

인간태반추출물이 창상 치유에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 범 진

인간태반추출물이 창상 치유에  
미치는 영향

지도교수 유 대 현

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

김 범 진

# 김범진의 석사학위논문을 인준함

심사위원 유 대 현 인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2008년 6월

## 감사의 글

새로운 학문의 세계를 접할 기회를 주셨고, 연구의 주제와 실험 방법을 놓고 고민하거나 진행 중에 난관에 봉착했을 때마다 지친 저에게 열정을 불어 넣어 주시고 새로운 길을 제시하여 주신 유대현 교수님께 깊은 감사를 드립니다

이 논문이 완성되기까지 학문적 조언을 아끼시지 않으셨던 정기양 교수님께 감사 드립니다. 또한 이 논문의 진행 과정에서 깊은 배려로 지도해 주신 유원민 교수님께 감사 드립니다.

바쁜 가운데서도 자료 수집과 결과 분석을 도와준 홍종원 강사와 한승범 연구원에게 감사의 말을 전합니다.

끝으로 부족한 저를 믿고 곁에서 후원해 준 아내 박경희와 아들이안이에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 지금까지 한 명의 의사로 성장할 수 있게끔 묵묵히 도와주시고 지켜봐 주신 부모님, 그리고 이 논문이 나오기까지 학업을 지원해 주신 외조부님과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.

2008년 6월 저자 씀

## <차례>

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 실험 동물 및 창상 형성 .....	6
2. 인간태반추출물 투여 .....	6
3. 창상 크기 변화 측정 .....	7
4. TGF- $\beta$ , VEGF, CD31+ 의 측정 .....	7
5. 신생혈관 개수 측정 .....	8
6. 조직학적 변화 관찰 .....	9
7. 통계학적 분석 .....	9
III. 결과 .....	10
1. 창상 크기의 변화 .....	10
2. TGF- $\beta$ 발현 .....	12
3. VEGF 발현 .....	13
4. CD31+ 혈관내피세포 발현 .....	14
5. 신생혈관 개수 .....	15
6. 조직학적 변화 .....	16
7. 콜라겐의 변화 .....	17
IV. 고찰 .....	18
V. 결론 .....	25
참고문헌 .....	26
영문요약 .....	31

## 그림 차례

그림 1. 창상 크기 변화 사진.....	10
그림 2. 창상 크기 변화 그래프.....	11
그림 3. TGF- $\beta$ 발현 분석.....	12
그림 4. VEGF 발현 분석.....	13
그림 5. CD31+ 혈관내피세포 발현 분석.....	14
그림 6. 신생혈관 개수의 변화.....	15
그림 7. 조직학적 변화.....	16
그림 8. 콜라겐 형성.....	17

## 인간태반추출물이 창상 치유에 미치는 영향

인간태반에는 디옥시리보스 모이어티(deoxyribose moiety), 호르몬, 효소, 비타민뿐 만 아니라 여러 성장인자와 싸이토카인 등 생물학적 활성이 높은 분자가 풍부하다. 전통적으로 인간태반은 화상이나 만성창상, 넓은 부위의 피부결손 등 외상의 치료뿐 만 아니라 여러 다른 질환의 치료에도 사용되었다. 최근에는 인간태반을 추출물로 제품화하여 항 노화, 아토피 피부염, 천식, 간질환 등 여러 분야에서 쓰고 있다. 그러나 제품화된 인간태반추출물이 임상에서 많이 사용되고 있음에도 불구하고 추출물로서의 인간태반이 나타내는 효능이나 기전에 대해서는 과학적으로 밝혀진 바가 많지 않다. 본 연구는 인간태반이 창상치유에 효과가 있어 화상 등의 창상에 이용되는 것에 주목하여 인위적 창상치유 모델을 통해 인간태반추출물이 창상치유에 효과가 있는지, 효과가 있다면 창상치유 과정에서 어떠한 역할을 하며 어떤 기전으로 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다.

총 10마리의 마우스(ICR mouse, 5주령 수컷, 30g)를 실험군과 대조군으로 나누고 각각의 마우스의 배측에 직경 8mm의 피부조직검사용 펀치를 이용하여 1개의 전층 피부 결손을 만들었다. 창상 치유에 효과적인 용량을 찾는 예비실험을 통해  $2.0 \times 10^{-3}$  ml/30g 을 적정 농도로 하여 창상 경계에 주입하였다. 창상을 3일 간격으로 2주간 디지털 카메라로 촬영하고 디지털 영상 분석 프로그램을 이용하여 크기를 측정하였다. 창상치유 6일, 14일에 조직을 생검하여 헤마톡실린-에오신 염색을 통해 조직학적 변화를 관찰하고, 면역조직화학염색을 통해 창상 치유에 관여하는

사이토카인 중 TGF- $\beta$ 와 VEGF의 발현 정도를 측정하여 비교, 분석하였다. 면역조직화학염색을 통해 CD31+의 발현 정도를 알아보고, 신생혈관의 수를 세어 혈관의 생성 정도를 알아보았다. 또한 창상 치유 후에 콜라겐의 배열을 보기 위해 14일에 Masson' s trichrome 염색을 시행하였다.

창상치유 14일까지 창상의 크기를 연속적으로 측정한 결과, 3일째부터 9일째까지 실험군에서 대조군보다 창상의 크기가 빨리 감소하였다. TGF- $\beta$ 는 창상치유 6일에 실험군에서 유의한 증가를 보였으나, 14일에는 실험군과 대조군 모두에서 감소하였다. VEGF는 창상이 치유될수록 모두 증가하였고, 특히 창상치유 14일에는 실험군에서 유의한 증가를 보였다. CD31+의 발현과 신생혈관의 수는 창상 치유가 진행되면서 실험군과 대조군 모두에서 증가한 가운데, 실험군에서 대조군보다 더 많이 증가한 양상을 보였으나 통계학적으로 유의한 결과는 아니었다. 창상치유 14일에 시행한 Masson' s trichrome 염색에서 실험군과 대조군 사이에 콜라겐 생성과 배열의 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 창상에 인간태반추출물을 국소 투여하면 창상 치유와 관련된 사이토카인의 발현이 인간태반추출물에 의해 영향을 받아 창상 초기의 염증 반응이 보다 많이 유발되고 창상 후기의 신생혈관생성이 촉진되어 창상이 보다 빨리 치유되는 것을 알 수 있었다.

---

핵심 되는 말 : 인체태반추출물, 창상 치유, TGF- $\beta$ , VEGF, CD31+



# 인간태반추출물이 창상 치유에 미치는 영향

<지도교수 유 대 현>

연세대학교 대학원 의학과

김 범 진

## I. 서론

태반(placenta)은 태아(fetus)를 보호하고 성숙시키는 장기로서 산모와 태아 사이를 연결하여 양분, 노폐물, 가스교환뿐만 아니라 면역학적인 보호를 하고 여러 치료적 물질을 포함하고 있다.<sup>1</sup> 양막(amniotic membrane)은 태아를 둘러싼 가장 안쪽 층으로 기질(stromal matrix)이 풍부하고 두꺼운 콜라겐 층을 가지고 있다. 태반은 오래 전부터 화상,<sup>2</sup> 창상,<sup>3</sup> 궤양(ulcer)<sup>4-6</sup> 등의 치료에 민간요법으로 사용되었고, 질 재건<sup>7, 8</sup>, 각막 재생<sup>9</sup>, 장의 유착방지<sup>10, 11</sup> 등을 위한 재료로도 사용되었다. 태반을 이용하여 창상을 치료하였을 때 치유가 잘 되고,<sup>23</sup> 상피화를 촉진하는 한편 과도한 섬유화(fibrosis)를 막는 것으로 알려져 있다.<sup>24</sup> 또한 면역성이 적고,<sup>5</sup> 세균에 대한 정균 작용 (bacteriostatic effect)도 가지고 있어<sup>2, 9</sup> 넓은 부위의 피부 결손이 있어 제한된 피부로 피부이식의 한계가 있을 때 생체적 드레싱(biologic dressing) 제재로 사용하여 효과를 보거나<sup>12</sup>, 태반에서 얻은 콜라겐을 이용하여 만든 기질(matrix)로 복부의 누공(fistula)을 치료한 예도 있었다.<sup>13</sup> 이러한 여러 가지 예에서 태반이 유착방지, 창상보호, 통증경감,

상피화 촉진의 기능을 가지고 있음을 알 수 있다.<sup>9</sup>

태반의 의학적 효능이 알려지면서 보다 효과적으로 태반을 이용하기 위해 30여 년 전부터는 태반으로부터 유효 성분만을 추출한 인간태반추출물(Human placental extract: HPE)이 임상에 이용되기 시작하여<sup>14, 15</sup> 백반증, 아토피, 천식, 간염, 간경화, 관절염 등의 치료에 이용되었고, 최근에 이르러서는 미용 목적으로도 많이 사용되고 있다.<sup>16-19</sup> 만성 창상에 있어서도 HPE를 써서 효과가 있었다는 보고가 있었는데, Kaushal 등은 두경부에 발생한 편평세포암종(squamous cell carcinoma) 환자에서 방사선 치료 후 발생한 구강 점막염(oral mucositis) 환자 120명을 두 그룹으로 나눠 HPE를 투입한 집단과 대조군을 비교했을 때 HPE를 투여한 집단에서 점막염이 호전되었다고 하였고, 이 외에 연하곤란(dysphasia), 통증, 영양상태 등의 호전을 보였다고 하였다.<sup>20</sup> Tiwary 등도 태반추출물을 함유한 젤과 크림 재제를 이용하여 치유가 곤란한 창상에서 효과를 보았다고 하였다.<sup>21</sup> 특히 HPE가 창상 치유에 효과가 있었다는 기초적인 연구로 Shukla 등은 만성창상을 가진 환자를 대상으로 HPE를 국소투여 한 집단에서 창상 면적이 빨리 줄어들었고, 조직검사상 혈관생성이 잘 되었다고 보고하였다.<sup>22</sup>

그러나 이들 보고에서는 치유 기전을 명확히 밝히지는 못하였다. 대부분의 보고에서 태반이 다양한 효능을 나타내므로 그 추출물인 HPE도 많은 효과를 보일 것이라고 설명했으나, 태반이 가진 효능이 추출물로 걸러졌을 때도 동일하다고 보기는 어렵다. 태반 추출물에 많은 성장인자나 비타민, 단백질, 효소, acid phosphate, nucleotides 등이 있어서 효과가 있다고 하였으나 어떤 종류의 물질이 얼마 정도 있는지 아직까지 명확히 밝혀지지 않는 것이다.<sup>22</sup>

이렇듯 실제적으로는 제품화된 인간태반추출물이 임상에서 많이 사용되고 있음에도 불구하고 추출물로서의 인간태반이 나타내는 효능이나 기전에 대해서는 과학적으로 밝혀진 바가 많지 않다. 본

연구에서는 인간태반이 창상치유에 효과가 있음에 주목하여 동물 실험을 통해 일정한 규격의 창상모델에서 HPE를 투여했을 때 창상 치유가 더 잘 되는지를 알아보고, 만약 효과가 있다면 HPE가 창상 치유에 어떠한 역할을 하며 어떤 기전으로 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 창상 형성

중앙실험동물(주)에서 공급 받은 10마리의 ICR 마우스(5주령 수컷, 30g)를 이용하여 실험하였다. 실험 동물은 5마리씩 무작위로 나누어 실험군과 대조군을 설정하였다. 각각의 마우스에 대해 isoflurane 으로 흡입마취를 시행한 후, ketamine 0.02ml/100g과 xylazine 0.0015ml/100g 을 복강에 주입하여 마취하였다. 마우스의 배측에 두부에서 미부까지 털을 제거한 후, 직경 8mm의 피부조직검사용 펀치(Biopsy punch, Kai Medical, Japan)로 전층 피부 결손을 만들었다. 이때 일정한 크기의 창상을 만들기 위해 한 명의 실험자가 시행하였고, 마우스의 피부는 일정하게 당김으로써 창상의 크기가 개체 별로 많은 차이가 나지 않도록 하였다. 피부 결손 부위는 Tegaderm™(3M Health Care, St. Paul, U.S.A.)으로 덮어 조직액이 고인 상태에서 창상이 마르지 않도록 유지시켰다. 3일에 한 번씩 창상을 관찰하면서 털이 많이 나왔을 경우 다시 털을 제거하였고 Tegaderm™ 도 교환하였다.

### 2. 인간태반추출물 투여

본격적인 실험에 앞서 마우스에 만든 창상에 주입할 HPE의 용량을 정하기 위한 예비실험을 시행하였다. HPE는 Melsmon(2ml/Ample, Melsmon Pharm., Japan)을 사용하였다. 펀치 생검(punch biopsy)으로 만든 직경 8mm 크기의 창상 주변에 시계방향으로 8군데에 주입하기 위한 주입량은 0.2ml가 가장 적당하였다. 회색하지 않은 HPE 0.2ml를

주입한 예비실험군에서는 창상 주변으로 염증반응이 과도하게 나타나서 창상치유에 대한 평가가 불가능하였다. 따라서 임상에서 HPE를 사용할 때 60kg 성인에 1회에 1앰플 씩, 1주일에 3회, 2주에 걸쳐서 주입하는 것을 참고하여 30g의 ICR 마우스에서 사용하도록 0.9% 생리식염수로 희석하여 0.2ml에  $1.0 \times 10^{-3}$ ml의 HPE 포함된 희석액을 제조하였다. 그러나 이와 같이 희석된 양을 주입한 예비실험에서는 실험군과 대조군 간에 창상 치유의 차이가 나타나지 않았다. 그래서 용량을 두 배로 증가시켜 1앰플의 HPE를 200ml의 0.9% 생리식염수로 희석하여 0.2ml에  $2.0 \times 10^{-3}$ ml의 HPE가 포함된 희석액을 제조하여 본 실험에서 사용하였으며 대조군에는 0.9% 생리식염수 0.2ml를 8군데에 나눠 주입하였다.

### 3. 창상 크기 변화 측정

창상 크기 변화를 보기 위해 실험 당일을 0일로 하여 실험 시작일부터 3일 간격으로 2주간 디지털 카메라로 사진 촬영을 하였다. 카메라 위치의 차이에 의한 오차를 방지하기 위해 스탠드를 이용하여 일정거리에 카메라를 고정시켰다. 개방창의 면적은 촬영된 사진을 Image J program(NIH, Washington, USA)을 이용하여 보정화 작업을 거쳐 산출하였다.

### 4. TGF $\beta$ , VEGF, CD31+의 측정

창상치유 6일, 14일에 실험 동물의 배부 창상과 창상 주변 부위 조직을 생검하여 anti-transforming growth factor-beta(MAB1032, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA), rabbit anti-VEGF

(RB-222-P; Lab Vision, . Fremont, CA, USA), anti-mouse platelet endothelial cell adhesion molecule-1(PECAM/CD31) polyclonal antibody(M20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 면역조직화학염색을 시행하였다. 생검 조직을 표준 파라핀 블록을 만든 후, 약 5 $\mu$ m 두께로 박절하여 통상의 방법으로 재수화시켰다. 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 에 상온에서 5분간 배양하여 endogenous peroxidase를 비활성화 한 후, 5% bovine serum albumin으로 상온에서 30분간 배양하여 비특이 항원 반응을 억제하였다. 각각 일차 항체(1<sup>st</sup> antibody)로 mouse anti-human nuclei monoclonal antibody, anti-transforming growth factor-beta, rabbit Anti-VEGF를 희석하여 1시간 가량 상온에서 배양 후, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 이후 PBS로 세척하고 2<sup>nd</sup> antibody-conjugated polymer(EnVision<sup>TM</sup>, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)로 상온에서 20분간 처리하였다. 이후 0.05% diaminobenzidine(DAB, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)에 5분간 적용하여 발색시켰다. Gill' s hematoxylin으로 1회, 1분간 counterstaining 후, 통상의 방법으로 탈수시켜 조직표본을 제작한 뒤 광학현미경(Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)으로 400배율에서 관찰하였다. 각각의 표본은 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(Olympus DP71, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)을 이용하여 digital image로 저장하였다. computer-assisted planimetry (Metamorph, Metamorph Ltd., Limerick, Ireland)를 이용하여 digital image 상에서 각각의 항체에 염색된 정도(integrated optical density)를 측정하였다.

## 5. 신생혈관 개수 측정

창상치유 6일, 14일에 CD31+로 면역조직화학염색을 시행한 조직

표본에서 무작위로 10군데를 선택하여 HPF(x400)당 존재하는 혈관의 개수를 측정하여 비교 분석하였다.

## 6. 조직학적 변화 관찰

창상치유 6일, 14일에 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하여 창상치유에 따른 조직 소견을 관찰하였다. 창상치유 14일에는 콜라겐을 관찰하기 위한 Masson's trichrome 염색을 시행하였다. 생검 조직으로 파라핀 블록을 만든 후 절편을 얻어 표본을 제작하였다. 재수화 후에 15분간 미리 가열한 Bouin's solution에 15분간 배양한 후 2분간 냉각하였다. 이후 Weigert's iron hematoxylin 용액에 5분간 염색 후에 세척하고 Beibrich scarlet-acid fuchsin에 5분간 염색하였다. 이후 phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution에 5분간 담근 후 aniline blue solution에 염색하였다. 1% 아세트산에 2분간 배양한 뒤 탈수 후 표본을 제작하였다. 각각의 표본은 광학현미경(Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)으로 100배율에서 관찰하였고 광학현미경에 부착된 디지털 카메라(Olympus DP71, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)를 이용하여 digital image로 저장하였다.

## 7. 통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준 편차로 표시하였으며, 각 군간의 비교는 t-test와 비모수 검정(Mann-Whitney U test)로 유효성 여부를 검정하였다.  $p$  값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

### III. 결과

#### 1. 창상 크기의 변화

HPE를 주입한 실험군에서 대조군보다 빠른 창상 치유를 보였다(그림. 1). 특히 창상치유 3일, 9일에 대조군에 비해 통계적으로 유의한 창상 크기의 감소를 보였다(그림. 2). 창상 크기의 50%로 줄어드는 시간은 실험군에서 3.04일, 대조군에서 4.49일로 실험군에서 빨랐다. 하지만 창상 치유가 종결되어가는 14일째에는 거의 비슷한 크기로 감소되었다.

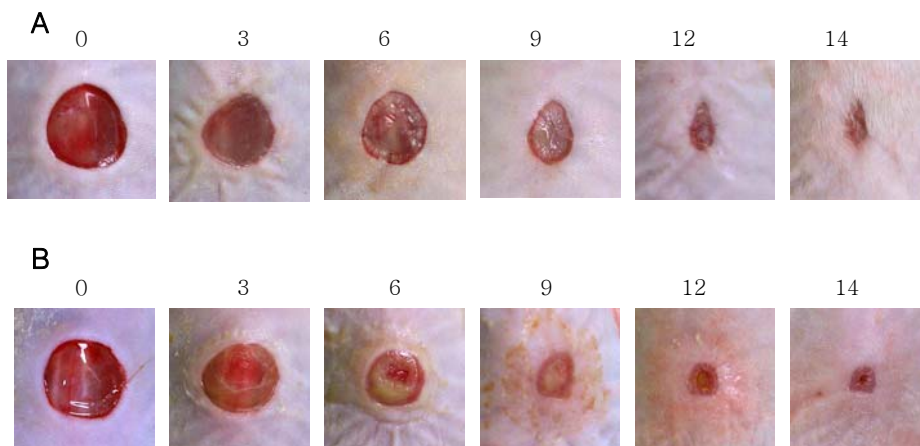


그림. 1. 창상 크기 변화 사진. 실험군과 대조군의 창상을 디지털 카메라로 찍었다. A는 실험군의 창상의 크기 변화를 보이고 있고, B는 대조군의 창상 크기의 변화를 보여주고 있다.



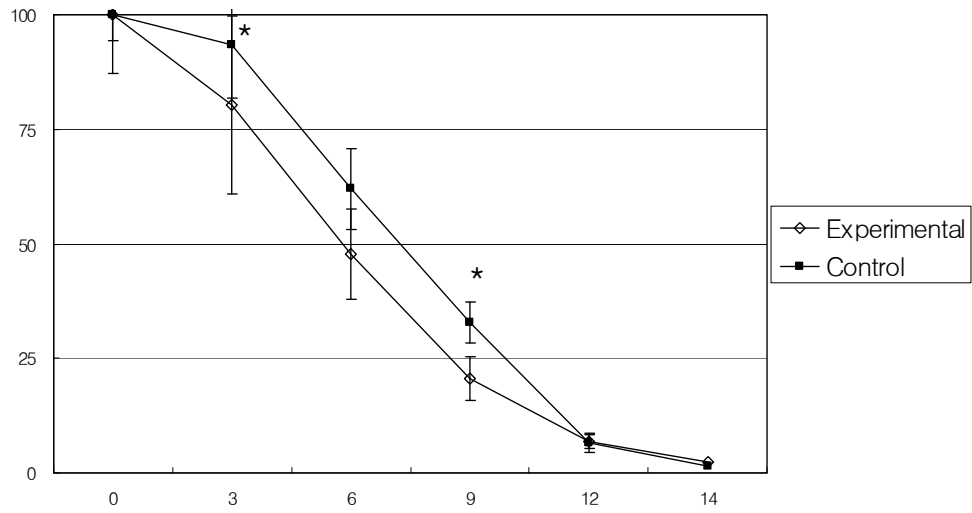


그림. 2. 창상 크기 변화 그래프. 처음 창상 크기를 100%로 하여 상대적인 크기의 변화를 보았다. 창상치유 3일, 9일에 실험군에서 대조군에 비해 통계학적 유의한 창상 크기의 감소를 보였다. 창상의 크기가 50%로 감소한 날짜는 실험군에서 3.04일, 대조군에서 4.49일로 실험군에서 창상치유 초기에 더 빠르게 창상의 크기가 감소하였다. (\*:  $p < 0.05$ )

## 2. TGF- $\beta$ 발현

창상치유 6일과 14일에 실험군과 대조군의 조직을 생검하여 TGF- $\beta$ 에 대해 면역조직화학염색을 시행하였다. 각각 항체에 염색된 정도(integrated optical density)를 computer-assisted planimetry (Metamorph, Metamorph Ltd., Limerick, Ireland)를 이용하여 측정하였다. integrated optical density는 창상치유 6일에 실험군에서  $49823 \pm 8596$ , 대조군에서  $40203 \pm 4404$  이었으며, 창상치유 14일에 실험군에서  $40373 \pm 9564$ , 대조군에서  $33556 \pm 7757$  이었다. 실험군과 대조군 모두에서 창상치유 6일에서 TGF- $\beta$ 가 많이 발현하였다가 창상치유 14일에는 감소하였다(그림. 3). 창상 초기인 창상치유 6일에서 TGF- $\beta$ 의 발현이 실험군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다. ( $p < 0.05$ ).

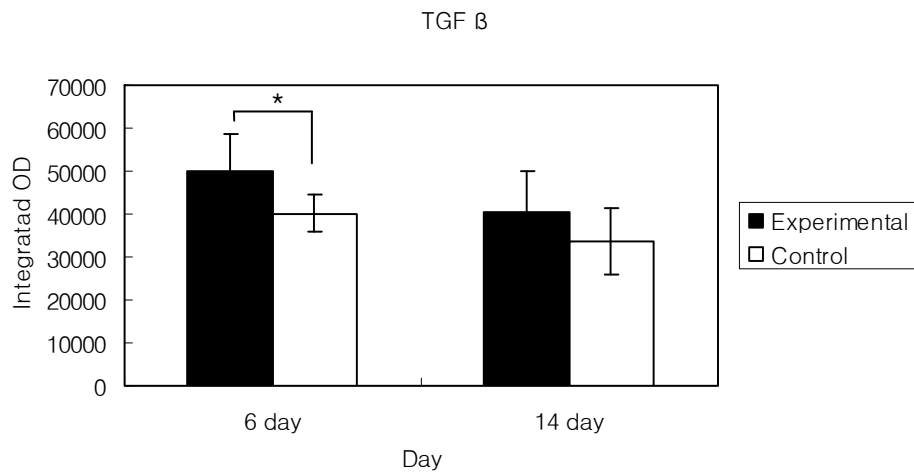


그림. 3. TGF- $\beta$  발현 분석. Computer-assisted planimetry(Metamorph, Metamorph Ltd., Limerick, Ireland)를 이용하여 산출하였다. 창상치유 6일에 실험군에서 대조군보다 의미 있는 증가를 보였다(\*:  $p < 0.05$ ).

### 3. VEGF 발현

창상치유 6일과 14일에 실험군과 대조군 조직을 생검하여 VEGF에 대해 면역조직화학염색을 시행하였다. 각각 항체에 염색된 정도(integrated optical density)를 computer-assisted planimetry (Metamorph, Metamorph Ltd., Limerick, Ireland)를 이용하여 측정하였다. integrated optical density는 6일째에 실험군에서  $53706 \pm 8692$ , 대조군에서  $43670 \pm 4403$  이었으며, 14일째에 실험군에서  $60173 \pm 9021$ , 대조군에서  $44557 \pm 4216$  이었다. 창상이 치유됨에 따라 VEGF도 증가하였는데, 대조군보다 실험군에서 더 증가하였다(그림. 4).

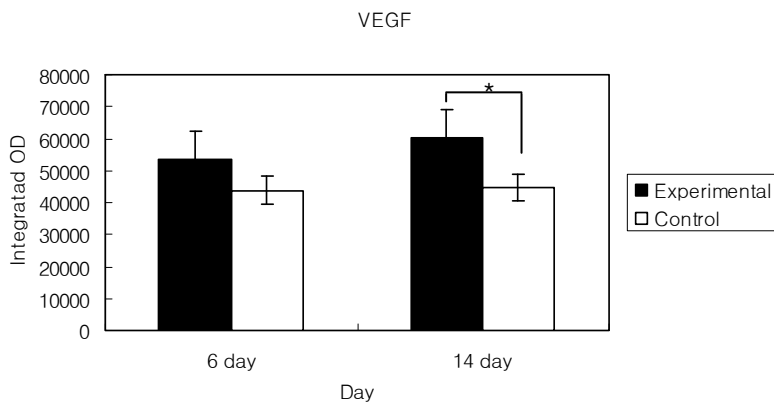


그림. 4. VEGF 발현 분석. Computer-assisted planimetry(Metamorph, Metamorph Ltd., Limerick, Ireland)를 이용하여 산출하였다. 창상치유 14일에서 실험군에서 대조군보다 의미 있는 증가를 보였다(\*:  $p < 0.05$ ).

#### 4. CD31+ 혈관내피세포 발현

실험군과 대조군 조직에서 CD31+에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 발현 정도를 분석하였다. 창상치유 6일에 실험군에서  $17787 \pm 946$ , 대조군에서  $18268 \pm 1916$  이었고, 창상치유 14일에 실험군에서  $35444 \pm 10544$ , 대조군에서  $32888 \pm 8579$  이었다. 창상이 치유됨에 따라 CD31+에 염색된 내피세포는 증가하는 양상을 보였으나 실험군과 대조군간에 의미 있는 차이는 보이지 않았다. (그림. 5).

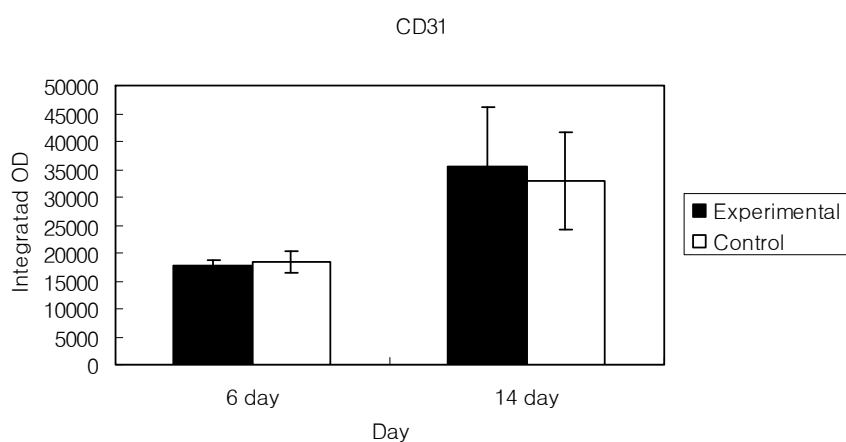


그림. 5. CD31+ 혈관내피세포 발현 분석. 창상이 치유됨에 따라 CD31+는 증가하였으나 실험군과 대조군간에 의미 있는 차이는 없었다.

## 5. 신생혈관 개수

창상이 치유됨에 따른 신생혈관의 생성 정도를 알아 보기 위해 창상치유 6일, 14일에 창상 조직을 생검하여 CD31+에 대한 면역조직화학염색을 시행한 슬라이드에서 High power field( $\times 400$ ) 당 존재하는 혈관 개수를 측정하여 비교분석 하였다. 혈관 개수를 비교해 보았을 때, 실험군과 대조군 모두에서 창상이 치유됨에 따라 혈관의 개수가 증가하였고, 실험군에서 대조군에 비해 더 많이 증가한 양상을 보였으나 통계학적 차이는 없었다(그림. 6).

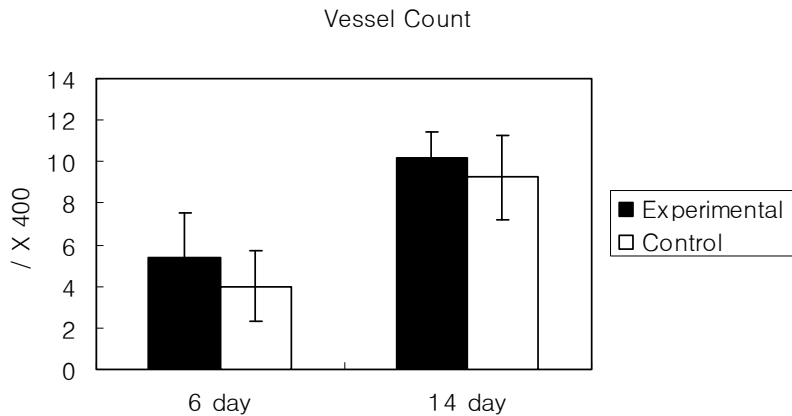


그림. 6. 신생혈관 개수의 변화. 창상이 치유되면서 통계학적 의미는 없었으나 대조군보다 실험군에서 혈관의 수가 증가하였다.

## 6. 조직학적 변화

창상치유 6일에 생검한 조직을 헤마톡실린-에오신 염색하여 관찰한 결과, 실험군에서 염증세포가 대조군에 비해 더 많이 관찰되었다. 특히 염증세포는 창상과 정상 조직 사이에 집중되는 경향을 보였다. 하지만 대조군보다 월등히 많이 나타났다고 할 만큼 큰 차이를 보이지는 않았다. 14일째에는 실험군과 대조군 모두 창상이 완전히 치유된 상태를 보여 두 집단간 큰 차이는 없었다(그림. 7).

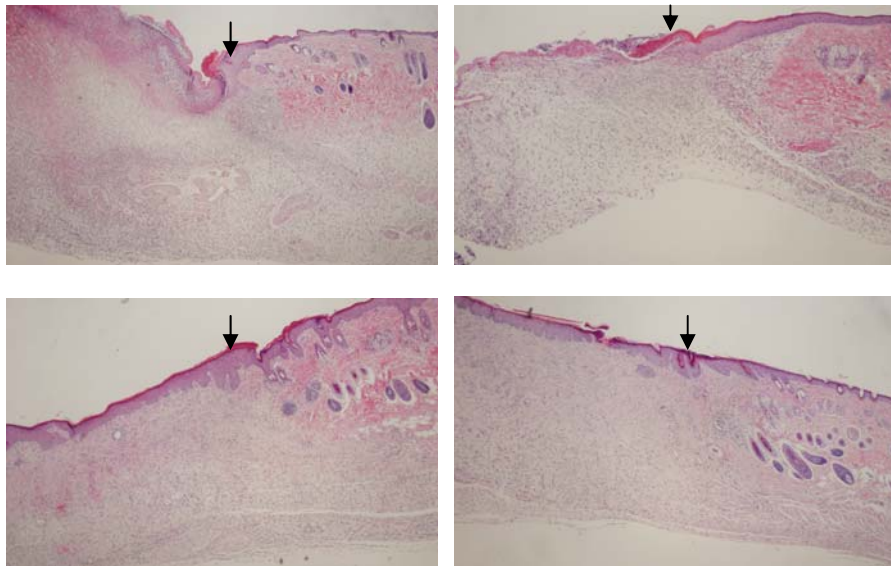


그림. 7. 조직학적 변화. 화살표를 기준으로 좌측은 창상 부위, 우측은 정상 조직이다. 창상치유 6일, 염증세포들이 실험군(좌상)에서 대조군(우상)에 비해 많고, 창상과 정상 조직 사이에 집중되어 있다. 창상치유 14일에서는 실험군(좌하)과 대조군(우하) 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다. (헤마톡실린-에오신 염색, 100배율)

## 7. 콜라겐의 변화

창상의 성숙 정도와 콜라겐의 형성 정도 및 배열을 보기 위해서 창상치유 14일에 Masson' s trichrome 염색을 하였다. 실험군과 대조군 모두에서 콜라겐의 배열이나 생성 정도의 차이는 없었다(그림. 8).

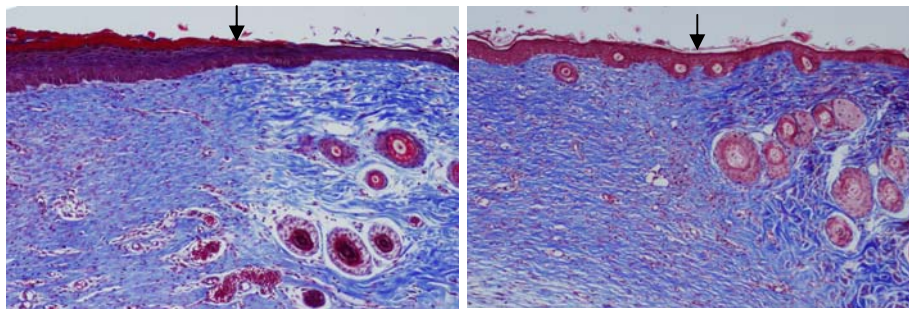


그림. 8. 콜라겐 형성. 실험군(좌)과 대조군(우) 모두에서 기질의 콜라겐 형성이 일정하고 규칙적인 배열을 보이고 있다. (Masson' s trichrome 염색, 100배율)

## IV. 고찰

태반은 오래 전부터 민간요법과 전통의학에서 특별히 가공되지 않은 상태로 각종 질환의 치료에 사용되어 왔는데, 근래에 들어서 보다 사용이 용이하고 균일한 효과를 기대할 수 있도록 태반 자체를 사용하지 않고 일련의 공정과정을 거쳐 추출물을 만들어 이용하게 되었다.<sup>19, 25</sup> 최근에는 치료적 목적 뿐만 아니라 미용적 목적으로 사용하는 경우도 많아서 내과, 외과, 이비인후과, 안과, 정형외과 뿐만 아니라 성형외과, 피부과, 산부인과 등 여러 분야에서 다양한 목적으로 널리 사용되고 있다.<sup>20</sup>

태반이 추출물로 사용되면서 HPE에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 이를 통해 HPE에 다양한 물질들이 함유되어 있음이 밝혀졌고, 기능을 연구하면서 간염이 있는 쥐에서 태반 추출물을 사용했을 때 간의 재생이 이루어진다는 것이 밝혀지기도 하였다.<sup>26</sup> 또 태반추출물이 창상 치유에 미치는 영향에 대한 연구도 많이 이루어져 HPE가 창상 치유에 효과가 있다는 보고도 많이 있었다.<sup>20, 22, 27</sup> O' Keefe 등은 태반 추출물을 각질형성세포(keratinocyte)와 혼합하여 배양하였을 때 인슐린이나 EGF와 혼합 배양한 것보다 월등히 배양이 잘 되었다고 하였다. 또한 HPE에 각질형성세포의 증식을 촉진하는 능력이 있다고 하였다.<sup>28, 29</sup> Muratore 등은 태반 추출물이 피부의 섬유모세포(fibroblast)의 증식을 촉진했다고 보고하였다.<sup>30</sup>

본 연구에서도 HPE의 영향으로 창상의 크기가 빨리 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 실험군과 대조군의 창상의 크기는 3일째부터 차이가 나기 시작하여 9일째까지 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 비록 창상 치유가 거의 종결된 14일째에는 비슷한 크기가 되었지만, 창상 크기가 50%로 줄어드는 시간은 실험군에서 3.04일, 대조군에서 4.49일로 실험군에서 빠르게 나타나 HPE의



투여가 창상의 초기 치유 속도를 높였음을 알 수 있었다.

본래 정상 창상치유과정은 각질세포, 섬유모세포, 백혈구, 혈관내피세포 등 여러 세포와 이들에서 분비된 여러 성장인자(growth factor)들에 의해 이루어진다.<sup>31</sup> 섬유모세포는 콜라겐을 생성하고 각질형성세포는 새로운 상피를 형성하는데, 이때 새롭게 형성되는 육아조직(granulation tissue)에 양분과 산소를 공급하기 위해 혈관형성(angiogenesis)이 이루어진다.<sup>33</sup> 이를 시기별로 나누어 보면, 창상 1일 이후 염증기(inflammation phase)가 시작되고 상피화 과정이 진행된다. 창상 4일경부터는 증식기(proliferation phase)로서 혈관생성과 육아조직형성이 시작된다. 창상 7일 이후로는 창상수축(wound contraction)이 시작되어 3주 가량 지속되고, 반흔형성 및 성숙 기간은 1년에 걸쳐 진행되는데 이때를 성숙기(remodeling phase)라고 한다.<sup>32</sup> 한편, 이러한 창상치유과정에는 많은 사이토카인이 관여하게 되고 창상치유가 잘 되려면 적절한 시기에 필요한 사이토카인이 분비되어야 한다. 사이토카인에는 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family, epidermal growth factor(EGF) family, transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), heparin-binding epidermal growth factor, fibroblast growth factor(FGF) family, vascular endothelial growth factor(VEGF), platelet-derived growth factor(PDGF), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1), insulin-like growth factor-1(IGF-1), colony-stimulating factor-1 등이 있다.<sup>34, 35</sup> 사이토카인들은 각각 독립적으로 작용하기도 하지만 상호작용을 통해 다른 인자들을 발현시키는 등 여러 단계에서 창상 치유 과정에 기여한다. 사이토카인들은 작용에 따라 크게 창상 치유의 초기 단계에서 염증세포를 소집(recruitment)를 하고 육아조직형성에 기여하는 것과 신생혈관형성에 관여하는 것으로 나눌 수 있는데, 대표적인 것으로 전자에서는 TGF- $\beta$ , 후자에서는 VEGF가 있다.<sup>36-40</sup>

본 연구에서는 TGF- $\beta$ 에 대한 면역조직화학염색을 시행하였고, 발현 정도를 분석한 결과에서 HPE의 투여가 창상의 초기 치유 속도를 높였음을 알 수 있었다. 일반적으로 TGF- $\beta$ 는 창상치유과정에서 창상 초기에 급격히 증가하여 치유가 진행되면서 점차 소실되는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서도 실험군과 대조군 모두에서 초기인 창상치유 6일에서 증가하였다가 창상치유 14일에는 감소하는 결과를 보였으나, 창상치유 초기인 6일째의 TGF- $\beta$ 의 발현이 실험군에서 대조군에 비해 의미 있는 증가를 보였다. 이것은 HPE에 의해 창상 초기에 TGF- $\beta$ 의 발현이 증가된 것을 의미하며, TGF- $\beta$ 의 발현이 증가하면 염증세포의 유입도 증가하므로 이를 근거로 창상 초기에 치유과정이 가속화된 것을 설명할 수 있다. 염증세포의 증가 소견은 헤마톡실린-에오신 염색을 통해 조직학적으로도 확인할 수 있었는데, 창상 초기인 창상치유 6일의 조직에서 대조군보다 실험군에서 더 많은 염증세포를 관찰할 수 있었다.

한편, 혈관의 생성은 정상 창상 치유 과정에서 중요한 부분인데, 신생혈관은 창상 치유가 진행되면서 점점 증가하게 된다. 본 연구에서도 혈관의 생성에 주요한 영향을 주는 것으로 알려져 있는 VEGF의 발현이 실험군과 대조군 모두에서 치유기간의 증가와 함께 증가하는 결과를 보였는데, 특히 창상치유 14일의 VEGF의 발현이 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 이것은 창상치유가 진행되면서 HPE에 의해 VEGF의 발현이 증가된 것을 의미하고, 이로부터 혈관의 생성이 촉진되어 창상 치유 과정이 촉진되는 결과를 가져온 것으로 생각할 수 있다. 또한 혈관의 생성 정도를 알아볼 수 있는 다른 지표로서 혈관내피세포에서 특이하게 발현되는 CD31+에 대한 면역조직화학염색을 시행하였는데, 비록 통계학적으로 유의한 결과는 아니었으나, 창상이 치유되면서 대조군 보다는 실험군에서 더 많이 증가하는 양상을 보였다. CD31+에 대한 면역조직화학염색 슬라이드에서 혈관 개수를 측정한 결과에서도

비슷한 경향을 보였다. 이런 결과를 종합해 보면, 비록 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나 실험군에서 대조군에 비해 혈관 숫자가 더 많이 빠르게 증가했을 것으로 추측된다.

창상 14일에 시행한 Masson' s trichrome stain의 결과를 보면 실험군과 대조군 모두에서 콜라겐의 생성이 정상적으로 이루어지고 배열도 고르게 보였다. 이런 결과는 창상 크기 변화를 비교했을 때 창상치유 14일경에 모두 비슷한 정도로 줄어든 것과 일치한다.

이상의 결과를 종합해 보면, HPE의 국소적 투여가 창상의 치유에 영향을 주었음을 알 수 있다. HPE는 창상 초기에 TGF- $\beta$ 를 증가시킴으로써 염증세포의 유입을 증가시키고, 초기를 지나 창상이 치유되면서 VEGF를 증가시켜 혈관생성을 촉진시킨 것으로 추정된다. 이는 비록 창상 치유에 관여하는 수많은 사이토카인 중 일부에 미친 영향에 대한 결과이지만, TGF- $\beta$ 와 VEGF가 창상 치유 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 주요 사이토카인이라는 점에서 HPE의 투여가 창상 치유 촉진에 긍정적인 영향을 주었다고 할 수 있다.

그 동안 HPE에 함유되어 있는 물질들을 밝히려는 많은 노력들에 의해 창상치유에 관여하는 인자로 polydeoxynucleotide(PDRN), NADPH, sphingolipids, fibronectin III, PlGF 등이 있음이 알려졌다.<sup>17, 30, 41, 42</sup> Muratore 등과 Datla 등은 HPE에 함유된 NADPH가 섬유모세포의 성장을 증진시키고 혈관생성을 증진시킨다고 하였고,<sup>30, 43</sup> Chakraborty 등은 HPE의 fibronectin III가 창상 치유를 촉진시키는 요소로 보고하였다.<sup>42</sup> Tonello 등도 HPE의 PDRN이 창상 치유를 자극한다고 하였다.<sup>1</sup> 이러한 창상 치유와 관련된 연구들 외에 간질환, 알러지질환, 면역질환, 갱년기질환, 미용적 치료 등과 관련하여 이루어진 연구들도 있으나, 대부분의 임상 의사들은 HPE를 사용하였을 때 인체에 국소적 또는 전신적으로 생기는 다양한 효과에 대해 경험적으로 접근하여 HPE의 효능을 추측해 보고 있을 뿐, 이러한 반응이 HPE의 어떤 함유물질에 의해 어떻게 일어나는 지에 대해서는

잘 모르는 상태에서 사용하고 있는 것이 현실이다. 하지만 HPE를 이용한 여러 시도들은 그 동안 민간요법이나 전통의학에서 태반을 이용하여 여러 질환을 치료하던 것의 연장선 상에 놓여있는 것만은 분명하다. 또 여러 분야에서 여러 임상 의사들에 의해, 비록 증례를 바탕으로 한 경험의 소산이기는 하나, 임상적으로 의미 있는 효과가 있는 것으로 알려지고 있고, 점차 새로운 영역으로 그 사용이 확대되고 있는 추세이다. 그런 의미에서 본 연구는 비록 이미 널리 알려진 HPE의 창상 치유 효과에 국한된 연구였지만, HPE가 창상치유과정에서 싸이토카인에 영향을 줌으로써 효과를 나타낸다는 것을 밝혀 HPE의 효능을 기전에 근거하여 보다 과학적으로 설명했다는 데 의미가 있다고 생각한다.

HPE에 관련하여 연구되어야 할 것은 여전히 많이 남아있다. 비록 HPE가 창상치유에 도움이 된다는 것이 실험적으로 입증되었다 할 지라도 실제 임상에서 HPE를 창상 치료에 사용하려면 적절한 용량이나 투여방법 등에 대한 보다 구체적인 연구가 필요할 것이다. 또 창상 치유에 관련된 다른 요소에 미치는 영향 및 그것에서 파생되는 다른 연구를 진행한다면, 창상 치유 촉진 효과 외에 HPE의 다른 효능에 대해서도 과학적 규명이 이루어 질 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 연구에서는 콜라겐의 배열을 창상치유 14일째에 조직학적으로 확인하였으나, 그 뒤로 성숙기를 지나 콜라겐의 재배열(remodeling)의 과정을 관찰하여 HPE가 콜라겐 재배열에 미치는 영향을 알아본다면 이를 바탕으로 최근 관심을 끌고 있는 HPE의 피부재생효과에 대한 과학적 근거를 제공할 수도 있을 것이다. 또한 HPE가 피부의 GAG(glycosaminoglycan)나 elastin에 미치는 영향에 대한 연구를 진행해 본다면 HPE에 관한 연구는 노화방지연구나 인체조직재생연구 등의 분야까지 확대 될 수 있을 것이다.

## V. 결론

인간태반추출물을 창상에 국소투여 하였을 때 창상치유가 촉진되었다. 창상 초기에 염증반응을 일으켜 창상치유를 촉진시키는 TGF- $\beta$ 의 증가를 보였고, 창상이 치유되면서 신생혈관형성을 촉진하는 VEGF 증가 소견을 보였다. 또 혈관내피세포에 염색되는 CD31+이 증가하는 경향을 보였다. 이것을 통해 인간태반추출물에 의해 창상 치유와 관련된 사이토카인의 발현이 영향을 받아 창상 초기의 염증 반응이 보다 많이 유발되고 창상 후기의 신생혈관생성이 촉진됨으로써 창상이 보다 빨리 치유되는 것임을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Tonello G, Daglio M, Zaccarelli N, Sottofattori E, Mazzei M, Balbi A. Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent. *J Pharm Biomed Anal* 1996 Aug;14(11):1555-60.
2. Robson MC, Krizek TJ. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973 Feb;177(2):144-9.
3. Gruss JS, Jirsch DW. Human amniotic membrane: a versatile wound dressing. *Can Med Assoc J* 1978 May 20;118(10):1237-46.
4. Bennett JP, Matthews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet* 1980 May 31;1(8179):1153-6.
5. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, Hsi BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet* 1980 May 31;1(8179):1156-8.
6. Ward DJ, Bennett JP. The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers. *Br J Plast Surg* 1984 Apr;37(2):191-3.
7. Dhall K. Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina. *Br J Obstet Gynaecol* 1984 Mar;91(3):279-82.
8. Zafar M, Saeed S, Kant B, Murtaza B, Dar MF, Khan NA. Use of amnion in vaginoplasty for vaginal atresia. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007 Feb;17(2):107-9.
9. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*

1999 Apr;83(4):399-402.

10. Rennekampff HO, Dohrmann P, Fory R, Fandrich F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *J Invest Surg* 1994 May-Jun;7(3):187-93.

11. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979 Aug 1;134(7):833-45.

12. Subrahmanyam M. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. *Br J Plast Surg* 1995 Oct;48(7):477-8.

13. Alam H, Kim D, Brun E, Tiollier J, Provido H, Kirkpatrick J. A placental-derived tissue matrix as a bowel wall substitute in rats: preliminary study. *Surgery* 1998 Jul;124(1):87-91.

14. Angelucci C, Lama G, Sica G. The growth of malignant and nonmalignant human cells is modulated by a human placental extract. *Anticancer Res* 1999 Jan-Feb;19(1A):429-36.

15. Gold-Aubert P, Chaumontet M, Capt M. An experimental study of the anti-inflammatory and anti-arthritic properties of a standardized placental extract. *Int J Tissue React* 1981 Dec;3(3-4):155-65.

16. Pal P, Mallick S, Mandal SK, Das M, Dutta AK, Datta PK, et al. A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. *Int J Dermatol* 2002 Nov;41(11):760-7.

17. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Mallick S, Bera R, Bhadra R. Transcriptional activation of tyrosinase gene by human placental sphingolipid. *Glycoconj J* 2006 May;23(3-4):259-68.

18. Mallick S, Singh SK, Sarkar C, Saha B, Bhadra R. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. *Pigment Cell Res*

2005 Feb;18(1):25-33.

19. Nair B, Elmore AR. Final report on the safety assessment of human placental protein, hydrolyzed human placental protein, human placental enzymes, human placental lipids, human umbilical extract, placental protein, hydrolyzed placental protein, placental enzymes, placental lipids, and umbilical extract. *Int J Toxicol* 2002;21 Suppl 1:81-91.

20. Kaushal V, Verma K, Manocha S, Hooda HS, Das BP. Clinical evaluation of human placental extract (placentrex) in radiation-induced oral mucositis. *Int J Tissue React* 2001;23(3):105-10.

21. Tiwary SK, Shukla D, Tripathi AK, Agrawal S, Singh MK, Shukla VK. Effect of placental-extract gel and cream on non-healing wounds. *J Wound Care* 2006 Jul;15(7):325-8.

22. Shukla VK, Rasheed MA, Kumar M, Gupta SK, Pandey SS. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. *J Wound Care* 2004 May;13(5):177-9.

23. Watson AL, Burton GJ. A microscopical study of wound repair in the human placenta. *Microsc Res Tech* 1998 Sep 1;42(5):351-68.

24. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2007 Jul-Aug;15(4):459-64.

25. Ackermann G. Does a low-molecular extract of human placenta support ossification? *Arch Orthop Trauma Surg* 1980;97(4):281-3.

26. Liu KX, Kato Y, Kaku T, Sugiyama Y. Human placental extract stimulates liver regeneration in rats. *Biol Pharm Bull* 1998 Jan;21(1):44-9.



27. Anil S, Beena VT. Oral submucous fibrosis in a 12-year-old girl: case report. *Pediatric dentistry* 1993;15(2):120-2.
28. O'Keefe EJ, Payne RE, Russell N. Keratinocyte growth-promoting activity from human placenta. *J Cell Physiol* 1985 Sep;124(3):439-45.
29. O'Keefe EJ, Chiu ML. Stimulation of thymidine incorporation in keratinocytes by insulin, epidermal growth factor, and placental extract: comparison with cell number to assess growth. *J Invest Dermatol* 1988 Jan;90(1):2-7.
30. Muratore O, Pesce Schito A, Cattarini G, Tonoli EL, Gianoglio S, Schiappacasse S, et al. Evaluation of the trophic effect of human placental polydeoxyribonucleotide on human knee skin fibroblasts in primary culture. *Cell Mol Life Sci* 1997 Mar;53(3):279-85.
31. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999 Sep 2;341(10):738-46.
32. Brunner G, Blakytyn R. Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost* 2004 Aug;92(2):253-61.
33. Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Cucinotta D, Arsic N, Marini H, et al. Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetologia* 2003 Apr;46(4):546-55.
34. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg [Am]* 2004 Jul;29(4):551-63.
35. Buckmire MA, Parquet G, Greenway S, Rolandelli RH. Temporal expression of TGF-beta1, EGF, and PDGF-BB in a model of colonic wound healing. *J Surg Res* 1998 Nov;80(1):52-7.

36. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000 Jul;115(1):3-11.
37. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007 May;127(5):998-1008.
38. Qiu Z, Kwon AH, Kamiyama Y. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Surg Res* 2007 Mar;138(1):64-70.
39. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006 May 22;580(12):2879-87.
40. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005 Oct-Dec;9(4):777-94.
41. Datta P, Bhattacharyya D. Spectroscopic and chromatographic evidences of NADPH in human placental extract used as wound healer. *J Pharm Biomed Anal* 2004 Mar 10;34(5):1091-8.
42. Chakraborty PD, Bhattacharyya D. Isolation of fibronectin type III like peptide from human placental extract used as wound healer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 Apr 15;818(1):67-73.
43. Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Nov;27(11):2319-24.

## Abstract

# The Effect of Human Placenta Extract in Wound Healing

Bom Jin Kim, M.D.

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Dae Hyun Lew, M.D.)

Human placenta has abundant amount of molecules which have high biological activities such as deoxyribose moiety, hormones, enzymes, vitamins, various growth factors and cytokines. Traditionally, human placenta has been used on burns, chronic ulcers, and skin defects of large areas. Recently, human placenta is widely used in the form of human placental extracts (HPE) in anti-aging therapy, atopic dermatitis, asthma, and liver diseases. However, it is unclear whether the effect of HPE is same as human placenta and the mechanism and the role of HPE has not been clarified scientifically.

We observed the wound healing effect of human placenta and found that wound healing was indeed accelerated by HPE in an artificial wound model. The study was focused on the mechanism of how HPE influences the wound healing. A total of 10 mice (ICR mouse, 5 weeks old male, 30g) were divided into an experimental group and a control group and an 8mm diameter single full thickness skin defect was made

on the dorsal side of the each mouse using a biopsy punch. Preparatory experiments were performed to find out the effective dose for wound healing in advance. As a result,  $2.0 \times 10^{-3}$  ml/30g HPE was injected into the margin of the wound.

The change in wound size was measured by digital images taken every three days for two weeks and evaluated using a digital image analysis program. On days 6 and 14, tissue biopsies were performed and hematoxylin and eosin stain was done for histologic evaluation. For the evaluation and analysis of TGF- $\beta$ , VEGF, and CD31+, immunohistochemical staining was performed and the intensity of the staining was calculated. Also, to figure out the degree of collagen synthesis after the wound healing was complete, Masson' s trichrome staining was done on the 14<sup>th</sup> day tissue samples.

By evaluating the 14 days of wound healing, we found that the experimental group showed acceleration of the wound size reduction from the 3<sup>rd</sup> day to the 9<sup>th</sup> day of wound healing when compared to the control group. TGF- $\beta$ , on the 6<sup>th</sup> day of wound healing, showed statistically significant increase in experimental group but reduced in both groups by the 14<sup>th</sup> day. VEGF was increased in both groups and the increase progressed with wound healing. Especially on the 14<sup>th</sup> day, the experimental group showed statistically significant increase in VEGF than the control group. CD31+, which stains the vascular endothelial cells, was increased in experimental group as the wound healing progressed. However, no statistically significant difference between the two groups was noted despite the increase compared to the initial data. Total number of vessels was counted and the increase in neovascularization was confirmed in the experimental group but the difference between two groups was not

statistical significant. There was no difference in the degree and arrangement of the collagen synthesis between two groups.

HPE showed positive effects on wound healing when administered locally. Especially, inflammatory responses were increased in the early wound healing phase probably resulting from the increase in TGF- $\beta$  and neovascularization was increased in the late wound healing phase by the increase in VEGF. We conclude that HPE enhances the wound healing by influencing the cytokines related to the wound healing process.

---

Key Words: Human placental extracts, wound healing, TGF- $\beta$ , VEGF, CD31+