

Verapamil이 켈로이드 섬유모세포의 성장과 세포자멸사에 미치는 영향

박정민¹ · 이근철¹ · 김석권¹ · 배혜란² · 나서희³

동아대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 생리학교실², 해부병리학교실³

The Effects of Verapamil on Growth and Apoptosis of Keloid Fibroblast

Jung-Min Park, M.D.¹, Keun-cheol Lee, M.D.¹,
Seok-Kwun Kim, M.D.¹, Hae-Rahn Bae, M.D.²,
Seo-Hee Rha, M.D.³

Departments of ¹Plastic & Reconstructive Surgery, ²Physiology,
³Pathology, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea

In this study, the effects of verapamil on growth rate, apoptosis, production of transforming growth factor (TGF- β) and fibronectin were evaluated in keloid and normal human dermal fibroblasts. Both fibroblasts were primarily cultured from earlobe keloids of three female patients and treated with various concentrations of verapamil. Cell toxicity was assessed by MTT assay, growth rate and apoptosis by FACS, and the production of TGF- β and fibronectin by ELISA and Western blot, respectively. In the MTT₅₀, the cell growth was more suppressed in keloid fibroblasts. In the MTT₉₀, cell growth was more stimulated in normal fibroblasts. No significant effect appeared on TGF- β expression but an increase in extracellular fibronectin secretion was found in keloid fibroblasts. Keloid fibroblasts responded to verapamil more sensitively, and the percentage of apoptosis was higher at the MTT₅₀. In brief, verapamil had growth-inhibitory effect with inducing apoptosis at the MTT₅₀, but rather growth-stimulatory effect at the MTT₉₀. The biphasic effect of verapamil depending on the dose might explain one of the reasons of relapse after keloid treatment with verapamil. Clinical application with high concentration (2.5 mg/ml) is advised unless excessive dosage is used.

Key Words: Keloid, Verapamil

I. 서 론

켈로이드와 비후성반흔은 피부의 두 가지 비정상적 반

Received March 29, 2005

Revised July 14, 2005

Address Correspondence: Seok-Kwun Kim, M.D., Ph.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of Medicine, Dong-A University, #1, 3ga, Dongdaeshin-dong, Seo-gu, Busan 602-715, Korea. Tel: 051) 240-5413 / Fax: 051) 243-5416 / E-mail: jmpark@daunet.donga.ac.kr

흔 형성이다. 최근까지 그 원인이 되는 기전이 완전히 밝혀지지 않았지만, 대개의 경우에 유전적인 요인을 포함한 국소 조직학적 요소들이 관여하는 것으로 생각되고 있다. 오늘날 켈로이드와 비후성반흔을 치료하는데 여러가지 방법이 있으며 그 효과도 다양하다. 크게 약물요법, 물리적 요법, 방사선 치료, 수술적 치료 등이 있으나 치료 효과가 만족스럽지 못한 경우가 많고, 재발이 잦아서 더 나은 치료법이 기대되고 있다. 이 중 약물요법으로 triamcinolone, verapamil, 5-fluorouracil(5-FU), interferons, bleomycin, colchicine, retinoid, interleukin-6 등의 단독 또는 병용요법 등이 있다.

Verapamil은 활성화된 칼슘 통로와 비활성화된 칼슘 통로 모두에 작용하는 칼슘 통로 차단제이다. Lee와 Ping¹은 verapamil이 칼슘에 의존하는 세포의 분비작용을 억제하고 교원질 분자에 proline이 결합하는 것을 억제하여 교원질 형성을 억제한다고 하였다. Doong 등²은 verapamil이 정상 피부와 켈로이드 섬유모세포에서 actin filaments를 탈중합시켜 세포 모양을 방추형에서 둥글게 변화시키며, 전교원질 분해효소(procollagenase) 유전자를 활성화하여 전교원질 분해효소의 합성을 증가시킴으로써 교원질이 정상에서보다 감소했다고 보고했다. Lee 등³은 임상 실험에서 verapamil이 특별한 부작용이나 후유증 없이 반흔의 부피를 줄이는 데 효과가 있다고 보고했다. 그러나 verapamil의 농도에 따른 켈로이드 섬유모세포의 성장 변화, 세포자멸사, 섬유화의 초기 기질인 fibronectin 생성 및 분비, 섬유화에 관여하는 transforming growth factor- β (TGF- β) 생성 등, 치료기전에 관한 총괄적인 연구가 부족한 실정이다.

이에 저자는 세포 및 분자수준에서 verapamil의 켈로이드 섬유모세포에 대한 효과를 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 조직 배양

세 명의 30대 여성의 귓볼에서 발생한 켈로이드를 채취

해서 섬유모세포를 일차배양하였다. 이전에 다른 약물이나 처치를 받지 않았던 켈로이드 조직을 100 U/ml penicillin과 0.1 mg/ml streptomycin sulfate가 혼합된 phosphate-buffered saline solution(PBS)으로 여러 번 세척했다. 채취한 켈로이드 조직의 진피를 일정한 크기(1 - 2 mm)의 육면체로 잘게 잘랐다. 각 켈로이드 조각을 60 mm Petridish에 넣고 유리 coverslip으로 덮은 후 배지를 4 ml 첨가했다. 배지는 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin sulfate가 혼합된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, Grand Island, N.Y.)를 사용하였다. 적당한 습도하에 5% 이산화탄소를 함유한 공기에서 37°C 온도에서 배양하였다. 배양 8 - 10일째에 조직 조각에서 자라 나온 섬유모세포가 관찰되면 진피 조직을 제거하고, 완전한 집합을 보일 때까지 배양하다가 trypsin을 처리하여 세대배양하였다. 3회 이상의 반복실험에서 3회까지의 실험에서는 3 - 4세대 켈로이드 섬유모세포를 사용하였고, 그 이상의 확인 반복 실험에서는 8세대까지 사용되었다.

대조군으로 동일한 환자의 이개후부의 정상조직도 채취하여 위와 동일한 방법으로 정상 섬유모세포를 배양하여 3세대까지 실험에 사용하였다.

각각의 실험에서는 같은 계배배양수의 세포를 이용하였다.

나. 약제 처리

verapamil(Isoptin[®], Ilsung, Korea)은 2.5 mg/ml 농도로 냉암소에 보관하고 사용 당일 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

다. 약물의 세포독성 효과 조사

약물들의 세포독성 효과는 세포가 MTT의 세포내 축적을 감소시키는 능력을 측정하는 3,4,5-dimethyl thiazole-3,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay로 조사하였다. MTT stock solution(5 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)을 PBS에 녹인 후 0.22 μ m filter로 formazan crystal을 제거하고 -20°C 암소에 보관하여 사용하였다. 섬유모세포를 96-well plate에 well당 10,000개의 농도로 분주하여 하루 배양한 뒤 약물을 처리하였다. 약물처리 48시간 후 상등액을 제거하고 10배 희석된 MTT(100 μ l/well)를 첨가하고 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 96-well plate를 275 g(gravity)에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 Dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μ l를 첨가하여 formazan crystal을 용해시킨 후 microplate ELISA reader(EI 312e, Bio-Tek)로 550 nm와 630 nm에서의 흡광도의 비를 측정하였다.

라. 세포 성장의 비교

Verapamil이 섬유모세포 성장에 어떤 영향을 미치는지 알기 위해 정상 섬유모세포와 켈로이드 섬유모세포를 MTT₉₀과 MTT₅₀으로 각각 처리하여 대조군과 비교하였다. 세포는 96-well plate에 이중으로 각 well당 2500개의 농도로 분주한 후 약물을 처리하였다. 약물 처리 후 1, 3, 5, 7일 시점마다 trypsin으로 처리하여 세포를 떼어낸 뒤 flow cytometry로 세포 수를 측정하였다. Flow cytometer가 30초간 저속도로 흡입한 80 μ l 내의 세포 수를 측정된 뒤 총 500 μ l 내 존재하는 세포수로 환산하여 사용하였다.

마. TGF- β 의 측정

Verapamil이 섬유모세포의 TGF- β 의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 정상 및 켈로이드 섬유모세포를 MTT₉₀으로 각각 처리하고 처리하지 않은 각각의 대조군과 비교하였다. 섬유모세포의 TGF- β 분비는 sandwich ELISA 방법으로 측정하였다. Anti-human TGF- β antibody(Endogen)를 PBS에 2 μ g/ml 농도로 희석하여, 96-well ELISA plate(Nunc)에 50 μ l씩 넣고 실온에서 하룻밤 정치시켰다. PBST(phosphate-buffered saline solution triton)로 3회 세척하고, 3% bovine serum albumin(BSA) (Fraction V, Sigma, USA)를 함유한 PBS를 200 μ l씩 첨가하여 실온에 2시간 정치하여 차단하였다. PBST로 3회 세척한 다음 2000 pg/ml부터 7단계까지 2배 계단 희석한 표준용액과 시료를 각각 100 μ l씩 첨가하여 실온에 3시간동안 정치하였다. 시료는 세포처리 후 일정시간 배양한 상등액을 사용하였다. PBST로 4회 세척하고 각 cytokine에 대한 biotin 부착 항체(Endogen)를 0.5 μ g/ml로 희석하여 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 다음 horse radish peroxidase(HRP)-conjugated streptavidin(0.125 μ g/ml, Endogen) 100 μ l를 첨가하여 실온에서 30분간 정치하고 PBST로 6회 세척하였다. 발색반응은 tetramethylbenzidine(TMB) 기질용액(InnoGenex) 50 μ l를 이용하였으며, Bio-Tek EL312e microplate ELISA reader에서 630 nm에서의 O.D(optical density) 값을 측정하였다. 반응정지를 위하여 0.18 M H₂SO₄ 용액을 50 μ l씩 첨가하고 450 nm에서의 O.D 값을 재측정하였다.

바. Fibronectin의 측정

Verapamil이 섬유모세포의 fibronectin 합성과 분비에 어떤 영향을 미치는지 알기 위하여, 섬유모세포를 verapamil을 MTT₉₀ 농도로 처리 후, 배양액내 분비된 fibronectin과 세포내의 생성, 축적된 fibronectin을 각각 면역침강법과 Western blot으로 분석하고 대조군과 비교하였다.

섬유모세포를 6-well plate에 분주하여 80%의 밀집도를

보이면 약물을 처리하고 48시간 배양 후 상등액을 채취하고 trypsin을 처리하여 세포를 회수하였다. 세포는 lysis buffer(20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% deoxycholic acid, 1% Triton X-100, 1× protease inhibitor mixture)를 이용하여 1시간 얼음 속에서 용해시킨 뒤 1000 g에서 5분간 원심분리로 세포 잔해는 제거하고 cell pellet extract를 얻어 Protein Assay Kit (Biorad)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 채취한 상등액(500 μ l)에 anti-human fibronectin antibody(1:250, BD)를 첨가한 뒤 4°C에서 밤새껏 회전시킨 뒤 다시 protein A-agarose를 첨가하고 1시간 반 동안 4°C에서 회전시켰다. 면역침강된 단백질은 PBS로 3회 세척하고 2×SDS sample buffer를 첨가하고 5분간 증탕한 뒤 SDS-PAGE를 하고 western blot을 시행하였다.

동량의 cell pellet extract(500 μ g)와 상등액을 면역 침강시킨 단백질(20 μ g)을 포함한 시료를 12% sodium dodecyl-sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) 하였으며 [Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell(Bio-Rad); 200 volts(Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad), 1시간], MultiMark Multi-Colored Protein standard(Novex)를 단백질 분자량 측정을 위한 기준으로 사용하였다. 겔을 transfer buffer에 약 15분간 평형화한 다음 겔 상의 단백질을 PolyScreen polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(NEN Life Science)으로 이동시켰다 [Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(Bio-Rad); 100 volts, mA, 4°C, 1시간]. 단백질이 이동된 membrane은 5% skim milk(Difco)와 실온에서 1시간 동안 차단한 다음 0.05% Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Sigma)이 포함된 PBS(PBST)에 3회 세척한 후 일차항체인 anti-human fibronectin antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체를 제거하고, PBST로 3회 세척한 다음 이차항체(mouse immunoglobulin, horseradish peroxidase (HRPO)-linked whole antibody, Amersham)로 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 이차항체를 제거하고 PBST로 3회 세척하여 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham)로 반응시킨 다음 Fujifilm luminescent analysis system (LAS)-1000 Luminescent Image Analyzer로 현상하고 Fujifilm Image Gauge Version 3.11 software를 이용하여 분석하였다.

사. 세포자멸사 분석

세포자멸사 비율은 annexin V와 propidium iodide(PI)로 표식 후 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. 세포사망의 초기 단계에 세포 바깥쪽 인지질 세포막이 안으로

전위되는데, Annexin V는 이 역전된 인지질 세포막에 부착하는 Ca^{++} 의존성 단백질이고, PI는 세포의 DNA 표식자로서 사용된다. 이 이중 표식 방법으로 초기와 후기의 세포자멸사를 구별할 수 있다.^{4,6}

켈로이드와 정상 섬유모세포를 1×10^5 의 밀도로 6-well plate에 심고, 10% fetal calf serum이 혼합된 DMEM 배지에 배양했다. Verapamil MTT50 농도로 처리하여 배양한 후 2일째 채취하여 trypsin 처리하고, PBS로 3번 세척했다. 그리고 annexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC)와 PI를 실온에 15분간 배양하고 표식을 했다. 섬유모세포는 FL3 filter를 통한 flow cytometry로 분석했다.

실험결과 Annexin V-FITC와 PI 형광도를 좌표로 하여 나타내었다. 각 세포열에 2×10^4 번 분석을 시행했다.

아. 세포주기 분석

켈로이드와 정상 섬유모세포를 1×10^5 cells/well의 밀도로 6-well plate에 심었다. 세포주기의 분석은 배양 후 3, 5, 7일째 행해졌다. 배양 후 3, 5, 7일째마다 trypsin 처리하여 세포를 채취하고, PBS로 2번 세척한 후 4°C에서 찬 70% 에탄올로 30분간 고정했다. 0.1 M PI와 0.2 mg RNAase A 용액을 첨가하고 세포를 4°C에서 30분간 배양하여 Flow cytometry를 시행했다. DNA 분석 소프트웨어를 이용하여 각 세포의 DNA 양을 측정했다.

배수염색체와 4배수염색체와 그 중간 단계의 DNA(intermediate DNA content)를 지닌 이 염색체들을 정량적으로 분석하여 G1, S, G2-M기의 세포의 비율을 측정하였다. 각 세포열에 2×10^4 번 분석을 시행하였다.

자. TUNEL 염색에 의한 세포자멸사 분석

Verapamil에 의한 켈로이드 섬유모세포의 세포자멸사를 형태학적으로 관찰하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였다. 약물에 의한 섬유모세포의 자멸사는 digoxigenin-labeled genomic DNA를 형광으로 검출하는 Apop Tag in situ apoptosis detection kit(Oncor)를 이용하였다.

섬유모세포는 coverslip이 들어 있는 6-well plate에 키워 약물처리 후 24시간 배양한 다음 PBS로 세척하고 4% paraformaldehyde에 10분간 실온에서 고정하였다. PBS 세척 후 찬 에탄올과 초산(acetic acid)을 2대 1로 혼합한 용액으로 -20°C에서 5분간 침투(permeabilization)가 용이하게 한 뒤 다시 PBS로 세척한 다음 평형완충액(equilibrium buffer)에 5분간 반응하고 TdT enzyme이 들어 있는 반응완충액(reaction buffer)에 37°C 1시간 반응시킨 뒤 중지완충액(stop buffer)에 37°C 30분간 세척하여 반응을 중지시켰다. Coverslip에 anti-digoxigenin-fluorescein을 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 PI/antifade가 함유된 mount

액을 떨어뜨려 슬라이드 위에 밀봉 한 후 공초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰하였다.

차. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며 결과는 평균치 ± 표준편차로 표시하였고, Student's t test를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

가. Verapamil의 세포독성 효과

Verapamil 농도에 따른 세포독성 효과는 농도에 따라 민감하게 반응하였으며, 0.05 - 0.125 mg/ml의 농도에서 켈로이드 섬유모세포의 미토콘드리아 탈수소효소(dehydrogenase)의 활성도를 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났으며, 0.25 mg/ml 이상의 농도에서 세포는 거의 자라지 못하였다.

켈로이드 섬유모세포에 대한 verapamil의 MTT₉₀과 MTT₅₀ 농도는 각각 0.05 mg/ml와 0.1 mg/ml 이었다 (Table I, Fig. 1).

나. Verapamil이 세포 성장에 미치는 영향

정상 피부조직에서 배양된 섬유모세포는 5일 경 최고 성장점에 도달하여 더 이상의 증식이 되지 않는 것으로 보이나, 켈로이드 섬유모세포는 세포 성장의 최고치에 이르지 못하여 7일 이후에도 지속적인 증식이 진행됨을 알 수 있었다(Table II, Fig. 2).

정상 및 켈로이드 섬유모세포를 verapamil의 MTT₉₀에서 배양한 결과, 세포의 성장이 오히려 촉진되어 세포배양 7일 째에 대조군보다 정상 섬유모세포는 약 4.6배, 켈로이드 섬유모세포는 1.1배 성장이 촉진되었으며, 정상 섬유모세포에서 그 차이가 더욱 뚜렷했고 통계상 유의하였다(p<0.05). MTT₅₀ 처리시 정상 및 켈로이드 섬유모세포가 대조군에

비해 현저히 세포 성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 켈로이드 섬유모세포의 경우 배양시간별 대조군을 100%로

Table I. The Cytotoxic Effect of Verapamil on Keloid Fibroblasts

Concentration of verapamil (mg/ml)	% of the control (Mean ± SD)
0.008 (× 320)	102.5 ± 9.4
0.016 (× 160)	97.0 ± 10.6
0.031 (× 80)	101.8 ± 13.8
0.05 (× 50)	90.0 ± 9.7
0.063 (× 40)	70.8 ± 8.9
0.083 (× 30)	63.1 ± 12.1
0.125 (× 20)	19.2 ± 7.0
0.25 (× 10)	7.7 ± 0.8
0.5 (× 5)	1.7 ± 1.6
1.25 (× 2)	0.3 ± 0.7

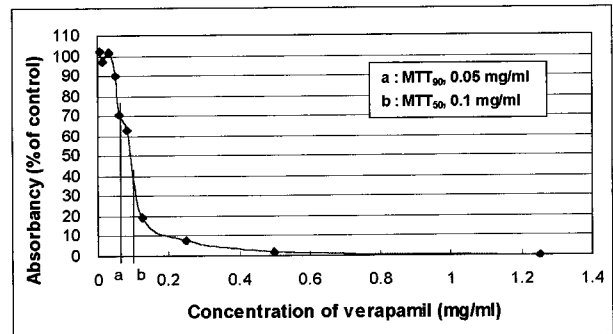


Fig. 1. Cytotoxic effect of verapamil in keloid fibroblasts assessed by the MTT assay. Verapamil induced cell toxicity dose-dependently in keloid fibroblasts in the range of 0.05 - 0.125 mg/ml, and the MTT₉₀ and MTT₅₀ values of verapamil were 0.05 mg/ml and 0.1 mg/ml, respectively.

Table II. The Effect of Verapamil on Proliferation of Normal and Keloid Fibroblasts

Time(days)		0	1	3	5	7
NFs	Control	250.0	592.2	1040.6	1501.6	1496.9
	VR(MTT ₉₀)	250.0	667.2	1406.3	3023.4	6906.3*
	VR(MTT ₅₀)	250.0	336.0	705.2	726.4	714.3*
KFs	Control	250.0	368.0	945.3	1954.7	2742.2
	VR(MTT ₉₀)	250.0	375.0	988.8	2897.2	2977.5*
	VR(MTT ₅₀)	250.0	320.0	591.1	645.9	601.3*

(cells/well)

NFs: normal fibroblasts, KFs: keloid fibroblasts, VR: verapamil, MTT₉₀: 0.05 mg/ml, MTT₅₀: 0.1 mg/ml, *: p<0.05.

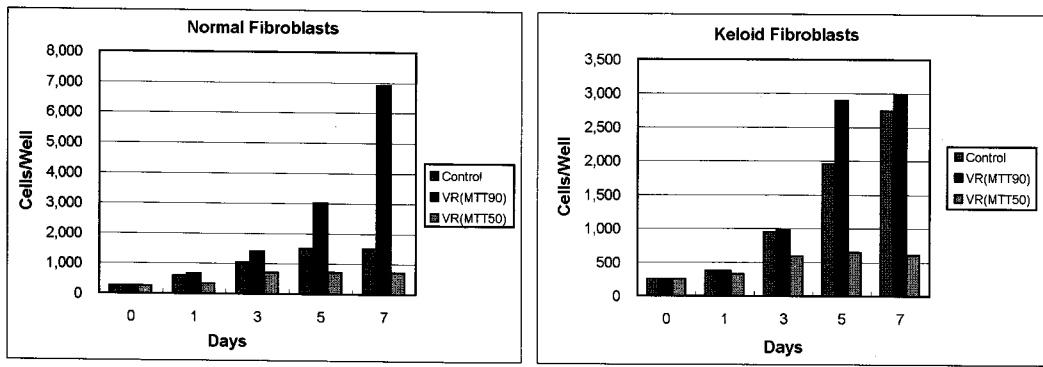


Fig. 2. Comparison of the growth rate in normal and keloid fibroblasts treated with verapamil. In MTT₅₀ concentration of verapamil, the cell growth was suppressed in both normal and keloid fibroblasts, which is more significant in keloid fibroblasts ($p < 0.05$). In MTT₉₀, the cell growth was rather stimulated in both normal and keloid fibroblasts, which is more significant in normal fibroblasts ($p < 0.05$). VR: verapamil, MTT₉₀: 0.05 mg/ml, MTT₅₀: 0.1 mg/ml.

Table III. TGF- β Expression in Normal and Keloid Fibroblasts Treated with Verapamil(MTT₉₀)

Group	TGF- β (pg/ml)		
	Mean	SD	
NFs	Control	1168.2	209.1
	VR(MTT ₉₀)	1065.9	218.3
KFs	Control	3108.5	269.3
	VR(MTT ₉₀)	2865.3	277.0

NFs: normal fibroblasts, KFs: keloid fibroblasts, VR: verapamil, MTT₉₀: 0.05 mg/ml, MTT₅₀: 0.1 mg/ml.

하여 비교할 때 well당 세포가 각각 배양 1일째 87%, 3일째 62.3%, 5일째 33%, 그리고 7일째 21.9%로 배양 초기에는 큰 차이를 보이지 않으나 3일 이후부터 verapamil에 의한 성장 억제 효과가 뚜렷하게 나타나기 시작하였고, 정상 섬유모세포보다 더 큰 차이를 보였으며 통계상 유의하였다($p < 0.05$).

다. Verapamil이 TGF- β 분비에 미치는 영향

정상 섬유모세포보다는 켈로이드 섬유모세포에서 TGF- β 가 더 많이 생성되었는데(각각 1065.9 pg/ml, 2865.3 pg/ml)(Table III, Fig. 3), verapamil MTT₉₀에서 정상 섬유모세포가 켈로이드 섬유모세포보다 더 높은 성장률을 보였으므로 세포 하나당 TGF- β 의 차이는 더 클 것으로 해석된다. 그러나 verapamil MTT₉₀으로 처리한 켈로이드 세포의 TGF- β 분비는 처리하지 않은 대조군에 비해 조금 감소되었지만 유의한 변화는 관찰할 수 없었다(각각 2865.3 pg/ml, 3108.5 pg/ml).

라. Verapamil이 fibronectin 합성 및 분비에 미치는 영향

대조군은 일정량의 fibronectin을 세포내 합성하여 저장하고 있는 양상이나 verapamil로 처리한 경우 세포외로의

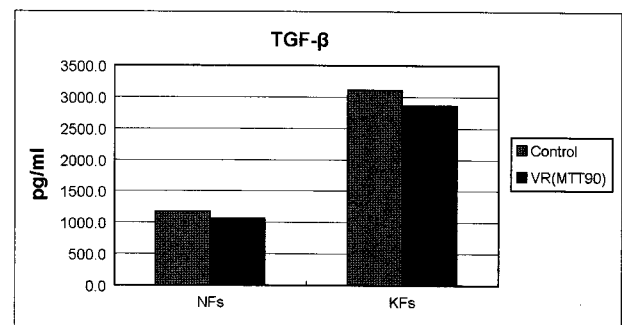


Fig. 3. Comparison of TGF- β secretion in normal and keloid fibroblasts treated with verapamil(MTT₉₀, 0.05 mg/ml). Fibroblasts were cultured on 24-well plate for 48 hours after treatment of verapamil, and supernatant was obtained for ELISA. Note that keloid fibroblasts secreted more TGF- β than normal fibroblasts, but there is no significant difference of TGF- β secretion between the group with verapamil treatment and the untreated control group. NFs: normal fibroblasts, KFs: keloid fibroblasts, VR: verapamil.

fibronectin의 분비는 촉진되었으나, 상대적으로 세포내의 합성, 저장된 fibronectin은 줄어든 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

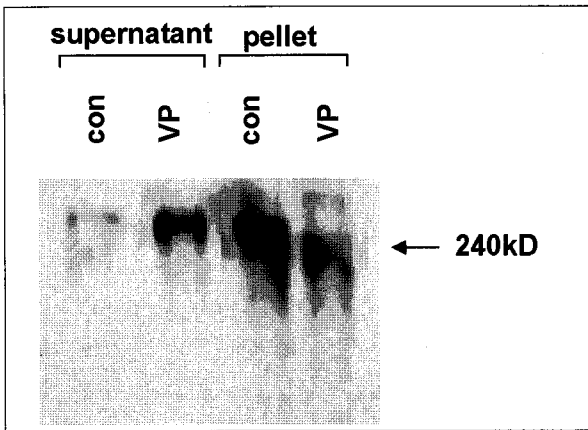


Fig. 4. The effects of verapamil on fibronectin synthesis and secretion. After keloid fibroblasts were cultured on 6-well plate for 48 hours after treatment of verapamil(MIT₅₀, 0.05 mg/ml), supernatant and cell pellet were harvested for immunoprecipitation and immunoblot, respectively. Fibronectin in supernatant represents extracellular fibronectin and that in cell pellet represents intracellular fibronectin. Verapamil treatment induced an increase in extracellular fibronectin secretion and a decrease in intracellular fibronectin in keloid fibroblast. con: control, VP: keloid fibroblasts treated with verapamil(MIT₅₀).

마. Verapamil에 의해 유도되는 세포자멸사 분석

각 그림의 4구획 중에서 우측 상하의 두 구획을 각각 후기 및 초기의 세포자멸사단계로 보고 좌측 상하의 구획을 각각 세포 사망과 생존의 상태로 볼 때, verapamil MIT₅₀으로 처리된 정상 및 켈로이드 섬유모세포의 세포자멸사 구간이 각각 6.42%에서 62.46%, 6.90%에서 69.77%로 나타나 세포자멸사 과정으로 변위되는 것이 유의하게 관찰되었다(p<0.05)(Table IV, Fig. 5).

그리고 각 대조군을 비교하면 생존률(좌측아래구획)은 정상 섬유모세포에서 91.17%의 값을 보이나 켈로이드 섬유모세포에서는 91.42%로 생존률이 약간 높았고, 사멸률(좌측 윗 구획)은 각각 2.41%, 1.67%로 켈로이드 섬유모세포에서 상대적으로 약간 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 한

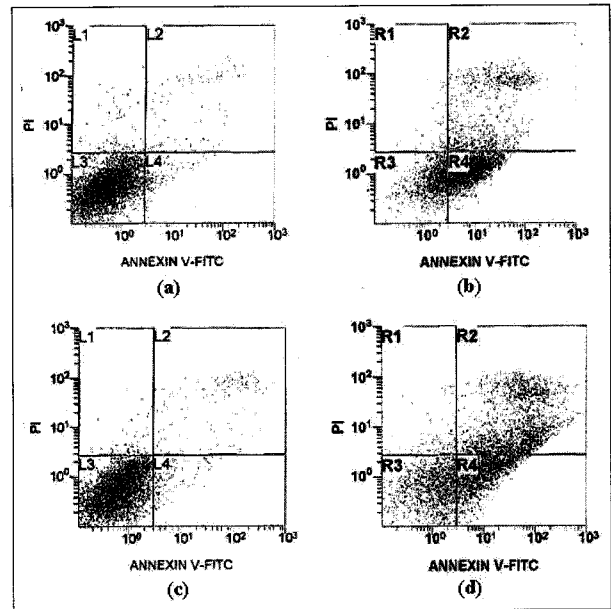


Fig. 5. The effects of verapamil on fibronectin synthesis and secretion. After keloid fibroblasts were cultured on 6-well plate for 48 hours after treatment of verapamil(MIT₅₀, 0.05 mg/ml), supernatant and cell pellet were harvested for immunoprecipitation and immunoblot, respectively. Fibronectin in supernatant represents extracellular fibronectin and that in cell pellet represents intracellular fibronectin. Verapamil treatment induced an increase in extracellular fibronectin secretion and a decrease in intracellular fibronectin in keloid fibroblast. con: control, VP: keloid fibroblasts treated with verapamil(MIT₅₀).

편 verapamil로 처리한 경우 위쪽 두 구획의 합이 각각 20.35%, 39.24%로 정상 섬유모세포보다 켈로이드 섬유모세포가 더 민감하게 상측으로 변위하여 급속하게 세포자멸사 과정으로 진행되는 것으로 나타났다(p<0.05).

바. Verapamil에 의한 세포주기 변화 관찰

세포주기 분석실험에서도 세포자멸사 정도를 알 수 있어 앞에서 PI와 Annexin V-FITC 이중표식 방법으로 측정

Table IV. Data of Flow Cytometry Plots in Fig. 5

Group	Quadrant(%)			
	1	2	3	4
a	2.41	2.73	91.17	3.69
b	1.63*	18.72*	35.91	43.74
c	1.67	2.94	91.42	3.96
d	2.29*	36.95*	27.95	32.82

a: control, untreated normal fibroblast, b: normal fibroblast, treated with MIT₅₀ of verapamil, c: control, untreated keloid fibroblast, d: keloid fibroblast, treated with MIT₅₀ of verapamil, 1: above, left quadrant-dead, 2: above, right quadrant-late apoptosis, 3: below, left quadrant-viable, 4: below, right quadrant-early apoptosis

*: p<0.05.

Table V. Data of Diploid Cycles in Fig. 6.

Group	Apoptosis and cell cycle(%)			
	Apoptosis	G1	S	G2
a	10.8	82.3	9.1	8.5
b	25.0*	85.8	6.7	7.5
c	8.2	83.9	9.6	6.5
d	8.1	58.4	37.7	3.9
e	66.8*	71.8	24.5	3.7
f	17.7	48.6	51.4	0.0

The shady area under each peak of figure 6 is presented as percentage.

a: control, untreated normal fibroblast, b: normal fibroblast, treated with MTT₅₀ of verapamil, c: normal fibroblast, treated with MTT₉₀ of verapamil, d: control, untreated keloid fibroblast, e: keloid fibroblast, treated with MTT₅₀ of verapamil, f: keloid fibroblast, treated with MTT₉₀ of verapamil

*: p<0.05.

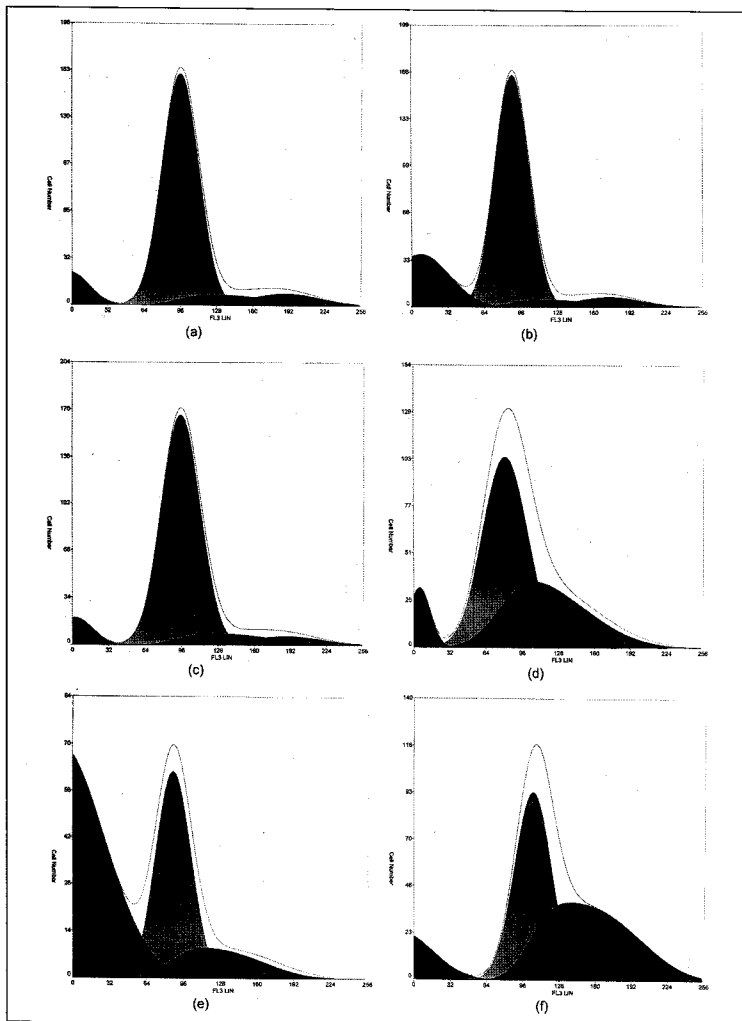


Fig. 6. Diploid cycles of normal and keloid fibroblasts treated with verapamil. The first peak is apoptosis, the second G1, the third S and the fourth G2. The shady area under each peak means the percentage of each cell cycle and apoptosis. Keloid fibroblast responded to verapamil more sensitively than normal fibroblasts, and the percentage of apoptosis was higher in keloid fibroblasts than in normal fibroblasts treated at the MTT₅₀ concentration of verapamil(p<0.05). a: control, untreated normal fibroblast, b: normal fibroblast, treated with MTT₅₀ of verapamil, c: normal fibroblast, treated with MTT₉₀ of verapamil, d: control, untreated keloid fibroblast, e: keloid fibroblast, treated with MTT₅₀ of verapamil, f: keloid fibroblast, treated with MTT₉₀ of verapamil.

한 세포자멸사 분석 자료를 다시 검정할 수 있었는데, 두 방법으로 측정된 결과는 일치하였다(Table V, Fig. 6).

대개 안정된 세포는 대부분 G1 세포주기에 머물면서 어떤 신호나 자극에 의해 S 세포주기로 이행하여 성장 및 분

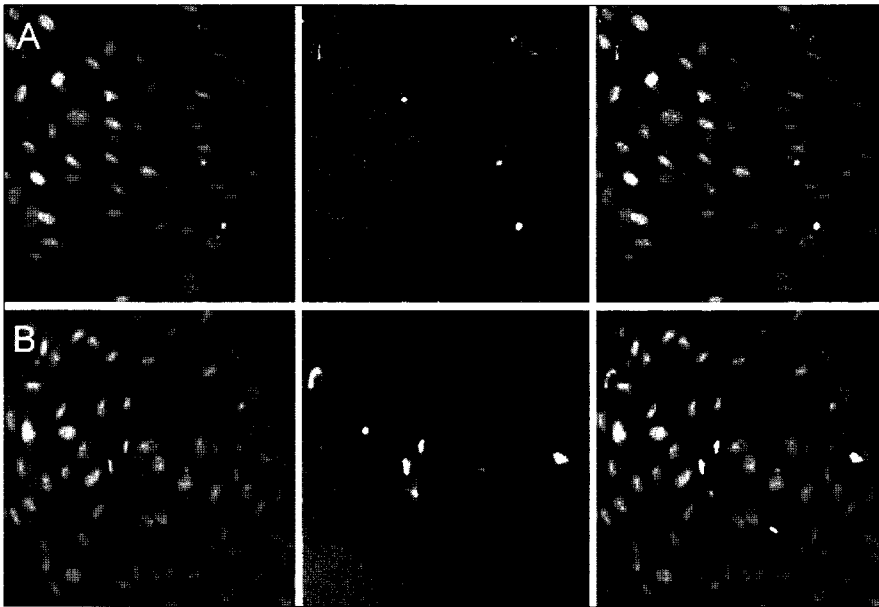


Fig. 7. TUNEL stain of keloid fibroblasts treated with verapamil (MTT₉₀). Keloid fibroblasts treated with MTT₅₀ of verapamil show increased TUNEL (+) staining of apoptotic cells compared to control. A: control, untreated keloid fibroblasts, B: keloid fibroblasts, treated with MTT₉₀ of verapamil, Left: propidium iodide stain, Center: TUNEL stain with labelling, Right: overlay of propidium iodide and TUNEL stain.

열을 하거나 세포자멸사를 맞게 된다. 정상 섬유모세포는 대부분 G1 세포주기에 머물러 있었는데, 켈로이드 섬유모세포는 정상 섬유모세포에 비하여 S 세포주기에 있는 세포분획이 많아서 활발한 성장 및 분열이 일어나고 있었다.

정상 섬유모세포를 verapamil로 처리한 경우 MTT₉₀에서는 10.8%에서 8.2%로 세포자멸사가 오히려 줄어든 반면, MTT₅₀에서는 25.0%로 약 2.5배 증가하였다. 켈로이드 섬유모세포를 verapamil로 처리한 경우 MTT₉₀에서는 세포자멸사가 8.1%에서 17.7%로 약 2배 증가했고 MTT₅₀에서는 66.8%로 8배 이상으로 증가하였다.

이로써 켈로이드 섬유모세포가 정상 섬유모세포보다 verapamil에 더 민감하게 반응하여 세포자멸사 단계로 이행되는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

사. TUNEL 염색

켈로이드 섬유모세포의 verapamil에 의한 세포자멸사를 형태학적으로 관찰하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였다. MTT₅₀ 농도의 verapamil로 24시간 처치한 켈로이드 섬유모세포가 대조군에 비하여 FITC 양성, 즉 세포자멸사를 보이는 세포의 수가 20% 증가하였다(Fig. 7).

IV. 고 찰

일반적으로 켈로이드나 비후성반흔 조직 내에는 섬유모세포의 수는 적은 반면, 과도한 섬유조직으로 구성되어 있다. 이러한 현상은 Cohen⁷에 의해 발표된 창상치유 과정에서 세포의 미세환경의 변화에 의해 정상 섬유모세포가 이상 반응하여 단위세포 당 과도한 교원질을 합성하여 섬유

유화 및 비후성반흔을 초래한다는 가설과 일치한다.

세포배양 기술이 발달함에 따라 *in vitro*에서 여러가지 약물의 세포 독성을 조사하기 위한 연구가 진행되어 왔는데, 특히 colorimetric assay인 MTT 분석법은 흡광도를 측정하여 대조군과 상대평가 할 수 있어 독성 정도를 정확히 검정할 수 있는 방법으로 널리 사용되어지고 있다. MTT assay(Mosmann)란 세포 내 사립체(mitochondria)에 존재하는 succinic dehydrogenase의 활성을 검사하는 방법으로서 succinic dehydrogenase를 MTT로 처리하여 MTT formazan 형성 정도를 흡광도로 측정하는 가장 예민하고 정확한 세포 독성 분석법으로 알려져 왔다.⁸ 이에 저자는 이 MTT assay를 이용하여 verapamil로 처리하였을 경우 섬유모세포에 대한 억제효과를 비교 분석하고자 실험을 시행하였다. 이 실험에서 켈로이드 섬유모세포에 대한 verapamil의 MTT₉₀과 MTT₅₀ 농도는 각각 0.05 mg/ml와 0.1 mg/ml로 나타났으나, 이는 실험에 사용된 각 개체의 세포의 고유특성과 실험관내에서의 배양조건, 그리고 실험 방법 등에 따라 반응의 차이가 있을 것으로 사료되며 임상에서 사용되는 농도(한 번에 크기에 따라 2.5 mg/ml를 0.5에서 2.0 ml 사용)보다는 훨씬 낮은 농도에서 세포 독성을 보이는 것은 분명한 것 같다. 그리고 더 낮은 MTT₉₀ 농도에서는 오히려 더 성장하는 것을 관찰할 수 있었다.

섬유모세포의 성장과 교원질 합성을 조절하는 기전으로 그의 합성물인 세포외기질에 의한 되먹이기 조절 기전을 설명할 수 있다. 쥐의 섬유모세포 배양에서 Wiestner 등⁹은 전교원질(procollagen)이 교원질 합성을 억제하는 되먹이기 기전을 보고한 바 있다. 이중원 등¹⁰도 배양액 내의 교원성 기질이 피부 섬유모세포의 DNA, 단백질 및 교원

질 합성 등을 감소시켰다고 보고했다. 조직 또는 세포배양에서 교원질의 양은 합성과 분해의 평형 여부에 의해 결정되는데, 켈로이드와 비후성반흔의 발생기전은 섬유모세포의 과다증식, 과다한 교원질의 합성, 교원 효소의 부족 및 효소 활성도의 억제 등으로 설명되고 있고, 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 이들은 서로 되먹이기 기전에 의해 조절된다는 보고도 있었다.¹¹ Wiestner 등⁹은 교원질 합성 조절기전을 procollagen peptidase에 의해 분리된 전교원질의 끝에 있는 아민계 펩타이드(NH₂-terminal extension peptide; procollagen peptide)가 섬유모세포에 되먹이기 기전으로 교원질 종류에 따른 특이성을 나타내며 교원질 합성을 조절한다고 하였다.

본 실험에서 MTT₉₀ 농도의 verapamil에서 배양된 켈로이드 섬유모세포가 TGF- β 분비에 별 영향을 받지 않고 세포외로 fibronectin이 더 많이 분비되는 것으로 보아, MTT₉₀의 낮은 농도에서는 되먹이기 기전에 의한 억제 기능이 작동하지 않는 것처럼 보인다. 그러므로 MTT₉₀ 농도의 verapamil에서 배양된 켈로이드 섬유모세포와 특히 정상 섬유모세포가 과다 증식을 한 것은 첫째로, MTT₉₀의 농도는 세포 독성이 낮아서 충분히 섬유모세포가 증식할 수 있는 능력을 가질 수 있고, 둘째로, TGF- β 의 변화는 거의 없었으므로 증식에 대한 자극은 계속되고 오히려 TGF- β 에 대한 감수성이 더 민감하게 변화하여 과성장할 수 있으며, 셋째로, 세포외로의 fibronectin 분비가 많음에도 불구하고 성장억제가 없는 것으로 보아 되먹이기 기전에 의한 조절 기능이 verapamil에 의해 방해받아서 오히려 과성장한 것으로 생각해 볼 수 있다. 그리고 켈로이드 섬유모세포는 정상 섬유모세포보다 과성장 상태이므로 성장 촉진 효과가 상대적으로 작게 나타난 것으로 여겨진다. 한편, MTT₅₀ 농도의 verapamil에서 배양된 정상 및 켈로이드 섬유모세포의 성장은 억제되었는데, 켈로이드 섬유모세포의 경우 더 크게 억제되어 고농도의 verapamil이 켈로이드 치료에 유효함을 알 수 있었다. 이는 verapamil에 의한 세포 독성이 더 크게 작용한 결과로 여겨진다.

정상 섬유모세포보다 켈로이드 섬유모세포가 더 민감하게 verapamil에 반응하여 세포자멸사를 하는 것으로 나타나 임상적으로 사용시 주사되어지는 켈로이드나 비후성반흔 주위의 정상 피부의 섬유모세포는 비교적 손상이 작을 것으로 여겨진다. 그리고 실제 임상에서 쓰여지는 농도보다 훨씬 낮은 농도의 MTT₅₀(0.1 mg/ml)에서는 섬유모세포의 성장이 억제되었으나 이보다 더 낮은 MTT₉₀(0.05 mg/ml)에서는 오히려 섬유모세포가 더 성장할 수 있었으므로, 실제 임상에서 쓰여지는 농도(2.5 mg/ml)도 전신적으로 매우 안전한 농도이므로 아주 사용량이 과량이 아니라면 임상적으로 2.5 mg/ml 농도의 사용이 무난할 것으로 사료

된다. Lee 등³은 임상실험에서 verapamil이 반흔의 부피를 줄이는 데 특별한 부작용이나 후유증없이 효과가 있다고 보고했다. 그러나, 작용범위가 넓어 임상적으로 많이 사용 시에는 저혈압, 심실세동, 방실차단, 변비, 피곤, 신경과민, 말초부종 등의 부작용이 일어날 수 있으므로 부위별로 나누어 처치하는 것이 좋을 것으로 여겨진다. 그리고, 실제로 임상적으로 낮은 농도의 verapamil에 의해 켈로이드나 비후성반흔이 커질 수 있는 지에 대한 임상 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

한편 anti-human TGF- β antibody와 anti-human fibronectin을 사용하고 혈청도 3%로 최소한 이용하였을 때 혈청으로부터 검출된 TGF- β 와 fibronectin이 실험치에 비해서 매우 미비하여 결과분석에서 계산하지 않았다.

세포는 성장 및 분열을 하기 위해서 G1 세포주기를 거쳐 S 세포주기로 이행되어야 한다. 대부분의 종말 분화 세포들은 거의 G0/G1 세포주기에 머물러 있다가 결국 세포자멸사를 맞게 된다. 세포가 손상을 입게 되면 세포분열을 하기 전에 G1 세포주기에 머물면서 세포자멸사로 갈 것인지, 혹은 손상을 교정한 후에 재분열을 할 것인지를 결정하게 된다.¹² 세포자멸사는 어떤 유발인자에 의해 염증반응이 없는 상황에서 세포가 결국 죽는 방향으로 이끌어지는 일련의 과정으로, 많은 기관의 생성 발달뿐만 아니라 성숙한 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 세포자멸사는 세포분열과는 반대되는 기전으로 세포 집단을 유지하는데 중요하다.¹³⁻¹⁵ MTT₅₀의 농도로 처치한 정상 및 켈로이드 섬유모세포는 세포자멸사 단계로 넘어가는데, 켈로이드 섬유모세포가 더 민감하게 반응하였으며, verapamil이 세포자멸사를 통해 세포독성을 나타내는 것으로 여겨진다. 한편, MTT₉₀의 농도에서는 세포배양에서의 결과와 유사하게 세포자멸사로 넘어가는 정도가 작든지 오히려 감소하는 경향을 보여 고농도의 verapamil 처치가 켈로이드 치료에 유용함을 다시 확인할 수 있었다.

TUNEL 염색에서 켈로이드 섬유모세포가 verapamil에 의해 세포자멸사 단계로 이행되는 것을 직접 확인할 수 있었는데, 세포 모양에서도 대조군은 편평하고, 여러 수지상 돌기를 내어 지속적인 활성을 의미하는 모습을 보였지만, 약물 투여군에서는 농도가 증가함에 따라 양극 돌기를 갖는 방추형의 안정된 모양을 보였다. 일반적으로 구형세포가 배양기에 부착시는 납작하게 퍼진 모습에서 성장을 도모하지만, 생착이 안된 세포이거나 세포의 성장과 기능이 억제된 세포는 구형상태로 존재하는 것으로 알려져있다.¹⁶

본 실험에서 켈로이드 환자에서 verapamil이 켈로이드 섬유모세포와 정상 섬유모세포에 미치는 영향을 비교 분석하고자 일반 반흔조직의 섬유모세포를 비교군으로 사용하지 않았으나, 더 정확한 자료나 결론을 위해서 일반 반

혼조적의 섬유 모세포를 또 하나의 대조군으로 이용하면 좋을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면, 칼슘길항제인 verapamil은 세포자멸사를 유도하여 MTT₅₀에서 켈로이드 섬유모세포의 성장을 억제하고, 켈로이드와 비후성반흔의 치료에 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 조사되었지만 낮은 농도(MTT₉₀)에서는 오히려 섬유모세포의 성장 촉진 효과가 나타나므로 임상에서 농도 선택에 있어서 주의를 요하며 농도에 따른 상반된 작용이 치료 실패나 치료 후 재발의 원인 중 하나로 추론될 수 있다. 그리고 임상적으로 사용량이 아주 과량이 아니라면 고농도(2.5 mg/ml)로 사용하는 것이 유용할 것으로 사료된다. 켈로이드와 비후성반흔의 치료에 있어서 verapamil 용량에 따른 치료효과에 대한 임상연구가 추후 선행되어야 할 것이다.

V. 결 론

켈로이드 섬유모세포의 성장과 세포자멸사에 verapamil이 미치는 영향을 알아보기 위한 본 실험에서 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. Verapamil은 0.05 - 0.125 mg/ml의 농도에서 켈로이드 섬유모세포에 농도 의존적으로 세포독성효과가 있었으며, MTT₉₀과 MTT₅₀ 수치는 각각 0.05 mg/ml와 0.1 mg/ml였다.
2. Verapamil은 MTT₅₀의 농도에서 섬유모세포의 성장을 억제하는 효과가 있었으며, 켈로이드 섬유모세포가 정상 섬유모세포보다 더 크게 억제되었다. 반면, Verapamil은 MTT₉₀의 농도에서 오히려 성장을 촉진시키는 효과가 있었으며, 정상 섬유모세포가 켈로이드 섬유모세포보다 더 높은 성장률을 보였다.
3. MTT₉₀의 농도에서 켈로이드 섬유모세포는 대조군에 비해 TGF- β 분비에는 차이가 없었고 세포외로의 fibronectin 분비의 증가와 세포내의 fibronectin의 감소를 보였다.
4. MTT₅₀의 농도에서 켈로이드 섬유모세포는 정상 섬유모세포에 비해 더 민감하게 반응하여 세포자멸사율이 더 높았다.

이상의 결과로 verapamil은 높은 농도(MTT₅₀)에서는 세포자멸사를 유도하여 켈로이드 섬유모세포의 성장을 억제하는 반면, 낮은 농도(MTT₉₀)에서는 오히려 과성장이 나타남을 알 수 있었다. 이러한 verapamil의 농도에 따른 상반된 작용이 치료 실패나 치료 후 재발의 원인 중 하나로 추론되므로 농도 선택에 있어서 주의를 요하며, 임상적으로

사용량이 아주 과량이 아니라면 고농도(2.5 mg/ml)로 사용하는 것이 유용할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Lee RC, Ping J: Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. *J Surg Res* 49: 463, 1990
2. Doong H, Dissanayake S, Gowrishankar TR, LaBarbera MC, Lee RC: The 1996 Lindberg Award. Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts. *J Burn Care Rehabil* 17: 497, 1996
3. Lee RC, Doong H, Jellema AF: The response of burn scars to intralesional verapamil. Report of five cases. *Arch Surg* 129: 107, 1994
4. Ogura Y, Krams SM, Martinez OM, Kopiwoda S, Higgins JPT, Esquivel CO, Strauss HW, Tait JF, Blankenberg FG: Radiolabeled annexin V imaging: diagnosis of allograft rejection in an experimental rodent model of liver transplantation. *Radiology* 214: 795, 2000
5. Mohiti J, Walker JH, Caswell AM: Studies on annexins in primary cultures of human osteoblasts and in the human osteosarcoma cell line MG-63. *Biochem Soc Trans* 23: 36S, 1995
6. Mohiti J, Caswell AM, Walker JH: Calcium-induced relocation of annexins IV and V in the human osteosarcoma cell line MG-63. *Mol Membr Biol* 12: 321, 1995
7. Cohen IK, Peacock EE sx: Keloids and hypertrophic scars. In McCarthy JG, May JW Jr, Littler JW(eds): *Plastic Surgery*. 1st ed, Philadelphia, WB Saunders Co., 1990, p 732
8. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55, 1983
9. Wiestner M, Krieg T, Horlein D, Glanville RW, Fietzek P, Muller PK: Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *J Biol Chem* 254: 7016, 1979
10. Rhie JW, Shim HG, Byeon JH, Kwak SI, Lee CK: The effects of collagen substrate in culture medium on DNA and protein synthesis of dermal fibroblasts. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 24: 229, 1997
11. Diegelmann RF, Cohen IK, McCoy BJ: Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts *in vitro*. *J Cell Physiol* 98: 341, 1979
12. Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059, 1993
13. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239, 1972
14. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251, 1980
15. Clarke PGH: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol(Berl)* 181: 195, 1990
16. Folkman J, Moscona A: Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345, 1978