

Triamcinolone Acetonide가 배양 켈로이드 섬유아세포의 G1 세포주기 관련 유전자 발현에 미치는 영향

우상현·설정현·서성일·백원기·서민호

영남대학교 의과대학 성형외과학교실,
· 경명대학교 의과대학 미생물학교실

- Abstract -

EXPRESSION OF G1 CELL CYCLE RELATED GENES IN TRIAMCINOLONE ACETONIDE TREATED KELOID FIBROBLASTS

Sang-Hyun Woo, M.D., Jung-Hyun Seul, M.D., *Seong-Il Suh, M.D., *Won-Ki Baek, M.D., *Min-Ho Suh, M.D.

Department of Plastic Surgery, School of Medicine, Yeungnam University,

*Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

The effect of triamcinolone acetonide(TA) on the expression of G1 related genes was investigated in the cultured keloid fibroblast. The addition of TA to the culture medium resulted in growth inhibition of keloid fibroblast. TA reduced the expression of cyclin A, B, E and cyclin dependent kinase(CDK) 2 mRNA, but unexpectedly, the expression of cyclin C, D1 and CDK4 mRNA was not affected significantly as compared with those of normal fibroblast. Expressions of p16^{INK4a}, p21^{WAF1} and p27^{KIP1}, the well-established CDK-inhibitors, were also investigated. The level of p16^{INK4a} was not detected in both normal and keloid fibroblasts and the expression of p27^{KIP1} was significantly decreased in keloid fibroblast. The expression of p21^{WAF1} was dramatically increased in keloid fibroblast but not significantly changed in normal fibroblast. Also the expressions of p53 and pRb, the well known tumor suppressor genes, were increased by the addition of TA. These data suggested that the observed growth inhibitory effect of TA may be related to transcriptional inactivation of cyclin A, B, E and CDK2 and to the transcriptional activation of p21, but the mechanisms of unchanged expression of cyclin C, D1 and CDK4 mRNA remain to be elucidated.

Key Word: Keloid, Triamcinolone acetonide, Cell cycle

I. 서 론

켈로이드는 일종의 섬유성 증식성 질환(fibroproliferative disorder)으로서 상처의 치유과정시 주로

섬유아세포의 이상 증식과 아울러 세포외 기질의 과다 생성 및 축적에 의해 초래된다고 알려져 있으나, 그 정확한 발병 원인은 아직까지 잘 밝혀져 있지 않다. 그러나 주로 상처후에 호발되는 것으로 보

아 섬유아세포의 이상 증식이나 잘못된 조직 재형성(tissue remodeling)의 결과로 이겨지며, 켈로이드과 같이 세포의 기질의 축적을 보이는 폐섬유증, 사구체신염, 간경화 등에 transforming growth factor- β (TGF- β)가 관련되어 있는 것으로 보아 켈로이드발생에 TGF- β 도 중요한 역할을 하고 있으리라고 생각된다.^{1,2} 켈로이드는 교원질의 과다합성 뿐 아니라 교원질 분해효소인 collagenase의 활성도 정상에 비해 높으며 교원질의 파괴가 성상에 비해 증가되어 있다.^{3,5} 이런 관점에서 볼 때 켈로이드형성은 교원질 유전자 발현 조절의 이상으로 볼 수 있으며, 또한 교원질 유전자 발현 조절에 영향을 미치는 신호 전달의 이상으로 초래될 수 있다.

아직 만족할 만한 켈로이드의 예방 및 치료법은 없다. 1960년대 중반에 트리암시노이드(triamcinolone acetonide; 이하 TA)의 치료 효과가 보고 되었으며,⁶ 레티노이드(retinoid), interleukin 6 및 interferon- γ 등의 cytokine, 방사선 조사, 적제술 등의 단독 또는 병용요법 등도 보고되었다.⁷⁻¹²

세포는 성장 및 분열을 하기 위해서 G1 세포주기를 거쳐 S 세포주기로 이행되어야 한다.¹³ 대부분의 종말 분화 세포들은 거의 G0/G1 세포주기에 머물러 있다가 결국 세포의 자위사(apoptotic cell death)를 맞게 된다. 세포가 손상을 입게되면 세포 분열을 하기전에 G1세포주기에 머물면서 세포 자연사 현상(apoptosis)으로 갈 것인지, 혹은 손상을 교정한 후에 재분열을 할 것인지를 결정하게 된다.^{14,15} 그래서 G1 세포주기는 세포의 항상성 유지에 필수적 과정이다. 세포가 G1세포주기에 머물기 위해서는 여러종류의 유전자 산물이 필요한데, 대표적인 것은 p53 및 pRb이다.^{16,18} p53에 의해 유도되는 유전자 산물로는 p21^{WAF1},^{19,20} Bax,^{21,22} Gadd45²³ 등이 알려져 있다. p53은 p21^{WAF1}을 유도하여 cyclin dependent kinase(CDK)의 활성을 차해하며 그 결과 pRb의 기능이 활성화되어 S 세포주기로의 이행을 억제하게 된다.^{16,19,24} p21^{WAF1}과 비슷한 작용을 나타내는 유전자 산물로는 p15^{INK4b},²⁵ p16^{INK4a},²⁶ p18^{INK4c},²⁷ p19^{INK4d},²⁸ p27^{KIP1},²⁹ p57^{KIP2},³⁰ 등이 알려져 있다.

섬유아세포의 성장을 촉진시킨다고 알려진 TGF- β 는 G1-S세포주기 이행에 관련하는 CDK활성을 증가시켜 pRb산물의 인산화에 관여하기 때문에³¹ G1 세포주기 관련 유전자 산물이 켈로이드의 형성과 관계가 있을 것으로 생각된다. 그러나 켈로이드 형성

과 세포주기와의 연관성에 대한 보고는 아직 없다. 또한 치료약제로 이용되고 있는 TA은 켈로이드 세포의 성장을 방해하는데, 어떤 기전을 통하여 일어나는지 아직 잘 모르고 있다.

본 연구는 켈로이드 치료제로 이용되고 있는 TA가 G1세포주기와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 분자생물학적으로 규명하여 보다 나은 켈로이드 치료의 방향을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 세포주, 세포배양 및 TA 처치

정상(CCL-110) 및 켈로이드(CRL-1762) 섬유아 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 11세대의 세포를 분양받아, 16-17세대에서 실험하여 ATCC에서 권장하는 세포 배양 계대수를 준수하였다. 상기의 세포주는 L-glutamine 및 비필수 아미노산이 함유된 Eagle's minimal essential media에 10% 태아소혈청(fetal bovine serum) 및 항생제를 첨가한 배지에서 유지 배양하면서 각 계대배양시 trypan blue 색소배제시험(dye exclusion test)방법으로 세포생존율을 산정하여 생존 세포수가 $5 \times 10^5/ml$ 되도록 배양하였다. Triamcinolone acetonide(Sigma Co.)는 세포를 petri dish에 $5 \times 10^5/ml$ 로 접종한 다음 $10^{-5}M$ 농도로 투여하였다. 대조군은 TA 용해에 사용뒤 에탄올을 실험군에 들어간 양만큼 넣어 5일간 처리 시행하였으며, 2일 간격으로 배지 및 TA를 교환하였다. 대조군과 실험군은 각각 한 개의 배지를 사용하였으며, 같은 실험을 3회 반복하였다.

나. RNA 분리

Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법³²을 변형하여 RNA를 분리하였는데, 세포를 guanidium-thiocyanate(GT) 완충액(4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.33% antifoam A emulsion(Sigma Chemicals), pH 7.0에 용해시킨 다음 phenol-chloroform-isoamylalcohol 수용 혼합액(V:V:V, 24:24:1)과 M sodium acetate(pH 5.2)를 넣고 4°C에서 20분간 10,000 rpm으로 원심한 후 상층액을 취하였다. 여기에 냉장 상태의 isopropanol 동량을 넣고 원침하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 GT 완

총액에 녹인 다음 2.5배의 냉알콜(ice-cold ethanol)을 넣어 RNA를 재원침한 후 70% 알코올로 세척하고 건조기(SpeedVac, Savant Instrument Inc.)를 이용하여 말린 후 diethylpyrocarbonate 처리된 물에 녹여 분광계로 260 nm에서 RNA농도를 측정하고 -20°C에서 보관하면서 2주일 이내에 사용하였다.

다. Northern blot analysis에 의한 mRNA 분석

Northern blot analysis는 mRNA의 양의 차이를 보기위해 상기 방법으로 분리한 20 µg의 RNA에 formamide와 formaldehyde 등을 첨가하고 65°C에서 10분간, 그리고 얼음에 10분간 둔 후 2.2 M의 formaldehyde가 들어있는 0.9% 한천겔(agarose gel)을 이용하여 6 volt/cm으로 잠수 전기영동(submarine electrophoresis)한 다음 nitrocellulose(NC) 필터(Hoefer Scientific Co.)로 약 14 16시간 전이시켰다. 그런 후 NC 필터를 공기중에서 건조시키고, 전기기마(Cole

Parmer Inc.)에 90분간 두어 RNA를 필터에 고정시켜 0.45 M NaCl/45 mM sodium acetate(pH 6.8), 50% formamide, 0.1% SDS, 5% Denhardt's solution (0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 및 0.1% ficoll), 및 5% salmon sperm DNA를 함유한 용액으로 42°C에서 12시간 동안 선재결합(prehybridization)시켰다. RNA-cDNA 유전자 재결합반응은 cDNA를 P-dCTP (DuPont Inc.)로 nick translation하여 특이 활성도가 1×10^8 cpm/g 이상되는 경우에 위의 용액에 cDNA가 10 ng/ml 되도록 첨가하였다.²² 그후 2X SSC(sodium-sodium citrate) (0.3 M NaCl 및 0.03 M sodium citrate, pH 6.8) 및 0.1% SDS(sodium dedocyl sulfate) 용액으로 실온에서 20분간 세척하고, 또 0.2X SSC 및 0.1% SDS가 들어있는 용액으로 65°C에서 10분, 그리고 0.1X SSC 및 0.1% SDS가 들어 있는 용액으로 65°C에서 10분간 세척한 다음 -70°C에서 70-76시간 X-

Table I. Nucleotide Sequences of Primers Used in This Study

Primer*	Sequence(5'→3')
GAPDH-S	CGTCTTCACCACCATGGAGA
GAPDH-AS	CGGCCATCACGCCACAGTTT
Cyclin A-S	CAGAACGAGACCCTGCATTGGCTG
A-AS	CAGATTAGTGTCTCTGGTGGTTG
Cyclin B-S	CCATTATTGATCGGTTCATGCAGA
Cyclin B-AS	CTAGTGGAGAAATTCAAGCTGTGGTA
Cyclin C-S	CCTGTATTAATGGCTCCTACATGTGTG
Cyclin C-AS	GGTTGCCATCTCTTTCTCTCATCGA
Cyclin D1-S	ACCTGGATGCTGGAGGTCTG
Cyclin D1 AS	GAACTTCACATCTGTGGCACA
Cyclin E-S	GGAAGGCAAACGTGACCGTT
Cyclin E- AS	GGGACTTAAACGCCACTTAA
CDK2-S	CATGGAGAACTTCCAAAAG
CDK2-AS	CTATCAGAGTCGAAGATGGGG
CDK4-A	ATGGCTGCCACTCGATATGA
CDK4- AS	CTCTGGTTGCCTTCGTCCTT
p16 ^{INK4} -S	ATGGAGCCTTCGGCTGACT
p16 ^{INK4} - AS	GAGCCTCTCTGGTTCTTCA
p21 ^{WAF1} -S	CGGGATCCGGCGCCATGTCAGAACCGGC
p21 ^{WAF1} - AS	CGGGAATTCTGTGGCGGATTAGGGCTTCC
p27 ^{KIP1} -S	GCGGGATCCATGTCAAACGTGCGAGTGTC
p27 ^{KIP1} - AS	GTGAAGCTTTACGTTGACGTCTCTGA

*S and AS represent sense and antisense primers, respectively.

선 필름에 노출시킨 다음 현상하였다.³³ mRNA 정량은 IBM 컴퓨터에 연결된 음영농도계측기(Hoefer GS360 scanning densitometer, Hoefer Scientific Co.)를 사용하여 측정된 각 음영의 면적을 Gaussian 적분으로 측정하였다.

라. 역전사중합효소연쇄반응을 이용한 mRNA의 정량적 분석

1) 역전사 중합효소를 이용한 cDNA 합성

분리된 RNA 2 μ g을 oligo-dT(16mer)를 사용하여 40 μ l 용량으로 역전사(reverse transcription, RT)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 μ g, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl(pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/ μ l RNase inhibitor(Perkin-Elmer Corporation), 2.5 U/ μ l MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co.), 2.5 μ M oligo-dT로, 반응 조건은 42°C에서 1시간, 99°C에서 5분, 그리고 5°C에서 5분으로 하였다.³³

2) mRNA의 정량적 분석을 위한 중합효소 연쇄

반응

중합효소연쇄반응(PCR)은 5 μ l의 10X reaction buffer (15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl)와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0.25 μ Ci의 α -³²P dCTP 그리고 20 mM sense 및 antisense primer를 각각 1 μ l를 넣은 혼합액에 0.5 μ l의 반응시킨 cDNA 반응액과 2.5 unit의 Taq polymerase(Perkin Elmer co.)를 넣은 후 중류수로 50 μ l로 용량을 맞추고 30 μ l의 광유를 증총한 다음 DNA thermal cycler(Perkin Elmer Co.)를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 본 실험에 사용한 primer 염기서열은 Table I에 나타내었다. 중합효소 연쇄반응의 조건은 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 하였으며, GAPDH (glutaldehyde phosphodihydrogenase) 유전자 증폭을 위해서는 24 주기를, p16^{INK4a}, p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1} 유전자 증폭을 위해서는 25 주기를 시행하였다 Cyclin A, B, C, D1, 및 E 그리고 CDK2 및 4의 primer의 염기서열은 Lucibello 등의 방법³⁴에 따라 합성 정재하여 총 25회의 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

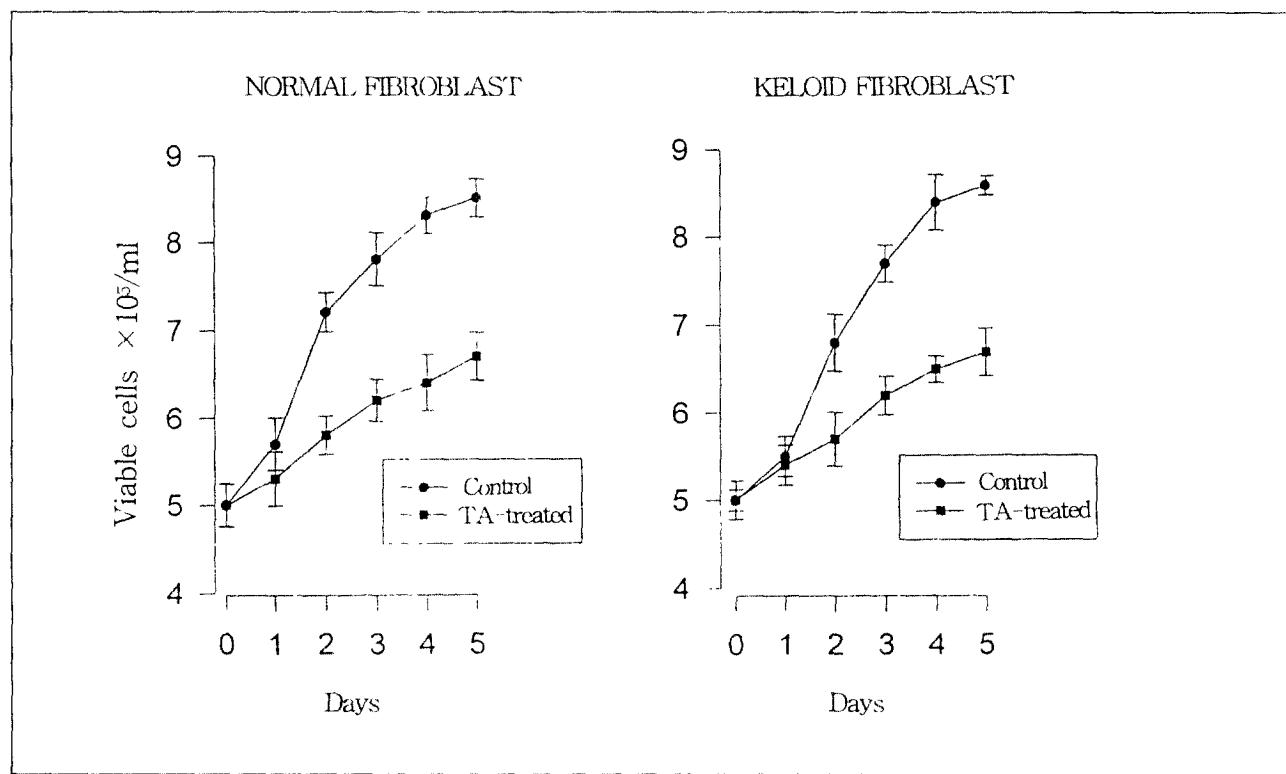


Fig. 1. The effect of triamcinolone acetonide(TA) on human normal and keloid fibroblasts. Cells were seeded at a concentration of 5 $\times 10^5$ cells/ml on day 0 and viability was determined by trypan blue dye exclusion($p < 0.05$)

3) 전기영동, 자가방사기록법(autoradiography) 및 밀도계(densitometry) 분석

증폭된 PCR 산물 $10 \mu\ell$ 을 5% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 X- β 필름에 15시간 감광시킨 후 현상하였다. 현상된 필름의 띠(band)는 GS365 주사밀도계(scanning densitometer)(Hoefer Scientific Instruments) 및 젤 전기영동 분석기(gel documentation system)(Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 밀도를 측정하였다. 자가방사기록법상 나타난 음영을 각각의 GAPDH의 음영으로 나누어 비교지수(relative index; RI)를 구하였다.

RI)를 구하였다.

마. Western blot 분석

Western blot analysis는 발현된 단백의 양의 차이를 보기위해 1×RIPA buffer(10 mM Tris [pH 7.5], 0.2% sodium deoxycholate, 0.2% tritonX 100, 0.2 mM sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)를 이용하여 세포로부터 단백질을 분리하였다. 150 μg 의 단백질을 7 또는 12.5%의 SDS polyacrylamide

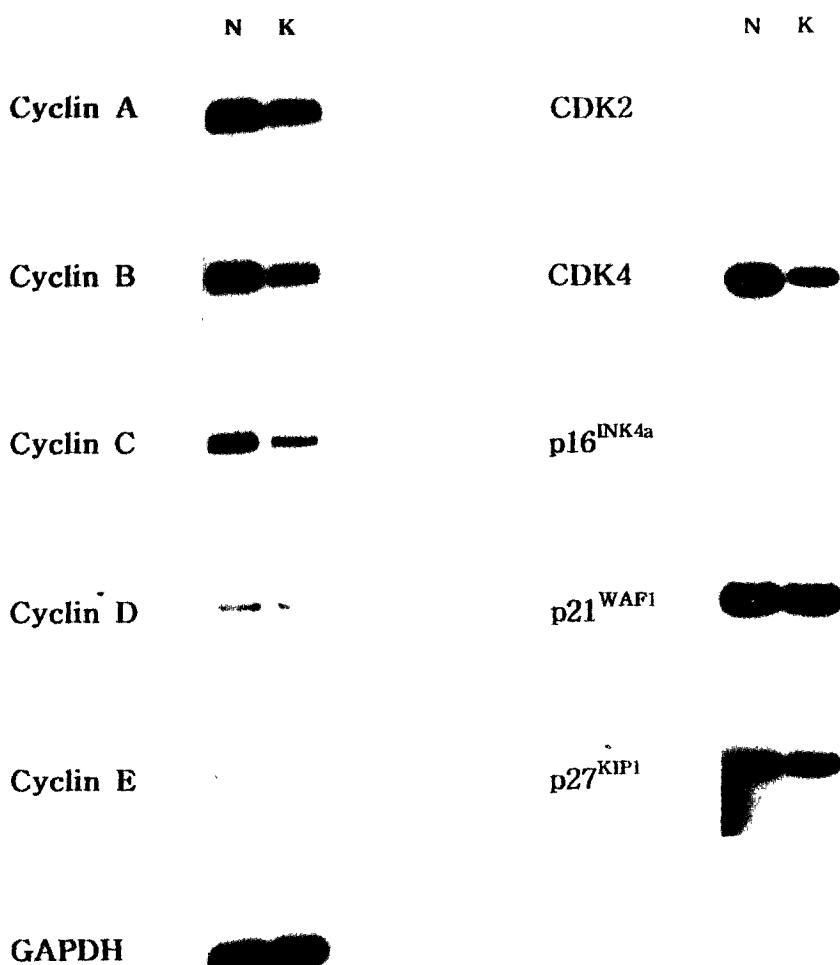


Fig 2. Comparision of cyclin, cyclin-dependent kinase(CDK) and CDK-inhibitor RNAs levels in human normal(N) and keloid(K) fibroblasts Total RNA($1\mu\text{g}$) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT(16 mer). PCR was carried out 24 cycles for GAPDH, 25 cycles for cyclin genes and 26 cycles for CDK and CDK-inhibitor genes. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed. N and K represent normal and keloid fibroblasts, respectively.

겔에서 전기영동하고 immobilon P 전이막(transfer membrane)(Millipore Co.)으로 선이하였다.³³ 그후 amidoblack으로 염색하여 표준 단백 크기(size marker)

를 표시하고 일주야 동안 blotto용액(5% non-fatty dry milk, 20 mM Tris[pH 7.5], 137 mM NaCl, 0.05% tween 20)에 눈 다음 G3-245 Rb monoclonal

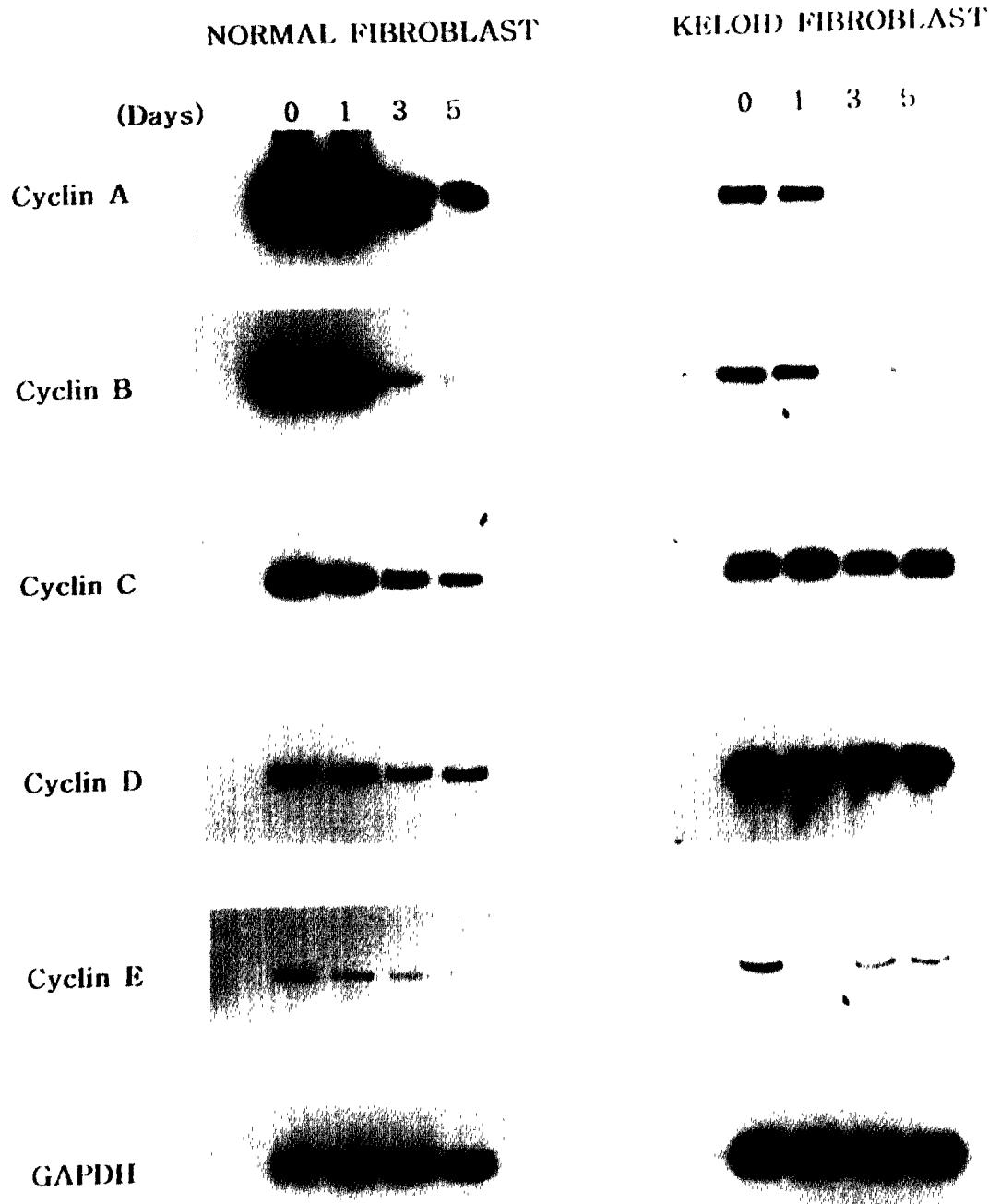


Fig. 3. Expressions of cyclin A, B, C, D and E genes in triamcinolone(TA)-treated normal and keloid fibroblasts. Cells were treated with TA for indicated days. Total RNA(1 μ g) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT(16 mer). PCR was carried out 24 cycles for GAPDH and 25 cycles for cyclin genes. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed.

antibody(Ab), cyclin D1 monoclonal Ab, CDK4 monoclonal Ab, 및 p27^{KIP1} monoclonal Ab(Pharmingen, Co.)와 p53 monoclonal Ab 및 p21^{WAF1} polyclonal

Ab (Oncogene Science Co.)와 2시간 동안 반응시킨 후 폐록시다이제로 표시된 2차 항체(peroxidase linked secondary Ab)와 1시간 반응시키고 ECL

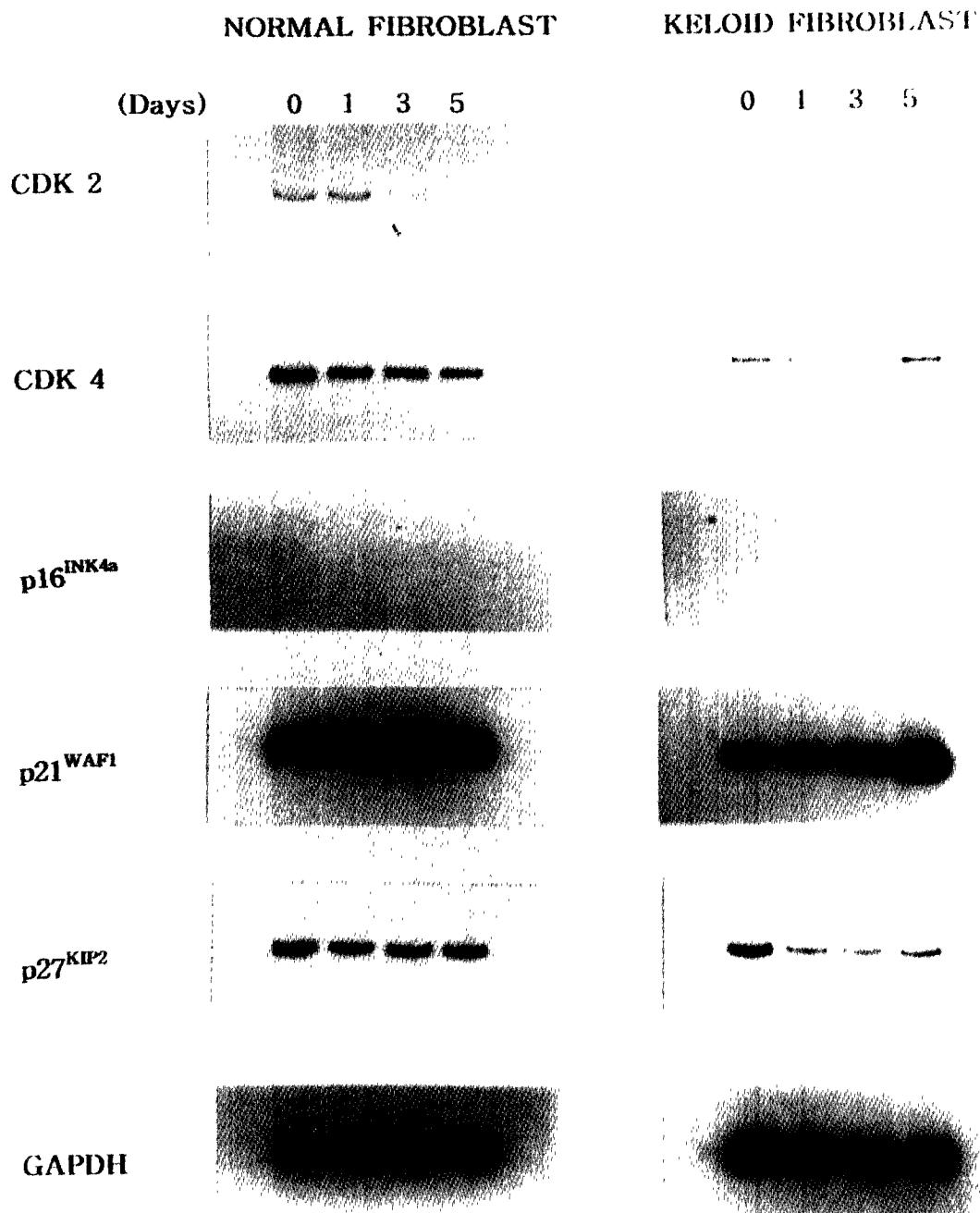


Fig. 4 Expressions of cyclin-dependent kinase(CDK) and CDK-inhibitor genes in triamcinolone(1A)-treated normal and keloid fibroblasts. Cells were treated with TA for indicated days. Total RNA(1 μ g) was reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT(16 mer). PCR was carried out 24 cycles for GAPDH and 26 cycles for CDK and CDK-inhibitor genes. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed.

(enhanced chemiluminescence) kit(Amersham Co.)를 이용하여 검출하였다.

III. 결 과

TA가 켈로이드 섬유아세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TA 처리후 trypan blue 색소 배제시험 방법으로 세포생존수를 조사한 결과 대조군에 비해 처치군의 성장이 현저히 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 1). 정상 및 켈로이드 섬유아세포에서 cyclin 유전자, CDK유전자 및 CDK-inhibitor유전자들의 발현의 차이를 반정량적 RT-PCR을 실시한 후 각각의 음영을 GAPDH 음영으로 나누어 측정한 결과,

cyclin A, B, C, D, E, CDK2 그리고 CDK4유전자의 발현은 정상 섬유아세포에서 1.1-8배정도 높았으며, CDK-inhibitor유전자인 p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1}의 발현 정도는 비슷하였고, p16^{INK4a}은 모두에서 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

TA를 5일간 처리한 후 상기 유전자의 발현을 Northern blot analysis 및 반정량적 RT PCR법으로 측정한 결과 정상 섬유아세포주의 경우는 cyclin A, D, E, CDK2 및 4의 발현이 처리시간에 비례하여 계속적으로 감소하는 경향을 보였으며, p21^{WAF1}은 다소 증가하였고, p27^{KIP1}의 발현은 다소 감소되었으며, p16^{INK4a}의 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 3, 4) Cyclin B와 함께 cyclin C의 발현은 처리시간

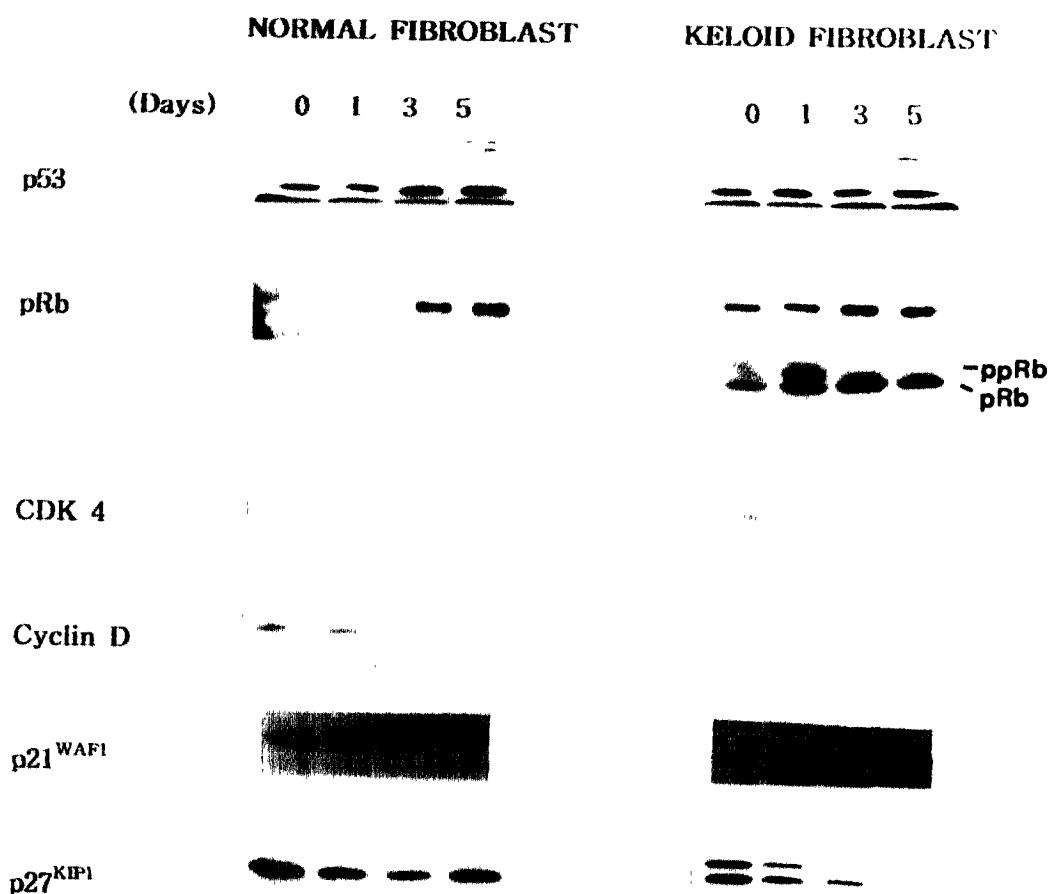


Fig. 5. Western blotting analysis of p53, pRb, CDK4, cyclin D, p21^{WAF1} and p27^{KIP1} proteins in triamcinolone(TA)-treated normal and keloid fibroblasts. Cells were treated with TA for indicated days. Cell lysates prepared at the different time points were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with monoclonal or polyclonal antibodies. Immuno-complexes were detected by enhanced chemiluminescence.

에 비례하여 감소하는 경향을 보였다. 켈로이드 세포주에 있어서는 cyclin A, E 및 CDK2의 발현은 정상세포와 마찬가지로 처리시간에 비례하여 계속 감소하는 양상을 보였지만, cyclin D의 발현은 정상 섬유아세포와 달리 거의 변화가 없었고, CDK4의 발현은 감소하다가 다시 대조군의 발현 정도와 같은 수준으로 증가하는 추세를 보였다. p21^{WAF1}의 발현은 켈로이드 섬유아세포에서 정상 섬유아세포 보다 증가하였으며, p27^{KIP1}의 발현은 감소하였다. 그러나 p16^{INK4a}은 정상 섬유아세포와 마찬가지로 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 4). Cyclin B의 발현은 처리시간에 비례하여 계속적으로 감소하였으나, cyclin C의 발현은 cyclin D와 같이 발현의 변화를 관찰할 수 없었다.

p53 및 pRb와 같은 항암유전자의 발현은 Northern blot analysis상에서는 발현을 관찰할 수 없었다 그러나 Western blot analysis에서 p53, pRb, p21^{WAF1}, p27^{KIP1} 및 CDK4에 대한 정상 및 켈로이드 세포주 공히 p53 및 pRB의 발현은 TA처리군에서 증가하는 양상을 나타내었으며, p21^{WAF1}, p27^{KIP1} 및 CDK4의 발현은 상기한 mRNA발현양상과 거의 비슷하였다(Fig. 5).

IV. 고찰

세포주기 중 G1 단계는 세포의 분열 및 성장을 위한 S 단계로의 이행을 통제하는 기능을 가진다.^{35,36} 만약 G1 단계를 통제하는 기능이 소실되면 세포는 지속적으로 S 단계로 이행되어 계속 분열할 수 밖에 없다. 켈로이드도 일종의 섬유성 종식성 질환이므로 G1 단계의 통제 기능의 이상유무를 알아 볼 필요성이 있어 켈로이드와 정상 섬유아세포에서 세포주기 관련 유전자의 발현을 조사해 본 결과, 주로 G1-S 이행 단계에 관여하는 cyclin D, E 및 A^{13,37,38}와 G2-S 이행 단계에 관여하는 cyclin B^{19,21}리고 아직까지 정확한 기전이 밝혀져 있지 않은 cyclin C¹⁰의 발현은 정상세포가 켈로이드 세포에 비해 다소 높았다. Cyclin D와 결합해서 G1-S 이행 단계에 관여하는 CDK4⁴¹의 발현도 정상 섬유아세포에서 3.5배정도 높았다. 또한 cyclin A, B, D 및 E와 결합하여 G1-S 및 G2-M 이행 단계에 관여하는 CDK2⁴²의 발현은 정상세포보다 2배 정도 높았다. CDK2 및 4의 활성을 억제하는 CDK-inhibitor인

p16^{INK4a}의 발현은 정상 및 켈로이드 세포 모두에서 발현을 볼수 없었으며, p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1}는 정상 및 켈로이드 세포에서 거의 비슷하였다. 또한 pRb는 켈로이드에서 발현이 다소 높았으며, p53은 비슷하였다. 그러나 이러한 결과만으로 정상세포와 켈로이드 세포를 비교하기가 곤란하며, 세포주기 관련 유전자의 단백산물의 발현차이 그리고 CDK활성도의 비교도 필요하리라고 생각된다.

G1 단계의 세포주기 조절에 가장 중요한 p53 및 pRb유전자의 발현은 TA처리에 따라 p53단백의 발현 증가, pRb단백의 발현 증가, 그리고 hypophosphorylated pRb단백의 증가를 보였는데(Fig. 5), TA가 정상 및 켈로이드 섬유아세포를 G1 단계에 머물게함을 시사한다. 즉, TA에 의한 섬유아세포의 성장억제효과가 G1 S 단계의 이행을 억제함으로서 일어남을 뒷받침하는 결과이다. Cyclin D, E 및 A의 발현은 정상섬유아세포에서는 유의한 감소 경향을 보였는데, 켈로이드의 경우에서는 cyclin A 및 E는 감소하였지만 cyclin D의 발현은 비처치군과 거의 동일한 수준을 나타났다. Cyclin A, D 및 E는 CDK2 또는 4와 결합하여 CDK를 활성화시키는데 이렇게 활성화된 CDK들은 pRb산물을 인산화시키게 되고 그 결과 pRb로부터 E2F관련 산물이 유리된다.^{43,44} 유리된 E2F관련산물은 전사인자로 작용하게 되고 그 결과 세포는 S 세포주기 단계로 이행하게 된다.^{15,50,51} 그리고 단순히 cyclin D, E 및 A의 발현정도만으로는 TA의 효과를 알기가 어려우므로 CDK2 및 4의 발현을 조사하였는데, CDK2의 발현은 정상 및 켈로이드 섬유아세포 모두에서 TA 처리시간과 비례하여 유의한 감소를 보였지만, CDK4는 정상 섬유아세포에서는 감소되는 경향을 보였다. 그러나 켈로이드 섬유아세포에서는 3일째까지는 감소하다가 5일째 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로써 TA가 정상 섬유아세포에서 전반적인 G1 S 단계의 세포주기 이행을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있고, 켈로이드 섬유아세포에서는 G1에서 S단계로 이행되기 바로 직전에 관여하는 cyclin E-CDK2 및 cyclin A-CDK2의 활성을 억제하나, G1 S 세포주기 이행 초반에 작용하는 cyclin D-CDK4에는 별다른 효과를 나타내지 못한다는 것을 알 수 있다. 이것은 TA의 성장억제효과와는 상반된 것인데, 아마도 cyclin E 및 CDK2의 감소에 따른 보상적인 효과로 cyclin D-CDK4의 발현이 유

지되었다고 볼 수도 있다. 그러나 성상 섬유아세포에서 cyclin D-CDK4의 발현이 감소된 것을 고려하면 켈로이드 섬유아세포에서 cyclin D-CDK4발현에 변화가 없는 것은 켈로이드 세포 자체의 cyclin D 및 CDK4의 mRNA의 구조적 이상에 의한 반감기의 증가에 따른 결과일 수도 있으므로 향후 이 분야에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. CDK4의 활성을 억제한다고 알려진 p16^{INK4a}의 발현은 정상 및 켈로이드 섬유아세포에서 관찰할 수 없었고, CDK2, 4 및 6 등의 활성을 억제하는 p21^{WAF1}의 발현은 TA 처리에 따라 증가하였는데 특히 켈로이드 섬유아세포가 정상 섬유아세포에 비해 뚜렷한 증가를 보였다. TA처리시 정상 섬유아세포에서는 p21^{WAF1}의 발현이 유의하게 증가되지 않은 것은 CDK4의 발현이 효율적으로 감소하여 p21^{WAF1}이 유도될 필요성이 없었기 때문이라고 사료된다. 켈로이드 섬유아세포에서 p21^{WAF1}의 발현이 뚜렷하게 증가된 이유는 CDK4의 계속적인 발현에 따른 활성을 억제하기 위한 보상 작용으로 볼 수도 있고, 정상세포에 비해 켈로이드 세포의 DNA 손상감지 체계가 TA 처리에 감수성이 더 높기 때문이라고 볼 수도 있어서 앞으로 그 분자적 차이를 더 깊이 규명해 볼 필요가 있다고 생각된다. 어떤 이유에서든지 CDK-inhibitor의 발현 증가는 CDK의 활성억제를 초래하여 세포로 하여금 더 이상 세포주기가 진행되는 것을 억제시킨다.⁵¹ TA처리시 p53유전자의 발현의 증가, p53에 의해 전사가 유도되는 p21^{WAF1}의 증가, CDK2의 감소 그리고 pRb의 증가 및 탈인산화의 증가 등을 종합적으로 고려해 보면 TA가 주로 G1 단계의 세포주기를 억제한다는 것을 알 수 있다. 비록 p27^{KIP1}의 발현 감소와 cyclin D 및 CDK4의 발현이 감소되지 않은 것은 TA의 G1-S세포주기 이행 억제효과와 관련하여 설명하기가 어렵지만 미분화 세포를 분화 유도한 실험에서 분화세포에서 cyclin D1의 증가⁵² 및 CDK4의 활성 증가⁵³가 관찰되었고 apoptosis나 노화가 일어날 때도 cyclin D1의 발현 증가^{34,54}를 볼 수 있어 TA에 의한 켈로이드 세포의 종식억제 효과도 cyclin D1 및 CDK4와는 다른 경로를 통하여 이루어지는 것으로 추정된다. 그러나 정상섬유아세포에서는 cyclin D 및 CDK4의 발현이 저하되는 점을 고려할때, 켈로이드 발생과 cyclin D 및 CDK4의 관계도 알아볼 필요성이 있고, TA에 대한 내성기전으로서 작용할 수 있다고 생각된다.

p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1}의 발현 증가 또는 감소가 TA에 의한 직접적인 효과인지, 아니면 p21^{WAF1}을 증가시킨다고 알려진 p53과 같은 유전자의 발현 증가를 유도시켜 생긴 간접적인 효과인지는 알 수 없다. DNA복제 및 G2-M 단계의 세포주기 이행, 그리고 G1-S 단계 이행에도 관여한다고 알려진 cyclin A^{38,42,55}와, p34^{cdc2}와 결합하여 G2-M 세포주기 이행에 관여한다고 알려진 cyclin B 유전자의 발현³⁹은 TA처리시간에 비례하여 정상 및 켈로이드 섬유아세포 모두에서 유의하게 감소하는 경향을 보였다. 이는 TA에 의한 keloid섬유아세포에 대한 성장억제 효과가 G2-M세포주기 이행 억제와도 관련 있음을 뉘우침해 주는 결과로 생각된다. 아직까지 기능이 잘 알려지지 않은 cyclin C의 발현은 TA처리시 정상섬유아세포에서는 유의한 감소를 보였으나 켈로이드 섬유아세포에서는 거의 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 앞으로 cyclin C와 켈로이드와의 관계 연구도 필요할 것으로 생각된다. TA는 G1 cyclin유전자 및 CDK유전자의 발현저하 그리고 p53, pRb 및 p21^{WAF1}의 발현증가를 유도하여 세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 켈로이드 섬유아세포에서 TA는 주로 G1-S 및 G2-M 세포주기 이행을 억제하여 성장억제효과를 나타낸다고 사료되며 정상 섬유아세포와 달리 G1-S세포주기 이행 초기에 작용하는 cyclin D-CDK4의 발현이 그대로 유지되고 아직까지 그 기능이 잘 알려지지 않은 cyclin C의 발현도 변화가 없는 것은 아마도 TA의 지속적 노출에 따라 생긴 내성이 원인으로 작용할 수도 있을 것으로 생각되지만 그 정확한 기전은 알 수 없다. 앞으로 TA처리시 발현의 변화를 보이지 않는 cyclin D 및 CDK4를 표적으로 하는 약제를 TA와 병용하여 사용하면 켈로이드 치료에 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

V. 요약

섬유아세포의 이상 종식과 교원질의 과다생성이 특징인 켈로이드의 치료에 이용되고 있는 triamcinolone acetonide(TA)의 성장억제 기전을 알아보기 위하여 정상 및 켈로이드 섬유아세포를 배양하여 TA처리시 G1 단계의 세포주기 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하여 향후 켈로이드 치료에 나아

갈 방향을 제시하고자 본 연구를 실시하였다.

TA를 5일간 처치한 결과 G1세포주기 조절에 가장 중요한 p53 및 pRb유전자의 발현이 증가하여 TA에 의한 섬유아세포의 성장억제효과가 G1 S세포주기 이행억제와 관계있음을 알 수 있었다. 정상 섬유아세포주의 경우는 G1-S세포주기 이행에 관여하는 cyclin A, D 및 E 그리고 cyclin-dependent kinase 2 및 4의 발현은 처치시간에 비례하여 감소하였다 CDK-inhibitor의 발현을 살펴보면, p21^{WAF1}은 다소 증가하였고, p27^{KIP1}은 감소하였으나, p16^{INK4a}의 발현은 관찰할 수 없었다. 주로 G2 M세포주기 이행에 관여하는 cyclin B의 발현은 처치시간에 비례하여 계속적으로 감소하였으며, 그 기능이 잘 알려지지 않은 cyclin C도 같은 양상을 보였다. 켈로이드 세포주에 있어서 cyclin A, E 및 CDK2의 발현은 정상세포와 마찬가지로 처리시간에 비례하여 발현의 정도가 계속 감소하였으나, cyclin D는 정상 섬유아세포와 달리 거의 변화가 없었고, CDK4는 감소하다가 다시 대조군의 발현 정도와 같은 수준으로 증가하는 추세를 보였다. p27^{KIP1}의 발현은 감소하는 추세를 보였으며, p21^{WAF1}은 정상섬유아세포에 비해 뚜렷하게 증가하였다. 그러나 p16^{INK4a}은 정상 섬유아세포와 마찬가지로 발현을 관찰할 수 없었다 Cyclin B의 발현은 처치시간에 비례하여 계속적으로 감소하였으며, cyclin C의 발현은 D와 같이 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과로 TA는 G1 S 및 G2-M 단계의 세포주기 이행에 관여하는 cyclin유전자 및 CDK 유전자의 발현저하와 p21^{WAF1}, p53 및 pRb의 발현증가를 유도하여 세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 추정된다.

우상현(Sang-Hyun Woo, M.D., Ph.D.)

705-035, 대구시 남구 대명5동 317-1

영남대학병원 성형외과

Tel: (053) 620-3483 Fax: (053) 626-0705

References

1. Tredget EE: The molecular biology of fibroproliferative disorders of the skin: Potential cytokine therapeutics. Ann Plast Surg 33: 152, 1994
2. Younai S, Nicther LS, Wellisz T, Reinisch J, Nimni ME, Tuan TL: Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. Ann Plast Surg 33: 148, 1994
3. Cohen IK, Keiser HR, Sjoerdsma A: Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar. Surg Forum 22: 488, 1971
4. Craig RDP, Schofield JD, Jackson DS: Collagen biosynthesis in normal and hypertrophic scars and keloids as a function of the duration of the scar. Br J Surg 62: 741, 1975
5. McCoy BJ, Cohen IK: Collagenase in keloid biopsies and fibroblasts. Connect Tissue Res 9: 181, 1982
6. Griffith BH: The treatment of keloids with triamcinolone acetonide. Plast Reconstr Surg 38: 202, 1966
7. Cosman B, Crikelaire GF, Ju DM, Gaulin JC, Latters R: The surgical treatment of keloid. Plast Reconstr Surg 27: 335, 1961
8. Janssen De Limpens AMP: The local treatment of hypertrophic scars and keloids with topical retinoic acid. Br J Dermatol 103: 319, 1980
9. Ollstein RN, Siegel HW, Gillooley JF, Barsa JM: Treatment of keloids by combined surgical excision and immediate postoperative X-ray therapy. Ann Plast Surg 7: 281, 1981
10. Rockwell WB, Choen IK, Ehlich HP: Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. Plast Reconstr Surg 84: 827, 1989
11. Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M: Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars: a 10 year follow up study. Br J Plast Surg 45: 374, 1992
12. Cruz NI, Korchin L: Inhibition of human keloid fibroblast growth by isotretinoin and triamcinolone acetonide in vitro. Ann Plast Surg 33: 401, 1994
13. Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. Cell 73: 1059, 1993
14. Hartwell LH, Weinert TA: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science

- 246: 629, 1989
15. Sherr CJ: G1 phase progression cycling on cue. *Cell* 79: 551, 1994
 16. Dulic V, Kaufman WK, Wilson S, Tisty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI: p53-dependent inhibition of cyclin dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation induced G1 arrest. *Cell* 76: 1013, 1994
 17. Wang JY, Knudsen ES, Welch Jr: The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* 64: 25, 1994
 18. Haffner R, Oren M: Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* 5: 84, 1995
 19. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817, 1993
 20. Noda A, Ning Y, Veneble SF, Pereira Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211: 90, 1994
 21. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and Bax gene expression in vitro and vivo. *Oncogene* 9: 1799, 1994
 22. Miyashita T, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene. *Cell* 80: 293, 1995
 23. Kastan MB, Zhan Q, El Deiry W-S, Carrier F, Jacks T, Walsh VW, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587, 1992
 24. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y: Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9: 2261, 1994
 25. Hannon GJ, Beach D: p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257, 1994
 26. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature* 366: 704, 1993
 27. Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A: Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16^{INK4}. *Mol Cell Biol* 15: 2682, 1995
 28. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr C: Novel INK4 proteins, p19 and 18, are specific inhibitors of the cyclin dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15: 2672, 1995
 29. Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78: 67, 1994
 30. Matsuoka S, Edwards M, Bai C, Parker S, Zhang P, Balini A, Harper JW, Elledge SJ: p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} CDK-inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9: 650, 1995
 31. Kim TA, Ravitz MJ, Wenner CE: Transforming growth factor-beta regulation of retinoblastoma gene product and E2F transcription factor during cell cycle progression in mouse fibroblasts. *J Cell Physiol* 160: 1, 1994
 32. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156, 1987
 33. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p 737
 34. Lucibello FC, Sewing A, Brusselbach S, Burger C, Muller R: Dereulation of cyclin D1 and E and suppression of CDK2 and CDK4 in senescent human fibroblasts. *J Cell Sci* 105: 123, 1993
 35. Hunter T: Barking the cycle. *Cell* 75: 839, 1993
 36. Motokura T, Arnold A: Cyclins and oncogenesis.

- Biochem Biophys Acta 1155: 63, 1993
37. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Robert JM: Formation and activation of cyclin E CDK2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257: 1689, 1992
 38. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11: 961, 1992
 39. Pines J, Hunter T: Human cyclin A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1, 1991
 40. Lew DJ, Dulic V, Reed SI: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66: 1197, 1991
 41. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ: Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{psk B}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclin. *Cell* 71: 323, 1992
 42. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO: Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2824, 1992
 43. Chen P L, Scully P, Shew J Y, Wang JYJ, Lee W-H: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58: 1193, 1989
 44. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D: Human D-type cyclin. *Cell* 65: 691, 1991
 45. Akiyama T, Ohuchi S, Sumida S, Matsumoto K, Toyoshima K: Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7900, 1992
 46. DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM: The retinoblastoma susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1795, 1992
 47. Nevins JR: E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncogene. *Science* 258: 424, 1992
 48. Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC: Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358: 259, 1992
 49. Schwarz JK, Devoto SH, Smith EJ, Chellappan SP, Jakoi L, Nevins JR: Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. *EMBO J* 12: 1013, 1993
 50. Chellappan SP, Hiebert SW, Mudryi M, Horowitz JM, Nevins JR: The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 65: 1053, 1991
 51. Harper JW, Elledge SJ: Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 6: 56, 1996
 52. Akiyama N, Sasaki H, Katoh O, Sato T, Hirai H, Yazaki Y, Sugimura T, Terada M: Increment of the cyclin D1 mRNA level in TPA-treated three human myeloid leukemia cell lines: HEL, CMK and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 1041, 1993
 53. Dobashi Y, Kudoh T, Toyoshima K, Akiyama T: Persistent activation of CDK4 during neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 351, 1996
 54. Kranenburg O, J.van der Eb A, Zantema A: Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* 15: 46, 1996
 55. Walker DH, Maller JL: Role of cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 354: 314, 1991