

# 배양된 사람 세포를 이용해 제작한 인공피부에서 방사선조사에 대한 dimethyl sulfoxide의 보호 효과

경북대학교 치과대학 치과방사선학교실, \*영남대학교 의과대학 해부학교실  
류영하·최갑식·송인환\*

## Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in the artificial skin reconstructed with cultured human cells

Young-Ha Ryu, Karp-Shik Choi, In-Hwan Song\*

Department of Dental Radiology, College of Dentistry, Kyungpook National University

\*Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University

### ABSTRACT

**Purpose** : To evaluate cultured human artificial skin as an experimental model for studying radiation effects in vitro.  
**Materials and Methods** : The skin was constructed by culturing keratinocytes over collagen lattice which made by culturing fibroblasts. Two groups were irradiated to gamma rays at single dose of 25 Gy with or without 3.5% of DMSO. Ultrastructures were investigated by electron microscopy after irradiation. The number of epidermal layers and expression of cytokeratin (CK) 14 & 10 were also seen by light microscopy.  
**Results** : At 2 days after irradiation in experimental group without DMSO, necrotic cells were rarely found in the spinosal layer and undercornified cells were visible in the horny layer. Similar findings were also found in experimental group with DMSO but in mild form. The number of epidermal layers in experimental group without DMSO were significantly fewer than other group. CK 14 expressed in all the layer excluding horny layer but CK 10 expressed over 3~4 basal layers. Such patterns of CK expression were similar to all groups. It is suggested that structures of the keratinocytes and epidermal formation could be disturbed by irradiation in artificial skin and that DMSO can protect these damages.  
**Conclusion** : Therefore this work could be used as an organotypic experimental model in vitro using human cells for studying radiation effect in skin. Furthermore structural findings provided in this study could be used as useful basic data in further study using this model. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2002; 32 : 11-8)

**KEY WORDS** : skin, artificial; radiation; dimethyl sulfoxide

### 서론

피부는 표피와 진피로 구성된 우리 몸에서 가장 큰 장기이며 표피는 각질화세포, 멜라닌세포, 표피속큰포식세포, 축삭세포 등으로 구성되어 있다. 표피의 세포는 각질세포가 대부분을 차지하며 이들이 분화되어 신체를 외부의 여러 유해한 환경으로부터 보호해주는 장벽의 역할을 수행

하고 있다. 근래 들어 각질화세포의 대량증식이 가능해지면서 배양된 세포를 여러 피부연구의 실험재료로 사용하고 있을 뿐만 아니라,<sup>1-3</sup> O'Connor 등<sup>4</sup>의 시도 이후로 생명이 위독한 넓은 부위의 화상환자 등에서 피부를 대치하는데 활용하려는 노력이 이어져왔다. Bell 등<sup>5</sup>은 아교섬유와 섬유모세포를 이용해 진피성분을 만들고 그 위에 각질화세포를 배양하여 중층을 형성시킴으로서 생체와 유사한 3차원 인공피부를 제작하는 모델을 제시하였다. 이러한 인공피부는 넓은 부위의 피부를 필요로 하는 환자에게 생체 피부와 유사한 피부를 제공하려는 시도로<sup>6-8</sup> 이어지고 있을 뿐만 아니라 지금까지 시험관내 피부연구 방법으로서 단순배양된 세포를 이용하던 방법에서 벗어나, 생체와 같은

접수일 : 2001년 8월 23일      채택일 : 2001년 12월 6일  
Correspondence to : Prof. Karp-Shik Choi  
Department of Dental Radiology, College of Dentistry, Kyungpook National University  
Dong-In 2 Ga 101, Jung-Gu, Daegu, Korea  
Tel) 82-53-420-5971, Fax) 82-53-427-3396  
E-mail) ksichoi@bh.knu.ac.kr

전 층 인공피부를 피부연구에 응용할 수 있는 방법을 제 공하였다.<sup>9-11</sup>

지금까지 방사선 조사에 대한 피부의 영향 및 표피세포 의 역동학적 연구는 주로 사람피부와 형태 및 세포역동이 비슷한 돼지피부를 이용해 많은 연구가 이루어져 왔다.<sup>12-15</sup> 근래 들어 일부 연구자들이 돼지피부에서 방사선 동위원 소를 이용한 방법으로 표피세포의 여러 세포역동의 수치 를 제시하여<sup>16,17</sup> 이전 연구자들이 제시한 사람표피의 세포 역동과<sup>18-21</sup> 비교하여 유사한 결과를 얻음으로 사람피부를 대신한 연구재료로서의 타당성에 대한 좋은 자료를 제시 하였다. 지금까지의 연구들에서는 사람피부를 대신해 동물 을 이용한 생체실험 들이었고 분자생물학 분야의 발달 등 과 함께 세포수준 연구의 필요성이 높아져 가고 있지만 세포수준에서의 결과를 보기 위한 시험관내 실험은 단순 배양된 세포를 이용한 방법을 벗어나지 못하였다. 방사선 조사에 대한 피부의 반응은 아주 복잡할 뿐만 아니라 세 포수준의 영향을 직접적으로 보여주는 형태학적 자료는 찾아보기 어려운 실정이다. 그래서 생체와 유사한 사람 인 공피부를 시험관내 연구모델로 응용 할 수 있다면 피부, 특히 표피에 대한 방사선의 직접적 영향을 관찰할 수 있는, 이 분야 연구의 새로운 돌파구가 되리라 기대된다.

본 연구에서는 방사선 조사에 대한 피부의 영향을 연구 하기 위한 새로운 모델을 제시하고자 배양된 사람세포를 이용해 제작한 인공피부를 이용하여 방사선 조사 후 인공 피부의 변화를 형태학적으로 관찰함과 아울러 대표적 라 디칼 방어제 중 하나인 Dimethyl Sulfoxide를 첨가한 군과 비교하여 새로운 모델로서의 타당성을 검증하여 이를 앞 으로 이 분야 연구의 새로운 방법으로 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

포경수술 후 남은 음경껍질을 채취하여 항생제가 첨가 된 Dulbecco's modified eagle media (DMEM, Gibco, USA)에 넣어 저온 상태로 실험실로 운반하였다. 무균상태에서 피 부를 항생제가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)으로 여러 번 세척 후 피부밑 조직을 수술용 가위로 박리하고 조각을 내어서 dispase (Sigma, USA)를 DMEM에 2.5 mg/ml 농도로 녹인 용액에 4°C에서 하룻밤 처리하였다. 다음날 피부를 가는 핀셋을 이용해 진피로부터 표피를 박 리하였다. 이를 37°C trypsin (Gibco, USA) 용액에 넣어 15 분 동안 처리하여 각질화세포를 분리하였다. 세포를 포함 한 용액에, soybean (Gibco, USA)을 PBS에 0.25 mg/ml 농 도로 녹인 용액을 trypsin 용액과 동량 첨가하여 trypsin의 작용을 중지시킨 후 원심분리관에 옮겨 50g로 10분간 원 심분리 하였다. 원심분리 후 상청액을 버리고 침전된 세포

에 keratinocyte serum free media (Gibco, USA)를 첨가하여 배양용기에 담아 37°C 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다. 이 후로 세포가 증식하면 계대배양하여 충분한 세포가 획득 되면 인공피부 제작에 사용하였다.

섬유모세포의 배양은 음경껍질에서 분리한 피부밑 조직 을 잘게 잘라 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)을 10% 로 첨가한 DMEM 용액에 넣어 CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였 다. 섬유모세포가 조직으로부터 자라 나오면 조직을 제거 하고 계대배양하였다. 본 실험에서는 5-6계대의 섬유모세 포를 사용하였다.

### 2. 인공피부 제작

흰쥐 꼬리로부터 획득한 힘줄을 0.1% 빙초산에 녹인 collagen 용액 12 ml에 2배 농축한 DMEM 용액 8 ml, FBS 2.4 ml를 혼합한 후 0.1 M NaOH로 pH를 조절한 다음 2× 10<sup>6</sup>/ml 농도로 섬유모세포를 부유시킨 DMEM 용액 1 ml를 첨가하여 6 well plate에 well당 3 ml씩 분주하였다.

CO<sub>2</sub>배양기에서 1시간 배양 후 고형화된 collagen 격자를 FBS가 10%로 첨가된 DMEM 용액으로 배양하였다. 4~5 일 후 어느 정도 collagen 격자가 수축하면 배양액을 제거 하고 그 위에 2×10<sup>7</sup>/ml 농도의 각질화세포를 50 μl씩 분주 하였다. 1시간동안 CO<sub>2</sub>배양기에 넣어서 각질화세포를 착 상시킨 후 피부배양액 A로 3일간 배양하였다. 이때 피부배 양액 A는 DMEM과 F-12 (Gibco, USA)를 1:1 비율로 혼합 하고 여기에 5 μg/ml의 insulin (Sigma, USA), 0.5 μg/ml의 hydrocortisone (Sigma, USA), 그리고 adenine (Sigma, USA) 을 1.8×10<sup>-4</sup> M로 첨가하였으며 antimycotic-antibiotics (Gibco, USA)를 1%로, FBS를 10%로 첨가하여 사용하였 다.

3일 후 인공피부를 stainless mesh 위에 얹은 후 다시 stainless 철사고리 위에 얹었다. 기존의 배양액을 제거하고 피부배양액 B를 진피 부위만 잠기도록 첨가하여 표피세포 가 공기에 노출되도록 하였다. 이때 사용한 피부배양액은 피부배양액 A와 동일하나 DMEM과 F-12의 비율만 3:1로 조정된 배양액을 사용하였다.

### 3. DMSO처리 및 방사선 조사

실험군으로는, 방사선 조사시 배양액에 DMSO (Sigma, USA)를 첨가한 DMSO실험군, DMSO를 첨가하지 않은 일 반실험군, 그리고 대조군으로 나누었다. 각질화세포를 공기 에 노출시키고 3일 후 DMSO실험군에는 3.5% DMSO를 포함한 피부배양액 B로, 일반실험군에는 DMSO를 포함하 지 않은 피부배양액 B로 교환하였다. 20분 후 <sup>60</sup>Co γ선을 1.67 Gy/min의 선속으로 15분간에 걸쳐 25 Gy 조사하였다. 대조군에는 DMSO를 포함하지 않은 피부배양액 B로 교환 후 방사선 조사 과정만 생략하고 다른 조작은 실험군과

같이 하였다. 방사선 조사 10분 후 DMSO가 첨가되지 않은 피부배양액 B로 30분 간격으로 2회 교환 배양하여 DMSO를 제거하였다. 이후는 표면이 공기에 노출되도록 하여 2일마다 피부배양액 B를 교환하면서 배양하였다.

#### 4. 광학현미경 관찰 및 면역염색

방사선 조사 후 2시간, 2일, 5일 후 배양 중인 인공피부를 꺼내어 표본을 제작하였다. 배양 중인 피부를 PBS로 세척한 다음 4% paraformaldehyde로 4°C에서 2시간 동안 고정하였고 냉동절편기로 4 μm 두께의 절편을 제작하였다. 일반염색으로는 통상적인 방법으로 Hematoxylin-Eosin 염색을 하였다.

Cytokeratin 면역염색과정은 다음과 같다. 조직표본을 흐르는 물에 넣어서 냉동포매제를 씻은 후 1.5% normal goat serum과 0.25% bovine serum albumin을 포함한 용액으로 20분간 blocking 시켰다. 1차항체는 생쥐에서 생산된 단일 클론성 항체들로 anti-human cytokeartin 10 (Bio genex, USA)과 anti-human cytokeartin 14 (Novocastra, UK)를 각각 20:1 및 40:1로 희석하여 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 세척 후 2차항체인 FITC conjugate goat anti-mouse IgG (Sigma, USA)를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Propidium iodide로 핵을 대조염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 5. 투과 전자현미경 표본제작

방사선 조사 후 2시간, 2일, 5일 후 배양 중인 인공피부를 꺼내어 표본을 제작하였다. 배양 중인 피부를 PBS로 세척한 다음 4% paraformaldehyde로 30분간 고정하였다. 1시간 후 2.5% glutaraldehyde로 2시간 전고정한 다음 PBS로 세척하였고 1% osmium tetroxide로 2시간 후고정하였다. 70, 80, 90, 95, 100%의 순차적 농도의 ethanol로 탈수과정을 거친 후 propylen oxide로 치환하였다. Epon 812 (Poly Science, USA) 에폭시 수지에 침투시킨 후 60°C에서 60시간 동안 중합시켰다. 중합된 block으로 80 nm 두께의 절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 20분 및 10분씩 이중 염색하여 H-7000B (Hitachi, Japan) 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 6. 표피층수의 분석

광학현미경 하에서 시간대 별로 각 실험군에서 표피층의 수를 세었다. 세포가 납작해진 상부층은 제외하고 어느 정도 세포의 모양을 유지하고 있는 층수를 10개 이상의 영역에서 세었다. 각 실험군 별로 시간의 경과에 따른 표피층수의 변화를 t-test로 검사하였고 실험군간 증가폭의 차이를 ANOVA test로 검사하였다.

## 결 과

### 1. 표피형성

표피부의 가장 상부에 호산성을 보이는 얇은 층이 관찰되었고 아래쪽은 세포가 정방형에 가까운 모양을 취하고 있었으며 그 중간층은 상부로 가면서 납작해지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 실험군에 따른 차이로는 표피층의 수가 차이를 보일 뿐 다른 광학현미경적 소견은 관찰할 수 없었다.

시간별로 실험군에 따른 표피층의 수적 변화는 Fig. 1과 같았다. 방사선 조사 2시간째, 즉 공기에 노출시킨 후 3일이 경과했을 때 모든 군이 4층 정도의 증층을 형성하였다. 시간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 표피층수는 유의성 있게 증가하였으며 ( $p < 0.05$ ) DMSO를 첨가하지 않은 일반실험군에서 증가폭이 가장 적었다. 각 실험군간의 증가폭은 조사 2일 및 5일째에 DMSO실험군과 대조군 혹은 일반실험군 사이에 유의성이 인정되었다 ( $P < 0.05$ ). DMSO 실험군은 대조군보다 보다는 다소 증가폭이 적었으나 유의성은 인정되지 않았다 ( $p < 0.05$ ).

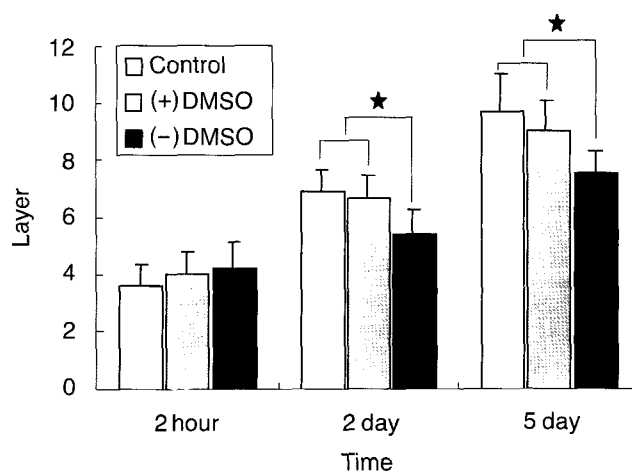
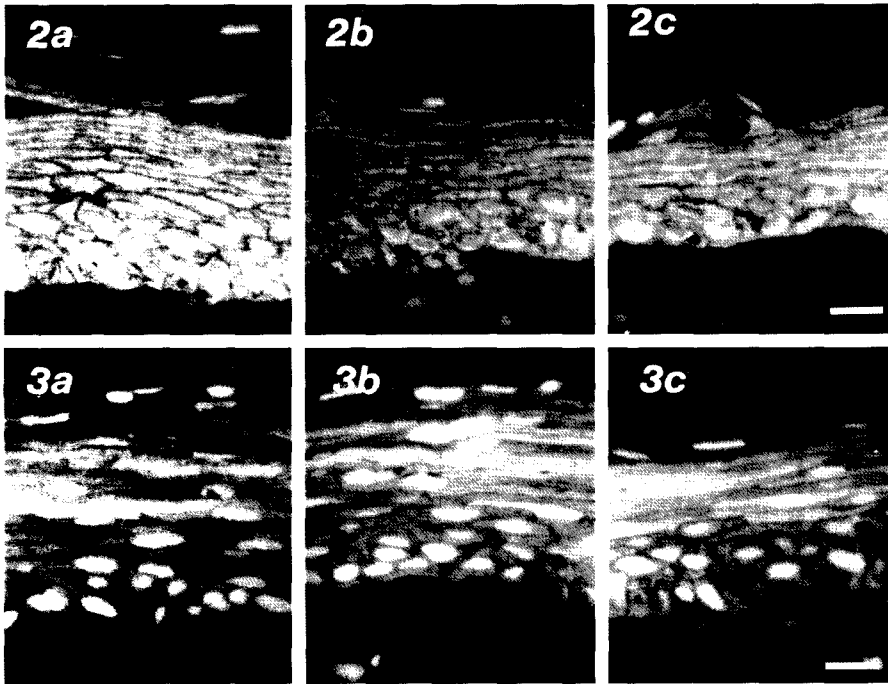


Fig. 1. Bar graph showing the number of epidermal layers in artificial skin after expose to 25 Gy gamma ray with or without 3.5% DMSO. Control was not exposed to radiation and DMSO. Increasing rate of three groups were analyzed by ANOVA test ( $p < 0.05$ ). Significant differences are compared to -DMSO and control or +DMSO (★).

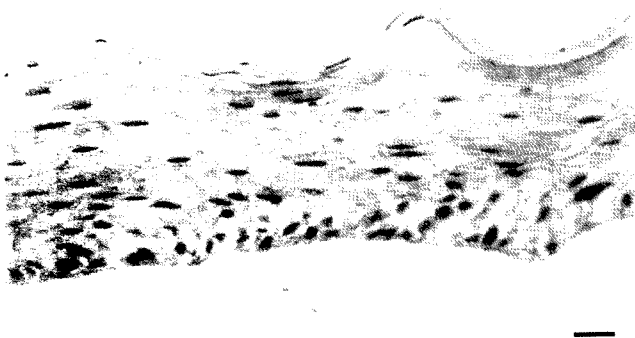
### 2. Cytokeratin 면역염색

Cytokeratin (CK) 14는 모든 실험군에서 각화층에 해당하는 최상부의 얇은 층을 제외하고 바닥층 및 가시층에 해당하는 전 층의 모든 세포에서 강하게 반응하였다(Fig. 2). CK 10은 모든 실험군에서 바닥층에 해당하는 하부 3-4층



**Fig. 2.** Immunogenic stain for CK 14 at 5 days after irradiation. 6a: Irradiated with 3.5% DMSO. 6b: Irradiated without DMSO. 6c: Not irradiated. Positive reactions visible in all layers from basal to sinous layer. Except the number layer, there are no difference in expression pattern among three groups. Bar represents 25  $\mu$ m.

**Fig. 3.** Immunogenic stain for CK 10 at 5 days after irradiation. 6a: Irradiated with 3.5% DMSO. 6b: Irradiated DMSO. 6c: Not irradiated. Positive reactions visible above 3-4 basal layers. Except the number layer, there are no difference in expression pattern among three groups. Bar represents 25  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Reconstructed skin of control group, 8days after exposure to air-fluid interface. Keratinocytes stratified into multi layers which resemble in vivo epiderdis. Bar represents 25  $\mu$ m.

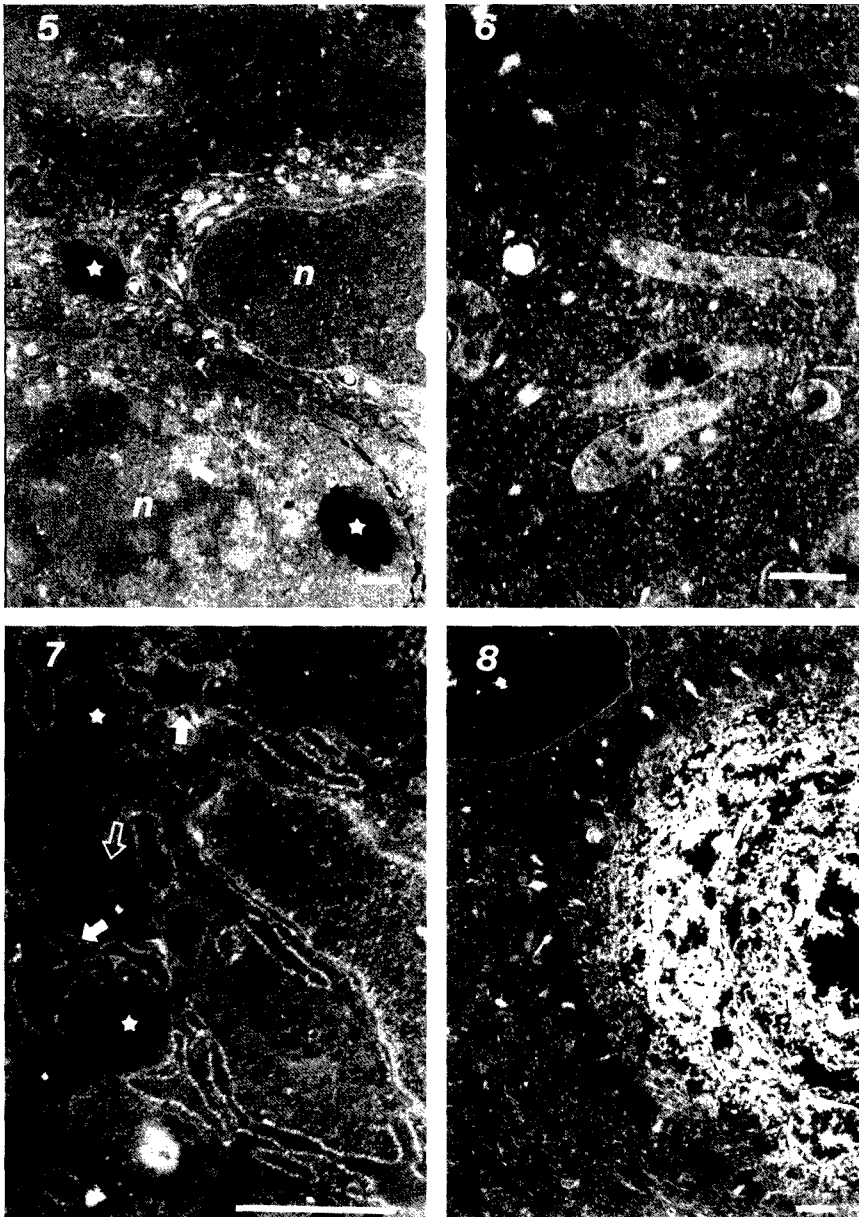
에서는 반응하지 않았고 가시층에 해당하는 그 이상의 층에서 반응하였다(Fig. 3) 각각의 실험군에서 표피층 수가 다름에 따라 양성반응 세포수는 달랐지만 반응 양상은 차이가 없었다.

### 3. 미세구조변화

조사 후 2시간째 일반실험군에서 일부세포의 세포질 내에 소강(lacunae)이 관찰되었다. 막성구조의 경계 없이 세포질 내에 액체가 차 있었으며 이런 소강을 가진 세포는 많은 수가 염색질 농축 소견을 보였으며 일부세포는 특별

소견없이 정상적인 형태를 유지하고 있었다(Fig. 5). 또한 다수 세포에서 사립체능선의 소실을 동반한 사립체 확장양상이 관찰되었다(Fig. 6). 하지만 과립형질내세망을 위시한 다른 세포소기관들에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었다. 진피부분의 섬유모세포에서는 사립체확장과 능선소실 양상이 각질화세포에 비해 저명하게 관찰되었을 뿐만 아니라 과립형질내세망도 상당히 확장되어 있었다(Fig. 7). DMSO실험군 및 대조군에서는 별다른 이상소견이 관찰되지 않았다. 다만 사립체 손상소견이 일부 관찰되기도 하였지만 미미한 수준이었다.

조사 2일째 일반실험군에서 피사과정을 통해 죽은 세포가 관찰되었다. 핵은 용해되어 있었고 중심부의 세포질에서는 세포소기관이 파손되어 있었지만 주변부에는 아직까지 소기관의 형태를 유지하고 있었고 인접한 세포사이의 부착반점도 손상되지 않고 유지되어 있었다(Fig. 8). 또한 세포질이 농축된 피사세포도 관찰되었다 소기관은 모두 파괴되어 형태를 구분할 수 없었지만 인접한 세포사이의 부착반점은 유지되어 있었다(Fig. 9). 하지만 이러한 사망세포의 수는 극히 적어 한 개의 절편에서 한 세포를 발견하기가 쉽지 않았다. 가시층 영역에서는 염색질 주변화(chromatin margination) 혹은 세포질내 소형 소강을 가진 세포가 간혹 관찰되었다(Fig. 10). 각화층에 해당하는 층은 소기관을 소실한 납작해진 세포가 여러 층 쌓여 있었는데 전자투과도가 아주 낮았다. 이 층에서 아직 각화되어 편평해지지 않고, 염색질 주변화 양상을 보이는 핵을 가진 세포가 다수 관찰되었다(Fig. 11). DMSO실험군에서도 각화층에 이러한 세포가 출현하였지만 그 빈도는 적었으며, 일



**Fig. 5.** Electron micrograph of keratinocytes in the lower spinous layer, 2 hours after irradiation without DMSO. Lacunae (★) is visible in the cytoplasm. Chromatin condensation (arrow) visible in lower cell but not in upper cell. n; nucleus. Bar represents 1  $\mu$ m.

**Fig. 6.** Higher magnification of a cell near the Fig. 9. Mitochondria are swollen and cristae are disintegrated. Bar represents 1  $\mu$ m.

**Fig. 7.** Electron micrograph of dermal fibroblast in same group of Fig. 8. Markedly swollen mitochondria (★) with peripherally placed, disoriented and disintegrating cristae. sER (vacant arrow) and rER (arrow) are dilated. Bar represents 1  $\mu$ m.

**Fig. 8.** Electron micrograph of middle spinous layer, 2 days after irradiation without DMSO. A necrotic cell with karyolytic nucleus is visible but desmosomes and organelles in peripheral portion are not destroyed yet. Box is higher magnification of the arrow. Bar represents 1  $\mu$ m.

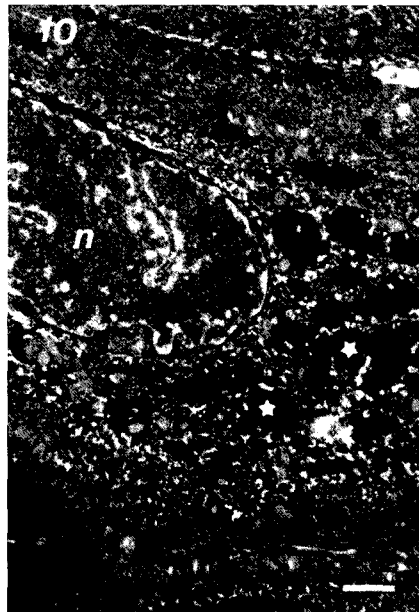
반실험군에 비해 각화층이 규칙적으로 형성되어 있었다 (Fig. 12).

조사 5일째 각 실험군 사이에는 세포층의 수적 차이와 실험군의 각화층에 나타나는 미각화세포의 출현을 제외하고는 특별한 차이점은 관찰되지 않았다. 바닥층은 세포사이가 넓었고, 인접한 세포의 세포질돌기들과의 연결부에 부착반점이 생성되어 세포사이다리를 형성하였다. 그러나 부착반점의 수는 생체조직에 비해 현저히 감소되어 있었다. 상부로 올라가면서 세포는 편평해지고 다소 커졌으며 세포사이 간극은 사라졌지만 부착반점의 수는 상당히 증가하였다. 핵은 진성염색질이 대부분을 차지해 연하게 보였으며 핵막 함입이 많은 세포에서 관찰되었다. 저명한 등근 핵인이 관찰되었지만 핵인을 관찰할 수 없는 세포도

많았다.

## 고 찰

각질화세포는 각화층으로 이동하면서 세포질이 각질화되고 세포사이 지방질로 채워져 방수벽을 위시한 물리적 장벽의 역할을 수행하게 된다. 기간세포가 바닥층에 존재하며 이 세포로부터 새로운 세포를 공급받아 표피를 유지시키고 있다. 그러나 과량의 방사선 조사시 기간세포의 손실로 이러한 표피 유지체계가 무너지게 되고 표피탈락이 일어나 피부 궤양을 초래하게 된다.<sup>22</sup> 방사선 조사시 발생하는 표피 유지체계의 변화에 따른 세포역동 뿐만 아니라 모세혈관의 내피세포 손실 등으로 인한 진피의 위축과



**Fig. 9.** Electron micrograph of the middle spinous layer, 2 days after irradiation without DMSO. A dead cell is visible. All organelles are destroyed and cytoplasm is highly condensed but some desmosome has its integrity. Box is higher magnification of the arrow. Bar represents 1 mm.

**Fig. 10.** Electron micrograph of a keratinocyte in the upper spinous layer, 2 days after irradiation without DMSO. Chromatin margination and small lacuna (★) are visible. n; nucleus. Bar represents 1 μm.

**Fig. 11.** Electron micrograph of the horny layer, 2 days after irradiation without DMSO. There are uncornified cells found between flatten fully cornified cell layers. These cells have chromatin margined nucleus. Bar represents 1 μm.

**Fig. 12.** Electron micrograph of the horny layer, 2 days after irradiation with DMSO. Flatten cornified layers are relatively in regular arranged. co; cornified layer. Bar represents 1 μm.

괴사, 방사선 조사시 나타나는 홍반의 기전 등 개체내에서 일어나는 조직 및 장기수준의 반응에 대해서는 이전의 여러 연구자들에 의해 많은 연구들이 되어왔다.<sup>12,22-24</sup> 오늘날 분자생물학의 발달과 더불어 세포의 기능에 관여하는 여러 유전자와 cytokine의 발견 등으로 세포수준의, 시험관내 실험의 필요성이 커지고 있는 실정이다. 물론 이전의 실험 등에서 배양된 세포를 이용한 시험관내 연구가 많이 이루어지기는 하였으나 생체와 유사한 3차원 장기형 (organotypic) 실험 모델을 응용할 수 있다면 그 응용범위가 넓을 뿐만 아니라 생체에 근접된 조건하에서, 세포수준의 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

본 실험모델에서 공기에 노출된, 인공진피 위의 각질화 세포는 중층을 형성하였고 상부층은 최종분화과정을 거쳐

각질층을 형성하였다. 그러나 방사선을 조사한 실험군에서는 각화층 영역에 최종분화과정 이전의 세포들이 발견되고 있으며 일반실험군에서 이런 경향이 더욱 뚜렷하다. 이런 소견은 본 실험의 대조군 뿐 아니라 이전의 다른 연구 25에서도 관찰되지 않았던 소견이다. 각질화세포는 분화되어가면서 상부층으로 이동한다는 것은 잘 알려진 사실이다. 뿐만 아니라 인접한 세포들은 부착반점으로 서로 단단하게 연결되어있다. 그래서 인접한 주위의 세포들이 서로 연결되어 상부층으로 이동하면서 비슷한 분화정도를 거친다고 볼 수 있다. 각화층에서 발견되는 최종분화 이전의 세포들은 주위세포들과 같이 이동하면서 다른 세포들에 비해 분화가 지연 혹은 일어나지 않았다고 판단된다. 핵이나 세포질의 형태로 보아 가시층에서 발견되었던 손상세

포(Fig. 10)와 같은 부류의 세포로 판단되며 이런 세포들은 정상적인 분화과정에 장애가 발생된 결과로 판단된다. 즉 방사선에 의해 정상적 기능에 장애를 받은 세포들이 주위 세포와 같은 분화과정을 거치지 못한 채 주위세포들과 같이 상부로 이동한 결과로 판단된다.

일반실험군에서 관찰되었던 세포질내의 소강의 출현은 방사선에 의한 세포손상의 결과로 생각된다. Fig. 5에 제시된 것처럼 이런 소강이 나타난 위쪽세포가 회복되어 가는 과정인지 아니면 아래쪽세포처럼 퇴화되어 가는 과정인지는 알 수 없지만, 방사선에 의한 각질화세포의 손상표식자로서의 의미는 있다고 판단된다.

본 실험에서는 예비실험과 문헌상의 고찰을 통하여 방사선량을 25 Gy로 1회 조사하였다. 배양 중인 세포에 조사된 방사선으로는 상당히 과량이지만 미세구조에는 큰 변화가 일어나지 않고 있다. 일반실험군에서 경미한 사립체 손상양상과 소강의 형성이 관찰되었을 뿐 자유 라디칼에 의한 손상에 민감한 형질내세망을 위시한 막성구조에도 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 각질화세포가 구조적으로나 기능적으로 상당히 안정된 세포인 때문으로 생각된다.

미세구조에서는 많은 변화가 발견되지 않았지만 실험군에 따른 표피층의 수에는 상당한 차이를 보였다. 일반실험군에서 증가폭이 가장 작았고 DMSO실험군에서는, 대조군에 근접하기는 하였지만 이보다 적은 증가폭을 보였다. 조사 후 2일 및 5일째 일반실험군과 DMSO실험군 사이에 유의성이 인정되는 것으로 보아 방사선에 의해 세포손상을 DMSO가 유의성 있게 방어한 것으로 판단된다. 방사선에 의한 세포손상의 주된 목표물은 핵이라고 볼 수 있다. 방사선을 조사 받은 세포는 바로 사망하거나 염색체이상, 돌연변이, 분열지연 등을 거쳐 사망 혹은 장애를 초래하게 된다. 본 실험에서 25 Gy의 고용량의 조사임에도 불구하고 바로 사망에 이른 세포는 거의 없었다. 조사 후 바로 사망하는 '세포분열기' 사망을 초래하는 조사량은 세포종류 및 성장상황에 따른 차이가 있지만 각질화세포는, 본 실험과 같이 시험관내에서 빠른 속도로 분열, 증식중인 상황에서도 그 저항성이 높은 것으로 판단되었다. 특히 진피부의 섬유모세포와 비교해 보더라도 손상정도가 경미하였다. 사망세포는 거의 발견되지 않았지만 방사선을 조사받은 실험군에서 대조군에 비해 표피형성이 저조하였던 것은 분열지연 혹은 수회의 분열 후 증식기능을 잃고 죽는 '증식기 사망'에 의한 것으로 생각된다.

Cytokeratin (CK)은 상피세포의 중간세사를 구성하는 단백질이다. 다른 종류의 세포에서 발견되는 vimentin, desmin, glial filament 등의 중간세사들은 한 종류의 아단위 단백질로 구성되는 반면에, cytokeratin은 40-68 kD의 분자량을 가진 여러 종류의 폴리펩타이드로 구성되며 그 분자량과 등전점에 따라 20여종으로 분류된다.<sup>26</sup> 이들은 조직의 종류와 세포의 분화 및 성장 등 여러 상황에서 발현되는

종류가 특이적일 뿐 아니라 이들은 조직의 종류와 세포의 분화 및 성장 등 여러 상황에서 발현되는 종류가 특이적이다.<sup>27,28</sup> 그 중 CK 14는 중층상피의 바닥층에서 발현되며 미분화 중층상피의 표식자의 의미를 가지고 CK 10은 중층상피의 분화가 시작되는 바닥층상부에서 발현되며 분화시작 표식자의 의미를 가진다.<sup>29,30</sup> 본 실험결과에서는 CK 14는 각화층을 제외한 전 영역에, CK 10은 바닥쪽 3-4층을 제외하고 그 이상에서 양성반응을 보였으며 특이한 그룹간의 차이는 발견되지 않았다. 이는 바닥쪽 3-4층의 세포는 바닥세포의 특징을 유지하고 있으며 그 이상에서 분화가 시작된다는 것과 이러한 분화양상은 방사선 조사에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 알 수 있었다.

지금까지의 결과들로 보아 인공피부에서 방사선은 각질화세포의 손상을 초래하고 표피형성을 저해시키나 DMSO는 이런 세포손상을 효과적으로 방어한다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 배양된 세포를 이용해 제작한 시험관내 인공피부는 방사선의 영향을 연구할 수 있는 사람세포를 이용한 3차원적 시험관내 연구모델로 유용하게 활용할 수 있으며, 본 연구에서 제시된 여러 형태학적 자료는 앞으로 이 모델을 이용한 연구의 주요한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Basset-Seguín N, Culard JF, Kerai C, Bernard F, Watrin A, Demaille J, et al. Reconstituted skin in culture. Simple method with optimal differentiation. *Differentiation* 1990; 44 : 232-8.
2. Sebok B, Bonnekoh B, Geisel J, Mahrle G. Antiproliferative and cytotoxic profile of antipsoriatic fumaric acid derivatives in keratinocyte cultures. *Euro J Pharmacol* 1994; 270 : 79-87.
3. Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Dramon M. Retinoic acid improves epidermal morphogenesis. *Devel Biol* 1989; 133 : 322-35.
4. O'Conner NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Olaniki K. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1 : 75-8.
5. Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, et al. The reconstruction of living skin. *J Invest Dermatol* 1983; 81 : 2s-10s.
6. Ellis DL, Yannas IV. Recent advances in tissue synthesis in vivo by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials* 1996; 17 : 291-9.
7. Suzuki S, Matsuda K, Maruguchi T, Nishimura Y, Ikada Y. Further application of "bilayer artificial skin". *Br J Plast Surg* 1995; 48 : 222-9.
8. Vizarova K, Bokos D, Rehakova M, Macho V. Modification of layered atelocollagen by ultraviolet irradiation and chemical cross-linking, structure stability and mechanical properties. *Biomaterials* 1994; 15 : 1081-6.
9. 송인환, 성언기, 김주영, 이용창, 이무삼. 시험관내 진선 질병모델 개발에 관한 연구. *대한해부학회지* 1998; 31 : 923-35.
10. 성언기, 박영모, 성훈기. 세포배양으로 제작한 인공피부에서 멜라닌 세포에 대한 관찰. *대한해부학회지* 2000; 33 : 89-98.
11. Triglia D, Braa SS, Yonan C, Naughton GK. In vitro toxicity of various class of test agents using the neutral red assay on a human three-

- dimensional physiologic skin model. *In vitro Cell Dev Biol* 1991; 15 : 239-44.
12. Fowler JF, Morgan RL, Silvest JA, Bewley DK, Turner BA. Experimentals with fractionated X-ray treatment of the skin of pigs I. Fractionation up to 28 days. *Br J Radiol* 1963; 36 : 188-96.
  13. Morris GM, Rezvani M, Hopell JW, Franke H, Loeffler M. Epidermal cell kinetics in pig skin. *Epithelia* 1987; 1 : 231-42.
  14. van den Ardweg GJM, Hopewell JW, Simmonds RS. Repair and recovery in epithelial and vascular connective tissue of pig skin after irradiation. *Radiother Oncol* 1988; 11 : 73-82.
  15. Archambeau JO, Ines A, Fajardo LF. Response of the swine skin microcirculation to acute single exposure of X-ray quantification of endothelial cell changes. *Radiat Res* 1984; 98 : 37-51.
  16. Morris GM, Hopewell JW. Changes in the cell kinetics of pig epidermis after repeated daily doses of x-rays. *Br J Radiol Suppl* 1986; 119 : 34-8.
  17. Morris GM, Hopewell JW. The cell kinetics of pig epidermis. Further studies. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20 : 161-9.
  18. Potten CS. Epidermal transit time. *Br J Dermatol* 1975; 93 : 649-58.
  19. Camplejohn RS, Gelfant S, Chalker D, Sittampalam Y. Mitosis and labelling activity in normal human epidermis in vivo. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17 : 315-22.
  20. Heenen M, Galand P. Cell population kinetics in human epidermis in vivo autoradiographic study by double labelling method. *J Invest Dermatol* 1971; 56 : 425-9.
  21. Fisher LB. The diurnal mitotic rhythm in human epidermis. *Br J Dermatol*. 1968; 80 : 75-80.
  22. Archambeau JO, Pezner R, Wasseman T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31 : 1171-85.
  23. Young CMA, Hopewell JW. Functional and morphological changes in pig skin after single or fractionated doses of x-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8 : 1439-47.
  24. Peel DM, Hopewell JW, Simmonds RH, Dodd P, Meistrich ML. Split-dose recovery in epithelial and vascular-connective tissues of pig skin. *Radiother Oncol* 1984; 2 : 151-7.
  25. 송인환. 시험관내 인공피부제작. *대한체질인류학회지* 1988; 11 : 247-60.
  26. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins. Patterns of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 32 : 11-24.
  27. Franke WW, Weber K, Osborn M, Schmid E, Freudenstein C. Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament-like arrays in various cells of epithelial character. *Exp Cell Res* 1978; 116 : 429-45.
  28. Sun TT, Shih CH, Green H. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 72 : 2626-30.
  29. Muijen GNP, Warnaar SO, Ponc M. Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and in fetal, newborn, and adult epidermis. *Exp Cell Res* 1987; 171 : 331-45.
  30. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 1980; 19 : 1033-42.