

전층피부창상에서 실크피브로인과 하이알론산 혼합 스폰지의 창상치유효과

강석윤 · 노대현 · 김현우 · 윤서연 · 권영배¹ · 권해용² · 이광길² · 박영환³ · 이장헌*

서울대학교 수의과대학, ¹전북대학교 의과대학,
²국립농업과학진흥청 잠사연구소, ³서울대학교 농업생명과학대학
(게제승인: 2006년 10월 10일)

Silk fibroin/hyaluronic acid blend sponge accelerates the wound healing in full-thickness skin injury model of rat

Seuk-Yun Kang, Dae-Hyun Roh, Hyun-Woo Kim, Seo-Yeon Yoon, Young-Bae Kwon¹,
HaeYong Kweon², Kwang-Gill Lee², Young-Hwan Park³, Jang-Hern Lee*

College of Veterinary Medicine and BK21 Program for Veterinary Science,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Institute for Medical Science, Chonbuk National University Medical School,
Jeonju 561-756, Korea

²National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea

³College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: October 10, 2006)

Abstract : The primary goal of the wound healing is rapid wound closure. Recent advances in cellular and molecular biology have greatly expanded our understanding of the biologic processes involved in wound repair and tissue regeneration. This study was conducted to develop a new sponge type of biomaterial to be used for either wound dressing or scaffold for tissue engineering. We designed to make a comparative study of the wound healing effect of silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend sponge in full-thickness dermal injury model of rat. Two full-thickness excisions were made on the back of the experimental animals. The excised wound was covered with either the silk fibroin (SF), hyaluronic acid (HA) or SF/HA (7 : 3 or 5 : 5 ratio) blend sponge. On the postoperative days of 3, 7, 10 and 14, the wound area was calculated by image analysis software. Simultaneously, the tissues were stained with Hematoxylin-Eosin and Masson's trichrome methods to measure the area of regenerated epithelium and collagen deposition. In addition, we evaluated the degree of the epithelial cell proliferation using immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). We found that the half healing time (HT₅₀) of SF/HA blend sponge treated groups were significantly decreased as compared with either those of SF or HA treatment group. Furthermore, SF/HA blend sponges 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. Especially, the 5 : 5 ratio group of SF/HA among all treatment groups was most effective on wound healing rate and histological studies. These results suggest that SF/HA blend sponges could accelerate the wound healing process through the increase of epithelialization, collagen deposition and basal cell proliferation in full thickness skin injury.

Key words : epithelialization, hyaluronic acid, proliferating cell nuclear antigen, silk fibroin, wound healing

*Corresponding author: Jang-Hern Lee

College of Veterinary Medicine and BK21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: +82-2-880-1272, Fax: +82-2-885-2732, E-mail: JHL1101@snu.ac.kr]

서 론

창상치유과정은 조직의 파괴에 따라 일어나는 역동적이고, 복잡한 과정이다 [34]. 조직이 손상되면 세포의 구조, 생리, 생화학적 변화가 일어나 손상 또는 결손 부위가 완전히 재생되거나 흉터를 남기고 치유되게 된다. 정상적인 창상치유는 기본적으로 염증기, 증식기, 재형성기와 같은 일련의 단계에 따라 진행되는데 손상부위에서 각 단계에 따라 세포들이 고유의 역할을 하여 창상치유가 이루어진다 [5, 22, 30]. 따라서, 이러한 창상치유의 궁극적인 목적은 반흔을 최소화하면서 가능한 빨리 창상부위가 감소하도록 하는 것이다 [2, 14].

최근 고령화에 따른 대표적인 노인성질환 중 하나인 당뇨병의 합병증으로서 피부질환이나 장기입원환자의 욕창, 피부염 등의 만성피부질환으로 고생하는 환자가 증가하고 있는 추세이다. 대부분의 만성피부질환이나 화상과 같이 광범위한 피부손상이나 진피층의 결손이 있는 경우에는 세포외기질의 자연재생이 일어나지 않아 치유에 상당한 시간이 소요되며, 그 예후가 좋지 못한 것으로 보고되고 있다 [30, 34]. 이에 따라, 창상치유를 위한 신속하고 효과적인 치료 방법이나 진피 기능을 대체할 만한 인공피부나 창상피복제 개발의 필요성이 대두되고 있다.

피부창상치료를 위한 창상피복제로 사용되는 생체재료는 조직에서 흡수성이 우수하여야 하고, 동시에 조직을 재생할 수 있어야 한다. 현재 인공피부 개발은 생체적합성이 우수한 비세포성 물질인 알긴산, 키토산 및 하이알론산 등의 폴리사카라이드 계통과 교원질, 젤라틴 등의 단백질 계통 및 poly(lactic acid), poly(lactic-co-glycolic acid) 등의 합성고분자 계통의 물질을 중심으로 진행되고 있다 [4, 19, 27, 36].

이 중 실크피브로인(SF)은 누에에서 추출하여 제조한 전형적인 자연 고분자물질로 오랫동안 직물의 섬유소재 및 봉합사와 같은 의, 공학 소재로 이용되어 왔다 [37]. 최근에는 SF를 생체에 적용할 때 염증반응을 거의 일으키지 않으면서, 섬유모세포나 각질세포 등에 세포 부착 능력과 증식효과가 뛰어나서 생체 적합성이 우수한 인공피부의 소재로서 많은 관심이 모아지고 있다 [23, 24, 32]. 따라서 SF는 인공피부 개발에 응용가능성이 높아, 의료용 소재의 한계를 극복할 대체 물질로서 개발하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 [25, 41].

하이알론산(HA)은 수분을 다량 함유할 수 있는 특징을 가지고 있기 때문에 세포 외 기질을 수화시켜 조직 내 수분의 항상성을 유지함으로써 상처치유과정의 여러 단계에 걸쳐 상처치유를 촉진하고, 다양한 세포의 이동과 증식을 자극하여 조직복원을 증진시킬 수 있다고 보

고되어왔다 [6, 8, 35, 40]. 또한, HA는 다양한 물리적 형태로 이용되어 관절수술, 조직공학, 약물의 이동 등을 위한 생체재료로도 이용되고 있다 [15, 25, 30, 38, 39]. 이러한 여러 보고에서 밝혀진 바에 따라, SF와 HA의 복합체는 상처 드레싱에 이용 가능하며, 상처 치유에 필요한 요구를 충족시킬 수 있는 매우 효과적인 재료로서의 가능성이 있다.

본 실험에서는 인위적으로 실험동물에 전층 결손 창상을 유발시킨 후, SF, HA 및 그 복합체(SF/HA)를 스폰지의 형태로 제작하여 창상에 적용시키고, 이를 대조군과 비교하여 창상면적의 감소 정도를 측정함으로써 창상 치유 효과를 비교하였다. 또한 SF/HA 혼합 스폰지의 효과를 판단하기 위하여 면역, 조직학적 방법과 분석을 통하여 상피세포의 재생피화와 교원질의 침착 정도 및 PCNA 발현 세포의 정도를 평가하여 창상치유촉진을 위한 인공피부 소재로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 체중 250~300 g의 수컷 Sprague-Dawley 종 랫트(8주령, 한림실험동물)를 실험동물로 사용하였고, 동물실은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도로 조절하였으며, 명암은 주야 12시간으로 자동 조절하였다. 또한, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 모든 실험동물은 1주 동안 동물실 환경에 적응 시킨 후, 실험에 사용하였다.

전층 결손 창상의 유발

모든 실험군에서 창상유발 2시간 전에 항생제를 근육 주사하고, 8% chloral hydrate(400 mg/kg)를 복강 주사하여 전신 마취시킨 후, 전기제모기로 백서의 등 부위 털을 제거하였다. 등 부위에 10% povidone-iodine과 70% ethanol을 각각 도포하여 소독한 뒤, 양쪽 두 부위에 소독된 수술용 가위를 이용하여 직경 2 cm의 크기로 진피층을 포함한 원형의 전층 결손 창상을 유발하였다.

실험재료 제조(sponge) 및 실험군

본 실험에서 창상의 치유정도를 알아보기 위한 실험재료로 사용된 sponge는 이전에 보고된 바와 같은 방법으로 제조되었다 [20]. SF 및 HA 단독 함유된 sponge와 SF/HA 복합 처리된 sponge(SF/HA(5:5, 7:3))는 SF 1%와 HA 1%의 혼합으로 제조되었다. 각 용액은 10:0, 7:3, 5:5, 0:10의 비율로 30분 동안 실온에서 혼합되었다. SF/HA(5:5, 7:3) sponge는 SF와 활성화된 HA의 화학결합으로 가교된 형태의 SF/HA 복합 처리된 sponge

(SF/HA(5 : 5, 7 : 3))가 혼합비율을 달리하여 일정온도에서 동결 건조하여 제조되었다.

창상의 처치

각 sponge가 나타내는 창상 치유 효과를 측정하기 위해 창상부위의 크기에 맞게 SF 및 HA 단독처리군과 SF/HA(7 : 3, 5 : 5)처리군을 각각 동일하게 직경 2 cm로 절단하여 창상부위를 덮고, 대조군에는 아무런 처치도 하지 않았다. 모든 처리군의 날짜별 실험동물의 수는 각각 5마리로 하였다. 이후, sponge 탈락을 방지하기 위해 멸균된 거즈(Tegaderm; 3M Health Care, USA)를 감고, 그 위에 탄력밴드(Coban; 3M Health Care, USA)를 움직임에 지장이 없도록 감아주었다.

창상치유의 속도 측정

창상의 면적을 측정하기 위해, 전층 결손 창상 유발 직후의 크기를 최초 창상면적으로 하고, sponge 처치 후 3, 7, 10, 14일 경과 시 일어나는 창상면적의 변화를 창상외부 경계를 따라 창상의 크기를 투명한 멸균 필름용지에 그린 후 스캔을 시행하였다. 다음으로 영상분석장치(Metamorph; Universal image, USA)를 이용하여 잔여 창상면적을 측정하였으며, 백분율로 환산하여 치유속도 및 절반 치유일(HT_{50})을 계산하였다. Residual wound area(%) = $[R_{(3,7,10,14)} / R_{(0)}] \times 100$, $R_{(0)}$ 와 $R_{(3,7,10,14)}$ 은 수술 직후와 수술 후 3, 7, 10, 14일째의 창상면의 넓이를 나타낸다.

면역·조직학적 검사

창상 유발 후 3, 7, 10, 14일째에 조직 검사용 실험동물을 안락사시켜, 원형 창상 전체가 포함된 조직을 채취하고, 10% 중성 formalin 용액에 24시간 고정된 후, 창상 증상을 통과하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 paraffin 블록에 포매하였다. 조직을 4 μ m 두께로 조직절편기(RM2125; Leica, Germany)를 이용하여 절단한 다음 polylysine으로 coating된 slide에 붙여 paraffin 제거 및 합수과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin 염색과 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 또한 창상내의 세포분화유무와 정도를 측정하기 위하여 proliferation cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 항체를 이용하여 avidin-biotin-peroxidase(ABC)법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다.

가. Hematoxylin-Eosin 염색

조직절편을 xylene을 이용하여 paraffin을 제거한 후 100, 90, 80, 70% alcohol과 증류수로 10분간 함수시켰으며, 증류수로 세척한 후 사용하였다. Harriss hema-

toxylin으로 10분간 염색하였고, 흐르는 물에 조직을 5분간 세척하였다. 1% acid alcohol을 떨어뜨린 후 다시 흐르는 물에 세척하였다. 희석된 ammonia water에 반응 후 10분간 흐르는 물로 세척하였다. 세척이 끝난 조직을 다시 80% alcohol에 2분간 처리 후 Eosin으로 2분간 반응을 유도하였다. 70, 80, 90, 100% alcohol 및 xylene을 이용하여 탈수한 후 Permout(Fisher, USA)로 봉입하였다.

나. Masson's trichrome 염색

조직절편을 xylene을 이용하여 paraffin을 제거한 후 100, 90, 80, 70% alcohol과 증류수로 10분간 함수시켰으며, 증류수로 세척하였다. 56°C에서 Bouins 용액에 한 시간 동안 조직을 반응시킨 후 흐르는 물에 조직이 깨끗해질 때까지 세척하고, 최종적으로는 증류수로 세척하였다. Weigerts ion hematoxylin으로 10분간 반응을 유도한 후, 흐르는 물에 조직을 10분간 세척하고 다시 증류수로 세척하였다. 반응과 세척이 끝난 조직을 다시 Biebrich scarlet-acid fuchsin으로 15분간 처리한 후 증류수로 세척하였다. phosphomolybdic-phosphotungstic acid로 10분간 처리한 후 Light green으로 다시 1분간 발색하였으며, 증류수로 세척하였다. 70, 80, 90, 100% alcohol 및 xylene을 이용하여 탈수한 후 Permout(Fisher, USA)로 봉입하였다.

다. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 면역조직화학염색

PCNA에 대한 면역조직화학반응을 유도하기 위해 조직절편을 xylene을 이용하여 paraffin을 제거하고 100, 90, 80, 70% alcohol과 증류수로 10분간 함수시킨 후 최종적으로 phosphated buffered solution(PBS)으로 세척하였다. 함수 과정과 PBS세척을 마친 조직을 3% 과산화수소에 30분간 반응시킨 다음 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 또한 비특이 단백질 결합을 억제하기 위하여 조직 절편을 실온에서 3% 표준혈청(normal rabbit serum; Vector, USA)을 사용하여 1시간동안 처리하였다. 일차 항체(PCNA, 1 : 100; DAKO, USA)의 처리는 4°C에서 12시간 이상 반응을 유도하였으며, 반응 후 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 2차 항체에 대한 처리는 biotin이 표지된 rabbit anti-mouse IgG(1 : 200; Vector, USA)를 이용하여 실온에서 1시간동안 반응시켰으며, 세척 후 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC kit; Vector, USA)를 사용하여 마찬가지로 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 특이적 결합 반응을 유도하였다. 반응이 끝난 조직은 세척과정을 거친 후, 0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-0.03% H₂O₂로 발색시켰다.

영상분석

Hematoxylin-Eosin 염색된 조직을 광학현미경(Axioscope; Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 창상 경계면을 현미경 시야 하에서 200배율로 촬영하고, 영상분석장치를 이용하여 창상의 경계면에서 500 μm 까지의 길이에 선택적으로 염색된 신생상피에서 그 면적을 측정하였다.

Masson's trichrome 염색된 조직에서는 창상 경계면을 현미경 시야 하에서 100배율로 촬영하고, 영상분석장치를 이용하여 육아조직에 선택적으로 염색되는 색상 중, 3개 이상의 표본을 추출하여 평균값에 해당되는 면적을 측정하여 영상분석하였다.

PCNA 발현 세포의 수를 분석하기 위하여 동일한 광학현미경을 이용하여 창상 경계면을 현미경 시야 하에서 cooled CCD camera(Micromax Kodak 1317; Princeton instrument, USA)를 이용하여 200배율로 영상을 수집하고, 영상분석장치를 이용하여 Gray level 평균값이 70% 이상의 intensity에서 PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포 수를 측정하였다.

통계학적 처리

Metamorph program에 의해 자동으로 측정된 값을 이용하여 통계 처리하였으며, 실험결과로 얻은 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 각 처치군 사이의 전반적인 효과 차이를 ANOVA test를 통해 검증하였다. 대조군과의 통계학적 유의성은 unpaired t-test로 검증하였고, 각 처치군과의 비교는 Student Newman-Keuls test를 실시하였다. 유의수준은 5% 미만에 두었다.

결 과

창상 치유 속도에 있어서 SF/HA복합체의 효과

창상 유발 후 3일, 7일, 10일, 14일 째의 창상면적의 감소 정도를 스캔 후 영상분석장치를 이용하여 측정하고, HA처치군 및 SF처치군과 SF/HA(7:3, 5:5) 처치군에서의 각 시점 별 창상치유면적의 정도를 백분율로 환산하여 비교하였다(Fig. 1). 창상 유발초기인 3일째부터 SF처치군, SF/HA(7:3)과 SF/HA(5:5)처치군에서 창상의 크기가 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 창상 유발 7일째와 10일째는 HA 처치군, SF 처치군 및 SF/HA(7:3)과 SF/HA(5:5)의 모든 처치군에서 대조군에 비해 창상의 크기가 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 또한, 창상 유발 3일, 7일, 10일째 SF/HA(5:5) 처치군에서는 HA 처치군과 SF 처치군에 비해서도 유의한 창상 치유 효과를 나타내었다.

특히 창상 유발 7일째, SF/HA(5:5) 처치군에서 대조군과 HA 및 SF 각 처치군 뿐만 아니라, SF/HA(7:3) 처

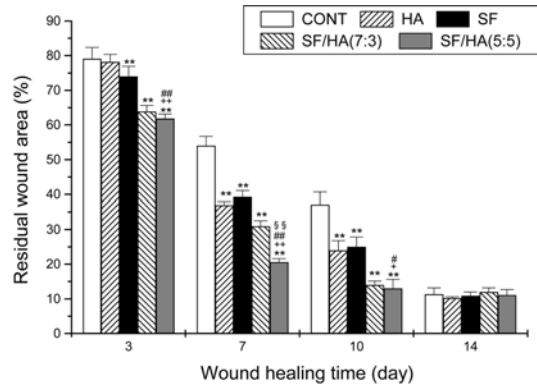


Fig. 1. The effect of silk fibroin (SF), hyaluronic acid (HA) and silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (7:3, 5:5) sponges on the degree of wound healing. (**: $p < 0.01$ as compared with control (CONT), +,+: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with HA, #, ##: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with SF, §§: $p < 0.01$ as compared with SF/HA (7:3)).

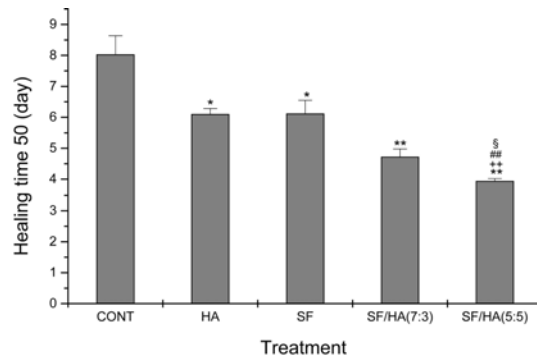


Fig. 2. Healing Time 50% (HT₅₀) of silk fibroin (SF), hyaluronic acid (HA) and silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (7:3, 5:5) sponge treated groups. (*, **: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with control (CONT), ++: $p < 0.01$ as compared with HA, ##: $p < 0.01$ as compared with SF, §: $p < 0.05$ as compared with SF/HA (7:3)).

치군에 대해서도 유의한 창상 치유 효과를 나타내어 ($p < 0.01$), 복합체 중에서도 SF/HA(7:3)보다 SF/HA(5:5)가 더욱 우수한 창상 치유 효과를 보였다.

창상유발 후, HA 및 SF의 단독처치군과 SF/HA복합체(7:3, 5:5) 처치군의 창상치유과정에서 절반치유일수 (HT₅₀)를 비교하였다(Fig. 2). HA, SF, SF/HA(7:3)와 SF/HA(5:5)의 모든 처치군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 특히 SF/HA(5:5) 처치군은 HA 처치군과 SF 처치군에 비해서도 통계적으로 유의한 차이를 보여주었고, 또한 SF/HA(7:3) 처치군에 비해서도 절반치유일이 유의하게 낮아($p < 0.05$) SF/HA(7:3)보다 SF/HA(5:5) 처치가 초기 창상치유에 우수함을 보여

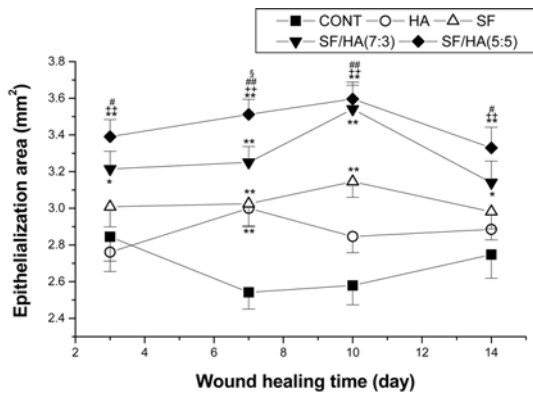


Fig. 3. The proliferative effect of silk fibroin (SF), hyaluronic acid (HA) and silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (7 : 3, 5 : 5) sponges on the epithelialization. (*, **: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with control (CONT), ++: $p < 0.01$ as compared with HA, #: $p < 0.05$ as compared with SF, ##: $p < 0.01$ as compared with SF, §: $p < 0.05$ as compared with SF/HA (7:3)).

주었다.

HA와 SF의 단독처치군에서는 절반치유일이 각각 6.11 ± 0.18 일 및 6.12 ± 0.43 일로서 유사하게 나타났고, SF/HA(7:3), SF/HA(5:5) 처치군에서는 절반치유일이 4.73 ± 0.25 일과 3.95 ± 0.07 일로 관찰되어 SF/HA(5:5)가 가장 단시간내에 절반치유일에 도달하는 것을 확인하였다.

상피재생(epithelialization)에 있어서 SF/HA복합체의 효과

창상 유발 후, 3일, 7일, 10일, 14일째의 상피재생면적의 정도를 H-E 염색을 통해 HA 및 SF의 단독 처치군과 SF/HA(7:3, 5:5) 처치군에서 각 시점 별로 비교하였다(Fig. 3). SF/HA(7:3, 5:5) 처치군에서 창상유발 3일째부터 14일째까지 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며, 또한 SF/HA(5:5) 처치군에서는 3일, 7일, 10일 및 14일째 모두에서 HA와 SF 단독처치군에 비해 유의한 차이가 나타났다. 특히 7일째에서는 대조군과 단독처치군 뿐만 아니라 SF/HA(7:3) 처치군에 비해서도 유의한 차이를 나타냄으로써 ($p < 0.05$) SF/HA(5:5) 처치군이 가장 우수한 상피재생 능력을 가지고 있음을 보여주었다.

SF/HA복합체가 교원질(collagen) 침착에 미치는 영향

창상 유발 후, 3일, 7일, 10일, 14일 째의 교원질 침착의 정도를 Masson's trichrome 염색을 통해 HA 처치군 및 SF 처치군과 SF/HA복합체(7:3, 5:5) 처치군에서 각

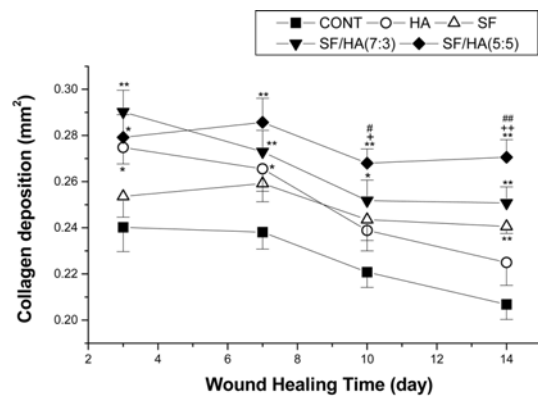


Fig. 4. The effect of silk fibroin (SF), hyaluronic acid (HA) and silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (7 : 3, 5 : 5) sponges on the collagen deposition of dermal layer. (*, **: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with control (CONT), +: $p < 0.05$ as compared with HA, ++: $p < 0.01$ as compared with HA, #: $p < 0.05$ as compared with SF, ##: $p < 0.01$ as compared with SF).

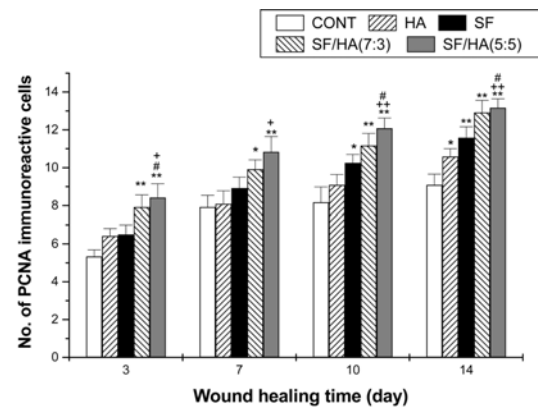


Fig. 5. The number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactive cells on epidermal basement membrane cell. (*: $p < 0.05$ as compared with control (CONT), **: $p < 0.01$ as compared with CONT, +, ++: $p < 0.05$, $p < 0.01$ as compared with HA, #: $p < 0.05$ as compared with SF).

시점 별로 비교하였다(Fig. 4). 창상유발초기인 3일째와 7일째는 HA 처치군과 SF/HA(7:3)과 SF/HA(5:5) 처치군에서 교원질 침착이 대조군에 비해 유의하게 많았다. 또한, SF/HA(7:3)과 SF/HA(5:5) 처치군에서는 HA 처치군과 SF 처치군에 대해서도 유의한 효과를 보여주었다.

SF/HA복합체가 PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 발현에 미치는 영향

PCNA antibody를 이용한 면역조직화학 염색을 통해 창상치유과정에서 상피세포증식에 관련된 PCNA에 대

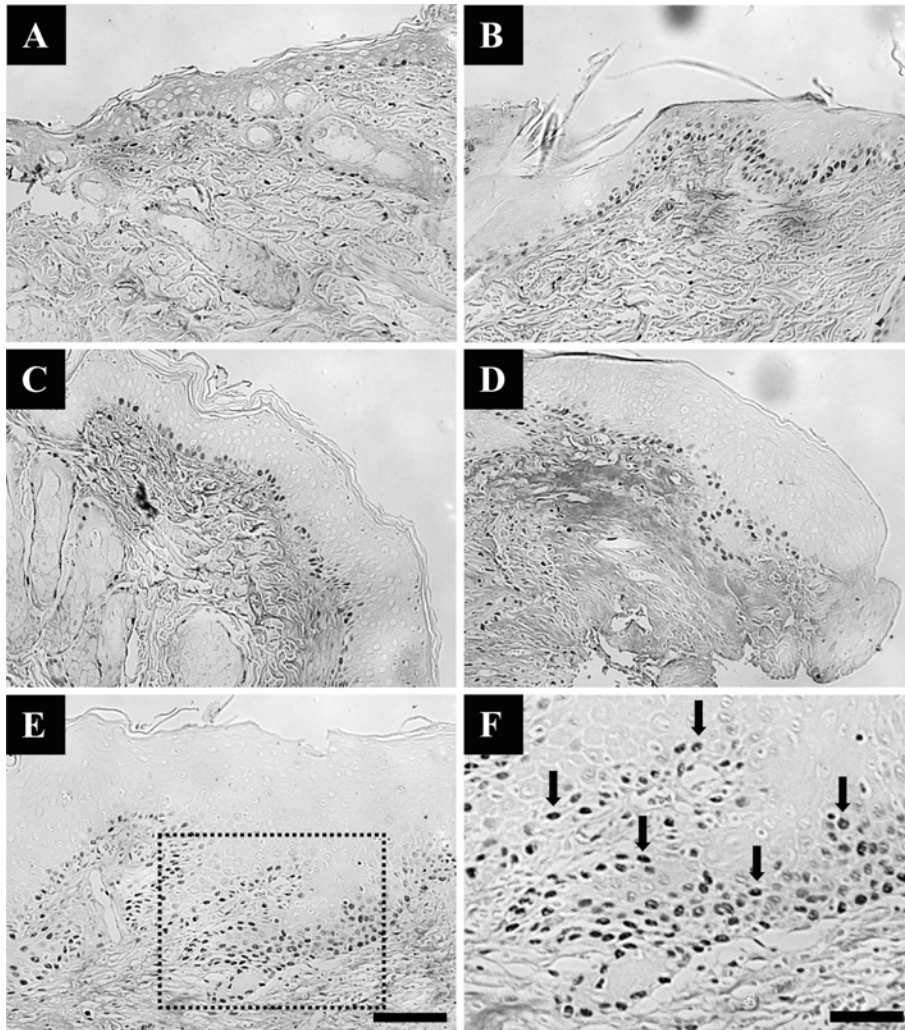


Fig. 6. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactive cells on the postoperative 7 day. (A) control group, (B) hyaluronic acid (HA) treated group, (C) silk fibroin (SF) treated group, (D) silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (7 : 3) treated group, (E) silk fibroin/hyaluronic acid (SF/HA) blend (5 : 5) treated group. (F) The higher magnification of the box drawn in panel (E). Black arrow, representative PCNA immunoreactive epidermal cells. Scale bar; 100 μ m in panel (E) (\times 200), 50 μ m in panel (F) (\times 400).

한 양성 면역반응을 나타내는 세포 수를 HA 처치군 및 SF 처치군과 SF/HA(7 : 3, 5 : 5) 처치군에서 각 시점 별로 비교하였다(Fig. 5와 6). SF/HA(7 : 3, 5 : 5) 처치군에서 대조군에 비해 창상유발 3일째부터 PCNA 발현 세포 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한, SF/HA(5 : 5) 처치군에서는 HA 처치군과 SF 처치군에 비해서도 유의한 차이를 나타내었다. 반면, SF 처치군에서는 10일째부터 대조군에 비해 유의한 증가를 보였고, HA 처치군에서는 14일째만 유의한 차이를 나타내었다.

고 찰

창상 치유는 파괴된 조직을 회복시키는 복잡한 생물학적인 과정이며, 재상피화, 창상수축, 육아조직형성 및 교원질 합성 등을 포함한 여러 과정을 통하여 이루어진다. 이러한 과정은 동시에 일어나며, 반흔을 형성하거나, 조직의 재생을 유도하여 창상면적이 감소되는 것이 일반적이다 [2, 14]. 창상면적의 감소는 재상피화와 수축이라는 서로 다른 치유 기전에 의해 동시에 유도되는 현상이므로 창상면적의 변화만으로는 창상 치유에

대한 영향을 명확하게 평가할 수 없다. 하지만, 창상면적의 감소율을 측정하는 것은 창상치유의 주요한 목적인 상처부위의 회복 속도를 확인하는데 적절한 평가 방법이다 [3, 10, 21, 26]. 본 실험에서 창상 유발 3일, 7일과 10일째 SF/HA(5:5) 처치군에서는 HA 처치군과 SF 처치군에 비해서도 유의한 창상 치유 효과를 나타냄으로 단독처치군에 비해서 SF/HA복합체가 창상치유에 우수함을 나타내었으며, 특히 창상 유발 7일째는 복합체 중에서도 SF/HA(7:3)보다 SF/HA(5:5)가 더욱 우수한 창상 치유 효과를 보였다. 이는 이미 7일째가 되기 전에 창상면적의 반 이상이 덮여 HA와 SF 각각의 치유 효과가 상승작용을 나타낸 것으로 보인다.

창상부위에서 상피의 재생과정은 필수적이며, 창상 후 24시간이 지나면 창상경계면의 진피층에서 떨어져 나온 기저세포가 분열하기 시작하여 피부의 결손부위로 이동하게 된다. 섬유소 그물을 따라 창상 경계면에서부터 창상 중심부로 이동하던 기저세포는 창상 반대쪽에서 이동해 오던 다른 기저세포와 서로 접하게 되어 이동을 멈추게 되며, 표피의 두께가 정상이 될 때까지 유사분열을 계속하여 상피세포의 밀도를 증가시키게 된다 [5, 22]. 본 실험의 7일째에서는 SF/HA(5:5) 처치군이 대조군과 단독처치군 뿐만 아니라 SF/HA(7:3)처치군에 비해서도 유의한 차이를 나타냄으로 가장 우수한 상피재생 능력을 나타내었다. 이는 SF의 뛰어난 세포 증식효과가 상피재생을 촉진시키고 [23, 24, 31, 32], HA의 수분유지능력이 가피 형성을 촉진시킴으로써 상피세포를 주위 환경으로부터 보호하는 역할을 수행하는 것으로 보여진다 [34, 39].

창상의 수축은 근섬유모세포의 수축력에 매개되는 것으로 알려져 있다. 이러한 근섬유모세포는 정상피부의 섬유모세포에서 유래하며, 이는 창상 주위세포에서 분비되는 성장인자들에 의해 영향을 받는다 [12, 29, 33]. 또한, 섬유모세포는 창상 내로 이동하여 증식하고, 복구 조직의 기본골격이 되는 교원질의 합성에 중요한 역할을 한다 [7]. 창상 초기에 교원질과 기질이 육아조직을 형성하기 시작하며, 결손부위를 채우게 되고, 혈관 형성이 활발해 진다. 교원질 1형과 3형이 피부기질을 구성하는 주된 요소임이 알려져 있으며, 또한 대식세포에서 분비하는 섬유모세포 성장인자와 혈관 내피세포 성장인자에 의해 내피세포의 증식, 분화과정을 거쳐 새로운 모세혈관이 형성된다 [9]. SF는 교원질 합성에 중요한 역할을 하는 섬유모세포, 각질세포 등의 세포에 대한 부착 능력과 성장을 촉진하는 것으로 보고되었으며 [24, 31, 32], 수분 및 산소투과성을 증진시킴으로 상처치유 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있다 [37]. HA는 창상 초기에 상처부위 내로 섬유모세포와 내피세포의 유입을

유도하고, 육아조직을 형성한다고 보고되었다 [28, 38, 39]. 또한 동물실험에서도 HA는 쥐와 햄스터의 전층 피부 결손창상에서 피부상처 치유를 증가시키는 것이 보고되어 왔다 [1, 11, 18]. 본 실험결과는 SF/HA 복합체의 처치가 창상치유 초반부에 주로 작용하여 창상치유 효과가 상승작용을 나타낸 것으로 볼 수 있다.

세포의 증식능력을 나타내는 표지자 중의 하나인 PCNA는 분열중인 핵 내에서 발견되는 단백질로서 PCNA에 대한 면역염색은 특정 조직의 분열정도의 지표가 될 수 있으며, 육아조직의 형성 및 상피화 정도의 지표로서 보고되었다 [13, 17]. PCNA는 증식되는 상피와 진피의 땀샘, 모낭 등에서 핵이 증식되는 형태로 나타나고, 상피화의 과정에서 PCNA는 분화하고 있는 상피의 기저세포에서 잘 관찰된다. SF/HA 복합체(5:5) 처치가 창상치유 전 기간 동안 상피조직의 기저세포 증식을 가장 활발하게 유도하고 있음을 본 실험에서 관찰할 수 있었다. 백서의 전층결손창상에서 표피성장인자가 함유된 하이알론산-젤라틴 복합체가 PCNA 면역염색법을 통해 창상 치유 과정에서 세포증식에 효과적이라는 것이 밝혀진 바 있고 [16], 알긴산-젤라틴 복합체가 창상치유를 촉진하는 결과도 보고되었다 [4]. 이러한 보고들은 SF/HA 복합체가 상피세포 증식을 촉진시킴으로서 창상 치유과정에 탁월한 효과를 나타낼 수 있다는 본 실험의 결과를 뒷받침하고 있다.

결론

본 연구에서는 상처치유와 관련된 SF/HA 복합체의 중요한 기능으로서 창상치유속도 및 절반치유일수에 대한 효과가 증대되는 것을 확인하였으며, 조직 및 면역조직화학적 분석을 통해 재생피화 및 교원질의 침착에 대한 촉진 효과와 증식성 기저 세포수의 증가를 확인함으로써 SF/HA 복합체의 상처치유 촉진효과를 검증하였다. 또한 SF/HA 복합체 처치군에서도 특히 SF/HA(5:5) 복합체가 SF/HA(7:3) 복합체보다 우수한 창상치유효과를 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 사용된 SF/HA(5:5) 복합체는 상처 보호막으로서의 역할 뿐만 아니라, 창상치유속도를 촉진하는 인공피부로서의 역할도 수행할 수 있으리라 평가된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구사업(grant No. R01-2002-000-00391-0) 및 전북대학교 Research Funds(2004)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. **Abatangelo G, Martelli M, Vecchia P.** Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: histological observations. *J Surg Res* 1983, **35**, 410-416.
2. **Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC.** Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci* 1985, **82**, 7340-7344.
3. **Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS.** Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J Pediatr Surg* 1997, **32**, 1017-1021.
4. **Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam SY.** Studies on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials* 1999, **20**, 409-417.
5. **Coulombe PA.** Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 2003, **121**, 219-230.
6. **Culp LA, Murray BA, Rollins BJ.** Fibronectin and proteoglycan as determinants of cell-substratum adhesion. *J Supramol Struct* 1979, **11**, 401-427.
7. **Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH.** Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res* 1985, **5**, 481-492.
8. **Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM.** Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987, **57**, 673-686.
9. **Ehrlich HP.** Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 1988, **2**, 149-157.
10. **Estes JM, Vande Berg JS, Adzick NS, MacGillivray TE, Desmouliere A, Gabbiani G.** Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds. *Differentiation* 1994, **56**, 173-181.
11. **Foschi D, Castoldi L, Radaelli E, Abelli P, Calderini G, Rastrelli A, Mariscotti C, Marazzi M, Trabucchi E.** Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats. *Int J Tiss React* 1990, **12**, 333-339.
12. **Gabbiani G.** The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 1996, **192**, 708-711.
13. **Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm. *J Pathol* 1990, **162**, 285-294.
14. **Hasan W, Zhang R, Lin M, Warn JD, Smith PG.** Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res* 2000, **300**, 97-109.
15. **Hellström S, Laurent C.** Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations: An experimental study. *Acta Otolaryngol Suppl* 1987, **442**, 54-61.
16. **Hong SR, Chong MS, Lee SB, Lee YM, Song KW, Park MH, Hong SH.** Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *J Biomater Sci Polymer* 2004, **15**, 201-214.
17. **Isik FF, Ferguson M, Yamanaka E, Gordon D.** Proliferating cell nuclear antigen: A marker for cell proliferation in autopsy tissues. *Arch Pathol Lab Med* 1992, **116**, 1142-1146.
18. **King SR, Hickerson WL, Proctor KG, Newsome AM.** Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery* 1991, **109**, 76-84.
19. **Kubo K, Kuroyanagi Y.** Spongy matrix of hyaluronic acid and collagen as a cultured dermal substitute: evaluation in an animal test. *J Artif Organs* 2003, **6**, 64-70.
20. **Lee KG, Kweon HY, Yeo JH, Woo SO, Lee JH, Park YH.** Structural and physical properties of silk fibroin /alginate blend sponges. *J Appl Polym Sci* 2004, **93**, 2174-2179.
21. **Liu M, Warn JD, Fan Q, Smith PG.** Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res* 1999, **297**, 423-433.
22. **Martin P.** Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997, **276**, 75-81.
23. **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* 1995, **208**, 511-516.
24. **Minoura N, Tsukada M, Nagura M.** Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane

- treated with methanol. *Polymer* 1990, **31**, 265-269.
25. **Nakamura M, Hikida M, Nakano T.** Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr Eye Res* 1992, **11**, 981-986.
 26. **Nedelec B, Dodd CM, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE.** Effect of interferon-alpha2b on guinea pig wound closure and the expression of cytoskeletal proteins in vivo. *Wound Repair Regen* 1998, **6**, 202-212.
 27. **O'Donoghue JM, O'Sullivan ST, Beausang ES, Panchal JI, O'Shaughnessy M, O'Connor TP.** Calcium alginate dressings promote healing of split skin donor sites. *Acta Chir Plast* 1997, **39**, 53-55.
 28. **Oksala O, Salo T, Tammi R, Häkkinen H, Jalkanen M, Inki P, Larjava H.** Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1995, **43**, 125-135.
 29. **Park JS, Kim JY, Cho JY, Kang JS, Yu YH.** Epidermal growth factor (EGF) antagonizes transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen lattice contraction by human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 2000, **23**, 1517-1520.
 30. **Pruitt BA, Levine NS.** Characteristics and uses of biological dressings and skin substitutes. *Arch Surg* 1984, **119**, 312-322.
 31. **Roh DH, Kang SY, Kim JY, Kwon YB, Kweon HY, Lee KG, Park YH, Baek RM, Heo CY, Choe J, Lee JH.** Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J Mater Sci Mater Med* 2006, **17**, 547-552.
 32. **Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M.** In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* 1999, **46**, 382-389.
 33. **Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G.** Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 1994, **425**, 3-24.
 34. **Singer AJ, Clark RA.** Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999, **341**, 738-746.
 35. **Toole BP.** Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 1997, **242**, 35-40.
 36. **Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T.** Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* 1999, **20**, 1407-1414.
 37. **Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S.** Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol* 2001, **29**, 91-97.
 38. **Weigel PH, Frost SJ, McGary CT, LeBoeuf RD.** The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int J Tiss React* 1988, **10**, 355-365.
 39. **Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD.** A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theoret Biol* 1986, **119**, 219-234.
 40. **West DC, Kumar S.** The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 1989, **183**, 179-196.
 41. **Yoo MK, Kweon HY, Lee KG, Lee HC, Cho CS.** Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of silk-fibroin and poloxamer macromer. *In J Biol Macromol* 2004, **34**, 263-270.