



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

-국문요약-

## 아스피린 과민성 및 내성 천식 환자의 비용 조직의 염증 반응의 비교

아주대학교 대학원 의학과

서 유 진

(지도교수: 박 해 심)

**배경 및 목적:** 아스피린 과민성은 기관지천식 환자의 5-20%에서 관찰되며 이들에게서 만성 부비동염과 비용종은 흔히 동반한다. 아스피린 과민성 천식에 병발된 비용종의 병리 소견은 기관지천식의 병리소견과 유사하여, 상피세포의 탈락, 염증세포, 특히 호산구 침윤, 기저막의 비후 및 세포외 기질의 축적이며, 이는 천식의 병리소견과 유사하다. 이처럼 비용종과 기관지천식은 연관성이 많으며 일부에서는 두 질환이 공통된 병인기전에 의해 발생한다고 주장하기도 한다. 그러나, 현재까지 일반적인 비용종과 아스피린 과민성이 있는 기관지천식에 동반된 비용종 사이의 차이점이나 발생 기전에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다. 이에 저자들은 아스피린 과민성 천식과 아스피린 내성 천식 환자의 비용 조직에서 염증 반응의 차이를 관찰하기 위해 두 군간에 호산구 염증을 반영하는 eosinophil cationic protein (ECP), 비반세포의 활성도를 반영하는 tryptase, 염증 침윤 뿐 아니라 조직의 재형성에 관여하는 MMP-2, MMP-9와 TIMP-1, 그리고 염증 반응에 관여할 효소 중의 하나로 COX-2의 발현을 비교하였다.

**연구대상 및 방법:** 1994년부터 2001년까지 아주대병원 알레르기-류마티스내과에

내원하여 기관지천식으로 진단 받고 비용종으로 수술 받은 환자중 아스피린 과민성 천식 환자 10명 (제 I군)과 아스피린 내성 천식 환자 10명 (제 II군)을 대상으로 하였다. 아스피린 과민성은 아스피린 또는 진통소염제 복용 후 비염 또는 호흡기 증상의 과거력이 있고, lysine-aspirin 기관지유발시험에서 양성 반응을 나타낸 경우로 하였다. 비용 조직을 갈아서 0.1% Triton X-1-PBS로 균질액 (homogenate)을 준비한 후 원심분리 하였으며, 분리 후 상층액으로 검사를 시행 하였는데 ECP와 tryptase는 CAP system (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 측정하였고, MMP-2, MMP-9, 및 TIMP-1 은 ELISA (Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, UK)로 측정하였다. COX-2의 발현은 IgG immunoblot으로 관찰하였다.

**결과:** 1) ECP치는 제 I군에서 유의하게 높았으며 ( $366.5 \pm 89.1$  ng/mg vs.  $59.0 \pm 14.0$  ng/mg,  $p < 0.05$ ), tryptase치도 제 I군에서 더 높은 경향을 보였으나 두 군간에 유의한 차이는 없었다 ( $838.1 \pm 1114.9$  ng/mg vs.  $407.4 \pm 416.8$  ng/mg,  $p > 0.05$ ). 2) TIMP-1치는 제 I군에서 유의하게 높았으며 ( $42.7 \pm 12.3$  ng/mg vs.  $11.1 \pm 4.1$  ng/mg,  $p < 0.05$ ), MMP-9는 제 I군에서 더 높은 경향을 보였으나 두 군간에 유의한 차이는 없었고 ( $53.7 \pm 21.1$  ng/mg vs.  $27.8 \pm 6.3$  ng/mg,  $p > 0.05$ ), MMP-2는 두 군간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ( $134.1 \pm 30.5$  ng/mg vs.  $81.9 \pm 14.1$  ng/mg,  $p > 0.05$ ). 3) MMP-9/TIMP-1비는 제 I군이 제 II군에 비해 더 낮은 경향을 보였다. 4) ECP와 tryptase치는 각각 MMP-2, MMP-9치와 유의한 양의 상관관계를 보였으나 ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.05$ ) TIMP-1치와 상관성은 없었다. 5) COX-2는 제 II군 10명중 5명에서 검출되었으며 제 I군에서 검출되지 않았다.

**결론:** 아스피린 과민성 천식 환자의 비용 조직에서 호산구 염증 반응이 더 심하였다. MMP 중 MMP-2가 가장 높게 측정되었다. MMP-2와 MMP-9이 호산구 및 비만세포 염증 반응 및 침윤에 관여할 것으로 생각되며, COX-2는 아스피린 과민성 천식 환자에서 검출되지 않는 반면 아스피린 내성 환자에서는 검출되어 COX-2 발현의 감소가 아스피린 과민성 천식에 동반된 비용종의 발생에 기여할 가능성을 제시한다.

---

핵심되는 말: 아스피린 과민성 천식, 비용종, ECP, tryptase, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, COX-2

## 차 례

국문요약 .....	1
차례 .....	4
그림차례 .....	6
표차례 .....	8
I. 서론 .....	9
II. 연구대상 및 방법 .....	11
A. 연구대상 .....	11
B. 방법 .....	12
1. 조직 균질액 (tissue homogenate)의 준비 .....	12
2. ELISA를 이용한 MMP-2, MMP-9 및 TIMP-1치의 측정 .....	12
3. SDS-PAGE와 IgG-immunoblot을 이용한 COX-2의 발현 측정 .....	12
4. 통계방법 .....	13
III. 결과 .....	14
A. 대상군의 임상적 특성 .....	14
B. 기관지천식 환자 제 I, II군간 비용 조직의 ECP와 tryptase치의 비교 .....	14
C. 기관지천식 환자 제 I, II군간 비용 조직의 MMP-9/TIMP-1비의 비교 .....	14
D. MMP-2, MMP-9, TIMP-1치와 염증지표와의 상관관계 분석 .....	15
E. 제 I군과 II군간 비용 조직의 COX-2의 발현 비교 .....	15
IV. 고찰 .....	16
V. 결론 .....	21

참고문헌 .....	28
영문요약 .....	33

## 그림 차례

Fig. 1. Comparison of ECP (eosinophil cationic protein) and tryptase levels in nasal polyp tissue homogenate between groups I and II. ECP levels were significantly higher and tryptase levels tended to be higher in group I patients. Horizontal bars indicate median values. Group I: aspirin-intolerant asthmatic patients, Group II: aspirin-tolerant asthmatic patients.....21

Fig. 2. Comparison of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 levels and MMP-9/TIMP-1 ratios in nasal polyp tissue homogenate from patients with or without aspirin-intolerant asthma undergoing nasal polypectomy. Note the significantly higher levels of TIMP-1 in group I patients. MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 levels were measured by ELISA. Horizontal bars indicate median values. Group I: nasal polyp tissue from aspirin-intolerant asthmatic patients, Group II: nasal polyp tissue from aspirin-tolerant asthmatic patients.....22

Fig. 3. Correlations between ECP, and MMP-9 (A), MMP-2 (B), and TIMP-1 (C) levels in nasal polyp tissue. Significant correlations were noted between ECP levels and MMP-2 and MMP-9 levels. ECP was measured by CAP system and MMP-2 and MMP-9 were measured by ELISA.....23

Fig. 4. Correlations between tryptase, and MMP-2 (A), MMP-9 (B), and TIMP-1 (C) levels in nasal polyp tissue. Significant correlations were noted

between ECP levels and MMP-2 and MMP-9 levels, ECP was measured by CAP system and MMP-2 and MMP-9 were measured by ELISA.....24

Fig. 5. IgG immunoblot of COX-2 in nasal polyp homogenates in groups I (A) and II (B). Notice that COX-2 is downexpressed in group I patients compared to group II patients. COX-2 was measured as described in materials and methods. Group I: aspirin-intolerant asthmatics, Group II: aspirin tolerant asthmatics.....25



## 표 차 례

Table 1. Clinical characteristics of the study subjects.....	26
--	----

## I. 서론

비용종은 비점막의 만성 염증성 질환에 의해 발생하는 것으로 기관지천식 환자의 기도 점막에서 관찰되는 염증 반응과 유사한 소견이 많다. 상기도와 하기도는 비특이적 자극 및 알레르기성 항원에 대해 같은 상피층 및 염증의 변화를 보이며, 비용 조직에서도 호산구와 림프구의 침윤 및 비반세포의 탈과립이 관찰되며, 여러가지 사이토카인이 분비된다고 보고되고 있으나,<sup>1</sup> 아직 비용종의 생성 및 염증 발생기전에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다.

비용종, 만성 부비동염, 기관지천식 및 아스피린 과민성은 서로 연관성이 많아 aspirin triad syndrome이라고 부른다. 비용 조직은 다양한 염증 세포 침윤이 관찰되는데, 특히 활성화된 림프구, 비반세포 및 호산구가 많다. 호산구는 비용종에서 가장 흔히 관찰되며, 아스피린 과민성이 없는 알레르기비염 및 비알레르기비염 환자보다 아스피린 과민성 비용종에 더 많이 존재한다고 보고되고 있으나,<sup>2</sup> 이들 환자에서 호산구 염증 및 침윤이 어떤 기전에 의해 발생하는지에 대해서는 명확하게 규명되지 않았다.

한편, 최근의 한 연구에서 비용 조직의 호산구 침윤을 특징으로 하는 만성 염증 및 조직 재형성에서 MMP의 역할에 대한 보고가 있었다.<sup>3</sup> Matrix metalloproteinase (MMP)와 tissue inhibitor of metallo-proteinase (TIMP)가 기관지천식의 특징적인 기도염증 및 기도개형에 역할을 하는 것으로 알려져 있는데,<sup>4</sup> MMP는 칼슘에 의해 활성화되며 아연 (zinc)에 의존하는 endopeptidase로서, 세포외기질을 구성하는 여러 물질을 단백 분해하고, 체내의 정상 생리반응 및 병적과정에 작용하며, 특히 염증세포 침윤과 섬유화, 종양의 전이 및 상처치유에

관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 또한 호산구를 포함한 많은 세포가 기저막을 통과할 때 관여하며, MMP 억제제를 사용하면 세포이동이 방해되는 것이 보고되었다. MMP중 MMP-2와 MMP-9 (일명 gelatinase A와 B)은 기저막을 구성하는 type IV collagen을 분해한다.<sup>6</sup> MMP의 작용은 TIMPs에 의해 조절되며, MMP와 같은 종류의 세포에서 분비된다.<sup>7</sup> TIMP-1은 분자량은 28kDa으로 MMP-9와 1:1로 결합하며, MMP와 TIMP의 비율이 결합 조직의 재형성에 중요한 역할을 한다.<sup>8</sup> 그러나, 아직까지 아스피린 과민성과 아스피린 내성 환자의 비염종에서의 MMP의 역할에 대한 보고는 없는 실정이다.

아스피린은 아라키돈산 대사에서 COX 경로를 차단함으로써 류코트리엔 생성경로로 전환되거나 또는 류코트리엔 생성을 억제하는 PGE<sub>2</sub>를 제거함으로써 cysteinyl leukotriene이 과잉 생산되어 증상이 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한, 최근의 한 연구에서 아스피린 과민성 비염 조직에서 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)로 측정된 COX-2 mRNA가 아스피린 내성 환자군과 비교시 그 측정치가 더 낮았다고 보고하여,<sup>9</sup> 아스피린 과민성의 발생기전에서 COX-2의 역할을 제시하였다.

저자들은 이들 환자에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-1의 측정과 COX-2의 발현이 다른 염증세포 활성화 지표와의 관련성을 확인하고, 비염 조직의 염증 반응을 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### A. 연구대상

1994년부터 2001년까지 아주대병원 알레르기-류마티스 내과에 내원하여 기관지천식으로 진단받고 비용종으로 수술받은 환자중 아스피린 과민성 천식 환자 10명(제 I군)과 아스피린 내성 천식 환자 10명(제 II군)을 대상으로 하였다. 기관지천식은 천명, 호흡곤란 등의 증상이 있으면서 폐기능검사상 속효성 기관지 확장제 흡입 후 기도과민성이 증명되거나 메타콜린 기도유발시험 결과 기도과민성이 증명된 경우로 하였으며, 아스피린 과민성은 아스피린 또는 진통소염제 복용 후 비염 또는 호흡기 증상의 과거력이 있고 lysine-aspirin 기관지유발시험에서 양성 반응을 나타낸 경우를 포함시켰다.

아토피의 정의는 알레르기 피부단자시험상 1개 이상의 혼한 흡입 알레르겐에 양성을 보인 경우로 하였다. 알레르기 피부단자시험은 50개의 흡입항원 (Bencard, U.K.)을 사용하였으며, 양성과 음성 대조군으로 각각 0.1% histamine (Bencard, U.K.) 과 0.9% normal saline을 사용하였다. 피부반응은 소독된 침으로 등에 단자한 15분 후에 측정하였고, 평진의 장경과 직각된 직경의 합을 2로 나눈 수치와 histamine에 대한 평진비 (allergen/histamine, A/H)로 나타낸 후, A/H비가 1이상인 경우를 양성으로 판정하였다. 총 IgE는 RIA (radioimmunoassay)로 측정하였다. 연구대상자들의 특성중 나이, 성별, 아토피 유무, 비염 증상의 기간, 총 IgE치, 재발 여부 등을 비교하였다.

## B. 방법

### 1. 조직 균질액 (tissue homogenate)의 준비

모든 환자는 만성 부비동염 및 비용종으로 비용종 절제술을 받았으며 비용종은 절제후 -70°C에서 냉동 보관하였다. 비용 조직을 갈아서 0.1% Triton X-1-PBS (phosphate buffered saline)로 균질액 (homogenate)을 준비한 후 4°C에서 14,000 rpm 속도로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액으로 검사를 시행하였는데 ECP와 tryptase치는 ImmunoCAP system (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 측정하였다.

### 2. ELISA를 이용한 MMP-2, MMP-9 및 TIMP-1치의 측정

MMP-2, MMP-9, 및 TIMP-1이 부착된 assay plate (Biotrak, Amersham Pharmacia Biotech, U.K.)를 이용하여 희석된 tissue homogenate를 각 well당 100µL씩 작용시킨 후 0.1% PBST (phosphate buffered saline and 0.05% Tween 20)로 4회 세척하였다. 여기에 peroxidase conjugate (anti-MMP-9 horseradish peroxidase)를 100 µL씩 투여하여 2시간 작용시킨 후 4회 세척하였다. 발색제 (TMB: 33' 55' -tetraethylbenzidine 1 tablet, phosphate citrate buffer 10 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 µL)를 well당 100 µL씩 넣고 상온에서 20분간 발색 후 동량의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 발색을 중지시키고 plate reader를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

### 3. SDS-PAGE와 IgG-immunoblot을 이용한 COX-2의 발현 측정

표지자 (4 to 250kDa, Novex, San Diego, CA)와 조직 균질액(tissue homogenate)을 Bio-Rad Mini Protein II electrophoresis cell을 이용하여 만든

7% SDS-polyacrylamide gel에 2시간 동안 전기영동 (80V, 200mA)한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membrane (Millipore, Bedford, MA)에 전이하였다. 양성 대조군은 IFN- $\alpha$ 와 LPS으로 자극시킨 RAW 264.7 (ATCC# T1B71) cell line에서 추출한 용해액 (lysate)을 사용하였다. 여기에 비특이적 결합을 방지하기 위하여 3% non-fat dry milk를 이용하여 30분 동안 blocking 처리한 후, antibody solution을 작용시켰다. COX antibody는 goat polyclonal COX-2 IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 5% skim milk-TBST를 이용하여 1: 500v/v으로 희석하여 사용하였으며, 상온에서 3시간 작용시킨 후, TBST로 3회 세척하였다. Secondary antibody는 horseradish peroxidase-labelled anti-goat IgG (Zymed, San Francisco, CA)를 5% skim milk-TBST를 이용하여 1: 2000v/v으로 희석하여 상온에서 1시간 작용시킨 후, TBST로 세척하였다. Band는 enhanced chemiluminescence system (Amersham, Arlington Heights, IL.)로 확인하였다.

#### 4 통계방법

연구 결과의 통계학적 분석은 SPSS 9.0 for Windows로 하였으며, 두 군의 ECP, tryptase, MMP-2, MMP-9, 및 TIMP-1치와 COX-2의 발현을 비교하고 상관성을 분석하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의하다고 판정하였다.

### III. 결 과

#### A. 대상군의 임상적 특성

기관지천식으로 진단 받은 환자 중 제 I군과 제 II군간에 연령 ( $39.5 \pm 11.6$ 세,  $40.6 \pm 15.5$ 세,  $p=0.92$ ), 남/녀 성비 (9/1, 5/5,  $p=0.06$ ), 아토피 유무 (2/6, 2/8,  $p=0.81$ ), 유병 기간 (27개월, 39개월,  $p=0.29$ ), 총 IgE치 ( $474.0 \pm 399.2$  IU/ml,  $410.1 \pm 85.3$  IU/ml,  $p=0.83$ )를 비교한 결과 두 군간에 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

#### B. 기관지천식 환자 제 I, II군간 비용 조직의 ECP와 tryptase치의 비교 (Fig. 1).

호산구 및 비만세포의 활성화는 제 I, II군의 비용 조직 모두에서 관찰되었다. ECP/protein치는 제 I군에서  $366.5 \pm 89.1$  ng/mg (mean $\pm$ S.E.), 제 II군에서  $59.0 \pm 14.0$  ng/mg으로 제 I군에서 제 II군에 비해 유의하게 높았다 ( $p=0.001$ ). Tryptase치는 제 I군에서  $838.1 \pm 1114.9$  ng/mg, 제 II군에서  $407.4 \pm 416.8$  ng/mg으로 제 I군에서 더 높은 경향을 보였으나 두 군간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

#### C. 기관지천식 환자 제 I, II군간 비용 조직의 MMP-2, MMP-9, TIMP-1치 및 MMP-9/TIMP-1비의 비교 (Fig. 2).

두 군 모두에서 MMP-2, MMP-9, TIMP-1의 순으로 많이 검출되었다. MMP-2치는 제 I군에서  $134.1 \pm 30.5$  ng/mg, 제 II군에서  $81.9 \pm 14.1$  ng/mg으로 제 I군에서

더 높은 경향을 보였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았으며 ( $p=0.29$ ), MMP-9치도 제 I군에서  $53.7\pm 21.1$  ng/mg, 제 II군에서  $27.8\pm 6.3$  ng/mg으로 제 I군에서 더 높은 경향을 보였으나 두 군간에 차이가 없었다 ( $p=0.71$ ). TIMP-1치는 제 I군에서  $42.7\pm 12.3$  ng/mg, 제 II군에서  $11.1\pm 4.1$  ng/mg으로 제 I군에서 유의하게 더 높았다 ( $p=0.02$ ). MMP-9/TIMP-1비는 제 I군에서  $1.8\pm 0.6$ , 제 II군에서  $4.6\pm 1.3$ 으로 제 I군에서 낮은 경향을 보였으나 두 군간에 유의한 차이가 없었다 ( $p=0.07$ ).

#### **D. MMP-2, MMP-9, TIMP-1치와 염증지표와의 상관관계 분석 (Fig. 3, 4).**

비염 조직에서 측정된 MMP-9치는 TIMP-1치와 유의한 상관관계를 보였다 ( $r=0.44$ ,  $p<0.05$ ). 또한 비염 조직에서 측정된 ECP치는 MMP-2치 ( $r=0.61$ ,  $p<0.05$ ) 및 MMP-9치 ( $r=0.65$ ,  $p<0.05$ )와 유의한 양의 상관관계를 보였으나, TIMP-1치와는 유의한 상관관계가 없었다 ( $r=0.42$ ,  $p>0.05$ ). Tryptase치는 MMP-2치 ( $r=0.47$ ,  $p<0.05$ )와 MMP-9치 ( $r=0.62$ ,  $p<0.05$ )와 유의한 양의 상관관계를 보였으나 TIMP-1치와는 유의한 상관관계가 없었다 ( $r=0.04$ ,  $p>0.05$ ).

#### **E. 제 I군과 II군간 비염 조직의 COX-2의 발현 비교 (Fig. 5)**

제 I군 10명 중 0명에서, 제 II군 10명 중 5명에서 COX-2의 발현이 관찰되었다.



## IV. 고 찰

아스피린 과민성 천식 환자는 비용종이 흔히 동반되나,<sup>10</sup> 이들 환자들에서 비용종의 발생기전은 아직 명확하게 규명되지 않았다. 비용 조직의 병리소견을 보면 많은 종류의 염증 세포가 관찰되며, 그중 호산구, 림프구, 형질 세포 및 비반세포의 침윤 소견이 보고되었다.<sup>11,12</sup> 그중 호산구 침윤은 비용종의 중요 소견이며, 비용종의 생성 및 발달에 중심적인 역할을 한다고 알려져 있으나, 호산구가 비용 조직으로 이동하는 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 한편, 비용종에서 관찰되는 호산구는 정상 비점막보다 많으며, 천식이 있는 경우와 아스피린 과민성이 있는 경우가 천식 또는 아스피린 과민성이 없는 경우보다 호산구의 침윤이 유의하게 많다고 알려져 있다.<sup>13</sup>

ECP (eosinophil cationic protein)는 호산구의 세포질내 과립에 존재하며, 자극을 받으면 세포 외부로 유리되어, 활성화된 호산구를 대표하는 화학매체다. 아스피린 과민성 천식 환자와 내성 환자에서의 비용조직에서 호산구 및 비반세포수는 유의한 차이가 없었으나, 아스피린 과민성 천식 환자의 비용 조직의 면역화학 조직소견에서 ECP로 염색된 호산구수가 정상인에 비해 높았다.<sup>2</sup> 또한, 치료를 받지 않은 비용종 환자군과 정상 비점막군을 비교한 연구에서 비용 조직을 갈아서 만든 상층액으로 ECP치를 측정된 결과 비용 조직에서 유의하게 높았는데, 이는 더 많은 수의 활성화된 호산구 침윤을 시사한다.<sup>14</sup> 아스피린 과민성으로 진단된 환자의 비용 조직의 병리소견상 많은 수의 호산구 침윤과 기저막의 비후, 혈액검 사상 호산구의 증가 등의 소견이 보였으며,<sup>15</sup> 본 연구에서 측정된 ECP치는 제 I 군의 비용종에서 유의하게 높았다. 이는 아스피린 과민성 천식 환자의 비용종에

서 호산구의 침윤이 더 심할 수 있음을 시사한다.

Tryptase는 비반세포에서 외부 자극에 의해 유리되는 화학매체로, 활성화된 비반세포를 반영한다. 한 연구에서는 비용 조직의 면역화학조직검사상 아스피린 과민성 비용 조직의 상피층과 피하층에서 tryptase가 관찰되었는데, 이 소견은 활성화된 비반세포가 tryptase를 분비하여 비반세포가 아스피린 과민성 비용종의 형성과정에 관여할 가능성을 시사한다.<sup>2</sup> 본 연구에서 tryptase치는 제 II군에 비해 제 I군에서 더 높은 경향을 보였으나, 두 군간에 유의한 차이가 없었다. 이는 아스피린 과민성 유무와 무관하게 비반세포의 활성화가 염증반응에 관여할 것으로 생각한다.

비용종은 기관지천식과 병리소견상 유사한 특징이 많다.<sup>16</sup> MMP-2는 기관지천식에서 주로 연구되어 왔으며,<sup>17</sup> 본 연구에서 비용 조직내 MMP-2치를 측정하였다. 한편, 비용종과 정상 비점막의 조직소견을 면역조직화학검사로 비교한 최근의 연구는 비용 조직에서 정상 비점막보다 MMP-2치에 비해 MMP-9치가 더 높게 측정되었으며, MMP-2치는 두 군간에 유의한 차이가 없었다고 한다.<sup>3</sup> 본 연구에서 측정한 MMP-2치는 두 군 모두에서 MMP-9에 비해 유의하게 높았으며, 이 차이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 MMP-2치와 MMP-9치가 두 군간에 유의한 차이가 없어, 아스피린 과민성의 발생기전에 기여하지 않을 가능성을 시사한다.

MMP-9와 TIMP-1은 기관지천식 환자에서 많이 연구되어져 왔다. MMP-9은 기관지천식 환자의 호산구<sup>18</sup>에서 분비되며 또한 기관지천식 환자에서 검출한 기관지 폐포 세척액내 대식세포<sup>19</sup>에서도 분비된다. 또한 최근의 연구 결과에 의하면, 정상 대조군에 비해 기관지천식 환자의 객담내 ELISA로 측정한 객담내 MMP-9치가 더 높은 농도로 존재하며 zymography상 pro-MMP-9의 활성화 정

도가 더 높다고 한다.<sup>20</sup> 이들 연구에서 치료 7일과 28일 후 객담내 MMP-9치가 감소되었으며, 급성 천식 발작이 있었던 환자에서 객담내 MMP-9치가 총 대식세포, 증성구 및 호산구수와 비례함으로 이는 MMP-9가 미세혈관의 투과성 증가와 함께 혈관부종 및 세포 이동에 관여한다고 주장하였다. 또한 쥐를 이용한 동물실험에서 항원 흡입후 채집한 기관지 폐포 세척액내 MMP-2치와 MMP-9치가 기저치에 비해 증가하였으며, 조직소견상 기저치에 비해 림프구와 호산구의 침윤의 증가가 동반되었다고 보고하였다.<sup>21</sup> 이때, 항원 흡입 후 TIMP-2로 처리하였는데, 항원에 의해 유도된 림프구와 호산구 침윤이 기관지내경 및 기관지벽으로 이동이 더 적었다고 하였으며, 이는 TIMP-1이나 합성 MMP억제제를 사용했을 때에도 같은 결과를 보였다. 이런 결과는 MMP, 특히 MMP-2와 MMP-9가 기관지천식 환자에서 관찰되는 염증세포 침윤에 결정적인 역할을 한다는 것을 시사한다. MMP-9은 기관지천식 뿐 아니라, 비용종에서도 발현이 증가된다는 보고가 있으며, 면역조직화학검사서 정상 비점막과 비교하였을 때 유의하게 증가되어 있다.<sup>3</sup> MMP-9의 발현은 상피층, 선, 점막하 염증세포, 내피세포 등에서 관찰되며 in situ zymography상 효소의 활성도가 증가된 소견을 보였다. 본 연구에서도 MMP-9이 두 군 모두에서 측정되었으며, MMP-9이 비용종 형성에 염증 반응에 기여할 것으로 생각한다. MMP를 분비하는 세포의 종류는 호산구<sup>18</sup>, 비반세포<sup>22</sup>, 기도의 대식세포<sup>19</sup>, 내피세포<sup>23</sup>, 증성구<sup>24</sup> 등으로 알려져 있으며, MMP는 혈관내 콜라겐을 분해하여 세포가 혈관내로부터 조직으로 이동하는 과정에 관여한다고 알려져 있다. 비용종에서 가장 많은 세포가 호산구 및 비반세포인데 본 연구에서는 이들에서 분비되는 ECP, tryptase 및 MMP는 서로 양의 상관성이 있어, 호산구 및 비반세포의 이동에 ECP, tryptase 및 MMP가 관여할 가능성을 시사한다고 생각한다. 또한, MMP-9치는 두 군간에 유의한 차이는 없었으나, 제 I군에서

더 높은 경향을 보여, 제I군인 아스피린 과민성 환자의 비용종에서 발견되는 호산구 활성화와 관련이 있을 가능성을 시사한다.

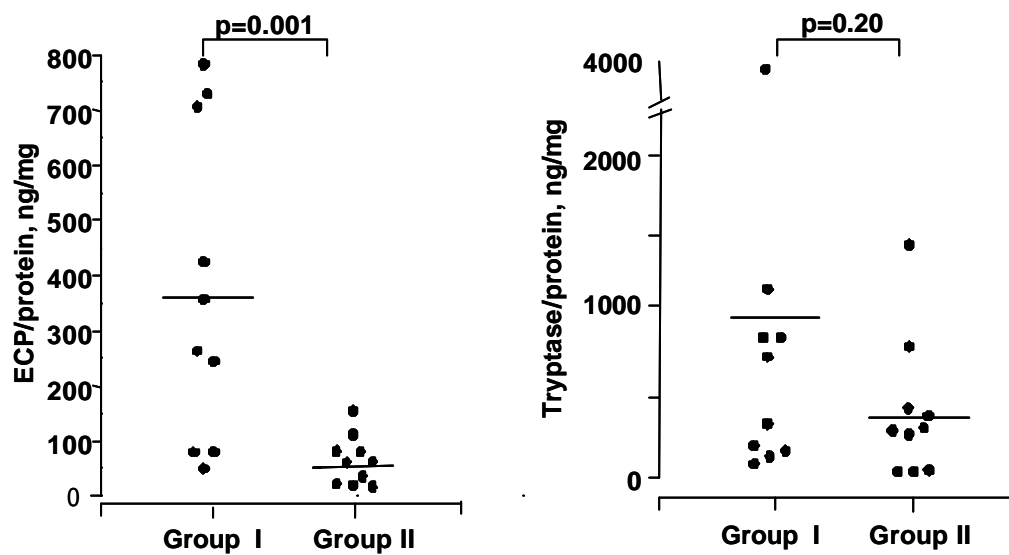
MMP와 MMP 억제제는 일정한 평형을 유지하며 이것은 MMP-9/TIMP-1비로 표시한다. 기관지천식 환자에서의 MMP-9/TIMP-1비는 중등증 내지 중증 천식 환자의 스테로이드에 대한 반응성과 상관관계가 있다는 보고가 있으며, MMP-9/TIMP-1비가 낮을수록 즉, TIMP-1이 증가될수록 스테로이드 전후의 FEV<sub>1</sub>의 호전이 적었으며, 연구자들은 TIMP-1이 기도 개형 및 섬유화에 중요한 역할을 한다고 주장한다.<sup>25</sup> 한편, Vignola등의 연구에서 기관지천식 환자의 기도 폐쇄의 원인은 기저막 두께의 증가 등 기도 구조의 변화에 의한 것으로써, MMP-9/TIMP-1비는 FEV<sub>1</sub>과 양의 상관관계를 가지며, 따라서 천식 환자에서 보이는 기관지의 구조변화에는 TIMP-1이 중요하게 작용한다고 하였다.<sup>26</sup> 비용종에서 MMP-9/TIMP-1비의 임상적 의의에 대해서는 보고되어 있지 않으나, 비용종도 기관지천식과 같은 만성 염증성 질환으로 염증세포의 침윤, 조직의 재형성 및 상피의 변화와 MMP-9와 TIMP-1의 증가가 보고되어 있어,<sup>3</sup> 비용종에서 염증세포 침윤의 개시 및 유지에 작용할 수 있다. 본 연구에서는 제 I군에서 MMP-9/TIMP-1비가 감소된 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았다. 제 I군과 제 II군을 비교했을 때 유병기간은 두 군간에 차이는 없지만, 일반적으로 제 II군에 비해 제 I군의 질병경과가 더 심한 것으로 알려져 있으므로<sup>27</sup> 이들 환자에서 TIMP-1의 증가 또는 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 천식에서와 같이 섬유화 과정 및 조직의 재형성과 관련이 있을 것으로 추측된다.

COX (cyclooxygenase)는 두 개의 isoform으로 존재하는데, COX-1은 위점막의 보호, 혈관 운동, 이온과 물의 항상성 등 체내 항상성에 관여하며, 대부분의 세포에서 생성된다. COX-2는 기저 상태에 있는 대부분의 세포에서 검출되지 않

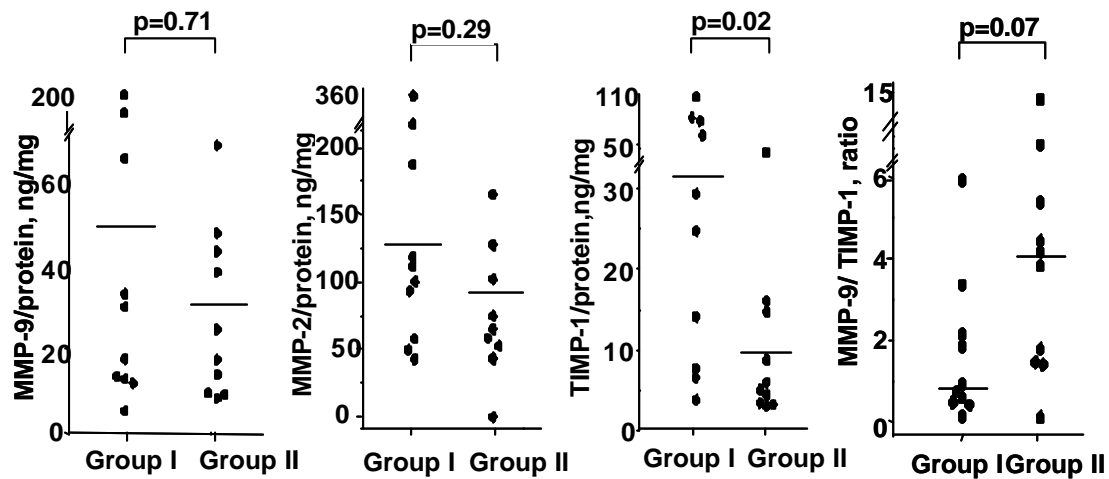
으며, 사이토카인, 성장인자, 염증 등 여러 종류의 자극에 의해 유도된다고 보고된다.<sup>28,29</sup> 한편, 비알레르기 비염종에서는 COX-2에 대한 면역조직화학검사상 상피세포, 점막세포, 내피세포 및 비반세포에 주로 분포한다는 보고가 있었으나 호산구와의 연관성에 대해서 아직 알려져 있지 않은 상태이다.<sup>30</sup> 또한, 최근의 한 연구에서 아스피린 과민성 비염 조직에서 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)로 측정된 COX-2 mRNA가 아스피린 내성 환자군과 비교시 그 측정치가 더 낮았다고 보고했다.<sup>9</sup> 아스피린 과민성의 기전으로 널리 인정받고 있는 이론은 COX의 억제에 따른 생화학적 현상들이다. 이에 대한 근거는 아스피린 과민성 환자에서 COX를 억제하는 진통제는 기관지 수축 반응을 일으키지만 이를 억제하지 않는 진통제는 이러한 현상을 일으키지 않는다.<sup>31</sup> 즉 아스피린이 아라키돈산 대사에서 COX경로를 차단함으로써 류코트리엔 생성 경로로 전환되거나 또는 류코트리엔 생성을 억제하는 PGE<sub>2</sub>를 제거함으로써 류코트리엔이 과잉 생산된다. 본 연구에서도 제 II군 10명중 5명에서 COX-2가 검출되었고, 제 I군에서 검출되지 않아, 이러한 COX-2의 발현의 감소 현상이 아스피린 과민성 천식 환자에서 동반된 비염 조직의 염증 반응에 관여할 가능성을 제시한다. 그러나, 아스피린 과민성 천식 환자의 기관지 조직을 면역조직화학검사로 COX-2에 대한 염색을 하였을 때, 정상군과 내성 천식 환자보다 COX-2로 염색된 비반세포 및 호산구 수가 각각 6배, 2.5배 증가된 보고 등이 있으므로, 이들 환자에서 COX-2의 역할에 대한 연구는 추후 더 필요할 것으로 판단된다.<sup>32</sup>

## V. 결 론

아스피린 과민성 천식 환자의 비용 조직에서 호산구 염증이 더 심하며, MMP-2와 MMP-9는 각각 ECP와 tryptase와 양의 상관관계가 있어 호산구 및 비만세포 염증 및 침윤에 관여할 것으로 생각된다. 또한, 아스피린 과민성 천식 환자의 비용 조직에서 TIMP-1의 증가 또는 MMP-9/TIMP-1의 불균형이 천식에서와 같이 섬유화 과정 및 조직의 재형성과 관련이 있을 것으로 생각한다. 이것은 두 군의 차이를 설명하는데 중요한 단서로 생각되며, 아스피린 과민성 환자에서 COX-2의 발현이 감소되어 병인 기전에 기여할 것으로 생각한다.

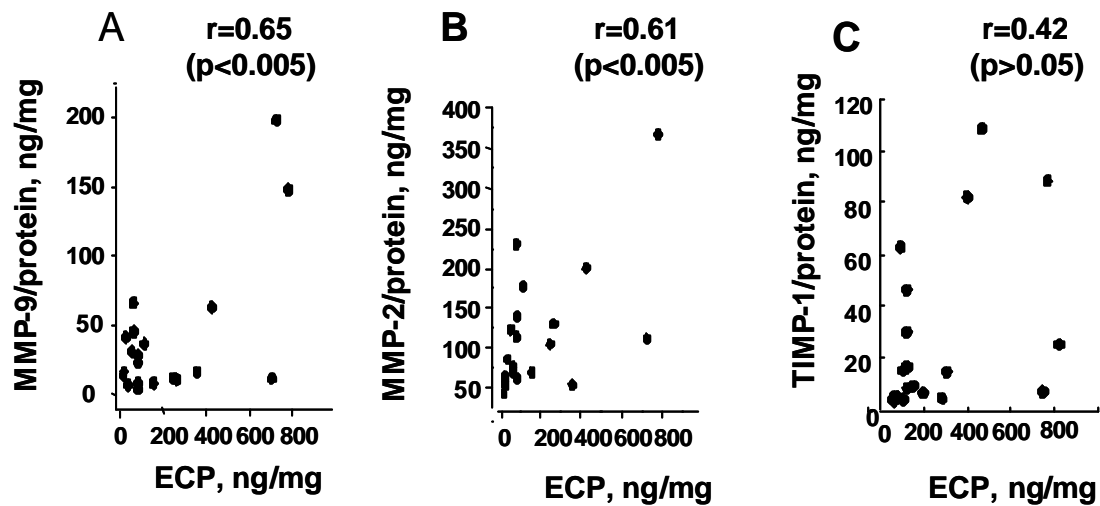


**Fig. 1. Comparison of ECP (eosinophil cationic protein) and tryptase levels in nasal polyp tissue homogenate between groups I and II. ECP levels were significantly higher and tryptase levels tended to be higher in group I patients. Horizontal bars indicate median values. Group I: aspirin-intolerant asthmatic patients, Group II: aspirin-tolerant asthmatic patients**

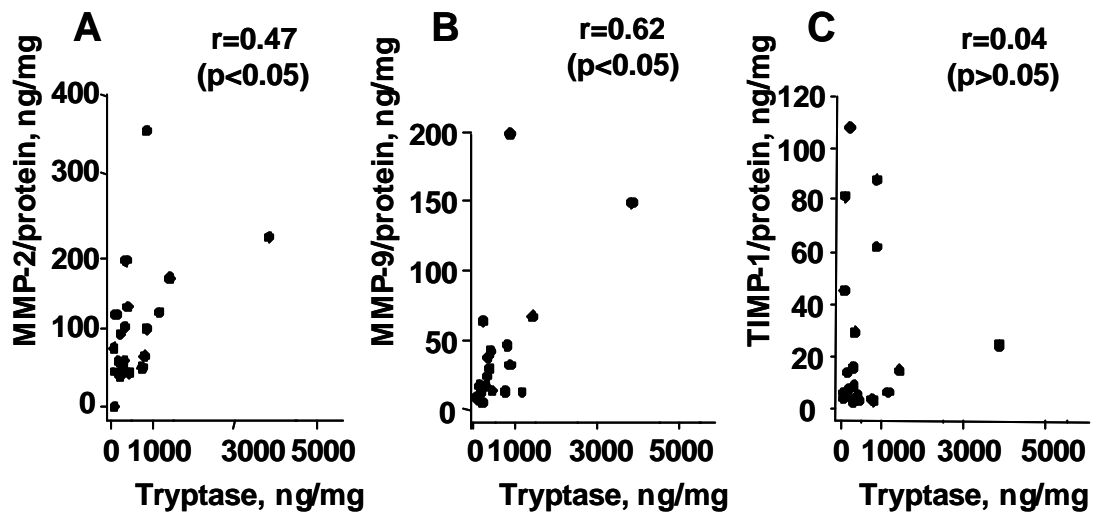


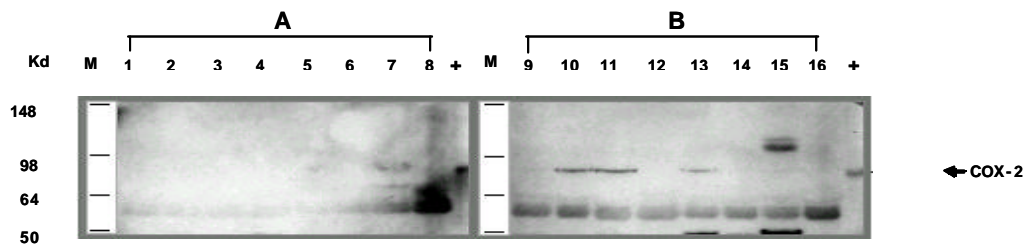
**Fig. 2. Comparison of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 levels and MMP-9/TIMP-1 ratios in nasal polyp tissue homogenate from patients with or without aspirin-intolerant asthma undergoing nasal polypectomy. Note the significantly higher levels of TIMP-1 in group I patients. MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 levels were measured by ELISA. Horizontal bars indicate median values. Group I: nasal polyp tissue from aspirin-intolerant asthmatic patients, Group II: nasal polyp tissue from aspirin-tolerant asthmatic patients**





**Fig. 3. Correlations between ECP, and MMP-9 (A), MMP-2 (B), and TIMP-1 (C) levels in nasal polyp tissue. Significant correlations were noted between ECP levels and MMP-2 and MMP-9 levels. ECP was measured by CAP system and MMP-2 and MMP-9 were measured by ELISA.**





**Fig. 5. IgG immunoblot of COX-2 in nasal polyp homogenates in groups I (A) and II (B). Notice that COX-2 is downexpressed in group I patients compared to group II patients. COX-2 was measured as described in materials and methods. Group I: aspirin-intolerant asthmatics, Group II: aspirin tolerant asthmatics**

**Table 1. Clinical characteristics of the study subjects**

	AIA (n=10)	ATA (n=10)	p-value
Age (yr)*	39.5 ± 11.6	40.3 ± 15.5	0.92
Gender (M/F)	9/1	5/5	0.06
Atopy (+/-)	2/6	2/8	0.81
Sx. duration(mo)	27	39	0.29
TIgE (IU/ml)†	474.0 ± 399.2	410.1 ± 85.3	0.83
FVC (pred%)	3.47 (93.5)	3.41 (93.7)	0.89
FEV1 (pred %)	2.48 (76.2)	2.84 (91.8)	0.52
FEF <sub>25-75%</sub> (pred%)	1.98 (51.6)	3.05 (79.3)	0.29

AIA : ASA-intolerant asthma ATA : ASA tolerant asthma

Sx. : nasal symptoms TIgE : total IgE

Atopy + : positive skin test for common aeroallergens

FVC: forced vital capacity

FEV1: forced expiratory volume in 1 sec.

FEF<sub>25-75%</sub>: forced expiratory flow in 25-75%

\* : Values are represented as mean ± S.D. † : mean ± S.E.M.

## 참 고 문 헌

1. Rowe-Jones JM. The link between the nose and the lung, perennial rhinitis and asthma-is it the same disease? *Allergy* 52(suppl 36):20-8,1997
2. Park HS, Nahm DH, Park K, Suh KS, Yim HE. Immunohistochemical characterization of cellular infiltrate in nasal polyp from aspirin-sensitive asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 81:219-24, 1998
3. Lechapt-Zalcman E, Coste A, d' Ortho MP, Frisdal E, Harf A, Lafuma C, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in nasal polyps. *J Pathol* 193:233-41, 2001
4. 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
5. Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:120-5, 1992
6. Wilhelm SM, Collier IE, Marmor BL, Eisen AZ, Grant GA, and Goldberg GI. SV-40 transformed human lung fibroblasts secrete a 92kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264:17213-21, 1989
7. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral*

Biol Med 4:197-250, 1993

8. Kikuchi K, Kubo M, Sato S, Fujimoto M, and Tamaki K. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 33:973-8, 1995
9. Picado C, Fernandez-Morata JC, Juam M, Roca-Ferrer J, Fuentes M, Xaubet A, et al. Cyclooxygenase-2 mRNA is downexpressed in nasal polyps from aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 160:291-6, 1999
10. Pleskow WW, Stevenson DD, Mathison DA. Aspirin-intolerant rhinosinusitis/asthma: spectrum of adverse reactions to aspirin. *J Allergy Clin Immunol* 71:574-9, 1993
11. Hamilos DL. Nasal polyps as immunoreactive tissue. *Allergy Asthma Proc* 7:17:293-6, 1996
12. Stoop AE, van der Hijden HAMD, Biewenga J, van der Baan S. Lymphocytes and non-lymphoid cells in human nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 87:470-5, 1991
13. Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, Vignaud JM. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology* 40:173-8, 2002
14. Keith PK, Conway M, Evans S, Wong DA, Jordana G, Pengelly D, et al. Nasal polyps: effects of seasonal allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 93:567-74, 1994
15. Składzien J, Nowogrodzka-Zagorska M, Obtulowicz K, Gawęik J.

- Wierzchowski W. Drug allergy among patients suffering from nasal polyps. *Przegl Lek* 58:975-8, 2001
16. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y, Iwata M, Noda Y, Takagi K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *J Asthma* 38:477-84, 2001
  17. Cataldo D, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, et al. MMP-2 and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and COPD. *Int Arch Allergy Immunol* 123:259-67, 2000
  18. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 104:983-90, 1999
  19. Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D, Bousquet J, Capony F. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 160:324-30, 1999
  20. Lee YC, Lee HB, Rhee YK, Song CH. The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. *Clin Exp Allergy* 31:1623-30, 2001
  21. Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 162:4212-9, 1999
  22. Baram D, Vadat GG, Salamon P, Drucker I, Hershkoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T

- cells: juxtacrine regulation by TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 167:4008-16, 2001
23. Partridge CA, Jeffrey JJ, Malik AB. A 96-kDa gelatinase induced by TNF- $\alpha$  contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am J Physiol* 265:L438-47, 1993
24. Kelly EAB, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 162:157-61, 2000
25. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J. 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 (2pt 1):356-63, 1999
26. Vignola AM, Hoccocono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellis 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
27. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. ALANE Investigators, European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J* 16:432-6, 2000
28. O' Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 330:156-60, 1993
29. Miller DB, Munster D, Wasvary JS, Simke JP, Peppard JV, Bowen BR,



- et al, The heterologous expression and characterization of human prostaglandin G/H synthase, *Biochem Biophys Comm* 201:356-62, 1994
30. Yun CB, Lee BH, Jang TJ. Expression of glucocorticoid receptors and cyclooxygenase-2 in nasal polyps from nonallergic patients, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111:61-7, 2002
31. Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma, *Eur Resp J* 3:588-93, 1990
32. Sousa A, Pfister R, Christie PE, Lane SJ, Nasser SM, Schmitz-Schumann M, et al. Enhanced expression of cyclo-oxygenase isoenzyme 2 (COX-2) in asthmatic airways and its cellular distribution in aspirin-sensitive asthma, *Thorax* 52:940-5, 1997

-ABSTRACT-

**Differences in the inflammatory reaction of nasal polyp homogenates  
between aspirin intolerant and tolerant asthma**

**Yu-Jin Suh**

**Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University  
(Supervised by Associate Professor Hae-Sim Park)**

**Background and objective:** Nasal polyps are frequently found in patients with aspirin intolerant asthma (AIA). Recently, matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) are thought to play a crucial role in airway inflammation and remodeling. Eosinophil and mast cell infiltration is a consistent finding in these polyps but few studies have studied the relationship between these cells and protease-antiprotease balance in the nasal polyp tissue of aspirin intolerant asthmatics. Our purpose was to compare the differences of eosinophil cationic protein (ECP), tryptase, MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 between aspirin intolerant and tolerant asthmatics (ATA) and also to evaluate the relationship with inflammation in nasal polyp homogenates.

**Materials and Methods:** Nasal polyp tissue homogenates from 10 AIA

subjects (group I) and 10 ATA subjects (group II) were compared. Inflammatory cell markers such as ECP and tryptase were measured by the CAP system (Pharmacia, Sweden). MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 levels were measured by ELISA (Biotrack, UK).

**Results:** ECP levels were significantly higher in group I ( $p < 0.05$ ) and tryptase levels tended to be higher in group I although it was not significant. 2) MMP-2, followed by MMP-9 and TIMP-1, was the predominant form in both groups. 3) TIMP-1 levels were significantly higher in group I than in group II ( $p < 0.05$ , respectively). MMP-9 levels tended to be higher in group I, although these differences were not significant ( $p > 0.05$ , respectively) and no significant differences were noted in MMP-2 levels between the two groups. 4) MMP-9/TIMP-1 ratio was significantly lower in group I than group II, and 5) there were significant correlations between ECP, and MMP-9 ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.05$ ), MMP-2 ( $r = 0.61$ ,  $p < 0.05$ ), and tryptase ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ), but not with TIMP-1. Significant correlations were also noted between tryptase, and MMP-2 ( $r = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ), and MMP-9 ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.05$ ), but not with TIMP-1. 6) COX-2 was detected in 5 of 10 patients with ATA as compared to none in patients with AIA.

**Conclusion:** Nasal polyps from AIA patients had more severe eosinophilic inflammation compared to ATA subjects. MMP-9 and especially MMP-2 may contribute to eosinophil and mast cell migration. COX-2 was only detected in ATA patients.

Key words: Nasal polyp, Matrix metalloproteinase, Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, Eosinophil cationic protein