

Staphylococcus enterotoxin B와 lipopolysaccharide를 작용시킨 사람 섬유아 세포에서 생성된 Transforming Growth Factor- β_1 의 정량적 분석

이성근 · 김광혁* · 김욱규** · 김종렬** · 정인교** · 양동규**

고신대학교 의학부 치과학교실, 미생물학교실*, 부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실**

Abstract

QUANTITATIVE ANALYSIS OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 IN HUMAN FIBROBLASTS INDUCED WITH STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXIN B AND LIPOPOLYSACCHARIDE

Seong-Geun Lee, Kwang-Hyuk Kim*, Uk-Kyu Kim**, Jong-Ryoul Kim**, In-Kyo Chung**, Dong-Kyu Yang**

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

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University***

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 infection control.

The objective of this study is to investigate production of TGF- β 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 infection control.

The fibroblasts were originated from gingiva and facial dermis 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(2.5×10^5 /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 gingival fibroblast induced with SEB and LPS respectively or in combination, the suppression of cell proliferation occurred very significantly since 3 days after incubation, compared with the control and the production of TGF- β_1 occurred very significantly at 1 day after incubation, compared with the control.
2. 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.

In conclusion, the concentration of bacterial toxins and the incubation period correlated with cell proliferation and production of TGF- β_1 very significantly.

The gingival and facial dermal fibroblasts have different phenotype each other. The orchestrated understanding of fibroblast proliferation and TGF- β_1 production play an important part in host defense against the bacterial infection and may prevent tissue necrosis such as necrotizing fasciitis and life-threatening syndrome such as multiple organ failure.

Key words : Transforming growth factor- β_1 , Lipopolysaccharide, Necrotizing infection

I. 서 론

감염에 대한 숙주의 반응은 염증 세포의 단계별 출현으로 시작되며 섬유아 세포의 주입과 세포의 기질 합성 및 재형성 단계를 거쳐 용해되어 구조와 기능이 손상전의 상태로 되돌아가는 일련의 치유 다단계를 거친다¹⁾. 이러한 단계에 필요한 화학적인 신호 인자를 사이토카인이라 부른다. 그 중에서도 Transforming growth factor- β (TGF- β)는 390개 혹은 412개의 아미노산의 전구체로 만들어지며^{2,5)}, 각각의 전구체는 잠복기와 관계하는 폴리펩티드로 긴 전구 분절인 N 말단과 성숙한 TGF- β 단량체를 구성하는 112개의 아미노산으로 구성된 펩티드인 C 말단으로 구성되어 있다. 이러한 TGF- β 는 창상 치유의 과정에 관여하는 조혈 기원의 염증 세포와 비조혈 기원의 섬유아 세포, 상피 세포, 평활근 세포, 내피세포 등 대부분의 세포에서 분비된다^{6,7)}. 최근에 TGF- β 에 대한 두개의 황단막 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 밝혀졌다⁴⁾. 이러한 비활성화된 TGF- β 는 plasmin과 cathepsin같은 단백질 분해 효소에 의해 전구 분절이 분해되어 활성화되며⁸⁻¹⁰⁾, 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 유도하고²⁰⁻²²⁾, 단백질 분해 효소 억제제의 생성을 촉진하며, 기질 단백질 분해 효소의 생성을 억제하여^{23,24)}, 세포의 기질의 축적과 안정화를 통해 감염을 조절한다. 만약 급성 진행성 감염에서 TGF- β 에 의해 염증전 사이토카인들이 엄격하게 조절되지 못하면, 국소적으로 과사성 근막염이나 전신적으로 패혈증 및 다기관 기능 부전과 같은 생명을 위협하는 증후군으로 진행되어 숙주의 죽음을 초래할 수 있는 데²⁵⁾, 이는 급성 진행성 감염이 A군 연쇄상 구균의 독력과 보다 높은 점액성의 외독소를 생성하는 포도상 균주의 재출현과 관계가 있다는 보고²⁶⁾와 배양된 쥐의 진피 섬유아 세포가 tumor necrosis factor(TNF)를 위한 표적 이자 제공자로 작용한다는 보고²⁷⁾ 및 쥐의 창상 섬유아 세포가 정상적인 진피 섬유아 세포에 비해서 lipopolysaccharide(LPS)로 자극시 활발한 TNF 반응을 일으킨다는 보고²⁸⁾와 TNF의 과사 효과에 대한 보고²⁹⁾ 등이 잘 뒷받침하고 있다. 그러므로, TGF- β 는 감염시 나타나는 염증 및 면역 반응을 조절하고 세포의 기질의 축적 및 안정화를 통해 세균의 감염을 조절하는 주 인자로 인정받고 있다²⁰⁾.

본 연구는 구강악안면 감염시 관여하는 그램 양성 세균의

Staphylococcus enterotoxin B(SEB)와 그램 음성 세균의 LPS를 생체의 배양한 안면 진피 및 비후성 반흔의 섬유아 세포에 각기 다른 농도로 단독 혹은 함께 작용시킨 후 섬유아 세포의 증식을 확인하였고 TGF- β 의 생성량을 측정하여 감염의 조절에 도움을 줄 수 있는 기초 자료를 마련코자 계획하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 섬유아 세포의 배양

26세 남성 환자의 구강 악안면 부위에서 치은 및 안면부의 진피의 조직절편 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 적정한 60mm 조직배양용 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, U.S.A.)와 lipopolysaccharide(LPS, Sigma, U.S.A.)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, U.S.A.)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 1의 생성

부유시킨 섬유아 세포 1ml(2.5×10^4 /ml)씩을 24wells 배양용 plate(Corning, NY, U.S.A.)에 분주한 후 ml 당 SEB 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g와 LPS 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g를 각각 작용시킨 후 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C에 보관하여 TGF- β 1의 측정을 위해 사용되었다.

4. TGF- β 1의 측정

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

1) 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화

비활성화 상태의 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화를 위하여 1N HCl을 작용하여 4 $^{\circ}$ 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 l 씩을 적하하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 HRP-conjugated 항체액 100 μ l 씩을 적하하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번

세척한 후 기질액 100 μ l 씩을 적하하여 다시 실온에서 27분 동안 방치한 다음 stop액 100 μ l 씩을 가하였다 Optical density(OD)는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 450nm에서 측정하였다

5. 통계학적 분석

실험 성적은 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며, 실험군과 대조군간의 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

치은 및 안면 진피 섬유아 세포(5×10^4 /ml) 0.1ml 씩을 96 wells 배양용 plate(Corning, NY, U.S.A.)에 분주한 후 ml 당 SEB 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g, LPS 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1.0 μ g를 각각 작용시킨 후 1, 3, 5일 배양 후에 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 540nm에서 Optical density를 측정된 결과는 다음과 같다.

1) SEB를 작용한 경우

치은 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양후 3일째 0.01

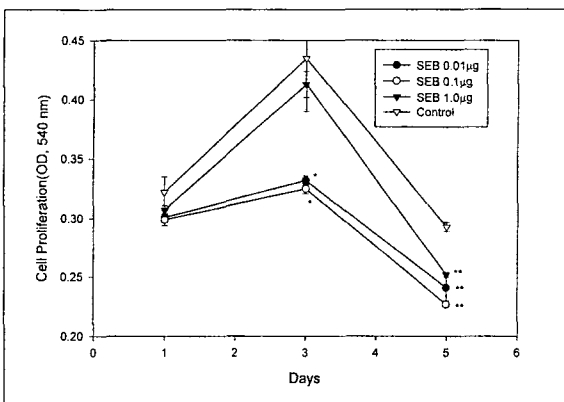


Fig. 1. Proliferation of gingival fibroblasts(5×10^3)with 0.01, 0.1, and 1.0 μ g of SEB. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

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

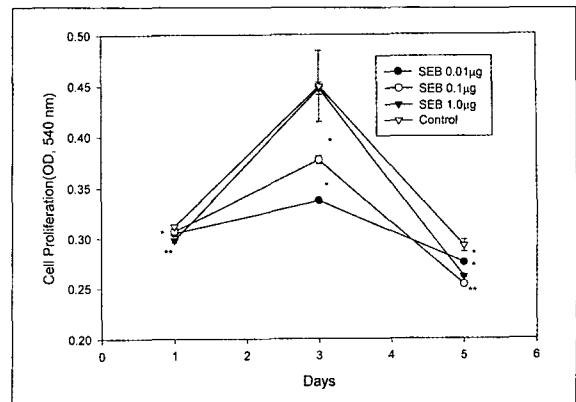


Fig. 2. Proliferation of facial dermal fibroblasts(5×10^3)with 0.01, 0.1, and 1.0 μ g of SEB. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.

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

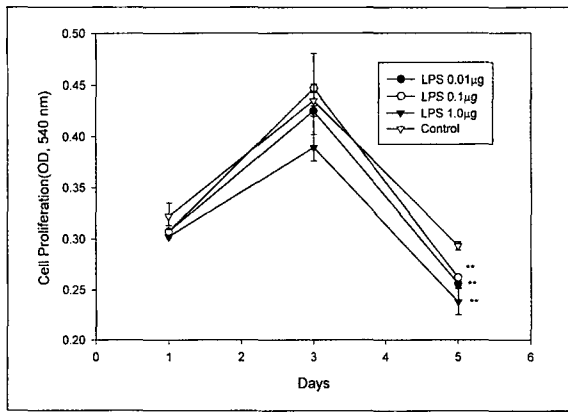


Fig. 3. Proliferation of gingival fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and 1.0 μg of LPS. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures
* $P < 0.01$ compared with control.

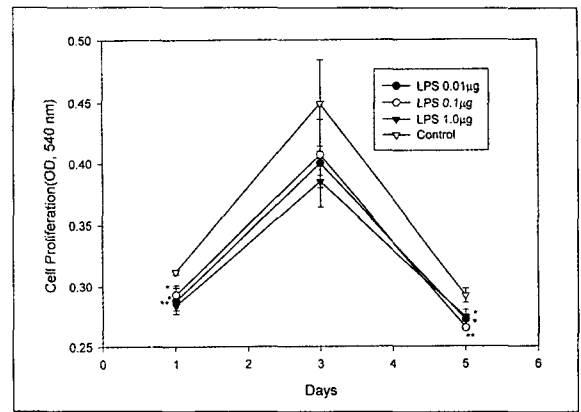


Fig. 4. Proliferation of facial dermal fibroblasts(5×10^3) with 0.01, 0.1, and 1.0 μg of LPS. At 1, 3, and 5 days after incubation, cells were counted. Data represent means \pm SD of triplicate cultures.
* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control.

Table 1. Production of TGF- β_1 in gingival fibroblasts cultured with SEB units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
SEB (0.01 μg)	1.40 \pm 0.18*	2.69 \pm 0.23*	5.28 \pm 0.06**
SEB (0.1 μg)	2.88 \pm 0.21**	2.81 \pm 0.14**	4.36 \pm 0.51
SEB (1.0 μg)	1.15 \pm 0.07**	4.17 \pm 0.24**	3.99 \pm 0.25
Control	0.83 \pm 0.02	1.45 \pm 0.32	3.91 \pm 0.02

Gingival fibroblasts were cultivated with SEB for 24, 48, and 72 hours. TGF- β_1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : $P < 0.05$ compared with the control.
** : $P < 0.01$ compared with the control.

μg , 0.1 μg 에서 $P < 0.01$ 로, 5일째에 0.1 μg 에서 $P < 0.01$ 로, 0.01 μg , 1.0 μg 에서 $P < 0.05$ 로 세포의 증식이 억제되었다. 배양 시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어 $P < 0.01$ 로 유의하였다(Fig. 1). 안면 진피 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양후 1일째 0.01 μg 과 1.0 μg 에서 각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 로 세포의 증식 억제를 보였으며, 3일째에도 0.01 μg , 0.1 μg 에서 $P < 0.05$ 로 세포의 증식 억제를 보였으며, 5일째에도 0.1 μg 에서 $P < 0.01$ 로, 0.01 μg , 1.0 μg 에서 $P < 0.05$ 로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어서도 $P < 0.01$ 로 유의하였다(Fig. 2).

2) LPS를 작용한 경우

치은 섬유아 세포에서 대조군에 비해 배양후 5일째에 모든 농도에서 $P < 0.01$ 로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도에 있어 $P < 0.01$ 로 유의성을 보였지만, 이 둘의 상호 관계에 있어서는 $P > 0.05$ 를 보였다

Table 2. Production of TGF- β_1 in facial dermal fibroblasts cultured with SEB units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
SEB (0.01 μg)	0.98 \pm 0.10	2.16 \pm 0.22	1.73 \pm 0.20*
SEB (0.1 μg)	1.07 \pm 0.14	2.36 \pm 0.53	1.34 \pm 0.13
SEB (1.0 μg)	0.96 \pm 0.10	1.96 \pm 0.04	0.85 \pm 0.04
Control	0.88 \pm 0.06	2.04 \pm 0.08	1.04 \pm 0.10

Facial dermal fibroblasts were cultivated with SEB for 24, 48, and 72 hours. TGF- β_1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : $P < 0.05$ compared with the control.
** : $P < 0.01$ compared with the control.

(Fig. 3). 안면 진피 섬유아세포에서 대조군에 비해 배양후 3일째까지 0.01 μg , 0.1 μg 에서 $P < 0.05$ 로, 1.0 μg 에서 $P < 0.01$ 로 세포의 증식이 억제되었으며, 5일째에 모든 농도에서 대조군에 비해 $P < 0.01$ 로 세포의 증식이 억제되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도에 있어 $P < 0.01$ 로 나타났지만, 이 둘의 상호 관계에 있어서는 $P > 0.05$ 를 보였다(Fig. 4).

2. TGF- β_1 정량 분석

치은 및 안면 진피 섬유아 세포($2.5 \times 10^5/\text{ml}$)에 ml 당 SEB 0.1 μg , LPS 0.1 μg 을 각각 작용시킨 후, EMEM에서 1, 2, 3일 동안 배양하여 수거된 상층액에서 미리 TGF- β_1 에 대한 모노클론항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 100 μl 씩을 적하하여 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 450nm에서 Optical density를 측정 한 결과는 다음과 같다.

Table 3. Production of TGF- β 1 in gingival fibroblasts cultured with LPS units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
LPS (0.01 μ g)	2.54 \pm 0.13**	3.13 \pm 0.30**	5.27 \pm 0.29**
LPS (0.1 μ g)	1.27 \pm 0.38	3.85 \pm 0.21**	5.02 \pm 0.11**
LPS (1.0 μ g)	ND	1.28 \pm 0.08	4.67 \pm 0.04**
Control	0.83 \pm 0.02	1.45 \pm 0.32	3.91 \pm 0.02

Gingival fibroblasts were cultivated with LPS for 24, 48, and 72 hours. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : P<0.05 compared with the control.

** : P<0.01 compared with the control.

Table 5. Production of TGF- β 1 in gingival fibroblasts cultured with SEB, LPS, and SEB and LPS in combination. units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
SEB (0.1 μ g)	2.88 \pm 0.21**	2.81 \pm 0.14**	4.36 \pm 0.51**
LPS (0.1 μ g)	1.27 \pm 0.38	3.85 \pm 0.21**	5.02 \pm 0.11**
SEB+LPS	2.65 \pm 0.18**	4.54 \pm 0.57**	4.24 \pm 0.05**
Control	0.83 \pm 0.02	1.45 \pm 0.32	3.91 \pm 0.02

Gingival fibroblasts were cultivated with SEB, LPS, and SEB and LPS in combination for 24, 48, and 72 hours. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : P<0.05 compared with the control.

** : P<0.01 compared with the control.

1) SEB를 작용한 경우

치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 대조군에 비해 배양 후 1일째 0.01 μ g에서 P<0.05로, 0.1 μ g에서 P<0.01로, 2일째 0.01 μ g에서 P<0.05로, 0.1 μ g, 1.0 μ g에서 P<0.01로, 3일째 0.01 μ g 농도에서 P<0.01로 증가되었고, 0.1 μ g, 1.0 μ g에서는 유의할 만한 변화가 없었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Table 1). 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 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(Table 2).

2) LPS를 작용한 경우

치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 대조군에 비해 배양 후 1일째 0.01 μ g에서, 2일째 0.01 μ g, 0.1 μ g에서 P<0.01로, 3일째 모든 농도에서 P<0.01로 증가되었다 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있

Table 4. Production of TGF- β 1 in facial dermal fibroblasts cultured with LPS units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
LPS (0.01 μ g)	2.06 \pm 0.14**	2.59 \pm 0.16*	1.15 \pm 0.12
LPS (0.1 μ g)	1.30 \pm 0.04**	2.21 \pm 0.18	1.49 \pm 0.08**
LPS (1.0 μ g)	1.97 \pm 0.01**	2.09 \pm 0.01	1.49 \pm 0.01**
Control	0.88 \pm 0.06	2.04 \pm 0.08	1.04 \pm 0.10

Facial dermal fibroblasts were cultivated with LPS for 24, 48, and 72 hours. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : P<0.05 compared with the control.

** : P<0.01 compared with the control.

Table 6. Production of TGF- β 1 in facial dermal fibroblasts cultured with SEB, LPS, and SEB and LPS in combination. units:ng/ml

Stimulant	Culture time		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
SEB (0.1 μ g)	1.07 \pm 0.14	2.36 \pm 0.53	1.34 \pm 0.13
LPS (0.1 μ g)	1.30 \pm 0.04**	2.21 \pm 0.18	1.49 \pm 0.08**
SEB+LPS	0.86 \pm 0.05	0.81 \pm 0.05**	2.04 \pm 0.17**
Control	0.88 \pm 0.06	2.04 \pm 0.08	1.04 \pm 0.10

Facial dermal fibroblasts were cultivated with SEB, LPS, and SEB and LPS in combination for 24, 48, and 72 hours. TGF- β 1 was measured in the culture supernatant. Data is mean \pm SD.

* : P<0.05 compared with the control.

** : P<0.01 compared with the control.

어 P<0.01로 유의하였다(Table 3). 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 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 이 둘의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Table 4).

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

치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 대조군에 비해 배양 후 1, 2, 3일째 모두에서 P<0.01로 증가되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Table 5). 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 1은 대조군에 비해 배양 후 2일째에 P<0.01로 감소되었고, 3일째에는 오히려 P<0.01로 증가되었다. 배양시간과 작용시킨 독소의 농도 및 이 둘의 상호 관계에 있어 P<0.01로 유의하였다(Table 6).

IV. 총괄 및 고찰

감염 부위에서는 먼저 호중구가 30~60분내에 염증 부위에 처음 도달하여 24시간까지 우세하게 존재하며 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 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 감염의 방에 관계하는 사이토카인을 생성한다. 이러한 사이토카인들에는 interferon- α (IFN- α), TNF, IL-1, IL-1 receptor antagonist, 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 유리한다³⁰⁻³³. 이러한 염증 세포에서 많은 폴리펩티드 인자가 유리된다³⁴⁻⁴¹. 감염 부위의 염증 반응은 부분적으로는 염증성 사이토카인 TNF, IL-1, IL-6의 유리에 의해서 매개된다^{20,25}. 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 유도시킨다. 이러한 매개체는 감염 부위에서 염증 반응의 기시와 증폭 및 회복 과정을 기시하는 데 중요한 역할을 한다¹²⁻¹⁷. 대식세포는 감염후 48시간까지 주요한 세포로서³⁰, 창상 부위의 이물질과 세균뿐만 아니라 비기능적인 숙주세포를 제거한다. 감염이 생기면, 결합 조직의 기질에 정상적으로 존재하는 말초 단핵구가 감염 부위에서 대식세포가 되며 섬유아 세포의 주입을 조절하는 사이토카인인 PDGF와 TGF- β 를 분비한다^{42,43}. 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 있다⁴⁴. 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}. 이 때에 세포의 기질에 저장된 TGF- β 가 국소적으로 감염의 조절에 도움을 주는 세포의 기질의 축척과 안정화를 초래하며⁴⁴, 순환 혈중에 높은 농도로 유지되는 α_2 -macroglobulin(α_2 -MG)와 상호 작용하여 비활성화된 후 간장에서 α_2 -MG의 수용체와 결합하면 고농도로 유리되어 염증성 사이토카인들에 의한 전신적인 독작용을 조절할 것으로 여겨진다^{21,45-47}. 이러한 작용은 안면부 급성, 진행성 감염에서도 잘 나타나는 데, 정상적인 인체의 반응에서는 사이토카인과 염증성 매개체들의 조화로운 단계별 작용에 의해 섬유화 과정을 거쳐 만성 감염으로 진행되는 반면, 전신적으로 스테로이드를 투여받거나^{48,49}, 면역이 억제되어 있는 당뇨병 환자⁵⁰ 및 비스테로이드 항염증약⁵¹를 복용하는 사람들에서는 이러한 사이토카인들의 부조화된 유리로 종창과 함께 감염이 급속히 확산되며, 이로 인해 국소적인 혈류 공급이 중단되어 혈소판과 염증 세포에 의한 TGF- β 의 분비가 감소된다. Hendrich 등은 두경부 괴사성 근막염의 원인균으로 A군 beta 용혈성 연쇄상 구균과 포도상 구균등을 언급하였다⁵². Wolf와 Rabinowitz는 연쇄상 구균에 의한 독성 속 증후군에서 괴사성 근막염, 전신적인 패혈증 혹은 심지어 사망으로 진행되는 빈도가 더 높다고 하였으며, 이러한 급성, 진행성의 질병이 A군 연쇄상 구균의 독력과 보다 높은 점액성의 외독소를 생성하는 포도상 구균의 재출현과 관계가 있을 것이라고 하였다²⁶. Spillert 등은 TNF가 괴사 효과를 일으킬 수 있는지에 대해 실험하였을 때, TNF 단독으로는 응고전 작용을 가지지 않지만 단핵구의 활성화에 의해 TNF는 응고전 조직 인자를 생성하고 과응고 상태를 만들어 결과적으로 혈관내 혈전형성에 의한 폐색과 조직의 괴사를 일으킬 수 있다고 하였다²⁹. 다량 분비된 TNF- α 가 TGF- β 에 의해 길항되지 않고 혈관 내피 세포에 영향을 주어 항응고 성질이 사라지며 섬유소 응고를 유도하여 혈관내의 응고를 초래하게 된다. 이렇게 되면, 혈장은 응고 인자의 결핍으로 응고되지 않는다. 또 혈관내피 세포에 다형핵 백혈구의 접착을 촉진하고 이들 세포의 탈과립을 유도하여 과산화물 음이온과 과산화 수소같은 반응성 산소의 중간 산물을 형성한다⁵³. 이러한 결과로 국소적으로는 가스 형성을 동반하는 괴사성 근막염과 전신적으로는 패혈증과 다기관 기능 부진과 같은 생명을 위협하는 증후군을 야기해 숙주의 죽음을 초래하기도 한다²⁵.

한편, 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 한다²¹⁾. 이러한 작용에는 첫째 TGF- β 가 collagen, fibronectin, thrombospondin, tenascin, osteopontin, osteonectin 및 proteoglycans을 포함하는 세포의 기질의 수많은 단백질의 합성과 분비를 유도한다^{20, 22, 54-56)}. 이러한 단백질의 증가된 침착이 세포의 기질의 증가된 형성을 유도한다²¹⁾. 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^{20, 23, 24, 57, 58)}. 둘째 TGF- β 가 세포 유착 수용체인 integrin의 발현을 증가시켜 세포내 유전자 발현과 세포의 분화에 영향을 주며, 빈번히 세포와 세포의 기질의 접착성을 증가시킨다⁵⁹⁾. 감염 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 용해되어 구조와 기능이 손상전의 상태로 되돌아가게 된다²⁰⁾. TGF- β 는 이러한 일련의 단계에 관여하는 모든 세포들에서 분비되어²³⁾ 이들 분비 세포들과 자가자극인자 혹은 인접자극인자 형태로 작용하면서 이러한 단계들을 조절하는 주 인자이다²⁰⁾.

본 연구에서는 구강 및 안면부 감염시 관여하는 그람 양성 세균의 독소인 SEB와 그람 음성 세균의 내독소인 LPS를 각각 다른 농도로 생체의 배양한 치은, 안면 진피의 섬유아 세포에 단독 혹은 함께 작용시킨 후, 세균 독소 존재하에서의 섬유아 세포의 증식과 생성되는 TGF- β 를 정량적으로 측정하여 통계학적 검증을 하였다. 먼저 치은 섬유아 세포, 안면 진피 섬유아 세포, 비후성 반흔 섬유아 세포에서 SEB로 처리하였을 때(Fig. 1, 2), 안면 진피 섬유아 세포에서 배양 후 1일째 대조군에 비해 0.01 μ g, 0.1 μ g에서 유의할 만하게 세포의 증식 억제를 보였으며, 치은 섬유아 세포와 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. 치은 섬유아 세포에서는 배양 후 1일째에는 유의할 만한 변화가 없었으나 3일째에 유의할 만하게, 5일째에 매우 유의할 만하게 세포의 성장을 억제시켰다. 안면 진피 섬유아 세포는 대조군에 비해 배양 후 1일째부터 관찰한 5일째까지 유의할 만한 세포의 성장을 억제시켰다. 그러므로, SEB로 처리한 두가지 섬유아 세포에서 배양 시간에 따라 안면 진피, 치은 섬유아 세포의 순서로 세포의 증식을 억제시켰다 다음으로 LPS로 세가지 섬유아 세포를 처

리하였을 때(Fig. 3 4), 치은 섬유아 세포와 안면 진피 섬유아 세포에서 배양 후 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 배양 후 1일째에 모든 농도에서 유의할 만한 세포의 증식 억제를 보여 주목할 만하였다. LPS로 처리한 두가지 섬유아 세포에서 배양 시간에 따라 안면 진피, 치은 섬유아 세포의 순서로 세포의 증식을 억제시켰다. 이들 세균의 독소로 처리한 섬유아 세포의 증식에 관한 실험 결과들을 고찰해 보면, 안면 진피 섬유아 세포에서 치은 섬유아 세포보다 SEB와 LPS 둘다에 배양 후 초기에 세포의 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 숙주의 초기 안면부 급성 진행성 감염의 반응에서 섬유화 과정에 의한 만성 감염으로의 이행이 치은 섬유아 세포에 비해 어려울 것으로 사료된다. 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 치은 및 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 치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 1일째 0.01 μ g, 1.0 μ g에서 대조군에 비해 각각 유의할 만하게 그리고 매우 유의할 만하게 감소되었고, 반대로 0.1 μ g에서 매우 유의할 만하게 증가되었다. 2일째 0.01 μ g에서는 대조군에 비해 유의할 만하게, 0.1 μ g, 1.0 μ g에서는 매우 유의할 만하게 증가되었다. 3일째 0.01 μ g 농도에서 대조군에 비해 매우 유의성있게 증가되었고, 0.1 μ g, 1.0 μ g에서는 유의할 만한 변화가 없었다. 반면에, 안면 진피 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 1일째 0.01 μ g에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었다. 그러므로, SEB로 처리한 치은 섬유아 세포에서의 TGF- β 의 생성은 안면 진피 섬유아 세포에 비해 가해진 독소의 농도와 배양 시간에 따라 다양한 양상으로 유의할 만하게 증가되었다. 이는 그람 양성 세균에 의한 감염시 초기에 증가된 TGF- β 의 생성에 의한 섬유화로 만성적인 감염으로 잘 진행될 수 있게 할 것으로 여겨진다(Table 1, 2). LPS로 처리한 치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 배양 후 1일째 0.01 μ g에서, 2일째 0.01 μ g, 0.1 μ g에서, 3일째 모든 농도에서 대조군에 비해 매우 유의성 있게 증가되었다. 이는 저농도에서 배양 초기에 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가

하고 고농도에서는 배양 후 3일째 유의할 만하게 증가되었다. 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 치은 및 안면 진피 섬유아 세포가 그램 음성 세균에 의한 감염을 잘 조절할 수 있음을 보여준다(Table 3, 4). 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. 치은 섬유아 세포에서 생성된 TGF- β 는 대조군에 비해 배양 후 1, 2, 3일째 모두에서, 안면 진피 세포에서는 배양 후 2, 3일째에서 매우 유의하게 증가되었다. 즉 치은 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 따라 TGF- β 의 생성이 다름을 알 수 있다(Table 5, 6). Agarwal 등⁶⁰⁾은 치은 섬유아 세포에 LPS와 IL-1 β 를 작용시켜 염증전 사이토카인을 생성시키는 능력을 평가하였는데, Actinobacillus actinomycetemcomitans와 Escherichia coli로부터의 LPS가 염증전 사이토카인 IL-1 β , IL-6, 및 IL-8의 합성을 유도하는 것으로 보아 치은 섬유아 세포가 구조적인 지지를 제공하는 동시에 초기 염증반응에 부가적인 면역 세포로서의 기능을 할지도 모른다고 지적하였다. 본 연구에서 독소를 작용시킨 치은 섬유아 세포에서 세포의 증식 억제에 늦게 일어나며, 단독 혹은 병용 작용시켰을 경우에도 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가한 것을 고려할 때, 치은 섬유아 세포는 안면 진피 섬유아 세포에 비해 세균의 감염 조절에 유리한 표현형을 가지고 있음을 알 수 있다. 안면 진피 섬유아 세포에서 독소 작용시 세포의 성장이 배양 초기에 억제되고 SEB에 대한 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 감소되어 조직의 피사를 초래할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 쥐의 진피 섬유아 세포에 LPS로 처리시 이 섬유아 세포가 TNF를 위한 표적이자 제공자라는 보고²⁶⁾와 본 연구에서 LPS와 SEB(0.1 μ g)와 LPS(0.1 μ g)에 대한 TGF- β 의 생성은 초기에 유의할 만하게 증가한 것을 종합해 보면 서로 길항 작용으로 인해 그램 음성 세균이나 혼합균일 경우 감염의 조절에 불리하지 않은 상태를 알 수 있다. 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 이 둘의 상호 관계에 있어 유의성이 있음을 알 수 있었다. 하지만, SEB를 작용시킨 후 안면 진피 섬유아 세포에서는 배양 시간과 작용시킨 독소의

농도와 상호 관계에서 유의할 만한 변화가 없었다.

V. 결 론

치은 및 안면 진피 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 치은 및 안면 진피의 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 치은 및 안면 진피 섬유아 세포에서는 배양 시간과 작용시킨 LPS사이의 상호관계에 유의할 만한 변화가 없었다
2. SEB, LPS 및 SEB와 LPS의 병용한 각각을 세가지 모든 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 않았다.
3. 치은 섬유아 세포에서 독소 작용시 3일, 5일째에 세포의 증식 억제가 일어난 사실과 독소를 단독 혹은 병용 작용시켰을 경우에도 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 증가한 사실을 볼 때, 치은 섬유아 세포는 어떠한 구강내 감염에서도 섬유아 세포의 증식과 증가된 세포의 기질의 침착을 통한 섬유화로 감염의 조절에 유리한 상태를 알 수 있었다.
4. 안면 진피 섬유아 세포에서 독소 작용시 세포의 증식이 배양 초기에 억제되고 SEB에 대한 TGF- β 의 생성이 유의할 만하게 감소되었다. 따라서, 안면 진피 섬유아 세포는 그램 양성 세균의 감염시 감염의 계속적인 진행으로 조직의 피사를 초래할 수 있음을 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 그램 음성이나 혼합균의 감염에서는 감염 조절에 불리하지 않을 것으로 사료되었다.

그러므로, 치은 및 안면 진피 섬유아 세포는 각각 작용시킨 인자와 시간에 따라 다양한 량의 TGF- β 를 분비하여 급성 진행성 감염의 조절에 관여하며 서로 다른 표현형을 나타냄을 알 수 있었다. 본 연구에서 저자 등은 세균의 독소 존재시 섬유아 세포의 증식과 TGF- β 의 생성을 관찰하여 본 바, 비록 이러한 결과들이 생체내의 복잡한 환경을 반영

하지 않은 생체외에서 배양한 섬유아 세포에서 얻어진 결과이지만, 이 둘의 상호 관계를 조화롭게 이해함으로써 향후 감염의 조절에 관한 유용한 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kingsley DM : The TGF- β supefamily : New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes Dev 8:133, 1994.
- Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, et al : 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 79:1285, 1987.
- Kojima S, Rifkin DB : Mechanism of retinoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. J Cell Physiol 155:323, 1993.
- 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.
- 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.
- Lawrence DA : Transforming growth factor-beta: a general review. Eur Cytokine Netw 236:363, 1996.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Roberts AB, Sporn MB : In Peptide Growth Factors and their Receptors(eds Sporn MB, Roberts AB). Springer-Verlag, Heidelberg p421, 1990.
- 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.
- 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.
- Moses HL, Tucker RF, Leof 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.
- Diegelmann RF : Cellular and biomechanical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. J Urol 157:298, 1997.
- Derynck R : Transforming growth factor-beta. In: Thomson A, eds. The Cytokine Handbook, p319, 1994.
- Ignatz 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.
- Matrisian LM : The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays 14:455, 1992.
- 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.
- Colletti LM, Kunkel SL, Strieter RM : Cytokines. In: Greenfield LJ, Mulholland M, OIdhan KT, Zelenock GB, Lillemoe KD, eds. Surgery: scientific principles and practice. New York, Lippincott Raven p125, 1997.
- Wolf JE, Rabinowitz LG : Streptococcal toxic shock-like syndrome. Arch Dermatol 131:73, 1995.
- de Kossodo S, Cruz PD Jr, Dougherty I, Thompson P, Silva-Valdez M, Beutler B : Expression of the tumor necrosis factor gene by dermal fibroblasts in response to ultraviolet irradiation or lipopolysaccharide. J Invest Dermatol 104:318, 1995
- 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.
- Spillert CR, Sun S, Ponnudurai R, Miller MA, Lazaro EJ : Tumor necrosis factor-induced necrosis: a monocyte-mediated hypercoagulable effect. J Natl Med Assoc 87:508, 1995.
- Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM : The role of macrophages in wound repair: a review. Plast Reconstr Surg 68:107, 1981.
- Folkman J : Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 43:175, 1985.
- Folkman J, Kagsbrun M : Angiogenetic factors. Science 235:442, 1987.
- Leibovich SJ, Weisman DM : Macrophages, wound repair and angiogenesis Prog Clin Biol Res 266:131, 1988.
- McGrath MH : Peptide growth factors and wound healing.

- Clin Plast Surg 17:421, 1990.
35. Graves DT, Cochran DL : Mesenchymal cell growth factors. *Grit Rev Oral Biol Med* 1:17, 1990.
 36. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN : Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 84:640, 1989.
 37. Sporn MB, Roberts AB : Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119:1017, 1992.
 38. Roberts AB, Sporn MB : Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta. *Growth Factors* 8:1, 1993.
 39. Nathan C, Sporn M : Cytokines in context. *J Cell Biol* 113:981, 1991.
 40. 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
 41. Clark RA : Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol* 19:693, 1993.
 42. Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR : Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 113:261, 1983.
 43. Seppa HEJ, Grotendorst GR, Seppa SI, Schiffman E, Martin GR : Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 92:584, 1982.
 44. 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-1 expression in normal and hypertrophic scar fibroblasts. *J Invest Dermatol* 104:118, 1995.
 45. LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL : An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest* 87:39, 1991.
 46. Huang SS, O'Grady P, Huang JS : Human transforming growth factor beta, alpha 2-macroglobulin complex is a latent form of transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 263:1535, 1988.
 47. LaMarre J, Wollenberg GK, Gonias SL, Hayes MA : Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. *Lab Invest* 65:3, 1991.
 48. Birkinshaw R, O'Donnell J, Sammy I : Necrotizing fasciitis as a complication of steroid injection. *J Accid Emerg Med* 14:52, 1997.
 49. Tam BY, Philip A : Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA is down-regulated in human dermal fibroblasts by dexamethasone: differential regulation by TGF-beta. *Growth Factors* 176: 151, 1995
 50. Sakai H, Fukami Y, Ibe M, Tamura T, Hashimoto Y, Iizuka H : A verrucous lesion in skin grafted after necrotizing fasciitis in a diabetic patient successfully treated with combined topical 5-FU and tacalcitol. *J Dermatol* 24:573, 1997.
 51. Holder Ep, Moore PT, Browne BA : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and necrotizing fasciitis. An update. *Drug Saf* 17:369, 1997.
 52. Henrich DE, Smith TL, Shockley WW : Fatal craniocervical necrotizing fasciitis in an immunocompetent patient: a case report and literature review *Head and Neck* 17:351, 1995.
 53. Rook Graham : Cell-mediated immune responses. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*, eds. London, Gower Medical 9:11, 1989.
 54. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA : Transforming growth factor-beta 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.
 55. Murphy-Ullrich, JE, Schultz-Cherry S, Hook M : Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Molec Biol Cell* 3: 181, 1992.
 56. 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.
 57. 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.
 58. 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.
 59. Damsky CH, Werb Z : Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix. cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 4:772, 1992.
 60. 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 Periodontal Res* 30:382, 1995.

저자연락처

우편번호 602-032
부산시 서구 암남동 34
고신대학교 의학부 치과학교실 구강약안면외과
이 성 근

원고 접수일 1999년 12월 06일
게재 확정일 1999년 12월 24일

Reprint requests

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

Paper received 6 December 1999
Paper accepted 24 December 1999