

헤파린이 수근관 증후군 환자의 횡수근 인대에서 추출한 섬유아세포의 콜라겐, MMP 및 TGF- β 동위형 발현에 미치는 영향

정성호¹ · 나민화² · 이재선¹ · 송상훈¹ · 윤을식¹ · 동은상¹ · 김한중²

고려대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 이화여자대학교 의과대학 성형외과학교실²

The Effect of Heparin on Gene Expression of Collagen, MMP, TGF- β Isoforms Using Cultured Fibroblast from Transverse Carpal Ligament of Carpal Tunnel Syndrome

Seong Ho Jeong, M.D.¹, Min Hwa Na, M.D.²,
Jae Sun Lee, M.D.¹, Sang Hun Song, M.D.¹, Eul Sik Yoon, M.D.¹,
Eun Sang Dhong, M.D.¹, Han Joong Kim, M.D.²

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea,

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ehwa Wemen's University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Noninflammatory synovial fibrosis has been noted for main causal factor of carpal tunnel syndrome (CTS). Recently, there are some reports that heparin have not only anti-coagulative effect but also anti-inflammatory and anti-fibrotic potential and have an effect on interstitial pulmonary fibrosis. Authors examined whether heparin affects pathogenesis of CTS.

Methods: First, heparin was administered to fibroblast that was cultured from patient's transverse carpal ligament. Secondly, we evaluated the expression from genes of type I, III collagen, TGF β isoforms and MMP. Fibroblasts were isolated and cultured from transverse carpal ligaments of 5 patients with CTS. Heparin (0, 1, 10, 100 μ g/ml) was administered to cultured fibroblast and reverse transcription PCR for mRNA expression of type I, III collagen, TGF- β isoforms and MMP was done.

Results: Heparin suppressed gene expression of type I, III collagen and TGF- β_1 , β_3 but promoted gene expression of TGF- β_2 and MMP-2.

Conclusion: Heparin directly suppress gene expression of type I, III collagen. But, It is undetermined that heparin can present it's effect mediated by TGF β iso-

forms or MMP.

Key Words: Heparin, Fibroblast, Collagen, MMP, TGF- β

I. 서론

수근관 증후군의 발생기전은 아직까지 명확하게 규명되어 있지 않다. 조직학적인 연구 결과, 수근관 증후군 환자의 횡수근 인대는 비정상적으로 크기가 다양한 콜라겐 원 섬유로 구성되어 있으며,^{1,2} 콜라겐 증식 후 광범위한 섬유-하이알린화가 일어나는 퇴행의 단계를 거치면서 인대의 비후가 초래된다고 보고되었다.³ 또한 분자생물학적인 기법을 활용하여 IL-1, IL-6, PGE₂, Free oxydative radical (MDA) 등을 분석한 결과 비염증성 허혈-재관류 손상에 따른 섬유화가 병인으로 주목을 받기도 하였다.^{4,6}

한편 저분자량 헤파린은 기존의 항 응고작용뿐 아니라 항염증성, 항 증식성 기능 및 신생혈관 억제 기능이 있음이 밝혀졌고, 동물실험에서 항 섬유화 작용도 확인된 바 있다.^{7,8}

저자들은 수근관 증후군 환자의 횡수근 인대에서 배양된 섬유아세포에 헤파린을 투여한 뒤 섬유화의 핵심인 Type I, III 콜라겐의 발현 및 창상치유 과정에 중요한 역할을 하는 TGF- β 동위형(1, 2, 3)과 세포의 기질 분해 효소 중 collagen의 대사 과정에 중요한 matrix metalloproteinase (MMP) 2, 9의 변화를 헤파린을 투여하지 않은 대조군과 비교 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험대상

임상적으로 진단된 수근관 증후군 환자로서, 2년 이상 유병기간을 가지며 다른 결체조직질환의 증후가 없는 다섯 명을 선별하였다. 이들은 모두 4가지 촉발 검사(팔렌씨 검사, 역 팔렌씨 검사, 티넬 증후 및 수근관 압박 검사) 중 두 가지 이상의 검사에서 양성을 보이고 근전도 검사에서 정중 신경의 원위 잠시(latency) 지연이 확인된 경우를 대상으로 하였다. 전신마취 하에 수술을 시행하면서 환자의 횡수근 인대를 편측에서 3 mm³ 크기로 생검하였다.

Received March 8, 2006

Revised April 14, 2006

Address Correspondence: Eun Sang Dhong M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Ansan Hospital, 516 Gojan-1 dong, Danwon-gu, Ansan, Gyeonggi-do 425-707, Korea. Tel: 031) 412-5073 / Fax: 031) 475-5074 / E-mail: prsdhong@kumc.or.kr

* 본 논문은 2005년 제58차 대한성형외과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

나. 실험방법

1) 섬유아세포 배양

수근관 증후군 환자에서 채취한 횡수근 인대를 1% PBS 로 2번 씻은 후 메스로 잘라 배양 접시 바닥에 붙이고, DMEM 배양액에서 3일간 배양하였다. 세포가 조직을 완전히 둘러쌀 정도가 되면 조직을 제거하고 계대배양을 실시하였다. 배양은 DMEM 7 ml를 첨가한 후 5% CO₂ 배양기(CO₂ Water-Jacketed Incubator, NUAIRE)에서 37°C 조건하에 시행하였다. 1차 배양 후 세포가 융합되면 0.05% EDTA용액 2 ml로 세포를 분리하였고, 10% FBS 30 ml로 세척한 후 원심분리(4°C, 1000 rpm, 10 minutes)하였다. 이 과정을 2회 반복하여 세포를 분주하는 동일한 과정을 거쳐 3회의 계대배양을 하였다.

2) 실험군

실험군에서는 서로 다른 농도(1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml)의 헤파린(H3149, Sigma, U.S.A.)을 생검한 횡수근 인대로부터 배양한 섬유아세포에 투여한 뒤 24시간 배양하였고, 대조군은 헤파린을 투여하지 않았다.

3) RNA(ribonucleic acid) 추출

실험 24시간 후 배양된 세포에 TRIzol(Gibco BRL, U.S.A.) 1 ml를 첨가하여 세포를 분해한 후 4°C에서 15000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하였다. 상층액 300 - 400 µl를 분리해

같은 양의 isopropanol을 넣어준 뒤 -20°C에서 1시간 동안 보관하였다. 다시 4°C에서 15000 rpm으로 20분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하여 RNA pellet만 남긴 뒤 여기에 70% ethanol 300-400 µl를 첨가하고 15000 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 이것을 건조시켜 순수한 RNA pellet을 추출하였다. 추출된 RNA를 diethyl pyrocarbonate water (Sigma, U.S.A.; 이하 DEPC) 60 µl로 녹인 후 DNase와 반응시켜 genomic DNA를 파괴시키고, -70°C에 보관하여 DNase를 불활성화시켰다.

4) 역전사 반응(reverse transcription, RT)

RNase inhibitor(Boehringer Mannheim, Germany) 0.5 µl에 10 µg의 RNA를 용해시키고, 70°C에서 10분간 보관한 후 바로 얼음물에 담가 변성(denaturation)시켰다. 결합반응(annealing)을 위해 1 µl AMV(avian myeloblastosis virus) 역전사 효소 및 0.5 µl RNase inhibitor, 2 µl dNTP 혼합물(mixture of dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 2 µl oligo dT 및 2 µl first strand cDNA synthesis reaction buffer(250 mM Tris-HCl)와 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. cDNA의 합성을 마친 후 역전사효소를 불활성화시키기 위해 PCR machine(Perkin-Elmer)에서 94°C에서 7분간 방치하였다.

5) 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

Cosmo Co.(Seoul, Korea)에 의뢰하여 미리 제작해 둔

Table I. Oligonucleotides Sequences of RT-PCR Primer Pairs (5' - 3' orientation)

Type	Primer
Type I collagen (489 bp)	5'GACATGCTCAGCTTTGTGGA 3'
	5'CCTGTGGTCCAACAACCTCT 3'
Type III collagen (458 bp)	5'CTAAAGGCGAAGATGGCAAG 3'
	5'CACCATTCTTCCAGGAGGA 3'
TGF-β ₁ (196 bp)	5'CCAACTATTGCTTCAGCTCCA3'
	5'TTATGCTGGTTGTACAGGGC 3'
TGF-β ₂ (233 bp)	5'CTGGAGCATGCCCGTATTTA 3'
	5'TTGGTCTTGCCACTTTTCC 3'
TGF-β ₃ (211 bp)	5'CCAATTACTGCTTCCGCAACT 3'
	5'GCAGATGCTTCAGGGTTC G 3'
MMP 2 (410 bp)	5'ATGACAGCTGCACCACTGAG 3'
	5'TGATGTCATCCTGGGACAGA 3'
MMP9 (378 bp)	5'CAGTGGTTCCAACCTCGGTTT 3'
	5'CCCAAGTGTGTCTCTTCT 3'
GAPDH	5'ACAGTCAGCCGCATCTTCTT 3'
	5'TTGATTTGGAGGGATCTCG 3'

Table II. RT-PCR Conditions in this Study

Primers	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
TGF-βs	94 °C, 1 minutes	54 °C, 1 minutes	72 °C, 3 minutes	35
MMP 2	94 °C, 1 minutes	60 °C, 1 minutes	72 °C, 3 minutes	40
MMP 9	94 °C, 1 minutes	56 °C, 1 minutes	72 °C, 3 minutes	40
Collagen	94 °C, 1 minutes	57 °C, 1 minutes	72 °C, 3 minutes	40

TGF-β₁, β₂, β₃, MMP 2, MMP 9 그리고 type I, III collagen의 시발체와 각각의 결과 수치의 보정을 위한 기준치로서의 GAPDH 시발체(Table I) 0.3 μl를 각각의 cDNA 증폭을 위해 2.5 μl 10 PCR reaction buffer(10 mM Tris- HCl, 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100), 2 μl dNTP mix(각각 2.5 mM dTTP, dCTP, dGTP와 1.25 mM dATP), 0.25 U Taq DNA Polymerase와 3 μl cDNA에 혼합하였다. 그리고 적절한 증합반응 매개 조건(Table II)을 설정한 후 증합효소 연쇄반응을 시켰다.

6) 전기영동(electrophoresis)

각각의 PCR 산물 10 μl를 loading buffer와 혼합하였고 지시계로서는 100 bp DNA ladder(Promega)를 사용하였다. 전기영동은 1% agarose gel에서 시행하였으며, DNA image visualizer(Fuji Film Co., Japan)에서 band 확인 후 사진을 현상하였다. Scion image프로그램(Scion image beta 4.02, Scion corporation, U.S.A.)을 사용하여 GAPDH, TGF-β₁, β₂, β₃, MMP 2, MMP 9, Type I, III collagen mRNA의 농도측정적인 분석을 하였으며 각각의 결과는 GAPDH mRNA 수치를 기준으로 보정하여 비교하였다.

다. 통계처리

5회 반복한 실험치의 평균값과 각각의 표준편차를 구하였고 통계적 유의성은 SPSS(version 11.0 for windows)를 이용하여 Mann-Whitney U 검사 및 Kruskal-Wallis 방법으로 5% 유의수준으로 검정하였다.

III. 결 과

가. Type I, III collagen mRNA 발현에 대한 헤파린의 효과

실험군에서는 mRNA 발현이 Type I collagen의 경우 1, 10, 100 μg/ml의 헤파린 투여에 대해 각각 0.05 ± 0.01, 0.18 ± 0.04, 0.36 ± 0.07 μg/ml로 0.79 ± 0.09 μg/ml를 보인 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였다(*p* < 0.05) (Fig. 1). Type III collagen의 경우에도 0.32 ± 0.06, 0.53 ±

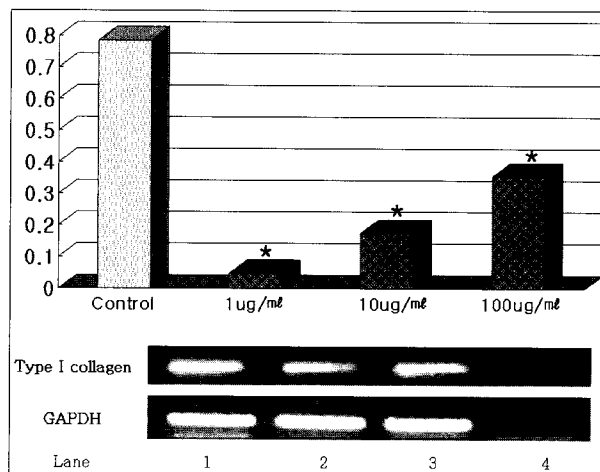


Fig. 1. RT-PCR analysis of mRNA expression of type I collagen in fibroblasts of CTS patients' TCL. (Above) mRNA expression of type I collagen was significantly decreased at all concentration of heparin. (Below) Agarose gel electrophoretic photograph of RT-PCR product of type I collagen (*: compared to control group (*p* < 0.05)) lane 1: CT, lane 2: CT + heparin(1 μg/ml), lane 3: CT + heparin(10 μg/ml), lane 4: CT + heparin(100 μg/ml)(CT: CTS fibroblast)

0.07, 0.43 ± 0.05 μg/ml로 0.98 ± 0.09 μg/ml를 보이는 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였으며(*p* < 0.05), 특히 Type I collagen은 저농도(1 μg/ml)에서 더 감소(*p* < 0.05)하는 양상을 보였다(Fig. 2).

나. TGF-β isomers mRNA 발현에 대한 헤파린의 효과(Fig. 3)

1) TGF-β₁ mRNA

실험군에서 고농도(100 μg/ml)의 헤파린 투여에 의해 TGF-β₁의 mRNA 발현이 0.58 ± 0.06 μg/ml로 나타나 0.96 ± 0.08 μg/ml을 보인 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소되었으나(*p* < 0.05), 저농도와 중등도 농도에서는 통계학적인 의미는 없었다.

2) TGF-β₂ mRNA

실험군에서 모든 농도의 헤파린 투여에 의해 TGF-β₂

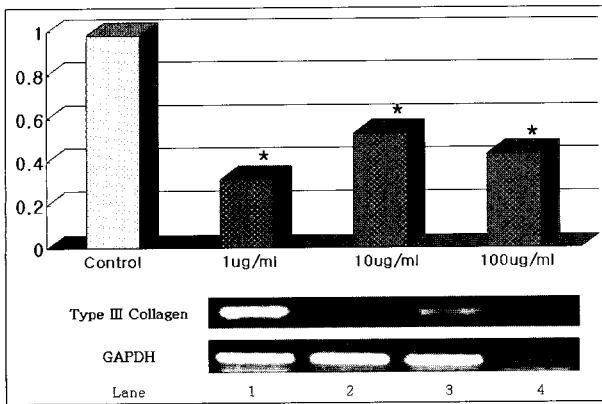


Fig. 2. RT-PCR analysis of mRNA expression of type III collagen in fibroblasts of CTS patients' TCL. (Above) m RNA expression of type III collagen was significantly decreased at all concentration of heparin (Below) Agarose gel electrophoretic photograph of RT-PCR product of type III collagen(*: compared to control group ($p < 0.05$)) lane 1: CT, lane 2: CT + heparin(1 μ g/ml), lane 3: CT + heparin(10 μ g/ml), lane 4: CT + heparin(100 μ g/ml)(CT: CTS fibroblast)

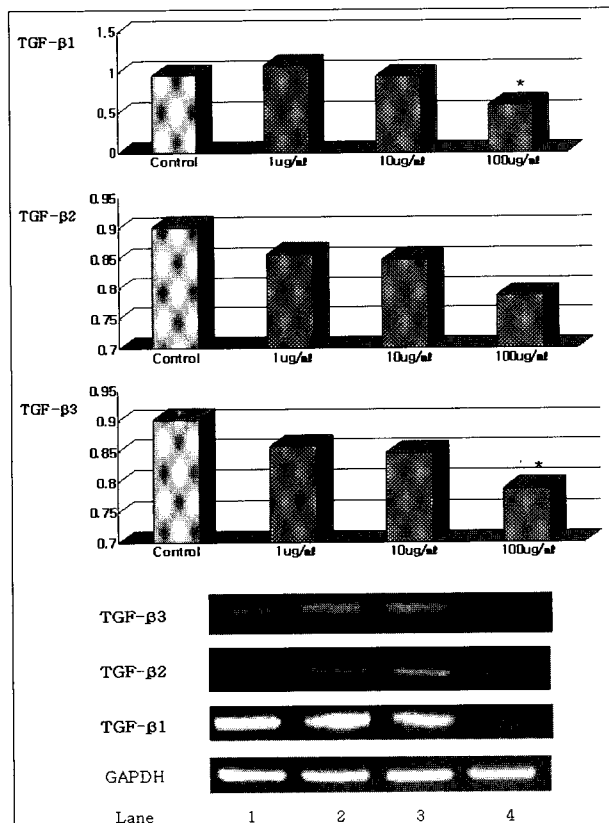


Fig. 3. RT-PCR analysis of mRNA expression of TGF- β isomers in fibroblasts of CTS patients' TCL. (Above) m RNA expression of TGF- β_1 and β_3 was significantly decreased at high concentration of heparin; the expression of others was not significant. (Below) Agarose gel electrophoretic photograph of RT-PCR product of TGF β isomers (*: compared to control group ($p < 0.05$)) lane 1: CT, lane 2: CT + heparin(1 μ g/ml), lane 3: CT + heparin(10 μ g/ml), lane 4: CT + heparin(100 μ g/ml)(CT: CTS fibroblast)

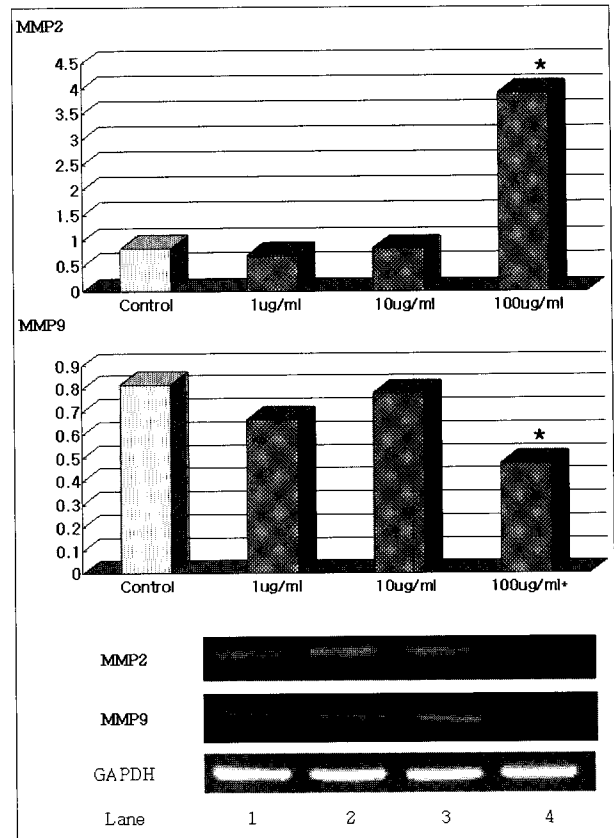


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNA expression of MMP 2, 9 in fibroblasts of CTS patients' TCL. (Above) m RNA expression of MMP 2 was significantly increased in CTS a at high concentration and expression of MMP9 was significantly decreased in CTS at high concentration. (Below) Agarose gel electrophoretic photograph of RT-PCR product of MMP 2, 9 (*: compared to control group($p < 0.05$)) lane 1: CT, lane 2: CT + heparin(1 μ g/ml), lane 3: CT + heparin(10 μ g/ml), lane 4: CT + heparin(100 μ g/ml)(CT: CTS fibroblast)

mRNA 발현이 대조군에 비해 약간 감소하였으나 통계학적으로 의미 있는 것은 없었다.

3) TGF- β_3 mRNA

실험군에서 고농도(100 μ g/ml)의 헤파린 투여에 의해 TGF- β_3 mRNA 발현이 $0.53 \pm 0.05 \mu$ g/ml로 나타나 $0.87 \pm 0.08 \mu$ g/ml를 보인 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$) 다른 농도에서는 유의하지 않았다.

다. MMP 2, 9 mRNA 발현에 대한 헤파린의 효과 (Fig. 4)

1) MMP-2 mRNA

실험군에서 고농도(100 μ g/ml)의 헤파린 투여 시 MMP2 mRNA의 발현이 $3.91 \pm 0.76 \mu$ g/ml로 나타나 $0.85 \pm 0.07 \mu$ g/ml를 보인 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증

가하였으며($p < 0.05$) 나머지 농도별 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다.

2) MMP-9 mRNA

실험군에서 고농도(100 $\mu\text{g/ml}$)의 헤파린 투여 시 MMP9 mRNA의 발현이 $0.48 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ 로 나타나 $0.82 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ 를 보인 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$) 나머지 농도별 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다.

IV. 고 찰

수근관 증후군 환자의 횡수근 인대를 조직학적으로 분석한 다수의 연구결과 콜라겐 원섬유의 크기가 균일하지 않고 비정상적으로 다양하며, 초기에는 혈관 주위 및 간질 조직에 제1, 2형 콜라겐이 축적되는 소견을 보이다가, 후기에는 Type 3 콜라겐의 축적 및 하이알린화로 인한 광범위한 섬유화가 발생해 건활막이 전반적으로 비후되는 양상을 보인다고 보고되었다.³ 이 같이 콜라겐의 축적과 섬유화가 수근관 증후군의 대표적인 병인으로 주목되고 있다.

헤파린은 항 응고작용뿐 아니라 항 염증성, 항 섬유화 기능이 있다고 알려져 있다. 헤파린은 동물실험에서 콜라겐의 축적을 대폭 감소시키고, 신생혈관 억제기능도 나타낸다.⁸ 인체조직에 헤파린을 적용한 연구에서도, 헤파린은 신장의 간질성 섬유화를 초래하는 Endothelin-1(ET-1)과 기도평활근의 비후를 초래하는 TGF- β_1 을 억제하는 것으로 나타났다.^{9,10} 실제 만성 B형 간염 환자에게 헤파린을 투여한 연구에서도 혈청 하이알루론산 및 제 4형 콜라겐이 감소하였다.¹¹ 본 연구의 결과에서도, 헤파린 투여 시 제1, 3형 콜라겐의 발현이 통계학적으로 유의하게 억제되었다.

TGF- β 는 창상치유 과정에서 섬유아세포의 증식, 분화에 관여하여 콜라겐의 축적을 유발하고, 세포 외 기질의 분해는 감소시키는 것으로 알려졌다. 그 중 TGF- β_1 은 신장 및 기도 평활근조직에 콜라겐의 축적을 일으키는 것으로 밝혀졌으며,¹² 반면에 TGF- β_3 는 근섬유세포의 분화를 억제하여 콜라겐의 축적을 억제하고, MMP-9의 발현 및 활성을 유도하여 콜라겐의 분해를 촉진하므로써 궁극적으로 콜라겐의 축적을 감소시킨다.¹³

본 연구에서는 고농도(10 $\mu\text{g/ml}$)의 헤파린을 투여 시 TGF β_1 과 β_3 mRNA의 발현이 감소되는 결과를 보였다. 이는 문헌을 참고하여 예측했던 결과와는 다소 다른 것이다. 섬유화 촉진인자인 TGF- β_1 mRNA의 발현을 억제함과 동시에 섬유화 억제 인자로 알려진 TGF- β_3 mRNA 또한 억제하는 것으로 나타나서 TGF- β_3 의 발현이 증가할 것이라는 예상을 빚나간 것이다. 이는 헤파린의 항섬유화 작용이 주

로 TGF β_1 의 억제에 기인한다는 사실을 시사하고 있다.

MMP(Matrix metalloproteinase)는 세포의 기질을 분해하는 효소의 통칭으로 세포의 이동, 증식, 자멸사 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 특히 젤라틴분해효소인 MMP-2, 9은 콜라겐을 화학적으로 소화, 분해한다.¹⁴ 창상치유 과정에서 MMP-2는 장기적으로 창상의 재구성 시기에 중요한 역할을 하고, MMP-9은 초기 창상치유 과정에서 상피화 과정에 연관되어있다.¹⁵

본 연구에 따르면, 고농도의 헤파린은 MMP-2 mRNA의 발현을 현저하게 증가시켰다. 그러나 MMP-9의 발현은 고농도 헤파린 투여에서 유의하게 발현이 감소되었다. 이것은 헤파린이 MMP-2, 9의 발현을 모두 증가시킬 것이라는 예측과는 다소 다른 결과이다. 질병의 유발기간을 고려할 때, 장기적인 창상 재구성에 작용하는 MMP-2만이 증가한 것으로 생각된다.

헤파린 투여로 인해 섬유아세포의 콜라겐 1, 3형 생성이 감소된 것을 통해 헤파린의 항염증성, 항섬유화 기능을 확인할 수 있었으며, 향후 수근관 증후군의 치료에 사용할 수도 있을 것으로 전망된다. 그러나 TGF- β 동위형 및 MMP를 매개로한 작용에 대해서는 기존의 연구와 상충되는 부분이 있어 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

향후 정밀한 정량적인 분석을 위해 real time PCR을 이용하여 각종 세포분비물질의 시간대 별 추이를 관찰하거나, 실험대상을 질환의 급만성기에 따라 나누어 세분화된 변화를 관찰하는 연구로 발전시킬 필요가 있다.

V. 결 론

본 연구에서 특정 농도의 헤파린 투여에 의해 섬유증식 촉진 인자인 TGF- β_1 mRNA 발현이 감소하나 섬유증식 억제 인자인 TGF- β_3 mRNA의 발현도 감소되는 것으로 보아 헤파린이 TGF- β 동위형을 매개로 항섬유화 작용을 나타내지는 불확실하다. 또 고농도 헤파린 투여에서 MMP-2 mRNA 발현이 일부 증가되는 것으로 보아 MMP를 매개로 한 항섬유화 작용도 단정할 수 없다. 그러나 직접적으로 헤파린은 제1, 3형 콜라겐의 mRNA의 발현을 직접적으로 감소시킴을 관찰할 수 있었다.

REFERENCES

1. Stransky G, Weis S, Neumuller J, Hakimzadeh A, Firneis F, Ammer K, Partsch G, Eberl R: Morphometric analysis of collagen fibrils in idiopathic carpal tunnel syndrome. *Exp Cell Biol* 55: 57, 1987
2. Weis S, Stransky G, Dimitrov L, Wenger E, Neumuller J, Hakimzadeh A, Firneis F, Partsch G, Eberl R: Morphometric analysis of collagen fibrils in idiopathic carpal

- tunnel syndrome: Part2. *Exp Cell Biol* 55: 179, 1987
3. Scelsi R, Zanlungo M, Tenti P: Carpal tunnel syndrome. Anatomical and clinical correlations and morphological and ultrastructural aspects of the tenosynovial sheath. *Ital J Orthop Traumatol* 15: 75, 1989
 4. Freeland AE, Tucci MA, Barbieri RA, Angel MF, Nick TG: Biochemical evaluation of serum and flexor tenosynovium in carpal tunnel syndrome. *Microsurgery* 22: 378, 2002
 5. Miyasaka N, Sato K, Kitano Y, Higaki M, Nishioka K, Ohta K: Aberrant cytokine production from tenosynovium in dialysis associated amyloidosis. *Ann Rheum Dis* 51: 797, 1992
 6. Takasu S, Takatsu S, Kunitomo K, Kokumai Y: Serum hyaluronic acid and interleukin-6 as possible markers of carpal tunnel syndrome in chronic hemodialysis patients. *Artif Organs* 18: 420, 1992
 7. Frizelle S, Schwarz J, Huber SA, Leslie K: Evaluation of the effects of low molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice. *Am J Pathol* 141: 203, 1992
 8. Mousa SA, Mohamed S: Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol Rep* 12: 683, 2004
 9. Yard BA, Chorianopoulos E, Herr D, van der Woude FJ: Regulation of endothelin-1 and transforming growth factor- β_1 production in cultured proximal tubular cells by albumin and heparan sulphate glycosaminoglycans. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1769, 2001
 10. Okona-Mensah KB, Shittu E, Page C, Costello J, Kilfeather SA: Inhibition of serum and transforming growth factor β (TGF- β_1)-induced DNA synthesis in confluent airway smooth muscle by heparin. *Br J Pharmacol* 125: 599, 1998
 11. Shi J, Hao JH, Ren WH, Zhu JR: Effects of heparin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 9: 1611, 2003
 12. Mogford JE, Tawil N, Chen A, Gies D, Xia Y, Mustoe TA: Effect of age and hypoxia on TGF β_1 receptor expression and signal transduction in human dermal fibroblasts: impact on cell migration. *J Cell Physiol* 190: 259, 2002
 13. Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L, Ohishi M: TGF- β_3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *J Dent Res* 82: 558, 2003
 14. Parks WC: Matrix metalloproteinases in lung repair. *Eur Respir J Suppl* 44: 36s, 2003
 15. Agren MS: Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 131: 634, 1994