

Oncostatin M이 피부섬유모세포의 증식과 기질생성에 미치는 영향

전경욱¹ · 임형우² · 한승규² · 김우경²

단국대학교¹, 고려대학교² 의과대학 성형외과학교실

Effect of Oncostatin M on Proliferation and Matrix Synthesis of Dermal Fibroblasts

Kyung Wook Chun, M.D., Ph.D.¹, Hyung Woo Lim, M.D.²,
Seung-Kyu Han, M.D., Ph.D.²,
Woo Kyung Kim, M.D., Ph.D.²

Department of Plastic Surgery, ¹Dankook University, ²Korea University College of Medicine

Purpose: Oncostatin M(OSM) is a multifunctional cytokine that belongs to the interleukin(IL)-6 family. Although there have been a number of studies that focused on the role and mechanism of OSM in various organs and tissues, there are few reports on its effect on wound healing. The final purpose of this project is to evaluate the effect of OSM on wound healing. This pilot study was designed to investigate the effect of OSM on proliferation and matrix synthesis of human dermal fibroblasts, which are the major components of the wound healing.

Methods: Excess skin that was obtained from patients who underwent skin grafts, was used for this study. From this material, fibroblasts were isolated and cultured. The cultured fibroblasts were treated with one of four concentrations of OSM. The OSM concentrations used were 0, 50, 100, and 200 ng/ml, respectively. After the OSM treatment, cell proliferation was determined by the MTT assay, collagen synthesis by the C1CP method, GAG levels by the Blyscan Dye method. The parameter levels of each group were compared.

Results: OSM treatment increased all the components tested in the study. In particular, cell proliferation, GAG synthesis demonstrated statistically significant increases($p < 0.05$ in the Mann-Whitney U-test). The highest increase in all the components was obtained at a 100 ng/ml concentration of OSM.

Conclusion: The results of the present study indicate that OSM stimulates proliferation and matrix synthesis of human dermal fibroblast and the optimal concentration for wound healing is 100 ng/mL.

Key Words: Oncostatin M, Dermal fibroblasts

I. 서 론

Oncostatin M(OSM)은 염증질환에서 주로 나타나는 것으로 알려진 IL-6 계열의 사이토카인(cytokine)으로, 이 계열에는 IL-6뿐 아니라 IL-11, 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor; LIF), 섬모 신경성 인자(ciliary neurotrophic factor; CNTF), Cadiotrophin-1(CT-1) 등이 속하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵ OSM은 초기에는 A375 흑색종과 다른 종류의 배양된 종양세포의 성장억제인자로 알려져 있었지만, 최근의 연구에서 보면 섬유모세포를 포함한 여러 세포간의 상호작용에도 관여하는 등 그 기능이 다양하다는 것(pleotropic)이 밝혀지고 있다.²

OSM의 여러 기능 중 특히 창상치유와 관련될 수 있는 흥미로운 연구결과들이 발표된 바 있다. Scaffidi 등에 의하면 OSM은 인간의 폐 섬유화에서 교원질의 유도과 증식을 자극한다고 보고하고 있으며, 쥐를 대상으로 한 다른 연구에서는 OSM의 과발현이 폐실질의 세포외기질 내에서 교원질의 생성을 증가시킨다고 보고하고 있다.⁴ 그 외에도 OSM은 인간의 폐나 윤활막의 섬유모세포 배양에서 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMPs-1)를 증가시키며, TIMPs-1와 Matrix metalloproteinases(MMPs)의 반응을 조절함으로써 폐섬유화에 연관되는 것으로 알려져 있다.^{5,6}

OSM의 이러한 기능들은 폐조직에는 바람직하지 않은 작용을 나타내는 원인물질이 되지만 피부에서 창상치유라는 측면에서 볼 때는 교원질합성을 증가시킴으로써 창상치유에 도움이 될 수도 있다. 그러나 OSM이 창상치유에 미치는 영향에 대한 연구는 발표된 바

Received November 23, 2007

Revised February 5, 2008

Address Correspondence: Seung-Kyu Han, M.D., Ph.D.,
Department of Plastic Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: 02) 2626-3333 / Fax: 02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

없다.

따라서 저자들은 OSM의 창상치유에 대한 효과를 알아보고자 연구를 계획하였으며, 이번 연구는 일차적으로 OSM의 투여가 창상치유에 있어 가장 중요한 역할을 담당하는 진피섬유모세포의 기능에 미치는 영향을 조사해보고자 한다. 특히 창상치유 비교의 중요한 요소인 진피섬유모세포의 증식, 교원질 합성, 그리고 당아미노글리칸(Glycosaminoglycan; GAG) 합성에 OSM의 효과 및 적정농도를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 인간 진피 섬유모세포의 분리 및 배양

피부이식을 받은 총 6명의 환자의 이식 후 남은 여분의 피부를 사용하였다. 채취 전 환자에게 연구에 대한 충분한 설명을 하였고, 이에 동의를 얻었다. 이렇게 얻은 피부조직에서 표피를 제거한 후 이를 2×1 mm로 잘게 잘라내어 절편을 만들었다. 이 조직들을 10% 태아우혈청(Fetal bovine serum; GIBCO; Grand Island, NY, U.S.A.)을 포함한 3 mL의 Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F-12 Nutrient(DMEM/F-12; GIBCO; Grand Island, NY, U.S.A.)가 담긴 100 mm의 조직배양용기의 표면에 일정하게 펼쳤다. 배양용기를 37°C에서 24시간 놓아 배양용기에 진피조직이 잘 붙도록 하였다. 이후 10%의 태아우혈청과 25 µg/mL의 gentamycin이 포함된 12 mL의 DMEM/F-12 Nutrient을 첨가하고 다시 배양하였다. 모든 배양과정은 온도 37°C, 5% CO₂, 100% 습도로 유지하였다. 충분한 양의 섬유모세포가 배양되면 트립신처리(trypsinization)로 세포들을 유리한 후, 유리된 세포들은 Mg²⁺과 Ca²⁺이 제거된 Dulbecco phosphate-buffered saline(DPBS; GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)로 2.7배 희석 한 후 17분 동안 450 × g의 속도로 원심침전 하였다. 40 mL의 DPBS로 두 번 세척 한 후에 다시 5 mL의 DPBS에 재 부유시킨 후 100-µm의 nylon mesh를 이용하여 여과시키고 추출하였다. 세포의 밀도는 hemocytometer를 이용하였고, 세포 생존률은 trypan blue dye exclusion assay를 이용하였다. 총 2회 계대 배양된 세포가 이번 연구에 사용되었다.

나. OSM의 처리

제조한 인간 OSM은 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)사의 것을 사용하였다. 세포증식의 분석을 위해 배양된 섬유모세포는 5% FBS가 포함된 DMEM/F-12를 넣은 96 well의 배양판에 well당 3.3×10^3 개의 세포를 분주하

였다. 모든 세포는 온도 37°C와 5% CO₂와 100% 습도로 유지하였으며 24시간 후 각각의 well에 0, 50, 100, 200 ng/mL농도의 OSM을 처리하였다. OSM 처리 후 배양판은 다시 온도 37°C와 5% CO₂와 100% 습도로 유지하였다.

교원질 합성과 GAG의 합성량을 알아보기 위해 배양된 섬유모세포는 5% FBS가 포함된 DMEM/F-12를 넣은 6 well의 배양판에 well당 4.4×10^4 개의 세포를 분주하였다. 마찬가지로 이 배양판도 온도 37°C와 5% CO₂와 100% 습도로 유지하였으며 24시간 후 각각의 well은 앞서와 마찬가지로의 농도의 OSM으로 처리하였다.

OSM 처리 48시간 후 세포증식과 교원질 및 GAG 합성도를 측정하였다.

다. 세포증식의 측정

세포의 증식은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT; Sigma) assay를 하여 측정하였다. 요약하면, 5 mg/mL 농도의 MTT 10 µL를 96-well 배양판의 100-µL cell의 monolayer에 첨가하였다. 이후 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 다음 0.04-M HCl in propan-2-ol 100 µL를 각각의 well에 첨가하고 불용성 blue formazan crystals에 녹이기 위해 완전히 혼합하였다. 흡광도측정은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 570 nm의 시험 파장으로 측정 후, 630 nm의 표준 파장으로 측정하였다.

라. 교원질 합성의 측정

교원질 합성의 측정은 제조사의 설명서에 따라 Metra C1CP kit(Quidel; San Diego, CA, USA)의 collagen type I carboxy-terminal propeptide enzyme immunoassay를 이용하였다. 요약하면, 희석된 배양 상청액 10 µL을 monoclonal anti-C1CP antibody로 처리된 배양판에 첨가하고 상온에서 2시간 배양하였다. 이후 100 µL의 rabbit anti-C1CP antisera를 50분간 첨가하고 이어서 100 µL의 goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugates를 50분간 첨가하였다. 모든 반응이 종료된 후, 교원질 합성정도는 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. GAG의 측정

GAG의 측정은 제조사의 설명서에 따라 Blyscan Dye Reagent™(Biocolor Ltd.; Newtownabbey, Northern Ireland)를 이용하여 측정하였다. 황화 GAG(sulfated GAG)의 양을 측정하는 방법인데, 요약하면 100 µL의

희석 배양 상청액과 1 ml의 염색 시약을 1.5 mL의 마이크로 원심분리기 시험관(microcentrifuge tube)에 첨가하고 30분간 혼합하였다. 불용성인 GAG 염색 시약 복합체(glycosaminoglycan-dye complex)가 형성된 후 시험관을 10분간 1,000 × g의 속도로 원심분리하였다. 상청액을 버린 후 1 mL의 Blyscan Dissociation Reagent (Biocolor Ltd)를 각각의 시험관에 첨가하고, 656 nm 파장의 spectrophotometer를 이용하여 수치를 측정하였다.

바. 통계처리

변수자체의 분석은 Kruskal-Wallis analysis를 이용하였다. Kruskal-Wallis analysis에서 통계적 유의성을 가진 실험값 간의 분석은 Mann-Whitney U-test를 이용하여 분석하였다. 결과는 평균과 표준분포로 나타냈으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 분석하였다. 실험값은 SPSS 13.0 software를 이용하여 분석하였다.

III. 결 과

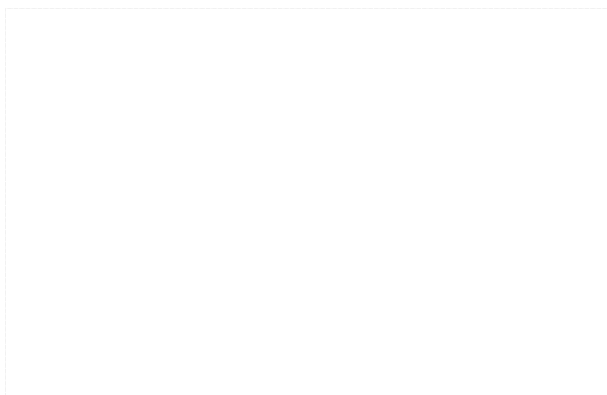
가. 세포증식

세포증식은 대조군에 비해 OSM 처리한 군에서 유의

Table I. Test Statistics for Analysis of Variance*.**

	<i>p</i> -value
Number of cell	0.032
Collagen	0.180
Glycosaminoglycan	0.006

*: kruskal wallis test
 *.: grouping variable: OSM
 †: $p < 0.05$



*: $p < 0.05$ compared with control group.
 Fig. 1. OSM Stimulates fibroblast proliferation.

하게 높게 나타났다($p = 0.032$, Kruskal-Wallis test). 최대치는 100 ng/mL의 OSM 농도에서 나타났는데 대조군에 비해서는 유의한 통계적 차이를 보였으나 다른 농도의 OSM 처리군과는 유의한 차이는 없었다(Table I, Fig. 1).

나. 교원질 합성

합성된 교원질의 양은 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL 농도에서 대조군에 비해 각각 12%, 18%, 16% 증가하였다. 하지만 대조군과 OSM 처리군 사이에 유의한 통계적 차이를 보이지 않았다($p = 0.180$)(Table I, Fig. 2).

다. GAG 합성

GAG 합성은 대조군에 비해 OSM 처리한 군에서 유의하게 높게 나타났다($p = 0.006$, Kruskal-Wallis test)

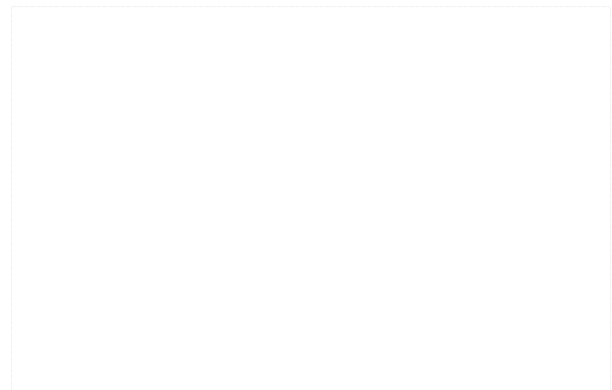
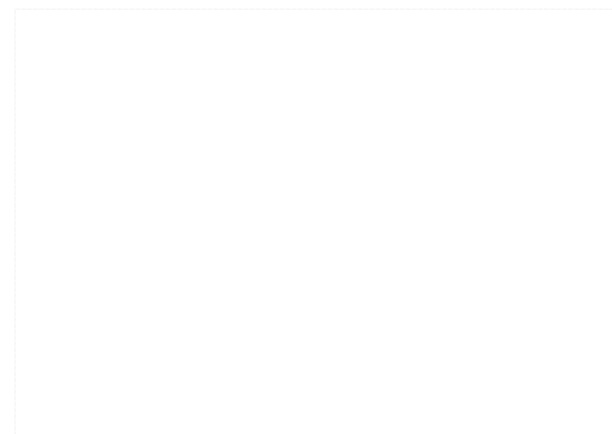


Fig. 2. Effect of OSM on collagen production by dermal fibroblasts.



* : $p < 0.05$ compared with control group.
 Fig. 3. Effect of OSM on glycosaminoglycan production by dermal fibroblasts.

(Table I, Fig. 3). 최대치는 100 ng/mL에서 나타났고, OSM 처리군 내에서도 최소치 50 ng/mL와 최대치 100 ng/mL 사이에 통계적으로 의미있는 차이가 나타났다 ($p=0.041$).

IV. 고 찰

창상치유는 지혈로부터 시작하여 제한적인 염증 단계, 육아조직형성과 상피화 단계, 이어서 반흔 형성과 재형성 단계로 진행된다. 이러한 과정 중에서 섬유모세포는 결손 부위의 복원에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 창상치유의 전 과정에 걸쳐 각 단계를 조절하는 역할을 담당한다.

섬유모세포는 세포증식과 염증반응을 조절하고, 교원질 합성에 관여하며, 혈관생성을 유도하는 다양한 cytokine과 창상치유를 촉진하는 전환 성장인자- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$: TGF- $\beta 1$), 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor: PDGF), 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor: FGF), 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor: VEGF) 등의 성장인자를 분비한다. 또한, 창상주변의 섬유모세포는 대식세포가 분비하는 TGF- $\beta 1$ 의 영향을 받아 근섬유모세포(myofibroblast)로 분화를 한 후, α -평활근 가는근육미세섬유(α -smooth muscle actin: α -SMA)를 합성, 분비하여 창상구축과 재형성 단계에서 핵심적인 역할을 담당한다.

성장인자의 창상치유 촉진에 대한 연구는 계속 되어지고 있으며, 이러한 연구들의 결과로 성장인자를 이용한 창상치유 촉진제들이 상업화되어 나오고 있다. 최근 Regranex(OMJ Inc.; San German, Puerto Rico)나 Easyef(Daewoong Inc.; Seoul, Korea)와 같은 국소도포용 성장인자가 상품화되어 실제 임상에 쓰이고 있다. Regranex는 섬유아세포내의 PDGF의 isomer인 PDGF-BB의 재조합체를 함유하고 있으며,⁷ Easyef는 재조합된 인간 표피성장인자(recombinant human epidermal growth factor)를 함유하고 있다.⁸ 그러나 이러한 상품화된 제제는 창상치유에 크게 긍정적인 효과를 보이지는 않는 것 같다. 성장인자 자체가 불안정한 물질이며 창상에 일정 농도로 머물 수 있는 환경의 형성에 어려움이 많은 이유도 있겠지만 염증단계에 머물러 있는 만성창상들에 이런 제품들을 사용하는 경우가 많기 때문인 것도 중요한 원인이 된다. 따라서 항염증효과가 있는 성장인자가 있다면 만성창상의 치유에 획기적인 결과를 가져올 수도 있다고 사료된다. Wallace 등은 싸이토카인으로서 OSM의 항염증효과를 *in vivo* 실험을 통

하여 이미 보고하고 있다.⁹ OSM이 창상치유를 촉진한다는 것만 입증되면 향후 만성창상의 치유에 성공적인 치료법으로 사용될 수도 있다는 가정하에 본 연구를 계획하였다. 이번 연구결과 일단 정상세포의 *in vitro* 상에서는 기대할 만한 수준의 가능성을 보였다고 판단된다.

Oncostatin M(OSM)은 폐의 섬유화에 관여한다는 것으로 밝혀진 이후, 폐세포와 간세포의 생리학, 병리학, 면역학적 연구가 활발히 진행 중인 cytokine이다. OSM은 28,000 Da의 glycoprotein이며,¹⁰ gp130^{4,11,12}을 포함한 OSM 수용체를 통하여 세포 내 신호를 활성화시켜 세포의 전반적인 기능에 영향을 주고, CRP, fibrinogen과 같은 급성기반응물질(acute phase reactants)로서 작용하여 감염과 여러 손상에 작용하며, *in vivo*와 *in vitro*에서 다양한 생물학적 반응을 보인다. 이러한 반응은 OSM이 유전자 활성화나 세포생존, 증식, 분화와 같은 복잡한 세포기능의 조절에 중요한 역할을 한다는 걸 시사한다.^{9,10} OSM은 프로스타글란딘 E₂ (prostglandin E₂: PGE₂)와는 별도의 경로로 폐의 섬유모세포를 자극하여 간세포성장인자(hepatocyte growth factor: HGF)의 분비를 조절하며,¹³ 또한 혈관내피세포, 형질세포종, 섬유모세포 계열의 증식을 촉진하고, TIMPs-1과 MMPs 사이의 반응을 조절하여 폐섬유화에 영향을 미치기도 한다. Bamber 등⁶의 실험에 의하면, 인위적으로 결합조직병(connective tissue disease)을 유도한 유전자 조작 쥐(transgenic mice)의 췌장 모델에서 OSM 실험군이 대조군에 비해 현저한 섬유화와 교원질 형성을 보였다. 하지만 광학현미경과 관찰한 결과이고, 섬유화의 정도와 교원질 합성의 정도를 실험군과 대조군 사이의 2차원적인 면적 비교로 결과를 도출했을 뿐 정량적인 분석이 없어서 그 연구의 한계가 있다. 또한, 교원질 합성의 가장 중요한 역할을 하는 섬유모세포의 활성화나 증식에 대한 연관성 역시 언급되어 있지 않다. Ihn과 Tamaki의 연구에 의하면 OSM이 진피섬유모세포의 증식에 영향을 준다고 보고하고 있다.¹⁴ 그러나 이 연구는 창상치유에 직접적인 영향을 주는 교원질과 세포외바탕질(extracellular matrix)합성, 성장인자의 분비 등에 대한 결과는 없어서 창상치유의 연관성 내지는 인과 관계를 설명한 연구라고는 할 수 없으며, 결과 또한 본 연구의 적정농도와는 다른 결과가 도출되었다. 또한 Duncan 등의 연구에서는 적정농도에 관한 언급이 없으며, 주안점이 켈로이드 등의 비정상적인 섬유모세포와의 비교이다.¹⁵

위에서 언급한 논문들과 차별화를 두어 OSM의 여러

작용이 창상치유에 가장 중요한 역할을 하는 진피섬유모세포에게도 효과가 있을 것인가를 알아보려고 각각도의 종합적 연구를 시행하였다. 창상치유 과정에서 진피섬유모세포의 세포증식이나 교원질과 GAG의 합성은 창상치유 단계 중 실제 결손 부위를 채우게 되는 증식 단계에서 중요한 과정이기 때문에 기존에 발표된 여러 논문과는 차별화를 두어 각각도로 알아보는 실험을 구상하였다. 또한 차후의 후속 실험 및 임상에서의 이용 등에 계속 적용하기 위한 적정 농도를 구하는 실험 모델도 설계하게 되었다.

결과에서 보듯이 세포증식, 교원질 생성 및 GAG 합성 등 실험한 모든 요소에서 OSM의 투여는 대조군에 비해 훨씬 우수한 효과를 보였다. 특히, 세포증식과 GAG 합성에서는 통계적으로도 유의한 차이가 있었다. 또한 각 실험에서 100 ng/mL는 창상치유에 가장 적합한 OSM의 농도였으며, 그 다음으로는 200 ng/mL이 50 ng/mL보다 더 나은 결과를 보였다. 이에 OSM 100 ng/mL의 농도가 창상치유에 가장 적합한 농도라고 사료된다.

본 연구결과, OSM은 창상치유 촉진에 무한한 잠재력을 가지고 있다고 사료되며 이러한 OSM의 창상치유에의 효과를 좀 더 명확하게 규명하기 위해서는 OSM이 진피섬유모세포의 기능을 향진 시키는 기전, 예를 들면 창상치유를 촉진시키는 성장인자의 합성도나 수용체에 대한 연구를 포함한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 창상치유를 위해 사용하는 사이토카인 등은 궁극적으로는 당뇨병성 족부궤양이나 욕창과 같은 만성창상 환자의 창상치유에 도움을 주기 위해 개발되는 치료제이므로 이들 만성창상의 치료에 있어서의 효과 등에 관한 추가연구도 필요할 것으로 사료된다. 이번 실험은 정상세포의 효과를 입증하기 위한 *in vitro* 실험이었다. 만성창상의 섬유모세포에 대한 효과 입증을 위한 실험 및 *in vivo* 실험과 임상적 사용에 대한 안정성에 대한 연구도 진행되어야 하겠다.

V. 결 론

OSM의 투여는 *in vitro* 상에서 창상치유의 중요한 지표인 진피섬유모세포의 증식과 교원질 합성, GAG 합성을 촉진한다. 특히 세포증식과 GAG 합성에는 통계학적으로 의미있는 증가치를 보였다. 또한 OSM의 창상치유에 가장 적합한 농도는 100 ng/mL이다.

REFERENCES

- Hibi M, Nakajima K, Hirano T: IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 74: 1, 1996
- Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H: Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 139: 2977, 1987
- Scaffidi AK, Mutsaers SE, Moodley YP, McAnulty RJ, Laurent GJ, Thompson PJ, Knight DA: Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* 136: 793, 2002
- Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, Cosman D: Dual oncostatin M(OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271: 32635, 1996
- Richards CD, Shoyab M, Brown TJ, Gaudie J: Selective regulation of metalloproteinase inhibitor(TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* 150: 5596, 1993
- Bamber B, Reife RA, Haugen HS, Clegg CH: Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. *J Mol Med* 76: 61, 1998
- Embil JM, Papp K, Sibbald G, Tousignant J, Smiell JM, Wong B, Lau CY: Recombinant human platelet-derived growth factor-BB(becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. *Wound Repair Regen* 8: 162, 2000
- Kano M, Masuda Y, Tominaga T, Hori T, Kitaichi T, Yoshizumi M, Kitagawa T: Collagen synthesis and collagenase activity of cryopreserved heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122: 706, 2001
- Wallace PM, MacMaster JF, Rouleau KA, Brown TJ, Loy JK, Donaldson KL, Wahl AF: Regulation of inflammatory response by oncostatin M. *J Immunol* 162: 5547, 1999
- Gómez-Lechón MJ: Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci* 65: 2019, 1999
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1, 2003
- Finelt N, Gazel A, Gorelick S, Blumenberg M: Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to Oncostatin-M. *Cytokine* 31: 305, 2005
- Cohen M, Marchand-Adam S, Lecon-Malas V, Marchal-Somme J, Boutten A, Durand G, Crestani B, Dehoux M: HGF synthesis in human lung fibroblasts is regulated by oncostatin M. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: 1097, 2006
- Inh H, Tamaki K: Oncostatin M stimulates the

- growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 165: 2149, 2000
15. Duncan MR, Hasan A, Berman B: Oncostatin M stimulates collagen and glycosaminoglycan production by cultured normal dermal fibroblasts: insensitivity of sclerodermal and keloidal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 104: 128, 1995