태아와 성인의 배양된 섬유아세포의 교원질 합성양상의 비교

나동균 · 노태석 · 박병윤 · 이광훈
연세대학교 의과대학 성형외과학교실, 연세대학교 의과대학 피부과학교실

With the development of antenatal diagnostic tools such as ultrasonography, some congenital anomalies or diseases can be detected in early fetal life. Routine serial antenatal check-ups have made it possible to predict the prognosis of these problems, and a few life-threatening single anatomic malformations have been treated by open fetal surgery. The experience of fetal surgery revealed that the human fetus appears to heal without any scarring. In contrast to adult animals, the response to tissue injury in the fetus is conspiciously devoid of acute inflammation. Indeed, the absence of neutrophils is perhaps the most consistent observation in fetal wounds and seems to be followed by absent or scanty fibroblast infiltration, which results in healing with sparse and well organized collagen deposition. Actually, the amount and quality of the collagen deposition were decided by the fibroblasts which infiltrated the wound. It is well known that fetal wounds have sparse collagen deposition, however, the mechanisms are still unclear. This study was designed to evaluate the role of fibroblast activity in the differences of the scar formation between the fetus and neonate. Fibroblast activity such as the cell growth rate, the amount of collagen synthesis and the synthesized collagen types of fetus (IUP 18 - 22 weeks) was compared with that of neonate. The amount of collagen synthesis was measured by H-proline uptake and the amount of collagen type III was measured by Western blot using antihuman procollagen type III. The cell growth rate as determined by cell proliferation from the initial cell count of 5 x 10^5 to cell confluence was 3.6 x 10^6 in the fetal fibroblasts compared to 2.5 x 10^6 in neonatal fibroblasts. Fetal fibroblast synthesize 16.9 x 10^4 cpm of collagen and neonatal fibroblasts synthesize 2.7 x 10^4 cpm of collagen. The synthesized amount of type III collagen was 2.1 x 10^4 ug/ml, and 1.5 x 10^4 ug/ml by fetal and neonatal fibroblasts, respectively. In conclusion, fetal fibroblasts grow faster and synthesize a smaller amount of collagen, but produce more type III collagen than neonatal fibroblasts.

Key Words: Fetal wound healing, Fibroblast, Collagen.

Dong Kyun Rah, M.D., Tai Suk Roh, M.D. Beyoung Yun Park, M.D., Kwang Hoon Lee, M.D. Comparative study of the Characteristics of Collagen Synthesis by Cultured Fibroblasts in the Fetus and Adult. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg 106: 377-382, 1999*

From the Department of Plastic Surgery, Yonsei University College of Medicine. Department of Dermatology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Address Correspondence to Dr. Dong Kyun Rah, M.D. Department of Plastic Surgery Yonsei University College of Medicine Shinchon Dong 134, Seodaemoon Ku Seoul, 120-752, Korea, Fax: 02) 393-6947 / E-mail: dkrah@yumc.yonsei.ac.kr

"이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음"
"The authors wish to acknowledge the financial support of the Korea Research Foundation made in the program year of 1997"

I. 서 론

산모의 산전 초음파진단과 같은 첨단 진단장비의 발달로 임신초기에 태아의 기형이나 병변을 정확하게 진단할 수 있게 되었으며, 태아의 지속적인 추적관찰로 그 예후 판정이 가능하여 일부 생명을 위협하는 기형이나 병변의 경우 태아수술이 가능하게 되었다. 태아의 창상은 반흔이 형성되지 않고 치유된다는 것은 이미 받아들여지고 있는 사실이다.

태아의 창상치유과정이 성인의 창상치유와 기본적으로 다른 것은 성인에서 나타나는 전형적인 급성 염증반응이 없거나 미약하며, 섬유아세포의 침윤이 없거나 극히 제한되고 콜라겐의 과다한 침착 없이 정상조직과 같이 규칙적인 배열을 보인다는 점이다.

창상치유에서 반흔형성에 가장 중요한 역할을 하는 콜라겐은 전적으로 창상치유과정에서 창상으로 유주(migration)한 섬유아세포에 의해 합성되므로, 섬유아세포의 증식과 각각의 섬유아세포내에서의 콜라겐 합

성능력은 반흔형성의 판단에 매우 중요한 역할을 한다 그러나 태아의 창상이 반흔 없이 치유되는 기전에서 태아의 섬유아세포의 역할을 규명할 만한 기초적인 연구는 매우 빈약한 상태이다. 그러므로 저자는 인간태아와 신생아의 피부내 섬유아세포를 분리 배양하여, 각각의 세포의 성장 속도, 콜라겐 합성의 양과 콜라겐의 특성을 비교관찰하여 태아에서 반흔 없이 치유되는 기전의 일부를 밝히고자 아래와 같은 실험을 시도하였다.

II. 재료 및 방법

가. 태아 및 신생아 진피 섬유아세포의 분리 배양

각기 다른 연령의 성인개체로부터 배양된 진피 섬유아세포의 증식속도 및 특성에 차이가 있으므로 본 연구에서는 신생아 피부로부터 얻은 진피 섬유아세포를 사용하였다. 섬유아세포의 분리 및 배양은 Waymouth의 방법[1]에 따라서 실시한다. 임신 약 20주(18주-22주)의 태아 및 신생아 피부를 채취하여 phosphate buffered saline(PBS)용액(1 liter용액에 sodium chloride 8 g, potassium chloride 0.2 g, disodium hydrogen phosphate 1.15 g, potassium dihydrogen phosphate 0.2 g을 포함한 phosphate buffer saline용액, pH 7.4) 20 ml를 사용하여 2회 세척하고, 조직을 수술칼로 잘게 절단한 후, 다시 PBS용액으로 세척하였다. 이 피부조직에 미리 37℃ 에서 평형시킨 0.25% trypsin(KC Biological 회사제품)용액으로 세포를 분리한다. 약 10분후 penicillin(300 units/ml), streptomycin(300 ug/ml)과 열비활성화시킨 10% fetal calf serum이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM) 10 ml를 가한 후, 2500 rpm에서 10분간 원침시켜서 침전물을 배양용액 5 ml에 부유시켜 세포배양 용기에 옮겼다. 이 세포들을 5% CO_2, 37℃ 에서 배양하였다.

나. 배양된 섬유아세포의 성장속도

총 5 x 10^5 개의 태아 및 신생아 섬유아세포를 분리 배양한 후 세포융합이 관찰되는 배양 3일 후 hemocytometer를 이용하여 총 세포수를 측정하였다.

다. 배양된 태아 및 신생아 섬유아세포의 콜라겐 합성양

태아와 신생아 섬유아세포에서의 콜라겐 합성은 Diegellemann[2] 방법으로 측정하였다. 태아와 신생아의 섬유아세포(10 x 10^5)를 배양 디스크 내에 10% 우태혈청이 첨가된 DMEM으로 3일간 배양한 후, 혈청을 분리해 내고 20 uCi/m 3H-proline을 첨가하여 배양하였다. 24시간후 배양액을 제거하고, 10000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액의 단백은 5% TCA 용액으로 침전시켰다. 각 검체의 침전된 단백은 콜라겐용액(0.05M tris., pH 7.4, 0.15M NaCl, Triton X-100, 3mM N-ethylamide, 0.6mM $CaCl_2$) 50 ug/ml을 첨가 혹은 첨가하지 않은 상태에서 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. Collagenase 반응은 0.5% tannic acid가 첨가된 10% TCA용액으로 중지시켰다.

반응하지 않은 단백은 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전시킨 후, 상층액을 채취하여 liquid scintillation counter로 방사선 라벨된 콜라겐을 측정하였다. 응집침전물은 0.1N sodium hydroxide로 용해시켜 radioactivity를 측정함으로써 비콜라겐성 단백을 측정하였다. 섬유아세포에서 생성된 총 콜라겐양은 collagenase 반응액내 총 radioactivity와 sodium hydroxide로 처리하여 얻은 세포액의 radioactivity를 합하여 계산하였다.

라. Western blot을 이용한 콜라겐 type III의 정량분석

McDonald 등[3]의 방법에 따라 세포 배양판에서 배양액을 제거한 후, 세포층을 차가운 PBS용액 으로 3회 세척한다. 세포층은 0.5 ml 1 x cold lysis buffer로 용해시켜 얼음위에 약 5분간 방치한다. 용해된 액을 얼음 위에서 5초간 4회 sonicate 하였다. 각 검체의 단백은 12000 rpm으로 10분간 원심분리하여 8% SPS polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동후 gel은 약 1시간 동안 12 Volt에서 nitrocellulose membrane에 transfer하였다.

Blot한 membrane을 blocking buffer(2% wt./vol. skim milk가 포함된 TBST)에 넣고 실온에서 1시간동안 방치한다. 그 후 blot을 0.05% TBST로 세척하여, 0.1% wt./vol. skim milk로 희석한 primary antibody(1 : 500/1 : 800, antihuman goat anti-procollagen type III Ab, Chemicon, Ca, USA)를 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

Blot을 다시 TBST로 4회 세척한 후 ECL solution과 반응시켜 현상시킨 후 현상된 band를 SPS-PAGE standard(Bio-rad)와 비교하여 분석하였다.

III. 결 과

가. 배양된 태아 및 신생아 섬유아세포의 성장속도

동일한 배양조건에서 태아의 섬유아세포는 평균 3.6

x 10^6개, 신생아 섬유아세포는 평균 2.5 x 10^6개로 태아 섬유아세포의 성장속도가 신생아에 비교하여 약 144% 빠른 결과를 보여주었다(p = 0.01, independence sample test)(Fig. 1).

나. 배양된 태아 및 신생아 섬유아세포의 콜라겐 합성양

배양된 세포의 콜라겐 합성양을 H-proline의 세포내 이동양으로 간접적으로 측정한 결과, 배양된 태아 섬유아세포가 평균 2.7 x 10^4 cpm, 배양된 신생아 섬유아세포가 평균 16.9 x 10^4 cpm으로 태아 섬유아세포가 신생아 섬유아세포에 비하여 평균 16%로 콜라겐 합성량이 훨씬 작은 결과를 보여주었다(p = 0.006, independence sample test)(Fig. 2).

다. Western blot을 이용한 콜라겐 type III의 정량 분석

세포내의 콜라겐 type III의 양을 antihuman goat anti-type III procollagen antibody(Chemicon, Ca, USA)를 이용하여 정량분석한 결과 배양된 태아 섬유아세포가 평균 2.1 x 10^4 ug/ml, 배양된 신생아 섬유아세포가 평균 1.5 x 10^4 ug/ml로 태아 섬유아세포가 신생아 섬유아세포에 비하여 평균 1.4배의 콜라겐 type III 합성양이 많은 결과를 보여주었다(p = 0.01, independence sample test)(Fig. 3).

IV. 고 찰

조직내에 과다한 콜라겐 침착은 창상에서의 비후성 반흔이나 켈로이드 형성으로 인한 추형뿐만 아니라, 간경화, 폐장 섬유화증, 수술후 장유착 등 임상적으로 해결하기 어려운 문제와 연관되어 진다.

최근 초음파 등의 진단방법의 발달로 태아의 기형을 임신초기에 발견하여 일부 태아의 생명을 위협하는 해부학적 기형의 태아수술이 가능하게 되었다. 그 결과 태아수술 후에는 피부창상반흔이 전혀 없이 정상적인 조직구조로 치유되는 것이 관찰되었다. 이런 소견은 임신중기에서 간엽조직 증식에 의한 무반흔

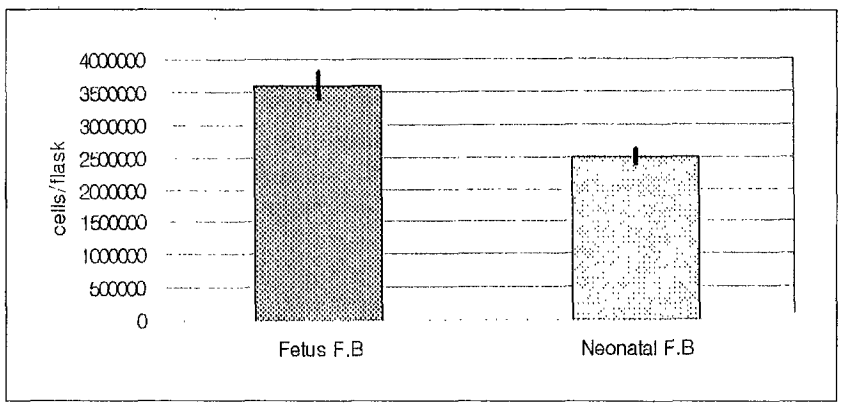

Fig. 1. The growth rate(cells/flask) of fetal and neonatal fibroblasts. The fetal fibroblasts grow faster than neonatal fibroblasts($p < 0.05$). F.B: Fibroblast

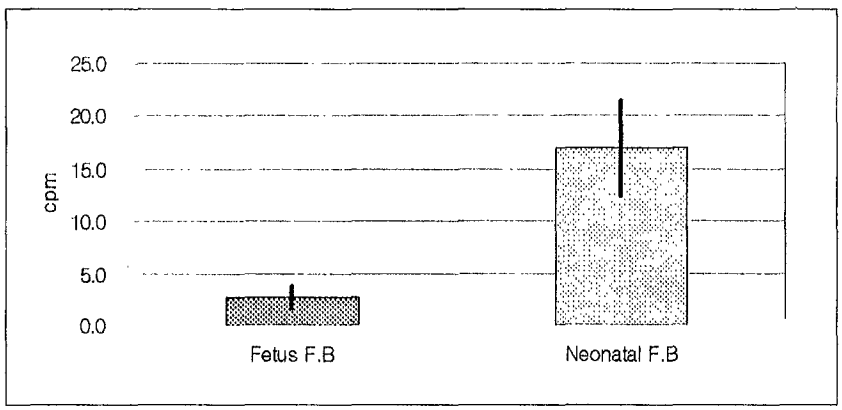

Fig. 2. The total amount of collagen(cpm) synthesized by cultured fetal and neonatal fibroblast respectively. The fetal fibroblsts synthesize a smaller amount of collagen($p < 0.05$). F.B: Fibroblast

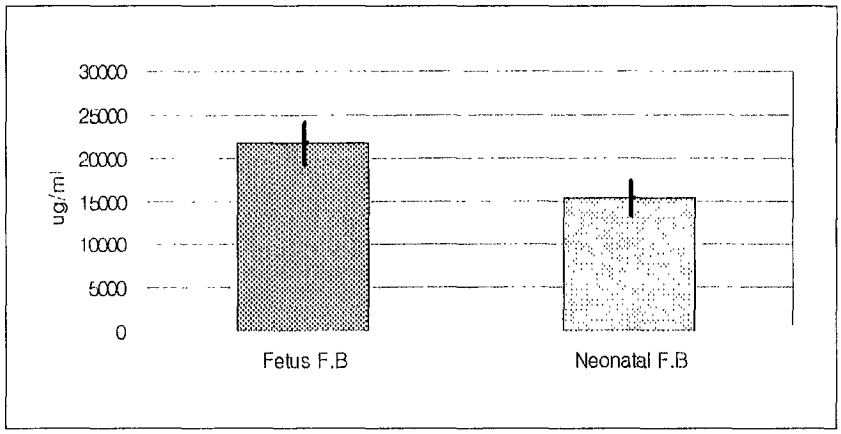

Fig. 3. The synthesized amount of type III collagen(ug/ml) by fetal and neonatal fibroblasts, repectively. The fetal fibroblasts produce more type III collgen than neonatal fibroblasts($p < 0.05$). F.B: Fibroblasts

성 치유가 입증된 Rowlatt의 증례에서도 확인되었고,[4] 또한 쥐, 가토, 양 및 유인원 등의 많은 동물실험을 통하여서도 태자와 성숙개체간의 창상치유 차이점을 보여주었다.

임신중기의 태자의 창상치유 과정에서 특징적으로 염증반응이 전혀 없거나 극히 미약한데, 태자에서 급성염증이 유발되지 못한다는 가설로는 태아의 면역체계가 성숙되지 못하여 immunoglobulin G(IgG)를 생산하지 못하므로 성숙개체와 비교하여 백혈구가 수적으로 적고,[5] 백혈구 자체의 주화성(chemotaxis) 및 식작용(phagocytosis)이 감소되어 있으며, 여러가지 효소(enzyme) 계통이 성숙되지 못한 점, free radical을 hydroradical로 전환시키는 능력이 감소되어 있는 등이 제시되어 왔다. 또한 일부 보체(complement)는 성인과 유사하게 측정이 가능하나 대부분 성인에 비하여 그 양이 적은데,[6] 이러한 물질의 결핍은 백혈구 주화성의 감소의 원인이 된다고 추측된다. 태아에서의 염증반응의 불현 및 감소는 섬유아세포의 활성 및 출현으로 이어지는 세포간 상호작용을 극소화시켜, 콜라겐의 침착이 미약하거나 침착 없이 치유되는 소견을 보여주고 있다. 그러나 태자의 모든 조직이 반흔 없이 치유되는 것은 아니다. 태자의 피부, 골 조직은 반흔 없이 신속히 치유되는 반면에, 중배엽에서 발생된 복막(peritonieum)이나 늑막(pleura)은 수술후 많은 반흔이 형성된다는 보고가 있고,[7] 실험적으로도 태자에서 polyvinyl alcohol(PVC), formyl methionyl leucine phenylalanine(FMLP)이나 모체의 창상에서 유도되는 물질, 그리고 성인의 창상치유에서 육아조직 및 염증을 유발하는 transforming growth factor-B(TGF-B), platelet derived growth factor(PDGF) 등의 성장인자(polypeptide growth factor) 등을 조직 내에 삽입하면 급성염증을 유발하며 교원질이 침착된다는 보고가 많다. 또한 이러한 성장인자에 의해 유발된 염증은 그 정도가 투여농도와 비례한다고 보고되었다.[8]

창상치유에서 반흔형성에 가장 중요한 역할을하는 콜라겐은 전적으로 창상치유 과정에서 창상에 유주한 섬유아세포의 콜라겐 합성에 의지하므로 섬유아세포의 증식과 각각의 섬유아세포 내에서의 콜라겐 합성능력은 반흔형성에 매우 중요한 역할을 한다. 태자창상기질에서의 콜라겐 합성량 및 역할을 측정하기 위하여 많은 실험적 방법과 실험동물이 이용되어 왔으나, 태자창상에서 콜라겐의 존재 및 역할은 아직도 불분명하다. Siebert[9]는 cellulose sponge를 이용하여 가토 태자창상에서 콜라겐의 존재를 확인하였으나, Krummel[10]은 polyvinyl alcohol(PVA) sponge를 이용한 태자창상의 검체물에서 비교적 신빙성이 있는 HPLC 검사법으로도 콜라겐이 검출되지 않는다는 서로 상반되는 결과를 보고하였다. Hallock & Merkel은 태자백서창상의 추출물과 정상조직의 콜라겐 type I과 III을 비교측정한 결과, 콜라겐 type I과 type III의 분포는 태자의 창상과 정상조직 사이에 유사한 비율을 보였다.[11] 동일한 실험에서 창상의 추출물을 Masson's trichrome 염색을 시행한 결과 태자창상에서 풍부한 콜라겐이 염색되었으며 hydroxyproline의 양도 성숙개체에 비하여 높게 측정되었다. 실험관 실험에서 태자가토의 섬유아세포는 성숙가토 섬유아세포보다 콜라겐 합성에 있어서 훨씬 활발하다는 보고가 있으며, Thomas 등은 제 1, 2의 단계(passage)의 콜라겐 합성양을 비교한 결과 태자에서 성숙개체에 비교하여 수배 많다는 것을 보고하였는데 이는 본 실험의 결과와 상반된다.[12]

Hussain과 Hunt는 인간태아와 성인과 비교한 결과

수임 20주까지는 태아에서 prolyl hydroxylase activity가 높으나 임신후기에는 성인의 수준으로 떨어지는데, 태아세포에서의 prolyl hydroxylase의 활성은 성인세포와는 달리 poly-ADP-ribose synthetase에 의하여 조절된다고 보고하였다.[13] Durham은 가토에서 배자기, 태자기, 성숙가토로 성장하면서 섬유아세포가 변화하는 과정에 세포표면의 TGF-B의 receptor의 수가 점차적으로 감소하여 TGF-B의 친화력이 감소한다고 보고하면서, 섬유아세포 자체보다는 주변의 growth factor나 섬유아세포 표면의 receptor에 대한 문제의 가능성을 제시하였다.[14]

실제로 콜라겐 type I, III, IV는 정상 중배엽이나 결체조직에, 콜라겐 type V는 피부나 혈관내피 세포의 basement membrane에 태자, 신생개체, 성숙개체 모두에 광범위하게 분포되어 있으나, 태자에서는 성숙개체에 비하여 type III가 type I보다 많은 부분을 차지하고 있다. 창상치유과정에서는 태자, 신생개체, 성숙개체에 따라 출현시기는 다소 다르다. 실험동물에서 콜라겐 type III는 태자에서 수상후 48시간에는 창상에 출현하여 72시간 후에는 reticular pattern의 콜라겐 type III가 관찰되는데 비하여, 성숙개체에서는 수상후 5일에 출현하여 12일후에야 정상 조직구조를 파괴하는 반흔형상으로 침착하게 된다. 다른 콜라겐 type I, V, VI도 이와 유사한 침착양상을 보인다. 다시 말하면 태자와 성숙개체간의 콜라겐 침착의 차이는 어떤 특정 콜라겐 종류의 문제가 아니고, 창상에 콜라겐 fibril이 침착되는 배열정도(organization)가 의미가 있다. 콜라겐 fibril의 형성은 극히 일부분만이 밝혀진 복잡한 과정으로, 각기 다른형의 콜라겐과 여러 가지 거대분자(macromolecule), 특히 glycosaminoglycans과의 고분자합(supramolecular organization)과정을 통하여 이루어 진다. 콜라겐 type I, III, V는 같은 콜라겐 fibril 내에 존재하며, 이때 서로 다른 콜라겐의 상호관계가 콜라겐 fibril의 크기를 결정한다고 하였다.[15]

본 실험에서 태아에서 분리 배양된 섬유아세포가 신생아에서 분리 배양된 섬유아세포보다 성장속도는 약 144% 증가하였으나, H-proline으로 측정한 콜라겐의 합성양에서 태아에서 분리 배양된 섬유아세포가 신생아에서 분리 배양된 섬유아세포에 비하여 14%로 작았으며, 콜라겐 type III의 양은 태아에서 분리된 섬유아세포에서 신생아에서 분리된 섬유아세포에 비하여 1.4배 많았다. 이러한 결과는 태아의 섬유아세포가 성장은 빠르나 콜라겐 합성의 양은 신생아에서 분리 배양된 섬유아세포보다 적은 반면, type III 콜라겐이 주로 합성된다고 분석할 수 있다. 본 실험에서 주요 변수인자로는 임신중기의 태아 섬유아세포가 실험동물의 태자 섬유아세포에 비교하여 미숙할 수 있다는 가능성과, 섬유아세포를 채취한 태아의 수임기간이 추정 임신기간보다 훨씬 짧을 수 있는 점을 추정할 수 있다. 그러나 일례로 실험관 내에서는 TGF-B가 endothelial cell의 성장을 억제하나 생체실험 결과에서는 많은 혈관신생을 관찰할 수 있듯이, 실험관내 실험이 수많은 복합적인 상호관계의 결과로 이루어지는 생체의 결과를 정확하게 표현하기는 한계가 있을 것으로 생각된다.

그러므로 태아 및 성숙개체의 서로 다른 창상치유기전은 임상적인 연구와 병행되어 그 연계성이 입증됨이 남은 과제로 생각되며, 임상적으로 과다한 콜라겐 축적으로 유발되는 여러 가지 난치의 질병치유의 실마리가 될 수 있을 것으로 기대한다.

V. 결 론

태아와 신생아의 피부내 섬유아세포를 분리 배양하여 각각의 세포의 성장속도, 콜라겐합성의 양과 합성되는 콜라겐의 특성을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 태아의 섬유아세포는 같은 배양조건에서 신생아의 섬유아세포보다 약 144% 더 빨리 성장하였다.
2. 태아의 섬유아세포는 신생아 섬유아세포의 콜라겐 합성양의 약 16%로 훨씬 작은 결과를 보였다.
3. 태아의 섬유아세포가 신생아 섬유아세포보다 약 1.4배의 Type III 콜라겐을 합성하였다.

References

1. Waymouth C: To disaggregate or not disaggregate. Injury and cell disaggregation, transient or permanent? *In Vitro* 19: 97, 1974
2. Diegellmann RF, Graham MF, Bryson GR: An in vitro microassay to quantitate collagen synthesis and its utility for analyzing the effects of defined inflammatory mediators. *Annals New York Acad Sci* 580: 514, 1990
3. McDonald JA, Brokelmann TJ, Matheke ML, Crouch E, Koo M, Kuhn C: A Monoclonal Antibody to the Carboxy-terminal Domain of Procollagen Type I Visualizes collagen-Synthesizing Fibroblasts. *J Clin Invest* 78: 1237, 1986
4. Rowlatt V: Intrauterine wound healing in a 20-week human fetus. Virchow's Arch 381: 353, 1979
5. Mills EL, Thompson T, Bjorkston B: The chemiluminescence response and bacteriocidal activity of polymorp-

honuclear neutrophils from newborns and their mothers. *Pediatrics* 63: 429, 1979
6. Kohler PF: Maturation of the human complement system. I: time and sites of fetal C1q, C4, C3 and C5 synthesis. *J Clin Invest* 52: 671, 1973
7. Holder TM, Ashcroft KW: The effects of bile duct ligation and inflammation in the fetus. *J Pediatr Surg* 2: 35, 1967
8. Krummel TM, Michna BA, Thomas BL: Transforming growth factor-B induce fibrosis in a fetal wound model. *J Pediatr Surg* 83: 647, 1988
9. Siebert JW, Burd DAR, McCarthy: Fetal wound healing: a biochemical study of scar less healing. *Plast Reconstr Surg* 85: 495, 1990
10. Krummel TM, Nelson JM, Diegelmann RF: Fetal response to injury in rabbit. *J Pediatr Surg* 22: 640, 1987
11. Hallock GG, Rice DC, McClure HM: In utero lip repair in the rhesus monkey. an update. *Plast Reconstr Surg* 80: 855, 1987
12. Thomas BL, Krummel TM, Melang M: Collagen synthesis and type expression by fetal fibroblast in vito. *Surg Forum* 39: 642, 1988
13. Hussain Z, Hunt TK: Inhibition of prolyl hydroxlase by poly(ADP-ribose) and phosphoribose-AMP. J Biol Chem 264: 7850, 1989
14. Durham LA, Krummel TM, Cawthorn JW, Thomas BL, Diegelmann RF: Analysis of TGF-beta receptor binding in embryonic, fetal, adults rabbit fibroblasts. *J Pediatr Surg* 24: 784, 1989
15. Brik DE, Fitch JM, Barbiaz JP, Linsenmayer TF: collagen Type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol* 106: 999, 1998