

세균 독소를 작용시킨 섬유아 세포에서 Transforming Growth Factor- β 의 생성

이성근 · 김광혁*

고신대학교 의학부 치과학교실, 미생물학교실*

Abstract

PRODUCTION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β IN HUMAN FIBROBLASTS INDUCED WITH BACTERIAL TOXINS

Seong-Geun Lee, Kwang-Hyuk Kim*

Department of Dentistry, *Department of Microbiology, Kosin Medical College

TGF- β 1 is a potent chemotactic factor for inflammatory cells and fibroblasts. It also stimulates the cellular source and components of extracellular matrix and the production of proteinase inhibitors. Collectively, these biologic activities lead to the accumulation and stabilization of the nascent matrix, which is vital to wound healing.

The objective of this study is to investigate production of TGF- β 1 *in vitro* fibroblast culture in the presence of *Staphylococcus* enterotoxin B(SEB) and/or lipopolysaccharide(LPS) and to elucidate the role of TGF- β 1 which may be responsible for wound healing

The fibroblasts were originated from facial dermis and hypertrophic scar in 26 year-old male patient. In the presence of LPS(0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g), SEB(0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g) respectively, cells(5×10^3 /ml) were cultivated *in vitro*. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Also, cells(2.5×10^3 /ml) were cultivated in EMEM with LPS(0.01, 0.1 and 1.0 μ g), SEB(0.01, 0.1 and 1.0 μ g) respectively and LPS(0.1 μ g) and SEB(0.1 μ g) in combination for 24, 48, and 72 hours respectively. Culture supernatants were harvested at 1, 2, and 3 days after incubation period and triplicate culture supernatants were pooled and TGF- β 1 was assayed in duplicate.

The results were as follows.

1. In facial dermal fibroblast induced with SEB and LPS respectively or in combination, the suppression of cell proliferation occurred very significantly at 1 day after incubation, compared with the control. In SEB exposure, the production of TGF- β 1 was decreased very significantly at 1 day after incubation, compared with the control. However, in LPS, SEB and LPS exposure, the production of TGF- β 1 was increased very significantly at 1 day after incubation, compared with the control.
2. In hypertrophic scar fibroblast induced with SEB and LPS respectively or in combination, the suppression of cell proliferation did not occur at 1 day after incubation, compared with the control. In SEB and LPS exposure in combination, the production of TGF- β 1 was increased very significantly at 1 day after incubation, compared with the control. However, the production of TGF- β 1 did not occur in SEB and LPS exposure respectively.

In conclusion, the concentration of bacterial toxins and the incubation period correlated with cell proliferation and production of TGF- β 1 very significantly and both fibroblasts have different phenotype each other in this regard. This data suggest that the significant production of TGF- β 1 may develop abnormal wound healing associated with tissue fibroproliferative disorder, such as hypertrophic scar and keloid formation.

Key words : Wound healing, Transforming growth factor- β 1, Lipopolysaccharide

I. 서 론

손상에 따른 창상 치유는 지혈, 섬유소 응괴, 염증 세포의 단계

이성근

602-032, 부산시 서구 암남동 34

고신대학교 의학부 치과학교실 구강악안면외과

Seong-Geun Lee

OMS, Dept. of Dentistry, Kosin Medical College

34, Amnam-Dong, Seo-Gu, Pusan 602-032, KOREA

Tel:(051)240-6258 E-mail: omslee@ns.kosinmed.or.kr

별 출현으로 시작되며 섬유아 세포의 주입과 세포의 기질 합성 및 재형성 단계 등 일련의 치유 다단계를 거친다¹⁾. 이 단계에 필요한 화학적인 신호 인자를 사이토카인이라 부르며, 이는 염증과 면역 반응, 창상 치유, 세포의 분화와 증식 및 형태 유도, 손상된 신경의 치유, 신생 혈관 형성과 암발생 등 다양한 기능에 관여한다^{2,3)}. 그 중에서도 Transforming growth factor- β (TGF- β)는 390개의 아미노산(TGF- β 1)이나 412개의 아미노산(TGF- β 2와 β 3)의 전구체로 만들어지며⁴⁾, 각각의 전구체는 잠복기와 관계하는 폴리펩티드로 긴 전구 분절인 N 말단과 성숙한 TGF- β 단량체를 구성하는 112개의 아미노산으로 구성된 펩티드인 C 말단으로 구성되어

있다. 최근에 TGF- β 에 대한 두개의 횡단막 수용체의 보고와 함께, 이 수용체의 광범위한 분포와 TGF- β 의 생물학적인 효과를 고려할 때 작용 부위에 이를 때까지 비활성화 상태로 남아 있는 것이 유리하다는 것이 밝혀졌다³⁾. 이러한 비활성화된 TGF- β 는 plasmin과 cathepsin같은 단백질 분해 효소에 의해 전구 분절이 분해되어 활성화되며^{8,10)}, 염증 세포의 효과적인 화학 주성제로서 다양한 염증전 및 창상 치유 사이토카인을 유도하며 염증 반응의 기시와 증폭 및 조절에 중요한 역할을 한다¹¹⁻¹⁷⁾. 또, TGF- β 는 손상 부위에서 세포의 기질 성분의 주요한 세포 기원인 섬유아 세포의 주입을 위한 효과적인 화학 주성제로서 역할을 하는 데¹⁸⁾ 미성숙한 섬유아 세포의 증식을 촉진하며¹⁹⁾, 세포의 기질의 수많은 단백질의 합성과 분비를 유도하고^{3,20)}, 단백질 분해 효소 억제제의 생성을 촉진하며, 기질 단백질 분해 효소의 생성을 억제하여^{21,22)}, 세포의 기질의 축적과 안정화를 통해 창상의 치유를 조절한다. 만약 창상 부위에서 지속적인 TGF- β 의 작용에 의한 콜라겐의 과잉 침착으로 인해 비후성 반흔이나 킬로이드 등과 같은 섬유 증식성 장애를 초래할 수 있는 데²³⁾, 이는 안면 비후성 반흔 섬유아 세포가 정상적인 섬유아 세포에 비해 TGF- β 의 증가된 분비를 할 수 있는 상태를 반영한다는 보고²⁴⁾와 킬로이드 섬유아 세포에서 전피 섬유아 세포에서보다 절대적인 콜라겐의 합성이 증가되었다는 보고²⁵⁾ 등이 뒷받침한다. 그러므로, TGF- β 는 손상받은 부위와 창상 치유의 단계에 따라 염증 및 면역 반응을 조절하고 세포의 기질의 축적 및 안정화를 통해 창상 치유를 조절하는 주 인자로 인정받고 있다²⁶⁾.

본 연구는 외상성 손상시 관여하는 그램 양성 세균의 *Staphylococcus enterotoxin B*(SEB)와 그램 음성 세균의 lipopolysaccharide(LPS)를 생체의 배양한 안면 전피 및 비후성 반흔의 섬유아 세포에 각기 다른 농도로 단독 혹은 함께 작용시킨 후 섬유아 세포의 증식을 확인하였고 TGF- β 의 생성량을 측정하여 창상 치유에 도움을 줄 수 있는 기초 자료를 마련코자 계획하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 섬유아 세포의 배양

안면 부위의 외상을 수상하여 1차 봉합술을 받은 후 약 1년이 경과한 26세 남성 환자의 안면부의 전피 및 비후성 반흔의 조직 절편 5mm³를 무균적으로 채취하였다. 이 시료를 각각 1mm³ 크기로 절편한 후 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 10% 추가하여 만든 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, Grand Island, USA) 2ml을 적하한 60mm 조직 배양용 접시(Costar, Cambridge, USA)에 정치하고 멸균된 cover slip으로 고정된 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에 넣어 3~4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배양용 접시 전체에 단층으로 형성된 섬유아 세포로부터 배지를 흡입하여 버리고 phosphate buffered saline(PBS)로 1회 세척하고 0.25% trypsin 0.3ml을 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM으로 재부유시켜 세균의

독소 존재하의 세포 증식 유도 및 TGF- β 생성 세포로 사용하였다. 이때 사용된 세균의 독소는 *Staphylococcus enterotoxin B*(SEB, Sigma, USA)와 lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA)였으며, 세균의 독소를 작용시키지 않은 경우를 대조군으로, 세균의 독소를 작용시킨 경우를 실험군으로 하였다.

2. 세포 증식

부유시킨 각각의 섬유아 세포 0.1ml(5×10⁴개/ml)씩을 96 wells 배양용 plate(Corning, NY, USA)에 분주한 후 ml 당 SEB 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g과 LPS 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g을 각각 작용시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1, 3, 5일 동안 충분한 습도를 유지시키면서 배양하였다. 1, 3, 5일 배양후에 plate의 각 well에 MTT액 10 μ l (PBS 1ml 당 5mg의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)씩을 적하하고 4.5시간 추가 배양하였다. 시간이 경과된 후 10% SDS-0.02M HCl액 25 μ l씩을 well에 적하하여 암실조건에서 하룻밤동안 실온에 방치하였다. Optical density(OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

3. TGF- β 의 생성

부유시킨 섬유아 세포 1ml(2.5×10⁵/ml)씩을 24wells 배양용 plate(Corning, NY, USA)에 분주한 후 ml 당 SEB 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g과 LPS 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g을 각각 작용시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1, 2, 3일 동안 배양하여 상층액을 수거하였다. 용량별 시험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양 상층액은 300g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하여 TGF- β 의 측정을 위해 사용되었다.

4. TGF- β 의 측정

TGF- β 의 측정은 PREDICTA[®] Human TGF- β 1 ELISA kit (Genzyme, Cambridge, USA)을 이용하였다.

1) 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화

비활성화 상태의 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화를 위하여 1N HCl을 작용하여 4°C에서 60분간 작용시킨 다음 1N NaOH로 중화시켰다.

2) TGF- β 1의 정량분석

미리 TGF- β 1에 대한 모노클론 항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 100 μ l씩을 적하하여 37°C에 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 HRP-conjugated 항체액 100 μ l씩을 적하하여 다시 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 기질액 100 μ l씩을 적하하여 다시 실온에서 27분 동안 방치한 다음 stop액 100 μ l씩을 가하였다. Optical density(OD)는 microplate reader (Model 550

microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450nm에서 측정하였다

5. 통계학적 분석

실험 성적은 평균±표준편차로 나타냈으며, 실험군과 대조군 간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하여 P값이 0.05 이하일 때 의미가 있는 것으로, p값이 0.01 이하일 때 유의성이 큰 것으로 간주하였고, 섬유아 세포의 배양된 시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상관 관계에 대한 통계학적 검정을 위해서는 SAS system을 이용한 이변량 분산분석(two-way ANOVA)을 시행하였다.

III. 연구 결과

1 세포 증식

안면 진피와 비후성 반흔 섬유아 세포(5×10^4 /ml) 0.1ml 씩을

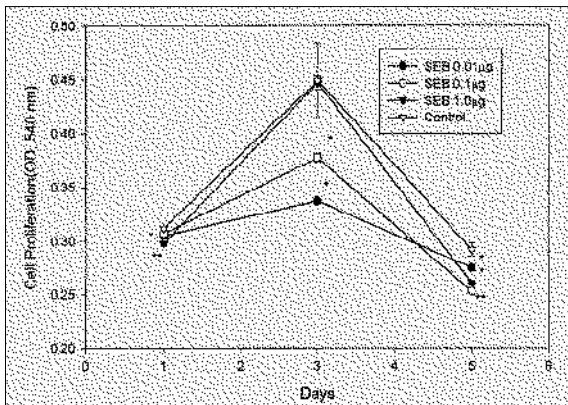


Fig. 1. Proliferation of facial dermal fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and $1.0 \mu\text{g}$ of SEB. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

*P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

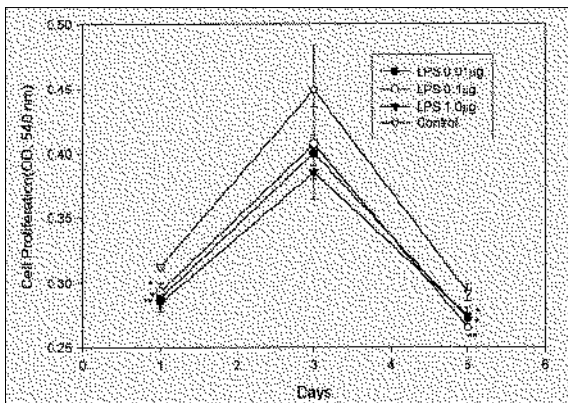


Fig. 3. Proliferation of facial dermal fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and $1.0 \mu\text{g}$ of LPS. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

*P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

96 wells 배양용 plate(Corning, NY, USA)에 분주한 후 ml 당 SEB $0.01 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{g}$, $1.0 \mu\text{g}$, LPS $0.01 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{g}$, $1.0 \mu\text{g}$ 를 각각 작용시킨 후 1, 3, 5일 배양 후에 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 540nm에서 Optical density를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1) SEB를 작용한 경우

안면 진피 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양후 1일째 $0.01 \mu\text{g}$ 과 $1.0 \mu\text{g}$ 에서 각각 P<0.05, p<0.01로 세포의 증식 억제 를 보였으며, 3일째에도 $0.01 \mu\text{g}$, $0.1 \mu\text{g}$ 에서 P<0.05로 세포의 증식 억제를 보였으며, 5일째에도 $1.0 \mu\text{g}$ 에서 P<0.01로, $0.01 \mu\text{g}$, $1.0 \mu\text{g}$ 에서 P<0.05로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 들의 상호 관계에 있어서도 P<0.01로 유의하였다(Fig. 1). 비후성 반흔 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양후 5일째 $0.01 \mu\text{g}$ 에서 P<0.05로, $0.1 \mu\text{g}$, $1.0 \mu\text{g}$ 에서 P<0.01로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 들의 상호 관계에 있어서도 P<0.01로 유의하였다(Fig. 2).

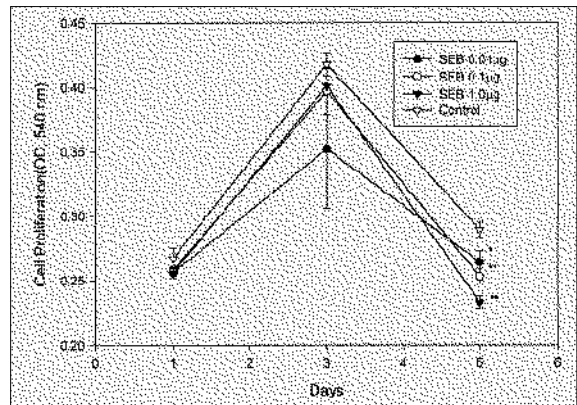


Fig. 2. Proliferation of hypertrophic scar fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and $1.0 \mu\text{g}$ of SEB. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

*P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

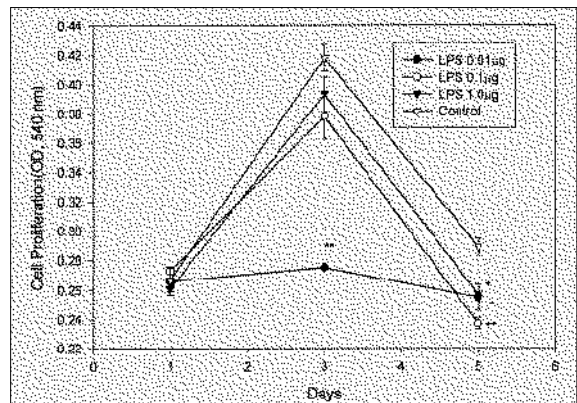


Fig. 4. Proliferation of hypertrophic scar fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and $1.0 \mu\text{g}$ of LPS. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

*P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

2) LPS를 작용한 경우

안면 진피 섬유아세포에서 대조군에 비해 배양후 3일째까지 0.01 μ g, 0.1 μ g에서 P<0.05로, 1.0 μ g에서 P<0.01로 세포의 증식이 억제되었으며, 5일째에 모든 농도에서 대조군에 비해 P<0.01로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도에 있어 P<0.01로 나타났지만, 이 둘의 상호 관계에 있어서는 P>0.05를 보였다(Fig. 3). 비후성 반흔 섬유아 세포에서 대조군에 비해 3일째 0.01 μ g에서 P<0.01로, 5일째에 0.1 μ g에서 P<0.01로 0.01 μ g, 1.0 μ g에서 P<0.05로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어서도 P<0.01로 유의하였다(Fig. 4).

2. TGF- β_1 정량 분석

안면 진피 및 비후성 반흔 섬유아 세포(2.5×10^5 /ml)에 ml 당

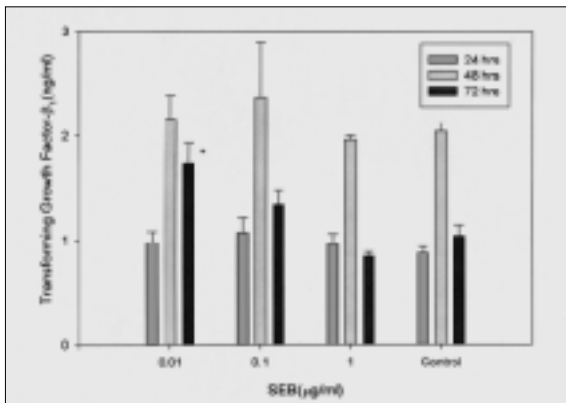


Fig. 5. Proliferation of TGF- β_1 by facial dermal fibroblasts(2.5×10^5) with 0.01, 0.1, and 1.0 μ g of SEB for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 compared with control.

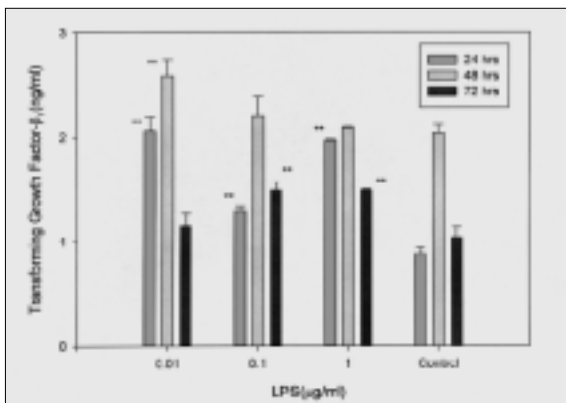


Fig. 7. Proliferation of TGF- β_1 by facial dermal fibroblasts(2.5×10^5) with 0.01, 0.1, 1.0 μ g of LPS for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

SEB 0.1 μ g, LPS 0.1 μ g을 각각 작용시킨 후, EMEM에서 1, 2, 3일 동안 배양하여 수거된 상층액에서 미리 TGF- β_1 에 대한 모노클론 항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 100 μ l 씩을 적하하여 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450nm에서 Optical density를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1) SEB를 작용한 경우

안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 은 대조군에 비해 배양 후 3일째 0.01 μ g에서 P<0.05로 증가되었다. 배양시간에서 P<0.01로, 작용시킨 독소의 농도에서 P<0.05로, 이 둘의 상호 관계에 있어서는 유의성을 보이지 않았다(Fig 5) 비후성 반흔 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 은 대조군에 비해 배양 후 2일째 0.01 μ g 에서 P<0.01로 증가되었다 배양시간 및 배양시간과 작용 시킨 독소의 농도에서는 P<0.01로 유의하였지만, 작용시킨 독소

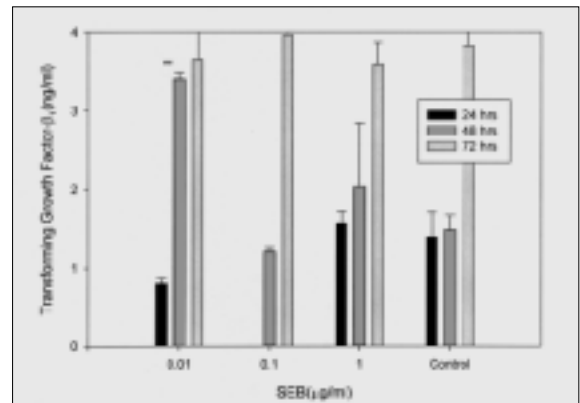


Fig. 6. Proliferation of TGF- β_1 by hypertrophic scar fibroblasts(2.5×10^5) with 0.01, 0.1, 1.0 μ g of SEB for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 compared with control.

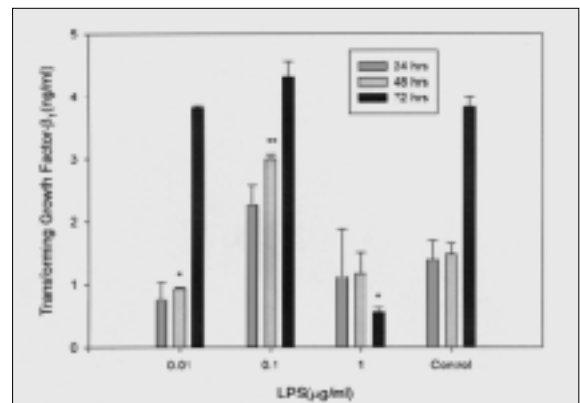


Fig. 8. Proliferation of TGF- β_1 by hypertrophic scar fibroblasts(2.5×10^5) with 0.01, 0.1, 1.0 μ g of LPS for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

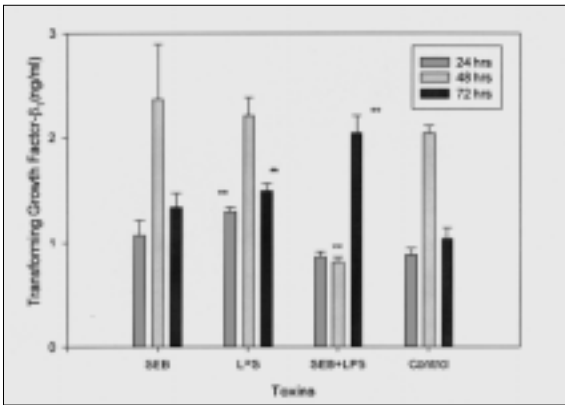


Fig. 9. Proliferation of TGF- β_1 by facial dermal fibroblasts with SEB(0.1 μ g), LPS(0.1 μ g), and SEB+LPS. Cells(2.5×10^5) were cultivated for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 compared with control.

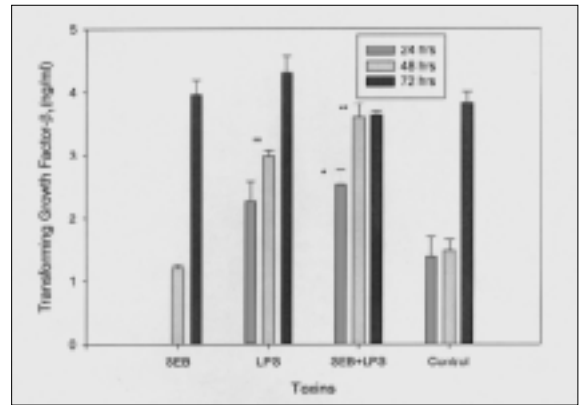


Fig. 10. Proliferation of TGF- β_1 by hypertrophic scar fibroblasts with SEB(0.1 μ g), LPS(0.1 μ g), and SEB+LPS. Cells(2.5×10^5) were cultivated for 24, 48, and 72 hrs respectively in MEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF- β_1 was assayed. Data represent means \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

의 농도에서 P>0.05를 보였다(Fig. 6).

2) LPS를 작용한 경우

안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 는 대조군에 비해 배양 후 1일째 모든 농도에서 P<0.01로, 2일째 0.01 μ g에서 P<0.05로, 3일째 0.1 μ g, 1.0 μ g 농도에서 P<0.01로 증가되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Fig. 7). 비후성 반흔 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 는 대조군에 비해 배양 후 2일째 0.01 μ g에서 P<0.05로 감소되었고, 0.1 μ g 농도에서 P<0.01로 증가되었다. 3일째 1.0 μ g 농도에서 P<0.01로 감소되었다 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Fig. 8).

3) SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)를 함께 작용한 경우

안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 는 대조군에 비해 배양 후 2일째에 P<0.01로 감소되었고, 3일째에는 오히려 P<0.01로 증가되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Fig. 9). 비후성 반흔 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β_1 는 대조군에 비해 배양 후 1, 2일째에서 각각 P<0.05, P<0.01로 증가되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Fig. 10).

IV. 총괄 및 고찰

손상 부위로 출혈과 혈장이 유리되면, 이것이 내인성 및 외인성 응고 경로를 활성화하며 섬유소 침착과 일시적인 기질의 확립을 초래한다. 응고 과정 동안 혈소판 활성화와 탈과립이 일어나며 지혈 및 체액과 전해질의 조절에 필요한 응고 인자를 방출하고 치유 반응을 기시하는 사이토카인을 단계별로 방출하여^{26, 28)}, 일시적인 기질에 사이토카인을 침착시킨다 이러한 사이토카인들에는 TGF- α , TGF- β , platelet derived growth factor(PDGF), 및

혈소판의 기본적인 단백질의 단백질 분해 분할 산물인 neutrophil activating peptide-2(NAP-2)가 포함된다. 이러한 사이토카인들은 조직의 수복에 중요한 백혈구, 내피세포, 섬유아 세포, 및 각질세포를 유도하는 중요한 growth factor 혹은 chemotaxin이다²⁹⁾. 그러므로, 응고와 혈소판 활성화가 일련의 세포들의 보충을 위한 초기의 토대가 된다. 섬유소 응고는 적혈구를 응집시켜 지혈을 조절하며 fibronectin으로 덮히면³⁰⁾, 손상시에 유리된 다양한 사이토카인을 결합한다. 섬유소 망은 초기 기질에 약간의 안정성을 준다³¹⁾. 호중구는 30~60분내에 창상 부위에 처음 도달하여 24시간까지 우세한 세포로서 이물질과 사이토카인을 분비하는 세균을 식작용하여 제거한다. 염증 부위에서의 이 세포의 보충 및 활성화는 호중구와 활성화된 혈관 내피세포사이에 초기 낮은 친화성의 결합을 보이며 이에 의해 세포 표면에 β_2 integrin의 발현과 함께 호중구를 충분히 활성화해 해 준다. TNF, interleukin-1(IL-1), 혹은 LPS에 의해 내피 세포가 더 활성화되면 유착 분자들의 증가된 발현을 초래해 호중구를 내피세포에 견고하게 부착시킨다. 이러한 견고하게 부착된 호중구는 protease, oxidant, 및 phospholipid를 유리하여 내피세포의 손상과 미세혈관의 투과성이 증가해 화학 주성 인자인 IL-8에 의해 혈관외로 빠져나오게 된다. 이 세포는 창상 치유의 진행을 조화롭게 하는 사이토카인을 생성한다. 이러한 사이토카인들에는 Interferon- α (IFN- α), TNF, IL-1, IL-1 receptor antagonist(IL-1ra), IL-6, IL-8, macrophage inflammatory protein-1- α 및 TGF- β 를 포함한다. 호중구가 초기 숙주의 방어를 위해 중요한 반면에, 4~5 시간내에 출현하는 단핵구는 창상 수복의 진행에 중요한 역할을 하며 일시적인 기질을 더 성숙한 육아 조직으로 변형시키는 데 중요한 염증성 매개체를 유리한다^{32, 35)}. 이러한 염증 세포에서 많은 폴리펩티드 인자가 유리된다^{36, 43)}. 창상 부위로의 염증 반응은 부분적으로는 염증성 사이토카인 TNF, IL-1, IL-6의 유리에 의해서 매개된다^{23, 44)}. 이 시기에 유리된 TGF- β 가 염증 부위에서 효과적으로 단핵구를 끌어 들여 활성화시켜 여러 가지 성장 인자와 염증 매개체들인 TNF- α , IL-1, PDGF, fibroblast growth factor(FGF) 및 TGF- β 의 발현과 유리를 유도시킨

다. 이러한 매개체는 상처 부위에서 염증 반응의 기시와 증폭 및 회복 과정을 기시하는 데 중요한 역할을 한다.¹²⁻¹⁷ 대식세포는 의상후 48시간까지 주요한 세포로서³⁷, 창상 부위의 이물질과 세균 뿐만 아니라 비기능적인 섬유세포를 제거한다. 창상이 생기면, 결합 조직의 기질에 정상적으로 존재하는 말초 단핵구가 창상의 대식세포가 되며 창상 부위에 섬유아 세포의 주입을 조절하는 사이토카인인 PDGF와 TGF- β 를 분비한다²⁶⁻²⁷. 일단 단핵구가 대식 세포로 분화되면, TGF- β 는 효과적으로 대식 세포를 비활성화시켜 활성화된 대식 세포에 의해 유리되는 과산화물과 일산화 질소의 생산을 억제시킨다 이러한 억제는 IFN- γ 와 TNF- α 같은 활성화제에 의해 반전되는 것을 볼 수 있다¹⁰. TGF- β 는 혈관 내막에 호중구와 T 임파구의 유착을 억제시키고 염증 반응을 억제하며, T 및 B 임파구, 흉선 세포, 자연사(natural killer, NK) 세포, 및 lymphokine activated killer(LAK) 세포의 증식을 억제한다^{16,17}. 또 IFN- γ , TNF- α 와 TNF- β 와 IL-1, IL-2, IL-3의 생성, 및 IL-2 수용체의 발현을 억제한다. 그러므로, 생체내에서 TGF- β 는 여러 가지 사이토카인들에 의해 유도된 작용의 중요한 길항제 역할을 하며, 이것은 TGF- β 와 TNF- α 의 대조되는 작용에서 잘 나타난다^{14,15}.

TGF- β 는 이러한 염증 세포뿐만 아니라^{11,12}, 섬유아 세포를 위한 효과적인 화학 주성제이며¹⁸, 섬유아 세포에서 생성되기도 한다. 그것은 대부분의 세포의 증식을 억제하지만, 몇가지 간엽세포의 성장을 촉진한다. 또한 미성숙한 섬유아 세포의 증식을 촉진하며¹⁹, 손상 부위에 세포의 기질 성분의 주요한 세포 기원인 섬유아 세포의 증가된 군집을 초래한다. 이 시기에 세포로부터 일단 유리되면, 잠복중이지만 활동적인 TGF- β 가 세포의 기질과 기저막에 있는 단백질과 상호 작용을 한다³. 이러한 작용에는 첫째 TGF- β 가 collagen, fibronectin, thrombospondin, tenascin, osteopontin, osteonectin 및 proteoglycans을 포함하는 세포의 기질의 수많은 단백질의 합성과 분비를 유도한다^{3,20,23,45-47}. 이러한 단백질의 증가된 침착이 세포의 기질의 증가된 형성을 유도한다³. 또한, TGF- β 는 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP), plasminogen-activator inhibitor를 포함하는 단백질 분해 효소 억제제의 생성을 촉진하고 collagenase와 plasminogen activator같은 기질 단백질 분해 효소의 생성을 억제한다^{21,23,48,49}. 둘째 TGF- β 가 세포 유착 수용체인 integrin의 발현을 증가시켜 세포내 유전자 발현과 세포의 분화에 영향을 주며, 빈번히 세포와 세포의 기질의 접착성을 증가시킨다⁵⁰. Carver 등⁵¹은 $\alpha_2\beta_1$ integrin 복합체가 형태 형성과 창상 치유에서 보이는 기질의 재형성과 관계하는 세포와 세포간 콜라겐의 상호 작용에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 콜라겐 분자는 hydroxyproline에 의해 안전한 3중 나선 구조가 되며⁵², lysyl oxidase에 의해 안전한 교차 결합이 이루어진다⁵³. 이러한 중요한 교차 결합 단계가 콜라겐에 강도와 안정성을 주며 정상 약 80%에 이른다⁵⁴. 손상 후 10시간 이내에 증가된 콜라겐 합성의 증거가 있으며, 5일에서 7일까지 절정에 이르며 그 이후로 점차 감소한다. 이후 섬유아 세포, 호중구 및 대식세포에 있는 특이한 collagenase에 의해 3/4 및 1/4 분절로 분해되고 다른 단백질 분해 효소에 의해 소화된다²³. TGF- β 는 창상 치유의 일련의 단계에 관여하는 모든 세포들에서 분비되어^{4,5} 이들 분비 세포들과 자가자

극인자 혹은 인접자극인자 형태로 작용하면서 이러한 단계들을 조절하는 주 인자이다²⁹. 만약, TGF- β 에 의해 창상 치유 사이토카인들이 잘 조절되지 않으면, 이것의 과잉 활동으로 창상 부위에 너무 많은 콜라겐의 침착으로 인한 비후성 반흔이나 킬로이드, 폐섬유화, 간경화, 공피증, 건유착증, 동맥 경화증 섬유성 골유합, 신경의 손상에 따른 전달 장애, Crohn 질환, 식도 및 요도 협착증, 유방 임플란트 주위의 피막 및 Peyronie's 질환을 일으키는 막에서의 창상 등과 같은 섬유 증식성 장애를 초래할 수 있다^{23-25,55-57}. 이러한 비후성 반흔과 킬로이드의 형성에 관여하는 인자로는⁵⁵ 유전, 병소의 위치, 장력, 나이, 손상후 경과한 시기⁵⁶, 비만 세포⁵⁷, 콜라겐 결합⁵⁸, α -smooth muscle actin 근섬유아 세포(myofibroblast)⁵⁹, 미세환경적인 인자인 열과 산⁶⁰, 분화도^{61,62} 및 산소 포화도⁶³, proline hydroxylase의 작용^{64,65}, 세포의 기질의 성분⁶⁶, 낮은 밀도⁶⁷, 스테로이드 호르몬⁶⁸, 및 세포 형태 변화와 cytoskeleton^{69,70}, 콜라겐 대사의 조절(collagenase와 TIMP-1), 및 TGF- β 를 포함한 사이토카인들^{24,25,56,71-75} 등을 들 수 있다. 반대로, 콜라겐에 hydroxyproline이 존재하지 않는 혐기성 혹은 괴혈병 상태에서는 콜라겐이 낮은 나선 구조를 가지므로 보다 빨리 더 낮은 농도에서변성을 겪으며⁴⁸, 창상은 약해져서 열개를 초래한다^{23-25,55-57}.

본 연구에서는 외상성 손상시 관여하는 그램 양성 세균의 독소인 SEB와 그램 음성 세균의 내독소인 LPS를 각기 다른 농도로 생체의 배양한 안면 진피 및 비후성 반흔의 섬유아 세포에 단독 혹은 함께 작용시킨 후, 세균 독소 존재하에서의 섬유아 세포의 증식과 생성되는 TGF- β 를 정량적으로 측정하여 통계학적 검증을 하였다. 먼저 안면 진피 섬유아 세포, 비후성 반흔 섬유아 세포 모두에서 SEB로 처리하였을 때(Fig. 1, 2), 안면 진피 섬유아 세포에서 배양 후 1일째 대조군에 비해 0.01 μ g, 0.1 μ g에서 유의할 만한 세포의 증식 억제를 보였으며, 안면 진피 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양 후 3일째까지 0.01 μ g, 0.1 μ g에서 유의성 있게 세포의 증식이 억제되었으며, 7일째에 모든 세포에서 대조군에 비해 유의성 있게 세포의 증식이 억제되었다. 안면 진피 섬유아 세포는 대조군에 비해 배양 후 1일째부터 관찰한 5일째까지 유의할 만한 세포의 성장을 억제시켰다. 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 배양 후 5일전까지는 유의할 만한 억제가 없었지만, 5일째에는 농도에 따라 유의할 만한 혹은 유의성이 큰 세포의 성장억제가 있었다 그러므로, SEB로 처리한 세가지 섬유아 세포에서 배양 시간에 따라 안면 진피, 비후성 반흔 섬유아 세포의 순서로 세포의 증식을 억제시켰다. 다음으로 LPS로 두가지 섬유아 세포를 처리하였을 때(Fig. 3, 4), 안면 진피 섬유아 세포에서 배양후 3일째까지 모든 농도에서 세포의 증식을 보였지만 유의할 만한 변화는 없었으나, 5일째에 모두 세포에서 대조군에 비해 유의성 있게 세포의 증식이 억제되었다 하지만, 안면 진피 섬유아 세포에서는 대조군에 비해 배양후 1일째에 모든 농도에서, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 배양 후 3일째 0.01 μ g에서 유의할 만한 세포의 증식 억제를 보여 주목할 만하였다. LPS로 처리한 세가지 섬유아 세포에서 배양 시간에 따라 안면 진피, 비후성 반흔 섬유아 세포의 순서로 세포의 증식을 억제시켰다. 이들 세균의 독소로

처리한 섬유아 세포의 증식에 관한 실험 결과들을 고찰해 보면, 안면 진피 섬유아 세포에서 나머지 두 세포보다 SEB와 LPS 둘 다에 배양 후 초기에 세포의 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 숙주의 scarless wound healing에 유리할 것으로 사료된다 반면, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 SEB와 LPS 둘 다에 안면 진피보다 배양 후 후기에 세포의 성장을 억제시킴을 알 수 있었다 이는 창상의 초기에 섬유아 세포의 다량 주입에 의한 비정상적인 창상의 치유와 관계가 있을 것으로 여겨진다. 섬유아 세포의 배양시간과 작용시킨 독소의 농도에 대한 이변량 분산분석에서 위의 두가지 섬유아세포 모두에서 배양 후 3일째에 증식이 최고조에 달하고 그 이후로 5일째로 가면서 증식이 억제됨을 알 수 있었다. 또 두가지 섬유아 세포 모두에서 세포의 증식에 관한 배양시간과 작용시킨 두 가지 독소인 SEB와 LPS 및 배양 시간과 작용시킨 독소의 상호 관계에 있어 유의성이 있음을 알 수 있었다 하지만, LPS 작용시 안면 진피 섬유아 세포에서 배양시간과 작용시킨 LPS사이의 상호관계에 유의할 만한 변화가 없었다. TGF- β 의 생성 변화에 대한 정량적 분석을 위해, SEB와 LPS으로 단독 혹은 병용 작용시켜 농도에 따른 TGF- β 의 생성량을 측정하였다. SEB로 처리한 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 1일째 0.01 μ g에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었고, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 배양 후 2일째 같은 농도에서 대조군에 비해 매우 유의하게 증가되었다. 그러므로, SEB로 처리한 두가지 섬유아 세포에서의 TGF- β 의 생성은 가해진 독소의 농도와 배양 시간에 따라 유의할 만한 변화가 없었다. 이는 그램 양성 세균에 의한 감염시 초기에 증가된 TGF- β 의 생성에 의한 섬유화로 만성적인 감염으로 잘 진행될 수 있게 할 것으로 여겨진다(Fig. 5, 6). LPS로 처리한 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 1일째 모든 농도에서, 2일째 0.01 μ g에서, 3일째 0.1 μ g, 1.0 μ g 농도에서 대조군에 비해 매우 유의성 있게 증가되었다. 이는 농도에 무관하게 배양 초기에 대조군에 비해 더 많은 TGF- β 의 생성을 보였다. 이는 안면 진피 섬유아 세포가 창상 치유측면에서 비정상적인 창상을 초래할 수 있음을 보여준다. 반면, 비후성 반흔 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 2일째 0.01 μ g에서 대조군에 비해 오히려 유의할 만하게 감소되었고, 0.1 μ g 농도에서는 매우 유의성 있게 증가되었으나, 3일째에 다시 1.0 μ g 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되어 안면 진피 세포와 비교해서 그램 음성 세균의 내독소인 LPS에 대한 반응에서 가해진 독소의 농도와 배양 시간에 따라 TGF- β 생성의 증가와 감소를 보였다(Fig. 7, 8). 혼합 감염시 독소에 따른 TGF- β 의 생성을 살펴보기 위해 위의 두가지 섬유아 세포에다 SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)를 함께 처리하였다. 안면 진피 세포에서는 배양 후 2, 3일째에서 매우 유의하게 증가되었고, 비후성 반흔 세포에서는 배양 후 1, 2일째에서 대조군에 비해 각각 유의하게, 매우 유의할 만하게 증가되었다. 즉 비후성 섬유아 세포는 배양 후 1일째부터 대조군에 비해 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가하지만, 안면 진피 세포에서는 배양 후 2일째부터 대조군에 비해 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가하였다. 그러므로, SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)로 처리한 서로 다른 기원의 섬유아 세포에서 독소의 농도와 배양 시간에 따

라 TGF- β 의 생성이 다름을 알 수 있다(Fig. 9, 10). 안면 진피 섬유아 세포에서 독소 작용시 세포의 성장이 배양 초기에 억제되고 SEB에 대한 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 감소되어 상흔이 적은 창상치유에 유리함을 알 수 있었다. 하지만, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)에 대한 세균의 성장 억제가 배양의 초기에 이루어지지 않고, SEB(0.1 μ g) 혹은 LPS(0.1 μ g)의 단독 작용시 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가하지 않았지만 양 독소의 작용시 배양 초기부터 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가하는 것으로 보아, 개방창이나 오염된 창상에서 섬유아 세포의 다량 주입과 TGF- β 의 유의할 만한 생성으로 지속적인 콜라겐 합성을 초래해 비정상적인 창상 치유 형태를 나타낸 것으로 사료된다. 이는 Younai 등이 비후성 반흔 섬유아 세포가 정상적인 섬유아 세포에 비해 TGF- β 의 증가된 분비를 할 수 있는 상태를 반영한다는 보고²⁴⁾와 Yang 등이 정상 및 비후성 반흔 섬유아 세포로 군집한 콜라겐 격자에 PDGF-BB, TGF- β , β FGF, 및 epidermal growth factor(EGF)를 작용시켜 수축에 관한 효과의 검사시 단지 TGF- β 만이 P<0.01로 통계학적으로 유의할 만 하였다는 보고⁷⁴⁾ 및 Sporn과 Robert의 보고⁴⁰⁾와 Bettinger 등의 보고²⁵⁾ 등이 본 연구 결과와 일치함으로써 논제에 의미를 부여할 수가 있었다. 하지만, SEB(0.1 μ g) 혹은 LPS(0.1 μ g)의 단독 작용시 TGF- β 의 생성에 있어 유의할 만하게 증가하지 않았는데, 이는 양독소가 TGF- β 의 생성에 있어 서로 길항 작용을 보임을 알 수 있었다. 이것은 위의 창상 섬유아 세포에 LPS를 노출시킨 반응에서 정상적인 진피 섬유아 세포들보다 활발한 TNF 반응을 일으킨다는 Fahey 등의 보고⁷⁶⁾가 뒷받침한다. 또한, SEB, LPS 및 SEB과 LPS를 함께 사용한 것을 각각 두가지 섬유아 세포에 작용시킨 후 TGF- β 의 생성에 관한 이변량 분산 분석을 시행한 결과 세포의 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이들의 상호 관계에 있어 유의성이 있음을 알 수 있었다. 하지만, SEB를 작용시킨 후 안면 진피 섬유아 세포에서는 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도와와의 상호 관계에서, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 작용시킨 농도에서 유의할 만한 변화가 없었다.

그러므로, TGF- β 는 각기 다른 기원의 섬유아 세포에서 작용하는 단계와 작용시킨 인자에 따라 다양한 사이토카인을 분비하여 창상 치유시 비정상적인 반응을 나타낼 수 있음을 알 수 있다. Lin 등^{75,77)}은 사람 태아의 창상 치유에서 TGF- β 이 중요한 조정자이며 항 TGF- β 의 전략이 성인의 창상에서 scarless healing을 촉진할지도 모른다고 하였다. Colman 등⁷⁸⁾은 초기 태아 쥐의 피부 섬유아 세포에서 collagen gel의 수축이 일어나며, 후기 태어나 성인의 피부 섬유아 세포에서 보다 다소 덜 TGF- β 를 분비하고 활성화시킨다. 하지만, 이러한 창상이 발생적 전이를 겪으며 이러한 전이는 성장 인자와 섬유아 세포의 상호 작용에 의해 영향을 받는 데, plasmin을 유리시켜 TGF- β 를 활성화시킬 수 있는 능력을 가지는 피부 섬유아 세포의 출현과 관계가 있다고 하였다 또, Younai 등²⁴⁾은 비후성 반흔 섬유아 세포에 의한 섬유소 응괴의 수축 혹은 킬로이드 섬유아 세포에 의한 콜라겐 합성을 감소시킬 수 있는 항 TGF- β 항체의 능력이 섬유화와 창상 수축 치료의 항체 사용에 대한 약물학적 유용성을 지시한다고 하였다. Edwards

등은 국소적으로 합성된 TGF- β 가 비후성 반흔에서 콜라겐 대사의 조절에 대한 역할을 한다고 보고하였다. 그러므로, 미래에 창상 치유 과정에서의 TGF- β 의 역할에 대한 수많은 연구들에 의해 더 나은 창상 치유를 얻을 수 있을 것이다. 본 연구에서 저자들은 세균의 독소 존재시 섬유아 세포의 증식과 TGF- β 의 생성을 관찰하여 본 바, 비록 이러한 결과들이 생체내의 복잡한 환경을 반영하지 않은 생체외에서 배양한 섬유아 세포에서 얻어진 결과이지만, 이 둘의 상호 관계에 대한 조화로운 이해로 향후 창상의 치유에 관한 유용한 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

안면 진피, 및 비후성 반흔의 섬유아 세포를 생체의 배양하여 *Staphylococcus enterotoxin B*(SEB)와 lipopolysaccharide(LPS)를 단독 혹은 병용 처리한 후 나타나는 세포의 증식과 생성되는 TGF- β 를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 독소 작용시 안면 진피 및 비후성 반흔의 섬유아 세포 모두에서 배양 후 3일째에 최고로 증식되었고 5일째로 가면서 증식이 억제되었으며, 섬유아 세포의 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도 및 상호간에 유의성이 컸다. 하지만, LPS 작용시 안면 진피 섬유아 세포에서는 배양시간과 작용시킨 LPS사이의 상호관계에 유의할 만한 변화가 없었다
2. SEB, LPS 및 SEB와 LPS의 병용한 각각을 두가지 섬유아 세포에 작용시켰을 때, TGF- β 의 생성에 있어 세포의 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어 유의성이 컸다. 하지만, SEB를 작용시킨 안면 진피 섬유아 세포에서는 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도의 상호 관계에서 유의성을 보이지 않았고, 비후성 반흔 섬유아 세포에서는 작용시킨 독소의 농도에서 유의성을 보이지 않았다.
3. 안면 진피 섬유아 세포에서 독소 작용시 세포의 증식이 배양 초기에 억제되고 SEB에 대한 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 감소되어 안면 진피 섬유아 세포는 창상 치유의 관점에서 유리함을 알 수 있다. 반면에, LPS와 SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)를 병용한 경우에는 TGF- β 의 생성이 초기에 유의할 만하게 증가를 보여 비정상적인 창상 치유 형태를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다
5. 비후성 반흔 섬유아 세포에서 SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)에 대한 세균의 증식 억제가 배양의 초기에 이루어지지 않고, 양 독소의 작용시 배양 초기부터 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가하는 것으로 보아 비정상적인 창상 형태를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 하지만, SEB(0.1 μ g) 혹은 LPS(0.1 μ g)의 단독 작용시 TGF- β 의 생성이 유의하게 증가되지 않았다.

그러므로, 안면 진피 및 비후성 반흔 섬유아 세포는 서로 다른 표현형을 가지며, 자극시킨 인자에 따라 다양한 TGF- β 의 생성으로 창상의 치유를 조절할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cohen IK, Diegelmann RF, Crossland MC : Wound care and wound healing. In: Principles of Surgery, 6th eds Edited by S.I. Schwartz et al. New York: McGraw-Hill, Inc chapt 8, p279, 1994.
2. Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK : Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 30:347, 1997.
3. Derynck R : Transforming growth factor-beta. In: Thomson A, eds. *The Cytokine Handbook*. p319, 1994.
4. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV : Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701, 1985.
5. de Martin R, Haendler B, Hofer Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E : Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family *EMBO J* 6:3673, 1987.
6. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, et al : A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7:3737, 1988.
7. Kingsley DM : The TGF- β supefamily : New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133, 1994.
8. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses-HL : Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110:1361, 1990.
9. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL : Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106:1659, 1988.
10. Lawrence DA : Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 236:363, 1996.
11. Brandes ME, Mai UE, Ohura K, Wahl-SM : Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *J Immunol* 147:1600, 1991.
12. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield L, McCartney-Francis N, Wahl LM, Robers AB, Sporn MB : Transforming growth factor beta (TGF- β) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5788, 1987.
13. Espevik T, Figari IS, Rangesd GE, Palladino-MA Jr : Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. Comparison between natural porcine platelet-derived TGF-beta 1 and TGF-beta 2, and recombinant human TGF-beta 1, *J Immunol* 140:2312, 1988.
14. Ohta M, Greenberger JS, Anklesaria P, Bassols A, Massague J : Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential hematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539, 1987.
15. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA Jr : Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166:991, 1987.
16. Roberts AB, Sporn MB : In *Peptide Growth Factors and their Receptors*(eds Sporn MB, Roberts AB). Springer-Verlag, Heidelberg p421, 1990.
17. Kehrl JH, Thevenin C, Rieckmann P, Fauci AS : Transforming growth factor-beta suppresses human B lymphocyte Ig production by inhibiting synthesis and the switch from the membrane form to the secreted form of Ig mRNA. *J Immunol* 146:4016, 1991.
18. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165:251, 1987.
19. Moses HL, Tucker RF, Leaf EB, Coffey RJ, Halter J, Shirley GD : Type beta transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. *Cancer Cells* 3:65, 1987.
20. Igotz RA, Endo T, Massague J : Regulation of fibronectin and type

- I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 262:6443, 1987.
21. Matrisian LM : The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455, 1992.
 22. Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J : Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 164:399, 1986.
 23. Diegelmann RF : Cellular and biomechanical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. *J Urol* 157:298, 1997.
 24. Younai S, Venters G, Vu S, Nichter L, Nimni ME, Tuan TL : Role of growth factors in scar contraction: in vitro analysis. *Ann Plast Surg* 36:495, 1996.
 25. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK : The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* 98:827, 1996.
 26. Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, and Martin GR : Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 113:261, 1983.
 27. Seppa HE, Grotendorst GR, Seppa SI, Schiffman E, Martin GR : Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92:584, 1982.
 28. Roberts AB, Sporn MB, Assoian Rk, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Helne U J, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH : Transforming growth factor type beta. rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 83:4167, 1986.
 29. Davidson JM. Wound repair. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation basic principles and clinical correlates*. New York, Raven, p244, 1992.
 30. Wysocki AB, Grinnell F : Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63:825, 1990.
 31. Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD : A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing *J Thoret Biol* 119:219, 1986.
 32. Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM : The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg* 68:107, 1981.
 33. Folkman J : Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43:175, 1985.
 34. Folkman J, Klagsbrun M : Angiogenetic factors. *Science* 235:442, 1987.
 35. Leibovich SJ, Weisman DM : Macrophages, wound repair and angiogenesis *Prog Clin Biol Res* 266:131, 1988.
 36. McGrath MH : Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg* 17:421, 1990.
 37. Graves DT, Cochran DL : Mesenchymal cell growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 1:17, 1990.
 38. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN : Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 84:640, 1989.
 39. Sporn MB, Roberts AB : Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119:1017, 1992.
 40. Roberts AB, Sporn MB : Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta. *Growth Factors* 8:1, 1993.
 41. Nathan C, Sporn M : Cytokines in context. *J Cell Biol* 113:981, 1991.
 42. Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB : Transforming growth factor-beta. Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann NY Acad Sci* 580:225, 1990.
 43. Clark RA : Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol* 19:693, 1993.
 44. Colletti LM, Kunkel SL, Strieter RM : Cytokines. In: Greenfield LJ, Mulholland M, Oldhan KT, Zelenock GB, Lillemoe KD, eds. *Surgery: scientific principles and practice*. New York, Lippincott Raven p125, 1997.
 45. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA : Transforming growth factor- 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* 247:597, 1987.
 46. Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Hook M : Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Molec Biol Cell* 3: 181, 1992.
 47. Bassols A, Massague J : Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 263:3039, 1988.
 48. Birkedal-Hansen-H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal Hansen B, DeCarlo A, Engler JA : Matrix metalloproteinases. a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197, 1993.
 49. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Witham SE, Docherty AJP, Angel P, Health JD : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitors. *EMBO J* 6:1899, 1987.
 50. Damsky CH, Werb Z : Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix. cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 4:772, 1992.
 51. Carver W, Molano I, Reaves TA, Borg TK, Terracio L : Role of the alpha 1 beta 1 integrin complex in collagen gel contraction in vitro by fibroblasts. *J Cell Physiol* 165:425, 1995.
 52. Udenfriend S : Formation of hydroxyproline in collagen. *Science* 152:1335, 1966.
 53. Siegel RC : Lysyl oxidase. *Int Rev Connect, Tissue Res* 9:7, 1978.
 54. Schilling JA : Wound healing. *Surg Clin N Amer* 56:859, 1976.
 55. Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP : Keloids and hypertrophic scars. a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg* 84:827, 1989.
 55. Khalil N, O'Conner RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH : Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:155, 1991.
 56. 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.
 56. Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA : In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108:2477, 1989.
 57. Kischer CW, Bunce HIII, Shetlah MR : Mast cell analyses in hypertrophic scars, hypertrophic scars treated with pressure and mature scars. *J Invest Dermatol* 70:355, 1978.
 57. Gruschwitz M, Muller PU, Sepp N, Hofer E, Fontana A, Wick G : Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: a mediator of fibrosis *J Invest Dermatol* 94:197, 1990.
 58. Ehrlich HP, Desmouliere A, Diegelmann RF, Cohen IK, Compton CC, Garner WL, Kapanci Y, Gabbiani G : Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 145:105, 1994.
 59. Larrabee WF, Bolen JW, Sutton D : Myofibroblasts in head and neck surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 114:952, 1988.
 60. Miyazono K, Yuki K, Takaku F, Wernstedt C, Kanzaki T, Olofsson A, Hellman U, Heldin CH : Latent forms of TGF-beta: structure and biology. *Ann N Y Acad Sci* 593:51, 1990.
 61. Moulin V, Castilloux G, Auger FA, Garret D, O'Conner-McCourt MD, Germain L : Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 238:283, 1998.
 62. Nilsen Hamilton M : Transforming growth factor- β and its actions on cellular growth and differentiation. *Cur Top Dev Biol* 24:95, 1990
 63. Falanga V, Qian SW, Danielpour D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB : Hypoxia upregulates the synthesis of TGF-beta 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 97:634, 1991.
 64. Cohen IK, Keiser HR, Sjoerdsma A : Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar. *Surg Forum* 22:488, 1971.
 65. Cohen IK, Beavers MA, Horakova Z, Keiser HR : Histamine and collagen synthesis in keloid and hypertrophic scar. *Surg Forum* 73:509, 1972.
 66. Streuli CH, Schmidhauser C, Kobrin M, Bissell MJ, Derynck R : Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene *J Cell Biol* 120:253, 1993.

67. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S : Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density Proc Natl Acad Sci USA 93:4219, 1996.
68. Wakefield L, Kim SJ, Glick A, Winokur T, Colletta A, Sporn M : Regulation of transforming growth factor-beta subtypes by members of the steroid hormone superfamily. J Cell Sci Suppl 13:139, 1990.
69. Varedi M, Tredget EE, Scott PG, Shen YJ, Ghahary A : Alteration in cell morphology triggers transforming growth factor-beta 1, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-I expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts. J Invest Dermatol 104:118, 1995.
70. Varedi M, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE : Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. J Cell Physiol 172:192, 1997.
71. Schmidl P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA : Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar Am J Pathol 104:485, 1998.
72. Younai S, Nichter 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.
73. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, Chandra CS : Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. J Periodontol Res 30:382, 1995.
74. Yang CC, Lin SD, Yu HS : Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. J Dermatol Sci 14: 162, 1997.
75. Lin RY, Sullivan KM, Argenta PA, Meuli M, Lorenz HP, Adzick NS : Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. Ann Surg 110:146, 1995.
76. Fahey TJ 3rd, Turbeville T, McIntyre K : Differential TNF secretion by wound fibroblasts compared to normal fibroblasts in response to LPS. J Surg Res 58:759, 1995.
77. Lin RY, Adzick NS : The role of the fetal fibroblast and transforming growth factor-beta in a model of human fetal wound repair. Semin Pediatr Surg 5:165, 1996.
78. Coleman C, Tuan TL, Buckley S, Anderson KD, Warburton D : Contractility, transforming growth factor-beta, and plasmin in fetal skin fibroblasts: Role in scarless wound healing Pediatr Res 43:403, 1998.
79. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ et al : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. EMBO J 6:1899, 1987.