

## 당뇨가 유발된 햄스터 창상치유에 미치는 벼세포 유래 GM-CSF의 효과

한규범<sup>1</sup>, 허시현, 정진주, 한만덕, 김완중\*, 신길상

<sup>1</sup>(주)헨슨바이오텍, 순천향대학교 자연과학대학 생명과학과

## Rice Cell Origin Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (rrhGM-CSF) Could Improve the Wound Healing in Diabetic Hamster

Kyu Boem Han<sup>1</sup>, Si Hyun Heo, Jin Ju Jeong, Man Deuk Han, Wan Jong Kim\* and Kil Sang Shin

<sup>1</sup>Hanson Biotech Co., Ltd., Daejeon 305-811, Korea

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

(Received August 14, 2009; Accepted September 24, 2009)

### ABSTRACT

GM-CSF is a multipotent growth factor, which also plays an important role during the process of wound healing. rrhGM-CSF was specifically produced from rice cell culture in our laboratory (Hanson Biotech Co., Ltd, Daejeon). The rrhGM-CSF contains more oligosaccharide side chains than any other types of GM-CSF. This work was taken to evaluate the influence on wound healing of rrhGM-CSF in male golden hamsters. Full thickness skin defects of 9 mm in diameter were made in the back of hamsters, and 100  $\mu$ L ointment containing rrhGM-CSF 50  $\mu$ g/mL was applied. Control groups were given ointment without rrhGM-CSF. The wound sizes were relatively reduced and skin was well regenerated in the experimental group compared with the control group. Structurally, reepithelialization and architecture of the skin following injury were well accomplished in the experimental group. And also, positive reaction of PCNA of the skin following injury was more prominent in rrhGM-CSF containing ointment treatment group. Since this type of GM-CSF has highly glycosylated side chains, the effectiveness might be retain longer and stable, regarding acceleration of wound healing in the animal model. The present study has important implications for further development of the therapeutic manipulation of wound healing using rrhGM-CSF.

**Keywords :** Hamster, rrhGM-CSF, Wound healing

### 서 론

상처치유 과정에는 일련의 생화학적, 물리학적 작용은 물론 다양한 종류의 세포들이 관여하게 된다. 상처 유발 후 혈관이

확장되고 모세혈관 삼투압이 증가함에 따라 백혈구들이 상처 부위로 이동하는데, 주로 호중구와 대식세포가 감염된 조직이나 세포성 물질들을 제거하며 상처 가장자리부터 포피화가 시작된다. 상처 치유과정은 응고, 염증 혹은 손상 조직과 같은 일련의 과정을 거친 후 세포증식, 이동, 혈관생성, 세포외

본 연구는 지식경제부 차세대신기술개발사업비(00014839-2008-32)로 이루어졌음.

\* Correspondence should be addressed to Wan Jong Kim, Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea. Ph.: (041) 530-1251, Fax: (041) 530-1256, E-mail: wjkim56@sch.ac.kr

기질 합성 및 축적의 순으로 재상피화(reepithelialization)하고 재구성됨으로써 종결된다. 이 과정은 세포 간 상호작용이 필수적이며, cytokine이나 성장인자가 세포 표면의 수용체들과 결합함으로써 시작된다 (Brem & Tomic-Canic, 2007).

GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)는 골수 내 progenitor cell들을 자극하여 과립구 및 대식세포로 발달하도록 하며, 127개의 아미노산들로 구성되어 있고 분자량 23 kDa 정도의 당단백질 성장인자이다 (Kaplan et al., 1992; Bussolino et al., 1994; Hill et al., 1995). 또한, 피부 손상 직후 각질세포(keratinocyte)에서 분비되어 autocrine 방식으로 표피세포의 증식을 촉진함으로써 상처회복을 도와주는 다기능(pleiotropic) cytokine이다 (Braunstein et al., 1994; Malik et al., 1998). 특히 GM-CSF 국소 적용은 만성적 피부 궤양과 같이 치유가 어려운 환자들의 상처회복에 도움을 주는 것으로 보고되어져 있다 (Fararh et al., 2005).

재조합 GM-CSF는 주로 대장균 또는 효모를 숙주로 이용하여 생산되어져 왔으나, 최근 배양 중인 벼세포(rice cell) 유래 재조합 rrhGM-CSF가 헨슨바이오텍(주)에서 생산되었다. 식물세포를 숙주로 하여 단백질을 생산하는 과정은 상대적으로 생산비용이 저렴하고, 바이러스 혹은 프리온과 같은 감염원으로부터 안전하며, 현탁배양이 가능한 장점들이 있다. 또한 대장균 유래 GM-CSF에 비해 당사슬이 매우 풍부한 것으로 분석되었으며, 당단백질에서 당화(glycosylation)의 정도는 물질의 안정성 혹은 효과의 지속성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 2008).

본 연구에서는 식물세포에서 재조합기술을 응용하여 생성된 rrhGM-CSF의 상처치유 효능을 확인하고자 하였다. Streptozotocin을 주사하여 인위적으로 당뇨를 유발하여 자연치유를 지연시킨 후, 햄스터의 등 피부에 상처를 일으키고, rrhGM-CSF가 포함된 연고를 도포하여 상처치유효과를 대조군과 비교하였다. 시간 경과에 따른 상처의 육안적인 변화를 관찰하여 상처크기를 측정하였고, 수일 간격으로 재생 중인 피부조직을 적출하여 통상적인 광학현미경 표본을 제작하고 관찰하여 재상피화 정도를 비교함으로써, 식물세포로부터 얻어진 rrhGM-CSF의 효과를 조사하였다. 또한 증식 중인 세포에서 뚜렷하게 증가하는 것으로 알려져 있는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 분포 정도와 피부조직 내 localization 등을 확인하기 위하여 면역조직화학적 염색을 실시하여 관찰함으로써, rrhGM-CSF가 피부상처 치유과정에 미치는 세포증식 효과를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물로는 일정한 조건에서 7일간 기초 사육된 5주령

90 g 내외의 수컷 성체 골든 햄스터(Golden hamster, *Mesocricetus auratus*)를 사용하였다. 대조군과 실험군은 각각 10마리씩 사용하였으며, 관찰 및 분석과정에서의 인위적인 오류를 방지하기 위하여 이중맹검(double blind test)을 실시하였다.

### 2. 당뇨 및 상처유발

골든 햄스터의 만성 당뇨를 유발하기 위해 Sigma사의 streptozotocin을 사용하였고, 실험군에 적용된 rrhGM-CSF는 헨슨바이오텍(주)에서 개발한 것을 제공받아 사용하였으며 대조군으로는 삼아제약(주) 제품의 base cream을 사용하였다.

만성 당뇨유발은 Phares (1980) 방법을 개량하여 적용하였다. 골든 햄스터를 하루 한 번씩 3일 동안 50 mg/kg의 streptozotocin을 복강 주사하여 1주일간의 당뇨 유발 기간을 거친 후 햄스터의 꼬리에서 탄색으로 채혈하고 혈당검사지와 측정기(Roche Co.)를 이용하여 측정하였다. 만성 당뇨가 유발된 햄스터의 등쪽 털을 제모기를 이용하여 깎은 후 제모제로 2차적으로 털을 제거하고, 알코올로 소독한 후 양쪽으로 지름 9 mm의 크기로 피부 전 층을 제거하였다. 오른쪽 상처는 실험군으로 rrhGM-CSF를 50 µg/mL 들어있는 연고 100 µL 적용하였고, 왼쪽은 대조군으로 rrhGM-CSF를 섞지 않은 base cream 100 µL를 적용하였다. 또한 시험 물질의 손실을 막고, 창상의 자연적인 수축을 방지하기 위해 건식밴드와 의료용 테이프를 이용하여 드레싱을 해주었다. 시험물질 적용 후 각각 3일, 6일, 9일째에 상처부위의 가피를 제거한 후 육안으로 비교 관찰하고, 조직을 생검하였다.

### 3. H-E 표본제작

적출된 피부조직을 10% neutral buffered formalin (pH 7.2)에 고정된 후, 흐르는 물로 수세하여 남아있는 고정액을 제거한 후 에탄올 60%부터 무수 에탄올까지 농도를 상승시키면서 탈수하고, 에탄올과 자일렌 1:1과 자일렌 100%로 2회, 자일렌과 파라핀 1:1 비율로 치환한 후 파라핀 침투과정을 거쳐 동일한 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하였다. 파라핀 블록은 회전식 박절기(rotary microtome, Leica Co.)를 사용하여 5 µm 두께로 박절하고 슬라이드글라스 위에 부착 후 건조시켰다. 이어서 자일렌으로 파라핀을 제거하고 무수에탄올에서 60% 에탄올까지 함수과정을 거친 후, 수세하고 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 이중염색하였다. 염색된 조직은 다시 탈수과정을 거치고 캐나다 발삼(Canada balsam)으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 4. PCNA-면역조직화학 표본제작

증식 중인 세포에서 뚜렷하게 증가하는 것으로 알려져

있는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 발현 양상을 조사하기 위해 면역조직화학 표본을 제작하였다. H-E 염색한 슬라이드와 같은 방법으로 조직표본을 제작하고 DAB chromogen kit와 anti-PCNA를 이용하여 면역조직화학(immunohistochemistry)적 방법으로 조사하였다(Hall et al., 1990). 파라핀에 포매된 피부 조직을 microtome을 이용하여 5µm의 두께로 자른 후, 자일렌에 각 5분씩 2회 처리하여 파라핀을 제거하였다. 흡수된 조직을 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 처리하고 Immunotech kit (Immunotech Co.)를 이용하여 anti-PCNA를 4°C에서 하루 동안 처리하였다. 2차 항체(biotinylated secondary antibody)와 streptatavin peroxidase를 10분씩 처리한 후, DAB로 발색시키고, 헤마톡실린으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 5. 전자현미경표본 제작

재생 중인 골든 햄스터 피부의 미세구조 변화를 관찰하고자 전자현미경 표본을 제작하였다. 4% glutaraldehyde 고정액에 전고정한 조직을 0.1 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.2)으로 20분씩 3회에 걸쳐 수세 후, 1% OsO<sub>4</sub> 고정액으로 1시간 동안 후고정하고 마찬가지로 0.1 M 인산완충용액으로 수세하였다. 60% 에탄올부터 무수 에탄올까지 농도 상승 순으로 각 20분씩 탈수한 후, propylene oxide로 10분씩 2회 치환하였다. NMA (nadiac methyl anhydride), DDSA (dodecenyl succinic anhydride), Poly/Bed 812 Resin (Epon)과

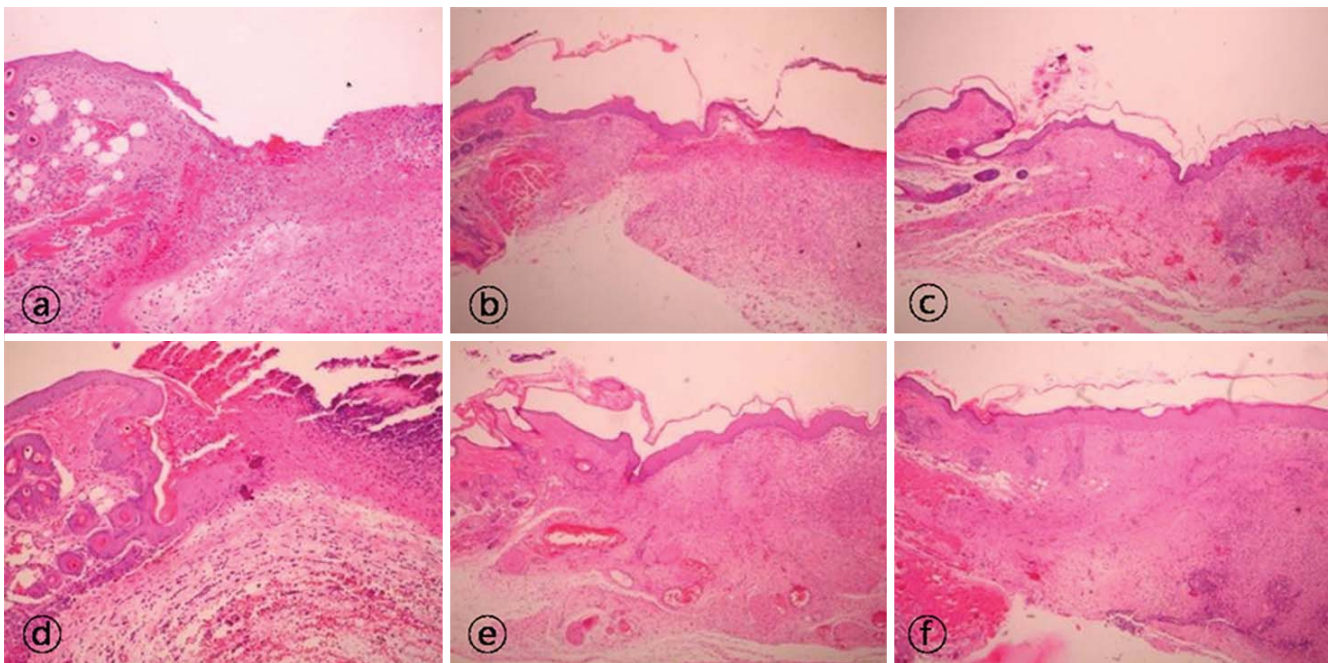
DMP-30(dimethyl aminomethyl)로 조성된 Epon 혼합액으로 포매하고 60°C dry oven에서 72시간 중합하였다. 포매된 조직은 초박절편기(Reichert supenmova ultramicrotome, Leica Co.)를 이용하여 80 nm 두께로 초박절편하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후, 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL Co.)으로 80 kV하에서 관찰하였다.

## 결 과

실험군과 대조군에서 상처회복 정도를 알아보기 위해 시험물질인 rrhGM-CSF를 적용한 후 3일, 6일, 9일에 육안으로 관찰하였다. Base cream만을 적용한 대조군의 경우 3일째 상처에서 삼출물이 많이 보였고, 6일째에서는 고름도 관찰되었으며, 재생피화가 많이 진행되지 않아 실험군에 비해 상처크기가 큰 것을 볼 수 있었다. 한편 실험군의 경우 6일

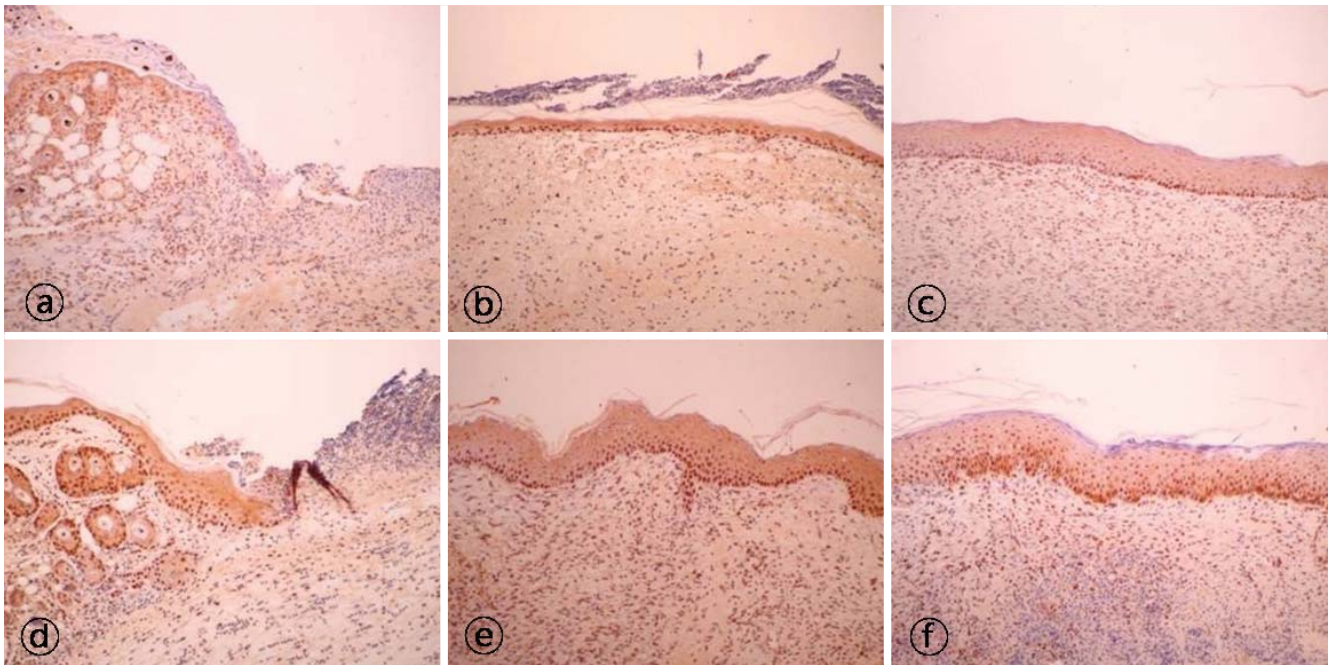
**Table 1.** Relative wound sizes at various days after injury in two groups of treatment of base cream (control group) and rrhGM-CSF containing ointment (experimental group). Data were expressed as mean±S.D.

Groups	Days after injury			
	0	3	6	9
Control (%)	100.00	54.07±0.15	31.11±0.09	1.60±0.02
Experimental (%)	100.00	42.33±0.18	16.92±0.08	0.53±0.01

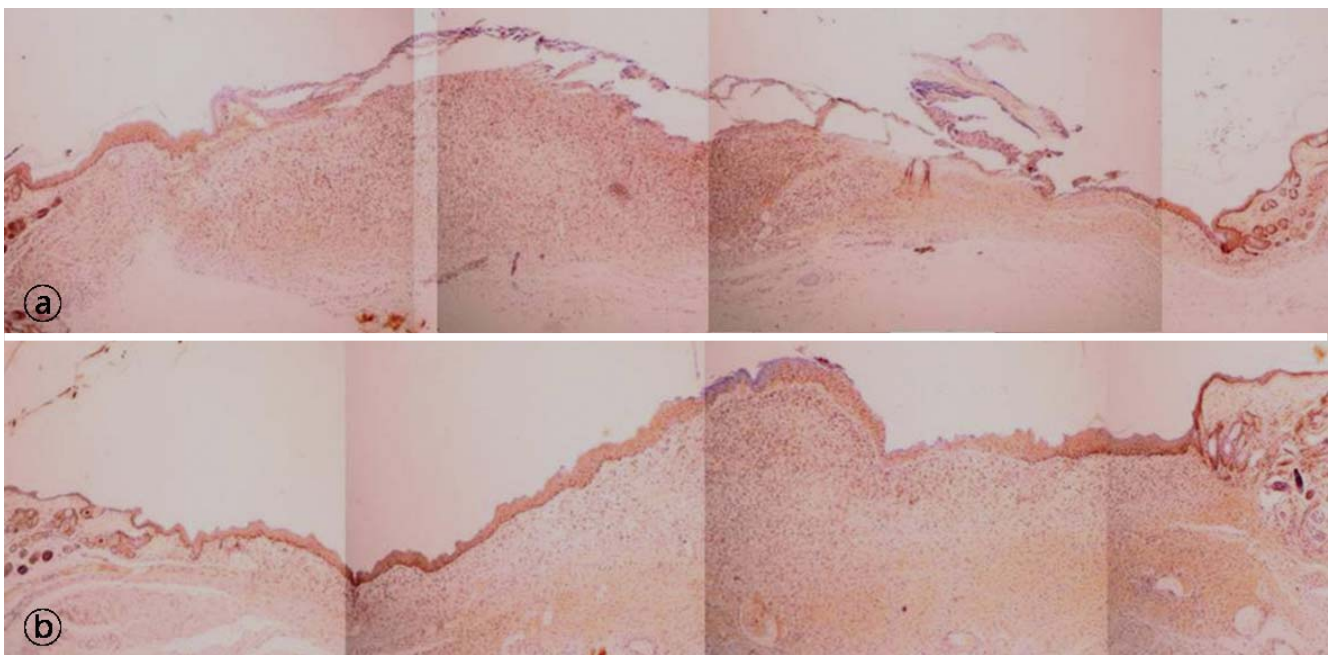


**Fig. 1.** Light micrographs of the hamster skin at 3 days (a, d), 6 days (b, e) and 9 days (c, f) after injury and treatment with only base cream (a, b and c) or rrhGM-CSF containing ointment (d, e and f). Reepithelialization of the skin relatively prominent in the experimental group. H-E stain (×100).





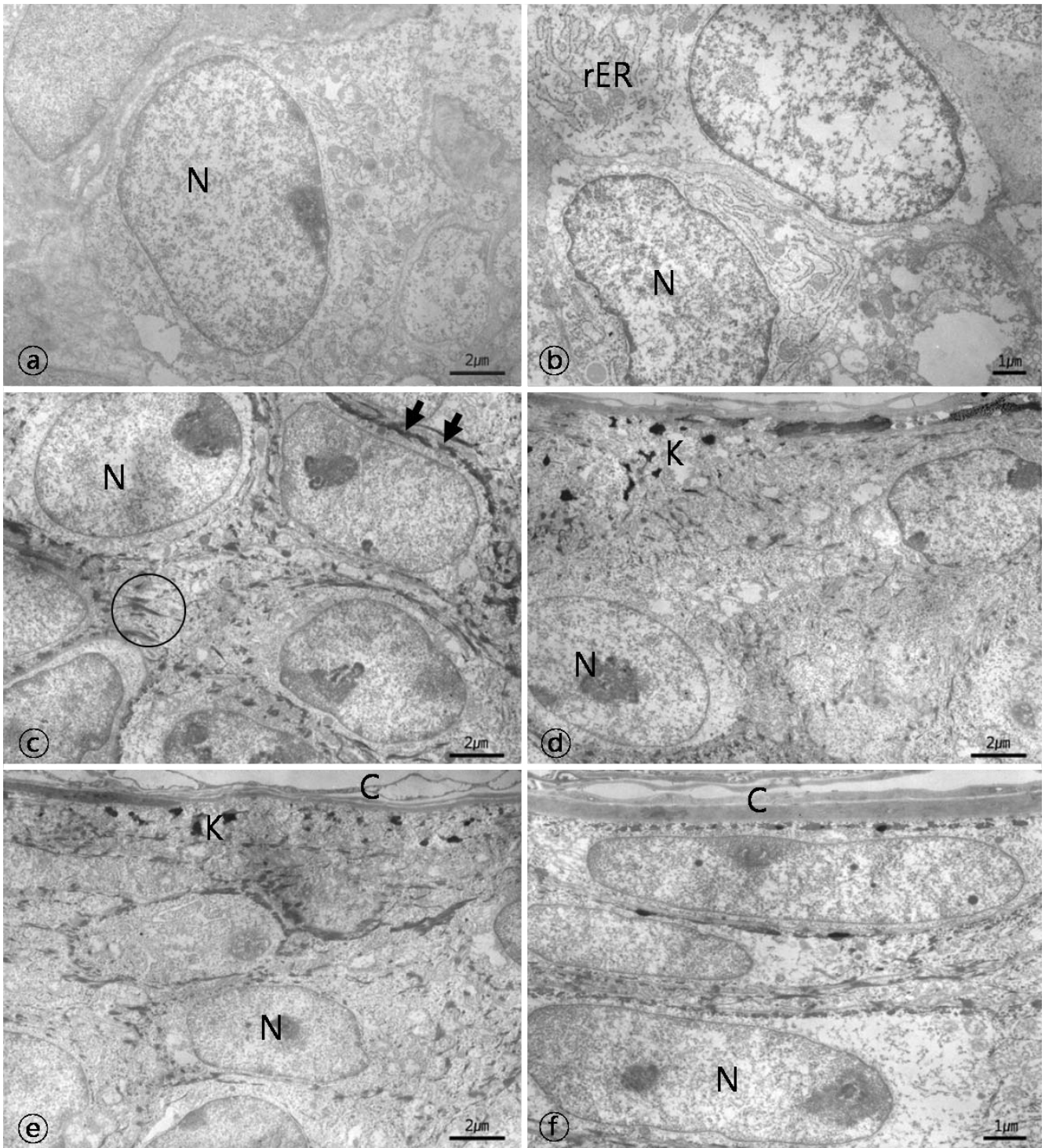
**Fig. 2.** Immunohistochemistry of PCNA at 3 days (a, d), 6 days (b, e) and 9 days (c, f) after injury and treatment with only base cream (a, b and c) or rrhGM-CSF containing ointment (d, e and f). Positive reaction of PCNA is stronger in the experimental group ( $\times 100$ ).



**Fig. 3.** Wide plane of immunohistochemistry of PCNA in hamster skin at 6 days after injury and treatment with only base cream (a) or rrhGM-CSF containing ointment (b). Positive reaction of PCNA is seen throughout the whole epidermis in the experimental group ( $\times 40$ ).

후에는 재생피화가 많이 진행되어 상처크기가 줄어든 것을 볼 수 있었다(Table 1). 9일째에는 두 그룹 모두 재생피화가 거의 완료된 것으로 관찰되었으나 rrhGM-CSF를 포함한 연

고를 적용한 실험군의 표피가 정상피부조직의 색과 더 유사하게 보였고, 대조군의 표피는 상대적으로 더 붉게 보였다.



**Fig. 4.** Electron micrographs of hamster skin at 3 days after injury and treatment with only base cream (a and b) or rrhGM-CSF containing ointment (c, d, e and f). Oval nucleus (N) and swollen rough endoplasmic reticulum (rER) of keratinocyte are seen in the control group. Tonofibrils (circle) and keratohyaline granules (K) are observed in stratum granulosum and corneum (C). Desmosomes (arrows) between cells are plentiful in the experimental group.

H-E 염색한 조직에서 3일째 대조군 피부조직의 전 층이 거의 제거된 상태로 남아 있었으나 실험군은 상처부위로

피부조직이 확장되어지는 것을 볼 수 있었다. 6일째 실험군은 재상피화가 되어 얇은 표피층을 이룬 것을 볼 수 있었으



나, 대조군은 아직도 상처 중앙 부위의 재생피화가 이루어지지 않았고 가피가 남아 있는 것을 관찰할 수 있었다. 9일 후에는 두 그룹 모두 재생피화가 거의 이루어져 있었으나 실험군의 표피가 대조군에 비해 더 두꺼운 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

면역조직화학적 방법에서는 시험물질 적용 후 3일째부터 실험군에서 대조군보다 세포증식을 하는 각질세포를 많이 관찰할 수 있었다. 6일째 재생피화 중인 피부를 비교하였을 때, 두 그룹 모두 기저층에서 활발히 세포 증식을 하는 각질세포가 많이 나타났으나 대조군보다 실험군의 표피가 더 많은 세포층으로 구성되어 있었다. 9일째의 결과에서도, 대조군의 기저층보다 실험군의 기저층에서 PCNA에 대해 양성반응을 나타내는 기저층 각질세포들이 많이 관찰되었다. 또한 이 시기에는 표피의 가장 바깥구조인 각질층도 관찰되는 것으로 보아 인위적인 창상에 의한 피부상처의 재생이 거의 완료된 것으로 관찰되었다(Figs. 2, 3).

투과전자현미경을 이용하여 관찰된 대조군 햄스터 등쪽 피부의 미세구조는 대부분 포유동물들의 특징과 유사한 것으로 나타났다. 표피 최외층에 각질층이 10여 층으로 겹쳐 있었고, 그 아래로 3~4층의 각질세포들로 이루어진 과립층, 가시층 및 종자층이 분포하였다. Base cream만을 도포한 대조군의 상처부위 주변 표피의 종자층 세포는 타원형의 핵으로 진염색질(euchromatin)들이 대부분이었고 두 층의 핵막이 분리되어 나타났으며, 세포질 내 조면소포체들이 팽창되어있는 모습도 관찰할 수 있었다. 가시층이나 과립층에서의 세포분화 정도가 정상보다 낮게 나타났고, 정상 햄스터 피부의 경우와 비교하여 각질층의 세포층 수도 적은 것을 관찰할 수 있었다. rhGM-CSF를 포함하는 연고를 도포한 실험군의 경우, 상처부위에서 재생 중인 표피는 각질층의 수가 적었고 가시층과 종자층 세포들에서 유리리보솜들이 발달한 모습을 종종 관찰할 수 있었다. 또한 핵막이 불규칙하거나 이질염색질 혹은 염색체들도 관찰되었고, 가시층에서 세포 간 연결부위에는 desmosome이 발달하였으며, 과립층에서는 초자상과립(keratohyaline granule)들의 발달이 관찰되었다. 진피층에서는 콜라겐섬유다발들이 대조군보다 더 발달되어 있는 특징을 보였고, 혈관들도 자주 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

## 고 찰

햄스터를 동물모델로 설정하여 만성 당뇨를 유발한 후, 등쪽 피부창상의 치유과정에 미치는 벼세포(rice cell)에서 유래한 재조합 GM-CSF의 효과를 광학현미경 및 면역조직화학적 방법으로 알아보고자 하였다. 본 실험에 사용되었던 정상 햄스터들의 평균 혈당치는 80 mg/dL 내외였으며, strep-

tozotocin 복강주사에 의해 혈당치가 타 연구자들의 기준과 유사한 범위인 300 mg/dL 이상인 경우를 만성당뇨가 유발된 것으로 판단하였다(Phares, 1980). 당뇨가 신체 말초부위의 상처치유를 지연시키는 기작에 대해서는 많은 보고들이 있는데, 고혈당이 손상된 피부조직에서 각질세포의 이동을 억제하고 콜라겐 및 혈관 생성을 지연시키는 것으로 판단된다(Nagumo, 1994; Lan et al., 2009; Liao et al., 2009).

실험군과 대조군에서 상처회복 정도를 알아보기 위해 시험물질 적용 후 3일, 6일, 9일에 육안관찰 결과, 대조군에서 재생피화가 많이 진행되지 않아 실험군에 비해 상처크기가 큰 것을 볼 수 있었다. 한편, 9일째에는 두 그룹 모두 재생피화가 거의 완료된 것으로 관찰되었으나 rhGM-CSF를 포함한 연고를 적용한 실험군의 표피가 정상피부조직의 색과 더 유사하게 보였고, 대조군의 표피는 상대적으로 더 붉게 보였다. 이는 대조군의 표피의 두께가 더 얇아 표피 아래쪽의 혈관이 드러나 보이기 때문이라고 생각된다(Fang et al., 2007).

창상유발 후 재생피화 과정에서 나타나는 햄스터 피부 구조를 실험군과 대조군에서 비교하기 위해 H-E 염색한 조직을 광학현미경으로 관찰하였던 바, 실험군에서 상처부위 피부조직의 재생피화가 진행되어 얇은 표피층을 이룬 것을 볼 수 있었으나, 대조군은 상처 중앙부위의 재생피화가 이루어지지 않아 손상을 입은 피부에서 일시적인 장벽 역할을 하는 가피가 남아 있는 것을 관찰할 수 있었다. 9일 후에는 두 그룹 모두 재생피화가 거의 이루어져 있었으나 실험군의 표피가 대조군에 비해 더 두꺼운 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 다른 실험동물을 이용하여 피부 전층을 제거한 후 관찰하였던 재생피화과정을 보고한 결과와 비교될 수 있다(Sta & Stepp, 2000).

PCNA는 DNA 복제 시 leading strand의 끝에 결합하여 DNA 중합효소의 작용 속도를 증가시키는 trimer로 이루어진 단백질이다(Sousa et al., 2009). 손상된 피부조직의 재생피화과정에서 세포증식의 정도를 알아보기 위해 면역조직화학적 방법을 적용하였던 바(Yamamoto et al., 2007), 분열 중인 세포의 핵은 DAB에 의한 갈색반응을 보이게 되는데, 실험군에서 대조군보다 PCNA 양성반응이 강하게 나타나는 것으로 보아, 세포증식을 하는 각질세포들이 증가한 것으로 판단할 수 있었고, 그 결과 실험군의 표피가 더 많은 세포층으로 구성되어 있었던 특징과도 일치하는 결과로 생각된다(Hall et al., 1990). 이것은 표피 상피화의 특성상 각질세포가 발달하면서 바깥쪽으로 밀려나가는 과정을 거치므로 실험군의 각질세포가 먼저 증식을 시작하여 같은 시간 동안 대조군보다 많은 층을 이룬 것으로 보인다. 9일째의 결과에서도, 대조군보다 실험군의 기저층에서 PCNA에 대해 양성반응을 나타내는 기저층 각질세포들이 뚜렷이 증가하여 있었다. 또한 이 시기에는 표피의 가장 바깥구조인 각질

층도 관찰되는 것으로 보아 인위적인 창상에 의한 피부상처의 재생이 거의 완료된 것으로 판단된다(Kawada et al., 1997; Sousa et al., 2009).

대조군 햄스터 등쪽 피부의 미세구조를 투과전자현미경으로 관찰하였던 바, 대부분의 포유동물들의 경우와 유사한 구조를 나타냈다. 외측으로 각화 중인 세포와 10여 층으로 이루어진 각질층이 분포하였고 종자층 세포들의 분비과정을 나타내는 조면소포체 발달상 혹은 골지복합체의 관찰이 두드러졌다. 가시층 혹은 과립층에서의 세포 간 연결이 미약하거나 각질층의 형성이 불완전한 것으로 나타나는 것으로 보아 창상유발에 의한 표피재생이 미흡한 것으로 생각된다. 실험군의 경우, 상처부위에서 재생 중인 표피는 각질층의 수가 적었고 타원형의 핵과 유리리보솜들이 발달한 피부세포들이 표피부위를 채우고 있었는데, 이는 세포분열을 위한 준비과정의 하나로 세포소기관들의 증가 및 단백질합성의 필요성과 연관되는 특징으로 판단된다. 세포들 간 연결부위에는 desmosome이 발달하여 세포 간 결합을 강화시키고 있었고, 세포질 내에서 초차상과립(kerato-hyaline)들도 다수 관찰되어 외측의 각질층으로 분화할 수 있는 구조를 나타냈다. 한편, 실험군의 경우 진피층 내에서는 콜라겐섬유다발들이 대조군보다 더 발달되어 있는 특징을 보였고 혈관들도 종종 관찰할 수 있었던 것으로 보아 혈관이 없는 표피층으로의 물질확산을 위한 기초를 마련하고 있는 것으로 생각된다(Repsch & Oberpriller, 1980; Khammo et al., 1997).

이상과 같이, 처음 백혈구 증식 촉진인자로 널리 알려져 있던 GM-CSF가 본 실험에서 종자층에서의 세포분열을 자극하는 것으로 확인되었고, 실험실에서 새롭게 생산한 rrhGM-CSF가 인위적으로 유발된 창상부위에서 피부세포의 증식을 유발하는 것으로 조사되었다. 즉 rrhGM-CSF가 상처 주변부의 각질세포의 증식을 자극하여 재상피화 속도를 가속화시키는 것으로 판단할 수 있었으며, 이는 최근의 다른 연구자들의 결과와도 일치하였다(Fang et al., 2007; Kim et al., 2008). 이러한 효과는 rrhGM-CSF에 풍부하게 결합된 탄수화물 측쇄의 작용으로 안정성과 지속성을 부여하면서 더욱 크게 나타나는 것으로 판단된다(Kim et al., 2008). 한편, 피부 상처의 재생 및 재상피화에 대한 정확한 기작과 rrhGM-CSF에 의한 치유효과 및 다른 종류의 GM-CSF들과의 비교효과 등에 대해서는 앞으로 더욱 깊이 있게 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

Braunstein S, Kaplan G, Gottlieb AB, Schwartz M, Walsh G, Abalos RM, Fajardo TT, Guido LS, Krueger JG: GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte pro-

- liferation in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 103 : 601-604, 1994.
- Brem H, Tomic-Canic M: Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117 : 1219-1222, 2007.
- Bussolino F, Wang FM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A: Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 6206 : 471-473, 1989.
- Fang Y, Gong SJ, Xu YH, Hambly BD, Bao S: Impaired cutaneous wound healing in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor knockout mice. *Br J Dermatol* 157 : 458-465, 2007.
- Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T: Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci* 79 : 219-223, 2005.
- 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 neoplasms. *J Pathol* 162 : 285-294, 1990.
- Hill AD, Naama HA, Calyano SE, Daly JM: The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *J Leukoc Biol* 58 : 634-642, 1995.
- Kaplan G, Walsh G, Guido LS, Meyn P, Burkhardt RA, Abalos RM, Barker J, Frindt PA, Fajardo TT, Celona R, Cohn ZA: Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* 175 : 1717-1728, 1992.
- Kawada A, Hiruma M, Noquchi H, Ishibashi A, Motoyoshi K, Kawada I: Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 289 : 600-602, 1997.
- Khammo K, McPhie P, Settle JAD, Ingham E, Kearney JN: Effect of burn patient serum on fibroblast and keratinocyte morphology. *Burns* 23 : 212-217, 1997.
- Kim HJ, Lee DH, Kim DK, Han GB, Kim HJ: The glycosylation and *in vivo* stability of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in rice cells. *Biol Pharm Bull* 31 : 290-294, 2008.
- Lan CC, Wu CS, Kuo HY, Huang SM, Chen GS: Hyperglycaemic conditions hamper keratinocyte locomotion via sequential inhibition of distinct pathways: new insights on poor wound closure in patients with diabetes. *Br J Dermatol* 160 : 1-9, 2009.
- Liao H, Zakhaleva J, Chen W: Cells and tissue interactions with glycosylated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials* 30 : 1689-1696, 2009.
- Malik IA, Zahid M, Haq S, Syed S, Moid I, Waheed I: Effect of subcutaneous injection of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on healing of chronic refractory wounds. *Eur J Surg* 164 : 737-744, 1998.

- Nagumo Y: Three dimensional architecture of the microvascular systems of the skin in wound healing processes of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 95 : 306-316, 1994.
- Phares CK: Streptozotocin-induced diabetes in Syrian hamsters: New model of diabetes mellitus. *Experientia* 36 : 681-682, 1980.
- Repesh LA, Oberpriller JC: Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Am J Anat* 159 : 187-208, 1980.
- Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE: Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci* 51 : 117-121, 2009.
- Sta Iglesia DD, Stepp MA: Disruption of the basement membrane after corneal débridement. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1045-1053, 2000.
- Yamamoto Y, Uede K, Yonei N, Furukawa F: Expression patterns of proliferating cell nuclear antigen in trichloroacetic acid peeled skin. *J Dermatol* 34 : 95-98, 2007.

일어나는 과정이다. GM-CSF는 호중구와 대식세포를 분화시키고 각질세포를 증식시키는 다면발현성 사이토카인으로 여러 세포에서 재조합되어 사용되고 있다. (주)헨슨바이오텍에서 개발한 rice cell 유래의 재조합 rrhGM-CSF는 다른 세포에서 유래된 GM-CSF들보다 탄수화물 측쇄가 많은 것이 특징이다. rrhGM-CSF의 창상치유 효과를 알아보기 위하여 햄스터에 만성 당뇨를 유도하여 상처치유가 어려운 동물모델을 만든 후, 등쪽에 인위적으로 피부 전 층을 제거하여 창상을 유발하였다. 실험군에는 rrhGM-CSF가 포함된 연고를 적용하고, 대조군에는 base cream만을 적용하여 재생피화되는 과정과 피부조직의 구조 및 PCNA 반응을 통한 세포증식 정도를 비교하였다. 육안 및 조직학적 관찰 결과, rrhGM-CSF를 적용한 그룹의 재생피화 속도가 더 빨랐으며, PCNA 면역조직화학적 조사에서도 증식하는 각질세포의 수가 대조군보다 상대적으로 많은 것으로 나타남으로써, rrhGM-CSF에 의한 피부상처 치유 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들로 미루어 보아 벼세포 유래의 rrhGM-CSF는 국소적인 피부 창상 치유에 효과적인 것으로 보이며, rrhGM-CSF의 풍부한 당화 사슬은 이 단백질이 상처부위에 안정된 상태로 기능을 나타냄으로써 효과를 오랫동안 지속시킬 수 있었던 것으로 사료된다.

#### < 국문초록 >

상처치유는 growth factor와 cytokine들의 복합적인 작용에 의해