

## 설파디아진은의 피부세포 증식 및 화상모델에 있어서의 상처치유과정에 미치는 영향

조 애 리

덕성여자대학교 약학대학

(2002년 5월 9일 접수 · 2002년 6월 10일 승인)

### Effect of Silver sulfadiazine on the Skin Cell Proliferation and Wound Healing Process in Hairless Mouse 2nd degree Burn Model.

Ae-Ri Cho Lee

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

(Received May 9, 2002 · Accepted June 10, 2002)

**ABSTRACT**—Cyto-toxic effect of silver sulfadiazine (Ag-SD) on keratinocytes and its implication on wound healing process were investigated in 2<sup>nd</sup> degree burn hairless mouse model. As a dermal model, HaCat (immortalized keratinocytes) monolayer culture in DMEM with 10% FBS was used. Cyto-toxicity of Ag-SD was estimated by measuring the cell viability using neutral red assay after adding the drug. The 2<sup>nd</sup> degree burn was prepared on hairless mouse back skin (1 cm diameter) and dressings with Ag-SD were applied for 96 hr. The process of re-epithelialization and the presence of inflammatory cells were investigated and histology with Hematoxylin-Eosin staining was performed. Ag-SD displayed highly cyto-toxic effect on cultured HaCat cells in a concentration dependent manner (1-100 µg/mL). Topical application of Ag-SD (2%) could control the infection: no inflammatory cells were observed in histology. However the cyto-toxic effect of Ag-SD on skin cells induced the impairment in epidermal regeneration.

**Keywords**—Silver sulfadiazine, Keratinocytes, Cyto-toxicity, Wound healing

화상환자의 치료 시 창상 부위에 항생제를 투여하는 것은 2차 감염 등을 예방하기 위해서 꼭 필요하지만, 섬유 아 세포의 증식과 collagen 기질의 형성이 중요한 역할을 하는 창상 치유에 있어서, 항생제 등이 세포에 미치는 영향 등으로 창상 부위의 재생속도를 지연시킨다는 연구결과 등이 보고 되고 있다.<sup>1-3)</sup>

Figure 1은 2차 감염이 진행되어 상처부위의 치유가 저해 되는 과정을, 정상적인 상처 치유 과정과 비교하여 도식화 한 것이다. 정상적인 상처치유과정은 지혈단계(hemostasis), 염증단계(inflammatory phase), 증식단계(proliferative phase), 상처 수축(wound contraction)의 단계를 거치는데, 각 단계에서 정상적으로 균형이 맞지 않았을 경우 상처치유가 늦어 지거나 혹은 상처치유 후 흉터를 남기게 된다. 창상 치유의 각 과정에는 염증세포, 각질세포, 섬유 아 세포 등에서 분비 되는 여러 종류의 성장인자 혹은 사이토 카인이 함께 작용 하여 창상 치유에 관여한다. 즉 정상적인 상처치유과정에서는 상처부위의 염증세포가 분비하는 매개체들의 신호에 의

해서 대식세포들이 상처부위로 모여들고, cytokine등을 분비 하면, 상처부위에서 섬유 아 세포 등의 이동과 증식이 진행 되면서 손상된 상처부위의 진피층이 기질을 형성하면서 상처부위의 치유가 일어나게 된다.<sup>4,6)</sup>

반면, 2차 감염 등으로 염증 세포 등의 이상 증식이 있는 상처에서는 Interleukin-8 등 여러 종류의 염증 유도성 cytokine 등이 분비되게 되면서, 각질층 형성세포 등의 증식 속도를 감소시키고, 진피 층의 기질형성을 방해 하므로써 손상된 피부의 상처치유 속도를 저하시키게 된다. 이 같은 이유로 상처부위의 2차 감염 예방은 창상 치유과정에서 아주 중요하다. 하지만, 항생제 등의 사용은 정상 치유 과정에서 초기에 진행되는 염증 반응 등의 억제로 인하여, 상처의 치유 시 세포의 이동과 증식을 원활히 이루어 지지 않아 상처 치유과정이 더디게 일어난다는 연구들이 보고되고 있다.<sup>7,8)</sup>

Silver sulfadiazine(Ag-SD)은 1968년 Fox에 의해서 개발 된 후 화상부위의 2차 감염을 예방하는데 현재 가장 많이 처방 되어지고 있는 약물이다.<sup>9)</sup> 피부세포로는 상피세포를 이루는 keratinocyte와 진피 층을 이루는 fibroblast cell이 피부 기질(skin matrix)을 이루게 되는 주요 세포들이다. 하지만, 항생제 등의 fibroblast에 미치는 세포독성 및 이로 인한

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)901-8501, E-mail : aeri@duksung.ac.kr

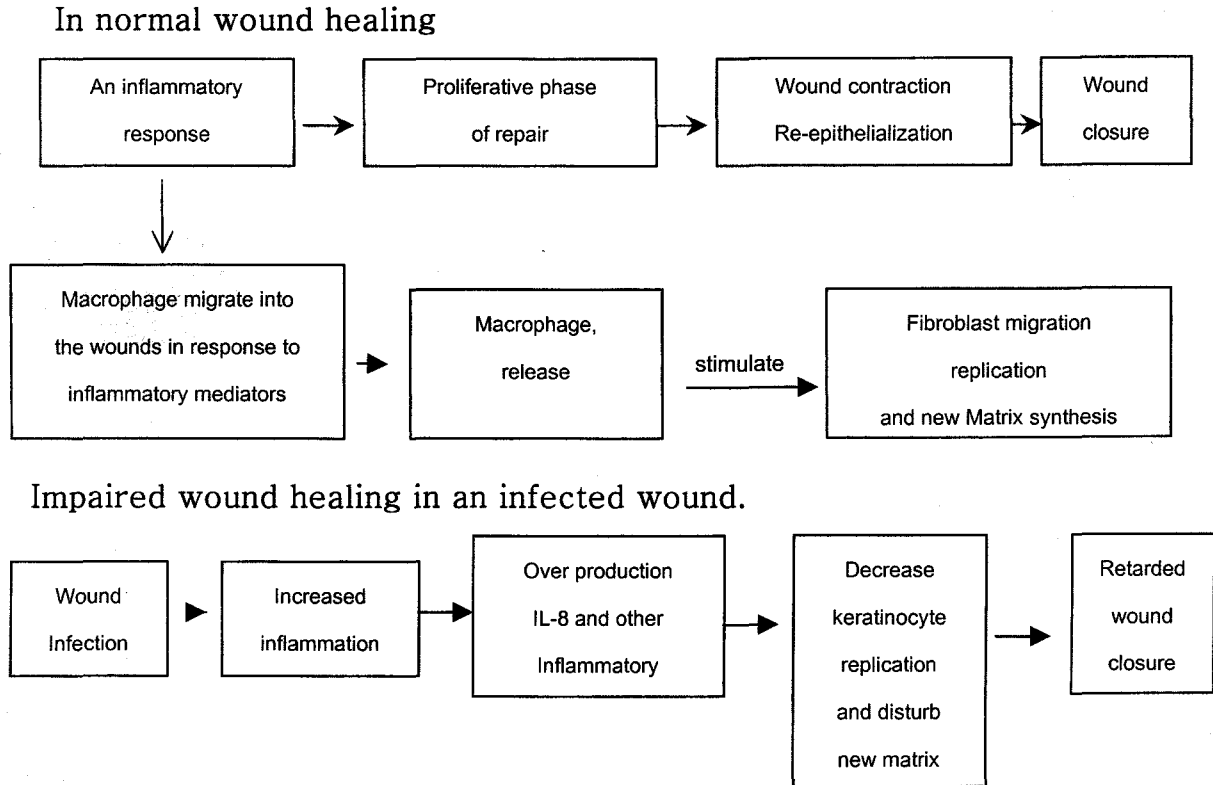


Figure 1-Schematic diagram of wound healing process in normal- and inflammation-induced impaired healing process.

상처치유과정의 손상으로, 2도 이상의 화상에서는 피부의 상피 및 진피 세포 층이 심하게 손상을 입어서, 이들 세포의 재생속도가 화상의 상처치유 속도에 크게 영향을 미친다. 이에 본 논문에서는 Ag-SD의 *in vitro* 세포독성효과 및 mouse의 2도 화상 model에 있어서의 상피세포의 재생속도, 염증세포의 존재, 상처치유속도에 미치는 영향 등에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

**실험방법**

**재료**

Silver sulfadiazine은 동화약품에서 구하였으며, 기타시약은 Sigma에서 구입하거나, 기타 시약급을 사용하였다. 신생아 또는 소아의 표피로부터 분리된 각질형성세포를 서울대학교 의과대학 피부과 교실로부터 제공받았다. Hairless mouse(Charles river)는 생 후 5주에서 7주까지의 것을 실험동물로 사용하였으며, 한림실험동물연구소에서 공급 받았다.

Occlusive dressing으로 OpSite(Smith & Nephew, Inc., FL, USA)가 사용되었으며, dressing의 고정을 위하여 Coban™ 'Self-adherent Wrap'(3M Co., Minnesota, USA)을 배주위에 감아서 dressing의 움직임을 방지하였다.

**기기**

조직학적 소견은 Microscope(BX41, Olympus)와 Image recording equipment(DP11, PM10SP, Olympus)을 이용하여 관찰하고, 촬영하였다.

**세포독성 테스트**

각질형성세포를 표피세포성장 배양액에 다음과 같이 배양하였다. 35 mm petri-dish에 2 mL DMEM(10% FBS)을 이용하여 HaCat cell이 80% confluency가 되도록 배양을 하였다. 각기 다른 농도의 Ag-SD 용액(1-100 µg/mL)에 노출된 각질형성세포를 1일 배양 후 cell viability를 neutral red assay법으로 측정하였다.

**화상피부 모델의 준비**

5주에서 7주경의 mouse를 ether 마취시킨다. 원형으로 1 cm<sup>2</sup>의 면적을 각각의 mouse에 2개씩 등 부위에 표시 후 open cylinder(1 cm<sup>2</sup>×7 cm) 모양의 area controller를 등 부위에 누른 후, 70°C의 hot water 5 mL를 10초간 접촉시킨 후 곧바로 hot water를 따라낸 후 얼음물에 담가두었던 Acrynol 용액 10 mL를 화상피부의 감염예방 및 진정작용을 위하여 30초간 적용시킨다. Thermostat System(Polyscience

Co., USA)으로 hot water의 온도는 set temperature±0.1°C로 조절하여 사용하였다. 화상 후 24시간에 멸균된 큐렛으로 죽은 상피 막(dead epidermis layer)을 제거하여 화상 모델을 준비한다.

**콜라겐 스폰지 및 Ag-SD가 첨가된 콜라겐 스폰지의 제작**

실험에 사용된 콜라겐은 돼지 피부로부터 초산으로 추출하여 NaCl에 침전 정제된 용액을 사용하였다. 콜라겐용액은 13 mg/mL 농도로 stock solution을 제조하여 4°C에 보관하였다. 콜라겐 스폰지는 35-mm petri-dish에 3.8 mL의 용액을 각각 분주한 후 동결건조 시킨 후, 5 mL의 hexamethylene diisocyanate(1% in MeOH)를 사용하여 10분간 교차 결합을 시켜 제조하였다. 제조된 스폰지는 -20°C에서 냉동보관 하였다가 사용하였다. Ag-SD가 첨가된 콜라겐 스폰지는 준비된 Ag-SD의 용액을 콜라겐 스폰지에 loading 시킨 후 동결 건조하여 제조하였다.

**드레싱 적용 및 조직소견 검토**

화상 24시간 후 각기 다른 농도의 Ag-SD를 첨가한 콜라겐 스폰지와 Ag-SD 무 첨가 콜라겐 스폰지 등을 각각 적용한 후, OpSite을 덮고 그 위에 마른 거즈로 덮은 다음, Coban™으로 드레싱 재제를 화상피부에 고정시켜주었다. 수술 후 2, 3, 4일째에 조직을 떼어내 상피의 재생정도를 관찰하였다. 콜라겐 스폰지는 창상에 도포하기 전 충분한 양의 PBS를 적셔서 사용하였다. 창상은 같은 조건에서 4개씩을 준비하였으며 4개의 병변 모두에서 조직검사를 시행하였다. 화상피부에 OpSite을 도포하여 각 시료 적용 군 간의 상처 부위로부터의 삼출 물 등의 흡수, occlusion 정도 등을 조절하였다. 드레싱 적용 후 96시간 경과 후 적용부위를 도려낸 후 포름 알데하이드에 고정시킨 후 Hematoxylin-Eosin(H-E) 염색을 하여 조직검사를 하였다. Wound contraction rate, 상피화 정도, 상처부위의 염증세포 존재 등을 조사하였다.

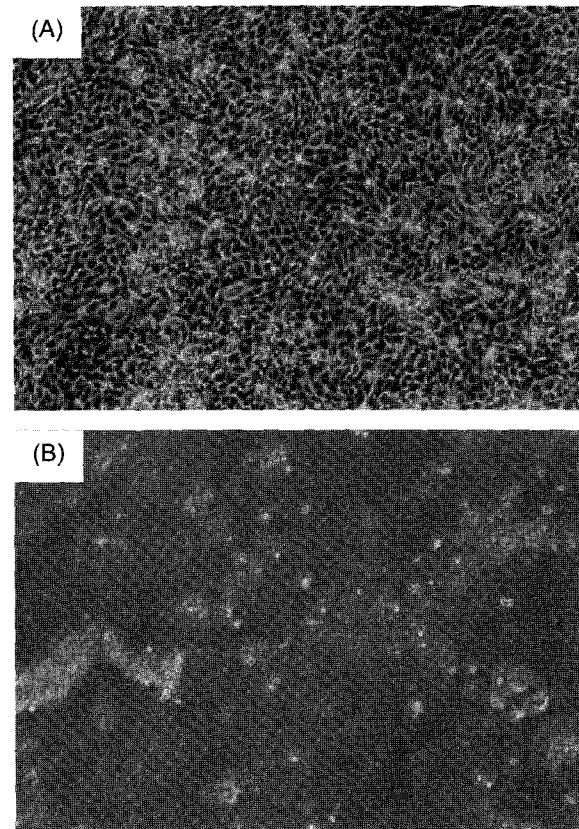
**조직검사**

떼어낸 조직은 10% formalin 용액에 고정한 후 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매 하였다. 포매된 시료는 5-6 mm 두께로 깎아 H-E 염색하여 관찰하였다.

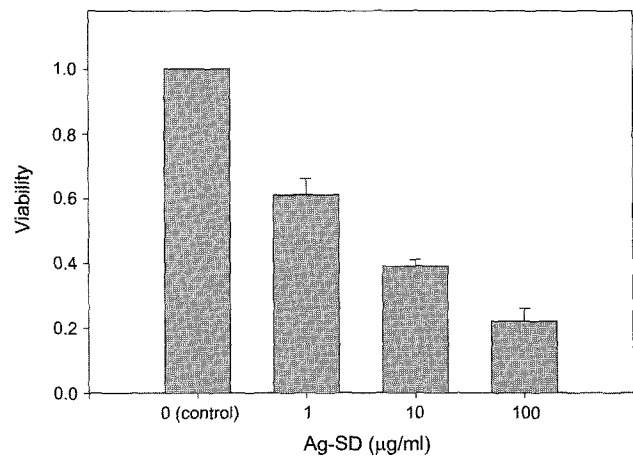
**결과 및 고찰**

**Ag-SD의 각질형성세포에의 독성효과**

Figure 2는 Ag-SD(100 µg/mL) 포함한 배양액에서 HaCat Cell을 1일간 노출시킨 후의 현미경 사진이다. Control과 비



**Figure 2**—Micrographs of HaCat cells cultured in media containing Ag-SD (100 µg/mL) for 1 day. Control culture (A) and Ag-SD exposed culture (B). Ag-SD supplementation in culture media showed the highly cyto-toxic effect on the cells.



**Figure 3**—Effect of silver sulfadiazine (Ag-SD) on viability of cultured HaCat cells. The cells were exposed to Ag-SD for 1 day and cell viability was measured by neutral red assay. Each data represents the average of triplicate experiments. The viability responded to Ag-SD in dose-dependent manner.

교시 Ag-SD 투여군에서는 세포괴사가 일어나는 것이 관찰되었다. 이는 Ag-SD에 의한 세포독성으로 생각된다.

Figure 3은 대조군 의 세포 생존 도를 1로 하였을 때의 Ag-SD의 농도(1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 따른 상대적인 세포생존 도를 표시한 것이다. 배양액 중의 Ag-SD의 농도가 증가 할수록 세포생존도가 감소하였다. Ag-SD의 세포독성은 농도 의존적인 것으로 나타났고, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 정도의 세포생존도가 감소하였다.

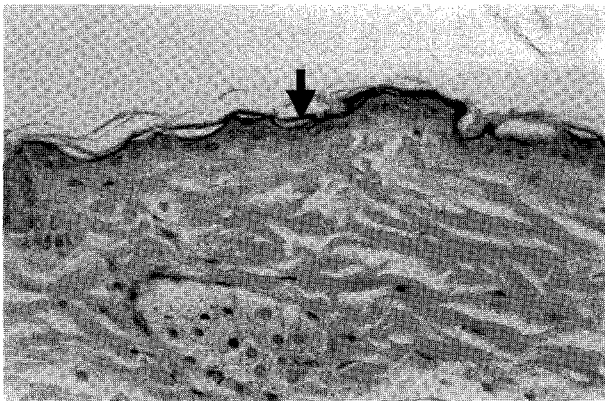
#### 조직학적 소견: 화상모델의 설정 및 피부의 손상정도

상피 층 및 진피 층이 부분 손상된 2도 화상의 모델을 만들기 위하여 100°C 5 sec, 70°C 10 sec burn의 2가지 조건에서 화상 창상 모델을 만든 후 조직학적 소견을 검토한 결과, 100°C 화상에서는 표피전체는 물론이고 진피 층도 파괴되며 진피 아래의 근육 층 일부까지 조직이 손상되는 소견을 보였다. 또한 화상 후 96시간 이후까지도 전혀 조직의 재생이 진행되지 않음이 예비실험 결과 관찰되었다.<sup>10)</sup>

70°C 10 sec burn에서는 상피 층 및 진피 층 일부의 손상이 관찰되었으며, 진피 층 내에 다수의 모낭이 남아 상피 재생에는 지장이 없을 것으로 판단되었다. 창상 치료 제재간의 치유과정의 차이를 화상 후 96시간 이후에 명확히 관찰할 수 있었다.<sup>11)</sup>

#### 창상 치유에 미치는 항생제(Ag-SD)의 영향

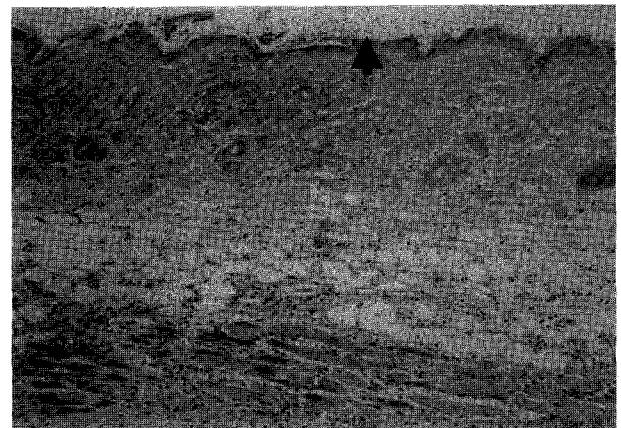
Figure 4는 무모마우스의 정상피부의 조직 소견이다. 각질 층(stratum corneum)은 eosin으로 붉게 염색되어 있으며, 기저층의 핵은 hematoxylin에 의해서 진한 푸른색으로 한 층으로 염색된 것이 나타난다. 진피층에서는 분홍색으로 염색이 된 collagen bundle과 핵(nuclei) 부분이 푸르게 염색된



**Figure 4**—Histological appearance of the normal skin. Stratum corneum was strongly stained by eosin (dark gray) and observed as a 3-5  $\mu\text{m}$  thick layer. The stratum basale stained by hematoxylin (light gray) as a single cell layer appeared. The nuclei of stratum basale (arrow) were distinct and strongly stained by hematoxylin. Original magnification  $\times 100$ .



**Figure 5**—Histology of H-E stained 5-day post burn 2<sup>nd</sup> degree burn wound with occlusive dressing only without Ag-SD application. Without antibiotics treatment, a lot of inflammatory cells denoted as an arrow were present and red blood cells were also observed. Due to an impaired wound healing process, stratum basal layer was not regenerated yet. Original magnification  $\times 100$ .



**Figure 6**—Histology of silver sulfadiazine (2%) applied burn wound: No inflammatory cells are observed. Due to some cytotoxic effect of Ag-SD on cell growth, regeneration of epidermal cells denoted as an arrow like stratum basale was not progressed. Impaired epidermal regeneration was observed. Original magnification  $\times 100$ .

섬유 아 세포 등이 아주 명확히 관찰되고 있다.

Figure 5은 70°C 10 sec 조건으로 2도 화상을 입힌 무모마우스의 경우, 화상 96시간 후 dressing 제거 후의 조직 소견이다. 피부결손 부분을 덮어주는 역할을 갖고 있는 OpSite 드레싱만을 적용 시 H-E 염색을 한 조직 소견은 항생제의 투여 없이 많은 염증 세포들이 존재하는 것이 관찰되었다. 또한, 상피세포의 재생이며, 진피 층의 증식도 정상적으로 진행되고 있지 않음을 보여주고 있다.

Figure 6은 Ag-SD(2%) 포함한 콜라겐 드레싱을 화상부위에 덮은 후 OpSite의 dressing 제재를 동일한 방법으로 적용한 창상 피부의 조직소견은 정상피부와 비교시 상피세포

의 증식이 정상적으로 이루어지지 않음을 보여주고, 표피재생이 지연되는 것으로 나타났다. 각질형성이 전혀 진행되고 있지 않음이 관찰된다. Ag-SD의 투여는 화상부위의 염증세포의 증식을 억제작용이 있지만, 창상 피부의 상피재생속도 등의 억제효과로 상피화가 올바르게 진행되어지지 않았다. 본 연구실에서는 설파디아진은의 피부세포독성 및 화상 피부의 상처치유과정을 개선시키기 위하여, 상피세포성장인자 등의 영향에 대한 연구를 진행 중이다.

### 결 론

동일한 조건에서 부분 피부결손 화상모델을 만들고 Ag-SD 포함 드레싱, 단순한 드레싱 두 가지 종류의 창상 치료 재료를 사용 한 결과 Ag-SD 투여 군에 있어서는 표피재생이 지연되는 것으로 나타났다. 설파디아진은은 화상피부에 있어서의 각질형성세포의 증식을 농도 의존적으로 저하시키며, 창상 부위의 섬유아 세포의 이동 및 증식이 정상적으로 이루어지지 않으며, 2도 화상 마우스 모델에 있어서의 상처치유속도의 지연이 관찰되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 덕성여자 대학교 2001년도 약학연구소의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다. 실험을 성실히 수행해준 덕성여자 대학교 약학대학 임현주, 권인숙 학생에게 감사 드립니다. 본 연구에 관련되어 피부세포의 기증과 조직학적 소견을 해석하는데 도움을 주신 서울대학교 의과대학 피부과 박경찬 교수님께 감사 드립니다. Silver sulfadiazine을 제공하여 주신 동화약품의 유재만 박사님께 감사 드립니다.

### 문 헌

1) R.McCauley, Y. L. V. Chopra, D. Herndon and M. Robbison, Cytoprotection of human dermal fibroblasts against silver sulfadiazine using recombinant growth factor, *J. Surg. Res.*,

56, 378-384 (1994).  
 2) S.J. Piscatelli, B.M. Michaels, P. Gregory, R.W. Jennings, M.T. Longaker, M.R. Harrison and J.W. Siebert, Fetal fibroblast contraction of collagen matrices *in vitro*: the effects of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$ , *Ann. Plast. Surg.*, **33**, 38-45 (1994).  
 3) M.Eisinger, S.Sadan, I.A. Silver and R.B. Flick, Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 1937-1941 (1988).  
 4) T. Kaufman, P. Nathan, M. Levin P.A. Hebda, E.H. Eichenlaub and B. Korol, Drug-loaded synthetic dressings : effect on contraction, epithelialization, and collagen synthesis of deep second-degree experimental burns, *Ann. Plast. Surg.*, **14**, 420-427 (1985).  
 5) Y. Kuroyanagi, E. Kim and N. Shioya, Evaluation of a synthetic wound dressing capable of releasing silver sulfadiazine, *J. Care. Rehabil.*, **12**, 106-115 (1991).  
 6) E.C. Robb and P. Nathan, Control of experimental burn wound infection : comparative delivery of antimicrobial agent (silver sulfadiazine) either from a cream base or from a solid synthetic dressing, *J. Trauma.*, **21**, 889-893 (1981).  
 7) F.W. Fuller, M. Parrish and F.C. Nance, A review of the dosimetry of 1% silver sulfadiazine cream in burn wound treatment, *J. Burn. Care. Rehabil.*, **15**, 213-223 (1994).  
 8) E.C. Robb, D.G. Fitz and P. Nathan, Delivery of topical antimicrobial agents silver sulfadiazine, gentamicin and nystatin to infected burn wounds in rats from preloaded synthetic dressings, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **26**, 533-536 (1980).  
 9) J. B. Wright, K. Lam and R.E. Burrell, Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment, *Am. J. Infect. Control.*, **26**, 572-577 (1998).  
 10) A. Cho Lee, Evaluation of dermal stability and wound healing efficacy of epidermal growth factor after topical application: in burn skin and in normal skin, *Progress Report (971-0713-409-1) to KOSEF* (1998).  
 11) A. Cho Lee, Y. Suzuki, A. Shigematsu and K. Jung, Wound healing effect of epidermal growth factor after topical application, *Proceedings of the 23<sup>rd</sup> international symposium on Controlled release of Bioactive materials*. Kyoto, Japan, Controlled Release Society, 325-326 (1996).