

# 인공피부의 제조 및 응용

조 광 현

(서울대학교 의과대학 피부과학교실)

## 1. 피부의 구조

피부는 외부로부터 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하지방층(subcutis)의 3개의 층으로 구성되어 있다. 표피는 주로 각질형성세포로 구성된 각질화하는 중층 편평상피이고 진피는 결합조직 섬유와 기질(ground substance)이 주요 구성성분을 차지하며 혈관, 림프관, 신경, 근육, 표피부속기 등을 내포하고 있고, 피하지방층은 지방세포로 구성되어 있다.

## 2. 인공표피제조의 필요성

일반적으로 화장품, 의약품 또는 산업화학물을 인체의 피부에 적용하기 전에 그 독성이나 약리작용에 관한 실험을 동물의 피부나 배양된 피부의 세포를 이용하여 실시하게 된다. 그러나 동물의 피부를 사용하는데 있어서는 윤리적인 문제가 제기될 수 있고 또한 실험동물을 이용한 결과가 항상 만족스러운 것은 아니다. 피부의 가장 바깥층인 표피는 각질형성세포가 대부분을 차지하는 각질화 하는 중층 편평상피로서 기저층, 유극층, 과립층, 각질층의 4층으로 되어 있는데 기저층에서만 각질형성세포의 분열이 이루어지며 기저층을 떠나 피부의 표면으로 이동하면서 각질형성세포는 여러 단계의 분화과정을 밟게 된다. 피부의 각질형성세포는 일찍부터 체외배양이 가능하여 피부의 성상을 이해하는 연구에 광범위하게 이용되어 왔으나 각질형성세포를 배양액 속에 잠근채로 배양을 하면 피부의 특징인 각질화하는 중층 편평상피를 형성하지 못하고 대부분의 세포가 기저층에 해당하는 세포의 성질을 갖게 되므로 인체의 표피가 가진 성상을 반영하지 못하

는 단점이 있다. 특히 피부의 장벽기능(barrier function)을 담당하는 각질층은 피부에 대한 독성물질을 방어하는데 가장 중요하므로 각질층을 가진 인공표피를 제조하는 것은 화장품이나 약물에 관한 screening 검사에 이용되어 온 동물의 피부를 대체할 수 있는 모델로서 효용성이 많을 것으로 기대되었다.

### 3. 각질형성세포의 3차원적 배양

분화하는 각질형성세포를 배양하기 위해서는 진피의 대응물 위에서 각질형성세포를 배양한 다음, 2-7일 후에 각질형성세포를 공기 중에 노출시키고 각질형성세포가 필요한 영양분은 진피 대응물을 통해 확산되어 각질형성세포에 도달하게 하면 각질형성세포가 인체의 표피와 유사하게 삼차원적인 구조를 형성하게 된다. 이때 진피의 대응물로 콜라겐 젤과 배양한 섬유모세포를 혼합한 것, nylon mesh에서 섬유모세포를 혼합한 것, 표피를 제거한 인체의 진피 등이 이용되며 각질형성세포는 이미 배양된 사람 또는 동물의 각질형성세포를 이용하게 된다. 본 연구자는 콜라겐 젤과 배양한 섬유모세포를 혼합하여 진피 대응물을 제조한 후, 그 위에서 각질형성 세포를 배양하는 방법(living skin equivalent, LSE로 약함)과 인체의 피부에서 표피를 제거하여 얻은 진피를 사멸시킨 후(deepidermized dermis, DED), 그 위에서 각질형성세포를 배양하는 방법(epidermis reconstructed on the deepidermized dermis, RE-DED로 약함)의 두가지 모두에서 각질층을 가진 중층의 표피가 형성되는 것을 관찰하였다. 그러나 실험실에서 제조된 인공 표피는 정상 인체 피부의 표피와 비교하여 표피가 두껍고, 각질층이 과다하게 형성되었으며 개개의 각질형성세포의 크기가 정상 인체 표피의 각질형성세포 보다 컸다. 정상 인체 표피의 기저층에 존재하는 각질형성세포는 원주형으로 대체로 기저막에 대하여 수직으로 배열하는데 반하여 RE-DED에서는 불규칙한 모양과 배열상태를 나타내었고, LSE에서는 크기가 작은 입방형의 세포가 일렬로 배열되어 있었다. 또한 RE-DED에서는 표피-진피 경계부에 굴곡은 있었으나 정상 피부에서와 같은 표피능(reticulate ridge)은 아니었으며 LSE에서는 표피-진피 경계부가 편평하였다.

#### 4. 인공피부의 생화학적 성상

정상 인체 피부의 표피에서 각질형성세포는 기저층에서 분열하며 기저층을 떠나 최종 분화과정을 밟는 동안 단백질 합성에 있어서 많은 변화가 일어난다. 대표적인 것이 분자량이 큰 케라틴의 출현이다. 표피의 기저세포층에는 K5와 K14가 존재하며 기저세포층의 상층부에서는 분자량이 큰 K1과 K10이 발현한다. 각질형성세포 분화와 관련된 또 다른 단백질은 epidermal growth factor receptor(EGFR)로서 각질형성세포가 분화하여 감에 따라 발현이 감소한다. 각질형성세포의 최종분화 단계에 나타나는 각질화 외피(cornified envelope)를 형성하는 단백질 involucrin은 표피의 유극층 상부에서 부터 나타나며 loricrin은 과립층에서 발현한다. Filaggrin은 과립층의 케라토히알린 과립에 profilaggrin으로 존재하며 각질층에서 케라틴을 응집하는 matrix 단백질로 작용하여 각질층을 형성하는데 중요한 역할을 하게 된다. 저자들은 실험실에서 제조한 인공피부 조직인 RE-DED와 LSE의 표피에서 이와 같은 단백질의 발현을 면역조직화학 염색으로 검색해 본 결과, 발현양상에 있어서 정상 인체 피부의 표피와 비교하여 분포 영역에 있어서 약간의 차이가 나기는 하지만 인공 피부조직의 표피에서도 이와 같은 단백질들이 대부분 발현됨을 관찰하였다. 따라서 형태학적인 측면에서 뿐 아니라 생화학적인 성상에서도 인공피부조직의 표피는 정상 인체 피부 표피와 유사성을 가졌음을 확인하였다. 특히 RE-DED는 LSE에 비해 K1, involucrin 뿐 아니라 filaggrin, loricrin의 발현이 뚜렷하고 발현양상도 정상 인체 피부의 표피에 더욱 가까운 성상을 나타내었다. 또한 정상 인체에서는 일부 피부에서만 발현하지만 구강 점막과 같이 각질화하지 않는 중층편평상피에서는 항상 발현하는 K13이 RE-DED에서는 발현하지 않았고 LSE에서는 표피 상층부의 1/3에서 발현하였다. 그러나 RE-DED와 LSE는 모두 정상 피부의 표피와 비교하여 PCNA 양성 세포의 비율이 높았으며 K1 발현이 늦게 나타나고, involucrin 발현은 빨리 나타나서 표피 증식성 피부질환인 건선에서의 양상과 비슷한 면을 보여주었는데 과증식성 표피에서 발현하는 이들 인공피부조직의 표피에서는 K6의 발현도 있어서 인공피부 조직의 표피가 과증식 상태임을 확인할 수 있었다.

그러나 RE-DED에서는 건선 조직에서와 달리 filaggrin, loricrin의 발현이 뚜렷하여 인공피부의 표피가 건선의 표피에서와 같은 분화과정을 밟는다고 보기는 어려웠다. 피부의 표피와 진피의 경계부인 기저막은 lamina lucida, lamina densa 그리고 각질형성세포가 생성하는 세포의 기질로 이루어 진다. 저자들은 lamina lucida의 대표적인 당단백질인 laminin과 lamina densa의 주성분인 제4형 콜라겐의 발현을 검색한 결과 인공피부조직에서는 정상 인체 피부에서 처럼 가늘게 뚜렷이 발현 되지는 않았는데 RE-DED에서는 laminin과 제4형 콜라겐의 발현이 비교적 뚜렷한 반면, LSE에서는 이들 두 기저막 성분의 발현이 매우 약하게 발현되는 것을 관찰하였다. 지질(lipid) 성분을 분석해보면 RE-DED는 정상인체 표피와 비교하여 상당히 유사한 정도의 지질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 각질층이 장벽(barrier) 기능을 수행하는데 필요한 ceramide도 상

당량 존재하는 것으로 되어 있다. 그러나 지질의 조성에 있어서 정상 인체 피부와 다른점은 정상 인체 표피와 비교하여 triglyceride가 너무 많고 linoleic acid 양은 너무 적다는 점이다. 이러한 조성의 차이가 RE-DED에서 각질층 세포 사이에 lamellar lipid structure가 불완전한 이유가 될 수 있을 것으로 추측된다.

## 5. 인공 표피의 barrier 기능과 피부의 자극도 검사

표피를 통한 수분 손실 방지와 외부로부터 화학물질의 피부 안으로 유입되는 것을 방지하는 기능은 주로 각질층이 담당한다. 화학물질이 어느 정도 피부의 각질층을 투과하는가에 따라 그 독성이 결정되게 되므로 체외에서 피부자극 검사를 시행하는 모델을 개발함에 있어서 각질층의 장벽(barrier) 기능을 어느 정도 재현할 수 있는지가 중요하다. 여러 연구에 의하면 RE-DED나 LSE에서 각질층은 어느정도 장벽기능을 수행하고 있으나 정상 인체와 비교하면 그 질은 상당히 떨어지는 것으로 나타난다. 일반적으로 RE-DED의 경우가 LSE 경우보다 장벽기능이 우수하나 정상 인체표피와 비교하여 물의 투과력은 5배, sucrose의 투과력은 10배 높은 것으로 나타났다. 그러나 인공표피의 각질층이 어느 정도 장벽기능을 수행하고 있으므로 국소적으로 도포하는 약물 또는 화장품의 피부자극도를 screening하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 6. 인공 피부를 이용한 약리적 작용 연구

약물의 약리작용을 연구하는 모델로서 인공 피부가 이용될 수 있다는 예를 보여준 것으로서 활성 vitamin D와 retinoic acid에 대한 연구들이 있다. 본 연구자도 인공 피부를 이용하여 표피의 분화에 영향을 미치는 대표적인 약물인 비타민 D의 새로운 유도체인 calcipotriol과 retinoid에 대한 연구를 수행한 바 있다.

### 1. Calcipotriol

Calcipotriol은 비타민 D<sub>3</sub>의 새로운 유도체로 각질형성세포의 증식과 분화에 미치는 효과는 활성 비타민 D<sub>3</sub>와 거의 유사 하지만 활성 비타민 D<sub>3</sub>를 사용할 때 문제가 되는 과 칼슘혈증을 유발

하는 부작용이 아주 미약한 것으로 밝혀져서 대표적인 피부질환인 건선의 치료제로 개발되어 현재 임상에서 사용되고 있다.

#### 1) 3차원적으로 배양한 정상 인체 각질형성 세포에 미치는 영향

각질형성세포를 대기에 노출시킬 때부터 calcipotriol을 배양액에 첨가한 경우와 각질형성 세포를 10일간 대기에 노출시킨 채 배양하여 완전히 3차원적 구조를 형성한 후 calcipotriol을 4일간 처리한 경우의 두가지 방법으로 실험하여 calcipotriol의 효과를 알아 보았다. 그 결과를 보면 calcipotriol  $10^{-7}M$  및  $10^{-6}M$  농도로 처리한 군에서 과립층의 소실과 함께 전체 표피의 두께가 감소하였는데 배양 처음부터 calcipotriol을 처리한 군에서는 각질층의 두께도 감소하였으나, 각질형성세포가 3차원적인 구조를 형성한 다음 calcipotriol을 처리한 군에서는 각질층의 두께가 약간 증가하는 경향을 보였다. 표피에 존재하는 단백질의 발현도 표피 두께의 감소와 함께 감소하였다. 또한 각질형성세포의 증식을 나타내는 표식자도 calcipotriol 처리군에서 감소하였다. 이상의 결과로서 calcipotriol은 정상 인체 각질형성세포의 증식을 억제하며 분화과정의 최종 단계를 촉진 시키는 것을 알수 있었다.

#### 2) 3차원적으로 배양한 편평상피세포암 세포주에 미치는 영향

콜라겐 젤과 섬유모 세포를 혼합하여 진피 대응물을 만들고 그위에서 피부의 편평상피세포암 세포주인 SCC 13 세포주를 삼차원적으로 배양하면서 배양액에 calcipotriol을 10일간 첨가하여 calcipotriol이 편평상피세포암 세포주의 최종분화에 미치는 영향을 알아 보았다. 형태학적으로 calcipotriol은  $10^{-8}$ - $10^{-6}M$  농도에서 편평세포암 세포주의 분화를 촉진하는 것이 관찰되었으며 각질형성세포의 최종분화와 관련된 단백질의 발현도 증가하는 것이 관찰되었다. 한편 정상 표피의 기저세포층에 존재하는 단백질도 calcipotriol 처리 후에 3차원적으로 배양된 편평세포암 세포주의 가장 안쪽으로 국한되어 발현하는 것이 관찰되었다. 이상의 결과에서 calcipotriol은 편평상피세포암의 분화과정에서의 결함을 개선시키는 효과가 있는 것으로 생각되었다.

## 2. Retinoic acid

Retinoic acid는 피부과 영역에서 건선을 위시한 표피 증식성 피부질환의 치료제로 널리 쓰이고 있다. 본 연구자는 DED 위에서 인체 각질형성세포를 3차원적으로 배양하고 all-trans retinoic acid를  $10^{-10}M$ - $10^{-6}M$  농도로 첨가하여 형태학적 관찰과 증식 및 분화 표식자의 발현을 면역조직 화학적 방법으로 검색하여 보았다. 각질형성세포를 대기에 노출시킬 때부터 배양액에 retinoic acid를 첨가한 경우에 retinoic acid의 농도가 올라갈 수록 형태학적으로 정상적인 각질층을 형성

하지 못하고 이상각화증이 나타나는 등 각질형성세포의 최종 분화가 지연되었으며 K1을 비롯한 분화표식자의 발현이 감소 되었다.

## 7. 인공 피부를 이용한 자외선 조사에 의한 피부반응 연구

피부에 대한 자외선의 효과를 연구하는 모델로서 인공피부가 이용될 수 있다는 몇몇 연구보고가 있다. 다량의 자외선을 조사한 후 각질형성세포의 손상을 연구하거나 멜라닌 세포가 포함된 인공표피를 제조하여 자외선을 조사한 후 인공표피의 멜라닌 세포가 기능을 하는가의 여부를 조사한 예도 있다. 본 연구자는 LSE를 제조하고 10mJ, 20mJ, 30mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사한 직후 및 1일 후의 케라틴 생합성 변화를 측정하기 위하여 조직채취 전 16시간동안 100 μci/ml <sup>35</sup>S-methionine을 label한 후 intermediate filament를 추출하여 SDS-PAGE를 하고 autoradiography를 실시하였다. 그 결과 K1의 경우 10mJ, 20mJ/cm<sup>2</sup> UVB 조사후에서는 처음 16시간에는 생합성이 감소하였으나 1일이 지난후 16시간에는 대조군 이상으로 생합성이 증가하였다. 그러나 30mJ/cm<sup>2</sup> UVB 조사후에는 처음 16시간에 생합성이 감소하여 1일이 지난 후 16시간에도 대조군의 수준을 회복하지 못하였다. K5 및 K14은 10mJ/cm<sup>2</sup> UVB 조사후 처음 16시간에는 생합성이 감소하였으나 1일 후 16시간에는 생합성이 대조군 수준을 회복하였고 20mJ/cm<sup>2</sup> 조사후에는 생합성이 대조군 이상으로 증가하였다. 또한 UVB 조사후의 K1 및 K14에 대한 항체를 이용한 면역조직화학염색에서 10mJ, 20mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB 조사에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나, 30mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 조직에서는 자외선 조사후 16시간 후와 40시간 후의 조직에서 모두 기저세포층의 상층부에서 K1의 발현이 감소하였다.

## 8. 결론

여러가지 방법으로 인공피부가 제조되고 있지만 인공적으로 제조된 표피의 각질형성세포의 성상이 정상 인체의 표피와는 차이가 나고 인공 피부에는 모낭이나 피지선과 같은 피부 부속기가 아직 포함되어 있지 않으며, 정상 인체의 표피에 존재하는 Langerhans 세포나 Merkel 세포도 포함되어 있지 못하므로 정상 피부와 비교하여 아직은 불완전한 상태라고 할 수 있다. 그러나 단일층으로 배양한 각질형성세포와 비교할 때에 앞에서 보여준 바와 같이 각질형성세포에 작용하는

retinoid, 스테로이드를 비롯한 약물, 화장품의 효과를 screening하는데 있어서 유용한 수단으로 사용될 수 있다고 판단된다. 또한 연구목적에 따라 정상 혹은 병적 상태의 각질형성세포를 배양하여 사용할 수 있으며, RE-DED와 LSE를 비교하여 진피의 세포나 세포의 기질이 각질형성세포에 미치는 영향을 연구할 수도 있다. 앞으로 인체의 피부와 좀 더 비슷한 성상을 가진 인공 피부를 제조할 수 있다면 피부과학의 연구분야에서 인공 피부의 응용 가능성은 더욱 높아질 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. 조광현, 이동윤, 은희철등. 실험실에서 제조된 인체 표피에서 표피 단백질항원 및 기저막 구성 성분의 발현. 대한피부과학회지 1996;34:264-272
2. Regnier M, Asselineau D, Lenoir MC. Human epidermis reconstructed on dermal substrate in vitro. An alternative to animals in skin pharmacology. Skin Pharmacol 1990; 3:70-85
3. Ponc M, Kempenaar J. Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. Skin Pharmacol 1995;8:49-59