

배양된 인체진피섬유모세포의 증식에 대한 황체호르몬의 영향

권순성^{1,2} · 오명준^{1,3} · 이진희¹ · 박종림^{1,4} · 장 학^{1,3} · 민경원^{1,3}

서울대학교병원 성형재건연구소¹, 인하대학교 의과대학 성형외과학교실², 서울대학교 의과대학 성형외과학교실³,
서울대학교 보라매병원 성형외과⁴

Effect of Progesterone on Cultured Human Dermal Fibroblast

Soon Sung Kwon, M.D.^{1,2}, Myung June Oh, M.D.^{1,3},
Jin Hee Lee,¹ Jong Lim Park, M.D.^{1,4}, Hak Chang, M.D.^{1,3},
Kyung Won Minn, M.D.^{1,3}

¹Research Institute of Plastic and Reconstructive Surgery,

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine,

³Seoul National University, ⁴Boramea Hospital, Seoul, Korea

Purpose: The mechanism of scar formation is not fully understood. Fibroblast is an important cell in wound healing process. We experienced a patient who was taking progesterone orally. Upper blepharoplasty was performed on her but, wound healing was delayed. We hypothesized that progesterone was the cause of delayed wound healing and fibroblast proliferation inhibition. We investigated the effect of progesterone *in vitro* on human dermal fibroblasts to study the effects on fibroblast proliferation.

Methods: Human dermal fibroblasts from four persons were cultured initially. Progesterone is mixed to them at various concentrations, and fibroblast cell count was measured by MTT assay method at 570 nm. We confirmed that progesterone has some inhibitory effect on fibroblast proliferation and maximal inhibitory concentration of progesterone was determined. Then fibroblasts from a total of nineteen persons were cultured and the effects of progesterone were studied.

Results: The initial study showed the maximal inhibitory concentration of progesterone to be 50 µg/ml. The main study showed that progesterone had 70.9% inhibitory effect on human dermal fibroblast *in vitro*.

Conclusion: Progesterone has inhibitory effect on cultured human dermal fibroblast proliferation *in vitro*.

Progesterone is an agent that has inhibitory effect on fibroblast proliferation. Further study of progesterone concerning anti-scar action needs to be made.

Key Words: Progesterone, Fibroblast

I. 서 론

섬유모세포는 상처치유의 전 과정에 관여하며, 염증기부터 나타나기 시작하여 주로 상처가 생긴지 3-5일 경인 증식기에 활성화되어 상처 부위에 세포외기질성분(extracellular matrix component)과 성장인자를 분비하여 상처치유를 촉진한다.¹ 그리고, 상처치유 과정의 마지막 단계인 성숙기(remodeling phase)에는 복잡한 세포내과정과 세포외과정을 통해 콜라겐을 합성함과 동시에 상피세포와 함께 콜라겐 분해효소(collagenase)를 분비하여 콜라겐 용해가 평행을 이루게 하는 상처치유 과정에 있어서 중요한 역할을 하는 세포이다.¹

또한 황체호르몬(progesterone)은 여성의 난포에서 분비되는 스테로이드 호르몬으로 콜레스테롤에서 유도되는 스테로이드 호르몬이다. 저자들은 황체호르몬을 투여받고 있던 환자에게서 상안검 수술 후 안검의 상처치유가 지연되는 현상을 경험하였다. 만약 이 환자에게 수술 과정의 오류가 없었던 상처치유의 지연은 환자에게 투여된 황체호르몬이 원인일 수 있으며, 특히 상처치유에 중요한 세포인 섬유모세포의 증식을 억제하였을 가능성이 있다고 생각하였다.

기존의 실험에서 알려진 바와 같이 스테로이드 호르몬은 섬유모세포의 증식에 대한 억제력을 가지고 있으므로^{2,3} 스테로이드 호르몬의 일종인 황체호르몬 역시 섬유모세포의 증식을 억제하는지 알아보고자 하였다. 이를 위하여 사람의 진피섬유모세포(human dermal fibroblast)에 황체호르몬을 혼합배양 하여 섬유모세포의 증식에 억제력이 있는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

가. 재료

Antibiotic-Antimycotic(Gibco BRL, Gaithersburg, MD,

Received November 29, 2006

Revised April 11, 2007

Address Correspondence: Soon Sung Kwon, M.D., Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Inha University, 7-206, 3-ga, Sinheung-dong, Jung-gu, Incheon 400-711, Korea. Tel: 032) 890-3516 / Fax: 032) 742-3821 / E-mail: frc22@hanmail.net

* 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수 연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(R11-2005-065).

- USA)
- FBS(fetal bovine serum, Hyclone, USA)
- DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium, WelGENE, South Korea)
- Trypsin-EDTA(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)
- Dispase(Sigma, St. Louis, USA)
- Collagenase (Worthington, USA)
- DPBS(Dulbeco's Phosphate buffered Saline, CHEMICON, Temecula, CA)
- Progesterone(Progest Inject[®], Samil, Korea)
- Propan 2-ol solution (CHEMICON, Temecula, CA)
- MTT(3-(4, 5-dimethylquad-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, CHEMICON, Temecula, CA)

나. 섬유모세포의 추출

섬유모세포는 사람 피부의 진피에서 채취한 진피섬유모세포를 배양하였다. 피부조직은 성형외과에서 유리피판술이나 변연절제술을 받는 환자에게 동의서(informed consent)를 받고 수술 시 발생하는 잉여조직에서 얻었다. 먼저

황체호르몬의 농도 결정을 위한 준비실험을 하였는데 준비실험에서 4명, 본 실험에서 15명의 피부를 사용하여 모두 19명(남자 10명, 여자 9명, 평균 44.1세)의 환자에서 피부조직을 얻었다(Table I).

피부조직의 표피층은 최대한 제거하고 진피층만을 얻어 이를 가늘고 길게 자른다. 섬유모세포를 얻기 위하여 4 U/ml dispase를 37°C에서 30분간 처리한 후 다시 collagenase로 90분간 처리한다. Collagenase를 처리한 진피에 0.025% trypsin-0.27 mM EDTA를 넣고 37°C에 10분간 두었다가 FBS(fetal bovine serum)로 trypsin-EDTA를 불활성화 한다. 이를 10분간 와동(vortex)한 후 single cell suspension을 만든다. 배양접시에 10% FBS를 첨가한 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여 cm²당 10,000 cells로 접종(inoculation)하여 100 dish당 7.85 × 10⁵ cells로 배양한다. 충분한 양의 섬유모세포가 배양될 때까지 7일간 기다린다. 이렇게 3일 간격으로 2회 계대배양한 세포를 실험에 사용하였다.

Table I. Sources of Cultured Human Dermal Fibroblasts

No	Sex	Age	Harvest site
1	M	2	Foot
2	M	21	Arm
3	M	23	Leg
4	M	24	Abdomen
5	M	37	Back
6	M	44	Back
7	M	57	Abdomen
8	M	59	Abdomen
9	M	61	Abdomen
10	M	63	Back
11	F	37	Abdomen
12	F	42	Leg
13	F	42	Back
14	F	44	Chest
15	F	48	Chest
16	F	52	Back
17	F	52	Chest
18	F	56	Arm
19	F	74	Back

다. 황체호르몬의 실험농도 결정 및 실험방법

남자 2명과 여자 2명에서 진피를 채취하여 2회 계대배양 한 섬유모세포를 24 well plate에 well당 일정하게 10,000 cells/ml의 농도가 되도록 분주하여 2일간 배양한다. 세포가 포화 상태에 이르면 여기에 황체호르몬의 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 µg/ml로 다양하게 하여 혼합하였다. 대조군의 농도는 황체호르몬을 혼합하지 않은 것이었고, 실험군의 농도는 이 농도 중에서 섬유모세포의 증식을 가장 급격하게 억제하는 농도를 MTT assay를 이용하여 흡광도를 측정하여 선택하였다. 이렇게 하여 실험군의 황체호르몬 농도를 결정하여 이 농도로 15명의 섬유모세포에 처리하여 혼합배양하였다. 이 실험에서는 모두 19명에게서 얻은 섬유모세포에 황체호르몬을 처리하여 분석하였다.

라. MTT assay에 의한 섬유모세포의 증식력 비교

혼합배양 10일째 되는 날 3-(4,5-dimethylquad-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)법을 이용하여 측광기(spectrophotometer)로 흡광도(absorbance)를 측정한다. MTT법은 어떤 세포의 미토콘드리아 탈수효소(mitochondrial dehydrogenase)가 노랑색 수용성인 MTT기질을 균청색 비수용성 formazan crystal로 변화시키는 정도를 측정하는 것으로 세포의 수를 대변한다. PH 7.5에서 DPBS(Dulbeco's Phosphate buffered Saline)와 혼합하여 5 µg/ml의 농도로 MTT용액을 만든 후 이를 0.2 µl의 필터로 소독하고 100 µl의 세포배양액당 10 µl의 양으로 96 well 세포 배양액에 첨가하고 3시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 배양

용기에서 배양한다. 0.04 M HCl in propan-2-ol 용액 100 μ l를 첨가하고 shaker에서 5분간 흔들어 준 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 판독하였다. 흡광도는 샘플마다 3회씩 측정하여 평균값을 구하였다.

마. 자료의 분석

섬유모세포증식에 대한 억제력을 보기 위하여 MTT 법으로 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 실험에 사용했던 세포를 이용하여 96 well에 0.01×10^5 부터 2.0×10^5 까지 29개의 간격으로 나누어 각각을 3회씩 반복 측정하여 standard curve를 구하였다. 실험군과 대조군의 세포는 동일한 사람에게서 얻은 섬유모세포이므로 두 군간의 세포 수의 차이를 SPSS의 paired-t test를 사용하여 $p < 0.001$ 에

서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

실험군의 농도를 결정하기 위한 준비 실험으로 4명에게서 채취하여 2회 계대배양한 섬유모세포에 황체호르몬을 여러 농도로 처리하여 10일간 배양하여 현미경으로 관찰한 결과 섬유모세포의 수가 감소하였다(Fig. 1). 570 nm에서 3회씩 측정한 흡광도의 평균값은 Table II와 같았다. 이를 그래프로 그려보면 4개의 샘플 모두 유사한 양상을 보였는데 황체호르몬의 농도가 50 μ g/ml일 때 흡광도는 가장 낮은 값을 보였으며, 이보다 큰 농도에서는 흡광도가 증가하다가 100 μ g/ml 이상에서는 일정한 값을 보여(Fig.

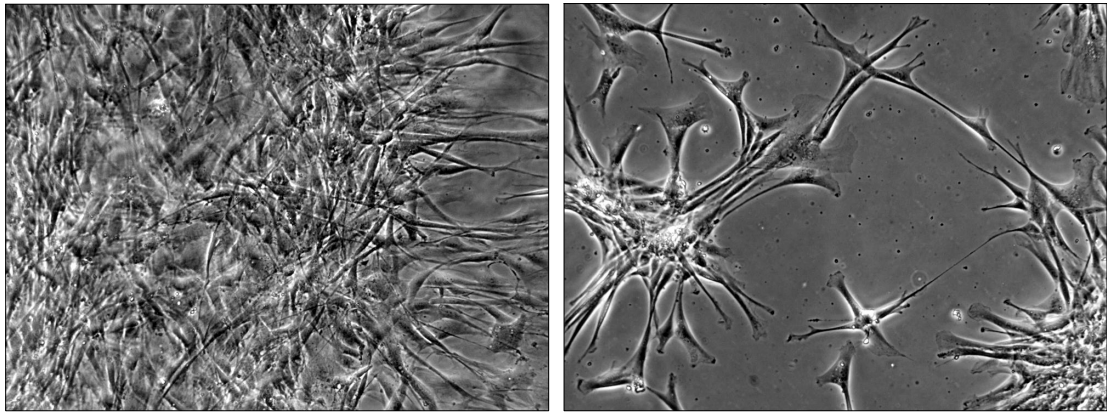


Fig. 1. Fibroblast(M/24) cultured with progesterone at 50 μ g/ml for 10 days($\times 20$). (Left) Experimental sample is decreased compared to (Right) control sample.

Table II. Absorbances of Fibroblasts from 4 Persons Mixed with Progesterone with Various Concentrations. MTT assay was done at 570 nm

Progesterone (μ g/ml)	M/37	F/74	M/21	F/56
0	0.8874	0.7541	0.9019	0.8152
10	0.8611	0.7123	0.8712	0.8079
20	0.7541	0.6855	0.7961	0.5167
30	0.6523	0.6449	0.6879	0.6518
40	0.5689	0.5811	0.6018	0.5479
50	0.511	0.5231	0.5338	0.5501
100	0.5523	0.5491	0.5799	0.4106
200	0.5479	0.5621	0.5688	0.4618
300	0.5699	0.5699	0.5716	0.4007
400	0.5517	0.5509	0.5691	0.4501
500	0.5339	0.5608	0.5604	0.4205
1000	0.5219	0.5497	0.5777	0.4588

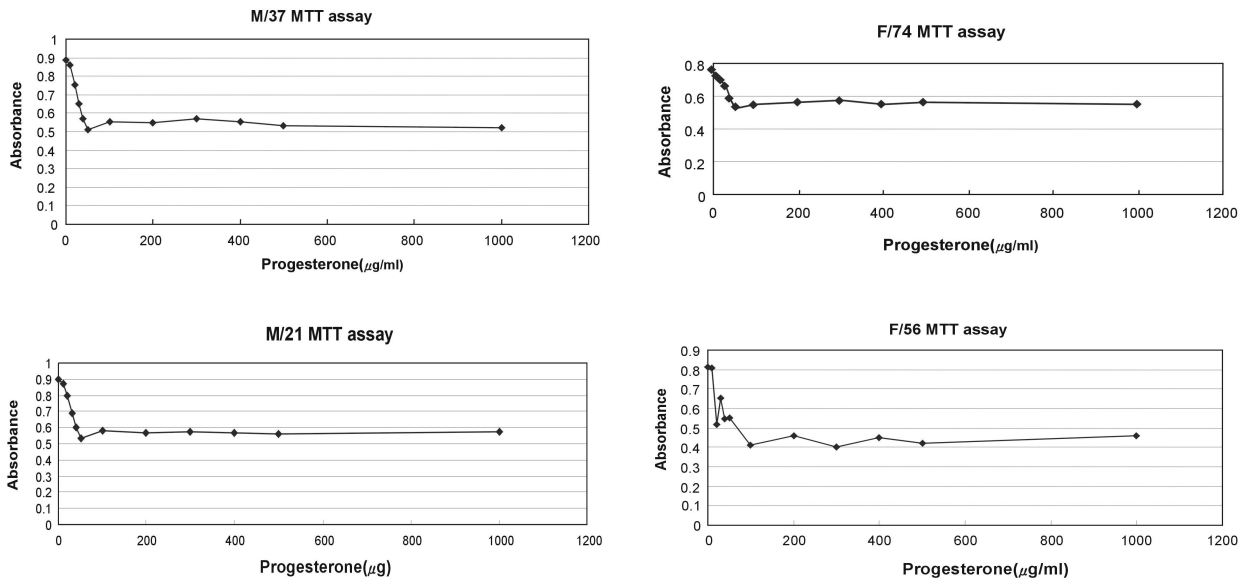


Fig. 2. Growth patterns of cultured human dermal fibroblasts mixed with progesterone. MTT assay result at 570 nm from 4 persons. At the concentration of 50 µg/ml, the proliferation is inhibited maximally.

Table III. Cell Count of Fibroblasts Cultured with Progesterone at 50 µg/ml

No.	Source of cell	Cell count of control (C, cells/ml)	Cell count of experimental (E, cells/ml)	Inhibition ratio (1-E/C, %)
1	M/2	170110	80772	52.52
2	M/21	170365	9618	94.35
3	M/23	203018	123844	38.99
4	M/24	199824	132426	33.73
5	M/37	165023	8712	94.72
6	M/44	158893	86490	45.57
7	M/57	132839	8839	93.35
8	M/59	129894	4290	96.7
9	M/61	126083	5997	95.24
10	M/63	131473	3690	97.19
11	F/37	156527	98881	63.17
12	F/42	165172	62043	61.83
13	F/42	116353	61699	46.97
14	F/37	123717	5302	95.71
15	F/48	123420	3968	96.78
16	F/52	149626	1844	98.77
17	F/52	159045	105475	33.68
18	F/56	136862	10265	92.5
19	F/74	110996	9193	91.72
Average		148907	43334	70.9
SD		26443	47322	

MTT assay was done at 570 nm. The difference of cell count between control groups(C) and experimental groups(E) is 70.9%.

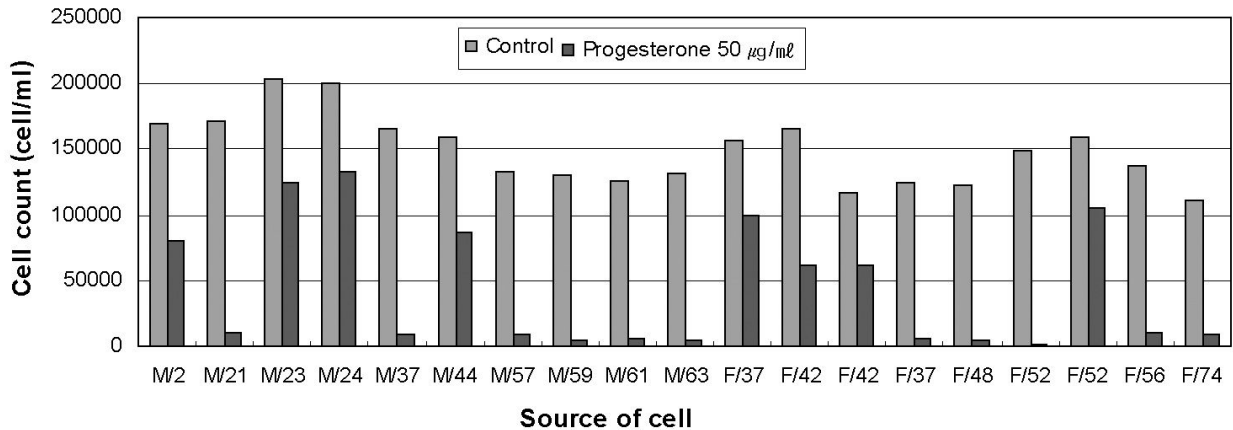


Fig. 3. Histogram of 19 samples. Cell count of fibroblasts cultured with progesterone at 50 µg/ml. MTT assay was done at 570 nm.

2) 실험 농도는 50 µg/ml로 결정하였다.

이 농도로 모두 19명에서 채취한 섬유모세포에 황체호르몬을 처리하여 570 nm에서 MTT법으로 흡광도를 구하여 환산한 세포수는 Table III과 같았다. 황체호르몬을 처리한 실험군은 모두 대조군에 비하여 세포수가 감소하였으며(Fig. 3), 섬유모세포의 증식은 평균 70.9% 감소하였다. 따라서 황체호르몬은 인체진피섬유모세포의 증식을 억제함을 알 수 있었으며, SPSS로 paired t-test를 실시한 검정에서 $p < 0.001$ 로 통계적으로 유의하게 억제되었다.

IV. 고 찰

황체호르몬을 50 µg/ml로 처리하여 3일간 배양한 결과 섬유모세포의 증식이 억제됨을 관찰하였다. 황체호르몬으로 섬유모세포의 증식이 억제됨을 관찰한 여러 실험이 있었다. Nyman 등은 난소를 제거한 토끼에게 황체호르몬을 투여하여 상처 부위의 조직액을 관찰한 실험에서 황체호르몬이 상처치유를 억제하였는데 이는 섬유모세포의 증식에 대한 직접적 작용이 아니라 황체 호르몬이 염증 반응과 혈관의 발달을 변화시키기 때문이라 하였다.⁴ Lundgren 등은 쥐의 육아조직에 대한 황체호르몬의 영향을 관찰한 실험에서 에스트로겐과 황체호르몬을 병용 투여한 경우 콜라겐합성이 황체호르몬에 의해 억제된다고 하였다.^{5,6} 인체 섬유모세포와 황체호르몬에 대한 보고를 보면 Christoffers 등은 사람의 잇몸의 섬유모세포에 황체호르몬 50 µg/ml과 100 µg/ml을 처리하여 모두 증식이 억제되었음이 관찰하였고,⁷ Yu 등은 사람의 전방십자인대에서 채취한 섬유모세포에 황체호르몬을 혼합하여 배양하여 섬유모세포의 기능을 억제하는 작용이 있다고 하였다.⁸ 사람 잇몸의 섬유모세포를 배양하여 세포질 내에 존재하는 에스트로겐 수용체와 황체

호르몬의 수용체의 위치와 발현을 면역화학 검사로 확인한 보고도 있다.⁹

이 실험에서 인체 진피에서 채취한 섬유모세포를 황체호르몬과 혼합 배양하여 증식이 억제되는 결과를 얻었다. 그러나, 상처치유는 섬유모세포의 작용만이 아니라 여러 세포와 매개물질의 상호 작용으로 이루어지므로 섬유모세포에 대한 황체호르몬의 작용으로 상처치유와 수술 부위의 상처치유가 지연되거나 억제된다고 말하기는 어렵다. 또한 섬유모세포의 콜라겐 합성에 대한 관찰이 필요하며, 섬유모세포의 증식과 상처치유는 직접적으로 연관지을 수는 없다. 그렇지만 황체호르몬이 실험적으로는 인체 진피의 섬유모세포의 증식을 억제할 수 있음이 관찰되었고, 이 호르몬이 스테로이드 호르몬 일종이라는 관점에서 트리암시놀론 아세토나이드 같은 스테로이드 호르몬이 흉터를 줄이는 물질로 사용되고 있는 것을 감안하면 황체호르몬은 추후 흉터와 관련이 있는지 연구해볼 가치가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

황체호르몬이 *in vivo* state에서 수술 후 상처치유에 영향이 있는지는 알 수 없지만 *in vitro* state에서는 상처치유에 많은 관련이 있는 섬유모세포의 증식을 억제하였음을 알 수 있었다. 황체호르몬이 수술 후 상처치유를 지연시킬 가능성이 있는지 알 수 없으나 섬유모세포의 증식 억제와 관련이 있고 성형외과영역에서 사용되고 있는 스테로이드 호르몬과 유사한 스테로이드 호르몬이라는 점에서 추후 상처치유에 관련된 연구를 시도해 볼 가치가 있다고 사료된다.

REFERENCES

1. Lorenz HP, Longaker MT: Chapter 5. Wound healing: repair biology and wound and scar treatment. In Mathes SJ: *Plastic Surgery*, 2nd ed, Elsevier Inc., Philadelphia, 2006, p 209
2. Ponc M, De Haas C, Bachra BN, Polano MK: Effects of glucocorticosteroids on cultured human skin fibroblasts. III. Transient inhibition of cell proliferation in the early growth stages and reduced susceptibility in later growth stages. *Arch Dermatol Res* 265: 219, 1979
3. Priestley GC: Effects of corticosteroids on the growth and metabolism of fibroblasts cultured from human skin. *Br J Dermatol* 99: 253, 1978
4. Nyman S, Lindhe J, Zederfeldt B: Impaired wound healing in progesterone-treated rabbits. *Acta Chir Scand* 139: 415, 1973
5. Lundgren D: Influence of estrogen and progesterone on exudation, inflammatory cell migration and granulation tissue formation in preformed cavities. *Scand J Plast Reconstr Surg* 7: 10, 1973
6. Lundgren D: Influence of estrogen and progesterone on vascularization of granulation tissue in preformed cavities. A microangiographic study. *Scand J Plast Reconstr Surg* 7: 85, 1973
7. Christoffers AB, Kreisler M, Willershausen B: Effects of estradiol and progesterone on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Eur J Med Res* 8: 535, 2003
8. Yu WD, Panossian V, Hatch JD, Liu SH, Finerman GA: Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res* 383: 268, 2001
9. Kawahara K, Shimazu A: Expression and intracellular localization of progesterone receptors in cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 38: 242, 2003