

pH 변화가 섬유아세포 증식에 미치는 영향

김영석 · 황용석 · 노태석 · 유원민 · 탁관철¹

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 성형외과학교실, ¹인체조직복원연구소

The Effect of pH on the Fibroblast Growth

Young Seok Kim, M.D., Yong Seok Hwang, M.D., Tai Suk Roh, M.D., Ph.D., Won Min Yoo, M.D., Ph.D. and Kwan Chul Tark, M.D., Ph.D., FACS.¹

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Yong Dong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, ¹Institute for Human Tissue Restoration, Seoul, Korea

Purpose: Fibroblasts are exposed to an acidotic or alkalotic environment in a variety of pathological and physiological conditions. However, the effect of pH changes on fibroblast is still largely unknown, and it was evaluated in the present study using thymidylate synthase activity and cell count.

Methods: NIH3T3-mouse fibroblasts were used in this study. Fibroblasts were divided into 5 groups in 6-well plate and fibroblasts (2×10^5 cells in each) were grown in 37°C 5% CO₂, DMEM and 10% FBS culture media for 4 days. Each well was controlled in the condition of either acidosis or alkalosis (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0). To evaluate the effect of acidosis or alkalosis, cell survival rate and thymidylate synthase (TS) catalytic ratio were used.

Results: Mouse fibroblasts showed highest survival rate in pH 7.5 (neutral condition) and the survival rate decreased in both high and low pH. But, the survival rate decreased more profoundly in alkalotic condition. TS catalytic activity ratio showed various changes in either low pH or high pH through the time interval. More significant changes of TS catalytic activity ratio were observed in the high pH.

Conclusion: These results show that acidosis and alkalosis inhibit fibroblast proliferation and TS catalytic activity shows similar pattern in low pH but paradoxical changes in high pH because of the cell protective mechanism. (*Journal of Korean Burn Society* 2008;11:22-26)

Key Words: Fibroblast, Growth, pH, Acidosis, Alkalosis, Thymidylate synthase

서론

창상 치유는 외과 영역에서 오래전부터 가장 기본이 되고 많이 연구되어온 분야이다. 창상이란 정상적인 조직 혹은 장기의 연속성(continuity)가 깨진 상태를 의미한다. 창상 치유에는 각질세포(keratinocyte), 혈소판(platelet), 대식세포(macrophage) 등 많은 세포들이 관여하지만, 그중에서도 섬유아세포(fibroblast)가 중요한 역할을 하게 된다. 섬유아세포는 조직 손상에 의한 염증반응에 의해 수일내에 빠른 증식을 보이게 된다¹⁾. 섬유아세포는 세포외기질(extracellular matrix; ECM) 단백질의 주된 근원이 되면 육아조직 (granulation)을 형성하는 교원질(collagen)과 섬유결합소(fibronectin)를 생산하게 된다. 또한 근섬유아세포(myofibroblast)는 창상 수축을 일으켜 치유를 돕게 된다. 이러한 섬유아세포의 역할에는 TGF- β (transforming growth factor-beta), PDGF (platelet derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor) 등의 사이토카인(cytokine)이 작용을 하게 되는데 이중 TGF- β 가 가장 강력한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. TGF- β 는 세포 성장 및 분화, 이동 (migration), 세포외기질 생성(ECM production), 혈관생성(angiogenesis), 면역반응(immunity) 등의 다양한 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}. Thymidylate synthase (TS)는 DNA 합성에 필요한 thymidylate 생산에 필수적인 인자이며 곧 세포 증식이 활발할수록 TS activity가 증가하는 것으로 알려져 있다. 주로 항암제의 치료적 효과를 판정하는데 TS activity가 평가되어 왔다⁵⁻⁷⁾.

허혈상태(ischemia), 당뇨병성산증(diabetic ketoacidosis), 창상치유(wound healing), 호흡부전(respiratory failure), 요독증(uremia) 등 다양한 환경들에서 산성 pH가 나타나게 되어서 세포 증식에 영향을 미치게 된다. 상피세포에 있어서는 산성화가 에서는 혈관내피세포(endothelial

책임저자 : 유원민, 서울시 강남구 도곡동 146-92
☎ 135-720, 연세대학교 의과대학 성형외과학교실
Tel: 02-2019-3421, Fax: 02-3463-4914
E-mail: wnmnyoo@yuhs.ac

본 연구는 연세대학교 의과대학 1998년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(과제번호: 6-1998-1102).

cell) Ca²⁺을 증가(enhance) 시키고, 혈관내피세포 표면에 내피성부착분자(intercellular adhesion molecule-1) 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 이러한 산성화는 내피세포의 기능을 억제하고 세포자멸(apoptosis)을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 또한 몇 가지 cell line에서 세포내 산성화가 세포자멸에 대해 미치는 영향에 대해서도 보고되어 왔다.

저자들은 이러한 세포내 산성도의 변화가 창상치유에 중요한 섬유아세포에 미치는 영향을 알아 보기 위해서 다양한 pH 환경속에서 섬유아세포의 증식 및 활성화에 영향을 미치는 TGF- β 와 세포 증식의 표식자 역할을 하는 TS의 발현 정도를 통해 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 섬유아세포 배양(fibroblast culture)

마우스의 섬유아세포(NIH3T3-mouse fibroblast)를 가지고 배양을 하였다. 세포는 사용전까지 액화 질소에 냉동보존 하였고 실험은 3차례의 계대배양을 진행한 후에 진행되었다. 배양방법은 37°C 5% CO₂가 함유된 절대 습도공간에서 10%의 fetal bovine serum (FBS Hyclone, Logan, UT)와 5% penicillin/streptomycin (Gilsen, Rockville, MD)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies, Inc., Rockville, MD)에서 배양하였다.

2. 다른 pH 환경에서의 섬유아세포 배양

DMEM과 10% FBS가 각 well에 포함된 6-well 플레이트(Corning Costar, Cambridge, MA)에 섬유아세포 2×10⁵개씩을 넣고 세포의 pH 영향을 평가하기 위해서 각well의 배양배지를 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 나누어 맞추고 배양

하였다. 각 pH 조절을 위해서는 1N HCl과 1M의 NaOH가 사용되었다. 각각의 다른 pH하에서 4일간 37°C 5% CO₂가 함유된 절대 습도공간에서 배양하였다.

3. 세포 생존율 및 TS catalytic activity 측정

각기 다른 pH 환경에서 배양된 마우스의 섬유아세포를 배양전 및 배양 1일, 2일, 3일, 4일째에 세포 생존율 및 TS catalytic activity ratio를 측정하였다. 세포생존율을 보기위해 trypsinisation 시킨 후에 trypan blue exclusion을 이용하여 생존 세포 수를 측정하였다. 생존율은 각 시간별 pH 7.5의 생존세포 수를 기준으로 하여 각각의 pH에서의 생존세포 수의 비를 백분율로 표시하였다.

TS activity는 Mirjolet 등¹¹⁾이 기술한 바 대로 측정하였다. 그들 보고에서는 TS가 [5-³H]dUMP를 dTMP로 전환시키면서 발생하는 삼중수(tritiated water)를 이용해 그 발현도를 측정하였다. 각 샘플을 37°C 에서 15분간 배양시킨후, 15% 활성 charcoal(activated charcoal)이 포함된 4%trichloroacetic acid를 300 μ L 첨가한다. 5000xg, 10분간 원심분리 시킨후에 상층액 150 μ L에 존재하는 radioactivity를 liquid scintillation counting을 이용해서 측정하였다. 이렇게 측정한 TS activity를 바탕으로 각 시간대별 TS catalytic activity ratio (=TS activity 각 pH/TS activity_{pH7.5}×100%)를 구하여 비교하였다.

결 과

1. pH변화가 섬유아세포 생존율에 미치는 영향

마우스 섬유아세포는 pH 7.5에서 가장 높은 생존율을 보였으며, pH가 높거나 낮은 경우모두에서 생존율이 감소하였다. 섬유아세포 생존율은 pH 7보다 pH 8에서 보다 낮게

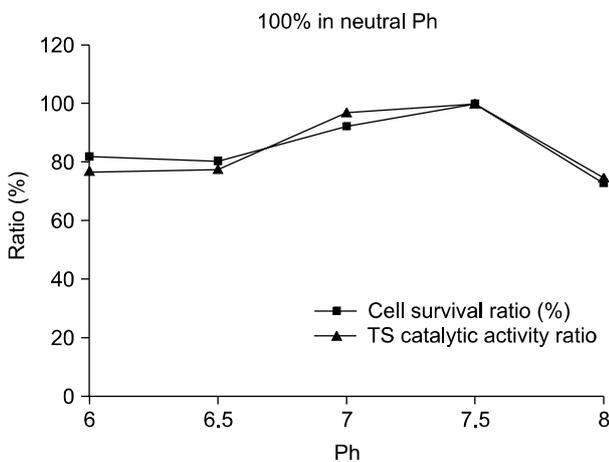


Fig. 1. Cell survival and TS catalytic activity ratio at day 1.

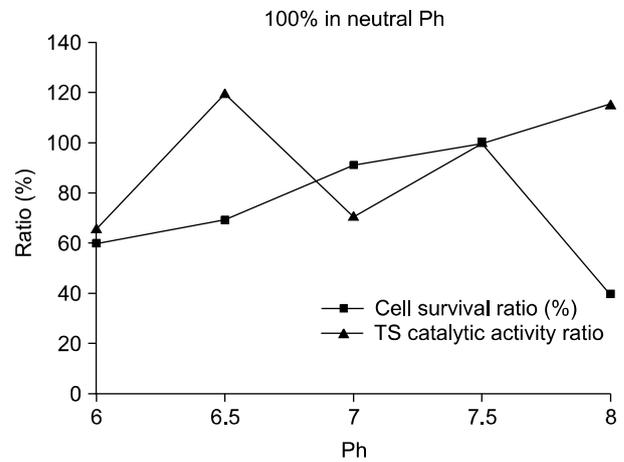


Fig. 2. Cell survival and TS catalytic activity ratio at day 2.

나타났고 이는 시간이 지남에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. pH가 낮아질수록 점차 섬유아세포의 생존율은 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1~4).

pH변화가 thymidylate synthase activity에 미치는 영향 TS catalytic activity는 각 시간의 변화에 따라 다양하게 나타났다는데 1일째에는 pH에 따른 변화가 pH 7.5에서 가장 높게 나타났고 pH 7.0에서는 큰 차이를 보이지 않았으며 pH 6.0, 6.5, 8.0에서는 activity가 떨어져 있는 것으로 나타났다. 섬유아세포의 생존율과 비슷한 정도로 나타났다(Fig. 1). 하지만 2일째에는 TS activity가 pH 6.5와 8.0에서 가장

높고 7.0과 6.0에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 2). 3일째에는 pH 8.0에서 오히려 TS activity가 증가하는 양상을 보였으며 pH가 낮을수록 감소하는 양상이 나타났다(Fig. 3). 4일째에는 pH감소할수록 생존율이 감소하는 것은 비슷했으나 pH 8.0에서 보다 TS activity ratio가 증가함을 나타냈다(Fig. 4, 5).

고찰

세포의 pH의 변화는 창상치유에 큰 영향을 미치게 된다.

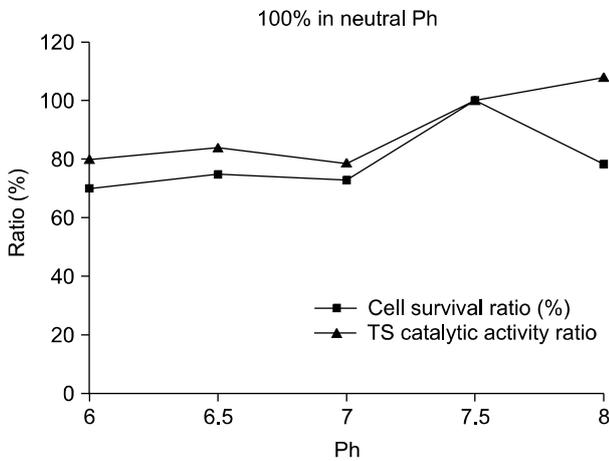


Fig. 3. Cell survival and TS catalytic activity ratio at day 3.

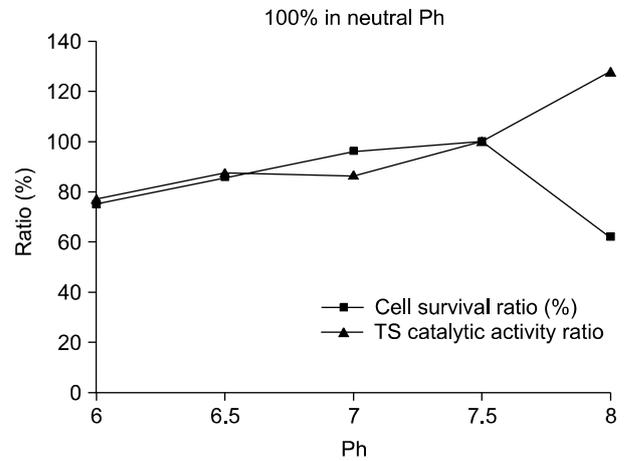


Fig. 4. Cell survival and TS catalytic activity ratio at day 4.

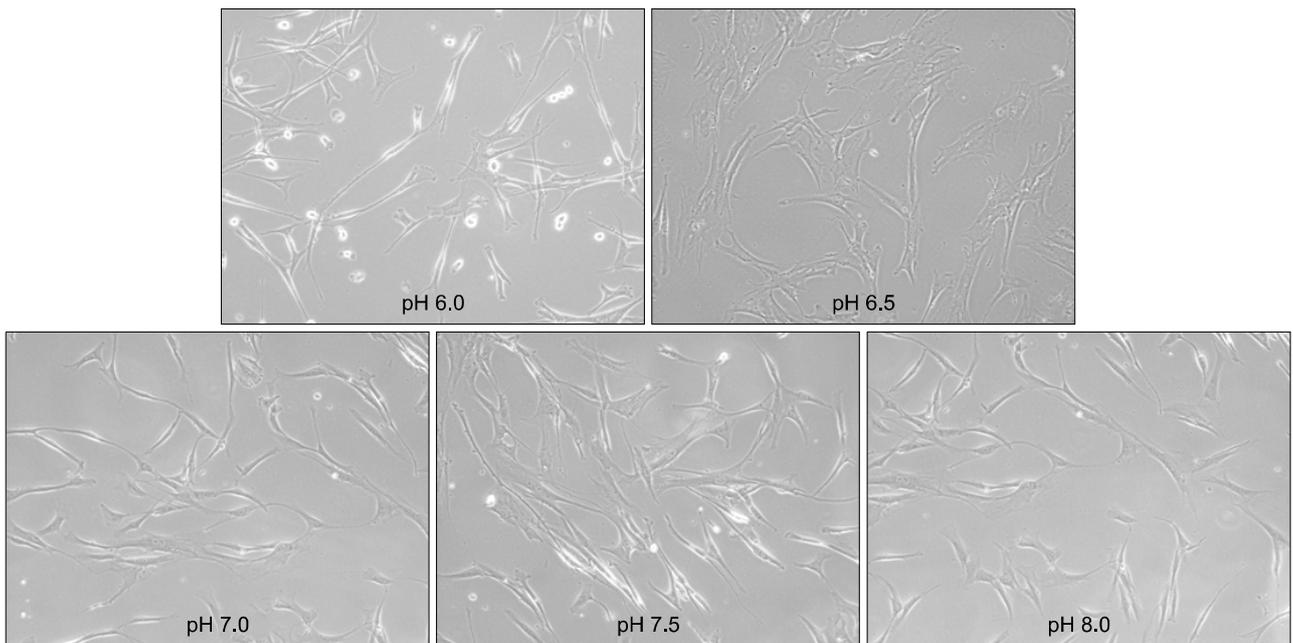


Fig. 5. Microscopic findings of cultured fibroblast survival in various pH conditions at day 4 (×100).

혈관 허혈, 당뇨병성 발 등의 환경에서는 산성 pH가 나타나게 되어서 창상 치유를 지연시키고, 만성 창상으로 이행시키게 되는 원인이 되기도 한다. 이러한 산성화는 내피세포의 기능을 억제하고 세포자멸을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 또한 몇 가지 세포 줄기(cell line) 에서 세포내 산성화가 세포자멸에 대해 미치는 영향에 대해서도 보고되어 왔다. 하지만 알칼리 환경을 포함해서 섬유아세포를 대상으로 pH 변화를 연구한 보고는 아직 없었다.

본 연구에서 나타난 바에 의하면 섬유아세포의 증식은 중성 pH (7.5)에서 가장 최고점(peak)을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 산성 혹은 알칼리 환경에 노출된 시간에 관계 없이 항상 일정하게 나타났다. 그리고 pH가 낮거나 높을수록 섬유아세포 생존율이 감소하고 더구나 pH가 높은 환경에서 더욱 그 생존율이 감소하는 것을 알 수 있었다. 즉 중성 환경을 유지시키는 것이 섬유아세포의 생존율을 높여 보다 창상 치유를 촉진시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 산성 pH 환경에서는 TGF- β 가 활성화 되는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 하지만 가장 강력한 섬유아세포 자극 성장 인자인 TGF- β 가 활성이 되지만 섬유아세포가 감소하는 것은 아마도 본 연구가 *in vitro* 실험이었으므로 성장 인자가 산성화로 인하여 수용체(receptor)에 결합하는 친화력(affinity)가 감소하기 때문이고 그 수용체가 감소하기 때문에 세포내로의 신호 전달이 되지 않기 때문이라고 생각된다. 물론 *in vivo*에서는 이러한 과정과는 다른 과정(pathway)을 통해, 혈관신생화나 교원질 생산이 촉진되어 섬유아세포의 활성이 증가하는 것으로 여겨진다. 반면 pH가 높은 알칼리 환경에서는(pH 8.0) 섬유아세포가 TGF- β 의 비활성화 때문에 증식하지 못하고 생존율이 감소한 것으로 사료된다. 이것은 *in vivo*에서 나타나는 현상과 비슷한 결과로 여겨진다.

Thymidylate synthase (TS)는 DNA 합성에 필요한 thymidylate 생산에 필수적인 인자이며 곧 세포 증식이 활발할수록 TS activity가 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 TS activity ratio는 1일째에는 섬유아세포 생존율의 변화와 비슷한 양상으로 나타났고 2일째에는 알칼리 환경에서 TS activity가 증가한 것을 제외하고는 큰 의미를 나타내지 못했다. 3일째에는 다시 섬유아세포 생존율의 변화와 비슷한 양상을 보였으나 알칼리 환경에서 TS activity가 증가하는 양상을 보였고 4일째에서는 3일째와 비슷한 양상을 보였으나 알칼리 환경에서 보다 TS activity가 크게 증가하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 pH가 낮은 환경에서는 TS의 변화는 큰 의미를 나타내지 못했다. 하지만 pH가 높은 알칼리 환경에서는 TS가 예측과는 달리 매우 높게 나타났는데 그것은 세포의 방어적 메커니즘(protective mecha-

nism)이 알칼리 환경에서 시작되어서 오히려 TS activity가 증가하는 것으로 사료된다. 실제로 TS activity가 증가해도 섬유아세포는 증식되지 않았다. 그 이유는 앞서 TGF- β 와 마찬가지로 세포내 활성은 증가되지 않았기 때문으로 사료된다.

본 연구는 다양한 pH 환경에서 섬유모세포의 증식 및 이와 관련된 TS activity의 변화를 처음으로 밝혔다는데 의의가 있다 하겠다 하지만 좀더 일관성 있는 결과를 얻기 위해서는 좀더 많은 실험이 필요할 것이며 추후에는 인간 섬유모세포를 이용한 실험이 필요할 것으로 생각된다. 향후 pH와 TS activity blockage를 통한 인간 섬유모세포의 이상증식(예:켈로이드) 억제에 기초를 마련하는 연구가 될 것이라 사료된다.

결 론

산성화 혹은 알칼리 환경에 노출된 섬유아세포는 그 증식이 억제되고, TS catalytic activity는 산성환경에서는 세포증식과 비슷한 패턴을 보이거나 알칼리 환경에서는 오히려 증가하는 패턴을 보이기도 하였다.

REFERENCES

- 1) Hewitson TD, Becker GJ. Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *Am J Nephrol.* 1995;15:111-117.
- 2) Rahimi RA, Leof EB. TGF- β signaling: a tale of two responses. *J Cell Biol.* 2007;102:593-608.
- 3) Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000;103:295-309.
- 4) Patterson GI, Padgett RW. TGF- β related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet.* 2000;16:27-33.
- 5) Jehn C, Geyer P, Johnson L. Control of thymidylate synthase mRNA content and gene transcription in an overproducing mouse cell line. *Mol Cell Biol.* 1985;5:2527-2532.
- 6) Navalgrund L, Rossana C, Muench A, Johnson L. Cell cycle regulation of thymidylate synthase gene expression on cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem.* 1980;255:7386-7390.
- 7) Pestalozzi B, McGinn C, Kinsella T, et al. Increased thymidylate synthase protein levels are principally associated with proliferation but not cell cycle phase in asynchronous human cancer cells. *Br J Cancer.* 1995;71:1151-1157.
- 8) Ziegelstein RC, Cheng L, Blank PS, et al. Modulation of calcium homeostasis in cultured rat aortic endothelial cells by intracellular acidification. *Am J Physiol.* 1993;265:H1424-433.
- 9) Serrano CV Jr, Fraticelli A, Paniccia R, et al. pH dependence of neutrophil-endothelial cell adhesion and adhesion molecule expression. *Am J Physiol.* 1996;271:C962-970.
- 10) D'arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, et al. Acidosis

- inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res.* 2000;86:312-318.
- 11) Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, Merlin JL, et al. Thymidylate synthase expression and activity: relation to S-phase parameters and 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer.* 1998;78:62-68.
- 12) Tovbin D, Franch HA, Alpern RJ, Preisig PA. Media acidification inhibits TGF beta-mediated growth suppression in cultured rabbit proximal tubule cells. *Proc Assoc Am Physicians.* 1997;109:572-579.
-