



### 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](#)

의학 석사학위 논문

Toluene diisocyanate (TDI)-천식환자의  
유도객담에서 matrix metalloproteinase와  
tissue inhibitors of metalloproteinase의  
임상적 의의

아주대학교 대학원

의학과

정재욱

Toluene diisocyanate (TDI)-천식환자의  
유도객담에서 matrix metalloproteinase와  
tissue inhibitors of metalloproteinase의  
임상적 의의

지도교수 박 해 심

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2002년 8월

아주대학교 대학원

의학과

정 재 욱

정재욱의 의학 석사학위 논문을  
인준함.

심사위원장 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

아주대학교 대학원

2002년 6월 21일

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 바쁘신 와중에도 많은 지도와 조언을 주신 박해심 교수님과 이수영 교수님, 서창희 교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 그리고 옆에서 많은 충고와 도움을 주신 최정희 선생님, 서유진 선생님, 내과 의국원 여러분들에게 감사를 드립니다.

또한 저를 낳아 주시고 길러주신, 언제나 저를 사랑해 주신 부모님께 깊은 감사를 드립니다.

앞으로 더욱 정진할 것을 약속드리며 저를 관심있게 지켜보아 주시는 모든 분들에게 감사를 전합니다.

2002년 5월

저자 씀

-국문요약-

**Toluene diisocyanate (TDI)-천식 환자의 유도객담에서  
matrix metalloproteinase와 tissue inhibitors of  
matrix metalloproteinase의 임상적 의의**

**배경 및 목적 :** 최근 국내 연구들에 의하면 TDI-천식 환자는 진단 후 작업장에서 의 완전 회피 및 지속적인 항 염증제의 투여에도 불구하고 약 50%이상에서 지속적인 천식 증상을 호소하여, 예후가 불량한 것으로 알려져 있는데, 그 기전에 대해서는 확실히 밝혀지지 않았다. 이에 저자는 그 기전으로 TDI-천식 환자의 경우 초기에 기도 개형이 올 수 있다는 가정하에, 기도 개형을 구성하는 주요 효소 중의 하나인 MMP-9와 이의 억제효소인 TIMP-1의 변화를 유도객담내에서 비교 관찰하여, TDI 노출후 기도 수축 과정과 기도 개형에서의 MMP-9와 TIMP-1의 역할을 규명하고자 하였다.

**연구대상 및 방법 :** 19명의 TDI-천식 환자 (제 I군-초진 환자 8명, 제 II군-5년 이상 천식 증상을 호소하는 환자 11명)를 대상으로 하였다. 제 I군에서는 TDI 기도유발시험 전과 7시간 후에 각각 유도객담을 채취하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 MMP-9 및 TIMP-1 농도를 측정하여 비교 분석하였으며, 또한 이들을 I군과 II군 간에 비교하였다. 유도 객담내 MMP-9의 활성도는 zymography로 분석하였다.

**결과 :** TDI-천식 환자 제 I군의 TDI 기관지 유발시험 전과 7시간 후, 유도객담에서 MMP-9은 기관지 유발시험 전보다 후에 유의하게 증가하였으나 ( $p < 0.05$ ), TIMP-1 및 MMP-9/TIMP-1 비는 유발시험 7시간 후에 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. TDI-천식 환자 제 I군과 II군의 유도객담에서 MMP-9 및 MMP-9/TIMP-1 비는 제 II군이 제 I군에 비해 유의있게 높았으며 ( $p < 0.05$ ), 반면 TIMP-1은 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

Zymography 분석상 92 kD에 해당하는 proMMP-9 부위에 두 명의 제 I군 환자 중 두 명 모두에서 뚜렷한 밴드를 형성하였으며, 복합형 형태의 MMP-9도 관찰되었다. 또한 이들에서 위약 유발 검사 전후에 채취한 객담 결과는 현저한 변화가 없었으나, TDI 유발시험 후에 채취한 객담은 유발 시험 전에 비해 proMMP-9의 활성도가 현저하게 증가하였고, 한 환자의 경우 활성화된 밴드도 관찰되었다.

**결론 :** 이러한 결과들은 TDI 천식 환자에 있어서 TDI에 대한 노출은 MMP-9 생성을 유발하고, 결국 만성적인 천식 증상 및 TDI 천식의 기도 개형을 유발할 가능성을 시사하는 것으로 생각한다.

---

핵심되는 말 : TDI-천식, MMP-9, TIMP-1, 기도 개형, 유도객담

## 차 례

국문요약	1
차례	3
그림차례	4
표차례	5
I. 서론	7
II. 연구대상 및 방법	9
A. 연구대상	9
B. 방법	9
1. 메타콜린 및 TDI 기도유발시험	9
2. 객담 유도 및 처리	10
3. MMP-9 및 TIMP-1의 측정	11
4. Zymography	11
5. 통계 분석	12
III. 결과	13
A. 대상군의 임상적 특성	13
B. TDI-천식 환자 제 I군의 유도객담에서 TDI-기도유발시험 전후 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치의 측정	13
C. TDI-천식 환자 제 I, II군간 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치의 비교	13
D. 객담내 MMPs의 zymography 분석	14
IV. 고찰	15



V. 결론	.....	19
참고문헌	.....	24
영문요약	.....	31

## 그림 차례

Fig. 1. Changes of the levels of MMP-9 and TIMP-1 and MMP-9/TI  
-MP-1 ratio after TDI-bronchoprovocation in induced sputum of eight  
new TDI-induced asthma patients ..... 20

Fig. 2. Comparison of the levels of MMP-9 and TIMP-1 and MMP-9/  
TIMP-1 ratio in the induced sputum of new and chronic TDI-induced  
asthma patients ..... 21

Fig. 3. Changes of MMP-9 during toluene diisocyanate(TDI)-broncho  
-provocation in induced sputum of one control and two TDI-induced  
asthma patients by zymographic analysis ..... 22

## 표차례

Table. 1. Characteristics of the study subjects .....	23
---	----

## I. 서론

직업성천식의 빈도는 성인 천식의 2.9-13%로<sup>1,2</sup> 국내 성인 천식의 상당수가 직업성천식으로 알려져 있다. 국내에서도 수 십가지의 원인 물질이 보고되어 있는데, 이들중 isocyanate 화합물 중의 하나인 toluene diisocyanate(TDI)에 의한 직업성천식이 가장 흔하며, 이는 노출된 근로자의 13%까지 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>. 이들의 예후는 알레르기성 천식에 비해 불량하여, TDI에 의한 직업성천식의 경우 환자의 50% 이상에서 진단후 작업 전환을 통해 더 이상 노출되지 않고 항염증제를 포함한 적절한 약물 치료에도 불구하고 천식 증상이 지속되거나, 일부 증상이 호전후 더 이상 호전되지 않아 지속적인 천식 증상을 호소하고, 지속적인 천식 억제 투여를 요한다<sup>3</sup>. 이러한 사실은 TDI와 같은 반응성 물질에 의한 직업성천식의 경우 다른 흡입성 알레르겐에 비해 노출시 기도 개형(airway remodeling)이 빨리, 혹은 심하게 진행될 가능성을 추정할 수 있지만, 현재까지 TDI에 노출시 어떤 기전에 의해 기도 개형이 진행되며, 또한 이러한 현상과 예후와의 관련성에 대해서는 알려진 바 없다.

한편 지속적인 천식 증상은 기도 염증과 세포외 기질의 침착과 연관되어 있으며 이 과정은 matrix metalloproteinases(MMPs)와 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases(TIMPs)이 관여하는 것으로 알려져 있다. MMP중 천식의 염증에 주로 관여하는 것은 기저막의 IV형 콜라겐 및 세포외 기질의 proteoglycan을 주요 기질로 하는 gelatinase에 속하는 MMP-9이다<sup>4,5</sup>. 또한 최근의 여러 연구에 의하면 MMP-9은 기저막을 통한 호산구<sup>6</sup>, 림프구<sup>7</sup>, 및 중성구<sup>8</sup>등 염증 세포의 이동에 필수적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 골체조직 세포에서 분비되는

TIMP-1에 의하여 기능이 억제된다<sup>b</sup>.

이에 연자는 TDI-천식 환자에서 기도 개형 진행에 중요한 물질중의 하나로 여겨지는 MMP-9과 이의 억제인자인 TIMP-1의 생성을 관찰하여, 기도 염증 유발과 기도 개형 과정에서 MMP-9 과 TIMP-1의 역할을 규명하고자 하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### A. 연구대상

대상 환자군은 TDI에 의한 직업성천식으로 의심되어 아주대학병원 알레르기-면역내과로 의뢰되어 TDI-천식으로 확진된 초진자 8명(제 I군)과, 과거 진단후 5년 이상, 작업 전환을 통해서 원인물질로부터 완전 회피와 적절한 약물치료에도 불구하고 지속적으로 천식증상을 지닌 환자 11명(제 II군)을 대상으로 하였다. TDI에 의한 직업성천식의 확진은 저자들의 교실에서 보고한 방법대로<sup>4)</sup>, 뚜렷한 병력과 함께 작업장내 노출된 물질을 확인하고, 이들에서 혈청내 특이 항체 검사와 메타콜린 및 TDI를 이용한 기도유발시험, TDI 기도유발시험 전후 메타콜린-PC20 치의 변화, 유도 객담 검사내 염중세포, 작업전후의 최대호기류 측정(PEFR monitoring)을 통하여 확진하였다.

### B. 방법

#### 1. 메타콜린 및 TDI 기도유발시험

메타콜린과 TDI-기도유발시험은 저자들의 교실에서 보고했던 방법<sup>4)</sup>에 준하여 복용했던 약물을 24시간이상 중단한 후에 시행하였다. 특히 TDI-기도유발시험은 De Vilbiss 646 nebulizer(Debilbiss, Somerset, PA)로 생리식염수를 상시 호흡량

으로 10회 흡입하고 폐기능 검사를 시행하여 FEV<sub>1</sub>을 측정하여 이를 기저치로 하였다. 작은 밀폐된 방에서 TDI(80:20=2, 4-form: 2, 6-form, Aldrich, Milwaukee, WIS)를 5분에서 15분까지, 천식 증상이 나타날 때까지 흡입하도록 하였으며, 이때 유독 가스 측정기인 TDI-1(MDA Scientific, Jupiter, FL)로 측정 한 TDI의 농도는 20 ppb 이하였다. 흡입후 첫 1시간 동안은 10분마다 3회, 30분마다 1회 폐기능 검사를 시행하여 FEV<sub>1</sub> 치가 기저치에 비해 20%이상 감소하는 경우 양성 반응으로 판정하였다.

## 2. 객담 유도 및 처리

객담 유도전에 mini-Wright 최고유속측정기를 사용하여 최고호기유속을 측정한 후 Ventolin<sup>®</sup>을 200 µg 2회 흡입시켰다. 3% 고장성 식염수를 5분간 흡입시킨 후 객담 배출을 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 킁후 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% dithiothreitol을 혼합한 후, vortex를 사용하여 15초간 혼합하고 shaking water bath(37℃)에 20분간 배양하면서 가끔씩 vortex로 혼합하였다. 원심분리(1,500 rpm, 5분) 후 상층액을 분리하여 -20℃에 보관하여 MMP-9, TIMP-1 측정 실험에 사용하였으며 남아있는 세포압착결정은

상층액과 동량의 PBS(phosphatebuffered saline)를 넣고 다시 혼합하였다. 혼합물을 60  $\mu\text{m}$ 의 그물에 여과시켜 큰 부스러기등을 제거한 후 10  $\mu\text{l}$ 의 객담세포액을 동량의 0.4% trypan blue 용액과 혼합한 후 Neubauer counting chamber을 이용하여 전체세포수 및 세포 생존률을 측정하였다. 객담세포액을  $1 \times 10^6$  세포/ml 가 되도록 PBS에 희석한 후 100  $\mu\text{l}$ 를 취하여 450 rpm에서 6분간 원심침전시킨 후 Wright 염색하였다. 염색된 슬라이드는 대상자의 상태를 모르는 판독의로 하여 금 편평상피세포를 제외한 염증세포 400개 이상을 분별하여 계산하였다. 객담 세포성분 분석결과 세포생존률이 50% 이상이면서 편평상피세포가 전체세포의 40% 미만인 경우만을 대상에 포함하였다.

### 3. MMP-9 및 TIMP-1의 측정

객담내 MMP-9 및 TIMP-1은 ELISA kit(MMP9-BIOTRAK ELISA 및 TIMP-1-BIOTRAK ELISA; Amersham Int. plc, UK)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 비활성형, 활성형 또는 기질과 붙어있는 복합형의 MMP-9과 TIMP-1을 각각 측정하는 것으로 MMP-9의 측정 가능 최저 수준은 1 ng/ml 이었으며 TIMP-1의 측정 가능 최저수준은 3.13 ng/ml 이었다. 객담 희석에 따른 차이를 보정하기 위하여 Bradford법으로 측정한 객담내 단백질 양을 측정하여 그 비 (MMP-9/protein, TIMP-1/protein)를 비교하였다.

### 4. Zymography

Zymography를 이용하여 객담내 MMPs의 정상 및 활성도를 확인하였다. 약술하면 객담 상층액을 0.1% gelatin을 함유한 10% polyacrylamide gel에서 전기영동



을 시행하였다. 전기 영동후 2.7% Triton X-100 및 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)을 포함한 세척액으로 30분 간격으로 3번 세척하고, 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 및 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)가 포함된 배양액에서 배양시킨 후 0.5% Coomassie blue R-250, 30% methanol, 10% acetic acid가 포함된 염색액에서 4시간 염색한 후 탈염색하여 비교, 분석하였다.

## 5. 통계 분석

환자군과 대조군의 검사자료에 대한 통계분석은 SPSS version 10.0(Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL)을 이용하여 기술통계 분석, Mann-Whitney U-검정, Wilcoxon sign rank 검정 등을 시행하였고, 측정치는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

### III. 결 과

#### A. 대상군의 임상적 특성

TDI-천식 환자 19명 중 TDI-천식으로 진단된 초진 환자 8명인 제 I군과, 진단 후 5년 이상 작업 전환을 통해서 완전 회피와 적절한 약물치료에도 불구하고 지속적으로 천식 증상을 지닌 환자 11명의 제 II군간에 연령, 성별, 총 IgE치, 유도 객담 검사 당시의 폐기능 검사치를 비교한 결과 각각 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

#### B. TDI-천식 환자 제 I군의 유도 객담에서 TDI-기도유발시험 전후 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치의 비교

TDI-천식 환자 제 I군의 TDI 기관지 유발시험 전과 7시간 후, 유도객담에서 MMP-9은 기관지 유발시험 전( $93.3 \pm 33.8$  ng/mg) 보다 후( $181.0 \pm 23.2$  ng/mg)에 유의있게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 반면 TIMP-1 및 MMP-9/TIMP-1 비는 유발시험 7시간 후에 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

#### C. TDI-천식 환자 제 I, II군간 유도 객담에서 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치의 비교

TDI-천식 환자 제 I군과 II군의 유도객담에서 MMP-9는 제 II군에서  $200.5 \pm$

30.0 ng/mg, I군에서  $93.3 \pm 33.8$  ng/mg로 제 II군에서 I군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). MMP-9/TIMP-1 비는 제 II군이 I군에 비해 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 반면 TIMP-1은 두 군간에 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

#### D. 객담내 MMPs의 zymography 분석

Zymography 분석상 두 명의 제 I군 환자중 두 명 모두에서 TDI-provocation 후 92kD에 해당하는 proMMP-9 부위에 뚜렷한 밴드를 관찰하였으며, 복합형 형태의 MMP-9도 관찰되었다. 또한 이들에게서 위약 유발 검사 전후에 채취한 객담 결과(A)는 현저한 변화가 없었으나, TDI 유발시험 후에 채취한 객담은 유발 시험 전에 비해 proMMP-9의 활성도가 현저하게 증가하였고, 한 환자(B)의 경우 활성화된 밴드도 관찰되었다(Fig. 3).

## IV. 고찰

본 연구는 일반적인 천식에 비해 예후가 불량한 것으로 알려져 있는 TDI-천식 환자의 경우 조기에 기도 개형이 올 수 있다는 가정하에, 기도 개형의 주요 효소 중의 하나로 알려진 MMP-9과 이의 억제효소인 TIMP-1의 변화를 유도객담내에서 비교 관찰하여, TDI 노출후 기도 수축 과정과 기도 개형에서의 MMP-9과 TIMP-1의 역할을 규명하고자 하는 목적으로 시행하였다. 이에 본 연구에서는 TDI-기도유발시험 전후 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치를 측정하였고, 또한 초진 환자와 만성적인 TDI-천식 환자간 유도 객담에서 MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1 치를 측정하여 비교하였고, 객담내 MMPs의 성상을 관찰하기 위해 zymography 분석을 시행하였다.

기도의 만성 염증 질환인 천식은 염증 세포의 침윤을 특징으로 하며, 병리소견은 기저막 두께 증가가 특징이며 천식의 발병 기간 또는 중등도와 관계없이 대부분의 환자에서 나타난다<sup>11</sup>. 기저막의 변화는 실제 기저막의 두께 증가는 아니며 상피하 섬유화(subepithelial fibrosis) 과정에 의해 나타나며 기도 개형(remodeling) 과정의 일부로 이해된다. 그 병태생리에 대해서는 아직 완벽히 밝혀지지 않았으나 기도벽에 세포외 기질이 과다 축적된 결과로 파악되고 있으며, 그 과정에 단백 분해 효소가 중요하게 작용한다<sup>12</sup>. 즉 기도의 결체조직에서 분비되는 물질들에 의해서 점막하 조직에 세포외 기질이 채워지게 되며, 세포외 기질은 역동적인 구조로서 안정성을 유지하기 위해서는 기질 성분의 합성 및 분해과정의 평형이 요구된다<sup>13</sup>. 많은 단백 분해 효소들이 세포외 기질 구성 성분을 분해할 수 있으나 MMPs 및 TIMPs가 세포외 기질 분해과정에 참여하는 가장 생리

적인 효소로 추측되고 있다. 현재 천식은 MMP-9 및 그 억제제인 TIMP-1의 불균형에 의하여 특징적인 병리소견인 조직의 손상 및 기도 구조의 변화가 오는 것으로 이해되고 있다<sup>14,15</sup>.

기관지천식에서 MMP-9과 TIMP-1에 대한 연구는 염증의 병태생리 및 기도 구조변화 관점에서 활발히 이루어지고 있다. 증성구 및 기관지 상피세포에서 분비된 MMP-9에 의하여 급성 천식 발작에서 기관지 투과성이 증가되고 염증 반응이 악화되며<sup>16</sup>, 혈청내의 MMP-9과 TIMP-1의 비가 낮을수록 스테로이드를 포함하는 항염증치료에 잘 반응하지 않는 것으로 밝혀졌다<sup>17</sup>. 한편 subepithelial fibrosis 소견에 MMPs의 활성화 및 침착이 중요한 소견으로 알려져 있는데, 즉 천식 증상이 심하고 오래될수록 MMP, 특히 MMP-9의 증가 현상이 보고되어 있다<sup>18</sup>. 또한 항원 노출후 기관지폐포세척액내 MMP-9의 유의한 증가가 관찰되었으며<sup>19</sup>, 급성 발작후 증상이 악화되었을 때 객담내 MMP-9치와 MMP-9/TIMP-1 비가 유의하게 증가하였다가 치료후 감소되는 보고가 있다<sup>15</sup>. 또한 ovalbumin을 이용한 동물 천식 모델에서 MMP 억제제를 전처치하면 ovalbumin 흡입후 천식유발시 말초혈액에는 호산구 증다증이 심해지나, 폐 및 기도 조직으로 호산구를 비롯한 염증 세포의 침윤은 일어나지 않는다는 보고가 있다<sup>20</sup>. 이상의 결과로 미루어 MMP-9은 기관지천식 염증의 시작 및 유지 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

TDI에 의한 천식은 직업성천식의 가장 흔한 종류로 병인기전에 대해 아직 완전하게 밝혀져 있지 않지만, 환자의 기도 점막내 림프구, 호산구, 증성구 등의 침윤을 동반하는 기도 염증 반응<sup>21</sup>이 특징적이다. TDI를 이용한 이 등<sup>22</sup>의 동물 모델에서 TDI 흡입후 천식의 특징적인 병리소견과 함께 기도폐포세포액내 MMP-9치가 증가하며, MMP 억제제를 전처치하면 이러한 염증 반응이 소실된다고 하

였다. 이는 TDI 천식유발시 MMP-9 생성이 증가하며 이는 기도내 염증 반응의 시작 및 유지 과정에서 중요한 역할을 할 가능성을 제시한다. TDI-환자 제 1군에서 TDI-기도유발시험 전과 7시간 후, 유도객담에서 측정된 객담내 MMP-9 농도는 유의하게 증가하였고, TIMP-1 및 MMP-9/TIMP-1 비는 TDI-기도유발시험전보다 7시간 후에 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다. 이러한 결과를 통해 MMP-9은 TDI에 대한 폭로의 결과로 발생하였음을 알 수 있고, 추후 기도내 염증세포와의 연관성에 대한 연구가 추후 필요할 것으로 판단된다. 또한 TDI-천식 환자의 연구에서 중성구가 중요한 역할을 한다는 여러 보고가<sup>21,22</sup> 있으나, 어떠한 기전에 의해 염증 반응이 발생하는지에 대해서 알려진 바가 없다. 본 연구에서 시행한 zymography 결과를 살펴보면, 주로 proMMP-9에 속하는 92kD 부위에 젤라틴 분해 현상이 있으며 그외 일부에서 복합형 및 활성화형 MMP-9 형태로 나타났고, 또한 두 명의 제 I군 환자중 두 명 모두에서 TDI 유발시험 전에 비해 후에 proMMP-9가 증가하였고, 한 환자(B)의 경우 활성화된 형태의 밴드도 관찰되었다. 이는 객담내 gelatinase는 주로 gelatinase B에 해당하는 MMP-9임을 확인할 수 있었고, 또한 TDI 천식유발시 MMP-9 생성이 증가함을 시사한다.

TDI-천식은 알레르기성 천식에 비해 예후가 불량한 것으로 알려져 있고<sup>3</sup>, 이는 TDI와 같은 반응성 물질에 의한 직업성천식의 경우 기도 개형이 빨리, 혹은 심하게 진행될 가능성을 추정할 수 있다. 저자들의 교실에서<sup>24</sup> 일반 기관지천식 환자들과는 다른 환자군인 TDI-천식 환자들에서 기도 개형의 존재 유무와 정도를 조사한 결과, 대조군에 비해서 TDI-천식 환자군에서 상피하 기저막과 점막하 세포외 기질의 두께가 유의하게 증가되어 있는 기도 개형 소견을 확인하였다. TDI에 노출시 어떤 기전에 의해 기도 개형이 진행되는 지에 대해서는 알려진 바

가 없으나, 저자들의 교실에서 TGF  $\beta$ 1이 병태 생리에 기여할 가능성을 보고하였다<sup>24</sup>. 또한 본 연구에서는 TDI-천식 환자 제 I군과 II군의 유도 객담에서 MMP-9 및 MMP-9/TIMP-1 비는 제 II군이 I군에 비해 유의있게 높았으며, 반면 TIMP-1은 두 군간에 유의한 차이는 없었다. 이는 지속적인 천식 증상을 호소하는 제 II군이 I군에 비해서 기도 개형의 정도가 더 심할 것으로 예측되며 이에 MMP-9이 관여할 것으로 생각한다.

유도객담 검사는 기도 조직내에서 발생하는 기도 개형의 과정을 연구하는 데 간접적인 방법이다. 그러나, 기도 개형은 만성적인 염증과정으로 기도 내강뿐 아니라 기도 조직내 세포에서도 나타난다고 생각된다. 지속적인 심한 기도 조직의 파괴와 기도 개형이 특징인 폐기종에서 폐포내 대식세포가 대조군에 비해 더 많은 MMP와 gelatinase B를 분비하고<sup>25</sup>, 모든 폐포 기질의 구성 성분을 파괴하며, 또한 폐포내 대식세포는 천식과 만성기관지염 환자군에서 대조군에 비해 더 많은 TGF  $\beta$ -1, fibronectin, MMP-9을 분비한다는 보고가 있다<sup>26,27</sup>. 이러한 결과는 기도 내강내에 위치하는 세포가 세포외 기질의 구조변화에 관여할 수 있고, 또한 기관지조직내에서 발생하는 염증 및 기도 개형 과정에 관여할 수 있음을 시사한다. 최근 여러 보고에 의하면 기관지폐포세척액처럼 유도객담 또한 기도 염증 반응 및 기도 개형을 연구하기 위해 시행되는 표준화된 검사 방법이다<sup>28,29</sup>. 본 연구는 유도객담 검사를 이용하여 객담 검체를 얻었고, ELISA 방법으로 객담 내 MMP-9과 TIMP-1의 농도를 측정하였다.

본 연구 결과는 TDI 천식 환자에 있어서 완전 회피 및 지속적인 항염증제의 투여에도 불구하고 만성적인 천식 증상을 호소하는 환자들의 병태생리에 MMP-9이 관여할 가능성을 시사하는 것으로 생각되며, 만성적인 기도의 염증 상태를 초래하는 보다 상세한 기전에 대한 추후 연구를 필요로 한다.

## V. 결론

TDI 천식 환자에 있어서 TDI에 대한 노출은 MMP-9 생성을 유발하고, 결국 만성적인 천식 증상 및 TDI 천식의 기도 개형을 유발할 가능성을 시사한다.



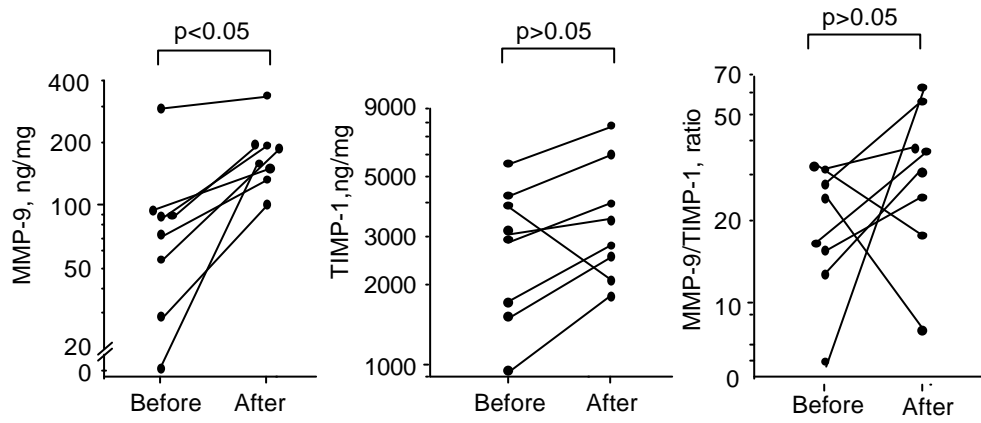


Fig. 1. Changes of the levels of MMP-9 and TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio after TDI-bronchoprovocation test in induced sputum of eight new TDI-induced asthma patients

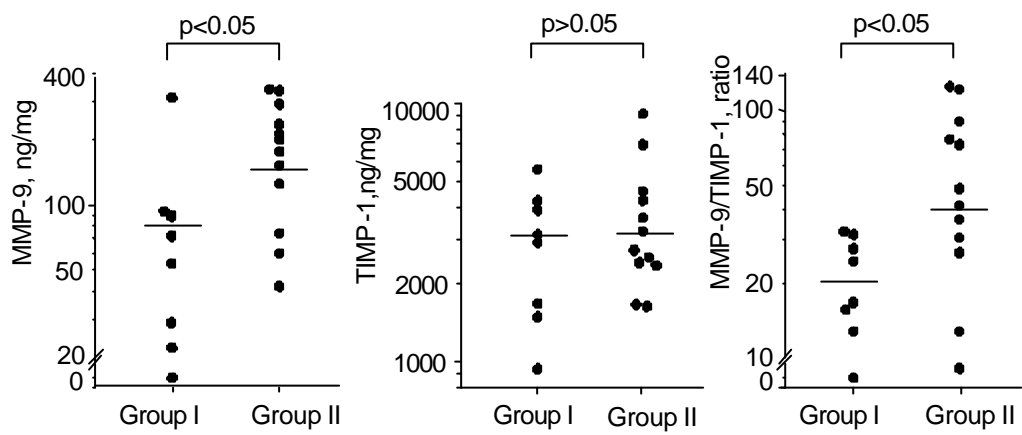


Fig. 2. Comparison of the levels MMP-9 and TIMP-1 and MMP-9/TIMP-1 ratio in induced sputum of new and chronic TDI-induced asthma patients  
 Group I : newly diagnosed TDI-asthma patients  
 Group II: TDI-asthma patients with persistent asthma symptoms for more than 5 years

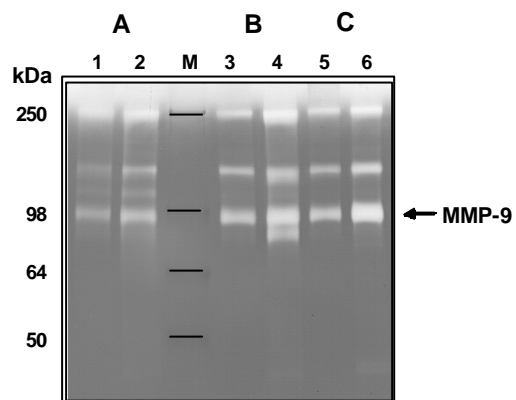


Fig. 3. Changes of MMP-9 during toluene diisocyanate(TDI)-bronchoprovocation test(BPT) in induced sputum of one control and two TDI-induced asthma patients(B-C) by zymographic analysis

lane 1 : before placebo-BPT, lane 2 : after placebo-BPT, M : standard marker  
 lane 3, 5 : before TDI-BPT , lane 4,6 : after TDI-BPT

Table 1. Characteristics of the study subjects\*

	Group I (n=8)	Group II (n=11)
Age (yr)	39.4 ± 3.3	45.0 ± 1.5
Sex (M : F)	5 : 3	4 : 7
Symptom duration (yr)	2.6 ± 0.6	8.0 ± 0.7
Total IgE (IU/ml)	231.0 ± 75.5	258.8 ± 106.1
FEV1 (%)	101.0 ± 6.2	80.0 ± 5.9

\* : All value were present as mean ± S.E.

## 참고문헌

1. Park HS, Park JN, KIM JW, KIM SK: Clinical and immunological evaluation of isocyanate-exposed workers, *J Kor Sci* 7:122-7, 1992
2. Kim YY, Cho H, Yoon HJ, Min KU, Back DM, Jung KC: Isocyanate-induced occupational asthma in Korea, *Korean J Int Med* 47:439-53, 1994
3. Park HS, Nahm DH: Prognostic factors for toluene diisocyanate-induced occupational asthma after removal from exposure, *Clin Exp Allergy* 27:1145-50, 1997
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 J, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM: Migration of eosinophils through basement membrane componets in vitro: role of

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. Declaux 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. 김희연, 서정희, 남동호, 박해심, 손지웅, 김유영: Toluene diisocyanate (TDI)에 의한 직업성 천식에서 TDI-인혈청 알부민 접합체에 대한 특이 IgG 및 IgE 항체의 임상적 의의. 천식 및 알레르기 19:594-600, 1999
10. Park HS, Kim HY, Nahm DH, Son JW, Kim YY: Specific IgG, but not specific IgE, antibodies to toluene diisocyanate-human serum albumin conjugate associated with TDI bronchoprovocation test results. J Allergy Clin Immunol 104:847-51, 1999

11. Roche WR, Beasley R, William JH, Holgate ST: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1:520-3, 1989
12. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White P, Godard P, Michel FB: Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 47:3-11, 1992
13. Delacourt C, Bourgeois ML, D'Ortho MP, Doit C, Sheinmann 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* 154:346-52, 1996
14. 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
15. 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

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 metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 159:596-602, 1999
18. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanea P, Bellia V et al: Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airway obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1945-50, 1998
19. Kelly EAB, Busse WW, Jarjour NN: Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1157-61, 2000



20. 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
21. Mapp CE, Boschetto P, Zocca E, Milani G, Pivrotto F, Dal Vecchio A et al: Pathogenesis of late asthmatic reactions induced by exposure to isocyanates. *Bull Eur Physiopathol Respir* 80:261-7, 1987
22. Lee YC, Song CH, Lee HB, Oh JL, Rhee YK, Park HS, Koh GY: A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 108:1021-6, 2001
23. Park HS, Jung KS, Kim HY, Nahm DH, Kang KR: Neutrophil activation following TDI bronchial challenges to the airway secretion from subjects with TDI-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 29:1395-401, 1998
24. 이수결, 이선민, 함기백, 임현이, 김선신, 남동호, 박해심: Toluene diisocyanate(TDI)에 의한 천식 환자에서 transforming growth factor

$\beta 1$ (TGF  $\beta 1$ )과 TGF  $\beta$  receptor II (R II)의 발현 정도와 지속적인 천식 증상과의 관계. 대한내과학회지 61:623-633, 2001

25. Finlay G, Russell K, McMahon K, D'arcy E, Masterson J, FitzGerald M, O'Connor C: Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchial alveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*, 52:502-506, 1997
26. Mautino G, Oliver N, Chanez P, Bousquet J, Capony F: Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchial alveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17:583-591, 1997
27. Vignola A, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, Bonsignore G: Release of transforming growth factor- $\beta$  and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol*, 106:114-119, 1996
28. Fahy J, Steiger D, Liu J, Basbaum B, Finkbeiner W, Boushey H: Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*.

147:1132-1137, 1993

29. Hargreave F, Popov E, Kidney J, Dolovich J: Sputum measurements to assess airway inflammation in asthma. *Allergy*, 48:81-83, 1999

**-Abstract-**

**Clinical significance of matrix metalloproteinase and  
tissue inhibitor of matrix metalloproteinase  
in the induced sputum of TDI-asthma**

**Jae-Wook Chung**

**Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University**

**(Supervised by Associate Professor Hae-Sim Park)**

**Introduction** : Previous studies showed that over 50% of TDI-asthma patients had persistent asthma symptoms despite complete avoidance and anti-asthmatic medications. Persistent asthma symptoms are associated with airway inflammation and deposition of extracellular matrix which may be mediated by matrix metalloproteinases(MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). We performed this study to investigate the role of TDI exposure in

the induction of MMPs and TIMP-1 in airway secretion of TDI-induced asthma.

**Materials and Methods :** We measured the concentrations of MMP-9 and its tissue inhibitor, TIMP-1, in induced sputum which was collected before and 7 hours after TDI challenges in 19 subjects with TDI-induced asthma (group I: 8 newly diagnosed patients, group II: 11 patients with persistent asthma symptoms for more than 5 years after diagnosis). MMP-9 and TIMP-1 levels in sputum were measured by ELISA. We performed zymographic analysis to identify the MMP-9 activity in induced sputum of two of group I patients.

**Results :** MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels were significantly increased after TDI challenge ( $p < 0.05$ ). The TIMP-1 level in sputum tended to increase after TDI challenges, but no statistical significance was noted. MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels in sputum were significantly higher in group II than in group I ( $p < 0.05$ ) with no significant differences in TIMP-1 level between two groups. Zymography revealed bands in the 92kDa region in two patients. ProMMP-9 activity increased after TDI challenges in two patients with no changes after placebo challenge.

**Conclusion** : TDI exposure leads to generation of MMP-9 which may then lead to persistent asthma symptoms and airway remodelling in TDI-asthma.

---

Key words : TDI-induced asthma, MMP-9, TIMP-1, airway remodelling,  
induced sputum