

각질세포와 섬유모세포가 배양된 고분자 미립구를 이용한 피부재생

곽소정¹, 김상수², 전현욱¹, 이영무¹, 박문향³, 송강원³, 최차용², 김병수¹

¹한양대학교 공과대학 화학공학과, ²서울대학교 생물화학협동과정,

³한양대학교 의과대학 병리학교실,

전화 (02) 2297-0838, FAX (02) 2298-4101

Abstract

The standard cultured sheet grafts for large full-thickness burn wound has been tempered by weak points such as long culture periods, difficulty in handling the fragile sheets, high costs and the detachment of the skin cells from the culture dishes by enzymatic digestion. Here we report on a new technique of using skin cells cultured on spherical microcarriers for skin regeneration. We cultured the human skin cells on biodegradable polymer microcarriers and transplanted onto wounds in the back of nude mice. After 21 days, histological examination showed the regeneration of epithelium. The technique developed in this study overcomes the drawbacks of the current artificial skin grafts, and could be utilized as an efficient skin wound regeneration therapy.

서론

광범위한 중증화상의 경우 조직공학기술을 이용하여 생체적합성 재료와 사람의 실제 세포 및 조직을 결합시킨 인공피부가 종종 필요하다. 손상된 피부의 재생은 배양한 각질세포를 이용하거나 인공진피 이식 후 얇은 부분 층 식피 편으로 덮어주는 방법을 사용하고 있으며 세포 배양기술과 고분자에 대한 연구 결과 여러 종류의 인공피부^{1,2}가 개발되어 왔다.

현재 조직공학적 생인공피부는 피부세포를 배양한 후 *in vitro*에서 sheet로 형성시킨 제품이다. 그러나 세포배양 공정 후 피부 sheet를 만드는 공정이 추가로 필요한 이 방법은 여러 가지 문제점을 가지고 있다. 즉, 제조기간이 길며, 제조비용이 높으며, 세포배양 후 배양 표면에서 세포를 분리하기 위하여 피부세포와 단백질에 해를 가할 수 있는 트립신 효소 처리가 사용된다는 단점이 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 새로운 조직공학적 피부재생법에 대한

연구를 수행하였다. 이 연구에서는 인체피부 조직의 일부로부터 분리한 세포를 고분자 미립구 담체에서 배양하여 면역결핍 쥐에 이식한 후 형성된 인공피부를 형태학적으로 관찰하였다.

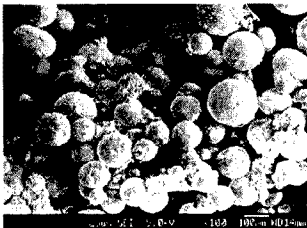
재료 및 방법

인간 피부조직에서 분리한 각질세포와 섬유모세포를 고분자 미립구에 부착하여 바이オリ액터에서 배양하였다. 이식하기 전에 고분자 미립구에 세포의 부착 여부를 전자현미경으로 조사하였고, 미립구에 부착된 세포의 성장속도를 확인하기 위해서 세포를 citric acid 용액에서 1시간동안 배양시켜서 방출된 세포핵을 crystal violet으로 염색하여 세포수를 측정하였다.

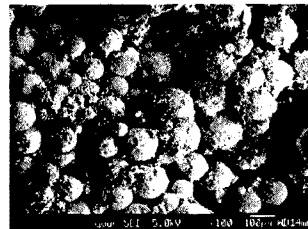
미립구에 부착된 세포의 증식능력을 알아보기 위해서 세포가 부착된 미립구를 배양접시에 5일 동안 배양하였다. 배양된 세포-미립구 복합체를 면역결핍 생쥐의 피부결손 부위에 이식하여 화학 조직학 검사와 면역화학 조직학 검사를 실시하였고, 피부 재생을 조사하였다.

결과 및 고찰

미립구에 각각 각질세포와 섬유모세포를 부착한 후 바이オリ액터에서 배양시킨 결과 미립구에 표피세포가 부착된 것을 주사 전자 현미경을 통해서 확인하였다. 부유 상태로 PLGA미립구에 부착된 각각의 표피세포와 섬유아세포는 빠른 시간 안에 PLGA미립구에 부착되었으며 바이オリ액터의 배양액에는 세포는 거의 관찰되지 않았다. 미립구에 표피세포와 섬유아세포를 부착한 후 바이オリ액터에서 성장률을 10일 동안 측정한 결과 표피세포의 성장률은 초기에 비해 2.3배 증가하였으며 섬유모세포는 7.6배 증가하였다. 세포가 부착된 미립구를 5일 동안 배양접시에서 배양한 결과 단일층을 형성하였다. 조직학 검사 결과 21일 후 실험군에서는 분해되지 않은 미립구와 함께 정상피부와 유사하게 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 구성된 다수의 층들을 가진 표피가 관찰되었다.



(a)



(b)

그림. PLGA 미립구에 부착된 각질세포(a), 섬유모세포(b)

요 약

각질세포의 배양법이 개발 후 피부 결손 부위의 치료에 인체 각질세포를 배양하여 얻어진 표피를 이식하는 방법부터 세포부유물을 도포하는 방법들은 Trypsin 처리 과정을 거치면서 배양된 세포의 부착능력을 가진 단백질이 손상되어 성공적인 피부 재생이 불가능하다. 본 실험에서는 이러한 효소처리의 단점을 보완하기 위해서 고분자 미립구에 세포를 효소처리 과정없이 동물실험을 한 결과 21일 후에는 대조군에 비해서 표피가 완벽하게 재생되었고 이식 후 세포의 부착면적을 늘리고 생착율을 높일 수 있었다.

이 연구에서 효소처리 없이 고분자 미립구에서 배양된 세포를 이용한 인공피부 재생이 효과적인 것을 보여주었다. 이러한 모델은 앞으로 화상이나 궤양으로 인한 피부 손실 부위 치료에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Martine L, Lafrance, Ph.D, and David W. Armstrong, Ph.D., RSM Novel Living Skin Replacement Biotherapy Approach for Wounded skin Tissue (1999). *Tissue engineering*, 5 ,153 ~170
2. Raymund E. Horch, MD., Markus Debus, M.D., et al. Cultured Human Keratinocytes on Type I Collagen Membranes to Reconstitute the Epidermis.(2000). *Tissue engineering*, 6 ,53 ~67