

## 무모쥐의 피부화상에 대한 실크피브로인 필름 피복제의 치유 효능

한림대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>생화학교실, <sup>2</sup>외과학교실, <sup>3</sup>영상의학교실, <sup>4</sup>삼육대학교 자연과학연구소, <sup>5</sup>화인코주식회사

최영희 · 김민규 · 안동현 · 홍수희<sup>1</sup> · 이재용<sup>1</sup> · 김해성<sup>2</sup> · 김홍철<sup>3</sup> · 남상용<sup>4</sup> · 임건빈<sup>5</sup>

### The Wound Healing Effect of a Silk Fibroin Film on Cutaneous Burn of Hairless Mice

Young Hee Choi, M.D., Ph.D., Min Gyu Kim, M.D., Dong Hyun Ahn, M.D.,  
Soo Hee Hong, M.D.<sup>1</sup>, Jae-Yong Lee, Ph.D.<sup>1</sup>, Hae Sung Kim, M.D.<sup>2</sup>, Heung Cheol Kim, M.D.<sup>3</sup>,  
Sang Yong Nam, Ph.D.<sup>4</sup>, Garbeen Yim, Ph.D.<sup>5</sup>

Departments of Pathology, <sup>1</sup>Biochemistry, <sup>2</sup>Surgery and <sup>3</sup>Radiology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon,  
<sup>4</sup>Division of Natural Science, SahmYook University, Seoul, <sup>5</sup>FineCo Ltd., Chuncheon, Korea

**Purpose:** The aim of this study was to examine the effects of silk fibroin film on wound healing of cutaneous burn in hairless mice by using microscopic findings and stem cell markers (nestin, cytokeratin 15) and ki-67 proliferation marker.

**Methods:** Each mouse received two burns at the dorsal area by applying a metal rod heated with boiling water. Burn wound sites were dressed with Silk Fibroin Film and duoderm (SF group), Aquacel hydrofiber and duoderm (AC group) and duoderm only (Control group). All groups were covered externally with duoderm adhesive bands. Those mice were sacrificed at zero, two, seven, fourteen and twenty one days after burn. Histological findings and immunohistochemical staining for stem cell markers were observed.

**Results:** In SF group, inflammatory cell infiltration, formation of granulation tissue and inflammatory foci are greater than in AC and control group. Those factors appear to enhance mesenchymal stem cell markers such as nestin. Finally mesenchymal tissue regeneration was enhanced. In addition, the length of ki-67 expressed re-generating epithelium, which appeared to be associated with epithelial regeneration, was the longest in SF group.

**Conclusion:** The results show that the wound healing effect of SF is the best among other treatment materials including AC in the experimental group and duoderm in the control group through mesenchymal regeneration and epithelial regeneration which are essential factors for wound healing. (J Korean Surg Soc 2010;79:421-427)

**Key Words:** Hairless mice, Silk fibroin film, Burn, Wound healing, Stem cell

중심 단어: 무모쥐, 실크피브로인, 화상, 창상치유, 줄기세포

## 서 론

드레싱이란 상처 면을 보호하기 위해 무엇인가로 상처를 덮어주는 것으로 이때 사용하는 소재를 드레싱재(재)라고

한다. 드레싱은 내부의 상처 분비물을 흡수, 제거하고 외부로부터의 이물 침입을 방지하며 물리적 충격 혹은 자극으로부터 보호하기 위한 목적으로 시작되었다. 그러나 최근에는 종래의 단순 보호개념에서 능동적인 보호 개념으로 바뀌어 습윤 환경을 유지시켜 주거나 보온하여 주어서 상처가 보다 효율적으로 치유될 수 있는 환경을 제공하는 개념으로 새롭게 변화되고 있다.(1) 이에 저자들은 무모쥐에 심층 2도 화상을 유발한 후 Duoderm만을 이용한 드레싱을 대조군으로 하여, Aquacel hydrofiber 및 duoderm을 이용한

책임저자: 김해성, 강원도 춘천시 교동 153번지  
☎ 200-704, 한림대학교 춘천성심병원 외과  
Tel: 033-240-5179, Fax: 033-243-6413  
E-mail: biogra@hallym.or.kr

접수일 : 2010년 5월 25일, 게재승인일 : 2010년 10월 8일

드레싱과 Silk fibroin film 및 duoderm을 이용한 드레싱을 비교하는 방법으로 Silk fibroin film이 화상치유에 미치는 효과를 알아보려고 하였다.

## 방 법

### 1) 동물

동물윤리위원회 규정과 동물실험관련 법규(Hallym 2008 ~09)에 따라 동물을 보호하고 실험하였다. 25~30 g 무게의 수컷 무모쥐를 군별로 5마리를 사용하였고, 실험기간 중 사육실 환경은  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 10\%$ 를 유지하였다. 12 시간 인공 조명하에서 마우스용 케이지에 4마리씩 넣어 사육하였으며, 실험동물용 사료 및 식수는 자유로이 공급하였다.

### 2) 심부 2도 화상 유도 및 드레싱

70% 아산화질소와 30% 산소가 섞여 있는 기체에 2% 이소플루란(isoflurane)을 무모쥐에 흡입시켜 마취를 유도한 후 1% 이소플루란 농도로 마취를 유지시키면서 화상을 유도하였다. 지름 1 cm의 등글 납작한 쇠막대기를 끓는 물에 넣어서 가열한 후 무모쥐의 등 양쪽에 10초간 두어서 화상을 입혔다. 조직학적으로 심부 2도 화상을 확인하였다.(2,3) Silk fibroin film (SF, Fine Co., Seoul, Korea)과 aquacel hydro-fiber (AC, ConvaTec Co., Seoul, Korea) 드레싱 제재를 화상 부위보다 약간 크게 잘라서 무모쥐 등에 부착하고 듀오덤(Duoderm)을 사용하여 고정시켰다. 실험군은 크게, SF와 duoderm (SF군), AC와 duoderm (AC군) 및 듀오덤 부착한 대조군(control)으로 분류하였으며, 각 군마다 5마리씩 사용하였다.

화상을 입힌 2시간 후, 2일, 7일, 14일, 21일 후에 각각 5마리씩 희생하였다. 동물들은 모두 경추 탈골한 후 화상 부위의 피부 조직을 채취하여 가운데를 잘라서 헤마톡실린에 오진(Hematoxin & Eosin, H&E) 염색과 면역조직화학 염색을 위하여 10% 중성 포르말린 용액에 10시간 고정하였다.

### 3) 조직학적 검사

파라핀 블록을  $5\mu\text{m}$ 두께로 연속절편을 제작하여 일부는 통상적인 헤마톡실린에 오진 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 그리고 일부는 면역조직화학 염색을 하였다(Fig. 1~3). 광학현미경으로는 아래의 목록들을 관찰하였다.(4)

(1) 염증세포침윤도(Cellularity): 화상 부위에 침윤한 염증세

포는 주로 상피와 나란히 침윤하였다. 화상부위의 전체 면적 중에 염증세포가 침윤한 면적이 차지하는 비율(%)로 관찰하였다.

(2) 근육층의 위치: 화상 부위의 근육층이 주위 정상부위의 근육층 보다 위에 있으면 2, 그대로이면 0, 내려가 있으면 -2로 하였다.

(3) 육아조직의 양(Amount of Granulation tissue): 100배로 관찰하여 육아조직의 양은 화상부위의 전체 면적 중에 육아조직이 차지하는 면적의 비율(%)로 관찰하였다.

(4) 재생 상피의 길이 측정(Length of regenerated epithelium): 재생 상피는 정상 상피보다 4층 이상으로 두꺼워진 상피로 정의하였다. 재생상피의 길이는 독일 Zeiss 현미경으로 관찰하였고, AxioCamera로 촬영하여, Axio Vision Soft Ware를 사용하여 길이( $\mu\text{m}$ )를 측정하였다.

### 4) 면역조직화학염색(Immunohistochemical stain)

파라핀 블록 절편으로 면역조직화학 염색을 실시하였다. 일차 항체로 rabbit Nestin (1 : 4,000, ab 5968, abCAM, Cambridge, UK), rabbit keratin 15 (1 : 200, NB 100-91841, Novus Biologicals, USA), rabbit Ki-67 (1 : 200, RM-9106-S0, Labvision, California, USA)을 사용하였고, 면역조직화학염색은 Polink-2 plus Rabbit DAB kit (D41-125, GBI, WA, USA)를 사용하였다.

Nestin은 세포질, keratin 15는 세포질, Ki-67은 핵에서 발현한 것을 양성으로 하였고, 화상부위와 주위 정상부위의 진피낭에서의 발현을 관찰하였다.

Ki-67과 keratin 15는 재생상피에서 발현하는 양상이 정상 상피에서와 다르고, 부위마다 발현하는 양상이 달라서 화상으로 손상을 입은 진피 위로 자라는 재생상피(원위부), 원위부 재생상피와 정상부위 중간에 존재하면서 아래 진피층과 붙어 있는 재생상피(근위부)로 나누어 관찰하였다. 원위부에서는 Ki-67과 keratin 15이 발현하지 않았으며, 근위부는 Ki-67의 발현이 기저세포층뿐만 아니라 그 위층에도 발현하여 중층을 형성하였다. Keratin 15는 기저세포층과 위의 몇 층에서도 발현하지 않아서 그 부위의 길이를 각각 측정하였다. 독일 Zeiss 현미경으로 관찰하였고, AxioCamera로 촬영하여, Axio Vision Soft Ware를 사용하여 길이( $\mu\text{m}$ )를 측정하였다.

### 5) 통계분석

모든 자료의 분석은 SAS (version No. 9.1) 통계 프로그램

을 이용하였고, 지표간의 상관관계는 Pearson  $\chi^2$  test, Duncan's multiple range test로 검정하였으며, 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

## 결 과

### 1) 염증세포침윤도(Cellularity)

염증세포들은 주로 화상부위에 두꺼운 띠모양으로 상피와 평행하게 침윤하였다. 대조군에서는 화상 후 2일, AC군에서는 화상 후 7일, SF군에서는 화상 후 14일에 가장 많았다. 대조군에서는 2일 이후에 침윤이 감소하였고, AC군은 7일 이후에 감소하였으며 SF군은 7일 이후에도 침윤은 그대로 있었다. 대조군에 비하여 SF군에서 염증세포침윤도가 7일, 14일에 유의하게 높았다( $P<0.05$ )(Table 1). AC군은 대조군에 비하여 2일, 7일, 14일에 증가하였고( $P<0.05$ )(Table 1), AC군과 SF군의 비교에서는 전반적으로 SF군에서 염증세포침윤도가 높았으며 14일( $72.50\pm8.21$ )에는 유의하게 높았다( $P<0.05$ )(Table 1).

### 2) 근육층의 위치

대조군은 화상 후 7일부터 화상부위 근육층이 주위의 정상 근육층보다 올라갔으며, AC군도 7일부터 올라갔으나, 대조군에 비하면 높지 않았다( $P<0.05$ )(Table 1). SF군은 화상 후 7일에도 화상부위 근육층이 주위 정상부위 근육과 동일한 위치에 있었고, 14일 쯤 올라갔다. 그러나, 대조군보다는 적게 올라갔다( $P<0.05$ )(Table 1).

### 3) 육아조직의 양

화상 후 7일에 모든 군에서 육아조직을 관찰할 수 있었다. 육아 조직은 14일에 SF군에서 가장 많이 생성되었으며( $74.66\pm9.85$ ), SF군에서 대조군 및 AC군 양군과 비교해서 의미있게 증가하였다( $P<0.05$ )(Table 1).

### 4) 재생 상피의 길이 측정

재생 상피는 화상 후 2일부터 관찰되었고, 14일에는 가장 길었다. SF군에서 재생 상피의 길이가 가장 길었다( $2,004.24\mu\text{m}\pm113.69$ )( $P<0.05$ )(Table 1). 그러나, 21일에는 화상부위가 완전히 봉합되어서 재생 상피의 길이를 측정할 수 없었다.

**Table 1.** Histologic changes in dressed wounds at 2, 7, 14 and 21 days after burn

| Dressing/<br>days | Cellularity (%) | *    | Location of<br>muscle layer | * | Amount of<br>Granulation<br>tissue (%) | * | Length of<br>regenerated<br>epithelium ( $\mu\text{m}$ ) | *       |
|-------------------|-----------------|------|-----------------------------|---|--|---|--|---------|
| 0 day<br>Control  | 0               |      | 0                           | C | 0                                      |   | 0  |         |
| 2                 | $25.50\pm17.38$ | B, C | 0                           | C | 0                                      | C | $42.61\pm54.46$  | D       |
| 7                 | $17.44\pm20.78$ | C, D | 2                           | A | $22.77\pm4.38$                         | B | $1,021.32\pm310.76$                                      | B       |
| 14                | $8.50\pm9.81$   | D    | 2                           | A | $23.00\pm12.53$                        | B | $1,421.32\pm212.49$                                      | A, B, C |
| 21                | -               |      | -                           |   | $4.63\pm2.46$                          | C | -  |         |
| AC                |                 |      |                             |   |  |   |  |         |
| 2                 | $8.00\pm9.34$   | D    | 0                           | C | 0                                      | C | $41.65\pm86.28$  | D       |
| 7                 | $36.33\pm5.85$  | B    | $1.33\pm0.97$               | B | $19.55\pm13.74$                        | B | $812.22\pm212.08$  | C, D    |
| 14                | $32.83\pm18.63$ | B    | 2                           | A | $27.12\pm4.38$                         | B | $1,794.99\pm3,021.32$                                    | A, B    |
| 21                | -               |      | -                           |   | $7.66\pm10.42$                         | C | -  |         |
| SF                |                 |      |                             |   |  |   |  |         |
| 2                 | $17.58\pm5.85$  | C, D | 0                           | C | 0                                      | C | $222.89\pm444.79$  | D       |
| 7                 | $36.88\pm8.16$  | B    | 0                           | C | $6.44\pm4.03$                          | C | $1,128.48\pm343.14$                                      | B, C    |
| 14                | $72.50\pm8.21$  | A    | $1.00\pm1.09$               | B | $74.66\pm9.85$                         | A | $2,004.24\pm113.69$                                      | A       |
| 21                | -               |      | -                           |   | $27.66\pm23.93$                        | B | -  |         |

Control represents the animals with burn wound dressed with duoderm only. AC group represents the animals with burn wound dressed with aqua cell and duoderm. SF group represent the animals with burn wound dressed with Silk fibroin film and duoderm. \*Duncan's multiple range test: Means with the same letter are not significantly different. Means with a different letter are significantly different ( $P<0.05$ ). Example = A, B are significantly different ( $P<0.05$ ). Cellularity and Amount of granulation tissue represent the percentage in total area of wound.

## 5) Nestin의 발현(Fig. 1)

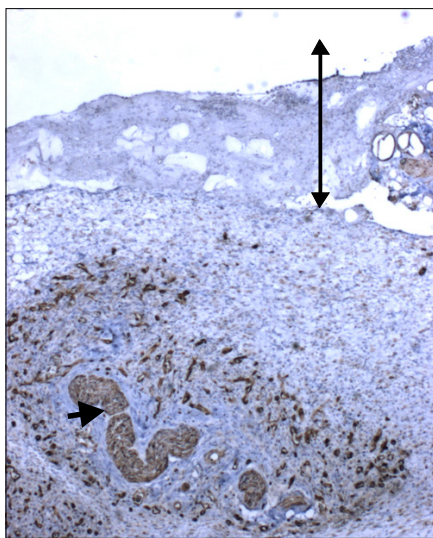
화상부위에서 nestin은 주로 육아조직의 내피세포에서 발현하였고 육아조직의 양과 비례하였다.

## 6) Keratin 15의 발현(Table 2, Fig. 2)

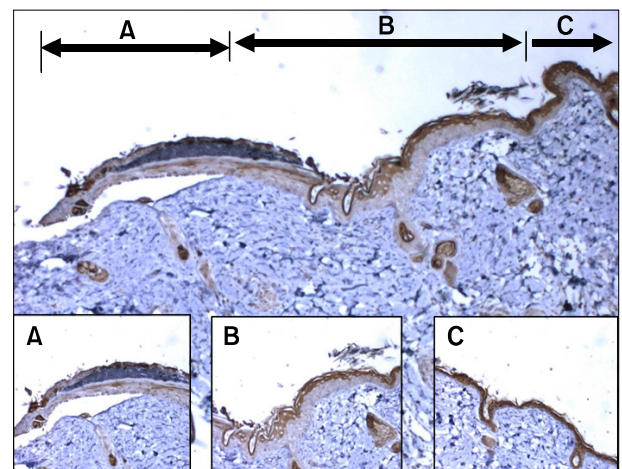
정상 상피에서는 keratin 15가 기저세포에서만 발현하지 않았고, 상부에서는 발현하였다. 재생상피에서는 keratin 15의 발현이 정상상피와는 달랐다. 원위부 재생상피에서는 keratin 15의 발현이 화상 후 14일까지 관찰되지 않거나 소

수에서만 관찰되었다. 화상 후 2일에는 대조군, AC 및 SF 군에서 기저부부터 표면까지 전층에서 발현하지 않았다. 발현되지 않은 부위의 길이는 화상 후 14일에 SF에서 가장 길었으며( $1,258.00 \mu\text{m} \pm 599.93$ ), 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

근위부 재생상피에서는 keratin 15가 주로 표면층에서 발현되었지만, 기저부의 2~3층에서는 발현되지 않았다. 화상 후 2일에는 재생피화 정도가 대조군, AC, SF군에서 각각  $492.08 \mu\text{m}$ ,  $467.05 \mu\text{m}$  및  $820.45 \mu\text{m}$  길이로 발현하였으며, SF가 대조군에 비하여 유의한 차이를 보였다( $P < 0.05$ ).



**Fig. 1.** Immunohistochemical expression of nestin in granulation tissue 7 days after burn. The long and thin arrow indicates necrotic tissue after burn. Nestin presents in the capillaries and peripheral nerve bundles (short and thick arrow) in the granulation tissue under the necrotic tissue ( $\times 40$ ).



**Fig. 2.** Immunohistochemical expression of keratin 15 in regenerating epithelium 2 days after burn. A shows the distal part of regenerating epithelium without keratin 15 expression. B shows the proximal part of regenerating epithelium with keratin 15 expression of superficial layer. C shows the normal epidermis with keratin 15 expression of the full thickness skin except basal layer ( $\times 40$ , Inset:  $\times 100$ ).

**Table 2.** The length of the expression of CK15 in regenerating epithelium

|         | Day 2                       |                               |                            | Day 7                       |                               |                            | Day 14                      |                               |                            |
|---------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|         | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) |
| Control | 206.23 $\pm$<br>82.29       | 492.08 $\pm$<br>174.62        | 698.31 $\pm$<br>204.72     | 350.59 $\pm$<br>79.08       | 797.99 $\pm$<br>113.76        | 1,148.59 $\pm$<br>152.05   | 951.12 $\pm$<br>336.45      | 712.43 $\pm$<br>159.10        | 1,663.55 $\pm$<br>490.76   |
| AC      | 265.06 $\pm$<br>105.24      | 467.05 $\pm$<br>113.65        | 732.11 $\pm$<br>168.50     | 944.54 $\pm$<br>214.75      | 290.53 $\pm$<br>110.90        | 1,235.08 $\pm$<br>133.70   | 646.73 $\pm$<br>304.64      | 789.07 $\pm$<br>319.34        | 1,435.81 $\pm$<br>503.04   |
| SF      | 315.23 $\pm$<br>83.11       | 820.45 $\pm$<br>107.33        | 1,135.68 $\pm$<br>98.68    | 1,125.68 $\pm$<br>114.81    | 528.94 $\pm$<br>114.85        | 1,654.63 $\pm$<br>10.28    | 1,258.00 $\pm$<br>599.93    | 1,347.71 $\pm$<br>320.75      | 2,605.71 $\pm$<br>920.69   |

Control represents the animals with burn wound dressed with duoderm only. AC group represents the animals with burn wound dressed with aqua cell and duoderm. SF group represents the animals with burn wound dressed with Silk fibroin film and duoderm. \*Duncan's multiple range test: Means with the same letter are not significantly different. Means with a different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Example = A, B are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Expression of Ki-67 in regenerating epithelium.

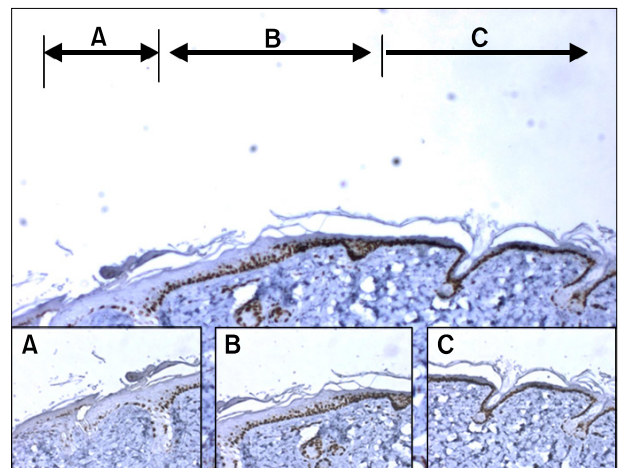
|         | Day 2                       |                               |                            | Day 7                       |                               |                            | Day 14                      |                               |                            |
|---------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|         | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) | Distal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Proximal<br>( $\mu\text{m}$ ) | Total<br>( $\mu\text{m}$ ) |
| Control | 204.72 $\pm$<br>122.75 A    | 302.29 $\pm$<br>96.35 A       | 507.01 $\pm$<br>172.84 B   | 246.32 $\pm$<br>78.76 B     | 1,001.37 $\pm$<br>203.65 A, B | 1,247.69 $\pm$<br>155.92 A | 415.91 $\pm$<br>100.72 A    | 966.75 $\pm$<br>12.25 B       | 1,382.66 $\pm$<br>88.47 B  |
| AC      | 194.18 $\pm$<br>67.63 A     | 493.93 $\pm$<br>119.32 A      | 688.11 $\pm$<br>90.91 B    | 661.07 $\pm$<br>222.52 A    | 766.41 $\pm$<br>147.01 B      | 1,427.47 $\pm$<br>268.44 A | 499.05 $\pm$<br>291.77 A    | 1,340.26 $\pm$<br>305.92 A, B | 1,839.31 $\pm$<br>474.06 A |
| SF      | 353.85 $\pm$<br>166.89 A    | 521.76 $\pm$<br>266.59 A      | 875.61 $\pm$<br>253.14 A   | 447.71 $\pm$<br>182.45 B    | 1,195.59 $\pm$<br>362.81 A    | 1,643.31 $\pm$<br>223.18 A | 573.73 $\pm$<br>7.63 A      | 1,415.25 $\pm$<br>551.57 A    | 1,988.97 $\pm$<br>543.94 A |

Control represent the animals with burn wound dressed with duoderm only. AC group represent the animals with burn wound dressed with aqua cell and duoderm. SF group represent the animals with burn wound dressed with Silk fibroin film and duoderm. \*Duncan's multiple range test: Means with the same letter are not significantly different. Means with a different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Example = A, B are significantly different ( $P < 0.05$ ).

화상 후 7일에는 대조군, AC군, SF군에서 각각 797.99  $\mu\text{m}$ , 290.53  $\mu\text{m}$  및 528.94  $\mu\text{m}$ 이었으며 각 군간에 재상피화에 유의한 차이를 보였다( $P < 0.05$ ). 화상 후 14일에는 재상피화 정도가 대조군, AC군, SF군에서 712.43  $\mu\text{m}$ , 789.07  $\mu\text{m}$  및 1,247.71  $\mu\text{m}$  길이로 발현되었으며, SF군과 대조군 간, SF군과 AC군 간에는 차이가 있었다( $P < 0.05$ ). 근위부와 원위부 재생상피의 길이를 합했을 때 화상 후 2일, 7일, 14일에는 SF군에서 가장 길었으며, 화상 후 2일 및 14일에는 SF군에서 1,135.68  $\mu\text{m}$  및 2,605.71  $\mu\text{m}$ 로 대조군에 비하여 의미있게 길었다( $P < 0.05$ ).

#### 6) Ki-67의 발현(Table 3, Fig. 3)

정상상피에서는 Ki-67은 기저세포층에서만 발현하였다. 그러나 화상의원위부 재생상피에서는 Ki-67의 발현이 거의 없거나 간혹 관찰되었다. 화상 후 2일에는 대조군, AC군, SF군에서 각각 204.72  $\mu\text{m}$ , 194.18  $\mu\text{m}$ , 및 353.85  $\mu\text{m}$  길이로 발현하여 SF군에서 대조군과 AC군에 비교하여 길었고, 7일에는 246.32  $\mu\text{m}$ , 661.07  $\mu\text{m}$  및 447.71  $\mu\text{m}$ 이었으며, AC군에서 길었다( $P < 0.05$ ). 14일에는 Ki-67의 발현길이는 대조군, AC군, SF군에서 415.91  $\mu\text{m}$ , 499.05  $\mu\text{m}$  및 573.73  $\mu\text{m}$ 이었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. 근위부 재생상피에서는 정상상피와는 다르게 Ki-67의 발현이 기저세포뿐만 아니라 상부 몇 개의 층에서도 발현하였다. 화상 후 2일에는 Ki-67의 발현이 302.29  $\mu\text{m}$ , 493.93  $\mu\text{m}$  및 521.76  $\mu\text{m}$ 이었으며 SF군에서 길이가 가장 길었다. 화상 후 7일에는 대조군, AC군, SF군에서 1001.37  $\mu\text{m}$ , 766.41  $\mu\text{m}$  및 1,195.59  $\mu\text{m}$ 으로 SF군이 가장 길었으며 통계학적으로 유의하게 AC군



**Fig. 3.** Immunohistochemical expression of Ki-67 in regenerating epithelium on 2 days after burn. A shows the distal part of regenerating epithelium with sparse Ki-67 expression. B shows the proximal part of regenerating epithelium with Ki-67 expression of 2-3 basal layers. C shows the normal epidermis with Ki-67 expression of basal layer ( $\times 40$ , Inset:  $\times 100$ ).

에 비하여 길었다( $P < 0.05$ ). 화상 후 14일에는 SF군에서 발현길이가 1,415.25  $\mu\text{m}$ 로 가장 길었다.

원위부와 근위부 재생상피의 길이를 합친 길이는 화상 후 2일 및 14일( $P < 0.05$ ), 7일에도 SF군에서 가장 길었다.

## 고 찰

상처면의 회복에 대한 최초 기록은 BC2500년경 고대 Sumerian 도판에서 발견할 수 있고, 이집트, 메소포타미아,

인도 등의 고대문명에도 기록이 남아 있다. 의학의 아버지인 그리스의 Hippocrates는 창상관리의 기본 개념으로 감염이 없는 창상을 피복하지 않고 건조시켜서 가피를 형성시켜야 한다고 주장하였다. 19세기 근대 세균학의 아버지인 Pasteur는 ‘창상에서의 화농은 세균감염에 의한 것이고 창상치유에 좋지 않다’고 하였고, 창상면을 건조시켜서 처치하는 것이 감염을 방지하는 올바른 방법으로 생각하였다. 1962년 Winter는 폴리에틸렌 필름으로 창상을 밀폐해서 습윤상태로 유지시켜 치유한 돼지 창상의 상피형성 속도가 건조시켜 가피를 형성시켜서 치유한 창상의 경우보다 2배 빠르게 진행된다는 것을 보고하였다. 또한 1963년 Hinman과 Maibach는 사람의 경우도 동일한 결과를 보이고 습윤 창상 환경이 창상치유에 필요함을 밝혔다. 그리고 이후 다양한 연구 결과가 발표되었고, 창상을 습윤 환경으로 유지시켜주기 위한 목적의 드레싱재가 다양하게 개발되었다.(1)

본 연구에서 사용된 실크 피브로인은 섬유의 한 종류이기도 하지만, 젤, 가루, 다공성막으로 사용할 수 있다. 또한 외과 봉합사, 효소조정기술을 이용한 바이오센서, 선택적 투과막, 투약을 조절하는 장치, 상처 회복, 골접합기능 등 여러 분야에서 사용하고 있다.(5) 실크 피브로인은 fibroin과 sericin으로 구성되어 있는데 전체 무게 중에 fibroin이 70~80%를 차지하고, sericin이 20~30%이다. Sericin은 serine을 많이 함유하고 있으며, fibroin을 감싸고 있다. Sericin은 특히 지질 과산화(lipid peroxidation)를 억제하고, 티로시나아제(tyrosinase)의 활동력을 방해하므로, 피부를 촉촉하게 하고, 주름을 방지하는 작용을 한다고 한다.(6)

Sugihara 등(7)의 실험에서는 피부 전층을 제거한 후에 실크 피브로인으로 드레싱을 하였을 때 듀오액티브(Duoactive) 드레싱제제보다 염증세포 침윤이 적었다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 고온으로 인하여 손상된 조직이 존재하면서 치유되는 과정이기 때문인지 SF군에서 염증세포침윤도가 가장 높았다. 일반적으로 피부 창상 치유과정에서 염증세포들의 침윤의 의미는 손상된 조직들을 제거하고 사이토카인과 성장인자를 제공하여 창상 치유에 도움을 준다고 한다.(8-10) 창상 치유 과정에서 실크 피브로인은 섬유아세포의 부착과 성장을 도우며, 섬유아세포를 활성화시켜서 콜라겐의 합성을 자극한다.(10) 세포배양용기에 실크 피브로인을 입혀서 섬유아세포를 2차원으로 배양하였을 때, 세포의 부착이 2.2배 향상되었고, 섬유아세포의 포도당흡수가 증가하였으며 글루타민의 소비가 감소하였다고 한다. 섬유아세포가 IL-1 beta, TNF-alpha, TGF-beta1과 같은 염증에 영

향을 주는 사이토카인의 분비는 보이지 않았지만 IL-6의 분비는 증가하였다고 한다.(11)

Yeo 등(12)은 생쥐(Sprague-Dawley)의 피부에 전기화상을 입힌 후 실크 피브로인으로 드레싱을 하였을 때 콜라겐 증식이 대조군에서 증가하였다고 보고하였다. 또한 실크 피브로인은 뼈, 인대, 힘줄, 혈관, 연골의 재생을 돕는다고 하였다.(13)

Choi 등(2)에 따르면, 무모쥐의 화상부위에서 nestin의 발현이 육아조직에서 주로 발현하였다고 하였다. 결국 육아조직의 양에 비례하여 nestin의 발현이 증가한다고 보면, 본 실험에서는 육아조직의 양이 가장 많은 SF군에서 nestin의 발현도 가장 많았을 것이며, 이 nestin의 발현이 기질의 재생을 도왔으리라 생각된다.

Liu 등(14)의 보고에 의하면, 실크 피브로인은 세포독성도 없으며, 세포의 부착이나 분열 주기, 자멸사(apoptosis) 등에 영향을 미치지 않으며, 섬유아세포의 FGF2 및 PDGF의 분비를 유지시켜서 신생혈관의 생성을 촉진시키므로 창상의 치유과정을 돕는다고 하였다. 아마도 위의 기술한 여러 기전에 의해 SF군에서는 손상 입은 부위의 기질이 빠르게 재생이 진행되어, 근육층이 진피층으로 이동하지 않고 해부학적 위치를 그대로 유지할 수 있었던 것으로 생각된다.

H&E 염색에서도 재생상피를 관찰할 수 있었는데 SF에서 재생상피 길이가 가장 길었다. 또한 keratin 15와 Ki-67의 면역조직염색을 통하여 좀 더 생물학적인 면으로 재생상피를 관찰할 수 있었다. Ki-67과 keratin 15는 재생상피에서 발현하는 양상이 정상상피에서와 다르고, 재생상피에서도 원위부와 근부위에 발현하는 양상이 달라서 화상으로 손상을 입은 진피 위로 자라는 재생상피(원위부), 원위부 재생상피와 정상상피 중간에 존재하면서 아래 진피층과 붙어 있는 재생상피(근위부)로 나누어 관찰하였다. Keratin 15는 기저세포뿐만 아니라 상부 2~3층에서도 발현하지 않았지만, Ki-67은 기저세포층뿐만 아니라 상부 2~3층에서도 발현하고 있어서 근위부의 재생상피에서 주로 활발하게 세포분열이 일어나 상피의 재생을 돕는 것으로 생각된다. SF에서 원위부 및 근위부의 길이가 대체적으로 가장 긴 것으로 보아 SF가 상피의 재생을 돕는 역할을 하는 것으로 생각된다.

Choi 등(2)에 따르면, keratin 15는 재생상피에서는 발현하지 않고 성숙한 표피세포에서만 발현한다고 하였다. 본 실험에서도 keratin 15는 원위부 재생상피에서는 발현하지 않거나 소량 발현하였고, 근위부 재생상피에서는 발현이 증가하였으나, 정상상피보다는 적었다.



Ki-67의 발현은 원위부 재생상피에서는 발현이 적었고, 근위부 재생상피에서는 기저층뿐만 아니라 여러 층에서 발현하였고, 정상부위에서는 기저층에서만 발현하였다. Patel 등(15)도 창상 치유 과정에서 창상연접 부위 상피의 기저층과 기저상부층에서 Ki-67의 발현이 증가한다고 하였다. 근위부 재생상피부위가 세포분열이 활발하게 일어나는 부위로 생각되며, 세포분열에서 만들어진 상피들이 원위부로 옮겨가는 것으로 생각된다. Repesh와 Oberpriller(16)는 이동 중인 상피세포의 앞쪽이 다른 세포들과 만나면, 상처의 중앙부위의 상피세포들은 순간적으로 이동을 멈추고 세포들이 차곡차곡 쌓이게 되고, 이러한 세포들의 움직임에 의해 상처 중앙부위에서 상피조직의 두께는 하나 또는 두 개의 층을 형성한다고 하였다. 상처 봉합에 관여하는 세포들은 주로 인접한 상피 조직에서 유래된다고 하였으며 상처가 봉합되는 동안 포유류 상피는 롤링(rolling)과 활주(sliding and crawling)의 형태로 움직인다고 알려져 있다.(17)

재생상피의 길이도 SF 군에서 가장 길었는데, Roh 등(18)에 의하면, 실크 피브로인이 상피 세포의 세포분열을 자극하여 재생을 촉진시킨다고 하였다.

## 결 론

실크 피브로인 드레싱제는 상피의 Ki-67의 발현을 증가시켜 상피의 재생화를 촉진시켰으며, nestin의 발현으로 육아조직이 형성되어 간엽조직의 재생을 촉진시켜서 근육층의 해부학적 위치유지시키면서 창상의 치유를 촉진하는 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Korean Research Group for Wound Care. *Advances in Wound Care*. 1st ed. Seoul: Korea Medical Book Publisher; 2002. p.11-9, 167-95.
- 2) Choi YH, Kim MG, Ahn DH, Cho SJ, Hong SH, Lee JY, et al. Immunohistochemical expression of stem cell markers during the wound healing process of cutaneous burn. *J Korean Surg Soc* 2010;79:1-7.
- 3) Zhu H, Wei X, Bian K, Murad F. Effects of nitric oxide on skin burn wound healing. *J Burn Care Res* 2008;29:804-14.
- 4) Yoon HJ, Shin JW, Kim YK, Kim JE, Cho KH. The effect of vitamin C and E on the expression of the cutaneous basement membrane components. *Korean J Invest Dermatol* 2007;14:87-98.
- 5) Fredi G, Tsukada M, Beretta S. Structure and physical properties of silk fibroin/polyacrylamide blend films. *J Appl Polym Sci* 1999;71:1563-71.
- 6) Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:145-7.
- 7) Sugihara A, Sugiura K, Morita H, Ninagawa T, Tubouchi K, Tobe R, et al. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;225:58-64.
- 8) Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol* 2001;28:521-34.
- 9) Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835-70.
- 10) Suh W, Kim KL, Kim JM, Shin IS, Lee YS, Lee JY, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells* 2005;23:1571-8.
- 11) Chiarini A, Petrini P, Bozzini S, Pra ID, Armato U. Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials* 2003; 24:789-99.
- 12) Yeo JH, Lee KG, Lee YW. Collagen growth effects in rats using B.mori fibroin. *Korean J Sericult Sci* 2001;43:49-52.
- 13) Sobajo C, Behzad F, Yuan XF, Bayat A. Silk: a potential medium for tissue engineering. *Eplasty* 2008;8:e47.
- 14) Liu TL, Miao JC, Sheng WH, Xie YF, Huang Q, Shan YB, et al. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010;11:10-6.
- 15) Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE. Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol* 2006;126:497-502.
- 16) 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* 1980;159:187-208.
- 17) Jeong MJ. Wound healing and cell migration, trends in medical research cell organization. *Korean Soc Med Biochem Mol Biol News* 2000;7:20-6.
- 18) Roh DH, Kang SY, Kim JY, Kwon YB, Kweon HY, Lee KG, et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:547-52.