J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 38, No. 3, September 2012, 219-224

진피세포의 조성이 인공피부의 기저막과 표피형성에 미치는 영향

이 해 란 · 정 효 순 · 김 잔 디 · 윤 혜 영 · 백 광 진 · 권 년 수 · 민 영 실* · 박 경 찬** · 김 동 석†

중앙대학교 의과대학 생화학교실, *중원대학교 한방산업학부,
**서울대학교 의과대학 피부과학교실
(2012년 4월 19일 접수, 2012년 8월 8일 수정, 2012년 8월 15일 채택)

Effects of Dermal Cell Combination on the Formation of Basement membrane and Epidermis in Skin Equivalents

Hailan Li, Hyo-Soon Jeong, Jandi Kim, Hye-Young Yun, Kwang Jin Baek,
Nyoun Soo Kwon, Young Sil Min*, Kyoung-Chan Park**, and Dong-Seok Kim†

Department of Biochemistry, Chung-Ang University College of Medicine, Dongjak-gu, Seoul 156 - 756, Korea.
*Department of Herb Industry, Jungwon University,
**Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine
(Received April 19, 2012; Revised August 8, 2012; Accepted August 15, 2012)

요 약: 최근 유럽연합에서는 동물실험을 통하여 검증된 성분을 함유하고 있는 화장품에 대하여 판매를 금지할 것을 선언하였다. 그리하여 동물실험을 대체할 동물실험 대체모델의 개발이 필요해졌다. 인공피부는 화장품, 의약품 및 의료기기의 안전 테스트에 있어서 아주 중요한 시스템이다. 본 연구에서는 기저막과 표피를 가지고 있는 최적의 인공피부를 만들기 위한 시도를 하였다. 이러한 목적으로 중간엽줄기세표(MSCs, mesenchymal stem cells)와 지방전구세포를 진피세포인 섬유모세포와 혼합하여 진피대체물을 만들었다. 기저막과 표피의 형성은 면역조직화학 염색(immunohistochemical stains)을 통하여 확인하였다. 여러 가지 모델 중에서, 중간엽줄기세포를 혼합한 모델에서 표피의 두께가 제일 두꺼웠으며 또한 PCNA와 involucrin의 분포가 실제 사람피부와 비슷하였다. 결론적으로, 본 연구의 결과는 진피대체물에 중간엽줄기세포를 혼합한 인공피부가 동물실험 대체모델로 개발될 수 있다는 점을 제시한다.

Abstract: European Union prohibited the marketing of cosmetic products containing constituents that have been examined through animal experiments. Thus, non-animal test models are needed to replace animal experiments. The reconstructed skin models are important as a test system for cosmetic, pharmaceutical, and medical device safety testing. In the present study, we tried to develop an optimal skin equivalent model containing basement membrane and epidermis. For this purpose, we used mesenchymal stem cells (MSCs) and/or preadipocytes as well as fibroblasts as the dermal matrix cells. The formation of basement membrane and epidermis was verified by immunohistochemical stains. Among various models, the epidermis was thickest when MSCs were used in the dermal matrix. Furthermore, PCNA and involucrin distribution showed that dermal matrix with MSCs resembled human skin. Therefore, skin equivalents with MSCs could be developed as a non-animal test model to replace animal experiments.

Keywords: *basement membrane, mesenchymal stem cell, non-animal test, preadipocytes, skin equivalent*

1. 서 론

피부는 외부의 유해한 자극에 대하여 장벽 역할을 하고 체온을 조절해주며 면역기능을 하는 등 다양한 기능을 수행한다. 이러한 피부는 크게 나누어 표피, 진피 및 피하지방층으로 구성된다. 지금까지 인공피부는 화상환자 또는 정맥성 궤양환자들에게 피부이식을 할 때 주로 사용되어왔다[1,2].

† 주 저자 (e-mail: ds_kim@cau.ac.kr)

최근 유럽연합에서는 동물실험을 통하여 검증된 성분을 함유하고 있는 화장품과 위생용품에 대하여 2013년부터 판매를 금지할 것을 선언하였다. 화장품의 개발과정에서 지금까지 행하여져 왔던 동물실험의 금지 추세로 인하여 화장품 신소재 개발에 큰 장애요인이 발생하였다. 따라서 각국은 동물실험 대체법 연구기관을 설립하여 동물실험의 대체기반을 키워나가고 있는 실정이다. 인공피부는 동물실험의 대체 모델로서 매우 중요하며, 이는 새로운 화장품 신소재 개발뿐만 아니라 약물학적 피부투과 실험모델에 다양하게 사용될 수 있다.

인공피부가 동물실험 대체모델로 사용되기 위해서는 사람의 피부와 형태학적, 조직학적, 기능적으로 유사하게 만들어지는 것이 목표이다. 이를 통하여 궁극적으로 사람의 피부에 적용되는 화장품 소재의 경우 사람의 피부와 다른 동물실험의 한계를 넘어서서 이상적인 시험모델로까지 발전할 수 있는 것이다. 현재까지 사용되는 것은 콜라겐 기질에 섬유모세포를 혼합하여 배양한 후, 그 위에 각질형성세포를 배양하여 만든 3차원 인공피부모델이다[3]. 사람에게 직접 이식하게 되는 이식용 인공피부와는 달리 동물실험대체용 인공피부는 면역부작용을 걱정할 필요가 없고, 일차 배양한 사람의 세포가 아니라 세포주나 동물유래 세포 및 구성물의 사용에서 자유롭게 인공피부를 구성할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 실제 사람 피부에 근접한 인공피부를 구축하기 위한 한 방편으로 다양한 종류의 세포와 그들의 조합을 사용하였다. 특히 진피에 다양한 세포 종류를 혼합하여 기저막과 표피의 구성에 영향을 줄 수 있는 진피대체물을 만들기 위한 시도를 하였다.

섬유모세포는 인공피부의 3차원 모델에서 세포이동과 matrix remodeling에 영향을 준다[4]. 중간엽줄기세포(MSC, mesenchymal stem cells)는 섬유모세포로 분화할 능력을 가지고 있는 세포로서 상처치료에 도움을 준다는 연구보고가 있다[5]. 중간엽줄기세포는 골수에서 처음으로 분리되었고 현재는 골막, 혈액막, 골격근, 말초혈액 및 지방조직에서도 분리할 수 있다고 보고되었다[6]. 본 연구에서는 지방조직에서 분리한 중간엽줄기세포를 사용하였다. 지방전구세포는 최근 성형외과 영역에서 지방조직의 재건에 많이 사용하는 세포로서 기계적인 자극이나 허혈성 조건에 저항성을 가지고 있는 세포이다[7].

따라서 본 연구에서는 섬유모세포, 중간엽줄기세포 및 지방전구세포를 일정비율로 혼합하여 진피대체물을 만들었으며 그것이 표피와 기저막 형성에 주는 영향을 비교하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 세포배양

각질형성세포주(HaCaT)는 Cell Lines Service (Eppelheim, Germany)에서 구입하였고, 쥐의 지방전구세포주(3T3-L1)와 사람의 CCD-25Sk 섬유모세포주(CCD-25Sk human fibroblasts)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 5 %의 CO_2 37 ℃ 하에서 10 %의 fetal bovine serum (FBS), 50 μg/mL의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 DMEM 배지에서 37 ℃, 5 % CO_2의 조건하에서 배양하였다.

중간엽줄기세포는 피하지방조직으로부터 분리하여 배양하였다. 피하지방조직은 피하지방 제거술을 받은 28세에서 40세의 환자로부터 동의하에 얻었다. 그 방법을 간단히 설명하면 지방조직을 500 x g에서 5 min 원심분리 후 상층만 분리하여 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 0.075 % type I collagenase로 처리하여 37 ℃, 5 % CO_2 환경에서 30 min 정치하였다. DMEM 배지를 넣어 준 후 1,200 xg으로 10 min 원심 분리하여 pellet은 160 mM NH_4Cl 으로 현탁 후 상온에 10 min 반응을 하고 다시 DMEM 배지를 넣어 준 후 1,200 xg으로 10 min 원심 분리하여 부유물은 버리고 가라앉은 세포를 100 mm culture dish에 접종하여 10 % FBS와 50 μg/mL의 스트렙토마이신 및 50 U/mL의 페니실린을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37 ℃, 5 % CO_2 환경에서 배양하였다.

2.2. 콜라겐 추출

흰쥐의 꼬리에서 콜라겐을 함유한 tendon을 뽑아 70 % 에탄올에 3 분 담가놓은 뒤 PBS로 세척을 해주고 일정 정도 물기를 뺀 다음 0.1 % acetic acid에 넣어 4 ℃에서 일주일 동안 교반하여 최종농도가 10 mg/mL이 되도록 제 I형 콜라겐을 추출하였다.

2.3. 인공피부의 배양

진피는 흰쥐의 꼬리에서 추출한 I형 콜라겐, 10x 완충액(0.05 N NaOH, 0.26 mM $NaHCO_3$, 200 mM HEPES), 10x 배양액(DMEM : Ham's nutrient mixture F12 = 3 : 1), 5 mg/mL 히알루론산(Hyaluronic Acid : HA) 및 0.33 g/mL 녹각교(시원생약(주), 충북 진천)를 준비하여 콜라겐, 10x 완충액, 10x 배양액, 히알루론산과 녹각교를 각각 7.5 : 1 : 1 : 0.4 : 0.1 비율로 혼합하여 진피

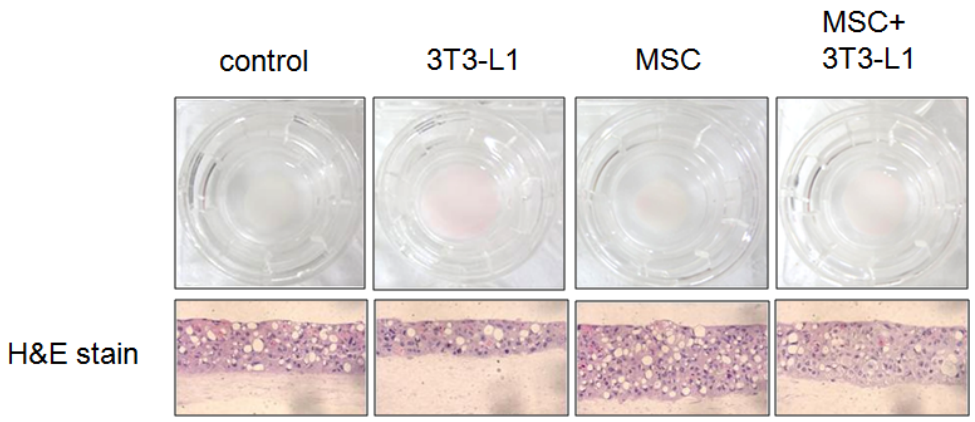

Figure 1. Morphology of four artificial skin models after 14 day culture and histological features in hematoxylin and eosin staining. Dermal substitute was prepared by adding 3T3-L1 and/or MSC to each millicell. Sections of skin equivalents were hematoxylin/eosin stained. Original magnification : (× 400).

기질을 만들었다. 이 진피기질에 준비된 세포를 혼합하여 진피대체물을 만들었다.

대조군으로 사용된 진피 대체물은 진피기질 3 mL당 섬유모세포 6×10^5 cells을 혼합하였고, 시험군에는 첫째로 진피기질 3 mL당 섬유모세포 3×10^5 cells와 지방전구세포 3×10^5 cells을 함께 혼합하였으며, 둘째는 섬유모세포 3×10^5 cells와 중간엽줄기세포 3×10^5 cells을 함께 혼합하였고, 셋째는 세 가지 세포를 각각 2×10^5을 함께 혼합하여 37 ℃에서 젤화하여 만들었다. 만들어진 진피대체물 위에 각질형성세포 1×10^6 cells를 뿌려준 후 배지에 잠기게 하루 배양하고 13일간 공기에 노출하여 배양하였다. 공기에 노출 배양 시에는 epidermal growth factor (EGF, 10 ng/mL)을 처리하였다.

2.4. 면역조직화학 염색

두 주간의 배양이 끝난 인공피부 조직을 millicell로부터 조심스럽게 분리하여 10 % 포르말린에 24 h 고정한 후 파라핀에 포매하여 블록을 만들었다. 만들어진 블록으로 4 μm 절편을 만들어 H&E 염색 및 면역조직화학 염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하였다. 일차 항체로는 p63 (sc-8431, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), PCNA (proliferating cell nuclear antigen, sc-56, Santa Cruz Biotechnology), involucrin (I9018, Sigma chemical, St. Louis, MO, USA), integrin-α6 (sc-6597, Santa Cruz Biotechnology), integrin-β1(sc-9970, Santa Cruz Biotechnology), 및 fibronectin (24911, Novotec, Lyon, France) 항체를 이용하였고, 이차 항체로는 anti-goat IgG (PK-6105, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 항체를 이용하였다. 면역조직화학 염색은 아비딘-비오틴-과산화효소 복합체 기법(avidin-biotin-peroxidase complex method, UltraVision DetectionSystem Anti-Polyvalent, HRP/DAB, Thermo Scientific, Inc., Fremont, CA)을 이용하였다.

3. 결 과

3.1. 형태학적 관찰

본 실험에서는 기존의 인공피부의 진피대체물에 쓰이던 세포인 섬유모세포 이외에 다른 세포들을 조합하여 여러 종류의 인공피부를 만들었다. 대조군으로 사용된 진피 대체물은 섬유모세포만으로 만들어졌고, 시험군에는 첫째로 섬유모세포에 지방전구세포를 함께 혼합하였으며, 둘째는 섬유모세포에 중간엽줄기세포를 함께 혼합하였고, 셋째는 세 가지 세포를 함께 혼합하여 만들었다. 14일 간의 배양을 거친 후, 육안으로 관찰한 결과 표면적은 지방전구세포를 넣은 군에서 제일 크고 중간엽줄기세포가 들어간 군에서 수축이 제일 많이 된 것을 볼 수 있었다(Figure 1). H&E 염색 결과 중간엽줄기세포가 들어간 군의 표피가 제일 두꺼운 것을 관찰할 수 있는 반면 지방전구세포를 넣은 군에서 표피의 두께가 제일 얇은 것을 볼 수 있었다(Figure 1).

3.2. 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색결과, 표피성체줄기세포의 표식자인 p63은 진피대체물의 세포의 종류에 따라 큰 차이가

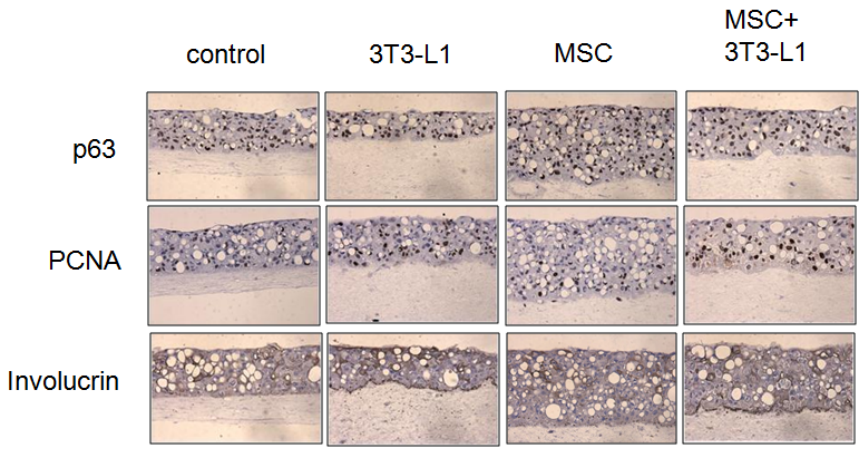

Figure 2. Immunohistochemical stains with p63, PCNA and involucrin. Dermal substitute was prepared by adding 3T3-L1 and/or MSC to each millicell. Sections of skin equivalents were immunostained for p63, PCNA and involucrin. Original magnification : (× 400).

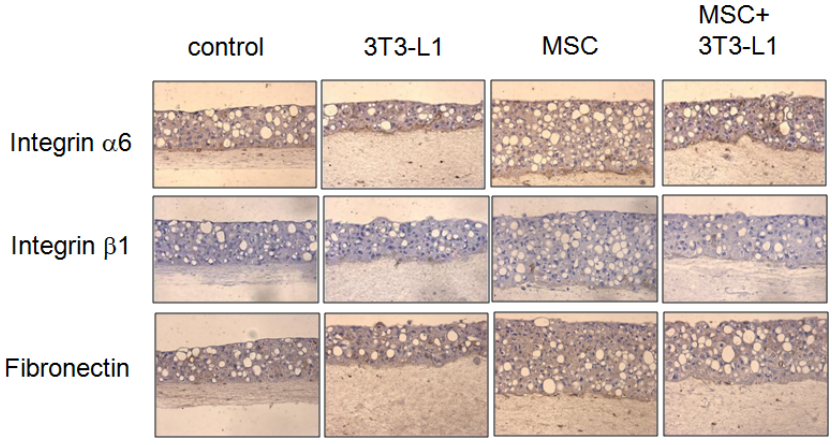

Figure 3. Immunohistochemical stains with integrin-α6, integrin-β1, and fibronectin. Dermal substitute was prepared by adding 3T3-L1 and/or MSC to each millicell. Sections of skin equivalents were immunostained for integrin-α6, integrin-β1, and fibronectin. Original magnification : (× 400).

없었다(Figure 2). 또한, 세포증식능의 표식자인 PCNA을 염색하였을 때 대조군과 지방전구세포를 넣은 군에서는 표피에 전체적으로 분포된 것을 관찰할 수 있다. 반면 중간엽줄기세포가 들어간 군에서는 표피와 진피의 경계선인 기저막 쪽에 많이 분포된 것을 볼 수 있다. 표피분화 표지자인 involucrin의 경우 지방전구세포를 넣은 군에서 다른 군에 비해 약간 강하게 발현된 것으로 보였으며, 중간엽줄기세포가 들어간 군에서는 표피 상부층에서 약간 더 진하게 염색된 것을 볼 수 있었다. 다음으로 기저막의 주성분인 integrin-α6 및, integrin-β1과 세포외기질의 성분인 fibronectin에 대하여 면역조직화학염색을 진행하였는데 대조군에 비하여 진피대체물의 세포의 종류에 따라 큰 차이를 보이지 않았다(Figure 3).

4. 고 찰

인공피부모델은 피부의 생리학과 약리학 및 독성학 등을 연구하는데 이용되고 동물실험의 대체모델로 각광을 받고 있다[8]. 섬유모세포는 지금까지 인공피부모델에서 가장 중요하게 사용되는 세포이며 표피와 기저막의 형성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 중간엽줄기세포는 지금까지 대부분 골수세포를 중심으로 연구하여 왔지만 채취과정과 대량채취가 어렵기 때문에 널리 사용되지는 못하였다[10]. 하지만 최근에는 많은 연구진

에서 지방조직으로부터 중간엽줄기세포를 추출하여 사용되고 있음이 보고되어 있다[10]. 더욱이, 1 mL의 지방조직에서 4×10^5의 세포를 분리할 수 있을 뿐만 아니라 지방조직 역시 간단한 국소마취 하에 쉽게 얻을 수 있기 때문에 널리 사용되고 각광을 받는다[11]. 중간엽줄기세포는 골세포, 지방세포, 연골세포, 근육세포, 섬유모세포 및 신경세포 등 다양한 세포로 분화가 가능하다[12].

본 연구에서는 기존의 진피대체물에 사용되었던 섬유모세포에 중간엽줄기세포 및 지방전구세포를 인공피부 모델을 만들어 각각 비교하였다. 이렇게 다양한 세포를 이용하여 만든 진피대체물 위에 인간의 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 뿌려 인공피부를 만들었는데 표피가 성공적으로 만들어진 것을 관찰할 수 있었다. 일반적으로 이식용 인공피부를 만들기 위하여는 일차배양한 각질형성 세포가 사용되지만, 배양을 위하여 많은 비용과 노력이 필요한데 비하여 HaCaT세포는 쉽게 얻을 수 있는 세포주로 이를 이용한 인공피부는 동물실험 대체용으로 편하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다. Figure 1에서 보여지는 것처럼, 중간엽줄기세포가 들어간 군에서 표피의 두께가 제일 두꺼운 것을 관찰하였다. 이로부터 중간엽줄기세포가 분화를 하여 표피의 재생을 촉진하였다고 볼 수 있다. 이는 이미 이전의 여러 *in vivo* 모델에서 중간엽줄기세포가 피부의 재생을 촉진시킨다는 연구결과와도 일치한다[13,14].

본 연구에서 세포증식능의 표적인 PCNA, 표피 성체줄기세포의 마커인 p63, 각질형성세포의 분화표지자인 involucrin, 기저막 형성 마커인 integrin-α6과 integrin-β1으로 각각 확인을 한 결과 눈에 띄는 큰 변화는 없었지만 주목할 만한 것은 바로 중간엽줄기세포가 들어간 군에서 PCNA가 기저층의 가까이에 있는 세포에만 주요하게 염색이 된 것을 확인할 수 있었으며, involucrin은 표피 상부층에서 약간 더 진하게 염색된 것을 볼 수 있었다. 이는 중간엽줄기세포에 의하여 각질형성세포가 기저층에서는 증식을 활발히 하고 각질층에서는 분화가 더 많이 되어 사람의 피부와 유사한 성질을 나타낸다는 것을 의미한다. 중간엽줄기세포를 사용하는 경우 더 많은 매개물질이 분비된다고 알려져 있다. 중간엽줄기세포는 약 44가지의 사이토카인을 분비하여 주로 혈관형성과 자멸사 및 증식에 영향을 준다고 보고되었다[15]. 한편 중간엽줄기세포와 지방전구세포를 같이 혼합하여 인공피부 모델을 만들었을 때에는 중간엽줄기세포에 의한 효과가 반감되어 인공피부로서의 장점은 없었다.

인공피부에서 증식과 분화가 적절히 일어나는 것이 중요하기 때문에 중간엽줄기세포를 사용한 인공피부모델은 앞으로 동물실험 대체용 인공피부 구축에 사용될 수 있다고 사료된다. 그러므로, 중간엽줄기세포에서 풍부한 bFGF나 HGF외의 각질형성세포 및 섬유모세포의 분화와 증식을 적절히 조절하는 다른 사이토카인을 찾아서 인체의 실제 피부와 보다 유사한 인공피부를 만든다면 동물실험 대체모델로서 활용할 수 있다고 생각된다.

감사의 글

This study was supported by a grant (A103017) from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

참 고 문 헌

1. E. Bell, M. Rosenberg, P. Kemp, R. Gay, G. D. Green, N. Muthukumaran, and C. Nolte, Recipes for reconstituting skin, *J. Biomech. Eng.*, **113**, 113 (1991).
2. H. J. Cho, I. H. Bae, H. J. Chung, D. S. Kim, S. B. Kwon, Y. J. Cho, S. W. Youn, and K. C. Park, Effects of hair follicle dermal sheath cells in the reconstruction of skin equivalents, *J. Dermatol. Sci.*, **35**, 74 (2004).
3. D. S. Kim, H. J. Cho, H. R. Choi, S. B. Kwon, and K. C. Park, Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2774 (2004).
4. S. Rhee, Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling, *Exp. Mol. Med.*, **41**, 858 (2009).
5. H. Nakagawa, S. Akita, M. Fukui, T. Fujii, and K. Akino, Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing, *Br. J. Dermatol.*, **153**, 29 (2005).
6. A. I. Caplan, Mesenchymal stem cells, *J. Orthop. Res.*, **9**, 641 (1991).
7. M. Keck, D. Haluza, H. F. Selig, M. Jahl, D. B. Lumenta, L. P. Kamolz, and M. Frey, Adipose tissue engineering: three different approaches to seed preadipocytes on a collagen-elastin matrix, *Ann. Plast. Surg.*, **67**, 484 (2011).

8. M. Regnier and M. Darmon, Human epidermis reconstructed *in vitro*: a model to study keratinocyte differentiation and its modulation by retinoic acid, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **25**, 1000 (1989).
9. A. El Ghalbzouri and M. Ponec, Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components, *Wound Repair Regen.*, **12**, 359 (2004).
10. C. H. Huh, S. Y. Kim, H. J. Cho, D. S. Kim, W. H. Lee, S. B. Kwon, J. I. Na, and K. C. Park, Effects of mesenchymal stem cells in the reconstruction of skin equivalents, *J. Dermatol. Sci.*, **46**, 217 (2007).
11. L. Aust, B. Devlin, S. J. Foster, Y. D. Halvorsen, K. Hicok, T. du Laney, A. Sen, G. D. Willingmyre, and J. M. Gimble, Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates, *Cytotherapy*, **6**, 7 (2004).
12. J. R. Mauney, V. Volloch, and D. L. Kaplan, Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects, *Tissue Eng.*, **11**, 787 (2005).
13. C. K. Perng, H. H. Ku, S. H. Chiou, I. L. Chen, F. T. Tsai, Y. P. Yang, K. Y. Chang, and C. L. Kao, Evaluation of wound healing effect on skin-defect nude mice by using human dermis-derived mesenchymal stem cells, *Transplant. Proc.*, **38**, 3086 (2006).
14. X. Fu, L. Fang, X. Li, B. Cheng, and Z. Sheng, Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury, *Wound Repair Regen.*, **14**, 325 (2006).
15. T. Schinkothe, W. Bloch, and A. Schmidt, *In vitro* secreting profile of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells Dev.*, **17**, 199 (2008).