

창상치유목적의 골수기질세포 동종이식을 위한 고분자막의 조건

이은상 · 김명주 · 한승규 · 홍성택 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Optimal Condition of Microporous Membrane for Bone Marrow Stromal Cell Allograft Transplantation to Stimulate Wound Healing *in Vitro*

Eun Sang Lee, M.D., Myeong Joo Kim, M.D.,
Seung-Kyu Han, M.D., Sung Taek Hong, M.D.,
Woo Kyung Kim, M.D.

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

Purpose: Major drawbacks of conventional bone marrow stromal cells (BSCs) transplantation method are mainly caused by direct transplanted cell to host cell interactions. We hypothesized that separation of the transplanted cells by a microporous membrane might inhibit most of the potential adverse effects and induce superior effect. The purpose of the study is to determine the optimal condition of the microporous membrane.

Methods: First, BSCs were placed in polyethylene terephthalate (PET) transwell inserts with 3, 8, or 12 μm pore size, and cultured in 24 well culture plates. After 5 days, bottoms of the plates were observed for presence of attached BSCs in monolayer and cell numbers were evaluated. Second, BSCs were placed PET, polycarbonate (PCT), and mixed cellulose esters (MCE) transwell inserts with 3 and 8 μm pore size, and cultured in 24 well culture plates. After 3 days, the supernatants of the media left in culture plate were analyzed for collagen, vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor BB (PDGF-BB), and basic fibroblast growth factor (bFGF). Third, BSCs were placed in 15% and 70% of the PET membrane with 3 μm pore size. All the experimental conditions and methods were same as the second study.

Results: The optimal pore sizes to prevent BSC leakage were 3 μm and 8 μm . The amounts of type I collagen and three growth factors tested did not show significant differences among PET, PCT, and MCE groups.

However, the collagen, VEGF, and bFGF levels were much higher in the high (70%) density group than in the low (15%) density group.

Conclusion: This study revealed that the optimal pore size of membrane to prevent direct BSC to recipient cell contact is in between 3 μm and 8 μm . Membrane materials and pore sizes do not influence the collagen and growth factor passage through the membrane. The most striking factor for collagen and growth factor transport is pore density of the membrane.

Key Words: Wound healing, Bone marrow stromal cell, Microporous membrane

I. 서론

최근에는 창상치유분야에서도 세포치료법이 도입되어 실제 환자에게도 적용되고 있으며 특히 당뇨족 등 만성창상을 가진 환자의 궤양 부위에 창상치유능이 뛰어난 소아나 젊은 사람의 섬유아세포를 직접 이식함으로써 창상치유속도를 증가시키거나 자연치유가 불가능했던 창상을 치유시키는 목적으로 사용되고 있다.^{1,3} 세포이식 방법은 이식된 세포가 생존하는 동안에는 계속적으로 여러 필요한 성장인자들을 생물학적으로 최적의 상태로 분비 조절하고 환자 자신의 세포의 이동이나 분열에 적합하도록 세포외기질을 합성함으로써 종합적으로 창상환경을 개선해 줄 수 있는 방법이라 할 수 있으며 특히 만성창상치유에 있어 가장 중요한 성장인자로 알려져 있는 혈관내피성장인자 (VEGF)도 공급해 줄 수 있다는 것도 큰 장점이라 하겠다.^{1,3}

본 교실에서는 골수기질세포를 이용한 동종배양세포치료제 개발을 최종목표로 하여 연구를 진행해오고 있으며 지난 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통하여 창상치유에 있어 섬유아세포에 비하여 골수기질세포의 우수성을 규명한 바 있다.^{4,5}

그러나 골수기질세포를 이용한 동종세포이식 치료법이 안전하고 경제적이며 효과적인 방법으로서 임상적으로 상용화되기 위해서는 해결 되어야 할 과제들이 적지 않다. 이식된 세포의 추적이 불가능하며 이식 후 창상 부위의 만족스럽지 못한 환경에서 세포의 성장인자나 세포외기질의 분비 기능이 어느 정도 유지되는지 알 수 없다. 또한 이식 받은

Received May 17, 2010

Revised June 21, 2010

Accepted June 22, 2010

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

환자의 면역세포에 의해 결국은 이식된 세포가 파괴될 것이므로 지속적인 세포이식의 효과를 기대하기는 어렵다. 기존의 세포이식 치료 시 통상적으로 1주 내외의 간격으로 새로운 세포를 이식하게 되므로 전체적인 치료비용도 고식적인 방법에 비해 훨씬 높으며 이식된 동종세포의 생착도 완전히 배제할 수 없다. 특히 골수기질세포에 다량 포함되어 있는 간엽줄기세포의 경우는 수혜환자에게 생착될 경우 세포의 분화나 종양형성 등을 일으킬 가능성이 있으므로 이를 예방하는 것이 중요하다. 이식된 동종세포와 수혜환자의 세포나 세포외기질과의 접촉에 의한 상호신호전달, 이로 인한 이식세포의 이동 등 창상치유 촉진이라는 원래의 목적 이외에 원하지 않는 방향의 부작용이 발생할 수 있다.

따라서 저자들은 창상치료 시 이러한 골수기질세포를 이용한 동종세포이식 방법의 문제점을 최소화하고자 세포치료 시 이식되는 세포들이 수혜부의 세포들과 직접적으로 접촉하지 못하도록 이식되는 세포들을 일정한 세공이 있는 고분자막으로 포장하는 방법을 고안 하고자 하였다.

본 연구의 목적은 이러한 고분자막 포장의 장점을 최대한 살릴 수 있는 고분자막의 조건을 찾는 것이다. 고분자막의 세공크기, 재질, 그리고 세공의 밀도에 따른 세포외기질과 성장인자의 투과정도를 비교하여 가장 적절한 고분자막의 종류를 정하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 골수기질세포의 분리 및 배양

수부외상으로 인하여 부분적인 결손을 동반한 수지골 골절이 발생하여 골수기질세포 이식을 이용한 수지골 재건을 시행한 6명의 남자 환자에서 잉여 골수기질세포를 이용하여 성체 골수기질세포를 추출하였다. 환자들의 나이는 20세에서 47세 사이였으며 외상 이외에는 건강한 상태였다. 본 연구는 기관윤리위원회 (Institutional Review Board)의 심사를 통과하였으며 연구에 잉여조직을 기증한 환자들 모두 충분한 설명을 듣고 기꺼이 연구참여에 동의하였다.

환자의 후장골 부위에서 골수를 채취하였다. 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 줄기세포가 포함된 층인 단핵구층을 취하여 50 µg/mL gentamycin과 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand island, NY, USA)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; GIBCO, Grand island, NY, USA) 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, USA)로 2.7배 희석한 후 17분 동안 450 × g의 속도로 원심침전법을 시행하여 모집한 후 이를 다시 DPBS로 두 번 세척하고 재부유시킨 후 추출하였다. 이렇게 추출된 세포는 3~4회 계대배양하여 본 실험에 사용하였다.

골수기질세포의 순도는 flow cytometer (Coulter EPICS XL, Beckman Coulter, CA, USA)로 확인하였다.

나. 고분자막내 세포의 유출예방을 위한 세공크기 연구

먼저 고분자막내의 세포들이 바깥으로 유출되지 않는 고분자막 세공의 적절한 크기를 결정하기 위한 실험을 시행하였다. 실험에 사용한 고분자막은 세포 공동배양을 위한 insert로써 상품화되어 널리 사용되는 polycarbonate insert (PCT; Millipore, Billerica, MA, USA)였으며 실험한 세공크기는 3 µm, 8 µm, 12 µm였다. 24 well 배양용기에 각각의 세공크기를 가진 PCT insert를 삽입하고 그 안에 각 PCT당 1 × 10⁴개의 골수기질세포와 5% FBS가 포함된 1 mL의 DMEM/F-12를 넣었다. 대조군으로서는 insert를 사용하지 않고 골수기질세포를 배양하였다.

24 well 배양용기를 세포배양기에 넣고 5일간 배양하였는데 모든 배양과정에서 gentamycin 50 µg/mL, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되도록 하였다. 배양 5일 후 PCT insert 및 그 내용물을 24 well로부터 제거하고 100배 역광현미경 하에서 24 well 배양용기의 바닥에 부착하여 자라고 있는 세포들이 있는지를 관찰하였다. 또한 각 군의 실제 세포수를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, USA) 방법을 이용하여 spectrophotometer로 측정하였다. 간단히 설명하면 살아있는 세포 내의 mitochondrial dehydrogenase 효소가 노랑색의 수용성인 MTT기질을 균청색의 비수용성인 formazan crystal로 변화시키는 정도를 측정하는 것이다. 방법은 PH 7.5의 조건하에서 DPBS와 혼합하여 5 mg/mL의 농도로 MTT용액을 만든 후 이를 0.2 µL의 filter로 소독하고 100 µL 세포배양액당 10 µL의 양으로 96 well 세포배양액에 첨가하고 3시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 0.04 M HCl in propan-2-ol 용액 100 µL를 첨가하고 shaker에서 5분간 흔들어 준 후 ELISA reader로 570 nm에서의 흡광도를 판독하였다. Standard curve를 제작한 후 실제 세포수를 환산하였다.

다. 고분자막의 재질과 세공크기에 따른 교원질과 성장인자 통과정도 비교

고분자막의 재질에 따라 막내의 세포들이 생산한 교원질과 성장인자들이 고분자막을 통과하여 막외로 분비되는 양에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 재질비교실험을 하였다. 실험에 사용된 재질은 세포 공동배양 시 insert로써 널리 사용되는 PCT, mixed cellulose esters (MCE; Millipore, Ballerica, MA, USA), polyethylene terephthalate (PET; BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)였다. 세공크기에 따른 차이는 각 재질당 고분자막 내 세포의 유출예방을 위한 세공크기연구('나'번 연구)의 결과를 바탕으로 3 μm 와 8 μm 를 가진 고분자막으로 실험하였다. 모든 재질의 세공밀도는 15%를 사용하였다.

24 well 배양용기에 앞서 언급한 바와 같이 다양한 재질 및 세공크기를 가진 insert를 넣고 그 안에 각 고분자막 당 1×10^4 개의 골수기질세포가 포함된 1 mL의 DMEM/F-12를 넣었다. 3일간 배양한 후 각 고분자막과 그 안의 세포를 포함한 내용물을 well에서 제거한 후 바닥에 부착되어있는 세포들이 있는지 관찰하고 well내 배지를 수거하여 배지내로 분비된 교원질과 만성창상에서 가장 결핍이 큰 성장인자로 알려져 있는 vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, basic fibroblast growth factor (bFGF)의 양을 측정 비교하였다.

1) 교원질 양의 측정

교원질의 양을 측정하기 위해 Metra collagen type I carboxy-terminal propeptide (CICP; Quidel, CA, USA) kit를 이용하여 면역분석 (immunoassay)하였다. 간단하게 정리하면 100 μL 의 희석된 상층액 (supernatants)을 항 CICP 항체가 처리된 well에 첨가한 후, 20°C에서 2시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후 100 μL 의 rabbit anti-CICP 항체혈청을 50분 간 첨가한 후 100 μL 의 goat antirabbit alkaline phosphatase 결합물을 50분 간 처리하였다. 제 1형 교원질 양을 파장 405 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

2) 성장인자 양의 측정

VEGF, PDGF-BB, bFGF의 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 방법을 이용하였다. 제조사의 설명서에 따라 검체 및 기준표본을 일정하게 희석하여 각각의 희석액을 첨가한 뒤 각각의 포획항체 (capturing antibody)가 입혀진 각각의 well에서 실온정지하였다. 세척 후 각각의 탐색항체결합물질 (detection antibody-conjugate)를 첨가하여 다시 세척하기 전에 실온에서 배양하였다. 배양 후 기질용액 (substrate solution)을 첨가하면 색을 발하게 되는데, 여기에 고

정액을 넣은 후 일정과장에서 ELISA reader 기기를 이용해 색의 강도를 측정하였다.

라. 고분자막 세공밀도에 따른 교원질과 성장인자 통과 비교

세공의 밀도에 따른 차이의 비교실험은 '다'번 연구의 결과를 바탕으로 3 μm 세공크기를 가진 PET insert를 사용하였는데 15%와 70%의 세공밀도를 대상으로 하였다. '다'번 연구와 같은 실험방법으로 재질과 세공크기가 같은 경우라도 세공의 밀도에 따라 교원질과 성장인자들이 고분자막 통과 양에 차이가 있는지 비교하였다.

마. 통계처리

각 조건의 고분자막의 측정치는 한 환자 세포당 3회씩 실험하여 평균치를 그 환자 세포의 측정치로 사용했으며, 6명 환자 측정치의 평균값을 구하여 그 조건의 측정치로 사용하였다. 평균값에 대한 통계처리는 3 종류의 재질비교실험에서는 nonparametric K-independent sample test인 Kruskal-Wallis test를 사용하였고, 2종류의 세공크기실험에서는 nonparametric two-independent sample test인 Mann-Whitney U-test 방법을 이용하였으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 분석하였다.

III. 결 과

가. 골수기질세포의 분리 및 배양

분리된 골수기질세포는 기술된 배양조건하에서 어려움 없이 단층배양 되었으며 2회 계대배양 후 통상적인 인체 진피의 섬유아세포보다 크기가 크고 다각형모양을 보였다 (Fig. 1). 본 연구에서 사용된 배양된 골수기질세포는 조혈계 세포의 항원항체 반응인 CD45 (Immunotech, Marseille, France), CD34 (Becton Dickinson Bioscience, CA, USA), CD14 (Immunotech, Marseille, France)에 음성을 나타냈다.

나. 고분자막내 세포의 유출예방을 위한 세공크기 연구

배양 5일 후 고분자막과 그 내용물의 제거 후 배양용기의 바닥을 현미경으로 관찰해 본 바 3 μm 와 8 μm 의 세공크기를 가졌던 군에서는 바닥에 부착된 세포를 전혀 관찰할 수 없었으며 cell debris만이 보였는데 8 μm 군에서 debris가 더 많이 관찰되었다. 12 μm 군에서는 많은 부착 세포가 관찰되었으며 대조군에서는 부착세포가 바닥을 모두 메우고 있을 정도로 세포증식이 왕성했다 (Fig. 2).

MIT를 이용한 실제 세포수는 3 μm 와 8 μm 군에서는 배양용기 바닥에 부착된 세포가 측정되지 않았고, 12 μm 군에서는 $4.2 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$ 개가 측정되었다. 대조군의 경우는

$3.7 \times 10^4 \pm 3.7 \times 10^3$ 개가 측정되었다.

다. 고분자막의 재질과 세공크기에 따른 교원질과 성장인자 통과정도 비교

3 μm 와 8 μm 의 세공크기를 가진 PCT, MCE, PET 세균

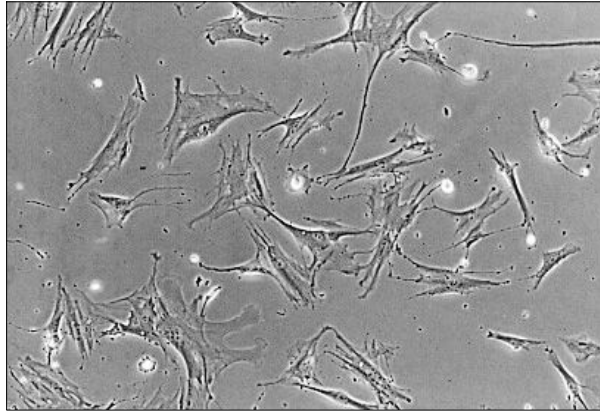


Fig. 1. A light micrograph ($\times 100$) of cultured BSCs.

고분자막에서는 모두 배양용기 바닥에 부착된 세포가 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

1) 교원질 양의 측정

고분자막의 재질과 세공크기에 따른 교원질 양의 통계학적 차이는 전혀 보이지 않았다.

3 μm 세공크기를 가진 PCT, MCE, PET 등 세균 고분자막군의 교원질 양 평균은 각각 156 ± 9 , 152 ± 19 , 159 ± 17 ng/mL였으며 ($p=0.61$), 8 μm 세공크기군의 평균은 각각 155 ± 7 , 151 ± 25 , 156 ± 16 ng/mL였다 ($p=0.86$) (Table I, Fig. 4).

3종류 고분자막 각각의 군에서 3 μm 세공크기군과 8 μm 세공크기군 사이의 통계적 유의성도 없었다.

2) 성장인자 양의 측정

고분자막의 재질에 따른 성장인자들의 양에서도 통계학적 차이는 발견할 수 없었다. 3 μm 세공크기를 가진 PCT, MCE, PET 등 세균 고분자막군의 VEGF 양의 평균은 각각 137 ± 16 , 134 ± 28 , 131 ± 14 pg/mL였으며 ($p=0.80$), 8 μm 세공크기를 가진 세균 고분자막군의 평균은 각각 140 ± 19 ,

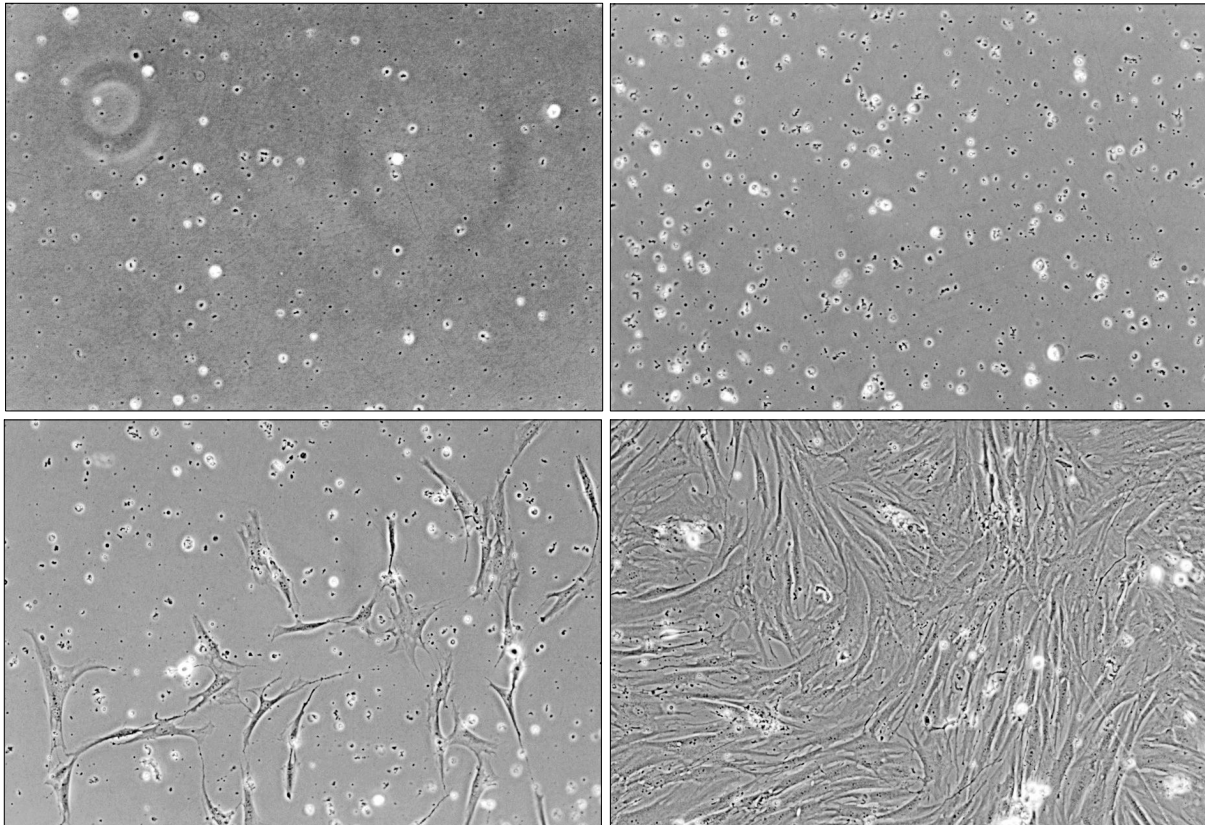


Fig. 2. After BSCs incubation for 5 days, the microporous PCT membrane inserts were taken out from the culture wells. Photographs demonstrate the bottoms of culture wells after removing the inserts. (Above, left) After removing the 3 μm pore size insert. (Above, right) 8 μm pore size. (Below, left) 12 μm pore size. (Below, right) BSC culture without an insert (Original magnification: $\times 100$).

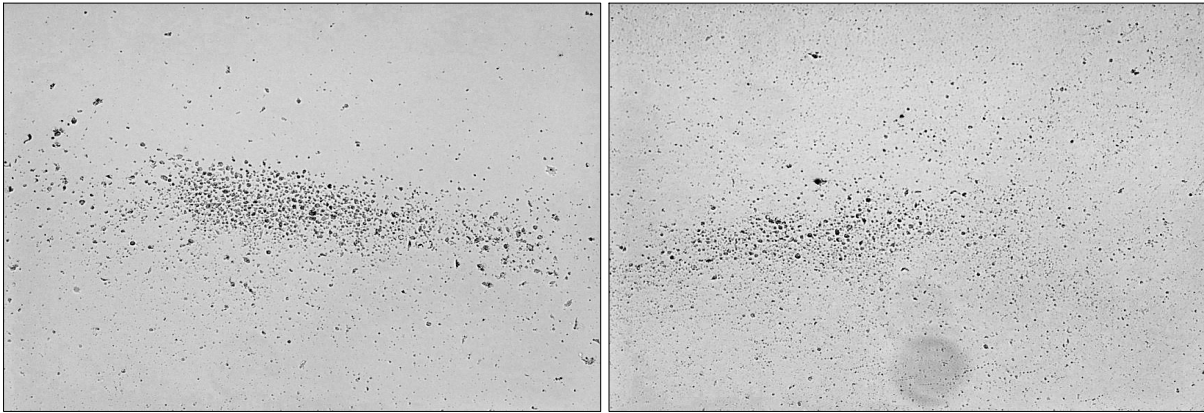


Fig. 3. (Left) Bottoms of the 8 μm pore size MCE inserts culture plates. (Right) Bottoms of the 8 μm pore size PET inserts culture plates.

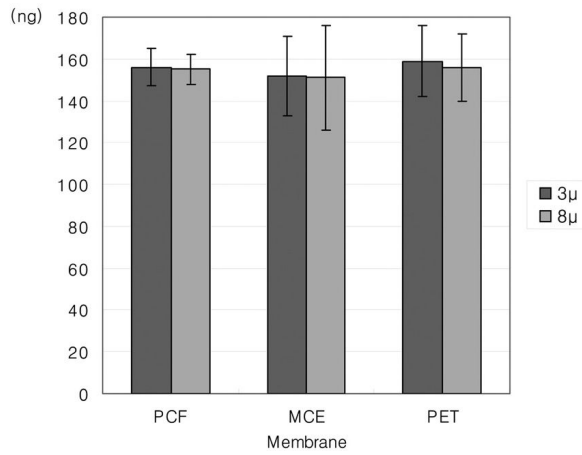


Fig. 4. Amount of collagen in the media.

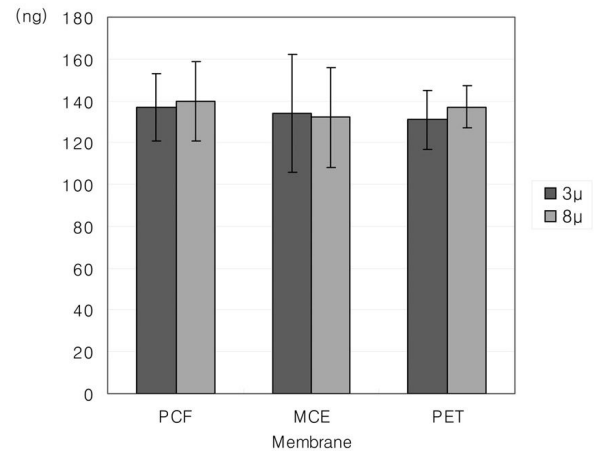


Fig. 5. Amount of VEGF in the media.

132 ± 24, 137 ± 10 pg/mL였다 ($p=0.89$).

3 μm 세공크기를 가진 PCT, MCE, PET 등 세균고분자막 균의 PDGF-BB 양의 평균은 각각 3.8 ± 1.3, 3.8 ± 1.4, 4.1 ± 1.8 pg/mL였으며 ($p=0.99$), 8 μm 세공크기를 가진 세균 고분자막 균의 평균은 각각 3.9 ± 1.2, 4.1 ± 1.4, 4.0 ± 1.3 pg/mL였다 ($p=0.95$).

3 μm 세공크기를 가진 PCT, MCE, PET 등 세균고분자막 균의 bFGF 양의 평균은 각각 6.3 ± 1.0, 6.6 ± 0.8, 6.2 ± 0.7 pg/mL였고 ($p=0.46$), 8 μm 세공크기를 가진 세균 고분자막 균의 평균은 각각 6.5 ± 1.0, 6.5 ± 1.2, 6.7 ± 1.1 pg/mL였다 ($p=0.91$).

3종류 고분자막 각각의 균에서 3 μm 세공크기균과 8 μm 세공크기균 사이에서도 통계적 유의성은 관찰되지 않았다 (Table I, Fig. 5~7).

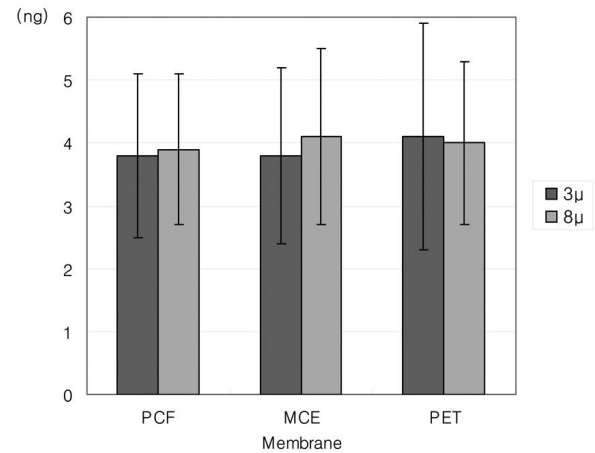


Fig. 6. Amount of PDGF-BB in the media.

Table I. Amount of Collagen and Growth Factors According to Material and Pore Size of Membrane

		Collagen	VEGF	PDGF - BB	bFGF
PCT	3 μ	151	134	2.6	5.6
		163	124	4.6	6.9
		167	153	5.5	7.7
		145	124	3.4	4.9
		163	160	4.5	6.9
		148	125	2.2	5.9
	Mean \pm SD	156 \pm 9	137 \pm 16	3.8 \pm 1.3	6.3 \pm 1.0
	8 μ	155	121	4.5	6.9
		162	127	3.7	7.2
		148	147	4.9	6.0
		149	127	2.2	5.5
		165	170	5.2	7.9
		150	150	2.7	5.3
	Mean \pm SD	155 \pm 7	140 \pm 19	3.9 \pm 1.2	6.5 \pm 1.0
MCE	3 μ	125	129	2.0	6.1
		178	169	3.5	7.5
		136	106	2.4	5.9
		155	120	4.5	6.0
		165	169	5.5	7.7
		150	110	4.7	6.3
	Mean \pm SD	152 \pm 19	134 \pm 28	3.8 \pm 1.4	6.6 \pm 0.8
	8 μ	178	166	4.3	7.7
		122	107	2.1	5.0
		159	129	5.5	6.7
		118	104	2.7	6.2
		172	150	4.9	7.9
		156	133	4.9	5.4
	Mean \pm SD	151 \pm 25	132 \pm 24	4.1 \pm 1.4	6.5 \pm 1.2
PET	3 μ	179	132	6.1	7.4
		167	123	6.1	6.7
		136	109	2.0	5.6
		167	142	4.4	6.0
		165	149	3.7	5.7
		140	133	2.1	5.7
	Mean \pm SD	159 \pm 17	131 \pm 14	4.1 \pm 1.8	6.2 \pm 0.7
	8 μ	135	125	2.7	5.8
		137	138	2.9	5.3
		172	138	6.2	7.9
		159	127	4.3	6.8
		165	149	4.0	7.9
		165	145	3.7	6.5
	Mean \pm SD	156 \pm 16	137 \pm 10	4.0 \pm 1.3	6.7 \pm 1.1

Table II. Amount of Collagen and Growth Factors According Pore Density of PET Membrane

	Collagen	VEGF	PDGF-BB	bFGF
3μ LOW	169	141	5.8	6.9
	166	137	6.1	6.7
	140	111	2.3	6.0
	174	140	4.7	5.7
	177	150	3.3	6.0
	143	136	2.5	5.8
Mean ± SD	162 ± 16	136 ± 13	4.1 ± 1.7	6.2 ± 0.5
3μ HIGH	189	169	6.9	6.8
	204	188	7.4	8.0
	197	195	3.0	7.2
	211	195	4.7	6.8
	175	161	2.4	7.0
	202	189	5.1	7.3
Mean ± SD	196 ± 13	183 ± 14	4.9 ± 2.0	7.2 ± 0.4

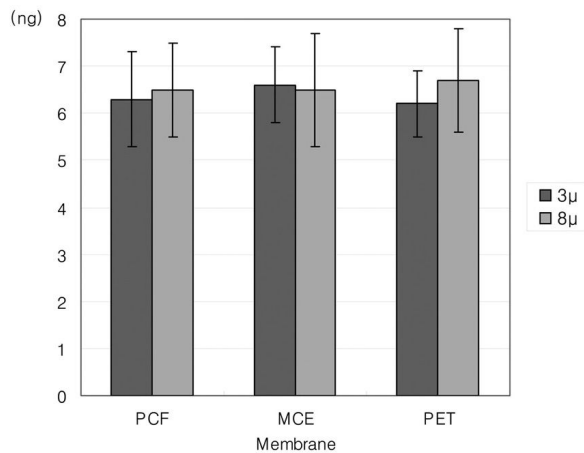


Fig. 7. Amount of bFGF in the media.

라. 고분자막 세공밀도에 따른 교원질과 성장인자 통과 비교

저밀도의 3 μm 세공크기를 가진 PET 고분자막군의 교원질과 VEGF, PDGF-BB, bFGF의 평균은 각각 162 ± 16 ng/mL과 136 ± 13, 4.1 ± 1.7, 6.2 ± 0.5 pg/mL였으며 고밀도군의 평균은 각각 196 ± 13 ng/mL와 183 ± 14, 4.9 ± 2.0, 7.2 ± 0.4 pg/mL였다. 교원질, VEGF, bFGF의 양에 있어서는 상당히 유의한 통계학적 차이가 있었으며 (각각의 $p=0.01, 0.00, 0.01$), PDGF-BB의 양에 있어서는 통계적 유의성은 없었다 ($p=0.47$, Table II, Fig. 8~11).

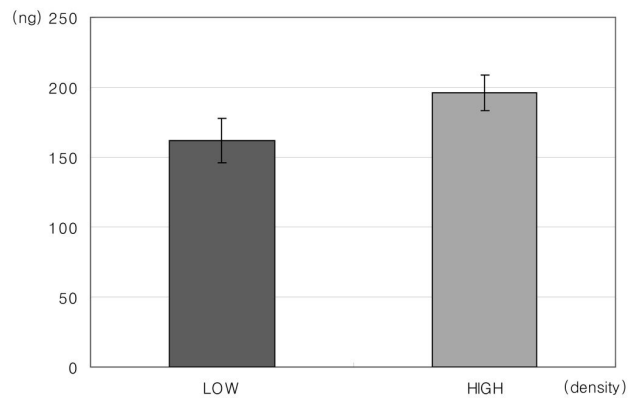


Fig. 8. Amount of collagen in 3 μm pore PET group samples.

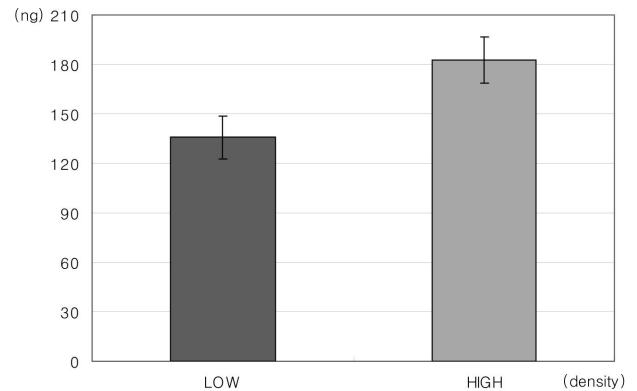


Fig. 9. Amount of VEGF in 3 μm pore PET group samples.

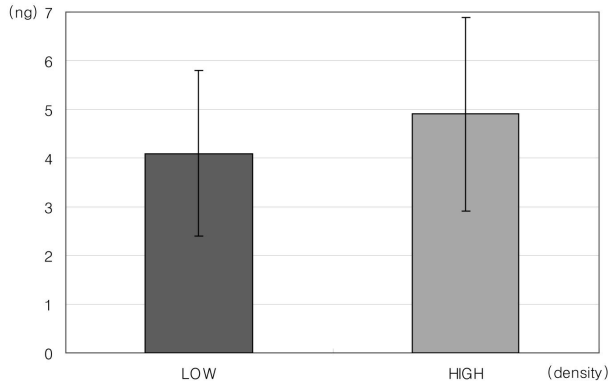


Fig. 10. Amount of PDGF-BB in 3 μm pore PET group samples.

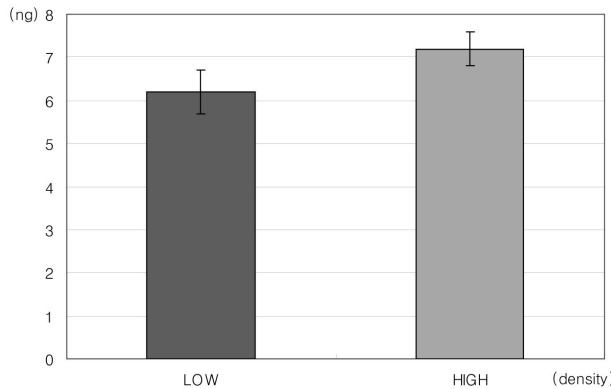


Fig. 11. Amount of bFGF in 3 μm pore PET group samples.

IV. 고 찰

표피성장인자 (EGF)나 혈소판성장인자 (PDGF) 등 세포 분열, 이동 및 세포외기질합성 등을 증가시키는 세포신호전달물질들이 만성창상치유를 위해 오래전부터 상품화되어 국내에서도 사용되고 있으며 표피성장인자의 경우는 국산화도 이루어졌다. 그러나 창상치유란 많은 신호전달물질들이 서로 유기적 연관성을 유지하면서 분비의 조절이 이루어져야 한다는 점에서 볼 때 한 가지 성장인자만을 투여하는 것은 그 효과에 한계가 있다. 또한 성장인자들을 상품화 및 보관하기 위한 과정들과 *delivery vehicle*과의 혼합 등으로 인해 성장인자들의 안정성유지도 미지수이다.^{6,7}

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.⁸⁻¹¹ 특히 윤리적인 문제점 등으로 인해 임상적 이용이 많은 제약과 많은 제약이 있어 줄기세포에 비해 성체 골수기질세포는 임상적으로 유

용성이 크다 하겠다.

본 교실에서는 일련의 지난 연구를 통하여 창상치유에 있어 골수기질세포의 우수성을 규명한 바 있다.^{4,5} 그러나 서론에서 언급한대로 골수기질세포 동종이식의 몇 가지 문제점이 있어 이를 극복하기 위하여 일정 크기의 세공을 가진 의료용 고분자막으로 포장하여 이식하는 방법을 고안하게 되었다.

고분자막이란 고분자의 분자구조를 이용하여 막을 형성시킨 것을 말한다. 일반적으로 화학물질은 나뉠대로의 분자량을 가지고 있는데 고분자란 단량체라고 하는 화학물질들이 모여서 분자량이 높은 물질이 된 것이다. 고분자는 최소 1,000개 이상의 단량체 들이 모여있는 것을 말하며, 분자량은 보통 10,000 이상인 제품을 말한다. 고분자막은 비록 의료용으로 제조되었다 하더라도 제품에 따라 그 특성에 차이가 있을 수 있다. 제조를 용이하게 하기 위하여 고분자 물질이 외에도 monomer, oligomer, catalyst 등을 혼합하게 되는데 그 혼합비율이 다르다. 또한 처리시간, 온도, 용접이나 멸균 방법 등에 따라 여러가지 additional chemical species (ACS)가 제조 과정에서 생성될 수 있다.¹²

따라서 고분자막 형성과정에 따라 고분자막 안의 골수기질세포, 교원질 등의 세포외기질, 혹은 여러 성장인자들과의 친화성이나 안정성 등에 영향을 미칠 수 있을 수도 있다는 가정 하에 재질의 비교연구를 시행하였다.

본 연구에 사용한 고분자막은 모두 친수성 (hydrophilic)이며 무독성이고 세포친화성이 뛰어나 이미 세포배양용으로 상품화되어 있는 것들이다. 제조사의 설명에 따르면 PCT와 PET는 세포외기질 없이 단층배양세포의 증식에 적합한 재질로 되어 있는데 PCT의 경우는 세포에서 생산된 여러 분자들의 이동이나 통과가 용이하도록 제조되었고, PET는 투명도를 높여 단층배양 시 세포의 관찰에 더욱 적합하도록 생산된 것이다. MCE의 경우는 단층배양세포의 부착도를 높여 세포증식을 유도하기 보다는 입방형 (cuboidal)의 세포모양과 원형 (round)의 핵 모양을 유지한 상태에서 세포막의 수용체나 세포의 독성도에 관련된 연구를 위해 고안되었다. 제조목적 뿐만 아니라 앞서 언급한 바와 같이 이들 고분자막의 재질이나 표면처리 등에 따라 세포들이 분비한 단백질과의 친화도나 세공의 모양, 친수성의 차이에 의한 배지를 통한 산소, 영양분, 성장인자, 세포외기질의 확산 등이 다를 수 있으므로 골수기질세포의 동종이식 시 세포의 분비물이 고분자막을 통과하는 양에 차이가 날 수도 있다. 그러나 본 연구의 결과 재질이나 제조과정에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

세포의 크기는 조직마다 그 차이가 심하다. 100 μm 내외의 크기를 갖는 식물세포에 비해 동물세포는 크기가 훨씬 작아 일반적인 동물조직의 세포는 10 μm 내외의 크기를 갖

는다. 박테리아의 경우는 약 1~5 μm 의 크기이며 세포내의 분자들은 nm 단위의 크기를 갖고 있다.¹³ 골수기질세포의 경우 세포크기에 대한 정확한 정보가 기술된 바는 없으나 현미경 조건에서 섬유아세포와 큰 차이가 없는 것으로 보아 약 10 μm 내외의 크기일 것으로 생각된다. 단 공모양의 부유상태와 별모양의 단층배양 상태에 따라 크기의 변화가 있을 것으로 추측되는데 세포의 크기가 고분자막의 세공보다 크더라도 세포의 모양을 변형시켜 고분자막을 통과할 가능성도 배제할 수 없다. 적혈구들이 자신들의 직경보다 작은 모세혈관 내를 찌그러진 모양으로 자신들의 모양을 변형시켜 통과하는 것과 같은 원리가 발생 할 수도 있다고 추측하였다. 본 연구의 결과 골수기질세포의 경우는 재질에 상관없이 8 μm 이하의 세공크기이면 안전하게 세포의 통과를 막을 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 대식세포의 크기가 최소 12 μm 이상인 점을¹⁵ 고려하면 8 μm 이하의 고분자막 세공 크기는 수혜부세포의 공격에 의한 이식골수기질세포의 파괴를 막기에도 충분하다 하겠다.

그러나 5 μm 이상의 세공크기를 가질 경우 박테리아에 의한 공격에도 거의 무방비 상태가 될 수 있으므로 본 연구에서 실험한 세공크기 중에서는 3 μm 의 세공크기가 골수기질세포 동종이식의 장점을 살릴 수 있는 가장 적당한 크기로 판단된다. 3 μm 보다도 더 작은(예를 들면 1 μm) 세공크기의 고분자막도 교원질이나 성장인자 등은 충분히 통과시키면서 박테리아나 대식세포의 공격은 피해갈 수 있을 수도 있으나 현재 상품화된 insert 중에서는 다른 세공크기들과 완전히 같은 조건으로 제조된 1 μm 의 세공크기를 가진 고분자막이 없어 이번 연구에는 포함되지 않았다. 이의 확인을 위하여는 향후 3 μm 보다 더 작은 세공크기를 가진 고분자막을 대상으로 한 연구가 진행 되어 할 것으로 생각된다.

세포들이 고분자막내에서 배양될 경우 세포들은 부유상태로 있거나 부분적으로 고분자막에 단층배양상태와 같이 들러붙어 있게 된다. 따라서 고분자막의 세공의 크기나 작거나 밀도가 낮을 경우 더 많은 세포가 spindle 혹은 별모양의 단층배양상태에 있게 될 것으로 추측할 수 있는데¹⁴ 이러한 세포의 표현형도 연구결과에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있음을 배제할 수 없으나 본 연구만으로는 이를 확인할 수는 없으며 추후 이에 대한 후속연구도 필요할 것으로 사료된다.

창상치유 목적으로 골수기질세포를 동종이식시 세공이 있는 고분자막으로 포장하여 이식하는 방법은 여러 가지 장점이 있다. 첫째, 이식된 세포들의 추적 및 회수가 가능하다. 둘째, 면역세포나 대식세포에 의한 이식된 세포들의 파괴를 방지 할 수 있고 박테리아에 의한 공격도 최소화 할 수 있어 세포이식 효과를 오랜 기간 유지할 수 있고 세포외기질과 성장인자 분비 등의 세포 기능도 수혜부세포나 박테리아와 직접적으로 접촉할 때보다 우수하다. 셋째, 세포이식 후 일

정기간이 지나면 이식된 세포들은 창상 부위의 불충분한 산소 및 영양분 공급으로 인해 그 기능이 저하되고 사멸할 수 있는데 고분자막으로 포장하여 이식할 경우 세포들을 다시 회수하여 실험실내에서 충분한 산소 및 영양분 공급을 한 후 재활성화시켜 창상 부위에 재이식 할 수 있으므로 경제적으로도 이익이 된다 하겠다. 넷째, 골수기질세포의 경우 간엽줄기세포를 다량 포함하고 있어 수혜부에 정착할 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 문제점이 있는데 이 또한 차단할 수 있다. 다섯째, 수혜부세포나 조직과의 직접 접촉에 의한 이식세포의 이동도 방지 할 수 있다. 예를 들면 세포막의 integrin은 주위 세포외기질과 친화성이 높아 세포의 부착 및 이동을 촉진하게 되는데 이를 차단할 수 있다. 마지막으로 대식세포의 과다활성으로 인한 조직손상을 예방할 수 있다. 이식된 세포와 수혜부의 대식세포가 직접 접촉할 경우 대식세포를 자극하여 그 표현형이 변경됨으로써 CD54 등을 유도하고 따라서 다른 면역세포들과의 상호연계를 통한 인체 내의 면역반응을 과민하게 만들게 된다. 이럴 경우 이식된 세포에 대한 거부반응 뿐만 아니라 정상적인 조직에 대한 파괴도 이루어 질 수 있다.¹⁵ 그러나 이식된 세포와의 접촉을 차단할 경우 조직파괴를 최소화하여 창상치유에 도움이 될 수 있다.

본 연구에서는 세포배양용 insert를 고분자막으로 사용했으나 이런 디자인의 고분자막을 실제 환자의 창상 부위에 드레싱재료로 사용할 수는 없으므로 임상적으로 사용하기 위하여는 세포를 포함하는 고분자막의 모양을 한쪽에 실이 붙어있는 tea-bag처럼 만들어 사용한다면 창상 부위로의 적용과 세포의 회수가 용이하지 않을까 생각된다.

고분자막을 이용한 골수기질세포 이식방법이 창상치유를 위한 새로운 방법으로 적용되기 위하여는 물론 *in vivo*와 임상연구를 통하여 그 효과가 확인되어야 한다. 향후 후속연구를 통하여 본 방법의 장점이 입증되길 기대한다.

V. 결 론

골수기질세포의 동종이식을 통하여 창상치유를 촉진시키기 위한 방법의 문제점을 최소화 하고자 세공이 있는 고분자 막으로 이식세포를 포장하는 방법을 고안하였다. 가장 적당한 고분자막의 조건을 연구한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험에 사용한 3, 8, 12 μm 의 세공크기 중에서는 3 μm 와 8 μm 크기가 적당하다.
2. 실험에 사용한 PET, PCT, MCE의 고분자막 재질이나 제조과정은 세포이식효과에 차이를 보이지 않는다.
3. 고분자막 세공의 밀도가 세포이식 효과에 가장 큰 차이를 보이며, 고밀도에서 저밀도보다 훨씬 우수한 결과를 나타낸다.

REFERENCES

1. 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
2. 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
3. Mansbridge JN, Liu K, Pinney RE, Patch R, Ratcliffe A, Naughton GK: Growth factors secreted by fibroblast: role in healing diabetic foot ulcers. *Diabetes Obes Metab* 1: 265, 1999
4. 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
5. Han SK, Chun KW, Gye MS, Kim WK: The effect of human bone marrow stromal cells and dermal fibroblasts on angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 117: 829, 2006
6. 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
7. 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
8. Conget PA, Minguell JJ: Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67, 1999
9. Watanabe N, Woo SL, Papageorgiou C, Celechovsky C, Takai S: Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech* 58: 39, 2002
10. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL: Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 30: 783, 2002
11. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71, 1997
12. Briganti E, Losi P, Raffi A, Scoccianti M, Munao A, Soldani G: Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. *J Mater Sci Mater Med* 17: 259, 2006
13. Gerald K: *Introduction to the study of cell biology*. Cell and molecular biology. 1st ed, New York, John Wiley & Sons, 1996, p 17-19
14. Ng KW, Leong DT, Huttmacher DW: The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions. *Tissue Eng* 11: 182, 2005
15. Striz I, Slavcev A, Kalanin J, Jaresova M, Rennard SI: Cell-cell contacts with epithelial cells modulate the phenotype of human macrophages. *Inflammation* 25: 241, 2001