

폐포자충 폐렴에서의 폐포세포자멸사: 전자현미경적 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling법의 적용

강규현 · 김상표 · 권건영

계명대학교 의과대학 병리학교실

접수 : 2001년 6월 7일
게재승인 : 2001년 11월 21일

책임저자 : 권건영
우 700-712 대구시 중구 동산동 194
계명의대 병리학교실
전화: 053-250-7482
Fax: 053-250-7852
E-mail: k19156ky@dsmc.or.kr

*이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의
연구비(KRF-99-F00068)에 의하여 지원되었음.

Apoptosis of Alveolar Cells in *Pneumocystis Carinii* Pneumonia:
Application of Electron Microscopic Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling Method

Kyu Hun Kang, Sang Pyo Kim and Kun Young Kwon

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) attaches to alveolar cells and causes injury to the epithelial cells by direct toxic effects or inhibition of epithelial growth and replication. Although respiratory cell damage or death is a common feature in *P. carinii* pneumonia, there has been little reports about expression of apoptosis of the lung tissue in the literatures.

Methods : We examined expression of fibronectin and vitronectin in the interaction between *P. carinii* and alveolar cells, and *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling (TUNEL) expression of apoptosis in the respiratory cells by immunohistochemistry and pre-embedding immunoelectron microscopy. **Results :** Light microscopic (LM) and electron microscopic (EM) immunohistochemical stains for the fibronectin and vitronectin showed strong expressions on the pellicles and tubular extensions of *P. carinii* and weak expression along the surfaces of type I alveolar cells. LM and EM TUNEL stains showed positive expression in the nuclei of alveolar cells, apoptotic bodies in the cytoplasm of alveolar macrophages and cellular debris in alveolar spaces. **Conclusions :** *P. carinii* induces injury and apoptosis of alveolar cells after attachment of the organisms to host cells, and alveolar macrophages enhance the clearance of apoptotic bodies of alveolar cells as well as phagocytosis and degradation of *P. carinii*.

Key Words : *Pneumocystis carinii*, *In situ* nick-end labeling, Apoptosis, Microscopy, immunoelectron

서 론

폐포자충(*P. carinii*) 폐렴은 후천성면역결핍증후군 환자를 비롯하여 암, 만성 질환 및 기관 이식 후 면역 억제 요법을 장기간 받은 환자에게서 합병증으로 발생하는 질환으로 치사율이 높아 이 질환의 발병 기전, 치료 및 예방에 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁻³ 1981년 이후 후천성면역결핍증후군 환자가 아프리카, 유럽 및 미국을 위주로 발생하다가 세계 도처에 만연해지면서 의학계에 주요 관심의 대상이 되었으며, 후천성면역결핍증후군 환자에게서 합병증으로 흔히 야기되는 *P. carinii* 폐렴에 대한 임상 및 기초적 연구가 상당히 진행되어 왔다.^{1,2,4,5} 그러나

후천성면역결핍증후군을 제외한 각종 원인에 의한 면역결핍 환자에게서 발생하는 *P. carinii* 폐렴에 대해서는 아직 문헌에 보고된 연구가 많지 않으며 이 분야에 대한 연구의 필요성이 높아지고 있다.⁴⁻⁶

*P. carinii*가 인체 내에서 폐렴을 야기하는 기전은 대단히 복잡하며 아직도 그 발병기전이 완전히 밝혀져 있지 않다. 최근 *P. carinii*에 대한 연구 방향은 숙주세포와 병원체 간의 복잡한 반응기전을 규명하는 데 있다.⁷⁻¹¹ *P. carinii*가 인체에 감염될 경우 대부분 I형 폐포세포에 부착하여 병원체의 수가 많아지면서, 폐포세포의 상해를 초래하는 것으로 알려져 있다.⁷ 또한 폐포 내에 존재하는 단백 물질이 I형 폐포세포와 *P. carinii*의 상호 반응에

조절 역할을 할 것으로 보고되어 있으며, 이들 중에는 세포간 접착물질, 면역글로불린, 섬유소원, tumor necrosis factor ($\text{TNF}-\alpha$), 표면활성제-A 및 -D 등을 들 수 있다.^{1,10-13}

세포 손상 때에 야기되는 세포자멸사를 광학현미경상에서 형태학적으로 발현할 수 있는 *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 법이 개발되면서 의생물학 영역의 각종 연구에서 TUNEL 법을 활용하게 되었다.¹⁴⁻¹⁷ 최근에는 전자현미경 TUNEL 기법이 개발되어 광학현미경에서 판별이 어려운 세포자멸사의 초기 과정과 세포자멸사를 야기한 세포의 성상을 전자현미경 수준에서 정확히 관찰할 수 있어 전자현미경 TUNEL 법을 적용한 연구를 시도하고 있으나 아직은 초기 단계에 있다.¹⁸ *P. carinii* 병 원체가 숙주에 침입하여 폐실질 세포에 손상을 초래하는 과정에서 나타나는 폐포세포, 간질세포, 폐포 대식세포 등의 세포자멸사 양상을 형태학적으로 관찰하기 위해서는 TUNEL 법의 적용이 필요하다. 일반적으로 세포 손상에서 야기되는 세포자멸사는 변화가 빠르게 진행된다. 이러한 세포자멸사의 초기과정을 형태학적으로 확인하고 세포자멸사가 일어난 세포의 종류를 정확히 감별하기 위해서는 전자현미경 수준의 TUNEL 법을 이용하여 검색할 필요성이 있다. 그러나 *P. carinii*의 감염에 의한 폐포세포의 손상에서 초래되는 세포자멸사를 광학현미경 및 전자현미경 TUNEL 법으로 발현한 연구 보고는 아직 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 그 동안 *P. carinii* 폐렴에 관련된 저자들의 연구 결과^{10,13,19}를 기초로 하여 *P. carinii* 감염에 의한 폐포세포의 손상에서 출현할 수 있는 세포자멸사의 양상과 그 전개 과정을 광학현미경 및 전자현미경 TUNEL 법을 적용하여 형태학적으로 발현하고자 한다.

재료와 방법

실험동물

체중 200-250 g 되는 Sprague-Dawley종 흰쥐 30마리를 사용하여 대조군 및 *P. carinii* 폐렴의 실험군 재료로 사용하였다.

대조군은 정상식을 제공하고 아무런 처치를 하지 않는 군(5마리)이고, 실험군은 I군과 II군으로 나누었다. 실험 I군은 *P. carinii* 폐렴을 야기한 흰쥐를 희생시킨 후 폐장조직을 체취하여 광학현미경, 투과전자현미경 및 주사전자현미경 관찰을 위해 각각 시료 제작 과정을 실시한 군(15마리)이고, 실험 II군은 *P. carinii* 폐렴을 야기한 흰쥐를 희생시킨 후 폐장 조직을 사용하여 광학현미경 TUNEL 법을 실시하고, 전포매법을 응용한 전자현미경 TUNEL 법을 실시한 군(10마리)이다.

P. carinii 폐렴의 실험적 모델

Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하여 저단백식(8%)을 제공하

면서 마시는 물에 텍사메타손(2 mg/L)을 혼합하여 매일 투여하였다. 이렇게 하여 6주 내지 8주가 경과한 뒤, 흰쥐의 전신 상태가 불량하고 체중 감소가 현저한 것부터 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage) 검사를 실시하여 Diff-Quik 및 Gomori's methanamine silver (GMS) 염색을 하거나, 체취한 폐 조직을 HE 및 GMS 염색을 하여 *P. carinii*가 다수 확인되는 흰쥐를 *P. carinii* 폐렴의 실험군 모델로 사용하였다. 실험 모델을 만드는 도중 세균 감염을 방지하기 위하여 테트라사이클린(500 mg/L)을 사용하였고, 진균 감염을 방지하기 위해 니스타틴(200,000 U/L)을 마시는 물에 각각 녹여 투여하였다.

연구방법

P. carinii 폐렴의 실험적 모델에서 얻은 폐 조직을 이용하여 다음과 같은 시료 제작 과정을 거쳐서 관찰하였다.

광학현미경 검사

체취한 폐 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열에탄올로 탈수한 후 파라핀 침투와 파라핀 포매 과정을 거친 후 4 μm 의 박절편을 만들어 HE 염색과 GMS 염색을 하였다.

투과전자현미경 관찰

투과전자현미경용으로 제공된 폐 조직을 1 mm^3 크기로 세절하여 폐포 내의 공기를 탈기 방법으로 제거한 후 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1-4°C에서 2시간동안 전고정을 하였다. 다음 0.1 M 인산염완충액으로 세척한 후 1% OsO_4 용액에서 2시간 동안 후고정을 하고 같은 완충액으로 세척한 후 계열 에탄올로 탈수를 하였다. Propylene oxide로 치환한 후, epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하고 toluidine blue 염색을 하여 전자현미경상에서 관찰할 부위를 선택한 다음, 나머지 epon 포매 부위를 깎아서 제거하고 Sorvall MT 5000형 초박절기를 사용하여 40-60 nm의 회백색을 나타내는 초박절편을 만들었다. 이를 구리 grid에 부착하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 한 후 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

주사전자현미경 검사

흰쥐를 양와위로 고정시킨 후 정중선을 따라 개복하고 하대정맥에 cannula (18 gauge polyethylene tube)를 넣어 생리식염수를 주입하면서 홍부 대동맥을 절개하여 폐 혈관 내의 혈액을 모두 제거하였다. 혈액이 제거된 혈관 내로 0.5% glutaralde-

hyde와 0.5% paraformaldehyde를 혼합한 고정액을 사용하여 관류를 통해 고정시킨 후 폐 조직을 절취하여 $1 \times 1 \times 4$ mm 정도의 크기로 세절한 다음 같은 고정액에 넣어 1일간 더 고정 시켰다. 그 다음 1% O₂O₄ 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 수세한 후 2% tannic acid에 침투시킨 다음 1% O₂O₄ 용액으로 전도염색을 하였다. 계열 에탄올로 탈수를, isoamyl acetate로 침투를 시킨 후 임계점 건조를 하고 이온증착기(IB-3 Ion-coater, Eiko Co., Japan)를 사용하여 Pt-Pd로 증착한 후 Hitachi S-4200형 주사전자현미경으로 관찰하였다.

드라이아이스-아세톤 냉각법에 의한 Optimal Cutting Temperature 동결 포매

P. carinii 폐렴의 실험 모델에서 채취한 폐 조직의 fibronectin 및 vitronectin 발현을 위한 면역전자현미경법과 세포자멸사 발현을 위해, 광학현미경 및 전자현미경 TUNEL의 시료 제작 과정의 일환으로 드라이아이스-아세톤 냉각법에 의한 전포매 시료 제작법을 사용하였다. 폐 조직을 $4 \times 4 \times 1$ mm로 세절하여 10 °C 하에서 periodate lysine paraformaldehyde (PLP)용액에 5시간 고정을 하였다. PLP 용액으로 고정한 폐 조직을 10%, 15% 및 20%의 설탕/인산염완충액(sucrose/PBS)에 넣어 3-4 시간씩 각각 통과시켜서, 폐 조직 내의 수분을 고농도의 설탕/인산염완충액으로 치환하여 폐 조직을 단단하게 하고 조직 냉동 때의 변형을 최소화하였다. 동결절편용 조직 포매 재료인 Optimal cutting temperature (OCT) 물질을 사용하여 폐 조직을 충분히 침적시켰다. 알루미늄 포일로 포매용 주물을 만들어 폐 조직을 넣고 5 mm 높이로 OCT 물질을 추가하였다. 그 다음 드라이아이스-아세톤 냉각 용액 내에 알루미늄 포일을 담가 급 속 냉동(-80°C)을 하였다. 동결된 폐 조직 블록을 parafilm으로 단단히 싸서 공기를 차단하고 초저온 냉동기(-70°C 이하)에서 보관하였다.

전포매법 면역전자현미경법에 의한 Fibronectin 및 Vitronectin 발현

냉동 폐 조직을 꺼내어 Cryostat에 장착하여 9 μm 두께로 세절한 후 silane이 덮인 슬라이드에 부착하였다. 30분 정도 실온에서 방치하고 10% 설탕/인산염완충액으로 충분히 씻은 후 5% 정상 흰쥐 혈청으로 작용시켜 비특이성 반응을 차단시켰다. 일차 단클론 항체인 fibronectin (NCL-FIB, 1:100, Novocastra, U.K.)과 vitronectin (MAB 1945, 1:100, Chemicon INC, U.S.A.)을 사용하여 4°C의 습한 용기 내에서 하룻밤 동안 반응

을 시켰다. 10% 설탕/인산염완충액으로 수세한 후 0.5% glutaraldehyde로 고정하고, 이차 항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite Kit, U.S.A.)를 사용하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 0.1 M 인산염완충액으로 수세하고, avidin-biotin 혼합용액(ABC Elite Kit, Vector, U.S.A.)으로 37°C에서 30분간 작용시켰다. 10% 설탕/인산염완충액으로 수세하고 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 사용하여 3-5분간 실온에서 발색시킨 후 10% 설탕/인산염완충액으로 수세하였다. 2% osmium tetroxide로 후고정한 후 계열 에탄올로 완전히 탈수하고 epon으로 역위 포매하여 60°C에서 3일간 중합반응을 시켰다. Silane이 덮인 슬라이드에서 epon 블록을 떼 다음 관찰할 부위를 선택한 후 나머지 부분을 trimming하고 Sorvall MT 5000형 초박절기를 사용해 100 nm 두께로 초박절하여 동 grid에 올린 다음 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

광학현미경적 TUNEL 염색

파라핀 블록을 사용하여 5 μm 두께로 세절편을 만들어 silane이 덮인 유리 슬라이드에 부착시키고 크실렌과 계열 알코올을 사용하여 탈 파라핀과 함수를 한 후 증류수로 2분간 5회 수세하였다. Proteinase K (20 μg/mL)용액을 사용하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 내인성 과산화수소의 차단을 위하여 30% 과산화수소 1 mL에 메탄올 99 mL를 혼합하여 만든 용액에서 20분간 처리하고 증류수로 2분간 5회 수세하였다. TdT 용액을 만들어 37°C에서 3시간 반응시킨 후 2×SSC 용액을 사용하여 TdT 반응을 중지시킨 다음 0.01 M 인산염완충액으로 2분씩 5회 수세하였다. 1% bovine serum albumine/phosphate buffer solution (BSA/PBS)으로 실온에서 20분간 반응시킨 다음 1:100으로 희석한 peroxidase-conjugated streptavidin으로 실온에서 3시간 처리한 후 0.01 M 인산염완충액으로 5분간 6회 수세하였다. 실온에서 Tris-HCl로 5분간 작용시킨 후 DAB 를 사용하여 10분간 실온에서 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하고 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경적 TUNEL 염색

초저온 냉동기에 보관된 폐 조직의 OCT 블록을 사용하여 cryostat로 9 μm 두께로 세절한 후 silane을 도포한 유리 슬라이드에 부착하여 0.01 M 인산염완충액으로 수세하였다. 20 μg/mL의 proteinase K 용액을 사용하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 0.01 M 인산염완충액으로 2분씩 5회 수세하였다. 3% H₂O₂ 용액을 슬라이드에 도포하여 5분간 작용시킨 후 0.01 M 인산염완충액으로 2분씩 5회 수세하였다. TdT 반응 용액을 만들어 37°C에서 3시간 반응시킨 후 2×SSC 용액을 사용하여

TdT 반응을 중지시킨 다음 0.01 M 인산염완충액으로 2분씩 5회 수세하였다. 1% BSA/PBS 용액으로 실온에서 20분간 반응시킨 다음 1:100으로 희석한 peroxidase-conjugated streptavidin으로 37°C에서 1시간 방치한 후 0.01 M 인산염완충액으로 5분간씩 6회 수세하였다. 실온에서 Tris-HCl로 5분간 작용시킨 후 DAB를 사용하여 3-5분간 실온에서 발색하고 0.01 M 인산염완충액으로 2분씩 5회 수세하였다. 0.01 M cacodylate 완충액을 사용하여 1% OsO₄를 만들어서 슬라이드 위에 1% OsO₄ 100 μL를 가한 후 보습함 내에서 1시간 방치하였다. 계열 에탄올을 사용하여 세절편을 완전히 탈수시킨 후 epon 혼합물로 도립 포매하여 60°C에서 3일간 열중합을 시켰다. Epon에 포매한 폐 조직 블록을 광학현미경으로 관찰하면서 전자현미경 관찰을 위한 부위를 선택하였다. 그 다음 나머지 포매 부분을 깎아서 제거한 후 Sorvall MT 5000형 초박절기를 사용하여 80 nm 두께의 초박절편을 만들어 구리 grid에 부착하여 건조시킨 후 Hitachi H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결과

광학현미경 소견

P. carinii 폐렴을 가진 흰쥐의 폐 조직에서 폐포강은 미만성으로 포말성 호산성 삼출액을 보였으며, 폐 간질 조직에는 림프구와 형질세포를 포함한 단핵구들이 침윤되었으나 그 정도는 미

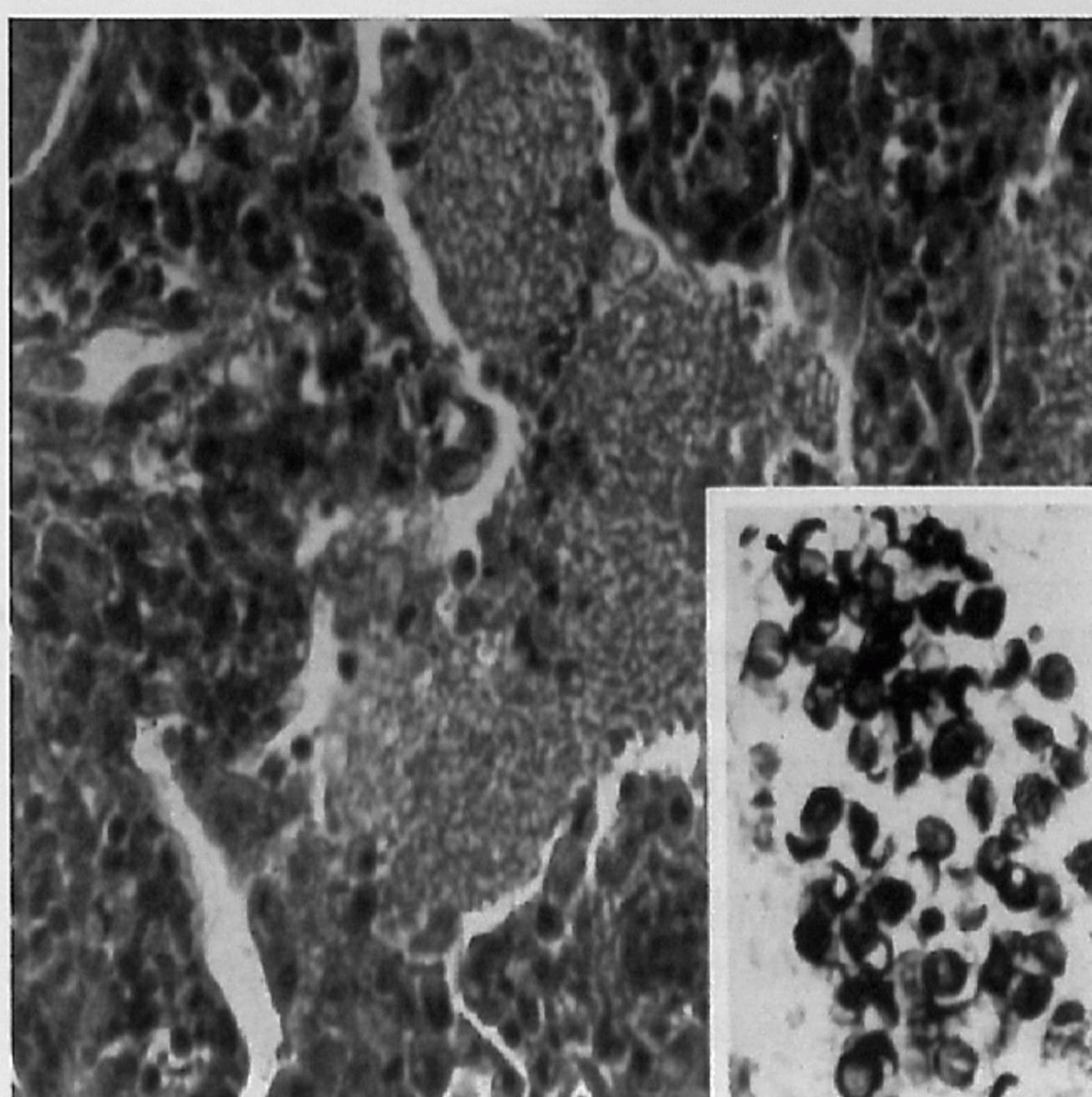


Fig. 1. Light micrograph shows intra-alveolar foamy exudate and some inflammatory infiltrates in the alveolar septa. Inset: Gomori-methenamine silver stain shows some cysts of *P. carinii* organism.

약하였다. GMS 염색에서 *P. carinii* 균체가 대부분 둥글거나, 컵 또는 반달 모양의 포낭 구조를 가지면서, 그 표면에 주름이 있거나 피막점(capsular dot)이 있었다. 폐포강에는 포말성 호산성 삼출액과 함께 폐포 대식세포들이 관찰되었으며 그 수는 대조군에 비해서 약간 증가하였다. 폐포벽에는 섬유모세포의 수가 증가하였고, 림프구 및 형질세포의 침윤과 교원질 침착으로 인해 폐포벽이 다소 비후되었다(Fig. 1).

투과전자현미경 소견

P. carinii 영양형의 균막이 I형 폐포세포의 세포막과 직접 밀착하거나, 영양형의 관상연장(tubular extensions)이 I형 폐포세포의 세포막과 밀착하는 양상을 보였다(Fig. 2). *P. carinii*가 부착한 I형 폐포세포의 세포질 및 세포소기관은 다양한 손상과 파괴를 보였으며, 때때로 *P. carinii* 영양형이 폐포벽의 간질 내로 침투한 소견도 있었다. I형 폐포세포에 부착한 *P. carinii*의 영양형은 그 형태가 매우 불규칙하고 여러 개의 영양형이 I형 폐포세포 표면에 밀착 배열을 하면서 부착하였다. *P. carinii* 포낭은 대부분 폐포강에 위치하면서 영양형과 함께 활발한 증식 양상을 보였으며, I형 폐포상피세포에 부착하는 포낭은 거의 찾을 수 없었다. II형 폐포세포의 표면에는 미세융모가 잘 보존되어 있었으며, *P. carinii*의 영양형 또는 포낭의 부착을 거의 볼 수 없었다.

주사전자현미경 소견

P. carinii 영양형의 형태는 매우 불규칙하고 표면에 무수한 관상연장 구조를 갖고 있었다. 폐포세포에 부착되어 있는 영양

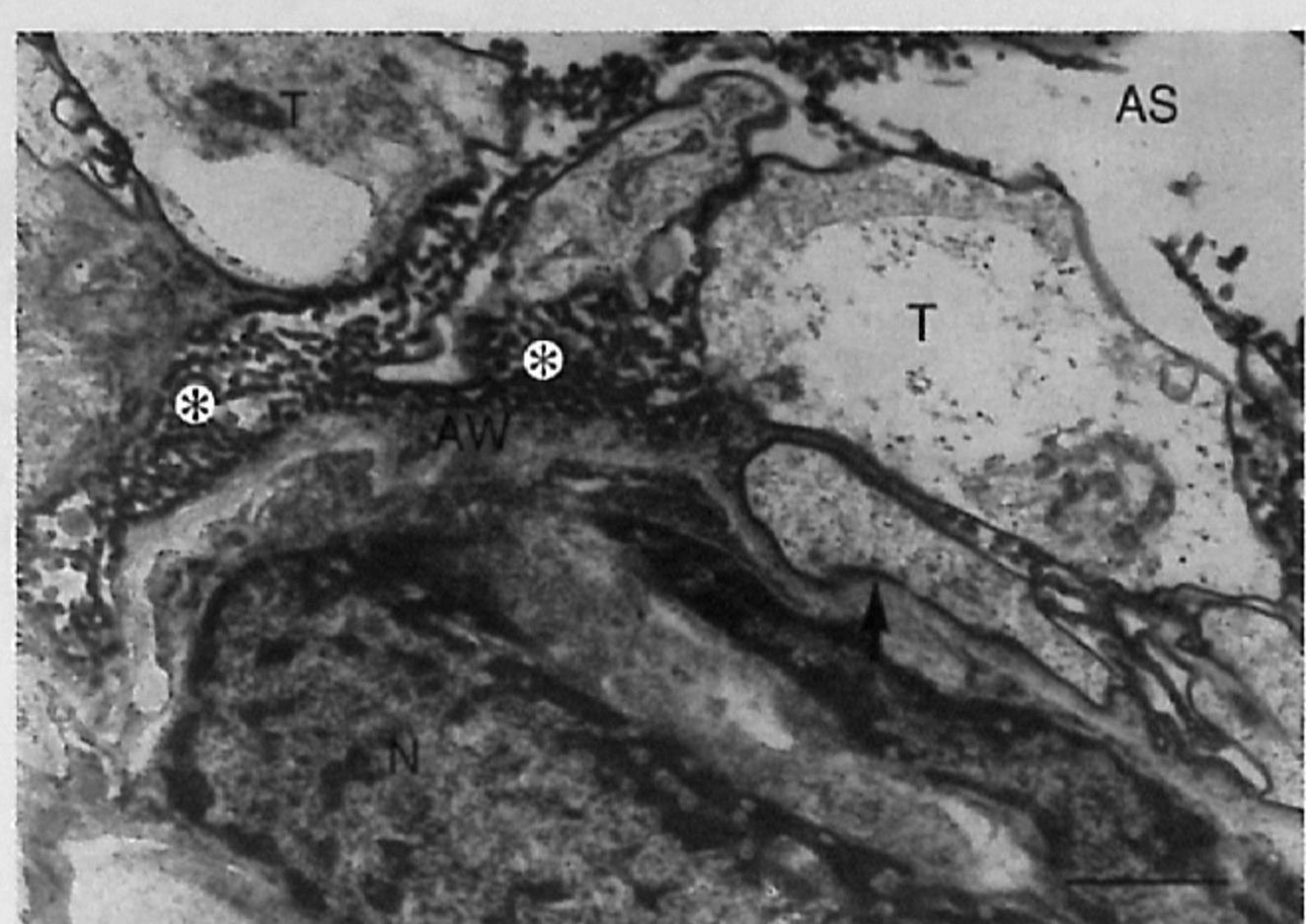


Fig. 2. Transmission electron micrograph shows some *P. carinii* trophozoites which attached firmly to type I alveolar cells by numerous tubular extensions (*) of the trophozoites. A trophozoite attached firmly to the alveolar wall (arrow). T: trophozoite of *P. carinii*, AS: alveolar space, AW: alveolar wall, N: nucleus of interstitial cell. Bar= 1 μm, ×17,000.

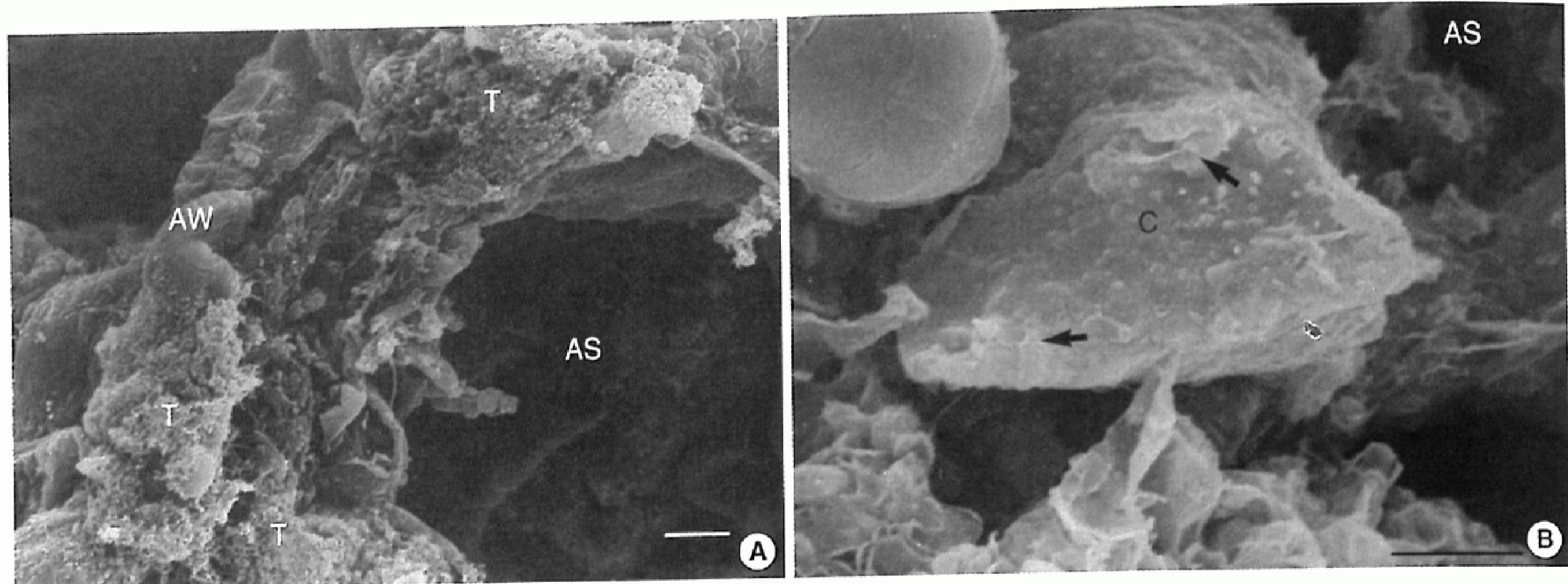


Fig. 3. A: Scanning electron micrograph shows trophozoites of *P. carinii* attached to alveolar cells. B: A semilunar shaped cyst with a few tubular extensions (arrows) on the outer surface is seen in alveolar space. C: cyst of *P. carinii*, T: trophozoite of *P. carinii*, AS: alveolar space, AW: alveolar wall. A: Bar= 3 μm , $\times 3,450$, B: Bar= 2 μm , $\times 10,500$.

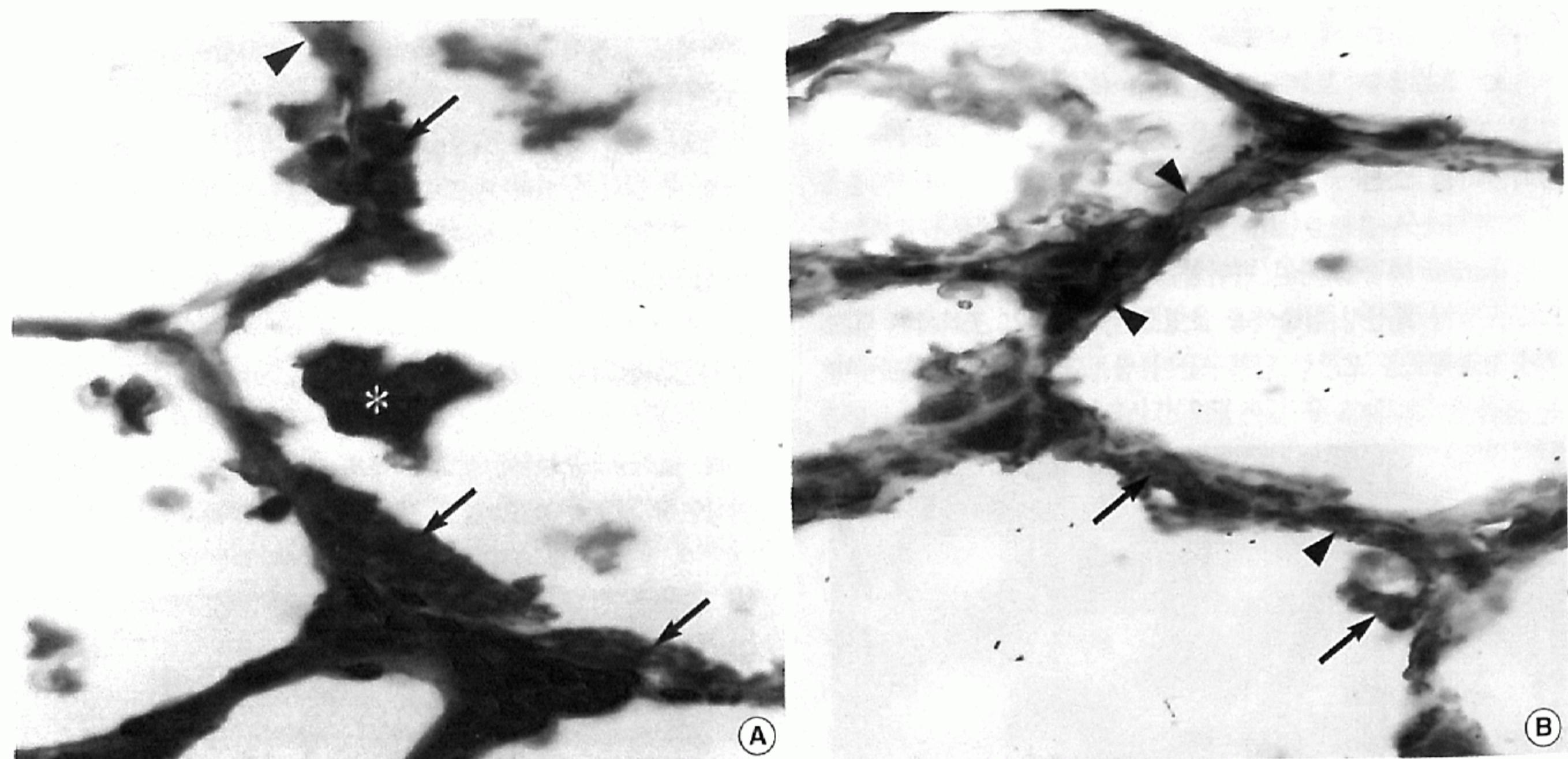


Fig. 4. A: Immunohistochemical stain for fibronectin shows positive expression on the *P. carinii* trophozoites (arrows), alveolar macrophages (asterisks), and surface of the type I alveolar cells (arrow head). B: Vitronectin shows diffusely positive expression along the type I alveolar cells (arrow heads) and trophozoites (arrows) attached to the alveolar wall.

형은 관상연장에 의해 폐포세포 표면과 단단히 부착되어 있었다 (Fig. 3A). 포낭은 둥글거나 반달 또는 초승달 등의 모양으로 형태가 다양하였으며, 주위 폐 조직에 비해서 전자 밀도가 높아 관찰이 용이하였다. 포낭은 영양형에 비해서 균막 표면이 매끈하였으며 관상연장의 수가 매우 적고 길이는 짧았다. 포낭은 폐포세포와 부착하지 않고 주로 폐포강에서 볼 수 있었다 (Fig. 3B). 폐포강에는 폐포 대식세포가 흔히 보였으며 활단면을 보이는 폐포 대식세포의 세포질 내에는 다수의 *P. carinii* 균체의 일부를 탐식하였다.

면역조직화학법에 의한 Fibronectin 및 Vitronectin의 발현

단클론 항체인 fibronectin과 vitronectin를 사용하여 광학현미경용 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 폐포세포막을 따라서 선상으로 다소 약하게 발현하였다 (Fig. 4). 폐포 대식세포에서는 부분적으로 세포질에 양성 발현을 보

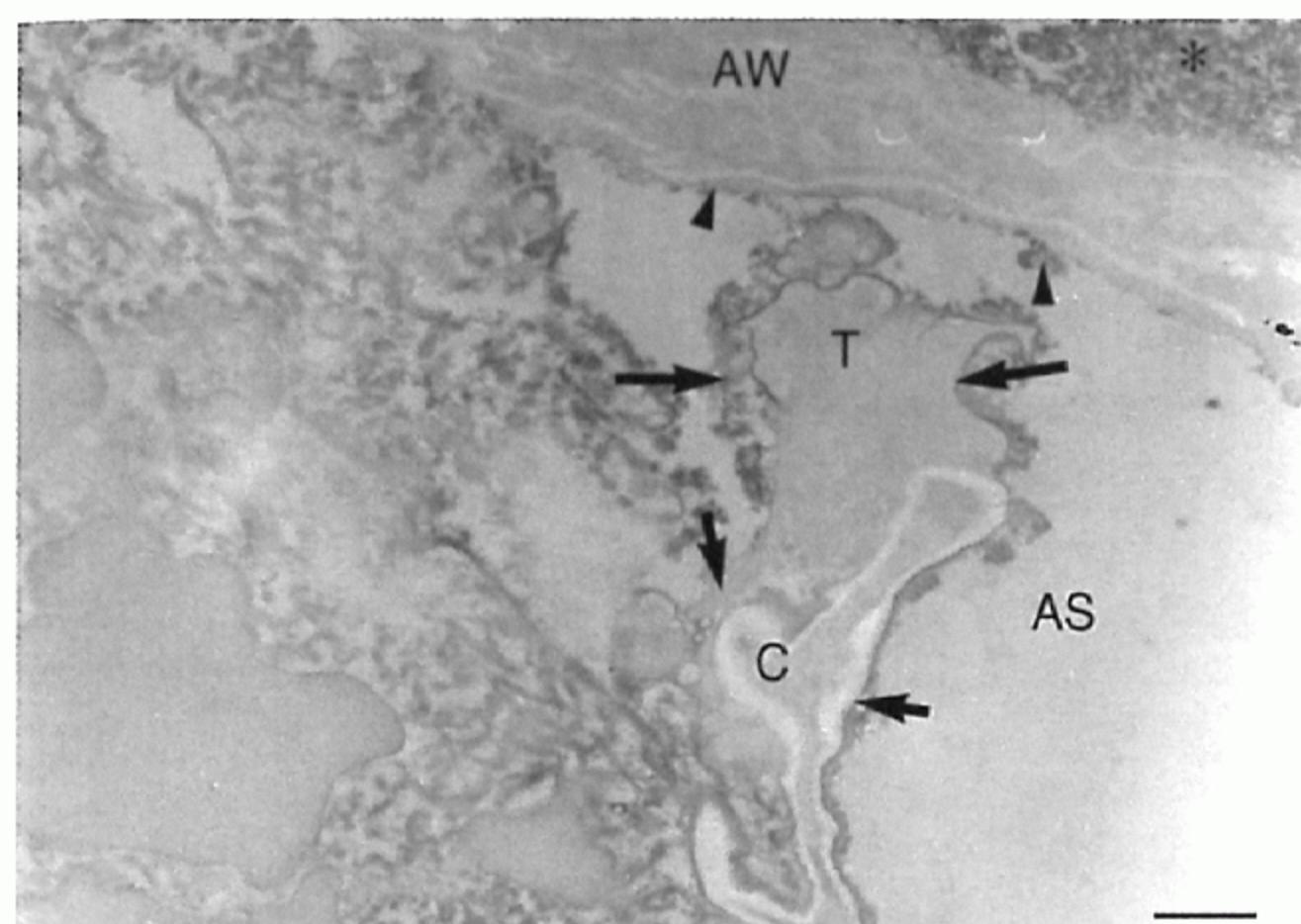


Fig. 5. Pre-embedding immunoelectron micrograph using fibronectin shows diffusely electron dense expression on the pellicles of the trophozoites (long arrows) and collapsed cyst (short arrows), less electron dense expression on type I alveolar cell surface (arrow heads), and floating materials (asterisk). T: trophozoite of *P. carinii*, C: collapsed cyst of *P. carinii*, AS: alveolar space, AW: alveolar wall (Bar= 1 μ m, \times 10,000).

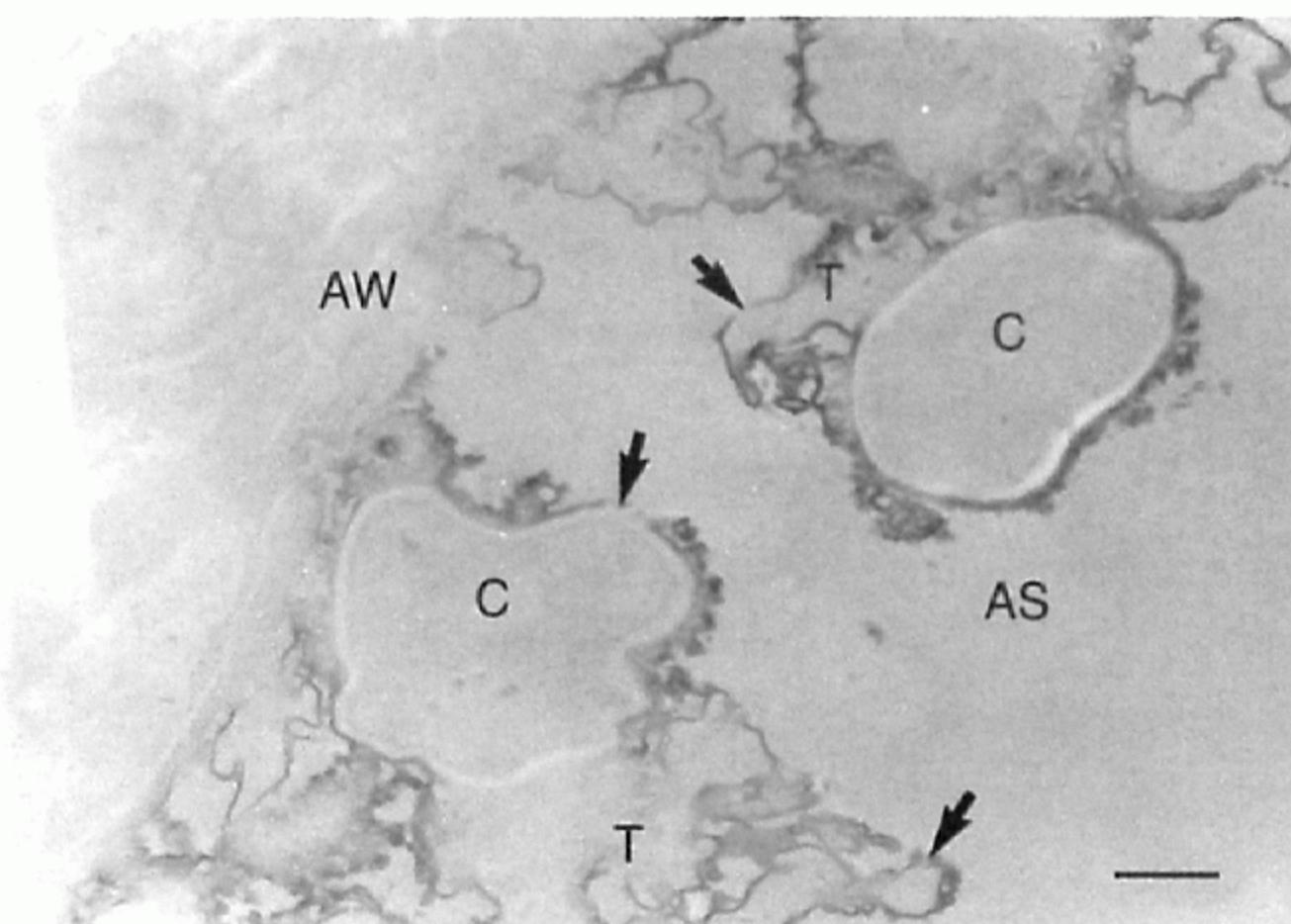


Fig. 6. Pre-embedding immunoelectron micrograph using vitronectin shows electron dense expression along the surface pellicles of trophozoite, and cysts (arrows). T: trophozoites of *P. carinii*, C: cyst of *P. carinii*, AS: alveolar space, AW: alveolar wall (Bar= 1 μ m, \times 10,800).

선상으로 발현되었다. *P. carinii* 영양형이 I형 폐포세포와 밀착한 부위에서는 fibronectin과 vitronectin에 대한 발현이 약하였다(Fig. 5, 6).

광학현미경 TUNEL 소견

폐포벽을 따라서 세포자멸사를 일으킨 폐포세포가 간헐적으로 TUNEL에서 발현되었으나 I형 폐포세포인지 II형 폐포세포 인지는 분명하지 않았다. TUNEL에 발현된 폐포세포의 세포자멸사는 *P. carinii*가 폐포벽에 부착하는 부위에서 주로 관찰되었고, *P. carinii*가 분포하지 않는 폐포에서는 TUNEL 발현을 거의 볼 수 없었다. 폐포강 내에 위치한 폐포 대식세포에 탐식된 세포자멸사체에서도 TUNEL에서 강하게 발현되었다(Fig. 7). 그리고 폐포강에 흩어진 세포 잔해물에서도 TUNEL에 양성 발현을 볼 수 있었다. 대조군에서는 폐포세포나 *P. carinii* 또는 폐포 대식세포 등에서 TUNEL에 양성 발현을 거의 볼 수 없었다.

전자현미경 TUNEL 소견

폐포벽을 구성하는 I형 및 II형 폐포세포에서 세포자멸사가 일어난 곳에서는 핵막을 중심으로 전자밀도가 강한 TUNEL 양성 발현을 보였으며, 세포자멸사의 진행에 따라 그 발현의 양상이 다양하였다. 즉 핵의 변연부에 불규칙하게 발현하거나 핵 전체에 걸쳐서 미만성으로 발현하기도 하였으며 일부에서는 핵막이 부서지면서 조각으로 나뉘어진 발현 양상을 볼 수 있었다. 폐포벽을 포함한 폐 간질에 비후를 보이는 부위에서도 때때로 섬유모세포의 핵에서 TUNEL 양성 발현을 볼 수 있었다(Fig. 8). 폐포강에 출현한 폐포 대식세포의 세포질 내에서 주로 TUNEL에 강하게 발현하였고, 폐포 대식세포의 핵에서는 발현

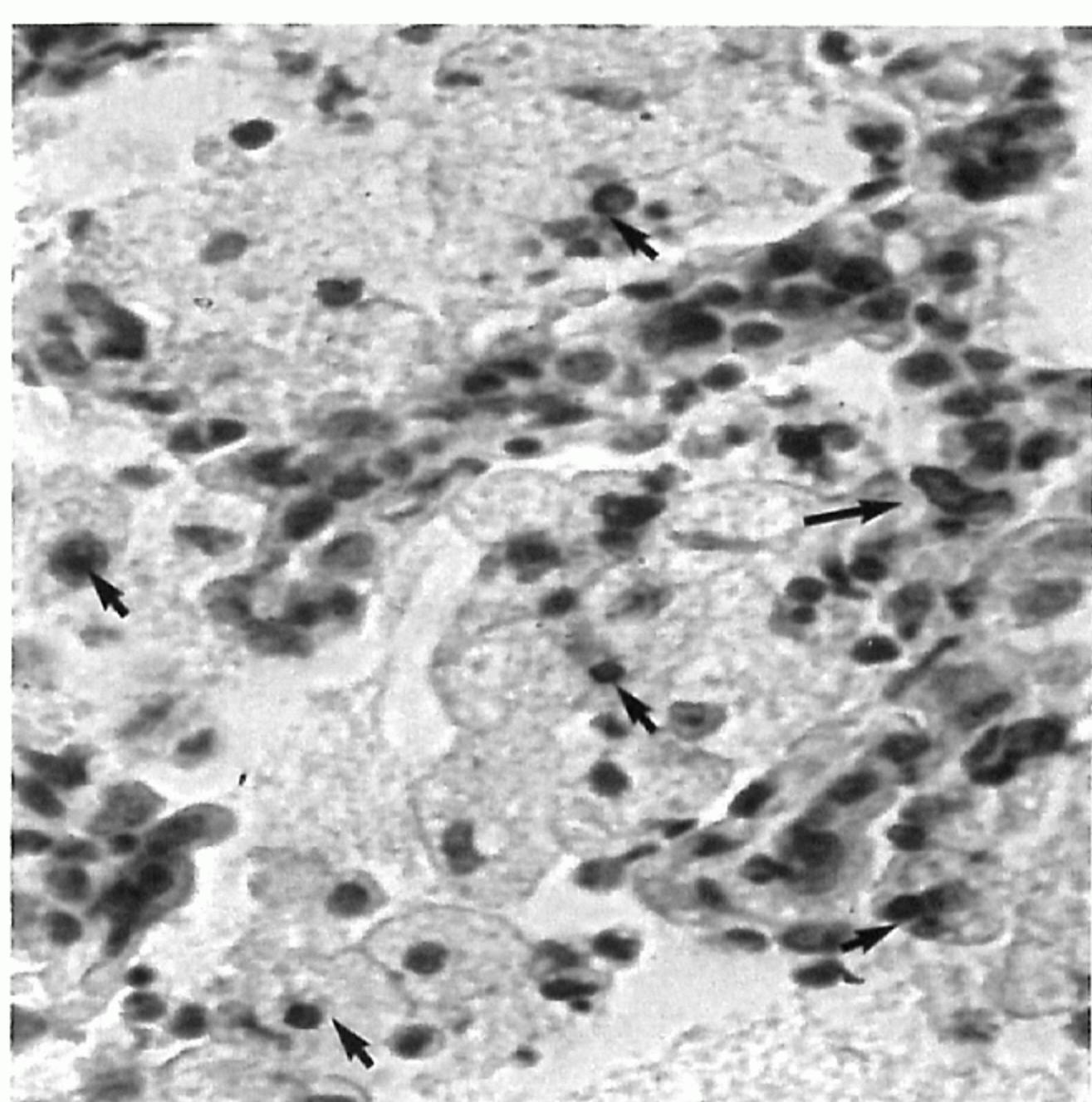


Fig. 7. Light microscopic TUNEL stain shows positive expression on the alveolar cell (large arrow), and apoptotic bodies in cytoplasm of alveolar macrophages (small arrows). TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling.

였다. 드라이 아이스-아세톤 냉동법을 적용한 면역전자현미경 검색에서 fibronectin과 vitronectin의 발현 양상은 서로 비슷한 소견을 보였으며, 주로 영양형의 균막 외층을 따라서 미만성으로 고전자 밀도의 발현을 보였다. 그리고 *P. carinii* 포낭의 균막을 따라서는 다소 약하게 발현하였고, 폐포강에 존재하는 세포 잔해물과 I형 폐포세포막을 따라서 전자 밀도가 다소 약하게

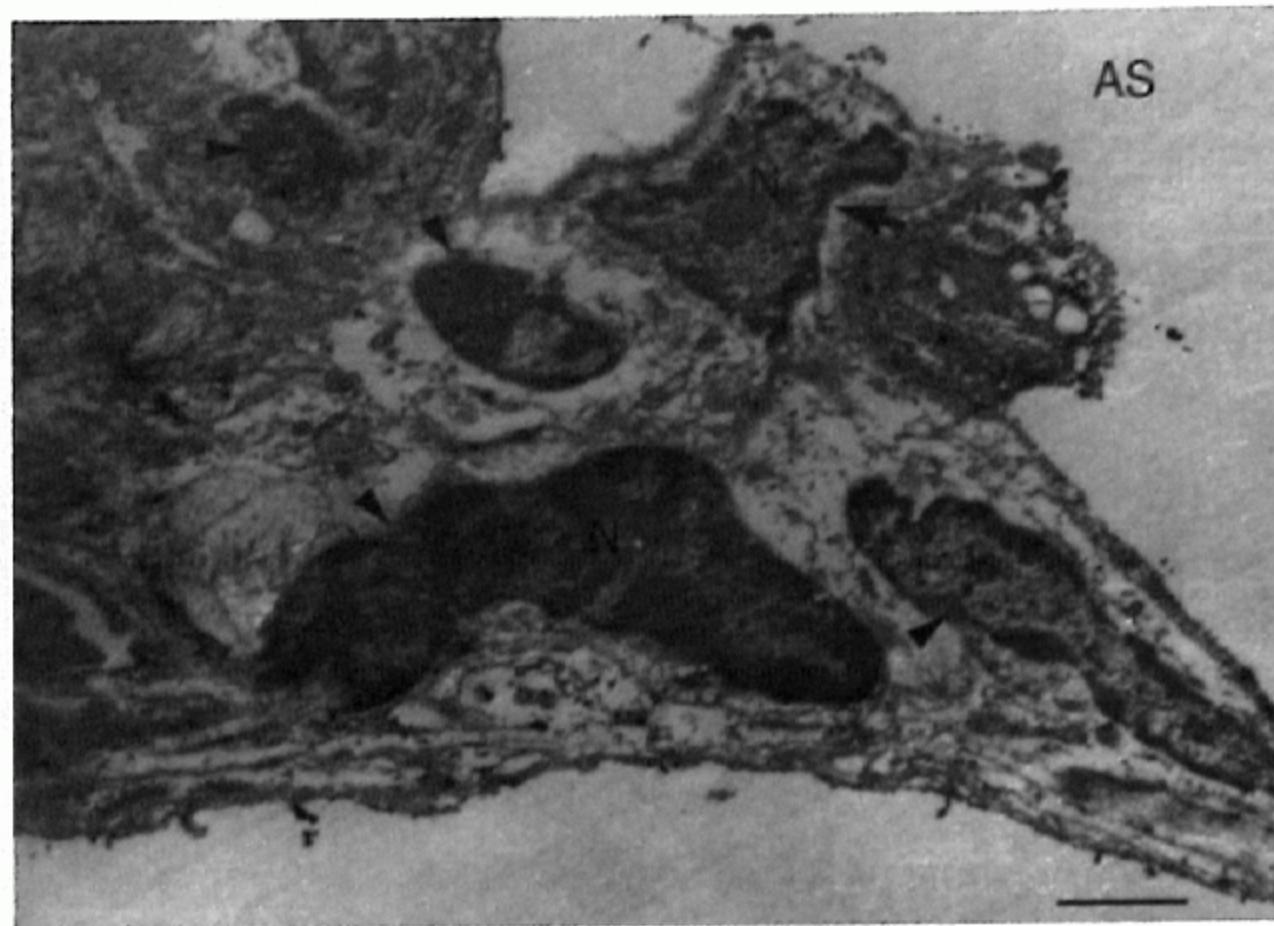


Fig. 8. Electron microscopic TUNEL stain shows an electron dense expression on the nucleus of alveolar cell (arrow), some nuclei of scattered interstitial cells (arrow heads) with variable expression patterns. TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, N: nucleus of alveolar cell or interstitial cells, AS: alveolar space. Bar= 2 μ m, \times 6,300.

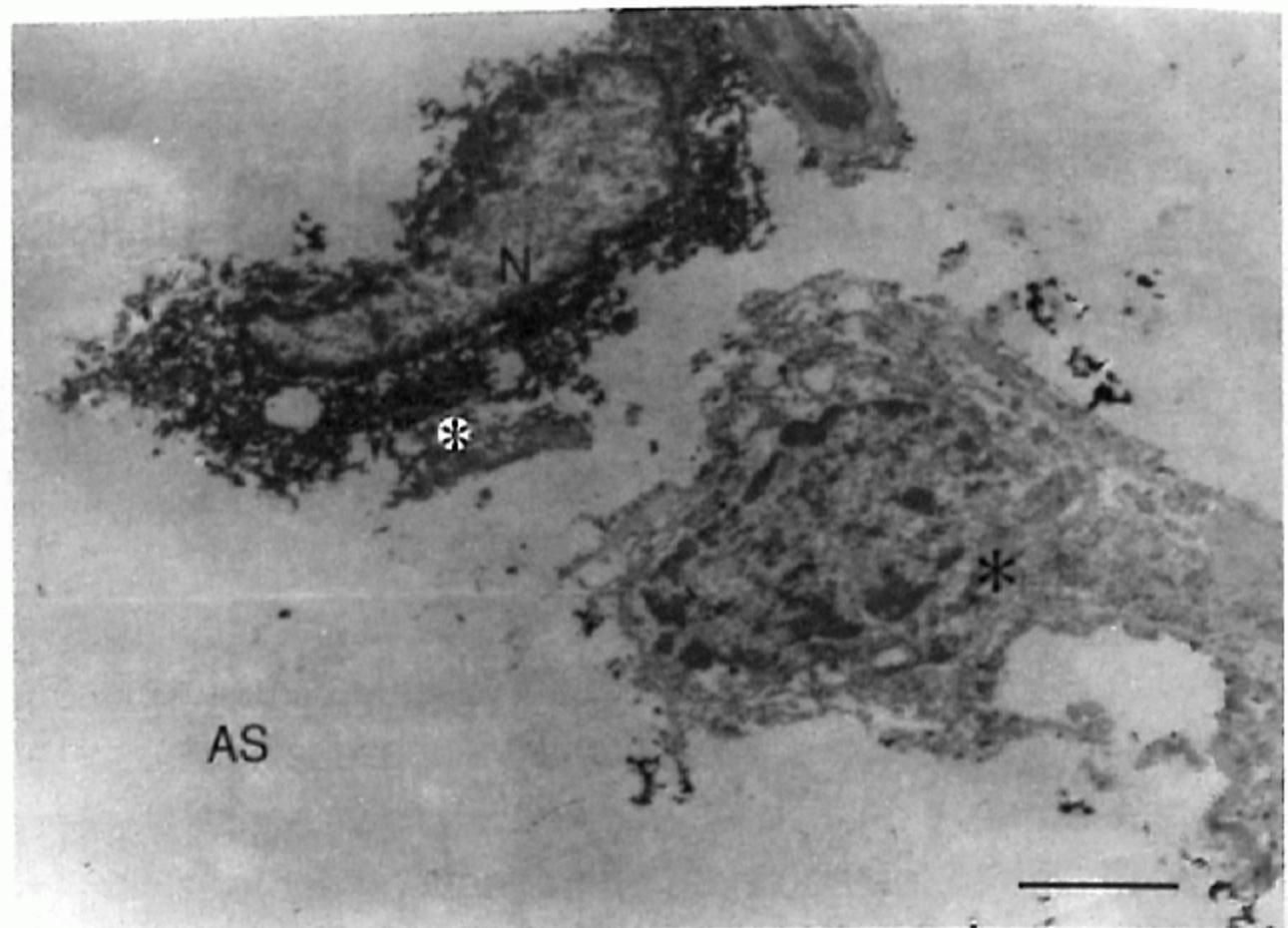


Fig. 10. Electron microscopic TUNEL stain shows an electron dense expression on the cytoplasm (small asterisks) of alveolar macrophage which phagocytize the apoptotic debris. A negative expressed cell (large asterisk) is seen. TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, AS: alveolar space, N: nucleus of alveolar macrophage. Bar= 2 μ m, \times 7,200.

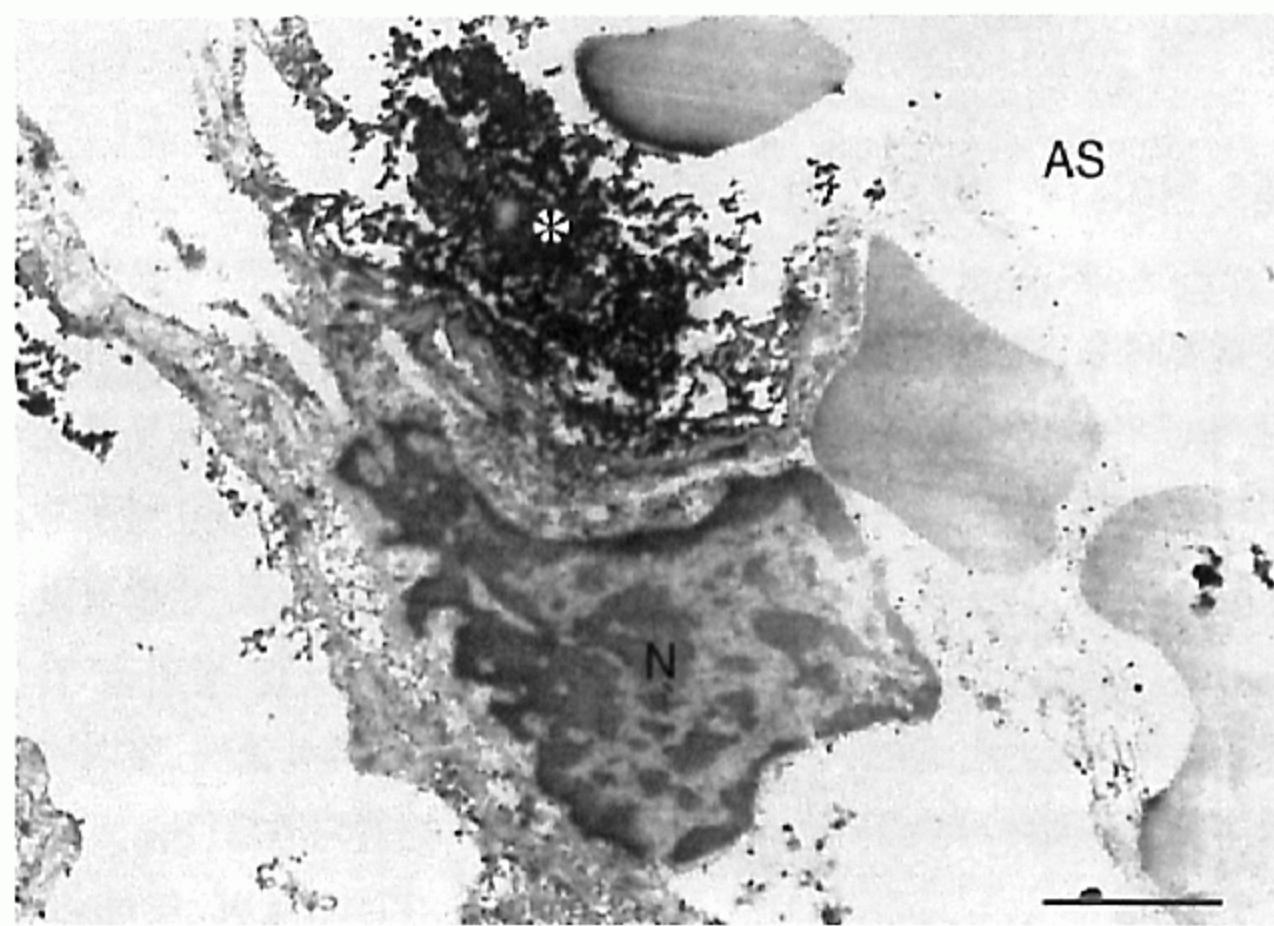


Fig. 9. Electron microscopic TUNEL stain shows strongly electron dense expression on the apoptotic nuclear debris in the alveolar space (asterisk). TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, AS: alveolar space, N: nucleus of alveolar cell. Bar= 2 μ m, \times 9,000.

되지 않거나 미약하였다. 그리고 폐포강에는 흔히 세포자멸사체 또는 세포 잔해물로 보이는 구조물에서 TUNEL에 강하게 발현하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 9, 10).

고찰

*P. carinii*의 영양형은 주로 I형 폐포세포와 결합하며 대부분 폐포세포 표면에 부착하여 직접 손상을 야기하거나 *P. carinii*와 폐포세포 사이의 면역반응을 유도하며, *P. carinii*가 폐포세포의

성장과 복제를 억제하여 폐포세포의 손상과 세포자멸사를 초래하는 것으로 보고되어 있다.^{3,5,13} 본 연구의 전자현미경 관찰에서 *P. carinii*의 영양형, 전포낭 및 포낭의 형태학적 구조를 잘 볼 수 있었으며, 이 중 영양형이 주로 관상연장에 의해 I형 폐포세포 표면에 밀착하거나 폐포세포의 형질막과 깍지를 끼는 형태로 단단히 결합하였다. 드물게 포낭에 의해 폐포세포와 밀착을 보이나 포낭의 표면에 관상연장이 많지 않으므로 포낭의 균막이 직접 폐포세포막과 결합하였다. 따라서 폐포세포와 *P. carinii* 사이의 결합에서 관상연장이 중요한 역할을 하는 것으로 이해할 수 있다. 포낭에 비해서 영양형이 폐포세포에 주로 부착하는 것은 구조적으로 영양형의 표면에 많은 관상연장을 가지고 있을 뿐만 아니라 세포골격 시스템이 포낭에 비해서 보다 잘 발달되어 있기 때문이며, 세포골격 시스템은 *P. carinii*가 폐포세포와 결합하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{3,5}

면역조직화학 검색상 *P. carinii*의 영양형 및 포낭에서 fibronectin과 vitronectin의 접착물질에 대한 발현이 강하게 나타났고 폐포벽을 덮고 있는 폐포세포에 선상 발현을 보였다.

그리고 면역전자현미경 검색에서는 포낭과 영양형의 균막에 미만성으로 고전자밀도의 양성 발현을 보였으며 폐포세포 표면을 따라서도 선상의 양성 발현을 보여 fibronectin과 vitronectin이 *P. carinii*와 폐포세포 사이의 결합에 큰 역할을 하였을 것으로 생각된다. 이러한 점은 *P. carinii*와 폐포세포의 결합에서 폐포강에 존재하는 fibronectin, vitronectin, 표면활성제-A 및 -D 등의 접착물질이 관여하는 역할에 대한 일련의 연구^{5,10-13,20}에서도 이를 뒷받침하고 있다. *P. carinii*가 I형 폐포세포에 직접 부착하는 부위에서는 접착 물질에 대한 발현이 약하거나, 없는 것은 *P. carinii*와 폐포세포가 결합하면서 면역학적 반응이 이미

시작된 것으로 해석할 수 있다.⁵ 그리고 I형 폐포세포막에 특이한 수용체가 존재하여 *P. carinii* 균막에 위치한 당단백질, β -glucan 및 폐포 내의 접착물질 등과 결합한다는 연구 보고도 있다.^{5,12}

권 등¹⁹은 *P. carinii*와 폐포세포와의 상호 반응에 관한 연구의 투과전자현미경 관찰에서 *P. carinii*가 I형 폐포세포에만 부착하는 이유로, 첫째 I형 폐포세포는 폐포벽의 대부분을 덮고 있어 *P. carinii* 영양형이 쉽게 부착할 수 있는 공간을 제공하고, 둘째 II형 폐포세포의 표면에는 미세융모가 다수 존재하는 데 비해서 I형 폐포세포의 표면은 대체로 평활하여 영양형이 쉽게 부착할 수 있으며, 셋째 I형 폐포세포 막 표면에는 *P. carinii*와 결합에 관여하는 특이한 수용체가 있을 것으로 보고하였다. Limper 등⁵은 폐포강에 존재하는 fibronectin, vitronectin, 표면활성제-A 및 -D 등의 단백 물질에 대해서 *P. carinii*의 균막에 당단백-A 및 β -glucan 등의 상응하는 배위자를 가지며, 이들의 상호 작용으로 *P. carinii*와 폐포세포가 결합하는 것으로 보고하였다.

*P. carinii*의 영양형이 I형 폐포세포와 결합하면서 폐포강에는 접착성을 가진 기질 당단백, 표면활성제 단백물질, 면역글로부린, fibronectin, vitronectin, 섬유소원 및 gangliosides의 양이 증가한다.⁵ 폐포강에 이런 접착물질의 증가는 손상 받은 폐포-모세혈관 막을 통해서 혈청 단백질이 빠져나감으로써 초래되거나 감염된 폐 조직에서 국소적인 생산 증가로 야기될 수 있다.²¹ Limper 등^{12,22}은 fibronectin 및 vitronectin이 *P. carinii*와 폐포세포 사이의 결합을 용이하게 할 것으로 보고하였다. Fibronectin은 *P. carinii* 균막에 존재하는 당단백질-A와 결합하며,²³ vitronectin은 *P. carinii* 균막에 존재하는 β -glucan을 포함한 탄수화물과 결합하는 것으로 알려져 있다.^{22,24}

그리고 vitronectin과 fibronectin 등의 접착성 단백 물질은 폐포 대식세포가 *P. carinii*와 부착하는 데에도 관여하며, vitronectin은 폐포 대식세포가 *P. carinii*를 잘 인식하도록 하여 탐식을 용이하게 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁵ *P. carinii*를 탐식한 후 폐포 대식세포에서는 반응성 산화제 및 TNF- α 를 위시한 시토카인 분비가 증가되며, 산소유리기, 반응성 질소 중간 산물 등의 분비가 증가하면서 *P. carinii*를 파괴시키는 것으로 알려져 있다.^{26,27} 일반적으로 *P. carinii*가 부착하면 폐포 대식세포에서 TNF- α 의 분비가 증가되어 *P. carinii*의 세포막에 존재하는 TNF- α 수용기와 결합하여 *P. carinii*에 직접적인 독성 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{11,28,29}

*P. carinii*가 폐포세포에 부착하면 *P. carinii* 병원체의 생활주기가 활발하게 진행되어서 그 수는 많아지나 폐포세포에서는 세포주기에 장해를 초래하는 것으로 보고되어 있다.^{5,25} 즉 *P. carinii*는 폐포세포에 부착한 후 폐포세포 p34^{cdc2} kinase 활성을 방해함으로써 폐포세포의 성장을 억제하며,⁵ 때로는 폐포세포의 세포주기의 진행을 변화시키는 것으로 알려져 있다.²⁵ *P. carinii*가 폐포세포와 결합하면 폐포세포에 직접적인 독성 영향을 초래하

거나 *P. carinii*에 대한 숙주 세포의 면역 반응의 결과 또는 동원된 염증 세포에 의한 염증 작용의 일환으로 폐포세포에 손상을 초래한다.³ 그러나 *P. carinii*와 폐포세포 사이의 상호 반응에 관련된 기전과 폐포세포의 상해 기전 및 진행 과정에 대해서는 아직도 보고되지 않은 점이 많다. 첫째, *P. carinii*가 대부분 I형 폐포세포에 부착하여 어떤 기전으로 폐포세포에 상해를 초래하는지, 둘째 상해 받은 폐포세포는 어떤 과정을 거쳐 세포자멸사를 초래하는지, 셋째, 세포자멸사를 일으킨 I형 폐포세포 자리에 II형 폐포세포의 증식이 일어나는 기전에 관한 연구 등 아직도 규명할 부분이 많이 있다.

한편 의생물학 연구에서 TUNEL법이 적용되면서 각종 세포 손상 때에 볼 수 있는 세포자멸사를 광학현미경상에서 형태학적으로 관찰할 수 있게 되었다.¹⁴ 또한 최근에는 전자현미경 TUNEL 기법이 개발되고 있어 광학현미경에서 판단이 어려운 초기 과정의 세포자멸사를 전자현미경 수준에서 관찰이 가능하여 이에 관한 연구가 제한적으로 시도되고 있다.^{15,18} 일반적으로 세포자멸사는 빠르게 진행하는 변화로서, 세포자멸사의 초기 과정을 형태학적으로 자세히 발현하기 위해서는 전자현미경 TUNEL법의 적용이 필요하다. 그러나 *P. carinii*와 폐포세포와의 상호 작용으로 초래된 폐포세포의 손상과, 이어서 초래되는 세포자멸사를 광학현미경 및 전자현미경 TUNEL법을 이용하여 형태학적으로 발현한 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *P. carinii* 감염으로 인한 폐포세포의 손상과 세포자멸사의 초래 기전을 형태학적으로 이해하기 위해 광학현미경 및 전자현미경 TUNEL법을 시도하였다.

광학현미경 및 전자현미경 TUNEL 기법의 적용 원리로서는 세포자멸사를 초래한 폐포세포 핵의 DNA에 분절이 일어나며, 분절된 DNA의 끝 부분(3'-OH)에 terminal deoxy- ribonucleotidyl transferase (TdT)를 반응시킨다. 여기에 biotinylated nucleotide (dUPT-biotin)를 반응시키며, 발색을 나타내는 DAB 발색 물질을 붙여서 광학현미경상으로 세포자멸사 여부를 관찰할 수 있다. 전자현미경 TUNEL 발현을 위해서는 광학현미경 TUNEL의 DAB 발색 단계에 연속하여 osmium tetroxide (O_3O_4)를 DAB 발색 물질에 붙여서 전자 빔 통과 때에 반응성 물질로 치환하여 전자밀도가 큰 물질로 만들어 전자현미경적 검색이 가능해진다. 전자현미경 TUNEL 발현을 잘 관찰하기 위해서는 파라핀 조직의 사용은 부적절하며, 동결 보관된 조직을 사용하고, 면역전자현미경의 전포매 기법을 적용하여 시료 제작 과정의 초기 단계를 수행할 수 있다.^{10,13,18,30}

본 연구의 광학현미경 TUNEL 결과에서 폐포벽을 따라서 세포자멸사를 야기한 폐포세포의 핵에서 TUNEL에 양성으로 발현되었으나, I형 폐포세포인지 II형 폐포세포인지는 광학현미경 관찰에서는 분명하지 않았다. TUNEL에 발현된 세포들은 주로 *P. carinii*가 폐포세포와 결합된 병변에서 잘 관찰되었으며, *P. carinii*가 결합되지 않는 폐포면에서는 TUNEL 양성 발현을 거의 볼 수 없었다. 이러한 결과는 *P. carinii*가 폐포세포에 직접

결합함으로써 세포자멸사를 초래하는 것으로 해석할 수 있다. 폐포강에 위치한 폐포 대식세포의 핵은 TUNEL에 발현되지 않았으나 세포질에서는 흔히 TUNEL에 발현된 세포자멸사체를 관찰할 수 있었다. 이 점에 대해서는 활동성 폐포 대식세포가 손상된 폐포세포의 세포자멸사체를 탐식한 것으로 볼 수 있다.

전자현미경 TUNEL 검색에서 폐포벽을 구성하는 I형 및 II형 폐포세포의 핵에서 전자밀도가 강하게 TUNEL 양성 발현을 보였으며 주로 핵막의 변연부에서 발현하였으나, 그 발현의 양상은 다양하였다. 즉 핵의 변연부를 따라 불규칙하게 발현하거나 핵 전체에 걸쳐서 미만성으로 발현되기도 하며 일부에서는 핵막 부분이 부서지면서 조각으로 나뉘어지는 양상을 보였다. 이와 같이 전자현미경 TUNEL에서 발현 양상이 다양한 것은 세포자멸사의 진행 시간대가 상이함을 나타낸 것으로 해석할 수 있다. 핵 변연부를 중심으로 TUNEL 양성 발현을 보이는 세포들은 세포자멸사의 초기 과정으로 생각하였으며, 이들 세포는 광학현미경상에서는 정상 세포와 구별이 어려웠다. 따라서 세포자멸사의 초기 단계를 형태학적으로 알아보기 위해서는 전자현미경 TUNEL법의 적용이 필요할 것으로 생각하였다. 폐포강에서 흔히 발현된 세포자멸사체는 대부분 폐포세포의 기인한 것으로 보이며, 폐포 대식세포에 의해 탐식 및 처리되는 것으로 해석하였다. 폐포벽에서 간혹 발현되는 섬유모세포나 염증 세포의 세포자멸사는 폐포자충에 의해 직접 초래된 것보다는 폐포자충 폐렴의 염증 진행 과정에서 야기된 세포자멸사로 판단하며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

참고문헌

- 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.
- 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.
- Cushion MT. Taxonomy, genetic organization, and life cycle of *Pneumocystis carinii*. Semin Respir Infect 1998; 13: 304-12.
- O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. Infect Immun 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- α 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- α in the interaction of *Pneumocystis carinii* and alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Korean J Pathol 1999; 33: 684-94.
- Martin WJ. Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 8: 356-7.
- 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.
- Kwon KY, Jeon YJ, Chang ES. Expression of fibronectin, vitronectin, surfactant-A, D in interaction of *P. carinii* and alveolar epithelial cells in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Korean J Pathol 2000; 34: 625-35.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119: 493-501.
- Schitton JC, Djonov V, Fine A, Burri PH. Programmed cell death contributes to postnatal lung development. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 18: 786-93.
- Haet BA, Lee CH, Shukla GS, et al. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. Toxicology 1999; 133: 43-58.
- Aljandali A, Pollack H, Yeldandi A, Li Y, Weitzman SA, Kamp DW. Asbestos causes apoptosis in alveolar epithelial cells: role of iron-induced free radicals. J Lab Clin Med 2001; 137: 330-9.
- Takemura G, Kato S, Aoyama T, et al. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. J Pathol 2001; 193: 546-56.
- 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.
- 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.
- 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.
22. 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.
 23. 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.
 24. Olson EJ, Standing JE, Griego-Harper N, Hoffman OA, Limper AH. Fungal β -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor- α release from macrophages. *Infect Immun* 1996; 64: 3548-53.
 25. 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.
 26. Hidalgo HA, Helmke RJ, German VF, Mangos JA. *Pneumocystis carinii* induce an oxidative burst in alveolar macrophages. *Infect Immun* 1992; 60: 1-7.
 27. Hoffman OA, Standing JE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor- α release from alveolar macrophages through a β -glucagon-mediated mechanism. *J Immunol* 1993; 150: 3932-40.
 28. Pesanti EL. Interaction of cytokine and alveolar cells with *Pneumocystis carinii* in vitro. *J Infect Dis* 1991; 163: 611-6.
 29. Chen W, Havell EA, Harmsen AG. Importance of tumor necrosis factor- α and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 1279-84.
 30. Kwon KY. Immunogold labeling in the transmission and scanning electron microscopy. *Keimyung Med J* 1996; 15: 96-104.