

인공피부용 실크 피브로인-알긴산 해면체의 창상치유 효과

오 민 · 최 준 · 허찬영 · 백룡민 · 김영수 · 최영웅

인제대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effect of Silk Fibroin-Alginic Acid Sponge Treatment as an Artificial Skin on Wound

Min Oh, M.D., Joon Choe, M.D., Chan Yeong Heo, M.D.,
Long Min Baik, M.D., Young Soo Km, M.D.,
Young Woong Choi, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Inje
University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: This study was designed to compare the wound healing effect of silk fibroin, alginate and fibroin/alginate blend sponge with clinically used Nu gauze in a rat skin defect model.

Methods: Two full thickness excisions were made on the back of Sprague-Dawley rat. The excised wound was covered with either of the silk fibroin(SF), alginate(SA), or fibroin/alginate blend sponge(SF/SA). On the postoperative days of 3, 7, 10 and 14, the wound area was calculated by image analysis software. At the same time, a skin wound tissue was biopsied.

Results: Healing time 50% (HT₅₀) of SF/SA sponge treated group was dramatically reduced as compared with that of control treatment. We also found that the HT₅₀ of SF/SA sponge was significantly decreased as compared with either those of SF or SA treatment. Furthermore, SF/SA treatment significantly increased the size of epithelialization and collagen deposition as well as the number of PCNA positive cells on epidermal basement membrane as compared with those of control treatment.

Conclusion: Our results suggest that the wound healing effect of SF/SA blend sponge is the best among other treatments including SF and SA during the whole wound healing period.

Key Words: Silk fibroin-alginic acid, Wound healing, Epithelialization, PCNA

Received November 8, 2005

Revised May 9, 2006

Address Correspondence: Joon Choe, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Sanggye Paik Hospital, Inje University Medical Center, 761-1 Sanggye-dong, Nowon-gu, Seoul 139-707, Korea. Tel: 02) 950-1048 / Fax: 02) 932-6373 / E-mail: 1015min@hanmail.net

I. 서론

창상이란 해부학적으로 조직의 연속성이 파괴된 것을 의미하며 손상에 따른 창상치유의 결과로 반흔조직이 형성된다. 실제 임상에서 창상 및 화상에 의해 유발되는 광범위한 피부손상 및 진피층이 크게 파괴되는 경우, 이에 대한 신속하고 효과적인 치료가 절실히 요구되며, 피부재생이 일어나지 않아 치유에 상당한 시간이 소요된다. 이를 치료하기 위해 피부이식 등과 같은 치료방법이 이용되고 있으며 그 효과를 인정받고 있으나, 자가 피부이식은 피부조직을 얻을 수 있는 부위가 한정되어 광범위한 창상이나 화상의 경우 적용이 제한된다는 점이 단점으로 지적되어 왔다. 이러한 배경에서 인공피부(또는 상처보호막)나 폴리우레탄과 같은 합성고분자 재료 및 돈피 등과 같은 생체재료가 개발되어 임상에서 이용되어 왔으나 실제로 임상에서 적용하기에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 특히 환자 자신의 피부조직을 배양하여 이식하는 경우 조직배양에 최소 1주일 이상 소요되므로 화상 등과 같이 응급처치가 필요한 경우에는 응용할 수 없어 상처보호막이나 인공피부의 개발이 절대적으로 시급하다.

현재 인공피부 개발은 생체 적합성이 우수한 비세포성 물질인 알긴산, 키토산 및 히아론산 등의 폴리사카라이드(Polysaccharide) 계통과 콜라겐, 젤라틴 등의 단백질 계통 및 poly(lactic acid), poly(lactic-co-glycolic acid) 등의 합성고분자 계통을 중심으로 진행되고 있다.¹

이 중에서 실크 피브로인은 오랫동안 봉합사 등 의공소재로 활용되어 왔으며 polystyrene이나 poly(2-hydroxyethyl methacrylate)와 마찬가지로 염증반응을 거의 일으키지 않으면서 기계적 성상이 우수하고 화학적 처리를 거치지 않더라도 구조적(conformation) 변화를 일으킬 수 있는 장점이 있어 최근 인공피부의 소재로서 많은 관심이 모아지고 있다.² 또한 실크 피브로인은 섬유아세포, 각질세포 및 골모세포 등 여러 종류의 세포에 대한 부착 및 성장에 양호하며,^{3,4} 실크 피브로인을 키토산 및 PVA(poly vinyl alcohol) 등과 같은 물질로 재조합하여 고분자 복합체를 형성하였을 때 수분 및 산소 투과성이 향상되어 상처치유

촉진효과가 상승한다고 알려져 있어 인공피부 개발에 응용 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다.⁵ 알긴산은 laminaria 라는 해초로부터 추출한 것으로서 mannuronic acid와 guluronic acid로 구성되어 있는데 guluronic acid가 calcium과 결합하여 젤을 형성하며, 이러한 guluronic acid 성분이 증가할 경우 더욱 천천히 고형화하는 것으로 알려져 있다. 알긴산은 창상 시 많은 양의 삼출액을 흡수하며, 형성된 gel이 hydrogel과 유사하게 작용하여 보습효과를 나타내어 창상의 치유를 촉진시킨다. 뿐만 아니라 혈액응고의 전구물질로 작용하여 창상치유과정 중 삼출혈액을 지혈하는 역할을 담당한다.⁶

현재까지 개발된 인공피부는 아직도 다양한 종류의 창상을 치료하는데 있어 그 치료 효능 및 성능 수준이 만족스럽지 못하며 해결해야 하는 부작용과 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 보다 우수하고 효과적인 인공피부 제조가 시급한 실정이며, 국내외에서 이러한 인공피부의 제조에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 실험의 목적은 생체 고분자인 실크 피브로인과 알긴산 복합체가 인공피부로서의 기능을 효과적으로 수행할 수 있는지의 여부를 검증하고 특히, 창상치유 과정에 관점을 두어 창상치유 속도 및 상피화의 정도, 교원질 침착, 그리고 증식성세포 발현정도에 있어서 그 효과를 검증하고자 함이다.

II. 재료 및 방법

본 실험에서는 실크 피브로인과 알긴산의 복합체를 백서의 전층 결손 절제 창상모델에 적용하여 잔여 창상면적의 감소율 및 반수 치유일의 측정을 통해 창상치유 효과를 검증하고자 하였다. 뿐만 아니라 창상치유 기전 중 재상피화와 교원질 합성에 있어서 실크 피브로인/알긴산 복합체의 효과를 검증하기 위해 각각의 실험 날짜에 창상 경계면 내 상피세포 증식에 대한 면역조직화학법, Hematoxylin-Eosin 염색 및 Masson's trichrome 염색을 실시하여 컴퓨터와 연계된 영상분석 기법을 이용하여 정성 및 정량 분석하였다.

가. 실험동물

실험동물은 체중 250-300g의 8주령 수컷 Sprague-Dawley종 백서(rats, 한림실험동물)를 사용하였으며, 동물실은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도로 조절되었고 주야시간 또한 12시간으로 자동 조절되었다. 사료와 물은 자유롭게 섭취토록 하였으며 모든 실험동물은 1주 동안 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

나. 전층 결손 절제 창상의 작제

모든 실험군에서 창상제작 2시간 전에 항생제(streptomycin; (주)종근당)를 근육주사하고(0.25 g/kg), 8% chloral hydrate(0.5 ml/100 g)를 복강주사하여 마취한 후 백서의 등 부위에 있는 털을 제거하였다. 70% 에탄올로 등 부위를 소독한 후, 등의 양측 두 부위에 직경 2cm의 크기로 원을 작도하고 소독된 수술용 scissors를 사용하여 표피 및 진피층을 제거하여 전층 결손 창상(full-thickness wound)을 유발하였다.

다. 창상의 처치방법

각각의 인공피부가 나타내는 창상 효과를 측정하기 위해 전층 결손 창상부위의 크기에 맞추어(직경 2cm) 실크 피브로인(SF), 알긴산(SA), 실크피브로인-알긴산 복합체(SF/SA) 및 대조군인 Nu gauze(Johnson & Johnson Co., USA)를 각각 동일하게 절단하여 창상부위를 덮어주었다. 이후 멸균된 탄성 붕대(6 × 7 cm, Tegaderm™, 3M Health Care, USA)를 이용하여 sponge의 탈락을 방지하고 움직임에 지장이 없도록 감아주었다. 모든 처치군의 실험동물 수는 7마리로 실시하였다.

라. 창상치유 속도의 측정

전층 결손 창상유발 직후의 크기를 최초 창상면적으로 하여 sponge 처치 후 3, 7, 10, 14일 경과 시 일어나는 창상면적의 변화를 투명한 필름 용지를 이용하여 각각의 창상부위를 도안한 후 스캔하였다. 다음으로 영상분석 장치(Image analysis system, Metamorph, USA)를 이용하여 잔여 창상면적을 측정하였으며 백분율로 환산하여 치유 속도 및 반수 치유일(HT₅₀)을 계산하였다.

마. 조직학적 및 면역조직학적 검사

창상유발 후 3, 7, 10, 14일째에 조직검사용 실험동물을 희생시켜, 원형창상 전체가 포함된 조직을 채취하고 10% 중성 포르말린용액에 24시간 고정된 후, 창상 중앙을 통과하는 절편을 취하여 탈수 후 파라핀 블록에 포매하였다. 조직을 4μm 두께로 조직절편기(Leica microsystems, Germany)를 이용하여 절단한 다음 polylysine으로 coating된 slide에 붙여 deparaffination 및 hydration 과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 또한 창상내의 세포 분화유무와 정도를 측정하기 위하여 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 항체를 이용하여 avidin-biotin-peroxidase(ABC)법으로 면역조직화학 염색을 실행하였다.

바. 영상분석

Masson's trichrome과 Hematoxyline-Eosine으로 각각 염색된 조직을 광학현미경(Zeiss Axioscope, Germany)을 이용하여 창상 경계면을 현미경 시야하에서 100배율로 사진촬영하고, 화상 분석 장치(Image Analysis System, Metamorph, USA)를 이용하여 신생상피와 육아조직에서 선택적으로 염색되는 색상 중 5개 이상을 표본 추출하여 평균값에 해당되는 염색 면적을 측정하였고 영상 분석하였다. PCNA 발현세포의 수를 분석하기 위하여 동일한 광학현미경을 이용하여 창상경계면을 현미경 시야 하에서 cooled CCD camera(Micromax Kodak 1317, Princeton instrument, USA)를 이용하여 100배율인 영상을 수집하고, 화상 분석 장치(Image Analysis System, Metamorph, USA)를 이용하여 Gray level의 평균값이 70% 이상의 intensity에서 PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포 수를 측정하였다.

사. 통계학적 처리

Metamorph program에 의해 자동으로 측정된 값을 이용하여 통계 처리하였으며, 실험결과로 얻은 수치는 평균 표준편차로 표시하였다. 대조군과의 통계학적 유의성은 unpaired t-test로 검증하였고 유의수준은 5% 미만에 두었다. 또한 각 처치군 사이의 전반적인 효과 차이를 ANOVA test를 통해 검증하였으며, 그룹 간 비교를 위해 Newman-Keuls test를 실시하였다.

III. 결 과

가. 창상치유 속도의 시점별 측정 및 healing time 50%(HT₅₀)에 있어서 실크 피브로인-알긴산 복합체의 효과

실크 피브로인(SF) 및 알긴산(SA)의 단독 처치와 실크 피

브로인-알긴산 복합체(SF/SA) 처치의 창상치유과정에 있어서 시점별 효과를 비교하였다(Fig. 1, Table I). Nu gauze 처치군(CONT)에 비해 실크 피브로인, 알긴산 그리고 실크피브로인-알긴산 복합체의 모든 처치군에서 창상 유발 후 7 일째부터 창상 크기가 현저히 감소되었다. 또한 7일과 14 일째 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군이 실크 피브로인 및 알긴산 단독 처치군에 비해 유의한 창상치유 효과를 나타내었다.($p < 0.05$ as compared with SA, $\#p < 0.05$ as compared with SF) 창상 유발 후 14일째 각 처치군의 잔여 창상 면적(%)은 원래 면적(100%)을 기준으로 비교할

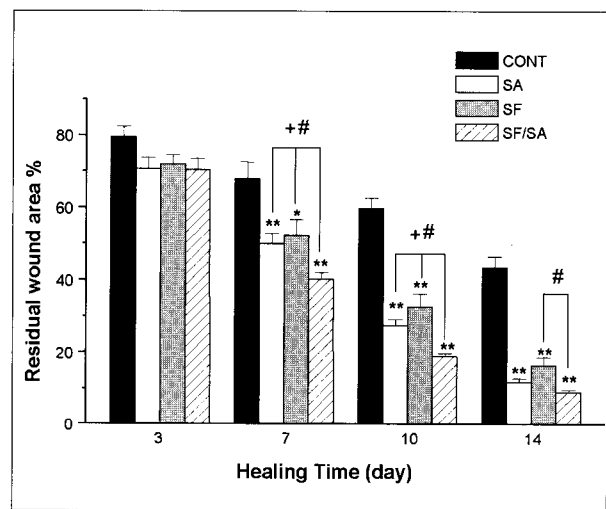


Fig. 1. The effect of silk fibroin(SF), alginate(SA) and silk fibroin-alginate(SF/SA)-blended sponges on the degree of wound healing. The wound size was significantly reduced from 7 days after treatment in the SF, SA and SF/SA groups as compared with the Nu gauze-treated control group(CONT). Moreover, the wound size of SF/SA group was significantly decreased as compared with either those of SF group and SA group. Each bar represented mean±SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with CONT, † $p < 0.05$ compared with SA and # $p < 0.05$ compared with SF.

Table I. The Residual Wound Area Measured for 2 Weeks. The wound size of silk fibroin-alginate(SF/SA) sponge-treated group was significantly reduced as compared with those of alginate group(SA) and silk fibroin group(SF) as well as control group(CONT) from the seventh day

Day	Residual wound area (%)			
	CONT	SA	SF	SF/SA
3	79.37 ± 2.94	70.64 ± 3.15	71.97 ± 2.49	70.29 ± 3.27
7	67.96 ± 4.58	41.91 ± 2.91**	52.32 ± 4.23*	40.12 ± 1.91**†, #
10	59.81 ± 2.76	21.31 ± 1.73**	22.58 ± 3.50**	18.82 ± 0.75**†, #
14	43.51 ± 2.95	11.62 ± 1.05**	14.32 ± 2.38**	8.88 ± 0.68**†, #

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with CONT, † $p < 0.05$ compared with SA and # $p < 0.05$ compared with SF. Each data represented as mean ± SEM

때, 대조군이 43.51 ± 2.95 , 알긴산 처치군이 11.62 ± 1.05 , 실크 피브로인 처치군이 14.32 ± 2.38 그리고 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군이 8.88 ± 0.68 까지 감소하였다 (Table I).

또한, 실크 피브로인(SF) 및 알긴산(SA)의 단독 처치와 실크피브로인-알긴산 복합체(SF/SA) 처치의 창상치유 과정에 있어서 50% 창상치유 시간(Healing time 50%, HT₅₀)을 Nu gauze 처치군(CONT)과 측정, 비교해 본 결과, 실크 피브로인, 알긴산 및 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군에서 모두 유의하게 시간이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2, Table II). 또한 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군이 각각의 단독 처치군에 비해 현저히 창상치유 속도가 빠르다는 것을 알 수 있었다. 각 처치군의 반수 치유시간(일)은 control 처치군에서 12.12 ± 1.04 , 알긴산 처치군이 $6.23 \pm$

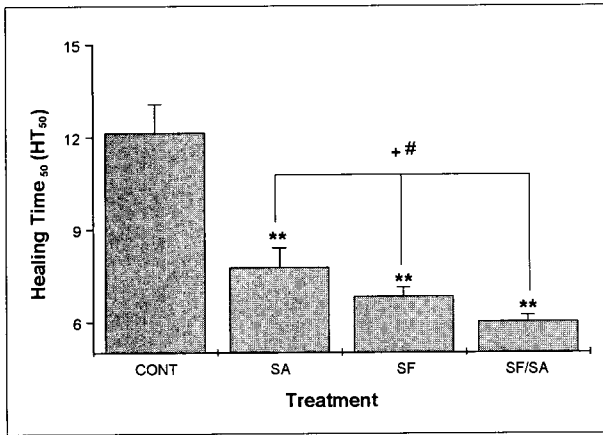


Fig. 2. Healing Time 50%(HT₅₀) was compared in each groups. Not only silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponge treatment but also silk fibroin treatment(SF) and alginic acid treatment(SA) significantly decreased HT₅₀ as compared with control group (CONT). Furthermore, there was significant reduction of HT₅₀ in SF/SA group as comparison to either SF group or SA group. Each bar represented mean±SEM. ***p* < 0.01 compared with CONT, †*p* < 0.05 compared with SA and #*p* < 0.05 compared with SF.

0.57, 실크 피브로인 처치군이 6.94 ± 0.62 그리고 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군이 5.99 ± 0.51 (일)로 나타났다(Table II).

나. 신생 상피의 증식에 있어서 실크 피브로인-알긴산 복합체의 효과

실크 피브로인(SF) 및 알긴산(SA)의 단독 처치와 실크 피브로인-알긴산 복합체(SF/SA) 처치에서 측정된 신생 상피의 면적은 Nu gauze 처치군(CONT)에 비해 창상 유발 후 7일째부터 유의하게 증가되었다(Fig. 3, Table III). 반면, 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치의 효과는 알긴산 처치군에 비해서는 7일째부터 현저한 신생 상피 면적의 증가를 나타내었으나, (+*p* < 0.05, ++*p* < 0.01 as compared with SA) 실크 피브로인 단독 처치군에 비해서는 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 실험 종료일인 창상 유발 후 14일째 신생 상피의 면적(mm²)은 control 처치군에서 0.08 ± 0.005 , 알긴산 처치군에서 0.11 ± 0.005 , 실크피브로인 처치군은 0.12 ± 0.005 그리고 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군에서 0.13 ± 0.008 로 각각 관찰되었다(Table III, Fig. 4).

Table II. Healing Time 50%(HT₅₀) Measured in Each Groups. Silk fibroin-alginic acid(SF/SA)-blended sponge treatment reduced about 6 day of HT₅₀ as compared with control group(CONT)

Group	Healing time 50% (Day)
CONT	12.12 ± 1.04
SA	6.23 ± 0.57**
SF	6.94 ± 0.62**
SF/SA	5.99 ± 0.51**†, #

***p* < 0.01 compared with CONT, †*p* < 0.05 compared with SA and #*p* < 0.05 compared with SF. Each data represented as mean ± SEM.

Table III. Changes of Epithelialization Area on Full-thickness Excision Wound at Each Time Point. Silk fibroin(SF), alginic acid(SA) and silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponges-treated groups were significantly increased thickness of epithelialization as compared with Nu gauze-treated group(CONT).

Day	Area of epithelialization (mm ²)			
	CONT	SA	SF	SF/SA
3	0.11 ± 0.008	0.13 ± 0.007	0.12 ± 0.004	0.11 ± 0.006
7	0.09 ± 0.007	0.11 ± 0.003*	0.13 ± 0.009**	0.14 ± 0.006**††
10	0.08 ± 0.008	0.11 ± 0.008*	0.12 ± 0.007*	0.13 ± 0.006*†
14	0.08 ± 0.005	0.11 ± 0.005**	0.12 ± 0.005**	0.13 ± 0.008**†

p* < 0.05, *p* < 0.01 compared with CONT and †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01 compared with SA. Each data represented as mean ± SEM.

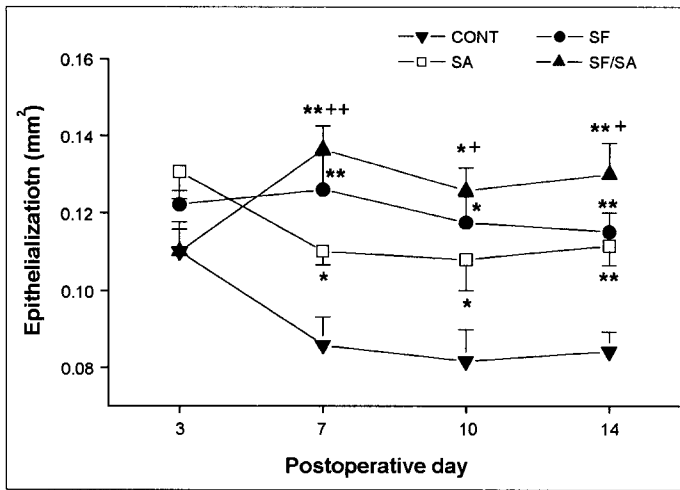


Fig. 3. Graphs showing the proliferative effect of silk fibroin-alginic acid(SF/SA)-blended sponge on the re-epithelialization of the full-thickness excision. The area of new epithelialization tissue were markedly increased from the 7th day after treatment in silk fibroin(SF), alginic acid(SA) and silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponges-treated groups as compared with those in Nu gauze-treated group(CONT). In addition, SF/SA-treated group produced significant effect on epithelialization of wound as compared with SA-treated group. Each value represented mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with CONT and + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ compared with SA.

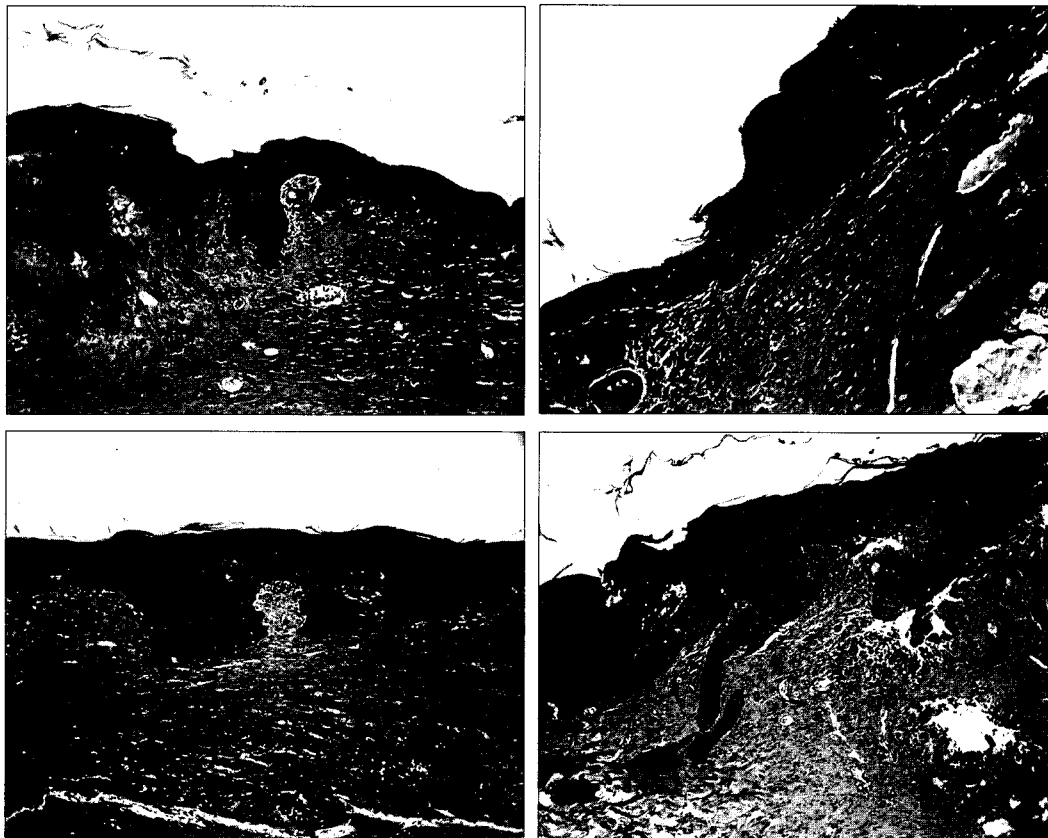


Fig. 4. The histological finding of epithelialization on full-thickness excision wound at 14 days. Sections were taken from the margin of the wound (Hematoxylin-eosin stain, $\times 100$, Scale bar=200 μ m). The epithelialization of thickness was markedly increased in silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponges-treated group as compared with that of control group(CONT). (Above, left) Nu gauze-treated group(CONT). (Above, right) Alginic acid(SA)-treated group. (Below, left) Silk fibroin(SF)-treated group. (Below, right) Silk fibroin-alginic acid(SF/SA)-treated group.

다. 교원질 침착 면적에 있어서 실크 피브로인-알긴산 복합체의 효과

신생상피 증식의 결과와 유사하게 교원질 침착 면적에 있어서도 창상유발 후 7일 쯤부터 실크 피브로인(SF) 및

알긴산(SA)의 단독 처치와 실크피브로인-알긴산 복합체(SF/SA) 처치군이 Nu gauze 처치군(CONT)에 비해 유의하게 증가되었음을 확인하였다(Fig. 5, Table IV). 반면, 실크 피브로인-알긴산 복합체의 교원질 침착에 있어서 그 증

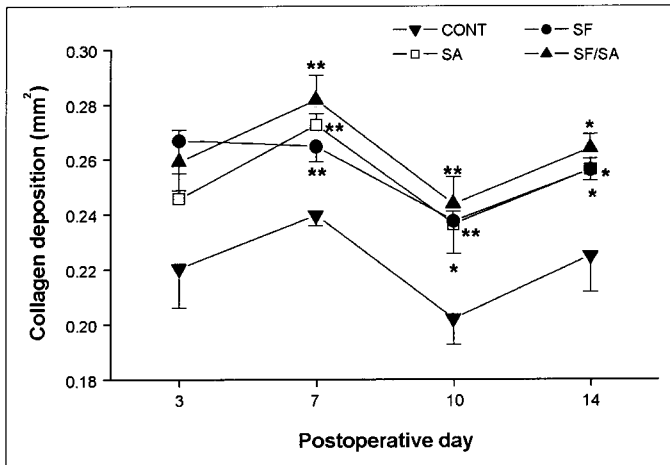


Fig. 5. Graphs showing the effect of silk fibroin-alginate (SF/SA)-blended sponge on the collagen deposition of the full-thickness excision. The area of collagen deposition of new granulation tissue was significantly increased from 7 days after treatment in silk fibroin(SF), alginate acid(SA) and silk fibroin-alginate(SF/SA) sponges-treated groups as compared with those in Nu gauze-treated group(CONT). Values represented mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with CONT.

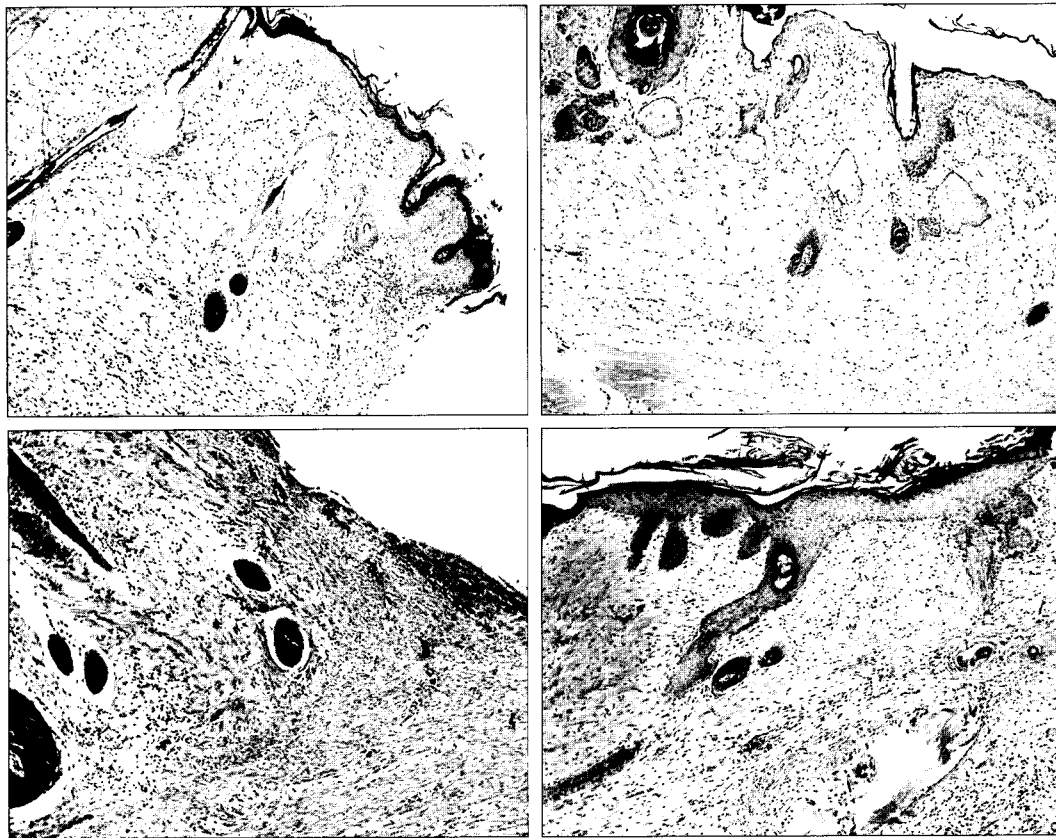


Fig. 6. The histological finding of full-thickness excision wound at 14 days. Sections were taken from the margin of the wound. (Masson's trichrome method, $\times 100$, Scale bar=200 μ m) The maturation of collagen bundles was remarkably increased in silk fibroin-alginate(SF/SA) sponges-treated group as compared with that of control group(CONT). (Above, left) Nu gauze-treated group(CONT). (Above, right) Alginate acid(SA)-treated group. (Below, left) Silk fibroin(SF)-treated group. (Below, right) Silk fibroin-alginate(SF/SA)-treated group.

진 효과는 실크 피브로인 및 알긴산 단독 처치군에 비해서 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 창상유발 후 14일째 각각의 처치에 따른 교원질 침착의 면적(mm^2)은 control 처치군에서 0.22 ± 0.013 , 알긴산 처치군은 0.25

± 0.004 , 실크 피브로인 처치군에서 0.26 ± 0.004 그리고 실크피브로인-알기산 복합체 처치군에서 0.26 ± 0.005 로 나타났다(Fig. 6, Table IV).

Table IV. Changes of Collagen Deposition of Granulation Areas on Full-thickness Excision Wound at Each Time Point. Silk fibroin(SF), alginic acid(SA) and silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponges-treated groups were significantly increased thickness of maturation of granulation as compared with Nu gauze-treated group(CONT)

Day	Area of collagen deposition (mm ²)			
	CONT	SA	SF	SF/SA
3	0.22 ± 0.014	0.25 ± 0.009	0.27 ± 0.018	0.26 ± 0.012
7	0.24 ± 0.003	0.27 ± 0.004 [†]	0.26 ± 0.005 [†]	0.28 ± 0.009 [†]
10	0.20 ± 0.009	0.24 ± 0.004*	0.24 ± 0.012 [†]	0.24 ± 0.010 [†]
14	0.22 ± 0.013	0.26 ± 0.004*	0.26 ± 0.004*	0.26 ± 0.005*

Each data represented as mean ± SEM. **p* < 0.05, [†]*p* < 0.01 compared with CONT group.

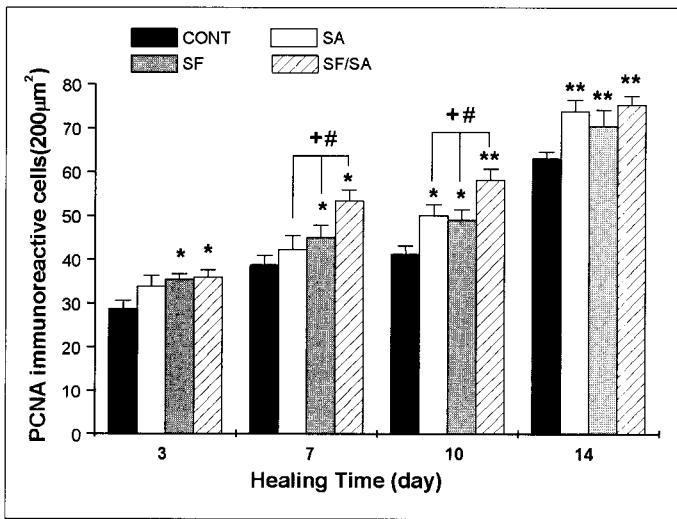


Fig. 7. The number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactive cell. The value of PCNA positive cells was evaluated in silk fibroin(SF), alginic acid(SA) and silk fibroin-alginic acid(SF/SA) sponges-treated groups as well as Nu gauze-treated group(CONT). The number of PCNA positive cells was significantly increased from the third day after treatment in SF and SF/SA groups and from the 10th day in SA group as compared with those of control group. Furthermore, there are more PCNA positive cells on the 7th and 10th day after treatment in SF/SA group as compared with those of either SA and SF groups. Each bar represented mean ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with CONT, [†]*p* < 0.05 compared with SA and [#]*p* < 0.05 compared with SF.

Table V. Changes of the Number of Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) Immunoreactive Cells. The number of PCNA positive cells was significantly increased from the third day after treatment in SF and SF/SA groups and from the 10th day in SA group as compared with those of control group

Day	Number of PCNA positive cells (200 µm ²)			
	CONT	SA	SF	SF/SA
3	28.67 ± 1.91	33.83 ± 2.37	35.33 ± 1.33*	35.83 ± 1.74*
7	38.67 ± 2.20	42.17 ± 3.16	45.00 ± 2.86*	53.33 ± 2.44* ^{†, #}
10	41.17 ± 1.89	50.00 ± 2.46*	49.00 ± 2.22*	58.00 ± 2.60** ^{†, #}
14	63.00 ± 1.53	73.67 ± 2.80**	70.40 ± 3.75**	75.20 ± 2.11**

Each data represented as mean ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with CONT, [†]*p* < 0.05 compared with SA and [#]*p* < 0.05 compared with SF.

라. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 발현에 있어서 실크 피브로인-알긴산 복합체의 효과

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 양성 면역반응을 나타내는 세포의 수는 창상경계면의 신생상피와 기저세포층에서 Nu gauze 처치군(CONT)에 비하여 실크 피브로인(SF)과 실크피브로인-알긴산 복합체(SF/SA)

처치군에서 창상유발 후 3일째부터 유의하게 증가하였다 (Fig. 7, Table V). 반면, 알긴산(SA) 처치군에서는 창상 유발 후 10일째부터 대조군에 비해 PCNA 발현 세포의 수가 유의하게 증가하였다. 또한, 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군의 PCNA 발현 세포수의 증가가 창상유발 후 7일과 10일째에 알긴산 및 실크 피브로인 단독 처치군에 비해

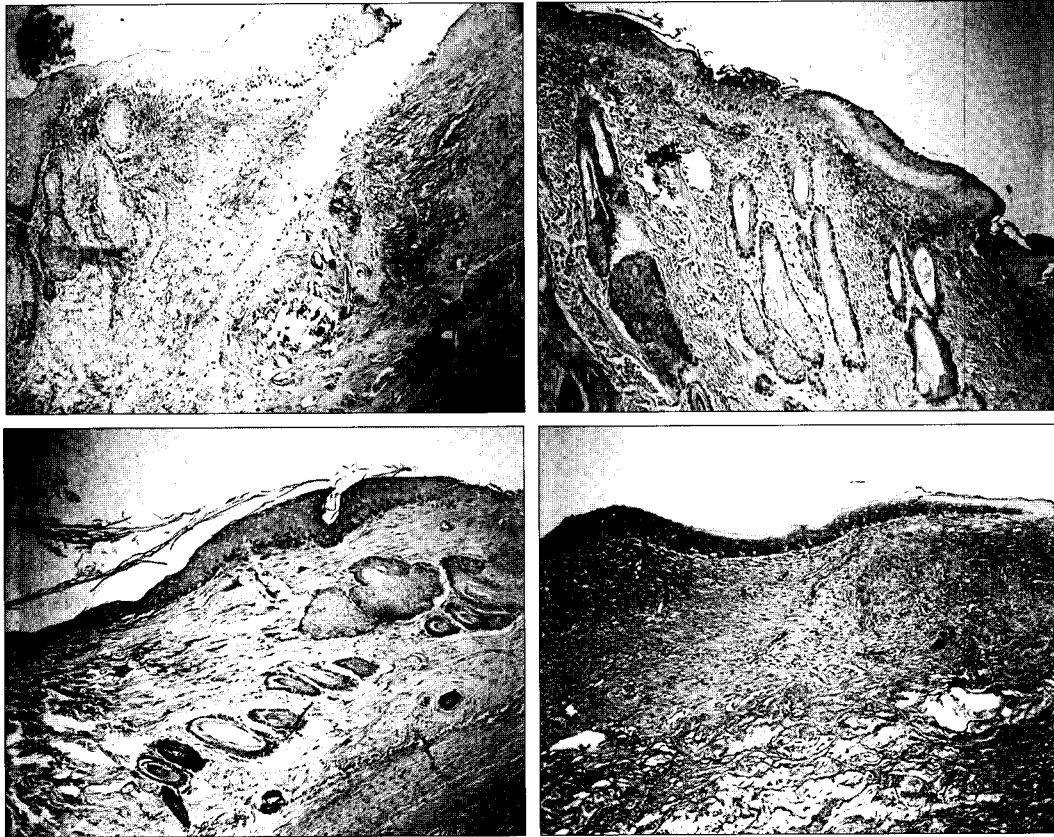


Fig. 8. The immunohistological observation of full-thickness excision wound at 10 days. ($\times 100$, Scale bar=200 μm) The number of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunoreactive cells was markedly increased in SF and SA groups as well as SF/SA group as compared with those of Nu gauze-treated group(CONT). (Above, left) Nu gauze-treated group(CONT). (Above, right) Alginate(SA)-treated group. (Below, left) Silk fibroin(SF)-treated group. (Below, right) Silk fibroin-alginate(SF/SA)-treated group.

유의하게 나타남이 관찰되었다($^{\dagger}p < 0.05$ compared with SA and $^{\#}p < 0.05$ compared with SF).

창상유발 후 10일째, PCNA에 대한 양성 면역반응을 나타내는 세포의 수는 대조 처치군에서 41.17 ± 1.89 , 알긴산 처치군에서 50.00 ± 2.46 , 실크 피브로인 처치군에서 49.00 ± 2.22 그리고 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군에서 58.00 ± 2.60 개로 나타났으며, 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군의 PCNA 발현세포 개수가 현저히 증가한 것으로 관찰되었다(Fig. 8, Table V).

IV. 고 찰

본 실험에서 사용한 실크 피브로인은 의류 소재 및 봉합사와 같은 제한적인 용도로 널리 이용되어 왔으나 최근에는 실크 피브로인의 생체 접합성 및 증식 능력에 대한 연구 결과가 보고되어 의료용 소재의 한계를 극복할 대체 물질로 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.⁴ 최근에 Yoshimizu와 Asakura는 실크 피브로인 powder가

효소를 고정화시키는 능력이 우수하다는 것을 보고하였으며,⁷ Santin 등은 실크 피브로인을 생체에 적용할 때 염증 반응을 거의 형성하지 않음을 확인하였다.³ 또한 fibroblast cell에 대한 실크 피브로인 매트릭스의 뛰어난 세포 부착 능력 및 증식효과도 최근에 보고되었다.⁴ 본 실험 결과 중에서 실크 피브로인 단독 처치의 창상치유 효과는 임상적으로 사용되고 있는 Nu gauze 처치에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났으며 이는 실크 피브로인에 대한 의료용 인공피부로서의 가능성을 제시해 주었다.

알긴산은 mannuronic acid와 guluronic acid로 구성되어 있으며 guluronic acid가 calcium 이온과 결합하여 gel을 형성하며, 이러한 guluronic acid 성분이 증가할 경우 더욱 천천히 고형화되는 것으로 보고되었다.⁸ 알긴산은 창상 시에 분비되는 많은 양의 삼출액을 흡수하며, calcium 이온과 결합하여 형성된 gel은 hydrogel과 유사하게 작용하여 보습효과를 나타내게 되고 창상의 치유를 촉진시킨다고 알려져 있다.⁶ 또한 혈액응고의 전구물질로 작용하여 창상치유 과정 중 삼출혈액을 지혈하는 역할을 한다. 본

실험 결과에서 보여지는 알긴산 단독 처치군의 창상치유 효과 역시 대조군에 비해 유의하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 이러한 알긴산 및 실크 피브로인의 복합체를 적절한 비율로 재조합함으로써 서로 간의 장점들이 잘 반영되고 창상치유 효과가 상승작용을 나타내는지를 본 실험에서 검증하였다. 창상 유발 후 7일째부터 Nu gauze를 처치한 대조군 및 실크 피브로인과 알긴산 단독 처치군에 비해 실크 피브로인과 알긴산 복합체를 처치한 군에서 유의한 창상치유 효과를 관찰할 수 있었다. 이는 실크 피브로인과 알긴산의 각 치유 효과가 상승작용을 나타낸 것으로 평가되어 진다.

본 실험에서 창상유발 후 3, 7, 10, 14일째 상피화의 정도를 Hemotoxylin-eosin 염색을 통해 확인하였으며 실크 피브로인과 알긴산 단독 처치군 및 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군이 대조 처치군에 비해 상피조직의 면적이 유의하게 증가하였음을 확인할 수 있으며 또한 실크 피브로인-복합체 처치군이 가장 우수한 효과를 나타내는 경향을 보였다. 본 실험에서 사용한 실크피브로인-알긴산 복합체에서, 앞서 설명한 바와 같이 알긴산의 guluronic acid는 calcium 이온이 결합하여 hydrogel의 양상을 띠게 됨으로써 보습효과를 나타내며, 창상 시에 분비되는 혈액성분 및 응고원 등의 가피 형성에 필요한 삼출물들을 흡수해줌으로써 가피 형성을 억제 해 준다. 또한 표피세포를 주위 환경으로부터 보호하는 가피의 기능은 실크피브로인-알긴산 복합체의 인공피부로서의 기능에 의해 보완될 수 있을 것이다.

육아조직 형성은 섬유아세포가 창상으로 이동하고 증식하여 새로운 세포의 matrix를 합성하는 창상치유의 중간 과정에서 가장 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 손상 후 3일째 섬유아세포에서 분비한 콜라겐과 기질이 육아조직을 형성하기 시작하며 대식세포, 호중구, 림프구, 형질세포 등의 염증세포를 포함하고 있고, 5일째부터는 육아조직이 결손부위를 채우게 되며 모세혈관 형성이 활발해 진다. 섬유아세포는 교원질의 침착을 유도시키며 교원질 type I과 type III가 피부의 matrix를 구성하는 주된 섬유소임이 알려져 있다. 또한 대식세포에서 분비하는 섬유모세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF)와 혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)에 의해 내피세포의 증식, 분화과정을 거쳐 새로운 모세혈관이 형성되어진다.⁹

본 실험 결과에서 실크 피브로인-알긴산 복합체의 교원질 침착에 대한 효과가 Nu gauze 처치군에 비해 7일째부터 유의하게 상승한 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 실크 피브로인은 섬유아세포, 각화세포 및 골화모

세포 등 여러 종류의 세포에 대한 부착 능력과 성장을 촉진하는 것으로 보고되었으며,^{3,4} 수분 및 산소 투과성에 대한 효과를 증가시킴으로써 상처치유 속도를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.⁵ 따라서 본 연구에서 이용된 실크 피브로인-알긴산 복합체의 창상 처치에 의한 섬유아세포 부착능력 증가와 그에 따른 교원질 합성의 증가에 의한 것으로 사료된다. 또한 실크 피브로인의 혈액 적합성이 우수한 것으로 보고된 바, 실크 피브로인-알긴산 처치가 혈관 내피세포의 유주 및 증식을 야기하고 새로운 모세혈관 신생을 유도하여 섬유아세포와 같은 대사가 활발한 세포에 영양을 충분히 공급할 수 있게 하고 가스교환에 중요한 역할을 수행한 것으로 추측된다.

본 실험의 monoclonal PCNA antibody를 이용한 면역조직화학 염색에서 실크 피브로인 단독 처치군은 창상유발 3일째부터 14일째까지 모두 대조군에 비해 유의하게 증가된 PCNA 발현을 나타냈으며 알긴산 단독 처치군 역시 10일째부터 대조군에 비해 PCNA 발현이 현저히 증가된 양상을 보였다. 또한 실크 피브로인-알긴산 복합체 처치군에서 처치 3일째부터 대조 처치군에 비해 현저히 많은 PCNA 발현이 나타났으며, 이는 피브로인 및 알긴산 단독 처치군의 결과와 비교하여 볼 때 7일과 10일째 유의있게 증가함이 나타났다. 이러한 결과는 창상 면적 감소율에서 창상치유 속도를 실크피브로인-알긴산 복합체가 현저히 촉진시키는 것과 신생 상피화 및 교원질 침착에서의 실크피브로인-알긴산 복합체에 의한 증진 효과와 유사하였다. 본 실험에서 사용한 백서의 전층 결손 창상모델과 유사한 실험에서 알긴산과 젤라틴 복합체가 효과적으로 창상치유를 촉진하는 것이 보고되어 있으며,¹ 또한 최근에는 EGF가 함유된 젤라틴-히아론산 복합체가 상처치유 과정 중에서 세포증식에 효과적이라는 것을 PCNA 면역 염색법을 통해 밝혀진 바 있다.¹⁰ 이러한 보고들은 실크 피브로인-알긴산 복합체 또한 상피세포의 증식 및 유주에 영향을 미쳐 창상치유에 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 제시해 준다.

V. 결 론

본 실험은 반수 치유일의 측정 및 창상속도를 측정함으로써 인공피부로의 실크 피브로인과 알긴산의 복합체가 탁월한 창상치유 효과를 나타냄을 입증하였다. 나아가 조직학적 분석기법을 이용하여 상피화 과정 및 육아조직 형성에 대한 복합체의 효과와 면역조직화학 염색을 통한 증식성 세포의 발현 양상도 비교한 결과, 실크 피브로인과 알긴산 복합체 처치가 창상의 재상피화 및 교원질 합성을 증가시키며, 증식성 세포의 발현 또한 증가시킴으로써 창

상치유를 촉진함을 검증하였다.

본 실험결과를 바탕으로, 현재 창상치유 도포제로 널리 사용되고 있는 Nu gauze 처치는 창상치유력 및 치유 속도를 증진시키지 못하는 것으로 평가되며, 생체에 적합한 인공피부나 상처 보호막으로서 역할을 수행하지 못하는 반면에 실크 피브로인-알긴산 복합체는 상처 보호막으로서의 역할 뿐 아니라 각 성분의 상승효과에 의해 창상치유 과정에 있어서 상피세포와 섬유아세포의 증식을 촉진시킴으로써 창상치유 속도를 증진시키는 인공피부로서의 역할도 수행할 수 있으리라 평가된다.

REFERENCES

1. Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS: Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 20: 409, 1999
2. Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS: Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *J Biomed Mater Res* 48: 631, 1999
3. Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M: *In vitro* evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* 46: 382, 1999
4. Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y: Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 511, 1995
5. Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh HYL, Kim AJ, Kim SY: The effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats. *Bio Phar Bull* 23: 1220, 2000
6. Thomas A, Harding KG, Moore K: Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- α . *Biomaterials* 21: 1797, 2000
7. Yoshimizu H, Asakura T: Preparation and characterization of silk fibroin powder and its application to enzyme immobilization. *J Appl Polym Sci* 40: 127, 1990
8. Attwood AI: Calcium alginate dressing accelerates split skin graft donor site healing. *Br J Plast Surg* 42: 373, 1989
9. Ehrlich HP: Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 2: 149, 1988
10. Hong SR, Lee SJ, Shim JW, Choi YS, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS, Lee SI: Study on gelatin-containing artificial skin IV: a comparative study on the effect of antibiotic and EGF on cell proliferation during epidermal healing. *Biomaterials* 22: 2777, 2001