

저산소 및 재산소화가 배양된 태아 섬유아세포에 미치는 영향

박병윤 · 최종우 · 곽혁준 · 이원재 · 나동균

연세대학교 의과대학 성형외과학교실 인체조직복원연구소

Effect of Hypoxia and Reoxygenation on Cultured Human Dermal Fetal Fibroblast

Beyoung Yun Park, M.D., Jong Woo Choi, M.D.,
Hyug Jun Kwark, M.D., Won Jai Lee, M.D.,
Dong Kyun Rah, M.D.

Institute for Human Tissue Restoration, Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The wound healing process in fetus is quite different from that of adult. Regeneration plays an important role and scarless wound healing is possible in early gestational fetal period. Recently, the various effects of the hypoxia and reoxygenation in the wound healing process have been investigated by many researchers. The hypoxic state is known to alter protein synthesis and gene expression of TGF- β , VEGF. The authors hypothesize there may be differences between fetal and adult fibroblast and this difference may play a possible role in the mechanism of scarless fetal wound healing. In this study, we investigated the growth of fibroblast, the amount of collagen deposition, the amount of protein synthesis and gene expression in TGF- β (transforming growth factor- β), VEGF(vascular endothelial growth factor) under the various hypoxic and reoxygenation conditions. Through these processes, we tried to determine the relationships between scarless fetal wound healing and hypoxic condition.

In control group, fetal and adult fibroblasts were cultured under normoxic condition. The experimental groups were allocated into four different groups. The differences in TGF- β , VEGF under 24, 48, 72 hours were statistically investigated. Compared to adult fibro-

blast group, there was a statistically significant increase ($p < 0.01$) in the rates of protein synthesis in TGF- β and VEGF of fetal fibroblast.

In this study, these results may reflect the possibility that fetal fibroblast are more susceptible to change in oxygen and has a superior rate of angiogenesis through increased VEGF expression. The possible superiority of angiogenesis in fetal fibroblast may play an important role in scarless wound healing.

Key Words: Hypoxia, Re-oxygenation, Fetal fibroblast, Collagen, TGF- β , VEGF

I. 서 론

1979년 Rowlatt 등이 임신 중기까지의 태아의 경우 반흔 없이 창상이 치유됨을 보고한 이래 성인과 다른 태아의 교원질 합성을 포함한 태아의 창상치유 과정에 대한 많은 연구가 진행되어 오고 있다.^{1,4}

태아의 창상치유 과정은 여러 가지 내적, 외적 환경의 차이에 의해 어른의 경우와 많은 차이가 나타나며 이는 조직이 재생과정(regeneration)을 거쳐 창상이 치유되어서 반흔이 생기지 않는다는 것으로 요약될 수 있으나, 그 기전에 대해서는 명확히 밝혀지지 않고 있다. 태아의 환경은 크게 외인적(extrinsic) 측면과 내인적(intrinsic) 측면으로 대별할 수 있는데, 외인적인 측면으로는 우선 각종 성장인자와 영양요소(trophic factor)가 풍부하며, 따뜻하고 멸균상태의 양수(amniotic fluid)에 둘러싸여 있다는 점과 태아 피부의 산소 분압이 성인과는 달리 저산소 상태라는 것을 들 수 있다. 이 중에서 최근 TGF- β (transforming growth factor- β), VEGF(vascular endothelial growth factor), HIF-1(hypoxia induced factor-1), MMP(matrix metalloproteinase) 등에 관한 많은 보고가 있다.^{5,6}

이러한 태아의 창상치유 과정에 있어서 최근 주목받고 있는 것이 바로 저산소화(hypoxia) 조건에서의 창상치유 과정이다. 이러한 섬유아세포 증식에 저산소증이 연관된 많은 보고가 있었으며, 이러한 저산소 상태는 신생 혈관(neo-angiogenesis)에 의한 재산소화를 필히 수반하게 되고, 이 과정 중 유리되는 성장인자와 재산소화 과정 중 생

Received September 6, 2004

Revised February 3, 2005

Address Correspondence: Dong-Kyun Rah, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemum-gu, Seoul, 120-752, Korea. Tel: 02) 2228-2216 / Fax: 02) 393-6947 / E-mail: dkrah@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 논문은 2004년 제 56차 대한성형외과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

기는 산화 유리기(oxygen free radical)가 창상치유에 있어 영향을 준다는 보고가 많다.^{7,8,12,13}

성인의 경우 창상부위의 저산소 상태가 창상치유 과정에 미치는 영향을 살펴보면, 첫번째로 저산소 상태는 섬유아세포에 의한 TGF- β 의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹ TGF- β 는 창상치유 과정 중에서 섬유아세포의 증식과 세포기질의 합성을 조절하는 역할을 하는 중요한 성장인자이며, Falanga 등⁸은 진피 섬유아세포가 72시간 동안의 저산소상태 후, TGF- β 1 isoform의 분비가 9배 증가하였고, mRNA 발현도 8배 증가하였다고 보고하였다. 이들은 이러한 실험결과를 통해 저산소 상태가 전사 수준(transcription level)에서 TGF- β 유전자의 발현을 증가시켜, 인체 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast)에 의한 TGF- β 의 합성을 촉진시킨다고 하였다. 두번째로 저산소 상태는 섬유아세포의 교원질 합성을 억제시킨다고 알려진 keratinocytes의 motility를 증가시킨다. 세번째, 저산소 상태에 의한 VEGF의 증가는 혈관생성을 촉진시킨다. Steinbrech,⁹ Yang 등¹⁰은 1998년 케로이드 섬유아세포 배양에서 저산소 상태가 VEGF의 발현량을 증가시킨다는 것을 보고하였는데, 혈관생성과 케로이드 형성의 연관성에 대해서는 아직까지 확실히 알려진 바가 없다. 성인에서는 저산소화 상태에서 위와 같은 과정을 통해 반흔이 전반적으로 증가하는 것으로 알려져 있다.

반면, 태아의 섬유모세포의 저산소화 상태에 따른 변화에 대해서는 논란이 있다. Steinbrech 등⁹은 태아의 섬유모세포에서 저산소 상태를 유발한 경우 태아 섬유아세포에서 TGF- β mRNA 증가를 관찰할 수 있었지만 어른의 섬유아세포에서는 증가하지 않았음을 보고하였다. 반면 Scheid 등¹¹은 양의 태아(sheep fetus)를 실험 대상으로 하여 상반된 결과를 보고하였다. 저산소 상태에서의 VEGF, TGF- β 의 발현정도를 실험하였는데, 이 실험에서 Chang과 Longaker 등의 결과와는 다르게 성인과 태아 섬유아세포 모두의 경우에서 저산소상태를 유발하였을 때 TGF- β 가 증가하지 않지만, 절대적으로 산소 의존적인(oxygen-dependent) 유전자의 강력한 전사 조절 물질(transcriptional regulator)인 VEGF mRNA의 경우는 증가된다고 하였다. 하지만, 태아의 저산소화 상태가 반흔 없는 창상치유 과정에 어떤 영향을 미치는지, 그리고, 성인 섬유아세포에 주는 영향과 비교하여 태아 섬유아세포에 저산소 상태가 주는 영향에 어떤 차이가 있는지에 대해선 연구된 바가 없다. 또한 저산소화 상태 후 다시 재산소화를 시켰을 때의 태아 섬유아세포의 반응에 대해선 거의 연구되어진 바가 없다.

따라서 본 연구는 태아의 창상치유 과정의 기전에서 섬유아세포의 낮은 산소분압이 어떤 영향을 미치며, 어떤 차

이가 있는지를 알아보기 위해 태아와 어른의 섬유아세포를 배양하여 저산소 상태와 이에 따른 재산소화를 유발하였을 때 각각의 섬유아세포의 성장속도, 제 1형 교원질 합성의 양과 TGF- β 와 VEGF, TNF- α 의 양을 측정하여 태아에서 반흔 없이 치유되는 기전의 일부를 밝히고자 하였다. 궁극적으로 저산소화 상태에 따른 태아와 성인의 창상치유 과정을 비교 분석하여 반흔 없는 태아의 치유과정과 저산소화 상태의 연관성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 조직 채취 및 세포 배양

태아 섬유아세포는 임신 중기(임신 20주 전후)의 태아 피부에서 분리 배양된 섬유아세포를 사용하였으며, 성인 섬유아세포는 성인진피(human adult dermal skin)에서 채취하여 사용하였다. 섬유아세포의 배양은 Waymouth의 방법에 따라 시행하였다. 실험에서는 5세대 계대배양세포까지만 사용하였다. 이 배양된 세포를 hemocytometer를 계측하여 2×10^5 개를 다른 세포배양기에 넣고 4개의 실험군으로 나누어 약품조작을 하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 배양액으로 사용하여 95% 대기, 5% CO₂, 37°C에서 3일간 배양하였다. 이후 저산소 상태가 필요한 경우 37°C, 95% N₂, 2% O₂, 3% CO₂를 관류하는 용기 내에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하여 저산소 상태를 유도하였으며 재산소화가 필요한 경우 다시 95% 대기, 20% O₂, 5% CO₂, 37°C 하에서 48시간 동안 배양하였다.

나. 실험군

대조군: 아무런 처치를 하지 않은 태아 및 성인 섬유아세포

실험군 1: 24시간 동안 저산소화 상태를 유도하여 배양된 태아 및 성인 섬유아세포

실험군 2: 48시간 동안 저산소화 상태를 유도하여 배양된 태아 및 성인 섬유아세포

실험군 3: 72시간 동안 저산소화 상태를 유도하여 배양된 태아 및 성인 섬유아세포

실험군 4: 48시간 저산소화 상태 유도후 48시간동안 다시 재산소화를 유도한 태아 및 성인 섬유아세포

다. MTT assay를 이용한 세포 활성도 측정

각각 실험군의 세포 활성도를 MTT(3-4,5-Dimethylthiazol-2-y-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay(SIGMA, M-5655, USA)를 이용하여 측정하였다. 5 μ g/ml의 MTT reagent를 제조하여 일정기간 배양한 세포에 배지과 MTT

reagent를 1:4비율로 처리하고, 혼드는 상태로 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 pellete를 PBS로 2회 세척 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해(lysis)시켜 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

라. 제1형 교원질 합성량

섬유아세포로부터 분리된 교원질의 양을 측정하기 위해 Sircol Collagen Assay kit(Ireland)를 사용하였다. 이 방법은 먼저 각각의 실험군의 배지를 100 μ l씩 취해 Sircol dye reagent 1 ml과 0.5 M acetic acid 100 μ l를 혼합하여 dye와 교원질이 결합할 수 있게 30분간 혼합하여 원심분리하여 pellete를 취하였다. 이때 pellete은 dye와 교원질이 결합되어 있는 형태로, 이렇게 얻어진 pellete은 몇 번의 세척 과정을 거쳐 1 ml의 alkali reagent로 용해하였다. 충분히 pellete을 녹인 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

마. 분비된 TGF- β , VEGF의 측정

각각의 실험군의 조건에 따라 배양하던 섬유아세포에서 분비되는 TGF- β 와 VEGF, TNF- α 를 ELISA assay kit(Endogen, USA)로 측정을 하였다. 실험 과정은 kit에 포함되어 있는 내용에 준하여 시행하였다. 실험조건에 따라 배양된 섬유아세포의 배지액 100 μ l을 각각 TGF- β 와 VEGF 항체로 코팅 되어있는 plate에 넣어 1시간 정도 배양한 후, PBS-T로 세척한 후, biotinylated secondary 항체와 1시간 동안 반응시킨 후, streptavidin-HRP결합되어 있는 TGF- β 와 VEGF, TNF- α 의 다른 항체를 blocking buffer에 적당량 희석한 후 100 μ l씩 plate에 넣어 1시간 정도 incubation한 후 세척해 내었다. 그 후 발색시약을 이용하여 발색 반응을 일으킨 후, 15분 후에 발색반응을 정지시켜 spectrophotometer에서 그 발색정도를 측정하여 대조군과 비교 정량화 하였다.

바. RT-PCR을 이용한 제1형 교원질, VEGF의 mRNA 발현정도 측정

전체 RNA는 TRIzol reagent(GIBCO Lab. Calif., USA)를 이용한 acid guanidine method를 사용하여 분리하였고, 증류수로 처리한 diethylphyrocarbonate(DEPC, SIGMA, USA)에 용해시켰다. RT-PCR과정은 one step RT-PCR system(GIBCO Lab. USA)를 이용하였다. 반응은 25 μ l의 2 \times reaction mixture, 1 μ l의 enzyme mixture(SUPER-SCRIPT II RT and recombinant Taq DNA polymerase in 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol(v/v), stabilizer), 200 nM of each primer

와 RNA sample 3 μ l을 혼합하여 사용하였다. RT-PCR 과정에서 정량 마크로 GAPDH를 사용하였다. 정량마크는 GAPDH: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', GAPDH: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'를 사용하였고, cDNA 합성은 55°C 1 cycle 30 min, 94°C 1 cycle 2 min 조건에서 시행하였고, PCR 과정은 94°C, 58°C, 72°C 각 60sec, 총 35 cycle 시행하였다. 제 1형 교원질의 sense primer sequence은 5'-GATGATGCCAATGTGGTTCGTG-3'를 사용하였고, anti-sense는 5'-CAGGCTCCGGTGTGACTCGT-3'을 사용하였다. cDNA합성은 50°C 1 cycle 25-30min, 94°C 1 cycle 2 min 조건에서 시행하였고, PCR은 94°C, 64°C, 72°C 각 60 sec 조건에서 총 35cycle 시행하였다.

실험조건에 따라 배양한 섬유아세포를 용해시킨 후, RNeasy kit(Quiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 RNA를 agarose gel에 전기영동(electrophoresis)한 후 nitrocellulose membrane으로 이전하였다. 이 membrane을 준비된 probe(32P α -dCTP로 labeling)가 포함된 solution에 배양한 후 세척하여 autoradiography로 발현정도를 확인하였다. VEGF에 대한 RT-PCR시 sense primer로는 5'-CTCTACCTCCACCATGCCAAG-3'를 사용하였고, anti-sense primer로는 5'-GGTACTCCTGGAAGATGTCCACC-3'를 사용하였다.

사. 통계학적 결과 분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준 편차로 표시하며, 통계적인 분석에는 Student's t-test를 사용하였고, p-value가 0.05이하는 *, 0.01이하는 **, 0.0001이하인 경우는 ***로 표시하여 통계적인 유의성을 표시하였다.

III. 결 과

실험 결과는 크게 3가지로 나누어, 저산소, 재산소화 상태에 따른 성인 섬유아세포, 태아 섬유아세포의 변화를 각 실험군별로 관찰하였고, 마지막으로 성인 섬유아세포와 태아 섬유아세포의 변화를 비교 분석하였다.

가. 저산소, 재산소화 상태에 따른 성인 섬유아세포의 변화

저산소 상태와 재산소화 과정에 따른 성인 섬유아세포의 세포 활성도는 배양사진 상 저산소화 조건에 따라 저산소화 조건 72시간에 다소 증가된 소견을 보였으나(Fig. 1, Left), MTT assay로 세포활성도를 측정해 본 결과 통계적으로 유의한 변화를 보이지는 않았다($p > 0.05$). 하지만, 정상분압 조건의 대조군에 비해 성인 섬유아세포의 VEGF 분비량은 저산소 상태에서 24시간, 48시간, 72시간 동안

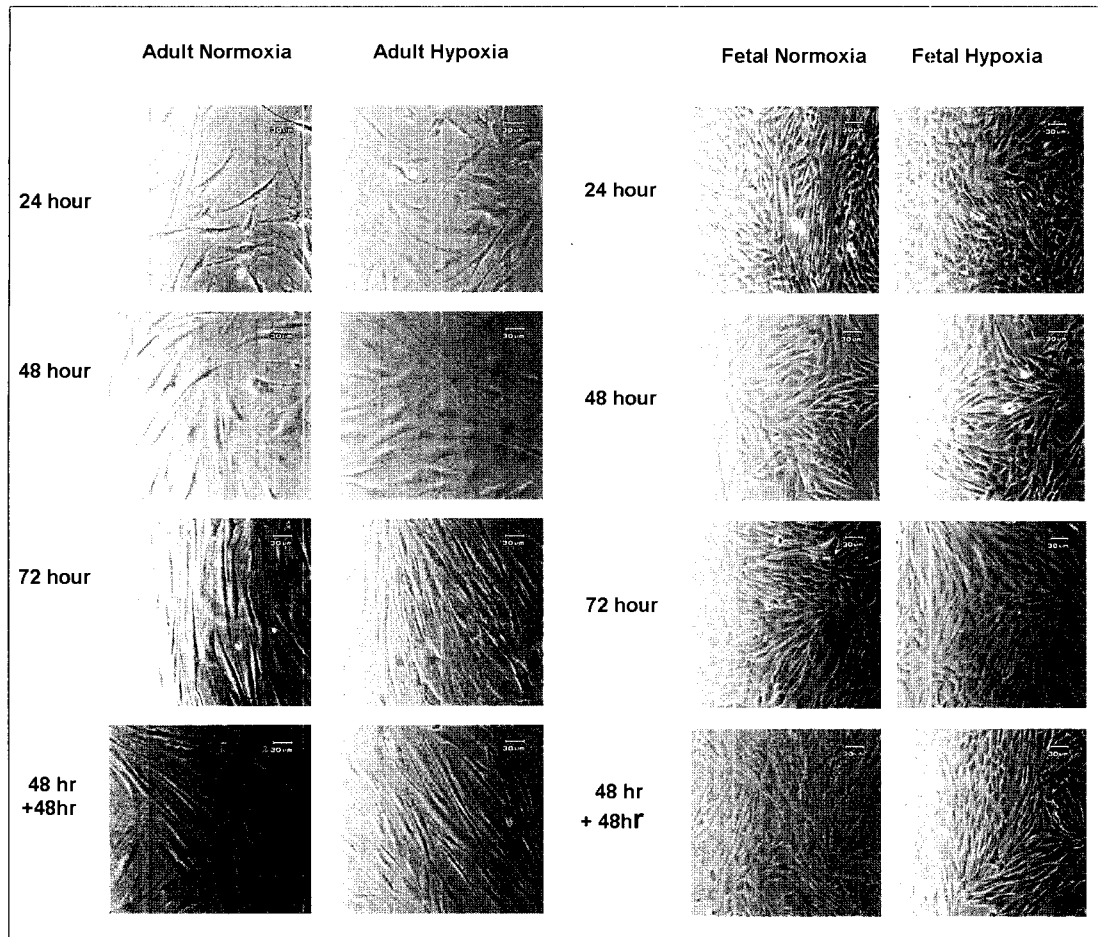


Fig. 1. (Left) Histological photographs of adult fibroblast according to the cultured period under hypoxia and reoxygenation. At 72 hours under hypoxia, increased adult fibroblasts were seen; (Right) Histological photographs of fetal fibroblast according to the cultured period under hypoxia and reoxygenation. At 24, 48 hours under hypoxia, increased fetal fibroblasts were seen.

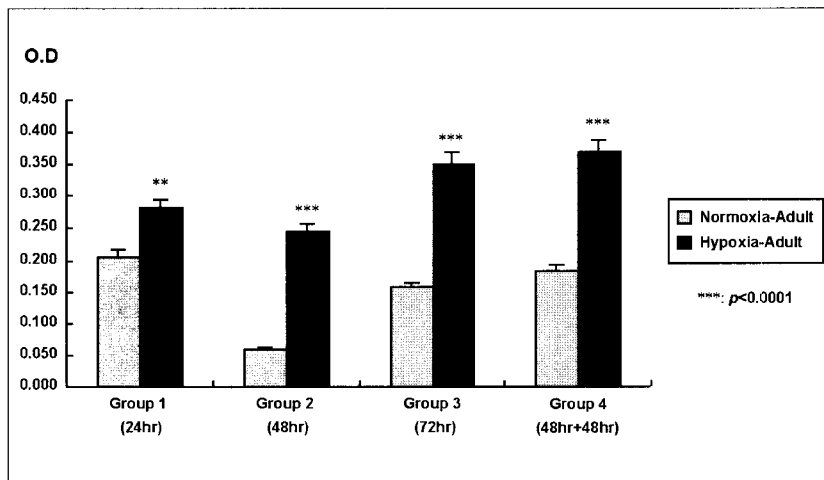


Fig. 2. Comparison of VEGF synthesis in adult fibroblast under hypoxia and reoxygenation state. In adult fibroblast, the amount of VEGF synthesis were increased statistically significantly in all groups.

유지한 1, 2, 3군 모두에서 매우 유의하게 증가됨을 알 수 있었고(p<0.0001), 48시간 동안 저산소화 시킨 후 다시 48

시간 동안 재산소화 시킨 4군의 경우에도 VEGF 분비량이 대조군에 비해 증가상태가 유지되었다(p<0.0001)(Fig. 2).

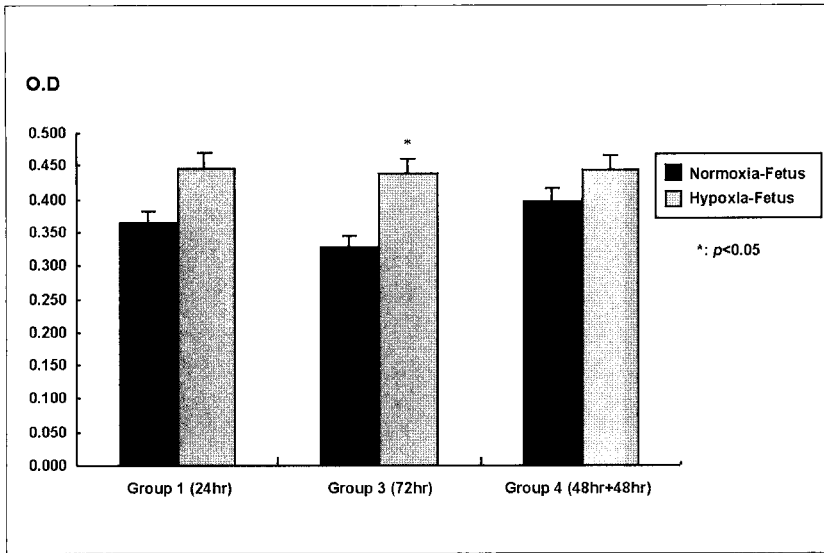


Fig. 3. Comparison of VEGF synthesis in fetal fibroblast under hypoxia and reoxygenation state. In fetal fibroblast, the amount of VEGF synthesis were increased statistically significantly in all groups except group 1.

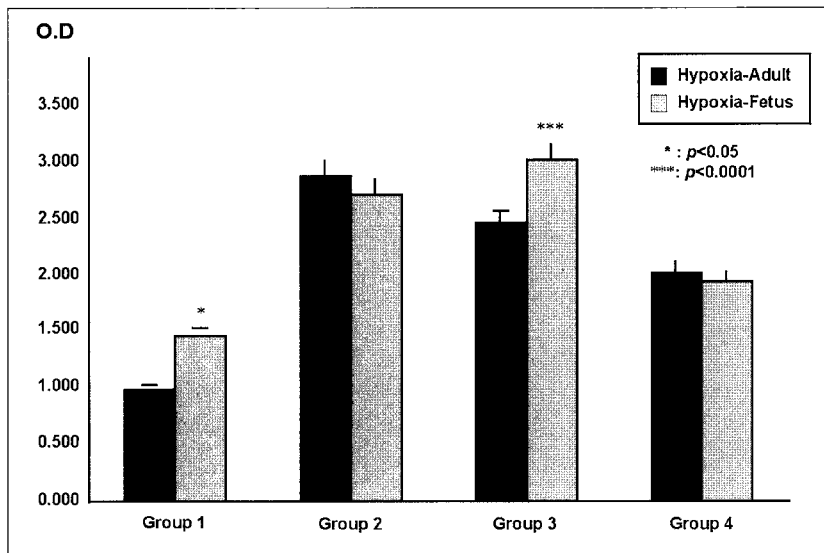


Fig. 4. Comparison of number of adult and fetal fibroblast under hypoxia and reoxygenation state.

나. 저산소, 재산소화 상태에 따른 태아 섬유아세포의 변화

배양사진 상 저산소 상태와 재산소화에 따른 태아 섬유아세포 세포활성도는 저산소 상태가 지속됨에 따라 증가하는 소견을 보였고, 재산소화 조건에서 세포의 수가 감소하는 양상을 보였지만(Fig. 1, Right), MTT assay로 세포활성도를 측정해 본 결과 유의한 변화를 보이지는 않았다($p > 0.05$). 태아 섬유아세포의 경우, 정상분압 조건의 대조군에 비해 저산소 상태에서 72시간 동안 배양한 실험군에서 유의한 TGF- β 의 증가 소견을 보였다($p < 0.05$). 하지만, VEGF 분비량은 저산소화 조건 24시간, 48시간, 72시간 후에 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), 48시간 저산소화 시킨 후 다시 48시간 재산소화 시킨 군에서도 유의하게 분

비량이 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 3).

다. 저산소 상태 및 재산소화에 따른 성인 및 태아 섬유아세포의 비교

MTT assay를 통하여 세포 활성도를 비교하여본 결과, 저산소 상태 24시간과 72시간에 성인 섬유아세포에 비해 상대적으로 태아 섬유아세포의 세포 활성도가 유의하게 더 증가하였음을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$, $p < 0.0001$, Fig. 4).

제 1형 교원질 합성량을 비교하여 본 결과, 저산소화 상태 48시간, 72시간에서 배양시킨 태아 섬유아세포 2군, 3군에서 성인 섬유아세포 2, 3군에 비해, 유의하게 교원질 합성량이 증가하였고($p < 0.05$), 재산소화 시킨 경우에도

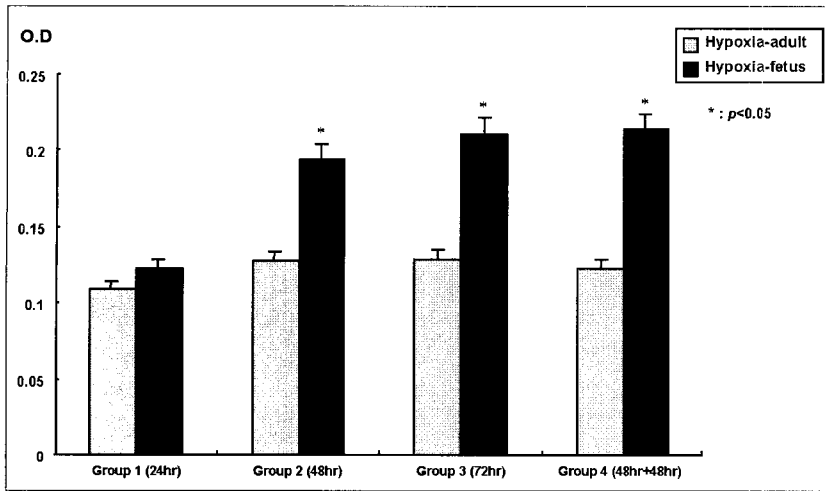


Fig. 5. Comparison of collagen synthesis of adult and fetal fibroblast under hypoxia and reoxygenation state.

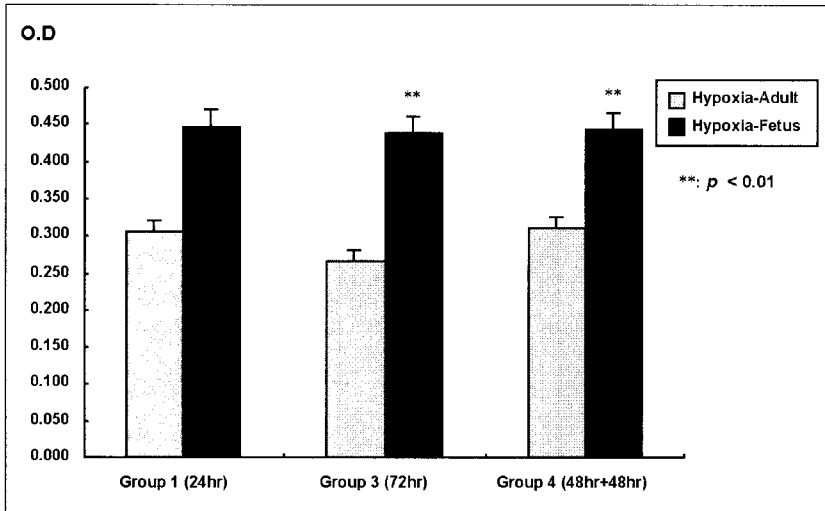


Fig. 6. Comparison of TGF-β synthesis of adult and fetal fibroblast under hypoxia and reoxygenation state.

교원질 합성량의 상대적인 증가수준이 유지되었다($p < 0.05$, Fig. 5).

TGF-β 분비량을 비교해 본 결과 태아 섬유아세포에서 성인 섬유아세포에 비해 저산소화 72시간 배양시킨 3군에서 유의하게 증가된 소견이 관찰되었고($p < 0.01$), 재산소화 조건에서도 분비량이 성인 섬유아세포에 비해 증가되어 있었다(< 0.01 , Fig. 6).

VEGF 분비량을 비교하여 본 결과 72시간 동안 저산소 배양한 태아 섬유아세포 3군에서 매우 유의하게 VEGF 분비량의 증가를 관찰할 수 있었고($p < 0.0001$), 48시간 저산소화 조건 후 다시 48시간 다시 재산소화 시킨 4군에서 VEGF 분비량이 3군에 비해 감소하지만 성인 섬유아세포에 비해서는 유의하게 증가 소견을 유지하였다($p < 0.05$) (Fig. 7).

또한, 제 1형 교원질의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 관찰한 결과, 저산소 상태에서 태아 섬유아세포에서 발현이

상대적으로 증가된 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 8, 9), densitometry를 이용하여 분석하여본 결과에서도 같은 결과를 확인할 수 있었다. VEGF의 mRNA 발현량을 RT-PCR로 살펴본 결과에서도 사진 및 densitometry 분석에서, 태아 섬유아세포의 경우, 성인 섬유아세포의 경우와 비교해서 VEGF 발현량도 증가된 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 8, 9). 즉, 저산소화 조건 48시간, 72시간에서는 뚜렷하지 않지만, 24시간 동안 저산소화 조건에서 배양한 성인 섬유아세포의 발현량 증가량에 비해 태아 섬유아세포 군에서의 증가량이 큼을 Densitometry를 통한 측정을 통해 확인할 수 있었다.

IV. 고 찰

섬유아세포는 교원질과 세포외기질의 합성을 통해 창상 치유와 섬유화 과정에 있어서 중요한 역할을 한다. 저자들

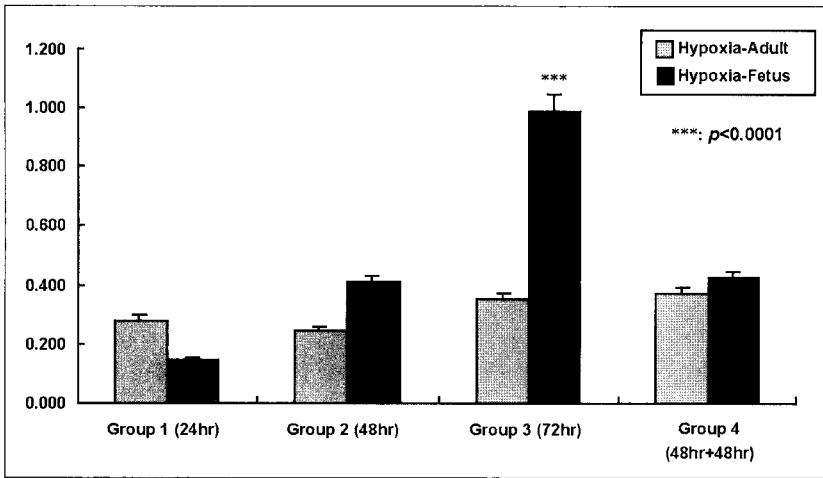


Fig. 7. Comparison of VEGF synthesis of adult and fetal fibroblast under hypoxia and reoxygenation state.

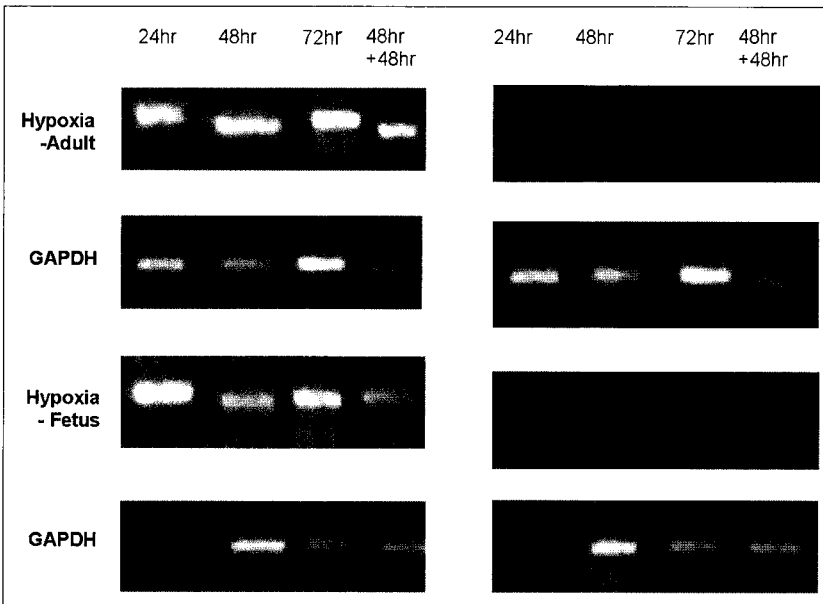


Fig. 8. Comparison of gene expression of collagen synthesis in adult and fetal fibroblast(Left); Comparison of gene expression of VEGF synthesis in adult and fetus.

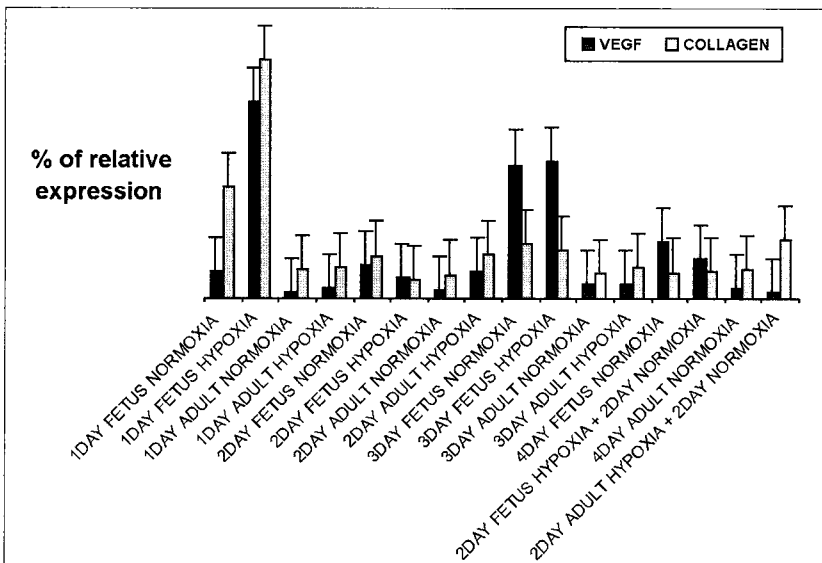


Fig. 9. Densitometric analysis of Collagen & VEGF expression.

은 저산소 상태에 반응하는 태아 섬유아세포의 세포 활성도와 교원질 합성량, 각종 성장인자 발현량의 차이가 반흔 없는 태아 창상치유에 기여할 수 있을 것이라는 가설하에 본 연구를 진행하였다. 특히, 저산소 상태에 의해 태아 섬유아세포에서 TGF- β 발현량이 감소함으로써, 교원질 합성량의 감소가 유도되어 반흔 없는 창상치유에 기여할 것이라는 가설과, 강력한 신생혈관 생성물질(angiotenic factor)로 알려진 VEGF의 경우, 태아 섬유아세포에서 발현이 증가하여 혈관생성(angiogenesis)를 촉진함으로써, 반흔 없는 창상치유가 가능하다는 가설을 설정하였다.

저산소 및 재산소 환경에서 섬유아세포의 세포 활성도를 MTT assay를 통하여 비교해 본 결과, 태아 섬유아세포의 증가량이 성인 섬유아세포 증가량보다 큼을 확인할 수 있었다. 즉, 성인 섬유아세포의 경우도 정상 산소환경에 비해 저산소 조건에서 시간이 지남에 따라 다소 증가하는 양상을 보였으나(Fig. 2), 태아 섬유아세포의 경우 정상 산소 분압에서 보다 저산소 조건 24시간, 72시간에서 배양한 2,3군에서 유의하게 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 태아 섬유아세포가 성인 섬유아세포에 비해 저산소 환경에 반응하는 정도가 다름을 반영하는 것이라고 사료되며, Mackool,¹ Longaker 등²이 보고한 바와 같이 태아 섬유아세포 자체가 성인 섬유아세포와 표현형의 차이(phenotypic difference)가 있음을 보여주는 것으로 생각된다. 교원질 합성량의 경우 태아와 성인 섬유아세포를 비교해 보면, 태아 섬유아세포의 교원질 합성량 증가가 유의하게 더 크게 나타났는데(Fig. 5), 이러한 교원질 합성량의 증가가 생체에서 반흔의 증가를 의미하는 것인지에 대해서는 이번 연구만으로는 알 수 없었다. 반흔 없는 창상치유는 교원질 합성량의 차이보다는 교원질의 배열이 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어,² 이러한 결과가 창상형성에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 교원질의 수축 정도, 교원질의 배열 등이 고려되어야 할 것이다. 또한 본 연구에서는 제 1형 교원질 mRNA 발현을 조사하였는데 이는 제 1형 교원질 합성량이 태아 창상치유 과정에서 제 3형 교원질 합성량에 비해 절대적으로 많고 창상치유와 가장 연관이 되는 것이어서 교원질 type에 따른 연구는 시행하지 않았고 제 1형을 대표로 교원질 합성량을 측정하였다.

저산소 환경에서는 각종 성장인자들의 증가된 발현으로 인해 섬유아세포의 증식이 촉진된다고 알려져 있다. 이 중에서 창상치유 및 섬유화에 중요한 역할을 한다고 알려진 TGF- β 의 경우는 저산소 환경에서 TGF- β 의 증가로 인해 제 1형 콜라겐 합성량이 증가하고, 교원질 교환(turn-over)이 감소한다고 알려져 있다.⁸ 본 연구에서 저산소 환

경에 의해 유도되는 TGF- β 이 태아 섬유아세포에서 발현량이 감소함으로써, 교원질 합성량의 감소가 유도되어 반흔 없는 창상치유에 기여할 것이라는 가설과는 달리 태아 섬유아세포에서 TGF- β 의 합성량이 성인 섬유아세포에 비해 유의하게 증가하였다. 이것은 두 가지 경우로 살펴볼 수 있는데, 첫번째로 TGF- β isoform에 따른 차이를 구별해 내지 못한 때문일 가능성이 있다. Yang 등¹¹에 따르면 TGF- $\beta_{1,2}$ 의 경우는 pro-fibrotic function을 가지고 있어 반흔형성에 관여하며, 이는 정상 성인 창상에서 외부에서 주입하였을 경우 교원질, proteoglycan 및 염증세포 축적으로 반흔 형성을 일으키는 것으로 증명되었다. 또한, TGF- β_1 은 MMP(matrix metalloprotenase)를 감소시키고, MMP의 endogenous inhibitor를 감소시키는 것으로 알려져 있다.¹¹ 반면, 반흔 없는 창상치유에서는 TGF- β_3 isoform의 상대적인 비율이 증가한다고 하였다. 따라서, 본 연구에서 증가된 TGF- β 분비량 및 발현량에 대해서 TGF- β isoform이 각각 얼마나 차지하는가에 대해서 추후 연구를 지속하여야 할 것으로 사료된다. 둘째로 증가된 교원질 합성량이 TGF- β 에 기인한다고 생각해 볼 수 있다. TGF- β 에 의해서 교원질 합성량은 증가하지만, 반흔 없는 창상치유의 경우 교원질의 배열이 성인 창상과는 다르고, 또한 증가된 VEGF에 의해서 반흔의 remodeling이 촉진되어서 창상치유가 아닌 창상재생이 이루어지므로, 이에 대한 지속적인 연구가 병행되어야 할 것이다.

이외에도 최근에는 VEGF에 관한 연구가 활발히 보고되고 있다. Steinbrech 등⁹은 배양된 인간 피부세포, 즉, 각질형성세포(epidermal keratinocyte), 진피 섬유아세포(dermal fibroblast), 진피 미세혈관 내피세포에서 24시간 저산소 환경에서 VEGF mRNA의 발현이 증가(upregulation)됨을 보고하였다.⁹ 또한, 신생혈관 생성과정은 창상의 재생과 회복에 있어서 가장 중요한 정상 생물학적인 과정임을 확인할 수 있음이 보고되고 있다.¹¹ 이번 연구의 결과, VEGF의 경우 태아 섬유아세포의 경우에 성인 섬유아세포와 비교하여 저산소 환경에서 VEGF 분비량이 24시간, 48시간, 72시간 모두 매우 유의있게 증가하였는데(p-value < 0.0001), 이는 상대적으로 저산소 환경에 있게 되는 태아에서 창상이 발생할 경우, VEGF 발현 증가에 따른 혈관신생 증가가 태아의 흉터 없는 창상치유에 중요한 단서로 작용할 수 있음을 보여주는 것이라 사료된다. 즉, Yang 등¹¹에 의하면, VEGF는 가장 강력한 혈관생성 물질의 하나로, 반흔 없는 창상의 경우 VEGF, PDGF, FGF-2와 같은 혈관생성 촉진 성장인자들에 의해 혈관생성이 활성화되어 있음이 알려져 있다. 이는 곧 VEGF 분비량 증가가 혈관생성과정을 통해 반흔 없는 창상치유에 기여할 수 있음을 반영하는 것이라 할 수 있을 것이다. 특히, 성인과 태아

섬유아세포의 저산소 환경에서의 VEGF 분비량을 상대적으로 비교해 본 결과, 태아 섬유아세포에서 그 증가량이 성인 섬유아세포에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였는데, 성인 섬유아세포에서 성인과 태아 섬유아세포의 저산소상태에 대한 반응이 다름을 보여주는 결과로서 의의를 갖은 것으로 생각된다. 또한, 이는 RT-PCR후 densitometry로 측정된 mRNA 발현량 증가로도 확인할 수 있었는데(Fig. 8, Right, Fig. 9), VEGF의 분비량 증가가 mRNA 수준에서의 유전자 발현의 증가에 기인함을 알 수 있었다.

Mehta 등¹³은 저산소 재산소화(ischemic-reoxygenation)에 따른 조직 손상에 있어서, TGF- β 의 발현량이 증가하여, 재산소화에 따른 조직 손상을 막아주는 역할을 한다고 보고하였다. 또한, TGF- β 가 TNF- α 의 활성화, 과산화 음이온(superoxide anion)생산, 세포 내 nitric oxide synthase 발현, 혈관내피(endothelium)에의 중핵구의 유착(neutrophil adherence)를 감소시키는 등의 다양한 기전으로 재산소화에 따른 조직손상의 보호가 가능하다고 알려져 있다.^{12,13} 재산소화에 따른 TGF- β 의 분비량과 mRNA 발현량이 태아섬유모세포에서 성인 섬유모세포 보다 더 증가하였는데, 이는 재산소화에 따른 조직손상을 최소화하기 위한 것으로 태아에서의 흉터 없는 창상재생 과정에 기여하는 것으로 생각된다. 또한, VEGF의 경우 재산소화 조건에서 태아 섬유아세포에서 성인 섬유아세포에 비해 상대적으로 분비량이 유의하게 감소하였는데, 이는 태아 섬유아세포가 성인 섬유아세포에 비해 산소 의존적(oxygen-dependent)임을 반증하는 결과라고 사료되며, 태아 섬유아세포의 표현형의 차이(phenotypic difference)가 있음을 짐작할 수 있었다.

본 연구에서 상대적으로 저산소 환경에서 작용하게 되는 태아섬유아세포의 경우 성인섬유아세포보다 산소 의존적(oxygen-dependent)이며 저산소 환경에서 TGF- β 의 발현 및 분비량이 증가하였고 VEGF 역시 분비 및 발현량이 증가하였는데, 이는 혈관생성 과정을 통해 반흔 없는 창상치유에 기여하는 기전의 일부로 생각되며 이에 대한 세포학적 분자 생물학적인 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

성인 섬유아세포와 비교하여 저산소 및 재산소화 상태가 태아 섬유아세포에 미치는 영향이 상대적으로 어떠한 차이가 있는지를 알아보기로 *in vitro* 연구를 시행한 결과 다음과 같은 것을 알 수 있었다.

첫째, 저산소 상태 24시간, 72시간에 성인 섬유아세포에

비해 태아 섬유아세포의 세포 활성도가 유의하게 증가되었다. 둘째, 저산소 상태에서 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 제 1형 교원질 합성량 및 type I collagen mRNA 발현량이 유의하게 높았고, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다. 셋째, 저산소 상태 72시간에 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 TGF- β 의 분비량이 유의하게 증가되었으며, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다. 저산소 상태에서 태아 섬유아세포가 성인 섬유아세포에 비해 VEGF의 분비량 및 mRNA 발현량이 유의하게 높았으며, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다.

즉, 태아 섬유아세포의 경우 성인 섬유아세포보다 저산소 및 재산소화 조건에서 세포활성도, TGF- β , VEGF의 발현 및 분비량이 증가하며, 이러한 태아 섬유아세포의 특성이 반흔없는 창상치유에 기여하는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Mackool RJ, Gittes GK, Longaker MT: Scarless healing: the fetal wound. *Clinic Plast Surg* 25: 357, 1998
- Longaker MT, Adzick NS: The Biology of fetal wound healing: A review. *Plast Reconstr Surg* 87: 788, 1991
- Stelnick EJ, Chin GS, Gittes GK, Longaker MT: Fetal wound repair: where do we go from here? *Seminars in Pediatric Surgery* 8: 124, 1999
- Lorenz HP, Whitby DJ, Longaker MT, Adzick NS: Fetal wound healing: The ontogeny of scar formation in the non-human primate. *Ann Plast Surg* 217: 391, 1993
- Sancho MA, Julia V, Alber A, Diaz F, Morale L: Effect of the environment on fetal skin wound healing. *J Ped Surg* 32: 663, 1997
- Siebert JW, Burd AR, McCarthy JG, Weinzwieg JW, Ehrlich HP: Fetal wound healing: A biochemical study of scarless healing. *Plast Reconstr Surg* 85: 495, 1990
- Adzick NS, Lorenz HP: Cells, matrix, growth factors, and the surgeon: the biology of scarless fetal wound repair. *Ann Plast Surg* 220: 10, 1994.
- Falanga V, Qian SW, Daniel puor D, Katz MH, Roberts AB, Sporn MB: Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β 1 by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 97: 634, 1991
- Steinbrech DS, Mehrara BJ, Chau D, Rowe NM, Chin G, Lee T, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT: Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts. *Ann Plast Surg* 42: 514, 1999
- Yang GP, Lim JJ, Rhan TT, Lorenz HP, Longaker MT: From scarless fetal wounds to keloids: Molecular studies in wound healing. *Wound Rep Reg* 11: 411, 2003
- Scheid A, Wenger RH, Christina H, Camenisch I, Ferenc A, Stauffer UG, Gassmann M, Meuli M: Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. *Pediatr Surg Int* 16: 232, 2000
- Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T: Myocardial protection from ischemia/

reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 106: 1511, 1999

13. Mehta JL, Chen HF, Li DY: Protection of Myocytes from

hypoxia-reoxygenation injury by nitric oxide is mediated by modulation of transforming growth factor- β_1 . *Circulation* 105: 2206, 2002