

당뇨족 궤양의 치료를 위한 신선 섬유아세포 동종이식

심재선 · 한승규 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Fresh Fibroblast Allograft as a Treatment for Diabetic Foot Ulcers

Jae Sun Shim, M.D., Seung-Kyu Han, M.D.,
Woo Kyung Kim, M.D.

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

Purpose: In order to overcome the limitations of the conventional cryopreserved fibroblast or keratinocyte allograft method used in the treatment of diabetic foot ulcers, we reported a pilot study in 2004 demonstrating promising results of a fresh fibroblast allograft method in eight patients. However, the number of cases was insufficient for full evaluation and the follow-up duration was not long enough to determine the efficacy and safety of the method. This encouraged us to conduct this follow-up study to fully evaluate the use of noncryopreserved fresh human fibroblast allografts in treating diabetic foot ulcers.

Methods: Thirty-seven patients with diabetic foot ulcers were treated using fresh fibroblast allografts. Human dermal fibroblasts from healthy teenagers were cultured in DMEM/F-12 medium supplemented with 10% serum. The cultured cells were applied on the wounds immediately following debridement, with fibrin being used as a cell carrier. In eight weeks, percentages of complete healing, mean healing time, and patient satisfactions were assessed, with follow-up time ranging from 6 to 40 months.

Results: Our study showed that 83.8% of the treated patients were complete healed. The time required for complete healing was 30.9 ± 10.1 days. Patient satisfaction scores for the experimental treatment were higher than those for the conventional method (mean scores of

8.1 ± 1.1 and 4.8 ± 1.4 , respectively). No adverse events related to the study treatment occurred.

Conclusion: 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

I. 서 론

만성 창상 중 특히 당뇨족 궤양 치료시의 문제점은 치료자체의 어려움 외에 통상적인 접근법으로는 좋은 결과를 보이기 어렵다는 점에 있다. 정상적인 체내 조건에선 성장인자와 사이토카인이라는 매개체를 통해 순차적이고 효율적으로 창상치유과정이 진행된다. 그러나 당뇨족 궤양환자에서 추출한 섬유아세포는 매개체를 통한 세포간의 정보교환과 관련한 세포치유능력이 감소되어 있다. 만성창상에서는 이러한 섬유아세포의 기능이 감소되어 세포증식능력과 성장인자생산의 저하를 유발하게 되고, 금속단백질 분해효소(metalloproteinases)의 과형성과 이들의 억제제(inhibitor)인 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP-1, TIMP-2)이 감소된 소견을 보인다. 그 결과, 성장인자 및 fibronectin과 같은 세포외 기질이 감소하게 된다.¹⁻³

따라서 이들 세포의 기능을 활성화시키기 위해 냉동 보관 각질세포 및 섬유아세포로 구성된 동종 피부 대체 물질을 이용한 당뇨족 궤양환자의 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 비록 이론적으로 창상환경을 조절할 수 있고, 추가적인 성장인자를 분비하며, 기타 결핍된 세포외기질성분을 제공할 수 있음에도 불구하고 그 효과는 일반적으로 탁월하다고 평가 받지는 못한다. 만성창상환자의 치유를 향상시키기 위해서는 이식된 세포가 창상부위에 생존하여 집락을 형성해야 한다. 그러나 영양분이나 산소공급이 충분하지 못한 만성염증환부에서 이식된 냉동섬유아세포가 기능을 회복하여, 군락을 형성하고, 환부바닥에서 지속적으로 생존하는 것은 기대하기 힘들다. 게다가 일반적으로 냉동보관과정을 통해 세포 능력이 감소되어, 성장인자의 발현이나 혈관 신

Received April 10, 2008

Revised June 26, 2008

Accepted July 18, 2008

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) 2626-3333 / Fax: (02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 논문은 2007년 제63차 대한성형외과학회 학술대회에서 구 연 발표되었음.

생의 측면에서 낮은 회복률을 보이며,^{4,6} 냉동보관조직내의 세포는 50%정도에서 생존하고, 단백질 합성능력은 정상세포에 비해 70-98%정도 감소하게 된다.⁶

이러한 냉동보관된 세포의 동종이식술의 한계점을 극복하기 위해 저자들은 신선 섬유아세포의 동종이식을 8명의 환자군에서 투여하는 예비연구(pilot study)를 진행하여 그 결과를 보고한 바 있다.⁷ 그러나 환자군이 충분히 크지 않고, 추적관찰 기간이 길지 않아 신선 섬유아세포 동종이식술의 효과와 안전성을 평가함에 있어 제한이 있었다고 사료된다.

따라서 장기적이고 지속적인 추적관찰을 통해 당뇨병족 궤양환자의 치료에 있어서 신선 섬유아세포의 동종이식술의 효과와 안전성을 평가하고자 본 연구를 계획하였다. 예비연구 이후 37명의 새로운 환자에서의 신선 섬유아세포 동종이식술의 효과와 안정성을 분석하고 이전 연구와는 다른 몇 가지 개선점을 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 진피 섬유아세포 배양(Dermal fibroblast culture)

피부이식술을 받은 10대 연령 환자 5명의 잉여 피부 중 표피를 제거하고 2×1 mm의 크기로 박리하였다. 모든 공여자는 hepatitis, HIV, syphilis 등의 감염 질환에 대한 혈액검사를 시행하였다. 100-mm 조직배양 플레이트 위에 진피조직을 고르게 펼쳐놓고 50%의 자가 혈청이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12(DMEM/F-12; Gibco, Grand Island, NY) 3 mL를 도포하였다. 진피가 플레이트에 잘 부착되도록 37°C에서 4시간 동안 배양한 뒤, 10% 자가 혈청과 25 µg/mL gentamycin 항생제를 포함한 DMEM/F-12 12 mL를 추가하여 다시 배양하였다. 분리해 낸 세포들을 5% CO₂/95% air atmosphere에서 37°C에서 배양하였다. 배양된 섬유아세포는 트립신(trypsin)처리를 한 뒤 nylon mesh를 통해 걸러내었다. 분리한 세포는 Mg²⁺와 Ca²⁺이 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco, Grand Island, NY)으로 2.7배 희석하였다. 그 후 450 g으로 17분간 원심분리하여 세포를 분리하고 이를 DPBS 40 mL로 세척하였다. 세포의 밀도는 혈구계(hemocytometer)를 통해 계산하였고 trypan blue를 이용하여 세포의 생존정도(viability)를 판단하였다. 이러한 과정을 통해 2-3회 추가 계대배양을 한 세포를 이번 연구에 사용하였다.

나. 방법(Technique)

모든 환자를 대상으로 섬유아세포 동종이식을 이용

한 치료의 적합여부 검사(screening)를 치료 전에 시행하였다. 검사기간 동안 필요 시 변연절제술을 시행하였다.

변연절제술을 시행한 궤양의 크기는 Visitrak(Smith & Nephew)를 이용하여 측정하였다. 배양된 신선 섬유아세포를 50 mL 원심분리 튜브(centrifuge tube)에 넣고 0.3-0.7 mL의 fibrinogen(Baxter Healthcare Corp., Vienna, Austria)과 섞은 뒤 1 mL syringe에 옮겨 담은 다음 환부에 도포하였다. 그 위에 창상크기에 따라 0.2-1.0 mL의 thrombin(Baxter Healthcare Corp., Vienna, Austria)을 첨가하여 세포를 고정하였다(Fig. 1). 도포된 섬유아세포의 수는 2.2×10⁶에서 5.6×10⁶였다. 환부를 Tegaderm(3M, Minneapolis, MN)으로 덮어 드레싱한 뒤 치료 5일째에 교체하여 주었다. 이후 환자들은 3-7일마다 창상 부위를 확인하고 드레싱을 교체하였고 환부는 상처치유가 완료될 때까지 드레싱은 마르지 않도록 습윤한 상태로 유지하였다.

다. 환자군(Patients)

2003년 9월부터 12월까지 총 37명의 당뇨병족 궤양 환자(남자 20명, 여자 17명)를 대상으로 하였다. 환자의 평균 나이는 63.9±8.2세였고, 궤양의 크기는 2.0-7.2 cm²(평균 4.6±1.7 cm²)로서 추적관찰기간은 6-30주(평균 13.2±5.5주)였다. 20명의 환자에서 골노출을 확인할 수 있었고 18명의 환자에서 이전에 당뇨병족 궤양의 병력이 있었다.

Transcutaneous oxygen pressure(TcPO₂)가 30 mmHg 이하 혹은 Ankle brachial pressure index(ABI)가 0.5 이하인 궤양환자는 제외하였다. 연구 시작 전에 윤리 위원회(institution' review board)의 승인을 얻었다.

라. 평가(Evaluation)

일차효과의 기준은 8주 이내에 완전 치유된 환자의 비율로, 이차효과의 기준은 8주 이내에 완전치유까지 걸린 평균기간으로 정의하였다. 환부의 완전치유란 분비물(discharge)이 없이 상피화가 완전하게 이루어져서 환부를 물로 세척할 수 있는 상태로 정의하였다.

또한, 이전에 당뇨병족 궤양에 대한 고식적인 치료를 받았던 18명 환자를 대상으로 치료 만족도를 측정하였고 이 때 사용한 방법으로는 환자 스스로 점수화하도록 한 Visual Analogue Scale(VAS)로서 제일 만족스러운 치료 결과를 10점 만점으로 하였다. 모든 환자들은 최소 6개월에서 40개월까지 추적관찰(평균 16.3±7.9개월)을 하였고, 특히 27명의 환자에서는 12개월 이상의 추적관찰(12-24개월 16명, 24-40개월 11명)이 가능하였다.

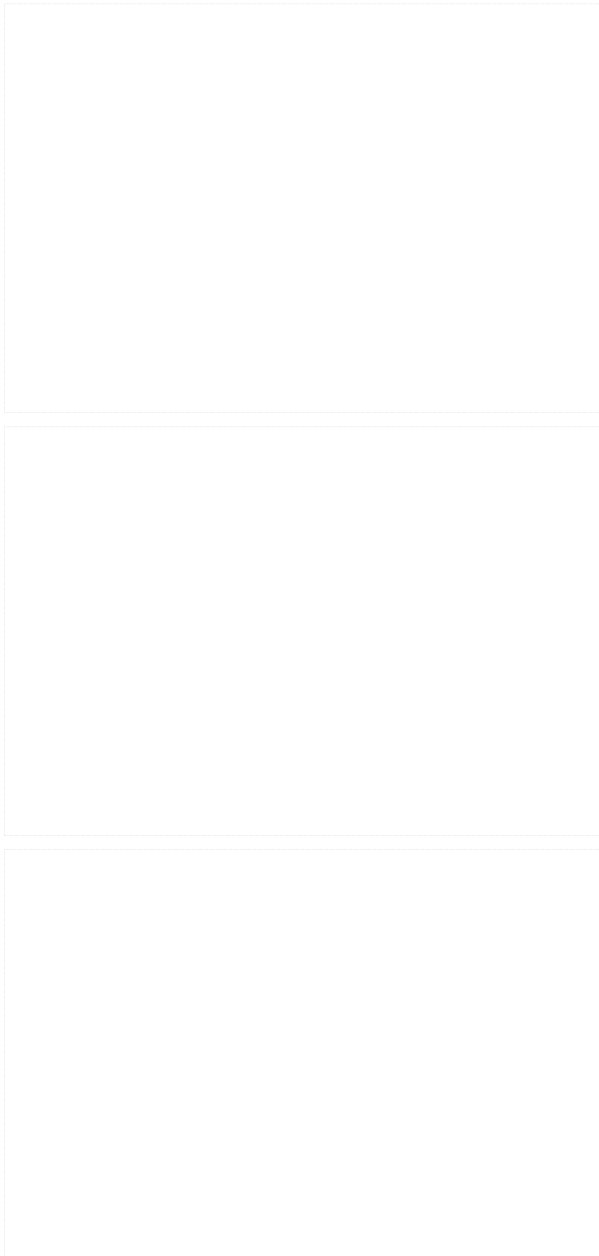


Fig. 1. (Above) Fibroblast-fibrinogen mixture was spread on a debrided wound using a plastic syringe. (Center) The fibroblast-fibrinogen mixture was then sealed using thrombin. (Below) Twenty-two days after treatment. Epithelialization was complete.

III. 결 과

섬유아세포 동종이식 치료결과 이식 후 8주 31명의 환자(83.8%)에서 완전치유가 이루어졌으며 그 기간은 이식 후 17일에서 56일로 평균 30.9 ± 10.1 일이었다.

환자들의 만족도는 매우 높아서, VAS를 측정한 18명

환자군에서 8.1 ± 1.1 점으로 기존의 고식적 치료의 4.8 ± 1.4 점에 비해 만족도가 높았다.

가장 흔한 합병증은 감염이었다. 창상치유과정 및 치유 후 관찰 기간 동안 임상적으로 의미 있는 감염이 각각 3례와 1례가 관찰되었다. 모든 감염은 외과적으로 변연절제술과 내과적으로 균배양검사결과에 따른 선택적 항생제 치료를 통해 성공적으로 치료되었다. 2명의 환자에서 반흔구축으로 인한 경미한 족지의 굴곡현상(toe deviation)이 관찰되었으나 임상적으로 수술이 필요한 경우는 없었다. 안전성과 치료 순응도는 만족스러웠으며, 이식편 거부반응과 같은 동종이식과 관련한 부작용은 없었다. 이식 후 혈청 및 생화학 검사, 소변검사 등의 모든 임상검사에서 특별한 변화는 보이지 않았으며 신체활력 징후 역시도 정상적이었다.

IV. 고 찰

당뇨환자의 경우 병리 생리학적으로 순환기적, 신경학적, 면역학적, 생화학적 복합적인 이상으로 인해 창상 부위의 치유가 지연된다.

또한, 창상치유와 관련된 주요 세포(key cells)가 심각하게 저하되어 있는 점이 당뇨병 족궤양 치료의 문제점으로서 지적된다. 배양된 섬유아세포 동종이식은 치료의 어려움이 있는 창상환경을 전체적으로 개선시켜주는 효과가 있다. 즉, 환부에 이식된 섬유아세포는 세포증식(cell proliferation)의 조절, 신생혈관 형성(angiogenesis) 유도, 염증단계(inflammatory process)조절 등의 작용을 하게 되는데, 이런 작용은 사이토카인(cytokines)이나 성장인자(growth factors)의 분비를 조절함으로써 이루어진다. 섬유아세포는 콜라겐(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycans), 그 외 단백질(protein)로 구성된 3차원적 입체구조의 세포외기질 형성을 만든다.

2004년 저자들은 8명의 당뇨병 족궤양환자를 대상으로 진피섬유아세포 동종이식을 통한 치료에 대한 예비연구(pilot study)를 보고 한 바 있다. 모든 환자에서 창상을 완전 치유되었고, 완전한 상피화까지의 기간은 11일에서 21일로 임상적 혹은 실험실검사 상 특이사항은 없었다. 치료결과에 대한 환자의 주관적인 만족도는 높았다.⁷ 그러나, 치유기간에 있어 본 연구와 차이를 보인 시술 후 8주의 완전 치유율은 83.8%이며 평가기간 내에 궤양의 완전 치유까지 걸린 시간은 시술 후 평균 30.9일이었다. 저자들은 기존의 연구와 본 연구와의 상처 치유과정의 상이함의 주원인을 특히 혈관상태에 따른 환자군의 차이라고 판단한다. 기존의 연구에서는 혈관조영술(angiogram)이나 도플러(Doppler)를 통해 하지로의 명

백한 혈류가 존재하는 경우만을 환자군으로 잡았다. 반면, 본 연구에서는 중한 혈관협착을 보여 도플러음(Doppler sound)이 들리지 않는 환자들 역시 TcPO₂가 30 mmHg 이상이고 ABI가 0.5 이상인 경우라면 환자군으로 포함시켰다. 따라서 기존의 예비연구에 비해 보다 혈관상태가 좋지 않은 환자들이 다수 포함되었다.

말초 혈류량의 저하는 당뇨병에서의 창상치유 지연의 주요한 원인이므로, 기존의 연구와 본 연구의 상이한 결과는 혈류량 측면에서의 환자선정기준의 차이점에 기인하는 것으로 생각된다. 또 다른 영향인자로는 궤양의 크기차이이다. 기존의 연구와 본 연구의 평균적인 궤양 크기는 각각 3.2 cm²와 4.6 cm²로서 본 연구의 궤양크기가 더 컸던 것이 치료 성공률 차이를 나타냈다고 사료된다. 그러나 양자에서 모두 치료에 대한 환자의 주관적 만족도는 높았고, 유의한 차이를 보이고 있지 않았다. 지난 연구에서는 환자군이 적고 추적관찰기간이 짧아서 본 연구에서는 이를 보완하는 데에 초점을 맞춰서 진행하였다. 또한 말초혈관질환의 경중이나 환부면적에 따라 완전치유기간 및 환자만족도를 각각의 변수로 설정하여 추적관찰기간을 늘려서 결과를 분석하였다면 추가

적인 결과를 도출할 수 있었다고 생각하지만 지난 연구에서는 Visitrak과 TcPO₂에 대한 자료가 없기 때문에 이를 직접 비교하는 것은 불가능하였다.

기존의 연구와 본 연구에서는 연구 진행상 몇 가지 차이점을 보인다. 첫째, 이번 연구에서는 배양된 신선 섬유아세포를 피브리노겐(fibrinogen)과 섞은 다음 이를 환부에 도포한 뒤 트롬빈(thrombin)으로 고정하였으나, 기존연구에서는 섬유아세포를 트롬빈과 섞은 다음 이를 환부에 도포한 뒤 피브리노겐으로 고정하였다.

기존연구에서 액체화된 트롬빈에 섬유아세포를 혼합한 것은 겔형태(gel-form)의 피브리노겐에 혼합하는 것보다 기술적으로 용이하다는 장점이 있었다. 그러나 초기환자 치료 경험상 섬유아세포-트롬빈혼합체를 환부에 도포할 경우 환부에 고정하는 과정이 힘들다는 문제점이 발견되었다. 본 연구와 같이 세포이식조건을 조정하여 보다 효과적으로 환부에 섬유아세포를 고정 및 유지할 수 있었다. 둘째, 본 연구에서는 Visitrak을 이용하여 궤양의 크기를 측정하였다. Visitrak을 이용하여 궤양의 크기를 측정할 경우 기존의 경우 환부의 폭과 길이를 단순히 곱하여 크기를 구하는 것보다 간결하면서도 정확

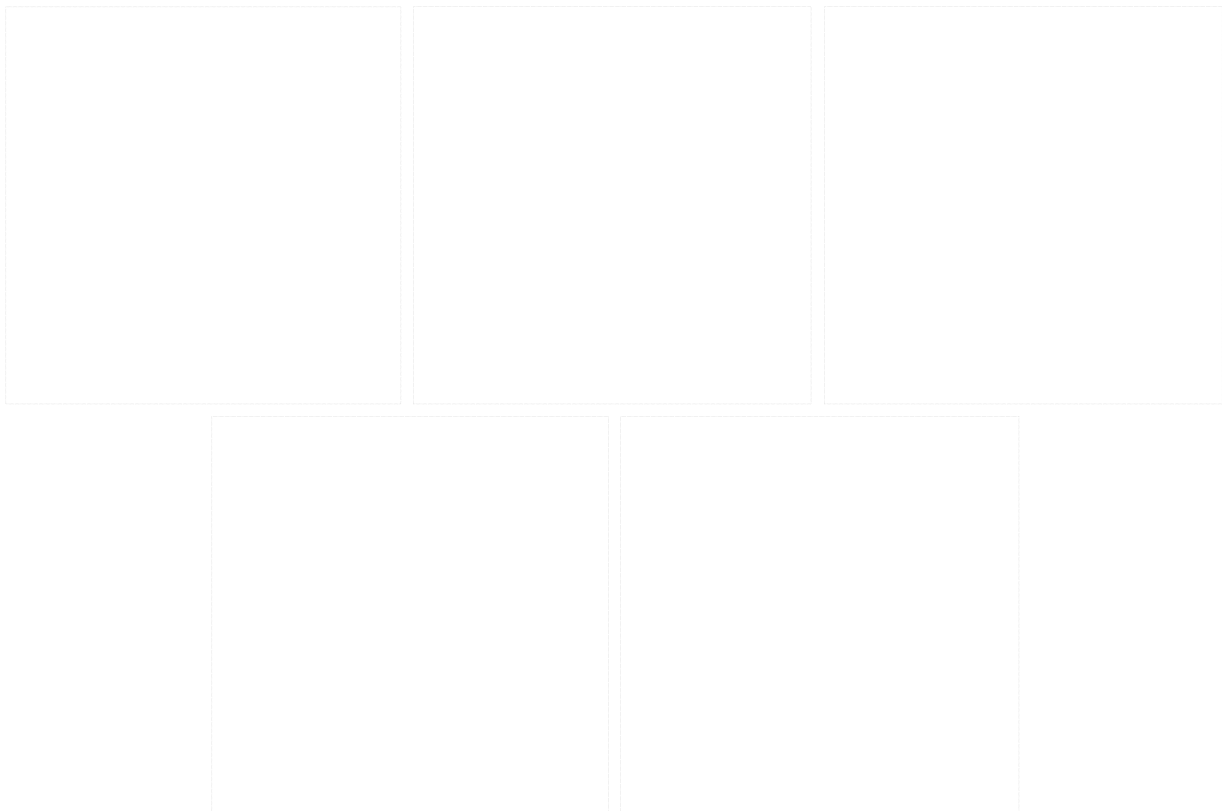


Fig. 2. (Above, left) Preoperative view. (Above, center) Immediately after debridement. (Above, right) Immediately after application of the fresh fibroblast allograft. (Below, left) Thirty days after the treatment, complete wound closure was achieved. (Below, right) In 40 months follow-up, the affected site had a healthy texture.

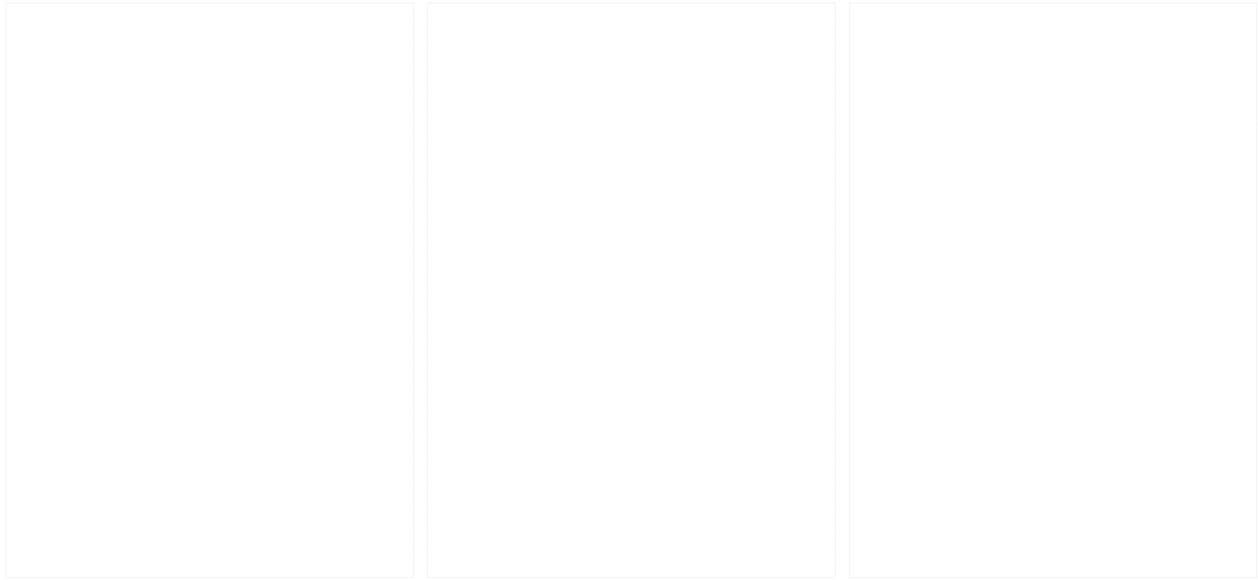


Fig. 3. (Left) Preoperative view. (Center) Thirty-six days after the fresh fibroblast allograft, the wound was completely closed. (Right) Thirty-six months after the treatment.

하게 환부의 크기를 측정할 수 있다. 마지막으로 환자군 선택에 있어서 TcPO₂와 ABI를 측정하여 객관적인 기준을 설정할 수 있었다는 차이가 있다. 저자들은 이 같은 연구 방법의 개선으로 본 연구에서는 시술시의 효율성과 실험결과에 대한 신뢰성을 높일 수 있게 되었다.

당뇨족 궤양환자에서 신선 섬유아세포의 동종이식을 이용한 치료의 효율성을 명확하게 증명하기 위해서는 면밀하게 고안된 대조군이 필요하나, 본 연구에서는 대조군이 없다는 제한점이 있다. 그러나 다른 저자들의 연구결과와 비교하여 이러한 제한점을 보완할 수 있으리라 생각한다. 성장인자 혹은 배양 후 냉동보관한 섬유아세포를 사용한 많은 연구를 고찰하여 보면 본 연구와 유사하게 창상크기와 결과기준을 설정한 문헌을 확인할 수 있다. Veves 등⁸에 따르면 평균 2.97 cm² 크기의 환부에서 섬유아세포와 각질 세포 등의 생체 피부 대용물질(living skin equivalent)을 사용하여 실험한 결과 12주 이내에 56%의 창상치유를 보였다. Marston 등⁹에 따르면 배양된 섬유아세포를 평균 2.31 cm² 크기의 환부에 도포하여 12주 이내에 30%의 창상치유 결과를 보였다. 그 외에 세포치료나 성장인자 치료를 통해 12주 이내에 27-75%의 창상치유를 보인 사례가 많은 연구에서 있었다.¹⁰⁻¹² 본 저자들의 연구결과 8주 이내에 83.8%의 치유율을 보인점은 이와 비교하여 매우 우수하다고 볼 수 있다. 또한, 섬유아세포 동종이식술은 안전성과 순응도 측면에서도 만족스러운 결과를 얻었는데 6-40개월간(평균 16.3±7.9개월) 추적관찰한 결과

세포치료와 관련한 특별한 부작용은 발견되지 않았다 (Fig. 2, 3).

그러나 신선 섬유아세포 동종이식술이 하나의 표준화된 치료법으로서 인정받기 위해서는 다음과 같은 사항에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 첫째, 치료효과를 보이는 이식된 섬유아세포의 수를 결정하는 것이다. 둘째, 이식된 신선 섬유아세포의 수명을 예측할 수 있어야 한다. 냉동된 섬유아세포가 이식 후 6개월까지는 환부에서 발견된다는 보고도 있지만,¹³ 이에 대한 정확한 정보를 위한 추가 연구가 없는 실정이다. 셋째, 동종이식술의 시술빈도에 대한 연구가 필요하다. 현재는 단일투여만을 사용하고 있으나, 주기적인 반복 시술이 더 좋은 결과를 보일 수 있을지 미지수이다. 아직까지 창상치유를 위해 어떤 것이 우수한 치료법인지 일반적으로 정립된 것은 없다. 예를 들어 자주 적은 수의 세포를 자주 투여하는 것과 단일 투여로 많은 수의 세포를 투여하는 것 중 어느 쪽이 나은 방법인지 아직 알려진 바가 없다. 마지막으로 새로운 세포치료법은 식품의약품안전청(FDA)의 승인을 받아야 하므로, 임상 의사들이 연구목적으로 실험실에서 배양한 세포를 치료목적으로 임상 시술하는 데에는 어려움이 있다.

비록 섬유아세포의 동종이식술이 하나의 표준화된 치료법으로서 정립되려면 추가적인 연구가 필요하겠지만, 이와 같은 방법이 당뇨병 족 궤양환자의 창상치유에 있어서 우수한 여건을 제공하리라고 생각한다.

V. 결 론

신선 섬유아세포의 동종이식술은 당뇨족 궤양의 창상 치유를 촉진시키며 안전성과 치료 순응도 측면에서도 우수하다.

REFERENCES

- 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
- 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
- Hehenberger K, Heilborn JD, Brismar K, Hansson A: Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of l-lactate. *Wound Repair Regen* 6: 135, 1998
- De Loecker W, Koptelov VA, Grischenko VI, De Loecker P: Effects of cell concentration on viability and metabolic activity during cryopreservation. *Cryobiology* 37: 103, 1998
- 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
- Liu K, Yang Y, Mansbridge J: Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression. *Tissue Eng* 6: 539, 2000
- Han SK, Choi KJ, Kim WK: Clinical application of fresh fibroblast allografts for the treatment of diabetic foot ulcers: a pilot study. *Plast Reconstr Surg* 114: 1783, 2004
- Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML: Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 290, 2001
- Marston WA, Hanft J, Norwood P, Pollak R: The efficacy and safety of dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 26: 1701, 2003
- Smiell JM, Wieman TJ, Steed DL, Perry BH, Sampson AR, Schwab BH: Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen* 7: 335, 1999.
- Sams HH, Chen J, King LE: Graftskin treatment of difficult to heal diabetic foot ulcers: one center's experience. *Dermatol Surg* 28: 698, 2002
- Pham HT, Rosenblum BL, Lyons TE, Giurini JM, Chrzan JS, Habershaw GM, Veves A: Evaluation of a human skin equivalent for the treatment of diabetic foot ulcers in a prospective, randomized, clinical trial. *Wounds* 11: 79, 1999
- 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