 띠가 관찰되어 확인되었고 1, 3, 5, 7일에

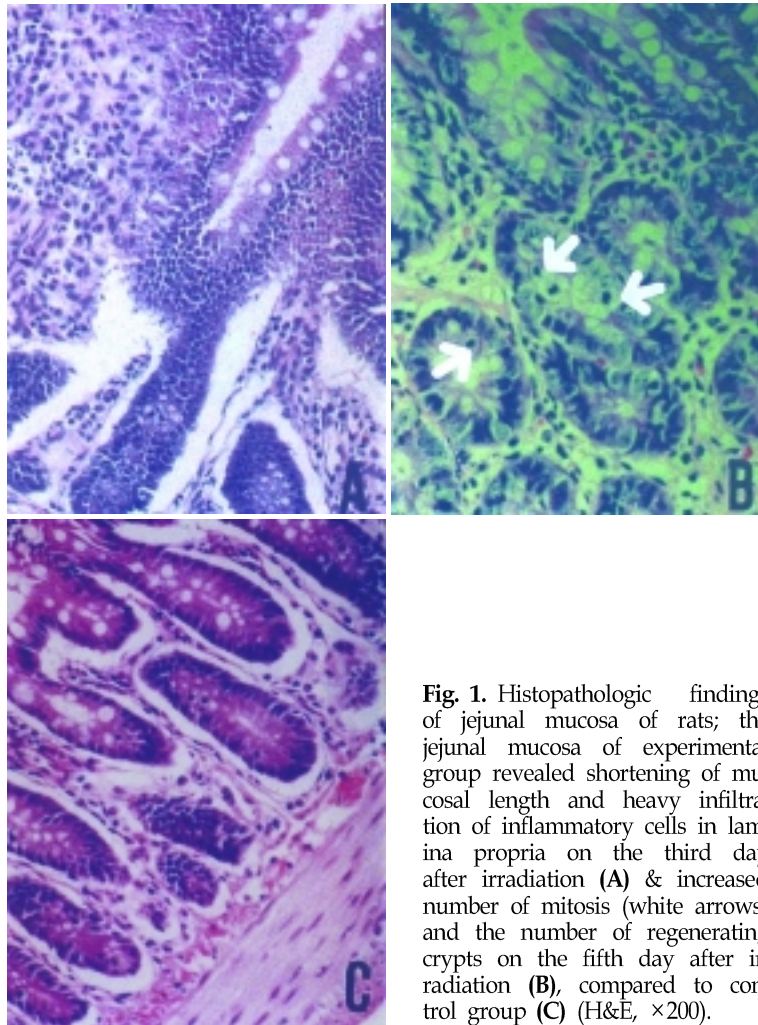


Fig. 1. Histopathologic findings of jejunal mucosa of rats; the jejunal mucosa of experimental group revealed shortening of mucosal length and heavy infiltration of inflammatory cells in lamina propria on the third day after irradiation (A) & increased number of mitosis (white arrows) and the number of regenerating crypts on the fifth day after irradiation (B), compared to control group (C) (H&E, ×200).

Table 3. Immunohistochemical Stain of MMP-2 & TIMP-2 in Jejunal Mucosa of Rats after Irradiation

	Control		I		II		III		IV		V		VI	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T
1 st rat	-	+	+	+	+	-	2+	+	2+	3+	+	+	-	+
2 nd rat	-	-	+	+	+	+	+	2+	2+	2+	+	2+	-	-
3 rd rat	-	+	-	-	2+	2+	+	+	3+	+	-	+	-	+
4 th rat	-	-	-	-	+	+	3+	2+	+	2+	-	2+	-	-
5 th rat	-	-	-	+	2+	+	2+	+	3+	3+	+	+	-	+

Abbreviations : M, MMP-2; T, TIMP-2

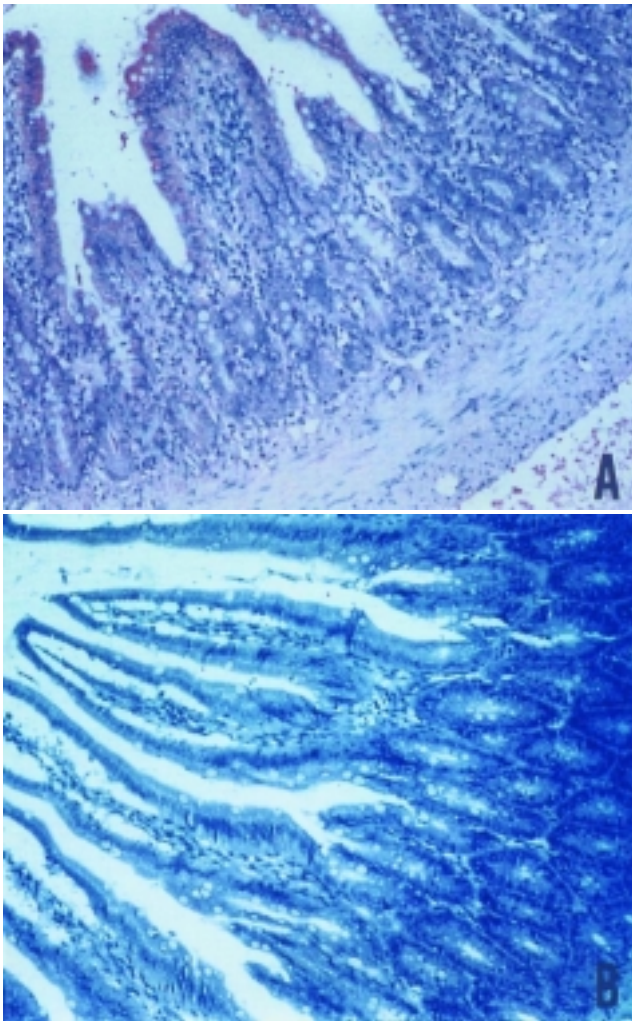


Fig. 2. Immunohistochemical stain of MMP-2 of jejunal mucosa of rats; MMP-2 was expressed mainly in damaged surface epithelium on the third day after irradiation (A), whereas there is no expression of MMP-2 in control group (B) (Immunostatin, ×200).

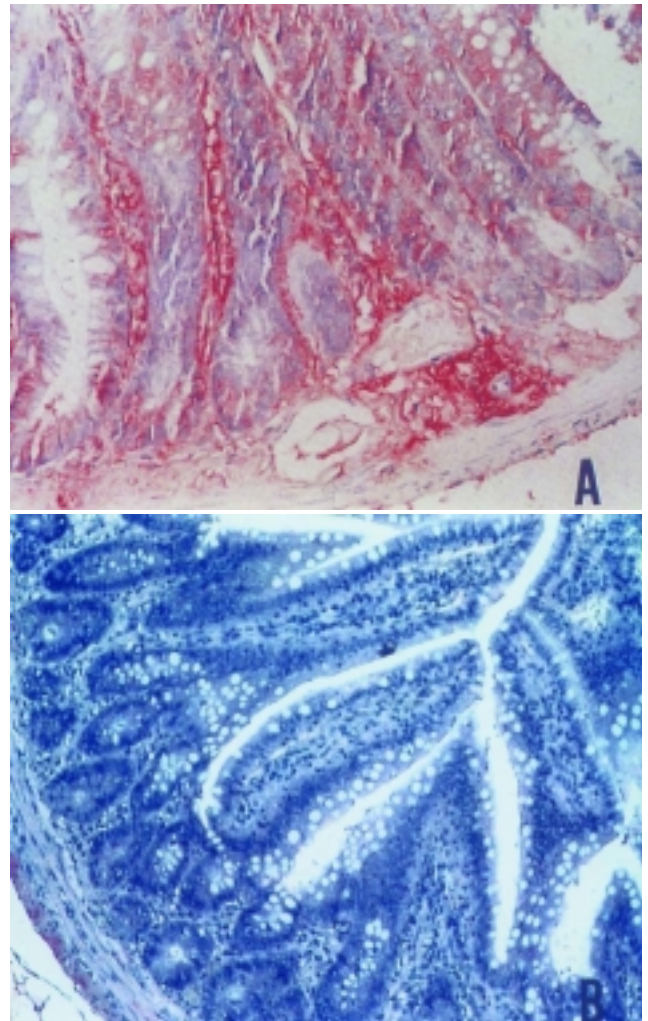


Fig. 3. Immunohistochemical stain of TIMP-2 of jejunal mucosa of rats; TIMP-2 was strongly expressed in stroma on the fifth day after irradiation (A), compared to focal expression in control group (B) (Immunostatin, ×200).

같은 정도의 양성 반응을 보였다(Fig. 4).

3) ELISA

대조군과 방사선조사군 사이의 MMP-2와 TIMP-2 측정치는 Mann-Whitney test로 검증하였을 때 서로 유의한 차이가 있었으며 방사선조사군에서 증가하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 7, 14일의 MMP-2와 TIMP-2의 측정치도 Kruskal-Wallis test로 검증하여 각각 통계적으로 유의한 차이가 있었으며 5일에 가장 높은 수치를 보였다(Table 4).

고안 및 결론

방사선조사에 의한 세포 손상은 소장 점막 세포와 같이

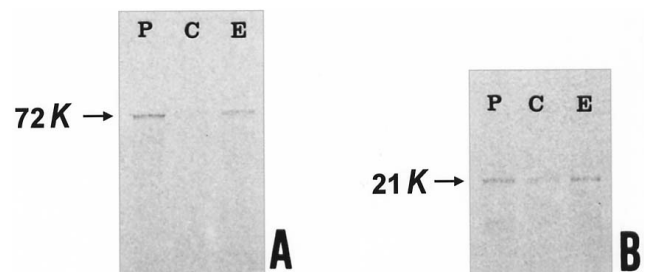


Fig. 4. The immunoblot analysis of MMP-2 & TIMP-2. (A) The expression of MMP-2 was strongly positive on the third day after irradiation (E), compared to control group (C). (B) The expression of TIMP-2 was strongly positive on the fifth day after irradiation (E), compared to control group (C) (p: positive control, 72k: 72 kDa, 21k: 21 kDa).

Table 4. Levels of MMP-2 & TIMP-2 Measured by ELISA

MMP & TIMP	Post irradiation days						
	Contorl	1	2	3	5	7	14
MMP-2 (ng)	10.5	5.2	8.1	19.5	90.5	38.6	18.1
	3.1	3.9	3.1	51.5	41.1	45.8	16.7
	2.5	6.5	5.4	48.1	25.5	27.5	8.4
TIMP-2 (ng)	10.1	22.6	11.5	13.4	42.8	47.8	35.9
	20.5	28.5	20.4	25.7	65.5	31.3	20.2
	11.2	20.1	5.8	31.0	81.4	46.8	14.3

빠르게 증식하는 세포들에서 주로 일어나며 이와 같이 손상이 있게 되면 반드시 재생과정이 일어나게 된다.²⁶⁾ 방사선조사에 의한 소장 점막의 손상 정도는 광학현미경상의 병리학적인 소견을 관찰하여 소낭선세포의 생존수에 의한 소집락측정을 이용하여 정량측정하기도 한다.²⁷⁾ 본 연구에서는 방사선조사에 의한 소장 점막의 손상과 재생 과정을 관찰하기 위하여 조직병리학적 변화를 관찰하였고 재생 과정의 객관적 증거로 광학현미경상의 유사분열 수를 측정하였다. 방사선조사 후 소장 점막의 변화로는 점막의 위축이 심해지면서 용모의 길이가 짧아지고 염증세포의 침윤이 관찰되었다. 이는 방사선조사 후 1일부터 관찰되기 시작하여 2일과 3일에 현저하였고 7일에는 정상으로 회복되는 변화를 보였다. 유사분열 수의 증가는 방사선조사 후 3일부터 나타나기 시작하여 5일에 가장 많이 보여 이 시기에 재생이 가장 활발함을 알 수 있었다. 이러한 조직병리학적 결과는 Yoo 등²⁾과 Kim 등³⁾의 연구와 일치되었고 이는 Withers와 Elkind²⁷⁾가 소집락측정을 이용한 연구에서 소장의 재생시간이 90~96시간 정도라고 발표한 것과 일치된 결과를 보였다. 또한 Kim 등⁷⁾이 흰쥐 소장 점막에서 세포 손상에 의한 아포토시스가 방사선조사 후 1일에 많이 나타나고 유사분열 수도 5일에 가장 많이 증가한다고 발표한 것과 일치하였다. Leshner와 Leshner²⁸⁾는 방사선조사 후 쥐 소장상피에서 유사분열세포가 방사선조사 후 5일에 가장 많이 증가된다고 보고하여 본 연구와 일치된 결과를 보였다.

방사선조사에 의한 MMP-2와 TIMP-2 발현에 대해 발표된 보고가 없어 본 연구가 방사선에 의한 조직 손상과 재생 과정에서의 MMP와 TIMP의 역할을 밝히고자 한 최초의 시도이다. 면역조직화학염색법으로 관찰한 소장 점막내의 MMP-2와 TIMP-2의 발현은 방사선조사 후 3일과 5일에 가장 강하게 나타나 소장 조직의 손상과 재생여부를 관찰한 조직병리학적 소견과 일치되는 변화를 보였다. 또한 ELISA로 측정할 혈청내 MMP-2와 TIMP-2도 방사선조사 후 5일째에 가장 증가되어 조직병리학적 소견, 면역조직화학염색법과 일치하는

결과를 보였다. 이로써 방사선조사에 의한 소장 조직의 손상과 재생 과정에 MMP-2와 TIMP-2가 역할을 할 것이라고 추정할 수 있었다.

MMP는 단백분해효소로 공통된 아미노산 서열을 공유하며 기질 특이성이 있고 비활성의 형태로 분비되어 단백분해 활성을 갖기 위해서는 활성화가 필요하며 조직내 억제자에 의해 억제된다.⁸⁾ MMP는 크게 collagenase, gelatinase와 stromelysin 등으로 나뉘며 collagenase는 MMP-1, 8, 13이 있고, gelatinase는 MMP-2, 9이 있으며 stromelysin은 MMP-3, 7, 10, 11, 12이 있다.^{7, 8)} MMP는 세포의 기질의 분해를 통해 조직의 개형(remodeling), 조직 재생, 상처 치유, 종양의 침윤과 전이에 관여하며, 세포의 기질은 콜라겐성 성분과 비콜라겐성 성분으로 나뉘고 콜라겐성 성분의 분해, 개형에 의해 상처 치유, 피부 노화 등에 관여하는 것으로 생각된다.^{7, 25)} 세포의 기질의 분해는 먼저 collagenase에 의해 원섬유 콜라겐(fibrillar collagen)의 분해가 시발된 후 gelatinase에 의해 지속된다. Gelatinase는 collagenase에 의해 분해가 시작된 콜라겐의 분해를 완성하는 것 외에도 콜라겐 분해의 시발에도 관여하여 콜라겐성 세포의 기질의 개형에 중요한 역할을 한다.⁷⁾ MMP는 손상된 조직의 제거, 혈관 형성, 새로 생성된 결체 조직의 개형 등을 통해 상처 치유에 관여하며 실험적으로 유발된 상처의 치유와, 화상, 궤양 등의 치유에 연관이 있음이 알려졌다.^{7, 29)}

쥐에 저산소증을 유발시킨 후 정상대조군과의 비교를 통해 MMP-2 & 9, TIMP-1 & 2의 발현을 비교한 연구에서는 MMP-2 & 9의 활성이 증가되었고 TIMP-1 & 2의 발현은 변화가 없었다고 하여 저산소증에 의한 폐 손상이 MMP-2 & 9의 증가와 연관이 있다고 하였다.¹⁶⁾ 총경동맥에 실험적으로 유발된 손상이 MMP-2의 mRNA level과 활성을 증가시킨다는 보고도 있다.²²⁾ 국소적 허혈성 뇌손상의 초기에 뇌조직에서 MMP-2가 증가됨을 보고한 연구에 의하면 허혈에 따른 기저막 파괴에 의한 신경손상에 MMP-2가 관여할 것이라고 하였다.²³⁾ 피부 손상의 재생시에 초기 재상피화 과정 중 collagenase, MMP-9, stromelysin-1 & 2와 TIMP-1의 증가가 있었고 재생의 후기에는 MMP-2와 membrane type 1 MMP의 증가가 있었다는 연구 결과는 피부 손상의 재생 과정에 시기별로 다른 종류의 MMP가 관여한다는 것을 입증하였다.¹⁷⁾ 또한 치은과 같은 결체조직내 콜라겐의 분해에 MMP-2가 중요한 역할을 한다는 보고도 있었고,³⁰⁾ 쥐의 뇌에 허혈성 손상을 유발시켜 MMP-9와 MMP-2가 증가됨을 관찰하고 MMP-9을 억제하여 검색 범위가 감소함을 보고한 연구도 있다.³¹⁾ 이와 같은 연구 결과는 MMP와 TIMP가 여러 원인에 의한 조직

손상과 재생 과정에 관여함을 입증한다.

TIMP는 MMP의 활성을 억제하는 억제자로 현재까지 TIMP-1, 2, 3 & 4의 4종류가 있고 TIMP-1 & 2는 대부분의 MMP에 억제자로 작용하며 MMP와 TIMP의 상호 균형에 의해 세포외 기질의 분해와 축적이 조절되며³²⁾ 불균형이 초래되면 세포의 손상과 종양의 침윤 또는 전이 같은 병리적 상태를 유도한다고 알려졌다.^{33~35)} 각막절개술 후 인체의 각막에서 절개부위에 TIMP-1 & 2가 증가됨을 면역조직화학염색법으로 확인한 연구보고에 의하면 TIMP-1 & 2가 각막의 반흔 형성과 개형에 중요한 역할을 한다고 하였다.³⁶⁾ 또한 급성 심근경색의 성공적 재관류 후 MMP-1과 TIMP-1의 혈청 농도가 처음 4일간 감소되다가 14일경에 최고치를 보여 MMP-1과 TIMP-1이 심근경색 후 재관류에 의한 좌심실의 치유 과정에 관여한다고 보고한 연구가 있다.²¹⁾

자외선조사에 의한 피부노화와 MMP, TIMP와의 상관관계를 관찰한 연구에 의하면 자외선조사 후 포피와 진피내의 collagenase, gelatinase와 stromelysin의 증가가 있었고 이는 자외선조사 후 피부의 제 I형 콜라겐 분해가 증가됨과 관련한 변화라고 하였다.^{24, 25)} 이 연구에서는 진피층의 세포외 기질은 주로 제 I, III형 콜라겐이며 자외선의 피부노출에 의해 콜라겐이 감소하고 이러한 세포외 기질의 분해가 MMP에 의해 유도된다고 하였다. MMP와 TIMP의 발현은 자외선조사의 양과 비례하며 횡수가 늘어날수록 증가하는 것으로 나타났고 자외선조사 후 16~24시간 내에 최고치가 되었다가 48~72시간에 정상화되는 것으로 나타났다. Gelatinase 중에서는 MMP9의 증가가 현저한 반면 MMP-2의 증가는 약하게 나타났다. 자외선조사는 TIMP의 발현도 유도하는 것으로 나타났고 TIMP-1은 증가되었으나 TIMP-2의 발현은 변화를 보이지 않았다. 피부에서의 MMP와 TIMP 발현의 변화는 자외선조사 후 피부노화 뿐 아니라 피부의 수포성 질환, 상처의 치유, 진피 섬유화 질환, 피부 종양의 침윤시에도 관찰되어 다양한 원인에 의해 MMP와 TIMP가 유도되며 이것이 피부의 생리적, 병리적 상태에 대한 기전에 관여할 것이라 생각할 수 있다.

본 연구에서는 방사선조사에 의한 흰쥐 소장 점막에서의 MMP와 TIMP 발현을 관찰하여 조직면역화학염색법에서 MMP-2가 3일과 5일에, TIMP-2가 5일에 강한 발현을 보이며 ELISA 검사법에서 MMP-2와 TIMP-2 모두 5일에 최고치를 나타냄을 보았다. 이는 소장 점막의 조직병리학적 소견에서 조직 손상이 방사선조사 후 1일에 시작되어 2, 3일에 가장 심하고 재생은 3, 5일에 가장 활발한 결과와 일치되었다. 이상의 결과로써 방사선조사에 의한 소장 점막의 손상과 재생

시에 MMP-2와 TIMP-2가 역할을 함을 알 수 있었으나 정확한 기전을 밝히기 위해서는 다양한 MMP와 TIMP의 종류에 있어 발현의 차이를 알아보고 방사선조사의 양, 조사 기간과 방법에 따른 변화에 대한 추후 연구가 필요하다고 생각된다.

방사선조사 후 조직의 손상과 재생 과정 중에 MMP-2와 TIMP-2가 관여할 것이라는 가정하에 방사선에 의해 조직 손상을 보인 흰쥐의 소장 점막 세포에 면역조직화학염색과 면역블로팅을 시행하고 희생시 채취한 혈액에서 ELISA 검사법을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 조직병리학 소견상 소장 점막의 손상은 점막의 위축과 염증세포의 침윤으로 나타났고 1일부터 +로 관찰되기 시작되어 2일, 3일에 2+, 3+로 가장 심하게 관찰되었다.

둘째, 조직병리학 소견상 기저부 증식과 유사분열 수 증가를 비롯한 재생의 증거는 3일에 +, 2+로 나타나서 5일에 2+, 3+로 가장 활발한 것으로 나타났다.

셋째, 면역조직화학염색법에서 MMP-2는 방사선조사 후 1일에 +로 나타나기 시작하여 3일, 5일에 2+, 3+로 가장 강하게 나타났으며 TIMP-2는 1일에 +로 나타나기 시작하여 5일에 2+, 3+로 가장 강하게 나타났다.

넷째, 면역블로팅 결과 MMP-2와 TIMP-2는 72 kDa과 21 kDa에서 양성 band가 관찰됨으로써 확인되었고 MMP-2는 3일과 5일에 강한 양성을 보이며 TIMP-2는 1, 3, 5, 7일에 같은 정도의 양성반응을 보였다.

다섯째, 혈액에서의 MMP-2와 TIMP-2의 ELISA 검사법에서는 대조군과 방사선조사군 사이의 MMP-2와 TIMP-2 측정치가 Mann-Whitney test로 검증하였을 때 서로 유의한 차이가 있었으며 방사선조사군에서 증가하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 7, 14일의 MMP-2와 TIMP-2의 측정치도 Kruskal-Wallis test로 검증하여 각각 통계적으로 유의한 차이가 있었으며 5일에 가장 높은 수치를 보였다.

결론으로 방사선조사 후 조직병리학적 손상의 척도인 염증 반응과 재생의 척도인 유사분열 수의 변화가 면역조직화학염색, 면역블로팅, ELISA검사에 의한 MMP-2, TIMP-2의 증가와 일치하는 것으로 나타나 이들이 방사선조사 후 손상과 재생 기전에 중요한 역할을 하고 있음을 보여 주었다.

참 고 문 헌

1. Park KR, Rhee CS, Kim SS, Lee YH, Ryu SH, Suh PG. The influence of 5-fluorouracil administration mode on the expression of phospholipase C and Ras oncoprotein associated with regeneration of rat intestinal mucosa following radiation. J Korean Soc Ther Radiol 1994;12(3):271-284

2. Yoo JH, Kim SS, Lee KJ, Rhee CS. The signal transduction mechanisms on the intestinal mucosa of rat following irradiation. *J Korean Soc Ther Radiol* 1997;15(2):79-95
3. Kim SS, Woo YJ, Huh J, et al. Expression of phospholipase C isoenzymes in radiation-induced tissue damage and subsequent regeneration of murine small intestine. *Korean J Pathol* 1998;32:155-161
4. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33(4):781-796
5. Kim SS, Woo YJ, Huh J, Rhee CS, Choi IP. The relationship between radiation-induced apoptosis and the expression of cytokines in the small intestine of the rat. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29(6):921-929
6. Kureshi SA, Hofman FM, Schneider JH, Chin LS, Apuzo MLJ, Hinton DR. Cytokine expression in radiation-induced delayed cerebral injury. *Neurosurg* 1994;35(5):822-830
7. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6:199-213
8. Parson SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinase. *Br J Surg* 1997;84:160-166
9. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993;142(2):359-365
10. Visscher DW, Hoyhtya M, Ottosen SK, Liang C M, Sarkar FH, Crissman JD. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (MMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 1994;59:339-344
11. Hong SI, Park IC, Hong WS, et al. Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in the stroma of gastric cancer. *J Korean Med Sci* 1996;11(8):474-479
12. Kim SS, Woo YJ, Huh J, Yoon H, Park JM, Kim MY. Immunodetections of the metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) in prostatic adenocarcinomas. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29(3):445-453
13. Furukawa A, Tsuji M, Nishitani M, et al. Role of the matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase families in noninvasive and invasive tumors transplanted in mice with severe combined immunodeficiency. *Urology* 1998;51(5):849-853
14. Ko BK, Cho HR, Choi DW, et al. Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase in nodal metastasis of stomach cancer. *J Korean Med Sci* 1998;13:286-290
15. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, et al. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. *Am J Pathol* 1998;153(3):833-844
16. Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 1998;242(1):201-210
17. Witte MB, Thornton FJ, Kiyama T, et al. Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. *Surgery* 1998;124(2):464-470
18. Roeb E, Purucker E, Breuer B, et al. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997;27(3):535-544
19. Theret N, Musso O, L'helgoualc'h A, Campion JP, Clement B. Differential expression and origin of membrane-type 1 and 2 matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in association with MMP2 activation in injured human livers. *Am J Pathol* 1998;153(3):945-954
20. Hirohata S, Kusachi S, Murakami T, et al. Time dependant alterations of serum matrix metalloproteinase-1 and metalloproteinase-1 tissue inhibitor after successful reperfusion of acute myocardial infarction. *Heart* 1998;78(3):278-284
21. Bassiouny HS, Song RH, Hong XF, Singh A, Kocharyan H, Glagov S. Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury. *Circulation* 1998;98(2):157-163
22. Shofuda K, Nagashima Y, Kawahara K, Yasumitsu H, Miki K, Miyazaki K. Elevated expression of membrane-type 1 and 3 matrix metalloproteinases in rat vascular smooth muscle cells activated by arterial injury. *Lab Invest* 1998;78(8):915-923
23. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, et al. Matrix metalloproteinase increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-633
24. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379(25):335-339
25. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang SW, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Eng J Med* 1997;337:1419-1428
26. Ito H, Meistrich ML, Barkley HT, Thomas HD, Milas L. Proliferation of acute and late radiation damage of the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:211-219
27. Wither HR, Elkind MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol* 1970;17:261-267
28. Leshner J, Leshner S. Effects of single-dose partial-body X-irradiation on cell proliferation in the mouse small intestinal epithelium. *Radiat Res* 1974;57:148-157
29. Stricklin GP, Liying L, Jancic V, Wenczak BA, Nanney LB. Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds. *Am J Pathol* 1993;143:1657-1666
30. Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJ, Reynolds JJ, Beertsen W, Everts V. Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix Biol* 1998;17(1):35-46
31. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998;29(5):1020-1030
32. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tis-

- sue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-122
33. Tryggvason KH, Yhty M, Pyke C. Type IV collagenase in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-218
34. Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 1997;182(3):347-355
35. Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, Fujii A, Nakajima M. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br J Cancer* 1998;77(4):650-655
36. Alexander JP, Samples JR, Acott TS. Growth factor and cytokine modulation of trabecular meshwork matrix metalloproteinase and TIMP expression. *Current Eye Res* 1998;17(3):276-285

Abstract

**Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and
Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in
Radiation Exposed Small Intestinal Mucosa of the Rat**

Hyon Joo Kwag, M.D.^{*}, Kyoung Ja Lee, M.D.[†], and Chung Sik Rhee, M.D.[‡]

^{*}Department of Diagnostic Radiology, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University,

[†]Department of Radiation Oncology, [‡]Department of Diagnostic Radiology,
Medical College, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose: The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes whose main function is the degradation of the extracellular matrix. Several studies have revealed that MMPs and TIMPs are related to the wound healing process and in photoaging caused by ultraviolet irradiation. However, the expressions of MMP and TIMP after irradiation have not, to the best of our knowledge, been studied. This study investigates the expressions of MMP-2 and TIMP-2 in rat intestinal mucosa following irradiation.

Material and Methods: The entire abdomen of Sprague-Dawley rats was irradiated using a single dose method. The rats were sacrificed on day 1, 2, 3, 5, 7 and 14 following irradiation. Histopathological observations were made using hematoxylin & eosin staining. The expressions of MMP-2 and TIMP-2 were examined using immunohistochemistry, immunoblotting and ELISA.

Results: Radiation induced damage, associated with atrophic villi, and infiltration of inflammatory cells was observed from the first postirradiation day, and severe tissue damage was observed on the second and the third postirradiation days. An increase in mitosis and the number of regenerating crypts, as evidence of regeneration, were most noticeable on the fifth postirradiation day. From the immunohistochemistry, the MMP-2 expression was observed from the first postirradiation day, but was most conspicuous on the third and the fifth postirradiation days. The TIMP-2 expression was most conspicuous on the fifth postirradiation day. From the immunoblotting, the MMP-2 expression was strongly positive on the third postirradiation day, and that of TIMP-2 showed a strong positive response on the fifth postirradiation day. In ELISA tests, the expressions of MMP-2 and TIMP-2 were increased in the postirradiation groups compared to those of the normal controls, and showed a maximum increase on the fifth postirradiation day. These results were statistically significant.

Conclusion: The expressions of MMP-2 and TIMP-2 were increased in the intestinal mucosa of the rats following irradiation, and these results correlated with the histopathological findings, such as tissue damage and regeneration. Therefore, this study suggests that MMP-2 and TIMP-2 play roles in the mechanisms of radiation-induced damage and regeneration of intestinal mucosa of rats.

Key Words: Matrix metalloproteinase, Tissue inhibitor of metalloproteinase, Radiation, Rat small intestine