

## 기관지천식 환자의 유도객담내 matrix metalloproteinase-9 및 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 측정

연세대학교 의과대학 내과학교실, 알레르기연구소

김철우 · 김혜진 · 박중원 · 홍천수

### Matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in induced sputum of bronchial asthmatics

Cheol-Woo Kim, Hae-Jin Kim, Jung-Won Park and Chein-Soo Hong

Department of Internal Medicine, Institute of Allergy,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by inflammatory cell infiltrations, which require extracellular matrix(ECM) breakdown and inflammatory cell migration. Airway remodeling with ECM deposition is another characteristic of asthma and reflect imbalance of collagen homeostasis. Collagen homeostasis is regulated by balance of metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs).

**Objective** : We performed this study to evaluate the clinical significance and the role of MMPs and TIMPs in induced sputum of patients with symptomatic asthma.

**Methods** : We measured the concentrations of MMP-9 and its tissue inhibitor, TIMP-1, in induced sputum of 16 symptomatic asthmatics, 6 active smokers, and 5 healthy control subjects.

**Results** : Concentrations of MMP-9 and TIMP-1 were greater in patients with asthma than in control subjects. The molar ratio between MMP-9 and TIMP-1 was significantly lower in asthmatics than in control subjects( $p<0.05$ ). In asthmatics, MMP-9 concentrations were correlated with the number of total inflammatory cells, neutrophils and eosinophils( $Rho=0.618$ ,  $Rho=0.545$  and  $Rho=0.384$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.01$  and  $p=0.058$ , respectively). The concentrations of MMP-9 was negatively correlated with FEV<sub>1</sub>( $Rho=-0.467$ ,  $p<0.05$ ) and positively correlated with the levels of sputum ECP and IL-8( $Rho=0.595$  and  $Rho=0.769$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.01$ , respectively).

**Conclusion** : MMP-9 may be involved in active inflammatory processes in symptomatic chronic airway disease, and the lower ratio of MMP-9/TIMP-1 in asthmatics suggests that MMP-9/TIMP-1 imbalance may be involved in airway remodeling. (**J Asthma Allergy Clin Immunol 20: 916-26, 2000**)

**Key words** : Bronchial asthma, sputum, MMP-9, TIMP-1

본 연구는 1999년 연세대학교 의과대학 강사연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

통신저자 : 연세의대 내과 홍천수

서울시 서대문구 신촌동 134 (☎ 120-752)

e-mail : cshong@yumc.yonsei.ac.kr

접수 : 2000년 6월 1일, 통과 : 2000년 7월 25일

## 서 론

기관지천식은 기도의 만성염증성 질환으로 호산구, 림프구, 중성구 및 비만세포 등 염증세포의 활성화 및 침윤을 특징으로 한다<sup>1)</sup>. 천식의 병태생리에서 염증상태가 계속 유지되기 위하여서는 염증세포들이 혈관 내피조직 및 기도 상피조직의 기저막 장애를 뚫고 폐실질 및 기도 내강으로 계속 이동하는 과정이 필수적이다. 염증세포의 활성화 및 침윤에는 여러 유착분자, 싸이토카인 및 케모카인이 관여하지만, 기저막 및 세포의 기질을 뚫고 이동하는 과정에는 matrix metalloproteinases (MMPs)가 중요하게 관여한다<sup>2)</sup>.

현재까지 밝혀진 MMPs는 20여가지로, 크게 네가지, 즉 기저막 콜라젠을 기질로 하며 젤라틴을 분해하는 능력이 있는 gelatinase, 결합조직 콜라젠을 기질로 하는 collagenase, 세포의 기질의 proteoglycan, laminin, fibronectin 등을 기질로 하는 stromelysin 및 gelatinase A를 활성화 시키는 것으로 알려진 세포막형 MMP (MT-MMP)로 분류되고 있다. MMPs는 비활성화된 형태(proMMP)로 분비되기 때문에 활성화된 형태(active MMP)로 전환되어야 단백분해능을 갖으며, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)에 의하여 기능이 억제된다<sup>3)</sup>.

MMPs중 천식의 염증에 주로 관여하는 것은 기저막의 IV형 콜라젠 및 세포의 기질의 proteoglycan을 주요 기질로 하는 gelatinase에 속하는 MMP-9 이다<sup>4,5)</sup>. 최근의 여러 연구에 의하면 MMP-9 은 기저막을 통한 호산구<sup>6)</sup>, 림프구<sup>7)</sup> 및 중성구<sup>8)</sup> 등 염증 세포의 이동에 필수적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 결합조직 세포에서 분비되는 TIMP-1에 의하여 기능이 억제된다<sup>5)</sup>.

최근 기관지천식에서 MMP-9 과 TIMP-1에 대한 연구는 염증의 병태생리 및 기도의 구조변화(remodeling) 관점에서 활발히 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 기관지천식 환자 및 기관지 염증 반응의 양성 대조군으로 흡연자를 대

상으로 유도객담검사를 실시하여 객담내 염증 지표, 세포성상 및 폐기능과의 관계를 분석하여 기도 염증과정에서 MMP-9 과 TIMP-1의 역할을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

연구대상은 기관지천식군(BA), 흡연군(SC) 및 건강 대조군(HC)의 세 군으로 분류하였다.

천식군(BA)은 1999년 11월부터 2000년 2월까지 연세의대 세브란스병원 알레르기 클리닉에 내원하여 기관지천식으로 진단받은 16명을 대상으로 하였다. 천식의 진단은 기침, 천명 및 호흡곤란 등 특징적인 증상을 보이면서 속효성 기관지 확장제 사용 전 후의 FEV<sub>1</sub> 값이 12% 이상 증가하거나 메타폴린 기관지유발시험상 PC<sub>20</sub> 값이 8mg/ml 이하인 경우로 하였다. 내원 당시 증상이 있는 만성 지속성 천식 환자를 대상으로 하였으며, 흡연의 경력이 있는 경우, 객담검사 4주 이내에 상기도 감염의 병력이 있거나 전신적 부신피질호르몬제를 사용하였던 경우 그리고 급성 천식발작 등과 같은 경우는 대상에서 제외하였다.

정상 폐기능 소견을 보이면서 객담배출이 많은 6명의 흡연자를 대상으로 기관지 염증 양성의 흡연군(SC)으로 하였으며, 정상 폐기능이며 호흡기 증상이 없고 4주 이내 상기도 감염 병력이 없는 비흡연자 5명을 건강 대조군(HC)으로 하였다.

### 2. 객담 유도 및 처리

객담유도는 저자 등이 이미 보고한 방법을 일부 변형하여 시행하였다<sup>9)</sup>. 즉 객담 유도전에 mini-Wright 최고유속측정기를 사용하여 최고 호기유속을 측정한 후 Ventolin<sup>®</sup>을 200  $\mu$ g 2회 흡입시켰다. 3% 고장성 식염수를 5분간 흡입시킨 후 객담배출을 시도하였고, 객담이 나오지 않으면 3% 식염수 흡입을 반복 시행하였다(총 20분간). 검사도중 호흡곤란을 호소할 경우 최고

호기유속을 측정하여 20% 이상 감소하면 검사를 중단하였고, 검사 종료 후 다시 최고 호기유속을 측정하였다. 객담은 편평상피세포의 오염을 줄이기 위하여 생리식염수로 구강내를 깨끗이 씻고 코를 푼후 받아냈다.

유도된 객담은 채취 즉시 다음과 같은 방법으로 처리하였다. 즉 채취된 객담에서 타액성분이 아닌 점액성분만을 선별, 채취한 후 객담의 무게 및 부피를 측정하였다. 선별된 객담에 동량의 0.1% dithiothreitol 을 혼합한 후, vortex를 사용하여 15초간 혼합하고 shaking water bath (37°C)에 20분간 배양하면서 가끔씩 vortex 혼합하였다. 원심분리(1,500rpm, 5분) 후 상층액을 분리하여 -20°C에 보관하여 MMP-9, TIMP-1, ECP 및 IL-8 측정실험에 사용하였으며 남아있는 세포압착결정은 상층액과 동량의 PBS (phosphatebuffered saline)를 넣고 다시 혼합하였다. 혼합물을 60  $\mu$ m의 그물에 여과시켜 큰 부스러기등을 제거한 후 10  $\mu$ l의 객담세포액을 동량의 0.4% trypan blue 용액과 혼합한 후 Neubauer counting chamber를 이용하여 전체 세포수 및 세포생존률을 측정하였다. 객담세포액을  $1 \times 10^6$  세포/ml 가 되도록 PBS에 희석한 후 100  $\mu$ l를 취하여 450rpm에서 6분간 원심침전시킨 후 Wright 염색하였다. 염색된 슬라이드는 대상자의 상태를 모르는 판독의로 하여금 편평상피세포를 제외한 염증세포 400개 이상을 분별하여 계산하였다. 객담 세포성분 분석결과 세포 생존률이 50% 이상이면서 편평상피세포가 전체세포의 40% 미만인 경우만을 대상에 포함하였다.

### 3. Zymography

Zymography를 이용하여 객담내 MMPs 의 성장 및 활성도를 확인하였다. 약술하면 객담 상층액을 0.2% gelatin을 함유한 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기 영동후 2.5% Triton X-100 및 50mM Tris-HCl

(pH 7.5)을 포함한 세척액으로 1시간 간격으로 3번 세척하고 증류수로 2회 세척한 후, 0.15M NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub> 및 50mM Tris-HCl(pH 7.5)가 포함된 배양액에서 배양시킨 후 증류수로 1회 세척하였다. 그 후 isopropanol 및 acetate 가 포함된 염색액에서 염색한 후 탈염색하여 비교, 분석하였다. MMP-9의 표준시약으로 92kD 제조합 proMMP-9(Amersham Int. plc, UK) 을 사용하였다.

### 4. MMP-9 및 TIMP-1의 측정

객담내 MMP-9 및 TIMP-1은 ELISA kit (MMP9-BIOTRAK ELISA 및 TIMP1-BIOTRAK ELISA; Amersham Int. plc, UK)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 비활성형, 활성형 또는 기질과 붙어있는 복합형의 MMP-9과 TIMP-1을 각각 측정하는 것으로 제품설명에 의하면 MMP-9의 측정가능 최저수준은 4  $\mu$ g/ml 이었으며 TIMP-1의 측정가능 최저수준은 3.13  $\mu$ g/ml 이었다.

### 5. ECP 및 IL-8 측정

호산구 활성화의 증거로 객담내 ECP 농도를 CAP system을 이용하여 fluoroimmunoassay (Pharmacia, Swden)로 측정하였으며, 중성구 화학주성의 지표로 객담내 IL-8을 ELISA (Endogen, USA) 방법으로 측정하였다.

### 6. 통계

모든 자료의 통계는 SPSSwin 9.0을 사용하여 처리하였다. 자료값은 평균±표준오차로 표기하였으며, 세 군간 객담내 MMP-9 및 TIMP-1 농도 비교는 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였고 두 군간의 비교에는 Mann-Whitney U 검정을 이용하였다. 천식환자에서 MMP-9 및 TIMP-1의 농도와 폐기능 및 다른 염증지표와의 상관관계는 Spearman rank correlation 검정을 사용하여 분석하였다.

## 결 과

### 1. 대상환자의 특성 및 객담 세포분석

검사를 시행한 16명의 천식환자중 9명은 경증 천식군이었으며 7명은 중등증-중증 천식군에 속하였다. 객담 유도를 시행한 총 27명중 1명의 천식 환자에서 고장성 식염수 흡입 12분 후 호흡곤란 및 폐기능 감소(PFR 23% 감소) 현상이 나타나, 식염수 흡입 중단 및 속효성 기관지확장제 투여 후 호전되어 객담을 배출하였으며, 이외 다른 심각한 부작용은 없었다. 흡연 대조군의 흡연력은 평균 18.3 갑년이었으며 최소 5 갑년, 최대 35 갑년이였다. 천식군(BA), 흡연군(SC) 및 건강 대조군(HC) 사이의 연령 및 성별의 유의한 차이는 없었으며 중등증-중증 천식군이 경증 천

식군에 비해 FEV<sub>1</sub> 및 FEV<sub>1</sub>/VC 이 의미있게 낮았다(Table 1).

편평상피세포의 오염 및 세포생존률은 세 군간에 큰 차이가 없었으며 총 염증세포수는 흡연군에서 가장 높았으나 유의한 차이는 없었다. 호산구 백분율은 천식군에서 건강대조군에 비하여 의미있게 높았다(Table 2).

### 2. 객담내 MMPs의 zymography 분석

Zymography 분석상 92kD에 해당하는 pro MMP-9 부위에 천식군, 흡연군 및 건강대조군 모두에서 뚜렷한 밴드를 형성하였으며 일부 복합형 및 활성형 형태의 MMP-9에 해당하는 부위가 나타나서 객담내의 MMP는 주로 MMP-9

Table 1. Characteristics of enrolled subjects

	Bronchial asthma (BA)			Smoker control (SC)	Healthy control (HC)
	Mild	Mod-Sev	Total		
Age (year)	41.0±7.0	40.6±7.6	40.8±5.0	47.3±6.4	42.6±7.1
Sex (M/F)	6 / 1	4 / 5	10 / 6	3 / 3	3 / 2
Serum IgE (U/ml)	101.8±1.7	192.4±2.1	125.9±1.5	126.5±2.1	48.9±1.8
TEC (/μ l)	361.4±112.4	558.7±159.2	452.5±95.3	180.0±20.0	133.3±66.7
Pulmonary function					
FVC (%)	97.3±2.6	77.4±8.7	88.1±5.0	98.3±6.4	92.1±7.0
FEV <sub>1</sub> (%)	96.7±3.5	63.2±7.9	81.2±6.2	97.4±9.0	98.5±4.5
FEV <sub>1</sub> /VC (%)	103.3±3.9	87.9±6.6	94.7±4.4	98.6±4.9	108.2±2.5
MMFR (%)*	77.8±7.2	37.8±7.9	59.3±7.7	84.9±14.7	103.2±9.6
PC <sub>20</sub> -M (mg/ml) <sup>*,+</sup>	1.84±2.12	0.32±1.94	0.83±1.75	> 25	> 25

all values except sex were described as mean±SEM

\* : p<0.05 between BA and HC.

<sup>+</sup> : p<0.05 between BA and SC

There was significant difference of all pulmonary function parameters and PC<sub>20</sub>-M between mild BA and moderate-severe BA

M: male, F: female, TEC: total eosinophil count, Mod-Sev: moderate to severe

FVC: functional vital capacity, % of predicted value for age, sex and height

FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume for 1 second, % of predicted value for age, sex and height

FEV<sub>1</sub>/VC: FEV<sub>1</sub> expressed as percent of FVC

MMFR: maximal midexpiratory flow rate, % of predicted value for age, sex and height

PC<sub>20</sub>-M: provocative concentration of methacholine responsible for 20% decrement of FEV<sub>1</sub>

에 해당함을 확인하였다(Fig. 1).

**Fig. 1.** Zymographic analysis of MMPs in induced sputum.

lane 1: 92kD proMMP-9 reference  
 lane 2, 3: from 2 asthmatics  
 lane 4, 5: from 2 active smokers  
 lane 6, 7: from 2 healthy controls

### 3. 객담 MMP-9 및 TIMP-1 측정결과

객담에서 측정된 MMP-9 및 TIMP-1 농도는 천식군 및 대조군 모두에서 다양한 범위로 나타났다. MMP-9 농도는 천식군( $118.8 \pm 19.8 \text{ ng/ml}$ )에서 흡연군( $104.7 \pm 25.1 \text{ ng/ml}$ ) 및 건강대조군( $61.4 \pm 21.6 \text{ ng/ml}$ )에 비하여 높은 경향을 보였지만 통계적인 유의성은 없었다. 객담내 TIMP-1 농도는 천식군( $2093.1 \pm 282.0 \text{ ng/ml}$ )에서 흡연군( $1106.3 \pm 367.8 \text{ ng/ml}$ ) 및 건강대조군( $312.3 \pm 133.3 \text{ ng/ml}$ )에 비하여 유의있게 높았으며 MMP-9 과 TIMP-1의 비는 천식군에서 건강대조군에 비하여 유의있게 낮았다(Fig. 2).

한편 중등증-중증 천식군이 경증 천식군에 비하여 MMP-9(각각  $133.4 \pm 28.3$  및  $104.2 \pm 28.7 \text{ ng/ml}$ ) 및 TIMP-1(각각  $2102.9 \pm 371.2$  및  $2083.02 \pm 454.8 \text{ ng/ml}$ ) 이 높은 편이었으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다.

### 4. 객담 MMP-9 및 TIMP-1과 폐기능과의 관계

천식 환자에서 객담내 MMP-9 농도는 FEV<sub>1</sub> 과 통계적으로 유의한 역상관관계를 나타냈다 ( $\rho = -0.467, p < 0.05$ ). 또한 MMP-9/TIMP-1

**Table 2.** Cellular profiles of induced sputum

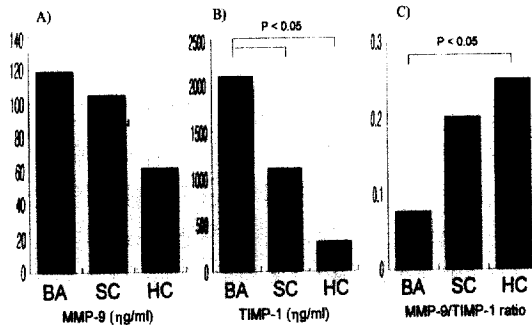
	Bronchial asthma (BA)			Smoker control (SC)	Healthy control (HC)
	Mild	Mod-Sev	Total		
Squamous cell (%)	$27.3 \pm 4.4$	$25.5 \pm 6.0$	$26.4 \pm 3.6$	$22.5 \pm 4.9$	$33.1 \pm 2.4$
Cell viability (%)	$63.7 \pm 4.3$	$64.9 \pm 3.9$	$64.3 \pm 2.8$	$64.9 \pm 4.7$	$55.7 \pm 6.9$
Total cell count ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	$2.70 \pm 0.72$	$2.98 \pm 0.66$	$2.84 \pm 0.47$	$3.80 \pm 1.07$	$1.90 \pm 0.49$
Differential count					
Macrophage (%)	$40.8 \pm 9.1$	$40.5 \pm 8.5$	$40.7 \pm 6.0$	$40.7 \pm 9.8$	$64.3 \pm 6.8$
Neutrophil (%)	$49.2 \pm 10.2$	$27.8 \pm 22.0$	$38.5 \pm 7.0$	$52.8 \pm 10.9$	$31.7 \pm 8.0$
Eosinophil (%)*	$8.2 \pm 3.6$	$31.1 \pm 9.9$	$19.7 \pm 6.0$	$4.4 \pm 2.0$	$1.1 \pm 0.4$
Lymphocyte (%)	$1.8 \pm 0.9$	$0.5 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.5$	$2.0 \pm 1.1$	$2.8 \pm 1.5$

all values were described as mean  $\pm$  SEM

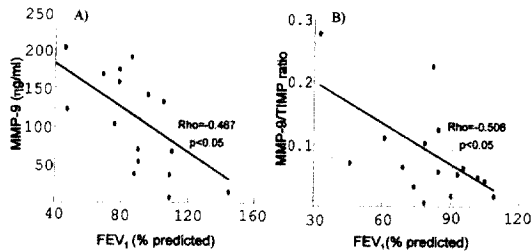
\* :  $p < 0.05$  between BA and HC

Mod-Sev: moderate to severe bronchial asthma

의 비도 FEV<sub>1</sub>과 역상관관계를 보였으며( $\rho = -0.506, p < 0.05$ ). 이는 증상이 있는 천식환자에서 기도폐쇄는 기도의 염증에 의한 것으로 MMP-9이 높으면 기도의 염증정도가 심함을 시사하는 것으로 MMP-9이 기저막 및 세포의 기질을 파괴하고 염증세포의 이동에 관여함을 뒷받침한다 (Fig. 3).



**Fig. 2.** Mean concentrations of MMP-9(Fig. 2A) and TIMP-1(Fig. 2B) in induced sputum as well as MMP-9/TIMP-1 molar ratio(Fig. 2C). BA: bronchial asthma, SC: smoker control, HC: healthy control.

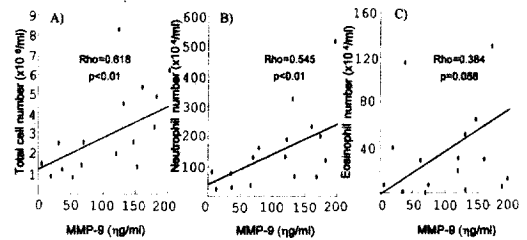


**Fig. 3.** Correlation between the concentrations of MMP-9(Fig. 3A) or MMP-9/TIMP-1 molar ratio (Fig. 3B) and FEV<sub>1</sub> values in asthmatics.

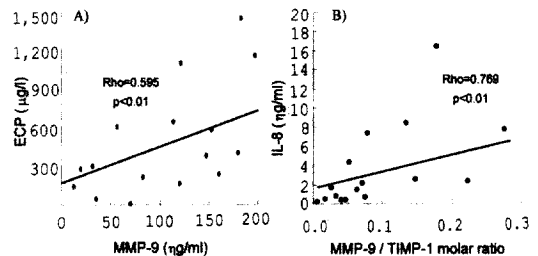
### 5. MMP-9 및 TIMP-1과 객담세포 및 ECP와의 관계

천식 환자에서 편평상피세포를 제외한 총염증세포수 및 호중구수는 MMP-9 농도와 밀접한 상관관계를 보였으며(각각  $\rho = 0.618$  및  $\rho = 0.545, p < 0.05$ ). 호산구수는 MMP-9 농도와 약한 상관관계를 보였으나 통계적인 유의성은 없었다( $\rho = 0.384, p = 0.058$ )(Fig. 4). 그러나 호

산구 활성화의 지표로 측정된 객담 ECP 농도와 MMP-9 농도는 유의한 상관성을 보여 객담내 MMP-9은 호산구와 밀접한 관계를 보임을 간접적으로 확인하였다( $\rho = 0.595, p < 0.01$ ). 한편 호중구 화학주성의 지표로 측정된 객담 IL-8 농도와 MMP-9 사이에는 약한 상관관계를 보였으나( $\rho = 0.455, p = 0.061$ ), MMP-9/TIMP-1 비는 객담 IL-8 농도와 강한 양의 상관관계를 보였었다( $\rho = 0.769, p < 0.01$ )(Fig. 5).



**Fig. 4.** Correlation between the number of total inflammatory cell counts(Fig. 4A) or of neutrophils(Fig. 4B) or of eosinophils(Fig. 4C) and the concentrations of MMP-9 in induced sputum of asthmatics.



**Fig. 5.** Correlation between the concentrations of MMP-9 and of ECP in induced sputum(Fig. 5A), and between the MMP-9/TIMP-1 molar ratio and the concentration of IL-8 in sputum(Fig. 5B) in asthmatics.

### 고찰

기도의 만성염증 질환인 천식은 염증세포의 침윤을 특징으로 하며, 염증상태가 계속 유지되기 위하여서는 염증세포들이 혈관 내피조직 및 기도 상피조직의 기저막을 뚫고 폐실질 및 기도

내강으로 계속 이동하는 과정이 필수적이다. 한편 천식환자의 기도에서 나타나는 병리소견중 기저막 두께 증가가 특징이며 천식의 발병 기간 또는 중증도와 관계없이 대부분의 환자에서 나타난다<sup>10)</sup>. 기저막의 변화는 실제 기저막의 두께 증가는 아니며 상피하 섬유화(subepithelial fibrosis) 과정에 의해 나타나며 기도의 구조변화(remodeling) 과정의 일부로 이해된다. 기도의 구조변화 과정이 일어나는 정확한 기전은 현재까지 밝혀져 있지 않으나 기도벽에 세포의 기질이 과도히 축적된 결과로 파악되고 있으며, 그 과정에 단백분해효소가 중요하게 작용한다<sup>11)</sup>. 즉 기도의 결체조직에서 분비되는 물질들에 의해서 점막하 조직에 세포의 기질이 채워지게 되며, 세포의 기질은 역동적인 구조로서 안정성을 유지하기 위해서는 기질 성분의 합성 및 분해 과정의 평형이 요구된다<sup>12)</sup>. 많은 단백분해효소들이 세포의 기질 구성성분을 분해할 수 있으나 MMPs 및 TIMPs의 억제효소들이 세포의 기질 분해과정에 참여하는 가장 생리적인 효소로 추측되고 있다. 폐조직에서는 collagenase, gelatinase 및 stromelysin을 포함하는 MMPs들이 생성되어 조직의 손상을 야기한다<sup>4,5)</sup>. MMPs는 주로 결체조직세포, 과립구, 단핵구 및 대식세포에서 생성되며  $\alpha_2$ -macroglobulin에 의해 억제되나 폐조직에서  $\alpha_2$ -macroglobulin는 거의 발견되지 않으며 폐의 결체조직 세포에서 MMPs와 함께 TIMPs를 동시에 분비하여 MMPs를 억제시킨다<sup>4,5)</sup>. MMPs중 천식의 염증에 주로 관여하는 것은 기저막의 IV형 및 V형 콜라젠, 세포의 기질의 proteoglycan, elastin, entactin, 콜라젠을 기질로 하는 MMP-9 으로 호산구를 포함한 염증세포의 이동 및 조직손상에 관여한다<sup>13)</sup>. 현재 천식은 MMP-9 및 그 억제제인 TIMP-1의 불균형에 의하여 특징적인 병리소견인 조직의 손상 및 기도 구조의 변화가 오는 것으로 이해되고 있다<sup>13)</sup>.

호흡기 질환에서 MMP-9의 역할에 대한 연구

결과를 살펴보면 낭성 섬유증(cystic fibrosis)에서는 활성형 MMP-9의 농도와 기도 손상의 정도는 유의한 상관관계가 있으며<sup>14)</sup>, 외상 또는 폐혈증 환자에서 MMP-9의 농도가 높을수록 성인형 호흡곤란 증후군의 위험성이 현저히 증가하는 것으로 밝혀져 있다<sup>15)</sup>. 기관지천식에서 MMP-9 과 TIMP-1에 대한 연구는 염증의 병태생리 및 기도 구조변화 관점에서 활발히 이루어지고 있다. 중성구 및 기관지 상피세포에서 분비된 MMP-9에 의하여 급성 천식발작에서 기관지 투과성이 증가되고 염증반응이 악화되며<sup>16)</sup>, 혈청내의 MMP-9과 TIMP-1의 비가 낮을수록 스테로이드를 포함하는 항염증치료에 잘 반응하지 않는 것으로 밝혀졌다<sup>17)</sup>. 이러한 연구결과를 살펴보면, 폐실질 또는 기도의 염증성 질환에서 MMP-9은 조직손상의 기능을 통하여 염증의 심한 정도를 반영하며, 급성염증반응에서 예후를 판단하는 지표로 사용될 수 있다고 가정할 수 있다.

본 연구에서 시행한 zymography 결과를 살펴보면, 주로 proMMP-9에 속하는 92kD 부위에 젤라틴분해 현상이 있으며 그외 일부에서 복합형 및 활성형 MMP-9 형태로 나타나서 객담내 gelatinase는 주로 gelatinase B에 해당하는 MMP-9임을 확인할 수 있었다.

객담내 MMP-9은 정상 대조군 및 흡연군에 비해 천식군에서 높은 양상이었으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다. 세 군간 MMP-9 농도의 유의한 차이를 확인할 수 없었던 것은 대상군의 수가 많지 않았으며 MMP-9 농도가 개인마다 심한 차이를 나타내어 광범위한 형태로 나타났기 때문으로 판단된다. 실제 객담내에서 MMP-9 농도를 측정된 연구결과를 살펴보면 본 연구에서와 같이 환자군과 정상대조군 사이의 명확한 구별없이 광범위한 범위의 값을 보이고 있다<sup>18,19)</sup>. 또한 본 연구결과 천식군에서 건강대조군에 비하여 TIMP-1 농도가 의미있게 높았으며 MMP-9/TIMP-1 비는 의미있게 낮은 것으로

로 나타났다. 건강대조군에 비하여 천식군에서 보이는 이러한 MMP-9, TIMP-1 및 MMP-9/TIMP-1 비의 양상은 Vignola 등<sup>18)</sup>의 보고와 동일한 결과이다. 그러나 Vignola 등<sup>18)</sup>에 의하면 객담내 MMP-9/TIMP-1 비는 기도의 구조변화를 나타내는 것으로 그 비가 높은 것은 TIMP-1의 활성도가 낮은 상태여서 섬유화의 진행이 덜 되어있으며 기저막 두께증가의 정도가 약한 상태로, 천식 환자에서 MMP-9/TIMP-1 비는 FEV<sub>1</sub>과 강한 양의 상관관계를 보인다고 하였다. 본 연구에서는 이와는 반대되는 양상, 즉 MMP-9 농도 및 MMP-9/TIMP-1 비는 FEV<sub>1</sub>과 음의 상관관계를 보였다(각각 Rho=-0.467 및 Rho=-0.506). 이러한 차이의 정확한 원인은 확인할 수 없지만 대상환자 선정기준의 차이인 것으로 판단된다. 즉 본 연구에서는 조절이 잘 되지 않는 천식으로 본원에 전원된 유증상 환자를 대상으로 연구를 시행하였으며 이러한 경우 폐기능 검사상 나타나는 기도폐쇄는 주로 기도의 염증반응에 의한 것으로, 염증이 심한 경우 MMP-9 이 높으며, 결과적으로 MMP-9의 농도는 FEV<sub>1</sub>과 역상관관계를 나타낸 것으로 이해된다. 한편 Vignola 등<sup>18)</sup>의 연구에서 대상환자의 정확한 특성은 파악할 수 없지만 흡입용 부신피질호르몬제를 비롯한 치료약제를 2개월간 사용하지 않아도 조절이 가능한 비교적 안정된 상태의 환자를 대상으로 한 것으로 판단되며, 그러한 경우 기도폐쇄의 원인은, 최소한 일부분은, 기저막 두께 증가 등 기도 구조의 변화에 의한 것으로 써, MMP-9/TIMP-1 비는 FEV<sub>1</sub>과 양의 상관관계를 나타낼 수 있을 것이다. 그러나 같은 연구팀의 최근보고에 의하면 고해상 흉부 전산화단층촬영상 보이는 기관지확장증 또는 심한 기관지벽 비후와 같은 기관지의 영구적인 변화는 객담내 MMP-9/TIMP-1 비가 아닌 TIMP-1 농도와 유의한 양의 상관관계를 갖으며, 따라서 천식 환자에서 보이는 기관지의 구조변화에는 TIMP-1 이 중요하게 작용한다고 하였다<sup>20)</sup>. 또한 치료

를 하지 않은 천식군에서 부신피질호르몬제치료군 또는 정상대조군에 비하여 기관지폐포세척액내에 TIMP-1 농도가 높으며, TIMP-1의 기능상 이런 비치료군에서 근섬유세포의 증식 및 섬유화, 즉 기도의 구조변화의 가능성이 높다는 보고가 있다<sup>21)</sup>. 즉 천식 환자에서 보이는 기도의 구조변화 과정에서 TIMP-1의 역할은 현재 정확히 밝혀져 있지 않지만, TIMP-1 단독 또는 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 병태생리에 관여하는 것으로 추정된다. 한편 천식발작으로 내원한 환자를 대상으로 객담내 MMP-9과 TIMP-1을 연속적으로 측정한 최근의 연구에 따르면 내원당시 최고호기유속은 감소되어 있고 객담 ECP는 증가된 상태에서 부신피질호르몬제 치료에 따라 호기유속은 증가되면서 객담 ECP 및 MMP-9은 감소되고 MMP-9/TIMP-1의 비도 감소한다고 하였다<sup>19)</sup>. 또한 ovalbumin을 이용한 동물 천식모델에서 MMP 억제제를 쓰면 ovalbumin 천식유발시 말초혈액에는 호산구 증다증이 심해지나, 폐 및 기도 조직으로 호산구를 비롯한 염증세포의 침윤이 일어나지 않는다는 보고가 있다<sup>22)</sup>. TDI를 이용한 이<sup>23)</sup> 등의 동물실험에서도 TDI 천식유발시 천식의 특징적인 병리소견과 함께 MMP-9 농도가 높아지며, MMP를 억제하면 이러한 염증반응이 없어진다고 하였다.

이상의 결과를 종합하면 MMP-9은 기관지천식 염증의 시작 및 유지과정에서 중요한 역할을 하며 염증이 악화될 때의 병태생리에도 관여함을 알 수 있으며, TIMP-1은 단독 또는 MMP-9/TIMP 비로 기도의 영구적인 손상, 변형 및 기도 구조변화에 관여하는 것으로 추정된다. 본 연구에서도 MMP-9이 천식군에서 정상대조군에 비하여 높으며 MMP-9이 FEV<sub>1</sub>과 역상관관계를 보여 기도염증에 비례하여 MMP-9이 높아짐을 의미하며, 천식군에서 정상대조군 및 흡연군에 비하여 TIMP-1이 높으며 MMP-9/TIMP-1이 낮아 천식에서 나타나는 기도 구조변화에 TIMP-1 또는 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 관



여함을 간접적으로 시사하는 것으로 해석된다. 그러나 천식환자에서 흡입용 부신피질호르몬제를 장기간 사용하면 점막하 조직의 MMP-9이 저하되고 TIMP-1이 높아지면서 상피하 콜라겐 침착이 줄어든다는 보고<sup>24)</sup> 등이 있으므로 천식의 기도 구조변화에 있어서 MMP-9 및 TIMP-1의 역할에 대한 연구는 추후 더 필요할 것으로 판단된다.

MMP-9은 섬유모세포, 혈관내피세포 및 상피세포<sup>5)</sup> 뿐만 아니라 대식세포<sup>25)</sup>, 림프구<sup>7)</sup>, 호중구<sup>8)</sup> 및 호산구<sup>26)</sup>와 같은 염증세포에서도 분비된다. 본 연구에서 객담내 MMP-9 농도는 전체 염증세포수 및 호중구수와 유의한 상관성을 보였으나 호산구수와는 통계적인 유의성이 없었다. 그러나 약한 상관성은 확인할 수 있었으며(Rho=0.384, p=0.058), 호산구 활성화의 지표로 측정된 객담내 ECP와는 강한 상관관계를 보여(Rho=0.595, p<0.01) 객담내 MMP-9은 호산구와도 밀접한 관계를 갖는 것으로 추정된다.

결론적으로 유증상 기관지천식 환자의 객담내 MMP-9 농도는 기도의 염증상태를 반영하며, 기저막 및 세포의 기질을 파괴할 수 있는 기능을 통하여 염증세포의 이동 및 활성화에 관여하는 것으로 추정된다. 또한 MMP-9/TIMP-1 비의 불균형이 천식에 있으며 이는 천식의 특징적 소견중 하나인 기도의 구조변화에 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 관여함을 시사하며, 이에 대한 연구로 기도 구조변화의 병태생리에 대한 정확한 이해가 가능할 것으로 판단된다.

### 결 론

증상이 있는 천식 환자에서 객담내 MMP-9은 기도염증의 정도를 반영하며, 기저막 및 세포의 기질을 파괴할 수 있는 기능을 통하여 전신 순환계에서 기도염증 부위로 염증세포의 이동에 관여하는 것으로 추정된다. 또한 천식군에서 TIMP-1 농도가 높으며 MMP-9/TIMP-1의 비는 건강대조군 및 흡연군에 비하여 낮은 상태로,

이는 천식의 특징적 소견중 하나인 기도의 구조변화에 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 관여됨을 시사하나 이에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Jeffery PK : Pathology of asthma. Br Med Bull 48: 23-39, 1992
- 2) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S : Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 284: 67-8, 1980
- 3) Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi H, Hurewitz AN, Matrisian L et al : Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissue: clinical and experimental applications. An NY Acad Sci 878: 212-27, 1999
- 4) O'Connor CM, FitzGerald MX : Matrix metalloproteinases and lung disease. Thorax 49: 602-9, 1994
- 5) Murphy G, Docherty AJ : The matrix metalloproteinases and their inhibitors. Am J Respir Cell Mol Biol 7: 120-5, 1992
- 6) Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM : Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. Am J Respir Cell Mol Biol 14: 519-28, 1997
- 7) Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL : T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. J Immunol 154: 4379-89, 1995
- 8) Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A : Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. Am J Respir Cell

- Mol Biol 14: 288-95, 1996
- 9) 강석민, 김철우, 박중원, 홍천수 : 기관지천식 환자에 있어 고장성 생리식염수 흡입을 이용한 유도객담 검사. 대한내과학회지 52: 797-804, 1997
  - 10) Roche WR, Beasley R, William JH, Holgate ST : Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet 1: 520-3, 1989
  - 11) Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White P, Godard P, Michel FB : Asthma: a disease remodeling the airways. Allergy 47: 3-11, 1992
  - 12) Mosher D, Sottile J, Wu C, McDonald J : Assembly of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 4: 810-8, 1992
  - 13) Mautino G, Capony F, Bousquet F, Vignola AM : Balance in asthma between matrix metalloproteinases and their inhibitors. J Allergy Clin Immunol 104: 530-3, 1999
  - 14) Delacourt C, Bourgeois ML, D'Ortho MP, Doit C, Scheinmann P, Navarro J et al : Imbalance between 95 kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 152: 765-74, 1995
  - 15) Ricou B, Nicold L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JM : Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 154: 346-52, 1996
  - 16) Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, Wallaert B et al : Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. Am J Respir Crit Care Med 159: 1298-307, 1999
  - 17) Bosse M, Chakir J, Rouabhia M, Boulet LP, Audette M, Laviolette M : Serum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinases-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. Am J Respir Crit Care Med 159: 596-602, 1999
  - 18) Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V et al : Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 158: 1945-50, 1998
  - 19) Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ohmichi M, Abe S : Sputum matrix metalloproteinase-9:tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. J Allergy Clin Immunol 105: 900-5, 2000
  - 20) Capieu L, Paganin F, Vachier I, Maekel L, Vignola AM, Godard P et al : Sputum marker and CT-scan assessment of remodelling in asthma and COPD. Am J Respir Crit Care Med 161:A685, 2000
  - 21) Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D, Bousquet J, Capony F : Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. Am J Respir Crit Care Med 160: 324-30, 1999
  - 22) Kumagai K, Ohno I, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, Nagase H et al : Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. J Immunol 162: 4212-9, 1999
  - 23) 이용철, 최광호, 이홍범, 이양근 : The role of matrix metalloproteinase-9 in TDI-induced asthma. 천식 및 알레르기 20: 398, 2000(초록)
  - 24) Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim JJ : Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. J Allergy Clin Immunol 104: 356-63, 1999
  - 25) Mautino G, Oliver N, Chanez P, Bousquet

J, Capony F : Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics, *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 583-92, 1997

26) Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M et al : Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation, *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 212-9, 1997