대한성형외과학회지. 제 38 권, 제 6 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 38, No. 6, 725 - 732, 2011

C57BL/6 마우스의 등에 시행한 자가 전층피부이식편을 이용한 색소침착 동물모델

이홍기[1] · 박종림[2] · 허은주[3] · 김석화[3]

이미지 성형외과[1], 바노바기 성형외과[2], 서울대학교 의과대학 성형외과학교실[3]

Animal Skin Pigmentation Model Using Full Thickness Skin Graft in C57BL/6 Mouse

Hong Ki Lee, M.D.[1], Jong Lim Park, M.D.[2], Eun Ju Heo, M.D.[3], Sukwha Kim, M.D.[3]

[1]Image Plastic Surgery Clinic, [2]Banobagi Plastic and Aesthetic Clinic, [3]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Skin grafting is one of the most commonly used methods in reconstructive plastic surgery field, but complications such as color change, contracture or hypertrophy are common problems. However, pathophysiology of the color change after skin graft is not yet determined and no animal model is established.

Methods: Full thickness skin grafts were performed on the dorsum of C57BL/6 mice. Serial chronological gross inspection for color change and pigmentation were examined. Melanin pigments were traced by Fontana-Masson staining and semi-quantitative analysis was performed. In addition, immunohistochemical staining of S-100, Micropthalmia related Transcription Factor (MITF) and Melan-A antibodies were also performed to observe melanocytes and their changes.

Results: After skin graft, color change and pigment spots were observed in the graft. Fontana-Masson staining showed melanin pigments in the epidermal and dermal layers in all mice. Immunohistochemistry staining to S-100, MITF, Melan-A antibodies showed melanocytes at the basal layer of epidermis and dermis.

Conclusion: In conclusion, we have established an animal model for skin pigmentation after skin graft. We believe this study may be useful in understanding of the behavior of melanocytes after skin graft.

Received January 8, 2010
Revised June 9, 2011
Accepted June 21, 2011

Address Correspondence : Sukwha Kim, M.D., Ph.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University College of Medicine, Department of Pediatric Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University Children Hospital, 101 Daehang-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea. Tel: 82-2-2072-3530 / Fax: 82-2-3675-3680 / E-mail: kimsw@snu.ac.kr

Key Words: C57BL/6 mouse, Skin graft, Pigmentation, Melanocyte, Premature melanocyte

I. 서 론

피부의 결손은 성형외과 영역에서 흔히 직면하는 문제이며, 이를 재건하는 방법으로는 크게 피부이식술과 피판술이 있다. 기존에는 발생한 결손부를 피복하여 창상면을 없애고 빠른 회복을 유도하는 것이 수술치료의 주된 목적이었으나, 재건 방법들의 눈부신 발달로 요즈음은 결손 부위를 피복하는 데에 그치지 않고 재건 후 수혜부와의 기능적, 미용적인 조화를 염두에 두어 기능적으로도 문제가 없으면서도 미용적으로 좋은 결과를 얻기 위하여 많은 노력을 기울이고 있다. 이러한 결손부를 해결하기 위하여 가장 널리 쓰이는 방법은 다양한 방법의 피부이식술이다.

피부이식수술은 각각의 여타 방법들에 비하여 비교적 쉬운 술기와 적은 공여부의 이환률, 높은 수술 성공률로 널리 사용되고 있지만, 피부이식을 시행한 부위의 색상변화나 구축, 비후, 탄력성의 손실 등의 변화를 흔히 경험 할 수 있다.[1]

미용적인 측면을 세심하게 고려해야 하는 성형외과 영역에서의 수술이지만 이러한 수술들도 의료진이 원치 않는 과색소 침착(hyperpigmentation)이나 홍반(erythema)이 발생하여 만족하지 못하는 결과를 초래하는 경우가 흔히 있고, 환자에게도 만족스럽지 못한 결과로 다가오는 경우가 많다. 그러나 이러한 색소침착이나 홍반에 대한 객관적인 연구는 많지 않으며, 이의 기전에 대한 연구 또한 많지 않다.

피부이식 후에 발생하는 과색소 침착의 원인으로 여러 가지의 연구가 있었다. 피부이식편이 수축하면서 멜라닌의 밀도 증가,[2] 활성화된 멜라닌세포의 증가,[3] 멜라닌 생성과 연관된 효소의 활성도 증가,[4] 멜라닌세포와 효소의 활성화가 모두 증가하기 때문이라고 한다.[5] 그러나 아직까지 어떤 자극에 의하여 멜라닌세포가 늘어나는지, 어떠한 물질에 의하여 멜라닌의 생성이 증가되는지 등에 대한 정확한 보고는 없다.

피부의 색소침착을 관찰한 설치류 모델에서는 특수한 계통의 쥐끼리 교배시킨 쥐를 사용한 예가 있으나,[6] 이러한

특수한 종류의 쥐나 그 외의 사용동물을 보면 가격이 매우 비싸거나, 구하고 사육하기 어려운 특수한 동물들이고, 통계적으로 유의한 결과를 보이기 위하여 충분한 개체의 동물에서 실험을 시행하기 어려운 점이 있어, 보편적인 동물모델이라고 하기에는 무리가 있다.

피부의 색소침착이 아닌 피부이식과 연관된 색소침착에 대한 동물모델이나 이와 연관된 연구는 더더욱 희귀한 실정이다.

이러한 정황들로 판단하건데, 구하기 쉽고 사육이 용이하며, 실험의 재현성이 높은 동물모델의 필요성은 매우 높다고 할 수 있지만, 아직까지 널리 받아들여지는 정립된 동물모델은 없다.

본 연구에서는 C57BL/6 마우스의 등에 시행한 피부이식편에서 시행한 dopa 염색과 Fontana-Masson 염색을 통하여 멜라닌의 생성이 이루어짐을 확인한 선행 연구[7]를 바탕으로, C57BL/6 마우스의 등에 전층 피부이식을 시행한 후, 시간에 따른 색소반의 형성을 관찰하고, 헤마톡시린-에오신 염색과 Fontana-Masson 염색을 통하여 멜라닌이 생성되는 것을 확인하고 이를 정량화하여, 시간에 따른 멜라닌의 생성 및 침착 정도를 보고자 하였다. 또한 이러한 멜라닌의 생성과 침착의 세부기전을 알아보고자 다양한 면역조직화학염색을 통하여 멜라닌세포를 확인하고, 그 수적 변화와 변화 양상을 관찰함으로써, 피부이식 후 색소침착을 연구할 수 있는 동물모델을 정립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

8주령의 수컷 C57BL/6 마우스(24~26 g) 15마리의 등에 1.5 × 2 cm 크기로 피부를 절제한 후, 그 자리에 전층피부이식을 시행하고, 쌈지봉합법(tie-over dressing)으로 고정하였다. 전층 피부이식 후 5일째에 쌈지봉합을 제거하고, 1주, 4주, 8주, 12주째에 각각 제모를 시행한 상태에서 사진을 촬영하였다. 사진촬영 시 동일한 색조를 얻기 위하여, 동일한 장소와 조명하에서 동일 연구자가 촬영하였다.

피부이식 후 1주, 4주, 8주에 각각 피부이식편의 색소반으로 생각되는 부위에서 생검용 펀치를 이용하여 얻은 피부의 생검조직에 대하여 헤마톡시린-에오신 염색, Fontana-Masson 염색과 S-100, Micropthalmia related Transcription Factor (MITF), Melan-A 항체에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 방법은 파라핀에 포매한 생검 조직을 4 μm 두께로 자르고 유리 슬라이드에 부착시킨 후, 자일렌으로 파라핀을 제거하고, 에틸알코올에서 단계적으로 함수시켰다. 그리고 항원성 회복을 위해 구연산 완충액(10 mM, pH 6.0)에 담근 후, 전자렌지에서 5분씩 3번 처리하고, 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리하였다. 그 후 비특이성 반응을 제거하기 위해 serum free protein block으로 10분간 처리한 후, 일차항체인 S-100 (Polyclonal, DAKO, Glostrup, Denmark), MITF (NeoMarkers, Fremont, CA, USA), Melan-A 항체(monoclonal IgG1, DAKO)를 사용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 일차 항체반응 후, Tris-buffered saline으로 5분간 3회 수세한 다음, 이차 항체로 각각의 Envision-HRP kit (DAKO)를 이용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, streptavidin peroxidase (DAKO)로 처리하였다. 발색제로는 3-amino-9-ethyl carbazole (Sigma, St Louis, MO, USA)를 사용하고, hematoxylin으로 대조염색하였다.

멜라닌색소에 대한 분석은 Fontana-Masson 염색에서 표피의 멜라닌과 진피의 멜라닌색소 각각에 대하여 색소의 군집(cluster)이 3~4군데가 관찰될 때를 +(one positive)로 판정하여 1점을 부여하고, 5군데 이상 관찰되면 ++(two positive)로 판정하고 2점을, 1~2군데의 군집이 보이면 +-(trace)로 판정하고 0.5점을 부여하였다. 관찰되지 않을 경우는 -(negative)로 판정하고 0점으로 계산하였다.

멜라닌세포에 대한 분석은 S-100, MITF, Melan-A에 대한 염색을 시행한 슬라이드를 광학현미경을 이용하여 관찰하고, 한 장의 슬라이드 당 무작위로 선택한 400배의 시야 다섯 군데에서 각각 관찰되는 양성세포수를 세고, 그 평균을 내어 멜라닌세포의 수를 산출하였다.

통계적 분석은 윈도우버젼의 SPSS®(version 10; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 각각의 변수에 대한 비모수적인 평균치 분석을 시행하였다(Kruskal-Wallis test, Wilcoxon's signed rank test).

III. 결 과

가. 육안적 관찰에 의한 전층피부이식편의 색변화

육안소견 상 1주째에 충혈과 비슷한 검붉은 색을 보였으나, 시간이 지나며 차차 밝은 홍반에 가까운 색을 보였다. 4~8주째까지는 피부이식편의 중간에 드문드문 회갈색의 색소반과 홍반소견을 보였으며, 12주에 홍반소견은 거의 사라졌고 회갈색의 색소반은 계속 관찰되었다. 색소반의 크기나 색이 진한 정도는 쥐마다 차이가 있었으며, 사람의 피부이식편에서 관찰되는 전반적인 색소침착과는 양상의 차이가 있었다(Fig. 1).

나. 조직학적 검사에 의한 멜라닌색소의 관찰과 분석

피부이식 전과 피부이식 후, 피부이식편에서 순차적으로 채취한 피부조직에 헤마톡시린-에오신 염색과 Fontana-Masson 염색을 시행하여 슬라이드를 관찰한 결과, 모든 쥐

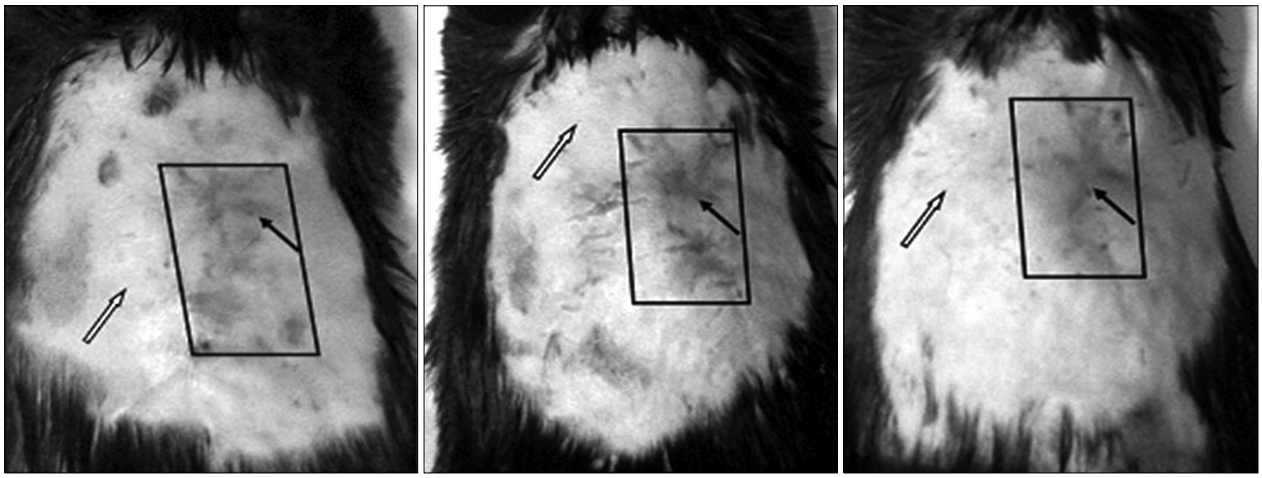

Fig. 1. Detail views of grafted skins after 12 weeks. The square box indicates the margin of the grafted skin. The grafted skin is darker in comparison to normal skin (white arrow) and brownish-gray patches are visible (black arrow).

Table I. Visual Grading Score of Epidermal and Dermal Pigmentation at Day 0, 1 Week, 4 Week, and 8 Week (average ± SD)

	0 day	1 week	4 week	8 week
Epidermal melanin	0	0.23 ± 0.12	1.31 ± 0.13	1.08 ± 0.08
Dermal melanin	0	0.23 ± 0.12	0.77 ± 0.12	0.92 ± 0.16

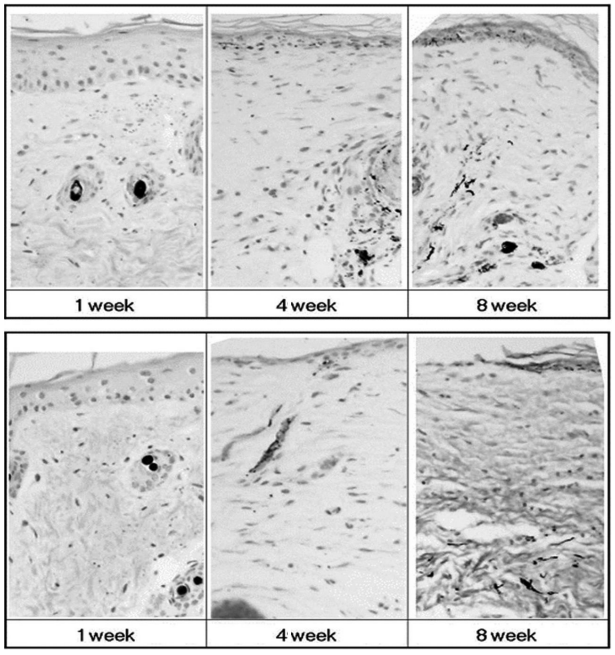

Fig. 2. Fontana-Masson staining of grafted skin (× 200). Melanin pigments are not prominent at week 1. At weeks 4 and 8, epidermal pigmentation and dermal melanophages are prominent.

에서 0일에는 모낭을 제외한 피부에서 멜라닌이 전혀 관찰되지 않았고, 1주째에는 미미한 정도의 멜라닌색소가 관찰되었으나, 4주째와 8주째에는 표피와 진피 모두에 상당한 양의 멜라닌색소가 관찰되었다(Fig. 2).

표피의 멜라닌과 진피의 멜라닌에 대한 visual grading scale 결과는 Table I과 Fig. 3에 나타나 있다.

표피의 멜라닌에 대해서, 비모수적인 방법으로 여러 그룹간의 평균치를 검정하는 Kruskal-Wallis test 상 통계적인 차이가 있어(p<0.001), 그룹 간에 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 각 그룹 간을 비교하기 위한 Wilcoxon's signed rank test에서는 0일과 4주, 0일과 8주, 1주와 4주, 1주와 8주 그룹간은 통계적으로 유의한 차이가 있었으나(p=0.001, p<0.001, p=0.002, p=0.002), 0일과 1주, 4주와 8주 그룹 간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.083, p=0.180).

진피도 표피와 같은 결과를 보여서 Kruskal-Wallis test 상 통계적인 차이가 있어(p<0.001), 그룹 간에 유의한 차이가 있었다. 각 그룹 간을 비교하기 위한 Wilcoxon's signed rank test에서는 0일과 4주, 0일과 8주, 1주와 4주, 1주와 8주 그룹간은 통계적으로 유의한 차이가 있었으나(p=0.001, p=0.002, p=0.015, p=0.006), 0일과 1주, 4주과 8주 그룹 간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.083, p=0.541).

따라서 수술 전 관찰되지 않았던 멜라닌색소는 표피와 진피 모두에서 4주째에 유의하게 증가되고, 8주째까지 유지된다고 해석할 수 있었다.

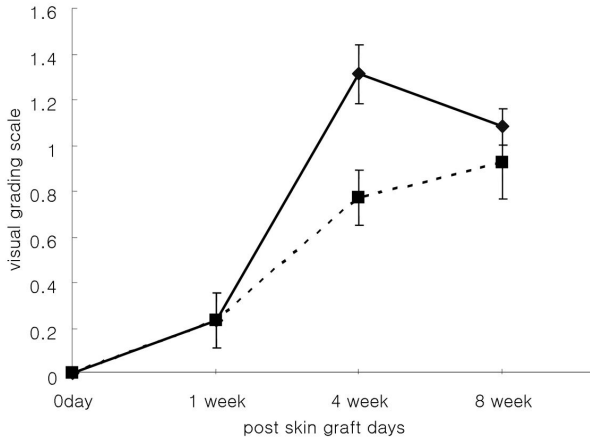

Fig. 3. Epidermal (straight line) and dermal (dotted line) pigmentation by visual grading score. There is a statistically significant increase in the epidermal and dermal pigmentation scores from day 0 and week 1 to week 4 and 8 (p<0.05). There is no statistically significant difference between week 4 and week 8 in both groups (p>0.05). Thus, we can postulate that pigmentation gradually increases until week 4 and maintains until week 8.

다. 면역조직화학염색에 의한 멜라닌세포의 관찰과 분석

S-100과 MITF, Melan-A염색에서 표피의 기저층과 그 하방의 진피에 염색이 되는 수지상의 세포들과 모낭의 bulge로 생각되는 부위나 외피(outer root sheath)로 생각되는 부위에 염색이 되는 타원형의 세포들이 관찰되었다(Fig. 4).

1주에는 모든 슬라이드에서 표피의 기저층에서 수지상 세포들이 관찰되었다. 모낭의 세포밀집부분(hypercellular area)에 타원형 세포(oval shaped cells)이 관찰되었는데, 이 세포밀집부분은 피지선 바로 아래에 있어서, bulge로 생각되는 부위이다. 수지상 세포가 모낭으로부터 기어 나오려는(creep out) 듯한 모습이 관찰되었다.

4주에는 수지상 세포의 군락들이 모낭의 외피를 따라 있었고, 타원형 세포도 역시 모낭의 외피를 따라서 관찰되었다.

8주에는 진피에 세 가지 염색에 양성인 세포들이 많아졌다. 그리고 멜라닌색소를 많이 가진 melanophage 들이 관찰되었다.

0일, 1주, 4주, 8주에 S-100과 MITF, Melan-A염색에서 400배의 시야 다섯 군데에서 각각 관찰되는 양성세포수를

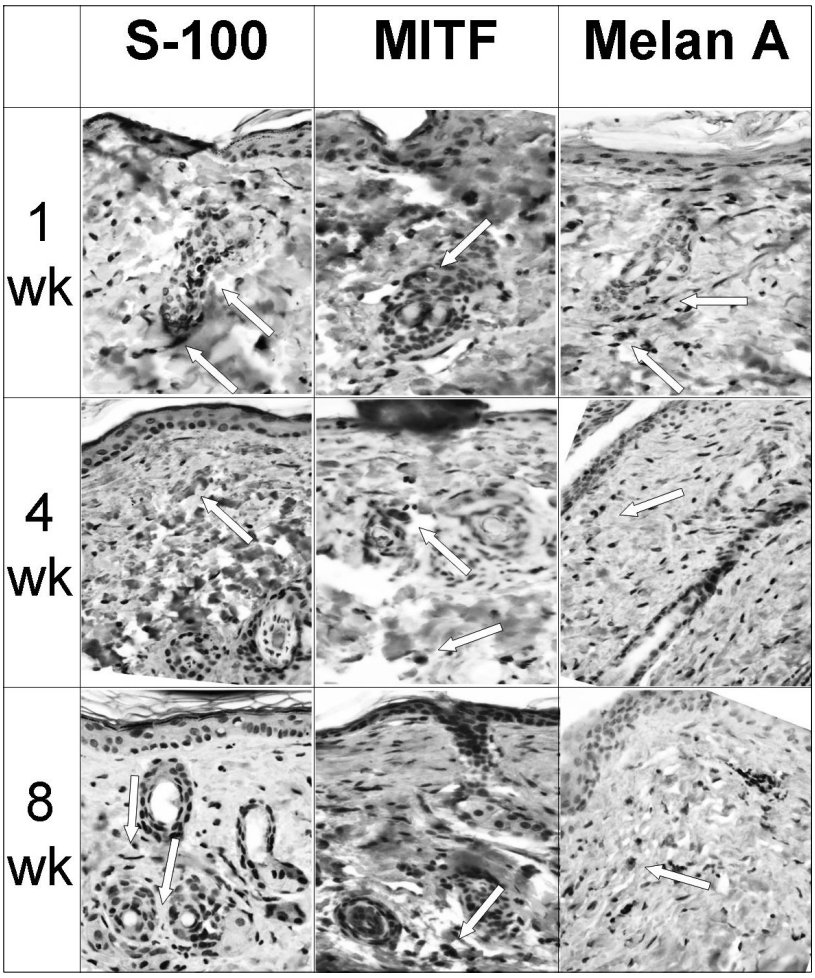

Fig. 4. S100 (left column), MITF (middle column), Melan-A (right column) staining of grafted skin at week 1 (top row), week 4 (middle row), and week 8 (bottom row). The dendritic cells in the basal layer are positively stained in all sections and oval shaped cells in the hypercellular area of hair follicles are also positively stained. These hypercellular areas are immediately below the sebaceous gland and are thought to be the bulge area. In some sections, clusters of positively stained cells are observed along the outer root sheath of hair follicle (week 1 melan A, week 4 and 8 MITF). In week 8 Melan A staining, positively stained cells are observed in abundance in the dermis. Note that melanophages are dark brown due to melanin pigments, but are not positively stained.

Table II. Number of Melanocytes by Staining with S100, MITF, and Melan-A Antibody (average ± SD). Positively Stained Cells are Counted from 5 Randomly Selected fields (× 400).

		0 day	1 week	4 week	8 week
S-100	Number	0	0.83 ± 0.15	9.00 ± 1.53	14.52 ± 1.26
	p (0 day)		0.001*	0.001*	0.001*
	p (1 week)			0.001*	0.001*
	p (4 week)				0.005*
MITF	Number	0	0.77 ± 0.16	4.95 ± 0.53	10.42 ± 0.99
	p (0 day)		0.001*	0.001*	0.001*
	p (1 week)			0.001*	0.001*
	p (4 week)				0.002*
Melan-A	Number	0	0.83 ± 0.22	6.23 ± 1.14	16.03 ± 1.96
	p (0 day)		0.008*	0.001*	0.001*
	p (1 week)			0.003*	0.001*
	p (4 week)				0.002*

p values were obtained for 0 day, 1 week, 4 weeks, and 8 weeks by the Wilcoxon's signed rank test. The number of melanocytes by staining with S-100, MITF, and Melan-A on day 0 were statistically significant at 1, 4, and 8 weeks; on week 1, at 4 and 8 weeks; on week 4, at 8 weeks. *, $p<0.01$; Number, Number of melanocytes.

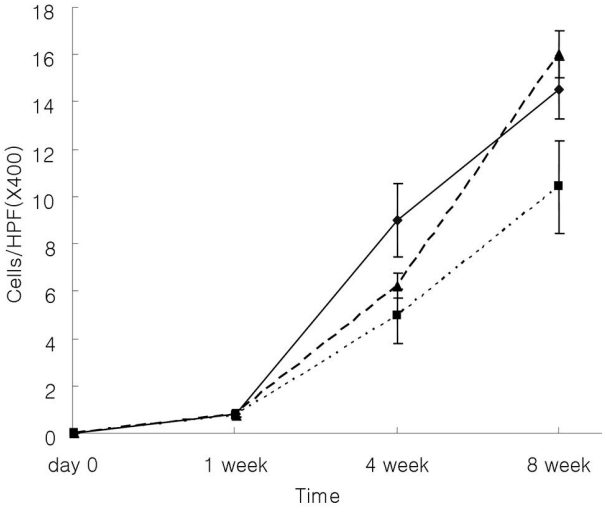

Fig. 5. The average melanocyte count at immunohistochemistry staining. S-100 is represented as a linear line, MITF as a short dotted line, and Melan A as a long dotted line. In all three stains, there are a statistically significant increase in the number of melanocytes (Kruskal-Wallis test $p<0.001$, Wilcoxon's signed rank test $p<0.05$).

세어 평균을 내서 멜라닌세포의 수를 산출한 결과는 Table II와 같고, 이를 그래프로 표시하면 Fig. 5와 같다. S-100, MITF, Melan-A 모두에서 0일, 1주, 4주, 8주의 측정값의 평균치들은 Kruskal-Wallis test에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$).

각 그룹 간을 비교하기 위한 Wilcoxon's signed rank test에서 역시 S-100, MITF, Melan-A 세 가지 염색 모두에서 0일, 1주, 4주, 8주 4가지 그룹 모두 간에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table II).

따라서 피부이식 후 시간이 경과하면서 멜라닌세포의 숫자는 2달까지 점진적으로 증가한다고 할 수 있었다.

IV. 고 찰

본 연구에서 C57BL/6마우스의 등에 전층피부이식을 시행한 결과 색소반이 발생하였고, 멜라닌색소와 멜라닌세포를 관찰하여 피부의 색소침착을 연구할 수 있는 동물모델을 확립하였다.

피부의 색소침착을 연구할 수 있는 동물모델은 그리 많지 않다. 많은 경우 기니아 픽(pigmented guinea pig)을 사용하여 피부의 색소변화를 관찰하는 연구를 시행하지만,[8] 현재 국내에서 번식이 되고 있지 않아 대부분 일본에서 수입해야한다. 이외에 피부의 색소침착을 보기위한 동물실험에 사용되는 동물들은 앞서 기술한 특수한 종류의 마우스,[6] 돼지,[9] 원숭이[10] 등이 있다.

이렇듯 몇몇 동물에서 피부의 색소침착을 보았다는 연구 보고들은 있지만, 구하기가 매우 어려운 동물이거나 동물의 크기로 인하여 실험이나 관리가 어려운 경우가 많아, 보편적인 실험동물모델이라고 하기 어렵다. 또한 이러한 동물모델들에 행하여진 실험들도 대부분 자외선을 쬔 후의 피부에 색소침착을 관찰한 경우이거나, 창상모델에서 상처 치유 후 발생한 색소침착을 본 것들이 대부분이다. 피부이식 후 색소침착을 관찰하는 모델로는 면역결핍쥐에 사람의 피부를 이종이식하고 이 피부이식편에서 색소변화를 본 경우가 있지만,[4,5] 이 경우도 이종피부를 이식했기 때문에 순수한 동물실험 모델이라 하기에는 무리가 있고, 실험을 실제로 시행하기 쉽지 않은 등의 문제점들이 있어 널리 받아들여질 수 있는 동물모델이라 하기에는 무리가 있다. 이러한 면들을 고려할 때 C57BL/6 마우스는 구하기 용이하고 저렴하며, 실험을 시행하고 관리 사육하기에 용이하여, 여타 동물과 비교할 때 동물모델로써의 가치가 높다고 생각된다.

널리 알려진 바와 같이, C57BL/6 마우스의 피부는 귀와 꼬리 등의 털이 없는 부위에는 멜라닌세포가 있지만, 정상적인 상태의 피부에는 멜라닌세포가 없고, 주로 모낭에만 멜라닌세포가 존재한다. C57BL/6 마우스의 피부에 검은 반점이 있는 경우가 있지만, 이는 털의 주기상 털을 활발하게 만드는 합성기(anagenic phase)를 포함하는 부위는 모낭의 멜라닌에 의해 검게 보이고, 이외의 주기에 있는 부위는 원래의 피부색인 분홍색으로 보인다고 알려져 있다.[11]

본 연구의 선행실험에서도 피부이식을 시행하지 않은 정상피부에서는 표피나 진피의 어떤 부분에서도 멜라닌색소가 관찰되지 않았다. 그러나 피부이식을 시행한 후 색소반이 형성되고, 순차적으로 시행한 조직생검에서 모든 쥐에서 다소간의 차이는 있으나, 멜라닌세포와 멜라닌색소가 표피와 진피에서 관찰되었다. 더구나 피부이식 후, 시간의 흐름에 따라 멜라닌세포와 멜라닌색소 모두가 증가하였다. 따라서 피부이식 후 멜라닌세포의 발생과 멜라닌색소의 침착을 보이는 C57BL/6 마우스는 앞서 기술한 여타 동물들과 비교할 때, 피부이식 후 색소침착을 보기위한 가치 있는 동물모델이라 생각되며, 존재하지 않던 멜라닌세포와 멜라닌색소가 발견된 것 뿐 만 아니라, 그 양이 증가하였다는 점 또한 큰 의미가 있다고 생각된다.

사람의 피부이식에서 발견되는 색소침착을 이해하기 위한 방법으로 사람의 피부를 면역결핍 쥐에 이식한 Matsumoto나 Faroqui 등의 실험에서도 멜라닌세포의 증가와 더불어 멜라닌세포의 활성도가 증가하여 많은 멜라닌색소를 만들어 낸다고 보고하였다.[4,5] 본 실험의 결과에서도 시간이 경과하며 멜라닌세포의 숫자와 침착되는 멜라닌의 양 모두가 증가하였고, 이러한 양상은 사람의 피부이식편에서의 색소침착 양상과 유사한 면이 있어, 이를 이해하는 데에 좋은 자료가 될 수 있다고 생각된다.

본 연구에서는 피부이식 후 1주, 4주, 8주에 생검을 시행한 조직을 대상으로 S-100과 MITF, Melan-A 염색을 하였다. 1주, 4주, 8주 모두에서 표피의 기저층과 진피에 양성으로 염색이 되는 수지상세포가 관찰되었으며, 각 항체들의 교차반응을 고려한다고 하여도 세 가지 항체 모두에서 염색이 되는 세포가 다수 관찰되어, 이 세포들을 멜라닌세포로 보는 것이 타당하다고 생각된다. 간혹 S-100염색에 랑게르한스세포나 MITF에 대식세포로 보이는 세포가 염색이 되기는 했지만, 수적으로는 미미하여 결과를 해석하는데 큰 의미는 없다고 생각된다.

면역조직화학염색 후의 멜라닌세포의 정량분석에서도 각 염색 간에 약간의 수적 차이가 있었다. 이것은 각 염색 간에 민감도(sensitivity)의 차이나 교차반응에 의하여 염색되는 세포에 차이가 있어 발생한 것으로 생각되지만, 각 염색별로 분석한 결과에 큰 차이가 없이 동일한 추세를 보여, 민감도나 교차 염색에 의한 오차는 크지 않다고 생각된다.

모낭의 줄기세포는 bulge 부위와 그 하방부에 주로 있는 것으로 알려져 있으며, bulge의 위치를 정확히 파악하는 방법은 아직까지 정립되지 않았고, 털 기립근(erector pilli muscle)의 부착 부위나 피지선(sebaceous gland)의 하방 등 상대적인 위치로 파악하여야 한다. 본 연구에서는 모낭의 bulge라고 생각되는 세포가 밀집된 부분이나, 외피라고 생각되는 부분에서 각 염색에 양성인 타원형의 세포들이 관찰되었고, 이러한 세포들은 앞에서 언급한 다른 연구결과들을 고려할 때, 멜라닌 전구세포일 가능성이 있다. 모낭 안에서 관찰된 MITF 양성인 타원형 세포가 멜라닌 줄기세포에서 멜라닌세포에 이르는 세포의 분화스펙트럼에서 어떠한 단계의 세포인지는 정확하지 않지만, 일시적 증식 상태(transient amplification)의 멜라닌 전구세포에서 MITF 유전자가 양성이라는 Osawa 등의 보고를 생각할 때,[12] 성숙한 멜라닌세포라기보다는 멜라닌세포로 분화하기로 정해진(committed) 초기단계의 미성숙 세포일 가능성이 있다. 물론 이러한 미성숙 세포들을 표피 쪽으로 유도하는 매개 물질이나, 미성숙 세포들의 분화를 야기하는 신호가 무엇인지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

쥐에서 피부이식을 시행한 후, 발견되는 멜라닌세포가 어디에서 기원하였는지에 대한 보고는 아직까지는 없다. Nishimura 등은 K14-Kitl과 Dct-Lac-Z를 모두 가지는 형질변환 마우스에서 anti-Kit 항체를 처리하여 증식하는 멜라닌세포를 제거한 쥐 실험을 통하여, 첫 모낭 주기에는 Lac-Z에 양성인 세포가 모낭의 bulge 부위에만 존재하지만, Kitl 유전자가 발현되는 관계로 이후의 모낭주기에서는 색소를 포

함하는 털을 생성하고, 주로 모낭 주위의 표피에 색소 침착이 발생하는 것을 관찰하였다. 이 실험을 통하여 모낭의 bulge 부위의 멜라닌 줄기세포가 표피의 멜라닌세포의 근원이며, 표피의 Kitl 유전자가 분화하는 멜라닌세포의 이동을 야기하였다고 주장하였다.[13] 또한 백반증의 예에서도 모낭에서 기원한 멜라닌세포가 피부의 색소침착을 일으킬 수 있다는 보고들이 있다. 백반증을 가진 피부에서는 표피-진피 경계부의 멜라닌세포와 표피층의 멜라닌 과립이 소실되어 있지만, 모낭 내부의 멜라닌 전구세포들은 유지되어 있는 것으로 알려져 있다. 백반증의 자연경과는 예측하기 쉽지 않지만, 10~20%의 환자에서는 불완전하지만 자연적으로 색소침착이 다시 일어나며, 주로 모낭주위에서 이러한 현상이 일어난다. 또한 백반증 환자에 모낭 이식을 시행한 후 발생하는 재색소화 때, 모낭의 외피(outer sheath)에 비활성 멜라닌세포(inactive melanocyte)의 수가 늘어나고, 이들이 외피와 모낭주위의 표피에 활성화된 멜라닌세포(active melanocyte)가 관찰된다는 보고들이 있다.[14] 이러한 사실들에 기반하여, 백반증의 치료에 모낭이식이 사용되고 있으며, Na 등은 21명의 백반증 환자에게 후두부에서 채취한 두피조직으로부터 모낭을 분리하여 백반증 병변에 모낭이식을 시행하여 71%의 환자에게서 이식한 모낭주위의 색소가 침착됨을 관찰하였다. 모낭주위의 색소 침착은 모낭을 중심으로 2~10 mm 정도였다고 보고하였고, 5례의 환자에서는 이식한 모낭주변의 색이 없던 털도 색을 회복하였다고 보고하였다. 이들은 이식한 모낭이 멜라닌전구 세포의 저장고(melanocyte reservoir) 역할을 하여, 여기에서 유래한 멜라닌세포가 피부의 색소 침착을 일으켰다고 해석하고 있다.[15] 이렇듯 제한적이지만 표피의 멜라닌색소가 모낭에서 유래될 가능성을 보여주는 보고들이 있으며, 이와 연관지어 생각할 때 본 연구에서 관찰된 멜라닌세포도 모낭에서 기원했을 가능성이 있다고 생각되나, 이에 대한 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

본 실험에서 쥐의 등에 피부이식 후 색소반이 생성되었고, 정상적인 상태에서 표피나 진피에 존재하지 않았던 멜라닌세포와 멜라닌이 새로 생겼음이 확인되었다. 또한 멜라닌세포와 멜라닌의 양이 피부이식 후 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 본 실험모델은 피부이식 후 색소침착에 대한 새로운 실험동물모델로 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

향후 색소침착의 세부 기전이나 멜라닌세포의 이동과 관련된 더 자세한 연구가 필요하다고 생각되지만, 본 실험은 모낭의 멜라닌세포나 멜라닌 전구세포의 분화나 이동을 연구하는 데에 있어 중요한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

C57BL/6 마우스의 등에 전층 피부이식을 시행한 후 색소반이 발생하였고, 면역조직화학 염색에서 표피와 진피에 걸쳐 멜라닌색소가 관찰되었으며, 시간 경과에 따라 증가하였다. 면역조직화학염색에서 표피의 기저층과 진피 모두에서 멜라닌세포가 관찰되었고, 멜라닌세포 역시 시간이 지나면서 숫자가 증가하였다. 또한 모낭에서 멜라닌 전구세포라 생각되는 세포들이 관찰되었다.

본 연구를 통하여 피부이식 후 피부에 색소침착을 연구할 수 있는 동물모델을 확립할 수 있었으며, 또한 모낭의 멜라닌세포와 멜라닌 전구세포의 분화나 이동을 연구하는 데에 있어 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Ratnet D: Skin grafting: from here to there. *Dermatol Clin* 16: 75, 1998
2. Conway H, Sedar J: Report of the loss of pigment in full thickness autoplastic skin grafts in the mouse. *Plast Recontr Surg* 18: 30, 1956
3. Tsukada S: Studies on the pigmentation of skin grafts: the ultrastructure of epidermal melanocytes. *Plast Reconstr Surg* 59: 98, 1977
4. Matsumoto K, Robb E, Warden G, Nordlund J: Hyperpigmentation of human skin grafted on to athymic nude mice: immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 135: 412, 1996
5. Farooqui JZ, Auclair BW, Robb E, Sarkisian E, Cooper C, Alexander JW, Warden G, Boissy RE, Norlund J: Histological, biochemical, and ultrastructural studies on hyperpigmented human skin xenografts. *Pigment Cell Res* 6: 226, 1993
6. Naganumaa M, Yagi E, Fukuda M: Delayed induction of pigmented spots on UVB-irradiated hairless mice. *J Dermatol Sci* 25: 29, 2001
7. Kim SW: Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft in C57BL mouse (I) *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 13: 391, 1986
8. Choi H, Ahn S, Lee BG, Chang I, Hwang JS: Inhibition of skin pigmentation by an extract of Lepidium apetalum and its possible implication in IL-6 mediated signaling. *Pigment Cell Res* 18: 439, 2005
9. Gallant-Behm CL, Hart DA: Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Repair Regen* 14: 46, 2006
10. Kimura T: Dermal melanocytosis in Japanese monkeys (Macaca fuscata). *Comp Med* 57: 305, 2007
11. Topping A, Gault D, Grobbelaar A, Green C, Sanders R, Sibbons P, Linge C: Successful reduction in skin damage resulting from exposure to the normal-mode ruby laser in an animal model. *Br J Plast Surg* 54: 144, 2001
12. Osawa M, Egawa G, Mak SS, Moriyama M, Freter R, Yonetani S, Beermann F, Nishikawa S: Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche.

Development 132: 5589, 2005
13. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S: Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 25: 854, 2002
14. Sardi JR: Surgical treatment for vitiligo through hair follicle grafting: how to make it easy. *Dermatol Surg* 27: 685, 2001
15. Na GY, Seo SK, Choi SK: Single hair grafting for the treatment of vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 38: 580, 1998