

Oncostatin M이 당뇨 환자 섬유모세포의 창상치유능에 미치는 영향

임형우 · 전경욱 · 한승규 · 김우경
고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Effect of Oncostatin M on Wound Healing Activity of Diabetic Fibroblasts *in vitro*

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

Department of Plastic Surgery, Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Oncostatin M(OSM) has been known as a role in fibrosis and anti-inflammatory effects of various organs and tissues. Although there have been a number of studies which are focused on the roles and mechanisms of OSM, there are few reports on its effects in chronic wound healing. The purpose of this study is to evaluate the effects of OSM in wound healing activities of dermal fibroblasts of chronic wound *in vitro*. In particular, this study is focused on cell proliferation and synthesis of collagen and glycosaminoglycan(GAG), which are the major components of the extracellular matrices, of diabetic fibroblasts.

Methods: Fibroblasts were isolated from excess skin that was obtained from diabetic foot ulcer patients who underwent debridement. The isolated fibroblasts were cultivated in presence of OSM(100 ng/mL). Cell proliferation, collagen synthesis and GAG levels were compared.

Results: All the components tested in this study increased in OSM treatment group. In particular, collagen and GAG synthesis demonstrated statistically significant increases($p < 0.05$ in the Mann-Whitney U-test).

Conclusion: These results indicate that OSM increases wound healing activities of dermal fibroblasts of chronic wound *in vitro*.

Key Words: Oncostatin M, Diabetic fibroblasts

Received February 19, 2008

Revised March 11, 2008

Accepted May 21, 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

I. 서 론

정상적인 창상치유는 염증단계, 증식단계, 이어서 성숙단계로 진행된다. 이러한 과정 중에서 섬유모세포는 교원질형성과 섬유화치유 및 근섬유모세포로의 분화를 통해 창상구축까지 창상치유의 전 과정에 걸쳐 각 단계를 조절하는 중요한 역할을 담당한다.

그러나 만성창상의 경우 창상치유의 단계 중에서 면역기능의 약화 및 감염 및 염증으로 인해 첫 번째 단계인 염증단계에서 다음 단계로 진행하지 못한 채로 머물러 있게 되어 성공적인 창상치유가 되지 못한다.¹ 또한 만성창상에서는 섬유모세포의 기능이 떨어져 있어 세포 증식이나 세포외기질의 합성이 감소되고, 단백질 분해 효소의 농도가 높아 그나마 만들어진 기질도 파괴된다. 창상치유에 가장 핵심적인 역할을 하는 섬유모세포의 이러한 기능적 상실은 창상의 만성화를 가속화시킨다.²

따라서 이런 저하된 섬유모세포의 기능에 도움이 되도록 외부에서 성장인자를 투여하는 연구가 계속되어지고 있으며, 이러한 연구들의 결과로 몇몇 성장인자는 상업화되어 나오기도 있다. 그러나 성장인자의 투여는 세포의 활성화에는 도움이 되나 앞서 언급한 만성창상의 또 다른 문제점인 지속적인 염증단계를 변화시키지는 못한다.

Oncostatin M(OSM)은 interleukin(IL)-6계열의 cytokine으로 급성 염증질환에서 주로 생성된다.^{3,7} OSM은 폐의 섬유모세포의 세포자멸사(apoptosis)를 억제 하고, 인간의 폐섬유화에서 교원질의 유도과 증식을 자극한다.⁵ 또한 OSM은 tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMPs-1)과 플라스미노겐 활성화인자(plasminogen activator) 등을 유도하고 염증 사이토카인의 전구물질을 억제함으로써 항염증작용을 나타낸다.^{8,9}

이러한 OSM의 섬유화촉진 및 항염증작용은 염증단계 지속과 섬유모세포기능 저하라는 만성창상의 커다란 두 가지 문제점을 함께 극복 할 수 있는 기능으로서, 이에 착안하여 저자들은 OSM이 창상치유에 미치는 영향을 연구하고 있다. 이전 연구에서 저자들은 OSM이

정상 섬유모세포의 창상치유능을 촉진시킴을 보고한 바 있다.¹⁰ 이러한 배경을 바탕으로, 이번 연구에서는 OSM이 만성 창상의 섬유모세포 특히 당뇨병성 족부 궤양의 진피섬유모세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 창상치유에 있어서 가장 중요한 요소인 진피섬유모세포의 증식, 교원질 합성 및 glycosaminoglycan (GAG) 합성에 OSM의 투여가 어떤 영향을 미치는지에 초점을 맞추어 진행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 당뇨병성 족부 궤양 환자의 진피 섬유모세포 분리 및 배양

당뇨병성 족부 궤양을 가진 4명의 환자를 대상으로 수술실에서 변연절제술을 하면서 절제된 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 펼친 후 37°C에서 24시간 동안 놓고 배양용기에 진피조직이 잘 붙도록 하였다. 이 후 10%의 태아우혈청과 25 µg/mL의 gentamycin이 포함된 12 mL의 DMEM/F-12 Nutrient을 첨가하고 다시 배양하였다. 모든 배양 과정은 온도 37°C, 5% CO₂, 100% 습도로 유지하였다. 충분한 양의 섬유모세포가 배양되면 트립신처리(trypsinization)로 세포들을 유리 한 후, 유리된 세포들은 Mg²⁺과 Ca²⁺이 제거된 Dulbecco phosphate-buffered saline (DPBS; GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450×g의 속도로 원심 침전하였다. 40 mL의 DPBS로 두 번 세척 한 후에 다시 5 mL의 DPBS에 재 부유 시킨 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

재조합한 인간 OSM은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)사의 것을 사용하였다. 세포증식의 분석을 위해 배양된 섬유아세포는 5% FBS가 포함된 DMEM/F-12 Nutrient를 넣은 96 well의 배양판에 well당 3.0×10³ cells를 넣

었다. 모든 세포는 온도 37°C와 5% CO₂와 100% 습도로 유지하고, 24시간 후 100 ng/mL 농도의 OSM으로 처리하였다. 이 100 ng/mL 농도는 저자들의 이전 연구결과를 참조하였다.¹⁰ OSM 처리 후 배양판은 다시 온도 37°C와 5% CO₂와 100% 습도로 유지하면서 48시간 동안 배양하였다.

교원질 합성과 GAG의 합성량을 알아보기 위한 실험에서는 배양된 섬유모세포는 5% FBS가 포함된 DMEM/F-12 Nutrient를 넣은 24 well의 배양판에 well당 3.3×10⁴ cells를 넣었다. 마찬가지로 이 배양판도 온도 37°C와 5% CO₂와 95% 습도로 유지하였다. 24시간 후 OSM을 100 ng/mL 농도로 처리하였고, 48시간 동안 배양하였다. 대조군은 위에서 기술한 조건과 동일한 상태로 OSM 처리만 하지 않았다.

다. 세포 증식의 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. 이 후 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 시험과장으로 측정한 후, 630 nm의 표준과장으로 흡광도를 측정하였다.

라. 교원질 합성의 측정

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

마. GAG의 측정

GAG의 측정은 황산화 GAG의 양을 Blyscan Dye Reagent™ (Biocolor Ltd.; Newtownabbey, Northern Ireland)를 이용하여 측정하였다. 요약하면, 100 µL의 희석 배양 상층액과 1 mL의 염색 시약을 1.5 mL의 마이

크로 원심분리기 시험관(microcentrifuge tube)에 첨가하고 30분간 혼합하였다. 불용성인 당아미노글라이칸-염색 시약 복합체(glycosaminoglycan-dye complex)가 형성된 후 시험관을 10분간 1,000 × g의 속도로 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 1 mL의 Blyscan Dissociation Reagent(Biocolord Ltd)를 각각의 시험관에 첨가하고, 656 nm 파장의 spectrophotometer를 이용하여 수치를 측정하였다.

바. 통계처리

이번 연구에서 각각의 단계와 처치는 3배수 연구(triplicate study)로 시행하였다. 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

세포증식에서 OSM군은 $4.1 \pm 0.2 (\times 10^3 / \text{well})$ 로 대조군 $3.6 \pm 0.3 (\times 10^3 / \text{well})$ 보다 13.8% 높았다. 그러나 이 수치는 통계적으로 유의하지는 않았다($p = 0.057$, Mann-Whitney U-test)(Fig. 1).

나. 교원질 합성

합성된 교원질의 양은 OSM처리한 군에서 $212.3 \pm 16.8 (\text{ng/mL})$ 로 대조군 $146.0 \pm 7.8 (\text{ng/mL})$ 보다 45.2% 높았다. 그리고 이 수치는 통계적으로도 의미가 있었다($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)(Fig. 2).

다. GAG 합성

GAG합성은 OSM 처리한 군에서 $1.9 \pm 0.1 (\mu\text{g/mL})$ 로

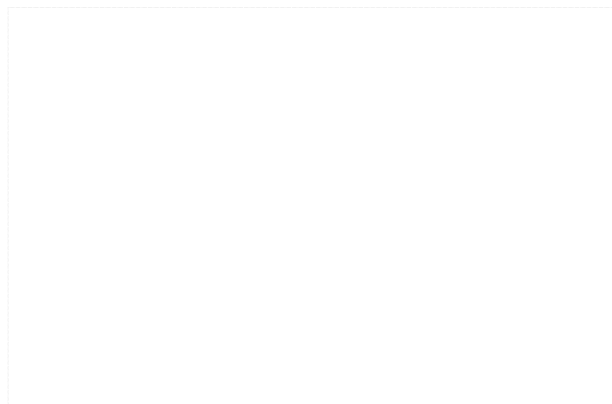


Fig. 1. Effect of OSM on fibroblast proliferation.

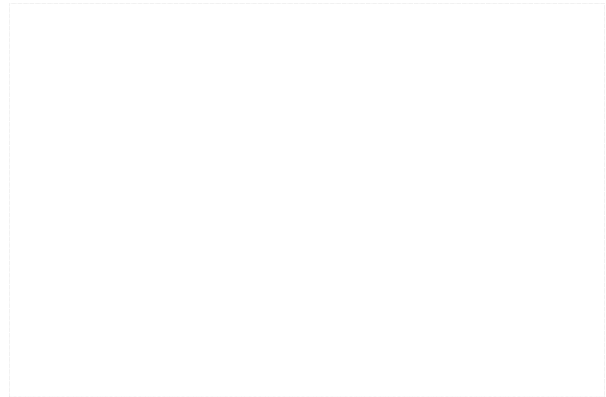


Fig. 2. Effect of OSM on collagen production. *: $p < 0.05$ compared with control group.

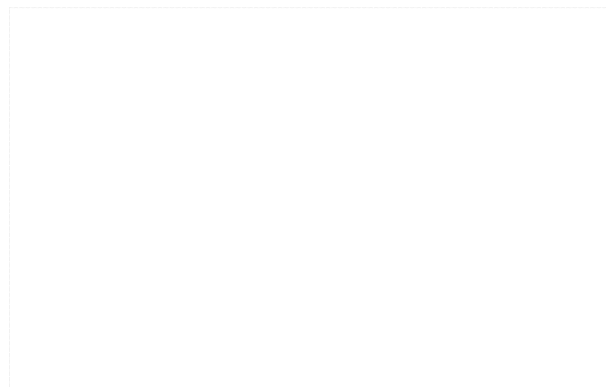


Fig. 3. Effect of OSM on glycosaminoglycan production. *: $p < 0.05$ compared with control group.

대조군 $1.5 \pm 0.2 (\mu\text{g/mL})$ 보다 26.7% 높았다. 그리고 이 수치는 통계적으로도 의미가 있었다($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)(Fig. 3).

IV. 고 찰

창상치유는 지혈로부터 시작하여 크게 염증단계, 증식단계, 성숙단계의 3단계로 구별된다. 창상치유는 이러한 복합적인 작용이 긴밀하게 복합적, 조직적으로 일어나는 동적인 과정이며, 이러한 과정은 창상 부위의 유전자 발현과 손상된 조직으로 모여든 여러 세포들 간의 신호전달로 정밀하게 조절된다.¹¹ 만성창상은 치유과정이 창상의 감염을 해결하는 쪽으로 전환되지 못하여 염증단계에서 다음 단계로 진행하지 못하는 것이다.^{1,11} 만성창상의 대표적인 당뇨병성 족부 궤양의 경우 역시 마찬가지이다. 당뇨 환자의 당화 단백질(glycated protein)은 미세혈류를 통하여 기저막 비후를 유발하고, 섬유소띠(fibrin cuff)를 형성하며 섬유아세포 자체의 활동성을

감소시킨다.

창상치유과정에서 섬유모세포는 여러 종류의 성장인자들을 합성, 분비하여 창상주변 세포의 분화와 이동을 촉진한다. 창상주변으로 이동한 섬유모세포는 분화와 증식을 거듭하면서 교원질, 섬유결합소(fibronectin), GAG 등을 합성한다. 또한 대식세포(macrophage)에서 분비되는 전환성장인자- β (transforming growth factor- β : TGF- β)의 영향을 받아 창상 수축에 중요한 역할을 담당하는 근섬유모세포(myofibroblast)로 분화하기도 한다.¹² 근섬유모세포로 분화를 한 후, α -평활근 가는근육미세섬유(α -smooth muscle actin: α -SMA)를 합성, 분비하여 창상구축과 재형성 단계에서 핵심적인 역할을 담당한다. 이렇게 섬유모세포는 세포증식과 염증반응을 조절하고, 교원질 합성에 관여하며, 혈관생성을 유도하며 창상 수축에 관여하고 창상치유에 필요한 다양한 cytokine과 성장인자를 분비한다.

그러나 당뇨병성 족부 궤양 같은 만성 창상에서의 섬유모세포의 기능은 정상적인 상처치유의 경과를 수행하지 못한다. Hehenberger 등¹³에 의하면, 당뇨병성 족부 궤양의 환자의 창상에서 채취한 섬유모세포를 배양해 보았을 때, 정상인의 섬유모세포보다 증식율과 부착률이 현저히 감소하며, 그 원인으로 성장인자와 proteoglycans의 생산성 감소와 각종 수용체와 integrin의 발현 저하로 인한 성장인자에 대한 저항성을 들고 있다.

OSM은 폐의 섬유화에 관여한다는 것으로 밝혀진 이후, 폐세포와 간세포의 생리학적, 병리학적, 면역학적 연구가 활발히 진행 중인 cytokine이다. 28,000 Da의 glycoprotein이며, 주로 급성 질환에서 생성되는 IL-6 계열의 cytokine으로 세포의 증식, 분화, 생존 그리고 세포자멸사를 조절한다.¹⁴ OSM은 glycoprotein 130을 포함한 OSM 수용체를 통하여 세포내 신호를 활성화시켜 세포의 전반적인 기능에 영향을 주며, *in vivo*와 *in vitro*에서 다양한 생물학적 반응을 보인다.^{6,14} 이러한 반응은 OSM이 유전자 활성화나 세포생존, 증식, 분화와 같은 복잡한 세포기능의 조절에 중요한 역할을 한다는 걸 시사한다.

Ihn과 Tamaki¹⁵는 DNA 정량분석을 통하여 OSM이 분열제활성단백키나아제(Mitogen-activated protein kinase)과 DNA 분석을 통하여 인간의 정상 피부의 진피섬유모세포 증식에 영향을 준다고 보고한 바 있다. 저자들의 경우도 이전 연구를 통하여 OSM 처리군이 대조군보다 섬유모세포의 증식에서는 21.6%, 교원질합성에서는 18.0% 그리고 GAG 합성에서는 66.7% 증가한 결과를 얻었고, 이 중 세포증식과 GAG합성은 통계적으로도 유의함을 보고한 바 있다.¹⁰

Wallace 등⁹은 OSM이 염증작용으로 인한 조직손상을 막고, 조직복구를 조절하며, 조직의 항상성(homeostasis)을 유지한다는 기능을 들며 '항염증 사이토카인'으로 분류하고 있다. 대식세포(macrophage)와 활성화 T-세포(activated T-cell)에 의해 분비된 OSM은 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMPs-1), 플라스미노겐 활성화인자(plasminogen activator), 급성기반응물질(acute phase reactants)을 유도하고 염증 사이토카인의 전구물질들을 억제함으로써 조직재형성 촉진 및 항염증작용을 나타낸다. 또한, Goren 등¹¹은 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophil; PMN)와 대식세포가 풍부한 당뇨쥐의 만성 창상에서 OSM의 농도가 현저히 증가함을 보고하면서, 창상 치유의 초기 염증단계에서 OSM과 다형핵 호중구 그리고 창상치유와의 연관성을 설명하였다.

우리는 위에서 언급한 OSM의 여러 작용 중에서 섬유화 촉진과 항염증 작용에 주목하였고, 이러한 두 가지 작용이 만성창상 특히 당뇨병성 족부 궤양 환자의 치료에 효과가 있을 것이라는 가정 하에 이번 연구를 계획하게 되었다. OSM의 항염증작용은 만성창상의 고질적인 문제인 '염증단계에서의 악순환'에 도움이 될 것이고, 섬유화의 촉진작용은 창상의 치유의 2, 3단계인 육아조직형성과 성숙단계에 도움이 될 것이라는 가정이었다. 창상치유과정에서 진피섬유모세포의 세포증식과 교원질과 GAG의 합성은 창상치유의 그 어느 단계 중에서도 중요한 과정이기 때문에 이번 연구결과 이들 요소들의 향진은 창상치유능을 촉진시킬 수 있다는 기대를 갖기에 충분하다 하겠다.

그러나 이번 연구는 *in vitro*연구이므로 OSM이 섬유모세포의 기능 촉진과 항염증작용으로 실제 당뇨족에 궤양 환자들의 창상치유에 도움이 될 수 있는지는 *in vivo* 연구를 추가하여 확인해야 할 것으로 사료되며, 저자들은 이에 대한 후속 연구도 계획하고 있다. 또한 추가적인 연구로 antiOSM 처리군과의 비교, total protein 증가치의 비교, 성장인자의 분비 및 생성 촉진 기능이나, 육창과 같은 다른 만성창상에서의 효과를 알아보는 실험 및 임상적 적용에 대한 연구 등도 필요하다고 판단된다.

V. 결 론

OSM의 투여는 당뇨병성 족부궤양 환자의 진피섬유모세포의 세포증식과 교원질 합성, GAG합성을 촉진시킨다. 특히 교원질과 GAG합성에는 통계적으로 의미 있는 증가치를 보였다. 따라서 OSM은 만성창상 특히 당뇨병성 족부궤양 치유촉진에 잠재력과 활용의 가능성

이 있다고 사료된다.

REFERENCES

1. Han SK, Choi KJ, Kim WK: Clinical application of fresh fibroblast allografts for the treatment of diabetic foot ulcers: a pilot study. *Plast Reconstr Surg* 114: 1783, 2003
2. Cavallini M: Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. *Wound Repair Regen* 15: 35, 2007
3. 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
4. Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H: Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic anti-proliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 139: 2977, 1987
5. 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
6. 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
7. Richards CD, Shoyab M, Brown TJ, Gauldie J: Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol* 150: 5596, 1993
8. Wallace PM, Macmaster JF, Rillema JR, Rouleau KA, Hanson MB, Burstein SA, Shoyab M: *In vivo* properties of oncostatin M. *Ann N Y Acad Sci* 762: 42, 1995
9. Wallace PM, Macmaster JF, Rouleau KA, Brown TJ, Loy JK, Donaldson KL, Wahl AF: Regulation of inflammatory responses by oncostatin M. *J Immunol* 162: 5547, 1999
10. Chun KW, Han SK, Lee BI, Kim WK: Optimal concentration of OSM for wound healing activity of fibroblasts. *J Korea Wound Care Soc* 2: 77, 2006
11. Goren I, Kämpfer H, Müller E, Schiefelbein D, Pfeilschifter J, Frank S: Oncostatin M expression is functionally connected to neutrophils in the early inflammatory phase of skin repair: Implications for normal and diabetes-impaired wounds. *J Invest Dermatol* 126: 628, 2006
12. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE: Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl): 1e-S, 2006
13. Hehenberger K, Kratz G, Hansson A, Brismar K: Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin. *J Dermatol Sci* 16: 144, 1998
14. 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
15. Ihn H, Tamaki K: Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 165: 2149, 2000