

세포조직배양법을 이용한 쥐 인공피부의 개발

양은경 · 이재호¹ · 최태부¹ · 박정극*
동국대학교 화학공학과, ¹건국대학교 미생물공학과

Development of Dermal Equivalent Using Mouse Fibroblasts

Yang, Eun-Kyoung, Jae-Ho Lee¹, Tae-Boo Choe¹ and Jung-Keug Park*

Dept. of Chemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

¹Dept. of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — As the first stage of development of an artificial skin, fibroblasts were cultured in the collagen matrices to make a living dermal equivalent. Mouse embryonic fibroblasts were incorporated into a collagen matrices on plastic dishes containing concentrated DMEM culture media supplemented with sodium bicarbonate, hepes, antibiotics and fetal bovine serum. As the growth stimulation components, glycosaminoglycans were added; hyaluronic acid, chondroitin sulfate, heparin, chitosan were incorporated into the media at a concentration of either 1% or 5% w/w to collagen in order to investigate the effect on development of dermal equivalent. After the few days of incubation, gel matrices were contracted and firm dermal equivalent were formed. And the keratinocytes were cultured on top of dermal equivalent and make a three dimensional artificial skin tissue.

동물세포 배양기술의 한 분야로서 *in vitro*에서 실제 생체내의 기능을 갖도록 세포분화를 유도하여 다양한 조직을 구성하는 조직배양공학(tissue engineering)이 광범위한 응용성과 함께 이용되고 있다(1, 2). 즉 사람의 분화된 세포를 분리, 배양한 후 본래의 조직형태로 *in vitro*에서 재구성한 뒤 이를 인공장기의 일부분으로서 임상수술 혹은 독성학(toxicology), 병리학(pathology), 생리학(physiology) 등과 같은 연구에 응용할 수 있다(3, 4). *In vitro*에서 구조를 재현한 조직배양은 세포를 하나하나 분리하여 배양하는 세포 배양에 비하여 여러가지 장점을 가지고 있다. 단세포들은 조직내에서 원래 가지고 있던 분화된 기능을 *in vitro* 배양에서 쉽게 잃어버릴 수 있는데 반하여 콜라겐(collagen)과 같은 extracellular matrix를 이용하거나 원래조직을 구성하고 있는 주변 세포와 함께 세포를 배양할 경우 3차원적으로 *in vivo*에서와 유사한 구조로 배양할 수 있으며, 따라서 이들 조직은

*in vitro*에서도 거의 동일한 기능을 유지할 수 있다.

응용되는 분야로서는 인공장기(인공피부, 인공혈관, 인공체장, 인공간, 인공식도, 인공신장, 인공심장, 인공신경, 인공망막 등) 또는 그의 일부를 만드는데 널리 이용될 수 있는데 현재 인공장기의 개발소재로 사용되고 있는 각종 플라스틱, 인조섬유, 세라믹, 금속류 등은 그 소재자체가 대부분 인체내에서 거부반응을 일으킨다. 따라서 인공장기의 자기화를 촉진시키기 위해서 인공재질에 생체세포나 조직을 배양하여 생체기능을 보강한 hybrid type의 인공장기가 개발되고 있다(5, 6).

조직배양 기술을 이용한 인공장기 개발중 가장 실용화에 접근하고 있는 기술이 바로 *in vitro*에서 재구성한 인공피부의 개발이다. 생체에서 유래된 피부 세포를 콜라겐과 같은 matrix에서 *in vitro*상에서 배양하여 만든 재구성 인공피부의 개발연구는 화상과 같은 피부 손상부위에 임상적으로 이용될 수 있다(7). 또한 이 개발연구는 동물실험 대신 동물세포나 조직 배양을 이용하여 여러가지 약물의 독성시험을 하는 *in vitro* toxicology의 연구에도 응용될 수 있고 기타

Key words: Dermal equivalent, artificial skin, fibroblasts, keratinocytes, collagen matrix.

*Corresponding author

피부의 구조 및 생물학적 메카니즘 연구, 세포의 생리 및 대사작용, 모발의 성장연구, 또는 최근의 약물 전달시스템연구와 바이러스 백신연구를 위한 숙주(예, 파필로마 암바이러스)로서 응용될 수 있다(8).

이러한 인공피부 제작의 기본기술 습득은 앞으로 인간의 생명을 연장 유지시키는데 획기적인 역할을 할 각종 인공장기의 기술개발에 중요한 자료가 될 것은 물론, 이 분야에서의 외국의 여러 학회 및 산업계의 활발한 연구기술을 국내에서도 개발할 수 있는 좋은 계기가 될 것이며, 나아가 피부 임상치료나 의용공학 연구진과의 연결로 실용화시킬 수 있는 가능성이 크다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 생체내 진피의 조건인 70%의 섬유아세포(fibroblasts), 25%의 connective protein(collagen) 그리고 약 5%의 glycoprotein과 glycosaminoglycan으로 구성된 것에 보다 가까운 dermal equivalent의 형태로 mouse에 대하여 *in vitro* 상에서 재현하는 것을 목적으로 하여 콜라겐용액의 농도와 접종세포농도를 결정하였고 여러가지 배지첨가물의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

배지와 혈청

배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하였으며, NaHCO₃(Sigma Co.) 3.70 g/l, HEPES(Sigma Co.) 5.95 g/l와 penicillin 100 units/ml, streptomycin 10 µg/ml의 항생제 혼합액 1 ml를 첨가하고 pH는 7.2~7.4로 조절하였다. 또한 fetal bovine serum을 배지에 10%(v/v) 농도로 사용하였다(9-12).

쥐 섬유아세포의 분리

임신한지 약 12일된 mouse에서 분리한 embryo로부터 피부의 섬유아세포를 유도하였다. 1~2 mm² 정도로 잘게 자른 피부조직을 poly-D-lysine이나 콜라겐 용액으로 미리 코팅해둔 조직배양용 플라스크에서 배양한다. DMEM 배지와 10% FBS로 37°C, 95% air/5% CO₂ incubator에서 배양시키고 3일에 한번씩 배지를 교환한다(13).

Collagen Solution

Rat tail에서 콜라겐 섬유를 잘라내어 0.1% 아세트산용액에 넣어 4°C에서 48~72시간 동안 교반하여 녹여 2~3 mg/ml 농도의 콜라겐용액을 7,000~10,000

rpm에서 30분 동안 원심분리하고 그 상등액을 취한다. 이 실험에서 사용된 콜라겐의 종류는 rat tail tendon의 type I 콜라겐이다(14-16).

배지첨가물(Supplements)

콜라겐섬유와 세포간의 교차결합(crosslink)을 증진시키기 위해서 glycosaminoglycans(GAGs)인 hyaluronic acid, chondroitin sulfate, heparin 등과 chitosan을 배지에 1%와 5% 농도로 첨가하였다(17-19).

Dermal equivalent 제조

Bacteriological plastic dishes(Nunc Co.)를 사용하여 콜라겐용액 2.0 ml을 dish에 고르게 편 후 0.4 ml의 혈청과 0.8 ml의 농축된 배지를 첨가하여 가볍게 혼합한다. 세포는 25T-flask에서 0.05%-trypsin 처리로 떼어내서 배지에 현탁시킨 세포용액 0.8 ml을 접종한다. Hyaluronic acid, chondroitin sulfate, heparin, chitosan 등 배지첨가물에 대한 실험은 농축된 배지 대신에 이들 첨가물이 콜라겐의 무게에 대해 1%, 5%로 녹아있는 배지 0.8 ml을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 dermalization한다.

Dermal equivalent에서의 세포성장 측정

수축되는 직경의 측정 : 형성된 콜라겐 젤은 시간이 지남에 따라 섬유아세포가 콜라겐 섬유에 부착되어 성장함에 따라 액체배지를 밀어내고 dermal equivalent를 형성하면서 수축되므로 dermal equivalent의 직경이 줄어들게 된다. 각 조건에 따라 수축된 젤의 직경을 매일 측정하였다. 6일 정도가 지나면 수축속도가 아주 느려져서 더이상 수축이 진행되지 않았다.

세포수 측정 : Dermal equivalent(DE)내에서의 세포성장을 nuclei counting method를 이용하여 직접 측정하였다. 젤형태의 DE를 0.1 mg/ml collagenase (type I, SIGMA) 용액을 1 ml 첨가하여 37°C에서 30분 동안 처리하여 완전히 녹인 후 원심분리하여 얻은 pallet을 citric acid에 녹인 crystal violet을 가하여 37°C에서 한시간 처리하고 hemacytometer로 세포수를 측정하였다.

Epidermal equivalent 제조

Epidermal keratinocyte(표피 각질형성세포)를 배양하기 위해서는 DMEM 배지와 Ham's F12 배지를 3 : 1(v/v)로 섞고, 5%의 혈청과 0.4 µg/ml의 hydrocortisone(HC), 10 µg/ml의 epidermal growth factor,

10^{-10} M의 cholera toxin, 1.8×10^{-4} M의 adenine, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 insulin 등의 growth factors와 hormones을 포함한 성장배지를 사용하였고 수축이 거의 완료된 dermal equivalent 위에 mouse 표피조직을 얹어 세포를 배양, 분화시키는 방법을 사용하였다. 직경 1~2 cm 정도로 수축된 dermal equivalent의 중앙에 biopsy를 얻는다. Nile blue sulfate(Sigma Co.)를 사용하여 염색하면 각질형성세포 부분이 파란색으로 염색되어 표피조직으로부터 자라나온 세포영역의 면적을 측정할 수 있다(20-30).

결과 및 고찰

농축배지의 농도결정

Dermal equivalent의 형성시 배지가 콜라겐용액등에 의하여 희석되는 것을 보완하기 위해서 농축배지를 사용하였는데 여러 농도로 농축된 배지를 사용하여 실험해 보았다. 그 중 3배로 농축한 배지를 사용한 경우 세포와 배지간의 삼투압평형이 이루어져 세포 배양에 알맞았고 6배 이상으로 배지가 농축된 경우 세포생존율이 낮아 DE를 형성하지 못했다. 10배, 8배, 6배, 3배로 농축된 배지에 대하여 DE를 제조한 결과를 다음 Fig. 1에 나타내었다.

세포계대수에 따른 dermal equivalent의 형성

DE를 만드는데 사용하는 mouse 섬유아세포의 적당한 세포 성장시기를 알아보기 위하여 일차배양 후 여러번 계대할 때마다 DE를 만들어 그 수축정도를 알아보았다. 4~5일 간격으로 계대배양한 세포를 사용하여 각각 DE를 만들었으며 Fig. 2와 Fig. 3에서 보듯이 30일 이내의 세포를 사용한 것이 DE의 수축

상태가 좋았다. 40일 이상이 지나면 일차배양 이후 정상세포는 이미 노화되기 시작하여 DE의 상태와 DE내의 세포성장도 불완전하였다.

Dermal equivalent내의 혈청의 농도

Dermal equivalent 제조시 콜라겐의 젤상태가 크게 되며 또한 그 안에서 mouse 섬유아세포가 콜라겐섬유와 교차결합(crosslink)하고 동시에 세포성장이 활발히 이루어지도록 DE를 완성하기 위해서는 콜라겐 용액과 성장배지, 혈청, 세포농도의 양을 잘 조절하여야만 한다. 60 mm의 petri dishes를 사용하는 경우 총 4 ml의 용액이 사용되었고 그에 따른 혈청의 농도를 결정하였다. 실험결과 Fig. 4와 Fig. 5에서 보듯이 혈청의 농도변화가 DE의 수축속도에는 큰 영향을 미치지 않는 않지만 0.4 ml 이상에서는 더이상 세포증식에 영향을 주지 못하였으므로 본 실험에서는 혈청의 최적농도를 0.4 ml로 결정하였다. 60 mm dishes의 경우 농축배지 0.8 ml, 혈청 0.4 ml, 성장배지에

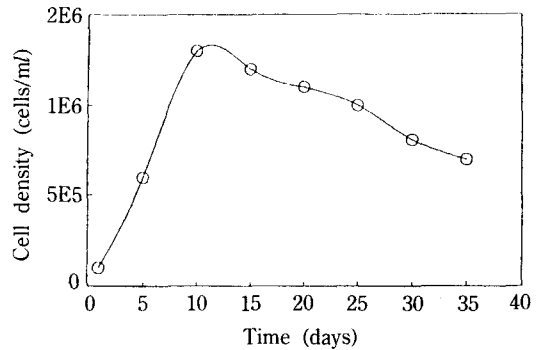


Fig. 2. The Growth curve of mouse fibroblasts of primary culture on the tissue culture flask.

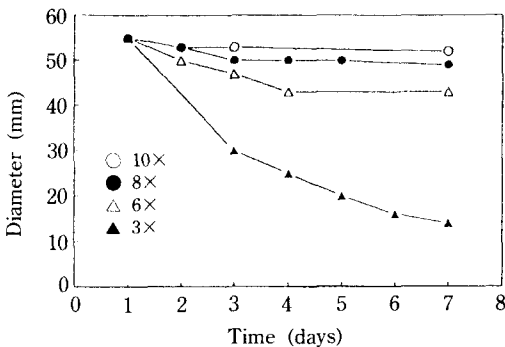


Fig. 1. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various media concentrations.

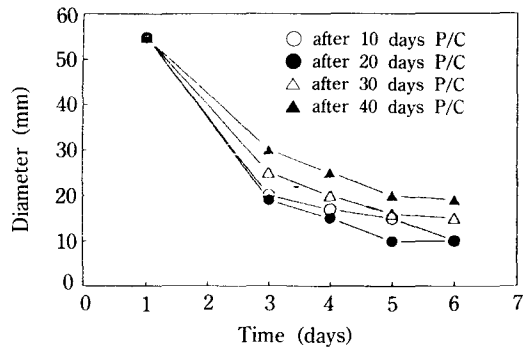


Fig. 3. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various cell generation numbers (P/C; primary culture).

현탁시킨 세포 0.8 ml, 콜라겐용액 2.0 ml을 사용하여 총 4.0 ml을 젤화하였으며 DE가 완성된 후의 부피는 약 2.0 ml이 되었다.

Mouse dermal equivalent의 관찰

불용성 콜라겐을 약산에 일정농도로 녹여서 준비한 콜라겐 용액은 배지와 혈청 등의 pH에 의하여 젤화된다. 이 콜라겐에 배양시킨 mouse 섬유아세포는 콜라겐섬유와 교차결합하여 자라면서 dermal equivalent를 형성한다. 플라스틱 배양용기에서보다는 세포

성장속도가 느리지만 콜라겐 젤위에서 세포가 성장 분화하여 진정한 피부형태를 구성한다.

Mouse 섬유아세포가 자라면서 젤형태의 collagen matrix를 수축시켜 dermal equivalent(DE)를 이루는데, 2일내에 수축이 일어나고 6일 정도 지나면 수축이 거의 끝난 상태가 된다. 현미경으로 관찰하면 젤을 형성한 다음날에 젤에 부착된 섬유아세포가 퍼져 자라고 있음을 볼 수 있다.

DE를 형성하면서 젤이 수축되는 사진을 초기(0 day)와 2, 4, 6일째에 대하여 Fig. 6에 보였다. DE를

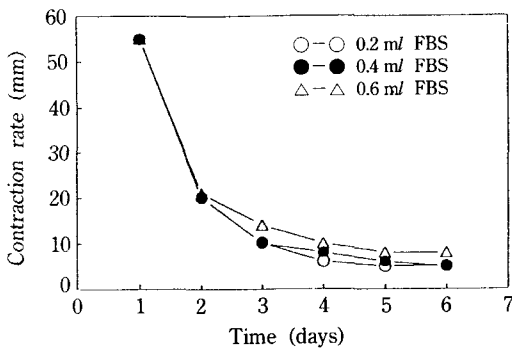


Fig. 4. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various serum concentrations.

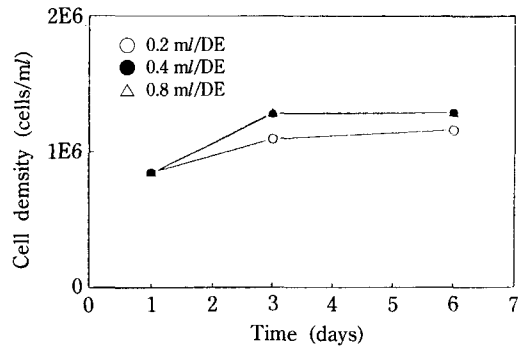


Fig. 5. Growth plot of mouse fibroblasts inside dermal equivalent at various serum concentrations.

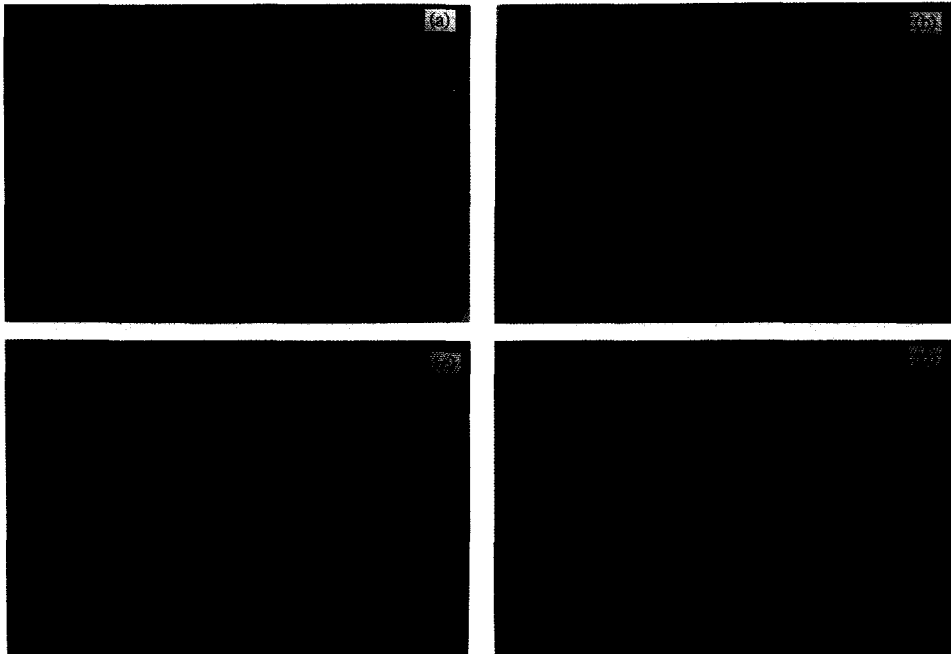


Fig. 6. Contraction of mouse fibroblastic dermal equivalent. (a) initial, (b) after 2 days, (c) after 4 days, (d) after 6 days

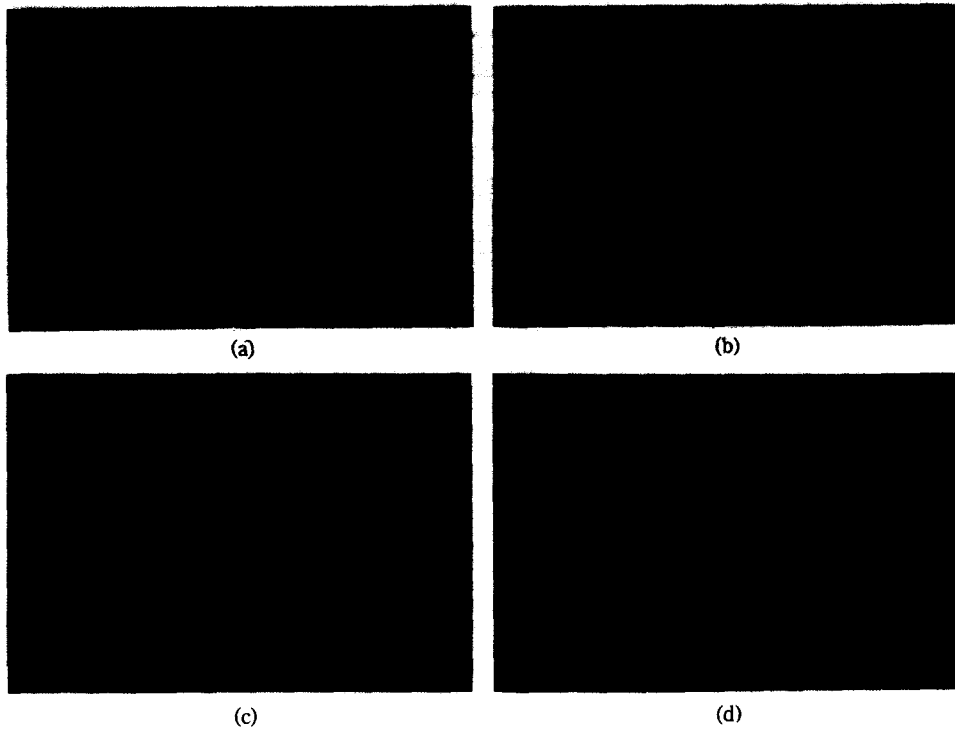


Fig. 7. Micrograph of growth pattern of mouse fibroblasts inside dermal equivalent, $\times 100$. (a) after 2 days, (b) after 3 days, (c) after 4 days, (d) after 6 days.

만들었을 때의 초기직경은 Fig. 6(a)와 같이 48 mm 이며 점차 수축이 진행되어 6일째에는 직경이 1~1.5 cm 정도였고 수축이 더이상 일어나지 않았다.

그리고 Fig. 7은 DE내에서의 mouse 섬유아세포를 시간이 경과함에 따라 현미경으로 관찰한 사진이다. DE를 만든 후 하루가 지나면 섬유아세포가 퍼지면서 자라기 시작하여 2일째에 DE의 표면을 가득 덮고 3~4일 후에는 섬유아세포가 콜라겐 섬유 사이에서 여러 층으로 자람을 확인할 수 있었으며, 6일째에는 Fig. 7 (d)에서와 같이 세포들이 뭉친 덩어리가 2~3군데 생김을 볼 수 있었다.

Collagen stock solution의 농도가 gel contraction에 미치는 영향

콜라겐용액의 농도를 2 mg/ml와 3 mg/ml로 변화시켜 각각을 비교하였으며 세포농도가 8×10^5 cells/ml인 세포용액을 0.8 ml 접종하였다. 완성된 matrix의 총부피는 4 ml이므로 DE를 만든 후 젤내부의 콜라겐 농도는 각각 1.0 mg/ml와 1.5 mg/ml이고, 젤내부의 초기세포농도는 2×10^5 cells/ml이며 접종된 전체 세

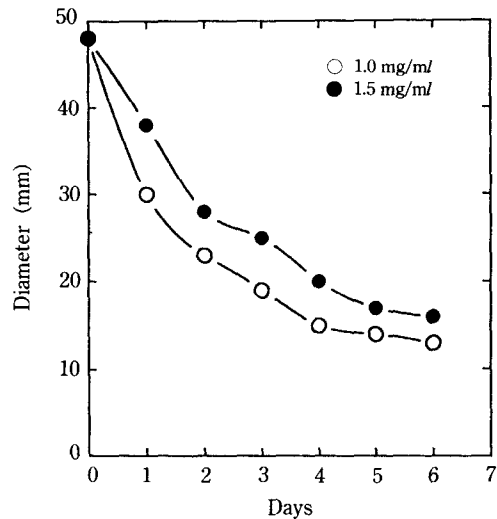


Fig. 8. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various collagen concentration (1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml).

포수는 8×10^5 cells이다. 그리고 초기(0 day)의 matrix 직경은 48 mm이고 6일간 실험하였으며 3일째에 배

지를 일부 교환해주었다. 실험결과 콜라겐용액의 농도가 더 낮을수록 젤수축이 더 잘되었다. 3일째에 1.5 mg/ml의 것은 25 mm까지, 1.0 mg/ml의 것은 19 mm까지 수축하였다. 그리고 6일 후 1.5 mg/ml의 것은 16 mm, 1.0 mg/ml의 것은 13 mm로 수축하였다(Fig. 8).

세포 접종농도가 gel contraction에 미치는 영향

콜라겐 젤의 수축속도는 접종되는 세포의 농도가 높아질수록 증가하였다. 세포접종농도를 0.5×10^5 에서 2.0×10^5 cells/ml까지 변화시켜가며 실험하였고, gel matrix의 초기직경은 48 mm이며 각각 2일째의 세포 농도를 보면 0.5×10^5 cells/ml이 접종된것은 40 mm로 수축되었고 1.0×10^5 cells/ml는 30 mm, 2.0×10^5 cells/ml는 23 mm로 수축되었다. 세포 접종농도를 2.0×10^5 cells/ml로 한 경우는 4일째에 수축이 거의 이루어져 skin equivalent를 만들기 위한 dermal equivalent로 사용할 수 있게 되었으며 나머지는 6일 후 dermal equivalent로 사용할 수 있었다. 세포 접종 농도를 각각 0.5×10^5 cells/ml, 1.0×10^5 cells/ml, 2.0×10^5 cells/ml로 하였을 때 수축되는 DE의 실험결과를 Fig. 9에 나타내었다.

배지첨가물(GAGs)이 gel contraction과 DE내 세포 성장에 미치는 영향

콜라겐 섬유와 섬유아세포 사이의 교차결합을 증진시키는 것으로 알려진 여러가지 결합조직구성 고

분자물질을 matrix에 첨가하여 dermal equivalent를 만들었는데, hyaluronic acid(HA), chondroitin sulfate (CS), heparin(Hep), chitosan(Chi) 등의 glucosaminoglycans(GAGs)을 각각 0.01 mg/ml(1% w/w to collagen)와 0.05 mg/ml(5% w/w to collagen)의 농도로 첨가하였다. 배지첨가물에 따른 48 mm 직경의 DE 제조에 대한 실험결과를 Fig. 10~15에 나타내었는데, 여기서 control dish는 이러한 배지첨가물을 넣지않고

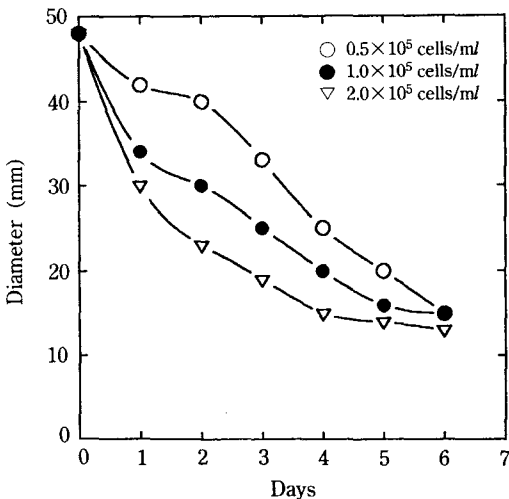


Fig. 9. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various inoculum cell density.

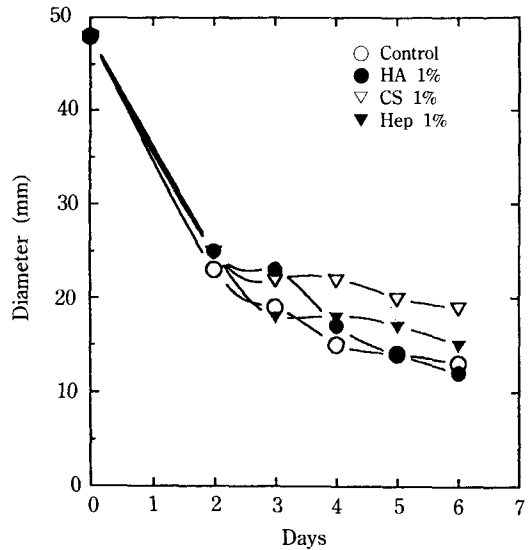


Fig. 10. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various media supplements in DMEM.

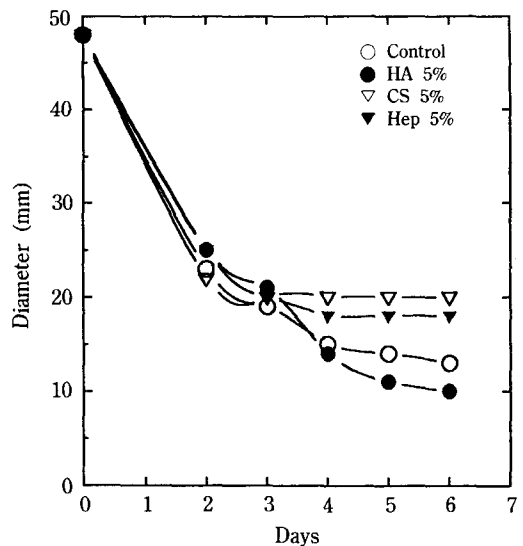


Fig. 11. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various media supplements in DMEM.

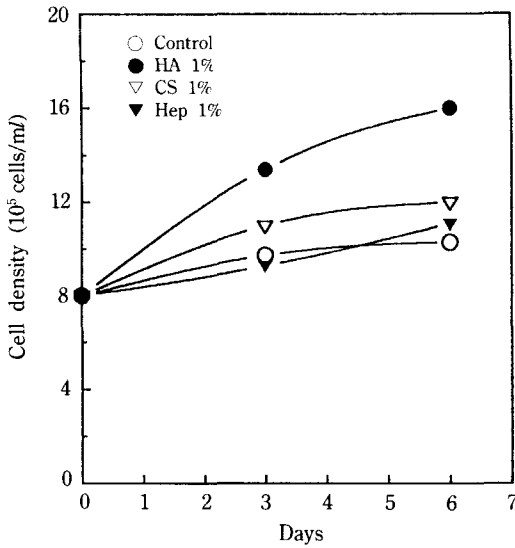


Fig. 12. Growth plot of mouse fibroblasts inside dermal equivalent at various media supplements in DMEM.

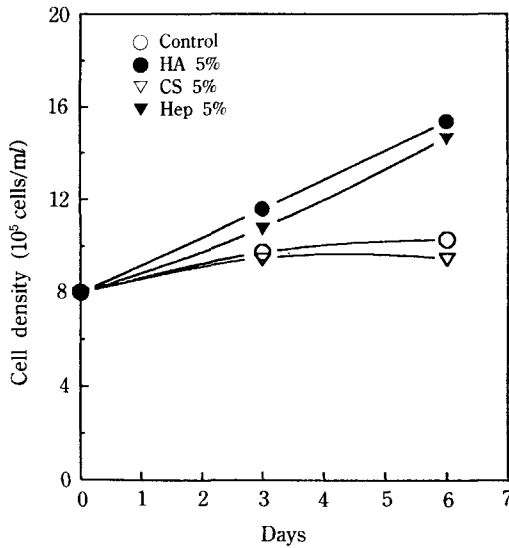


Fig. 13. Growth plot of mouse fibroblasts inside dermal equivalent at various media supplements in DMEM.

단지 농축된 배지만을 사용한 것이다. Bacteriological dish내의 초기 젤의 직경은 48 mm였다. DE의 형성이 거의 완성된 5일째부터는 직경이 20 mm 이하로 수축된다. 실험결과, HA를 첨가한 경우 DE의 수축속도는 Fig. 10, 11에서 보듯이 control dish의 경우와 거의 비슷하였으나 DE내의 세포성장률 측정된 결과는 Fig. 12, 13에서 보듯이 control dish에 비해 매우

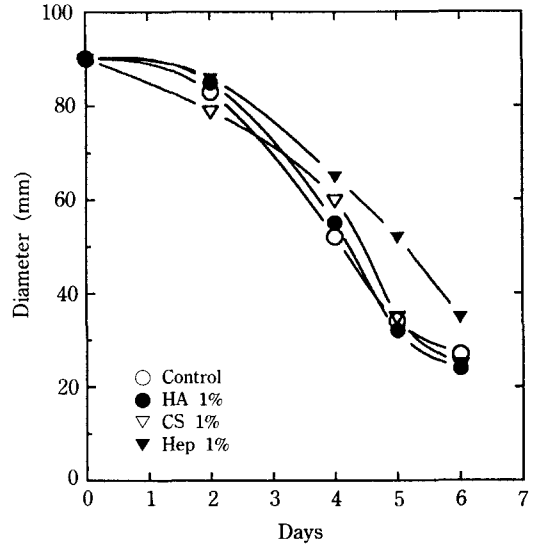


Fig. 14. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various media supplements in DMEM, scale-up to 90 mm.

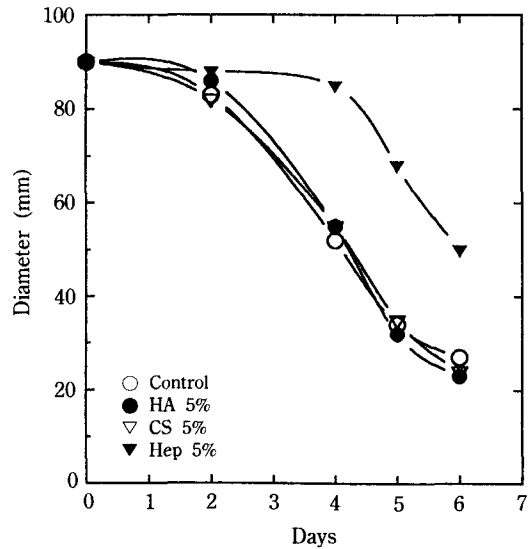


Fig. 15. Contraction plot of mouse fibroblastic dermal equivalent at various media supplements in DMEM, scale-up to 90 mm.

우수하다. DE내의 세포농도는 콜라겐 젤을 통제로 녹여서 측정하였다. DE 제조시 8×10^5 개의 세포를 접종하였으며 DE가 완성된 6일째에 control dish의 경우는 약 1×10^6 , HA를 첨가한 경우는 약 1.6×10^6 개로 증가하여 control dish에 비해 세포성장률이 약 4배 높아졌다. 따라서 HA 첨가량은 1%가 적당하다고

판단된다. 초기 젤 내부의 세포농도는 2.0×10^5 cells/ml of gel이었고 HA를 첨가한 경우 6일째에 8.0×10^5 cells/ml of gel이었다.

Heparin(Hep)을 첨가한 경우는 DE의 수축정도가 control에 비해서 불완전하였고 DE내의 세포성장은 5%의 경우에만 높아서 HA를 1%와 5%로 첨가한 경우에 비하여 저조한 결과를 나타냈다.

이상의 실험결과와 재현성을 확인하기 위하여 DE의 초기직경을 약 2배 증가시켜 90 mm 크기의 젤로 scale-up하여 같은 방법으로 실험하여 보았다. 48 mm의 경우에서 DE의 수축과 세포성장에서 모두 좋은 결과를 나타낸 HA를 사용하였고 피부의 결합 조직에 존재하는 chondroitin sulfate(CS)와 그밖의 chitosan(Chi)을 각각 1%와 5%로 첨가하여 실험하였다. 실험결과로서 DE의 수축결과를 Fig. 14, 15에 나타내었다. 초기 직경이 48 mm인 경우보다 수축 curve가 완만하게 나타났고 그 경향은 비슷하였다. Control dish의 경우 초기직경 90 mm에서 6일째에 27 mm로 수축된것에 비해 1%, 5%의 HA와 CS를 첨가한 것은 약 24 mm로 각각 수축하였으며 chitosan을 첨

가한 것은 수축상태가 좋지 못하였다. 초기의 총 접종 세포수는 1.92×10^6 cells로 하였고 DE를 만든 후 4일째에 세포수를 측정한 결과, control dish의 경우 세포농도는 2.64×10^6 cells인데 비하여 HA와 CS를 첨가하였을때 훨씬 높은 세포성장율을 보였다. 초기 젤의 부피는 12 ml이었고 따라서 내부의 초기세포접종농도는 1.6×10^5 cells/ml of gel이었으며 control의 경우 4일째 수축된 DE의 부피는 약 6 ml로서 내부의 세포농도는 4.4×10^5 cells/ml of gel이었다.

이상의 실험에서, 젤의 수축상태도 우수하고 동시에 세포성장율도 높은 경우는 hyaluronic acid를 첨가하여 dermal equivalent를 제조한 것임을 알 수 있으며 chondroitin sulfate의 경우도 만족한 결과를 얻었다. Hyaluronic acid에 대한 양호한 결과는 Doillon, Wasserman 등의 다른 연구에서 보고된 것과 유사하며 (31-33), GAGs는 대부분 extracellular matrix(ECM)의 공간을 채우며 역학적으로 조직을 지지하고 수용 성분자들의 확산을 증진시키며 세포의 성장을 돕는 것으로 알려져 있다. 최종세포농도가 실제 피부의 경우보다 훨씬 낮은 것은 접종세포 농도를 높임으로써

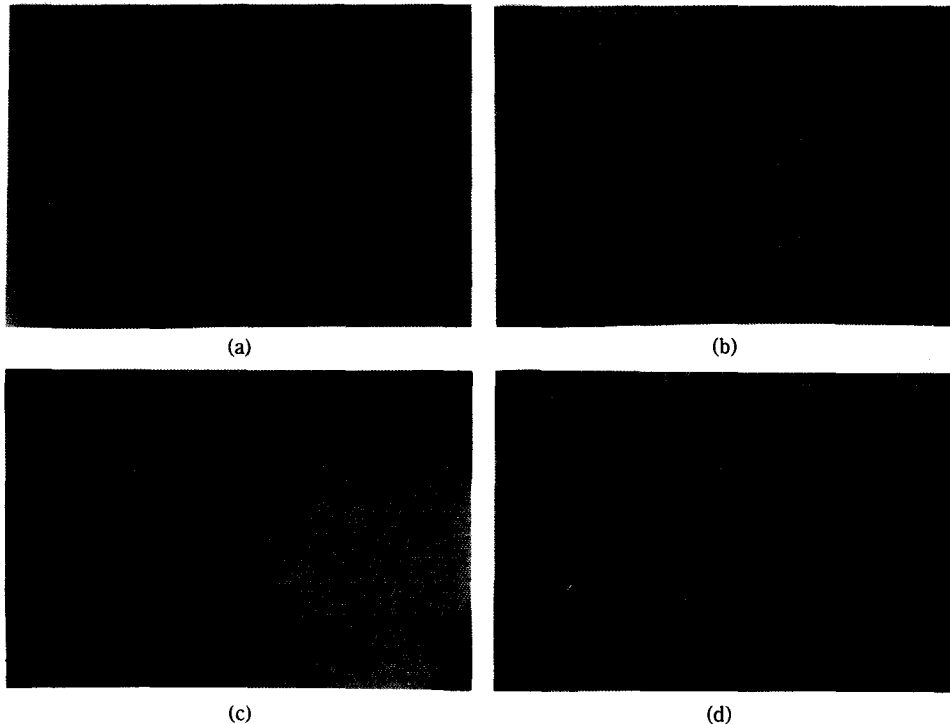


Fig. 16. Mouse skin equivalent.

(a) Keratinocyte outgrowth from mouse epidermal biopsy on the dermal equivalent. (b), (c), (d) Micrograph of skin equivalent.

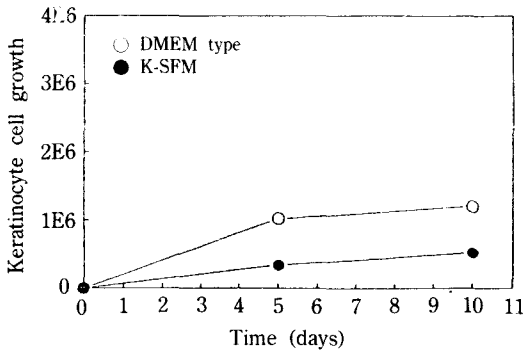


Fig. 17. Profile of keratinocyte cell growth on mouse skin equivalent.

보완할 수 있을 것으로 생각되며 실제로 이식후에는 혈관진입과 함께 주위의 세포들도 이식조직으로 이동하여 자랄 것이다.

Mouse skin equivalent의 제작 및 배지와 배지첨가물의 영향

Dermal equivalent(DE) 위에 mouse의 상피조직을 없어 배양하면 각질형성세포가 자라나와 DE조직과 함께 재조직되어 skin equivalent를 형성하는 것을 Fig. 16에 나타내었다. 2주 정도 후에 Nile blue 염색시약으로 각질형성세포가 상피조직으로부터 자라나오는 것을 관찰한 결과 Fig. 16(a)와 같이 DE위 중앙의 조직으로부터 둥근 모양으로 자라나오는 각질형성세포 부분이 과량계 염색되었다.

Fig. 16(b), (c), (d)는 mouse 섬유아세포로 만든 DE위에서 배양한 조직으로부터 각질형성세포가 자라나오는 모습을 배양기간이 경과함에 따라 관찰한 현미경 사진이다.

또한 GAGs를 첨가하여 만든 DE 위에서의 mouse 각질형성세포의 성장과 분화를 알아보았다. Fig. 17은 hyaluronic acid를 첨가하여 만든 DE에서 각질형성세포를 배양시켜 세포성장을 측정된 결과이다. 이때 배지를 서로 다르게 사용하여 비교하였는데 10% 혈청을 포함한 DMEM 배지와 무혈청배지인 K-SFM을 각각 사용하였다. K-SFM 배지는 GIBCO Co.에서 keratinocyte용 serum-free medium으로 제작한 것으로서 MCDB153 기본배지에 bovine pituitary extract와 epidermal growth factor를 첨가한 것이다.

각질형성세포의 단독배양시에는 K-SFM 무혈청배지가 성장배지로서 적당하지만 skin equivalent(SE) 위에서 섬유아세포와 함께 분화, 성장하기 위해서는

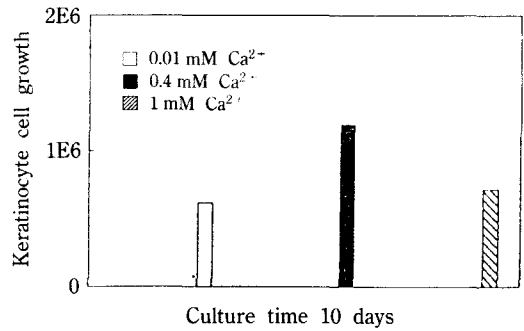


Fig. 18. Effect of calcium concentration on the growth of keratinocytes in the skin equivalent.

혈청이 존재하는 DMEM 배지가 적당함을 알 수 있었다.

세포의 분화촉진인자인 Ca²⁺의 최적농도를 결정하기 위하여 skin equivalent 제조시 Ca²⁺의 농도를 조절해주었다(34). Fig. 18은 각질형성세포의 증식 및 분화에 필요한 Ca²⁺의 농도를 조사한 것으로 Ca²⁺ 0.4 mM을 첨가하였을 때가 가장 적당하다고 볼 수 있다. 1 mM Ca²⁺의 농도에서는 각질형성세포의 분화를 너무 빨리 진행시켜 오히려 세포의 증식이나 대사에 역효과를 준 것으로 생각되며 이때의 세포를 현미경으로 관찰하면 세포조직의 표면이 거칠게됨을 알 수 있다.

또한 각질형성세포가 분화하여 living skin equivalent(LSE)를 형성하는 것은 이 세포가 만들어내는 keratin 단백질의 assay와 antibody 등을 이용하여 더욱 구체적으로 확인할 수 있을 것이라고 생각되며, 이것은 앞으로 계속해서 연구해야할 과제이다.

요 약

이상의 연구에서, mouse 섬유아세포를 이용하여 dermal equivalent(DE)를 제조하였으며 이와함께 상피조직으로부터 유도한 각질형성세포를 이중배양함으로써 mouse에 대하여 living skin equivalent를 제조하였다. 이때 세포의 지지체역할과 동시에 세포성장을 돕는 콜라겐의 농도는 1.0 mg/ml of gel 이하의 낮은 농도에서, 그리고 초기점종세포의 농도를 높일수록 3차원구조 형성에 적합하였으며 젤의 수축과 DE형성이 잘되었다. 본 실험에서는 최대로 8×10⁵개의 세포를 점종하였고, 이때 젤내의 초기세포농도는 2×10⁵ cells/ml of gel이다.

배지중에 첨가한 GAGs는 dermal equivalent에서

세포와 콜라겐간의 교차결합을 도와 세포성장을 촉진시켰으며, hyaluronic acid를 첨가한 경우 젤의 수축과 DE내의 세포성장에 대하여 초기직경을 48 mm에서 90 mm로 scale-up한 경우 모두 좋은 결과를 보였고, DE 위에 배양한 mouse 각질형성세포는 그 위에서 분화되어 *in vitro*에서 skin equivalent를 형성하였다.

이상의 결과를 인체세포를 이용한 skin equivalent의 제작에 적용하기 위하여 본 연구에서는 인체 섬유아세포와 각질형성세포를 신생아의 포피(foreskin)로부터 분리, 유도 및 배양하였다. 앞으로의 연구에서는, 분리배양한 인체세포를 이용하여 human skin equivalent를 제작하고 대량생산을 위한 제반 조건을 최적화하여 실제 임상에 응용할 수 있도록 하는 것이 남은 과제이다.

감 사

본 연구는 1991. 4. 1.~1993. 2. 28. 한국과학기술원 생물공정연구센터(ERC)로부터 지원받은 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Langer, R. and J.P. Vacavti. 1993. Tissue engineering. *Science*. **260**: 920-926.
- Edgington, S.M. 1992. 3-D Biotech: Tissue engineering. *Bio/Technol.* **10**: 855-860.
- Bell, E. and S. Sher. 1983. The Reconstitution of living skin. *J. Invest. Derm.* **81**: 2s-10s.
- Bell, E. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1274-1278.
- 阿岸鐵三, 佐中孜. 1991. 하이브리드型 人工血管의 開發-現狀と 將來. *Japn. J. Artificial Organs.* **19**: 401-405.
- 高木淳彦, 多田祐輔, 出月庚夫. 1990. 하이브리드型 人工血管. *Japn. J. Artificial Organs.* **19**: 1461-1467.
- Bell, E. and H.P. Ehrlich. 1981. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. **211**: 1052-1054.
- Meyers, C., M.G. Frattini, J.B. Hudson, L.A. Laimins. 1992. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science*. **257**: 971-973.
- Doillon, C.J. 1988. Fibroblast and epidermal cell-type I collagen interactions: Cell culture and human studies. *Scanning Microscopy*. **2**: 985-992.
- Marks, M.G. 1991. Effects of fibroblasts and basic fibroblast growth factor on facilitation of dermal wound healing by type I collagen matrices. *J. Biomed. Materials Res.* **25**: 683-696.
- Martin, G.R., 1979. High cell density alters the ratio of type III to I collagen synthesis by fibroblasts. *Nature*. **279**: 442-444.
- Mario, J.D. 1980. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science*. **244**: 688-690.
- Doillon, C.J. and A.J. Wasserman. 1988. Behaviour of fibroblasts and epidermal cells cultivated on analogues of extracellular matrix. *Biomaterials*. **9**: 91-96.
- Yang, J. 1980. Sustained growth in primary culture of normal mammary epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2088-2092.
- Karasek, M.A. and M.E. Charlton. 1971. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J. Invest. Derm.* **56**: 204-210.
- Flink, J. and I.V. Yannas. 1981. Design of an artificial skin. part III. Control of pore structure. *J. Biomed. Materials Res.* **14**: 511-528.
- Doillon, C.J. and F.H. Silver. 1986. Fibroblast growth on a porous collagen sponge containing hyaluronic acid and fibronectin. *Biomaterials*
- Svahn, C.M. 1989. Importance of size, sulfation, and anticoagulant activity in the potentiation of acidic fibroblast growth factor by heparin. *J. Biol. Chem.* **264**: 6892-6897.
- O'Keefe, E.J. 1987. Production of fibronectin by epithelium in a skin equivalent. *J. Invest. Derm.* **88**: 634-639.
- Brunt, J.V. 1991. Artificial organs from culture. *Bio/Technol.* **9**: 136-137.
- Marcelo, C.L. 1978. Stratification, specialization, and proliferation of primary keratinocyte cultures. *J. Cell Biol.* **79**: 356-370.
- Greenburg, G. and E.D. Hay. 1982. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **95**: 333-339.
- Doillon, C.J. 1986. Epidermal cells cultured on a collagen-based material. Proceedings of the 44th Annual Meeting of the Election Microscopy Society of America.
- Yang, J. and J.J. Elias. 1981. Effects of hormones and growth factors on human mammary epithelial cells in collagen gel culture. *Cancer Res.* **41**: 1021-1027.

25. Guo, M. and F. Grinnell. 1989. Basement membrane and human epidermal differentiation *in vitro*. *J. Invest. Derm.* **93**: 372-378.
26. Tong P.S. 1990. Trans rectionic acid enhances the growth response of epidermal keratinocytes to epidermal growth factor and transforming growth factor beta. *J. Invest. Derm.* **94**: 126-131.
27. Green, H. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5665-5668.
28. Nelson, P.H. 1980. Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J. Invest. Derm.* **75**: 176-182.
29. Pittelkow, M.R. and R.E. Scott. 1986. New techniques for the *in vitro* culture of human skin keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patiens with extensive burns. *Mayo Clin. Proc.* **61**: 771-777.
30. Eisinger, M. and J.S. Lee. 1979. Human epidermal cell cultures: Growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5340-5344.
31. Doillon, C.J. and A.J. Wasserman. 1988. Behaviour of fibroblasts and epidermal cells cultivated on analogues of extracellular matrix. *Biomaterials* **9**: 91-96.
32. Doillon, C.J. 1988. Fibroblast and epidermal cell-type I collagen interactions: Cell culture and human studies. *Scanning Microscopy* **2**: 985-992.
33. Heino, J. and T. Heinonen. 1990. Interleukin-1 β prevents the stimulatory effect of transforming growth factor- β on collagen gene expression in human skin fibroblasts. *Biochem. J.* **271**: 827-830.
34. Boyce, S.T. 1983. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Derm.* **81**: 33s-40s.

(Received June 23, 1993)

〈정 정 원〉

21권 3호(93년도 6월호) p.263에 게재된 「치면세균막 분해효소인 α -1,3 glucanase를 생산하는 미생물의 분리 및 효소특성」의 저자 중 허태련의 영문표기는 Tae Ryon Hae에서 Tae Ryeon Heo로 정정합니다.