

Transforming Growth Factor- β 1에 대한 항체 및 유전자 치료가 피부 반흔 형성에 미치는 영향

김준형 · 한기환 · 안종덕¹ · 이인규¹
김은주² · 황미열² · 박관규²

계명대학교 의과대학 성형외과학교실
¹내과학교실, ²병리학교실

접 수 : 2001년 4월 7일
게재승인 : 2001년 9월 19일

책임저자 : 박 관 규
우 700-712 대구시 중구 동산동 194
계명대 병리학교실
전화: 053-250-7465
Fax: 053-250-7852
E-mail: park1234@dsmc.or.kr

The Effect of Antibody and Gene Therapy for Transforming Growth Factor- β 1 on Scar Formation

Jun Hyung Kim, Ki Hwan Han, Jong Duck Ahn¹, In Kyu Lee¹, Eun Joo Kim²
Mee-Yul Hwang² and Kwan Kyu Park²

Departments of Plastic Surgery, ¹Internal Medicine and ²Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Background : Transforming growth factor (TGF)- β has a large variety of biological functions, including the modulation of inflammation and the immune system, and is presumed to play important roles in repairing wounds and reducing scarring. The objective of this study is to examine the effects of TGF- β 1 on healing wounds and reducing scarring. We have also analysed the ability of the hemagglutinating virus of Japan (HVJ) liposome mediated antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) to specifically inhibit wound-induced expressions of TGF- β 1 proteins and mRNA in the rat skin. **Methods :** Skin wounds were created on the backs of 80 anesthetized rats. The first group of wounds, as the controls, was unmanipulated. The second group of wounds, as positive controls or an excessive scarring model, was injected with TGF- β 1 subcutaneously. The third group of wounds was injected with anti-TGF- β 1 antibody subcutaneously. The fourth group of wounds was injected with HVJ liposome mediated antisense ODNs for TGF- β 1 subcutaneously. The wounds of all groups were bisected and analysed histologically 5, 10, 15, 30, and 50 days after the wounds were made. **Results :** All control wounds (TGF- β 1 or no injection) healed with scarring, whereas the wounds treated with the antibody or antisense ODNs healed with less scar formation compared to the control group. The wounds treated with the antibody or antisense ODNs had fewer macrophages, less collagen and fibronectin contents than the other wounds. Northern blotting and *in situ* hybridization analysis showed that wound sites treated with HVJ liposome mediated antisense ODNs for TGF- β 1 exhibited decreased levels of TGF- β 1 mRNA after injury. **Conclusions :** These findings suggest an important new approach to controlling scarring in normal wound healing, complementing the practice of adding exogenous growth factors to chronic wounds in the attempt to inhibit collagen deposition.

Key Words : Transforming growth factor beta, Liposomes, Wounds and injuries, Oligoribonucleotides, Antisense

서 론

성형외과 영역에서 외상이나 심한 염증 후에 발생하는 반흔의 교정은 매우 중요한 문제이다. 그러나 많은 연구에도 불구하고 아직도 반흔을 완전히 없앨 방법은 없는 실정이다.¹ 최근 조직 사이토카인의 한 종류인 transforming growth factor (TGF)- β 1이 콜라겐 혹은 세포외기질의 침착에 깊이 관여한다는 사실이 알려진 후^{2,3} 많은 연구가 진행되고 있다.

TGF- β 는 다양한 기능을 갖고 있는 사이토카인으로서 세포의 성장, 분화 및 세포외기질 형성 등에 관여하고 있으며 조직의 재생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹ 또한 피부 반흔, 켈로이드, 피부경화증 등의 병적 상태에서 단핵세포나 섬유세포의 이주와 활성화를 조장하여 만성 염증을 일으키고 결국 섬유화를 초래한다고 알려져 있다.^{4,5} 이러한 TGF- β 가 섬유화를 초래하는 기전은 단백분해효소의 분비를 억제하거나, 단백분해효소 억제제를 생성함으로써 세포외기질의 파괴를 억제하는 것으

로 보고되어 있다.⁶ 최근 포유동물에서 이 성장 인자에는 3가지 형이 있음이 밝혀졌으며 TGF-β3도 반흔 형성에 관여한다고 보고되고 있으나, 본 연구에서는 TGF-β1이 반흔 형성에 미치는 영향을 연구하고자 한다. 지금까지 연구된 바로는 TGF-β는 활성화된 혈소판, 대식세포 및 림프구에서 분비되며^{7,8} 생체 내에서 섬유모세포에 의한 콜라겐과 fibronectin의 생성을 증가시켜 섬유모세포의 세포분열을 촉진한다고 연구되어져 있다.^{9,10} 이와 같은 문헌적 배경을 통해 TGF-β1은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 여러 조직 및 세포에서 섬유화를 초래하는 주된 매개 물질로 알려짐에 따라,¹¹ 섬유화 방지를 위해 TGF-β1을 치료 목표로 많이 이용하고 있다. 또한 TGF-β1에 대한 억제제로서의 가능성은 TGF-β1에 대한 antisense oligodeoxynucleotides (ODNs)를 투여한 유전자 치료가 피부 반흔 형성을 감소시킬 수 있는가에 달려 있다. 즉 antisense ODNs 투여는 TGF-β1 mRNA와 결합함으로써 TGF-β1 단백질의 과잉생산을 억제하고 세포외기질의 침착을 억제한다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 첫째, 외상 후 조직에서의 반흔 형성 과정에서 TGF-β1의 발현과 세포외기질의 침착 양상을 살펴보고, 둘째, 외상 후 TGF-β1 단백질의 형성을 차단하기 위한 TGF-β1 항체의 외상에 대한 치료제로서의 효과를 살펴보고, 셋째, TGF-β1 mRNA에 대한 antisense ODNs를 투여한 유전자 치료가 외상에서의 반흔 억제효과가 있는지에 대한 가능성을 살펴보고자 하였다. 이를 위하여 본 실험에서는 흰쥐에서 실험적으로 손상을 유발한 후 TGF-β1에 대한 유전자를 투여하고 그 결과를 광학현미경 검사, 면역조직화학 염색, *in situ* hybridization, northern blot 등의 분자생물학적 방법으로 관찰하였다.

재료와 방법

실험동물

실험동물로는 250 g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 80마리를 사용하였으며, 모든 흰쥐의 등에 10 mm 길이의 절개를 피하층까지 가한 후 봉합하지 않은 상태로 그냥 두었다. 실험동물은 각 군당 20마리씩이며 다음과 같다.

- 제1군: 대조군으로서 외상을 가한 후 봉합하지 않은 상태로 둔 군
- 제2군: 외상을 가한 후 곧바로 10 ng의 TGF-β1을 피하조직에 투여한 군
- 제3군: 10 μg의 TGF-β1에 대한 항체를 50 μg/100 μL농도로 인산염 완충액에 희석하여 창상 부위에 투여한 군
- 제4군: 10 μg의 TGF-β1에 대한 리포솜 매개 ODNs를 투여한 군

동물은 전 처치 후 5, 10, 15, 30, 50일째에 각 군당 4마리씩 도살하고 창상부위의 피부조직을 채취하여 광학 및 전자현미경 검사, TGF-β1, CD 68, fibronectin 등에 대한 면역조직화학 검사, TGF-β1 mRNA 발현에 대한 northern blot과 *in situ* hybridization을 시행하였다.

방법

일본 적혈구 응집 바이러스(Hemagglutinating virus of Japan: HVJ) 리포솜 매개 antisense ODNs 제작

수정된 지 10일이 경과된 닭의 수정란을 구입하여 암실에서 검란 후, 종자 바이러스를 polypepton에 1:1,000으로 희석하여 0.1 mL 수정란에 접종하여 35.5°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 바이러스 25 mL를 3,000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심분리한 후 상청액을 원심분리용 시험관으로 옮겨 15,000 rpm으로 40분간 4°C에서 원심분리하였다. 그런 다음 상청액을 버리고 바이러스가 흩어지지 않게 balanced salt solution (BSS)을 첨가하여 4°C에서 하룻밤 재운 뒤 바이러스를 조심스럽게 부유시켜서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

일본 적혈구 응집 바이러스(HVJ)-리포솜을 만들기 위하여 phosphatidyl-L-serine (PS): phosphatidylcholine (PC): cholesterol (Chol)을 1:4.8:2의 비율로 10 mg되게 혼합하여 질소가스로 채워진 유리 용기에 넣고 클로로포름으로 조심스럽게 녹였다. 증발기에 유리 용기를 고정하고 진공 상태에서 지질이 유리 용기에 얇게 퍼질 때까지 증발시킨 후 사용하였다.

TGF-β1에 대한 antisense ODNs의 염기 서열은 5'-CGA-GGG-CGG-CAT-GGG-3'을 사용하였다. 지질이 포함된 유리 용기에 10 μg의 ODNs를 첨가하여 30초간 흔들어서 섞어 주고, 30초간 37°C 수조에서 8회 반복 배양하였다. 그 후 0.45 μm 필터에 걸러낸 후 BSS를 0.5 mL 첨가하여 다시 0.2 μm 필터에 걸렀다. 정제된 바이러스를 사용 양의 1.5배 정도 배양접시에 퍼서 0.198 J의 자외선으로 불활성화 시켰다. 불활성화된 바이러스 30,000 적혈구 응집 단위를 지질과 ODNs 혼합물에 첨가하여 얼음에서 10분간 반응시켰다. 30% 설탕물을 초고속원심분리기 용기에 주입하고 그 위에 지질, ODNs, 바이러스의 혼합물을 얹은 후 25,000 rpm으로 2시간 초고속 원심분리하여 리포솜 층을 조심스럽게 건져서 사용하였다.

광학현미경 검사

실험군과 대조군에서 적출한 피부 생검조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열 알코올로 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 다음 2-4 μm의 박절편을 만들어 HE 염색을 하였으며, 필요에 따라 Masson trichrome 특수염색을 시행하였다. 반흔의 크기는 광학현미경으로 검색하고 현미경에 부착된 자로 폭을 측정하였다.

면역조직화학 염색

TGF- β 1, CD 68, fibronectin 등의 단백 발현을 알아보기 위해 이들 각각에 대한 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 하였다. 파라핀 포매된 피부생검조직을 4 μ m 두께로 잘라서 부착제로 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀을 거쳐 흡수하였다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소수 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01 M 인산염 완충액에서 10분간 세척하였다. TGF- β 1, CD 68, fibronectin 각각에 대한 1차 항체를 37°C에서 30분간 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG (DAKO LSAB kit, U.S.A.)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. Streptavidin peroxidase (DAKO LSAB kit, U.S.A.)로 37°C에서 15분간 반응시키고 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하였다. 그런 다음 헤마톡실린으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

TGF- β 1 mRNA에 대한 *in situ* hybridization

2% 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)와 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)로 처리한 유리 슬라이드에 4 μ m 두께로 조직 절편을 붙이고 60°C 오븐에 하루밤 방치하여 조직 절편을 슬라이드에 부착시켰다. 조직 절편을 붙인 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀하고 계열 알코올로 흡수한 후 DEPC 처리한 증류수로 수세하였다. 조직 절편 위에 10 μ g/mL 농도의 proteinase K (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 30-50 μ L 취하고 37°C에서 30분간 반응시켜 세포질 및 핵의 단백 일부를 제거한 후 DEPC 처리한 증류수로 수세하였다. 0.4% paraformaldehyde로 4°C에서 20분간 고정하고 상온에서 0.2% glycine 용액으로 처리한 후 95% 알코올로 세척하여 공기 중에 건조시켰다. 주된 보합결합반응을 실시하기 전에 보합결합반응액에서 소식자를 제외한 용액으로 37°C에서 2시간 동안 전보합결합반응시켰다. 보합결합반응에 사용한 소식자는 TGF- β 1에 상보적인 30 mer oligonucleotide (Bioneer, Korea)에 oligonucleotide tailing kit (Boehringer Mannheim, Mannheim Germany)를 사용하여 digoxigenin을 표지해 사용하였다. 반응용액의 조성은 최종 농도는 각각 50% formamide (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 4 X SSC, 5 X Denhardt 용액, 5 μ g/mL salmon sperm DNA (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)로 조절하였고 digoxigenin을 표지한 소식자는 0.3 ng/mL 농도로 사용하였다. 조직 절편 위에 20-30 μ L의 반응용액을 취하여 덮개유리를 덮은 후 고무풀로 봉하고 37°C에서 하루밤 동안 반응시켰다. 결합되지 않은 소식자를 제거하기 위해 2 X SSC 용액으로 37°C에서 10분간 두 번, 0.1 X SSC 용액으로 10분, 0.1 X SSC 용액으로 실온에서 5분간 수세하였다. 비특이 반응 억제제(0.5% bovine serum albumin)로 37°C에서 30분간 처리한 후 anti-digoxigenin Fab alkaline phosphatase

(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, 1:500)를 사용하여 37°C에서 30분간 결합반응시켰다. Nitroblue tetrazolium (NBT; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)와 5-bromo-4-chloroindolyl phosphate (BCIP; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 실온에서 1-8시간 동안 발색 반응시키고 methyl green으로 대조염색하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵에 미만성으로 암청색의 발색이 있으면 양성으로 판정하였다.

TGF- β mRNA에 대한 northern blot 분석

RNA를 분리하기 위하여 액화질소를 사용하여 조직 0.1 g을 곱게 분쇄하고, 변성용액(4 M guanidin thiocyanate, 0.5% lauryl sarcosyl, 25 mM sodium citrate, 0.7% β mercaptoethanol) 3 mL를 첨가하여 조직 분쇄기로 세포를 파괴시키고 균질화시켰다. 2 M sodium acetate (pH 4.0) 0.3 mL를 넣어 잘 섞고 페놀 3 mL를 넣어 심하게 흔들었다. 클로로포름 0.6 mL를 첨가하여 1분간 심하게 흔든 후 얼음에 20분간 반응시켰다. 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상청액을 새로운 용기로 옮긴 후, 3 M sodium acetate (pH 5.2)를 1/10 부피 첨가하여 잘 섞어준 다음 동일 부피의 isopropyl alcohol을 첨가하여 -70°C에서 하루밤동안 반응시켰다. 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 70% 알코올로 세척한 후 DEPC 처리한 증류수에 녹여 분광광도계를 이용하여 정량하였다.

Northern transfer를 위하여 정량된 RNA를 20-30 μ g 취하여 5 X gel running buffer, formamide, formaldehyde의 부피가 4:2:3.5:10이 되도록 잘 섞은 후 65°C에서 15분간 반응시키고, gel loading dye를 1/10 부피로 첨가하여 준비하였다. RNA gel은 agarose에 DEPC 처리 증류수를 넣고 끓인 후 5 x gel running buffer 1/5 부피, formaldehyde 2.2/12.3 부피를 첨가하여 잘 혼합하여 사용하였다. 전기영동은 3-4 V/cm이 되도록 수행하였다. 전기영동한 RNA를 DEPC 처리한 증류수에 3-4회 세척하고 transfer buffer에 40분간 담갔다. 사용할 막을 gel 크기로 잘라 DEPC 처리한 증류수에 15분간 담근 후 10 x SSC에 담가 사용할 때까지 방치하였다. 큰 용기에 지지대를 놓고 여과지를 길게 엮어서 10 x SSC로 적셨다. RNA gel을 뒤집어 여과지 위에 놓고 준비된 막을 놓았다. 2 X SSC에 적신 여과지를 두 장 놓고 종이 타올을 놓은 후 8시간 동안 전이하였다.

Hybridization에 사용된 probe DNA는 Megaprimer kit (Amersham Pharmacia, Life Science, Little Chalfont, Bucks., U.K.)였다. TGF- β 1 DNA 25 ng에 Mega primer를 첨가하여 100°C에서 10분간 끓여 변성시킨 후 상온에 15분 이상 방치하여 annealing시켰다. 얼음에서 10 x buffer와 dNTP, α -³²P dCTP (Amersham Pharmacia Life Science, Little Chalfont, Bucks., U.K.) Klenow를 첨가하여 잘 섞은 후 37°C에서 30분 이상 반응시켰다. Probe DNA에 첨가되지 못한 α -³²P dCTP를 제거하기 위하여 Nick-column (Amersham

Pharmacia, Life Science, Little Chalfont, Bucks., U.K.)을 사용하였다. Column을 수직으로 세워 equilibration buffer (20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8) 3 mL로 3회 세척한 후 probe DNA를 column 위에 얹고 equilibration buffer를 400 μL 첨가하였다. 그 다음 TEN (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl)을 1 mL 첨가하여 나온 추출물을 E-tube에 받아서 100°C에서 10분간 끓인 후 보합결합반응에 사용하였다. 전이된 막을 6 X SSC에 15분간 담근 후 공기 중에서 말려 80°C에서 2시간 동안 구웠다. 보합결합반응 용액을 65°C에서 반응시켜 점성을 작게 한 뒤 보합결합반응 병에 막을 넣고 ExpressHyb 용액을 5-10 mL 첨가하여 1시간 반응시켰다. 전

보합결합반응 용액에 probe를 적어도 1×10⁷ cpm/mL 되도록 첨가하여 보합결합반응 용액으로 사용하였다. 보합결합반응은 65°C에서 1시간 이상 하였다. 세척 과정은 2 x SSC, 0.1% SDS로 상온에서 15분간 수행한 후 0.2 x SSC, 0.1% SDS로 55°C에서 20분간 2회 수행하였다. 영상분석기 (MacBAS, Kodak, U.S.A.)를 사용하여 신호 강도를 측정하여 결과를 판독하였다.

결 과

창상 후 반흔의 크기는 아무 처치도 하지 않은 대조군 혹은 TGF-β1을 투여한 양성 대조군보다 TGF-β1에 대한 항체 또는 antisense ODNs를 투여한 군에서 더 감소하는 것으로 나타났다. 특히 antisense ODNs를 투여한 군에서 가장 많이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1, 2). 대조군에서 창상 부위의 콜라겐 침착은 시간이 경과할수록 증가되었으며, 초기에 육아조직이 형성될 때에는 성숙한 콜라겐의 침착은 많지 않은 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 동일한 군에서의 TGF-β1 단백질 발현을 관찰한 결과, 창상을 만든 후 초기에 육아조직이 형성될 때 발현이 증가하였으며, 창상을 만든 후 30일째 콜라겐이 많이 침착되었을 때에는 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4). TGF-β1 단백질 발현이 증가되는 세포들은 주로 섬유모세포, 혈관내피세포, 림프구 및 대식세포 등이었다(Fig. 5). 창상 후 염증의 초기에 TGF-β1이 특히 과발현되는 세포는 대식세포였으며, 이것은 대식세포의 염색지표인 CD 68에 대한 면역조직화학 염색에서도 TGF-β1 염색과 동일한 세포에 염색됨으로써 확인할 수 있었다(Fig. 6). 아무것도 처치하지 않은 대조군의 정상 상피 세포에서는 TGF-β1 단백질이 염색되지 않았으나, TGF-β1에 대한 항체 혹은 antisense ODNs 투여 후에 상피세포가 재생되는

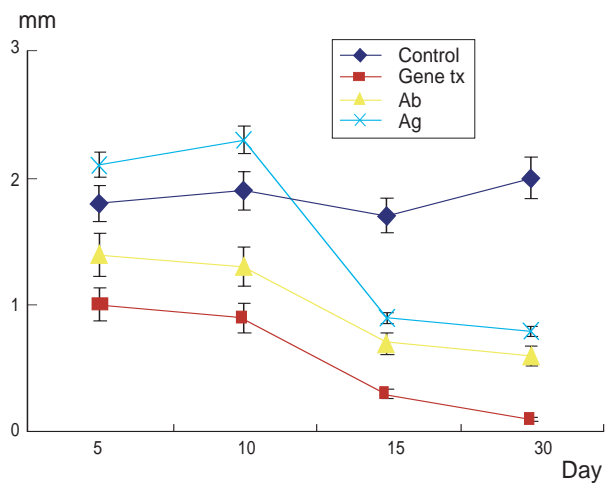


Fig.1 The size variation of the scar after injection of transforming growth factor (TGF)-β1 (Ag), anti TGF-β1 Antibody (Ab) and antisense oligodeoxynucleotides (gene). The size of the scar after gene therapy is mostly reduced (20 rats per group: *P* < 0.05 compared with control group).

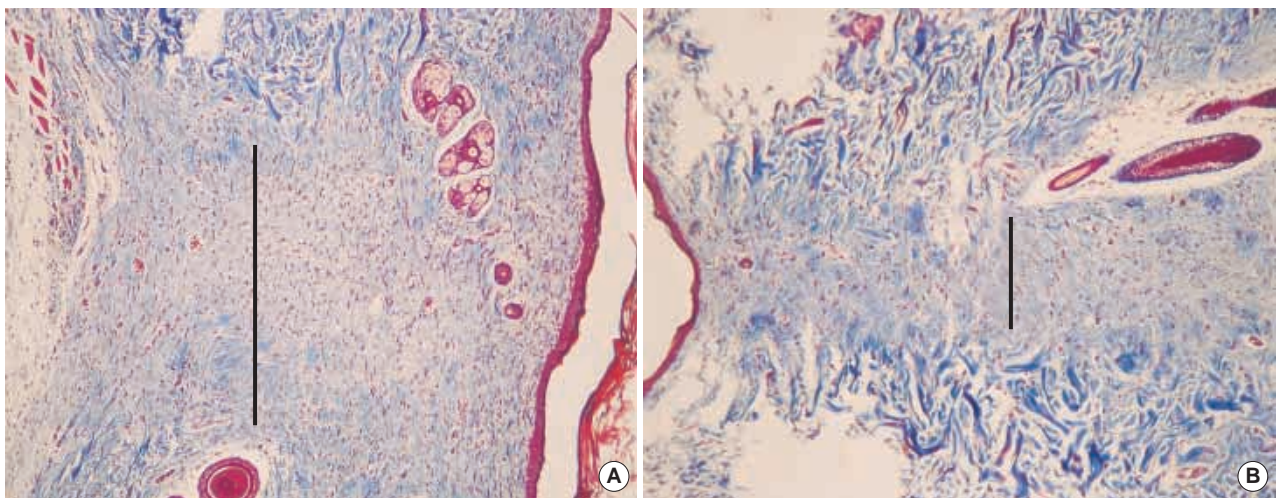


Fig. 2. The size of the scar is larger in the rat of control group (A) than that of antisense oligodeoxynucleotides (ODNs) injection group (B) 15 days after injury (trichrome stain).

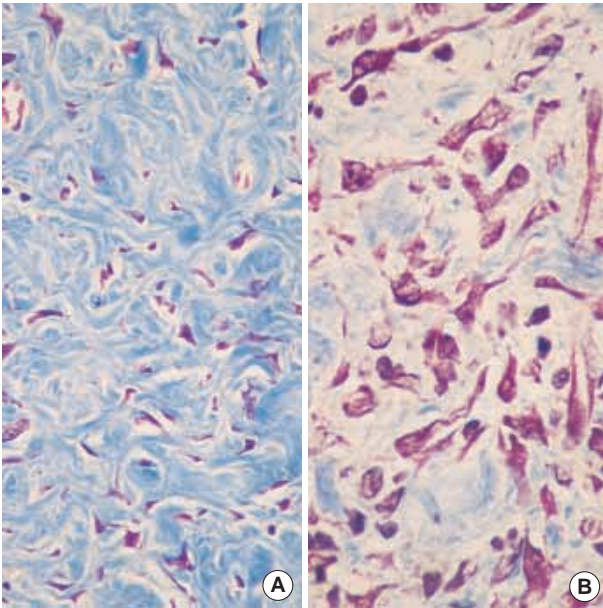


Fig. 3. The amount of collagen deposition is higher in the rat of control group after 30 days (A) than that of 5 days (B) after injury (trichrome stain).

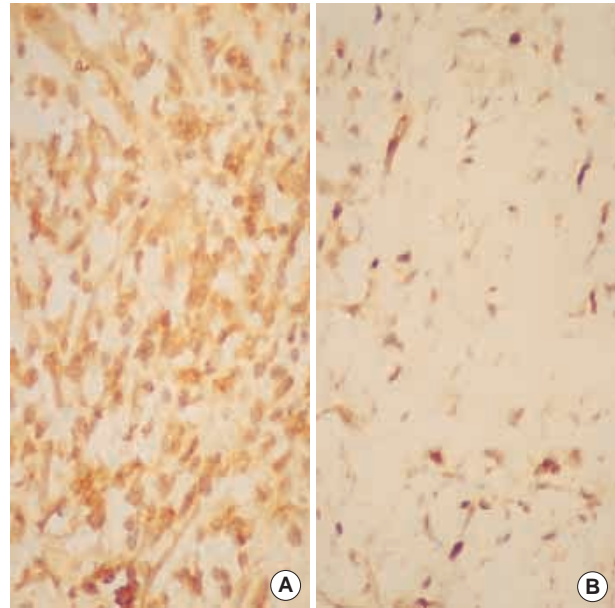


Fig. 4. Transforming growth factor (TGF)- β 1 is highly expressed in the granulation tissue (A) after 5 days and less expressed in the mature collagen (B) after 30 days of injury.

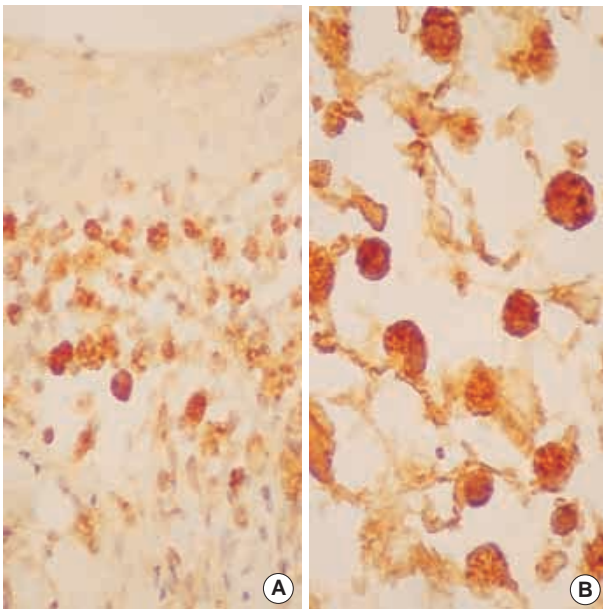


Fig. 5. Transforming growth factor (TGF)- β 1 is expressed in the macrophage in the subepithelial layer after 5 days of injury with TGF- β 1 injection (A). High power view (B) of TGF- β 1 expressed cells.

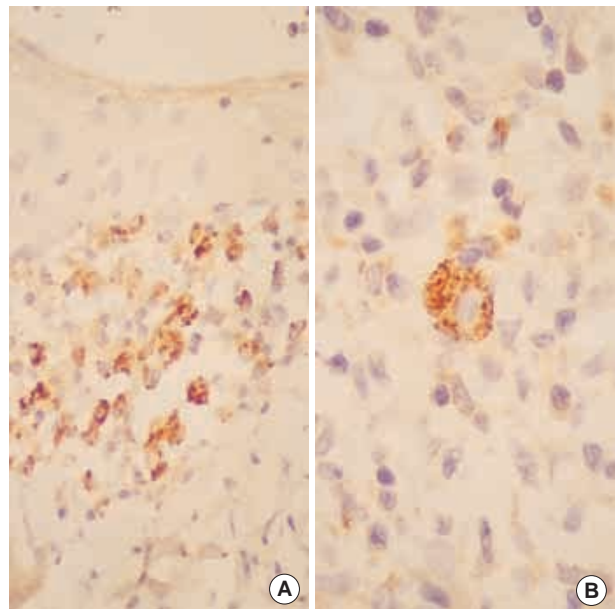


Fig. 6. Immunohistochemical stain for CD68 is positive in the macrophages after 10 days after injury with transforming growth factor (TGF)- β 1 injection (A). High power view (B) of CD68 expressed macrophages.

부위에서는 TGF- β 1 단백질 발현이 증가되었다(Fig. 7). 반흔 부위는 항체 또는 antisense ODNs 투여 후에 대조군에 비해 TGF- β 1 mRNA 발현이 전반적으로 감소되는 것으로 관찰되었다(Fig. 8). TGF- β 1 mRNA에 대한 *in situ* hybridization

및 northern blot 분석에 의해서도 mRNA의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 9, 10). 이 결과를 통하여 TGF- β 1에 대한 항체 또는 antisense ODNs를 이용한 유전자 치료가 반흔 형성을 어느 정도 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

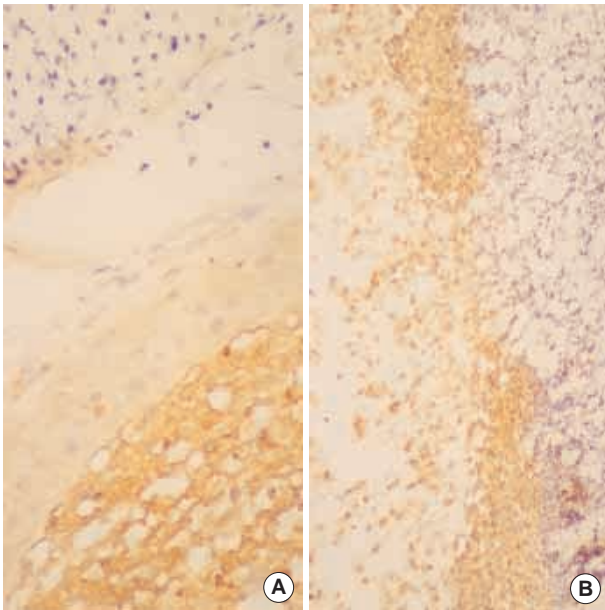


Fig. 7. The skin of the control rat (A) is negative for transforming growth factor (TGF)-β1, but the regenerated skin after injury with TGF-β1 antisense oligonucleotides (ODNs) injected rat (B) expresses TGF-β1.

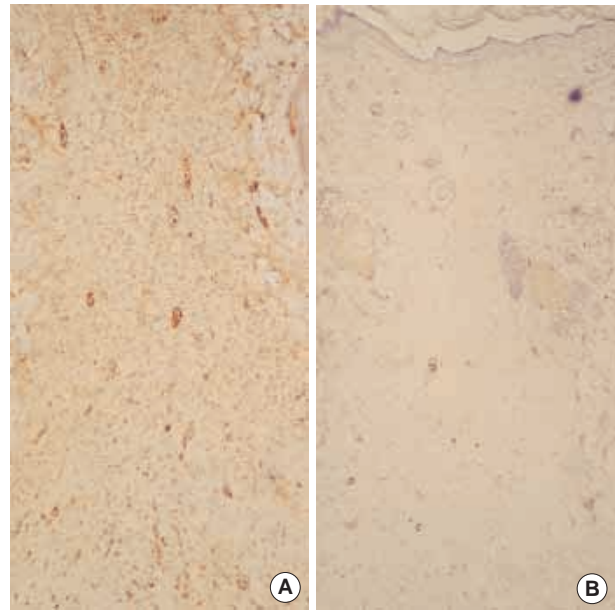


Fig. 8. Transforming growth factor (TGF)-β1 in the scar is expressed in the control rat (A), but not in the antisense oligonucleotides (ODNs) injected rat (B) 15 days after injury.

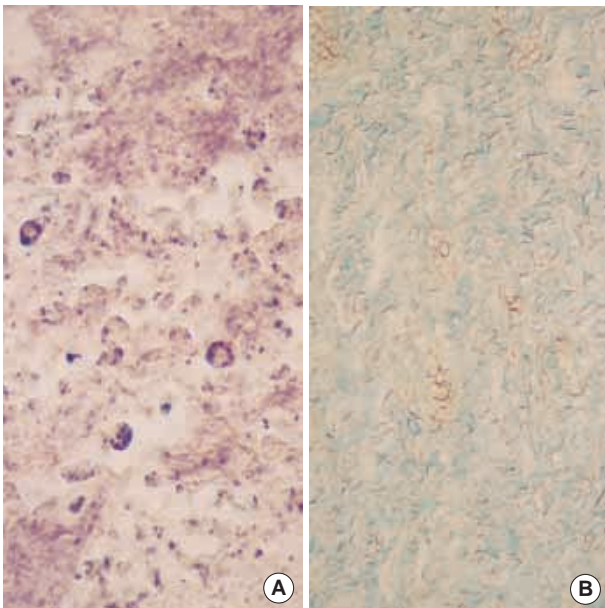


Fig. 9. In situ hybridization for transforming growth factor (TGF)-β1 mRNA shows scattered positive cells of control rat (A), but negative in the antisense oligonucleotides (ODNs) injected rat (B) 10 days after injury.

고 찰

창상치유 과정은 염증, 세포 증식, 세포 이주, 혈관 증식, 세포외기질 형성 등을 포함하는 매우 복잡한 과정이다.¹² TGF-β

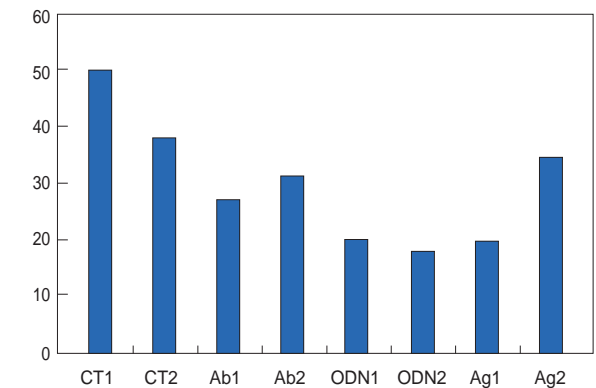


Fig.10 Northern blot analysis of transforming growth factor (TGF)-β1 expression shows a 2.5 Kb band in control (CT), anti-TGF-β1 antibody-injected (Ag), antisense oligonucleotides (ODNs) injected, and TGF-β1 injected rats. Antibody and ODNs injected rats shows lower levels of TGF-β1 expression than in the control or antigen injected rats.

는 이 모든 과정, 즉 염증세포에 대한 화학주성,¹³ 혈관증식,¹⁴ 세포외기질 침착, 육아조직 형성 등을 조절하여 창상치유의 촉진과 반흔 형성에 관여한다.¹⁵ 이것은 또한 비정상적 창상치유 과정인 비후성 반흔과 켈로이드 형성과 같은 섬유성 질환의 형성

과정에도 관여한다.¹⁶ 이러한 TGF- β 의 작용을 밝히기 위한 노력이 계속 있어 왔지만 아직도 완전히 밝혀지지 않은 실정이며, 그것은 TGF- β 의 존재를 확인할 수 있는 실험방법이 없는 것에 기인한다. 본 연구에서는 면역조직화학 염색, immunoblotting 및 *in situ* hybridization 등의 다양한 방법을 시도하여 TGF- β 1의 기능과 피부 창상치유에 관여하는 TGF- β 1의 존재를 밝히고자 하였다.

TGF- β 1을 외상과 관련지어 시행한 최초의 실험은 1986년에 Roberts 등¹⁴에 의해 행해졌으며, 이들은 생쥐에서 처음 3일 동안 TGF- β 1을 주사하였을 때 주사 부위에 혈관 증식이 초래되고 섬유모세포 및 콜라겐으로 이루어진 육아조직이 형성되었다고 보고하였다. 그 후 이와 관련된 보고에서도 유사한 결과를 보여,¹⁷ 진피에서 TGF- β 1의 발현은 대식세포 등과 같은 염증세포의 침윤과 육아조직 형성에 매우 중요한 요소로 생각된다. 특히 외상 후 초래되는 반흔 형성에 매우 중요할 뿐만 아니라, 본 연구에서 관찰된 것처럼 외상 경계 부위에서 재생되는 상피세포에서도 TGF- β 1의 발현이 관찰됨으로써 상피 재생에도 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

잠복된 TGF- β 1이 활성화되는 시기는 보고자에 따라 다르나 대체로 창상 직후라고 알려져 있으며,¹¹ 창상 초기의 혈소판에서 분비된 TGF- β 1이 활성화되는 것으로 추측하고 있다. 그 후 약 5일째 대식세포, 섬유모세포, 각질세포 및 혈관내피세포들이 창상 부위로 이주하며, 이들 대부분의 세포에서 TGF- β 1이 생성되고, 또 활성화되어 최고 농도치를 이루는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서 TGF- β 1은 창상 후 5일째에 이미 증가되어 있었으며 초기에 최대치에 이르는 시점을 알기 위해서는 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다. 외상 후 TGF- β 1 활성화도의 감소는 세포에 의한 TGF- β 1의 흡수에 의하거나, 창상 부위 바깥으로 확산되거나, 단백질분해효소에 의한 TGF- β 1의 파괴에 의한 것으로 알려져 있다.¹¹

본 실험을 위한 가설로 TGF- β 1을 직접 투여한 양성 대조군은 실험군인 항체 투여군 혹은 유전자 치료군에 비해 세포외기질의 양이 증가될 것으로 추측된다. 그리고 TGF- β 1에 대한 항체를 투여한 군과 유전자 치료군에서는 반흔의 크기가 크게 감소할 것이고, 콜라겐 등의 구조적 배열이 다른 대조군들과 비교 시 매우 질서정연할 것으로 예상된다. TGF- β 1은 혈관을 증식시키고 단핵구, 대식세포 등에 화학주성으로 작용하여 그 분비를 증가시키기 때문이다. 따라서 TGF- β 1에 대한 항체를 초기에 투여하여 창상부위에 혈관이나 대식세포의 수를 줄여 세포외기질의 침착을 억제할 수 있는 것으로 본다.

항체투여법과 함께 본 연구에서 시도한 유전자치료는 인체에서 1990년 adenosine deaminase 결핍 환자에서 처음으로 시행되었다.¹⁸ 치료하고자 하는 유전자를 표적세포로 운반하는 방법은 매우 다양하나, 대표적으로 많이 연구된 방법은 retrovirus, adenovirus 등의 바이러스 운반체와^{21,22} 양이온 지질분자, 고분자 등의 비바이러스 운반체이다.²³ 세포 전이율에 있어서는 바이

러스계가 단연 효율적이지만 면역성과 안전성의 문제로 인해 고농도 적용이나 반복투여가 어렵다. 이를 보완하기 위하여 비바이러스계가 관심을 받아 왔으나, 세포내 도입효율, 세포핵으로의 이행률, 유전자 표현을 등에서 개선책이 필요한 실정이다. TGF- β 1에 대한 유전자치료는 주로 바이러스를 매개체로 사용한 정도이나, 본 연구에서는 바이러스 및 비바이러스 방법을 혼합한 TGF- β 1에 대한 일본 적혈구 응집 바이러스-리포솜 매개 antisense ODNs 유전자 치료법을 사용하였다.²⁴ 그 결과 antisense ODNs 투여군에서 현저하게 반흔의 크기가 줄었을 뿐만 아니라 TGF- β 1 단백질 및 mRNA의 발현도 감소되어, 아마도 항체투여보다 유전자치료가 더욱 효과가 있지 않을까 추측된다.

유전자치료 방법 중 하나인 antisense ODNs 투여 후 TGF- β 1 mRNA 발현 변화 양상을 관찰한 보고는 드물다.²⁵ 그러나 최근 유전자치료가 발달함에 따라 이 방법도 매우 활발히 연구될 전망이다. 특히 피부는 다른 인체 내부의 장기와는 달리 외부에 노출되어 있으므로 유전자를 목표로 하는 세포로 용이하게 운반할 수 있는 이점이 있다. 이론적으로 antisense ODNs 투여는 창상에 의해 초래될 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제시킬 것으로 보인다.²⁶ 문헌 보고에 의하면 antisense ODNs의 투여는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 선택적으로 TGF- β 1 유전자와 단백을 억제한다고 알려져 있고,^{27,28} 세포외기질의 정상적인 침착 방향과 반흔 형성의 감소를 보여 준다. TGF- β 1에 대하여 일본 적혈구 응집 바이러스-리포솜 매개 antisense ODNs를 실험동물의 신장에 투여한 후, northern blot 방법으로 검사해 보면 TGF- β 1 mRNA 농도가 antisense ODNs를 투여한 신장에서 sense, scrambled, 혹은 reverse ODN 투여군에 비해 현저히 감소되어 있고, 세포외기질의 형성도 감소되어 있다.²⁹ 이러한 결과는 TGF- β 1에 대한 antisense ODNs가 TGF- β 1 mRNA의 발현을 억제하여 과다한 섬유화 혹은 반흔 형성을 막아준다는 것을 의미한다. 이 과정에서 다른 종류의 성장인자가 동시에 협동적으로 관여할 것으로 추측되고 있다. 이러한 다양한 성장인자가, TGF- β 1과 함께 결합조직의 재생, 콜라겐 합성 및 상피재생에 매우 중요할 것으로 생각된다.

TGF- β 1과 섬유화 과정과의 관계는 이미 기술한 바와 같이 밀접한 관계가 있으며, 또한 TGF- β 1을 억제하면 섬유화를 감소시킬 수도 있으나, 치유 후 강도 차이에 관해서는 잘 밝혀져 있지 않다. 그러나 태아의 피부 외상에서 보듯이 반흔이 적게 남더라도 회복 후 강도에는 차이가 없는 경우를 흔히 관찰할 수 있다.¹² 따라서 본 연구에서도 항체 혹은 유전자 치료 실험군에서 반흔조직의 양이 감소되더라도 그 강도의 차이는 없을 것이며, 그 이유는 전자현미경 검사를 통한 콜라겐 혹은 세포외기질성분의 구조적 배열에 있을 것으로 추측해 볼 수 있다.³⁰ TGF- β 가 섬유화 과정에 있어서 매우 중요한 역할을 하지만 TGF- β 의 다양한 기능과 다른 사이토카인과의 상호작용에 의한 기능은 너무 복잡하고, 다양한 결과를 초래할 수 있으므로 이를 치료목적으로 사용하는 것에는 제한이 있을 수 있다. 따라서 TGF- β 를

사용한 어떤 시도는 기대한 만큼의 결과가 나타나지 않을 수도 있고, 예기치 못한 심각한 부작용이 초래될 수도 있다. 본 연구를 통해 반흔 형성에 대한 TGF- β 1의 역할 및 기전과 외상 후의 반흔 형성을 감소시킬 수 있는 방법으로서 TGF- β 1에 대한 항체, antisense ODNs 투여 등이 반흔 형성의 감소에 효과가 있을 것으로 생각되었다. 또한 이러한 결과가 이 분야의 치료 방향을 제시하고, 반흔 형성을 감소시키는 약제를 개발하는 데 기본 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- Shinozaki M, Kawara S, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takehara K. Induction of subcutaneous tissue fibrosis in newborn mice by transforming growth factor- β : simultaneous application with basic fibroblast growth factor causes persistent fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 292-6.
- Bullard KM, Cass DL, Banda MJ, Scott Adzick N. Transforming growth factor β -1 decreases interstitial collagenase in healing human fetal skin. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1023-7.
- Tredget EE, Shankowsky HA, Pannu R, et al. Transforming growth factor- β in thermally injured patients with hypertrophic scars: effects of interferon α -2b. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 1317-28.
- Peltonen J, Kahari L, Jaakkola S, et al. Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by *in situ* hybridization. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 365-71.
- Gabrielli A, Di Loreto C, Taborro R, et al. Immunohistochemical localization of intracellular and extracellular associated TGF β in the skin of patients with systemic sclerosis (scleroderma) and primary Raynaud's phenomenon. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 340-9.
- Cox DA, Maurer T. Transforming growth factor- β . *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 25-30.
- Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, et al. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 184: 6020-4.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, et al. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986; 163: 1037-50.
- Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; 79: 1285-8.
- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 1987; 247: 597-604.
- Yang L, Qiu CX, Ludlow A, Ferguson MWJ, Brunner G: Active transforming growth factor- β in wound repair: determination using a new assay. *Am J Pathol* 1999; 154: 105-11.
- Clark RAF, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM. TGF- β 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol* 1997; 170: 69-80.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield NM, et al. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5788-92.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-71.
- Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . *Science* 1987; 237: 1333-6.
- Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6642-6.
- Wu L, Siddiqui A, Morris DE, Cox DA, Roth SI, Mustoe TA. Transforming growth factor β 3 (TGF β 3) accelerates wound healing without alteration of scar prominence: histologic and competitive reverse-transcription-polymerase chain reaction studies. *Arch Surg* 1987; 132: 753-60.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-80.
- Marcel T, Gausz J: The TMC worldwide gene therapy enrollment report, end 1996. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 775-800.
- Moullier P, Friedlander G, Calise D, Ronco P, Perricaudet M, Ferry N. Adenoviral-mediated gene transfer to renal tubular cells *in vivo*. *Kidney Int* 1994; 45: 1220-5.
- Imai E, Akagi Y, Isaka Y. Towards gene therapy for renal diseases. *Nephrologie* 1998; 19: 397-402.
- Imai E, Isaka Y, Akagi Y, Kaneda Y. Gene transfer into the glomerulus by the hemagglutinating virus of Japan-liposome method. *Exp Nephrol* 1997; 5: 112-7.
- Rappaport J, Hanss B, Kopp J, Copeland T, et al. Transport of phosphorothioate oligonucleotides in kidney: implications for molecular therapy. *Kidney Int* 1995; 47: 1462-9.

24. Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, Mori M, Awai K, Kaneda Y. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Hum Gene Ther* 1987; 8: 2133-41.
25. Kim HM, Choi DH, Lee YM. Inhibition of wound induced expression of transforming growth factor- β 1 mRNA by its antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 1987; 37: 289-93.
26. Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A. Liposomal delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides, in Erickson R, Izant JG (eds): *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA*. New York: Raven Press Ltd, 1992; 147-61.
27. Hall TJ, Brostoff J. Specific inhibition of IgE antibody production by an antisense oligodeoxynucleotide oligomer (oligostick). *Immunology* 1992; 77: 462-4.
28. Simons M, Edelman ER, Dekeyser JL, Langer R, Rosenberg RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 1992; 359: 67-70.
29. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, *et al.* Inhibition of TGF- β 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996; 50: 148-55.
30. Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ. control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . *Lancet* 1992; 339: 213-4.