

헤파린이 쥐의 창상치유에서 MMP-1,2,9 mRNA의 발현에 미치는 영향

김한구¹ · 홍정수¹ · 김세환³ · 이미경² · 김승홍¹ · 김우섭¹

중앙대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 진단검사의학과², DF 성형외과³

Effect of Heparin on Expression of mRNA of MMP 1,2,9 in Adult Rat Wound

Han Koo Kim, M.D.¹, Jung Soo Hong, M.D.¹,
Sae Hwan Kim, M.D.³, Mi Kyoung Lee, M.D.²,
Seung Hong Kim, M.D.¹, Woo Seob Kim, M.D.¹

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, ²Pathology,
College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea,

³DF Plastic Surgery Clinic, Seoul, Korea.

Purpose: This study was to investigate how the heparin, which has been known to induce neovascularization by MMP in the infarcted tissue of the myocardium, had influence on the expression of mRNA of MMP 1,2,9 of the skin wound of rat.

Methods: Full depth skin wounds were created on the dorsum of Sprague-Dawley 60 rats. The experimental rats were divided into two groups according to the concentration of heparin(100 µg/ml in 20, 300 µg/ml in 20). Heparin soaked gelatin sponges in different concentration were inserted into the pocket of experimental rats and the wounds were closed. Normal saline soaked gelatin sponges were used in control rats. Wounds were harvested at 48 and 72 hours after closure. We performed histologic study in H-E stain. RNA was isolated from the harvested tissue and then real time polymerase chain reaction was performed to determine the gene expression of MMP-1,2,9.

Results: We observed that inflammatory cell decreased in heparin soaked group and heparin increased the expression of MMP-1,9 mRNA of dorsal wound of rat at 72 hours ($p < 0.05$).

Conclusion: This result suggest that heparin may be used inducing another factor inducing scarless wound healing by increasing MMP.

Key Words: Matrix metalloproteinases(MMPs), Heparin, Scarless wound healing

1. 서 론

태아의 반흔없는 창상치유가 외부 환경적 요인인지, 세포생물학 및 유전자발현 등 내부요인에 의한 것인지에 대한 논란이 있었으나, 태아의 외부 환경이 흉터 없는 상처 회복에 결정적 영향을 미치지 않는다¹고 알려진 후, 세포생물학 및 유전자 발현 등 내부요인의 영향에 대한 관심이 집중되고 있다.

기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)는 그 기능은 세포외 기질의 여러 가지 단백질을 분해하며, 기질 금속단백분해효소 조직억제제(tissue-derived inhibitors of MMPs, TIMP)에 의해 억제된다. 섬유모세포, 각질세포, 호중성백혈구, 대식세포에서 분비되는 MMP는 조직회복, 혈관생성, 조직의 발생과정에서 형태 형성에 중요한 역할을 하고, 창상의 여러 단계에서 활성이 조절 받게 되어 조절기전이 파괴되면 만성 창상 등 병적인 상태가 되며 특히 켈로이드와 비후성반흔에서 증가된 콜라겐 축적은 MMP-1, 9의 감소와 연관되어 있다고 보고되었다.²

흉터를 남기지 않는 태아의 창상에서는 MMP-1, 9가 성인의 창상에 비해 더 빠르고 더 크게 상승하며 MMP-2는 태아 창상에서 변하지 않지만 성인 창상에서는 감소한다. 이것은 콜라겐 축적의 감소, 세포 이동에 적당한 액상 기질(fluid matrix)을 만들어 결국 흉터 없이 창상치유를 유도하는 것으로 해석하고 있다.²

한편 헤파린은 심근경색의 경계 부위에서 혈관신생을 자극하여 심근경색의 범위를 줄이는데,³ 이것은 헤파린이 Ca²⁺ 유입과 티로신 활성효소를 활성화하여 인간심장 섬유모세포에서 MMP-1,2를 증가시킴에 의한 것이다. 즉 헤파린에 의한 혈관신생은 MMP에 의해 매개된다⁴는 것이다.

이점에 착안하여 본 연구에서는 쥐의 창상에 헤파린을 투여하여 실시간 증합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)으로 MMP-1,2,9 mRNA를 정량분석하여 MMP의 변화여부를 관찰함으로써 헤파린이

Received August 14, 2006
Revised December 18, 2006

Address Correspondence : Woo Seob Kim, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, 224-1 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-755, Korea. Tel: 02) 6299-1615 / Fax: 02) 825-9880 / E-mail: kimws@cau.ac.kr

* 본 논문은 1995학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해서 만들어진 논문임.

창상치유과정에서 MMP-1,2,9의 변화를 야기시키는지를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험동물 및 약물

실험동물은 체중이 200 - 220 gm 내외의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 암수구별 없이 70마리(실험군 40마리, 대조군 30마리)사용하였으며, 일주일간의 적응 기간을 거친 후 실험을 시작하였다.

Heparin(Heparin sodium salt, Sigma Aldrich, Korea)은 100 µg/ml, 300 µg/ml로 만들어 사용하였고, heparin의 carrier로는 gelatin(Cutanplast[®], Cutanplast, Korea)을 사용하였다.

나. 실험방법

1) 실험동물에 창상유발

5% ketamine hydrochloride(Ketar[®], 유한양행, 서울, Korea) 20 mg/kg와 xylazine hydrochloride(Rompun[®], 바이엘코리아, 서울, Korea) 2 mg/kg를 혼합해서 근주하여 흰쥐를 마취시킨 후 배부의 털을 깨끗이 면도하고 베타딘으로 피부를 소독하고 멸균된 상태로 실험에 임하였다.

실험군은 투약할 헤파린의 농도에 따라 각각 20마리씩 두 군으로 나누고, 흰쥐의 배부에 2cm의 절개를 가하고 피부를 박리한 다음 제 1군에서는 heparin 100 µg/ml용액에, 제 2군에서는 heparin 300 µg/ml용액에 1 × 1 cm 크기의 Cutanplast[®]를 5분간 적신 후 절개부 피하에 넣고 6-0 나일론으로 창상을 봉합하였다.

대조군은 heparin 대신, 생리식염수에 적신 Cutanplast[®]를 이용하여 동일한 방법으로 20마리에 시행하였고, 10마리는 창상을 가하지 않은 상태로 정상군으로 이용하였다.

2) 조직채취

수술 후 48시간과 72시간에 같은 술기로 마취 및 멸균

을 시행하고, 실험군에서 20마리(heparin 100 µg/ml에서 10마리, 300 µg/ml에서 10마리), 대조군에서 15마리의 흰쥐의 창상 가운데에서 2 × 2 mm 전층피부를 채취하여 RNA추출을 위해 보관하였다. 실험군 중 20마리(heparin 100 µg/ml에서 10마리, 300 µg/ml에서 10마리), 대조군 중 15마리는 창상 주위 약 2 mm 변연부를 포함하여 2.5 × 0.5 cm 크기의 창상전체를 절제하여 조직학적 검사를 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였다.

다. 평가방법

1) 조직학적 검사

10% 포르말린 용액에 고정한 조직을 4 mm 두께로 박편을 만들어 각 군의 Hematoxylin and Eosin 염색조직에서 침윤된 염증세포의 수를 현미경 400배 시야에서 세어 평균치를 구하고, 교원질의 침착 정도와 배열을 관찰하였다.

2) 실시간 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 MMP-1,2,9 유전자 발현의 상대정량

a) 시발체 합성과 표준화 곡선(standard curve) 준비
흰쥐의 MMP-1, 2, 9 유전자를 증폭할 수 있는 시발체(primer)와 내부 대조 유전자 증폭을 위한 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 시발체는 Primer Express 2.0(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 프로그램을 이용하여 고안하였다(Table I).

표준화 곡선에 필요한 genomic DNA는 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 추출한 후, 각각의 유전자들을 중합효소연쇄반응으로 증폭하였다. 이때의 PCR 반응액은 시발체 각각 0.5 µM, dNTP 250 µM, Tris-HCl(pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Taq DNA polymerase(Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN, USA) 0.5 unit, template DNA 4 µL에 멸균 증류수를 첨가하여 총 20 µL로 만들었다. PCR은 자동온도조절기(GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)를 이

Table I. Primers Used for Real-time PCR

Primer		Oligonucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)
MMP-1	Forward	TGGGATTTCCAAAAGAGGTG	121
	Reverse	ACGIGGTTCCCTGAGAAGA	
MMP-2	Forward	GGCCCTCIGCGGGTT	125
	Reverse	ATTGCACTGCCAACICTTTGT	
MMP-9	Forward	TGCGCTGGGCTTAGATCA	114
	Reverse	GGATGCCCTTTTATGTCGTCIT	
GAPDH	Forward	AATGTATCCGTTGTGGATCTGA	122
	Reverse	AGCCAGGATGCCCTTTA	

용하여 94°C에서 5분간 전 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 30초씩 35회 증폭하고 마지막으로 72°C에서 10분 동안 연장반응시켰다. 각각의 증폭산물은 3% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 증폭산물을 확인하였다. PCR 증폭 산물을 QIAquick[®] PCR purification kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제한 후 단계적으로 희석하여 실시간 정량적 PCR에서 표준 곡선의 template로 사용하였다.

b) 총 RNA 분리

총 RNA는 RNAqueous[®]-4PCR(Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 추출하였다. 채취한 조직은 즉시 1.5 ml 원심분리용 튜브로 옮겨 작은 막자로 분쇄한 후 guanidinium thiocyanate가 들어있는 Lysis/Binding 용액 400 µL를 첨가하여 조직이 완전히 균질화될 때까지 혼합하였다. 동량의 64% ethanol을 첨가하여 잘 섞은 후 silica로 이루어진 여과판(RNAqueous filter cartridge)에 혼합된 검체를 분주하고 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 이때 tRNA와 5S ribosomal RNA와 같은 매우 작은 RNA를 제외한 RNA가 여과판에 결합하게 된다. DNA, 단백질 및 다른 오염 물질을 제거하기 위하여 여과판을 새로운 원심분리용 튜브로 옮겨 키트 내에 제공된 세척용액으로 여과판을 3회 세척하고 여과판으로부터 RNA를 추출하기 위하여, 여과판을 새로운 튜브로 옮기고 80°C로 가온된 추출 용액 50 µL를 여과판의 중앙 부분으로 잘 분주한 후 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 RNA를 얻었다. 추출된 RNA 용액에 남아있을 DNA 제거를 위하여 DNase I(2 units/µL)과 완충액을 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 다시 DNase I을 비활성화시키기 위하여 DNase inactivation reagent를 첨가하여 실온에 2분간 방치한 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층을 새 튜브로 옮겨 cDNA 합성에 사용하였다.

c) cDNA 합성

cDNA 합성을 위한 역전사는 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 총 RNA 10 µL와 10 × reaction buffer(100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8.3) 5 µL, 25 mM MgCl₂ 10 µL, dNTP mix(dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 10 mM each) 5 µL, Random primer p(dN) 65 µL, RNase inhibitor 2.5 µL, AMV reverse transcriptase 2 µL에 DEPC-처리 멸균 증류수를 첨가하여 총 50 µL로 만들었다. 역전사 반응은 자동온도조절기(GeneAmp PCR system 2400)에서 25°C에서 10분, 50°C에서 60분간 반응시키고 역

전사 효소의 불활성화를 위해 99°C에서 5분간 반응시켰다. 합성된 cDNA는 QIAquick[®] PCR purification kit(Qiagen)를 사용하여 정제한 후, 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정제한 cDNA의 양과 순도를 확인하였다.

d) 실시간 정량적 PCR(real-time PCR)

실시간 정량적 PCR은 ABI PRISM[®] 7000(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였고, PCR 반응액은 2 × SYBR[®] Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 12.5 µL, 시발체 각각 320 nM, template 2 µL를 넣고 멸균 증류수를 첨가하여 총 25 µL가 되게 하였고, 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분씩 40회 반응시켜 증폭하였다. 이 때 SYBR Green은 PCR로 합성된 double-stranded DNA에 결합하여 형광을 나타내게 되므로, 반응이 진행됨에 따라 발생하는 형광신호를 각 주기마다 감지하여 유전자 증폭 양상을 실시간으로 분석함으로써 증폭 산물의 생성량을 측정하게 된다. 즉 증폭 초기에는 형광의 증가가 감지되지 않으나 일정 주기가 지나면 축적된 형광량이 비로소 기기에 감지되기 시작하는데, 이렇게 형광량이 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 주기수를 역치 주기(CT, threshold cycle)로 명명하고 있다. 그러므로 분석하고자하는 검체에서 표적 유전자의 CT값을 측정하면, 농도를 알고 있는 표적 유전자의 증폭 산물을 단계적으로 희석하여 PCR을 시행한 검체로부터 그려진 표준화 곡선을 이용하여 표적 유전자의 PCR 증폭산물의 양을 산출할 수 있다. 표적 유전자 발현의 상대 정량을 위한 내부 대조 유전자로 GAPDH를 이용하였으며, 표적 유전자 정량과 같은 방법으로 동시에 GAPDH를 정량한 후 GAPDH의 PCR 증폭산물에 대한 표적 유전자의 PCR 증폭산물의 비를 구하여 표적 유전자 발현을 상대 정량하였다. 모든 검체는 각각 2번 또는 3번의 독립된 실시간 정량적 PCR을 시행하여 이들 결과의 평균값으로 평가하였다.

또한 증폭이 끝난 PCR 산물의 dissociation curve 분석을 시행하여 증폭 산물의 용해 온도(melting temperature)를 확인함으로써 표적 유전자와 GAPDH의 PCR 증폭시 단일 산물이 증폭됨을 확인하였다(Fig. 1, 2).

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 대조군과 heparin 100 µg/ml군, heparin 300 µg/ml 군에서 MMP-1,2,9 mRNA 발현을 상대 정량하여 각 군에서 평균과 표준 편차를 구하였다.

라. 연구결과의 분석

본 연구에서는 대조군, heparin 100 µg/ml 실험군,

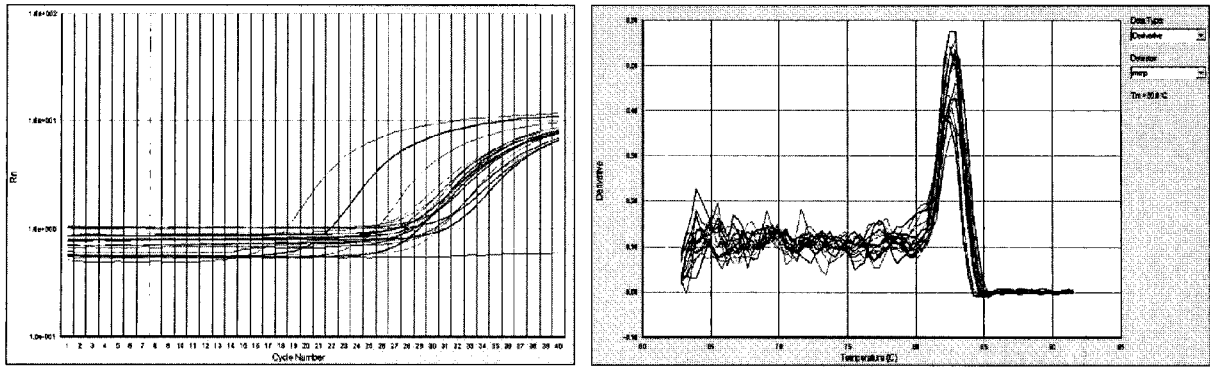


Fig. 1. Quantification of MMP-1 mRNA expression in real-time PCR. Serially diluted samples of purified MMP-1 PCR product and cDNA(unknown samples) were prepared and amplified for 40 cycles. (Left) Plotting fluorescence data against cycle number. (Right) Melting curve analysis for each sample was performed by plotting the first negative derivative of the fluorescence (F) with respect to temperature (T) against temperature [(-dF/dT) vs T] and showed a single melting maximum for each sample indicating specific amplification without primer dimer.

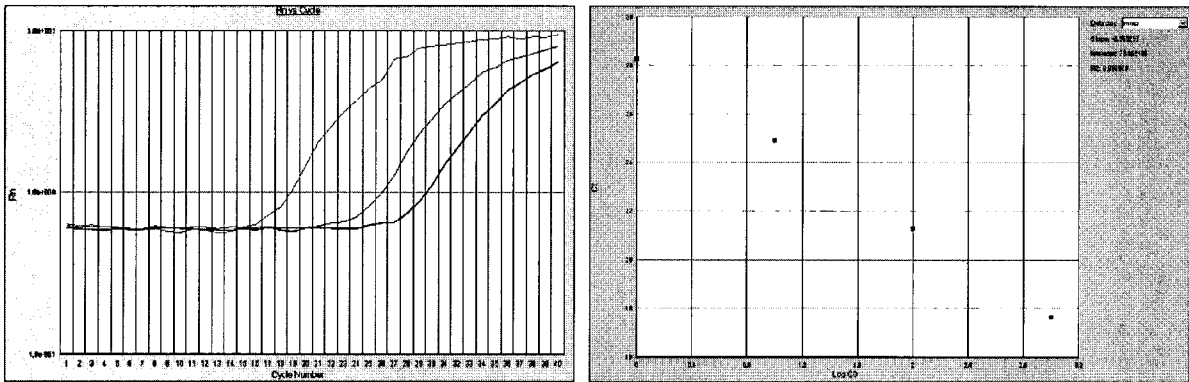


Fig. 2. (Left) Generation of an external standard curve for real-time PCR (a: 1×10^5 , b: 1×10^6 , c: 1×10^7 , d: 1×10^8). The graph shows the interrelationship between log F(fluorescence) and the amplification cycle; background levels are indicated by the horizontal line. The cycle at which the sample fluorescence crosses the background line is set as the threshold cycle(CT). (Right) Standard curve of MMP-1 for real-time PCR. The graph shows the regression curve resulting from threshold determinations for the serially diluted MMP-1 PCR products.

heparin 300 µg/ml 실험군 즉 세균을 비교할 수 있는 비모수적 검정인 Kruskal-Wallis Test를 시행하여 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적 의의가 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

가. 조직학적 검사

침윤된 염증세포의 수를 현미경 400배 시야에서 세어 평균치를 구하였으며 아무런 처리를 하지 않은 정상 대조군에서는 7.60 ± 1.67개의 염증세포가 관찰되었으며, 식염수로 48시간 처리한 군에서는 105.80 ± 4.32개로 관찰되었으며, 72시간 처리한 군에서는 99.40 ± 3.22개로 시간이 경과하면서 약간 염증세포가 감소하였다. heparin 100 µg/ml를 48시간 처리한 군에서는 75.60 ± 9.6개, 72시간 처리한

군에서는 73.80 ± 12.76개로 관찰되어 식염수로 처리한 군에 비하여 염증세포의 수가 감소하였고, heparin 300 µg/ml를 48시간 처리한 군에서는 75.20 ± 10.23개, 72시간 처리한 군에서는 49.20 ± 12.21개로, heparin 300 µg/ml를 72시간 처리한 군에서 현저하게 염증세포의 수가 감소하였다(Table II). 염증세포의 침윤 외에 교원질의 침착 정도와 배열은 각 군 간에 특별한 차이를 나타내지 않았다.

나. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 MMP-1,2,9 유전자 발현의 상대정량

MMP-1의 발현은 정상조직에서 7.47(± 2.35), 대조군에서 48시간에 11.82(± 6.91), 72시간에 9.22(± 5.01), heparin 100 µg/ml군에서 48시간에 10.54(± 5.28), 72시간에 18.31

Table II. Inflammatory Cell Counts(HPF × 400, *p*-value: 0.0001)

	48 hours	72 hours
Normal saline(control)	105.80(± 4.32)	99.40(± 3.22)
Heparin 100 µg/ml	75.60(± 9.6)	73.80(± 12.76)
Heparin 300 µg/ml	75.20(± 10.23)	49.20(± 12.21)

Table III. MMP-1 mRNA Expression(*p*-value *: 0.011)

	48 hours	72 hours
Normal saline(control)	11.82(± 6.91)	9.22*(± 5.01)
Heparin 100 µg/ml	10.54(± 5.28)	18.31*(± 8.94)
Heparin 300 µg/ml	10.35(± 2.08)	24.26*(± 5.24)

Table IV. MMP-2 mRNA Expression

	48 hours	72 hours
Normal saline(control)	3.44(± 3.48)	1.66(± 0.91)
Heparin 100 µg/ml	5.35(± 2.89)	5.26(± 5.93)
Heparin 300 µg/ml	5.52(± 2.20)	1.73(± 0.57)

Table V. MMP-9 mRNA Expression(*p*-value *: 0.013)

	48 hours	72 hours
Normal saline(control)	32.95 (± 20.41)	41.19* (± 18.30)
Heparin 100 µg/ml	40.04 (± 5.39)	44.93* (± 34.75)
Heparin 300 µg/ml	53.22 (± 9.45)	131.09* (± 37.75)

(± 8.94), heparin 300 µg/ml군에서 48시간에 10.35(± 2.08), 72시간에 24.26(± 5.24)의 평균과 표준편차였다(Table III).

MMP-2에서는 정상조직에서 5.51(± 1.75), 대조군에서 48시간에 3.44(± 3.48) 72시간에 1.66(± 0.91), heparin 100 µg/ml군에서 48시간에 5.35(± 2.89), 72시간에 5.26(± 5.93), heparin 300 µg/ml군에서 48시간에 5.52(± 2.20), 72시간에 1.73(± 0.57)의 평균과 표준편차였다(Table IV).

MMP-9에서는 정상조직에서 30.54(± 8.91), 대조군에서 48시간에 32.95(± 20.41) 72시간에 41.19(± 18.30), heparin 100 µg/ml군에서 48시간에 40.04(± 5.39) 72시간에 44.93(± 34.75), heparin 300 µg/ml군에서 48시간에 53.22(± 9.45) 72시간에 131.09(± 37.75)의 평균과 표준편차였다(Table V).

Kruskal-Wallis Test를 시행하여 대조군, heparin 100 µg/ml군, heparin 300 µg/ml군을 비교했을 때 48시간에서 *p*

값이 MMP-1은 0.990, MMP-2는 0.336, MMP-9는 0.108로 *p*값이 0.05보다 크므로 세군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없다.

72시간에서 *p*값이 MMP-1은 0.011, MMP-2는 0.852, MMP-9는 0.013으로 MMP-1과 MMP-9에서 통계학적으로 유의한 차이가 있었다. 즉, 대조군에 비해 heparin군에서 72시간에 MMP-1, MMP-9의 유의한 증가가 있었다.

IV. 고 찰

창상의 세포외기질은 피부 수복(cutaneous repair)에서 세포 유착, 이동, 증식, 분화에 중요한 조절 인자이다. 정상적인 창상세포외기질의 양과 구성은 전반적인 기질의 합성, 축적, 분해간의 역동적인 평형에 의해 결정된다. 이러한 정상적인 평형이 깨어지면, 과도한 기질 합성이나 부적절한 분해로 비정상적 기질 축적이 생길 수 있고, 또한 부적절한 기질 축적이나 과도한 분해로 인해 비정상적 기질 분해가 생길 수 있다. 창상기질에서 콜라겐, 당단백질, 엘라스틴(elastin), 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans)의 합성과 축적에는 섬유모세포와 각질세포가 중요한 작용을 한다. 반면에 창상기질 분해와 재형성에 관여하는 MMPs와 TIMPs는 다양한 세포에서 생산된다. MMPs는 정상 및 병적인 세포외기질 재형성에 관여하는 기질 금속단백분해효소군이며, 불활성 효소원(zymogen)으로 분비되어, 촉매활동에서 아연의존성이며, 기질특이성에 따라 분류되며, TIMPs에 의해 억제된다. MMPs는 콜라겐 분해에서 속도한계 효소(rate-limiting enzyme)로 작용하며, 또한 세포외기질의 다른성분, 엘라스틴, 섬유결합소(fibronectin), 프로테오글리칸 등을 분해한다.^{1,5}

창상 후 MMP-1, MMP-9, TIMP-1 mRNA가 첫 12시간에서 증가되며 2, 3일에 최고점에 이르는 것은 창상회복의 염증 및 증식단계에 일치한다. 기능적으로 호중구에서 필요에 따라 MMP-9, TIMP-1을 저장 및 분비하며, 반면 MMP-1은 각질세포이동에 필요하다.⁶ 창상 2, 3일 이후 MMP-1, MMP-9, TIMP-1 mRNA가 계속된 증가를 보이지 않는 것은 창상회복의 육아 및 재형성 단계에서는 필요하지 않다는 것을 의미하고, 창상 없는 정상 피부에서 관찰되는 MMP-1, MMP-9, TIMP-1 mRNA의 낮은 수치는 정상피부 유지에는 적은 역할을 하는 것으로 생각된다.⁵ 반면 창상 없는 정상피부에서 MMP-2 mRNA는 중등도의 발현을 보이며, 이는 정상진피 유지에 MMP-2가 역할을 하는 것을 의미한다고 하였으며,⁷ 창상 후 3일까지는 MMP-2 mRNA의 증가소견이 보이지 않다가 5일에 증가하여 14일까지 유지되는 것으로 보아 MMP-2가 창상회복

에서 육아 및 초기 재형성 단계에서 중요한 의미를 가진다고 하였다.⁵

MMP-1(collagenase-1)은 주로 섬유모세포, 대식세포, 이동하는 각질세포에서 생산되며, 콜라겐 대사에서 속도한계 효소로 작용한다. 일단 MMP-1에 의해 변성되면, 콜라겐은 MMP-9(gelatinase-B)에 의해 분해된다. MMP-2는 급성 창상 후에 수복(repair)보다는 진피구조의 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며,⁵ MMP-14(membrane type-1)는 TIMP-2와 pro-MMP-2와 결합하여 활성화된 MMP-2를 생산한다고 한다.⁸

인간의 만성 창상에서는 MMP-2, MMP-9 mRNA가 지속적으로 높은 농도로 나타난다고 하며,⁹ 이와 같이 높은 기질 금속단백분해효소는 만성 창상에서 육아조직 형성 부족을 야기한다. 이는 과도한 기질 금속단백분해효소가 유용한 성장인자와 세포외기질 성분을 분해하여 세포이동에 부적절한 세포외기질을 형성하여, 궁극적으로 육아조직 형성실패로 유도하기 때문이다.

켈로이드나 비후성 반흔도 부적절한 기질 금속단백분해효소에 의한 상처 재형성의 실패에 기인한다. MMP-1없이 TIMP의 지속적인 생산은 기질 금속단백분해효소의 활성을 저하하여, 과도한 세포외기질 축적, 상처의 재형성 실패로 이어진다.

Dang 등은 동물실험에서 흉터 없는 태아 창상과 흉터 있는 성인 창상에서 모두 MMP-1, 9 mRNA의 증가를 관찰하여, 이는 MMPs가 상처와 재상피화에서 급성반응의 일부라고 생각하였고, TIMP에 대한 MMP의 상대적인 증가가 세포외기질 대사전환(turnover) 증가, 콜라겐 축적의 감소, 세포이동에 적당한 체액 기질(fluid matrix)을 만들어 흉터 없는 창상에 관여한다고 하였다.²

헤파린은 심근경색의 경계부위에서 혈관신생을 자극하여 심근경색의 범위를 줄인다.³ Tyagi 등은 헤파린에 의한 혈관신생이 MMP에 의해 매개되며, 헤파린이 인간 심장 섬유모세포(human heart-derived fibroblast)에서 MMP-1, 2를 증가시키는데 이것이 Ca^{2+} 유입(Ca^{2+} transient)과 티로신 활성화효소 활성(tyrosine kinase activity)에 의한 것이라고 하였다.⁴

본 실험에서는 기존의 연구에서 MMP의 증가가 흉터 없는 창상치유를 유도하므로 MMP활성의 증가를 유도하는 방법 중에서 heparin의 효과를 알아보고자 실험하였다. Heparin 실험군에서의 농도는 Tyagi 등의 실험에서와 비슷한 100 μ g/ml, 300 μ g/ml로 사용하였고,⁴ 조직채취 시간은 Dang에 의한 실험에서 가장 증가한 시점인 48시간, 72시간으로 하여 실험하였다.² 조직학적 검사로는 400배 시야에서 염증세포를 세어본 결과 대조군에 비해 heparin 100 μ g/ml, 300 μ g/ml군에서 염증세포의 수가 감소하였

고, 염증세포의 침윤 외에 교원질의 침착 정도와 배열은 현미경적으로 각 군 간에 특별한 차이를 나타내지 않았다. 조직학적 결과에서 교원질의 침착과 배열에 차이가 없는 것은 창상 후 교원질의 침착이 5일 이후에 생기는데, 본 실험에서는 48시간, 72시간에 조직검사를 시행하였으므로 변화가 없었던 것으로 사료된다.

본 실험에서 창상 후 72시간째 MMP-1 mRNA가 대조군(생리식염수주입)에서 $9.22(\pm 5.01)$, 실험군 중 heparin 100 μ g/ml 주입군에서 $18.31(\pm 8.94)$, heparin 300 μ g/ml 주입군에서 $24.26(\pm 5.24)$ 으로 나와 대조군에 비해 실험군이 통계학적으로 의미있게 증가하였고, MMP-9 mRNA에서도 72시간째 대조군에 비해 실험군이 통계학적으로 의미있게 증가하였다. 반면 MMP-2 mRNA는 72시간까지 통계학적으로 의미있는 증감을 보이지 않았다.

이는 정상창상에서 다른 유발약제 없이 MMP-1, 9 mRNA의 증가가 창상 후 2, 3일째 최고점에 이르며 MMP-2 mRNA가 창상 후 3일째까지는 증가소견을 보이지 않는다는 기존의 실험⁵과 일치하는 소견을 보였다. 또한 같은 조건에서 헤파린이 창상 72시간 후에 MMP-1, 9 mRNA를 통계학적으로 유의하게 증가시키므로 Dang 등²에 의해 MMP-1, 9의 상대적인 증가가 반흔없는 창상을 유도한다는 기존의 실험결과를 본 실험과 연계하여 보면 헤파린이 반흔없는 창상치유를 유도하는데 유발물질이 될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 헤파린이 직접적으로 반흔없는 창상을 유도하는지에 대한 실험적 연구와 추후 기질 금속단백분해효소를 증가시킬 수 있는 다른 약제에 대한 동반 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 쥐의 등 부위에 창상을 만들어 헤파린을 준 창상과 주지 않은 창상을 비교하여 기질 금속단백분해효소가 증가하는지 관찰하여 헤파린이 흉터없는 창상치유에 효과가 있는지 알아보려고 실험을 하였다.

헤파린을 투여한 창상에서 72시간째 MMP-1, 9 mRNA가 증가하였으며, TIMP에 대한 MMP의 상대적인 증가가 반흔없는 창상을 유도한다는 기존의 실험과 연계하여 헤파린이 반흔없는 창상을 유발할 수 있는 또 다른 원인인자가 될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Lorens HP, Longaker MT, Perkocho LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzik NS: Scarless wound repair: a human fetal skin model. *Development* 114: 253, 1992
2. Dang CM, Beanes SR, Lee H, Zhang X, Soo C, Ting K:

- Scarless fetal wounds are associated with an increased matrix metalloproteinase-to-tissue derived inhibitor of metalloproteinase ratio. *Plast Reconstr Surg* 111: 2273, 2003
3. Carroll SM, White FC, Roth DM, Bloor CM: Heparin accelerates coronary collateral development in a porcine model of coronary artery occlusion. *Circulation* 88: 198, 1993
 4. Tyagi SC, Kumar S, Katwa L: Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J Mol Cell Cardiol* 29: 391, 1997
 5. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K: Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* 105: 638, 2000
 6. Triebel S, Blaser J, Gote T, Pelz G, Schuren E, Schmitt M, Tschesche H: Evidence for the tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1) in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 231: 714, 1995
 7. Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmanen H, Larjava H: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 70: 176, 1994
 8. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P: Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of progelatinase-A. *J Cell Biol* 137: 67, 1997
 9. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F: Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101: 64, 1993