

## 양막과 표피세포 및 골수 간엽세포의 피부 결손 치유 효과

김철홍 · 김성수 · 손성근 · 김달희 · 송창근 · 김현준

동아대학교 의과대학 정형외과학교실

### The Effect of Human Amniotic Membrane, Epidermal Cells and Marrow Mesenchymal Stem Cells in Healing a Skin Defect

Chul Hong Kim, M.D., Sung Soo Kim, M.D., Sung Keun Shon, M.D.,  
Dal Hee Kim, M.D., Chang Geun Song, M.D., and Hyun Jun Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Dong-A University, Busan, Korea

**Purpose:** The purpose of this study was to investigate the transplantation results of human amniotic membrane (HAM), epidermal cells, or marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in healing a skin defect.

**Materials and Methods:** Defects (full-thickness) in rabbits were treated with HAM alone (group A), HAM injected with cultivated epidermal cells (group B), HAM injected with cultivated MSCs (group C), or Vaseline gauze (group D). Tissue granulation, regeneration, re-epithelization and healing time were measured. Defects and healed area were calculated 2 weeks after surgery.

**Results:** The mean healing area was 67.5%, 81.7%, 83.2% and 49.5% in each group, with all treatment groups significantly different than group D ( $p < 0.01$ ), and groups B and C compared higher than group A ( $p < 0.05$ ). The healing time of groups A, B, and C was 5.7 to 6.4 days faster than that of group D ( $p < 0.01$ ). Histologic analysis showed that the new epidermis covered nearly the whole wound surface in group B and C, and contained granulated tissue with fibroblasts, capillaries, and collagen.

**Conclusion:** HAM grafts injected with cultivated epidermal cells or MSCs promoted healing of skin defects.

**Key Words:** Amniotic membrane, Epidermal cells, MSCs, Skin defect

## 서 론

지금까지 피부 결손의 치료에 있어서 피부이식이 가장 효과적인 방법이었다. 그러나 본인이나 타인의 피부 공급이 제한되어 있다. 인공 합성 피부의 이식도 많이 사용되고 있으나 면역 반응에 의해 많은 어려움이 있다. 최근에는 인공합성 피부 대신 양막으로 구성된 진피 대체물이 개발되었고<sup>8)</sup>, 조직 합성 기술의 발전 및 응용으로 자체 모세포를 이용하여 체외에서 이를 증식 배양함이 가능해졌다. 급성피부결손에서 이식된 골수 간엽 세포(bone marrow mesenchymal stem cells)가 피부재생에 효과적이라는 보고도 있었다<sup>21)</sup>.

골수 간엽세포는 골, 연골, 근육, 지방세포로 분화할

수 있는 다양한 능력을 가지고 있다<sup>4)</sup>. 배양된 골수 간엽 세포로 피부 결손을 치료하기 위해서는 체외에서 배양된 표피 및 진피 조직 성분을 갖춘 이식 피부를 만들어 상처 치유에 적용할 수 있으며, 결손 조직을 대체할 적절한 배양세포와 이식피부의 선택이 필요하다.

양막은 두꺼운 기저막과 무혈관성 기질로 이루어진 태반막으로 창상 치료에 있어 새로운 기저막을 제공한다. 또한 여러 가지 사이토카인의 분비와 억제 및 상처의 미세 환경을 변화시켜 육아종의 형성과 상피화의 촉진, 창상 부위의 통증을 감소시키는 역할을 한다<sup>11)</sup>. 본 연구에서는 토끼의 피부 결손에 동종의 표피세포와 골수 간엽세포를 배양세포로 하고 인간의 양막(HAM)을 이식 피부의 재료로

통신저자 : 김 성 수

부산광역시 서구 동대신동 3가 1  
동아대학교 의과대학 정형외과학교실  
TEL: 051-240-2953 • FAX: 051-254-6757  
E-mail: sskim2@dau.ac.kr

Address reprint requests to

Sung Soo Kim, M.D.  
Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Dong-A University,  
3-1, Dongdaesin-dong, Seo-gu, Busan 602-715, Korea  
Tel: +82,51-240-2953, Fax: +82,51-254-6757  
E-mail: sskim2@dau.ac.kr

선택하였다. 산모의 태반에서 분리한 양막에 각각 체외 배양 증식을 통해 얻어진 동종 표피세포와 골수 간엽세포를 양막 아래에 주입하여 이를 피부 상처 결손부에 이식함으로써 전체적인 치유 상태 및 조직학적 차이점을 관찰하고 상처 치유 과정에 미치는 영향을 분석해 보고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

#### 1) 실험동물

생후 15주된 체중 2-2.5 kg인 건강한 뉴질랜드산 화이트종 집토끼를 사용하였고 실험동물은 실험 1주일 전부터 동일한 온도(21°C)와 습도(45%)를 유지한 사육실에서 동일 배합사료로 사육하여 환경에 적응시켰다.

#### 2) 실험군

9마리 토끼를 대상으로 하였고, 1마리는 표피세포와 골수 채취 및 배양을 위해 사용하였고, 나머지 8마리는 각각 등에 피부 및 피하 절개하여 2×2 cm의 전층 피부 결손을 1마리당 5개, 총 40개를 만들어 각 군당 10개씩 이식을 시행하였다. 양막만을 이식한 A군, 양막과 양막 아래에 배양한 표피세포를 주입한 B군, 양막과 양막 아래에 배양한 골수 간엽세포를 주입한 C군 및 단순 바세린 거즈를 부착한 D군으로 나누었다. 이식 1주 후부터 매일 상처를 치료하면서 육안적으로 각 군의 육아 조직 성장, 상피화 및 가피 형성, 분비물 삼출 정도 등 치유 상태를

관찰하고 각 군의 상처 치유 기간을 비교하였다. 상처 치유 후 상처 부위의 조직을 상처 변연과 정상 조직의 경계 부위에서 0.5×0.5 cm 절제하여 이를 조직학적으로 검사하였고, 일반적인 조직학적 변화와 염증세포의 침윤 정도, 섬유화 등을 비교 관찰하였다.

## 2. 방법

### 1) 양막의 채취와 보관

양막은 본인의 양막이 동물실험에 사용되는 것에 대한 동의를 한 한명의 제왕절개술을 받은 산모의 태반에서 분리하여 양막에 붙어있는 이물질을 생리식염수로 4회 세척한 후 gentamicin과 amphotericin B가 첨가된 생리식염수로 4회 세척하였다. 이렇게 처리된 양막을 nitro-cellulose paper (Bio-Rad Inc, Gainesville, FL, USA) 위에 간질 쪽을 밑으로 향하게 하여 종이에 부착시키고 약 3×3 cm 크기로 자른 후 DMEM (Dulbecco modified eagle medium, Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD, USA)과 glycerol을 1 : 1로 혼합한 보존액에 넣어 -80°C에서 보관하였다가 사용 전 실온에서 녹인 다음 피부 절개 부위에 알맞게 잘라 사용했다<sup>11)</sup>.

### 2) 표피세포의 분리 및 배양

토끼 표피를 메스를 이용하여 3×3 cm 크기로 채취하였다(Fig. 1-A). 채취된 표피를 평판에 놓고 생리식염수로 여러 번 세척하고 표피를 잘게 자른 후 Trypsin-

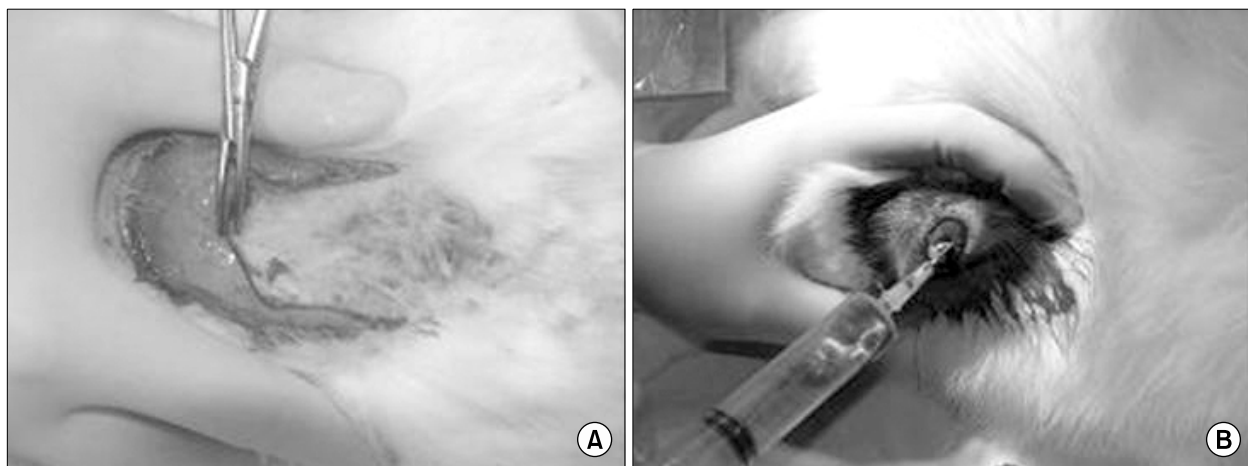


Fig. 1. (A) Incision of a 3×3 cm size of full-thickness skin for collection of epidermal cells. (B) Aspiration and collection of 10 cc bone marrow mesenchymal stem cells in the rabbit femur.

EDTA가 포함된 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO™, Grand Island, NY, USA) 용액에 넣고 4°C shaker에서 밤새 처리하였다. Cold shaking 하고 있는 조직을 꺼내어 HBSS 용액을 제거하고 RPMI-1640 (Hyclone Road, Logan, Utah, USA)을 첨가하여 5분 정도 두어 trypsinization을 중단시킨다. RPMI 1640을 제거한 뒤 HBSS 용액에 0.75% collagenase I (Sigma®, Steinheim, Germany)이 첨가된 HBSS 용액에 37°C의 shaking incubator에서 5분 동안 반응시킨 후, 반응용액을 시험관으로 옮겼으며, 남은 조직은 시간 간격을 5 분, 7 분, 10분으로 조정하면서 위 과정을 수차례 반복하였다. 교원질을 녹여서 모든 용액을 원심분리하여 상층액은 버리고, 조직배양 용기(25T flask)에 세포의 농도가  $1 \times 10^6$  cell/ml이 되도록 분주하여 37°C, 5% 배양기에 배양하였다. 배양액은 basal medium for mesenchymal stem cells (Stem cell technologies, Vancouver, BC, Canada)과 mesenchymal stem cell stimulatory supplements (Stem cell technologies, Vancouver, BC, Canada)를 9 : 1로 혼합한 후 fetal bovine serum for mesenchymal stem cell (Stem cell technologies, Vancouver, BC, Canada)을 10%로 넣어 주었다. 배양용기 바닥에 80% 이상 세포가 자라면 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포를 떼내어 3-4회 계대배양 하였다<sup>21)</sup>. 상기한 방법으로 충분한 양의 세포가 얻어지면 -70°C에서 보관하였다(Fig. 2-A).

### 3) 골수 간엽세포의 분리 및 배양

18게이지 주사침을 이용하여 토끼의 대퇴골에 삽입하여 골수를 10 cc 흡입 채취하였다(Fig. 1-B). 채취한 골수에 10% Pentaspan (Jeil Pharm, Seoul, Korea)를 이용하여 적혈구를 가라앉히고 상층액을 채취해서 원심 분리하여 혈장을 제거하였다. 부피가 1 : 1이 되도록 PBS (phosphate buffered saline)로 희석한 후 Ficoll-Hypaque (d=1.077 g/ml, Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 density gradient 방법으로 단핵구를 분리하였다. Ficoll-Hypaque 위에 조심스럽게 중층하여 2,500 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 형성된 저비중의 단핵구층을 흡인하여 새로운 시험관으로 옮기고 PBS로 2회 세척하였다. 다음은 표피세포와 동일한 방법으로 배양하여 보관하였다(Fig. 2-B).

### 4) 실험방법

Ketamin (35 mg/kg)과 xylazine (2% Rompun®, 5 mg/kg)을 근육 주사하여 마취하였다. 각각 양측 등을 제모하였고 betadine과 70% alcohol로 제모 부위를 닦고, 절개세트를 이용하여 피부 및 피하 절개하여 사각형(2×2 cm)의 전층 피부 결손을 만들었다(Fig. 3). 피부결손부위에 무균 면봉으로 삼출된 피를 닦은 후 생리식염수로 상처 부위를 세척하였으며 양막은 상온에서 해동하여 생리식염수로 세척 후 상처에 이식하기 위해 2×2 cm 크기로 자르고 기저막 층을 아래로 향하게 하여 부착한 후 nylon 5.0을 이용하여 양막을 상처 변연에 8-12군데 봉

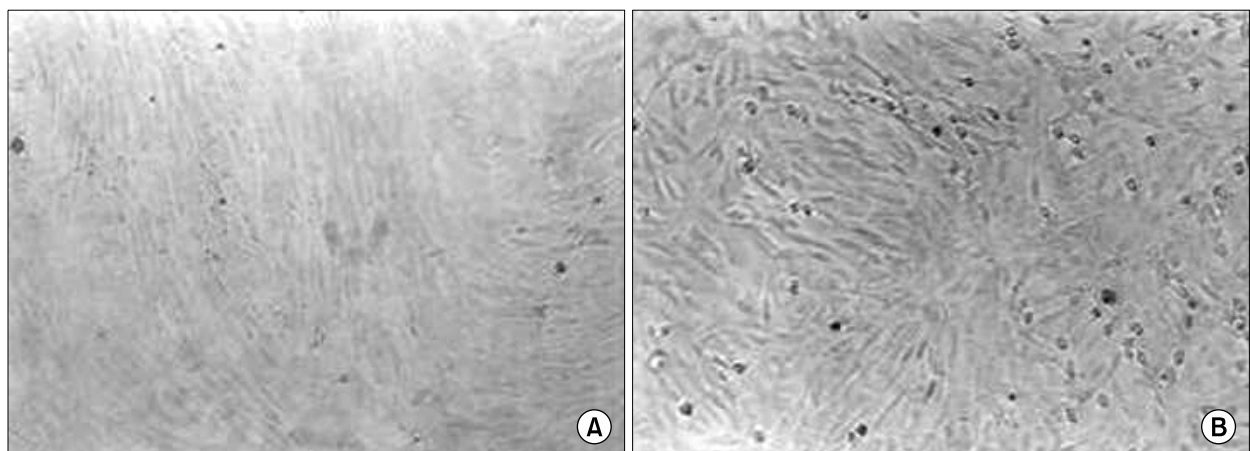


Fig. 2. Photographs of cultivated epidermal cells and mesenchymal stem cells in vitro. (A) Epidermal cells (total cells:  $6.8 \times 10^6$ , 5 cc). (B) Mesenchymal stem cells (total cells:  $6.8 \times 10^6$ , 5 cc).

합하였고 단순히 양막 만을 이식한 군을 A군으로 하였다 (Fig. 4-A). 배양된 냉동 표피세포를 실온에서 해동 시킨 후, 0.5 cc ( $6.8 \times 10^5$ 개의 세포)를 tuberculin syringe로 채취하여 양막 아래 공간에 주입한 군을 B군으로 (Fig. 4-B), 배양된 골수 간엽세포 0.5 cc ( $6.8 \times 10^5$ 개의 세포)를 양막 아래에 주입한 군을 C군으로 하였다 (Fig. 4-B). 양막 없이 수술실에서 사용하는 멸균 처리된 바세린 거즈로만 처리한 군을 D군으로 정하였다 (Fig. 4-C). 모든 상처 부위는 처치 후 소독 거즈로 덮고 고정하였다. 세균 감염을 방지하기 위해 수술 직후 cefazolin 100 mg을 1회 근육 주사하였다.

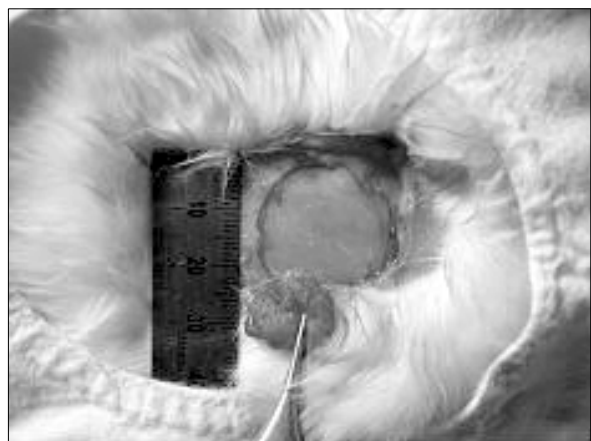


Fig. 3. A full-thickness skin defect of 2×2 cm in the rabbit.

#### 5) 육안 관찰 및 상처 치유의 평가

토끼들은 분리해서 사육하였고, 술 후 1주째부터 매일 상처를 치료하면서 육아 조직의 성장, 상피화 및 가피 형성, 분비물 삼출 정도 등 치유 상태를 관찰하고 상처 치유 기간을 비교하였다. 이식 후부터 상처 치유까지 각 군의 육안적 치유 상태를 사진 촬영하여 기록하면서 비교 평가하였다. 술 후 2주째, 가피의 가장 긴축과 이에 수직하는 가장 긴축의 길이를 곱하여 잔여면적을 측정하고, 치유 면적 백분율을 계산하였다<sup>18)</sup>. 상처 면적의 90% 이상이 상피 조직으로 치유된 경우를 상처 치유 완료의 기준으로 정하였다.

$$HP(\%) = (OA - RA) / OA \times 100$$

HP (healing area percentage): 치유 면적 백분율.

OA (original defect area): 최초 결손 면적.

RA (remaining defect area at 2 weeks)

: 2주 후 잔여면적.

통계학적 분석은 SPSS 12.0 통계 소프트웨어를 이용하였고 비모수검정인 Mann-Whitney검정을 시행하여  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 수준으로 판단하였다.

#### 6) 조직학적 검사

상처 치유 완료 후, 새로 형성된 조직을 상처 변연 및

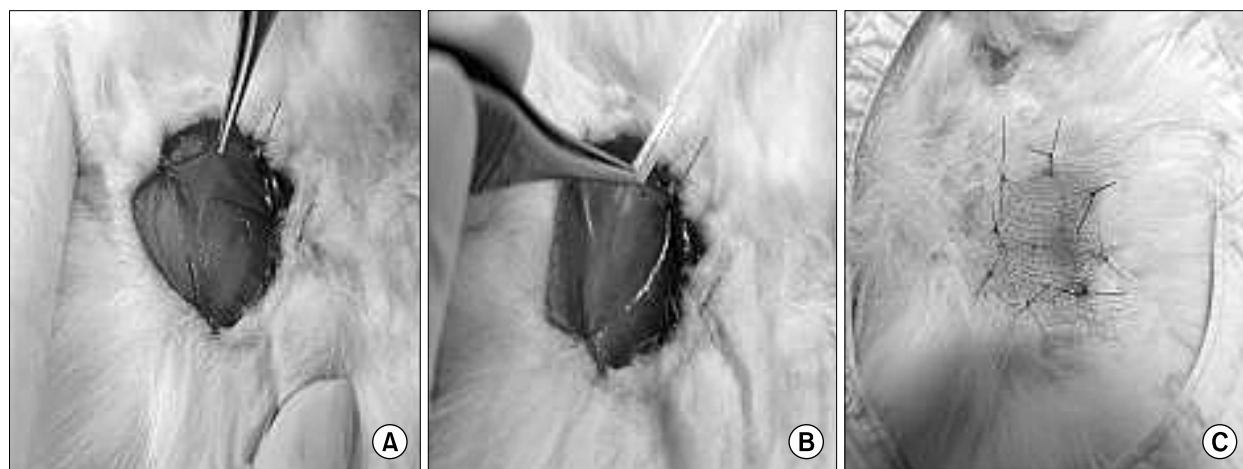


Fig. 4. Graft procedures in each group. (A) Sutured graft of human amniotic membrane. (B) Injection of epidermal cells or mesenchymal stem cells under the human amniotic membrane. (C) Wound covered with Vaseline gauze.

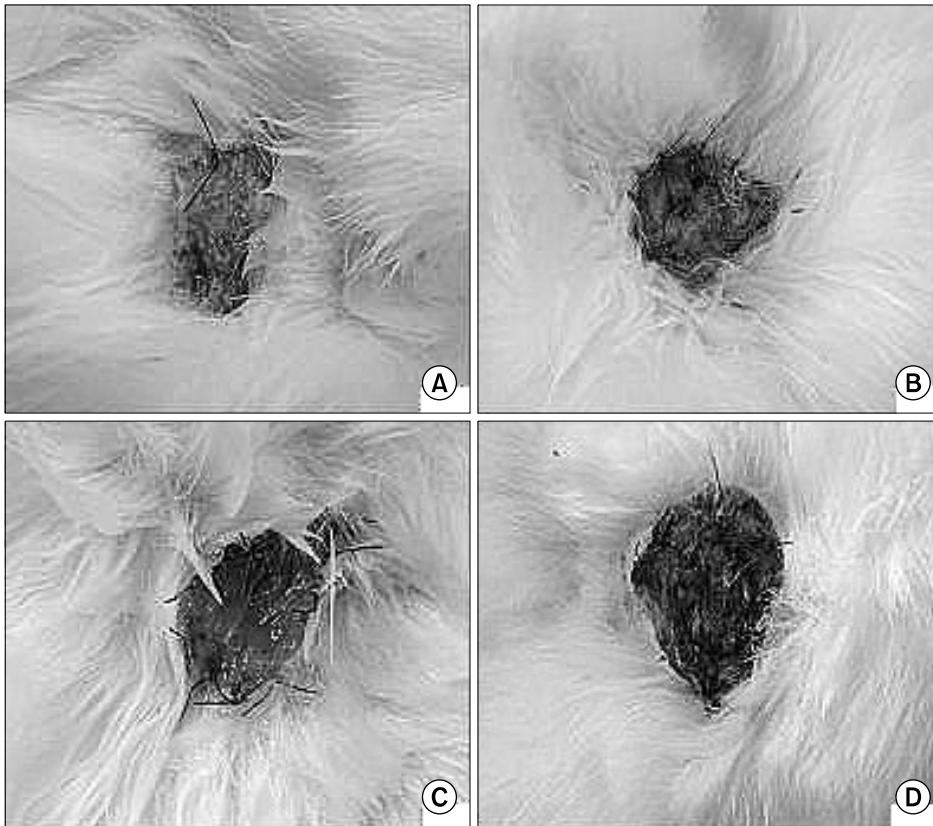


Fig. 5. Comparison of HAM alone (A), HAM with epidermal cells (B), HAM with MSCs (C), and the Vaseline gauze (D) group 1 week post-graft (HAM, human amniotic membrane; MSCs, mesenchymal stem cells).

정상 조직 경계 부위에서  $0.5 \times 0.5$  cm로 절제하여 포르말린에 고정 후 통상적인 parafin 포매를 하고, 이를 슬라이드로 만들어 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 시행하였다. H&E 염색에서 일반적인 조직학적 변화 및 치유 정도, 염증세포의 침윤 정도, 섬유화 등을 비교 관찰하였고 결과는 한 명의 병리학 전문의가 판독하였다.

## 결 과

### 1. 육안 관찰 및 상처 치유의 평가

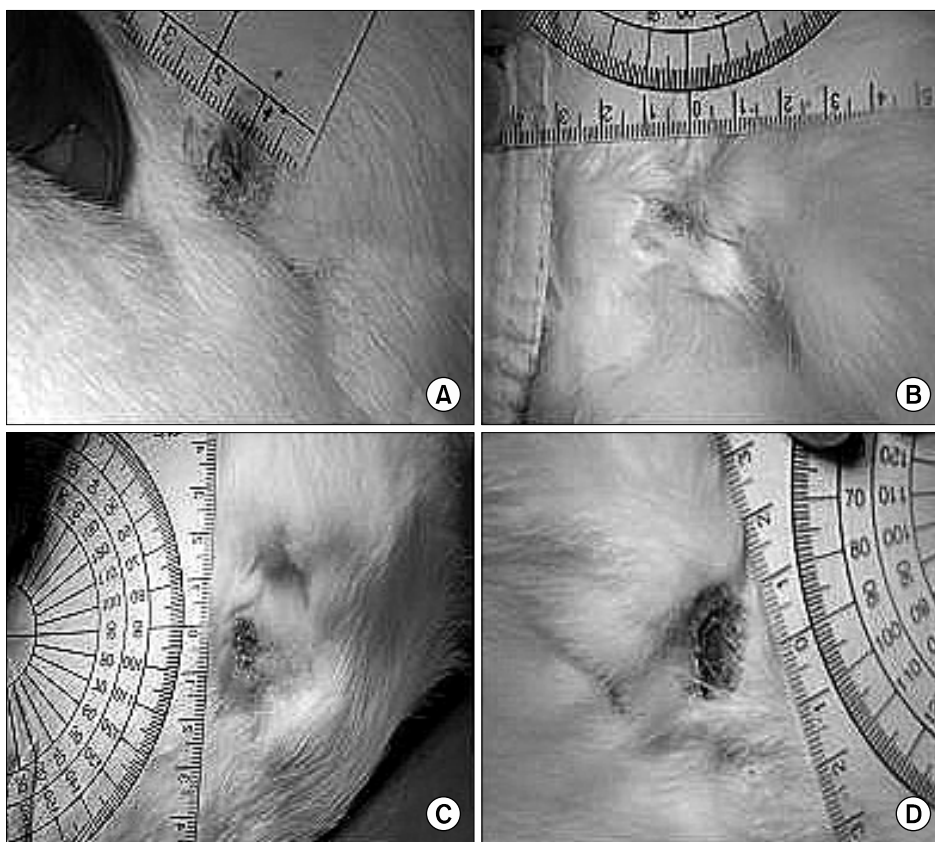
모든 토끼는 생존하였고 활동 및 식욕은 정상이었고 혈변, 혈뇨 또는 체중 감소 등 이상 소견은 보이지 않았다. 술 후 1주째, 상처를 개방하고 그 후 매일 치료하면서 상처 치유 상태를 관찰하였다. 바세린 거즈로 이식한 D군에서는 1주째까지 소량의 분비물 삼출을 보였으며 1주 후부터는 모든 상처 부위에서 약간의 건조를 보이고 선홍색 상피가 보이면서 뚜렷한 감염이나 괴사는 보이지 않고 건강한 육아 조직 상태를 보였다. 양막 이식군들은 바세린 거즈로 처리한 군에 비해 상처의 가장자리와 중심부가

비교적 균등하게 치유되는 양상을 보였으나 B군에서는 1마리 토끼의 2군데 상처부위에서 반복적인 삼출 및 심한 염증 소견을 보여 이를 감염이나 동종간 이식 거부 반응으로 판단하고 본 연구 결과에서 제외하였다.

술 후 1주째, 바세린 거즈로 처리한 D군은 가피로 덮혀 있는 반면(Fig. 5-D), 양막군에서는 투명한 양막 아래로 분홍빛의 육아조직 및 상피화를 확인할 수 있었다(Fig. 5-A, Fig. 5-B, Fig. 5-C). 10일 이후부터는 육안적으로 각 군 간에 큰 차이를 보이지 않았다.

술 후 2주째, 상처 잔여 면적 즉 가피 형성 정도를 보면 A군에서는 32.5% (Fig. 6-A), B군에서는 18.3% (Fig. 6-B), C군에서는 16.8%의 가피 형성을 보이고(Fig. 6-C), D군에서는 50.5%의 상처면이 가피로 덮여져 있었다(Fig. 6-D). 평균 치유 면적 백분율은 A군에 비해 B, C군에서 ( $p < 0.05$ ), D군에 비해 A, B, C군에서( $p < 0.01$ ) 보다 좋은 결과를 얻었으며 통계적으로도 유의한 차이를 보였다(Table 1).

각 군의 상처면은 점차 치유가 진행되고 상처 면적도



**Fig. 6.** Comparison of HAM alone (A), HAM with epidermal cells (B), HAM with MSCs (C), and the vaseline gauze (D) group 2 weeks post-graft (HAM, human amniotic membrane; MSCs, mesenchymal stem cells).

**Table 1.** Mean Remaining Defect Area and Healing Area of Wounds at 2 Weeks Post-graft

Group	A (HAM)	B (HAM+Ep)	C (HAM+MSCs)	D (Va)
Number	10	8	10	10
Remaining defect area (cm <sup>2</sup> )	1.30±0.49	0.72±0.24	0.67±0.74	2.02±0.81
Remaining defect area percentage (%)	32.5	18.3	16.8	50.5
Healing area percentage (%)	67.5±7.3	81.7±6.2	83.2±7.2	48.5±6.4

Group D compared with group A, B and C.  $p < 0.01$ , Group A compared with group B and C.  $p < 0.05$ . HAM, human amniotic membrane; MSCs, mesenchymal stem cells; Ep, epidermal cells; Va, Vaseline gauze.

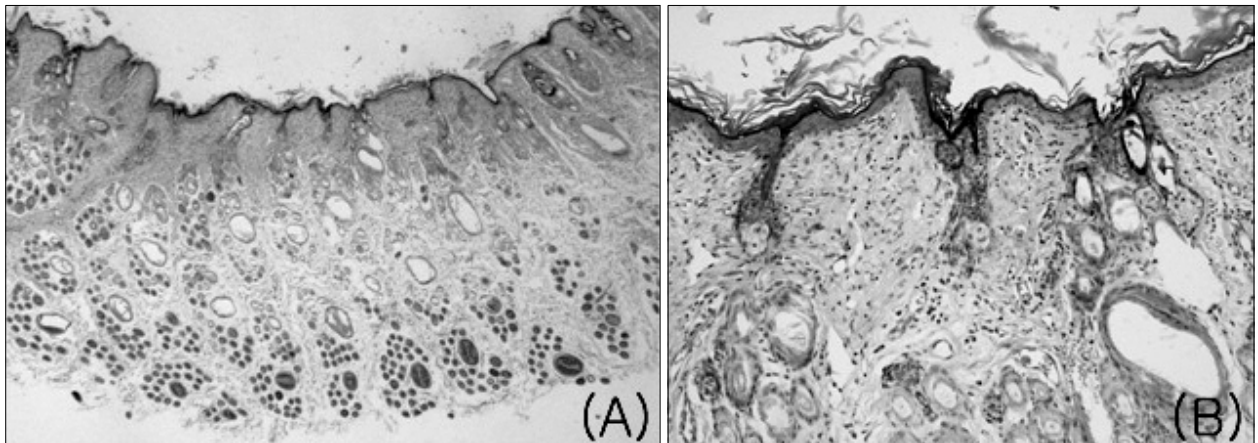
**Table 2.** Mean Wound Healing Time

Group	A (HAM)	B (HAM+Ep)	C (HAM+MSCs)	D (Va)
Mean healing time (days)	17.00±1.01	16.82±1.16	16.34±0.96	22.72±1.62

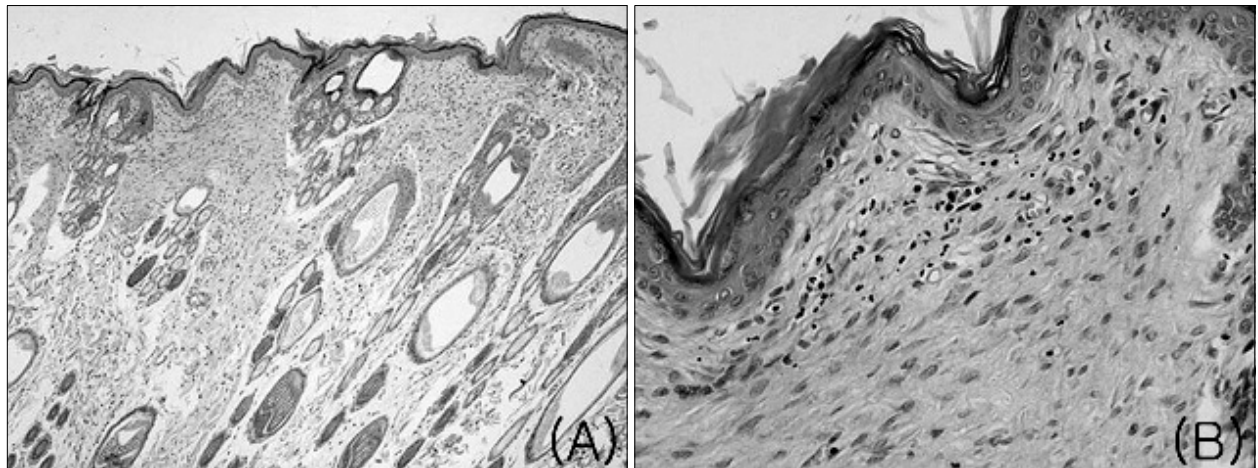
Group D compared with group A, B and C.  $p < 0.01$ . HAM, human amniotic membrane; MSCs, mesenchymal stem cells; Ep, epidermal cells; Va, Vaseline gauze.

점점 감소되었다. 상처 면적의 90% 이상이 상피 조직으로 치유된 평균 치유 기간을 보면 A군 17.0 (15–19)일, B군 16.8 (14–19)일, C군 16.3 (14–18)일로 A, B, C군 간에는 통계적으로 차이가 없었으나, D군은 22.7 (17–

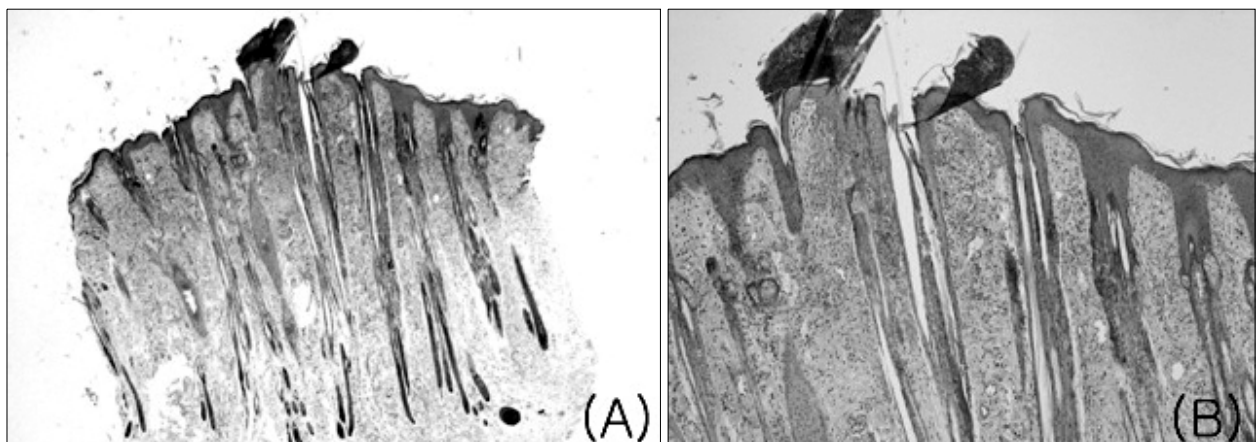
24)일로 A, B, C군에 비해 5.7–6.4일 치유기간이 늦어졌고 통계적으로 의미 있는 차이가 있었다( $p < 0.01$ ) (Table 2).



**Fig. 7.** Histologic finding in group A. (A) Healed tissue shows a moderately recovered, relatively thin epidermis, but a completely healed skin appendage ( $\times 40$ ). (B) Increased vascularity, little lymphocytic infiltration, and minimal fibrosis are noted in the dermis ( $\times 200$ ).



**Fig. 8.** Histologic finding in group B. (A) Healed tissue shows a regenerated epidermis and recovered skin appendage ( $\times 40$ ). (B) The dermis shows a few infiltrated inflammatory cells and mild fibrosis ( $\times 200$ ).



**Fig. 9.** Histologic finding in group C. (A) Healed tissue shows a regenerated epidermis and recovered skin appendage ( $\times 40$ ). (B) The dermis shows mild lymphoplasmic cell infiltration and hemorrhaging; with abundant vasculature and minimal fibrosis are noted ( $\times 200$ ).



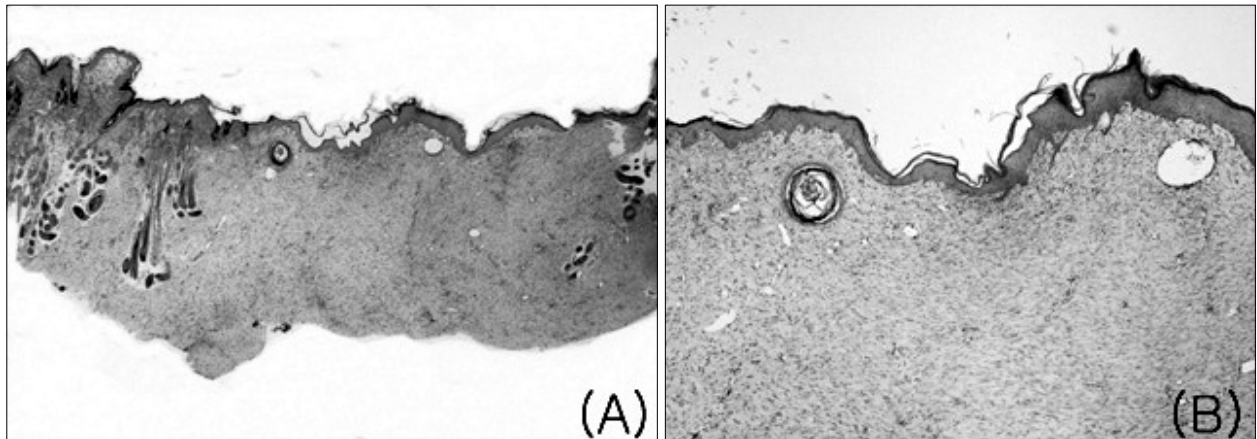


Fig. 10. Histologic finding in group D. (A) Healed tissue shows an irregular and flattened ridge in the epidermis and the skin appendage is mostly absent ( $\times 40$ ). (B) The dermis shows marked fibrosis with some lymphocyte infiltration and poor vasculature ( $\times 200$ ).

## 2. 조직학적 소견

광학 현미경을 통해 H&E 염색 결과를 분석하였고, 표피(epidermis), 진피(dermis), 피부 부속물(skin appendage)로 나누어 관찰하였다.

A군에서는 얇은 표피층을 보이고 완벽한 표피 재생이 이루어지지 않았고, 진피층은 B군에 비해 림프구 침윤이 B, C군에 비해 상대적으로 증가된 소견이 보이고 모세혈관, 섬유모세포 및 교원세포 침착도 B, C군 보다는 적어 불완전한 재생 소견과 약간의 섬유화가 보였으나 피부 부속물은 완벽한 재생이 이루어진 상태였다(Fig. 7, 8, 9).

B군에서는 피부 부속물 및 표피층의 표피 재생이 비교적 규칙적으로 이루어진 상태였고, 진피층은 소량의 림프구 침윤 및 섬유화 소견을 보이나 모세혈관 함량이 풍부하고 섬유모세포 및 교원세포 침착도 뚜렷하였다(Fig. 8).

C군에서는 표피층은 각질층에 약간의 림프구 형질세포 침윤이 보이나 표피 재생이 규칙적이고 완벽하며, 진피층은 림프구 침윤이 적으며 모세혈관 함량이 풍부하고 섬유모세포 및 교원세포 침착도 뚜렷하였다. 섬유화는 거의 없는 상태이고 피부 부속물도 완벽한 재생이 이루어진 상태였다(Fig. 9).

D군에서는 층간의 경계가 불명확하며 표피층은 불규칙한 재생이 보이고 진피층은 상당수의 중성구 및 림프구 침윤이 보이고 모세혈관 함량이 적으며 섬유모세포 및 교원세포 침착도 명확하지 않았다. 전반적인 섬유화가 진행된 상태이고 피부 부속물은 대부분 파괴된 상태로 재생은 이루어지지 않은 상태였다(Fig. 10).

## 고 찰

피부의 창상 치유는 표피화와 수축 및 교원질의 합성, 신생 혈관의 형성 그리고 육아 조직의 생성 등에 의한 일련의 복잡한 병리생리학적 과정이다<sup>5)</sup>. 창상은 다양한 원인으로 인해 발생하며, 각기 다른 치유 양상을 보인다. 임상자들은 이러한 창상에 대한 최상의 치료 효과를 거두기 위해 다양한 시도를 하고 있다<sup>10)</sup>.

창상 치유 과정은 염증기, 상피화기, 증식기 그리고 성숙기의 4단계로 구분할 수 있다. 이러한 각 단계는 명확한 구분없이 어느 정도 중첩되면서 연속적으로 진행되며 치유의 속도와 정도는 조직 종류와 창상의 치료 방법에 따라 다르게 진행된다. 또한 표피 및 진피 전층의 전층 결손 창상에서는 주로 수축이 중요한 역할을 하고, 피부 부속기관이 남아 있는 부분 결손 창상에서는 표피화가 중요한 역할을 하게 된다.

이러한 관점에서 보았을 때 부분층 피부 결손을 보이는 창상의 초기 치료에 양막을 사용하는 것은 표피의 상피화를 촉진시켜 상피세포의 생착을 유도하는데 의미가 있고 전층 피부 결손 창상에서는 수축 작용과 함께 양막이 기저막을 제공하고 다양한 세포 활성화 물질들을 분비하여 상처 치유 과정을 촉진시킨다. 양막은 현재 다양한 의학 영역에서 활용되고 있으며, 특히 화상이나 외상에 의한 상처나<sup>16)</sup> 하지의 울혈성 궤양과 일반적인 치료에 반응하지 않는 만성 궤양<sup>2,7,8)</sup> 등의 치료에 사용하고 있다. 본 실험에서 사용된 인간의 양막은 효과적인 생물학적 삽입물이며, 값이 싸고 쉽게 구할 수 있으며 여러 논문에서



부작용이 없다고 증명된 바 있다<sup>3,15,19</sup>. 양막은 태반의 가장 안쪽에 있는 0.02–0.5 mm의 얇은 막으로 상피층, 기저층, 치밀층, 섬유아세포층, 해면층의 5층으로 구성되고, 신경, 림프관, 혈관 등이 존재하지 않는 무혈관성 기질의 태반막으로 태아를 둘러싸고 있어 모체로부터의 각종 감염 및 면역반응에서 태아를 보호하는 장벽 역할을 한다<sup>12,13</sup>. 또한 양막에서 생산된 epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), keratinocyte growth factor (KGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- $\beta_1$ , - $\beta_2$  (TGF- $\beta_1$ , - $\beta_2$ ) 등의 다양한 cytokine은 신체 내 세포의 분열과 증식을 촉진하고 조절하며, 항염 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>. 양막의 상피 표면은 평탄하고 유착성이 없으며 반면 내부 실질은 거칠고 유착성이 있다. 이러한 이유로 양막은 이식에 있어서 대체물로 사용되기보다 외부표면을 덮는 덮개로 사용되고 있다<sup>8</sup>. 이번 실험에 포함되지는 않았지만 예비 실험에서 양막 간질 쪽을 피부 결손 부위에 부착한 군과 반대로 기저층 쪽을 피부 결손부에 부착시킨 군 간의 조직학적 소견을 비교한 결과, 상피층은 두 군 모두 상피 재생 및 분화가 잘 이루어져 있었고 진피층에서는 간질 쪽을 피부 결손 부위에 부착한 군에서 림프구를 포함한 급성 염증세포 침윤 및 혈관 잔존이 좀 더 많았으나 전체적으로 상처 치유에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 양막은 평활근세포, 신경, 림프관 및 혈관과 major histocompatibility complex (MHC)의 결핍으로 이중, 동종 간 거부반응이 거의 없다고 알려져 있다<sup>1</sup>. Bennett 등<sup>2</sup>은 양막을 창상 치료에 사용 시 벗겨진 상처 위를 덮음으로 즉각적으로 통증을 경감시키며, 육아종의 형성을 촉진하여 만성 궤양성 병변에서의 유용성을 보고한 바 있으며, Faulk 등<sup>8</sup>과 Egan 등<sup>7</sup>은 양막의 피부이식시 angiogenic factor가 혈관내피세포에 작용하여 벽이 얇고 직경이 넓은 혈관의 증식을 촉진시킨다고 보고한 바 있다. 또한 Robson과 Krizek<sup>19</sup>은 양막의 세균 감염 예방 효과를 관찰하였으며 양막에서 생산된 다양한 cytokine이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 시행되고 있다<sup>14</sup>. 지금까지 임상적으로 알려진 양막의 역할은 정상적인 상피세포의 특성은 유지시키고 상피세포 성장을 촉진하며 항염증 작용과 신생혈관 억제 작용 및 반흔 형성 억제 작용을 하는 것이다<sup>10</sup>. 이번 실험에서도 피부결손에서 양막 단독 이식의 경우에서도

바세린 처치군에 비해서는 치료 기간의 단축과 조직학적으로도 양호한 상피화와 육아조직 형성 소견을 관찰할 수 있었다.

자가세포 배양 이식은 환자로부터 채취한 세포의 실험실 배양 과정을 통하여 세포의 증식을 유도함으로써 이식에 필요한 충분한 수의 세포를 확보하고 이를 원래의 조직과 같은 구조가 되도록 삼차원 배양하여 생체에 이식하는 술식이다. 이는 실험실 배양 과정을 통해 충분한 수의 세포를 확보함으로써 결손 부위가 크더라도 무리 없이 사용할 수 있다는 장점과 함께 자가 세포이식 이므로 면역 거부 반응이 전혀 없다는 매우 유용한 장점을 가지고 있다. 본 연구에서도 A군(양막) 및 C군(양막+골수 간엽세포)에서는 상처 치유과정과 조직학적 소견을 고려하면 이중 또는 동종 이식 거부 반응을 보인 경우가 없었다고 사료된다. B군(양막+표피세포)에서는 1마리 토끼에서 2군데의 상처 부위에서 반복적인 삼출 및 심한 염증 소견을 보여 이는 감염이나 표피세포의 동종 이식 거부 반응으로 판단하고 본 연구 결과에서 제외하였다. 이번 실험에 쓰인 표피세포 및 골수 간엽세포는 자가 세포가 아닌 동종 세포의 배양을 통한 이식이기 때문에 거부 반응에 대한 가능성도 배제할 수는 없으나 Ryan 등<sup>20</sup>은 골수 간엽세포에 대한 인체 및 동물 실험에서 골수 간엽세포는 MHC-II의 결여로 저면역성을 보이고 간접적으로 T세포 면역 반응을 방지하고 prostaglandin 및 IL-10을 만들어 억제된 국소 미세환경을 만드는 특성으로 동종 거부 반응은 없는 것으로 나왔으며 본 연구에서도 골수 간엽세포 이식군에서는 거부반응이 없었고 표피세포 이식군에서는 이상 반응이 보였으나 1마리 토끼에서만 그리고 5개의 상처 중 2군데에서만 삼출 및 염증 소견을 보이는 것은 거부 반응이라기보다는 외부 요인에 의한 감염이라고 생각된다.

골수 간엽세포는 현재 정형외과 영역에서 골형성 유도 및 연골 결손 치유에 있어서 많은 연구가 이루어지고 있다. 간엽세포는 주위의 환경 변화에 따라 여러 종류의 세포로 변화할 수 있는 가능성을 가지고 있는데 관절 내에 이식된 간엽세포는 골쪽을 향한 부분은 골 손상이 있을 때 유발되는 활성 물질(bioactive factor)인 bone morphogenetic protein이나 TGF- $\beta$  등의 작용으로 골 조직으로 분화하고 관절을 향한 쪽은 관절 액에 포함되어 있는 인자들의 영향으로 연골세포로 분화한 것으로 추측

하였다<sup>9,17,22)</sup>. 이번 연구에서의 골수 간엽세포도 피부 결손부 또는 양막에서 나온 어떤 활성 물질의 작용으로 표피세포나 섬유아세포 등으로 분화되었다고 추정된다. 비록 치유 기간에 있어서 유의 있는 결과를 보이지 않았지만 상피 잔여면적 및 조직학적 소견에 있어서 보다 좋은 결과를 보였고 치료에 있어서 의미가 있다고 생각된다. 이번 결과에 포함하지 않았지만 예비 실험에서 양막 없이 피부 결손부에 골수 간엽세포나 표피세포를 뿌려서 그 위에 바세린 거즈로 덮은 군은 양막 아래에 골수 간엽세포나 표피세포를 뿌린 군과의 조직학적 비교에서 두 군 간에는 조직학적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 바세린 거즈 단독 군과 비교하였을 때 골수 간엽세포 및 표피세포를 뿌린 군에서 보다 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 피부 결손 부위에 대한 양막 이식이 상처 치유에 있어서 효과적인 방법이라고 생각되고 토끼에서 채취한 표피세포와 간엽세포를 배양하여 양막 아래에 주입하여 창상 조직에 이식한 결과 육안적 또는 조직학적으로 모두 우수한 결과를 나타냈다. 하지만 피부결손 치유에서 양막 아래에 주입된 표피세포 및 간엽세포가 어떻게 이용되었는지에 대한 점, 표피세포와 간엽세포의 자가 세포 배양한 이식과 동종 세포 배양한 이식의 차이 여부, 그리고 단순 봉합이 과연 배양세포의 방벽 역할을 할 수 있는지 여부 그리고 양막 위에서 직접 배양하면 이들 세포의 접착력과 분화를 호전시킬 수 있는 지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

양막은 상피세포 성장을 촉진하는 데에 있어서 중요한 역할을 하며 양막 아래에 배양된 표피세포 및 골수 간엽세포를 주입하여 상처에 이식하면 피부 결손 치유에 육안 및 조직학적으로 모두 우수한 치료 효과를 볼 수 있었다.

## 참고문헌

- Akle CA, Adinofi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I: Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*, 7: 1003-1005, 1981.
- Bennett JP, Matthews R, Faulk WP: Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet*, 31: 1153-1156, 1980.
- Buultmann S, You L, Spandau U: Amniotic membrane down-regulate chemokine expression in human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 3044-3060, 1999.
- Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9: 641-650, 1991.
- Clark RA: Cutaneous tissue repair: basic biologic consideration. *J Am Acad Dermatol*, 13: 701-725, 1985.
- Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, et al: Williams obstetrics. 21th ed. New York, McGraw-Hill: 101-105, 2001.
- Egan TJ, O'Driscoll J, Thaker DR: Human amnion in the management of chronic ulceration of the lower limb: a clinicopathologic study. *Angiology*, 34: 197-203, 1983.
- Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, Hsi BL: Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet*, 31: 1156-1158, 1980.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64: 295-312, 1997.
- Jeung WJ, Ha SJ, Park WC, Yoo KW: The effects of amniotic membrane for prevention of adhesion in strabismus surgery in rabbits. *J Korean Ophthalmol Soc*, 43: 402-410, 2002.
- Kim HS, Song KH, Park WC, Kim KH: Effectiveness of amniotic membrane patch in the treatment of chronic ulcers. *Korean J Derma*, 43: 29-36, 2005.
- Kim JC, Tseng SC: The effects on inhibition of corneal neo-vascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol*, 9: 32-46, 1995.
- Kim JC, Tseng SC: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14: 473-484, 1995.
- Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozona CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S: Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20: 173-177, 2000.
- Krishnan R, Coombs R, Wright N: Amniotic arthroplasty - a biological alternative. (cited from Coombs R, Gristina A, Hungerford D. Joint replacement : state of art. St Louis, Mosby: 31-37, 1990).
- Maximillian S: The grafting of preserved amniotic membrane

- to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts. *JAMA*, 13: 973-974, 1913.
17. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*, 60: 334-339, 1989.
  18. Reed BR, Clark RA: Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. II. *J Am Acad Dermatol*, 13: 919-941, 1985.
  19. Robson MC, Krizek TJ: The effect of human amniotic membranes on the bacterial population of infected rat burns. *Ann J Surg*, 177: 144-149, 1973.
  20. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP: Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*, 2: 8, 2005.
  21. Satoh H, Kishi K, Tanaka T, et al: Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. *Cell Transplant*, 13: 405-412, 2004.
  22. Wakitini S, Goto T, Pineda SJ, et al: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76: 579-592, 1994.

#### = 국문초록 =

**목 적:** 피부 결손치료에 있어 양막, 표피세포 및 골수 간엽세포의 상처 치유 효과에 대해 연구하고자 하였다.  
**대상 및 방법:** 토끼의 전측 피부 결손 치료에 있어서 양막(human amniotic membrane: HAM)을 이식한 군, 양막과 배양된 표피세포(epidermal cells)를 주입한 군, 양막과 배양된 간엽세포(mesenchymal stem cells: MSCs)를 주입한 군, 그리고 바세린 거즈로 처리한 군을 각각 A (HAM), B (HAM+epidermal cells), C (HAM+MSCs), D (Vaseline gauze)군으로 하였다. 이식 후 각 군의 상처 치유 기간, 육아 조직 성장 및 상피화 등 상태를 관찰하고 수술 2주 후 치유 면적 백분율을 측정하였다.

**결 과:** 2주 후, 평균 치유 면적 백분율은 A군 67.5%, B군 81.7%, C군 83.2%, D군 49.5%로 관찰되었고, A, B, C군과 D군 간( $p < 0.01$ ), 그리고 B, C군과 A군 간( $p < 0.05$ )에 통계적인 유의한 차이를 보였다. 평균 회복기간은 D군에 비해 A, B, C군이 5.7-6.4일 짧았고 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.01$ ). 가피 형성, 삼출물 분비 등 육안적 치유에서도 A, B, C군에서 보다 좋은 결과를 얻었다. 조직학적으로 B, C군은 피부 결손이 신생 상피로 덮여져 있고 육아 조직 성장이 왕성하며 섬유모세포, 미세혈관, 교원세포 함량이 풍부했다.

**결 론:** 양막하 주입한 배양된 표피세포 및 골수 간엽세포 이식은 피부 결손 치료에 있어 효과적이고 조직학적으로도 우수한 결과를 보였다.

**색인 단어:** 양막, 표피세포, 골수 간엽세포, 피부결손