

## Cyclooxygenase-2 over-expression is associated with increased mast cells in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis

Seung-Joo Jekal<sup>1</sup>, Jae-Hyoung Lee<sup>2</sup>, and Seung-Teack Park<sup>3</sup>

*Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Jeonbuk, 570-750, Korea<sup>1</sup>*

*Department of Physical Therapy, Wonkwang Health Science University, Jeonbuk, 570-750, Korea<sup>2</sup>*

*Department of Anatomy, College of Medicine, Wonkwang University, Jeonbuk, 570-749, Korea<sup>3</sup>*

Cyclooxygenase(COX-2) is an inducible enzyme that catalyzes the synthesis of prostaglandins (PGs) from arachidonic acid. Over-expression of COX-2 has been reported to be associated with progressive hepatic fibrosis in chronic hepatic C infection and rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>). Recently, it is well known that mast cell products can stimulate the proliferation of hepatic stellate cells and key players in liver fibrosis. But little is known regarding their role in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rat. Our aim was to investigate the relation between COX-2 expression and mast cells during liver fibrosis after CCl<sub>4</sub> treatment. Thirty Wistar rats were divided into five groups (non-treated 0, 2, 4, 6 and 8-week after CCl<sub>4</sub>-treatment). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to assess the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen-1 and COX-2 in liver tissue from CCl<sub>4</sub>-treated rats. The density of collagen and mast cells were determined using a computerized image analysis system in liver sections stained with picosirius red and toluidine blue, respectively. The expression levels of  $\alpha$ -SMA, collagen-1 and COX-2 mRNA were significantly higher at 2 wk in CCl<sub>4</sub>-treated groups than non-treated group. The number of mast cells in liver tissues increased gradually from 2 wk to 6 wk depending on the fibrosis severity but decreased abruptly at 8 wk. The significant increase of collagen-1 and  $\alpha$ -SMA mRNA expression in CCl<sub>4</sub>-treated rats was continued until 6 wk while the COX-2 mRNA was significantly decreased at 8 wk. These results suggest that increased mast cells are closely associated with COX-2 over-expression during hepatic fibrogenesis of CCl<sub>4</sub>-treated rats.

**Key Words** : Hepatic fibrosis, Cyclooxygenase-2, Mast Cells

### 서론

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid로부터 염증 증개제로 중요한 Prostaglandin2 (PG2), prostacyclin 그리고 thromboxane 등의 전구체인 prostaglandin H2 (PGH2)로 전환시키는데 관여하는 속도제한효소로서 COX-1과 COX-2의 두가지 isoform이 존재한다(Dubois 등, 1998). COX-1은 정상적으로 많은 세포에서 발현되며 PG의 항상성 기능에 관여하는 반면에, COX-2는 정상 상태에서는 존재하지 않지만 시토키인이나 지질다당체(LPS)와 같은 다양한 염증유발 자극에 의해 합성된다(Appleton 등, 1996; Simonin 등, 2002). 이 중 COX-2는 염증, 섬유화 그리고 발

Corresponding Author : Jekal, Seung-Joo, Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Jeonbuk 570-750, Korea

Tel : +82-63-840-1215 Fax : +82-63-840-1219

Mobile +82-10-3084-4275

E-mail : sjjei@wkhc.ac.kr

Received : 29 November 2012

Return for modification : 5 December 2012

Accepted : 14 December 2012

본 연구는 2012년도 원광보건대학교 연구지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

암과정에 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 왔고, 특히 간에서는 COX-2의 상향조절이 염증유발 및 유사분열 촉진 자극에 반응하여 PGs의 생성을 증가시키는 것으로 추정하고 있다(Friedman, 2000; Shattuck-Brandt 등, 2000; Kwon 등, 2012). 최근 몇몇 연구에서도 간암종 주위 간경변조직, 만성 C형 간염환자에서 간섬유화 그리고 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)에 의한 간섬유화 과정에서 COX-2 상향조절이 있음을 보여 주었다(Cheng 등, 2004; Mohammed 등, 2004; Hui 등, 2006).

비만세포는 염증 중개체의 주요 생성세포로서 분비과립 내에 중개체의 일부를 미리 만들어 저장하고 있으며, 시토키인과 지질유래 eicosanoid와 같은 것들은 세포내에서 생합성하기도 한다(Levi-Schaffer와 Kupietzky, 1990). 또한 비만세포는 간별모양세포의 증식을 자극하여 간섬유화 과정에서 주요 연출자로서 역할을 하고 있으나 사염화탄소 유도 간섬유화 과정에서의 비만세포 역할에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 최근 사람비만세포(HMC)주와 사람 섬유모세포 공생배양에서 섬유모세포에서의 PGs 합성과 PGE<sub>2</sub> 생성에 COX-2의 상향조절이 있으며 이 작용에는 비만세포로부터 생성된 IL-4가 관여한다고 보고하였다. 그리고 이때 생성된 PGD<sub>2</sub>를 포함한 PGs는 섬유모세포의 증식과 I형 콜라겐 생성을 조절할 수 있음도 보여주었다(Smith 등, 1999).

따라서 본 연구는 CCl<sub>4</sub>로 유도한 간섬유화 과정에서 COX-2 과발현이 비만세포 수의 증가와 상호관련성이 있는지를 조사하기 위해 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 처치

130-150g의 Wistar 흰쥐 숫컷 30마리를 구입하여 실험실에서 2~3일간 적응시킨 후 사용하였다. 모든 쥐는 19-22°C의 실내에서 12시간 명암주기로 상품화된 사료(카길 애그퓨리나, 한국)와 수돗물을 자유롭게 공급하면서 사육하였다. 간섬유증 유도를 위해 올리브기름에 1:1로 희석한 CCl<sub>4</sub>를 8주 동안 1주에 3번씩 체중 100g 당 0.2ml를 복강 내로 주사하였다. 실험쥐는 각 군당 6마리씩 5군으로 나누어 간섬유

증 군은 2, 4, 6, 8주 간격으로 희생시켰고 나머지 CCl<sub>4</sub>를 처리하지 않은 한 군은 비처리 대조(0 주)로 사용하였다. 각 군으로부터 채취한 간조직에서 일부는 즉시 10% 중성완충 포르말린에 24시간 고정하여 조직학적, 면역조직학적 검사에 사용하였고, 나머지 조직은 나중에 RNA 추출을 위해 잘게 썰어 RNAlater™(Ambion, Inc., Texas, U.S.A)에 담아 4°C에서 1일간 두었다가 -20°C에 옮겨 보관하였다. 동물 실험은 원광보건대학 동물윤리심의위원회에서 정한 동물실험 관리 및 사용에 관한 규정에 따라 수행하였다.

### 2. 조직학적 분석

각 군으로부터 얻은 포르말린에 고정된 간조직은 일반적인 방법에 따라 탈수, 침투과정을 거쳐 파라핀 포매 한 다음 4 μm 두께로 연속절편을 만들어 hematoxylin-eosin(HE) 염색, 콜라겐 침착을 보기 위해 picrosirius red염색(López-De León과 Rojkind 등, 1985) 그리고 비만세포를 보기 위해 toluidine blue염색(Enerbäck, 1966)을 하였다.

### 3. 면역조직화학 분석

면역염색은 DAKO EnVision 키트를 사용하여 습윤챔버에서 손으로 실온에서 수행하였다. 4μm 두께의 파라핀 절편을 제작하여 ProbeOn™ Plus slide(Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.A)에 붙이고 58°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 하강 계열알코올에 함수한 다음 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 손으로 시행하였다. 그 과정을 간단히 요약하면 절편을 수세 후 α-SMA의 경우 항원부활 없이, COX-2는 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)에 넣어 압력솥(Cell marque, Austin, TX, USA)에서 15분간 항원부활을 하였다. 이어 조직 내인성 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 3% hydrogen peroxide로 5분간 작용시킨 후, Tris buffer saline(ScyTex laboratories, Utah, USA)으로 세척한 다음 비특이적 반응을 차단하기 위해 protein block(Dako, A/S; Grostrup, Denmark)에 옮겨 20분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 mouse anti-human α-SMA antibody(1:400; Dako, Denmark)와 rabbit antimurine/rat Cox-2 antibody(1:500; Cayman Chemical, USA)를 각각 30분간 작용시킨 다음 Tris buffer saline로 적당히 세척

**Table 1.** Primer sequences and PCR product sizes

Primer	Forward sequence	Reverse sequence	Product size(bp)
$\beta$ -actin	5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3'	5'-GAGAAGTGGGGTGGCTT-3'	350
$\alpha$ -SMA	5'-CCGAGATCTCACCGACTACC-3'	5'-TCCAGAGCGACATAGCACAG-3'	120
Collagen $\alpha$ 1(I)	5'-TGGAGACAGGTCAGACCTG-3'	5'-TATTCGATGACTGTCTTGCC-3'	409
COX-2	5'-GATTGACAGCCCAACTT-3'	5'-CGGGATGAACTCTCTCTCA-3'	150

하고 Dako Envision Detection kit를 사용하여 30분간 작용시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 permount로 봉입하였다.

#### 4. 영상분석

간섬유화 정도와  $\alpha$ -SMA-양성세포 면적을 정량적으로 분석하기 위하여 picosirius와 면역염색표본을 광학현미경(Olympus BX 50, Olympus Optical Lts., Japan) 100배에서, 비만세포를 보기 위한 toluidine blue 염색의 경우는 400배에서 전체 시야를 디지털 카메라(Olympus DP72, Japan)로 촬영하여 JPG 파일로 저장한 후, 영상분석 프로그램(Image-Pro<sup>®</sup> Plus ver 4.5, Media Cybernetics Inc., Georgia, USA)을 사용하여 콜라겐과  $\alpha$ -SMA-양성세포의 경우는 양성면적부위의 백분율을 산출하였고, 비만세포는 1mm<sup>2</sup> 당 수를 세어 비만세포밀도를 구하였다.

#### 5. RT-PCR에 의한 collagen $\alpha$ 1(I), $\alpha$ -SMA 및 COX-2 mRNA의 발현률 분석

-20°C에 보관되어 있는 동결 간조직 약 50mg을 RNAzol(Tel-Test Inc, U.S.A)에 2ml에 옮겨 조직분쇄기(homogenizer)를 사용하여 균질화한 후 chloroform 0.2ml을 첨가하여 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 isopropanol 0.5 ml을 넣어 잘 섞고 실온에서 10분간 두었다가 4°C에서 12,000 × g로 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 80% ethanol로 세척한 다음 건조시켰다. 추출한 RNA는 agarose gel 전기영동하여 RNA 질을 확인하고 Qubit fluorometer(invitrogen corp, USA)로 RNA 양을 측정하였다.

총RNA는 Reverse trascription kit(Bioneer, Korea)를 사용

하여 cDNA를 합성하였고 합성된 cDNA 1 ul를 취하여 각 PCR을 시행하였다. 정상 표준 유전자로는  $\beta$ -actin house-keeping 유전자를 사용하였다. 프라이머는 Bioneer회사에 의뢰하여 제작하였고, 프라이머 염기서열과 PCR 산물크기는 Table 1과 같다.

$\beta$ -actin, collagen  $\alpha$ 1(I),  $\alpha$ -SMA, COX-2의 PCR은  $\beta$ -actin의 경우 94°C에서 30초간 변성, 59°C에서 30초간 어닐링, 72°C에서 30초간 연장하여 30회 반복 시행, collagen  $\alpha$ 1(I)은 94°C에서 60초간 변성, 59°C에서 60초간 어닐링, 72°C에서 60초간 연장하여 30회 반복 시행,  $\alpha$ -SMA은 94°C에서 30초간 변성, 59°C에서 30초간 어닐링, 72°C에서 30초간 연장하여 30회 반복 시행, COX-2는 72°C에서 30초간 변성, 94°C에서 60초간 어닐링, 59°C에서 60초간 연장하여 35회 반복 시행하였다. 증폭산물은 50bp DNA ladder(Invitrogen Co., California, USA)와 함께 2% agarose gel에서 85 V로 45분간 전기영동한 후 Gel Doc 2,000<sup>™</sup>(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 RNA 크기를 확인하였다. 획득한 전기영동 밴드 영상은 영상분석 프로그램인 Quantity One 1-D image analysis software ver 4.1(Bio-Rad Laboratories Inc., USA)을 사용하여 RNA 정점 밀도를 측정하였다. DNA ladder의 밀도를 기준으로  $\beta$ -actin, collagen  $\alpha$ 1(I),  $\alpha$ -SMA 그리고 COX-2 mRNA의 밀도를 비율(ratio)로 환산한 후,  $\beta$ -actin의 밀도를 기준으로 하여 collagen  $\alpha$ 1(I),  $\alpha$ -SMA 그리고 COX-2 mRNA의 밀도 비율을 각각 산출하였다.

#### 6. 자료 통계 분석

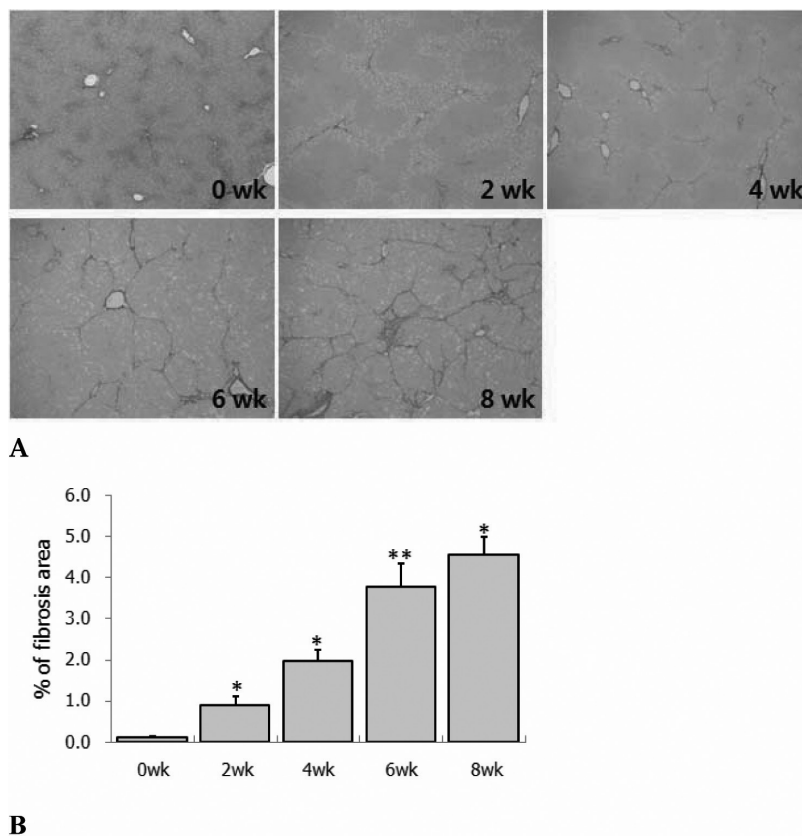
각 군 사이의 차이를 비교하기 위하여 일원분산분석(one-Way ANOVA test)를 하였으며, 사후검정을 위해 터키 다중 검사(Turkey multiple range test)를 시행하였다.

모든 결과는 평균과 표준편차로 표현하였으며, p값이 0.05 이하이면 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다. 분석에는 SPSS ver 10.0 패키지 프로그램을 사용하였다.

## 결 과

CCl<sub>4</sub>-투여 쥐의 간조직 HE염색표본에서는 2주 후부터 중심정맥 주변으로 지방변성, 염증세포 침윤, 간세포의 풍선화 그리고 괴사세포들이 띠모양으로 형성하기 시작하여 4주 후에는 문맥부위까지 뻗어나가 중심정맥과 문맥부위의 연결이 관찰 되었으며, 6주 후에는 중심정맥과 문맥부위, 문맥부위와 문맥부위 사이에 가교가 만들어졌으며 가교를 따

라 방추형의 세포들이 뚜렷이 증가하였다. 8주 후에는 가교를 따라 방추형의 세포들이 더 많이 증가하여 굵고 진한 띠로 관찰되었으며 이들 띠로 인하여 간실질조직에 광범위하게 변형이 일어나면서 동굴모양혈관은 더 이상 구별되지 않았으며 크고 작은 결절모양들이 만들어지기 시작하였다. 간조직의 picrosirius red염색 결과 CCl<sub>4</sub>-투여 2주 후부터 중심정맥 주변에서 콜라겐이 증가하면서 띠모양으로 짧게 뻗어나가기 시작하여 4주 후에는 일부에서 문맥부위까지 이어져 가교모양을 만들었으며, 6주 후에는 중심정맥과 중심정맥, 중심정맥과 문맥부위 사이에 뚜렷한 가교가 형성되었고, 8주 후에는 부분적으로 두꺼운 섬유 사이막 (fibrous septae)을 만들기도 하였으며(Fig. 1A), picrosirius red-양성 콜라겐의 이미지분석 결과 CCl<sub>4</sub>-투여 후 2주부터 8주까지

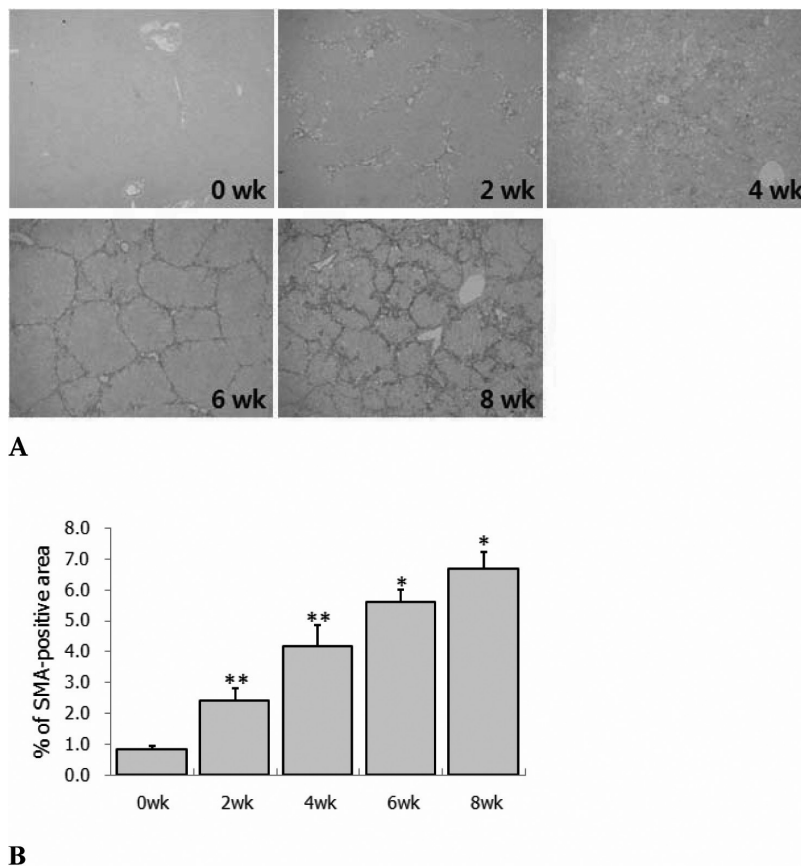


**Fig 1.** Changes of Collagen accumulation of liver sections at 0, 2, 4, 6 and 8 week after CCl<sub>4</sub> treatment. A. Collagen is stained red in the centrilobular and periportal area. At 4, 6, 8 wk, neighboring central vein and central-portal area were bridged by fibrous septa. Picrosirius red staining. Magnification, x40. B. Quantitative analysis by morphometry of area of fibrosis. Results are expressed as mean ± SD. \*p<0.05 compared with \*\*p<0.01 compared with 2wk and 4wk. NS(no significant) compared with normal control and 6wk.

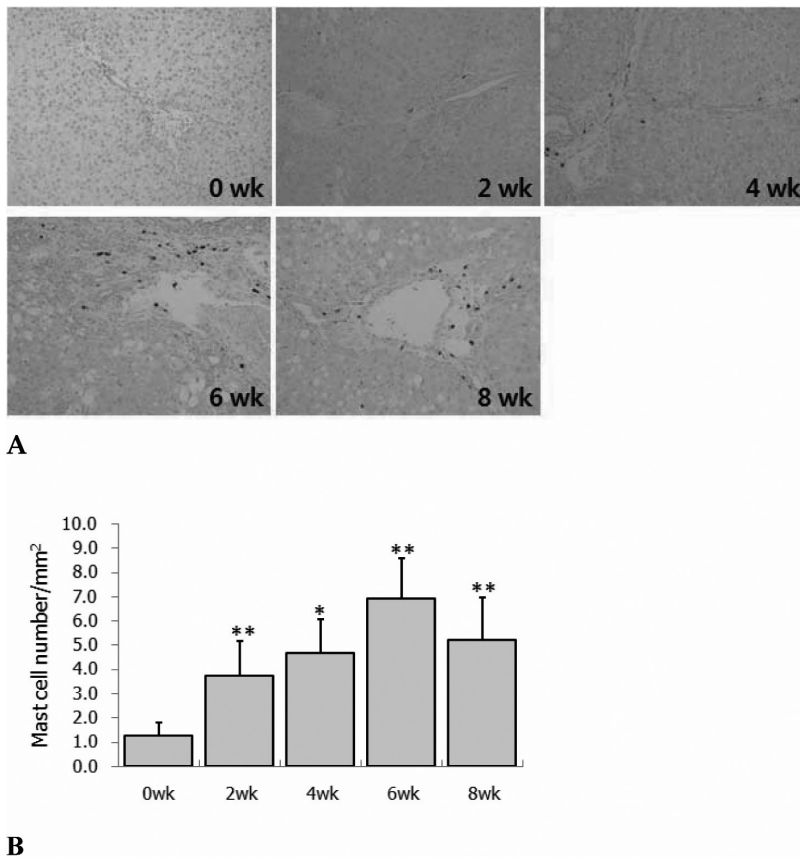
콜라겐이 앞 주의 콜라겐 %보다 통계학적으로 의미 있게 증가하였다 (Fig. 1B).  $\alpha$ -SMA 면역염색에서는  $\text{CCl}_4$ -투여 2주 후부터 8주까지 섬유화 진행 정도와 일치하여 형성된 섬유 사이막 내에 활성화된 간별모양세포 (hepatic stellate cells) 가 증가되어(Fig. 2A)  $\alpha$ -SMA-양성 부위가 통계학적으로 의미 있게 증가하였다 (Fig. 2B). 또한 간섬유화 진행과 더불어 비만세포 수적 변화를 보기 위해 toluidine blue염색 한 결과 정상대조군의 경우 문맥부위에 없거나 1개 내지 2개 정도가 출현하였으며, 그 모양은 구형 또는 난원형으로 관찰되었다(Fig. 3A). 그러나  $\text{CCl}_4$ -투여 2주군에서는 섬유화의 증가와 더불어 6주까지 통계학적으로 의미 있는 증가를 보이다가 8주군에서는 통계학적으로 매우 의미 있게 감소하였다 (Fig. 3B).

한편, 면역염색 결과를 mRNA 수준에서 확인하기 위하여 RT-PCR에 의해  $\alpha$ -SMA, collagen-a1(I) 그리고 COX-2 mRNA의 발현률을 조사한 결과 정상 대조군에 비해  $\text{CCl}_4$ -투여군에서 2주군부터 통계학적으로 의미 있게 증가하기 시작하여 6주까지 섬유화 정도가 심할수록 증가하다가 8주에서는  $\alpha$ -SMA mRNA 발현률은 약간 의미 있게 증가하였으나, collagen-a1(I) mRNA 발현률은 약간 의미 있는 증가를 보이지 않았으며, COX-2 mRNA 발현률은 매우 의미 있는 감소를 보였다 (Fig. 4).

COX-2 면역염색에서는 COX-2 양성세포가 정상 대조군에서는 거의 관찰되지 않았으나  $\text{CCl}_4$ -투여 2주 후부터 동굴모양혈관 내피세포와 염증세포에서 약한 양성반응을 나타냈으며, 4주 후부터 간세포에서 뚜렷한 양성반응을 보



**Fig 2.** Immunohistochemistry for  $\alpha$  smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) to detect activated hepatic stellate cells in liver sections at 0, 2, 4, 6 and 8 wk after  $\text{CCl}_4$  treatment. A. At 2 and 4 wk, slight positive staining is only detected in centrilobular area. Marked staining for  $\alpha$ -SMA is found at 6 and 8 wk, along the fibrous septa. Magnification, x40 B. Quantitative analysis by morphometry of area of staining for  $\alpha$ -SMA. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \*\* $p$ <0.01 compared with normal control and 2 wk. \* $p$ <0.05, NS(no significant) compared with 4 wk and 6 wk.



**Fig 3.** Comparison of mast cell density of liver sections at 0, 2, 4, 6 and 8 wk after CCl<sub>4</sub> treatment, A. Mast cells are observed in periportal region, along fibrous septa and in surface fibrous capsular area. Toluidine blue staining, Magnification, x100. B. Quantitative analysis by morphometry of mast cell number per mm<sup>2</sup> in control and CCl<sub>4</sub>-treated rats during experimental period. Results are expressed as mean ± SD. \*p<0.05, compared with 2 wk, \*\*p<0.01, compared with 0, 4 and 6 wk.

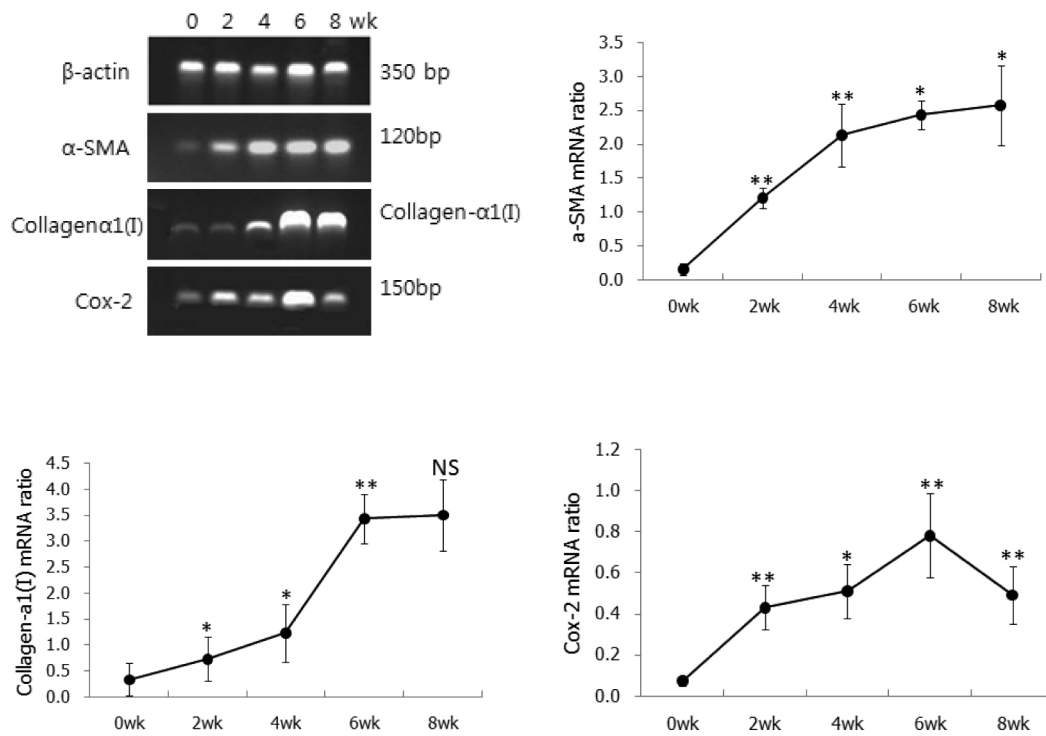
였으며, 6주후부터는 간세포의 양성반응 강도가 4주에 비해 뚜렷이 증가하였고 특히 섬유사이막 가까이에 위치한 간세포에서 양성반응이 더욱 뚜렷하게 관찰되었으며, 문맥부위의 증식된 담관 상피에서도 강한 양성반응을 볼 수 있었다. 그러나 활성화된 간별모양세포는 음성반응을 나타내었다 (Fig. 5).

### 고 찰

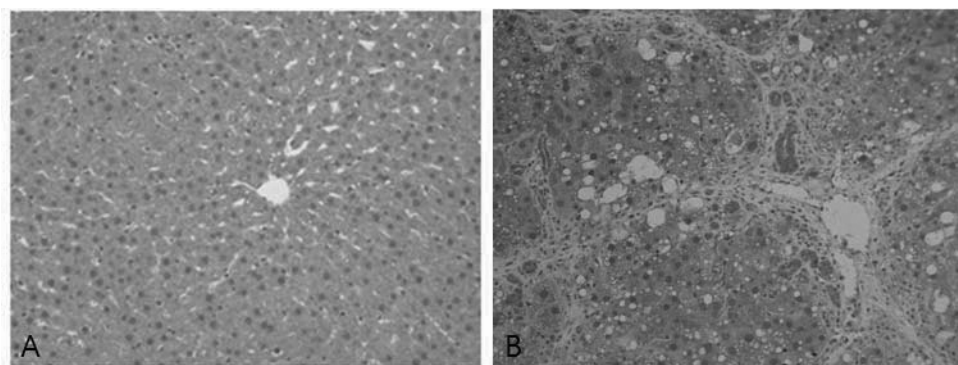
본 연구에서 우리는 CCl<sub>4</sub>로 유도된 쥐의 간조직에서 COX-2가 과발현되고 그 발현률은 섬유화의 진행 정도에 따라 증가함을 관찰할 수 있었으며, 간섬유화의 초기 발생단

계에서 COX-2의 발현과 비만세포의 수의 증가와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

이는 Hinz 등(2001)의 연구에서 정상 심장조직의 경우 섬유모세포 의해 세포외기질 분비와 침착이 비교적 느리고 광범위하게 진행되는 반면에 심장에서 섬유화가 일어날 경우 섬유모세포가 수축성과 단백질합성능이 활발한 근섬유모세포로 표현형이 바뀌면서 세포외기질을 신속하게 분비하여 심장조직 사에네 많은 양을 침착시킴으로서 심장 비대가 일어나는 것과 같은 변화로 생각된다. 섬유화 과정에서 섬유모세포가 근섬유모세포로의 표현형 전환하는 데는 기계적인 부하와(loading)와 함께 TGF-β1 자극 등과 같은 신호전달 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있는데, TGF-β1 자극은 섬유모세포 내에 α-smooth muscel actin이 증가시키고 이



**Fig 4.** Comparison of  $\alpha$ -SMA, collagen- $\alpha$ 1(I) and COX-2 mRNA expression ratio by RT-PCR analysis in CCl<sub>4</sub>-treated liver tissues during a period of experiment, The expression ratio is expressed as a relative value for  $\beta$ -actin expression, house-keeping gene.  $\alpha$ -SMA mRNA. \*\*p<0.01, compared with 0wk, 2wk, and 4wk. \*p<0.05, compared with 4wk and 6wk. Collagen-  $\alpha$ 1(I) mRNA \*p<0.05, compared with 0wk and 2wk. \*\*p<0.01, compared with 4wk. NS(no significant) compared with 6wk. COX-2 mRNA \*\*p<0.01, compared with 0, 4 and 6 wk. \*p<0.05, compared with 2 wk.



**Fig 5.** Immunohistochemistry for cyclooxygenase-2(COX-2) in liver sections at 0 wk(control)(A) and 6 wk after CCl<sub>4</sub> treatment(B). Positive staining is predominantly detected in hepatic cells adjacent to fibrous septa and bile duct epithelial cells. Magnification, x200.

로 인해 수축성과 세포외기질 합성능이 활발한 근섬유모세포가 증가하게되고 심근경색 후의 심근경색 반흔을 형성하는데 기여한다고 알려져 있다(Border와 Noble, 1994;Hinz

등, 2001). 그러나 사이질 섬유증(interstitial fibrosis)에서 근섬유모세포가 어떠한 경로에 의해 활성화되는지에 대해서는 여전히 잘 알려져 있지 않고 있다.

최근 Levick 등(2009)은 비만세포가 고혈압성 심장 내의 섬유증 발생에 중심 역할을 하며, 이들 세포가 확인되지 않은 기전에 의한 tryptase 방출과 관련이 있다는 강력한 증거를 제시하였고, McLarty 등(2011)도 tryptase 방출 기전의 하나로 tryptase와 protease-activated receptor 2경로 (tryptase/ PAR-2)가 있음을 확인하였고, 콜라겐 합성의 활성화에 tryptase/ PAR-2 신호전달 경로가 중요한 역할을 담당할 것을 시사하였다. Masamune 등(2004)도 이미 PAR2 agonist가 쥐 췌장별모양세포(pancreatic stellate cells)에서의 콜라겐 합성을 증가시키며 이는 c-Jun N-terminal kinase의 활성화를 경유하여 이루어진다고 보고하였다. 더욱이 Gaca 등(2002)은 간섬유증에서 thrombin 또는 tryptase에 의해 활성화된 PAR-2 수용체가 간별모양세포(liver stellate cells)의 증식과 콜라겐 합성을 촉진하여 간섬유증을 지속시키는데 기여하는 것으로 보고하였다. 따라서 간섬유화는 tryptase-유도 신호전달경로를 통해 tryptase와 그 수용체인 PAR2, COX-2 그리고 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) 성분들의 관여로 이루어지는 것으로 추정하고 있다(Frungieri 등, 2002; Knight 등, 2012). Tryptase/ PAR-2 경로를 통해 비만세포로부터 방출된 tryptase는 PAR2를 활성화하여 그 결과 COX-2의 발현을 상위 조절하고 PG 합성을 자극하며, 이것은 15d-PGJ2에 대한 수용체로 작용하는 PPAR $\gamma$ 를 소유한 섬유모세포와 근섬유모세포를 활성화로 이어져 간섬유화가 일어난다는 견해와 일치한다(Abe 등, 2000; Okuda-Ashitaka 등, 1990; Altiok 등, 1997). 뿐만 아니라 tryptase는 섬유모세포 증식과 화학주성 그리고 아교섬유 생성에 효과를 미친다는 것은 이미 여러 연구자들에 의해 알려져 있고 섬유모세포 증식인자도 동정되었다(Asano-Kato 등, 2005; Sawamukai 등, 2010). 이는 Frungieri 등(2002)이 지적한대로 구조적으로 COX-2를 매우 적게 발현하는 사람 섬유모세포가 tryptase 유도 하에 PAR-2의 활성화를 통하여 세포증식을 자극하고 COX-2 발현을 증가시키며, tryptase와 PAR2 agonist 펩티드인 SLIGKV가 PG-2합성효소인 COX-2를 유도한다는 결과를 통해서도 COX-2와 비만세포 tryptase의 관련성을 충분히 유추할 수 있다. 또한 Frungieri 등(2002)은 COX-2 mRNA와 그 단백질의 유도는 수분 내에 일어나는 신속한 사건으

로 그 결과 생물학적으로 활성화된 COX-2는 tryptase로 유도된 섬유모세포로부터 PGF2 $\alpha$ 와 15d-PGJ2의 두 PGs를 증가시킨다고 하였다. 그리고 PGs와 그 수용체는 섬유모세포의 증식과 I형 콜라겐 합성을 조절한다는 것은 이미 여러 연구에서 제시되어 있다(Akers 등, 2000; Gruber 등, 1997; Abe 등, 2000).

따라서 섬유화 과정에서 섬유모세포의 증식을 매개하는 tryptase 신호전달경로는 COX-2의 유도, 15d-PGJ2의 합성 그리고 PPAR $\gamma$ 를 경유하는 작용이 관여하는 것으로 생각된다(Kersten 등, 2000; Simonin 등, 2002). 그리고 CCl $_4$ 로 유도한 간섬유화의 경우 초기에 증가된 비만세포로부터 tryptase/ PAR-2 경로를 통해 tryptase가 방출되어 간별모양세포를 활성화함으로써 세포외기질을 침착을 유도하고 이 과정에서 간세포나 담관상피세포들로부터 생성된 COX-2 역할이 중요할 것으로 사료된다. 또한 초기에 증가하기 시작한 비만세포는 6주까지 계속적으로 증가를 보이다가 그 후 감소하는 경향을 나타내는 것은 피부절제 후 피부 비만세포도 초기에 증가하여 섬유모세포를 활성화하여 콜라겐을 침착을 유도한 후 감소하며(Jekal et al, 2010), 피부가 자외선에 노출되었을 때 초기에 활성화되기 시작하는 피부진피 섬유모세포에서는 COX-2가 전자가 증가하나 오히려 증식중인 섬유모세포에서는 COX-2의 전사가 감소한다는 결과와 일치한다(Mohammed 등, 2004).

이상의 결과를 종합해 볼 때 CCl $_4$ -유도에 의한 초기 간섬유화과정에서의 COX-2 과발현은 초기에 증가된 비만세포로부터 방출된 tryptase에 의한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, 106:78-84.
2. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000, 278:193-201.
3. Altiok S, Xu M, Spiegelman BM. PPARgamma induces cell



- cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev.* 1997, 11:1987-1998.
4. Appleton I, Tomlinson A, Willoughby DA. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv Pharmacol.* 1996, 35:27-78.
  5. Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005, 46:4622-4626.
  6. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994, 331:1286-1292.
  7. Cheng AS, Chan HL, Leung WK, To KF, Go MY, Chan JY, et al. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Mod Pathol.* 2004, 17:1169-1179.
  8. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998, 12:1063-1073.
  9. Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1966, 66:289-302.
  10. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000, 275:2247-2250.
  11. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *PNAS.* 2002, 99:15072-15077.
  12. Gaça MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol.* 2002, 36:362-369.
  13. Gruber BL, Kew RR, Jelaska A, Marchese MJ, Garlick J, Ren S, Schwartz LB, et al. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol.* 1997, 158:2310-2317.
  14. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* 2001, 159:1009-1020.
  15. Hui AY, Leung WK, Chan HL, Chan FK, Go MY, Chan KK, et al. Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat. *Liver Int.* 2006, 26:125-136.
  16. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* 2000, 405:421-424.
  17. Knight V, Tchongue J, Lourenz D, Tipping P, Sievert W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2012, 55:879-887.
  18. Kwon SH, Jeong SW, Jang JY, Lee JE, Lee SH, Kim SG, et al. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol.* 2012, 18:287-294.
  19. Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension.* 2009, 53:1041-1047.
  20. Levi-Schaffer F, Kupietzky A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Exp Cell Res.* 1990, 188:42-49.
  21. López-De León A, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J Histochem Cytochem.* 1985, 33:737-743.
  22. Masamune A, Kikuta K, Suzuki N, Satoh M, Satoh K, Shimosegawa T. A c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 (anthra[1,9-cd]pyrazole-6 (2H)-one) blocks activation of pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 310:520-527.
  23. McLarty JL, Meleńdez GC, Brower GL, Janicki JS, Levick SP. Tryptase/ protease-activated receptor 2 interactions induce selective mitogen-activated protein kinase signaling and collagen synthesis by cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 2011, 58:264-270.
  24. Mohammed NA, El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RFT. Distribution of constitutive(COX-1) and inducible(COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol.* 2004, 57:350-354.
  25. Okuda-Ashitaka E, Negishi M, Sugama K, Hatanaka M, Ito S. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth by prostaglandin D2 in a fibroblastic cell line (EBTr). *Eicosanoids.* 1990, 3:213-218.
  26. Sawamukai N, Yukawa S, Saito K, Nakayamada S, Kambayashi T, Tanaka Y. Mast cell-derived tryptase inhibits apoptosis of human rheumatoid synovial fibroblasts via rho-mediated signaling. *Arthritis Rheum.* 2010, 62:952-959.
  27. Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology.* 2000, 118:337-345.
  28. Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Bécuwe P, et al. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002, 282:125-133.

29. Smith TJ, Parikh SJ. HMC-1 mast cells activate human orbital fibroblasts in coculture: evidence for up-regulation of prostaglandin E2 and hyaluronan synthesis. *Endocrinology*. 1999, 140:3518-3525.
30. Jekal SJ, Kwon PS, Kim JK. Effect of 630 nm Light Emitting Diode(LED) Irradiation on Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Exp Biomed Sci*. 2010, 16:365-376