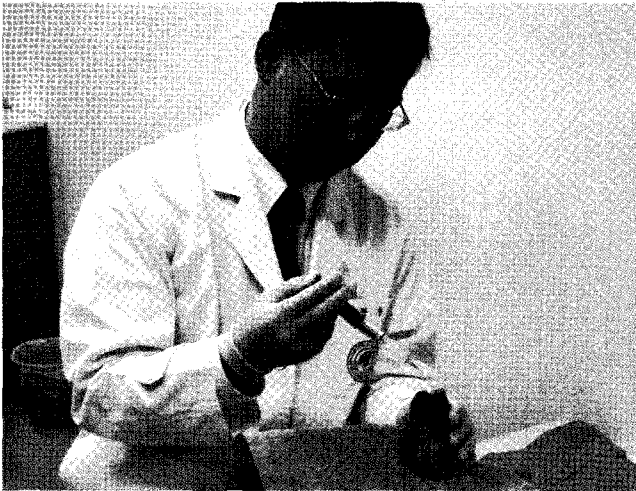


# 섬유아세포 동종이식을 이용한 당뇨족부 궤양의 치료

## Clinical Application of Fresh Fibroblast Allograft for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers

한승규

고려대학교 의과대학  
성형외과학교실



### Abstract

Diabetic foot ulcers often pose a difficult problem for health care professionals because of the defects associated with fibroblast functioning. Although there has been much interest recently in the use of topical growth factors for the treatment of diabetic foot ulcers, the effects are generally not very dramatic.

The purpose of this study is to assess the effects of clinical application of fresh fibroblast allograft for the treatment of

diabetic foot ulcers. Eight patients with diabetic foot ulcers ranging from 6 to 17 weeks in duration were treated.

The size of the wounds ranged from 2.0 to 6.0 cm<sup>2</sup> with 3 patients exhibiting exposed bones. Human dermal fibroblasts from healthy teenagers were cultured in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% autologous serum. The cultured cells were applied over the wounds immediately following debridement, with fibrin being used as a cell carrier. A dressing was then applied with Tegaderm and kept moist until healing was complete.

The progress and time for complete wound closure and patient satisfaction

were assessed, with follow-up time ranging from 6 to 18 months. Complete wound healing occurred in all patients. Eleven to twenty-one days were needed for complete reepithelization of the wound and no clinical or laboratory abnormalities were noted.

Patient satisfaction was also very positive. In this study, the use of fresh human fibroblast allografts was found to be a safe and effective treatment for diabetic foot ulcers.

(Key Words: Diabetic foot, Fibroblast, Cell therapy)

## □ 서론

현대사회로 갈수록 당뇨병 환자의 수는 급격히 증가하고 있다. 당뇨병 환자에게서 많이 발생하는 하지의 만성창상은 일상 생활에 많은 불편함과 제약을 주고 또한 심할 경우 이로 인하여 사망까지 할 수 있는 무서운 결과를 초래하기도 한다.

한 연구에 의하면 하지에 만성창상을 가지고 있는 당뇨병 환자의 20%에서는 결국 절단이 요하게 된다. 그러나 이러한 당뇨병은 지금까지 해 오고 있는 고식적인 치료방법으로 좋은 결과를 보기 힘들며 뚜렷하게 좋은 치료 방법이 없는 실정이다.

당뇨족에서 채취한 섬유아세포는 고혈당의 영향으로 증식능력이 떨어

지고 성장인자(growth factor)나 여러가지 사이토카인 (cytokine)의 분비능력이 감소하는 등 세포기능에 변화가 생긴다. 또 만성 창상으로부터의 분비물이 섬유아세포의 증식을 방해한다.

최근에는 당뇨족에서 감소된 성장인자(growth factor)를 외부에서 공급해 줌으로써 당뇨족을 치료하는 방법들이 연구되고 임상적으로 이용되고 있으나 그 효과는 아직까지 미비하다.

예를 들면, 재조합 인간 혈소판 증식인자(recombinant human platelet-derived growth factor-BB)를 성분으로 하고 당뇨족 창상에 국소적으로 이용할 수 있는 제품 등이 개발되어 이용되고 있다. 또 냉동된 상태로 보관된 섬유아세포나 각질세포 등을 구성성분으로 하는 자가배양피표, 동종배양진피, 동종배양피부 등의 다양하게 개발된 배양피부 대체물을 통해 창상에 성장인자나 기타 다른 당뇨로 인하여 부족하게 된 여러가지 인자들을 공급할 수 있도록 하는 치료가 이루어지고 있다. 그러나 세포를 냉동 보관하게 될 경우 냉동과정이나 세포의 종류에 따라 차이를 나타내기는 하나 cryoprotectant의 혼합이나 제거시의 osmotic damage, cryoprotectant 자체의 세포 독성, 냉동 및 해동 과정으로 인한 liquid phase의 변화 등으로 세포의 증식도나 아미노산 투과도, 단백질 합성도 등에 손상을 입게 된다.

현대사회로 갈수록 당뇨병 환자의 수는 급격히 증가하고 있다. 당뇨병 환자에게서 많이 발생하는 하지의 만성 창상은 일상 생활에 많은 불편함과 제약을 주고 또한 심할 경우 이로 인하여 사망까지 할 수 있는 무서운 결과를 초래하기도 한다.

따라서 이번 연구는 냉각시키지 않은 인체 섬유아세포를 당뇨족 창상에 동종이식하여 당뇨족 창상치유에 미치는 효과에 대하여 알아보려고 하였다.

## □ 재료 및 방법

### 1. 인체 섬유아세포 배양(Human fibroblast culture)

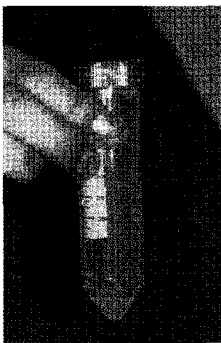
피부이식술을 받은 10대의 환자 3명으로부터 얻은 잉여 피부 중 표피를 제거하고 진피층만을 2x1mm 크기로 박리하였다. 박리한 진피를 50% 자가혈청이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12(DMEM/F-12; Gibco, Grand Island, NY) 100-mm 조직배양 플레이트위에 고르게 펼쳐놓고 진피가 플레이트에 잘 부착되도록 37°C에서 4시간동안 배양하였다.

배양 후에 10% 자가혈청과 25 $\mu$ g/ml gentamycin 항생제를 포함한 DMEM/F-12 12ml를 추가하고 다시 배양한 다음 배양한 섬유아세포에 트립신(trypsin)을 넣어주고 100 $\mu$ m nylon mesh를 통해 걸러내었다.

분리해 낸 세포들을 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>가 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; Gibco, Grand Island, NY)으로 2.7배 희석하였다.

그 후 17분 동안 450 X g로 원심분리하여 세포를 분리하였다. 모아진 세포들을 DPBS 40ml로 씻어내었다. 세포의 밀도는 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 계산하였고 trypan blue를 이용하여 세포의 생존정도(viability)를 판단하였다.

이러한 과정을 거쳐 세번의 계대배양을 한 세포를 이번 연구에 이용하였다 <Fig. 1>. 공여자는 모두 HIV, hepatitis, syphilis 등의 감염질환에 대한 혈액검사를 시행하여 세포 공여를 통한 감염의 위험을 배제하였다.



<Fig.1>

Thrombin solution containing dermal fibroblasts

### 2. 환자군(Patients)

2002년 1월부터 7월까지 총 8명(남자 4명, 여자 4명)의 당뇨족 환자를 대상으로 하였다. 환자의 평균 나이는 54.9세였으며, 환부의 크기는 20~60cm<sup>2</sup> (평균 32cm<sup>2</sup>)였다. 당뇨족의 이환 기간은 6~17 주였고 세명의 환자는 환부에 뼈가 노출되어 있는 상태였다. 이전에 이미 당뇨족을 치료 받은 적이 있던 환자는 5명이었다. 당뇨족부 궤양의 병력이 있던 5명의 환자 중 3명은 괴사조직 제거술과 드레싱 등의 고식적인 방법을 사용했던 환자이며 나머지 2명은 Regranex 제품으로 치료받았던 환자였다. 연구시작 전에 윤리위원회(institutional Review Board)의 승인을 얻었으며 모든 환자와 공여자로부터 이번 연구에 동의하는 인지 동의서를 받았다.

### 3. 방법(technique)

모든 환자를 대상으로 섬유아세포 동종이식을 이용한 치료의 적합 여부를 치료 시작 전에 감별하였다. 감별기간 동안 고식적인 드레싱을 하면서 필요시 환부의 죽은 조직과 회복 불가능한 정도로 손상을 받은 조직을 건강한 조직이 노출되도록 예리하게 변연절제술을 시행하였다. 환부에 감염이 되어있지 않고 비교적 치료에 순응도가 좋은 환자를 대상으로 세포치료에 적합하다고 판단되면 본격적인 치료를 위해 다시 한번 깨끗하게 변연절제술을 시행하여 환부의 면적을 구하여 치료전의 환부 크기를 기록하였다.

배양된 섬유아세포를 50ml 원심분리 튜브(centrifuge tube)에 넣고 0.5 ml (250 IU) thrombin(Baxter Healthcare Corp.)과 섞은 다음 1ml syringe에 옮겨 담은 다음 환부에 도포하였다 <Fig. 2>. 그 위에 fibrinogen(Baxter Healthcare Corp.)을 떨어뜨려 세포를 고정하였다. 도포된 섬유아세포의 수는  $2 \times 10^6$  에서  $4 \times 10^6$  였다. 환부를 Tegaderm (3M, Minneapolis, MN)으로 덮어 드레싱한 다음 치료 5일째 교체하여 주었다. 그 후 환자는 2~3일마다 환부의 상태 검사와 드레싱을 받았다. 환부는 완전히 치료가 될 때까지 마르지 않도록 습하게 유지하였다.

### 4. 평가(evaluation)

환부가 상피화로 덮여가는 정도와

완전 치유까지 걸린 시간을 조사하였다. 완전 치유는 환부를 물로 씻을 수 있는 상태로 완전히 상피화가 이루어진 상태로 정의 하였다. 섬유아세포 동종이식을 이용한 치료와 괴사조직 제거술과 드레싱 등의 기존의 치료를 비교하기 위하여 이전에 당뇨족을 치료 받았던 과거력이 있는 5명의 환자를 대상으로 괴사조직 제거술과 창상 드레싱 등의 고식적인 치료 방법으로 치료를 받았을 때의 결과에 대한 만족도와 섬유아세포 동종이식을 이용한 치료의 결과에 대한 만족도를 환자 스스로 점수화하도록 한 Visual Analog Scale(VAS)를 이용하여 두 치료를 평가하였다.

VAS는 제일 좋지 않은 결과를 0점으로 하고 제일 만족스러운 결과를 10점으로 하였으며 추적 관찰기간은 6~18개월이었다.

### □ 결과

섬유아세포 동종이식 치료 결과 환부의 바닥면과 노출된 뼈 위로 육아조직이 형성되었다.

환부의 둘레 경계로부터 상피화가 시작되어 진행되었고 뼈가 노출된 환부를 포함하여 모든 환부가 한번의 섬유아세포 동종이식 치료로 완전한 상피화가 이루어졌다. 완전한 상피화가 이루어지기 까지 걸린 시간은 11~21일로 평균 18.1일이었다. 세포를 이식 받은 후에 전신적으로 이식거부의 징후나 창상부위의 특이



<Fig.2>

The fibroblast-fibrin mixture is being applied to an ulcer site.

Table 1. Case reports of diabetic foot ulcers

Ptients	Gender	Age	Location	Size(cm <sup>2</sup> )	Past ulcer history	Time to heal (days)	VAS for conventional method	VAS for Fibroblast Allograft
1	Male	62	Rt great toe tip, Bone exposed	2.2	No	20	-	-
2	Female	50	Lt 2 <sup>nd</sup> toe tip	2.0	Yes	20	4	9
3	Female	54	Lt 4 <sup>th</sup> toe medial side, Bone exposed	2.0	Yes	16	4	8
4	Male	67	Rt 2 <sup>nd</sup> toe plantar side	2.0	No	17	-	-
5	Male	50	Rt little toe plantar side	2.2	Yes	11	6	9
6	Female	51	Rt great toe medial side, Bone exposed	3.8	No	19	-	-
7	Female	52	Lt little toe plantar side, MPJ level	6.0	Yes	21	6	9
8	Male	53	Rt great toe plantar side	4.8	Yes	21	4	8



<Fig.3.(A)>



<Fig.3.(B)>



<Fig.3.(C)>



<Fig.3.(D)>

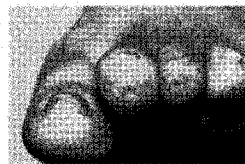
A 54-year-old woman with chronic non-healing diabetic foot on left fourth toe medial side (A) Preoperative view (B) After debridement with rongeur the exposed bone (C) 10 days after treatment (D) 17 days after treatment, Epithelization was completed.



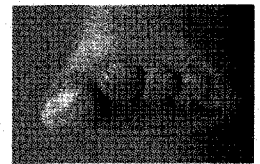
<Fig.4.(A)>



<Fig.4.(B)>



<Fig.4.(C)>



<Fig.4.(D)>

A 50-year-old woman with chronic non-healing diabetic foot on left second and third toe tip. The second toe with larger size wound was treated with fibroblast allograft, and the third toe with smaller size wound was conservatively treated. (A) Preoperative view (B) 9 days after fibroblast transplantation (C) 15 days after treatment, the second toe wound were completely epithelized, but the third toe wound showed raw surface (D) 100 days after treatment, long term result of second toe was good with healthy texture, but the third toe was not yet completely epithelized.

한 이상징후는 발견되지 않았다. 또 치료후 치료시작 전의 생화학 검사, 혈액검사, 소변검사 등 모든 임상 검사와 다른 변화를 보이지 않았다.

환자의 치료 결과에 대한 만족도도 매우 높았다. VAS를 시행한 5명의 환자 모두 섬유아세포 동종이식을 이용한 치료가 기존의 고식적인 치료에 비하여 만족도가 높았다(각각 86 및 48). 1례에 있어서 치료부위에 비후성 반흔이, 다른 1례에 있어서 반흔구축으로 인한 족지의 내측 굴곡(varus deviation)이 발생했으나 환자나 의사 모두 이에 대한 치료를 고려할 정도는 아니었으며, 기타 감염, 재발 등의 합병증은 발생하지 않았다 (Fig. 3과 4, Table I).

#### □ 고찰

정상적인 창상치유는 이미 잘 알려진 일련의 과정을 통해 진행된다. 먼저 지혈과정을 거쳐 염증기, 육아 조직의 형성, 재상피화가 일어난 다음 반흔이 형성되면서 최종적으로 성숙단계를 거치게 된다. 이렇게 조직적이고 효율적으로 이루어지는 창상의 치유 과정은 성장인자(growth factor) 등의 사이토카인(cytokine)에 의해 이루어지는 세포간의 정보 교환에 의해 이루어지게 된다.

만성 창상은 창상치유과정이 정상적으로 진행되지 못하고 염증기에 계속하여 머물러 있게 되는 경우인데 창상치유 기전이 창상을 닫는데 작용하지 못하고 대부분이 감염에

대항하여 싸우는 염증기에 머무르게 된다.

특히 당뇨 환자의 경우는 몇 가지 요소가 창상의 치유과정에 영향을 미쳐 만성창상으로 머무르게 만든다. 단백질이 변성되고 조직의 미세혈관들을 통한 혈류에 장애가 생기며 기저막(basement membrane)이 두꺼워 진다. 이러한 세포의 변화와 함께 당뇨족에서 채취한 섬유아세포는 세포의 활동이 감소된 것을 볼 수 있다. 당뇨족에 생긴 상처는 정상적인 창상 치유과정이 일어나지 않고 대식세포(macrophage)가 환부로 이동하는 것이 감소하게 된다.

당뇨병 환자는 동맥경화가 동반되는 경우가 많기 때문에 이런 경우 주요 혈관에 협착이 일어나거나 막히게 되어 감소된 혈류로 인해 창상으로의 산소 공급 감소되어 혈관형성술(angioplasty)이나 혈관우회술(vascular bypass) 등을 시행하지 않는 한 창상이 치유되기 어렵다. 한편 미세혈관에도 변화가 생겨 미세혈관의 기저막이 두꺼워져 창상으로의 미량영양소(micronutrients)의 공급이 감소된다.

결국, 창상 치유를 촉진시키기 위해서는 혈관형성(angiogenesis)이 잘 되도록 해주어야 한다고 할 수 있다.

만성 창상에서는 금속단백질 분해효소(metalloproteinases)가 과형성되고 그것의 억제제(inhibitor)인 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP-1

---

외부에서 공급해주는 성장인자 제품은 불안정하고 실제로 작용을 나타내는 성장인자의 비율이 낮고 성장인자 단독으로는 섬유아세포의 중요한 기능 중 하나인 창상치료 과정에 화학주성으로 작용하는 세포외 기질의 생성을 기대하기 어렵다.

---



and TIMP-2tissue)는 감소된다. 이런 원인으로 성장인자(growth factor)와 fibronectin 같은 세포의 기질 요소들이 파괴된다. 각각의 단백질 분해효소의 정확한 역할은 알려져 있지 않지만 전반적인 단백질분해효소의 활성 증가와 창상치유를 촉진하는 성장인자의 감소가 만성창상에서 나타나는 일반적인 상태이다. 만성창상에서 섬유아세포의 기능 변화 역시 중요한 요소이다.

섬유아세포는 PDGF 나 TGF-beta 같은 성장인자와 사이토카인을 분비하고 이것이 세포의 증식과 혈관형성과 염증반응을 조절한다. 또 콜라겐(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycan)과 다른 단백질로 이루어진 3차원적 입체 구조의 세포의 기질(extracellular matrix)을 만든다. 그러나 당뇨병의 섬유아세포는 이런 기능이 현저히 떨어질 뿐만 아니라 건강한 섬유아세포에 비하여 저산소 환경에서 혈관내피 성장인자(Vascular endothelial growth factor)를 생산하는 능력이 많이 감소되어있고 세포 이동 능력 역시 감소되어있다.

최근에는 이렇게 부족한 성장인자나 섬유아세포의 기능을 보강해줄 수 있는 Regranex®, Easyef® 등의 성장인자 공급을 해주는 제품과 냉동상태의 섬유아세포를 포함한 Apligraf(Organogenesis, Canton, MA), Dermagraft® 등의 제품이 당뇨병의 치료에 이용되고 있다.

최근에는 이렇게 부족한 성장인자나 섬유아세포의 기능을 보강해줄 수 있는 Regranex®, Easyef® 등의 성장인자 공급을 해주는 제품과 냉동상태의 섬유아세포를 포함한 Apligraf(Organogenesis, Canton, MA), Dermagraft® 등의 제품이 당뇨병의 치료에 이용되고 있다.

Regranex는 recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB)를 성분으로 하고 있으며 Easyef는 recombinant human epidermal growth factor(rhEGF)를 성분으로 하고 있다. 하지만 이렇게 한 가지 성장인자만을 공급해주는 방법으로 실제 효과는 그렇게 좋지 못하다.

PDGF및 Easyef 제품의 광고 내용과 몇몇 연구에 의하면 이러한 제품으로 12~42cm<sup>2</sup> 크기의 창상을 치유하는데 4~17주가 걸렸다고 하고 있다.

외부에서 공급해주는 성장인자 제품은 불안정하고 실제로 작용을 나타내는 성장인자의 비율이 낮고 성장인자 단독으로는 섬유아세포의 중요한 기능 중 하나인 창상치료 과정에 화학주성(chemoattractants)으로 작용하는 세포의 기질(extracellular matrix)의 생성을 기대하기 어렵다. 또 이들 제품들이 매우 비싸다는 단점도 있다.

Apligraf는 구조로 신생아 포피(foreskin)로부터 추출한 살아있는 섬유아세포

냉동시키지 않은 섬유아세포의 동종이식은 기존의 치료 방법에 비해 당뇨병의 창상 치유 속도를 더욱 촉진하고 부작용을 발생시키지 않는 안전하고 효과적인 치료방법이다.

를 포함한 우형 콜라겐 기질 (bovine collagen matrix)과 각질세포가 포함된 표피의 이중구조로 된 생물학적 드레싱 제품이다.

DermaGraft는 인간의 섬유아세포를 분해되는 주형(degradable scaffold)에 넣어 삼차원적 구조로 만든 드레싱 제품이다. 이러한 각질세포나 섬유아세포의 공급을 통해 창상치유에 필요한 성장인자의 상호작용이 일어나고, 기질의 침착과 분해가 일어나며, 창상이 덮이는 등 일시적이거나 각 세포들이 창상치유 과정에 역할을 함으로써 창상이 치료되는 효과를 볼 수 있다.

하지만, 이들 제품들은 냉동보관된 세포를 이용하는 것으로 역시 치료 결과는 그렇게 좋지 못하다. 성장인자의 분비는 살아있는 세포의 기능이고 따라서 창상의 기저면에 살아있는 섬유아세포의 착상능력은 매우 중요하다.

그렇게 섬유아세포가 창상에 착상되어 살아가고 기능을 하는 것은 가능한 일이지만 냉동 보관되었던 세포가 해동 후에도 같은 정도로 창상에 착상되어 기대하는 역할을 해낼 수 있는지에 대하여는 의문이다.

이번 연구에서는 당뇨족의 치료를 위해 냉동시키지 않은 살아있는 섬유아세포를 동종이식하였다. 냉동되었던 섬유아세포가 창상에서 6개월 정도까지 살아있는 것이 확인 되었지만 냉동시키지 않은 섬유아세포가 창상에서 얼마나 오랫동안 살아있을 수 있는지 장기간의 추적 관찰은 아직 이루어지지 않았다. 하지만 더 많은 수의 섬유아세포가 살아 남고 더 많은 사이토카인이 분비되어 나올 것이고 따라서 창상 치유가 더욱 잘 진행될 것으로 기대된다.

이번 연구에서 기존의 고식적인 드레싱과 괴사조직 제거술의 방법으로 6주 이상 치료해도 낫지 않던 뼈가 노출된 창상이 섬유아세포 동종이식을 통한 치료로 단 17일만에 완전히 나은 결과를 보였다. 20~60cm<sup>2</sup> 크기의 모든 창상이 평균 3주이내에는 모두 치료되었다. 6~18개월간 추적 관찰 결과에서도 재발이나 감염 같은 합병증은 일어나지 않았다.

이번 연구는 대상 환자의 수가 적고, 냉동시키지 않은 섬유아세포의 기능에 대한 더욱 자세한 연구가 요구되지만 냉동시키지 않은 섬유아세포의 동종이식은 당뇨족의 치료에 좋은 환경을 만들어 주는 치료방법이라고 생각되어진다.

## □ 결론

냉동시키지 않은 섬유아세포의 동종이식은 기존의 치료 방법에 비해 당뇨족의 창상 치유 속도를 더욱 촉진하고 부작용을 발생시키지 않는 안전하고 효과적인 치료방법이다. 