

## 켈로이드 치료약제가 켈로이드 섬유모세포의 Fibronectin, Transforming Growth Factor- $\beta$ 및 Transforming Growth Factor- $\beta$ 수용체 발현에 미치는 영향

박정민<sup>1</sup>, 이민혁<sup>1</sup>, 이근철<sup>1</sup>, 김석권<sup>1</sup>, 배혜란<sup>2</sup>, 나서희<sup>3</sup>

동아대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 생리학교실<sup>2</sup>, 병리학교실<sup>3</sup>

Keloids represent a dysregulated response to cutaneous wounding that results in an excessive deposition of extracellular matrix. However, the molecular mechanisms underlying this pathologic deposition of extracellular matrix still remain to be elucidated.

In this study, the effects of anti-keloid drugs (triamcinolone<sup>®</sup>, 5-FU<sup>®</sup>, bleomycin<sup>®</sup>, verapamil<sup>®</sup>) on the expression of fibronectin and TGF- $\beta$  and its receptor in keloid fibroblasts were evaluated *in vitro*.

Human keloid fibroblasts (KFs) and normal human dermal fibroblasts (NHDFs) were isolated from earlobe keloids. Immunoprecipitation and Western blot of fibronectin, ELISA of TGF- $\beta$  secretion and Western blot of TGF- $\beta$  receptor were performed using the primary cultured fibroblasts treated with various drugs.

TGF- $\beta$  secretion was increased in keloid fibroblasts compared to NHDFs. TGF- $\beta$  promoted fibronectin synthesis in keloid fibroblasts. These results substantiate the hypothesis that the elevated levels of TGF- $\beta$  play a potential role in keloid pathogenesis. 5-FU suppressed profoundly TGF- $\beta$  secretion. Triamcinolone and verapamil inhibited significantly fibronectin synthesis and secretion, and also suppressed TGF- $\beta$  receptor expression in keloid fibroblasts.

In conclusion, it is postulated that the combination of low dose of 5-FU and triamcinolone or verapamil may be useful in keloid treatment by the additive effect of different anti-keloid action.

**Key Words:** Keloid, Fibroblasts, Fibronectins, TGF-beta, TGF-beta receptor

## The Effects of Anti-keloid Drugs on the Expressions of Fibronectin, Transforming Growth Factor- $\beta$ and Transforming Growth Factor- $\beta$ Receptor in Keloid Fibroblast

Jung Min Park, M.D.<sup>1</sup>,  
Min Hyuk Lee, M.D.<sup>1</sup>,  
Keun Cheol Lee, M.D.<sup>1</sup>,  
Seok Kwun Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
Hae Rhan Bae, M.D.<sup>2</sup>,  
Seo Hee Rha, M.D.<sup>3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Plastic & Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Physiology, <sup>3</sup>Anatomical Pathology, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea

**Address Correspondence:** Seok Kwun Kim, M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, College of Medicine, Dong-A University, 1 Dongdaeshin-dong 3ga, Seo-gu, Busan 602-715, Korea.  
Tel: 051) 240-5413, Fax: 051) 240-5416,  
E-mail: jmpark@daunet.donga.ac.kr

### I. 서 론

켈로이드는 피부손상 시 부적절한 조절반응으로 인해 세포외기질의 과다 축적으로 인해 발생하는 보기 흉한 증식성 반흔이다. 현재까지 병적인 세포외기질의 축적을 조절하는 기전에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않으나, TGF- $\beta$ 와 TGF- $\beta$  수용체가 켈로이드의 발병기전과 관계가 있을 것이라는 것은 여러 문헌에서 보고된

바 있다.<sup>1-3</sup> TGF- $\beta$ 는 켈로이드의 병리기전에 중요한 인자로 생각되는데, TGF- $\beta$ 의 과생성은 폐섬유화<sup>4</sup>, 간경화 등<sup>5</sup>의 섬유화 질환과 연관이 있기 때문이다.

세포외기질 중 혈청 단백질의 일종이며 당단백질인 fibronectin은 창상치유 초기에 나타나 섬유모세포 및 대식세포의 이동을 유도하고 섬유모세포에서 합성된 교원질 등 이차적 세포외기질이 침착 및 배치될 수 있도록 일차적 기질로서 작용한다. 또한 세포배양에서 배양액 내에 이것을 첨가하면 세포의 모양과 성장 분화에

도 영향을 준다. 이와 같이 창상치유초기에 이차적 세포 외기질을 형성할 수 있도록 유도시키는 fibronectin은 창상치유 과정 중 섬유화단계에 이르러 대부분 이차적 세포외기질인 교원성 기질로 대체된다.<sup>6</sup>

저자는 fibronectin, TGF- $\beta$ 의 분비나 TGF- $\beta$  수용체의 발현을 억제하거나 세포외기질의 생성을 억제하는 약물은 켈로이드와 비후성반흔 치료에 효과가 있을 것이라는 가설을 세우고 현재 치료에 흔히 이용되는 대표적인 켈로이드 치료 약물들(triamcinolone, 5-FU, bleomycin, verapamil)이 켈로이드의 섬유모세포의 fibronectin의 생성과 분비 및 TGF- $\beta$ 의 분비와 TGF- $\beta$  수용체의 발현에 어떠한 영향을 미칠지 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 조직 배양

이전에 켈로이드에 대해 다른 약물이나 처치를 받지 않았던 세 명의 30대 초반(평균 33세)의 여성의 귓볼에서 발생한 켈로이드를 채취한 후 켈로이드 조직을 100 U/ml의 penicillin과 0.1 mg/ml streptomycin sulfate가 혼합된 phosphate-buffered saline solution(PBS, PBST)으로 여러 번 세척하였다. 채취한 켈로이드 조직의 진피를 일정한 크기(1 - 2 mm)의 육면체로 잘게 잘라, 각 켈로이드 조각을 60 mm Petridish에 넣고 유리 coverslip으로 덮은 후 배지를 4 ml 첨가하였다. 배지는 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin sulfate가 혼합된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, N.Y.)을 사용하여, 적당한 습도의 5% 이산화탄소를 함유한 공기에서 37°C 온도로 배양하였다. 약 7 - 8일 경과 후 현미경하에서 조직 조각에서 자라 나온 섬유모세포가 관찰되면 진피조직을 제거하고 배양하다가 완전한 집합을 보이면 trypsin을 처리하여 세대배양하였다. 본 실험에는 8세대까지의 켈로이드 섬유모세포를 사용하였다. 약물 효과를 관찰하기 위해 배지에 각각 triamcinolone acetonide(Triamcinolone<sup>®</sup>, Dongkwang, Korea), 5-fluorouracil(5-FU<sup>®</sup>, Choongwae, Korea), bleomycin(Bleocin<sup>®</sup>, Donga, Korea), 그리고 verapamil(Isoptin<sup>®</sup>, Ilsung, Korea)을 첨가한 후 48시간 배양하여 실험에 사용하였다.

켈로이드 섬유모세포와의 비교를 위해 동일한 환자에서 정상조직도 채취하여 위와 똑같은 방법으로 정상 섬유모세포를 배양하여 3세대까지 실험에 사용하였다.

### 나. 면역세포화학적 염색법

일차배양된 섬유모세포의 동정은 면역세포화학적 염색법을 이용하여 확인하였다. 섬유모세포를 coverslip이 들어있는 6-well plate에 90% 이상의 집합(confluency)으로 자라게 한 다음 고정 및 염색을 실시하였다. Coverslip 위에 자란 세포는 배양액을 조심스럽게 제거하고 4% paraformaldehyde로 실온에서 30분간 고정하였다. 고정액 제거 후 0.1 M glycine을 함유한 PBS로 2회에 걸쳐 세척(quenching)하고 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% hydrogen peroxide 용액에서 20분간 처리한 다음 PBS에서 10분간 세척하였다. 그 후 0.4% saponin, 1% bovine serum albumin, 2% normal goat serum으로 구성된 침투(permeabilization) 용액을 15분간 처리하고 일차항체(anti-human vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA), factor VIII antibody, Santa Cruz Biotechnology)를 1 : 100의 희석배수로 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 침투용액으로 4번 세척하였다. 이차항체인 biotinylated anti-rabbit antibody(Sigma)를 1 : 100의 희석배수로 실온에서 1시간 반응시킨 후 침투용액으로 3번 세척하였다. ABC(avidin-biotin horseradich peroxidase complex) 용액으로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 세척하고 0.05% DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma)와 0.01% hydrogen peroxide 혼합용액에서 5분간 발색시킨 후 PBS로 발색을 정지시켰다. 그 후 통상적인 탈수(dehydration)과정을 거쳐 Permout<sup>®</sup>(Polysciences, Amresco, USA)로 봉입하고 광학현미경하에서 세포를 관찰하였다.

### 다. 약제 처리

Triamcinolone acetonide(Triamcinolone<sup>®</sup>), 5-fluorouracil(5-FU<sup>®</sup>), bleomycin(Bleocin<sup>®</sup>), verapamil(Isoptin<sup>®</sup>)을 냉암소에 보관하고 사용 당일 MTT90 농도로 희석하여 사용하였다.

### 라. TGF- $\beta$ 측정

섬유모세포의 TGF- $\beta$  발현은 sandwich ELISA 방법으로 측정하였다. Anti-human TGF- $\beta$  antibody(TGF- $\beta$ , Endogen, USA)를 PBS에 2  $\mu$ g/ml 농도로 희석하여, 96-well ELISA plate(Nunc)에 50  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 하룻밤 정지시켰다. PBST로 3회 세척하고, 3% bovine serum albumin(Fraction V, Sigma, USA)을 함유한 PBS

를 200  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에 2시간 정치하여 차단(blocking)하였다. PBST로 3회 세척한 다음 2000 pg/ml부터 7단계까지 2배 계단 희석한 표준용액과 시료를 각각 100  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에 3시간 동안 정치하였다. 시료는 세포처리 후 일정시간 배양한 상등액을 사용하였다. PBST로 4회 세척하고 각 cytokine에 대한 biotin 부착 항체 (Endogen)를 0.5  $\mu$ g/ml로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 다음 HRP-conjugated streptavidin(0.125  $\mu$ g/ml, Endogen) 100  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 30분간 정치하고 PBST로 6회 세척하였다. 발색반응은 tetramethylbenzidine(TMB) 기질용액(InnoGenex) 50  $\mu$ l를 이용하였으며, Bio-Tek EL312e microplate ELISA reader에서 630 nm에서의 O.D 값을 측정하였다. 반응정지를 위하여 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 50  $\mu$ l씩 첨가하고 450 nm에서의 O.D 값을 재측정하였다. 정상 및 켈로이드 섬유모세포 각각의 대조군과 약제 처리군에서 TGF- $\beta$ 를 측정하였다.

#### 마. Immunoprecipitations

섬유모세포에서 분리된 fibronectin의 양은 immunoprecipitation으로 정량하였다. 섬유모세포를 6-well plate에 분주하여 80% 집합(confluency)을 보이면 약물을 처리하고 48시간 배양 후 상등액을 채취하고 trypsin을 처리하여 세포를 회수하였다. 세포는 lysis buffer(20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1mM sodium orthovanadate, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% deoxycholic acid, 1% Triton x-100, 1 $\times$ protease inhibitor mixture)를 이용하여 1시간 얼음 속에서 용해시킨 뒤 1000 g 5분간 원심분리로 세포 잔해는 제거하고 cell pellet extract를 얻어 단백질을 정량하였다. 채취한 상등액(500  $\mu$ l)과 동량의 cell pellet extract (500  $\mu$ g)에 anti-human fibronectin antibody(1 : 250, BD)를 첨가한 뒤 4 $^{\circ}$ C overnight으로 회전시킨 뒤 다시 protein A-agarose를 첨가하고 1시간 반 동안 4 $^{\circ}$ C에서 회전시켰다. 면역침전된 단백질은 PBS로 3회 세척하고 2 $\times$  sodium dodecylsulfate(SDS) sample buffer를 첨가하고 5분간 중탕한 뒤 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 하고 western blot을 시행하였다.

#### 바. Western blotting

배양된 섬유모세포에 켈로이드 약물(MTT<sub>90</sub> 농도)을 처리하고 24시간 경과 후 상등액은 채취하여 보관하고

섬유모세포는 회수하여 1 ml의 차가운 PBS로 12000 g에서 2분간 원심분리하여 세척하고 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF, Sigma)가 포함된 1 $\times$  lysis buffer(0.5% nonidet (NP)-40, 120 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0) 250  $\mu$ l에서 4 $^{\circ}$ C에서 30분 이상 용해하였다. 상등액을 12000 g에서 30분간 원심분리하여 취하였으며, Protein Assay Kit(Bio-Rad)를 사용하여 단백질을 정량하였다. Fibronectin(Santa Cruz Biotechnology), TGF- $\beta$  receptor(Santa Cruz Biotechnology)의 단백질 발현 변화는 각각에 대한 항체를 이용하였다. 동량의 단백질을 포함한 시료를 12% SDS-PAGE하였으며 [Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell(Bio-Rad); 200 volts (Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad), 1시간], MultiMark Multi-Colored Protein standard (Novex)를 단백질 분자량 측정을 위한 기준으로 사용하였다. 겔을 transfer buffer에 약 15분간 평형화한 다음 겔상의 단백질을 PolyScreen polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(NEN Life Science)으로 이동시켰다 [Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(Bio-Rad); 100 volts, 250 mA, 4 $^{\circ}$ C, 1시간]. 단백질이 이동된 membrane은 5% skim milk(Difco)에서 실온에서 1시간 동안 차단한 다음 0.05% Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Sigma)가 포함된 PBS에 3회 세척한 후 일차항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체를 제거하고, PBST로 3회 세척한 다음 이차항체(mouse immunoglobulin, horseradish peroxidase(HRPO)-linked whole antibody, Amersham)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이차항체를 제거하고 PBST로 3회 세척하여 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham)로 반응시킨 다음 Fujifilm luminescent analysis system (LAS)-1000 Luminescent Image Analyzer로 현상하고 Fujifilm Image Gauge Version 3.11 software를 이용하여 분석하였다.

#### 사. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며 결과는 평균치  $\pm$  표준편차로 표시하였고, Student's t test를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 검정하였다.

### III. 결 과

#### 가. 섬유모세포의 확인

배양된 세포에서 면역조직 화학적으로 vimentin,  $\alpha$ -SMA, factor VIII을 검증하였다. 대부분의 세포는 vimentin 양성,  $\alpha$ -SMA 양성이고, 혈관 내피세포 표지자인 factor VIII에는 음성이어서 섬유모세포 혹은 섬유조모세포로 확인할 수 있었다(Fig. 1).

#### 나. 켈로이드 치료약물이 정상 및 켈로이드 섬유모세포에서 TGF- $\beta$ 의 생성에 미치는 영향

배양된 정상 섬유모세포와 켈로이드 섬유모세포에서 생성되는 TGF- $\beta$ 의 양을 ELISA로 측정하였는데, 켈로이드 섬유모세포에서 TGF- $\beta$ 의 생성이 3108.5 pg/ml로 정상 섬유모세포(1168.2 pg/ml)의 266% 증가되어 있었다. 여러 켈로이드 약물 처리시 섬유모세포의 TGF- $\beta$ 의 분비도 대체적으로 감소되었는데, 특히 5-FU에 의한 TGF- $\beta$  분비 억제효과가 가장 우수하였다. 정상 섬유모세포에서는 69% control, 켈로이드 섬유모세포에서는 58% control로 억제되었다( $p < 0.05$ ). Bleomycin은 정상 섬유모세포에서는 TGF- $\beta$  생성을 감소시켰다( $p < 0.05$ ). 켈로이드 섬유모세포에서는 유의한 억제효과가 관찰되지 않았다(Table I, Fig. 2).

#### 다. 켈로이드 치료약물이 Fibronectin 합성 및 분비에 미치는 영향

켈로이드 치료약물(triamcinolone, 5-FU, bleomycin, verapamil)이 세포외기질인 fibronectin 합성 및 분비를 억제하여 켈로이드 치료효과를 가지는지, 그리고 TGF- $\beta$

가 세포외기질인 fibronectin 합성 및 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT<sub>90</sub>의 농도에서 섬유모세포를 배양한 후 배양액 내 분비된 fibronectin과 세포 내 합성되어 축적된 fibronectin을 각각 immunoprecipitation과 immunoblot을 이용하여 측정하였다. 그 결과 정상 섬유모세포에서는 세포외로 분비된 fibronectin의 양은 대조군에서보다 오히려 triamcinolone, 5-FU, bleomycin, verapamil을 처리한 경우 더 증가되었으며, 특히 TGF- $\beta$ 를 처리한 경우 대조군보다 가장 현저하게 증가하였다.

세포 내 생성, 축적된 fibronectin의 양을 측정한 결과는 triamcinolone을 혼합한 배지에서 대조군보다 증가되었으며, 5-FU, bleomycin 처리시에는 대조군과 유의한 차이는 없었다. 그에 반해 verapamil을 처리한 경우에는 세포내 fibronectin이 다소 감소하였으며, TGF- $\beta$ 를 첨가한 경우 가장 낮은 양으로 측정되었다(Fig. 3).

켈로이드 섬유모세포에 triamcinolone, 5-FU, bleomycin, verapamil MTT<sub>90</sub>의 농도에서 TGF- $\beta$ 를 처리한 경우 세포외로 분비된 fibronectin의 양은 triamcinolone의 경우에 유의하게 감소하였고(75.4% control,  $p < 0.05$ ), verapamil의 경우에는 오히려 대조군보다 증가하였으며(115.5% control), 5-FU와 bleomycin을 처리한 경우에는 대조군과 유사하였다(각각 91.8, 99.2% control)(Table II, Fig. 4). 세포 내 축적되어 있는 fibronectin-

tin은 네 가지 약물처리시 TGF- $\beta$ 만 존재하는 대조군에 비해 모두 감소되었으며, 특히 verapamil과 triamcinolone의 경우에서 대조군보다 많이 감소하였다(각각 68.1, 75.6% control,  $p < 0.05$ )(Table III, Fig. 4).

#### 라. 켈로이드 치료약물이 TGF- $\beta$ 수용체 발현에 미치는 영향

켈로이드 치료약물(triamcinolone, 5-FU, bleomycin, verapamil)이 섬유모세포의 TGF- $\beta$  수용체 발현을 억제하여 켈로이드 치료효과를 가지는지를 알아보기 위해 MTT90의 농도에서 섬유모세포를 배양한 후 발현되는 TGF- $\beta$  수용체의 양을 측정하였다. 네 가지 약물을 사용한 경우 모두에서 대조군(199400.00 AU/mm<sup>2</sup>)에 비해 대체적으로 TGF- $\beta$  수용체 발현이 감소하였으나 5-FU와 bleomycin을 처리한 경우에 감소한 양은 유의한 수준이 아니었으며(각각 90.3, 96.5% control), triamcinolone과 verapamil을 처리한 경우에는 대조군에 비해 TGF- $\beta$  수용체 발현이 현저하게 감소하였다(각각 68.8, 80.0% control,  $p < 0.05$ ).

동일한 실험을 TGF- $\beta$ 를 첨가한 상태에서 시행하였는데, 역시 마찬가지로 네 가지 약물을 사용한 경우 모두에서 대조군(195000.00 AU/mm<sup>2</sup>)에 비해 TGF- $\beta$  수용체 발현이 감소하였으나 5-FU와 bleomycin은 감소한 양이 유의한 수준이 아니었으며(각각 98.8, 93.6% control), triamcinolone과 verapamil을 처리한 경우에는 대조군에 비해 TGF- $\beta$  수용체 발현이 유의하게 감소하였다(각각 82.4, 87.1% control,  $p < 0.05$ ).

켈로이드 섬유모세포의 TGF- $\beta$  수용체 발현은 TGF- $\beta$ 를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 사이의 유의한 차이는 없었다(Table IV, Fig. 5).

#### IV. 고 찰

조직의 구조 및 형태를 유지하는 세포외기질은 교원질, 접다당질, 당단백질 등으로 구성되어 있다. 이들 세포외기질들은 조직의 다양한 형태와 장력을 유지하고 주위 세포의 기능을 조절하며 세포의 모양과 대사, 분화 및 성장, 분열에도 영향을 준다.<sup>7</sup> 세포외기질 중 혈청 단백질의 일종이며 당단백질인 fibronectin은 창상치유 초기에 나타나 섬유모세포 및 대식세포의 이동을 유도하고 섬유모세포에서 합성된 교원질 등 이차적 세포외기질이 침착 및 배치될 수 있도록 일차적 기질로서 작용

한다.<sup>6</sup> 섬유화조직이나 피부반흔 조직 내에 있는 세포외기질의 대부분은 교원질에 해당한다. 교원질은 섬유모세포에서 전교원질(procollagen)의 형태로 합성된 후 세포외부에 분비되고, 전교원질은 procollagen peptidase에 의해 양측 말단에 존재하는 당 및 아민계 펩티드가 분리되어 교원질로 된다. 이들은 서로 교차하고 나선형으로 꼬이면서 결합하여 강한 장력을 갖는 교원섬유가 된다. 교원질의 양은 섬유모세포에서의 합성과 교원효소에 의한 분해로 결정지어지는데 그 조절기전은 아직 정확히 밝혀지지 않고 있다.

대식세포, 단핵구, 혈소판에서 합성 유리되는 TGF- $\beta$ 는 섬유모세포의 증식과 교원질 합성에 있어서 다양하고도 복잡한 작용을 하는 펩티드 성장인자로 알려져 있다.<sup>8</sup> TGF- $\beta$ 는 lymphokine의 일종으로 섬유모세포의 성장 및 교원질 합성을 모두 촉진시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1-2</sup> 본 실험에서도 정상 섬유모세포보다 켈로이드 섬유모세포에서 TGF- $\beta$ 의 생성이 증가하였으며, 켈로이드 섬유모세포에 TGF- $\beta$ 를 처리한 경우 fibronectin의 합성이 더 증가됨을 관찰하였는데, 이러한 사실은 켈로이드 형성에 TGF- $\beta$ 가 관여하고 있음을 뒷받침해 주고 있다.

섬유모세포의 성장과 교원질 합성을 조절하는 기전으로 그의 합성물인 세포외기질에 의한 되먹이기 조절 기전이 있다. 쥐의 섬유모세포 배양에서 Wiestner 등<sup>9</sup>은 전교원질이 교원질 합성을 억제하는 되먹이기 기전을 보고한 바 있다. 이종원 등<sup>10</sup>도 배양액 내의 교원성 기질이 피부 섬유모세포의 DNA, 단백질 및 교원질 합성을 감소시켰다고 보고했다. 본 실험에서 정상 섬유모세포의 fibronectin 합성과 분비에 있어서 TGF- $\beta$ 를 첨가한 경우 분비된 fibronectin 양은 증가하였으나, 세포 내 fibronectin 양 즉, 합성된 양은 감소한 것 또한 세포 외 fibronectin의 증가로 인한 되먹이기 기전에 의한 세포 내 합성의 감소로 여겨진다.

Wiestner 등<sup>9</sup>은 교원질 합성 조절기전을 procollagen peptidase에 의해 분리된 procollagen의 끝에 있는 아민계 펩타이드(NH<sub>2</sub>-terminal extension peptide; procollagen peptide)가 섬유모세포에 되먹이기 기전으로 교원질 종류에 따른 특이성을 나타내며 교원질 합성을 조절한다고 하였다.

5-FU는 DNA와 RNA 양쪽에 다 영향을 미치나 DNA 합성에 더 큰 영향을 미치며, 5-FU의 작용은 유사분열의 속도가 빠른 조직에서 선택적으로 일어나 세포의 증

식이 활발히 진행되고 있는 성장기의 병변에 반응이 좋다. 병변 내 주입치료에 대한 약동학에 대해선 정확히 밝혀지지 않았으나 본 실험에서 TGF- $\beta$ 생성을 억제하는 효과가 있는 것을 증명하였다. 5-FU를 국소적으로 사용하였을 때, 통증, 가려움, 화끈거림, 동통, 과색소침착 등이 있을 수 있으며, 5-FU에 알러지성 접촉성 피부염이나 과민반응을 보이는 환자에 있어서는 금기이다.<sup>11</sup>

Bleomycin은 *Streptomyces verticillus*에 의해 생산되는 항암 항생제의 일종으로, 유리기(free radical)를 생성하여 DNA single- and double-strand를 파괴하여 DNA 합성을 억제한다.<sup>12</sup> 본 실험결과 Bleomycin은 TGF- $\beta$  생성이나 TGF- $\beta$  수용체 발현을 억제하거나 fibronectin 생성 및 분비를 억제하는 효과는 없는 것으로 보인다.

Verapamil은 활성화된 칼슘 통로와 비활성화된 칼슘 통로 모두에 작용하는 칼슘 통로 차단제이다. Lee 등<sup>13</sup>은 verapamil이 칼슘에 의존하는 세포의 거대분자 분비 작용을 억제하고 교원질 분자에 proline이 결합하는 것을 억제하여 교원질 형성을 억제한다고 하였다. Doong 등<sup>14</sup>은 verapamil이 정상 피부와 켈로이드의 섬유모세포에서 actin filaments를 탈중합시키고, 이는 세포 모양을 방추형에서 둥글게 변화시키며 procollagenase 유전자를 활성화하여 procollagenase의 합성을 증가시켜 결국 collagen이 정상에서보다 감소했다고 보고했다. Lee 등<sup>15</sup>은 임상실험에서 verapamil이 반흔의 부피를 줄이는 데 특별한 부작용이나 후유증 없이 효과가 있다고 보고했다. 본 실험에서 verapamil은 fibronectin의 세포 외로의 분비는 증가시키고, 세포 내 fibronectin은 감소시켰는데, 이것은 칼슘 길항제이지만 오히려 초기에는 세포 내 칼슘치를 증가시키기 때문으로 생각된다. 또한 verapamil은 TGF- $\beta$  수용체의 발현도 억제하였는데, 이것은 켈로이드 치료제로서의 가능성을 보여준다.

Triamcinolone은 합성 부신피질 스테로이드로 현재 임상적으로 켈로이드나 비후성 반흔에 흔히 쓰는 약물이다. 스테로이드는 섬유모세포 이동을 억제하고, prolyl hydroxylase 활성 억제하며, 교원질 분해 활성을 증가시켜 반흔의 부피를 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서는 fibronectin의 생성 및 분비를 억제할 뿐만 아니라, TGF- $\beta$  수용체의 발현도 억제하였다.

정상섬유모세포에서는 MTT<sub>90</sub>의 낮은 농도에서 triamcinolone, 5-FU, bleomycin은 fibronectin 합성 및 분비를 증가시켰는데, 이것은 낮은 농도에서는 오히려 생성을 자극하는 효과가 더 우세한 때문인 것 같다. TGF- $\beta$

를 사용한 경우에도 fibronectin의 분비를 증가시켜 세포 외의 fibronectin은 증가하고, 세포 내의 fibronectin은 감소한 것으로 여겨진다.

TGF- $\beta$  수용체 발현 또한 정상 섬유모세포에서보다 켈로이드 섬유모세포에서 더 증가하며, 증가된 TGF- $\beta$ 와 그 수용체가 켈로이드의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> 따라서, TGF- $\beta$  수용체 발현을 억제하는 것도 켈로이드 형성을 막는 방법 중의 하나라 여겨지며, 본 실험에서 TGF- $\beta$  수용체의 발현은 triamcinolone과 verapamil을 사용한 경우에서 유의하게 감소하였다.

결론적으로 TGF- $\beta$  수용체의 발현과 fibronectin 생성을 억제하는 것으로 추정되는 triamcinolone이나 verapamil과 함께 TGF- $\beta$  생성을 억제하는 것으로 추정되는 5-FU를 병행하여 사용한다면 켈로이드 치료에 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 여겨진다. 추후 이 약물들을 병행하여 fibronectin 생성 및 분비와 TGF- $\beta$ 의 분비 및 TGF- $\beta$  수용체의 발현을 실험해 보는 것이 필요하며, 병행요법이 실제로 효과가 있을지에 대한 임상실험이 필요할 것으로 본다.

## V. 결 론

켈로이드 섬유모세포는 정상 섬유모세포에 비해 TGF- $\beta$  생성이 증가하였고, TGF- $\beta$  처리 시 fibronectin 합성이 촉진되었는데, 이는 켈로이드 형성에 TGF- $\beta$ 가 관여하고 있음을 알 수 있었다.

실험에 쓰인 여러 약제 중 5-FU는 TGF- $\beta$ 의 생성을 가장 강력하게 억제하였다. Triamcinolone과 verapamil은 TGF- $\beta$  수용체의 발현과 fibronectin의 합성을 민감하게 억제하였다.

기전(작용부위)이 다른 두 약제 즉, triamcinolone 또는 verapamil과 5-FU를 낮은 농도로 병용하여 부작용없이 더 좋은 효과를 볼 수 있으리라 여겨진다.

Triamcinolone과 더불어 verapamil, 5-FU 이 두 약물은 켈로이드나 비후성 반흔 등의 치료에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 보여주므로, 이 약물들을 병행하여 fibronectin 생성 및 분비와 TGF- $\beta$ 의 분비 및 TGF- $\beta$  수용체의 발현을 실험해 보는 것이 필요하며, 병행요법이 실제로 효과가 있을지에 대한 임상실험이 필요할 것으로 본다.

## REFERENCES

1. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK: The

- effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* 98: 827, 1996
2. Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT: Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg* 43: 179, 1999
  3. Chin GS, Liu W, Peled Z, Lee TY, Steinbrech DS, Hsu M, Longaker MT: Differential expression of transforming growth factor-beta receptors I and II and activation of Smad 3 in keloid fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 108: 423, 2001
  4. Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y: The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 126: 171, 1987
  5. Border WA, Ruoslahti E: Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1, 1992
  6. Hynes RO, Yamada KM: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 95: 369, 1982
  7. Folkman J, Moscona A: Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345, 1978
  8. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK: Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233: 532, 1986
  9. Wiestner M, Krieg T, Horlein D, Glanville RW, Fietzek P, Muller PK: Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *J Biol Chem* 254: 7016, 1979
  10. Rhie JW, Shim HG, Byeon JH, Kwak SI, Lee CK: The effects of collagen substrate in culture medium on DNA and protein synthesis of dermal fibroblasts. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 24: 229, 1997
  11. Katzung BG: *Basic & Clinical Pharmacology*. 6th ed, East Norwalk, Appleton & Lange, 1995 p 945
  12. Katzung BG: *Basic & Clinical Pharmacology*. 6th ed, East Norwalk, Appleton & Lange, 1995 p 839
  13. Lee RC, Ping JA: Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. *J Surg Res* 49: 463, 1990
  14. Doong H, Dissanayake S, Gowrishankar TR, LaBarbera MC, Lee RC: Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts. *J Burn Care Rehabil* 17: 497, 1996
  15. Lee RC, Doong H, Jellema AF: The response of burn scars to intralesional verapamil. Report of five cases. *Arch Surg* 129: 107, 1994