

## 피부 재생능력 촉진을 위한 물리적 복합자극의 활용 연구

### Combinatorial Physical Stimulation and Synergistically-Enhanced Fibroblast Differentiation for Skin Regeneration

고웅현<sup>1</sup>, 홍정우<sup>1</sup>, 신현준<sup>1</sup>, 김철웅<sup>2</sup>, 신현정<sup>1,✉</sup>  
Ung Hyun Ko<sup>1</sup>, Jungwoo Hong<sup>1</sup>, Hyunjun Shin<sup>1</sup>, Cheol Woong Kim<sup>2</sup>, and Jennifer H. Shin<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup> 한국과학기술원 기계공학과 (Department of Mechanical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology)

<sup>2</sup> (주)트리플씨메디칼 (Triple-C Medical Corporation)

✉ Corresponding author: j\_shin@kaist.ac.kr, Tel: +82-42-350-3232

Manuscript received: 2015.4.6. / Revised: 2015.6.16. / Accepted: 2015.6.30.

*For proper wound healing, dermal contraction and remodeling are critical; during the natural healing process, differentiated fibroblasts called “myofibroblasts” typically undertake these functions. For severe wounds, however, a critical mass of dermal matrix and fibroblasts are lost, making self-regeneration impossible. To overcome this impairment, synthetic wound patches with embedded functional cells can be used to promote healing. In this study, we developed a polydioxanone (PDO)-based cell-embedded sheet on which dermal fibroblasts were cultured and induced for differentiation into myofibroblasts, whereby the following combinatorial physicochemical stimuli were also applied: aligned topology, electric field (EF), and growth factor. The results show that both the aligned topology and EF synergistically enhanced the expression of alpha smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA), a key myofibroblast marker. Our proof-of-concept (POC) experiments demonstrated the potential applicability of a myofibroblast-embedded PDO sheet as a wound patch.*

KEYWORDS: Wound patch (상처패치), Fibroblast (근섬유아세포), Electrospinning (전기방사), Polydioxanone (PDO) (폴리디옥사논), Electrical stimulation (전기자극)

#### 1. 서론

피부 조직은 신체를 둘러싸고 있는 하나의 막으로써 외부환경으로부터 내부 장기를 보호하고 체내의 항상성을 유지하는 역할을 한다. 피부는 우리 몸에서 가장 자주 손상되는 조직으로써 일정 수준의 자가 재생능력을 가지고 있으나, 손상 부위의 크기와 정도에 따라 재생 능력이나 속도가 제한 된다.<sup>1</sup> 피부에 상처가 발생하는 경우, 수시간

내에 면역 반응이 시작되고 세포외기질 (ECM: Extracellular Matrix) 단백질의 재생, 표피세포의 이동 등에 의해 피부 재생이 이루어진다. 이와 같은 재생과정에서 가장 중요한 역할을 하는 섬유아세포 (fibroblast)는 상처발생시 상처 부위로 이동하여 증식하고 근섬유아세포 (myofibroblast)로 분화하여 재생을 돕는다. 특히 근섬유아세포는 다양한 생물학적 성장인자를 분비하여 피부재생에 필요한 여러 주변세포들의 움직임을 유도 할 뿐만 아니라, 스

스로 콜라겐, 엘라스틴 등의 ECM 단백질을 합성하고 분비시켜 조직재생의 증추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이렇듯 근섬유아세포는 ECM 단백질을 가장 효율적으로 생산하는 세포이기 때문에 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화 유도가 매우 중요하다. 그러나 심각한 외상, 3도 이상의 화상, 당뇨 합병증과 같은 중증의 상처가 발생하는 경우, 재생 한계를 넘는 양의 ECM 과 세포의 손실로 인하여 회복이 지연되거나, 심한 경우 완전한 회복이 이루어지지 않을 수 있다. 이와 같은 피부 재생 능력의 한계를 극복하고자 음압치료 (negative pressure wound therapy, NPWT), 성장인자 표적치료 (growth factor targeted therapy), 혹은 피부 이식 (skin substitutes) 등의 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>2</sup> 음압치료란 상처부위에 음압 흡입을 가해 죽은 조직을 제거하고, 상처 내의 유동을 순환시켜 재생 속도를 증가시키는 치료법으로 수술, 사고 등으로 감염이 되기 쉬운 큰 상처에 효율적인 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> 성장인자 표적치료는 면역 반응 등에 관여되어 있는 생화학적 인자를 투여하여 재생을 촉진시키는 치료법으로써 세포 단위에서 재생이 촉진되는 결과가 관측되었다.<sup>4</sup> 재생능력이 완전히 상실되어버린 치명적인 창상이나 화상 부위의 치료의 경우에는 자가재생을 할 수 있는 세포들의 부재로 간접적인 재생유도가 불가능 하게 되고 이에 따라 피부이식이 불가피하다. 일반적으로 면역 반응에 안전한 자가피부이식 방법이 많이 선호되고 있으나 실제 환자로부터 얻을 수 있는 피부가 제한되어 있어서 타종으로부터의 이식 및 조직 공학적인 접근 방법 등이 활발히 연구되고 있다.<sup>5</sup>

조직공학이란 세포가 부착되어 자랄 수 있는 지지체와 각종 성장 인자를 적절히 이용하여 줄기 세포 (stem cell) 혹은 전구세포 (precursor cell) 등을 원하는 조직에 맞는 세포로 분화시켜 기능성 조직 재생을 구현하는 학문이다. 예를 들면 피부 재생을 위한 조직공학적 방법은 일반적으로 각질세포와 섬유아세포 등을 포함하여 배양한 지지체가 개발되어 사용 중인데, 진피의 ECM 구조 회복이 느리며 재생이 완전하지 않다고 보고된 바 있다.<sup>6</sup> ECM의 보다 효과적인 회복을 위해 콜라겐을 포함한 합성 지지체의 사용도 보고된 바 있으나, 주입된 콜라겐이 생체 내 흡수 및 분해되어 조직 내 유지되는 양이 매우 적은 문제점이 지적되었다.<sup>7</sup> 따라서 조직 내 세포가 스스로 ECM 물질 및 사이토카인 등의 생산과 분비를 촉진 시키는 것이 중

요할 것이다. 이를 위해 본 연구에서는 기존 수용용 복합실로 사용되어 온 생체적합재료인 폴리디옥사논 (PDO: Polydioxanone)을 이식이 가능하도록 전기방사법을 이용하여 시트 형태로 제작하고 피부유래 섬유아세포를 배양하여 피부재생 패치로서의 가능성을 연구하고자 하였다. 섬유아세포는 피부재생 과정 중에 근섬유아세포로 분화하여 ECM 단백질 합성과 분비, 조직의 수축에 직접적으로 기여 하게 되므로, 준비단계에서 미리 근섬유아세포로의 분화를 유도하여 적용하는 접근방법을 고려하고자 한다. 특히 본 연구에서는 단일 방향성 패턴과 전기장의 복합적인 물리적인 자극에 성장인자를 더한 복합 자극을 이용하여 섬유아세포의 사전분화를 극대화하고자 한다.<sup>8</sup> 앞서 언급한 대로, 섬유아세포의 근섬유아세포 분화는 피부의 ECM을 재생하고 상처를 회복하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있어,<sup>9,10</sup> 복합 물리적 자극이 섬유아세포의 분화에 미치는 영향을 보다 심도 있게 분석해 보고자 한다.

## 2. 세포 배양 시스템 개발

### 2.1 단일 방향성 섬유 지지체

단일 방향지지체를 제작하기 위해 Fig. 1(a)와 같이 전기방사 (electrospinning) 방법을 사용하였다.<sup>11</sup> 전기방사 재료는 폴리디옥사논 (polydioxanone, PDO)을 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP)에 250 mg/ml의 농도로 용해시켜 사용하였다. 방사 노즐은 25G 사이즈를 사용하였고, 노즐과 섬유수집기 간의 거리는 275mm로 유지하였다. 전기방사는 20kV의 전압으로 수행하였다. 단일 방향성 섬유 시트를 제작하기 위해서 비대칭 공간 수집기 (asymmetric air gap collector)를 사용하여 수집하였다. 비대칭 공간 수집기는 비대칭적인 전기장의 형성을 통해 섬유를 수집기의 두 전극 사이에 팽팽하게 배열시키는 장치이다. 보다 높은 밀도의 섬유 시트를 제작하기 위해, 섬유를 비대칭 공간 수집기에 1분간 수집하고, 다시 한 번 글라스를 이용하여 60회 누적했다. 방향성이 없는 섬유 시트는 일반적인 평면 수집기 (flat plate collector)를 사용하여 제작했다. 방향성이 없는 섬유 시트의 경우 수집되는 섬유의 양이 많기 때문에 총 3분 간 1회 수집하여 제작했다. 제작된 섬유 시트는 실험시의 취급의 용이성을 위해 direct polymer melting deposition (DPMD)를 사용하여 시트에 1×1 cm<sup>2</sup> 크기의 사각형 틀을 부착시켰다.<sup>12</sup>

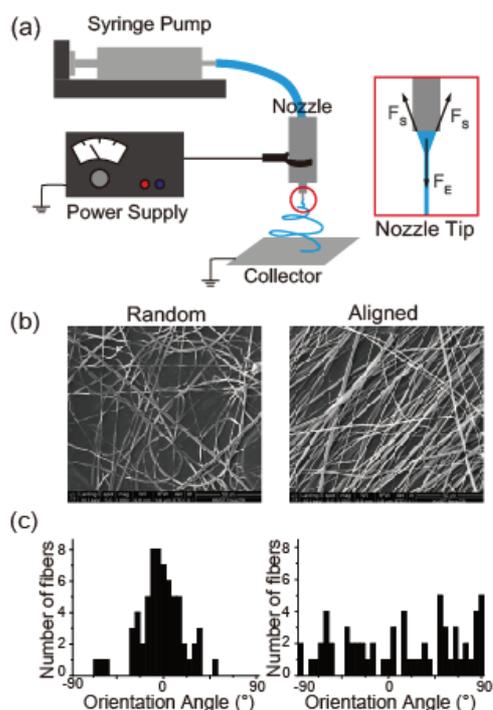


Fig. 1 (a) Illustration of electrospinning system to fabricate the fibrous scaffolds (b) SEM images of PDO scaffold (c) Angular distribution of PDO fibers

제작된 섬유 시트는 Fig. 1(b)와 같이 주사전자 현미경(scanning electron microscopy, SEM)으로 촬영하여 섬유의 패턴이 잘 구축되었는지를 확인하였다. 이에 정확한 방향성을 측정하기 위해, 의도하였던 섬유의 방향과 실제 제작된 섬유의 방향 간의 사이 각도를 IMAGEJ software (NIH, USA)를 사용하여 확인하였다. 그 결과, 비대칭 공간 수집기를 통해 수집된 섬유는 Fig. 1(c)와 같이 80% 이상의 섬유가  $\pm 30^\circ$  내의 방향성 오차를 가졌다. 반면 평면 수집기에서 수집한 섬유는 특정 방향성을 띄지 않았다. 섬유는 수집기에 관계 없이 1~2 $\mu$ m의 직경을 갖는 것을 확인했다.

제작된 폴리디옥산은 지지체가 섬유아세포(normal human dermal fibroblast, Lonza)를 배양 할 수 있는지를 검증하기 위해 방향성이 없는 지지체와 단일 방향성 지지체에 세포를 24시간 동안 배양하고, live-dead assay (L3224, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 통해 세포의 생존율을 Fig. 2(a)와 같이 형광 이미지로 확인하였다. 세포는 10% fetal bovine serum

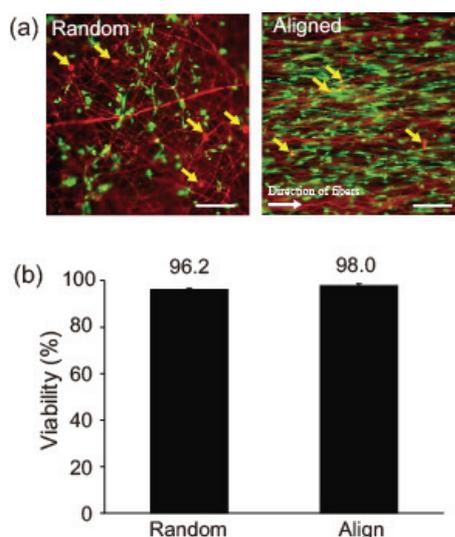


Fig. 2 (a) Live-dead assay results on PDO scaffolds (green: live cell, yellow arrows: dead cell, scale bar: 200  $\mu$ m) (b) Percentage of live cells/total cells on PDO scaffolds (n=3)

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 과 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin (Invitrogen)이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (Lonza)에서 배양하였다. 지지체는 세포의 부착력 증가를 위해 10  $\mu$ g/ml의 파이브로넥틴 (fibronectin)으로 3시간 동안 코팅하였고, 세포는 40000 cells/cm<sup>2</sup>으로 seeding 되었다. 그 결과, Fig. 2(b)에서와 같이 모든 지지체에서 90%가 넘는 세포가 생존하는 것으로 나타나 세포 배양이 가능하다는 것을 확인하였다.

## 2.2 전기장 자극 및 세포 배양 시스템

본 연구에서는 세포의 생존을 유지하면서 동시에 전기장을 인가할 수 있는 시스템을 제작하여 사용하였다. 전기장 자극 시스템은 전선이 직접적으로 세포배양액 (cell culture medium)에 닿으면, 오염 및 화학적인 영향을 가할 수 있어, 아가브릿지 (agar bridge)를 사용하여 간접적인 전기장을 가할 수 있도록 제작되었다. 아가브릿지는 일정 수준 이상의 전기전도성을 갖추기 위해, Steinberg solution에 2% 아가파우더를 용해시킨 뒤, U자관에서 굳혀 제작하였다.

섬유아세포는 섬유시트에서 2일간 배양된 후, 전기장 자극 시스템으로 옮겨져 전기장 자극을 받았다. 전기장 자극은 0.5, 0.75, 1 V/cm의 크기로 인

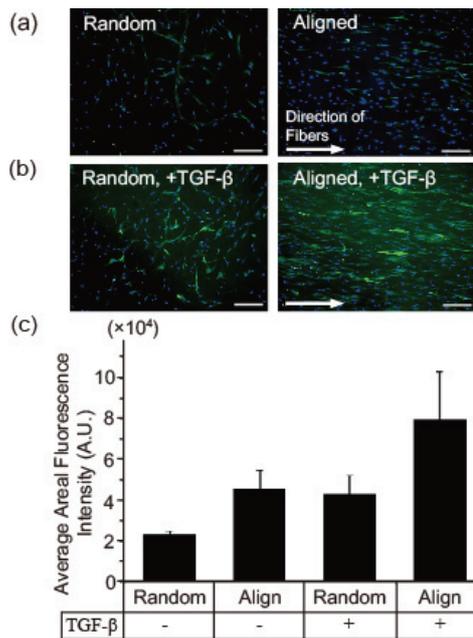


Fig. 3 Immunofluorescence images of  $\alpha$ -SMA expression; (a) Without TGF- $\beta$  and (b) With 10 ng/ml TGF-  $\beta$  on random and aligned fibers (green:  $\alpha$ -SMA, blue: nuclei, scale bar: 200  $\mu$ m) (c) Average fluorescence graph of  $\alpha$ -SMA expression (n=3)

가 되었으며 10분간 자극을 인가하고 20분 간 휴식 시간을 갖도록 하여 총 3시간 동안 6회 자극과 휴식을 반복하였다. 전기장 자극이 모두 끝난 후에는 섬유아세포의 분화를 촉진하기 앞서, 다른 성장인자의 영향을 줄이기 위해 FBS가 없는 환경에서 1일간 starvation하였으며, 이를 다시 2일간 10 ng/ml의 농도의 hTGF- $\beta$ 1가 첨가된 기존 배양용액에서 분화를 유도하였다.

### 3. 근섬유아세포로의 분화 촉진

#### 3.1 단일 방향성 패턴에 의한 분화 촉진

섬유 시트의 방향성에 따른 근섬유아세포의 분화 촉진을 관찰하기 위해  $\alpha$ -SMA 발현량을 측정했다.  $\alpha$ -SMA는 근섬유아세포에서 발현되는 대표적인 단백질로써  $\alpha$ -SMA의 발현이 증가되었다는 것은 섬유아세포가 근섬유아세포로의 분화가 효율적으로 이루어졌음을 의미한다. 방향성이 없는 패턴과 단일 방향성 패턴에서 섬유아세포를 근섬유아세포로 분

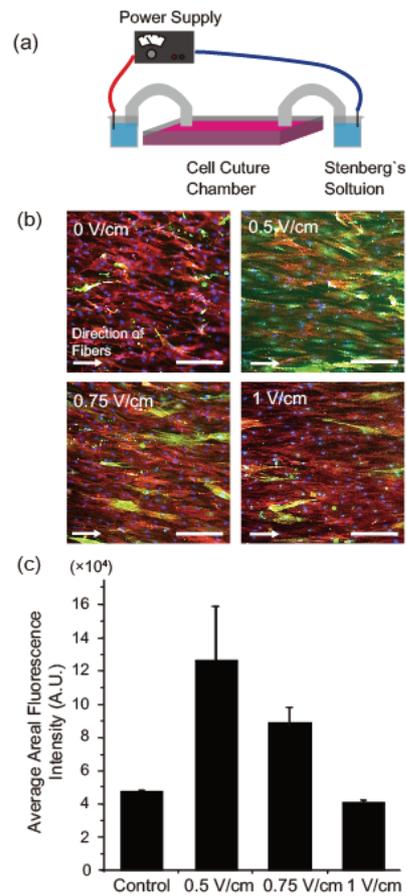


Fig. 4 (a) Illustration of Electrical Field Stimulation Device (b) Immunofluorescence images of  $\alpha$ -SMA expression with various electrical field (green:  $\alpha$ -SMA, red: actin, blue: nuclei, scale bar: 200  $\mu$ m) (c) Average fluorescence graph of  $\alpha$ -SMA expression (n=3)

화시킨 결과 Fig. 3(a)와 같이 단일 방향성 패턴에서 배양된 섬유아세포가 방향성이 없는 패턴에서 배양된 것에 비해  $\alpha$ -SMA 발현이 증가하는 것을 확인했다. 또한 단일방향성 지지체에 human TGF- $\beta$ 1 (Rhoche, Germany)를 처리한 경우  $\alpha$ -SMA 발현량이 더욱 증가하는 것을 확인했다. 이를 보다 정량적으로 비교하기 위해 발현되는  $\alpha$ -SMA의 형광의 세기를 비교하여 본 결과, 앞서의 결과 같이 단일방향성 패턴이 방향성이 없는 경우에 비해  $\alpha$ -SMA 발현량을 크게 증가시키고 hTGF- $\beta$ 1 처리 시에 더욱 시너지를 일으키는 것을 알 수 있었다(Fig. 3(b)). 이와 같은 결과는 단일방향성 패턴이 방향성이 없는 패

턴에 비해 근섬유아세포로의 분화에 더욱 유리한 조건임을 보여주고, hTGF- $\beta$ 1과 같은 생화학적 인자와 시너지 효과를 낼 수 있음을 보여준다.

### 3.2 단일 방향성 및 전기자극에 의한 분화 시너지 효과

단일 방향성 지지체와 전기장 자극과의 시너지 효과를 관찰하기 위해 우선 단일 방향성 패턴에서 배양 중인 섬유아세포에 다양한 크기의 전기장을 인가하여 근섬유아세포로의 분화를 관찰했다. 전기장의 세기는 피부에 상처가 발생할 경우 자연적으로 형성된다고 알려진 0.1~0.5V의 전기장 세기를 기준으로 하여 0.5, 0.75, 1 V/cm 크기를 선정하였다.<sup>13,14</sup> 그 결과, Fig. 4(b)와 같이 0.5, 0.75 V/cm 크기의 전기장에서  $\alpha$ -SMA의 발현량이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 정량적으로 비교 분석하기 위해  $\alpha$ -SMA의 형광 발현 세기를 비교한 결과, Fig. 4(c)와 같이 0.5 V/cm의 조건에서  $\alpha$ -SMA의 발현 세기가 가장 크다는 것을 확인했다. 이와 같은 결과는 적절한 크기의 전기장 자극이 근섬유아세포의 분화를 촉진시킬 수 있다는 것을 의미한다. 또한 단일방향성 패턴만 있는 경우 보다 0.5 V/cm 크기의 전기장이 함께 인가되는 있는 경우에  $\alpha$ -SMA의 발현량이 더 크다는 것을 확인할 수 있다. 이와 같은 결과는, 전기장과 단일 방향성 패턴이 서로 시너지 효과를 내어 분화를 증가시키는 것을 의미한다.

### 4. 결론

본 연구는 피부재생에 필수적인 섬유아세포의 근섬유아세포 분화에 복합적인 물리적 자극이 미치는 영향을 세포의 형태변화와  $\alpha$ -SMA의 면역염색법을 이용하여 평가하였다. 본 연구를 통해 단일방향성 패턴이 방향성이 없는 패턴에 비해 더욱 효율적으로 근섬유아세포로의 분화를 유도할 수 있다는 것을 확인했고, 단일방향성 패턴과 전기장 자극의 복합자극이 시너지 효과를 통해 근섬유아세포의 분화에 더욱 효율적임을 밝혀냈다.

기존 연구에 따르면 단일방향성 패턴은 세포를 더욱 신장(elongation)시키게 되는데, 이와 같이 세포가 강제로 길게 자라게 되면 세포 내부의 장력(internal tension)이 더욱 커지게 되고 이는 세포막의 다양한 채널(stress activated channels)을 활성화시켜 생물학적인 현상에 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다.<sup>15</sup> 이와 같은 기존 연구는 단일 방향성

패턴에서 근섬유아세포로의 분화가 촉진되는 이유가 세포의 형태(morphology) 및 다양한 신호 전달 기전과 관련되어 있음을 암시하며 전기장과의 복합자극이 분화를 촉진시키는 것을 밝혀내었다. 하지만 이러한 물리적인 자극이 어떠한 기전에 의해 섬유아 세포의 분화를 촉진하는지에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다. 본 연구단계에서는 PDO 고분자 화합물의 구조적, 화학적 특성으로 인해, 배양된 세포의 분리의 어려움으로 PCR (polymerase chain reaction)이나 western blot 등의 방법을 이용한 유전자와 단백질 발현의 정량화에 어려움이 있어 추후 실험방법의 보완을 통해, 보다 정량적인 생물학적인 기법을 활용하여 메커니즘을 확인할 예정이다.

본 연구는, 단일방향성 지지체와 전기자극이 복합적인 물리자극으로써 피부재생에 효과적인 자극이 될 수 있음을 증명하였고, 그 조건을 확립하였는데 의의가 있으며, 추후 피부재생 패치 개발에 기초가 되는 연구가 될 것으로 기대한다.

### 후 기

본 연구는 한국연구재단 중견연구지원사업 핵심과제(NRF-2013R1A2A2A01017014)와 한국 보건복지부 R&D 사업(A092140)의 지원을 받아 수행하였다.

### REFERENCES

1. Park, S. C., Oh, S. H., and Lee, J. H., "Alginate/Aloe-Containing Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel Patch as a Wound Dressing," *Biomaterials Research*, Vol. 13, No. 4, pp. 138-143, 2009.
2. Murphy, P. S. and Evans, G. R., "Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products," *Plastic Surgery International*, Vol. 2012, Article ID. 190436, 2012.
3. Vikatmaa, P., Juutilainen, V., Kuukasjärvi, P., and Malmivaara, A., "Negative Pressure Wound Therapy: A Systematic Review on Effectiveness and Safety," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, Vol. 36, No. 4, pp. 438-448, 2008.
4. Cianfarani, F., Zambruno, G., Brogelli, L., Sera, F., Lacal, P. M., et al., "Placenta Growth Factor in Diabetic Wound Healing," *The American Journal of Pathology*, Vol. 169, No. 4, pp. 1367-1182, 2006.

5. Augustine, R., Kalarikkal, N., and Thomas, S., "Advancement of Wound Care from Grafts to Bioengineered Smart Skin Substitutes," *Progress in Biomaterials*, Vol. 3, No. 2-4, pp. 103-113, 2014.
6. Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., and Eccleston, G. M., "Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 97, No. 8, pp. 2892-2923, 2008.
7. Sun, G., Zhang, X., Shen, Y.-I., Sebastian, R., Dickinson, L. E., et al., "Dextran Hydrogel Scaffolds Enhance Angiogenic Responses and Promote Complete Skin Regeneration during Burn Wound Healing," *Proc. of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, No. 52, pp. 20976-20981, 2011.
8. Balint, R., Cassidy, N. J., and Cartmell, S. H., "Electrical Stimulation: A Novel Tool for Tissue Engineering," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, Vol. 19, No. 1, pp. 48-57, 2012.
9. Evans, R. A., Tian, Y. C., Steadman, R., and Phillips, A. O., "Tgf- $\beta$ 1-Mediated Fibroblast-Myofibroblast Terminal Differentiation-The Role of Smad Proteins," *Experimental Cell Research*, Vol. 282, No. 2, pp. 90-100, 2003.
10. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A., "Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 3, No. 5, pp. 349-363, 2002.
11. Park, S. H., Park, J. H., Lee, H. J., and Lee, N. K., "Current Status of Biomedical Applications Using 3D Printing Technology," *J. Korean Soc. Precis. Eng.*, Vol. 31, No. 12, pp. 1067-1076, 2014.
12. Park, S.-H., Koh, U. H., Kim, M., Yang, D.-Y., Suh, K.-Y., et al., "Hierarchical Multilayer Assembly of an Ordered Nanofibrous Scaffold via Thermal Fusion Bonding," *Biofabrication*, Vol. 6, No. 2, Paper No. 024107, 2014.
13. Guo, A., Song, B., Reid, B., Gu, Y., Forrester, J. V., et al., "Effects of Physiological Electric Fields on Migration of Human Dermal Fibroblasts," *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 130, No. 9, pp. 2320-2327, 2010.
14. Song, S., Han, H., Ko, U. H., Kim, J., and Shin, J. H., "Collaborative Effects of Electric Field and Fluid Shear Stress on Fibroblast Migration," *Lab on a Chip*, Vol. 13, No. 8, pp. 1602-1611, 2013.
15. Liao, I.-C., Liu, J. B., Bursac, N., and Leong, K. W., "Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers," *Cellular and Molecular Bioengineering*, Vol. 1, No. 2-3, pp. 133-145, 2008.