

혈관내피성장인자의 섬유아세포 증식과 Notch 1 발현에 대한 영향

고성훈

한림대학교 의과대학 성형외과학교실

Vascular Endothelial Growth Factor Effect on Notch 1 Expression and Proliferation of Fibroblast

Sung Hoon Koh, M.D.

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Hallym University Sacred Heart Hospital, Gyeonggi-do, Korea

Purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known as a growth factor of endothelium and fibroblast. The purpose is to know the VEGF effects on fibroblast proliferation and fibroblast's notch receptor expression.

Methods: CCD-986sk fibroblast was purchased from the Korean Cell Bank and was used in XTT assay for proliferation and wound healing assay for migration. Immunofluorescent (IF) staining and western blotting were used in testing notch expression of fibroblast. Semi-quantitative RT-PCR was used in checking notch 1 mRNA production by fibroblast. Student-t test was used for analyzing results.

Results: Cell proliferation assay using XTT showed significant higher proliferation in VEGF treated fibroblast, 2.324 ± 0.0026 vs. 2.463 ± 0.017 ($p=0.002$). Wound healing assay showed longer migration in VEGF treated fibroblast ($p=0.062$). The fluorescence was brighter in VEGF treated cells of notch 1 IF staining. Notch 1 expressions and mRNA productions increased more in VEGF treated cells.

Conclusion: VEGF stimulates fibroblast to proliferate, migrate and to express Notch 1 simultaneously. Notch receptor could be related to VEGF mediated wound healing.

Key Words: Fibroblast, Notch receptor, Vascular endothelial growth factor

Received June 22, 2009
Revised August 10, 2009
Accepted December 3, 2009

Address Correspondence: Sung Hoon Koh, M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Hallym University Sacred Heart Hospital, 896 Pyeongchon-dong, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 431-796, Korea. Tel: 031) 380-3781 / Fax: 031) 380-5980 / E-mail: pshkoh@hanmail.net

1. 서 론

진피 내에 존재하는 섬유아세포는 생체 내에서 주위의 세포 기질과 밀접하게 관련되어 있으며, 다양한 생물학적 특성을 가지고 있다. 섬유아세포는 진피세포에 가장 많이 존재하는 세포로 여러 성장인자들을 합성하여 각종 세포의 기질의 형성 및 각질 형성세포나 기타 상처 회복의 구성요소들에 영향을 미친다.¹ 섬유아세포는 상처 회복 초기 화학주성 인자에 의해 상처내로 이동하여 TGF- β , FGF 등과 같은 각종 성장인자들을 분비함으로써, 혈관을 생성하고,² 육아 조직 형성에 필요한 성분들을 생산하여 골격을 생성하고,^{3,5} 창상수축을 일으키고, 기질분해효소를 합성하며,^{6,7} 교원섬유, 프로테오글리칸, 탄력소, 그 외 많은 기질단백을 합성하여 상처회복의 촉진에 중요한 역할을 한다.⁸

VEGF는 혈관형성을 유도하는 cytokine이고 정상 및 병적인 창상 회복에서 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁹ VEGF는 다양한 isoforms를 가지고 있으며, 혈관투과성 인자 (vascular permeability factor)일 뿐만 아니라 혈관신생과 세포 성장을 촉진시킨다.¹⁰ 최근 Gira 등에 의하면 VEGF 생산이 keloid의 밑에 있는 진피에 풍부하다. *In vitro* 연구에서 VEGF는 정상 피부의 섬유아세포 보다는 keloid에서 기원한 섬유아세포에서 높은 수준으로 발견되므로, 세포 외 기질의 변화를 통하여 keloid 형성에도 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.¹¹

Notch 수용체는 분자량이 약 300 kD에 달하는 세포막 관통 단백질 수용체로서 후생동물 (metazoa)의 발달 과정에서 세포의 운명을 결정하는 역할을 하고, 세포 내 신호전달 과정의 변이는 발암과정과도 관련되어 있다. 또한 혈관신생과도 관련되어 있는 것으로 알려져 있으므로 창상치유 과정에서 어떤 역할을 할 것으로 예상할 수 있다.¹² 또한 Notch 수용체와 VEGF는 종양의 혈관신생에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹³

따라서 본 연구에서는 피부의 재생과 밀접한 연관성을 가지고 있는 섬유아세포의 VEGF에 대한 반응과 Notch 수용체 발현에 대한 효과를 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 재료

단층으로 자라는 것으로 알려진 사람의 피부에서 기원한 섬유아세포 (CCD-986sk)를 한국 세포주 은행에서 구입하여 52.5%의 RPMI1640에, 40%의 FBS, 7.5%의 DMSO에 냉동되어있는 것을 해동하여 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)에서 90%의 25 mM HEPES와 25 mM NaHCO₃와, 10%의 heat inactivated fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 배양하였다.

대장균으로부터 만들어진 human vascular endothelial growth factor (Santa Cruz, Nunningen, Switzerland)를 사용하였다. Western blotting을 위한 Notch 1 antibody는 goat anti rabbit notch 1 antibody (Santa Cruz, Nunningen, Switzerland)를 사용하였다.

나. 섬유아세포 배양

CCD-986sk를 수분이 함유된 5% CO₂와 95%의 공기, 온도 37°C 인큐베이터에서 Falcon tissue culture dishes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 섬유아세포가 100% 꽉 찬 상태까지 단층배양한 후 실험 조건에 따라 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 넣고 배양한다. 대조군의 배지에는 약물을 첨가하지 않고, 실험군에는 100 ng/mL의 VEGF를 함유한 배양액을 사용하고 24시간씩 배양 한 후 검사를 시행하였다.

다. Cell proliferation assay

대조군과 VEGF 100 ng/mL을 첨가하여 배양한 섬유아세포의 성장을 측정 비교하기 위하여 XTT assay를 사용하였다. 준비된 XTT (2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt와 Phenazine methosulfate (PMS) reagent (WEL GENE, Seoul, Korea)를 37°C에서 완전히 녹인 다음 WelCount Cell Viability Assay Kits (WEL GENE, Seoul, Korea)를 사용하여 XTT reagent 1 mL를 20 µL PMS reagent에 혼합한다. 20% mixed media (20 µL)를 조심스럽게 첨가한 후 롤링하여 배양액을 혼합한다. 혼합한 후 세포들은 37°C의 5% CO₂ incubator (SANYO)에서 2시간 동안 방치한다. XTT formazan 용액이 골고루 퍼지도록 가볍게 두드린다. Microplate reader (Molecular devices, Minnesota, USA)를 사용하여 흡광도를 측정한다 (450 - 690 nm). 모든 실험은 3회 이상씩 반복한다.

라. Cell migration assay

세포를 배양하여 꽉 들어찬 상태로 되면 피펫 끝으로 틈

을 만들고, VEGF 100 ng/mL를 실험군에 첨가하였다. 48시간 동안 배양하며 12, 24, 48시간마다 시간대별로 세포들이 이동한 거리를 현미경으로 측정한 후 이동 거리를 처음 거리와의 차이를 계산하여 비교한다. 모든 실험은 3회 이상씩 반복하였다.

마. Notch 1

1) Immunofluorescent staining

배양된 세포들을 PBS에 3회 세척한 다음 4% polyformaldehyde가 들어있는 PBS로 상온에서 고정한다. 고정된 세포들을 PBS에 3회 세척한 후에 0.2% Triton x-100이 든 PBS에 상온에서 6분간 방치한다. 세포들을 PBS로 세척한 후에 5% BSA (bovine serum albumin)로 2시간 동안 상온에서 차단한 다음, rabbit polyclonal anti-Notch 1 항체를 (H-131, Santa Cruz, Nunningen, Switzerland) 1:100 농도로 2시간 동안 붙인다. 라벨된 세포들을 PBS로 마지막 세척한 후 상온에서 1시간 동안 FITC가 붙은 goat-anti-rabbit IgG (1:200) (sc-2012, Santa Cruz, Nunningen, Switzerland)로 염색한다. PBS로 세척한 후 Fluorescent mounting medium (s-3023, Dako Cytomation, CA, USA)로 마운팅한다. Confocal laser scanning 현미경으로 FITC를 발광시키는 488 nm 파장에서 관찰하고 사진을 3회 이상 촬영한다.

2) 단백질 검출

대조군과 VEGF 100 ng/mL을 24시간 처치한 후 세포배양 진행이 완료된 세포를 용해액으로 용해한 후 Bradford법을 이용한 bio-rad 분석 시약을 이용하여 spectrophotometer로 단백질을 측정한다. 적정량의 조직용해산물 (35 - 50 mcg)에 reducing sample buffer를 넣고 95°C에서 5분간 끓인다. Polyacrylamide gel (8 - 15%)에서 전기영동하여 각각의 단백질을 분리하고 완충액을 이용하여 nitrocellulose 흡착지에 전이하였다. 흡착지에 전이된 단백질에 각각의 일차 항체와 이차 항체를 반응시킨 후 항체를 제거한다. ECL solution kit을 이용하여 X-ray 필름에 감광시킨다. 감광시킨 필름을 scan하여 density를 구하여 b-actin 단백질의 density로 보정한 후 대조군과 비교한다.

바. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

제약회사의 지침대로 VEGF 100 ng/mL을 24시간 처치한 후 세포배양 진행이 완료된 섬유아세포들로부터 총 RNA를 Triazol reagent (Gibco BRL)을 사용하여 준비하였다. 총 RNA와 Gibco BRL kit를 template로 사용하고 oligo-dT를 프라이머로 사용하여 cDNA (complementary DNA)를 합

성한다. 인간 Notch 1 cDNA의 코딩부위를 5' 프라이머 5'-CAGCCTCACCTGGTGCAGAC; 3' 프라이머, 5'-GGCGA TCTGGGACTGCATG를 사용하였다. 내부 대조군으로써 질관리를 위하여 GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 프라이머들을 RT-PCR의 5' 프라이머: 5-GAGCTGAAC GGAAGCTCACTGG-3; 3' 프라이머: 5-C AACTGTGAGGAGGGGAGATTCAG-3로 cDNA를 만들어서 사용하고 94°C에서 denaturation, 63°C에서 annealing, 72°C에서 extension을 30 cycle씩 시행하였다. 밴드의 농도를 densitometer로 측정하여 GAPDH 측정치로 Notch 1 수용체의 농도를 보정하여 비교한다. Notch 1의 PRC 결과물의 크기는 724 bp, GAPDH의 PCR 결과물의 크기는 346 bp였다.

사. 통계적 분석

통계적 분석은 측정된 수치의 평균을 비교하는 것이므로 student t-test를 이용하여 검정하였다. 0.05 미만의 p 값을 의미 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

가. XTT assay

통계적으로 유의하게 섬유아세포들의 증식이 VEGF의 첨가로 일어나는 것을 알 수 있었다 ($p=0.002$), (Fig. 1). 대조군의 섬유아세포를 배양한 결과 OD450 측정치-OD690 측정치는 각각 2.320, 2.332, 2.328, 2.318, 2.322이며, 평균 2.324 ± 0.0026 (100%)이었다. VEGF 100 ng/mL을 첨가하고 배양한 결과는 각각 2.4443, 2.4477, 2.4482, 2.4467, 2.4448로써 평균 2.463 ± 0.017 (106%)이었다. 이를 백분율로 비교하면 100%와 106%로서 실험군이 대조군 보다 많은 세포성장을 보

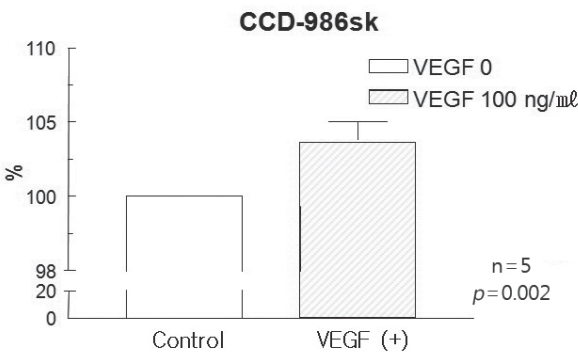


Fig. 1. The comparative result of CCD-986sk fibroblast proliferation without (2.324 ± 0.0026 , 100%) or with VEGF (vascular endothelial growth factor) 100 ng/mL through XTT assay (2.463 ± 0.017 , 106%). Student-t test was used for statistical analysis.

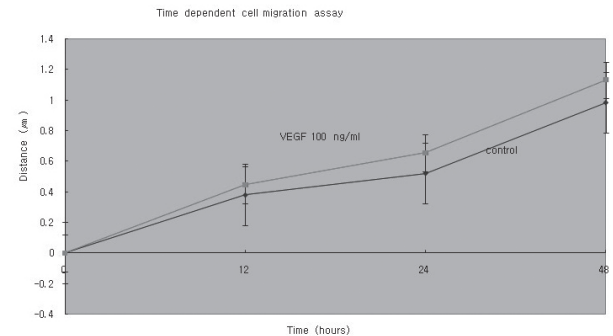
여서 VEGF가 섬유아세포들의 성장을 촉진함을 알 수 있다.

나. Cell migration assay

통계적으로 유의성을 보이지는 않았지만 VEGF를 첨가함으로써 섬유아세포들의 운동성이 시간이 지날수록 증가하여 멀리 이동하였음을 알 수 있다 ($p=0.062$), (Fig. 2). 대조군에서 처음 시작은 0.000 μ m라면, 12시간 후 $0.379 \pm 0.140 \mu$ m, 24시간 후 $0.521 \pm 0.100 \mu$ m, 48시간 후 $0.983 \pm 0.201 \mu$ m이었다. VEGF 100 ng/mL을 첨가한 군에서는 처음에 0.000 μ m라면, 12시간 후 $0.445 \pm 0.178 \mu$ m, 24시간 후 $0.654 \pm 0.277 \mu$ m, 48시간 후 $1.129 \pm 0.239 \mu$ m 이어서 시간이 지날수록 그 이동거리의 차이가 커짐을 알 수 있었다.

다. Notch 1 immunofluorescent staining

VEGF 100 ng/mL을 첨가한 세포에서 거의 밝기를 알 수 없는 음성대조군 및 양성 대조군에 비하여 Notch 1 수용체의 염색이 형광발현이 더 밝게 확인되었다 (Fig. 3). 따라서 VEGF의 영향을 받은 섬유아세포들의 Notch 1 수용체 발현이 증가하는 것으로 보인다.



Time (hours)	Control			VEGF 100 ng/mL		
	MEAN	SEM	N	MEAN	SEM	N
0	0	0	5	0	0	5
12	0.379	0.14	5	0.445	0.178	5
24	0.521	0.1	5	0.654	0.277	5
48	0.983	0.201	5	1.129	0.239	5

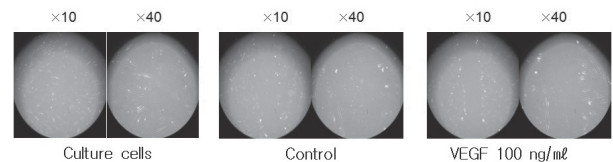


Fig. 2. Time dependent migration assays of fibroblast (CCD-986sk) under the influence of VEGF. VEGF 100 ng/mL made more fibroblast migration than the control cells (Student-t test, $p=0.062$). VEGF: vascular endothelial growth factor.

라. Notch 1 단백질 검출

단백검출결과는 b-actin 으로 보정한 결과 대조군이 각각 88, 97, 78, 89, 96으로 평균 89.6±7.64이었다. 실험군이 각각 100, 101, 126, 109, 119로 평균 111.0±11.34이었다. 결국 VEGF 100 ng/mL을 첨가한 섬유아세포에서 Notch 1 수용체의 단백질 검출량이 더 증가한 것으로 확인되었다. 따라서 VEGF는 섬유아세포를 자극하여 Notch 1 수용체의 생산을 촉진하는 것으로 보인다 ($p=0.005$), (Fig. 4).

마. RT-PCR

RT-PCR 결과를 GAPDH 결과로 보정한 결과는 대조군이 각각 111, 102, 101, 89, 106이었고 평균 101.8±8.16이었다. 실험군은 121, 114, 126, 109, 119로서 평균 117.8±6.53이었다. 따라서 대조군과 VEGF 100 ng/mL을 첨가한 세포에서 RNA를 분리하여 시행한 Notch 1 수용체의 mRNA 검출량이 실험군에서 증가하므로, VEGF의 영향 하에서 notch 1 유전자의 복제가 증가된다고 할 수 있다 ($p=0.045$), (Fig. 5).

IV. 고찰

전층 피부손상 후 자가 배양된 섬유아세포를 자가이식

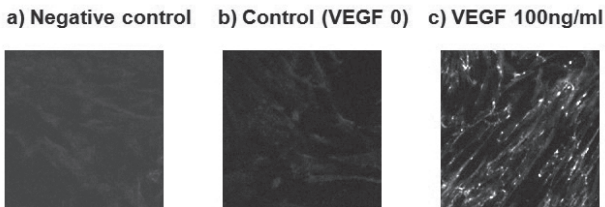


Fig. 3. Immunofluorescent stains of notch 1 receptor in fibroblasts (CCD-986sk) under the influence of VEGF (vascular endothelial growth factor) were performed. The figure of VEGF 100 ng/mL added cells (c) shows brighter expression than the others a) and b) (× 100).

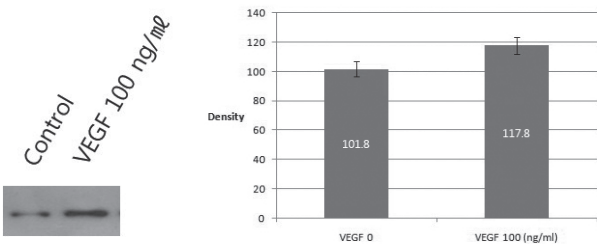


Fig. 4. The western blotting of Notch 1 receptor (300 kD) in fibroblasts (CCD-986sk) under the influence of vascular endothelial growth factor (VEGF) 100 ng/mL. VEGF made fibroblasts to produce more notch 1 ($p=0.005$).

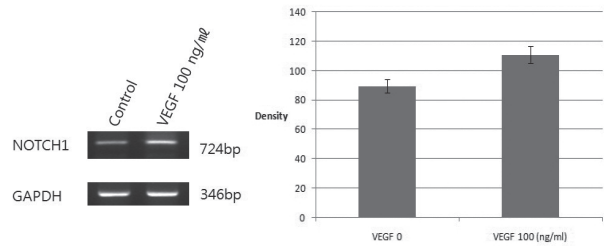


Fig. 5. The RT-PCR of Notch 1 gene in fibroblast (CCD-986sk) under the influence of vascular endothelial growth factor (VEGF) 100 ng/mL. VEGF resulted more mRNA production in fibroblasts ($p=0.045$).

하면 상처회복이 촉진되는데, 이 기전에는 TGF-β, FGF, VEGF 등이 초기 창상치유 과정에서부터 지속적으로 상승되어 있어서 혈관 및 육아조직 등의 빠른 증식을 일으키고, 이로 인한 빠른 재상피화 과정이 관련되어 있다.⁸ 상처치유가 잘 안되는 만성궤양 등에서는 serine protease, metalloprotease 등의 기질 분해효소는 활성화되어 있고, 히알유론산 등은 저하되어 상처 회복이 지연되며, 정맥 궤양의 진피 섬유세포는 TGF-β와 같은 화학주성인자에 대한 반응성이 저하되어 있어서 상처가 지연된 회복을 보인다.⁸ 이러한 만성 상처에서 정상 섬유아세포를 이식하여 기질 합성 및 성장인자의 증식을 유도할 수 있는데,¹⁴ 이와 같은 섬유아세포의 특성을 이용하여 화상, 만성 및 당뇨병성 피부궤양 등 특히 상처치유가 잘 안되는 피부질환 및 창상치유를 위하여 배양된 섬유아세포나 각질형성세포들을 단독 혹은 복합하여 만든 피부대체물을 이용한 치료로 응용할 수 있다.¹⁵ 섬유아세포는 정상적인 또는 병적인 상황에서 주위에 존재하는 여러 세포들에서 생산되는 많은 cytokines에 의하여 영향을 받고, 섬유아세포의 이동과 물질들의 생산에 관여한다. 한편 섬유아세포나 각질형성세포에서 나온 각종 성장인자에 의한 치료효과에 대하여 연구가 진행되고 있으며,¹⁵ 특히 섬유아세포를 이용한 치료법은 피부이식 수술법에 비하여 공여부위 피부의 제약을 받지 않고 cadaveric grafts의 문제점인 거부반응도 거의 없으며, 입원하지 않고 외래에서 시행할 수도 있어 수술 부담을 줄이고 회복시간을 단축시킬 수 있는 장점이 있다.¹⁵

본 연구에서는 섬유아세포가 분비하는 것으로 알려진 혈관내피성장인자가 섬유아세포 자신에 대하여 어떻게 작용하는 지 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. 그 결과 세포 성장과 이동에 관련된 두 실험을 통하여 섬유아세포들이 자신이 분비하는 혈관내피세포에 반응하여 증식이 촉진되고 이동도 증가하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 1, 2). 따라서 섬유아세포는 세포 자신이 분비하는 혈관내피세포 성장인자에 대하여 스스로 반응함으로써 자가 증식을 초래하는 것일 수

있다고 할 수 있다. 이렇게 혈관내피세포 성장인자가 섬유아세포들의 성장을 촉진하는 과정에서 Notch 1 수용체의 발현과 mRNA의 생성이 증가하는 것도 관찰되었다 (Fig. 3, 4, 5). 이런 결과로 보아 두 과정 간에 어떤 관련 가능성을 배제할 수 없다.

Notch 수용체는 혈관신생이나 발암과정 및 줄기세포와 관련이 있는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서와 같이 섬유아세포에서도 발현될 뿐만 아니라 VEGF에 의하여 그 발현이 증가하는 것을 볼 때 창상치유와 관련된 역할도 있을 것으로 예상된다. 또한 VEGF가 VEGF 수용체와 결합하여서 일어나는 반응 중에 Notch 신호전달과 관련된 분자들이나 경로를 이용할 수 있다는 가능성을 보여준다. 이와 같은 결과들은 섬유아세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 노화연구나 창상치유 연구를 위하여 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 동물실험과 인체 연구를 통한 증명으로써 VEGF를 상처회복이 지연되고 있는 사람에게 치료제로 사용할 수 있을 것으로 생각되며, 이와 관련된 notch와 관련된 더 깊은 연구를 통하여 새로운 기전이 규명되어야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

피부 절개나 회복이 더딘 창상의 치유에서 VEGF의 사용은 혈관의 증식효과 뿐만 아니라 섬유아세포들의 증식과 이동을 촉진하는 효과로 인하여 상처 회복의 촉진할 것으로 사료 된다. 또한 VEGF에 의하여 발현이 증가하는 것으로 본 연구결과 밝혀진 Notch 1 수용체 및 신호전달과정이 관련되어 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ: Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol* 92: 61S, 1989
2. Singer AJ, Clark RA: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 738: 341, 1999
3. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, Ciliberto G: Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 16: 187, 1998
4. Noso N, Sticherling M, Bartels J, Mallet AI, Christohpers E, Schroder JM: Identification of an N-terminally truncated form of the chemokine RANTES and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as major eosinophil attractants released by cytokine-stimulated dermal fibroblasts. *J Immunol* 156: 1946, 1996
5. Xu J, Clark RA: Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. *J Cell Biol* 132: 239, 1996
6. Malcain SA, Simon M, Jones E, Nandi A, Gailit JO, Tonnesen MG, Newman D, Clark RA: Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of the granulation tissue induction. *Am J Pathol* 149: 1257, 1996
7. Welch MP, Odland GF, Clark RA: Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 110: 133, 1990
8. Hasan A, Murata H, Fallabella A, Ochoa S, Zhou L, Badivas E, Falanga V: Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor β 1. *J Dermatol Sci* 16: 59, 1997
9. Le AD, Zhang Q, Wu Y, Messadi DV, Akhonzadeh A, Nguyen AL, Aghaloo TL, Kelly AP, Bertolami CN: Elevated vascular endothelial growth factor in keloids: relevance to tissue fibrosis. *Cells Tissues Organs* 176: 87, 2004
10. Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249, 2000
11. Gira AK, Brown LF, Washington CV, Cohen C, Arbisser JL: Keloids demonstrate high-level epidermal expression of vascular endothelial growth factor. *J Am Acad Dermatol* 50: 850, 2004
12. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM: Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128: 3675, 2001
13. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 15: 946, 2005
14. Lamme EN, Leeuwen RT, Jonker A, van Marle J, Middelkoop E: Living skin substitutes: Survival and function of fibroblasts seeded in a dermal substitutes in experimental wounds. *J Invest Dermatol* 111: 989, 1998
15. Svensjo T, Yao F, Pomahac B, Winkler T, Eriksson E: Cultured autologous fibroblasts augment epidermal repair. *Transplantation* 15: 1033, 2002