

## 흰쥐 피부의 반흔 형성과정에서 VEGF, TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 역할과 상호관계

전대우<sup>1</sup> · 김지영<sup>2</sup> · 한상미<sup>2</sup> · 노혜정<sup>2</sup> · 한기환<sup>1</sup> · 박관규<sup>2,3</sup>

계명대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 신장연구소<sup>2</sup>, 병리학교실<sup>3</sup>

### The Role and Relation of VEGF, TGF- $\beta$ 1 and CTGF in the Scar Formation of the Rat

Dae Woo Jeon, M.D.<sup>1</sup>, Ji Young Kim<sup>2</sup>, Sang-Mi Han<sup>2</sup>,  
Hey Jeong Noh<sup>2</sup>, Ki Hwan Han, M.D.<sup>1</sup>,  
Kwan-Kyu Park, M.D.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Kidney Institute, and <sup>3</sup>Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Skin fibrotic disorders are understood to develop under the influence of various cytokines, such as transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 1, connective tissue growth factor(CTGF) and vascular endothelial growth factor(VEGF). To establish an appropriate animal model of skin fibrosis by exogenous application of growth factors, the author investigated the *in vivo* effects of growth factors by injecting recombinant TGF- $\beta$ 1 protein and pCMV-Flag5-CTGF into the subcutaneous tissue of Sprague-Dawley rats. A single application of TGF- $\beta$ 1 protein and CTGF DNA resulted in the formation of transient granulation tissue. Immunohistochemical finding showed increased expression of TGF- $\beta$ 1 protein after injection of pCMV-Flag5-CTGF. *In situ* hybridization analysis revealed the expression of CTGF mRNA after injection of TGF- $\beta$ 1 protein. VEGF expression was not affected by the TGF- $\beta$ 1 and CTGF injection. These findings suggest TGF- $\beta$ 1 and CTGF are deeply related with skin fibrosis and it appears that TGF- $\beta$ 1 may cause the induction of CTGF expression.

The animal model on skin fibrosis by exogenous application of TGF- $\beta$ 1 protein and CTGF DNA developed in this study may be useful for future studies on fibrotic disorders.

**Key Words:** Skin fibrosis, Transforming growth factor- $\beta$ 1, Connective tissue growth factor, Vascular endothelial growth factor

Received September 3, 2003

Revised November 6, 2003

Address Correspondence : Kwan-Kyu Park, M.D., Ph.D., Kidney Institute and Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, 194 Dongsan-dong, Choong-gu, Daegu 700-712, Korea. Tel: 053) 250-7465 / Fax: 053) 250-2095 / E-mail: park1234 @dsmc.or.kr

### I. 서 론

외과 영역에서 외상이나 심한 염증 후에 발생하는 반흔형성은 매우 중요한 문제이며 이 반흔의 교정 혹은 크기를 감소시키기 위한 노력은 지속적으로 진행되어 왔으나, 아직도 반흔을 완전히 없앨 방법은 없는 실정이다. 최근 면역학 및 생화학의 발달로 세포의 성장인자 등에 대한 이해와 함께 반흔형성의 기전은 어느 정도 알려져 있으며, 특히 조직 cytokine의 한 종류인 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 1이 콜라겐 혹은 세포외기질의 침착에 깊이 관여한다는 것이 알려진 후 여기에 관한 많은 연구가 진행 중에 있다.<sup>1,2</sup> 또한 반흔형성과 연관된 조직 cytokine의 상호관계에 대한 많은 연구가 진행되면서 TGF- $\beta$ 1의 발현 및 조직의 섬유화에 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되는 connective tissue growth factor(CTGF) 및 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 역할과 상호관련에 관한 연구가 진행되고 있다.<sup>3</sup> 이들 상호간의 발현조절 및 섬유화 과정에서의 역할 등에 관한 이해가 있어야 반흔형성 방지를 위한 새로운 치료적인 방향이 제시될 수 있을 것으로 생각되며, 이와 더불어 이들 조직 cytokine들의 발현조절에 관여하는 전사인자(transcription factor)의 조절 및 기전의 이해를 통한 섬유화과정의 상관관계에 대해서도 연구되어야 할 것이다. CTGF는 최근 TGF- $\beta$ 1과 관련되는 cytokine으로 시험관 실험을 통해 섬유모세포를 자극하여 세포외기질의 침착에 깊이 관련되는 것으로 보고되고 있고,<sup>4</sup> 피부경화증에서 CTGF mRNA의 발현이 조직섬유화에 깊은 연관이 있다고 보고되고 있다.<sup>5</sup> VEGF는 세포배양 실험을 통해 혈관내피세포에서 선택적으로 발현된다고 알려져 있고, 동물실험에서 혈관증식능력을 갖는다고 보고되고 있다.<sup>6</sup> 혈관증식과 투과성의 증가는 상처재생 과정에서 관찰되는 매우 중요한 특징중의 하나이므로, VEGF 역시 상처재생 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추측할 수 있다. 따라서 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF가 상처재생 과정에서 VEGF와 어떤 관련이 있지 않을까 추측해 볼 수 있다.

이 연구는 CTGF DNA 및 TGF- $\beta$ 1 단백을 투여하여 이

들 cytokine 및 VEGF의 발현 여부 및 상호 연관성을 알아보는데 그 목적이 있다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 실험동물

실험동물은 200g 내외의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 실험군과 대조군으로 나누어 사용하였다. 실험동물은 각 군당 15마리씩 나누어, 제 1군은 대조군으로 목 뒷부분에 phosphate-buffered saline(PBS)를 피하주사하였고, 제 2군은 실험군으로 200 ng의 pCMV-Flag5-CTGF를 hemagglutinating virus of Japan(HVJ)-liposome을 벡터로 사용하여 피하주사하였다. 제 3군은 800 ng의 TGF- $\beta$ 1 재조합 단백질을 같은 방법으로 20  $\mu$ l의 PBS에 희석하여 투여하였다. 실험동물은 전처치 후 1, 3, 5, 7, 14일째에 각 3마리를 도살하여 피하주사한 부위의 피부조직을 채취하였다.

### 나. 실험방법

#### 1) TGF- $\beta$ 1과 CTGF mRNA에 대한 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

적출한 흰쥐의 피부조직으로부터 RNAzolB(TEL-TESR, USA)를 이용하여 전체 RNA를 분리하고, 추출한 RNA의 순도와 정제된 양을 측정하였다. 분리된 1  $\mu$ g의 RNA를 주형으로 하여 1st strand cDNA synthesis kit(Roche, Germany)로 TGF- $\beta$ 1과 CTGF의 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용한 각각의 primer는 Table I에 기술한 바와 같다.

#### 2) CTGF의 발현 벡터 구축: CTGF cDNA의 증폭

사람의 CTGF cDNA를 확보하기 위해서 경북대학교 모발연구소에서 분양받은 콜로니에서 pSK-hCTGF plasmid를 일차적으로 분리하였다. 발현벡터에 클로닝하기 위해서 유전자의 개시코돈이 포함된 5'-primer, 5'-GCCAAC CATGACCGCCGC CAG-3'를, 종결코돈을 제외한 3'-

primer, 5'-TGCCATGTCTCCGTACATCTTCCT G-3'를 고안하였다. 이 plasmid를 주형으로 하여 각각의 10 pM primer, 0.5 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U/ $\mu$ l의 Taq polymerase를 첨가하여 25 cycle의 증폭반응을 수행하였다. 이와 같이 증폭된 cDNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

#### a) CTGF의 클로닝

원하는 발현 벡터에 클로닝하기 위해서 pSTBlue-1 벡터(Novagen, USA)에 일차적으로 클로닝하고자 하였다. 증폭된 CTGF cDNA를 1% agarose gel에서 분리한 후, pSTBlue 벡터와 16시간 이상 결찰(ligation) 반응을 수행하였다. 이를 DH5 $\alpha$ 에 형질전환시켜서 밤샘 배양 후 콜로니를 확보하였다. 이렇게 확보한 콜로니를 접종하여 밤샘 배양해서 pSTBlue-hCTGF plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid를 제한효소로 절단하여 삽입유전자의 크기를 확인하였다.

#### b) CTGF의 염기서열 확인

증폭된 CTGF의 염기서열을 정확성을 확인하기 위해서 plasmid를 대량 배양 후 sequencing 반응을 수행하였다. 이 sequencing 반응은 바이오넥스(한양대학교, 서울)에 의뢰하였다. 클로닝된 CTGF의 염기서열은 BLAST search를 통해서 기존의 염기서열과의 차이점을 검증하였다.

#### c) pCMV-Flag5-CTGF 발현 벡터의 구축

pSTBlue-hCTGF와 pCMV-Flag5(Sigma, USA)를 제한효소 EcoRI으로 절단하여 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 이들 DNA를 agarose gel에서 분리하여 결찰반응을 16시간 이상 수행하였다. 결찰 반응액을 DH5 $\alpha$ 에 형질전환시켜서 밤샘 배양 후 콜로니를 확보하였다. 이렇게 확보한 콜로니를 접종하여 밤샘 배양해서 pSTBlue-hCTGF plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid를 제한효소로 절단하여 그 크기와 방향성을 확인하였다.

#### d) 섬유아세포에서 pCMV-Flag5-CTGF의 발현 확인

확립세포주인 섬유아세포(NIH3T3)는 DMEM media로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 세포 내에서의 CTGF 발현을 확인하기 위해서 NIH3T3 세포로 transfection 방법을

Table I. The Sequence of Primers for TGF- $\beta$ 1, CTGF and GAPDH

cDNA	Primer
TGF- $\beta$ 1	5'-CCTGCTGCTTCTCCCTCAACC-3' 5'-CTGGCACTGCTTCCGAATGTC-3'
CTGF	5'-AGAACTGTGCACGGAGCGTG-3' 5'-CTGACCATTAGAGACGAC-3'
GAPDH	5'-GTGGACATTGTTGCCATCAAGG-3' 5'-GAGGGAGTTGTCATATTCTCG-3'

이용하여 CTGF 유전자를 도입하였다.  $4 \times 10^5$  cell에 2  $\mu\text{g}$ 의 pCMV-Flag5-CTGF을 Invitrogen사의 지침을 따라서 transfection을 실시하였다.

Transfection 24시간 후에 세포를 회수하여, RNAzolB (TEL-TESR, USA)를 이용하여 RNA를 분리하고, 추출한 RNA의 순도와 정제된 양을 측정하였다. 분리된 RNA를 1% denaturing agarose gel에 전기영동한 후, 16시간 이상 nylon membrane으로 RNA를 이동시켜서, Northern hybridization을 수행하였다. Membrane과  $^{32}\text{P}$ -dCTP로 표식된 탐침자는 Expressed Hybridization solution (Clontech, USA)에서 60°C에서 16시간 반응시켰다. 이때 탐침자는 Prime-a-Gene Labelling system(Promega, USA)을 이용하여  $^{32}\text{P}$ -dCTP로 표지하였다. 밤샘 반응 이후에 membrane은 2X SSC, 0.1% SDS/0.2X SSC, 0.1% SDS 용액으로 씻은 후, X-ray 필름에 감광하였다.

#### e) 흰쥐 피부의 Cryosection 및 면역형광염색

흰쥐 피부를 절단하여 4% paraformaldehyde(PFA)에 고정한 후, OCT 용액(Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 급속 냉각하여 4  $\mu\text{m}$ 의 박편으로 절단하였다. 이러한 박편에 1차 항체로 1:100으로 희석한 anti-Flag antibody(Sigma, USA)를 30분간 반응하였고, PBS로 세척한 후, 1:500으로 희석한 FITC-conjugated 2차 항체(Amersham, USA)를 30분간 반응시켰다. 그 후 PBS로 세척한 후 Vectorshield 용액(Vector laboratories, USA)으로 봉입하였다.

#### 3) 광학현미경 관찰

채취한 피부조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열 에탄올로 탈수한 후, 파라핀 침투와 파라핀 포매 과정을 거쳐서 4  $\mu\text{m}$ 의 박절편을 만들어 hematoxylin & eosin, Masson trichrome 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 4) 면역조직화학적 염색

TGF- $\beta$ 1과 VEGF의 단백발현을 관찰하기 위하여 이들 각각에 대한 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 하였다. 파라핀 포매된 피부 생검조직을 4  $\mu\text{m}$  두께로 잘라서 부착제로 처리된 슬라이드에 붙이고 탈 파라핀을 거쳐 함수하였다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소 용액에 20분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01 M 인산 완충액에서 10분간 세척하였다. TGF- $\beta$ 1과 VEGF 각각에 대한 1차 항체를 37°C에서 30분간 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG와 Streptavidin peroxidase(DAKO LSAB kit, USA)로 각각 37°C에서 15분간 반응시키고, DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahy-

drochloride)로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조군은 일차항체를 처리하지 않고 음성대조시약으로 대체한 피부조직을 이용하였다. 양성대조군은 TGF- $\beta$ 1의 경우 TGF- $\beta$ 1 단백에 양성인 피부조직을 이용하였으며, VEGF 항원의 경우 실험조직 내에 포함되어 있는 혈관내피세포를 내부 양성대조로 활용하였다.

5) TGF- $\beta$ 1과 CTGF mRNA에 대한 In Situ Hybridization 2% 3-aminopropyltriethoxysilane(APES)(Sigma, USA)과 0.1% diethylpyro-carbonate(DEPC)로 처리한 유리슬라이드에 4  $\beta\text{m}$  두께로 조직절편을 붙이고, 60°C 오븐에 하룻밤 방치하여 조직 절편을 슬라이드에 부착시켰다. 조직 절편이 붙은 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀하고 계열 알코올로 함수한 후 증류수로 수세하였다. 조직 절편 위에 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 proteinase K를 50  $\mu\text{l}$  취하고, 37°C에서 30분간 반응시켜 세포질 및 핵의 단백 일부를 제거한 후 DEPC 처리한 증류수로 수세하였다. 0.4% PFA로 4°C에서 후고정하고 상온에서 0.2% glycine 용액으로 처리한 후 95% 알코올로 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 주된 보합결합반응을 실시하기 전에 보합결합반응액에서 소식자를 제외한 용액으로 37°C에서 2시간 동안 전보합결합반응 시켰다. 보합결합반응에서 사용한 소식자는 CTGF에서 상보적인 25 mer oligonucleotide에 oligodioxinucleotide tailing kit(Roche, Germany)를 사용하여 digoxigenin을 표시하여 사용하였다. 반응용액의 조성과 최종 농도는 각각 50% formamide, 4X SSC, 5X Denhardt 용액, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  salmon sperm DNA로 조절하고 digoxigenin을 표지한 소식자는 0.3 ng/ $\text{mL}$  농도로 사용하였다. 조직 절편 위에 30  $\mu\text{l}$ 의 반응용액을 취하여 덮개 유리를 덮은 후 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 결합되지 않은 소식자를 제거하기 위해 2X SSC 용액으로 37°C에서 10분간 두번, 0.1X SSC 용액으로 10분, 0.1X SSC 용액으로 실온에서 5분간 수세하였다. 비특이적 억제제(0.5% bovine serum albumin)로 37°C에서 30분간 처리한 후 anti-digoxigenin Fab alkaline phosphatase를 사용하여 37°C에서 30분간 결합반응시켰다. Nitroblue tetrazolium(NBT)과 5-bromo-4-chloroindolyl phosphate(BCIP)로 실온에서 4시간 동안 발색반응 후 methyl green으로 대조염색하였다.

#### 다. HVJ-liposome을 이용한 재조합 DNA 제작

수정된지 10일 경과된 수정란을 구입하여 암실에서 검란하였다. 종자 바이러스를 polypepton에 1:1000으로 희석하여 0.1 mL씩 수정난에 접종하여 35.5°C에서 3일간 배양하고 3일 되는 저녁에 4°C로 옮겨서 하룻밤 재웠다. 수

정난의 겹질을 제거하고 용액을 회수하여 4°C에서 보관하며 리포좀(liposome)을 만들 때마다 필요한 양만큼 분주하여 사용하였다. 배양된 바이러스 25 mL를 3000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심분리한 후 상등액을 원심분리용관으로 옮겨 15000 rpm에서 40분간 4°C에서 원심분리하였다. 상등액을 버리고 바이러스가 흩어지지 않게 2 mL의 balanced salt solution(BSS)을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 재운 다음 바이러스를 조심스럽게 부유시켜서 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HVJ-liposome을 만들기 위하여 phosphatidyl-L-serine(PS): phosphatidyl-choline(PC): Cholesterol을 1:4.8:2의 비율로 10 mg되게 혼합하여 질소가스로 채워진 유리용기에 넣고 chloroform으로 조심스럽게 녹였다. 증발기에 유리용기를 장착하고 진공을 걸어 chloroform이 모두 휘발될 때까지 증발시켰다. Lipid가 유리용기에 얇게 펴지면 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다. Lipid가 포함된 유리용기에 pCMV-Flag5-CTGF 200  $\mu$ g을 첨가하여 30초간 심하게 섞어 주고, 30초간 37°C 수조에서 8회 반복 배양하였다. 그 이후 5초간 초음파분쇄(sonication)하고, 30초간 섞는 것을 3회 반복 수행하고 0.2  $\mu$ m filter에 걸려낸 후 BSS를 0.5 mL 첨가하여 다시 걸렸다. BSS를 0.5 mL 첨가하여 37°C에서 1시간 흔들어서 배양하였다. 정제된 바이러스를 사용양의 1.5배 정도 배양접시에 펴서 0.198 J의 UV로 불활성화시켰다. 불활성화된 바이러스 35,000 HAU(hemagglutinating unit)를 lipid와 recombinant plasmid DNA를 첨가하여 얼음에서 10분간 반응시켰다. 30% sucrose를 초고속원심분리기 용기에 주입하고 그 위에 lipid와 recombinant plasmid DNA 및 HVJ 혼합물 1 mL를 얹고 1 mL BSS를 첨가하여 25,000 rpm에서 2시간 초고속 원심분리하였다. 리포좀을 형성하지 못한 lipid가 포함된 상등액을 제거하고 리포좀 band를 pipetting하여 4°C에서 4일간 보관하며 사용하였다.

### III. 결 과

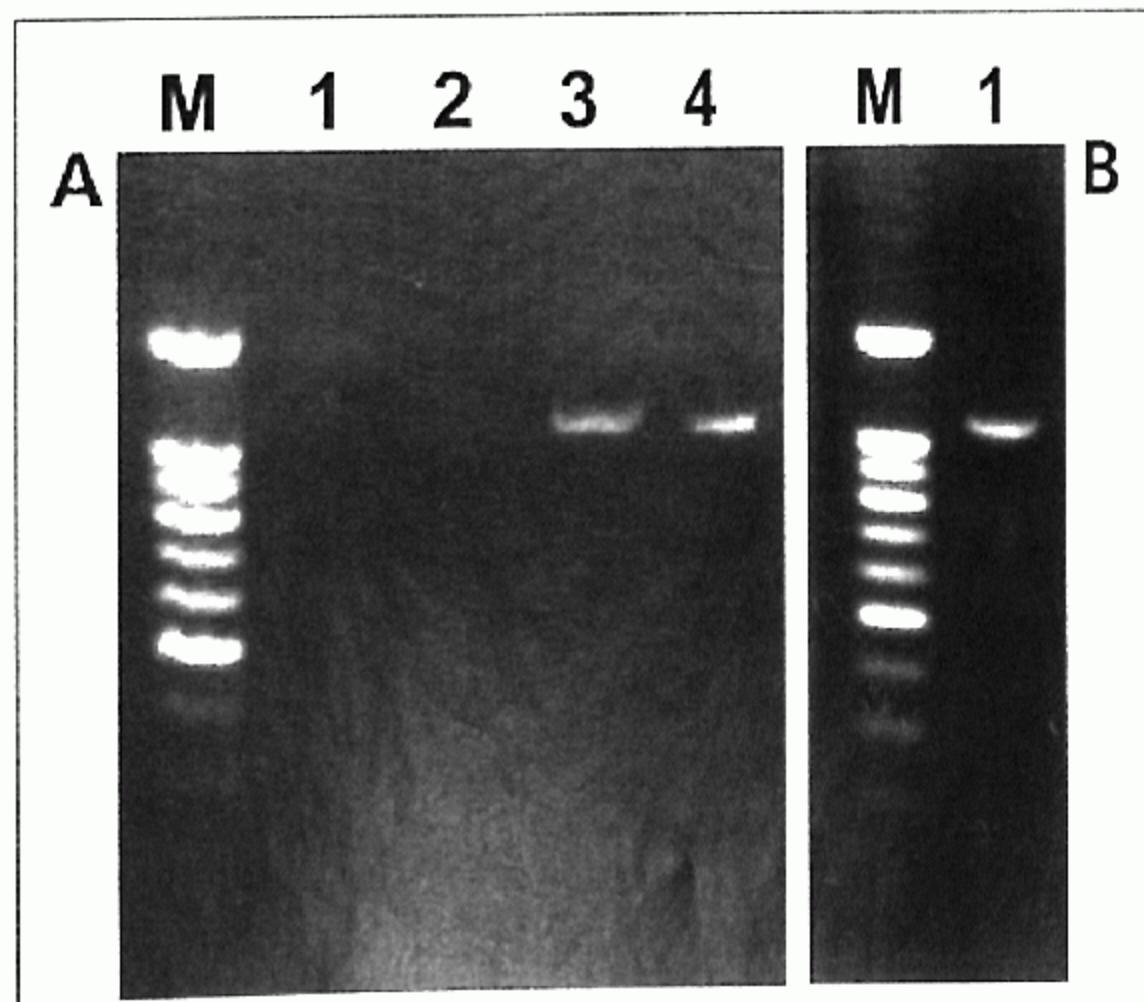
#### 가. 고농도 glucose에 의한 CTGF의 반응성 및 CTGF cDNA의 확보

고농도의 glucose(HG)에 의해서 CTGF의 발현이 증가되는지 여부를 확인하기 위해서 사람의 혈관 평활근 세포에 5.5 mM과 30 mM glucose를 처리해서 CTGF의 발현 변화를 확인하고자 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 30 mM의 고농도 glucose의 처리에 의해서 CTGF가 확실히 증가되는 것을 확인하였다(panel A, Fig. 1). CTGF의 유전자가 삽입된 것으로 밝혀진 pSK-hCTGF 클론에 CTGF의 전체

open reading frame(ORF)이 포함된 cDNA의 존재 여부를 확인하기 위해서 ORF 내에 있는 제한효소 EcoR1과 Xho1, Pst1을 이용하여 plasmid를 절단해 본 결과, 각각 3 kb와 2 kb, 0.6 kb의 크기의 삽입유전자를 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때 5 kb 정도의 삽입유전자 내에 1.1 kb로 알려진 CTGF의 전체 cDNA가 충분히 존재할 수 있다는 것을 확인하였다. 그래서 분리한 pSK-hCTGF를 주형으로 PCR 반응을 수행하였고, 이 결과 1.1 kb의 CTGF cDNA를 확보할 수 있었다(panel B, Fig. 1).

#### 나. CTGF의 클로닝 및 발현 벡터의 구축

PCR 반응으로 확보한 CTGF 1.1 kb의 cDNA를 pSTBlue 클로닝 벡터에 클로닝하여 정확한 크기의 삽입유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위해서 EcoR1과 Pst<sup>1</sup> 등의 제한효소로 plasmid를 절단한 후 전기영동하여 유전자의 삽입 여부를 확인할 수 있었다. 이러한 pSTBlue-hCTGF의 plasmid를 대량 분리하여 클로닝된 CTGF의 염기서열을 확인하고자 하였다. Sequencing 반응으로 CTGF의 염기서열의 정확성을 확인할 수 있었으며, CTGF cDNA가 오차 없이 잘 증폭되었음을 알 수 있었다(Table II). 포유동물모델에서 CTGF를 발현시키고자 C-terminal 부분에 Flag이라는 단백질이 발현되는 벡터를 선택하였다. 이러한 벡터를 구축하기 위해서 pSTBlue-hCTGF를 EcoR1으로 절단하여 1.1 kb의 삽입유전자를 확보하였고, EcoR1으로 절단된 pCMV-Flag5에 삽입하였다. 이러한 절차로 pCMV-Flag5-CTGF를 구축하였으며, 흰쥐의 피부에 투여하기 위해서 대량의 plasmid DNA를 분리하였다. 이러한

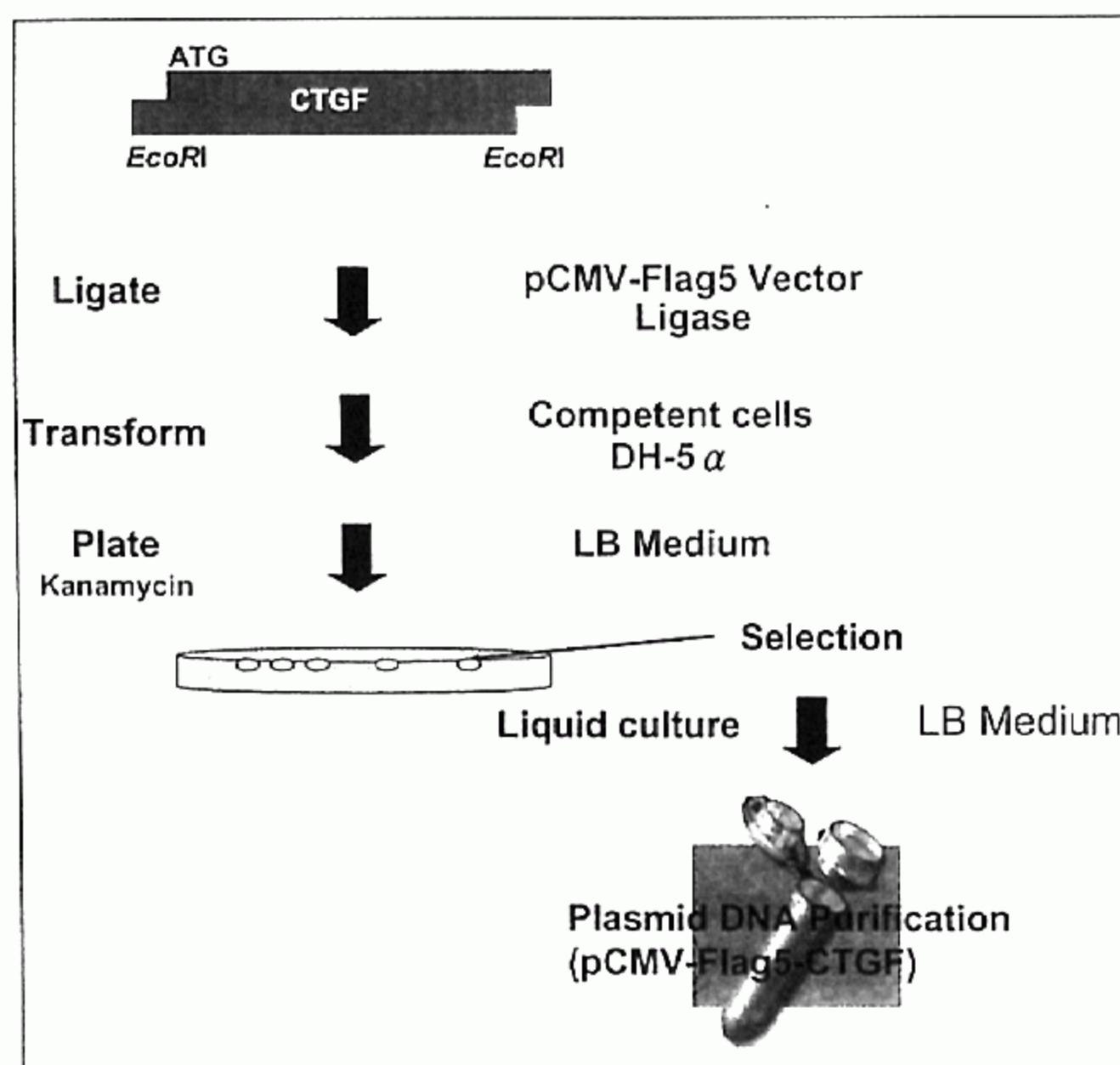


**Fig. 1.** Amplification of hCTGF cDNA. (A) Effect of CTGF expression by high glucose in human smooth muscle cells. Lane 1 and 2; 5.5 mM glucose, 3 and 4; 30 mM glucose. (B) Amplification of hCTGF. Lane 1; hCTGF from pSK-hCTGF, M; 100 bp DNA ladder.

**Table II.** DNA Sequence of hCTGF

atgaccggccgcaggatggcccccgtccgcgtcgccctcgtggcctcgcagccggccggcgtcgccagaactgcagcggccgtgcgggtgccggacgagccgg  
cgccgcgtgccccggcggcgtgagcgtcggtggacggctgcccgtgcggctgcgcgtgcgcacaaggcagctggcggagctgtgcaccgcgacccctgcgacccgcacaag  
ggccttcgtgacttcggctccggccaaccgcagaatcgccgtgtgcaccgcataagatgggtgccttcgcattcggtgglacgggtaccgcagcggagagtcctccagac  
agctgcagaatcgtacgtgcacgtgcgtggacggggcggtggcatgcggctgtgcagcatggacgttcgtctgcccgcactgcggcttcggaggaggtaagctgc  
ggaaatgcgcgaggagtgggtgtgtgacgagccaaaggaccaaccgtgggtggccctgcggcttaccgactggaagacacgtttggccagacccaaactatgattagac  
caactgcctggcggcaccacagagtgagcgcctgttccaagacctgtggatggcatctccacccgggttaccaatgacaacgcctctgcaggcttagagaagcagagccgc  
gcatggtcaggcctgcgaagctgacctggaagagaacattaagaagggcaaaaagtgcattccaaatccatgccttatcaagttgagcttcgtgcaccagcatga  
agacataccgagctaaattctgtggagtatgtaccgacggccatgcaccccccacagaaccaccctgcggtgagttcaagtgcctgacggcggaggtcatgaagaagaa  
catgatgttcatcaagacactgtgcctgcattacaactgtccggagacaatgacatcttgaatgcgtactacaggaagatgtacggagacatggca

hCTGF: Human connective tissue growth factor



**Fig. 2.** Outline of pCMV-Flag5-CTGF's construction, selection, and purification.

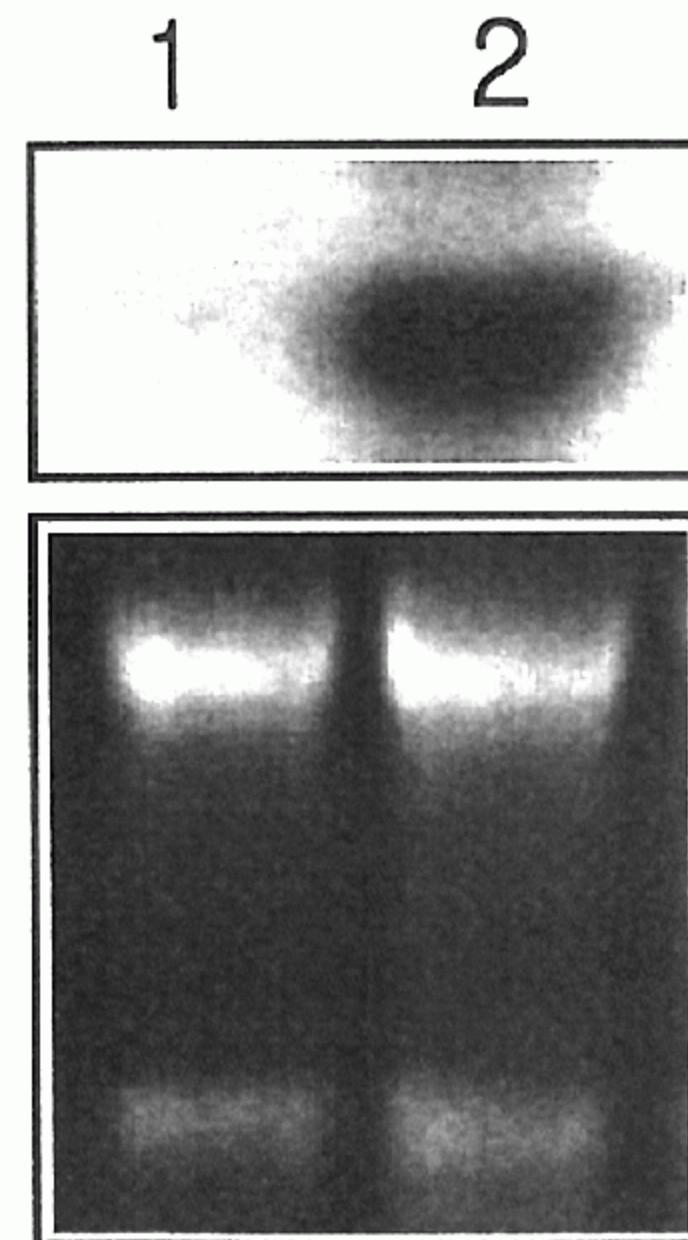
전반적인 과정을 도식화하면 Fig. 2와 같다.

#### 다. 세포에서 pCMV-Flag5-CTGF의 발현 확인

Lipofectamine을 이용해서 pCMV-Flag5-CTGF를 NIH3T3 세포로 도입시킨 후, CTGF의 발현 여부를 RNA 수준에서 일차적으로 확인하였다. pCMV-Flag5(negative control)과 pCMV-Flag5-CTGF를 각각 transfection한 세포에서 RNA를 분리하여 Northern blot을 수행한 결과, pCMV-Flag5-CTGF를 도입시킨 세포에서 CTGF가 강하게 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

#### 라. pCMV-Flag5-CTGF의 피부 투여 및 발현 확인

HVJ-liposome을 이용하여 pCMV-Flag5-CTGF를 쥐의 피하에 주입하여 3일 후에 CTGF의 발현을 여부를 확인하였다. 이를 위해 흰쥐의 피부를 채취하여 cryosection하였



**Fig. 3.** Ectopic expression of pCMV-Flag5-CTGF in NIH3T3. NIH3T3 cells were grown in the DMEM media in the presence of 10% FBS. The cells were transfected with pCMV-Flag5(lane 1) or by pCMV-Flag5-CTGF(lane 2) by lipofectamine. 24hr after transfection, the RNAs were isolated, electrophoresed through 1% denaturing agarose gel, transferred onto nylon membrane, and hybridized with cDNA [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-labelled CTGF(upper panel). The RNAs were stained with EtBr before transfer(lower panel).

다. 이렇게 준비한 피부 박편으로 1차 항체로 anti-Flag antibody를, 2차 항체로 anti-mouse-FITC-conjugated antibody를 이용하여 면역형광염색하였다. 형광현미경으로 그 발현을 확인한 결과, 흰쥐의 피부조직에서 CTGF가 발현되는 것을 확인하였다.

#### 마. 피부에서의 TGF- $\beta$ 1과 CTGF의 발현 확인 및 조직학적 관찰

흰쥐의 피부에 pCMV-Flag5-CTGF과 TGF- $\beta$ 1 단백을 투여하여 그 발현양상을 RT-PCR 방법으로 확인하였다. TGF- $\beta$ 1은 pCMV-Flag5-CTGF를 투여하고 7일째에, TGF-

$\beta$ 1 단백질을 투여하였을 때도 7일째에 그 발현을 확인할 수 있었다. 그리고 CTGF는 pCMV-Flag5-CTGF를 투여 후 3일과 7일째에 모두 발현되는 것으로 나타났으며, TGF- $\beta$ 1 단백질을 투여했을 경우에는 3일째에는 강하게 발현되었지만, 7일째에는 발현되지 않았다(Fig. 4). 광학 현미경적 관찰에서 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF 투여군에 모두에서 그 부위의 초기 염증성 변화인 부종 및 염증세포의 침윤이 관찰되었으며, 7일 이후에는 염증세포의 침윤은 소실되고 초기 육아조직의 증식이 관찰되었다(Fig. 5). Trichrome 염색에서 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF 투여군 모두에서 약한 교원질의 침착이

7일부터 증가되어 관찰되기 시작하였다(Fig. 7). TGF- $\beta$ 1 투여 후 3일째 *in situ hybridization*을 통해 CTGF mRNA의 발현이 관찰되었으며, 7일 이후에는 CTGF의 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 7). TGF- $\beta$ 1 투여 후 VEGF의 발현도 실험기간 동안 관찰되지 않았다. CTGF 투여 후 TGF- $\beta$ 1의 발현은 실험초기부터 증가되어 관찰되었으며 14일째에는 그 발현이 약하게 관찰되었다. CTGF 투여 후 VEGF의 발현은 일부세포에서 초기에 몇 개가 관찰되었으나 대체로 발현이 되지 않았다(Fig. 8).

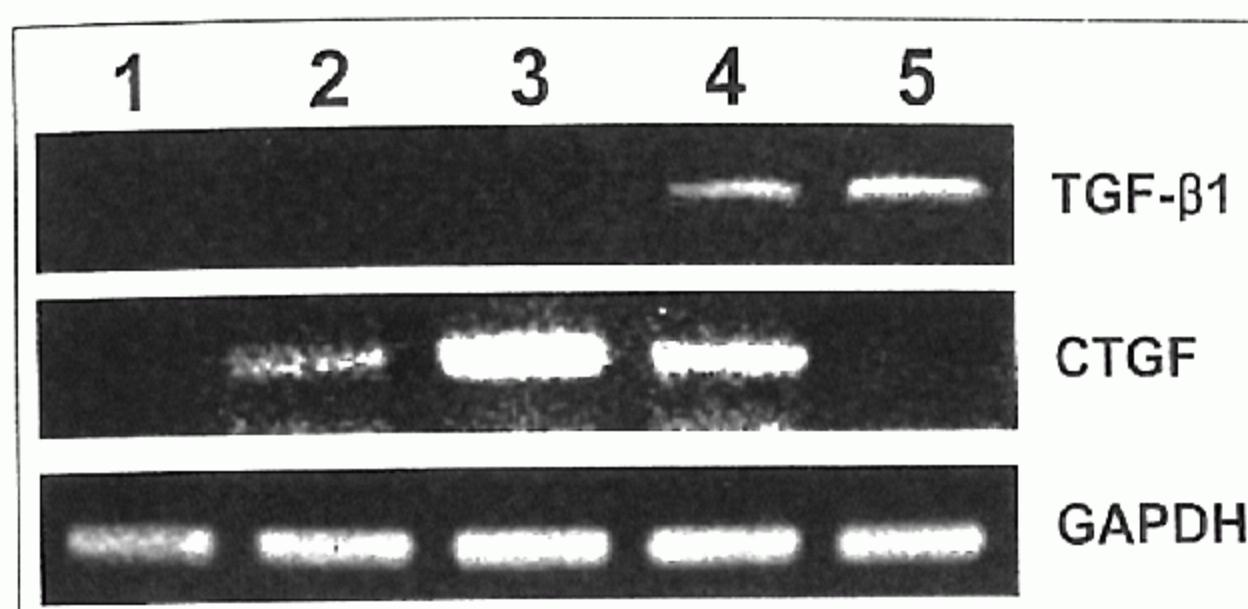


Fig. 4. Expression of TGF- $\beta$ 1 and CTGF mRNA in the skin. 1; PBS, 2; 3 days transfected with pCMV-Flag5-CTGF, 3; 3 days injected with TGF- $\beta$ 1 protein, 4; 7 days transfected with pCMV-Flag5-CTGF, 5; 7 days injected with TGF- $\beta$ 1 protein.

#### IV. 고 찰

창상치유 과정은 염증세포의 침윤, 세포의 증식, 세포의 이주, 혈관의 증식과 세포외기질의 형성 등을 포함하는 매우 복잡한 과정이다. TGF- $\beta$ 는 이 모든 과정, 즉 염증세포에 대한 화학주성, 혈관증식, 세포외기질의 침착과 육아조직의 형성 등을 조절하여 창상치유의 촉진과 반흔형성에 관여한다.<sup>7</sup>

반흔형성의 과정에는 TGF- $\beta$ 1 뿐만 아니라 TNF- $\alpha$ , IFN, IL-2, -12 등의 제 1형 cytokine들과 IL-4, -5, -10, -13 등의 제 2형 cytokine들도 서로 간의 조절기전을 통해 직접 혹은 간접적으로 관여한다. 이들 cytokine 및 mediator

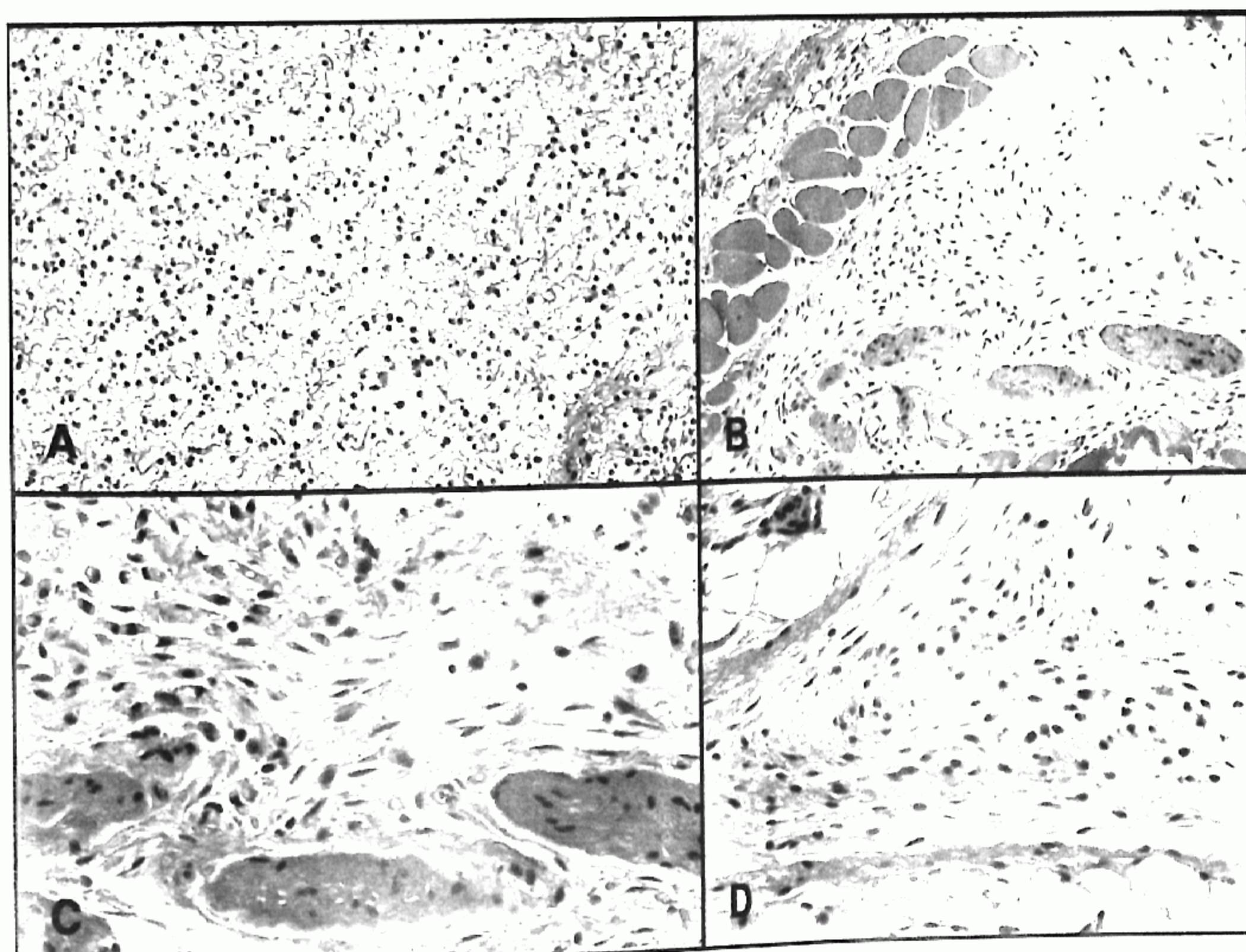
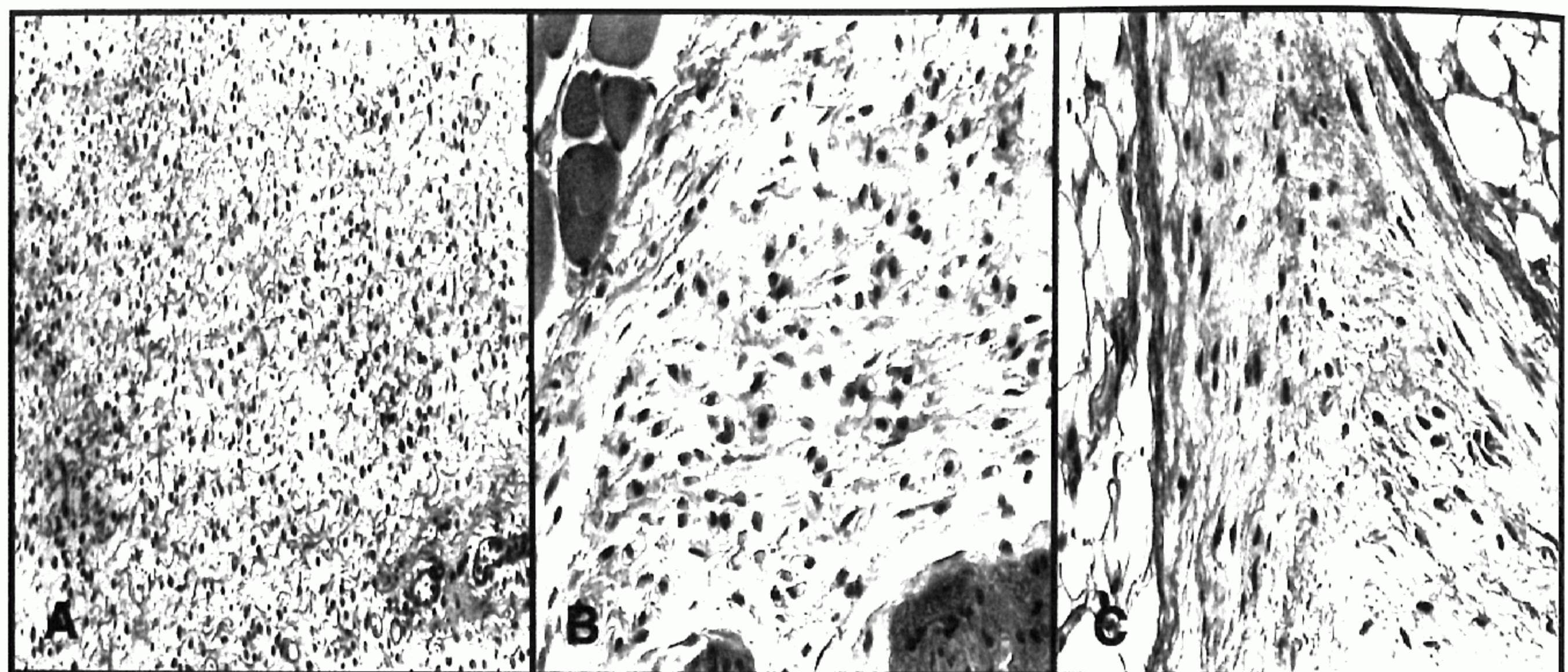
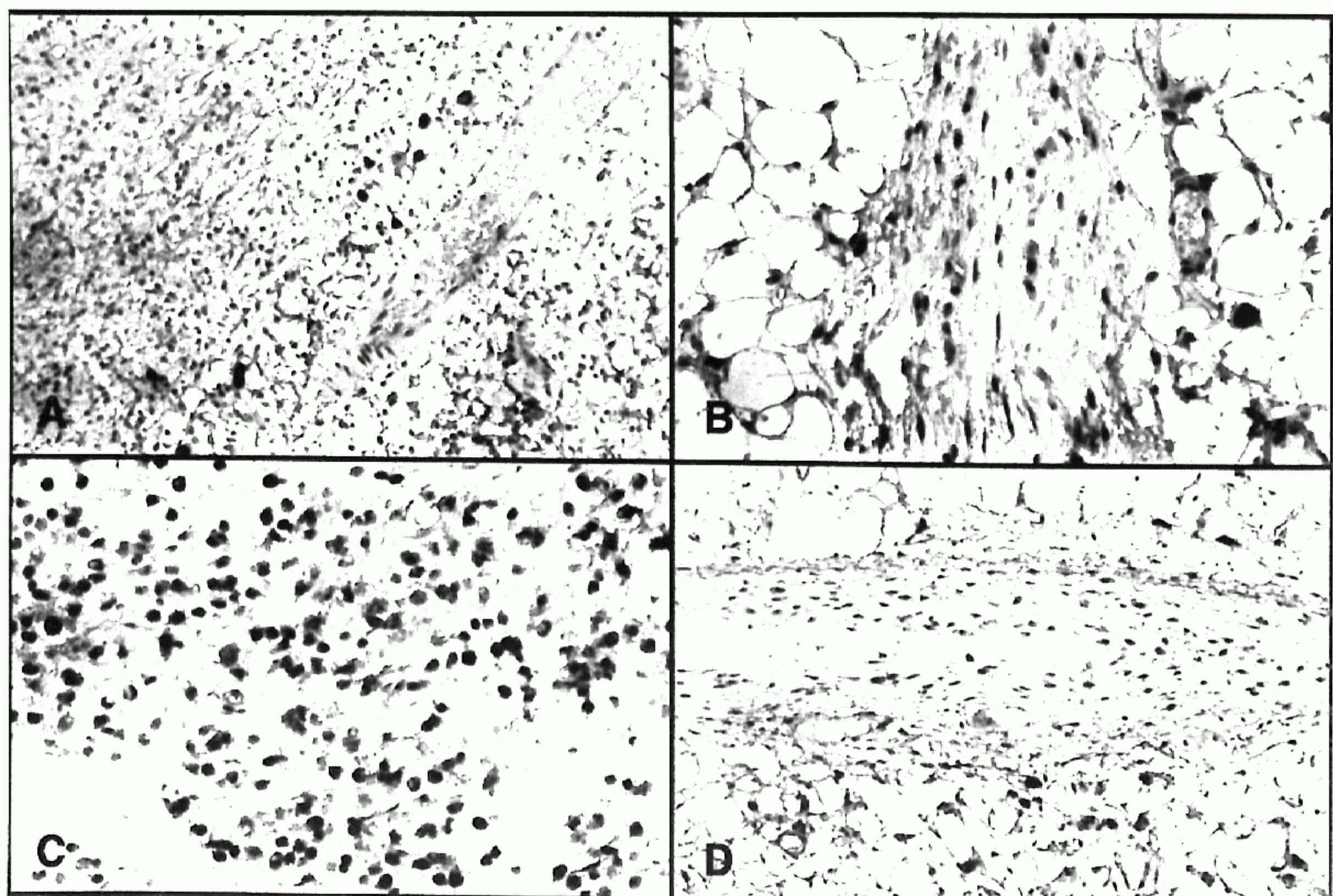


Fig. 5. Light microscopic findings of rats injected with pCMV-Flag5-CTGF and TGF- $\beta$ 1 protein. A: One day after pCMV-Flag5-CTGF injection. B: Seven days after pCMV-Flag5-CTGF injection. C: Seven days after pCMV-Flag5-CTGF injection. D: Fourteen days after TGF- $\beta$ 1 protein injection (Original magnification: A and B,  $\times 100$ ; C and D,  $\times 200$ ).



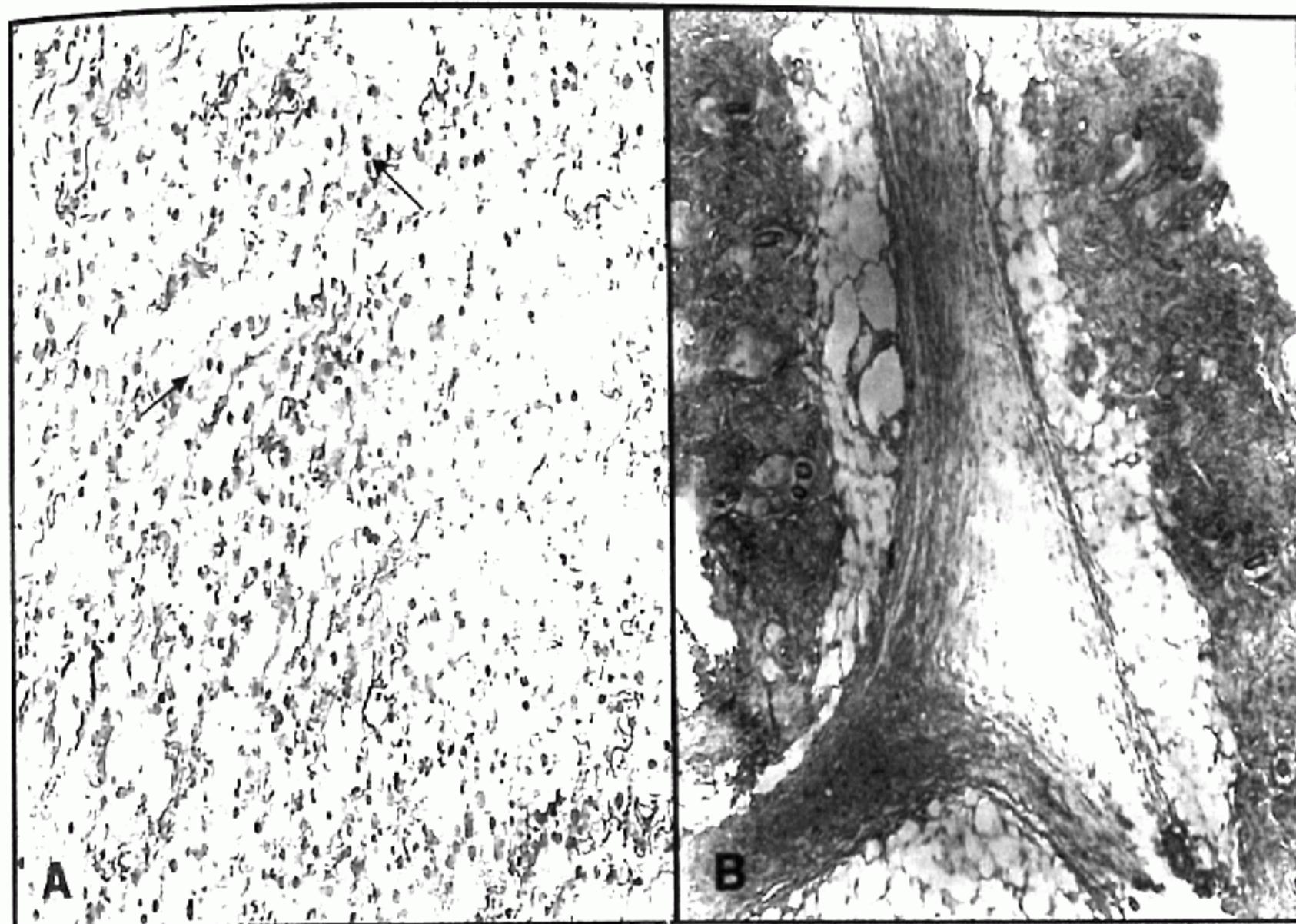
**Fig. 6.** Masson trichrome stain shows increased collagen deposits at day 1 (A), day 7 (B), and day 14 (C) after pCMV-Flag5-CTGF injection(Original magnification: A,  $\times 100$ ; B and C,  $\times 200$ ).



**Fig. 7.** Immunohistochemical findings of VEGF expression at day 1 (A) and day 14 (B) after pCMV-Flag5-CTGF injection; TGF- $\beta 1$  expression at day 1 (C) and day 14 (D) after pCMV-Flag5-CTGF injection(Original magnification: A and D,  $\times 100$ ; B and C,  $\times 200$ ).

들의 상호관계는 너무 복잡해서 아직 완전히 밝혀져 있지 않거나 이미 알려진 것도 다시 수정되는 등 매우 복잡하다. 이 연구에서는 특히 TGF- $\beta 1$ 과 CTGF 간의 피부 반흔에서의 상호관련성 및 많은 장기에서의 염증성 질환에서

발현되는 것으로 알려지는 VEGF와 상호발현 관계를 조사하고자 하였다. 이러한 연구를 시행하는 것은 이들 상호간의 발현조절 및 섬유화 과정에서의 각각의 역할 등에 관한 이해가 있어야만 앞으로 섬유화의 조절 혹은 반흔형성 방



**Fig. 8.** In situ hybridization shows increased expression of CTGF mRNA at day 3 after TGF- $\beta$ 1 protein injection (A). CTGF mRNA expression is decreased at day 7 after TGF- $\beta$ 1 protein injection (B) (Original magnification: A,  $\times 100$ ; B,  $\times 200$ ).

지를 위한 새로운 치료제개발 방향이 제시될 수 있기 때문이다.

세포외기질의 형성과정에서 관찰되는 세포 및 조직들은 TGF- $\beta$ 1에 의해 조절된다고 알려지는 많은 과정이 있다. TGF- $\beta$ 1의 조절은 많은 문헌에서 CTGF에 의해 매개된다고 보고되고 있고,<sup>8</sup> 이 실험에 의해서도 TGF- $\beta$ 1이 CTGF 발현을 유도하는 것으로 관찰되었다.

CTGF 단백은 38-kDa 단백으로 Bradham 등<sup>9</sup>에 의해 human umbilical vein의 endothelial cell에서 처음 밝혀졌으며, TGF- $\beta$ 1에 의해 평활근세포와 섬유모세포에서 선택적으로 발현되는 것으로 보고되고 있고,<sup>10</sup> 이 실험에서도 그것이 관찰되었다. 또한 CTGF는 거의 모든 문헌에서 TGF- $\beta$ 1에 의해 발현이 유도된다고 보고되고 있으나,<sup>8,9</sup> 신장의 메산지움세포에서는 그 반대로 CTGF에 의해 TGF- $\beta$ 1의 발현이 초래되기도 하는 등 세포마다 다를 수도 있다. 그러나 피부질환에서의 CTGF mRNA는 섬유화초래 과정에서 발현되는 것으로 알려져 있고,<sup>10</sup> 이 과정에서 어느 것이 섬유화에 선택적으로 작용하는지를 아는 것이 중요하다. 왜냐하면 TGF- $\beta$ 1은 섬유화 초래 외에도 혈관신생, 면역억제 기능, 세포의 증식 등의 다양한 기능을 하기 때문에 TGF- $\beta$ 1을 차단하는 것은 예상치 않은 부작용을 초래할 수 있기 때문이다. 이 실험에서 고농도의 포도당에서 배양된 세포에서 CTGF mRNA의 발현이 관찰되었는데, 고농도의 포도당은 섬유화 초래 조건과 비슷하여 이미 다른 문헌보고<sup>11</sup>에서도 TGF- $\beta$ 1의 발현을 보기 위해 많이 사용되어지는 조건이다. 따라서 이것은 CTGF가 TGF- $\beta$ 1과 같이 섬유화 초래의 원인이 되는 것으로 보이는 소견이다. 이와 연관된 이 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다. 첫째, CTGF DNA를 투여하였을 때 TGF- $\beta$ 1 단백이 발현

되었다. 이것은 CTGF mRNA 및 단백이 발현되어 TGF- $\beta$ 1 DNA의 전사과정에 영향을 미쳤거나, CTGF DNA 전사과정에서 TGF- $\beta$ 1이 같이 전사되어 그 단백이 발현되었음을 의미한다. 이 과정에서의 복잡한 과정에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않으며 앞으로 연구되어야 할 것으로 생각한다. 둘째로, TGF- $\beta$ 1 단백을 투여한 후 초기에 CTGF의 mRNA 발현이 관찰되었다. 이를 결과는 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF는 어떠한 방향이든 서로간에 영향을 미치는 것으로 생각이 된다. 다른 문헌보고처럼 TGF- $\beta$ 1이 CTGF를 발현하게 한다는 결과는 다른 결과로 생각되어지며, 이에 대한 연구 역시 뒤따라야 할 것으로 생각하며, 시기에 따라 서로의 발현에 영향을 미치는지도 고려되어야 할 것이다.

TGF- $\beta$ 1이 동물실험에서 혈관신생에 관련된다고 보고되고 있지만, 시험관 및 동물실험에서 가장 강력한 혈관내피세포 성장인자는 VEGF로 알려지고 있다.<sup>3</sup> 그리고 반흔형성 과정에서 혈관신생 및 투과성의 증가는 매우 중요한 과정중의 하나이므로 VEGF 역시 반흔형성에 관련된다고 볼 수 있다. 또한 이 과정에서 TGF- $\beta$ 1을 포함한 많은 cytokine들과도 어떤 관련성이 있을 것으로 추측해 볼 수 있다. 그러나 이 연구 결과를 통해 VEGF가 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF에 의해 직접적인 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 비록 같은 염증 조건과 비슷한 시기에 발현되지만 직접 연관이 없는 것으로 관찰되어 아마도 다른 cytokine들과 연관이 있을 것으로 추측되며 앞으로 추가적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각한다.

이 연구에서는 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 상호 발현관계를 살펴보기 위하여 TGF- $\beta$ 1은 기존에 상품화된 단백을 사용하였지만, CTGF는 DNA 차원에서 전사관계 등을 살펴보기 위하여 CMV promoter에 부착시켜 전사과정부터 RT-PCR

방법 등을 사용하여 mRNA 발현부터 관찰하였다. CTGF 단백질은 세포외부로 분비되는 분비단백질로 N-terminal의 21개의 아미노산(63 bp)이 signal peptide로써 작용한다. 이러한 이유로 CTGF의 C-terminal 부분에 Flag이라는 tag 단백질이 발현이 되는 pCMV-Flag5 벡터에 CTGF를 클로닝하였다. 즉 CTGF의 성숙 단백질과 Flag이라는 tag 단백질이 함께 결합해 있기 때문에 Flag에 대한 항체로 CTGF를 간편히 검출해 낼 수 있다는 장점이 있다. 지금까지는 상용화된 CTGF 항체가 없었으므로, 위에서 언급한 것과 같이 Flag로 tag된 단백질과 함께 CTGF가 발현되는 벡터를 구축하여 실험에 사용하였다. 이 pCMV-Flag 벡터는 세포 내에서 강하게 발현되는 CMV(Cytomegalovirus) promoter를 가지고 있어서 외부의 특정 유전자를 발현시키고자 많이 이용되고 있다.<sup>12</sup> 또한 이때 세포 내로의 CTGF DNA 유입을 위한 매개체로는 HVJ-liposome을 이용, 세포 내로의 투과성을 증가시키고자 하였다.

이 연구를 요약해 보면 TGF- $\beta$ 1 단백 및 CTGF mRNA를 외부에서 투여하여 각각의 경우에서 TGF- $\beta$ 1, CTGF 및 VEGF 발현의 상호관계를 관찰하였다. 공통적으로 섬유화 과정으로 가는 조직학적 소견이 관찰되었으며, TGF- $\beta$ 1 및 CTGF는 서로간의 발현에 밀접한 관련이 있는 것으로 관찰되었다. 아마도 TGF- $\beta$ 1이 CTGF 발현을 유도하는 것으로 생각되나 발현시기 및 기전에 관한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각한다. VEGF의 경우에는 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 발현에는 직접적인 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었으나, 다른 cytokine들과 연관된 간접적인 영향 역시 더 연구되어야 할 과제로 생각한다.

## V. 결 론

피부반흔 형성과정에서 중요한 역할을 한다고 알려진 TGF- $\beta$ 1, CTGF 및 VEGF의 상호관련성을 살펴보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 흰쥐의 피하조직에 TGF- $\beta$ 1 단백을 투여한 후 CTGF 및 VEGF의 발현을 관찰하였으며, CTGF의 DNA를 투여한 후 TGF- $\beta$ 1 및 VEGF의 발현을 관찰하였다. 이를 위하여 재조합 TGF- $\beta$ 1 단백과 pCMV-Flag5-CTGF를 제작하여 HVJ-liposome 혼합액과 함께 투여하였으며, 실험결과의 관찰방법으로는 광학현미경, 면역조직화학염색, ISH 및 RT-PCR을 시행하였다. TGF- $\beta$ 1 단백 투여 후 초기에는 CTGF의 mRNA의 발현이 관찰되었으며, pCMV-Flag5-CTGF 투여 후 역시 초기에 TGF- $\beta$ 1 발현이 관찰되었다. VEGF의 발현은 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF의 투여 후 관찰되지 않았다. 따라서 TGF- $\beta$ 1 및 CTGF는 반흔형성 과정에 밀접한 관련이 있으며 서로의

발현에 영향을 주는 것으로 생각이 되며 VEGF는 이들과 무관한 것으로 생각된다. 이 연구에서 사용되어진 TGF- $\beta$ 1 단백 및 CTGF DNA 투여에 의한 동물실험 모델은 향후 반흔형성 연구에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K: Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 181: 153, 1999
- Kothapalli D, Grotendorst GR: CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts. *J Cell Physiol* 182: 119, 2000
- Diaz BV, Lenoir MC, Ladoux A, Frelin C, Demarchez M, Michel S: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 275: 642, 2000
- Frazier KS, Grotendorst GR: Expression of connective tissue growth factor mRNA in the fibrous stroma of mammary tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 153, 1997
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Manabu F, Grotendorst GR, Takehara K: Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic disease. *J Invest Dermatol* 106: 729, 1996
- Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S: Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem* 271: 21793, 1996
- Quaglino D Jr, Nanney LB, Ditesheim JA, Davidson JM: Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: incisional wound model. *J Invest Dermatol* 97: 34, 1991
- Kothapalli D, Frazier K, Grotendorst GR: TGF- $\beta$  induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-independent signalling pathway. *Cell Growth Differ* 8: 61, 1997
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst G: Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114: 1285, 1991
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107: 404, 1996
- Ito Y, Aten J, Bende RKJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R: Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 53: 853, 1998
- Cheng D, Meegalla RL, He B, Cromley DA, Billheimer JT, Young PR: Human acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem J* 359: 707, 2001