

## 동종진피에 사람진피 섬유모세포와 각질세포를 적용한 인공피부의 실험적 제작

오정철<sup>1</sup> · 임영국<sup>1</sup> · 정재호<sup>2</sup>

동국대학교 경주병원 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 영남대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>2</sup>

### Application of Human Dermal Fibroblast and Keratinocyte on Allogenic Dermis(AlloDerm<sup>®</sup>)

Jung Chul Oh, M.D.<sup>1</sup>, Yeung Kook Lim, M.D.<sup>1</sup>,  
Jae Ho Jeong, M.D., Ph.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Dongguk University College of Medicine, Gyungju, Korea,

<sup>2</sup>Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Yeungnam University College of Medicine, Daegu, Korea

**Purpose:** Large skin defect by various causes, should be covered by autologous skin graft. But, the donor site of autologous skin graft is limited and leaves permanent donor scar and contracture. There have been our trial to engineer artificial skin using allogenic dermis (AlloDerm) with basement membrane.

**Methods:** Dermal and epidermal layer were separated by immersing in dipase solution for 30 minutes, and the separated layers were treated with 0.05% trypsin for 10 minutes. And then each layer was cultivated to fibroblasts and keratinocytes on a culture medium. Fibroblasts were first penetrated into basement membrane of allogenic dermis facing down, then allogenic dermis was flipped over to face up and keratinocytes were transplanted to allogenic dermis.

**Results:** Observing artificial skin fabricated in vitro, we found following: 1) The artificial skin opened in air for 5 days formed epidermal layer. In dermal layer, fibroblast was distributed evenly among all. 2) The artificial skin opened in air for 30 days formed thicker and thicker, and it formed basement membrane, spinous and granular layers. PAS stain to confirm existence of basement membrane showed positive reaction. 3) Cytokeratin 10 stain to confirm the formation of epidermal layer showed positive reaction. 4) The formation of thick

keratin, lamellar body and desmosome similar to human skin were observed in result of an electron micrograph.

**Conclusion:** As a result of research, the structure seen in normal skin such as rete ridge, is found in reproduced artificial skin. This type of artificial skin can be used as a useful model for investigating skin disease and for clinical application also.

**Key Words:** Artificial skin, Alloderm

## I. 서 론

우리 몸에서 방어막과 체온 및 수분조절 등의 중요한 기능을 담당하는 피부가 외상이나 화상 등으로 인하여 손상된 경우에는 전층 또는 부분층 식피술을 하는 것이 이상적이다. 특히, 화상에서처럼 손상의 범위가 매우 넓은 경우나 공여부가 이환된 경우에는 피부를 제공할 수 있는 공여부가 부족하게 되어 손상부위를 모두 피복할 수 없는 문제가 발생하게 되고 피복한 이후에도 구축반응과 같은 문제가 야기될 수 있다. 이러한 이유로 과학자들은 오래 전부터 인공적으로 피부를 제작하여 광범위한 피부손상 환자들에게 사용하려는 연구를 진행하여 왔다.

1981년 O'Connor 등<sup>1</sup>이 최초로 화상 환자의 피부에서 분리 배양한 표피세포(cultural epithelial keratinocyte)를 자가 이식하여 화상상처를 치료해보려는 시도가 있었고, 현재 미국에서는 Biosurface사나 한국의 Tego science사가 배양된 각질세포의 자가이식을 상업적 수준에서 활용하려고 노력하는 단계이다. 최근에는 단순 각질세포층의 이식에서 좀 더 발전하여 진피층과 표피층의 이중구조를 가진 보다 피부조직에 근접한 인공피부를 제작하려는 많은 시도가 이루어지고 있는데, 이는 인공진피 대체물(artificial dermal substitute) 위에 각질세포를 배양하여 제작하는 방법이다.

그러나, 현재 기술수준으로 개발된 인공진피 대체물은 아교질(collagen)과 같은 생체물질로 제조되어 있어 염증 환경에서 쉽게 생분해가 되므로 화상 환자와 같이 상처의 면적이 넓고 염증 유발 확률이 높은 경우에는 실제 임상 적용에서 많은 문제점을 유발한다. 또한 인공진피의 구조

Received April 3, 2006

Revised July 21, 2006

**Address Correspondence :** Yeung Kook Lim, M.D., Department of Plastic & Reconstructive Surgery, School of Medicine, Dongguk University, 1090-1 Sukjang-dong, Gyungju-si 780-350, Korea. Tel: (054) 770-8243 / Fax: (054) 774-9307 / E-mail: psdrlyk@yahoo.co.kr

\* 본 논문은 2002년 대한성형외과학회 제 53차 추계학술대회에서 구연발표 되었음.

는 표피층과 진피층 사이에 정상적으로 존재하는 기저막(basal lamina)의 재생이 불완전하므로 두 층간의 결합력이 약하여 표피층이 쉽게 탈락되는 등의 단점이 있어 궁극적으로 완성도가 높은 인공피부를 제작하는 데에는 한계가 있다.

본 연구는 기저막(basement membrane)의 골격을 유지하고 있는 상품화된 동종진피(allogenic dermis)에 섬유모세포(fibroblast)를 침투시켜 진피층을 만들고 그 위에 배양된 각질세포(keratinocyte)를 부착시키는 방법을 사용하여, 기존 방법들의 미숙한 기저막 형성을 보완함으로써 표피층과 진피층의 결합력을 강화할 수 있었고, 제작된 인공피부에 대하여 조직학적 관찰과 투과 전자현미경을 이용한 미세구조를 관찰함으로써 정상피부와 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 섬유모세포와 각질세포의 분리 및 배양

섬유모세포의 분리 및 배양을 위하여 사람의 피부조직을 전층으로 채취한 후 표피층과 진피층의 분리를 위하여 37°C에서 2.4 U/ml 농도의 dispase(Sigma, St. Louis, USA)에 30분간 넣어둔 후 표피층과 진피층을 분리하였다.

분리된 진피조직은 0.05% trypsin(Sigma, St. Louis, USA)으로 10분간 처리한 후 세포부유액을 만들었다. 분리된 세포들을 적정 세포밀도( $10,000/\text{cm}^2$ )로 배양접시에 분주하여 섬유모세포의 배양액인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Gaithersburg, USA)을 넣어 5%, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, 배양액은 3-4일 간격으로 갈아주었다.

분리된 표피조직은 0.05% trypsin으로 10분간 처리한 후 세포부유액을 만들었다. 분리된 세포들을 적정 세포밀도( $10,000/\text{cm}^2$ )로 배양접시에 분주하여 각질세포배양액 KBM(Keratinocyte basal medium, Clonetics, San Diego, USA)을 넣어 5%, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, 배양액은 3-4일 간격으로 갈아주었다.

### 나. 동종진피의 준비와 진피 및 표피층의 제작

동종진피는 세포성분을 제거하고 냉동 건조하여 상품화된 AlloDerm<sup>®</sup>(Lifecell corp., Woodlands, USA)을 사용하였다. AlloDerm<sup>®</sup>을  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  크기로 자른 다음, KBM 배지에 넣어 15분 동안 수화시키고 AlloDerm<sup>®</sup>에 붙어있는 종이 막을 떼어내었다.

동종진피에 섬유모세포를 이식하기 위하여 동종진피의 기저막 쪽이 아래로 향하도록 하여 Millicell-PC(Millipore, Massachusetts, USA)에 깔고 이를 6-well plate안에 하나씩 넣은 후 섬유모세포를  $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 로 분주하였다. 1시

간 후에 섬유모세포가 착상하면 DMEM배지를 동종진피가 잠기도록 넣어 배양액을 1일 간격으로 갈아주면서 3일간 배양하였다.

섬유모세포가 이식된 동종진피에 표피세포를 이식하기 위하여 동종진피의 기저막 쪽이 위로 향하도록 뒤집어서 Millicell-PC(Millipore, Massachusetts, USA)에 깔고 이를 6-well plate안에 하나씩 넣은 후 각질세포를  $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 로 분주하였다. 각질세포의 증층형성을 유도하기 위한 배양액으로는, DMEM과 F-12(Gibco, Gaithersburg, USA)를 1:1로 혼합한 피부배양액 A와 3:1로 혼합한 피부배양액 B를 사용하였고, 5 µg/ml의 insulin(Sigma, St. Louis, USA), 0.5 µg/ml의 hydrocortisone(Sigma, St. Louis, USA),  $1.8 \times 10^4 \text{ M}$ 의 adenine(Sigma, St. Louis, USA), 1%의 antimycotic-antibiotics(Gibco, Gaithersburg, USA), 10% 태우혈청(10% fetal calf serum, Sigma, St. Louis, USA) 등을 첨가하여 사용하였다. 1시간 후에 각질세포가 진피층 위에 착상을 하면 피부배양액 A로 4일간 배양한 뒤 기존의 배양액을 제거하고 피부배양액 B를 진피 부위만 잠기도록 첨가하여 표피세포가 공기에 노출되도록 하였다. 매일마다 배양액을 교환하였으며 37.5%의 CO<sub>2</sub> 배양기내에서 10일 동안 증식시켰다.

### 다. 인공피부의 육안적, 조직학적 및 투과 전자현미경 관찰

인공피부의 표피층을 공기에 노출시킨 후 각각 5일, 30일 후에 인공피부조직의 색깔과 수축정도를 육안으로 관찰하였다.

인공피부의 조직학적 관찰을 위하여 표피층을 공기에 노출시킨 후 각각 5일, 30일된 인공피부를 10%의 중성 포르말린으로 고정하여 파라핀 블록을 만든 후 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-eosin)염색을 실시하였다. 기저막의 존재를 확인하기 위해 PAS염색(Periodic acid Schiff stain)을 시행하였고, 기저막에 존재하는 제 4형 아교질(collagen Type IV)의 형성을 알아보기 위해서 면역조직화학염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰 후 조직사진을 촬영하였다.

인공피부의 투과 전자현미경 관찰을 위하여 30일 동안 배양한 인공피부를 세척하여 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde, Sigma, St. Louis, USA)로 2시간 동안 전고정하고 1시간 30분 후 1% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide, Merck, Germany)으로 고정하였다. 순차적 농도의 탈수를 거친 후 산화 프로필렌(propylene oxide, Sigma, St. Louis, USA)으로 치환하였다. Epon으로 침투 후 60°C에서 48시간 동안 중합하고 중합된 블록을 다이아몬드 칼(diamond knife)로 70 nm 두께의 절편을 제작하여 초산 우라닐

(uranyl acetate)과 구연산 납(lead citrate)으로 20분 및 10분씩 이중 염색하여 H-7000B(Hitachi, Japan) 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

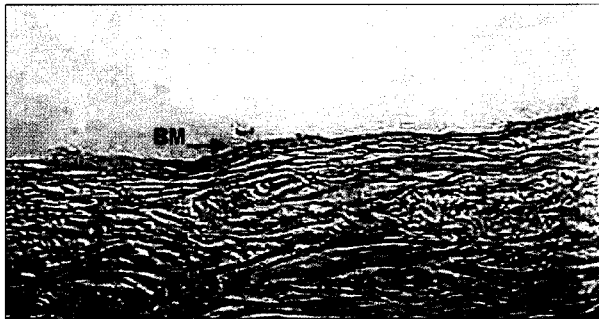
### III. 실험 결과

#### 가. 인공피부의 육안적 관찰

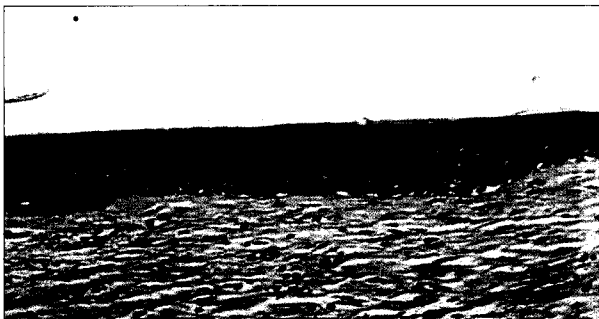
제작된 인공피부의 색깔은 30일 경과 후에도 원래의 동종진피 색깔인 흰색을 유지하고 있었으며 30일 경과 후에도 원래 크기와 유사하여 수축이 거의 일어나지 않았다. 그리고 *In vitro*상에서 제작된 인공피부의 표면에는 시간이 지날수록 투명하고 탄력성을 가지는 각질층이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다.

#### 나. 인공피부의 조직학적 관찰

섬유모세포를 첨가하기 전의 AlloDerm®을 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 관찰하면 세포성분 없이 밀집된 섬유조직과 남아있는 기저막으로 구성된 자연적인 진피구조



**Fig. 1.** Microphotograph of AlloDerm®. No cellular components are identified and only collagen scaffold is seen (Hematoxylin and eosin stain, × 400). Arrow heads: basement membrane.

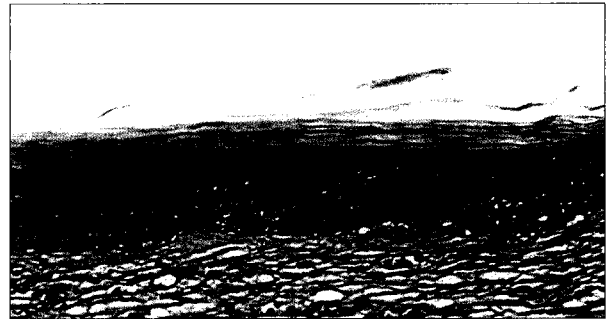


**Fig. 2.** Microphotograph of reconstructed artificial skin *in vitro* at day 5. Epithelial layer with thick keratin is seen and basal layer is also identified. Natural looking dermal area is seen(Hematoxylin and eosin stain, × 400). Arrow heads: epithelial layer. BL: basal layer.

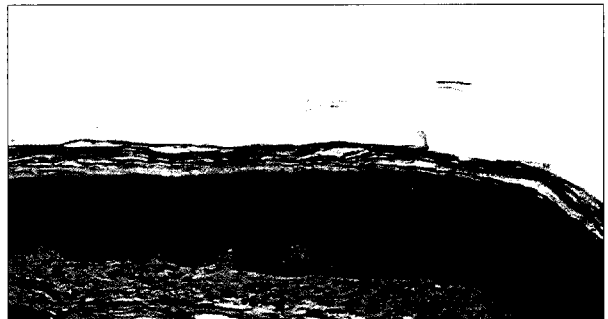
를 볼 수 있다(Fig. 1). *In vitro*상에서 제작하여 5일간 공기에 노출시킨 인공피부는 얇은 표피층을 형성하고 있었으며(Fig. 2), 진피층에는 섬유모세포가 고루 분포하고 있는 것이 관찰되었다. 배양한지 30일째 되는 인공피부의 표피층은 점차 두꺼워져 정상피부와 유사하게 기저층(basal layer), 유극층(spinous layer), 과립층(granular layer) 등을 형성하는 것이 관찰되었고, 인공피부에서 기저막의 존재를 확인하기 위해서 PAS염색한 결과는 양성반응이 나타났다(Fig. 3). 표피층의 형성을 확인하기 위한 cytokeratin 10 면역조직화학염색에서도 양성반응이 관찰되었다(Fig. 4).

#### 다. 인공피부의 투과 전자현미경 관찰

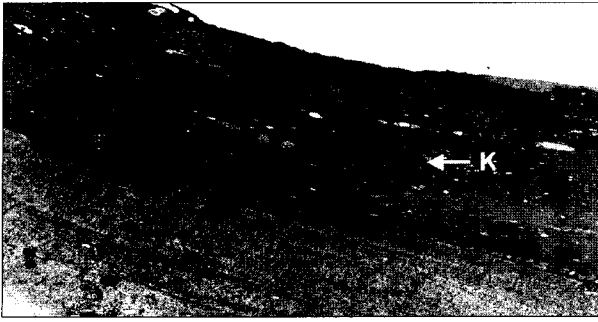
*In vitro*상에서 30일째 공기에 노출시킨 인공피부조직을 투과 전자현미경으로 관찰한 결과, 사람의 피부에서와 유사한 중층각질층을 형성하고 있었고(Fig. 5), 층체(Lamellar body)와 부착반점(desmosome)을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).



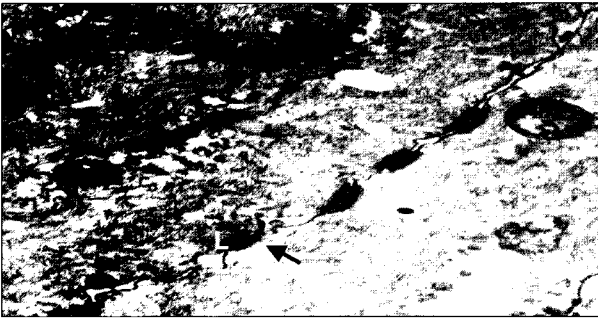
**Fig. 3.** Microphotograph of reconstructed artificial skin *in vitro* at day 30. Basement membrane is identified at dermo-epidermal junction(Periodic acid Schiff stain, × 400). Arrow heads: basement membrane. GL: granular layer, SL: spinous layer, BL: basal layer.



**Fig. 4.** Microphotograph of reconstructed artificial skin *in vitro* at day 30. Immunodetection of cytokeratin 10 at suprabasal layer of epithelium with thick keratin(× 400).



**Fig. 5.** Electron micrograph of reconstructed artificial skin *in vitro* at day 30. Keratinocytes formed stratified squamous epithelium. K: Keratinocyte.



**Fig. 6.** Electron micrograph of reconstructed artificial skin *in vitro* at day 30. Well developed lamellar body and desmosome are observed. L: Lamellar body, Arrow head: Desmosome.

#### IV. 고 찰

피부 대체물들은 피부결손으로 생기는 반흔구축(scar contracture)을 방지할 뿐만 아니라, 창상치유를 촉진하면서 수분과 전해질의 손상을 막고 감염에 저항성을 지니면서 거부반응이 없어야 이상적이라 할 수 있다. 조직공학적인 인공피부의 제작은 앞에서 언급한 이유뿐만 아니라, 피부의 환경 독소 평가, 세포분화의 연구 등을 위한 방법으로도 많은 관심을 받아왔다.<sup>24</sup> 최근 배양기술의 급속한 발달로 인하여 소량의 피부조직으로부터 각질세포의 대량증식이 가능해짐에 따라,<sup>5,6</sup> 배양된 각질세포로부터 표피층을 만들어 피부결손부에 이식하는 시도가 있었다.<sup>1</sup> 더 나아가 표피층 밑에 진피성분을 첨가해줌으로써 표피이식 후에 초래되는 심한 이차 수축(secondary contraction) 등의 부작용을 줄여보고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 또한 모자라는 공여부를 보충하고 integra<sup>®</sup>나 Terudermis<sup>®</sup> 등과 같은 인공 진피의 경우에는 이차적인 수술이 필요하므로 이를 줄이기 위한 노력의 일환으로 정상피부와 좀 더 유사한 인공피부를 만들기 위한 시도가 이루어지고 있다. 인공진피 제작의 대표적인 방법은 아교질 용액을 중합시켜 인공진피를 만드는 것인데, 이 과정에서 아교질 격자의 강도를

높이기 위해 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 첨가하거나,<sup>7,8</sup> 화학적으로 교차결합(cross-linking)을 시키기도 하였다.<sup>9-11</sup> 한편, 인공진피에 배양된 섬유모세포를 첨가하여 생체조직에 근접한 아교질의 중합을 유도하려는 시도뿐만 아니라,<sup>12,13</sup> 재료공학을 이용한 진피의 제작 등의 많은 노력이 이어지고 있다.<sup>14</sup> 순수 합성된 인공진피는 아교질 등과 같은 물질로 이루어져 있으므로 감염에 약하고 2차례의 수술이 필요하고 이식된 얇은 자가 이식편이 rete 못(rete peg)을 형성하지 못하여 표피층이 쉽게 탈락될 수 있는 등의 단점이 있다.

저자들은 이러한 문제를 극복하기 위하여 최근에 상품화된 동종진피를 사용하였다. 상품화된 동종진피는 사체에서 채취한 피부에서 표피를 제거하고 동종이식 시 면역 거부반응이 일어나지 않도록 세포성분을 모두 제거하여 동결 건조시킨 동종진피재료로서 미국식품위생국(FDA)의 공인을 받고 임상적으로 이식용 및 이식용으로 개발되어 현재 많이 사용되고 있다. 제품화된 동종진피는 어느 정도의 기계적 강도를 지니므로 조작이 용이하고 감염에 대한 저항성이 비교적 강하다. 특히하게도, 제품화된 동종진피의 표면에는 기저막 성분이 고스란히 남아 있다. 기저막을 구성하는 생화학 성분으로서 라미닌(laminin), 제 4형 아교질, 제 7형 아교질(collagen type VII) 등은 진피와 표피의 결합력을 증가시키므로, 그 동안 인공피부 제작에서 진피층의 제작을 위해 사용되던 아교질 젤(collagen gel)에 비하여 우수한 재료라고 할 수 있다. 생화학, 해부학적으로도 동종진피의 표면은 정상피부의 rete 능선(rete ridge), rete 못(rete peg) 등의 구조를 고스란히 유지하고 있으므로 재생된 인공피부는 표면에 가해지는 전단력(shear force)에 대한 표피의 저항력이 강할 것으로 생각되나, 실제 실험에서 측정할 수는 없었다. 본 연구결과에서도 재생된 인공피부에서 조직학적으로 rete 능선(rete ridge) 등의 정상 피부에서 볼 수 있는 구조를 확인할 수 있었다.

제품화된 동종진피를 이용한 조직공학적인 인공피부를 임상에 적용하여 광범위한 화상이나 손상된 피부창상을 피복하는 데에는 아직까지 문제점이 많다. 실제로 임상에서 이것을 자가 피부이식처럼 성공적으로 생착시키기 위해서는 인공피부의 제작방법 및 임상시술방법에서 적절한 방법들이 고안되어야 할 것이다. 하지만, 이 인공피부는 소규모로 제작하여 각종 피부독성 검사, 표피분화의 연구 등의 실험모델로서 다양한 연구분야에서 즉시 이용될 수 있으리라 사료된다.

#### IV. 결 론

재생된 인공피부는 rete 못을 제외하고는 정상 피부조직

과 유사한 해부조직학적 구조를 가지고 있었고, 투과 전자 현미경을 이용한 관찰에서도 사람의 피부에서와 유사한 중층각질층을 형성하고 있었고, 층체와 부착반점을 관찰할 수 있었다.

상표화된 동종진피는 조직공학적 인공피부의 제작에 효과적인 재료로 판단되며, 향후 임상적용을 위한 적용방법의 개발을 위한 동물실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1: 75, 1981
- Eun HC, Chung JH, Jung SY, Cho KH, Kim KH: A comparative study of the cytotoxicity of skin irritants on cultured human oral and skin keratinocytes. *Br J Dermatol* 130: 24, 1994
- Basset-Seguín N, Culard JF, Kerai C, Bernard F, Watrin A, Demaille J, Guilhou JJ: Reconstituted skin in culture: a simple method with optimal differentiation. *Differentiation* 44: 232, 1990
- Asselineau D, Bernard BA, Bailly C, Darmon M: Retinoic acid improves epidermal morphogenesis. *Dev Biol* 133: 322, 1989
- Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81: 33s, 1983
- Tsao MC, Walthall BJ, Ham RG: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110: 219, 1982
- Matsuda K, Suzuki S, Isshiki N, Yoshioka K, Okada T, Ikada Y: Influence of glycosaminoglycans on the collagen sponge component of a bilayer artificial skin. *Biomaterials* 11: 351, 1990
- Ellis DL, Yannas IV: Recent advances in tissue synthesis *in vivo* by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Biomaterials* 17: 291, 1996
- Miyata T, Taira T, Noishiki Y: Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater* 9: 139, 1992
- Koide M, Osaki K, Konishi J, Oyamada K, Katakura T, Takahashi A, Yoshizato K: A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. *J Biomed Mater Res* 27: 79, 1993.
- 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* 15: 1082, 1994
- Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P, Rosenberg M, Wilkins LM, Johnson EW, Watson S, Mason VS, Bell E: Epidermis generated *in vitro*: practical considerations and applications. *J Cell Biochem* 45: 245, 1991
- Rittenberg T, Longaker MT, Adzick NS, Fhrlich HP: Sheep amniotic fluid has a protein factor which stimulates human fibroblast populated collagen lattice contraction. *J Cell Physiol* 149: 444, 1991
- Suzuki S, Matsuda K, Maruguchi T, Nishimura Y, Ikada Y: Further applications of "bilayer artificial skin". *Br J Plast Surg* 48: 222, 1995