

저산소 및 재산소화가 배양된
태아 섬유아세포에 미치는 영향

지도 교수 : 박 병 윤

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

곽 혁 준

저산소 및 재산소화가 배양된
태아 섬유아세포에 미치는 영향

지도 교수 : 박 병윤

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

곽 혁 준

곽혁준의 박사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

감사의 글

무엇을 완성하고 내어놓는 과정을 감히 산고에 비교해도 될지 모르겠습니다. 열달동안의 조심스럽고도 힘든 오랜 산고끝에 한 생명을 잉태한 산모와 같은 마음이 지금의 저와 같을까 하는 심정으로 학위 기간을 마치게 됩니다. 석사학위와는 달리 더 힘들게 느껴지고 무척이나 여유없이 지나버리는 것 같았는데 어느덧 모자란 연구논문을 쓰게 되었습니다. 지금 생각해보면 그리 짧지 않은 시간이었던 것 같습니다. 연구논문을 계획하고 준비하는 기간동안 순간마다 최선을 다했다고 생각했지만 막상 내어놓은 논문이 여러 면에서 부족하고 아쉬움이 남게됩니다. 하지만 비록 그 결과가 부족하고 보잘 것 없어도 최선을 다했다는데서 위안을 찾고 싶습니다.

먼저 항상 제 곁에서 힘이 되어준 제 아내에게 감사하는 마음을 전하고 싶습니다. 그리고 부족한 저를 지도해주시고 격려해주신 지도교수 박병윤 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 매 순간마다 따뜻한 격려와 조언을 해주신 나동균 교수님 그리고 성형외과학 교실 모든 분께도 감사를 드립니다. 마지막으로 학위연구논문을 완성할수 있도록 저를 키워주신 부모님, 그리고 항상 격려해주신 장인, 장모님께도 역시 감사드립니다.

2004 년 6 월 저자 씀

차 례

그림 및 표 차례

국문요약.....	1
I. 서론	4
II. 재료 및 실험방법.....	10
1. 조직 채취 및 섬유아세포 배양	10
2. 실험군	11
3. MTT assay를 이용한 세포 활성도의 측정	12
4. 제1형 교원질 양의 측정	12
5. 분비되어 나오는 TGF- β , VEGF의 측정	13
6. RT-PCR을 이용한 제1형 교원질과 VEGF의 mRNA 발현 측정.....	13
7. 통계학적인 분석.....	15
III. 결과	16
1. 저산소 및 재산소화 상태에 따른 성인 섬유아세포의 변화	16
2. 저산소 및 재산소화 상태에 따른 태아 섬유아세포의 변화	21
3. 저산소 및 재산소화 상태에 따른 성인 및 태아 섬유아세포의 변화의 비교.....	26
IV. 고찰	32
V. 결론	39
참고 문헌	40
영문 요약	45

그림 차례

그림 1. 배양시간에 따른 저산소,재산소조건에서의 성인 섬유아세포의 배양사진	16
그림 2. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포 활성도의 비교 ..	17
그림 3. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 교원질 합성량의 비교.....	18
그림 4. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 TGF- β 분비량의 비교.....	18
그림 5. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 VEGF 분비량의 비교.....	19
그림 6. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 TNF- α 분비량의 비교.....	20
그림 7. 배양시간에 따른 저산소,재산소 조건에서의 태아 섬유아세포의 배양사진.....	21
그림 8. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포 활성도의 비교 ..	22
그림 9. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 교원질 합성량의 비교.....	23
그림 10. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 TGF- β 의 비교	24
그림 11. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 VEGF 의 비교	24
그림 12. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 TNF- α 의 비교	25
그림 13. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포 활성도의 비교	27

그림 14. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 제 1 형 교원질 합성량의 비교.....	28
그림 15. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 TGF- β 분비량의 비교	28
그림 16. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 VEGF 분비량의 비교	29
그림 17. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 TNF- α 분비량의 비교	29
그림 18. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 제 1 형 교원질의 mRNA 발현량 비교	30
그림 19. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포 VEGF mRNA 발현량의 비교	31

국문요약

저산소 및 재산소화가 배양된 태아 섬유아세포에 미치는 영향

성인의 창상치유과정과 달리 반흔을 남기지 않는 것으로 알려진 태아의 창상치유 과정에 있어서 최근 주목 받고 있는 것이 저산소화(hypoxia), 재산소화(reoxygenation) 조건에서의 창상치유 과정이다. 저산소화 상태는 섬유아세포에 의한 TGF- β (transforming growth factor- β), VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현에 영향을 미치며, 신생혈관 생성 과정에서의 재산소화 과정도 이 때 유리되는 산화유리기(oxygen free radical)를 통해 창상치유 과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 저산소 상태와 이에 따른 재산소화를 유발하였을 때 각각의 섬유아세포의 성장속도, 교원질합성의 양과 TGF- β , VEGF의 발현량을 측정하여 저산소, 재산소화 상태에 따른 태아와 성인의 창상치유 과정을 비교 분석하여, 반흔 없는 태아의 치유과정과 저산소화 상태와의 연관성을 알아보고자 하였다.

임신 중기(20 주 전후)의 태아 피부에서 분리 배양된 섬유아세포를 Waymouth의 방법을 이용하여 섬유아세포를 배양하였다. 대조군은 정상산소 분압에서 배양한 태아 또는 성인 섬유아세포로 설정하였고,

실험군은 저산소 조건에서 24 시간, 48 시간, 72 시간동안 배양한 태아 또는 성인 섬유아세포군을 제 1,2,3 군으로 설정하였고, 제 4 군은 48 시간동안 저산소 및 재산소화 시킨 군으로 하였다. 또, 각각의 4 가지군은 태아 섬유아세포군과 성인 섬유아세포군으로 나누어 실험을 진행하였다. 세포 활성도 측정을 위해 MTT assay 를 시행하였다. 각각의 조건에 따른 섬유아세포에서 분비되는 TGF- β , VEGF, TNF- α 의 분비량은 ELISA assay 로 측정하였고, 교원질 및 VEGF 의 mRNA 발현정도를 측정하였다. 각 군간의 비교는 Student's t-test 로 검정하였다.

실험 결과 세포활성도의 측정에서 저산소화 상태 72시간에서는 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 수가 다소 증가되었으나, 유의한 결과는 아니었다. 교원질 합성량에 있어서는 저산소화 조건하에서 성인 섬유아세포와 비교하여 태아 섬유아세포의 교원질 합성량에 유의한 차이가 없었다. TGF- β 의 측정에서는 성인 섬유아세포의 경우 유의한 증가소견 보였으나, 태아 섬유아세포에서 상대적으로 더욱 증가한 소견을 보였다. VEGF 분비량을 측정한 결과 저산소 48시간, 72시간에 태아 섬유아세포의 VEGF 발현량이 급격히 증가하고, 재산소화 시에 감소하였다. 성인 섬유아세포의 경우도 증가 소견을 보였지만, 태아 섬유아세포의 경우 그 증가량이 상대적으로 유의있게 증가하였다. TNF- α 의 경우 모든 군에서 유의한 결과를 보이지 않았다.

저산소 상태에서 성인에 비해 태아 섬유아세포의 VEGF의

발현량이 상대적으로 더 증가함을 확인할 수 있었는데, 이는 태아의 창상 치유과정에서 신생혈관 형성이 더 활성화될 수 있는 가능성을 보여주는 것이라고 사료된다.

핵심 되는 말 : 저산소 상태, 재산소 상태, 태아 섬유아세포,
교원질 합성량, TGF- β , VEGF, TNF- α

저산소 및 재산소화가 배양된 태아 섬유아세포에 미치는 영향

< 지도교수 박병윤 >

연세대학교 대학원 의과학과

곽 혁 준

I. 서론

과다한 교원질의 침착은 반흔의 추상에 국한되지 않고, 간경화, 폐섬유화증 등 여러 질환의 원인이 되기도 한다. 이러한 교원질 합성의 조절은 아직까지 해결되지 못한 문제이다. 1979년 Rowlatt 등이 임신 중기까지의 태아의 경우 반흔 없이 창상이 치유됨을 보고한 이래 성인과 다른 태아의 교원질 합성을 포함한 태아의 창상 치유과정에 대한 많은 연구가 진행되어 오고 있다.¹

태아의 창상 치유 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 창상치유 과정에서의 여러 차이점은 우선 태아의 환경이 성인과 다르다는 것을 들 수 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.

내인적인 측면에서도 많은 차이점이 밝혀져 왔다. 첫째, 반흔 형성에 중요한 역할을 하는 태아섬유아세포 자체에서 큰 차이가 있다. 태아 섬유아세포(fetal fibroblast)의 경우는 성인섬유아세포에 비해 이동 능력이 탁월하다고 알려져 있다.^{1,2} 둘째, 태아를 둘러 싸고 있는 양수는 hyaluronic acid, fibronectin과 같은 세포외기질 성분(extracellular matrix components)이 풍부하여, 창상 발생시 교원질 합성에 의하기 보다 창상 재생과정(regeneration)에 의해 치유되어 반흔이 생기지 않게 되는 것으로 알려져 있으며 또한 hyaluronic acid의 경우 성인에 비해 그 양이 감소하지 않고, 계속 유지 됨으로써 태아 섬유아세포의 이동을 증가시키는데 기여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 셋째, 교원질 침착 유형뿐 아니라, 유전자 단계에서도 차이가 있으며, 양막에 많이 존재하는 것으로 알려진

각종 성장인자에 대해서도 많은 차이가 있다는 연구가 보고되어 왔다. 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.³⁻⁶

이러한 태아의 창상치유 과정에 있어서 최근 주목 받고 있는 것이 바로 저산소화(hypoxia) 조건에서의 창상치유 과정이다. 세포의 생존에 있어 산소는 필수적인 요소이며, 창상의 치유 과정에서도 창상 중앙부에 저산소화 상태가 나타나며, 창상치유 중 섬유아세포의 증식은 창상 발생 후 3-4일부터 10-14일 사이에 일어나게 된다. 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 생기는 산화유리기(oxygen free radical)가 창상 치유에 있어 영향을 준다는 보고가 많다.⁷⁻¹¹ 실제로 인간의 자궁내에서의 태아의 발달은 생리학적으로 태반을 통하여 혈액 순환이 이루어지므로 저산소화 상태에 있게 된다. Yang 등은 태아의 동맥혈의 산소분압은 20mmHg인 반면, 어른의 경우는 45mmHg-60mmHg로 태아는 심한 저산소화 상태에 노출되어 있음을 보고하였고,¹³ Sheid 등도 pO₂ histogram를 이용한 보고에서 성인의 경우는 36.3 mmHg인 반면, 태아 피부조직의 평균 산소농도는

8.3 mmHg였다고 하였다.¹¹

성인의 경우 창상부위의 저산소 상태가 창상치유 과정에 미치는 영향을 살펴보면, 첫번째로 저산소 상태는 섬유아세포에 의한 TGF- β 의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{10,11} TGF- β 는 창상치유 과정에서 섬유아세포의 증식과 세포기질의 합성을 조절하는 역할을 하는 중요 성장인자이며, Falanga 등⁹은 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. Steinbrech¹⁰, Yang¹³ 등은 1998년 켈로이드 섬유아세포 배양에서 저산소 상태가 VEGF의 발현량을 증가시킨다는 것을 보고하였는데, 혈관생성과 켈로이드 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 등¹⁰은 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 HIF-1(hypoxia-inducible factor 1)¹², 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. 이와 같이 태아의 창상치유에서 가장 중요한 역할을 하는 섬유아세포가 저산소 상태에 따른 반응에 대해서는 여러가지 실험결과 등이 다른 결과를 나타내고 있다. 이외에도 Yang 등¹³은 태아의 경우 TGF- β isoforms이 어른에 비하여 적게 존재하여 일정시기에 발현이 감소되며, 성인과는 달리 TGF- $\beta_{1,2}$ isoform보다는 TGF- β_3 isoform의 비율이 높다는 것을 보고하였다. 또한, 태아 창상에 외인성 TGF- $\beta_{1,2}$ 를 가한 경우 반흔이 유발되며, 어른의 창상에 TGF- β 의 항체를 가하면 반흔을 감소시킬수 있음도 보고하였다. 하지만, 태아의 저산소화 상태가 반흔 없는 창상 치유 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 차이가 있는지를 알아보기 위해 태아와 어른의 섬유아세포를 배양하여 저산소 상태와 이에 따른 재산소화를 유발하였을 때 각각의 섬유아세포의 성장속도, 제1형 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 알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 조직 채취 및 세포 배양

태아 섬유아세포는 임신 중기(임신 20 주 전후)의 태아 피부에서 분리 배양된 섬유아세포 사용하였으며, 성인 섬유아세포는 성인진피(human adult dermal skin)에서 채취하여 사용하였다. 섬유아세포의 배양은 Waymouth 의 방법에 따라 시행하였다. 조직을 petri dish 위에 놓고 phosphate-buffered saline(PBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)용액을 7ml 가한 후, pasteur pipette 으로 용액을 올렸다 내렸다하면서 세포를 분리시킨다. 약 10 분 후 penicillin(300units/ml), streptomycin(300 μ g/ml), actinomycin(25 μ g/ml)과 열비활성화 시킨 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 배양용액으로 사용하여 100ml 를 가한 후 원심분리기에서 3500RPM 으로 15 초간 원침시켜 침전물을 제거한 후 다시 20 분간 원침시켜 침전물을 모아 배양용액 5ml 에 부유시켜 세포배양용기에 옮겼다. 이 후 2-3 일간격으로 배양용액을 갈아주면서 섬유아세포가 자라서 배양용기 바닥을 완전히 채울 때까지 배양한다. 일차 세포배양이 confluent state 가 되면 일차 세포배양 용기내에 있는 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 씻어낸 후 0.025% trypsin 2 ml 를 가하여 배양용기

밑바닥에 부착된 세포를 완전히 분리해낸 다음 세포들을 모았다. 실험에서는 5 세대 계대 배양세포까지만 사용하였다. 이 배양된 세포를 hemocytometer 를 계측하여 2×10^5 개를 다른 세포배양기에 넣고 4 개의 실험군으로 나누어 약품조작을 하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 을 배양액으로 사용하여 95% 대기, 5% CO₂ , 37°C 에서 3 일간 배양하였다. 이후 저산소 상태가 필요한 경우 37°C, 95% N₂, 2% O₂ 3% CO₂ 를 관류하는 용기 내에서 24 시간, 48 시간, 72 시간 동안 배양하여 저산소 상태를 유도 하였으며 재산소화가 필요한 경우 다시 95% 대기, 20% O₂, 5% CO₂ , 37°C 하에서 48 시간동안 배양하였다.

2. 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 : 72시간동안 저산소화 상태를 유도하여 배양된 태아 및 성인 섬유아세포

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

3. MTT assay를 이용한 세포 활성도 측정

각각 실험군의 세포 활성도를 MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (SIGMA, M-5655, USA)를 이용하여 측정하였다. MTT assay 의 원리는 배지에 MTT substrate 를 넣어 주면 살아 있는 세포 mitochondria 의 mitochondria dehydrogenase 가 반응하여 insoluble colored formazan 이 생성되게 되고 따라서 살아 있는 세포만이 특이적으로 염색되는 방법이다. 5µg/ml 의 MTT reagent 를 제조하여 일정기간 배양한 세포에 배지와 MTT reagent 를 1:4 비율로 처리하고, 혼드는 상태로 37°C 에서 4 시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 pellete 을 PBS 로 2 회 세척 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해(lysis)시켜 ELISA reader 를 이용하여 570nm 에서 측정하였다.

4. 제 1형 교원질 합성량

섬유아세포로부터 분리된 교원질의 양을 측정하기 위해 Sircol Collagen Assay kit(Ireland)를 사용하였다. 이 방법은 먼저 각각의 실험군의 배지를 100µl 씩 취해 Sircol dye reagent 1ml 과 0.5M acetic acid 100µl 를 혼합하여 dye 와 교원질이 결합할 수 있게 30 분간 혼합하여 원심분리하여 pellete 을 취하였다. 이 때 pellete 은 dye 와 교원질이 결합되어 있는 형태로, 이렇게 얻어진 pellete 은 몇 번의 세척

과정을 거쳐 1ml 의 alkali reagent 로 용해하였다. 충분히 pellete 을 녹인 후 ELISA reader 를 이용하여 570nm 에서 측정하였다.

5. 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 코팅되어 있는 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 씩 plate에 넣어 1시간 정도 incubation 한 후 세척해 내었다. 그 후 발색시약을 이용하여 발색반응을 일으킨 후, 15분 후에 발색반응을 정지시켜 spectrophotometer에서 그 발색정도를 측정하여 대조군과 비교 정량화 하였다.

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

전체 RNA 는 TRIzol reagent (GIBCO Lab. Calif., USA)를 이용한 acid guanidine method 를 사용하여 분리하였고, 증류수로 처리한

diethylpyrocarbonate(DEPC, SIGMA, USA)에 용해 시켰다. RT-PCR 과정은 one step RT-PCR system(GIBCO Lab. USA)를 이용하였다. 반응은 25 μ l 의 2X reaction mixture, 1 μ l 의 enzyme mixture (SUPERScript II RT and recombinant Taq DNA polymerase in 20 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol(v/v), stabilizer), 200nM of each primer 와 RNA sample 3 μ l 을 혼합하여 사용하였다. RT-PCR 과정에서 정량 마크로 GAPDH 를 사용하였다. 정량마크는 GAPDH: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', GAPDH : 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'를 사용하였고, cDNA 합성은 55 $^{\circ}$ C 1 cycle 30 min, 94 $^{\circ}$ C 1 cycle 2min 조건에서 시행하였고, PCR 과정은 94 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 각 60sec, 총 35cycle 시행하였다. 제 1 형 교원질의 sense primer sequence 은 5'-GATGATGCCAATGTGGTTCGTG-3' 를 사용하였고, anti-sense 는 5'-CAGGCTCCGGTGTGACTCGT-3' 을 사용하였다. cDNA 합성은 50 $^{\circ}$ C 1 cycle 25-30 min, 94 $^{\circ}$ C 1cycle 2min 조건에서 시행하였고, PCR 은 94 $^{\circ}$ C, 64 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 각 60sec 조건에서 총 35 cycle 시행하였다. 실험조건에 따라 배양한 섬유모세포를 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(32 P a-dCTP로 labeling)가 포함된 solution에 배양한 후 세척하여

autoradiography로 발현정도를 확인하였다. VEGF에 대한 RT-PCR시 sense primer로는 5'- CTCTACCTCCACCATGCCAAG-3'를 사용하였고, anti-sense primer 로는 5'- GGTACTCCTGGAAGATGTCCACC-3' 를 사용하였다.

7. 통계학적 결과 분석

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

III. 결과

1. 저산소, 재산소화 상태에 따른 성인 섬유아세포의 변화

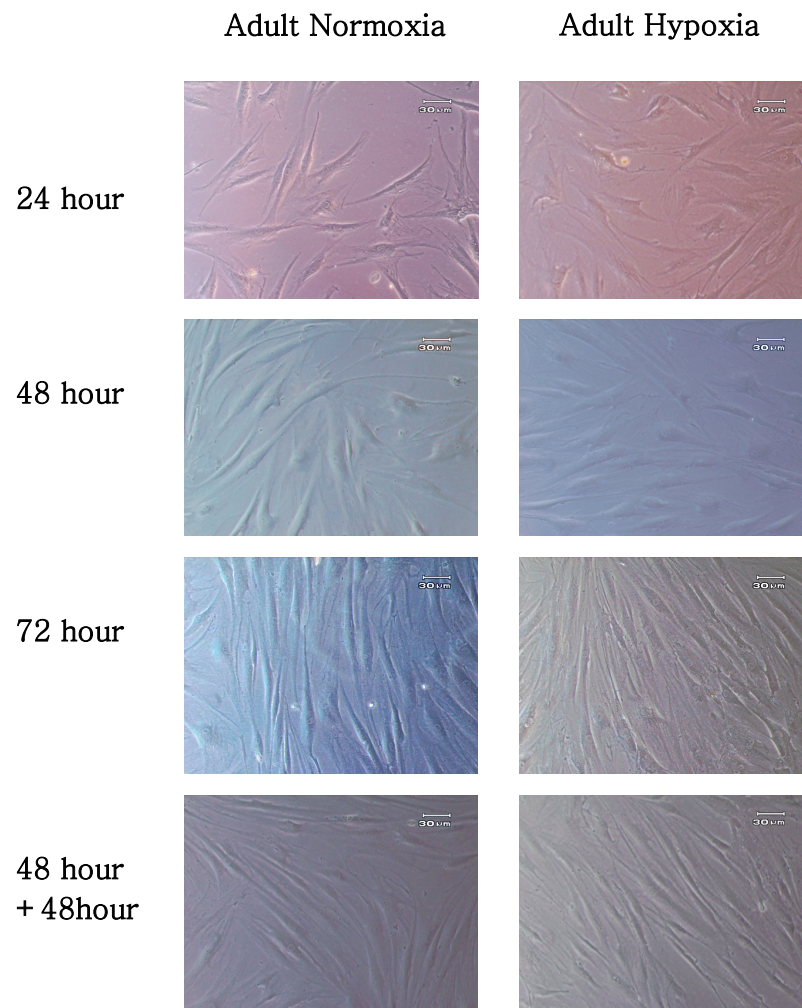


그림 1. 배양시간에 따른 저산소, 재산소 조건에서의 성인 섬유아세포의 사진. 저산소 상태 24시간, 48시간에서는 큰 차이가 보이지 않으나, 72시간째 섬유아세포의 수가 증가되어 있음을 관찰할 수 있다.

저산소 상태와 재산소화 과정에 따른 성인 섬유아세포의 세포 활성도는 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(그림 2). 저산소화 상태에서 교원질 합성량이 증가하였고, 다시 재산소화 상태에서 교원질 합성량이 감소하였으나, 통계적으로 유의한 결과는 아니었다(그림 3). TGF- β 의 경우 저산소 상태에서 정상 산소 분압상태보다 큰 변화를 보이지 않았다(그림 4). VEGF의 경우, 저산소 상태에서 24 시간, 48 시간, 72 시간 모두에서 VEGF 분비량이 통계적으로 매우 유의하게 증가됨을 알 수 있었고, 재산소화 시켰을 때에는 증가상태가 지속되었다(그림 5). TNF- α 의 경우 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(그림 6).

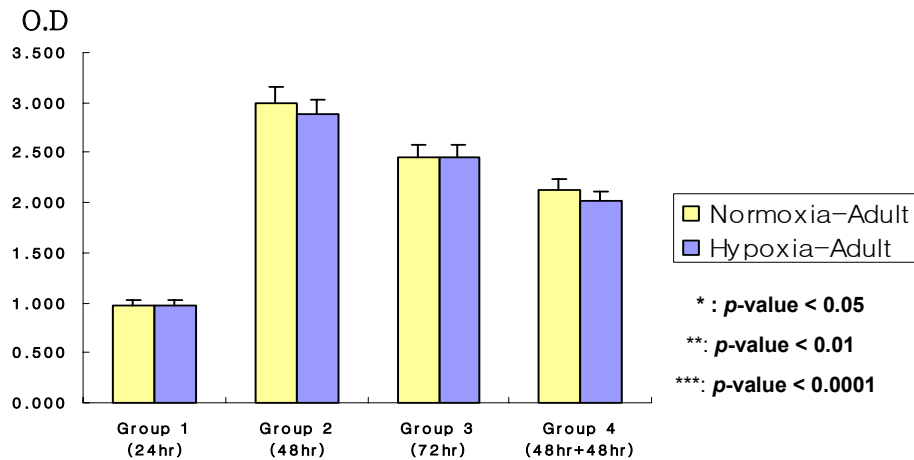


그림 2. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포 세포 활성도의 비교 (MTT assay). 성인 섬유아세포의 저산소, 재산소 조건하에서 세포 활성도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

O.D

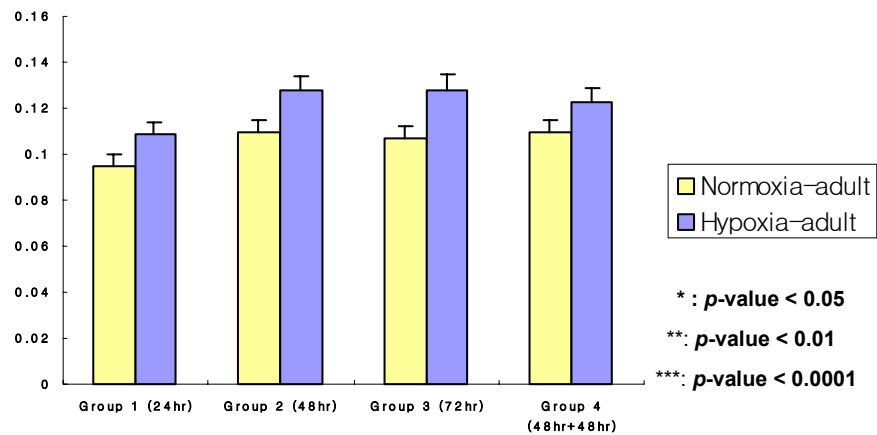


그림 3. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 교원질 합성량의 비교. 성인섬유아세포의 교원질 합성량은 저산소 조건에서 정상산소 조건에 비해 모든 군에서 다소 높았으나, 통계적인 의의는 없었다.

O.D

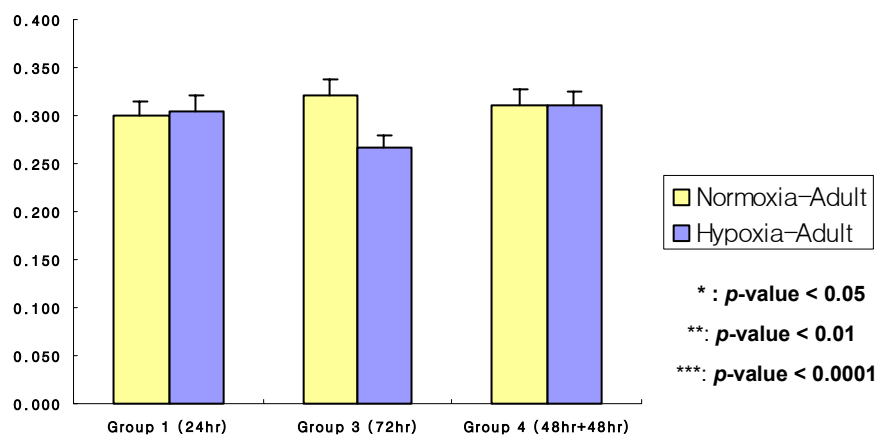


그림 4. 저산소, 재산소 조건하에서의 성인 섬유아세포의 TGF- β 분비량의 비교. 저산소, 재산소 상태에 따른 성인섬유아세포의 TGF- β 분비량은 정상산소 조건과 유의있는 차이를 보이지 않았다.

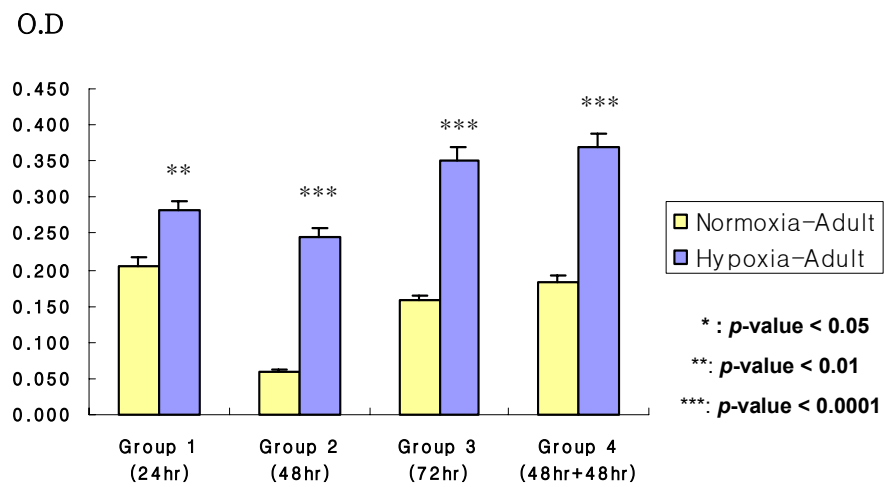


그림 5. 저산소, 재산소화 조건하에서의 성인섬유아세포의 VEGF 분비량의 비교. 성인의 경우, VEGF 분비량은 모든 군에서 저산소 조건에서 통계적으로 매우 유의하게 증가함을 관찰할 수 있다.

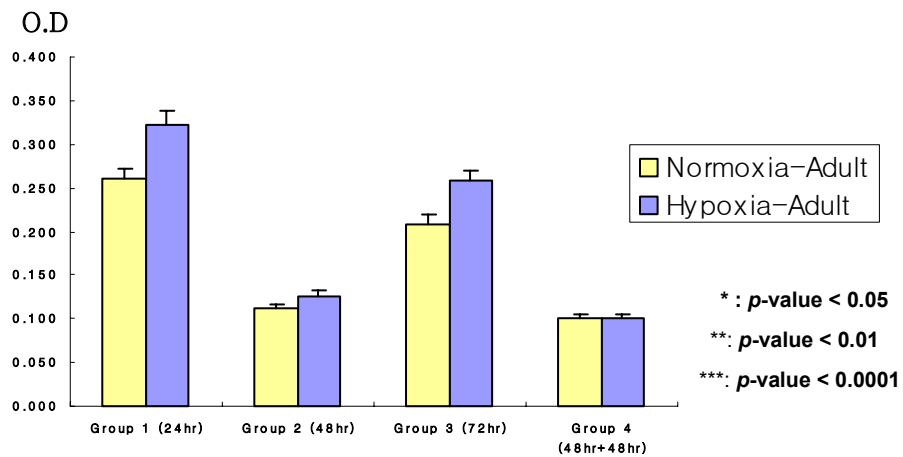


그림 6. 저산소, 재산소화 조건하에서의 성인 섬유아세포의 TNF- α 분비량의 비교. 성인 섬유아세포의 TNF- α 분비량은 저산소 상태에서 다소 증가하였으나, 통계적인 의의는 없었다.

2. 저산소, 재산소화 상태에 따른 태아 섬유아세포의 변화

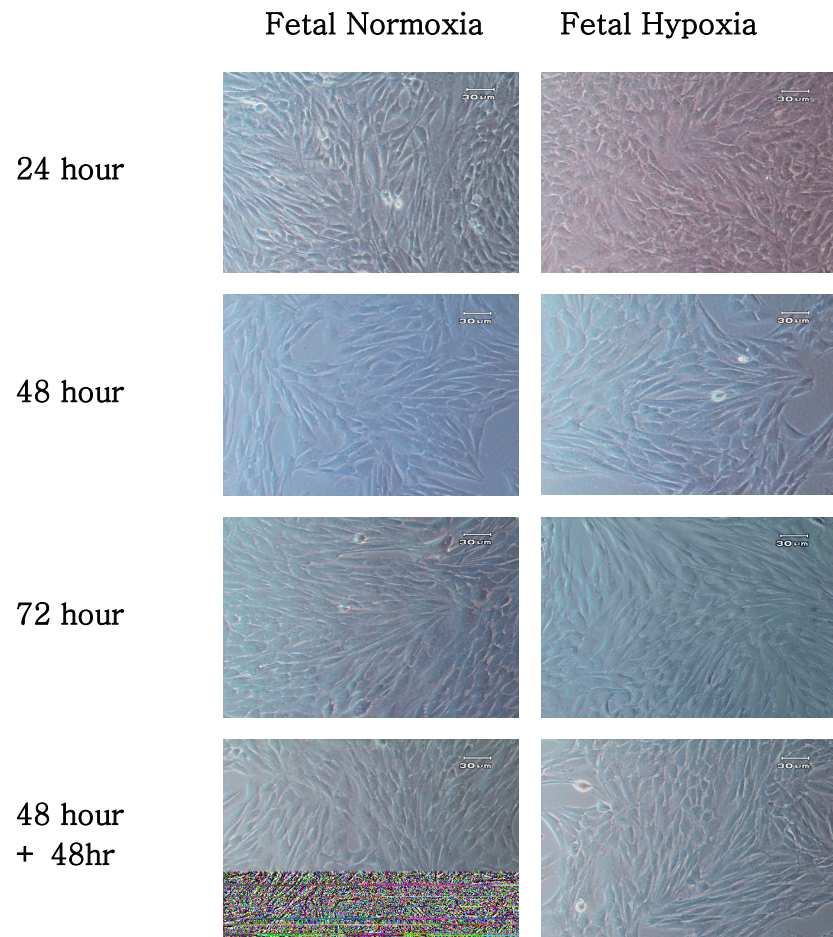


그림 7. 배양시간에 따른 저산소,재산소 조건에서의 태아 섬유아세포의 배양사진. 24 시간, 48 시간 저산소 상태에 따른 태아 섬유아세포의 수는 다소 증가하고, 72 시간 저산소 상태 및 재산소화 상태에서는 세포 수가 감소함을 관찰 할 수 있다.

저산소 상태와 재산소화에 따른 태아 섬유아세포 세포활성도는 저산소 상태가 지속됨에 따라 증가하는 소견을 보였고, 재산소화 조건에서 세포의 수가 감소하는 양상 보였지만, 통계적으로 유의한 변화를 보이지는

않았다(그림 8). 교원질 합성량을 비교해 보면 태아 섬유아세포의 경우, 저산소 상태에서 다소 합성량이 증가하였고, 재산소 상태에서 다소 감소하는 추세를 보였으나, 통계적으로 유의한 결과는 아니었다(그림 9). 저산소 상태 72 시간에 태아 섬유아세포의 경우, 통계적으로 유의한 TGF- β 의 증가 소견을 보였다(그림 10). 태아 섬유아세포의 경우, 저산소화시켰을 때, 역시 24 시간, 48 시간, 72 시간후에 VEGF 분비량이 통계적으로 매우 유의하게 증가하였고, 재산소화시켰을 경우 분비량이 감소하였다(그림 11). TNF- α 의 경우 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(그림 12).

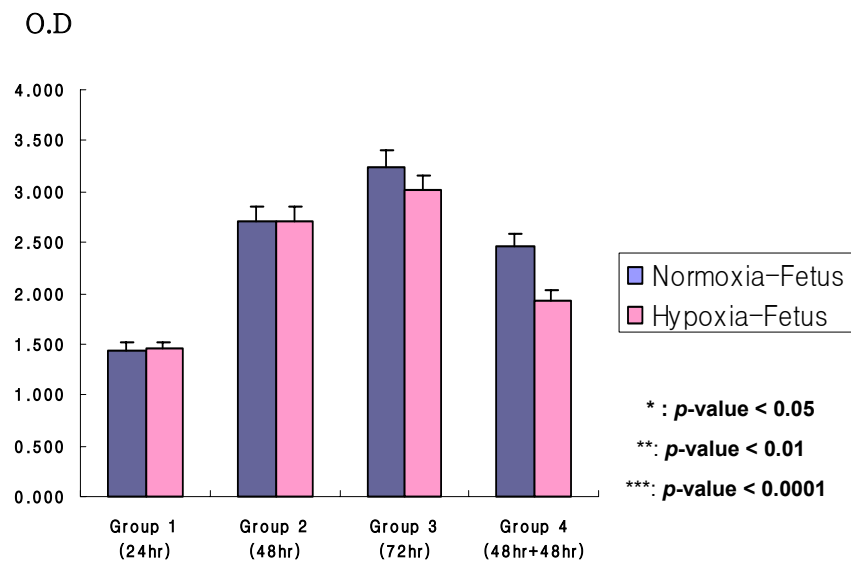


그림 8. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포 활성도의 비교
정상 산소분압 상태의 태아 섬유아세포에 대한 저산소 상태의 태아 섬유아세포 세포 활성도의 비교에서 태아 섬유아세포의 경우, 저산소 상태에 따른 세포활성도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

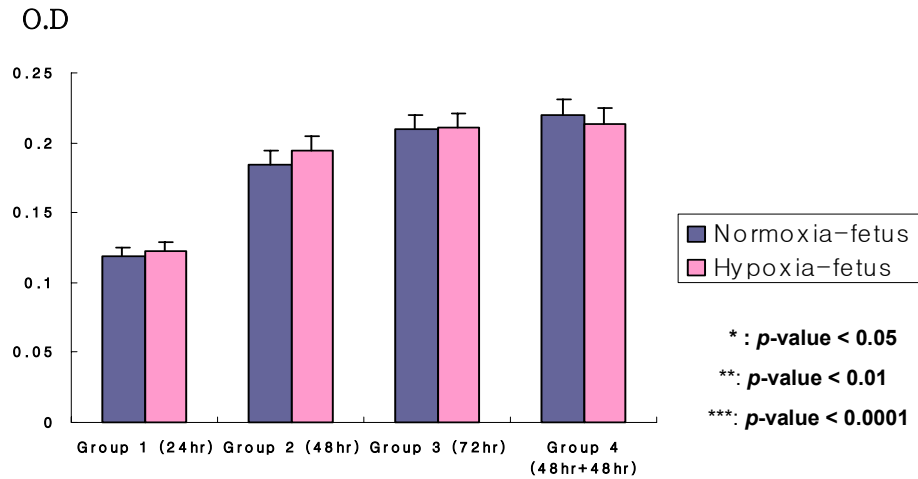


그림 9. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 교원질 합성량의 비교. 정상 산소분압 상태의 태아 섬유아세포에 대한 저산소 상태의 태아 섬유아세포 교원질 생성량은 1,2,3 군에서 다소 증가하는 양상이었고, 4 군에서 다소 감소하는 양상을 보였으나, 통계적인 유의성은 없었다.

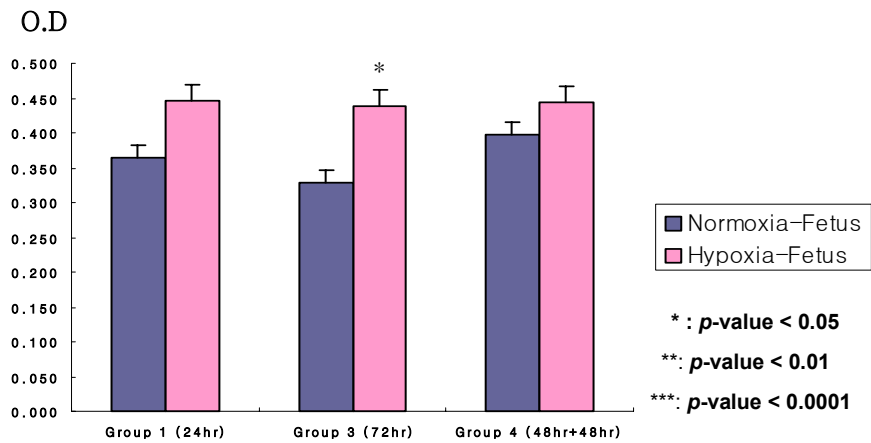


그림 10. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 TGF- β 의 비교.

3 군에서 저산소 상태의 태아 섬유아세포의 TGF- β 분비량이 통계적으로 유의하게 증가됨을 관찰할 수 있었다.

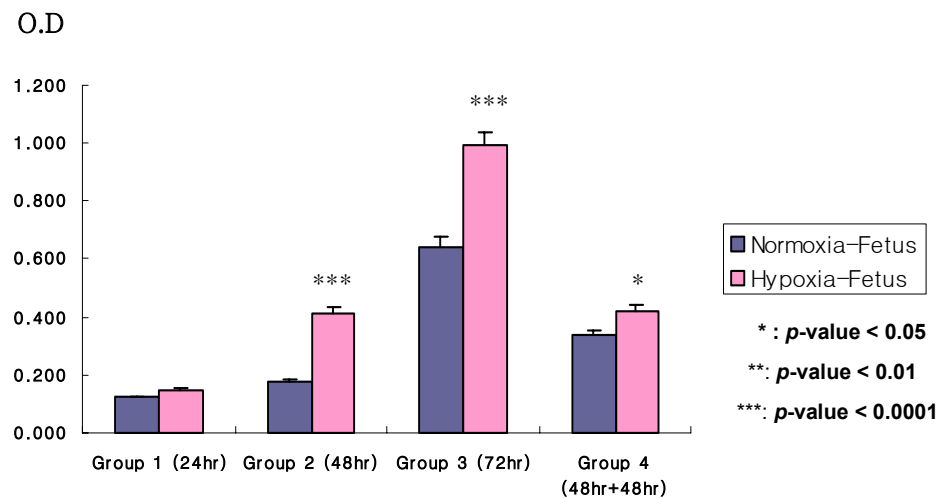


그림 11. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 VEGF의 비교.

정상 산소분압 상태의 태아 섬유아세포에 대한 저산소 상태의 태아 섬유아세포 VEGF 분비량의 비교하여 보면, 1 군을 제외한 모든 군에서 태아 섬유아세포의 VEGF 분비량이 통계적으로 유의하게 증가하였다.

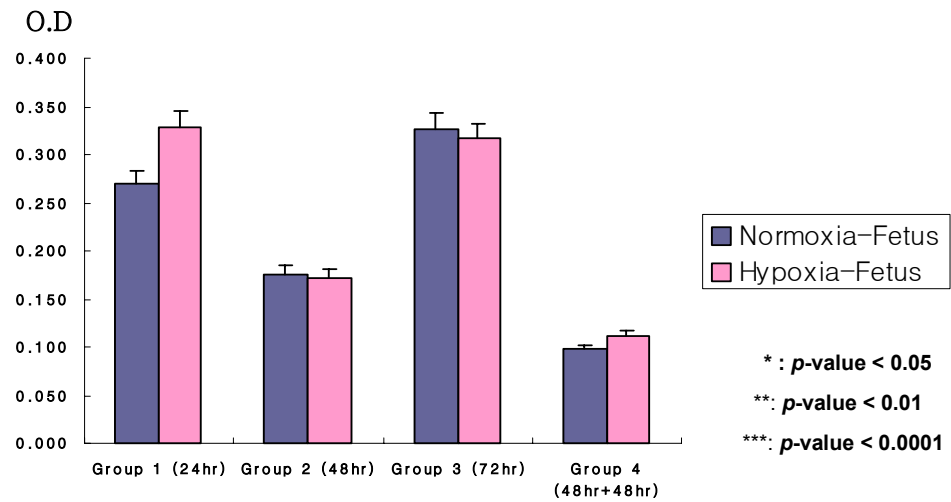


그림 12. 저산소, 재산소 조건하에서의 태아 섬유아세포의 TNF- α 의 비교. 정상 산소분압 상태의 태아 섬유아세포에 대한 저산소 상태의 태아섬유아세포 TNF- α 분비량의 비교하여 보면, 모든 군에서 유의한 태아 섬유아세포 TNF- α 분비량의 차이를 보이지 않았다.

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

성인 및 태아 섬유아세포 모두에서 전체적으로 저산소 상태가 지속됨에 따라, 세포의 숫자가 증가하는 양상을 보였고, 저산소 상태 24 시간과 72 시간에 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 세포 활성도가 통계학적으로 유의하게 더 증가하였음을 관찰할 수 있었으며, 재산소화 시켰을 때, 섬유아세포의 수가 감소하였지만, 통계적으로 유의한 결과는 아니었다(그림 13).

제 1 형 교원질 합성량을 비교하여 본 결과, 저산소화 상태 48 시간, 72 시간에 태아 섬유아세포에서 성인 섬유아세포에 비해, 통계적으로 유의하게 교원질 합성량이 증가하였고, 재산소화 시킨 경우에도 교원질 합성량의 증가가 유지되었다(그림 14).

TGF- β 의 경우 태아 섬유아세포에서 성인 섬유아세포에 비해 통계적으로 유의하게 저산소화 72 시간째에 증가된 소견 관찰 하였고, 재산소화 조건에서도 분비량이 증가되어 있었다(그림 15). 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 경우, VEGF 분비량이 통계적으로 매우 유의하게 증가하였고, 48 시간 다시 재산소화 시켰을 때 분비량이 감소하였지만 성인에 비해서는 유의하게 증가 소견을 유지하였다. 특히 저산소 72 시간째 현저히 증가되고, 재산소화 경우에도 증가소견이 유지됨을 확인할 수 있었다(그림 16). TNF- α 의 경우 통계적으로 유의한 변화를

보이지 않았다(그림 17). 그리고, 저산소 상태에서 제 1 형 교원질 mRNA 의 발현을 살펴본 결과, 태아 섬유아세포에서 더 많이 발현된 것을 관찰할 수 있었다(그림 18).

VEGF 의 mRNA 발현량을 RT-PCR 로 살펴본 결과, 태아 섬유아세포의 경우, 성인 섬유아세포의 경우와 비교해서 VEGF 발현량이 증가된 소견을 관찰할 수 있었다(그림 19).

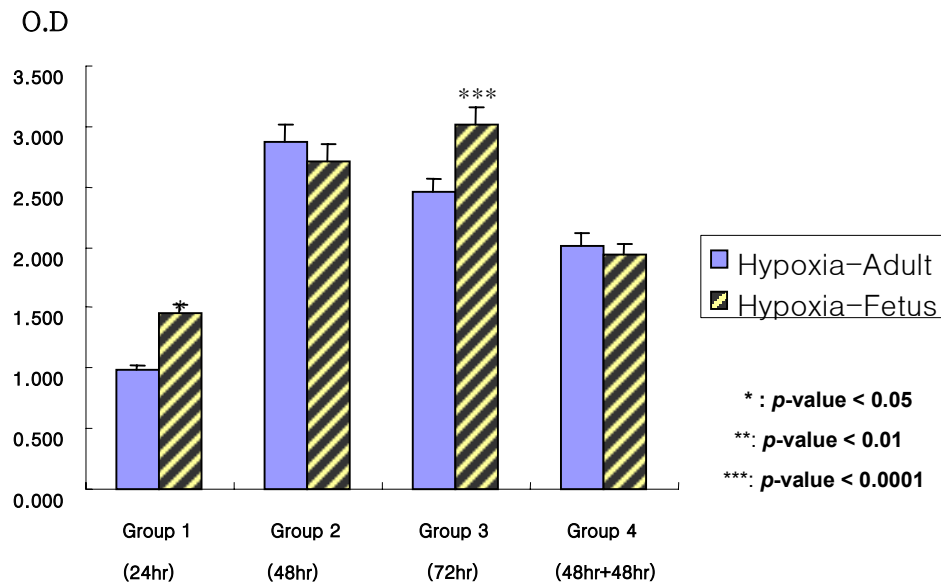


그림 13. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포 활성도의 비교. 저산소 상태 및 재산소화 과정에 따른 성인 및 태아 섬유아세포 세포 활성도를 비교하여 보면, 1군과 3군에서 통계적으로 유의하게 태아 섬유아세포의 세포 활성도가 증가함을 관찰할 수 있었다.

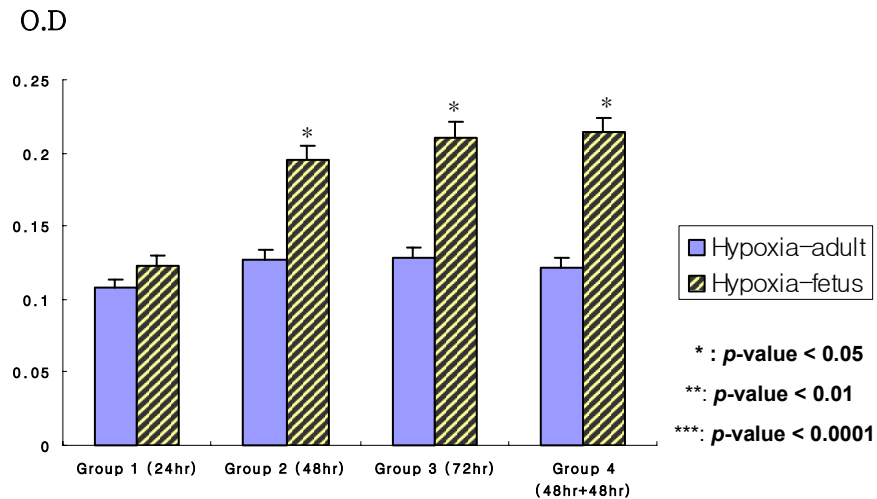


그림 14. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 제1형 교원질 합성량의 비교. 2, 3, 4 군에서 태아 섬유아세포의 제1형 교원질 합성량이 통계적으로 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었다.

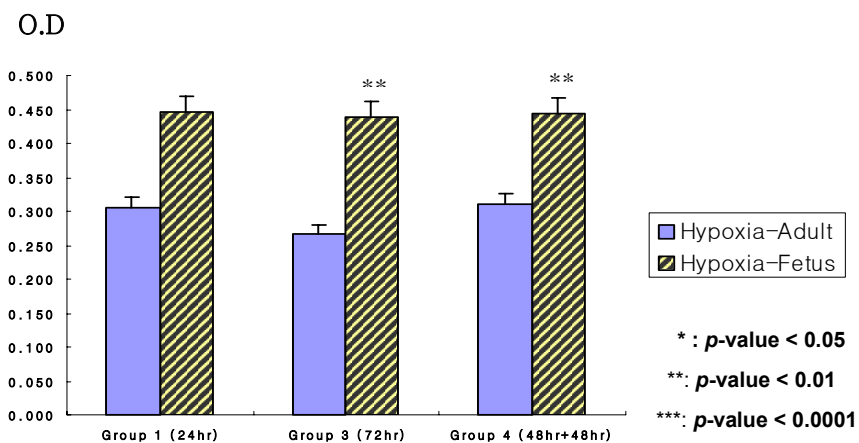


그림 15. 저산소 상태 및 재산소화 과정에 따른 성인 및 태아 섬유아세포의 TGF- β 분비량이 3 군과 4 군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다.

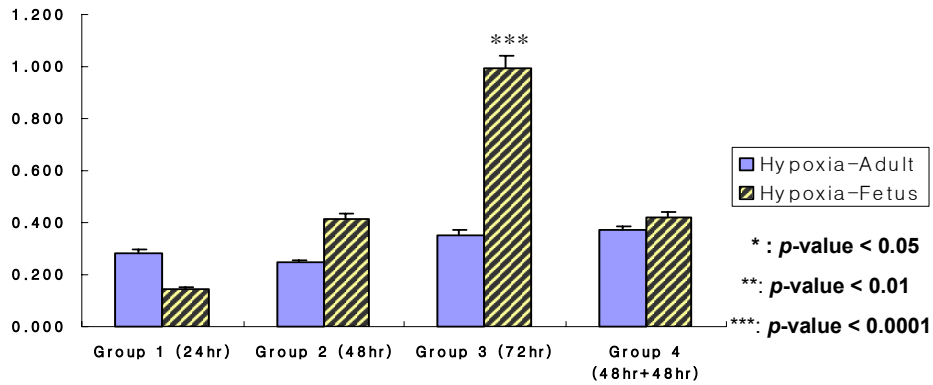


그림 16. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 VEGF 분비량의 비교. 저산소 상태 및 재산소화 과정에 따른 성인 및 태아 섬유아세포에 의한 VEGF 분비량은 정상 산소 분압상태에 비해 3군에서 통계적으로 매우 유의하게 증가한 소견을 관찰할 수 있었다.

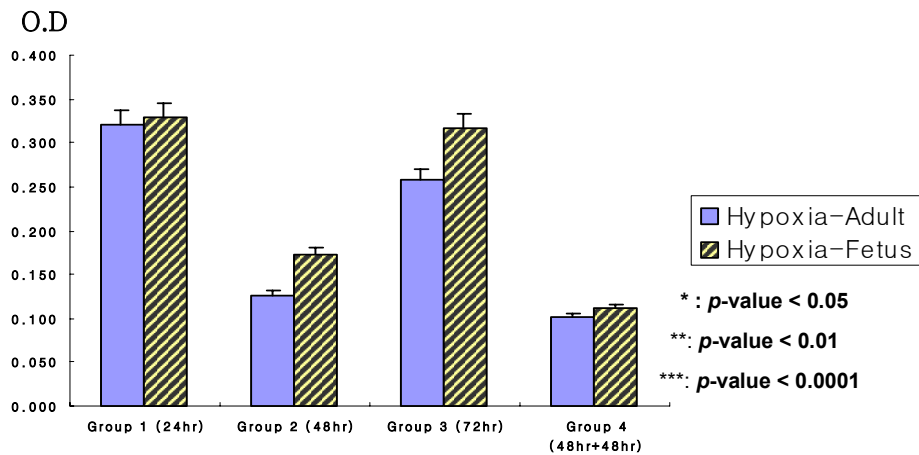


그림 17. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포의 TNF- α 분비량의 비교. 모든 군에서 유의한 성인군과 태아 섬유아세포 TNF- α 분비량의 차이를 보이지 않았다.

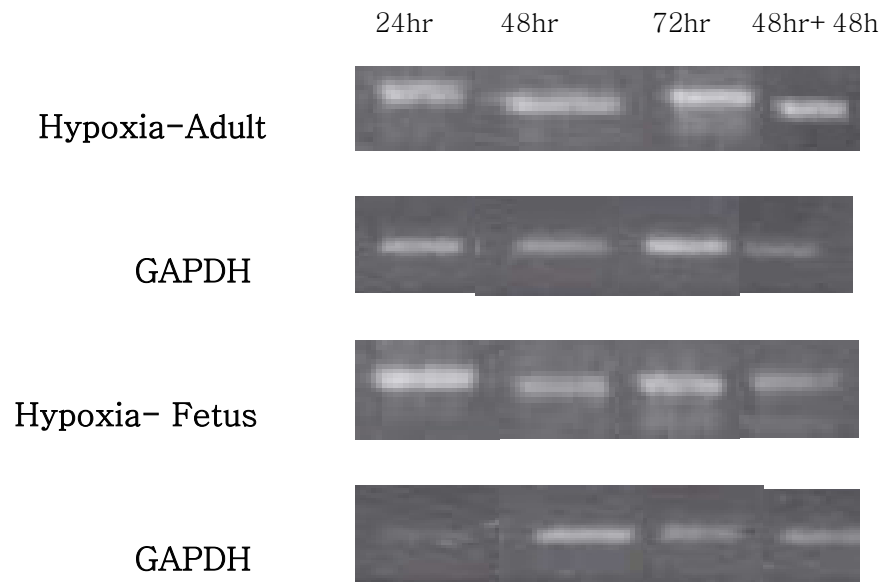


그림 18. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포 VEGF mRNA 발현량의 비교. 제 1 형 교원질의 mRNA 발현이 태아에서 성인에 비해 증가되어 있다.

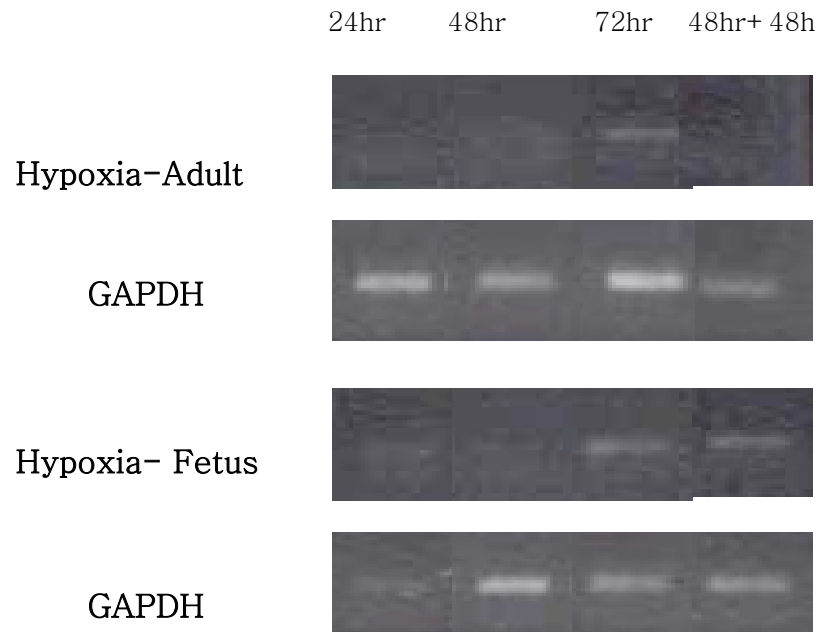


그림 19. 저산소 및 재산소 조건하에서의 성인 및 태아 섬유아세포 VEGF mRNA 발현량의 비교. 저산소 및 재산소화에 따른 태아 섬유아세포의 VEGF 의 mRNA 발현이 성인에 비해 증가되어 있음을 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

섬유아세포는 교원질과 세포외기질의 합성을 통해 창상치유와 섬유화 과정에 있어서 중요한 역할을 한다. 창상치유 수일 내에 섬유아세포는 저산소 환경의 창상으로 이동하는데, 창상 주위의 섬유아세포의 여러 분비는 저산소 환경에 반응하여 이루어 지는 것으로 알려져 있으며,⁹ 이러한 저산소 환경이 창상치유에 영향을 미쳐 반흔형성에 중요한 역할을 한다는 점은 확실히 밝혀지지 않았다.¹⁴⁻²³

본 연구에서는 이러한 저산소 미세 환경(hypoxic microenvironment)이 성인 창상치유과정에서 섬유아세포의 증식, 제1형 교원질 합성량, TGF- β , VEGF 등의 분비와 연관되어있다는 지금까지의 보고를 기초로, 태아 섬유아세포와 성인 섬유아세포간에 저산소 및 재 산소화 환경에서 상대적으로 어떠한 반응의 차이를 보이는가를 밝혀 봄으로써, 성인 창상치유와는 달리 창상없이 치유되는 것으로 알려진 태아의 창상치유 기전과 저산소 환경과의 연관관계를 밝혀 보고자 한 것이었다.

저자들은 저산소 상태에 반응하는 태아 섬유아세포의 세포 활성도와 교원질 합성량, 각종 성장인자 발현량의 차이가 반흔없는 태아 창상치유의 기전을 일부 밝힐 수 있을 것이라는 가설하에 본 연구를 진행하였다. 특히, 저산소 상태에 의해 태아 섬유아세포에서 TGF- β

발현량이 감소함으로써, 교원질 합성량의 감소가 유도되어 반흔없는 창상치유에 기여할 것이라는 가설과, 강력한 신생혈관 생성물질(angiogenetic factor)로 알려진 VEGF의 경우, 태아섬유아세포에서 발현이 증가하여 혈관생성(angiogenesis)를 촉진함으로써, 반흔없는 창상치유가 가능하다는 가설을 설정하였다.

저산소 및 재산소 환경에서 섬유아세포의 세포 활성도를 살펴본 결과, 태아 섬유아세포의 증가량이 성인 섬유아세포 증가량보다 증가함을 확인할 수 있었다. 성인 섬유아세포의 경우는 정상 산소환경에 비해 저산소 조건에서 시간이 지남에 따라 다소 증가하는 양상을 보였으나, 통계적으로 유의한 변화는 보이지 않았다. 태아 섬유아세포의 경우는 정상 산소 분압에서 보다 저산소 조건 24시간, 72시간에서 유의하게 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 태아 섬유아세포가 성인 섬유아세포에 비해 저산소환경에 반응하는 정도가 다름을 반영하는 것이라고 사료되며, Mackool¹, Longaker² 등이 보고한 바와 같이 태아 섬유아세포 자체가 성인 섬유아세포와 표현형의 차이(phenotypic difference)가 있음을 보여주는 것으로 생각된다. 또한, 성인 및 태아 섬유아세포간의 상대적인 섬유아세포 수 증가량의 비교에서 태아 섬유아세포의 증가가 유의하게 더 크게 나온 결과는 이러한 추론을 뒷받침하고 있다.

교원질 합성량의 경우 성인, 태아 섬유아세포 각각의 경우에는

정상 산소분압과 저산소화 상태에서 교원질 합성량의 차이는 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았으며, 태아와 성인 섬유아세포를 비교해 보면, 태아 섬유아세포의 교원질 합성량 증가가 통계적으로 유의하게 더 컸다. 이러한 교원질 합성량의 증가가 생체에서 반흔의 증가를 의미하는 것인지에 대해서는 이번 연구만으로는 알 수 없었지만, 반흔없는 태아 창상치유의 경우 교원질 침착 형태가 성인반흔과는 달리 망상형(reticular pattern)으로 이루어진다는 점을 고려하여 보면, 교원질 합성량의 증가가 반흔을 증가시킨다고는 할 수 없을 것이다. 즉, 반흔없는 창상치유는 교원질 합성량의 차이보다는 교원질의 배열이 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어², 이러한 결과가 창상 형성에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 교원질의 수축 정도 등이 고려 되어야 할 것이다. 또한 본 연구에서는 제1형 교원질 mRNA 발현을 조사 하였는데 이는 제1형 교원질 합성량이 태아 창상치유 과정에서의 제3형 교원질 합성량에 비해 절대적으로 많고 창상치유와 가장 연관이 되는 것이어서 교원질 type에 따른 연구는 시행하지 않았고 제1형을 대표로 교원질 합성량을 측정하였다.

창상치유에는 이러한 섬유아세포 수와 교원질 합성 이외에도 각종 성장 인자들이 관련되어 있다. 특히, 저산소 환경에서는 각종 성장인자들의 증가된 발현으로 인해 섬유아세포의 증식이 촉진된다고 알려져 있다. 이중에서 창상치유 및 섬유화에 중요한 역할을 한다고

알려진 TGF- β 의 경우는 저산소 환경에서 TGF- β 의 증가로 인해 제1형 콜라겐 합성량이 증가하고, 교원질 교환(turnover)이 감소한다고 알려져 있다.⁹ 본 연구에서 저산소 환경에 의해 유도되는 TGF- β 이 태아 섬유아세포에서 발현량이 감소함으로써, 교원질 합성량의 감소가 유도되어 반흔없는 창상치유에 기여할 것이라는 가설과는 달리 태아 섬유아세포에서 TGF- β 의 합성량이 성인 섬유아세포에 비해 유의하게 증가하였다. 이것은 두가지 경우로 살펴 볼 수 있는데, 첫번째로 TGF- β isoform에 따른 차이를 구별해 내지 못한 때문일 가능성이 있다. Yang 등¹³에 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 감소 시키는 것으로 알려져 있다.¹³ 반면, 반흔없는 창상치유에서는 TGF- β_3 isoform의 상대적인 비율이 증가한다고 하였다. 따라서, 본 연구에서 증가된 TGF- β 분비량 및 발현량에 대해서 TGF- β isoform이 각각 얼마나 차지하는 가에 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, 반흔없는 창상치유의 경우 교원질의 배열이 성인 창상과는 다르고, 또한 증가된 VEGF에 의해서 반흔의 remodeling이

촉진되어서 창상치유가 아닌 창상 재생이 이루어진다고 생각된다.

지금까지 많은 연구가 진행되어온 TGF- β 이외에도 최근에는 VEGF에 관한 연구가 활발히 보고되고 있다. Steinbrech 등¹⁰은 배양된 인간 피부세포, 즉, 각질형성세포(epidermal keratinocyte), 진피섬유아세포(dermal fibroblast), 진피 미세혈관 내피세포에서 24시간 저산소환경에서 VEGF mRNA 의 발현이 증가(upregulation)됨을 보고하였다.¹⁰ Trompezinski 등¹⁹은 저산소환경에서 인체 일차 섬유아세포(human primary fibroblast)의 VEGF mRNA 발현의 증가를 보고하였다. 신생혈관 생성과정은 창상의 재생과 회복에 있어서 가장 중요한 정상 생물학적인 과정임을 확인할 수 있으며¹³, 만성 창상의 치유나 흉터없는 태아의 창상 치유과정에서 혈관생성이 매우 중요한 역할을 하고 있음이 보고 되고 있다.²⁴⁻²⁶ 이번 연구의 결과, VEGF의 경우 태아 섬유아세포의 경우에 성인 섬유아세포와 비교하여 저산소 환경에서 분비량이 24시간, 48시간, 72시간에서 모두 통계적으로 유의있게 증가하였는데, 이는 상대적으로 저산소 환경에 있게 되는 태아에서 창상이 발생할 경우, VEGF 발현 증가에 따른 혈관신생 증가가 태아의 흉터 없는 창상 치유에 중요한 단서로 작용할 것을 알수 있다.

VEGF는 하나의 유전자에 의해 생산되는 다양한 isoform이 알려져 있으나, 일반적으로 반흔이 발생하는 경우보다 반흔없는 창상치유의 경우에서 그 발현이 2배 정도 증가되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서

성인과 태아 섬유아세포 각각의 경우, 저산소 환경 24, 48, 72시간에 모두 정상산소 분압(normoxia)상태에 비해 통계적으로 매우 유의있게 증가하였는데, 이는 지금까지 알려진 보고들과 일치하였다. Yang 등¹³에 의하면, VEGF는 가장 강력한 혈관생성 물질의 하나로, 반흔없는 창상의 경우 VEGF, PDGF, FGF-2 와 같은 혈관생성 촉진 성장인자들에 의해 혈관생성이 활성화 되어 있음이 알려져 있다.¹³ 이는 곧 VEGF 분비량 증가가 혈관생성과정을 통해 반흔없는 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 다를 것을 보여주는 결과로서 의의를 갖은 것으로 생각된다. 또한, 이는 RT-PCR을 통한 mRNA 발현량 증가로도 확인할 수 있었는데, VEGF의 분비량 증가가 mRNA 수준에서의 유전자 발현의 증가에 기인함을 알 수 있었다.

Mehta 등^{29,30}은 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, 세포내 nitric oxide synthase 발현, 혈관내피(endothelium)에의 중핵구의 유착(neutrophil

adherence)를 감소시키는 등의 다양한 기전으로 재산소화에 따른 조직손상의 보호가 가능하다고 알려져 있다.^{27,28} 재산소화에 따른 TGF- β 의 분비량과 mRNA 발현량이 태아섬유모세포에서 성인 섬유모세포 보다 더 증가하였는데, 이는 재산소화에 따른 조직손상을 최소화하기 위한 것으로 태아에서의 흉터없는 창상 재생 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)하며 저산소 환경에서 TGF- β 의 발현 및 분비량이 증가하였고 VEGF역시 분비 및 발현량이 증가하였는데, 이는 혈관생성 과정을 통해 반흔 없는 창상치유에 기여하는 기전의 일부로 생각되며 이에 대한 세포학적 분자 생물학적인 추가 연구가 필요할것으로 생각된다.

V. 결론

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

1. 저산소 상태 24시간, 72시간에 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 세포 활성도에는 유의한 차이가 없었다.
2. 저산소 상태에서 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 제1형 교원질 합성량 및 type I collagen mRNA 발현량이 유의하게 높았고, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다.
3. 저산소 상태 72시간에 성인 섬유아세포에 비해 태아 섬유아세포의 TGF- β 의 분비량이 유의하게 증가되었으며, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다.
4. 저산소 상태에서 태아 섬유아세포가 성인 섬유아세포에 비해 VEGF의 분비량 및 mRNA 발현량이 유의하게 높았으며, 재산소화 상태에서도 증가 소견이 유지되었다.

이상의 결과로 보아 태아 섬유아세포의 경우 성인 섬유아세포보다 저산소 및 재산소화 조건에서 TGF- β , VEGF의 발현 및 분비량이 증가하며, 이러한 태아 섬유아세포의 특성이 반흔 없는 창상치유에 기여하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Mackool, R.J, Gittes, G.K, Longaker, M.T. Scarless healing : the fetal wound. Clinic Plast Surg 1998;25:357-365.
2. Longaker, M.T., Adzick, N.S. The Biology of fetal wound healing : A review . Plast Reconstr Surg 1991;87:788-798.
3. Stelnick, E.J., Chin, G.S., Gittes, G.K., Longaker, M.T. Fetal wound repair: where do we go from here? Seminars in Pediatric Surgery 1999;8:124-129.
4. Lorenz, H.P. , Whitby, D.J., Longaker, M.T., Adzick, N.S. Fetal wound healing : The ontogeny of scar formation in the non-human primate. Ann Surg 1993;217 :391-396.
5. Sancho, M.A., Julia, V., Alber, A., Diaz, F., Morale, L. Effect of the environment on fetal skin wound healing. J Ped Surg 1997;32:663-666.
6. Siebert, J.W., Burd, A.R., McCarthy, J.G., Weinzwieg, J.W., Ehrlich, H.P. Fetal wound healing : A biochemical study of scarless healing. Plast Reconstr Surg 1990;85: 495-502.
7. Chang, J., Longaker, M.T., Lorenz, H.P., Robert, A.B., Harrison, M.R., Adzick, N.sS. Fetal and adult sheep fibroblast TGF- β_1 gene

- expression in vitro: effects of hypoxia and gestational age. Surg Forum 1993;44:720-728.
8. Adzick, N.S., Lorenz, H.P. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon : the biology of scarless fetal wound repair. Ann Surg 1994;220:10-18.
 9. Falanga, V., Qian, S.W., Daniel puor, D., et al. Hypoxia upregulates the synthesis of TGF- β_1 by human dermal fibroblasts. J. Invest Dermatol 1991;97:634-637.
 10. Steinbrech, D.S., Longaker, M.T., et al. Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts. Ann Plast Surg 1999;42:514-520.
 11. Scheid, A., Wenger, R.H., Gassmann, M., et al. Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. Pediatr Surg Int. 2000;16:232-236.
 12. Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H. Hypoxia-inducible factor 1 level vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension Am J Physiol 1996;271: 1172-1177.
 13. Yang GP, Lorenz HP, Longaker MT. From scarless fetal wounds to keloids: Molecular studies in wound healing Wound Rep Reg 2003;11: 411-418.
 14. Papakonstatinou E, Aletras AJ, Karakiulakis G. Hypoxia modulates

- the effects of transforming growth factor- β isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* 2003;24: 25-35.
15. Buchler P, Reber HA, Hines OJ. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2003;26:56-64.
 16. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda FD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation : auto-paracrine role during endochondral bone formation *J of Cell sci* 2000;113:59-69.
 17. Stelnicki E, Chin GS, Gittes GK, Longaker MT. Fetal wound repair: Where do we go from here? *Seminars in Pediatric surgery* 1999;8:124-130.
 18. Amemiya K, Kaneko Y, Muramatsu T, Shimono M Inoue T. Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Eur J Oral Sci* 2003;111:332-338.
 19. Trompezinski S, Denis A, Schmitt D, Viac J. Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D by normal human keratinocytes and fibroblasts. *Experimental Dermatology* 2004;13:98-105.

20. Julia MV, Alber A, Morales L, Miro D, Sancho A, Garcia X. Wound healing in the fetal period: The resistance of the scar to rupture. *J of Ped Surg* 1993;28:1458-1465.
21. Berger AP, Kofler K, Bartsch G, Klocker H. Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *The prostate* 2003;57:65.
22. Kan C, Abe M, Yamanaka M, Ishikawa O. Hypoxia-induced increase of matrix metalloproteinase-1 synthesis is not restored by reoxygenation in a three-dimensional culture of human dermal fibroblasts. *J Dermatological Sci.* 2003;32:75-82.
23. Eichler W, Yafai Y, Kuhrt H, Wiedemann P, Reichenbach A. Hypoxia: modulation of endothelial cell proliferation by soluble factors released by retinal cells. *NeuroReport* 2001;12:182-187.
24. Oettgen P. Reviews : Transcriptional regulation of vascular development *Circulation Research* 2001;31 380-388.
25. Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family: proteins which guide the development of the vasculature. *Int. J. Exp Pathol* 1998;79:244-251.
26. Hirschi KK, Rohovsky SA. PDGF, TGF-beta and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of

- 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. J Cell Biol. 1998;141:805-811.
27. Norman JT, Clark IM, Garcia PL. Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. Kidney international 2000;58:2351-2366.
28. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. J. Clin Invest. 1999;106:1511-1518.
29. Mehta JL, Chen HF et al. Protection of Myocytes from hypoxia-reoxygenation injury by nitric oxide is mediated by Modulation of transforming growth factor- β_1 Circulation 2002;105:2206-2211.
30. Mehta JL, Yang BC, Strates BS, et al. Role of TGF- β_1 in platelet-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. Growth factors 1999;16:179-187.

Abstract

Effect of Hypoxia and Reoxygenation
on cultured human dermal fetal fibroblast

Hyug Jun Kwark

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Beyoung Yun Park)

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 wound healing. Recently, the various effects of the hypoxia and reoxygenation in the wound healing process have been investigated by many reseachers. Hypoxia state has effects on various aspects of wound healing. Its effects include alterations in the deposition of collagen, protein synthesis and expression of various cytokines, growth factors and fibroblast itself.

The hypoxic state is known to alter protein synthesis and gene expression of TGF- β , VEGF, and tissue injury by oxygen-free radicals formed during the reoxygenation process has been also investigated by many researcher.

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), TNF- α (tumor necrosis factor- α) under the various hypoxic and reoxygenation conditions. Through these processes, we tried to determine the relationships between scarless fetal wound healing and hypoxic condition.

Fetal fibroblasts aquired from human dermis in a 20 week-gestational aged fetus were cultured according to the Waymouth method. Adult fetal fibroblasts were obtained from an adult human dermis. The control group was the cultured fetal and adult fibroblasts under normoxic conditions. The experimental groups were allocated into four different groups. MTT assay and the differences in TGF- β ,

VEGF, TNF- α under 24, 48, 72 hours were investigated. The results were compared with the control group and statistically analyzed.

The number of fetal fibroblast were increased in conditions of hypoxia state for 72 hours compared to the adult fetal fibroblast group. The amount of collagen deposition was also increased in the fetal fibroblast group. Compared to adult fibroblast group, there was a statistically significant increase ($p < 0.01$) in the rates of protein synthesis in TGF- β and VEGF of fetal fibroblast.

Through this study, we found that under the hypoxic conditions, the protein synthesis and gene expression of TGF- β , VEGF are enhanced in the fetal fibroblast groups compared to the adult fibroblast groups. 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, TNF- α