

# 뉴우모시스티스 카리니 폐렴에서 폐포상피세포와 뉴우모시스티스 카리니의 상호반응에 관련된 Fibronectin, Vitronectin 및 Surfactant-A, D의 발현

계명대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>내과학교실

권 건 영·전 영 준<sup>1</sup>·장 은 숙

## Expression of Fibronectin, Vitronectin, Surfactant-A and D in Interaction of *Pneumocystis carinii* and Alveolar Epithelial Cells in *Pneumocystis carinii* Pneumonia

Kun Young Kwon, Young June Jeon<sup>1</sup>, and Eun Sook Chang

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine  
Taegu 700-712, Korea

Both fibronectin and vitronectin bind to *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) and mediate the attachment of the organisms to respiratory epithelial cells. Surfactant A and D play a role in the interaction between *P. carinii* and host cells. In this study we examined the expression of fibronectin, vitronectin, surfactant-A and D in the interaction between *P. carinii* and alveolar epithelial cells by immunohistochemistry and pre-embedding immunoelectron microscopy. The experimental rat model of *P. carinii* pneumonia was induced by administration of low protein diet (8%) and drinking water containing dexamethasone (2 mg/liter) for 6 to 8 weeks. The primary antibodies for light and electron microscopic immunohistochemistries were monoclonal antibodies including fibronectin (1 : 100) and vitronectin (1 : 100), and polyclonal antibodies including surfactant A (1 : 50) and D (1 : 50), respectively. Light microscopic immunohistochemistry for the fibronectin, vitronectin, surfactant-A and D showed strong expressions on the *P. carinii* and surface linings of type I alveolar epithelial cells. The electron microscopic immunohistochemistry of the fibronectin and vitronectin showed a strong immuno-expression along the surface pellicles and tubular extensions of *P. carinii* trophozoites, and surface membranes of the type I epithelial cells. The surfactant-A and D proteins showed a strong expression on the pellicles of *P. carinii* and surface membranes of the type I epithelial cells, but a weak expression on the free-floating surfactant materials. In conclusions, the trophozoites of *P. carinii* were mostly attached to type I epithelial cells. The fibronectin, vitronectin, surfactant-A and D were strongly expressed, and played an enhancing role in the binding between the *P. carinii* organisms and the type I alveolar epithelial cells. (Korean J Pathol 2000; 34: 625~635)

**Key Words:** *Pneumocystis carinii*, Type I epithelial cells, Fibronectin, Vitronectin, Surfactant-A and D

접수: 2000년 5월 27일, 게재승인: 2000년 8월 3일

주 소: 대구시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-712

계명대학교 의과대학 병리학교실, 권건영

E-mail: k19156ky@dsmc.or.kr

\* 본 연구는 1998년 한국학술진흥재단 학술연구비의 지원으로 이루어졌음.

ISSN : 0379-1149

## 서 론

뉴우모시스티스 카리니(*P. carinii*) 폐렴은 후천성면역 결핍증후군과 악성종양을 가진 환자에서 호발하며, 기관 이식을 받거나 각종 만성 염증성 질환을 가진 환자에 대해 면역억제요법을 장기간 사용할 경우 폐장에 기회 감염으로 초래된다.<sup>1,2</sup> 후천성면역결핍증후군 환자에

서 합병증으로 초래되는 *P. carinii* 폐렴의 발병기전이나 진단 및 치료에 대해서는 많은 연구가 보고되어 있으며, *P. carinii* 폐렴으로 인한 사망률도 15% 정도로 낮아지게 되었다.<sup>1,3~6</sup> 그러나 후천성면역결핍증후군을 제외한 각종 암 환자, 기관 이식술을 시행한 환자, 그리고 항생제 및 면역요법제를 장기간 투여한 환자 등에서 발생하는 *P. carinii* 폐렴에 의한 사망률은 아직도 40~50%에 이르며 이에 대한 대책 마련이 요구되고 있다.<sup>2</sup>

*P. carinii*가 인체 내에서 폐렴을 야기시키는 기전은 대단히 복잡한 과정을 거치게 되어 아직도 그 발병기전이 완전히 밝혀져 있지 않다. *P. carinii*는 폐포 내에서 잘 자라나 배양하기는 매우 힘들어 이 병원체의 주된 생물학적 특성을 연구하는 데 많은 어려움이 있다. 최근 *P. carinii*에 대한 주된 연구 방향은 숙주와 병원체 간의 복잡한 반응기전을 규명하는 데 있다.<sup>7,8~12</sup> *P. carinii*가 인체에 감염될 경우 대부분 I형 폐포상피세포에 부착하여 병원체의 증식이 활발히 일어나거나 I형 폐포상피세포의 생활주기는 억제되면서, 손상을 초래하는데 이러한 양상은 면역학적 및 전자현미경적 연구와 조직배양 실험 등을 통하여 보고되어 있다.<sup>3,7,13</sup> 그리고 폐포강에 존재하는 세포간 접착물질, 면역글로불린, fibrinogen 및 surfactant 단백 물질이 숙주의 I형 폐포상피세포와 뉴우모시스티스 카리니의 상호반응에 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>7,14,15</sup>

*P. carinii*와 숙주의 상호반응 중 *P. carinii*에 대한 폐포대식세포의 방어 기전에 관해서는 활발히 연구되어 왔으나<sup>8,12,16</sup> *P. carinii*와 폐포상피세포 사이의 상호작용의 기전에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 특히 *P. carinii*가 대부분 I형 폐포상피세포와 결합하는 기전 및 형태학적 특징에 대한 기술이나, *P. carinii*와 폐포상피세포의 상호작용에 조절 역할을 하는 물질의 형태학적 발현에 대해서는 문헌상에 거의 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *P. carinii* 병원체가 숙주의 폐포상피세포에 부착하는 양상에 대해서 중점을 두면서, 투과 및 주사전자현미경적으로 *P. carinii* 병원체가 폐포상피세포에 부착할 때의 형태학적 변화를 자세히 관찰하고자 한다. 그리고 *P. carinii*와 폐포상피세포와의 부착 과정에 중요 역할을 할 것으로 알려진 fibronectin, vitronectin 및 surfactant A, D의 일차항체를 사용하여 면역조직화학 및 면역전자현미경적 검색을 통해 이들 물질의 발현 양상과 위치를 알아보기 위해 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

1) 실험동물: 체중 200~250 g의 Sprague-Dawley종 흰쥐 50마리를 사용하여 대조군 및 *P. carinii* 폐렴의 실험군 재료로 사용하였다.

(1) 대조군: 정상식을 제공하고 아무런 처치를 하지

않는 군 (5마리)

(2) 실험군: 저단백식 (8%)을 투여하면서 텍사메타손 (2 mg/liter)을 물에 혼합하여 매일 투여하고 6~8주 경과한 군 (45마리). 이들 중 기관지폐포 세척검사나 폐조직 검색에서 *P. carinii*를 확인한 흰쥐 20마리를 선택하여 관찰 방법에 따라 다음과 같이 세분하였다.

I군: 폐장조직을 적출한 후 광학현미경, 투과 및 주사전자현미경으로 관찰한 군 (10마리)

II군: 단클론 및 다클론 일차항체를 사용하여 면역조직화학 검색과 면역투과전자현미경 검색을 실시한 군 (10마리)

2) 단클론 및 다클론 일차항체: *P. carinii*와 폐포상피세포의 상호작용에 관여하는 것으로 알려진 폐포 내 물질인 fibronectin과 vitronectin에 대한 발현 양상을 보기 위해 단클론항체인 fibronectin (NCL-FIB, Novocastra, UK)과 vitronectin (MAB 1945, Chemicon INC, USA)을 사용하였다. II형 폐포상피세포에서 분비하는 surfactant 단백 물질이 *P. carinii*와 폐포상피세포의 상호작용에 있어서 발현하는 양상 및 역할을 알아보기 위해 다클론항체인 surfactant-A (AB3030, Chemicon INC, USA)와 Surfactant-D (SP-D, Thoracic Research Laboratory, Mayo Foundation, USA)를 사용하여 면역조직화학 검색 및 면역투과전자현미경 검색을 실시하였다.

3) *P. carinii* 폐렴의 실험적 모델: Sprague-Dawley 종 흰쥐 45마리에 저단백식과 텍사메타손을 매일 투여하여 6~8주간 지속하였다. 이들 중 몸무게가 현저히 감소하고 육안적으로 여위며 병색이 뚜렷하다고 판단되는 흰쥐부터 도살하여 기관지폐포세척액을 채취하여 Diff-Quik 및 GMS 염색을 하거나, 채취한 폐조직을 HE 및 GMS 염색을 하여 *P. carinii*가 다수 확인되는 흰쥐를 실험군으로 사용하였다. 실험 도중 세균 감염을 방지하기 위하여 테트라사이클린 (500 mg/liter)을, 진균 감염을 방지하기 위해 니스타틴 (200,000 U/liter)을 마시는 물에 각각 녹여 투여하였다. *P. carinii* 폐렴의 실험적 모델을 만드는 과정에서 20마리는 도중에 사망하여 실험 재료에서 제외하였다. 그리고 5마리는 도살하여 실시한 조직 검색에서 비특이적 감염을 보일 뿐 *P. carinii*의 존재가 확실하지 않아서 제외하였고, 나머지 흰쥐 20마리에서 기관지폐포세척액 혹은 광학현미경 검색에서 *P. carinii*를 확인할 수 있었다.

### 2. 방법

1) 투과전자현미경 관찰: 투과전자현미경용으로 제공된 폐장조직을 1 mm<sup>3</sup> 크기로 세절하여 폐포 내의 공기를 탈기방법으로 제거한 후 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간동안 전고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액에서 2시간동안 후고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척한 후 계열 에탄올로 탈수를 하였다. Propylene oxide로 치환한 후, epon 혼합물로 포매

하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하고 toluidine blue 염색을 하여 광학현미경상에서 관찰할 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에서 40~60 nm 두께의 회백색을 나타내는 초박절편을 얻어서 동 grid에 부착하여 Watson<sup>17</sup> 및 Reynolds<sup>18</sup> 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

**2) 주사전자현미경 관찰:** 흰쥐를 앙와위로 고정시킨 후 정중선을 따라 개복한 후 하대정맥에 cannula (18 G polyethylene tube)를 넣어 생리식염수를 주입하면서 흉부대동맥을 절개하여 폐장 혈관내의 혈액을 모두 제거하였다. 혈액이 제거된 혈관 내로 0.5% glutaraldehyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 고정액을 사용하여 관류를 통해 고정시킨 후 폐장을 절취하여 1×1×4 mm 정도 크기로 세절한 후 같은 고정액에 넣어 1일간 더 고정한 후 1% OsO<sub>4</sub> 용액으로 2시간 동안 후고정을 하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세한 다음 25% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 30분간, 50% DMSO에 30분간 담근 다음 액체질소로 동결한 후 조직을 할단(cracking)하였다. 할단된 조직을 50% DMSO에 녹여 수세 후 2% tannic acid에 침투시킨 다음 1% OsO<sub>4</sub> 용액으로 전도염색을 하였다. 계열 에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로 침투를 시킨 후 임계점 건조를 실시하고 이온증착기 (IB-3 Ion-coater, Eiko Co., Japan)를 사용하여 Pt-Pd로 증착한 후 Hitachi S-4200형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

**3) 면역조직화학 검색:** 채취한 폐장조직에서 5 μm 두께로 파라핀 절편을 만들어 2% 3-Aminopropyl-Triethoxysilane으로 처리한 유리슬라이드에 부착시키고 xylene과 계열알코올을 사용하여 탈파라핀과 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위하여 30% 과산화수소 1 ml에 메탄올 99 ml를 혼합하여 만든 용액에서 30 분간 처리하고 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세하였다. 조직 항원이 잘 노출될 수 있도록 조직절편을 단백분해효소인 0.4% pepsin으로 37°C에서 1시간 동안 방치시킨 후 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세하였다. 일차항체인 fibronectin (1 : 100), vitronectin (1 : 100), surfactant-A (1 : 50) 및 surfactant-D (1 : 50)를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 인산염 완충용액으로 수세하였다. 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite Kit, USA)를 사용하여 37°C에서 30분간 방치한 후 인산염 완충용액으로 수세하고, avidin-biotin 혼합용액(ABC Elite Kit, Vector, USA)으로 37°C에서 30분간 작용시켰다. DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 사용하여 10분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하고 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

**4) 전포매법에 의한 면역전자현미경 검색:** 폐조직을

4×4×1 mm 크기로 세절하여 periodate lysine paraformaldehyde 용액으로 냉장 상태 (10°C 이하)에서 5시간 고정한 후 계열 sucrose/PBS 용액 (10%, 15%, 20%)으로 순서대로 세척하였다. 드라이아이스와 아세톤을 혼합한 용액이 든 용기 내에서 OCT로 포매한 폐조직을 넣어 급격히 냉동 (-80°C)시킨 후 parafilm으로 단단히 싸서 공기를 차단하여 냉동실 (-70°C 이하)에서 보관하였다. OCT로 포매된 냉동 폐조직을 꺼내어 Cryostat에 장착하여 9 μm 두께로 세절한 후 silane이 덮힌 슬라이드에 부착하였다. 30분 정도 실온에서 방치하고 10% sucrose/PBS로 충분히 씻은 후 5% 정상 흰쥐혈청으로 작용시켜 비특이성 반응을 차단시켰다. 일차항체인 fibronectin, vitronectin 및 surfactant-A를 사용하여 4°C의 습한 용기 내에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 10% sucrose/PBS로 수세한 후 0.5% glutaraldehyde로 고정하고, 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite Kit, USA)를 사용하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 0.1 M 인산염 완충용액으로 수세하고, avidin-biotin 혼합용액 (ABC Elite Kit, Vector, USA)으로 37°C에서 30분간 작용시켰다. 10% sucrose/PBS로 수세하고 DAB를 사용하여 10분간 실온에서 발색시킨 후 10% sucrose/PBS로 수세하였다. 2% osmium teroxide로 후고정한 후 계열 에탄올로 완전히 탈수하고 epon으로 역위포매하여 60°C에서 3일간 중합반응을 시켰다. Silane으로 처리한 슬라이드에서 epon 블록을 뗀 다음 관찰할 부위를 선택한 후 나머지부분을 trimming하고 Sorvall MT 5000형 초박절기를 사용하여 100 nm 두께로 초박절하여 동 grid에 올린 다음 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 투과전자현미경 소견

*P. carinii* 영양형의 세포막이 I형 폐포상피세포 형질막과 직접 밀착하거나 영양형의 관상연장 (tubular expansions)이 I형 폐포상피세포 형질막과 밀착 또는 세포질 내로 침투하는 양상을 보였다 (Fig. 1). *P. carinii*가 부착한 I형 폐포상피세포의 세포질 및 세포소기관에는 다양한 정도의 손상과 파괴를 보였으며, 때때로 *P. carinii* 영양형이 폐포상피세포 내로 깊숙히 침투한 소견도 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). I형 폐포상피세포에 부착한 *P. carinii*의 영양형은 그 형태가 매우 불규칙하면서 여러 개의 영양형이 I형 폐포상피세포 표면에 일렬로 배열되어 부착하였고, 폐포강에 위치한 포낭과 함께 활발한 증식 양상을 보였다. II형 폐포상피세포에서는 *P. carinii*의 포낭 또는 영양형의 부착을 볼 수 없었으며, II형 폐포상피세포의 표면에 미세융모가 잘 보존되어 있었다. *P. carinii*의 포낭(cyst)은 대부분 폐포강에 존재하였으며, I형 폐포상피세포와 부착하는 소견은 쉽게 관찰할 수 없었다.

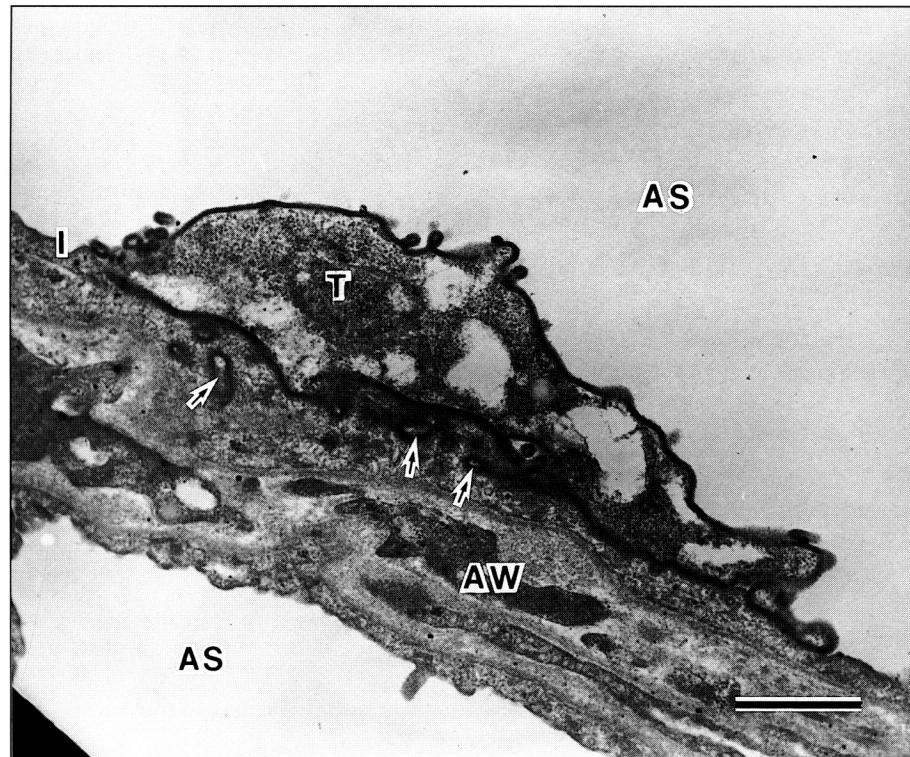


Fig. 1. Transmission electron micrograph shows a trophozoite of *P. carinii* which attached firmly to type I alveolar epithelial cell. Some tubular extensions are infiltrated into the cytoplasm of the alveolar epithelial cell (arrows). AS: alveolar space, AW: alveolar wall, I: type I epithelial cell, T: trophozoite of *P. carinii*. Bar=1  $\mu$ m,  $\times 18,000$ .

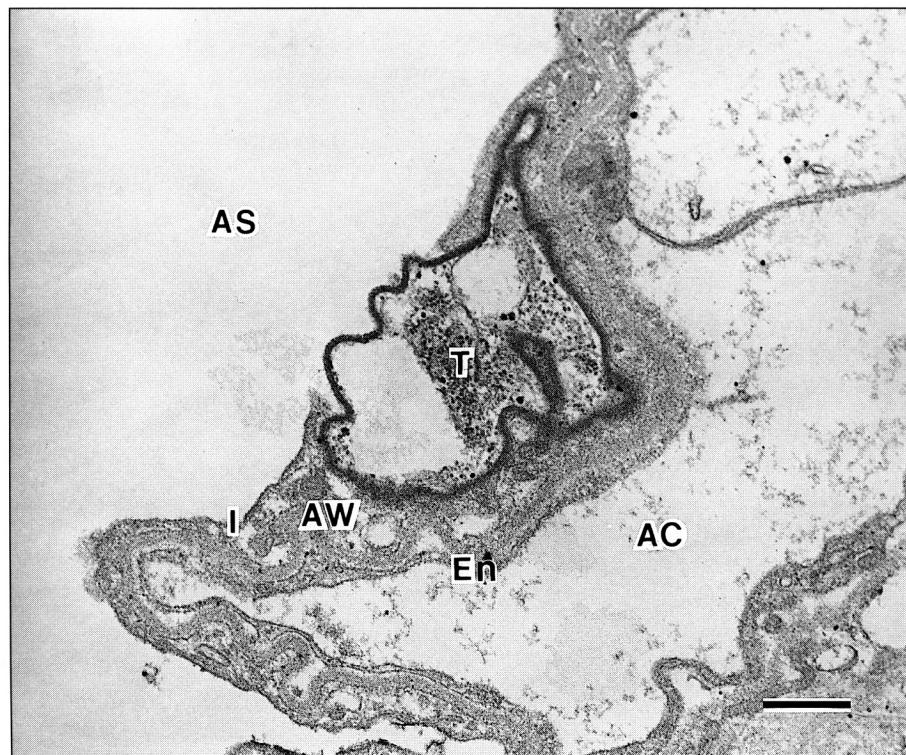


Fig. 2. Transmission electron micrograph shows a trophozoite of *P. carinii* infiltrated into the alveolar wall. AC: alveolar capillary, AS: alveolar space, AW: alveolar wall, En: endothelial cell, I: type I epithelial cell, T: trophozoite of *P. carinii*. Bar=0.5  $\mu$ mm,  $\times 25,500$ .

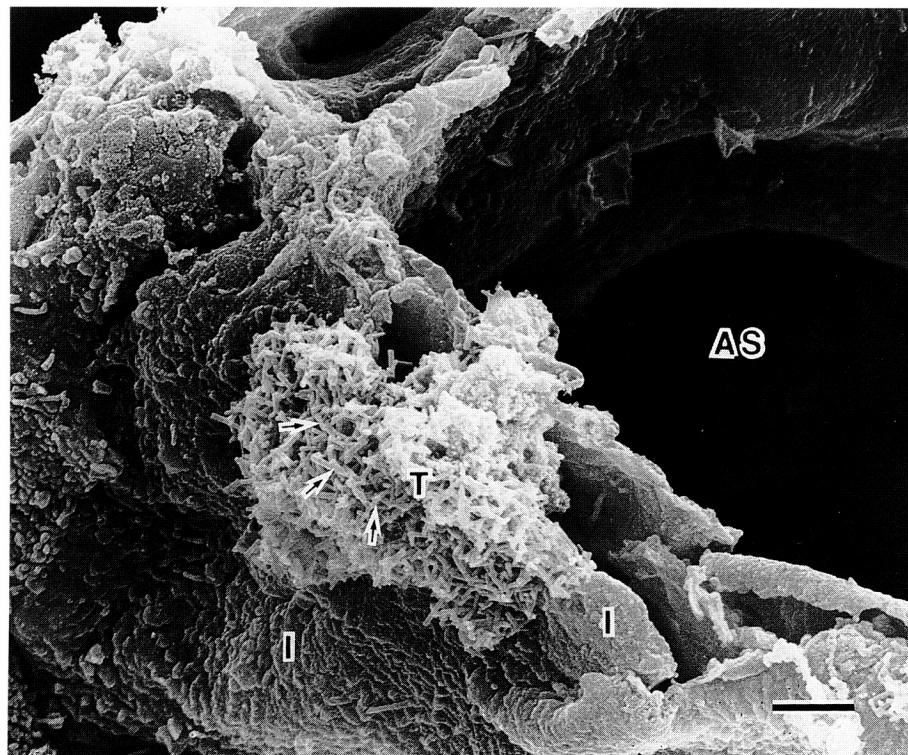


Fig. 3. Scanning electron micrograph shows a trophozoite of *P. carinii* with abundant tubular extensions (arrows) which is attached firmly to the alveolar wall. AS: alveolar sac, I: inner surface of type I alveolar epithelial cell, T: trophozoite of *P. carinii*. Bar=3  $\mu\text{m}$ ,  $\times 4,100$ .

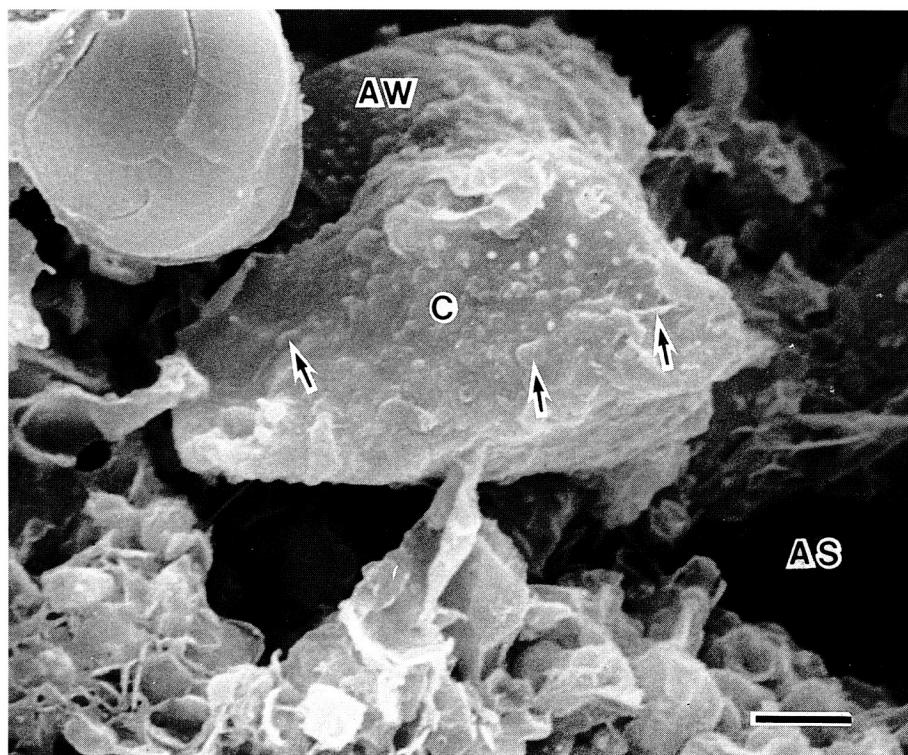


Fig. 4. Scanning electron micrograph shows a cyst of *P. carinii* attached to the alveolar wall. The cyst shows semilunar shape and only a few tubular extensions (arrows) on the external surface. AS: alveolar space, AW: alveolar wall, C: cyst of *P. carinii*. Bar=2  $\mu\text{m}$ ,  $\times 6,900$ .

## 2. 주사전자현미경 소견

*P. carinii* 영양형의 형태는 매우 불규칙하고 표면에 무수한 관상연장 구조를 갖고 있었다. 폐포상피세포에 부착되어 있는 영양형은 관상연장에 의해 폐포상피세포 표면과 단단히 부착되어 있었다 (Fig. 3). 포낭은 대체로 둥글면서 영양형에 비해서 표면에 관상연장의 수가 적었으며, 흔히 포낭의 내용물이 빠져나간 채 반달 또는 초생달 형태를 보였다 (Fig. 4). 포낭은 주로 폐포상피세포와 부착되지 않은 채 폐포강에 존재하였다. 폐포강에는 폐포대식세포가 보였으며 할단면에서 다수의 *P. carinii* 영양형 또는 포낭을 탐식하였다.

## 3. 면역조직화학 염색 소견

단클론항체인 fibronectin 및 vitronectin를 사용하여 면역조직화학 염색을 하였을 때 HE 염색상 포말성 호산성 삼출액을 보이는 부위에서 *P. carinii*의 포낭과 영양형에서 강하게 발현되었다. 특히 폐포벽 면에 *P. carinii* 영양형이 부착한 곳을 따라서 미만성으로 강한 반응을 보였다. 폐포강의 I형 폐포상피 세포막을 따라서 선상으로 다소 약하게 발현하였다 (Fig. 5A). 폐포강의 폐포대식세포에도 양성 발현을 하였다. 다클론항체인 surfactant-A 및 D를 사용하여 면역조직화학 염색을 실시한 결과 I형 폐포상피세포에 부착한 *P. carinii* 영양형에서 강한 발현을 보였다. 또한 폐포상피세포 막을 따

라서도 선상으로 발현하였고, 폐포강에 산재한 세포 잔해물이나 폐포대식세포 표면과 막성 표면활성물질에서도 약하게 발현하였다 (Fig 5B). 그리고 폐포강에 관찰되는 *P. carinii* 포낭에서도 발현되었으며, II형 폐포상피세포 내에서도 양성 발현을 보였다. 그러나 면역조직화학 염색에서는 *P. carinii* 병원체의 어느 곳에서 양성 발현이 나타나는지는 정확하게 관찰할 수 없었다.

## 4. 전포매법에 의한 면역전자현미경 소견

드라이-아세톤 냉동법을 적용한 면역전자현미경 검색에서 일차항체인 fibronectin과 vitronectin의 발현 양상은 서로 비슷하였으며, 주로 영양형의 균막 외층을 따라서 미만성으로 고전자 밀도의 발현을 보였다. 그리고 *P. carinii* 포낭의 균막을 따라서는 다소 약하게 발현하였고 주변 세포 잔해물과 I형 폐포상피세포막을 따라서 전자밀도가 다소 약하게 선상으로 발현되었다. *P. carinii* 영양형이 I형 폐포상피세포와 부착하는 곳에서는 fibronectin 또는 vitronectin에 대한 발현이 약하게 관찰되었다 (Fig. 6, 7). Surfactant-A를 사용한 면역전자현미경 검색에서 I형 폐포상피 세포막에 부착한 *P. carinii* 영양형의 균막 표면을 따라서 강한 발현을 보였다 (Fig. 8). *P. carinii* 포낭에서는 균막 외층을 따라 다소 전자밀도가 약한 발현을 보였다. *P. carinii* 영양형이 I형 폐포상피세포와 부착하는 부위에서는 그 발현이 약하거나 발현되지 않았다. 세포잔해물 및 I형 폐포상피세포 표면

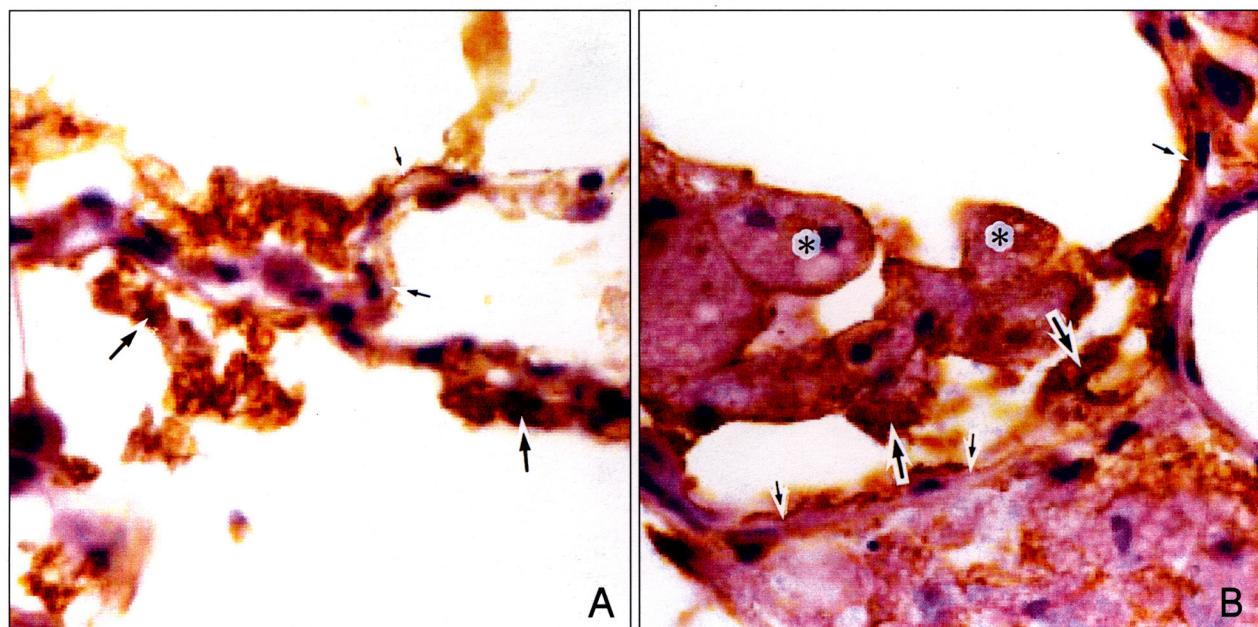
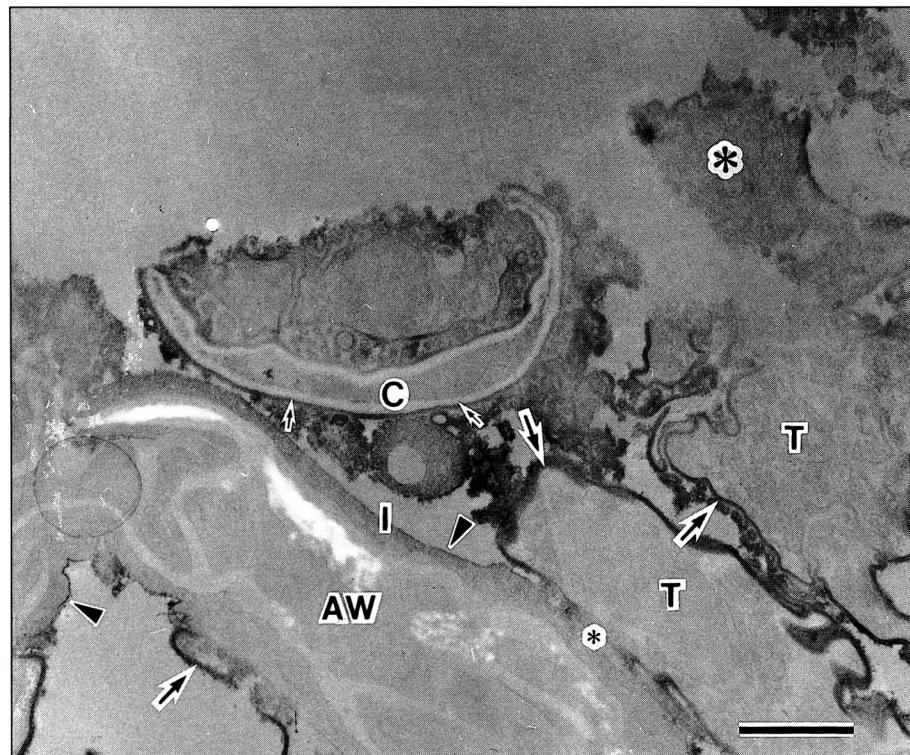
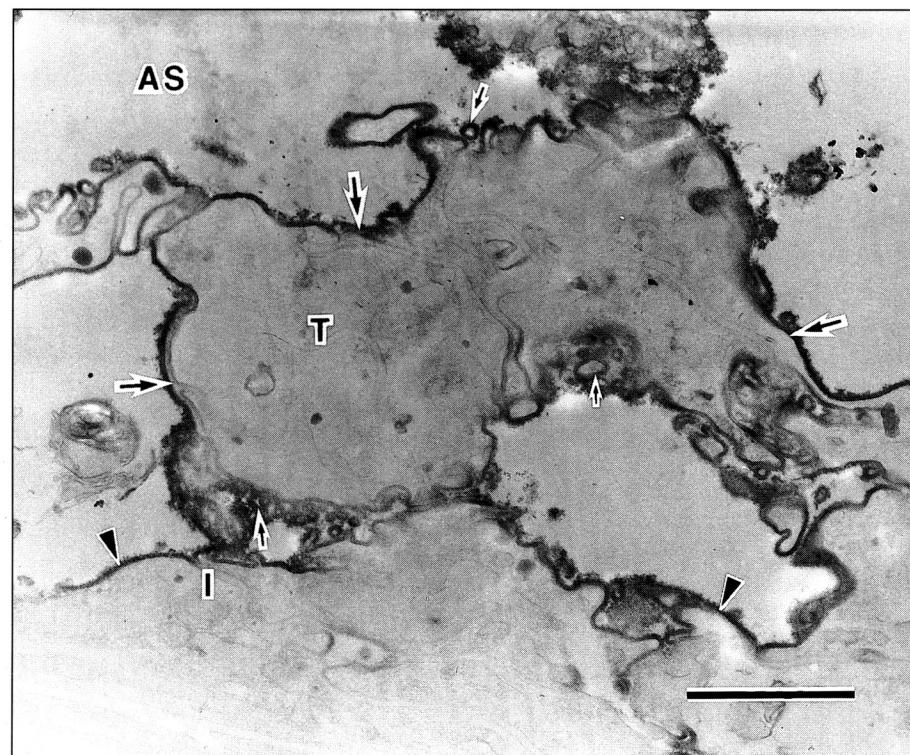


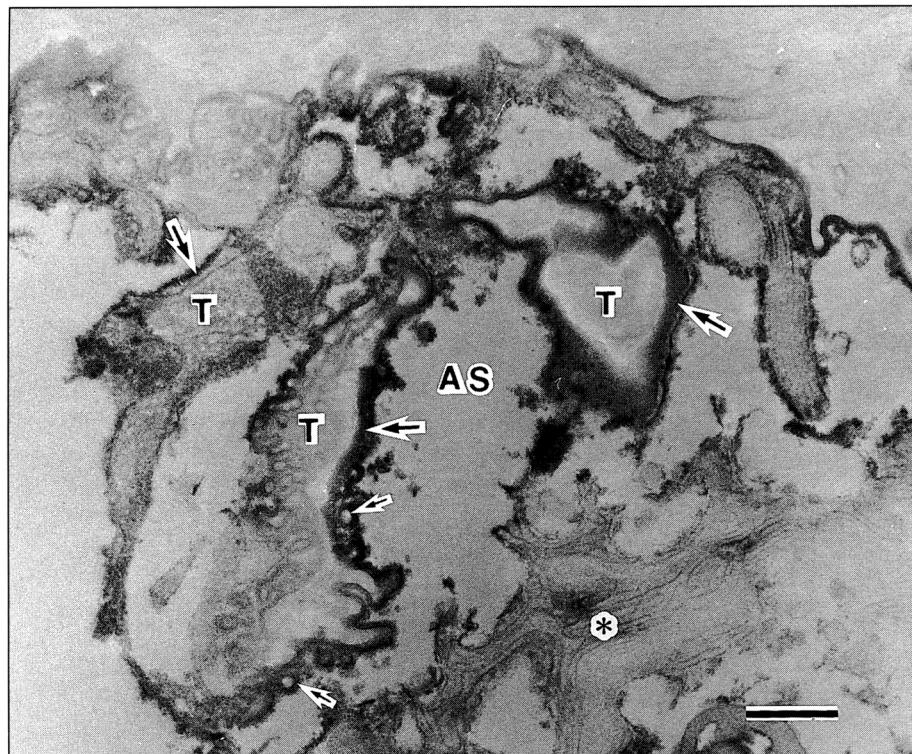
Fig. 5. A. Immunohistochemical stain of fibronectin shows positive expression on the *P. carinii* trophozoites (long arrows) and surface of the type I alveolar epithelial cells (short arrows). B. Immunohistochemical stain of surfactant-A shows diffusely positive expression along the type I epithelial cells (short arrows), trophozoites (long arrows) attached to the alveolar wall, and surfaces and cytoplasms (asterisks) of the alveolar macrophages.



**Fig. 6.** Pre-embedding immunoelectron micrograph using fibronectin shows diffuse electron dense expression on the surface pellicles of the trophozoites (long arrows), less dense expression on the pellicle of the collapsed cyst (short arrows), type I epithelial cell surface (arrow heads), and floating materials (large asterisk). The binding site between the trophozoite and type I epithelial cell shows fading of the positive expression (small asterisk). AS: alveolar space, AW: alveolar wall, I: type I epithelial cell, T: trophozoite of *P. carinii*. Bar=1  $\mu\text{m}$ ,  $\times$  15,100.



**Fig. 7.** The fibronectin shows diffuse electron dense expression along the outer surface pellicles (long arrows) and tubular extensions (short arrows) of the trophozoite which is attached to the cell membrane of the type I alveolar epithelial cell (arrow heads). AS: alveolar space, I: type I epithelial cell T: trophozoite of *P. carinii*. Bar=1  $\mu\text{m}$ ,  $\times$  23,000.



**Fig. 8.** The surfactant-A shows electron dense expression along the pellicles (long arrows) and tubular extensions (short arrows) of trophozoites, and less dense expression in the floating surfactant materials (asterisk). AS: alveolar space. T: trophozoites of *P. carinii*. Bar=1 μm, ×12,600.

을 따라서 양성 발현을 보였으며, 폐포강에 관찰되는 막성 표면활성물질에도 약하게 발현되었다.

## 고 찰

전자현미경 소견에서 *P. carinii* 영양형은 그 표면에 무수한 관상연장을 가지고 포낭은 그 표면에 관상연장의 수가 적으면서 비후된 낭벽을 가지고 포낭 내에는 2개, 4개 또는 8개의 포낭 내체를 포함하고 있다. 성숙한 포낭은 그 벽이 깨어지면서 포낭 내체가 나와서 새로운 영양형으로 진행하며 *P. carinii*의 생활주기를 이룬다.<sup>19</sup> *P. carinii*의 생활주기를 이루는 병원체 중에서 영양형이 주로 I형 폐포상피세포와 결합하고 대부분은 세포질 내로 침투하지 않고 세포 표면에 부착하여 폐포상피세포를 손상시키는 것으로 알려져 있다.<sup>3,7,19,20</sup> 본 연구의 전자현미경 검색에서 *P. carinii*의 생활주기에 포함되는 영양형, 전포낭 및 포낭의 각 병원체를 볼 수 있었으며, 이 중 영양형이 주로 I형 폐포상피세포 표면에 밀착되어 있었다. 그리고 면역조직화학 검색에서 폐포강에 fibronectin, vitronectin 및 surfactant-A, D 등 접착물질이 강하게 발현하였으며 *P. carinii*와 폐포상피세포 사이의 결합에 큰 역할을 하였을 것으로 생각된다. 그 근거로 면역전자현미경 소견에서 포낭과 영양형의 균막에 미만성으로 fibronectin, vitronectin 및 surfactant-A, D의 일차 항체에 대해 고전자밀도의 양성 발현을 보인 점을 들 수 있다. *P. carinii*가 I형 폐포상피세포에

착하는 부위에서는 이들 접착 물질에 대한 발현이 약해지거나 발현이 없어지는 것은 *P. carinii*와 폐포상피세포가 결합 후 면역학적 상호반응의 결과로 생각할 수 있다.<sup>7</sup> 그리고 I형 폐포상피세포 막에 특이한 수용체가 존재하여 *P. carinii* 균막에 위치한 당단백질, β-glucan 및 폐포 내의 접착물질 등과 결합이 가능할 것으로 보고 있다.<sup>7</sup>

투과전자현미경 검색에서 *P. carinii* 영양형이 대부분 I형 폐포상피세포와 부착하고 II형 폐포상피세포와의 결합은 거의 볼 수 없었다. *P. carinii*가 I형 폐포상피세포에만 부착하는 이유로서, 첫째 I형 폐포상피세포는 폐포벽의 대부분을 덮고 있어 *P. carinii* 영양형이 쉽게 부착할 수 있는 공간을 제공하며, 둘째 I형 폐포상피세포의 표면이 대체로 매끈하여 영양형이 쉽게 부착할 수 있으나 II형 폐포상피세포의 표면에는 미세융모가 다수 존재하여 *P. carinii* 영양형이 부착하기가 어려우며, 셋째 I형 폐포상피세포 막 표면에는 *P. carinii*와 결합하는데 관여하는 특이한 수용체가 있을 것으로 보고 있으며, 이에 대한 기전은 아직 분명히 밝혀져 있지 않다.<sup>7,21</sup>

*P. carinii*가 폐포상피세포에 부착하는 형태학적 특징에 대해서는 문헌상에 주로 *P. carinii* 영양형이 I형 폐포상피세포의 형질막과 단순 결합 또는 접촉하는 것으로 기술되어 있다.<sup>22,23</sup> 본 연구의 전자현미경 소견에서 *P. carinii* 영양형의 균막이 I형 폐포상피세포에 직접 부착하거나 균막에 존재하는 무수한 관상연장의 일부가 I형 폐포상피세포 내로 들어와 있는 양상을 보임은 *P.*

*carinii*가 폐포상피세포에 단순 접촉이 아닌 적극적 부착 내지 침투할 수 있다는 것을 보여주는 소견으로 생각된다. 그리고 포낭에 비해서 영양형이 폐포상피세포에 주로 부착하는 것은 구조적으로 영양형이 표면에 더욱 많은 관상연장을 가지고 있고 세포골격 시스템(cytoskeletal system)이 보다 잘 발달되어 있기 때문이며, 이 세포골격 구조가 *P. carinii*의 폐포상피세포와의 결합에 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있다.<sup>3,7</sup> 이와 관련된 연구로 Limper 등<sup>7</sup>은 *in vitro* 실험에서 *P. carinii* 병원체에 cytochalasin B, colchicine 등의 세포골격 기능에 장해를 주는 물질을 투여했을 때 *P. carinii*가 배양된 A549 폐상피세포와 결합하는 능력이 감소됨을 관찰하였다.

*P. carinii*의 영양형이 I형 폐포상피세포와 결합하면서 폐포강에는 접착성을 가진 기질 당단백, surfactant 단백물질, 면역글로부린, fibronectin, vitronectin, fibrinogen 및 gangliosides의 양이 증가된다.<sup>7</sup> 폐포강에 이런 물질의 증가는 손상받은 폐포-모세혈관 막을 통해서 혈청 단백질이 빠져나감으로서 초래되며, 또한 감염된 폐 조직에서 국소적인 생산 증가로 야기될 수도 있다.<sup>24</sup> Limper 등<sup>3</sup>은 fibronectin 및 vitronectin이 *P. carinii*와 폐포상피세포 사이의 결합을 용이하게 할 것으로 보고하였고, Pottratz와 Martin<sup>25</sup>은 배지 내에서 *P. carinii*가 폐포상피세포에 부착하는 데 fibronectin이 관여함을 확인하였다. Fibronectin은 *P. carinii* 균막에 존재하는 당단백질-A와 결합하며,<sup>26</sup> vitronectin은 *P. carinii* 균막에 존재하는  $\beta$ -glucan을 포함한 탄수화물과 결합하는 것으로 알려져 있다.<sup>27,28</sup> 또한 폐포강에 존재하는 단백 물질 중 Surfactant-A, D가 I형 폐포상피세포와 *P. carinii* 사이의 상호반응을 촉진하는 것으로 보고되어 있다.<sup>7,29</sup> 이와 관련된 연구에 의하면 첫째 Surfactant-A, D가 *P. carinii* 폐렴이 진행하는 동안 하기도에서 축적되며, 둘째 Surfactant 단백 물질은 특이하게 *P. carinii* 균막에 존재하는 당단백질-A와 상호반응을 하고, 셋째 Surfactant-A, D는 *P. carinii*와 폐포 대식세포와의 상호작용에도 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>12,30</sup> Limper 등<sup>31</sup>은 *P. carinii* 병원체의 표면에 존재하는 mannose 함량이 풍부한 당단백질 A가 폐포상피세포에 있는 mannose 결합 단백질과 상호반응하는 것을 보고하였다. 그리고 Settnes과 Nielsen<sup>15</sup>은 I형 폐포상피세포의 plasmalemmal vesicular system의 활성이 *P. carinii*와 결합하는 데 중요하다는 점을 강조하였다.

일반적으로 *P. carinii*는 I형 폐포상피세포에 주로 부착하여 손상을 일으키며 폐렴을 초래하나 혈관 침범 또는 타 장기로 원격 전이는 거의 일어나지 않는 것으로 보고 있다.<sup>3,5</sup> 그 이유로서 *P. carinii*가 숙주 조직에서 침투하거나 원격 장기로 전이하는 능력이 결여되어 있기 때문으로 해석하고 있다.<sup>32</sup> 그러나 본 연구에서 흔히 *P. carinii*의 영양형이 I형 폐포상피세포에 부착하면서 관상연장의 일부가 폐포상피세포 내에서 관찰되는 소견은

적어도 *P. carinii*가 깍지끼는 형태를 취하거나 또는 침투하여 I형 폐포상피세포를 손상시킴을 나타내는 소견으로 해석되며, *P. carinii*의 숙주 조직 내로 침투 내지 전이할 가능성이 있는 소견으로 판단된다.

*P. carinii*가 폐포상피세포에 부착하면 *P. carinii* 병원체의 생활주기가 활발하게 진행되면서 그 수가 많아지나 폐포상피세포는 세포주기에 장해를 초래하는 것으로 보고되어 있다.<sup>7,13,23,33</sup> 즉 *P. carinii*는 폐포상피세포에 부착한 후 폐포상피세포 p34<sup>cdc2</sup> kinase 활성을 방해함으로서 폐포상피세포의 성장을 억제하며,<sup>7</sup> 때로는 폐포상피세포 세포주기의 진행을 변화시키기도 한다.<sup>20,33</sup> 그리고 *P. carinii*가 폐포상피세포와 결합하여 폐포상피세포에 직접적인 독성 영향을 초래하거나 동원된 염증세포에 의해 폐포상피세포에 손상을 초래한다.<sup>3</sup>

본 연구 결과와 관련된 연구 보고를 종합하면 *P. carinii*와 폐포상피세포와의 결합에는 폐포강 내의 fibronectin, vitronectin 및 surfactant-A, D의 접착 물질이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그리고 *P. carinii*와 폐포상피세포의 상호반응은 이들 접착물질과 함께 *P. carinii* 균막에 존재하는 당단백질-A,  $\beta$ -glucan 등의 배위자(ligands)와 I형 폐포상피세포 막에 있는 특이한 수용체 등의 상호작용과 함께 *P. carinii* 영양형이 가지는 활발한 세포골격 시스템에 의해 일어나는 복잡한 과정으로 해석할 수 있다. 그러나 *P. carinii*와 폐포상피세포 사이의 상호반응에 관련된 기전과 *P. carinii*가 폐포상피세포와 결합 후 *P. carinii* 병원체의 수적 증가나 폐포상피세포의 상해 기전에 대해서는 아직도 규명되지 않은 점이 많으며, 이에 관련된 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

*P. carinii*가 폐포상피세포와 결합할 때의 형태학적 특징을 관찰하기 위해 전자현미경 검색을 하였으며, *P. carinii*와 폐포상피세포의 상호작용에 조절 역할을 하는 것으로 알려진 fibronectin, vitronectin 및 surfactant A, D 물질의 형태학적 발현 양상을 알아보기 위해 면역조직화학 및 면역전자현미경적 검색을 실시하였다. Sprague-Dawley 종 흰쥐를 실험 재료로 저단백 식이를 제공하고 텍사메타손을 6~8주간 투여하여 *P. carinii*의 실험적 모델을 만든 다음 투과 및 주사전자현미경 검색을 실시하였다. 그리고 단클론항체인 fibronectin 및 vitronectin과 다클론항체인 surfactant-A 및 D를 사용하여 면역조직화학 검색 및 면역투과전자현미경 검색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

투과전자현미경 검색에서 주로 *P. carinii* 영양형이 I형 폐포상피세포와 결합하였으며, 직접 부착하거나 간혹 폐포상피세포 관상연장 일부가 침투하는 양상을 보였다. II형 폐포상피세포에서는 *P. carinii*의 부착을 볼 수 없었다. 주사전자현미경 검색에서 *P. carinii* 영양형

의 표면에 무수한 관상연장 구조를 갖고 있으며 폐포상피세포 표면과 단단히 유착되어 있었다. 포낭은 주로 폐포상피세포와 부착되지 않은 채 폐포강에 존재하였다. 면역조직화학 염색에서 일차항체인 fibronectin, vitronectin, surfactant-A, D에 대해 *P. carinii*의 포낭과 폐포벽 면에 부착한 영양형에서 강하게 발현되었다. 그리고 I형 폐포상피 세포막 표면을 따라서 선상으로 약하게 발현하였다. 전포매법에 의한 면역전자현미경 검색에서 fibronectin과 vitronectin은 주로 영양형과 포낭의 군막 외층을 따라서 미만성으로 고전자 밀도의 발현을 보였으며, I형 폐포상피 세포막을 따라서 다소 약하게 발현하였다. Surfactant-A에 대해서는 *P. carinii* 영양형의 군막 표면을 따라서 강한 발현을 보였으며, I형 폐포상피 세포막을 따라 선상 발현을 하였고, 폐포 내의 포낭, 세포잔해물 및 막성 표면활성물질에도 약하게 발현되었다.

이상의 연구 결과와 문헌 보고를 종합하면 *P. carinii*의 영양형이 주로 I형 폐포상피세포와 결합하여 상호작용을 하며, 여기에 fibronectin, vitronectin, surfactant-A 및 D 등의 접착 물질이 관여하여 결합을 용이하게 할 것으로 생각된다. 그리고 *P. carinii*와 폐포상피세포의 결합 과정에서 *P. carinii* 영양형의 세포골격 시스템이 작용할 것으로 보고되어 있으나 *P. carinii*와 I형 폐포상피세포 사이의 결합 및 상호반응에 대한 자세한 기전을 규명하기 위해서는 향후 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Gal AA, Koss MN, Strigle S, Angritt CP. *Pneumocystis carinii* infection in the acquired immune deficiency syndrome. Semin Diagn Pathol 1989; 6: 287-99.
- Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated disorders and prior corticosteroid therapy. Mayo Clin Proc 1996; 71: 5-13.
- Limper AH. Parasitic adherence and host responses in the development of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Semin Respir Infect 1991; 6: 19-26.
- Bedrossian CWM. *Pneumocystis carinii*- the enigma goes on. Semin Diagn Pathol 1989; 6: 191-4.
- Gutierrez Y. The biology of *Pneumocystis carinii*. Semin Diagn Pathol 1989; 6: 203-11.
- Kondo H, Taguchi N, Abe N, Nogami Y, Yoshioka H, Ito M. Pathological changes in epidemic porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Comp Pathol 1993; 108: 261-8.
- Limper AH, Thomas CF, Anders RA, Leof EB. Interactions of parasite and host epithelial cell cycle regulation during *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Lab Clin Med 1997; 130: 132-8.
- O'Riordan DM, Standing JE, Kwon KY, Chang D, Crouch EC, Limper AH. Surfactant protein-D interacts with *Pneumocystis carinii* and mediates organism adherence to alveolar macrophages. J Clin Invest 1995; 95: 2699-710.
- O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. Infect Immune 1995; 63: 779-84.
- Thomas CF, Gustafson M, Vukpavlovic Z, Leof EB, Limper AH. Identification of a cell division cycle (cdc2) homologue in *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol 1996; 43: S11.
- Limper AH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated host defense against *Pneumocystis carinii*. Am J Resp Cell Mol Biol 1997; 16: 110-1.
- Kwon KY, Park KK, Park CK, Jeon YJ, Chang ES. Expression of surfactant-D protein and TNF- $\alpha$  in the interaction of *Pneumocystis carinii* and alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Korean J Pathol 1999; 33: 684-94.
- Limper AH, Standing JE, Leof EB. *Pneumocystis carinii* adherence to alveolar epithelial cells promotes organism proliferation [abstract]. J Invest Med 1995; 43: 466A.
- Martin WJ. Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 8: 356-7.
- Settnes OP, Nielsen MJ. Host-parasite relationship in *Pneumocystis carinii* infection: activation of the plasmalemmal vesicular system in type I alveolar epithelial cells. J Protozool 1991; 38: 174S-5S.
- Limper AH, Crouch EC, O'Riordan DM, et al. Surfactant protein-D modulates interaction of *Pneumocystis carinii* with alveolar macrophages. J Lab Clin Med 1995; 126: 416-22.
- Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J Biophys Biochem Cytol 1958; 6: 475-9.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17: 208-12.
- Yoshida Y. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. J Protozool 1989; 36: 53-60.
- Itatani CA. Ultrastructural morphology of intermediate forms and forms suggestive of conjugation in the life cycle of *Pneumocystis carinii*. J Parasitol 1996; 82: 163-71.
- Kwon KY, Cho SC, Kim SP, Park KK, Chang ES. Expression of antigenic surface molecules of *Pneumocystis carinii* by immunoelectron microscopic examination. Korean J Pathol 1998; 32: 393-403.
- Long EG, Smith JS, Meier JL. Attachment of *Pneumo-*

- cystis carinii* to rat pneumocytes. Lab Invest 1986; 54: 609-15.
23. Limper AH, Martin WJ. *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. J Clin Invest 1990; 85: 391-6.
  24. Neese LW, Standing JE, Olson EJ, Castro M, Limper AH. Vitronectin, fibronectin, and gp120 antibody enhance macrophage release of TNF-alpha in response to *Pneumocystis carinii*. J Immunol 1994; 152: 4549-56.
  25. Pottratz ST, Martin WJ II. Role of fibronectin in *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells. J Clin Invest 1990; 85: 351-6.
  26. Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ II. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by pneumocystis gp 120, a fibronectin binding protein. J Clin Invest 1991; 88: 403-7.
  27. Limper AH, Standing JE, Hoffman OA, Castro M, Neese LW. Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells. Infect Immun 1993; 61: 4302-9.
  28. Olson EJ, Standing JE, Griego-Harper N, Hoffman OA, Limper AH. Fungal  $\beta$ -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor- $\alpha$  release from macrophages. Infect Immune 1996; 64: 3548-53.
  29. Limper AH, Stnading JE, Vuk-Pavlovic Z, Chang D, Crouch EC. Surfactant protein D interacts with *P. carinii* gp A through saccharide mediated mechanisms. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: A794.
  30. Williams MD, Wright JR, March KL, Martin WJ II. Human surfactant protein A enhances attachment of *Pneumocystis carinii* to rat alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 14: 232-8.
  31. Limper AH, Pottratz ST, Martin WJ II. Modulation of *Pneumocystis carinii* adherence to cultured lung cells by a mannose-dependent mechanism. J Lab Clin Med 1991; 118: 492-9.
  32. Travis WD, Pittaluga S, Lipschik GY, et al. Atypical pathologic manifestation *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immune deficiency syndrome. AM J Surg Pathol 1990; 14: 615-25.
  33. Anders RA, Gustafson M, Edens M, Limper AH, Leof EB. *Pneumocystis carinii* modulates cyclin-dependant kinase activity in a lung epithelial cell line. J Eukaryot Microbiol 1996; 43: S13.