



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2010년 2월
박사학위 논문

다낭성난소 유발 흰쥐의 피부상처
회복에 따른 분비백혈구단백
분해효소억제제의 발현

조선대학교 대학원

치의학과

김 성 신

다낭성난소 유발 흰쥐의 피부상처
회복에 따른 분비백혈구단백
분해효소억제제의 발현

Expression of Secretory leukocyte protease inhibitor
(SLPI) on the rat skin wound healing in Polycystic
ovary syndrome (PCOS)

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

김 성 신

다낭성난소 유발 흰쥐의 피부상처
회복에 따른 분비백혈구단백
분해효소억제제의 발현

지도교수 장 현 선

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 10월

조선대학교 대학원

치의학과

김 성 신

김성신의 박사학위논문을 인준함

위원장 전남대학교 교수 김 영 준 인
위 원 조선대학교 교수 이 상 호 인
위 원 조선대학교 교수 김 병 옥 인
위 원 조선대학교 교수 정 문 진 인
위 원 조선대학교 교수 장 현 선 인

2009년 12월

조선대학교 대학원

목 차

도목차.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. 서 론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	4
1. 다당성난소 유도.....	4
2. 피부상처유도.....	4
3. 조직절편 제작 및 조직화학적 분석.....	4
4. 역전사중합효소반응.....	5
5. 면역학적 단백질 검출법.....	6
6. 면역조직화학적 염색.....	7
7. 통계분석.....	8
III. 실험결과.....	9
1. 상처부위 면적측정.....	9
2. 각질세포 이동율.....	9
3. 염증세포 수 측정.....	9
4. 대식세포 수 측정.....	9
5. 교원질 침착 측정.....	10
6. 상처조직에서 SLPI mRNA와 단백질 발현.....	10
7. 상처부위 및 재생중인 상피층에서 SLPI 단백질 발현.....	10
IV. 총괄 및 고안.....	12

V. 결 론.....17

참고문헌.....19

사진부도설명.....30

사진부도.....34

도 목 차

Figure 1. Difference of skin wound area between normal and EV treated group	34
Figure 2. Difference of keratinocyte migration rate between normal and EV treated group.....	35
Figure 3. Difference of recruited inflammatory cells between normal and EV treated group.....	36
Figure 4. Difference of recruited macrophage between normal and EV treated group.....	37
Figure 5. Difference of accumulated collagen between normal and EV treated group (MT stain).....	38
Figure 6. Difference of accumulated collagen between normal and EV treated group (Picrosirius Red stain).....	39
Figure 7. Differential expression of SLPI in skin wounds between normal and EV treated group.....	40
Figure 8. SLPI expression between normal and EV treated group on the skin wounds.....	41

ABSTRACT

Expression of Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on the rat skin wound healing in Polycystic ovary syndrome (PCOS)

Kim Sung Sin

Advisor : Prof. Jang Hyun-Sun D.D.S, M.S.D., PhD.

Department of Dental Science,

Graduate School of Chosun University

Estrogen promotes the wound healing rate through the reduction of excessive inflammatory response, accelerating re-epithelialization and increasing amount of collagen deposition. Excessive administration of Estradiol valerate (EV) which using for hormonal therapy was known that decreased abruptly concentration of estrogen and induce the Polycystic ovary syndrome (PCOS). Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) promotes wound healing through the inhibition of excessive inflammatory response and acceleration of keratinocyte proliferation. The expression of SLPI by stimulation with estrogen has been reported to increase. The purpose of this study is to investigate functional role of SLPI on the cutaneous wound healing process within PCOS as the systemic reduction of estrogen concentration.

The wound area of PCOS group was larger than the normal group.

Keratinocyte migration rate of PCOS group was lower than the normal group. The inflammatory cells in wound area within PCOS group were increased compared to the normal group and collagen deposition was more increased on normal group. The Mac-3 positive cells were increased in wound area of PCOS group compared with normal group at day 1 but increased on normal group at day3 and day 5. SLPI mRNA and protein expression in skin wound were higher on PCOS group than normal group. Expression intensity of SLPI in dermis was more increased in PCOS group compared with normal group at day 3 and day 5 but in case of regenerated epithelium, intensity was high in normal group. Taken together, skin wound healing was delayed in PCOS group compared with normal group. In unwounded skin of PCOS group, expression of SLPI was lower than normal group. After wounding, the expression of SLPI was increased in wounded skin of PCOS group compared with normal group.

In conclusion, SLPI may be an important regulatory molecule involved in the skin wounds within PCOS, which has hormonal imbalance with reduced estrogen. Specially, we suggest that SLPI can be possibly used as an agent for reducing of side effects by hormonal treatment on the chronic inflammation and wound healing process of the postmenopausal women.

Key Words: Estrogen, Wound healing, Estradiol valerate, Polycystic ovary syndrome, Secretory leukocyte protease inhibitor

I. 서 론

피부상처의 회복과정은 세밀하고 복잡한 생물학적 기전을 통해 이루어지는데 크게 지혈 및 염증, 상피재생 및 과립조직형성 그리고 기질재구성의 세 단계로 나눌 수 있다(Stephens & Thomas, 2002). 이 과정은 조직학적 또는 기능적으로 구분되지만 실제로는 시기적으로 겹쳐서 일어나며 상처부위 조직에 존재하는 염증반응세포 및 섬유모세포와 각질세포의 상호 작용에 의해 이루어지고 그 결과 상처부위의 미세환경 변화를 유도하게 된다(Werner et al., 2007; Toriseva & Kähäri, 2009).

성호르몬들은 상처치유 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌는데 그 중 여성 호르몬인 에스트로겐은 각질세포의 증식을 자극하여 상처부위의 재생피화를 촉진하고 진피층 섬유모세포에서 전환성장인자- β 1(Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 분비를 증가시켜 과립조직 형성을 자극하며 교원질 침착을 증가시키는 것으로 알려졌다(Ashcroft et al., 1997; Grande, 1997; Beck et al., 1993). 국소적인 또는 전신적인 에스트로겐 치료는 염증반응 기간을 줄여 남성과 나이든 여성의 상처치유 속도를 가속화 시키는 것으로 보고되었다(Ashcroft et al., 1997; 1999).

다낭성난소증후군(Polycystic ovary syndrome, PCOS)은 가임기 여성 무배란증의 가장 대표적인 원인 중 하나로써 복잡한 내분비 및 대사장애에 의해 일어난다(Chen, 1997; Paradisi et al., 1988; Garcia-Rudaz et al., 1998). PCOS 난소에서는 정상 난소와 달리 우성 배란전난포(dominant preovulatory follicles)가 보이지 않고 안드로겐을 생산하는 다발성 동난포(antral-follicle)가 관찰된다(Lara et al., 2000). PCOS 환자들은 남성호르몬인 안드로겐 농도가 과다하게 되어 다모증, 여드름, 그리고 탈모증 등과 같은 피부 이상과 관련된 증상을 겪는 것으로 알려져 있다(Balen, 1999). 호르몬 불균형 상태인 PCOS는 내분비계에 영향을 미쳐

비만과 당뇨병 같은 합병증을 유발하기도 한다(Franks, 1995; Lara et al., 1993). Estradiol valerate(EV)는 폐경기 여성의 호르몬 치료에 사용되는 에스트로겐 대체물질 중 하나로써(Dören, 2000) 과다하게 투여할 경우 PCOS가 유도되고 유방압통, 두통 그리고 발바닥 종창형성 등과 같은 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다(Brawer et al., 1986; Koninckx et al., 1993; Hamad et al., 2002). 또한 EV 투여 후 순환 에스트로겐 농도가 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Schulster et al., 1984). 이러한 호르몬 불균형 상태는 여성에게서 건선과 같은 만성염증성 피부질환 발생 시 회복을 지연시키거나 방해하는 것으로 보고되었다(Mowad et al., 1998).

분비백혈구단백분해효소억제제(Secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 크기가 11.7kD이고 Chymotrypsin, Trypsin, Pancreatic elastase, Cathepsin G, Mast cell chymase 같은 Serine계열의 단백분해효소들을 억제하며 기관지, 비강과 자궁경부의 점막층과, 침샘과 정장의 상피층에서 다량 분비되는 것으로 알려졌다(Seemüller et al., 1986; Thompson & Ohlsson, 1986). SLPI 단백질은 130개 아미노산으로 이루어져 있으며 N-말단에는 항균작용을 하는 영역이 있고 C-말단에는 항단백분해 기능을 하는 부위가 존재한다(Eisenberg et al., 1990). 최근 연구에서는 상아모세포에서 SLPI가 초기 염증반응에 기여하는 항염증인자로서 알려졌다(Choi et al., 2009). 또한 SLPI는 염증부위에 분비된 단백분해효소들로부터 조직을 보호하는 기능뿐만(McElvaney et al., 1992) 아니라 상처회복과 세포 증식을 촉진하고 에이즈 바이러스 감염억제, 항박테리아 및 항곰팡이 기능도 있는 것으로 보고되었다(Shugars & Wahl, 1998; Laurie et al., 2002; Sallenave, 2002).

PCOS와 같은 호르몬 불균형 상태는 피부상처회복을 지연시킬 뿐만 아니라 여러 합병증을 동반한다. 최근에 난소를 제거하여 에스트로겐의 분비를 막은 생쥐의 피부상처 회복속도가 현저하게 저하되는 것으로도 보고되었다(Holcomb et al., 2009). SLPI는 피부와 구강점막에 일어난 상처의 회복을 촉진하는 것으로 알려져 있고(Ashcroft et al., 2000;

Angelov et al., 2004), 프로게스테론과 에스트로겐에 의해 발현이 조절되는 것으로도 알려졌다(King et al., 2003; Chen et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 PCOS와 같은 호르몬 불균형 상태가 피부 상처회복에 어떤 영향을 미치는지 조사해보고 그에 따른 SLPI의 발현과 기능을 규명하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 다낭성난소(Polycystic ovary, PCO) 유도

무게가 190-210 g이고 4일 간격으로 성주기를 보이는 7주령된 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐(Samtako Bio, KOR)에 Estradiol valerate(Sigma-Aldrich, USA) 4 mg을 근육 주사하고 60일 후 PCO가 확인된 것을 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 전 기간 동안 사육환경을 온도 23±2°C 상대습도 60±10 %로 유지하고 12시간의 명암주기가 유지되는 실내에서 사료와 식수를 자유로이 공급하였다. 본 실험은 조선대학의 실험동물윤리 지침에 의거 Specific pathogen free(SPF) 수준의 동물 사육시설을 이용하였다.

2. 피부상처 유도

실험군인 EV투여 흰쥐 8마리와 EV를 투여하지 않은 정상 흰쥐 8마리에 염산케타민(Ketamin, 0.2 ml/100g, Yuhan, KOR)과 럼푼(Rompun, 0.08 ml/100g, Bayerkorea, KOR)혼합액을 대퇴부에 근육 주사하여 마취시켰다. 마취 후 등 쪽 털을 제모하고 알콜 솜으로 소독한 후 수술용 블레이드를 이용하여 진피층 깊이까지 길이 1 cm 크기의 상처를 6곳에 1 cm 간격으로 각각 유도하였다. 상처 유발 후 1일, 3일, 5일, 7일째의 상처 부위 조직을 각각 적출하여 실험에 사용하였다. 대조군으로는 EV를 처리한 흰쥐와 처리하지 않은 것의 정상 피부조직을 각각 사용하였다.

3. 조직절편 제작 및 조직화학적 분석

흰쥐는 Ethyl ether를 흡입시켜 희생시키고 적출한 피부 상처 조직은 즉시 고정액(4% paraformaldehyde, in 1× phosphate-buffered saline: PBS, pH 7.4)에 옮기고 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 1× PBS 용액으로 2시간 세척하고, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % I, 100 % II, 100% III, 100 % IV 에탄올 처리를 하여 탈수하였으며, 자일렌으로 투명화 과정을 거친 후 파라핀을 침투시켜 포매 하였다. 파라핀 포매된 조직을 Motorized Rotary Microtome MT990(RMC products, USA)을 이용하여 6 μm 두께로 절편을 만든 후 3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate(SIGMA, USA)로 코팅된 유리 슬라이드에 올리고 37°C 신 전기 위에서 하루 동안 건조 하였다. 제작된 조직 절편은 형태학적 변화 관찰 및 상처부위 면적을 측정하기 위하여 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하였고, 염증세포 수 분석을 위한 Giemsa 염색, 기질 재형성 시 나타나는 교원질 분석을 위한 Masson's Trichrome(MT) 및 Picrosirius Red 염색을 추가로 수행하였다. 상처면적 측정은 치유중인 상피와 결합조직의 변연부를 따라 측정하였고, 염증세포 수는 상처부위 좌측, 중앙 그리고 우측에서 각각 측정하였다. 또한 각질세포 이동률은 재생된 상피조직의 길이를 측정하였다. Picrosirius Red로 염색된 조직은 편광현미경(Carl Zeiss, GER)으로 관찰하였고 나머지 조직 관찰에는 광학현미경(Carl Zeiss)을 사용하였다. 조직분석에는 AxioVisionLE release 4.6(Carl Zeiss) 프로그램을 이용하였다.

4. 역전사중합효소반응 (Reverse Transcription and Polymerase chain reaction)

적출한 피부상처 조직은 Tri reagent(MRC Inc, USA)와 함께 액체질 소로 급속 냉동 시킨 후 분쇄하였고 제조 회사에서 제공된 설명서를 참고하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 1 μg 을 상보성 DNA(Complementary DNA, cDNA) 합성을 위해 AccuPower RT Premix(Bioneer, KOR)에 첨가하여 역전사(Reverse-transcription, RT)반

응을 하였고, AccuPower PCR Premix(Bioneer)에 합성된 cDNA 1 μ l를 첨가하여 중합효소반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 흰쥐 SLPI 특이적 프라이머인 Forward: 5'-ATC AAA ATC GGA GCC TGC CC-3', Reverse: 5'-TGG CCG TCA TTC TGG CAC TT-3'와 대조 발현군인 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 특이적 프라이머인 Forward: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GG-3', Reverse: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'을 제작하여 (Bioneer) PCR 반응에 사용하였다. 반응조건은 SLPI가 32 cycles, 94°C 5분, 94°C 40초, 66°C 40초, 72°C 35초, 72°C 5분, GAPDH는 30 cycles, 94°C 5분, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초, 72°C 5분으로 각각 설정하였다. PCR 반응 후 생산물은 0.5 \times Tris-Borate-EDTA buffer(TBE buffer)에 Ethidium bromide(EtBr)가 첨가된 1.5 % 농도의 아가로스겔에 전기영동 한 후 Gel-Doc(BioRad Laboratories, USA)에서 확인하였다. 전기영동 후 확인된 SLPI 밴드 크기는 239 bp이고 GAPDH는 199 bp로 확인되었다. 각 밴드의 밀도 측정 및 정량은 Science lab Image Gauge(FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용하였다.

5. 면역학적 단백질 검출법(Western blotting)

피부상처 조직에서 SLPI 단백질과 대조 발현군인 β -actin 단백질 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출 방법을 사용하였다. 적출한 피부상처 조직은 NP-40 lysis buffer(150 mM NaCl, 1 % NP-40, 50 mM Tris-Cl(pH 7.4), 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 2 mM EDTA(pH 7.4) 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin 그리고 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin)와 액체질소를 이용하여 분쇄하였고 얼음에 30분간 처리한 후 13,000 rpm 속도로 30분간 원심분리를 통해 세포질 총 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 μg 씩 각각 같은 양을 정량 하였고 SDS 15 % -Polyacrylamide 겔에 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질을 Nitrocellulose 막으로 이동 시킨 후, Blocking solution(1 \times PBS + 5 %

skim milk)에서 1시간 동안 실온 반응을 한 뒤에 세척 후, 새로운 Blocking solution에 1차 항체인 anti-rabbit SLPI(Choi et al., 2006)를 1:500 농도로 그리고 anti-mouse β -actin(SIGMA) 1:2,500 비율로 각각 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 다음으로 세척 후 HRP(horseradish-peroxidase)가 연결된 Goat-anti-rabbit과 Goat-anti-mouse 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 1:10,000 비율로 처리하고 ECL(Amershampharmacia, UK) 용액을 이용하여 발색 시킨 후 Chemiluminescence film(Amershampharmacia)을 이용하여 현상하였다. 현상 후 나타난 단백질 밴드의 밀도 측정 및 정량은 Science lab Image Gauge (FUJI FILM) 프로그램을 이용하였다.

6. 면역조직화학적 염색(Immunohistochemistry)

준비된 조직표본을 자일렌 I, 자일렌 II, 자일렌 III에 순서대로 5분씩 처리하여 탈 파라핀을 하고 100 %, 90 %, 80 %, 70 % 에탄올에 각각 5분씩 단계적으로 흡수처리 하였다. 1× PBS로 조직표본을 5분씩 세 번 세척 후 1차 Blocking으로 과산화수소가 포함된 완충액(0.6 % H₂O₂ in Methanol)을 20분간 상온에서 조직 표본 위에 처리 하였다. 다시 PBS로 조직 표본을 5분씩 세 번 세척 하고 Normal goat serum(Vector Lab, USA) 15 μ l를 1× PBS 1 ml에 희석한 용액을 20분간 상온에서 처리하는 2차 Blocking을 수행 하였다. Normal goat serum 희석액을 간단히 제거하고 새로운 Normal goat serum 희석 용액에 anti-rabbit SLPI(Choi et al., 2006)와 anti-mouse Mac-3(BD Biosciences Phamingen, USA)를 각각 1:500, 1:250의 비율로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 처리 하였다. 다음 날, 1× PBS로 10분간 두 번 세척 후 2차 항체인 Goat-anti-rabbit IgG(Vector Lab)와 Goat-anti-mouse IgG(Vector Lab)를 1:200 비율로 동일 용액에 희석하여 상온에서 20분간 각각 처리 하였다. 다음으로 1× PBS로 10분간 2회 세척 후, 사용하기 30분전 1× PBS 용액에 희석한 ABC 시약(Vector Lab)을 조직 표본 위에 20분간

반응시켰다. 다시 1× PBS로 10분간 2회 세척 과정을 거치고 0.05 % DAB(Deaminobenzidine Tetrahydrochloride; Vector Lab)를 이용하여 1분 40초 동안 발색시켰다. 발색시킨 조직 표본을 2차증류수에 10분간 세척 후 Hematoxylin (Samchun Chemical, KOR)에 15초간 대조염색 하였고 다시 2차증류수에 세척한 후 조직 표면에 탈수, 투명 및 봉입 과정을 수행 하였다. 염색된 조직 표본은 광학현미경(Carl Zeiss)을 통해 관찰 하였다. 피부상처 조직에서 측정된 SLPI 단백질의 발현 강도는 상처 영역과 재생중인 상피층을 픽셀값으로 각각 나타냈고, Mac-3에 의해 염색된 대식세포 수는 상처 영역에서 측정하였다. 픽셀값과 대식세포 수 측정에는 Axiovision LE release 4.6(Carl Zeiss) 프로그램을 이용하였다.

7. 통계분석

RT-PCR, 면역학적단백질검출, 면역조직화학적염색, 상처면적, 각질세포 이동율, 염증세포 수, 대식세포 수 그리고 교원질 합성에 대한 측정값은 Excel 2007 프로그램(Microsoft, USA)에서 평균과 표준편차로 나타냈고 유의도 분석을 위해 Student *t*-test를 수행 하였다. Student *t*-test에서 $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적 차이가 있음을 의미한다.

III. 실험 결과

1. 상처부위 면적측정

정상군과 EV투여군 사이의 상처부위 면적변화를 비교하기 위해 상처 유도 후 1일, 3일, 5일 그리고 7일째 상처조직 표본에 H&E염색을 하였다. 관찰 결과 상처부위 면적은 EV 투여군이 정상군보다 전기간 동안 더 넓었다(Fig. 1A). 상처부위의 면적을 측정한 결과 EV 투여군이 정상군보다 1일째에 1.5배($p<0.05$), 3일째에 1.1배, 5일째에 1.08배 그리고 7일째 1.9배($p<0.05$) 더 넓었다(Fig. 1B).

2. 각질세포 이동율

EV투여 후 상처부위에서 각질세포의 이동률을 측정한 결과 1일째에 EV 투여군이 정상군에 비해 20 %($p<0.05$) 낮았고 3일째는 3 % 낮았으며 5일째에는 차이가 없었다(Fig. 2).

3. 염증세포 수 측정

Giemsa 염색에 의해 상처부위로 유입된 염증세포들을 관찰하였다 (Fig. 3A). 상처부위의 염증세포 수를 측정한 결과 EV 투여군이 정상군보다 1일째에 1.3배, 3일째에 1.5배($p<0.05$), 5일째에 1.4배($p<0.05$) 그리고 7일째에 1.3배 더 많았다(Fig. 3B).

4. 대식세포 수 측정

Mac-3 항체를 이용하여 면역조직화학염색 후 대식세포들을 상처부위에서 관찰하였다(Fig. 4A). 상처부위에 유입된 대식세포 수를 측정한 결과 1일째에는 EV 투여군이 정상군에 비해 2.3배($p<0.05$) 더 많았고 3일째에는 정상군이 EV 투여군보다 3.7배, 5일째에는 4배 더 많았으며 7일째에는 차이가 없었다(Fig 4B).

5. 교원질 침착 측정

상처부위에서 새로 형성된 교원질의 형성을 MT 염색을 통해 알아본 결과 1일, 3일, 5일 그리고 7일째 모두에서 정상군이 EV 투여군보다 푸른색으로 염색된 교원질이 더 많이 관찰되었다(Fig. 5). MT염색을 통해 확인된 교원질의 침착과 재배열을 측정하기 위해 Picrosirius Red 염색을 실시하고 새로 합성된 교원질을 관찰한 결과(Fig. 6A), 교원질의 측정강도는 정상군이 EV 투여군보다 1일째에 1.1배, 3일째에 1.3배, 5일째에 1.3배, 7일째에 1.2배 더 높았다(Fig. 6B).

6. 상처조직에서 SLPI mRNA와 단백질 발현

상처조직에서 SLPI mRNA 발현은 3일과 5일째에 EV 투여군이 정상군보다 더 늘어났고, 단백질 발현은 상처 유도 후 1일과 3일 그리고 5일째에 더 늘어난것을 확인하였다(Fig. 7A, B). 각각의 발현율을 측정한 결과 SLPI mRNA는 EV 투여군이 정상군 보다 3일째에 21 %($p<0.05$), 5일째에 49 %($p<0.05$) 더 높았고, 단백질 발현은 1일째에 60 %($p<0.05$), 3일째에 20 %, 5일째에는 40 %($p<0.05$) 더 증가하였다(Fig. 7C, D). 또한 상처를 유발하지 않은 조직에서 SLPI mRNA 발현은 정상군과 EV 투여군 사이에 차이가 없었으나 단백질 발현은 EV 투여군이 정상군보다 65 % 더 감소하였다(Fig. 7C, D).

7. 상처부위 및 재생중인 상피층에서 SLPI 단백질 발현

상처 조직에 면역조직화학염색 후 SLPI 단백질 발현 부위를 관찰한 결과(Fig. 8A), 상처부위의 SLPI 단백질 발현 강도는 EV 투여군이 정상군보다 3일과 5일째 각각 1.2배($p<0.05$) 더 높았고(Fig. 8B), 재생중인 상피층에서는 정상군이 EV 투여군 보다 3일째에 1.4배($p<0.05$), 5일째에 1.3배($p<0.05$) 더 높았다(Fig. 8C).

IV. 총괄 및 고안

에스트로겐은 피부 노화에서 상피층 두께가 얇아지는 것을 지연 시키고 피부 두께와 습기를 유지하는 중요한 역할을 한다(Sator et al., 2004). 폐경기 여성은 피부 교원질 함량과 탄력도가 떨어지지만 에스트로겐 처리 시 회복되는 것으로 알려졌다(Varila et al, 1995; Sumino et al., 2004). EV는 여성에 대한 호르몬 치료 시 사용하는 합성 에스트로겐 중 하나로써 과다 투여는 흰쥐의 혈중 에스트로겐 농도를 급격하게 낮추고 PCOS를 유도하는 것으로 알려졌다(Schulster et al., 1984). 난소를 제거하여 순환 에스트로겐 농도를 낮추면 생쥐의 상처부위에서 염증반응 기간 증가, 상처부위 면적확장, 재상피화 및 교원질 침착이 감소되어 상처회복이 지연되는 것으로 알려졌다(Ashcroft et al., 1997). SLPI는 Serine 계열 뿐만 아니라 Matrix metalloproteinase(MMP)와 같은 단백질 분해효소들의 활성을 억제하는 기능을 하며 SLPI 발현이 결손 되면 상처치유가 지연된다고 알려졌다(Barrick et al., 1999; Henry et al., 2002; Angelov et al., 2004; Qu et al., 2008). SLPI는 난소를 제거한 흰쥐 자궁조직에서는 발현하지 않았지만 에스트로겐 처리 시 발현이 크게 증가하였다(Moriyama et al., 1999). 에스트로겐을 첨가한 배지에서 배양한 자궁상피세포는 SLPI 분비가 증가하였고, Lipopolysaccharide(LPS) 자극 시 Interleukin-6(IL-6)와 IL-8과 같은 염증성사이토카인 분비가 억제되었으며, IL-1 β 를 첨가하면 종양괴사인자- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)와 IL-8 그리고 Nuclear factor- κ B(NF- κ B) mRNA 발현이 감소되었다(Fahey et al., 2008). 이 연구에서 에스트로겐이 염증성사이토카인 발현과 분비를 억제하는 작용은 SLPI에 의한 NF- κ B 활성조절을 통해 매개될 것이라고 언급하였다(Fahey et al., 2008). 본 연구에서 상처를 유도하지 않은 정상조직의 SLPI mRNA와 단백질 발현은 정상군에 비해

PCOS 흰쥐 피부에서 더 낮았지만 상처유도 후에는 PCOS 상처피부에서 더 증가하였다. 따라서 에스트로겐은 SLPI 발현을 유도하는 진구물질 중 하나로 생각되지만 피부 상처회복 과정에서는 에스트로겐과는 독립적으로 기능을 할 것으로 생각된다.

에스트로겐수용체 β (Estrogen receptor β , ER β)는 사람 두피 상피조직 내 기저층과 가시층에서 mRNA와 단백질이 강하게 발현하는 것으로 알려졌다(Mosselman et al., 1996; Thornton et al., 2003a; 2003b; Brandenberger et al., 1997). 또한 에스트로겐은 각질세포에서 에스트로겐수용체 α (Estrogen receptor α , ER α) 발현을 증가시키는 것으로 보고됐다(Verdier-Sevrain et al., 2004). 에스트로겐은 피부 상피층 각질세포 증식을 자극함으로써 생쥐 피부상처 회복 시 재상피화를 촉진한다(Ashcroft et al., 1997 Kanda & Watanabe, 2004). SLPI는 자궁내막 상피세포 증식을 조절하고 상피성 암세포에서 강하게 발현하며(Garver et al., 1994; Zhang et al., 2002), 상처회복 과정 중 재상피화를 촉진하는 것으로 알려졌다(Ashcroft et al., 2000). 본 연구에서도 각질세포 이동률은 상처유도 후 PCOS군이 정상군보다 더 낮았고 재생중인 상피층에서 SLPI 단백질 발현도 PCOS군보다 정상군이 더 낮았다. 따라서 PCOS 흰쥐 피부상처의 에스트로겐 농도 감소는 상피세포의 SLPI 발현도 감소시킴으로써 재상피화가 지연되는 것으로 생각된다.

성호르몬 진구체인 Dehydroepiandrosterone(DHEA)에서 변환된 에스트로겐은 에스트로겐 수용체와 결합한 후 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달체계를 이용해 상처부위에서 대식세포이동억제인자(Macrophage migration inhibitory factor, MIF), TNF- α , 그리고 IL-6같은 염증성사이토카인 발현과 분비를 억제한다고 알려졌다(Mills et al., 2005). 염증성사이토카인 중 하나인 IL-1을 진피층 섬유모세포에 처리했을 때 MMP-1, 3, 그리고 9의 발현을 증가시켰다(Unemori et al., 1994). 또한 연골세포에 IL-1을 처리하면 엘라스타제 분비를 크게 증가시켰고, TNF- α 와 Interferon- γ (IFN- γ)를 각각 처리하면 엘라스틴 분해가 촉진되었다(Rédini et al., 1988). 만성염증 피부질환에서 나타나는 심

각한 조직손상은 과다하게 증가된 엘라스타제 농도가 원인인데 에스트로젠은 상처부위에 중성구 유입을 억제함으로써 엘라스타제에 의한 세포외기질 분해를 막는 것으로 보고됐다(Ashcroft et al., 1999). SLPI는 상처부위에 존재하는 비만세포, 중성구 그리고 대식세포와 같은 염증세포에서 발현하는 것으로 알려져있다(Westin et al., 1999; Sallenave et al., 1997; Mihaila & Tremblay, 2001). SLPI는 단핵구에서 TNF- α 와 IL-6 그리고 IL-8 발현을 감소시키는데 이것은 SLPI가 NF- κ B의 p65부위에 결합하여 활성을 억제하기 때문인 것으로 알려졌다(Greene et al., 2004; Taggart et al., 2005). SLPI발현이 결손된 생쥐 피부상처에서 MMP-2와 MMP-9분비는 정상군에 비해 증가하였고(Angelov et al., 2004), 기관지 상피세포에서 염증반응 시 MMP-9과 IL-8 발현이 증가하였으나 SLPI를 처리하면 발현이 크게 감소되었다(Qu et al., 2008). SLPI 발현이 결손된 생쥐의 구강점막 상처는 정상군보다 엘라스타제 활성이 높았고 이것은 결국 상처부위 기질 재생을 방해하는 것으로 알려졌으며(Angelov et al., 2004; Herrick et al., 1997), 피부 상처면적은 정상 생쥐에 비해 넓게 관찰됐고 상처회복이 지연되었다(Jeong et al., 2005). 또한 SLPI는 배란기에 엘라스타제 활성을 억제하는 것으로 알려졌다(Chen et al., 2004). 이처럼 에스트로젠 농도 감소 및 SLPI의 부재는 상처부위 염증세포 유입 증가와 엘라스타제 같은 단백분해효소 농도를 높이게 되어 상처면적을 넓히고 기질재생을 방해한다. 본 연구에서 PCOS 피부상처 부위에 염증세포 유입이 정상군보다 더 많았고 교원질 합성양이 정상군보다 감소하였으며 상처면적은 PCOS군이 정상군보다 더 넓었다. 그러나 상처부위 진피층에서 SLPI 발현은 PCOS군이 정상군에 비해 높았고 상처조직에서 SLPI mRNA와 단백질 발현은 PCOS군이 정상군보다 더 증가하였다. 따라서 PCOS 피부 상처부위에서 과다 유입된 염증세포 및 엘라스타제 억제 등 염증반응을 줄이기 위해 SLPI의 발현이 증가한 것으로 생각된다.

에스트로젠은 MIF 발현을 억제함으로써 국부적인 염증반응을 줄여 피부상처 회복을 촉진시키는 것으로 보고됐고(Ashcroft et al., 2003), 난소를 제거한 생쥐모델의 피부상처를 유발시키거나 방광에 염증반응을 유도

하면 대식세포 유입이 증가한 반면 에스트로젠을 처리하면 감소하였다 (Hardman et al., 2008; Martinez-Ferrer et al., 2008). 또한 혈관상처 부위에 에스트로젠을 처리하면 단핵구와 대식세포에 대한 화학유인인자로 알려진 Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2 β (CINC-2 β)와 Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)의 mRNA발현이 억제되었다(Miller et al., 2004). SLPI는 폐와 간조직 손상 시 TNF- α 와 Macrophage inflammatory protein-1(MIP-1)의 분비를 감소시켰고 그 결과 중성구 유입을 방해하였다(Lentsch et al., 1999). SLPI를 국소적으로 처리한 경우 결막염 부위의 비만세포로부터 분비되는 Chymase 활성을 억제하고 이것은 다형핵백혈구, 단핵구 그리고 호중구 유입을 방해하였다(Murata et al., 2003 Tani et al., 2000). SLPI가 결손된 생쥐의 구강상처 부위에는 중성구와 대식세포 유입이 정상군 보다 많은 것으로 보고되었다(Angelov et al., 2004). 본 연구에서는 PCOS에서 정상군보다 상처 유도 초반인 1일째에 대식세포 유입이 더 많았고 3일과 5일째에는 정상군에서 더 많았다. PCOS 상처부위에서 SLPI발현은 정상군에 비해 더 증가하였고 SLPI mRNA와 단백질 발현도 정상군보다 더 증가하였다. 따라서 PCOS 환위에 상처유도 후 초기에는 많은 대식세포의 유입이 있었으나 SLPI의 발현 증가로 줄어든 것으로 생각된다.

폐경기 이후 여성 피부의 교원질 함량은 해마다 1~2%씩 감소하는데 에스트로젠 처리가 이것을 회복시키는 효과가 있는 것으로 보고됐다 (Brincat et al., 1987). 에스트로젠은 진피층 섬유모세포로부터 TGF- β 1 분비를 촉진시켜 교원질 합성을 증가시키며 세포외기질의 분해를 억제하는 것으로 알려졌다(Ashcroft et al., 1997; Grande, 1997; Beck et al., 1993). 에스트로젠은 염증부위에 유입된 단핵구와 대식세포로부터 혈소판유래성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF)의 발현을 자극하고 이것은 섬유모세포의 교원질 합성을 증가시킨다(Shanker et al., 1995). 또한 초대배양한 진피층 섬유모세포에서 ER α 와 ER β 가 발현하고 에스트로젠은 ER β 의 발현을 증가시키는 것으로 알려졌다(Haczynski et al., 2004). SLPI를 흰쥐의 관절 염증반응 부위에 처리했을 때 급성 및

만성상태 모두에서 II형 교원질 분해가 억제되었고(Song et al., 1999), SLPI 발현이 결손된 생쥐 피부상처에서 교원질의 침착이 느리게 진행되었으며 조직 장력 측정 결과 정상 생쥐에 비해 낮은 것으로 확인되었다(Jeong et al., 2005). 본 연구에서도 상처부위 교원질 합성량은 정상군에 비해 PCOS 흰쥐에서 감소했음에도 불구하고 SLPI 발현은 증가하였다. 따라서 에스트로겐 감소는 피부상처과정에서 교원질 합성을 느리게 하지만 이를 보상하기 위해 SLPI 발현이 증가하는 것으로 생각된다.

본 연구 결과들을 종합해 보면 PCOS 흰쥐 피부상처과정은 정상군보다 상피세포의 이동저하, 과도한 염증세포의 유입, 느린 기질형성 등 회복이 지연되었고, 정상피부와 비교해서 PCOS 피부에서 낮게 발현되었던 SLPI는 상처치유과정 중에는 PCOS 상처치유 조직에서 더 많이 발현되었다. 따라서 에스트로겐과 유사한 기능을 지닌 SLPI는 에스트로겐에 의해서 발현이 떨어지기는 하지만 피부상처 회복과정에서는 에스트로겐 등 호르몬을 대체할 수 있는 중요한 인자로 생각된다. 또한 이것은 SLPI가 폐경기 여성에 대한 만성염증 및 상처치유에서 호르몬제 사용에 의한 부작용을 줄일 수 있는 대체약물로서 가능성을 보여주지만 이에 대해 구체적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

에스트로겐은 과도한 염증반응을 줄이고 재생피화와 교원질 침착을 증가시켜 상처회복을 촉진시킨다. 호르몬대체 치료제로 사용되는 Estradiol valerate(EV)는 과다 투여할 경우 에스트로겐 농도를 급격하게 감소시키고 다낭성난소증후군(Polycystic ovary syndrome, PCOS)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 분비백혈구단백분해효소억제제(Secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 단백분해효소 활성억제를 통한 과도한 염증반응 감소, 각질세포 증식 자극 및 교원질 침착을 증가시킴으로써 상처회복 속도를 증가시키며, 에스트로겐에 의해 발현과 분비가 증가하는 것으로 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 전신적 에스트로겐 감소 상태인 PCOS 흰쥐 피부의 상처치유 과정 및 SLPI의 기능에 대해 알아보고자 하였다.

상처부위 면적은 회복 전 기간에 걸쳐 PCOS군이 정상군보다 더 넓었고 각질세포 이동률은 정상군이 더 높았다. 상처부위 염증세포 유입은 PCOS군이 정상군보다 더 많았고 교원질 침착은 정상군이 더 많았다. 또한 유입된 대식세포 수는 PCOS군이 정상군보다 1일째에 더 많았지만 3일째와 5일째는 더 적었다. 상처를 유발하지 않은 정상 조직에서 SLPI 단백질 발현은 PCOS군이 정상군보다 낮았지만 상처조직에서 SLPI mRNA 발현과 단백질은 PCOS군이 정상군보다 상처 유도 후 3일째와 5일째에 더 7일째에는 두 군에서 비슷하게 발현하였다. 상처부위인 진피층에서 SLPI 발현은 PCOS군이 정상군보다 3일째와 5일째에 더 높았지만 재생중인 상피층에서는 더 낮았다.

실험결과를 종합해보면 PCOS 흰쥐의 피부상처 회복은 정상군 보다 지연됐다. 상처를 내지 않은 정상조직에서 SLPI 발현은 PCOS군이 더 낮았으나, 상처유도 후 SLPI 발현은 PCOS군이 정상군에 비해 증가하였다. 따라서 에스트로겐과 유사한 기능을 지닌 SLPI는 에스트로겐의 활성이 떨어진 피부상처 회복과정에서 이를 대치할 수 있는 중요한 인자로 생각되며, 특히 폐경기 여성에 대한 만성염증 및 상처치유에서 호르몬제

사용에 의한 부작용을 줄이는 대체약물로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med* 3:1209-1215.

Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW. (1999) Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol* 155(4):1137-1146.

Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM. (2000) Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* 6(10):1147-1153.

Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong MJ, Taniguchi M, Burow M, Horan MA, Wahl SM, Nakayama T. (2003) Estrogen modulates Cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 111:1309-1318.

Angelov N, Moutsopoulos N, Jeong MJ, Nares S, Ashcroft G, Wahl SM. (2004) Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor. *Thromb Haemost* 92(2):288-297.

Balen AH. (1999) The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: the

- enigma unravels. *Lancet* 354:966-967.
- Barrick B, Campbell EJ, Owen CA. (1999) Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen* 7(6):410-422.
- Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. (1993) One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* 92(6):2841-2849.
- Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. (1997) Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3509-3512.
- Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod* 35(3):647-655.
- Brincat M, Versi E, Moniz F, Magos A, de Trafford J, Studd JW. (1987) Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol* 70:123-127.
- Chen BY. (1997) Acupuncture normalizes dysfunction of hypothalamicpituitary-ovarian axis. *Acupunct Electrother Res* 22(2):97-108.
- Chen D, Xu X, Cheon YP, Bagchi MK, Bagchi IC. (2004) Estrogen induces expression of secretory leukocyte protease inhibitor in rat

- uterus. *Biol Reprod* 71(2):508-514.
- Choi BD, Lee SH, Jeong SJ, Jang HS, Kim BO, Lim DS, Park JC, Wang G, Jeong MJ. (2006) Increased protein of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and expression of growth factors in NIH3T3 cells by LPS stimulation. *Korean J Electron Microscopy* 36(3):165-172.
- Choi BD, Jeong SJ, Wang G, Kim HJ, Kim BO, Hwang HK, Lim DS, Kim SH, Jeong MJ. (2009) Temporal induction of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in odontoblasts by lipopolysaccharide and wound infection. *J Endod* 35(7):997-1002.
- Dören M. (2000) Basic principles of hormone replacement therapy in the postmenopause. *Ther Umsch* 57(10):628-634.
- Franks S. (1995) Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333:853-861.
- Fahey JV, Wright JA, Shen L, Smith JM, Ghosh M, Rossoll RM, Wira CR. (2008) Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol* 1(4):317-325.
- Garcia-Rudaz C, Armando I, Levin G, Escobar ME, Barontini M (1998) Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 49(2):221-228.
- Grande JP. (1997) Role of TGF- β in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med* 214:27-40.

- Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ, Taggart CC. (2004) Secretory leucoprotease inhibitor impairs Toll-like receptor 2- and 4-mediated responses in monocytic cells. *Infect Immun* 72:3684-3687.
- Haczynski J, Tarkowski R , Jarzabek K , Wolczynski S , Magoffin DA , Czarnocki KJ , Ziegert M , Jakowicki J , Jakimiuk AJ. (2004) Differential effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on estrogen receptor expression in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med* 13:903-908.
- Hamad M, Abu-Elteen KH, Ghaleb M. (2002) Persistent colonization and transient suppression of DTH responses in an estrogen-dependent vaginal candidosis murine model. *New Microbiol* 25(1):65-73.
- Hardman MJ, Emmerson E, Campbell L, Ashcroft GS. (2008) Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. *Endocrinology* 149(2):551-557.
- Henry MT, McMahon K, Costello C, Fitzgerald MX, O'Connor CM. (2002) Secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin are resistant to degradation by MMP-8. *Exp Lung Res* 28(2):85-97.
- Holcomb VB, Keck VA, Barrett JC, Hong J, Libutti SK, Nunez NP. (2009) Obesity impairs wound healing in ovariectomized female mice. *In Vivo* 23(4):515-518.
- Jeong JO, Jeong SJ, Park JC, Kim HJ, Wahl SM, Jeong MJ. (2005)

- Morphological differences of the wound healing in secretory leukocyte protease inhibitor knockout mice. *Korean J Phys Anthropol* 18(3):197-206.
- Kanda N, Watanabe S. (2004) 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol* 123:319-328.
- King AE, Morgan K, Sallenave JM, Kelly RW. (2003) Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochem Biophys Res Commun* 310(2):594-299.
- Koninckx PR, Lauweryns JM, Cornillie FJ. (1993) Endometrial effects during hormone replacement therapy with a sequential oestradiol valerate/cyproterone acetate preparation. *Maturitas* 16(2):97-110.
- Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133(6):2690-2695.
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. (2000) An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141(3):1059-1072.
- Laurie RG, Audrey LA, Diane CS (2002) Construction, non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. *Protein Expr Purif*

26:179-186.

Lentsch AB, Yoshidome H, Warner RL, Ward PA, Edwards MJ. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Gastroenterology* 117(4):953-961.

Martinez-Ferrer M, Iturregui JM, Uwamariya C, Starkman J, Sharif-Afshar AR, Suzuki K, Visedsindh W, Matusik RJ, Dmochowski RR, Bhowmick NA. (2008) Role of nicotinic and estrogen signaling during experimental acute and chronic bladder inflammation. *Am J Pathol* 172(1):59-67.

McElvaney NG, Nakamura H, Birrer P, Hébert CA, Wong WL, Alphonso M, Baker JB, Catalano MA, Crystal RG. (1992) Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest* 90:1296-1301.

Mihaila A, Tremblay GM. (2001) Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor. *Z Naturforsch* 56:291-297.

Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S. (2004) Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation* 110(12):1664-1669.

- Mills SJ, Ashworth JJ, Gilliver SC, Hardman MJ, Ashcroft GS. (2005) The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol* 125(5):1053-1062.
- Moriyama A, Shimoya K, Ogata I, Kimura T, Nakamura T, Wada H, Ohashi K, Azuma C, Saji F, Murata Y. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 5(7):656-661.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53.
- Mowad CM, Margolis DJ, Halpern AC, Suri B, Synnestvedt M, Guzzo CA. (1998) Hormonal influences on women with psoriasis. *Cutis* 61:257-260.
- Murata E, Sharmin S, Shiota H, Shiota M, Yano M, Kido H. (2003) The effect of topically applied secretory leukocyte protease inhibitor on the eosinophil response in the late phase of allergic conjunctivitis. *Curr Eye Res* 26(5):271-276.
- Paradisi R, Grossi G, Venturoli S, Capelli M, Porcu E, Fabbri R, Pasquali R, Flamigni C. (1988) Evidence for a hypothalamic alteration of catecholamine metabolism in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 29(3):317-326.
- Qu MY, Luo BL, Chen HM, Feng JT, Gu QH. (2008) Effects of

secretory leukocyte protease inhibitor on expression of inflammation mediators in normal human bronchial epithelial cells induced by cigarette smoke extract. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 31(5):352-355.

Rédini F, Lafuma C, Pujol JP, Robert L, Hornebeck W. (1988) Effect of cytokines and growth factors on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 155(2):786-793.

Sallenave JM, Si-Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. (1997) Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukocyte Biol* 61:695-702.

Sallenave JM. (2002) Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem Soc Trans* 30 111-115.

Sator PG, Schmidt JB, Rabe T, Zouboulis CC. (2004) Skin aging and sex hormones in women - clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. *Exp Dermatol* 13(Suppl 4):36-40.

Schulster A, Farookhi R, Brawer JR. (1984) Polycystic ovarian condition in estradiol valerate-treated rats: spontaneous changes in characteristic endocrine features. *Biol Reprod* 31(3):587-593.

Seemüller U, Arnhold M, Fritz H, Wiedenmann K, Machleidt W, Heinzl R, Appelhans H, Gassen HG, Lottspeich F. (1986) The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions

- (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett* 199(1):43-48.
- Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams MR. (1995) Estrogen modulates the inducible expression of platelet-derived growth factor mRNA by monocytes/macrophages. *Life Sci* 56:499-507.
- Shugars DC, Wahl SM. (1998) The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc* 129:851-858.
- Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR, Wahl SM. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med* 190(4):535-542.
- Stephens P, Thomas DW. (2002) The cellular proliferative phase of the wound repair process. *J Wound Care* 11:253-261.
- Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Ishikawa O, Kurabayashi M. (2004) Effects of aging, menopause, and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in women. *J Am Geriatr Soc* 52:945-949.
- Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG. (2005) Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF- κ B binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med* 202:1659-1668.

- Tani K, Ogushi F, Kido H, Kawano T, Kunori Y, Kamimura T, Cui P, Sone S. (2000) Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 67(4):585-589.
- Thompson RC, Ohlsson K. (1986) Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(18):6692-6696.
- Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, Al-Azzawi F, Lyon CC, O'Driscoll JB, Messenger AG. (2003a) Estrogen receptor beta (ER β) is the predominant estrogen receptor in human scalp. *Exp Dermatol* 12:181-190.
- Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, Al-Azzawi F, Lyon CC, O'Driscoll JB, Messenger AG. (2003b) The distribution of estrogen receptor beta (ER β) is distinct to that of ER alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit. *J Investig Dermatol Symp Proc* 8:100-103.
- Toriseva M, Kähäri VM. (2009) Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci* 66(2):203-224.
- Unemori EN, Ehsani N, Wang M, Lee S, McGuire J, Amento EP. (1994) Interleukin-1 and transforming growth factor-alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE₂, and proliferation in human fibroblasts. *Exp Cell Res* 210(2):166-171.
- Varila E, Rantala I, Oikarinen A, Risteli J, Reunala T, Oksanen H,

- Punnonen R. (1995) The effect of topical estradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol* 102:985-989.
- Verdier-Sevrain S, Yaar M, Cantatore J, Traish A, Gilchrist BA. (2004) Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism. *FASEB J* 18:1252-1254.
- Werner S, Krieg T, Smola H. (2007) Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 127(5):998-1008.
- Westin U, Polling A, Ljungkrantz I, Ohlsson K. (1999) Identification of SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) in human mast cells using immunohistochemistry and in situ hybridisation. *Biol Chem* 380:489-493.
- Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA. (2002) Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth associated genes. *J Biol Chem* 277:29999-30009.

사진부도 설명

Figure 1. Difference of skin wound area between normal and EV treated group. (A) Difference of wound area between normal and EV treated groups at the skin wounds. When compared with normal groups, EV treated wound area was more wide during wound healing period. All scale bars indicate 200 μm . **(B)** This resultant was drawn from morphometrical analysis through the wounds tissue between normal and EV treated groups. The wound area of EV treated group was larger than the normal group at day 1 to day 7. All the scale bars in images are 200 μm . *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 2. Difference of Keratinocyte migration rate between normal and EV treated group. This resultant was drawn from keratinocyte migration of the wounds tissue on the normal and EV treated groups. Keratinocyte migration rate of EV treated group was lower than the control group at day 1. *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 3. Difference of recruited inflammatory cells between normal and EV treated group. (A) Difference of recruited inflammatory cells in wound area between normal and EV treated groups on the skin wounds. The number of inflammatory cells in EV

treated wound area were increased from day 1 to 7 compared with wound area of normal group. All tissues were stained with Giemsa. **(B)** This graph was drawn from counting inflammatory cells in the wound area. The inflammatory cells were counted in distinctive three areas (left, middle, and right wound area). As shown in the result, the inflammatory cells of the EV treated group from day1 to day 7 were increased compared to the control group. All scale bars indicate 20 μm . *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 4. Difference of recruited macrophages between normal and EV treated group. **(A)** Expression of Mac-3 positive macrophages were observed in the normal and EV treated skin wounds. **(B)** The number of Mac-3 positive cells was higher in wound area of EV treated group compared with normal group at day 1. On the contrary, the number of Mac-3 positive cells was increased in wound area of normal group compared with EV treated group at day 3 and day 5. All scale bar is 20 μm . *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 5. Difference of accumulated collagen between normal and EV treated group. Difference of accumulated collagen (blue color) in healing area between normal and EV treated groups at the skin wounds. The collagen deposition of healing area in normal group was more increased than EV treated group from day 1 to day 7. All the scale bars in images are 100 μm .

Figure 6. Difference of accumulated collagen between normal

and EV treated group. (A) Difference of accumulated collagen (bright red color) in healing area between normal and EV treated groups on the skin wounds. This result was coincided with it of collagen staining. To detect the quantity of newly accumulated collagen, it was used polarizing microscope. **(B)** This graph was drawn from analysis of collagen positive intensity in the wound area. As shown in the result, the collagen deposition of the EV treated group from day1 to day 7 was decreased compared to the normal group. All scale bars indicate 100 μm . *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 7. Differential expression of SLPI in skin wounds between normal and EV treated group. (A) and (B) SLPI mRNA and protein expression between Rat normal skin wound and EV treated skin wound SLPI mRNA normalized to the corresponding GAPDH and β -actin (Sample/GAPDH or β -actin) and (M, DNA size marker; C, control). **(C)** SLPI mRNA expression in EV treated skin wound more higher compared to normal skin wound at day 3 and day 5. **(D)** SLPI protein level in EV treated group was higher day 1 to day 5 compared to normal group. *, Statistically significant difference (n=6, * p <0.05). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 8. SLPI expression between normal and EV treated group on the skin wounds. Expression intensity of SLPI protein was compared between normal and EV treated group in skin wound. The intensity of SLPI was measured in wound area, epithelium and wound edge of skin. All scale bars indicate 200 μm . *, Statistically

significant difference (n=6, * $p < 0.05$). The data are expressed as mean \pm standard deviation.

사진부도

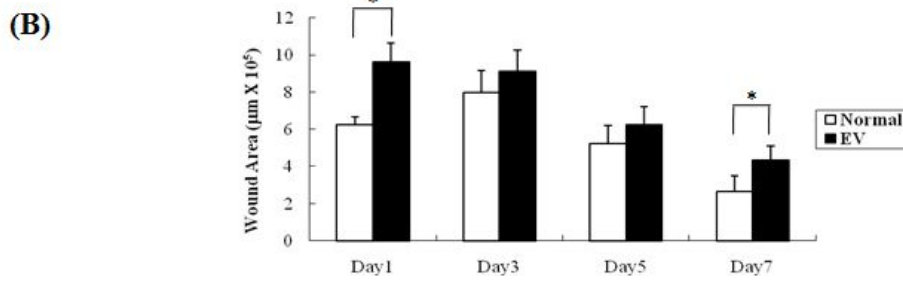
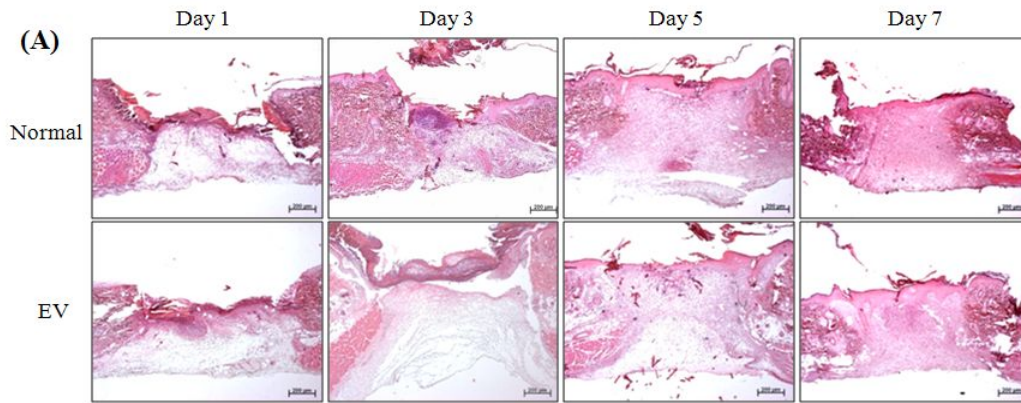


Figure 1. Difference of skin wound area between normal and EV treated group.

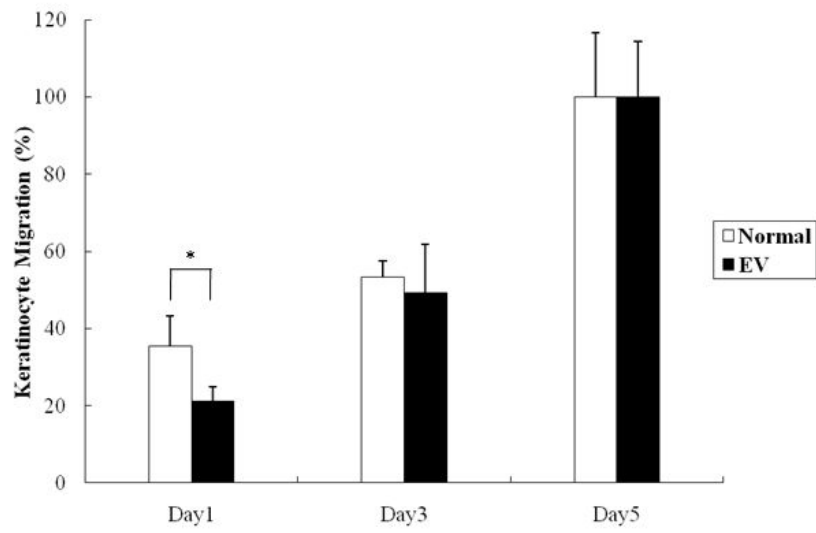


Figure 2. Difference of Keratinocyte migration rate between normal and EV treated group.

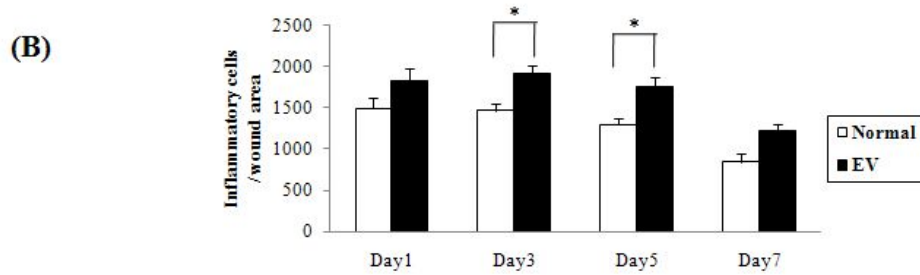
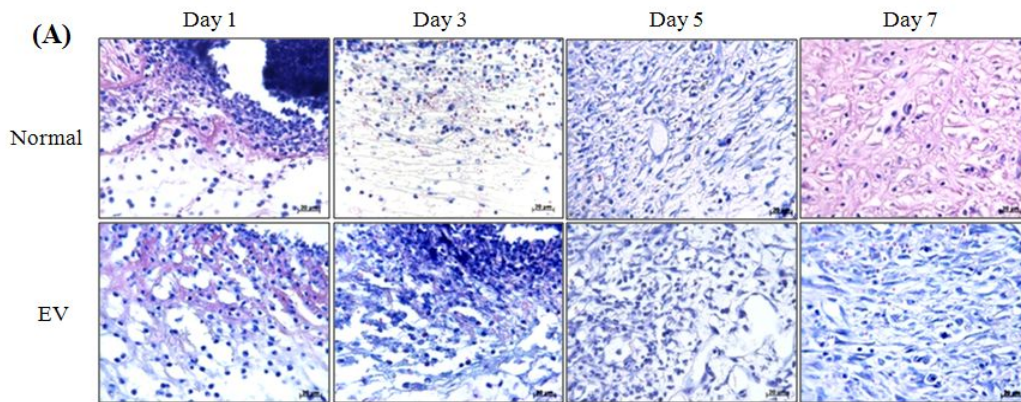


Figure 3. Difference of recruited inflammatory cells between normal and EV treated group.

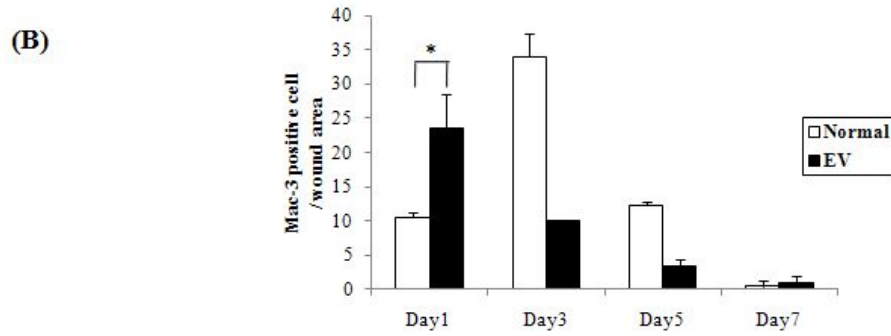
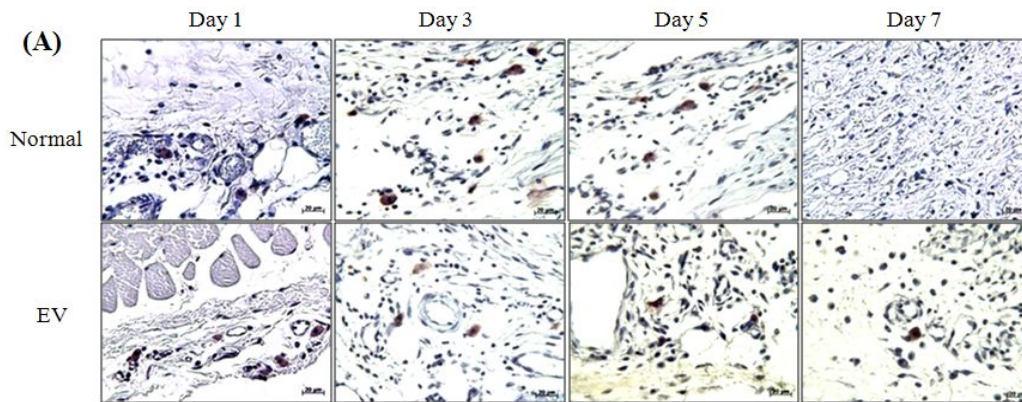


Figure 4. Difference of recruited macrophages between normal and EV treated group.

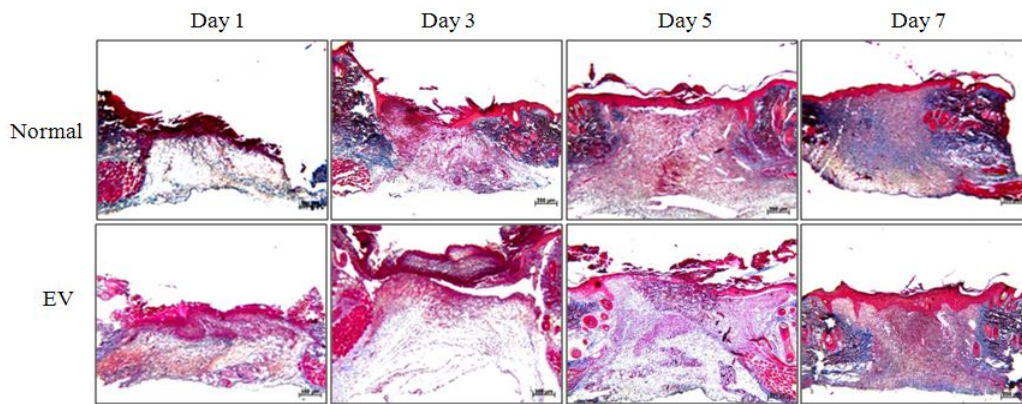


Figure 5. Difference of accumulated collagen between normal and EV treated group (MT stain).

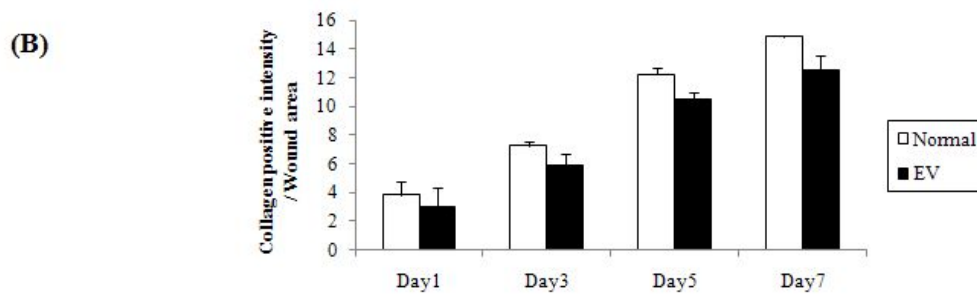
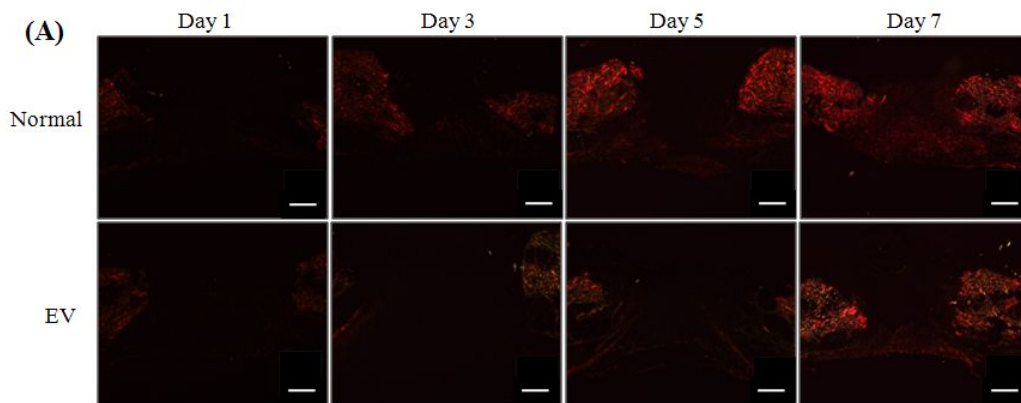


Figure 6. Difference of accumulated collagen between normal and EV treated group (Picosirius Red stain).

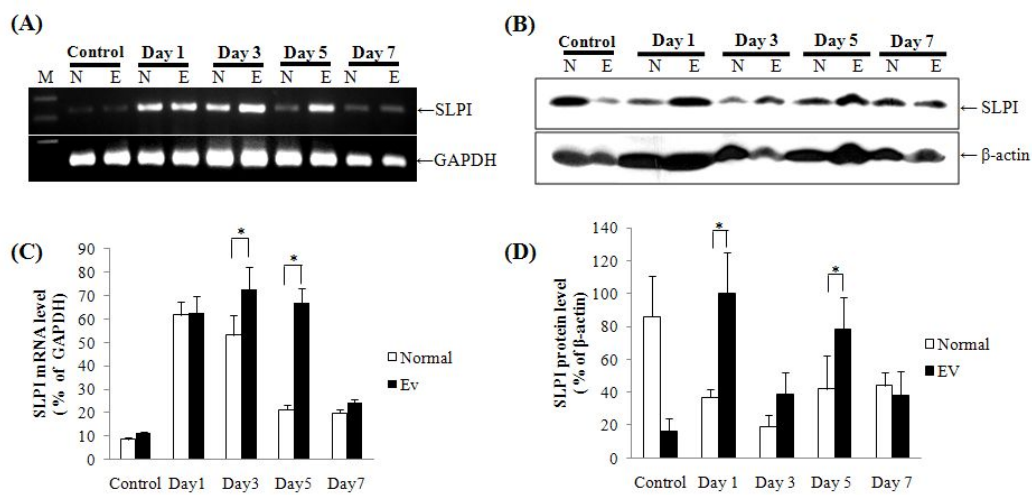


Figure 7. Differential expression of SLPI in skin wounds between normal and EV treated group.

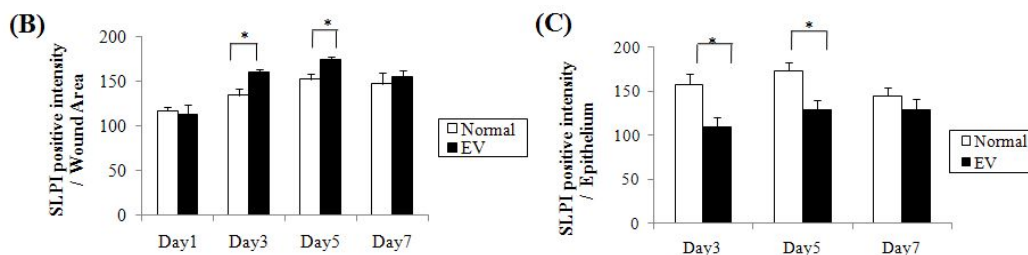
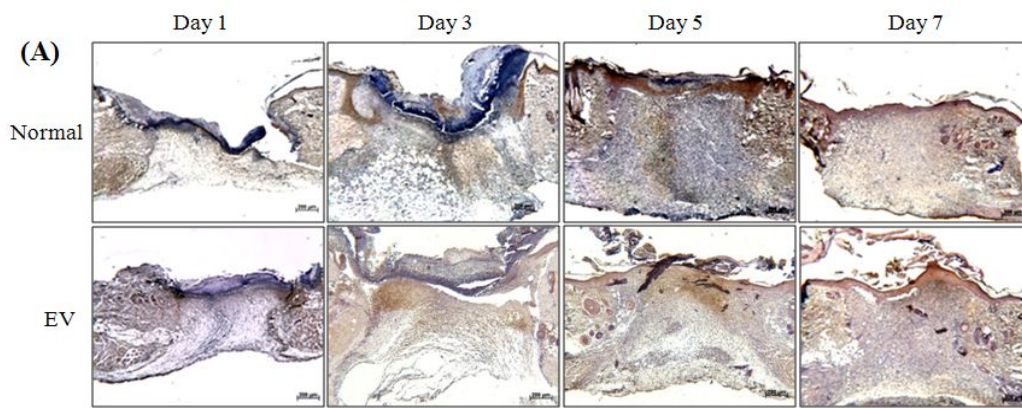


Figure 8. SLPI expression between normal and EV treated group on the skin wounds.

