삼차원 배양에서 doxycycline 처리에 의한 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 생합성과 matrix metalloproteinase-1의 발현

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 남 희

삼차원 배양에서 doxycycline 처리에 의한 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 생합성과 matrix metalloproteinase-1의 발현

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 남 희

삼차원 배양에서 doxycycline 처리에 의한 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 생합성과 matrix metalloproteinase-1의 발현

지도교수 김 진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 남 희

김 남 희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

무엇을 얻으려고 했던 것은 아닙니다. 기나긴 산행일지라도 그 끝에서 하늘을 보며 웃음 지을 수 있다면 올라가고 싶었습니다. 구강병리교실에서의 석사생활은 저에게 하고 싶은 것과 잘 할 수 있는 것이 무엇인가를 가르쳐 주었습니다.

2년이라는 시간의 처음과 끝을 이끌어주신 김 진 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 따뜻한 웃음으로 격려해주신 김종관 선생님과 자상하게 조언해주시고 논문을 봐주신 정기양 교수님께 감사를 드립니다.

어려울 때면 이건 네가 할 수 있는 것이라며 용기를 주신 육종인 교수님과 언제나 믿어주셨던 이은주 교수님, 힘들어하는 막내 동생을 위해 든든한 버팀목이길 자처해준 김현실 선생님께 감사드립니다.

행복하기도하고 눈물겹기도 했던 날들을 언제나 같이 해주었고, 따스한 눈빛으로 커피 한 잔을 내밀어 주었던 구강병리교실의 조교 김은정, 최정희 선생님과 대학원 동기 공선영, 후배 류주경 선생님, 그리고 묵묵히 석사 생활과 실험을 도와주신 홍준철 선생님과 언니처럼 챙겨주셨던 지원주 선생님, 자신의 일처럼 함께 해주었던 주소연 선생님, 짧게나마 같이 한 생활이 즐거웠던 차충민, 곽영은 선생님께 감사드립니다.

아낌없이 주는 나무이기만 하셨던 부모님과 환한 웃음을 안겨준 귀여운 조카 효은이, 내 곁에 있는 것만으로도 감사한 우리 가족에게 이 논문을 바칩니다. 또한 내게 기댈 수 있는 어깨를 내어준 교산에게 고마움을 전합니다.

마지막으로 나의 무관심에도 불구하고 필요할 때 손을 내밀면 언제나 따스하게 감싸주신 하느님께 감사를 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표차례
국문요약 1
I. 서론 3
II. 재료 및 방법 6
1. 재료 6
가. 인체 진피 섬유모세포 6
나. 삼차원 지지체 6
2. 인체 진피 섬유모세포의 배양 6
3. 세포성장률 측정 7
4. Conditioned media 추출 및 농축 7
5. Total cell lysate 추출 8
6. Zymography 8
7. Western blot analysis 9
8. mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응 9
9. 교원질 추출 10
10. 광학 현미경적 관찰 10
11. 전자 현미경적 관찰 11
12. 통계처리 11
III. 결과 12
1. Doxycycline의 농도 설정 12
가. Doxycycline이 MMP 활성도에 미치는 영향 12
나. Doxycycline에 대한 인체 진피 섬유모세포의 생존율 측정 13
2. Doxycycline의 MMP 억제기전 14
가. Doxycycline에 의한 MMP-1 mRNA 발현 분석 15
나. Doxycycline에 의한 pro-MMP-1 단백질 발현 분석 16

다. Doxycycline에 의한 MMP-1 효소 활성도 분석 17
3. 삼차원 상에서의 MMP-1 발현과 doxycycline 처리에 의한 제 1형 교원질 합성 18
가. MMP 발현 분석 18
나. 교원질 합성의 광학현미경적 관찰 19
다. 삼차원 상에서 doxycycline 처리에 따른 제 1형 교원질 mRNA 발현 21
4. 추출한 교원질 분석 22
가. 전자현미경적 관찰 22
나. 추출한 교원질의 단백질 분석 23
IV. 총괄 및 고찰 24
V. 결론 28
참고문헌 30
영문요약 35

그림 및 표 차례

그림 1. Doxycycline이 MMP 활성도에 미치는 영향 12
그림 2. Doxycycline에 의한 인체 진피 섬유모세포의 세포 생존율..... 14
그림 3. 인체 진피 섬유모세포의 MMP-1 RT-PCR 15
그림 4. 인체 진피 섬유모세포의 MMP-1 western blot analysis 16
그림 5. Zymography 및 배양액의 MMP-1 western blot analysis 17
그림 6. 단층 배양과 삼차원 배양의 zymography 19
그림 7. 2주 배양한 PLGA 지지체의 주사 전자 현미경 사진 20
그림 8. 4주 배양한 PLGA 지지체의 Masson's trichrome 염색 20
그림 9. PLGA 지지체 내의 제 1형 교원질 RT-PCR 21
그림 10. 6주 배양한 PLGA 지지체에서 추출한 교원질의 전자 현미경 사진..... 22
그림 11. 추출한 교원질의 제 1형 교원질 western blot analysis 23

국문요약

삼차원 배양에서 doxycycline 처리에 의한 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 생합성과 matrix metalloproteinase-1의 발현

생체의 손상부위를 그 본래의 조직으로 회복시키는 재생과정에서 실질세포의 재생능력과 교원질을 비롯한 세포외 기질의 형성이 필수적이다. 따라서 의학 및 조직공학에서 세포외 기질의 가장 중요성분인 교원질의 합성에 대한 필요성이 강조되고 있다. 현재 적용되고 있는 교원질의 대부분이 가축 및 사체에서 얻어지며, 이는 면역반응 및 감염 등의 우려가 있어, 이를 대체할 수 있는 사람 교원질을 *in vitro*에서 생합성하는 것의 중요성이 대두되고 있다.

본 연구는 사람의 성숙한 제 1형 교원질을 *in vitro*상에서 얻기 위한 목적으로 인체 진피 섬유모세포를 삼차원 배양하여 사람의 교원질을 생합성하였고, 인체 진피 섬유모세포의 삼차원 배양에서 doxycycline 처리로 인해 제 1형 교원질의 합성과 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 삼차원 배양을 위하여 poly-lactic-co-glycolic acid(PLGA) 지지체를 이용하였고, 이 과정에서 장기간의 삼차원 배양 시 MMP-1에 의한 제 1형 교원질의 분해를 억제하기 위하여 MMP 억제제로 알려진 doxycycline을 처리하였다. PLGA 지지체 내에 축적된 교원질은 산과 염의 침전법으로 추출하였으며, 이를 전자현미경적 관찰과 제 1형 교원질 western blot anaylsis를 통해 분석하였다. 또한 doxycycline의 억제 효과가 어느 단계에 영향을 미치는지 파악하기 위하여 RT-PCR, western blot analysis와 zymography를 시행하였다.

결과는 다음과 같다.

1. 인체 진피 섬유모세포를 PLGA 지지체내에서 삼차원 배양하여 추출한 결과 성숙한 제 1형 교원질을 얻을 수 있었다.

2. 삼차원 배양에서 MMP-1의 발현을 반으로 억제하는 농도(IC_{50})인 200μM의 doxycycline을 6주간 처리한 결과, 대조군에 비해 제 1형 교원질의 합성량이 증가되었다.

3. PLGA 지지체 내에서 인체 진피 섬유모세포를 삼차원 배양한 결과, 단층 배양에서보다 MMP-1의 발현 양이 증가되었으며, 활성도를 지닌 형태가 발현되었고, doxycycline을 처리한 결과, MMP-1의 발현이 감소되었다.

4. Doxycycline의 MMP-1 억제기전을 파악한 결과, mRNA 및 pro-MMP-1 발현을 억제하는 단계보다, 효소의 활성도를 낮추는 기작을 통해 MMP-1이 억제되었다.

이상의 연구 결과로 MMP 억제제인 doxycycline의 장기간 처리는 지지체 내에 축적된 교원질의 분해를 억제함으로써 교원질의 합성을 증가시키며, PLGA 지지체를 통한 장기간의 삼차원 배양은 인체 진피 섬유모세포로부터 성숙된 사람의 교원질을 합성하여 추출해 낼 수 있었다.

핵심되는 말 : 제 1형 교원질, MMP-1, PLGA, 삼차원 배양, doxycycline

삼차원 배양에서 doxycycline 처리에 의한 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 생합성과 matrix metalloproteinase-1의 발현

(지도교수 김 진)

연세대학교 대학원 의과학과

김 남 희

I. 서 론

교원질은 단백질 구조재라고 부르고 있는 바와 같이 동물의 체형을 유지하는 지지조직으로 진피, 건 등과 같은 결합 조직을 포함한 연조직은 물론 골, 치아 등과 같은 경조직에도 석회화를 위한 지지조직을 이루고 있다. 이러한 생체 내 거의 모든 조직에 분포하는 교원질은 일정한 질서를 갖추어 세포의 지지, 증식을 위한 구조체로서 세포와 결합하여 장기와 조직의 형태를 형성하고 유지함으로써 생체를 구축하는 데 필수 불가결한 단백질이다[1-3]. 따라서 생체의 손상부위를 본래의 조직으로 재생시키는 것이 최선의 방법이라고 볼 때, 손상부위에 조직의 교원질이 공급될 경우 조직세포를 재생시킴에 있어, 손상부위에 정상 교원질의 합성 및 재생은 재생의학의 핵심 분야이다.

현재 이용되는 대부분의 교원질은 가축의 가죽과 뼈, 소의 무릎관절 등에서 추출하고 있는 실정이며 인간의 교원질은 사체나 태반조직으로부터 추출하여 생산하고 있다. 이러한 동물로부터 추출된 교원질은 면역거부반응에 의한 후유증을 완전히 방지하는 것이 아직은 쉽지 않아 사용 시 알레르기 테스트를 반복하여 시행받아야 하는 어려움이 있으며, 사람의 교원질은 수요에 따른 공급의 문제점과 제공자에 의한 2차 감염, 즉 후천성 면역결핍증 (acquired immune deficiency

syndrome , AIDS)이나 간염 (hepatitis) 등과 같은 치명적인 질환에 대한 문제들이 아직 미해결상태이다[4].

이러한 단점을 극복하고자, 조직세포를 배양하여 장기를 재구축하는 방법 또는 필요한 조직성분만을 유전자 조합하여 생합성하는 연구가 이루어지기 시작하였으나 아직까지 *in vitro*에서 교원질을 생합성하는 것에는 여러 가지 어려움이 있어 뚜렷한 성과가 나타나지 않고 있다. 1998년 Business Week지에 "Biotech Body" 라는 제목으로 생합성된 교원질은 사람의 교원질로 대체 가능하며, 면역거부반응을 배제할 수 있으며, 공급의 문제, 생산과정의 문제를 해결할 수 있다고 하여 교원질의 생합성에 대한 필요성을 강조하였다[5].

교원질의 축적은 세포에 의한 교원질의 합성과 분해의 불균형에 의해 일어나며[6], 결합조직의 주 구성세포인 인체 진피 섬유모세포는 교원질 및 다른 세포외 기질을 합성할 뿐만 아니라 MMP를 발현함으로서 교원질을 분해시킨다[7,8].

Matrix metalloproteinase(MMP)는 Zn^{2+}와 결합된 활성부위를 가지고 있으며, 불활성인 분자량이 좀 더 큰 전구체(zymogen) 상태로 분비되어 스스로 활성화되며, tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) 및 다른 억제제에 의해 그 활성이 억제된다. MMP는 크게 4가지로 분류할 수 있는데, 첫 번째 군으로는 interstitial collagenase로 MMP-1과 MMP-8이 여기에 속하며, 이들 효소는 제 I, II, III, VII 교원질 및 gelatin을 분해한다. 두 번째 군에 속하는 것은 gelatinase로 72kDa의 MMP-2(gelatinase A)와 92kDa의 MMP-9(gelatinase B)가 여기에 속하며, 이들 효소는 gelatin에 친화도가 높다. 세 번째 군으로는 stromelysin (MMP-3, 10, 11)이 있고, 마지막으로 putative metalloproteinase-1 (PUMP-1, MMP-7)로 구분한다[9-11].

교원질을 분해하는 과정에서 MMP에 의해 교원질의 N-말단에서 약 3/4인 지점을 절단하여 두 개로 잘려진다[12]. 이렇게 잘려진 교원질은 더욱 쉽게 분해되고, 결국에는 200개 이상으로 절단되어 Gly-X-Y 형태의 펩타이드를 만든다[13].

Doxycycline은 tetracycline계 약물로써 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, collagenase와 gelatinase 등의 MMP의 활성도를 억제하는 것으로 알려져 있다[14-16]. 현재 많은 MMP의 억제제가 개발·연구되고 있는데 이러한 억제제는 오히

려 인체에서 박테리아를 대항하는 활성을 약화시킬 가능성이 있어 문제가 되고 있다. 그러나 최근에는 저농도의 doxycycline의 처리는 항생제로서의 박테리아의 활성에 영향을 주지 않으면서 MMP의 발현을 억제할 수 있다는 보고도 있으며[8], 치주염이나 골육종에 대한 동물모델에서 doxycycline 처리에 의한 MMP-1 억제 효과를 잘 설명하였다[11,17,18].

그러나 최근 Beckman 등 (1997)은 doxycycline처리함으로써 MMP-1, 2의 발현을 억제할 뿐만 아니라 *in vitro*에서 교원질의 합성을 억제한다고 보고하였다[19]. 반면 Steffen 등 (2002)은 6주 동안 쥐에게 doxycycline을 처리하여 제 1형 교원질의 농도와 쥐의 무게를 측정한 *in vivo* 실험 결과, 처리하지 않은 군에 비해 교원질의 분해가 거의 일어나지 않았으며, 제 1형 교원질의 농도 및 쥐의 무게가 증가한다고 보고하였다[20,21].

이와 같이 doxycycline의 MMP-1 억제 기전 및 제 1형 교원질의 생합성에 대한 기전에 대해서는 아직 불명확한 상태이며, 특히 *in vitro*에서 삼차원 상에서의 장기간 배양 시 doxycycline이 MMP-1 발현 및 제 1형 교원질 합성에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 연구는 더욱 미비한 상태이다.

따라서 이 연구에서는 이러한 문제점을 극복하여 사람의 교원질을 얻기 위해서 인체 진피 섬유모세포를 PLGA 지지체에서 삼차원 배양하여 *in vitro*에서 사람의 교원질을 생합성하였고. 또한 장기간의 삼차원 배양 시에 인체 진피 섬유모세포의 MMP-1 발현에 의한 교원질의 분해를 막기 위하여 MMP 억제제로 알려진 doxycycline을 처리하였다. 또한, doxycycline의 MMP-1 억제 기전을 RT-PCR, western blot analysis, zymography를 통해 파악함으로써 PLGA 지지체 내에서 인체 진피 섬유모세포를 삼차원 배양하는 경우에 doxycycline이 제 1형 교원질의 합성과 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 인체 진피 섬유모세포

정상인 3명의 절제술시 얻어진 피부의 진피에서 배양한 섬유모세포를 실험에 이용하였다.

나. 삼차원 지지체

삼차원 배양에 이용된 지지체는 Poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA, Innotech, Korea)로서 직경 10㎜, 두께 3㎜의 디스크형태이며 평균 기공크기는 300-500㎛이고, 90%의 다공성을 가졌다.

2. 인체 진피 섬유모세포의 배양

인체 진피의 표피와 지방층을 제거하고 잘게 잘라 collagenase로 진피와 표피를 분리한 후 진피 조직을 0.25% trypsin 용액에 놓고 36℃에서 10분간 배양하였다. 이후 vortex를 시행하여 섬유모세포를 유리시켰다. 유리된 세포를 모아 세척한 후 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 DMEM (GIBCO, MO, U.S.A.) 배지를 넣고 배양하였다. 70-80% 정도 자라면 1:3으로 분주하여 계대배양하며 4-6차 계대 배양한 세포를 실험에 이용하였다.

PLGA 지지체 내에서의 삼차원적 세포배양을 위해 4℃에서 100%, 90%, 70%, 10% 알콜로 지지체를 전처리하고 phosphate buffered saline (PBS)와 배양배지로 씻어준 후 건조된 삼차원 지지체에 $1x10^6$개의 세포현탁액 100㎕를 분주한 후 지름 60㎜크기의 배양접시에서 배양하였다. 2시간 후 6㎖배지를 첨가하였고 orbital

shaker (30 rpm)를 이용하여 배양기내에서 배양하였다. 세포 분주 2일 후, 3일 간격으로 새 배지를 첨가하여 2, 4, 6주간 배양하였다.

모든 실험에서 실험군으로 200μM doxycycline (하나제약, 한국)을 처리하고, 제 1형 교원질 발현의 양성 대조군으로 최종농도 1ng/㎖의 transforming growth factorβ-1 (TGFβ-1; PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, U.S.A.), MMP-1 발현의 양성 대조군으로 10ng/㎖의 tumor necrosis factor α (TNFα; Boerhinger Mannheim, Mannheim, Germany)를 첨가하였다.

3. 세포성장률 측정

Doxycycline 처리에 따른 세포의 생존능을 측정하기 위하여 96 well plate에 200㎕당 $3x10^3$개의 인체 진피 섬유모세포를 넣어 24시간동안 배양한 후, 무혈청 배지에 doxycycline을 0, 25, 50, 100, 200, 400, 600μM 농도로 처리하여 37℃에서 72시간 반응시킨 후 N-methylthiotetrazole (MTT; Sigma, U.S.A.)검사로 인체 진피 섬유모세포의 세포성장률을 측정하였다. MTT검사는 각각의 농도로 처리한 인체 진피 섬유모세포를 PBS로 두 번 세척하고 MTT용액을 37℃에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, U.S.A.)로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Conditioned media 추출 및 농축

6 well plate에 well당 $1x10^6$개의 세포를 뿌리고 24시간 배양한 후, PBS로 두 번 세척하였다. 무혈청 배지 1㎖에 doxycycline을 각 농도별로 처리하여 37℃에서 24시간 추가로 배양시킨 후 배지만을 모아 15000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 잔여 세포를 침전시킨 후 centriprep centrifugal filter device (Millipore, Beverly, MA, U.S.A.)로 농축하고, 단백질 정량후 분주하여 -20℃ 냉동 보관하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA; Pierce, U.S.A.)을 표준 단백질로 하여 bicinchoninic acid protein assay reagent (BCA; Pierce, U.S.A.)로 제조회사의 사

용설명서에 따라 측정하였다.

5. Total cell lysate 추출

6 well plate에 well당 $1x10^6$개의 세포를 넣고 24시간 배양한 후 무혈청 배지에 0, 200㎛M의 doxycycline을 처리하여 24시간 추가 배양하였다. PBS로 2차례 세척한 후 세포를 모아서 NP-40 lysate buffer [50mM Tris-Cl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0.5% NP-40, 2㎍/㎖ aprotinin, 10㎍/㎖ leupeptin, 1㎎/㎖ 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride]에 넣었다. 이를 얼음 위에서 45분 간 배양한 후 4℃에서 13000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 취하고 단백질을 정량한 후 분주하여 -20℃에 보관하였다.

6. Zymography

Doxycycline 처리에 따른 인체 진피 섬유모세포의 MMP 억제 영향 및 단층배양과 삼차원 배양에서의 MMP 발현정도를 파악하기 위하여 gelatinase, collagenase를 기질로 하는 zymography 방법을 시행하였다. 동량의 시료에 sample buffer (62mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS(w/v), 10% glycerol(v/v), 0.05% bromphenol blue (w/v)) 5㎕을 넣어 각각 1% gelatin과 collagen을 포함한 8% SDS-PAGE gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후, gel은 상온에서 2.5% Triton X-100(v/v)으로 1시간 세척하고, incubation solution (10mM $CaCl_2$, 50mM Tris, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100)을 넣어 37℃에서 48시간 반응시켰다. 인체 진피 섬유모세포의 효소 활성도 확인을 위하여 gel은 0.05%(w/v) coomassie blue, 10% acetic acid(v/v), 10% methanol(v/v)로 1시간동안 염색하고, 10% methanol, 10% acetic acid로 2시간 탈색하였다. 이때 나타나는 band를 통해 MMP가 발현되는 것으로 간주하였고, 관찰한 결과는 영상분석기 (Densitometry TINA 2.0, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다.

7. Western blot analysis

Doxycycline 처리에 따른 MMP-I과 제 1형 교원질의 발현양을 비교하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. 각각의 sample 동량에 5배의 SDS sample buffer (60mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 넣어 8% SDS-acrylamide gel에 2시간 전기 영동한 다음, 전기 영동한 gel을 semi-dry transfer (Bio-Rad, U.S.A.)에서 30분간 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 5% fat-free dry milk-PBST buffer (PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking을 한 후에 PBST buffer로 3번씩 5분간 세척하였다. MMP-1 단일클론항체 (Oncogene, U.S.A.), 제 1형 교원질 단일클론항체 (Abcom, U.S.A.)를 3% fat-free dry milk-PBS buffer에 각각 100배, 1000배 희석한 농도로 넣고 이 용액에 transfer된 nitrocellulose membrane을 넣어 2시간 동안 흔들고, 다시 5분 간격으로 PBST용액에서 3회 세척하였다. Membrane을 각각 anti-mouse-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody와 anti-rabbit-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody가 PBS에 2000배 희석된 용액에 넣고 상온에서 1시간동안 반응시켰다. PBST 용액으로 5분간 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, U.S.A.)를 사용하여 X-ray 필름에 감광하여 현상하여 결과를 관찰하였다. 관찰한 결과는 영상분석기 (Densitometry TINA 2.0, U.S.A.)를 이용하여 정량하였고, 정량한 결과는 β-actin의 단백질 발현 값으로 교정하였다.

8. mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

Doxycycline을 0, 200μM의 농도로 처리하여 각각 단층배양과 PLGA 지지체 내에서 삼차원 배양한 섬유모세포로부터 RNeasyTM kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. Spectrophotometer (Eppendorf, Hamburg,

Germany)를 사용하여 260/280nm에서 흡광도를 측정하여 RNA의 양을 계산하여 추출한 RNA를 정량하고 순도를 검증하였다. cDNA 합성을 위하여 0.5㎍의 RNA를 reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Germany)와 oligo-d(T) primer를 이용하여 42℃에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)와 제 1형 교원질, MMP-1 primer로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94℃에서 30초, 결합반응을 55℃에서 1분, 중합반응은 72℃에서 1분간 25주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72℃에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)의 산물은 1% agarose gel에 전기 영동하여 관찰하였다. 각각의 결과는 영상분석기 (Densitometry, TINA 2.0)를 이용하여 측정하였고, GAPDH mRNA 발현 값으로 교정하였다.

9. 교원질 추출

2, 4, 6주 배양한 세포-지지체를 소독된 칼로 잘게 자른 후, PBS로 2회 세척하고 0.2M acetic acid를 지지체당 20㎖씩 넣어 4℃에서 2일 동안 교반한 후, 9000g로 4℃에서 3시간 원심 분리하였다. 조심스럽게 새로운 tube에 상등액만을 취해 NaCl (30%)를 천천히 넣어, 4℃에서 1시간 방치한 뒤, 4000g로 4℃에서 1시간 원심 분리하여 상등액만을 조심스럽게 버린다. 남은 침전물에 버린 상등액 양만큼 0.05M acetic acid를 넣고 덩어리가 제거될 때까지 교반하였다. 4℃에서 0.02M Na_2HPO_4 (50× volume)에 대해서 2일 동안 용액을 투석시켰다. 이때 최소한 6시간 간격을 두고 3번 0.02M Na_2HPO_4로 교체하였다. 투석시킨 용액을 4000g로 4℃에서 1시간 동안 원심 분리하여, 침전물을 모은 후, 동결 건조시켜 4℃에 보관하였다.

10. 광학 현미경적 관찰

2, 4, 6주 배양 기간동안 지지체 내에서 doxycycline 처리에 따른 교원질 합성

정도를 파악하기 위하여 배양된 세포-지지체 복합체를 10% 중성 포르말린에 8시간 이상 고정하여 통상적인 방법에 의해 파라핀에 포매한 후 5㎛의 연속 절편을 제작하여 Masson's trichrome (TRC) 염색을 시행하여 PLGA 지지체 내에서의 교원질 침착 정도를 관찰하였다.

11. 전자 현미경적 관찰

지지체내 접종 후 인체 진피 섬유모세포의 교원질 형성과 추출한 교원질의 형태를 파악하기 위하여 주사 전자 현미경 (scanning electron microscopy, hitachi S-800, Japan)과 투과 전자 현미경 (transmission electron microscopy, Philips CM-10, Germany) 검사를 시행하였다. 투과 전자 현미경을 위해 적출된 시료를 0.1M PBS (pH 7.4)으로 완충된 2% glutaraldehyde와 paraformaldehyde로 전고정 및 1.33% OsO_4로 후고정을 시행하였다. 알콜로 탈수 후 propylene oxide로 치환하고 Epon 혼합액에 포매한 후 초박 절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 주사 전자 현미경의 경우, 탈수 후 isoamylactate로 치환시켜, 약 6시간 뒤에 임계점 건조 (critical point dry)한 다음 ion coater (Eiko IB-3형)를 이용하여 300Å 두께로 금피복 (gold coating)하여 주사 전자 현미경으로 관찰하였다.

12. 통계처리

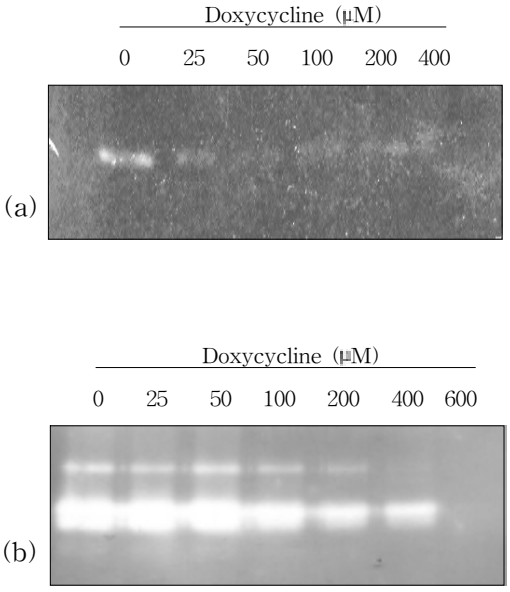
모든 실험은 3번씩 시행되었으며, 대조군 내 차이에 대한 유의성은 two sided t-test 방법을 이용하여 통계처리 하였다. 본 논문의 수치는 평균과 표준편차로 나타내었으며, P = 0.01에서 유의성을 결정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Doxycycline의 농도 설정

가. Doxycycline이 MMP 활성도에 미치는 영향

인체 진피 섬유모세포의 MMP 활성정도와 doxycycline의 농도별 MMP 억제정도를 파악하기 위하여 gelatin zymography와 collagen zymography를 각각 시행하였다. Doxycycline을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 200μM의 doxycycline을 처리하였을 경우 인체 진피 섬유모세포의 MMP 발현이 50% 감소되었다(**그림 1**).



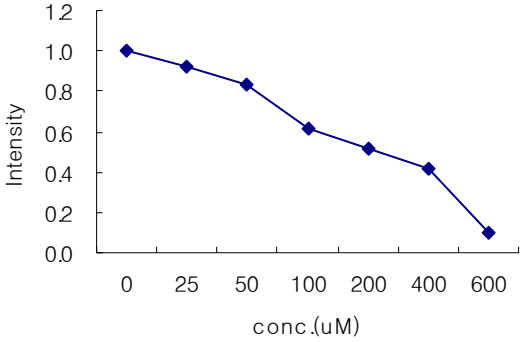


그림 1. Doxycycline이 MMP 활성도에 미치는 영향. Zymography를 통해 doxycycline 처리에 따른 MMP 발현의 억제 정도를 파악하였다. 그림의 값은 영상분석기를 통해 doxycycline을 처리하지 않은 대조군과 비교한 상대적 측정값이다. 200μM에서 MMP 발현이 50%로 감소하였다. (a)collagen, (b)gelatin zymography

나. Doxycycline에 대한 인체 진피 섬유모세포의 생존율 측정

Doxycycline 처리에 따라 MMP 발현이 50% 감소되는 농도(IC_{50})에서 인체 진피 섬유모세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해, 72시간동안 doxycycline을 농도별로 처리하여 MTT assay로 관찰하였다. 400μM에서 인체 진피 섬유모세포의 증식률이 반으로 감소되었으며, MMP 발현이 반으로 감소되는 농도 200μM에서는 75%이상의 세포가 생존해 있었다(**그림 2**).

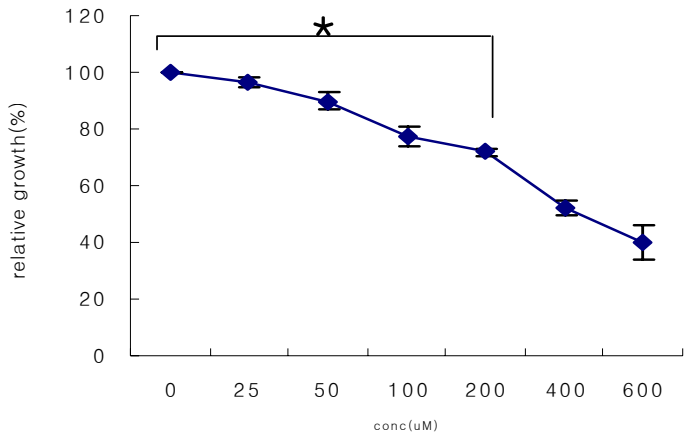


그림 2. Doxycycline 농도에 따른 인체 진피 섬유모세포의 생존율 측정 (MTT assay). MMP 활성도가 50% 감소되는 농도인 200㎛M에서 인체 진피섬유모세포의 생존율을 MTT assay로 파악하였다. 이때 200㎛M에서 75% 이상의 세포 생존율을 보였다. *p=0.0007

2. Doxycycline의 MMP 억제 기전

가. Doxycycline에 의한 MMP-1 mRNA 발현 분석

Doxycycline 처리에 따른 MMP-1 mRNA의 발현정도를 RT-PCR을 통해 관찰하였다. TNF¤를 양성 대조군으로 하여 densitometry로 발현정도를 비교하였을 때, doxycycline을 처리함으로써 MMP-1 발현은 처리하지 않은 군과 유의적인 차이가 없었다 (p=0.073) (**그림 3**).

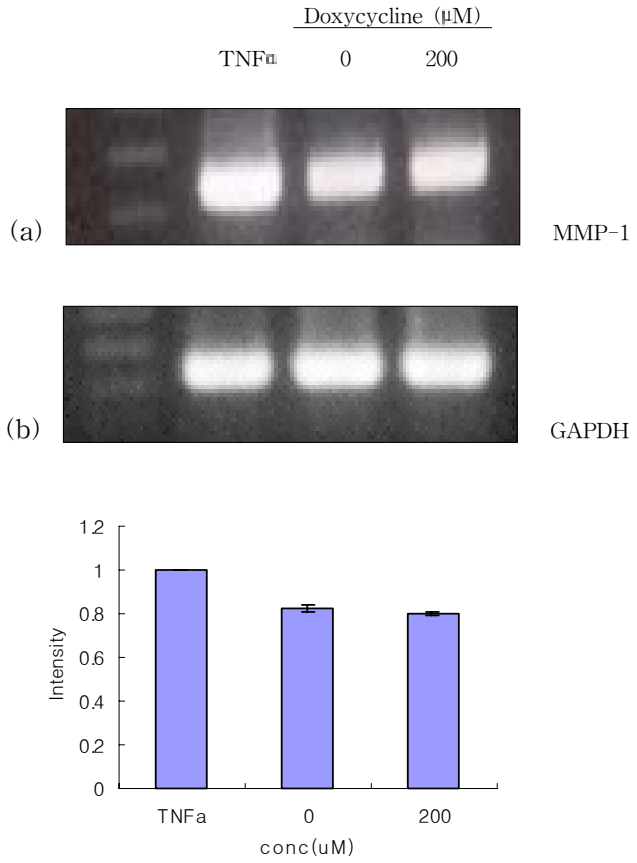


그림 3. 인체 진피 섬유모세포의 MMP-1 mRNA RT-PCR. Doxycycline의 세포 수준에서의 영향을 파악하기 위하여 MMP-1 mRNA RT-PCR을 수행하였다. TNFα의 mRNA를 기준으로 MMP-1의 mRNA의 발현을 파악한 결과, 세포 수준에서는 doxycycline 처리로 인한 MMP-1의 mRNA 발현 차이는 없었다. (*p=0.073) (a) MMP-1 (b) GAPDH mRNA RT-PCR.

나. Doxycycline에 의한 pro-MMP-1 단백질 발현 분석

세포 내에서 합성된 pro-MMP가 세포 밖으로 분비되는 단계에서 doxycycline에 의한 MMP 발현 억제 정도를 파악하기 위하여 MMP-1 western blot analysis를 시행하였다. 그 결과 doxycycline을 처리함으로써 처리하지 않은 군과 MMP-1 발현의 유의적 차이가 없었다 (p=0.02) (**그림 4**).

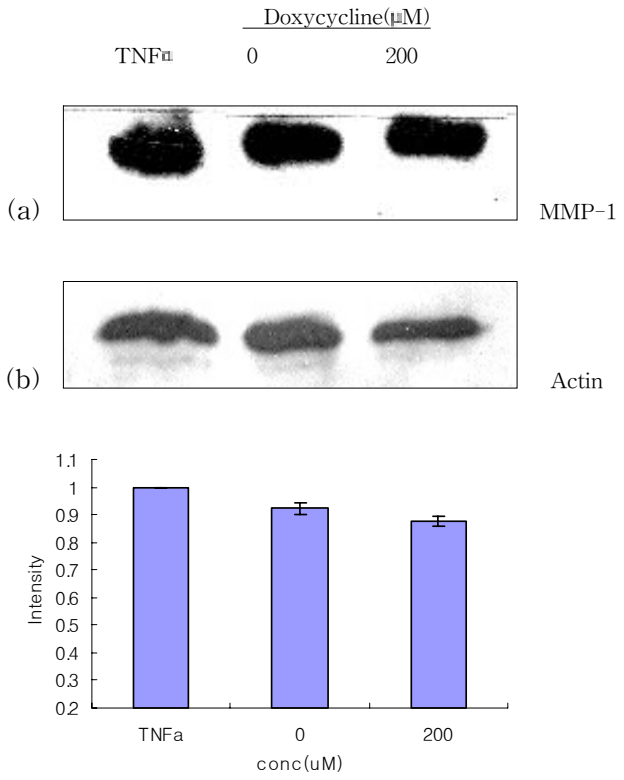
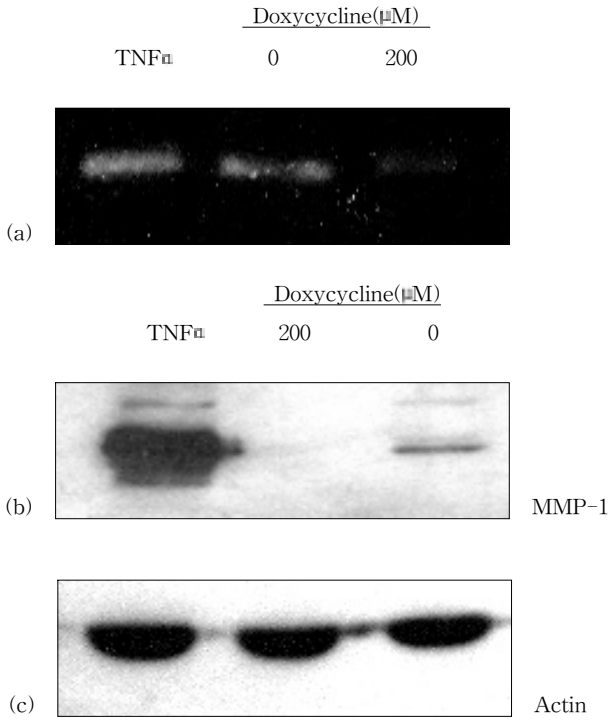


그림 4. 인체 진피 섬유모세포의 MMP-1 western blot analysis. Doxycycline 처리에 따른 pro-MMP의 발현 정도를 파악하기 위하여 MMP-1 western blot analysis를 시행하였다. TNF-α를 기준으로 세포 내에서의 pro-MMP의 발현을 비교한 한 결과, doxycycline 처리로 인한 세포 내에서의 MMP-1 발현에 차이가 없었다.(*p=0.02) (a) MMP-1, (b) Actin western blot analysis.

다. Doxycycline에 의한 MMP-1의 효소 활성도 분석

제 1형 교원질을 기질로 한 zymography를 통해 doxycycline 처리에 의한 MMP-1의 활성도에 미치는 영향을 파악한 결과, 200㎛M doxycycline을 처리한 군에서는 MMP-1의 활성도가 나타나지 않았다. 또한 배지 내로 분비된 MMP-1의 발현정도를 zymography와 병행하여 western blot analysis를 동시에 실시한 결과 단층 배양의 경우 세포 내에서보다 배지 내로 분비되어진 MMP-1의 발현양이 많았으며, 200㎛M의 doxycycline을 처리한 군에서는 MMP-1이 발현되지 않았다(그림 5).



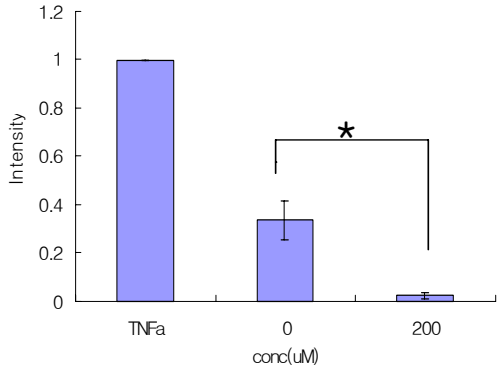
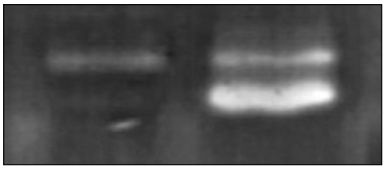


그림 5. Zymography와 MMP-1 western blot analysis. Doxycycline을 처리함으로써 세포 밖으로 효소 형태로 발현된 MMP의 발현이 감소되었으며, MMP-1 western blot analysis 한 결과, doxycycline에 의해 세포 밖으로 분비된 MMP-1의 발현이 현저히 감소되었다. (a) zymography (b) MMP-1 (c) Actin western blot analysis. *p=0.0048

3. 삼차원 상에서의 MMP 발현과 doxycycline 처리에 따른 교원질 합성의 변화

가. MMP 발현 정도

단층 배양과 PLGA 지지체에서의 삼차원 배양에서 인체 진피 섬유모세포의 MMP 발현 정도를 zymography로 비교한 결과, 삼차원 배양은 단층 배양에 비해 전체 MMP 활성도가 2.3배 증가되었으며, 활성도를 지닌 형태의 MMP가 발현되었다. 인체 진피 섬유모세포 배양 시 배양 배지로 인한 MMP 발현의 유의성을 배제하기 위하여 배지만을 zymography한 결과, 배지 자체에서는 MMP가 발현되지 않았다(**그림 6**).



2D 3D

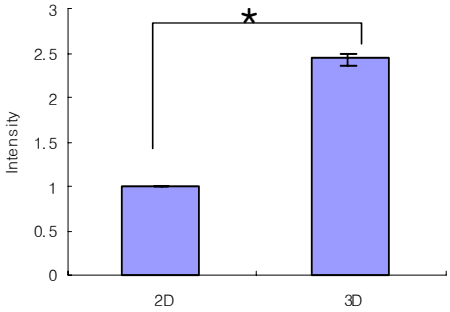


그림 6. 단층 배양과 삼차원 배양의 zymography. 인체 진피 섬유모세포의 단층 배양과 PLGA 지지체에서의 삼차원 배양을 통한 MMP 발현 정도를 파악하기 위하여 배양 상등액을 zymography 시행하였다. 삼차원 배양에서는 단층 배양에서보다 MMP 발현이 2.5배 증가하였으며, 활성도를 지닌 형태의 MMP가 발현되었다. *p=0.0005

나. 교원질 합성의 광학현미경적 관찰

PLGA 지지체 내에서 인체 진피 섬유모세포의 교원질 합성 정도를 파악하기 위하여, 2, 4주 동안 배양한 세포-PLGA 지지체를 주사 전자 현미경과 TRC 염색하여 관찰하였다. 그 결과 PLGA 지지체 내에 풍부한 섬유상의 세포외 기질과 교원질 다발이 관찰되었다(**그림 7**), (**그림 8**).

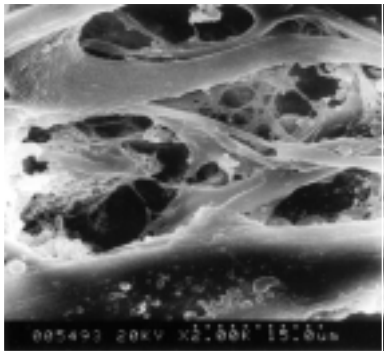
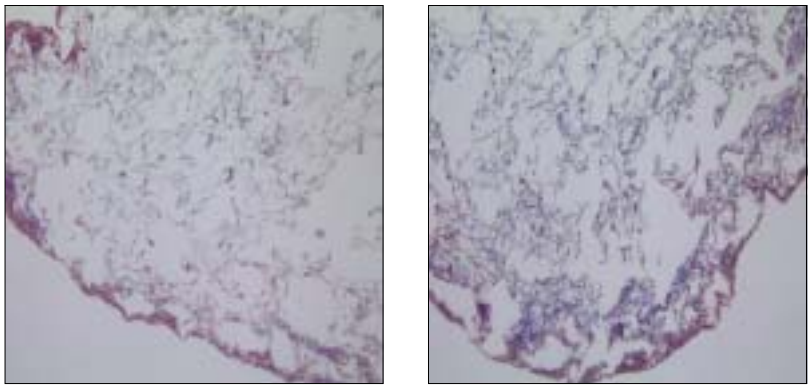


그림 7. 2주 배양한 PLGA 지지체의 주사 전자 현미경 사진. 2주 동안 doxycyline을 처리하여 인체 진피 섬유모세포를 삼차원 배양한 PLGA 지지체를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 지지체 내에서 풍부한 섬유상의 세포외 기질과 교원질 다발을 확인할 수 있었다.



(a) (b)

그림 8. 4주 배양한 PLGA 지지체의 TRC (Masson's trichrome)염색. PLGA 지지체에서 배양한 인체 진피 섬유모세포에 4주 동안 doxycyline을 처리한 후 교원질 축적을 관찰하였다. (a) Doxycycline을 처리하지 않고 4주 배양한 PLGA 지지체 (b) 200μM doxycycline을 4주 처리하여 배양한 PLGA 지지체.

다. 삼차원 상에서 doxycycline 처리에 따른 제1형 교원질 mRNA발현

4주 배양한 PLGA 지지체에서 인체 진피 섬유모세포에 의한 제 1형 교원질 mRNA 발현정도를 알아보기 위하여, TGFβ-1을 처리한 것을 대조 유전자로 하여 GAPDH를 통해 발현정도를 관찰한 결과, 200μM doxycycline을 처리하였을 경우, 처리하지 않은 배양에서보다 1.8배 제 1형 교원질의 mRNA 발현이 증가되었다 (그림 9).

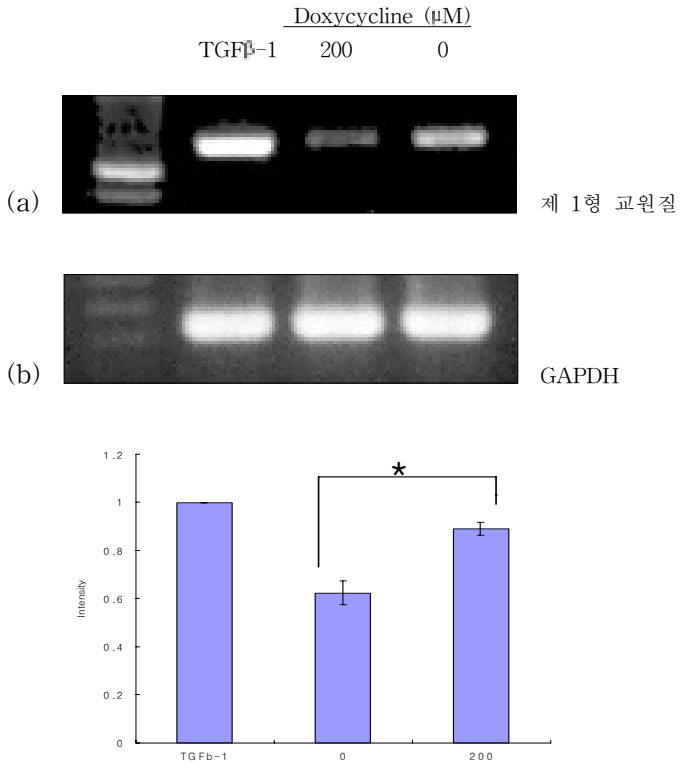
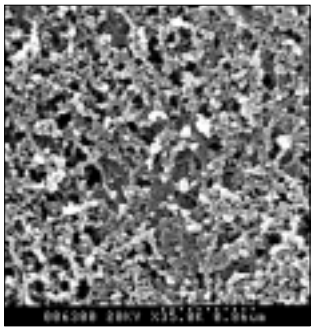


그림 9. PLGA 지지체의 제 1형 교원질 mRNA RT-PCR. Doxycycline 처리에 따른 PLGA 지지체에서 인체 진피 섬유모세포의 제 1형 교원질 mRNA 발현정도를 알아보기 위하여 RT-PCR 하였다. TGFβ-1을 처리한 것을 대조 유전자로 하여 발현정도를 비교한 결과, doxycycline을 처리함으로써 제 1형 교원질의 발현이 1.8배 증가하였다. (a) 제 1형 교원질 (b) GAPDH mRNA RT-PCR. *p=0.0025

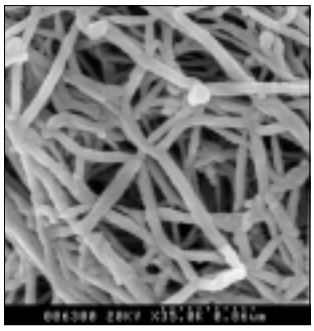
4. 추출한 교원질의 분석

가. 전자현미경적 관찰

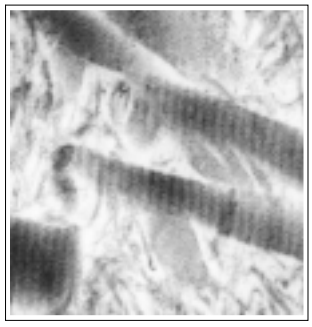
PLGA 지지체 내에서 6주 배양한 인체 진피 섬유모세포에 의해 합성·축적된 교원질을 추출하여 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 6주 동안 doxycycline 처리하여 배양한 교원질은 가늘고 긴 구조로 직경 20~90㎚의 그물망을 형성하여 정상과 유사한 형태를 지닌 반면, doxycycline을 처리하고 6주간 배양하여 추출한 교원질은 잘게 분해되어 처리한 군에 비해 교원질의 길이가 짧았다, 또한 투과 전자 현미경 관찰 결과, 교원질 원섬유(fibril)에서 발견되는 D주기 줄무늬 모양과 64㎚의 주기가 분명하게 관찰되었다(그림 10).



(a)



(b)



(c)

그림 10. 6주 배양한 PLGA 지지체에서 추출한 교원질의 전자현미경 사진. PLGA 지지체 내에서 인체 진피 섬유모세포에 의해 합성·축적된 교원질을 산과 염의 침전법으로 추출하여 비교한 결과, doxycycline 처리로 인해 교원질의 분절을 막을 수 있었으며, 가늘고 긴 구조로 20~90㎚로 다양한 직경의 그물망을 형성하는 형태로 정상의 교원질과 유사한 형태를 관찰하였다. 또한 투과 전자 현미경을 통해 원섬유에서 관찰 할 수 있는 교원질의 주기성을 관찰 할 수 있었다. (a) Doxycycline을 처리하지 않고 6주 배양하여 추출한 교원질 (b) 200㎛M doxycycline을 6주 처리하여 추출한 교원질의 주사 전자 현미경 사진 (c) 200㎛M doxycycline을 6주 처리하여 추출한 교원질의 투과 전자 현미경 사진.

나. 추출한 교원질의 단백질 분석

추출한 교원질의 제 1형 교원질 western blot analysis하여 추출한 교원질의 순도를 분석한 결과, α1, α2 사슬을 확인할 수 있었다(**그림 11**).

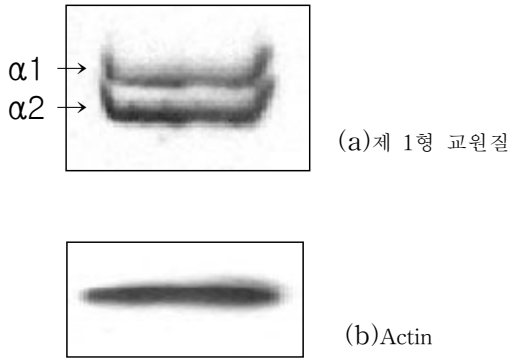


그림 11. 추출한 교원질의 제 1형 교원질 western blot analysis . 추출한 교원질의 순도를 분석하기 위하여 제 1형 교원질 western blot analysis를 통해 분석한 결과, 제 1형 교원질의 α1, α2 사슬을 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

교원질은 인체의 모든 결합조직에서 가장 중요한 구성 성분으로, 전체 단백질의 약 1/3정도를 차지하면서, 지지조직으로서의 역할을 담당하고 있다.

결합조직의 주 구성세포인 진피 섬유모세포는 교원질 합성을 포함한 다양한 생물학적 기능을 가지고 있다. 진피 섬유모세포를 단층 배양하는 방법은 섬유화를 일으키는 질환 및 섬유화 과정을 연구하기 위한 유용한 기법으로 널리 이용되고 있다. 그러나 삼차원적으로 배양된 섬유모세포는 단층 배양에 비해 생물학적 차이뿐만 아니라 형태학적 면에 있어서도 차이를 보인다[22]. 섬유모세포를 단층으로 배양할 경우 세포는 계속적으로 분열하나, 삼차원적으로 배양할 경우에는 세포는 더 이상 분열하지 않게 되며, 형태도 정상 인체 진피 조직에서 관찰되는 모양과 유사해진다[23,24]. 배양 기간 동안 새로이 합성된 교원질은 단층으로 배양할 때는 배양 상등액 내로 대부분 유리되는 반면에, 삼차원적으로 배양할 경우에는 지지체 내에 축적되게 된다[25].

본 연구에 사용된 삼차원적 지지체인 poly-lactic-co-glycolic acid(PLGA) 지지체는 균일한 크기의 기공으로 이루어져 있고, 기공의 평균 크기는 약 300-500㎛이며 90%이상의 높은 다공성을 지닌다. Yoon (2001)은 PLGA 지지체 내에 세포를 분주하였을 때, 높은 세포 부착율과 세포 생존성을 보였으며, 장기간 배양하여 관찰한 결과, 지지체 내 기공에 풍부한 교원질이 축적된다고 보고하였다[26]. 또한 PLGA 지지체 내에서 사람 간엽 줄기 세포를 삼차원 배양하였을 경우, 풍부한 교원질 다발이 축적된다고 연구되었으며[27], 본 연구에서도 인체 진피 섬유모세포를 장기간 PLGA 지지체 내에서 삼차원 배양하여 관찰한 결과, TRC 염색에서 풍부한 교원질의 분비와 축적이 보였고, 주사 전자 현미경에서 섬유상의 세포외 기질과 교원질 다발을 확인할 수 있었다.

Carole N 등 (2001) Sato H 등 (1994, 1996)은 단층 배양에 비해 교원질 젤이나 그 밖의 다른 삼차원 배양에서는 세포에 의한 MMP 발현이 현저히 증가되었으며, 단층 배양이 대부분 전구체의 형태를 지니고 있는 반면, 삼차원 배양에서는 활성도를 지닌 형태로 발현된다고 하였다[28-30]. 본 연구에서도 zymography로 단층 배

양과 삼차원 배양에서의 MMP 발현을 비교한 결과, 인체 진피 섬유모세포를 PLGA 지지체 내에서 삼차원 배양하였을 경우, MMP 발현이 증가되었으며, 활성도를 지닌 형태가 발현되는 것을 관찰하였다.

진피에서의 주요 MMP는 MMP-1으로 교원질을 분해하는 다른 MMP인 MMP-8, 13은 전구체의 형태를 지닌 반면, MMP-1은 대부분 활성도를 지니고 있어[9,31] 인체 진피 섬유모세포에 의해 분비된 MMP-1로 인하여 삼차원 배양 시 축적된 제 1형 교원질이 분해 된다[32]. Herrick (1995), Varani (2001)은 분해된 제 1형 교원질의 존재 하에서는 새로운 제 1형 교원질의 합성이 감소된다고 보고하였고, 장기간의 배양 시 그 영향은 더욱 뚜렷이 나타난다고 하였다[33,34].

그러나 교원질 젤에서와 같은 삼차원 배양 시, TIMP, EDTA 등을 처리하여 MMP를 억제하였을 경우, 처리하지 않은 군에 비해 제 1형 교원질의 발현이 현저히 증가되었으며[35], 교원질 젤의 분해정도가 세포를 분주하지 않은 대조군과 비슷한 형태로 유지하고 있다고 연구되었다[33].

Doxycycline은 항생제와 MMP의 억제제로서의 기능을 하며, *in vitro*에서 혈관내피 세포 및 골육종 세포의 성장을 억제함으로써 세포고사를 유도한다(Guerin, 1994 ; Fife, 1995). Golub 등 (1994), Ingman 등 (1996)은 피부 창상에 저농도의 doxycycline을 처리하였을 경우 특이적으로 MMP의 활성을 억제하는 억제제로서의 기능만을 나타냈다는 보고를 하였다[36-38]. 본 연구에서 zymography를 시행하여 섬유모세포에서의 MMP의 발현 정도 및 MMP 억제제인 doxycycline을 처리하였을 때의 활성을 관찰한 결과, 200㎛M 정도에서 MMP 활성도가 반으로 감소되었으며, MTT assay 결과 이 농도에서는 75% 이상의 세포가 생존할 수 있었다. 이로서 본 연구에서는 200㎛M 농도를 처리함으로써 세포의 성장에는 관여하지 않으면서 MMP의 활성도만을 억제하여 실험을 진행하였다.

Doxycycline이 직·간접적으로 MMP의 활성도를 억제한다는 것은 알려져 있지만, 그 기전은 명확하지 않다. 일반적으로 doxycycline은 MMP의 Ca^{2+}와 Zn^{2+}와 결합하는 능력에 의해 활성을 나타내는 단계에서 억제하는 것으로 알려져 있으나, 그 이외에 pro-MMP가 활성화되는 산화적 과정을 막음으로서 억제할 수 있으며, 세포 자체에서의 합성이 억제되는 경우가 있다[37,39]. 본 연구에서 zymography,

western blot analysis, RT-PCR을 통해 doxycycline의 억제기전을 파악한 결과, zymography와 세포 상등액을 통한 MMP-1의 western blot analysis에서는 세포 밖으로 분비된 MMP의 활성도가 doxycycline을 처리함으로써 뚜렷하게 감소됨을 확인하였다. 반면, 세포 내에서 pro-MMP의 활성도 감소에 대한 doxycycline의 영향을 보기 위하여 세포 추출물을 western blot analysis하였으나, 6%정도의 감소가 보였으며, 세포 자체의 합성 단계에서 doxycycline에 의한 MMP-1의 억제 정도를 관찰하기 위해 RT-PCR한 결과 큰 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 doxycycline은 mRNA 발현과 pro-MMP 발현 단계에서보다는 주로 MMP의 활성도를 억제함으로써 MMP-1 억제 작용을 나타낼 것으로 추측된다.

그러나 교원질 합성에 대한 doxycycline의 영향을 파악한 연구에서 doxycycline에 의해 교원질 합성이 억제된다는 보고도 있었다. 즉 Beekman (1997)은 alginate에 소의 연골세포를 삼차원 배양하여 관찰한 결과, doxycycline에 의해 교원질 합성이 감소하였다고 보고하였다[19]. 그러나 이는 단기간인 7일 동안 doxycycline을 처리하여 초기 영향만을 관찰한 결과이며, 또한 MMP-1을 억제할 수 있는 농도 이하의 저농도로 처리함으로써, MMP-1에 의한 제 1형 교원질의 분해 여부를 배제한 실험이었다.

장기간의 배양 시 MMP에 의한 교원질 분해 영향에 대해, 섬유모세포를 장기간동안 삼차원 배양하였을 경우, 과도한 MMP-1, 2, 9의 발현이 교원질을 분해하기 때문에 축적된 교원질은 정상의 교원질에 비해 길이가 짧고 끝이 두꺼운 등의 정상과 다른 형태를 지닌다는 보고가 있었다[32]. Lamparter (2002)는 *in vivo*에서 장기간동안 doxycycline을 투여하였을 때, 초기 1, 2주에는 처리하지 않은 군보다 교원질의 합성량이 감소하는 반면, 3주부터 증가하기 시작하여 7주에는 합성량이 2배로 증가되었다고 보고하였다[20].

본 연구에서는 4주 동안 200㎛M의 doxycycline을 처리하여 TRC 염색을 한 결과, doxycycline을 처리한 군에서 교원질의 축적양이 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 제 1형 교원질 RT-PCR로 확인한 결과, 삼차원 배양에서 doxycycline에 의해 섬유모세포의 제 1형 교원질의 합성이 1.8배 증가되었다. PLGA 지지체에서 6주 동안 인체 진피 섬유모세포를 배양한 후, 산과 염침전법으로 교원질을 추출하여

주사 전자 현미경으로 비교하였을 때, doxycycline을 처리함으로써 교원질이 잘게 분해되는 것이 억제되었고, 가늘고 긴 구조와 직경 20~90nm로 정상의 교원질과 유사한 형태를 지니는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 doxycycline을 처리하여 추출한 교원질의 투과 전자 현미경으로 관찰한 결과, 교원질 원섬유(fibril)에서 발견되는 D주기의 줄 무의 모양과 64nm의 주기가 분명하게 관찰되었으며, 제 1형 교원질 western blot analysis 통해 α1사슬과 α2사슬로 이루어져 있는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 doxycycline을 장기간 처리하여 PLGA 지지체에 배양한 인체 진피 섬유모세포에 의한 제 1형 교원질의 합성 증가를 유도하였고 또한 이의 분해를 억제할 수 있었다. 따라서 PLGA 지지체를 이용하여 인체 진피 섬유모세포를 장기간 삼차원 배양·추출함으로써 우수한 교원질을 *in vitro*에서 생합성 할 수 있으며, 이는 사람의 교원질을 의학적·조직 공학적으로 적용 가능하게 만드는 계기가 될 수 있으리라 생각한다.

V. 결 론

본 연구에서는 의학적·조직 공학적 필요에 의해 사람의 교원질을 *in vitro*에서 합성하였다. 인체 진피 섬유모세포를 PLGA 지지체에서 삼차원 배양하여 정상 사람의 성숙한 교원질과 동일한 교원질을 생합성하였고. 또한 장기간의 삼차원 배양 시에 MMP-1에 의한 교원질의 분해를 막기 위하여 MMP 억제제로 알려진 doxycycline을 처리하였으며, doxycycline의 억제 효과가 어느 단계에 일어나는 지를 RT-PCR, western blotting, zymography를 통해 파악함으로써 삼차원 배양에서의 doxycycline의 처리가 교원질의 합성과 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

결과는 다음과 같다.

1. 인체 진피 섬유모세포를 PLGA 지지체 내에서 삼차원 배양, 추출한 결과 성숙한 정상의 사람 교원질을 얻을 수 있었다.

2. 삼차원 상에서 200㎛M의 doxycycline을 4주간 처리한 결과, 대조군에 비해 제1형 교원질의 합성량이 증가되었다.

3. PLGA 지지체 내에서의 인체 진피 섬유모세포의 삼차원 배양에서는 단층 배양보다 MMP 발현양이 증가되었으며, 활성도를 지닌 형태가 나타났고, doxycycline을 처리한 결과, MMP-1의 발현이 감소되었다.

4. Doxycycline의 MMP 억제기전을 파악한 결과, mRNA 및 pro-MMP 발현을 억제하는 단계보다, 효소의 활성도를 낮추는 기작을 통해 MMP-1이 억제되었다.

이상의 연구 결과로 MMP 억제제인 doxycycline의 장기간 처리는 축적된 교원질의 분해를 막음으로써 교원질의 합성을 증가시키며, PLGA 지지체를 통한 장기간의 삼차원 배양은 인체 진피 섬유모세포로부터 성숙된 사람의 교원질을 합성·추출해 낼 수 있다.

참고 문헌

1. Chavrier C, Couble ML, Magloire H. Connective tissue organization of health human gingiva. J Periodontal Res, 1984;19:221-229.

2. Romanos G, Schroter C, Hinz N. Immunohistrochemical distribution of the collagen types IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, Marmoset and hyman gingivae. Matrix, 1991;11:125-132.

3. Salonen J,Oda D, Funk SE, Sage H. Synthesis of type VIII collagen by epithelial cells of human gingiva. J Periodontal Res, 1991;26:355-360.

4. Kathy Liszewski. Bio-pharma tackles TSEs; Seeking to improve and validate purification processes. Genetic Engineering News, 2000;20:47.

5. BioCentury. FibroGen's BSE play in vaccines. The Bernstein Report on BioBusiness 2001;22:A11-18c.

6. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J 1991;5:2145-54.

7. Sorsa T, Uitto V-J, Suomalainen K, Rurto H, Lindy S. A trypsin-like protease from Bacteroides gingivalis. J Periodont Res, 1987;22:375-380.

8. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A. Treat in periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. J Am Dent Ass 1994;125:163-9.

9. Woessner JF. The matrix metalloproteinases family. In Matrix

Metalloproteinases. 1998;1-14, Academic Press, San Diego.

10. Jukka W, Veli-Matti K. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J, 1999;13:781-792.

11. Golub LM, Ramamurthy NS, McMamaraTF. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown. Crit Rev Oral Med, 1991;2:297-322.

12. Sunada H, Nagai Y. Mechanism of collagen degradation by collagenase. Biomed Res, 1983;4:61-69.

13. Yaron A, Smith Jr, G.N, Brandt Jr. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit, 1894;19:268-274.

14. Smith , G.N., Yu Jr. Oral administration of Doxycycline reduces collagenase and gelatinase activities in exracts of human osteoarthritic cartilage. J Rheumatol, 1998;25:532-536.

15. Nordstror, Lindy O, Lauhio AM. Anti-collagenolytic mechanisms of action of doxycycline treatment in rheumatoid arthrits. J Rheumatol Int, 1998;17:175-180.

16. Fife RS, Sledge GW Jr. Effects of doxycycline on hyman prostate cancer cells in vitro. Cancer Lett, 1998;127:37-41.

17. Uitto VJ, Firth JD, Nip L et al. Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A gene expression in human skin keratinocytes. Ann N Y Acad Sci, 1994;732:140-151.

18. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, et al. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing. J Cell Biol, 1997;137:67-77.

19. Beckman B, Verzijl N, de Roos JA. Doxycycline inhibits collagen synthesis by bovine chondrocytes cultured in alginate. Biochem Biophys Res Commun, 1997;237:107-10.

20. Steffen L, Simon HS, Karl TW. Doxycycline and tissue repair in rats. J Lab Clin Med, 2002;139:295-302.

21. Tyagi SC, Kumar SG, Alla SR, Reddy HK, Voelker DJ. Extracellular matrix regulation of metalloproteinase involved in granuloma-induced cartilage degradation. Int J Tissue React, 1992;14:287-294.

22. Worber L, Mauch C, Kirsch E. Modulation of collagen type synthesis in organ and cell cultures of fibroblast. J Invest Dermatol, 1986;87:217-220.

23. Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrate in vitro. J Cell Sci, 1980;41:159-175.

24. Kleinman HK, Klebe RJ, Matrin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J Cell Biol, 1981;88:473-485.

25. Nakagawa S, Pamela P, Grinnell F. Long-term culture of fibroblast in contracted collagen gels: Effects on cell growth and biosynthetic activity. J Invest Dermatol, 1989;93:792-798.

26. Yon JJ, Park TG. Degradable behavior of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas forming of effervescent salts. J Biomed Mater Res, 2001;55:401-408.

27. So Yeon Joo. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro on PLGA[dissertation]. Yonsei Univ. ; 2002

28. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J. Nature, 1994;370:61-65.

29. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K. FEBS Lett, 1996;393:101-104.

30. Carole N, Sandrine L, Odile B-V, Willian H. Cumulative influence of Matrix Metalloproteinase-1 and 2 in the Migration of Melanoma cells within Three-Dimensional Type I collagen Lattices. Experimental Cell Research, 2001;270:110-118.

31. Kahari V, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinaes in skin. Exp Dermatol, 1997;6:199-213.

32. Varani J, Hattori Y, Chi Y. Elaboration of collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors by basal cell carcinomas of skin. Br J Cancer, 2000;82:657-665.

33. Varani J, Spearman D, Perne P. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagense-degraded collagen in vitro. 2001;158:931-942.

34. Bell E, Ivarson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattice by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 1979;76:1274-1278.

35. Jonathan M, Korostoff, Jian FW. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients. J Periodontol, 2000;71:353-359.

36. Guerin C, Golub LM, Masnyk T. Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase. Biochem Biophys Res Commun, 1992;188:740-745.

37. Golub LM, Evans R, McNamara TF, Lee HM. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. Crit Revs Oral Biol Med, 1994;732:96-111.

38. Ingman T, Tewarhartiala T, Ding Y, Ding Y, Tschesche H, Haerlan A, Kinane DF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid aliva of periodontitis patients. J Clin Periodontol, 1996;23:1127-32.

39. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Dalo T. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines(CMTs) in human endothelial cells. Adv Dent Res, 1998;12:114-118.

Abstract

Doxycycline effect on type I collagen synthesis and MMP-1 expression in three-dimensional culture of human dermal fibroblasts

Nam Hee Kim

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jin Kim, D.D.S., Ph. D.)

Tissue regeneration of the wounds requires the proliferative capacity of parenchymal cells accompanied by the supports of extracellular matrix, in particular collagen fibers. Therefore, collagen synthesis has been one of the target fields in regeneration medicine and tissue engineering. Collagen products extracted from bovine or porcine tissues are widely used for support in medical and tissue engineering. However, they may cause immune response and may transfer pathogens to the recipient tissue.

In order to solve these problems, we aimed to synthesize mature collagen derived from human dermal fibroblasts and in particular, focused on the up-regulation of collagen synthesis by long-termed three-dimensional culture with the treatment of doxycycline, a MMP inhibitor.

Human dermal fibroblasts were cultured on PLGA scaffold and they were treated with doxycycline to inhibit MMP-1 activity. Type I collagen was extracted by acid solution and salt precipitation and it was quantitative by

western blot analysis. In addition, we determined the direct and indirect mechanisms by which doxycycline can inhibit matrix metalloproteinase (MMP) activity using RT-PCR, western blot analysis and zymography.

1. Mature human collagen was obtained by long-term three-dimensional culture of skin fibroblasts in PLGA scaffold.

2. Type I collagen synthesis was increased in three-dimensional culture by 200μM doxycycline treatment for 6 weeks.

3. MMP-1 was expressed in latent form in skin fibroblast monolayers, whereas it was expressed predominantly in active form in the three-dimensional cultures. MMP-1 expression in the three-dimensional culture was approximately 2.5 times higher than that of the monolayer culture, and its expression was markedly reduced by doxycycline treatment.

4. MMP-1 inhibition by doxycyline treatment was induced by the inhibition of enzyme activity, rather than the degradation of the pro-MMP zymogen or the suppression of MMP-1 mRNA transcription.

In summary, mature human type I collagen was obtained by long-term three-dimensional culture of human dermal fibroblasts in PLGA scaffold and its yield was increased by long-term treatment of doxycycline.

Key Words : type I collagen, MMP-1 , doxycycline, PLGA scaffold, three-dimensional culture.