

골수기질세포와 섬유아세포의 세포 증식과 교원질 합성능 비교

한승규 · 윤태환 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Comparison of Human Bone Marrow Stromal Cells with Fibroblasts in Cell Proliferation and Collagen Synthesis

Seung-Kyu Han, M.D., Tae-Hwan Yoon, M.D.,
Woo-Kyung Kim, M.D.

Department of Plastic Surgery Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

It has been established that a graft of fibroblasts is able to improve wound healing. However, there has been no research on the effect of a graft of bone marrow stromal cells on wound healing. The wound healing process requires cell proliferation and production of extracellular matrix and various growth factors. The purpose of this study was to compare the abilities of human fibroblasts and bone marrow stromal cells, which contains mesenchymal stem cells, to proliferate and to produce collagen.

Human bone marrow stromal cells and fibroblasts were isolated from bone marrow and dermis of the same patients and grown in culture respectively. Cell proliferation and production of type I collagen by human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts were examined by MTT method and by ELISA of cell culture media on day 1, 3, and 5 days post-incubating. The human bone marrow stromal cells showed 11-17% higher cell proliferation than fibroblasts at each time interval. The levels of type I collagen in the human bone marrow stromal cell group was also significantly higher than those in the fibroblast group. The results indicate that the grafts of human bone marrow stromal cells can show more promising effect than that of fibroblasts for healing of chronic wounds.

Received December 3, 2004

Revised March 3, 2005

Address Correspondence: Seung-Kyu Han, M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: (02) 818-6698 / Fax: (02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 논문은 2004년 춘계 대한성형외과학회에서 발표되었음.

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호 03-PJ1-PG3-20500-0006).

Key Words: Stem cells, Collagen, Cell proliferation

I. 서 론

당뇨족과 같은 만성 창상의 경우 통상의 치료방법에 잘 반응하지 않아 그 치료에 어려움이 많다. 최근 이러한 만성 창상을 치료함에 있어 국소적인 성장 인자를 사용하는 것이 많은 관심을 끌고 있으나 그에 대한 효과는 대개 만족스럽지 못하다.¹⁻⁴ 다른 시도로서 냉동 보존한 섬유아세포를 이식하여 만성 창상의 환경에 부족한 성장 인자를 공급하는 방법이 개발되어 생물학적 창상치료에 사용되어지고 있다.^{5,6}

골수 기질은 골, 연골, 근육 및 결체 조직의 전구체 역할을 하는 간엽줄기세포의 근원이 되는 물질이다.^{7,8} 골수기질세포의 구성 성분인 간엽줄기세포는 면역 거부 반응이 적고 분화된 세포보다 세포자멸사(apoptosis)없이 분화하므로 분화된 세포보다 세포 치료제로서 우월한 능력을 보이고 있다.^{9,10} 따라서 간엽 줄기 세포는 생체공학 영역에서 큰 관심을 끌고 있다. 골수기질세포를 이용하여 골 및 연골을 재생한 연구가 몇몇 보고된 바 있지만 창상치유에 대해 골수기질세포 이식의 효과에 대한 연구는 아직 없는 상태이다.¹¹ 이에 본 교실은 간엽줄기세포를 포함하고 있는 골수기질세포가 섬유아세포보다 창상치유에 있어서도 더 우월한 효과를 보일 수도 있다고 가정하였다. 만약 그렇다면 그 동안 섬유아세포를 이용한 만성 창상의 치료는 더욱 효과가 좋은 골수 기질 세포로 향후 대치가 될 수 있을 것이다. 이번의 예비 연구(pilot study)는 생체외(*in vitro*)에서 골수기질세포와 섬유아세포의 세포 증식과 교원질 합성의 차이를 알아보는 데 초점을 맞추었다.

II. 재료 및 방법

가. 진피 섬유아세포 및 골수 기질 세포의 분리 및 배양
지골(phalangeal bone)의 재건을 위해 골수기질세포 이식 및 동시에 식피술을 받은 환자의 골수와 진피에서 남은 조직을 얻었다. 20세에서 38세 사이의 6명(n=6)의 건강한

남자 환자에게서 연구에 필요한 세포를 채취하였다. 채취 전에 환자에게 연구에 대한 충분한 설명을 하였고, 이에 동의를 얻었다. 모든 환자는 이번 실험에 대해 잘 이해하였고 기꺼이 실험에 참여하였다.

진피 섬유아세포의 추출을 위하여 환자들의 피부 조직에서 표피를 제거한 후 진피만을 채취하였다. 이를 약 2 mm 정도 크기로 잘게 나눈 후 50% 태아우혈청(Fetal bovine serum; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)을 포함한 3 ml의 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 Nutrient(DMEM/F-12; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)가 담긴 100 mm 배양용기에 고르게 뿌려졌다. 이후 배양용기는 37°C 조건에서 4시간동안 보관하여 배양용기에 진피조직을 부착시켰다. 이후 25 µg/ml gentamycin과 10% FBS를 포함한 DMEM/F-12 12 ml를 추가하여 배양을 시작하였다. 모든 배양과정에서 5% CO₂, 100% 습도, 37°C 온도가 유지되도록 하였다. 충분한 양이 배양되면 트립신처리로 세포들을 유리한 후, 유리된 세포들은 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)으로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450 Xg의 속도로 원심 침전법을 시행하여 모집하였다. 이를 다시 DPBS로 두 번 세척하고 재부유시킨 후 100 µm의 nylon mesh를 이용, 여과하여 추출하였다. 세포의 밀도는 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 trypan blue dye exclusion 방법을 이용하였다. 그리고 이렇게 추출된 세포는 3회 계대 배양하여 본 실험에 사용하였다.

간엽 줄기세포의 추출은 환자의 후장골 부위의 골수를 채취하여 시행하였다. 주사기를 이용하여 20 ml의 골수를 뽑은 후 5,000 IU의 헤파린에 혼합하여 혈액응고를 예방하였다. 골수를 50 ml 원심분리 튜브에 옮긴 후 1.077 밀도의 Ficoll-Paque density gradient solution을 첨가하고 실온 2,500 Xg에서 30분간 원심분리 하였다. 분리된 골수 표본 중 상층의 단핵구층을 취하여 배양을 시작하였다. 배양액, 배양과정 및 계대배양 등 모든 조건은 진피 섬유아세포 때와 동일하게 시행하였다.

각각의 세포는 96 well 배양기에 각 well당 5% 우혈청을 함유하는 DMEM/F-12 배지 200 µl에 5.0×10^3 cells/well의 밀도로 뿌린 뒤 5% CO₂, 100%의 습도, 37°C에서 배양되었다. 배양 후 1, 3, 5일째에 세포 증식과 교원질 합성능을 측정하여 비교하였다.

나. 세포증식의 측정

세포증식은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, U.S.A.) 분석으로 측정하였다. 간단히 정리하면 5 mg/ml의 10 µl MTT를 총 96 well에 100 µl의 세포 단층에 첨가한 후 37°C에서

3시간 동안 배양하였다. 다음, propan-2-ol의 100 µl 0.04 M HCl를 각 well에 첨가하여 혼합한 후 insoluble blue formazan crystals을 분해하였다. 흡수 정도는 ELISA reader 기기를 이용하여 파장 570 nm와 참고 파장 630 nm에서 측정하였다.

다. 교원질 합성능의 측정

교원질의 생성을 측정하기 위해 Metra CICP(Quidel, CA, U.S.A.) kit를 이용한 collagen type I carboxy-terminal propeptide enzyme를 면역분석(immunoassay)하였다. 간단히 정리하면 100 µl의 희석된 상층액(supernatants)을 항 CICP 항체가 처리된 well에 첨가한 후, 20°C에서 2시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후 100 µl의 토끼의 항-CICP 항체액을 50분간 첨가한 후 100 µl의 염소 항 토끼 alkaline phosphatase 결합물을 50분간 처리하였다. 제 1형 교원질 양은 파장 405 nm에서 측정되었다.

라. 통계처리

모든 실험은 환자 1인 세포당 각각의 배양시기마다 세포 증식과 교원질 합성능의 측정을 3회 반복하였으며, 측정값의 평균값을 통계에 사용하였다. 얻은 측정값에 대한 통계학적 처리는 Mann-Whitney U-test 방법을 이용하여 $p < 0.05$ 의 유의성으로 분석하였다

III. 결 과

가. 세포증식의 측정

배양 첫날 골수기질세포와 섬유아세포간의 세포 증식의 차이는 없었다. 하지만 셋째, 다섯째 날에는 골수기질세포의 세포 증식이 섬유아세포보다 각각 11%, 17% 높은 수치를 보였다. 하지만 이는 통계적으로 유의한 수치는 아니었다(Fig. 1).

나. 교원질 합성의 측정

골수기질세포의 교원질 합성 정도는 세포 증식보다 훨씬 우수한 양상을 보였다. 배양 1, 3, 5일째 각각 128%, 80%, 70%씩 섬유아세포보다 높은 수치를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 2).

IV. 고 찰

창상치유 과정은 세포의 증식과 이동, 신생혈관 생성, 세포외 기질의 침착 등이 관여하는 복합적이고 역동적인 과정이다. 이러한 창상치유 과정에 결함이 생길 경우 창상치유를 지연시켜 당뇨족과 같은 만성 창상에 이르게 한다.

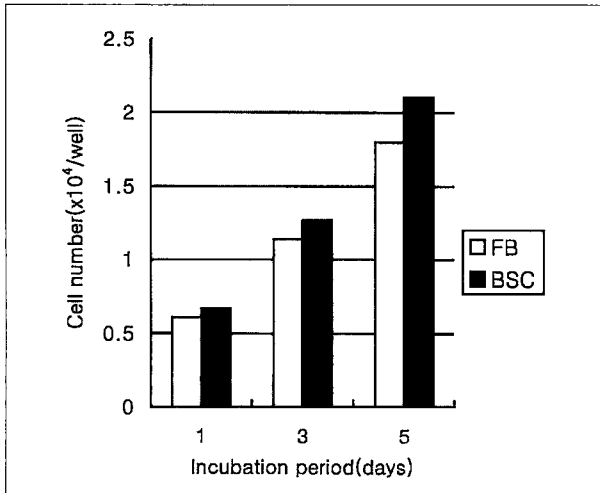


Fig. 1. There was no significant difference in cell proliferation between two cell groups in the first day after plating. At third and fifth day post-plating, the cell proliferation in the bone marrow stromal cell group was 11 and 17 percent greater than that in fibroblast group, respectively.

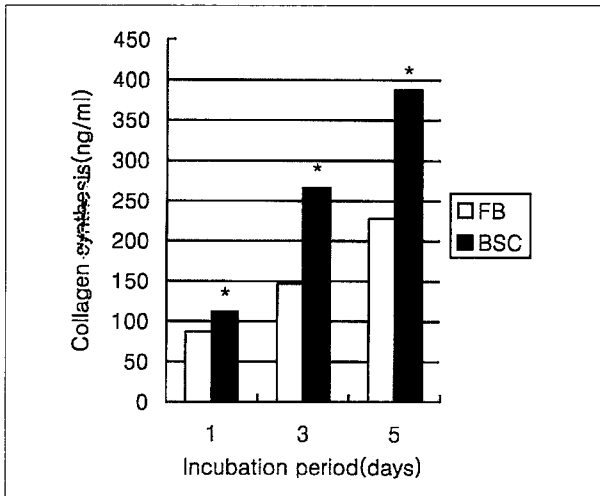


Fig. 2. Collagen synthesis of the bone marrow stromal cell group significantly increased when compared to that of the fibroblast group, with increases of 28, 80, and 70 percent at 1, 3, and 5 days after plating, respectively ($p < 0.05$).

만성 창상은 통상적인 방법으로 창상을 치유하는 데 어려움이 많아 최근에는 성장인자나 섬유아세포 등을 직접 창상 부위에 도포해 주는 방법이 시도되고 있다.^{9,11} 골수기질은 잘 알려진 간엽줄기세포의 공여조직으로 최근 골수기질세포를 이용한 연구가 재생의학 분야에서 활발히 시행되고 있다. 그러나 그동안의 연구는 분화배양환경 내에서의 골수기질세포의 분화능력 연구에만 국한되는 것이 대부분이었다. 본 연구에서는 조혈세포와의 혼합을 완전 배

제하기 위하여 세 차례의 계대배양을 한 세포를 사용하였다. 보통 1-2회의 계대배양을 하면 조혈세포가 사라지는 것으로 알려져 있다.¹⁰ 골수기질세포는 조직배양 판(tissue culture plastic)에 쉽게 부착하는 성질이 있어 조혈세포와 분리가 쉬우므로 비교적 다른 조직보다 줄기세포를 획득하기가 용이하다. 이렇게 골수에서 획득한 골수기질세포는 분화 과정을 거쳐 골아세포, 연골세포, 지방세포, 섬유아세포, 근세포 등으로 분화하는 것이 확인되어 간엽줄기세포가 골수기질세포의 주요 구성 세포라는 것이 입증되었다.^{7,10} 간엽줄기세포는 분화 과정 및 증식 과정에서도 거의 세포자멸사없이 분화, 증식하는 뛰어난 능력이 있다.^{9,10} 그리고 배양과정에서도 20-30회 정도의 세포 배가(doubling) 과정을 거쳐도 줄기세포의 성질을 유지하는 특징이 있다.¹¹ 게다가 간엽줄기세포는 면역관용성격(immunologic tolerance)이 있어, 면역 거부 반응이 적다. 그러므로 간엽줄기세포의 원천인 골수기질세포는 세포 치료제로의 유용성 및 잠재력이 충분하다 할 수 있다.

배양된 골수기질세포는 제 1형 교원질, fibronectin, 제 4형 교원질 그리고 laminin 등을 포함한 세포외 기질을 합성하며 또한 여러 cytokine을 분비하는 것이 보고된 바 있다.⁷ 하지만 어느 정도 분비를 하는지에 대해서는 아직 밝혀진 바 없는 상태이며 창상치유 목적으로 현재 사용되고 있는 섬유아세포보다 창상치유를 증진시킨다는 연구는 아직 보고된 바 없다. 결과에서와 같이, 세포 증식에 있어서는 기대만큼의 차이를 발견할 수 없었다. 반면, 교원질의 합성에 있어서는 골수기질세포가 진피 섬유아세포보다 높다는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구자들은 이전 연구에서 골수기질세포가 창상치료의 또다른 중요 과정인 신생혈관화에 있어서도 섬유아세포에 비해 훨씬 우수하다는 것을 발표한 바 있다.¹² 골수기질세포는 면역관용성격이 있으면서도 안정적인 형질을 보이는 확장 능력이 뛰어난 세포이므로^{9,10} 본 연구자들의 연구 결과를 종합해 볼 때 창상치유 목적으로서의 잠재력이 무한하다 할 수 있다. 하지만 창상치유란 신생혈관화, 세포증식, 교원질 합성 이외에도 성장인자 분비, 상피화 등 다른 요소들도 관여되며 생체내 환경은 보다 복잡하고 여러 요인들을 고려해야 하므로 앞으로는 생체내 환경에서 골수기질세포 이식의 심화된 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 생체외에서 골수기질세포와 섬유아세포의 세포증식 및 교원질 합성능을 비교한 것이다. 세포증식에 있어서는 11-17%, 교원질 합성능에 있어서는 70-128% 골수기질세포가 섬유아세포에 비해 유의하게 높은 양상을

확인할 수 있었다.

이는 창상치유 목적의 세포 치료제로써 골수 기질세포의 가능성을 제시해 준 결과라 할 수 있다.

REFERENCES

- Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL: Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 90: 133, 2003
- Embil JM, Papp K, Sibbald G, Tousignant J, Smiell JM, Wong B, Lau CY: Recombinant human platelet-derived growth factor-BB(becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. *Wound Rep Reg* 8: 162, 2000
- Kano M, Masuda Y, Tominaga T, Hori T, Kitaichi T, Yoshizumi M, Kitagawa T: Collagen synthesis and collagenase activity of cryopreserved heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122: 706, 2001
- Tang W, Wong WKR, Hung CS, Lai KM, Cheung EYN, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EKH: Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 26: 1856, 2003
- Kuroyanagi Y, Yamada N, Yamashita R, Uchinuma E: Tissue-engineered product: allogenic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. *Artif Organs* 25: 180, 2001
- Gohari S, Gambla C, Healey M, Spaulding G, Gordon KB, Swan J, Cook B, West DP, Lapiere JC: Evaluation of tissue engineered skin(human skin substitute) and secondary intention healing in the treatment of full thickness wounds after Mohs micrographic or excisional surgery. *Dermatologic Surgery* 28: 1107, 2002
- Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurter GC: Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 162: 303, 2003
- Hansen SL, Young DM, Boudreau NJ: HoxD3 expression and collagen synthesis in diabetic fibroblasts *Wound Repair Regen* 11: 474, 2003
- Goodson WH 3rd, Hunt TK: Deficient collagen formation by obese mice in a standard wound model. *Am J Surg* 138: 692, 1797
- Pierce GF: Inflammation in nonhealing diabetic wounds: the space-time continuum does matter. *Am J Pathol* 159: 399, 2001
- Schultz GS, Sibbald SG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, Romanelli M, Stacey MC, Teot L, Vanscheidt W: Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* 11: 1, 2003
- Han SK, Chun KW, Kye MS, Kim WK: The effect of transplantation of human mesenchymal stem cells and dermal fibroblasts on the angiogenesis in rats. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 539, 2004