

Lipopolysaccharide로 자극시킨 방사선 조사 치은 섬유아 세포에서 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor와 transforming growth factor- β 1 생성

김홍식 · 이성근* · 김광혁** · 김육규 · 김종렬 · 정인교 · 양동규

부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 이화여자대학교 의과대학 치과학교실*

고신대학교 의학대학 미생물학교실**

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:169-174)

PRODUCTION OF GM-CSF AND TGF- β 1 IN IRRADIATED HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS CULTURED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE

Hong-Sik Kim, Seong-Geun Lee*, Kwang-Hyuk Kim**, Uk-Kyu Kim,

Jong-Ryoul Kim, In-Kyo Chung, Dong-Kyu Yang

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

*Department of Dentistry, College of Medicine, Ewha Womans University**

*Department of Microbiology, College of Medicine, Kosin University***

Purpose: Irradiation in the oral cancer patients causes early and late complications such as intraoral mucositis and fibrosis, with a various expression of GM-CSF and TGF- β . The purpose of this study was to investigate the production of GM-CSF and TGF- β 1 by the irradiated human gingival fibroblasts cultivated with lipopolysaccharide.

Materials and Methods: Irradiated (total dose, 60 Gy) human gingival fibroblasts were incubated with LPS. Culture supernatants that were collected at 24, 48, and 72 hours were assessed for GM-CSF and TGF- β 1 by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: 1. GM-CSF production in normal gingival fibroblasts was increased with incubation time, but decreased with incubation time in irradiated gingival fibroblasts. GM-CSF production in both normal and irradiated gingival fibroblasts induced with LPS was higher than the control. 2. TGF- β 1 production in normal gingival fibroblasts was decreased after 24 hours, but, it was increased until 48 hours in irradiated gingival fibroblasts. TGF- β 1 production in normal gingival fibroblasts exposed with LPS was higher than the control. Conversely, it was lower than the control in irradiated gingival fibroblasts exposed with LPS.

Conclusion: This indicates that irradiation in gingival fibroblasts may play an important role in radiation-induced intraoral mucositis and fibrosis. However, LPS decreases the production of TGF- β 1 in the irradiated gingival fibroblasts.

Key words : Gingival fibroblasts, Irradiation, lipopolysaccharide

I. 서 론

사이토카인은 염증과 면역 반응, 창상 치유, 세포의 분화와 증식 및 형태 유도, 신생 혈관 형성과 암 발생 등 다양한 기능에 관여하는 고분자 폴리펩타이드로 대부분의 세포에서 분비되어 이들 세포들과 자기 자극 인자 혹은 인접 자극 인자 형태로 작용하는 화학적 신호 인자이다.

먼저, 분자량 14.5-34 kilo-dalton(KD)의 폴리펩타이드인 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)는 활동성의 T 임파구와 B 림프구, 대식세포, 비만세포, 내피세포, 및 섬유아 세포 등에서 합성되어 조혈 세포의 증식, 성숙, 및 기능을 자극하여 다양한 세포로 분화시키는 다형질 발현성 사이토카인이다. 성숙된 조혈세포에서 GM-CSF는 호중구나 호산구를 활성화시켜 superoxide 생성, leukotriene 합성, 및 arachidonic acid 방출 등을 증가시키고, 호염구로부터 히스타민 방출을 증가시키고 단핵구로부터 interleukin-1이나 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 같은 사이토카인의 생성을 유도한다²⁾. 또한 암세포에 대한 대식세포, 호중구, 및 호산구의 항체 의존성 세포 독성능을 증가시킨다^{3,4)}. 특히, 항암 화학 요법 후 골수억제를 보이는 환자에서 GM-CSF 주입 후 백혈구 생성을 촉진시키며⁵⁾, 방사선 조사와 동시에 GM-CSF를 주입하면 방사선 조사시 빈발하는 구내 점막염과 이로 인한 불

이성근

110-783, 서울시 종로구 종로 6가 70

이화여자대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

Seong-Geun Lee

Dept. of Dentistry College of Medicine, Ewha Womans University

70 Chongro 6-ga, Chonro-Gu, Seoul, 110-783, KOREA

Tel : 82-2-760-5159, 5384 Fax : 82-2-763-8703

E-mail: omslee@ewha.ac.kr

편감을 유의할 만하게 완화시킬 수 있음을 알 수 있다⁷.

한편, transforming growth factor- β 1(TGF- β 1)는 분자량 25 KD의 다이머 구조의 단백질로서 조혈기원의 염증세포와 비조혈기원의 섬유아세포, 상피세포, 평활근세포, 및 내피세포 등 대부분의 세포에서 분비된다. TGF- β 1은 세포의 종류와 주변 환경에 따라 그 기능이 다양하다. 먼저, TGF- β 1은 호중구, 단핵구 등 염증 세포의 효과적인 화학 주성제로서 염증 반응의 기시와 증폭 및 조절에 중요한 역할을 한다. 또한 손상 부위 세포의 기질 성분의 주요 세포 기원인 섬유아 세포의 주입을 위한 효과적인 화학 주성제로서 섬유아 세포에 작용하여 콜라겐, 피브로넥틴, 티네이신 등 세포의 기질의 합성과 분비를 유도하고 기질 단백 분해 효소의 생성 및 단백 분해 효소 억제제의 생성을 촉진하여 세포의 기질을 축적한다⁸. 만약, TGF- β 에 의해 사이토카인들이 잘 조절되지 않으면, 이것의 과잉 활동으로 창상 부위에 너무 많은 콜라겐의 침착으로 인한 비후성 반흔이나 킬로이드와 같은 섬유 증식성 장애를 초래할 수 있다^{9,10}. *Ilisley* 등¹¹은 방사선 조사를 받은 피부 섬유아 세포에서 TGF- β 1에 의한 콜라겐 생성의 증가를 보고하였다.

이에 본 연구에서는 정상 치은 섬유아 세포를 대조군으로, 방사선을 조사 받은 구강암 환자에서 채취한 치은 섬유아 세포를 실험군으로 하여 그람 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide(LPS) 노출시켜 생체외에서 배양시켰을 때 생성되는 GM-CSF와 TGF- β 1를 정량적으로 분석하여 정상 치은 섬유아 세포와 방사선 조사 치은 섬유아 세포에서 세균 독소를 작용시 사이토카인의 생성에 미치는 영향에 대해 알아보려 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 치은 섬유아 세포의 배양

정상인과 X-선에 조사된 환자(총 조사량: 60 Gy)의 치은 조직 절편 2~5 mm³를 각각 무균적으로 생검하여 1 mm³ 크기로 절편한 후 10% 우태아 혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 함유 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, Grand Island, USA) 2 ml를 적하한 60 mm 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. 3주 후에 배양용 접시 전체에 단층으로 형성된 섬유아 세포로부터 배지를 흡입하여 버리고 phosphate buffered saline(PBS)로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3 ml를 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 사이토카인을 측정하기 위해 박리된 세포들은 10% FCS EMEM에 재부유시켰다.

2. 세균 독소하의 GM-CSF와 TGF- β 1의 생성

사용된 독소로는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리 정제된 제품(Sigma Cat. L8274, St. Louis, USA)인 LPS를 사용하였다.

먼저 부유시킨 치은 섬유아 세포(2.5×10⁵/ml) 1 ml 씩을 24 wells 배양용 plate(Corning, NY, USA)에 분주한 후 ml 당 LPS 0.01, 0.1 및 1.0 μ g을 작용시켰다. 대조군은 LPS를 작용시키지 않았다. 이들을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24, 48 및 72 시간 동안 배양하여 배양 상층액을 수거하였다. 용량별 시험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양 상층액은 300 g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하면서 GM-CSF와 TGF- β 1 생성 효과 측정에 사용하였다.

3. GM-CSF 측정

GM-CSF의 측정은 Quantikine[®] Human GM-CSF ELISA kit (R & D, Minneapolis, USA)을 이용하였으며 간략하면 다음과 같다. 미리 GM-CSF에 대한 단일 클론 항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 희석액 100 μ l 씩 작용시킨 다음 시료 100 μ l 씩 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 horse radish peroxidase가 접합된 항체액 200 μ l 씩 적하하여 다시 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 기질액 200 μ l 씩을 적하하여 다시 실온에서 20분 동안 방치하였다. 여기에 stop 액 50 μ l 씩 가하였다. 각 well의 optical density(OD)를 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 표준곡선의 작성을 위한 시험도 동시에 시행하였다.

4. TGF- β 1 측정

비활성 상태의 표준 TGF- β 1과 시료의 활성화를 위하여 표준 TGF- β 1 (100 ng/ml) 20 μ l와 배양 상층액 200 μ l 씩을 각각 취하여 희석액으로 희석한 다음 1N HCl을 작용시킨 후 1N NaOH로 중화시켰다. TGF- β 1의 측정에는 사람 TGF- β 1 DuoSet ELISA kit (R & D, Minneapolis, USA)을 이용하였다. 먼저 미리 TGF- β 1에 대한 단일 클론 항체를 96 wells microplate에 100 μ l 씩 적하하여 4°C 냉장고에서 18시간 방치한 후 세척용 완충액으로 충분히 세척하였다. 1% 우혈청 알부민이 포함된 용액을 250 μ l 씩 각 well에 가한 후 37°C에서 2시간 동안 방치한 다음 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 활성화된 시료를 100 μ l 씩 적하하여 37°C에서 방치하였다. 그 후 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 horse radish peroxidase가 접합된 항체액을 100 μ l 씩 적하하여 다시 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 이를 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 기질액인 tetramethylbenzidine과 hydrogen peroxide을 100 μ l 씩 적하하여 다시 실온에서 10분 동안 방치한 다음 stop액인 2N H₂SO₄을 100 μ l 씩 가하였다. OD는 상동의 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 이때 표준 곡선의 작성을 위한 시험도 동시에 시행하였다.

5. 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군간

의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 미만일 때 유의 있는 것으로 간주하였다.

III. 연구 결과

정상 치은 섬유아 세포군과 X-선 조사 치은 섬유아 세포군에서 LPS 자극시 세포로부터 유출된 GM-CSF와 TGF- β 1을 정량 분석한 결과는 다음과 같다.

1. GM-CSF 생성

정상 치은 섬유아 세포 배양에서의 GM-CSF 생성은 시간이 경과되면서 증가하는 양상을 나타낸 반면, X-선 조사 섬유아 세포에서는 시간이 경과되면서 GM-CSF 생성이 완만하게 감소하는 양상을 나타냈다(Fig. 1). 정상 치은 섬유아 세포에 LPS 0.01 μ g/ml를 작용시켰을 때에는 GM-CSF의 생성이 대조군과 거의 유사하였다. 그러나, 0.1 및 1.0 μ g/ml로 투여량이 증가되면 각 시간대에서 GM-CSF의 생성이 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 2).

X-선 조사 치은 섬유아 세포에 LPS를 작용시켰을 때에는 GM-CSF 생성이 정상 섬유아 세포와 유사한 결과를 나타냈으며, 대조군에 비하여 모든 시간대에서 GM-CSF 생성이 증가하였다. 특히, 0.1 μ g/ml 및 1.0 μ g/ml 작용시켰을 때 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Fig. 3).

2. TGF- β 1 생성

배양된 정상 치은 섬유아세포에서의 TGF- β 1 생성은 시간이 경과되면서 감소하는 경향을 보인 반면, X-선 조사 치은 섬유아

세포에서는 48시간째까지 증가하다가 72시간째에는 정상과 유사하게 나타났다(Fig. 4). 정상 치은 섬유아세포에 LPS를 0.01 μ g/ml 작용시켰을 때 24시간째에 세포만의 배양 상층액인 대조군에 비하여 유의한 증가를 보이지 않았지만, 48시간과 72시간째에는 유의한 증가를 보였다. LPS 0.1 μ g/ml를 작용시켰을 때에는 24시간째에서는 오히려 대조군에 비하여 감소를 나타냈으나 72시간째에서는 유의한 증가를 보였다. LPS 1.0 μ g/ml를 작용시켰을 때에는 48시간째에서 증가를 보였다(Fig. 5).

X-선 조사 치은 섬유아세포에 LPS를 작용시켰을 때에는 대조군에 비하여 모든 시간대에서 TGF- β 1의 생성의 감소를 나타냈다. 즉 0.01 μ g/ml를 작용시켰을 때 모두 시간대에서, 0.1 μ g/ml을

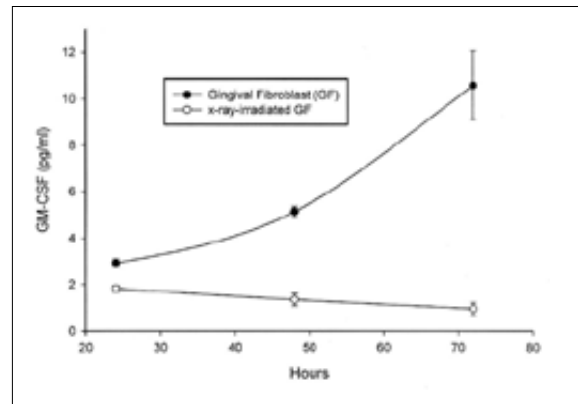


Fig. 1. Production of GM-CSF by gingival fibroblasts and x-ray irradiated fibroblasts cultivated for 24, 48, and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and GM-CSF was assayed. Data represent mean \pm SD.

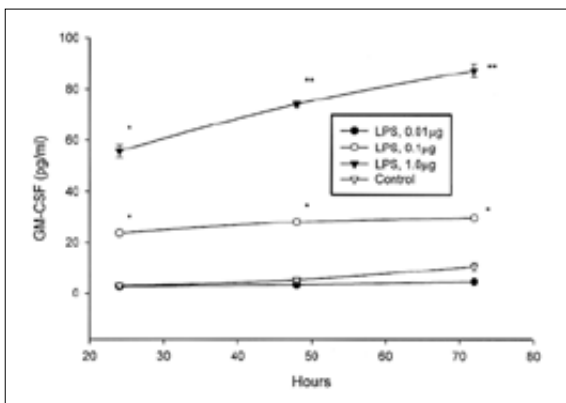


Fig. 2. Production of GM-CSF by gingival fibroblasts with 0.01, 0.1 and 1.0 μ g of LPS for 24, 48 and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and GM-CSF was assayed. Data represent mean \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

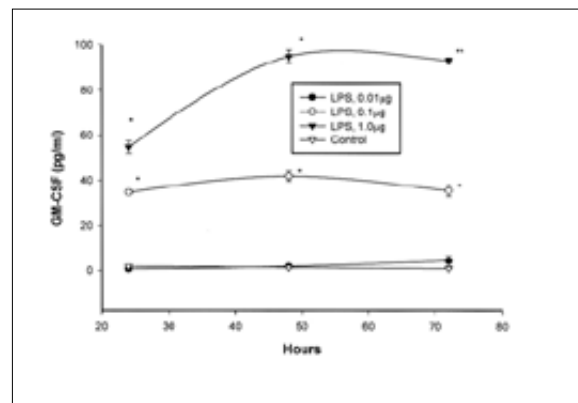


Fig. 3. Production of GM-CSF by x-ray irradiated gingival fibroblasts with 0.01, 0.1 and 1.0 μ g of LPS for 24, 48 and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and GM-CSF was assayed. Data represent mean \pm SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

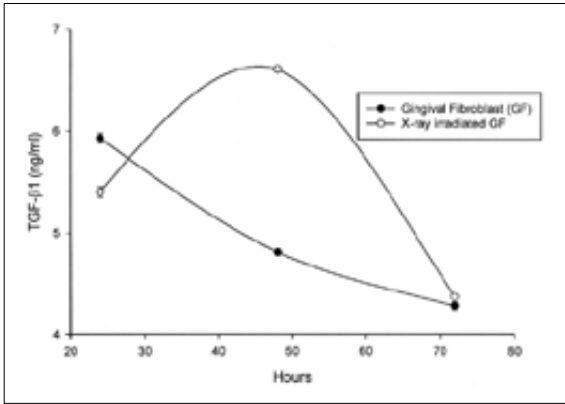


Fig. 4. Production of TGF-β1 by gingival fibroblasts and x-ray irradiated fibroblasts cultivated for 24, 48, and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD.

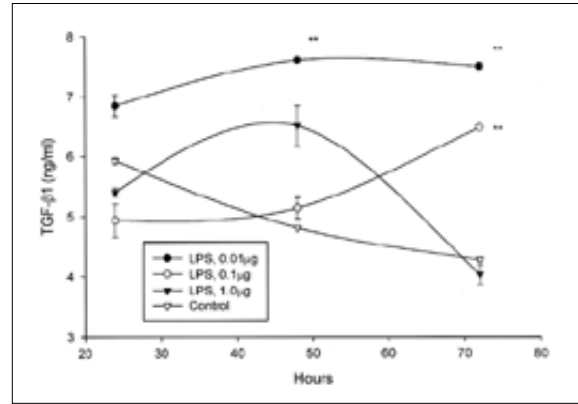


Fig. 5. Production of TGF-β1 by gingival fibroblasts with 0.01, 0.1, 1.0 μg of LPS for 24, 48, and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

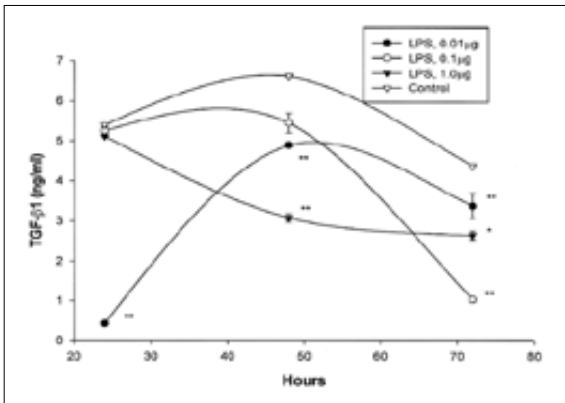


Fig. 6. Production of TGF-β1 by x-ray irradiated gingival fibroblasts with 0.01, 0.1 and 1.0 μg of LPS for 24, 48, and 72 hrs respectively in EMEM. Culture supernatants were harvested after each incubation time and TGF-β1 was assayed. Data represent mean ±SD. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control.

작용시켰을 때에는 72시간대에서, 1.0 μg/ml 작용시켰을 때에는 48시간과 72시간에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 6).

IV. 총괄 및 고찰

섬유아 세포가 IL-1과 같은 염증성 사이토카인에 의해 활성화 되면 성장과 분화 인자, 염증 매개 물질을 분비하여 염증 반응에 간접적 증강효과를 나타내지만 LPS와 같은 외독소에 대한 직접적인 반응은 논란의 여지가 많다. Seelentag 등¹²⁾은 배양된 인체 섬유아 세포에서 IL-1β와 TNF-α의 투여는 2시간 이내에 투여량에 비례하여 GM-CSF와 G-CSF mRNA의 생성을 야기하며, 4~8시간에 가장 많이 생성되며, 약 48시간까지 지속됨을 관찰했지만,

LPS의 투여는 대식세포와 내피세포에서와는 달리 섬유아 세포에서 배양 48시간까지 CSF mRNA를 증가시키지 못했음을 관찰했다. Hachiya 등¹³⁾은 실험실에서 배양된 인체 섬유아 세포에 방사선 조사를 했을 때 조사 시간과 조사량에 비례하여 GM-CSF의 생성을 현저히 증가시켰다고 보고하였다. 반면에 본 실험에서 GM-CSF의 생성은 자극물 없이 정상 치은 섬유아 세포에서는 배양시간이 길어질수록 증가를 보였고 정상 치은 섬유아 세포와 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에 LPS(0.1-1.0 μg/ml)를 처리하였을 때 GM-CSF 생성은 거의 모든 시간대에서 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 그람 음성 세균 독소의 노출에 의해서 GM-CSF 생성이 증가됨을 보였다. 반면, X-선 조사 후 치은 섬유아 세포만의 배양에서는 배양시간이 경과되면서 반대로 GM-CSF 생성능이 저하됨을 알 수 있었다. 이는 방사선 조사나 LPS가 치은 섬유아 세포의 초기 GM-CSF의 생성능을 증가시키지만 이후 방사선에 조사된 치은 섬유아 세포에서는 GM-CSF 생성능이 저하되지만 이후 LPS 자극에 의해 GM-CSF의 생성능이 다시 증가되는 것으로 사료되었다. 창상 치유에 대한 GM-CSF의 효과에 대해서 Robson 등¹⁴⁾은 *E. coli*에 감염된 쥐에 GM-CSF의 국소 투여시 세균 수가 현저히 감소하고 창상의 치유가 빨리 일어났음을 관찰하였는데, 이는 GM-CSF의 살균력과 섬유화 촉진에 따른 것으로 보였다. 또한, Chachoua 등¹⁵⁾은 고형암 환자들에게 GM-CSF를 피하로 투여한 후 시험관에서 환자 단핵구에 대한 세포 독성능을 측정 한 결과 그 독성능이 크게 항진되는 것을 관찰하였다. 이는 두경부 종양 환자의 방사선 조사시 가장 빈발하는 구강 점막염과 통증 및 기능적인 장애의 치료를 위해 방사선 조사와 동시에 GM-CSF를 투여하면 이러한 증상들의 유의할 만한 감소를 보고한 Nicolatou 등⁷⁾의 결과를 뒷받침함을 알 수 있다.

치은 섬유아 세포는 주로 인체의 구조적인 지지 역할에 관계하지만 국소적인 환경에 따라 초기 염증 및 면역 반응의 증폭에 중요한 역할을 담당하는 다양한 사이토카인을 분비하여 부가적인

면역세포로 작용한다¹⁶). 이 세포에서 분비된 사이토카인 중 TGF- β 는 세포의 기질과 기저막에 있는 단백질과 상호 작용을 한다⁸). 이러한 작용에는 첫째, TGF- β 가 collagen, fibronectin, thrombospondin, tenascin, osteopontin, osteonectin 및 proteoglycans을 포함하는 세포의 기질의 수많은 단백질의 합성과 분비를 유도한다^{9,17,18}). 이러한 단백질의 증가된 침착이 세포의 기질 형성을 증가시킨다⁸). 또한 TGF- β 는 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP), plasminogen-activator inhibitor를 포함하는 단백질 분해 효소 억제제의 생성을 촉진하고 collagenase와 plasminogen activator 같은 기질 단백 분해 효소의 생성을 억제한다^{19,20}). 둘째, TGF- β 가 세포 유착 수용체인 integrin의 발현을 증가시켜 세포내 유전자 발현과 세포의 분화에 영향을 주며, 빈번히 세포와 세포의 기질의 접촉성을 증가시킨다²¹). 만약, TGF- β 에 의해 사이토카인들이 잘 조절되지 않으면, 이것의 과잉 활동으로 창상 부위에 너무 많은 콜라겐의 침착으로 인한 비후성 반흔이나 킬로이드, 폐 섬유화, 간 경화, 공피증, 건 유착증, 동맥 경화증, 섬유성 골유합, 신경의 손상에 따른 전달장애, Crohn 질환, 식도 및 요도 협착증, 및 임플란트 주위의 섬유 증식성 장애를 초래할 수 있다^{9,10}).

구강암 환자에서 방사선 조사 후 합병증으로 나무처럼 딱딱한 섬유화가 흔히 경부에서 생기는 데, 그 병인은 아직 명확하지 않지만 GM-CSF와 대식세포에 의한 TGF- β 의 자극과 섬유아 세포에 의한 콜라겐의 지속적인 합성에 의해 이루어지는 것으로 여겨진다²²). 이러한 경부 섬유화에 TGF- β 이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 최근 일련의 연구들에서 항섬유화 제제의 개발을 위해 TGF- β 경로가 깊이 연구되고 있음이 이를 뒷받침하고 있다^{23,24}). Gao 등²⁵은 구강 점막하 섬유화 조직의 각화 세포가 TGF- β 를 합성하고 분비하여 구강내 점막하 섬유화의 진행에 중요한 역할을 한다고 하였다. Martin 등²⁶은 방사선 조사 조직에서 TGF- β 의 비정상적인 생성이 조직 치유와 장기간의 세포 활성화에 지속적인 신호 인자로 작용할 것이란 가설 하에 방사선 유도 섬유화를 돼지모형에서 실험하였다. 방사선 조사 3주 후 초기 흥반성 반응기 피부에서 TGF- β mRNA 수치는 19배 증가하였으며, 6~12개월의 후기 섬유화 동안에 TGF- β mRNA 수치는 피부와 하부 근육 섬유화 조직에서 각각 10배와 8배 증가하였다. 따라서 그들은 TGF- β 이 초기와 후기의 방사선 유도 섬유화에 관여하는 주 사이토카인이라고 하였다. Randall과 Coggle²⁷은 Sr-90 beta에 노출된 생쥐의 피부에서 TGF- β mRNA를 측정하였는데 1-10 Gy 조사후 TGF- β mRNA가 급격히 증가하였으며, 20-50 Gy 조사 후 대조군에 비해 200% 증가된 수치로 지속되었다. 시간대 별로 관찰했을 때 조사 3시간 후 대조군에 비해 9.4%~44%까지 감소하다 6~12시간에 124%~230%까지 급격히 증가하였으며, 24~48시간에 대조군 수준으로 돌아갔으며, 그 후 7~14일 사이에 대조군에 비해 약 200% 정도로 서서히 증가하며, 55일째 실험 종료 시까지 100~200% 증가된 채로 지속되었다. 이 실험의 결과는 TGF- β 이 방사선 조사에 대한 초기 스트레스 반응, 급성 염증 반응 및 후기 만성 섬유화 반응에 관여함을 보여준다.

본 연구에서 TGF- β 의 생성은 자극물 없이 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포만의 배양에서 48시간까지 생성이 증가하다가 그 이

상의 배양에서는 감소를 보인 반면 정상 치은 섬유아 세포에서는 24시간 이후 배양 시간이 길어질수록 감소를 보임으로서 X-선 조사에 따른 TGF- β 1 생성의 변화로 보여진다. 이는 X-선 조사에 따른 창상 치유와 면역 기능에 변화가 예상된다. 이러한 세포들에 LPS를 노출시켰을 때 세포만의 배양 때보다 각각의 시간대에서 상당한 변화를 보였다. 정상 치은 섬유아 세포에 LPS를 처리하였을 때 TGF- β 1 생성은 거의 모든 시간대에서 대조군에 비하여 증가를 보임으로서 세균 독소의 노출에 따른 TGF- β 1 생성의 변화를 나타냈다. 그러나 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에 LPS를 처리하였을 때 TGF- β 1 생성은 거의 모든 시간대에서 대조군에 비하여 감소를 보였다. 이러한 결과는 X-선 조사가 세포 생성물에 있어서 독소에 의해 차이를 나타낸 것이다. 따라서 X-선 조사 치은 섬유아 세포에 대한 TGF- β 1 생성 효과는 세균 독소에 노출되었을 시 오히려 TGF- β 1의 생성이 감소됨으로서 이에 따른 생물학적 반응이 예상되며, TGF- β 1의 항상성 조절과 병인에 대한 역할을 적절히 이용하면 방사선 조사 후 염증과 섬유화를 특징으로 하는 많은 질환의 진단과 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

요약하면, 정상 치은 섬유아 세포에서의 GM-CSF와 TGF- β 1의 생성을 비교하면 세포만의 배양에서 시간이 경과됨에 따라 GM-CSF는 증가함에 비하여 TGF- β 1은 감소하여 생성 양식에 차이를 나타냈으며, 세균독소에 대한 GM-CSF와 TGF- β 1 생성의 경우 LPS에 의해 큰 증가를 보였다. X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에서의 자극물 없이 세포만의 배양에서 GM-CSF와 TGF- β 1 생성을 비교하면 GM-CSF의 경우 시간이 경과됨에 따라 감소했으나, TGF- β 1의 경우 배양 48 시간까지 증가하다 감소했으며, GM-CSF는 LPS에 의해서 증가를 나타냈으나, TGF- β 1 생성의 경우 LPS에 의해서 감소를 보였다. 이와 같이 자극물과 농도 및 경과한 시간에 따라 정상 혹은 X-선 조사 치은 섬유아 세포로부터 생성되는 GM-CSF와 TGF- β 1은 양적으로 다양한 변화를 나타냄을 알 수 있다.

V. 결 론

방사선 조사와 세균 독소의 작용이 치은 섬유아 세포에서 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해서 초대 배양한 정상인 치은 섬유아 세포와 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에서 lipopolysaccharide (LPS)를 작용하면서 배양 시간에 따라 생성된 GM-CSF와 TGF- β 1을 정량 분석한 결과 다음과 같았다.

1. GM-CSF의 생성은 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포만의 배양에서 배양시간이 경과되면서 감소를 보인 반면 정상 치은 섬유아 세포에서는 배양시간이 길어질수록 증가를 나타냈다. 정상 치은 섬유아 세포와 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에 LPS를 처리하였을 때에도 GM-CSF 생성은 대조군에 비하여 증가를 나타냈다.
2. TGF- β 1의 생성은 자극물 없이 X-선 조사 후 치은 섬유아 세포에서는 48시간 배양까지 생성이 증가하다가 이후 감소를 보인 반면 정상 치은 섬유아 세포에서는 24시간 이후 감소를 나타냈다. X-선에 조사된 치은 섬유아 세포에 LPS를 처리하였을

때에는 TGF- β 1 생성이 대조군에 비하여 감소를 보였다.

결론적으로, X-선 조사는 치은 섬유아 세포에서 GM-CSF의 생성을 감소시키고 TGF- β 1의 생성을 증가시켜 조직내 주요 세포들의 증식능의 변화와 항상성의 불균형을 야기하여 방사선 유도 구강내 점막염 및 섬유화를 야기하여 기능적 장애 및 불편감을 보일 가능성이 높음을 알 수 있다. 하지만, TGF- β 1의 생성에 있어 방사선 조사 치은 섬유아 세포에서의 LPS의 적용은 오히려 상반된 작용을 일으키는 것을 알 수 있다.

참고문헌

- Lopez AF, Eglinton JM, Lyons AB et al : Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J Cell Physiol* 145:69, 1990.
- Bussolino F, Wang JM, Defilippi P et al : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 337:471, 1989.
- Costello RT : Therapeutic use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). A review of recent experience. *Acta Oncol* 32:403, 1993.
- Cebon JS, Lieschke GJ : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for cancer treatment. *Oncol* 51:177, 1994.
- Romani N, Reider D, Heuer M et al : Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196:137, 1996.
- Zhao Y, Chegini N : Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. *J Clin Endocrinol Metab* 79:662, 1994.
- Nicolatou O, Sotiropoulou-Lontou A, Skarlatos J, Kyprianou K, Kolisti G, Dardoufas K : A pilot study of the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on oral mucositis in head and neck cancer patients during X-radiation therapy: a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42:551, 1998.
- Lee SG, Kim KH, Kim UK, Kim JR, Chung IK, Yang DK : Quantitative analysis of transforming growth factor- β 1 in human fibroblasts induced with staphylococcus enterotoxin B and lipopolysaccharide. *J Korean Acad Maxillofac Plast Reconstr Surg* 22:123-132, 2000.
- Diegelmann RF : Cellular and biomechanical aspects of normal and abnormal wound healing : an overview. *J Urol* 157:298, 1997.
- Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP : Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg* 84:827, 1989.
- IIIlsley MC, Peacock JH, Cotswold RJ, Yarnold JR : Increased collagen production in fibroblasts cultured from irradiated skin and effect of TGF beta(1) - clinical study. *Br J Cancer* 83(5):650-4, 2000.
- Seelentag W, Mermod JJ, Vassalli P : Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha additively increase the levels of granulocyte colony-stimulating factor(CSF) mRNA in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 19(1):209-12, 1989.
- Hachiya M, Suzuki G, Koeffler HP, Akashi M : Irradiation increases expression of GM-CSF in human fibroblasts by transcriptional and post-transcriptional regulation. *Exp Cell Res* 214:343, 1994.
- Robson M, Kucukcelebi A, Carp SS et al : Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on wound contraction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 Suppl 2:541, 1994.
- Chachoua A, Oratz R, Hoogmoed R et al : Monocyte activation following systemic administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15:217, 1994.
- Agarwal S, Baran C, Piesco NP et al : Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 beta. *J Periodontal Res* 30:382, 1995.
- Ignotz RA, Endo T, Massague J : Regulation of fibronectin and type collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262:6443, 1987.
- Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Hook M : Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Molec Biol Cell* 3:181, 1992.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK et al : Matrix metalloproteinases. a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197, 1993.
- Matrisian LM : The matrix degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455, 1992.
- Damsky CH, Werb Z : Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix:cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 4:772, 1992.
- Bretscher V, Andreutti D, Neuville P et al : GM-CSF expression by tumor cells correlates with aggressivity and with stroma reaction formation. *J Submicrosc Cytol Pathol* 32:525, 2000.
- Martin M, Lefaix J, Delanian S : TGF-beta 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1:47:277, 2000.
- Martin M, Delanian S, Sivan V et al : Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1. *Cancer Radiother* 4:369, 2000.
- Gao Y, Ling T, Wu H : Expression of transforming growth factor-beta 1 in keratinocytes of oral submucous fibrosis tissue. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 32(4):239-41, 1997.
- Martin M, Lefaix JL, Pinton P, Crechet F, Daburon F : Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. *Radiat Res* 134(1):63-70, 1993.
- Randall K, Coggle JE : Expression of transforming growth factor-beta 1 in mouse skin during the acute phase of radiation damage. *Int J Radiat Biol* 68(3):301-9, 1995.