콜라겐과 무세포진피를 이용한 혼합형 인공피부 개발 및 쥐 모델에서 창상치료 적용

이동혁, 윤진철, 이정희, 김인섭*

Application of a Composite Skin Equivalent using Collagen and Acellular Dermal Matrix as the Scaffold in a Mouse Model of Full-thickness Wound

Dong Hyuck Lee, Jin Chul Youn, Jung Hee Lee, and In Seop Kim*

접수: 2013년 12월 12일 / 게재승인: 2014년 1월 16일

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The aim of this study was to develop a composite human skin equivalent for wound healing. Collagen type1 and acellular dermal matrix powder were utilized as the scaffold with dermal fibroblasts and keratinocytes for the development of a composite human skin equivalent. Fibroblast maintained the volume of composite skin equivalent and also induced keratinocytes to attach and proliferate on the surface of composite skin equivalent. The composite human skin equivalent had a structure and curvature similar to those of real skin. Balb-C nu/nu mice were used for the evaluation of full-thickness wound healing effect of the composite human skin equivalent. Graft of composite skin equivalent on full-thickness wound promoted re-epithelialization and granulation tissue formation at 9 days. Given the average wound-healing time (14 days), the wound in the developed composite skin equivalent healed quickly. The overall results indicated that this three-dimensional composite human skin equivalent can be used to effectively enhance wound healing.

Keywords: Acellular dermal matrix, Collagen, Composite human skin equivalent, Fibroblast, Keratinocyte, Wound healing

1. 서론

피부는 크고 복잡한 구조의 기관으로 사람의 신체 전체를 덮고 있다. 피부는 해부학적으로 크게 상피 (Epidermal layer)와 진피 (Dermal layer) 두 개의 층으로 이루어져 있다. 상피는 피부의 외부층으로 각질세포 (Keratinocyte)가 그 구조를 유지하며, 상피 밑의 보다 깊은 층인 진피는 섬유아세포 (Fibroblast)가 그 구조를 유지한다. 기능적으로 상피는 외부감염 및 다양한 유해 인자를 방어할 뿐만 아니라 체온 및 수분의 유지와 유출억제에 중요한 역할을 담당한다. 진피는 피부의 탄성 및 피부의 물리적 상태를 유지하며 감각의 수용체 역할을 하고, 상피를 재생하는 기능을 한다 [1,2]. 하지만 피부조직은 조직의 위치 및 부드러운 특성으로 인해 쉽게 외부의 물리적 충격에 창상과 화상 등의 손상을 입는다.

창상은 통상 진피층까지 손상되어 피부가 열리는 현상을 말한다. 창상의 치료 및 재생을 위한 다양한 치료법이 개발되었는데, 자가이식과 동종이식이 대표적인 치료법이다 [3]. 자가이식은 실제 환자의 피부조직을 적출하여 그물구조로 가공해 직접 창상에 적용하는 형태인 Split Skin Graft (SSG)와 표피세포를 배양해 이식하는 Cell-cultured Epithelial Autograft (CEA)가 대표적이다. 자가이식은 창상치료뿐만 아니라 화상과 족부궤양 등 넓은 범위의 환부에 적용이 가능하며 빠른 창상치료가 유도되는 장점이 있다 [4-6]. 반면 멸균이 어렵고 종종 흉터, 창상수축, 염증반응 등 부작용이 발생하며, 빠르게 분해되는 물성 등의 단점을 가지고 있다 [7]. 동종이식

은 영구적인 생착보다 분해, 흡수, 재구성을 통해 창상 주변 부 세포의 이동과 치료를 돕는 역할을 한다. 사체에서 채취한 피부조직을 냉동보존 후 사용하거나, 면역인자를 제거하여 무세포진피 (Acellular Dermal Matrix: ADM)를 만들어 적용한다. 특히 무세포진피는 진피 특징적인 3차원 망상구조, 생장인자, 1형, 4형, 7형 등의 콜라겐과 elastin, proteoglycan, basement membrane complex로 이루어져 있어 세포적합성, 조직적 합성이 뛰어나고 연조직 특유의 물성으로 다양한 치료에 적용되고 있다 [8]. 또한 조직재건 및 미용성형, 전층부 창상, 화상 등 피부치료제로써의 이용범위도 확대되고 있다 [9-11]. 그러나 사체기증의 어려움 및 합성고분자 치료제에 비교해 동일면적 대비 고가의 가격으로 인해 선택의 폭이 좁은 실정이다 [12].

본 연구에서는 기존 치료제의 기능적 단점을 보완하고 치료능을 극대화하기 위해 1형 콜라겐을 이용해 분쇄 무세포진피와 피부세포를 혼합한 인공피부를 개발하고자 하였다. 1형 콜라겐은 대표적인 결합조직 (Connective tissue)으로 섬유아세포가 분비하며 조직의 생산 및 복구를 수행한다 [13,14]. 콜라겐은 스폰지, 시트, 겔, 용액 등 다양한 형태로의 가공이 가능하며, 세포의 부착 및 생장에 자극을 주어 재생의학적 소재 특히 피부치료제의 소재로 다양한 개발이 이루어졌다 [15]. 혼합형 인공피부를 개발하며 고려해야할 사항은 생체적합성, 생분해성, 소재와 세포 간의 상호작용이다 [16,17]. 이러한 문제점의 해결을 통해, 창상 치료에 적용하기 쉽고 치료효과가 우수한 치료제를 개발하기 위해 1형 콜라겐과 분쇄 무세포진피를 스케폴드 (Scaffold)로 활용하고 각질세포와 섬유아세포를 배양한 실제피부와 유사한 인공피부를 제작하였다. 또한 대표적인 생체고분자인 피브린으로 동일한 방식의 인공피부를 제작하여 성능의 비교평가를 실시하였다. 제작된 각각의 인공피부를 창상을 유발시킨 동물모델에 적용하여 창상치료능력을 비교 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 섬유아세포와 각질세포의 분리 및 초대배양

환자에서 적출된 피부조직에서 사람유래 섬유아세포와 각질세포를 무균환경 하에 분리하였다. 환자에서 적출된 피부는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 50 IU/mL penicillin 그리고 50 µg/mL streptomycin을 첨가한 배지에 넣어 4°C에서 이동 및 보관하였다. 각질세포층과 진피조직의 분리를 위해 1.4 units/mL의 dispase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 배지에 넣고 4°C에서 16시간 동안 처리하였다. 분리된 진피조직을 362 units/mL의 type I collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 옮겨 37°C에서 90분 간 처리하여 섬유아세포를 분리하였다. Type I collagenase를 불활성시키기 위해 10% FBS에 노출시킨 뒤 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였

다. 원심분리된 섬유아세포 침전물을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

분리된 각질세포층을 수거하여 0.05% trypsin EDTA (0.02%)에 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 30분간 처리하여 단일세포화 하였다. Trypsin EDTA를 불활성시키기 위해 10% FBS에 노출시킨 뒤 1,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리된 각질세포 침전물을 Keratinocyte Growth Medium-2 (KGM-2, Lonza, Visp, Switzerland) 배지에 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.2. 1형 콜라겐에 대한 섬유아세포와 각질세포의 안정성 확인

인공피부 제작에 사용된 1형 콜라겐의 세포안정성을 확인하기 위해 1형 콜라겐인 Matrixen-CSC (바이오랜드, 대한민국, 충청북도, 청원군)에 각질세포와 섬유아세포를 배양하였다. 대조군으로 피브린 (Greenplast Kit 1, 녹십자, 대한민국, 경기도, 용인시)을 사용하였다. 12 well plate에 1형 콜라겐 (20 mg/mL)과 피브린 (20 mg/mL)을 각각 2 mL 분주한 뒤 12시간 동안 코팅하였다. 코팅면을 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 뒤 각질세포와 섬유아세포를 각각의 코팅면에 1×10⁴ 개 접종하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 배양면을 PBS로 세척하고 5 mg/mL의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 500 µL씩 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척 후 기질별 세포부착 양상을 확인하였다. 또한 0.05% trypsin EDTA (0.02%) 처리 후 세포를 모아 계수하였다.

2.3. in vitro 창상치료능 시험

1형 콜라겐의 in vitro 창상치료능을 확인하기 위해 1형 콜라겐과 피브린을 각각 코팅한 12 well plate에 각질세포와 섬유아세포를 각각 접종하여 plate에 100%가 되도록 배양하였다. 각각의 세포가 배양된 코팅면 위를 멸균된 파이펫 팁으로 긁어 배양면에 인공창상을 유발시켰다. 배양면을 PBS로 세척하고 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 10시간 동안 배양하였다. 배양 후 피부세포의 이동 정도를 확인하였다 [18].

2.4. 인공피부 제작

2.4.1. 1형 콜라겐과 무세포진피를 이용한 혼합형 인공피부 제작

1형 콜라겐과 무세포진피를 이용한 혼합형 인공피부를 제작하기 위해 1형 콜라겐 (20 mg/mL), 10x Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 섬유아세포 4×10⁵개를 7:1:2의 비율로 천천히 섞어 콜라겐 혼합용액을 만들었다. 분쇄 무세포진피 (SureDerm, 한스바이오매드, 대한민국, 대전시, 유성구) 20 mg을 첨가한 9.6 cm² 인서트를 6 well plate에 삽입한 후 콜라겐 혼합용액 3 mL를 분쇄 무세포진피와 혼합하였다. 이후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2시간

동안 콜라겐 겔화 (Collagen gelation)시켰다. 만들어진 콜라겐 겔에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지 2 mL을 넣은 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 콜라겐 겔 표면에 배양된 각질세포 1×10⁵개를 접종하였다. 공기노출 액체배양 (Air liquid interface culture)을 하기 위해 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 삽입한 인서트에 닿을 만큼만 채운 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하였다. 같은 방법으로 분쇄 무세포진피를 포함하지 않는 콜라겐 인공피부도 제작하였다. 만들어진 각각의 인공피부를 인서트에서 삼투막과 함께 분리한 후 10% 완충 포르말린 (Buffered formalin)에 1시간 고정하였다. 고정한 조직은 파라핀 (Paraffin) 블록을 만들어서 6~7 µm 두께로 절편을 제작하였고 통상적인 Hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경 (ECLIPSE Ti: Nikon, Yokohama, Kanagawa, Japan)으로 관찰하였다.

2.4.2. 피브리노겐과 무세포진피를 이용한 인공피부 제작

Greenplast Kit 2 (녹십자, 대한민국, 경기도, 용인시)의 트롬빈을 염화칼슘 용액과 섞어 500 IU/mL 트롬빈 용액을 만들었다. 섬유아세포 1×10⁵개를 트롬빈 용액 1.5 mL에 첨가하였다. Greenplast Kit 1의 피브리노겐을 아프로티닌 용액과 섞어 100 mg/mL 피브리노겐 용액을 만들었다. 분쇄 무세포진피 20 mg을 첨가한 9.6 cm² 인서트를 6 well plate에 삽입한 후 피브리노겐 용액 1.5 mL를 분쇄 무세포진피와 혼합하였다. 이후 트롬빈과 세포를 혼합한 용액을 추가한 뒤, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 피브린 겔화 시켰다. 만들어진 피브린 겔에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지 2 mL를 넣은 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 피브린 겔 표면에 배양된 각질세포 1×10⁵개를 접종하였다. 공기노출 액체배양 (Air liquid interface culture)을 하기 위해 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 삽입한 인서트에 닿을 만큼만 채운 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2일 동안 배양하였다. 같은 방법으로 분쇄 무세포진피를 포함하지 않는 피브린 인공피부도 제작하였다.

2.5. in vivo 창상치료 효과 시험

제작한 인공피부의 창상치료 효과 시험을 위해 마우스 (Balb-C nu/nu mice 6 weeks: Japan SLC, Hamamatsu, Kotoh-cho, Japan)에 창상을 유발하여 적용하였다. 마우스 몸무게 kg 당 Ketamine hydrochloride (유한양행, 대한민국, 서울시, 동작구)와 Rompun (Bayer Korea, 대한민국, 서울시, 동작구)을 각각 75 mg과 20 mg씩 사용하여 마우스를 마취시킨 뒤 의료용 천공기 (Biopsy punch-8mm: Suddesche Feinmechanik GmbH, Brueckenstrasse 5, German)로 등 부위에 인공창상을 유발시켰다. 인공창상 유발 시 근막 (Fascia), 피하근육층 (Panniculus carnosus)을 제외한 피부층 (Dermis)만 제거하였다. 4가지 타입의 인공피부를 유발시킨 창상에 적용하였다. 대조군은 인공피부를 적용하지 않고 거즈 드레싱 (Medipore, 3M health Care, St. Paul, MN, USA)만 하였다. 마우스는 약 22°C, 습도

65%의 환경에서 키웠으며 0, 3, 6, 9, 12일마다 관찰을 하고 9 일차에 조직을 적출하였다. 적출한 조직의 표본을 염색하기 위하여 10% 완충 포르말린에 1시간 고정하였다. 고정한 창상조직은 파라핀 (Paraffin) 블록을 만들어서 6~7 µm 두께로 절편을 제작하였고 통상적인 H&E 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2.6. 창상면적 측정

디지털카메라로 창상 부위를 촬영한 후 Photoshop program을 사용하여 최초 창상부위의 면적을 기준으로 각 창상부위를 Pixel 수로 측정하고 측정수를 백분율로 환산하여 시간에 따른 창상면적의 변화를 측정하였다. 디지털사진을 이루는 최소단위는 픽셀 (pixels)로 픽셀이 모여 사진을 이룬다. 조직사진에서 10,000픽셀은 40,000 µm²이었으며 이 값에 창상부의 픽셀을 계수한 값을 대입하여 실제면적을 확인하였다. 공식은 다음과 같다.

$$\text{Wound area size (}\mu\text{m}^2\text{)} = 10,000 / (\text{P value} \times 40,000 \mu\text{m}^2)$$

P value : measured Pixel value

3. 결과 및 고찰

3.1. 1형 콜라겐에 대한 섬유아세포와 각질세포의 안정성

1형 콜라겐의 세포적합성 및 생체적합성을 피브린과 비교 검증하기 위해 사람 각질세포와 섬유아세포를 1형 콜라겐과 피브린을 코팅한 플레이트에 접종하여 세포부착 및 증식형태를 비교하였다 (Fig. 1). 1형 콜라겐을 코팅한 플레이트에서는 접종한 각질세포와 섬유아세포가 코팅면에 빠르게 부착하였

Fig. 1. Photographs of keratinocytes and fibroblast grown on collagen-coated culture dish and fibrin-coated culture dish. Biocompatibility of collagen type I was compared with that of fibrin with keratinocytes and fibroblast.

으며, 각 세포의 특이적 형태가 1시간 이내에 나타났다. 또한 부착한 세포를 수거하여 계수한 결과 98% 이상의 세포생존율을 나타내 접종한 대부분의 세포가 부착하였음을 확인하였다. 반면, 피브린을 코팅한 플레이트에서의 세포부착 및 생존율은 콜라겐 코팅 플레이트와 유사하였으나, 세포의 형태가 변하는 양상을 보였다. 정상적인 각질세포는 다각형의 형태를 나타내지만, 피브린 코팅면 위에 부착한 각질세포는 부정형의 형태를 나타내었다. 또한 정상적인 섬유아세포는 길쭉한 외형을 가지며 불규칙한 돌기를 나타내지만, 피브린 코팅면 위에 부착한 섬유아세포는 이동상 (Stress fiber form)을 나타내었다. 창상에서 섬유아세포는 혈병 (Fibrin clot)을 분해하며 창상부로 빠르게 이동 (migration)해 퍼져 나가는데 이때 이동상을 나타낸다 [19]. 이와 같은 결과에서 1형 콜라겐이 각질세포와 섬유아세포에 대해 부착성과 형태학적 안정성이 우수함을 확인하였다.

3.2. 1형 콜라겐의 *in vitro* 창상치료 효과

실제 피부의 창상치료 단계에서 섬유아세포는 창상주변 조직에서 빠르게 혈병과 창상으로 이동해 들어가 혈병을 분해하고 창상조직에 새로운 진피층을 형성한다. 생성된 진피층 위를 각질세포가 빠르게 덮고 각질분화를 시작해 창상을 치료한다 [20]. 1형 콜라겐의 *in vitro* 창상치료 효과를 확인하기 위해 1형 콜라겐을 코팅한 플레이트에 섬유아세포와 각질세포를 각각 배양하고 인공창상을 유발한 뒤 시간에 따른 각 세포의 이동 정도를 확인하였다. 또한 피브린을 코팅한 플레

이트에서도 동일한 실험을 진행하였다. 아무것도 코팅하지 않은 플레이트를 대조구로 사용하였다. 1형 콜라겐 코팅의 경우 섬유아세포, 각질세포 모두 대조구에 비교하여 빠른 이동을 나타내었다. 특히 각질 세포의 경우 대조구에 비교하여 3배, 피브린 코팅에 비교하여 5배의 빠른 이동을 보였다 (Fig. 2). 피브린 코팅에서 섬유아세포는 대부분의 인공창상으로 세포가 이동하였으나 각질세포의 경우 거의 이동을 하지 않았다. 이와 같은 결과에서 각질세포의 빠른 이동 및 분화를 돕는 치료용 인공피부 소재로 1형 콜라겐이 적합함을 확인하였다.

3.3. 1형 콜라겐과 무세포진피를 이용한 혼합형 인공피부 제작

1형 콜라겐을 기본 기질로 하고 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 세포적합성 및 구조안정성을 확인하기 위해 분쇄 무세포진피와 섬유아세포 유무에 따른 인공피부를 제작하였다. 1형 콜라겐을 기본으로 하는 인공피부, 섬유아세포를 포함한 인공피부, 섬유아세포와 분쇄 무세포진피를 포함한 혼합형 인공피부를 비교해 보았을 때, 섬유아세포를 포함한 인공피부와 섬유아세포와 분쇄 무세포진피를 포함한 인공피부가 1형 콜라겐을 기본으로 하는 인공피부에 비해 3배 이상의 부피를 유지하였다 (Fig. 3). 각질세포 1×10^5 개를 접종하고 2일간 공기노출 액체배양 시 1형 콜라겐을 기본으로 하는 인공피부의 각질세포 수는 1.23×10^5 개였으며, 섬유아세포를 포함한 인공피부의 각질세포 수는

Fig. 2. *In vitro* scratch assay for analysis of cell migration on collagen-coated culture dish, fibrin-coated culture dish, and cell culture dish. Keratinocyte and fibroblast cell monolayers grown on collagen-coated culture dish, fibrin-coated culture dish, and cell culture dish were scratched with p200 pipet tips and images were acquired at 0 and 10 hr in *in vitro* scratch assay. The dotted lines define the areas lacking cells.

Fig. 3. Histological analysis of air liquid interface culture of artificial skin equivalents. Keratinocytes were grown on collagen matrix (A), collagen matrix containing fibroblast (B), and collagen matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (C).

1.80×10^5 개, 섬유아세포와 분쇄 무세포진피를 포함한 인공피부의 각질세포 수는 1.82×10^5 개로 섬유아세포와 분쇄 무세포진피를 포함한 인공피부에서 각질세포 부착 및 증식량이 높게 나타났다. 또한 1형 콜라겐을 기본으로 하는 인공피부와 섬유아세포를 포함한 인공피부에서는 인공피부의 일반적 단점인 겔 표면의 평면화 현상이 나타났지만, 섬유아세포와 분쇄 무세포진피를 포함한 인공피부에서는 실제 피부와 유사한 구조를 나타내었다. 이와 같은 결과를 통해 섬유아세포가 인공피부 부피 유지 및 각질세포 부착에 영향을 주며, 분쇄 무세포진피는 인공피부를 실제 피부와 유사한 구조로 형성

할 수 있음을 확인하였다.

3.4. 1형 콜라겐과 무세포진피를 이용한 혼합형 인공피부의 *in vivo* 창상치료 효과

1형 콜라겐을 기본 기질로 하고 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 창상치료 및 수축억제 효과를 동물모델에서 검증하기 위해 창상이 유도된 마우스에 적용하여 총 12일간 마우스를 사육하며 창상치료 및 수축억제 효과를 비교하였다. *In vivo* 창상치료 효과를 비교하기 위한 인공피부 대조군으로 1형 콜라겐에 섬유아세포만 포함한 인공피부, 피브린을 기본 기질로 하고 섬유아세포를 포함한 인공피부, 피브린과 분쇄 무세포진피, 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부를 사용하였다. 또한 인공피부를 적용하지 않고 거즈 드레싱만 한 대조군을 사용하였다.

분쇄무세포진피의 유무에 상관없이 1형 콜라겐 인공피부는 적용 6일차부터 이식체의 두께가 감소하며 얇은 피막을 형성해 창상조직과 완벽하게 통합된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A, 4B). 반면 피브린 인공피부의 경우 6일차까지 인공피부의 원형이 분해되지 않고 남아 있다가 9일차에는 가피처럼 말랐다. 특히 분쇄 무세포진피가 포함된 피브린 인공피부의 경우 12일차까지도 첨가한 무세포진피가 그대로 남아있

Fig. 4. Photographs of the full-thickness wound made on the back of balb-c nu/nu mice with changes in the wound morphology and contraction as a function of time after transplantation with each artificial skin equivalent. Each air liquid interface culture of keratinocyte on collagen matrix containing fibroblast (A), collagen matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (B), fibrin matrix containing fibroblast (C), and fibrin matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (D) was transplanted. Only gauze dressing was used as the control experiment (E).

었다 (Fig. 4C, 4D). 인공피부를 적용하지 않고 거즈 드레싱만 한 대조군의 경우 창상이 수축했으며 가피가 생성되었다 (Fig. 4E).

최초 창상부위 면적을 기준으로 각 창상부위 면적을 백분율로 환산하여 시간에 따른 창상면적의 변화를 알아보았다 (Fig. 5). 창상면적의 변화를 측정한 결과 3일차에는 모든 실험군에서 0일차와 비교해 약 20~40% 이상 창상면적의 확장 현상이 나타났다. 이는 정상조직에 있던 텐션 (Tension)이 창상유도로 인해 일시적으로 약해져 나타난 현상으로 보인다. 6일차부터 인공피부를 적용하지 않고 거즈 드레싱만 한 대조군은 급속도로 창상수축반응이 나타났다. 대조군에서 창상면적 감소는 폐혈증, 감염 등을 막기 위해 주변조직이 창상부를 중심으로 수축해 나타나는 현상으로 생체에서 기본적으로 나타나는 반응이다. 1형 콜라겐을 기본 기질로 하고 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 경우 6일차부터 창상수축이 일어나 12일차에는 0일차 창상의 넓이와 비슷한 크기로 수축이 이루어졌다. 1형 콜라겐에 섬유아세포만 포함한 인공피부의 경우 6일차까지 창상면적의 확장이 일어났으며, 9일차부터는 수축이 일어나 12일차에는 0일차 창상의 넓이와 비슷한 크기로 수축이 이루어졌다. 피브린을 기본 기질로 하고 섬유아세포를 포함한 인공피부의 경우 6일차까지 창상면적의 확장현상이 나타났으며, 그 이후에는 12일차까지 확장된 면적을 유지하였다. 피브린과 분쇄 무세포진피, 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 경우에는 9일차까지 창상면적의 확장이 일어났고, 12일차에는 수축이 있었지만 0일차 창상 넓이에 대비하여 60% 이상의 확장을 나타내었다.

인공피부를 적용한 창상부의 조직학적 관찰을 위해 9일차에 창상조직을 적출하여 H&E 염색을 진행한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다. 1형 콜라겐에 섬유아세포만 포함한 인공피

Fig. 5. Change of wound area after transplantation of each artificial skin equivalents. Each air liquid interface culture of keratinocyte on collagen matrix containing fibroblast (A), collagen matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (B), fibrin matrix containing fibroblast (C), and fibrin matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (D) was transplanted and then change of wound area was measured by analyzing the wound size in photographs using photoshop program. Only gauze dressing was used as the control experiment (E).

부의 경우 반흔조직부위만 일부 상피화가 진행되었고, 진피층에 육아조직이 형성되었다 (Fig. 6A). 1형 콜라겐을 기본 기질로 하고 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 경우 창상부위 전 구역에서 상피화가 진행되었으며 진피층에 육아조직이 형성되었다. 첨가한 분쇄 무세포진피는 완전히 분해되었으며 진피조직으로 흡수된 것으로 판단된다 (Fig. 6B). 피브린을 기본 기질로 하고 섬유아세포를 포함한 인공피부의 경우에는 피브린층이 창상위에 그대로 남아있었으며, 상피화와 진피층에서 육아조직 형성이 전혀 진행되지 않았다 (Fig. 6C). 피브린과 분쇄 무세포진피, 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부의 경우에도 피브린층이 창상위에 그대로 남아 있었으며, 상피화가 진행되지 않았다. 진피층에서는 육아조직이 얇게 형성되었지만, 첨가한 분쇄 무세포진피가 육아조직 위에 분해되지 않은 형태로 남아 있었다 (Fig. 6D). 거즈 드레싱만 한 대조군의 경우 창상부가 수축하여 'V' 형을 나타냈다. 상피화가 진행되지 않았으며, 진피층에서는 육아조직이 형성되었지만 염증반응이 미약하게 나타났다 (Fig. 6E). 위와 같은 결과 일반 창상이 완전히 닫히는데 14일 정도의 시간이 소요될 때 1형 콜라겐을 기본 기질로 하고 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 포함하는 혼합형 인공피부를 적용하면 약 9일후 완전히 창상이 닫힘을 확인하였다.

심한 화상, 외상, 상피암 절제 및 피부질환 등으로 피부가 심각하게 손실된 환자의 경우, 이식된 인공피부는 손실 부위의 감염 및 체액의 손실을 막아주는 보호막의 기능과 함께 환자의 상처 부위에 흉터가 남지 않고, 자연 치료 과정에 발생할 수 있는 심각한 수축을 막아 주어야 한다 [8]. 따라서 이상적인 인공피부는 창상의 외부 노출을 차단하여 감염을 예방하고, 초기 삼출물을 적절히 흡수해야 하며, 염증반응을 억제할 수 있어야 한다. 콜라겐 겔은 세포와 친화성이 높아 세포가 잘 부착하고, 세포로부터 분비된 콜라겐분해효소에 의해 콜라겐 섬유사이로 세포돌기를 쉽게 뺄 수 있어 세포의 증식에 좋은 환경을 형성한다 [21]. 무세포진피는 진피 특징적인 3차원구조, 성장인자, 단백질을 유지하고 있어 세포적합성, 조직적합성이 뛰어난 소재이다 [11]. 본 연구에서는 콜라겐과 무세포진피의 장점을 극대화하고, 배양 표피세포 이식 또는 자가 조직 이식의 단점을 보완하기 위해 1형 콜라겐, 분쇄 무세포진피, 피부세포를 융합한 새로운 형태의 혼합형 인공피부를 개발하였다. 특히 고가의 무세포진피를 적은 양 사용하여 넓은 창상을 치료할 수 있도록 분쇄하여 적용하였다. 시트 타입 무세포진피를 분쇄하면 약 5배 이상의 창상에 적용할 수 있으며, 분쇄로 인해 생긴 공극으로 시트 타입 무세포진피보다 많은 양의 섬유아세포가 쉽게 유입될 수 있다. 또한 1형 콜라겐을 기본 기질로 활용함으로써 분쇄 무세포진피와 섬유아세포를 인공피부에 쉽게 고정할 수 있었다. 고정된 많은 양의 섬유아세포가 분비하는 epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF)와 같은 수용성 성장인자의 paracrine 분비로 각질세포 성장 및 상피화를 촉진할 수 있다 [22,23]. 뿐

Fig. 6. Histological findings of grafted tissue. Each air liquid interface culture of keratinocyte on collagen matrix containing fibroblast (A), collagen matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (B), fibrin matrix containing fibroblast (C), and fibrin matrix containing fibroblast and micronized particulate acellular dermal matrix (D) was implanted onto full-thickness wound made on the back of balb-c nu/nu mice and the thin section of grafted area after 9 days of transplantation was hematoxylin and eosin stained. Only gauze dressing was used as the control experiment (E). Black arrows indicate the region of re-epithelization and open arrow heads show fibroblast proliferation in the grafted tissue. Open arrows indicate the insoluble fibrin matrix layer.

만 아니라 섬유아세포는 basement membrane의 component를 빠르게 분비하여 피부의 구조적 재건을 돕는다는 보고도 있다 [24]. 본 연구의 결과에서도 섬유아세포가 각질세포의 부착, 인공피부 구지유조에 주는 영향을 확인하였다.

4. 결론

창상 치료에 적용하기 쉽고 치료효과가 우수한 치료제를 개발하기 위해 1형 콜라겐과 분쇄 무세포진피를 스케폴드로 활용하고 각질세포와 섬유아세포를 배양한 실제피부와 유사한 혼합형 인공피부를 제작하였다. 섬유아세포는 인공피부의 부피를 유지하였고 각질세포가 인공피부 표면에서 부착 및 생장이 되도록 유도해 실제 피부와 동일한 구조를 보였다. 일반 창상이 완전히 닫히는데 14일 정도의 시간이 소요되지만, 혼합형 인공피부를 적용하면 9일 안에 창상부위 전 구역에서 상피화가 진행되고 진피층에 육아조직이 형성됨을 확인하였다. 본 연구 결과를 통해 제시된 3차원 구조의 혼합형 인공피부는 창상 치료를 위한 피부세포치료제로 사용될 수 있을 것

이다.

감사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 전략기술인력양성사업으로 수행된 결과임.

REFERENCES

1. Darlenski, R., J. Kazandjieva, and N. Tsankov (2011) Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms. *J. Clin. Med.* 4: 36-45.
2. Denda, M. (2000) Skin barrier function as a self-organizing system. *Forma* 15: 227-232.
3. Han, S. K. and H. J. You (2011) Wound coverage using advanced technology in Korea. *JKor. Med. Assoc.* 54: 594-603.
4. Tanner, J. C., J. Vandeput, and J. F. Olley (1964) The mesh skin graft. *Plast. Reconstr. Surg.* 34: 287-291.

5. Rheinwald, J. G. and H. Green (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344.
6. Mahmood, K., M. Gill, and A. M. Baber (2003) Role of split thickness skin grafting in various surgical conditions. *Pak. J. Surg.* 19: 30-33.
7. Kim C. H., H. S. Park, and Y. Son (2002) The status and prospect of bioartificial skin. *Polym. Sci. Tech.* 13: 48-55.
8. Chen, R. N., H. O. Ho, Y. T. Tsai, and M. T. Sheu (2004) Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials* 25: 2679-2686.
9. Lee, K. C., N. H. Lee, J. H. Ban, and S. M. Jin (2008) Surgical treatment using an allograft dermal matrix for nasal septal perforation. *Yonsei Med. J.* 49: 244-248.
10. Lineen, E. and N. Namias (2008) Biologic dressing in burns. *J. Craniofac. Surg.* 19: 923-928.
11. Sclafani, A. P., T. Romo 3rd, A. A. Jacono, S. McCormick, R. Cocker, and A. Parker (2000) Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (micronized AlloDerm) forms for soft tissue augmentation. Clinical observations and histological analysis. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2: 130-136.
12. Ge, P. S., T. A. Imai, A. Aboulain, and T. L. Van Natta (2010) The use of human acellular dermal matrix for chest wall reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 90: 1799-1804.
13. Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009) Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 929-958.
14. Albin, A. and B. C. Adelman-Grill (1985) Collagenolytic cleavage products of collagen type I as chemoattractants for human dermal fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 36: 104-107.
15. Li, S. T. (2003) Biologic biomaterials: Tissue-derived biomaterials (Collagen). pp. 117-139 In: J. B. Park and J. D. Bronzino (eds.). *Biomaterials: Principles and applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
16. Metcalfe, A. D. and M. W. J. Ferguson (2007) Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 28: 5100-5113.
17. Shin, H., S. Jo, and A. G. Mikos (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4353-4364.
18. Liang, C. C., A. Y. Park, and J. L. Guan (2007) In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2: 329-333.
19. Tzoneva, R., N. Faucheux, and T. Groth (2007) Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 1538-1547.
20. Diegelmann, R. F. and M. C. Evans (2004) Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 9: 283-289.
21. Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 349-463.
22. Coulomb, B., C. Lebreton, and L. Dubertret (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J. Invest. Dermatol.* 92: 122-125.
23. Barreca, A., M. De Luca, P. Del Monte, S. Bondanza, G. Damonte, G. Cariola, E. Di Marco, G. Giordano, R. Cancedda, and F. Minuto (1992) In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. *J. Cell Physiol.* 151: 262-268.
24. Okamoto, E. and Y. Kitano (1993) Expression of basement membrane components in skin equivalents: Influence of dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 5: 81-88.