

방사선조사된 폐에서 Melatonin에 의한 TGF-β1 발현의 변화

가톨릭대학교 의과대학 방사선종양학교실

장 성 순 최 일 봉

목적: 강력한 항산화 효과를 지닌 melatonin을 전처치하였을 때 방사선유도성 섬유증 과정에서 중요한 사이토카인인 TGF-β1의 변화된 발현양상을 마우스 폐에서 연구하였다.

대상 및 방법: C57BL/6 마우스를 실험군에 따라 세 군(대조군, 방사선조사 단독군, melatonin 전처치군(방사선조사 1시간 전에 300 mg/kg 복강주사))으로 분류하고 양측 흉곽에 12 Gy의 선량을 단일조사하였다. 방사선조사 후 2주와 4주의 폐조직에서 TGF-β1 mRNA 발현수준을 측정하기 위해 semiquantitative RT-PCR를 시행하였고, TGF-β1 protein 발현의 수준과 위치를 보기 위해 면역조직화학염색을 시행하였다.

결과: 2주 후에 측정된 mRNA 발현은 방사선조사 단독군과 melatonin 전처치군에서 각각 대조군의 1.92배와 1.80배 증가된 수준을 보였고(p=0.064), 4주 후에는 각각 2.38배와 1.94배 수준의 증가된 발현을 보였다(p=0.004). TGF-β1 protein의 발현은 조직병리학적으로 방사선손상 영역에서 주로 관찰되었는데 폐포 대식세포와 폐포벽의 상피세포들이 주요 근원이었다. 발현수준은 2주와 4주 후에 각각 15.8% vs 16.9% (p=0.565), 그리고 36.1% vs 25.7% (p=0.009)이었다.

결론: Melatonin 전처치로 방사선조사에 의한 TGF-β1 mRNA와 protein의 발현이 4주 후에 유의하게 감소됨을 관찰하였다. 따라서 방사선으로 인한 폐손상 시에 항섬유증 약물로의 사용가능성을 확인하였다.

핵심용어: Melatonin, TGF-β1, 방사선, 섬유증

서 론

세포의 유리기 반응과정을 통한 산화성 스트레스가 간, 폐, 동맥, 그리고 신경계 등의 여러 조직과 기관들에서 섬유증으로 인한 질환들의 원인이라는 여러 보고들이 있다. 즉, 방사선을 포함한 여러 원인물질들에 의해 생성된 활성 산소물질들이 대식세포 등을 자극하여 NF-κB나 AP-1같은 전사인자들의 활성화로 여러 성장인자와 사이토카인들이 발현되고 이 물질들이 조직 특이적인 세포외기질생성세포들을 활성화시켜 세포외기질 단백질들이 침착됨으로써 섬유증식 과정이 발생한다고 설명하고 있다.¹⁾

최근 방사선에 의한 폐 손상의 기전도 시기적으로 명확히 구분되는 잠복기와 폐렴기를 거쳐 만기 섬유증으로 이어지는 전통적인 개념이 아닌, 일차적으로 손상을 받은 대식세포나 제2형 폐포세포에서 성장인자와 사이토카인들의

즉각적인 방출이 일어나고 이 물질들이 표적세포인 섬유아세포에 작용하여 신호전달경로를 통해 세포외기질 단백질을 생성하는 사이토카인의 연속적인 다단계반응 모델로 설명하고 있다.^{2,3)} 또한, 여러 연구들에서 transforming growth factor β1 (TGF-β1)이 이러한 여러 성장인자와 사이토카인들의 연속적인 상호반응을 통한 섬유증식 과정에 기본이 되는 중요한 사이토카인으로 보고된다.⁴⁾

방사선치료 시에 정상 폐조직에는 조사선량을 줄이면서 상대적으로 종양부위에 고선량을 주기 위한 새로운 치료 기법으로 예방적립프절조사의 생략, 삼차원입체조형치료, 그리고 강도변조방사선치료 등이 시행되고 있으나, 방사선 섬유증에 직접적으로 효과가 있는 생물학적 약물은 보고되지 않았으며 단지 일부 임상연구들에서 방사선치료 전에 정맥 내로 주사된 Amifostine이 Grade 2, 3의 방사선 폐렴 빈도를 줄이는 효과가 있음이 발표되었고, 그 외의 다른 약물들로 captopril, pentoxifylline, SOD (superoxide dismutase) 등이 일부 동물실험을 통해 항섬유증의 효과가 있다고 보고되었으나 실제 임상적 효과는 입증되지 않았다.⁵⁾

Melatonin은 뇌의 송과체(pineal gland)에서 만들어지는 신

이 논문은 2005년 7월 26일 접수하여 2005년 8월 16일 채택되었음.
책임저자: 장성순, 가톨릭대학교 대전성모병원 방사선종양학과
Tel: 042)220-9630, Fax: 042)221-9038
E-mail: ssjang@ catholic.ac.kr

경호르몬으로 강력한 유리기 청소기능과 여러 항산화효소들을 활성화시키는 능력이 있다고 보고되어⁶⁾ 방사선조사로 인한 정상 폐의 산화성 스트레스를 감소시켜 사이토카인 유전자들의 발현을 차단함으로써 섬유증식 과정을 막을 수 있을 것으로 기대되나, 방사선으로 인한 폐 손상의 보호효과에 대해선 아직 연구된 바 없다. 따라서 본 연구는 방사선으로 유도된 마우스 폐의 섬유증식 과정에서 melatonin 전처치로 인한 방사선조사 단독군에 상대적 TGF- β 1 발현양상의 변화를 측정하여 항섬유증 약물로의 사용가능성을 알아보고자 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

섬유증을 잘 일으키는 마우스 종으로 알려진 암컷 C57 BL/6 마우스를 대한바이오링크(주)에서 구입하여 사용하였는데 나이는 8주령이었고 무게는 약 20 g이었다. 실험군에 따라 정상대조군, 방사선조사 단독군, 그리고 melatonin 전처치 후 방사선조사군으로 분류하고 폐 적출 시기별로 실험군에 따라 각각 7마리의 마우스를 배정하였다.

2. 방사선조사 및 Melatonin 투여

마우스를 150 mg/kg의 ketamine (케타라[®], 50 mg/ml, 유한양행)을 복강주사하여 마취시킨 후 1 cm 두께의 아크릴 판 위의 아크릴상자에 고정하고 6 MV 선형가속기(Siemens, PA, USA)를 사용하여 3 Gy/min의 선량률로 양측 흉곽에 12 Gy를 SSD 100 cm으로 후면에서 단일선량으로 조사하였다. Melatonin (Sigma, MO, USA)은 70% DMSO를 용매로 사용하여 40 mg/ml로 완전히 용해시킨 후 방사선조사 1시간 전에 300 mg/kg의 용량으로 복강주사하여 전처치하였다.

3. 조직 적출

방사선조사 후 각각 2주와 4주에 마우스를 개흉한 뒤 양측 폐를 적출하였는데 적출 즉시 우엽들은 Total RNA 추출을 위해 1.2 ml의 RNazol-B (Tel-Test, TX, USA)용액에 담근 후 2 ml tissue grinder (Wheaton Science Products, NJ, USA) 내에서 잘 갈아 균질화한 후 1.5 ml tube에 담아 -70°C에 보관하였고, 좌엽들은 면역조직화학염색을 위해 적출 즉시 10% neutral buffered formalin에 담가 4°C에서 고정 후 다음 날 파라핀블록을 제작하였다.

4. RNA 추출 및 RT-PCR

RNazol-B 용액을 이용하여 제조사가 권하는 방법에 따라 Total RNA를 추출하였다. 즉, -70°C에 보관하였던 RNazol-B 용액 내의 조직 균질체를 4°C에서 녹인 후 chloroform을 첨가하고 원심분리하여 상부의 aqueous phase를 분리하고 따로 tube에 담아 isopropanol을 첨가해 RNA를 침전시킨 후 75% ethanol로 세척하고 얻어진 RNA pellet을 간단히 건조시켜 DEPC-dH₂O에 녹였다. 얻어진 Total RNA는 분광비색계(Spectrophotometer)로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정해 농도와 순도를 계산하여 정량하였다.

이후 TGF- β 1 mRNA 발현수준은 AccuPower[®] RT/PCR Premix (0.2 ml tube, 50 μ l reaction, Bioneer, Daejeon, Korea)와 Thermal cycler (GeneAmp 9600, Perkin-Elmer, MA, USA)를 사용하여 semiquantitative RT-PCR로 측정하였다. 각 Pre-mix tube에 Total RNA sample 1 μ g과 upstream, downstream primer를 각각 40 pmole씩 넣고 DEPC-dH₂O를 첨가하여 50 μ l로 맞추었다. 42°C, 60분의 조건에서 역전사반응을 실시하여 TGF- β 1 cDNA를 합성하였고 PCR 조건은 94°C, 30초 → 55°C, 30초 → 72°C, 30초의 순서로 실시하였는데 정상대조군과 방사선조사군 sample의 증폭주기들에 따른 band density의 차이를 실험하여 최대의 차이를 보이는 26 cycle을 선택하였으며, RNA loading 양을 보정하기 위해 사용된 β -actin에 대해선 같은 조건 하에서 18 cycle을 선택하였다. PCR products 10 μ l를 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 증폭된 DNA band를 자외선 투시로 확인한 후 촬영하여 각각의 band density를 Gel analysis software (SigmaGel, Jandel Scientific, CA, USA)로 측정하였다. RT-PCR 과정에서 사용한 specific primer의 염기서열은 TGF- β 1은 upstream primer 5'-TTGACGTCCTGGAGTTGTA-3'와 downstream primer 5'-CCACGTGGAGTTTGTATCT-3'를 사용하였고, β -actin은 5'-GGACCTGACAGACTACCTCA-3'와 5'-AATGTAGTTTCATGGATGCC-3'를 각각 upstream과 downstream primer로 사용하였다.

5. 면역조직화학염색

파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 붙인 후 xylene에 탈파라핀화한 후 알코올로 함수과정을 거치고 내인성 과산화효소 활성을 제거하기 위해 3% 과산화수소로 15분간 처리한 후 PBS로 세척하였다. 이후의 과정은 HistoMouse-SP kit (Zymed Laboratories, CA, USA)를 사용하였는데, 비특이적인 배경염색을 막기 위해 kit 내의 blocking solution을 30분간 처리하고 1 : 50으로 희석한 TGF- β 1 primary antibody (rabbit polyclonal IgG to carboxy terminus of human TGF- β 1, Santa Cruz Biotechnology, CA,

USA)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated secondary antibody로 20분간 반응시켜 이차항체를 부착한 후 PBS로 세척하고 streptavidine-peroxidase conjugate와 20분간 반응시켰다. 이후 substrate-chromogen (DAB) mixture를 첨가하여 발색시킨 후 세척 후에 hematoxylin으로 대조염색하고 세척 및 탈수과정을 거친 후 봉입하였다. 음성대조 염색은 TGF-β1 primary antibody대신에 normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 처리하여 실시하였다.

6. 결과판정 및 통계분석

방사선조사 단독군과 melatonin 전처치군에서 각각 2주와 4주 후의 TGF-β1 mRNA 발현수준은 각 sample들의 band density를 측정하여 정상대조군에 대한 배수증가(fold increase)로 판정하였는데 같은 sample에서의 β-actin mRNA 발현수준을 측정해 RNA loading 양의 차이를 보정하였다. TGF-β1 protein의 발현은 200배율의 광학현미경상에서 sample당 서로 겹치지 않는 5개의 영역에서 TGF-β1 양성 세포들의 평균 백분율로 정량화하였다.

이렇게 측정된 판정 시기와 실험군에 따른 TGF-β1 mRNA와 protein 발현의 차이는 Mann-Whitney U-test로 SPSS program을 사용하여 통계분석을 실시하였는데 p값이 0.05 이하인 경우를 유의하게 판정하였다.

방사선조사 2주 후의 우측 폐에서 TGF-β1 mRNA 발현은 방사선조사 단독군과 melatonin 전처치군에서 각각 정상대조군에 비해 1.92배, 그리고 1.8배 증가된 발현정도를 보였으나 두 군 간에 유의한 차이는 없었고(p=0.064), 4주 후에는 방사선조사 단독군에서 2주 때보다 발현의 증가폭이 좀 더 커서 정상대조군의 2.38배 증가된 발현을 보였으며 melatonin 전처치군에선 2주 때보다는 증가하였으나 1.94배 증가된 발현을 보여 두 군 간에 유의한 차이를 나타냈다(p=0.004)(Fig. 1, Table 1).

면역조직화학염색을 통해 측정된 TGF-β1 protein의 발현은 여러 염증세포들이 침윤하여 폐포벽이 비후되고 폐포강이 폐색을 나타내는 조직병리학적으로 방사선 손상을 받은 영역에서 주로 관찰되었으며 폐포벽의 상피세포와 폐포 대식세포들에서 주로 발현되었다. 방사선조사 후 시간경과에 따라 2주 때에는 조사단독군과 melatonin 전처치군에서 약 15% 정도로 비슷한 수준의 발현을 보였고(p=0.565), 4주 때에는 손상과 발현의 정도가 점차 증가하여 조사 단독군에서는 2주 때보다 2배 이상의 세포들에서 발현되어 36.1% 수준의 발현을 보였으나 melatonin 전처치군에서는 25.7%의 발현에 그쳐 두 군 간에 유의한 차이를 나타냈다(p=0.009)(Fig. 2, Table 1).



Fig. 1. TGF-β1 mRNA expression in right lung 2 and 4 weeks after 12 Gy irradiation. The expression of TGF-β1 was almost the same in the irradiation-only and the melatonin pretreatment group at 2 weeks, but decreased more in the melatonin pretreatment group at 4 weeks. M: molecular weight marker, A: control group, B: irradiation-only group, C: melatonin pretreatment group.

Table 1. Measurement of Transforming Growth Factor β1 Expression in Lung 2 and 4 Weeks after 12 Gy Whole Lung Irradiation

	mRNA (fold increase, mean±SD)		Protein (% , mean±SD)		
	R*	M and R [†]	C [‡]	R	M and R
2 weeks	1.92±0.12	1.80±0.15	5.46±2.27	15.80±2.48	16.86±4.71
4 weeks	2.38±0.17	1.94±0.18	5.56±1.61	36.14±3.95	25.69±6.17

*irradiation-only group, [†]melatonin pretreatment group, [‡]control group

결 과

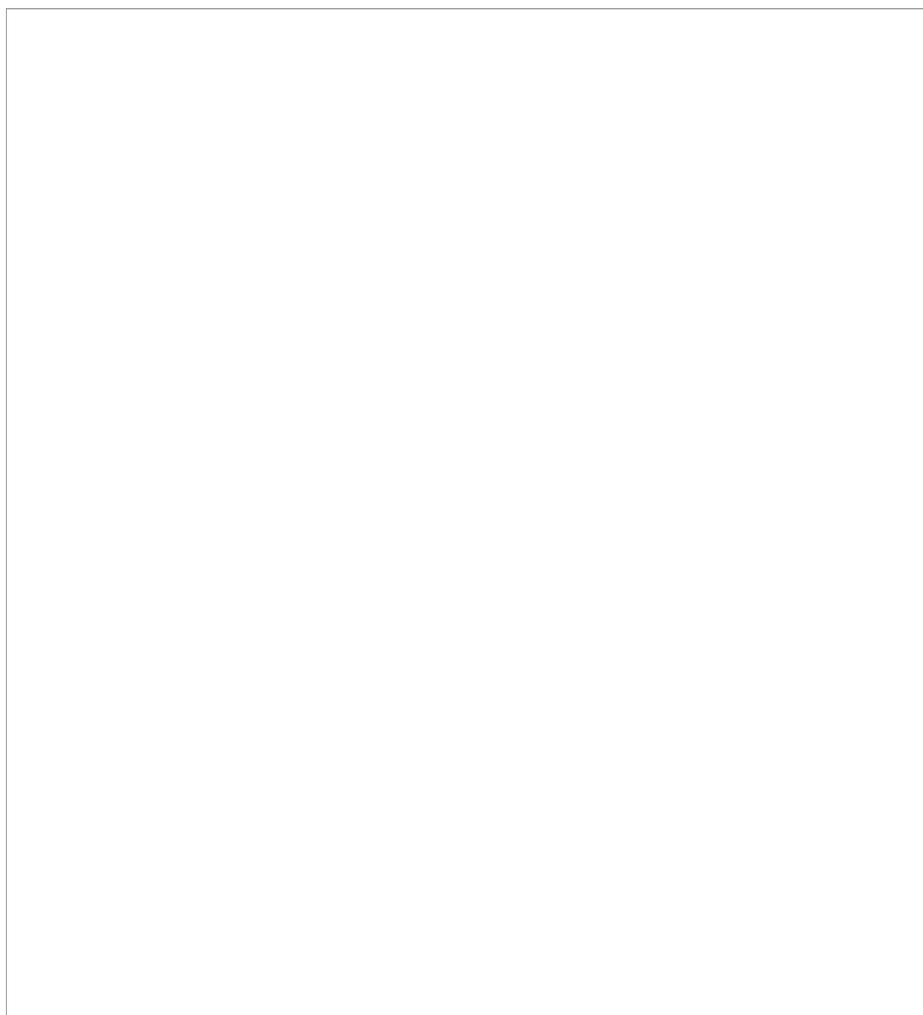


Fig. 2. Immunohistochemical staining of TGF- β 1 in left lung 2 and 4 weeks after 12 Gy irradiation. The expression of TGF- β 1 protein was detected prominently in regions of histopathologic radiation injury, and alveolar macrophages and septal epithelial cells served as important sources of TGF- β 1 expression. At 4 weeks, the TGF- β 1 immunoreactivity was stronger and wider in the irradiation-only group than in the melatonin pretreatment group. (A) Control group, (B) Irradiation-only group, (C) Melatonin pretreatment group. (A to C, $\times 200$).

고안 및 결론

방사선과 관련하여 섬유증은 방사선치료나 사고로 인한 과피폭 시에 생길 수 있는 합병증의 일종으로 조직학적으로 과도한 세포외기질의 침착과 섬유아세포의 증식을 특징으로 한다. 이런 방사선으로 인한 섬유증 현상은 오래전에 조직병리학적 연구를 통해 피부, 폐, 심장, 간 조직 등에서 밝혀졌으나, 섬유증이 유발되고 지속되는 기전에 대해선 아직 정확히 보고되지 않았다. 그러나 최근 분자생물학적 기법 등의 발달로 섬유증을 오랜기간 지속적인 섬유아세포의 활성화로 특징되는 역동적인 과정으로 이해하게 되었고, 이런 만기 섬유증 과정에서 지속적인 섬유아세포 활성화의 원인이 주된 관심사가 되었다. 정상적인 상처치유 과정에서는 섬유아세포들이 일시적으로 활성화되고 증식하여 콜라겐 기질들이 침착되며 이후 피드백 기전에 의해 활성이 떨어지나, 반면에 섬유증에서는 이런 피드백 조절기전 없이 활성화가 지속되는데 이런 지속적인 섬유아세포 활성화의 원인이 사이토카인이나 성장인자 같은 자극인자들의 비정상적인 생성 때문이라고 설명되고 있다.^{4,7)} 방사선에 의한 폐섬유증 과정도 특이적인 사이토카인들로 TNF- α , IL-1, TGF- β , PDGF, bFGF, IGF 등의 생성과 상호작용을 통해 대식세포나 제2형 폐포세포, 혈관내피세포, 그리고 섬유아세포 등의 여러 세포들이 관련된 복잡한 과정이며 방사선조사 후 수일에서 수주의 초기에 발현되는 사이토카인 유전자들이 5~6 개월 후에 있을 만기 섬유증의 발달에 중요한 역할을 할 것으로 보고되며,³⁾ 이런 여러 성장인자 및 사이토카인들 중에서 TGF- β 가 섬유증식 과정에 기본이 되는 가장 중요한 사이토카인으로 보고되었다.^{4,8)} 또한 실제 임상적으로도 Anscher 등⁹⁾은 폐암으로 방사선치료를 받는 환자들에서 혈장 TGF- β 1 수치가 방사선 폐렴의 위험도를 지닌 환자를 예측하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있음을 보고하였다. TGF- β 는 일반적으로 세포성장을 억제하고 면역억제 및 항염증 효과를 나타내며 또한 기질단백질들의 생성을 증가시키고 기질분해효소들의 생산을 감소시킴으로써 세포외기질의 항상성 조절에 중요한 역할을 하는 다양한 기능을 갖는 사이토카인으로 최근에는 세포에서 TGF- β 에 의한 신호전달경로로 세포 표면의 serine/threonine kinases 수용체를 통한 여러 종류의 Smad 단백질들이 발견되어 이 단백질들이 섬유증식 과정과 관련된 여러 단백질들의 전사인자들로 작용할 것으로 판단하고 활발히 연구되고 있다.^{4,10)}

여러 동물실험들에서 폐에 방사선조사로 인한 TGF- β 1

의 발현양상은 측정의 시기, 그리고 선량에 따라 차이를 보이고, 또한 같은 동물에서도 종(strain)에 따라 섬유증 유도의 유전적 감수성이 다르다고 보고되는데^{2,11~13)} 본 실험에 사용된 C57BL/6 마우스는 방사선에 의해 심각한 폐섬유증을 일으키는 방사선감수성을 지닌 마우스종으로 알려지면서 방사선유도성 폐섬유증에 대한 연구에 널리 이용되는 모델이다. TGF- β 1 측정시기 및 선량과 관련하여 C57BL/6 마우스를 사용했던 연구들을 보면 Rubin 등²⁾은 단일선량으로 5 Gy의 준치사선량과 12.5 Gy의 치사선량을 주었을 때 12.5 Gy 후 1주째까지는 대조군에 비해 감소된 TGF- β 1 mRNA 발현을 보이다가 점차 증가하여 2주 후에는 대조군의 수치를 1.5배 초과하며 계속 증가해 8주 때에는 약 2배 이상의 발현을 보이며 최고치로 발현되고 이후 16주까지 대조군 수준으로 점차 감소되다가 26주 때에는 약간 증가되는 양상을 관찰하였고 5 Gy에서도 발현의 양상이나 정도가 비슷하여 선량반응관계가 없었는데 이는 선택한 측정 시기 때문일 것이라고 설명하였다. 한편 Rube 등¹³⁾은 12 Gy 후 TGF- β 1 mRNA가 이미 1시간에서 12시간 사이에 대조군을 초과해 발현되어 2주와 4주 사이에 최대의 발현치를 보이고 이후 8주에서 24주까지는 점차 대조군 수준으로 감소되어 가는 발현양상을 보였으나 6 Gy에서는 지속적으로 거의 대조군과 비슷한 발현 수준을 보여 뚜렷한 선량반응관계를 보고하였는데, Rubin 등의 결과와 비교했을 때 이러한 차이를 보인 것을 mRNA 수치를 측정하기 위한 실험기법상의 차이 때문이라고 해석하였다. 이 두 연구들에서 공통적으로 최대의 발현을 보이는 시기는 대략 임상적으로 폐렴기가 시작되기 전인 2주에서 8주 사이에 있음을 확인하였다. 본 연구에서도 방사선조사군에서 최대의 발현을 보일 것으로 예측되며 임상적으로 잠복기에 속할 2주와 4주를 melatonin 전처치군과의 발현을 비교하기 위한 시기로 선택하여 측정하였는데, 12 Gy의 치사선량에서 대조군에 상대적인 mRNA 발현수준이 위의 두 연구들과 비슷한 결과를 나타내며 2주에서 4주로 경과함에 따라 mRNA 발현도 좀 더 증가하는 경향을 보였다. TGF- β 1 protein 발현과 관련하여서도 Rube 등¹³⁾은 면역조직화학염색을 통해 12 Gy 후 2주와 4주에 가장 뚜렷한 증가를 보이는 TGF- β 1 양성세포들을 확인하였고 발현의 근원이 되는 세포들의 종류가 초기 4주까지는 폐포 대식세포와 제 2형 폐포세포들이나 8주 후부터 24주까지는 제2형 폐포세포와 섬유아세포들에서 주로 발현됨을 보고하였다. 본 실험에서도 주로 조직병리학적으로 방사선손상이 뚜렷한 영역의 폐포 대식세포 및 폐포벽의 상피세포들에서 발현됨을 관찰하여 방사선손상이 진행되는 영역에 TGF- β 1이 관련되

어 있음을 확인하였고, 2주에서 4주로 진행됨에 따라 mRNA 발현의 변화와 같이 protein 발현도 점차 증가하며 조직병리학적 손상도 심해지고 있음을 관찰하였다.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 여러 다양한 작용을 갖는 신경호르몬으로 주로 지용성이고 약간의 수용성도 지녀서 모든 조직과 세포의 각 구성요소들에 광범위하게 분포될 수 있어 세포의 각 영역들에서의 손상에 대응할 수 있으며, 특히 방사선에 민감한 표적인 DNA를 포함하는 핵 내에 고농도로 분포한다고 알려져 있다. 여러 연구들에서 밝혀진 melatonin의 주된 기능들로는 24시간 주기리듬의 조절, 면역기능의 강화, 종양성장의 억제, 그리고 vitamin E, ascorbic acid, GSH (glutathione) 등을 증가하는 강력한 항산화작용 등이 있다. 본 연구에서 기대한 항산화작용과 관련하여 그 기전은 강력한 반응성을 지닌 수산화유리기(OH)에 전자공여체로 작용해 melatonin의 안정화된 대사물인 3-hydroxymelatonin을 형성함으로써 반응성을 제거하고 그 밖의 여러 활성산소물질들에도 직접적으로 작용해 제거하며, 또한 간접적으로는 melatonin의 특이수용체에 작용하여 SOD, GSH, CAT (catalase), G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 등의 항산화효소들을 활성화시켜 활성산소물질들을 제거한다.^{6,14)} 안전성에 대해서는 여러 종류의 동물들에서 800 mg/kg까지의 용량에서도 급성 및 만성 독성은 보고되지 않았으며 사람에서도 매일 1g의 용량으로 30일간 복용했을 때도 부작용은 보고되지 않아 상당히 안전한 약물로 알려져 있다.^{6,15)} 이러한 정상조직 및 세포에 대한 항산화작용과 더불어 암 치료과정 중에 주 관심사인 종양에 대한 melatonin이 갖는 효과는 여러 다양한 종양을 대상으로 한 시험관 내 그리고 동물실험을 통해 입증된 종양정지(oncostatic), 또는 종양세포 독성에 의한 퇴행(regression)효과를 바탕으로 하여 실제 여러 임상연구들을 통해 보고되었다. 연구들은 폐암을 포함한 여러 부위의 주로 진행성, 또는 전이성 암환자들에서 melatonin을 단일약물로 복용하거나 방사선치료나 항암화학요법과 더불어 동시에 복용하였는데, 주로 종양정지의 효과를 보고하였으며 일부 연구들은 종양 자체의 퇴행효과를 보고하고 있다. 그리고 여러 항암화학 약물들과 같이 복용하였을 때 상승적으로 작용하고 골수세포 보호 및 면역강화 효과로 치료에 따른 골수억제를 감소시켰으며, 방사선치료와 관련하여서는 뇌의 다형성교아종 환자들에서 같이 복용하였을 때 방사선치료 단독군에 비해 1년 생존율에서의 유의한 증가와 치료로 인한 부작용의 감소가 보고되었다.^{15~17)} 그러나 실제 임상적으로 방사선치료와 동시에 사용하기 위해서는 melatonin의 정상세포에 대한 보호효과 및 종양

에 대한 정지, 또는 퇴행효과와 더불어 종양세포 내에서 항산화작용을 통한 방사선치료의 효과를 감소시키지는 않는지에 대한 기초 및 임상연구들이 필요할 것이다.

실제 본 연구에서 의도된 항섬유증의 효과에 대한 연구들은 DMN (dimethylnitrosamine)으로 유도된 간섬유증과 bleomycin으로 유도된 폐섬유증에 관한 동물실험에서 찾아볼 수 있는데, Tahan 등¹⁸⁾은 DMN을 단일주사 후 14일 동안 melatonin을 100 mg/kg/day으로 복강주사한 쥐에서 간조직 내에서 콜라겐 대사산물인 hydroxyproline 수치와 혈액과 간조직에서 지질 과산화작용의 한 산물인 MDA (malondialdehyde) 수치가 DMN만 주사한 쥐에 비해 감소되었고, 또한 혈액과 간조직 내의 GSH와 SOD 수치는 증가하였음을 보고하였다. Arslan 등¹⁹⁾은 3주 동안 주 2회씩 10 mg/kg의 bleomycin을 복강주사 하였을 때 각 bleomycin 주사 30분 전에 10 mg/kg의 melatonin을 주사한 쥐에서 폐조직 내 hydroxyproline 수치와 기관지폐포세척액 내 지질과산화물인 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 수치가 bleomycin만 주사한 쥐보다 감소하였고 기관지폐포세척액 내 GSH 수치는 증가하였음을 관찰하여 산화성 손상과 관련된 간과 폐의 섬유증에 대하여 강력한 항산화작용을 지닌 melatonin의 보호효과를 보고하였다. Drobnik 등^{20,21)}은 또한 송과체적출술이 시행된 쥐의 정상 피부와 상처조직에서 hydroxyproline 수치가 증가됨을 관찰하였고, melatonin 주사에 의해 수치가 다시 감소됨을 확인하여 melatonin이 조직 내 콜라겐 양의 억제적 조절과 관련되어 있을 것이라고 보고하였다. 본 연구는 폐조직에서 섬유증의 최종 산물이라고 할 수 있는 hydroxyproline 수치를 직접 측정하여 방사선으로 유도된 폐섬유증에 대한 보호효과를 비교하지는 않았으나 폐섬유증의 기전으로 제시되는 사이토카인의 연속적인 다단계반응 과정의 초기단계에서 가장 중요시 되는 사이토카인으로 알려진 TGF-β1 유전자 발현의 차이를 상대적으로 비교분석하였다. Anscher 등⁹⁾의 혈장 TGF-β1 수치를 측정하여 방사선 폐렴의 위험도와와의 관련성을 입증한 연구에서처럼 본 연구에서 잠복기에 해당할 2주와 4주에 측정한 melatonin에 의한 TGF-β1 발현양의 변화는 후에 있을 방사선 폐렴, 또는 섬유증에 대한 보호효과를 가늠할 수 있는 중요한 의미를 지닐 것이다. 결과에서 방사선조사 후 2주에서 4주로 경과함에 따라 TGF-β1 mRNA와 protein의 증가폭은 melatonin 전처치군에서 감소됨을 확인하였고, 방사선조사 단독군에 비해 2주 후에는 차이를 보이지 않았으나 4주 때에는 유의한 차이를 보이며 감소되어 곧 있을 것으로 생각되는 임상적 폐렴기로의 진행에 대한 melatonin의 보호효과를 기대해 볼 수 있었다.

또한 방사선조사 단독군에 상대적인 melatonin 전처치군에서의 mRNA와 protein 발현 모두가 시기에 따라 유의성의 일치를 보이며 비슷한 변화경향을 보여 melatonin이 TGF-β1 발현의 어떤 전사단계에 작용하고 있음을 예측할 수 있었는데, 즉 방사선에 의해 생긴 활성산소물질들을 직접적으로 제거하거나, 또는 여러 항산화효소들을 활성화시켜 간접적으로 제거함으로써 TGF-β1 발현의 근원이 되었던 폐포 대식세포나 폐포벽의 상피세포들을 산화성 스트레스로부터 보호하여 TGF-β1의 전사인자로 알려진 AP-1 활성화를 막았다고 생각할 수 있을 것이다. 그리고 두 군 간에 발현차이의 유의성이 시기에 따라 2주와 4주에 달랐는데, 이는 TGF-β1 발현의 근원이 되는 주된 세포들의 종류가 방사선조사 후 시기의 경과에 따라 폐포 대식세포에서 제2형 폐포세포로, 그리고 섬유아세포로 점차 이동함을 보인 Rube 등¹³⁾의 연구에서처럼 본 연구에서도 TGF-β1 양성세포들 중 폐포벽의 상피세포보다 증가된 방사선감수성을 보일 것으로 판단되는 폐포 대식세포가 차지하는 비율이 4주에 비해 2주 때에 더 높은 경향을 관찰하여 이 시기에 melatonin의 보호효과가 더 미약했던 결과라고 생각한다.

결론적으로 melatonin 전처치로 방사선조사에 의한 TGF-β1 mRNA와 protein 발현이 4주 후에 유의하게 감소됨을 관찰하여 방사선으로 인한 폐손상 시에 항섬유증 약물로의 사용가능성을 확인하였다. 향후 melatonin이 좀 더 오랜 기간 동안 TGF-β1 및 다른 사이토카인들의 발현에 미치는 영향과 임상적으로 종양억제와 생존율에 대한 영향을 포함한 항섬유증 약물로서의 유용성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:287-305
2. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99-109
3. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995;35:83-90
4. Martin M, Lefaix JL, Delanian S. TGF-β1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277-290
5. Mehta V. Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;article in press
6. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;225:9-22

7. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-1292
8. Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:353-365
9. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, et al. Plasma transforming growth factor β1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:1029-1035
10. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF-β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002;82:85-91
11. Yi ES, Bedoya A, Lee H, et al. Radiation-induced lung

- injury in vivo: expression of transforming growth factor- β precedes fibrosis. *Inflammation* 1996;20:339-352
12. Johnston CJ, Piedboeuf B, Baggs R, Rubin P, Finkestein JN. Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat Res* 1995;142:197-203
 13. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor β (TGF- β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1033-1042
 14. Brzezinski A. Mechanisms of disease: melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336:186-195
 15. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX, Herman TS, Thomas CR. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:639-653
 16. Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002;20:2575-2601
 17. Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, et al. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology* 1996;53:43-46
 18. Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2004;37:78-84
 19. Arslan SO, Zerin M, Vural H, Coskun A. The effect of melatonin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2002;32:21-25
 20. Drobniak J, Dabrowski R. Pinealectomy-induced elevation of collagen content in the intact skin is suppressed by melatonin application. *Cytobios* 1999;100:49-55
 21. Drobniak J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios* 1996;85:51-58

Abstract

The Change of Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1) Expression by Melatonin in Irradiated Lung

Seong Soon Jang, M.D. and Ihl Bohng Choi, M.D.

Department of Radiation Oncology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: The changed expressions of TGF-β1, as a key cytokine in the fibrotic process, due to melatonin with potent antioxidative effects, were investigated in the irradiated lung using fibrosis-sensitive C57BL/6 mice.

Materials and Methods: Female C57BL/6 mice were divided into control irradiation-only, and melatonin (300 mg/kg i.p. 1 hr before irradiation) pretreatment groups. The thoraces of the mice were irradiated with a single dose of 12 Gy. The mRNA expressions of TGF-β1 in the lung tissue 2 and 4 weeks after irradiation were quantified using semiquantitative RT-PCR, and the cellular origin and expression levels of TGF-β1 protein were identified using immunohistochemical staining.

Results: The relative mRNA expression levels in the irradiation-only and melatonin pretreatment groups 2 and 4 weeks after irradiation were 1.92- and 1.80-fold ($p=0.064$) and 2.38- and 1.94-fold ($p=0.004$) increased, respectively compared to those in the control group. Increased expressions of TGF-β1 protein were prominently detected in regions of histopathological radiation injury, with alveolar macrophages and septal epithelial cells serving as important sources of TGF-β1 expression. At 2 and 4 weeks after irradiation, the expression levels of protein were 15.8% vs. 16.9% ($p=0.565$) and 36.1% vs. 25.7% ($p=0.009$), respectively.

Conclusion: The mRNA and protein expressions of TGF-β1 in the lung tissue following thoracic irradiation with 12 Gy were significantly decreased by melatonin pretreatment at 4 weeks. These results indicate that melatonin may have a possible application as an antifibrotic agent in radiation-induced lung injury.

Key Words: Melatonin, TGF-β1, Radiation, Fibrosis