

골수기질세포와 진피섬유모세포의 이식이 교원질 합성에 미치는 영향

최원일 · 한승규 · 이병일 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Effect of Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells and Dermal Fibroblasts on Collagen Synthesis

Won Il Choi, M.D., Seung-Kyu Han, M.D.,
Byung Il Lee, M.D., Woo Kyung Kim, M.D.

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

Purpose: In the previous *in vitro* studies the bone marrow stromal cells(BSCs) have shown the superior effect for wound healing activity than fibroblasts, which includes cell proliferation, type I collagen synthesis, and the production of bFGF, VEGF and TGF- β in chronic wound healing. The aim of this study is to compare the effects of BSCs and fibroblasts on wound healing activity *in vivo*, especially on collagen synthesis.

Methods: The fibroblasts and BSCs were harvested from patients and cultured. The cultured cells were infiltrated into the pores of polyethylene discs. These discs were divided into three groups according to the mixed cells. In groups I, II and III the discs were loaded with no cells, fibroblasts and BSCs, respectively. Twelve discs per group(total 36 discs) were made for this study. After creating 6 pockets in the back of each rats, each discs was implanted into each pockets. At three time intervals from 1 to 3 weeks, the implanted discs were harvested for the histological and quantitative analysis. The amount of collagen produced was evaluated using ELISA. Statistical comparisons were made using the Mann-Whitney U-test.

Results: There was great difference in the collagen synthesis among the three groups by the 1st and 2nd weeks. The BSC group showed highest collagen level,

followed by fibroblast group and no cell group($p < 0.05$). The 3rd week specimens also showed greater collagen amount in BSC and fibroblast groups compared to those of no cell group($p < 0.05$). However, there was little difference between BSC and fibroblast groups.

Conclusion: This result demonstrates that BSC has superior effect on stimulating wound healing than fibroblast, which is currently used for wound healing.

Key Words: Bone marrow stromal cell, Fibroblast, Wound healing, Collagen

I. 서 론

당뇨족과 같은 만성 창상은 그 창상을 가지고 있는 환자의 기질적 원인과 함께 창상 내 세포들의 활성 등의 생물학적 특성이 일반 창상과는 다르기 때문에 일반적인 접근방법으로는 그 치료가 어렵다. 그래서 수년 전부터 세포 분열, 이동 및 세포외기질합성 등을 촉진시킬 수 있는 성장인자들이 연구되고 국소적으로 사용되어 왔다. 그러나 창상치유란 많은 신호전달물질들이 서로 유기적 연관성을 유지하면서 분비의 조절이 이루어진다는 점에서 볼 때 한 두 가지의 성장인자만을 투여하는 것은 그 효과에 한계가 있다. 또한 성장인자들을 상품화 및 보관하기 위한 과정들과 투여과정에서의 성장인자들의 안정성유지도 미지수이다.^{1,3}

이와 같은 개별 성장인자 투여의 한계를 극복하기 위해 최근에는 세포치료법이 도입되어 미국 등 선진국에서는 실제 환자에게도 적용되고 있으며, 특히 당뇨족 등 만성 창상을 가진 환자의 궤양부위에 창상치유능이 뛰어난 소아나 젊은 사람의 섬유모세포를 직접 국소적으로 이식함으로써 창상치유속도를 증가시키거나 자연치유가 불가능했던 창상을 치유시키는 목적으로 사용되고 있다.^{4,6}

골수기질세포는 간엽줄기세포가 주된 구성성분으로 조건에 따라 여러 세포로 분화가 가능하며, 면역적으로 거부반응이 적고, 자연사멸(apoptosis)하지 않고 오랜 기간 분열할 수 있는 능력을 가진 세포로 알려져 있어 요즘 생명공학분야에서 집중적인 관심을 받고 있는 세포다.^{7,9} 골이나 연골 형성에 있어 골수기질세포를 이용한 연구는 여럿

Received October 19, 2006

Revised November 6, 2006

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 2005년 제 59차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제 고유번호 03-PJ1-PC3-20500-0006).

발표된 바 있으나 창상치유에 있어 골수기질세포의 이식이 기존의 분화된 섬유모세포의 이식에 비해 어떤 효과를 보이는지에 대한 연구는 시행된 바 없다.

본 교실에서는 골수기질세포를 이용한 동종배양세포치료제 개발을 최종목표로 하여 연구를 진행해오고 있으며 지난 *in vitro* 연구에서 세포증식, 교원질합성, 성장인자분비에 있어 골수기질세포의 우수성을 규명한 바 있다.¹⁰ 본 연구는 이러한 골수기질세포의 단층배양상태에서의 우수성이 실제 창상부위에 이식 시에도 나타나는지를 알아보기 위해 시행되었다. 특히 창상치유의 필수요소인 교원질합성에 있어 골수기질세포와 섬유모세포 이식의 효과를 서로 비교하였다.

II. 재료 및 방법

가. 진피 섬유모세포 및 성체 골수기질세포의 분리 및 배양

수부의상으로 인한 수지골 및 피부 결손이 발생하여 골수기질세포 이식을 이용한 수지골 재건 및 피부이식을 동시에 시행한 20세, 38세 및 45세의 정상 남자 환자에서 잉여 골수기질세포 및 진피조직을 이용하여 성체 골수기질세포 및 섬유모세포를 추출하였다. 본 연구는 본 연구자들이 속한 기관의 윤리위원회(Institutional Review Board)의 심사를 통과하였으며 연구에 잉여조직을 기증한 환자들 모두 충분한 설명을 듣고 기꺼이 연구참여에 동의하였다.

1) 진피 섬유모세포의 추출

환자들의 피부조직에서 표피를 제거하여 진피만을 채취하였다. 채취한 진피를 약 2mm 크기로 나눈 후 type I 및 III collagenase(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, U.S.A.)를 사용하여 섬유모세포를 분리하였다. 분리된 세포는 50 µg/ml

gentamycin과 10% fetal bovine serum(FBS; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12(DMEM/F-12; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.) 10 ml를 사용하여 배양을 시작하였고 모든 배양과정에서 gentamycin 50 µg/ml, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되도록 하였으며, 2-3일마다 배양액을 교환하였다. 충분한 양이 배양되면 trypsinization으로 세포들을 유리하였고 유리된 세포들은 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS; GIBCO, Grand island, NY, U.S.A.)로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450 × g의 속도로 원심침전법을 시행하여 모집한 후 이를 다시 DPBS로 2번 세척하고 재부유시킨 후 추출하였다. 이렇게 추출된 세포는 4회 계대배양하여 본 실험에 사용하였다.

2) 골수기질세포의 추출

환자의 후장골 부위에서 골수를 채취하여 시행하였다. 주사기를 이용하여 20 ml의 골수를 뽑은 후 바로 5,000 IU의 헤파린과 혼합하여 혈액응고를 예방하였다. 골수를 50 ml 원심분리 튜브에 옮긴 후 1.077 밀도의 Ficoll-Paque density gradient solution(Ficoll-Paque, Amersham Biotech, Stockholm, Sweden)을 첨가하고 실온에서 2,500 × g로 30분간 원심분리 하였다. 분리된 골수 중 줄기 세포가 포함된 층의 단핵구층을 취하여 배양을 시작하였다. 배양액, 배양과정 및 계대배양 등의 조건은 섬유모세포와 모두 동일하게 시행하였다(Fig. 1). 골수기질세포의 순도는 flow cytometer(Coulter EPICS XL, Beckman Coulter, CA, U.S.A.)로 확인하였다. 본 연구에서 사용된 배양된 골수기질세포는 조혈계세포의 항원항체 반응인 CD45(Immunotech, Marseille, France), CD34(Becton Dickinson Bioscience, CA, U.S.A.), CD14(Immunotech, Marseille, France)에 음성을 나타냈다.

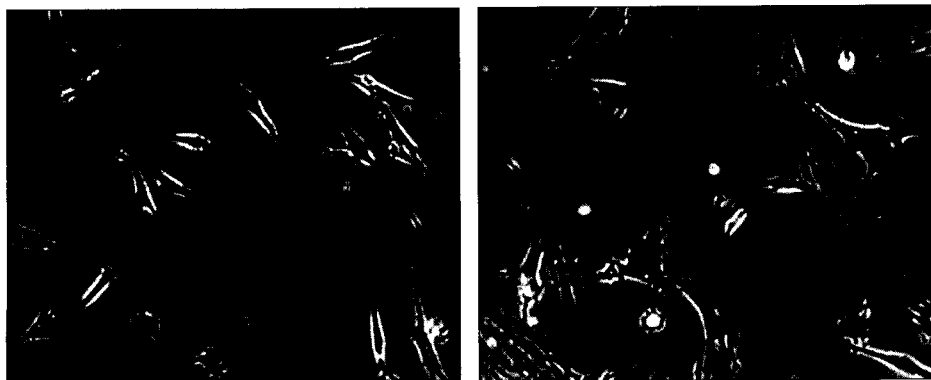


Fig. 1. Inverted microscopic findings of cells in monolayer culture(× 100). (Left) Dermal fibroblasts. (Right) Bone marrow stromal cells.

나. Polyethylene oxide 원반 제작 및 이식

1) Polyethylene oxide 원반의 제작 및 세포이식

실험을 위하여 다공성 산화 polyethylene 구조체인 Medpor(Porex, Newnan, GA, U.S.A.)를 이용하였다. 3 mm 두께의 Medpor판에서 5 mm 직경의 펀치를 사용하여 원반을 제작하였다. 4×10^6 개의 세포가 포함된 트롬빈액(Baxter AG, Vienna, Austria) 1 ml에 원반을 4개 넣고 50 ml 원심분리 튜브에서 10분간 흔들어서 주어 세포들이 polyethylene 구조체의 소공(pore)속으로 침투되도록 하였다. 세포가 침투된 각각의 원반을 꺼내어 96-well 배양기에 옮기고 섬유소원(Baxter AG, Vienna, Austria) 200 μ L을 각각의 well에 첨가하여 침투된 세포들이 밖으로 빠져나가지 않고 소공 안에 유지되도록 하였다. 10분 후 fibrin이 형성된 polyethylene 원반을 꺼내어 원반 밖의 잉여 fibrin을 제거한 후 실험동물에 사용하였다(Fig. 2).

Polyethylene 구조체는 혼합된 세포에 따라 3개 군으로 나누었으며, 제 I군은 세포의 혼합 없이 섬유소만을 형성시킨 대조군으로 만들고, 제 II군은 섬유모세포를 혼합하였고, 제 III군은 골수기질세포를 혼합하여 이식하였다. 각 군 당 12개씩 총 36개의 polyethylene 원반을 제작하였다.

2) 세포가 이식된 Polyethylene oxide 원반의 이식

실험동물로는 150 - 200 gm의 Sprague-Dawley 흰쥐 6마리를 암수 구별 없이 사용하였으며 Ketamin으로 복강내

주사하여 마취하였다. 실험쥐의 척추를 따라 좌우측에 길이 5 mm의 절개를 하여 양쪽으로 3개씩, 총 6개의 pocket을 만들고 여기에 각 군 당 2개씩의 원반을 좌우측에 이식하였다. 원반을 이식한 후에는 원반이 피부절개면에 닿지 않도록 피부의 안쪽면을 봉합한 후 절개면을 봉합하였다(Fig. 3).

3) 조직학적 비교

원반 삽입 후 1주, 2주, 3주째에 각각 2마리씩의 실험쥐를 다시 같은 방법으로 마취 한 후 이식된 원반을 주위의 피막조직과 함께 채취한 후 원반 주위의 피막조직을 조심스럽게 제거하였다(Fig. 4). 원반을 중심에서 수평으로 절단한 후 1/2은 조직학적 비교에 사용하였고 나머지 1/2은 정량비교에 사용하였다. 조직학적 비교 검체는 통상적인 Hematoxylin and Eosin 염색을 하여 slide에 봉입한 뒤 polyethylene원반의 pore 안으로 자라 들어간 조직을 40배, 100배 및 200배 광학현미경 하에서 관찰하였다.

4) 정량비교

Polyethylene원반을 삽입한 후 1주, 2주, 3주째에 검체의 원반 1/2을 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하여 교원질합성을 정량비교하였다. 조직이 자라 들어간 원반을 8조각으로 잘게 나누어 microcentrifuge 튜브에 넣었다. Microcentrifuge 튜브를 얼음에

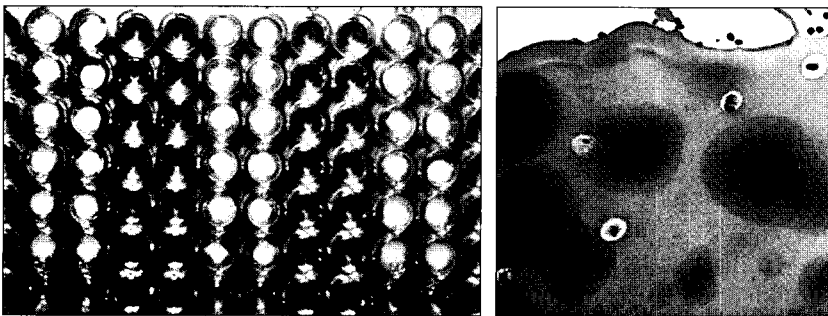


Fig. 2. (Left) Porous polyethylene discs loaded with cell-thrombin composite were coated with fibrinogen in a 96-well cultured plate. (Right) Cells in the pores of a polyethylene disc ($\times 100$).

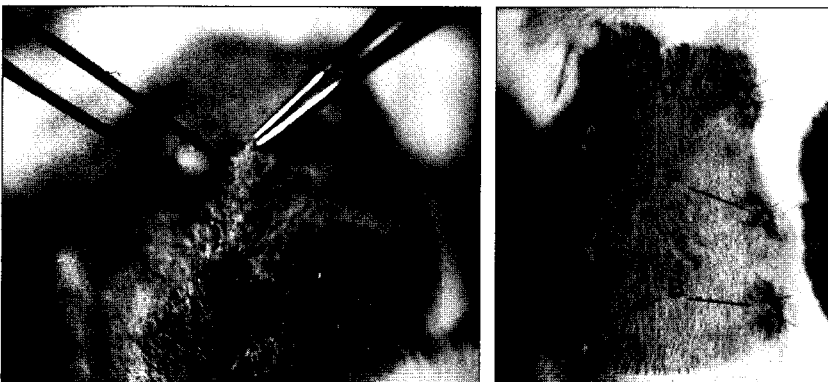


Fig. 3. (Left) Polyethylene discs were implanted in the back of white rats. (Right) The wounds were repaired. C, control group; F, fibroblast group; B, bone marrow stromal cell group.

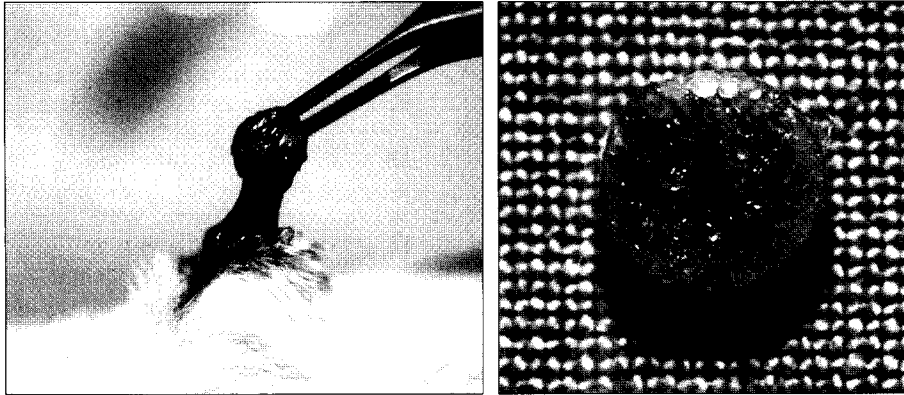


Fig. 4. Gross findings. (Left) At one, two or three weeks after implantation, implanted discs were harvested. A disc was surrounded by soft tissue. (Right) A disc after cleaning from surrounding soft tissue.

담근 채 NP-40 lysis buffer with proteinase inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, U.S.A.) 500 μ L를 첨가하였다. 각 튜브를 vortex mixer에서 10초 동안 혼합한 후 다시 얼음에 10분 동안 방치하고 4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g에서 30분 동안 원심분리하였다. Pellet과 상층의 고형물을 제외한 순수 supernatant만을 취해 분석하였다. 일차항체는 1 mg/ml 농도의 rabbit anti-rat collagen type I polyclonal antibody (Chemicon International, Temecula, CA, U.S.A.)를 사용하였고 이차항체는 HRP anti-rabbit IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 사용하였으며 spectrophotometer를 사용하여 405 - 410 nm에서 분석하였다. Standard protein으로는 Cultrex Rat Collagen I (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 사용하였다.

다. 통계처리

모든 결과는 평균과 표준편차로 표현하였고, 실험군과 대조군의 비교는 비모수적 two independent sample test인 Mann-Whitney U test(SPSS 10.0)를 사용하여 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

가. 조직학적 비교

Polyethylene 원반 삽입 후 1주째 조직에서는 조직과 polyethylene 원반이 서로 단단히 붙어 있었다. 현미경학적 소견으로는 대조군에서는 원반내로의 연부조직의 침투를 거의 발견할 수 없었으나 섬유모세포군에서는 원반 가장자리에는 섬유모세포 등의 연부조직세포 및 교원질 섬유 등이 관찰되었다. 그러나 원반 중앙에는 fibroid material과 염증세포 등이 meshwork 모양으로 섞여 있었을 뿐 대부분의 조직에서 교원질 섬유는 관찰되지 않았다. 골수기질세포군에서는 신생조직이 원반의 중앙부까지 거의 자라 들어왔음을 알 수 있었다. 2주째 조직에서는 대조군의 경우

원반 가장자리에서 연부조직이 발견되기 시작하였다. 섬유모세포군의 경우는 원반 가장자리의 연부조직이 안으로 많이 들어와 조직의 중심을 기준으로 200배에서는 관찰할 수 없었으나 100배 현미경 시야에서 연부조직이 관찰되었다. 골수기질세포군의 경우 역시 조직의 중심을 기준으로 200배 시야에서도 연부조직이 관찰되었다. 3주째의 조직에서는 대조군의 경우는 아직도 원반 중심부에서는 연부조직이 발견되지 않았으나 세포가 이식된 두 실험군에서는 200배 시야에서도 연부조직을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6).

나. 정량비교

이식 1주째 교원질합성은 골수기질세포군이 73 ± 11 ng/ml이고 섬유모세포군이 49 ± 4 ng/ml으로 모두 대조군(21 ± 4 ng/ml)에 비해 많이 진행되었으며($p < 0.05$) 2주째에도 역시 골수기질세포군(111 ± 13 ng/ml)과 섬유모세포군(82 ± 6 ng/ml)이 대조군(60 ± 8 ng/ml)에 비해 교원질합성량이 많았다($p < 0.05$). 또한 1주와 2주째에는 골수기질세포군의 교원질합성량이 섬유모세포군에 비해 많았다($p < 0.05$). 3주째에는 골수기질세포군(119 ± 10 ng/ml)과 섬유모세포군(112 ± 7 ng/ml)이 대조군(91 ± 2 ng/ml)에 비해 교원질합성 양이 많았으나($p < 0.05$) 골수기질세포군과 섬유모세포군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.343$)(Fig. 7).

IV. 고 찰

창상은 염증기, 육아조직의 형성, 재상피화, 반흔형성 및 성숙 등의 단계를 거치면서 치유된다. 이러한 창상치유 과정은 사이토카인과 같은 분자수준에서부터 세포수준까지 다양한 물질들의 역동적이면서도 복잡한 상호작용과 이런 상호작용에 의한 세포의 증식 및 이동, 혈관신생, 기질합성 등이 정상적으로 유도되어야 가능하다.¹¹ 창상치유

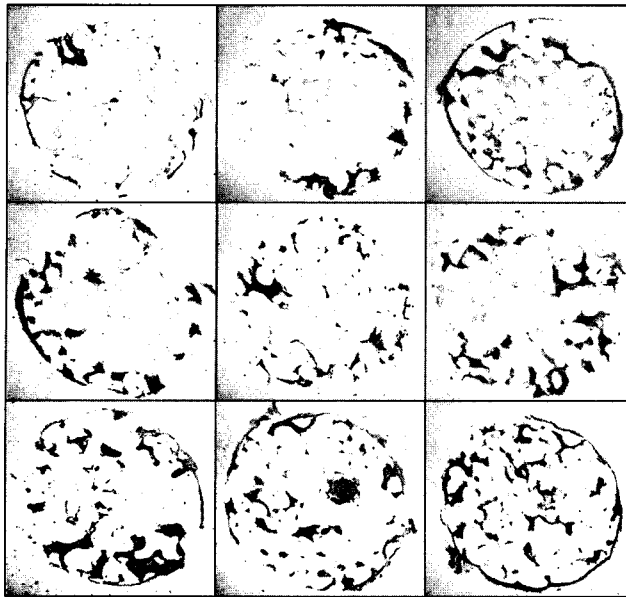


Fig. 5. Histology for collagen synthesis at (Left column) first, (Center column) 2nd, and (Right column) 3rd week ($\times 40$). (Above row) No cell group. (Center row) Fibroblast group. (Below row) Bone marrow stromal cell group. At 1st week, the no cell group showed little soft tissue growth in disc pores. On the other hand, the fibroblast group demonstrated soft tissue growth in disc pores at specimen peripheries, but no soft tissue was evident in the center of specimens. However, in the BSC group, soft tissue growth was observed in the centers as well as peripheries of specimens. At 2nd week, the no cell group showed soft tissue growth at peripheries, but not at centers, whereas the fibroblast group showed soft tissues at centers. At 3rd week, no cell group still did not show soft tissues in specimen centers, whereas in the fibroblast group and the BSC group, collagen fibers were observed.

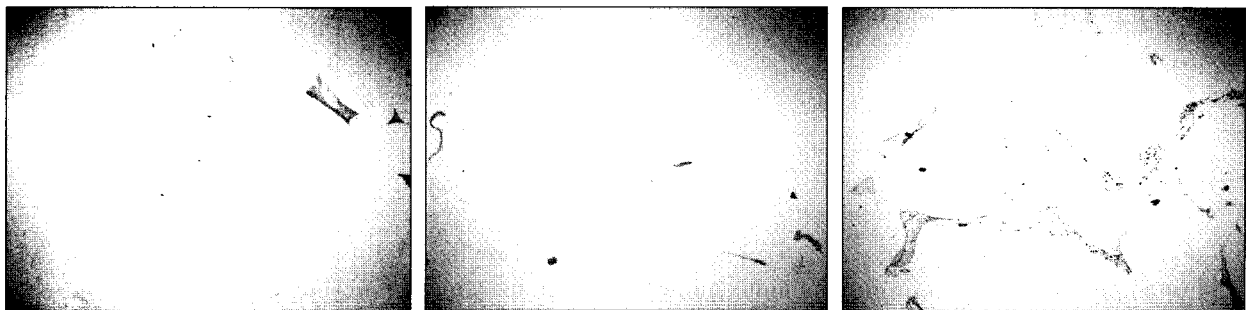


Fig. 6. Histology for collagen synthesis at 1st week ($\times 100$). (Left) No cell group. (Center) Fibroblast group. (Right) Bone marrow stromal cell group. The no cell group and the fibroblast group showed little soft tissue growth in the center of specimens. However, in the BSC group, soft tissue growth was observed in the centers.

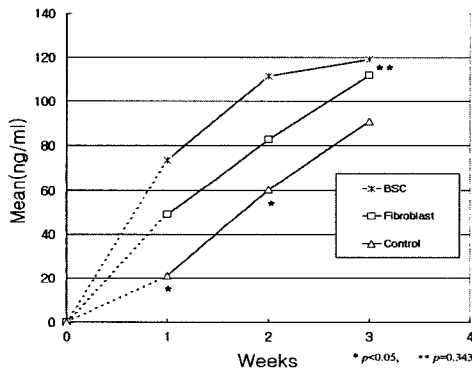


Fig. 7. The graph showing the amounts of collagen synthesis in control, fibroblast (FB) and bone marrow stromal cell (BSC) groups at the time of the 1st, 2nd and 3rd week respectively after cell transplantation. At the time of the 1st and 2nd week after the cell transplantation, BSC group revealed the highest collagen level, followed by FB and control groups ($p < 0.05$). At the time of the 3rd week, test groups synthesized more than the control group ($p < 0.05$). However, no statistical significance between the BSC group and FB group ($p = 0.343$).

과정이 정상적으로 진행하지 못하면 만성적으로 염증기에 머물게 되는데 대표적인 경우가 당뇨병자의 족부궤양이다. 당뇨병자의 만성 창상에서는 단백질의 변성과 혈류의 장애, 그리고 창상치유에 필요한 섬유모세포 등과 같은 세포의 활동이 감소되어 있고 사이토카인 등에 의한 세포 간의 정보교환이 정상적으로 이루어지지 않는 것을 볼 수 있다.^{12,13}

이러한 만성 창상 등의 치료를 위해 감소되거나 활성이 저하되어 있는 사이토카인이나 세포를 투여하는 방법이 최근 시도되고 있으며⁴⁶ 또한 창상치유와 그 외 여러 분야에서 간엽줄기세포에 대한 관심도 증가하고 있다. 골수에서 추출한 세포는 다양한 종류의 세포들로 구성되어 있으며 특히 조혈줄기세포, 간엽줄기세포 등과 같은 줄기세포들을 포함하고 있다. *In vitro*에서 위의 두 종류의 세포들은 같은 배양접시에 놓아두면 간엽줄기세포를 포함하는 골수 기질세포는 배양접시표면에 부착되는 반면 조혈줄기세포

는 그렇지 않기 때문에 쉽게 분리 가능하다. 저자들이 이렇게 추출한 골수기질세포는 CD34, CD45와 CD14 등을 이용한 순도검사에서 98% 이상의 음성반응을 보였다. 또한 골수기질세포는 1-2회 계대배양하면 조혈세포가 사라지는 것으로 알려져 있으며^{7,14} 본 연구에서는 4회 계대배양한 세포를 사용하였다.

본 교실은 이전 연구를 통해 쥐를 대상으로 골수기질세포와 섬유모세포의 이식이 혈관신생에 미치는 효과를 비교한 바 있으며 세포를 이식한 2, 3주째에 섬유모세포군에 비해 골수기질세포군에서 미세혈관밀도(MVD: microvascular density)가 통계적으로 유의하게 높은 것을 확인할 수 있었다.¹⁵ 또한 실험관 내 교원질 합성 비교 연구에서는 골수기질세포군이 섬유모세포군에 비해 높은 교원질 합성능력을 보였으며 세포증식능력도 섬유모세포군에 비해 더 높은 것으로 나타났고 또한 bFGF와 VEGF 분비능 실험에서도 섬유모세포군에 비해 우수한 능력을 보이고 있었다.¹⁰ 이와 같이 다양한 능력을 지닌 간엽줄기세포를 포함하는 골수기질세포들이 실제 창상에도 교원질합성에 효과가 있는지 확인하기 위하여 이번 연구를 수행하였다.¹⁶

섬유모세포와 골수기질세포의 교원질합성 효과를 비교한 본 실험에서 창상에 세포를 이식한 1주째에 골수기질세포군에서 이미 원반의 중심부까지 교원섬유가 자라 들어온 것을 확인할 수 있었으며 실험 2주와 3주째에도 대조군에 비해 두 실험 세포군에서 연부조직이 원반 중심으로 많이 자라 들어 온 것을 확인할 수 있다. 교원질 합성양도 실험 1주와 2주째에 대조군이나 섬유모세포군에 비해 골수기질세포군에서 합성양이 많은 것을 알 수 있다. 실험 3주째에는 골수기질세포군에서 교원질 합성속도가 완화된 면서 섬유모세포군에 비해 교원질 합성양은 많으나 통계적으로 유의한 정도의 차이는 나지 않고 있다. 이는 골수기질세포군은 이미 2주째에 교원질합성이 양적으로는 거의 마무리되고 그 이후에는 remodeling이 시작되기 때문인 것으로 판단된다. 즉 본 실험에서는 교원질 합성 매질로써 polyethylene oxide인 Medpor(Porex, Newnan, GA, U.S.A.)를 3 mm 두께에 5 mm 직경으로 만들어 사용하였는데 교원질합성량이 증가함에 따라 Medpor 내부에 공간적 제약이 있었을 것으로 생각된다.

이전 연구에서 본 교실에서는 창상치유에 매우 중요한 성장인자인 TGF- β , bFGF, VEGF 등의 분비능을 *in vitro*에서 섬유모세포와 골수기질세포를 대상으로 비교한 결과 세포외기질합성에 매우 중요한 역할을 하는 TGF- β 의 경우 섬유모세포군에서 오히려 증가했음을 보고한 바 있다. 따라서 우수한 세포외기질합성이나 성장인자 분비능 이외에 골수기질세포가 창상치유에 우수한 효과를 나타내는 더욱

자세한 기전이 앞으로 밝혀져야 할 것이며 창상에 이식한 골수기질세포의 형태나 기능변화, 분화 등에 대한 연구도 더 진행되어야 할 것이다.

V. 결 론

창상치유 촉진을 목적으로 인체의 골수기질세포와 섬유모세포를 흰쥐에 이종이식하여 창상치유의 가장 중요한 지표인 교원질합성을 비교한 결과 골수기질세포 이식군이 세포를 이식하지 않은 군이나 섬유모세포를 이식한 군에 비해 가장 우수한 결과를 보였다.

본 연구를 통해 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 환경에서도 교원질 합성에 있어서 섬유세포에 비해 골수기질세포가 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 세포들의 우수한 창상치유 유도 효과의 정확한 기전에 대하여는 명확히 밝혀진 바 없다. 세포치료제 개발이라는 목표를 위해서는 창상에서 세포의 분화와 역할 등에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. 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 Repair Regen* 8: 162, 2000
2. 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
3. Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK: Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 26: 1856, 2003
4. Kuroyanagi Y, Yamada N, Yamashita R, Uchinuma E: Tissue-engineered product: allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts. *Artif Organs* 25: 180, 2001
5. 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. *Dermatol Surg* 28: 1107, 2002
6. Pierce GF: Inflammation in nonhealing diabetic wounds; the space-time continuum does matter. *Am J Pathol* 159: 399, 2001
7. Conget PA, Minguell JJ: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67, 1999
8. Watanabe N, Woo SL, Papageorgiou C, Celechovsky C, Takai S: Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplan-

- tation. *Microsc Res Tech* 58: 39, 2002
9. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL: Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30: 783, 2002
 10. Han SK, Yoon TH, Lee DG, Lee MA, Kim WK: Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing *in vitro*. *Ann Plast Surg* 55: 414, 2005
 11. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442, 1987
 12. Mansbridge JN, Liu K, Pinney RE, Patch R, Ratcliffe A, Naughton GK: Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes Obes Metab* 1: 265, 1999
 13. Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner 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
 14. Simmons PJ, Torok-Storb B: CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78: 2848, 1991
 15. 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
 16. Conrad C, Huss R: Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 124: 201, 2005