

## Reconstruction of bioartificial skin made by collagen sponge

Young-Kwon Seo<sup>1</sup>, Kye-Yong Song<sup>2</sup>, Seong-Jun Seo<sup>3</sup>, Young-Jin Kim<sup>4</sup>, and Jung-Keug Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University,

<sup>2</sup>Department of Pathology Chung-Ang University, <sup>3</sup>Department of Dermatology Chung-Ang University,

<sup>4</sup>Biomedical Research Center Lifecord. Co.

Tel: + 82-2-2260-3365 Fax: +82-2-2271-3489

### 서 론

조직공학적 방법을 이용한 젤형 인공피부의 개발에 이어 이것의 단점을 보완하기 위해 스폰지형의 인공피부가 개발되었다. 스폰지형 전층 생인공피부의 제조에 있어 상피세포를 진피층위에 배양 및 분화를 위해서는 기저막이 존재하여야 한다. Boyce 등은 이를 위해 스폰지의 한쪽면을 콜라겐 용액에 적신뒤 건조시켜 기저막을 제조하였으나 시료마다 동일한 막제조가 어려움 단점이 있었다<sup>1)</sup>. 다른 방법은 스폰지에 섬유모세포를 3주이상 배양하여 스폰지의 다공성 구조를 세포외기질(ECM)로 채워 기저막을 대신하는 방법도 있으나 이는 오랜 기간 세포를 배양해야하는 문제점이 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점들을 해결하고자 콜라겐 필름을 제조한 후 스폰지에 부착시켜 기저막을 제조하여 2주간의 짧은 시간안에 스폰지형 전층 생인공피부를 제조하였다.

### 재료 및 방법

초산에 녹인 pH 3, 농도 0.5(W/V)%의 콜라겐 용액 1 ml를 24 well plate에 도포하고 냉동고에서 12시간 이상 냉동시킨 뒤 -80℃의 진공 동결건조기에서 36시간 동안 동결건조시켰다. 동결건조된 다공성 형태의 콜라겐스폰지를 진공오븐에 넣고 먼저 2시간정도 진공을 걸어 스폰지내의 미량의 수분을 제거한 뒤 110℃ 까지 온도를 상승시켜 24시간동안 진공을 걸어주었다.

콜라겐 필름은 1%의 용액, 1 ml을 35 mm petri dish에 도포하고 공기중에서 48시간동안 건조하여 제조하였다. 그리고 필름위에 콜라겐 용액을 약 0.5 ml 도포한 후 스폰지를 붙여 24시간동안 건조하여 기저막을 제조하였다. 제조된 스폰지는 0.25% 글루타르알데하이드로 가교결합 후 1주일 동안 3차증류수로 세척한 뒤 70%에탄올에 48시간 담그어 멸균하였다<sup>2,3)</sup>.

세포는 포피에서 일차배양한 섬유모세포(#6)를  $1 \times 10^6$ /well(10mm insert)농도로 스

폰지에 접종한후 2일간 DMEM/10%FBS로 배양하였다. P-media는 DMEM과 F-12를 3:1로 혼합하고  $\text{NaHCO}_3$ 를 3.07g, FBS를 10%첨가, 그리고 항생제 Antimycotic-antibiotic (Gibco,)를 10ml을 첨가 한다. 이 배지는 NIH J2 세포주를 배양할 때 이 용하며 각질세포를 배양하기위해서는 supplement를 첨가한다. Supplement에는 transferrin( $5\mu\text{g/ml}$ ), insulin ( $5\mu\text{g/ml}$ ), EGF( $5\text{ng/ml}$ ), hydrocortison( $0.4\mu\text{g/ml}$ ), cholera toxin( $10^{-10}\text{M}$ ), 그리고 T3( $2\times 10^{-11}\text{M}$ )을 첨가한다.

Submerge배양에는 3일간 80mm dish에 17ml의 배지를 넣었으며 기-액 배양단계에서는 처음 3일간은 submerge배양과 같은 조건의 배지를 넣어주며 insert를 grid위에 올려놓고 배지는 동일하게 17ml을 첨가하여 준다. 기-액 배양 3일후 7일간은 EGF를 제거한 배지를 넣어준다.

### 결과 및 고찰

Fig. 1의 (A)는 스폰지의 다공성구조를 보여주는 전자현미경사진이며 (B)는 그위에 기저막을 형성한 사진이다. 표면에 막이 형성되었음이 관찰되고 그 위에 각질형성세포를 각각 배양하면 기저막이 없는 경우(C)에는 상피세포가 증식조차 이루어지지 않았으며 기저막이 있는 경우(D)에는 상피층의 증식 및 분화가 잘 이루어졌음을 관찰할 수 있었다.

### 요약

젤형 인공피부의 약한 물성을 보완하기 위해 스폰지형 인공피부가 개발되었으나 다공성 표면구조 때문에 세포의 배양이 어려운 문제점이 남아 있었다. 이 다공성 구조를 섬유모세포의 장기 배양으로 ECM으로 채우기 위해서는 3주이상의 긴 시간이 필요하며 그 위에 상피층 배양하기 위해서는 2주 이상의 시간이 추가로 소요되기 때문에 환자에게 이식할 적절한 시기를 놓칠수가 있다. 따라서 본 연구결과로 단기일 내에 전층 인공피부를 배양함으로써 적절한 이식시기를 맞출수가 있으며 이러한 기저막이 부착된 스폰지구조는 물성도 향상되어 이식시 조작성이 쉽고 불합이 가능한 장점이 있다.

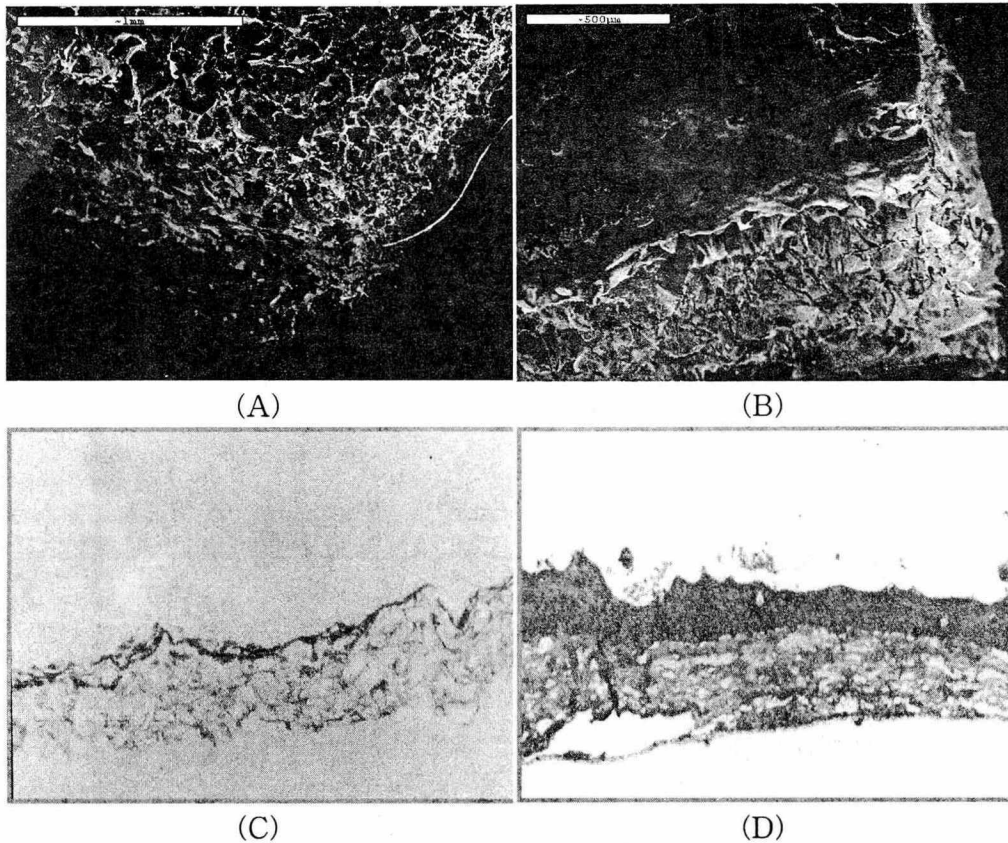


Figure 1. Culture of keratinocyte cells on collagen sponge without (A, C) or with (B, D) collagen film.

## References

1. S. T. Boyce, D. J. Christianson, and J. F. Hansbrough. Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. (1988) *J. Biomed. Mater. Res.* 22: 939-957.
2. I. V. Yannas, and J. F. Burke. Design of an artificial skin I. Basic design principles. (1980) *Journal of Biomedical Materials Research* 14: 107-131.
3. J. S. Pieper, A. Oosterhof, P. J. Dijkstra, J. H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. (1996) *Biomaterials* 20: 847-858.